



Universidade Federal de Uberlândia



Graduação em Química Industrial

Brenda Rosa Macedo dos Santos

**Síntese e estudo de derivados de benzotiazóis  
contra o parasita *Leishmania infantum*.**

Uberlândia

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL**

**Síntese e estudo de derivados de benzotiazóis  
contra o parasita *Leishmania infantum*.**

Brenda Rosa Macedo dos Santos

Trabalho de conclusão de curso em  
Química Industrial. Universidade Federal  
de Uberlândia, como requisito para  
obtenção do diploma de graduação em  
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

Uberlândia

2023

**Síntese e estudo de derivados de benzotiazóis  
contra o parasita *Leishmania infantum*.**

Brenda Rosa Macedo dos Santos

Trabalho de conclusão de curso em  
Química Industrial. Universidade Federal  
de Uberlândia, como requisito para  
obtenção do diploma de graduação em  
Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.

**Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior.**

---

**Prof. Dr. Jefferson Luis Ferrari**

---

**Prof. Dr. Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva**

Uberlândia

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Marcileny e Marcos por todo apoio durante todos esses anos, à minha irmã que sempre me deu forças a buscar meus objetivos, ao meu namorado Heitor que é meu companheiro e sempre me motiva em tudo o que faço, a minha sobrinha Henrieta e aos meus bichinhos de estimação Skye e Amora por toda alegria do dia a dia. Ao meu orientador Prof. Celso, pela oportunidade, por toda assistência, paciência e compreensão durante meu período de pesquisa e graduação; aos colegas do LaSFar Thibault, Douglas e Danilo que auxiliaram na execução desse trabalho.

A todos os meus amigos que me acompanharam durante esses anos, sempre me motivando e inspirando: Ieda, Monalysa, Natália, Luan, Leonardo, Arthur, Waleska, Taís, Thaynah, Mirian, Letícia, Wilson, Michele.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença pandêmica causada por parasitas vetoriais do gênero *Leishmania*. Esses parasitas fagócitos, utilizam os mosquitos (flebotomíneos sugadores de sangue) como hospedeiros e transmissores da doença. Existem diversos tipos de leishmaniose, sendo a forma visceral a mais perigosa, que é causada pelo parasita *Leishmania infantum*, muito comum em países de clima tropical e com regiões de vulnerabilidade social, como o Brasil. Para o tratamento da doença, existem fármacos que são eficazes, mas que contém muitos efeitos colaterais, sendo assim, necessário o estudo e pesquisa de novos fármacos com intuito de melhorias no tratamento. Nesse sentido, os derivados de benzotiazóis, merecem destaque, já que são conhecidos na indústria farmacéutica por sua considerável atividade biológica. Com estudos, utilizando os benzotiazóis contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, foram iniciados também, estudos contra o *Leishmania infantum*, já que ambos fazem parte da família *Trypanosomatidae* do filo de protozoários que são caracterizados por um único axonema e por uma organela conhecida como cinetoplasto, uma mitocôndria rica em ácido desoxirribonucléico (DNA). Sendo assim, tendo características parecidas na estrutura celular e na forma de contaminação, foi identificado a possibilidade de estudo de compostos testados para *Trypanosoma cruzi*, serem testadas também para *Leishmania infantum*. Com isso, foi testada uma estrutura inicial e realizada três tipos de modificações nela, através de diferentes aminas, com reações de amidação na presença de EDC e HOBt, para verificar possíveis melhorias ou redução, nos valores de IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> e IS, em comparação ao composto de referência (IC<sub>50</sub>: 5,5 5,5 uM; CC<sub>50</sub>: 203 uM; IS: 36,3), pois estes são parâmetros importantes na avaliação de um composto para subsequente realização de testes *in vivo* e para possíveis fármacos. Os compostos 8, 9 e 10 foram sintetizados com sucesso e purificados, obtendo um rendimento de 42%, 47% e 55% e com resultados biológicos (IS: 4,3; 19,8; 5,5 respectivamente). Dessa forma, obtivemos os resultados que, todas as moléculas sintetizadas tiveram efeitos de atividade biológica inferiores do composto de referência, mas que serviram de base para entendermos um pouco mais sobre essa classe tão importante nos estudos de farmacologia e como esses compostos se comportam com as modificações estruturais.

Palavras-chave: Leishmaniose, *Leishmania infantum*, Benzotiazóis, Atividades biológicas, amidação.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a pandemic disease caused by vector parasites of the genus *Leishmania*. These phagocyte parasites use blood-sucking sandflies, as hosts and transmitters of the disease. There are several types of leishmaniasis, being the most dangerous the visceral form, which is caused by the parasite *Leishmania infantum*, very common in countries with a tropical climate and with regions of social vulnerability, such as Brazil. For the treatment of the disease, there are drugs that are effective, but that contain many side effects, so it is necessary to study and research for new drugs in order to improve the treatment. So, studies with benzothiazole groups, which are already known in the pharmaceutical industry for their considerable biological activity, were initiated. With studies, using benzothiazoles against the parasite *Trypanossoma cruzi*, studies against *Leishmania infantum* were also initiated, since both are part of the family *Trypanosomatidae* of the phylum of protozoa that are characterized by a single axoneme and an organelle known as kinetoplast, a mitochondria rich in deoxyribonucleic acid. Therefore, having similar characteristics in the cellular structure and in the form of contamination, it was identified the possibility of studying compounds tested for *Trypanossoma cruzi*, to be tested also for *Leishmania infantum*. With this, an initial structure was tested and three types of modifications were made to it. Through different amines, with amidation reactions in the presence of EDC and HOBt, to verify possible improvements or reduction in the values of IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> and IS, compared to the reference compound (IC<sub>50</sub>: 5,5 5,5 uM; CC<sub>50</sub>: 203 uM; IS: 36,3), as these are important parameters in the evaluation of a compound for subsequent in vivo testing and for potential drugs. Compounds 8, 9 and 10 were successfully synthesized and purified, obtaining a yield of 42%, 47% and 55% and with biological results (IS: 4.3; 19.8; 5.5 respectively). In this way, we obtained the results that all synthesized molecules had lower biological activity effects than the reference compound, but which served as a basis for us to understand a little more about this class that is so important in pharmacology studies and how these compounds behave with the structural modifications.

Palavras-chave: Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, Benzothiazoles, Biological activities, amidation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação diagramática do ciclo de vida dos parasitas Leishmania.....	12
<b>Figura 2:</b> Mapa de casos de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil.....	14
<b>Figura 3:</b> Modificações iniciais de benzotiazóis utilizadas como base do presente estudo. ....	17
<b>Figura 4:</b> Compostos 7 (de referência), 8, 9 e 10 propostos para síntese.....	11
<b>Figura 5:</b> A) identificação da presença do produto na fase orgânica. B) ausência do produto na fase aquosa.....	14
<b>Figura 6:</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto 8.....	16
<b>Figura 7:</b> Espectro RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto 8.....	17
<b>Figura 8:</b> Espectro HRMS ( $\text{ESI}^+$ ) do composto 8. ....	18
<b>Figura 9:</b> Espectro na região do infravermelho do composto 8.....	18
<b>Figura 10:</b> CCD indicando a conclusão reação, sem material de partida.....	19
<b>Figura 11:</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO) do composto 9.....	21
<b>Figura 12:</b> Espectro RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO) do composto 9.....	22
<b>Figura 13:</b> Espectro HRMS ( $\text{ESI}^+$ ) do composto 8. ....	23
<b>Figura 14:</b> Espectro da região do infravermelho do composto 9.....	23
<b>Figura 15:</b> CDD indicando a conclusão reação, sem material de partida. ....	24
<b>Figura 16:</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto 10.....	25
<b>Figura 17:</b> Espectro RMN $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto 10.....	26

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Reação de amidação na presença de EDC e HOBt .....	13
<b>Esquema 2:</b> Síntese do derivado de benzotiazol com átomo de Oxigênio.....	14
<b>Esquema 3:</b> Síntese do derivado de benzotiazol com grupo Amina. ....	19
<b>Esquema 4:</b> Síntese do derivado de benzotiazol com retirada do benzeno.....	24

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ do composto 8 ( $\text{CDCl}_3$ ).....	16
<b>Tabela 2:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO) do composto 8.....	17
<b>Tabela 3:</b> Dados de número de onda de infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) do composto 8.....	19
<b>Tabela 4:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ do composto 9 (DMSO). ....	21
<b>Tabela 5:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, DMSO) do composto 9.....	22
<b>Tabela 6:</b> Dados de número de onda de infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) do composto 9. ....	23
<b>Tabela 7:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ do composto 10 ( $\text{CDCl}_3$ ).....	26
<b>Tabela 8:</b> Dados de RMN de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do composto 10 .....	26
<b>Tabela 9:</b> Dados de número de onda de infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) do composto 10.....	27
<b>Tabela 10:</b> Compostos com seus respectivos valores de $\text{IC}_{50}$ , $\text{CC}_{50}$ e IS.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC <sub>50</sub>	citotoxicidade em concentração de 50%
CCD	Cromatografia em camada delgada
DCM	Diclorometano
DMF	N,N-dimetilformamida
EDC	Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho
HOBt	N-hidroxibenzotriazol
HRMS	Espectrometria de Massas de alta resolução
IC <sub>50</sub>	metade da concentração inibitória máxima
IS	índice de seletividade
<i>L. Infatum</i>	<i>Leishmania infantum</i> (Parasita causador da Leishmaniose Visceral)
LaSFar	Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos
LC	Leishmaniose cutânea
LV	leishmaniose visceral
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i> (Parasita da doença de chagas)
TMS	Tetrametilsilano

## Sumário

<a href="#">RESUMO</a> .....	
LISTA DE FIGURAS .....	
LISTA DE ESQUEMAS .....	
LISTA DE TABELAS .....	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	
1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1. Leishmaniose.....	11
1.2. Transmissão, agente etiológico, fases e tipos da doença.....	11
1.3. Leishmaniose no mundo.....	12
1.4. Leishmaniose no Brasil e na América Latina.....	13
1.5. Tratamento .....	14
1.6. Desenvolvimento de novos fármacos.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVO.....	11
3.1. Objetivo geral.....	11
3.2. Objetivo específico.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
4.1. Planejamento para síntese dos derivados de benzotiazóis.....	12
4.2. Amidação .....	12
4.3. Síntese dos compostos almejados .....	14
4.4. Resultados Biológicos.....	28
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	29
5.1. Síntese .....	29
5.1.1 Preparação do composto 8 .....	29
5.1.2 Preparação do composto 9 .....	30
5.1.3 Preparação do composto 10 .....	30
5.2 Análise biológica.....	30
5.2.1. Avaliação da suscetibilidade in vitro .....	30
5.2.2. Avaliação da citotoxicidade .....	31
6. CONCLUSÃO .....	31
7. BIBLIOGRAFIA.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Leishmaniose

A leishmaniose é o termo global utilizado para doenças viscerais e zooticas causada pelos parasitas vetoriais do gênero *Leishmania*. Os protozoários desse gênero, são um grupo de diversos parasitas de fagócitos que são transmitidos através de flebotomíneos sugadores de sangue ( família *Psychodidae*, são artrópodes transmissores de uma variedade de patógenos), entre hospedeiros mamíferos, espalhando a doença (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). O mosquito infectado pela *Leishmania*, suga o sangue do hospedeiro, como suporte nutricional para o ovo. Uma variedade de espécies de mamíferos podem servir de reservatório, contraindo o parasita, entre eles, cães domésticos e selvagens, roedores, raposas, chacais, lobos, humanos e etc. (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

