

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
LABORATÓRIO DE QUÍMICA ORGÂNICA FINA - LQOF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS - POSMAT

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E ESTUDO
DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Rafael Dias do Espírito Santo

Orientador: Prof. Dr. Eduardo René Pérez González

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PRESIDENTE PRUDENTE

2017

RAFAEL DIAS DO ESPÍRITO SANTO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS GUANIDÍNICOS E ESTUDO
DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutor à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT), área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo René Pérez González

PRESIDENTE PRUDENTE

2017

Santo, Rafael Dias do Espírito.

Síntese e caracterização de compostos guanidínicos
e estudo da atividade leishmanicida / Rafael Dias do
Espírito Santo, 2017

181 f. : il.

Orientador: Eduardo René Pérez González

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2017

1. Leishmaniose. 2. Guanidinas. 3. Enzima DHPS. 4.
Mutagenicidade I. Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE RAFAEL DIAS DO ESPÍRITO SANTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 23 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 09:00 horas, no(a) Anfiteatro 7 - Presidente Prudente, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ - Orientador(a) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Faculdade de Ciências e Tecnologia do Câmpus de Presidente Prudente da UNESP, Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN do(a) Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI do(a) Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP, Prof. Dr. GIULIANO CESAR CLOSOSKI do(a) Departamento de Física e Química / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto, Prof. Dr. GIL VALDO JOSÉ DA SILVA do(a) Departamento de Química / Universidade de São Paulo, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de RAFAEL DIAS DO ESPÍRITO SANTO, intitulada **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS GUANIDINICOS E ESTUDO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. EDUARDO RENE PEREZ GONZALEZ

Profa. Dra. CHUNG MAN CHIN

Prof. Dr. CLESLEI FERNANDO ZANELLI

Prof. Dr. GIULIANO CESAR CLOSOSKI

Prof. Dr. GIL VALDO JOSÉ DA SILVA

À mulher mais guerreira do mundo, Sônia Regina Dias,
dedico de coração.

AGRADECIMENTOS

A minha família: minha mãe Sônia, a mulher mais guerreira do mundo e aos meus irmãos Thiago e Gabriel. Obrigado pelo amor incondicional e pelo apoio nos momentos mais difíceis... obrigado por serem meu alicerce.

A minha namorada, companheira, amiga, parceira... minha alma-gêmea Rebeca. Obrigado por aturar minhas chatices e implicâncias, mas muito obrigado mesmo por estar comigo em todos os momentos, bons ou ruins... obrigado por fazer parte da minha vida!

Ao Professor Alviclér Magalhães e ao Professor Gil Valdo José da Silva da FFCLRP – USP pelas análises de RMN.

Ao Professor Marcos Nogueira Éberlin e seu grupo de pesquisa do Instituto de Química da UNICAMP, pelas análises de Espectrometria de Massas.

A Professora Chung Man Chin e seu grupo de pesquisa da FCFar – UNESP, pelos testes de micronúcleo e apoio durante todo esse período.

A Professora Márcia Aparecida Silva Graminha e a doutoranda Ángela María Arenas Velásquez, da FCFar – UNESP, pelos testes de atividade Leishmanicida.

Ao Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli e seu grupo de pesquisa, pelos testes de inibição de DHPS.

Aos professores da FCT e da POSMAT que colaboraram e ainda colaboram em minha formação profissional.

Aos meus amigos do LQOF (os que passaram e os que permanecem), obrigado pela força e companheirismo.

Aos irmãos de Ilha Solteira que a vida me deu (Márcio, Rafa, Turco, Vicentão, Spaya, Jean e Paulinho), e aos tantos irmãos prudentinos que a vida me deu e que não vou escrever pra não correr o risco de esquecer ninguém. Muito obrigado por tornarem minha vida mais feliz e pela amizade sincera.

Ao professor Eduardo, pela orientação e grande amizade construída ao longo desses anos. Obrigado por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida!

A POSMAT, FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas, causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, sendo estimados 1,3 milhões de novos casos anualmente, que resultam em 20 – 30 mil mortes. Os fármacos usados para o tratamento de leishmanioses são antigos, estão relacionados a graves efeitos tóxicos, e o aparecimento de cepas de parasitas resistentes a esses fármacos tem tornado urgente a necessidade de se encontrar medicamentos novos, seguros e eficazes contra leishmanioses. Compostos do tipo guanidinas são estudados para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, sendo que alguns estudos testaram a efetividade de compostos guanidínicos contra leishmaniose. O principal objetivo do presente trabalho foi sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade leishmanicida de compostos que possuem o núcleo guanidínico. A síntese dos compostos derivados guanidínicos foi descrito e os compostos foram caracterizados por Espectrometria de Massas usando Ionização por Eletrospray e por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C . Quatorze compostos foram avaliados quanto à atividade leishmanicida frente às cepas promastigotas de *L. amazonensis* e também frente a macrófagos peritoneais de camundongo infestados com leishmania amastigotas. Os valores de IS de duas moléculas contra as formas amastigotas (SI=130,25 para o composto **LQOF-G7** e 36,37 para o composto **LQOF-G1**), sugeriram que estes podem ser candidatos promissores para estudos *in vivo*. As análises preliminares dos resultados de avaliação biológica mostraram que os compostos que possuem grupos eletroretiradores ligados ao átomo C4 do anel da porção anilina, foram mais ativos e seletivos contra leishmania promastigota. O teste do micronúcleo para a mutagenicidade foi realizado para cinco compostos, incluindo três dos mais ativos contra *Leishmania* (**LQOF-G1**, **LQOF-G2** e **LQOF-G7**). Para todos os compostos avaliados não foram observados diferenças significativas entre a frequência de células micronucleadas quando comparados com o controle negativo, sugerindo que os compostos não são mutagênicos quando avaliados pelo teste de micronúcleo, mesmo nas concentrações mais altas.

Palavras-Chave: Leishmanioses, guanidinas, enzima DHPS, mutagenicidade.

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoan parasites from >20 *Leishmania* species, being estimated 1.3 million new cases annually, which result in 20,000–30,000 deaths. The drugs used for the treatment of leishmaniasis are old and have serious toxic effects. In addition, the emergence of drug-resistant parasite strains has caused an urgent requirement for novel, safe, and efficacious drugs against leishmaniasis. Several guanidine derivatives have been studied in the treatment of neglected diseases and some of these studies tested the effectiveness of guanidine compounds against leishmaniasis. The main objective of the present work was the synthesis, characterization and evaluation of leishmanicide activity of compounds having guanidine nuclei. Synthesis of the guanidine derivatives was described and the compounds were characterized by Mass Spectrometry with Elettrospray Ionization and Nuclear Magnetic Resonance for ^1H and ^{13}C . Fourteen compounds were evaluated for their leishmanicidal activity against *L. amazonensis* promastigotes and mouse peritoneal macrophages infested with leishmania amastigotes. The IS values, of two molecules, against the amastigote forms (SI = 130.25 for compound **LQOF-G7** and 36.37 for compound **LQOF-G1**), suggested that they may be promising candidates for *in vivo* studies. The preliminary analysis of the results of biological evaluation showed that compounds, which contain electro-withdrawing groups bound to atom C4 of aniline ring, were more active and selective against *Leishmania* promastigotes. The micronucleus test for mutagenicity was performed for five compounds, including three of the most active against *Leishmania* (**LQOF-G1**, **LQOF-G2** and **LQOF-G7**). For all compounds evaluated, no significant differences were observed between the frequencies of micronucleated cells when compared to the negative control, suggesting that the compounds are not mutagenic when evaluated by the micronucleus test, even at the highest concentrations.

Keywords: Leishmaniasis, guanidines, DHPS enzyme, mutagenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de transmissão da leishmaniose	22
Figura 2	Estruturas do antimoniato de <i>N</i> -metilglucamina, da pentamidina e da anfotericina B	24
Figura 3	Estrutura do MTX	26
Figura 4	Biossíntese de poliaminas.	27
Figura 5	Estrutura da tripanotiona em sua forma reduzida com destaque para a porção espermidina (em vermelho).	28
Figura 6	Exemplos de derivados de poliaminas que apresentam inibição de TR.	29
Figura 7	Biossíntese da hipusina.	30
Figura 8	Estrutura do GC ₇ e de outros inibidores de DHPS	30
Figura 9	Ressonância do íon guanidínio.	31
Figura 10	Ligação do íon guanidínio com oxianions	32
Figura 11	Estruturas moleculares da Mirabilin B (II), <i>N</i> -hidroxianomontina (III) e anomontina (IV).	33
Figura 12	Estrutura geral das dihidroquinazolinas (V), e tetrahidroquinazolinas (VI). Estruturas moleculares e valores de IC ₅₀ dos compostos mais ativos contra <i>L. donovani</i> amastigotas.	34
Figura 13	Estrutura geral dos compostos VII, VIII e IX. Estruturas moleculares, porcentagem de inibição de crescimento (GI) e valores de IC ₅₀ dos compostos VII a-c contra as quatro espécies leishmania estudadas	35
Figura 14	Estrutura geral das guanidinas previamente sintetizadas no LQOF.	36
Figura 15	Estrutura e IC ₅₀ na inibição da enzima DHPS.	36

Figura 16	Estruturas dos isômeros E e Z.	56
Figura 17	Espectro de ESI(+)-MS (acima) e ESI(+)-MS/MS (abaixo) do composto LQOF-G9	60
Figura 18	Íons fragmentos de m/z 91, 105, 122 e 77 observados para os compostos LQOF-G1 a LQOF-G10 nos espectros de MS/MS. .	61
Figura 19	Espectros de ESI(+)-MS (acima) ESI(+)-MS/MS (abaixo) do composto LQOF-G18	63
Figura 20	ESI(+)-MS do composto LQOF-G28	66
Figura 21	Perda de amônia neutra para formar o íon de m/z 369.	66
Figura 22	Faixa de seleção para o MS/MS (acima) e espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 386 (abaixo)..	67
Figura 23	Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 369 do composto LQOF-G28	68
Figura 24	ESI(+)-MS do composto LQOF-G21	68
Figura 25	Espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 446 do composto LQOF-G21	69
Figura 26	ESI(+)-MS do composto LQOF-G25	69
Figura 27	Espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 424 do composto LQOF-G25	69
Figura 28	ESI(+)-MS do composto LQOF-G27	70
Figura 29	Espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 398 do composto LQOF-G27	70
Figura 30	Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 429 do composto LQOF-G21	70

Figura 31	Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 407 do composto LQOF-G25	71
Figura 32	Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 381 do composto LQOF-G27	71
Figura 33	Espectro de ESI(+)-MS do composto LQOF-G27 . Acima: antes do tratamento com bicarbonato de sódio. Abaixo: depois do tratamento com bicarbonato de sódio	72
Figura 34	Estrutura da tris-guanidina.	73
Figura 35	Espectros de ESI(+)-MS (acima) ESI(+)-MS/MS (abaixo) da tris-guanidina	73
Figura 36	Espectro de RMN de 1H do composto LQOF-G6	76
Figura 37	Espectro de RMN de ^{13}C do composto LQOF-G6	78
Figura 38	Espectro de DEPT 135 do composto LQOF-G6	78
Figura 39	Espectro de RMN de 1H do composto LQOF-G18	81
Figura 40	Espectro de RMN de ^{13}C do composto LQOF-G18	83
Figura 41	Espectro de DEPT 135 do composto LQOF-G18	83
Figura 42	Espectro de absorção na região do UV-Vis do composto LQOF-G4 (concentração 1×10^{-5} M em DMSO).	86
Figura 43	Gráfico da porcentagem de parasitas mortos VS Concentração do composto.	89
Figura 44	Estrutura geral dos compostos LQOF-G1 a LQOF-G10	91
Figura 45	Estrutura geral dos compostos LQOF-G12 , LQOF-G13 , LQOF-G15 e LQOF-G17	94
Figura 46	Comparação entre as estruturas e os valores de IC_{50} entre os compostos com os mesmos substituintes X	95

Figura 47	Reticulócitos normais e reticulócito micronucleado.	96
Figura 48	Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto LQOF-G1 em diferentes concentrações	98
Figura 49	Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto LQOF-G2 em diferentes concentrações	98
Figura 50	Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto LQOF-G4 em diferentes concentrações	99
Figura 51	Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto LQOF-G7 em diferentes concentrações	99
Figura 52	Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto LQOF-G8 em diferentes concentrações	100

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Relação entre a via de biossíntese de poliaminas e a via da tripanotiona.	27
Esquema 2	Primeira etapa: Síntese do isotiocianato de benzoíla. Segunda etapa: Reação entre o isotiocianato de benzoíla e anilinas <i>p</i> -substituídas para formação das respectivas tiouréias.	57
Esquema 3	Reação entre as diferentes tiouréias e benzilamina gerando os compostos LQOF-G1 a LQOF-G10	58
Esquema 4	Reação entre as diferentes tiouréias e 4-aminobutanol gerando os compostos LQOF-G11 a LQOF-G19	58
Esquema 5	Esquema proposto para a síntese de amino-guanidinas derivadas da espermidina.	59
Esquema 6	Proposta de mecanismo guanilação promovida por sais de Bi(III).	59
Esquema 7	Formação do íon fragmento de <i>m/z</i> 91.	61
Esquema 8	Proposta para fragmentação dos compostos LQOF-G1 a LQOF-G10 (exemplo para o composto LQOF-G9).	62
Esquema 9	Formação do íon fragmento de <i>m/z</i> 219.	63
Esquema 10	Formação do íon fragmento de <i>m/z</i> 221.	64
Esquema 11	Formação do íon fragmento de <i>m/z</i> 253.	64
Esquema 12	Formação do íon fragmento <i>N</i> -(<i>p</i> -substituído) fenilcarbodiimida (<i>m/z</i> 149 para o exemplo com o composto LQOF-G18).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estrutura geral dos compostos diguanidinium la-lk e valores de IC ₅₀ dos ensaios de <i>L. Donovanii</i> amastigota e macrófagos.	33
Tabela 2	Principais deslocamentos químicos de ¹ H (ppm) para os compostos LQOF-G1 a LQOF-G10	75
Tabela 3	Principais deslocamentos químicos de ¹³ C (ppm) para os compostos LQOF-G1 a LQOF-G10	77
Tabela 4	Principais deslocamentos químicos de ¹ H (ppm) para os compostos LQOF-G11 a LQOF-G19	80
Tabela 5	Principais deslocamentos químicos de ¹³ C (ppm) para os compostos LQOF-G11 a LQOF-G19	82
Tabela 6	Valores das principais bandas de absorção na região do infravermelho (cm ⁻¹).	85
Tabela 7	Comprimentos de onda de absorção observados nos espectros de UV-vis	87
Tabela 8	Resultados da atividade Leishmanicida. Exemplo para o composto LQOF-G2	88
Tabela 9	Porcentagem de parasitas mortos em cada poço.	89
Tabela 10	Atividade leishmanicida (IC ₅₀) e citotóxica (CC ₅₀) <i>in vitro</i> de compostos guanidínicos diluídos em DMSO (μmol.L ⁻¹) e seus índices de seletividade (IS). Em negrito ressaltam-se os índices de seletividade dos compostos guanidínicos maiores de 10	90
Tabela 11	Número de células micronucleadas em cada animal	97
Tabela 12	Triagem da atividade inibitória da DHPS das benzoilguanidinas na concentração de 500 μM	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CDCl_3 : clorofórmio deuterado

DHFR: Dihidrofolato redutase

DHPS: deoxihipusina sintase

DMF: *N,N'*-dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOHH: deoxihipusina hidroxilase

eIF5A: fator de iniciação eucariótico 5A

ESI-MS: Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray

IC_{50} : metade da concentração inibitória máxima

LIT: *LiverInfusionTryptose*

MTT: brometo de 3-metil[4,5-dimetiliazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MTX: Methotrexate

m/z = relação massa/carga

ODC: Ornitina descarboxilase

OMS: Organização Mundial da Saúde

PMS: metassulfato de fenazina

RFU: relative fluorescence units

RMN de ^1H : Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C : Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

SDS: dodecil sulfato de sódio

Spd Sintase: espermidina sintase

TMS: tetrametilsilano

TR: tripanotiona redutase

TS: tripanotiona sintetase

δ = deslocamento químico (em RMN)

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.	9
	LISTA DE ESQUEMAS.	13
	LISTA DE TABELAS.	14
	LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
1.	INTRODUÇÃO	19
1.1.	Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)	19
1.2.	Leishmaniose	21
1.3.	Alvos terapêuticos no tratamento de Leishmaniose. . .	25
1.3.1.	Via do Folato.	25
1.3.2.	Enzimas da biossíntese de poliaminas.	26
1.3.3.	Via da Tripanotiona.	27
1.3.4.	Via da Hipusina (inibição da enzima DHPS).	29
1.4.	Guanidinas	31
2.	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.	36
2.1.	Justificativa do presente trabalho. (Trabalhos anteriores do LQOF envolvendo derivados guanidínicos).	36
2.2.	Objetivo geral	37
2.3.	Objetivos específicos	37
3.	PARTE EXPERIMENTAL.	38
3.1.	Reagentes e solventes	38
3.2.	Metodologias sintéticas	38
3.2.1.	Síntese das tiouréias intermediárias.	38
3.2.2.	Síntese das guanidinas.	38
3.2.3.	Dados experimentais	39
3.3.	Técnicas analíticas	48

3.3.1.	Análises de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).	48
3.3.2.	Análises de Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI-MS).	48
3.3.3.	Análises de Espectroscopia de absorção na região do Infra-vermelho (FT-IR)..	49
3.3.4.	Análise de Espectroscopia de absorção na região do Ultra violeta-visível (UV-Vis).	49
3.3.5.	Ponto de fusão	49
3.4.	Ensaio biológico. Atividade leishmanicida.	50
3.4.1.	Parasitas.	50
3.4.2.	Bioensaio para avaliar atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	50
3.4.3.	Determinação da citotoxicidade contra macrófagos peritoneais de camundongos Swiss de compostos ativos pela técnica colorimétrica do MTT	51
3.4.4.	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antiprotozoa de compostos ativos contra formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	52
3.4.5	Cálculo do Índice de seletividade (IS).	53
3.5.	Ensaio biológico. Avaliação <i>in vivo</i> da mutagenicidade dos compostos sintetizados pelo teste de micronúcleo	53
3.5.1.	Preparo das lâminas com laranja de acridina (acridine Orange).	53
3.5.2.	Obtenção do sangue e preparo das células.	54
3.5.3.	Análise estatística dos resultados.	54
3.6.	Ensaio biológico. Efeito inibitório sobre a enzima DHPS).	54
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1.	Estudo das guanidinas por ESI-MS	60
4.2.	Estudo das guanidinas por RMN	74

4.3.	Estudo das guanidinas por FT-IR.	84
4.4.	Estudo das guanidinas por UV-Vis.	85
4.5.	Ensaio biológico	87
4.5.1.	Determinação da atividade leishmanicida	87
4.5.2.	Determinação da mutagenicidade <i>in vivo</i> pelo teste de micronúcleo.	95
4.5.3.	Outros resultados: determinação do efeito inibitório sobre a enzima DHPS.	100
5.	CONCLUSÃO.	103
6.	REFERÊNCIAS.	104
APÊNDICE A	Seção de espectros	115
APÊNDICE B	Dados das atividades leishmanicidas.	162

1. INTRODUÇÃO.

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).

Doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são as doenças causadas por agentes infecciosos ou parasitas que são endêmicas particularmente em países subdesenvolvidos, e afetam aproximadamente 1,7 bilhões de pessoas ao redor do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica 17 doenças como DTNs: úlcera de buruli, doença de chagas, dengue/chikungunya, dracunculose, equinococose, trematodíases transmitidas por alimentos, tripanossomíase humana africana (doença do sono), leishmanioses, hanseníase, filariose linfática, oncocercose, raiva humana, esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo, teníase/cisticercose, tracoma e boubas,^{1,2} sendo que a doença de chagas, a doença do sono e a leishmaniose visceral são as três DTNs com as mais altas taxas de morte.^{3,4}

Essas doenças incapacitam ou matam milhões de pessoas e representam uma necessidade médica importante que permanece não atendida,⁵ havendo uma falta de incentivo econômico para a descoberta de novos medicamentos para o tratamento dessas doenças, pois apesar das doenças negligenciadas terem uma elevada incidência, afetam as populações mais pobres que não possuem recursos para comprar tais medicamentos.² Desta forma, dos 1556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004, apenas 10 (0,6%) foram desenvolvidos especificamente para alguma destas doenças. Se adicionarmos a malária e a tuberculose, os registros de novos medicamentos no mesmo período sobe para 21 (8 para malária e 3 para tuberculose), correspondendo a apenas 1,3% do total de novos medicamentos registrados (1556) no período.^{5,6}

A OMS anunciou em Londres, em 2012, um programa destinado a melhorar o controle e a prevenção dessas doenças, incluindo o aumento do acesso a medicamentos para atender a demanda das populações afetadas. Neste programa, espera-se que cinco das DTNs sejam eliminadas até 2020 (hanseníase, doença do sono, tracoma, dracunculose e filariose linfática) e que outras cinco estejam controladas (esquistossomose, helmintíases transmitidas pelo solo, leishmaniose visceral, oncocercose e doença de Chagas).^{2,7}

Desta forma, em 30 de janeiro de 2017 a OMS lançou um informativo de celebração de cinco anos de colaboração, desde a declaração de Londres, entre os parceiros da comunidade global em DTNs.⁸ A OMS declarou nesse informativo que,

somente em 2015, a colaboração aprimorada resultou no tratamento de quase um bilhão de pessoas.⁸ Outras áreas de progresso são listadas abaixo:⁸

- Todos os países latino-americanos alcançaram a triagem universal de sangue em 2015 para a doença de Chagas entre os doadores de sangue.
- Somente três países (Chade, Etiópia e Sudão do Sul) relataram transmissão de dracunculose em 2017. Um total de 25 casos foram relatados em 2016 e Mali relatou zero casos pela primeira vez. O número de casos diminuiu acentuadamente em relação aos 1797 casos notificados em 2010.
- Menos de 3000 casos de tripanossomíase africana humana (doença do sono) foram relatados em todo o mundo em 2015, em comparação com aproximadamente 10 000 em 2009 e quase 40 000 em 1998.
- A OMS certificou dois países - Marrocos (2016) e Omã (2012) - como tendo eliminado o tracoma como um problema de saúde pública.
- Em 2016, a OMS publicou novas diretrizes sobre a verificação da eliminação da oncocercose e do tracoma.
- Em 2016, a OMS certificou seis países - Camboja, Ilhas Cook, Maldivas, Niue, Sri Lanka e Vanuatu - como tendo eliminado a filariose linfática como um problema de saúde pública.
- Outros 18 países reduziram as infecções filárias a níveis que já não requerem administração de medicamentos em massa.
- A oncocercose foi quase eliminada na Região das Américas; Guatemala (2016), México (2015), Equador (2014) e Colômbia (2013) foram recentemente declarados livres da doença.
- A vigilância e a gestão de casos de alguns DTNs foram melhoradas através de uma plataforma de base de dados DHIS; OMS está agora a considerar a implementação de uma nova abordagem para melhorar a detecção de casos, gerenciar deficiência e superar a estigmatização de DTNs que afetam a pele.
- OMS elaborou uma resposta global de controle vetorial para combater a propagação de doenças transmitidas por vetores, incluindo dengue, chikungunya, malária e Zika, para consideração pela 70ª Assembléia Mundial da Saúde.

Este informativo on-line celebrou o quinto aniversário do Roteiro e da Declaração de Londres e precedeu a Segunda Reunião dos Parceiros Globais da OMS (que ocorrerá em Genebra, em abril de 2017) para comemorar uma década de

colaboração global contra as DTNs. Esta segunda reunião dos parceiros globais da OMS irá delinear as estratégias para alcançar as metas de 2020.⁸

1.2. Leishmaniose.

As Leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas, causadas por mais de 20 espécies do gênero *leishmania*. As três principais formas de infecção são: Leishmaniose visceral ou calazar (uma forma grave da doença); Leishmaniose cutânea (a forma mais comum); e Leishmaniose muco-cutânea. A doença afeta principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América latina, e está associada à desnutrição, sistema imunológico fraco e condições pobres de moradia e de recursos. São estimados 1,3 milhões de novos casos anualmente, que resultam em 20 – 30 mil mortes.⁹

A transmissão da leishmaniose para os seres humanos ocorre através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas, sendo o repasto sanguíneo ocorrendo preferencialmente no período noturno. O ciclo de transmissão é apresentado na figura 1.¹⁰⁻¹² O inseto vetor, também conhecido como mosquito palha, injeta a forma infectante do parasito (promastigota) em um novo hospedeiro durante a picada. Essas formas promastigotas são então fagocitadas por macrófagos do hospedeiro, onde sofrem transformação para as formas amastigotas e multiplicam-se, provocando o rompimento da célula do hospedeiro e disseminando a infecção.¹⁰⁻¹² Quando um outro vetor se contamina com as formas amastigotas do parasita que estão internalizadas dentro do macrófago do hospedeiro, os macrófagos se rompem no trato digestivo anterior do vetor, liberando as formas amastigotas que sofrem diferenciação em promastigotas e se multiplicam. Essas formas promastigotas infectantes do parasito serão inoculadas em um novo hospedeiro durante o repasto sanguíneo completando o ciclo de transmissão.¹⁰⁻¹²

A Leishmaniose visceral (também conhecida como calazar) é uma forma grave da doença e é fatal se não for tratada. As características dessa forma da doença são episódios irregulares de febre, substancial perda de peso, inchaço do baço e do fígado, e anemia. As epidemias recorrentes de leishmaniose visceral na África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão) têm causado alta morbidade e mortalidade nas comunidades afetadas. São estimados cerca de 200 – 400 mil novos casos por ano, com 90% da ocorrência em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão.⁹

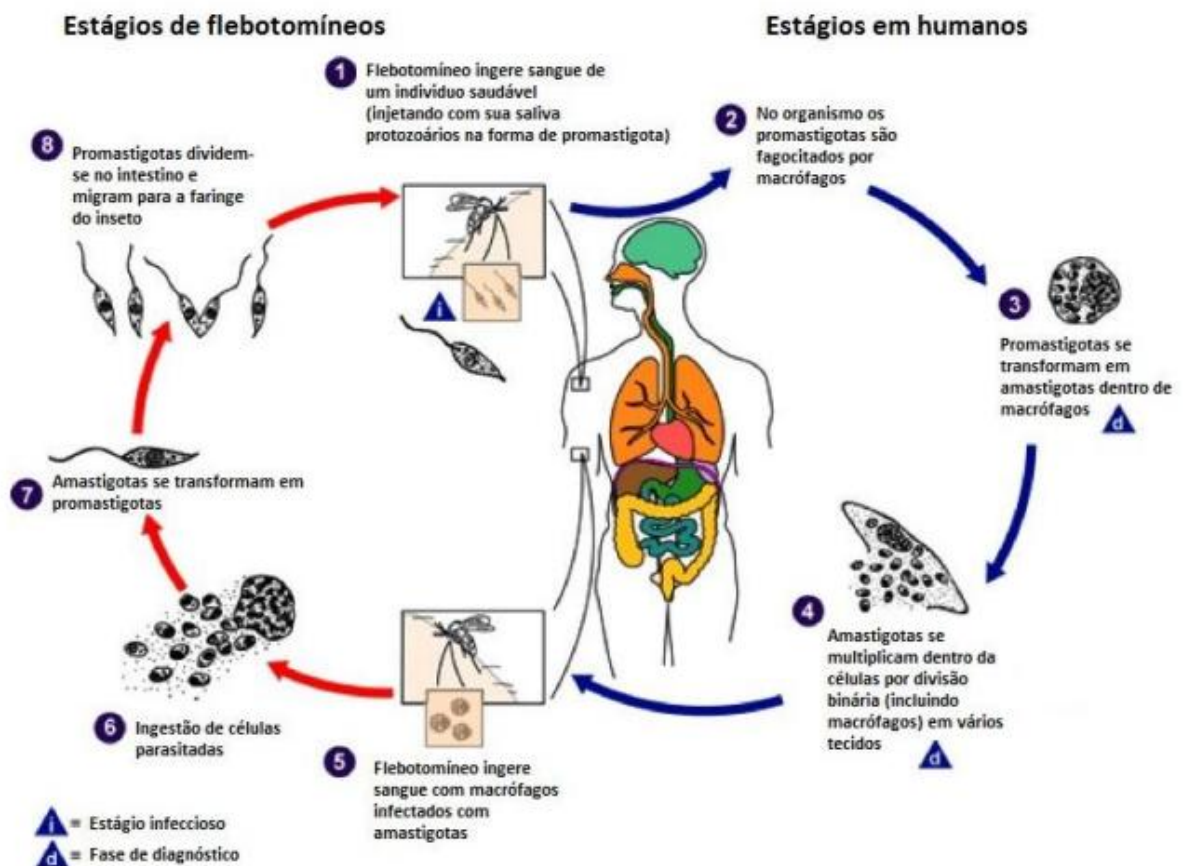


Figura 1. Ciclo de transmissão da leishmaniose. (Adaptado da ref. 12).

