

**Universidade Federal de Uberlândia**  
**Licenciatura em Química**

Adriane Cristina Rosa de Oliveira

**Planejamento, síntese, caracterização e estudo da atividade  
biológica de derivados de benzotiazóis contra *Leishmania*  
*Infantum*.**

Uberlândia  
2023

Adriane Cristina Rosa de Oliveira

**Planejamento, síntese, caracterização e estudo da atividade biológica de derivados de benzotiazóis contra *Leishmania Infantum*.**

Trabalho de conclusão de curso, submetido à Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de licenciada em Química.

Orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

Uberlândia  
2023

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família que esteve ao meu lado, acolheu e motivou a buscar pelos meus sonhos, principalmente a minha mãe Lílian, meu pai Fernando, meu padrasto Eurípedes e minha madrasta Késia pelo apoio e compreensão durante todo período de graduação.

Ao Jackson meu noivo, pelo companheirismo, suporte, ensinamentos e pelas noites estudando comigo, que me mostravam que eu sou capaz e que todo esforço valeria a pena.

Em especial ao meu orientador prof. Celso, por ter me acolhido no meu momento de maior desespero na vida acadêmica, pela paciência, por todo conhecimento científico que adquiri neste período, especialmente, por me incentivar e acreditar no meu potencial.

Aos meus amigos que não me deixarem desistir dos meus objetivos e que mesmo por mensagem mandavam energias positivas para que essa etapa ficasse mais leve. Aos meus colegas de classe que fizeram parte dessa jornada comigo durante 6 anos.

Aos amigos do LaSFar pela realização das análises de infravermelho e pelas experiências e vivências compartilhadas. Ao Thibault pela realização dos espectros de RMN e por me instruir em diversos momentos para a execução de etapas deste trabalho. Ao Felipe de Oliveira Souza e Eduardo Jorge Pilau do Laboratório de Biomoléculas e Espectrometria de Massas (LaBioMass), Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela realização das análises de massas.

Aos professores do Instituto de Química da UFU. A Ma. Mariza Gabriela F. de M. Lodi Cruz, Dra. Daniela de Melo Resende e Dra. Silvane Maria Fonseca Murta do Grupo de Genômica Funcional de Parasitos, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Minas) que fizeram os ensaios biológicos.

## Resumo

A leishmaniose é uma doença infecciosa, endêmica em 98 países e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é negligenciada uma vez que tem poucos estudos voltados para ela, sendo causada por parasitas do gênero *Leishmania* que são transmitidos pela picada de mosquitos flebotomíneos (família *Phlebotominae*) fêmeas infectadas. A doença pode se manifestar em diferentes formas, variando desde infecções assintomáticas até formas graves que podem levar a pessoa a óbito. O tratamento depende de vários fatores, incluindo tipo de doença, patologias concomitantes, espécies do parasita *Leishmania*, gravidade do caso e saúde do paciente. Os medicamentos antiparasitários são utilizados para o tratamento, dentre eles, o principal é a anfotericina B, além dos antimoniatos e derivados do miltefosine, mas estes medicamentos apresentam algumas limitações, são elas a toxicidade dos fármacos ou resistência do organismo para os mesmos, longa duração do tratamento, dificuldade na continuidade do acompanhamento médico necessário e alto custo. Este trabalho apresenta o planejamento, a síntese e avaliação de três compostos, derivados de benzotiazóis com substituintes de cloro (Cl), grupo nitro (NO<sub>2</sub>) e hidroxila (OH) no anel benzenico, para que seja avaliado aspectos como potência, citotoxicidade e seletividade anti *Leishmania infantum*. A escolha dos substituintes foi devido a uma rota sintética simplificada, disponibilidade dos reagentes em laboratório e diferentes efeitos estéricos como o efeito indutivo ou de ressonância entre estes substituintes. Assim, esse trabalho contribui para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos que sejam mais eficazes, menos tóxicos e de valor acessível para o tratamento da Leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose. *Leishmania infantum*. Doença negligenciada. Benzotiazóis. Desenvolvimento de fármaco. Substituintes cloro, grupo nitro e hidroxila.

## Sumário

1.	Introdução.....	6
1.1.	Leishmaniose .....	6
1.2.	Transmissão, agente etiológico e fases da doença.....	8
1.3.	Tratamentos disponíveis.....	9
2.	Justificativa .....	11
3.	Objetivos.....	13
3.1.	Objetivo Geral.....	13
3.2.	Objetivos Específicos .....	13
4.	Resultados e discussões .....	14
4.1.	Planejamento dos compostos almejados.....	14
4.2.	Síntese dos compostos almejados .....	14
4.3.	Mecanismo da amidação com EDC e HOBt .....	15
4.4.	Ponto de fusão .....	16
4.5.	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	17
4.6.	Espectro de infravermelho .....	23
4.7.	Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS).....	26
4.8.	Resultados biológicos.....	28
5.	Parte experimental.....	29
5.1.	Procedimento experimental (Síntese).....	29
5.1.1.	Síntese do composto 9.....	29
5.1.2.	Síntese do composto 11.....	30
5.1.3.	Síntese do composto 13.....	31
5.2.	Procedimento experimental (Biológico) .....	31
5.2.1.	Avaliação da potência (IC <sub>50</sub> ) contra <i>L. infantum in vitro</i> .....	31
5.2.2.	Avaliação da citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) .....	32
6.	Conclusão.....	33
7.	Referências bibliográficas.....	34

## 1. Introdução

### 1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença endêmica em regiões tropicais e subtropicais, além de infecciosa, é negligenciada, tendo em visto que existem poucas pesquisas voltadas para ela e que seu público-alvo são pessoas de vulnerabilidade socioeconômica. Cerca de 350 milhões de pessoas são consideradas em risco de contraí-la, uma vez que esta doença está associada à desnutrição, deficiência imunológica, deslocamento populacional, moradia precária, e falta de recursos financeiros. (DNDI20, 2023) (Christian e Col. 2020, p. 796) (ADVAIT e col. 2014, p. 11305)

Ela é causada por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada de mosquitos fêmea da espécie de flebotomíneos (*Lutzomyia longipalpis*), da família *Phlebotominae* infectados, estes são popularmente conhecidos como mosquito-palha. (Christian e Col. 2020, p. 796)

Esta doença afeta tanto humanos quanto animais, e pode se manifestar de diferentes maneiras, desde uma infecção assintomática até formas graves e potencialmente fatais, isso se dá devido ao tipo de parasita da *Leishmania* causador da doença, carga parasitária no organismo e sistema imunológico do hospedeiro. Por este motivo, é de extrema importância um diagnóstico precoce e, o tratamento adequado para evitar a progressão da doença e suas complicações. (CDC, 2020)

Existem quatro tipos principais de Leishmaniose, sendo elas a visceral/calazar (VL) que é a forma mais grave, pois ataca o sistema imunológico deixando o paciente propício a coinfeções, a cutânea (LC) que apresenta lesões na pele, mucocutânea (LCM) que é a mais rara e afeta as mucosas como nariz, boca e garganta, e a dérmica pós calazar (PKDL) que costuma aparecer meses depois do tratamento da VL. (ADVAIT e col. 2014, p. 11305)

Esta zoonose é típica em 98 países, principalmente aqueles que estão em desenvolvimento, costuma estar associada a áreas rurais ou de condições precárias, além de fatores como desmatamento, urbanização

desordenada e migração humana que influenciam na disseminação da doença. Em 2020, 90% dos casos registrados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), foram do Brasil, Etiópia, Eritreia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão. (DNDI20, 2023)

De acordo com o portal do ministério da saúde, atualizado em outubro de 2022, em 2021 o Brasil teve o maior índice registrado na América Latina, onde as regiões mais afetadas por esta doença foram o Norte, Nordeste e Sudeste, conforme mostrado na figura 1.

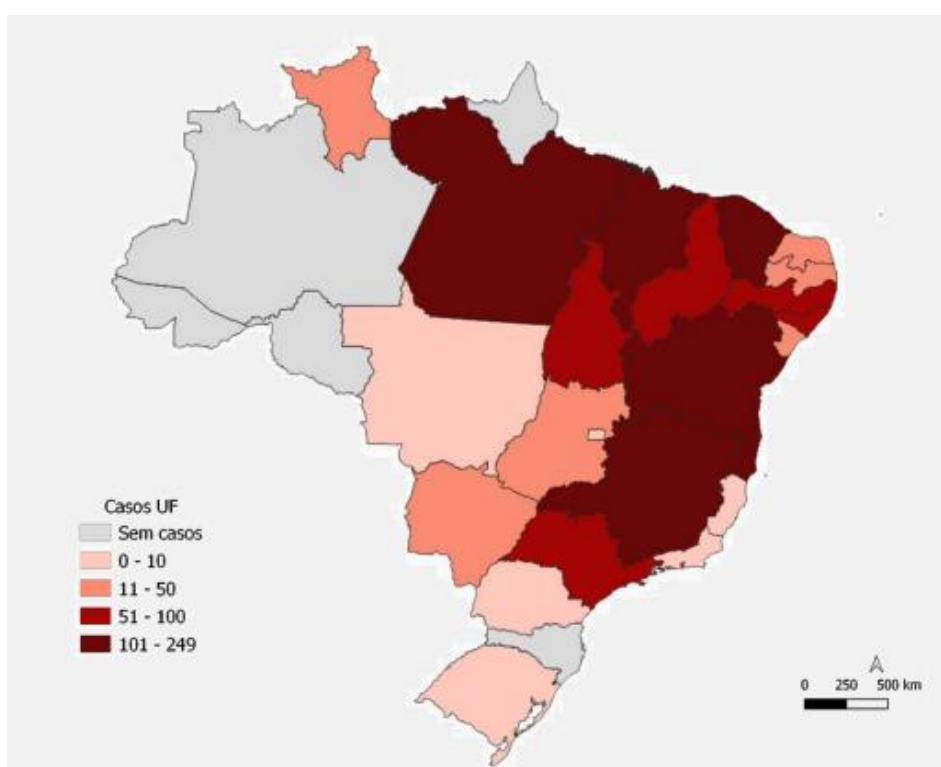


Figura 1: Distribuição da Leishmaniose Visceral no Brasil em 2021

Fonte: Boletim epidemiológico, (Ministério de Saúde, 2022).

Considerando que a Leishmaniose calazar é uma doença muito perigosa, e que das doenças tropicais é uma das mais graves, que leva grande parte dos seus pacientes a óbito se não tratadas a tempo e da maneira adequada, a Universidade pública e as instituições internacionais voltadas para as DTNs (Doenças Tropicais Negligenciadas), sem fins lucrativos como a MSF (Médecins Sans Frontieres) e DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative), são de extrema relevância para o

desenvolvimento de fármacos que possam tornar o tratamento mais eficaz e acessível.

## 1.2. Transmissão, agente etiológico e fases da doença

A transmissão da Leishmaniose se dá através da picada da fêmea infectada do mosquito-palha (figura 2), um inseto da família *Phlebotominae*, que mede de 2 a 3 mm de comprimento, com asas longas e finas.