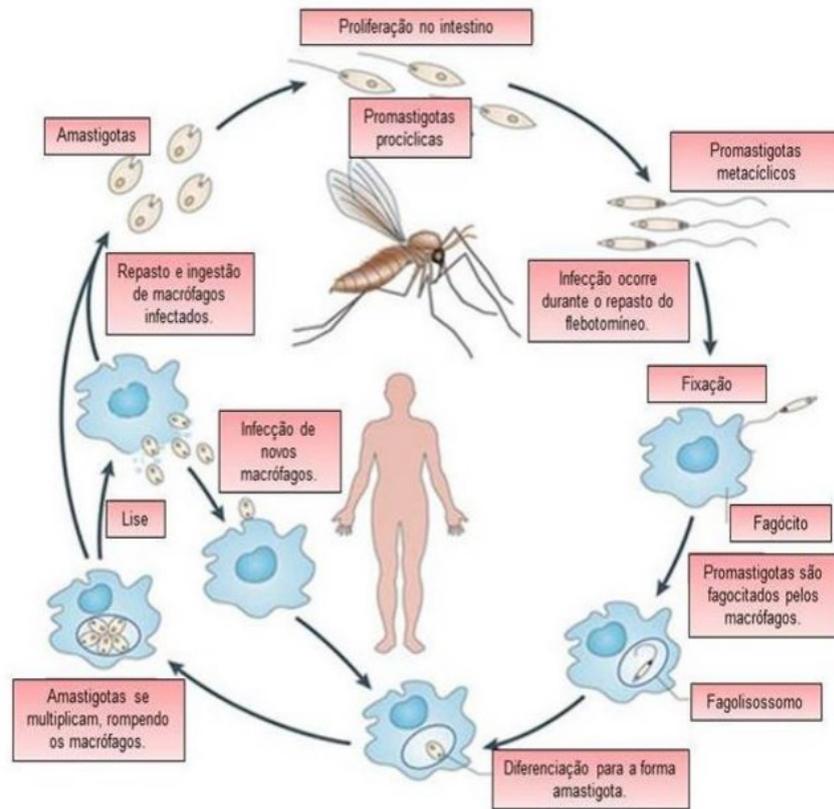
O gênero *Leishmania*, constituído por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, são organismos protozoários que provavelmente divergiram no início da evolução de outros eucariotos. Eles possuem uma série de características únicas com relação ao seu metabolismo de energia e carboidratos e constituídos por mais de 20 espécies diferentes. Elas são classificadas em dois subgeneros com base em diferenças anatômicas nos locais de crescimento do parasita no intestino do flebotomíneo. Estas são: a *Leishmania Old World* (encontrado na Europa, Asia e Africa) e *the New* (encontrado nas Américas). São utilizados métodos bioquímicos, como eletroforese enzimática, na identificação e distinção das espécies. (PACE, 2014).

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

A fêmea do flebotomíneo, pertencente ao gênero *Phlebotomus (Old World)* e *Lutzomyia (the New)*, é o único vetor responsável pela transmissão da leishmaniose. Noventa e três, dos cerca de oitocentos flebotomíneos conhecidos, disseminam a doença. Estes artrópodes são ativos em meses quentes na região do mediterrâneo e a maioria se alimenta entre o final de tarde e amanhecer (PACE, 2014).

Os parasitas da *Leishmania* tem dois estágios principais do ciclo de vida: o promastigota flagelado móvel, presente nos mosquitos transmissores de patógenos e a forma amastigota não flagelada intracelular, que está presente no mamífero contaminado (Figura 1). O flebotomíneo, durante a alimentação, deposita os parasitas, que se fundem com os lisossomos das células dos hospedeiros, formando fagolisossomos, em que a forma promastigota é transformada e replicada, para a forma amastigota. Eventualmente, a carga parasitária aumenta para outras células, podendo metastatizar dentro da pele e órgãos viscerais (CECÍLIO; CORDEIRO-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2022).

**Figura 1:** Representação diagramática do ciclo de vida dos parasitas *Leishmania*



Fonte: (ANDRADE.et al, 2016)

A leishmaniose compreende três principais formas de doenças: a visceral (LV), caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia, que se não tratada, pode levar à morte em mais de 90% dos casos. A forma cutânea (LC), dentre todas, é a forma mais comum da infecção, produzindo principalmente lesões ulcerativas que deixam cicatrizes pelo resto da vida; E por fim, a menos comum, a leishmaniose mucosa/mucocutânea, que, se não tratada, pode levar à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz e da boca, podendo causar grave incapacidade (OPAS, 2023; ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

### 1.3. Leishmaniose no mundo

Globalmente, a leishmaniose é uma das dez doenças tropicais negligenciadas, infectando mais de 12 milhões de pessoas. A leishmaniose é endêmica em 99 países, dos quais LC é endêmica em 89 países, LV é endêmica em 80 países e enquanto as formas LC e LV, são endêmicas em 71 países. Dos

nove países que relatam 85% dos casos de LC, três estão nas Américas: Brasil, Colômbia e Peru. Quatro países respondem por 68% dos casos de leishmaniose visceral no mundo: Índia, Sudão, Brasil e Quênia (OPAS, 2021).

De 2001 a 2021, um total de 1.105.545 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) foram notificados à Organização Pan-Americana da Saúde, equivalente a uma média de 52.645 casos por ano. No mesmo período, foram registrados 69.665 novos casos de leishmaniose visceral (LV), uma média de 2.488 casos por ano, com taxa de letalidade em torno de 8% no continente americano, considerada a mais alta em comparação com outros continentes (OPAS, 2021).

A leishmaniose é considerada uma doença da pobreza, por ser classificada como uma das doenças “mais negligenciadas”, conceito este que surgiu ao estudar e desenvolver medicamentos para doenças como essa. Os países mais afetados, principalmente os com altos índices de LV, são classificados como “países menos desenvolvidos”. Além disso, geralmente a leishmaniose é concentrada nas áreas mais pobres. Dentre as doenças “negligenciadas”, a leishmaniose tem o maior impacto, tanto na magnitude de sua morbidade e mortalidade, quanto na sua ampla distribuição geográfica (ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C., 2006).

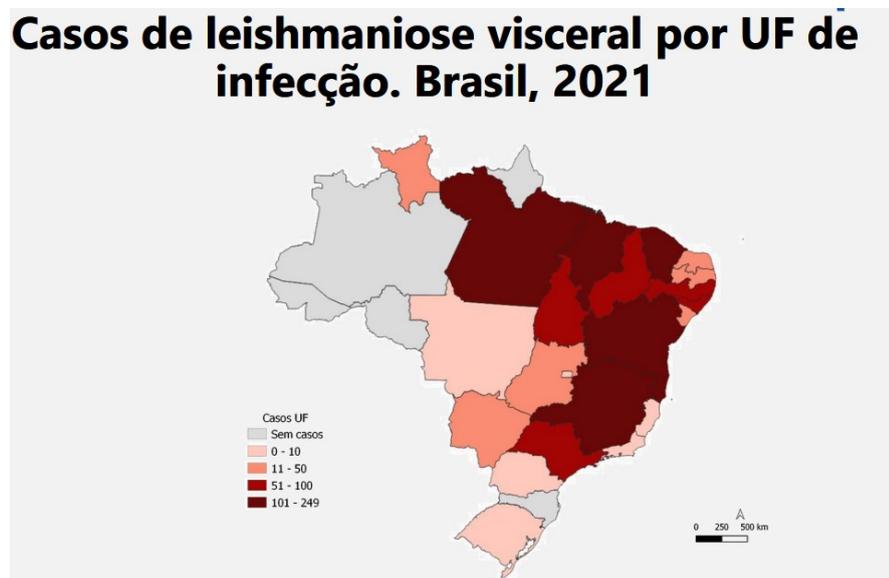
Em estudos comparando pacientes com leishmaniose em Bihar, Nepal, Bangladesh e Brasil, a renda per capita foi baixa (normalmente menos de US\$ 1/dia). Nas comunidades pobres, no entanto, a associação com baixa renda pode não ser o principal determinante do risco. A ligação entre pobreza e risco de leishmaniose é mediada por múltiplos mecanismos. A pobreza está associada a fatores ecológicos que podem aumentar o risco, como más condições de moradia, dormir ao relento ou no chão. A pobreza também aumenta a progressão da doença, morbidade e mortalidade, mais prevalente devido à desnutrição. Pessoas desnutridas com infecção por *Leishmania* têm maior probabilidade da doença progredir e agravar (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

#### **1.4. Leishmaniose no Brasil e na América Latina**

Na América Latina, a leishmaniose visceral (LV) é a variação mais comum. Causada pelo agente etiológico *L. infantum*, é transmitida principalmente por *Lutzomyia longipalpis*, um vetor bem adaptado ao ambiente dessa região. O Brasil responde por 90% dos casos de LV notificados nas Américas, e é o terceiro maior foco de LV no mundo; ao contrário de outros grandes focos de LV, a notificação de casos é obrigatória e os dados de vigilância são mais completos no Brasil. A LV ocorre tradicionalmente nas áreas rurais secas, empobrecidas do nordeste do Brasil e seu controle é um desafio tanto para médicos veterinários como para agentes de saúde pública (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008) (MARCONDES; ROSSI, 2013).

A primeira de uma série de epidemias urbanas no Brasil ocorreu em Teresina no início da década de 1980, seguida de surtos em São Luís, Natal e Fortaleza. Em favelas densamente povoadas, locais de degradação ambiental, condições precárias de moradia, esgoto, descarte inadequado de lixo, contato próximo com cães e outros animais domesticados promovem e favorecem a proliferação do vetor. Em 20 seguintes, desde 1980, a incidência relatada de LV no Brasil dobrou, atingindo mais de 3.000 por ano. A doença agora se tornou comum em áreas urbanas, periurbanas e rurais até nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul, além das cidades do nordeste, como exemplificado na figura 2. (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008).

**Figura 2:** Mapa de casos de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil



Fonte: (SVS,2021)

## 1.5. Tratamento

Existem diversos meios para tratar as várias formas de leishmaniose. A escolha por primeira linha ou segunda linha varia de acordo com o tipo de doença, e muitas vezes são feitas pelas práticas regionais. Existem diversos compostos utilizados no tratamento da leishmaniose, dentre eles: Paromomicina, Anfotericina B, Pentamidina, Miltefosina, Imiquimod, antimônio pentavalente etc. Para uso sistêmico, esses compostos podem ser administrados por via intravenosa, intramuscular (im), e também são usados intralésionalmente (il) para Leishmaniose cutânea (MCGWIRE; 2014).

O antimônio pentavalente tem sido considerado o principal composto no tratamento da leishmaniose por décadas. Entretanto, o mecanismo preciso de ação do antimônio pentavalente na leishmaniose não é bem compreendido. Além disso, este agente tem múltiplas toxicidades e em algumas condições, acaba sendo ineficaz devido ao desenvolvimento de resistência do parasita (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

## 1.6. Desenvolvimento de novos fármacos

Com isso, surge a necessidade do desenvolvimento de novos compostos para tratamento de leishmaniose, mas com menos efeitos colaterais. Assim, é necessário o estudo de descoberta de fármacos utilizando diferentes classes de compostos químicos contra os parasitas causadores das leishmanioses. Atualmente, a maioria dos fármacos utilizados clinicamente são de origem natural ou biotecnológica, ou sintetizados quimicamente a partir de produtos de origem natural. (MIKOVSKI; et al, 2018).

