



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

VANDERLAN NOGUEIRA HOLANDA

POTENCIAL LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE DE 4-FENIL-1-[2-(FTALIMIDO-2-IL)ETIL]-1H-1,2,3-TRIAZOL

Recife

2018

VANDERLAN NOGUEIRA HOLANDA

POTENCIAL LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE DE 4-FENIL-1-[2-(FTALIMIDO-2-IL)ETIL]-1H-1,2,3-TRIAZOL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof^a. Dra. Vera Lucia de Menezes Lima

Coorientador: Prof^a. Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Holanda, Vanderlan Nogueira

Potencial leishmanicida e citotoxicidade de 4-fenil-1-[2- (ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol / Vanderlan Nogueira Holanda - 2018.

102 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lucia de Menezes Lima

Coorientadora: Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Leishmaniose Tegumentar 2. Derivados de Ftalimida 3. Triazóis
I. Lima, Vera Lucia de Menezes (orient.) II. Figueiredo, Regina Celia Bressan Queiroz de (coorient.) III. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-083

VANDERLAN NOGUEIRA HOLANDA

POTENCIAL LEISHMANICIDA E CITOTOXICIDADE DE 4-FENIL-1-[2-(FTALIMIDO-2-IL)ETIL]-1H-1,2,3-TRIAZOL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Vera Lucia de Menezes Lima (Orientador)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dra. Ana Paula Sant'Anna da Silva (Membro Interno)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^o. Dr. Caique Silveira Martins da Fonseca (Membro Interno)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof^a. Dra. Bianka Santana dos Santos (Membro Externo)
Centro Acadêmico do Agreste – CAA
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

As mulheres da minha vida, Vanuza da Silva e Raimunda Amorim, por estarem sempre ao meu lado.

A grande companheira e amiga, Maria, pelo cuidado, carinho e apoio à minha família.

Ao meu amigo Magérbio Gomes Torres, que sempre acreditou em mim.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a intercessão de Maria Auxiliadora pelas bênçãos que sempre recebi ao longo da vida e pela oportunidade de realizar o sonho de estudar mestrado em Bioquímica e Fisiologia na Universidade Federal de Pernambuco;

À professora Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima, orientadora e amiga que Deus me presenteou desde o momento em que decidi cursar o mestrado em Bioquímica na UFPE. Obrigado pela acolhida que me fez, desde o primeiro momento, sentir querido e membro da família LAB-DPN. Dia a pós dia, o seu exemplo me impulsiona a buscar ser melhor sempre. A senhora é grande referência na minha vida e agradeço por tudo até aqui.

Ao professor Dr. Caique Silveira Martins da Fonseca, amigo e exemplo de profissionalismo. Uma enorme gratidão pelo apoio que sempre me destes e que me fez chegar até aqui, pela imensa contribuição com minha formação e por me apresentar este universo maravilhoso que é a Bioquímica da UFPE.

A Dra. Ana Paula Sant'Anna da Silva, outro grande exemplo de profissionalismo. É uma honra tê-la como amiga e ter a possibilidade de aprender e trabalhar contigo. Obrigado pela calorosa recepção nos Laboratórios de Lipídios e Bioquímica de Produtos Naturais, pela amizade e toda disposição em nos ajudar.

À profa. Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo, pelos ensinamentos, orientação, companheirismo e atenção. Obrigado pela acolhida, por me fazer sentir capaz e incentivar constantemente a buscar ser melhor.

A minha família pelo apoio que sempre tive, especialmente às minhas mães Vanuza Nogueira Borges da Silva e Raimunda Nogueira Amorim, que desde sempre não mediram esforços para me fazer chegar aonde cheguei, pelo exemplo de mulheres guerreiras que são, pelo amor e carinho que recebo diariamente e por me fazerem acreditar no meu potencial e na possibilidade de realizar sonhos.

Ao meu grande amigo, Cicero Magerbio Gomes Torres que me acompanhou desde o início da minha jornada acadêmica, me ajudando, incentivando e estando ao meu lado nos piores e melhores momentos da vida. Você é o exemplo e a referência que tenho desde o começo. Tornar-me Mestre em Bioquímica e Fisiologia é resultado de todo o apoio que me destes e por sempre acreditar em mim. Obrigado por estar sempre comigo. Você sempre será uma pessoa especial em minha vida.

Às minhas amigas e parceiras de jornada, agentes leishmanicidas, Rosy e Carina Helena. Como foi bom poder dividir a bancada e tantos momentos com vocês, aprendendo tantas coisas. Sorrir, brincar, gritar, chorar, dançar... Os melhores momentos e os bastidores aconteceram quando estivemos juntos. Jamais as esquecerei.

Aos meus amigos que diariamente convivem comigo, confidentes e que vou lembrar a vida inteira. Obrigado pela alegria diária que é viver com vocês e pelas experiências vividas, especialmente Romário Correia, Arthur Hipólito, Ricardo Nagô e Dayane Correia. Nunca irei esquecê-los. Obrigado também ao Alan, meu cardcaptor preferido.

Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Lipídios e Aplicação de Biomoléculas em Doenças Prevalentes e Negligenciadas – LABDPN, do Departamento de Bioquímica, pelo apoio, acolhida e conhecimento compartilhado. Obrigado Thaise, José Guedes, João Ricardhis, Rebeka, Fabiola, Weber, Douglas e Albérico.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, do Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE: Mary Aranda, Tuanne, Rayana, Victor, Gabriella, Danilo e Lucas. Agradecimento especial aos doutores Antonio Pereira Neves e Virginia Maria Barros de Lorena, pelo conhecimento compartilhado e contribuição com esta pesquisa.

Aos meus amigos companheiros de turma, maravilhosos que vivenciaram os melhores momentos de disciplina e que me presenteiam com amizade e alegria: Anderson Pedroza, Leila, Fernanda Ribeiro, Katarina, Luciclaudio, Wilka Nascimento, Meiga, Priscila, Joselma, Caio Guedes, Jessica, Yasmin Costa, Diego e Silvoneide.

Ao CNPq pelo apoio ao desenvolvimento desta pesquisa. À Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Coordenação da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, pelo empenho e dedicação que resultam no sucesso do programa. Obrigado também ao Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz/PE.

Obrigado a todos que acreditaram em mim.

RESUMO

As leishmanioses são doenças prevalentes negligenciadas que afetam à saúde pública de forma preocupante e estão cada vez mais presentes nos países em desenvolvimento. Dentre o arsenal químico e farmacológico que emerge na busca de novos compostos leishmanicidas, o derivado ftalimido-triazólico, fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol, foi identificado como composto promissor para obtenção de um novo fármaco contra a leishmaniose. O presente estudo, assim, investigou o efeito *in vitro* do fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol sobre duas formas evolutivas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. Foi avaliada a citotoxicidade contra as cepas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, e macrófagos peritoneais, bem como a produção de óxido nítrico (NO). Foram realizadas atividades contra amastigotas e formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e investigadas as alterações ultraestruturais nos parasitas e alvos intracelulares envolvidos. Os resultados mostram que o composto obtido da hibridação de ftalimida e 1,2,3-triazol apresentou atividade leishmanicida promissora. O composto fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol produziu alterações ultraestruturais, como encolhimento do corpo celular, perda de integridade da membrana e alterações significativas na morfologia celular e do flagelo. Os resultados mostraram que o composto diminuiu a sobrevivência de amastigotas e apresentou baixa toxicidade para as células hospedeiras. Não houve a indução do aumento de NO nas células tratadas com o composto. De acordo esta pesquisa, o híbrido fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol apresenta efeito leishmanicida e se constitui de um protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos anti-leishmania.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar. Derivados de Ftalimida. Triazóis.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a prevalent neglected disease that affects public health in a worrying way and is increasingly present in developing countries. Among the chemical and pharmacological arsenal emerging in the search for new leishmanicidal compounds, the phthalimido-triazole derivative, phenyl-1- [2- (phthalimido-2-yl) ethyl] -1H-1,2,3-triazole, has been identified as a promising compound for obtaining a new drug against leishmaniasis. The present study thus investigated the in vitro effect of phenyl-1- [2- (phthalimido-2-yl) ethyl] -1H-1,2,3-triazole on two evolutionary forms of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. The cytotoxicity against strains of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and peritoneal macrophages, as well as the production of nitric oxide (NO) were evaluated. Activities were performed against amastigotes and promastigotes of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* and investigated the ultrastructural changes in parasites and intracellular targets involved. The results show that the compound obtained from the hybridization of phthalimide and 1,2,3-triazole showed promising leishmanicidal activity. The phenyl-1- [2- (phthalimido-2-yl) ethyl] -1H-1,2,3-triazole compound produced ultrastructural changes such as shrinkage of the cell body, loss of membrane integrity and significant changes in cell morphology and of the flagellum. The results showed that the compound decreased the survival of amastigotes and showed low toxicity to the host cells. There was no induction of NO increase in infected cells treated with the compound. According to this research, the phenyl-1- [2- (phthalimido-2-yl) ethyl] -1H-1,2,3-triazole hybrid has leishmanicidal effect and is a prototype for the development of new anti- leishmania drug.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis. Phthalimide derivatives. Triazoles.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.2	OBJETIVOS	12
1.2.1	Objetivo Geral.....	12
1.2.2	Objetivos Específicos	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	QUÍMICA MEDICINAL MODERNA: SÍNTESE ORGÂNICA E BUSCA DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS	14
2.2	FTALIMIDAS.....	16
2.2.1	Métodos de Síntese de Ftalimidas.....	17
2.3	HETEROCÍCLICOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS	20
2.3.1	Síntese de 1,2,3-Triazóis: cicloadição 1,3 dipolar e <i>click chemistry</i>.....	21
2.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE FTALIMIDAS E HETEROCÍCLICOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS	22
2.4.1	Derivados de Ftalimida	22
2.4.2	Heterocíclicos 1,2,3-Triazóis.....	25
2.5	LEISHMANIOSE.....	28
2.5.1	Aspectos Históricos e Epidemiológicos	28
2.5.2	Agente Etiológico, Ciclo de Vida e Vetor.....	31
2.5.3	Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	33
2.5.3.1	Leishmaniose Cutânea	33
2.5.3.2	Leishmaniose Cutânea Difusa	35
2.5.3.3	Leishmaniose Muco-Cutânea	36
2.5.4	Diagnóstico	37
2.5.5	Medidas de Controle e Tratamento	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PT4	41
3.2	PARASITAS.....	41
3.3	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	42
3.4	EFEITO LEISHMANICIDA DO PT4 NAS FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	42
3.5	EFEITO DO PT4 NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	43

3.6	ENSAIO ULTRA-ESTRUTURAL	43
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
3.8	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
4	A NEW PHTHALIMIDE-TRIAZOLE HYBRID 4-(PHENYL)-1-(4 PHTHALIMIDOBUTHYL)-1,2,3-TRIAZOLE WITH LEISHMANICIDAL ACTIVITY AND LOW CYTOTOXICITY TO MAMMALIAN CELLS	45
5	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A – REVISTA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO	79
	ANEXO B - NORMAS DE SUBMISSÃO: BIOORGANIC CHEMISTRY	80

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças prevalentes negligenciadas que afetam à saúde pública de forma preocupante e estão cada vez mais presentes nos países em desenvolvimento. Essas parasitoses constituem um complexo de doenças causadas por espécies de parasitas do gênero *Leishmania* com alto índice de letalidade e possibilidade de produzir deformidades físicas, funcionais e metabólicas. O acometimento humano pode ocorrer de três formas distintas: cutânea, mucocutânea e visceral (LAINSON e SHAW, 1988; SANTOS e COIMBRA, 1994; LAINSON, 1997; CAMARGO e BARCINSKI, 2003; ORYAN, et al. 2008).

Alguns fatores têm contribuído para a disseminação dos protozoários em ambientes urbanos; como mudanças climáticas, desmatamento, urbanização, imigração de países endêmicos, viagens turísticas e de trabalho. No Brasil, foram notificadas as três formas clínicas da leishmaniose, dentre elas a Leishmaniose Tegumentar (LT) se destaca por presente em todas as regiões do país e é predominantemente ocasionada por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. Devido às questões psicossociais envolvidas, os indivíduos com LT se marginalizam e, na maioria dos casos, não procuram assistência médica por receio da lesão e falta de informação, dificultando o diagnóstico precoce e tratamento eficiente (BRASIL, 2017; DAYRIT, et al. 2018).

Por não haver uma vacina eficaz que impeça a infecção por *Leishmania*, a erradicação da doença é quase que completamente pautada no tratamento. Atualmente, os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são drogas de primeira linha para o tratamento das leishmanioses, os medicamentos de segunda linha são pentamidinas e a anfotericina B (SANTOS, 2008; GOTO e LINDOSO, 2010). Mesmo existindo tratamento para as leishmanioses, a resistência do parasito já foi relatada e seus efeitos colaterais ainda são prevalentes. Os antimoniais pentavalentes provocam uma variedade de efeitos adversos, a saber: mialgia, artralgia, cefaleia, náuseas, vômitos, dores abdominais e um grande desconforto no local de aplicação do medicamento. As ocorrências de afecções cardíacas, como a arritmia, têm sido relacionadas ao tratamento com essas drogas, sendo este um dos principais efeitos colaterais. Dessa maneira, de grande importância a busca por novas drogas com potencial leishmanicida de baixa ou nenhuma toxicidade ao ser humano (PELISSARI, et al. 2011; RAJASEKARAN e CHEN, 2015; BRASIL, 2017).

Através dos avanços dos estudos químicos e farmacológicos, em especial os de química orgânica, têm-se obtido resultados de novas drogas e tratamentos de doenças

infeciosas. Nesse contexto, destacam-se os derivados de ftalimidas como importantes compostos obtidos através de síntese orgânica e com ampla variedade de atividades biológicas investigadas (SHAMA, et al. 2010; BROCKSOM, et al. 2015; SANGI, 2016). Dentre as atividades biológicas de derivados ftalimídicos já exploradas, destacam-se: ação hipolipidêmica (CHAPMAN, et al. 1983; ABDEL-AZIZ, et al. 2011), analgésica (ALANAZI, et al. 2015), anticonvulsivante (OBNISKA, et al. 2016), anti-inflamatória (ALANAZI, et al. 2015; JOSÉ, et al. 2016); antitubercular (ABDEL-AZIZ, et al. 2011; BERK e AKGÜN, 2012), e antimicrobiana (SINGH, et al. 2015).

Assim com as ftalimidas, o heterocíclico 1,2,3-triazol, tem se mostrado promissor no campo da química medicinal e já vem sendo utilizado na síntese de fármacos comerciais. Esta classe de compostos tem chamado à atenção da comunidade científica pelas suas propriedades químicas no contexto biológico, como por exemplo, grande possibilidade de ligações e rearranjo químico, formação de ligações de hidrogênio, ligação a alvos biológicos com alta afinidade e solubilidade facilitada (HAIDER, ALAM e HAMID, 2014; PRAVEENA, MURTHY e PAL, 2015; KUMAR, et al. 2016; DANGROO, et al. 2016).

A busca por híbridos moleculares derivados de compostos químicos bioativos com o objetivo de unir mais de uma atividade biológica ou potencializar ações já existentes tem crescido. O derivado 4-(phenyl)-1-(4 phthalimidobuthyl)-1,2,3-triazole foi escolhido devido aos resultados promissores, com bom rendimento durante a síntese orgânica e em testes anti-inflamatórios *in vivo*, tendo em vista que o acometimento cutâneo e mucocutâneo da leishmaniose é estabelecido através de um intenso processo inflamatório com adjacente desenvolvimento dos parasitas. O presente estudo investigou o efeito de um novo híbrido derivado de ftalimida com núcleo triazólico sobre macrófagos peritoneais e as formas evolutivas das espécies de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do composto 4-fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol sobre *Leishmania brasilienses* e *Leishmania amazonensis*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito de 4-fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol sobre o crescimento de promastigotas de *Leishmania brasilienses* e *Leishmania amazonensis*;
- b) Avaliar o índice e o percentual de infecção de amastigotas de *Leishmania brasiliensis* e *Leishmania amazonensis* em macrófagos peritoneais tratados com 4-fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol;
- c) Analisar a citotoxicidade de 4-fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol em células de mamífero;
- d) Analisar o efeito 4-fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol sobre a produção de óxido nítrico de macrófagos;
- e) Avaliar as alterações ultraestruturais em *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de 4-fenil-1-[2-(ftalimido-2-il)etil]-1h-1,2,3-triazol;

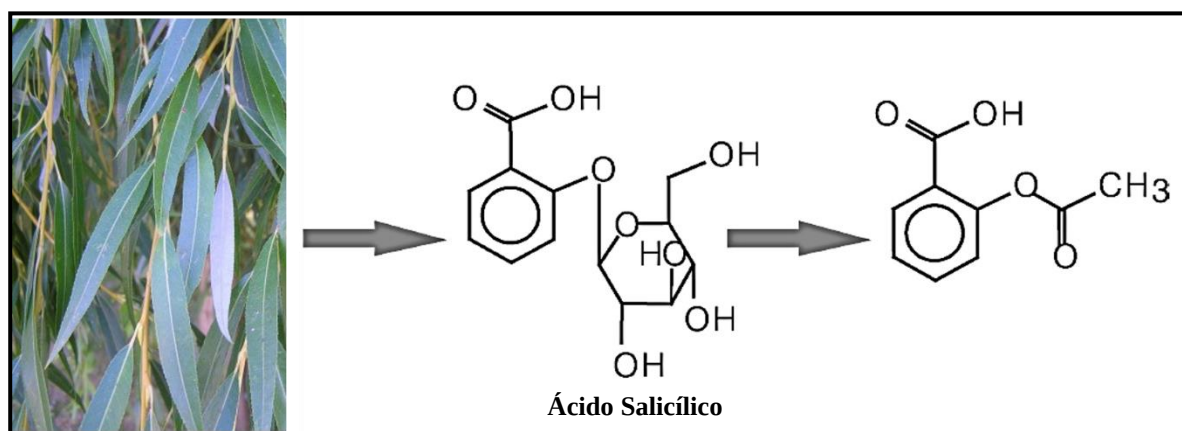
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 QUÍMICA MEDICINAL MODERNA: SÍNTESE ORGÂNICA E BUSCA DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS

A busca por agentes terapêuticos ocorre desde a antiguidade, tendo em vista a necessidade do homem em aliviar dores e se curar de diversas enfermidades. O tratamento de doenças por intermédio de drogas precede a história escrita, os primeiros compostos com propriedades terapêuticas tiveram origem natural, obtidos na maioria das vezes de plantas e destinavam-se ao tratamento de doenças infecciosas. Com o passar do tempo e à medida que a química progredia, os produtos isolados, de pureza mais acentuada, ganharam a preferência na terapia medicamentosa (BARBERATO FILHO, 2006; PINTO e BARREIRO e BOLZANI, 2009).

No século XIX iniciou-se a tentativa de obtenção dos princípios ativos presentes nas plantas, dessa forma, começaram a surgir os primeiros medicamentos com características semelhantes aos atuais. Em 1806, Friedrich Serturner, pesquisador alemão, conseguiu isolar a morfina da papoula, o que impulsionou a pesquisa de produtos biologicamente ativos noutras variedades de fontes naturais. Pouco mais de vinte anos mais tarde, o pesquisador Raffaele Piria obtém a salicina a partir da *Salix alba*, que passa por modificações para formar o ácido salicílico (figura 1), e a partir deste, Felix Hoffman sintetizou o ácido acetil salicílico (CALIXTO e SIQUEIRA JÚNIOR, 2008).

Figura 1 – Fármaco sintético derivado da salicina



Fonte: Menegatti, Fraga e Barreiro (2001)

Os primeiros compostos sintetizados de maneira intencional surgiram com o objetivo de combater a sífilis. Além de sintetizar compostos químicos para tratar a doença, o

pesquisador alemão Paul Erlich estabeleceu, também, definições sobre o mecanismo de ação dos medicamentos, contribuindo sobremaneira com o entendimento dos conceitos de receptores farmacológicos (PALMEIRA FILHO e PAN, 2003).

Na década de 80, o progresso da Biologia Molecular contribuiu para o entendimento de processos bioquímicos relacionados a fisiopatologia de diversas doenças, proporcionando estudos sobre o planejamento racional de fármacos. Nos dias atuais, através dos recursos disponíveis da química orgânica, além de criar análogos sintéticos e derivados, também é possível sintetizar substâncias inéditas, com grande possibilidade de tornarem-se fármacos (MENEGATTI, BARREIRO & FRAGA, 2001; BITTERMAN, SPYCHER e GOSS, 2016).

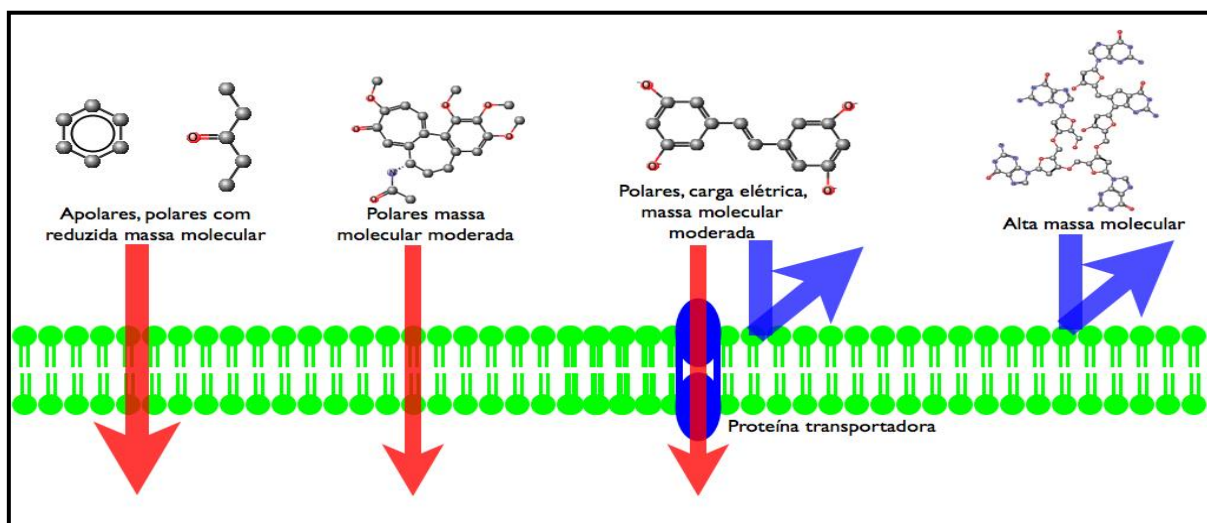
O setor de síntese orgânica passou por grandes avanços tecnológicos. O aprimoramento dos métodos de síntese de novos compostos fez com que os produtos naturais deixassem de ser a maior fonte de novos fármacos, sendo substituídos por compostos sintéticos. A quantidade e o nível de complexidade dos novos compostos cresceram exponencialmente com diversas aplicações, como por exemplo: farmacológica, candidatos a novos fármacos e reagentes para avaliação de sistemas biológicos (BROCKSOM, et al. 2015; SANGI, 2016).

