

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS – POSMAT

VITOR PARTITE MOREIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS PARA
ESTUDOS COMO LEISHMANICIDAS FRENTE A *L. amazonensis* E *L. infantum*.
ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA *Lm*CPB2.8ΔCTE COMO UM
POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO.**

PRESIDENTE PRUDENTE

2023

VITOR PARTITE MOREIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS PARA
ESTUDOS COMO LEISHMANICIDAS FRENTE A *L. amazonensis* E *L. infantum*.
ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITORIA DA ENZIMA *Lm*CPB2.8ΔCTE COMO UM
POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração Química dos Materiais, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo René Pérez González.

PRESIDENTE PRUDENTE

2023

M838s Moreira, Vitor Partite

Síntese e caracterização de compostos guanidínicos para estudos como leishmanicidas frente a *L. amazonensis* e *L. infantum*. Estudo da atividade inibitória da enzima LmCPB2.8CTE como um possível mecanismo de ação / Vitor Partite Moreira. -- Bauru, 2023

141 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Eduardo René Pérez González

1. Compostos guanidínicos. 2. Leishmaniose. 3. Inibição enzimática. 4. Estudo conformacional de RMN e Raio-X. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VITOR PARTITE MOREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 27 dias do mês de abril do ano de 2023, às 14:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VITOR PARTITE MOREIRA, intitulada **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS PARA ESTUDOS COMO LEISHMANICIDAS FRENTE A *L. amazonensis* E *L. infantum*. ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ENZIMA LmCPB2.8CTE COMO UM POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO..** A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PÉREZ GONZÁLEZ (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Faculdade de Ciências e Tecnologia - Unesp/Campus de Presidente Prudente, Prof. Dr. EDUARDO MAFFUD CILLI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - Unesp/Câmpus de Araraquara, Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN (Participação Virtual) do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Assinado de forma digital
por EDUARDO R. PÉREZ
GONZÁLEZ
Dados: 2023.05.01
09:22:43 -03'00'

Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PÉREZ GONZÁLEZ

*Dedico este trabalho às famílias que enfrentam ou já enfrentaram a leishmaniose;
Espero sinceramente que este trabalho possa contribuir de alguma forma para
avanços na pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a todos meus protetores por deixar viver este trabalho durante a pandemia.

À minha família por ser tão cuidadosos e se importarem.

Ao meu orientador, Professor Doutor Eduardo René Pérez González pela orientação, amizade e todas as mensagens trocadas visando o melhor do trabalho.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa LQOF, doutoranda Suzane, doutorando Eduardo Zampieri e a mestrand Luana por toda ajuda no laboratório durante esses anos. E não poderia esquecer de mencionar a já mestre Luana Passianoto pela ajuda no começo do meu mestrado. Também, Lays e Marina por algum tempo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli por contribuir ao trabalho tanto na banca de qualificação quanto a banca de defesa. Muito obrigado!

À Prof. Dra. Tatjana Kessen e sua aluna de doutorado Fernanda Silva Almeida da Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) - Paraíba que realizaram uma avaliação na produção de NO com o composto LQOF-G7.

À Prof. Dra. Márcia Graminha e sua aluna Michele Ferreira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, por todos os testes de atividade leishmanicida.

À Prof. Dra. Chung Man Chin pela a contribuição necessária neste trabalho.

Aos técnicos de laboratório: Gabriel, Sidnei e Marcelo, por toda amizade e companheirismo durante este tempo.

Agradeço a Capes pela bolsa concedida e FAPESP pelo financiamento do projeto.

“Muita coisa a gente faz seguindo o caminho
Que o mundo traçou seguindo a cartilha
Que alguém ensinou seguindo a receita
Da vida normal...Mas o que é a vida afinal?”

Diogo Nogueira – Verdade Chinesa

RESUMO

A leishmaniose, uma doença negligenciada globalmente, é ocasionada por parasitas protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Esta doença impacta milhões de pessoas em diferentes regiões do planeta, especialmente em áreas com condições socioeconômicas desfavoráveis e falta de acesso a cuidados de saúde adequado. O tratamento dessa doença grave apresenta um desafio significativo, pois muitos medicamentos disponíveis têm alta toxicidade para o hospedeiro e podem causar efeitos colaterais adversos. Além disso, ao longo do tratamento, existe o risco do surgimento de cepas resistentes, o que dificulta ainda mais a terapia. Com isso, compostos guanidínicos mostraram atividade antileishmanicida frente a *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foram sintetizados um total de quinze compostos, incluindo três tioureias intermediárias e treze guanidinas. Dentre esses compostos, destaca-se a dez compostos inéditos, os quais foram avaliados quanto à atividade leishmanicida. Nesse contexto, é importante ressaltar que dois desses compostos, denominados LQOF-G6 e LQOF-G7 demonstraram potentes e seletivos contra o parasita *L. amazonensis* ($IC_{50\text{AMA}}$: $17 \pm 2.1 \mu\text{M}$ e $7 \pm 0.8 \mu\text{M}$; IS: 65.82 e 88.42), respectivamente. O composto LQOF-G6 apresentou melhor resposta no tratamento de leishmaniose em relação aos outros compostos testados, incluindo a eficácia do tratamento *in vivo*, sendo uma redução de 79,4% a carga parasitária em comparação com o tratamento com Anf B que apresentou uma redução em 60,8%, enquanto o composto LQOF-G7 foi de 66,5%, respectivamente. Além do que, o composto LQOF-G6 mostrou atividade inibitória da cisteína protease *LmCPB2.8ΔCTE* (CPB) com ~73% de inibição e um $IC_{50\text{-CPB}}$ de $6,0 \pm 0.15 \mu\text{M}$, outros três compostos tiveram atividade inibitória, sendo duas guanidinas: LQOF-G32 e LQOF-G36, e um intermediário tioureia: LQOF-T5, sendo 53%, 34% e 9%, respectivamente. Todos os compostos guanidínicos sintetizados e testados foram caracterizadas por RMN com análises de ^{13}C e ^1H , EI-MS, HRESIMS, LC/UV/MS e realizado o ponto de fusão. Desse modo, o composto LQOF-G6 teve sua conformação do isômero Z o que foi demonstrado por estudos de RMN e DRX. Além disso, o composto LQOF-G7 aumentou a produção de nitrito nas células mononucleares do sangue periférico, sugerindo um mecanismo de ação contra *L. infantum* para esse composto ($10,5 \pm 3,58 \mu\text{M}$) em comparação com um grupo controle não tratado ($3,81 \pm 1,36 \mu\text{M}$).

Palavras-chave: Compostos guanidínicos, atividade antileishmania, produção de NO, estudo conformacional de RMN e Raio-X e inibição enzimática da cisteína protease.

ABSTRACT

Leishmaniasis, a globally neglected disease, is caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. This disease impacts millions of people in different regions of the planet, especially in areas with unfavorable socioeconomic conditions and lack of access to adequate health care. Treatment of this severe disease presents a significant challenge, as many available drugs have high toxicity to the host and can cause adverse side effects. In addition, throughout the treatment, there is a risk of the emergence of resistant strains, which makes therapy even more difficult. Thus, guanidine compounds showed antileishmanicidal activity against *L. amazonensis* and *L. infantum*. A total of fifteen compounds were synthesized, including three intermediate thioureas and thirteen guanidines. Among these compounds, ten new compounds stand out, which were evaluated for leishmanicidal activity. In this context, it is important to note that two of these compounds, called LQOF-G6 and LQOF-G7 were potent and selective against the parasite *L. amazonensis*. (IC₅₀AMA: $17 \pm 2.1 \mu\text{M}$ and $7 \pm 0.8 \mu\text{M}$; IS: 65.82 and 88.42), respectively. The compound LQOF-G6 showed better response in the treatment of leishmaniasis compared to the other compounds tested, including the efficacy of *in vivo* treatment, with a 79.4% reduction in parasite load compared to treatment with Anf B, which showed a reduction of 60.8%, while the LQOF-G7 compound was 66.5%, respectively. In addition, the compound LQOF-G6 showed inhibitory activity of cysteine protease LmCPB2.8 Δ CTE (CPB) with ~73% inhibition and an IC₅₀-CPB of $6.0 \pm 0.15 \mu\text{M}$, three other compounds had inhibitory activity, being two guanidines: LQOF-G32 and LQOF-G36, and one thiourea intermediate: LQOF-T5, being 53%, 34% and 9%, respectively. All guanidine compounds synthesized and tested were characterized by NMR with analyses of ¹³C and ¹H, EI-MS, HRESIMS, LC/UV/MS and realized the melting point. Thus, the compound LQOF-G6 had its conformation of the Z isomer, which was demonstrated by NMR and DRX studies. In addition, the compound LQOF-G7 increased nitrite production in peripheral blood mononuclear cells, suggesting a mechanism of action against *L. infantum* for this compound ($10.5 \pm 3.58 \mu\text{M}$) compared to an untreated control group ($3.81 \pm 1.36 \mu\text{M}$).

Key-words: Guanidine compounds, antileishmania activity, NO production, conformational study of NMR and X-ray and enzymatic inhibition of cysteine protease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fármacos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose.....	20
Figura 2. Fármacos de segunda linha utilizados para o tratamento da leishmaniose.....	21
Figura 3. Estrutura química do núcleo guanidínico.....	22
Figura 4. Organização de família e clãs da protease cisteína de <i>L. (L.) major</i>	23
Figura 5. Espectro ^1H de LQOF-G6 a 253 K em CDCl_3	43
Figura 6. Espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de LQOF-G6 a 253 K em CDCl_3	43
Figura 7. Estrutura da molécula LQOF-G6 desenhada com elipsóide de deslocamento de 50%. Segunda molécula independente omitida para maior clareza. A precisão da ligação para ligações carbono-carbono simples é de 0,0032 Å. Uma ligação de hidrogênio intramolecular de caráter moderado. ⁶⁷ estabiliza a estrutura (também válida para a segunda porção independente).....	45
Figura 8. Espectro ^1H - ^{15}N HMBC de LQOF-G6 a 253 K.....	46
Figura 9. ^1H espectro de LQOF-G6 em CDCl_3 em diferentes valores de temperatura (T(K)= 298 (amarelo), 283 (roxo), 273 (verde), 263 (vermelho) e 253 (azul)). (esquerda) Hidrogênio H2. (direita) Hidrogênios H1 e H13.....	47
Figura 10. Polarização cruzada $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Espectros de RMN de estado sólido de LFQO-G6, tempo de contato 3 ms durante a rampa de polarização de 50 a 100%, girado em 12 kHz, SSB - indica banda lateral de rotação, ^{13}C adquirido em 125,695 MHz, ^1H em 499,832 MHz foi desacoplado usando Potência de pulso de 70 kHz com sequência espinhal 64.....	48
Figura 11. Espectro ^1H de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.....	49
Figura 12. Espectro região aromática ^1H de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.....	49
Figura 13. Espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.....	50
Figura 14. Espectro da região aromática $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.	51
Figura 15. Compostos guanidínicos com átomo de bromo na posição “para” do anel.....	53
Figura 16. Compostos guanidínicos com grupos apolares.....	53
Figura 17. Fotos representativas das medidas semanais da lesão na orelha direita de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> nos dias 1, 7 e 15 de tratamento por via intraperitoneal com PBS, Anf B e composto LQOF-G6 e LQOF-G7.....	56
Figura 18. Medidas realizadas do diâmetro das lesões em orelhas tratadas com PBS, Anf B e composto LQOF-G6 e LQOF-G7. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-	

infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias do diâmetro ($D \times d$; D: diâmetro maior, d: diâmetro menor) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativo entre os animais tratados com LQOF-G6 e PBS ($p < 0.01$)..... 57

Figura 19. Medidas realizadas da espessura das lesões em orelhas dos animais tratados com PBS, Anf B e compostos LQOF-G6 e LQOF-G7. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias da espessura (mm) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativo entre os animais tratados com PBS ($p < 0.05$).....57

Figura 20. Medidas realizadas do volume das lesões em orelhas dos animais tratados com PBS, Anf B e compostos LQOF-G6 e LQOF-G7. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias do volume ($v = D \times d \times e$; D: diâmetro maior, d: diâmetro menor, e: espessura) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativo entre os animais tratados com PBS ($p < 0.01$).....58

Figura 21. Quantificação da carga parasitária de lesões cutâneas na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* utilizando o índice LDU. Os dados estão expressos como média $\pm$ DP de animais infectados e tratados durante 15 dias distintos por grupos, sendo eles: tratados com PBS, Anf B (2 mg/kg/dia), LQOF-G6 (2 mg/kg/dia) e LQOF-G7 (2 mg/kg/dia). *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais tratados com PBS em relação aos tratados com Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7 ($p < 0.001$).....59

Figura 22. Níveis de ALT (A) e níveis de AST (B) em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratado com PBS e doses iguais de 2 mg/kg/dia de Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7, durante 15 dias. Fonte: Os dados dos níveis estão expressos como média $\pm$ DP. *Diferença estatisticamente significativa com os animais não infectados (animais saudáveis) ($p < 0,05$).....60

Figura 23. Níveis de ALP (C) e níveis de Bilirrubina (D) em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratado com PBS e doses iguais de 2 mg/kg/dia de Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7, durante 15 dias. Os dados dos níveis estão expressos como média $\pm$ DP. *Diferença estatisticamente significativa com os animais não infectados (animais saudáveis) ($p < 0,05$).....61

- Figura 24.** Níveis de Creatinina (E) e níveis de Ureia (F) em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratado com PBS e doses iguais de 2 mg/kg/dia de Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7, durante 15 dias. Os dados dos níveis estão expressos como média $\pm$ DP. *Diferença estatisticamente significativa com os animais não infectados (animais saudáveis) ($p < 0,05$).....63
- Figura 25.** Gráfico de Lineweaver-Burk recíproco duplo mostrando a relação entre o recíproco da atividade da enzima ($1/V_0$) e o recíproco da concentração do substrato ($1/[S]$). A interceptação do gráfico com a abcissa dá o recíproco da constante de Michaelis-Menten ($1/K_m$) na ausência (w/o) e na presença de 3, 6 e 10 μ M de LQOF-G6.....63
- Figura 26.** Colunas medindo os níveis de nitrito (μ M) produzidos por monócitos infectados com *L. infantum* tratados com LQOF-G7 e controles. As colunas correspondem à condição com infecção e à condição sem infecção. * $P < 0,05$. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão. A ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey foi realizada para comparar os grupos com o controle. Fonte: Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB)/Paraíba.....64
- Figura 27.** Um verde intermolecular destacou ligação de hidrogênio de caráter moderado⁶⁵ prolongado na direção do eixo e influencia o empacotamento de LQOF-G6. A segunda porção constrói ligações de hidrogênio no eixo uma direção também. Gráfico visualizado sem a segunda porção independente para maior clareza.....101
- Figura 28.** Região alifática do espectro editado por ^1H - ^{13}C HSQC de LQOF-G6 a 253K em CDCl_3102
- Figura 29.** Espectro HSQC da região aromática ^1H - ^{13}C de LQOF-G6 a 253K em CDCl_3103
- Figura 30.** Espectro HMBC da região aromática ^1H - ^{13}C de LQOF-G6 a 253K em CDCl_3 (os números azuis indicam ^1H e os números vermelhos indicam ^{13}C).....103
- Figura 31.** Algumas das interações HMBC mais representativas de LQOF-G6.....105

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese da tioureia. Reagentes e condições: (A) Acetonitrila, 85°C, 1 h; (B) Acetonitrila 85°C, 2 h.....	25
Esquema 2. Síntese das guanidinas. Reagentes e condições: C. DMF, Bi(NO ₃) ₃ ·5H ₂ O, Et ₃ N, 120°C, 24 h.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Reagentes utilizados para a síntese de tioureia.....	26
Tabela 2. Reagentes utilizados para a síntese de guanidinas.....	27
Tabela 3. Parâmetros experimentais e CCDC-Code.....	31
Tabela 4. Valores de deslocamento químico de ^1H (δ ppm) do composto LQOF-G6 em CDCl_3 a 253 K.....	44
Tabela 5. Valores de deslocamento químico de ^{13}C (δ ppm) do composto LQOF-G6 em CDCl_3 a 253 K.....	44
Tabela 6. Valores de deslocamento químico de ^1H (δ ppm) do composto LQOF-G6 em CDCl_3 a 298 K. Fonte: Autoria própria.....	50
Tabela 7. Valores de deslocamento químico de ^{13}C (δ ppm) do composto LQOF-G32 em CDCl_3 a 298 K. Fonte: Autoria própria.....	51
Tabela 8. Resultados da atividade citotóxica em macrófagos muirnos CC_{50} , leishmanicida de compostos guanidínicos em promastigotas ($\text{IC}_{50\text{PRO}}$) e amastigotas ($\text{IC}_{50\text{AMA}}$) de <i>L. amazonensis</i> . Os valores estão apresentados, respectivamente, como média e $\pm$ desvio padrão.....	54
Tabela 9. Dados de cristal, parâmetros de coleta de dados e refinamento de estrutura.....	101

LISTA DE ABREVIACÕES

RMN: Ressonância magnética nuclear.

EI-MS: Espectrometria de massas por impacto de elétrons.

HRESIMS: Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por eletrospray.

ESI-MS: Espectrometria de massas com ionização por eletrospray.

UV-Vis: Espectrometria no ultravioleta visível.

PF: Ponto de fusão.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde.

LC: Leishmaniose cutânea.

LV: Leishmaniose visceral.

LCM: Leishmaniose mucocutânea.

CPs: Cisteína proteases.

INF- γ : Interferon-gama.

iNOS: Óxido nítrico sintetase.

IL12: Interleucina 12.

IL4: Interleucina 4.

IL5: Interleucina 5.

IL10: Interleucina 10.

ppm: parte por milhão.

$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: Nitrato de bismuto pentahidratado.

MgSO_4 : Sulfato de magnésio.

DMF: Dimetilformamida.

CDCl_3 : Clorofórmio deuterado.

IC_{50} : Metade da concentração inibitória máxima.

CC_{50} : Concentração citotóxica para 50% da amostra.

IS: Índice de seletividade.

Anf B: Anfotericina B.

HMBC: Heteronuclear multiple bond correlation.

HSQC: Heteronuclear single quantum coherence.

NOESY: Nuclear overhauser effect spectroscopy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Leishmaniose	18
1.2. Tratamento	19
1.3. Guanidina	21
1.4. Cisteíno Proteases (CPs).....	22
2. OBJETIVOS	24
2.2. Objetivo geral.....	24
2.1. Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1. Procedimento de Síntese.....	25
3.1.1. Síntese das tioureias.....	25
3.1.2. Síntese das guanidinas	26
3.2. Técnicas analíticas.....	29
3.2.1. Análise de ponto de fusão	30
3.2.2. Análises por EI-MS (Introdução Direta).....	30
3.2.3. Análise espectrometria de massas com ionização por eletrospray (HRESIMS) 30	
3.2.4. Análises Ressonância Magnética Nuclear (RMN).	31
3.2.5. Estudo de raios-X do cristal LQOF-G6	31
3.3. Estudo da atividade biológica.....	31
3.3.1. Cultivo da <i>Leishmania</i>	31
3.3.1.1. Condição e cultivo de <i>L. amazonensis</i>	31
3.3.1.2. Condição e cultivo de <i>L. infantum</i> para estudos da LQOF-G7.....	32
3.3.2. Atividade anti-promastigota de compostos guanidínicos	32
3.3.3. Avaliação da citotoxicidade dos compostos guanidínicos em macrófagos peritoneais murinos	33
3.3.4. Avaliação da Atividade anti-amastigota de compostos guanidínicos	34
3.3.5. Avaliação da eficácia <i>in vivo</i> e segurança em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> tratados com compostos guanidínicos LQOF-G6 e LQOF-G7	35

3.4. Testes biomarcadores <i>in vivo</i>	36
3.4.1. Determinação da concentração de creatinina	37
3.4.2. Determinação da concentração de alanina aminotransferase (ALT).....	37
3.4.3. Determinação da concentração de fosfatase alcalina (ALP).....	37
3.4.4. Determinação da concentração de ureia.....	38
3.4.5. Determinação da concentração de aspartato aminotransferase (AST).....	38
3.4.6. Determinação da concentração de bilirrubina total.....	38
3.4.7. Atividade inibitória na enzima LmCPB2.8 Δ CTE (CPB).....	38
3.5. Preparação de células mononucleares do sangue periférico e ensaio de infecção com <i>L. infantum</i>	39
3.5.1. Ensaio de Nitrito.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Caracterização RMN – LQOF-G6.....	42
4.2. Análise Conformacional LQOF-G6	44
4.3. RMN de estado sólido – LQOF-G6.....	47
4.4 Caracterização RMN – LQOF-G32.....	49
4.5. Resultados da atividade citotóxica e leishmanicida de compostos guanidínicos em promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	52
4.6. Avaliação da progressão do tratamento em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> utilizando os compostos LQOF-G6 e LQOF-G7	55
4.7. Avaliação de biomarcadores de função renal e lesão hepática para a determinação se LQOF-G6 e LQOF-G7 levam a efeitos tóxicos.....	59
4.8. Atividade inibitória da enzima LmCPB2.8 Δ CTE de compostos guanidínicos	62
4.9. Ação da LQOF-G7 na produção de NO por células mononucleares	63
5. CONCLUSÃO.....	66
6. REFERÊNCIAS.....	67
7. APÊNDICE.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

As leishmanioses pertencem ao grupo de doenças tropicais negligenciadas, representando um grave problema de saúde mundial.¹ O parasita responsável pertence à família Trypanosomatidae, espécie de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. São divididos em dois subgêneros distintos: *Leishmania* e *Vianna*. Esses parasitas são transmitidos ao hospedeiro humano e outras espécies de mamíferos pelo repasto sanguíneo do vetor flebotomíneo fêmea infectado.²⁻³

As principais formas das leishmanioses são classificadas em: leishmaniose visceral (LV), doença infecciosa, que agrava órgãos, como o baço, medula óssea e o fígado, podendo ser fatal quando não tratada;⁴ leishmaniose cutânea (LC), sendo a forma mais comum da doença que resulta em lesões ulceradas;² e a leishmaniose mucocutânea (LCM), atingindo as mucosas da boca, nariz e garganta.⁵

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* afetam mais de 1 bilhão de humanos, que estão localizados em áreas endêmicas para leishmaniose, tais espécies podem ser encontradas em áreas tropicais e subtropicais, incluindo África, Oriente Médio, Sudeste Asiático, Sudeste Europeu, América Central e do Sul.¹

Na região das Américas, a leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 13 países, sendo que em 2020 no Brasil foram notificados cerca de 97% (1.933) dos casos, com uma incidência de três casos por 100.000 habitantes, com o foco nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte do Sudeste, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).⁶ Em relação aos casos de leishmaniose cutânea (LC), em 2020 foram notificados mais de 16 mil casos, sendo o Brasil o país com maior incidência na região das Américas. Vale recuperar que há 20 anos foram registrados 1.067.759 casos de leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC), com média de 53.387 por ano.⁶

As espécies do gênero *Leishmania* alternam sob dois estágios evolutivos principais: o estágio evolutivo promastigota, de característica extracelular, móvel e flagelada, representando o vetor infectado, permanecendo de 4 a 25 dias no intestino do díptero, família *Psychodidae*, fêmea hematófaga que pertencem aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*,^{3,7} seguido do seu

estágio evolutivo amastigota, parasita intracelular, imóvel, e são encontradas nas células fagocíticas do hospedeiro vertebrado.

Durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo ao hospedeiro humano, é transmitida o parasita leishmaniose na forma promastigota, iniciando o processo de internalização via fagacitose, em que ocorre a multiplicação para a transformação na forma amastigota, até que rompem a membrana do macrófago, onde podem ser ingeridos por flebotomíneo dando continuidade no ciclo ou invadir novas células de macrófagos.^{2,8}

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam três tipos famílias de CPs: CPA, CPB e CPC (Figura 4) que participam do mecanismo de sobrevivência. A CPB que é um dos mecanismos em estudo neste trabalho, é um fator de virulência do parasita contribuindo para a permanência da *Leishmania* no interior dos macrófagos.³⁴

As células CD4⁺ são células efectoras fundamentais na resposta imune frente *Leishmania*.⁷⁵ As células se dividem em ao menos duas subpopulações de linfócitos T auxiliares, de acordo com o padrão de citocinas secretadas: T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2).

Os macrófagos respondem às células T *helper* 1 (Th1), que auxiliam na eliminação dos parasitas, induzindo citocinas do tipo IL-12 e IFN- γ na infecção intracelular⁶⁹ quando apresenta imunidade protetora adquirida contra forma amastigota da *Leishmania*⁹, por outro lado, os macrófagos, quando ativados pelas citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, entre outras, das células T *helper* 2 (Th2)⁷⁰, auxiliam a sobrevivência da *Leishmania* nas células do hospedeiro.⁸

O controle do crescimento parasitário é considerado uma relação das células do sistema imune de interação com o desenvolvimento de formas clínicas.⁷⁶ Deste modo, a resposta imune para o controle da carga parasitária dependeria da ativação de linfócitos CD4⁺ de Th1, levando à ativação dos macrófagos através da expressão da enzima NOS-2 e a consequente produção de NO.⁷⁶ A partir do aminoácido L-arginina, a enzima celular: óxido nítrico sintase do tipo 2 (NOS2) catalisa a síntese de óxido nítrico.⁷⁷

1.2 Tratamento

Atualmente não há vacinas disponíveis em humanos que sejam eficazes contra as formas do parasita da *Leishmania*, além disso, há pouca disponibilidade de fármacos para o tratamento desta doença, sendo a quimioterapia o tratamento mais eficaz para a doença.⁶⁸ Os fármacos disponíveis utilizados como primeiro tratamento das leishmanioses são dois complexos de antimoniais pentavalentes: antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio

(Figura 1), na busca de reduzir efeitos secundários, podendo ser aplicados via intramuscular ou intravenosa.¹⁰

Esses fármacos de primeira linha apresentam toxicidade e, conseqüentemente, efeitos colaterais – como os sintomas de pancreatite,¹¹ insuficiência renal,¹² além de longos períodos de tratamento, com isso, a doença passa a ser tratada com fármacos de segunda linha, tais quais o antibiótico anfotericina B lipossomal (polieno macrolídeo), miltefosina (quimicamente conhecida como hexadecilfosfocolina), paramomicina (antibiótico aminoglicosídeo), pentamidina (diamidina aromática).¹⁰ (Figura 1)

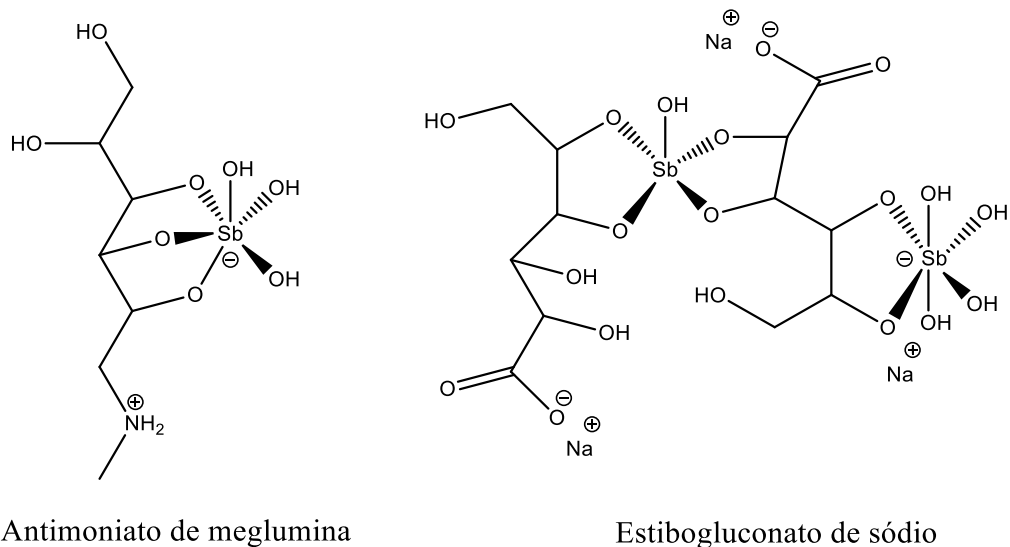


Figura 1. Fármacos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose.

Os fármacos de segunda linha (Figura 2) também exibem toxicidade e efeitos colaterais graves, no caso da Miltefosina, podem ser incluídos: hepatotoxicidade, toxicidade renal e distúrbio gastrointestinais¹⁰. No entanto, a longa duração do tratamento quimioterápico torna-se insuficiente¹³, sendo necessário o desenvolvimento de medicamentos menos tóxicos e métodos de tratamento mais efetivos.

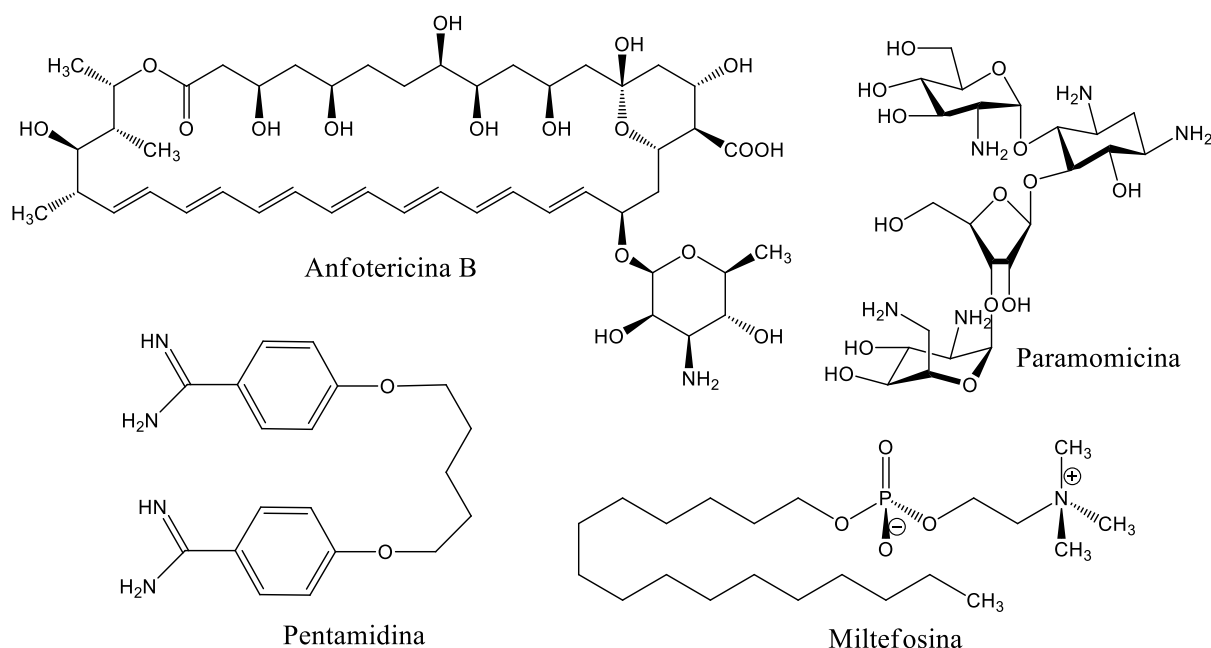


Figura 2. Fármacos de segunda linha utilizados para o tratamento da leishmaniose. Fonte: Adaptado de SANGSHETTI, JAIPRAKASH, N. et al, (2015).¹⁰

Além das deficiências graves como toxicidade, a administração prolongada dos fármacos de segunda linha pode corroborar com o surgimento de resistência por parte do parasito.¹⁰ Por exemplo, o tratamento com Miltefosina, está comprometida devido a progressão no aumento das taxas de falha terapêutica como o surgimento de resistência do parasito ao fármaco⁷² e a Pentamidina clones de promastigotas de *L. donovani* e *L. amazonensis* apresentam resistência ao medicamento devido à diminuição da captação, seguido por aumento do efluxo de medicamento.⁷²

1.3 Guanidinas

Compostos orgânicos com grupo funcional guanídínico (Figura 3) são encontrados na natureza com sua funcionalidade biológica (alcaloides naturais e no aminoácido arginina)⁷¹. Além de que, está presente na estrutura da guanina, uma das bases nitrogenadas encontradas no DNA.

Estão presentes em fármacos disponíveis no mercado.¹⁴ Sendo assim, diversos compostos com o grupo funcional guanídínico com atividade antimicrobiana estão sendo demonstrados pela literatura¹⁵ e que se mostram como potenciais modulares da resistência aos antibióticos no tratamento de doenças infecciosas como atividade antifúngica¹⁶, atividade

antivirais¹⁷, atividade antimalárica¹⁸ e atividade antiparasitária *in vitro* contra *Leishmania (L.) amazonensis*.¹⁹

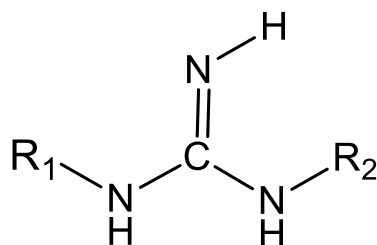


Figura 3. Estrutura química do núcleo guanidínico.

Os compostos guanidínicos sintetizados e caracterizados neste trabalho tem como objetivo buscar tratamentos mais efetivo e menos tóxico frente a espécie de *L. amazonensis* e *L. infantum* e a busca por possíveis mecanismos de ação.

1.4 Cisteíno Proteases (CPs)

As proteases (enzima proteolítica, proteinase ou peptidase) são enzimas que catalisam a clivagem de ligações peptídicas e têm papel fundamental em processos fisiológicos.²⁰ Podem ser classificadas de acordo com a posição de ligação peptídica a ser clivada nos aminoácidos na proteína³⁷. Também realizam a preferência da clivagem os grupos na região interna das cadeias peptídicas²³ o que se denomina ao nome de endopeptidase.

As proteases são classificadas em: serina-protease, que podem usar um resíduo de serina (Ser) ativado no sítio de ligação do substrato, como exemplo a quimotripsina e a tripsina.²³ A cisteína-protease, que possuem um resíduo de cisteína (Cys) no sítio ativo e que têm um papel catalítico semelhante ao resíduo da serina (Ser) e apresenta em seu sítio ativo uma conjugação com o resíduo histidina (His).^{22,24}

Além da serina-protease e cisteína-protease, podem ser classificadas como aspártico-proteases, contendo um resíduo de aspartato (Asp), treonina-proteases e metaloproteases que apresenta um íon metálico no sítio ativo.²²

No que se refere às proteases de *Leishmania spp.*, sabe-se que são fatores determinantes de virulência; constata-se que descobertas de inibidores específicos de proteases vem tendo capacidade de eliminação do parasito.²⁵ Dentre essas proteases, encontramos as CPs

de *Leishmania* que pertencem ao clã CA²⁶ e que integram a família C1, com o grupo cisteíno protease das quais são identificadas em *Leishmania* spp: CPA, CPB e CPC. (Figura 4).

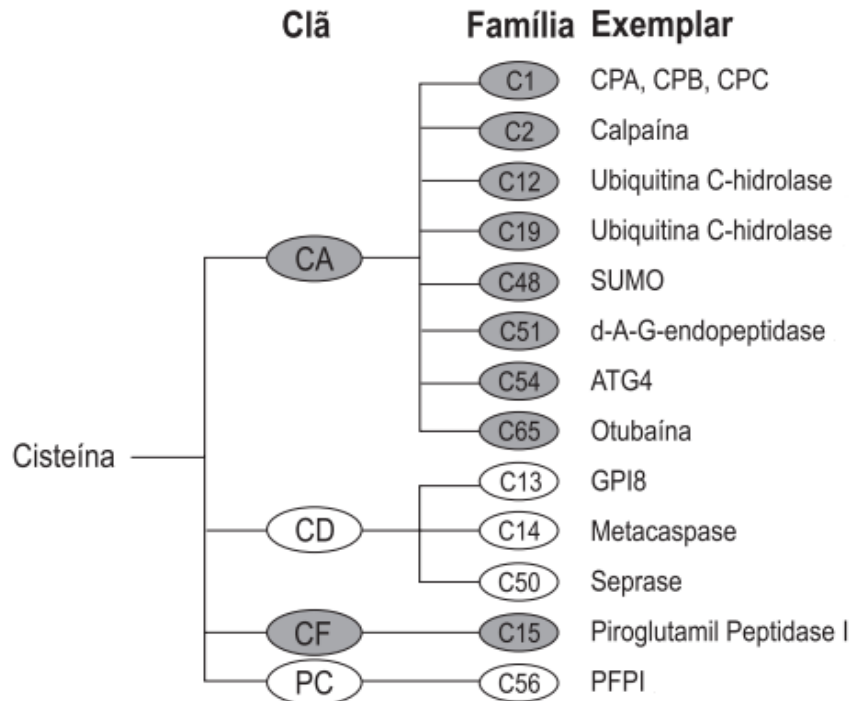


Figura 4. Organização de família e clãs da protease cisteína de *L. (L.) major*. Fonte: Adaptado de SILVA-LÓPEZ, R. E. (2010).²⁷

As cisteínas proteases estão presentes em protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*²⁸, contendo em seu centro ativo um resíduo de cisteína. São exemplos de cisteína protease a cruzaína, a papaína, além das catepsinas e a calpaínas. Estudos envolvendo a *L. mexicana* mostram fatores de virulência envolvendo a identificação de três genes de cisteína protease, sendo a *lmcpa*, *lmcpb* e *lmcp*.²⁹

Na análise da estrutura cristalográfica³⁰, a enzima *LmCPB2.8ΔCTE* é constituída por 217 resíduos de aminoácidos formando a cadeia polipeptídica, sendo Cys26, His164 e Asn184, responsáveis pela atividade catalítica, a qual refere-se ao enovelamento em domínio α -helicoidal e a de predominância, β -folha antiparalela.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Sintetizar, caracterizar e avaliar atividade leishmanicida de compostos guanidínicos frente a espécie de *L. amazonensis* e *L. infantum* e seus respectivos mecanismos de ação.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar uma série de compostos guanidínicos e avaliar a atividade anti-promastigota (IC_{50PRO}) e anti-amastigota (IC_{50AMA}) frente às espécies *L. amazonensis*;

- Investigar a atividade citotóxica (CC_{50}) em linhagem murinas de macrófagos e determinar do Índice de Seletividade ($IS=CC_{50}/IC_{50}$) dos compostos guanidínicos;

- Avaliar compostos guanidínicos com parâmetros adequados de eficácia e segurança ($IC_{50} < 10 \mu M$; $IS > 10$) pela administração em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, como segue:

1. Avaliar a função renal e hepática por meio da análise de marcadores bioquímico no plasma sanguíneo;
2. Determinar carga parasitária via Leishman Donovan Units (LDU);
3. Investigar o composto guanidínico LQOF-G6 como inibidor da enzima cisteino protease (CPB) de *L. mexicana* LmCPB2.8 Δ CTE;

- Avaliar a produção de NO nos sobrenadantes de cultura de PBMC em *L. infantum* com o composto LQOF-G7.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram cloreto de benzoíla, isotiocianato de amônio, 4-nitroanilina, 4-bromoanilina, 4-tercbutilanilina, 4-iodoanilina, 2,4-bromoanilina, 3-aminopiridina, 4-cloroanilina, 2,4 – diclorobenzilamina, 2-bromoanilina, 3-bromoanilina, 1-adamantanometilamina, 1-adamantilamina, benzilamina, trietilamina, nitrato de bismuto pentahidratado. Os solventes utilizados foram *N,N*-dimetilformamida, acetonitrila, éter de petróleo, éter etílico e diclorometano.

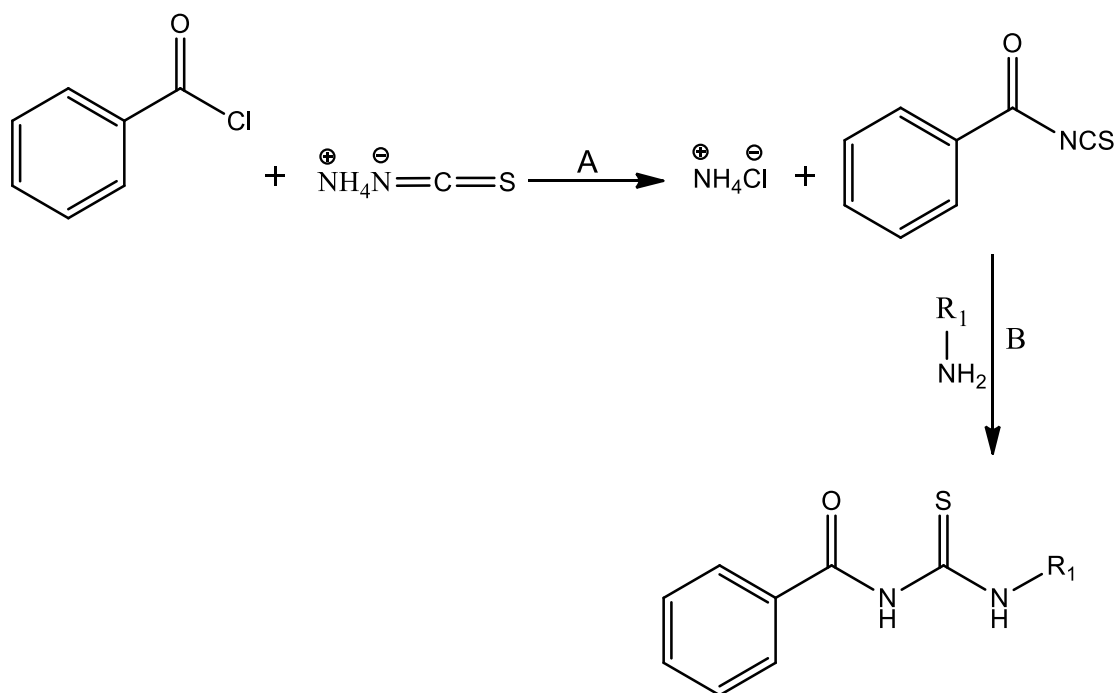
Todos os reagentes foram adquiridos da empresa SIGMA ALDRICH BRASIL e utilizados sem purificação prévia.

3.1. Procedimento de síntese

3.1.1. Síntese das tioureias

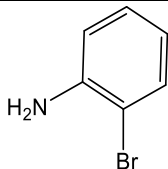
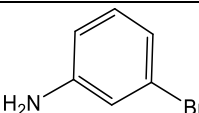
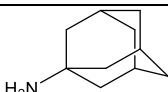
A. Em um balão de fundo redondo contendo uma solução de isotiocianato de amônio (0,076 g, 1 mmol) em acetonitrila (20 mL) adiciona-se o cloreto de benzoíla (0,140 g, 1,21 g/cm³, 1 mmol). A mistura resultante foi submetida a refluxo, sob agitação magnética constante durante 1 hora à temperatura de 85°C. Na sequência, a mistura de reação foi filtrada a frio sob pressão reduzida utilizando um funil de Büchner. Guardou-se o filtrado contendo o isotiocianato de benzoíla sob refrigeração para a sua utilização na síntese das tioureias.

B. Em um balão de fundo redondo contendo 1 mmol de isotiocianato de benzoíla em acetonitrila, foi adicionado 1 mmol de uma das anilinas (Tabela 1) correspondentes à respectiva tioureia. A mistura foi submetida a refluxo, sob agitação magnética constante durante 2 horas à temperatura de 85°C, quando a agitação foi interrompida e deixou-se atingir a temperatura ambiente. Então o balão foi colocado no congelador por 10 minutos e realizou-se a filtragem utilizando-se um funil de Büchner e papel de filtro. O sólido foi lavado com pequenas porções de acetonitrila gelada e, em seguida, seco para a obtenção do produto.



Esquema 1. Síntese da tioureia. Reagentes e condições: **(A)** Acetonitrila, 85°C, 1 h; **(B)** Acetonitrila 85°C, 2 h.
Fonte: Autoria própria.

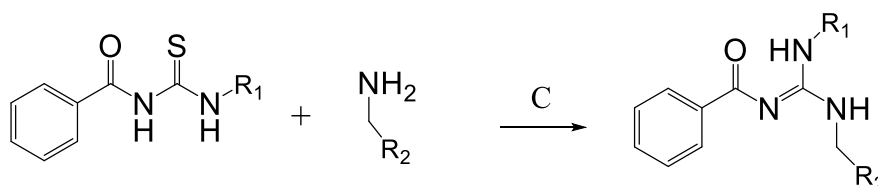
Tabela 1. Reagentes utilizados para a síntese de tioureia. Fonte: Autoria própria.

Amostra	Nome do reagente	Estrutura química (R ₁)
T4	2-bromoanilina	
T5	3-bromoanilina	
T6	1-adamantilamina	

3.1.2. Síntese das guanidinas

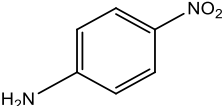
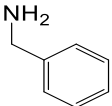
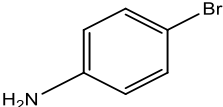
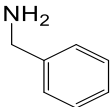
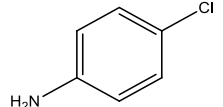
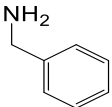
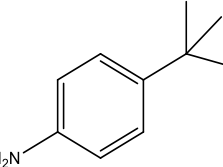
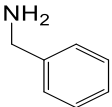
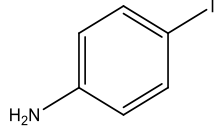
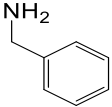
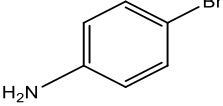
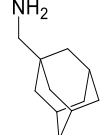
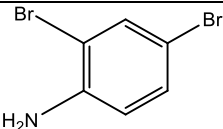
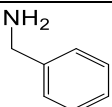
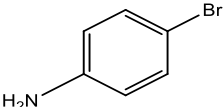
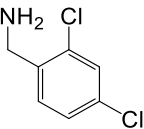
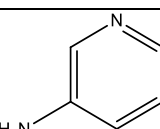
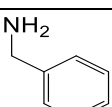
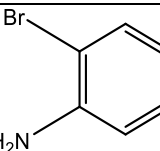
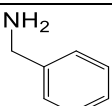
Em um balão de fundo redondo contendo uma solução de 1 mmol de tioureia em 5 ml de *N,N*-dimetilformamida verteu-se 2 mmol de benzilamina (107,15 g/mol, 0,981 g/cm³). Adicionou-se 4 mmol (101,19 g/mol, 0,726 g/cm³) de trietilamina e em seguida adicionou-se 1 mmol (458,07 g/mol) de Bi(NO₃)₃·5H₂O.⁵⁵ A solução foi aquecida à 120 °C e mantida sob agitação magnética constante por 24 horas. Após esse tempo, filtrou-se a suspensão sob pressão reduzida utilizando-se um funil de vidro sinterizado com uma camada de celite seguido da lavagem com 20 mL de diclorometano. Lavou-se o extrato orgânico com água (4 x 15 mL) e separou da fase aquosa. Na sequência, a fase orgânica foi dessecada por adição de MgSO₄ anidro e depois filtrou-se sob pressão reduzida utilizando um funil de Büchner.

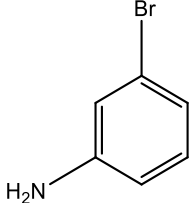
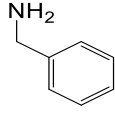
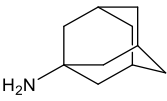
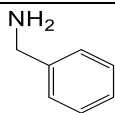
Após a evaporação do diclorometano, recristalizou-se o precipitado com uma mistura 1:4 de éter etílico/éter de petróleo (pf: 40-60°C). Temperatura aproximada de 85°C por 10 minutos sob agitação magnética até formação de um solido que é filtrado.



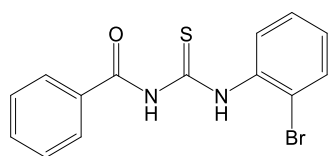
Esquema 2. Síntese das guanidinas. Reagentes e condições: C. DMF, Bi(NO₃)₃·5H₂O, Et₃N, 120°C. Fonte: Autoria própria.

Tabela 2. Reagentes utilizados para a síntese de guanidinas. Fonte: Autoria própria.

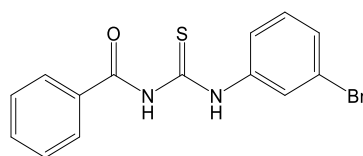
Amostra	Reagente (R ₁)	Estrutura (R ₁)	Reagente (R ₂)	Estrutura (R ₂)
LQOF-G1	4-nitroanilina		benzilamina	
LQOF-G2	4-bromoanilina		benzilamina	
LQOF-G3	4-cloroanilina		benzilamina	
LQOF-G6	4-tercbutilanilina		benzilamina	
LQOF-G7	4-iodoanilina		benzilamina	
LQOF-G29	4-bromoanilina		adamantanometilamina	
LQOF-G30	2,4-dibromobenzilamina		benzilamina	
LQOF-G32	4-bromoanilina		2,4-diclorobenzilamina	
LQOF-G34	3-aminopiridina		benzilamina	
LQOF-G35	2-bromoanilina		benzilamina	

LQOF-G36	3-bromoanilina		benzilamina	
LQOF-G37	adamantilamina		benzilamina	

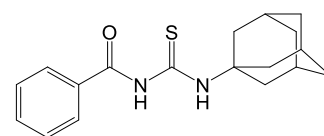
Moléculas sintetizadas – Intermediários Tiourea



LQOF-T4

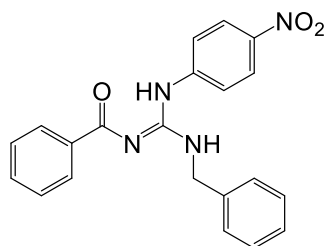


LQOF-T5

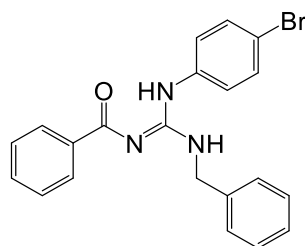


LQOF-T6

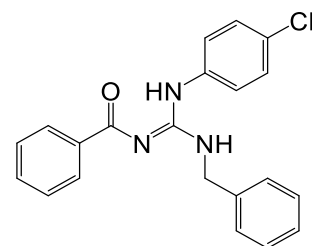
Moléculas sintetizadas - Guanidinas



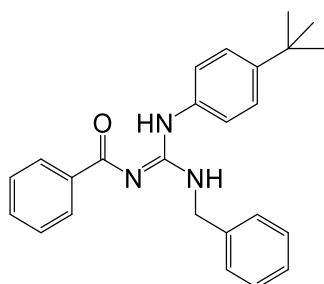
LQOF-G1



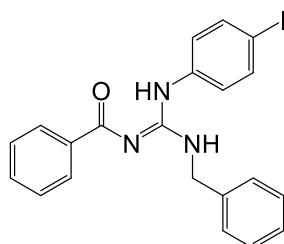
LQOF-G2



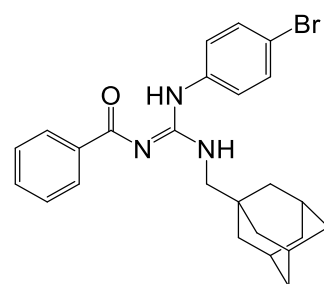
LQOF-G3



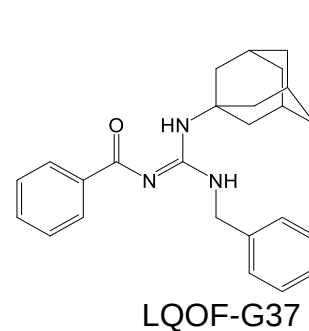
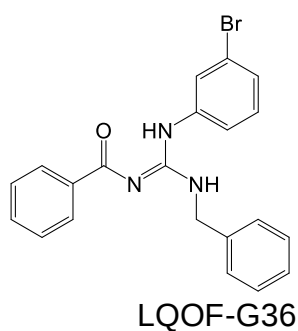
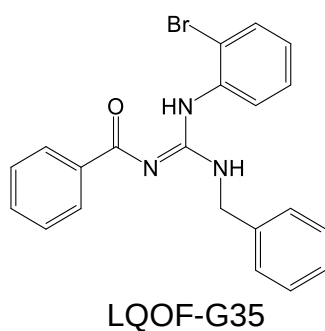
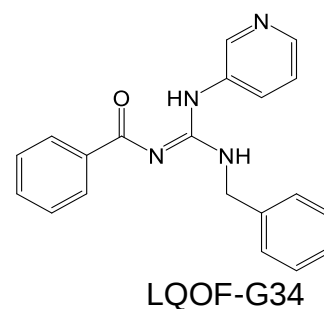
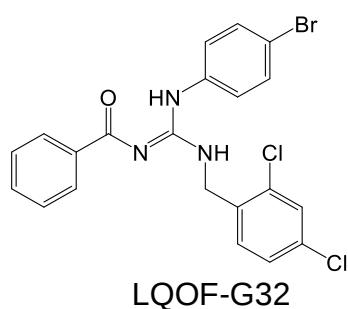
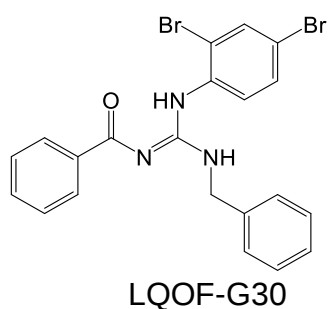
LQOF-G6



LQOF-G7



LQOF-G29



3.2. Técnicas analíticas

Os ensaios de toxicidade foram realizados em colaboração com a Prof^a. Dra. Amanda Martins Baviera do Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas da FCFAr, UNESP.

Avaliação da atividade citotóxica e a realização de testes *in vitro* para a determinação da atividade inibitória de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com o uso da estratégia de *screening* fenotípico foi realizada em colaboração da Professora Dra Marcia Graminha do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF UNESP/Araraquara.

Avaliação do potencial da LQOF-G6 capaz de inibir a enzima cisteíno protease, espécie da *L. mexicana*, foi realizado pela aluna de mestrado Michele Ferreira do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP/Araraquara.

Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB)/Paraíba realizou uma avaliação na produção de NO como investigação da capacidade moduladora na resposta imune em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) com o composto LQOF-G7.

Os estudos dos espectros 2D da LQOF-G6 foram realizados em colaboração com a aluna de mestrado Luana Ribeiro dos Anjos do Laboratório de Química Orgânica Fina – LQOF, da UNESP/Presidente Prudente.

A caracterização ^{13}C em RMN de estado sólido do composto LQOF-G6 foi realizado em colaboração com o Professor Dr. Alvicler Magalhães do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2.2. Análises de ponto de fusão

Os pontos de fusão foram obtidos utilizando um aparelho WRS-2A Microprocessador Melting Point Apparatus. As amostras foram colocadas em um tubo capilar, e as temperaturas de pré-aquecimento e rampa final foram selecionadas para 60°C e 250°C, respectivamente. A taxa de aquecimento utilizada foi de 3,0°C.min⁻¹.

3.2.3. Análises por EI-MS (Introdução Direta)

Os espectros de massas foram adquiridos por meio da introdução direta em um espectrômetro de massas com cromatografia gasosa GCMS-QP2010 PLUS. Os parâmetros utilizados para essas análises foram: temperatura da interface: 240°C; temperatura da câmara de ionização: 250°C; tempo de corte do solvente: 0,25 min; tempoinicial: 0,30 min; tempo final: 40,0 min; programa de temperatura da câmara de ionização temperatura inicial: 50°C, com aquecimento de 20°C.min⁻¹ até 350°C e tempo de espera de 10 min.

3.2.4. Análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (HRESIMS)

Os espectros de HRESIMS foram obtidos usando um espectrômetro de massas Micromass híbrido quadrupolo/tempo de voo (QToF) operando com resolução de 7000 e 5 ppm de precisão. A solução é infundida diretamente na fonte de electrospray por meio de uma seringa a uma razão de fluxo de 10 µL/min. O ESI-MS foi adquirido usando um Q-ToF em modo iônico positivo de uma solução de acetona com 0,1% de ácido fórmico, e usando as seguintes condições de operação: voltagens do cone e do capilar são selecionadas para 3500 e 45 V, respectivamente, com uma temperatura de desolvatação de 100°C.