A síntese química é particularmente útil para a modificação molecular, pois por meio da modificação estrutural, medicamentos menos tóxicos e mais ativos do que os encontrados na natureza podem ser obtidos. As modificações moleculares mais comuns realizadas na estrutura de produtos naturais visam introduzir alterações nas propriedades relacionadas à farmacodinâmica e farmacocinética, incluindo homologação linear, homologação ramificada e a introdução de alguns grupos funcionais específicos (MIKOVSKI; et al, 2018).

O desenho molecular do ligante dependerá do conhecimento da forma estrutural do alvo terapêutico escolhido. Após identificada a estrutura, ela deve ser sintetizada e avaliada por bioensaios *in vitro*, que, se bem-sucedidos, fornecerão novos ligantes para biorreceptores selecionados (MIKOVSKI; et al, 2018).

Esses novos ligantes passam por um processo de identificação das propriedades farmacocinéticas por meio de bioensaios farmacológicos *in vivo* ou pré-clínicos. Esses estudos pré-clínicos (testes em animais) são necessários para avaliar a toxicidade e a eficácia de um candidato a fármaco. Na sequência são realizados os estudos em humanos em quatro fases: I - Avaliação de Toxicidade em humanos; II – avaliação da dose de medicamentos; III – testes finais de segurança em humanos; e IV – comercialização de novos medicamentos, que requer autorização dos órgãos reguladores nacionais e de acordo com critérios estabelecidos por comitês de ética (CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa). Caso o composto passe por todas essas etapas, ele se torna um fármaco que atuará no alvo selecionado (MIKOVSKI; et al, 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

Com as limitações dos fármacos usados no tratamento da leishmaniose visceral, é evidente a necessidade de pesquisar outros compostos que poderiam ter resultados satisfatórios contra o parasita causador da doença.

O composto de estudo, benzotiazol, é um sistema bicíclico especial de grande potência e significância. Seus derivados são de grande interesse farmacêutico, por conta da sua considerável atividade biológica. Devido ao núcleo pequeno e simples do benzotiazol, o composto se tornou alvo de estudos destinados a avaliar novos produtos com atividades biológicas interessantes. Uma vez que a maioria dos derivados de benzotiazóis têm várias atividades antitumoral, antituberculose, antimalárica, anticonvulsivante, anti-helmíntica, analgésica, anti-inflamatória, antifúngica, inibidora tópica da anidrase carbônica e anti-hipóxica (GUPTA; RAWAT, 2010).

A doença de Chagas, assim como a leishmaniose visceral, é uma doença tropical negligenciada, que é causada por um protozoário cinetoplastídeo, chamado *Trypanosoma cruzi*. Com testes de compostos contra esse parasita, surgiram possíveis grupos de análises, como o dos benzotiazóis, que poderiam ter atividades satisfatórias para tratamento da doença de Chagas. A *L. infantum* e a *T. cruzi*, ambos parasitas são da espécie dos tripanossomatídeos, dessa forma, pela possível similaridade na estrutura e forma de contaminação, considerou a possibilidade da funcionalidade dos benzoatiazóis contra os parasitas da Leishmaniose Visceral.

Assim, introduzimos os testes com benzotiazóis, com diversas modificações, para testes com a *L. infantum*. Como temos esquematizado na figura (3).

Segundo Fleu e colaboradores, foi encontrado que uma molécula com grupo de benzotiazol e um fragmento acila (estrutura 1), com bons resultados de atividade biológica contra o *T. cruzi*. Identificados os grupos iniciais, foram feitas substituições no anel aromático do benzotiazol, chegando na molécula 2, que corresponde a otimização das estruturas anteriores e que obteve o melhor resultado de IC<sub>50</sub> dentre os testes feitos (FLEU, et al. 2019).

Os parasitas *L. infantum* e *T. cruzi*, fazem parte da família Trypanosomatidae do filo de protozoários que são caracterizados por um único axonema e por uma organela conhecida como cinetoplasto, um mitocôndria rica em ácido desoxirribonucléico (DNA). Sendo assim, tendo características parecidas na estrutura celular e na forma de contaminação, foi identificado a possibilidade de estudo dessa classe de benzotiazóis testadas para *T. cruzi*, serem testadas também para *L. infantum* (MCGHEE; COSGROVE. 1980).

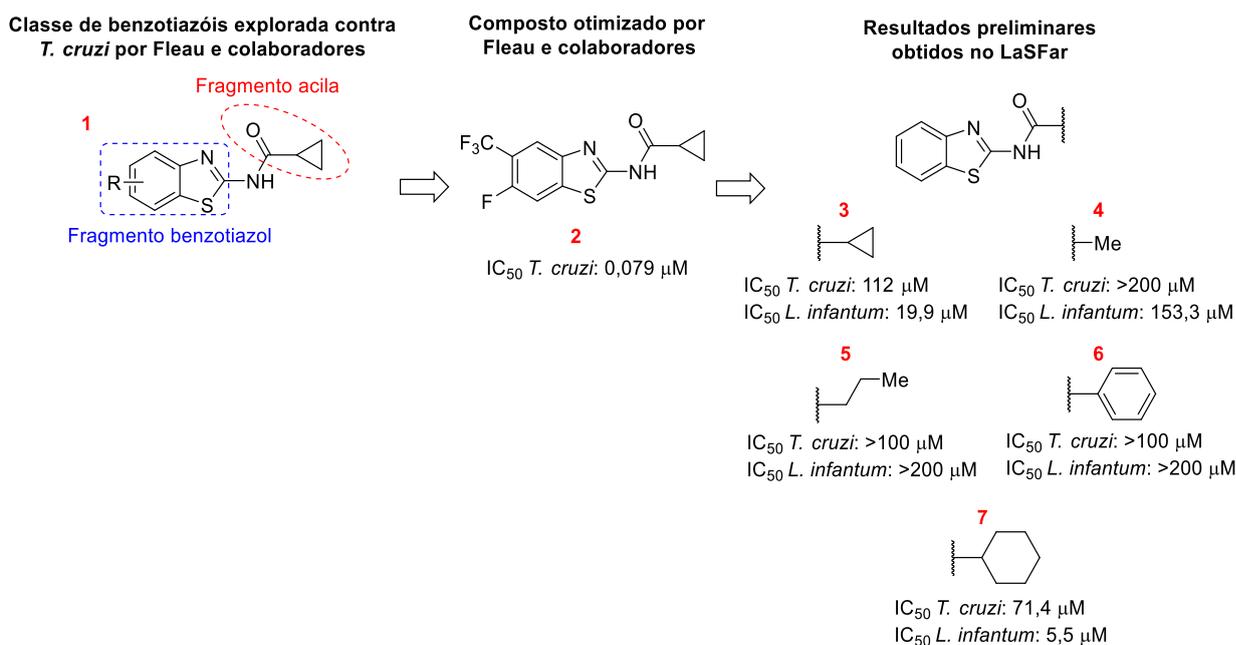
Com essas informações, a partir da estrutura 2, nosso grupo de pesquisa iniciou o estudo dessa classe química contra *L. infantum*.

Como já haviam sido feitas substituições na estrutura inicial, alterando os grupos substituintes no anel aromático do benzotiazol, pesquisadores do laboratório LaSFar iniciaram testes, modificando o outro lado da molécula inicial (fragmento acila). Inicialmente foi

sintetizado e testado o composto 3 com apenas hidrogênio no fragmento benzotiazol e o ciclopropil no fragmento acila, apresentando um  $IC_{50}$  de 19,9  $\mu M$ , um valor promissor para explorar essa classe contra *L. infantum*. Posteriormente foi realizado modificações no fragmento acila, substituindo o ciclopropil presente no composto 3 por outros grupos derivados de hidrocarbonetos (metil, propil, fenil e cicloexil) levando aos compostos 4 a 7 (como apresentado na figura 3).

Com as análises de  $IC_{50}$  desses derivados contra *L. infantum* foi identificado que a substituição com um cicloexil (composto 7) seria a estrutura com melhor valor de atividade biológicas, com  $IC_{50}$  de 5,5  $\mu M$ .

**Figura 3:** Modificações iniciais de benzotiazóis utilizadas como base do presente estudo.



Fonte: do autor

Com a identificação de uma estrutura com valor de  $IC_{50}$  significativo para *L. infantum* (composto 7), iniciou-se estudos com outras modificações ao longo dessa molécula. São três estruturas inéditas, baseadas no composto 7 citado acima, que serão identificadas e justificadas nesse trabalho.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo geral

Objetivo deste trabalho é a síntese de benzotiazóis, utilizando metodologias clássicas de química orgânica, afim de obter compostos eficazes contra o parasita *L. infantum*, causador da Leishmaniose Visceral.

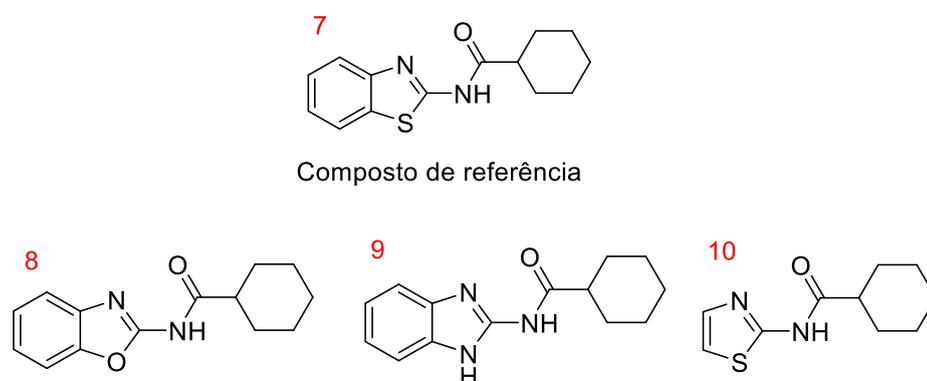
#### 3.2. Objetivo específico

- Sintetizar três derivados de benzotiazóis
- Caracterizar os compostos obtidos
- Realizar estudos de atividade biológica com os compostos

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através dos resultados preliminares obtidos pelo grupo LaSFar, foram identificadas possíveis rotas de síntese, que poderiam nos fornecer informações de quais fragmentos estruturais poderiam ser substituídos ou alterados, afim de encontrar melhores resultados para as análises de IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub>. Dessa forma, foram planejadas as modificações da figura 4.

**Figura 4:** Compostos 7 (de referência), 8, 9 e 10 propostos para síntese.



Fonte: do autor

Na estrutura 8, com a substituição do átomo de enxofre (S) do anel por um átomo de oxigênio (O), sendo possível verificar a influência de átomo mais eletronegativo, como o oxigênio em relação ao enxofre, em um sistema com conjugação. Na Estrutura 9, com a substituição do enxofre por um grupo N-H, será possível verificar o efeito do aumento da basicidade da estrutura, devido a disponibilidade do par de elétrons livres presentes no nitrogênio. E na proposta 10, com o anel tiazol, visando verificar a influência da diminuição do efeito de ressonância nas propriedades do composto obtido.

