

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata em  
formas promastigota de *Leishmania*

Lucas Oliveira Corumbá

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Biotecnologia, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata em  
formas promastigota de *Leishmania*

Lucas Oliveira Corumbá

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini

Monografia apresentada à Coordenação  
do Curso de Biotecnologia, da  
Universidade Federal de Uberlândia,  
para obtenção do grau de Bacharel em  
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata em  
formas promastigota de *Leishmania*

Lucas Oliveira Corumbá

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini  
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso  
de Biotecnologia em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG  
Dezembro – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Citotoxicidade de nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata em  
formas promastigota de *Leishmania*

Lucas Oliveira Corumbá

Aprovado pela Banca Examinadora em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Nota: \_\_\_\_

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini

---

Uberlândia, \_\_\_\_ de Dezembro de 2018

## Resumo

A Leishmaniose é uma doença tropical causada por um parasito intracelular do gênero *Leishmania*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), está entre as doenças tropicais mais impactantes para a sociedade. No mundo, cerca de 15 milhões de pessoas estão infectadas. Se não tratada, a enfermidade tem grande potencial de fatalidade, sendo estimado por ano, cerca de 70.000 mortes. Atualmente, o único tratamento com resultados satisfatórios é a administração de antimoniais pentavalentes, pentamidina, anfotericina B e paramomicina. Porém, tais drogas apresentam muitos efeitos colaterais, levando frequentemente à interrupção da terapia. Nos dias atuais já é comprovada a efetividade de tratamento de doenças com base em nanotecnologia. O presente trabalho verificou a efetividade de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) dopadas com prata em diferentes concentrações (durante sua síntese). O efeito citotóxico das nanopartículas para formas promastigota de *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis* foi analisado por MTT. Os resultados mostram que as nanopartículas apresentam significativa citotoxicidade, sendo que as mais promissoras são ZnO:7Ag e ZnO:9Ag. Ainda, a espécie *L. infantum* mostrou-se mais sensível ao tratamento com as nanopartículas.

Palavras-chave: Citotoxicidade, *Leishmania*, nanopartículas

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVO.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS. ....	11
3.1. Síntese e dispersão das nanopartículas.....	11
3.2. Cultivo de formas promastigota de <i>Leishmania</i> .....	11
3.3. Determinação de número de parasitos/mL.....	12
3.4. Ensaio de citotoxicidade.....	12
3.5. Determinação de citotoxicidade e cálculo do IC <sub>50</sub> .....	14
3.6. Análise estatística .....	14
4. RESULTADOS .....	15
4.1. Ensaios de citotoxicidade .....	15
5. DISCUSSÃO .....	19
6. CONCLUSÃO .....	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23

## Introdução

Leishmaniose é uma doença tropical causada por um parasito do gênero *Leishmania*. A enfermidade é transmitida para humanos pelo repasto sanguíneo de insetos fêmea do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (GUERRERO et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Leishmaniose está entre as doenças tropicais mais impactantes para a sociedade, uma vez que é um sério problema de saúde pública, apresentando amplo espectro de manifestações clínicas e grande potencial de fatalidade se não tratada (WHO, 2018).

Parasitos do gênero *Leishmania* pertencem à Família Trypanosomatidae (HIDE et al., 2007). O parasito é separado em dois principais grupos: espécies do Velho Mundo (ocorrem na Europa, África e Ásia) e espécies do Novo Mundo (ocorrendo na América) (COX, 1993). Cerca de 53 espécies do parasito foram descritas em diferentes regiões do mundo, das quais, 31 espécies são conhecidas por serem parasitos de mamíferos, e deste total 21 espécies são patogênicas para seres humanos (WHO et al., 2015). A distribuição global de cada espécie de *Leishmania* determina o tipo de doença que ocorre em determinada área. Por exemplo, *Leishmania donovani* causa Leishmaniose visceral na África e sul da Ásia, enquanto *Leishmania infantum* causa a mesma enfermidade na América Latina, Oriente Médio, Mediterrâneo e em partes da Ásia. A tabela 1 mostra as principais espécies de *Leishmania* que causam doenças em humanos (COX, 1993; KUMAR, 2013; ROBERTS et al., 2009).

As características clínicas variam dependendo das características do parasito e dos aspectos genéticos do hospedeiro que determinam a efetividade da resposta imune. De acordo com as diferentes formas clínicas, as Leishmanioses podem ser divididas em: Leishmaniose Cutânea (localizada e difusa), Mucocutânea e Visceral (ASSIMINA et al., 2008).

Tabela 1. Dados sobre as principais espécies de *Leishmania* patogênicas para humanos. Adaptado de (KUMAR, 2013; ROBERTS et al., 2009).

<b>Espécies</b>	<b>Forma Clínica</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Reservatório</b>	<b>Vetor</b>
<i>L. aethiopica</i>	Cutânea localizada Cutânea difusa	Etiópia, Kênia	<i>Procavia capensis</i>	<i>Phlebotomus longipes</i>
<i>L. major</i>	Cutânea localizada	África, Oriente Médio, Ásia Central, Norte da Índia	Roedores	<i>P. papatassi</i> , <i>P. duboscqi</i>
<i>L. mexicana</i>	Cutânea localizada	América Central	Roedores	<i>Lutzomyia olmeca</i>
<i>L. amazonensis</i>	Cutânea localizada	América do Sul	Roedores	<i>L. flaviscutellata</i>
<i>L. braziliensis</i>	Cutânea localizada Mucocutânea	América do Sul	Roedores, Animais domésticos	<i>Lutzomyia spp.</i>
<i>L. infantum</i>	Cutânea localizada Visceral	Mediterrâneo, Oriente Médio, América do Sul e Central, Ásia Central	Animais domésticos, Raposas, Chacais	<i>P. perniciosufi</i> , <i>P. arias</i>
<i>L. donovani</i>	Visceral	Índia, China, África	Roedores, Cães	<i>P. orinentalis</i> , <i>P. martini</i>

A forma cutânea localizada ocorre em partes do corpo expostas ao repasto sanguíneo do mosquito. O período de incubação varia de 1 a 4 semanas, mas pode se alongar por muitos anos. É caracterizada pelo aumento local de temperatura ligado a inchaço. Uma pápula eritematosa de 1 a 10 mm de diâmetro surge no local do repasto sanguíneo, que após alguns dias transforma-se em uma pústula. Quando rompida, resulta em uma úlcera circular com bordas elevadas (GUERRERO et al., 2017). O fundo das lesões apresentam tecido granuloso que sangra quando raspado, e por vezes é coberto por uma pseudomembrana branca. Em alguns casos, a secreção abundante forma uma crosta aderente. Tais úlceras podem permanecer por um período de 3 meses até 20 anos (HOLAKOUIE et al., 2017). A cura espontânea deixa uma placa desnivelada em depressão com pigmentação irregular e vasos capilares aparentes, ou cicatriz retrátil com centro hipopigmentado e periferia hiperpigmentada, bem como deformidade local devido à

grande destruição de tecido. Quando orelhas são afetadas, a lesão resulta em mutilações na forma de fendas (MINODIER et al., 2007; REITHINGER et al., 2007). Cerca de 33% dos pacientes mostra reincidência, onde a cicatriz reabre, apresentando características similares ao episódio original. Manifestações recorrentes podem ser mais brandas bem como mais severas que as observadas inicialmente (REITHINGER et al., 2007).

A forma cutânea difusa é caracterizada pela resposta imune ineficiente aos antígenos do parasito, o que possibilita a disseminação do parasito por tecidos, circulação sanguínea e linfática, desenvolvendo lesões em boa parte do corpo, com predomínio em áreas expostas e extremidades (GUERRERO et al., 2017). Usualmente começam com nódulos eritematosos duros, ou placas verrucosas. Quando mucosas como a orofaringe e nasofaringe são afetadas, nódulos dolorosos podem levar a obstrução da passagem de ar. Esta forma clínica é de difícil tratamento e não há cura espontânea (BRAVO et al., 2003; REITHINGER et al., 2007).