Figura 2. Mosquito-palha, transmissor da Leishmaniose

Fonte: Drauzio Varella (2023)

O agente etiológico *Leishmania*, é um parasita protozoário multi-hospedeiro que transmite a doença através de flebotomíneos. As fêmeas do inseto se alimentam de sangue de animais infectados, como cães, ratos e roedores silvestres que quando ingeridos, os parasitas proliferam-se dentro das células localizadas no intestino do inseto, sendo assim quando o inseto pica o ser humano, os parasitas ingeridos são depositados, tornando-o um novo hospedeiro. (ADVAIT e col. 2014, p. 11305)

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* sendo que as mais comuns são a *Leishmania donovani* e a *Leishmania infantum* (*L. infantum*), conhecidas por serem os causadores da leishmaniose visceral, e a *Leishmania braziliensis*, que é o causador da leishmaniose cutânea. Estes parasitas são responsáveis pelas diferentes formas da doença em humanos sendo que cada uma delas apresentam sintomas específicos. (ADVAIT e col. 2014, p. 11305) (J Immunol, 2008, p. 7537)

A leishmaniose visceral é caracterizada por febres de longa duração, perda de peso, fraqueza, anemia, inchaço do baço e fígado, tosse seca e diarreia, a leishmaniose cutânea e a dérmica pós calazar destacam-se por manchas na pele,



feridas que não cicatrizam, vermelhidão, coceira e inchaço, e a leishmaniose mucocutânea destaca-se por dores de garganta, sangramento nasal, dificuldade respiratória, fala e deglutição, além de desconfiguração facial. É importante ressaltar que nem todos os indivíduos infectados apresentam sintomas e que o diagnóstico precisa ser realizado pelo profissional especializado. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023)

### **1.3. Tratamentos disponíveis**

Assim como existem várias formas da leishmaniose, o tratamento dela depende de vários fatores, incluindo tipo de doença, patologias concomitantes, espécie de parasita, gravidade do caso e saúde do paciente. Por conta disso foram feitos diversos estudos científicos para otimizar o diagnóstico, prevenção e recursos terapêuticos da doença. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023) (CDC, 2020)

Apesar dos avanços no desenvolvimento de novos fármacos, o processo de recuperação contra a doença ainda apresenta algumas limitações. Dentre elas, as principais são: toxicidade dos fármacos ou resistência do organismo para os mesmos, duração ou dificuldade na continuidade do acompanhamento médico necessário devido ao alto custo, acesso limitado aos fármacos tanto pelo preço quanto pela ausência de matérias primas suficientes em algumas regiões e a falta de mais pesquisas voltadas para este problema negligenciado. (ADVAIT e col. 2014, p. 11305)

Para a leishmaniose visceral um dos tratamentos mais utilizados é o uso do medicamento antiparasitário à base de antimoniais pentavalentes, representado na figura 3, estes podem ser administrados de maneira oral ou intravenosa, e costumam apresentar quase todas as limitações citadas acima, além de diversos efeitos colaterais como pancreatite, arritmia cardíaca, entre outras. Por conta disso, desde 2011 têm sido desenvolvidas no Brasil, pesquisas que questionam a eficácia e a segurança de várias opções diferentes do tratamento padrão à base de antimonial, e com isso, em junho de 2022, a anfotericina B lipossomal ganhou espaço e visibilidade frente a OMS. (DNDI20, 2023)

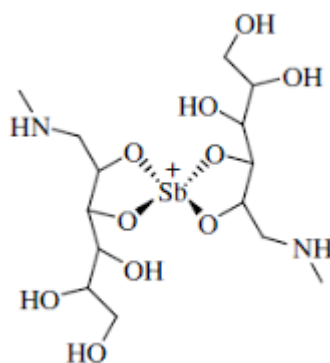


Figura 3. Antimoniato de meglumina usada no tratamento da leishmaniose.

Fonte: Universidade Federal do Mato Grosso – Falando farmacologia

A prevenção da leishmaniose é fundamental e engloba diversas ações, dentre elas é essencial evitar o contato com o mosquito palha, para isso, recomenda-se usar repelentes e vestir roupas que cubram completamente o corpo. Além disso, é importante manter as áreas externas das residências limpas, sem acúmulo de lixo ou entulho, que podem se tornar abrigos para os insetos. (Fiocruz, 2013)

Levando em consideração os aspectos que fazem as leishmanioses serem doenças negligenciadas, como o grande número de pessoas infectadas, a falta de medicamentos eficientes e de difícil acesso para o tratamento, além das poucas pesquisas nesta área, se faz necessário o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes, menos tóxicos e de baixo custo para seu tratamento. Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de compostos derivados de benzotiazol com potencial ação contra o parasita *L. infantum* e contra a leishmaniose visceral. (DNDI20, 2023)

## 2. Justificativa

Fleau e colaboradores reportaram recentemente no artigo Chagas Disease Drug Discovery: Multiparametric Lead Optimization against *Trypanosoma cruzi* in Acylaminobenzothiazole Series (Doença de Chagas: otimização multiparamétrica de leads contra *Trypanosoma cruzi* na série acilaminobenzotiazol), publicada no jornal de medicina e química, o estudo de uma classe de benzotiazóis ativos contra o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente causador da doença de Chagas (Figura 4), modificações estruturais nos fragmentos acila e benzotiazol foram exploradas e o composto **1** foi identificado como o mais promissor com IC<sub>50</sub> de 0,079 µM.

O IC<sub>50</sub> é definido como a concentração necessária do composto em estudo para inibir 50% da atividade biológica alvo. Em resumo, o IC<sub>50</sub> é uma medida importante para avaliar a potência de um composto inibitório em estudos farmacológicos e toxicológicos, fornecendo informações valiosas para o desenvolvimento de medicamentos e entendimento dos interruptores de ação de substâncias bioativas. Espera-se que o IC<sub>50</sub> seja menor que 1 µM para que o composto seja considerado potente, mas resultados até 10 µM podem ser interessantes, uma vez que apresentam compostos a serem otimizados para que se torne um líder. (Saravanan e col, 2012)

Os parasitas *T. cruzi* e *L. infantum* possuem semelhanças em seus ciclos de vida, conseqüentemente, os resultados da pesquisa de Fleau e colaboradores motivaram a exploração de derivados de benzotiazóis no tratamento da leishmaniose, uma vez que já se conhecia a eficácia desses compostos no tratamento da doença de Chagas. A partir dessa similaridade, acredita-se que um fármaco pode apresentar resultados biológicos para ambas as doenças. (CDC, 2020)

O grupo de pesquisa denominado como LaSFar têm se dedicado à pesquisas para explorar uma classe de benzotiazóis contra o *T. cruzi* e *L. infantum* através do planejamento e síntese de compostos inéditos (não explorados por Fleau e colaboradores), essa classe está representada na figura 4. Inicialmente, o composto **2**, que possuía compostos com o flúor como substituinte no fragmento benzotiazol passa a possuir apenas hidrogênios como substituintes neste fragmento, foi sintetizado e testado contra os parasitas levando a uma baixa atividade biológica

contra *T. cruzi* ( $IC_{50} = 112 \mu\text{M}$ ), porém uma atividade moderada contra *L. infantum* ( $IC_{50} = 19,9 \mu\text{M}$ ). Posteriormente, realizou-se modificações no fragmento acila iniciando pela substituição do grupo ciclopropil por um grupo metila, resultando no composto **3**, que apresentou um aumento significativo no valor de  $IC_{50}$  contra *L. infantum*.

Em seguida, foi substituído o grupo metila por um grupo propil de cadeia aberta, obtendo o composto **4**, que também não apresentou resultados satisfatórios. Os últimos testes realizados nesta classe consistiram em manter uma cadeia fechada com mais carbonos no grupo acila, resultando nos compostos **5** e **6**. No entanto, devido à ressonância que pode aumentar a densidade eletrônica do fragmento, o composto **5** não apresentou boa potência, e o composto de melhor resposta contra a *L. infantum* foi o **6** com  $IC_{50}$  de  $5,5 \mu\text{M}$ .

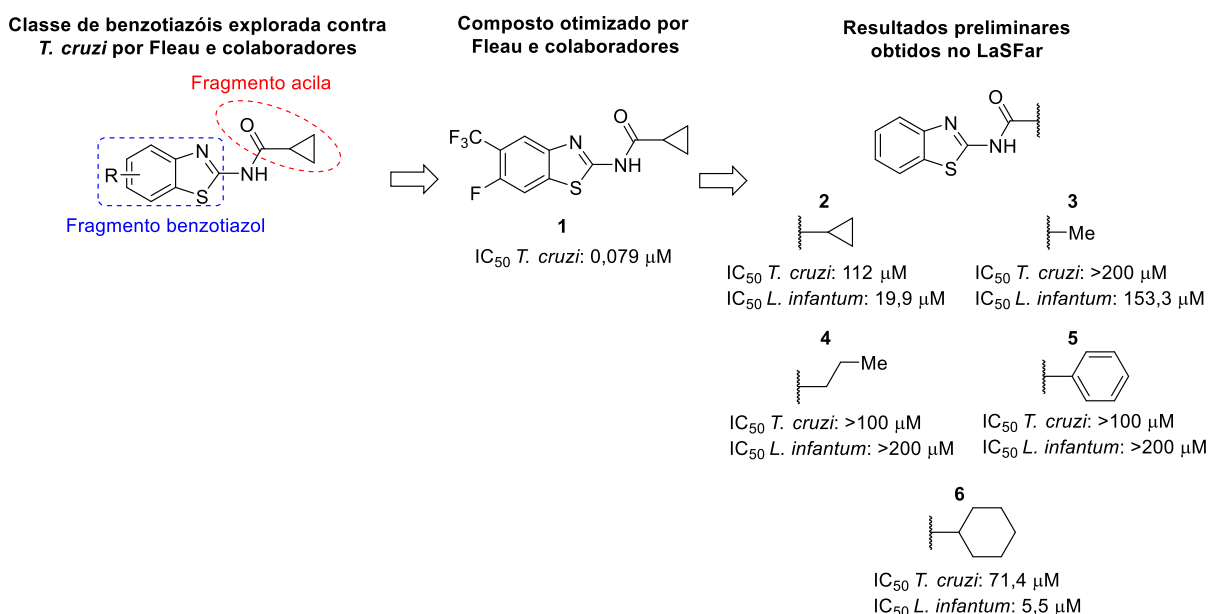


Figura 4. Esquema da otimização do composto de Fleau e seus colaboradores pelo grupo LaSFar- UFU

Considerando esses resultados, este trabalho visa fazer alterações no fragmento benzotiazol, mantendo o cicloexano no fragmento acila, pois foi o grupo de melhor resposta.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Avaliar o efeito biológico de modificações em benzotiazóis para a *L. infantum*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Planejar, sintetizar e caracterizar compostos derivados de benzotiazol com a influência de diferentes substituintes;
- Avaliar a atividade biológica *in vitro* contra *L. infantum* e citotoxicidade dos compostos sintetizados;
- Obter uma relação entre estrutura química e atividade anti-*L. infantum*.