#### **4.1. Planejamento para síntese dos derivados de benzotiazóis**

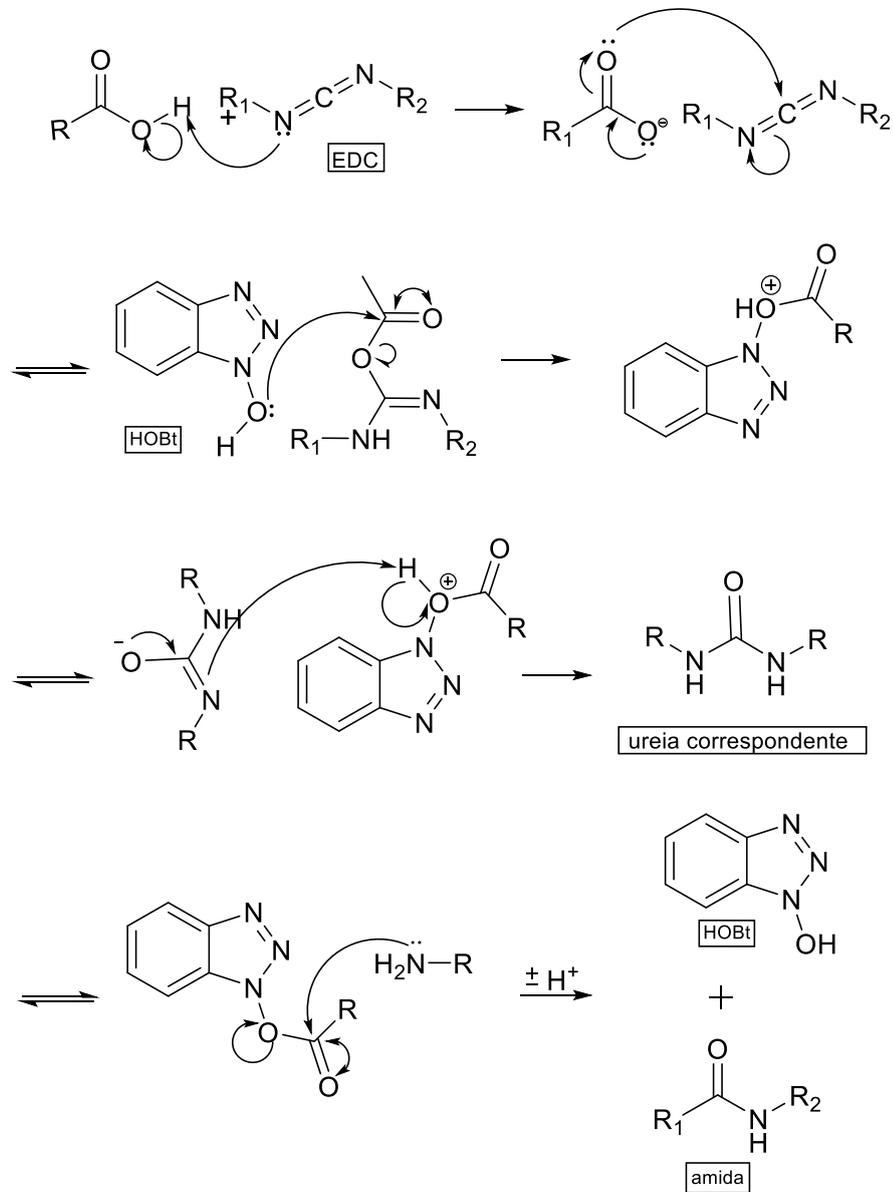
O planejamento das sínteses foi baseado na modificação do benzotiazol inicial (composto 7). Todos os derivados sintetizados, foram feitos seguindo a mesma sequência: A seleção de um derivado de amina, em seguida a reação com o ácido cicloexanóico, chegando aos derivados de interesse.

#### **4.2. Amidação**

A rota sintética utilizada envolve a reação de amidação. Iniciamos selecionando os derivados aminados que seriam o foco das sínteses e testes. Dessa forma, temos o processo da reação da amina com um ácido carboxílico, na presença do agente de condensação EDC, HOBt como catalizador e DMF como solvente da reação, a fim de obter a amida de interesse, seguindo o mecanismo reportado no esquema 1.

A primeira etapa da reação de amidação, é a retirada do hidrogênio do ácido carboxílico, pelo par de elétrons livres do nitrogênio presente no EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), como simbolizado no esquema 1. Após criar um dipolo, tendo um carboxilato no meio, esse entra em ressonância, sendo um bom nucleófilo, atacando o carbono presente no EDC. Em seguida, o HOBt (hidroxibenzotriazol), entra como catalizador da reação. O par de elétrons livres do oxigênio do HOBt, ataca a carbonila do éster, realizando uma substituição nucleofílica da carbonila, conseqüentemente, resultando na eliminação da ureia como subproduto. Assim, na etapa final, nossa amina de interesse, utiliza o par de elétrons livres do nitrogênio, atacando o carbono da carbonila, eliminando o HOBt, resultando na nossa amida de interesse. Toda essa reação em meio de DMF.

**Esquema 1:** Reação de amidação na presença de EDC e HOBt



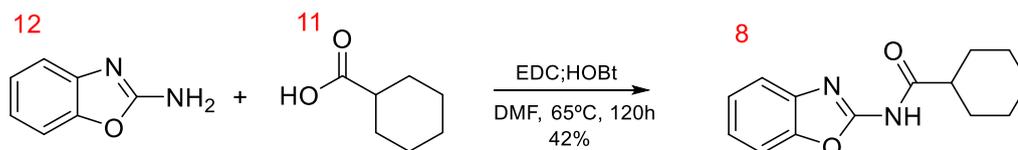
Fonte: Do autor

Seguindo essa metodologia, foram realizadas as sínteses de 3 compostos com diferentes alterações da amina inicial, resultando em derivados de propriedades e características diferentes.

### 4.3. Síntese dos compostos almeçados

A primeira alteração que realizamos foi a síntese do derivado de benzotiazol (composto 8, esquema 2), trocando o enxofre por um oxigênio.

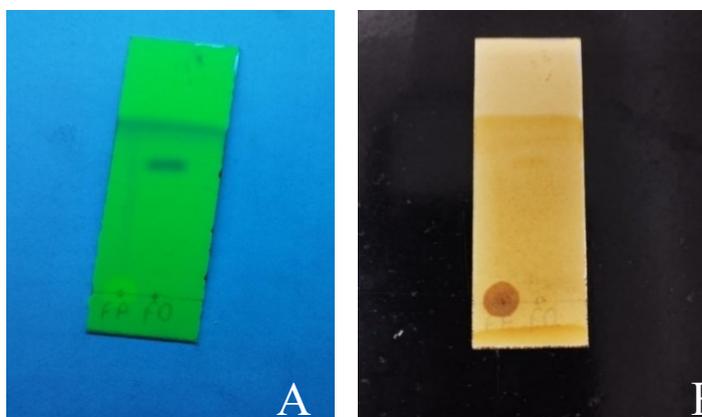
**Esquema 2:** Síntese do derivado de benzotiazol com átomo de Oxigênio.



Fonte: Do autor

Para a estrutura 8, realizamos a amidação entre o ácido carboxílico (11) e a amina derivada do benzotiazol (12), na presença do ativador EDC, do catalisador HOBT, utilizando DMF (N,N-dimetilformamida) como solvente, durante 120h a 65°C. Foi realizada a CCD, para verificação do avanço da reação e da pureza do composto sintetizado. Com a primeira análise, foi identificado a formação do composto de interesse (estrutura 8). Assim, foi realizada a tentativa de precipitação, mas o produto obtido não precipitou, estando na forma de um óleo. Dessa forma, foi realizada a extração do composto, em fase orgânica e aquosa. Após a extração, foi possível observar a presença do nosso produto ainda na fase aquosa. Sendo assim, foi necessário realizar um tratamento e uma nova extração utilizando hidróxido de sódio 2M, acetato de etila e cloreto de sódio (para quebrar a emulsão formada), sendo possível separar e passar nosso produto todo para fase orgânica, testado através da repetição da CCD (como indicado na figura 5).

**Figura 5:** A) identificação da presença do produto na fase orgânica.  
B) ausência do produto na fase aquosa.



Fonte: Do autor

Atráves da reação e dos tratamentos, obtivemos um rendimento de 42% do produto final. Com a análise na CCD, foi verificado uma possível pureza do composto sintetizado. Dessa forma, a amostra foi seca no rotaevaporador e na bomba à vacuo. A amostra foi preparada para análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo pesado 2mg e adicionado no tubo próprio para análise. Além do RMN, também foram feitas análises de espectrometria de massas e infravermelho.

Na Tabela 1 estão relacionados os prótons de cada ambiente químico da molécula obtida e seus respectivos sinais no RMN de  $^1\text{H}$ . A partir da análise de RMN de  $^1\text{H}$ , foi verificado que os Hidrogênios indicados no espectro (figura 6), correspondem ao seus possíveis ambientes químicos na molécula. Os picos 7,55 a 7,25 são correspondentes ao H1 ao H4 aromáticos. O pico em 10,57 corresponde ao H5, hidrogênio alfa a carbonila, sendo esse o mais ácido e o mais desblindado da molécula, tendo o maior deslocamento do ambiente químico. O H6 é mais desblindado dos hidrogênios alifáticos, tendo deslocamento maior. Por fim, os Hidrogênios de 7 a 11, são mais mais blindados, por não sofrerem tanto os efeitos de átomos eletronegativos ou de ressonância, estando mais próximo ao TMS (zero ppm - valor de referência), entre 1,92 a 1,19.

Também foi realizado o RMN  $\text{C}^{13}$ . Na tabela 2, temos os carbonos com seus ambientes químicos identificados no espectro (figura 7). Dentre os carbonos temos que o 8 é o carbono da carbonila, correspondente ao pico mais deslocado em 174,40, sendo o mais desblindado da molécula devido aos efeitos indutivos do átomo de oxigênio. Em seguida se encontra o C7, em 155, que sofre um deslocamento menor, também por efeito indutivo. O picos de C1 a C6 correspondem ao carbonos aromáticos, sendo o C1 e C6 os que tem maior deslocamento do ambiente químico devido ao efeito de ressonância do anel, além de sofrer com efeitos indutivos de átomos próximos, já os C9 a C14 alifáticos, sendo o C9 o mais desblindado deles, devido ser alfa carbonila.

Além do RMN, com a Espectroscopia de massas (figura 8), podemos identificar que a massa do composto 8 sintetizado, corresponde a massa indicada no espectro, sendo mais uma confirmação da pureza do nosso composto esperado. Com a caracterização a partir da análise de espectroscopia na região do infravermelho (figura 9), conseguimos identificar os grupos funcionais presentes no composto, através da frequência de vibração das ligações, como indicado na tabela 2. Finalizando dessa forma, a caracterização do composto 8 com rendimento de 42%.

Figura 6: Espectro RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 8.

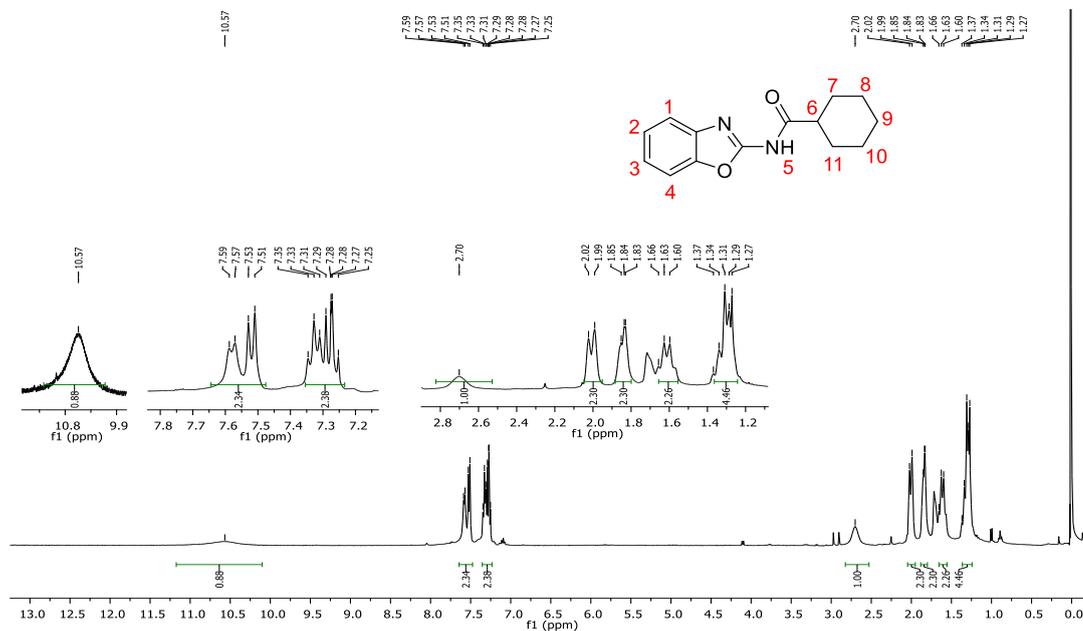


Tabela 1: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 8 ( $\text{CDCl}_3$ ).