3.2.5. Análises Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no equipamento AVANCE-III HD - 500 MHz, de campo magnético de 11,746 teslas; este possui sondas para análises líquidas de 5 mm (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P) e 1,7 mm (^1H , ^{13}C e ^{15}N), para todos os diferentes tipos de análises há a possibilidade de controlar a temperatura. Os deslocamentos químicos foram referenciados utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e reportados em ppm (δ). O solvente utilizado foi CDCl_3 . Os dados são apresentados da seguinte forma: deslocamento químico, multiplicidade (s = singuleto, d = duplete, dd = duplete de duplete, t = tripleto, qua = quadruplete, qu = quintuplete, m = multiplete, br s = amplo singuleto), as constantes de integração e de acoplamento (em Hertz).

3.2.6. Estudo de raios-X do cristal LQOF-G6

Os parâmetros experimentais do estudo de raios-X do cristal único LQOF-G6 são exibidos na Tabela 3. Dados de cristal, parâmetros de coleta de dados e refinamento de estrutura estão resumidos na Tabela 9 do Apêndice

Tabela 3. Parâmetros experimentais e CCDC-Code.

Sample	Machine	Source	Temp.	Detector Distance	Time/Frame	#Frames	Frame width	CCDC
	Bruker		[K]	[mm]	[s]		[°]	
LQOF-G6	Bruker D8 Venture	Mo	120	40	60	3506	0.3	2144089

3.3. Estudo da atividade biológica

3.3.1. Cultivo de *Leishmania*

3.3.1.1. Condição e cultivo de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) foram mantidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose)³¹ adicionado de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos estreptomicina (10 mg/mL) e penicilina (1000 U/ML) à temperatura de 28°C.

A fim de fazer ensaios *in vitro* para analisar a atividade anti-promastigotas ou fase estacionária, para a realização dos ensaios de infecção de macrófagos peritoneais com finalidade da avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos ou infecção de camundongos BALB/c, nos ensaios *in vivo*, foi determinado as fases de crescimento da *Leishmania* e identificado os dias que a *L. amazonensis* alcançam sua fase logarítmica a partir da concentração de *L. amazonensis* que foi quantificada individualmente em promastigotas/mL usando câmara de Neubauer, observada durante 6 dias, partindo do dia 0 em concentração 2×10^5 promastigotas/mL.

3.3.1.2. Condição e cultivo de *L. infantum* para estudos da LQOF-G7

As formas promastigotas de *Leishmania* (*L.*) *infantum* [IOC/L0579(MHOM/BR/1974/PP75)] foram cultivadas em meio de Schneider, pH 7,0, suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS), 2% de urina masculina humana, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/L de estreptomicina, e os parasitas foram mantidos *in vitro* a 26 °C.

O procedimento para obtenção da forma amastigota axênica extracelular de *L. infantum* foi baseado nos métodos descritos por Debrabant et al. (2004)³² com modificações³³ realizados pelo Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. As formas promastigotas na fase de crescimento estacionário foram diferenciadas em amastigotas axênicas por tratamento a temperatura (37°C). Os parasitas foram mantidos em cultura por não mais que 20 passagens.

3.3.2. Atividade anti-promastigota de compostos guanidínicos

O ensaio de viabilidade celular utilizando MTT (brometo de 3-(4,5- dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio) detalhado no protocolo^{34,35} para *L. amazonensis*. Ajustou-se a concentração de *Leishmania* em fase logarítmica para 1×10^7 promastigotas/mL e foram distribuídas em placas de 96 poços adicionado as diluições dos compostos guanidínicos de forma seriada em concentrações de 100 µM a 1,6 µM (razão de 1:2) para a determinação da concentração com a atividade inibitória em 50% dos parasitas (IC50PRO).

As placas, continham em cada poço o volume final de 100 µL, sendo, 97 µL de *Leishmania* e 3 µL dos compostos em avaliação contendo 100 µL de volume final com 97 µL de meio Schneider completo e 3 µL dos compostos, todas as placas organizadas em triplicatas.

Uma triplicata com 100 μ L de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269), e também, triplicata com 100 μ L de meio Schneider completo. A preparação da placa do experimento foi incubada em estufa BOD à temperatura de 27°C por 72 horas.

Após incubação, adicionou-se 10 μ L de MTT em todos os poços da placa do experimento em uma concentração por poço de 2,5 mg/mL e incubado novamente ao abrigo da luz por 75 minutos. Para a realização da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível (Tecan®) a 570 nm, foi adicionado 100 μ L de etanol e 100 μ L de isopropanol: PBS (1:1). Utilizou-se os valores resultantes da leitura das microplacas após o ensaio de viabilização celular e a porcentagem de parasitas mortos expressos em porcentagem de citotoxicidade (%C), para determinar a concentração inibitória máxima capaz de interferir na viabilidade de 50% dos parasitas (IC_{50}) de promastigotas. Esta foi calculada segundo a equação descrita em ^{34,36-37}. Por fim foi definido por regressão não linear a concentração efetiva para 50% das formas promastigotas (IC_{50PRO}) através do software BioEstat, e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de duas replicatas independentes.

3.3.3. Avaliação da citotoxicidade dos compostos guanidínicos em macrófagos peritoneais murinos

Para avaliar a citotoxicidade dos derivados guanidínicos frente a macrófagos de mamíferos, realizou-se a extração de macrófagos peritoneais de camundongos machos Swiss, com idade entre 4 a 6 semanas.

Após a extração, foram distribuídos em placas de 96 poços na razão de 5×10^5 células/poço em meio de cultura RPMI-1640 e depois mantidos por 6 horas em 37°C e 5% de CO_2 . Após o período de adesão dos macrófagos, descartou-se o sobrenadante para realizar o tratamento e adicionou-se 97 μ L de Meio RPMI-1640 e 3 μ L das moléculas a serem avaliadas, diluídas em diferentes concentrações iniciando de 300 μ M a 2,34 μ M. Deixando também poços somente com 100 μ L de Meio RPMI-1640 para controle de macrófagos sem tratamento. Feito o tratamento, as placas foram deixadas a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas.³⁵

Para realizar a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível (Tecan®) a 570 nm para analisar a viabilidade celular dessas células, adicionou-se 10 μ L de MTT em todos os poços da placa do experimento em uma concentração por poço de 2,5 mg/mL após o tempo de tratamento e em seguida as placas foram incubadas novamente ao abrigo da luz por 75 minutos, em seguida foi adicionado 100 μ L de etanol e 100 μ L de isopropanol: PBS (1:1).

Para determinar a concentração citotóxica em 50% dos macrófagos (CC50), foi feito uma conversão da densidade óptica obtida em porcentagem de inibição, uma análise de regressão dos dados usando o software BioEstat e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de duas replicatas independentes.

Esse experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob o protocolo CEUA/FCF/CAR: 12/2021.

3.3.4. Avaliação da Atividade anti-amastigota de compostos guanidínicos

Para a avaliação da atividade anti-amastigota de derivados guanidínicos foi realizado o protocolo para *L. amazonensis* descrito^{35,38}, exceto algumas modificações. Foram extraídos macrófagos peritoneais murinos, os quais foram mantidos durante 24 horas em meio RPMI-1640 a 37 °C e 5% de CO₂, distribuídos em placas de 24 poços (3 x 10⁵ células/poço) para aderência em lamínulas (13 mm diâmetro) presentes nos poços das placas.

Após aderência essas células foram infectadas com promastigotas da espécie de *Leishmania* a ser testada na fase estacionária de crescimento, em razão de 5 parasitas para 1 macrófago (5:1) para *L. amazonensis* e incubadas por 18h a 37°C e 5% de CO₂. O volume final dos poços era de 500 μ L.

Após o período de infecção, foi realizada uma lavagem com PBS para remoção dos parasitas não internalizados nos macrófagos e o tratamento foi feito utilizando derivados guanidínicos ao longo de 24 horas. Foram adicionados os derivados guanidínicos diluídos previamente em várias concentrações em razão de 1:2 (Para *L. amazonensis* as concentrações usadas foram: 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2.5 μ M, 1.25 μ M e 0.62 μ M).

Depois do período de tratamento, foi retirado o sobrenadante dos poços e as placas foram deixadas à temperatura ambiente até secar, seguido de adição de metanol para fixação das células nas lamínulas e logo após secar completamente, adicionou-se uma solução diluída de corante Giemsa (MERCK®) a 10% em tampão PBS em todos os poços, essa solução foi mantida nos poços por 8 minutos para coloração e depois desse momento, retirou-se as lamínulas de dentro dos poços das placas para secarem em temperatura ambiente e serem coladas em lâminas.

A determinação do IC₅₀AMA dessas moléculas em relação aos derivados guanidínicos foi feita posteriormente por contagem sob microscopia óptica comum e os

parâmetros como o número de amastigotas/macrófagos e o número de macrófagos infectados foram analisados e comparados às lamínulas resultantes do experimento onde as células infectadas não receberam quaisquer tratamentos. Os ensaios foram realizados em triplicatas experimental e duplicatas biológicas. Esses ensaios foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob o protocolo CEUA/FCF/CAr: 12/2021.

3.3.5. Avaliação da eficácia *in vivo* e segurança em modelo experimental de leishmaniose cutânea em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* tratados com compostos guanidínicos LQOF-G6 e LQOF-G7

Para avaliar a eficácia dos compostos guanidínicos LQOF-G6 e LQOF-G7, fêmeas de camundongos da linhagem BALB/c (CEMIB-UNICAMP – CEUA nº: 32/2020), com 5 semanas de idade foram infectadas subcutaneamente com 1×10^7 promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária na orelha direita e seguiu-se o protocolo.³⁹ Os camundongos foram separados em cinco grupos de cinco animais cada:

G1 infectados e tratados com veículo (Tampão PBS + 1% de DMSO);

G2 infectados e tratados com Anf B;

G3 infectados e tratados com o composto LQOF-G6;

G4 infectados e tratados com composto LQOF-G7;

G5 controle negativo e tratado com veículo (Tampão PBS + 1% de DMSO).

Uma nova infecção foi efetuada como descrito acima, após o não havendo formações de lesões durante 30 dias pós infecção. Ao surgir as lesões com diâmetro de 5 a 7 mm segundo as medidas aferidas usando um paquímetro digital (Mitutoyo), deu-se início ao tratamento, aproximadamente 60 dias pós-infecção. O tratamento ocorreu de forma intraperitoneal, usando doses diárias de 2 mg/kg por dia de Anf B, 4 (LQOF-G6) e 5 (LQOF-G7) por 15 dias.

Para o cálculo das doses dos compostos, foi utilizado os valores de IC_{50} obtidos através de ensaio anti-amastigota (LQOF-G6: 17 μ M e LQOF-G7: 7 μ M) e o volume de sangue do animal (1,5mL) levando em consideração que o volume de sangue de um camundongo BALB/c se refere a 6% da massa corpórea e o peso médio dos animais foi de ± 25 mg. A partir

desse cálculo, foi utilizado nos tratamentos doses iguais de 2 mg/kg/dia para todos os tratamentos, essa dose se refere à exatamente 10x IC₅₀ da molécula (LQOF-G7) e aproximadamente 10x IC₅₀ de (LQOF-G6) que seria o valor exato de 2,7 mg/kg/dia. Vale ressaltar que a dose (2 mg/kg/dia) do fármaco utilizado como referência (Anf B) foi estabelecida.³⁹

Ao decorrer do acompanhamento a cada 3 dias, foram feitas medidas de diâmetro e espessura das lesões usando o paquímetro digital (Mitutoyo) seguindo três parâmetros: diâmetro menor (d), diâmetro maior (D) e espessura das orelhas (com e sem lesão). O peso dos animais foi acompanhado, assim como também foram tiradas fotos das lesões ao longo do tratamento.

Ao final do tratamento, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, com o objetivo de investigar possível toxicidade do composto. Seu sangue foi coletado realizando uma punção cardíaca para coleta do soro para análises das alterações em biomarcadores de função hepática e renal. Foi coletado também as lesões das orelhas de cada camundongo e feito “imprints” das lesões da seguinte forma: Lâminas previamente limpas se colocam sobre a superfície das lesões das orelhas, essas lâminas são deixadas em temperatura ambiente até secar e, em seguida, são coradas usando corante Giemsa diluído em PBS 1X.

Para a determinação da carga parasitária foi realizada a contagem do número de amastigotas intracelulares nas células infectadas contidas nas lâminas usando microscopia óptica. O tecido da orelha foi pesado previamente para determinar o peso da lesão e usou-se o cálculo do índice LDU (Número de amastigotas de *Leishmania* por 1000 células nucleadas por peso da lesão. A contagem levou em consideração 100 células nucleadas por peso da lesão e os valores foram extrapolados para 1000).

Para avaliação os resultados obtidos após o tratamento *in vivo*, foi realizado análise estatística de todos os dados utilizando o teste de One-way ANOVA e Two-way ANOVA com ajuda do programa GraphPad Prism. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p \leq 0,05$.

3.4. Testes biomarcadores *in vivo*

Os experimentos *in vivo* aqui mencionados, foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob o protocolo CEUA nº: 32/2020

Os biomarcadores determinados foram: bilirrubina total, alanina e aspartato aminotransferases (ALT e AST, respectivamente), fosfatase alcalina (ALP), ureia e creatinina. Os ensaios são realizados por sistema de identificação-espectrofotométrica em analisador bioquímico semi-automático, com utilização de Kits comerciais Labtest Diagnóstica S. A.

3.4.1. Determinação da concentração de creatinina

A concentração de creatinina foi determinada pela ação da enzima creatinina amidohidrolase, na qual converte creatinina a creatina. A creatina produzida é hidrolisada a sarcosina e uréia pela ação da enzima creatina amidinohidrolase. Em seguida, a enzima sarcosina oxidase promove a desmetilação oxidativa da sarcosina, levando à produção de glicina, formaldeído e H_2O_2 . Na presença de peroxidase, o H_2O_2 formado reage com o N-ethyl-N-sulfopropyl-mtoluidina (ESPMT) e 4-aminoantipirina, produzindo uma quinoneimina, monitorada a 546 nm.⁴⁰ **Os resultados foram expressos em mg/dL.**

3.4.2. Determinação da concentração de alanina aminotransferase (ALT)

A ALT catalisa a transferência do grupo amino da alanina para o α -cetoglutarato, na presença do piridoxal-5-fosfato, produzindo piruvato e oxaloacetato; o piruvato é oxidado à acetilfosfato e é gerado peróxido de hidrogênio via uma oxidase de piruvato. A reação final consiste na oxidação de corante leuco pelo peróxido de hidrogênio, na presença de uma peroxidase, com a formação de cromóforo. A alteração da densidade da reflectância é proporcional à atividade de ALT na amostra.⁴¹⁻⁴² **Os resultados foram expressos em U/L.**

3.4.3. Determinação da concentração de fosfatase alcalina (ALP)

A ALP, em pH alcalino, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A quantidade produzida de p-nitrofenol, monitorada em 405 nm, é diretamente proporcional à atividade enzimática da ALP na amostra.⁴³ **Os resultados foram expressos em U/L.**

3.4.4. Determinação da concentração de ureia

A ureia é hidrolisada pela urease à íons amônio e CO. Os 2 íons amônio reagem, em pH alcalino, com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol, monitorado em 600 nm. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.⁴⁴ Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.4.5. Determinação da concentração de aspartato aminotransferase (AST)

A AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada à NAD. A oxidação da coenzima NADH é monitorada a 340 nm e é diretamente proporcional à atividade da AST na amostra.⁴² Os resultados foram expressos em U/L.

3.4.6. Determinação da concentração de bilirrubina total

A bilirrubina é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha, monitorada em 525 nm. A bilirrubina total, inclui a direta e indireta é dosada por ação de potente solubilizador de ação catalisadora⁴⁵. Os resultados foram expressos em mg/dL.

3.4.7. Atividade inibitória na enzima LmCPB2.8ΔCTE (CPB)

O ensaio de inibição da enzima LmCPB2.8ΔCTE (DA COSTA CLEMENTINO et al., 2021), foi realizado em placas pretas de 96 poços contendo:

- Tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 contendo 200 mM de NaCl e 0.01% de Triton-X 100;
- 2 nM da enzima LmCPB2.8ΔCTE;
- 2 mM de ditioneitol DTT;
- 5 μM de substrato Z-F-Arg-MCA (Calbiochem);
- Os compostos em concentração de 20 μM.

Em primeiro momento, foi realizado a leitura da fluorescência basal, ou seja, a atividade das substâncias sem a presença da enzima, como tampão, DTT e substrato. Nos poços são adicionadas essas três substâncias: 196 μL de tampão, 2 μL de DTT e 2 μL de substrato e realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV/Visível (Tecan®) a 30 °C por 2 minutos para registrar a fluorescência emitida em cada um dos poços.

Depois, foram preparados novos poços para testar a atividade da enzima sem a presença do composto em análise, contendo: 198 μL de um mix contendo tampão, DTT e enzima nas mesmas concentrações de trabalho e feito uma leitura no Tecan® nas mesmas condições descritas acima. Após essa leitura, adicionou-se 2 μL do substrato e realizou-se uma nova leitura dos mesmos poços, para registrar a fluorescência.

Finalmente, foi preparado os poços para o teste de inibição da enzima pelos compostos guanidínicos, contendo: 196 μL de do MIX (Tampão, DTT e Enzima), após adicionar o MIX é feito a primeira leitura no Tecan®. Depois foi adicionado a esses poços 2 μL do derivado guanidínico nas concentrações 20 μM , 10 μM e 5 μM , foi feito uma segunda leitura e por fim, adicionou-se 2 μL do substrato e realizou-se a terceira e última leitura.

Os resultados foram calculados e analisados quanto ao aumento ou diminuição da fluorescência, sendo considerado quanto menor a fluorescência do substrato, após adição do composto, maior a inibição da enzima.

Ao final, foi feito uma comparação dos valores de fluorescência obtidos nos poços do teste de atividade da enzima sem inibidor em relação aos valores dos poços que foram adicionados os compostos guanidínicos, sendo descontados o valor da fluorescência basal nas duas situações. Os valores foram analisados via regressão não linear à concentração efetiva para 50% de inibição da LmCPB2.8 Δ CTE (IC₅₀-CPB) através do software BioEstat, e os dados foram expressos como média $\pm$ DP de duas replicatas independentes.

3.5. Preparação de células mononucleares do sangue periférico e ensaio de infecção com *L. infantum*

Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMC) foram obtidas de um total de 5 voluntários saudáveis de João Pessoa, PB Brasil, em tubos contendo heparina sódica. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal da Paraíba, Brasil. Resumidamente, o sangue periférico foi diluído 1:1 com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e lentamente colocado sobre Ficoll® Paque PLUS (GE Healthcare, EUA). Os tubos

foram centrifugados a 400 g por 40 min a 20°C. Após centrifugação, o PBMC foi colhido, lavado três vezes com PBS e ressuspensão em meio RPMI suplementado com antibióticos (penicilina 200 U/ml e estreptomicina 0,1 mg/ml), 1 mM de L-glutamina e 10% de soro humano inativado. A viabilidade celular foi avaliada por exclusão do corante azul de tripano. As células foram contadas em um hemacitômetro.⁴⁷⁻⁴⁸

As formas promastigotas de *L. infantum* (1 x 10⁸ parasitas/mL) foram marcadas com o corante carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster CFSE (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit). A solução de CFSE foi adicionada ao tubo na concentração final de 5 µM. A suspensão foi incubada por 15 minutos a 5% de CO₂, 37 °C e lavada três vezes com PBS com 10% de FBS inativado, conforme descrito anteriormente)⁴⁷ Monócitos de sangue total de *L. infantum* marcados com CFSE. A infecção ocorreu na proporção de 1 monócito:10 Leishmania por 3 horas. Após a infecção, as células foram lavadas três vezes com PBS suplementado com 10% de FBS. Após a infecção e obtenção das PBMC, as células foram plaqueadas em placa de 96 poços (2,5 x 10⁵ células/poço), sendo incubadas com guanidina LQOF-G7 e Anfotericina B na concentração de 1x valor EC₅₀, com meio ou estímulo de LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* - Sigma-Aldrich O111:B4) a 100 ng/mL.⁴⁹⁻⁵¹

As placas foram incubadas por 24 h em um forno de 5% CO₂ a 37°C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 200 g por 8 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado para medir a produção de nitrito. Para marcação de monócitos, um anticorpo de superfície CD14 (PERCP-Cy5.5; clone MΦP9) foi adicionado no volume final de 40 µL. Após a adição do anticorpo, a placa foi incubada a 4°C por 15 minutos, protegida da luz. No final do período de incubação, as células foram lavadas adicionando 150 µl de tampão PBS gelado a cada poço. A placa foi centrifugada novamente por 10 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação, a placa dos sobrenadantes foi removida e as células suspensas. Em seguida, 100 µL de tampão PBS e 100 µL de solução de formaldeído a 4% foram adicionados e lidos no citômetro de fluxo. FACSCANTOII (BD FACSCanto® II - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), onde foram adquiridos 30 mil eventos. O software FlowJo v.10.8.1® foi usado como programa para analisar os dados obtido.^{52,78}

3.5.1. Ensaio de Nitrito

Os sobrenadantes da cultura foram avaliados quanto ao produto final estável de NO, nitratos e nitritos, usando a reação de Griess de acordo com o manual de instruções Cayman

chem (Cayman Chemical, EUA). O nível de NO foi determinado lendo a absorbância em um comprimento de onda de 540 nm em um leitor de microplacas (BioTek-ELx800). Os valores médios de densidade óptica (OD) em branco foram subtraídos dos valores médios de OD do teste.^{53, 78}

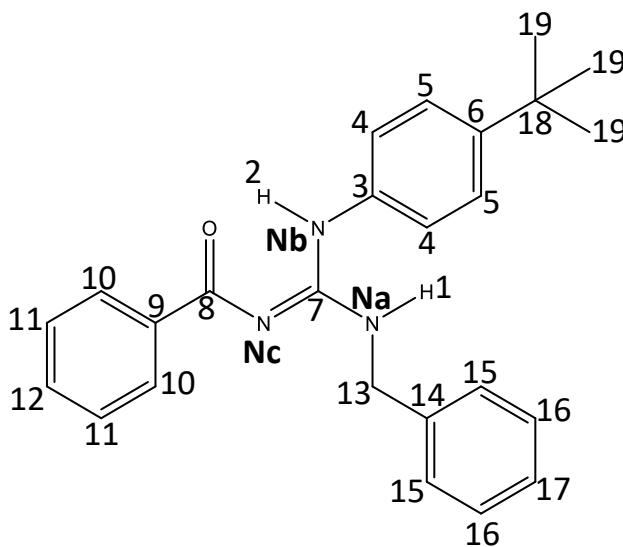
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização RMN – LQOF-G6

A molécula LQOF-G6 foi caracterizada por análises 1D e 2D-RMN. As Tabelas 4 e 5 resumem os valores do deslocamento químico dos núcleos ^1H e ^{13}C de LQOF-G6 em CDCl_3 a 253 K.

O espectro de ^1H (Figura 5) mostra os sinais dos nove equivalentes hidrogênios do grupo terc-butil, dois metilenos (H13), dois equivalentes aromáticos (H10) e dois hidrogênios permutáveis ligados ao nitrogênio (H1 e H2). Os oito sinais dos 12 hidrogênios aromáticos restantes foram agrupados na região 7,20-8,30 ppm com alguns deles sobrepostos.

O sinal em 177,456 ppm no espectro ^{13}C em 253 K (Figura 6) é característico de um carbonil e, portanto, atribuído a C8. Os sinais na região alifática em 45,784, 34,566 e 31,181 ppm foram atribuídos ao C13 benzílico e aos carbonos metil quaternário e três equivalentes do grupo terc-butil, respectivamente.



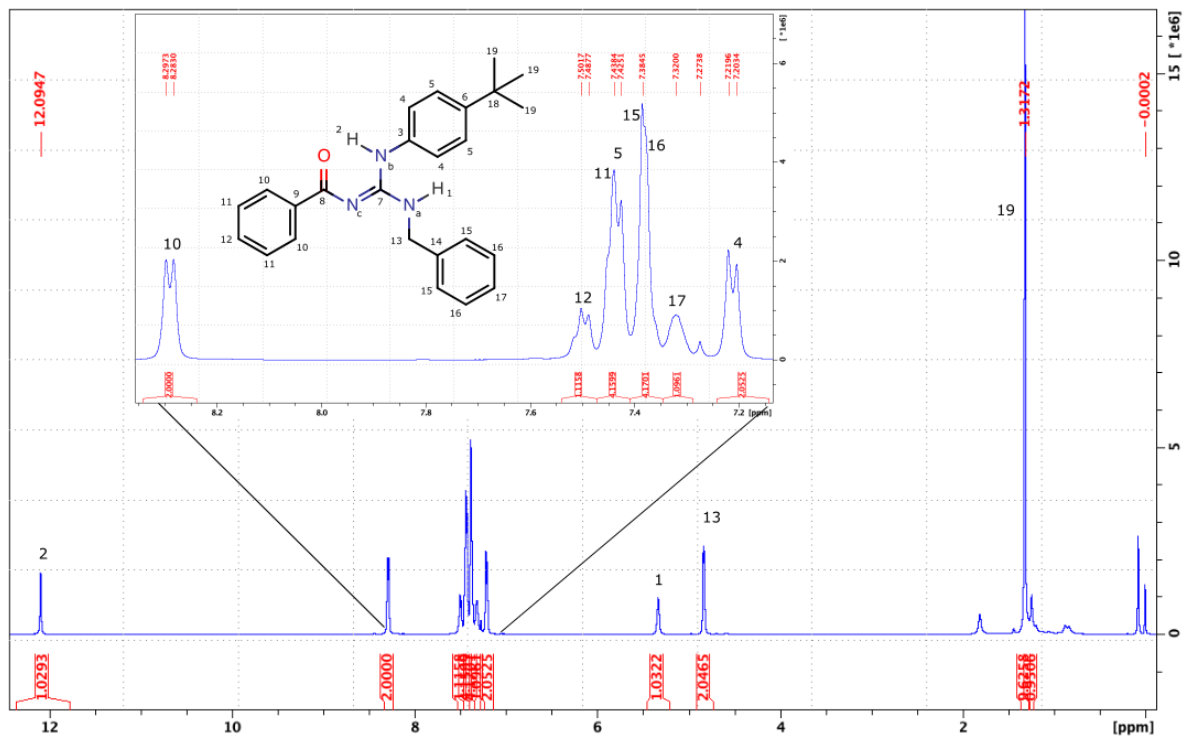


Figura 5. Espectro ^1H de LQOF-G6 a 253 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.

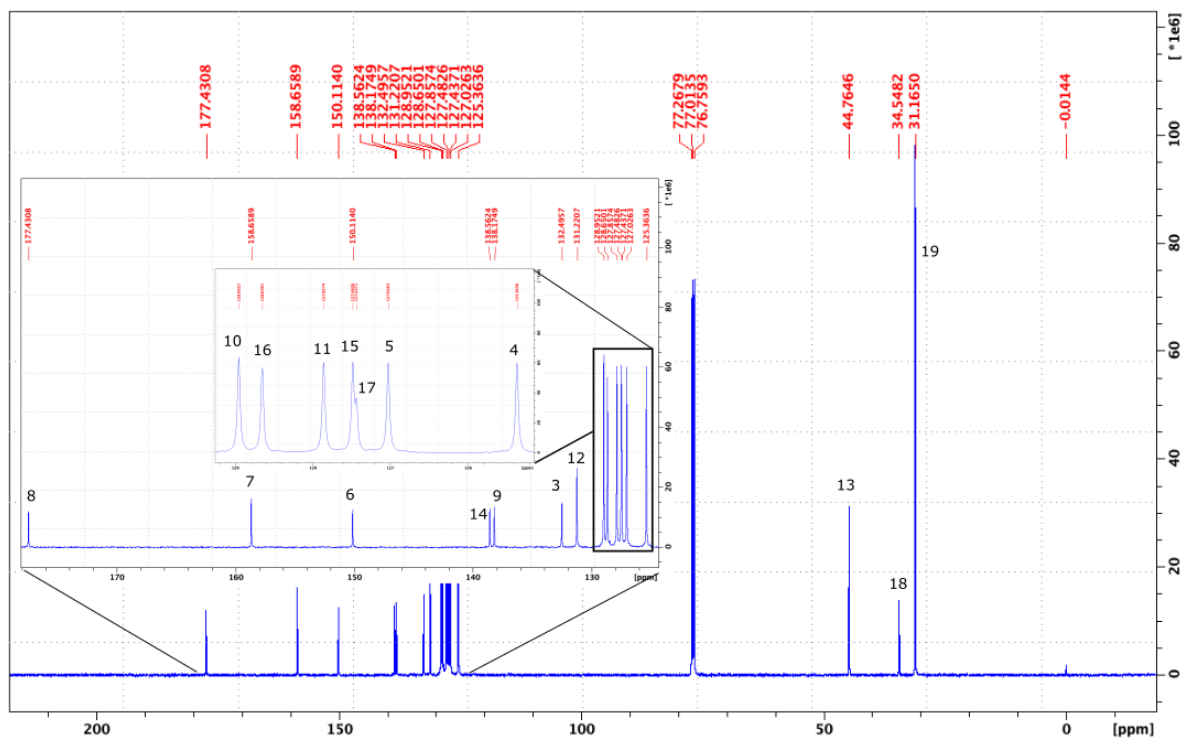


Figura 6. Espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de LQOF-G6 a 253 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.

Tabela 4. Valores de deslocamento químico de ^1H (δ ppm) do composto LQOF-G6 em CDCl_3 a 253 K. Fonte: Autoria própria.

Átomo	H1	H2	H4	H5	H10	H11
δ (ppm)	5,33	12,09	7,21	7,42	8,29	7,43
Multiplicidade	t	s	d	d	Dd	dt
J (Hz)	5,89		8,26	8,26	7.26/1.11	7.26/7.32
Átomo	H12	H13	H15	H16	H17	H19
δ (ppm)	7,50	4,83	7,37	7,37	7,31	1,31
Multiplicidade	tt	d	-	-	-	-
J (Hz)	7.32/1.11	5,89	-	-	-	-

Tabela 5. Valores de deslocamento químico de ^{13}C (δ ppm) do composto LQOF-G6 em CDCl_3 a 253 K. Fonte: Autoria própria.

C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
133.508	125.386	127.043	150.139	158.676	177.456	138.184	128.965	127.875
C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	
131.239	45.784	138.571	127.498	128.669	127.455	34.566	31.181	

Conforme sugerido pelo deslocamento químico de RMN de H2, 12,09 ppm, ele está envolvido em uma ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo carbonila. O sinal ^{13}C correspondente a C7 apareceu em 158,676 ppm, característico de um átomo de carbono central do núcleo guanidínico.⁶¹

4.2. Análise Conformacional LQOF-G6

O estudo de raios-X de LQOF-G6 mostrou a estrutura cristalina com a dupla ligação do grupo guanidínio localizado entre o carbono central (C1A em DRX e C7 em RMN) e a

amida N (N2A em DRX e Nc em RMN) e a ligação de hidrogênio intramolecular entre o átomo de hidrogênio na anilina N (N1A em DRX e Nb em RMN) e o átomo de oxigênio carbonil (O1A em DRX). Figura 7. Para confirmar, experimentos ^1H - ^{15}N HMBC, ^1H e ^{13}C em estado sólido em baixas temperaturas foram conduzidos.

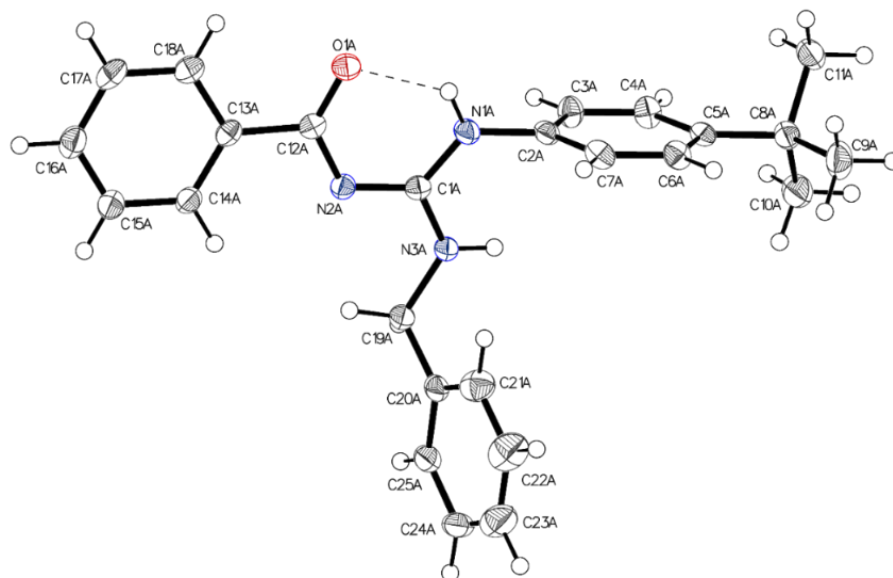


Figura 7. Estrutura da molécula LQOF-G6 desenhada com elipsóide de deslocamento de 50%. Segunda molécula independente omitida para maior clareza. A precisão da ligação para ligações carbono-carbono simples é de 0,0032 Å. Uma ligação de hidrogênio intramolecular de caráter moderado.⁶⁷ estabiliza a estrutura (também válida para a segunda porção independente).

O espectro HMBC ^1H - ^{15}N em $T = 253\text{ K}$ (Figura 8) mostrou os três átomos de nitrogênio com ressonâncias nas regiões típicas de aminas alifáticas (Na), aminas aromáticas (Nb) e o nitrogênio de guanidina conectado por ligação dupla (Nc).

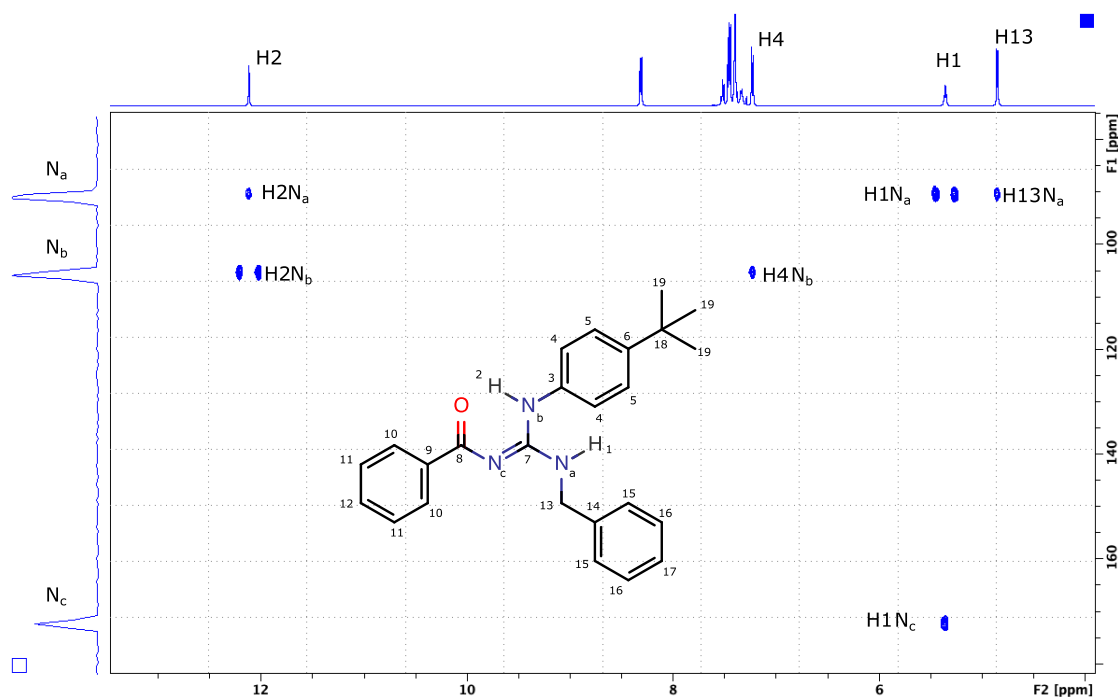


Figura 8. Espectro $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ HMBC de LQOF-G6 a 253 K. Fonte: Autoria própria.

O átomo de hidrogênio H1 (5,33 ppm) foi identificado por sua única correlação de longa distância com o nitrogênio Nc (172,51 ppm). H4 (7,21 ppm) foi correlacionado com Nb (105,54 ppm), H2 (12,09 ppm) também correlacionado com Nb (105,54 ppm) por uma ligação direta, e com Na (90,25 ppm), H1 (ligação direta) e H13, com químicas deslocamentos de 5,33 e 4,83 ppm, respectivamente, correlacionados com Na (90,25 ppm). Foi relatado o estudo de uma série de benzoilguanidinas que apresentavam isomerismo E/Z.⁶¹ No entanto, para o composto LQOF-G6, a ocorrência do isômero E não foi demonstrada por análises de RMN. O estudo HMBC $^1\text{H} - ^{15}\text{N}$ facilitou a atribuição da ressonância devido ao átomo de nitrogênio da anilina (destacado como Nc) e confirmou a atribuição dos sinais ^{15}N .

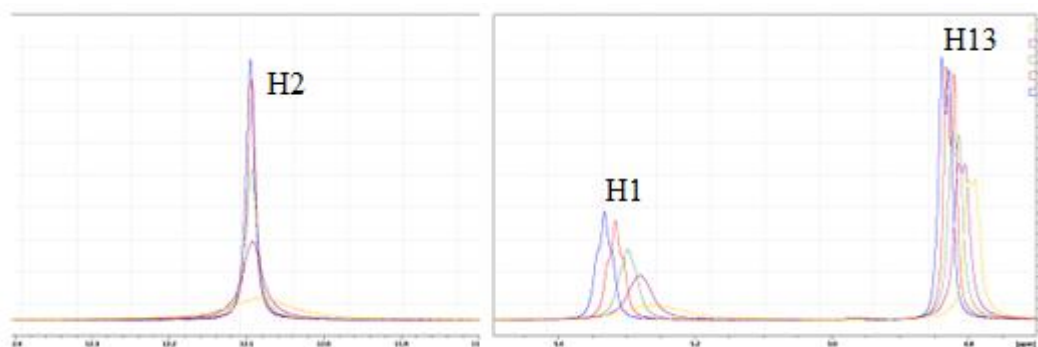


Figura 9. ^1H espectro de LQOF-G6 em CDCl_3 em diferentes valores de temperatura ($T(\text{K}) = 298$ (amarelo), 283 (roxo), 273 (verde), 263 (vermelho) e 253 (azul)). (esquerda) Hidrogênio H2. (direita) Hidrogênios H1 e H13. Fonte: Autoria própria.

Conforme observado no espectro ^1H em 253 K mostrado na Figura 9, os sinais dos prótons H2 e H1 apareceram como singlete e tripleto, respectivamente. Sinais de H2 e H1 em diferentes valores de Temperatura variando entre 298 e 253 K permitem observar os sinais mais finos e intensos, e, conseqüentemente, com maior resolução, facilitando a determinação da multiplicidade para ambos, H1 e H2.

Com H2 agora identificado, o deslocamento muito forte do sinal para baixo é evidência de seu envolvimento na ligação de hidrogênio com o grupo carbonila e a confirmação do isômero Z.

4.3. RMN de estado sólido – LQOF-G6

Além dos experimentos de RMN em solução da molécula LQOF-G6, foi realizada a análise do ^{13}C no estado sólido. Essa análise mostrou a estrutura relacionada ao isômero Z reproduzindo o que foi encontrado na análise em solução (Figura 10).

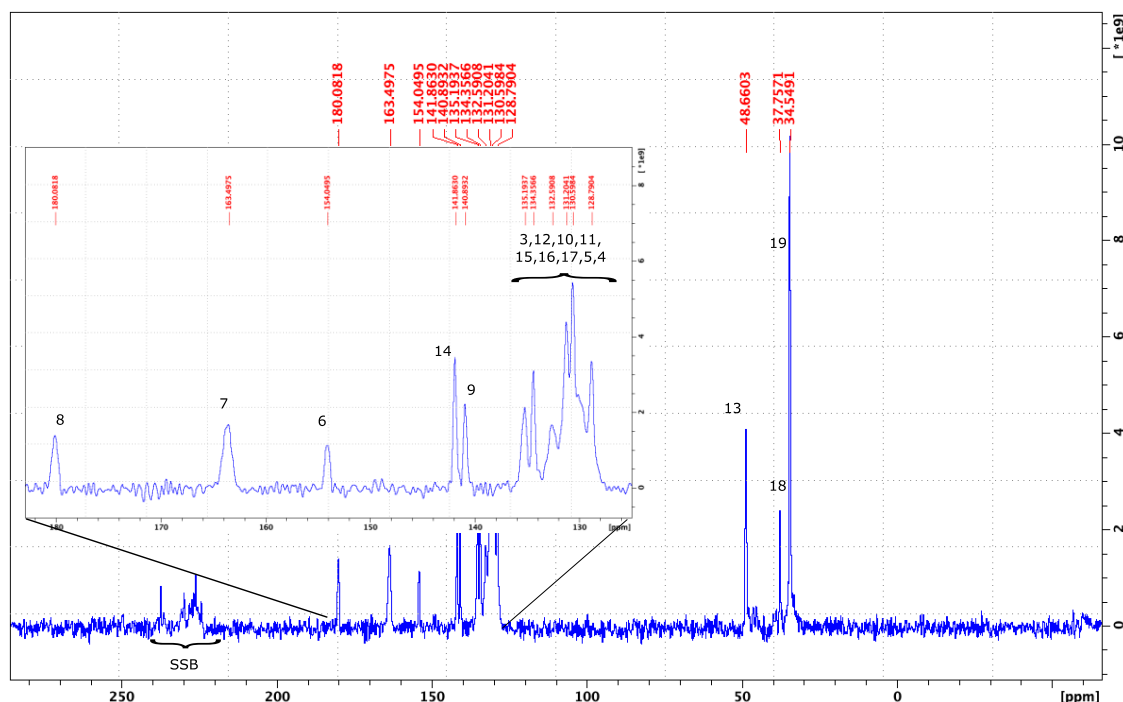


Figura 10. Polarização cruzada $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ Espectros de RMN de estado sólido de LFQO-G6, tempo de contato 3 ms durante a rampa de polarização de 50 a 100%, girado em 12 kHz, SSB - indica banda lateral de rotação, ^{13}C adquirido em 125,695 MHz, ^1H em 499,832 MHz foi desacoplado usando Potência de pulso de 70 kHz com sequência espinhal 64. Fonte: Elaborado pelo Departamento de Química Orgânica, Universidade de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro/RJ.

Comparando com o espectro de ^{13}C em solução (Figura 6), o carbono central guanidínico (C7) foi observado com um deslocamento químico de 163,497 (158,676 em solução).

Outra característica importante na estrutura da molécula de guanidina é o C13 (benzil), que é observado em 48,660 ppm no estado sólido e 45,784 ppm em solução.

A diferença entre os carbonos C9 e C14 também é observada no espectro ^{13}C do estado sólido, esses átomos são observados, respectivamente, em 140,893 e 141,863 ppm, e no espectro mostrado na Figura 6, C9 e C14 são observados em 138,184 e 138,571 ppm.

Resumindo a partir dos dados apresentados, é possível visualizar que os átomos de carbono discutidos aparecem próximos nos sinais de deslocamento químico, tanto para análise de sólidos quanto de solução, separados apenas por uma pequena diferença no deslocamento químico devido possivelmente ao efeito do solvente

4.4 Caracterização RMN – LQOF-G32

A molécula LQOF-G32 foi submetida à análise de ^1H e ^{13}C para sua caracterização. Os deslocamentos químicos dessas análises são apresentados nas Tabelas 6 e 7, onde estão atribuídos os valores de deslocamento químicos dos núcleos de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C), respectivamente, do composto LQOF-G32 em CDCl_3 a 298 K.

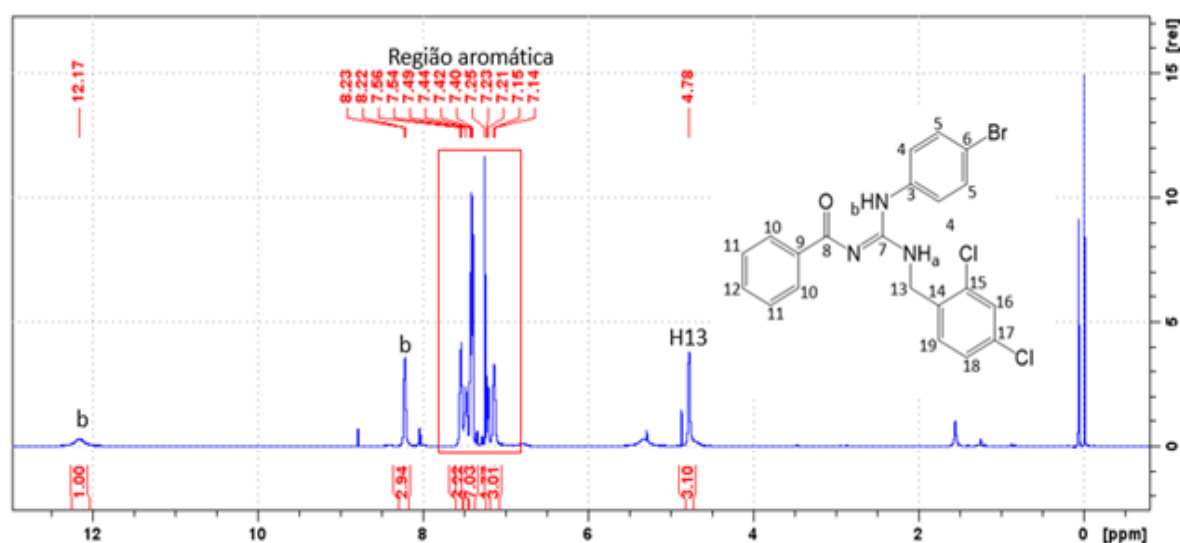


Figura 11. Espectro ^1H de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.

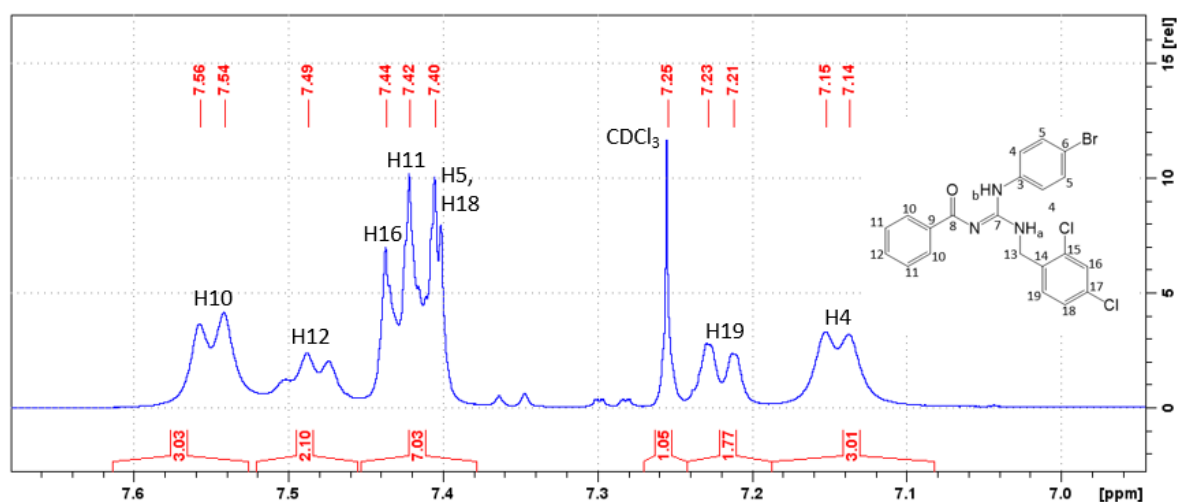


Figura 12. Espectro região aromática ^1H de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.

O espectro de ^1H (Figura 11) mostra os sinais de dois metilenos (H13), dois equivalentes aromáticos (H10) e dois hidrogênios ligados ao nitrogênio (a e b). Os oito sinais

dos 12 hidrogênios aromáticos restantes foram agrupados na região 7,10-7,60 ppm com alguns deles sobrepostos.

Tabela 6. Valores de deslocamento químico de ^1H (δ ppm) do composto LQOF-G6 em CDCl_3 a 298 K. Fonte: Autoria própria.

Átomo	a	b	H4	H5	H10	H11
δ (ppm)	5,33	12.17	7.14	7,40	7,55	7,42
Multiplicidade	s	s	d	d	Dd	d

Átomo	H12	H13	H15	H16	H17	H19
δ (ppm)	7,49	4,78	-	7,44	-	7,22
Multiplicidade	tt	d	-	d	-	-

Ao comparar as análises de ^1H dos compostos LQOF-G6 e LQOF-G32, é possível observar a semelhança nos deslocamentos químicos de certas regiões de hidrogênio. Por exemplo, os hidrogênios dos metilenos (H13) apresentam deslocamentos químicos de 4,83 ppm e 4,78 ppm, respectivamente, nos dois compostos. Essa similaridade nos deslocamentos químicos indica a presença dos hidrogênios nas mesmas posições relativas nas estruturas dos compostos.

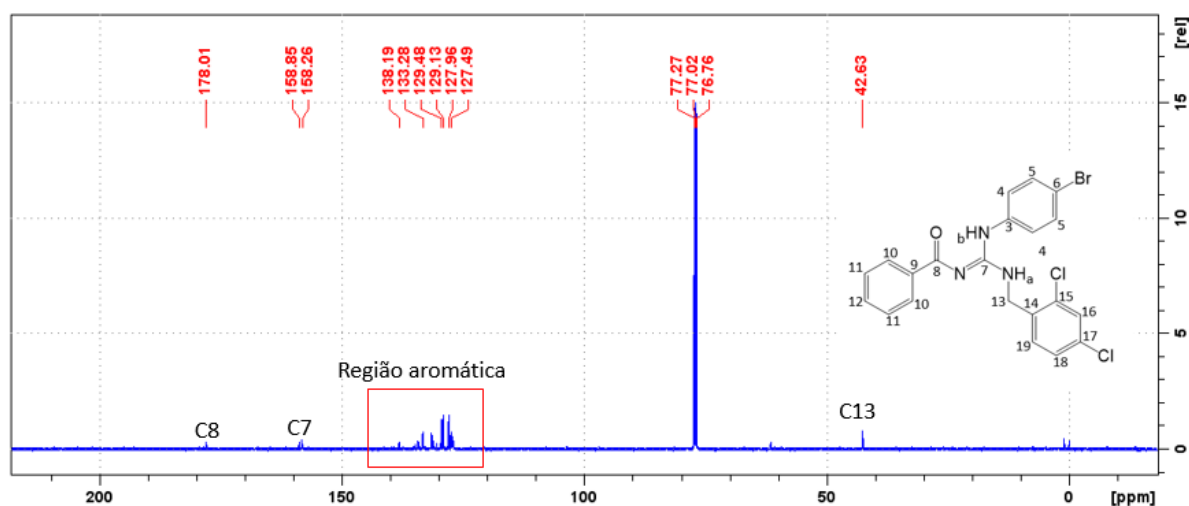


Figura 13. Espectro $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.

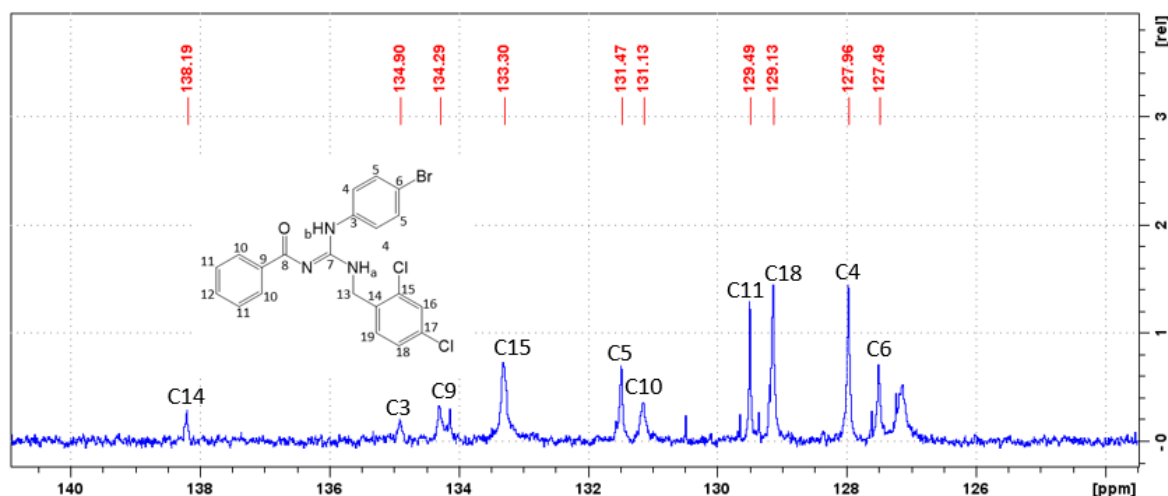


Figura 14. Espectro da região aromática $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ de LQOF-G32 a 298 K em CDCl_3 . Fonte: Autoria própria.

O sinal presente em 178,01 ppm no espectro de RMN de ^{13}C a 298 K (Figura 13) do composto LQOF-G32 é indicativo da presença de um grupo carbonila, sendo atribuído ao carbono C8. Em comparação, para o composto LQOF-G6, observa-se um sinal na mesma região, especificamente em 177,456 ppm.

Além deste sinal, o carbono C7, que está relacionado ao centro guanidínico, também apresenta um deslocamento químico similar. Para o composto LQOF-G6, esse carbono é atribuído em 158,676 ppm, enquanto para o LQOF-G32, encontra-se em 158,55 ppm. Esses deslocamentos químicos semelhantes evidenciam a presença desses grupos nas respectivas posições e fornecem informações importantes sobre a estrutura molecular dos compostos.

Tabela 7. Valores de deslocamento químico de ^{13}C (δ ppm) do composto LQOF-G32 em CDCl_3 a 298 K. Fonte: Autoria própria.

C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11
133.90	127.96	131.47	127.49	158.55	178.01	134.29	131.13	129.49
C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	
-	42.63	138.19	133.30	-	-	129.13	31.181	

4.5. Resultados da atividade citotóxica e leishmanicida das guanidinas das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Foram sintetizados um total de quinze compostos, incluindo três tioureias intermediárias e treze guanidinas. Dentre esses compostos, destaca-se dez compostos inéditos.¹⁹ Os compostos foram sintetizados no Laboratório de Química Orgânica Fina, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Câmpus de Presidente Prudente-SP, a fim de investigar *in vitro* contra amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis*, além disso, a atividade citotóxica frente a macrófagos murinos (CC₅₀) e atividade inibitória da CPB.

Foram testados quinze compostos quanto à atividade leishmanicida, sendo as dez inéditas: sete compostos LQOF-29 até LQOF-G37, e três tioureias: LQOF-T4, LQOF-T5 e LQOF-T6. Além destas, cinco moléculas (LQOF-G1, LQOF-G2, LQOF-G3, LQOF-G6 e LQOF-G7) foram avaliadas em trabalhos anteriores quanto ao potencial anti *L. amazonensis*, *in vitro*, sendo a molécula LQOF-G2, com IC_{50AMA} 5,6 µM, avaliada *in vivo*.¹⁹

Inicialmente, o planejamento dos compostos inéditos foi proposto com o objetivo de igualar ou superar a atividade *in vitro* das moléculas modelos LQOF-G2, LQOF-G6 e LQOF-G7.¹⁹ Essa proposta envolveu a substituição dos agrupamentos (Esquema 2) no centro guanidínico. Além disso, as anilinas propostas (Tabela 2) para a síntese desses compostos contém átomos de halogênios ligados ao anel da anilina na posição “para”. Essa escolha se baseia que esses compostos demonstraram a capacidade de reduzir a infecção por amastigota intracelulares em macrófagos.

