



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KAIO MACIEL DE SANTIAGO SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA  
*IN VITRO* DE BENZOILGUANIDINAS**

---

Londrina  
2019

KAIO MACIEL DE SANTIAGO SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA  
*IN VITRO* DE BENZOILGUANIDINAS**

Defesa de Mestrado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo

Coorientadora: Profa. Dra. Milena Menegazzo Miranda Sapla

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Silva, Kaio Maciel de Santiago.

Síntese e avaliação da atividade antileishmania in vitro de benzoilguanidinas / Kaio Maciel de Santiago Silva. - Londrina, 2019.  
110 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo.

Coorientador: Milena Menegazzo Miranda Sapla.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Tese. 2. Guanidina - Tese. 3. Leishmania - Tese. I. Bispo, Marcelle de Lima Ferreira. II. Sapla, Milena Menegazzo Miranda. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

KAIO MACIEL DE SANTIAGO SILVA

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VITRO* DE  
BENZOILGUANIDINAS**

Defesa de Mestrado apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle Lima Ferreira  
Bispo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Coorientadora: Profa. Dra. Milena Menegazzo  
Miranda Sapla  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Anna Paola Butera  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2019.

Dedico aos meus pais, minha irmã e a todos que contribuíram para o sucesso do presente trabalho, afinal ninguém vence sozinho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força, saúde concedida e acima de tudo por guiar e iluminar meus passos.

Ao meu porto seguro, meus pais Lazara Eli e Silvio Alves pelo amor, carinho, incentivo, compreensão e ajuda financeira em tempos difíceis. Em especial minha mãe por ser minha fortaleza e por suportar minhas loucuras, a vocês meus infinitos agradecimentos.

A minha irmã Gabrielle, minha jóia rara.

Ao Laboratório de Síntese de Moléculas Medicinais (LaSMMed) pela receptividade.

Aos laços de amizade criados durante esses dois anos, os quais tornaram a caminhada mais leve, em especial minhas amigas Marcieli Fabris e Jessica Bassetto.

Aos professores Dr. Alexandre, Dr<sup>a</sup> Carla e Dr<sup>a</sup>. Anna Paola que convivi durante esse período, por compartilharem seus ricos conhecimentos.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marcelle Bispo, pela sua orientação impecável, disponibilidade mesmo em período de férias, pelos ensinamentos, pelas críticas construtivas, pela paciência, pela amizade, pela confiança, pela compreensão e palavras amigas nos momentos difíceis e pela oportunidade de trabalhar ao seu lado e acima de tudo pelo incentivo e encorajamento na superação de meus limites.

A minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Milena Sapla pela paciência, amizade, disponibilidade e pelos ensinamentos na parte biológica. Seu incentivo nesses últimos meses, foram fundamentais para a conclusão este trabalho.

Ao Laboratório de Propriedades e Síntese de Substâncias Orgânicas (LAPSSO) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), em especial o professor Dr. Fernando Macedo Jr. e o Dr. Tiago Brito, pela parceria e pela disponibilização nos precursores sintéticos BTUs e reagentes.

Ao Laboratório de Espectroscopia (LABSPEC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela realização dos espectros de IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, sendo possível a caracterização das substâncias sintetizadas.

Ao Laboratório de imunoparasitologia de doenças negligenciadas e câncer da Universidade Estadual de Londrina (UEL), aos professores Dr<sup>a</sup> Ivete

Costa e Dr. Wander Pavanelli, pelos ensinamentos, sugestões, pela parceria e por disponibilizar o laboratório e os materiais fundamentais para a conclusão do presente trabalho. Aos seus alunos e, em especial, a aluna de doutorado Bruna Bortoleti, por compartilhar seus conhecimentos, pela paciência e apoio constante durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para o desenvolvimento e conclusão do presente trabalho.

“A inteligência! É uma questão de química orgânica, nada mais. Não somos mais responsáveis por sermos inteligentes do que por sermos estúpidos”

Paul Léautaud

SILVA, Kaio Maciel de Santiago. **Síntese e avaliação da atividade antileishmania *in vitro* de benzoilguanidinas**. 2019. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada de amplo espectro clínico variando entre formas cutâneas e visceral. Esta doença é causada por parasitas protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, que é responsável por 20 a 30 mil mortes por ano. No entanto, as opções terapêuticas disponíveis atualmente apresentam diversas limitações incluindo custo, elevada toxicidade e algumas vezes resistência do parasito aos fármacos. Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes antileishmania mais potentes e seletivos, visando melhorar a qualidade de vida do paciente. Neste contexto, este trabalho relata a síntese de nove benzoilguanidinas *N'*-substituídas a partir de suas correspondentes benzoiltioureias *N'*-substituídas, bem como a avaliação de sua atividade antileishmania *in vitro* frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, a fim de avaliar a relação estrutura-atividade para se identificar os pontos-chave para a atividade biológica. Além disso, a citotoxicidade dessas substâncias sobre macrófagos murinos foi avaliada e os índices de seletividade (IS) foram calculados. Os ensaios *in vitro* revelaram que as benzoilguanidinas apresentam uma maior atividade antileishmania, do que seus precursores sintéticos (tioureias) frente às formas promastigotas, destacando-se a substância **2g**, a qual apresentou IC<sub>50</sub> na ordem de 90,8 µM (23 ug/mL) sobre o parasito, com IS na ordem de 5,5. E o composto **2i** com IC<sub>50</sub> de 68,4 µM (15 ug/mL) sobre o parasito, com IS acima de 10, demonstrando baixa citotoxicidade sobre as células de mamíferos. A partir dos resultados obtidos, observou-se que as formas promastigotas tratadas com **2g** e **2i** aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a despolarização mitocondrial do parasito. Quando avaliada a ação destes compostos sobre macrófagos infectados por formas amastigotas de *L. amazonensis*, os compostos apresentaram atividade anti-amastigota promissora com resultados semelhantes à anfotericina B. O estudo de relação estrutura-atividade preliminar constatou que na série das benzoiltioureias, os efeitos estéricos dos substituintes parecem influenciar positivamente a atividade antileishmania. Enquanto que para as benzoilguanidinas, as maiores atividades foram obtidas quando essas apresentaram grupos retiradores de elétrons ligados ao anel aromático, entretanto tais substâncias apresentaram alta citotoxicidade e, conseqüentemente, baixo índice de seletividade. No entanto, estes resultados são preliminares, necessitando-se de investigações complementares e modificações estruturais visando otimizar a atividade antileishmania e diminuir a citotoxicidade dessas classes de substâncias. Diante das previsões do estudo *in silico*, visando futuros estudos *in vivo*, as substâncias-líderes **2g** e **2i** apresentaram características de “fármaco-similar”, como altas biodisponibilidade oral e absorção intestinal, não apresentando indícios de riscos toxicológicos.

**Palavras-chave:** *Leishmania amazonensis*. Tioureias. Guanidinas. Tripanossomatídeo. *In silico*. Leishmaniose.

SILVA, Kaio Maciel de Santiago. **Synthesis and evaluation of *in vitro* antileishmanial activity of benzoylguanidines.** 2019. 110 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease with a broad clinical spectrum varying between cutaneous and visceral forms. This disease is caused by intracellular protozoan parasites of the *Leishmania* genus, which is responsible for 20 to 30 thousand deaths per year. However, currently available therapeutic options have several limitations, including cost, high toxicity and sometimes resistance of the parasite to drugs. In view of this, it is necessary to develop new, more potent and selective antileishmanial agents, aiming to improve the quality of life of the patient. In this context, this work reports the synthesis of nine N'-substituted benzoylguanidines from their corresponding N'-substituted benzoylthioureas, as well as the evaluation of their antileishmanial activity *in vitro* against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania amazonensis*, in order to evaluate the structure-activity relationship to identify the key points for biological activity. In addition, the cytotoxicity of these substances on murine macrophages was evaluated and the selectivity indexes (IS) were calculated. *In vitro* assays on promastigotes forms revealed that benzoylguanidines exhibit a higher antileishmania activity than their synthetic precursors (thioureas), especially **2g**, which had IC<sub>50</sub> of 90.8 μM (23 μg/mL) on the parasite, with SI of 5.5, and compound **2i** with IC<sub>50</sub> of 68.4 (15 ug/mL) on the parasite, with IS above 10, respectively, showing low cytotoxicity on mammalian cells. From the results obtained, it was observed that promastigote forms treated with **2g** and **2i** increased the production of reactive species and a reduction of mitochondrial membrane potential in parasite. When evaluated the action of these compounds against intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, the compounds showed promising anti-amastigote activity with similar results to amphotericin B. The study of preliminary activity showed that in the benzoyl thiourea series, the steric effects of the substituents appear to positively influence antileishmanial activity. While for the benzoylguanidines, the greatest activities were obtained when they presented electron withdrawing groups bound to the aromatic ring, however these substances showed high cytotoxicity and, consequently, low selectivity index. However, these results are preliminary, requiring complementary investigations and structural modifications aimed at optimizing antileishmanial activity and reducing the cytotoxicity of these classes of substances. In view of the predictions of the *in silico* study, with a view to future *in vivo* studies, the **2g** and **2i** leader substances presented "drug-like" characteristics, such as high oral bioavailability and intestinal absorption, showing no signs of toxicological risks.

**Key words:** *Leishmania amazonensis*. Thioureas. Guanidines. Trypanosomatid. *In silico*. Leishmaniasis.

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b>	Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de sais do ácido de Lewis tiofílico HgCl <sub>2</sub> .....	26
<b>Esquema 2:</b>	Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de sais de bismuto (III).....	26
<b>Esquema 3:</b>	Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de sais de cloreto de Cu (II) .....	27
<b>Esquema 4:</b>	Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença do reagente de Mukaiyama.....	27
<b>Esquema 5:</b>	Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de <i>N</i> -Iodossuccinimida (NIS).....	28
<b>Esquema 6:</b>	Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de cloreto de cianúrico (TCT).....	28
<b>Esquema 7:</b>	Síntese de guanidinas utilizando o intermediário ácido sulfônico como reagente de guanilação.....	29
<b>Esquema 8:</b>	Síntese em fase sólida de guanidinas disssubstituídas usando a resina RAM .....	29
<b>Esquema 9:</b>	Rota sintética para preparo de derivados diguanidinos e identificação dos derivados mais ativos .....	31
<b>Esquema 10:</b>	Rota sintética para preparo da série de bis-2,5-[4-guanidinofenil]tiofenos e identificação de derivado guanidínico mais ativo.....	32
<b>Esquema 11:</b>	Síntese do composto 1-guanidinooxi-3-aminopropano (GAPA).....	33
<b>Esquema 12:</b>	Rota sintética para obtenção das BTUs ( <b>1a-i</b> ) .....	38
<b>Esquema 13:</b>	Rota sintética para obtenção das BGNs ( <b>2a-i</b> ).....	39
<b>Esquema 14:</b>	Ciclo catalítico proposto para obtenção das BNGs ( <b>2a-i</b> ) .....	40

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b>	Ciclo biológico do protozoário <i>Leishmania</i> spp .....	18
<b>Figura 2:</b>	Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da leishmaniose .....	19
<b>Figura 3:</b>	Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento da leishmaniose .....	20
<b>Figura 4:</b>	Estrutura molecular de guanidinas.....	22
<b>Figura 5:</b>	Efeito de ressonância do íon guanidíneo .....	23
<b>Figura 6:</b>	Exemplos de superbases.....	23
<b>Figura 7:</b>	Estrutura molecular da arginina .....	24
<b>Figura 8:</b>	Exemplos de fármacos e produtos naturais com o núcleo guanidínico e suas variadas atividades biológicas.....	25
<b>Figura 9:</b>	Reagentes de guanilação eletrofílicos utilizados em combinação com diferentes aminas para a obtenção de guanidinas acíclicas .....	25
<b>Figura 10:</b>	Planejamento estrutural para avaliação do potencial antileishmania de benzoilguanidinas.....	35
<b>Figura 11:</b>	Identificação da série de BGNs sintetizadas a partir das correspondentes BTUs.....	36
<b>Figura 12:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2h</b> .....	41
<b>Figura 13:</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>2h</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ).....	42
<b>Figura 14:</b>	a) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e b) Espectro de DEPT-135 do composto <b>2b</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente $\text{DMSO-}d_6$ ) .....	45
<b>Figura 15:</b>	Esquema ilustrativo para a reação do corante vital, o MTT .....	46
<b>Figura 16:</b>	Esquema ilustrativo para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial usando a TMRE.....	50
<b>Figura 17:</b>	Análises fluorimétricas de formas promastigotas controle (DMSO 0,01% veículo) e tratadas com as substâncias <b>2g</b> e <b>2i</b> ( $\text{IC}_{50}$ e $2x \text{IC}_{50}$ ).....	51

<b>Figura 18:</b>	Efeito das guanidinas <b>2g</b> e <b>2i</b> em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> . Macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> foram tratados por 24 h com 25 e 50 µg/mL de guanidinas ( <b>2i</b> e <b>2g</b> ) e avaliados a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago.....	60
<b>Figura 19:</b>	Microscopia óptica de luz demonstrando macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com as guanidinas <b>2g</b> e <b>2i</b> por 24h e corados com may-grunwald-giemsa (100x) .....	61
<b>Figura 20:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2a</b> .....	91
<b>Figura 21:</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>2a</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente DMSO- <i>d</i> 6) .....	92
<b>Figura 22:</b>	a) Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e b) DEPT-135 da substância <b>2a</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO- <i>d</i> 6) .....	92
<b>Figura 23:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2b</b> .....	93
<b>Figura 24:</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>2b</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente DMSO- <i>d</i> 6).....	94
<b>Figura 25:</b>	a) Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e b) DEPT-135 da substância <b>2b</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO- <i>d</i> 6) .....	94
<b>Figura 26:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2c</b> .....	95
<b>Figura 27:</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da substância <b>2c</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente CDCl <sub>3</sub> ) .....	96
<b>Figura 28:</b>	a) Espectro de RMN de <sup>13</sup> C e b) DEPT-135 da substância <b>2c</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO- <i>d</i> 6) .....	96
<b>Figura 29:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2d</b> .....	97

<b>Figura 30:</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2d</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ).....	98
<b>Figura 31:</b>	a) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e b) DEPT-135 da substância <b>2d</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente $\text{DMSO-}d_6$ ) .....	98
<b>Figura 32:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2e</b> .....	99
<b>Figura 33:</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2e</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ) .....	100
<b>Figura 34:</b>	a) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e b) DEPT-135 da substância <b>2e</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente $\text{DMSO-}d_6$ ).. .....	100
<b>Figura 35:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2f</b> .....	101
<b>Figura 36:</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2f</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente $\text{DMSO-}d_6$ .....	102
<b>Figura 37:</b>	a) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e b) DEPT-135 da substância <b>2f</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente $\text{DMSO-}d_6$ ) .....	102
<b>Figura 38:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2g</b> .....	103
<b>Figura 39:</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância <b>2g</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ) .....	104
<b>Figura 40:</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância <b>2g</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ) .....	104
<b>Figura 41:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2h</b> .....	105
<b>Figura 42:</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>2h</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ).....	106

<b>Figura 43:</b>	a) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e b) DEPT-135 do composto <b>2h</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO- <i>d</i> 6) .....	106
<b>Figura 44:</b>	Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto <b>2i</b> .....	107
<b>Figura 45:</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>2i</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ) .....	108
<b>Figura 46:</b>	a) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ e b) DEPT-135 do composto <b>2i</b> adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente $\text{CDCl}_3$ ) .....	108
<b>Figura 47:</b>	Comitê de ética em experimentação animal .....	110

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Identificação, rendimentos e pontos de fusão das benzoilguanidinas obtidas ( <b>2-ai</b> ).....	39
<b>Tabela 2.</b>	Sinais encontrados no espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) derivado <b>2h</b> .....	42
<b>Tabela 3.</b>	Atribuição dos sinais observados no espectro de RMN de <sup>1</sup> H do derivado <b>2h</b> .....	44
<b>Tabela 4.</b>	Atividade antileishmania <i>in vitro</i> em formas promastigotas (IC <sub>50</sub> ), citotoxicidade (CC <sub>50</sub> ) e índice de seletividade (IS) de BTUs e BGNs.....	49
<b>Tabela 5.</b>	Estrutura das benzoiltioureas ( <b>1a-i</b> ), com seus respectivos caracteres eletrônicos de doação e retirada de elétrons de acordo com seus valores de constante do substituinte de Hammett e índice de inibição (IC <sub>50</sub> ) frente a formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	54
<b>Tabela 6.</b>	Estrutura das benzoilguanidinas ( <b>2a-i</b> ), com seus respectivos caracteres eletrônicos de doação e retirada de elétrons de acordo com seus valores de constante do substituinte de Hammett e índice de inibição (IC <sub>50</sub> ) frente a formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	57
<b>Tabela 7.</b>	Predição <i>in silico</i> de propriedades físico-químicas da substância-líder <b>2i</b> para análise da Regra dos 5 de Lipinski (R <sup>o</sup> 5) e extensão de Veber.....	62
<b>Tabela 8.</b>	Propriedades farmacocinéticas preditas para composto <b>2g</b> e <b>2i</b> .....	63
<b>Tabela 9.</b>	Propriedades de toxicidade (ADME-TOX) do composto <b>2g</b> e <b>2i</b> .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
µg/ mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AcOH	Ácido acético
AmB	Anfotericina B
ANOVA	Análise de Variância
BALB/c	Linhagem de Camundongos isogênicos
B.O.D.	do inglês <i>Bioquimic Oxygen Demand</i>
BGN	Benzoilguanidinas
BTU	Benzoiltioureas
°C	Graus Celsius
CC <sub>50</sub>	do inglês cytotoxicity concentration 50%
CCCP	Carbonil cianeto <i>m</i> -clorofenilhidrazona
CCD	Cromatografia em camada delgada
cLog P	Log do coeficiente de partição
CYP	Enzimas da família Citocromo P450
DEPT	do inglês <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DNDi	do inglês <i>Drugs for Neglected Diseases Initiative</i>
EDCI	carbodiimida
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
ERRO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GAPA	1-guanidinoxí-3-aminopropano
h	Horas
HBA	Número de aceptores de ligação de hidrogênio

HBD	Número de doadores de ligação de hidrogênio;
H <sub>2</sub> DCFDA	Diacetato 2',7'-diclorofluoresceína
HIV	do inglês <i>Human immunodeficiency virus</i>
IC <sub>50</sub>	do inglês <i>inhibitory concentration 50%</i>
i-PrOH	Álcool isopropílico
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
M	Molar
MeOH	Metanol
Mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
Mmol	Milimol
MTBD	<i>N</i> -metil-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno
MTT	do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MW	do inglês <i>molecular weight</i>
NIS	<i>N</i> -Iodossuccinimida
nm	Nanômetro
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA	Organização Pan-Americana da Saúde
PBS	do inglês <i>Phosphate-Buffered Saline</i> (tampão fosfato)
Pd/ C	Paládio em carbono
Pd (PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	Tetraquis(trifenilfosfina)paládio
pK <sub>aH</sub>	Constante de dissociação ácida
pH	Potencial Hidrogeniônico
Ppm	Partes por milhão
p/v	Peso/Volume

RAM	Resina do tipo <i>Rink Amide</i>
RB	Número de ligações rotativas
REA	Estudo de relação estrutura-atividade
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI 1640	Meio de Cultura ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )
R <sub>1</sub> R <sub>2</sub> NH	Aminas dissustituídas
RNH <sub>2</sub>	Aminas monossustituídas
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
t.a	Temperatura ambiente
TBD	1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno
TCT	2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazina
TEA	Trietanolamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Tetraidrofurano
TMG	1,1,3,3-tetrametilguanidina
TMRE	do inglês <i>tetramethylrhodamine, ethyl ester</i>
TMS	Tetrametilsilano
tPSA	Área de superfície polar topológica
UV	Radiação ultravioleta
v/v	Volume/ volume
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Leishmaniose</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Agente etiológico, vetor e ciclo biológico</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Tratamento</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Guanidinas</b> .....	<b>22</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Síntese de guanidinas</b> .....	<b>25</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Derivados guanidínicos com atividades antileishmania</b> .....	<b>29</b>
<b>1.2.3</b>	<b>Planejamento estrutural das benzoilguanidinas com potencial atividade antileishmania</b> .....	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos gerais</b> .....	<b>36</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>36</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Síntese e caracterização estrutural da série de BGNs (2a-i)</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Avaliação dos perfis de atividade sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e citotoxicidade in vitro da série de BGNs (2a-i) e seus precursores sintéticos BTUs (1a-i)</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Mecanismos de morte celular em promastigotas de <i>L. amazonenses</i></b> .....	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Estudo preliminar de relação estrutura-atividade (REA)</b> .....	<b>52</b>
<b>3.5</b>	<b>Avaliação da atividade sobre formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> das substâncias mais promissoras</b> .....	<b>59</b>
<b>3.6</b>	<b>Estudo <i>in silico</i> para predição de parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade (ADME-Tox)</b> .....	<b>61</b>

<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>66</b>
<b>4.1</b>	<b>Procedimentos gerais</b> .....	<b>66</b>
<b>4.2</b>	<b>Metodologias sintéticas</b> .....	<b>66</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Síntese da série de BTUs (1a-i)</b> .....	<b>66</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Síntese da série de BGNs (2a-i)</b> .....	<b>67</b>
<b>4.3</b>	<b>Técnicas Analíticas</b> .....	<b>70</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)</b> .....	<b>70</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</b> .....	<b>70</b>
<b>4.3.3.</b>	<b>Ponto de fusão</b> .....	<b>71</b>
<b>4.4</b>	<b>Ensaio biológicos</b> .....	<b>71</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Animais e aspectos éticos</b> .....	<b>71</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Manutenção das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i></b> .....	<b>71</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Atividade <i>in vitro</i> de benzoilguanidinas e seus precursores sintéticos (benzoiltioureas) sobre formas promastigotas de <i>L. amazonenses</i></b> .....	<b>72</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Viabilidade de macrófagos peritoneais</b> .....	<b>72</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Índice de seletividade (SI)</b> .....	<b>73</b>
<b>4.4.6</b>	<b>Estudo <i>in silico</i> para predição de parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade (ADME-Tox)</b> .....	<b>73</b>
<b>4.4.7</b>	<b>Determinação do potencial de membrana mitocondrial</b> .....	<b>73</b>
<b>4.4.8</b>	<b>Produção de EROs em formas promastigotas</b> .....	<b>74</b>
<b>4.4.9</b>	<b>Ensaio anti-mastigota</b> .....	<b>74</b>
<b>4.5</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>75</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>
	<b>APÊNDICES</b>	
	<b>APÊNDICE A – Seção de espectros</b> .....	<b>91</b>
	<b>ANEXOS</b>	
	<b>ANEXO A – Comitê de ética em experimentação animal</b> .....	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é causada por parasitas protozoários do gênero *Leishmania*, dentre os quais dezoito espécies são responsáveis pela doença, que é transmitida aos seres humanos pela picada de flebotomíneos fêmeas infectados (STEVERDING, 2017; WHO, 2018).

A leishmaniose apresenta características clínicas e epidemiológicas diversas. A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas podendo acometer pele, mucosas e vísceras, sendo as formas principais: cutânea localizada, cutânea difusa, mucocutânea e visceral, as quais variam de acordo com a espécie do parasita, o ciclo do vetor e a resposta imunológica do hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2005; PEARSON e SOUSA, 1996; REITHINGER *et al.*, 2007; SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

A leishmaniose cutânea localizada (LC) é a forma mais comum da doença e se manifesta inicialmente com vermelhidão da pele no local da picada, devido à vasodilatação dos capilares cutâneos. Progressivamente, desenvolve-se em uma pápula indolor, a qual progride para um nódulo, que evolui gradativamente para úlceras únicas ou múltiplas indolores localizadas, caracterizadas por bordas elevadas, contornos regulares e leito da lesão granuloso com presença ou não de líquido purulento (PETERS e KILLICK-KENDRICK, 1987; REITHINGER, *et al.*, 2007)

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma variação da LC, caracterizada pela cronicidade e refratariedade ao tratamento devido à anergia de resposta imune no hospedeiro (ASHFORD, 2000). Na LCD há a presença de lesões difusas não ulceradas, distribuídos amplamente na derme, contendo grande número de parasitos, que disseminam do local inicial da infecção e podem cobrir todo o corpo do paciente, assumindo a evolução de caráter crônico e progressivo (PETERS e KILLICK-KENDRICK, 1987; REITHINGER, *et al.*, 2007).

Já a leishmaniose mucocutânea (LMC), normalmente é uma forma secundária à lesão cutânea, caracterizada pela capacidade do parasito de provocar metástase em tecidos mucosos por disseminação linfática ou hematogênica, que pode resultar em infecção da mucosa do trato respiratório superior e oral. As áreas mais comumente afetadas são boca, faringe, laringe e nariz (REITHINGER, *et al.*, 2007; PACE, 2014).

Nas Américas, as manifestações clínicas que acometem o tegumento são denominadas Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana. No Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia*: *L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) shawi*, *L. (V.) lindenberg*; e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L) amazonensis* (OPA, 2018; WHO, 2018). As espécies mais amplamente distribuídas no território nacional são: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* (MINISTERIO DE SAÚDE, 2007).

Outra manifestação clínica, é a Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar nas Américas, a qual é causada essencialmente por uma única espécie, denominada *Leishmania chagasi*, que evolui de forma crônica com acometimento sistêmico. Os sintomas incluem febre irregular, perda de peso, distensão abdominal, leucopenia, anemia e fraqueza. A disseminação dos parasitos induz ao acúmulo de células fagocíticas mononucleares nos órgãos afetados e hiperplasia secundária das células reticuloendoteliais causando hepatoesplenomegalia que, quando não tratada, é fatal em 90% dos casos (GRECH, *et al.*, 2000; PACE, 2014).

De acordo com a OMS, existem aproximadamente 12 milhões de seres humanos infectados e 350 milhões de pessoas que vivem em áreas endêmicas sob o risco de contrair a doença. Estima-se que existem entre 600 mil e 1 milhão de novos casos de LC e cerca de 50.000 a 90.000 novos casos de LV, em todo o mundo anualmente, sendo responsáveis por 20.000 a 30.000 mortes por ano (WHO, 2018).

As leishmanioses apresentam uma distribuição mundial com importantes focos de infecção em 102 países, áreas e territórios. No entanto, em 2017, 94% dos novos casos de LV notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, causando alta morbidade e mortalidade. A maioria dos casos de LC ocorreram no Afeganistão, na Argélia, no Brasil, na Colômbia, na República Islâmica do Irã, no Paquistão, no Peru, na Arábia Saudita e na República Árabe da Síria, bem como 90% dos casos da LMC ocorreram na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2018).

O Brasil é considerado a área endêmica de maior extensão territorial no continente para LTA e um dos países com as mais elevadas taxas de notificação

da doença. No período de 2007 a 2017, foram registrados 234.217 novos casos notificados no sistema de informação de agravos de notificação (SINAN, 2019). Atualmente, tem sido confirmada em todos os estados brasileiros, tendo como as principais espécies circulantes: *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. shawi*, esta última encontrada apenas na região amazônica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Por sua vez, a LV está presente em 21 estados, atingindo as cinco regiões brasileiras, onde no mesmo período de 2007 a 2017 foram registrados 41.204 novos casos confirmados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; SINAN, 2019).

Diante de sua ampla distribuição mundial, a leishmaniose é considerada um importante problema de saúde pública, afetando principalmente países em desenvolvimento devido a fatores de riscos ambientais, como migrações maciças e urbanização não planejada, os quais aumentam a exposição ao vetor devido às baixas condições sanitárias e habitações inadequadas. No Novo Mundo, o desmatamento generalizado ocorrido nas últimas décadas levou a uma domesticação de transmissão em toda a América Latina, aumentando a transmissão peri e intra-domiciliar. Um fator de risco importante no Velho Mundo é a construção de barragens, para novos esquemas de irrigação e novas plantações, que causam uma mudança acentuada nos padrões de reprodução de roedores, possíveis reservatórios do parasito. Fatores de risco individuais como sistema imunológico debilitado, desnutrição e a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) são considerados uma ameaça real ao desenvolvimento da leishmaniose. (DESJEUX, 2001; DESJEUX, 2004).

### **1.1.2 Agente etiológico, vetor e ciclo biológico.**

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários unicelulares pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. Este parasito apresenta ciclo biológico heteroxêno com morfologia variável durante o ciclo. No vetor, encontra-se na forma promastigota, com flagelo livre na porção anterior do corpo celular alongado. Já no hospedeiro vertebrado, após a internalização das formas promastigotas por células do sistema monocítico fagocitário, o pH ácido do vacúolo parasitóforo aliado à temperatura do hospedeiro vertebrado auxiliam a diferenciação das promastigotas em amastigotas

intracelulares. Essas formas apresentam um flagelo atrofiado na região anterior do corpo arredondado do parasito (CUNNINGHAM, 2002).

Esses parasitos são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada da fêmea de insetos hematófagos infectados com formas promastigotas, conhecidos como flebotomíneos. Esse hospedeiro invertebrado pertencente à ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo ou *Phlebotomus* no Velho Mundo (MCMAHON-PRATT e ALEXANDER, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017, TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

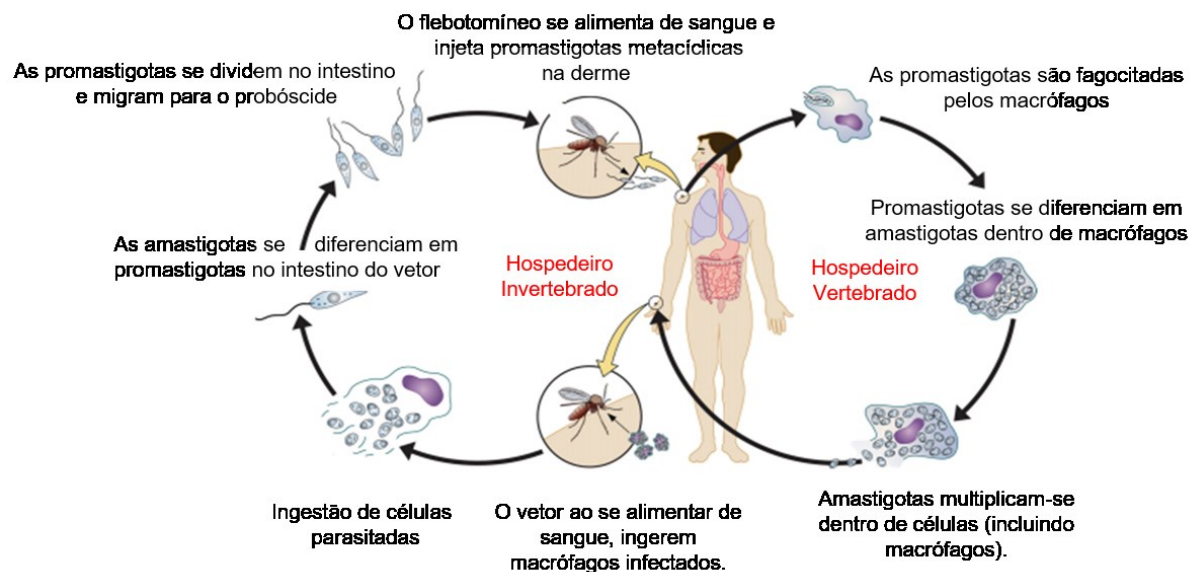
Entre as mais de 800 espécies de flebotomíneos existentes, apenas 98 espécies são vetores transmissores comprovados de leishmaniose para humanos, onde o gênero *Lutzomyia* inclui 90% das espécies de vetores responsáveis pela transmissão. Esses vetores exibem uma corcunda dorsal e asas com forma oval lanceolada e a sua saliva apresenta importante papel no processo de inflamação, pois possuem uma variedade de agentes farmacológicos, como anticoagulantes, vasodilatadores, agentes antiplaquetários, responsáveis pelo aumento do fluxo sanguíneo e ação quimiotática e imunorreguladora para monócitos (ALBERTOS-ALPUCHE, 1990; ANDRADE *et al.*, 2007, MAROLI, *et al.*, 2013; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). No Brasil, os principais vetores envolvidos na transmissão de LTA são *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata*, *L. migonei* e na transmissão de LV: *L. longipalpis* e *L. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O ciclo biológico (**Figura 1**) do agente etiológico *Leishmania* spp. é relativamente simples, envolvendo um estágio no hospedeiro vertebrado e outro no hospedeiro invertebrado (ALBERTOS-ALPUCHE, 1990).

O ciclo se inicia durante o repasto sanguíneo, na qual os vetores infectados regurgitam com a saliva formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp na derme do hospedeiro, onde são fagocitadas, principalmente por macrófagos formando vacúolos parasitóforos. Nos vacúolos as formas promastigotas se diferenciam na forma amastigota, ao escapar dos mecanismos microbicidas dos macrófagos, iniciam um processo de multiplicação por divisão binária (ESCH; PETERSEN, 2013; REITHINGER *et al.*, 2007).

Por sua vez, os flebotomíneos ao se alimentarem de um indivíduo infectado ou um hospedeiro reservatório aspiram macrófagos parasitados ou

amastigotas livres no sangue ou mesmo em tecidos. Assim as formas amastigotas se diferenciam em promastigotas no interior do intestino do inseto e se multiplicam. Por sua vez, essas promastigotas migram para as glândulas salivares e se diferenciam em promastigotas metacíclicas altamente infecciosas. No próximo repasto sanguíneo ocorre a regurgitação destas formas promastigotas metacíclicas em um novo hospedeiro vertebrado, recomeçando o ciclo (ESCH; PETERSEN, 2013; REITHINGER *et al.*, 2007).