A leishmaniose cutânea, o tipo mais comum da doença, causa úlceras nas regiões expostas do corpo, como a face, braços e pernas, podendo haver um grande número de lesões que podem causar incapacidade grave. Quando as úlceras cicatrizam, invariavelmente deixam cicatrizes permanentes, que muitas vezes são a causa de sérios preconceitos sociais. Estima-se que 0,7 – 1,2 milhões de novos casos ocorrem anualmente ao redor do mundo, principalmente nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Os dez países com a maior estimativa de casos são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, que juntos, representam de 70 – 75% da incidência global estimada de leishmaniose cutânea.⁹ A epidemiologia da leishmaniose cutânea na região das Américas é complexa, com variações nos ciclos de transmissão, variações de hospedeiros e de mosquitos vetores, variações das manifestações clínicas e da resposta à terapia, além do fato de existir múltiplas espécies de leishmania circulando na mesma área geográfica.⁹

Na leishmaniose muco-cutânea, as lesões podem levar à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, cavidades da boca e da garganta e de tecidos circundantes. Aproximadamente 90% dos casos de leishmaniose muco-cutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru.⁹

O acesso aos medicamentos para o tratamento das leishmanioses é, em geral, um desafio nos países pobres que possuem os maiores números de casos. Muitos desses países em que a leishmaniose é endêmica possuem sistemas de saúde pública fracos, e nesse contexto, uma série de fatores contribuem para a falta de acesso aos medicamentos, incluindo:¹¹

- Os medicamentos são relativamente caros e, portanto, muitas vezes inacessíveis;¹¹
- Os respectivos protocolos de tratamento nacionais freqüentemente não refletem os últimos desenvolvimentos, e, pouco ou nenhum medicamento antileishmania estão incluídos na lista de medicamentos essenciais desses países;¹¹
- Os medicamentos em que preços preferenciais foram negociados para os países de baixa renda nem sempre são registrados pelas empresas destes países, uma vez que não existe um mercado rentável. Muitos países com menos casos também não registram tais medicamentos;¹¹
- O fornecimento dos medicamentos não é contínuo. A maioria dos medicamentos antileishmania são produzidos por um único fabricante. Problemas de qualidade, baixa capacidade de produção e falta de uma adequada previsão de necessidades (resultando em longos prazos para encomendas) causam regularmente rupturas de estoque em países endêmicos. Não existem estoques que podem ser acessados nesses casos, e não existe uma plataforma para indicar as necessidades das drogas; isso representa um grande desafio na estimativa das quantidades necessárias globalmente e no planejamento adequando da produção das drogas;¹¹

O tratamento das leishmanioses são ainda complicados, uma vez que existem diferentes espécies e várias manifestações clínicas.^{3,13,14} Atualmente existem cerca de 25 compostos e formulações que apresentam efeitos antileishmania, mas apenas alguns são classificados como fármacos para humanos.^{3,15}

No âmbito mundial, os compostos antimoniais pentavalentes (antimoniato de *N*-metilglucamina e estibogliconato de sódio) permaneceram como a solução principal por quase 75 anos.¹⁵ Entretanto, a falta de resposta aos antimoniais pentavalentes levou ao uso de anfotericina B ou pentamidina como fármacos de segunda escolha. Entre os novos fármacos descobertos recentemente, podemos citar a miltefosina, a paromomicina, a sitamaquina, azóis e azitromicina. Entretanto, esses compostos têm sido relatados como tendo taxas de cura variáveis.¹⁵

No Brasil existem três fármacos disponíveis para o tratamento de leishmanioses: o antimoniato de *N*-metilglucamina, a anfotericina B e a pentamidina¹⁰ (Figura 2). O estibogliconato de sódio também é um fármaco utilizado para leishmanioses, mas, embora seja padronizado pela OMS, não está disponível no Brasil.¹⁶

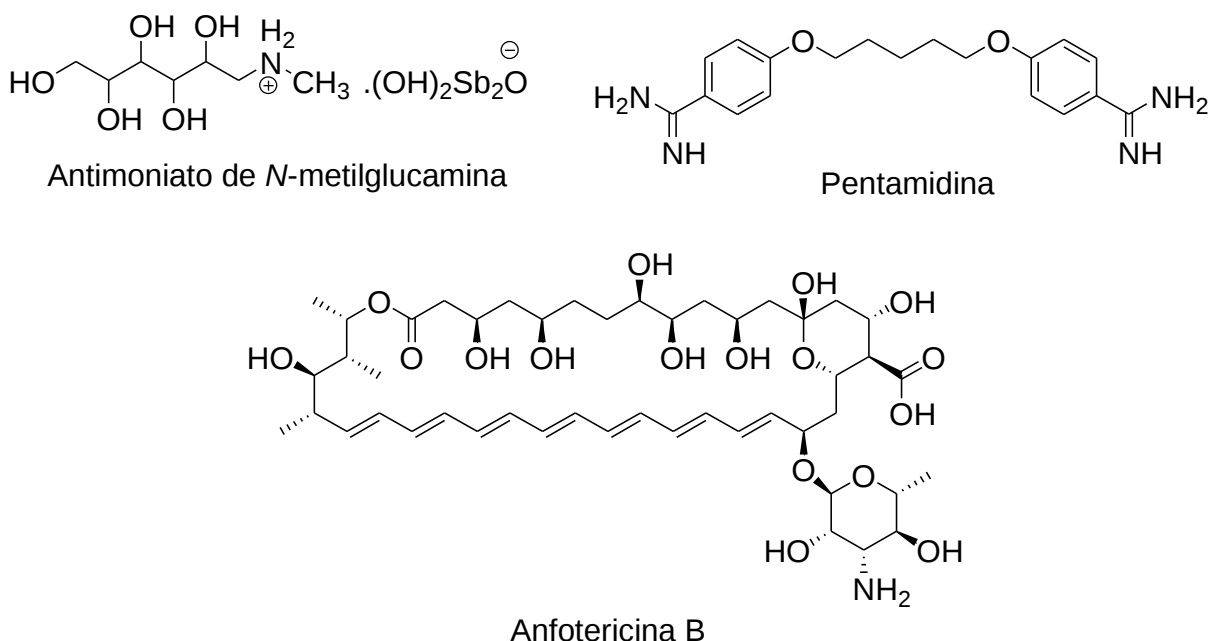


Figura 2. Estruturas do antimoniato de *N*-metilglucamina, da pentamidina e da anfotericina B.

Os tratamentos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, entretanto, esses tratamentos baseados em fármacos antimoniais pentavalentes são antigos e estão relacionados a graves efeitos tóxicos. Além disso, o aparecimento de cepas de parasitas resistentes a esses fármacos tem tornado urgente a necessidade de se encontrar medicamentos novos, seguros e eficazes contra leishmanioses.^{17,18}

A anfotericina B é o fármaco de segunda escolha, administrado em três aplicações semanais na dose máxima de 1mg/kg/dia.¹⁹ É indicada em casos de falha da terapia de primeira escolha ou impossibilidade de uso do antimonial, em pacientes com nefropatia e gestantes.^{19,20} O mecanismo de ação está relacionado na sua afinidade pelo episterol, precursor do ergosterol, presente na membrana do parasito.¹⁶ Entretanto, a afinidade da anfotericina B pelos esteróis não é seletiva, e o fármaco também pode interagir com o colesterol presente nas membranas celulares humanas o que contribui para os efeitos tóxicos apresentados pelo fármaco.¹⁰

Já a pentamidina, outro fármaco de segunda escolha na terapia, ainda possui o mecanismo de ação incerto. No entanto, parece estar relacionado às mitocôndrias, possivelmente causando colapso na membrana mitocondrial.²¹ Assim como os antimonials pentavalentes e a anfotericina B, a pentamidina também está relacionada à efeitos tóxicos, tais como, toxicidade renal, hepática e cardíaca; indução do surgimento de diabetes insulino-dependente quando administradas doses superiores a uma grama;^{16,19,21,22} além de outros efeitos adversos como dor ou enrijecimento no local da aplicação, abscessos, náuseas, vômitos, tontura, entre outros.¹⁶

1.3. Alvos terapêuticos no tratamento de Leishmaniose.

Uma das estratégias do processo de desenvolvimento de novos fármacos é a identificação de um alvo em uma via biológica ou metabolismo celular, principalmente aqueles não existentes nas células humanas ou substancialmente diferentes dos homólogos humanos, que sejam essenciais para a sobrevivência do agente patogênico.²³ Além disso, a estratégia de atingir mais de uma enzima de uma via metabólica (ou de diferentes vias metabólicas) pode ser de maior utilidade e eficácia.²⁴ Devido à escassez de fármacos para o tratamento de leishmanioses, são necessários mais estudos para descobrir novos inibidores específicos para os diferentes alvos terapêuticos já identificados relacionados a doença.

A seguir encontram-se alguns alvos terapêuticos que podem ser sugeridos para a sua utilização no desenvolvimento de novos compostos leishmanicidas, bem como as classes de compostos que apresentam inibição destes alvos.

1.3.1. Via do Folato:

Enzimas envolvidas no fornecimento e uso de cofatores folato reduzidos, como a dihidrofolato redutase (DHFR), são valorosos alvos para o tratamento de infecções

bacterianas, câncer e certas doenças parasíticas, como malária, leishmaníasis e tripanossomíasis.^{25–28} DHFR é responsável pela redução de dihidrofolato para tetrahydrofolato e sua inibição prejudica a replicação de DNA resultando em morte celular.^{24,27} Os principais inibidores de DHFR são compostos do tipo 2,4 diaminopteridinas, sendo o metotrexato (MTX, Figura 3) um clássico antifolato.²⁹

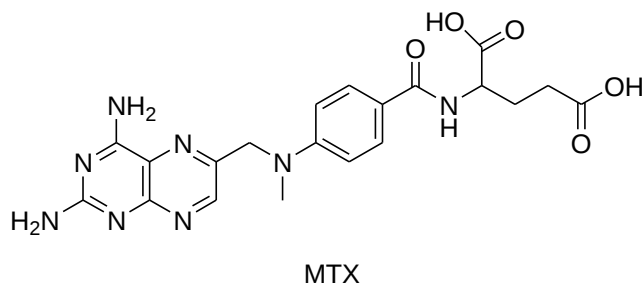


Figura 3. Estrutura do MTX.

1.3.2. Enzimas da biossíntese de poliaminas.

Putrescina, espermidina e espermina são poliaminas que desempenham papel importante no crescimento e diferenciação do parasita da fase promastigota para amastigota.^{24,30} Poliaminas também diminuem a peroxidação lipídica gerada por compostos oxidantes tornando o ambiente compatível para a sobrevivência do parasita.^{24,31}

Em *Leishmania*, arginina (Figura 4) é convertida em L-ornitina (Figura 4) pela enzima arginase. L-ornitina é convertida para putrescina através de sua descarboxilação pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), que por sua vez é convertida para espermidina pela enzima espermidina sintase (Spd Sintase). Espermidina e espermina são as substâncias responsáveis pelo crescimento e proliferação celular de *Leishmania*.³²

As enzimas envolvidas na biossíntese de poliaminas exibem fatores estruturais que diferem significativamente entre o parasita e o hospedeiro humano, e algumas enzimas que utilizam poliaminas como substratos existem apenas nos parasitas, fazendo com que essas enzimas sejam promissores alvos no desenvolvimento de drogas contra doenças tropicais parasíticas.³³ Os transportadores de poliaminas (LmPOT1) que transportam putrescina e espermidina e regulam o nível de poliamina intracelular, também são bons alvos.³⁴

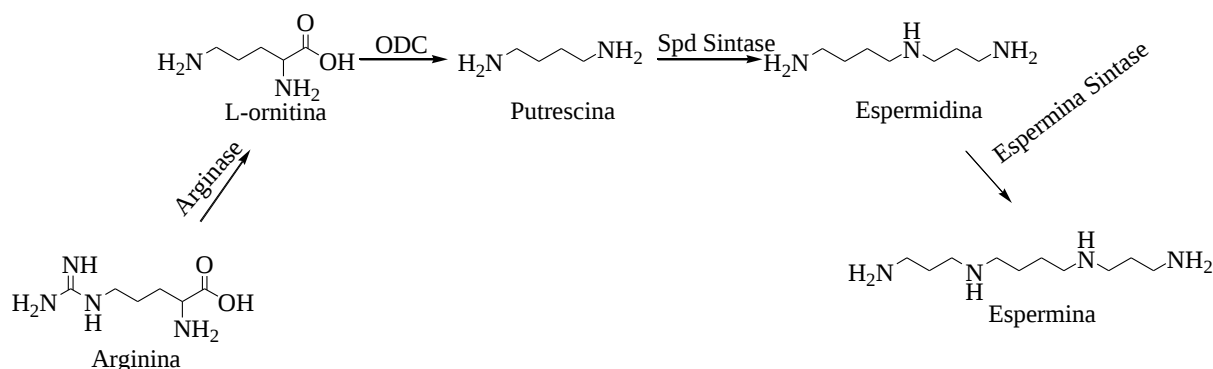


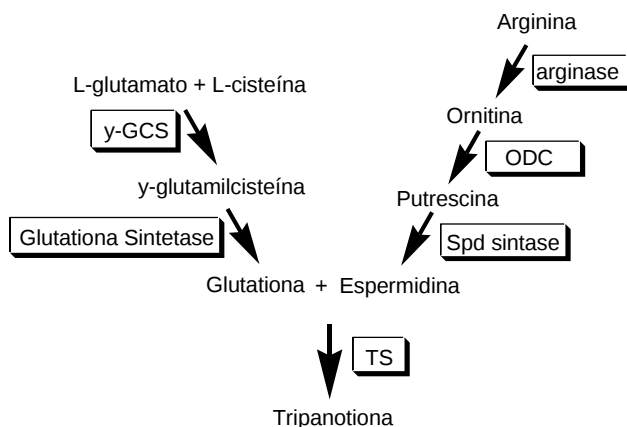
Figura 4. Biossíntese de poliaminas.

Substratos e produtos derivados ou análogos dos compostos envolvidos na biossíntese de poliaminas podem inibir específico e irreversivelmente as diferentes enzimas presentes no processo.^{30,33,35} O desenvolvimento de inibidores da biossíntese e transporte de poliaminas podem ser uma estratégia útil para novos agentes terapêuticos leishmanicidas. Portanto, são necessários mais estudos para descobrir novos inibidores específicos para a via de poliaminas.^{24,33,34}

1.3.3. Via da Tripanotiona.

A via da tripanotiona está diretamente relacionada com a síntese de poliaminas descrita no item 1.3.2., pois ela utiliza a poliamina espermidina (Esquema 1). Conseqüentemente, as enzimas utilizadas na via da tripanotiona se juntam as enzimas mencionadas acima na via de poliaminas como promissores alvos para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas.³³

Esquema 1. Relação entre a via de biossíntese de poliaminas e a via da tripanotiona.



Adaptado de Heby e colaboradores³³

Tripanotiona (bis-(glutationil)espermidina) (Figura 5) é uma molécula chave contra o estresse oxidativo em *Trypanosoma* e *Leishmania*, crucial na manutenção de um ambiente intracelular reduzido, sendo essencial para a sobrevivência do parasita.^{23,36}

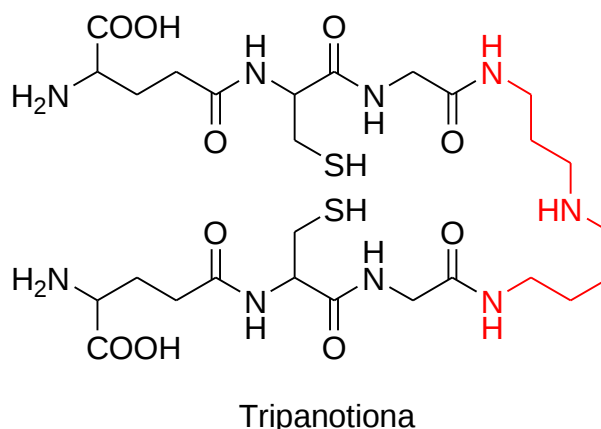


Figura 5. Estrutura da tripanotiona em sua forma reduzida com destaque para a porção espermidina (em vermelho).

A síntese de tripanotiona é catalisada por duas enzimas, a tripanotiona sintetase (TS) e a tripanotiona redutase (TR). TS catalisa a síntese de tripanotiona a partir de duas moléculas de glutatona e uma molécula de espermidina. A tripanotiona é então mantida em sua forma reduzida pela enzima TR na presença de NADPH. A tripanotiona em sua forma reduzida é utilizada para reduzir triparedoxina, gerando a tripanotiona na forma oxidada, que retorna para sua forma reduzida por ação da TR para iniciar um novo ciclo.^{23,37} Triparedoxina em sua forma ativa (reduzida) é usada para catalisar a redução de peróxido de hidrogênio e peróxidos hidro-orgânicos em água e álcool. Portanto, a inibição de TR impede a formação da forma ativa de triparedoxina causando um ambiente intracelular oxidado, maléfico para o parasita.^{23,37}

Derivados de poliaminas, compostos tricíclicos e difenilsulfetos foram identificados como compostos que inibem TR.^{23,38} Alguns derivados de poliaminas que possuem atividade contra TR são mostrados na figura 6.

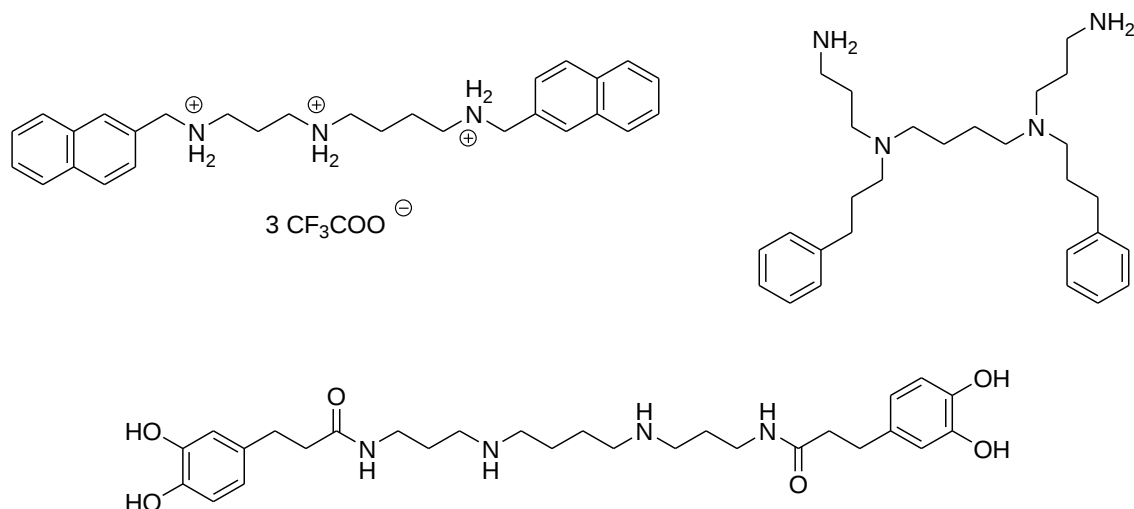


Figura 6. Exemplos de derivados de poliaminas que apresentam inibição de TR.³⁸

Poucos estudos em animais têm sido reportados de compostos que inibem TR. Muitos dos compostos que inibem TR, não são efetivos em animais, provavelmente porque são metabolizadas pelo corpo. Portanto, pesquisas por novos inibidores de TR são necessários, assim como a avaliação do efeito inibitório destes compostos contra TR de *Leishmania*.³⁷

1.3.4. Via da Hipusina (inibição da enzima DHPS).

Recentemente foi reportado que a biossíntese de hipusina ocorre em *Leishmania donovani*.³⁹

Hipusina (N-(4-amino-2-hidroxibutil)lisina) é um amino ácido incomum derivado da poliamina espermidina e é sintetizada como resultado de uma modificação pós-traducional que ocorre exclusivamente em uma proteína celular, o fator de iniciação eucariótico 5A (eIF5A).²³

A hipusinação ocorre em duas etapas enzimáticas (Figura 7).^{23,40} A primeira etapa é catalisada pela enzima deoxihipusina sintase (DHPS) que catalisa uma transferência dependente de NAD^+ de uma porção 4-aminobutil da espermidina para um resíduo específico lisina da proteína precursora eIF5A, formando o intermediário deoxihipusina.^{23,41–45} Este intermediário formado é subsequentemente hidroxilado pela enzima deoxihipusina hidroxilase (DOHH)^{23,46} que completa a síntese da hipusina.

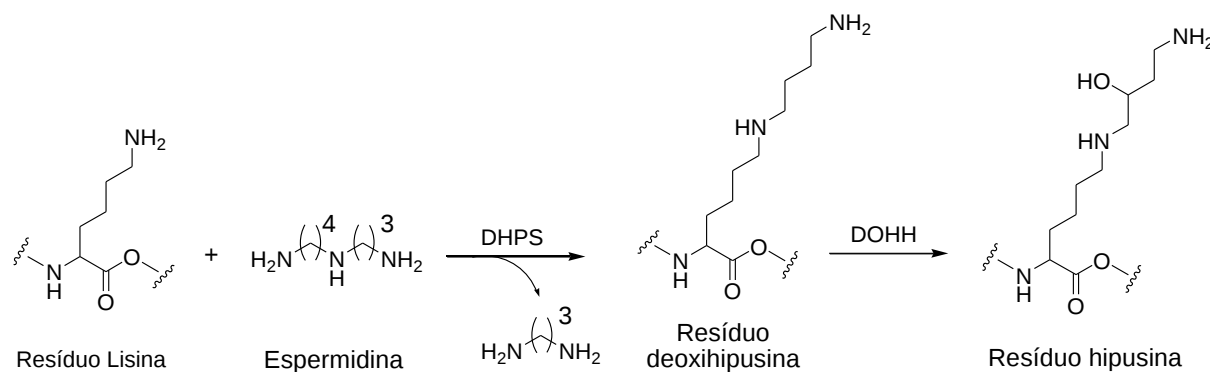


Figura 7. Biossíntese da hipusina (Adaptado da ref. 23).

A hipusinação de eIF5A é necessário para a função e viabilidade celular. A inibição das enzimas biossintéticas de hipusina (DHPS e DOHH) exercem efeitos anti-proliferativos e alteram a proliferação e diferenciação de células tumorais.^{23,45,47,48,49}

Compostos derivados e análogos da espermidina são inibidores de DHPS,⁵⁰ sendo o GC₇ (Figura 8) o mais potente inibidor de DHPS conhecido até hoje.^{39,51} A figura 8 também apresenta a estruturas de outros bons inibidores de DHPS.⁵⁰

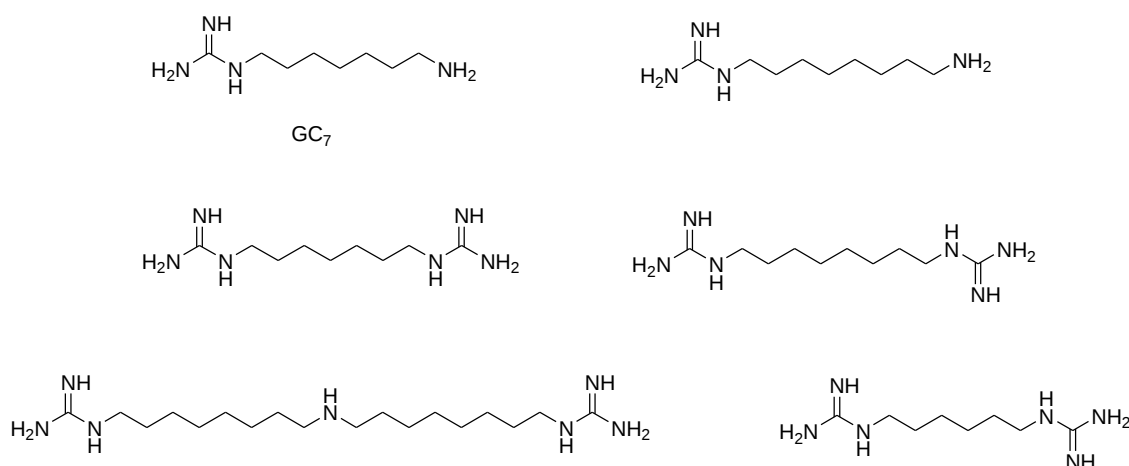


Figura 8. Estrutura do GC₇ e de outros inibidores de DHPS.

Apesar da conservação de alguns resíduos amino ácidos entre DHPS humano e *Leishmania*, o mais potente inibidor de DHPS humano GC₇ (figura 8) teve pouco efeito inibitório em *L. donovani*, indicando que existe uma diferença nos sítios de ligação da espermidina entre as enzimas humanas e de *Leishmania*, abrindo a

possibilidade que a diferença entre as duas enzimas podem ser exploradas para o desenvolvimento de drogas para a leishmaniose visceral.³⁹

1.4. Guanidinas.

Compostos do tipo guanidina são encontrados na natureza, e também são uma importante classe de compostos utilizados em química orgânica.⁵² Dentre os usos sintéticos de guanidinas, podemos destacar o rol catalítico em sínteses de carbonatos orgânicos e uretanas através de reações de alcoóis e aminas com CO₂, respectivamente,^{53–66} em reações de transesterificação para produção de biodiesel,⁶⁶ como catalisadores em reações de formação de quinazolinas,⁶⁶ lactonas,⁶⁶ oxazolidinonas,⁶⁶ entre outros.

O uso mais comum de guanidinas em química orgânica é como bases orgânicas,^{52,67} sendo que algumas delas são conhecidas como umas das bases orgânicas neutras mais fortes, devido à habilidade de sua forma protonada deslocalizar a carga positiva através de seus átomos de nitrogênio (Figura 9).^{52,67}

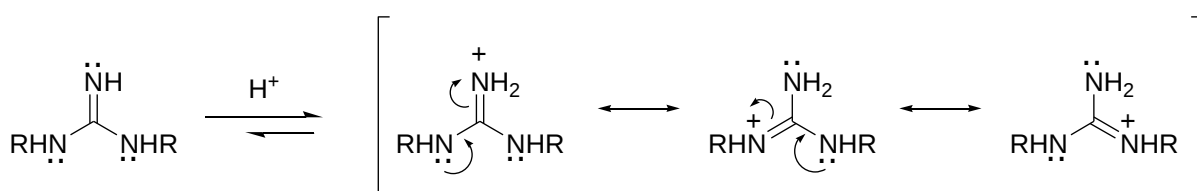


Figura 9. Ressonância do íon guanidínio.

Moléculas contendo o núcleo guanidínico apresentam várias atividades biológicas,^{68,69} como exemplo, são utilizados como dilatadores cardiovasculares,⁷⁰ anti-histamínicos,⁷¹ agentes anti-inflamatórios,^{72,73} anti-diabéticos,⁷⁴ anti-bactericidas, antifúngicos,⁷⁵ anti-protozoário, antiparasitário⁷⁶ e antiviral.^{77,78}

A atividade farmacológica de moléculas contendo o núcleo guanidínico ocorre devido à capacidade de ligação do íon guanidínio com espécies carregadas negativamente, como carboxilatos e fosfatos, que são grupos constituintes de membranas biológicas e organelas. A ressonância do cátion guanidínico e do ânion carboxilato (ou fosfato) são complementares, e ligações iônicas podem ser formadas simultaneamente entre os dois átomos de nitrogênio partilhando a carga positiva e os dois átomos de oxigênio partilhando a carga negativa, com a ligação de hidrogênio sendo curta e relativamente forte,⁷⁹ como pode ser visto na figura 10.

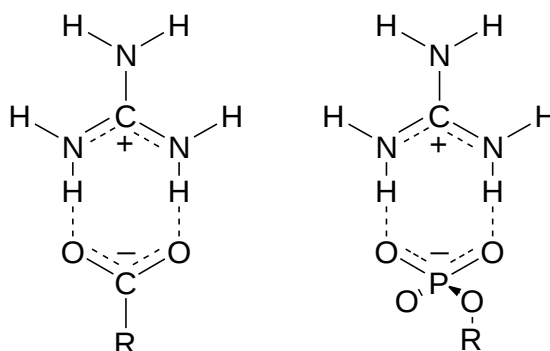


Figura 10. Ligação do íon guanidínio com oxiânions.

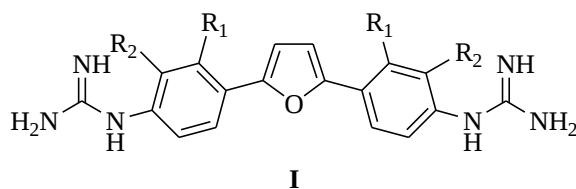
Vários compostos do tipo guanidinas são também estudados para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas,⁸⁰ sendo que alguns estudos testaram a efetividade de compostos guanidínicos contra leishmaniose.

Stephens e colaboradores⁸¹ reportaram a atividade *in vitro* de 11 di-cátions diguanidínicos em ensaios de parasitas *L. Donovanii* amastigotas e ensaios de macrófagos infectados por *Leishmania*. A estrutura geral e os valores de IC₅₀ encontrados são mostrados na Tabela 1.