Os fármacos sintéticos são, na maioria das vezes, aquirais e possuem mais de um heteroátomo entre átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio, além de cloro e flúor. São classificados pelo tipo de ação e comumente apresentam propriedades reguladoras de enzimas ou antagonistas de receptores celulares (ANDREI, et al. 2011).

Além de determinar a atividade biológica de compostos sintéticos, também são avaliadas as propriedades biofísicas. O efeito farmacológico está intrinsecamente relacionado a possibilidade de uma molécula interagir com a célula alvo (figura 2), seja atravessando a membrana plasmática ou por meio de sinalização celular, através de um receptor (BITTERMAN, SPYCHER e GOSS, 2016).

A capacidade do fármaco de penetrar as células é baseada, em parte, pela sua lipofilicidade, que está relacionada à absorção, transporte, distribuição e bioacumulação e é comumente expressa pelo coeficiente de partição. O coeficiente de partição é a medida de distribuição de um composto em um sistema lipofílico-hidrofílico (NOGUEIRA, MONTANARI e DONNICI, 2009; OMRAN, 2013; DURSH, et al. 2014; BAO, et al. 2016).

Figura 2 – Interação de Moléculas com Células Alvo



Fonte: <https://farmacologiauefs.wordpress.com>

As atividades biológicas de novas drogas têm sido relacionadas na literatura a compostos que apresentam, pelo menos, dois grupamentos químicos distintos numa mesma molécula. Geralmente esses grupamentos apresentam atividades biológicas nas formas isoladas, podendo, o híbrido resultante de sua união potencializar a ação biológica, suprimi-la ou desencadear uma nova atividade (CARDOSO, et al. 2015; LIU, et al. 2016; BACH, et al. 2017).

Dentre as estratégias de síntese de compostos, partindo do princípio de modificação molecular, está a hibridação molecular, técnica que possibilita o desenvolvimento de desenhos estruturais de novos análogos ou protótipos. A hibridação molecular consiste na identificação das subunidades farmacofóricas de dois compostos que são acoplados em uma nova estrutura, mas com preservação estrutural dessas subunidades (RAMPRASAD, NAYAK e DALIMBA, 2015; SHAIK, DANOVIK e HIBERTY, 2017).

Observando essas informações, podemos destacar as ftalimidas *N*-substituídas e também os heterocíclicos 1,2,3-triazóis como substâncias químicas com amplas atividades biológicas e merecedoras de destaque.

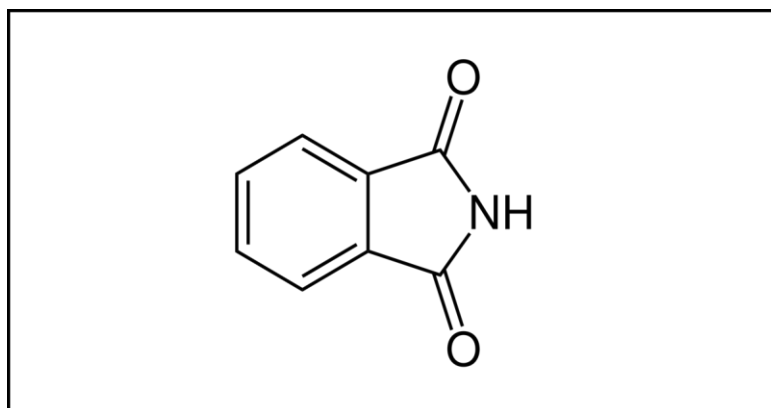
2.2 FTALIMIDAS

A ftalimida, 1,3-isoindolindiona, (figura 3) pertencente a importante família de compostos heteroaromáticos denominada de imidas cíclicas. As imidas cíclicas são compostos

que contém o grupamento $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$, podendo R ser um átomo de hidrogênio, grupamentos alquila ou arila. Essas substâncias e seus derivados podem ser subclassificados em maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas (AL-RAZZAK, 2012).

Os estudos com imidas cíclicas se iniciaram a partir da descoberta do alcaloide natural filantimida, purificado das partes aéreas do Sarandi, *Phyllanthus sellowianus*. Este metabólito apresentou significativas atividades biológicas, como por exemplo, efeito antimicrobiano e analgésico, tornando-se, dessa forma, protótipo para síntese e elaboração de diversos análogos (TEMPESTA, et al. 1988; CECHINEL FILHO, et al. 1998).

Figura 3 – Estrutura Química da Ftalimida



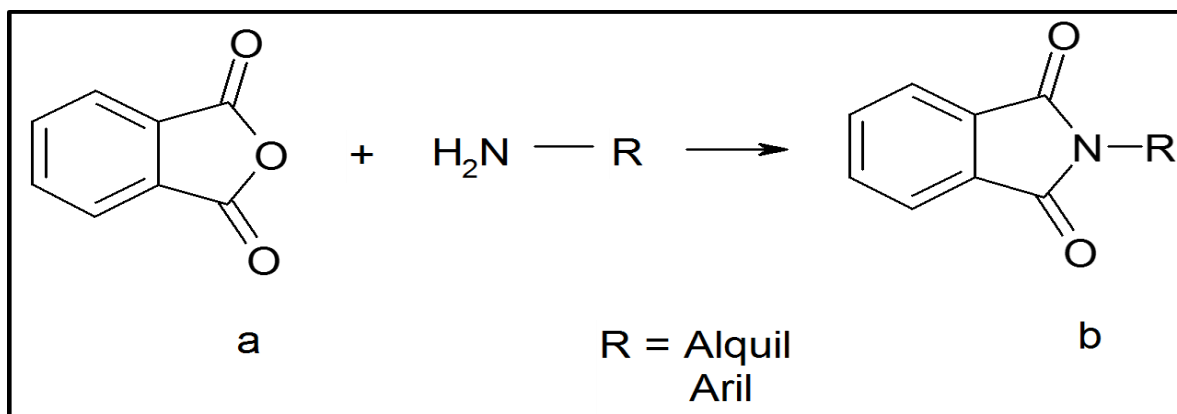
Fonte: Cechinel Filho, et al. (2003)

2.2.1 Métodos de Síntese de Ftalimidas

O método mais comum para obtenção de ftalimidas consiste na condensação desidratante de um anidrido com uma amina na presença de reagentes que produzem ácidos âmicos contendo ambos os grupos carboxilo e amida na sua estrutura. Esses compostos são considerados heteroaromáticos devido à viabilidade da formação do anel imida através das reações entre aminas e compostos relacionados com anidrido ftálico (Esquema 1) e dicloreto ftálico (SANI, et al. 2007; ABDEL-AZIZ, 2007).

Outras reações para obtenção de derivados de ftalimidas podem ocorrer partindo do anidrido ftálico com grupamentos específicos, quando se busca determinada atividade biológica. Por exemplo, a síntese de derivados de ftalimidas através da reação de condensação com anidrido 4,5,6,7 tetrafluoroftálico e derivados de sulfonaida, resulta na obtenção de compostos bifuncionais híbridos com atividade anti-micobacteriana (AKGUN, et al. 2012).

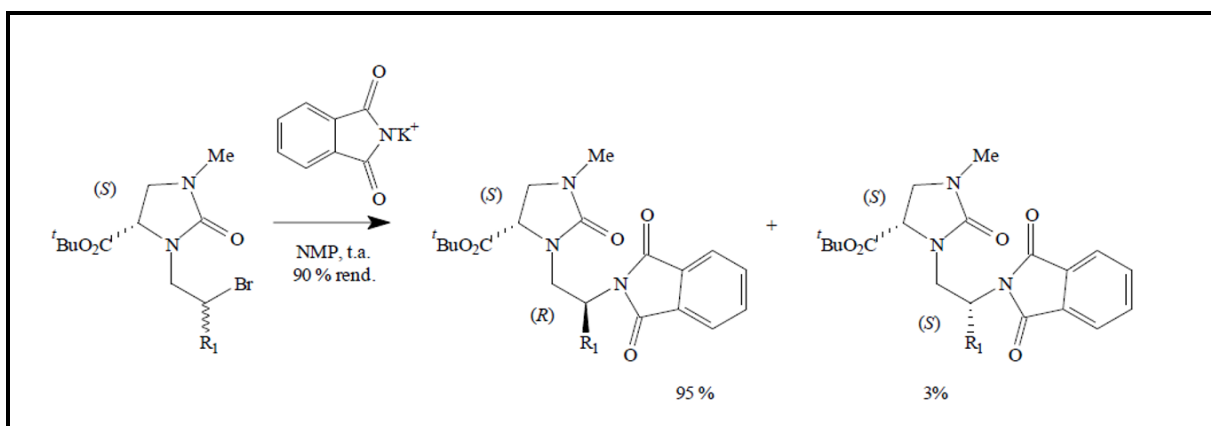
Esquema 1 - Síntese de ftalimidas partindo do anidrido ftálico com aminas



Fonte: Gawronski, et al. (1998)

A presença de um único anel aromático conjugado propicia às ftalimidas e derivados a possibilidade de sofrerem outras reações, como por exemplo, as clássicas reações de Gabriel, Colman e de Tiocarbonilações. Através da síntese de Gabriel, empregando-se ftalimida de potássio como base nucleofílica e volumosa, este derivado favorece à conversão de um diastereoisômero e permitindo a resolução quiral através de uma reação ácido-base livre de catalisador e com excelente estereoseletividade e rendimento (Esquema 2) (GIBSON & BRADSHAW, 1968).

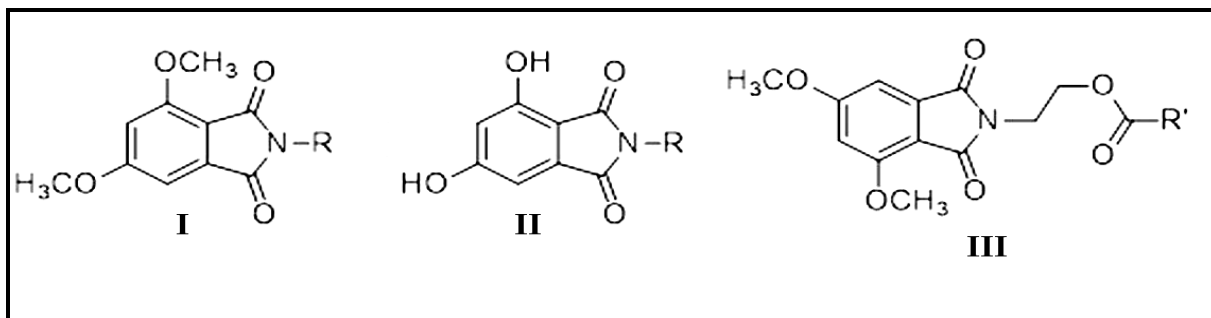
Esquema 2 – Síntese de Gabriel de Ftalimidas



Fonte: Kubo, et al. (1996)

A síntese de ftalimidas *N*-substituídas tem se modificado ao longo do tempo, sendo possível a obtenção de novos compostos com menos tempo, menos custo e melhores rendimentos. Bach, et al. 2017, sintetizaram três tipos de análogos de ftalimidas (figura 4), utilizando-se de reações com halohidrocarbonetos, desmetilação e utilização de cloreto de acilo como reagente de acilação.

Figura 4 – Novos Derivados de Ftalimida *N*-substituídas



Fonte: Bach, et al. (2017)

Os intermediários arinos têm sido outro ponto de partida para síntese de novos derivados de ftalimidas. Dentre os principais representantes deste grupo destaca-se o benzino, intermediário altamente reativo na química orgânica, aplicado em preparações de compostos funcionais e sínteses totais. Através da técnica de cicloadição 1,3-dipolar de CO₂ com isocianetos e arinos, é possível obter derivados de ftalimida sob condições livres de transição (ZHAO, WNAG e JI, 2013; FANG, WANG e JI, 2015).

Outras rotas sintéticas partindo de reações homogêneas com compostos nitrilos, aminas cíclicas e ftalimidas em catálise de metal de transição têm sido relatadas. Porém, a dificuldade de separação de reagentes catalisadores e produtos, além da possibilidade de contaminação de metais pesados em protótipos farmacológicos, têm limitado a aplicação dessas metodologias (WU, et al. 2013; SHI, RENZETTI e KUNDU, 2014).

Recentemente, a utilização de reagentes heterogêneos tem sido uma alternativa eficiente no que diz respeito à economia e reutilização de catalisadores usados na síntese de compostos. O óxido de nióbio V (Nb₂O₅) tem sido aplicado em várias reações orgânicas e foi visto que esse composto apresenta atividade catalítica tolerante, gerando altos rendimentos de ftalimidas a partir da reação entre o ácido dicarboxílico e aminas (ALI, SIDDIKI e KON, 2014; ALI, MOROMI e TOUCHY, 2016; WAN, et al. 2017).

A utilização de líquidos iônicos tem sido empregada na síntese e obtenção de derivados de ftalimidas contendo benzimidazol. A reação de síntese consiste na condensação

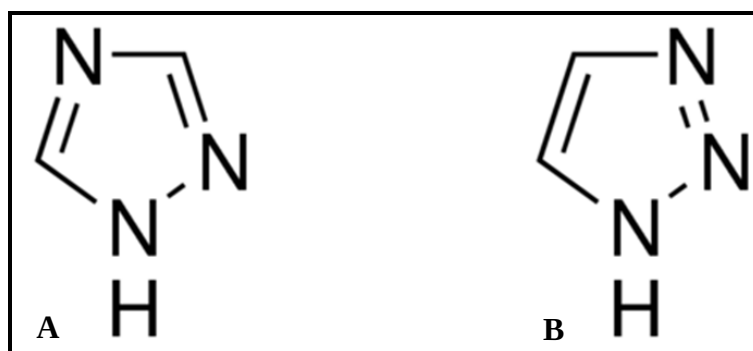
do anidrido ftálico a partir da aplicação de 2-aminobenzotiazol em líquidos iônicos distintos, com variação de tempo e temperatura. Nesse método de síntese foi observado que, quando as reações ocorreram sob vácuo, houve um ligeiro aumento no rendimento dos compostos sintetizados (NAGARAJAN, et al. 2013).

Novos derivados de ftalimidas ligados ao sal de lítio de dimetil metilfosfonato foram descritos na literatura como compostos inéditos. O mecanismo de síntese desses derivados consiste na adição do sal de lítio de dimetil metilfosfonato, obtido a partir de uma reação de dimetil metilfosfonato com *n*-butil-lítio, a ftalimidas *N*-substituídas. Através desse método, foi possível obter três derivados de ftalimidas: *N*-metilftalimida, resultante da reação entre a ftalimida de potássio com o iodeto de metil; *N*-benzilftalimida e *N*-terc-butil-ftalimida, obtidas da reação do anidrido ftálico com aminas primárias. Essa metodologia se mostrou eficaz para síntese de novos derivados de ftalimidas (PIETKA-OTTLIK, POTACZEK e PIASECKI, 2010; OLIVEIRA, et al. 2011; ZAGÓRSKI, et al. 2016).

2.3 HETEROCÍCLICOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS

Os triazóis são importantes compostos orgânicos heterocíclicos de cinco membros, com três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono. Existem dois isômeros triazólicos: 1,2,4-tiazol e 1,2,3-triazol (figura 5A e 5B, respectivamente). O composto 1,2,3-triazol ainda é classificado em: 1,2,3-triazóis monocíclicos, benzotriazóis e 1,2 sais de 3-triazólio. Esta classe de compostos tem chamado à atenção da comunidade científica pelas suas propriedades químicas no contexto biológico, como por exemplo: formação de ligações de hidrogênio, ligação a alvos biológicos com alta afinidade e solubilidade facilitada (HAIDER, ALAM e HAMID, 2014; PRAVEENA, MURTHY e PAL, 2015; KUMAR, et al. 2016; DANGROO, et al. 2016).

Figura 5 – Estrutura Química dos Isômeros 1,2,3-Triazólicos



Fonte: Adaptado de DHEER, SINGH e SHANKAR, (2017).

Estes compostos podem ser facilmente obtidos em excelentes rendimentos, na escala de multigramas, através do método de *Click Chemistry*, reação de halogenetos de arilo/alquilo, alcinos e NaN_3 sob condições ambientais (SHANKAR, et al. 2009; KAPPE e EYCKEN, 2010; SELVAM, et al. 2012; BAUMANN e BAXENDALE, 2013; HOPKINSON, et al. 2014).

2.3.1 Síntese de 1,2,3-Triazóis: cicloadição 1,3 dipolar e *click chemistry*

Assim como os derivados de ftalimidas, nos últimos anos, muitas metodologias de síntese de heterocíclicos triazólicos têm sido elaboradas e veiculadas na literatura. A reação mais popular para produção de 1,2,3-triazol é a cicloadição 1,3 dipolar, ou cicloadição de Huisgen, entre uma azida e um alquino terminal. Devido à baixa regioseletividade, rendimento químico diminuído e necessidade do emprego de altas temperaturas, este método não foi prontamente empregado na síntese de compostos orgânicos. Posteriormente, o protocolo foi adaptado e, através da catálise por cobre e emprego do princípio de *Click Chemistry*, foi possível obter, com elevado índice de rendimento 1,2,3-triazóis 4-dissubstituídos (HUISGEN, GUENTER e LEANDER, 1967; KOLB, FINN e SHARPLESS, 2001).

As reações de *Click Chemistry* constituem uma ampla possibilidade para o rápido desenvolvimento de compostos orgânicos e inclui reações com formação de ligações, que podem ser utilizadas para vincular estruturas moleculares através de heteroátomos. A síntese de derivados triazólicos impulsionou o interesse da comunidade científica pelo método, que vem sendo aprimorado cada vez mais ao longo do tempo. A reação de catalisação por metais, especificamente pelo cobre, é uma das reações de *Click Chemistry* mais bem documentadas (CONSTANT, et al. 2014; TOTOBENAZARA e BURKE, 2015; KHAN, et al. 2016).

Com o sucesso na obtenção de heterocíclicos triazólicos, o método de *Click Chemistry* se difundiu e tem sido amplamente utilizado. A síntese catalisada por cobre apresenta diversas vantagens, como por exemplo, alta regioseletividade, vasto alcance do substrato, fácil manuseio, excelentes rendimentos e ausência de sensibilidade a oxigênio e água. Outros reagentes têm sido pesquisados e testados, a fim ampliar as possibilidades de síntese sem perder as vantagens já encontradas pela rota catalisada por metal (SHAO, et al. 2011; RUIZ, PEDRO e LIMA, 2013).

Dentre os exemplos de compostos que foram utilizados com o objetivo de melhorar a reação estão: óxido cuproso sobre carvão, descrito na literatura, catalisa a reação de 1,2-di-

substituído 1,2,3-triazóis, com excelente rendimento; 2-etinilpiridina, adicionando como aditivo com o cloreto de cobre possibilitou a síntese de diversos triazóis; o iodeto de cobre na presença de N-diisopropiletamina e ácido acético em diclorometano à temperatura ambiente também foram explorados.

O protocolo mais utilizado para obtenção de heterocíclicos 1,2,3-triazólicos catalisados por metal, consiste na utilização de cobre e ascorbato de sódio. Outra maneira também explorada foi à utilização de Cu (0), Cu (I) e Cu (II) sob forma catalítica, em que se produziu uma reação a partir da mistura de água, trietilamina e terc-butanol, sob 100°C, obtendo bons resultados. Outros catalisadores metálicos, como prata (Ag), rutênio (Ru) e ouro (Au) também foram analisados para reação de cicloadição de azoto, com objetivo de síntese de triazóis (SHAO, et al. 2010; WANG, et al. 2011; SHIN, LIM e LEE, 2012; HIROKI e OGATA, 2013; COOK, WALKER e MACK, 2013).

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE DERIVADOS DE FTALIMIDAS E HETEROCÍCLICOS 1,2,3 TRIAZÓLICOS

2.4.1 Derivados de Ftalimida

Os derivados de ftalimidas e heterocíclicos triazólicos apresentam diversas atividades biológicas já descritas na literatura e isso tem atraído à atenção da comunidade científica. Muitos derivados de ftalimida foram promissores quanto às seguintes atividades biológicas: hipolipidêmica (CHAPMAN, et al. 1985; ABDEL-AZIZ, et al. 2011), analgésico (ALANAZI, et al. 2015), anticonvulsivante (OBNISKA, et al. 2016), anti-inflamatória (ALANAZI, et al. 2015; JOSÉ, et al. 2016); antiviral (HOLFFMAN et al. 1992); antitubercular (ABDEL-AZIZ, et al. 2011; BERK e AKGÜN, 2012), e antimicrobianos (BERK e AKGÜN, 2015; ELUMAI e ASHRAF, 2013; SINGH, et al. 2015).

A ação hipolipidêmica dos derivados de ftalimida é uma das primeiras atividades descritas. Compostos contendo 1-*N*-ftalimidobutano-3-ona demonstraram ação hipocolesterolêmica significativa, noutro estudo, foi observado que, após 16 dias de tratamento (20 mg/kg/dia) com o derivado 4,8 di-*O*-acetil-2,3-didesoxi-*a-D-eritro*-hex-2-enopiranósido de ftalimidometil, houve uma redução de até 25% de colesterol plasmático e triglicerídeos. Após tratamento de camundongos com 20 mg/kg/dia com o derivado de ftalimida *N*-(4-clorofenil)ftalimida, foi observado diminuição de 63 a 47% nos níveis de colesterol e triglicerídeos, respectivamente. Esses estudos demonstram que compostos

contendo o grupamento ftalimida são promissores com agentes hipolipidêmicos (CHAPMAN, COCOLAS e HALL, 1983; SRIVASTAVA, et al. 2001; SENA, et al. 2003).