Dessa forma, é possível considerar que a presença de um halogênio na posição “para” da anilina seja promissora para atividade anti-leishmania dos compostos guanidínicos investigados neste trabalho.¹⁹ Tal observação pode ser evidenciada na Tabela 8. Nota-se que os compostos LQOF-G2, LQOF-G30 e LQOF-G32 que apresentaram resultados promissores com valores de IC_{50AMA} 6 ± 2.5 , 11 ± 0.75 e 11 ± 1.4 , respectivamente, possuem uma semelhança estrutural: o átomo de bromo (-Br) (Figura 15). Deve-se ao fato de que a adição de halogênios, como flúor, cloro, o próprio bromo e iodo, em compostos aromáticos pode aumentar sua lipofilicidade, tornando-os mais solúveis em lipídios. Essa lipofilicidade aumentada pode facilitar a absorção desses compostos através da membrana celular.⁵⁵

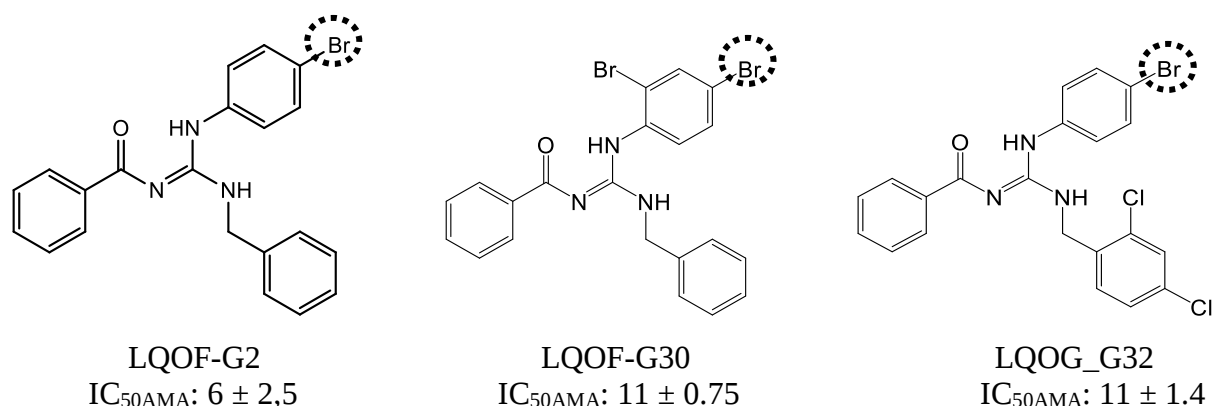


Figura 15. Compostos guanidínicos com átomo de bromo na posição “para” do anel.

Além dos compostos que contém o átomo de bromo que apresentaram atividade anti-amastigota frente a *L. amazonensis*, podemos destacar que a maioria dos compostos testados mostraram boa atividade, como, por exemplo a molécula LQOF-G6 e LQOF-G7 apresentaram IC_{50AMA} abaixo de 10 μM , (Tabela 8), parâmetro de medida da atividade do composto que inibiu 50% dos parasitas.

Para a atividade anti-promastigota frente a *L. amazonensis*, podemos observar que a LQOF-G37 e LQOF-T6 obtiveram resultados promissores de IC_{50PRO} de 15 ± 1.4 e 13 ± 0.6 , respectivamente. Essas estruturas possuem grupos apolares em suas estruturas químicas na posição “para” do anel (Figura 16) que proporcionaram uma atividade de IC_{50PRO} próxima de < 10 mM, considerando vantajosa, isso devido a características de elétron doador do reagente adamantilamina.⁷⁴

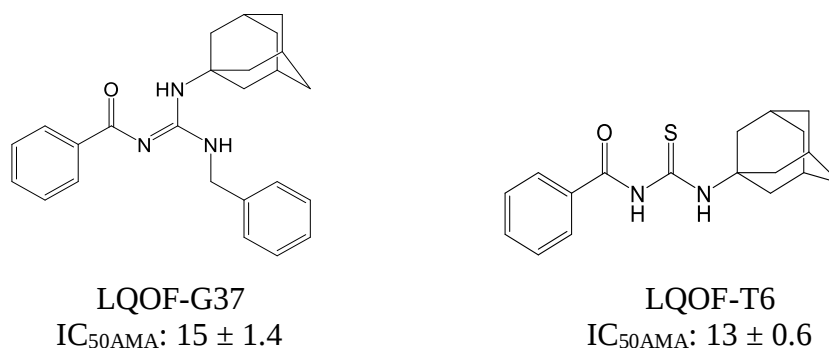


Figura 16. Compostos guanidínicos com grupos apolares.

Um dos critérios para a definição da segurança de uma molécula estudada é a sua toxicidade frente às células do hospedeiro. Porém, a determinação da citotoxicidade em

macrófagos (concentração citotóxica para 50% das células – CC₅₀) para as moléculas inéditas testadas estão apresentadas na Tabela 8 a seguir, sendo da LQOF-29 até LQOF-G37 com concentrações testadas em 300 µM. Para as tioureias intermediárias tem as concentrações testadas em 200 µM.

Tabela 8. Resultados da atividade citotóxica em macrófagos murinos CC₅₀, leishmanicida de compostos guanidínicos em promastigotas (IC_{50PRO}) e amastigotas (IC_{50AMA}) de *L. amazonensis*. Os valores estão apresentados, respectivamente, como média e $\pm$ desvio padrão. Fonte: Adaptado de MELA, M. F. da Silva. (2022).³⁷

Composto	Atividade anti- <i>L. amazonensis</i>			Atividade citotóxica em macrófagos murinos (CC ₅₀) µM	Atividade e inibitória CPB (%)	Atividade inibitória (IC ₅₀) µM
	(IC _{50PRO}) µM	(IC _{50AMA}) µM	SI _{ama}			
LQOF-G1	11 $\pm$ 0,70**	22 $\pm$ 3,35**	36,45	802 $\pm$ 0,32**	-	NA
LQOF-G2	19 $\pm$ 0,04**	6 $\pm$ 2,5**	123	738 $\pm$ 0,32**	-	NA
LQOF-G3	20 $\pm$ 0,04**	41 $\pm$ 4,1**	20,17	825 $\pm$ 1,59**	-	NA
LQOF-G6	26 $\pm$ 0,99**	17 $\pm$ 2,1**	65,82	1119 $\pm$ 105,4**	73	6 $\pm$ 0.15
LQOF-G7	16 $\pm$ 0,93**	7 $\pm$ 0,8**	88,42	619 $\pm$ 70,25**	-	NA
LQOF-29	38 $\pm$ 1,3	5 $\pm$ 1,4	60	300*	-	NA
LQOF-30	29 $\pm$ 0,2	11 $\pm$ 0,75	27,27	300*	-	NA
LQOF-32	14 $\pm$ 1,2	11 $\pm$ 1,4	27,27	300*	53	NA
LQOF-34	53 $\pm$ 0,2	NA	NC	300*	-	NA
LQOF-35	56 $\pm$ 5,5	NA	NC	300*	-	NA
LQOF-36	37 $\pm$ 6,45	NA	NC	300*	34	NA
LQOF-37	15 $\pm$ 1,4	NA	NC	300*	-	NA
LQOF-T4	42 $\pm$ 0,6	NA	NC	200*	-	NA
LQOF-T5	56 $\pm$ 1,5	NA	NC	200*	9	NA
LQOF-T6	13 $\pm$ 0,6	NA	NC	200*	-	NA
Miltefosina	15.1 $\pm$ 0,7	NA	NC	NA	-	NA
Anf B	3 $\pm$ 0,1**	5 $\pm$ 0,14**	4,6	23 $\pm$ 2,5**	-	NA

** Espírito Santo et al., 2019.

*Maior concentração testada.

NA = não avaliado.

NC = não calculado.

SI_{AMA} = Índice de seletividade (CC₅₀/IC₅₀).

Com a avaliação frente a espécie *L. amazonensis*, no presente trabalho foi avaliado o potencial da LQOF-G6 frente a inibição da enzima cisteína protease, espécie da *L. mexicana*. Visto que as guanidinas têm relatos na literatura frente à protease CPB de *L. mexicana* de capacidade de inibição desta cisteína protease.⁵⁶⁻⁵⁷

4.6. Avaliação da progressão do tratamento em camundongos fêmeas BALB/c infectados com *L. amazonensis* utilizando os compostos LQOF-G6 e LQOF-G7

Dentre os compostos avaliados quanto à atividade leishmanicida contra a forma amastigota frente a *L. amazonensis* ¹⁹, LQOF-G6 e LQOF-G7 também apresentaram boa potência (IC_{50AMA} : $17 \pm 2,1$ e $7 \pm 0,8$ μ M) e seletividade (SI: 65,82 e 88,42), respectivamente, indicando serem seguros para o prosseguimento com as análises *in vivo* em modelo experimental BALB/c.

Poderíamos indicar e avaliar o composto LQOF-G2, pois, obteve uma boa atividade a atividade anti-amastigota frente a *L. amazonensis* (IC_{50AMA} : $6 \pm 0,25$ μ M), no entanto, este composto já foi testado *in vitro* e *in vivo*, sendo, tratado por 15 dias (6 semanas após a infecção) reduzindo a carga parasitária em 46 e 60% a 0,13 e 0,25 mg / kg / dia, respectivamente.¹⁹

Para avaliar a cinética das lesões em diferentes grupos, os camundongos fêmeas BALB/c infectados com *L. amazonensis* foram tratados via intraperitoneal durante 15 dias (8 semanas após as infecções), utilizando 2 mg/kg/dia sendo:

- Grupo 1 (infectados e tratados com veículo);
- Grupo 2 (infectados tratados com Anf B);
- Grupo 3 (infectados e tratados com o composto LQOF-G6);
- Grupo 4 (infectados e tratados com composto LQOF-G7);
- Grupo 5 (controle negativo e tratado com veículo).

Foi realizada uma análise da progressão das lesões nas orelhas dos camundongos infectados, seguindo a medida das lesões com o propósito de determinar a eficácia do tratamento *in vivo* de camundongos BALB/c usando os compostos LQOF-G6 e LQOF-G7 e como controle, a Anf B.

Durante todo o tratamento, nos dias 1, 7 e 15, foi mensurado o diâmetro ($d \cdot D$; d = diâmetro menor e D = diâmetro maior), a espessura e o volume das lesões e, também, o registro do peso dos animais. Após o tratamento foi possível observar melhora no quadro da lesão dos grupos que foram tratados com os compostos LQOF-G6 e LQOF-G7 quando comparados com o grupo tratado apenas com o veículo (Figura 17).³⁷

Após o tratamento foi possível observar boa evolução no aspecto das lesões dos grupos tratados com LQOF-G6 e LQOF-G7 quando comparados ao grupo tratado apenas com o veículo (Figura 17). No entanto, observou-se que não houve desaparecimento total das lesões em todos os grupos, mas isso se deve à importante susceptibilidade dos camundongos BALB/c frente à infecção por *Leishmania*, sendo difícil a cura dessa linhagem, mesmo após o tratamento com o fármaco de referência.⁵⁸

As fotos referentes ao último dia de tratamento com Anf B não estão representativas devido a lesão estar encoberta pela pelagem do animal, como consequência, não sendo possível a comparação com os demais grupos.³⁷

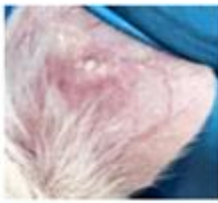
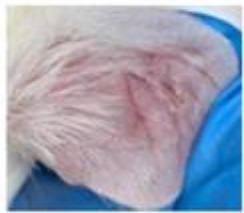
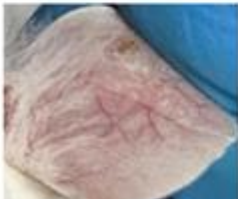
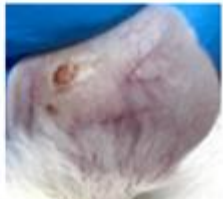
Grupos	Dia 1	Dia 7	Dia 15
Grupo 1 Infectados e tratados com PBS + 1% DMSO			
Grupo 2 Infectados e tratados com Anf B. 2mg/kg/dia			
Grupo 3 Infectados e tratados com LQOF-G6 2mg/kg/dia			
Grupo 4 Infectados e tratados com a LQOF-G7 2mg/kg/dia			

Figura 17. Fotos representativas das medidas semanais da lesão na orelha direita de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* nos dias 1, 7 e 15 de tratamento por via intraperitoneal com PBS, Anf B e composto LQOF-G6 e LQOF-G7.

Após o final do tratamento, verificou-se que os compostos LQOF-G6 e LQOF-G7 foram capazes de reduzir as lesões quanto a espessura e volume em relação ao grupo dos animais tratados com o veículo PBS (Figuras 19 e 20). Em relação ao diâmetro, não houve diferença significativa no final desta medida. (Figura 18)

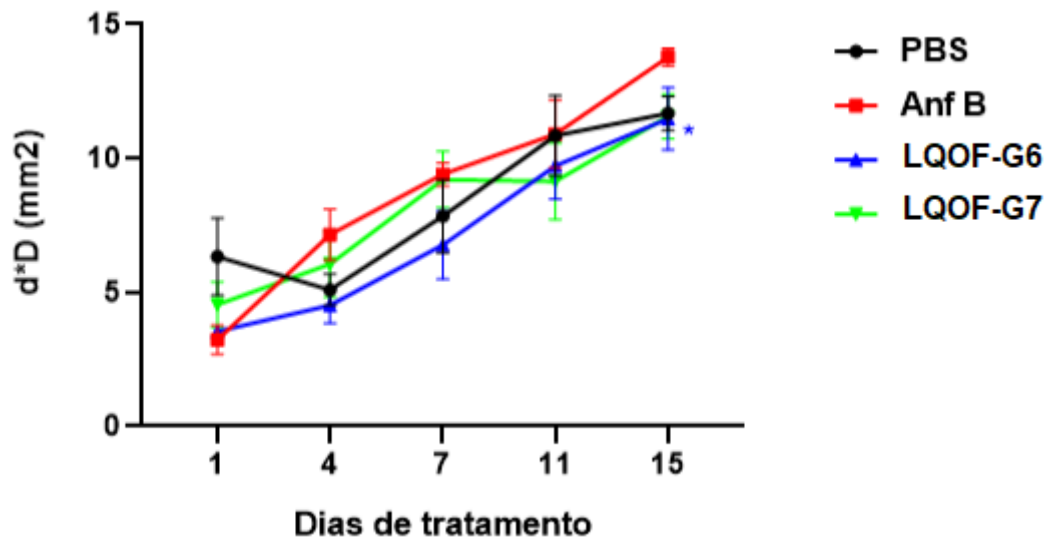


Figura 18. Medidas realizadas do diâmetro das lesões em orelhas tratadas com PBS, Anf B e composto LQOF-G6 e LQOF-G7. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias do diâmetro ($D \times d$; D: diâmetro maior, d: diâmetro menor) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativo entre os animais tratados com LQOF-G6 e PBS ($p < 0.01$).

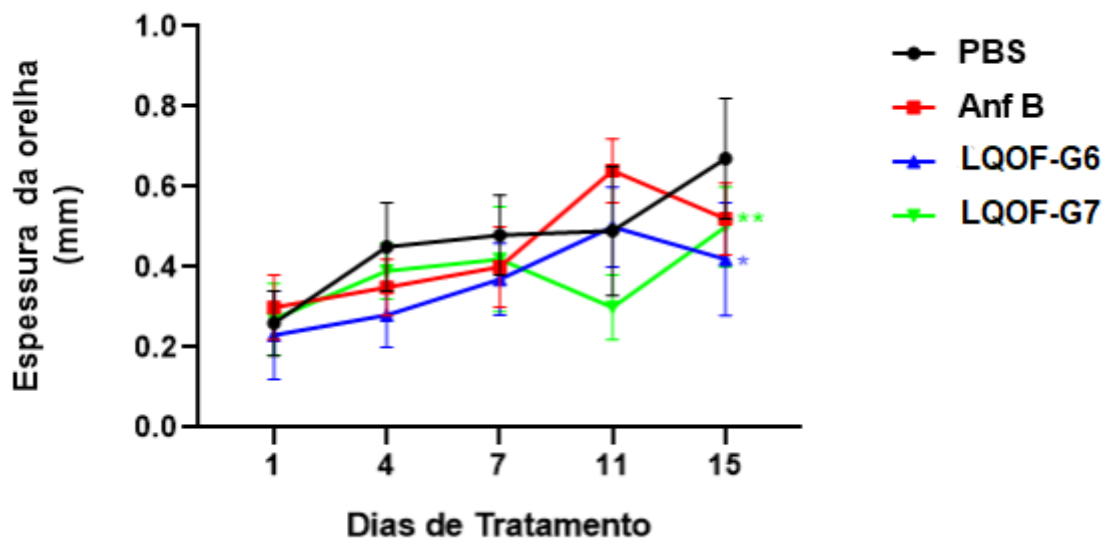


Figura 19. Medidas realizadas da espessura das lesões em orelhas dos animais tratados com PBS, Anf B e compostos LQOF-G6 e LQOF-G7. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias da espessura (mm) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativo entre os animais tratados com PBS ($p < 0.05$).

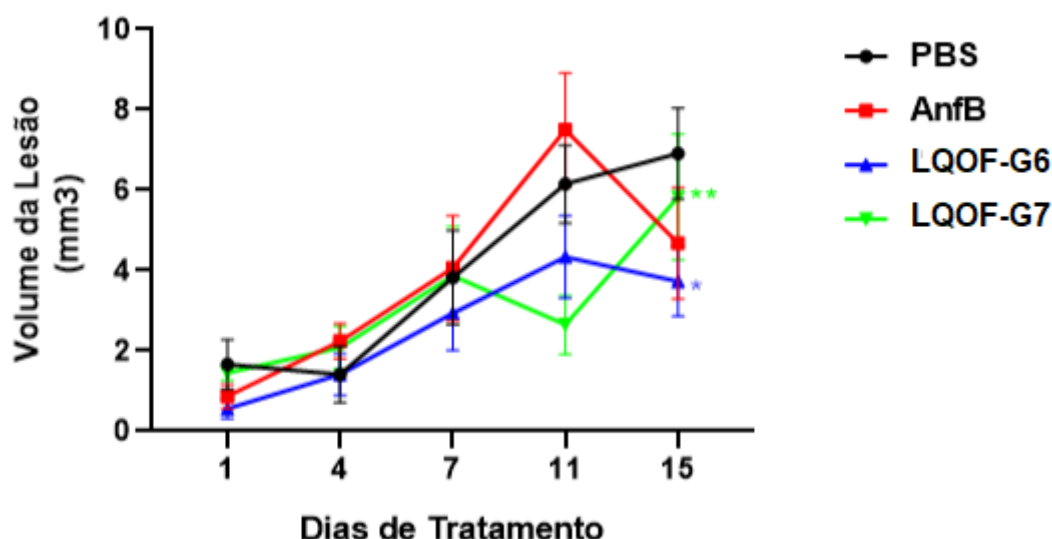


Figura 20. Medidas realizadas do volume das lesões em orelhas dos animais tratados com PBS, Anf B e compostos LQOF-G6 e LQOF-G7. O tratamento diário (1x ao dia) iniciou no 60º dia pós-infecção. O desenvolvimento das lesões foi monitorado três vezes por semana. Os valores correspondem às médias do volume ($v = D \times d \times e$; D: diâmetro maior, d: diâmetro menor, e: espessura) das lesões para cada grupo e as barras, o desvio padrão. *Diferença estatisticamente significativo entre os animais tratados com PBS ($p < 0.01$).

A carga parasitária foi determinada pelo cálculo do índice LDU a fim de avaliar a eficácia do tratamento *in vivo*, na qual foi confirmado que, após o tratamento com Anf B, a carga parasitária reduziu em 60,8%, enquanto com as moléculas LQOF-G6 e LQOF-G7, foi de 79,4% e 66,5%, respectivamente.

Apenas o diâmetro não teve diferença significativa tratado com os compostos (Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7), o restante dos grupos mostraram diferenças significativas em comparação com o grupo tratado com o veículo. Sendo assim, o composto LQOF-G6 foi o mais eficaz na redução da carga parasitária, enquanto o LQOF-G7, que também apresentou redução significativa neste parâmetro, semelhante ao fármaco de referência Anf B.³⁷ (Figura 21)

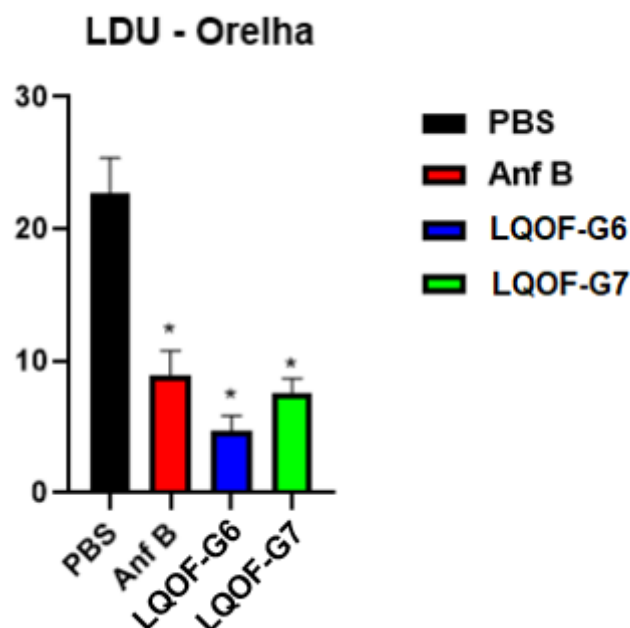


Figura 21. Quantificação da carga parasitária de lesões cutâneas na orelha de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* utilizando o índice LDU. Os dados estão expressos como média $\pm$ DP de animais infectados e tratados durante 15 dias distintos por grupos, sendo eles: tratados com PBS, Anf B (2 mg/kg/dia), LQOF-G6 (2 mg/kg/dia) e LQOF-G7 (2 mg/kg/dia). *Diferença estatisticamente significativa entre o grupo de animais tratados com PBS em relação aos tratados com Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7 ($p < 0.001$).

4.7. Avaliação de biomarcadores de função renal e lesão hepática para a determinação se LQOF-G6 e LQOF-G7 levam a efeitos tóxicos.

Os biomarcadores foram monitorados para mudanças devido à infecção por *Leishmania* ou por diferentes tratamentos medindo os níveis plasmáticos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), que são enzimas encontradas no fígado, além de bilirrubina total, creatinina e ureia.

O motivo para o aumento dos níveis de ALT e AST é relacionada a uma possível perda da integridade das células hepáticas, sendo assim, ocorreu uma alteração da função dos hepatócitos no local onde acontecem os processos de biotransformação de fármacos.⁵⁹

Não houve diferenças estatisticamente significativas nos níveis de ALT e AST de todos os grupos em relação aos animais saudáveis, o que pode indicar que os tratamentos analisados não causaram danos nos hepatócitos (Figuras 22 A e B).

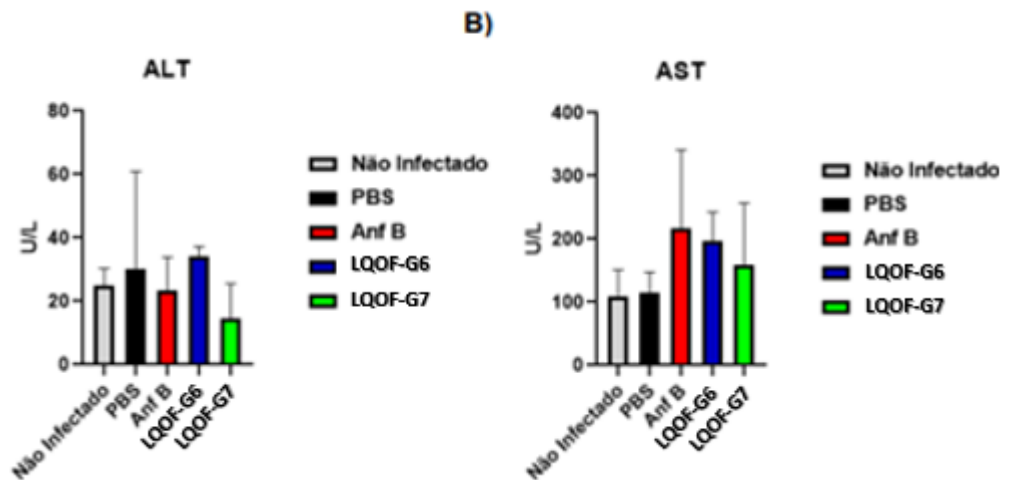


Figura 22. Níveis de ALT (A) e níveis de AST (B) em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratado com PBS e doses iguais de 2 mg/kg/dia de Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7, durante 15 dias. Fonte: Os dados dos níveis estão expressos como média $\pm$ DP. *Diferença estatisticamente significativa com os animais não infectados (animais saudáveis) ($p < 0,05$).

Níveis plasmáticos elevados de ALP e bilirrubina podem estar associados à obstrução do fluxo biliar, devido à processos patológicos, ou mesmo a perda de hepatócitos, que pode resultar na liberação de bilirrubina no plasma.⁵⁹ Os níveis de ALP tiveram uma diminuição estatisticamente significativa quando tratados com Anf B em comparação ao grupo de animais saudáveis, não existindo diferenças observadas nos demais grupos. (Figura 23 C).

Em relação aos níveis de bilirrubina, o grupo de animais infectados e tratados com PBS apresentou um aumento no nível de bilirrubina em relação ao grupo de animais saudáveis, o que é esperado como consequência da doença. Verificou-se também que os grupos tratados com Anf B e composto LQOF-G7 evitaram danos hepáticos, porque apresentaram níveis de bilirrubina mais baixos em comparação ao grupo de tratado com PBS.

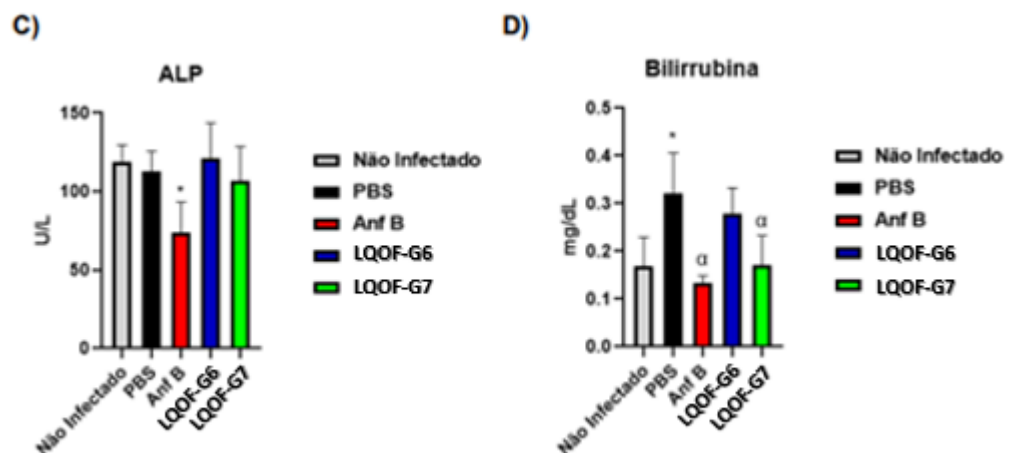


Figura 23. Níveis de ALP (C) e níveis de Bilirrubina (D) em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratado com PBS e doses iguais de 2 mg/kg/dia de Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7, durante 15 dias. Os dados dos níveis estão expressos como média $\pm$ DP. *Diferença estatisticamente significativa com os animais não infectados (animais saudáveis) ($p < 0,05$).

A creatina e a ureia estão entre os biomarcadores que indicam alterações renais e também são afetados em decorrência das leishmanioses comprometendo os rins.⁶⁰ Além da patologia, algumas substâncias também podem causar aumento da função renal, sendo assim, foi realizada uma análise desses biomarcadores.

Conforme a Figura 24 E e F, os grupos de tratamento analisados não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de creatinina, entretanto, os animais que receberam tratamento com Anf B e o composto G6 exibiram aumento estatisticamente significativo nos níveis de ureia em relação aos animais saudáveis, o que pode indicar um possível efeito nefrotóxico causado pela própria doença, uma vez que a leishmaniose cutânea, provoca danos aos rins do hospedeiro mesmo que de forma mais branda que em casos de leishmaniose visceral.⁷³

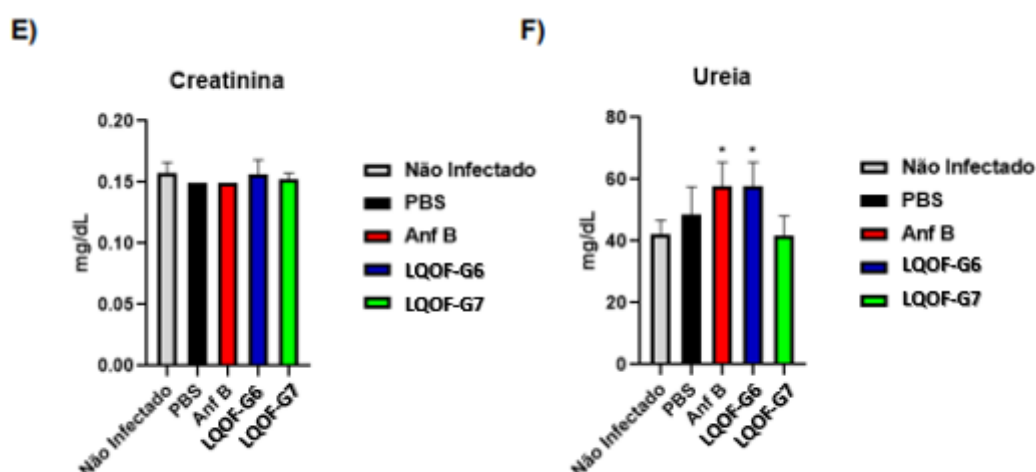


Figura 24. Níveis de Creatinina (E) e níveis de Ureia (F) em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis*, tratado com PBS e doses iguais de 2 mg/kg/dia de Anf B, LQOF-G6 e LQOF-G7, durante 15 dias. Fonte: Elaborado por MELA, M. F. da Silva. (2022).³⁷ Os dados dos níveis estão expressos como média $\pm$ DP. *Diferença estatisticamente significativa com os animais não infectados (animais saudáveis) ($p < 0,05$).

Para o desenvolvimento de novos fármacos terapêuticos para tratamento de leishmaniose é necessário considerar a eficácia do tratamento. A molécula LQOF-G6

apresentou melhor resposta no tratamento de leishmaniose em relação aos outros compostos, no entanto mostrou alteração nos parâmetros bioquímicos de função renal.

A molécula LQOF-G7 reduziu efetivamente a carga parasitária e melhorou os aspectos das lesões ao mesmo nível do tratamento com Anf B, e também não teve comprometimento nas funções renais, diferente da molécula LQOF-G6 e Anf B.

4.8. Atividade inibitória da enzima LmCPB2.8ΔCTE de compostos guanidínicos

Diversas Cisteínas proteases (CPs) causadoras da forma tegumentar e visceral da doença são descritas em amastigotas em *L. (L.) mexicana* encontradas em megassomos.⁶² As Cisteínas proteases B (CPBs), em especial, têm potencial imunorregulador na resposta imune no hospedeiro e na progressão da infecção experimental murina por *L. amazonensis*. Induzindo a apresentar uma resposta do tipo Th2 quando inibir uma resposta do tipo Th1, as CPBs evidenciam a ação de CPs de Leishmania, atuando na regulação da resposta imune do hospedeiro.⁶³

A literatura traz os compostos guanidínicos capazes de inibir a atividade da enzima LmCPB2.8ΔCTE, portanto, sendo interessantes compostos bioativos antileishmaniais tendo como mecanismo de ação as CPs.^{57,64}

Mesmo a LQOF-G2 sendo um composto antileishmanicida promissor *in vivo* frente a *L. amazonensis*¹⁹, ela não apresentou atividade inibitória contra LmCPB2.8ΔCTE. Diferente da LQOF-G6, sendo que a porcentagem de inibição da enzima pela LQOF-G6 foi inicialmente investigada na concentração de 20 μM. LQOF-G6 mostrou 73% de atividade inibitória contra CPB com IC_{50-CPB} de 6,0 ± 0,2 μM, descrito na Tabela 8. Este é um resultado relevante, que diferencia a LQOF-G6 de outras guanidinas desta série.

Além disso, usando 20 μM de substrato, LQOF-G6 mostrou ser um inibidor competitivo de LmCPB2.8ΔCTE em seu valor IC_{50-CPB} (6,0 ± 0,2 μM) com V_{max} = 500 μM/min e K_m = 25,3 μM. Portanto, LQOF-G6 apresentou valores aumentados de K_m com concentrações crescentes de 3 ± 0,2 μM, para 6 ± 0,2 μM e 10 ± 0,2 μM, o que se alinha com um comportamento competitivo (Figura 25). Esse resultado sugere que LQOF-G6 pode ser proposto para estudos mais avançados como candidato a agentes terapêuticos contra infecções por *L. amazonensis*.¹⁹

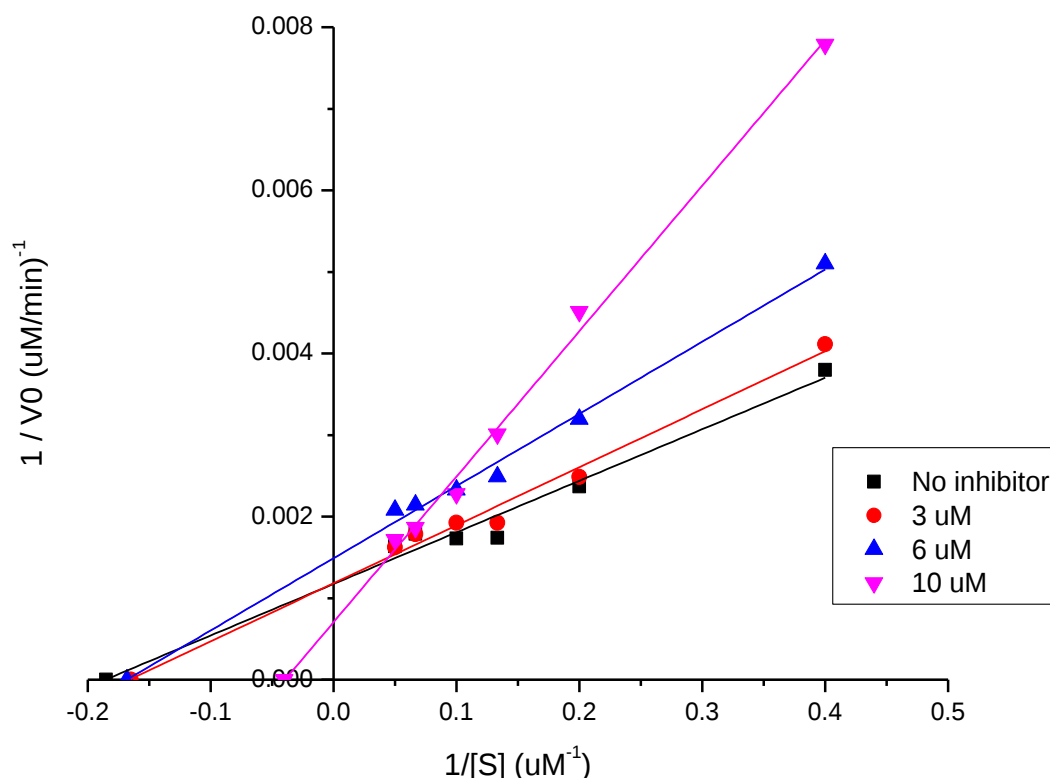


Figura 25. Gráfico de Lineweaver-Burk recíproco duplo mostrando a relação entre o recíproco da atividade da enzima ($1/V_0$) e o recíproco da concentração do substrato ($1/[S]$). A intercepção do gráfico com a abcissa dá o recíproco da constante de Michaelis-Menten ($1/K_m$) na ausência (w/o) e na presença de 3, 6 e 10 μM de LQOF-G6.

Além da LQOF-G6, podemos verificar que outras três moléculas tiveram atividade inibitória, sendo LQOF-G32, LQOF-G36 e LQOF-T5, sendo 53%, 34% e 9%, respectivamente.

4.9. Ação da LQOF-G7 na produção e influência de NO por células mononucleares

O composto LQOF-G7 foi escolhida para realização do ensaio do mecanismo de ação na produção de NO em monócitos humanos pela sua atividade anti-leishmania, baixa toxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humanos e capacidade de induzir morte por apoptose em amastigotas de *L. infantum*.⁷⁸ Sendo assim, os resultados realizado pela aluna de Doutorado, Fernanda Silva do Laboratório de Imunologia das Doenças Infeciosas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB)/Paraíba, com o composto que tem atividade mais promissor nos resultados escolhido frente a *L. infantum*, causadora da leishmaniose visceral.

As colunas representam à condição com infecção e à condição sem infecção, enquanto os sinais positivos e negativos indicam presença ou ausência dos componentes do experimento (composto LQOF-G7, LPS como estímulo e Anf B como controle). Um sinal negativo indica a ausência desses componentes, enquanto um sinal positivo indica a presença de um ou mais componentes.

Com isso, foi realizada uma avaliação na produção de NO como investigação da capacidade moduladora na resposta imune em células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Utilizando, então, o composto LQOF-G7, LPS como estímulo e Anf B como controle.

A avaliação das concentrações de nitrito foi medida utilizando a cultura do sobrenadante, sendo assim, a Figura 26 mostra resultados dos níveis de nitrito produzidos por monócitos infectados com *L. infantum*. A reação de Griess mediu os níveis de nitrito de sobrenadantes coletados do ensaio de taxa de infecção de monócitos de *L. infantum* em sangue periférico de indivíduos saudáveis (PBMC).

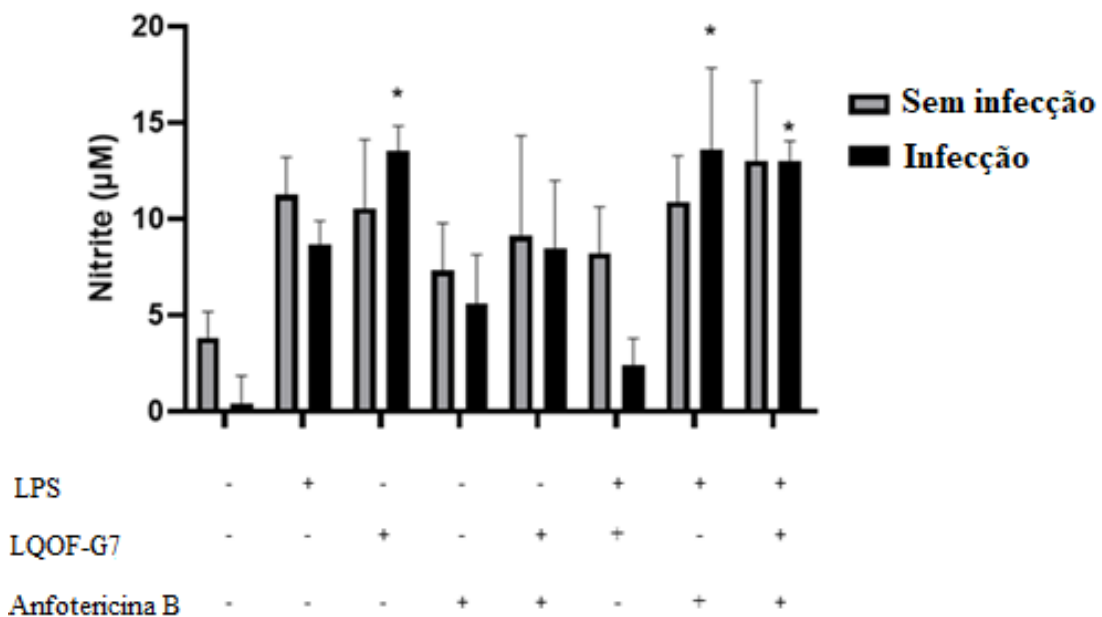


Figura 26. Colunas medindo os níveis de nitrito (μM) produzidos por monócitos infectados com *L. infantum* tratados com LQOF-G7 e controles. As colunas correspondem à condição com infecção e à condição sem infecção. * $P < 0,05$. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão. A ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey foi realizada para comparar os grupos com o controle. Fonte: Laboratório de Imunologia das Doenças Infecciosas, Universidade Federal da Paraíba (UFPB)/Paraíba

O aumento da produção de nitrito pode ser observado em monócitos tratados apenas com LQOF-G7 ($10,5 \pm 3,58 \mu\text{M}$) em comparação com um grupo controle negativo, ($3,81 \pm$

1,36 μM), com isso, o composto LQOF-G7 configura ter a capacidade de modulação da resposta imune de PBMC de indivíduos saudáveis, sendo que em monócitos não afetados também se observa um aumento leve na produção de NO com o tratamento da LQOF-G7.

Investigou-se o composto LQOF-G7 poderia aumentar a produção de espécies reativas de nitrogênio em monócitos humanos. Um aumento significativo na produção de nitrito pode ser visto em monócitos tratados apenas com o composto LQOF-G7 ($10,5 \pm 3,58 \mu\text{M}$) em comparação com o grupo controle não tratado ($3,81 \pm 1,36 \mu\text{M}$) ($p < 0,05$).⁷⁸ Não houve diferença significativa entre as células tratadas com LPS e o tratamento com LQOF-G7 em ambas as condições. Este ensaio descobriu que o composto LQOF-G7 induziu a produção de nitrito em PBMCs.

Níveis de espécies reativas de nitrogênio são essenciais, pois essas espécies controlam a infecção por patógenos, principalmente por meio de amastigotas intracelulares na leishmaniose. Além disso, a expressão da sintase do óxido nítrico (NOS) e a produção de NO são características das respostas das células imunes; em particular, as células imunes inatas são fontes essenciais de NO, principalmente em células dendríticas e monócitos/macrófagos.

5. CONCLUSÃO

Consegui sintetizar quinze compostos, sendo dez deles inéditos, que foram caracterizados por meio de técnicas como espectrometria de massas (MS), espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), ressonância magnética nuclear (RMN) para análise de ^{13}C e ^1H , além de técnicas 2D. Utilizou-se também cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas (LC/UV/MS), que revelou alta pureza dos compostos. Além disso os resultados do ponto de fusão dos compostos foram promissores. Além dessas técnicas mencionadas, a análise por RMN e por Raio-X evidenciaram a conformação do isômero Z do composto LQOF-G6.

Os compostos foram testados contra as formas promastigota e alguns deles contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*, obtendo resultados promissores com valores de IC_{50} . Esses resultados demonstraram que os compostos LQOF-G6 e LQOF-G7 são potentes e seletivos frente *L. amazonensis*. Por esse motivo, esses compostos foram selecionados para serem usados no tratamento *in vivo* de leishmaniose cutânea em camundongos BALBc infectados com *L. amazonensis*, na dose de 2 mg/kg/dia. Os compostos mostraram uma redução das lesões causadas pela doença e uma redução considerável da carga parasitária nas lesões (79,4% e 66,5% respectivamente). Além disso, não foram observados danos hepáticos e renais nos animais tratados com esses compostos.

Adicionalmente, o composto LQOF-G6 apresentou atividade inibitória na enzima *LmCPB2.8ΔCTE*, com uma porcentagem de inibição de 73% a uma concentração de 20 μM e um valor de $\text{IC}_{50\text{-CPB}}$ de $6,0 \pm 0,15 \mu\text{M}$. Outros três compostos também mostraram atividade inibitória, sendo eles o LQOF-G32, LQOF-G36 e LQOF-T5, com 53%, 34% e 9%, respectivamente.

O composto LQOF-G7 demonstrou um aumento na produção de nitrito nas células mononucleares do sangue periférico, indicando um possível mecanismo de ação contra *L. infantum*. A concentração desse composto para o aumento da produção de nitrito foi de $10,5 \pm 3,58 \mu\text{M}$, em comparação com um grupo controle negativo que apresentou uma concentração de $3,81 \pm 1,36 \mu\text{M}$.

Por fim, constata-se que os compostos guanidínicos LQOF-G6 e LQOF-G7 apresentaram melhores resultados e podem ser investigados como compostos promissores no desenvolvimento de novos fármacos para tratamento de leishmaniose. Isso se deve ao fato de que as opções de tratamento atuais para essa doença, principalmente a quimioterapia, estão

longe de serem ideais, devido à ocorrência frequente de efeitos colaterais significativos e ao desenvolvimento de resistência a determinadas drogas.

6. REFERÊNCIAS

- [1] WHO. **Health topics, Leishmaniasis**. World Health Organization, 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>.
- [2] SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; SILVA SANTOS, S.; SANTANA, L. A. **Parasitologia: fundamentos e prática clínica**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020.
- [3] TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.
- [4] Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. **Leishmaniose**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/leishmaniose-permanece-como-doenca-infectocontagiosa-de-grande-impacto>>.
- [5] HANDLER, M. Z. et al. Leishmaniose cutânea e mucocutânea: diagnóstico diferencial, diagnóstico, histopatologia e tratamento. **Jornal da Academia Americana de Dermatologia**, v. 73, n. 6, pág. 911-926, 2015.
- [6] Organização Pan Americana da Saúde – OPAS. **Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas**. Núm. 10, dezembro de 2021. Washington, D.C.: OPS; 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>>.
- [7] Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. **Leishmaniose**. Disponível em: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/vetores.htm>>.
- [8] DA COSTA CLEMENTINO, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity. **PLoS ONE**, v. 16. November, p. 1–22, 2021.

- [9] CAMERON, Pamela et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF- κ B signaling pathway. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3297-3304, 2004.
- [10] SANGSHETTI, Jaiprakash N. et al. Antileishmanial drug discovery: Comprehensive review of the last 10 years. **Rsc Advances**, v. 5, n. 41, p. 32376-32415, 2015.
- [11] GASSER JR, R. A. et al. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clinical infectious diseases**, v. 18, n. 1, p. 83-90, 1994.
- [12] ZAGHLOUL, I. Y.; AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 98, n. 8, p. 793-800, 2004.
- [13] DE LUCA, L. et al. Discovery of benzimidazole-based *Leishmania mexicana* cysteine protease CPB2.8 Δ CTE inhibitors as potential therapeutics for leishmaniasis. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 92, n. 3, p. 1585–1596, 2018.
- [14] NILSSON, B. L.; OVERMAN, L. E. Concise synthesis of guanidine-containing heterocycles using the Biginelli reaction. **The Journal of organic chemistry**, v. 71, n. 20, p. 7706-7714, 2006.
- [15] BERLINCK, R. G. S. et al. The chemistry and biology of guanidine natural products. **Natural product reports**, v. 34, n. 11, p. 1264-1301, 2017.
- [16] BAUGH, S. D. P.; CHALY, A.; WEAVER, D.G.; PELLETIER, J.C.; THANNA, S.; FREEMAN, K. B.; REITZ, A. B.; SCOTT, R. W. Agentes antifúngicos altamente potentes e amplamente ativos para o tratamento de infecções fúngicas invasivas. **Cartas de Química Bio Orgânica e Medicinal**. 2021. 33, 127727.

- [17] CHANG, L. C.; WHITTAKER, N. F.; BEWLEY, C. A. Crambescidin 826 and dehydrocrambine A: new polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp. that inhibit HIV-1 fusion. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1490-1494, 2003.
- [18] LIU, X. et al. Synthesis and antimalarial activity of 2-guanidino-4-oxoimidazoline derivatives. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 13, p. 4523-4535, 2011.
- [19] DO ESPIRITO SANTO, R. D. et al. N, N', N''-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 171, p. 116-128, 2019.
- [20] HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.
- [21] NOMENCLATURE, Enzyme. Recommendations of the nomenclature committee of the international union of biochemistry and molecular biology on the nomenclature and classification of enzymes. 1992.
- [22] NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger-7**. Artmed Editora, 2018.
- [23] SILVA-JR, F.P.; De-Simone SG. Proteases como lvsos de quimioterapia. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, Brasil, v. 22, p. 12 – 17, 2001.
- [24] LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4459-4488, 2002.
- [25] ACACIO SANTINI PEREIRA, B. et al. Proteinase inhibitors: a promising drug class for treating leishmaniasis. **Current Drug Targets**, v. 15, n. 12, p. 1121-1131, 2014.
- [26] SOUZA, R. S. et al. **Diferenças na expressão gênica e na forma de direcionamento da região COOH-terminal de cisteína-proteinase B de Leishmania (Leishmania) amazonensis**. Tese (Doutorado em ???) – FACULDADE. LOCAL. 2015.

- [27] SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de Leishmania: Novos Alvos para o desenvolvimento Racional de Fármacos. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p. 1541-1548, 2010.
- [28] ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics***, v. 1824, n. 1, p. 195-206, 2012.
- [29] KLEMBA, M.; GOLDBERG, D. E. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. ***Annual review of biochemistry***, v. 71, p. 275, 2002.
- [30] RIBEIRO, J. F. R. **Inibidores de Cisteíno Proteases como Candidatos Terapêuticos para o Tratamento de Doenças Parasitárias**. Tese (Doutorado em ???). Universidade de São Paulo. LOCAL. 2018.
- [31] FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, Olga. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. ***Experimental parasitology***, v. 18, n. 2, p. 195-202, 1966.
- [32] DEBRABANT, A., Joshi, MB, Pimenta, PFP, Dwyer, DM. Geração de amastigotas axênicos de *Leishmania donovani*: seu crescimento e características biológicas. ***Int J Parasitol*** 34, 205-217, 2004.
- [33] MURI, Estela Maris Freitas. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. ***Química Nova***, v. 37, p. 308-316, 2014.
- [34] DE ALMEIDA, L. **Leishmanioses e derivados de furoxano e benzofuroxano : atividade biológica *in vitro* e *in vivo* e potenciais mecanismos de ação**. p. 0–132, 2017.
- [35] VELÁSQUEZ, A. M. A. et al. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against *Leishmania amazonensis* and *trypanosoma cruzi*. ***Journal of the Brazilian Chemical Society***, v. 27, n. 6, p. 1032–1039, 2016.

- [36] MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 86, n. 12, p. 999–1002, 2000.
- [37] MELA, M. F. da Silva. Leishmanioses, derivados guanidínicos e cisteíno proteases: atividade biológica *in vitro* e *in vivo* para o desenvolvimento racional de fármacos. 2022
- [38] CLEMENTINO, L. DA C. et al. *in vitro* activities of glycoalkaloids from the *Solanum lycocarpum* against *L. infantum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 6, p. 673–677, 2018.
- [39] VELÁSQUEZ, Á. M. A. et al. Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for Cutaneous Leishmaniasis in the Murine Model of Infection with *Leishmania amazonensis* and Its Inhibitory Effect on Topoisomerase 1B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e00688-17, 2017.
- [40] JUNGE, W. et. al. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. *Clinica Chimica Acta*, v. 344, n. 1-2, p. 137-48, 2004.
- [41] HENRY, R. J., N. Chiamori, O. J. Golub and S. Berkman. "Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic-oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, and lactic acid dehydrogenase." *American journal of clinical pathology* 34(4_ts): 381-398. 10, 1960.
- [42] KARMEN, A. "A note on the spectrophotometric assay of glutamic transaminase in human serum." *J. Clin. Investigation* 34: 131-133, 1955.
- [43] BOWERS JR, George N.; MCCOMB, Robert B.; UPRETTI, Amapoli. Fosfato de 4-nitrofenil - caracterização de materiais de alta pureza para medir a atividade da fosfatase alcalina no soro humano. **Química clínica**, v. 27, n. 1, pág. 135-143, 1981.

- [44] BERGMEYER, Hans Ulrich. Ammonia. **Methods of enzymatic analysis: Metabolites 3: lipids, amino acids, and related compounds**. 3rd ed., v. 8, p. 454-462, 1985.
- [45] SIMS, F. H.; HORN, CPHLP. Some observations on Powell's method for the determination of serum bilirubin. **American Journal of Clinical Patholog**, v. 29, n. 5, p. 412-417, 1958.
- [46] CLEMENTINO, L. C.; FERNANDES, G. F. S.; PROKOPCZYK, I. M.; LAURINDO, W. C.; TOYAMA, D.; MOTTA, B. P. et al. (2021). Design, synthesis, and biological evaluation of N-oxide derivatives with potent *in vivo* antileishmanial activity. **PLoS ONE**. 1-22. doi: 10.1371/journal.pone.0259008.
- [47] VIANA, Agostinho Gonçalves et al. A infecção de monócitos humanos com cepas de *L. infantum* induz uma resposta modulada quando comparada com a infecção por *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1896, 2018.
- [48] VIEIRA, É. LM e outros. Perfil imunorregulatório de monócitos de pacientes com leishmaniose tegumentar e associação com o tamanho da lesão. **Imunologia parasitária**, v. 35, n. 2, pág. 65-72, 2013.
- [49] BARTOSH, Thomas J.; YLOSTALO, Joni H. Ensaio inflamatório de macrófagos. **Bioprotocolo**, v. 4, n. 14, pág. e1180-e1180, 2014.
- [50] LAPARA, Nicholas J.; KELLY, Ben L. Supressão de respostas inflamatórias induzidas por LPS em macrófagos infectados com *Leishmania*. **Journal of Inflammation**, v. 7, n. 1, pág. 1-9, 2010.
- [51] SCHILDBERGER, Anita e cols. Monócitos, células mononucleares do sangue periférico e células THP-1 exibem diferentes padrões de expressão de citocinas após estimulação com lipopolissacarídeo. **Mediadores da inflamação**, v. 2013, 2013.

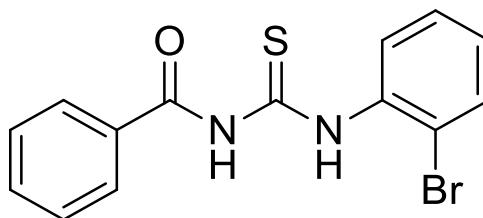
- [52] MAGALHÃES, Luísa MD et al. Ativação diferencial de monócitos e linfócitos humanos por cepas distintas de *Trypanosoma cruzi*. **PLoS doenças tropicais negligenciadas**, v. 9, n. 7, pág. e0003816, 2015.
- [53] REZA, Shafiei et al. Perfil de citocinas e níveis de óxido nítrico em macrófagos expostos a *L. infantum* FML. **Parasitologia experimental**, v. 203, p. 1-7, 2019.
- [54] CUNHA, S.; RODRIGUES JR, MANOEL, T. The first bismuth (III)-catalyzed guanylation of thioureas. **Tetrahedron letters**, v. 47, n. 39, p. 6955-6956, 2006.
- [55] THOMAS, G. Química medicinal: uma introdução. 2º Edição. 2003.
- [56] JONES, B. D. et al. Synthesis and Evaluation of Oxyguanidine Analogues of the Cysteine Protease Inhibitor WRR-483 against Cruzain. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, v. 7, n. 1, p. 77–82, 2016
- [57] LANGOLF, Sebastian e cols. Desenvolvimento de Inibidores Não Peptídicos de Cisteína Protease Antitripanossômicos e Antiplasmodiais Baseados em Blocos de Construção N-Protégidos-Guanidino-Furan e-Pirrol. **ChemMedChem**, v. 6, n. 9, pág. 1581-1586, 2011.
- [58] CROFT, Simon L.; SUNDAR, Shyam; FAIRLAMB, Alan H. Resistência a drogas na leishmaniose. **Revisões de microbiologia clínica**, v. 19, n. 1, pág. 111-126, 2006.
- [59] TIETZ, N. W. et al. **Tietz fundamentals of clinical chemistry.**, 2001. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001.
- [60] WANG, HONGKAI; JIANG, J. R. AND T. Urea. In: *Urea Transporters*. [s.l: s.n.]. p. 7–29.

- [61] SANTO, Rafael Dias Do Espírito et al. Experimental NMR and MS study of benzoylguanidines. Investigation of E/Z isomerism. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 26, n. 4, p. 315-321, 2013.
- [62] ROBERTSON, Colin D.; COOMBS, Graham H. Caracterização de três grupos de cisteína proteinases em amastigotas de *Leishmania mexicana*. **Parasitologia molecular e bioquímica**, v. 42, n. 2, pág. 269-276, 1990.
- [63] DE SOUZA LEÃO, S. et al. Amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* internalizam e degradam moléculas MHC classe II de suas células hospedeiras. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 10, pág. 3219-3231, 1995.
- [64] CHEN, Y. T. et al. *in vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.
- [65] MOREIRA, V. P. et al. Novel Selective and Low-Toxic Inhibitor of Lm CPB2. 8 Δ CTE (CPB) One Important Cysteine Protease for *Leishmania* Virulence. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, p. 1903, 2022.
- [66] SAITO, K., MIWA, S., IIDA, A., FUJIMOTO, Y., CAYTAN, E., ROUSSEL, C., & KITAGAWA, O. (2021). Detection of Isotopic Atropisomerism Based on ortho-H/D Discrimination. **Organic Letters**, 23(19), 7492-7496.
- [67] JEFFREY, G. A. **An introduction to hydrogen bonding**; Oxford University Press: New York, 1997.
- [68] SANTIAGO, Alexandre Silva; DA ROCHA PITA, Samuel Silva; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual ea necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021.