A forma mucocutânea é diferenciada por causar invasão e destruição de mucosa nasofaríngea. O alastramento ocorre lentamente, fazendo com que lesões iniciais passem despercebidas (DAVIES et al., 2000). Normalmente, as lesões começam a aparecer na mucosa nasal e se espalham para as mucosas oral e faríngea, e para a pele dos lábios e nariz. Produz sintomas que variam de leve desconforto ou dor branda, até caquexia em casos mais graves, onde lesões envolvem toda a laringe, faringe e esôfago (REITHINGER et al., 2007). Em fase inicial, ocorre infiltração da mucosa com ulceração superficial, posteriormente, quando as úlceras estão mais desenvolvidas, suas bordas adquirem aspecto necrótico. A úvula, o palato e tonsilas podem ser destruídos. Quando a infecção ocorre na cavidade nasal, há atrofia dos cornetos nasais e destruição do septo cartilaginoso com presença de mau cheiro, devido à presença de infecções secundárias, podendo acarretar em óbito em casos mais sérios (MARSDEN, 1986; REITHINGER et al., 2007).

Já a forma visceral da Leishmaniose, também conhecida por “calazar”, trata-se de uma séria infecção com período de incubação de 3 a 8 meses. É manifestada clinicamente por linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, leucopenia, deficiência plaquetária, palidez, fraqueza, anorexia e perda de peso que podem progredir rapidamente em semanas ou meses (RANJAN et al., 2005). Quando não tratado, o calazar é geralmente fatal em cerca de 1 a 2 anos após o aparecimento das manifestações clínicas. A causa da morte geralmente inclui hemorragia e infecções associadas devido ao desgaste físico e debilitação do sistema imune (FIGUEIRO, 2004).

Cerca de 12 e 15 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas com o parasito, e outras 350 milhões estão em risco de adquirirem a doença. É estimado que 1,5 a 2 milhões de novos casos ocorram a cada ano, causando cerca de 70.000 mortes por ano (BRAVO et al., 2003). A enfermidade está ligada a mudanças ambientais, como desmatamento, construções de barragens, além da migração de pessoas não imunizadas para áreas endêmicas (DOCKRELL, 2001). Em 2012, a OMS liderou esforços para criar um relatório da distribuição e ônus (impacto de um problema de saúde, medido pelo custo financeiro, mortalidade e morbidade causada) da Leishmaniose em 102 países e territórios ao redor do mundo, para identificar casos de Leishmaniose cutânea e visceral (WHO, 2016). Os dados indicaram que 70% dos casos de Leishmaniose cutânea ocorreram no Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Sudão e Síria (figura 1) e que cerca de 90% dos casos de Leishmaniose visceral ocorreram no Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (figura 2). Em outra análise, 25 países foram selecionados para estudo sobre o ônus da doença na região. Destes, 13 apresentaram alto ônus por Leishmaniose visceral, e 11 por Leishmaniose cutânea, sendo que o Brasil foi o único a apresentar alto ônus por ambas as manifestações clínicas (WHO, 2016).

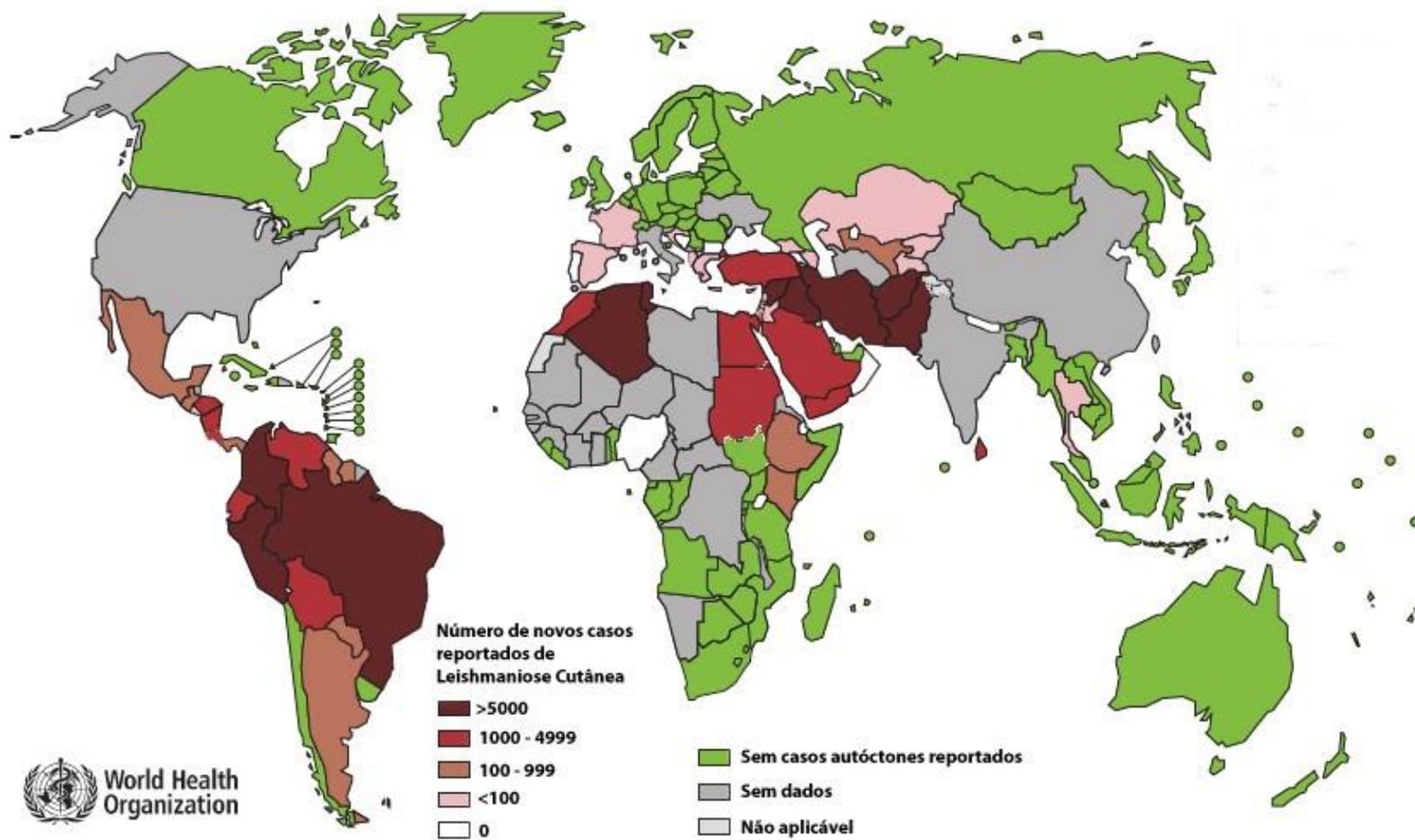


Figura 1. Status da endemicidade da Leishmaniose Cutânea pelo globo em 2015 (WHO, 2016).