Um novo derivado de ftalimida, LASSBio-1425, apresentou, dentre outras atividades, a capacidade de redução dos níveis séricos de colesterol total ($248,9 \pm 30,6 \times 519,2 \pm 17,4$ mg/dL), triglicerídeos ($107,3 \pm 7,8 \times 192,5 \pm 46,0$ mg / dL), LDL ($135,7 \pm 31,2 \times 336,6 \pm 18,5$ mg/dL) e aumentou os níveis de HDL ($96,7 \pm 17,0 \times 25,4 \pm 3,8$ mg / dL) em ratos wistar alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica. Outras novas imidas cíclicas halogenadas com fração *N*-ftalimida apresentaram significativa ação hipolipidêmica em camundongos diabéticos, com taxas próximas aos valores normais, reforçando a perspectiva de utilização de derivados de ftalimidas como agentes hipolipidêmicos (ABDEL-AZIZ, et al. 2011; FIUMAN, et al. 2016).

Os derivados de ftalimida também apresentam atividade analgésica com mecanismos bem estabelecidos já descritos na literatura. Sete novos compostos contendo a o grupo ftalimida ligados ao metil 1,2,4-oxadiazol-5-il apresentaram potente efeito analgésico ($ID_{50} = 2,2$ mg/kg/ip) através da avaliação por contorção abdominal, induzido por ácido acético em camundongos. Recentemente, um grupo composto por 30 imidas cíclicas derivadas de ftalimida, foi projetado como inibidores seletivos de COX-2, a fim de se obter atividades anti-inflamatórias e analgésicas. Dentre os derivados, foi destacado pelos pesquisadores um potente inibidor ($IC_{50} = 0,18$ μ M) e altamente seletivo ($SI = 668$) de COX-2 (ANTUNES, et al. 1998; ALANAZI, et al. 2015).

A atividade anticonvulsivante também tem sido relatada após experimentos com produtos sintéticos contendo a ftalimida como componente central. Dentre os compostos já descritos, destacou-se o 2-{2-[4-(4-fluorofenil)-piperazin-1-il]-2-oxoetil}ftalimida que revelou proteção contra convulsões induzidas eletricamente nas doses de 30 mg/kg e 100 mg/kg e se mostrou mais potente do que a fenitoína, medicamento de referência no tratamento de convulsão (RAGAVENDRAN, et al. 2011).

Outra atividade biológica das ftalimidas descrita na literatura é a ação anti-inflamatória. Uma série de derivados foi sintetizada visando à modulação da superprodução de TNF- α , mediador primário da resposta inflamatória. Foi observado que os derivados de ftalimida apresentaram relevantes resultados frente à modulação do TNF- α nas concentrações de 10 e 100 μ M, superando a atividade da talidomida. Além disso, os mesmos derivados conseguiram inibir significativamente (36%) o edema de pata em camundongos tratados com 10 mg/kg e diminuiu (45%) a hiperalgesia induzida por carragenina. Noutro estudo, onde foram utilizados os derivados 2-ftalimidetanol e 2-ftalimideto, ambos inibiram o edema de

pata quando administrados 1 hora antes da aplicação de carragenina (GONDIN, et al. 2014; CASAL, et al. 2016).

Apesar das diversas atividades metabólicas dos derivados de ftalimida, os ensaios antimicrobianos merecem destaque pela amplitude de ação desses compostos e excelência no combate a microrganismos patogênicos. Muitas infecções por vírus, bactérias, protozoários, fungos e etc. necessitam de coquetéis de drogas, incluindo drogas potentes que trazem ao usuário diversos efeitos colaterais, além de requererem terapias a longos prazos e com múltiplos medicamentos ().

O potencial antiviral de novos compostos, seja de origem sintética ou natural, tem sido alvo de grande interesse ao longo do desenvolvimento da ciência. O derivado N-I-adamantil-4-aminoftalimida recebeu destaque ao apresentar atividade antiviral, com $EC_{50} = 4,78 \mu\text{g/mL}$ para o vírus HIV. No mesmo estudo, foi destacada a importância do grupo amino na porção ftalil na atividade biológica investigada, tendo em vista que outros compostos com resultados significativos também apresentaram a mesma característica química em comum. Uma série de análogos de ftobuzona, preparados a partir da ftalimida de potássio apresentaram significativos resultados inibitórios contra vírus 1 e 2 do herpes simples. Os compostos com porções ftalimida apresentaram-se como potenciais agentes antivirais, com $IC_{50} = 2,85 \mu\text{g/mL}$ para vírus herpes simples 1 (DERPOORTEN, et al. 1997; YANG, et al. 2010).

Outros derivados de ftalimida contendo anel de pirimidina também foram sintetizados e testados frente a *M. tuberculosis* e apresentaram valores significativos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) = $3,9 \mu\text{g/mL}$, citotoxicidade (CC_{50}) = 312,5 e índice de seletividade frente a macrófagos (J774) de 80. Derivados de ftalimidas fluorados também foram testados quanto à eficácia no combate ao agente causador da tuberculose, *M. tuberculosis H37Ra* (ATCC 25177) e foi visto que as moléculas híbridas de ftalimidas fluorada tiveram atividade anti-micobactéria semelhante aos fármacos sulfonamidas. Noutro estudo, no qual foram sintetizados 12 derivados de ftalimidas com radicais fluorados, os compostos apresentaram potentes atividades anti-micobactéria, com a CIM médio de $1,8 \mu\text{g/mL}$ (SANTOS, et al. 2009; AKGÜN, et al. 2012; ELUMALAI, et al. 2013).

Os análogos obtidos a partir da síntese de N-(trietoxisililpropil)ftalimida, através da reação de transimidização entre o anidrido ftálico e 3-aminopropil trietoxissilano, foram testados quanto ao possível efeito antimicrobiano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As drogas testadas foram

consideradas antimicrobianas efetivas contra todos os microrganismos testados, e os compostos com a estrutura ftalimídica apresentaram resultado significativamente superior, podendo esse efeito ser atribuído a presença da ftalimidas em sua composição química (SINGH, et al. 2015).

Os compostos *N*-vinilftalimida e 8-[4-(ftalimida-2-il) butiloxi] quinolina, derivados de ftalimidas obtidos através de reações de condensação modificadas, estão descritos na literatura como bons agentes fungicidas. Os análogos sintéticos foram testados contra os fitopatógenos, *Alternaria solani* e *Botrytis cinérea*, com valores de IC_{50} de 7,92 $\mu\text{g/mL}$ e 10,85 $\mu\text{g/mL}$ (PAN, et al. 2016).

Outros compostos contendo o grupamento ftalimidas também apresentaram excelente atividade frente ao agente etiológico da malária, *Plasmodium falciparum*. De forma geral, no estudo, o grupo ftalimida foi introduzido em (+) – deshidroabietilamina e a partir de outras reações posteriores, foram obtidos 12 derivados. Dentre os compostos obtidos, o 12-acetil-N, N-ftaloildhidroabietilamina apresentou ótima atividade contra o protozoário com EC (atividade antiplasmódica) = 0,086 μM e SI (índice de seletividade) = >290, confirmando que compostos com grupamento ftalimida são promissores no tratamento de infecções por protozoários intracelulares (GONZÁLES, et al. 2014).

2.4.2 Heterocíclicos 1,2,3-Triazóis

Do mesmo modo que as ftalimidas e seus derivados, os heterocíclicos 1,2,3-triazólicos também apresentam diversas atividades biológicas estudadas e já descritas na literatura. Os anéis heterocíclicos apresentam grande possibilidade de ligações e rearranjo químico, tornando-se alvo de pesquisas e promovendo grandes avanços na área médica em longo prazo. Os 1,2,3-triazóis e benzotriazóis monocíclicos apresentam notável estabilidade frente a reações de hidrólise, oxi-redução e à degradação enzimática, ampliando dessa forma, a possibilidade de aplicação e uso terapêutico (BAUMANN e BAXENDALE, 2013; HOPKINSON, et al. 2014).

Muitas atividades biológicas dos 1,2,3-triazóis têm sido investigadas. Foi visto que numa série de compostos contendo grupo heterocíclico 1,2,3-triazólico, o composto 2-metoxi-5-(1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1 *H*-1,2,3-triazol-5-il)anilina inibia consideravelmente a polimerização da tubulina em baixas concentrações (IC_{50} = 4,8 μM). Outros compostos, híbridos de 1,2,3-triazóis-Jaspine B, foram testados frente a linhagens de células de câncer humano, dentre elas: MGC-803, câncer gástrico; MCF-7, câncer de mama e EC-9706, câncer

de esôfago e foi visto que o composto com cadeia alquila de 1-4 átomos de carbono apresentou maior potência citotóxica contra as células testadas, com IC_{50} = 7,83; 8,21 e 1,85 μ M, respectivamente (ODLO, et al. 2008; XU, et al. 2014).

A exigência de novas drogas anti-inflamatórias tem aumentado após elucidação dos mecanismos de ação dos fármacos atuais. Muitos anti-inflamatórios não-esteroidais inibem o metabolismo de aminoácidos ao inibir a COX, e alguns efeitos colaterais significativos têm sido relatados à terapia com esses medicamentos, como por exemplo: aumento do tempo de sangramento, insuficiência renal e ocorrência de úlcera. Dessa forma, alguns novos análogos de ácido carboxílico contendo 1H-1,2,3-triazóis foram avaliados quanto a capacidade anti-inflamatória num modelo de edema de orelha em camundongos. Foi visto que os compostos sintetizados apresentaram melhor atividade, a nível molecular, quando comparados ao fármaco de referência, diclofenaco (FOSSLIEN, 1998; KIM, et al. 2015).

Em estudos recentes foi descrito que o composto oxazolo[4,5- b]piridina-2-ona 1,2,3-triazóis, sintetizado através do método de *Click Chemistry*, inibiu significativamente a atividade da glicogênio sintase quinase (GSK-3 β), com IC_{50} = 0,19 mM. O referido composto também apresentou ainda boa atividade anti-inflamatória in vivo, no modelo de edema de pata em rato, inibindo citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Esses resultados foram comparados com o fármaco indometacina, padrão para ação anti-inflamatória e também inibidor de GSK-3 β (SARIGOL, et al. 2015).

Outros compostos contendo 1,2,3-triazóis, também sintetizados a partir do *Click Chemistry* apresentaram atividade contra *M. tuberculosis* (H37Ra) e *M. bovis*, e se destacaram alguns derivados pelo baixo valor de MIC (27, 34 μ g/mL). Em estudos continuados, foi visto que moléculas incluindo 1,2,3-triazóis se mostraram inibidores promissores de *M. tuberculosis*, com valores de MIC inferiores a 5,8 μ g/mL (SHAIKH, et al. 2015; SHAIKH, et al. 2016).

Quanto às atividades antimicrobianas, os 1,2,3-triazóis têm sido relatados na literatura como substâncias promissoras no combate de microrganismos diversos. Uma pesquisa realizada na tentativa de introduzir novas classes de agentes antimicrobianos, testou novos compostos sintetizados a partir de heterocíclicos 1,2,3-triazólicos, chalconas e flavonas pelo método de “*Click Chemistry*”. Os compostos sintetizados foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella boydii*, *Klebsiella pneumoniae* e atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. Parapsilosis*, *Cryptococcus*

neoformans, *Dermatophyte*. A maioria dos compostos testados mostrou atividade potente tanto antibacteriana como antifúngica (ALY e SAAD, 2015; KANT, et al. 2016).

As β -lactamases bacterianas são exemplos de compostos comerciais que contêm 1,2,3-triazóis. Esse potencial antibacteriano tem instigado diversos pesquisadores a sintetizarem e avaliarem o potencial antimicrobiano de compostos triazólicos frente a bactérias. Foi visto que drogas derivadas de 6-bromobenzo[*d*]tiazol-2(3*H*)-ona, apresentaram atividade boa moderada quando comparadas ao antibiótico estreptomicina, da mesma forma, em outra pesquisa, o bis-1,2,3-triazol simétrico foi descrito com potencial antibacteriano, contra *E. coli* e *Y. pseudotuberculosis* (DÜGDU, et al. 2016).

Noutro estudo, três compostos foram sintetizados, derivados do ácido 1-(2,6-difluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazóis-4-carboxílico contendo piperazina carboxamidas, (5-(fenilo substituído) 1,3,4-oxadiazol-2-ilo) e (5-(alquiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il) substituintes na posição 4. Foi visto que os compostos eram ativos contra todas as espécies patogênicas de bactérias, gram-negativas e gram-positivas, e fungos testados, confirmando dessa forma a eficácia de compostos contendo derivados triazólicos contra microrganismos que causam doenças ao ser humano (SINGH, et al. 2014).

Os compostos contendo o grupo 1,2,3-triazóis também são sintetizados a partir de estruturas bem estabelecidas clinicamente e farmacologicamente. A exemplo, tem-se a ribavirina, uma classe ampla de compostos à base de triazóis, com atividades relatadas contra vírus herpes simples (HSV), vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), vírus da gripe, vírus respiratório sincicial e vírus da hepatite C. Dentre as limitações do uso clínico do medicamento ribavirina, se destaca a sua alta toxicidade, a partir disso, novos derivados são sintetizados à base de 1,2,3-triazóis, através do método de “Click Chemistry” com o objetivo de diminuir os efeitos colaterais aos usuários. Em estudos recentes, foi visto que é possível obter análogos triazólicos da ribavirina com atividade superior ao composto padrão, destacando ação contra a replicação da gripe A e atividade da transcriptase reversa (LOURDES, et al. 2014).

Os microrganismos parasitas intracelulares são um desafio na pesquisa de novas drogas e quimioterapia, visto que os compostos sintetizados com a finalidade de combater tais agentes necessitam ultrapassar ou interagir com a célula hospedeira sem causar danos e ser seletivos para o patógeno. Dessa forma, diversos medicamentos têm sido utilizados no tratamento de doenças causadas por parasitas intracelulares, como o caso da malária (DEVENDER, et al. 2016). Os compostos 1,2,3-triazólicos são alvo de pesquisas quanto a ação anti-parasitária intracelular e novos compostos contendo o grupo triazol, como por

exemplo, 1 *H*-1,2,3-triazol conjugados de 4-aminoquinolinas foram descritos na literatura com excelente atividade antimalárica, exibindo uma IC₅₀ de 3,76 µM contra a estirpe 3D7 de *P. falciparum* (SINGH, et al. 2016).

A ampla ação dos compostos triazólicos e derivados de ftalimidas frente a microrganismos patogênicos reforça o incentivo a aplicação de novas drogas que contenham esses grupamentos. Assim como a malária, a leishmaniose é causada por um protozoário intracelular e tem desafiado a comunidade científica quanto ao desenvolvimento de compostos mais eficazes e menos tóxico para o tratamento da doença. Recentemente, alguns estudos têm sido realizados sugerindo que derivados de ftalimida e heterocíclicos triazólicos são eficientes no combate a protozoários tripanossomatídeos, o que inclui principalmente: *T. cruzi*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*, agentes causadores da Doença de Chagas e Leishmanioses Cutânea e Visceral, respectivamente.

2.5 LEISHMANIOSE

2.5.1 Aspectos Históricos e Epidemiológicos

A leishmaniose é uma doença transmitida por vetores causada por várias espécies de parasitas protozoários intracelulares obrigatórios e tem três formas clínicas bem estabelecidas, são elas: cutânea, mucocutânea e visceral (LAINSON, e SHAW, 1988; SANTOS e COIMBRA, 1994; LAINSON, 1997). O acometimento humano pela leishmaniose é descrito desde a antiguidade, havendo sido relatada na literatura desde o século I d. C. Nas Américas, peças de cerâmica denominadas de *huaco* (figura 6) datadas de 400 a 900 anos d.C., retratam os habitantes locais com deformações faciais, compatíveis com o que é observado na leishmaniose muco-cutânea, confirmando indícios de que o acometimento humano pelos parasitas do gênero *leishmania* é antigo (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; ORYAN, et al. 2008).

A obtenção de dados precisos sobre a incidência da leishmaniose é algo difícil, tendo em vista que o número de casos seja subestimado devido ao perfil subclínico da doença e pela concentração de casos nas áreas pobres do mundo (WHO, 2014). Estima-se que existam aproximadamente 12 milhões de indivíduos infectados e que, a cada ano, 2 milhões de novos casos são confirmados, sendo a maioria relacionada às formas cutânea e mucocutânea. Isso faz da leishmaniose a segunda principal doença ocasionada por protozoários, causando 20.000 a 30.000 mortes por ano (BOER, et al. 2011).

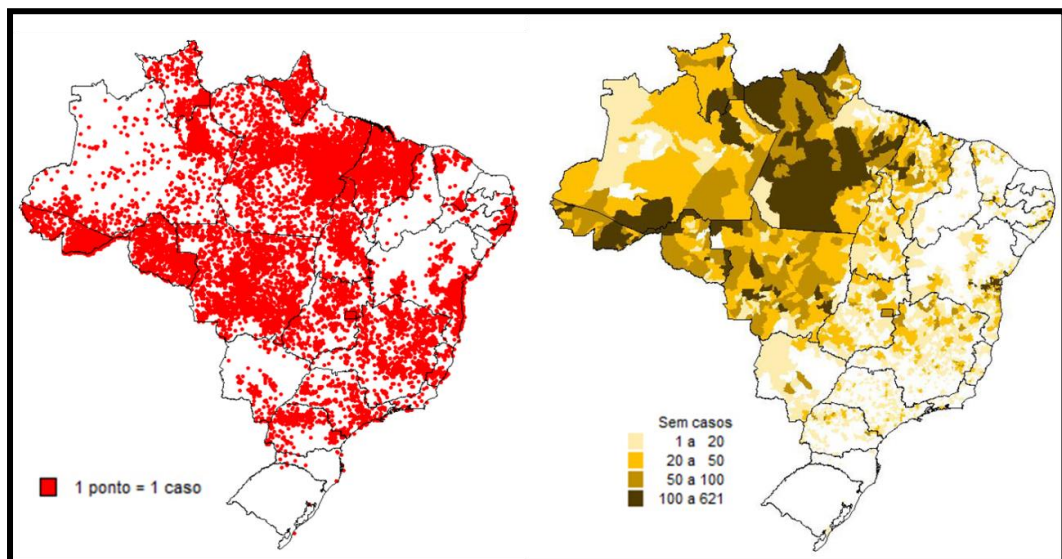
Figura 6 – *Huaco mochica* apresentando lesão sugestiva de leishmaniose muco-cutânea



Fonte: Marzoch, et al. (2003)

A infecção por leishmaniasis é comumente relacionada a ocorrência em áreas tropicais e outros fatores também têm contribuído para a sua disseminação em diversas áreas como: mudanças climáticas, desmatamento, urbanização, imigração de países endêmicos, viagens turísticas e de trabalho e etc. No Brasil, há a ocorrência das três formas clínicas da leishmaniose, sendo a Leishmaniose Tegumentar (LT) registrada em todas as regiões (figura 7), destacando os principais estados para cada região: Amazonas, Pará, Rondônia e Tocantins (Norte), Maranhão, Bahia e Ceará (Nordeste), Minas Gerais e São Paulo (Sudeste), Goiás (Centro-Oeste) e Paraná (Sul) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

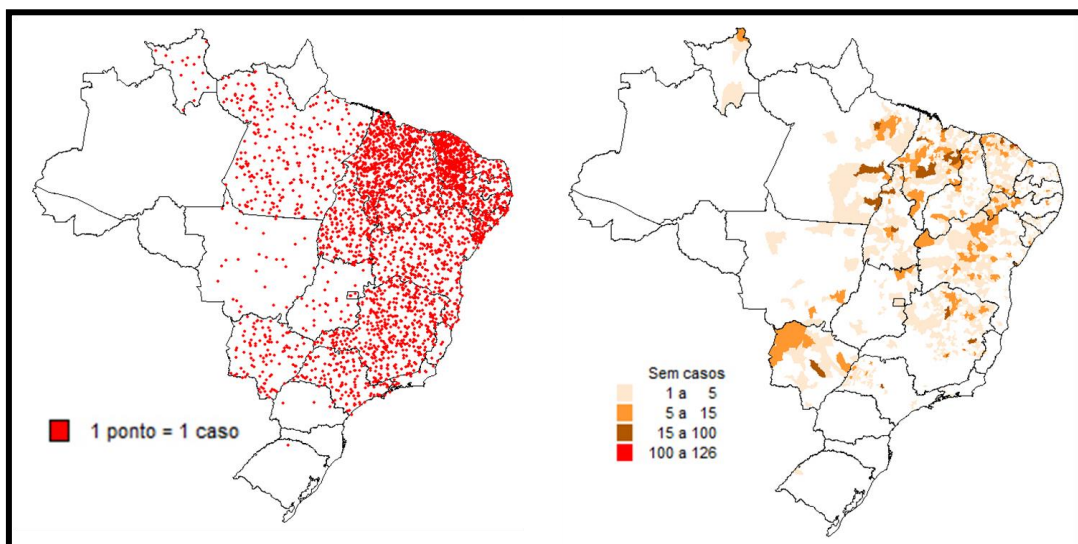
Figura 7 – Distribuição da Leishmaniose Tegumentar no Brasil, segundo município



Fonte: Ministério da Saúde (2015)

A Leishmaniose Visceral (LV) é altamente endêmica no subcontinente indiano e leste da África. Estima-se que 200 000 a 400 000 novos casos de LV ocorrem anualmente no mundo. Mais de 90% dos novos casos ocorrem nos seguintes países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Nas Américas, o acometimento visceral é notificado em 12 países. Aproximadamente 90% dos casos notificados na América Latina são registrados no Brasil, distribuídos amplamente no território nacional (Figura 8). No país, 3500 casos são identificados anualmente, com coeficiente de incidência de 2,0 casos/100.000 habitantes. O aumento substancial da letalidade fez com que no ano 2000 3,1% dos casos resultassem em óbito, já em 2015 o registro de óbitos totalizou 7,8% dos casos, além disso, tem sido observado um intenso processo de urbanização da doença com várias ocorrências notificadas nas áreas urbanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Figura 8 – Distribuição da Leishmaniose Visceral no Brasil, segundo município



Fonte: Ministério da Saúde (2015)

A ampla distribuição do vetor associada a diversidade de espécies de leishmania patogênicas ao homem, contribui com o grande número de casos e diversidade de formas clínicas encontradas no Brasil. Outro fator que está diretamente ligado à ocorrência dos casos de leishmaniose é a existência de reservatórios urbanos, como no caso dos cães e roedores. Esses aspectos têm se tornando desafios no controle e combate à leishmaniose, sobretudo em países em desenvolvimento (Kevric et al., 2015)

2.5.2 Agente Etiológico, Ciclo de Vida e Vetor

Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios. As principais espécies infecciosas de leishmaniose estão descritas na tabela 1. Esses microrganismos são classificados em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Essa classificação está relacionada ao local de desenvolvimento do protozoário no hospedeiro invertebrado. No primeiro subgênero, o parasito se dirige para a região posterior do tubo digestivo do vetor, já nos organismos pertencentes ao subgênero *Leishmania*, o desenvolvimento ocorre livremente ou no estômago, com posterior migração para a porção anterior do tubo digestivo. Os grupos *Viannia* e *Leishmania* contêm todas as espécies mais conhecidas e aproximadamente 20 espécies são responsáveis por infecções em humanos e 10 apresentam grande importância para a saúde pública (AKHOUNDI, et al. 2016; COTTON, 2017).