## 4. Resultados e discussões

### 4.1. Planejamento dos compostos almejados

Foram selecionados os compostos descritos na figura 5, a fim de planejar, sintetizar e purificá-los em laboratório, para que através de ensaios biológicos, fosse avaliada a potência, seletividade e propriedades farmacocinéticas. O composto mais promissor (mais ativo *in vitro*) poderá ser otimizado para criar um líder (composto com atividade biológica em ensaios *in vivo*). Esse processo de otimização é denominado *hit-to-lead*. (BAXTER, 2006)

Todas as modificações feitas no composto **6**, serão no fragmento de benzotiazol, com a adição dos substituintes cloro (Cl), grupo nitro (NO<sub>2</sub>) e hidroxila (OH).

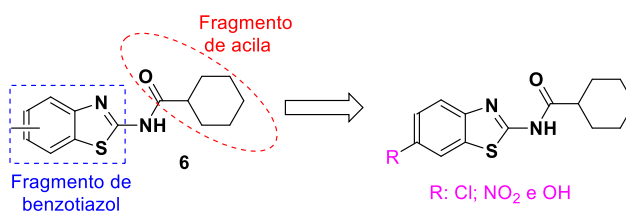


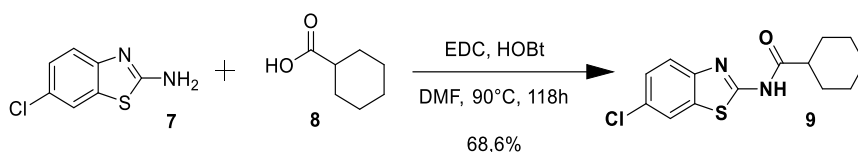
Figura 5: Estrutura dos compostos almejados.

Os critérios para a seleção dos compostos a serem sintetizados, levaram em conta a disponibilidade dos reagentes em laboratório, o comportamento dos substituintes tendo em vista efeito eletrônico doador ou retirador de elétrons e estérico (impedimento estérico das moléculas), além da realização de uma rota sintética com poucas etapas.

### 4.2. Síntese dos compostos almejados

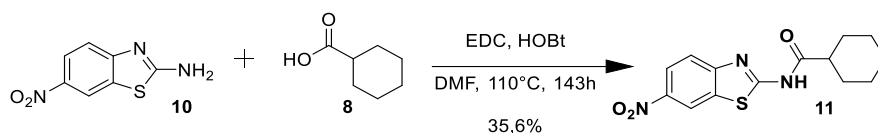
Para a formação do composto **9**, descrito no esquema 1, o composto **7**, 6-cloro-3-benzotiazol-2-amina, foi submetido a uma reação com o composto **8**, o ácido ciclohexanocarboxílico, na presença de EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) e HOBt (N-hidroxibenzotriazol), com aquecimento a 90° C, por aproximadamente 118 horas, obtendo-se um rendimento de 68,6%. A reação foi iniciada com aquecimento uma vez que como o grupo LaSFar já havia

trabalhado alguns outros compostos derivados do benzotiazol e já havia sido observado o comportamento desta classe.



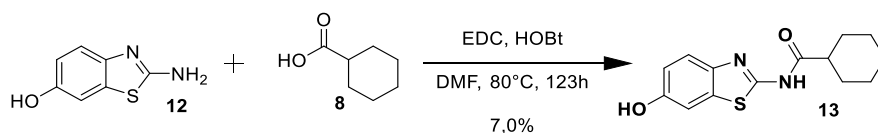
Esquema 1: Síntese do composto **9** contendo o substituinte cloro (Cl).

Para a formação do composto **11**, conforme descrito no esquema 2, o composto **10**, 6-nitro-3-benzotiazol-2-amina, reagiu com o composto **8**, também na presença de EDC e HOBT, com aquecimento a 110° C, por aproximadamente 143 horas, obtendo-se um rendimento de 35,6%.



Esquema 2: Síntese do composto **11** contendo o substituinte nitro (NO<sub>2</sub>).

Por fim, para a formação do composto **13**, conforme descrito no esquema 3, o composto **12**, 2-amino-3-benzotiazol-6-ol, reagiu com o composto **8**, na presença de EDC e HOBT, com aquecimento a 80° C, por aproximadamente 123 horas, obtendo-se um rendimento de 7,0%.



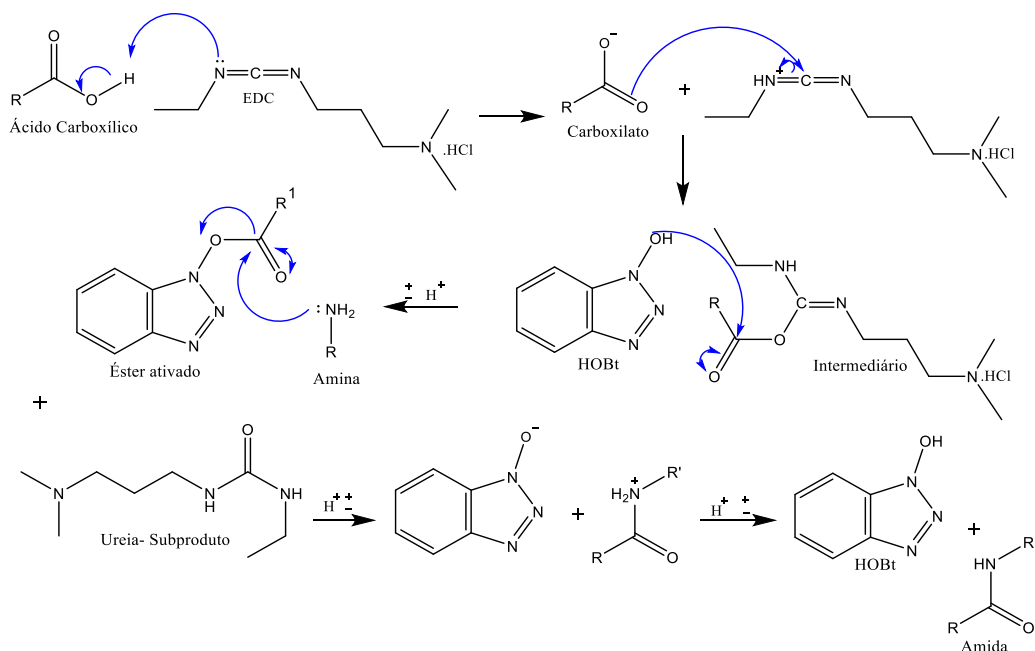
Esquema 3: Síntese do Hit 3 com o substituinte hidroxila (OH)

Esses esquemas descrevem a síntese dos compostos **9**, **11** e **13**, cada um com um substituinte diferente (cloro, nitro e hidroxila, respectivamente), utilizando a mesma metodologia de reação com o composto **8**, sob condições específicas de temperatura e tempo. Os rendimentos foram calculados, a partir do número de mols do produto comparado com o número de mols da amina, que é o reagente limitante da reação.

### 4.3. Mecanismo da amidação com EDC e HOBT

A reação de amidação com EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) com HOBT (*N*-hidroxibenzotriazol) é uma reação química bastante usada para ativar o grupo carboxila de um aminoácido, permitindo a formação de uma ligação amida com outro aminoácido ou uma molécula de amina. Nesta reação, o EDC é o ativador enquanto o HOBT é o catalisador. (L. YANG, 2017) (A MARTINHO, 2021)

No esquema 4, o EDC desprotona o ácido carboxílico formando um carboxilato, em seguida o carboxilato ataca o carbono eletrofílico e forma um intermediário. Na presença do catalisador HOBT, a hidroxila do HOBT realiza um ataque nucleofílico ao carbono eletrofílico do intermediário, e essa etapa resulta na formação de um éster ativado e na liberação de ureia como subproduto. O éster ativado possui um bom grupo de saída, por conta disso ele facilita o ataque nucleofílico, por fim ocorre a transferência de próton formando a amida desejada e o HOBT é restaurado.



Esquema 4: Proposta de mecanismo da amidação do EDC com HOBT

Os três compostos sintetizados tiveram a presença do EDC e HOBT.

#### 4.4. Ponto de fusão

A determinação do ponto de fusão é uma ferramenta fundamental para identificar substâncias, avaliar a pureza, controlar a qualidade dos produtos e verificar a conclusão de reações químicas, essas informações são essenciais para garantir a



segurança, eficácia e confiabilidade de substâncias químicas em diversos campos da ciência e da indústria. (Silverstein e Webster, 2014)

O ponto de fusão do composto **9**, foi feito em triplicata, para que o resultado pudesse ser mais preciso e confiável, os valores encontrados foram de 204,5°C, 202,7°C e 203,4°C, cuja média foi de 203,5°C. Para o composto **11** não foi possível fazer o teste em triplicata uma vez que o produto final é em forma de cristais, o ideal para fazer o ponto de fusão é um pó bem fininho para que possa ser compactado no capilar facilitando a visualização, o resultado obtido foi de 191,8°C. Por último, para o composto **13** também não foi possível fazer o teste em triplicata uma vez que o composto é um sólido viscoso, que se assemelha a um óleo, e dificulta a análise, contudo o resultado encontrado foi de aproximadamente 150,0°C.

#### **4.5. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Um dos critérios usados para a caracterização dos compostos sintetizados foi o espectro de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , uma vez que ele permite determinar a estrutura molecular de compostos orgânicos ou inorgânicos, fornecendo informações sobre ligações químicas, conectividade atômica e arranjo espacial dos átomos. (Silverstein e Webster, 2014)

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **9**, descrito na figura 6, foram observados um singlete em 12,32 ppm referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio do grupo amida, dois multipletos próximos de 8,10 e 7,70 ppm e um duplo duplete em 7,44 ppm referentes aos três hidrogênios ligados ao anel aromático (H2, H3 e H6), além de um multiplete próximo de 2,55 ppm referente à H9 e outros cinco multipletos entre 1,23 e 1,87 ppm referentes aos dez hidrogênios metilênicos do cicloexano (H10 – H14).