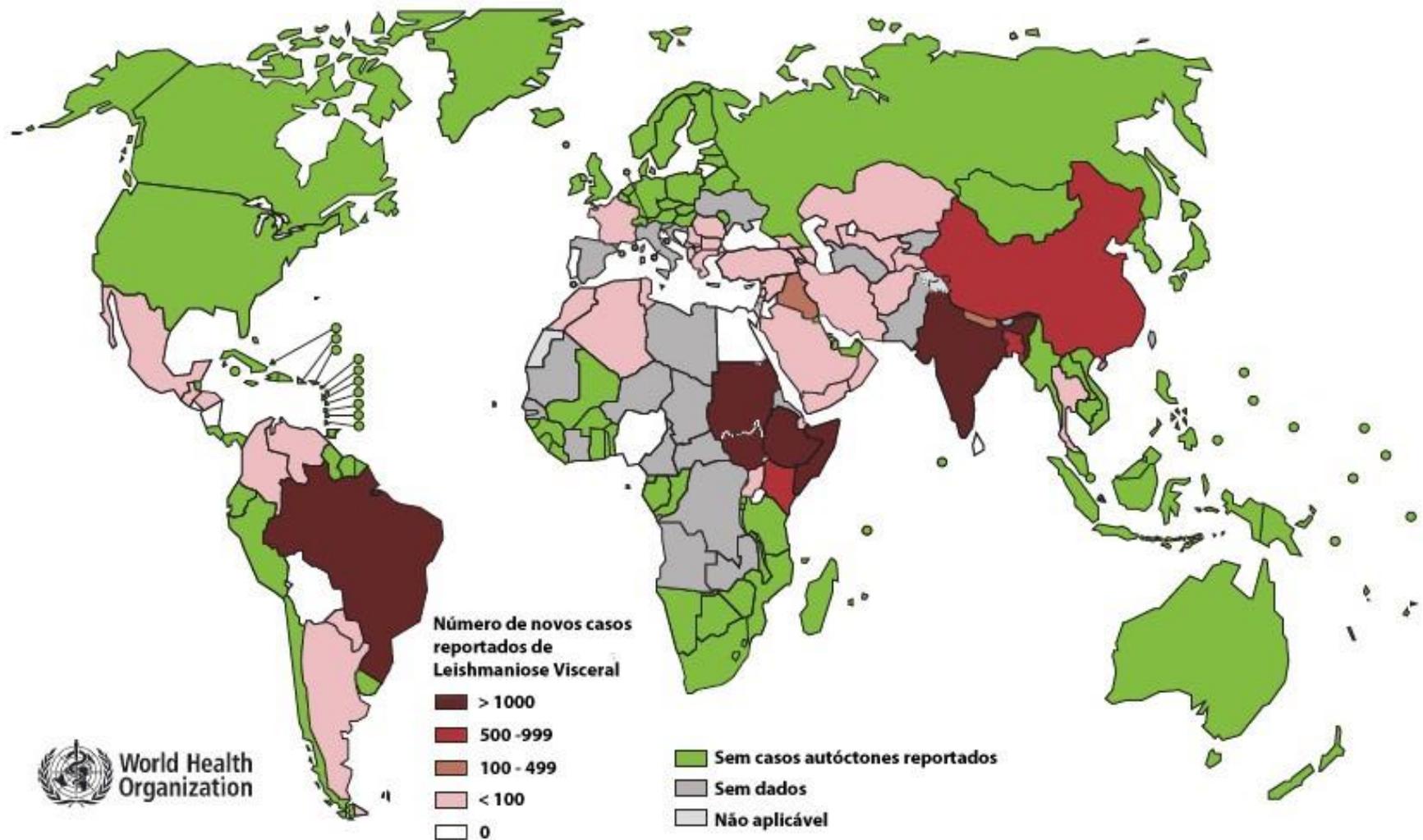


Figura 2. Status da endemicidade da Leishmaniose Visceral pelo globo em 2015 (WHO, 2016).

Na América Latina, é estimado que cerca de 60.000 novos casos (incluindo todas as formas clínicas) ocorram a cada ano. Nesta região, os países mais afetados são Brasil, Colômbia, Bolívia, Peru e Equador (HOYOS et al., 2016).

Parasitas do gênero *Leishmania* tem um ciclo de vida heteroxeno, onde o parasito apresenta duas formas morfológicas no seu ciclo de vida (figura 3), a forma amastigota nos células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado, e a forma promastigota presente no intestino do inseto vetor (GOHIL et al., 2017). O ciclo de vida em humanos começa quando uma fêmea do inseto vetor infectada injeta promastigotas no corpo humano através do repasto sanguíneo. Os promastigotas são então fagocitados por macrófagos do hospedeiro e, conseqüentemente, o parasito se modifica para sua forma amastigota, a qual se reproduz por divisão binária. A multiplicação ocorre continuamente dentro dos macrófagos até o ponto em que estes são forçadamente lisados. Após a lise, amastigotas são liberados e outros fagócitos são infectados. O mosquito vetor torna-se um potencial transmissor da doença quando este se infecta durante sua alimentação, ou seja, no momento que ingere sangue do hospedeiro humano contendo células parasitadas. No intestino do mosquito (intestino grosso para espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e intestino delgado para espécies do subgênero *Leishmania*) os amastigotas transformam-se em promastigotas, que por sua vez migram para a probóscide do inseto vetor. Assim, o ciclo se fecha quando o inseto vetor infectado se alimenta de sangue e contamina o hospedeiro (BATES, 2007; COX, 1993).

Atualmente o único tratamento com resultados satisfatórios para todas as formas clínicas é a administração intravenosa de antimoniais pentavalentes ( $Sb5^+$ ) na forma de estibogluconato de sódio (SSG) ou antimoniato de meglumina (Glucantime) (SANTOS et al., 2008). Tais drogas apresentam alguns problemas graves, incluindo alta toxicidade e muitos efeitos colaterais (nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, cefaleia, parestesia facial, tontura, entre outros) levando a problemas durante o tratamento (RATH et al., 2003), como interrupção da terapia, facilitando o

surgimento de linhagens mais resistentes (SINGH et al., 2004). Em Bihar, Índia, dados apresentam aumento em 65% na falha de tratamento com antimoniais entre 1980 e 1997 (HIRVE et al., 2016). Em adição aos problemas citados, o alto custo dos compostos faz com que o tratamento seja pouco acessível.

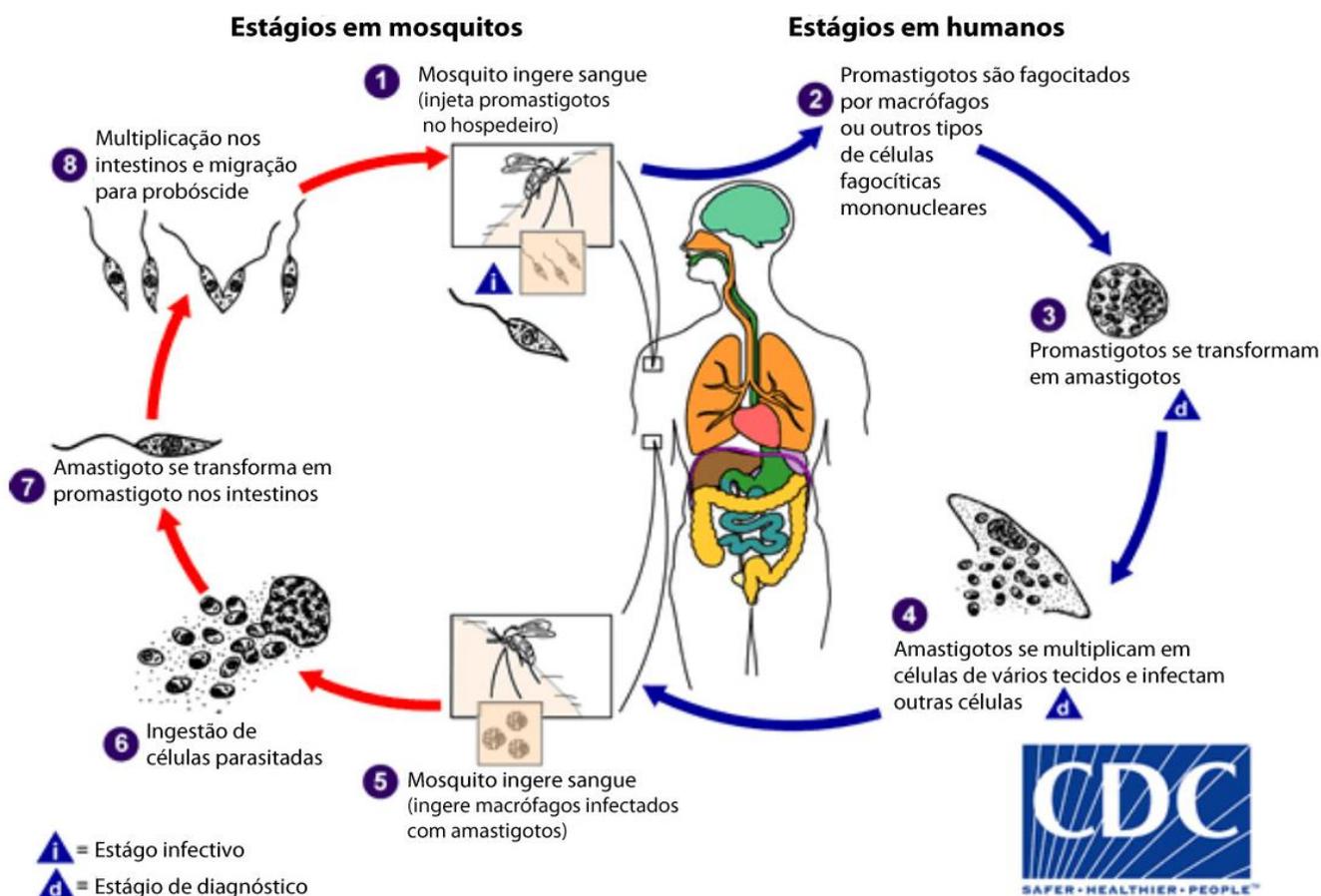


Figura 3. Representação das diferentes formas morfológicas da *Leishmania* em seu ciclo de vida. Adaptado de “Centers for Disease Control and Prevention” (<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).