Tabela 1 – Principais Espécies de *Leishmania* de acordo com região e manifestação clínica associada

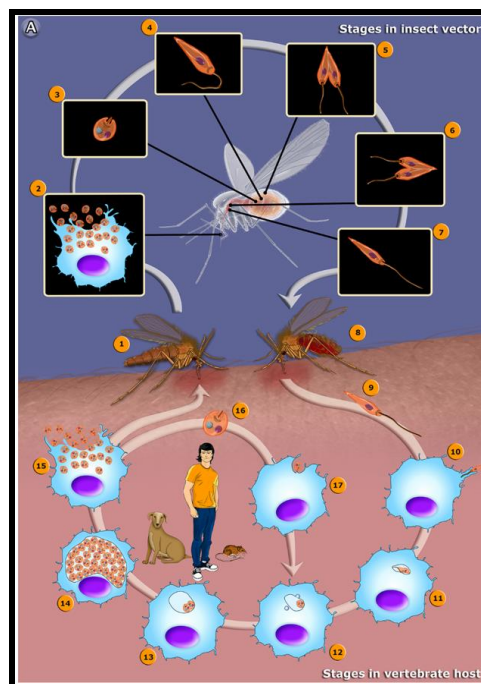
Região	Complexo	Espécies	Manifestação clínica
Velho Mundo	<i>Leishmania donovani</i>	<i>L donovani</i>	CL, VL, PKLD, ML (raro)
		<i>L infantum</i>	CL, VL (crianças), PKLD, ML (raro)
		<i>L chagasi</i>	CL, VL (crianças), PKLD, ML (raro)
	<i>Leishmania tropica</i>	<i>L tropica</i>	CL, ML (raro), VL (raro)
		<i>L major</i>	CL, ML (raro)
Novo Mundo	<i>Leishmania mexicana</i>	<i>L aethiopica</i>	CL, DCL
		<i>L mexicana</i>	CL, DCL (raro)
		<i>L amazonensis</i>	CL, DCL, ML, VL (raro), PKLD (raro)
		<i>L venezuelensis</i>	CL, DCL (raro)

Região	Complexo	Espécies	Manifestação clínica
	<i>Leishmania (Viannia)</i>	<i>L. braziliensis</i>	CL, ML, VL
	<i>braziliensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	CL, ML
		<i>L. panamensis</i>	CL, ML
		<i>L. peruviana</i>	CL

CL: leishmaniose cutânea; DCL: leishmaniose cutânea difusa; ML: leishmaniose mucocutânea; VL: leishmaniose visceral; PKLD: leishmaniose dermatológica pós-kala-azar

A infecção por parasitos leishmania (Figura 9) se inicia no momento em que o hospedeiro invertebrado, o flebotomíneo, realiza o repasto sanguíneo. Durante a picada, o inseto injeta a saliva que contém elementos que evitam a coagulação, importante para o processo de alimentação sanguínea do vetor. Durante este processo, promastigotas metacíclicos são liberados e entram na pele do hospedeiro por regurgitação, resultando na rápida infiltração de neutrófilos e substancial recrutamento de macrófagos no local da infecção

Figura 9 – Ciclo de Vida de parasitos do gênero *Leishmania*



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, et al. (2013)

As leishmanias atingem a pele do hospedeiro mamífero e, inicialmente, invadem os neutrófilos, macrófagos e outros tipos de células como, fibroblastos, também podem ser infectados. Nas células do sistema mononuclear fagocítico, existe o reconhecimento por adesão, seguido por sinalização e invasão e estas células se tornam espécies de “cavalos de Tróia”, ao ficarem repletas de parasitos, sendo o macrófago a principal célula relacionada ao estabelecimento final e amplificação da infecção (MCCLEAN, et al. 2005).

O parasita se liga à célula do hospedeiro através do flagelo ou corpo celular. A adesão envolve estruturas importantes já descritas na ultraestrutura da leishmania, tais como, lipofosfoglicanos (LPGs) e a glicoproteína Gp63, essas moléculas se ligam a receptores do complemento, receptores de manose e receptores de fibronectina. O macrófago realiza a fagocitose através da formação de pseudópodes, permitindo que o parasita se ligue à superfície de macrófagos e então, é internalizada num vacúolo, denominado de vacúolo parasitóforo (VP) (UENO, et al. 2012).

No VP, o promastigota se diferencia em amastigota, seguido pela fusão de lisossomos da célula hospedeira com o VP. Alguns amastigotas se aderem à membrana do vacúolo, enquanto outros permanecem livres e se proliferam, se dividindo rapidamente. Através de alguns estudos, foi visto que, durante a infecção por *L. amazonensis*, os amastigotas se multiplicam dentro de um VP muito grande, que contém muitos parasitas ligados à membrana, já nas espécies do subgênero *Viannia*, os amastigotas permanecem segregados dentro de um pequeno VP. Após um intenso processo de multiplicação, ocorre a ruptura da membrana do macrófago, liberando os amastigotas no tecido. Esses amastigotas podem invadir outros macrófagos, retomando a multiplicação ou serem ingeridos por outro flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (STUART, et al. 2008; UENO, et al. 2012).

2.5.3 Manifestações Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

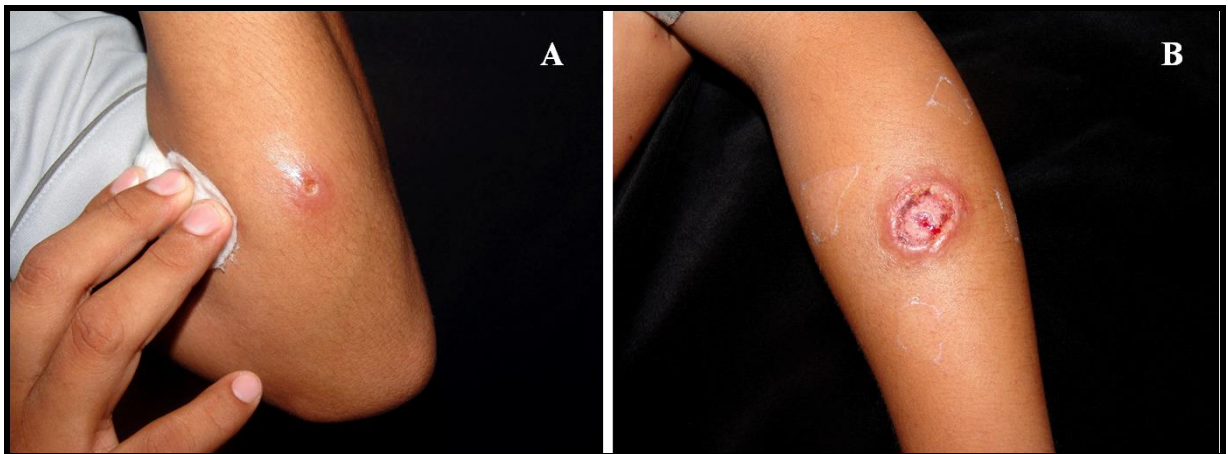
2.5.3.1 Leishmaniose Cutânea

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) também denominada de Leishmaniose Cutânea (LC), foi descrita pela primeira vez no Velho Mundo pelos pesquisadores Lewis e Cunningham, em 1876. No Brasil, essa doença é comumente ocasionada através de infecção com as espécies: *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A manifestação dermatológica da leishmaniose ocorre em áreas do corpo expostas a picadas do

inseto, podendo acometer mais de uma área quando não tratada (VARGAS-MARTÍNEZ, et al. 2013; HOYOS, et al. 2016).

As regiões mais acometidas são: orelhas (hélice e anti-hélice), nariz, lábio superior, bochechas, pernas, mãos e antebraços. O período de incubação pode variar, desde 1 a 4 semanas, até vários anos e a lesão inicial caracteriza-se por inchaço e aumento da temperatura local. No local da picada, forma-se uma pápula assintomática eritematosa, com prurido reportado e tamanho variável, de 1 a 10 mm de diâmetro. Após 2 dias, a lesão inicial se transforma em vesícula, evolui para pústula e por fim resulta na formação de úlcera, seja de forma espontânea ou após algum trauma mecânico, assumindo uma morfologia ulcerosa de bordas nodulares, grossas ou pontudas (Figura 10). O quadro clínico é normalmente afebril com adenopatia regional (SEIDELIN, 2016).

Figura 10 – Acometimento cutâneo da Leishmaniose



Fonte: Torres-Guerrero, et al. (2017)

A LC pode curar espontaneamente em até 4 anos, quando isso acontece, a cura progride da periferia para o centro da lesão. A cicatrização espontânea deixa uma placa com pigmentação irregular e cicatrizes retráteis, bem como deformidade local devido a grande extensão do dano tecidual. Por outro lado, quando não há uma resposta imune celular do hospedeiro frente à infecção por espécies de leishmania que causam a LC, pode haver uma piora do quadro e estabelecimento da Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (ARENAS, 2015).

2.5.3.2 Leishmaniose Cutânea Difusa

A LCD resulta da disseminação do parasito através dos tecidos e fluidos corporais, como linfa e sangue. Esse tipo de acometimento cutâneo da LTA desenvolve múltiplas lesões numa extensa área da pele (Figura 11), com exceção ao couro cabeludo e, às vezes, com acometimento de mucosas. Normalmente, a LCD se inicia com a ocorrência de nódulos eritematosos enrijecidos e placas verrucosas marrom-avermelhadas, que podem aparecer no rosto e progredir para outras áreas como nádegas e mucosas, além de quase toda a superfície da pele. Os indivíduos acometidos apresentam também febre, linfadenopatia acentuada e obstrução das vias aéreas quando a mucosa está afetada. Não há relatos de cura espontânea dessa forma clínica (VERA-IZAGUIRRE, et al. 2006; REITHINGER, et al. 2007).

Figura 11 – Extensa lesão dermatológica na Leishmaniose Cutânea Difusa



Fonte: Torres-Guerrero, et al. (2017)

Além da forma difusa, foi visto que a LC localizada também pode evoluir para leishmaniose muco-cutânea (LM). Em países como Bolívia, Brasil e Peru, 90% dos casos de LTA apresentam essa variante clínica e está mais associada às espécies do complexo *L. braziliensis* (MIRANDA e GONZÁLEZ, 2017).

2.5.3.3 Leishmaniose Muco-Cutânea

O acometimento de mucosa é frequentemente observado na região nasofaríngea (Figura 12). A lesão se inicia lentamente e, muitas vezes não ocasiona nenhum desconforto inicial, não chamando a atenção dos indivíduos acometidos. Em alguns casos, as lesões causam prurido e inchaço moderado. As lesões começam na mucosa nasal e depois se espalham para outras áreas como: lábios, cavidade oral, faringe e laringe, quando estão num estado mais avançado desencadeiam muito desconforto, sendo observado dor e até caquexia em casos extremos. As lesões se iniciam com ulcerações superficiais e posterior evolução para úlceras bem delimitadas, com aspecto necrótico e destruição parcial ou total de tecidos cartilagosos, ocorre também linfadenopatia acentuada e, quando não tratada, pode levar à morte (KHEZZANI, et al. 2017; TORRES-GUERRERO, et al. 2017).

Figura 12 – Leishmaniose Muco-Cutânea “Espundia”



Fonte: Torres-Guerrero, et al. (2017)

O acometimento cutâneo, seja difuso ou mucoso, não é um sinal patognomônico da leishmaniose, não podendo ser utilizado de forma isolada na clínica para o diagnóstico da infecção por leishmania. Apesar dos avanços científicos, o diagnóstico efetivo da leishmaniose não é uma tarefa fácil, pois é necessária a associação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais para estabelecimento de um diagnóstico preciso (PAIVA-CAVALCANTI, 2015).

2.5.4 Diagnóstico

Dentre as ferramentas disponíveis para diagnóstico da leishmaniose, os testes imunológicos (Tabela 2) recebem destaque pela praticidade e precisão, e tem sido observado que, em alguns casos, tais métodos são a única forma de diagnóstico antes do início da terapia com medicamentos anti-leishmania. A associação de ferramentas imunológicas e de biologia molecular facilita o estabelecimento de um diagnóstico mais rápido e preciso, além de se mostrar útil na diferenciação dos casos de infecção por *leishmania* spp. (SOUZA, et al. 2013).

Tabela 2 – Vantagens e Limitações nos testes imunológicos utilizados no diagnóstico das leishmanioses

Método	Antígeno	Vantagem	Limitação
Reação Intradérmica de Montenegro	Mataram parasitas inteiros	Baixo custo e detecção de imunidade a células T	Não pode detectar casos de leishmaniose visceral em alguns estágios da doença. Não é possível diferenciar entre infecção e doença, nem doença ativa e progressiva. Risco de recorrência.
Ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas (ELISA)	Moléculas Recombinantes	Baixo custo e alta sensibilidade e especificidade	Sensibilidade e especificidade é altamente dependente do antígeno usado
Imunofluorescência	Mataram parasitas inteiros	Alta sensibilidade e especificidade	Processo laborioso consome de tempo e custo. Necessidade de pessoal treinado para realizar o teste.
Citometria de fluxo	Foram testadas moléculas recombinantes e / ou parasitas	Melhor sensibilidade e especificidade quando comparado com todos os outros	Custo associado a reagentes e equipamentos. Poucos estudos ainda.

	inteiros mortos	métodos. Pequena quantidade de sangue. Pode diferenciar entre infecção e doença e pacientes curados.	
Teste Rápido de Anticorpos	Moléculas Recombinantes	Baixo custo, pequena quantidade de sangue, rápido	Sensibilidade e especificidade é altamente dependente do antígeno usado
Teste de aglutinação direta	Mataram parasitas inteiros	Baixo custo, pequena quantidade de sangue	Necessidade de um longo tempo de incubação, técnicos de laboratório bem treinados, custo do antígeno e antígeno controlado de qualidade

Fonte: PAIVA-CAVALCANTE, et al. (2015)

A reação intradérmica de Montenegro tem sido utilizada como diagnóstico das formas cutâneas e apresenta-se positivo em áreas endêmicas com infecções subclínicas, porém o teste também tem algumas limitações, por exemplo, é negativo em casos de lesões recentes, na LCD e em pacientes imunodeprimidos. Na LC, a utilização da imunofluorescência indireta associada ao teste intradérmico de Montenegro ou técnica parasitológica pode fornecer um diagnóstico diferencial (BRITO, et al. 2000; SZARGIKI, et al. 2009; ALVES, et al. 2013).

A maior parte das técnicas imunológicas empregadas na busca de anticorpos anti-Leishmania baseiam-se em reações com ensaio de imunossorvente vinculado a enzimas (ELISA). Diversos antígenos foram identificados com potencial para uso diagnóstico: a proteína K-39 recombinante de leishmania; glicoproteínas recombinantes ou purificadas: gp63, gp70 e gp72; proteína A2, todas específicas para o gênero leishmania. Esta última proteína está presente em amastigotas e algumas pesquisas sugerem que ela também pode ser utilizada no rastreio da leishmaniose canina (GOMES, et al. 2002; GOMES, et al. 2008; SRIVASTAVA, et al. 2013).

Na rotina laboratorial, inúmeros kits comerciais têm sido utilizados pela facilidade de manuseio e interpretação de resultados. Os testes rápidos para leishmaniose são baseados na detecção de anticorpos específicos, no soro ou no sangue periférico de um indivíduo com leishmaniose, a exemplo disso tem-se o TRALd (Rapid Antibody Test *Leishmania donovani*). Esse teste é composto das proteínas recombinantes, rK39 e K26, fixadas em papel de nitrocelulose e pode ser utilizado como teste confirmatório quando associado a outro princípio destino, seja imunofluorescência indireta ou ELISA. O diagnóstico correto associado às medidas terapêuticas eficientes são ferramentas essenciais no controle da leishmaniose (GOMES, et al. 2008; OLIVEIRA, et al. 2011).

2.5.5 Medidas de Controle e Tratamento

A indisponibilidade de vacina para a leishmaniose associada às limitações dos recursos terapêuticos atuais, impulsiona a busca de novas drogas com ação leishmanicida. Atualmente são disponíveis três tipos de medicamentos para tratar a infecção com *leishmania* spp.: antimoniais pentavalentes, pentamidina e anfotericina B.

No Brasil, os medicamentos à base de antimônio são utilizados como primeira escolha no tratamento da leishmaniose, inclusive para indivíduos infectados pelo HIV. A dosagem recomendada para tratamento da forma cutânea é de 20 mg de antimonial pentavalentes por Kg, durante 20 dias com administração intramuscular ou intravenosa. Dependendo do número e extensão das lesões, é possível fazer aplicação tópica. Essa última forma de administração tem se mostrado menos tóxica por não desencadear reações sistêmicas, apesar das limitações (LOPES, et al. 2013).

Os antimoniais pentavalentes, apesar de serem a primeira escolha de tratamento, são muito tóxicos. Durante o tratamento podem ocorrer um ou vários dos seguintes sintomas: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, tontura, edema e insuficiência renal aguda. Na dose utilizada para o tratamento, o antimonial pode atingir o limiar de toxicidade, levando alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas ou renais e requerer modificação do tratamento (BRASIL, 2017).

Os rins são os principais responsáveis pela eliminação dos antimoniais pentavalentes da corrente sanguínea. A redução da capacidade de concentração urinária é o principal efeito nefrotóxico. A utilização da droga é contraindicada em pacientes com qualquer grau de insuficiência renal, sendo indicado o tratamento de segunda escolha, como a anfotericina B, indicada também em casos de pacientes grávidas (NEVES et al., 2011; TRACY; WEBSTER,

2001). A quimioterapia contra as leishmanioses pode ser administrada pela utilização da diamina aromática pentamidina, medicamento de segunda escolha. A pentamidina liga-se ao DNA, inibindo a replicação. No entanto, importantes efeitos colaterais como a indução do diabetes insulino dependente está associado à utilização deste tratamento. Náuseas, vômitos, dores musculoesqueléticas, cefaléia, hipotensão, lipotimia, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia, bem como dor e abscessos estéreis no local de aplicação são comuns (BRASIL, 2017).

Os fármacos a base de antimônio são utilizados a mais de 60 anos no tratamento para as leishmanioses. O aumento do número de casos de resistência aos quimioterápicos, a falha terapêutica em pacientes imunodeprimidos, bem como o conhecimento deficitário sobre os mecanismo celulares de ação dos medicamentos utilizados, inviabilizam o tratamento, constituindo-se um desafio, pois as drogas disponíveis apresentam elevada toxicidade, e nenhuma delas é bastante eficaz (SRIVASTAVA et al., 2017; De LIMA et al., 2007; HALDAR; SEN; ROY, 2011). Esses fatores motivam a busca de uma droga ideal que estabeleça uma via alternativa para o tratamento das leishmanioses.

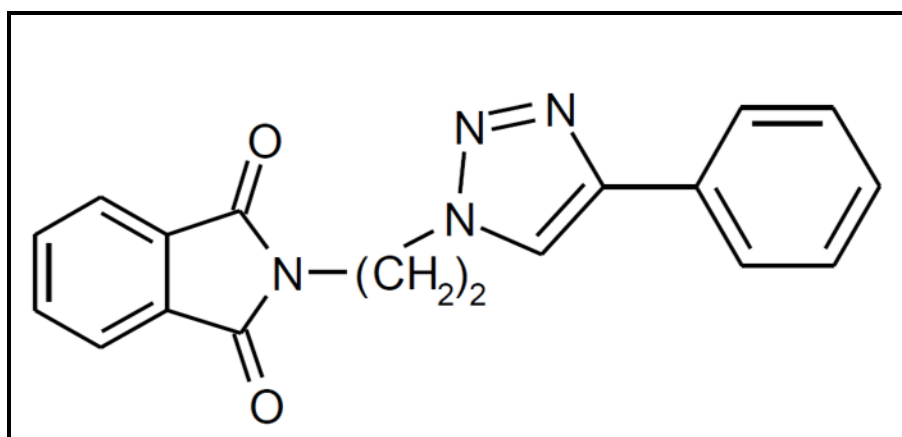
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO PT4

O derivado 4- (fenil) -1- (4-ftalimidobutil) -1,2,3- triazole (FT4) (Figura 13) foi desenhado e sintetizado de acordo com Silva et al. (2012). As anises elementares foram realizadas num analisador EA1110 CHNS-O. Os espectros de infravermelho foram registrados com um espectrofotômetro IFS66 Bruker usando discos de KBr. Obtiveram-se RMN de ^1H e ^{13}C em espectrômetro Varian Unity Plus-300 e 400 MHz utilizando CDCl_3 ou DMSO-d_6 como solvente. Os compostos foram purificados utilizando cromatografia em coluna em sílica gel Merck 60 (malha 70-230), com uma razão de sistema hexano: EtOAc (1: 1). A pureza das frações foi monitorizada em análise de TLC usando GF254.

O acetileno foi preparado de acordo com o procedimento descrito na literatura. Os dados espectroscópicos adequados também foram. Os compostos de azida foram preparados de acordo com o procedimento descrito na literatura (Barbosa e Oliveira, 2011). As RMN de ^1H e ^{13}C estão de acordo com dados previamente relatados (Barbosa e Oliveira, 2011). Os 1,2,3-triazóis foram preparados de acordo com o procedimento descrito na literatura.