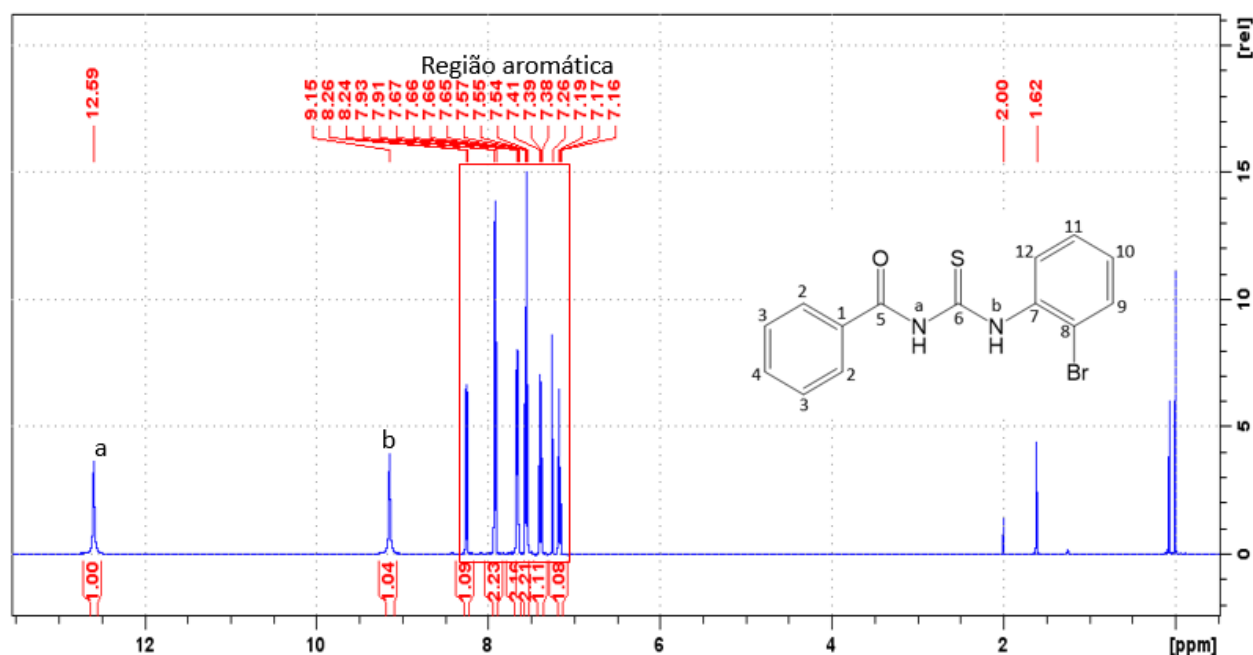
- [69] HEINZEL, FP et al. Interleucina 12 recombinante cura camundongos infectados com *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 5, pág. 1505-1509, 1993.
- [70] SYPEK, JP et al. Resolução da leishmaniose cutânea: a interleucina 12 inicia uma resposta imune protetora T helper tipo 1. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 6, pág. 1797-1802, 1993.
- [71] KIM, Seong-Heun; SEMENYA, Dorothy; CASTAGNOLO, Daniele. Fármacos antimicrobianos contendo porções de guanidina: uma revisão. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 216, p. 113293, 2021.
- [72] SANTIAGO, Alexandre Silva; DA ROCHA PITA, Samuel Silva; GUIMARÃES, Elisalva Teixeira. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual ea necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543-e29510716543, 2021.
- [73] MENESES, G. C. et al. Novel kidney injury biomarkers in tropical infections: A review of the literature Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, 2020.
- [74] BARRIOS EGUILUZ, A. D.. Estudo de novos compostos guanidínicos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase (DHPS) como agentes antiproliferativos e antifúngicos. 2018.
- [75] SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, Nancy. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews immunology**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.
- [76] IMUNE, RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO NA RESPOSTA; LTA, À. A Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa. **Leishmanioses do continente americano**, p. 357, 2014.
- [77] MICHEL, T. & FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? **The Journal of Clinical Investigation**, 100(9): 2.146-2.152, 1997.

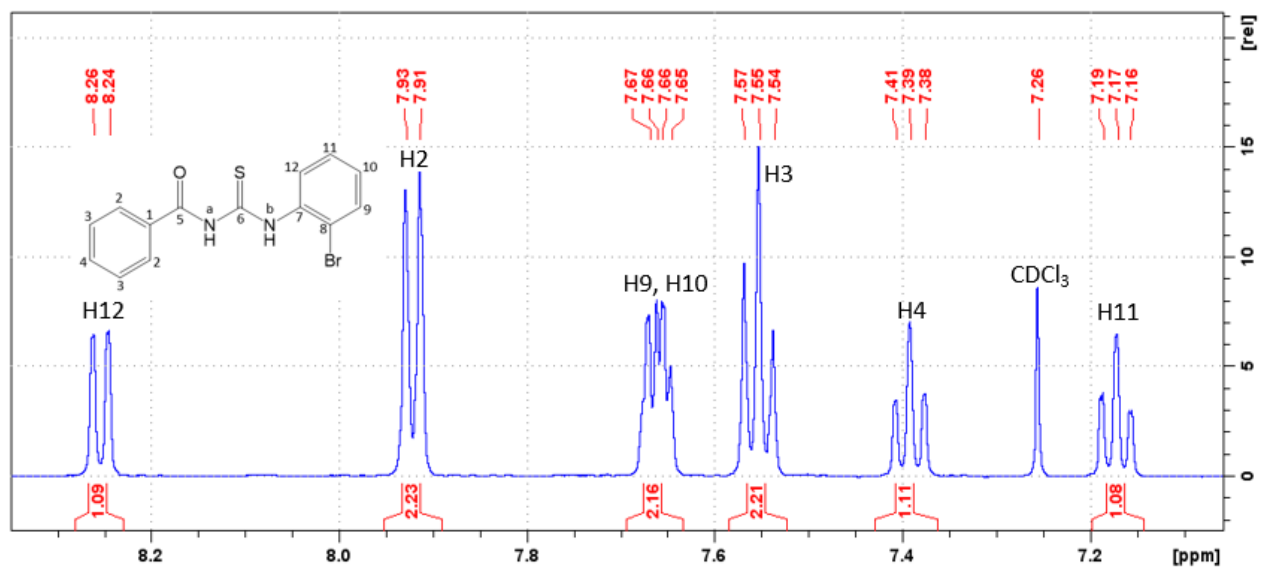
[78] ALMEIDA, F. S. et al. Leishmanicidal Activity of Guanidine Derivatives against *Leishmania infantum*. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 3, p. 141, 2023.

7. APÊNDICE

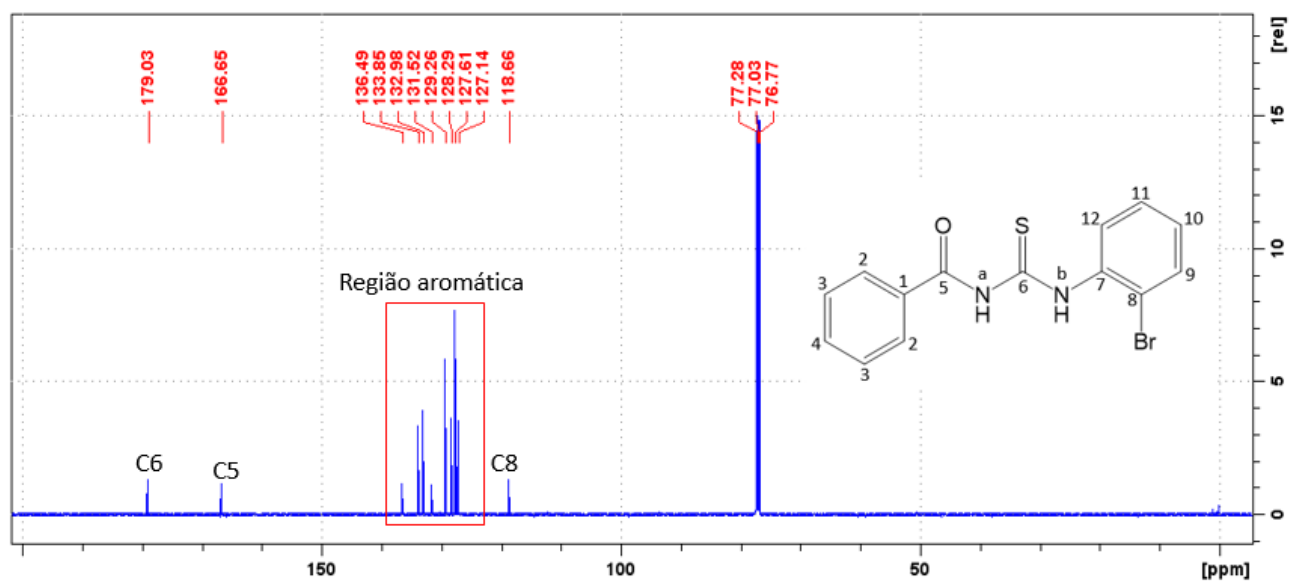


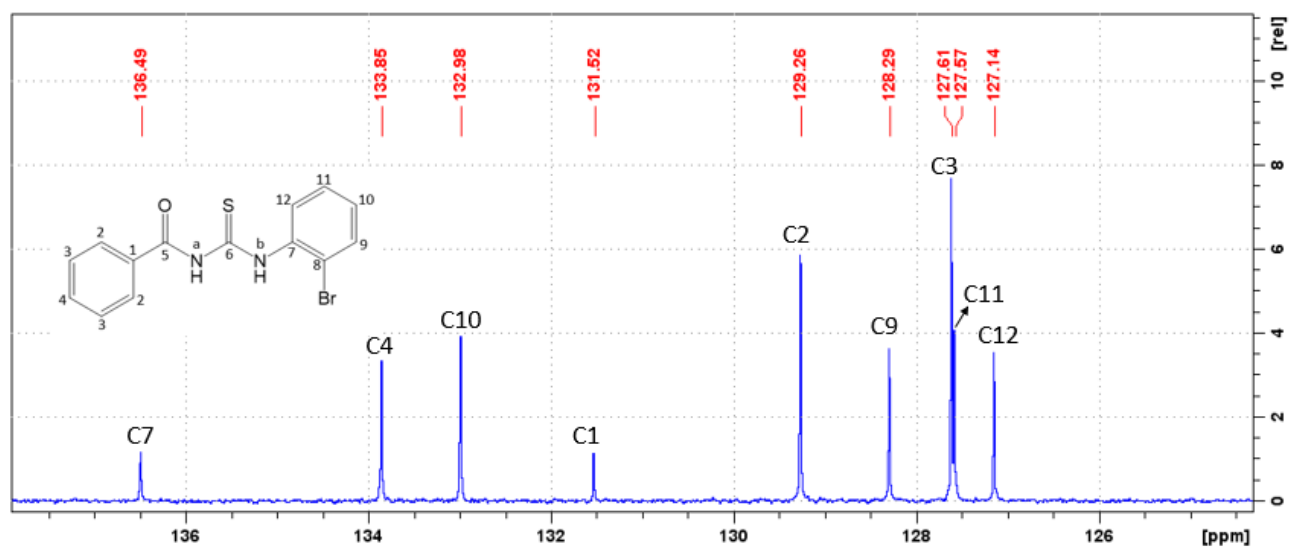
1-benzoyl-3-(2-bromofenil) tioureia – (LQOF_T4); pf = 136,9 – 137,2°C; recristalização: acetonitrila; rendimento: 87%; **LC-UV/MS**: 96,37%; **ESI(+)-MS**: m/z encontrada: 334,9846, m/z calculada para $[C_{14}H_{11}BrN_2OS + H]^+$: 334,9848, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS**: $[M + H - C_6H_5CONH_2]^+$ de m/z 213,9321, $[M + H - BrC_6H_4NH_2]^+$ de m/z 171,9760 e $[M + H - BrC_6H_4NCS]^+$ de m/z 122,0604; **1H NMR** (500.16 MHz, $CDCl_3$) δ = 12.59 (br, NH), 9.15 (br, NH), 8.26 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 10 Hz, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.55 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 7.5 Hz, 1H); **^{13}C NMR** (125.765 MHz, $CDCl_3$) δ = 179.03 (C=S), 166.65 (C=O), 136.49 (C), 133.85 (CH), 132.98 (CH), 131.52 (C), 129.26 (2CH), 128.29 (CH), 127.61 (2CH), 127.57 (CH), 127.14 (CH), 118.66 (C).

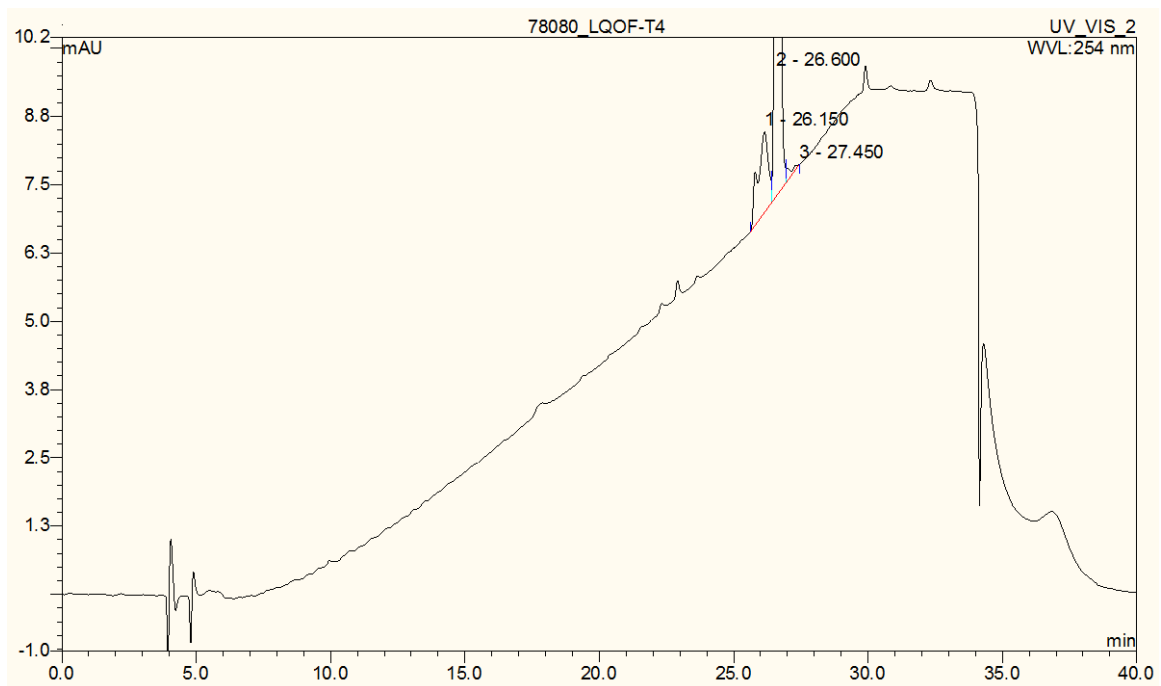
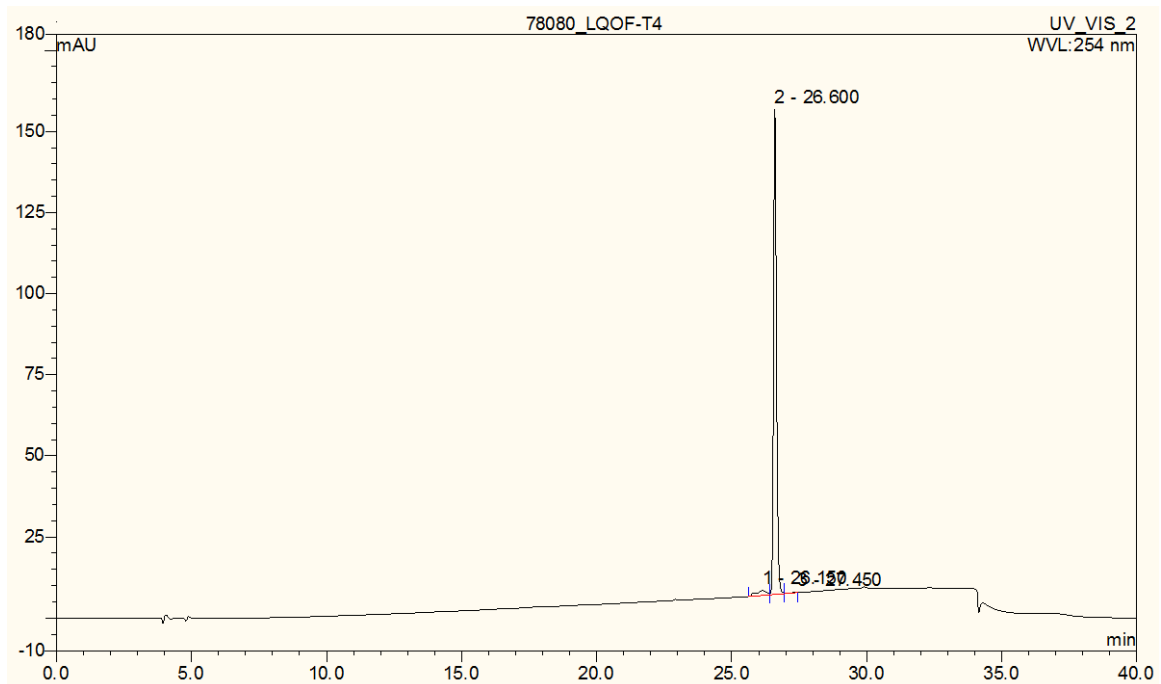
 1H - LQOF-T4 **1H – Região aromática LQOF-T4**



¹³C - LQOF-T4



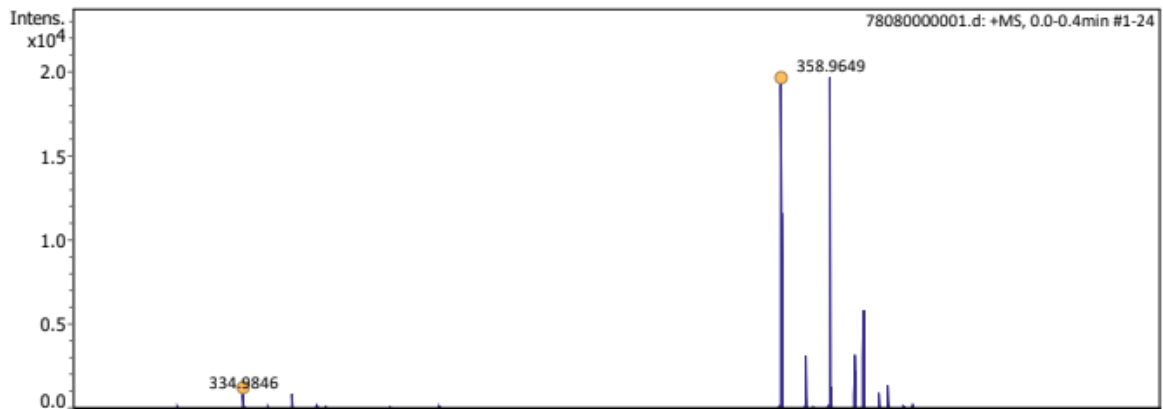
^{13}C – Região aromática LQOF-T4**LQOF_T4 – LC (HPLC)**



Retention Time: **26.60 min**

Relative Peak Area: **96.37 %**

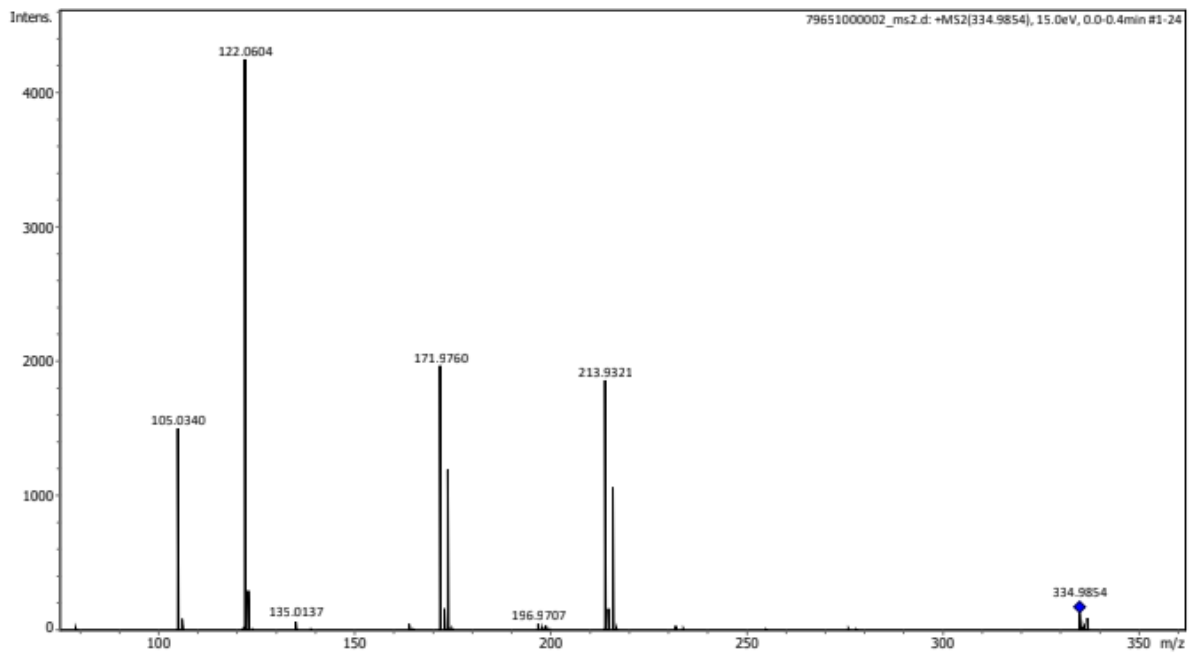
LQOF_T4 ESI-(+) MS

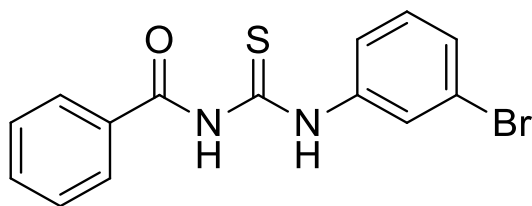
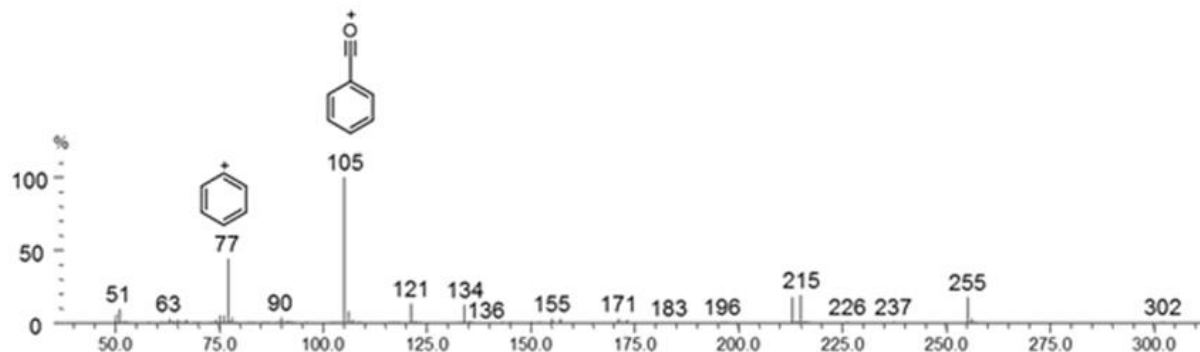


m/z 334,9846: C₁₄H₁₂BrN₂OS

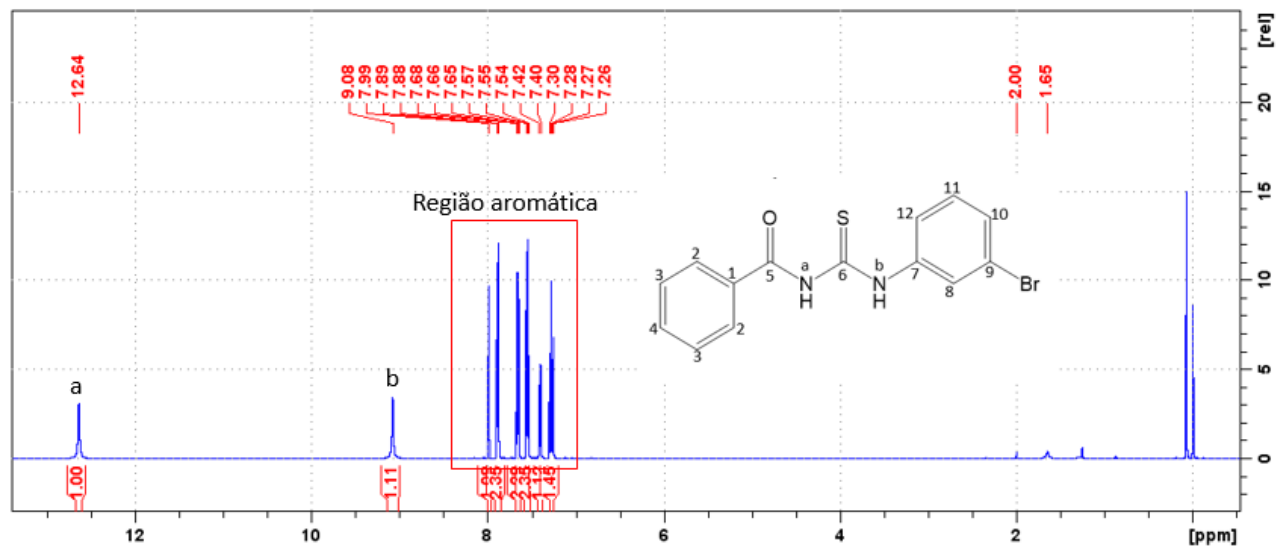
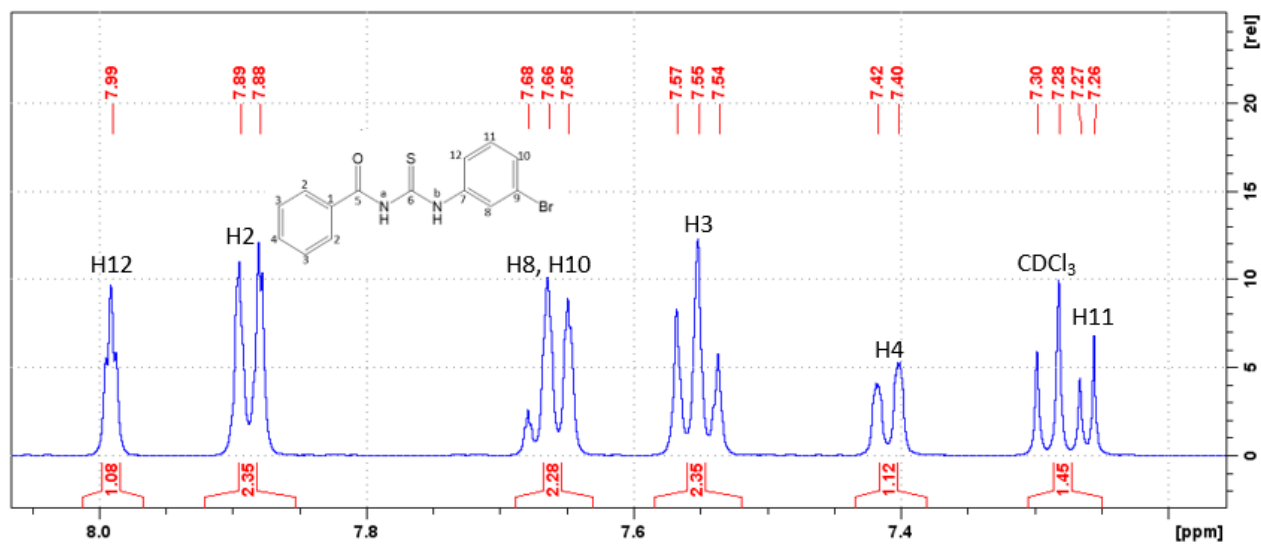
m/z 358,9649: C₁₄H₁₁BrN₂NaOS

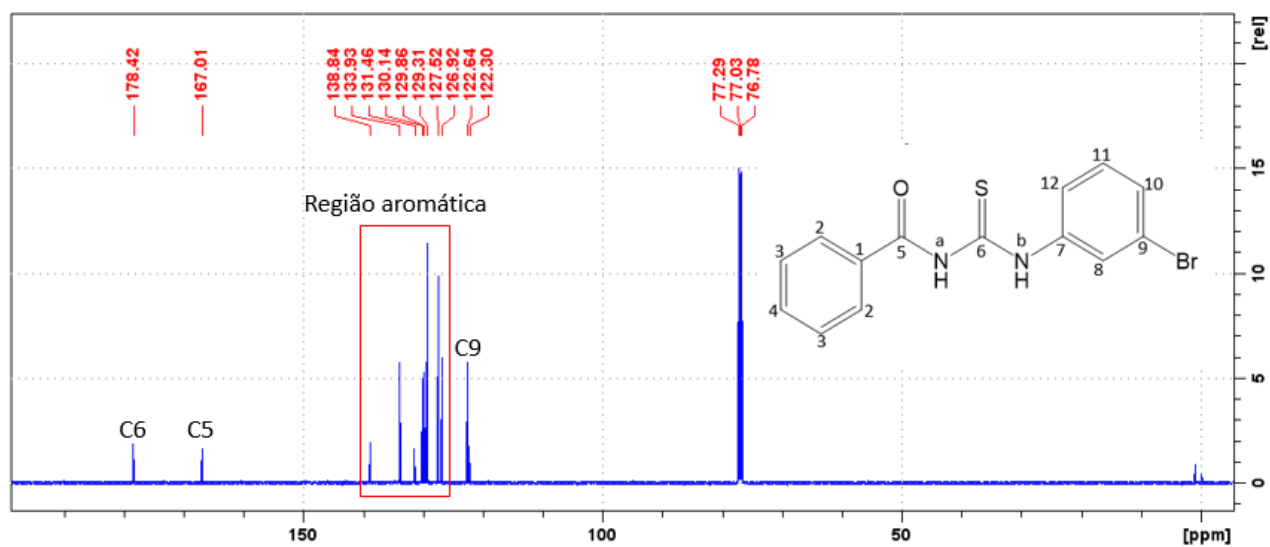
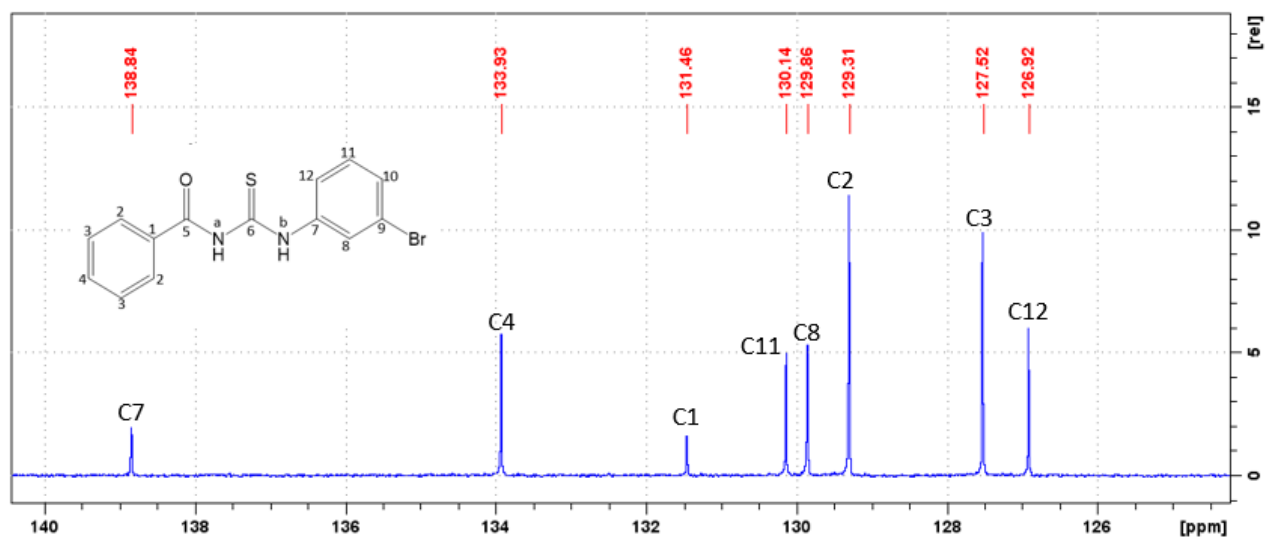
LQOF_T4 ESI-(+) MS/MS

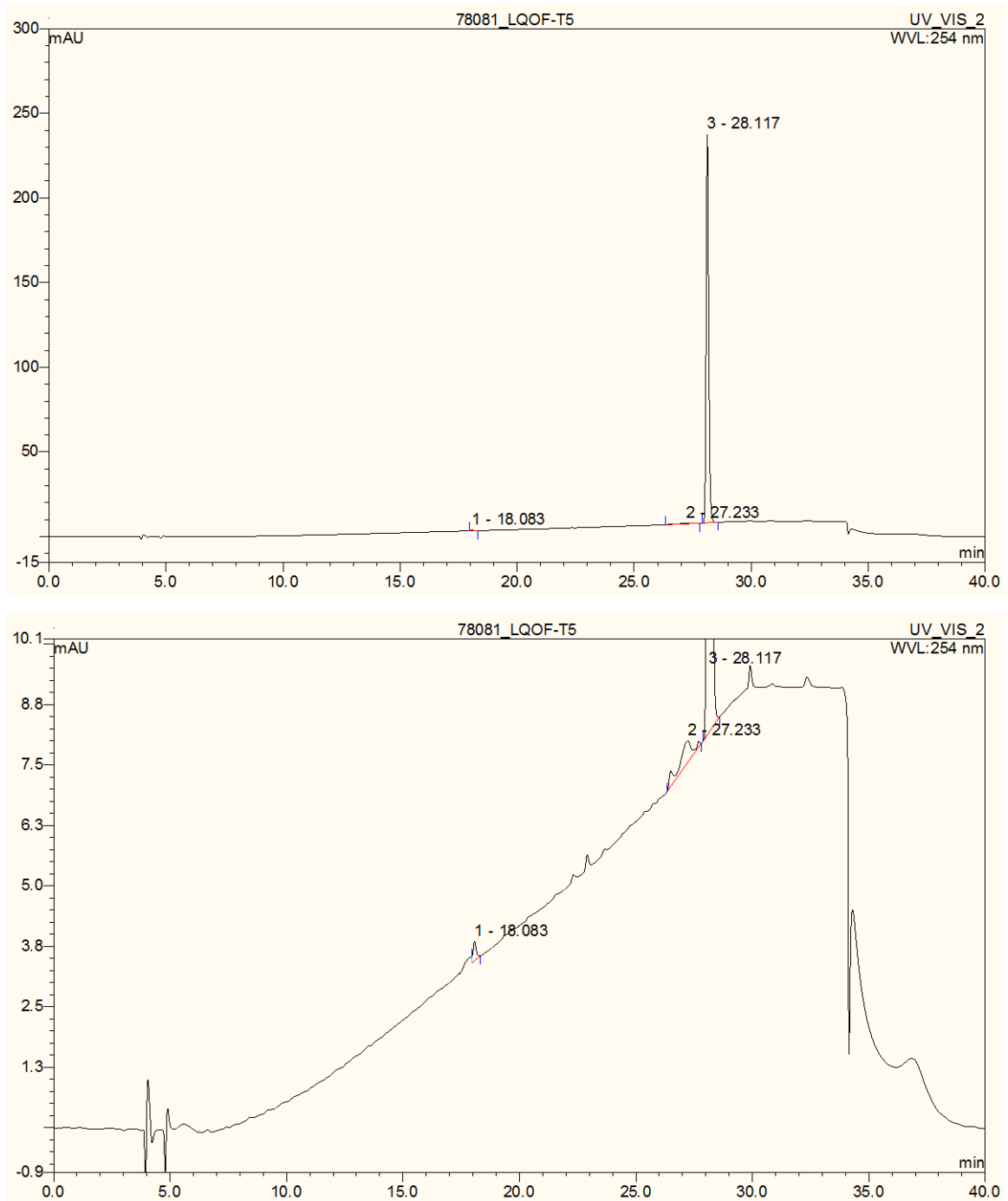


LQOF_T4 – EI-MS – 06/01/2021

1-benzoyl-3-(3-bromofenil) tiourea – (LQOF_T5); pf = 131,5 – 132,0°C, recristalização: acetonitrila; rendimento: 92 %; **LC-UV/MS:** 98,81%; **ESI(+)-MS:** m/z encontrada: 334,9846, m/z calculada para $[C_{14}H_{11}BrN_2OS + H]^+$: 334,9848, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** $[M + H - C_6H_5CONH_2]^+$ de m/z 213,9322, $[M + H - BrC_6H_4NH_2]^+$ de m/z 171,9757 e $[M + H - BrC_6H_4NCS]^+$ de m/z 122,0605; **1H NMR** (500.16 MHz, $CDCl_3$) δ = 12.64 (br, NH), 9.08 (br, NH), 7.99 (t, 1H), 7.89 (ddd, 2H), 7.66 (m, 2H), 7.55 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 5.0 Hz, 1H); **^{13}C NMR** (125.765 MHz, $CDCl_3$) δ = 178.42 (C=S), 167.01 (C=O), 138.84 (C), 133.93 (CH), 131.46 (C), 130.14 (CH), 129.86 (CH), 129.31 (2CH), 127.52 (2CH), 126.92 (CH), 122.30 (C).

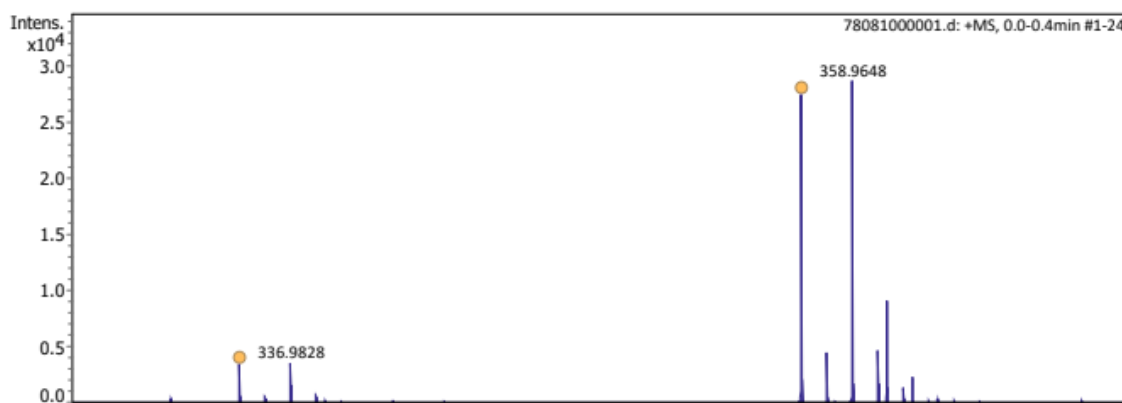
^1H - LQOF-T5 ^1H - Região aromática - LQOF-T5

^{13}C - LQOF-T5 ^{13}C – Região aromática - LQOF-T5

LQOF_T5 – LC (HPLC)

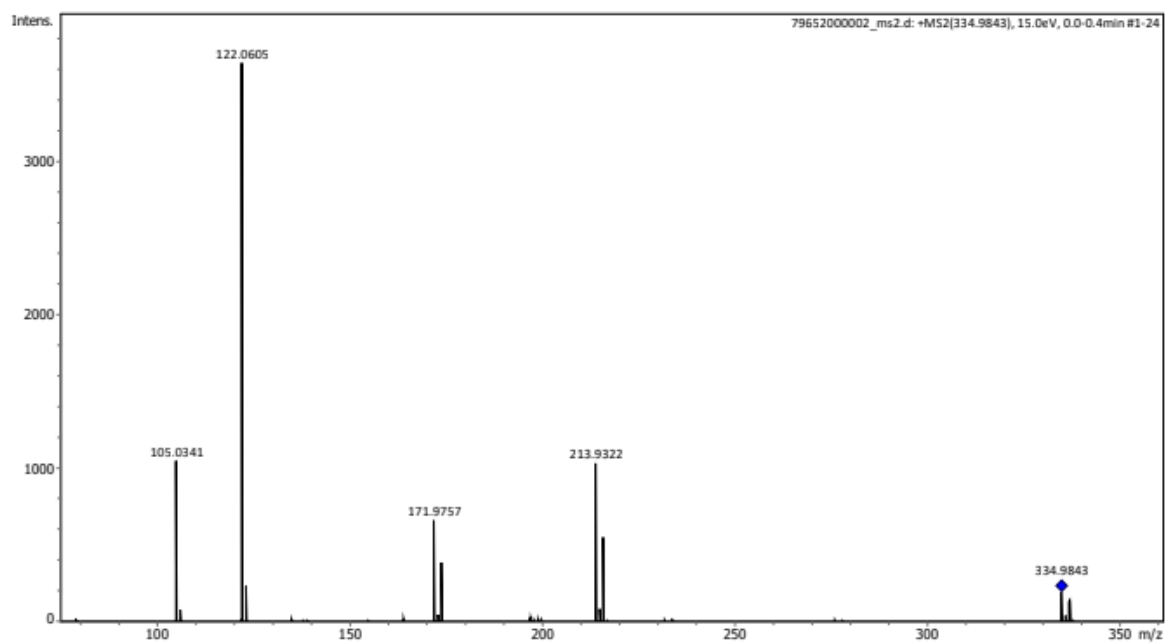
Retention Time: **28.12 min**

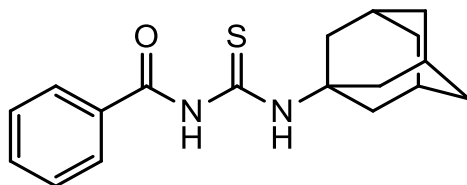
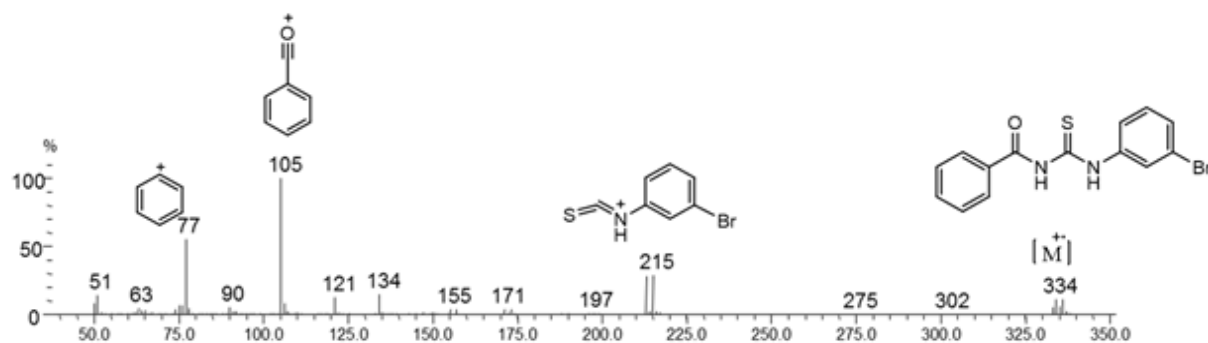
Relative Peak Area: **98.81 %**

LQOF_T5 ESI-(+) MS – 08/03/2021

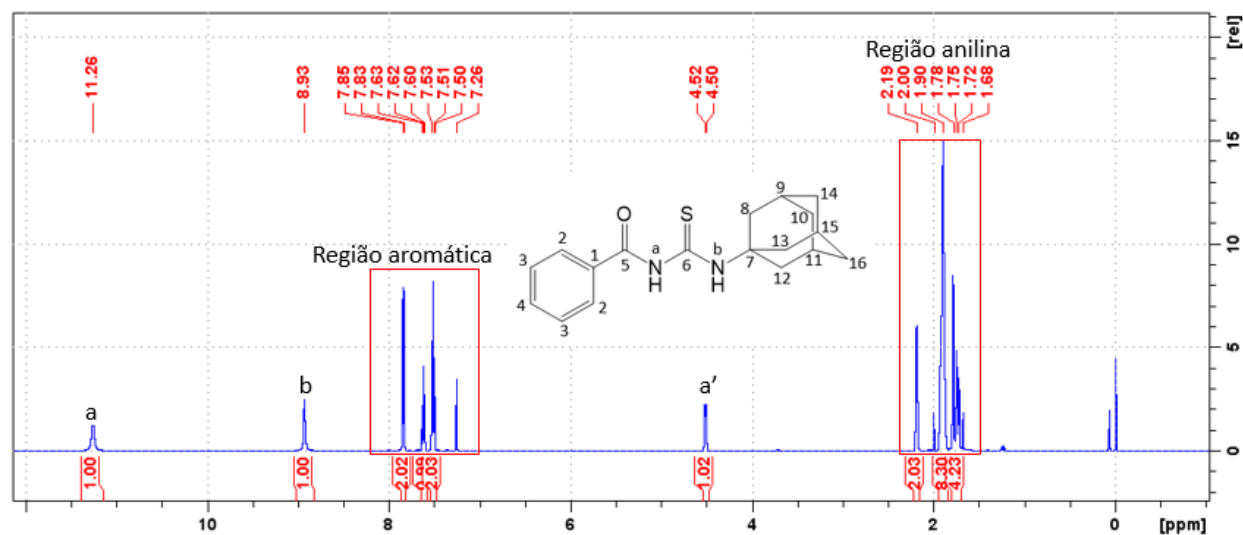
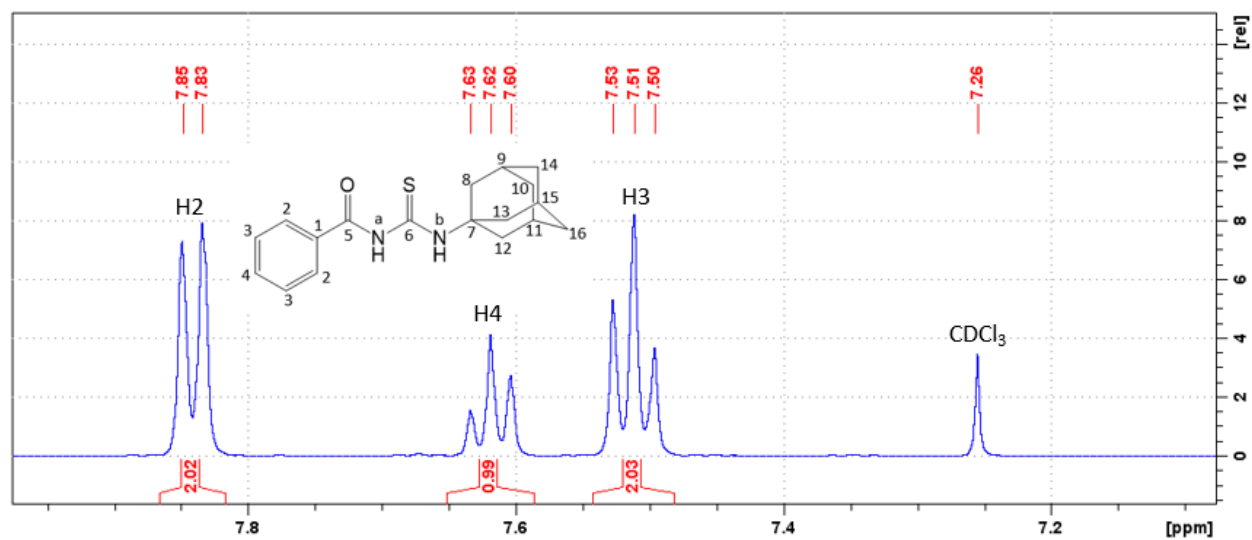
m/z 334,9846: C₁₄H₁₂BrN₂OS

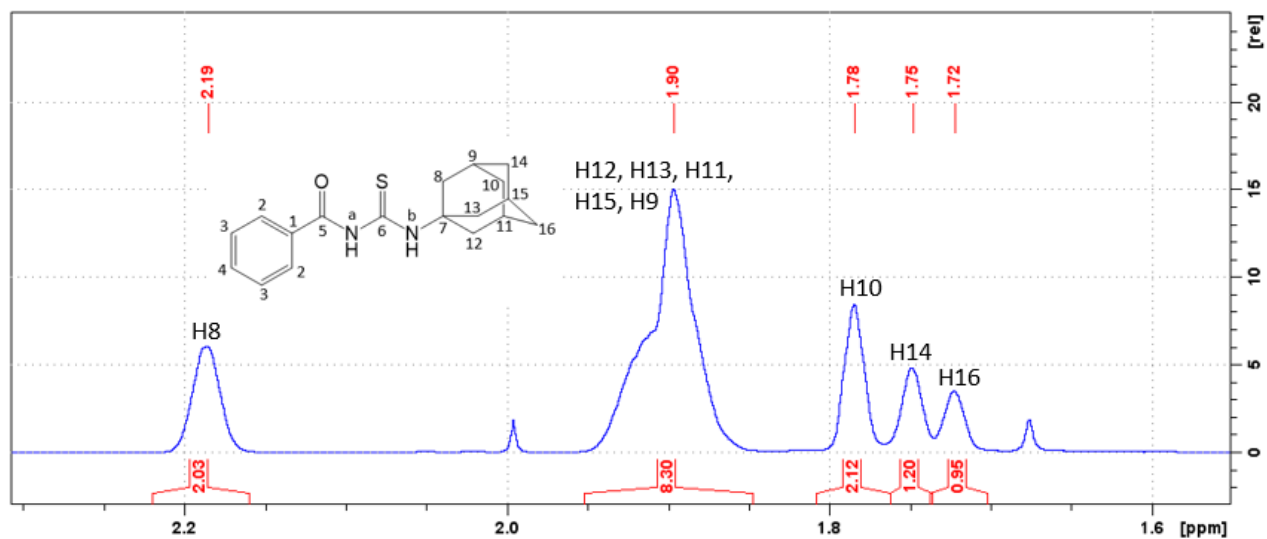
m/z 356,9668: C₁₄H₁₁BrN₂NaOS

LQOF_T5 ESI-(+) MS/MS – 30/04/2021

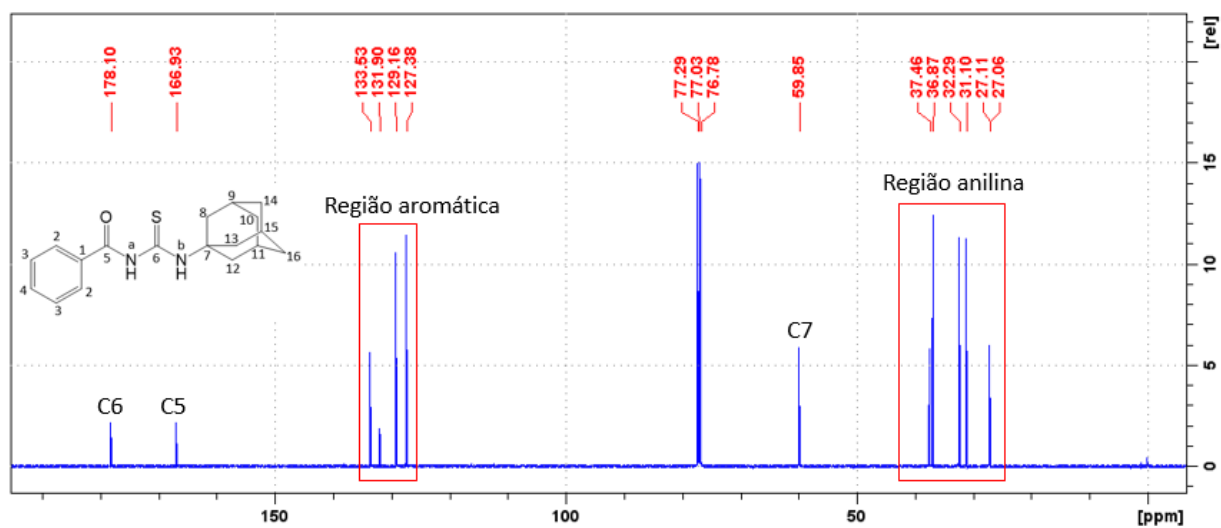
LQOF_T5 – EI-MS – 06/01/2021

1-benzoyl-3-(adamantil) tiourea – (LQOF_T6); pf = 161,6 – 162,1°C; recristalização: acetonitrila; rendimento: 79 %; **LC-UV/MS:** 98,79%; **ESI(+)-MS:** *m/z* encontrada: 315,1524, *m/z* calculada para $[C_{18}H_{22}N_2OS + H]^+$: 315,1526, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** $[M + H - C_{10}H_{14}]^+$ de *m/z* 181,0428, $[M + H - C_6H_5CONHC(S)NH_2]^+$ de *m/z* 135,1167 e $[M + H - C_{10}H_{14}NHCS]^+$ de *m/z* 122,0600. **¹H NMR** (500.16 MHz, CDCl₃) δ = 11.26 (br, NH), 8.93 (br, NH), 7.85 (d, *J*= 10Hz, 2H), 7.62 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.51 (t, *J*= 7.5 Hz, 2H), 2.19 (s, 2H), 1.90 (m, 7H), 1.78 (s, 2H), 1.75 (s, 2H), 1.72 (s, 2H). **¹³C NMR** (125.765 MHz, CDCl₃) δ = 178.10 (C=S), 166.93 (C=O), 133.53 (C), 131.90 (CH), 129.16 (2CH), 127.38 (2CH), 59.85 (CH), 37.46 (CH₂), 36.87 (2CH₂), 32.29 (3CH₂), 31.1 (CH), 27.11 (CH), 27.06 (CH).