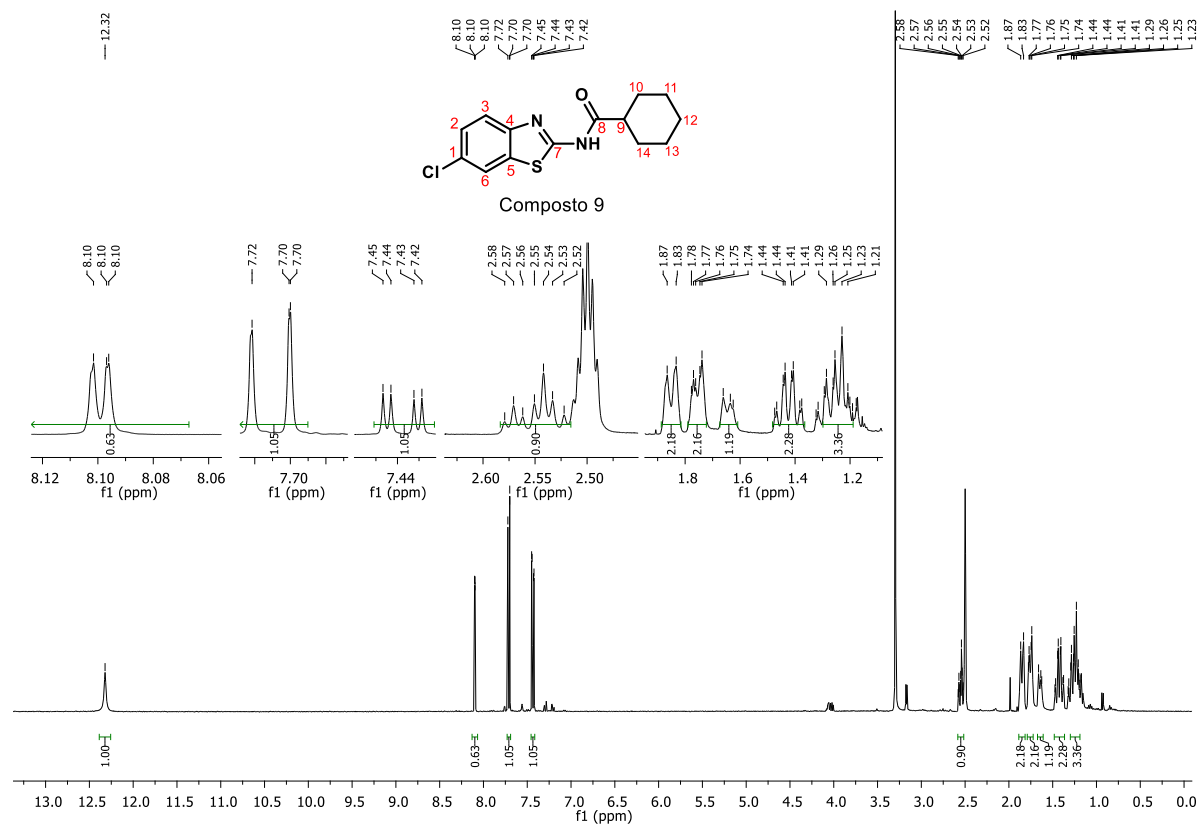


Figura 6: RMN de  $^1\text{H}$  do composto **9** (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT complementa as evidências de obtenção do composto **9**, descrito na figura 7, pois os cinco sinais pra baixo que estão entre 127,90 e 175,79 ppm são referentes aos carbonos não hidrogenados do fragmento benzotiazol e da carbonila (C1, C4, C5, C7 e C8), e os três sinais para cima entre 121,83 e 126,84 ppm referem-se aos carbonos monohidrogenados C2, C3 e C6. O sinal localizado em 44,00 ppm refere-se ao C9, enquanto os sinais para baixo localizados em 29,13, 25,71 e 25,48 ppm referem-se à C10/C14, C11/C13 e C12, respectivamente.

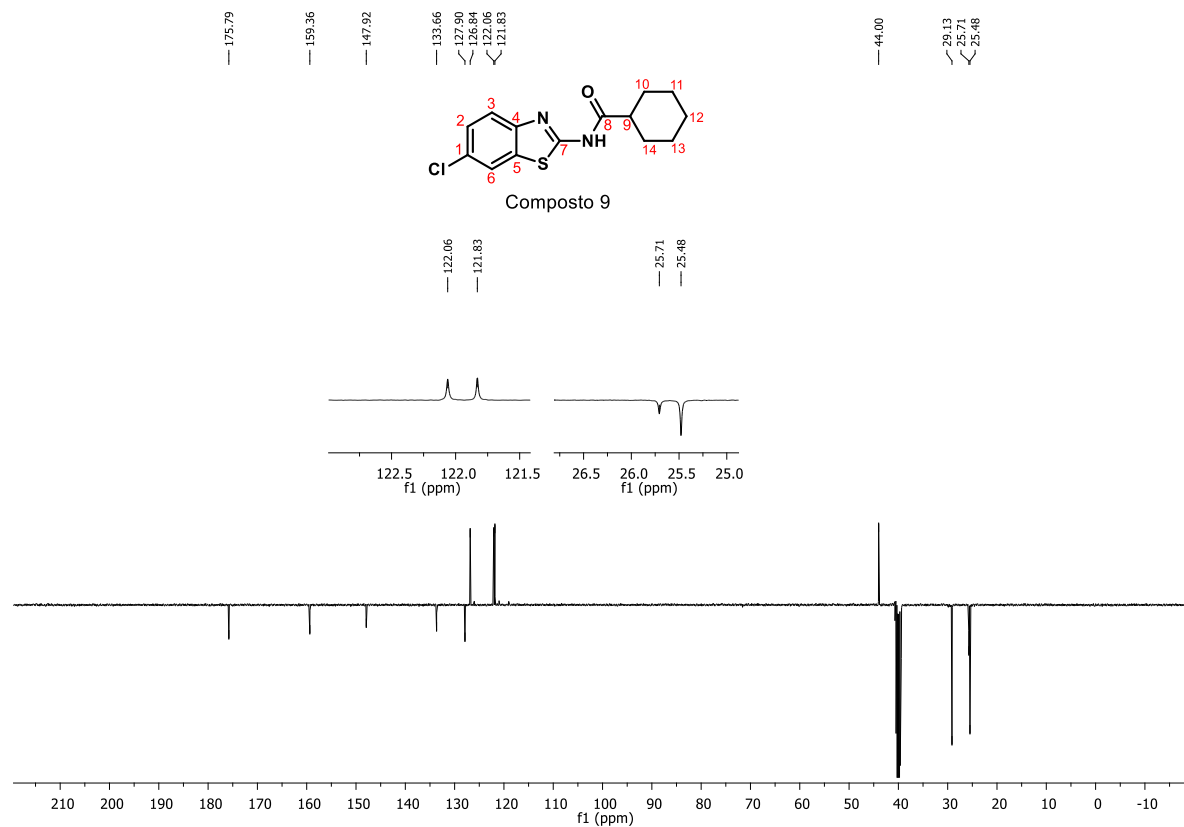


Figura 7: RMN de  $^{13}\text{C}$  APT do composto 9 (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o composto **11**, descrito na figura 8, foram observados um singlete em 12,66 ppm referente ao hidrogênio do grupo amida, os dupletos localizados entre 7,87 e 9,04 ppm referem-se aos três hidrogênios ligados ao C2, C3 e C6, o multipletto que aparece entre 2,55 e 2,62 refere-se ao hidrogênio ligado ao C9 e os multipletos localizados entre 1,26 e 1,90 ppm referem-se aos dez hidrogênios ligados nos carbonos C10 ao C14.

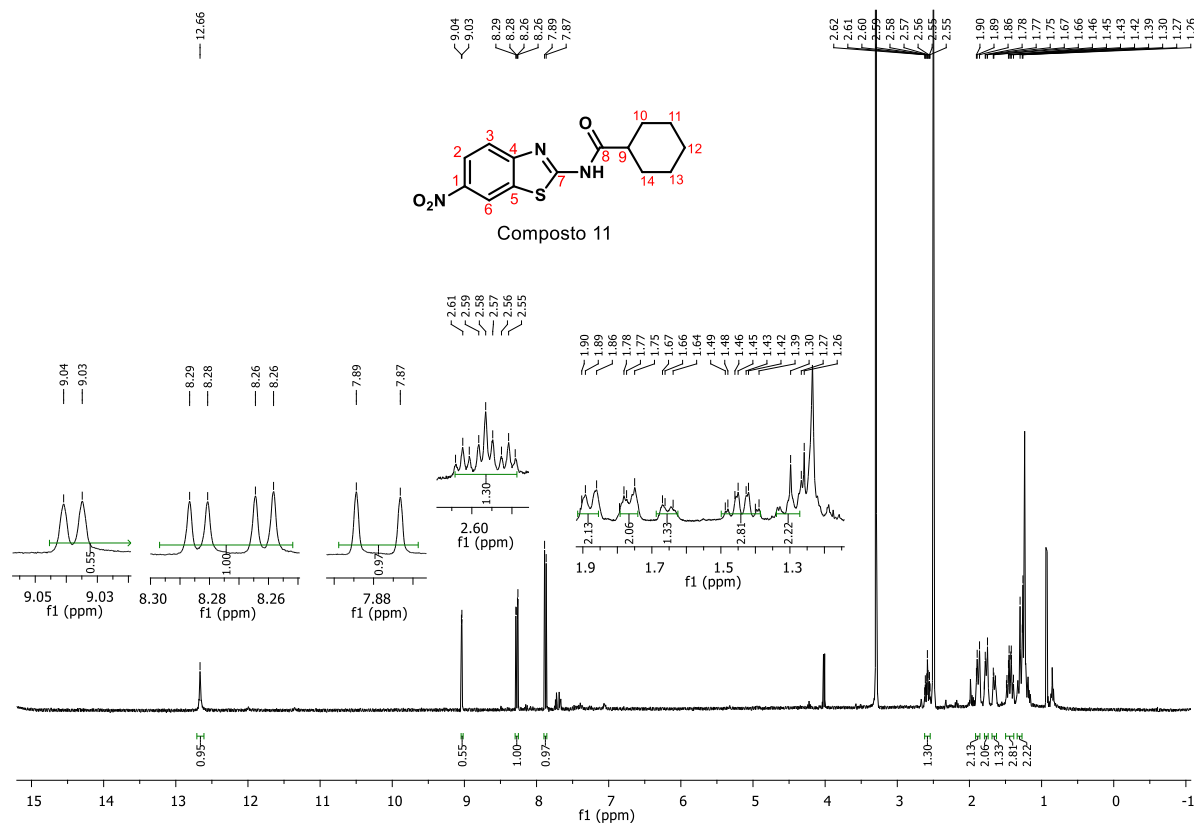


Figura 8: RMN de  $^1\text{H}$  do composto **11** (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT para o composto **11**, conforme ilustrado na figura 9, os cinco sinais pra baixo que estão entre 132,69 e 176,32 ppm são referentes aos carbonos não hidrogenados (C1, C4, C5, C7 e C8), e os três sinais para cima que estão entre 119,45 e 122,20 ppm referem-se aos carbonos monohidrogenados C2, C3 e C6. O sinal localizado em 44,07 ppm refere-se ao C9, enquanto os sinais para baixo localizados em 29,07 ppm refere-se aos C10 e C14, o que está a 25,69 ppm refere-se aos C11 e C13, por fim o sinal a 25,45 ppm refere-se ao C12.