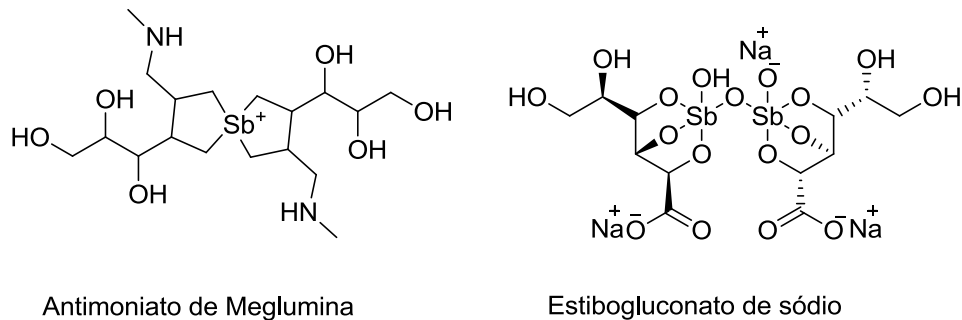


**Figura 1:** Ciclo biológico do protozoário *Leishmania* spp (adotado e modificado de ESCH e PETERSEN, 2013).

### 1.1.3 Tratamento

A leishmaniose faz parte de um grupo de doenças reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como doenças negligenciadas tropicais, pois acometem principalmente populações economicamente desfavorecidas de regiões tropicais. Tais doenças apresentam investimentos reduzidos, não despertando o interesse das indústrias farmacêuticas em relação à pesquisa, controle e desenvolvimento de novos fármacos (FDA, 2014). Portanto, a maioria das opções terapêuticas disponíveis para o tratamento dessa enfermidade apresentam elevada toxicidade e efeitos adversos graves, tais como distúrbios gastrointestinais, musculares, cardiovasculares e respiratórios. As formas de tratamento se baseiam no uso de fármacos de primeira escolha (**Figura 2**) denominados antimonialis

pentavalentes [Sb (V)] como antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostam®), que são medicamentos de administração parenteral obrigatória por pelo menos 28 dias (SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

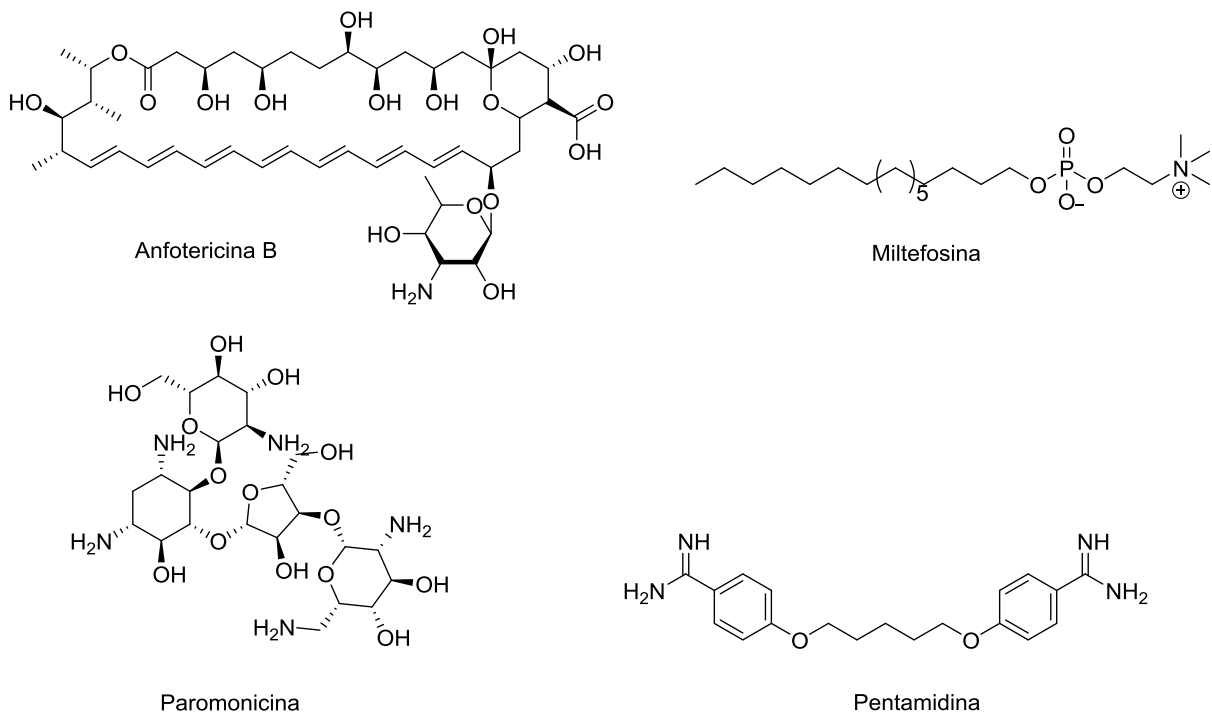


**Figura 2:** Fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da leishmaniose.

Mesmo após sete décadas de uso clínico no tratamento de leishmaniose, o mecanismo de ação preciso dos antimoniais não é totalmente conhecido. Até o momento, acredita-se que são pró-fármacos que requerem redução biológica para a forma trivalente [Sb (III)] e, após a redução, inibem enzimas glicolíticas e a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos em amastigotas de *Leishmania*, causando a depleção dos níveis intracelulares de adenosina trifosfato (ATP) (VAN-VOORHIS, 1990, BALANÃ-FOUCE *et al.*, 1998, CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006), efluxo de tripanotona (WYLLIE, CUNNINGHAM, FAIRLAMB, 2004) e mutagênicidade (MOREIRA *et al.*, 2017)

Após administração endovenosa ou intramuscular, os antimoniais apresentam como vantagem a rápida excreção pelo rim, uma vez que cerca de 60-80% de uma dose injetada é eliminada dentro de seis horas, o que evita a toxicidade aguda (OLLIARO e BRYCESON, 1993). Entretanto, em consequência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos para obter a eficácia do tratamento. Sendo assim, efeitos adversos do uso de antimoniais foram observados, tais como a pancreatite, que é provavelmente a causa das náuseas e da dor abdominal experimentada por muitos pacientes (GASSER, 1994), a pancitopenia e a neuropatia periférica reversível (BRUMMITT, PORTER E HERWALDT, 1996), além de mialgias, artralgias, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos (BALANÃ-FOUCE *et al.*, 1998; SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2015).

Apesar de apresentarem eficácia variável e provocarem graves efeitos adversos, os antimoniais continuam a ser o método mais barato para tratar todas as formas clínicas da leishmaniose (BERMAN, 1997). Diante das contraindicações tais como insuficiência renal, hepática e cardíaca, gestantes, crianças e idade maior de 50 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), dos efeitos adversos e o surgimento de cepas resistentes a esses fármacos, indica-se o uso de fármacos de segunda escolha (**Figura 3**), como a anfotericina B, a pentamidina, a



miltefosina e a paromomicina (BASTOS *et al.*, 2016).

**Figura 3:** Fármacos de segunda escolha utilizados no tratamento da leishmaniose.

Em casos onde os pacientes apresentam resistência aos antimoniais, recomenda-se o uso da Anfotericina B, um antibiótico antifúngico poliênico, extraído inicialmente da bactéria filamentosa chamada *Streptomyces nodusus* (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; LEMKE, KIDERLEN e KAYSER, 2005). Seu mecanismo de ação é multifacetado, sendo um agente que se liga a esteróis da parede celular, preferencialmente ao ergosterol, e forma orifícios na membrana da célula hospedeira, alterando sua permeabilidade, resultando na saída de íons que causam a morte celular (SINGH e SIVAKUMAR, 2004, CARREIRA e CEREGHETTI, 2006). No entanto, em menor grau, a Anfotericina B pode se ligar também ao colesterol presente na membrana celular do hospedeiro, causando lesão celular,

levando a efeitos adversos como febre, cefaleia, calafrios, náuseas, dor óssea, anemia, hipocalemia, hipomagnesemia e nefrotoxicidade, relacionada à dose cumulativa (VAN-VOORHIS, 1990; BERMAN, 1997).

A pentamidina, uma substância do grupo das diamidinas, apresenta atividade antiprotozoária e tem sido utilizada no tratamento de leishmanioses há mais de 50 anos. Seu mecanismo de ação não é completamente compreendido, mas acredita-se que sua ação inclui a inibição da biossíntese de poliamina, reduzindo a capacidade de divisão celular, bem como também apresenta efeito no potencial da membrana mitocondrial (BRAY *et al.*, 2003; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Diante da alta toxicidade e da baixa absorção pelo trato gastrointestinal, requer administração parenteral, ocasionando o surgimento de efeitos colaterais adversos que incluem abscessos, erupções cutâneas, taquicardia, cefaleia, hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e morte súbita (VAN-VOORHIS, 1990, BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998).

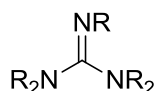
Outro fármaco utilizado no tratamento de leishmaniose é a paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro extraído da bactéria *Streptomyces rimosus* var. *Paromomycinus* (MOHAPATRA, 2014). Apresenta mecanismo de ação baseado na inibição da síntese de proteínas através de sua interação com subunidades ribossômicas, na interferência da atividade mitocondrial e na capacidade de captação de precursores de macromoléculas (DAVIS, 1987; MAAROUF *et al.* 1997, JHINGRAN *et al.*, 2009). Os efeitos adversos mais comuns reportados devido a sua toxicidade são nefrotoxicidade, ototoxicidade e disfunção hepática. (JHINGRAN *et al.*, 2009, MENEZES *et al.* 2015)

A grande maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são administrados por via parenteral, intramuscular ou intravenosa. A miltefosina, um fármaco alquilfosfolipídico, é o primeiro considerado altamente eficaz, quando administrado oralmente, para tratamento de leishmaniose visceral na Índia (GUERIN *et al.*, 2002; SUNDAR *et al.*, 2002). Seu mecanismo de ação não é claro, acredita-se que o fármaco desequilibra o metabolismo alquil-lipídico do parasito, causando morte celular por apoptose (MOHAPATRA, 2014). Efeitos colaterais reportados são vômitos, problemas gastrointestinais e ação teratogênica (GUERIN *et al.*, 2002; SUNDAR *et al.*, 2002).

## 1.2 Guanidinas

Em vista do caráter insatisfatório, elevada toxicidade dos fármacos de primeira e segunda escolha disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses, bem como o aparecimento crescente de casos com parasitos resistentes a esses medicamentos, faz-se necessário o desenvolvimento de novos agentes antileishmania mais potentes e seletivos, visando melhorar a qualidade de vida do paciente.

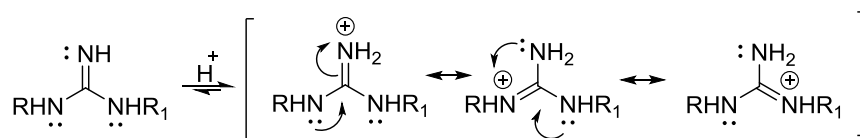
Sendo assim, no campo da descoberta de novos fármacos, as guanidinas (**Figura 4**) são uma importante classe de substâncias, visto que são encontradas em muitos produtos naturais e sintéticos, que possuem ampla gama de atividades farmacológicas, como por exemplo, antimicrobiana (MO *et al.*, 2009), antiviral (CHENG *et al.*, 2012), anti-inflamatória (HIRSCH, 2008), antidiabética (COXON *et al.*, 2009; TASSONI *et al.*, 2008), antitumoral (BROZEWICZ e SŁAWINSKI, 2012) antifúngica (MANETTI *et al.*, 2009) e antiprotozoário (ARAFÁ *et al.*, 2011; MCKEEVER e KAISER, 2013),



**Figura 4:** Estrutura molecular de guanidinas

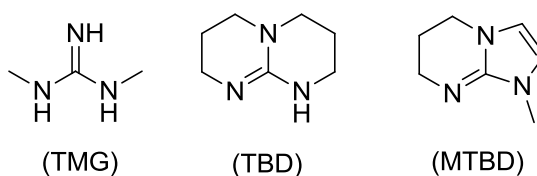
A guanidina (R= H; **Figura 4**) foi sintetizada pela primeira vez por Adolph Strecker em 1861, através da degradação oxidativa da guanina e, desde então, os derivados guanidínicos vem sendo utilizados com diferentes finalidades (STRECKER, 1861).

O grupo guanidina é uma base forte com  $\text{pK}_{\text{aH}} = 13,6$  (ANGYAL e WARBURTON, 1951), sendo mais forte do que outras substâncias de nitrogênio, que apresentam um grupo imino ou amino ligado a um átomo de carbono. Em condições apropriadas, o nitrogênio imínico é protonado levando a formação de um íon simétrico chamado guanidínio (**Figura 5**), que se trata de um caso especial de sistema heteroalílico conjugado, onde os três nitrogênios estão ligados ao mesmo átomo de carbono em forma de Y em um sistema contendo seis elétrons  $\pi$  deslocalizados (HÄFELINGER e KUSKE, 1991; RACZYNSKA *et al.*, 2003).



**Figura 5:** Efeito de ressonância do íon guanidíneo.

Devido à estabilidade conferida pelo efeito de ressonância dos ácidos conjugados, as guanidinas são caracterizadas como superbases, tais como, a 1,1,3,3-tetrametilguanidina (TMG), o 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno (TBD) e o N-metil-1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno (MTBD) (**Figura 6**), sendo, portanto, exploradas na química orgânica em inúmeras reações catalisadas por bases como reações de aldol, adições conjugadas, carbonilações, metilações, sililações e bromações (YAMAMOTO e KOJIMA, 1991; COSTA *et al.*, 1998; ISHIKAWA, 2009, TAYLOR, BULL e WILLIAMS, 2012).

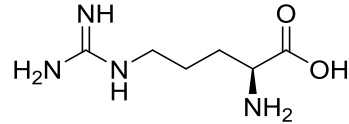


**Figura 6:** Exemplos de superbases

Além de suas aplicações na química orgânica sintética, o núcleo guanidínico está presente em diversos produtos naturais (**Figura 7**) isolados de microrganismos terrestres, marinhos ou de água doce, de invertebrados marinhos e terrestres, esponjas marinhas e plantas, os quais apresentam uma gama de atividades biológicas (**Figura 7**) (BERLINCK, TRINDADE-SILVA e SANTOS, 2012). Essa versatilidade pode ser atribuída à forte basicidade dos derivados guanidínicos, que em condições fisiológicas, existem principalmente em sua forma protonada (íon guanidíneo), o que pode favorecer a sua interação com proteínas, ou influenciar a função dos canais de sódio celulares e, até mesmo, alterar o seu transporte através das membranas (RACZYNSKA *et al.*, 2003).

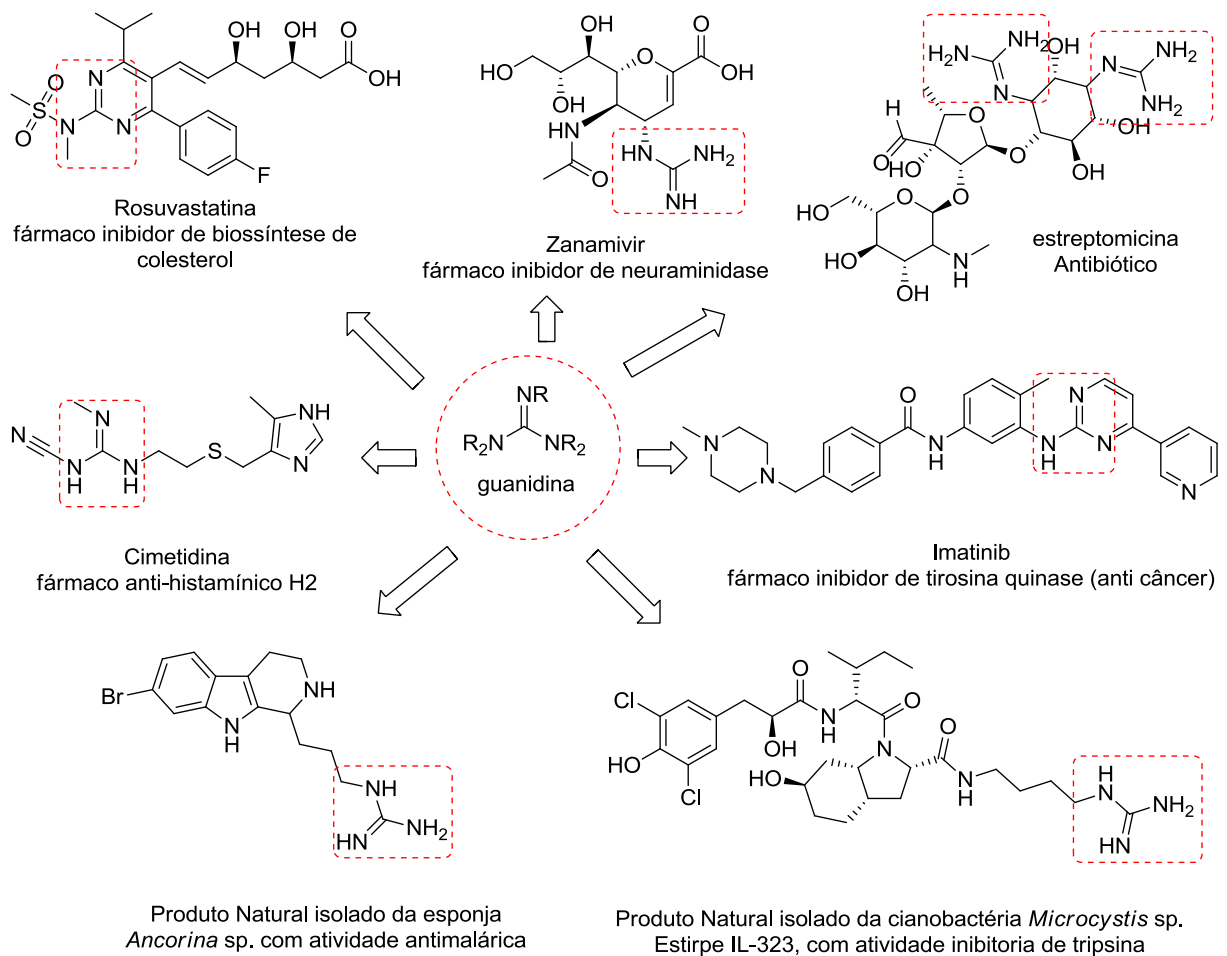
É válido ressaltar que o núcleo guanidínico está presente na estrutura da arginina (Figura 7), um aminoácido básico obtido por hidrólise de muitas proteínas comuns. A arginina desempenha papéis importantes em mamíferos como, por exemplo: na síntese de ureia, que é a principal forma na qual essas espécies excretam o nitrogênio; no estímulo a liberação de insulina pelo pâncreas, bem como sendo precursora sintética do óxido nítrico (NO), o qual é um mensageiro biológico

em uma variedade de respostas fisiológicas, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e a capacidade do sistema imunológico em destruir células tumorais e parasitas (SMITH, MARKS e LIEBERMAN, 2007).



**Figura 7:** Estrutura molecular da arginina.

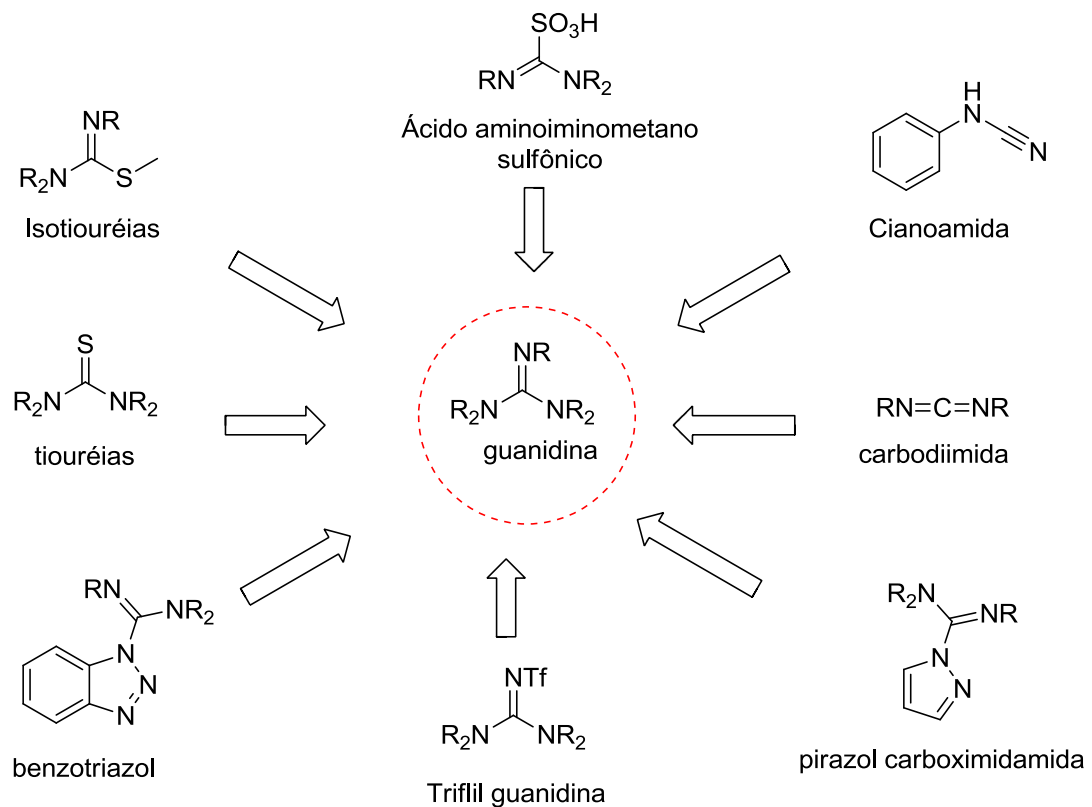
Tendo em vista essas importantes características, aliadas ao amplo espectro de possíveis aplicações biológicas, o núcleo guanidínico tem papel fundamental na química medicinal, servindo como bloco de construção em vários fármacos comercializados atualmente (**Figura 7**) (GREENHILL, PHARM e LUE, 1993; BUCHDUNGER *et al.* 1996; OLIVER *et al.*, 2004; VON ITZSTEIN, 2007).



**Figura 8:** Exemplos de fármacos e produtos naturais com o núcleo guanidínico (destaque em pontilhado) e suas variadas atividades biológicas.

### 1.2.1 Síntese de guanidinas

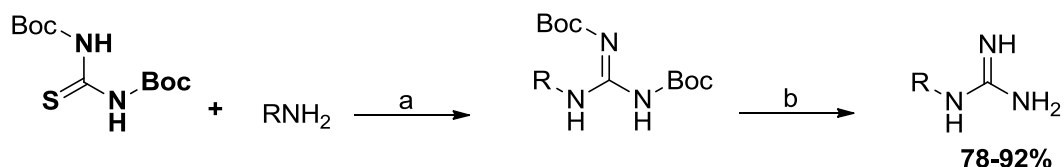
O núcleo de guanidina pode ser sintetizado comumente a partir de um método prático denominado “síntese clássica de guanidinas”, que é geralmente utilizado para a preparação de guanidinas acíclicas, o qual consiste na reação estequiométrica de uma amina com um reagente de guanilação eletrofílico (**Figura 8**) (KATRITZKY e ROGOVOY, 2005).



**Figura 9:** Reagentes de guanilação eletrofílicos utilizados em combinação com diferentes aminas para a obtenção de guanidinas acíclicas.

Apesar da variedade de reagentes de guanilação para a síntese de guanidinas, a via mais simples envolve o uso de tioureias eletrofílicas como reagentes de guanilação, as quais requerem ativação prévia (ALONSO-MORENO et. al., 2014). Nestas reações são utilizados como agentes de ativação, comumente, sais de metais pesados em quantidades estequiométricas, dentre os quais se

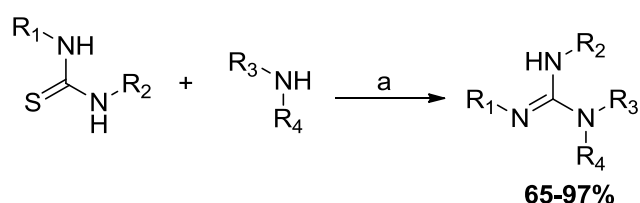
destaca o ácido de Lewis tiofílico  $\text{HgCl}_2$ , o qual aumenta a reatividade das tioureias, através da formação de complexo com o átomo de enxofre, atuando assim como agente de dessulfuração (**Esquema 1**), através da formação de uma carbodiimida eletrofílica, que é rapidamente atacada na presença de uma amina nucleofílica (KIM e QIAN, 1993).



**Reagentes e condições:** a)  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF, t.a.; b) TFA

**Esquema 1:** Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de sais do ácido de Lewis tiofílico  $\text{HgCl}_2$  descrita por Kim e Qian (1993).

No entanto, devido à conhecida toxicidade do mercúrio, Cunha e Rodrigues Jr. (2006) relataram a síntese de benzoilguanidinas (**Esquema 2**), utilizando sais de Bi (III) como ácido de Lewis tiofílico, para promover a dessulfuração de tioureias, com posterior ataque por aminas nucleofílicas, obtendo-se diferentes guanidinas com rendimentos que variaram de 65-97%. Vale ressaltar que o uso de sais de Bi (III) forneceu produtos com rendimentos comparáveis com as reações promovidas por  $\text{HgCl}_2$ , com a vantagem da toxicidade reduzida quando comparados aos sais de mercúrio.

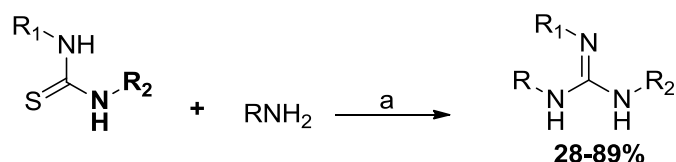


**Reagentes e condições:** a)  $\text{BiI}_3$ ,  $\text{NaBiO}_3$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , agitação, t.a., refluxo.

**Esquema 2:** Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de sais de bismuto (III) descrita por Cunha e colaboradores (2006).

Mais recentemente, Kelly e Rozas (2013) relataram o uso de sais de

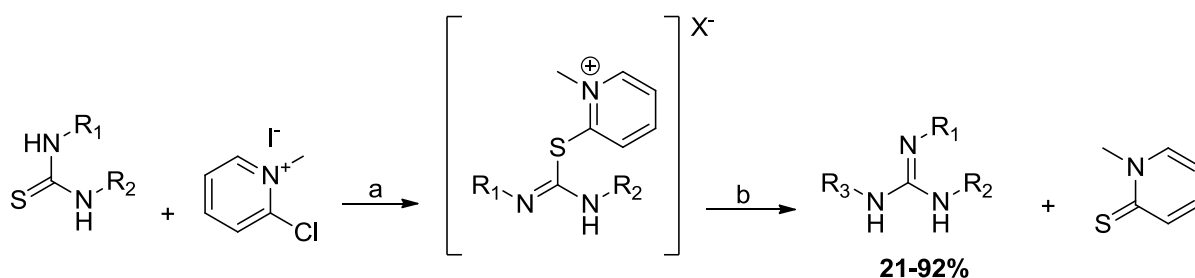
cloreto de Cu (II) (**Esquema 3**) como uma alternativa para substituir o cloreto de mercúrio em conversões de tioureias em guanidinas, demonstrando que o uso de  $\text{CuCl}_2$  é tão eficiente e produtivo quanto a guanidilação promovida por  $\text{HgCl}_2$ . Entretanto, a utilização de aminas não nucleofílicas produziu guanidinas com rendimentos que variaram de 28-89%.



**Reagentes e condições:** a)  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a.

**Esquema 3:** Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença de sais de cloreto de Cu (II) descrita por Kelly e Rozas (2013).

Uma alternativa para o preparo de guanidinas promovida por metal de transição é o uso do reagente de Mukaiyama (iodeto de 2-cloro-1-metilpiridínio) (**Esquema 4**) para auxiliar na dessulfurização da tioureia. Entretanto, o uso de tal reagente apresenta como principais problemas a baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos e a dificuldade de purificação das guanidinas, devido a formação de sub-produtos (SHIBANUMA, SHIONO e MUKAIYAMA, 1977).

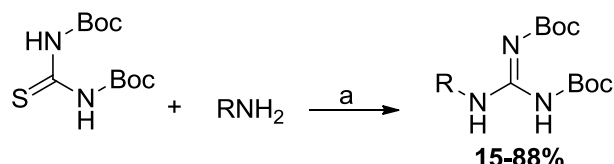


**Reagentes e condições:** a)  $\text{Et}_3\text{N}$ ;  $\text{CH}_3\text{CN}$ , t.a. sob atmosfera de argônio, refluxo 2h, b)  $\text{Et}_3\text{N}$ , aminas correspondentes.

**Esquema 4:** Síntese de guanidinas utilizando tioureias como reagentes de guanilação na presença do reagente de Mukaiyama descrita por Shibamura, Shiono e Mukaiyama (1977).

Smietana, Ohara e Vasseur (2009), descreveu reações de guanilação promovida por *N*-Iodossuccinimida (NIS) (**Esquema 5**). Como uma

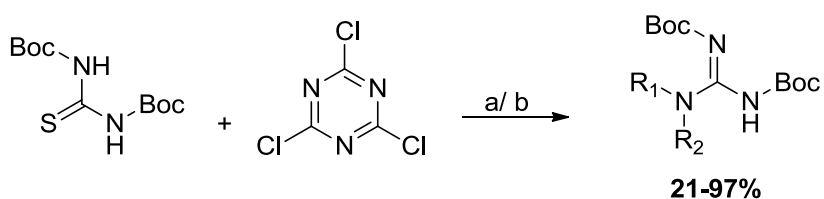
alternativa atraente aos métodos existentes utilizados para ativação da tiourea, como a catálise por metal de transição ou por reagente de Mukayama, este procedimento permitiu a guanilação de *di*-Boc-tioureas através de aminas primárias e secundárias, onde a NIS tiofílica se comportou como um ácido de Lewis mole, coordenando com a porção *di*-Boc-tiourea, obtendo-se produtos com rendimentos que variaram de 15-88%.



**Reagentes e condições:** a) NIS, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, t.a.

**Esquema 5:** Síntese de guanidinas utilizando tioureas como reagentes de guanilação na presença de *N*-Iodossuccinimida (NIS), descrita por Smietana e colaboradores (2009).

Porcheddu, De Luca e Giacomelli (2009) descreveram uma rota ecológica e eficiente para a guanilação de aminas. A reação consiste em um ataque de aminas primárias e secundárias sobre a *di*-Boc-tiourea ativada por um agente muito barato conhecido como 2,4,6-Tricloro-1,3,5-triazina (TCT) ou cloreto cianúrico (Esquema 6). A nova rota proposta elimina o risco ambiental de resíduos de metais pesados sem perda considerável de rendimento ou reatividade.

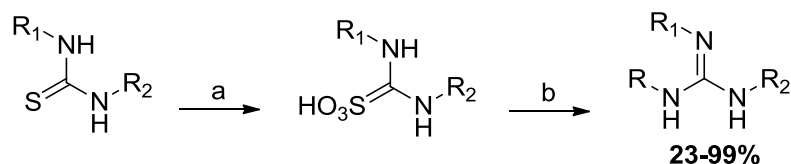


**Reagentes e condições:** a) NMM, THF, 0°C, 10 min; refluxo, 12 h; b) R<sub>1</sub>R<sub>2</sub>NH, DMAP (cat.) THF, 8-36 h, t.a.

**Esquema 6:** Síntese de guanidinas utilizando tioureas como reagentes de guanilação na presença de cloreto de cianúrico (TCT), descrita por Porcheddu e colaboradores (2009).

Maryanoff *et al.* (1986) descreveram que tioureas expostas ao molibdato de sódio diidratado (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) e peróxido de hidrogênio a 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) são convertidas em ácidos sulfônicos termicamente estáveis à temperatura

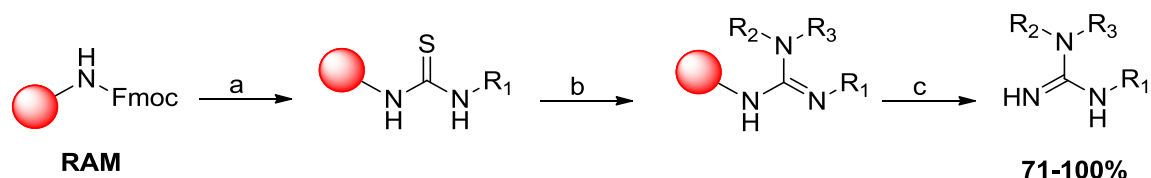
ambiente, sendo tais intermediários, opções viáveis como reagentes guanidilantes. Reações de guanilações envolvendo ácidos sulfônicos (**Esquema 7**), baseiam-se na ativação do enxofre através da oxidação, seguida pelo deslocamento do grupo de enxofre oxidado por aminas nucleofílicas. Portanto, sob estas condições oxidantes, obteve-se guanidinas com rendimentos que variaram de 23-99%.



**Reagentes e condições:** a)  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ; b)  $\text{RNH}_2$ ,  $\text{MeCN}$ , t.a.

**Esquema 7:** Síntese de guanidinas utilizando o intermediário ácido sulfônico como reagente de guanilação, descrita por Maryanoff e colaboradores (1986).

Além dos métodos supracitados, a dessulfuração de tioureias a carbodiimidas para preparo de guanidinas pode ser realizada em fase sólida. Nesse contexto Li, Wilson e Portlock (2001) relataram um método sintético combinatório simples e conveniente em fase sólida usando a resina do tipo *Rink Amide (RAM)* no qual um *linker* de amina é responsável pelo acoplamento com diferentes isotiocianatos aromáticos e aminas alifáticas para gerar guanidinas dissubstituídas com altos rendimentos (71-100%) e pureza.



**Reagentes e condições:** a) 25% piperidina/DMF, isotiocianatos correspondentes,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 8 h; b) aminas correspondentes, DIC, DIPEA,  $\text{CHCl}_3$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 2 dias; c) 25% TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , t.a., 1h.

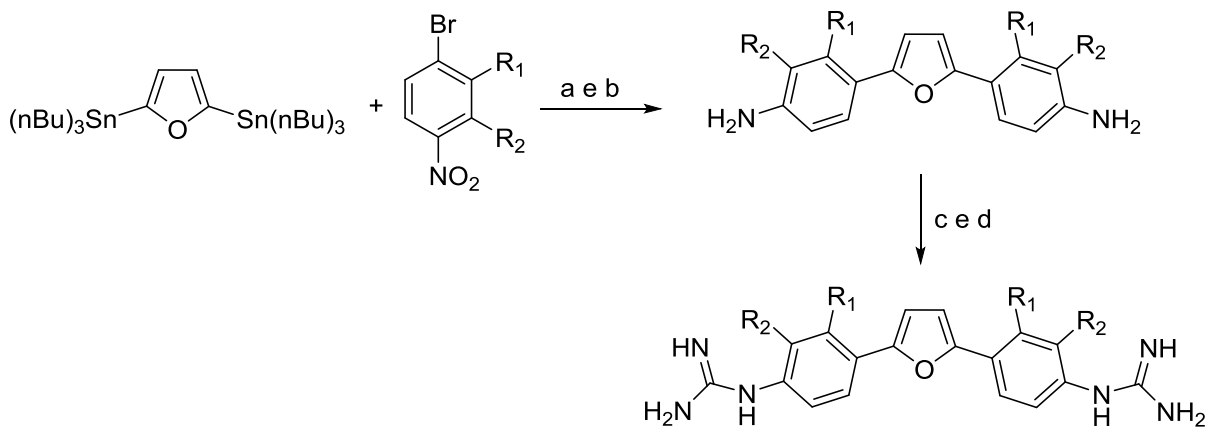
**Esquema 8:** Síntese em fase sólida de guanidinas dissubstituídas usando a resina RAM, descrita por Li e colaboradores (2001).

### 1.2.2 Derivados guanidínicos com atividades antileishmania

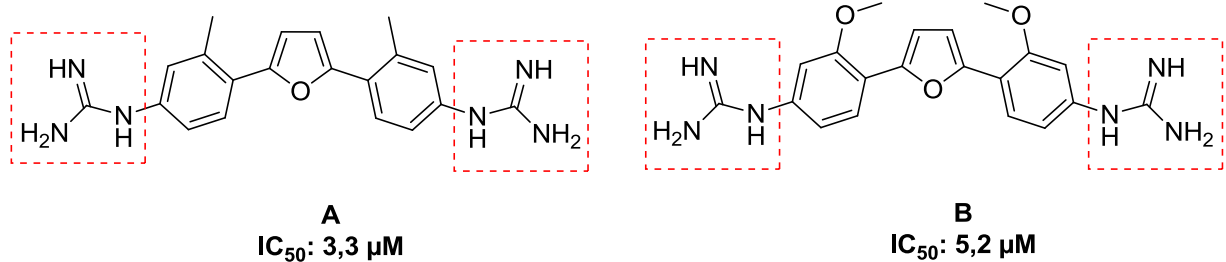
As guanidinas, constituem uma importante classe de substâncias para a química medicinal devido às suas diversas atividades biológicas. Nesse

contexto, vários derivados guanidínicos com potenciais atividades biológicas foram sintetizados ao longo dos anos, sendo que alguns estudos avaliaram a atividade destes compostos como promissores agentes antileishmania, os quais serão exemplificados nesse tópico.

Stephens *et al.* (2003) sintetizaram compostos diguanidinos a partir da reação do 2,5-bis (tri-*n*-butilestanil)furano com diferentes 4-bromonitrobenzenos dissubstituídos. A atividade antileishmania dos compostos sintetizados foi mensurada através de ensaios sobre formas amastigotas axênicas de *L. donovani* e sobre macrófagos infectados com *Leishmania donovani*. A diguanidina 1,1'-(furan-2,5-diilbis(3-metil-4,1-fenileno))diguanidina (**A**, Esquema 9) apresentou um importante valor de IC<sub>50</sub> na ordem de 3,3 µM nos ensaios sobre formas amastigotas axênicas de *L. donovani*, que é um valor comparável ao da pentamidina (IC<sub>50</sub> = 2,6 µM). Em relação ao ensaio dos macrófagos infectados, a substância 1,1'-(furan-2,5-diilbis(3-metoxi-4,1-fenileno))diguanidina (**B**, Esquema 9) foi o mais promissor com IC<sub>50</sub> de 5,2 µM.