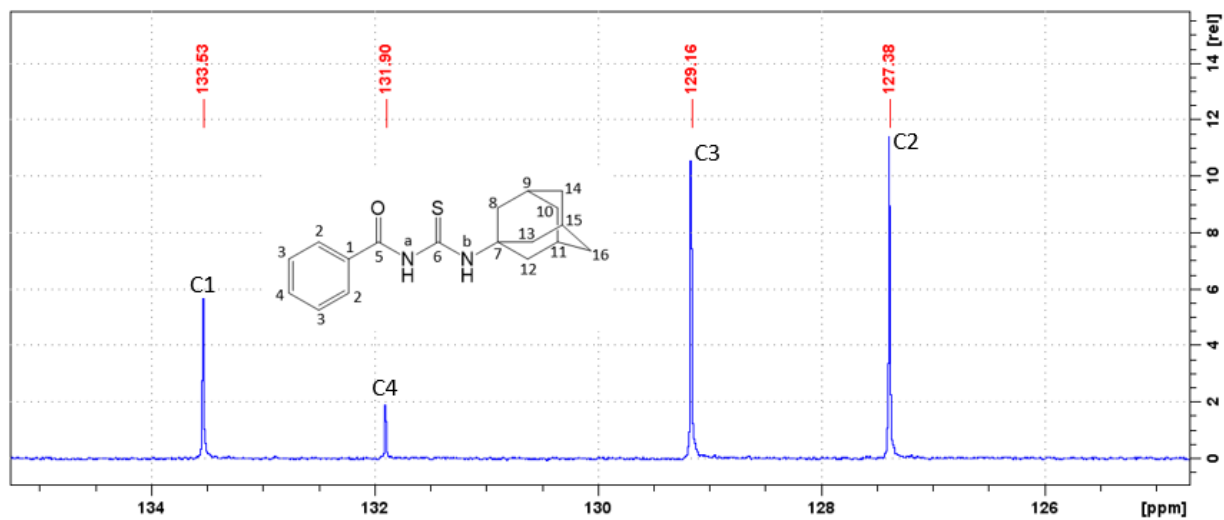
^1H - LQOF-T6 **^1H – Região aromática - LQOF-T6** **^1H – Região anilina - LQOF-T6**



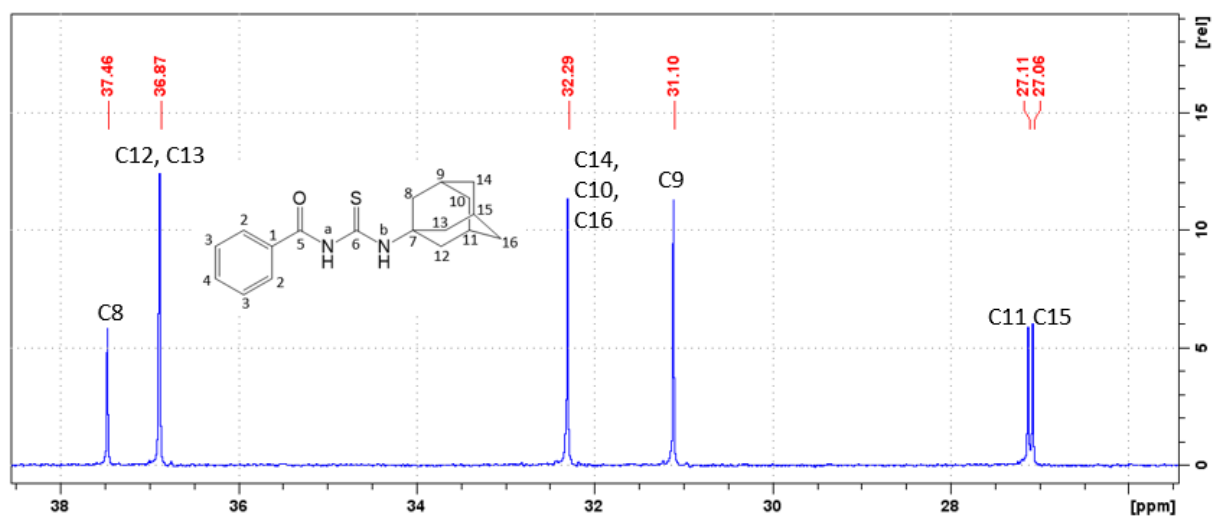
¹³C - LQOF-T6



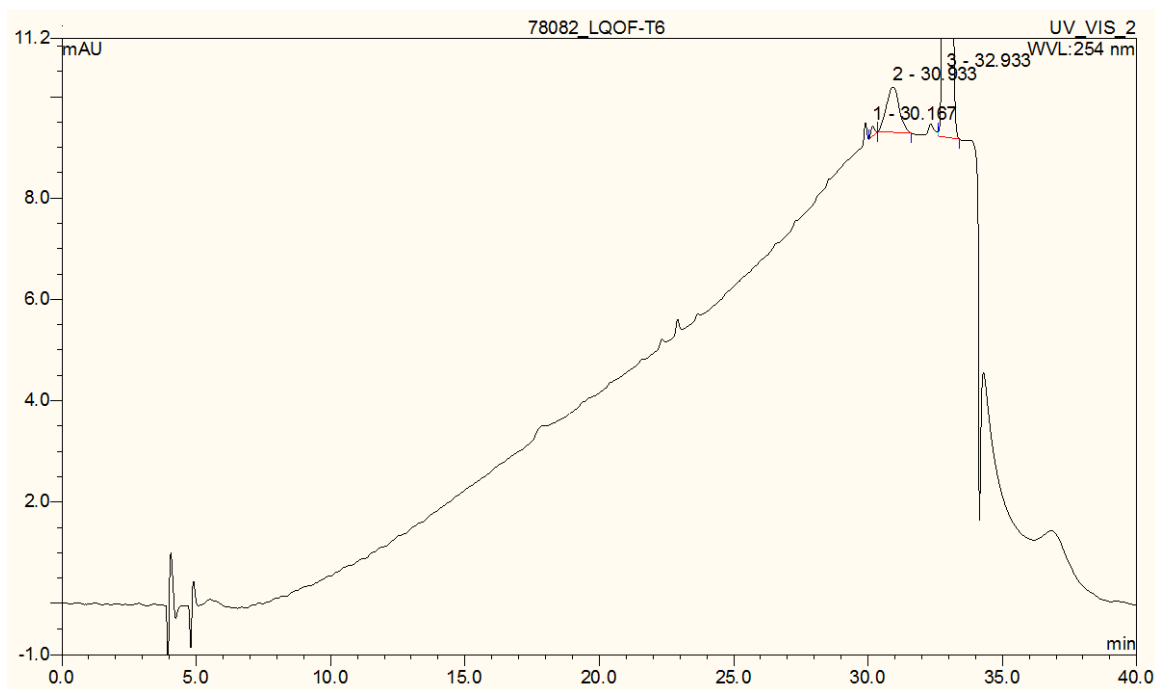
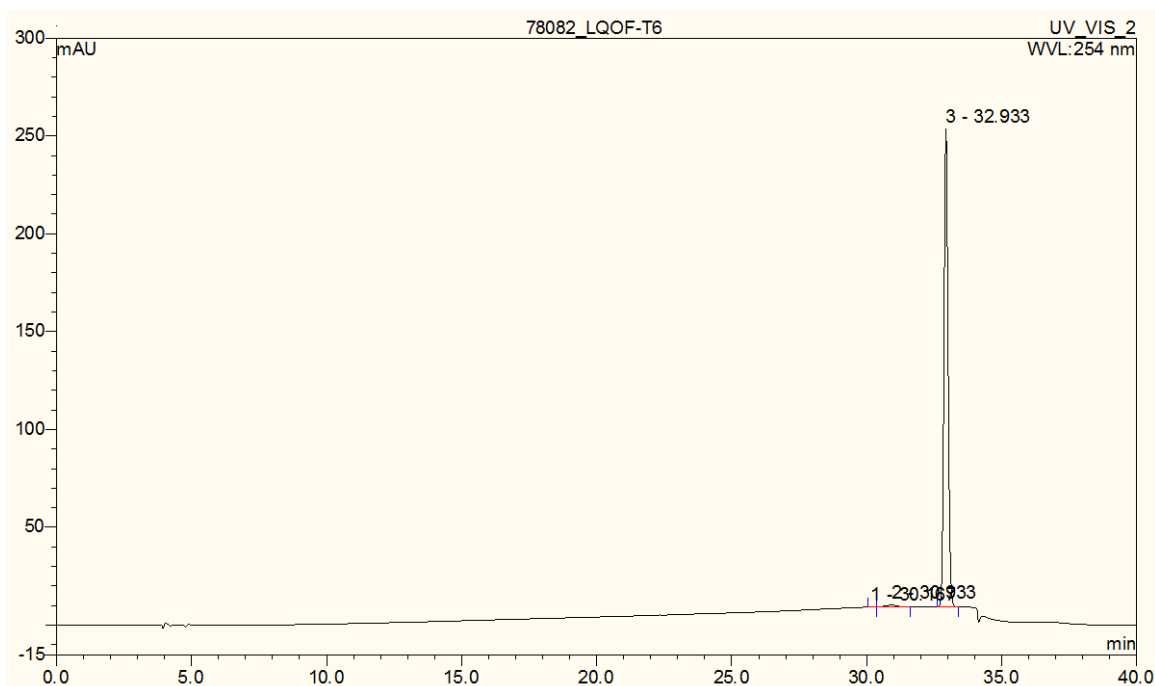
¹³C – Região aromática - LQOF-T6



¹³C – Região anilina - LQOF-T6



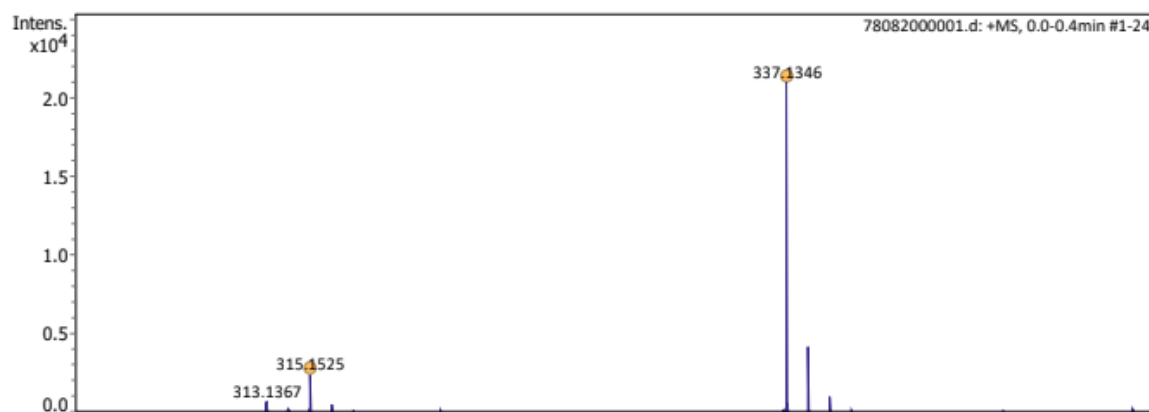
LQOF_T6 – LC (HPLC) – 06/01/2021



Retention Time: **32.93 min**

Relative Peak Area: **98.79 %**

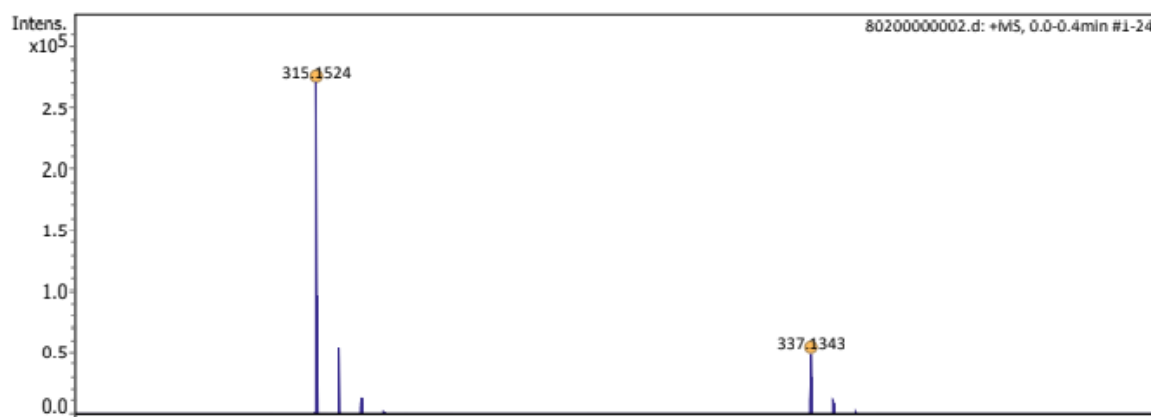
LQOF_T6 ESI-(+) MS – 08/03/2021



m/z 315,1525: $C_{18}H_{23}N_2OS$

m/z 337,1346: $C_{18}H_{22}N_2NaOS$

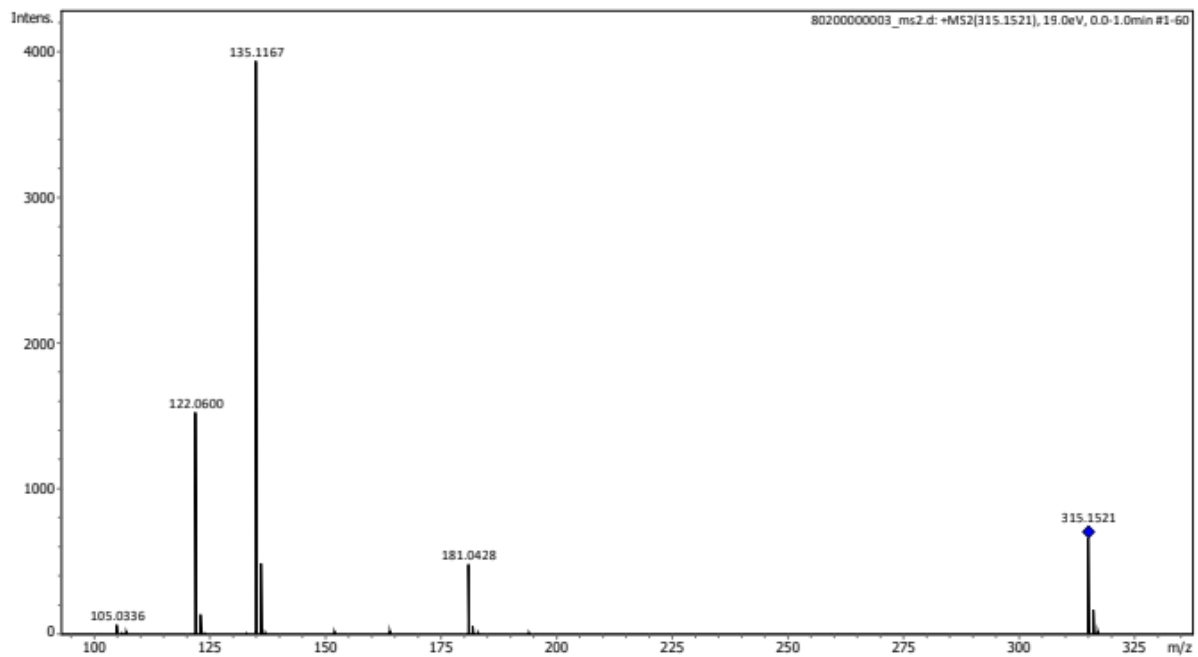
LQOF_T6 ESI-(+) MS – 13/05/2021



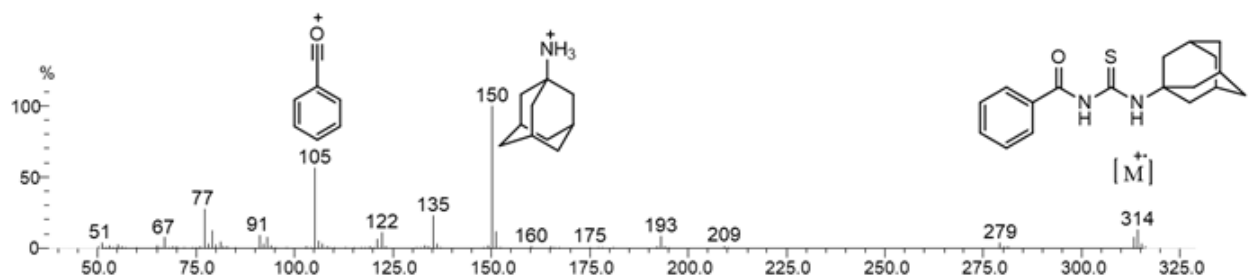
m/z 315,1524: $C_{18}H_{23}N_2OS$

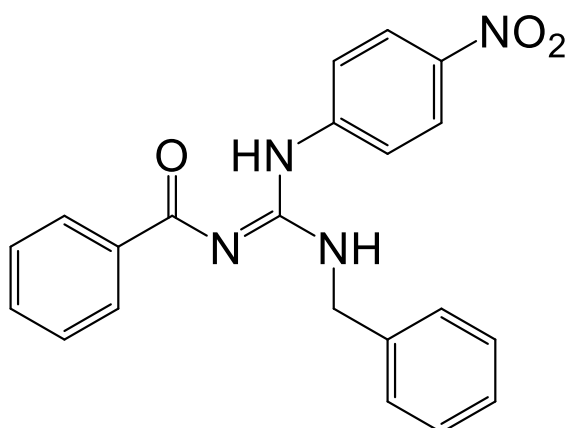
m/z 337,1343: $C_{18}H_{22}N_2NaOS$

LQOF_T6 ESI-(+) MS/MS – 13/05/2021



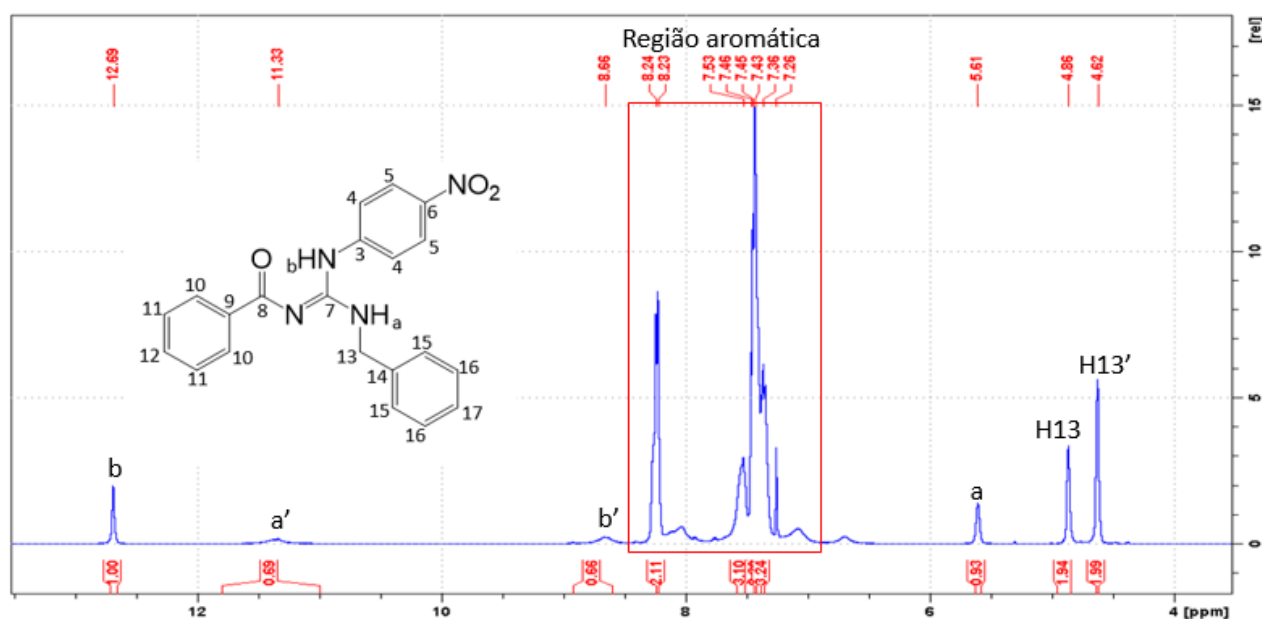
LQOF_T6 - EI-MS – 06/01/2021



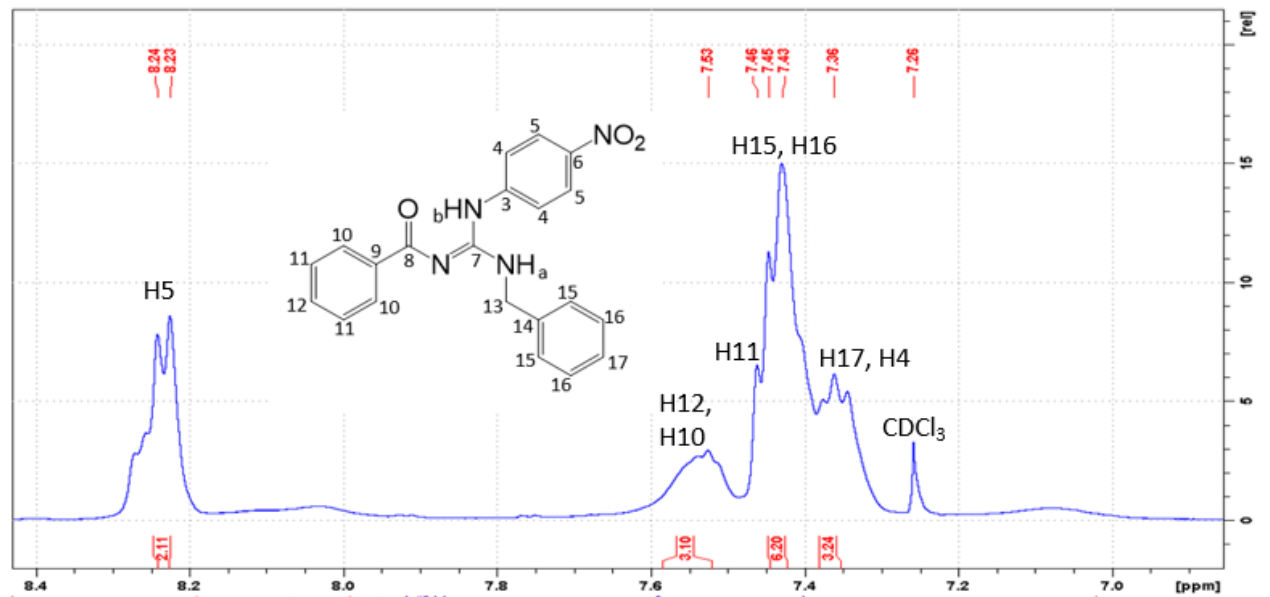


1-benzil-2-benzoyl-3-(4-nitrofenil) guanidina – (LQOF-G1); pf: 134,1 – 136,4°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 64 %; $^1\text{H NMR}$ (500.16 MHz, CDCl_3) δ = 12.69 (s, NH), 8.24 (d, J = 5 Hz, 2H), 7.53 (m, 3H), 7.46 (s, 2H), 7.45 (m, 4H), 7.36 (m, 3H), 4.86 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125.765 MHz, CDCl_3) δ = 178.14 (C=O), 157.21 (N=C), 144.66 (C-NO₂), 142.54 (C), 137.84 (CH), 132.06 (2CH), 129.31 (2CH), 128.25 (2CH), 126.00 (2CH), 123.77 (2CH), 45.53 (CH₂).

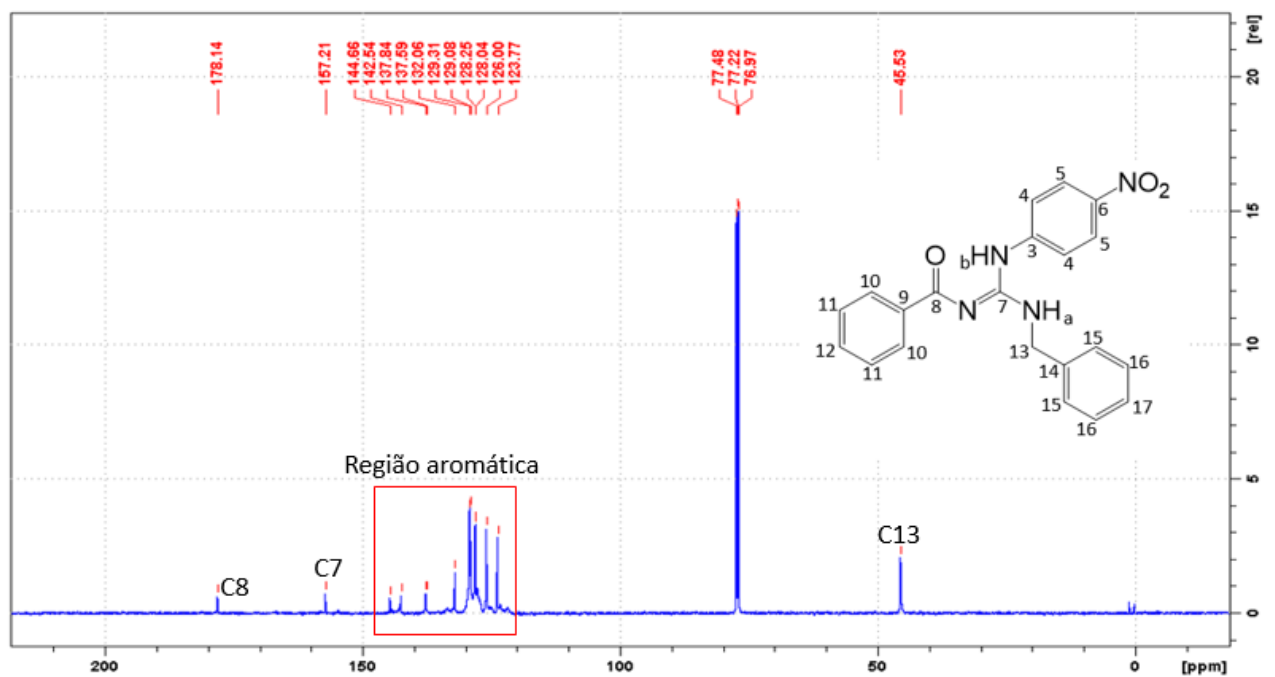
^1H - LQOF-G1



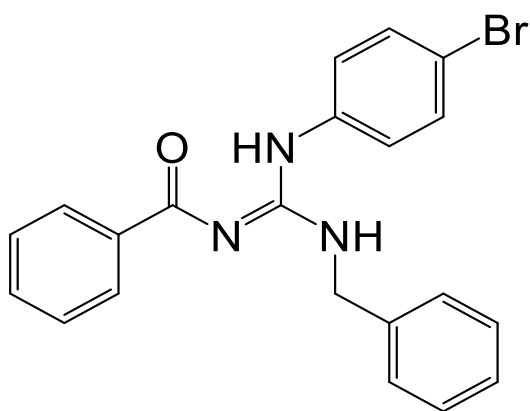
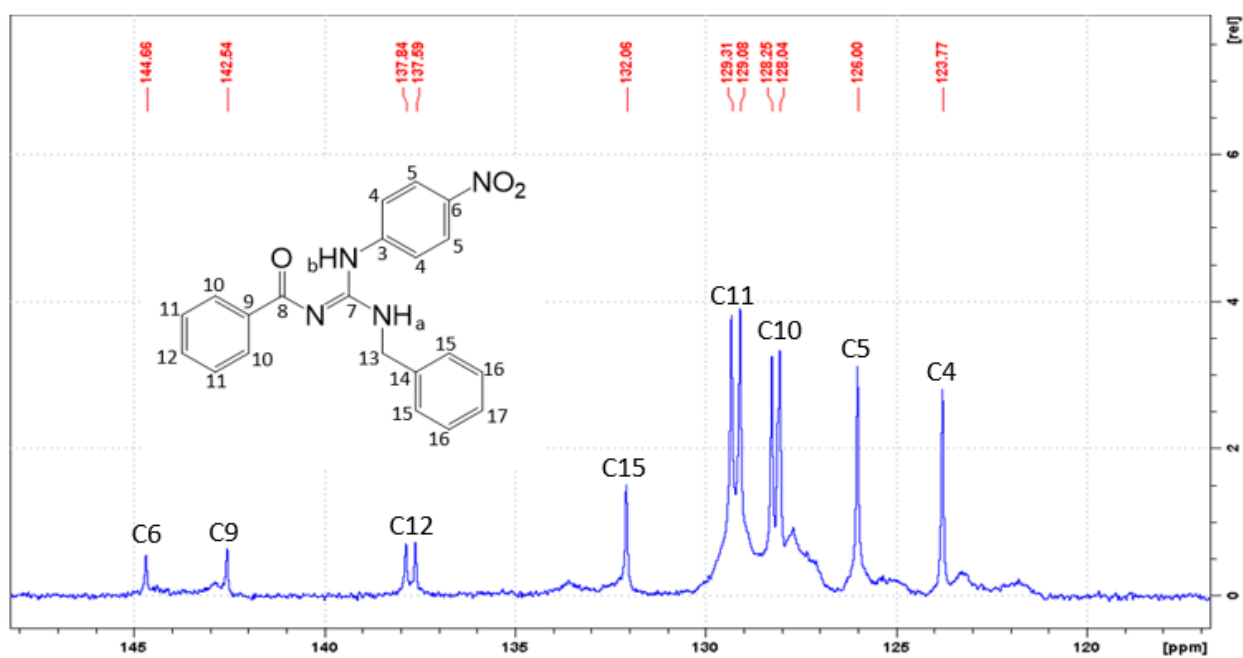
^1H – Região aromática – LQOF-G1



^{13}C – LQOF-G1



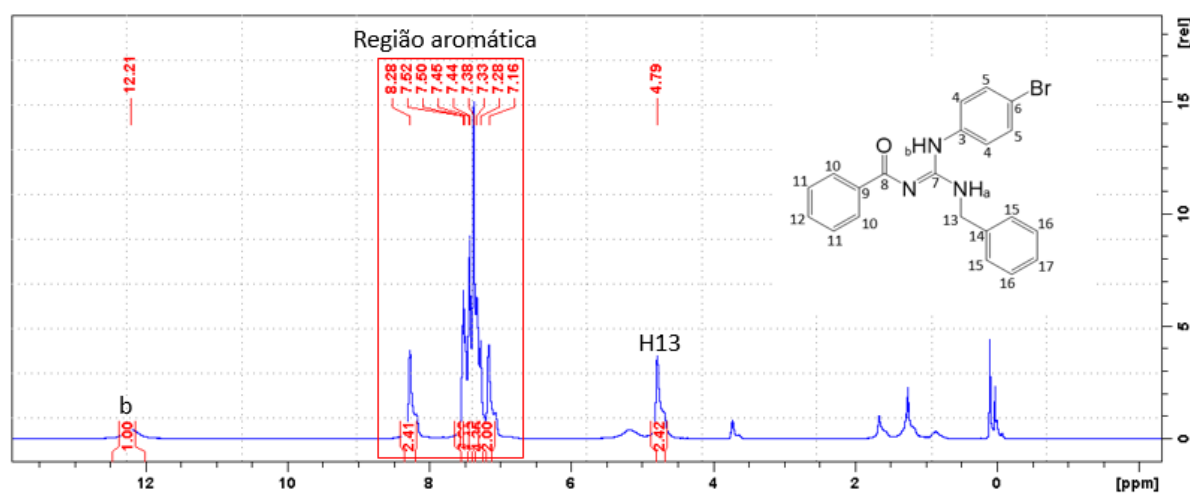
^{13}C – Região aromática - LQOF-G1



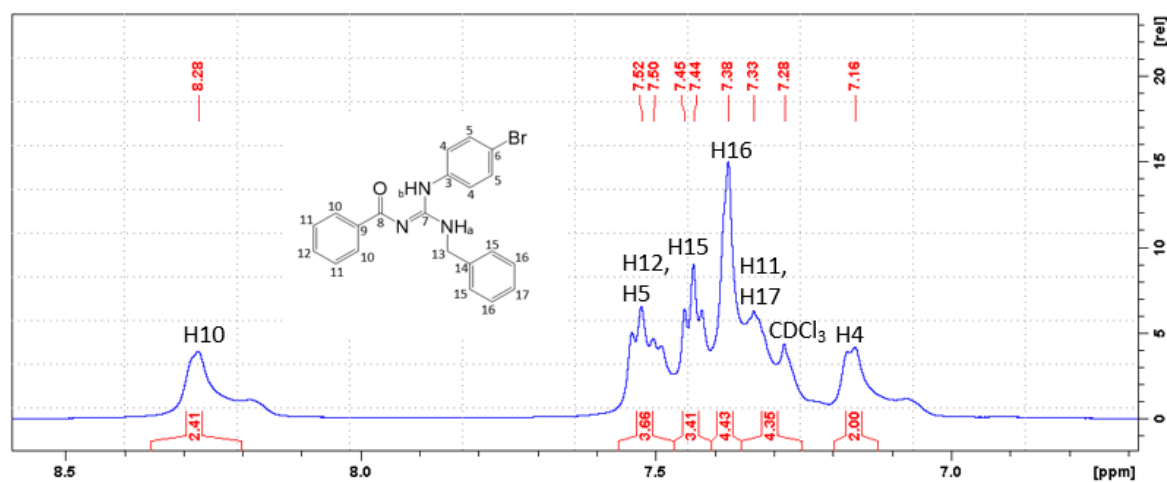
1-benzil-2-benzoil-3-(4-bromofenil) guanidina – (LQOF-G2); pf: 101,5 – 101,8°C;
 recristalização: álcool etílico; rendimento: 89 %; ^1H NMR (500.16 MHz, CDCl_3) δ = 12.21

(s, NH), 8.28 (s, 2H), 7.52 (t, 4H), 7.45 (t, 2H), 7.38 (s, 2H), 7.33 (s, 4H), 7.16 (s, 2H), 4.79 (s, 2H). ^{13}C NMR (125.765 MHz, CDCl_3) δ = 177.99 (C=O), 158.46 (N=C), 138.31 (C), 135.16 (C), 133.11 (CH), 131.39 (2CH), 129.04 (2CH), 127.92 (2CH), 127.60 (2CH), 127.02 (2CH), 45.36 (CH_2).

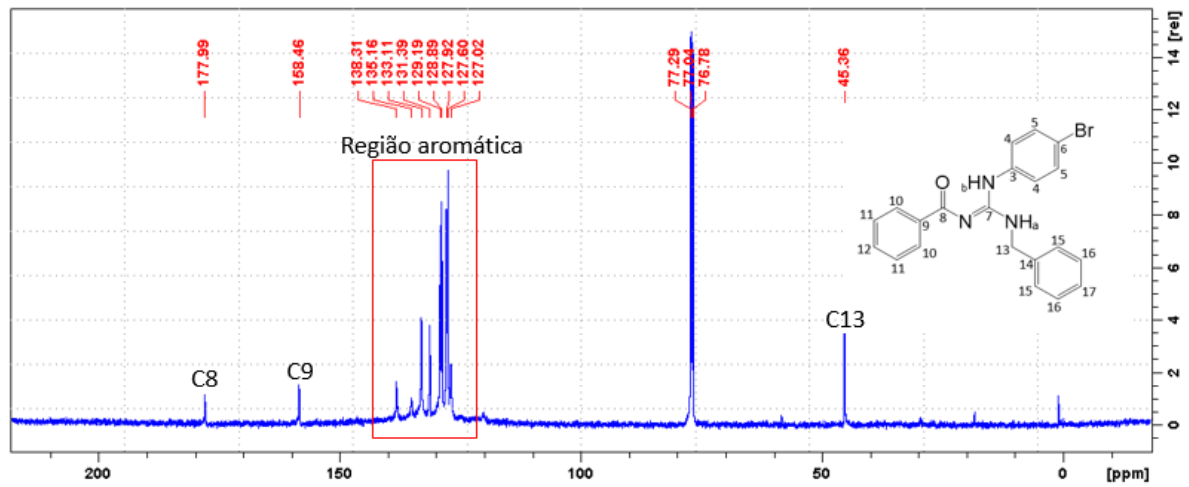
^1H - LQOF-G2



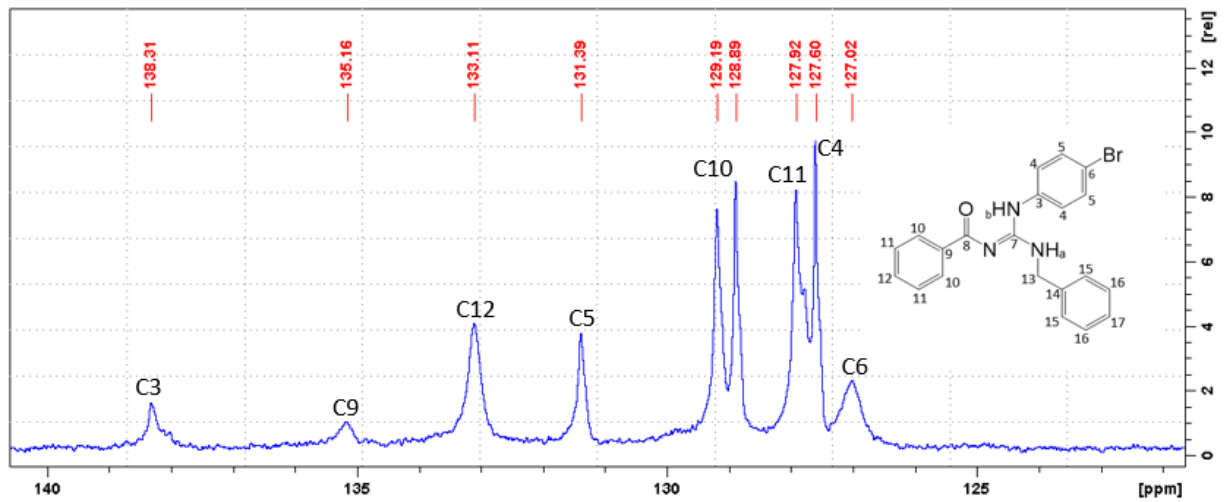
^1H – Região aromática – LQOF-G2



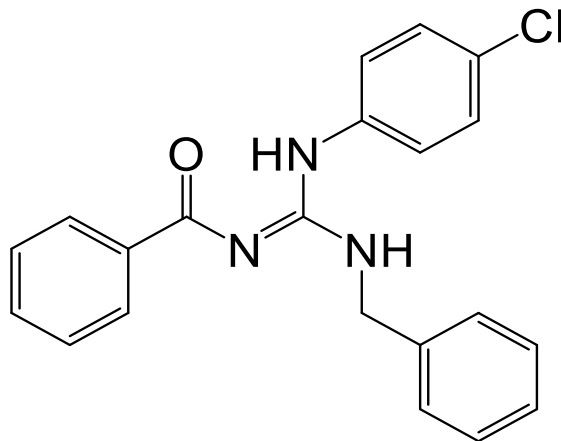
^{13}C – LQOF-G2



¹³C – Região aromática - LQOF-G2

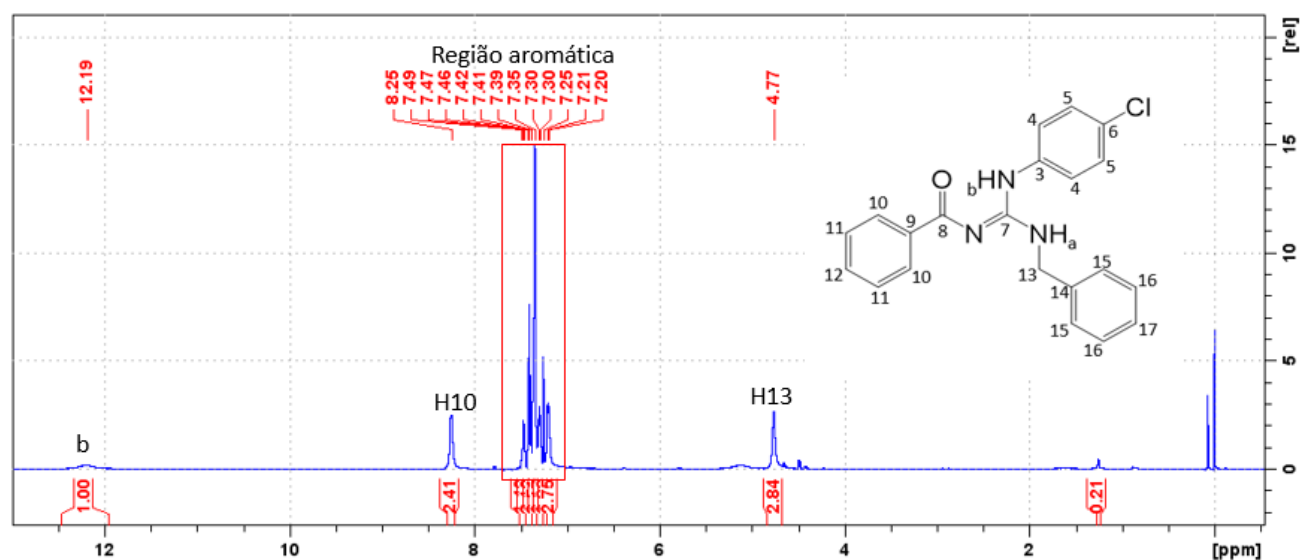


LQOF-G3

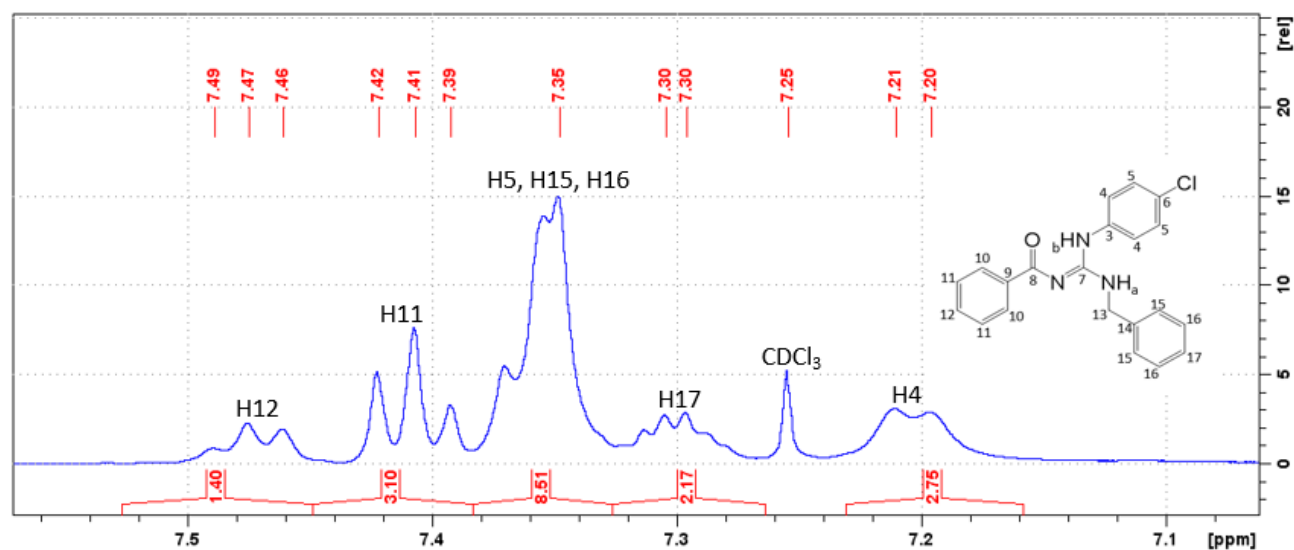


1-benzil-2-benzil-3-(4-clorofenil) guanidina – (LQOF-G3); pf: 87.3 – 88.5°C; recristalização: álcool etílico; rendimento: 52 %; $^1\text{H NMR}$ (500.16 MHz, CDCl_3) δ = 12.19 (s, 1H), 8.25 (s, 2H), 7.47 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.35 (m, 6H), 7.30 (m, 1H), 7.21 (d, J = 5 Hz, 2H), 4.77 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125.765 MHz, CDCl_3) δ = 177.98 (C=O), 158.55 (N=C), 138.30 (C), 134.56 (C), 131.39 (C), 130.16 (CH), 129.19 (2CH), 128.89 (2CH), 128.82 (2CH), 127.93 (2CH), 127.77 (CH), 127.61 (2CH), 126.94 (2CH), 45.35 (CH_2).

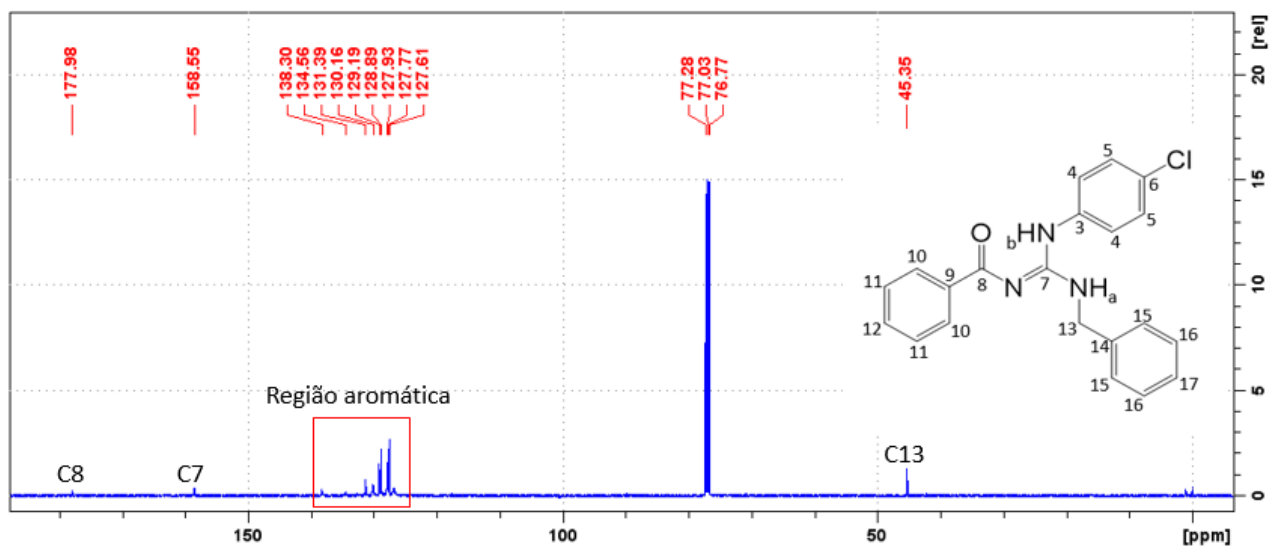
^1H - LQOF-G3



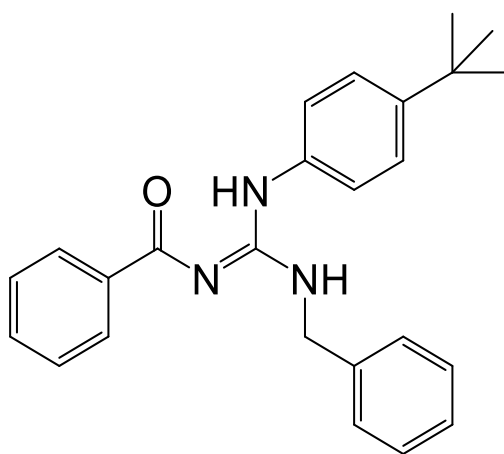
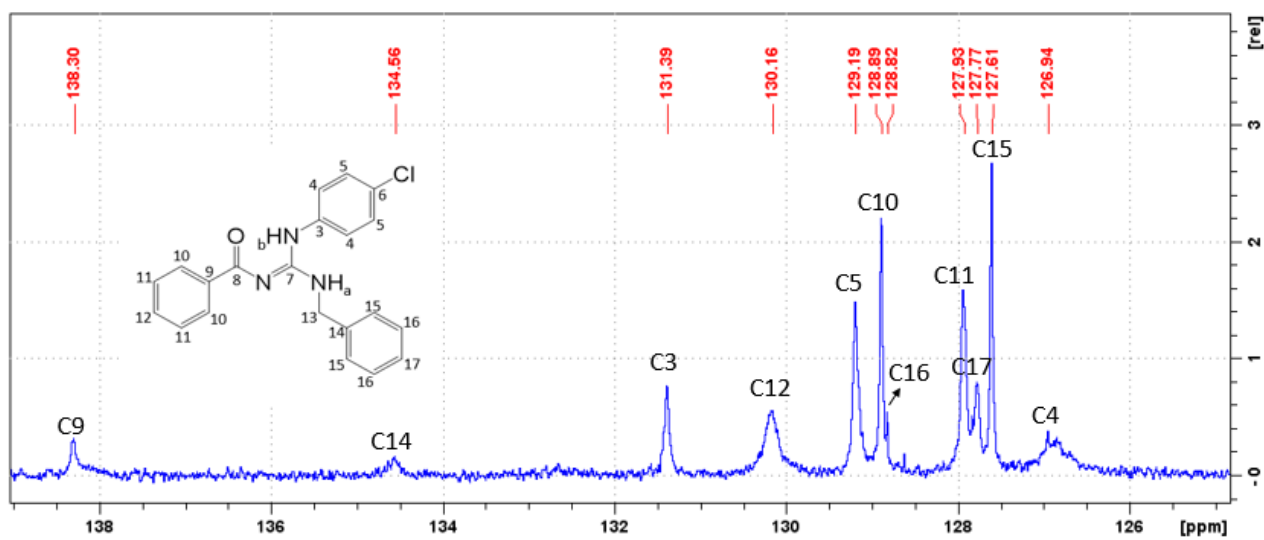
^1H – Região aromática - LQOF-G3



^{13}C - LQOF-G3



^{13}C – Região aromática - LQOF-G3



1-benzil-2-benzoil-3-(4-terc-butilfenil) guanidina – (LQOF-G6); pf: 124.4- 125.7°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 78 % $^1\text{H NMR}$ (500.16 MHz, CDCl_3) δ = 12.09 (s, 1H), 8.29 (dd, J = 7.26/1.11 Hz, 2H), 7.50 (tt, J = 7.32/1.11 Hz, 1H), 7.43 (dt, J = 7.26/7.32 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8.26 Hz, 2H), 7.37 (2H), 7.317 (1H), 7.21 (d, J = 8.26 Hz, 2H), 5.33 (t, J = 5.89 Hz, 1H), 4.83 (d, J = 5.89 Hz, 2H), 1.31 (9H);. $^{13}\text{C NMR}$ (125.765 MHz, CDCl_3) δ = 177.456 (C=O), 158.676 (N=C), 150.139 (C), 138.571 (C), 138.184 (C), 133.508 (C), 131.239 (p-CH), 128.965 (2CH), 128.669 (2CH), 127.875 (2CH), 127.498 (2CH + p-CH), 127.455 (2CH), 127.043 (2CH), 125.386 (2CH), 45.784 (NCH₂), 34.566 (C), 31.181 (CH₃)

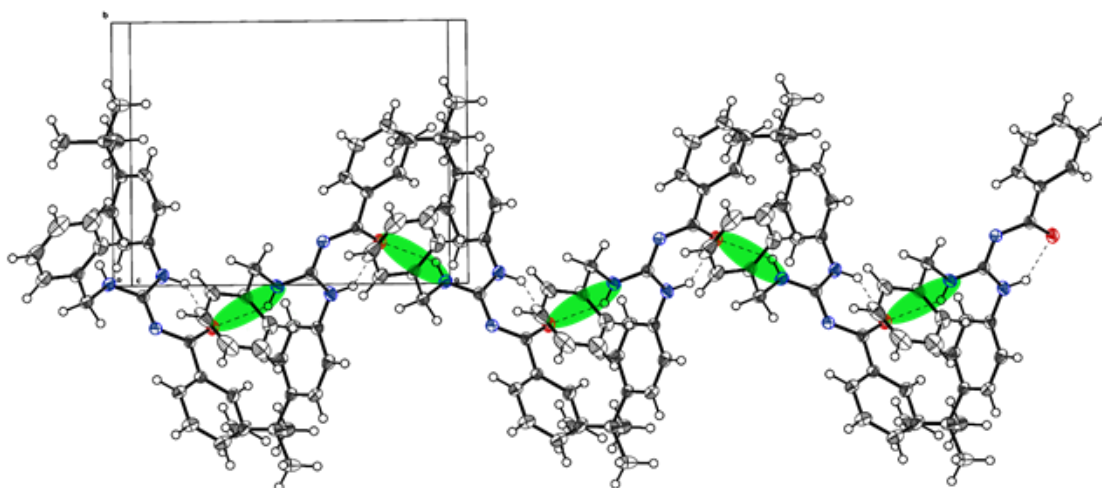


Figura 27. Um verde intermolecular destacou ligação de hidrogênio de caráter moderado⁶⁵ prolongado na direção do eixo e influencia o empacotamento de LQOF-G6. A segunda porção constrói ligações de hidrogênio ao eixo de uma direção também. Gráfico visualizado sem a segunda porção independente para maior clareza.

Tabela 9. Dados de cristal, parâmetros de coleta de dados e refinamento de estrutura

Identification code	LQOF_G6_Pca21
Empirical formula	C ₂₅ H ₂₇ N ₃ O
Formula weight	385.49
Temperature/K	120.0
Crystal system	orthorhombic
Space group	Pca2 ₁
a/Å	12.0522(5)
b/Å	9.4398(3)
c/Å	37.7926(14)

$\alpha/^\circ$	90
$\beta/^\circ$	90
$\gamma/^\circ$	90
Volume/ $\text{\AA}^3$	4299.7(3)
Z	8
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.191
μ/mm^{-1}	0.074
F(000)	1648.0
Crystal size/ mm^3	$0.2 \times 0.06 \times 0.02$
Radiation	MoK α ($\lambda = 0.71073$)
2θ range for data collection/ $^\circ$	4.314 to 60.128
Index ranges	$-16 \leq h \leq 16, -13 \leq k \leq 13, -53 \leq l \leq 53$
Reflections collected	140718
Independent reflections	12591 [$R_{\text{int}} = 0.0427, R_{\text{sigma}} = 0.0213$]
Data/restraints/parameters	12591/1/529
Goodness-of-fit on F^2	1.023
Final R indexes [$I \geq 2\sigma(I)$]	$R_1 = 0.0397, wR_2 = 0.0966$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.0476, wR_2 = 0.1015$
Largest diff. peak/hole / $e \text{\AA}^{-3}$	0.22/-0.19
Flack parameter	-0.1(3)

Os espectros de HMBC mostraram correlações como H13 com C7, C14 com C15 e H10 com C8. Como em ^1H NMR, os sinais ^{13}C concordam com a estrutura do composto LQOF-G6.

Para uma caracterização mais completa de LQOF-G6, foram realizadas análises 2D do acoplamento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (Figuras 24 e 25) e ^1H - ^{13}C HMBC (Figuras 26). Portanto, as atribuições também foram confirmadas pelas correlações correspondentes no espectro ^1H - ^{13}C HSQC (Figuras 5 e 6)

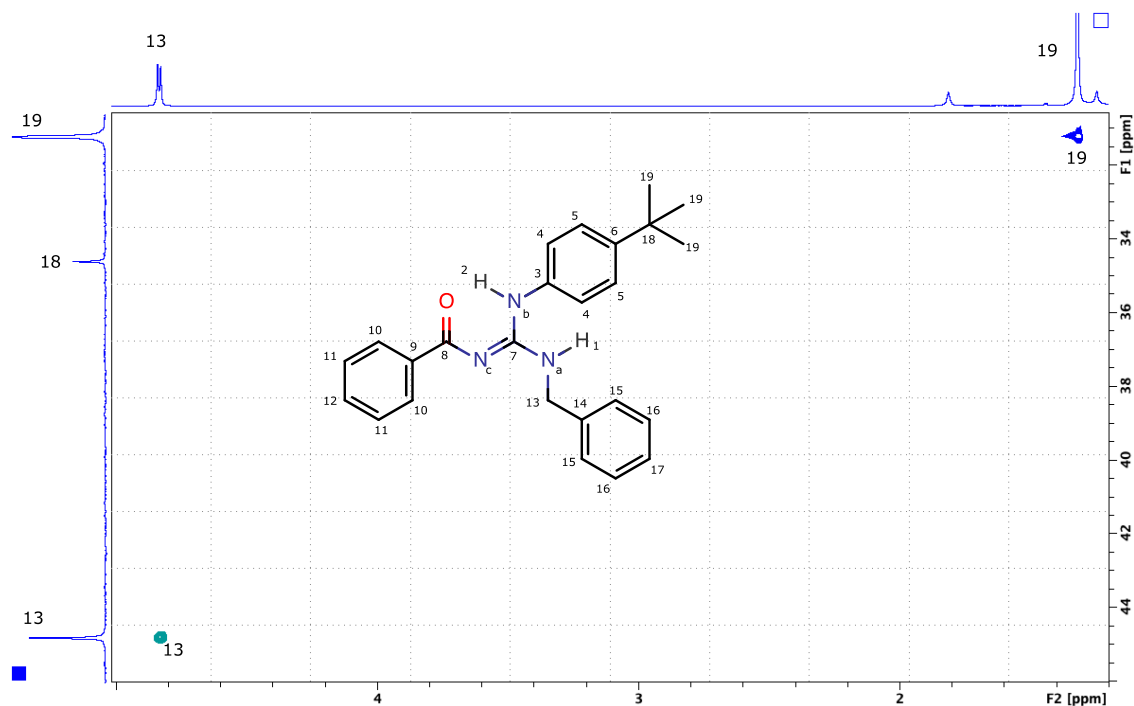


Figura 28. Região alifática do espectro editado por ^1H - ^{13}C HSQC de LQOF-G6 a 253 K em CDCl_3 .

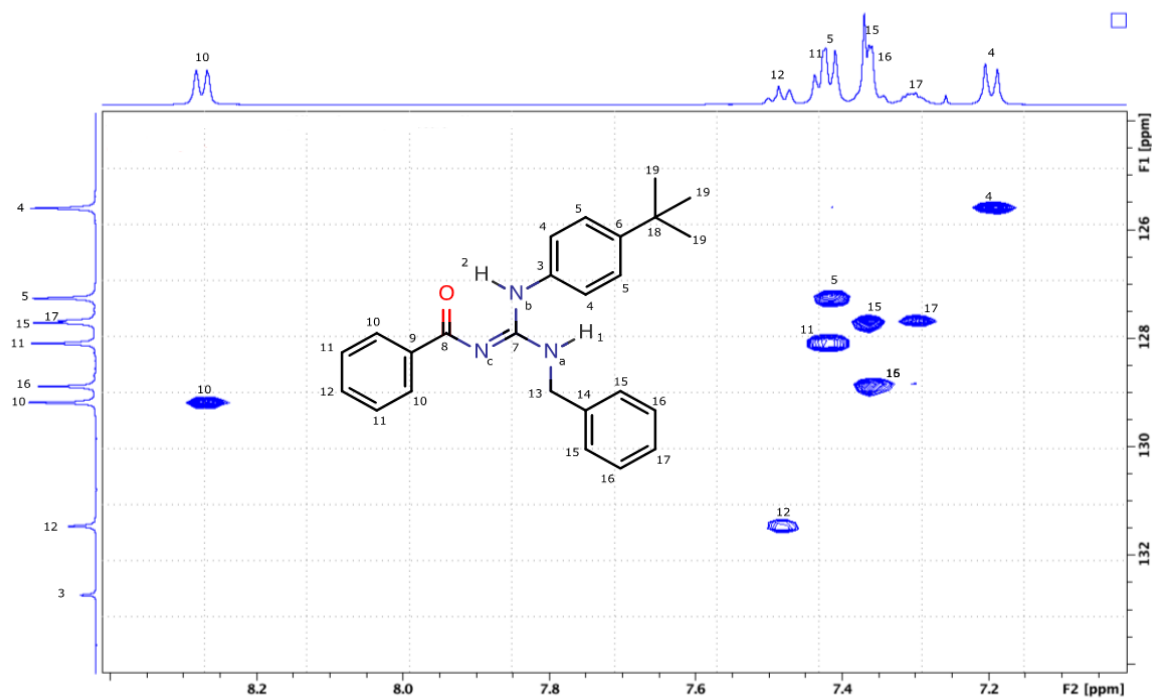


Figura 29. Espectro HSQC da região aromática ^1H - ^{13}C de LQOF-G6 a 253 K em CDCl_3 .