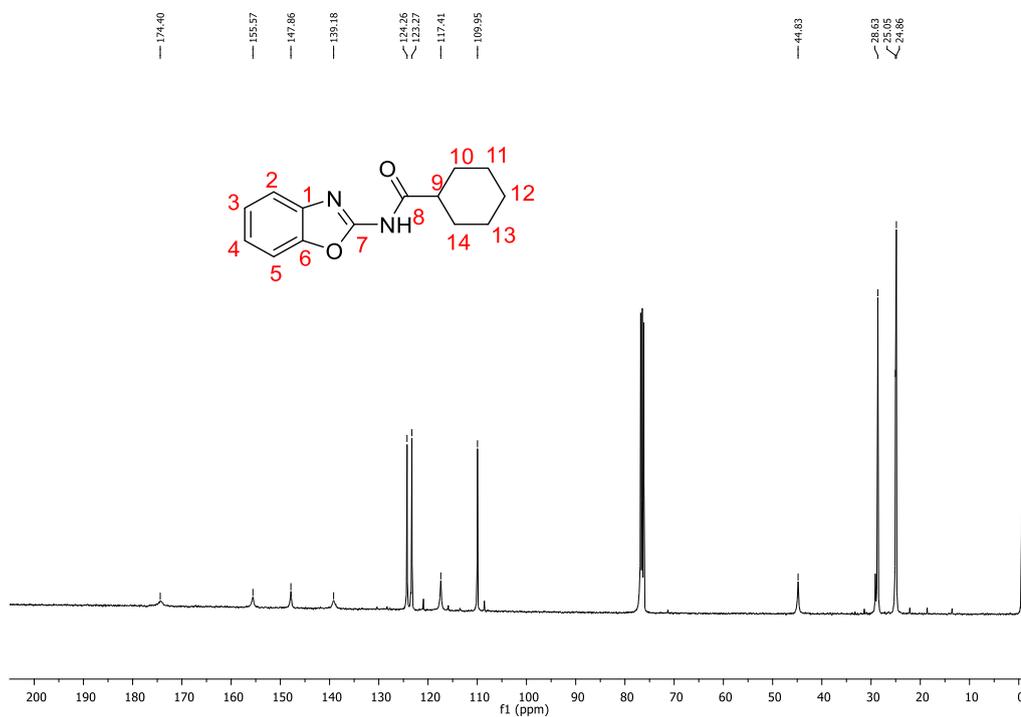
Hidrogênio	Deslocamento $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m <sup>b</sup> )
H7 a H11	2.01 – 1.19 (m)
H6	2.70 (s)
H1 a H4	7,55 – 7,25 (m)
H5	10.57 (s)

<sup>a</sup>deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

<sup>b</sup>multiplicidade

Fonte: do autor

**Figura 7:** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 8.



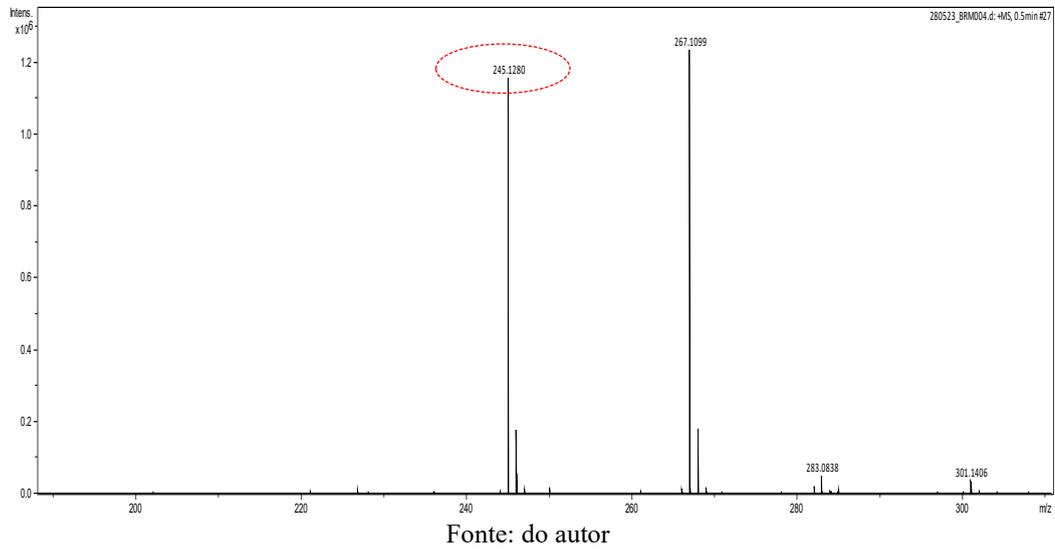
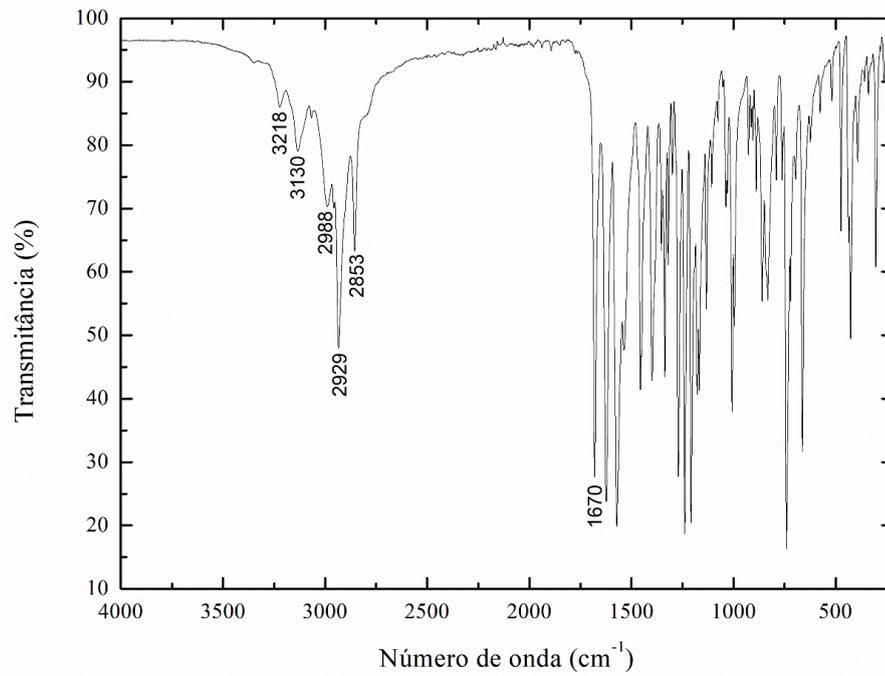
Fonte: do autor

**Tabela 2:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO) do composto 8.

Carbono	Deslocamento $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
C9 a C14	44,83 a 25,48 (C-H)
C2 a C5	124,26 a 109,95 (Ar)
C6 e C1	147 a 139,18 (Ar)
C7	155,57 (C-amida)
C8	174,40 (C=O)

<sup>a</sup>deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

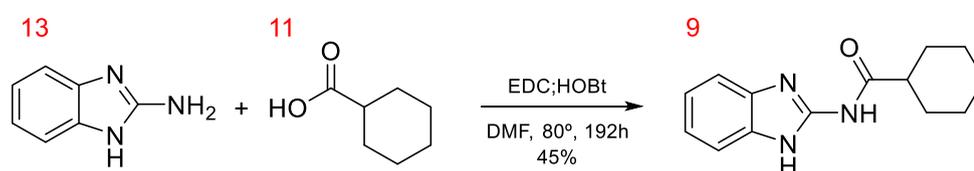
Fonte: do autor

**Figura 8:** Espectro HRMS (ESI+) do composto 8.**Figura 9:** Espectro na região do infravermelho do composto 8

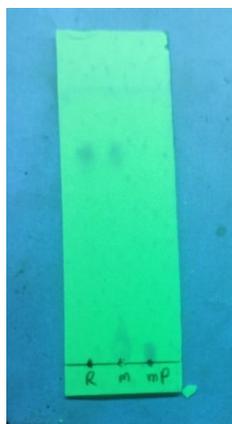
**Tabela 3:** Dados de número de onda de infravermelho (cm<sup>-1</sup>) do composto 8.

Tipo de ligação	Frequência (cm <sup>-1</sup> )
C = O (amida)	1675
C – H (alcano)	2853 - 2929 - 2998
C – H (aromático)	3130
N – H	3253

Para a estrutura 9, realizamos a amidação entre o ácido carboxílico (11) e a amina derivada do benzimidazol com um átomo de nitrogênio (13), na presença do ativador EDC, do catalisador HOBt, utilizando DMF como solvente, durante 192h a 80°C. Foi realizada a CCD (figura 10), para verificação do andamento da reação do nosso composto sintetizado. Com a análise, foi identificado, que houve a reação e foi obtido parte do composto 9. Mas, devido ao tempo da reação, ela foi parada pois não haveriam mais alterações no rendimento. Assim, foi realizada a precipitação para finalizar a reação. A solução foi filtrada, obtendo nosso composto.

**Esquema 3:** Síntese do derivado de benzimidazol com grupo Amina.

Fonte: do autor

**Figura 10:** CCD indicando a conclusão reação, sem material de partida.

Fonte: do autor

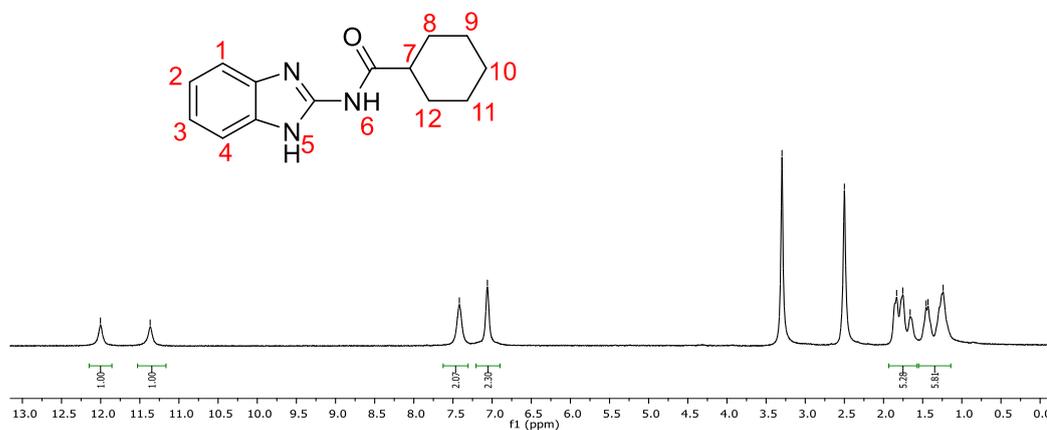
Após filtrado, foi possível identificar que o composto estava com uma pureza considerável para mandar para o análise de RMN, para sua caracterização completa. Assim, a amostra foi seca no rotaevaporador e na bomba à vacuo, em seguida, pesado 2mg para colocar nos tubos de RMN. Além do RMN, também foram feitas análises de espectrometria de massas e infravermelho, para confirmação do produto da reação, o qual, indicaram a pureza do composto 9.