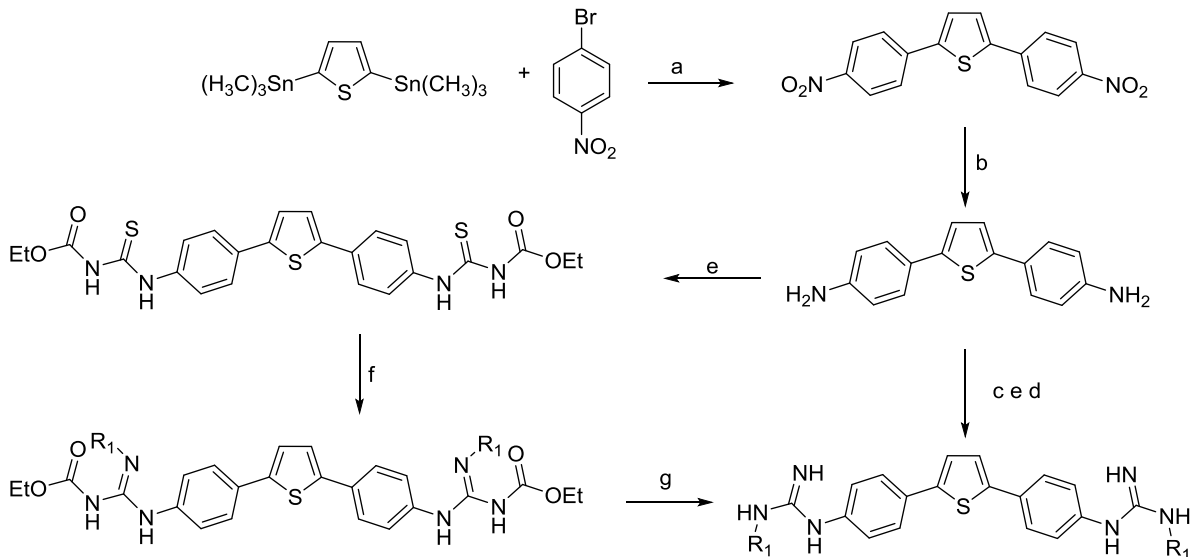


**Reagentes:** a) Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 1,4-dioxano; b) H<sub>2</sub>, Pd/ C, EtOAc, EtOH ou SnCl<sub>2</sub> di-hidratado, EtOH, DMSO; c) S-metil-di-Boctiouréia, HgCl<sub>2</sub>, TEA, DMF; d) HCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOH

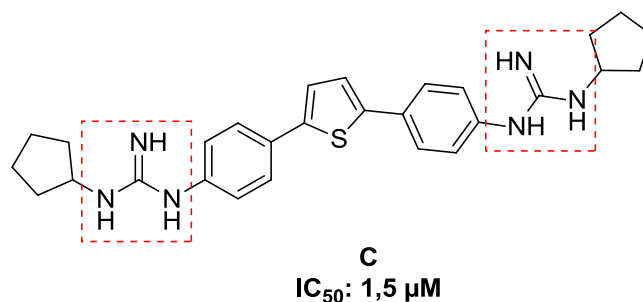


**Esquema 9:** Rota sintética para preparo de derivados diguanidinos e identificação dos derivados mais ativos (**A** e **B**) no estudo relatado por Stephens e colaboradores, 2002.

Gonzalez e colaboradores, no ano de 2007, prepararam a síntese de uma série de bis-2,5-[4-guanidinofenil]tiofenos através do acoplamento de Stille, utilizando como materiais de partida o bis-2,5-[trimetilestanil]tiofeno e o 4-bromonitrobenzeno. As atividades dos bis-2,5-[4-guanidinofenil]tiofenos foram avaliadas sobre formas amastigotas axênicas do gênero em *L. donovani*, sendo o composto 2,5-bis[4-(*N*-ciclopentilguanidino)fenil]-tiofeno (**C**, Esquema 10) o mais ativo com IC<sub>50</sub> de 1,5 µM (GONZALEZ *et al.*, 2007).

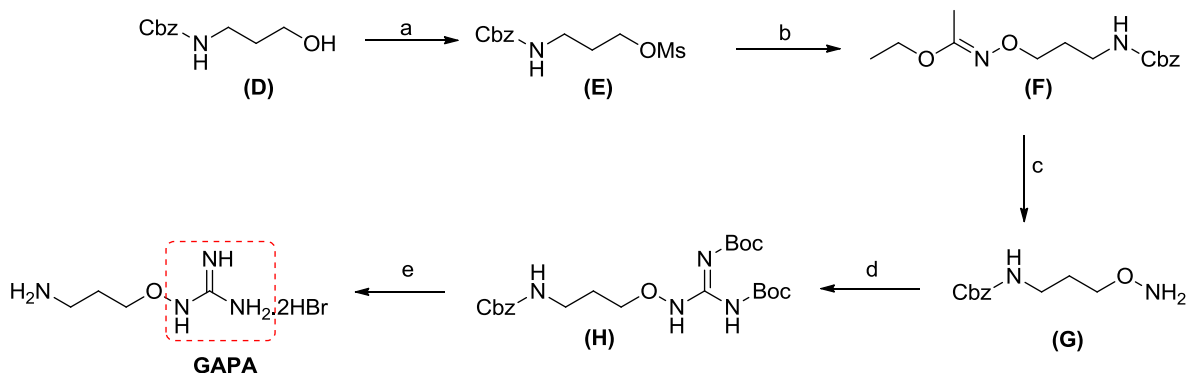


**Reações e condições:** a) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 1,4-dioxano, refluxo, *overnight*; b) SnCl<sub>2</sub> dihidratado, EtOH, 70°C, 5h.; c) *S*-metil-di-Boctiouréia, HgCl<sub>2</sub>, TEA, DMF; d) HCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOH; e) isotiocianatoformato de etila, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 0°C, *overnight*; f) NH<sub>2</sub>-R correspondente, *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), carbodiimida (EDCI), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 1h; g) KOH, EtOH, ~60°C, 20 h.



**Esquema 10:** Rota sintética para preparo da série de bis-2,5-[4-guanidino-fenil]tiofenos e identificação de derivado guanidínico (**C**) mais ativo no estudo relatado por Gonzalez e colaboradores, 2007.

Khomutov *et al.* (2009) relataram a síntese de um novo composto, o 1-guanidinoxi-3-aminopropano, denominado **GAPA** (Esquema 11). Essa substância foi sintetizada a partir de uma alquilação do *N*-hidroxiacetimidato de etila com um metanossulfonato de alquila (**E**), obtido pela reação de um álcool (**D**) com cloreto de mesila em piridina. Então, a remoção da proteção de etoxietilideno do grupo aminoxi do composto (**F**) foi realizada com solução aquosa de ácido clorídrico, promovendo a obtenção do 1-aminoxi-3-[*N*-(benziloxicarbonil)amino]propano (**G**), que ao reagir com *N,N'*-di-Boc-*N''*-trifililguanidina, empregando etilamina como base em diclorometano a 37 °C durante 24h, forneceu o GAPA protegido (**H**). Posteriormente, empregando ácido bromídrico em ácido acético os grupos *N*-Boc e *N*-Cbz foram removidos, obtendo-se o composto-alvo **GAPA**, com rendimento de 61% (em duas etapas). Essa substância teve sua atividade avaliada em formas promastigotas de *L. donovani* isoladas de pacientes sensíveis (S-1) e resistentes (R-1) ao gluconato de sódio e em formas amastigotas usando o modelo de amastigota-macrófagos. Tal substância apresentou valor de IC<sub>50</sub> de 10 µM para a cepa S-1 de promastigotas de *L. donovani* e, nas cepas R-1 e GE1 resistentes ao fármaco, apresentou IC<sub>50</sub> de 8 µM para ambas. Em formas amastigotas, o **GAPA** demonstrou inibir efetivamente o crescimento da estirpe S-1 com um valor de IC<sub>50</sub> igual a 9 µM, enquanto que nas estirpes R-1 e GE1 apresentou IC<sub>50</sub> de 18 e 3 µM, respectivamente.



Promastigotas  $IC_{50}$ : S-1 = 10  $\mu$ M e R-1 e GE1 = 8  $\mu$ M  
 Amastigotas  $IC_{50}$ : S-1 = 9  $\mu$ M e R-1 e GE1 = 18 e 3  $\mu$ M,  
 respectivamente.

**Reagentes e condições:** a) MsCl, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>, Et<sub>3</sub>N; b) C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OC(CH<sub>3</sub>)=NONa, i-PrOH ou MeOH, agitação, 20°C; c) HCl, H<sub>2</sub>O, 20°C; d) i-Tf-Boc<sub>2</sub>-Guanidina, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ou CHCl<sub>3</sub>, incubação, 37°C. 24h; e) HBr, AcOH, 20°C

**Esquema 11:** Síntese do composto 1-guanidinooxi-3-aminopropano (**GAPA**), relatado no estudo realizado por Khomutov e colaboradores (2009).

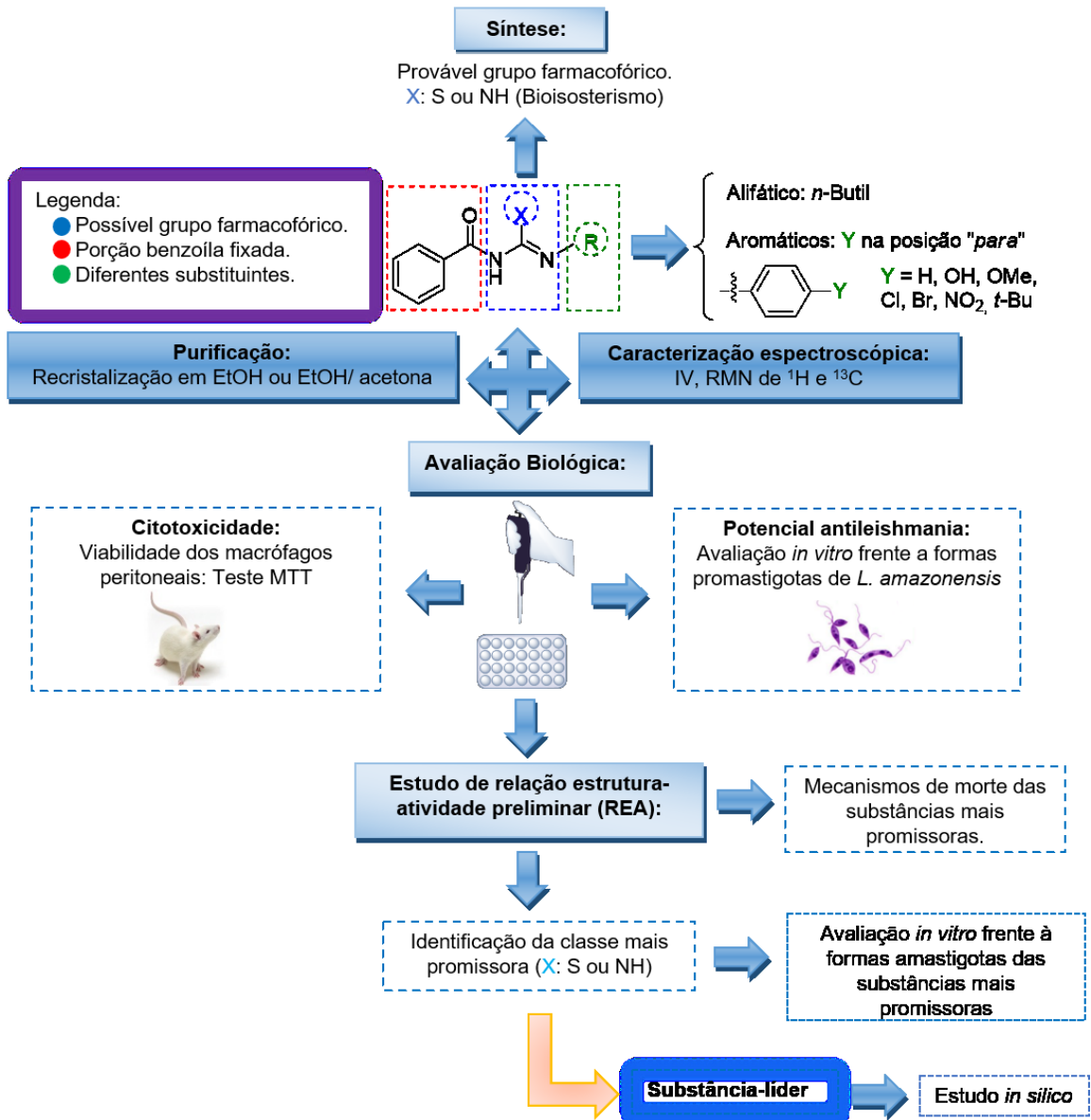
### 1.2.3 Planejamento estrutural das benzoilguanidinas com potencial atividade antileishmania.

Levando-se em consideração a crescente importância dos derivados de guanidina no campo da química medicinal, conforme ilustrado nos exemplos anteriormente citados, tais substâncias podem ser apontadas como interessantes pontos de partida para a descoberta de novos fármacos no combate às leishmanioses. Portanto, pretende-se nesse trabalho avaliar tanto o potencial antileishmania de uma série de benzoilguanidinas (BGNs, **2a-i**) como de seus precursores sintéticos benzoiltiouréias (BTUs, **1a-i**), uma vez que esses grupos apresentam uma relação de bioisosterismo entre si (NH x S). Essa é uma importante estratégia de modificação estrutural de um protótipo utilizada em química medicinal, que se baseia na troca de fragmentos moleculares que apresentem características físico-químicas similares, mas que sejam capazes de produzir alterações no perfil farmacocinético e/ou dinâmico do protótipo (BARREIRO e FRAGA, 2008). Sendo assim, realizou-se o planejamento estrutural (**Figura 10**), que foi iniciado com a síntese de uma série de derivados de *N*<sup>1</sup>-*N*<sup>2</sup>-tioureias dissustituídas (**1a-i**), conhecidas como reagentes de guanilação eletrofílicos, que foram utilizadas para a preparação de uma série de *N*<sup>1</sup>-*N*<sup>2</sup>-guanidinas acíclicas dissustituídas (**2a-i**). Em ambas as séries, manteve-se um grupamento benzoil fixo em *N*<sup>1</sup>, enquanto em *N*<sup>2</sup> foram introduzidos diversos substituintes de caráter alifático ou aromático, contendo grupos na posição 4 no anel benzênico com diferentes características estereoeletrônicas.

Posteriormente, as substâncias sintetizadas de ambas as séries, tiveram suas atividades antileishmania avaliadas *in vitro* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, bem como suas citotoxicidades foram avaliadas em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Com base nos resultados biológicos obtidos, realizou-se—um estudo de relação estrutura-atividade (REA) preliminar, sendo possível indicar tanto a classe (tiourea ou guanidina) mais promissora, bem como a substância que apresentou melhores perfis de atividade e citotoxicidade.

Em seguida, avaliou-se os derivados mais promissores frente as formas amastigotas, com posterior realização de ensaios para elucidação dos mecanismos de morte das substâncias mais relevantes frente as formas promastigotas. Finalmente, visando a realização de futuros testes *in vivo* da substância-líder identificada, realizou-se estudo *in silico* de suas propriedades físico-químicas, com o intuito de prever possíveis características de farmacocinéticas

(ADME-Tox).



**Legenda:** Em azul pontilhado: o possível grupo farmacofórico: tiourea ou guanidina. Em vermelho: Grupo benzoíla sem substituintes fixado no lado esquerdo do possível farmacóforo. Em verde pontilhado (Grupo G): substituintes com diferentes características estereoelétricas que serão avaliados com o objetivo de verificar se as modificações estruturais foram capazes de modular a atividade das tioureas ou guanidinas  $\text{N}^1$ - $\text{N}^2$ -substituídas em inibir o crescimento dos parasitos.

**Figura 10:** Planejamento estrutural para avaliação do potencial antileishmania de benzoilguanidinas.

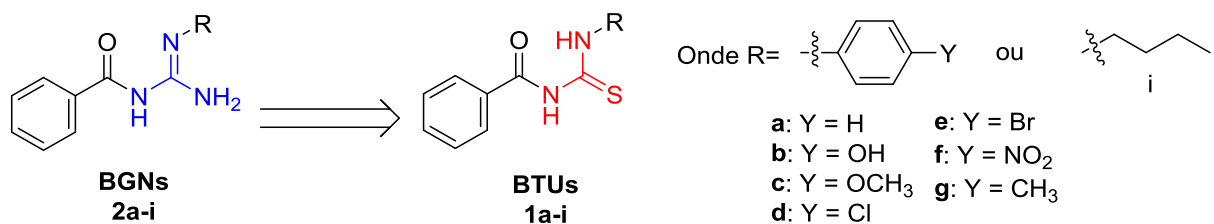
## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo a síntese de benzoilguanidinas com potencial atividade antileishmania *in vitro*, visando a identificação de substâncias-líderes potentes e seletivas sobre o parasito.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Síntese e caracterização espectroscópica de uma série de benzoilguanidinas (BGNs) obtidas a partir das benzoiltioureas (BTUs) correspondentes (Figura 11).



**Figura 11:** Identificação da série de BGNs sintetizadas a partir das correspondentes BTUs.

- b) Avaliação *in vitro* da potencial atividade antileishmania das BNGs e de seus precursores sintéticos BTUs frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- c) Determinar a citotoxicidade *in vitro* das BTUs e BGNs sintetizadas sobre macrófagos peritoneais murinos.
- d) Realizar um estudo de relação estrutura-atividade (REA) dessas classes de substâncias para identificar os pontos-chave para a atividade biológica.
- e) Elucidar mecanismos de morte celular induzido pelas substâncias mais promissoras sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- f) Avaliação *in vitro* das substâncias mais promissoras frente macrófagos infectados com formas amastigotas de *L.*

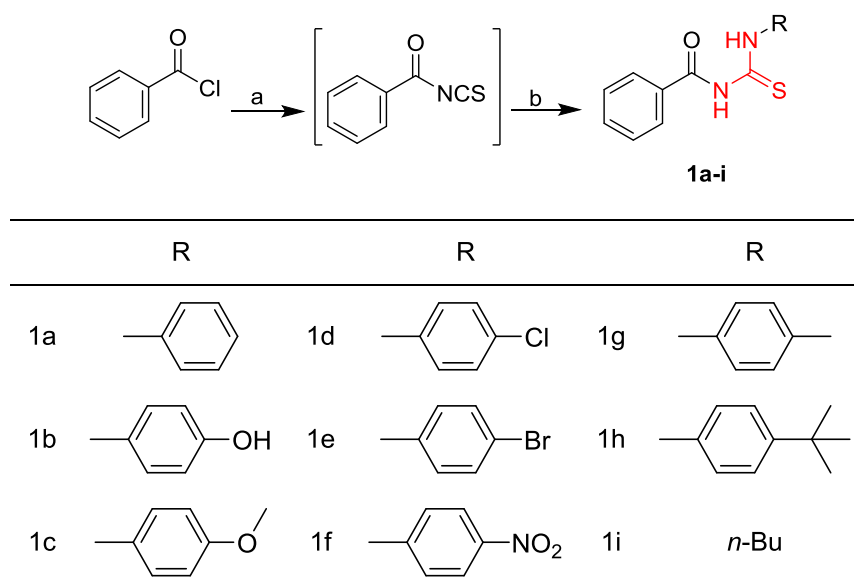
*amazonensis*.

- g) Realizar estudo *in silico* das substâncias mais promissoras para avaliar parâmetros farmacocinéticos teóricos relacionados à biodisponibilidade oral, absorção intestinal e toxicidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Síntese e caracterização estrutural da série de BGNs (2a-i)

A síntese da série de BGNs (**2a-i**) teve início com a preparação e caracterização dos reagentes eletrofílicos de guanilação BTUs (**1a-i**), conforme a metodologia descrita em um trabalho anteriormente realizado por nosso grupo de pesquisa (BRITO *et al.*, 2015). Esses precursores foram preparados a partir da reação entre o cloreto de benzoíla e o tiocianato de amônio em acetona sob refluxo, produzindo o isotiocianato de benzoíla *in situ*. Então, esse intermediário reage com uma solução das aminas apropriadas em acetona, obtendo-se as BTUs (**1a-i**) correspondentes (**Esquema 12**).



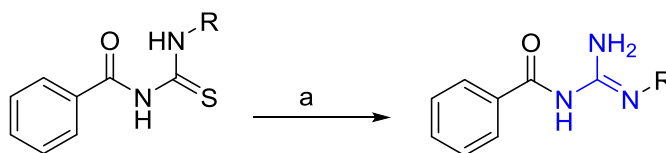
**Reagentes e condições:** a)  $\text{NH}_4\text{SCN}$ , acetona, refluxo, 15 min; b) aminas correspondentes, acetona, refluxo, 30 min-3h, 58-97%.

**Esquema 12:** Rota sintética para obtenção das BTUs (**1a-i**).

Todas as BTUs foram obtidas em rendimentos moderados a altos (58 a 97%), após recristalização em etanol ou etanol/acetona, sendo devidamente caracterizadas por técnicas espectroscópicas (IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), conforme descrito em BRITO *et al.*, 2015.

As BGNs (**2a-i**) foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita por Cunha e Rodrigues Jr. (2006), com algumas modificações. Nessa

metodologia, as BTUs anteriormente preparadas são ativadas utilizando bismuto catalítico, em meio contendo solução aquosa de hidróxido de amônio, trietilamina e acetonitrila como solvente (**Esquema 13**). As guanidinas foram obtidas com rendimentos que variaram de bons a excelentes, conforme **Tabela 1**.



**Reagentes e condições:** BiI<sub>3</sub> (5 mols%), NaBiO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, t.a, 5h.

**Esquema 13:** Rota sintética para obtenção das BGNs (**2a-i**).

**Tabela 1.** Identificação, rendimentos e pontos de fusão das benzoilguanidinas obtidas (**2a-i**)

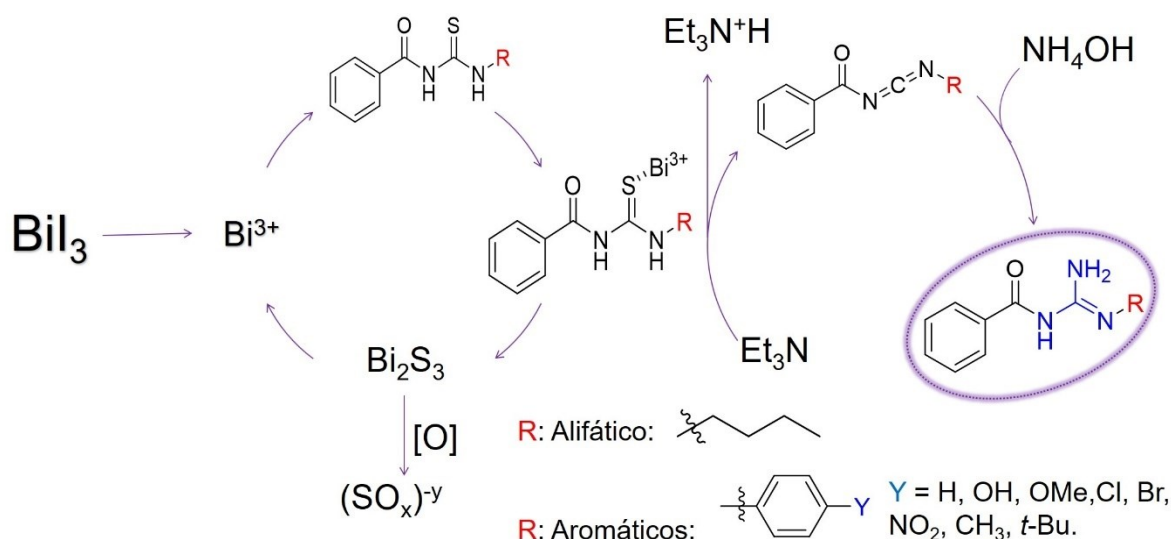
BGNs	Substituintes	Rendimento (%)	Ponto de Fusão (°C)
<b>2a</b>	Ph	87	90 <sup>a</sup>
<b>2b</b>	4-OH-Ph	59	140-142 <sup>d</sup>
<b>2c</b>	4-OMe-Ph	81	136 <sup>b</sup>
<b>2d</b>	4-Cl-Ph	83	130-132 <sup>d</sup>
<b>2e</b>	4-Br-Ph	41	144-145 <sup>d</sup>
<b>2f</b>	4-NO <sub>2</sub> -Ph	66	195-196 <sup>d</sup>
<b>2g</b>	4-CH <sub>3</sub> -Ph	53	118 <sup>d</sup>
<b>2h</b>	4- <i>t</i> -Bu-Ph	44	214-215 <sup>d</sup>
<b>2i</b>	<i>n</i> -Bu	62	113-114 <sup>c</sup>

Dados reportados segundo: <sup>a</sup> (CUSMANO *et al.*, 1955), <sup>b</sup> (ITO, 1960), <sup>c</sup> (SCOTT, 1957), <sup>d</sup> N.R = não relatado na literatura.

O ciclo catalítico envolvido na síntese das benzoilguanidinas ocorre através de um processo de eliminação-adição, onde a tioureia é previamente ativada através da formação de um complexo do átomo de enxofre com o bismuto (Bi<sup>3+</sup>) catalítico, que atua como agente de dessulfuração, com o auxílio da base trietilamina, que promove a desprotonação, eliminando assim o átomo de enxofre. O processo de dessulfuração, forma uma carbodiimida eletrofílica e sulfeto de bismuto

(III) ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ) como subproduto. Finalmente, ocorre a etapa de adição, onde o hidróxido de amônio aquoso reage com o carbono *sp* altamente eletrofílico da carbodiimida, obtendo-se as benzoilguanidinas (**Esquema 14**).

Cunha e Rodrigues Jr. (2006) relatam em seu trabalho que devido à baixa solubilidade do subproduto  $\text{Bi}_2\text{S}_3$  no meio reacional, este acaba por impedir a ativação contínua das tioureias, processo esse de suma importância para obtenção de guanidinas. Desta forma é necessário o uso de um agente oxidante como co-reagente para transformar *in situ* o subproduto em um derivado de Bi (III) mais solúvel, para tal utilizou-se bismutato de sódio ( $\text{NaBiO}_3$ ). (**Esquema 14**)

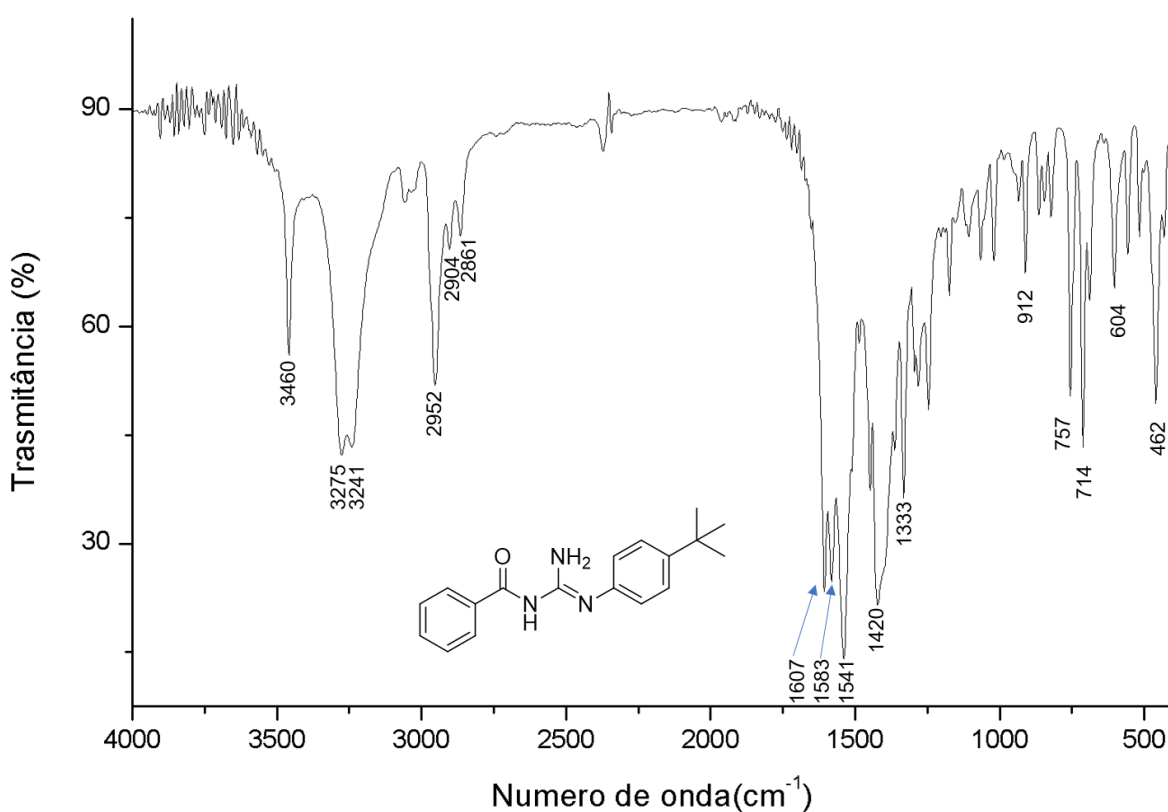


**Esquema 14:** Ciclo catalítico proposto para obtenção das BNGs (**2a-i**), adaptado de Cunha e Rodrigues Jr. (2006).

A estrutura das BNGs foi caracterizada por espectros de IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , onde os sinais detectados foram consistentes com a formação do núcleo guanidínico, bem como com a presença dos diversos grupos aromáticos ou alifático correspondentes em cada substância (Apêndices).

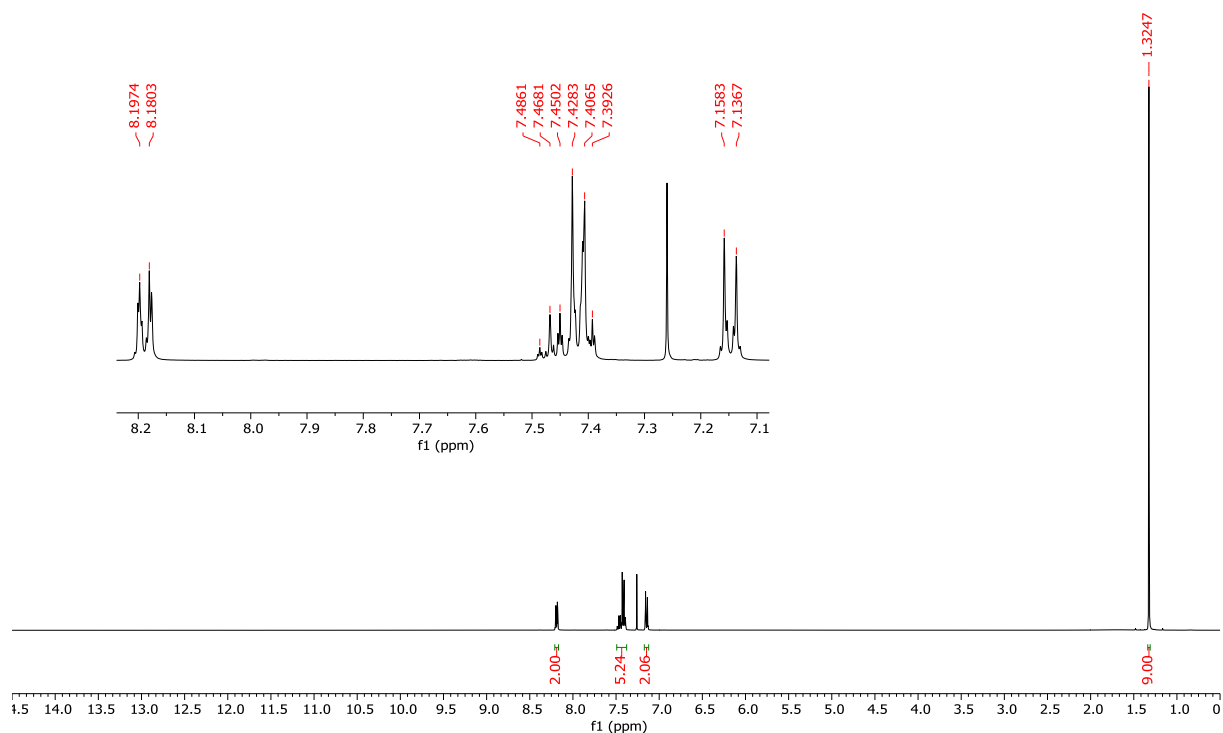
A título de exemplo, ilustrar-se-á como se procedeu a caracterização espectroscópica do derivado **2h**, inédito na literatura, que apresentou ponto de fusão igual a 214-215°C. Iniciou-se a análise espectroscópica a partir do espectro de absorção na região do IV obtido para essa substância (Figura 12). Em fase sólida (pastilha de KBr), a banda de estiramento C=O sobrepõe parcialmente a banda de dobramento N—H, observado na região de 1607-1583  $\text{cm}^{-1}$  (PAVIA *et al.* 2016).

Além disso, observa-se uma banda de estiramento simétrico e assimétrico do N—H em 3241-3275  $\text{cm}^{-1}$ , relativa a presença de amina primária ( $\text{—NH}_2$ ), bem como apresenta uma banda de estiramento N—H na região de 3460  $\text{cm}^{-1}$ , característica de amidas monossustituídas ( $\text{R—CO—NH—R}$ ). Uma outra evidência importante que comprova a obtenção da guanidina **2h** é a ausência da banda de estiramento da ligação C=S em 1291-1236  $\text{cm}^{-1}$ , anteriormente presente no precursor sintético **1h** (BRITO *et al.*, 2015).



**Figura 12.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2h**.

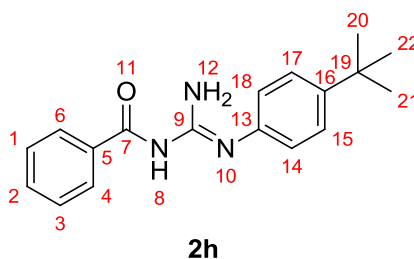
Para a análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , listou-se 4 sinais, os quais foram observados no espectro (**Figura 13**) na Tabela 2.



**Figura 13.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2h** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**Tabela 2.** Sinais de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz;

encontrados no espectro  $\text{CDCl}_3$ ) derivado **2h**.



Sinal	$\delta\text{H}$ (nH, m, $J$ em Hz)
a	1,32 (9H, s),
b	7,14 (2H, d, $J = 8,6$ Hz),
c	7,48 – 7,39 (5H, m),
d	8,17 (2H, d, $J = 7,0$ Hz).

Iniciando a análise desses sinais, pode-se observar um simpleto com integração para 9 hidrogênios em 1,32 ppm, referente aos hidrogênios das três metilas do grupamento *t*-butila ligado ao anel aromático. De acordo com Pavia *et al.* (2016), grupos metila frequentemente são reconhecidos como um pico isolado e agudo, cuja a absorção de hidrogênio (C—H) é encontrada em valores de

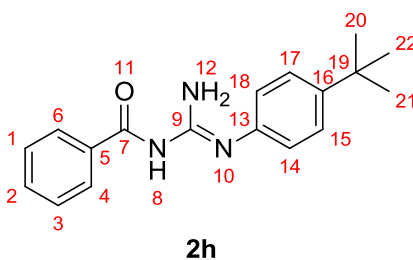
deslocamento químico na faixa de 0,7–1,3 ppm, uma vez que é o tipo de próton mais blindado.

Hidrogênios ligados a um anel aromático apresentam deslocamento químico grande, em geral entre 6,5 - 8,5 ppm, devido à desblindagem causada pelo efeito anisotrópico gerado pelos elétrons do sistema  $\pi$  do anel, diante disso pode-se correlacionar os sinais **b-d** a hidrogênios pertencentes aos anéis aromáticos. Como os dois dupletos, ambos com integração igual a 2, observados no espectro (sinais **b** e **d**), apresentaram constantes de acoplamento bastante diferentes ( $J= 8,6$  Hz para **b** e  $J= 7,0$  Hz para **d**), pode-se concluir que tais hidrogênios não acoplam entre si, pertencendo a diferentes redes de spin. Pelo deslocamento químico desses sinais, propõem-se que o sinal **b** seja referente aos hidrogênios  $H_{14}$  e  $H_{18}$ , uma vez que esses hidrogênios estariam mais blindados devido a influência do nitrogênio, que doa densidade eletrônica por ressonância. O efeito contrário pode ser observado no sinal **d**, que é o mais desblindado devido ao efeito de retirada de elétrons por ressonância, provocado pela carbonila, podendo ser assim relacionado aos hidrogênios  $H_4$  e  $H_6$ . Os outros 5 hidrogênios aromáticos apresentaram deslocamentos químicos muito próximos, portanto são observados como um multiplete (sinal **c**) na região de 7,48 – 7,39 ppm. Entretanto, um espectro bidimensional de correlação homonuclear como COSY poderia ser realizado para confirmar tais assinalamentos.