Em casos de resistência ou impossibilidade de uso dos tratamentos convencionais, fármacos como pentamidina, anfotericina B e paromomicina são usados como segunda opção a despeito de sua alta toxicidade para o hospedeiro (BRAY et al., 2003; RAMOS et al., 1990). No entanto, resistência à pentamidina já foi descrita (BRAY et al., 2003), bem como a dificuldade

no tratamento de pacientes imunossuprimidos, nos quais drogas convencionais se mostram menos efetivas, e se faz necessário o uso de doses mais altas por períodos mais longos (ESCOBAR et al., 2001).

Esforços têm sido feitos no desenvolvimento de novos protocolos e terapias para o tratamento de Leishmaniose, com o propósito de aumentar sua eficiência e reduzir os problemas citados. Uma nova alternativa muito relevante é a associação de drogas com lipossomos, que visa reduzir efeitos colaterais. Além de reduzir efeitos indesejados, este procedimento aumenta a eficiência e concentração nos tecidos (TIUMAN et al., 2011). Infelizmente, mesmo com bons resultados em efetividade, a produção ainda é cara, dificultando seu uso em países mais pobres (CHÁVEZ et al., 2015). No mais, o empenho tem sido feito na busca de novos fármacos e métodos de entrega mais eficientes (SANTOS et al., 2008).

O desenvolvimento recente da nanotecnologia possibilita novas abordagens no tratamento de Leishmaniose. Em uma visão geral, a nanotecnologia pode atuar de duas formas no tratamento de infecções. O primeiro se dá pelo arquetamento de sistemas de entrega de drogas convencionais em escala nanométrica, onde nanopartículas são conjugadas ao fármaco e funcionam como carreadoras (VYAS et al., 2006). Este método tem se mostrado notável no campo de desenvolvimento de drogas e apresenta uma das terapias mais encorajadoras devido ao aumento promovido nas propriedades farmacocinéticas. Dessa forma, tais sistemas de entrega aumentam a eficácia ao mesmo tempo que reduzem a toxicidade com efeitos no metabolismo das drogas, incluindo absorção, distribuição e excreção (PALMA et al., 2018). Em outras palavras, o sistema proporciona alta eficácia, biodisponibilidade aumentada, entrega direcionada, baixa toxicidade, maiores concentrações de fármaco e sua liberação de forma controlada e prolongada, aumentando, portanto, o tempo entre as doses administradas.

A segunda abordagem se dá pela redução do composto à escala nanométrica. Neste caso macrófagos fagocitam as nanopartículas como corpos estranhos, fazendo com que as mesmas

sejam entregues aos parasitos presentes em seu interior (KUMARA et al., 2014). Nanopartículas tem sido usadas em tratamentos e diagnósticos de doenças devido às suas grandes superfícies de contato, e distintas propriedades químicas, físicas e mecânicas em comparação com as usuais formas mais volumosas.

Em nanotecnologia, o principal objetivo dos recentes estudos é construir tanto nanopartículas citotóxicas apenas para o parasito, quanto desenvolver um sistema de entrega da droga baseado em escala nanométrica. Em todos os casos tem-se como alvo final a liberação controlada do composto ativo a fim de se alcançar uma ação específica no alvo em uma dose terapêutica ótima (AKBARI et al., 2017).

Partículas de metal em escala nanométrica tem chamado atenção devido ao seu amplo potencial em aplicações no campo biomédico. E, dentre todos os elementos metálicos, a prata é muito conhecida por apresentar propriedades antibacterianas, ao mesmo tempo em que exibe pouca toxicidade para humanos e outros animais (KOGA et al., 2009).

Há algum tempo pode-se notar um significativo aumento no número de trabalhos norteados por aplicações de nanopartículas metálicas (ANGELI et al., 2008). Existem diversos trabalhos elucidando a efetividade de nanopartículas de prata como agentes antibacterianos (SHRIVASTAVA et al., 2007; FRANCI et al., 2015), antivirais (HUY et al., 2017) e antifúngicos (KHATAMI et al., 2015). Porém, quando se trata de aplicações antiparasitárias, percebe-se uma maior escassez de estudos em comparação com os citados. Ainda assim, alguns resultados relevantes vêm sendo obtidos na aplicação de nanopartículas de prata contra algumas linhagens de *Leishmania* (FANTI et al., 2018; AKBARI et al., 2017; MEHTA et al., 2006).

## 2. Objetivo

Analisar o efeito citotóxico de nanopartículas de óxido de zinco puro (ZnO) e óxido de zinco dopadas com prata (ZnO:3Ag; ZnO:5Ag; ZnO:7Ag; ZnO:9Ag; ZnO:11Ag) contra formas promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum*.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Síntese e dispersão das nanopartículas

As nanopartículas foram sintetizadas e gentilmente cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anielle Christine Almeida Silva, no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia.

Se tratam de nanopartículas de óxido de zinco puro (ZnO) e óxido de zinco dopadas com prata em diferentes concentrações durante sua síntese (ZnO:3Ag; ZnO:5Ag; ZnO:7Ag; ZnO:9Ag; ZnO:11Ag).

Soluções estoque foram preparadas em tampão fosfato-salino (PBS) para cada nanopartícula. Cada amostra foi pesada e ressuspensa em PBS.

### 3.2. Cultivo de formas promastigota de *Leishmania*

Neste estudo foram utilizadas duas espécies de parasitos do gênero *Leishmania* em sua forma promastigota, *L. (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2904) e *L. (L.) infantum* (cepa MCER/BR/79/M6445). Os parasitos (forma promastigota) foram cultivados em meio de cultura LIT, pH 7,4, com suplementação de 10% de soro fetal bovino (SFB), 2% de glicose, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina, e mantidas em incubadora B.O.D à temperatura de 23°C.

Todos os parasitos utilizados nos experimentos apresentavam passagem menor que 20.

### **3.3. Determinação do número de parasitos/mL**

A fim de obter uma solução contendo formas promastigota de *Leishmania* concentrada para o ensaio de citotoxicidade, parasitos foram coletados do meio de cultivo por centrifugação em tubo falcon, à 2000 rpm por 10 minutos à 4°C. Após ressuspensão do sedimento em PBS em um volume conhecido, uma alíquota de 10 µL foi retirada para determinação do número de parasitos. Para tal, essa alíquota foi diluída em 90 µL com 2% de formaldeído em PBS, e mantida em repouso por 10 minutos para fixação dos parasitos. Diluições foram realizadas de modo a se obter um número de células ideal para a contagem em câmara de Neubauer. Após diluição, 10 µL da amostra foi disposta em câmara de Neubauer e analisada em microscópio óptico (Nikon Eclipse 80i). Quatro quadrantes foram contados para a obtenção da média do número de parasitos por quadrante. Esse valor foi utilizado para a determinação do número de parasitos/mL por meio da fórmula descrita a seguir:

$$\text{Concentração} = \text{Média de células por quadrante} \times 10^4 \times \text{Fator de Diluição}$$

### **3.4. Ensaio de citotoxicidade**

Para análise da citotoxicidade das nanopartículas em diferentes concentrações foi utilizado o ensaio MTT (3-(4-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo) de acordo com Mosmann, 1983, que permite a avaliação de viabilidade celular, uma vez que células metabolicamente ativas conseguem reduzir os cristais de MTT, modificando sua coloração de amarelo para roxo. Para tal, foram usadas placas de 96 poços para a incubação dos parasitos de *Leishmania* com as nanopartículas. Em cada poço foi adicionado meio suficiente para que, quando adicionadas as soluções estoque, complete-se 100 µL. De acordo com a pesagem feita no momento da ressuspensão das nanopartículas, foram adicionados diferentes volumes de cada

solução estoque, a fim de obter-se uma concentração inicial de 200 µg/mL para cada nanopartícula. Dessa forma, prosseguiu-se para a diluição seriada, feita em proporção 1:2. Assim, obtiveram-se concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 µg/mL

Após isso, foram adicionados 50 µL de promastigotas ( $5 \times 10^5$  células) à cada poço. Poços foram reservados para o controle negativo (meio de cultura e parasito) e branco (somente o meio de cultura). Ao final, obteve-se uma placa conforme layout descrito na figura 4.