Na Tabela 4 estão relacionados os prótons de cada ambiente químico da molécula obtida e seus respectivos sinais no RMN de  $^1\text{H}$ , indicados no espectro (figura 11) e que correspondem ao seus possíveis ambientes químicos na molécula. Os picos 7,42 a 7,06 são correspondentes ao H1 ao H4 aromáticos. O pico em 12 corresponde ao H6, hidrogênio alfa a carbonila, sendo esse o mais ácido e o mais desblindado da molécula, tendo o maior deslocamento do ambiente químico. O H5 encontra-se em 11,37 devido aos efeitos do anel aromático próximo. O H7 é mais desblindado dos hidrogênios alifáticos, tendo o maior deslocamento dentre eles. Por fim, os Hidrogênios de 8 a 12, são mais mais blindados, por não sofrerem tanto os efeitos de átomos eletronegativos ou de ressonância, estando mais próximo ao TMS (zero ppm - valor de referência), entre 1,95 a 1,07.

Também foi realizado, o RMN  $\text{C}^{13}$ . Na tabela 5, temos os carbonos com seus ambientes químicos identificados no espectro (figura 12). Dentre os carbonos temos que o 8 é o carbono da carbonila, correspondente ao pico mais deslocado em 175,91, sendo o mais desblindado da molécula devido aos efeitos indutivos do átomo de oxigênio. Em seguida se encontra o C7, em 175,82, que sofre um deslocamento menor, também por efeito indutivo. O picos entre 147,28 a 111.93, correspondem ao carbonos aromáticos (C1 a C6), sendo o C1 e C6 os que tem maior deslocamento do ambiente químico devido ao efeito de ressonância do anel, além de sofrer com efeitos indutivos de átomos próximos. E os C9 a C14 os carbonos alifáticos, sendo o C9 o mais desblindado deles, devido ser alfa carbonila.

Além do RMN, com a Espectroscopia de massas, podemos identificar que a massa do composto 9 sintetizado, corresponde a massa indicada no espectro, sendo mais uma confirmação da pureza do nosso composto esperado. E a caracterização a partir da análise de espectroscopia na região do infravermelho, conseguimos identificar os grupos funcionais presentes no composto, através da frequência de vibração das ligações, como indicado na tabela 6. Finalizando dessa forma, a caracterização do composto 9 com rendimento de 45%.

**Figura 11:** Espectro RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) do composto 9.



Fonte: Do autor

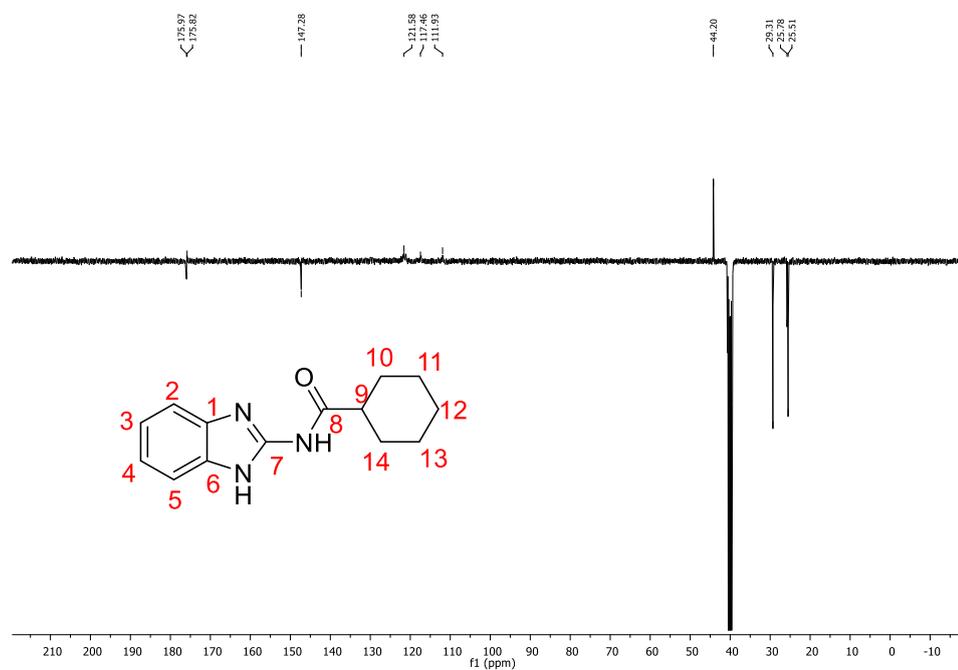
**Tabela 4:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 9 (DMSO).

Hidrogênio	Deslocamento $\delta_{\text{H}}$ <sup>a</sup> (m <sup>b</sup> )
H7 a H12	1.95 – 1.07 (m)
H6	12.0 (s)
H5	11.37 (s)
H1 a H4	7.42 – 7,06 (s)

<sup>a</sup>deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

<sup>b</sup>multiplicidade

**Figura 12:** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO) do composto 9.

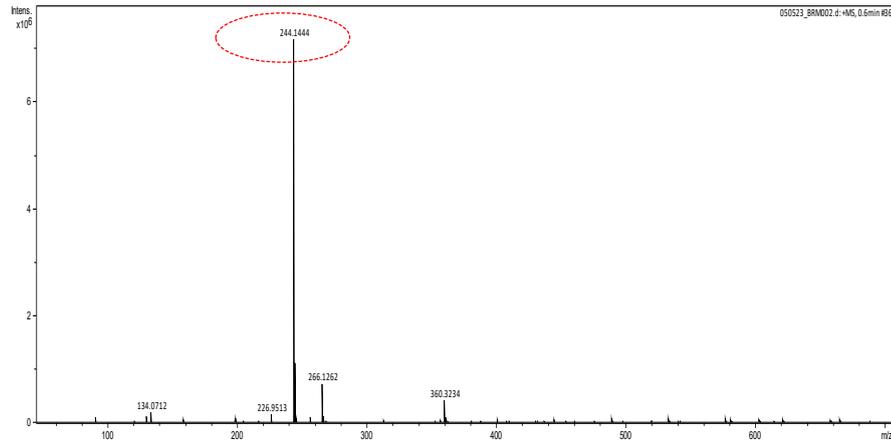


Fonte: do autor

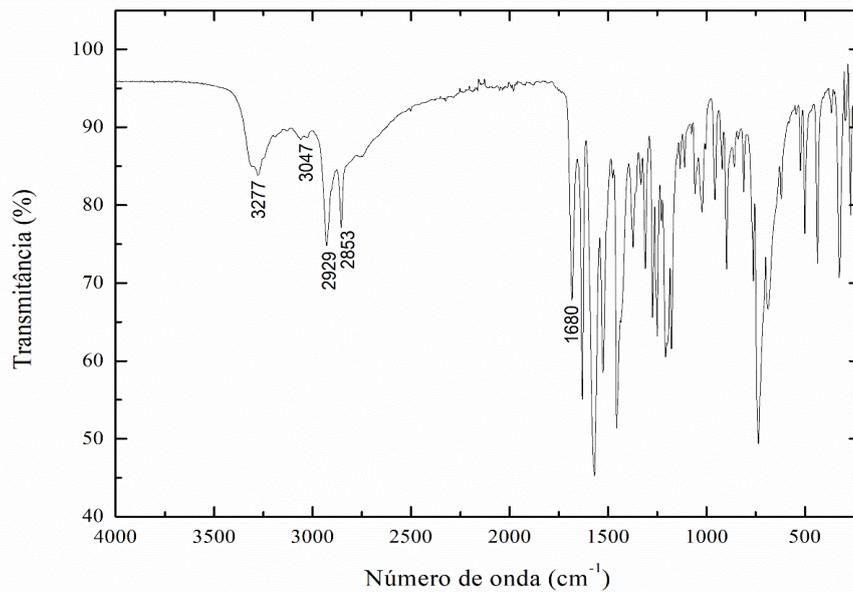
**Tabela 5:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO) do composto 9.

Carbono	Deslocamento $\delta_{\text{C}}$ <sup>a</sup>
C10 a C14	44,20 a 25,51 (C-H)
C1 a C6	147,28 a 111,93 (Ar)
C7	175,82 (C-amida)
C8	175,97 (C=O)

<sup>a</sup>deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

**Figura 13:** Espectro HRMS (ESI+) do composto 8.

Fonte: do autor

**Figura 14:** Espectro da região do infravermelho do composto 9

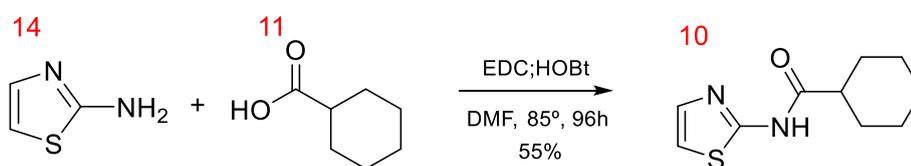
Fonte: do autor

**Tabela 6:** Dados de número de onda de infravermelho (cm<sup>-1</sup>) do composto 9.

Tipo de ligação	Frequência (cm <sup>-1</sup> )
C = O (amida)	1680
C – H (alcano)	2853 - 2929
C – H (aromático)	3047
N – H	3277

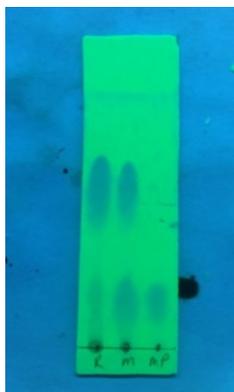
Para a estrutura 10, realizamos a amidação entre o ácido carboxílico (11) e o 2-aminotiazol (14), na presença do ativador EDC, do catalisador HOBt, utilizando DMF, durante 96h a 85C. Foi realizada a CCD (figura 15), para verificação do andamento da reação do nosso composto sintetizado. Com a análise, foi identificado, que aconteceu a reação, o material de partida foi consumido e que já havíamos obtido nosso produto (estrutura 10). Assim, foi realizada a precipitação para finalizar a reação, a solução foi filtrada, obtendo nosso composto com rendimento de 55%.

**Esquema 4:** Síntese do derivado de benzotiazol com retirada do benzeno.



Fonte: do autor

**Figura 15:** CDD indicando a conclusão reação, sem material de partida.



Fonte: do autor

Após filtrado e através da CDD, foi possível identificar que o composto estava com uma pureza considerável para mandar para o análise de RMN, para sua caracterização completa. Assim, a amostra foi seca no rotaevaporador e na bomba à vacuo, em seguida, pesado 2mg para colocar nos tubos de RMN. Além do RMN, também foram feitas análises de espectrometria de massas e infravermelho, para confirmação do produto da reação.