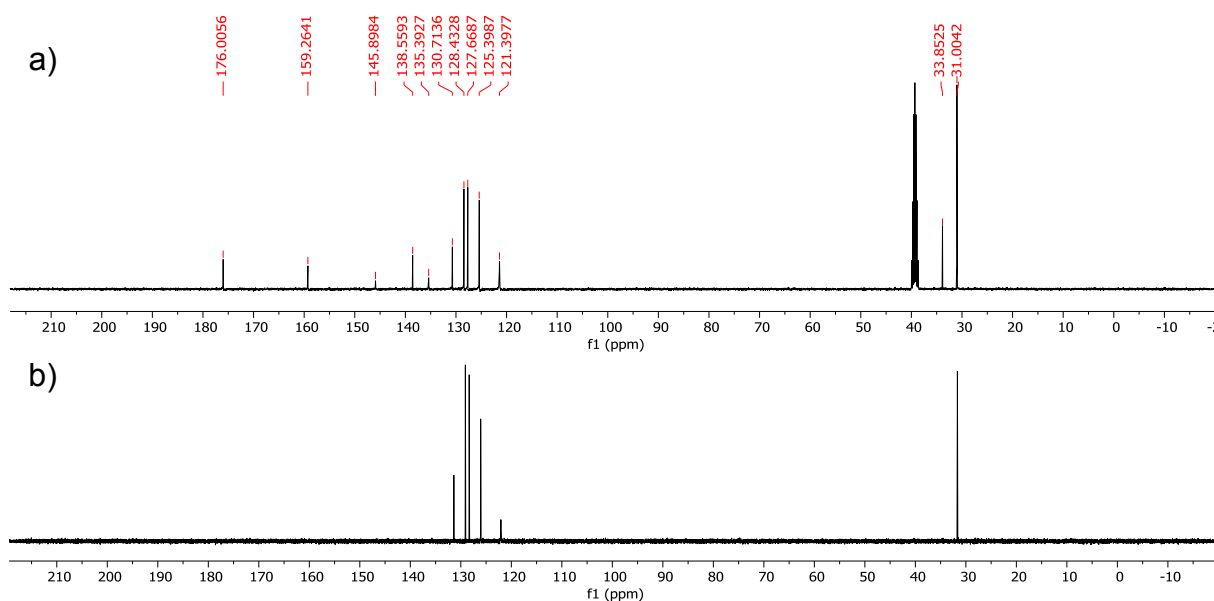
Nota-se que o espectro não apresentou sinais correspondente aos hidrogênios ligados aos nitrogênios ( $-\text{NH}$ ). Segundo Pavia *et al.* (2016), nem sempre a identificação desses sinais é possível, uma vez que devido a troca química do próton ou por uma propriedade dos átomos de nitrogênio chamada *alargamento quadrupolar*, os sinais de  $-\text{NH}$  são muito largos e fracos, normalmente sem nenhum acoplamento distinto com hidrogênios de carbonos adjacentes. Concluindo, o assinalamento completo do derivado **2h** por RMN de  $^1\text{H}$  se encontra resumido na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Sinais observados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do derivado **2h**.

Sinal	$\delta\text{H}$ (nH, m, J em Hz)	$\text{H}_x$
<b>a</b>	1,32 (9H, s),	$\text{H}_{20} - \text{H}_{22}$
<b>b</b>	7,14 (2H, d, J = 8,6 Hz),	$\text{H}_{14}$ e $\text{H}_{15}$
<b>c</b>	7,48 – 7,39 (5H, m),	$\text{H}_1 - \text{H}_3$ , $\text{H}_4$ e $\text{H}_{17}$
<b>d</b>	8,17 (2H, d, J = 7 Hz).	$\text{H}_4$ e $\text{H}_6$



Utilizando espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 14), verificou-se um sinal característico da carbonila do grupo benzofila em 176,0 ppm, bem como um sinal referente à  $\text{C}=\text{N}$  em 159,2 ppm, compatível com carbonos imínicos, sendo estes valores descritos também na literatura para benzoilguanidinas (CUNHA e RODRIGUES Jr.,2006). Além disto, os sinais característicos do grupamento *t*-butila foram observados em 31,0 ( $\text{CH}_3$ ) e 33,8 ppm ( $\text{C}_0$ ). O conjunto dos demais carbonos aromáticos (121 e 146 ppm), corroboraram para a caracterização da substância **2h**.



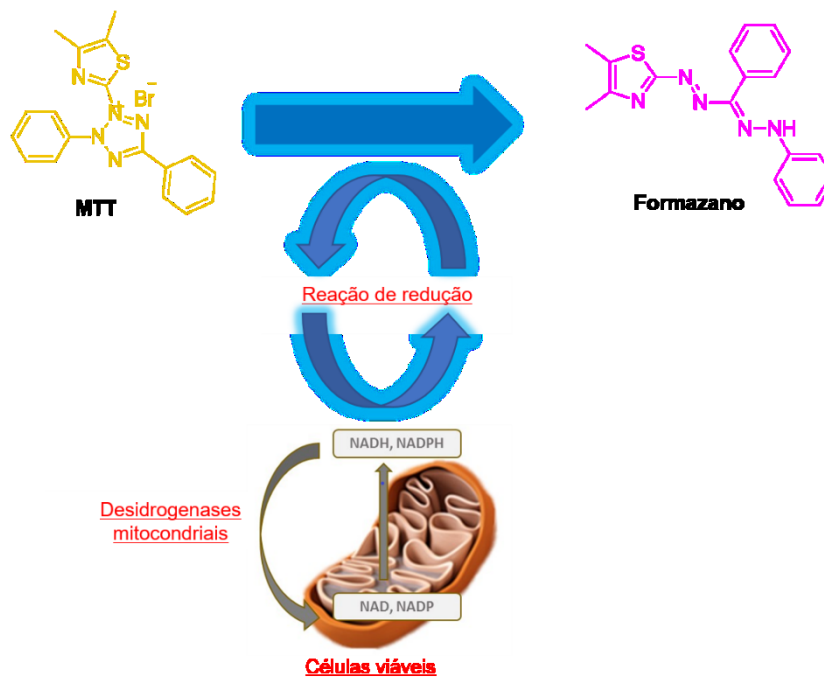
**Figura 14.** a) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e b) Espectro de DEPT-135 do composto **2b** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO-*d*6).

### 3.2 Avaliação dos perfis de atividade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e citotoxicidade *in vitro* da série de BGNs (2a-i) e seus precursores sintéticos BTUs (1a-i)

O efeito antileishmania das BTUs e BGNs sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado *in vitro* por meio da determinação da proliferação de parasitos incubados com diferentes concentrações (100, 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h. Essa espécie encontra-se amplamente distribuída em todo o território brasileiro, onde no homem, a *L. amazonensis* está relacionada aos casos de LC e LCD (MINISTERIO DE SAÚDE, 2007). Além de sua ampla ocorrência em nosso país, optou-se por trabalhar com essa espécie, pois em modelo murinho, a *L. amazonensis* desencadeia um perfil de resposta imune similar às infecções humanas (OSORIO *et al.*, 2007; MEARS *et al.* 2015).

A avaliação da citotoxicidade das moléculas sintetizadas em células hospedeiras é tão importante quanto a atividade que essas apresentem sobre as formas promastigotas. Portanto, a viabilidade celular das substâncias **1a-i** e **2a-i** foi avaliada através do método desenvolvido por Mosmann (1983), baseado na oxidação mitocondrial de macrófagos peritoneais de camundongos, que utiliza o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) como corante vital. O

mecanismo envolve reações com enzimas redutoras tais como as desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente viáveis, que clivam o anel de tetrazólio, convertendo o reagente MTT, de coloração amarelada, em um composto de coloração rósea, chamado de formazan (*E,Z*-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano). Os cristais de formazan são insolúveis e se acumulam próximo a membrana plasmática, embora também se encontrem no meio de cultura, é necessário que esse composto seja solubilizado para que as medidas de absorbâncias sejam tomadas, permitindo a mensuração de atividade mitocondrial pela mudança de coloração do meio de amarelado para róseo.



**Figura 15:** Esquema ilustrativo para a reação do corante vital, o MTT (MOSMANN,1983).

As concentrações das substâncias necessárias para inibir 50% dos parasitas ( $IC_{50}$ ) e as concentrações das substâncias que reduzem a viabilidade de células de mamíferos em 50% ( $CC_{50}$ ) foram transformadas para  $\mu M$ , utilizando-se as massas moleculares de cada composto. Essa transformação de unidade é necessária para que se realize estudo de REA mais adequadamente, pois uma vez que a massa molecular das substâncias é considerada, torna-se possível detectar pequenas alterações nas atividades biológicas, relacionando-as, portanto, com as diferenças estruturais existentes entre as substâncias-teste. Além disso, essa conversão garante uma melhor comparação entre os valores gerados pelo ensaio

para as diferentes substâncias avaliadas e o fármaco utilizado como referência (AmB).

Baseado nos resultados de inibição dos parasitos ( $IC_{50}$ ) e a citotoxicidade dos macrófagos peritoneais de camundongos ( $CC_{50}$ ), calculou-se o índice de seletividade (IS), que mensura o quanto um composto é ativo contra o parasito sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos. Quanto maior esta razão, mais seletivo é o composto sobre o parasita e, conseqüentemente, menor efeito ele tem sobre as células hospedeiras de mamíferos. Índice de seletividade maior ou igual a 10 sugere que o uso do composto pode ser considerado promissor no tratamento de doenças infecciosas (KATSUNO *et al.*, 2015).

A **Tabela 4** apresenta os valores de atividade antileishmania *in vitro* das substâncias, assim como os valores de citotoxicidade e índices de seletividade. De um modo geral, diante dos valores de  $IC_{50}$  relatados, pode-se observar que a série das BGNs apresentou perfil de maior atividade antileishmania frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* do que as suas precursoras sintéticas (BTUs), dentre as quais apenas o composto **1h** apresentou valor de  $IC_{50}$  abaixo de 100  $\mu$ M. Além disso, é importante salientar que o veículo (DMSO 0,01%) não mostrou efeito inibitório na proliferação do parasito (dados não mostrados).

Com relação à atividade citotóxica em células de mamíferos, observa-se que a maioria das BTUs somente em altas concentrações apresentam toxicidade sobre a célula, exceto o composto **1e** que apresenta maior citotoxicidade da série, com  $CC_{50}$  na ordem de 113,4  $\mu$ M. Entretanto as BNGs apresentam citotoxicidade mais acentuada destacando os compostos **2d** e **2f** com  $CC_{50}$  na ordem de 51,3 e 105,6  $\mu$ M, respectivamente.

Através dos valores de IS presentes na **Tabela 4**, observou-se que para a série das BTUs, as substâncias **1b**, **1g** e **1h** foram os que apresentaram os melhores índices, com valores de 7,0, 54 e 8,2, respectivamente. O composto **1g** apresentou o índice de seletividade mais promissor, denotando que ele é 55 vezes mais ativo contra o parasito e, conseqüentemente, menos citotóxico contra as células de mamíferos, entretanto, seu  $IC_{50}$  encontra-se acima de 100  $\mu$ M. Na série das BGNs, as substâncias **2a**, **2g** e **2i** apresentaram os melhores índices de seletividade 6,8, 5,5 e 12,5, respectivamente. Na literatura, valores de IS superiores a 10 são considerados promissores na busca de substância-protótipo com atividade antileishmania (KATSUNO *et al.*, 2015). Diante disso, pode-se notar que dentre os

três, o composto **2i** apresentou o índice de seletividade mais promissor, denotando que ele é 12,5 vezes mais ativo contra o parasito e, conseqüentemente, menos citotóxico contra as células de mamíferos.

**Tabela 4.** Atividade antileishmania *in vitro* em formas promastigotas (IC<sub>50</sub>), citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) e índice de seletividade (IS) de BTUs e BGNs.

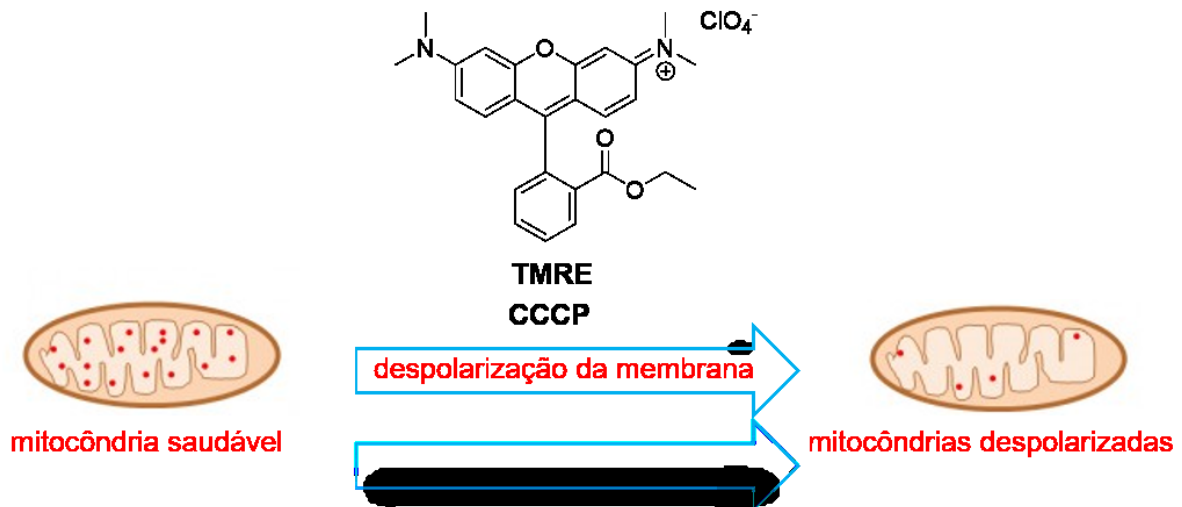
Substância	X	R	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)	IS
<b>1a</b>	S	Ph	665±0,37	1594,4±0,37	1010,5±0,12	0,4
<b>1b</b>	S	4-OH-Ph	134±0,06	492,1±0,06	1437,1±0,72	7,0
<b>1c</b>	S	4-OMe-Ph	349±1,06	1218,8±1,06	747,3±0,17	0,6
<b>1d</b>	S	4-Cl-Ph	324±1,30	1114,3±1,30	801,3±0,09	0,7
<b>1e</b>	S	4-Br-Ph	95±0,07	283,4±0,07	113,4±0,03	0,4
<b>1f</b>	S	4-NO <sub>2</sub> -Ph	395±0,32	1310,9±0,32	262,2±0,07	0,2
<b>1g</b>	S	4-CH <sub>3</sub> -Ph	36±0,05	133,2±0,05	>2000±0,40	55
<b>1h</b>	S	4- <i>t</i> -Bu-Ph	27±0,00	86,4±0,00	707,4±0,11	8,2
<b>1i</b>	S	<i>n</i> -Bu	62±0,05	262,3±0,05	275,0±0,05	1,0
<b>2a</b>	NH	Ph	59±0,03	246,7±0,03	1672,9±0,15	6,8
<b>2b</b>	NH	4-OH-Ph	61±0,10	239,0±0,10	740,4±0,05	3,1
<b>2c</b>	NH	4-OMe-Ph	158±0,11	587,1±0,11	442,2±0,03	0,8
<b>2d</b>	NH	4-Cl-Ph	15±0,04	54,9±0,04	51,3±0,10	0,9
<b>2e</b>	NH	4-Br-Ph	18,8±0,06	59,1±0,06	190±0,90	3,2
<b>2f</b>	NH	4-NO <sub>2</sub> -Ph	199±0,06	66,9±0,06	105,6±0,05	1,6
<b>2g</b>	NH	4-CH <sub>3</sub> -Ph	23±0,05	90,8±0,05	396,0±0,02	5,5
<b>2h</b>	NH	4- <i>t</i> -Bu-Ph	217±0,09	734,6±0,09	843,0±0,11	1,1
<b>2i</b>	NH	<i>n</i> -Bu	15±0,03	68,4±0,03	857,9±0,06	12,5
<b>AmB</b>	-----	-----	-----	0,068±0,21 <sup>a</sup>	49,72±0,00 <sup>a</sup>	731,17

Como controle negativo foram utilizados parasitos incubados apenas com meio 199. DMSO 0,01% foi utilizado como controle do diluente e Anfotericina B (AmB) 1 µM como controle positivo. Os valores representam a média ± SEM de três experimentos independentes. <sup>a</sup> (BORTOLETI *et al.*, 2018)

### 3.3. Mecanismos de morte celular em promastigotas de *L. amazonensis*

Diante do efeito antileishmania das guanidinas sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, o mecanismo envolvido nesta ação ainda é desconhecido, diante disso nós investigamos a ação da  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$  dos compostos mais promissores **2g** e **2i** quanto à despolarização da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e produção de espécies reativas de oxigênio.

O potencial de membrana mitocondrial (**Figura 16**) foi avaliado através do corante éster etílico de tetrametil-rodamina (TMRE), um corante fluorescente vermelho de permeabilidade celular, carregado positivamente, que se complexa com mitocôndrias ativas devido à sua carga negativa relativa. As mitocôndrias despolarizadas ou inativas têm um potencial de membrana diminuído e não conseguem sequestrar a TMRE, por sua vez a perda significativa do potencial de membrana torna as células exauridas, acarretando em morte subsequente (CROWLEY, CHRISTENSEN E WATERHOUSE, 2016)



**Figura 16:** Esquema ilustrativo para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial usando a TMRE (adaptado de G-Biosciences).

Os resultados mostraram que o tratamento com os compostos **2g** (**Figura 17 – A**) e **2i** (**Figura 17 – B**) diminuíram a intensidade de fluorescência total de TMRE em comparação com o controle, indicando comprometimento da membrana mitocondrial, no entanto não houve diferença entre as concentrações testadas.

Considerando as modificações mitocondriais observadas, foi

avaliada a produção de EROs para confirmar a existência de alteração no perfil funcional mitocondrial após o tratamento com os compostos **2g** (Figura 17 – C) e **2i** (Figura 17 – D) utilizou-se a sonda molecular diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA), um bom indicador de espécies oxidantes, como peróxidos, superóxidos, e óxido nítrico (GUNASEKAR *et al.*, 1995). O resultado confirmou o aumento na produção total de EROs em promastigotas tratadas com ambos os compostos.

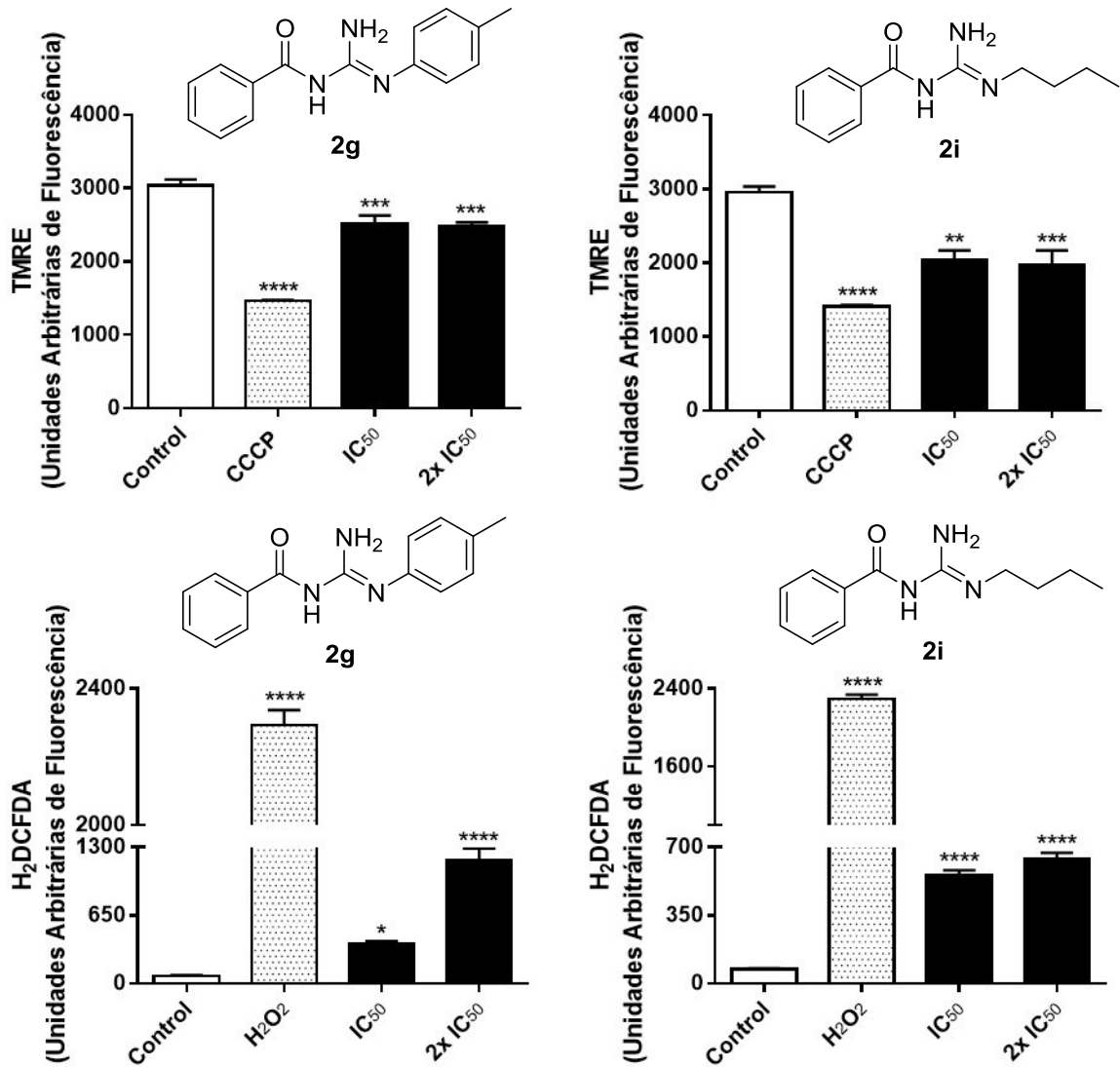


Figura 17: Análises fluorimétricas de formas promastigotas controle (DMSO 0,01% veiculo) e tratadas com compostos **2g** e **2i** (IC<sub>50</sub> e 2x IC<sub>50</sub>). (A) TMRE para avaliação de potencial de membrana mitocondrial do composto **2g** e (B) **2i**, (C) sonda molecular H<sub>2</sub>DCFDA para detecção de espécies reativas de oxigênio do composto **2g** e (D) **2i**.

Sabe-se que parasitas do gênero *Leishmania* possuem uma única mitocôndria, sendo esta organela essencial em vias metabólicas, síntese de ácidos graxos, cadeia de transporte de elétrons e metabolismo energético para o parasito, portanto a disfunção desta organela vital seria crucial na sua sobrevivência (MONZOTE e GILLE, 2010; FIDALGO e GILLE, 2011). Assim, qualquer alteração no potencial transmembrana mitocondrial pode causar um aumento na produção de EROs, importante molécula microbicida que combate a infecção por patógenos e que por sua vez induz a morte de protozoários, sendo um dos componentes fundamentais para desencadear a morte por apoptose (SMIRLES *et al.*, 2010). Nossos resultados demonstraram que as guanidinas causaram despolarização mitocondrial e produção de EROs nas formas promastigotas, porém mais experimentos serão realizados a fim de elucidar o mecanismo de morte envolvido.

### **3.4 Estudo preliminar de relação estrutura-atividade (REA)**

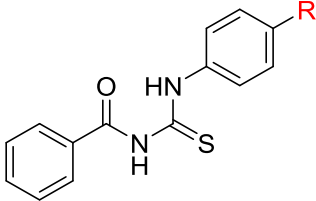
Para um entendimento mais profundo sobre as relações entre as estruturas das BTUs e BGNs e suas atividades biológicas sobre as formas promastigotas, realizou-se estudo preliminar de relação estrutura-atividade (REA).

O estudo de relação estrutura-atividade (REA) procura definir os grupos funcionais ou regiões de um composto que são importantes para a atividade biológica, permitindo ao químico medicinal algum nível de previsão da atividade desejada. O REA se baseia na avaliação das diferenças nas potências de uma substância-prótipo e seus análogos estruturais, baseado na hipótese de que como fármacos atuam normalmente em um alvo molecular preferencial, pode-se inferir que substâncias estruturalmente semelhantes, devem apresentar as mesmas atividades farmacológicas do ponto de vista qualitativo. Portanto, na grande maioria dos casos, quando se realizam pequenas modificações estruturais na substância-prótipo em estudo, pode-se observar diferenças na potência (para mais ou para menos) em relação a atividade apresentada pelo prótipo ou, até mesmo, diferenças nos efeitos adversos observados anteriormente. Logo, pode-se modular a atividade biológica do prótipo através dessas modificações estruturais. Assim, pode-se mapear quais são as modificações benéficas ou não para atividade farmacológica daquela substância em estudo (PATRICK, 2013).

Para que se possa realizar um completo estudo de REA, faz-se necessário a construção de uma quimioteca com dezenas de substâncias análogas ao protótipo. Nesse estudo preliminar de REA, dezoito substâncias foram avaliadas quanto ao seu potencial antileishmania, sendo elas nove tioureias (**1a-i**) e nove guanidinas (**2a-i**), estruturalmente relacionadas. Uma vez que o núcleo guanidínico e tioureia são grupamentos isósteros (S x NH), o primeiro objetivo desse REA preliminar foi determinar qual seria o grupo farmacofórico (ou farmacóforo) dessas substâncias. Além disso, os substituintes ligados a porção tioureia ou guanidínica foram escolhidos de modo que o conjunto de derivados sintetizados possuíssem uma grande diversidade de características estéricas e eletrônicas. Para tal, foram incluídas nessa abordagem preliminar um derivado alifático com uma cadeia butílica ligada a tioureia (**1i**) ou a guanidina (**2i**), comparar a influência do substituinte aromático ou alifático nas atividades biológicas dessas séries de substâncias. Dentro das substâncias aromáticas, os substituintes ligados ao anel benzênico foram classificados eletronicamente, de acordo com seus valores de constante do substituinte de Hammett (Tabela 5) (McDANIEL e BROWN, 1958), como: EWG (Grupos aceptores de elétrons, do inglês *Electron Withdrawing Groups*) ou EDG (Grupos doadores de elétrons, do inglês *Electron Donating Groups*), sendo ainda classificados como  $\sigma_i$  (indutivo) ou  $\sigma_r$  (ressonância) para indicar o tipo de efeito existente.

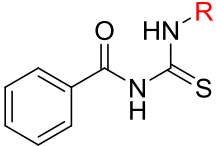
Primeiramente, comparou-se as BTUs aromáticas quanto as suas capacidades de doação e retirada de elétrons, partindo do composto neutro **1a** (R = H), bem como suas respectivas atividades. Diante do exposto na Tabela 5, foi possível verificar que a adição de um substituinte na posição 4 do anel aromático, independentemente de seu caráter, é capaz de modular a atividade antileishmania, pois tanto substituintes fortemente aceptores de elétrons como nitro (**1f**) ou fortemente doadores como hidroxila (**1b**) apresentaram melhores atividades do que a substância neutra **1a**.

**Tabela 5.** Estrutura das benzoiltioureas (**1a-i**), com seus respectivos caracteres eletrônicos de doação e retirada de elétrons de acordo com seus valores de constante do substituinte de Hammett e índice de inibição ( $IC_{50}$ ) frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.



Substância	R	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$\sigma_p^a$	Efeito eletrônico predominante
<b>1<sup>a</sup></b>	H	1594,4	0,00	Neutro
<b>1b</b>	OH	492,1	-0,357	EDGr
<b>1c</b>	OMe	1218,8	-0,268	EDGr
<b>1d</b>	Cl	1114,3	0,227	EWGi
<b>1e</b>	Br	283,4	0,232	EWGi
<b>1f</b>	NO <sub>2</sub>	1310,9	0,778	EWGr+i
<b>1g</b>	CH <sub>3</sub>	133,2	-0,170	EDGi
<b>1h</b>	<i>t</i> -Bu	86,4	-0,197	EDGi



Substância	R	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	$\sigma_p^a$	Efeito eletrônico predominante
<b>1i</b>	<i>n</i> -Bu	262,3	NR	EDGi

<sup>a</sup> (McDANIEL e BROWN, 1958), NR = não relatado

Comparando-se os efeitos fracos de doação de elétrons, produzidos por efeito indutivo de grupos alifáticos ligados ao anel aromático, observou-se que o substituinte *t*-butila (**1h**,  $\sigma_p = -0,197$ ) apresenta um caráter de doação de elétrons por efeito indutivo ligeiramente maior que a CH<sub>3</sub> (**1g**,  $\sigma_p = -0,170$ ), o que parece influenciar positivamente na atividade biológica, uma vez que **1h** foi 1,7 vezes mais ativo que **1g**. Tal tendência também pode ser observada em substituintes com efeitos fortemente doadores de elétrons, os quais são produzidos pelo efeito de

ressonância de grupos que contém pares de elétrons não-ligantes disponíveis, tais como os grupamentos hidroxila (**1b**) e metoxila (**1c**), cujas constantes de Hammett ( $\sigma_p$ ) são iguais a -0,357 e -0,268, respectivamente. Nesse caso, a substância com o substituinte mais fortemente doador (**1b**: R = OH) foi 2,5 vezes mais ativo que a substância **1c** (R = OMe). Além dos fatores eletrônicos, o fator estérico parece ser ainda mais importante nessa sub-classe, pois a substância mais ativa foi **1h** (R = *t*-Bu), que apesar de possuir um substituinte fracamente doador de elétrons, apresenta um volumoso grupo alifático ligado ao anel aromático. Portanto, pode-se inferir que fatores estéricos prevalecem aos fatores eletrônicos nessa sub-classe, uma vez que **1h** (R = *t*-Bu) foi 5,7 vezes mais ativo do que **1b** (R = OH), cujo substituinte é fortemente doador de elétrons.

Analisando-se os substituintes halogenados (R = Cl ou Br), percebe-se que quando inseridos na posição 4 do anel aromático, o efeito eletrônico que prevalece é o de retirada de elétrons, uma vez que ambos apresentam valores da constante de Hammett semelhantes ( $\sigma_p = 0,227$  e  $0,232$ ; respectivamente). Apesar do átomo de cloro ser mais eletronegativo do que o de bromo, o que deveria resultar em uma maior habilidade em retirar elétrons, não é apenas o efeito indutivo aceptor de elétrons que opera nesses casos, pois ambos os halogênios possuem elétrons não ligantes que podem ser doados ao anel aromático por ressonância, provocando uma redução líquida no valor de  $\sigma_p$ . Essa redução é mais pronunciada no caso do cloro do que no bromo, porque o primeiro está no mesmo período da tabela periódica do carbono, fazendo com que os orbitais envolvidos na ressonância estejam mais alinhados, havendo uma sobreposição mais adequada entre os orbitais dos átomos envolvidos (Cl e C). Assim, se apenas o efeito eletrônico fosse importante para a atividade biológica, não seria esperada uma diferença relevante entre os valores de IC<sub>50</sub>. No entanto, foi observado que o derivado bromado (**1e**) é 4 vezes mais ativo do que o clorado (**1d**), indicando que novamente fatores estéricos são mais importantes do que os efeitos eletrônicos nessa série aromática, visto que o átomo de bromo está no terceiro período da tabela periódica, apresentando assim maior raio atômico do que o átomo de cloro, que se apresenta no segundo período. É válido ressaltar que a polarizabilidade desses substituintes também pode ser um fator importante para a atividade biológica, pois o bromo devido ao seu maior raio e menor eletronegatividade, quando comparado ao cloro, apresenta uma maior polarizabilidade.

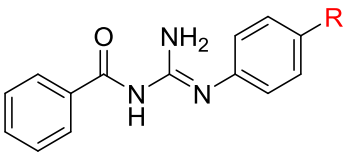
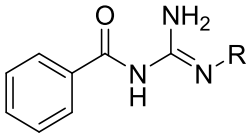
A adição de um substituinte fortemente acceptor de elétrons por efeito indutivo e ressonância como o  $\text{NO}_2$  (**1f**,  $\sigma_p = 0,778$ ), não apresentou um efeito positivo sobre a atividade biológica da série aromática, uma vez que o derivado nitrado foi o que apresentou a pior atividade dentre os substituintes avaliados. Entretanto, mais derivados contendo substituintes fortemente aceptores de elétrons, tais como  $\text{CN}$  ( $\sigma_p = 0,628$ ) ou  $\text{CF}_3$  ( $\sigma_p = 0,43$ ), poderiam ser avaliados para inferir se essa tendência é realmente válida para essa série.

Por fim, avaliou-se um único derivado alifático (**1i**), que contém uma cadeia butílica ligada diretamente na porção tioureia. Comparando a atividade desse derivado com aqueles da série aromática, observou-se que o mesmo apresentou atividade moderada sobre formas promastigotas, sendo mais ativo do que quase todos os aromáticos, exceto **1g** e **1h**. Esses três derivados têm em comum o fato de serem fracamente doadores de elétrons por efeito indutivo, o que reforça a importância dessa característica eletrônica nessa classe de substâncias. Entretanto, a avaliação da atividade de outros derivados alifáticos se faz necessária para traçar o perfil de influência do aumento do volume das cadeias alifáticas sobre a atividade antileishmania, verificando se o efeito estérico também contribuirá para um aumento da atividade desejada como aconteceu na série aromática.

Em relação a série das BGNs, construiu-se a Tabela 6, que permite a comparação entre as BGNs aromáticas quanto as suas capacidades de doação e retirada de elétrons, partindo do composto neutro **2a** ( $R = \text{H}$ ), bem como suas respectivas atividades.

Primeiramente, uma comparação entre os dados das Tabelas 5 e 6, pode-se perceber claramente que praticamente todas as BNGs foram mais ativas do que suas respectivas BTUs, exceto para os derivados **2h** e **1h** ( $R = \text{t-Bu}$ ), onde a tiouréia foi 8, vezes mais ativa do que a guanidina correspondente. Esses resultados permitem inferir que o grupamento guanidínico seja o farmacóforo dentre essas substâncias avaliadas.

**Tabela 6.** Estrutura das benzoilguanidinas (**2a-i**), com seus respectivos caracteres eletrônicos de doação e retirada de elétrons de acordo com seus valores de constante do substituinte de Hammett e índice de inibição (IC<sub>50</sub>) frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

				
Substância	R	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	$\sigma_p^a$	Efeito eletrônico predominante
<b>2a</b>	H	246,7	0,00	Neutro
<b>2b</b>	OH	239,0	-0,357	EDGr
<b>2c</b>	OMe	597,1	-0,268	EDGr
<b>2d</b>	Cl	54,9	0,227	EWGi
<b>2e</b>	Br	59,1	0,232	EWGi
<b>2f</b>	NO <sub>2</sub>	66,9	0,778	EWGr+i
<b>2g</b>	CH <sub>3</sub>	90,8	-0,170	EDGi
<b>2h</b>	<i>t</i> -Bu	734,6	-0,197	EDGi
				
<b>2i</b>	<i>n</i> -Bu	68,4	NR	EDGi

<sup>a</sup> (McDANIEL e BROWN, 1958), NR = não relatado

A partir de uma análise mais detalhada da Tabela 6, foi possível verificar que a presença tanto do substituinte doador de elétrons por efeito de ressonância (**2c**: R = OMe), quando do substituinte doador de elétrons por efeito indutivo (**2h**: R = *t*-Bu) na posição 4 do anel aromático não contribuiu positivamente para a atividade, uma vez que apresentaram atividades menores do que a substância neutra **2a**. Comparando-se os efeitos fracos de doação de elétrons, produzidos por efeito indutivo de grupos alifáticos ligados ao anel aromático, observou-se que o substituinte CH<sub>3</sub> (**2g**,  $\sigma_p = -0,170$ ) apresenta um caráter de doação de elétrons por efeito indutivo ligeiramente menor que a *t*-butila (**2h**,  $\sigma_p = -0,197$ ), o que parece influenciar positivamente na atividade biológica, uma vez que o

composto **2g** foi 8 vezes mais ativo que **2h**. Em contrapartida, a adição de substituintes com efeitos fortemente doadores de elétrons por efeito de ressonância, devido a disponibilidade de pares de elétrons não ligantes, tais como os grupamentos hidroxila (**2b**) e metoxila (**2c**), foi possível observar um efeito inverso observado quando ocorreu a adição de substituintes fracos doadores de elétrons, nesse caso, a substância com o substituinte mais fortemente doador (**2b**: R = OH) foi 2,5 vezes mais ativo que a substância **2c** (R = OMe), o mesmo efeito foi observado em seus precursores sintéticos **1b** e **1c**.