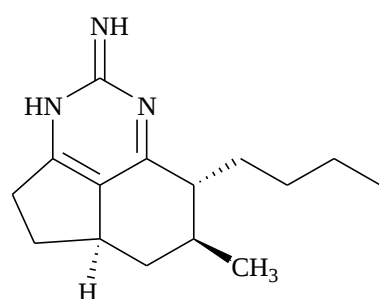
Hua e colaboradores⁸² reportaram a identificação, o isolamento e a atividade do alcalóide guanidina mirabilin B (estrutura II, Figura 11). Esse alcalóide guanidina foi identificado e isolado da esponja marinha *Monanchora unguifera* e foi testado contra *L. donovani*, exibindo atividade antiprotozoária com valor de IC₅₀ de 17 µg/mL.

Costa e colaboradores⁸³ reportaram a separação e caracterização de um novo alcalóide pirimidina-β-carbolina, chamado de *N*-hidroxianomontina e o composto previamente isolado anomontina (III e IV, respectivamente na figura 11). Os autores determinaram a atividade antiparasitária do extrato cru e dos compostos purificados contra *Leishmania braziliensis* e *L. guyanensis*, os maiores causadores de leishmanioses no Amazonas. Anomontina (IV) foi ativo contra *L. braziliensis*, sendo cerca de 6 vezes mais efetivo que *N*-hidroxiamonontina (III), com IC₅₀ de 34,8 e 252,7 µM, respectivamente. Entretanto, apenas o composto III apresentou atividade contra *L. guyanensis* com IC₅₀ de 437,5 µM (contra > 613 µM do composto IV).

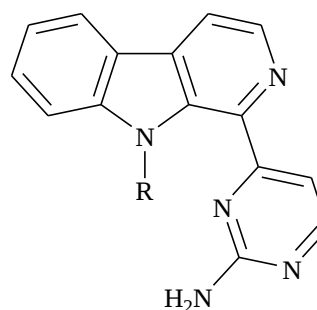
Tabela 1. Estrutura geral dos compostos diguanidinium **la-lk** e valores de IC₅₀ dos ensaios de *L. Donovanii* amastigota e macrófagos.⁸¹



Composto	R ₁	R ₂	<i>L.d.</i> (amastigota) IC ₅₀ , μM	<i>L. d.</i> (macrófago) IC ₅₀ , μM
la	H	H	10.9	> 24
lb	CH ₃	H	3.3	> 6
lc	OCH ₃	H	18.7	5.2
ld	O- <i>i</i> -Pr	H	9.65	> 6
le	Cl	H	6.2	> 6.8
lf	CF ₃	H	14.8	> 5.6
lg	CH ₃	CH ₃	4.2	> 19
lh	H	OCH ₃	14.5	> 29
li	H	OEt	11.2	> 40
lj	H	SCH ₃	22.6	> 19
lk	H	Cl	> 50	> 6.3



Mirabilin B
II



III. R = OH
IV. R = H

Figura 11. Estruturas moleculares da Mirabilin B (**II**),⁸² *N*-hidroxianomontina (**III**)⁸³ e anomontina (**IV**).⁸³

Agarwal e colaboradores⁸⁴ reportaram a eficácia *in vitro* de 16 dihidroquinazolinas sintéticas (**V**, figura 12) e 16 derivados tetrahydroquinazolinas (**VI**, figura 12), onde R1 é um grupo amino cíclico em todos os compostos. A atividade *in vitro* anti-leishmania de todos os compostos foi primeiro investigado contra *L. donovani* promastigota. Todos os compostos tetrahydroquinazolinas (**VI**) e somente três dihidroquinazolinas (**V**) exibiram inibição 100% ou perto de 100% contra promastigotas. Os compostos com taxas de inibição de promastigotas maiores que 80% foram então avaliados contra amastigotas e seus valores de IC₅₀ foram calculados. As estruturas e os respectivos valores de IC₅₀ dos compostos com atividade contra *L. donovani* amastigota são apresentados na figura 12.

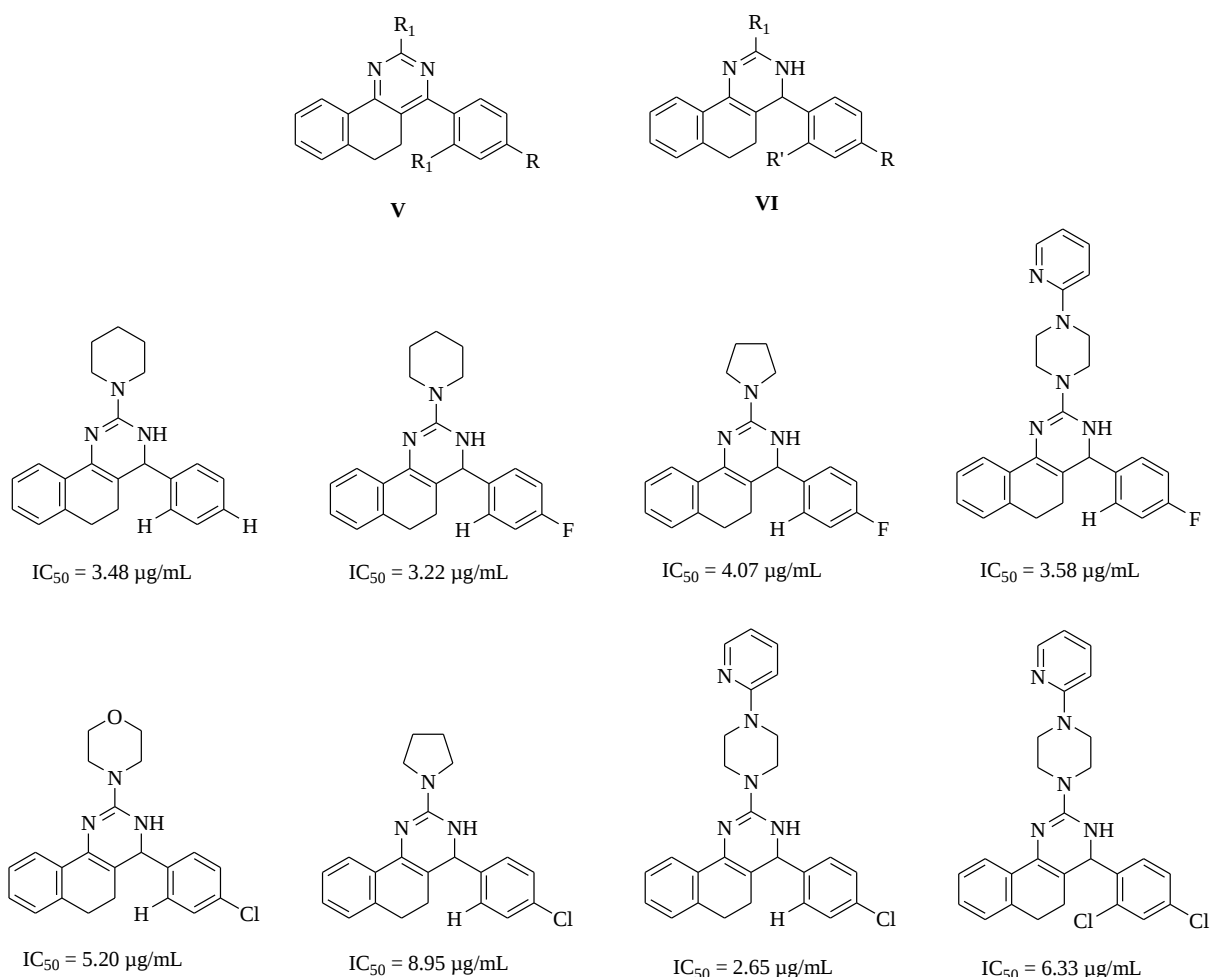
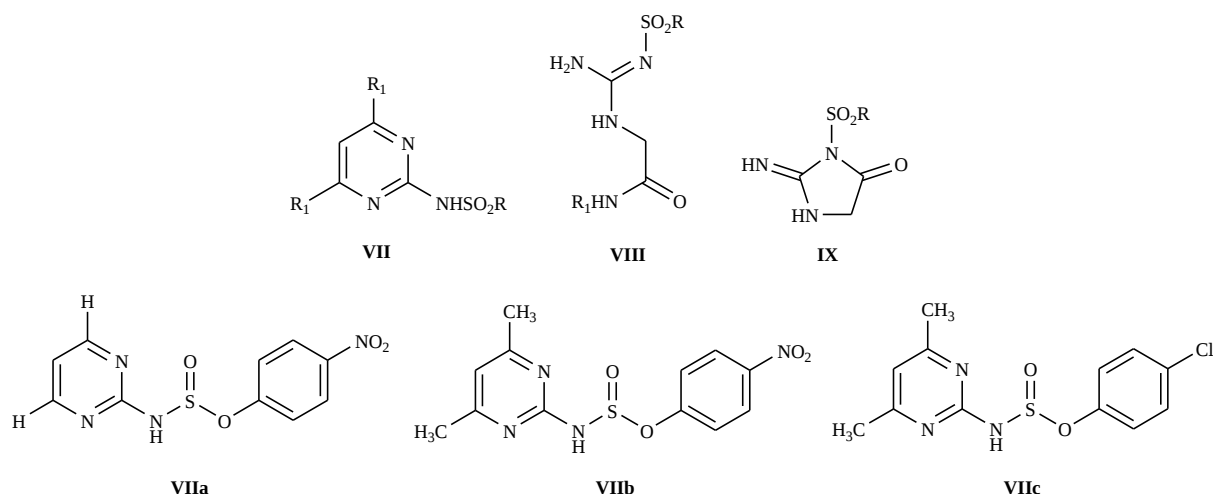


Figura 12. Estrutura geral das dihidroquinazolinas (**V**), e tetrahydroquinazolinas (**VI**). Estruturas moleculares e valores de IC₅₀ dos compostos mais ativos contra *L. donovani* amastigotas.⁸⁴

Dea-ayuela e colaboradores⁸⁵ reportaram uma série de compostos do tipo sulfonamida contendo porções guanidina. Os efeitos leishmanicidas foram observados *in vitro* contra *L. infantum* promastigotos. As estruturas gerais dos compostos reportados que possuem a porção guanidina neste estudo (**VII**, **VIII** e **IX**) são apresentados na figura 13. Os compostos **VIII** e **IX** não afetaram o crescimento de *L. infantum* promastigotos a concentrações altas como 100 µg/mL, mas alguns derivados pirimidinas (**VII a-c**) foram ativos. Com este resultado, os autores então estenderam a atividade antiprotozoária, avaliando também contra *L. guayanensis*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.⁸⁶ As estruturas dos compostos ensaiados (**VII a-c**) contra essas espécies Leishmania, a porcentagem de inibição de crescimento (GI) e os valores de IC₅₀ para cada espécie leishmania são apresentados na figura 13.



Composto	<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. guayanensis</i>		<i>L. amazonensis</i>	
	GI	IC ₅₀	GI	IC ₅₀	GI	IC ₅₀	GI	IC
	(%)	(µM)	(%)	(µM)	(%)	(µM)	(%)	(µM)
VIIa	92.7	76.4	94	48.8	99	46.4	98	68.6
VIIb	72.7	223.1	81.9	247.5	67	ND	31	ND
VIIc	71.5	216	79.6	223.3	81	110	87	214.6

Figura 13. Estrutura geral dos compostos **VII**, **VIII** e **IX**. Estruturas moleculares, porcentagem de inibição de crescimento (GI) e valores de IC₅₀ dos compostos **VII a-c** contra as quatro espécies leishmania estudadas.^{85,86}

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.

2.1. Justificativa do presente trabalho. (Trabalhos anteriores do LQOF envolvendo derivados guanidínicos).

Em trabalhos anteriores realizados no LQOF, sintetizamos uma série de compostos guanidínicos^{68,87} com estrutura geral apresentada na figura 14, sendo R, grupos benzila, furfurila, ciclohexila ou butila.

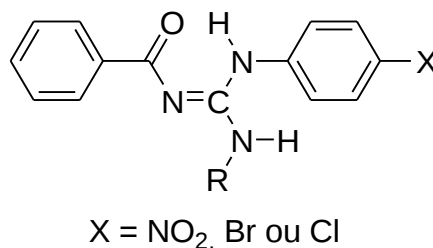


Figura 14. Estrutura geral das guanidinas previamente sintetizadas no LQOF.^{68,87}

Como parte desses trabalhos anteriores, seis desses compostos foram avaliados na inibição enzimática da DHPS humana *in vitro*, sendo que três desses compostos apresentaram bons resultados e dentre eles dois apresentam o grupo benzila nas suas estruturas (**LQOF-G1** e **LQOF-G3**, figura 15) (ver mais detalhes no tópico de resultados e discussão).

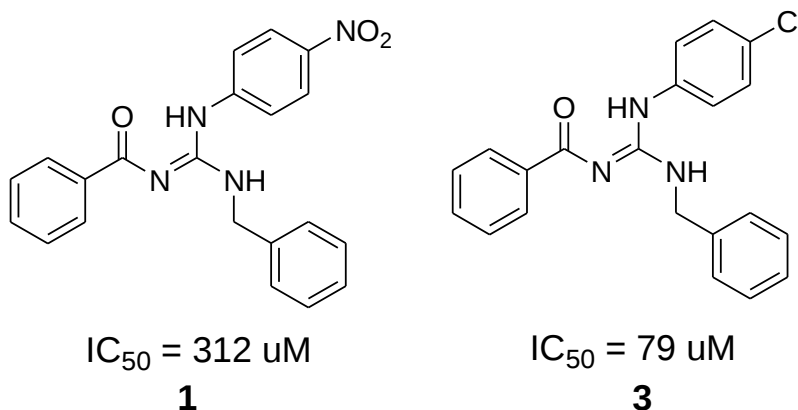


Figura 15. Estrutura e IC_{50} na inibição da enzima DHPS.

Desta forma, como continuação dos trabalhos desenvolvidos, realizamos no presente trabalho a síntese e caracterização estrutural dos novos derivados guanidínicos onde fixamos o substituinte benzila como grupo R (figura 14), uma vez que a presença deste agrupamento parece melhorar a inibição da enzima DHPS, e realizamos modificações no grupo *p*-substituinte no anel de anilina das guanidinas.

Tais modificações foram elaboradas para traçar um estudo futuro da relação estrutura-atividade na inibição da enzima DHPS e da atividade leishmanicida.

Os compostos sintetizados no presente trabalho foram avaliados quanto às suas atividades leishmanicidas em colaboração com a Profa. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha e a doutoranda Ángela María Arenas Velásquez, no laboratório de Parasitologia Clínica/Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

A avaliação *in vivo* da mutagenicidade dos compostos sintetizados pelo teste do micronúcleo foram feitas em colaboração com a Profa. Dra. Chung Man Chin e os doutorandos Diego Chiba e Daniela Hartmann, no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos – Lapdesf, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

Os testes de cinética enzimática de DHPS foram feitas em colaboração com o Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli, o Prof. Dr. Oedem Paulo de Almeida Junior e a mestre Ana Paula Biazotto, no laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microorganismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

2.2. Objetivo geral.

Sintetizar, caracterizar e avaliar a atividade leishmanicida de 20 compostos do tipo benzoilguanidinas desenvolvidos no presente trabalho.

2.3. Objetivos específicos.

- Sintetizar 20 compostos do tipo benzoilguanidinas com potencial atividade leishmanicida;
- Caracterizar os compostos sintetizados por Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI-MS) e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C);
- Avaliar a atividade dos compostos derivados guanidínicos frente a formas promastigotas de *L. Amazonensis*;
- Determinar a citotoxicidade dos derivados guanidínicos que possuem atividade leishmanicida;
- Avaliar a atividade dos compostos derivados guanidínicos frente a formas amastigotas de *L. Amazonensis*;
- Investigar a mutagenicidade dos compostos sintetizados;
- Avaliar a atividade inibitória de DHPS e da proliferação celular;

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e solventes.

Os reagentes utilizados nesse trabalho (cloreto de benzoíla, isotiocianato de amônio, anilina, 4-nitroanilina, 4-bromoanilina, 4-cloroanilina, 4-fluorânilina, 4-iodoanilina, 4-metoxianilina, toluidina, 4-*t*-butilanilina, benzilamina, 4-aminobutanol, espermidina, trietilamina, nitrato de bismuto penta-hidratado, e os solventes *N,N*-dimetilformamida, acetonitrila e diclorometano foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem nenhuma purificação prévia.

3.2. Metodologias sintéticas.

3.2.1. Síntese das tiouréias intermediárias.^{90,68,87}

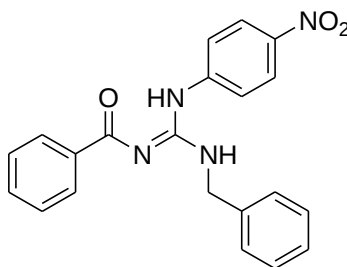
Em um balão de fundo redondo, isotiocianato de amônio (0.76 g, 10 mmol) foi dissolvido em acetonitrila (~ 20 mL) e então adicionou-se lentamente o cloreto de benzoíla (1.40 g, 10 mmol). Em poucos instantes observou-se a formação de um sólido branco (cloreto de amônio), e então deixou-se a mistura resultante sob agitação e refluxo por 1 hora. Ao término do tempo, a solução foi filtrada utilizando um funil de Buchner e papel de filtro, removendo-se o cloreto de amônio formado. Em seguida, adicionou-se 10 mmol de uma das anilinas sobre a solução de isotiocianato de benzoíla em acetonitrila. Em poucos instantes, nota-se a formação de um precipitado (que corresponde à respectiva tiouréia). A mistura reacional ficou sob agitação e refluxo por duas horas, quando a agitação foi interrompida e deixou-se esfriar até atingir a temperatura ambiente. Então o balão foi colocado no congelador por 10 minutos e realizou-se a filtração utilizando-se um funil de Buchner e papel de filtro. O sólido no papel de filtro foi lavado com pequenas porções de acetonitrila gelada, e então obteve-se o resíduo cru em bons rendimentos.

3.2.2. Síntese das guanidinas.^{91,68,87}

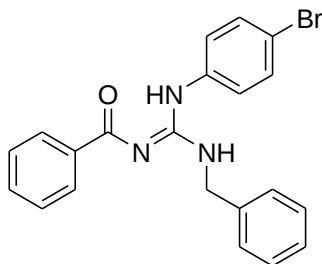
Para uma solução de 1 mmol de tiouréia dissolvido em 5 mL de DMF, foi adicionado 2 mmol de amina (benzilamina, 4-amino-1-butanol ou espermidina), 4 mmol de trietilamina e 1 mmol de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. A solução ficou preta após poucos minutos e a mistura foi aquecida e agitada por 24 horas a 100°C. Após o tempo de reação, esperou-se a solução atingir temperatura ambiente e a suspensão foi filtrada usando um bloco de celite em um funil de Buchner de vidro com placa porosa. Esse bloco foi lavado com ~ 20 mL de diclorometano. O filtrado foi transferido para um funil

de separação onde se realizou a remoção das impurezas através de extração com água (4 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro, e após filtragem foi evaporada. O resíduo cru obtido após a evaporação do solvente foi recristalizado em uma mistura éter etílico/éter de petróleo (8:2). A seguir encontram-se os dados experimentais dos compostos sintetizados. Os esquemas reacionais estão apresentados na seção resultados e discussão (esquemas 2 a 5). Foi realizada também a tentativa de sintetizar amino-guanidinas através da reação das tiouréias com a poliamina espermidina que dariam origem aos compostos **LQOF-G20** a **LQOF-G28** segundo o esquema 5. A discussão sobre essas tentativas de síntese são discutidas nos resultados e discussão.

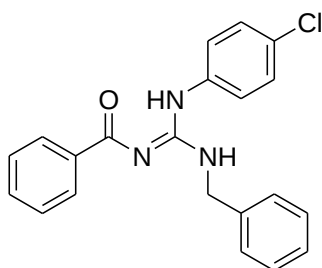
3.2.3. Dados experimentais.



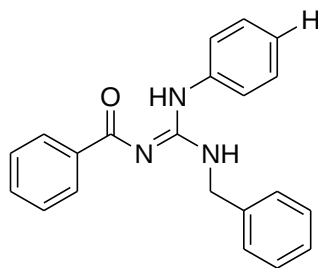
1-benzil-2-benzoil-3-(4-nitrofenil) guanidina (LQOF-G1). Sólido de cor amarelo (0,25g, 66%); pf = 134-137°C; **RMN de ^1H** à – 60°C (400,13 MHz, CDCl_3) δ isômero Z: 12,63 (s, 1H), 5,99 (t, 1H) e 4,92 (d, 2H) ppm; isômero E: 11,33 (t, 1H), 8,73 (s, 1H) e 4,64 (d, 2H) ppm. Sinais em comum: 8,30 – 8,21 (m, 6H), 8,12 (d, 2H), 7,58 (m, 2H) e 7,51 – 7,33 (m, 18H) ppm; **RMN de ^{13}C** à – 60°C (100,61 MHz, CDCl_3) δ 178,1; 177,7; 157,7; 156,9; 144,1; 143,6; 142,6; 142,2; 137,8; 137,2; 134,8; 132,0; 129,5; 129,0; 128,9; 128,3; 128,2; 127,9; 127,8; 127,0; 126,9; 125,8; 124,7; 123,6; 121,8; 45,5 e 45,1 ppm; **ESI(+)-MS:** m/z encontrado: 375,1454, m/z calculado para $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_3 + \text{H}]^+$: 375,1457, Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_2]^+$ de m/z 105 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_3]^+$ de m/z 91; **FT-IR** (KBr) ν 3423, 3061, 3027, 2930, 1630, 1601, 1566, 1505, 1329 e 1109 cm^{-1} ;



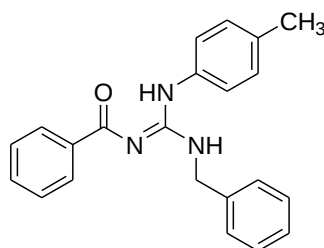
1-benzil-2-benzoil-3-(4-bromofenil) guanidina (LQOF-G2). Sólido de cor marrom claro (0,29 g, 71%); pf = 82-88°C; **RMN de ^1H** à – 60°C (400,13 MHz, CDCl_3) δ isômero Z: 12,15 (s, 1H), 8,29 (d, 2H), 7,54 – 7,48 (m, 5H), 7,41 – 7,35 (m, 5H), 7,14 (d, 2H), 5,45 (t, 1H) e 4,85 (d, 2H) ppm. isômero E: 11,16 (s, 1H) ppm; **RMN de ^{13}C** à – 60°C (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177,5; 158,1; 138,2; 137,6; 134,1; 133,1; 131,6; 129,2; 128,9; 128,8; 128,1; 127,7; 127,4; 120,6 e 44,8 ppm; **ESI(+)-MS:** m/z encontrada: 408,0771 e 410,0649, m/z calculada para $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BrN}_3\text{O} + \text{H}]^+$: 408,0771 e 410,0694, Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS (m/z 408): $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_7\text{NO}]^+$ de m/z 287, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrN}_2]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{BrN}_3]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrN}_3\text{O}]^+$ de m/z 91; **FT-IR** (KBr) ν 3432, 3062, 2930, 1601, 1559, 1363 e 1196 cm^{-1} ;



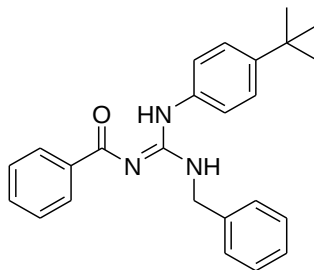
1-benzil-2-benzoil-3-(4-clorofenil) guanidina (LQOF-G3). Sólido de cor amarelo (0,25 g, 69%); pf = 84-88°C; **RMN de ^1H** à – 60°C (400,13 MHz, CDCl_3) δ isômero Z: 12,16 (s, 1H), 8,29 (d, 2H, $J = 7,6$ Hz), 7,56 (t, 1H, $J = 7,2$ Hz), 7,48 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,42 – 7,37 (m, 6H), 7,31 (m, 1H), 7,21 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 5,44 (t, 1H, $J = 5,8$ Hz) e 4,85 (d, 2H, $J = 5,8$ Hz) ppm. Isômero E: 11,20 (t, 0,1H, $J = 5,1$ Hz) e 10,00 (s, 0,1H) ppm; **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177,5; 158,2; 138,2; 137,6; 133,6; 132,5; 131,5; 130,1; 128,9; 128,7; 128,0; 127,6; 127,1 e 44,8 ppm; **ESI(+)-MS:** m/z encontrada: 364,1241, m/z calculada para $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O} + \text{H}]^+$: 364,1217, Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 243, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_2]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{ClN}_3]^+$ de m/z 105 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{O}]^+$ de m/z 91; **FT-IR** (KBr) ν 3435, 3064, 2931, 1601, 1558, 1361 e 1198 cm^{-1} ;



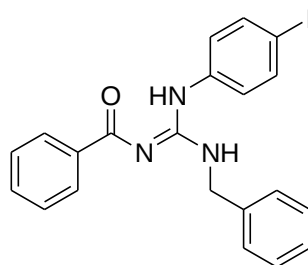
1-benzil-2-benzoil-3-fenil guanidina (LQOF-G4). Sólido de cor amarelo claro (0,29 g, 88,8%); pf = 92-93,7°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12,22 (br, 1H), 8,30 (br, 2H), 7,50 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H), 7,44 (m, 5H), 7,37 (d, 4H), 7,33 – 7,30 (m, 3H), 5,26 (br, 1H), 4,82 (br, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177,7, 158,7, 138,6, 136,0, 131,4, 130,1, 129,2, 128,9, 128,0, 127,7, 127,6, 127,1, 125,7, 45; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 330,16148, m/z calculado para $[\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O} + \text{H}]^+$: 330,16064. Erro: 2,54 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 77, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 91, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_2]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 209 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_6\text{N}]^+$ de m/z 237. **FT-IR:** (KBr) ν 3413, 3168, 3067, 2918, 1601, 1566, 1355 e 1198 cm^{-1} ; **UV-Vis:** (DMSO) 274 nm.



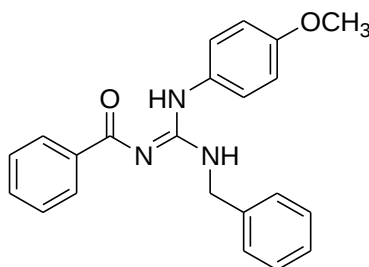
1-benzil-2-benzoil-3-(4-metilfenil) guanidina (LQOF-G5). Sólido de cor amarelo claro (0,18 g, 53%); pf = 90-91,5°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12,05 (br, 1H), 8,27 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H), 7,46 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H), 7,41 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 7,33 (d, $J = 4,5$ Hz, 4H), 7,29 (dd, $J = 8,7, 4,5$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,15 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H), 5,18 (br, 1H), 4,78 (br, 2H), 2,35 (s, 3H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177,8, 159,1, 138,7, 137,3, 133,2, 131,3, 130,8, 129,3, 128,9, 128,0, 127,7, 125,9, 45,3, 21,2; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 344,17702, m/z calculado para $[\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O} + \text{H}]^+$: 344,17629. Erro: 2,12 ppm; Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 77, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 91, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2]^+$ de m/z 122 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 22,3. **FT-IR:** (KBr) ν 3412, 3212, 3027, 2818, 1651, 1601, 1556, 1358 e 1201 cm^{-1} ; **UV-Vis:** (DMSO) 273 nm.



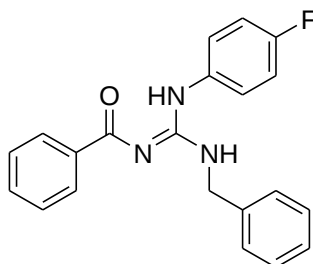
1-benzil-2-benzoil-3-(4-*t*-butilfenil) guanidina (LQOF-G6). Sólido de cor amarelo claro (0,27 g, 70%); pf = 122-125°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12,09 (br, 1H), 8,27 (d, J = 7,1 Hz, 2H), 7,48 – 7,44 (m, 1H), 7,42 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,35 (m, 4H), 7,29 (m, 1H), 7,19 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 5,27 (br, 1H), 4,79 (d, J = 5,3 Hz, 2H), 1,31 (s, 9H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.9, 159.1, 150.4, 138.8, 133.2, 131.4, 129.3, 128.9, 128.0, 127.7, 127.2, 125.5, 45.3, 34.8 and 31.5; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 386.22425, m/z calculado para $[\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O} + \text{H}]^+$: 386.22324. Erro: 2.61 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 77, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 91, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}]^+$ de m/z 237 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 265. **FT-IR:** (KBr) ν 3323, 3060, 2959, 1696, 1595, 1566, 1364 e 1209 cm^{-1} ; **UV-Vis:** (DMSO) 274 nm.