Figura 13 – Estrutura Química do PT4



3.2 PARASITAS

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (LTB0016) e *L. braziliensis* (LTB2903) foram obtidas de lesões cutâneas de camundongos Balb/c e mantidas a 26 ° C em meio de Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementadas com 10 % soro fetal bovino inativado (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100 µg / mL (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, EUA). As formas amastigotas foram obtidas de macrófagos peritoneais BALB c infectados por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.

3.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O potencial citotóxico do PT4 foi avaliado conforme protocolo estabelecido por Aliança et al. (2014) com ligeiras modificações. Resumidamente, macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram plaqueadas a 5×10^5 células / poço em placa de 96 poços contendo 100 µL de meio RPMI, suplementado com 10% de FBS inativado, e incubados por 2h a 37 ° C em 5% de CO₂. Após esse tempo, as células não aderentes foram removidas por lavagem e os macrófagos aderidos foram cultivados por 48h em meio RPMI na ausência ou presença das diferentes concentrações de PT4 (100 a 6,25 µg / mL). As culas tratadas e n tratadas foram lavadas e incubadas em meio de cultura RPMI fresco, contendo 5 mg / mL de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazio (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis , MO, EUA), por um período adicional de 3h a 37°C. Após a incubação, as células foram solubilizadas em DMSO (100 µL / poço) e o precipitado de formazan derivado da redução do MTT foi determinado espectrofotometricamente a 540 nm. A concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão utilizando o software SPSS 8.0 for Windows. O índice de seletividade (IE) foi determinado como a razão de CC₅₀ para os macrófagos para IC₅₀ para os protozoários. Cada ensaio foi realizado em triplicado em dois experimentos independentes.

3.4 EFEITO LEISHMANICIDA DO PT4 NAS FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

A avaliação dos efeitos do PT4 nas formas de promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (10⁶ parasitos mL) foi realizada a partir do cultivo das células a 26 ° C em meio de cultura na ausência (células controle) ou presença de diferentes concentrações de PT4 (100 a 6,25 µg / mL). O crescimento do parasita foi determinado por contagem direta, utilizando uma câmara de contagem de Neubauer. A concentração de droga que inibiu o crescimento da cultura em 50% (IC₅₀) foi determinada por análise de regressão usando o SPSS 8.0. Para amastigotas, macrófagos peritoneais foram coletados de camundongos Balb/c e plaqueados a 1×10^6 cels / mL em placas de cultura de 24 poços, contendo meio RPMI suplementado com 10% FBS. Deixou-se os macrófagos aderirem durante 3 horas a 37°C em 5% de CO₂ e depois

infectaram com promastigotas utilizando uma razão 15:1 de parasitas / célula a 37 ° C durante 3 horas. Os parasitas não-interiorizados foram removidos por lavagem e incubados durante mais 24 h a 1/2, 1x e 2x valores de IC₅₀ determinados para formas promastigotas de cada espécie, nas mesmas condições de meio. Células infectadas cultivadas em meio isento de drogas foram usadas como controle negativo. Após o tempo de incubação, as células controles e tratadas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa.

A percentagem de células infectadas foi determinada pela contagem de 150 macrófagos escolhidos aleatoriamente em duplicado. O índice de sobrevivência foi determinado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de parasitas por célula infectada. A concentração que inibiu o crescimento amastigota (IC₅₀/ama) dentro dos macrófagos em 50% foi determinada por análise de regressão como descrito acima. O medicamento de referência Pentamidina foi utilizado como um controle positivo.

3.5 EFEITO DO PT4 NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Para quantificar a produção de óxido nítrico (NO) macrófagos infectados por *L. amazonensis* foram tratados com 6,25 a 100 µg / mL de PT4 e submetidos a 100 µL de reagente de Griess (1% sulfanilamida e 0,1% de dicloridrato de N-(1-naftil) -etilenodiamina / 2,5% de H₃PO₄) à temperatura ambiente durante 10 min. A absorbância foi medida em 540 nm no leitor GloMax multiplates (Promega, Califórnia, EUA). A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Macrófagos não infectados e células infectadas não tratadas foram utilizados como controle.

3.6 ENSAIO ULTRA-ESTRUTURAL

Para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), promastigotas tratadas e não tratadas foram fixadas por 2h em temperatura ambiente em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído / 4% paraformaldeído em 0,1 M de tampão fosfato pH 7,2. Após lavagem no mesmo tampão, as células foram pos-fixadas durante 1 h com 1% de tetróxido de ósmio / 0,8% de ferricianeto de potássio / CaCl₂ 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2. Após lavagem com tampão cacodilato, as células foram deixadas aderir a lamínulas revestidas com poli-lisina. As amostras foram desidratadas em etanol, secas em ponto crítico com CO₂ em

um Secador de Ponto Crítico HCP-2 (Hitachi, Tóquio, Japão), revestidas com uma camada de ouro de 20 nm de espessura e observadas com um elétron de varredura JEOL T-200. microscópio

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As regressões lineares foram realizadas usando o software SPSS 8.0 (IBM Co., Nova York, EUA). Os dados não paramétricos foram analisados usando análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelos testes de Dunnett ou Bonferroni. A análise estatística foi realizada no software Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Todas as análises estatísticas foram realizadas ao nível de significância $p < 0,05$.

3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os experimentos envolvendo o uso de animais experimentais foram realizados de acordo com os padrões éticos da Fundação Oswaldo Cruz e foram aprovados pelo comitê de ética (CEUA-FIOCRUZ 77/2014).

4 A NEW PHTHALIMIDE-TRIAZOLE HYBRID 4-(PHENYL)-1-(4 PHTHALIMIDOBUTYL)-1,2,3-TRIAZOLE WITH LEISHMANICIDAL ACTIVITY AND LOW CYTOTOXICITY TO MAMMALIAN CELLS

Vanderlan Nogueira Holanda^{1,4}, Shalom Porto de Oliveira Assis², Ronaldo Nascimento de Oliveira³; Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo⁴, Vera Lucia de Menezes Lima¹

¹Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP 50.670-420. Recife-PE, Brazil.

²Universidade Católica de Pernambuco, Laboratório de Biotecnologia e Ciências Ambientais, Rua do Príncipe, 526, CEP 50050-900. Recife-PE, Brazil.

³Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos CEP 5271-900, Recife-PE, Brazil.

⁴Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fiocruz, Av. Prof. Moraes Rego, Campus da UFPE, CEP 50.670-420. Recife-PE, Brazil.

Corresponding authors:

Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo
rcbqf01@gmail.com

Vera Lúcia de Menezes Lima
lima.vera.ufpe@gmail.com

ABSTRACT

Leishmaniasis is a prevalent neglected disease with high impact on the public health of many developing countries. In the search for new compounds with leishmanicidal activity the phthalimido-triazole derivatives have emerging as a promissory. In the present study we

investigated the *in vitro* effect of phenyl-1- [2- (phthalimido-2-yl) ethyl]-1H-1,2,3-triazole (PT4) on *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*, the etiological agent of cutaneous leishmaniasis. The effects of PT4 on growth and survival of promastigote and amastigote forms of parasites were evaluated by direct counting and the IC₅₀ (concentration that inhibits the parasite growth by 50 %) was estimated by regression analysis. The cytotoxicity of PT4 was evaluated on peritoneal macrophages by MTT and the NO production was measured using Greiss reagent. To analyze the morphological changes on promastigotes, scanning electron microscopy was performed. The results show that the compound obtained from the hybridization of phthalimide and 1,2,3-triazole showed promising leishmanicidal activity. The phenyl-1- [2- (phthalimido-2-yl) ethyl] -1H-1,2,3-triazole compound produced ultrastructural changes such as shrinkage of the cell body, loss of membrane integrity and significant changes in cell morphology and of the flagellum. The results showed that the compound decreased the survival of amastigotes and showed low toxicity to the host cells. There was no induction of NO increase in infected macrophages treated with the compound only in cells with no infection. According to this research, the phenyl-1- [2- (phthalimido-2-yl) ethyl] -1H-1,2,3-triazole hybrid has leishmanicidal effect and is a prototype for the development of new anti-leishmania.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; Phthalimide derivatives; Triazoles.

1. Introduction

Leishmaniasis constitutes a complex of neglected diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. These diseases are a serious public health concern, mainly in the developing countries where they are considered endemic as: India, Brazil, Sudan and Nepal. The clinical manifestations of leishmaniasis depend on the specie and strain of *Leishmania*, the degree of virulence and the immunological status of the infected host, ranging from self-resolving localized cutaneous ulcer through the more severe mucocutaneous lesions, which can cause severe deformities, to the potentially lethal systemic visceral form of disease [1]. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) comprising the cutaneous (CL) diffuse (DCL) and mucocutaneous (MCL) leishmaniasis is one of six most prevalent infectious and parasitic diseases on the planet. In Brazil, autochthonous cases of ATL were confirmed in all the federal units of the country where *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* are its main etiological agent [2].

Regardless of the clinical form of disease and in the absence of effective vaccine, the treatment of leishmaniasis still relies on pentavalent antimonial as the primary drugs. These compounds were introduced by 1920s being used nowadays despite their high toxicity and the emergence of resistance to treatment. Amphoterecin B and its liposomal formulation have been used as the second line-drug. However, prolonged administration and the adverse effects are the major shortcomings to successful treatment [3, 4]. In this regard, the search of new efficient, safe and affordable drugs for the treatment of leishmaniasis is still needed [5, 6, 7].

Phthalimides derivatives, obtained by organic synthesis, have been reported as a interesting class of compounds with large of biological activities including anticonvulsant [8], anti-inflammatory [9, 10], hypolipidemic [11, 12], analgesic [9] and antimicrobial [13]. The -CO-N(R)-CO structure and the presence of amide hydrophobic ring as functional group of phthalimides favour these compounds cross the biological membrane interacting with many essential targets involved in their biological activities and pharmaceutical use [14]. Another important class of synthetic compound, the 1,2,3, triazole, have been used as heterocyclic system in many synthetic substances and commercial pharmaceutical compounds. These nitrogen heterocyclic compounds are able to form hydrogen bounds, which improve their solubility and ability to interact with biomolecules [15, 16]. In this regard, the triazoles have been used for broad therapeutic applications due their biological activities, including trypanocidal and leishmanicidal activities [17].

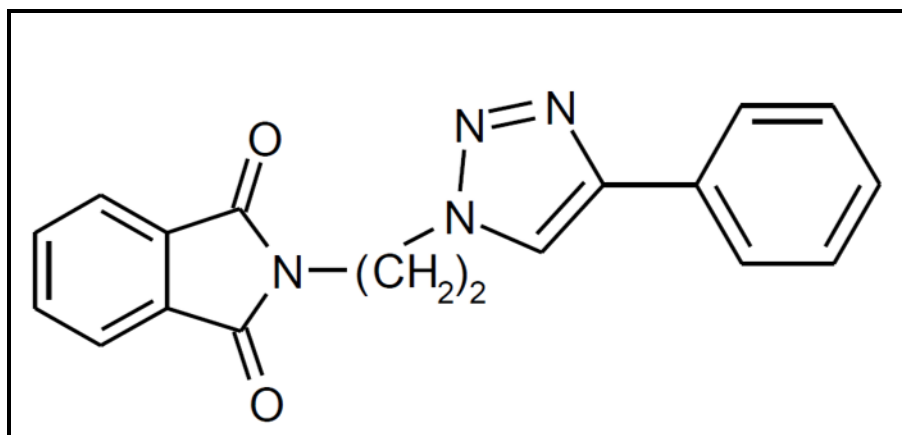
Looking at the relevant biological activities performed by phthalimides and the stability and reactivity of triazole scaffolds a series of phthalimides-1, 2,3-triazole hybrids molecules were designed and synthesised by our group and their *in vitro* activities have been evaluated in different biological models. Among these compounds the derivative 4-(phenyl)-1-(4 phthalimidobutyl)-1,2,3-triazole (PT4) has drawn attention due to its relevant anti-inflammatory activity (unpublished data). Because, ATL is characterized by important inflammatory response that ultimately leads to intense tissue destruction, a compound presenting both anti-inflammatory and microbicidal activities in a single molecules seems to be promissory as chemotherapeutic against ATL. In this work we investigated the effects of a new phthalimide-triazole hybrid molecule PT4 on the macrophages and on *Leishmania amazonensis* and *L. brasiliensis*, the main etiological agents of ATL in Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis and characterization of PT4 - The derivative 4-(phenyl)-1-(4 phthalimidobutyl)-1,2,3-triazole (PT4) (Figure 1) was designed and synthesized according to Silva et al. [18, 19]. Elemental analyses were carried out on in an EA1110 CHNS-O analyzer. The infrared spectra were recorded with an IFS66 Bruker spectrophotometer using KBr discs. ^1H and ^{13}C NMR were obtained on Varian Unity Plus-300 and 400 MHz spectrometer using CDCl_3 or $\text{DMSO}-d_6$ as the solvent. The compounds were purified using column chromatography on Merck silica gel 60 (70-230 mesh), with a system hexane:EtOAc (1:1) ratio. The purity of fractions was monitored in TLC analysis using GF₂₅₄.

The acetylene was prepared according to the procedure described in the literature. The adequate spectroscopic data [19] was, as well. The azide compounds were prepared according to the procedure described in the literature (Barbosa and Oliveira, 2011). The ^1H and ^{13}C NMR are in accordance with previously reported data (Barbosa and Oliveira, 2011). The 1,2,3-triazoles were prepared according to the procedure described in the literature [18]. The compound PT4 was synthesized and had the following characteristics colorless solid; mp 187-189 °C (Lit. 157-158 °C); R_f 0.4 (EtOAc-Hexane, 1:1); IR (KBr) ν_{max} 3126, 2952, 1774, 1716, 1464, 1432, 1396, 1231, 1078, 765, 720 cm^{-1} .

Fig. 1. Chemical structure of 4-(phenyl)-1-(4 phthalimidobutyl)-1,2,3-triazole



2.2. Parasites - Promastigote forms of *L. amazonensis* (LTB0016) e *L. braziliensis* (LTB2903) were obtained from Balb/c mice cutaneous lesions and maintained at 26 ° C in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) supplemented with 10% soro fetal bovino inativado (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) and 100 µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Amastigote forms were obtained from *L. amazonensis*- and *L. braziliensis*- infected BALB/c peritoneal macrophages.

2.3. Cytotoxicity assay - The cytotoxic potential of PT4 was evaluated according to protocol established by Aliança, et al. [20] with slight modifications. Briefly, Peritoneal macrophages from Balb/c mice were plated at 5×10^4 cell/well in 96-well plate containing 100 µL of RPMI medium, supplemented with 10% inactivated FBS, and incubated for 2h at 37 °C in 5% CO₂. After this time, non-adherent cell were removed by washing and the adhered macrophages were cultivated for 48 h in RPMI in the absence or presence of the different concentrations of PT4 (100 a 6.25 µg/mL). Treated and untreated cells were washed and incubated in fresh RPMI culture medium, containing 5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), for an additional 3 h at 37 °C. After the incubation, the cells were solubilized in DMSO (100 µL/well) and the formazan precipitate derived from MTT reduction was determined spectrophotometrically at 540 nm. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined by regression analysis using the software SPSS 8.0 for Windows. The selectivity index (SI) was determined as the ratio of CC₅₀ for the macrophages to IC₅₀ for the protozoa. Each assay was carried out in triplicates in two independent experiments.

2.4. Leishmanicidal effect of PT4 on promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* - To evaluate the effects of PT4 on forms of *L. braziliensis* and *L. amazonensis* promastigotes (10^6 parasites/mL) were incubated at 26°C in culture medium in absence (control cells) or presence of different concentrations of PT4 (100 a 6.25 µg/mL). The parasite growth was determined by direct counting using a Neubauer counting chamber. The drug concentration that inhibited the culture growth by 50% (IC₅₀) was determined by regression analysis using the SPSS 8.0. For amastigotes, peritoneal macrophages were collected from Balb/c mice and plated at 1×10^6 cels/mL in a 24-well culture plates, containing RPMI medium supplemented with 10% FBS. The macrophages were allowed to adhere for 3 h at 37 °C in 5% CO₂ and then infected with promastigotes using a ratio 15:1 parasites/cell at 37 °C for 3 h. Non-interiorized parasites were removed by washing and incubated for additional 24 h at 1/2, 1x and 2x IC₅₀ values determined for promastigote forms of each species, in same medium conditions. Infected cells cultivated in drug free medium were used as negative control. After incubation time, control and treated cells were washed with PBS, fixed with methanol and stained with Giemsa. The percentage of infected cells was determined by counting 150 randomly chosen macrophages in duplicate. The survival index was determined by multiplying the percentage of infected macrophages by the mean number of parasites per infected cell. The concentration that inhibited the amastigote growth (IC_{50/ama}) within the macrophages by 50% was determined by regression analysis as described above. The reference drug pentamidine was used as a positive control.

2.5. Effect of PT4 on Nitric oxide (NO) production by macrophages - In order to quantify the NO production by macrophages, *L. amazonensis*-infected macrophages were treated with 6.25 to 100 µg/ mL PT4 and submitted to 100 µL of Griess reagent (1% sulphanilamide and 0.1% of N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄) at room temperature for 10 min. The absorbance was measured in 540 nm at GloMax multiplates reader (Promega, Califórnia, EUA). The concentration of nitrite was determined using a standard curve of sodium nitrite. Non-infected macrophages and non-treated infected cells were used as control.

2.6. Ultrastructural assay - For scanning electron microscopy (SEM), treated and untreated promastigotes were fixed for 2 h at room temperature in a solution containing 2.5% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. After washing in the same buffer, the cells were post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide/5 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. and post-fixed. After washing

with Cacodylate buffer, the cells were allowed to adhere to poly-lysine-coated coverslips. The samples were dehydrated in ethanol, critical-point-dried with CO₂ in a HCP-2 Critical Point Dryer (Hitachi, Tokyo, Japan), coated with a 20 nm-thick gold layer, and observed with a JEOL T-200 scanning electron microscope.

2.7. Statistic Assay - Linear regressions was performed using SPSS 8.0 software (IBM Co., Nova York, EUA). Nonparametric data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Bonferroni's *post hoc* test. The statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). All of the statistical analyses were performed at the $p < 0.05$ level of significance.

2.8. Ethical considerations - All experiments involving the use of experimental animals were performed in accordance to the ethical standards of Fundação Oswaldo Cruz and were approved by the ethics committee (CEUA-FIOCRUZ 77/2014).

3. Results and Discussion

Drug discovery can be hampered by slow, high cost and complex synthesis. Click chemistry has been proven to furnish a set of powerful, selective and modular building blocks with valuable pharmacological activity. [21] phthalimides and 1,2,3-triazoles derivatives obtained by click reactions have shown diverse biological activities as anticancer [22], antibacterial [13] due to their stability, good yield, high selectivity among other advantages [23, 24]. In a previous study used 1,3, dipolar cycloaddition reaction to obtain O-benzenocercarine-1,2,3-triazoles derivatives with promising antileishmanial activity [25]. Herein we investigate the leishmanicidal effect of phthalimide-triazole hybrid compound (PT4) with anti-inflammatory activity, obtained by click chemistry reaction on the etiological agents of ATL in Brazil.

3.1. Cytotoxicity of PT4 on peritoneal macrophages

Because *Leishmania* parasites are obligatory intracellular pathogens, macrophages are indispensable for parasite survival [26] and also the main cell type to suffer the deleterious effects of parasite infection [27, 28]. In this regard, the investigation of cytotoxicity/cytoprotector potential of a given compound on macrophages is an important issue

to be considered in the prospection of leader molecules with leishmanicidal activity. Our results showed, that PT4 has dose-dependent cytotoxic effect on macrophages as determined by MTT technique. However, even at higher concentration tested of 400 $\mu\text{g/mL}$ the PT4 was not able to decrease the cell viability to values lower than 42.61% (Figure 2). The $\text{IC}_{50/48\text{h}}$ value was 312.74 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1).

Figure 2. Effect of PT4 on the viability of peritoneal macrophages.

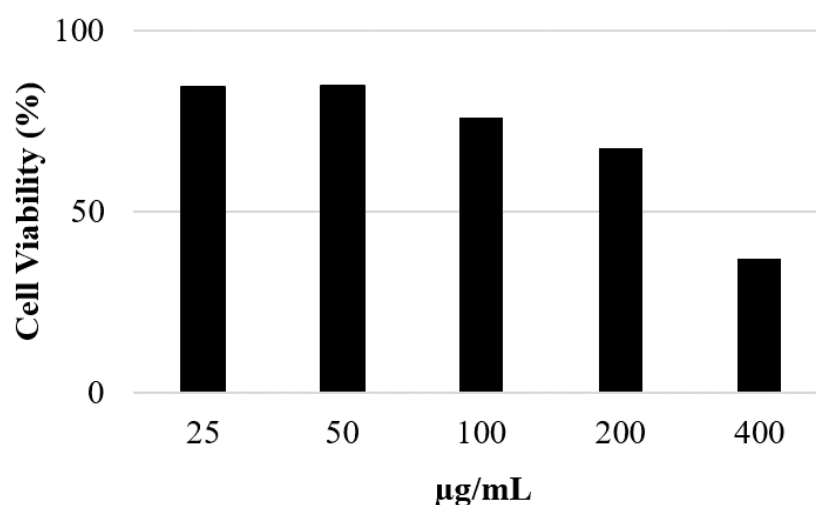


Table 1. Leishmanicidal and cytotoxic effects of FT4

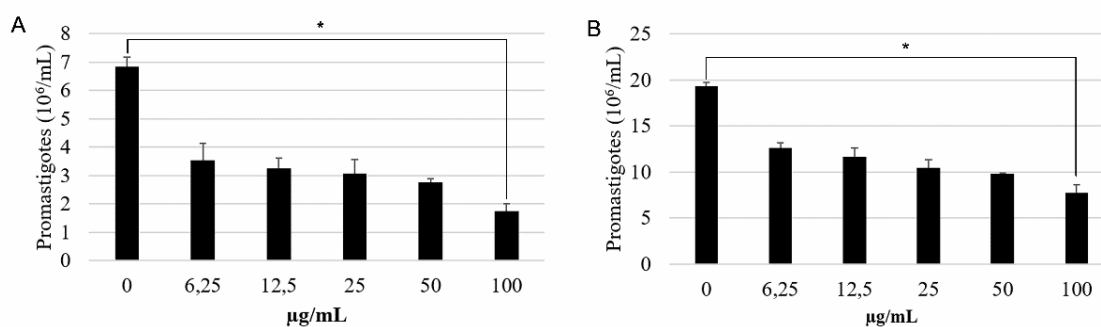
Cell type	$\mu\text{g/mL}$			SI	
	CC50	IC50/pro	IC50/ama	pro	ama
Macrophage	312.74 $\pm$ 81.63	-	-	-	-
<i>L. amazonensis</i>	-	22.43 $\pm$ 7.50	39.85 $\pm$ 1.05	13.94	7.84
<i>L. braziliensis</i>	-	57.85 $\pm$ 8.13	74.23 $\pm$ 1.19	5.40	4.21

SI = selectivity index; pro = promastigotes; ama = amastigote.