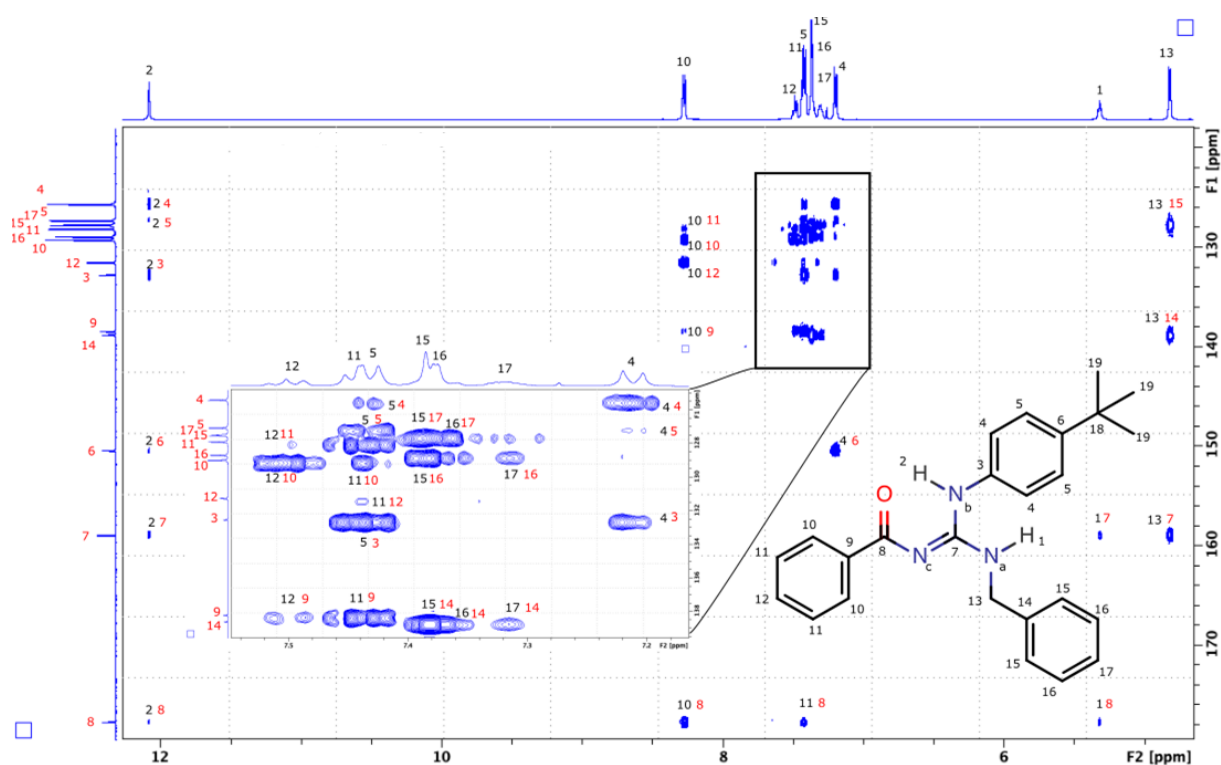
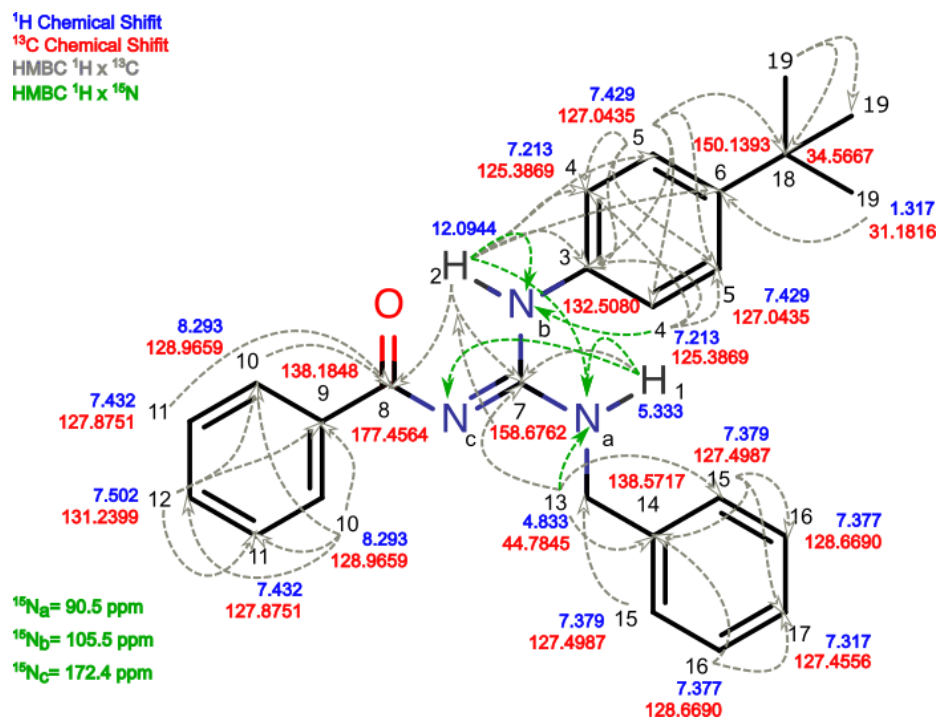


Figura 30. Espectro HMBC da região aromática ^1H - ^{13}C de LQOF-G6 a 253 K em CDCl_3 (os números azuis indicam ^1H e os números vermelhos indicam ^{13}C).



A região aromática do espectro HSQC (Figura 25) mostrou a seguinte ligação dos carbonos aos seus hidrogênios ligados diretamente: C4/H4 (125,386/7,21 ppm), C5/H5 (127,043/7,42 ppm), C10/H10 (128,965/8,29 ppm) e C12/H12 (131,239/7,50 ppm). O espectro

HMBC mostra uma correlação de longo alcance entre H10 a 8,29 ppm e C8 a 177,456 ppm (Figura 26), confirmando a posição de H10 na porção benzoíla.

Analogamente, um forte pico cruzado entre o grupo terc-butil H19 (1,31 ppm) e o quaternário C6 a 150,139 ppm posiciona o último no anel de anilina. H4 (7,21 ppm) também apresenta acoplamento com C6 e H5 (7,42 ppm), que acopla com C3 (133,508 ppm), é identificado como adjacente a H4. Além de longo alcance, o carbono central do grupo guanidina C7 corresponde ao sinal em 158,676 ppm, o carbono benzílico C13 aquele em 45,784 ppm, e o carbono quaternário C18 e os três grupos metil equivalentes C19 do grupo tertbutil a 34,566 e 31,181 ppm, respectivamente. Todos esses sinais atribuídos suportam a formação da molécula de guanidina LQOF-G6. A atribuição dos sinais ^1H e ^{13}C (Figura 5-6 (Resultados e discussão)) foi confirmada pelos espectros HSQC e HMBC (Figuras 28-30). O espectro HSQC $1\text{H}-^{13}\text{C}$ apresentou sinais correspondentes a correlações entre os átomos de carbono C19 (31,181 ppm) e C13 (44,784 ppm) com os hidrogênios H19 (1,31 ppm) e H13 (4,83 ppm), respectivamente⁶⁵.

Na região aromática (Figura 30) os sinais do espectro de acoplamento heteronuclear foram observados na seguinte ordem C4-H4 (125,386 ppm - 7,21 ppm), C5-H5 (127,043 ppm - 7,42 ppm), C10-H10 (128,965 ppm - 8,29 ppm), C12-H12 (131,239 ppm - 7,50 ppm) e C15-H15 (127,498 ppm - 7,37 ppm).

Além disso, o espectro HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (Figura 26) mostra sinais de correlações dos prótons H10 (8,29 ppm) e H13 (4,83 ppm) com os carbonos C8 (177,456 ppm) e C7 (158,676 ppm), respectivamente. Os acoplamentos heteronucleares $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ de longa distância foram observados, H10 (8,29 ppm) com C11 (127,875 ppm) e C12 (131,239 ppm), de H12 (7,50 ppm) com C11 e H11 (7,43 ppm) com C9 (138,184 ppm) dentro do grupo benzoíla, bem como de H15/H16 (7,37/7,37 ppm) com C13 (45,784 ppm) e C14 (138,571 ppm), bem como de H13 (4,83 ppm) com C14 (138,571 ppm) e C15 (127,498 ppm) dentro do grupo benzil.

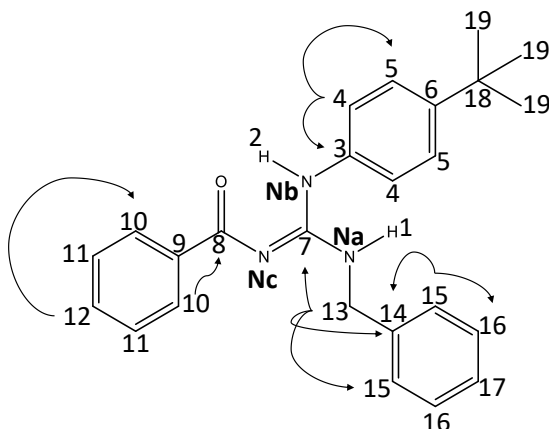
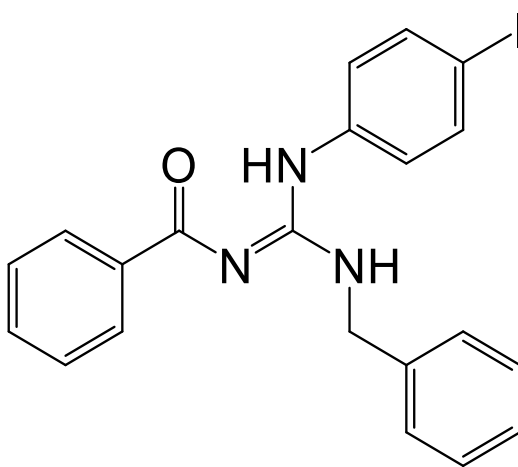
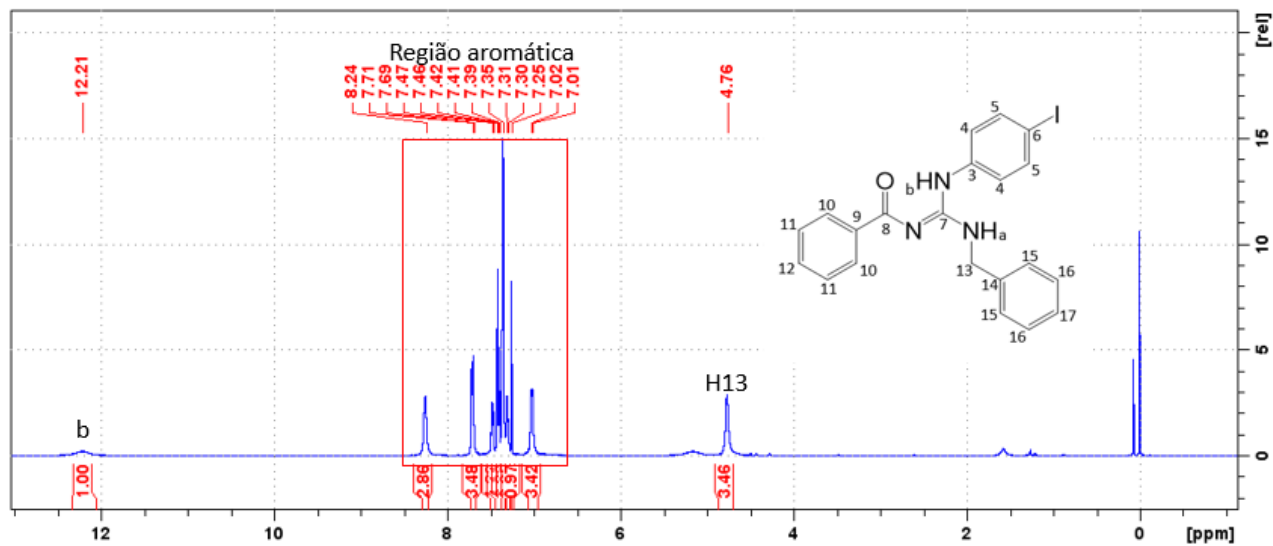
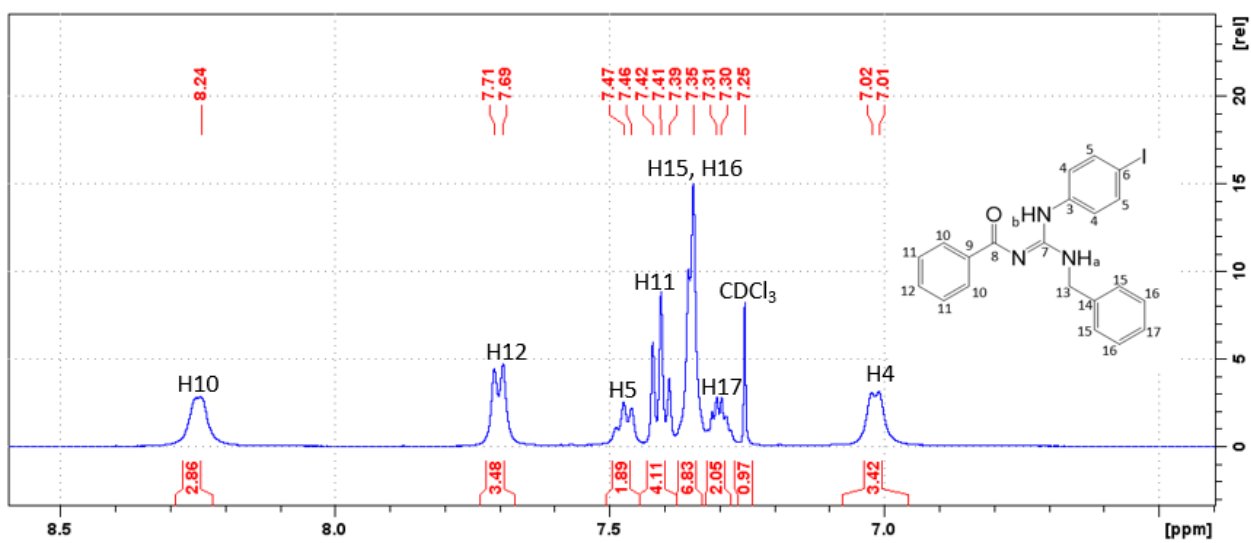
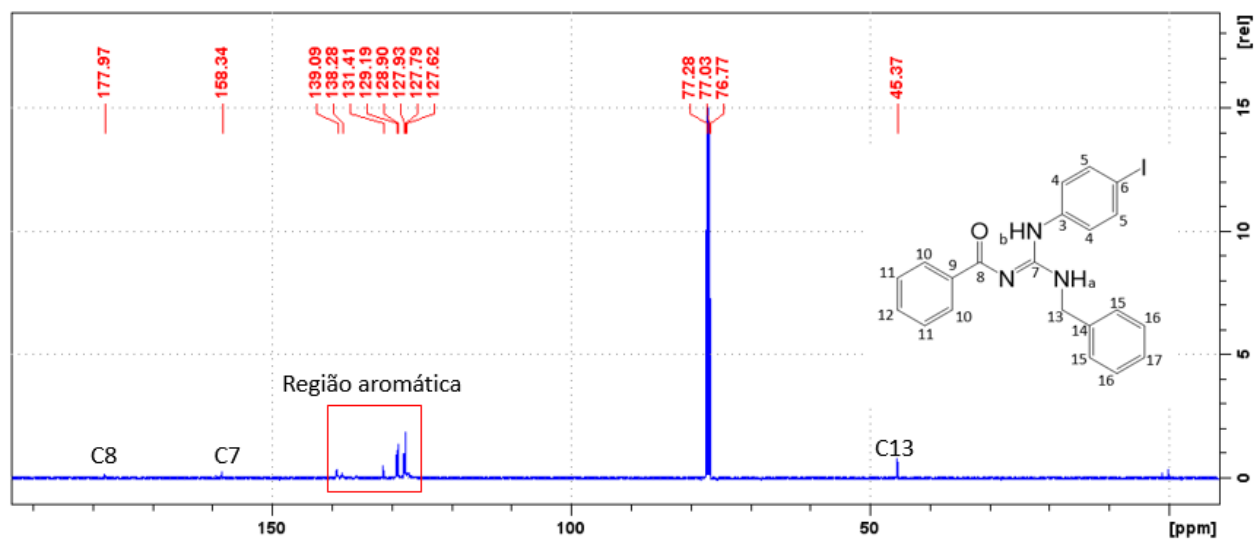
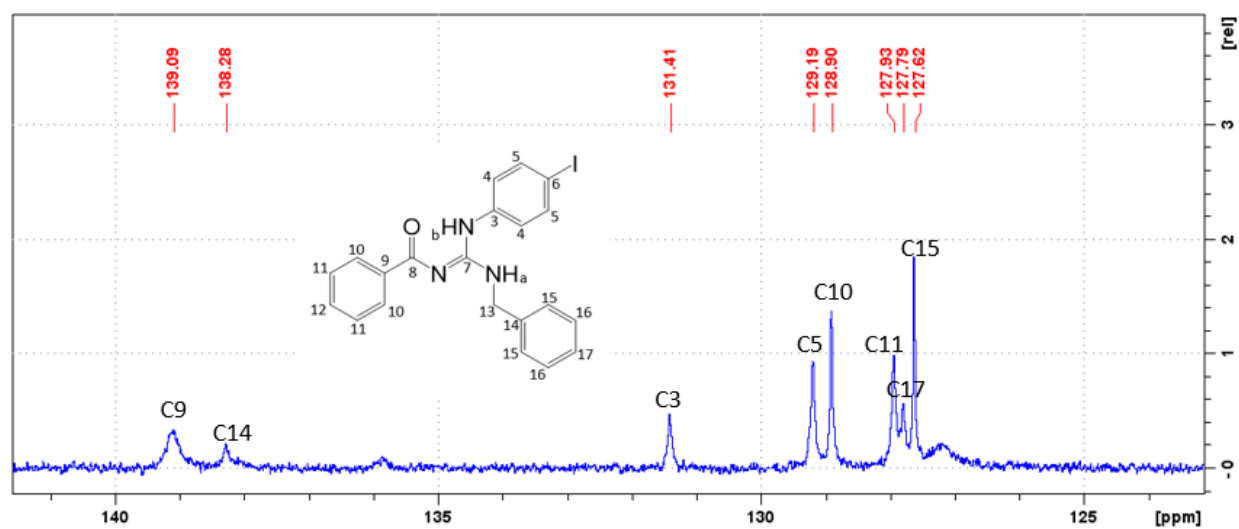


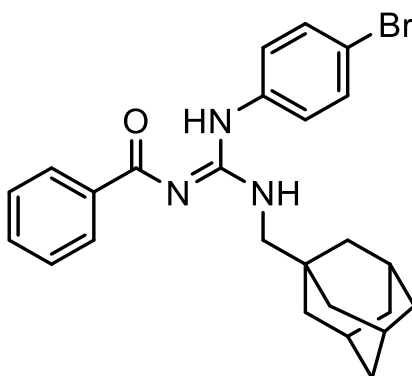
Figura 31. Algumas das interações HMBC mais representativas de LQOF-G6.



1-benzil-2-benzoyl-3-(4-iodofenil) guanidina – (LQOF-G7); pf: 126,9 – 131,4°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 65 % $^1\text{H NMR}$ (500.16 MHz, CDCl_3) δ = 12.21 (s, 1H), 8.24 (s, 2H), 7.71 (d, J = 10 Hz, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.35 (4H), 7.31 (m, 1H), 7.02 (d, J = 5 Hz, 2H), 4.76 (s, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (125.765 MHz, CDCl_3) δ = 177.97 (C=O), 158.34 (N=C), 139.09 (C), 138.28 (C), 131.41 (C), 129.19 (2CH), 128.90 (2CH), 127.93 (2CH), 127.79 (CH), 127.62 (2CH), 45.37 (CH₂).

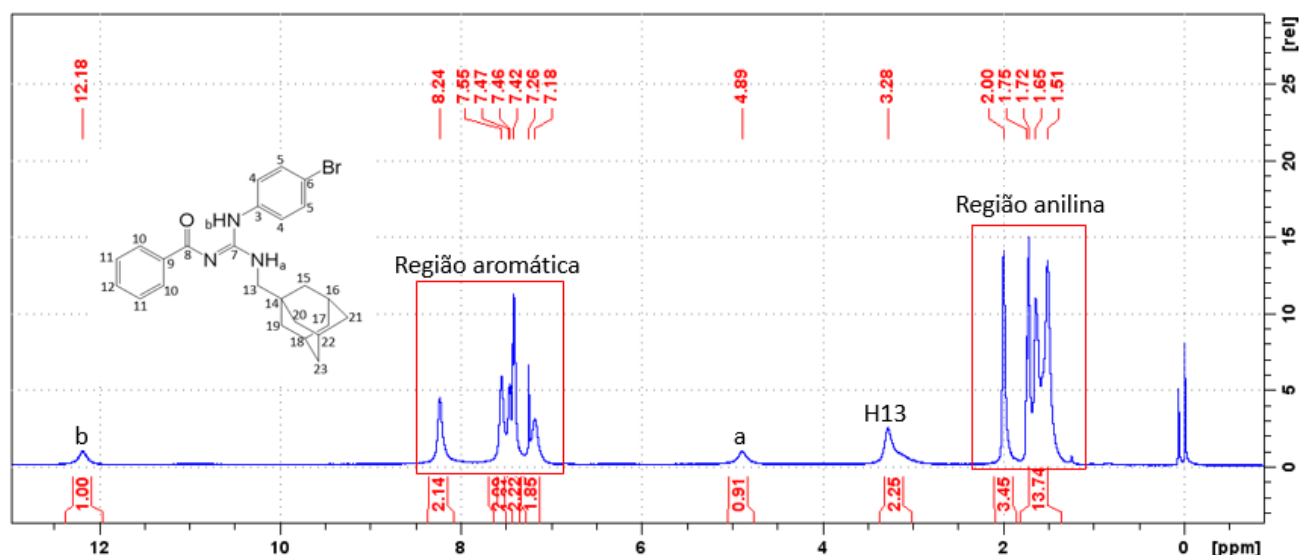
^1H - LQOF-G7 ^1H - Região aromática LQOF-G7

^{13}C - LQOF-G7 ^{13}C – Região aromática - LQOF-G7

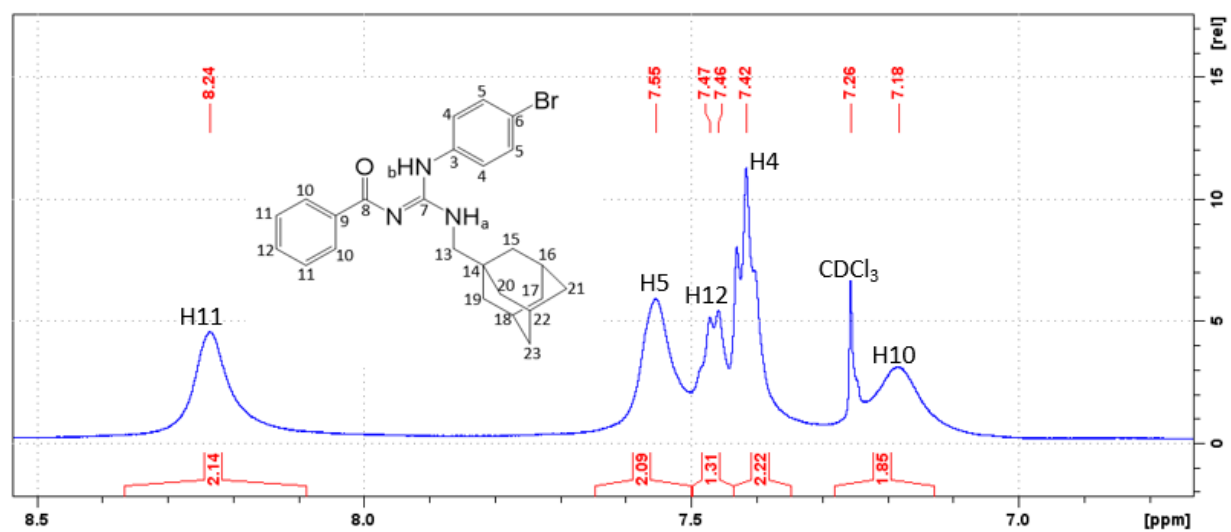


1-adamantanometilamina-2-benzoil-3-(4-bromofenil) guanidina – (LQOF_G29); pf: 174,6 – 174,9°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 67 %; **LC-UV/MS:** 99,73%; **ESI(+)-MS:** m/z encontrada 466,1490, m/z calculada para $[C_{25}H_{28}BrN_3O + H]^+$: 466,1489, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** $[M + H - C_6H_5CONH_2]^+$ de m/z 345,0959 e $[M + H - C_{10}H_{14}BrN_3O]^+$ de m/z 122,0603. **1H NMR** (500.16 MHz, $CDCl_3$) δ = 12.18 (br, NH), 8.24 (s, 2H), 7.55 (s, 2H), 7.47 (m, 1H), 7.42 (m, 2H), 7.18 (s, 2H), 4.89 (s, NH), 3.28 (s, 2H), 2.00 (s, 2H), 1.75 (s, 3H), 1.72 (s, 4H), 1.65 (s, 4H), 1.51 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125.765 MHz, $CDCl_3$) δ = 177.73 (C=O), 158.97 (C=N), 138.51 (C), 133.15 (CH), 131.22 (2CH), 129.11 (4CH), 127.90 (2CH), 127.04 (C), 52.86 (CH₂), 40.50 (3CH₂), 36.87 (3CH₂), 34.03 (C), 28.17 (3CH).

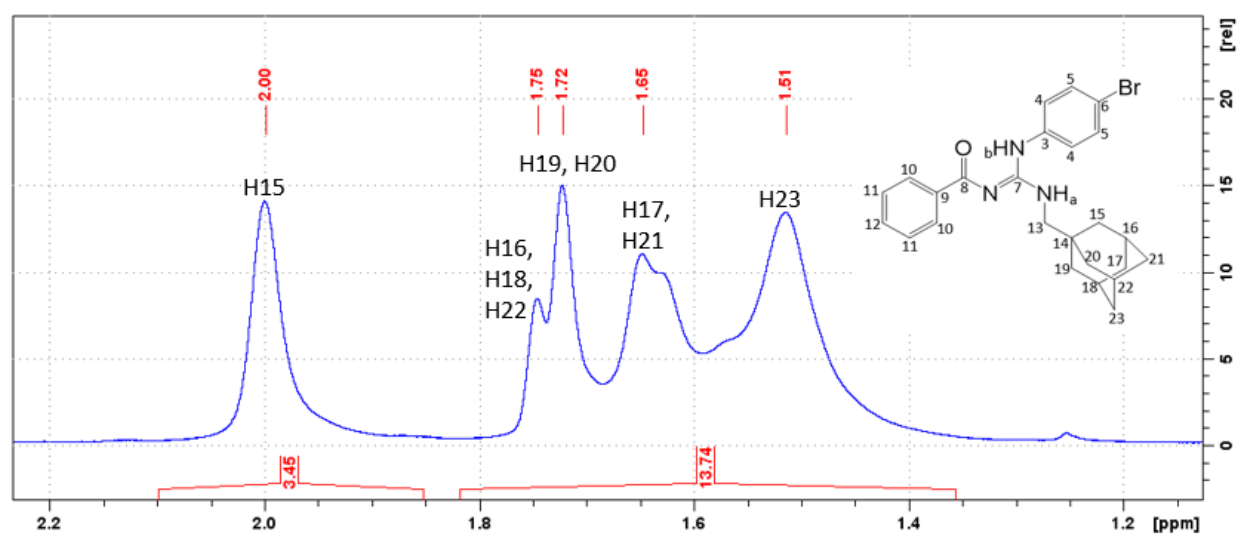
1H - LQOF-G29



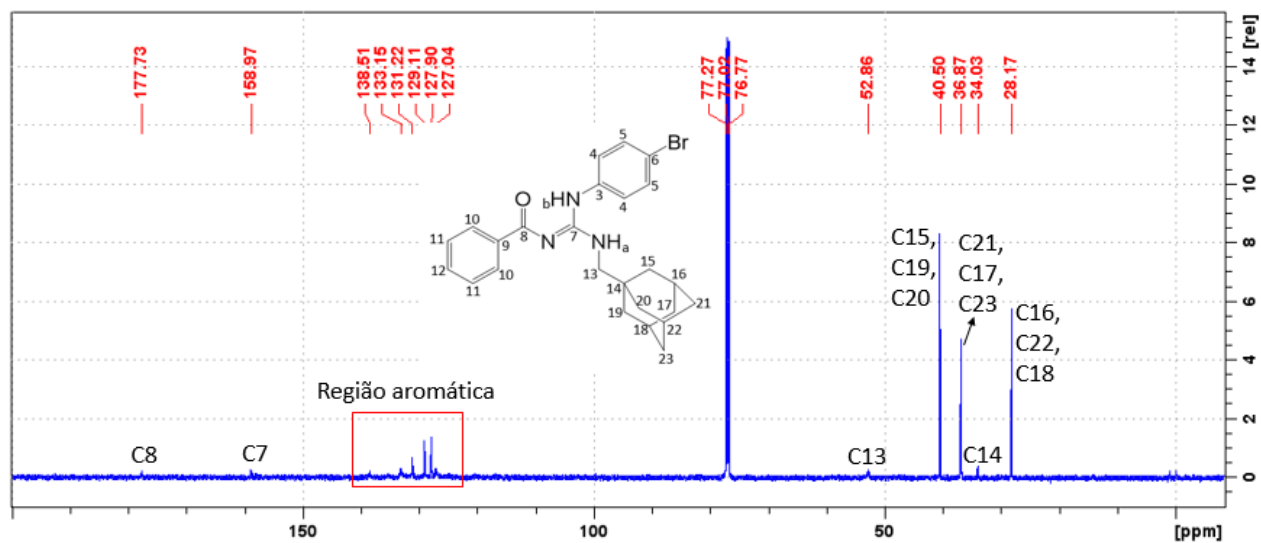
1H – Região aromática - LQOF-G29



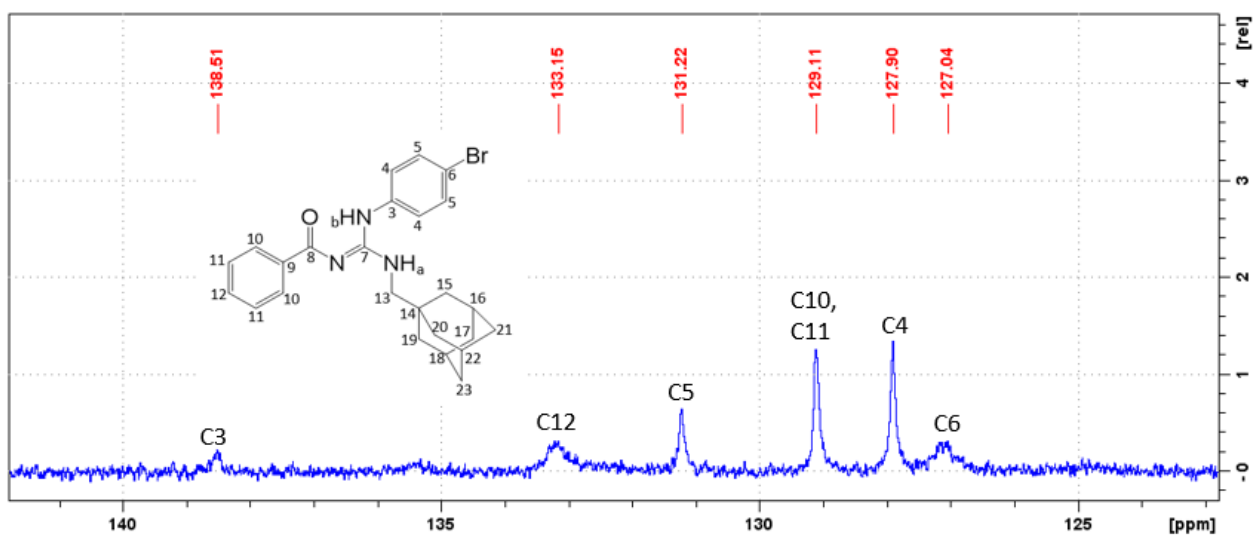
¹H – Região anilina - LQOF-G29

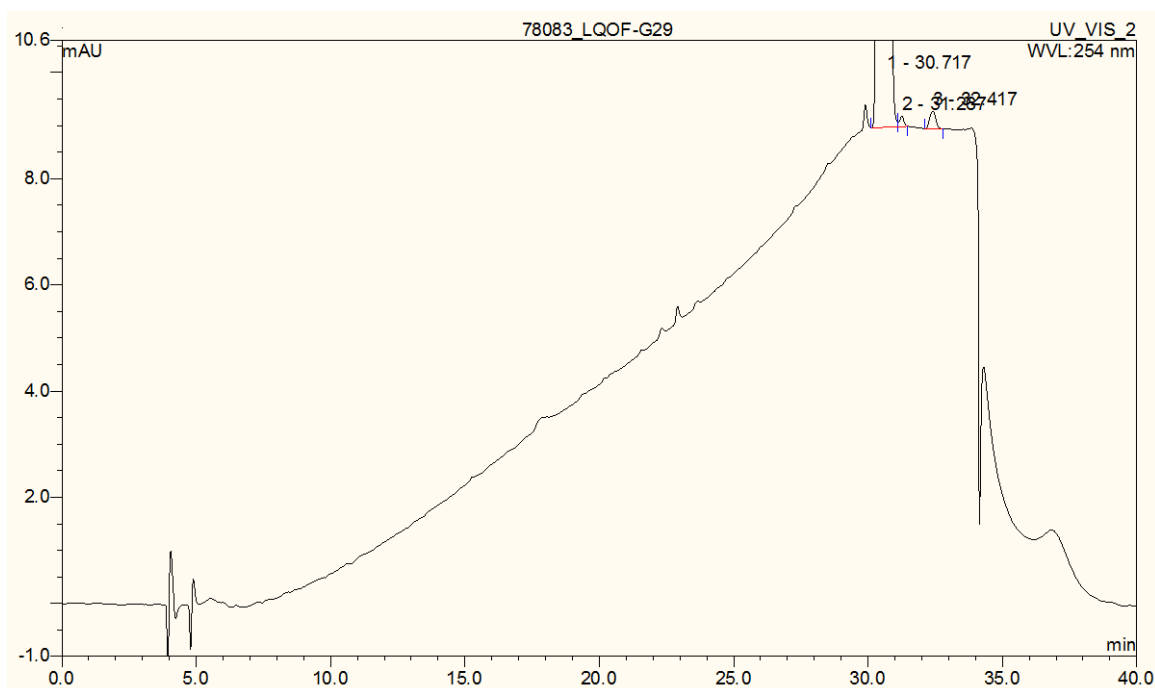
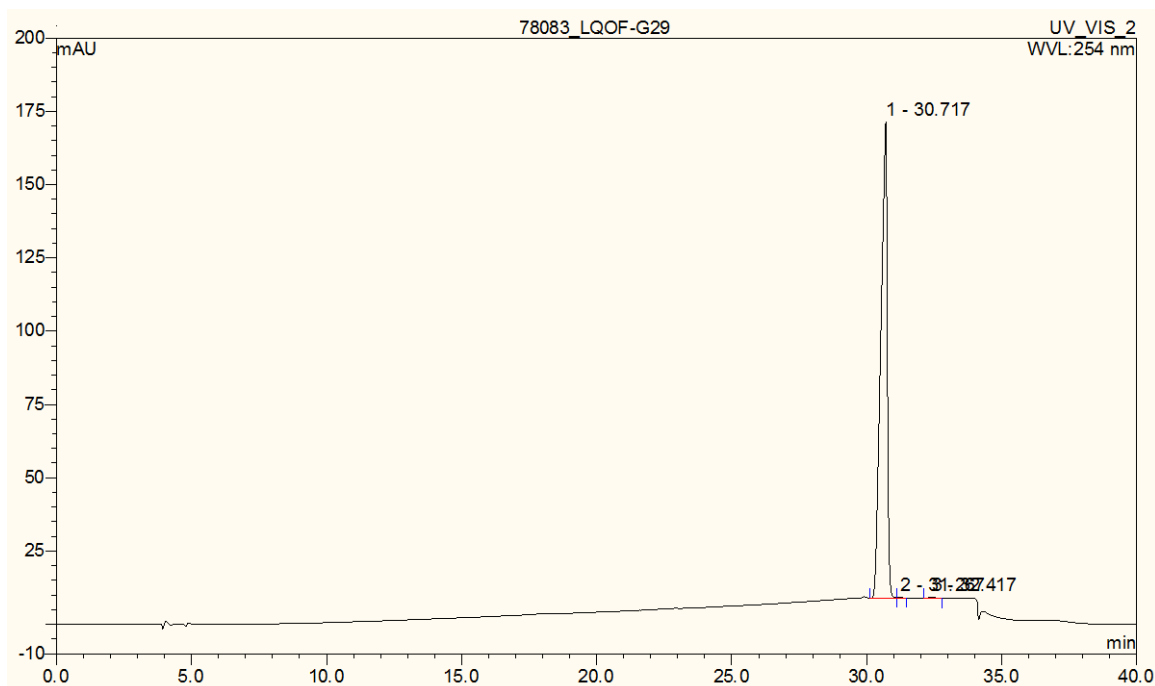


¹³C - LQOF-G29



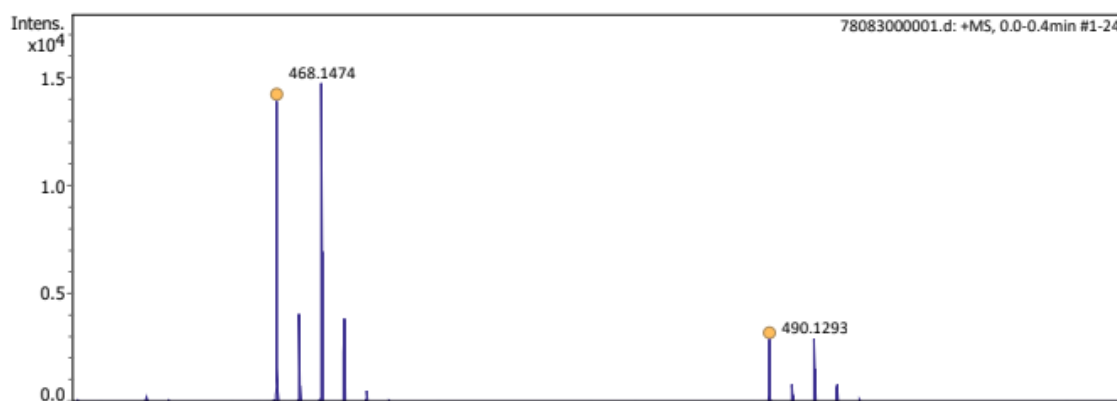
¹³C – Região aromática - LQOF-G29



LQOF_G29 – LC (HPLC)

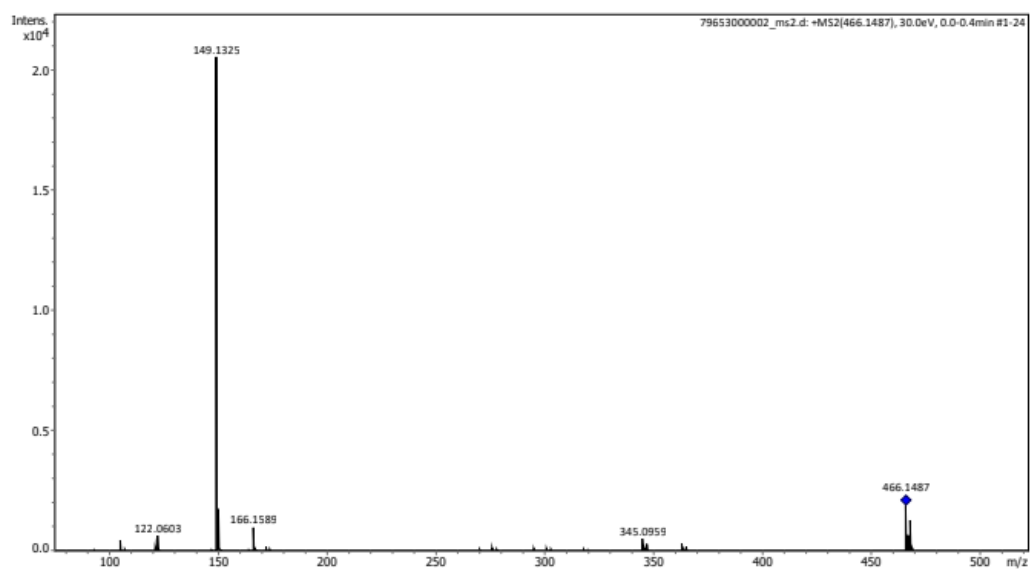
Retention Time: **30.72 min**

Relative Peak Area: **99.73 %**

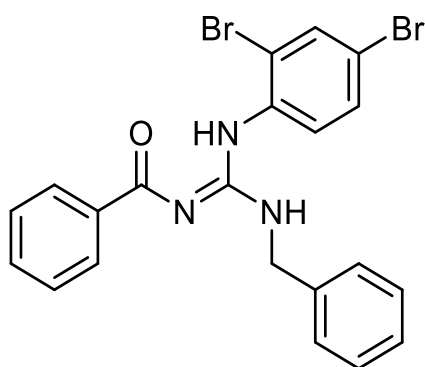
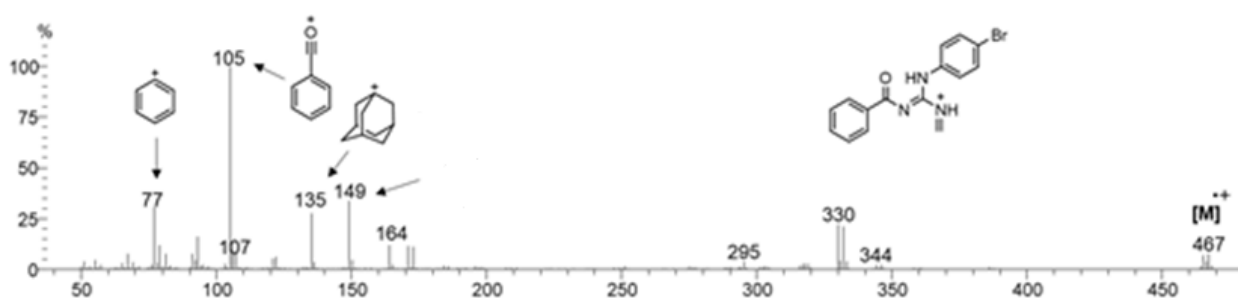
LQOF_G29 ESI-(+) MS

m/z 466,1490: $C_{25}H_{29}BrN_3O$

m/z 488,1309: $C_{25}H_{28}BrN_3NaO$

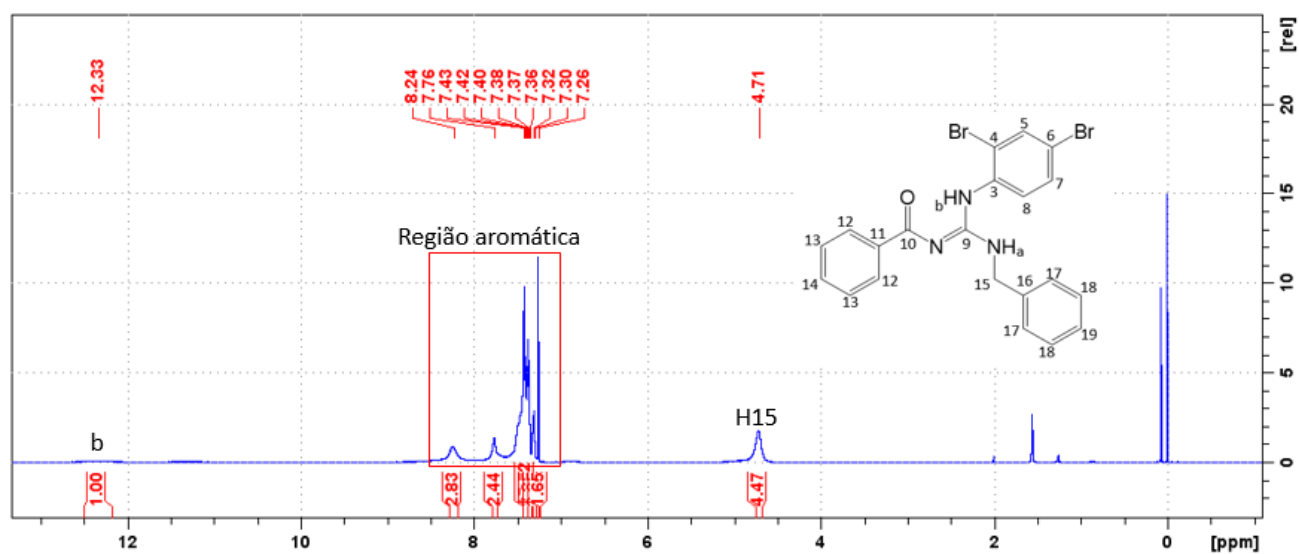
LQOF_G29 ESI-(+) MS/MS

LQOF_G29 – EI-MS – 12/04/2021

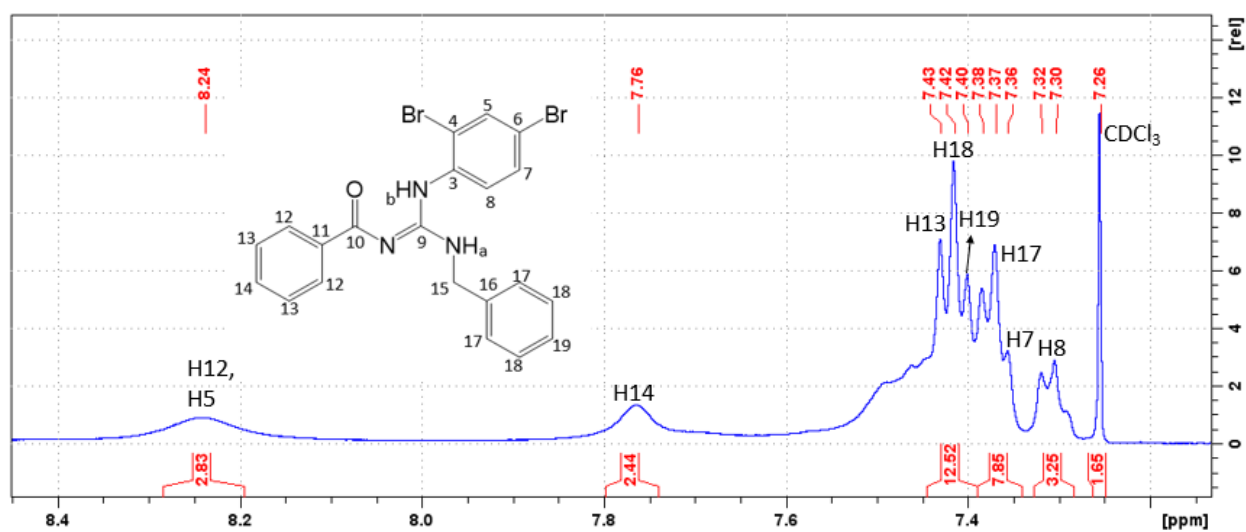


1-benzil-2-benzoil-3-(2,4-bromofenil) guanidina – (LQOF_G30); pf = 131,2 – 132,3°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 71 %; **LC-UV/MS:** 99,82%; **ESI(+)-MS:** *m/z* encontrada 485, 9812, *m/z* calculada para $[C_{21}H_{16}Br_2N_3O + H]^+$: 487,9790; **ESI(+)-MS/MS** $[M + H - C_6H_5C(O)NH_2]^+$ de *m/z* 366,9258. **1H NMR** (500.16 MHz, $CDCl_3$) δ = 12.33 (br, NH), 8.24 (s, 3H), 7.76 (s, 1H), 7.42 (m, 5H), 7.37 (m, 3H), 7.30 (m, 1H), 4.71 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125.765 MHz, $CDCl_3$) δ = 131.57 (2CH), 128.95 (CH), 127.97 (2CH), 127.58 (2CH), 45.45 (CH₂).