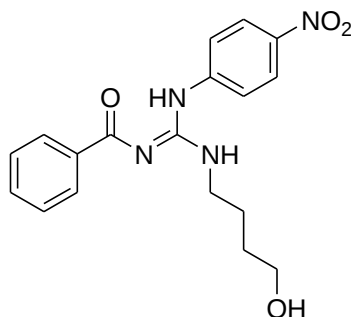
1-benzil-2-benzoil-3-(4-iodofenil) guanidina (LQOF-G7). Sólido de cor amarelo (0,23 g, 50%); pf = 92-95°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12,21 (br, 1H), 8,25 (br, 2H), 7,71 (d, J = 7,9 Hz, 2H), 7,49 (t, J = 6,8 Hz, 1H), 7,42 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,35 (m, 4H), 7,30 (m, 1H), 7,02 (br, 2H), 5,16 (br, 1H), 4,76 (br, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 178.0, 158.4, 139.2, 138.3, 131.5, 129.3, 129.0, 128.0, 127.9, 127.7, 127.3, 45.4; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 456.05780, m/z calculado para $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{IN}_3\text{O} + \text{H}]^+$: 456.05728; Erro: 1.14 ppm; Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{IN}_3\text{O}]^+$ de m/z 77, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{IN}_3\text{O}]^+$ de m/z 91, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{IN}_3]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{IN}_2]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_5\text{IN}]^+$ de m/z 237 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 335. **FT-IR:** (KBr) ν 3353, 3055, 2931, 1654, 1603, 1566, 1508, 1354 e 1207 cm^{-1} ; **UV-Vis:** (DMSO) 273 nm.



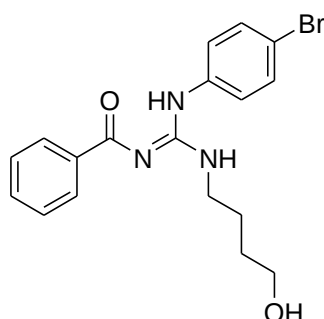
1-benzil-2-benzoil-3-(4-metóxfenil) guanidina (LQOF-G8). Sólido de cor amarelo (0,30 g, 84,9%); pf = 97-99°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 11.93 (br, 1H), 8.27 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.46 (m, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.33 (m, 4H), 7.29 (m, 1H), 7.19 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (dt, J = 8.9 Hz, 2H), 5.06 (br, 1H), 4.77 (br, 2H), 3.81 (s, 3H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.7, 159.4, 158.7, 138.6, 131.1, 129.2, 128.8, 128.2, 127.8, 127.7, 127.5, 122.2, 115.3, 113.3, 55.5, 45.2; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 360.17190, m/z calculado para $[\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 360.17120; Erro: 1.94 ppm; Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ de m/z 77, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ de m/z 91, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}]^+$ de m/z 122 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 239. **FT-IR:** (KBr) ν 3376, 3065, 2933, 1652, 1602, 1565, 1510, 1355 e 1205 cm^{-1} ; **UV-Vis:** (DMSO) 273 e 260 nm.



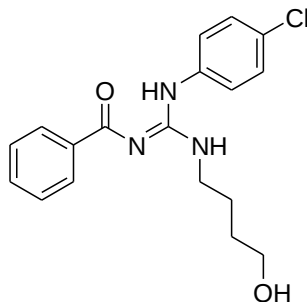
1-benzil-2-benzoil-3-(4-Fluorofenil) guanidina (LQOF-G9). Sólido de cor branca (0,25 g, 73%); pf = 121-123°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12.09 (s, 1H), 8.26 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.46 (m, J = 7.2 Hz, 1H), 7.40 (m, J = 7.3 Hz, 2H), 7.34 (m, 4H), 7.31 – 7.27 (m, 1H), 7.24 (dd, J = 8.8, 2H), 7.09 (t, J = 8.5 Hz, 2H), 5.08 (s, 1H), 4.77 (d, J = 4.6 Hz, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) (δ 177.9, 159.0, 138.4, 131.8, 131.3, 129.2, 129.1, 128.8, 127.9, 127.7, 127.5, 127.0 e 45.3; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 348.15186, m/z calculado para $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O} + \text{H}]^+$: 348.15122; Erro: 1.84 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}]^+$ de m/z 77, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{FN}_3\text{O}]^+$ de m/z 91, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{FN}_3]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{FN}_2]^+$ de m/z 122 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 227. **FT-IR:** (KBr) ν 3353, 3055, 2931, 1654, 1603, 1566, 1508, 1354 e 1207 cm^{-1} ; **UV-Vis:** (DMSO) 273 nm.



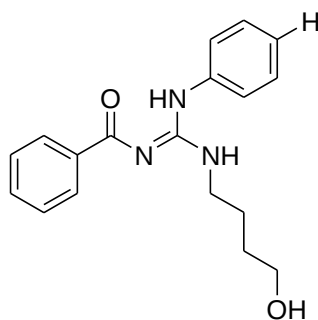
1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-nitrofenil) guanidina (LQOF-G11). Sólido de cor marrom (0,19 g, 53%); **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.94 – 7.83 (m, 2H), 7.60 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.54 – 7.49 (m, 2H), 7.44 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.79 (br, 2H), 3.56 (br, 2H), 1.83 (quint, $J = 6.7$ Hz, 2H), 1.71 (quint, $J = 6.4$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 143.9, 133.9, 132.6, 129.0, 128.4, 127.2, 125.1, 119.5, 62.8, 41.3, and 26.6; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 357.1617, m/z calculado para $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}]^+$: 357.1563; Erro: 15.1 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_3]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3]^+$ de m/z 122 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 164. **FT-IR** (KBr) ν 3405, 3371, 3094, 2947, 1633, 1607, 1563 e 1338 cm^{-1} ;



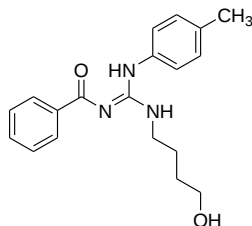
1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-bromofenil) guanidina (LQOF-G12). Sólido de cor amarelo (0,22 g, 62%); $\text{pf} = 82\text{--}88^\circ\text{C}$; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12.05 (br, 1H), 8.20 (br, 2H), 7.53 – 7.45 (m, 3H), 7.42 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 7.16 (br, 2H), 5.25 (br, 1H), 3.65 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.55 (br, 2H), 1.70 (br, 2H), 1.64 – 1.59 (qua, $J = 5.5$ Hz, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.7, 158.7, 138.4, 133.1, 131.9, 131.7, 129.1, 128.2, 127.2, 121.2, 62.5, 41.5, 29.6 and 26.6; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 390.0887 e 392.0779, m/z calculado para $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{BrN}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 390.0817 e 392.0779; Erro: 17.9 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}]^+$ de m/z 122 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 197. **FT-IR** (KBr) ν 3461, 3355, 3062, 2946, 1701, 1600, 1568 e 1372 cm^{-1} ;



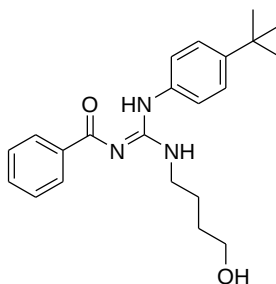
1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-clorofenil) guanidina (LQOF-G13). Sólido de cor amarelo (0,23 g, 66%); pf = 86-91°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12.11 (br, 1H), 8.23 (s, 2H), 7.48 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.42 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.22 (br, 2H), 5.15 (br, 1H), 3.68 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.58 (br, 2H), 1.72 (quint, J = 6.1 Hz, 2H), 1.63 (quint, J = 6.1 Hz, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.9, 158.8, 138.6, 135.0, 131.5, 130.2, 129.2, 128.1, 127.0, 62.6, 41.4, 29.7 and 26.6; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 346.1243, m/z calculado para $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 346.1322; Erro: 22.8 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}]^+$ de m/z 122 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 153. **FT-IR** (KBr) ν 3458, 3357, 3063, 2948, 1715, 1602, 1567 e 1373 cm^{-1} ;



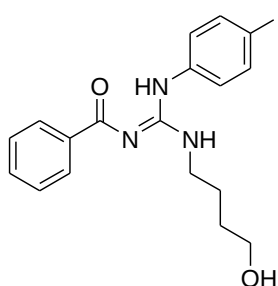
1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-fenil) guanidina (LQOF-G14). Sólido de cor marrom (0,24 g, 76,7%); pf = 91,5-95°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12.07 (br, 1H), 8.24 (br, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 5H), 7.27 (br, 3H), 5.21 (br, 1H), 3.65 – 3.62 (t, 2H), 3.56 (br, 2H), 1.70 – 1.67 (br, 2H), 1.61 (br, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.5, 158.7, 138.6, 136.2, 131.3, 130.0, 129.0, 127.9, 125.6, 120.4, 62.4, 41.2, 29.6, 26.4; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 312.17206, m/z calculado para $[\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 312.17120; Erro: 2.75 ppm; Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}]^+$ de m/z 90, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 119, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_2]^+$ de m/z 173, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 191, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_6\text{N}]^+$ de m/z 219 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}]^+$ de m/z 240.



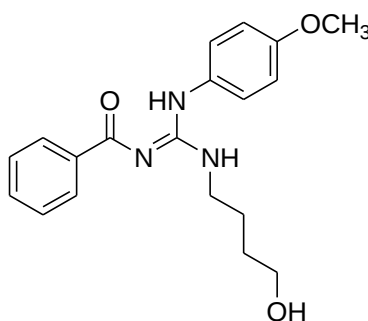
1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-metilfenil) guanidina (LQOF-G15). Sólido de cor marrom (0,25 g, 78,4%); pf = 89-94°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 11.95 (br, 1H), 8.24 (br, 2H), 7.49 – 7.44 (m, 1H), 7.41 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.15 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 5.10 (br, 1H), 3.66 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.57 (br, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.68 (quint, J = 13.5, 6.5 Hz, 2H), 1.61 (quint, J = 13.8, 6.1 Hz, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.5, 159.1, 138.7, 137.1, 133.3, 131.4, 130.7, 129.1, 128.1, 125.9, 62.5, 41.4, 29.7, 26.5 and 21.2; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 326.18825, m/z calculado para $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 326.18685; Erro: 4.29 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}]^+$ de m/z 90, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 133, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 205 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ de m/z 237.



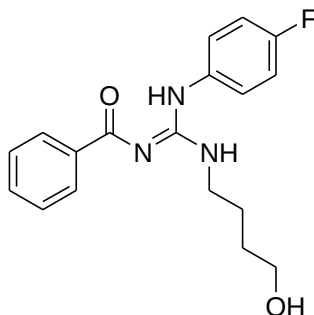
1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-t-butilfenil) guanidina (LQOF-G16). Sólido de cor marrom (0,20 g, 56,1%); pf = 102-110°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 11.97 (br, 1H), 8.24 (br, 2H), 7.49 – 7.41 (m, 5H), 7.19 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 5.13 (br, 1H), 3.66 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.58 (br, 2H), 1.72 – 1.68 (quint, J = 6.6 Hz, 2H), 1.65 – 1.59 (quint, J = 6.7 Hz, 2H), 1.33 (s, 9H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.5, 159.1, 150.3, 138.8, 133.4, 131.3, 129.2, 128.1, 127.1, 125.5, 62.5, 41.4, 31.5, 29.8 and 26.6; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 368.23530, m/z calculado para $[\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 368.23380; Erro: 4.07 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}]^+$ de m/z 90, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 175, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}]^+$ de m/z 219, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 247 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ de m/z 279. **FT-IR:** (KBr) ν 3445, 3291, 2948, 1651, 1597 e 1373 cm^{-1} ;



1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-iodofenil) guanidina (LQOF-G17). Sólido de cor marrom (0,11 g, 25%); pf = 85-92°C; **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 12.07 (br, 1H), 8.19 (br, 2H), 7.70 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.50 – 7.46 (m, 1H), 7.44 – 7.38 (m, 2H), 7.04 (br, 2H), 5.25 (br, 1H), 3.67 (t, 2H), 3.55 (br, 2H), 1.76 – 1.68 (m, 2H), 1.62 (quint, 5.9 Hz, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 138.9, 131.5, 128.9, 128.0, 62.4, 41.4, 29.4, 26.4; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 438.06854, m/z calculado para $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{IN}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 438.06784; Erro: 1.60 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{IN}_2\text{O}]^+$ de m/z 90, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{IN}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{IN}_2\text{O}]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_6\text{H}_5\text{IN}]^+$ de m/z 219, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 244, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 317 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ de m/z 348.



1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-metóxfenil) guanidina (LQOF-G18). Sólido de cor marrom (0,23 g, 69,3%); **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 11.81 (br, 1H), 8.24 (br, 2H), 7.50 – 7.45 (m, 1H), 7.40 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 5.00 (br, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.63 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 3.55 (br, 2H), 1.66 (quint, J = 13.5, 6.3 Hz, 2H), 1.59 (quint, J = 12.9, 6.1 Hz, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.4, 159.4, 158.5, 138.6, 133.3, 131.1, 129.0, 127.9, 122.2, 115.1, 62.4, 55.5, 41.2, 29.6, 26.4; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 342.18345, m/z calculado para $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3 + \text{H}]^+$: 342.18177; Erro: 4.91 ppm. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2]^+$ de m/z 90, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 149, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 221 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ de m/z 253. **FT-IR:** (KBr) ν 3434, 3297, 2935, 1652, 1601, 1568 e 1369 cm^{-1} ;



1-(4-hidroxibutil)-2-benzoil-3-(4-flúorfenil) guanidina (LQOF-G19). Sólido de cor marrom (0,20 g, 62%); **RMN de ^1H** (400,13 MHz, CDCl_3) δ 11.96 (br, 1H), 8.21 (br, 2H), 7.49 – 7.45 (m, 1H), 7.40 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.24 (br, 2H), 7.09 (t, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.09 (br, 1H), 3.65 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.55 (br, 2H), 1.73 – 1.66 (m, 2H), 1.64 – 1.58 (quint, 2H); **RMN de ^{13}C** (100,61 MHz, CDCl_3) δ 177.7, 159.0, 138.4, 131.3, 129.0, 127.9, 116.8, 62.4, 41.3, 29.5, 26.4; **ESI(+)-MS:** m/z experimental: 330.16268, m/z calculado para $[\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_2 + \text{H}]^+$: 330.16178; Erro: 2.72. Fragmentos iônicos observados em ESI(+)-MS/MS: $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}]^+$ de m/z 90, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{FN}_3\text{O}]^+$ de m/z 105, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{FN}_2\text{O}]^+$ de m/z 122, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_2]^+$ de m/z 137, $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_7\text{H}_6\text{NO}]^+$ de m/z 209 e $[\text{M} + \text{H} - \text{C}_4\text{H}_{10}\text{NO}]^+$ de m/z 241. **FT-IR:** (KBr) ν 3437, 3317, 3067, 2937, 1651, 1601, 1567, 1370 e 1210 cm^{-1} ;

3.3. Técnicas analíticas.

3.3.1. Análises de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um modelo Bruker utilizando 400.13 e 100.61 MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos para os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são referenciados utilizando tetrametilsilano (TMS). As análises foram realizadas em solução de CDCl_3 e todos os picos são reportados em ppm. Os dados são apresentados como segue: deslocamento químico, multiplicidade (s = singlete, d = dublete, dd = dubleto de dubletes, t = triplete, qua = quadrublete, qu = quintete, m = multiplete, br s = singlete largo), integração, e constante de acoplamento (em Hertz).

3.3.2. Análises de Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrospray (ESI-MS).

As amostras foram analisadas utilizando um LC Agilent 1290 e um espectrômetro de massas Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS. As amostras foram

diluídas em 1 mL de acetonitrila e 1 microlitro da solução foi injetada pelo autoamostrador do LC por injeção direta da amostra na fonte de eletrospray do espectrômetro de massas. A fase móvel do LC foi acetonitrila/0.1% Ac. fórmico na vazão de 0.1 mL/min. A fonte de ionização por eletrospray operou no modo positivo. A fonte de ESI operou nas seguintes condições: Temperatura do gás de nebulização 290°C, voltagem do capilar 3500 V, Nozzle Voltage 320 V, vazão do gás de secagem 14 mL/min, pressão do gás de nebulização 45 psig, temperatura do gás auxiliar 350°C e vazão do gás auxiliar 12 mL/min. O analisador quadrupolo operou na faixa de m/z 100 - 1000, o fragmentor 100 V, voltagem do octapolo 750 V, e aquisição de 1 espectro/s obtido com alta resolução no TOF até a 5 casa decimal. As formulas foram atribuídas com erro de 1 ppm usando o software Agilent Mass Hunter Workstation.

3.3.3. Análises de Espectroscopia de absorção na região do Infra-vermelho (FT-IR).

As medidas de FT-IR foram feitas na forma de pastilhas de KBr. O KBr é previamente secado em estufa à 80°C por 24h. Para a fabricação das pastilhas, utiliza-se 1 mg de amostra para 20 mg de KBr, os sólidos são homogeneizados e a mistura é prensada na forma de uma pastilha. Os espectros foram obtidos num espectrômetro Bruker, modelo Vector 22, e coletados a temperatura ambiente (25°C) com 124 scans e resolução espectral de 4 cm^{-1} .

3.3.4. Análise de Espectroscopia de absorção na região do Ultra violeta-visível (UV-Vis).

Os espectros de UV-Vis foram obtidos em soluções de concentração 1×10^{-5} M em DMSO, em um espectrofotômetro Lambda 25 da Perkin-Elmer na faixa de 200-700 nm, com velocidade de scan de 240 nm/min, utilizando cubetas de quartzo.

3.3.5. Ponto de fusão.

Os pontos de fusão (pf) foram obtidos usando um aparelho Quimis Q-340 M. As amostras foram colocadas em um tubo capilar, e as temperaturas de pré-aquecimento e final da rampa foram selecionados para 60°C e 250°C, respectivamente. A razão de aquecimento utilizada foi 4.0°C/min.

3.4. Ensaios biológicos. Atividade leishmanicida.

3.4.1. Parasitos.

Formas promastigotas da cepa (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) de *L.* foram cultivadas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) pH 7,2; 68,4 mM de NaCl (Merck); 5,4 mM de KCl (Merck); 56,3 mM de Na₂HPO₄ (Merck); 111 mM de Dextrose (Mallinckrodt); 0,3% de meio *Liver Infusion Broth* (Difco); 0,5% de Tryptose (Fluka); 25 mg/L de Haemin (ICN); 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab) em estufa a 28°C, até a fase logarítmica tardia de crescimento (1×10^7 parasitas/mL), para os bioensaios de atividade leishmanicida.

3.4.2. Bioensaio para avaliar atividade leishmanicida *in vitro*.

Para avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* realizou-se a metodologia descrita por Velásquez et al.⁹² O método de MTT, descrito inicialmente por Mosmann⁹³ está baseado na capacidade das células vivas reduzirem o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, MTT, em um produto colorido chamado *formazan*; este, por sua vez, é produzido pela atividade da enzima succinato desidrogenase no meio mitocondrial.

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque dos compostos a 20 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Para o uso *in vitro*, os compostos foram diluídos em concentrações apropriadas no meio de cultivo dos parasitos para a realização dos ensaios colorimétricos. Três microlitros de cada composto (concentrações finais de 100 a 1 µg/mL) foram adicionados a 97 µL de meio LIT (contendo as formas promastigotas de *L. amazonensis*). A placa foi incubada em câmara úmida a 28°C (BOD) por 72 h. A seguir, adicionou-se 10 µL de solução MTT/PMS (MTT 2,5 mg/mL e PMS 0,22 mg/mL, PMS = metassulfato de fenazina) em todos os poços e a placa novamente foi incubada, ao abrigo da luz, por 75 min a 28°C. O PMS foi utilizado como um carregador intermediário de elétrons, catalisando o processo de geração de *formazan*.⁹⁴ Os cristais de *formazan* foram dissolvidos com uma solução de SDS-HCl (dodecil sulfato de sódio a 10% em HCl 1 mol/L) e, após este passo, incubou-se as placas a temperatura ambiente por 30 min ao abrigo da luz. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro de placas (*Infinite M200Pro*, *TECAN*) a 492 nm. Os resultados foram obtidos em absorbância.

A porcentagem de parasitos mortos e porcentagem de citotoxicidade (%C) foram calculados segundo a equação seguinte.⁹⁵

$$\%C = \left[\frac{(G_C - G_P)}{G_C} \right] \times 100$$

Na fórmula, $G_C = A_C - A_M$ e $G_P = A_P - A_{PM}$, sendo que G_C representa o número de parasitos/mL nos poços controles e G_P o número de parasitos/mL detectados em diferentes concentrações das amostras. A_C corresponde ao valor de absorbância nos poços controle (na ausência de amostra) com parasitos; A_M representa o valor da absorbância nos poços controle (na ausência de amostra) sem parasitos; A_P , o valor da absorbância nos testes e A_{PM} o valor da absorbância das diferentes concentrações das amostras na ausência dos parasitos.

Foram realizados dois controles; um na ausência dos parasitos e outro na ausência dos compostos, mas contendo os parasitos. Os valores de IC_{50} (metade da concentração inibitória máxima) foram determinados a partir dos dados de absorbância obtidos e calculados por regressão linear para cada composto, utilizando-se o programa Origin 7.0.⁹⁶

Todos os testes foram feitos em triplicatas experimentais e biológicas expressando o valor em média e desvio padrão, e como controle positivo foi incluída a pentamidina (Sigma - Aldrich) e a anfotericina B (Cristalia) utilizada no tratamento das leishmanioses. Para o uso *in vitro*, a pentamidina e a anfotericina B seguiram mesmo protocolo de diluição citado acima.

3.4.3. Determinação da citotoxicidade contra macrófagos peritoneais de camundongos Swiss de compostos ativos pela técnica colorimétrica do MTT.

Para a obtenção dos macrófagos injetou-se, via intraperitoneal, 3,0 mL de solução de tioglicolato de sódio a 3% (Difco, São Paulo, Brasil) em camundongos Swiss (machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 25 e 30 g) para a migração de macrófagos à região peritoneal⁹⁷ e, com isso, estimular uma elevada produção de macrófagos para os ensaios. Os procedimentos seguintes foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Após 3 a 4 dias da estimulação/ativação, os animais foram eutanasiados segundo os procedimentos adotados pelo comitê de ética local (CEUA/FCF/CAR: 44/2016). Após a morte e assepsia do abdômen com álcool iodado, o peritônio foi exposto, realizando-se a retirada do exsudado peritoneal, que foi transferido para

tubos cônicos estéreis e mantido em banho de gelo. Seguindo a metodologia da literatura,⁹⁸ depois da contagem diferencial e ajuste para 5×10^6 macrófagos/mL, 100 μ L da suspensão celular foram adicionados em cada poço de uma placa estéril de poliestireno contendo 96 cavidades. Depois disto, cada placa foi incubada por 4h em estufa a 37°C com 5% CO₂ para adesão dos macrófagos no fundo de cada poço. Após esse tempo de incubação todos os poços foram lavados com meio RPMI à temperatura ambiente para se retirar células não aderidas, entre elas eventuais linfócitos e hemácias. Posteriormente se realizou a inserção dos compostos – em uma série de concentrações entre 300 a 1 μ g/mL por 24h – nos poços, junto aos macrófagos, para o ensaio de citotoxicidade, utilizando-se a técnica colorimétrica do MTT, como descrito no item anterior.

Os ensaios foram realizados frente a macrófagos peritoneais, em triplicatas, para cada amostra. A leitura da placa realizou-se em leitor de placa (*Infinite M200Pro*, *TECAN*), a 540 nm de filtro e 620 nm de referência. A intensidade da coloração, a partir da absorbância medida, é proporcional ao percentual de macrófagos vivos.

3.4.4. Avaliação *in vitro* da atividade antiprotozoa de compostos ativos contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

Para a avaliação da atividade antiparasitária contra formas amastigotas intracelulares, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram utilizadas numa concentração de aproximadamente 1×10^7 parasitos/mL.

Macrófagos peritoneais oriundos de camundongos Swiss foram obtidos conforme protocolo citado no item anterior. Depois da contagem e ajuste para 1×10^5 macrófagos/mL, 200 μ L da suspensão celular foram adicionados em cada poço, sobre lamínulas redondas (13 mm de diâmetro), em uma placa estéril de poliestireno contendo 24 cavidades. Após incubação da placa em estufa (37°C, 5 % de CO₂) para se promover a aderência dos macrófagos, parasitos foram adicionados na proporção 5:1 (promastigotas:macrófagos). A partir do melhor tempo de invasão e remoção dos parasitos não interiorizados, incubou-se a placa para permitir a replicação dos parasitos no interior do macrófago. Ao final desta etapa, as concentrações adequadas de cada amostra testada foram colocadas na presença dos macrófagos infectados. Depois da incubação, as lamínulas contendo o material celular foram removidas das placas e coradas com Giemsa para observação em microscopia ótica comum e contagem do número de amastigotas intracelulares em cada 100 macrófagos.^{92,99}

Todos os experimentos envolvendo animais foram realizados como indicado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), CEUA/FCF/CAr 44/2016, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista, UNESP-Araraquara.

3.4.5. Cálculo do Índice de seletividade (IS)

Baseado nos resultados de citotoxicidade dos macrófagos peritoneais de camundongo (CC₅₀) e dos parasitos (IC₅₀), a relação CC₅₀/IC₅₀ foi utilizada para determinar o índice de seletividade (IS).¹⁰⁰ Índices com valores superiores a 10 sugerem que o uso do composto pode ser considerado promissor.

3.5. Ensaios biológicos. Avaliação *in vivo* da mutagenicidade dos compostos sintetizados pelo teste de micronúcleo.

Para a avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos compostos sintetizados e padrões utilizou-se camundongos machos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com aproximadamente 30g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram mantidos em caixas durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23± 2 °C.

Para os tratamentos foram utilizados grupos de 5 animais. Cada grupo recebeu 25, 50 e 100 mg/Kg dos compostos sintetizados via gavagem. Foi estabelecido um grupo controle positivo, no qual os animais foram tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.). O grupo controle negativo recebeu via gavagem 0,3 ml da suspensão de goma arábica 5%.

3.5.1. Preparo das lâminas com laranja de acridina (acridine orange).

As lâminas, previamente lavadas, foram aquecidas em placa aquecedora a aproximadamente 70 °C. Colocou-se 10 µL de solução de laranja de acridina (1 mg/ml) sobre a lâmina quente e fez-se o espalhamento utilizando a extremidade de outra lâmina limpa. Estas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, a temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24h.

3.5.2. Obtenção do sangue e preparo das células.

Com o auxílio de uma agulha, perfurou-se a cauda do animal, coletando-se 10µL de sangue (uma gota) e depositando-o no centro da lâmina previamente corada, cobrindo-a com lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas a -20 °C e no escuro por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

A análise citológica das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, para evitar a deterioração do material biológico. Esta análise foi realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram contados 2000 reticulócitos por animal e quantificadas as frequências de células micronucleadas.

3.5.3. Análise estatística dos resultados.

Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os compostos, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico PRISMA.

3.6. Ensaios biológicos. Efeito inibitório sobre a enzima DHPS.

A atividade enzimática foi monitorada através de ensaio espectrofluorimétrico detectando-se a intensidade de fluorescência de NADH, conforme a sua produção na primeira etapa da reação mediada pela enzima DHPS. Para tanto, foi utilizado um espectrofluorímetro Synergy (BIOTEK), com o software KC4, modo Kinetics, onde o candidato a inibidor foi submetido à excitação com luz ultravioleta no filtro $\lambda=340/360\text{nm}$ e a fluorescência emitida foi detectada pelo filtro $\lambda=440/460\text{nm}$, medida em RFU (relative fluorescence units).¹⁰¹

Todas as reações foram feitas em triplicata, em placas de 96 poços opacas de poliestireno a 37°C. A composição do meio reacional foi: 0,2 M tampão glicina/NaOH pH 9,2, 10 µM de espermidina, 200 µM de NAD⁺, 200 nM de DHPS, 2 µM de eIF5A, água deionizada e inibidor diluído em DMSO, sendo o volume final de reação 200 µL.

DMSO 10% foi utilizado como controle negativo e 1 μ M de GC₇ foi utilizado como controle positivo de inibição.¹⁰¹ Primeiro realizou-se a triagem para determinar se os compostos possuíam atividade, e então na seqüência foi realizada a variação das concentrações dos compostos que obtiveram atividade inibitória maior que 30%.