Além dos fatores eletrônicos, o fator estérico nessa sub-classe de substituintes doadores de elétrons parece apresentar efeito inverso ao observado nos precursores sintéticos correspondentes (BTUs), pois a substância mais ativa o **2g** (R = CH<sub>3</sub>), que apesar de possuir um substituinte fracamente doador de elétrons, apresentou IC<sub>50</sub> na ordem de 90,8 µM, sendo a melhor atividade dessa sub-classe, provavelmente por apresentar o menor volume ligado ao anel aromático. Portanto, pode-se inferir que fatores estéricos prevalecem aos fatores eletrônicos nessa sub-classe, uma vez que **2g** (R = CH<sub>3</sub>) foi 2,6 vezes mais ativo do que **2b** (R = OH), cujo substituinte é fortemente doador de elétrons.

Analisando-se a adição dos substituintes halogenados (R = Cl ou Br), cujo efeito eletrônico que prevalece é o de retirada de elétrons quando inseridos na posição 4 do anel aromático, apesar do átomo de cloro ser mais eletronegativo do que o de bromo, o que deveria resultar em uma maior habilidade em retirar elétrons, porém devido os pares de elétrons não ligante disponíveis nos halogênios, estes também apresentam a capacidade de doação de elétrons por ressonância o que provoca uma redução líquida no valor de  $\sigma_p$ . Como exposto anteriormente, essa redução é mais pronunciada no caso do cloro. Observando os valores das constantes de Hammett para os substituintes Cl e Br, verificamos uma diferença singela em seus valores, assim, considerando apenas efeito eletrônico a atividade biológica, não seria esperada uma diferença relevante entre os valores de IC<sub>50</sub> e é exatamente o que observamos onde o composto **2d** (54,9 µM) é apenas 1 vez mais ativo que o composto **2e** (59,1 µM). No entanto, apesar de semelhantes o derivado clorado (**2d**) é levemente mais ativo do que o bromado (**2e**), indicando novamente que um menor volume é mais importante do que os efeitos eletrônicos nessa série aromática, visto que o átomo de cloro está no segundo período da tabela periódica, apresentando assim menor raio atômico do que o átomo de bromo, que se

apresenta no terceiro. Entretanto o efeito estérico observado nos substituintes halogenados é menos pronunciado em comparação com o efeito estérico observado na sub-classe dos doadores de elétrons.

A adição de um substituinte fortemente acceptor de elétrons por efeito indutivo e ressonância como o NO<sub>2</sub> (**2f**), apresentou um efeito positivo sobre a atividade biológica da série aromática, uma vez que o derivado nitrado foi o terceiro com melhor atividade dentre os substituintes avaliados dentro da série aromática.

Diante das informações anteriormente expostas, pôde-se verificar de modo geral que na série aromática o efeito de retirada de elétrons é melhor para a atividade biológica em comparação com o efeito de doação de elétrons, entretanto as substâncias com substituintes retiradores de elétrons (**2d**, **2e** e **2f**) são mais citotóxicos, o que, provavelmente, relaciona tais grupos com aumento da citotoxicidade em mamíferos exibido pelas BGNs.

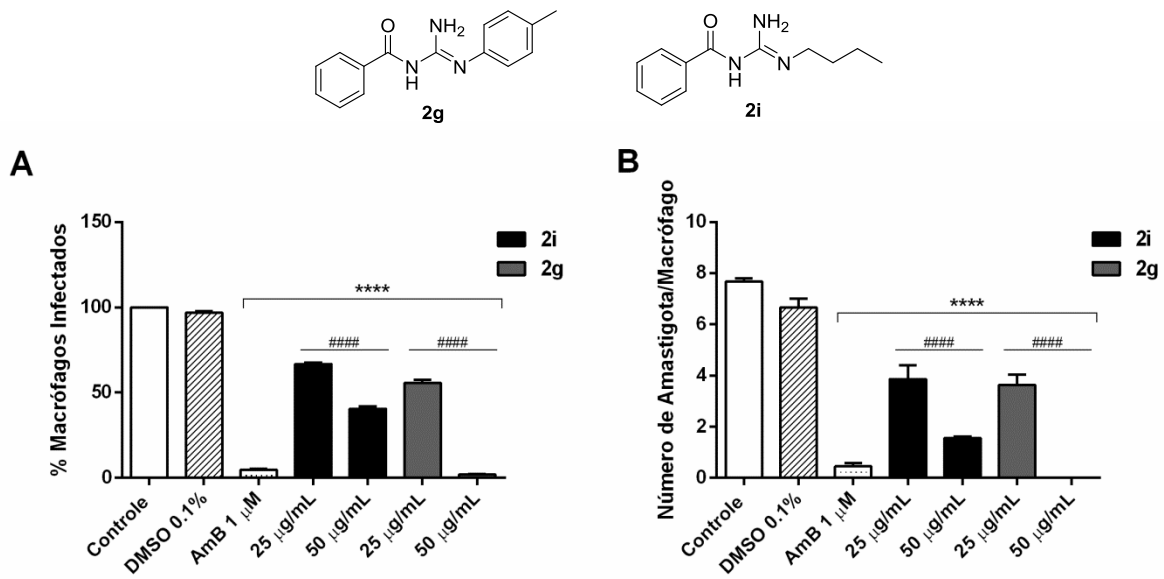
Por fim, avaliou-se um único derivado alifático (**2i**), que contém uma cadeia butílica ligada diretamente na porção guanidina. Comparando a atividade desse derivado com aqueles da série aromática, aliado ao bom índice de seletividade (Tabela X), observou-se que o mesmo é o composto mais promissor dentre todos aqui avaliados, uma vez que apresenta IC<sub>50</sub> (68,4 µM), maior apenas que as substâncias citotóxicos **2d** (54,9 µM), **2e** (59,1 µM) e **2f** (66,9 µM). Entretanto, a avaliação da atividade de outros derivados alifáticos se faz necessária para traçar o perfil de influência do aumento do volume das cadeias alifáticas sobre a atividade antileishmania, verificando se o efeito estérico também contribuirá para um aumento da atividade desejada como aconteceu na série aromática.

### **3.5 Avaliação da atividade sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* das substâncias mais promissoras**

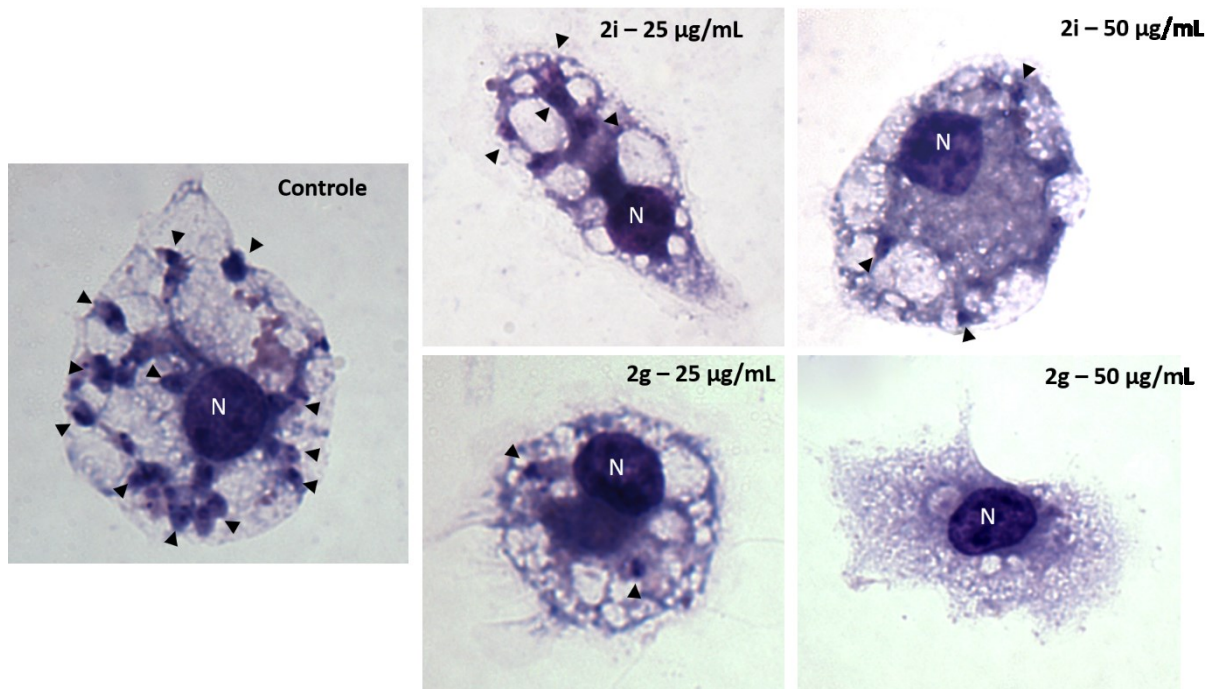
Após observar ação antileishmania nas formas promastigotas, decidimos investigar o efeito anti-amastigota dos compostos mais promissores em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, e observamos que os compostos agem nas formas intracelulares, reduzindo a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos de maneira concentração dependente.

O composto **2i** reduziu em 33,2% e 59,5% a porcentagem de macrófagos infectados e em 50,9% e 79,7% o número de amastigotas por

macrófagos quando tratados com 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (**Figura 18 A e B**). Em relação ao composto **2g**, a redução foi de 44,4% e 98,1% a porcentagem de macrófagos infectados e em 52,7% e 100% o número de amastigotas por macrófagos quando tratados com 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (**Figura 18 A e B**). A concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  de **2g** mostrou efeito semelhante a anfotericina B, reduzindo em aproximadamente 100% a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas /macrófagos.



**Figura 18:** Efeito das guanidinas em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram tratados por 24 h com 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  de guanidinas (**2g** e **2i**) e avaliados a porcentagem de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas por macrófago (B). DMSO 0, 01% (controle do diluente) e AmB 1  $\mu\text{M}$  (controle positivo). Os valores representam a média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferença significativa em relação ao controle \*\*\*\* ( $p \leq 0,0001$ ). ##### Diferença significativa em relação aos tratamentos ( $p \leq 0,0001$ ).

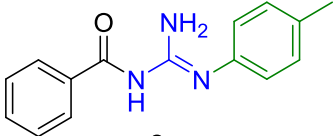
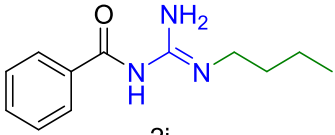


**Figura 19:** Microscopia óptica de luz demonstrando macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados por 24h com 25 µg/mL e 50 µg/mL de BNGs **2g** e **2i**. Macrófagos corados com Giemsa (1000x magnitude). N= núcleo. ► formas amastigotas.

### 3.6 Estudo *in silico* para predição de parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade (ADME-Tox)

De acordo com a agência internacional *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (DNDi), um candidato a novo fármaco destinado ao combate das leishmanioses deve proporcionar um tratamento oral, seguro, eficaz, de baixo custo e de curta duração (DON; IOSET, 2014; KATSUNO *et al.*, 2015). Portanto, é de extrema relevância que as substâncias-líderes apresentem um perfil farmacocinético e de toxicidade adequados para serem avaliados em modelos animais. Nesse contexto, visando a realização de futuros testes *in vivo* das substâncias mais promissoras (**2g** e **2i**), realizou-se estudo *in silico* de suas propriedades físico-químicas (**Tabela 7**), o qual permite realizar uma predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral e absorção gastrointestinal de substâncias promissoras no campo de descoberta de novos fármacos (LIPINSKI *et al.*, 1997; VEBER *et al.*, 2002).

**Tabela 7** – Predição *in silico* de propriedades físico-químicas da substância-líder **2g** e **2i** para análise da Regra dos 5 de Lipinski (R<sup>o</sup>5) e extensão de Veber.

Regra R <sup>o</sup> 5/ Veber						
MW (≤500)	cLogP (≤5)	HBA (≤10)	HBD (≤5)	RB (≤10)	tPSA (≤140 Å <sup>2</sup> )	N <sup>o</sup> viol.
 2g						
253,30	2,39	2	2	4	67,48	0
 2i						
219,28	1,97	2	2	6	67,48	0

MW: peso molecular; cLog P: Log do coeficiente de partição; HBA: número de aceptores de ligação de hidrogênio; HBD: número de doadores de ligação de hidrogênio; RB: número de ligações rotativas; tPSA: área de superfície polar topológica; N<sup>o</sup> viol.: número de violações da “Regra dos 5” de Lipinski.

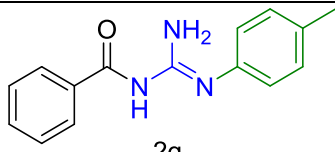
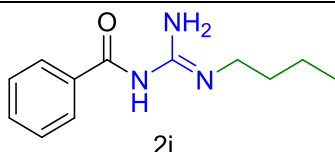
**Previsões:** Plataforma *online* SwissADME.

No campo de descoberta de novos fármacos, a Regra dos Cinco de Lipinski prediz que a má absorção ou permeação é mais provável quando há mais de 5 doadores de ligação de hidrogênio, mais de 10 aceptores de ligação de hidrogênio, o peso molecular é maior que 500 ou o Log calculado P (cLogP) é maior que 5 (LIPINSKI *et al.*, 1997). Os resultados do estudo *in silico* (**Tabela 7**) mostraram que as substâncias **2g** e **2i** atenderam às regras de Lipinski, o que sugere que teoricamente, essas moléculas não apresentaram problemas com a biodisponibilidade oral. A extensão de VEBER *et al.* (2002) inclui dois novos parâmetros a serem relacionados a permeabilidade e absorção, onde a substância deve apresentar 10 ou menos ligações rotáveis e área de superfície polar igual ou menor que 140 Å<sup>2</sup>, apresentando desta forma alta probabilidade de apresentar uma

boa biodisponibilidade oral. Uma área superficial polar menor que  $140 \text{ \AA}^2$  correlaciona-se melhor com o aumento da taxa de permeação do que a lipofilicidade (clogP), bem como o aumento da contagem de ligações rotativas tem um efeito negativo na taxa de permeabilidade. Neste contexto, pode-se observar que as substâncias **2g** e **2i** apresentaram um número menor que 10 ligações rotativas e uma TPSA inferior a  $140 \text{ \AA}^2$ , indicando uma boa permeabilidade pelas membranas celulares.

Outras propriedades farmacocinéticas também puderam ser estimadas *in silico*, utilizando-se a plataforma SwissADME, tais como a absorção pelo trato gastrointestinal, permeabilidade através da barreira encefálica, atuação como substrato da glicoproteína-P e como inibidor de enzimas do complexo do citocromo P450 (**Tabela 8**).

**Tabela 8** – Propriedades farmacocinéticas previstas para composto **2g** e **2i**.

Absorção GI	Permeabilidade BHE	Substrato gp-P	Inibidor				
			CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
 2g							
Alta	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
 2i							
Alta	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não

GI: gastrointestinal; BHE: barreira hematoencefálica, gp-P: glicoproteína P; CYP: Enzimas do complexo do citocromo P450. **Previsões:** Plataforma *online* SwissADME.

Os resultados demonstram que as substâncias **2g** e **2i**, apresentam boa capacidade de permear membranas biológicas, pois apresentaram uma alta absorção gastrointestinal e permeabilidade através da barreira hemato-

encefálica, algo não desejável para essas substâncias, uma vez que as moléculas não são destinadas para ação no Sistema Nervoso Central.

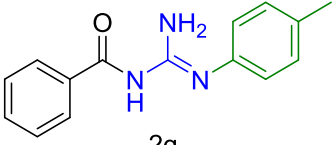
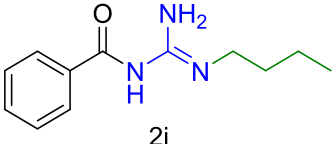
De acordo com o estudo, as substâncias **2g** e **2i** não atuam como substrato do glicoproteína-P. Transportadores de efluxo como a glicoproteína-P, desempenham um papel fundamental na absorção e disposição do fármaco. No intestino, a glicoproteína-P atua como uma bomba de efluxo transmembrana, bombeando seus substratos de volta para o lúmen, diminuindo sua absorção, desta forma fármacos que induzem a glicoproteína-P, podem reduzir a biodisponibilidade de alguns outros fármacos (LIN e YAMAZAKI, 2003; FINCH e PILLANS, 2014).

O citocromo P450 (CYP) é uma família de enzimas da fase I que atuam na biotransformação oxidativa de fármacos, sendo essenciais no processo de metabolização. As isoenzimas CYP desempenham um papel fundamental nas interações medicamentosas que podem resultar em aumento da toxicidade, eficácia reduzida ou início de reações adversas. Por outro lado, muitos agentes que afetam a expressão e atividade do CYP podem alterar a taxa metabólica de diferentes fármacos coadministrados (WU, 2014), podemos observar pela Tabela 8, que apenas a substância **2g** é inibidora de CYP1A2, algo não desejado, uma vez que em pacientes com leishmaniose a coinfeção pelo vírus HIV é comum, podendo dessa forma prejudicar a metabolização dos fármacos anti-retrovirais que sejam metabolizados por essa isoforma da enzima.

Além das estimativas de parâmetros farmacocinéticos, também foi realizada uma predição da toxicidade *in silico* da substância **2g** e **2i**, onde foram avaliados os seus potenciais mutagênico, carcinogênico, teratogênico e irritante, segundo o software DataWarrior (**Tabela 9**).

Pode-se observar que nas concentrações testadas as substâncias **2g** e **2i** não apresentaram citotoxicidade em macrófagos murinos, bem como não apresentam risco de toxicidade frente aos parâmetros analisados. Obviamente, testes *in vitro* e/ou *in vivo* devem ser realizados para confirmação dessas informações.

**Tabela 9** – Propriedades de toxicidade (ADME-TOX) do composto **2i**.

Mut.	Carc.	Terat.	Irrit.
 2g			
Não	Não	Não	Baixa
 2i			
Não	Não	Não	Não

Mut.: mutagênico; Carc.: carcinogênico; Terat.: teratogênico; Irrit.: irritante.

**Previsões:** Software DataWarrior (versão: Versão 4.7.2)

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes, para fins sintéticos, foram tratados, destilados e secos, conforme necessidades requeridas nas metodologias adotadas e de acordo com os processos descritos por Armarego e Chai (2003). O processo de monitoramento das reações foi realizado através da cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatofolhas de alumínio de Kieselgel 60 F-254 com espessura de 0,25 mm com indicador para UV (254nm), marca Merck. Os eluentes foram preparados volume a volume (v/v) e a revelação das substâncias em CCD foi realizada em lâmpada de UV (254-366nm) ou em solução etanólica de Ninhidrina a 2% (p/V) ou em solução etanólica de ácido fosfomolibdico a 10% (p/V). Para a purificação de substâncias por cromatografia em coluna aberta foi utilizada sílica gel 60 (0,063-0,200mm, Merck).

### 4.2 Metodologias sintéticas

#### 4.2.1 Síntese da série de BTUs (1a-i)

As benzoiltioureas *N*-substituídas foram anteriormente sintetizadas por nosso grupo de pesquisa, utilizando-se para tal a metodologia descrita por Otazo-Sánchez *et al.* (2001), com algumas modificações (BRITO *et al.*, 2015).

**Procedimento geral:** O cloreto de benzoíla adequado (11 mmol) foi adicionado a uma solução de tiocianato de amônio (11 mmol) em acetona seca (25 mL). A mistura de reação foi mantida sob agitação e refluxo por 15 minutos. Em seguida, esta foi resfriada até temperatura ambiente e, então, adicionou-se uma solução da amina correspondente (11 mmol) em acetona (10 mL). A mistura reacional foi mantida sob refluxo por mais 30 minutos. Em seguida, verteu-se o meio em um béquer contendo gelo picado sob vigorosa agitação. O sólido resultante foi filtrado, lavado com água deionizada (3 x 10 mL) e, por fim, recristalizado em etanol ou etanol/acetona. Os produtos foram obtidos como sólidos brancos ou amarelados em rendimentos que variaram de 58 a 97%.

As BTUs **1a-i** foram devidamente caracterizadas por dados espectroscópicos (IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), conforme relatado em BRITO *et al.*, 2015.

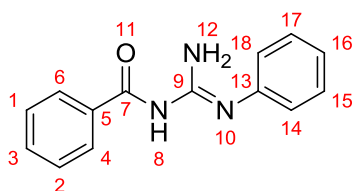
#### 4.2.2 Síntese da série de BGNs (2a-i)

As benzoilguanidinas *N'*-substituídas foram sintetizadas de acordo com a metodologia descrita por Cunha & Rodrigues Jr. (2006), com algumas modificações.

**Procedimento Geral:** Uma solução de BTU (**1a-i**) (2 mmol) em 30 mL de acetonitrila mantida sob vigorosa agitação, adicionou-se hidróxido de amônio aquoso à 40% (10 mmol), trietilamina (4 mmol), bismutato de sódio (2 mmol) e iodeto de bismuto (0,1 mmol). As reações processaram-se em 5 horas à temperatura ambiente. Após o consumo de todo o material de partida (verificado por CCD), a mistura reacional foi resfriada até a temperatura ambiente e o solvente foi removido à pressão reduzida. Então, o sólido resultante foi ressuspensão em diclorometano e, em seguida, foi filtrado em celite. A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$  anidro e o solvente foi removido em evaporador rotatório, fornecendo um óleo ou um sólido. Em seguida, o produto foi diluído com éter etílico/éter de petróleo (razão 1:1) e resfriado em geladeira. Cerca de dois dias após o início da precipitação, o sólido resultante foi filtrado e lavado com éter de petróleo (2 x 10 mL), obtendo-se assim as BGNs (**2a-i**) desejadas.

#### 4.2.3. Dados experimentais.

***N*-(*N*-fenilcarbamimidoil)benzamida (2a):** Rendimento: 87%. PF: 90 °C (Lit. 90 °C)



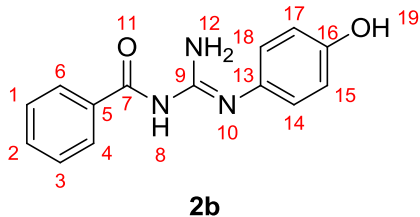
**2a**

(CUSMANO *et al.*, 1955). **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  9,33 (1H, s), 8,09 (2H, d,  $J = 6.8$  Hz), 7,54 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz), 7,50 – 7,36 (5H, m), 7,11 (1H, t,  $J = 7,3$  Hz).

**Lit. RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  9,36 (1H, s), 8,14 (2H, d,  $J = 6,8$  Hz), 7,56 (2H, d,  $J = 8,0$  Hz), 7,49 – 7,37

(5H, m), 7,12 (1H, t,  $J = 7.6$  Hz) (GU, *et al.*, 2013). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): 122,1, 123,8, 128,1, 129,0, 131,2, 138,5, 138,8, 159,5, 176,4. **Lit. RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  122,1, 123,9, 128,1, 128,9, 129,1, 131,3, 138,5, 138,8, 159,4, 176,3 (GU, *et al.*, 2013).

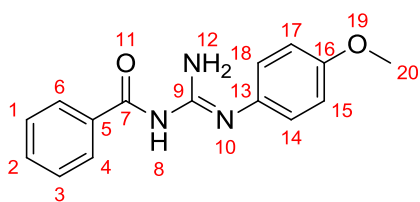
***N*-(*N'*-(4-hidroxifenil)carbamimidoil)benzamida (2b):** Rendimento: 59%. **PF:** 140-



2b

142 °C. Substância inédita: **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,38 (1H, s), 8,09 (2H, dd,  $J = 7,0$  Hz), 7,47 - 7,38 (3H, m), 7,22 (2H, d,  $J = 8,0$  Hz), 6,80 (2H, d,  $J = 8,7$  Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  e **DEPT 135** (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  115,1(+) (CH), 124,7 (C), 127,3 (+) (CH), 128,1 (+) (CH), 130,3 (+) (CH), 138,5 (C), 154,2 (C), 159,7 (C), 175,4 (C).

***N*-(*N'*-(4-metoxifenil)carbamimidoil)benzamida (2c):** Rendimento: 81%. **PF:** 136

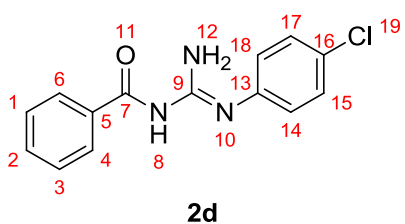


2c

°C (Lit. 136-137 °C) (ITO, 1960). **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,18 (2H, d,  $J = 6,8$ ), 7,48 - 7,38 (3H, m), 7,15 (2H, d,  $J = 8,7$  Hz), 6,92 (2H, d,  $J = 9,6$  Hz), 3,81 (3H, s). **Lit. RMN de  $^1\text{H}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  9,29 (2H, s), 8,05 - 8,12 (2H, m), 7,49 - 7,44 (1H, m),

7,44 - 7,35 (4H, m), 7,01 - 6,90 (2H, m), 3,76 (3H, s) (PAPE, WESSIG e BRUNNER, 2015). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  55,0, 113,9, 124,1, 127,6, 128,3, 130,6, 138,5, 159,6, 175,7. **Lit. RMN de  $^{13}\text{C}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  55,3, 114,2, 124,5, 127, 8, 128,6, 130,6, 130,8, 138,8, 156,2, 159,8, 176,0 (PAPE, WESSIG e BRUNNER, 2015).

***N*-(*N'*-(4-clorofenil)carbamimidoil)benzamida (2d):** Rendimento: 83%. **PF:** 84-85

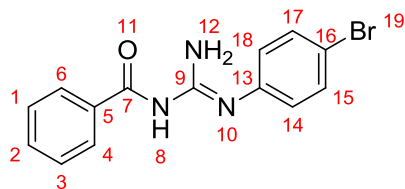


2d

°C. **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,08 (2H, d,  $J = 8,4$  Hz), 7,50 - 7,34 (5H, m), 7,10 (2H, d,  $J = 8,6$  Hz).

**Lit. RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,87 (2H, d,  $J = 8,0$  Hz), 7,63 - 7,58 (2H, m), 7,28 - 7,15 (5H, m), 6,41 (2H, sl) (SHAIK *et al.*, 2017). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  123,1, 126,9, 127,7, 128,4, 130,8, 137,3, 138,2, 158,8, 176,0. **Lit. RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  128,1, 129,1, 130,6, 132,5, 134,2, 137,1, 137,4, 139,1, 163,0, 169,1 (SHAIK *et al.*, 2017).

***N*-(*N'*-(4-bromofenil)carbamimidoil)benzamida (2e):** Rendimento: 41 %. **PF:** 144-

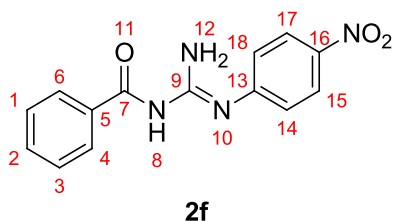


2e

145 °C. **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,07 (2H, d,  $J = 7,3$  Hz), 7,51 - 4,47 (3H, m), 7,43 - 7,40 (2H, m), 7,05 (2H, d,  $J = 8,5$  Hz). **Lit. RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,

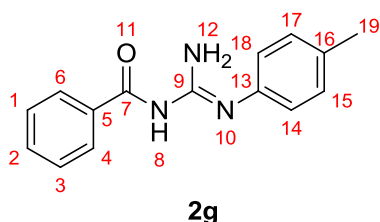
CDCl<sub>3</sub>) δ 8,07–8,01 (2H, m), 7,48–7,42 (3H, m), 7,41–7,33 (2H, m), 7,03–6,89 (2H, m) (ÅKERBLADH *et al.*, 2017). **RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 115,1, 123,6, 127,9, 128,6, 131,1, 138,0, 138,4, 158,9, 176,2. **Lit. RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 119,4, 126,1, 128,3, 128,7, 131,8, 133,0, 137,2, 158,2, 176,8 (ÅKERBLADH *et al.*, 2017).

**N-(N'-(4-nitrofenil)carbamimidoil)benzamida (2f):** Rendimento: 66%. **PF:** 195-196



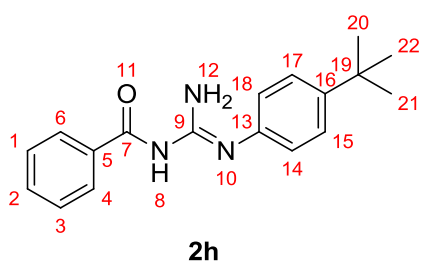
°C. **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,75 (1H, s), 8,28 (2H, d, *J* = 9,1 Hz), 8,13 (2H, d, *J* = 7,0 Hz), 7,90 (2H, d, *J* = 8,3 Hz), 7,56 – 7,46 (3H, m). **Lit. RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,30–8,23 (2H, m), 8,14–8,08 (2H, m), 7,89 (2H, d, *J* = 8,8 Hz), 7,53 (1H, t, *J* = 7,2 Hz), 7,47 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H) (ÅKERBLADH *et al.*, 2017). **RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 120,2, 124,8, 128,1, 128,8, 131,4, 137,9, 141,6, 145,6, 158,5, 176,6. **Lit. RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 120,2, 124,9, 128,2, 128,8, 131,5, 138,0, 141,7, 145,9, 158,4, 176,6 (ÅKERBLADH *et al.*, 2017).

**N-(N'-(p-tolil)carbamimidoil)benzamida (2g):** Rendimento: 53%. **PF:** 118 °C. **RMN**



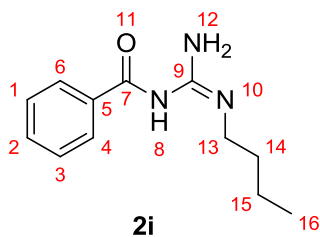
**de <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,17 (2H, d, *J* = 7 Hz), 7,48 – 7,38 (3H, m) 7,20 (2H, d, *J* = 8,0 Hz), 7,09 (2H, d, *J* = 8,0 Hz), 2,35 (3H, s). **RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 20,7, 124,9, 127,7, 128,6, 130,3, 131,1, 133,2, 136,7, 137,8, 160,0, 177,7. **Lit. RMN de <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 20,6, 128,1, 128,9, 130,0, 130,9, 133,3, 134,5, 137,8, 144,2, 162,2, 167,2 (SHAIK *et al.*, 2017).

**N-(N'-(4-terc-butil)carbamimidoil)benzamida (2h):** Rendimento: 44%. **PF:** 214-215



°C. Substância inédita: **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,17 (2 H, d, *J* = 7 Hz), 7,48 – 7,39 (5H, m), 7,14 (2H, d, *J* = 8,6 Hz), 1,32 (9H, s). **RMN de <sup>13</sup>C e DEPT 135** (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 31,00 (+) (CH<sub>3</sub>), 33,85 (C), 121,39 (+) (CH), 125,39 (+) (CH), 127,66 (+) (CH), 128,43(+) (CH), 130,71(+) (CH), 135,39 (C), 138,59 (C), 145,89 (C), 159,26 (C), 176,00 (C).

**N-(N'-butilcarbamimidoil)benzamida (2i):** Rendimento: 62%. PF: 113-114 °C (Lit.



2i

114° C) (SCOTT, 1957). **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,13 (2H, d,  $J = 7,0$  Hz), 7,44 – 7,35 (3H, m), 3,43 – 3,11 (2H, m), 1,54 (2H, d,  $J = 7,2$  Hz), 1,38 – 1,33 (2H, m), 0,9 (3H, t,  $J = 7,3$ ) **Lit. RMN de  $^1\text{H}$**  (MeOD)  $\delta$  8,08 (2H, s br), 7,51–7,27 (3H, m), 3,45–3,18 (2H, m), 1,58 (2H, p,  $J = 7,4$

Hz), 1,42 (2H, p,  $J = 7,3$  Hz), 0,96 (3H, t,  $J = 7,3$  Hz) (ÅKERBLADH *et al.*, 2017).

**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  14,0, 20,4, 31,9, 41,3, 128,3, 129,2, 131,4, 138,9, 162,1, 178,1. **Lit. RMN de  $^{13}\text{C}$**  (100 MHz, MeOD)  $\delta$  14,1, 21,0, 31,9, 41,8, 128,8, 129, 7, 132, 0, 140, 1, 163,5, 178,8 (ÅKERBLADH *et al.*, 2017).

### 4.3. Técnicas Analíticas

#### 4.3.1. Análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram adquiridos no Laboratório de Espectroscopia (LABSPEC) da UEL em espectrômetro BRUKER AVANCE III operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Os espectros foram registrados utilizando  $\text{DMSO}-d_6$  como solvente, TMS como padrão interno e todos os picos são reportados em ppm. Para calibração do espectro RMN de  $^1\text{H}$  foram adotados os valores de 0,00 ppm para TMS e 7,26 ppm para  $\text{DMSO}-d_6$ . As áreas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica, e suas multiplicidades foram descritas da seguinte forma: simpleto (s), simpleto largo (sl), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (p) e multiplete (m). As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram relatadas em Hz (Hertz).

#### 4.3.2 Análises de espectroscopia de absorção na região do infra-vermelho (FT-IR)

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no Laboratório de Espectroscopia (LABSPEC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) no espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo IR PRESTIGE-21 e no espectrofotômetro infravermelho por transformada de Fourier, marca Shimadzu modelo FTIR-8300. Foram utilizadas

pastilhas de KBr, previamente seco em estufa à 80°C por 24h. Para a fabricação das pastilhas, utilizou-se 1 mg de amostra para 20 mg de KBr. Então, os sólidos foram homogeneizados e a mistura foi prensada na forma de uma pastilha. Os números de onda das absorções foram expressos em  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.3.3. Ponto de fusão**

Os pontos de fusão (PF) foram determinados em aparelho digital da Microquímica Ltda. mod. MQAPF-302. As amostras foram colocadas em uma lamínula de vidro sob a placa aquecedora, e as temperaturas de pré-aquecimento e final da rampa foram selecionados para 60 °C e 250 °C, respectivamente. A razão de aquecimento utilizada foi 4,0 °C/min.

### **4.4 Ensaio biológicos**

#### **4.4.1 Animais e aspectos éticos**

Os camundongos BALB/c foram gentilmente fornecidos pelo Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, Curitiba, Brasil. Os animais foram mantidos em condições controladas no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina até atingirem o peso aproximado de 25-30 gramas e idade entre 6-8 semanas, com luminosidade e temperatura controlada. Foi utilizado ciclo de claro/escuro (12/12 h), com temperatura mantendo-se em torno de  $22 \pm 2$  °C. O estudo foi aprovado e os animais foram utilizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob o registro 8685.2018.13 (Anexo 1).

#### **4.4.2 Manutenção das formas promastigotas de *L. amazonensis***

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) provenientes da Universidade Estadual de Maringá foram mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO invitrogen, New York, EUA), meio HEPES 1M, urina humana 1%, L-glutamina 1%, estreptomicina com penicilina (GIBCO Invitrogen) e a 10% bicarbonato de sódio. O cultivo celular foi

mantido em estufa do tipo B.O.D. a 24 °C, em frasco de cultura 25 cm<sup>2</sup>. Em todos os experimentos, foram utilizadas formas promastigotas na fase de crescimento estacionária (cultura de 5 dias).