Depois de finalizado o processo de pipetagem, as placas foram incubadas à temperatura de 25°C por 24 horas. Após este prazo foram adicionados 20 µL de MTT (5mg/mL) por poço, e passadas 3 horas, onde as placas foram protegidas de luz e mantidas à 37°C, foram acrescentados 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) por poço, para que os sais de MTT fossem solubilizados no meio, possibilitando sua mensuração no espectrofotômetro. Com o procedimento concluído, as placas foram guardadas overnight. Após este tempo procedeu-se com a leitura das absorbâncias das amostras em espectrofotômetro na faixa de 570 nm.

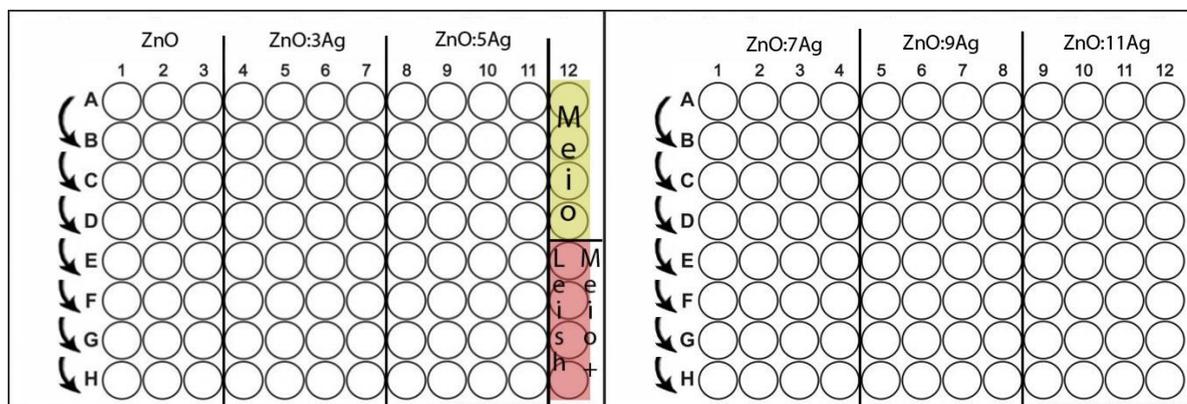


Figura 4. Layout das placas de 96 poços para a realização do ensaio de MTT. As setas pretas indicam a direção da diluição seriada para obtenção das diferentes concentrações testadas. Em amarelo, estão destacados os poços contendo somente o meio de cultivo (branco). Em vermelho, estão os poços contendo parasitos e meio de cultivo, sem tratamento (controle negativo). A nanopartícula ZnO pura foi testada em triplicada e as nanopartículas dopadas com diferentes concentrações de prata foram testadas em quadruplicata.

### 3.5. Determinação da citotoxicidade e cálculo do IC<sub>50</sub>

Em posse dos dados, segundo as seguintes fórmulas, foram realizados os cálculos para viabilidade celular, necessária para avaliação da citotoxicidade.

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorbância da amostra} - \bar{X} \text{ Branco}}{\bar{X} \text{ Controle Negativo} - \bar{X} \text{ Branco}} \times 100$$

$$\% \text{ Citotoxicidade} = 100 - (\% \text{ Viabilidade Celular})$$

Utilizado para medição da potência de uma substância em inibir uma função biológica ou bioquímica, o parâmetro denominado IC<sub>50</sub> se refere à medida quantitativa que indica quanto de uma substância é necessário para inibir um dado processo biológico pela metade. Neste experimento, com o auxílio do programa “GraphPad Prism 6”, e sua ferramenta de análise de regressão não-linear “Variable slope”, foi possível obter valores de IC<sub>50</sub> de cada nanopartícula em seu tratamento contra parasitos de ambas as linhagens, a partir dos dados de leitura observados no ensaio de citotoxicidade.

### 3.6. Análise estatística

Os dados de absorbância obtidos no espectrofotômetro estão expressos como média ± desvio padrão de 2 experimentos em triplicata e/ou quadruplicada, os quais foram realizados de forma independente. Todos os dados foram primeiramente analisados para distribuição normal. As diferenças de significância foram determinadas pelo one-way ANOVA e pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o programa “GraphPad Prism 6”. Os dados foram considerados estatisticamente significativos para  $p \leq 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Ensaios de citotoxicidade

A partir dos dados obtidos na leitura do ensaio MTT, foi possível quantificar a viabilidade das células de cada poço, e, por conseguinte, a citotoxicidade das nanopartículas para cada espécie de *Leishmania*. Com o auxílio do programa GraphPad Prism 6, curvas de concentração-efeito foram construídas, da mesma maneira que dados como o IC<sub>50</sub> de cada nanopartícula puderam ser obtidos.

Comparativamente todas as nanopartículas foram mais eficientes em eliminar o parasito *L. infantum* (figura 5) do que o parasito *L. braziliensis* (figura 6), conforme valores de IC<sub>50</sub> apresentados na tabela 2. A concentração média de valores de IC<sub>50</sub> entre as nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata contra *L. braziliensis* foi de 64,70 µg/mL, enquanto que para *L. infantum*, o valor médio foi de 22,98 µg/mL. As 3 nanopartículas mais efetivas contra o parasito *L. infantum* foram: ZnO:7Ag (IC<sub>50</sub> = 5,8 µg/mL), ZnO:9Ag (IC<sub>50</sub> = 16,21 µg/mL) e ZnO:5Ag (IC<sub>50</sub> = 20,84 µg/mL). Já para o parasito *L. braziliensis*, os menores valores de IC<sub>50</sub> foram observados para as nanopartículas ZnO:9Ag (IC<sub>50</sub> = 40,72 µg/mL), ZnO:11Ag (IC<sub>50</sub> = 42,62 µg/mL) e ZnO:7Ag (IC<sub>50</sub> = 45,74 µg/mL). A nanopartícula ZnO (não dopada com prata) mostrou-se pouco efetiva contra ambas as espécies de parasitos, sendo que nos ensaios realizados não foi possível determinação dos valores de IC<sub>50</sub>.

De modo geral, nanopartículas dopadas com concentrações mais elevadas de prata foram mais efetivas contra o parasito. Para ambas as espécies de *Leishmania* testadas, ZnO e ZnO:3Ag apresentaram menor efetividade, uma vez que a citotoxicidade contra os promastigotas foi observada apenas em presença de concentrações mais elevadas, quando comparadas com os demais compostos (contendo concentrações mais elevadas de prata). Para *L. infantum*, ZnO:3Ag apresentou IC<sub>50</sub> de 50,2 µg/mL, e para *L. braziliensis* o valor de IC<sub>50</sub> foi de 142,7 2 µg/mL.

Tanto em *L. infantum* quanto em *L. braziliensis*, na mais alta concentração testada no experimento, nem ZnO puro, nem ZnO:3Ag foram capazes de eliminar totalmente os promastigotas, sendo que ZnO puro, conforme dito anteriormente, não apresentou citotoxicidade suficiente para determinação dos valores de IC<sub>50</sub>.