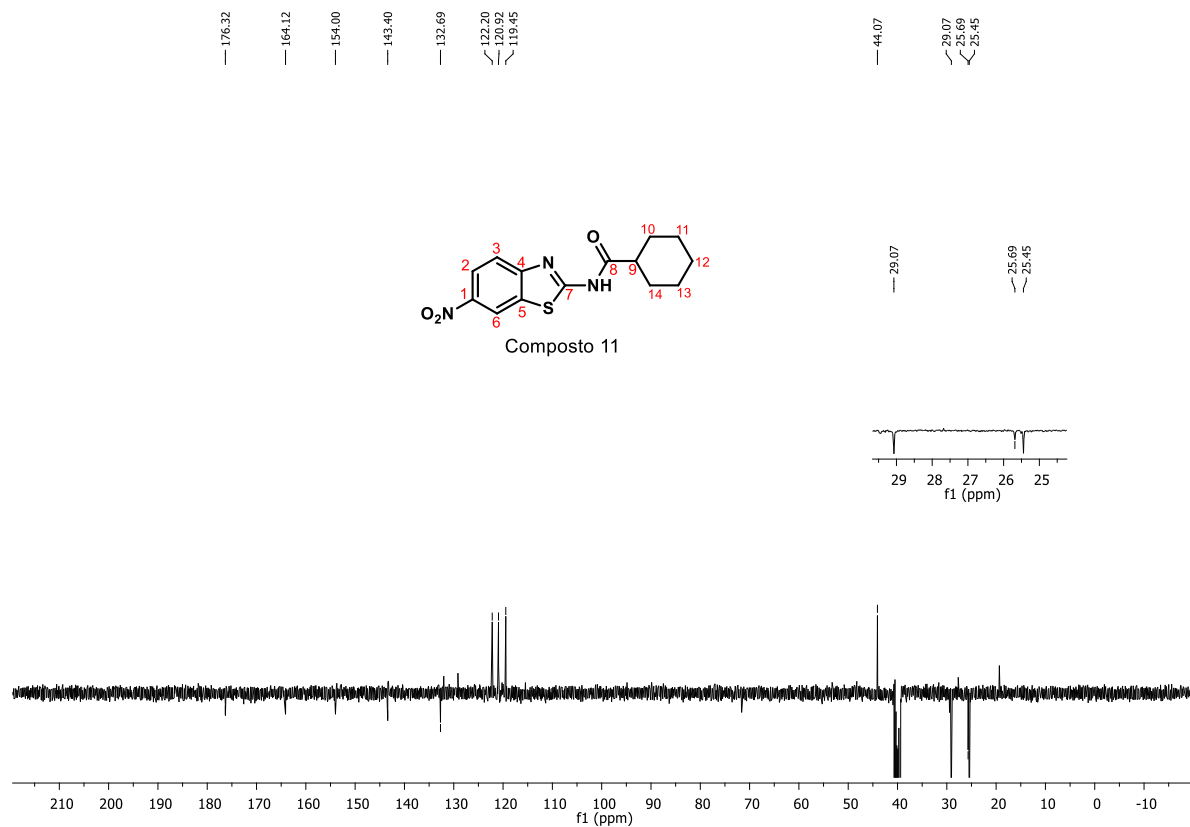


Figura 9: RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **11** (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ).

Para o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **13**, representado na figura 10, foram observados sinais entre 6,91 e 7,53 ppm referentes aos hidrogênios aromáticos H2, H3 e H6, um multipletto que aparece próximo de 2,40 ppm juntamente com o sinal de água referente a H9, além de outros multipletos entre 1,95 e 1,22 ppm referentes aos dez hidrogênios H10-14.



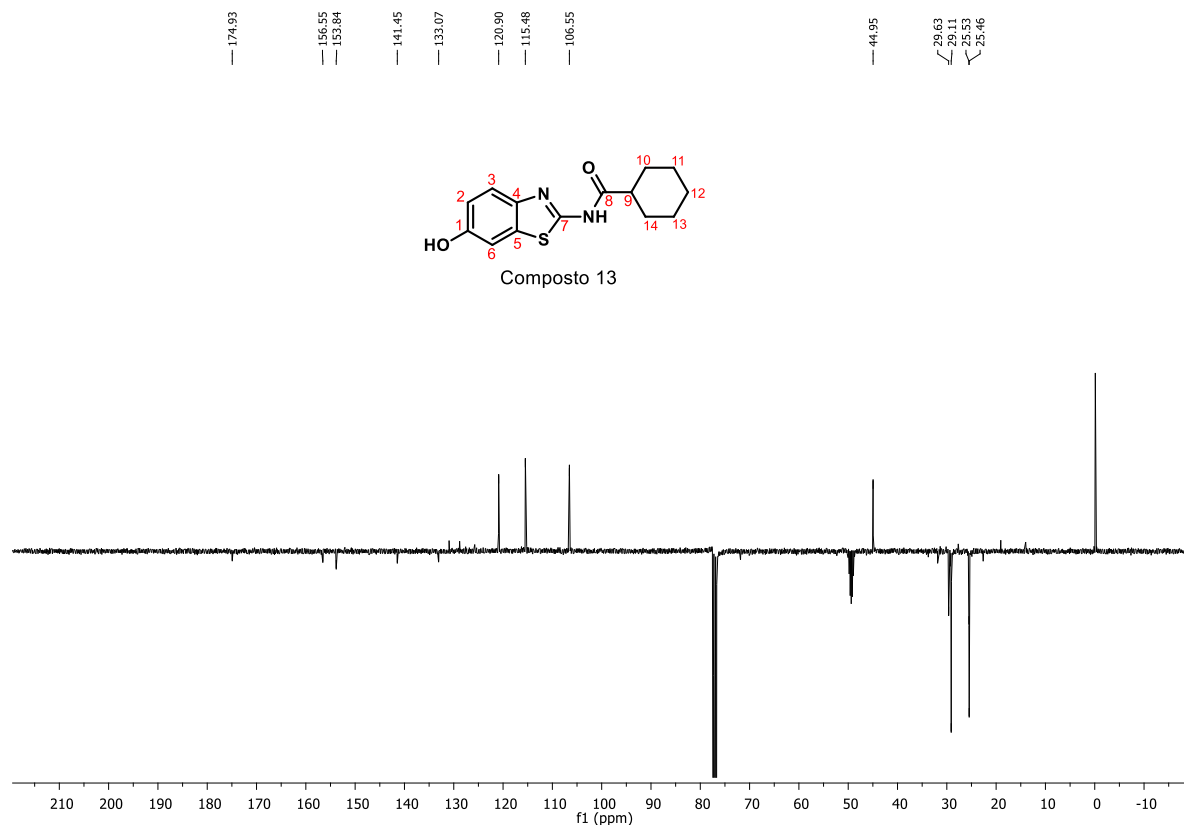


Figura 11: RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **13** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$ ).

É importante ressaltar que o RMN é uma técnica que oferece alta resolução, sensibilidade e seletividade, sendo capaz de distinguir diferentes isômeros, conformações e ambientes químicos, e que através dele podemos confirmar a pureza dos compostos. A ressonância de  $^{13}\text{C}$  apresentou características semelhantes nos três compostos coletados, devido à quantidade de carbonos e ao arranjo espacial semelhante. No entanto, observou-se que os substituintes presentes em cada composto exercem efeitos diferentes devido ao efeito eletrônico.

O efeito eletrônico dos substituintes pode ser percebido pela variação nos deslocamentos químicos dos sinais de ressonância de carbono e na distribuição eletrônica dos compostos.

#### 4.6. Espectro de infravermelho

O espectro de infravermelho, assim como o RMN, desempenha um papel fundamental na identificação, caracterização e análise de compostos químicos, uma vez que ele fornece informações valiosas sobre a estrutura molecular e principalmente

sobre os grupos funcionais presentes na molécula, podendo ser utilizada para verificar a pureza e a qualidade de substâncias químicas. (Silverstein e Webster ,2014)

A caracterização do composto **9** foi realizada a partir das análises de espectroscopia na região do infravermelho (figura 12). Neste espectro observou-se duas bandas entre 3159 e 3065  $\text{cm}^{-1}$ , que foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação N–H do grupo amida. As bandas referentes aos estiramentos das ligações C–H alifáticos foram identificadas na faixa de 2929 a 2853  $\text{cm}^{-1}$ . Além disso, foi possível observar uma banda na região de 1692  $\text{cm}^{-1}$ , referente aos estiramentos das ligações C=O, e entre 600 e 800  $\text{cm}^{-1}$ , observa-se uma banda referente aos estiramentos da ligação C–Cl .

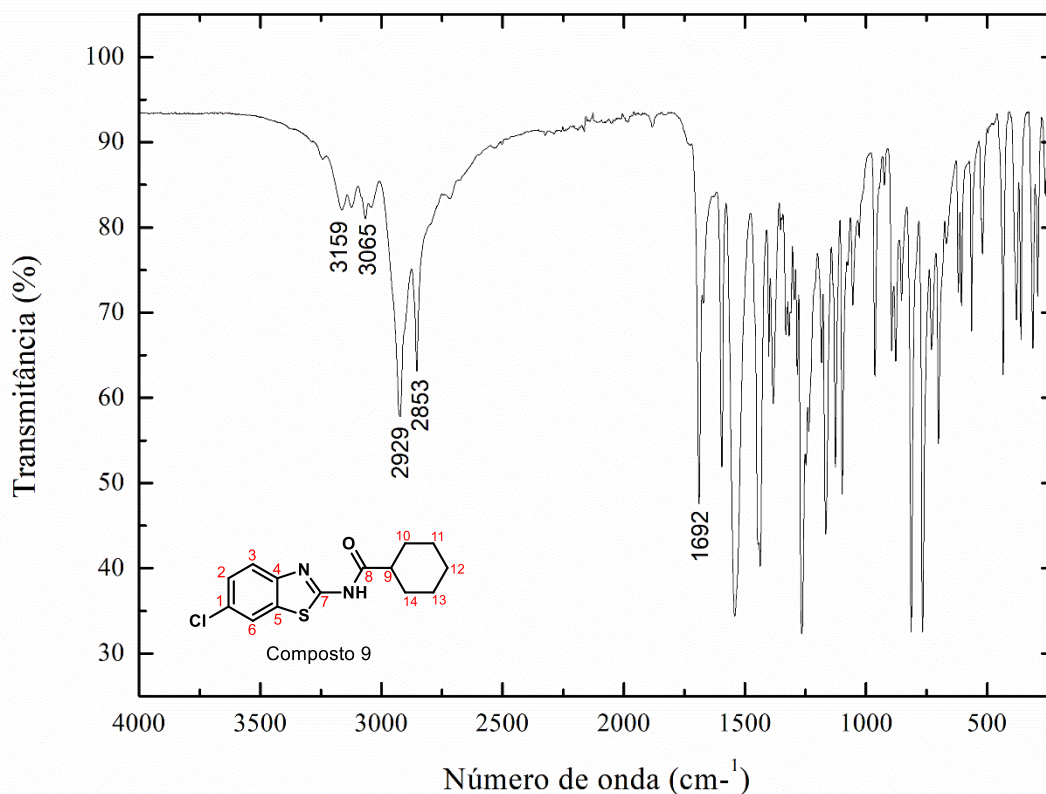


Figura 12: Espectro de Infravermelho do composto **9**.