#### **4.4.3 Atividade *in vitro* de benzoilguanidinas e seus precursores sintéticos (benzoiltioureias) sobre formas promastigotas de *L. amazonensis***

As formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $1 \times 10^6$  células/mL) foram incubadas em placas de 24 poços e tratadas com nove (**2a-2i**) BGNs e nove (**1a-1i**) BTUs, com concentrações de 100, 50 e 25 µg/ mL, com posterior incubação em estufa B.O.D. 24°C. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer após 24 h de tratamento. Como controle negativo, utilizou-se as promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em meio de cultura sem tratamento, controle do veículo utilizou-se DMSO 0,01 % e controle positivo, utilizou-se Anfotericina B 1 µM. Os experimentos foram realizados em duplicata e repetidos por 3 vezes.

#### **4.4.4 Viabilidade de macrófagos peritoneais**

Os efeitos citotóxicos das BGN e BTU sobre macrófagos peritoneais foram testados com base na oxidação mitocondrial por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como ensaio descrito por Mosmann (1983).

Os macrófagos ( $5 \times 10^5$  cel/mL) foram recuperados a partir da cavidade peritoneal com PBS gelado suplementado com 3% de SBF e, em seguida, cultivados em placas de 24 poços com 500 µL de meio RPMI 1640 (10% de SBF) durante 12 horas (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). As células aderentes foram incubadas com as substâncias (200, 100, 50 e 25 µg/ mL), controle negativo com meio RPMI e controle do diluente com DMSO 0,01%, cultivadas durante 24 h, sob as mesmas condições.

Após este período, a cultura foi lavada com PBS e adicionado MTT (5 mg/mL) aos poços, seguido de outra incubação por um período de quatro horas. O produto MTT (cristais de formazan) foi diluído com 300 µL de DMSO (Sigma, St. Louis, MO, EUA), transferidos para placas de 96 poços e a leitura foi realizada com um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) à 550 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao grupo de controle calculado com a seguinte fórmula: % (macrófagos viáveis) = (amostras tratadas / amostra não tratada) x 100.

#### **4.4.5 Índice de seletividade (Si)**

Através dos resultados da ação das diferentes concentrações de BGNs sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e sobre macrófagos peritoneais foi calculada a concentração mínima capaz de inibir de 50% dos parasitas viáveis (IC<sub>50</sub>) e a citotoxicidade de macrófagos peritoneais como concentração citotóxica para causar a morte de 50% das células (CC<sub>50</sub>). IC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> foram calculados por regressão não linear (GraphPad Software, Inc., EUA, 500, 288). O índice de seletividade das substâncias foi expresso como IS = CC<sub>50</sub> nos macrófagos peritoneais / IC<sub>50</sub> sobre as formas promastigotas.

#### **4.4.6 Estudo *in silico* para predição de parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade (ADME-Tox)**

O estudo *in silico* utilizando a estrutura das substâncias sintetizadas foi realizado para estimar parâmetros farmacológicos teóricos da molécula relacionados à sua biodisponibilidade oral, absorção intestinal e toxicidade. A biodisponibilidade oral e absorção intestinal teóricas foram preditas, utilizando o software de cálculo de propriedades DataWarrior (Versão 4.7.2, <http://www.openmolecules.org/datawarrior>) e a plataforma *online* SwissADME (<http://www.swissadme.ch>). Os parâmetros avaliados foram aqueles que estão relacionados a “Regra dos Cinco” de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1997), seguida da regra adicional proposta por VEBER *et al.* (2002).

#### **4.4.7 Determinação do potencial de membrana mitocondrial**

A análise do potencial da membrana mitocondrial foi realizada pela marcação com o fluoróforo tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Para esta finalidade, formas promastigotas (10<sup>6</sup> cel/mL) foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas durante 24 h com as substâncias

mais promissoras ( $IC_{50}$  e  $2x IC_{50}$ ). Posteriormente foram lavadas com PBS e incubadas com 25 nM de TMRE durante 30 min a  $24^{\circ}C$ , seguido de lavagem com PBS foram imediatamente analisadas em leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finlândia), com comprimento de onda de excitação de 530 nm e de emissão de 590 nm. Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 100  $\mu M$  foi utilizado para causar a despolarização da membrana mitocondrial interna como um controle positivo e o veículo (DMSO 0,01%) foi usado como controle negativo. Esse experimento foi realizado em duplicata e repetido por três vezes.

#### 4.4.8 Produção de eros em formas promastigotas

Foi avaliada a produção de EROs em formas promastigotas de *L. amazonensis* induzidas pelo tratamento com as substâncias mais promissoras. As promastigotas ( $10^6$  cel/mL) foram tratadas com as substâncias mais ativas ( $IC_{50}$  e  $2x IC_{50}$ ) por 24 h a  $24^{\circ}C$ . Após este período os parasitos foram lavados com PBS e carregadas com 10  $\mu M$  da sonda permeante diacetato 2',7'-diclorofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ) (Sigma St. Louis, MO, USA) e incubadas no escuro por 45 minutos a  $24^{\circ}C$ . Como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por 30 minutos e o veículo (DMSO 0,01%) foi usado como controle negativo. EROs foram mensurados como um aumento na fluorescência causada pela conversão do corante não fluorescente para o altamente fluorescente 2,7-diclorofluoresceína, com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm em um leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finland). Esse experimento foi realizado em duplicata e repetido por três vezes.

#### 4.4.9 Ensaio anti-amastigota

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $5 \times 10^5$  cel/mL) foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm, incubados com 500  $\mu L$  de meio RPMI 1640 por 12 horas à  $37^{\circ}C$  e 5%  $CO_2$ . Os macrófagos aderentes foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $2,5 \times 10^6$ ) por 2 horas. Após a infecção, as formas promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem com PBS e as células aderentes foram

tratadas com os compostos mais promissores nas concentrações não citotóxicas (50 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ), meio RPMI 1640 (controle negativo), DMSO 0,01% (veículo), anfotericina B 1 $\mu\text{M}$  (controle positivo) por 24 horas (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ). Em seguida, as células foram coradas com Giemsa (Laborclin, Pines-PR Brazil) e 20 campos foram analisados por imersão aumentada (ampliação de 1000x), usando um microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para determinar o índice de infecção e o número de amastigotas por macrófagos após 24 horas de tratamento.

#### **4.5 Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram determinadas por análise de variância (One Way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Três experimentos independentes foram realizados, cada um com conjuntos de dados em triplicata. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500,288). Valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho, reportou-se a síntese de uma série de nove benzoilguanidinas (BNGs, **2a-i**) a partir de uma série de benzoiltioureas (BTUs, **1a-i**), previamente obtidas e caracterizadas por nosso grupo de pesquisa (BRITO, 2015), utilizando-se para isso uma metodologia de guanilação baseada em catálise com sais de bismuto. Dentre as nove guanidinas sintetizadas, as substâncias **2b** e **2h** são inéditas na literatura. As BNGs foram obtidas em rendimentos que variaram de 44 – 87% após devida purificação e, posteriormente, foram devidamente caracterizadas por ponto de fusão, espectroscopia na região do IV e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

Posteriormente, ambas as séries foram avaliadas *in vitro* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, as citotoxicidades dessas substâncias em macrófagos murinos foram avaliadas e os índices de seletividade (IS) foram calculados. Os ensaios *in vitro* revelaram que as benzoilguanidinas apresentam uma maior atividade antileishmania, do que seus precursores sintéticos (tioureas) frente as formas promastigotas, se destacando o composto **2g** e **2i**, os quais apresentaram  $\text{IC}_{50}$  igual a  $90,8 \mu\text{M}$  ( $23 \mu\text{g/mL}$ ), com IS de 5,5 e  $\text{IC}_{50}$  igual a  $68,4 \mu\text{M}$  ( $15 \mu\text{g/mL}$ ), com IS acima de 10, respectivamente, demonstrando baixa citotoxicidade sobre as células de mamíferos. Quando avaliada a ação sobre as formas amastigotas em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, os compostos **2i** e **2g** reduziram a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos, sendo que a concentração de  $50 \mu\text{g/mL}$  de **2g** apresentou resultados semelhantes ao de anfotericina B, reduzindo em aproximadamente 100% a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas /macrófagos.

Através de um estudo *in silico*, visando futuros estudos *in vivo*, as substâncias mais promissoras **2g** e **2i** apresentaram características de “fármaco-similar” (do inglês *drug-like*), como altas biodisponibilidade oral e absorção intestinal, não apresentando riscos toxicológicos.

Pretende-se realizar novos estudos para elucidar os mecanismos de morte sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

## REFERÊNCIAS

ALBERTOS-ALPUCHE, N. E. Vectores de la leishmaniasis cutánea en México. **Review of Biomedical**, v. 1, n. 2, p. 92-102, abr-jun. 1990.

ALONSO-MORENO, C.; ANTIÑOLO, A.; CARRILLO-HERMOSILLA, F.; OTERO, A. Guanidines: from classical approaches to eficiente catalytic syntheses. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 10. p. 3406-3425, mai. 2014.

ÅKERBLADH, L.; SCHEMBRI, L. S.; LARHED, M.; ODELL, L. O. Palladium(0)-Catalyzed Carbonylative One-Pot Synthesis of N-Acylguanidines. **Journal of Organic Chemistry**, 82, n. 23, p. 12520-12529, out. 2017.

ANDRADE, B. B.; DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Role of sandfly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 122–127, ago-set. 2007.

ANGYAL, S. J.; WARBURTON, W. K. The basic strengths of methylated guanidines. **Journal of the Chemical Society**. p. 2492-2494, 1951.

ARAFA, R. K.; WENZLER, T.; BRUN, R.; CHAI, Y.; WILSON, D. Molecular modeling study and synthesis of novel dicationic flexible triaryl guanidines and imidamines as antiprotozoal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46 n. 12, p. 5852-5860, Dec. 2011.

ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. Purification of laboratory chemicals. 5. ed. Burlington: Butterworth-Heinemann, 2003.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-1281, nov. 2000.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435-443, Apr. 1998.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Química Medicinal, As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, 3ª ed; Artmed: Porto Alegre, Brasil, 2015.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; HOELZ, L. V. B.; DE OLIVEIRA, A. P. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**. v. 8, n. 6, p. 2072-2104, dez. 2016.

BERLINCK, R. G. S.; TRINDADE-SILVA, A. E.; SANTOS, M. F. C. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 12, p. 1382-1406, dez. 2012.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 684 - 703, Apr. 1997.

BORTOLETI, B. T. S.; GONÇALVES, M. D.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; ASSOLINI, J. P.; CARLOTO, A. C. M.; CARVALHO, P. G. C.; CARDOSO, I. L. A.; SIMÃO, A. N. C.; ARAKAWA, N. S.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, p. 11-20, 2018.

BRAY, P. G.; BARRETT, M. P.; WARD, S. A.; DE KONING, H. P. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 5, p. 232–239, mai. 2003.

BRITO, T. O.; SOUZA, A. X.; MOTA, Y. C. C.; MORAIS, V. S. S.; SOUZA, L. T.; FÁTIMA, A.; MACEDO, JR., F.; MODOLO, L. V. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances - Royal Society of Chemistry**, v. 5, n. 55, p. 44507-44515, abr. 2015.

BROZEWICZ, K.; SŁAWINSKI, J. 1-(2-Mercaptobenzenesulfonyl)-3-hydroxyguanidines -- Novel potent antiproliferatives, synthesis and in vitro biological activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 384-394, sep. 2012.

BRUMMITT, C. F.; PORTER, J. A.; HERWALDT, B. L.; Reversible peripheral neuropathy associated with sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 22, n. 5, p. 878-879, mai. 1996.

BUCHDUNGER, E.; ZIMMERMANN, J.; METT, H.; MEYER, T.; MÜLLER, M.; DRUKER, B. J.; LYDON, N. B. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. **Cancer Research**, v. 56, n. 1, p. 100-104, jan. 1996.

CARREIRA, E. M.; CEREGHETTI, D. M. Amphotericin B: 50 years of chemistry and biochemistry. **Synthesis**, v. 6, p. 914-942, 2006.

CHENG, T. J.; WEINHEIMER, S.; TARBET, E. B.; JAN, J. T.; CHENG, Y. S.; SHIE, J. J.; CHEN, C. L.; CHEN, C. A.; HSIEH, W. C.; HUANG, P. W.; LIN, W. H.; WANG, S. Y.; FANG, J. M.; HU, O. Y.; WONG, C. H. Development of oseltamivir phosphonate congeners as anti-influenza agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8657-8670, Oct. 2012.

COSTA, M.; CHIUSOLI, G. P.; TAFFURELLI, D.; DALMONEGO, G. Superbase catalysis of oxazolidin-2-one ring formation from carbon dioxide and prop-2-yn-1-amines under homogeneous or heterogenous conditions. **Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions**. p. 1541-1546, 1998.

COXON, G. D.; FURMAN, B. L.; HARVEY, A. L.; MCTAVISH, J.; MOONEY, M. H.; ARASTOO, M.; KENNEDY, A. R. TETTEY, J. M.; WAIGH, R. D. Benzylguanidines and Other Galegine Analogues Inducing Weight Loss in Mice. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3457-3463, May 2009.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, jan. 2006.

CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J.; Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, p. 1-6, dez. 2016.

CUSMANO, S.; RUCCIA, M. Nitrosoimidazoles. IV. The action of 4(or 5)-nitroso-2, 5(or 4)-diphenylimidazole. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 85, p. 1686-1697, 1955.

CUNHA, S.; RODRIGUES JR., M. T. The first bismuth(III)-catalyzed guanylation of thioureas. **Tetrahedron Letters**, v. 47, n. 39, p. 6955-6956, set. 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132-141, Abr. 2002.

DAVIS, B. D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 3, p. 341–350, set. 1987

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 95, n. 3, p. 239-243, May-jun. 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, sep. 2004.

DON, R.; IOSET, J.R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 01, p. 140–146, jan. 2014.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, nov. 2011.

FINCH, A.; PILLANS, P. P-glycoprotein and its role in drug-drug interactions. **Australian Prescriber**, v. 37, n. 4, p. 1-3, ago. 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for industry neglected tropical diseases of the developing world: developing drugs for treatment or prevention. **Silver Spring**. 2014.

GASSER JR., R. A.; MAGILL, A. J.; OSTER, C. N.; FRANKE, E. D.; GROGL, M.; BERMAN, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 83–90, jan. 1994.

GONZALEZ, J. L.; STEPHENS, C. E.; WENZLER, T.; BRUN, R.; TANIOUS, F. A.; WILSON, W. D.; BARSZCZ, T.; WERBOVETZ, K. A.; BOYKIN, D. W. Synthesis and antiparasitic evaluation of bis-2,5-[4-guanidinophenyl]thiophenes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 552-557, abr. 2007.

GRECH, V.; MIZZI, J.; MANGION, M.; VELLA, C. Visceral leishmaniasis in Maltesean 18 year paediatric, population based study. **Archives of Disease in Childhood**, v. 82, n. 5, p. 381-385, mai. 2000.

GREENHILL, J. V.; PHARM, B.; LUE, P.; Amidines and guanidines in medicinal chemistry. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 30, p. 203-326, 1993.

GU, L. H.; GUO, Z.; HE, L.; QI, Q. R. Synthesis of Aroylguanidines by an Unexpected Demethylation–Addition Cascade. **Synthesis**, v. 45, n. 18, p. 2533–2544, 2013.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Personal view Visceral leishmaniasis Visceral leishmaniasis: current status of control , diagnosis , and treatment , and a proposed research and development agenda Personal view. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494–501, Aug. 2002.

GUNASEKAR, P. G.; KANTHASAMY, A. G.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. **Journal of Neurochemistry**, v. 65, n. 5, p. 2016-2021, nov. 1995.

HÄFELINGER, G.; KUSKE, F. K. H. The Chemistry of Amidines and Imidates, v. 2, editores PATAI, S.; RAPPOPORT, Z. 1 ed. John Wiley & Sons: Chichester, 1991.

HIRSCH, E.; CIRAULO, E.; GHIGO, A.; COSTA, C. Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 2, p. 192-205, May. 2008.

ISHIKAWA, T.; **Superbases for organic synthesis: guanidines, amidines and phosphazenes and related organocatalysts**. John Wiley & Sons, 2009.

ITO, G. Über die Synthese von N1-substituierten N3-Acylguanidinen (Vorläufige Mitt.). Benzoylverbindungen. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. V. 9, n. 3, p. 245-248. 1961.

JHINGRAN, A.; CHAWLA, B.; SAXENA, S.; BARRETT, M. P.; MAD-HUBALA, R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 111–117, abr. 2009.

KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B. V. Recent developments in guanylating agents, **Arkivoc**, v. 2005, n. 4, p. 49-87, jan. 2015.

KATSUNO, K.; BURROWS, J. N.; DUNCAN, K.; HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, R.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C. E.; SCHMATZ, D.; WARNER, P.; SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–8, nov. 2015.

KELLY, B.; ROZAS, I. Copper(II) chloride promoted transformation of amines into guanidines and asymmetrical *N,N'*-disubstituted guanidines, **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 30, p. 3982-3984, Jul. 2013.

KHOMUTOV, M. A.; MANDAL, S.; WEISELL, J.; SAXENA, N.; SIMONIAN, A. R.; VEPSALAINEN, J.; MADHUBALA, R.; KOCHETKOV, S. N. Novel convenient synthesis of biologically active esters of hydroxylamine. **Amino Acids**, v. 38, n. 2, p. 509-517, dez. 2009.

KIM, K. S.; QIAN, L. Improved method for the preparation of guanidines. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 48, p. 7677-7680, nov. 1993.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, Abr. 2005.

LI, M.; WILSON, L. J.; PORTLOCK, D. E. A simple solid-phase synthesis of disubstituted guanidines using Rink amide resin as an amine component. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 12, p. 2273-2275, mar. 2001.

LIN, J. H.; YAMAZAKI, M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 59-98, 2003.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.

MAAROUF, M. In Vivo Interference of Paromomycin with Mitochondrial Activity of Leishmania. **Experimental Cell Research**, v. 232, n. 2, p. 339–348, 1997.

MANETTI, F.; CASTAGNOLO, D.; RAFFI, F.; ZIZZARI, A. T.; RAJAMÄKI, S.; D'AREZZO, S.; VISCA, P.; CONA, A.; FRACASSO, M. E.; DORIA, D.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; FADDA, G.; BOTTA, M. Synthesis of new linear guanidines and macrocyclic amidinourea derivatives endowed with high antifungal activity against *Candida spp.* and *Aspergillus spp.* **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7376-7379, Dec. 2009

McDANIEL, D. H.; BROWN, H. C. An Extended Table of Hammett Substituent Constants Based on the Ionization of Substituted Benzoic Acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 420-427, mar. 1958

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123-147, jun. 2013.

MARYANOFF, C. A.; STANZIONE, R. C.; PLAMPIN, J. N.; MILLS, J. E. A convenient synthesis of guanidines from thioureas. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1882-1884, mai. 1986.

MCKEEVER, C.; KAISER, M.; ROZAS, I. Aminoalkyl Derivatives of Guanidine Diaromatic Minor Groove Binders with Antiprotozoal Activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 700-711, jan. 2013.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the Leishmania major paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, n. 201, p. 206-224, Oct. 2004.

MEARS, E. R.; MODABBER, F.; DON, R.; JOHNSON, G. E. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003889, set. 2015

MENEZES, J. P. B.; GUEDES, C. E. S.; PETERSEN, A. L. O. A.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, p. 1-11. abr. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade**. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

MO, S.; KRUNIC, A.; PEGAN, S. D.; FRANZBLAU, S. G.; ORJALA, J. An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured *Cyanobacterium Scytonema* sp. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 2043-2045, Nov. 2009.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 4-9, jun. 2014.

MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a promising antiparasitic target. **Current Clinical Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 55-60, fev. 2010.

MOREIRA, V. R.; DE JESUS, L. C. L.; SOARES, R. P.; SILVA, L. D. M.; PINTO, B. A. S.; MELO, M. N.; PAES, A. M. A.; PEREIRA, S. R. F. Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by Leishmania (*Leishmania*) infantum. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy Journal**, v. 61, n. 6, p. e02360-16, jun. 2017.

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

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, nov. 2005.

NEVES, D. P.; DE MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A.; Parasitologia Humana. 11 ed. Editora Atheneu, 2005.

OLIVER, D. W.; DORMEHL, I. C.; WIKBERG, J. E. S.; DAMBROVA, M. Guanidines: from molecule to primate. **Medicinal Chemistry Research**, v. 13, n. 6-7, p. 427-438, jul. 2004.

OLLIARO, P. L.; BRYCESON, A. D. Practical Progress and New Drugs for Changing Patterns of Leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 9, n. 9, p. 323-328, sep. 1993.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018. Acesso em 20 de janeiro de 2019. Disponível em: <[www.paho.org/leishmaniasis](http://www.paho.org/leishmaniasis)>.

OSORIO Y FORTEA, J.; PRINA, E.; DE LA LLAVE, E.; LECOEUR, H.; LANG, T.; MILON, G. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunological Reviews**, v. 219, p. 66–74, out. 2007.

OTAZO-SÁNCHEZ, E.; MARIN, L. P.; HERNANDEZ, O. E.; LIMA, S. R.; CHAMARRO, J. A. Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy-metal ion selective electrodes. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction 2**, v. 0, n. 11, p. 2211-2218, out. 2001.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. 10-18, Set. 2014.

PAPE, S.; WESSIG, P.; BRUNNER, H. A new and environmentally benign synthesis of aroylguanidines using iron trichloride. **RSC Advances**, v. 5, n. 123, p. 101408–101411, nov. 2015.

PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry. 5 ed. Oxford University Press, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. 5 ed. Cengage Learning, 2016.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-13, Jan. 1996.

PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine. Clinical aspects and control, vol 2. London: Academic Press, 1987.

PORCHEDDU, A.; DE LUCA, L.; GIACOMELLI, G. A Mild and Inexpensive Procedure for the Synthesis of *N,N'*-Di-Boc-Protected Guanidines, **Synlett**, p. 3368-3372, dez. 2009.

RACZYNSKA, E. D.; CYRANSKI, M. K.; GUTOWSKI, M.; RAK, J.; GAL, J. F.; MARIA, P. C.; DAROWSKA, M.; DUCZMAL, K. Consequences of proton transfer in guanidine. **Journal of physical organic chemistry**, v. 16, n. 2, p. 91-106, fev. 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, vol. 7, n. 9, p. 581–596, sep. 2007.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4.ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2018.

SCOTT, F. L. Studies in the pyrazole series. VIII. Aminolysis of some 3,5-dimethyl-1-acylguanylpurazoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 22, n. 12, p. 1568-1575, jan. 1957 CAPLUS

SHAIK, B. V.; TAMMINANA, R.; SEELAM, M.; KAMMELA, P. R. Efficient Copper-Promoted Tandem Multi-Component Strategy: The Synthesis of 1- Aryl/Alkyl-5-( N - Benzoylamino) Tetrazoles and Guanidine's. **ChemPubSoc Europe**, v. 2, n. 35, p. 11521-11525, dez. 2017

SHIBANUMA, T.; SHIONO, M.; MUKAIYAMA, T. A convenient method for the preparation of carbodiimides using 2-chloropyridinium salt. **Chemistry Letters**, v. 6, n. 5, p. 575-576, mai. 1977.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - **Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Acesso em 24 de Janeiro de 2019.** Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). LEISHMANIOSE VISCERAL - **Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Acesso em 24 de Janeiro de 2019.** Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/dados-epidemiologicos-sinan>.

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

SMIETANA, M.; OHARA, K.; VASSEUR, J. J. NIS-promoted guanylation of amines, **Tetrahedron Letters**, v. 50, n. 13, p. 1463-1465, abr. 2009.

SMIRLIS, D.; DUSZENKO, M.; RUIZ, A. J.; SCOULICA, E.; BASTIEN, P.; FASEL, N.; SOTERIADOU, K. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 107, p. 1-15, nov. 2010.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. Mark's Essentials of Medical Biochemistry. A Clinical Approach; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 2007.

STEPHENS, C. E.; BRUN, R.; SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A.; TANIOUS, F.; WILSON, W.D.; BOYKIN, D. W. The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 12, p. 2065-2069, jun. 2003.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 82, p. 1-10, fev. 2017.

STRECKER, A. Untersuchungen über die chemischen Beziehungen zwischen Guanin, Xanthin, Theobromin, Caffein und Kreatinin. **Liebigs Annalen der Chemie**, v. 118, n. 2, p. 151-177, 1861.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 24, n. 1, p. 43-59, jan. 2015.

SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H.; FISCHER, C.; JUNGE, K.; BRYCESON, A.; BERMAN, J. Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, Nov. 2002.

TASSONI, E.; GIANNESI, F.; BRUNETTI, T.; PESSOTTO, P.; RENZULLI, M.; TRAVAGLI, M.; RAJAMÄKI, S.; PRATI, S.; DOTTORI, S.; CORELLI, F.; CABRI, W.; CARMINATI, P.; BOTTA, M. Novel substituted aminoalkylguanidines as potential antihyperglycemic and food intake-reducing agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3073-3076, Jun. 2008

TAYLOR, J. E.; BULL, S. D.; WILLIAMS, J. M. J. Amidines, isothioureas, and guanidines as nucleophilic catalysts. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 6, p. 2109–2121, jan. 2012.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 26, p. 1-15, mai. 2017.

VAN-VOORHIS, W. C. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. **Drugs**, v. 40, n. 2, p. 176–202, ago. 1990.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, jun. 2002.

VON ITZSTEIN, M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 12, p. 967–974, dez. 2007.

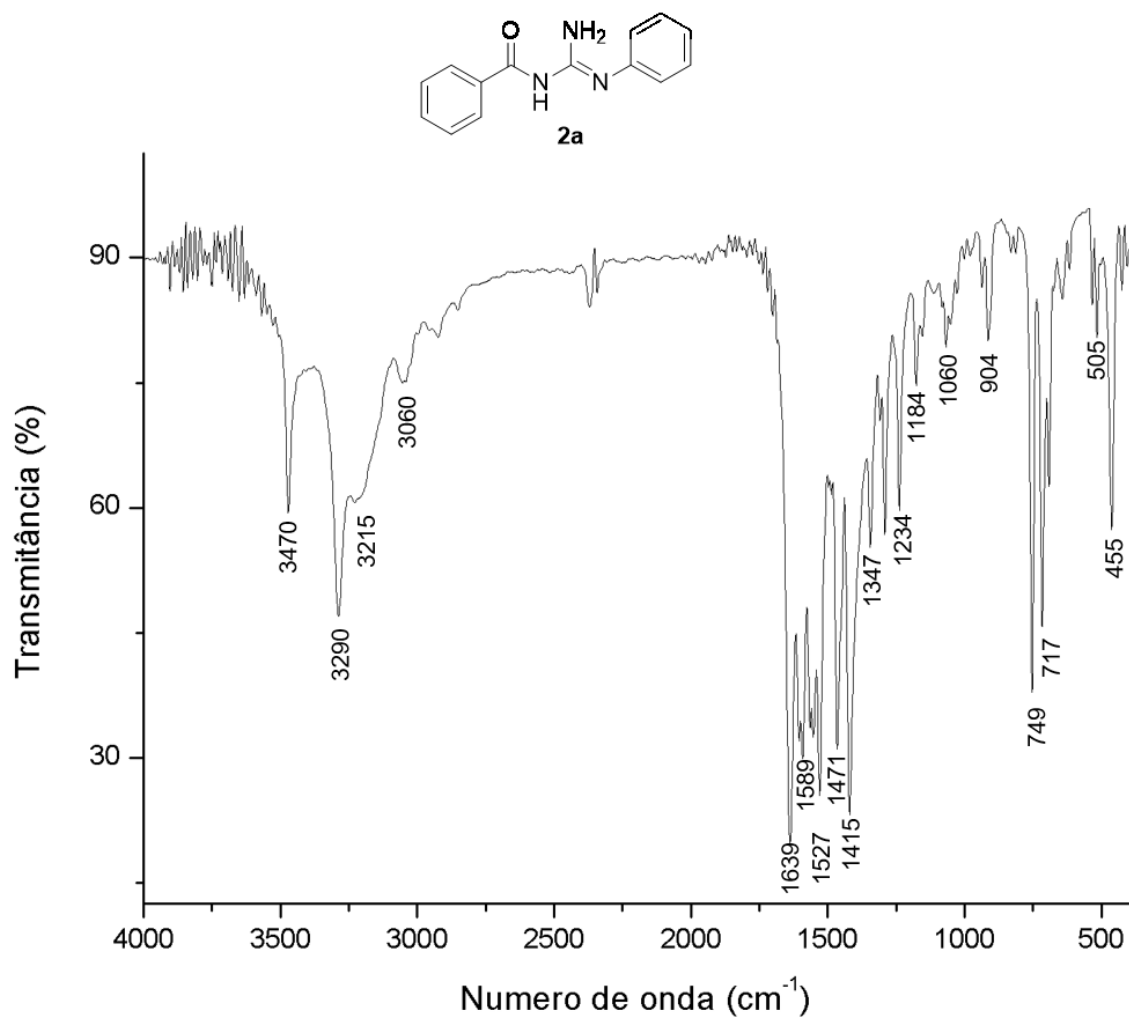
WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*, **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, sep. 2004.

WU, j. Cytochrome P450 enzymes: Biochemistry, Pharmacology and Health Implications. Nova Science Publishers, Inc. set. 2014

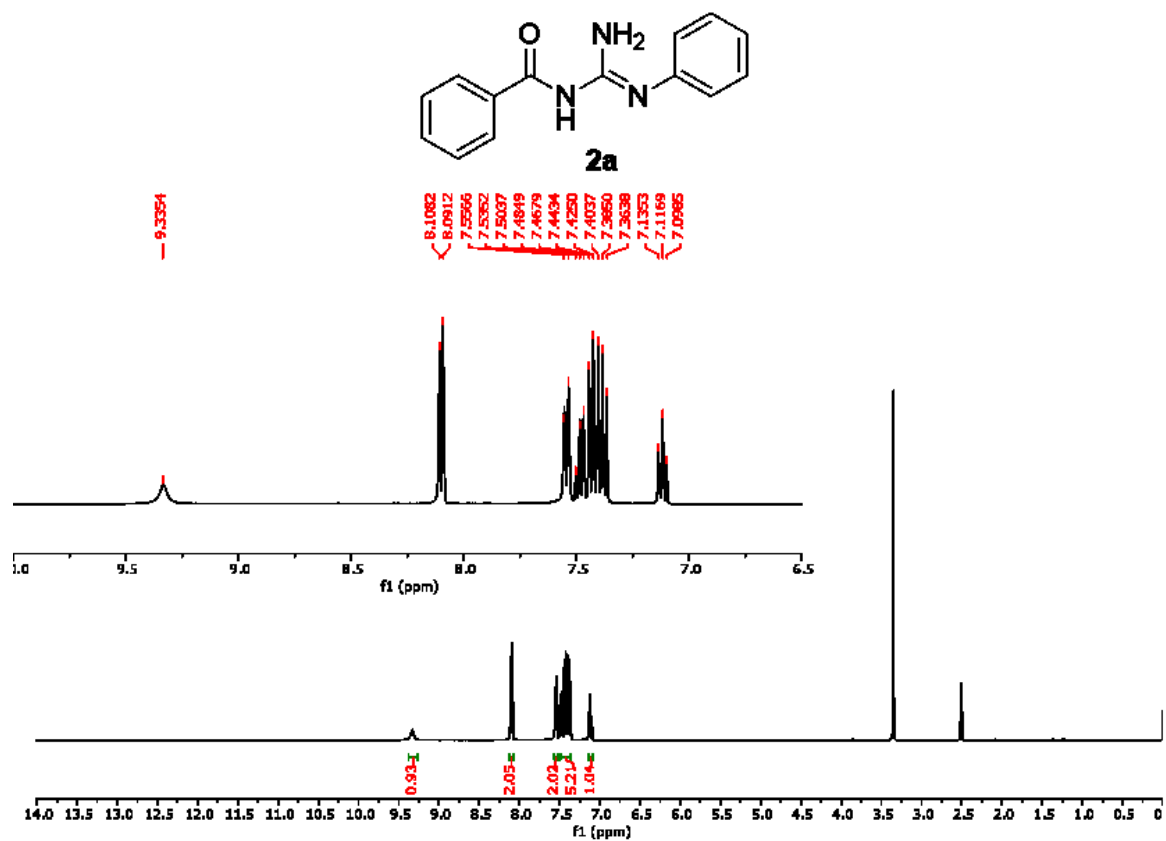
WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: < <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 02 out. 2018.

YAMAMOTO, Y.; KOJIMA, S.; **Synthesis and chemistry of guanidine derivatives, in The Chemistry of Amidines and Imidates**, vol. 2, editores PATAI, S.; RAPPOPORT, Z. John Wiley & Sons, 1991.

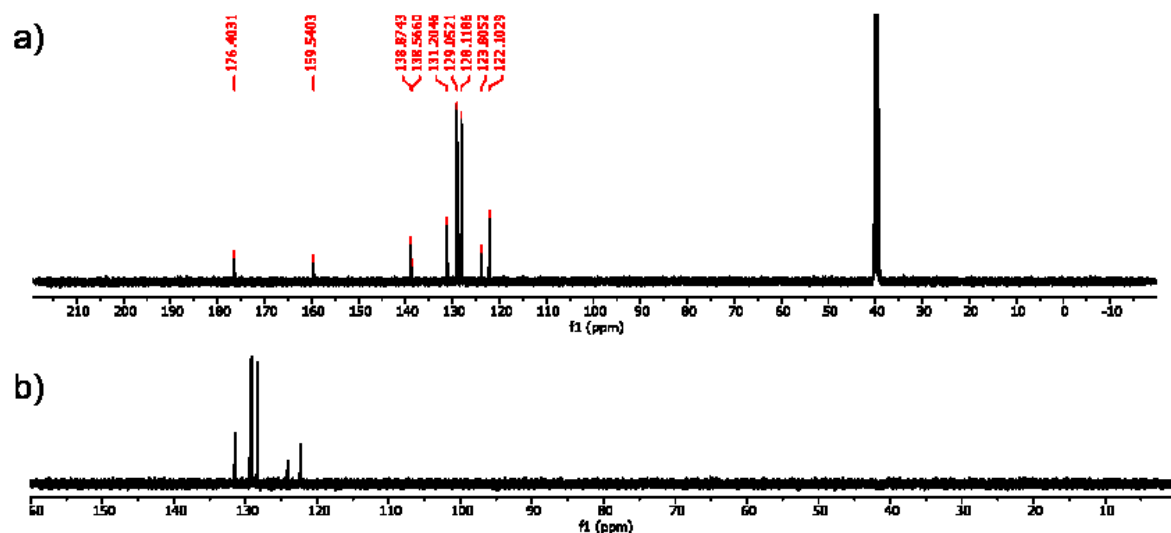
## APÊNDICE A: Seção de espectros.



**Figura 20.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2a**.



**Figura 21.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **2a** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente DMSO-d<sub>6</sub>).



**Figura 22.** a) Espectro de RMN de <sup>13</sup>C e b) DEPT-135 da substância **2a** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO-d<sub>6</sub>).