### Curvas de concentração-efeito em promastigotas de *L. (L.) infantum*

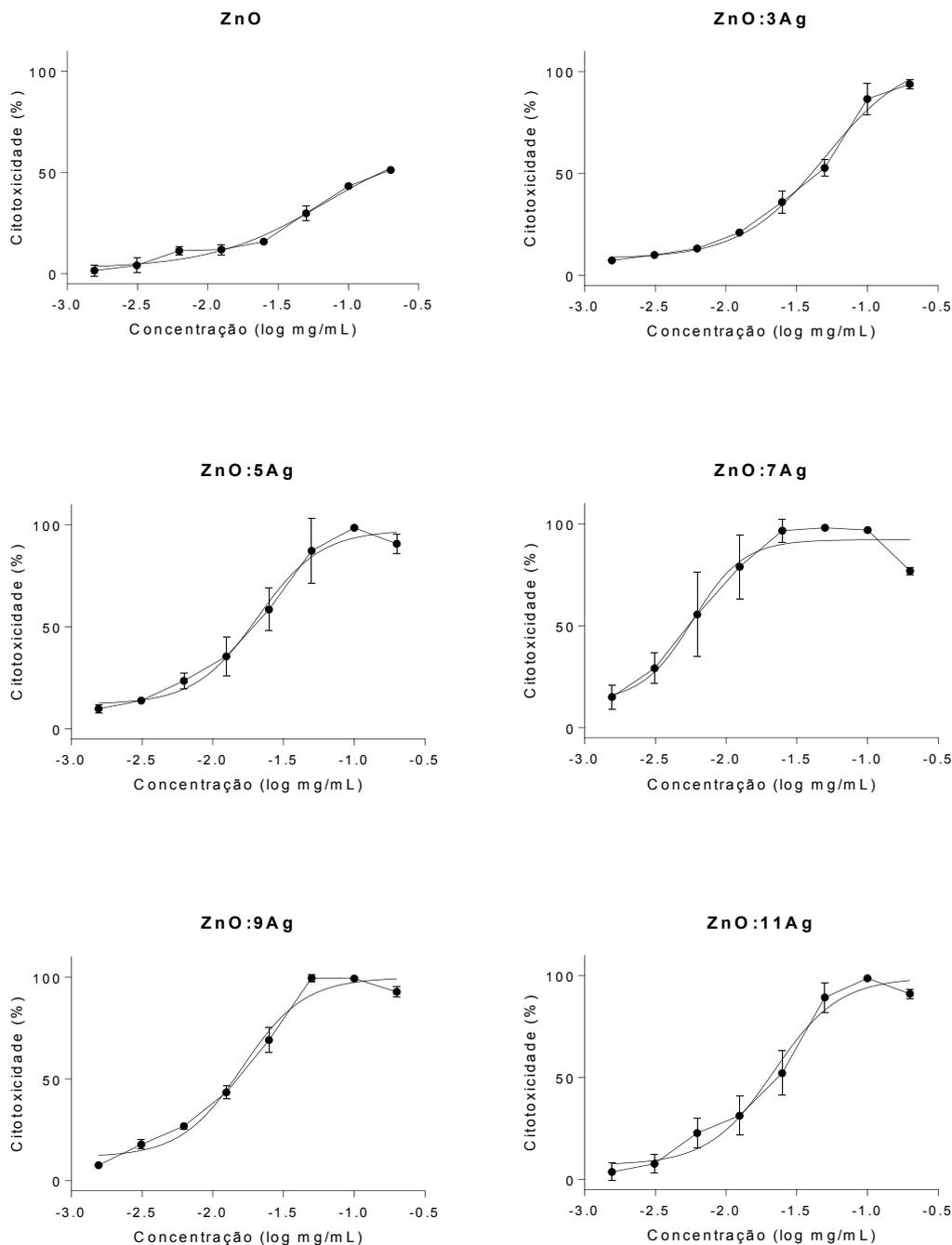


Figura 5. Curvas de dose-efeito para *L. (L.) infantum* obtidas através da análise dos dados obtidos nos ensaios de MTT após tratamento de 24h, no programa GraphPad Prism 6. Cada curva representa a citotoxicidade (em %) de cada nanopartícula designada em função da sua concentração, apresentada em log, onde 3,0 -log representa a menor concentração (1,56 µg/mL) e 0,5 -log representa (200 µg/mL).

### Curvas de concentração-efeito em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

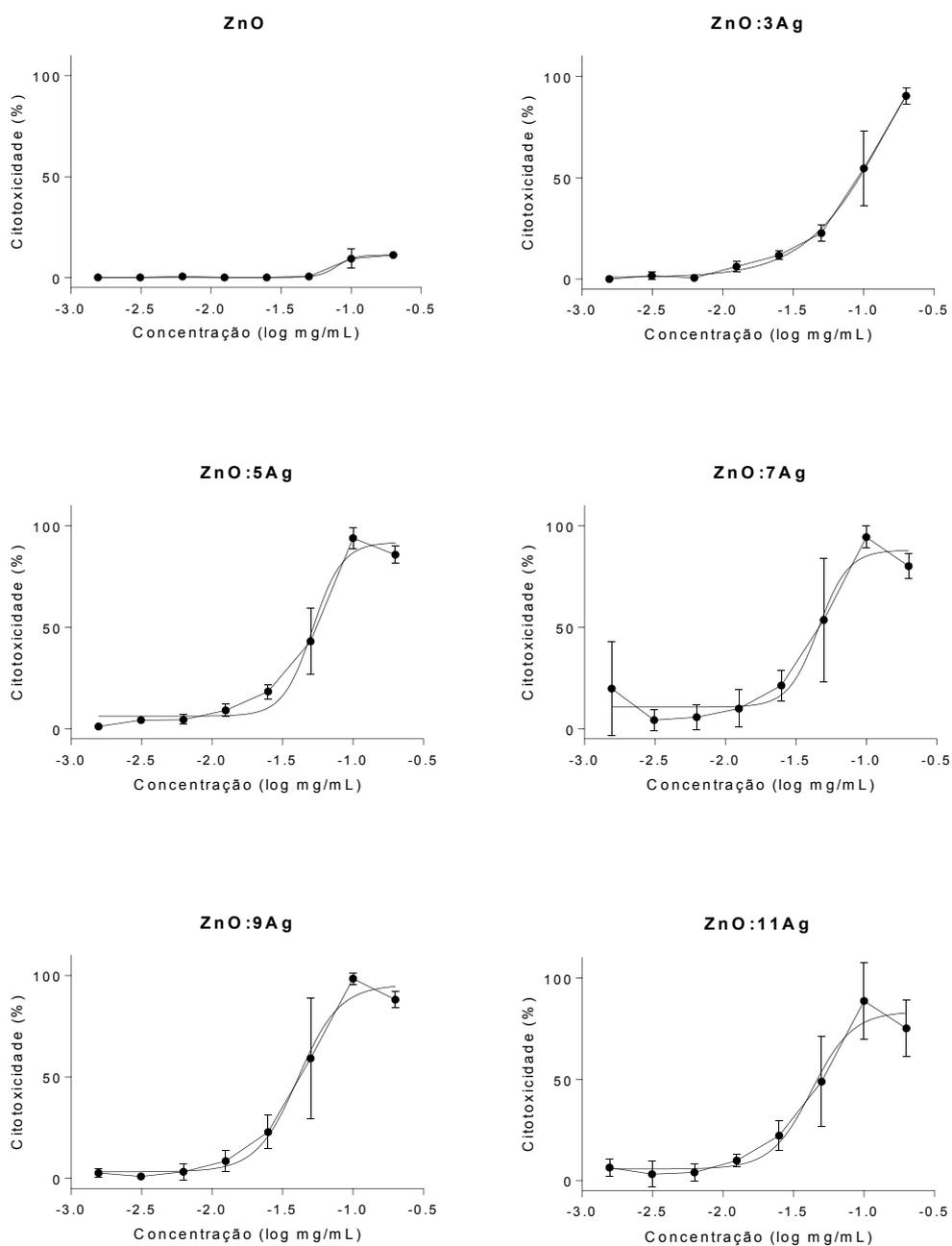


Figura 6. Curvas de dose-efeito para *L. (V.) braziliensis* obtidas através da análise dos dados obtidos nos ensaios de MTT após tratamento de 24h, no programa GraphPad Prism 6. Cada curva representa a citotoxicidade (em %) de cada nanopartícula designada em função da sua concentração, apresentada em log, onde 3,0 -log representa a menor concentração (1,56 µg/mL) e 0,5 -log representa (200 µg/mL).

Na tabela a seguir estão explicitados os valores de IC<sub>50</sub> dos compostos para cada espécie de parasito.