Na figura 13, está representado a análise de espectroscopia na região do infravermelho para o composto **11**. Neste espectro observou-se duas bandas entre 3301 e 3071  $\text{cm}^{-1}$ , que foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação N–H do grupo amida. As bandas referentes aos estiramentos das ligações C–H alifáticos foram identificadas na faixa de 2929 a 2853  $\text{cm}^{-1}$ , na região de 1692  $\text{cm}^{-1}$  foi observado uma banda referente aos estiramentos da ligação C=O do grupo



amida, e em  $1527\text{ cm}^{-1}$ , uma banda referente aos estiramentos das ligações O–N–O do grupo nitro.

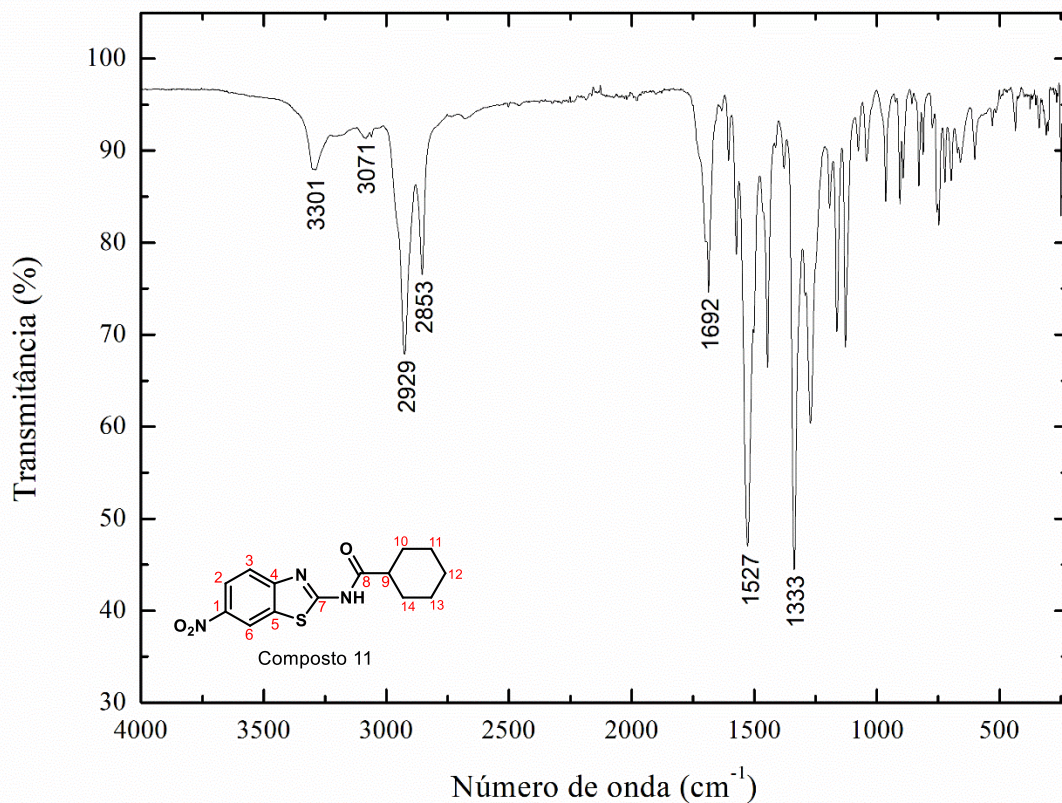


Figura 13: Espectro de Infravermelho do composto **11**.

Para finalizar os espectros de infravermelho, o composto **13** foi representado na figura 14, onde observou-se bandas entre  $3307$  e  $3188\text{ cm}^{-1}$ , que foram atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico da ligação N–H do grupo amida e estiramento da ligação O–H. As bandas referentes aos estiramentos das ligações C–H alifáticas foram identificadas na faixa de  $2929$  a  $2859\text{ cm}^{-1}$ , e na região de  $1610\text{ cm}^{-1}$  uma banda referente aos estiramentos da ligação C=O do grupo amida.

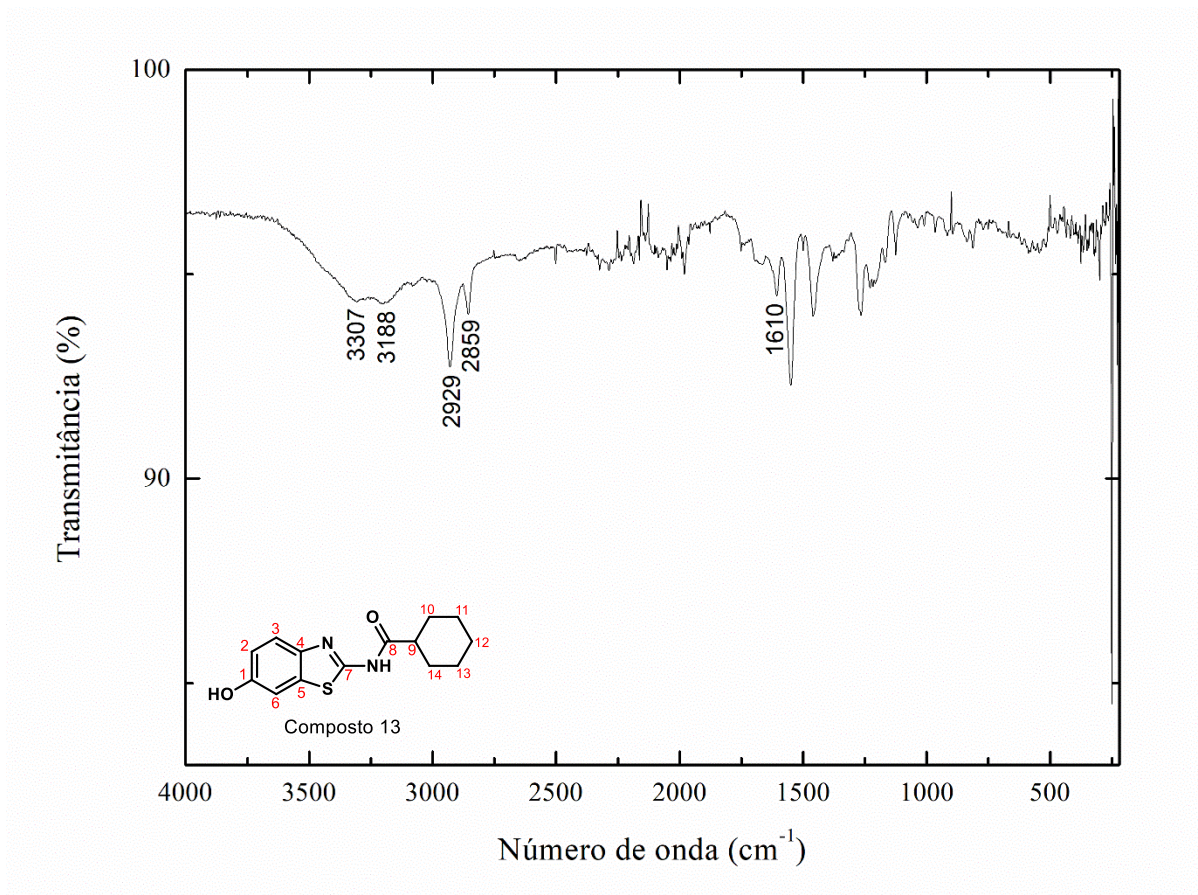


Figura 14: IV do composto **13**.

#### 4.7. Espectrometria de massas de alta resolução (HRMS)

O último teste feito para comprovar a pureza dos compostos sintetizados foi a Espectrometria de Massas de alta resolução, que tem a capacidade de fornecer informações detalhadas sobre a composição química de uma amostra e identificar grupos funcionais. (MASS Spectrometry, 2007)

Em um espectro de HRMS, se registra a intensidade dos íons detectados em função de sua massa. No composto **9**, a razão massa carga ( $m/z$ ) teórica para a reação com o íon  $\text{Na}^+$  é de  $m/z = 317.0486$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , e o valor experimental encontrado foi de  $m/z$  317.0483, gerando um erro de 0,95 ppm (Figura 15).

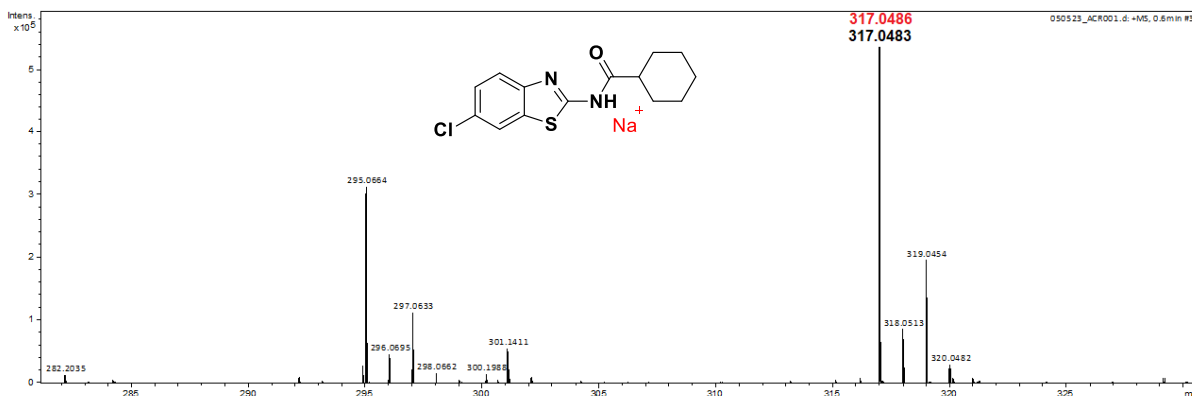


Figura 15: Espectro de Massas de alta resolução do composto 9.

No composto **11**, a razão massa carga teórica para a reação com o íon Na<sup>+</sup> é de  $m/z = 328.0726$  [M+Na]<sup>+</sup>, e o valor experimental encontrado foi de  $m/z$  328.0723 com um erro de 0,91 ppm (Figura 16).

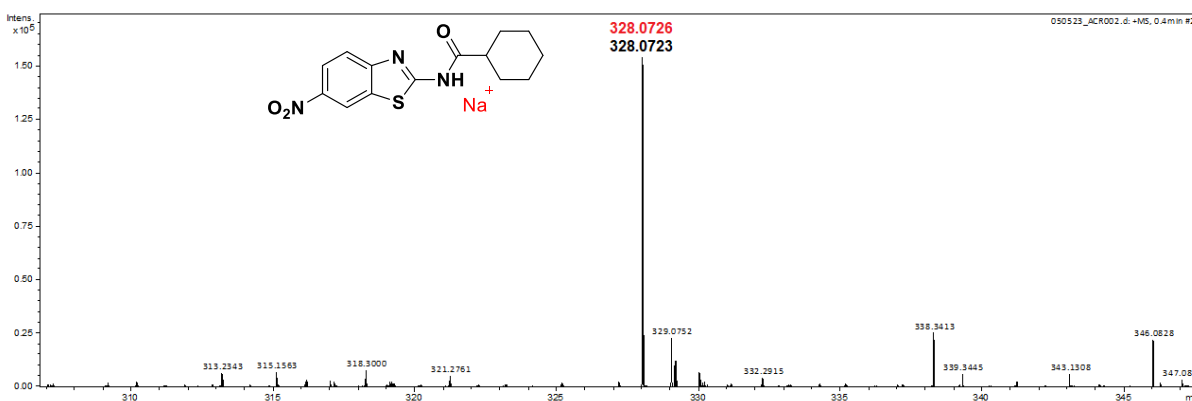


Figura 16: Espectro de Massas de alta resolução do composto 9.