3.2. The PT4 inhibited the growth of promastigotes and decrease the survival of amastigotes inside the macrophages infected with *L. amazonensis* and *L. braziliensis*

The derivative 4-(phenyl)-1-(4phthalimidobuthyl)-1,2,3-triazole inhibited significantly the growth of promastigote forms of both species of *Leishmania* tested, in a dose-dependent manner after 48 hours of incubation. However, none of the concentrations tested was able to cause 100% of growth of the parasites (Figure 3). *L. amazonensis* were more susceptible to treatment with PT4 than *L. braziliensis* with an estimated IC₅₀ of 22.43 and 57.85 µg/mL, respectively (Table 1). Biochemical/molecular differences between the species of *Leishmania* are well known in the literature [29]. Taking this in account, the differences in PT4 susceptibility found between *L. amazonensis* and *L. braziliensis* could be explained by biochemical and molecular variations existing between these species such as: the rate of parasite division, differential permeability and plasma membrane composition and varied intracellular target [30, 31].

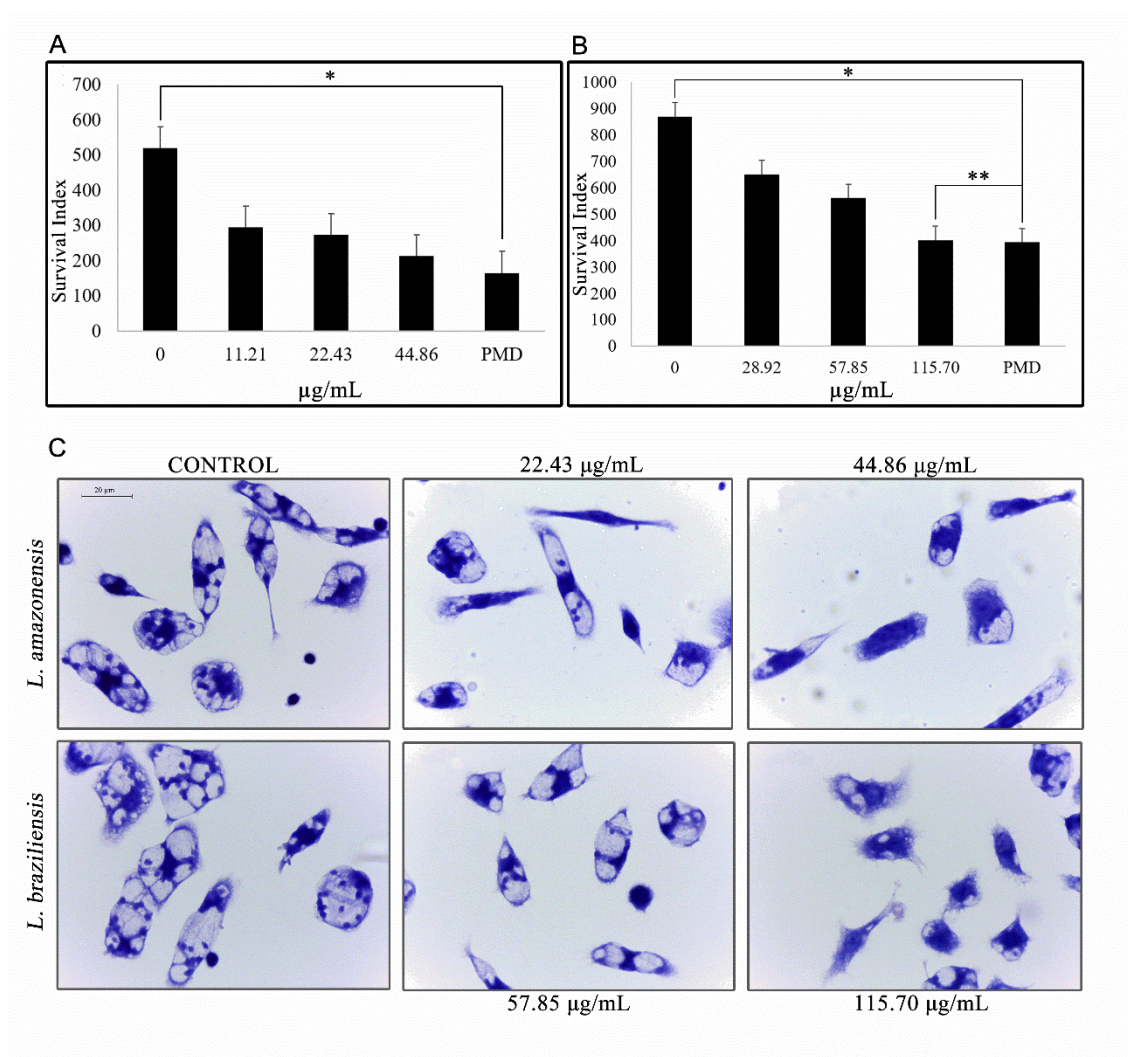
Figure 3. Effect of FT4 on *L. amazonensis* (A) and *L. braziliensis* (B) promastigotes forms. Each bar represents the mean ± standart deviation of three independent experiments in triplicate.



As expected the reference drug pentamidine (10 µg/mL) significantly inhibited the survival of amastigotes within the macrophages infected with both species of *Leishmania*. The PT4 was also able to decrease significantly the survival of amastigote in all concentrations tested. However, only at higher concentration (115.70 µg/mL) PT4 presented inhibitory activity comparable to the reference drug (Figure 4). Amastigote forms were more resistant to the treatment than promastigote forms. It is important to emphasize that the difference in the PT4 susceptibility between promastigotes of *L. amazonensis* and *L. brasiliensis* is also observed in the amastigote forms of parasite. The IC₅₀ values were 39.85 and 74.23 µg/mL for amastigote forms of *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectively.

The effect of triazole derivatives on *Leishmania* have been already reported. Tahghghi, et al. [32] showed that the compound *N*-[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl], reduced the number of *Leishmania major* amastigotes within macrophages. Marin, et al. [33] also have described the inhibitory effects effects of nitroindazoles derivatives on the survival of intracellular amastigotes of *L. infantum* e *L. brasiliensis*

Figure 4. Effect of FT4 on *Leishmania amazonensis* (A) and *Leishmania braziliensis* amastigote survival inside macrophages. Each column represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments in duplicate. (C) Light microscopy of Giemsa-stained control (C1) and PT4-treated macrophages and 44.86 μ g/mL of PT4



The effective internalization and intracellular accumulation is essential for leishmanicidal activity of drugs, and a clear correlation between drug uptake and susceptibility has been reported for miltefosine, for example [30]. In this context, the

hydrophobic/lipophilic feature of some compounds seems to have a pivotal role in the biological activity against *Leishmania sp.*, Pinto et al. [34], studying a series of naphthoquinones derivatives showed that the presence of hydrophobic phenyl groups in their structures conferred greater inhibitory activity against *L. infatum* than those in which these chemical groups were absent. In a previous work the substitution of benzophenones by alkyl groups increase the effectiveness of their hydroxylated precursors against suggesting that the increase of lipophilicity of these compounds allowing them to cross the host and parasites membranes [35]. This lipophilic feature of compounds is particularly important for drugs gain access to intracellular amastigote forms, which reside and divided into the parasitophorous vacuoles of host cells. However, Silva, et al. [36] showed that the increase of lipophilicity decrease the antiparasitic activity of thiosemicarbazones against *L. amazonensis*. This apparent contradictory result suggested that other factors as size and solubility in vitro test condition can influence the effect of hydrophobic/lipophilic compounds on parasites [37].

The introduction of nitrogen moieties, as 1,2,3-triazole rings to PT4 might result in an improvement of the solubility of phthalimide throughout parasite and host lipid cell membranes. Furthermore, 1,2,3-triazole core is stable against acid and basic hydrolysis, as well as oxidative e reductive conditions, conferring a high stability and resistance to metabolic degradation [38] . Besides confers stability to hybrid molecules, the presence of triazole group in PT4 can also contribute directly to the observed antileishmanial activity of this compound. Consistently, other triazolic compounds have already reported in the literature as presenting leishmanicidal activity higher than the reference drug against *Leishmania sp.* Gontijo et al. [39] showed that an alkyltriazole derivative presenting 1,2,3-triazole group strongly inhibited the *L. amazonensis* promastigote growth. Corrales, et al. [40] also demonstrated that 6-thiopurine-,2,3-triazole derivatives were effective against promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*. Dwivedi, et al. [25] studying a series of O-benzenocercetine linked to 1,2,3- triazole demonstrated that this chemical group was involved in the leishmanicidal activity of hybrid molecules. Besides presenting a phenyl group linked to pharmacophoric triazole unit, the PT4 also has a alkyl group jointing the 1,2,3-triazole core to aromatic ring of phthalimides. Taken together these chemical groups can be direct involved in the leishmanicidal activity of PT4.

3.3. The PT4 was more selective against promastigote and amastigote forms of leishmanial than to mammalian cells

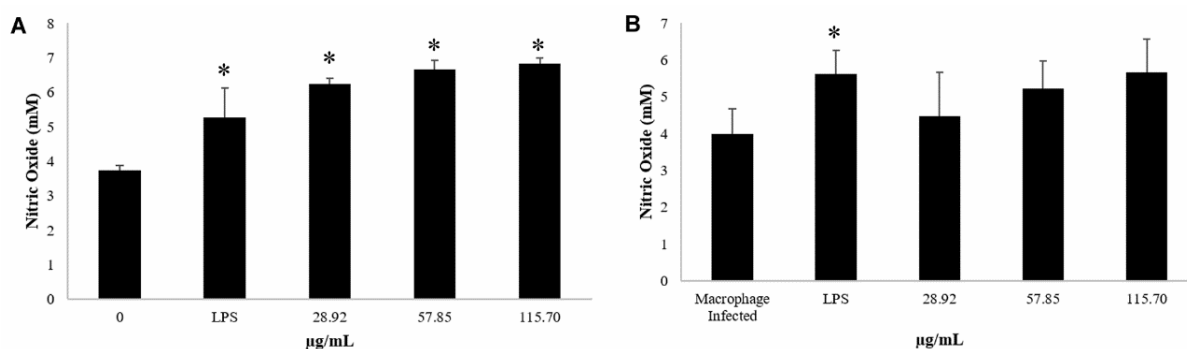
One the most important disadvantage of currently used chemotherapy for leishmaniasis is the lack of specificity of drugs towards the parasite, usually resulting in high toxicity to mammalian cells [41]. Thus, the selectivity index (SI), namely the ratio of IC_{50} against host cells to IC_{50} against the parasite, is also an important parameter [42]. Although in this work the compound PT4 has exhibited some cytotoxic effect to mammalian cells ($CC_{50}/48h = 312.74 \mu g/mL$) we have found that this compound was more selective to parasite than to peritoneal macrophages, with SI of 13.94 and 5.40 for promastigote and 7.84 and 4.21 for amastigotes from *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively (Table 2). Taking in account that intracellular amastigote forms were the most relevant for the pathology of disease, a $IS > 1$ favour the amastigote death and could determine the outcome of the disease. Papadopoulou et al. [42] investigating the biological activity of a series of novel 2-nitro-1H-imidazole- and 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based aromatic and aliphatic amines established that as ideal IS values ≥ 20 for *L. donovani* axenic amastigotes. Although our IS values for amastigotes were lower than those reported by this authors, it is important to emphasize that we tested the compound on intracellular amastigote which reside inside the parasitophorous vacuoles and consequently should be less accessible to drugs than axenic amastigote forms. Furthermore, as mentioned before we showed that at $44.86 \mu g/mL$ (6 fold smaller than CC_{50} values for peritoneal macrophages) the PT4 had an effect comparable to the reference drug. Tahghighi, et al. [32] showed a triazole group containing molecules with leishmanicidal activity higher than the drug the reference drug. The higher leishmanicidal effect of PT4 against amastigote comparing with the cytotoxicity to peritoneal macrophages, especially in *L. braziliensis*, points this compound as promissory agent against ATL. Although the mechanisms behind the action of PT4 on the parasite and mammalian cell have been not elucidated yet, it is already reported in the literature that drug containing nitroheterocyclic groups, as PT4 may function as prodrugs which must undergo enzyme-mediated activation on the pathogen to be effective [42]. Upon be activated, the nitroheterocyclic compound induced oxidative stress through 1-electron reduction of its nitro-group and subsequently formation of superoxide anion, which ultimately can lead to the parasite death [42]. Beside the triazole group the pthalimides have been reported as non-toxic and well tolerated by mammalian cells [43]. Rani, et al. [44], demonstrated that the pthalimide derivative 4-aminoquinoline-phthalimide presented a high selective antimalarial activity with no cytotoxicity to J774.

Bach, et al. [43] synthesized and evaluated the cytotoxicity of novel phthalimide heterocyclic compounds with low cytotoxicity to RAW 264.7 macrophages.

3.4. The PT affected differentially the production of NO in uninfected and infected macrophages.

Because nitric oxide (NO), produced by macrophages, is the most important molecules responsible for the killing of leishmania parasites, we investigated the effect of PT4 on uninfected and infected-macrophages. Our results showed that PT4 induced a significant increase in NO production in non-infected macrophages at higher levels compared to untreated and LPS-treated macrophages (Figure 5A). Several works have demonstrated that *Leishmania sp.* can subvert host defenses by inhibiting NO production by macrophages and thereby favouring its survival and replication inside these cells [45]. Our results showed that PT4 was not able to revert the inhibitory effect of the parasite on macrophages infected with both leishmania species at any concentration tested (Figure 5B). Similar results were found for other triazole compounds in macrophages infected by *Leishmania infantum* [46]. These results suggest that the inhibitory effect on amastigote found in PT4-treated macrophages did not depend on the enhancement of NO production by macrophages.

Figure 5. Effect of the FT4 on the production of nitric oxide (μM) by macrophages. **(A)** Levels of nitric oxide in the supernatant of uninfected macrophages; **(B)** Levels of nitric oxide in the supernatant of infected macrophages.



*Significant difference of each group compared to the control group ($p \leq 0.05$).

3.5. PT4 affect the morphology of *L. amazonensis* and *L. braziliensis*

In order to investigate the effects of PT4 on the ultrastructure of promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* Scanning Electron Microscopy assay was performed. Control cell presented a spindle shaped, twisted cell body and smooth plasma membrane (Figures 6A-B and 7A-B). An elongated flagellum is observed in most of the control cells (Figures 6A-B and 7A-B). Treatment with PT4 induced dose-dependent morphological changes in promastigote of both species of *Leishmania* tested (Figures 6C-F and 7C-F). The most prominent alterations were increased promastigote volume (Figure 6F) with shortening and rounding of cell body (Figure 7D). The plasma membranes became rough (figure 6F) and abnormal dividing cells, with more than one flagellum was commonly observed (Figures 7D, 6E). Some drastically affected cells were found ruptured (Figure 7C) or containing perforations in the cell membrane (Figure 6F). These latter cell changes were compatible with loss of plasma membrane integrity and cell death.

An interesting finding was the presence of membrane blebbing budding from parasite surface, mainly in *Leishmania braziliensis* treated parasites. Cellular blebbing has been reported as a singular form of dynamic protrusion emanating from the plasma membrane, in response to wide mechanical or chemical stimuli, which can be related to either apoptotic and non-apoptotic process [47]. Alterations in cell membrane as observed in PT4-treated cells have been also reported in *Leishmania* species treated with triazole derivatives [48] and can be strongly associated to inhibition of important steps of membrane synthesis. In agreement with this idea, Singh, et al. [49] demonstrated that triazole compounds were able to inhibit the enzyme methylsterol 14-demethylase of *Leishmania*, which is essential for the synthesis of structural membrane lipids.

Figure 6. The Effects of PT4 on *Leishmania amazonensis* ultrastructure as observed by scanning electron microscopy. (A-B) Control promastigotes showing spindle shape bodies, normal length flagellum and smooth surface (C-D) Promastigotes treated with 22.43 $\mu\text{g/mL}$ of cPT4. (E-F) Promastigotes treated with 44.86 $\mu\text{g/mL}$ of PT4

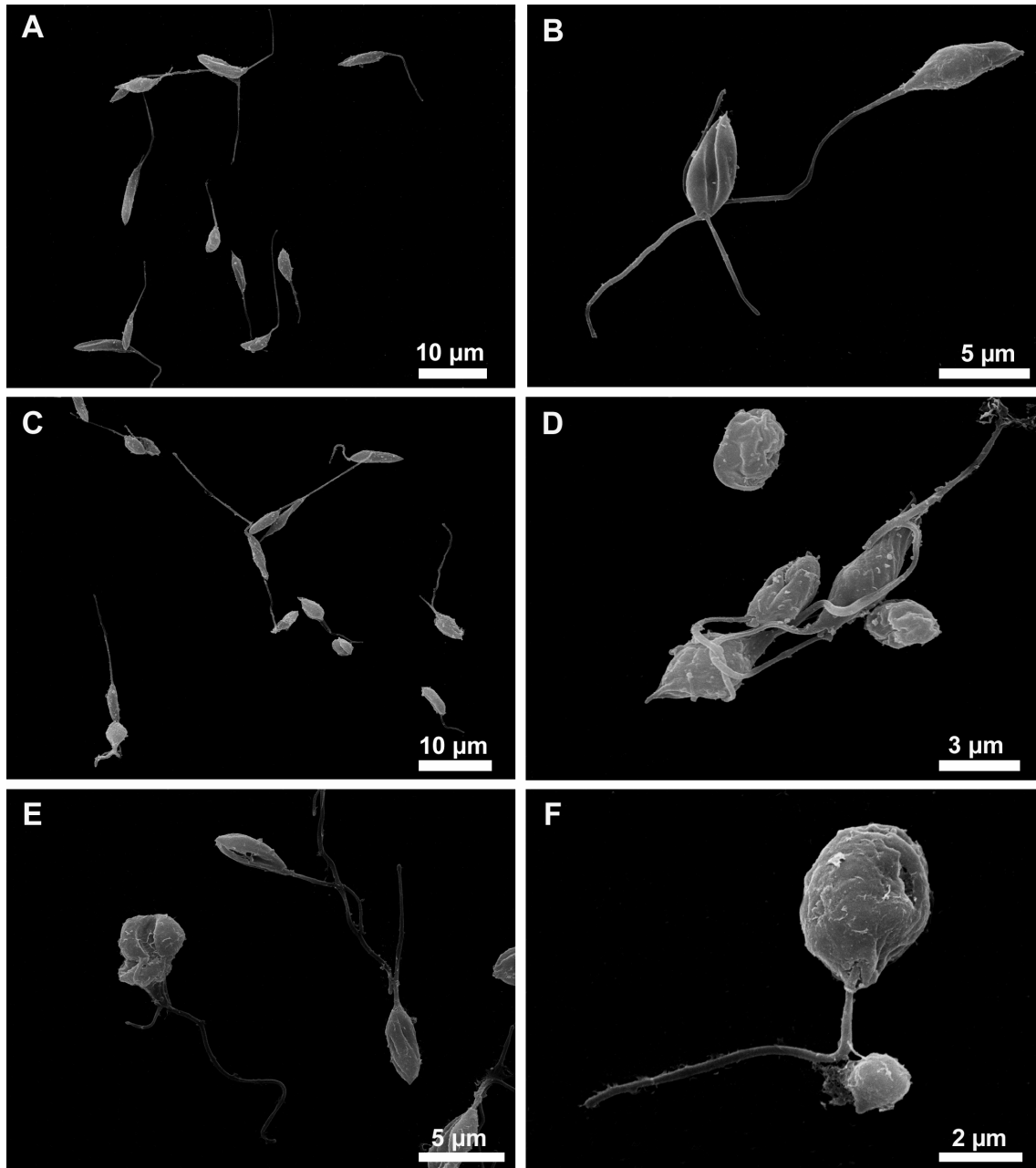
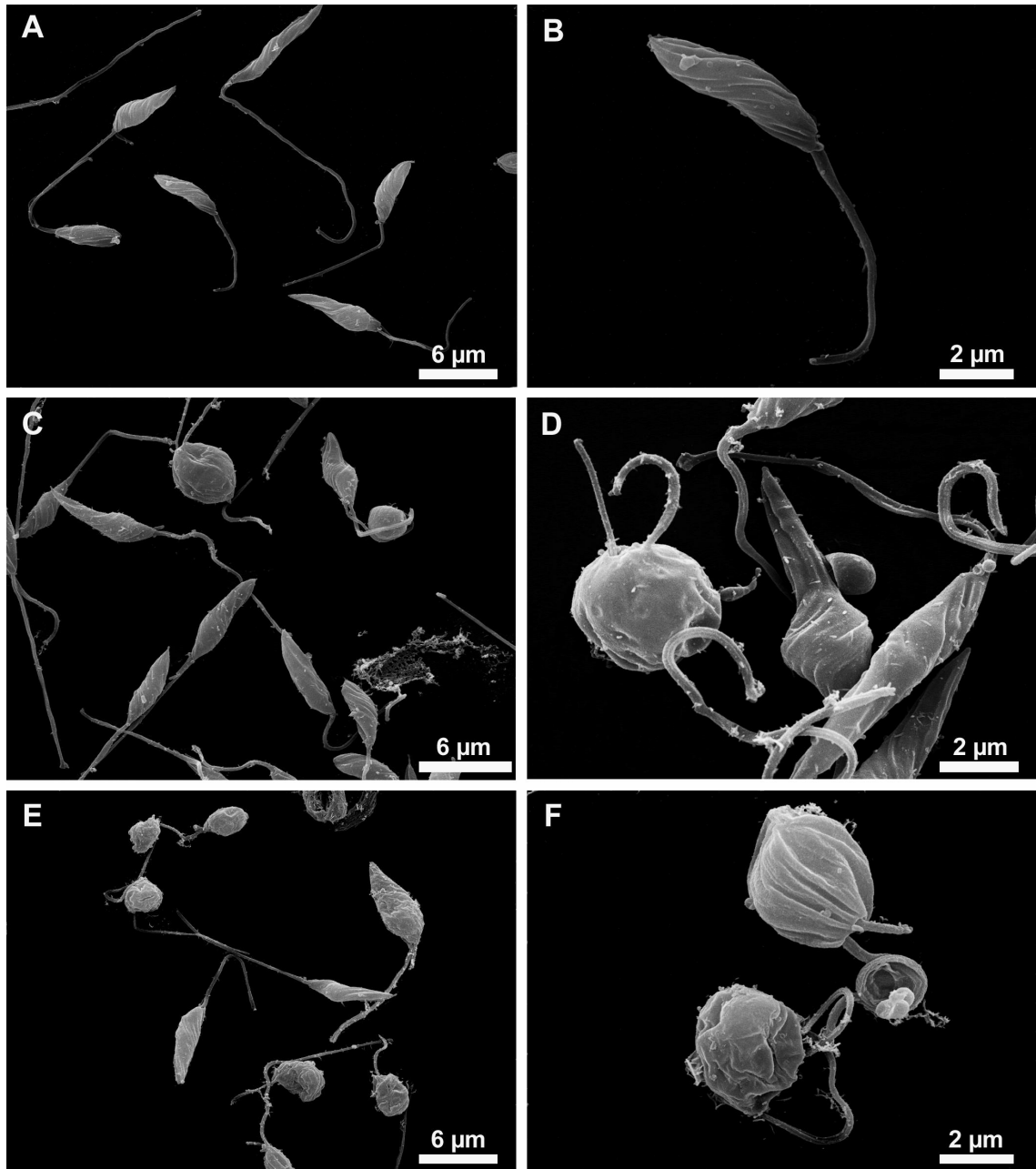


Figure 7. The Effects of PT4 on *Leishmania braziliensis* ultrastructure as observed by scanning electron microscopy. (A-B) Control promastigotes showing spindle shape bodies, normal length flagellum and smooth surface (C-D) Promastigotes treated with 57.85 $\mu\text{g/mL}$ of cPT4. (E-F) Promastigotes treated with 115.70 $\mu\text{g/mL}$ of PT4.