Para realizar a triagem, parte da reação foi preparada em placa (tampão, NAD⁺, DHPS, 500 μ M do inibidor e H₂O). Após 1 minuto de incubação da molécula a ser testada com a enzima na solução descrita, foi adicionado a mistura de espermidina e eIF5A, agitou-se por 3 segundos e então iniciou-se a leitura da fluorescência do NADH presente. A duração do ensaio foi de 90 segundos e os resultados da fluorescência detectada foram armazenados em planilha Excel.¹⁰¹ Os dados de RFU foram normalizados e a atividade inibitória das moléculas foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \left(1 - \frac{\text{RFU composto}}{\text{RFU controle}} \right) \times 100$$

Os inibidores que apresentaram porcentagem de inibição maior que 30% foram testados em diferentes concentrações, com a finalidade de calcular a concentração dos compostos capaz de inibir 50% da enzima DHPS (IC₅₀). Foi utilizada a seguinte equação para o cálculo do IC₅₀:

$$V = \frac{V_{\text{máx}} \times [S]}{IC_{50} + [S]}$$

Onde V corresponde à velocidade da reação, V_{máx} corresponde à velocidade máxima da reação, [S] corresponde a concentração do substrato e IC₅₀ corresponde a concentrador do inibidor responsável por diminuir pela metade a velocidade da reação.¹⁰¹

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado na justificativa, em trabalhos anteriores realizados no LQOF, sintetizamos uma série de compostos guanidínicos^{68,87} onde estudou-se o isomerismo E/Z desses compostos através de diferentes técnicas de RMN (HSQC, HMBC, COSY, NOESY, além de experimentos à baixas temperaturas como –

60°C).^{68,87} Nesses estudos, concluímos que os compostos com os grupos *p*-substituintes na porção anilina *p*-Cl e *p*-Br existem principalmente como isômero *Z* com uma pequena proporção do isômero *E*, enquanto que os compostos com o grupo *p*-NO₂ apresentaram uma diminuição na proporção do isômero *Z*. Essas proporções foram determinadas através da diferença nos deslocamentos químicos do hidrogênio NH em cada um dos isômeros, como apresentado na figura 16.^{68,87}

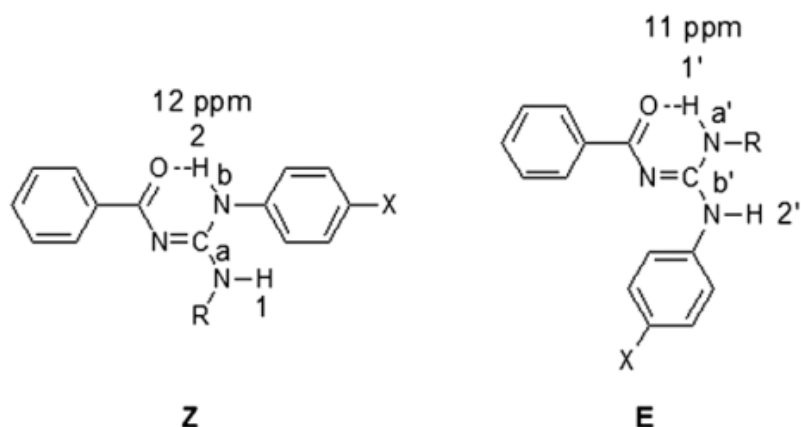
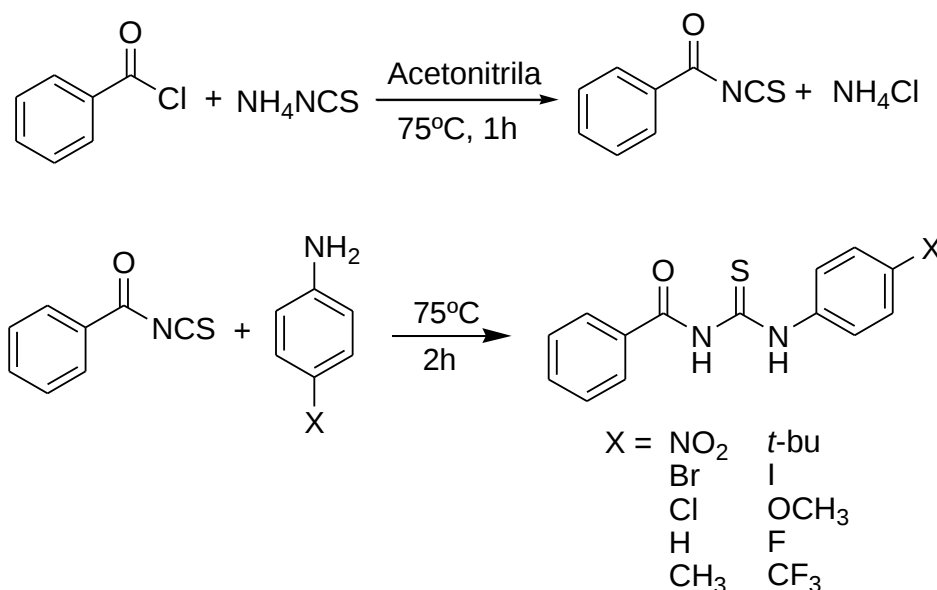


Figura 16. Estruturas dos isômeros *E* e *Z*.^{68,87}

Desta forma, diante dos resultados iniciais que obtivemos com alguns desses compostos na inibição da enzima DHPS humana, decidimos ampliar os derivados guanidínicos, o que deu origem aos compostos apresentados no presente trabalho.

As sínteses das guanidinas foram realizadas em três etapas, sendo que as duas primeiras etapas são comuns para todas as séries. Na primeira etapa sintetizou-se o isotiocianato de benzoíla, através da reação entre isotiocianato de amônio e cloreto de benzoíla utilizando acetonitrila como solvente à 75°C por 1 hora. A segunda etapa para a síntese das guanidinas envolve a reação entre o isotiocianato de benzoíla previamente sintetizado e uma anilina *p*-substituída (foram utilizadas a própria anilina, e também: *p*-nitro, *p*-bromo, *p*-cloro, *p*-metil, *p*-*t*-butil, *p*-iodo, *p*-metóxi e *p*-flúor anilina) à 75°C por 2 horas para a formação das respectivas tiouréias (esquema 2).



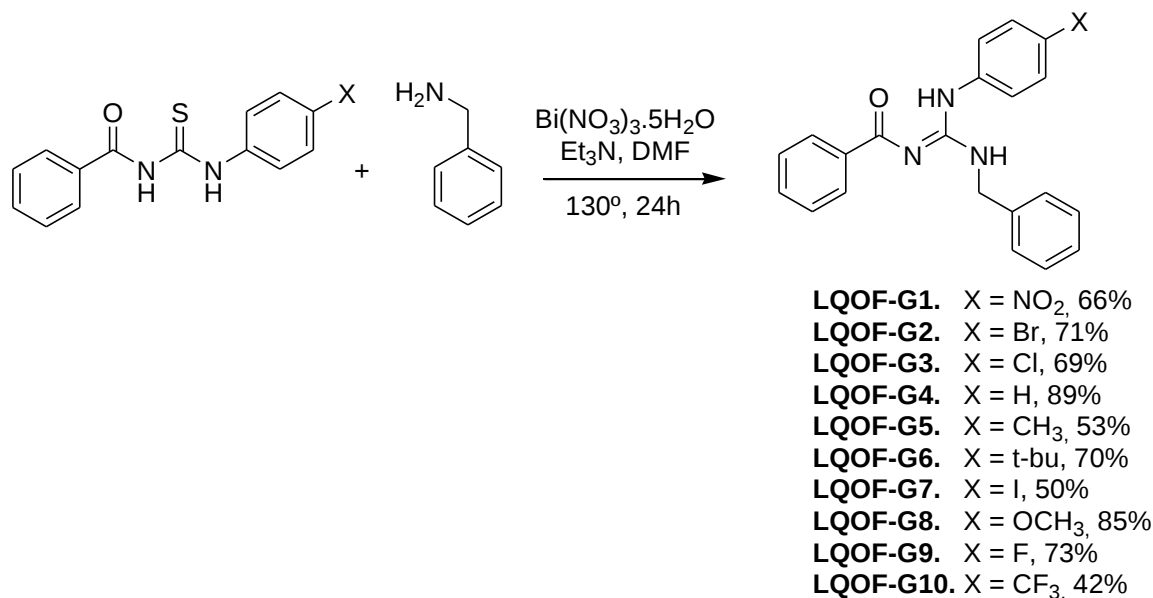
Esquema 2. Primeira etapa: Síntese do isotiocianato de benzoíla. Segunda etapa: Reação entre o isotiocianato de benzoíla e anilinas *p*-substituídas para formação das respectivas tiouréias.

A terceira etapa consiste finalmente na síntese das guanidinas através da reação entre as tiouréias pré-sintetizadas e uma amina.^{68,87} Existem diferentes metodologias na literatura para preparação de guanidinas,¹⁰² sendo que os métodos mais utilizados para síntese de benzoilguanidinas são através do uso de sais de mercúrio ou de bismuto.^{91,103} Esses dois métodos produzem rendimentos semelhantes das benzoilguanidinas, e, portanto, decidimos utilizar o método do nitrato de bismuto penta-hidratado,^{91,68,87} considerando a maior facilidade de trabalhar com os resíduos do catalisador (em comparação com os resíduos que seriam gerados pelo sal de mercúrio), e também por este ser um catalisador acessível comercialmente e de fácil manuseio (é um sólido cristalino estável e resistente à umidade).

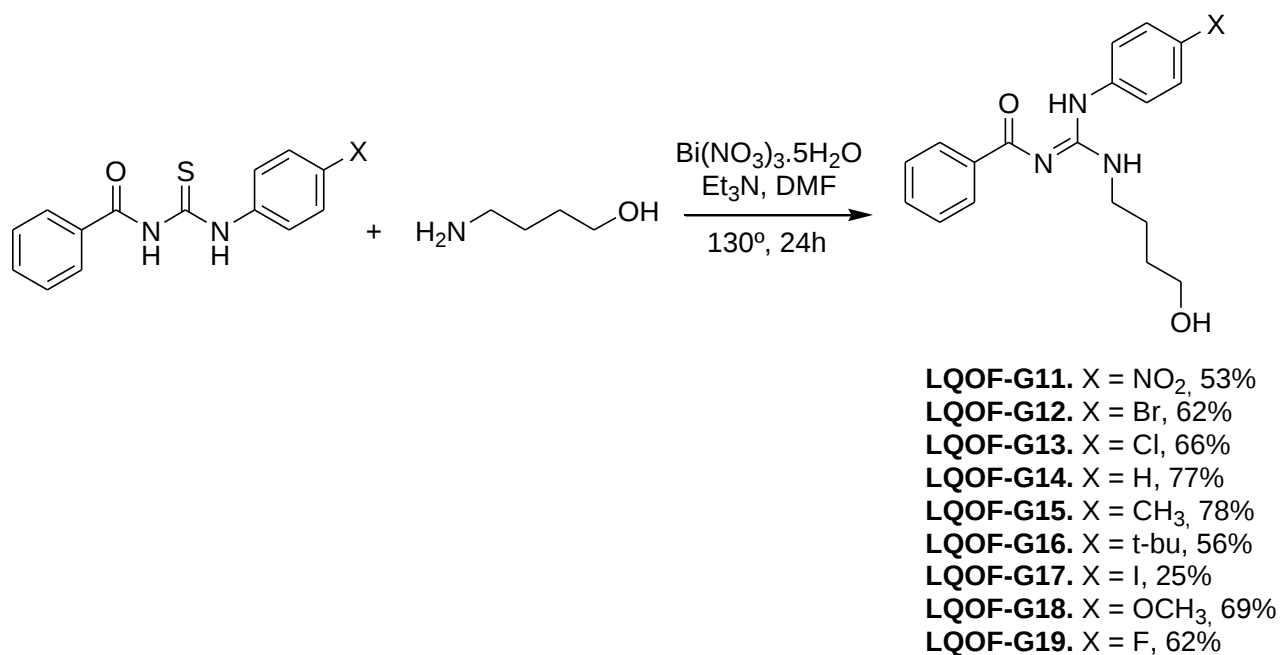
Desta forma as benzoiltiouréias obtidas na segunda etapa sintética foram utilizadas como intermediários para a síntese das guanidinas^{68,87} através da reação com benzilamina (para síntese dos compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10**, esquema 3) e com 4-aminobutanol (para síntese dos compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19**, esquema 4). A reação de quatro dessas tiouréias com espermidina também foi realizada na tentativa de sintetizar alguns dos compostos propostos no esquema 5.

Os compostos **LQOF-G1**, **LQOF-G2** e **LQOF-G3** (esquema 3) haviam sido sintetizados em trabalhos anteriores^{68,87} e avaliados na inibição enzimática da DHPS no ensaio *in vitro*. Os demais compostos foram sintetizados no presente trabalho com

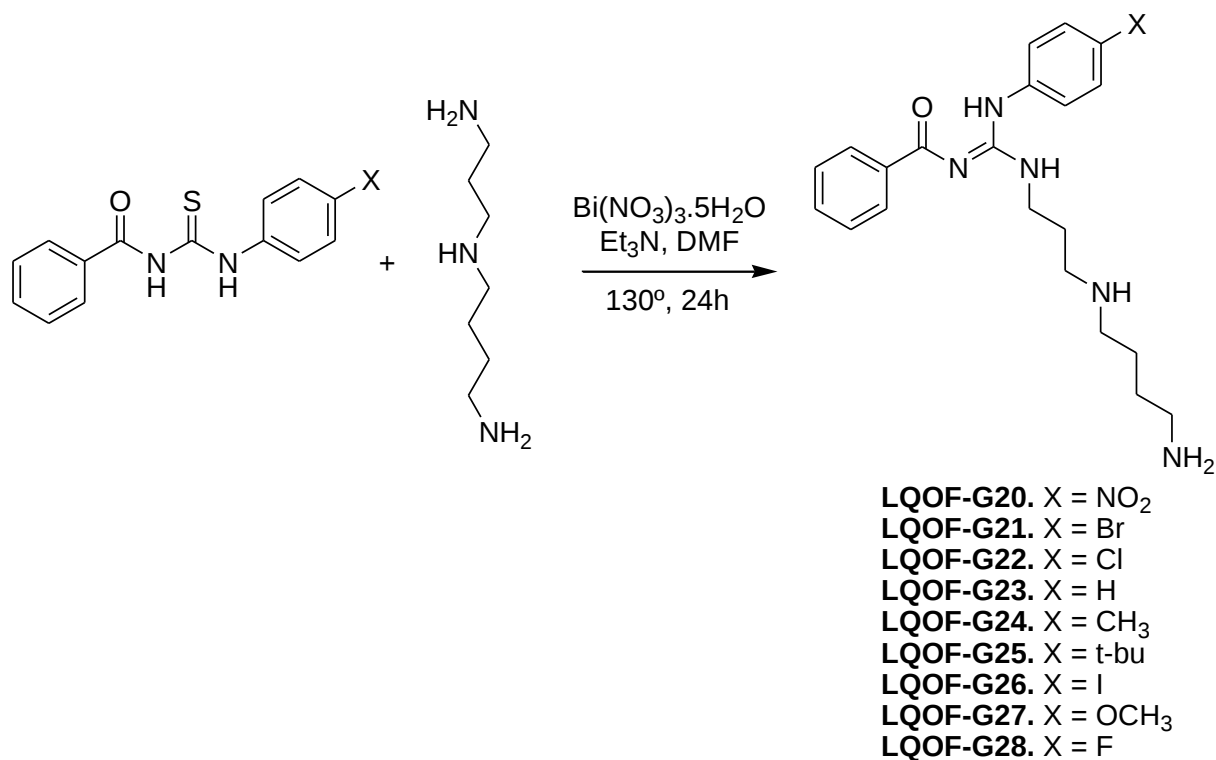
a intenção de avaliar suas atividades leishmanicidas frente as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, assim como estudar a inibição da enzima DHPS.



Esquema 3. Reação entre as diferentes tiouréias e benzilamina gerando os compostos **LQOF-G1 a LQOF-G10**.

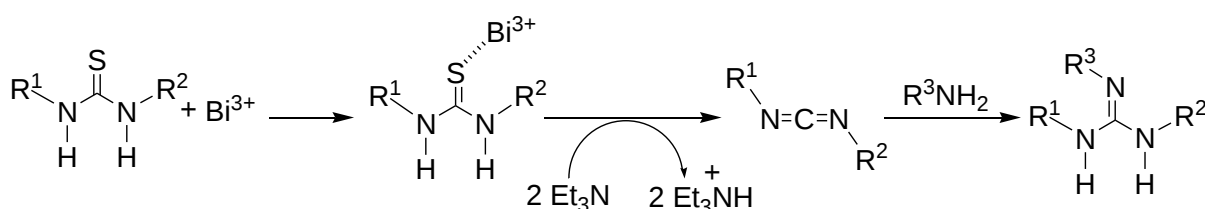


Esquema 4. Reação entre as diferentes tiouréias e 4-aminobutanol gerando os compostos **LQOF-G11 a LQOF-G19**.



Esquema 5. Esquema proposto para a síntese de amino-guanidinas derivadas da espermidina.

O ciclo catalítico proposto na literatura¹⁰⁴ para a guanilação promovida por sais de bismuto(III), assume que uma carbodiimida é o intermediário chave para a reação. Nesse mecanismo proposto, o Bi(III) deve atuar como um ácido de Lewis tiofílico coordenando a dessulfurização da tiouréia, seguido da reação desta com trietilamina, formando a respectiva carbodiimida. Essa carbodiimida reage então com a amina utilizada rendendo a guanidina. O mecanismo proposto na literatura é apresentado no esquema 6.¹⁰⁴



Esquema 6. Proposta de mecanismo guanilação promovida por sais de Bi(III). (Adaptado da ref 104).

4.1. Estudo das guanidinas por ESI-MS.

As guanidinas **LQOF-G1** a **LQOF-G10** (que possuem o substituinte benzila) foram caracterizadas por Espectrometria de Massas usando Ionização por Eletrospray em modo iônico positivo (ESI(+)-MS), que permitiu a detecção dos compostos como moléculas protonadas intactas com os correspondentes padrões isotópicos dos íons. As moléculas protonadas foram selecionadas e fragmentadas por experimentos de MS sequencial (ESI(+)-MS/MS). A Figura 17 apresenta os espectros de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS do composto **LQOF-G9** de $[M+H]^+ = 348$ como exemplo.

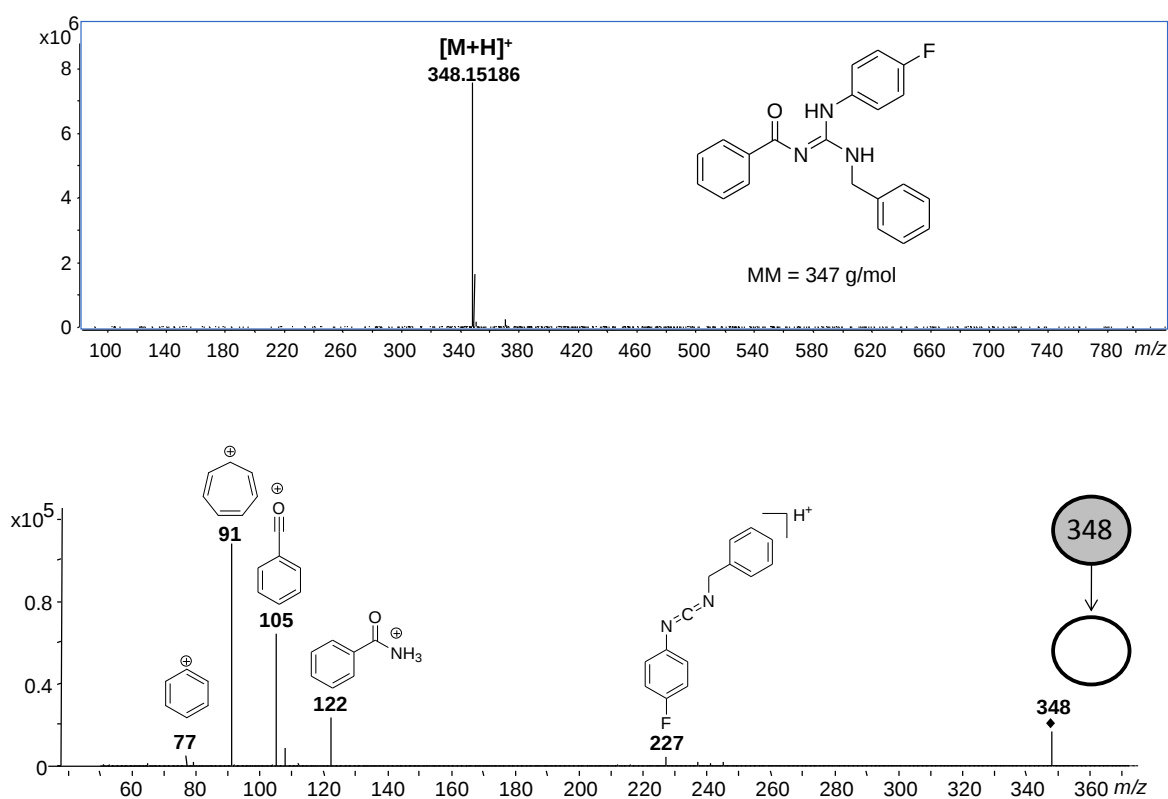


Figura 17. Espectro de ESI(+)-MS (acima) e ESI(+)-MS/MS (abaixo) do composto **LQOF-G9**.

Os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10** apresentaram os íons fragmentos de m/z 91, 105, 122 e 77 (figura 18), que correspondem aos cátions tropílio, benzoíla, benzamídeo e fenila, respectivamente.

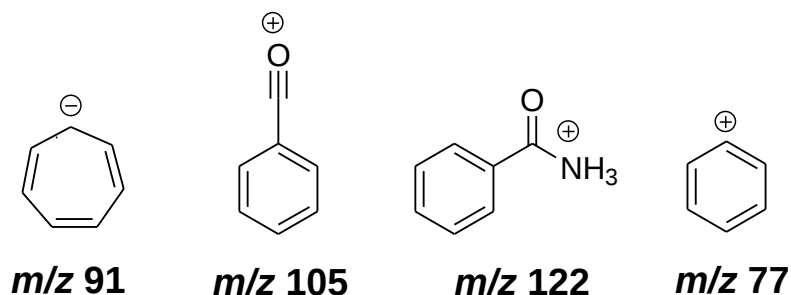
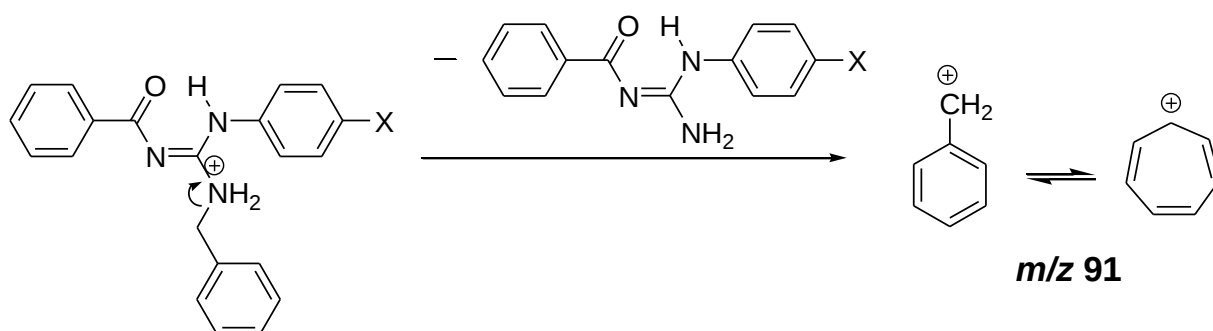


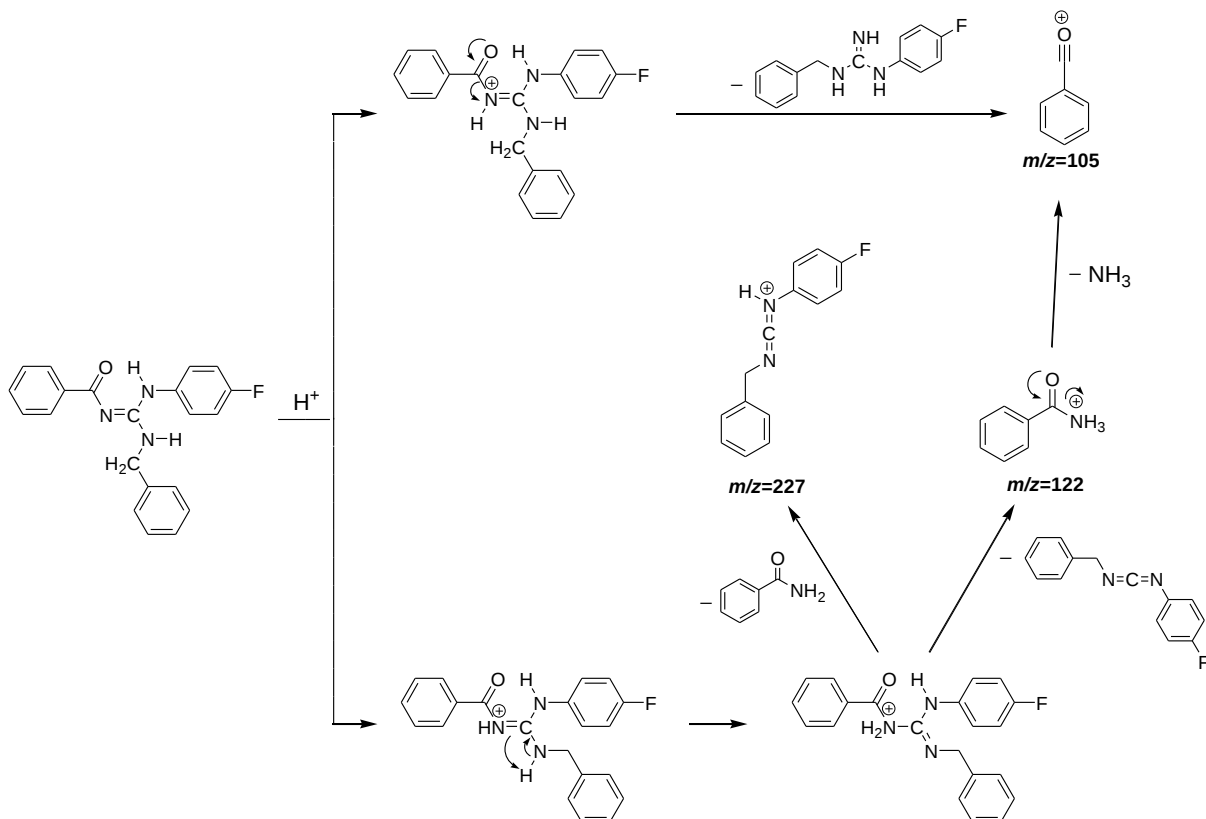
Figura 18. Íons fragmentos de m/z 91, 105, 122 e 77 observados para os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10** nos espectros de MS/MS.

O íon fragmento de m/z 91 é gerado através da protonação no nitrogênio alquílico, seguido da simples perda neutra das respectivas *N*-(*p*-substituído)fenil-*N*-(benzoil) guanidinas (esquema 7), e correspondem ao pico base para todos os compostos (exceto para **LQOF-G1**, onde o pico base observado foi o m/z 122).



Esquema 7. Formação do íon fragmento de m/z 91.

Os íons fragmentos de m/z 105 e 122 são gerados pela protonação no nitrogênio de amida, sendo que o íon de m/z 105 está associado com a perda neutra de *N*-(*p*-substituído)fenil-*N*-(benzil) guanidina, e o íon de m/z 122 envolve a eliminação de uma molécula neutra de *N*-(*p*-substituído)fenil-*N*-(benzil) carbodiimida. Os íons fragmentos correspondentes a perda neutra de benzamida (que corresponde ao íon de m/z 227 para o composto **LQOF-G9** apresentado no esquema 8) também estão presentes em pequenas intensidades para todos os compostos.



Esquema 8. Proposta para fragmentação dos compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10** (exemplo para o composto **LQOF-G9**).

As guanidinas **LQOF-G11** a **LQOF-G19** (que possuem o substituinte 4-hidroxibutila) foram também caracterizadas por Espectrometria de Massas usando Ionização por Eletrospray em modo iônico positivo (ESI(+)-MS), que permitiu a detecção dos compostos como moléculas protonadas intactas com os correspondentes padrões isotópicos dos íons. As moléculas protonadas foram selecionadas e fragmentadas por experimentos de MS sequencial (ESI(+)-MS/MS). A Figura 19 apresenta os espectros de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS do composto **LQOF-G18** de $[M+H]^+ = 342$ como exemplo.