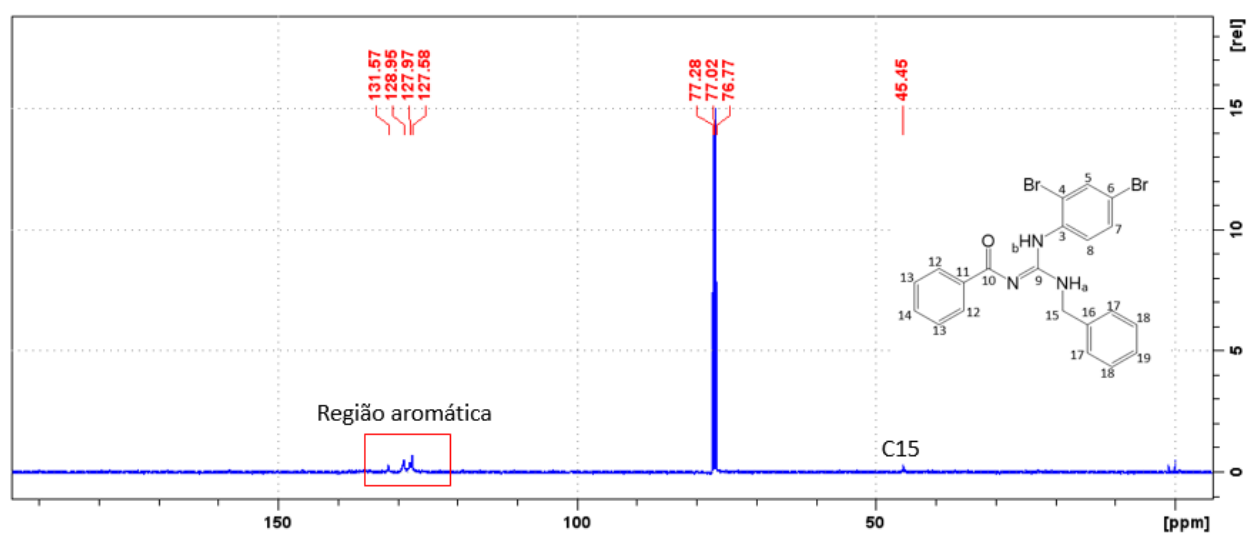
1H - LQOF-G30



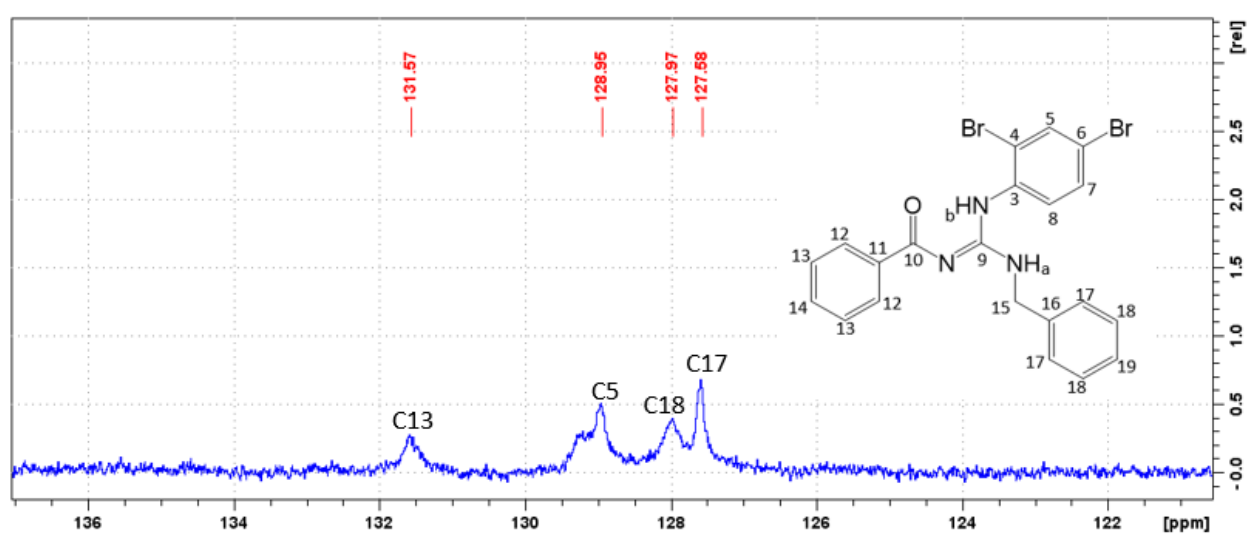
¹H – Região aromática - LQOF-G30

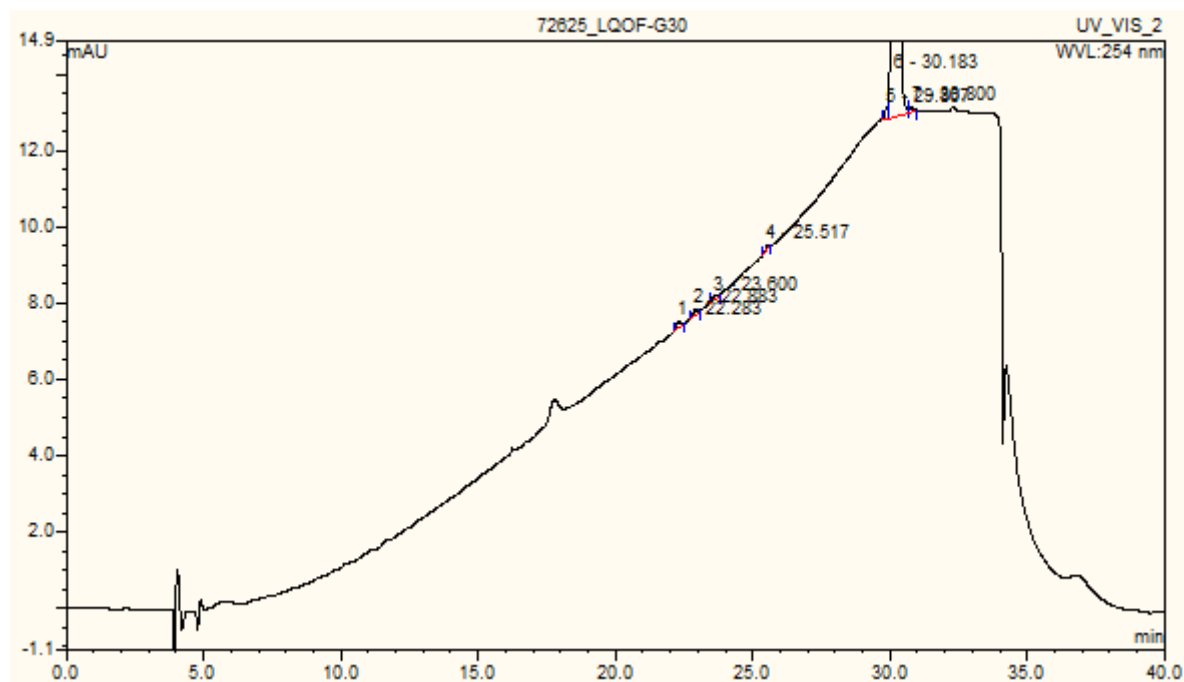
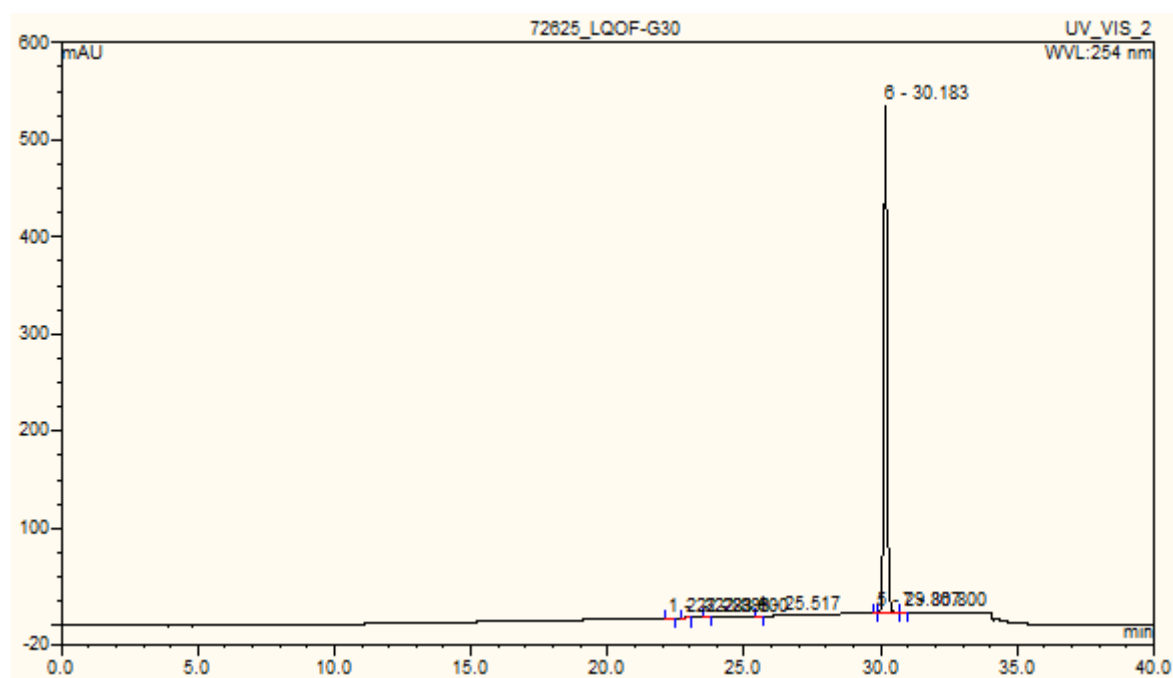


¹³C - LQOF-G30



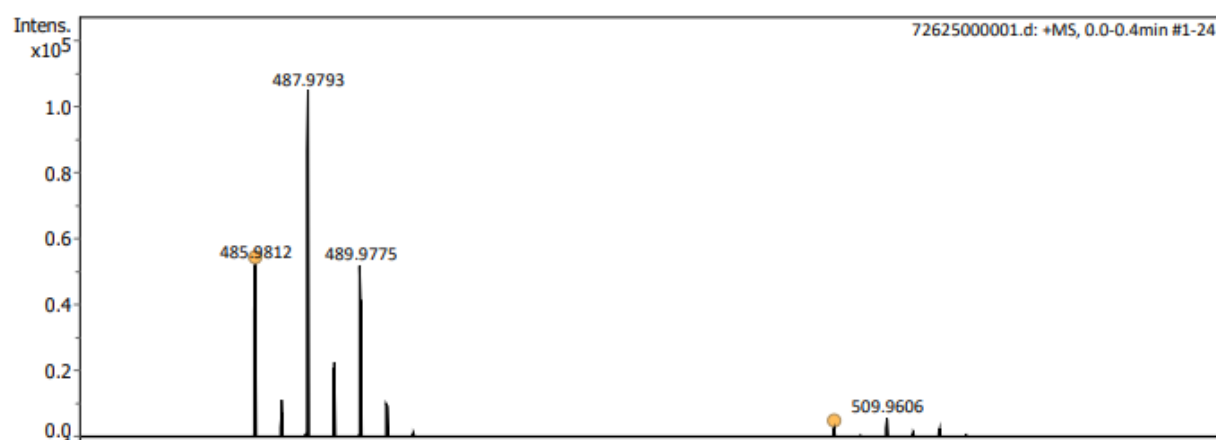
¹³C – Região aromática - LQOF-G30



LQOF_G30 – LC (HPLC)

Retention Time: **30.18 min**

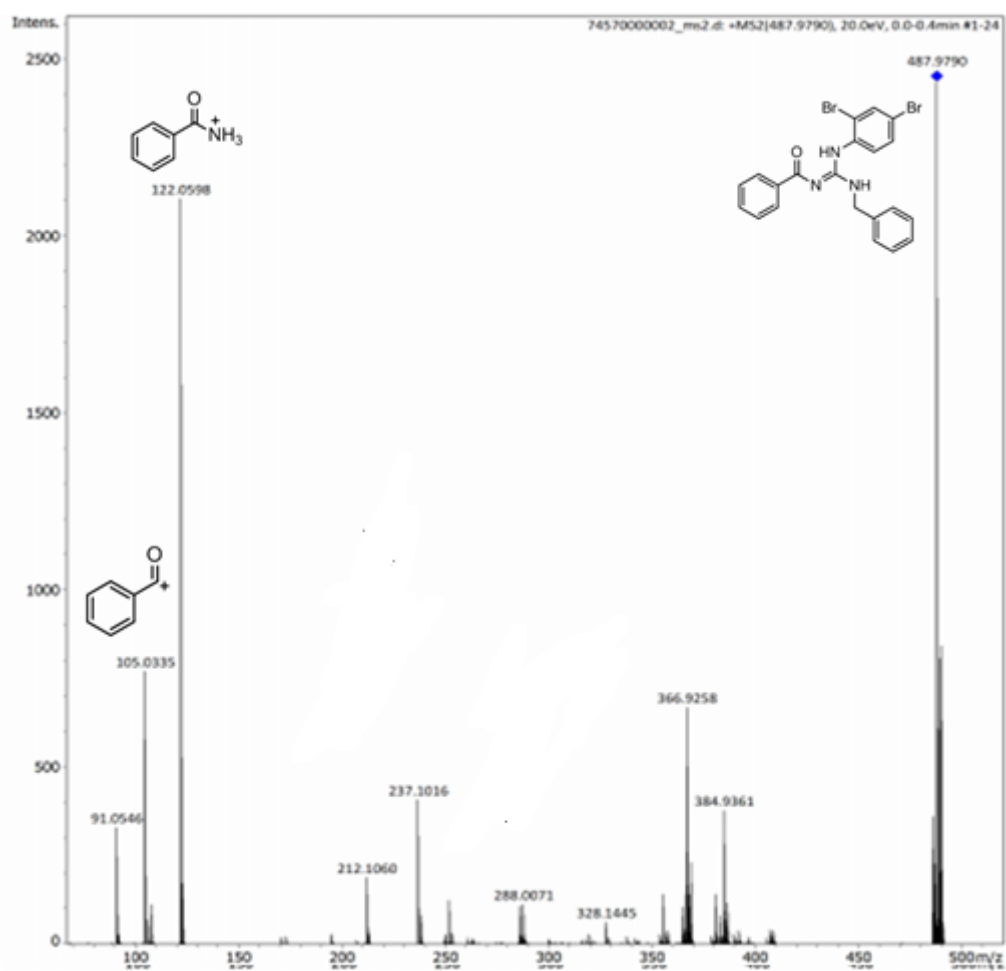
Relative Peak Area: **99.82**

LQOF_G30 ESI-(+) MS

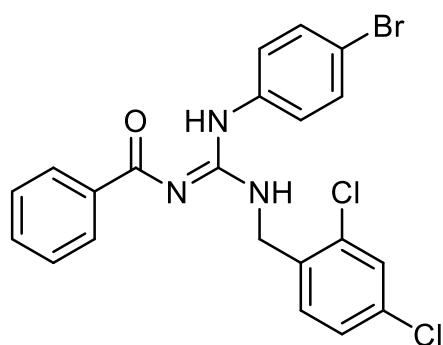
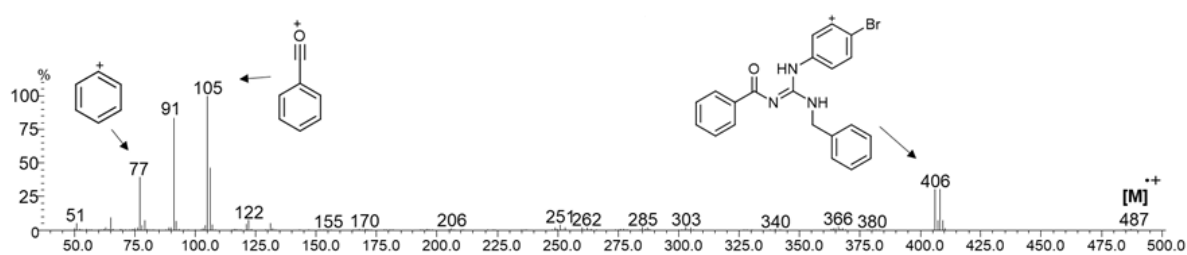
m/z 485,9812: $C_{21}H_{17}Br_2N_3O$

m/z 507,9627: $C_{21}H_{16}Br_2N_3NaO$

LQOF_G30 - ESI-(+) MS/MS

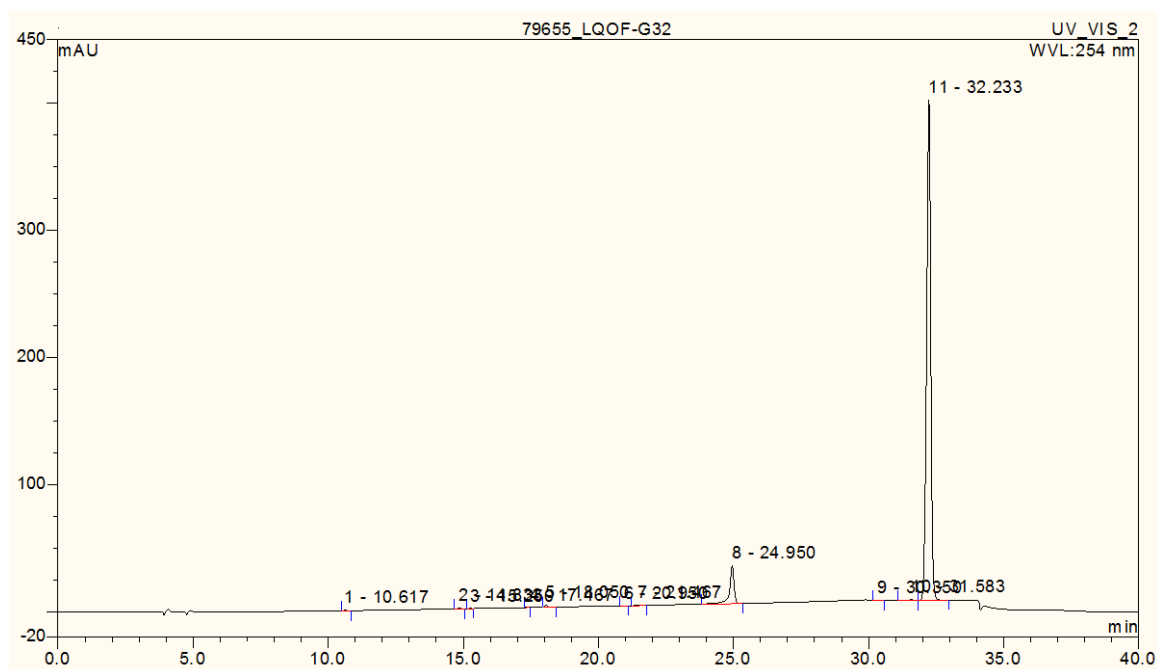


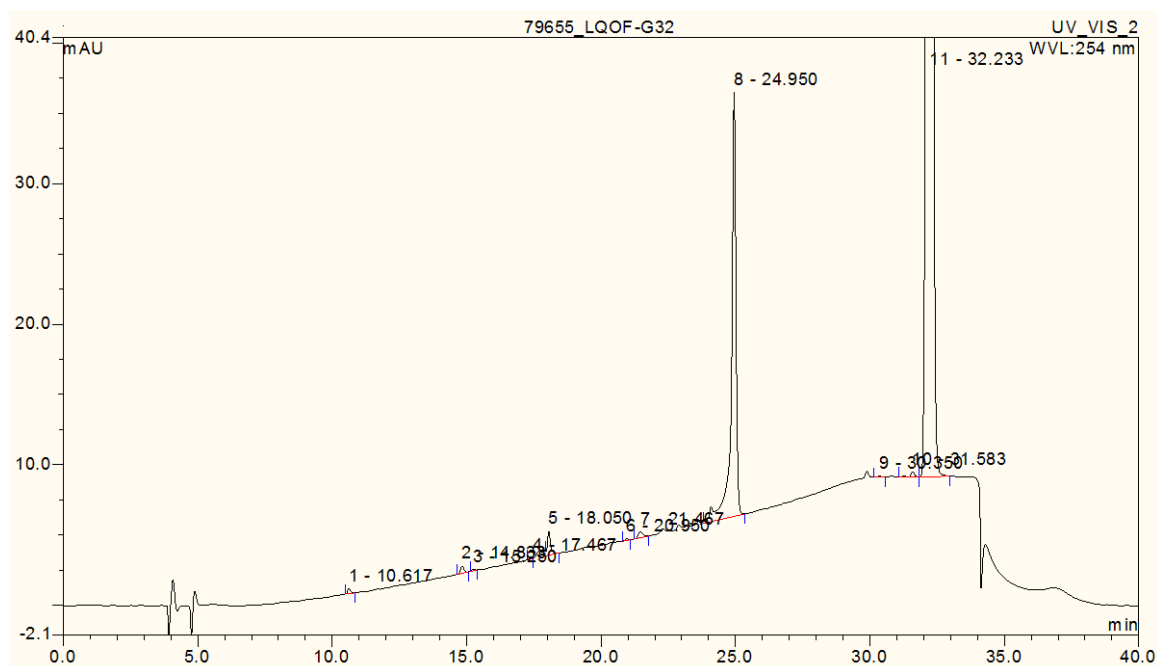
LQOF_G30 – EI-MS



1-(2,4-diclorobenzil) -2-benzoil-(4-bromofenil) guanidina – (LQOF_G32); pf = 128,0 – 128,8°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 82 %; **LC-UV/MS:** 91,45%; **ESI(+)-MS:** *m/z* encontrada 475,9925, *m/z* calculada para $[C_{21}H_{16}BrCl_2N_3O + H]^+$: 475,9927, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** $[M + H - C_6H_5CONH_2]^+$ de *m/z* 356,9373 e $[M + H - C_{13}H_{10}BrCl_2N_2]^+$ de *m/z* 122,0601. **¹H NMR** (500.16 MHz, CDCl₃) δ = 12.17 (br, NH), 7.56 (d, J= 10 Hz, 2H), 7.49 (m, 1H), 7.44-7.40 (m, 6H), 7.23 (m, 1H), 7.15 (d, J= 5 Hz, 2H), 7.23 (d, 1H), 7.15 (d, 2H). **¹³C NMR** (125.765 MHz, CDCl₃) δ = 178.01 (C=O), 158.85 (C=N), 138.19 (C), 134.90 (C), 134.29 (C), 133.30 (C), 131.47 (2CH), 131.13 (2CH), 129.49 (2CH), 129.13 (CH), 127.96 (2CH), 127.49 (C), 42.63 (CH₂).

LQOF_G32 – LC (HPLC)

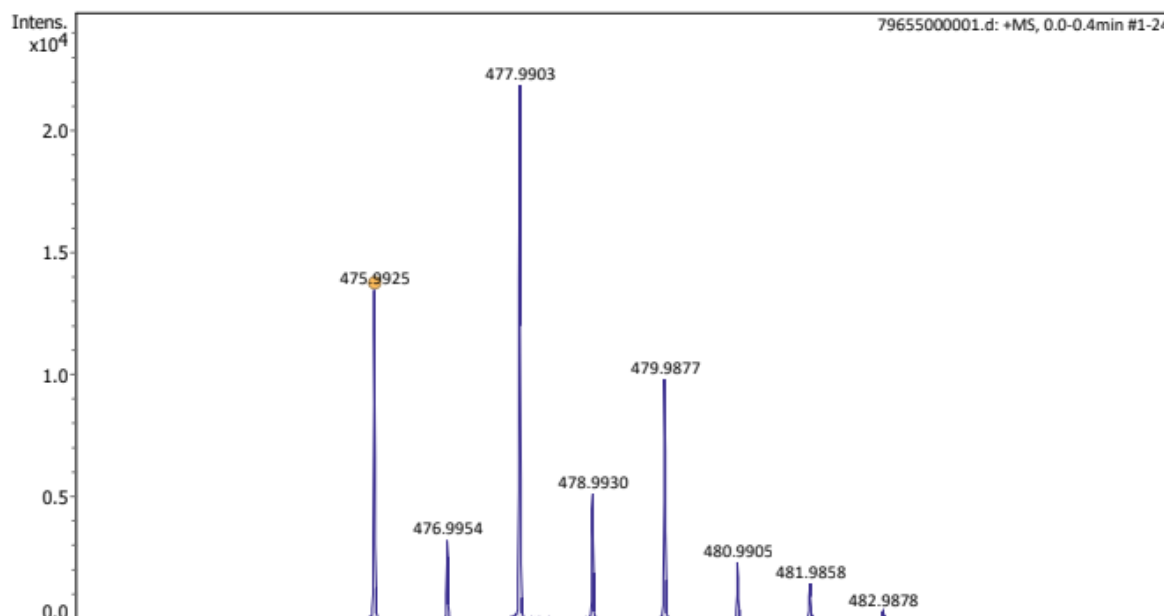




Retention Time: **32.23 min**

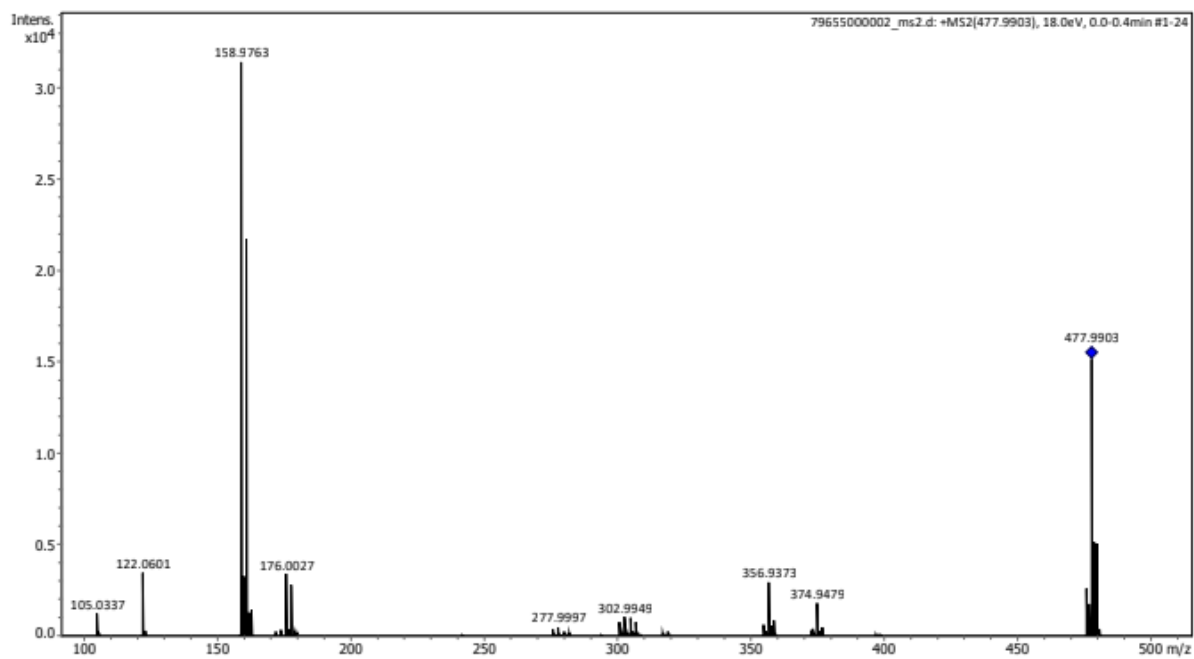
Relative Peak Area: **91.45 %**

LQOF_G32 ESI-(+)MS

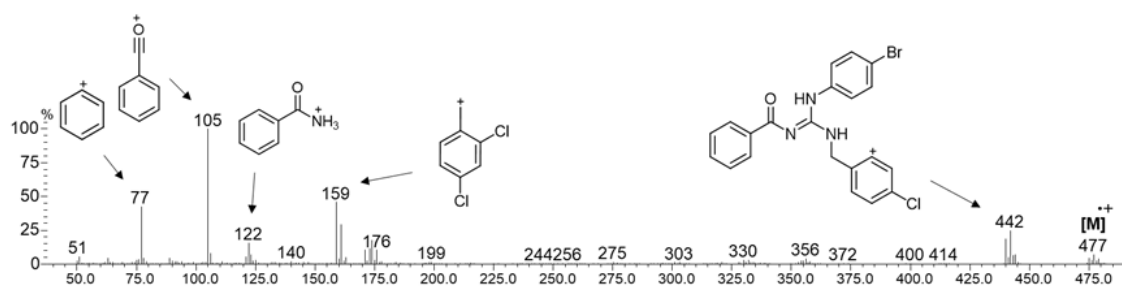


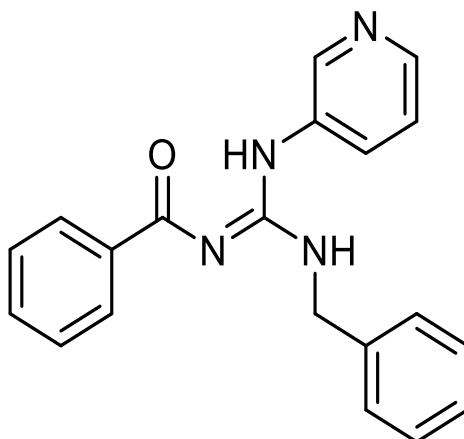
m/z 475,9925: $C_{21}H_{17}BrCl_2N_3O$

LQOF_G32 ESI-(+)MS/MS

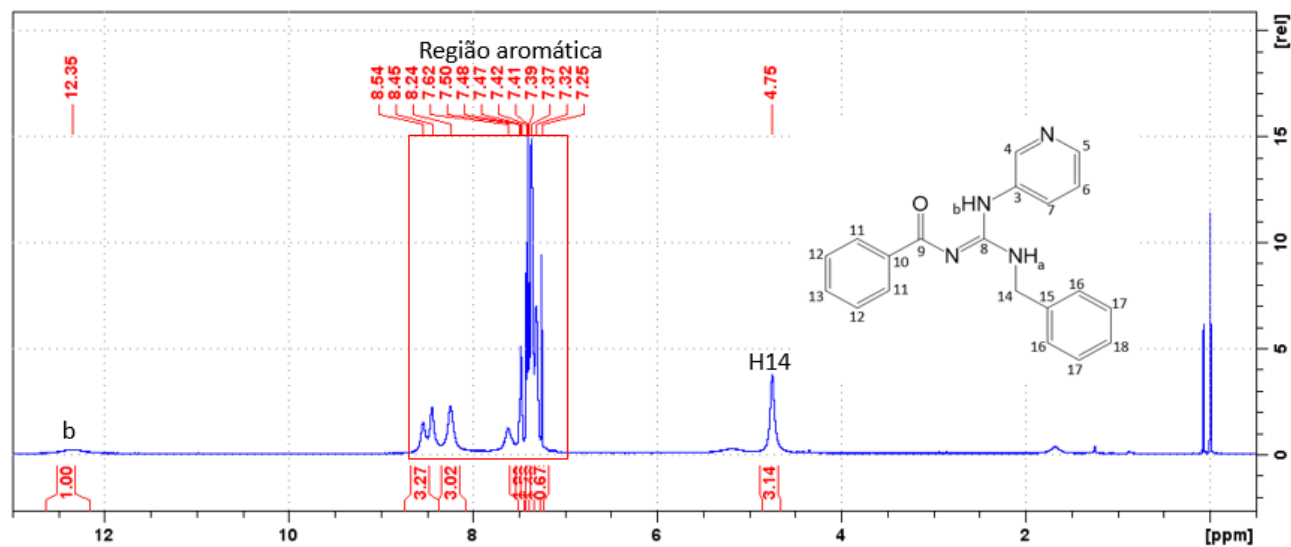
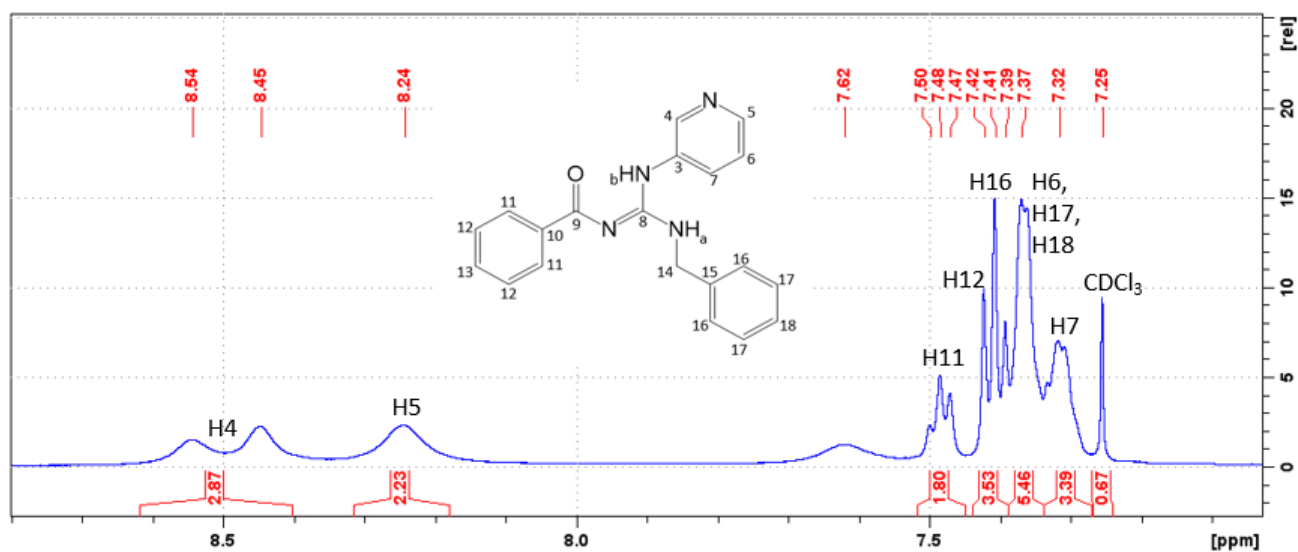


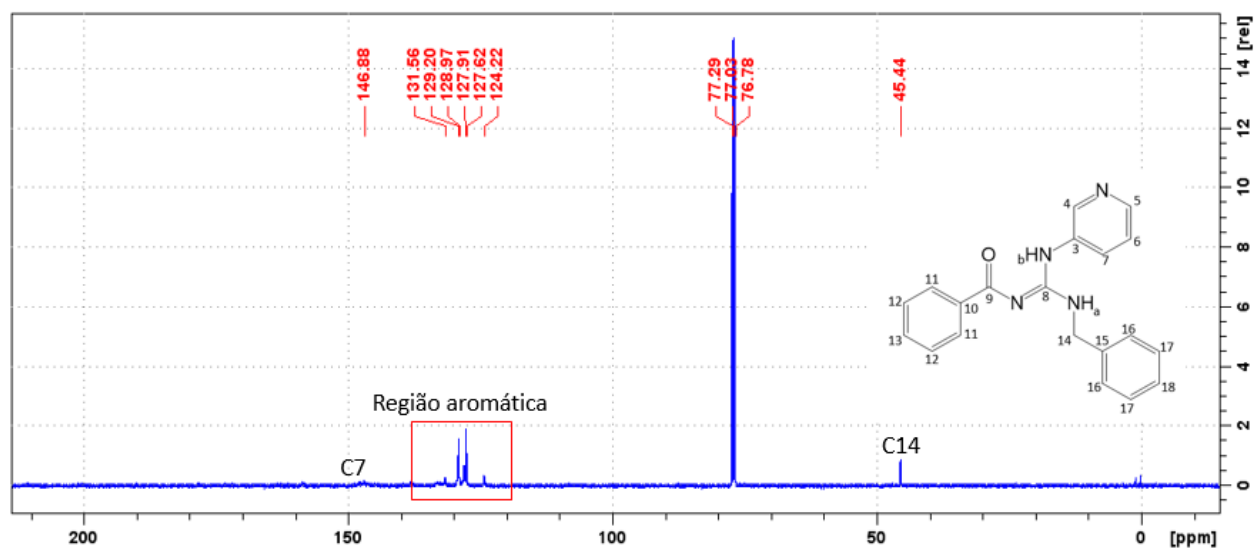
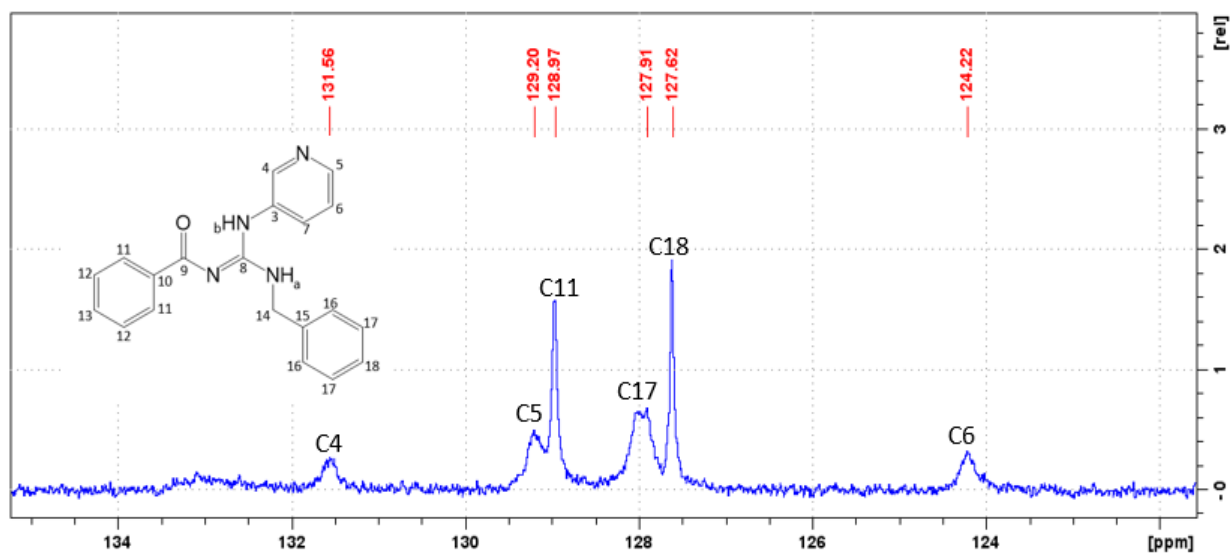
LQOF_G32 – EI-MS

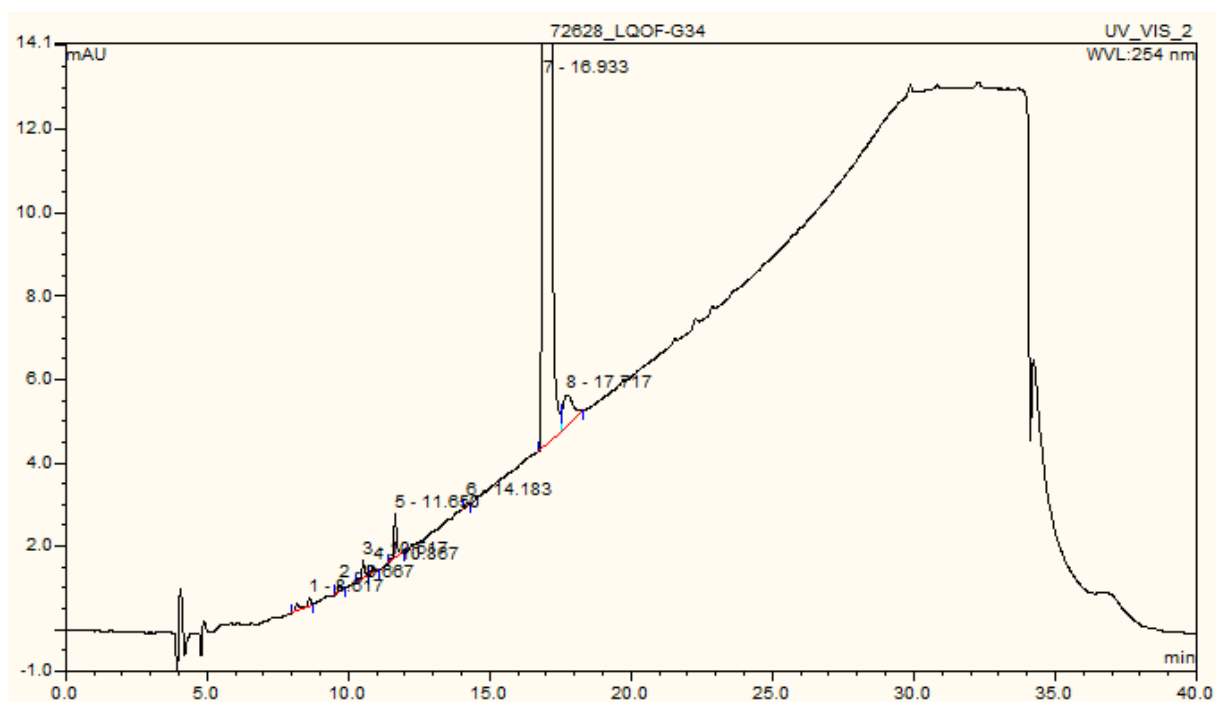
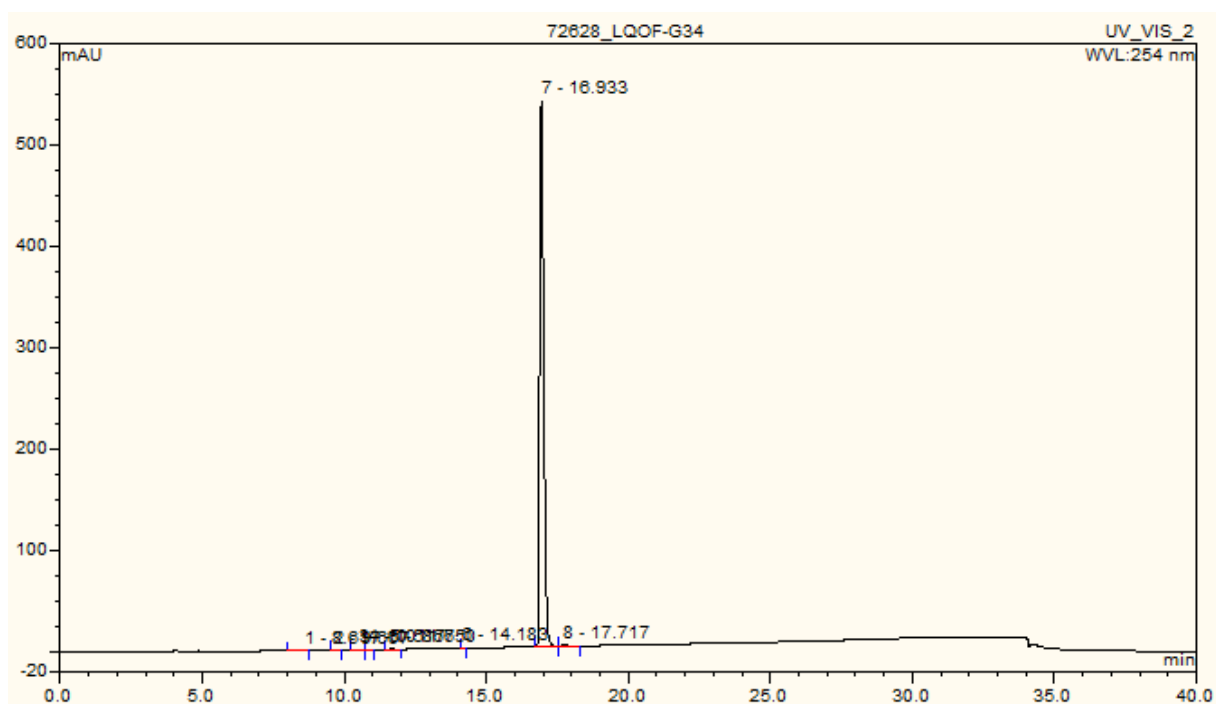




1-benzil-2-benzoyl-3-(3-aminopiridina) guanidina – (LQOF_G34); pf = 109,6 – 110,6°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 78 %; **LC-UV/MS:** 99,33%; **ESI(+)-MS** *m/z* encontrada 331,1554, *m/z* calculada para [C₂₀H₁₈N₄O + H]⁺: 331,1553, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** [M + H – C₆H₅C(O)] de *m/z* 224,0817, [M + H – C₆H₅CONH₂]⁺ de *m/z* 210,1024 e [M + H – C₁₂H₁₁N₃]⁺ de *m/z* 122,0600. **¹H NMR** (500.16 MHz, CDCl₃) δ = 12.35 (br, NH), 8.54 (d, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.48 (t, J= 7.5 Hz, 2H), 7.42-1.32 (m, 9H), 4.75 (s, CH₂). **¹³C NMR** (125.765 MHz, CDCl₃) δ = 146.88 (CH), 131.56 (CH), 129.20 (CH), 128.97 (2CH), 127.91 (2CH), 127.62 (CH), 124.22 (CH), 45.44 (CH₂).

^1H - LQOF-G34 ^{13}H – Região aromática - LQOF-G34

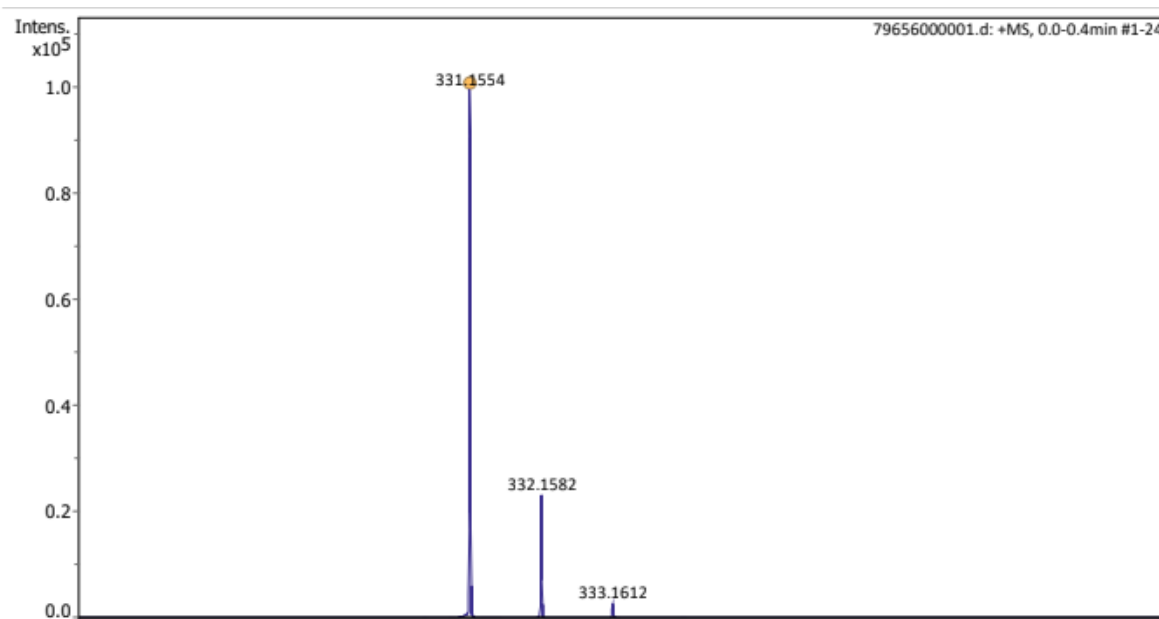
^{13}C – LQOF-G34 ^{13}C – Região aromática - LQOF-G34

LQOF_G34 – LC (HPLC)

Retention Time: **16.93 min**

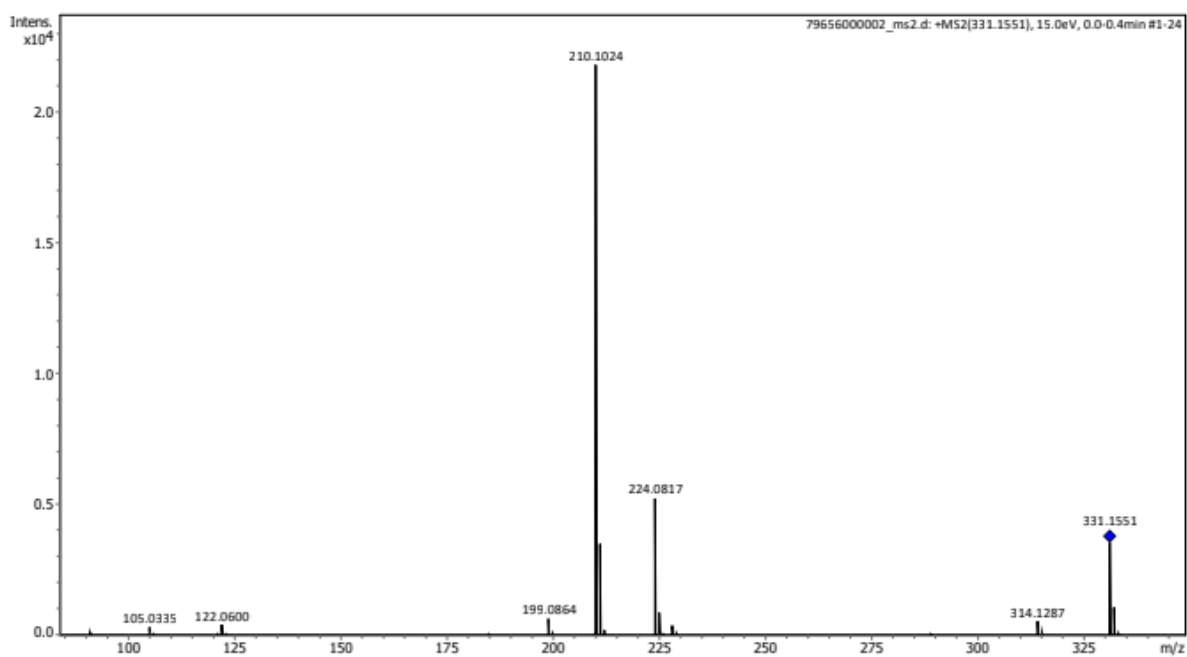
Relative Peak Area: **99.33 %**

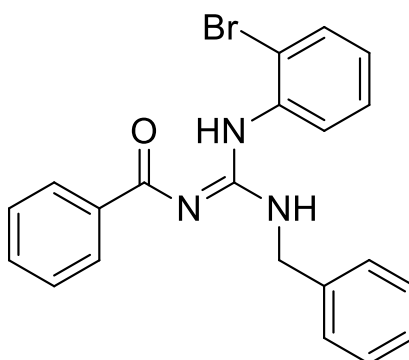
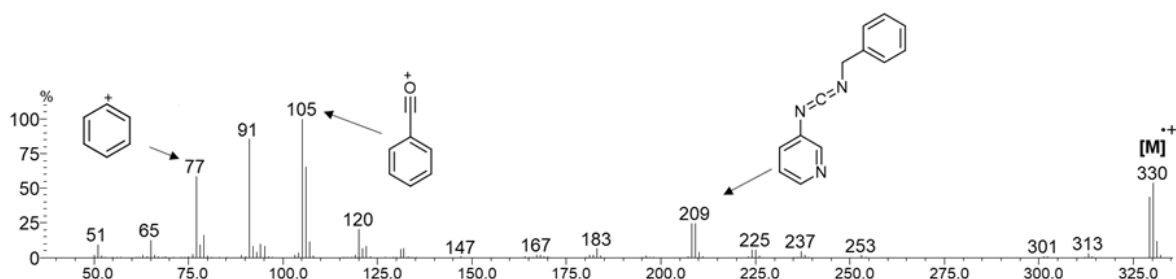
LQOF_G34 ESI-(+) MS



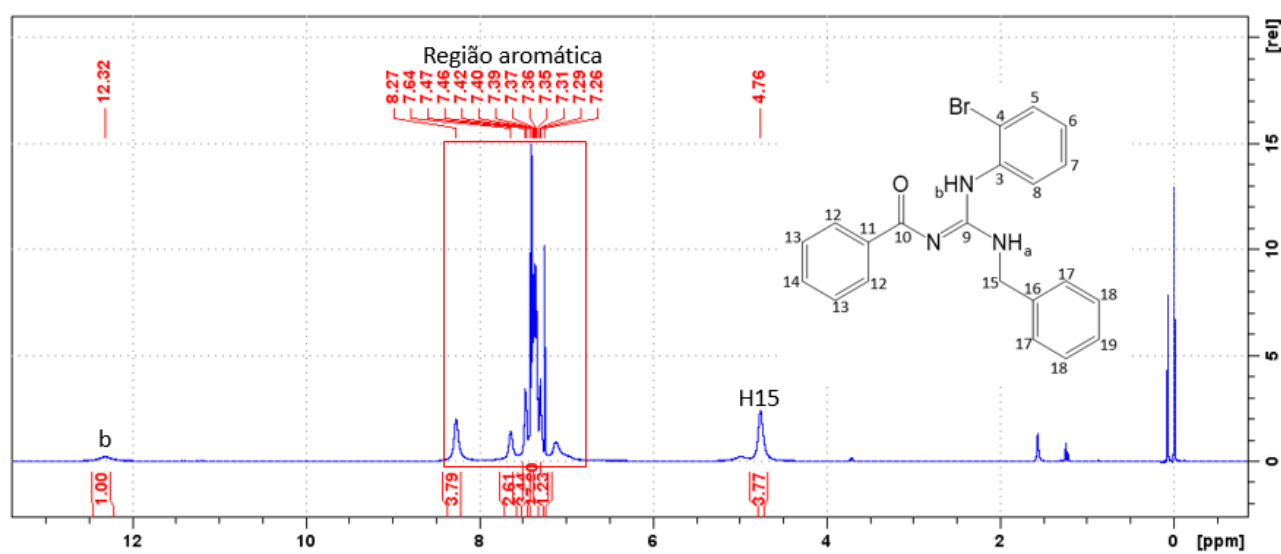
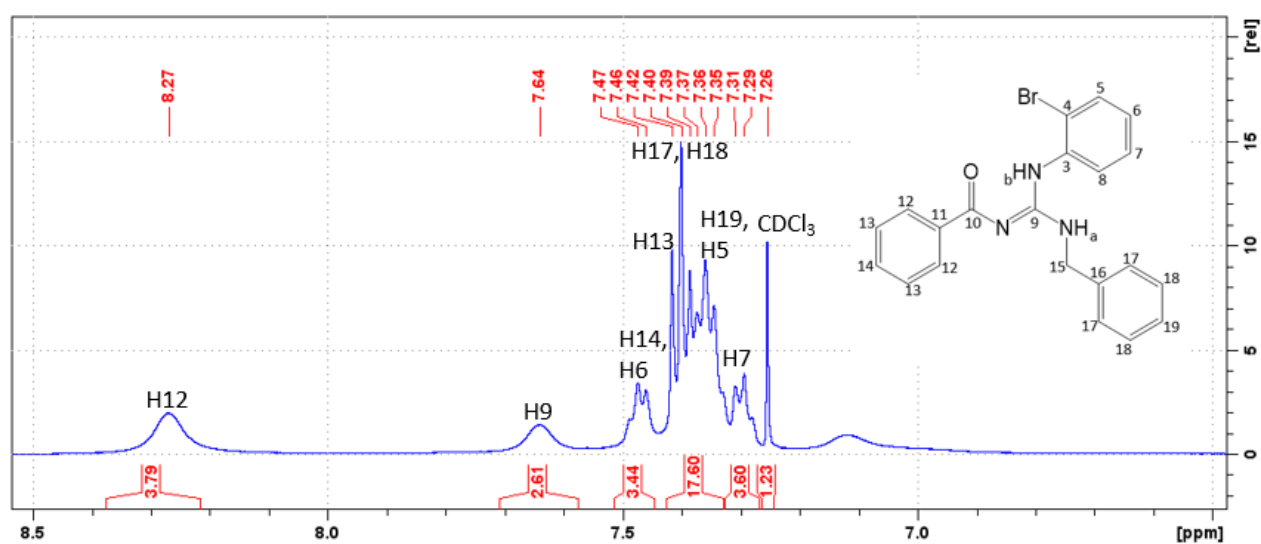
m/z 331,1554: C₂₀H₁₉N₄O

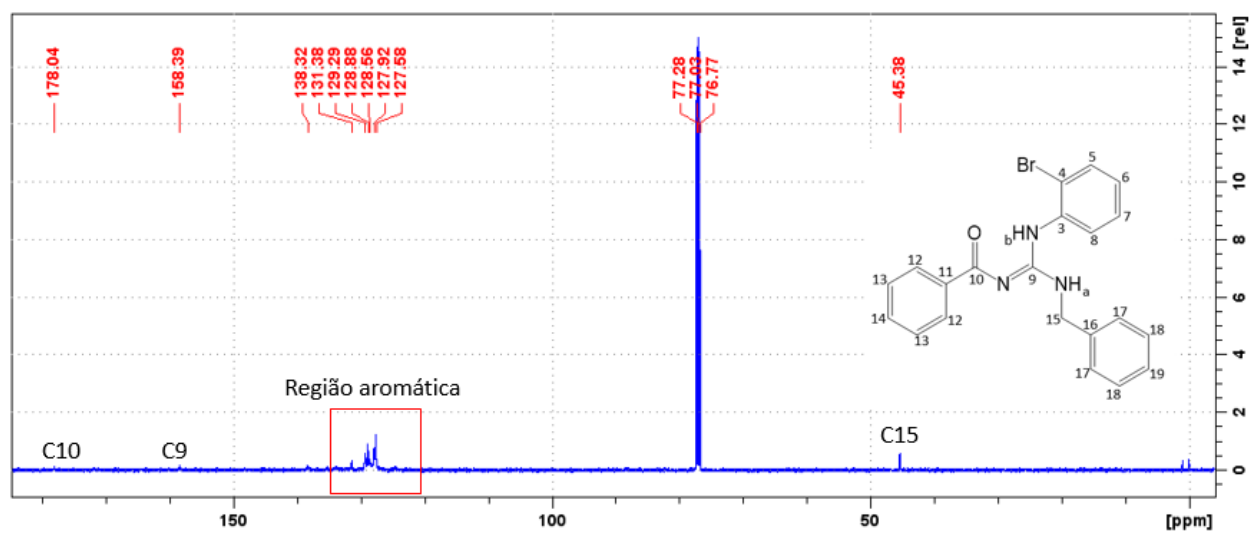
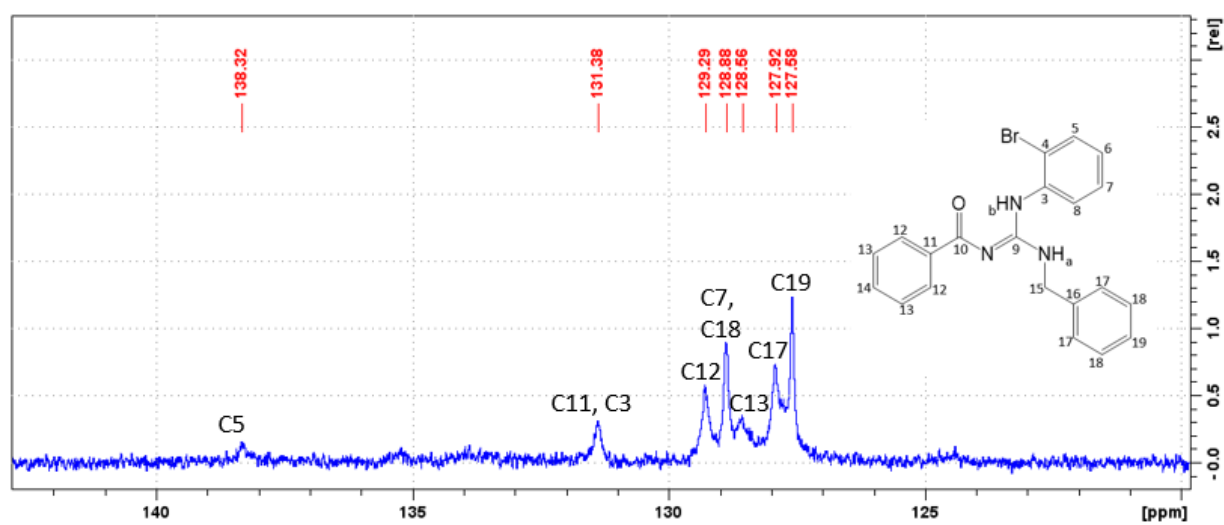
LQOF_G34 ESI-(+)MS/MS

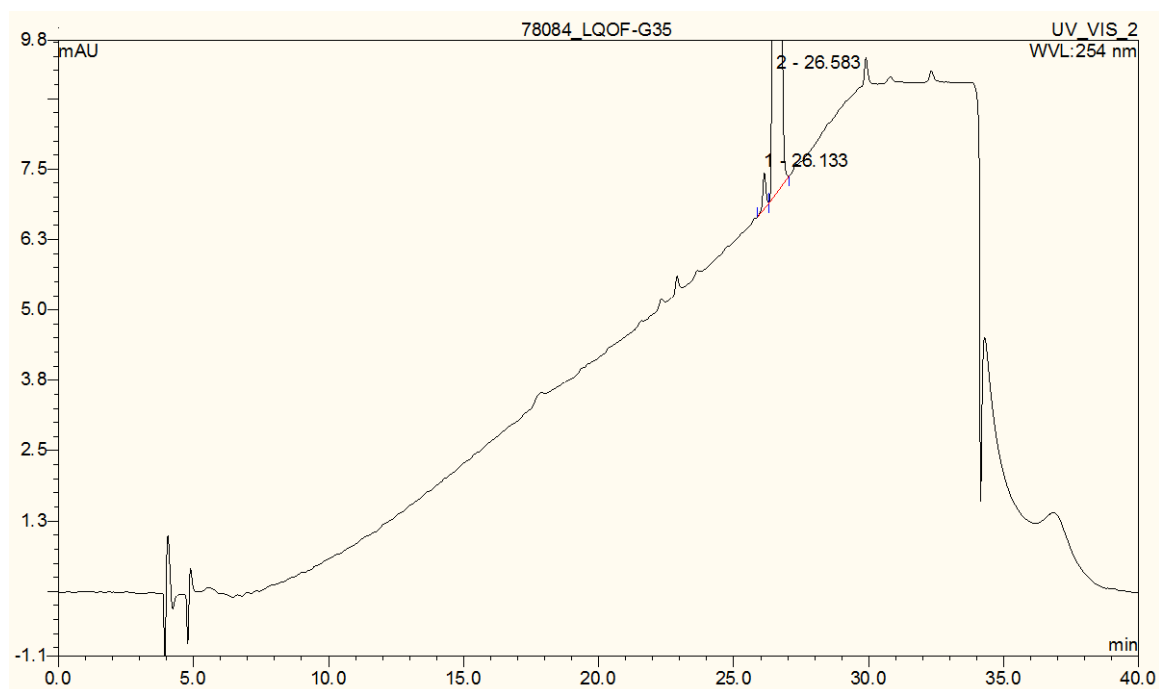
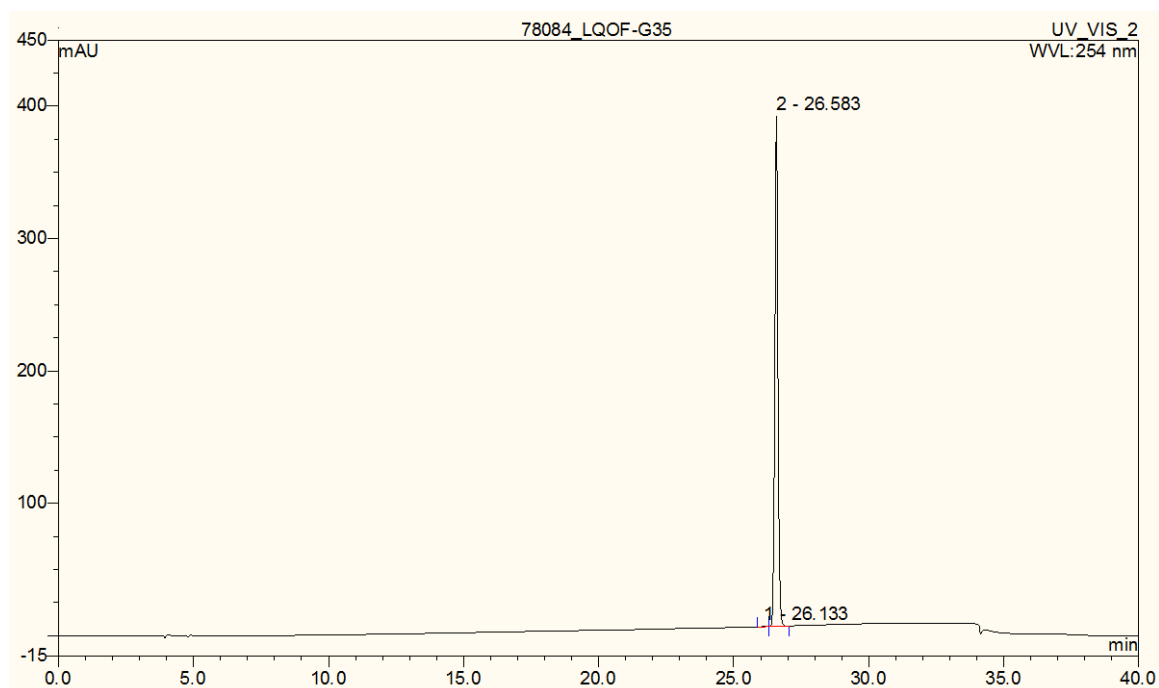


LQOF_G34 – EI-MS

1-benzil-2-benzoil-3-(2-bromobenzeno) guanidina – (LQOF_G35); pf = 103,7 – 104,2°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 69 %; **LC-UV/MS:** 99,84%; **ESI(+)-MS** *m/z* encontrada 408,0705, *m/z* calculada para $[C_{21}H_{18}BrN_3O + H]^+$: 408,0706, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** $[M + H - C_6H_5CONH_2]^+$ de *m/z* 287,0175, $[M + H - C_{15}H_{12}N_2O]^+$ de *m/z* 171,9757 $[M + H - C_{13}H_{12}BrN_2]^+$ de *m/z* 122,0603. **¹H NMR** (500.16 MHz, CDCl₃) δ = 12.32 (s, 1H), 8.27 (s, 2H), 7.64 (s, 1H), 7.46 (t, J= 5 Hz, 2H), 7.42-7.31 (m, 8H), 7.29 (m, 1H), 4.76 (s, 2H). **¹³C NMR** (125.765 MHz, CDCl₃) δ = 178.04 (C=O), 158.39 (N=C), 138.32 (CH), 131.38 (2C), 129.29 (2CH), 128.88 (3CH), 128.56 (2CH), 127.92 (2CH), 127.58 (1CH), 45.38 (CH₂).