4. Conclusions

Taken together our results showed that the compound 4-(phenyl)-1-(4 phthalimidobutyl)-1,2,3-triazole, obtained by click chemistry reaction, was effective in inducing the inhibition growth of promastigote and the survival of *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis* amastigotes inside peritoneal macrophages. This compound was more selective against the parasite than the peritoneal macrophages leading to important morphological changes, which can result in the parasite death. Further studies are still necessary to elucidate the mechanism the action of this phthalimide-triazole hybrid molecule on both mammalian and parasite cells.

5. References

- [1] LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world Leishmaniasis - The Neotropical Leishmania species. Topley & Wilson. Microbiology and Microbial Infections. 9^a ed. London: Ed. Feg Cox. 1988.
- [2] GOSCH, C. S.; MARQUES, C. P.; RESENDE, B. S.; SOUZA, J. D. S.; ROCHA, R. A. D. S.; LOPES, D. S. S.; GOSCH, M. S., DIAS, F. R.; DORTA, M. L. American tegumentary leishmaniasis: epidemiological and molecular characterization of prevalent Leishmania species in the State of Tocantins, Brazil, 2011-2015. Rev Inst Med Trop v. 21, 59:91. 2017. doi: 10.1590/S1678-9946201759091.
- [3] PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J. C.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Negl Trop Dis. 2017. doi: 10.1371/journal.pntd.0006052.
- [4] GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Review of Anti-Infective Therapy, Londres, v.8, p.419-433. 2010.

- [5] PELISSARI, D. M.; CECHINEL, M. P.; SOUSA-GOMES, M. L.; et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v. 20, p. 107 – 110. 2011.
- [6] RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discovery Today*, v. 20, n. 8. DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.04.006](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.04.006). 2015.
- [7] BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 1-191. 2017.
- [8] OBNISKA, J.; WIKLIK, B.; ATAMANYUK, D. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs, *Eur. J. Med. Chem.*, v.46, n.1 p. 4634–4641. 2011.
- [9] ALANAZI, A. M.; EL-AZAB, A. S.; AL-SUWAIDAN, A.; ELDIN, K.; ELTAHIR, H.; ASIRI, Y. A.; ABDEL-AZIZ, N. I.; ABDEL-AZIS, A. A. Structure-based design of phthalimide derivatives as potential cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: anti-inflammatory and analgesic activities, *Eur. J. Med. Chem.*, v. 92, n. 1. p. 115–123. 2015.
- [10] JOSÉ, J.; BOLLINI, M.; ELISA, M.; MARÍA, A. Thalidomide analogues: tumor necrosis factor- α inhibitors and their evaluation as anti-inflammatory agents *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 83, n. 1. p. 2016.
- [11] CHAPMAN, J. N.; COCOLAS, G. H.; HALL, I. H. Phthalimide Derivatives IV: Further Chemical Modification and Investigation of the Hypolipidemic Activity of N-Substituted Imides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 72, n. 11. 1344-1347. 1983.
- [12] ABDEL-AZIZ, A.A.; EL-ZAB, A. S.; ATTIA, S. M.; AL-OBAID, A. M.; AL-OMAR, M. A.; EL-SUBBAGH, H. I. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides

as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agents, *Eur. J. Med. Chem.*, v. 46, n. 1. p. 4324–4329. 2011.

[13] SINGH, G.; SAROA, A.; GIRDHAR, S.; RANI, S.; SAHOO, S.; CHOQUESILLO-LAZARTE, D. Synthesis, characterization, electronic absorption and antimicrobial studies of N-(silatranylpropyl) phthalimide derived from phthalic anhydride, *Inorg. Chim. Acta*, v. 427, n. 1. p. 232–239. 2015.

[14] KUSHWAHA, N.; KAUSHIK, D. Recent advances and future prospects of phthalimides derivatives. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 6., n. 3. 2016. DOI: 10.7324/JAPS.2016.60330

[15] LÓPEZ-ROJAS, P.; JANECZO, M.; KUBNSKI, K.; AMAESTY, A.; MASLYL, M. ESTÉVEZ-BRAUN, A. Synthesis and Antimicrobial Activity of 4-Substituted 1,2,3-Triazole-Coumarin Derivatives. *Molecules*, v. 18, n. 23(1). 2018. DOI: 10.3390/molecules23010199.

[16] DANGROO, N. A.; DAR, A. A.; SHANKAR, R.; KHUROO, M. A.; SANGWAN, P. L. An efficient synthesis of phosphoramidates from halides in aqueous ethanol, *Tetrahedron Letters*, v. 57, n. 25. p. 2717-2722. 2016. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.05.003

[17] DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal Attributes of 1,2,3-triazoles: current developments. *Bioorganic Chemistry*, v. 71. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.01.010>.

[18] SILVA, M. T.; OLIVEIRA, R. N.; VALENÇA, W. O.; BARBOSA, F. C. G.; SILVA, M. G.; CAMARA, C. A. Synthesis of N-Substituted Phthalimidoalkyl 1H-1,2,3-Triazoles: a Molecular Diversity Combining Click Chemistry and Ultrasound Irradiation. *J Braz Chem Soc* 23: 1839-1843. 2012.

- [19] SILVA, G. B.; GUIMARÃES, B. M.; ASSIS, S. P. O.; LIMA, V. L. M.; DE OLIVEIRA, R. N. Ultrasound- Assisted Synthesis of 1-*N*- β -D-Glucopyranosyl-1H-1,2,3-triazole Benzoheterocycles and their Anti-Inflammatory Activities. *J Braz Chem Soc* 24: 914-92. 2013.
- [20] ALIANÇA, A. S. S.; ANJOS, K. F. L.; REIS, T. N. V.; HIGINO, T. M. M.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. A.; BIANCO, E. M.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. The *in vitro* Biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*, v. 19. 2014. DOI: 10.3390/molecules190914052.
- [21] MA, N.; WANG, Y.; ZHAO, B. X.; YE, W. C.; JIANG, S. The application of click chemistry in the synthesis of agents with anticancer activity. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 9. 2015. DOI: 10.2147/DDDT.S56038.
- [22] KOK, S. H.; GAMBARI, R.; CHUI, C. H.; YUEN, M. C.; LIN, E.; WONG, R. S.; LAU, F. Y.; CHENG, G. Y.; LAM, W. S.; LAM, K. H.; CHENG, C. H.; LAI, P. B.; YU, M. W.; CHEUNG, F.; TANG, J. C.; CHAN, A. S. Synthesis and anti-cancer activity of benzothiazole containing phthalimide on human carcinoma cell lines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 1. 2008. DOI: 10.1016/j.bmc.2008.02.005
- [23] CANALLE, L. A.; BERKEL, S. S.; HAAN, L. T.; HEST, J. C. M. Copper-Free Clickable Coatings. *Advanced Functional Materials*. 2009. DOI: 10.1002/adfm.200900743
- [24] MEGHANI, N. M.; AMIN, H. H.; LEE, B. Mechanistic applications of click chemistry for pharmaceutical drug discovery and drug delivery. *Drug Discovery Today*. 2017. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2017.07.007
- [25] DWIVEDI, P.; MISHRA, K. B.; MISHRA, B. B.; SINGH, N.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Click inspired synthesis of antileishmanial triazolyl O-benzylquercetin glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*. 2015. DOI: 10.1007/s10719-015-9582-x

- [26] LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 83, n. 2. 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00083
- [27] ISNARD, A.; CHRISTIAN, J. G.; KODIHA, M.; STOCHAJ, U.; MCMASTER, W. R.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity. *PLOS Pathogens*, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004776>
- [28] FILARDY, A. A.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; KOELLER, C. M.; GUIMARÃES-PINTO, K.; RIBEIRO-GOMES, F. L.; LOPES, M. F.; HEISE, N.; FRIRE-DE-LIMA, C. G.; NUNES, M. P.; DOS REIS, G. A. Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. *PLOS One*, 9;9(1). 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085715
- [29] CROFT, S. L.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96. 2002.
- [30] COELHO, A. C. Miltefoine susceptibility and resistance in *Leishmania*: from the laboratory to the field. *Journal of Tropical Diseases*, 4:2. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/2329-891X.1000203>
- [31] COELHO, A. C.; TRINCONI, C. T.; COSTA, C. H. N.; ULIANA, S. R. B. In vitro and in vivo Miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2014. DOI: doi.org/10.1371/journal.pntd.0002999
- [32] TAHGHIGHI, A.; RAZMI, S.; MAHDAVI, M.; FOROUMADI, P.; ARDESTANI, S. K.; EMAMI, S.; KOBARFARD, F.; DASTMALCHI, S.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A.

Synthesis and anti-leishmanial activity of 5-(5-nitrofur-2-yl)-1,3,4-thiadiazol-2-amines containing N-[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] moieties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 50:142-8. 2012. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.01.046

[33] MARÍN, C.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; ROSALES, M. J.; MURO, B.; REVIRIEGO, F.; NAVARRO, P.; ARÁN, V. J.; SÁNCHEZ-MORENO, M. In vitro leishmanicidal activity of 1,3-disubstitued 5-nitroindazoles. *Acta Tropica*, 2015. DOI:10.1016/j.actatropica.2015.04.028

[34] PINTO, E. G.; SANTOS, I. O.; SCHMIDT, T. J.; BORBOREMA, S. E. T.; FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; TEMPONE, A. G. Potential of 2-Hydroxy-3-Phenylsulfanylmethyl-[1,4]-Naphthoquinones against *Leishmania (L.) infantum*: biological activity and structure-activity relationships. *Plos One*. 2014. DOI: 0.1371/journal.pone.0105127

[35] MACIEL-REZENDE, C. M.; ALMEIDA, L.; COSTA, É. D.; PIRES, F. R.; ALVES, K. F.; VIEGAS, C. J.; DIAS, D. F.; DORIGUETTO, A. C.; MARQUES, M. J.; SANTOS, M. H. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(11). 2013. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.03.045

[36] SILVA, A. C.; SANTOS, T. A. R.; SILVA, I. V. B.; OLIVEIRA, M. V. G.; MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; PEREIRA, V. R. A. Aryl thiosemicarbazones: in vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. *Experimental Parasitology*. 2017. DOI: 10.1016/j.exppara.2017.04.003

[37] BORGATI, T. F.; PEREIRA, G. R.; BRANDÃO, G. C.; SANTOS, J. O.; FERNANDES, D. A. M.; PAULA, R. C.; NASCIMENTO, M. F. A.; SOARES, L. F.; LOPES, J. C. D.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B. Synthesis by click reactions and antiplasmodial activity of lupeol 1,2,3-triazole derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 10. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170013>

- [38] LAURIA, A.; DELISI, R.; MINGOIA, F.; TERENCE, A.; MARTORANA, A.; BARONE, G.; ALMERICO, A. M. 1,2,3-Triazole in Heterocyclic Compounds, Endowed with Biological Activity, through 1,3-Dipolar Cycloadditions. *European Journal of Organic Chemistry*, 16. 2014. DOI: 10.1002/ejoc.201301695
- [39] GONTIJO, V. S.; ESPURI, P. F.; ALVES, R. B.; CAMARGOS, L. F.; SANTOS, F. V.; JUDICE, W. A. S.; MARQUES, M. J.; FREITAS, R. P. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkyltriazoles and alkylphosphocholines. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.06.005
- [40] CORRALES, R. C.; SOUZA, N. B.; PINHEIRO, L. S.; ABRAMO, C.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D. Thiopurine derivatives containing triazole and steroid: synthesis, antimalarial and antileishmanial activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2011. DOI: 10.1016/j.biopha.2010.10.013
- [41] NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; CASEY, J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chemical Reviews*, 2014. DOI: 10.1021/cr500365f
- [42] PAPADOPOULOU, M. V.; BLOOMER, W. D.; ROSENZWEIG, H. S.; WILKINSON, S. R.; KAISER, M. Novel nitro(triazole/imidazole)-based heteroarylamides/sulfonamides as potential antitrypanosomal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011. DOI: dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.045
- [43] BACH, D.; LIU, J.; KIM, W. K.; HONG, J.; PARK, S. H.; KIM, D.; QIN, S.; LUU, T.; PARK, H.; XU, Y.; LEE, S. K. Synthesis and biological activity of new phthalimides as potential anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2017. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.04.027
- [44] RANI, A.; SINGH, A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; KUMAR, V. Microwave-promoted facile access to 4-aminoquinoline-phthalimides: synthesis and anti-plasmodial evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.11.033

- [45] OLIVER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology*, v. 18, n. 2. 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.2.293-305
- [46] ALIANÇA, A. S. S.; OLIVEIRA, A. R.; FEITOSA, A. P. S.; RIBEIRO, K. R. C.; CASTRO, M. C. A. B.; LEITE, A. C. L.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazoles derivatives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. DOI: 10.1016/j.ejps.2017.05.005. 2017
- [47] KHAJAH, M.; LUGMANI, Y. A. Involvement of Membrane Blebbing in Immunological Disorders and Cancer. *Medical Principles and Practice*, 2016. DOI: 10.1159/000441848
- [48] MACEDO-SILVA, S. T.; URBINA, J. A.; SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. In vitro activity of the antifungal azoles intraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLOS One*. 2013. DOI: doi.org/10.1371/journal.pone.0083247
- [49] SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012. DOI: 10.1016/S1995-7645

5 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados da presente pesquisa demonstram que o composto 4-(phenyl)-1-(4 phthalimidobutyl)-1,2,3-triazole, sintetizado pela metodologia de click chemistry, apresenta ação anti-leishmania. O composto FT4 apresentou baixa citotoxicidade para células de mamíferos, induziu a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais e ação leishmanicida para duas formas evolutivas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, causando importantes alterações ultraestruturais que podem estar relacionadas com a perda da viabilidade celular em ambas as espécies deste estudo. Os resultados aqui descritos demonstram o potencial do composto FT4 para o desenvolvimento de novos fármacos anti-leishmania, especificamente no contexto da Leishmaniose Tegumentar Americana.

As duas espécies de leishmania deste estudo estão relacionadas à ocorrência da forma cutânea da leishmaniose no Brasil, dessa forma, é importante a busca de novos compostos que sejam eficazes contra ambas, pois ainda não é comum a identificação detalhada do agente etiológico para tomada de decisões terapêuticas. O presente estudo sugere a utilização do composto FT4 como protótipo para o desenvolvimento de novos agentes anti-leishmania e fornece subsídio para estudos mais aprofundados do efeito leishmanicida de derivados de ftalimida com triazóis e dos mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, C.F.; ALVES, C.F.; FIGUEIREDO, M.M.; SOUZA, C.C, MACHADO-COELHO, G.L.L.; MELO, M.N. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness Of An Immunohistochemical Protocol For The Detection Of *Leishmania* In Skin. PLoS ONE. v. 8, n. 5. 2013.
- BRITO, M. E.; MENDONÇA, M.G.; GOMES, Y.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G. Identification Of Potentially Diagnostic *Leishmania Braziliensis* Antigens In Human Cutaneous Leishmaniasis By Immunoblot Analysis. Clin Diagn Lab Immunol. v. 7, n. 2, p. 318–21. 2000.
- AKHOUNDI, M. A historical overview o the classification, evolution and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. PLOS Negl. DOI: doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349. 2016.
- ALI, M. A.; MOROMI, S. K.; TOUCHY, A. S.; SHIMIZY, K. irect Synthesis of Cyclic Imides from Carboxylic Anhydrides and Amines by Nb 2 O 5 as a Water-Tolerant Lewis Acid Catalyst, ChemCatChem, v.8. p. 891-894. 2016. DOI: 10.1002/cctc.201501172.
- ALI, M. A.; SIDDIKI, S. M. A. H.; KON, K.; HASEGAWA, J.; SHIMIZU, K. Versatile and Sustainable Synthesis of Cyclic Imides from Dicarboxylic Acids and Amines by Nb 2 O 5 as a Base-Tolerant Heterogeneous Lewis Acid Catalyst, Chemistry a European Journal Commuication, v. 20. p. 14256-1460. 2014. DOI: 10.1002/chem.201404538.
- AL-RAZZAK, M. S. A.; AL-AZZAWL, A. M. Synthesis and characterization of new phthalimides linked to Schiff bases, International Journal of Research In Pharmacy and Chemistry, v. 3, n. 3. p. 682-690. 2013.
- ALY, M. R. E. S.; SAAD, H. A.; MOHAMED, M. A. Click Reaction Based Synthesis, Antimicrobial, And Cytotoxic Activities Of New 1,2,3-Triazoles. Bioorg. Med. Chem. Lett., v. 25, p. 2824-2830. 2015.
- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. Da Química Medicinal à Química Combinatória. 2ª ed. Barueri: Manole, 2011.
- ARENAS, R. Dermatología, Atlas Diagnóstico y Tratamiento. 6ta Ed. México, McGraw Hill, p. 465–472. 2015.
- BACH, D.; LIU, J.; KIM, W. K.; HONG, J.; PARK, S. H.; KIM, D.; QIN, S.; LUU, T.; PARK, H. J.; XU, Y.; LEE, S. K. Synthesis and biological activity of new phthalimides as potential anti-inflammatory agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 25, n.1. p. 3396-3405. 2017.
- BAO, Q.; LIU, A.; MA, Y.; CHEN, H.; HONG, J.; SHEN, W.; ZHANG, C.; DING, Y. The effect of oil-water partition coefficient on the distribution and cellular uptake of liposome-

encapsulated gold nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 146, n. 1. p. 475-481. 2016.

BARBERATO FILHO, S. Pesquisa e desenvolvimento de fármacos no Brasil: estratégias de fomento. 2006. 192f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Revista Química Nova*. Rio de Janeiro, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BAUMANN, M.; BAXENDALE, I. R. An overview of the synthetic routes to the best selling drugs containing 6-membered heterocycles, *Beilstein J. Org. Chem.*, v. 9, n.1 p. 2265–2319.2013.

BITTERMANN, K.; SPYNCHER, S.; GOSS, K. Comparison of different models predicting the phospholipid-membrane water partition coefficients of charged compounds. *Chemosphere*, v. 144, n. 1. p. 382-391. 2016.

BOER, M.; ARGAW, D.; JANNIN, J. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clinical Microbiology Infec.* DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03635.x. 2011.

BOREN, B. C.; NARAYAN, S.; RASMUSSEN, L. K.; ZHANG, L.; ZHAO, H.; LIN, Z. JIA, G.; FOKIN, V. V. Ruthenium-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition: Scope and Mechanism, *Journal of the American Chemical Society*, v. 130, n. 28. p. 8923-8930. 2008. DOI: 10.1021/ja0749993.

BROCKSOM, T. J.; DESIDERÁ, A. L.; ALVES L. C.; DE OLIVEIRA, K. T. “The New Directions of Organic Synthesis”, *Current Organic Synthesis*, 2015, 12, 496-522.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. *Gazeta Médica da Bahia*. Bahia, v.78, suplemento 1, p.98 106, 2008.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar, *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 1. p. 34-37. 2003.

CARDO, L. J. Leishmania: risk to the blood supply. *Transfusion*. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00941.x. 2006.

CARDOSO, M. V. O.; MOREIRA, D. R. M.; OLIVEIRA FILHO, G. B.; CAVALCANTI, S. M. T.; COELHO, L. C. D.; ESPÍNDOLA, J. W. P.; GONZALEZ, L. R.; RABELLO, M. M.; HERNANDES, M. Z.; FERREIRA, P. M. P.; PESSOA, C.; SIMONE, C. A.; GUIMARÃES, E. T.; SOARES, M. B. P.; LEITE, A. C. L. Design, synthesis and structureactivity relationship of phthalimides endowed with dual antiproliferative and immunomodulatory activities, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 96, n. 1. p. 491-503. 2015.