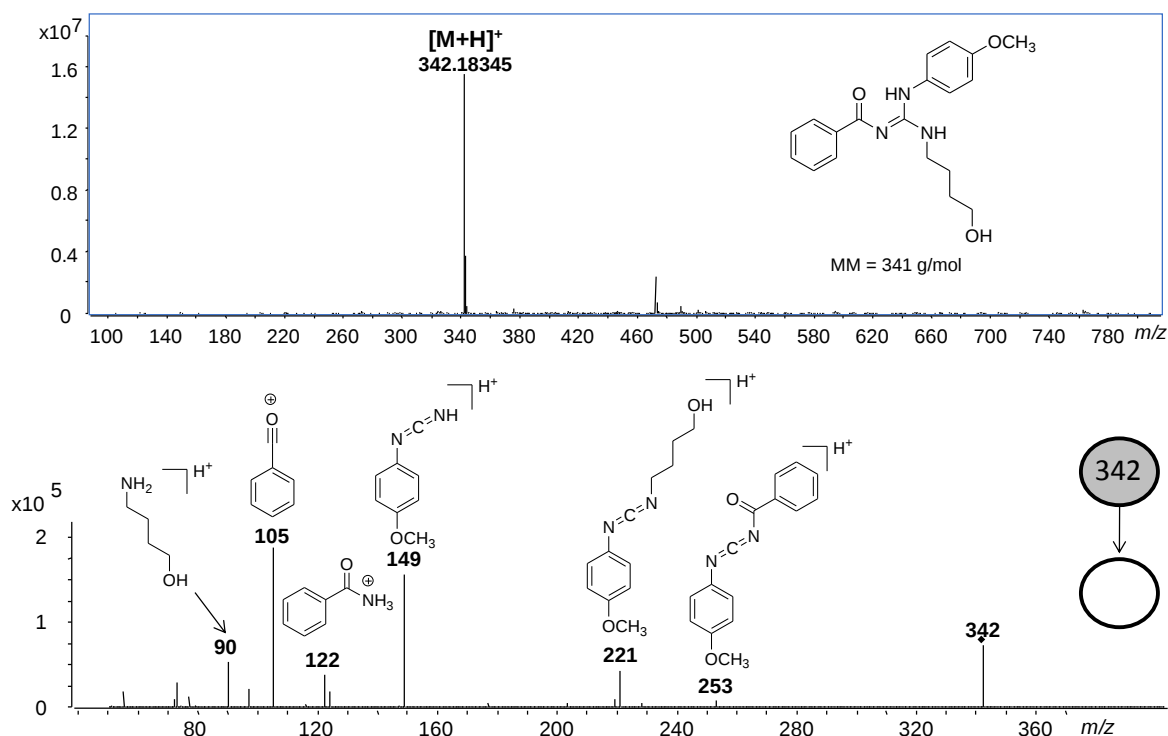
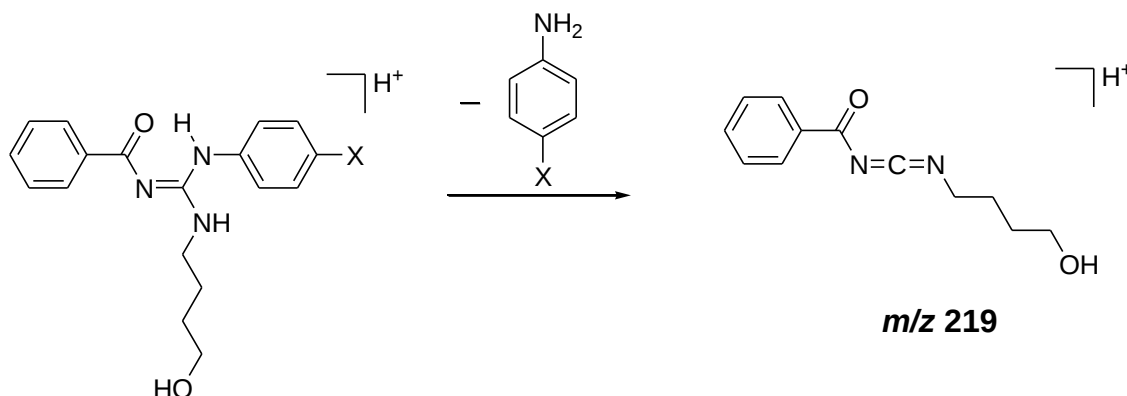


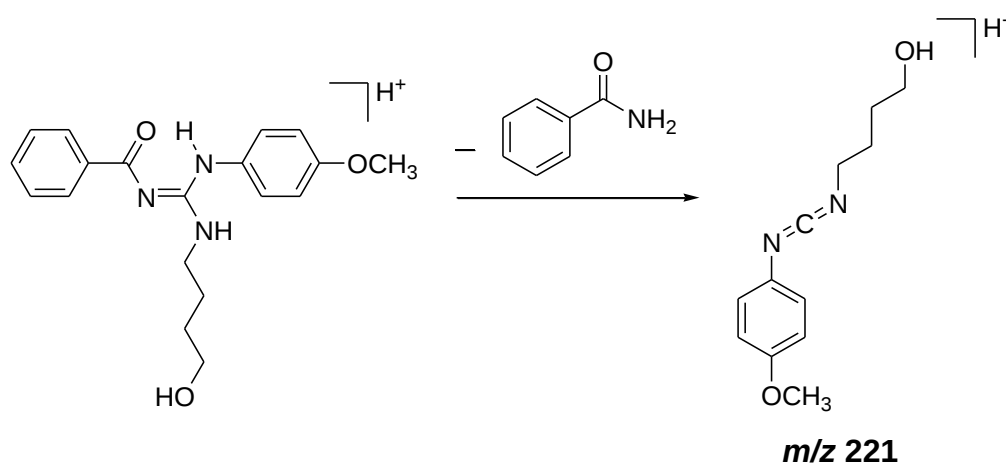
Figura 19. Espectros de ESI(+)-MS (acima) ESI(+)-MS/MS (abaixo) do composto LQOF-G18.

Os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19** apresentaram os íons fragmentos de m/z 105, 122, 90 e 219. Os fragmentos de m/z 105 e 122, correspondentes aos cátions benzoíla e benzamida, respectivamente, foram discutidos anteriormente (Figura 18). O íon de m/z 90 corresponde ao cátion da porção 4-amino-1-butanol. Já o íon fragmento de m/z 219 corresponde à perda neutra da respectiva anilina p -substituída (Esquema 9).

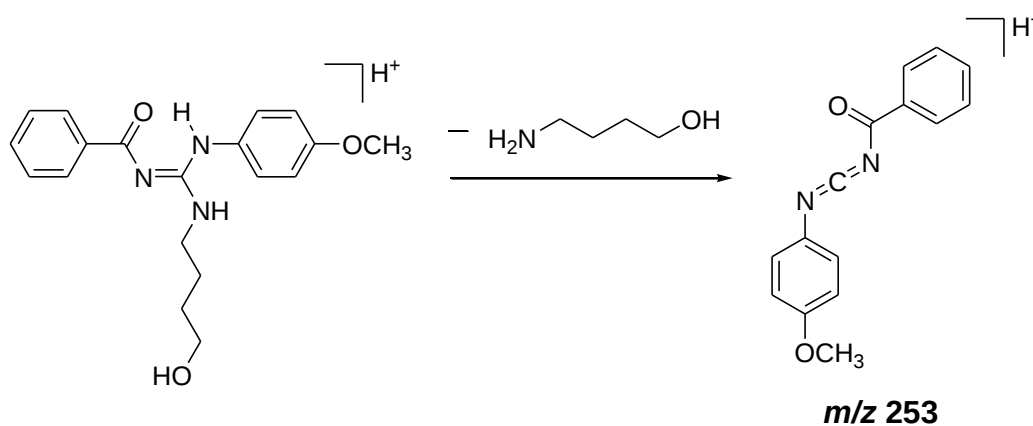


Esquema 9. Formação do íon fragmento de m/z 219.

Outras duas perdas neutras geram íons do tipo carbodiimida para os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19**. Na primeira, ocorre a perda neutra de uma molécula de benzamida gerando o cátion *N*-(*p*-substituído)fenil-*N*-(4-hidroxibutil)carbodiimida (m/z 221 no exemplo para o composto **LQOF-G18** apresentado no esquema 10). A outra envolve a perda neutra de uma molécula de 4-amino-1-butanol gerando o cátion *N*-(*p*-substituído)fenil-*N*-(benzoil)carbodiimida (m/z 253 no exemplo para o composto **LQOF-G18** apresentado no esquema 11).



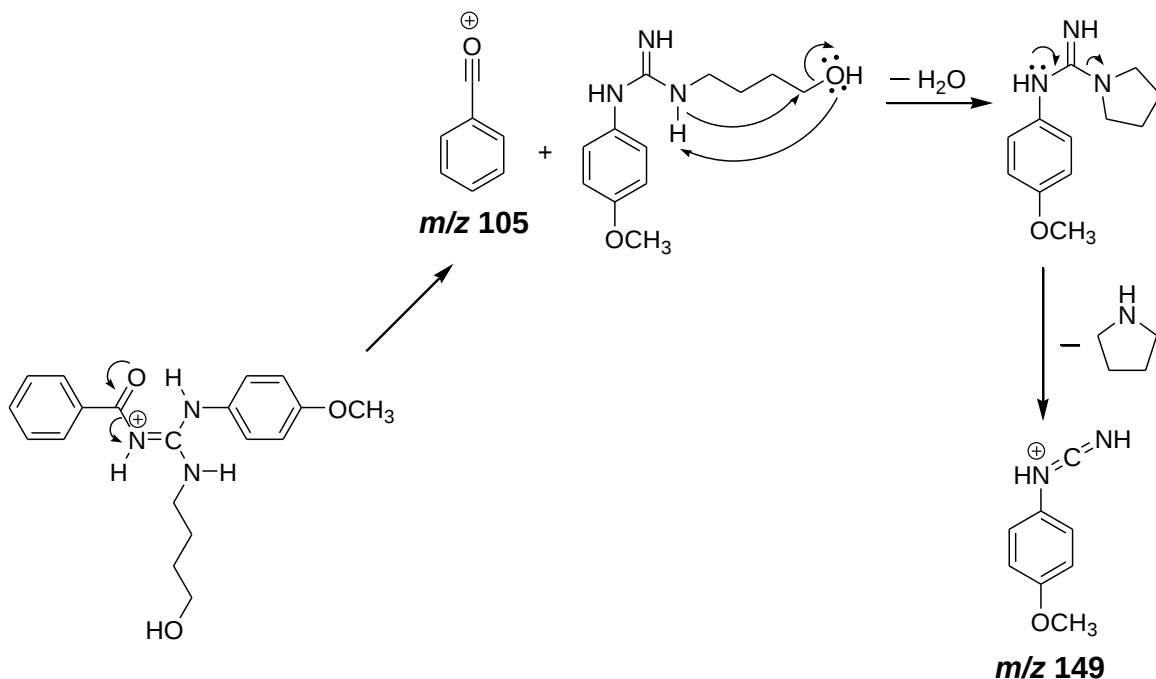
Esquema 10. Formação do íon fragmento de m/z 221.



Esquema 11. Formação do íon fragmento de m/z 253.

Além disso, todos os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19** apresentaram os cátions *N*-(*p*-substituído)fenilcarbodiimida com grande intensidade. Esses íons fragmentos podem ser formados através do caminho de fragmentação da formação da benzoíla (m/z 105). Como discutido no começo desta seção, a fragmentação para gerar o cátion benzoíla de m/z 105 resulta na eliminação da molécula neutra de *N*-(*p*-substituído)fenil-*N*-(4-hidroxibutil)guanidina. Esta molécula neutra eliminada pode

sofrer uma perda neutra de água seguido de uma perda neutra de pirrolidina gerando os cátions *N*-(*p*-substituído)fenilcarbodiimida (m/z 149 no exemplo para o composto **LQOF-G18** apresentado no esquema 12).



Esquema 12. Formação do íon fragmento *N*-(*p*-substituído)fenilcarbodiimida (m/z 149 para o exemplo com o composto **LQOF-G18**).

Finalmente, foi realizado no presente trabalho a tentativa de síntese de quatro compostos derivados da espermidina (**LQOF-G21**, **LQOF-G25**, **LQOF-G27** e **LQOF-G28**). Após o término do tempo reacional, foi realizado o mesmo procedimento de purificação utilizado para as demais guanidinas: filtragem em celite, seguido de lavagem com água gelada (3x15mL). Na etapa da lavagem com água das sínteses anteriores, esta extrai a trietilamina, o excesso de amina e o DMF, ficando o produto praticamente puro na fase orgânica. Ao realizar tal procedimento para os produtos da reação com espermidina, observou-se que a fase aquosa ficou com uma coloração marrom incomum, uma vez que os produtos costumam ficar na fase orgânica, indicando que o produto ficou na fase aquosa.

As respectivas fases aquosas obtidas dessas sínteses foram estudadas por Espectrometria de Massas usando Ionização por Eletrospray em modo iônico positivo (ESI(+)-MS). A figura 20 apresenta o espectro de ESI(+)-MS da fase aquosa do composto **LQOF-G28**. O íon correspondente ao produto desejado protonado ($[M+H]^+$

de m/z 386) apresentou-se com uma intensidade muito baixa, enquanto o íon de m/z 369, correspondente ao $[M+H-17]^+$ foi o principal íon observado. Esse íon correspondente ao produto protonado menos 17 pode ser atribuído à perda de uma molécula neutra de amônia, como no exemplo apresentado para o composto **LQOF-G28** na figura 21.

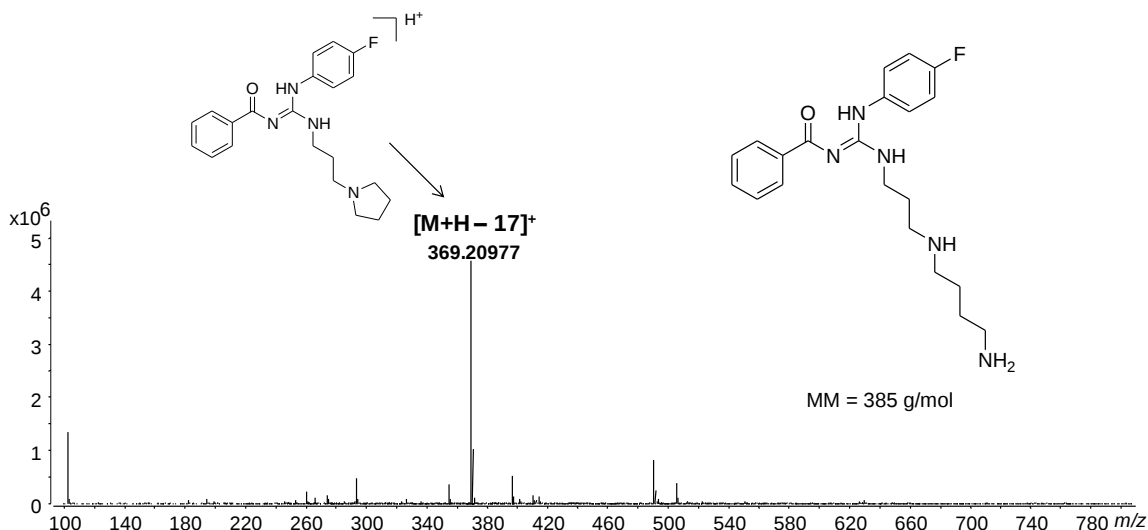


Figura 20. ESI(+)-MS do composto **LQOF-G28**.

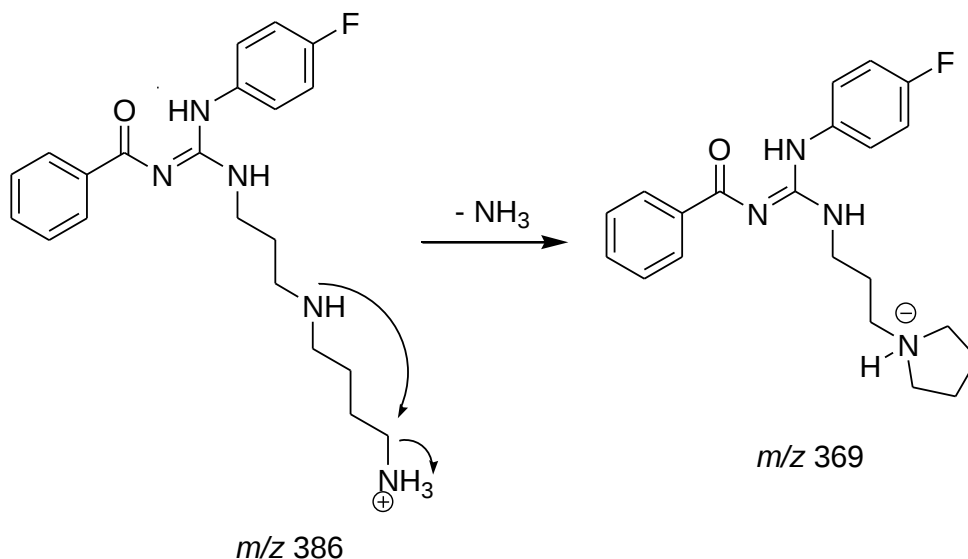


Figura 21. Perda de amônia neutra para formar o íon de m/z 369.

Essa perda de amônia neutra pode ter ocorrido durante a reação, e, portanto, o íon de m/z 369 seria o produto da reação, ou pode ter ocorrido um processo de fragmentação na fonte de ESI, onde a voltagem do cone e/ou o meio ácido

promoveram tal fragmentação, e neste caso o produto reacional seria o produto desejado de MM = 386 g/mol. Para investigar qual desses dois processos mencionados ocorreu, realizamos primeiro a análise de ESI(+)-MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 386 para verificar se o íon de m/z 369 seria formado como um íon fragmento. O espectro com a janela de seleção do íon precursor, assim como seu espectro de MS/MS são apresentados na figura 22. O íon de m/z 369 está presente no espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ como um dos fragmentos de maior intensidade, indicando que o aparecimento do íon de m/z 369 na análise por ESI-MS pode ter sido gerada por uma fragmentação na fonte ESI.

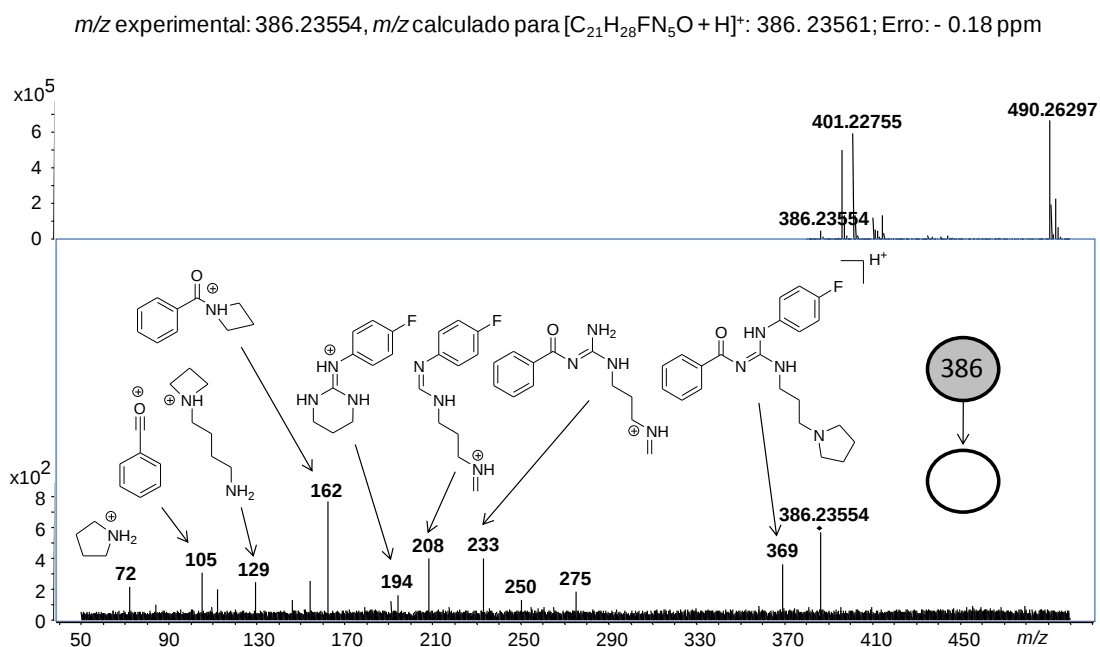


Figura 22. Faixa de seleção para o MS/MS (acima) e espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 386 (abaixo).

Na sequência, realizamos a análise de MS/MS do $[M+H-17]^+$ para obtermos a fragmentação do mesmo, caso este tenha sido formado durante a reação. Quando selecionamos o $[M+H-17]^+$ para fragmentação por dissociação induzida por colisão (CID), utilizando 20eV como energia de colisão (a mesma energia de colisão usada no experimento anterior do $[M+H]^+$), foi observado que houve pouca fragmentação (Figura 23). Este resultado também sugere que o $[M+H-17]^+$ observado no espectro de ESI-MS é um fragmento do $[M+H]^+$ formado na fonte ESI, pois é necessário uma

energia maior para fragmentar um fragmento, uma vez que esse já se dissociou para formar uma molécula estável.

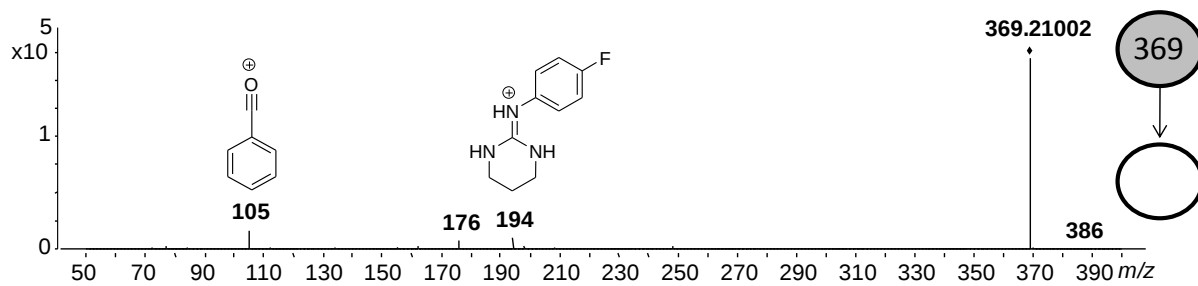


Figura 23. Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 369 do composto **LQOF-G28**.

Os outros três compostos sintetizados partindo-se da espermidina (**LQOF-G21**, **LQOF-G25** e **LQOF-G27**) apresentaram o mesmo padrão nas análises por ESI(+)-MS, ou seja, os respectivos sinais $[M+H]^+$ apresentaram-se com baixa intensidade enquanto os respectivos sinais $[M+H-17]^+$ foram observados. Em todos os casos, o $[M+H-17]^+$ foi observado como fragmento nas análises de MS/MS dos respectivos $[M+H]^+$. Os espectros de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS dos respectivos $[M+H]^+$ são apresentados nas figuras 24 a 29.

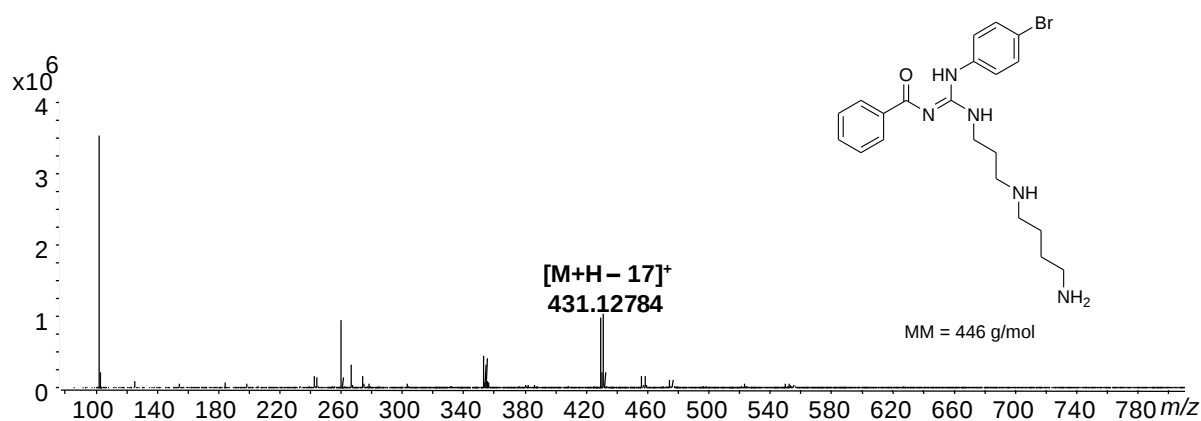


Figura 24. ESI(+)-MS do composto **LQOF-G21**.

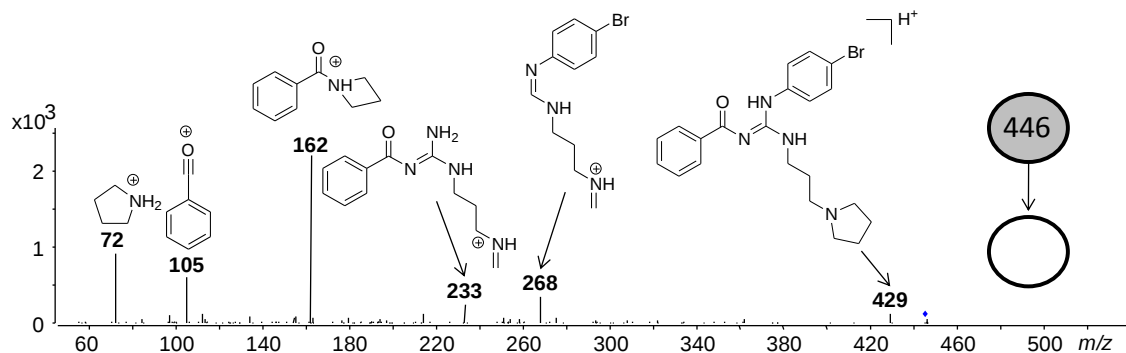


Figura 25. Espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 446 do composto LQOF-G21.

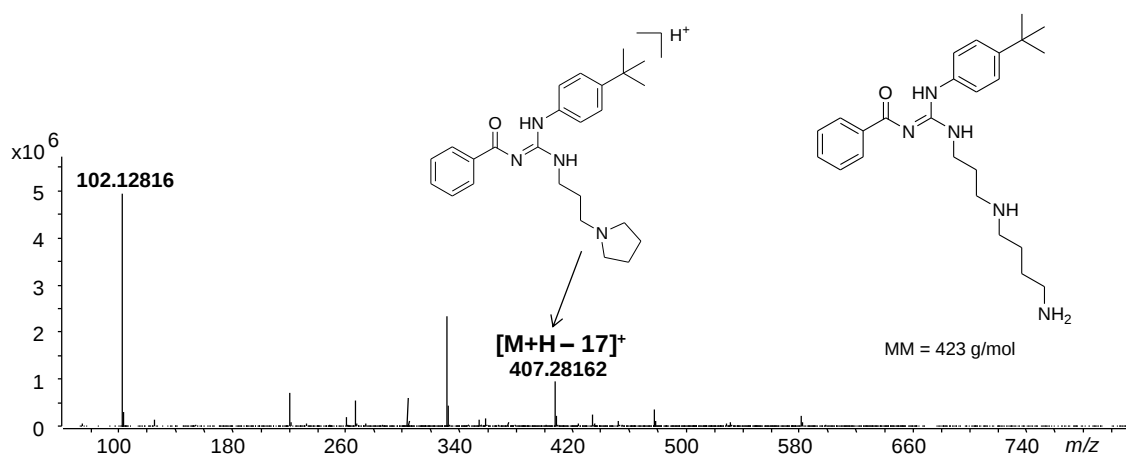


Figura 26. ESI(+)-MS do composto LQOF-G25.

m/z experimental: 424.30733, m/z calculado para $[C_{25}H_{37}N_5O + H]^+$: 424.30764; Erro: - 0.73 ppm

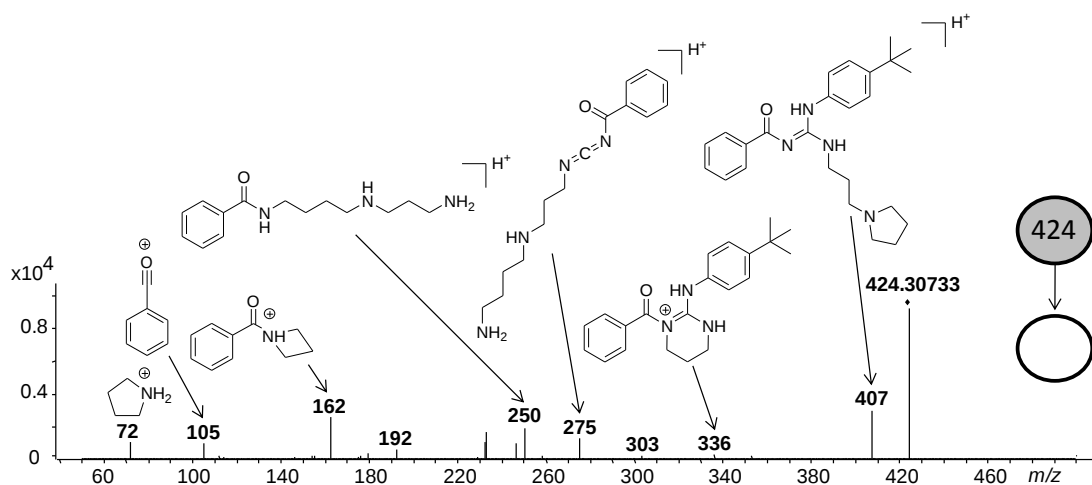


Figura 27. Espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 424 do composto LQOF-G25.

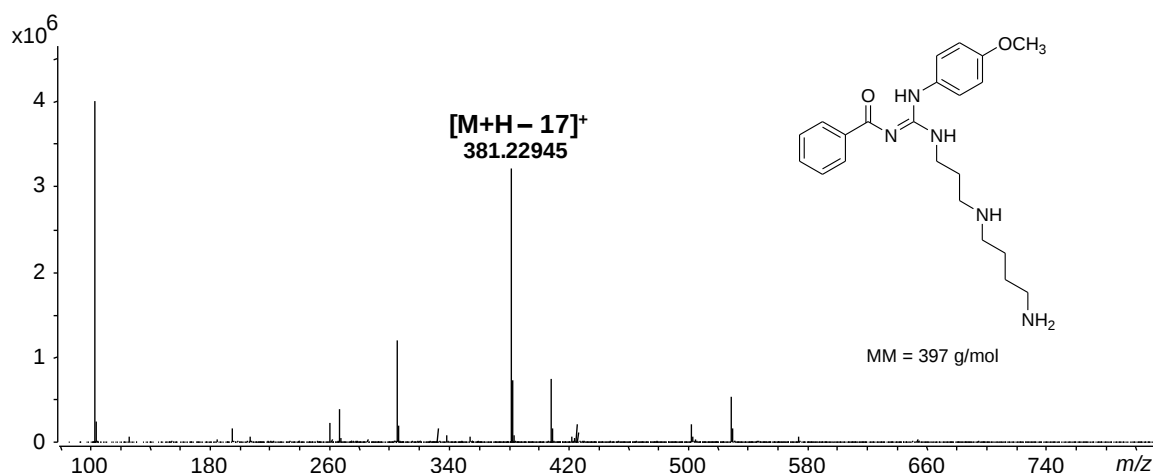


Figura 28. ESI(+)-MS do composto **LQOF-G27**.