Já para o composto **13**, a razão massa carga teórica para a reação com o íon H<sup>+</sup> é de  $m/z = 299.0821$  [M+H]<sup>+</sup>, e o valor experimental encontrado foi de  $m/z$  299.0821 com um erro de 1,34 ppm (Figura 17).

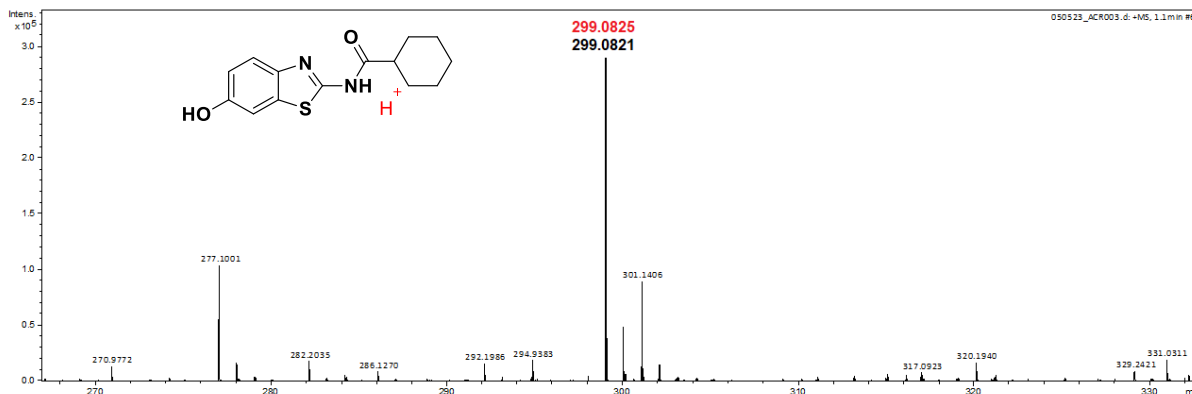


Figura 17: Espectro de Massas de alta resolução do composto 9.

É importante ressaltar que o erro aceitável para HRMS é de até 5 ppm, visto isso todos os espectros de massa de alta resolução comprovaram que o composto sintetizado corresponde ao planejado.

#### 4.8. Resultados biológicos

Os compostos sintetizados **9**, **11** e **13** foram enviados para testes biológicos *in vitro* para que fosse avaliado a potência ( $IC_{50}$ ) contra o parasita *L. infantum*, quanto menor o  $IC_{50}$  maior a potência do composto uma vez que é necessário uma dosagem menor para inibir 50% da atividade biológica alvo, a citotoxicidade ( $CC_{50}$ ), que ao contrário do  $IC_{50}$  espera-se um valor alto, visto que é usada para avaliar a ação do composto contra células não infectadas e seletividade (IS, razão  $CC_{50} / IC_{50}$ ). Os ensaios foram feitos em triplicatas para resultados mais confiáveis.

Na tabela 1, estão os resultados biológicos do composto de referência (previamente sintetizado pelo grupo de pesquisa LaSFar) e os compostos sintetizados neste trabalho com os substituintes cloro, nitro, e hidroxila. Quando fala-se isoladamente da potência do composto ( $IC_{50}$ ), todas as modificações resultaram em uma redução, uma vez que houve um aumento no  $IC_{50}$ . Já para a citotoxicidade ( $CC_{50}$ ), houve um aumento significativo, ou seja, precisa de uma concentração muito maior do composto para que ter citotoxicidade celular. Quando fala-se da seletividade, que é a razão entre o  $CC_{50}$  e o  $IC_{50}$ , o composto **9** apresentou uma melhora, enquanto os outros dois (**11** e **13**) se demonstraram pouco seletivos.

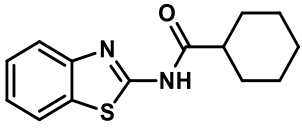
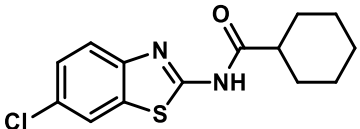
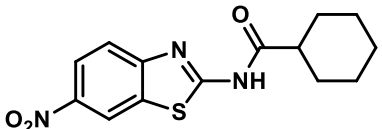
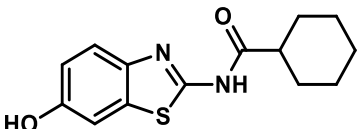
Composto	IC <sub>50</sub> <i>L. infantum</i>	CC <sub>50</sub> THP-1	IS
 Composto de referência	5,5 µM	203,0 µM	36,9
 Composto 9	26,8 µM	>1000 µM	>37,3
 Composto 11	107,8 µM	742,1 µM	6,9
 Composto 13	55,2 µM	717,7 µM	13

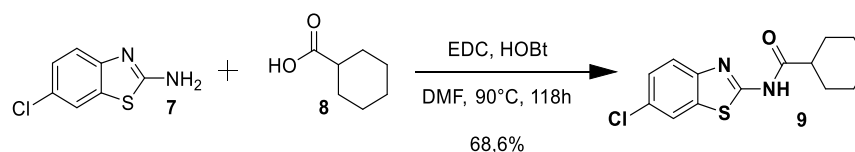
Tabela 1: Comparação dos resultados biológicos dos compostos

É importante destacar que a única modificação feita nos compostos, comparados ao de referência, foi a inclusão dos substituintes cloro, nitro e hidroxila, sendo que o cloro apresentou melhores resultados de seletividade, visto isso é possível propor novas modificações a fim de promover o desenvolvimento *hit-to-lead*, visando um melhor perfil farmacológico. No entanto, todas as modificações estruturais realizadas levou à perda de potência contra o *L. infantum*, evidenciando a importância da presença de hidrogênios no fragmento benzotiazol.

## 5. Parte experimental

### 5.1. Procedimento experimental (Síntese)

#### 5.1.1. Síntese do composto 9

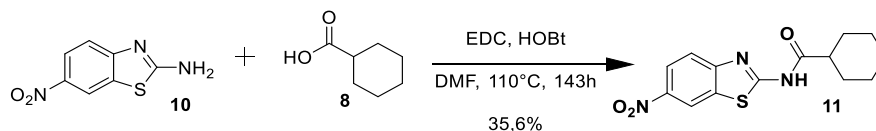


Em um balão de 50 mL, foi adicionado o 6-cloro-3-benzotiazol-2-amina **7** (50 mg, 0,271 mmol) com o ácido carboxílico **8** (104,2 mg, 0,813 mmol), EDC (155,9 mg, 0,813 mmol), HOBt (3,6 mg, 0,027 mmol) e 1 mL de DMF. A reação foi submetida a agitação e aquecimento a 90°C por aproximadamente 118 horas.

Em seguida, resfriou-se o balão, foi acrescentada água destilada gelada (15 mL), agitou-se a mistura por 20 minutos e filtrou-se 98,8 mg de precipitado bege. O rendimento da reação foi de 68,6%.

**9**: sólido fino e amarelado; F.F.: 202,7°C–204,5°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO); δ 12,32 (s, 1H); 8,11 – 8,09 (m, 1H); 7,73 – 7,69 (m, 1H); 7,44 (dd, J = 8,6; 2,2 Hz; 1H); 2,58 – 2,52 (m, 1H); 1,85 (d, J = 13,1 Hz; 2H), 1,78 – 1,72 (m, 2H); 1,67 – 1,60 (m, 1H), 1,44 -1,41 (m, 2H); 1,34 – 1,16 (m, 3H). RMN de <sup>13</sup>C APT (101 MHz, DMSO) δ 175,79; 159,36; 147,92; 133,66; 127,90; 126,84; 122,06; 121,83; 44,00; 29,13; 25,71; 25,48. FT-IR ν (cm<sup>-1</sup>): 3159-3065 (N–H), 2929-2853 (Csp<sup>3</sup>–H), 1692 (C=O), 1300-1200 (H–O–C=O). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>2</sub>NaOS<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> = 317,0486 m/z, encontrado [M + Na]<sup>+</sup> = 317,04863 m/z, erro = 0,95ppm.

### 5.1.2. Síntese do composto **11**



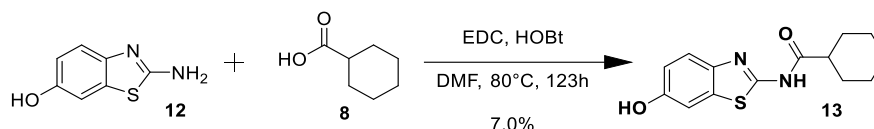
Em um balão de 50 mL, foi adicionado o 6-nitro-3-benzotiazol-2-amina **10** (50 mg, 0,256 mmol) com o ácido carboxílico **8** (98,435 mg, 0,768 mmol), EDC (147,2 mg, 0,768 mmol), HOBt (3,513 mg, 0,026 mmol) e 1 mL DMF. A reação foi submetida a agitação e aquecimento a 110°C por aproximadamente 143 horas.

Em seguida, resfriou-se o balão, foi acrescentada água destilada gelada (15 mL), agitou-se a mistura por 20 minutos e filtrou-se 27,7 mg de precipitado cinzo/preto. O precipitado foi purificado por coluna cromatográfica usando xx como eluente, levando à formação do composto **11** em 35,6% de rendimento.

**11**: Cristais amarelos; F.F.: 191,8°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO); δ 12,66 (s, 1H); 9,04 (d, J = 2,4 Hz, 1H); 8,27 (dd, J = 8,9; 2,4 Hz, 1H), 7,88 (d, J = 8,9 Hz; 1H); 2,62-2,55 (m, 1H); 1,94 – 1,84 (m, 2H); 1,79 - 1,75 (m, 2H); 1,71 – 1,62 (m, 1H); 1,46 – 1,39 (m, 3H); 1,34 – 1,23 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C APT (101 MHz, DMSO) δ 176,32; 164,12; 154,00; 143,40; 132,69; 122,20; 120,92; 119,45; 44,07; 29,07; 25,69; 25,45.

FT-IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3301-3071 (N–H), 2929-2853 (Csp<sup>3</sup>–H), 1692 (C=O), 1527 (H–O–C=O). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>14</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>S<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> = 328,0726 m/z, encontrado [M + Na]<sup>+</sup> = 328,0723 m/z, erro = 0,91 ppm.