CARVALHO, F.A.A.; CHAREST, H.; TAVARES, C.A.P, MATLASHEWSKI, G.; VALENTE, E.P.; RABELLO, A., ET AL. Diagnosis Of American Visceral Leishmaniasis In Humans And Dogs Using The Recombinant Leishmania Donovanii A2 Antigen. *Diagn Micr Infec Dis*. v. 43, p. 289–95. 2002.

CHAPMAN JUNIOR, J. M.; COCOLAS, G. H.; HALL, I. H. Hypolipidemic Activity of Phthalimide Derivatives IV: Further Chemical Modification and Investigation of the Hypolipidemic Activity of *N*-Substituted Imides, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 72, n. 11. p. 1344-1347. 1983. DOI: 10.1002/jps.2600721127.

CONSTANT, C.; ALBERT, S.; NICOLAS, Z.; BACZOKO, K.; FENSTERBANK, H.; ALLARD, E. Orthogonal functionalization of a fullerene building block through copper-catalyzed alkyne-azide and thiol-maleimide click reactions, *Tetrahedron*, v. 70. p. 3023-3029. 2014. DOI: 10.1016/j.tet.2014.02.086.

COOK, T. L.; WALKER JUNIOR, J. A.; MACK, J. Scratching the catalytic surface of mechanochemistry: a multi-component CuAAC reaction using a copper reaction vial, *Green Chemistry*, v. 15, n. 3. p. 617-619. 2013. DOI: 10.1039/C3GC36720G.

DANGROO, N. A.; DAR, A. A.; SHANKAR, R.; KHUROO, M. A.; SANGWAN, P. L. An efficient synthesis of phosphoramidates from halides in aqueous ethanol, *Tetrahedron Letters*, v. 57, n. 25. p. 2717-2722. 2016. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.05.003.

DEVENDER, N.; GUNJAN, S.; CHHABRA, S.; SINGH, K.; PASAM, V. R.; SHU, S. K.; SHARMA, A.; JAISWAL, S.; SINGH, S. K.; KUMAR, Y.; LAL, J.; TRIVE, A. K.; DI, R. Tripathiidentification Of B-Amino Alcohol Grafted 1,4,5 Trisubstituted 1,2,3-Triazoles As Potent Antimalarial Agents. *Eur. J. Med. Chem.*, v.109, p. 187-198. 2016.

DUA, R.; SHRIVASTAVA, S.; SONWANE, S. K.; SRIVASTAVA, S. K. Pharmacological Significance of Synthetic Heterocycles Scaffold: A Review, *Journal of Chemical Biology & Therapeutics*, v. 5, n. 3. p. 120-144. 2011.

DÜGDU, E.; ÜNLÜER, D.; ÇELİK, F.; SANCAK, K.; KARAOĞLU, A. ÖzelSynthesis Of Novel Symmetrical 1,4-Disubstituted 1,2,3-Bistriazole Derivatives Via ‘Click Chemistry’ And Their Biological Evaluation Molecules, v. 21, p. E659. 2016.

DURSH, T. J.; TAYLOR, N. O.; LIU, D. E.; WU, R. Y.; PRAUSNITZ, J. M.; RADKE, C. J. Water-soluble drug partitioning and adsorption in HEMA/MAA hydrogels. *Biomaterials*, v. 35, n. 1. p. 620-629. 2014.

FOSSLIEN, E. Adverse Effects Of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs On The Gastrointestinal System. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v. 28, n. 2, p. 67-81, 1998.

GOMES, Y.M.; PAIVA-CAVALCANTI M.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C.; ALVES, L.C. Diagnosis Of Canine Visceral Leishmaniasis: Biotechnological Advances. *Vet J.* v. 175, p. 45–52. 2008.

HAIDER, S.; ALAM, S. M.; HAMID, H. 1,2,3-Triazoles: andaime com significado medicinal, *Inflammation and Cell Signaling*, v. 1, n. 2. p. 1-10. 2014. DOI: 10.14800/ics.95

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* 18: 332–334.

HIROKI, H.; OGATA, K.; FUKUZAWA, S. 2-Ethynylpyridine-Promoted Rapid Copper (I) Chloride Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction in Water, *Synlett*, v. 24, n. 7. p. 843-846. 2013. DOI: 10.1055/s-0032-1318488.

HOFFMAN, J. M.; WAI, J. S.; THOMAS, C. M.; LEVIN, R. B.; O'BRIEN, J. A.; GOLDMAN, M. E. Synthesis and evaluation of 2-pyridinone derivatives as HIV-1 specific reverse transcriptase inhibitors. 1. Phthalimidoalkyl and -alkylamino analogs, *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 35, n. 21. p. 3784-3791. 1992. DOI: 10.1021/jm00099a006.

HOFFMAN, T.; METTERNICH, R. The Future of Medicinal Chemistry, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 51, n. 35. p. 8670-8671. 2012. DOI: 10.1002/anie.201201677

HOPKINSON, M. N.; RICHTER, C.; SCHEDLER, M.; GLORIUS, F. An overview of N-heterocyclic carbenes *Nature*, v. 510, n. 1. p. 485–496. 2014.

HOYOS, C. L.; CAJAL, S. P.; JUAREZ, M. Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* Infection in the Northwestern Argentina. *Biomed Res Int*. 2016; 2016: 6456031.

HUISGEN, R.; SZEIMIES, G.; MOBIUS, L. 1,3-Dipolare Cycloadditionen, XXXII. Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen, *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 100, n. 8. p. 2494-2507. 1967. DOI: 10.1002/cber.19671000806.

JAMES M.; CHAPMAN JR.; GEORGE H.; COCOLAS .IH HALL. Hypolipidemic Activity of Phthalimide Derivatives IV: Further Chemical Modification and Investigation of the Hypolipidemic Activity of N-Substituted Imides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 72, p. 1344-1347. 1983.

KANT, R.; KUMAR, D.; AGARWAL, D.; GUPTA, R. D.; TILAK, R.; AWASTHI, S. K. Agarwal Synthesis Of Newer 1,2,3-Triazole Linked Chalcone And Flavone Hybrid Compounds And Evaluation Of Their Antimicrobial And Cytotoxic Activities *Eur. J. Med. Chem.*, v. 113, p. 34-49. 2016.

KAPPE, C. O.; EYKEN, E. V. D. Click chemistry under non-classical reaction conditions, *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 1. p. 1280-1290. 2010.

KIM, T. W.; YONG, Y.; SHIN, S. Y.; JUNG, H.; PARK, K. H.; LEE, Y. H.; LIM, K. Y. Jung Synthesis And Biological Evaluation Of Phenyl-1h-1,2,3-Triazole Derivatives As Anti-Inflammatory Agents *Bioorg. Chem.*, v. 59, p. 1-11. 2015.

KHAN, I.; GURU, S. K.; RATH, S. K.; CHINTHAKINDI, P. K.; SINGH, B.; KOUL, S.; BHUSHAN, S.; SANGWAN, P. L. A novel triazole derivative of betulinic acid induces extrinsic and intrinsic apoptosis in human leukemia HL-60 cells, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 108, n. 27. p. 104-116. 2016. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.11.018.

KHEZZANI, B.; BOUCHEMAL, S. Demographic And Spatio-Temporal Distribution Of Cutaneous Leishmaniasis In The *Souf* Oasis (Eastern South Of Algeria): Results Of 13 Years. *Acta Trop.* V. 166, p. 74–80. 2017.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 40, n. 11.

p. 2004-2021. DOI: 10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.2001.

KUMAR, B.; SINGH, V.; SHANKAR, R.; KUMAR, K. RAWAL, R. K. Synthetic and Medicinal Prospective of Structurally Modified Curcumins, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 2. p. 148-161. 2017. DOI: 10.2174/1568026616666160605050052.

LAINSON, R. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil, *Revista Pararense de Medicina*, v. 11, n. 2. p. 29-40. 1997.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *New World Leishmaniasis*, Microbiology and Microbial Infections, 9 ed. p. 23-28. 2010. DOI: 10.1002 / 9780470688618.taw0182.

LAU, Y. H.; RUTLEDGE, P. J.; WATKINSON, M.; TODD, M. H. Chemical Sensors that Incorporate Click-derived Triazoles, *Chemical Society Reviews*, v. 40. p. 2848-2866. 2011. DOI: 10.1039 / C0CS00143K.

LIU, M.; LV, P.; LIAO, R.; ZHAO, Y.; YANG, B. Synthesis, characterization and biological activity of Rhein-cyclodextrin conjugate, *Journal of Molecular Structure*, 2016.

LÓPEZ-RUIZ, H.; CERDA-PEDRO, J. E.; ROJAS-LIMA, S.; PÉREZ-PÉREZ, I.; REDRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. V.; SANTILLAN, R.; COREÑO, O. Cuprous oxide on charcoal-catalyzed ligand-free synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles via click chemistry, *ARKIVOC*, v. 3. p. 139-164. 2013.

LOURDES, M.; FERREIRA, G.; PINHEIRO, L. C. S.; SANTOS, O. A.; PECANHA, M. D. S.; SACRAMENTO, C. Q.; MACHADO, V.; FERREIR, V. F.; SOUZA, T. M. L. Boechatdesign, Synthesis, And Antiviral Activity Of New 1h-1,2,3-Triazole Nucleoside Ribavirin Analogs. *Med. Chem. Res.*, v. 23, p. 1501-1511. 2014.

MCCLEAN, P.; JOHNSON, C, ROGERS R, DANIELS L, REBER J, et al. Molecular and cellular biology animations: development and impact on student learning. *Cell Biol Educ*. DOI: 10.1187/cbe.04-07-0047. 2005.

MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. A Importância da Síntese de Fármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova*, v. 1, n. 3. 2001.

MIRANDA, O.; GONZÁLEZ, I. Leishmaniasis Cutánea. Presentación de Casos. *Rev Cub Med Mil*, V. 36, n. 4, p. 51-54. 2007.

NAKAJIMA, K.; BABA, Y.; NOMA, R.; KITANO, M.; KONDO, J. N.; HAYASHI, S.; HARA, M. Nb₂O₅·nH₂O as a Heterogeneous Catalyst with Water-Tolerant Lewis Acid Sites, *Journal of the American Chemical Society*, v. 133, n. 12. p. 4224-4227. 2011. DOI: 10.1021/ja110482r.

NAKAJIMA, K.; NOMA, R.; KITANO, M.; HARA, M. Titania as an Early Transition Metal Oxide with a High Density of Lewis Acid Sites Workable in Water, *The Journal of Physical Chemistry*, v. 117, n. 31. p. 16028-16033. 2013. DOI: 10.1021/jp404523r.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; Histórico da Evolução da Química Medicinal e a Importância da Lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 3. p. 227-240. 2009.

ODLO, K.; HENTZEN, J.; CHABERT, J. F. D.; DUCKI, S.; GANI, O. A. B.; SYL, T. E.; SKREBE, M.; FLORENES, V. N.; HANSEN, T. V. 1,5-Disubstituted 1,2,3-triazoles as Cis-Restricted Analogues Of Combretastatin A-4: Synthesis, Molecular Modeling And Evaluation As Cytotoxic Agents And Inhibitors Of Tubulin. *Bio Org. Med. Chem.*, v.16, p. 4829-4838. 2008.

OLIVEIRA, K. N.; COSTA, P.; SANTIN, J. R.; MAZZAMBANI, L.; BURGER, C.; MORA, C.; NUNES, R. J.; SOUZA, M. M. Synthesis and antidepressant-like activity evaluation of sulphonamides and sulphonyl-hydrazones, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 14. p. 4295-4306. 2011. DOI: doi.org/10.1016/j.bmc.2011.05.056.

OLIVEIRA, G.G.; MAGALHÃES, F.B.; TEIXEIRA, M.C.; PEREIRA, A.M.; PINHEIRO, C.G.; SANTOS, L.R., ET AL. Characterization Of Novel *Leishmania Infantum* Recombinant Proteins Encoded By Genes From Five Families With Distinct Capacities For Serodiagnosis Of Canine And Human Visceral Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* v. 85, p. 1025–34. 2011.

OMRAN, A. A. An in vitro spectrometric method for determining the partition coefficients of non-steroidal anti-inflammatory drugs into human erythrocyte ghost membranes, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 104, n. 1. p. 461-467. 2013.

ORYAN, A.; MEHRABANI, D.; OWJI, S. M.; MOTAZEDIAN, M. H.; HATAM, G. H.; ASGARI, Q. Morphologic Changes due to Cutaneous Leishmaniasis in BALB/c mice experimentally infected with *Leishmania major*. *Journal of Applied Animal Research*. DOI: 10.1080/09712119.2008.9706946. 2008.

PALMEIRA FILHO, P. L.; PAN, S. S. K. Cadeia farmacêutica no Brasil: avaliação preliminar e perspectivas. *BNDES Setorial*. Rio de Janeiro, v.1, n.18, p.3-22, 2003.

PIETKA-OTTLINK, M.; POTACZEK, P.; PIASECKI, A.; MLOCHOWSKI, J.; Crucial Role of Selenium in the Virucidal Activity of Benziselenazol-3(2*H*)-ones and Related Diselenides, *Molecules*, v. 15, n. 11. p. 8214-8228. 2010. DOI: 10.3390/molecules15118214.

PRAVEENA, K. S. S.; MURTHY, N. Y. S. Syntheses and biological activities of 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v, 7, n. 5. p. 506-522. 2015.

RAMPRASAD, J.; NAYAK, N.; DALIMBA, U. Design of new phenothiazine-thiadiazole hybrids via molecular hybridization approach for the development of potent antitubercular agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, (2015), doi: 10.1016/j.ejmech.2015.10.035

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* v. 7, n. 9, p. 581–96. 2007.

SANGI, D. P. Estratégias de Síntese na Descoberta de Fármacos: o emprego da síntese orientada pela diversidade estrutural. *Química Nova*, v. 39, n. 8. 2016.

SANI, G. FOSSATI, F. HUGUENOT, M. ZANDA ANGEW. Total synthesis of tubulysins U and V, *Angewandte Chemie International Edition*, (2007), DOI: 10.1002/anie.200604557

SANTOS, R. V., COIMBRA, J. R. C. E. A. Saúde e Povos Indígenas Rio de Janeiro: 1994, Ed. FIOCRUZ; 1994.

SARIGOL, D.; UZGOREN-BARAN, A.; TEL, B. C.; SOMUNCUOGLU, E. I.; OZADALISARI, I. K. K.; UNSAL-TAN, O. K.; ERTAN, B. Tozkoparan Novel thiazolo[3,2-b]-1, 2,4-Triazoles Derivados De Naproxeno Com Propriedades Analgésicas / Anti-Inflamatórias: Estudos De Síntese, Avaliação Biológica E Modelagem Molecular. *Bioorg. Med. Chem*, v. 23, p. 2518 – 2528. 2015.

SEIDELIN, H. *Leishmaniasis And Babesiasis In Yucatan*. *Ann Trop Med Parasit*, v. 6, n. 2, p. 295–300. 2016.

SELVAM, T. P.; JAMES, C. R.; DNIANDEV, P. V.; VALZITA, S. K. A mini review of pyrimidine and fuse pyrimidine marketed drugs, *Res. Pharm.*, v. 2, n 1. p. 01-09. 2012.

SHAIK, S.; DANOVIK, D.; HIBERTY, P. C. To Hybridize or Not to Hybridize? This Is the Dilemma, *Computational & Theoretical Chemistry*, (2017), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.comptc.2017.01.017>

SHAIKH, M.H.; SUBHEDAR, D. D.; NAWALE, L.; SARKAR, D.; KHAN, F. A. K.; SANGHESTTI, J. A. Shingate1,2,3-Triazole Derivatives As Antitubercular Agents: Synthesis, Biological Evaluation And Molecular Docking Study. *Med. Chem. Commun.*, v. 6, p. 1104-1116. 2015.

SHAIKH, M.H.; SUBHEDAR, D. D.; ARKILE, M.; KHEDAR, V.M.; JADHAV, N.; SARKAR, B. B. ShingateSynthesis And Bioactivity Of Novel Triazole Incorporated Benzothiazinone Derivatives As Antitubercular And Antioxidant Agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 26, p. 561-569. 2016.

SHANKAR, R.; CHAKRAVARTI, B.; SINGH, U. S.; ANSARI, M. I.; DESHPANDE, S.; DWIVEDI, S. K. D.; BID, H. K.; KONWAR, R.; KHARKWAL, G.; CHANDRA, V.; DWIVEDI, A.; HAJELA, K. Synthesis and biological evaluation of 3,4,6-triaryl-2-pyranones as a potential new class of anti-breast cancer agents, *Bioorg. Med. Chem*, v. 12, n. 1. p. 3847–3856. 2009.

SHAO, C.; WANG, X.; XU, J.; ZHAO, J.; ZHANG, Q.; HU, Y. Carboxylic Acid-Promoted Copper(I)-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition, *Journal of Organic Chemistry*, v. 75, n. 20. p. 7002-7005. 2010. DOI: 10.1021/jo101495k.

SHAO, C.; WANG, X.; ZHANG, Q.; LUO, S.; ZHAO, J.; HU, Y. Acid-Base Jointly Promoted Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, *Journal of Organic Chemistry*, v. 76, n. 16. p. 6832-6836. 2011. DOI: 10.1021/jo200869a.

SHI, Y. X.; REZENTTI, A.; KUNDU, S.; CHAO-JUN, L. A Rhodium-Catalyzed Cascade Cyclization: Direct Synthesis of *N*-Substituted Phthalimides from Isocyanates and Benzoic Acids, v. 356, p. 723-728. 2014. DOI: 0.1002/adsc.201300834.

SHIN, J. A.; LIM, Y. G.; LEE, K. H. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction in Water Using Cyclodextrin as a Phase Transfer Catalyst, *Journal of Organic Chemistry*, v. 77, n. 8. p. 4117-4122. 2012. DOI: 10.1021/jo3000095.

SINGH, A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; KUMAR, V. 4-Aminoquinoline-Ferrocenyl-Chalcone Conjugates: Synthesis And Anti-Plasmodial Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* V. 125, p. 269-277. 2017.

SINGH, H.; SINDHU, J.; KHURANA, J. M.; SHARMA, C.; ANEJA, K. R. Ultrasound Promoted A Pot Synthesis of New Fluorescent Triazolyl Spirocyclic Oxindoles Using Dbu-Based Specific Ionic Liquids and Their Antimicrobial Activity. *EUR. J. Med. Chem.* , v. 77, p. 145 – 154. 2014.

SOUZA, A.P, SOTO M, COSTA JM, BOAVENTURA VS, DE OLIVEIRA CI, CRISTAL J.R, BARRAL-NETTO. M, BARRAL A. Plos One . Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. v. 8, n. 6. 2013.

SRIVASTAVA, P.; GIDWANI, K.; PICADO, A.; VAN DER AUWERA, G.; TIWARY, P.; OSTYN B., ET AL. Molecular And Serological Markers Of *Leishmania Donovanii* Infection In Healthy Individuals From Endemic Areas Of Bihar. India. *Trop Med Int Health.* v. 18, n. 5, p. 548–54. 2013.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GU^{RT}TLER, R. E. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* DOI: 0.1172/JCI33945. 2012. TOBENAZARA, J.; BURKE, A. J. New click-chemistry methods for 1,2,3-triazoles synthesis: recent advances and applications, *Tetrahedron Letters*, v. 56, n. 22. p. 2853-2859. 2015. DOI: 10.1016/j.tetlet.2015.03.136.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E.A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, A.M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison Of Serological And Parasitological Methods For Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis In The State Of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis.* V.13, n. 1, p. 47–52. 2009.

TORRES-GUERRERO, E.; VARGAS-MARTÍNEZ, F.; QUINTANILLA-CEDILLO M. R. Leishmaniasis en México. Academia Mexicana de Dermatología, Colegio de Dermatólogos de Yucatán A. C., Fundación Mexicana para la Dermatología, Universidad Autónoma de Campeche y Secretaría de Salud, México. 2013.

TOTOBENAZARA, J; BURKE, A. J. New click-chemistry methods for 1, 2, 3-triazoles synthesis: recent advances and applications. *Tetrahedron Letters*, v. 56, n. 22, p. 2853-2859, 2015.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.* DOI: 10.1016/j.pt.2012.05.002. 2012.

VERA-IZAGUIRRE, D.; VEGA-MEMIJE, E.; QUINTANILLA, R.; CEDILLO, M.,
Leishmaniasis Revisión. DCMQ. V. 4, n. 4, p. 252–260. 2006.

WANG, K.; BI, X.; XING, S.; LIAO, P.; FANG, Z.; MENG, X.; ZHANG, Q.; LIU, Q.; JI, Y.
Cu₂O acting as a robust catalyst in CuAAC reactions: water is the required medium, Green
Chemistry, v. 13. p. 562-565. 2011. DOI: 10.1039/C0GC00848F.

WANG, Y.; WANG, F.; SONG, Q. XIN, Q.; XU, S.; XU, J. Transformylating amine with
DMF to formamide over CeO₂ catalyst, Chemical Communications, Chemical Communications,
v. 50. p. 2438-2441. 2013. DOI: 10.1039/C3CC48400A.

X. WU, S. OSCHATZ , M. SHARIF , A. FLADER , L. KREY , M. BELLER , P. LANGER.
Practical Synthesis of Polysubstituted Imidazoles *via* Iodine- Catalyzed Aerobic Oxidative
Cyclization of Aryl Ketones and Benzylamines Adv. Synth. Catal. , 355 (2013) , pp. 3581 –
3585. DOI: 10.1002/adsc.201200582

ZHAO, L. L.; WANG, S. Y.; XU, X. P.; JI, S. J. Dual 1,3-dipolar cycloaddition of carbon
dioxide: two C=O bonds of CO₂ react in one reaction, Chemical Comumications, (2013), doi:
10.1039/C3CC38526D

ANEXO A – REVISTA PARA SUBMISSÃO DO ARTIGO



ANEXO B - NORMAS DE SUBMISSÃO: BIOORGANIC CHEMISTRY

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. .

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible

authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement'. Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2600, excluding taxes.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset

your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be

included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography.

Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results and Discussion may be combined if appropriate and may be organized into subheadings. The Conclusion may be presented in a short section that may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 10 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of").

Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate

source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier**

after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with

either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version

(where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/bioorganic-chemistry>. When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage.

Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. METTAM, L.B. ADAMS, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [hereto](#) find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579-593, 2015/07/01/2015. ISSN 0733-8635. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733863515000315>>.