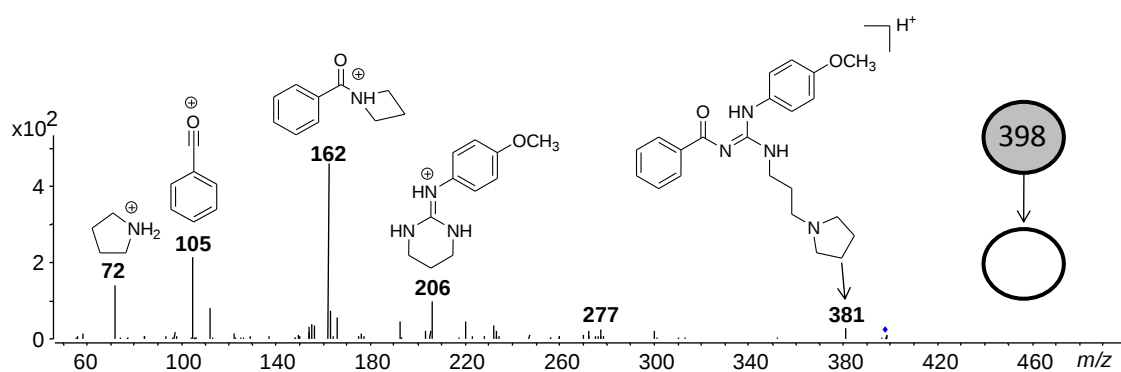


Figura 29. Espectro de MS/MS do $[M+H]^+$ de m/z 398 do composto **LQOF-G27**.

Como discutido para o composto **LQOF-G28**, os demais compostos também apresentaram pouca fragmentação quando o $[M+H-17]^+$ foi selecionado para os experimentos de MS/MS. Os espectros de MS/MS dos íons $[M+H-17]^+$ dos compostos **LQOF-G21**, **LQOF-G25** e **LQOF-G27** são apresentados nas figuras 30 a 32.

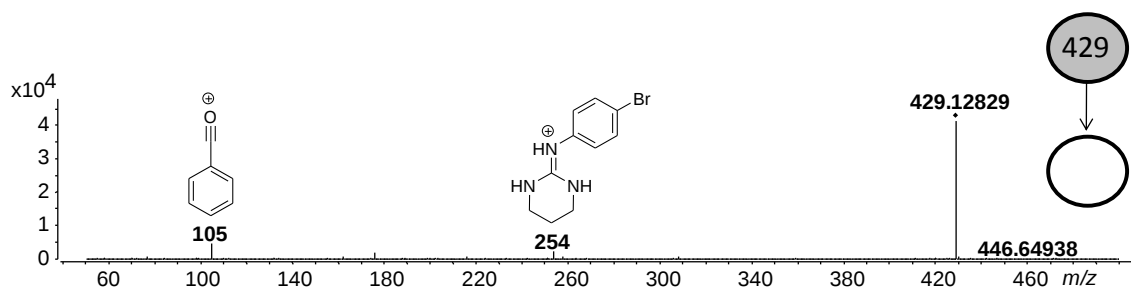


Figura 30. Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 429 do composto **LQOF-G21**.

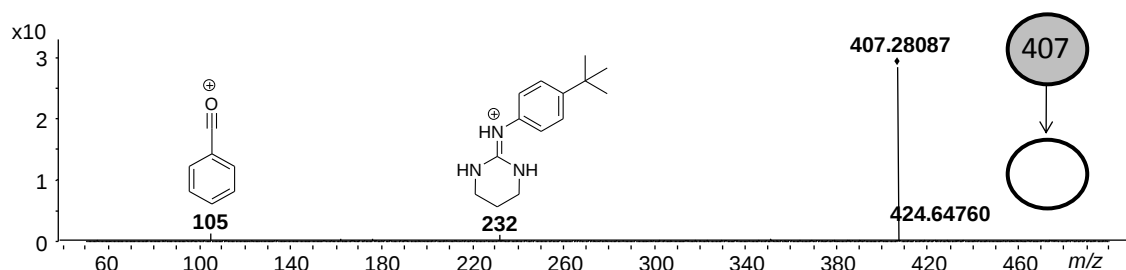


Figura 31. Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 407 do composto **LQOF-G25**.

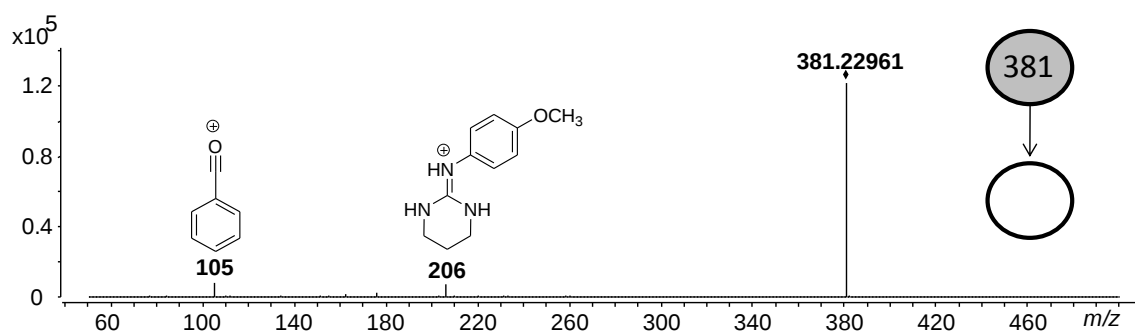


Figura 32. Espectro de MS/MS do $[M+H-17]^+$ de m/z 381 do composto **LQOF-G27**.

Portanto, dos experimentos realizados com as fases aquosas das quatro sínteses para formação das guanidinas derivadas da espermidina, a observação dos íons $[M+H-17]^+$ nos espectros de ESI(+)-MS, a constatação que esses íons $[M+H-17]^+$ são fragmentos dos respectivos $[M+H]^+$ em seus espectros de ESI(+)-MS/MS e o fato de que, quando selecionados para fragmentação, os íons $[M+H-17]^+$ fragmentam muito pouco, sugerem que tais íons ($[M+H-17]^+$) são gerados por fragmentação na fonte de ESI, e portanto, que foram obtidos os produtos desejados. Outros experimentos devem ser realizados para comprovar se os produtos de síntese são de fato os produtos esperados (ocorrendo a fragmentação na fonte de ESI) ou se essa perda de uma molécula de amônia ocorre durante a síntese.

Entretanto, pode-se observar pelas análises de ESI-MS que os compostos estão impuros, sendo a principal impureza a trietilamina utilizada como co-catalisador na reação, além de outros sub-produtos. Diante da observação dessas impurezas, tentou-se purificar o produto antes de realizar os experimentos de RMN. Ao medir o pH da solução aquosa do composto **LQOF-G27**, foi encontrado pH 3, e então, preparou-se uma solução saturada de bicarbonato de sódio, adicionou-se à solução até neutralizar e então realizou-se extração com clorofórmio (2x15mL). Ao evaporar o

clorofórmio, obteve-se um óleo marrom que foi analisado por ESI(+)-MS e observou-se o desaparecimento do sinal correspondente a trietilamina e de outras impurezas que estavam presentes anteriormente, estando portanto, o produto com uma pureza maior em relação a análise antes do tratamento com NaHCO_3 . Os espectros comparativos antes e depois do tratamento com NaHCO_3 do composto **LQOF-G27** são apresentados na figura 33.

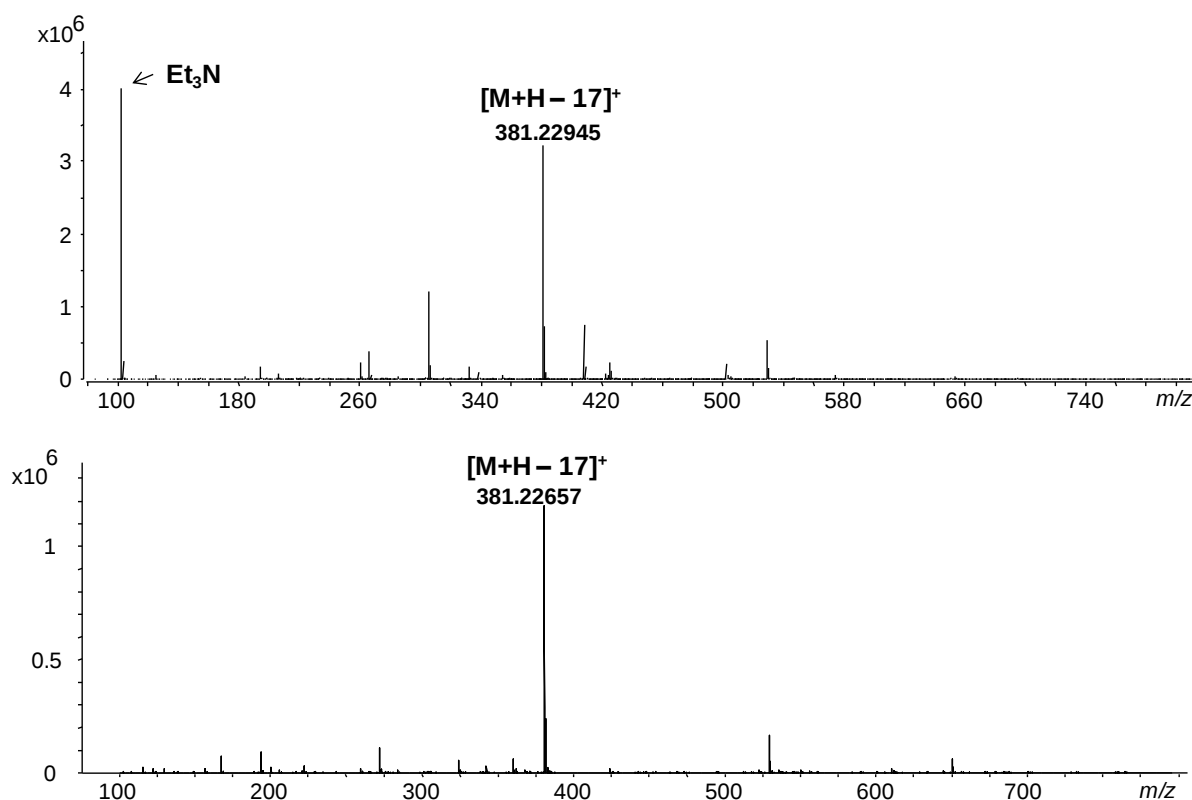


Figura 33. Espectro de ESI(+)-MS do composto **LQOF-G27**. Acima: antes do tratamento com bicarbonato de sódio. Abaixo: depois do tratamento com bicarbonato de sódio.

As demais sínteses utilizando-se a poliamina espermidina, o restante das caracterizações desses compostos (RMN, FT-IR e UV-Vis), assim como os testes biológicos desses compostos poliamínicos serão realizados em trabalhos futuros.

Realizamos também a tentativa de síntese de uma tris-guanidina (figura 34), utilizando 3 equivalentes de tiouréia para um equivalente de espermidina.

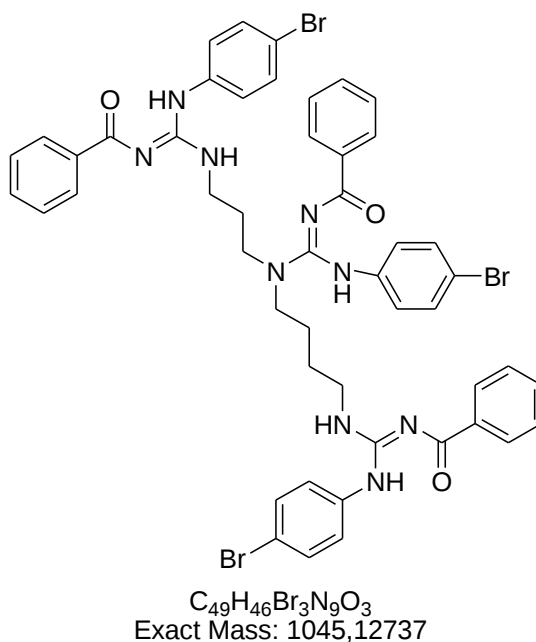
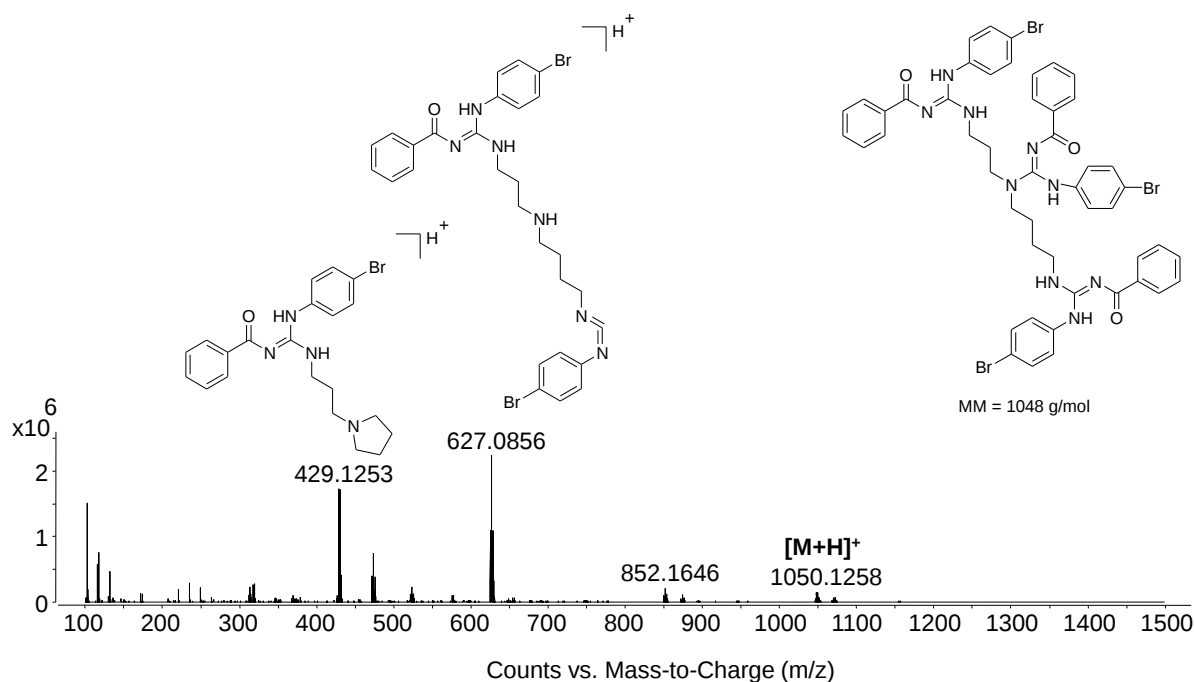


Figura 34. Estrutura da tris-guanidina.

O produto da reação foi analisado por Espectrometria de Massas usando ionização por Eletrospray em modo iônico positivo (ESI(+)-MS) e permitiu a detecção da tris-guanidina como molécula protonada intacta (m/z 1050) com o correspondente padrão isotópico dos íons. A molécula protonada foi selecionada e fragmentada por experimento de MS sequencial (ESI(+)-MS/MS). A Figura 35 apresenta os espectros de ESI(+)-MS e ESI(+)-MS/MS da tris-guanidina.



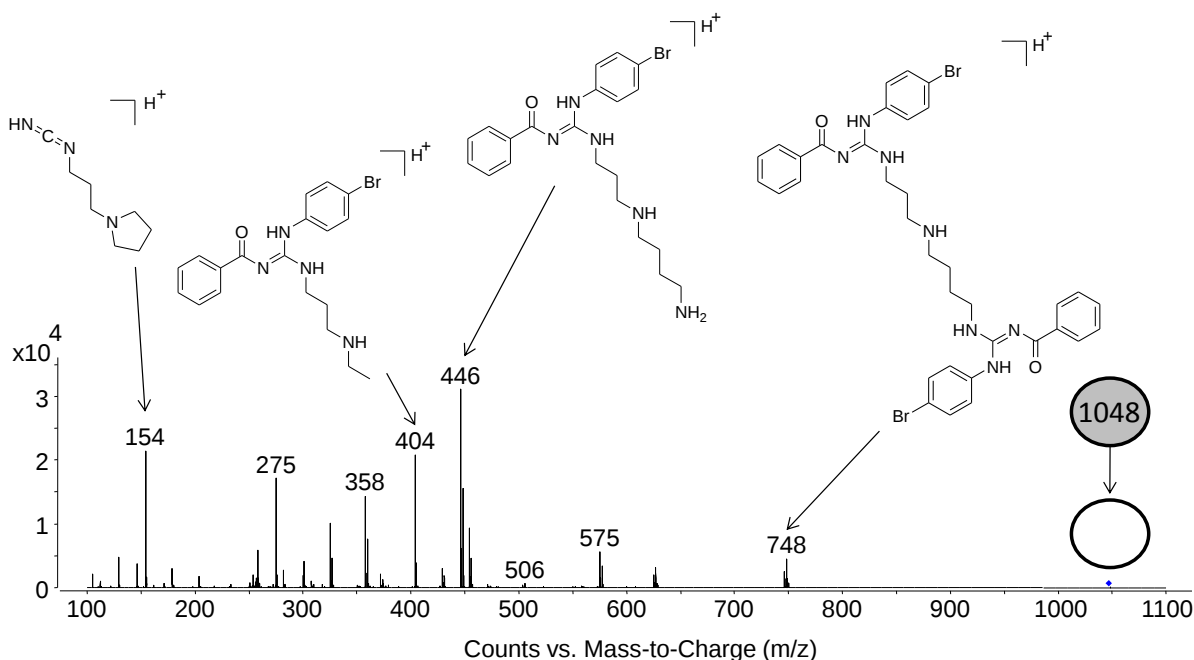


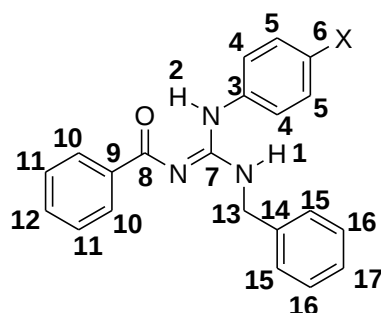
Figura 35. Espectros de ESI(+)-MS (acima) ESI(+)-MS/MS (abaixo) da tris-guanidina.

4.2. Estudo das guanidinas por RMN.

Os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10** também foram estudados por RMN de ^1H e de ^{13}C , assim como por DEPT 135, para confirmar a formação dos produtos desejados.

Os espectros de RMN de ^1H das guanidinas **LQOF-G1** a **LQOF-G10** mostram os sinais dos hidrogênios aromáticos (posições *H10*, *H11* e *H12*) em torno de 8.3, 7.4 e 7.5 ppm, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos do anel *p*-substituído (*H4* e *H5*) aparecem na região de 7.0-7.4 e 6.9-8.3 ppm, respectivamente, dependendo do grupo *p*-substituinte. O deslocamento químico dos hidrogênios NH foram observados em torno de ~ 5 e 12 ppm como sinais largos de baixa intensidade resultante da rápida interconversão configuracional entre os isômeros E e Z como publicado por nosso grupo em um trabalho anterior.^{68,87} A confirmação da formação das guanidinas é realizada pelo aparecimento dos hidrogênios metilênicos *H13* na região de 4.8 ppm e também dos hidrogênios aromáticos da benzila (*H15-H17*). A tabela 2 apresenta os principais deslocamentos químicos de ^1H (ppm) para os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10**. A figura 36 apresenta o espectro de RMN de ^1H do composto **LQOF-G6** como exemplo.

Tabela 2. Principais deslocamentos químicos de ^1H (ppm) para os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10**.



LQOF-G1. X = NO₂
LQOF-G2. X = Br
LQOF-G3. X = Cl
LQOF-G4. X = H
LQOF-G5. X = CH₃
LQOF-G6. X = t-bu
LQOF-G7. X = I
LQOF-G8. X = OCH₃
LQOF-G9. X = F
LQOF-G10. X = CF₃

Composto	H1	H2	H4	H5	X	H10	H12	H13	H15
LQOF-G1	5.99	12.63	7.36	8.23	-	8.29	7.50	4.92	7.42
LQOF-G2	5.45	12.15	7.14	7.53	-	8.29	7.56	4.85	7.41
LQOF-G3	5.44	12.16	7.21	7.42	-	8.29	7.56	4.85	7.40
LQOF-G4	5.26	12.22	7.30	7.44	7.42	8.30	7.50	4.82	7.38
LQOF-G5	5.18	12.05	7.20	7.16	2.35	8.28	7.47	4.78	7.34
LQOF-G6	5.27	12.09	7.19	7.40	1.31	8.27	7.47	4.80	7.36
LQOF-G7	5.16	12.21	7.02	7.70	-	8.25	7.49	4.76	7.36
LQOF-G8	5.06	11.93	7.19	6.92	3.81	8.28	7.46	4.77	7.35
LQOF-G9	5.08	12.09	7.09	7.25	-	8.26	7.46	4.77	7.34

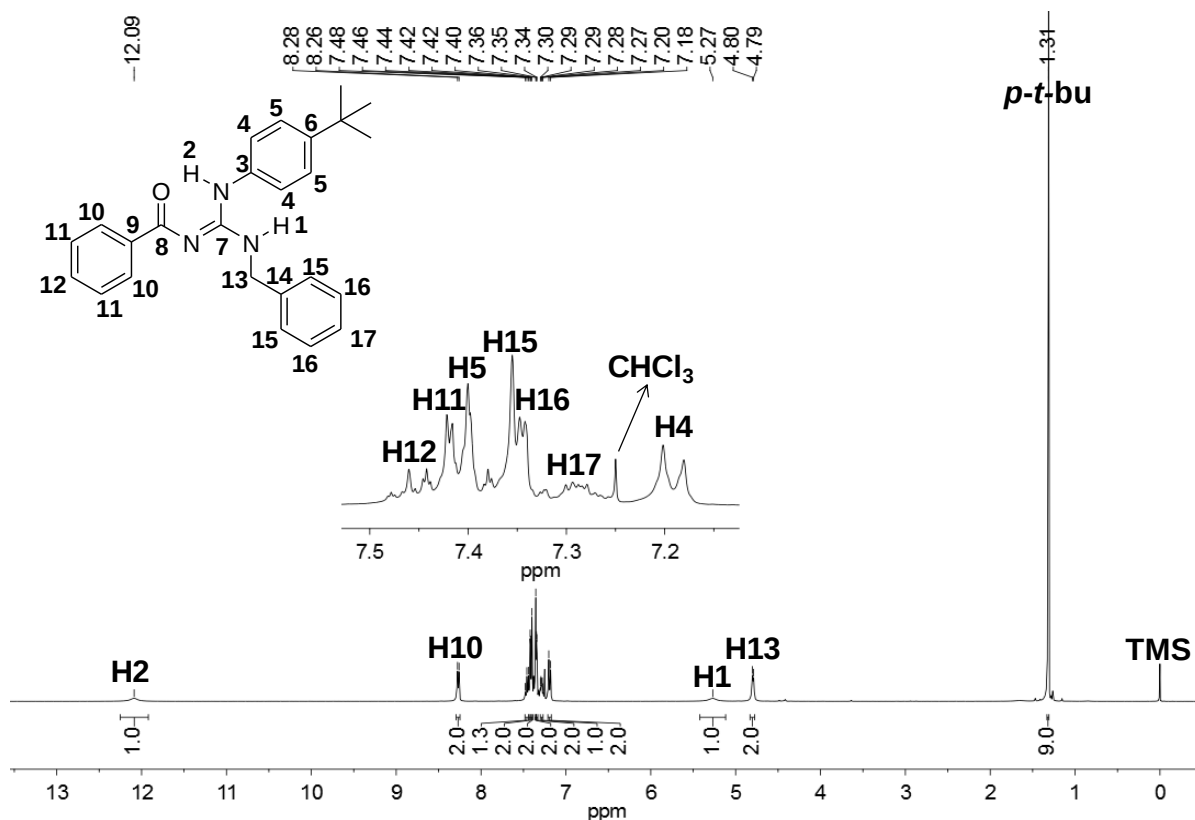
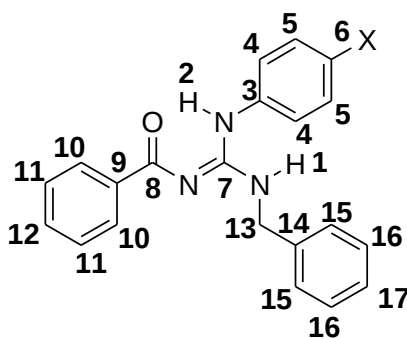


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H do composto **LQOF-G6**.

Os espectros de RMN de ^{13}C dos compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10** também comprovam a formação das guanidinas através da observação do sinal alquílico **C13**, dos sinais de carbonos aromáticos da porção benzila (**C14** – **C17**) adicionados a molécula e pelo aparecimento do sinal em torno de 158 ppm, característico de carbono guanidínico (**C7**). Os carbonos aromáticos foram observados na região de 120 a 145 ppm, e o carbono de carbonila (**C8**) sempre em torno de 177 ppm. A tabela 3 apresenta os principais deslocamentos químicos de ^{13}C (ppm) para os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10**. As figuras 37 e 38 apresentam, como exemplos, os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135, respectivamente, do composto **LQOF-G6**.

Tabela 3. Principais deslocamentos químicos de ^{13}C (ppm) para os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10**.



- LQOF-G1.** X = NO_2
LQOF-G2. X = Br
LQOF-G3. X = Cl
LQOF-G4. X = H
LQOF-G5. X = CH_3
LQOF-G6. X = t-bu
LQOF-G7. X = I
LQOF-G8. X = OCH_3
LQOF-G9. X = F
LQOF-G10. X = CF_3

Composto	C4	C5	X	C7	C8	C10	C12	C13	C15	C16
LQOF-G1	123.6	125.8	-	156.9	177.7	129.0	132.0	45.1	127.7	127.9
LQOF-G2	127.4	133.1	-	158.1	177.5	128.9	131.6	44.8	127.7	128.8
LQOF-G3	127.1	131.5	-	158.2	177.5	130.1	132.5	44.8	127.7	128.9
LQOF-G4	125.7	127.1	-	158.7	177.7	129.2	131.4	45.4	127.7	128.9
LQOF-G5	130.8	125.9	21.2	159.1	177.8	129.3	131.3	45.3	127.7	128.9
LQOF-G6	125.5	127.2	31.5	159.1	177.9	128.3	131.4	45.3	127.7	128.9
LQOF-G7	127.9	127.3	-	158.4	178.0	129.3	131.5	45.4	127.7	129.0
LQOF-G8	122.2	115,3	55.5	158.7	177.7	129.2	131.1	45.2	127.7	128.8
LQOF-G9	129.1	127.0	-	159.0	177.9	129.2	131.3	45.3	127.7	128.8

^aNão observado

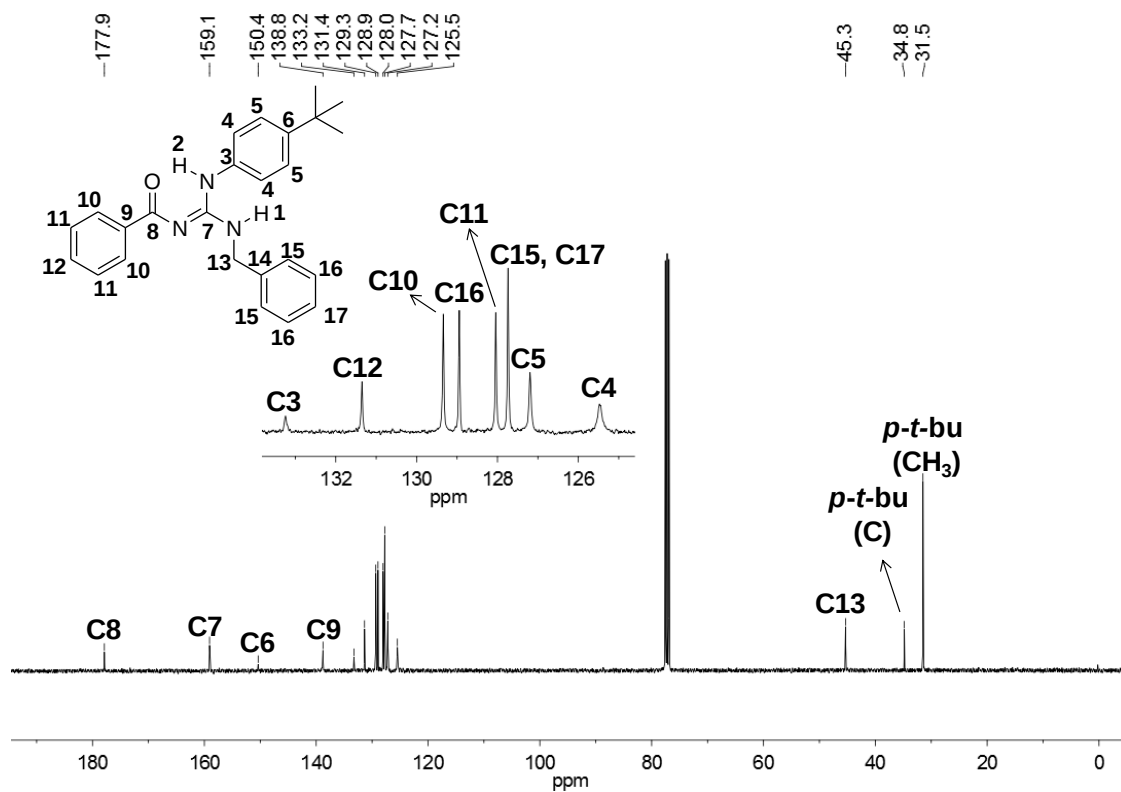


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C do composto LQOF-G6.