Tabela 2. Tabela indicando a citotoxicidade de todas as nanopartículas em valores de IC<sub>50</sub> obtidos através do processamento pelo programa GraphPad Prism 6, de dados observados no ensaio de citotoxicidade. Em negrito estão explicitados os valores médios de IC<sub>50</sub> para cada nanopartícula testada, enquanto que os mostrados entre parênteses representam os valores nos intervalos de confiança com 95% de certeza. \*ND (Não determinado), representa amostras que não apresentaram citotoxicidade suficiente para que em sua maior concentração testada no experimento, fossem capazes de matar 100% da população de promastigotas.

Nanopartícula \ Espécie	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
	IC <sub>50</sub> (µg/mL) (Intervalo de confiança de 95%)	IC <sub>50</sub> (µg/mL) (Intervalo de confiança de 95%)
ZnO	ND*	ND*
ZnO:3Ag	<b>50,2</b> (38,36-65,69)	<b>142,7</b> (58,27-349,7)
ZnO:5Ag	<b>20,84</b> (16,81-25,82)	<b>51,68</b> (46,18-57,85)
ZnO:7Ag	<b>5,8</b> (4,16-8,08)	<b>45,74</b> (36,29-57,64)
ZnO:9Ag	<b>16,21</b> (14,07-18,68)	<b>40,72</b> (33,24-49,89)
ZnO:11Ag	<b>21,85</b> (17,65-27,04)	<b>42,62</b> (32,91-55,19)

## 5. Discussão

O presente estudo analisou a capacidade leishmanicida de nanopartículas de ZnO puro e dopadas com prata contra espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*. As nanopartículas apresentaram um bom potencial citotóxico contra formas promastigota de ambas as espécies de parasitos testadas. Apesar de haverem muitos trabalhos em nanotecnologia sobre aplicações antibacterianas, antivirais e antifúngicas, a literatura mostra-se ainda escassa em trabalhos exibindo o uso de nanopartículas como potenciais drogas contra parasitos *Leishmania*. Ainda assim, resultados satisfatórios vêm sendo observados por alguns grupos de pesquisa quanto ao uso de nanopartículas como agentes anti-*Leishmania* (FANTI et al., 2018; ISAAC et al., 2018; JEBALI et al., 2013; MEHTA et al., 2006). Em resumo, diferentes ações estão associadas com o uso de tais compostos, como inibição na proliferação celular, viabilidade celular, bem como alteração da capacidade infectiva em diferentes espécies de *Leishmania*.

Em nossos ensaios de viabilidade celular em presença de ZnO e suas variantes dopadas com prata foi observado, de modo geral, um efeito citotóxico concentração-dependente para as diferentes nanopartículas testadas. Entretanto, não foi observada relação concentração-dependente de acordo com as diferentes concentrações de prata utilizadas durante a síntese das nanopartículas de zinco dopadas com prata, demonstrando que por si só, este parâmetro não foi determinante para o aumento da citotoxicidade das nanopartículas. Por outro lado, a nanopartícula não dopada com prata (ZnO) exibiu menor potencial citotóxico, tanto para *L. (V.) braziliensis* quanto para *L. (L.) infantum*, sugerindo um papel crucial da prata na citotoxicidade apresentada pelas nanopartículas.

Para *L. (L.) infantum* a nanopartícula que se destacou com a ação citotóxica mais efetiva foi ZnO:7Ag (IC<sub>50</sub>: 5,8 µg/mL). Entretanto, para *L.(V.) braziliensis*, três nanopartículas apresentaram-se mais efetivas exibindo valores de IC<sub>50</sub> bem próximos, são elas: ZnO:7Ag (IC<sub>50</sub>:

45,74  $\mu\text{g/mL}$ ), ZnO:9Ag ( $\text{IC}_{50}$ : 40,72  $\mu\text{g/mL}$ ) e ZnO:11Ag ( $\text{IC}_{50}$ : 42,62  $\mu\text{g/mL}$ ). Conforme comentado anteriormente, não foi observada relação entre a efetividade da nanopartícula e a concentração de prata. Comparativamente, as nanopartículas foram mais citotóxicas para a espécie *L. (L.) infantum*. Considerando a ação citotóxica das nanopartículas dopadas com prata para ambas as espécies de *Leishmania*, os valores de  $\text{IC}_{50}$  em *L. (L.) infantum* variaram de 5,8  $\mu\text{g/mL}$  a 50,2  $\mu\text{g/mL}$  e no caso de *L. (V.) braziliensis* os valores de  $\text{IC}_{50}$  variaram de 40,72  $\mu\text{g/mL}$  a 142,7  $\mu\text{g/mL}$ . O problema dos compostos que apresentam altos valores de  $\text{IC}_{50}$  é que estes resultam na necessidade de uso de altas concentrações terapêuticas, o qual provavelmente resultará em citotoxicidade também para células do hospedeiro, causando efeitos indesejáveis e perigosos (ASHARANI et al., 2008).

Alguns estudos, como o conduzido por Allahverdiyev et al., 2011, avaliaram o sinergismo para a ação de nanopartículas de prata e a exposição a luz ultravioleta (UV). Embora as nanopartículas isoladamente tenham mostrado efetividade, o tratamento combinado de nanopartículas de prata e exposição à luz UV melhorou significativamente a inibição do crescimento e infectividade de promastigotas.

*Leishmania* possuem apenas uma mitocôndria, logo a sobrevivência da célula depende grandemente da manutenção da integridade desta organela (KOWALTOWSKI et al., 1999). Sendo assim, compostos cujos mecanismos de ação afetem negativamente a estabilidade e integridade mitocondrial, seja de amastigotas ou promastigotas, se tornam definitivamente atrativos para pesquisa mais aprofundada. Estudos recentes mostraram que diferentes nanopartículas de prata exibiram redução na integridade mitocondrial em promastigotas e aumento de produção local de espécies reativas de oxigênio (FANTI et al., 2018; FONSECA et al., 2011). A deposição de nanopartículas de prata na mitocôndria pode alterar o funcionamento normal da organela pela disrupção da cadeia transportadora de elétrons, resultando em espécies reativas de oxigênio e baixa produção de ATP (TURRENS, 2003). Com o distúrbio na cadeia

respiratória, mais elétrons podem ocasionalmente escapar do ciclo e encontrarem oxigênio molecular como aceptores, formando ânions superóxido em uma taxa maior que a habitual, que posteriormente serão convertidos em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Reações entre  $H_2O_2$  e nanopartículas de prata são pressupostas como um dos fatores que causaria a liberação de íons  $Ag^+$  *in vivo*, aumentando a citotoxicidade desses compostos (ASHARANI et al., 2008). É possível também que a oxidação na superfície da nanopartícula, em contato com proteínas do citoplasma, libere íons  $Ag^+$ .

De acordo com Marano et al., 2011, a citotoxicidade induzida por nanopartículas de prata foi amplamente relatada como produtora de estresse oxidativo. Ainda sobre nanopartículas de prata, outros autores hipotetizaram características como grande superfície de contato, tamanho reduzido e capacidade de se ligar em grupos contendo enxofre e fósforo, levam a um aumento em seu efeito leishmanicida (ALLAHVERDIYEV et al., 2011). Alguns mecanismos foram propostos, tal como por Allahverdiyev et al., 2011, a respeito da interação dos compostos com DNA e geração de radicais livres, e por Sondi et al., 2004, sugerindo a liberação de íons de prata que inibem enzimas participantes do ciclo respiratório, em adição à lesões em membranas do microrganismo.

Contudo, células do hospedeiro não são imunes aos efeitos de praticamente nenhum composto, incluindo nanopartículas. Sendo assim, mesmo que um tratamento se mostre extremamente eficaz, pouco uso se faz dele se o mesmo apresentar alta toxicidade para o paciente. Nanopartículas são recentes no cenário de pesquisas farmacológicas, logo, não há abundância de disponibilidade de dados como observado para compostos mais tradicionais. Dessa forma, faz-se necessário que os mecanismos de ação de diferentes nanopartículas sejam mais bem descritos, para melhorar não somente a eficiência do tratamento, como também a segurança em seu uso.