^1H - LQOF-G35 **^1H – Região aromática - LQOF-G35**

^{13}C - LQOF-G35 ^{13}C - Região aromática - LQOF-G35

LQOF_G35 – LC (HPLC)

Retention Time: **26.58 min**

Relative Peak Area: **99.84 %**

LQOF_G35 ESI-(+) MS

m/z 408,0704: $C_{21}H_{19}BrN_3O$

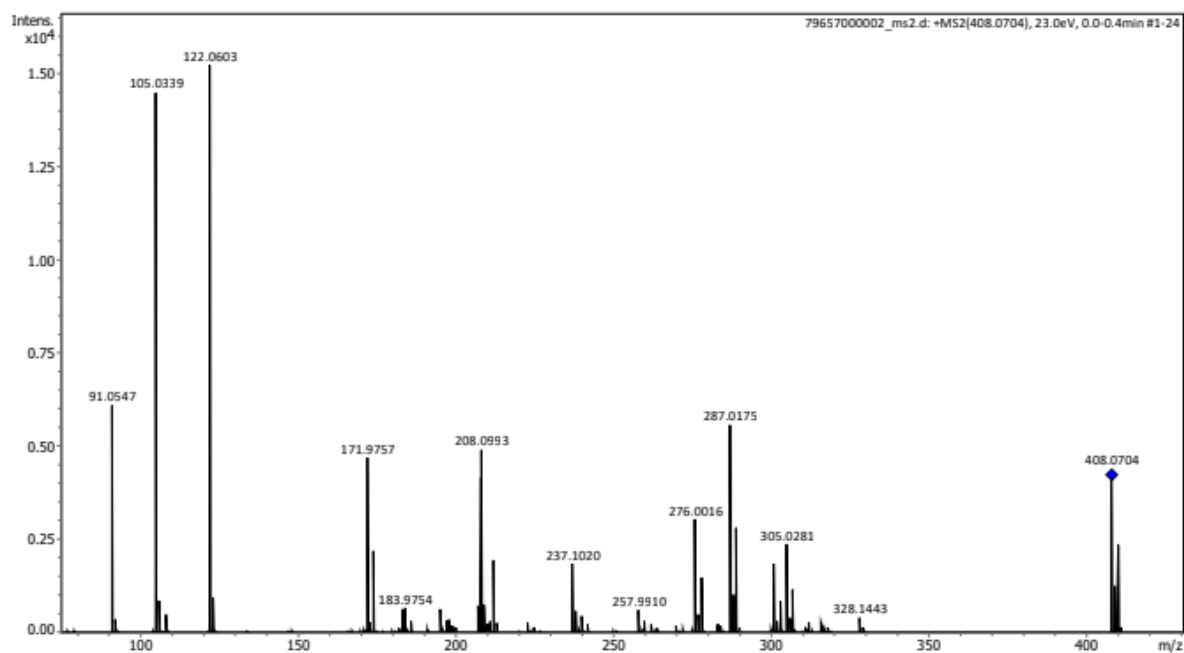
m/z 430,0522: $C_{21}H_{18}BrN_3NaO$

LQOF_G35 ESI-(+) MS

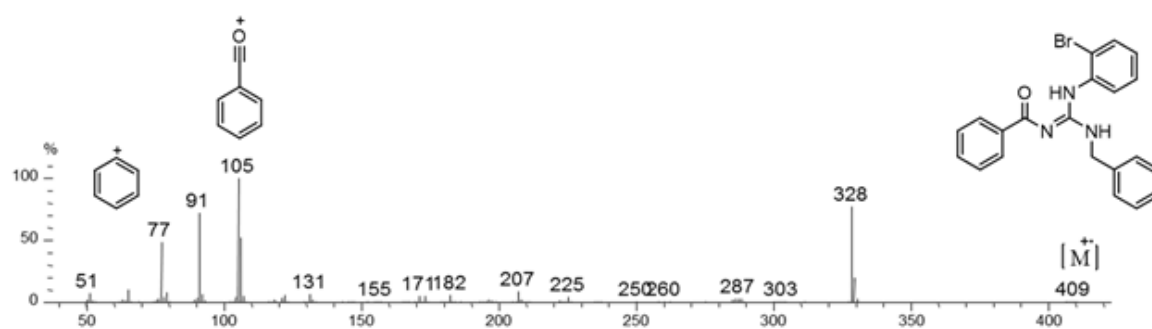
m/z 408,0705: $C_{21}H_{19}BrN_3O$

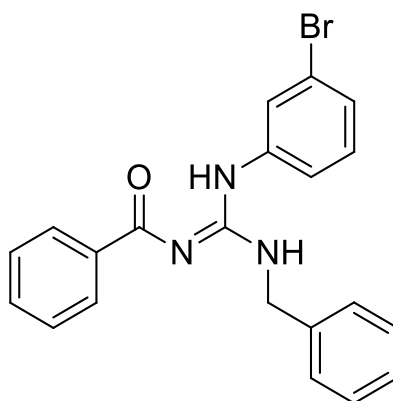
m/z 430,0522: $C_{21}H_{18}BrN_3NaO$

LQOF_G35 ESI-(+) MS/MS

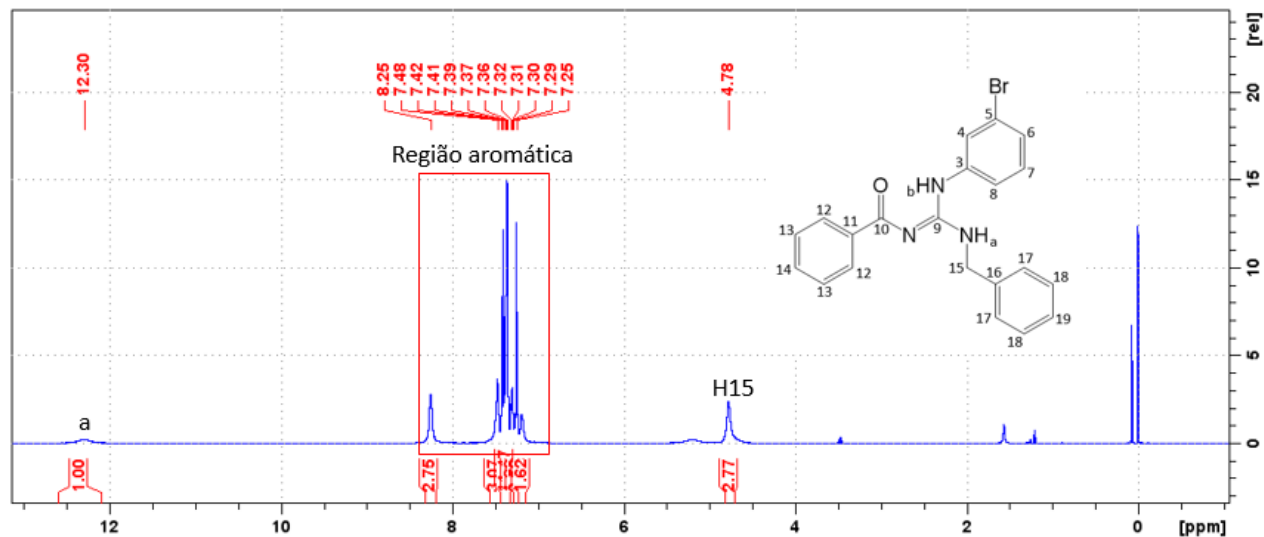
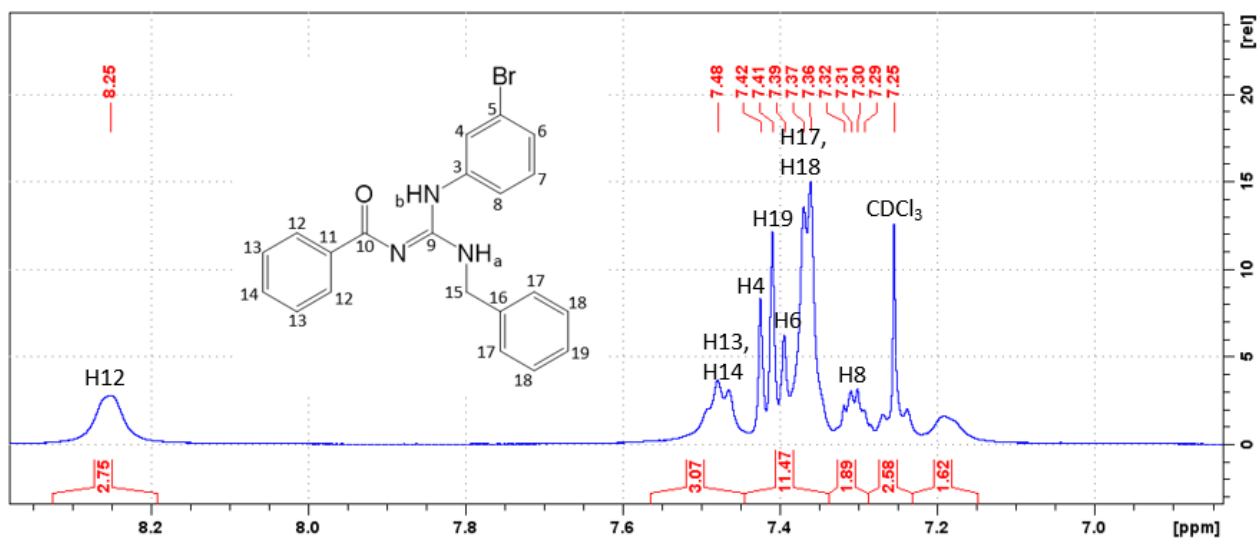


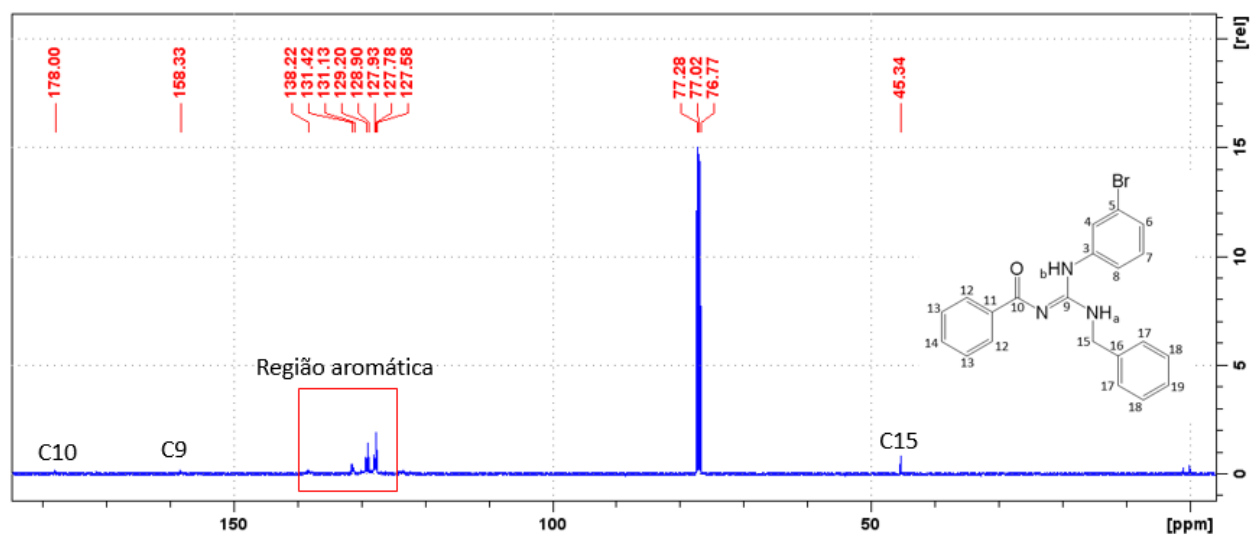
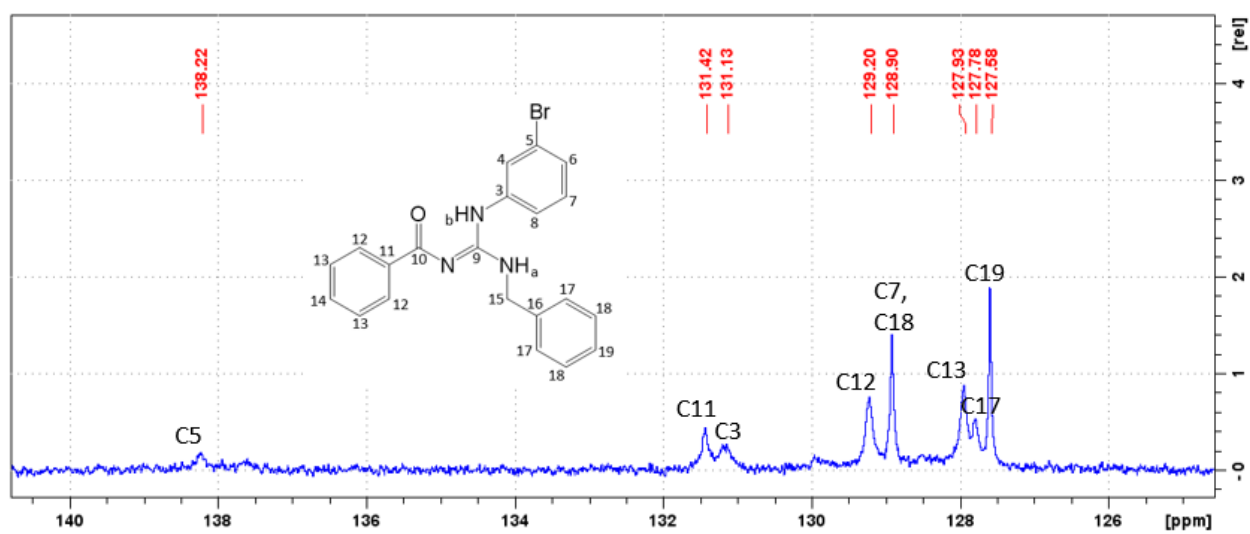
LQOF_G35 – EI-MS

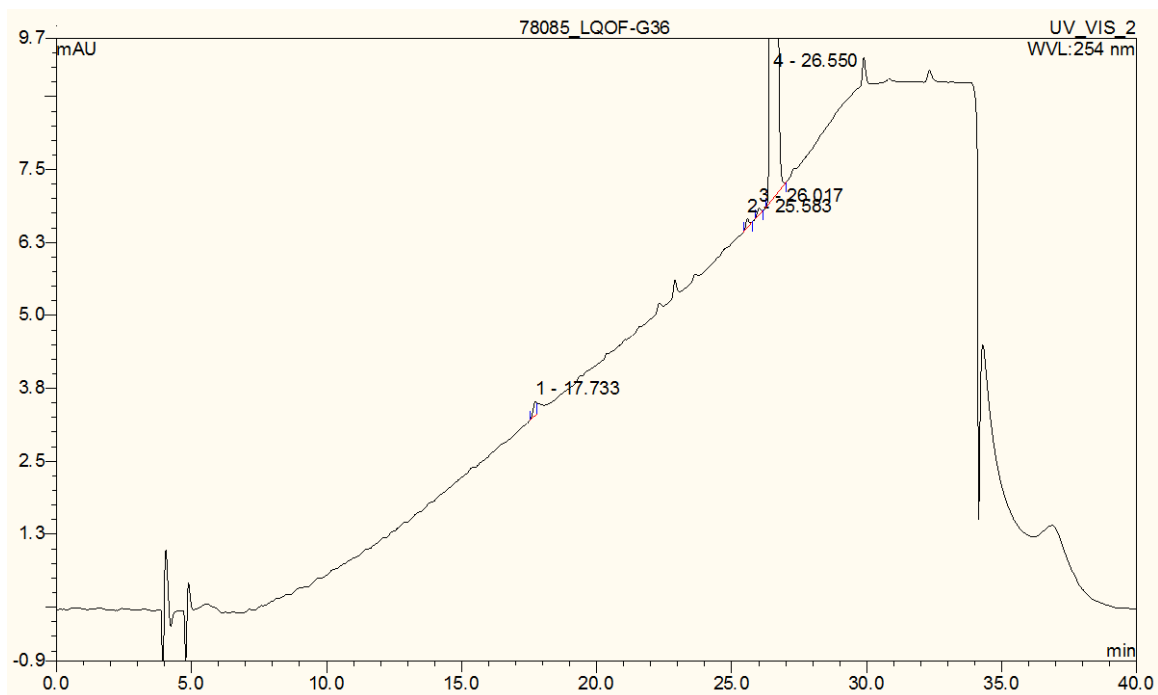
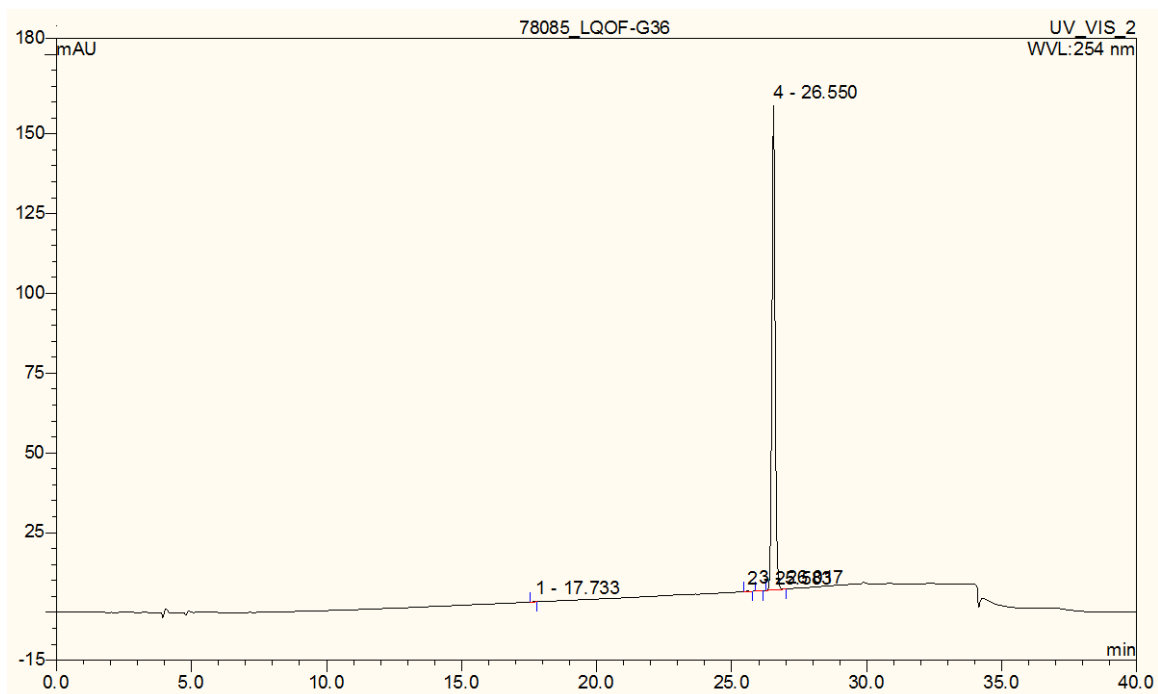




1-benzil-2-benzoyl-3-(3-bromobenzene) guanidina – (LQOF_G36); pf = 86,2 – 86,6°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 73 %; **LC-UV/MS:** 99,65%; **ESI(+)-MS** *m/z* encontrada 408,0705, *m/z* calculada para $[C_{21}H_{18}BrN_3O + H]^+$: 408,0706, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** $M + H - C_6H_5CONH_2]^+$ de *m/z* 287,0169, $[M + H - C_{15}H_{12}N_2O]^+$ de *m/z* 171,9755 e $[M + H - C_{13}H_{12}BrN_2]^+$ de *m/z* 122,0602. **¹H NMR** (500.16 MHz, CDCl₃) δ = 12.30 (s, 1H), 8.25 (s, 2H), 7.48 (m, 3H), 7.42-7.36 (m, 7H), 7.30 (m, 1H), 4.78 (s, 2H). **¹³C NMR** (125.765 MHz, CDCl₃) δ = 178.00 (C=O), 158.33 (N=C), 138.22 (C), 131.42 (C), 131.13 (C), 129.20 (2CH), 128.90 (3CH), 127.93 (2CH), 127.78 (2CH), 127.58 (CH), 45.34 (CH₂).

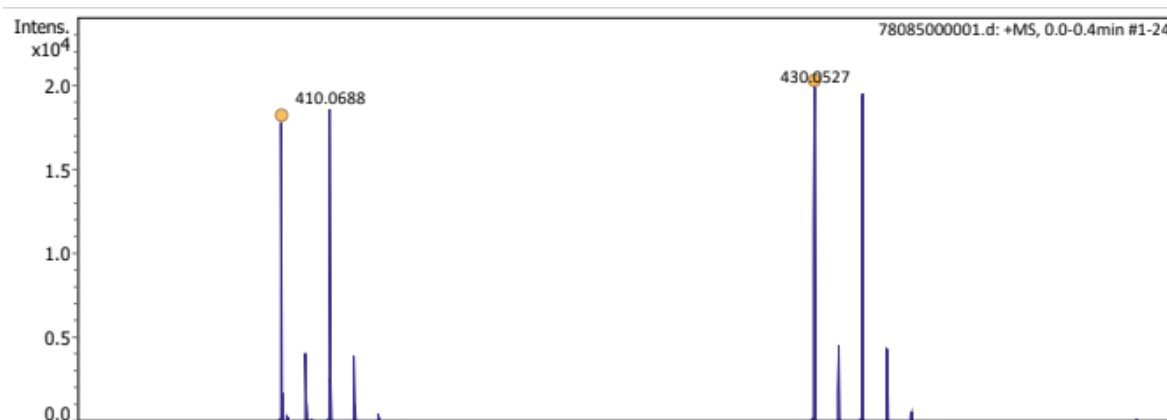
^1H - LQOF-G36 ^1H – Região aromática - LQOF-G36

^{13}C - LQOF-G36 ^{13}C – Região aromática - LQOF-G36

LQOF_G36 – LC (HPLC)

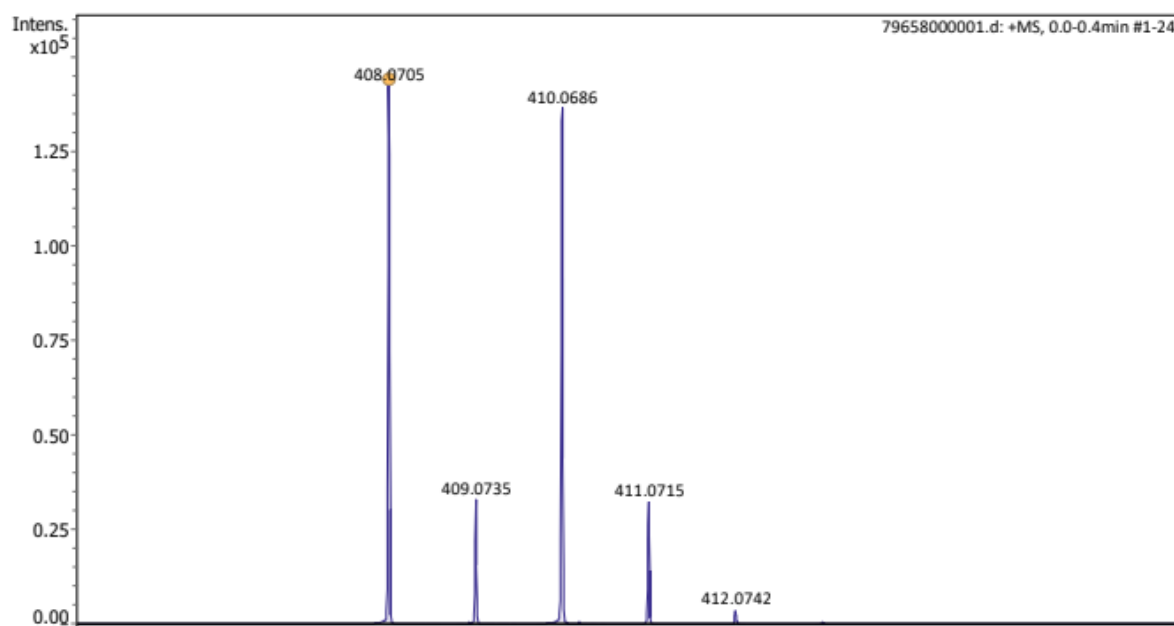
Retention Time: **26.55 min**

Relative Peak Area: **99.65 %**

LQOF_G36 ESI-(+) MS

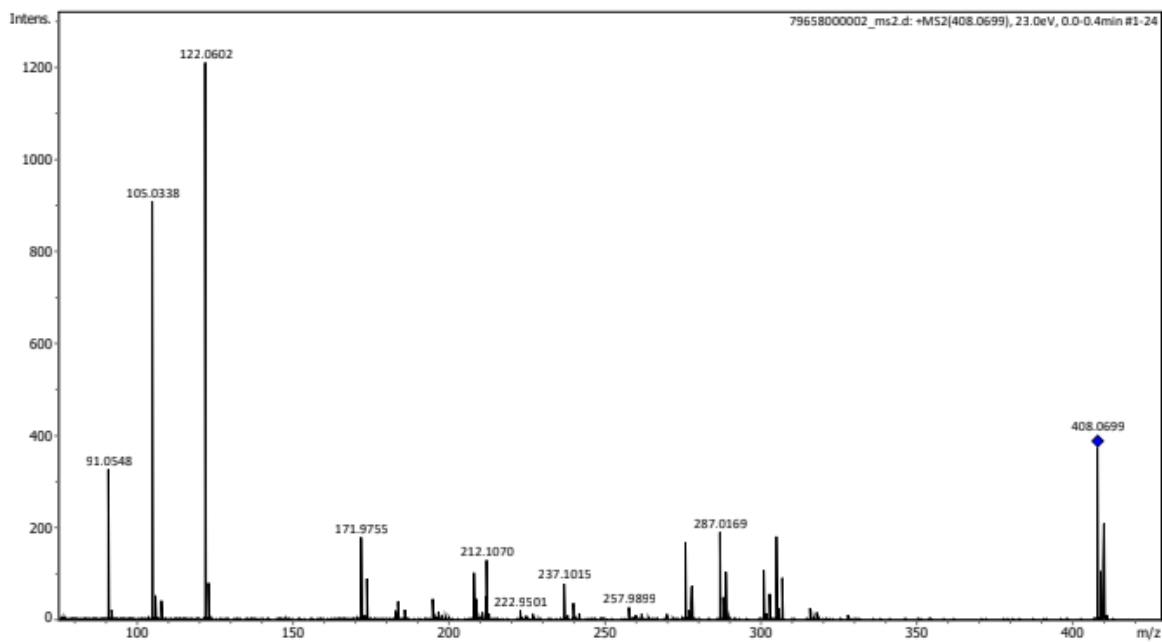
m/z 408,0707: C₂₁H₁₉BrN₃O

m/z 430,0527: C₂₁H₁₈BrN₃NaO

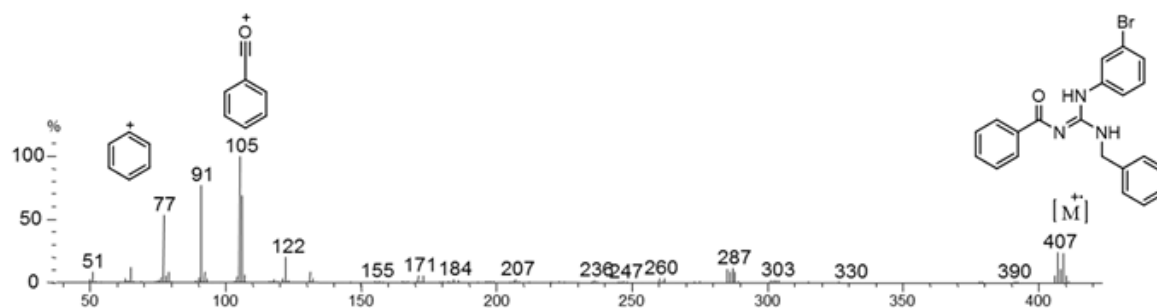
LQOF_G36 ESI-(+) MS

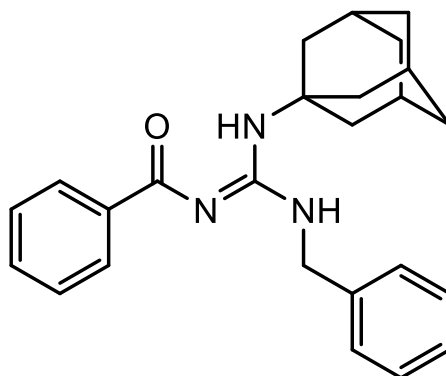
m/z 408,0705: C₂₁H₁₉BrN₃O

LQOF_G36 ESI-(+) MS/MS



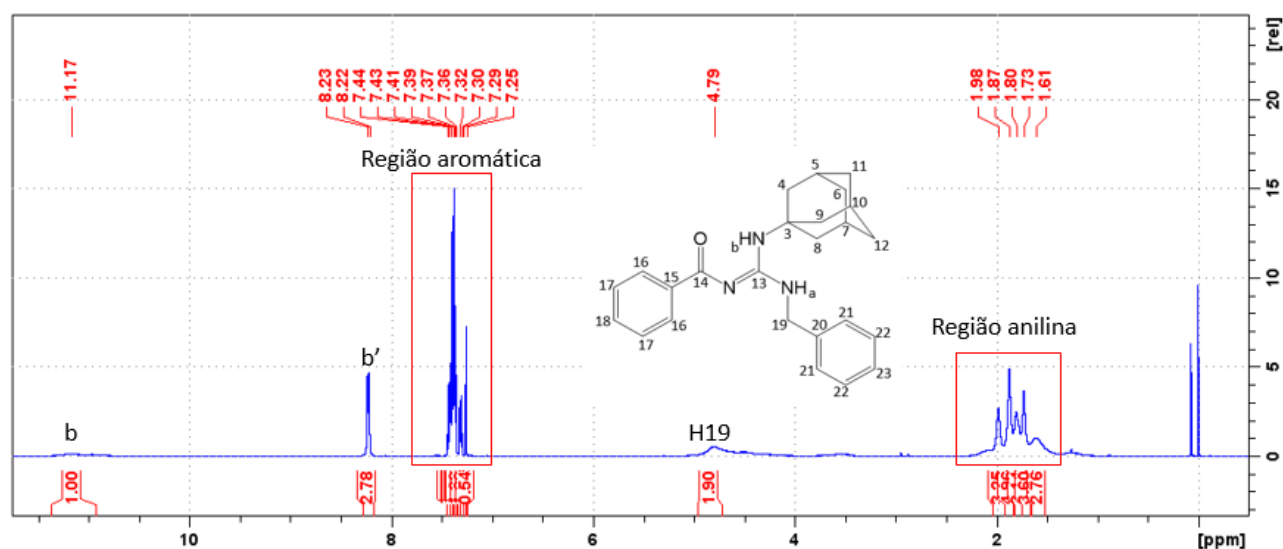
LQOF_G36 – EI-MS

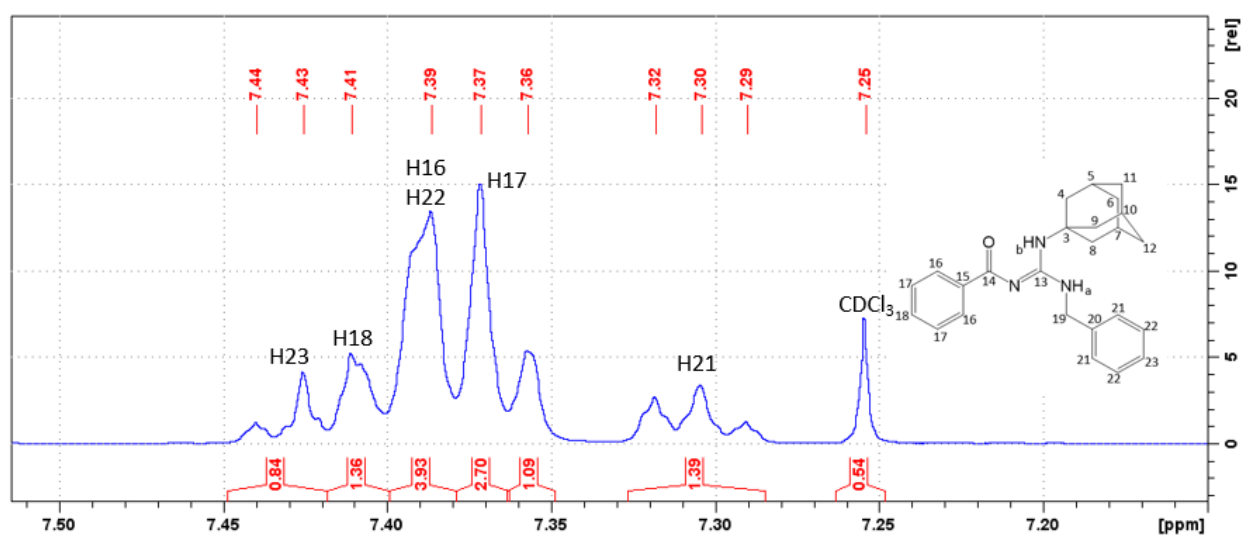
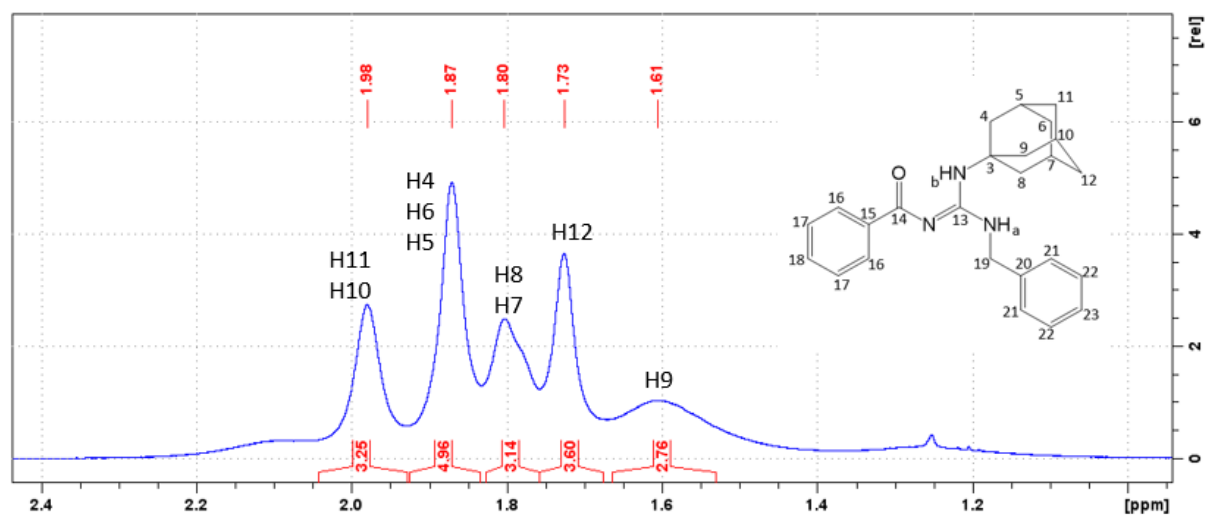


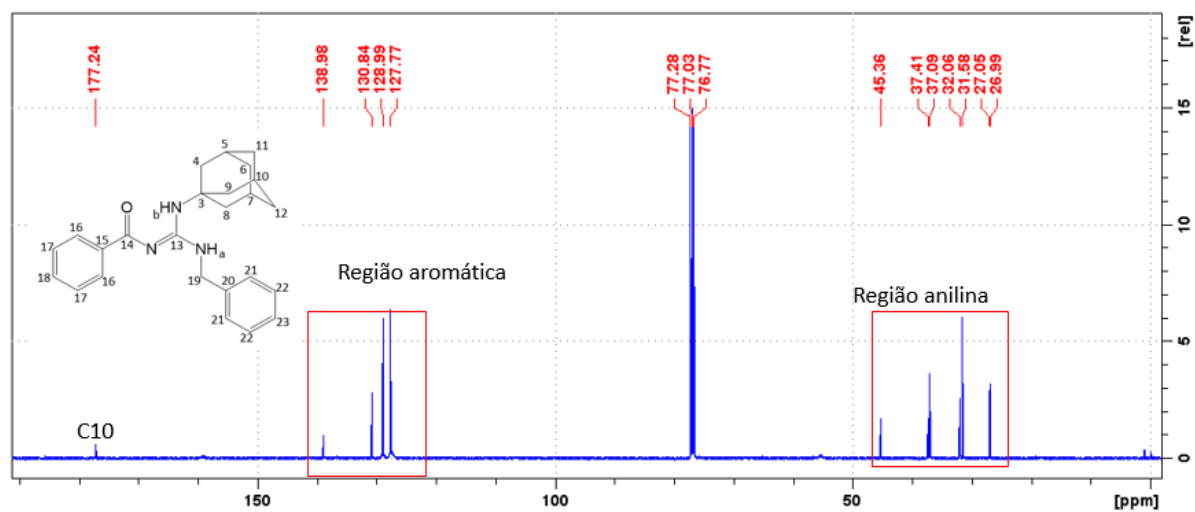
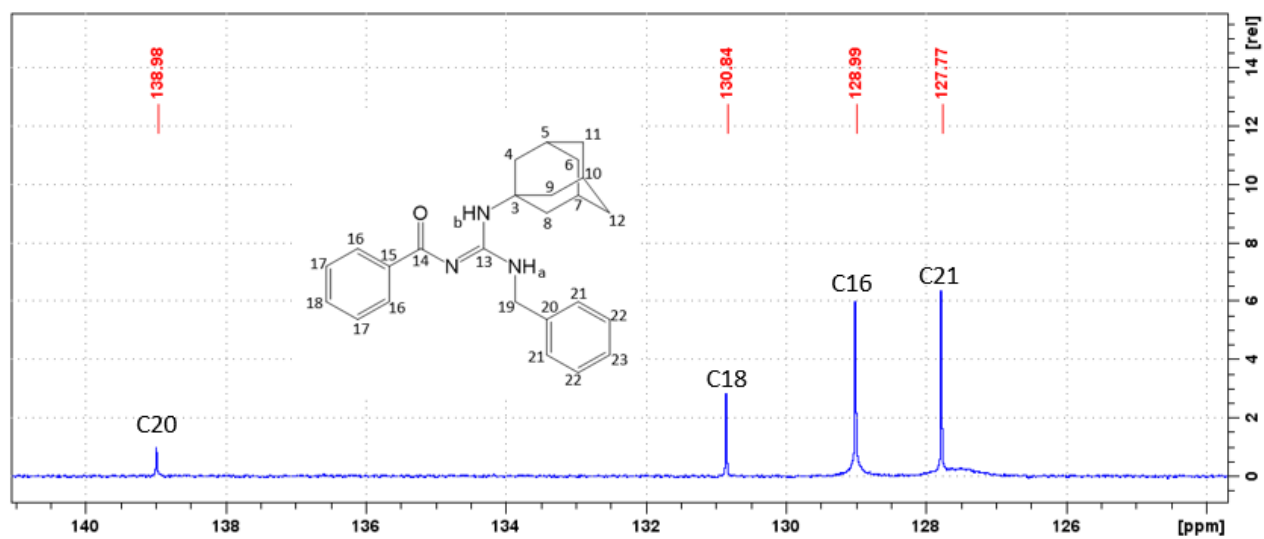


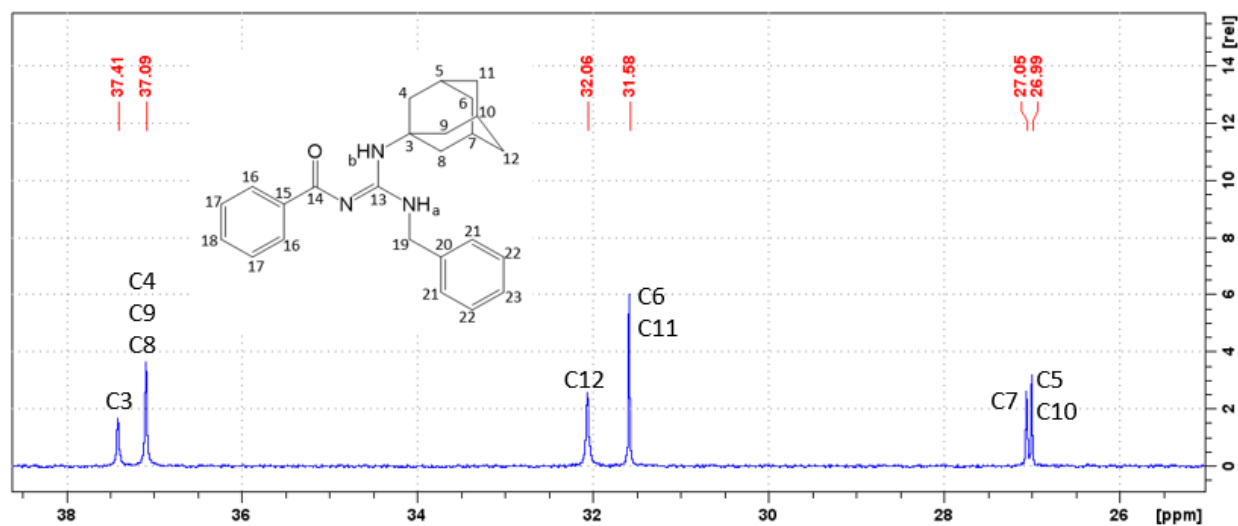
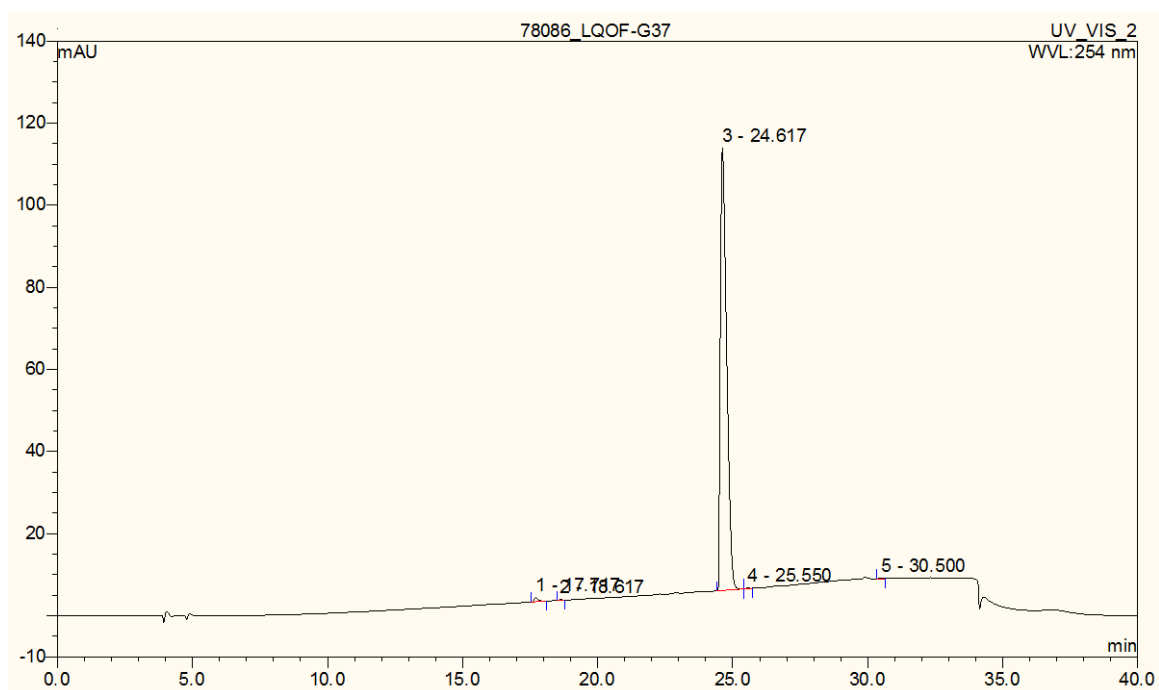
1-benzil-2-benzoyl-3-adamantilguanidina – (LQOF_G37); pf = 160,8 – 161,5°C; recristalização: éter etílico/éter de petróleo (1:4); rendimento: 59 %; **LC-UV/MS:** 99,19%; **ESI(+)-MS** m/z encontrada 388,2382, m/z calculada para $[C_{25}H_{29}N_3O + H]^+$: 388,2383, Fragmento iônico observado em **ESI(+)-MS/MS:** $[M + H - C_6H_5CONH_2]^+$ de m/z 254,1288 e $[M + H - C_{15}H_{15}N_3O]^+$ de m/z 135,1172. **1H NMR** (500.16 MHz, $CDCl_3$) δ = 11.17 (s, 1H), 7.43 (m, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.39 (m, 4H), 7.37 (s, 2H), 7.30 (m, 2H), 4.79 (s, 2H), 1.98 (s, 3H), 1.87 (s, 2H), 1.80 (m, 3H), 1.73 (s, 2H), 1.61 (s, 2H). **^{13}C NMR** (125.765 MHz, $CDCl_3$) δ = 177.24 (C=O), 138.98 (C), 130.84 (CH), 128.99 (2CH), 127.77 (2CH), 37.41 (C), 37.09 (3CH₂), 32.06 (CH₂), 31.58 (2CH₂), 27.05 (CH), 26.99 (2CH).

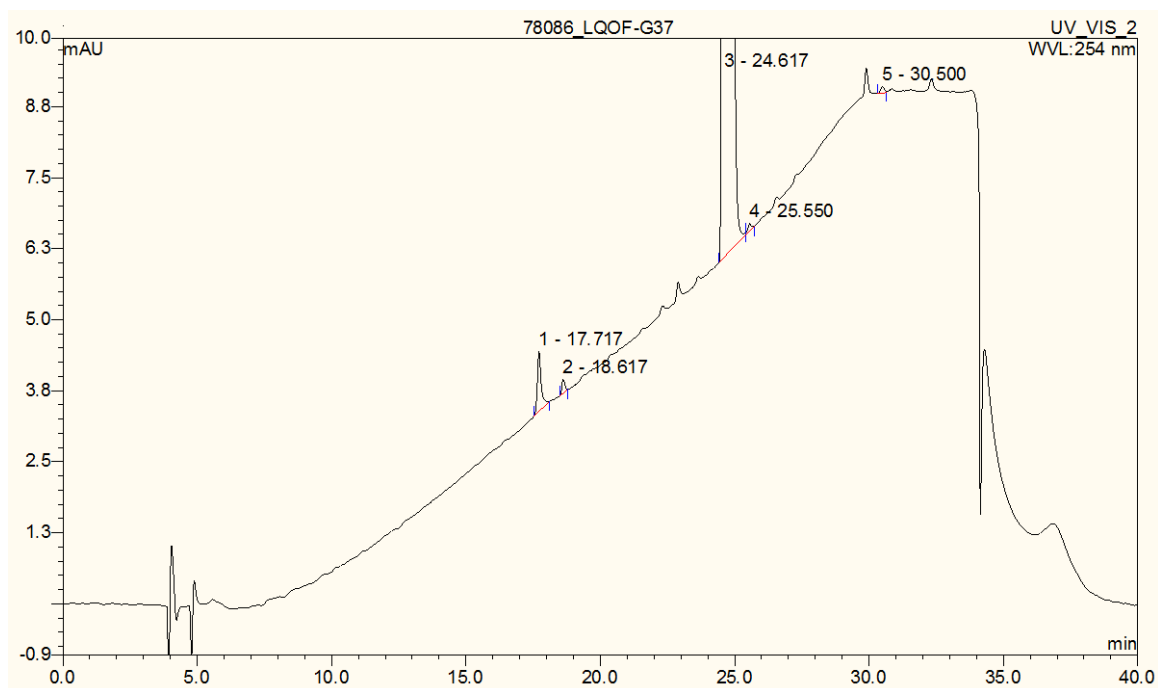
1H - LQOF-G37



^1H – Região aromática - LQOF-G37 **^1H – Região anilina - LQOF-G37**

^{13}C - LQOF-G37 ^{13}C – Região aromática - LQOF-G37

^{13}C – Região anilina - LQOF-G37**LQOF_G37 – LC (HPLC)**



Retention Time: **24.62 min**

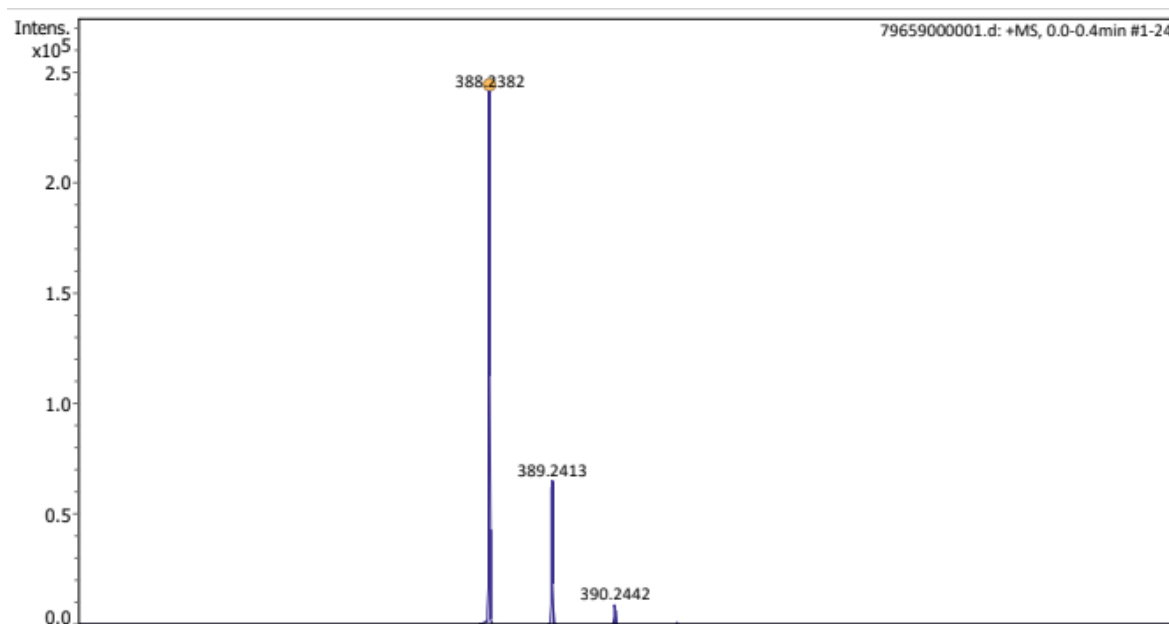
Relative Peak Area: **99.19 %**

LQOF_G37 ESI-(+) MS

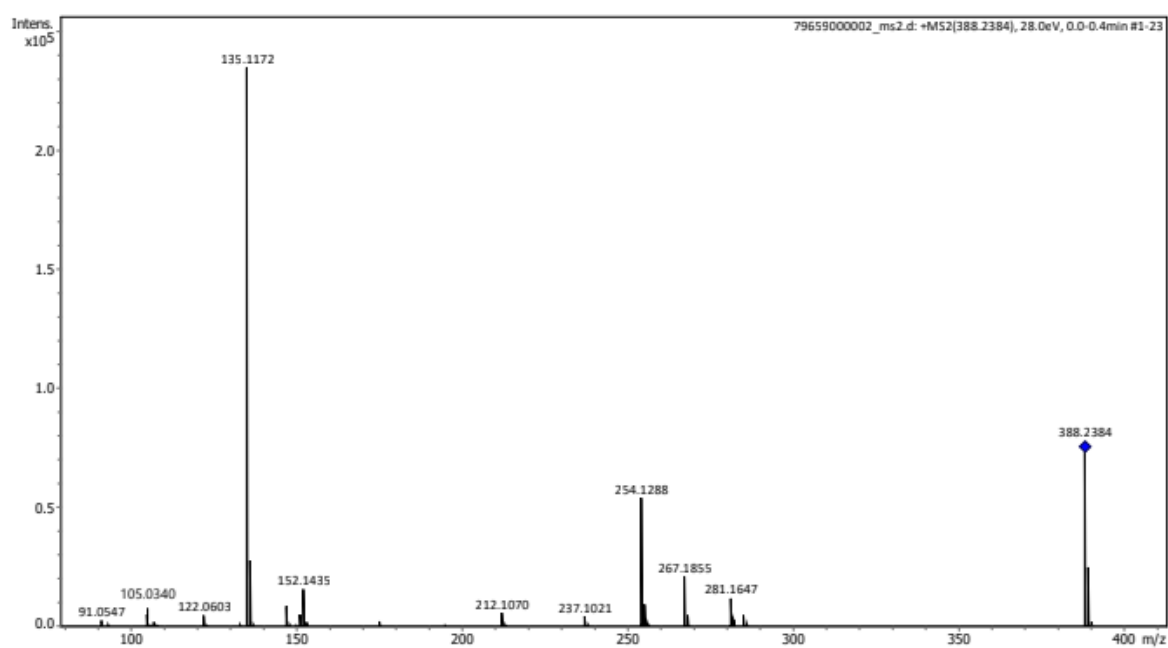


m/z 388,2385: $C_{25}H_{30}N_3O$

m/z 410,2202: $C_{25}H_{29}N_3NaO$

LQOF_G37 ESI-(+) MS

m/z 388,2382: $C_{25}H_{30}N_3O$

LQOF_G37 ESI-(+) MS/MS

LQOF_G37 – EI-MS