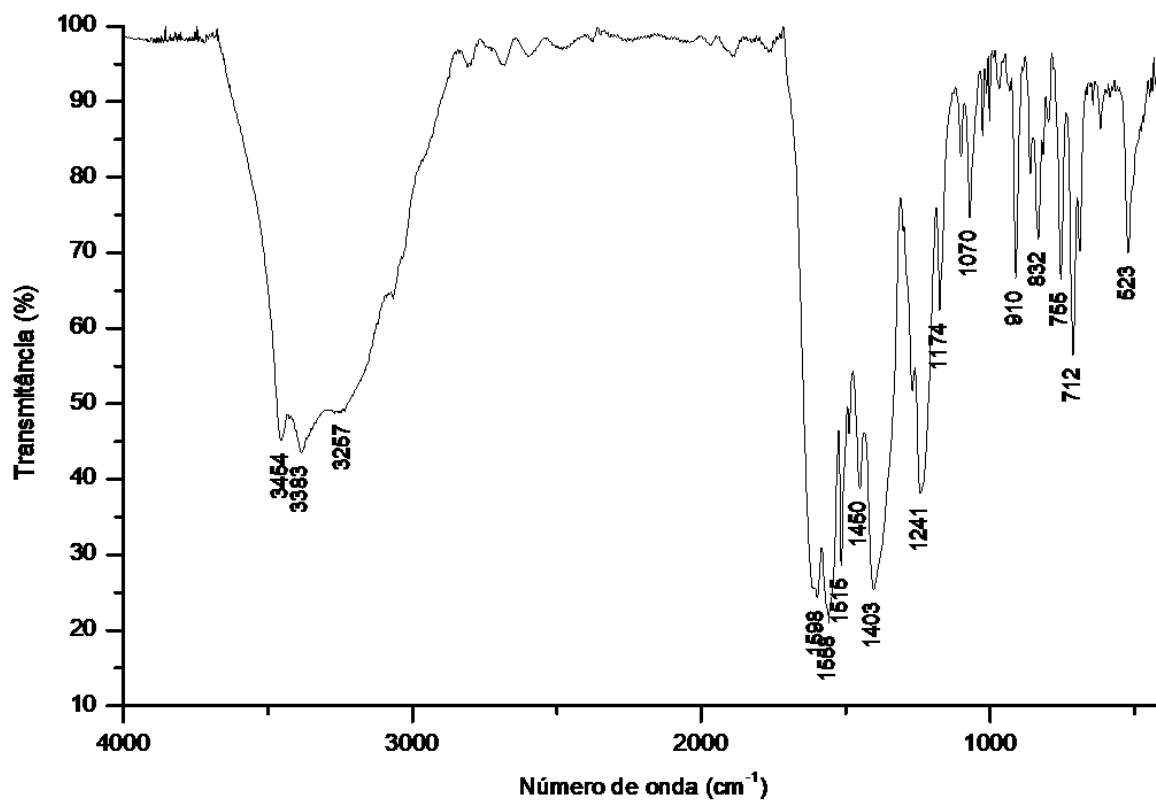
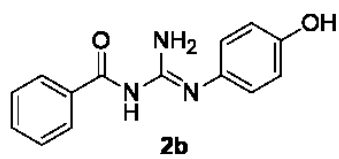
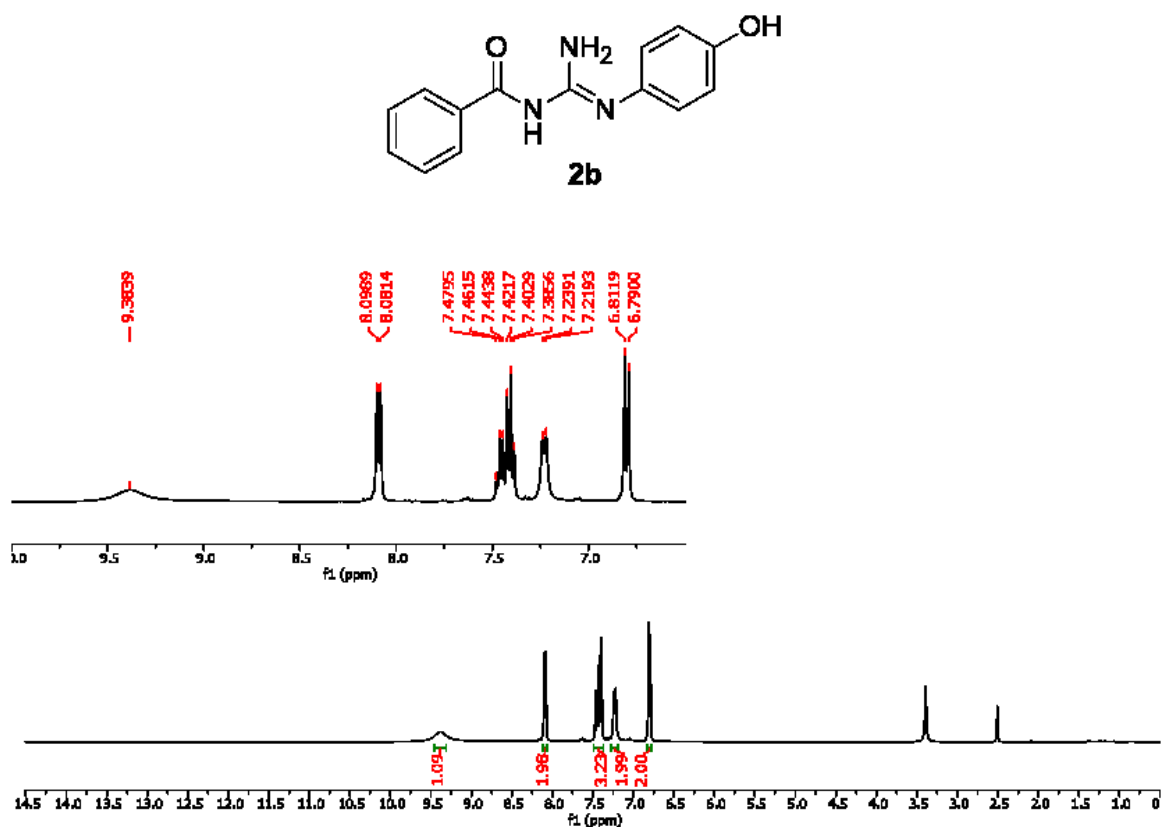
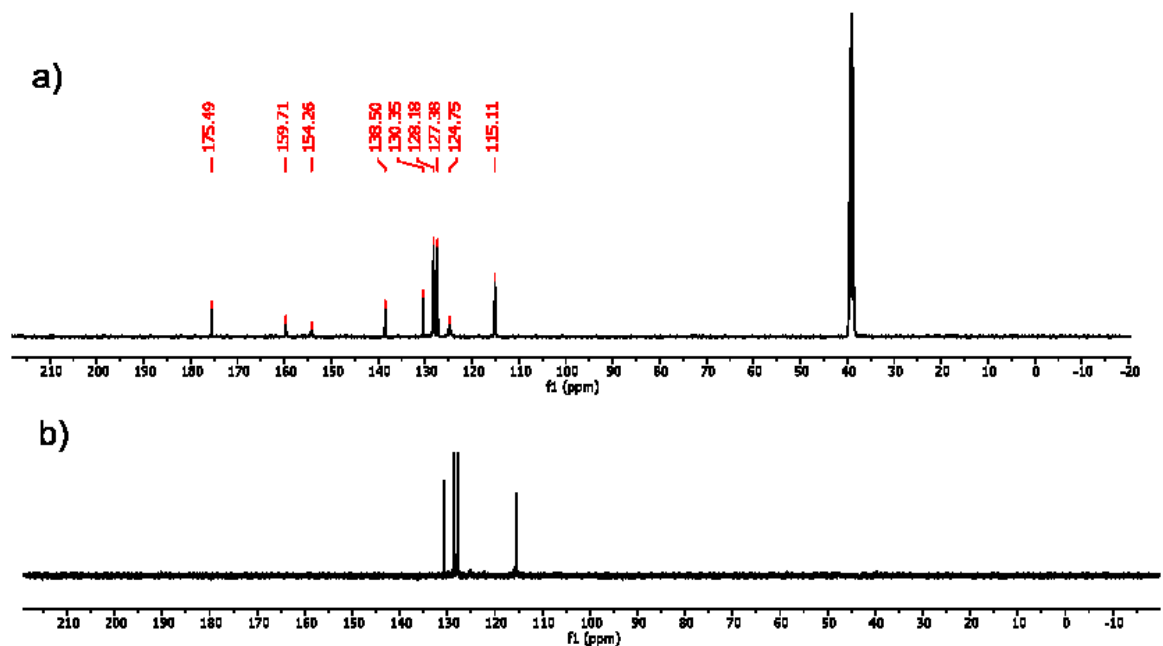


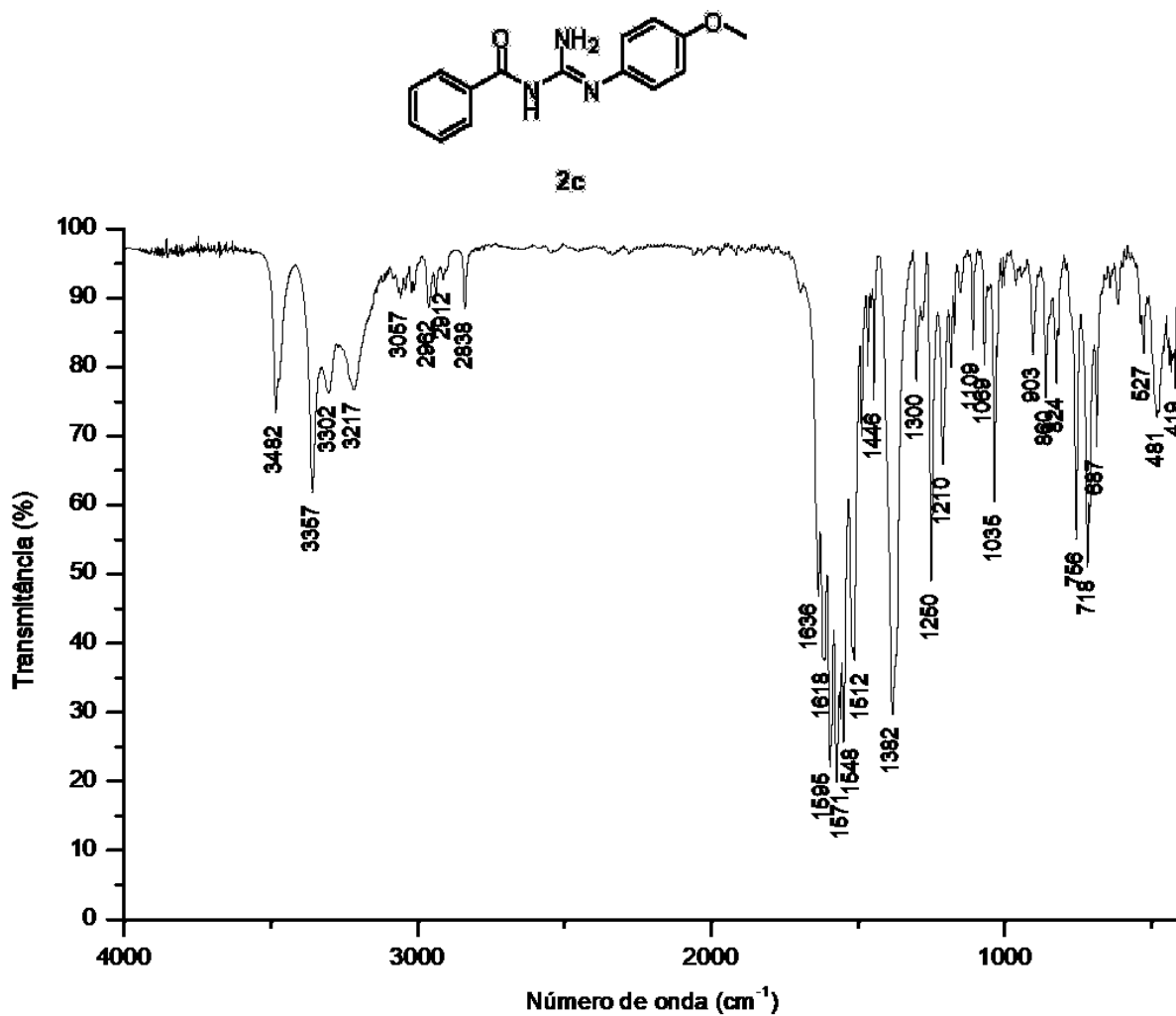
Figura 23. Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2b**.



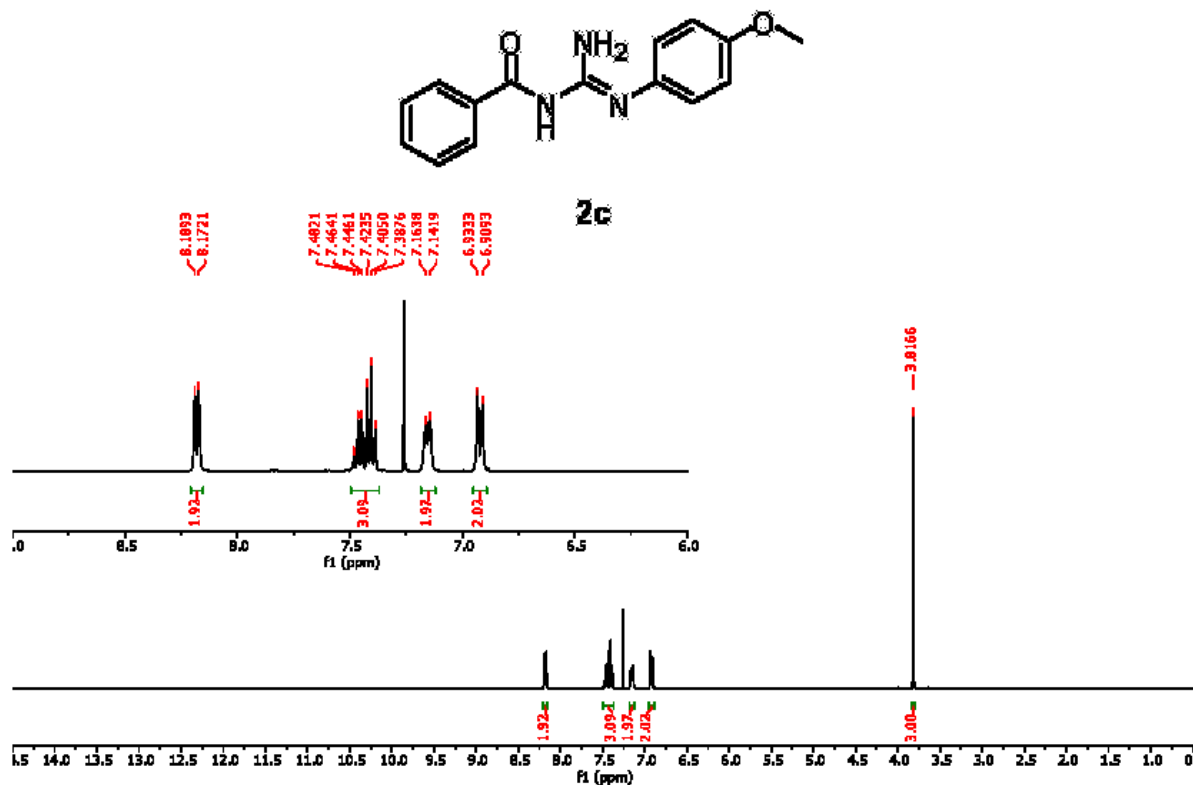
**Figura 24** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **2b** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente DMSO-d<sub>6</sub>).



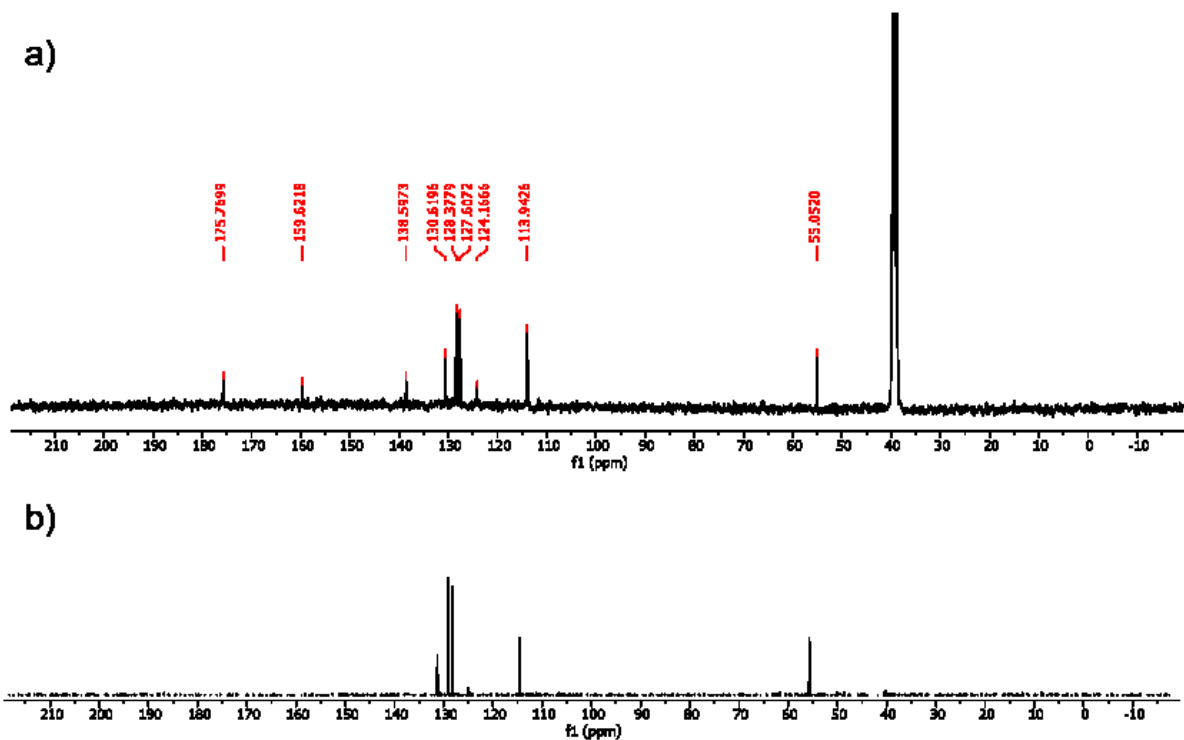
**Figura 25.** a) Espectro de RMN de <sup>13</sup>C e b) DEPT-135 da substância **2b** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO-d<sub>6</sub>).



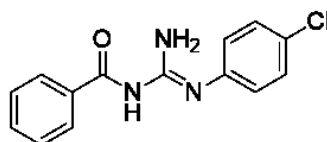
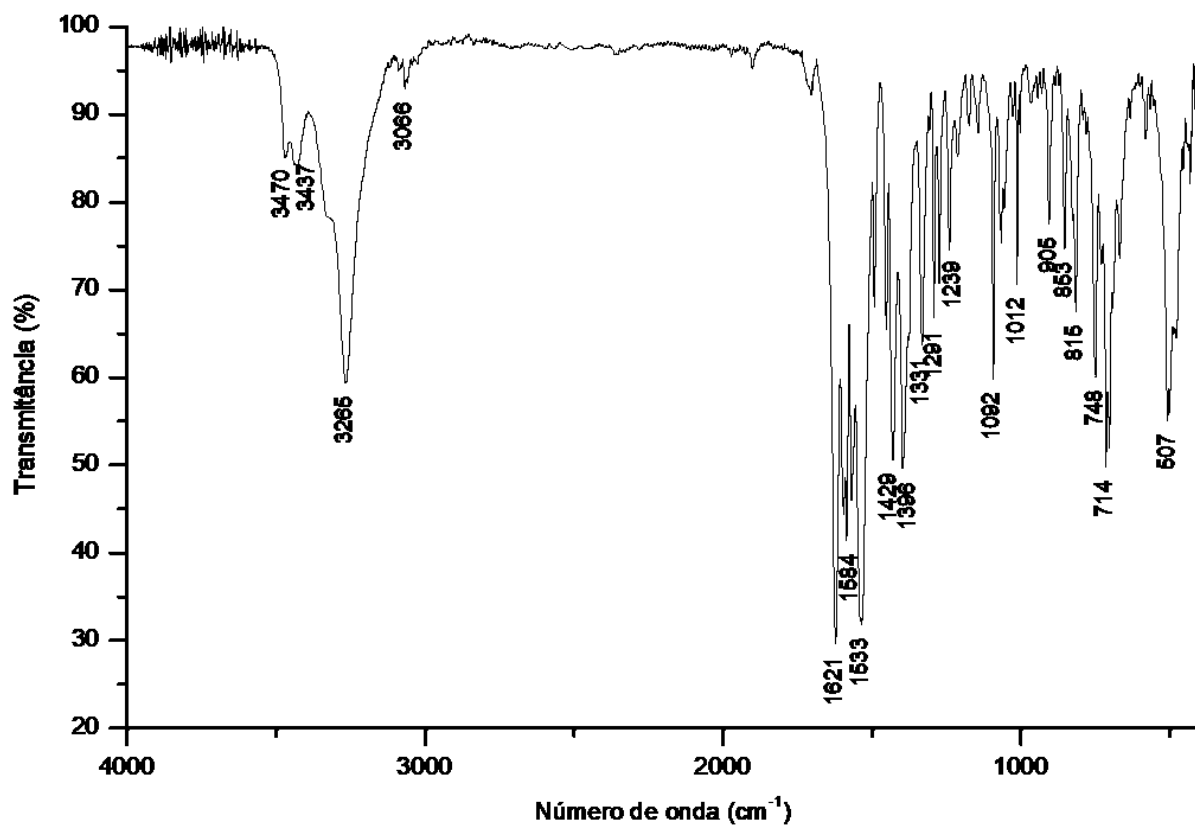
**Figura 26.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2c**.

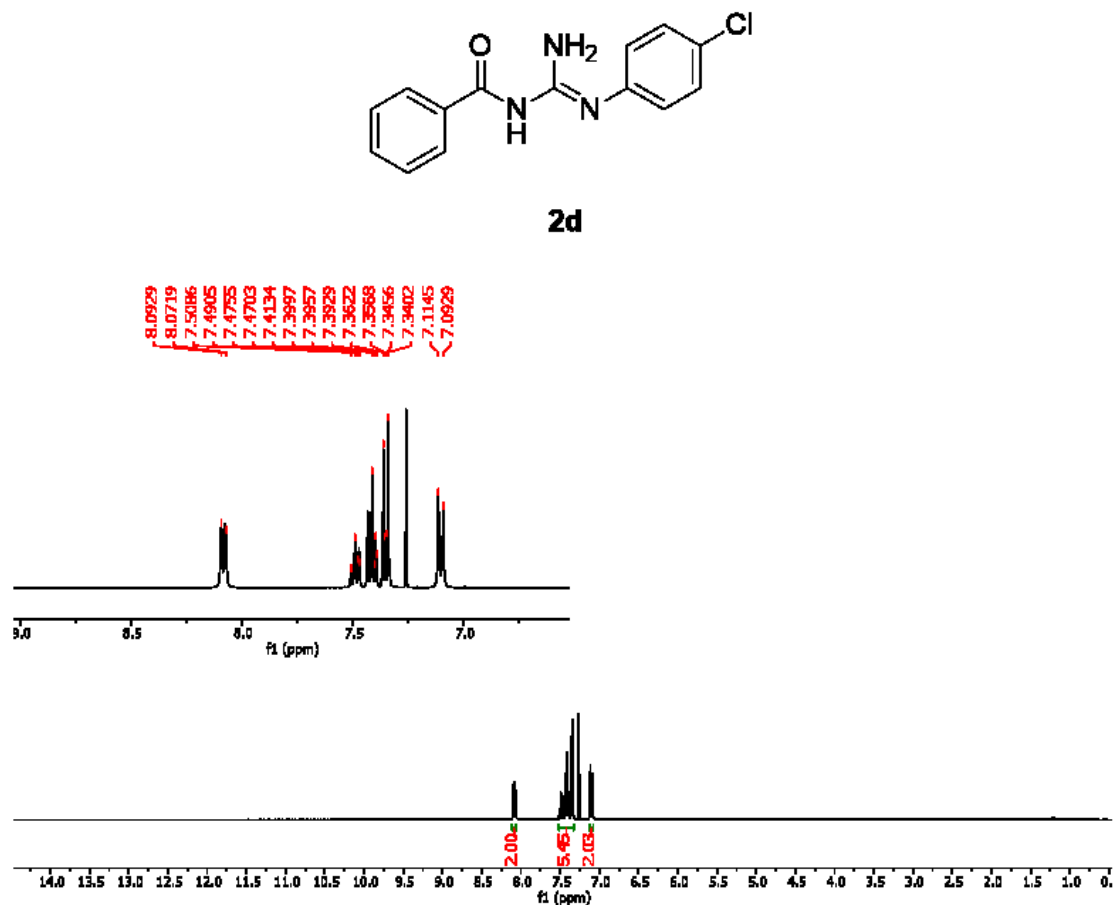


**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2c** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

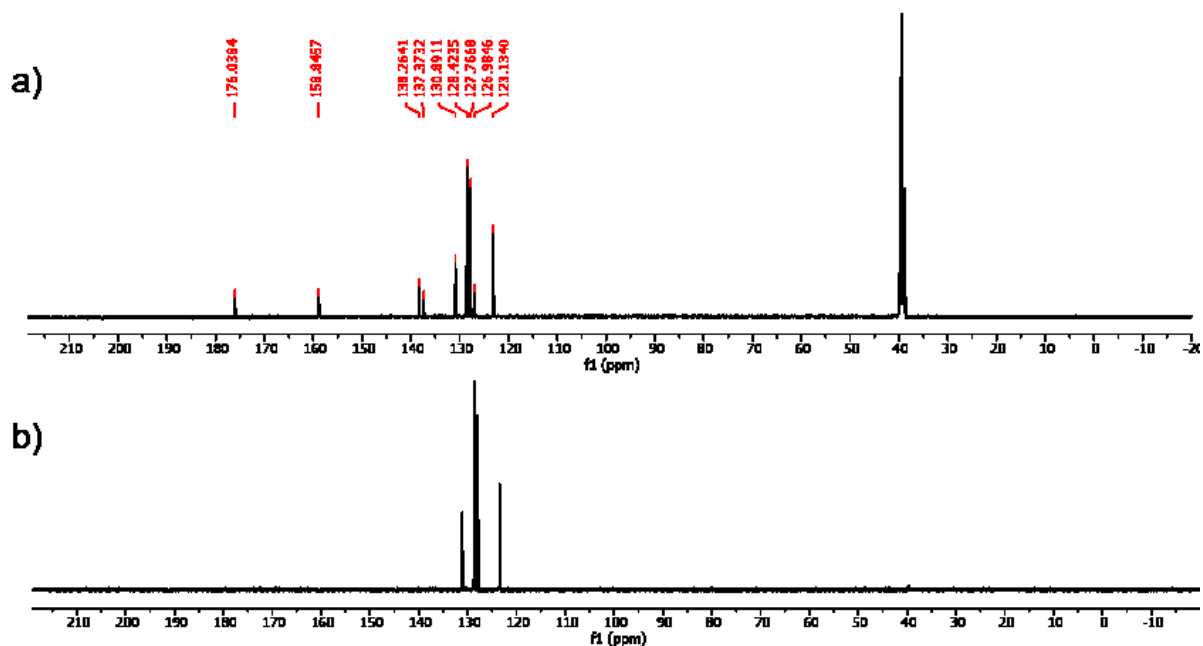


**Figura 28.** a) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e b) DEPT-135 da substância **2c** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).

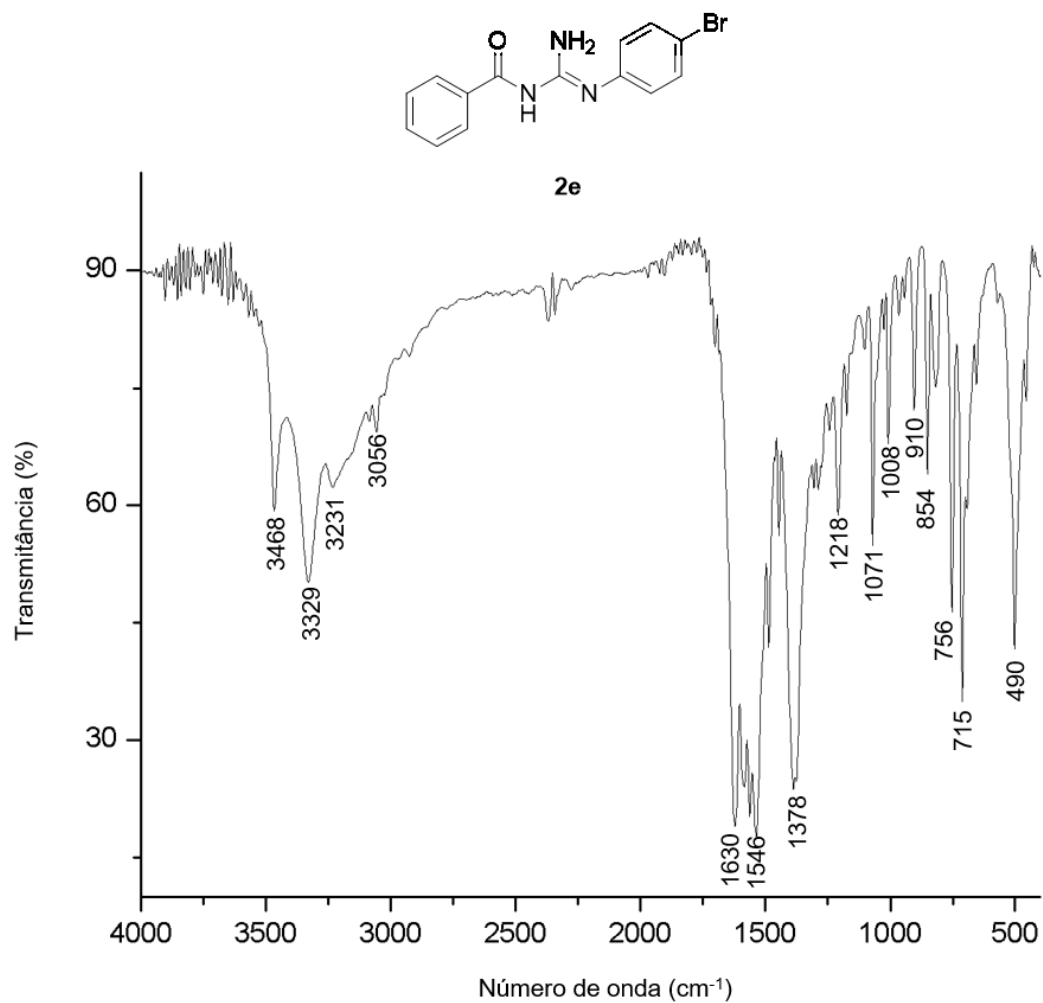
**2d****Figura 29.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2d**.



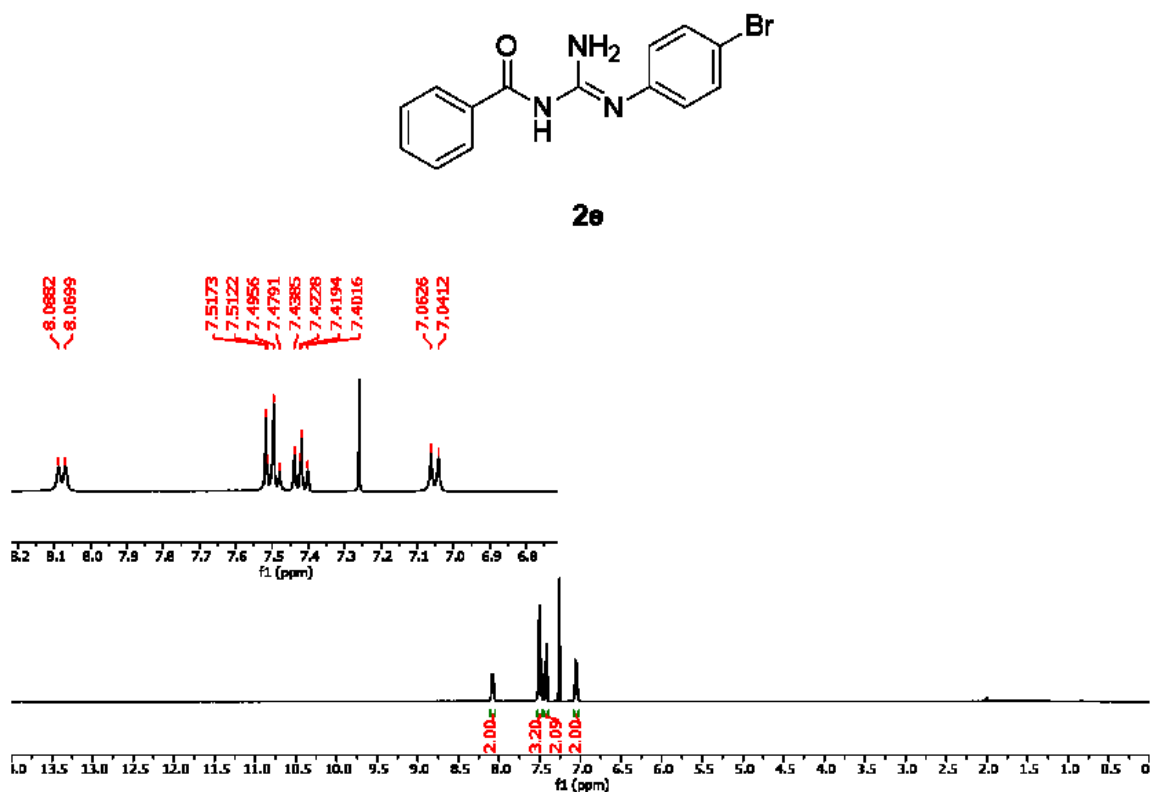
**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2d** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



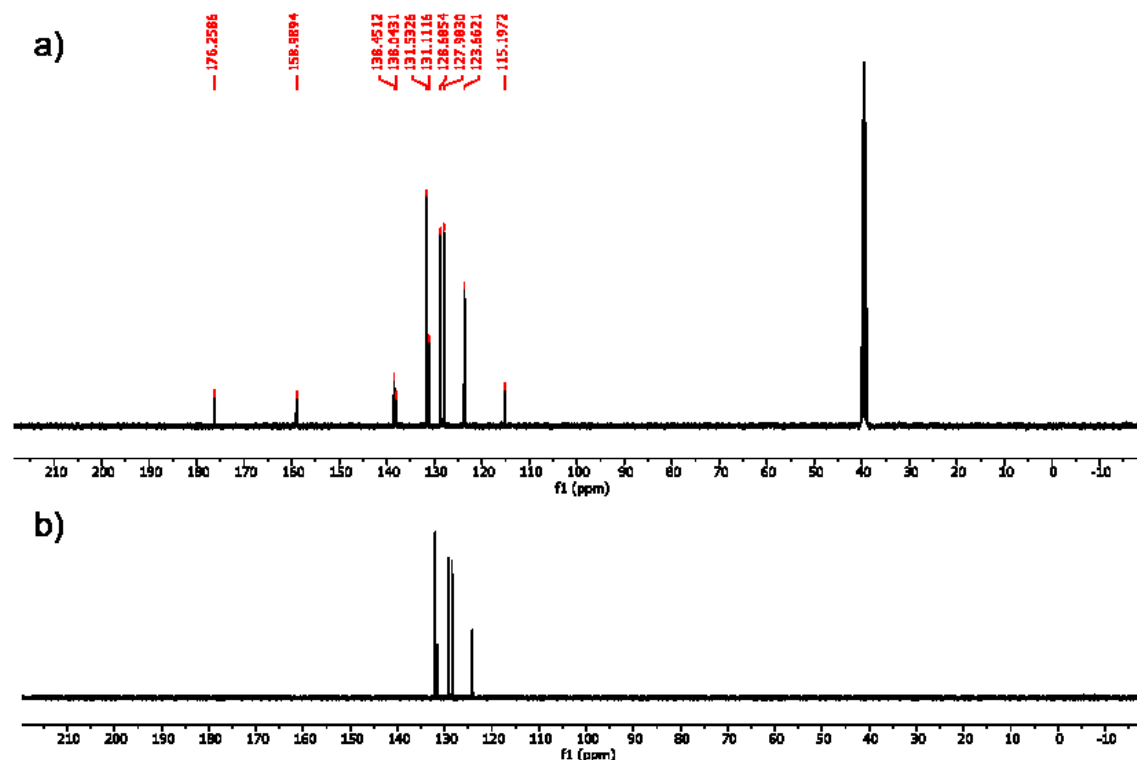
**Figura 31.** a) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e b) DEPT-135 da substância **2d** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).



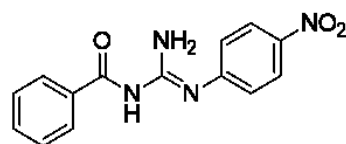
**Figura 32.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2e**.



**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2e** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 34.** a) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e b) DEPT-135 da substância **2e** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO}-d_6$ ).