## 6. Conclusão

O presente estudo demonstrou que nanopartículas de óxido de zinco dopadas com prata apresentam uma significativa citotoxicidade contra promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*, sendo que de modo geral as nanopartículas mais promissoras são ZnO:7Ag e ZnO:9Ag. Entretanto, ensaios adicionais serão necessários tais como a avaliação da citotoxicidade de nanopartículas de prata, a fim de verificar se há sinergismo entre ZnO e prata, a averiguação da citotoxicidade em macrófagos e em amastigotas, do efeito na interação parasito-hospedeiro, bem como a elucidação do mecanismo de ação destas nanopartículas.

## 7. Referências bibliográficas

AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. **Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review**. Acta tropica, v. 172, p. 86-90, 2017.

ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. **Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light**. International Journal of Nanomedicine, v. 6, p. 2705, 2011.

ANGELI, E. et al. **Nanotechnology applications in medicine**. Tumori Journal, v. 94, n. 2, p. 206-215, 2008.

ASHARANI, P. V. et al. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells**. ACS nano, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008.

ASSIMINA, Z.; CHARILAOS, K.; FOTOULA, B. **Leishmaniasis: An overlooked public health concern**. Health Science Journal, v. 2, n. 4, 2008.

BATES, P. A. **Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies**. International Journal for Parasitology, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BRAVO, F.; SANCHEZ, M. R. **New and re-emerging cutaneous infectious diseases in Latin America and other geographic areas**. Dermatologic Clinics, v.21 n. 4, p. 655-668, 2003.

BRAY, P. G. et al. **Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future**. Trends in Parasitology, v. 19, n. 5, p. 232-239, 2003.

CHÁVEZ, M. A. et al. **New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 48, n. 3, p. 235-242, 2015.

- COX, F. E. **A textbook of parasitology.** Blackwell Science Ltd, 2<sup>a</sup> ed., 1993.
- DAVIES, C. R. et al. **The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 16, n. 4, p. 925-950, 2000.
- DOCKRELL H. M. **The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, p. 239-243, 2001.
- ESCOBAR, P.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. **Activities of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), AmBisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in Immunodeficient scid Mice.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 6, p. 1872-1875, 2001.
- FANTI, J. R. et al. **Biogenic silver nanoparticles inducing *Leishmania amazonensis* promastigote and amastigote death in vitro.** *Acta Tropica*, v. 178, p. 46-54, 2018.
- FIGUEIRO, E. A. et al. **Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy.** *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, v. 12, n. 1, p. 31-40, 2004.
- FONSECA, S. F. et al. **Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*.** *PloS One*, v. 6, n. 2, p. e14666, 2011.
- FRANCI, G. et al. **Silver nanoparticles as potential antibacterial agents.** *Molecules*, v. 20, n. 5, p. 8856-8874, 2015.
- GOHIL, C. G.; KHER, J. D. **Review on Leishmaniasis.** *Journal of Scientific & Technical Research*, v. 1, n. 5, p. 1-3, 2017.
- GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. **The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control.** *International Journal of Parasitology*, v.35, n.11-12, p. 1169-1180, 2005
- GUERRERO, E. T. et al. **Leishmaniasis: a review.** *F1000 Research*, v. 6, n. 75, 2017.

HIDE, M. et al. **Understanding human leishmaniasis: The need for an integrated approach in encyclopedia of infectious diseases book of microbiology.** John Wiley and Sons, p. 87-107, 2007.

HIRVE, S. et al. **Transmission dynamics of visceral leishmaniasis in the indian subcontinent—a systematic literature review.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 10, n. 8, p. e0004896, 2016.

HOLAKOUIE, N. K. et al. **Spatial modeling of cutaneous leishmaniasis in Iran from 1983 to 2013.** Acta Tropica, v. 166, p. 67-73, 2017.

HOYOS, Carlos L. et al. **Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* Infection in the Northwestern Argentina.** BioMed Research International, v. 2016, 2016.

HUY, T. Q. et al. **Cytotoxicity and antiviral activity of electrochemical–synthesized silver nanoparticles against poliovirus.** Journal of Virological Methods, v. 241, p. 52-57, 2017.

ISAAC-MÁRQUEZ, A. P. et al. **Decanethiol functionalized silver nanoparticles are new powerful leishmanicidals in vitro.** World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 34, n. 3, p. 38, 2018.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. **Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis.** Toxicology in Vitro, v. 27, n. 6, p. 1896-1904, 2013.

KHATAMI, M. et al. **Synthesis of silver nanoparticles using seed exudates of *Sinapis arvensis* as a novel bioresource, and evaluation of their antifungal activity.** Bioresources and Bioprocessing, v. 2, n. 1, p. 19, 2015.

KOGA, H.; KITAOKA, T.; WARIISHI, H. **In situ synthesis of silver nanoparticles on zinc oxide whiskers incorporated in a paper matrix for antibacterial applications.** Journal of Materials Chemistry, v. 19, n. 15, p.2089-2260, 2009.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. **Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress.** Free Radical Biology and Medicine, v. 26, n. 3-4, p. 463-471, 1999.

KUMAR, A. **Leishmania and leishmaniasis.** SpringerBriefs of Immunology, p. 7-10, 2013.

KUMARA, R. et al. **PLGA-PEG Encapsulated sitamaquine nanoparticles drug delivery system against *Leishmania donovani*.** Journal of Scientific & Industrial Research. v. 3, p. 85-90, 2014.

MARANO, F. et al. **Nanoparticles: molecular targets and cell signalling.** Archives of Toxicology, v. 85, n. 7, p. 733-741, 2011.

MARSDEN, P. D. **Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911).** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986.

MEHTA, A.; SHAHA, C. **Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania spp.*: role of iron, reactive oxygen species, Ca<sup>2+</sup>, and glutathione.** Free Radical Biology and Medicine, v. 40, n. 10, p. 1857-1868, 2006.

MINODIER, P.; PAROLA, P. **Cutaneous leishmaniasis treatment.** Travel Medicine and Infectious Disease, v. 5, n. 3, p. 150-158, 2007.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of immunological methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

PALMA, E. et al. **Antileishmanial Activity of Amphotericin B-loaded-PLGA Nanoparticles: An Overview.** Materials, v. 11, n. 7, p. 1167, 2018.

RAMOS, H. et al. **Enhanced action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* resulting from heat transformation.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 34, n. 8, p. 1584-1589, 1990.

RANJAN, A. et al. **Risk factors for Indian kala-azar.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 73, n. 1, p. 74-78, 2005.

RATH, S. et al. **Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte.** Química Nova, 2003.

REITHINGER, R. et al. **Cutaneous leishmaniasis.** The Lancet Infectious Diseases, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

ROBERTS, L. S.; JANOBY, J.; SCHMIDT, G. D., **Foundations of parasitology.** 8ª ed., 2009

SANTOS, D. O. et al. **Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review.** Parasitology Research, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SHRIVASTAVA, S. et al. **Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles.** Nanotechnology, v. 18, n. 22, p. 225103, 2007.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. **Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis.** Journal of Infection and Chemotherapy, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.

SONDI, I. et al. **Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria.** Journal of Colloid and Interface Science, v. 275, n. 1, p. 177-182, 2004.

TIUMAN, T. S. et al. **Recent advances in leishmaniasis treatment.** International Journal of Infectious Diseases, v. 15, n. 8, p. e525-e532, 2011.

TURRENS, J. F. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** The Journal of Physiology, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

VARGAS, G. A; NARVAEZ A. J.; CANTO L. B. **Clinical picture of cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania Mexicana* in the Yucatan Peninsula.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 96, p.163-167, 2001.

VYAS, S. P.; GUPTA, S. **Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification.** International Journal of Nanomedicine, v. 1, p. 417–432, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Leishmaniasis.** World Health Organization Fact Sheets. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Leishmaniasis: strengthening cross-border collaboration for control in Central Asian and Middle Eastern countries of the WHO European and Eastern Mediterranean Regions: report of a bi-regional meeting, Awaza, Turkmenbashi, Turkmenistan, 18–20 November 2014.** World Health Organization, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World Health Organization Weekly Epidemiologic Record.** Leishmaniasis WHO Fact Sheet, v. 91, n. 115, p. 285-296, 2016.