### 5.1.3. Síntese do composto 13



Em um balão de 50 mL, foi adicionado o 2-amino-3-benzotiazol-6-ol **12** (50 mg, 0,3008 mmol) com o ácido carboxílico **8** (38,554 mg, 0,3008 mmol), EDC (57,6533 mg, 0,3008 mmol), HOBT (4,053 mg, 0,030 mmol) e 1 mL de DMF. A reação foi submetida a agitação e aquecimento por aproximadamente 123 horas a 80°C.

Em seguida, resfriou-se o balão, foi acrescentada água destilada gelada (15 mL), agitou-se a mistura por 20 minutos e filtrou-se 15,6 mg de precipitado.

**13**: Sólido viscoso amarelo escuro/ marrom; F.F.: 150°C; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> e DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7,51 (d, J = 8,7 Hz; 1H); 7,20 (d, J = 2,4 Hz; 1H); 6,92 (dd, J = 8,7; 2,4 Hz; 1H); 2,44 – 2,33 (m, 3H); 1,94 (d, J = 11,8 Hz; 2H); 1,83 (d, J = 12,6 Hz; 2H); 1,70 (d, J = 10,7 Hz; 1H); 1,58-1,50 (m, 3H); 1,35 – 1,25 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C APT (101 MHz, CDCl<sub>3</sub> e DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  174,93; 156,55; 153,84; 141,45; 133,07; 120,90; 115,48; 106,55; 44,95; 29,63; 29,11; 25,53; 25,46. FT-IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3307-3188 (N–H), 2929-2859 (Csp<sup>3</sup>–H), 1610 (C=O). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>S<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> = 299,0825 m/z, encontrado [M + Na]<sup>+</sup> = 299,0821 m/z, erro = 1,34 ppm.

## 5.2. Procedimento experimental (Biológico)

### 5.2.1. Avaliação da potência (IC<sub>50</sub>) contra *L. infantum in vitro*

Monócitos derivados da linhagem monocítica humana THP-1 (5x10<sup>4</sup>) foram diferenciados em macrófagos pela adição de 20ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA) em cultura. Após 72 horas da diferenciação de macrófagos THP-1, em placas pretas de 96 poços (Corning Incorporated, Corning, NY), eles foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) transfectada com o gene tdTomato, em fase estacionária (20 parasitos por macrófago)



por 4 horas. Após três lavagens com PBS 1X, as células infectadas foram tratadas com várias concentrações dos compostos testados.

Foram realizados dois experimentos independentes, em quadruplicata de cada amostra. o IC<sub>50</sub> foi determinado pelo método não linear modelo de inclinação variável de regressão de acordo com a equação “log (inhibitor) vs. response” no GraphPad Prisma v.8.2.0. A concentração do composto que inibe 50% do crescimento dos parasitos (IC<sub>50</sub>) foi determinada pela diminuição da fluorescência dos parasitos na ausência e presença do composto, após 72 horas de exposição, por meio de um leitor de microplacas (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com valores de excitação e emissão: 554 e 581nm, respectivamente.

### **5.2.2. Avaliação da citotoxicidade (CC<sub>50</sub>)**

Macrófagos THP-1 (5,0x10<sup>4</sup>) foram diferenciados em placas de 96 poços e incubadas por 72 horas em meio RPMI 1640 suplementado à 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de diferenciação das células, o meio de cultura foi removido, e adicionado meio RPMI 1640 suplementado.

Posteriormente, os macrófagos foram tratados com os compostos, empregando-se diluições seriadas, durante 72 horas à 37°C, em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após o período de tratamento, a viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue (Invitrogen™). Foram adicionados aos poços 20μL de uma solução de Alamar Blue em uma diluição de 1:1 e após quatro horas de incubação a leitura foi realizada através dos seguintes comprimentos de onda: 570 e 600nm.

Os resultados foram expressos como o percentual diferença na redução entre células tratadas e não tratadas. A concentração do composto que inibe 50% da viabilidade da célula THP-1 (CC<sub>50</sub>) foi obtida por análise de regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 8.0, Inc. Foram realizados dois experimentos independentes, em triplicata de cada amostra.



## 6. Conclusão

Neste trabalho foram realizadas a síntese de três compostos derivados de benzotiazol e acila, cujo composto de referência é uma otimização de um resultado de Fleau e seus colaboradores que até então era testado contra *T. Cruzi*, mas que apresentou bons resultados contra *L. Infantum*. Nestes compostos acrescentou-se três substituintes diferentes no fragmento de benzotiazol para verificar o comportamento dessas modificações na inibição do parasita. Os substituintes adicionados foram respectivamente o cloro, grupo nitro e hidroxila.

Todos os compostos passaram por testes de ponto de fusão, RMN, infravermelho e HRMS para comprovar sua estrutura química e pureza. Nos ensaios biológicos todos os substituintes apresentaram um aumento do IC<sub>50</sub>, que pode ser considerada como uma diminuição da potência dos candidatos a fármacos, em contrapartida também apresentaram um aumento da citotoxicidade, que indica que são necessárias dosagens maiores para que este composto possa ser tóxico para o organismo humano.

Um ponto importante também a ser levado em consideração é que quanto a seletividade o composto com cloro (**9**) apresentou melhores resultados, isso pode ser influência de que este elemento é muito eletronegativo e pode exercer um efeito indutivo retirador de elétrons, em que o cloro atrai a densidade eletrônica do anel de benzeno, reduzindo a sua densidade e tornando-o menos reativo em certas reações ou ele pode influenciar a ressonância no anel aromático, afetando a distribuição eletrônica e a estabilidade do sistema.

Os compostos sintetizados foram menos ativos do que o composto de referência, demonstrando que talvez o Hidrogênio seja o melhor substituinte, além de que este estudo pode fornecer novas propostas de modificações estruturais que podem aprimorar o perfil farmacocinético e farmacodinâmico dessa série de compostos levando ao *Hit-to-lead*, tanto em termos de atividade contra a leishmaniose quanto em relação à sua segurança e eficácia, avançando assim no desenvolvimento de potenciais fármacos contra essa doença. (BAXTER, 2006)

## 7. Referências bibliográficas

BAXTER, A. et al. Hit-to-Lead studies: The discovery of potent, orally bioavailable thiazolopyrimidine CXCR2 receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. v. 16, p. 960-963, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.10.091>

CDC. Parasitas: Leishmaniose. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>. Acesso em: 2 maio 2023.

DNDI20. Doenças: Leishmaniose Visceral. [S. l.], [2023]. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/visceral-leishmaniasis/projects-achievements/>. Acesso em: 28 abr. 2023.

FIOCRUZ (Manguinhos RJ). Fundação Oswaldo Cruz; VILELA, Mauricio; MENDONÇA, Sergio. Leishmaniose. Manguinhos - RJ, 10 set. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>. Acesso em: 21 abr. 2023.

FLEAU, Charlotte et al. Chagas Disease Drug Discovery: Multiparametric Lead Optimization against *Trypanosoma cruzi* in Acylaminobenzothiazole Series. *Journal of Medicinal Chemistry*, [s. l.], p. 10362-10375, 2019. DOI J. Med. Chem. 2019, 62, 10362-10375.

LEISHMANIOSE VISCERAL (CALAZAR). [S. l.], [2023]. Disponível em: <https://drauziovarella.uol.com.br/doencas-e-sintomas/leishmaniose-visceral-calazar/>. Acesso em: 28 abr. 2023.

MASS Spectrometry: Principles and Applications. 3. ed. atual. SP: [s. n.], 2007. Disponível em: <https://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf>. Acesso em: 3 jun. 2023.

MARTINHO, Ana Clara Cassiano. Planejamento, síntese e estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de uma classe de sulfonilpiperazinas potente contra o *Trypanosoma cruzi*. Orientador: Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior. 2021. Dissertação (Mestrado, Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. Disponível em: [https://docs.google.com/document/d/15S-q\\_1NZBywJCE-vBpVp0PBvy-AVVsy6-Uq7S6n8uq4/edit?pli=1](https://docs.google.com/document/d/15S-q_1NZBywJCE-vBpVp0PBvy-AVVsy6-Uq7S6n8uq4/edit?pli=1). Acesso em: 20 mar. 2023.

MEDECINS SANS FRONTIERES. Medecins Sans Frontieres, Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.msf.org.br/> Acesso em: 8 maio 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral: Casos de leishmaniose visceral. Brasil, 1980 a 2021. In: Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. [S. l.], 16 maio 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022/lv-graficos-e-mapas.pdf>. Acesso em: 5 maio 2023.

MOWBRAY, Charles E. et al. DNDI-6148: A Novel Benzoxaborole Preclinical Candidate for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, [s. l.], p. 16159-16176, 2021. DOI J. Med. Chem. 2021, 64, 16159–16176.

NAGLE, Advait S. et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chemical Reviews*, Califórnia, p. 11305–11347, 2014. DOI [pubs.acs.org/CR](https://pubs.acs.org/CR). Disponível em: [https://docs.google.com/document/d/1rYrIS9glaTQ9bVUCyQi0gATlqSD8\\_QCwy3EY\\_4edkQI/edit](https://docs.google.com/document/d/1rYrIS9glaTQ9bVUCyQi0gATlqSD8_QCwy3EY_4edkQI/edit). Acesso em: 30 abr. 2023.

SARAVANAN, Rajan; SIDHU, Sachdev S. Simplified synthetic antibody libraries. *Methods in Enzymology*, [s. l.], v. 502, p. 3-23, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/ic50>. Acesso em: 16 jun. 2023.

SILVERTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 6. ed. United States of America: [s. n.], 2014. Disponível em: <https://quimicafundamental.files.wordpress.com/2014/05/spectrometric-identification-of-organic-compounds-silverstein.pdf>. Acesso em: 17 maio 2023.

THOMPSON, Andrew M. et al. Development of (6R)-2-Nitro-6-[4-(trifluoromethoxy)phenoxy]-6,7-dihydro-5H-imidazo[2,1-b][1,3]oxazine (DNDI-8219): A New Lead for Visceral Leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, [s. l.], p. 2329-2352, 2018. DOI J. Med. Chem. 2018, 61, 2329–2352.

WENLOCK, M. C. A comparison of physicochemical property profiles of development and marketed oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*. v. 46, p. 1250 - 1256, 2003. <https://doi.org/10.1021/jm021053p>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *CONTROL OF THE LEISHMANIASES*. Control of the leishmaniasis, Geneva, 2010. Disponível em: <https://docs.google.com/document/d/1fVdFo0NcziJX7nDFue4vK-slqs2BGTyFnptAbWQTkWg/edit>. Acesso em: 2 maio 2023.

WUNBERG, T. et al. Improving the hit-to-lead process: data-driven assessment of drug-like and lead-like screening hits. *Drug Discovery Today*. v. 11, n. 3/4, p. 175 - 180, 2006. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03700-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03700-1)

YANG, L. et al. Lewis acid-catalyzed reductive amination of aldehydes and ketones with N,N-dimethylformamide as dimethylamino source, reductant and solvent. *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 360, n. 3, p. 485-490, 2018. <https://doi.org/10.1002/adsc.201701221>