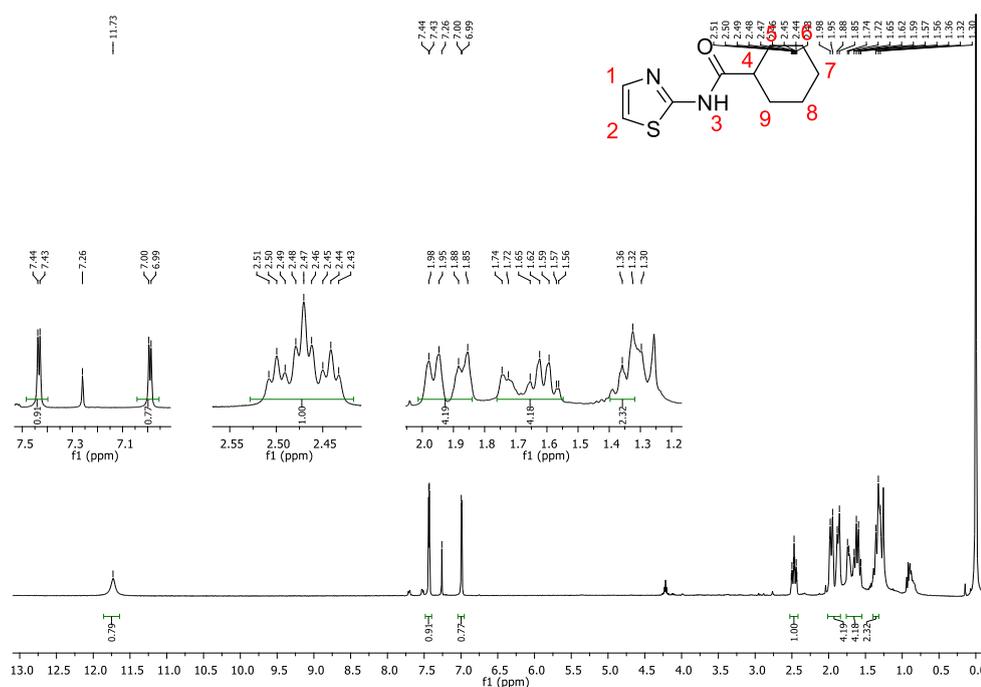
Na Tabela 7 estão relacionados os prótons de cada ambiente químico da molécula obtida e seus respectivos sinais no RMN de  $^1\text{H}$ , indicados no espectro (figura 16). O pico em 11,73 corresponde ao H3, hidrogênio alfa a carbonila, sendo esse o mais ácido e o mais desblindado da molécula, tendo o maior

deslocamento do ambiente químico. O H1 e H2 encontra-se em 7,43 a 6,99 respectivamente, devido ao efeito da insaturação. O H4 é mais desblindado dos hidrogênios alifáticos, tendo o maior deslocamento dentre eles. Por fim, os Hidrogênios de 5 a 9, são mais mais blindados, por não sofrerem tanto os efeitos de átomos eletronegativos ou de ressonância, estando mais próximo ao TMS (zero ppm – valor de referência), entre 1,98 a 1,30.

Também foi realizado, o RMN  $^{13}\text{C}$ . Na tabela 8, temos os carbonos com seus ambientes químicos identificados no espectro (figura 17). Dentre os carbonos temos que o C4 é o carbono da carbonila, correspondente ao pico mais deslocado em 174,26, sendo o mais desblindado da molécula devido aos efeitos indutivos do átomo de oxigênio. Em seguida se encontra o C3, em 160,04, que sofre um deslocamento menor, também por efeito indutivo. O picos entre 136,20 - 113,50, correspondem ao carbonos C1 e C2 insaturados. E em 44,94 - 25,59, encontramos os carbonos alifáticos de C5 a C9, sendo o C5 o mais desblindado deles, devido ser alfa carbonila.

Além do RMN, com a Espectroscopia de massas, podemos identificar que a massa do composto 10 sintetizado, corresponde a massa indicada no espectro, sendo mais uma confirmação da pureza do nosso composto esperado. E a caracterização a partir da análise de espectroscopia na região do infravermelho, conseguimos identificar os grupos funcionais presentes no composto, através da frequência de vibração das ligações, como indicado na tabela 9. Finalizando dessa forma, a caracterização do composto 10.

**Figura 16:** Espectro RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 10.



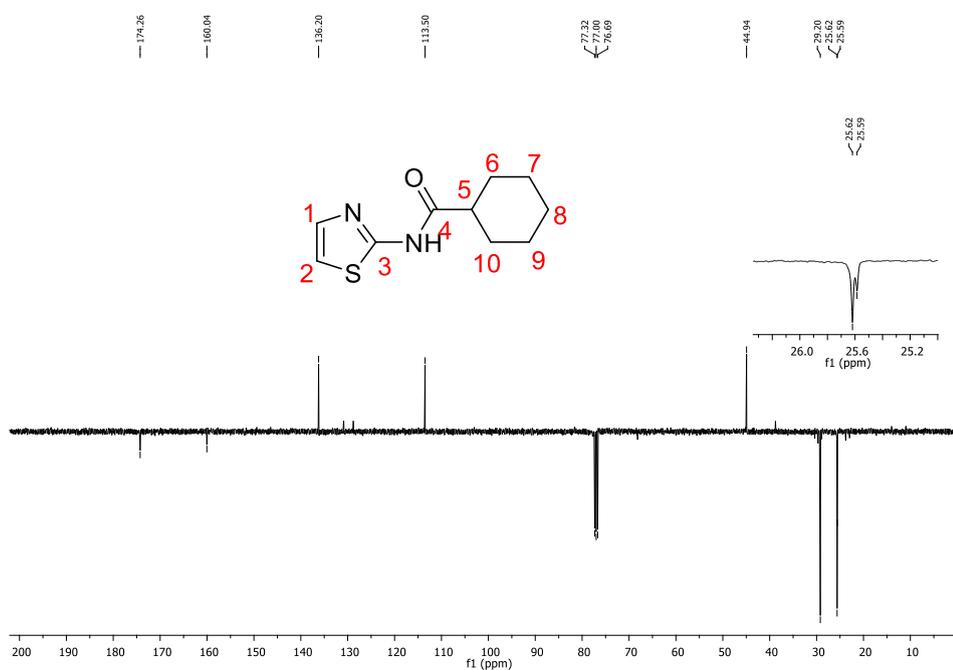
Fonte: Do autor

**Tabela 7:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 10 ( $\text{CDCl}_3$ ).

Hidrogênio	Deslocamento $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m <sup>b</sup> )
H5 a H9	1,98-1,30 (m)
H4	2,47 (m)
H1 e H2	7,43 – 6,99 (d)
H3	11,73 (s)

<sup>a</sup>deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

<sup>b</sup>multiplicidade

**Figura 17:** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 10.

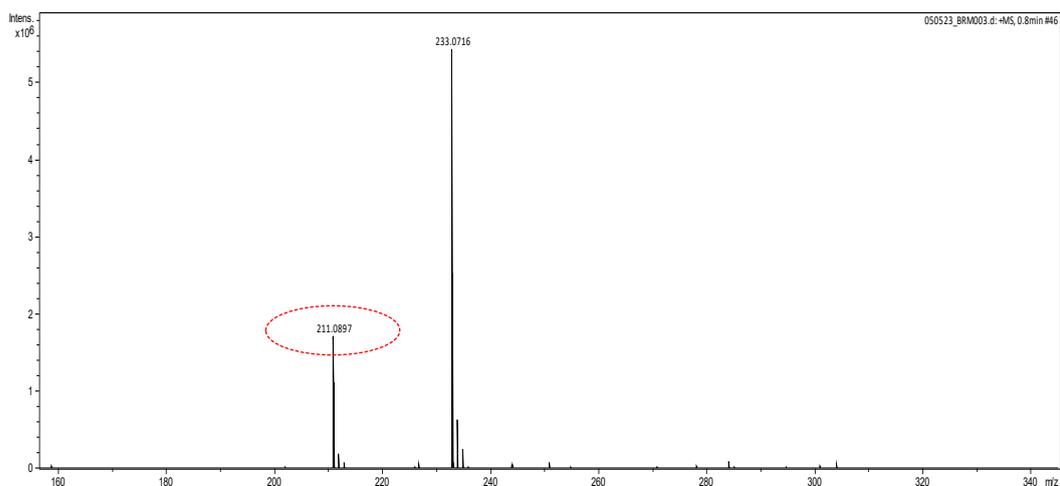
Fonte: Do autor

**Tabela 8:** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do composto 10

Carbono	Deslocamento $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$
C5 a C10	44,94 - 25,59 (C-H)
C1 e C2	136,20 - 113,50 (C=C)
C3	160,04 (C-amida)
C4	174,26 (C=O)

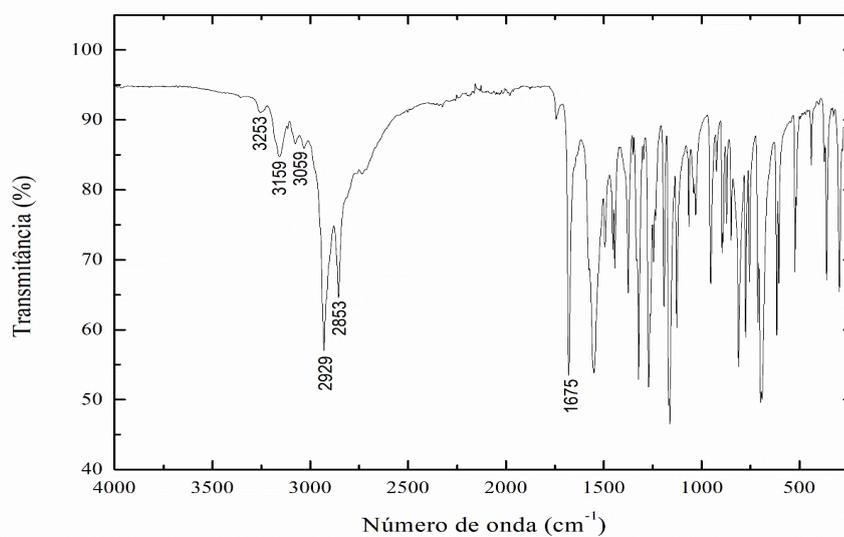
<sup>a</sup>deslocamentos químicos em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

**Figura 13:** Espectro HRMS (ESI+) do composto 8.



Fonte: Do autor

**Figura 14:** Espectro da região do infravermelho do composto 10.



Fonte: Do autor

**Tabela 9:** Dados de número de onda de infravermelho ( $\text{cm}^{-1}$ ) do composto 10.

Tipo de ligação	Frequência ( $\text{cm}^{-1}$ )
C = O (amida)	1675
C – H (alcano)	2853 - 2929
C – H (aromático)	3059 - 3159
N – H	3253

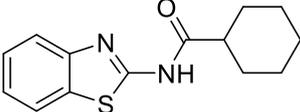
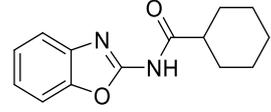
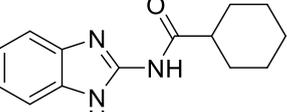
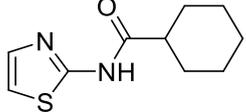
#### 4.4. Resultados Biológicos

Após os testes de caracterização e a identificação da pureza dos compostos sintetizados, foram realizadas as análises biológicas de  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$ , encontrando o IS (índice de seletividade). Assim, foi possível definir o potência em relação a citotoxicidade dos compostos testados e verificar se as modificações feitas no composto de referência foram efetivas.

A metade da concentração inibitória máxima ( $IC_{50}$ ), é uma medida quantitativa representativa da potência de uma substância para inibir *in vitro* um processo biológico específico em 50%, e é definida principalmente através de modelos de teste *in vitro*. Um outro teste importante, é da determinação do  $CC_{50}$  (citotoxicidade em concentração de 50%) que é a concentração do composto que causa citotoxicidade nos 50% do células. E com isso, empregamos o índice de seletividade (IS) que é definido como a razão de a concentração citotóxica de 50% ( $CC_{50}$ ) pela a concentração inibitória de 50% ( $IC_{50}$ ) (KOUTSONI.; KARAMPETSOU; DOTSIKA, 2019).