2f

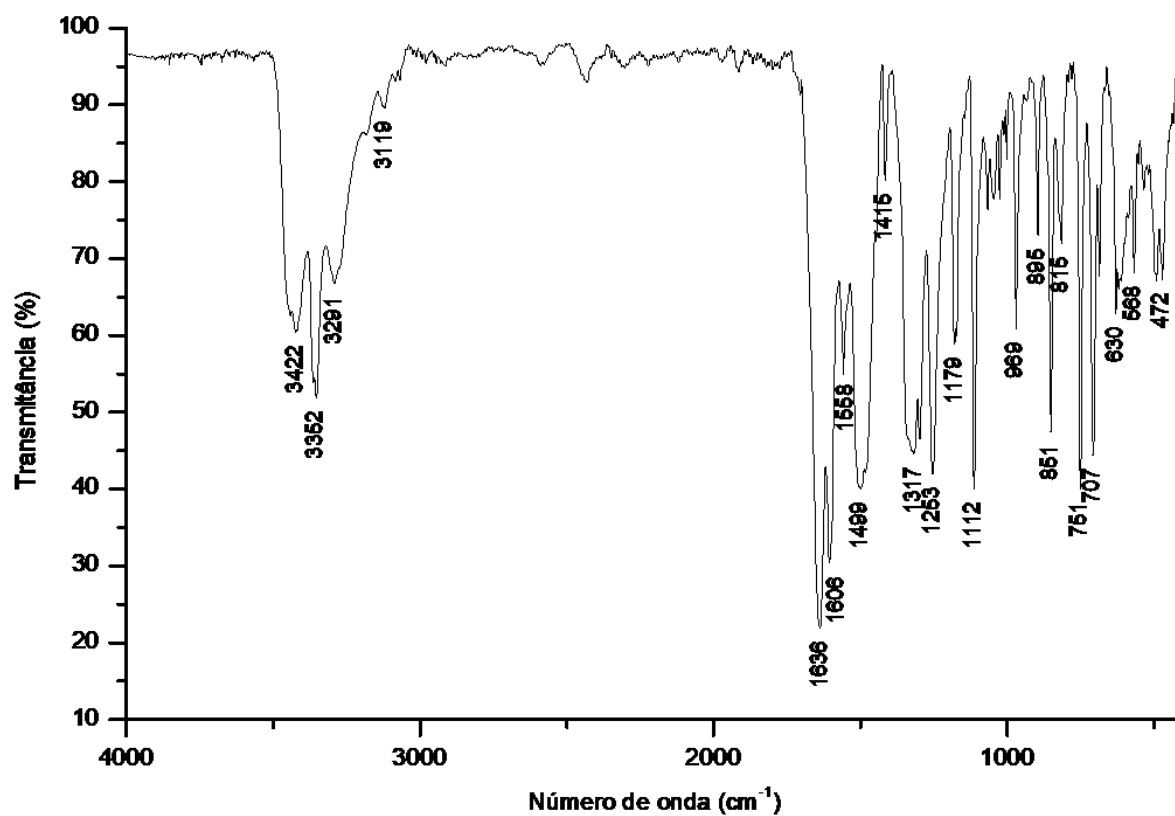
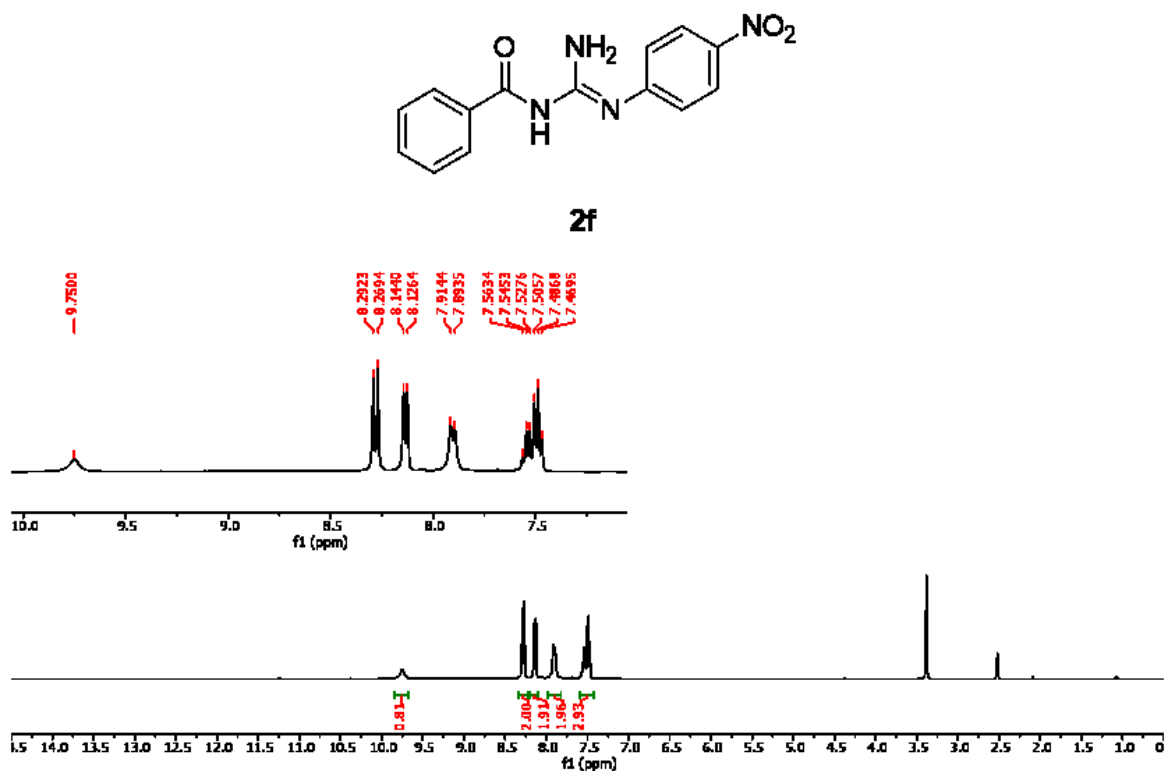
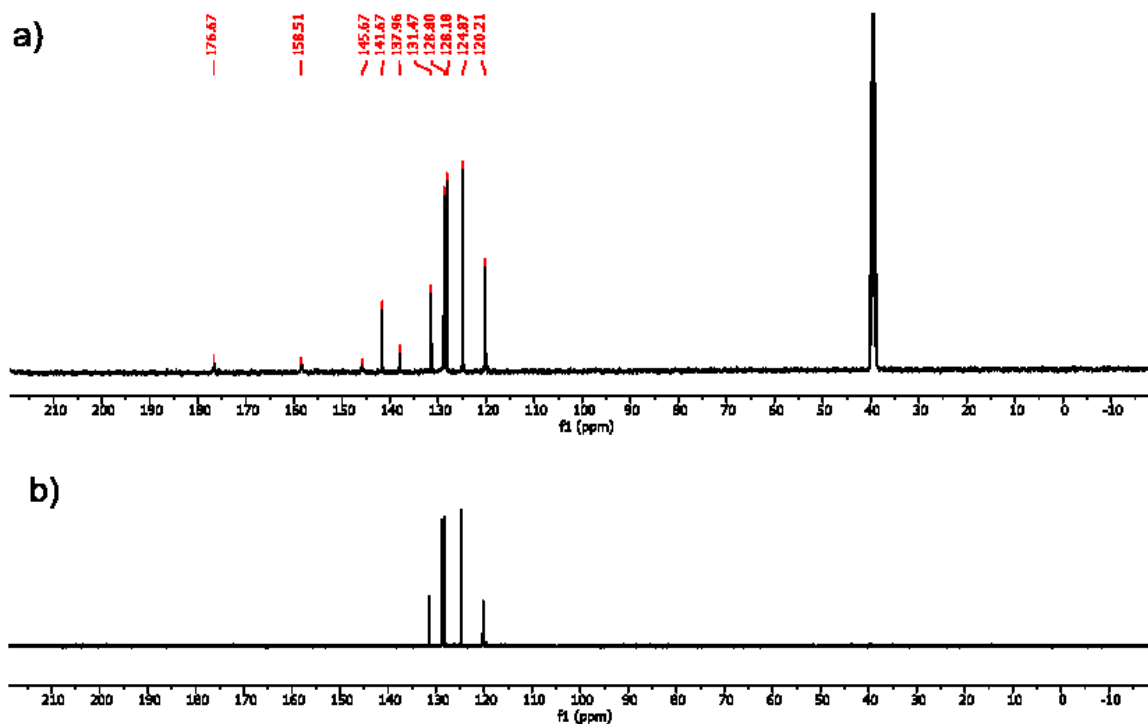


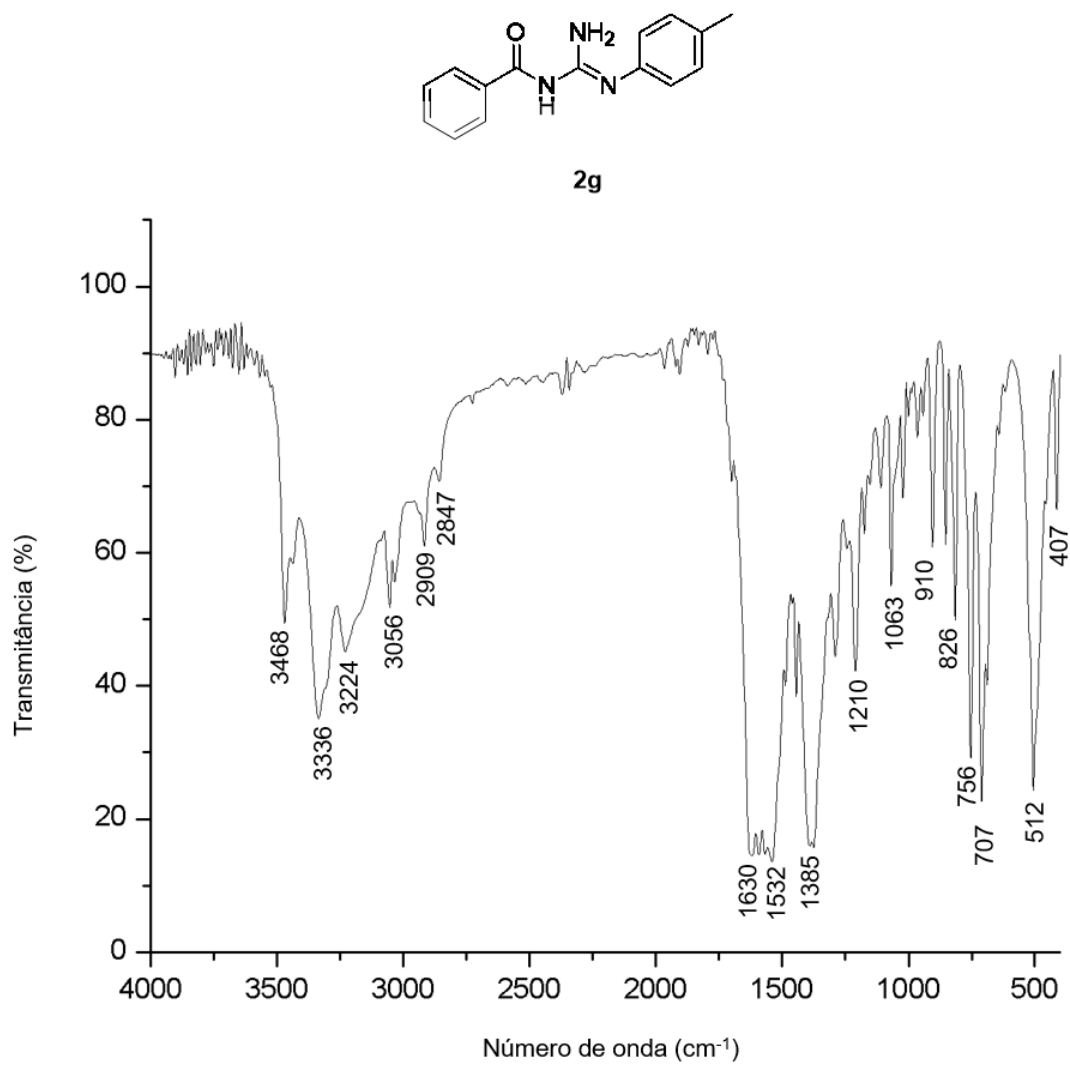
Figura 35. Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto 2f.



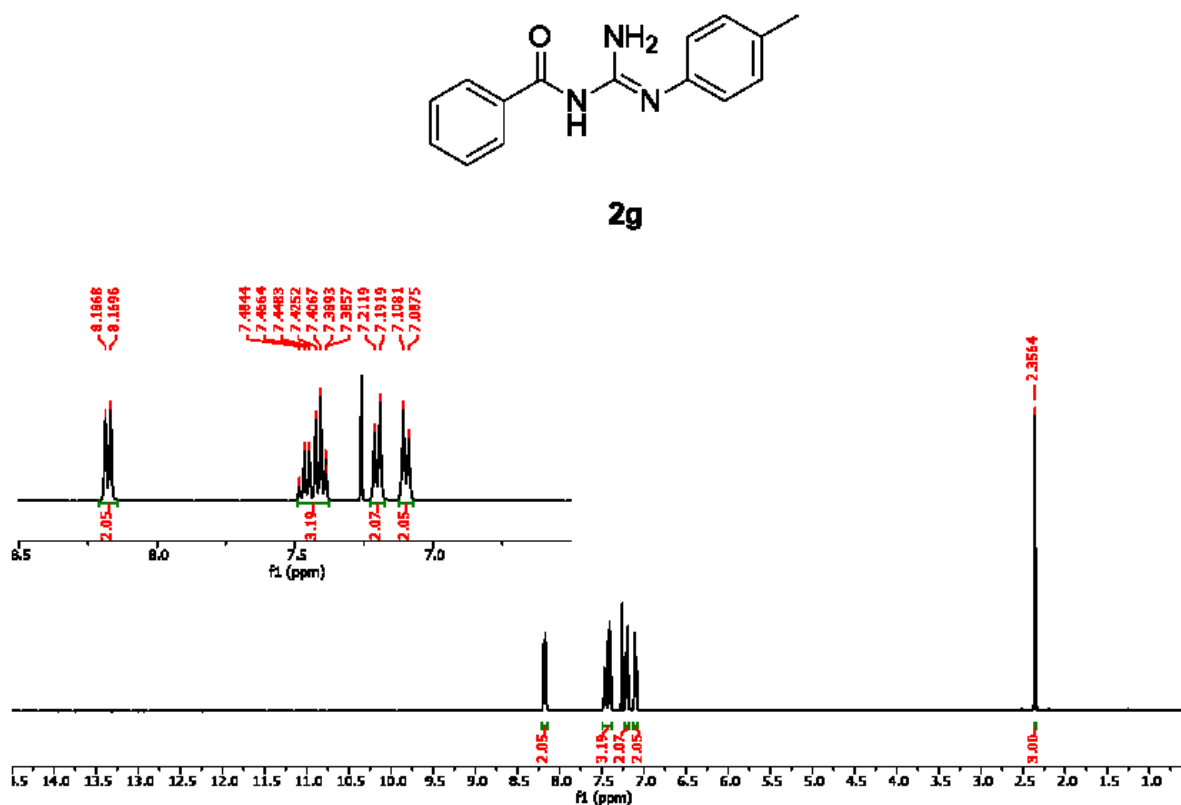
**Figura 36.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **2f** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



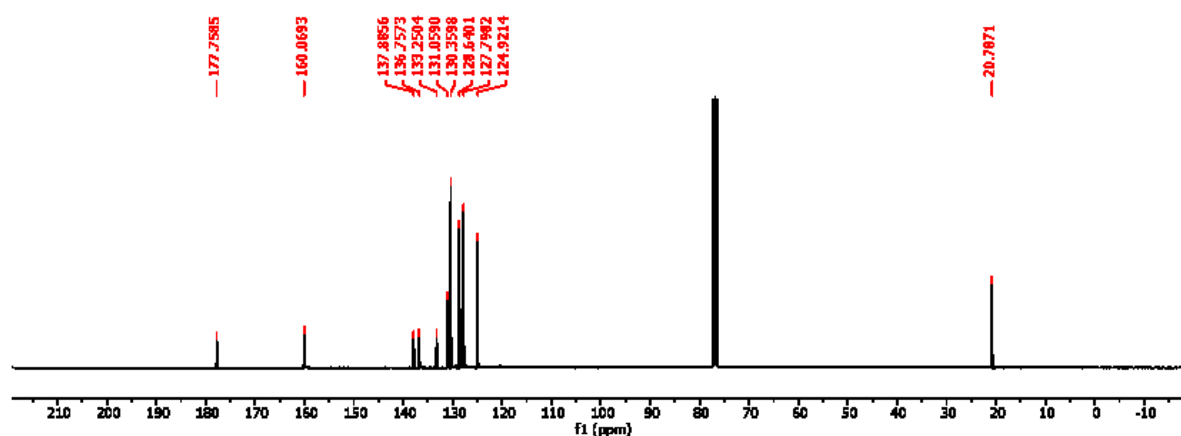
**Figura 37.** a) Espectro de  $^{13}\text{C}$  e b) DEPT-135 da substância **2f** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{DMSO-}d_6$ ).



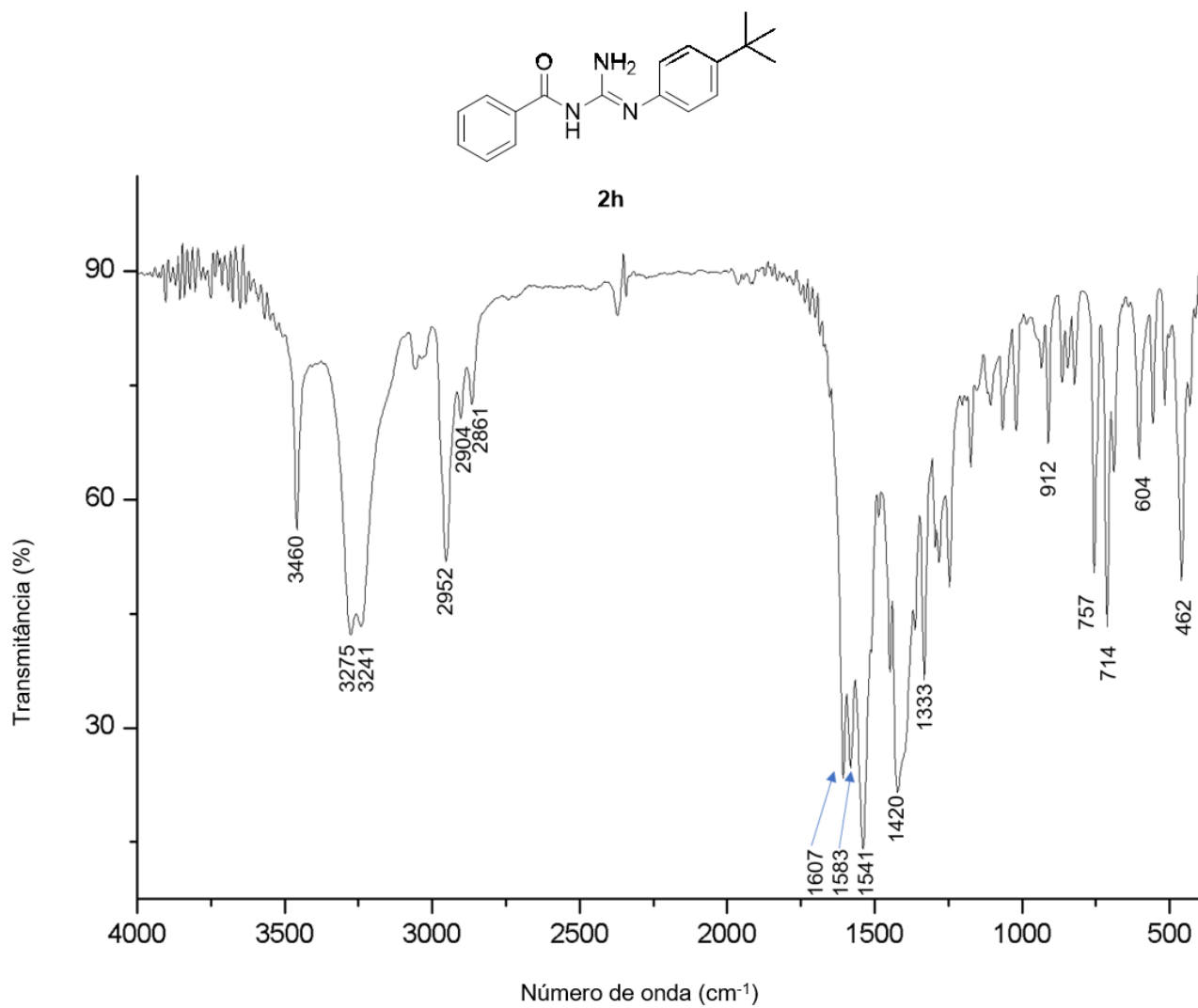
**Figura 38.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2g**.



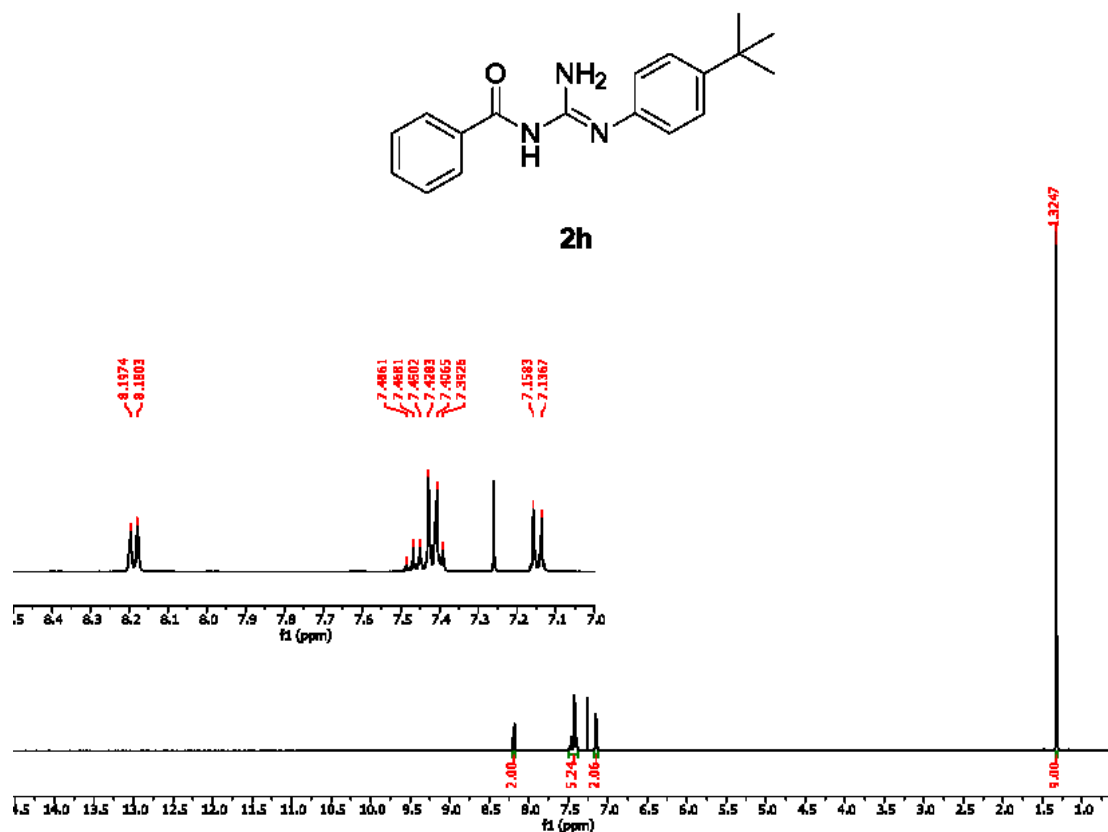
**Figura 39.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da substância **2g** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente CDCl<sub>3</sub>).



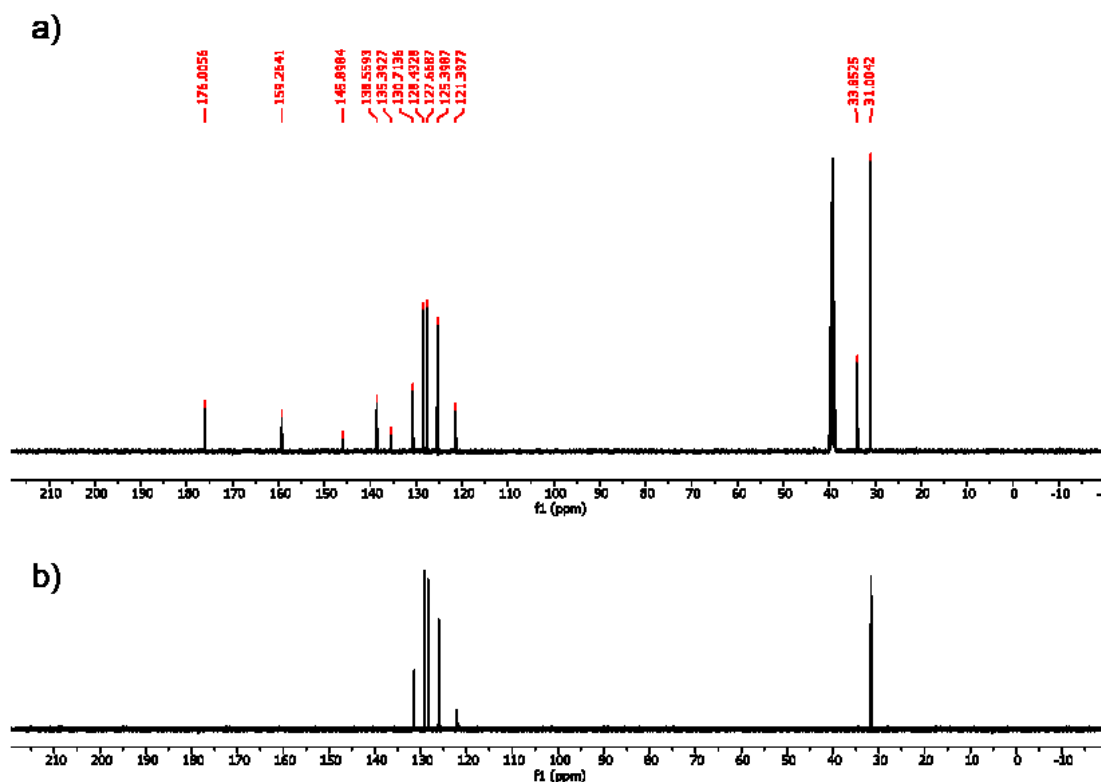
**Figura 40.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da substância **2g** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente CDCl<sub>3</sub>).



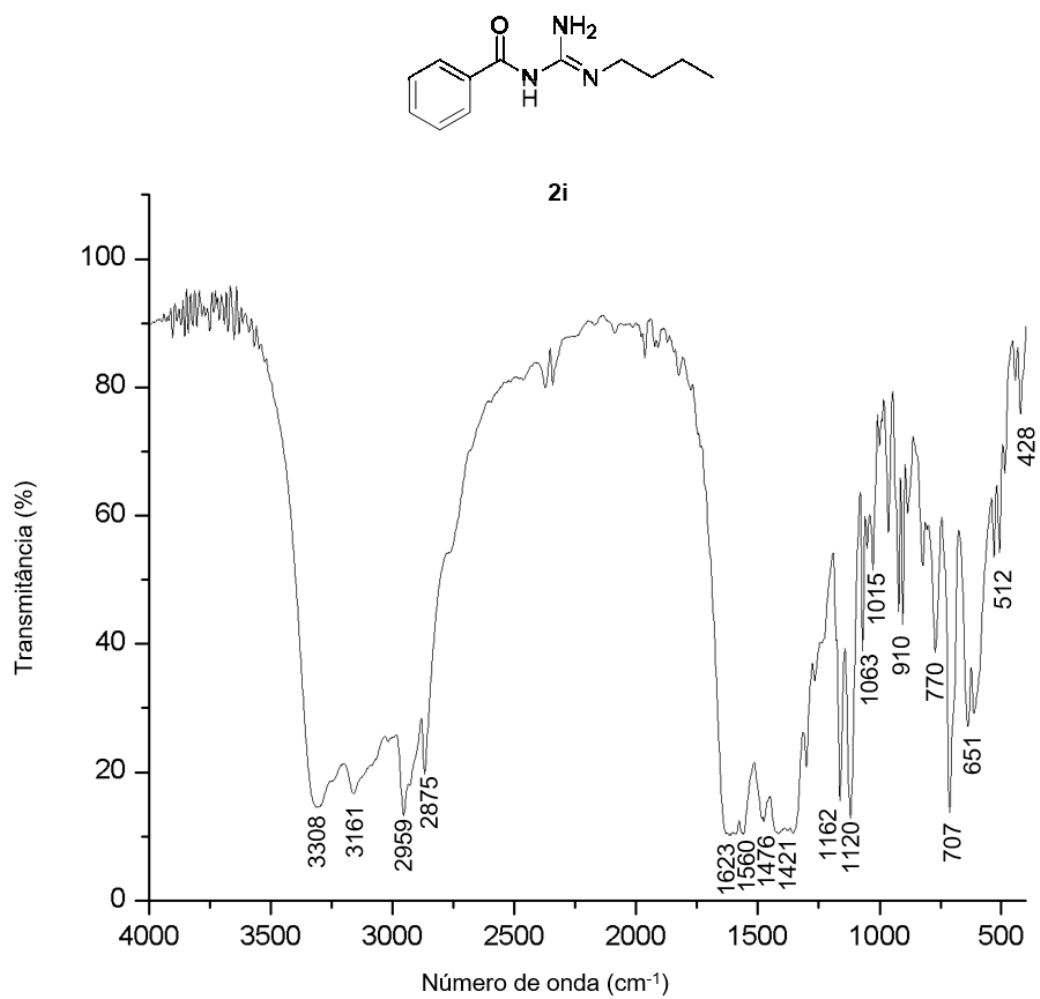
**Figura 41.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2h**.



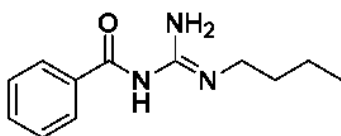
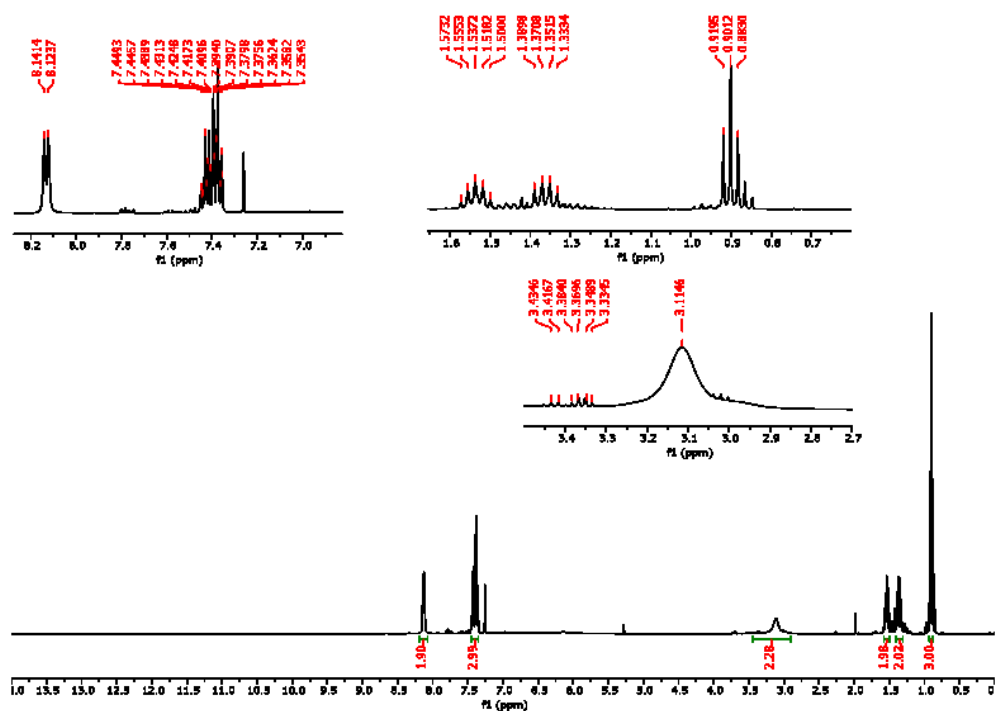
**Figura 42.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto **2h** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente CDCl<sub>3</sub>).



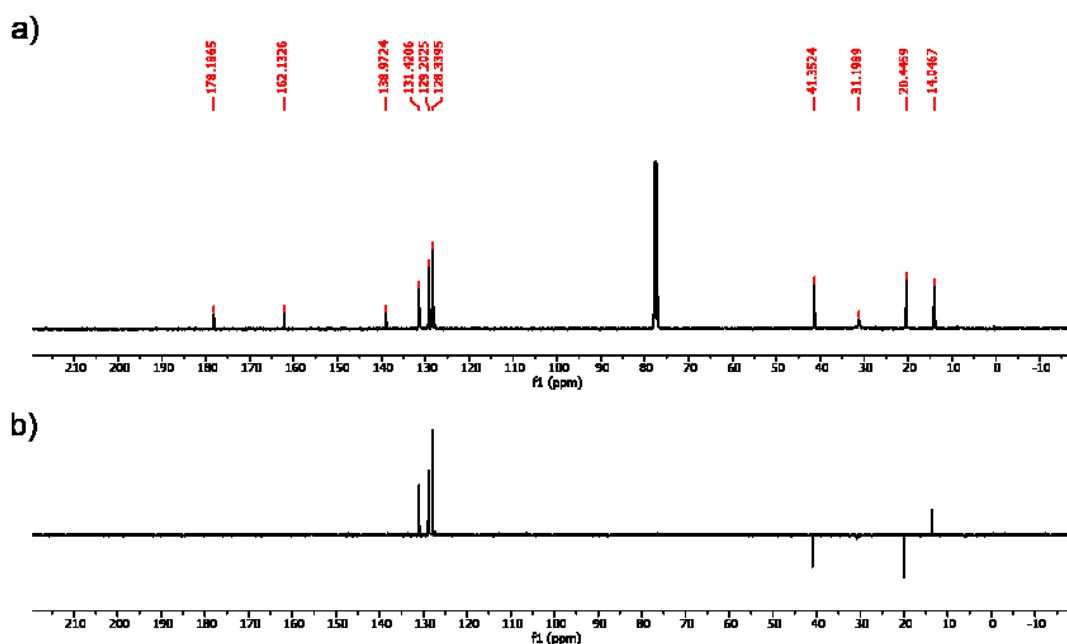
**Figura 43.** a) Espectro de RMN de <sup>13</sup>C e b) DEPT-135 do composto **2h** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente DMSO-*d*<sub>6</sub>).



**Figura 44.** Espectro de infravermelho (pastilha de KBr) do composto **2i**.

**2i**

**Figura 45.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **2i** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 400 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 46.** a) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e b) DEPT-135 do composto **2i** adquirido em espectrômetro Bruker avance III operando a 100 MHz (solvente  $\text{CDCl}_3$ ).

**ANEXOS**

## ANEXO A

Figura 47. Comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 104/2018

Londrina, 28 de Junho de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: “Síntese e avaliação *in vitro* da atividade antileishmania de benzoiltiouréias e benzoilguanidinas.” Protocolo CEUA nº 8685.2018.13, sob a responsabilidade de **Marcelle de Lima Ferreira Bispo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em **26/06/2018**.

O objetivo é avaliar *in vitro* o efeito do tratamento com compostos de benzoilguanidinas e seus precursores sintéticos (benzoiltiouréias) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, bem como sua citotoxicidade em macrófagos peritoneais. GI: 1

Vigência do Projeto	01/07/2018 a 30/05/2020
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico (BALB/c)
Nº de animais	25
Peso/Idade	25 g/ 6 a 12 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério da FIOCRUZ de Curitiba
Amostras a serem coletadas	Células peritoneais

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

*Maria Fernanda R. Graciano*  
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)  
**Prof. (a) Dr. (a) Marcelle de Lima Ferreira Bispo**  
 Responsável pelo projeto  
 Departamento de Química do CCE  
 C/C para a Chefia do CCE  
 C/C para a Direção do CCE