Todos os valores acima são cruciais para concluir se um composto testado, é ou não apropriado como agente antileishmania. Assim, os valores  $IC_{50}$ ,  $CC_{50}$  e consequentemente de IS, que estão indicados na tabela 7.

**Tabela 10:** Compostos com seus respectivos valores de  $IC_{50}$ ,  $CC_{50}$  e IS.

Composto	$IC_{50}$ <i>L. Infantum</i>	$CC_{50}$ THP-1	IS
 Composto de referência	5,5 $\mu$ M	203,0 $\mu$ M	36,9
 Composto 8	186,9 $\mu$ M	798,6 $\mu$ M	4,3
 Composto 9	50,2 $\mu$ M	>1000 $\mu$ M	>19,9
 Composto 10	180,2 $\mu$ M	>1000 $\mu$ M	>5,5

Fonte: Do autor

Analisando a tabela, podemos observar que dentre os compostos sintetizados, o composto 9 foi o que obteve o melhor resultado referente ao Índice de Seletividade (IS), pois quanto maior o valor de IS, melhor o resultado biológico. A alteração do átomo de enxofre (do composto de referência), por um N-H, resulta em um resultado melhor do que a troca por um Oxigênio como feito no composto 8, mas não foi uma mudança significativa que justifique a troca do átomo inicial de enxofre. Da mesma forma, com a retirada do benzeno do benzotiazol do composto 10, foi possível identificar uma alteração negativa nos resultados biológicos, sendo possível identificar que apenas o grupo tiazol não é o suficiente para ter uma atividade biológica efetiva.

Dessa forma, conclui-se que o grupo benzeno ser mantido na estrutura e que o enxofre (do tiazol) não deve ser trocado por oxigênio nem por N-H, para garantir os efeitos biológicos do composto, sendo necessário explorar outros tipos de substituição de átomos em testes futuros.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Síntese

#### 5.1.1 Preparação do composto 8

Em uma solução do ácido carboxílico (11) (95,6 mg, 0,746 mmol) em dimetilformamida (1,0 mL), foram adicionados EDC (143,0 mg, 0,746 mmol), HOBt (5 mg, 0,037 mmol) e a amina (12) (50 mg, 0,373 mmol). A reação foi agitada a 65°C por 120 horas com acompanhamento por CCD, em seguida foi tratada com água destilada. Como não houve precipitação, foi feita uma extração com acetato de etila e solução de NaOH 2M. Após extraído a parte aquosa da parte orgânica, onde estava presente o composto, foi seco com sulfato de sódio anidro e o solvente removido pelo rotaevaporador e na bomba à vácuo, levando a obtenção de 8.

38 mg, 42%, óleo amarelo. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.57 (s, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.35 – 7.25 (m, 2H), 2.70 (s, 1H), 2.01 (d, 2H), 1.92 – 1.79 (m, 2H), 1.66 – 1.51 (m, 2H), 1.38 – 1.19 (m, 4H). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.40, 155.57, 147.86, 139.18, 124.26, 123.27, 117.41, 109.95, 44.83, 28.63, 25.05, 24.86. HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{NaO}_2^+$   $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 267.1104$  m/z, encontrado  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 267.1104$  m/z, erro = 0 ppm. FT-IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3253 (N-H), 3130 (C<sub>sp3</sub>-H), 2998-2853 (C-H); 1675 (C=O);

### 5.1.2 Preparação do composto 9

Em uma solução do ácido carboxílico (11) (96,4 mg, 0,752 mmol) em dimetilformamida (1,0 mL), foram adicionados EDC (144,2 mg, 0,752 mmol), HOBt (5 mg, 0,037 mmol) e a amina (13) (50 mg, 0,376 mmol). A reação foi agitada a 80°C por 192 horas com acompanhamento por CCD, em seguida foi tratada com água destilada e filtrada. Após filtrado, o composto foi transferido e seco com sulfato de sódio anidro. O solvente removido pelo rotaevaporador e na bomba à vácuo, levando a obtenção de 9.

45 mg, 45%, sólido bege. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  12.00 (s, 1H), 11.37 (s, 1H), 7.42 (s, 2H), 7.06 (s, 2H), 1.95 – 1.63 (m, 5H), 1.52 – 1.07 (m, 5H). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{HO}^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+ = 244.1444$  m/z, encontrado  $[\text{M} + \text{H}]^+ = 244.1444$  m/z, erro = 0 ppm. FT-IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3277 (N–H), 3047 (Csp<sup>3</sup>–H), 2929-2853 (C–H); 1680 (C=O);

### 5.1.3 Preparação do composto 10

Em uma solução do ácido carboxílico (11) (127,9 mg, 0,999 mmol) em dimetilformamida (1,0 mL), foram adicionados EDC (191,44 mg, 0,999 mmol), HOBt (6,7 mg, 0,0499 mmol) e a amina (14) (50 mg, 0,499 mmol). A reação foi agitada a 85°C por 96 horas com acompanhamento por CCD, em seguida foi tratada com água destilada e filtrada. Após filtrado, o composto foi transferido e seco com sulfato de sódio anidro. O solvente removido pelo rotaevaporador e na bomba à vácuo, levando a obtenção de 10.

58 mg, 55%, sólido alaranjado. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.73 (s, 1H), 7.43 (d, 1H), 6.99 (d, 1H), 2.47 (m, 1H), 1.98-1.85 (m, 4H), 1.79 – 1.55 (m, 4H), 1.36-1.30 (m, 2H). HRMS (ESI<sup>+</sup>): calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{NaOS}^+$   $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 233.0719$  m/z, encontrado  $[\text{M} + \text{Na}]^+ = 233.0716$  m/z, erro = 1,29 ppm. FT-IR  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>): 3253 (N–H), 3159-3059 (Csp<sup>3</sup>–H), 2998-2853 (C–H); 1675 (C=O);

## 5.2 Análise biológica

### 5.2.1. Avaliação da suscetibilidade 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 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  $IC_{50}$  foi determinado pelo método não linear modelo de inclinação variável de regressão de acordo com a equação “log (inibidor) vs. response” no GraphPad Prisma v.8.2.0. A concentração do composto que inibe 50% do crescimento dos parasitos ( $IC_{50}$ ) 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

Macrófagos THP-1 ( $5,0 \times 10^4$ ) 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  $CO_2$ . 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 fármacos, empregando-se diluições seriadas, durante 72 horas à 37°C, em estufa contendo 5% de  $CO_2$ . 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 ( $CC_{50}$ ) 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, realizamos a síntese dos compostos 8, 9 e 10, partindo de um composto de referência (composto 7), já estudado pelo grupo do Laboratório de Síntese de Candidatos a Fármacos (LaSFar) e que obteve bons resultados biológicos ( $IC_{50}$ : 5,5 5,5 µM;  $CC_{50}$ : 203 µM; IS: 36,3).

Os compostos 8, 9 e 10 foram sintetizados com sucesso e purificados, obtendo um rendimento de 42%, 47% e 55% respectivamente. Por fim, caracterizados através de técnicas de espectroscopia, espectrometria e realizado testes biológicos (IS: 4,3; 19,8; 5,5 respectivamente).

Atráves das sínteses conseguimos aumentar o portfólio de moléculas com modificações interessantes na classe dos benzotiazóis. Dessa forma, obtivemos os resultados que, todas as moléculas sintetizadas tiveram efeitos de atividade biológica inferiores do composto de referência, mas que serviram de base para entendermos um pouco mais sobre essa classe tão importante nos estudos de farmacologia e como esses compostos se comportam com as modificações estruturais.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557. (2006).
- ANDRADE, M. A.; AZEVEDO, C. D. S.; MOTTA, F. N.; SANTOS, M. L. D.; SILVA, C. L.; SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. D.; Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16(1), 444. , (2016). Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12906-016-1401>>.
- MCGWIRE, B.S. ; SATOSKAR, A.R. ; Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment, *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 107, Issue 1, January 2014, Pages 7–14. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>>.
- BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 10, p. 313. (2008).
- CECÍLIO, P.; SILVA, A. C.; OLIVEIRA, F.; Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Commun Biol* 5, 305. (2022). Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z>>.
- FLEAU, C.; PADILLA, A.; SILES, J. M.; CAMPOS, M. T. Q.; NICOLAS, I. S.; IGNACIO COTILLO, JUAN CANTIZANI PEREZ, RICK L. TARLETON, MARIA MARCO, AND GILLES COURTEMANCHE. *Journal of Medicinal Chemistry* pg 10362-10375. (2019) Disponível em: <[10.1021/acs.jmedchem.9b01429](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01429)>
- GUPTA, R.; SWATI, R. Synthesis and Cyclization of Benzothiazole: Review. *Journal of Current Pharmaceutical Research JCPR*. 3. 13-23. (2010).
- HANNAERT, V., BRINGAUD, F., OPPERDOES, F.R. *et al.* Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11 (2003). Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-11>>.
- CUNHA, I. V.; Revisão de estudos da combinação de fotossensibilizadores com inibidores de bomba de efluxo NorA na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e planejamento de um híbrido de Azure

A com Capsaicina. Trabalho de conclusão de curso (Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia. (2023).

KOUTSONI, O. S.; KARAMPETSOU, K.; DOTSIKA, E.; In vitro screening of antileishmanial activity of natural product compounds: Determination of IC50, CC50 and SI values. *Bio-protocol*, v. 9, n. 21, p. e3410. (2019). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.21769/BioProtoc.3410>>.

LAL, J.; RAMALINGAM, K.; MEENA, R.; et al. Design and synthesis of novel halogen rich salicylanilides as potential antileishmanial agents. *European journal of medicinal chemistry*, v. 246, n. 114996, p. 114996. (2023). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114996>>.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Visceral leishmaniasis in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 50(5), 341-352. (2013). Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/issn.2318-3659.v50i5p341-352>>

MARTINHO, A. C. C. Planejamento, síntese e estudo da relação entre estrutura química e atividade biológica de uma classe de sulfonilpiperazinas potente contra o *Trypanosoma cruzi*. 2021. 197 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia. (2021). Disponível em: <<http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.456>>.

MCGHEE, R. B. and COSGROVE, W. B. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiological reviews**, vol. 44, no. 1, p. 140–173. (1980). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/mr.44.1.140-173.1980>>.

MCNAMARA, N.; SAUNDERS, E.; VARGHESE, S.; et al. Hit-to-lead optimization of novel phenyl imidazole carboxamides that are active against *Leishmania donovani*. *European journal of medicinal chemistry*, v. 240, n. 114577, p. 114577. (2022). Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114577>>.

MIKOVSKI, D., BASSO, J., DA SILVA, P., & COELHO RIBAS, J. L. Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. *Revista Saúde E Desenvolvimento*. 29–43. (2019). Disponível: <<https://revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/article/view/997>>.

MIKOVSKI; et al.; Química Medicinal e a Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. *Revista Saúde e Desenvolvimento* | vol.12, n.13. (2018).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmaniose**. Organização Mundial da Saúde das Américas. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>>. Acesso em: 10 maio. (2023).

PACE, D. Leishmaniasis. *The Journal of infection*, v. 69 Suppl 1, p. S10-8. (2014).

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., & VYVYAN, J. R. (2010). *Introdução à espectroscopia* (5a ed.). Cengage Learning.

SVS/MS., F. **Casos de leishmaniose visceral. Brasil, 1980 a 2021**. 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: 10 maio. (2023).