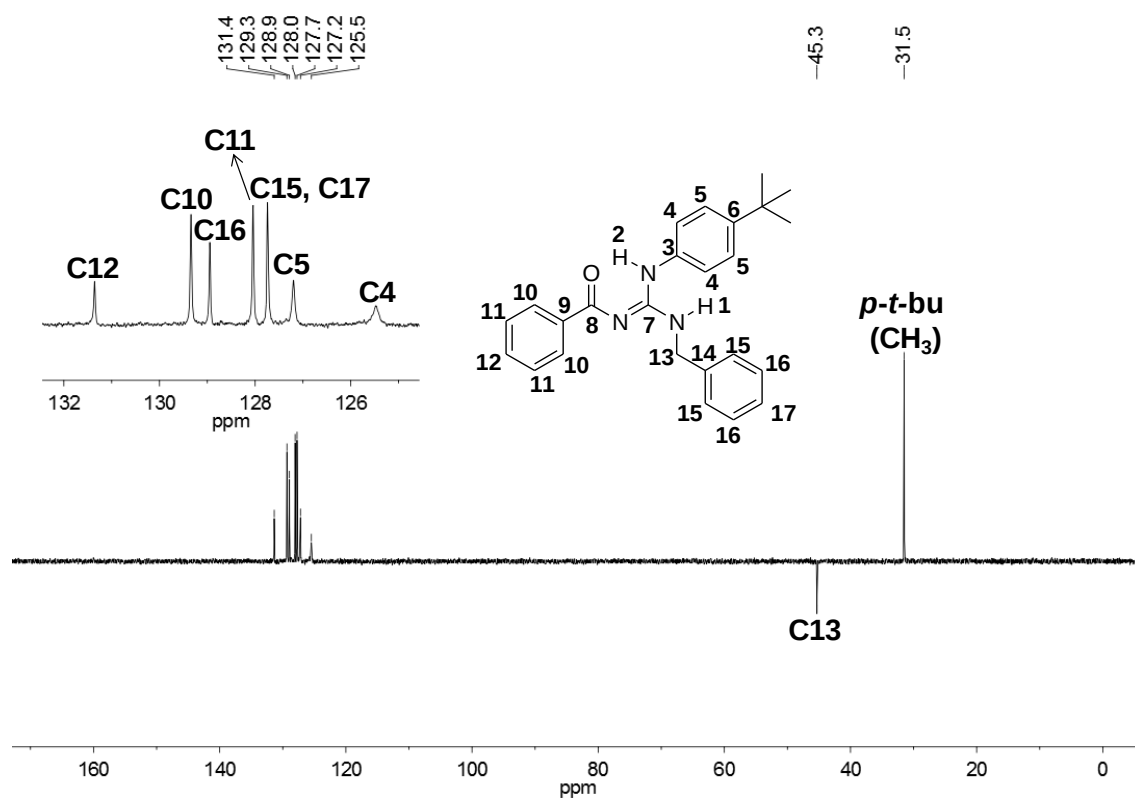
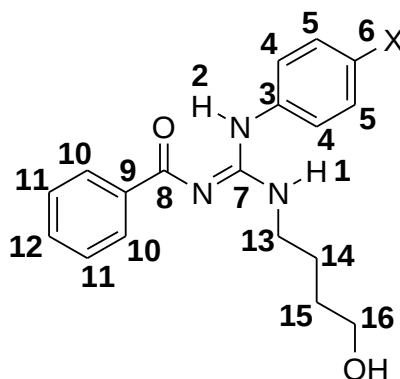


Figura 38. Espectro de DEPT 135 do composto LQOF-G6.

Os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19** também foram estudados por RMN de ^1H e de ^{13}C , assim como por DEPT 135, para confirmar a formação dos produtos desejados.

Os espectros de RMN de ^1H das guanidinas **LQOF-G11** a **LQOF-G19** mostram os sinais dos hidrogênios aromáticos (posições *H10*, *H11* e *H12*) em torno de 8.2, 7.4 e 7.5 ppm, respectivamente. Os hidrogênios aromáticos do anel *p*-substituído (*H4* e *H5*) aparecem na região de 7.0-7.4 e 6.9-8.3 ppm, respectivamente, dependendo do grupo *p*-substituente. O deslocamento químico dos hidrogênios NH foram observados em torno de ~ 5 e 12 ppm como sinais largos de baixa intensidade resultante da rápida interconversão configuracional entre os isômeros E e Z como publicado por nosso grupo em um trabalho anterior.^{68,87} A confirmação da formação das guanidinas é realizada pelo aparecimento dos hidrogênios alquílicos *H13* – *H16* da porção 4-hidroxibutil na região de 1.6 a 3.8 ppm no espectro. A tabela 4 apresenta os principais deslocamentos químicos de ^1H (ppm) para os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19**. A figura 39 apresenta o espectro de RMN de ^1H do composto **LQOF-G18** como exemplo.

Tabela 4. Principais deslocamentos químicos de ^1H (ppm) para os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19**.



LQOF-G11. X = NO₂
LQOF-G12. X = Br
LQOF-G13. X = Cl
LQOF-G14. X = H
LQOF-G15. X = CH₃
LQOF-G16. X = t-bu
LQOF-G17. X = I
LQOF-G18. X = OCH₃
LQOF-G19. X = F

Composto	H1	H2	H4	H5	X	H10	H12	H13	H16
LQOF-G11	n.o ^a	n.o ^a	7.43	8.24	-	7.88	7.60	3.56	3.79
LQOF-G12	5.25	12.05	7.16	7.47	-	8.20	7.49	3.55	3.65
LQOF-G13	5.15	12.11	7.22	7.38	-	8.23	7.48	3.58	3.68
LQOF-G14	5.21	12.07	7.27	7.39	7.27	8.24	7.46	3.56	3.64
LQOF-G15	5.10	11.94	7.21	7.16	2.36	8.24	7.47	3.57	3.66
LQOF-G16	5.13	11.97	7.20	7.41	1.33	8.24	7.47	3.58	3.66
LQOF-G17	5.25	12.07	7.04	7.71	-	8.19	7.48	3.55	3.67
LQOF-G18	5.00	11.81	7.17	6.93	3.80	8.24	7.48	3.55	3.63
LQOF-G19	5.09	11.96	7.24	7.09	-	8.21	7.47	3.55	3.65

^aNão observado

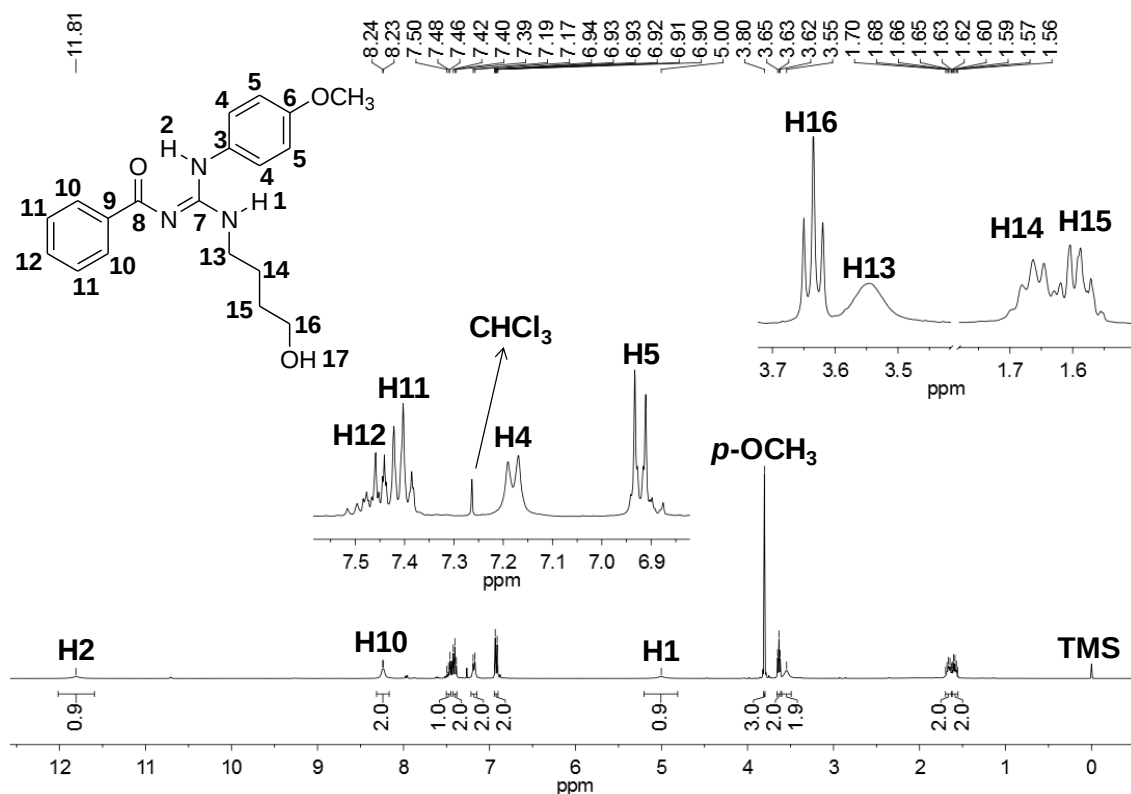
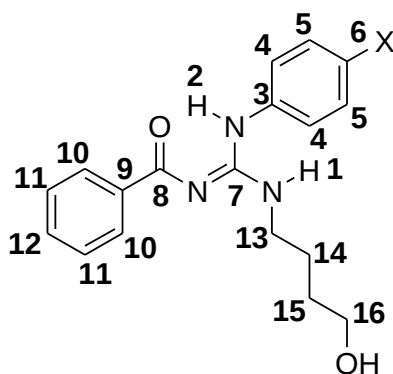


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H do composto **LQOF-G18**.

Os espectros de RMN de ^{13}C dos compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19** também comprovam a formação das guanidinas através da observação dos sinais alquílicos *C13* – *C16* da cadeia 4-hidroxibutil, na região de 26 a 62 ppm. Outra evidencia da formação dos produtos é o aparecimento do sinal em torno de 159 ppm, característico de carbono guanidínico (*C7*). Os carbonos aromáticos foram observados na região de 115 a 150 ppm, e o carbono de carbonila (*C8*) sempre em torno de 177 ppm. A tabela 5 apresenta os principais deslocamentos químicos de ^{13}C (ppm) para os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19**. As figuras 40 e 41 apresentam, como exemplos, os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135, respectivamente, do composto **LQOF-G18**.

Tabela 5. Principais deslocamentos químicos de ^{13}C (ppm) para os compostos **LQOF-G11** a **LQOF-G19**.



LQOF-G11. X = NO_2
LQOF-G12. X = Br
LQOF-G13. X = Cl
LQOF-G14. X = H
LQOF-G15. X = CH_3
LQOF-G16. X = t-bu
LQOF-G17. X = I
LQOF-G18. X = OCH_3
LQOF-G19. X = F

Composto	C4	C5	X	C7	C8	C10	C12	C13	C15	C16
LQOF-G11	119.5	125.1	-	n.o	n.o	129.0	132.6	41.3	26.6	62.8
LQOF-G12	127.2	133.1	-	158.7	177.7	129.1	131.7	41.5	26.6	62.5
LQOF-G13	127.0	130.2	-	158.8	177.9	129.2	131.5	41.4	26.6	62.6
LQOF-G14	125.6	130.0	-	158.7	177.5	129.0	131.3	41.2	26.4	62.4
LQOF-G15	125.9	130.7	21.2	159.1	177.5	129.1	131.4	41.4	26.5	62.5
LQOF-G16	125.5	127.1	(CH_3)31.5 (C)34.8	159.1	177.5	129.2	131.3	41.4	26.6	62.5
LQOF-G17	n.o	n.o	-	n.o	n.o	128.9	131.5	41.4	26.8	62.4
LQOF-G18	122.2	115.1	55.5	158.5	177.4	129.0	131.1	41.2	26.4	62.4
LQOF-G19	n.o	116.8	-	159.0	177.7	129.0	131.3	41.3	26.4	62.4

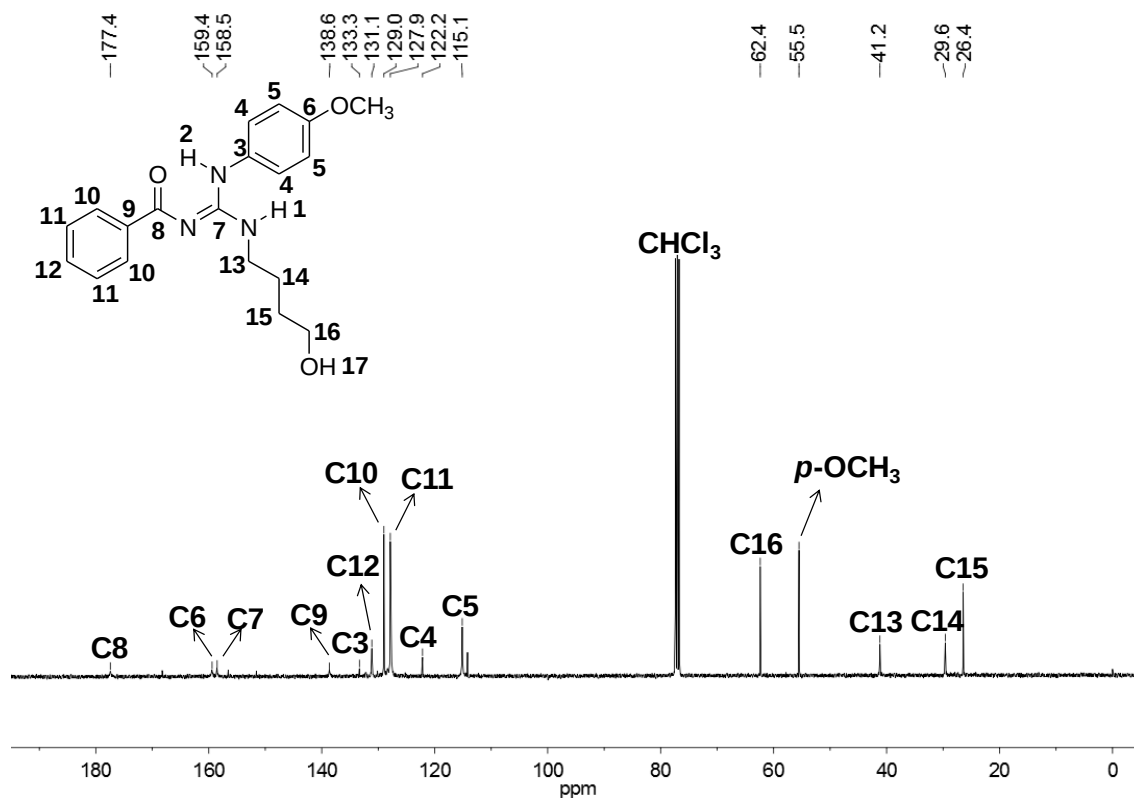


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C do composto LQOF-G18.

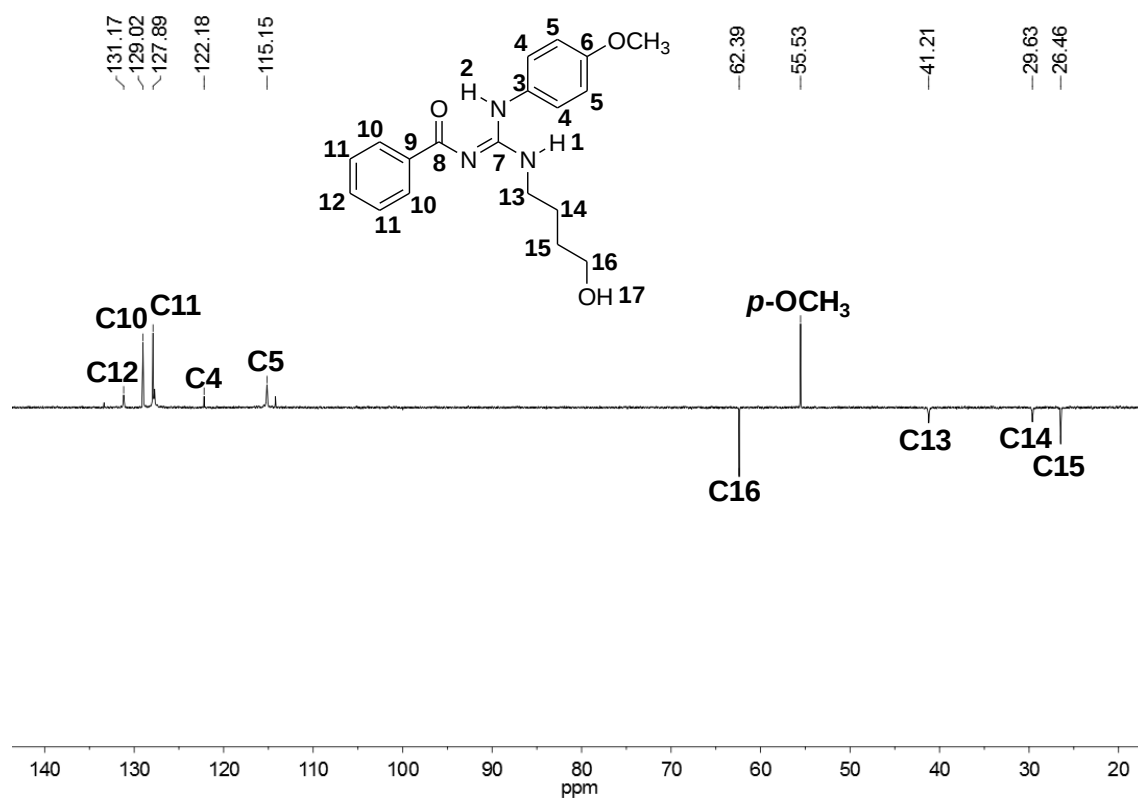


Figura 41. Espectro de DEPT 135 do composto LQOF-G18.

4.3. Estudo das guanidinas por FT-IR.

Alguns dos principais compostos foram também caracterizados por FT-IR. A transformação das tiouréias nas respectivas guanidinas foi confirmada pelo desaparecimento da banda de absorção em 1262 cm^{-1} que está associada ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{S})$, e pelo aparecimento da banda de absorção em $\sim 1566\text{ cm}^{-1}$ característico do estiramento $\nu(\text{C}=\text{N})$.^{24,72} Outra comprovação da formação das guanidinas é a observação das bandas características dos grupos alquílicos adicionados às moléculas na transformação. Essas bandas absorvem na região de 2800 a 2960 cm^{-1} e são característicos de estiramento $\nu(\text{C}-\text{H})$ de grupos metilênicos dos grupos benzila ou 4-hidroxibutila.^{24,72} As guanidinas apresentaram também bandas de absorção na região de 3200 a 3400 cm^{-1} que são característicos do estiramento $\nu(\text{N}-\text{H})$, na região de 3010 - 3100 cm^{-1} e 1590 - 1610 que são associadas ao estiramento $\nu(\text{C}-\text{H})$ e $\nu(\text{C}-\text{C})$ aromático, respectivamente, e as bandas de absorção observadas na região de 1630 - 1730 cm^{-1} que são característicos do estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ de grupos carbonílicos.^{24,72} Os compostos hidroxilados também apresentaram uma banda ao redor de 3450 cm^{-1} referente ao estiramento $\nu(\text{O}-\text{H})$ do substituinte 4-hidroxibutil. As bandas mais importantes observadas nos espectros dos compostos estudados são mostradas na tabela 6.

Tabela 6. Valores das principais bandas de absorção na região do infravermelho (cm^{-1}).

Composto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C-H})_{ar.}$	$\nu(\text{C-H})_{al.}$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$
LQOF-G1	3423	3027	2930	1630	1556
LQOF-G2	3432	3062	2930	1653	1559
LQOF-G3	3435	3064	2931	1653	1558
LQOF-G4	3413	3067	2918	1654	1566
LQOF-G5	3412	3027	2918	1651	1566
LQOF-G6	3323	3060	2959	1696	1566
LQOF-G7	3353	3055	2931	1654	1566
LQOF-G8	3376	3065	2933	1652	1565
LQOF-G9	3353	3055	2931	1654	1566
LQOF-G11	3371	3094	2947	1633	1563
LQOF-G12	3355	3062	2946	1701	1568
LQOF-G13	3357	3063	2948	1715	1567
LQOF-G16	3291	3065	2948	1651	1567
LQOF-G18	3297	3094	2935	1652	1568
LQOF-G19	3317	3067	2937	1651	1567

4.4. Estudo das guanidinas por UV-Vis.

Alguns compostos foram também caracterizados por Espectroscopia de Absorção na região do UV-Vis em soluções de concentração 1×10^{-5} M de DMSO.

Todos os compostos apresentaram a banda de absorção na faixa de 272 – 274 nm que corresponde ao λ_{max} desses compostos e foram atribuídos à absorção do grupo guanidínico.^{24,72} Compostos similares aos estudados no presente trabalho, possuem também uma banda correspondente à transferência de carga do grupo amino para o anel aromático.^{24,72} Entretanto, essas bandas muitas vezes não são observadas pois possuem absorções na região de 260 nm e, portanto, tal banda fica sobreposta à banda de absorção referente ao núcleo guanidínico. Apenas em dois

dos compostos estudados por UV-Vis (**LQOF-G8** e **LQOF-G18**) foi possível observar a banda de transferência de carga em 260 e 259 nm, respectivamente.

A Figura 42 apresenta o espectro do composto **LQOF-G4** como exemplo. A tabela 7 apresenta os comprimentos de onda de absorção observados para os compostos estudados.

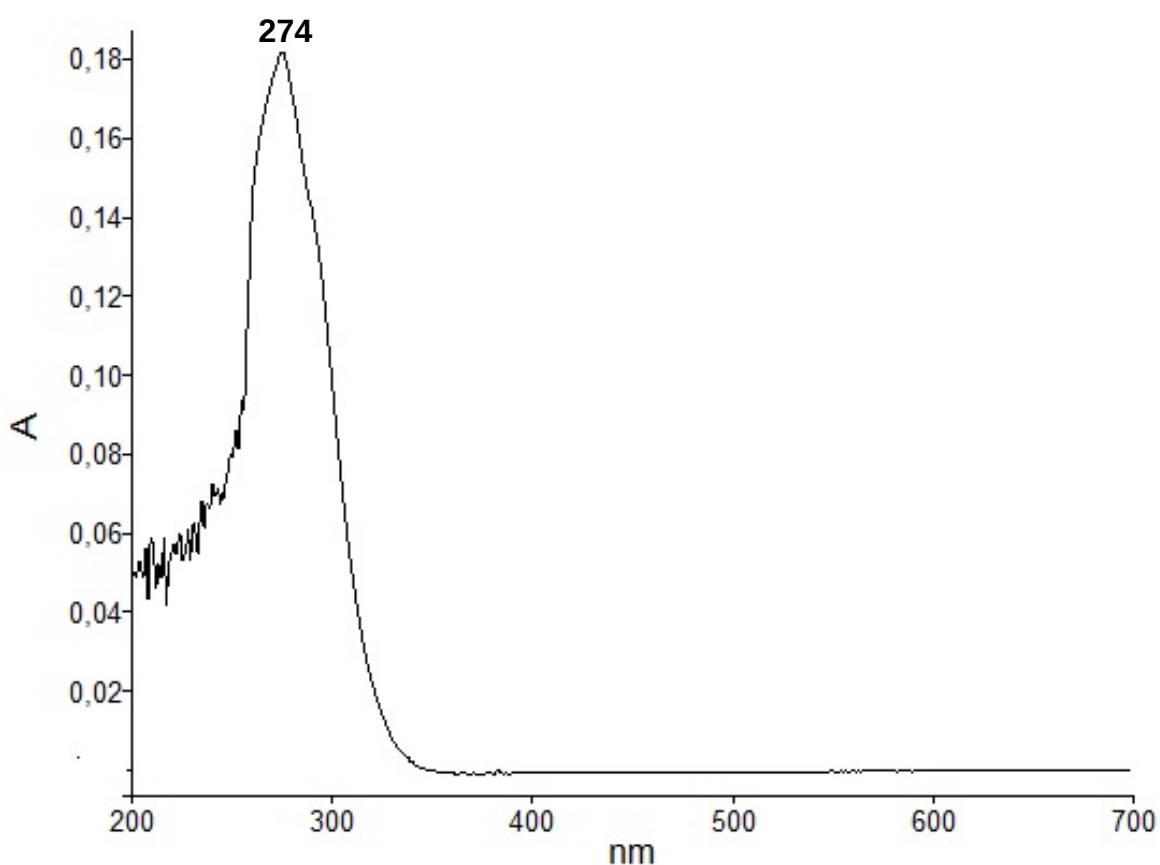


Figura 42. Espectro de absorção na região do UV-Vis do composto **LQOF-G4** (concentração 1×10^{-5} M em DMSO).

Tabela 7. Comprimentos de onda de absorção observados nos espectros de UV-vis.

Composto	$\lambda(\text{nm})$ (guan)*	$\lambda(\text{nm})$ (TC)*
LQOF-G4	274	-
LQOF-G5	273	-
LQOF-G6	274	-
LQOF-G8	273	260
LQOF-G9	273	-
LQOF-G18	272	259

*(guan) = absorção do grupo guanidínico; (TC) = absorção da banda de transferência de carga.

4.5. Ensaios biológicos.

4.5.1. Determinação da atividade leishmanicida.

Dos compostos sintetizados no presente trabalho, quatorze foram avaliados até o momento quanto a atividade leishmanicida frente as cepas promastigotas de *L. amazonensis* e quanto a citotoxicidade frente a macrófagos peritoniais de camundongo, sendo que dez desses compostos possuem o substituinte benzila e quatro possuem o substituinte 4-hidroxibutila. Os três melhores resultados frente as formas promastigotas foram avaliados quanto as formas amastigotas intracelulares. Os demais ensaios frente as formas amastigotas encontram-se em andamento.

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos do composto **LQOF-G2** como exemplo. Para determinar a atividade de cada composto, foi calculado a média de absorbância e o desvio padrão nos poços que continham os parasitas e diferentes concentrações do composto (Média A, acima). Da mesma forma, calculou-se a média de absorbância e o desvio padrão nos poços sem parasitas, que continham apenas o meio LIT e diferentes concentrações do composto, correspondentes aos brancos (Média B, abaixo).

Tabela 8. Resultados da atividade Leishmanicida. Exemplo para o composto **LQOF-G2**.

	[2] (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)
A	100	0,2846	0,2155	0,2075	0,2115	0,005656855
B	50	0,3319	0,3069	0,192	0,3194	0,017677674
C	25	0,3507	0,3512	0,2005	0,3510	0,000353570
D	12,5	0,3991	0,3704	0,1856	0,3848	0,020293960
E	6,25	0,8002	0,7791	0,3757	0,7896	0,014919942
F	3,13	0,8604	0,8475	0,4403	0,8540	0,009121674
G	1,56	0,8765	0,8583	0,3915	0,8674	0,012869372
H	0	0,9485	0,9011	1,0646	0,9714	0,084121169

	[2] (ug/mL)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)
A	100	0,2489	0,2472	0,2542	0,2501	0,003651035
B	50	0,2493	0,2478	0,2574	0,2515	0,005164306
C	25	0,258	0,2574	0,249	0,2548	0,005031897
D	12,5	0,2539	0,2612	0,2678	0,2610	0,006952943
E	6,25	0,2575	0,2619	0,2693	0,2629	0,005963231
F	3,13	0,2601	0,2648	0,2651	0,2633	0,002804163
G	1,56	0,2586	0,2579	0,2676	0,2614	0,00540956
H	0	0,2552	0,2472	0,2531	0,2518	0,004147692

Na sequência, subtraiu-se a absorção dos brancos (Média A – Média B) obtendo-se o Δ Abs para cada uma das concentrações utilizadas (tabela 9). Para calcular a % de parasitas mortos no poço A, utilizou-se a seguinte equação:

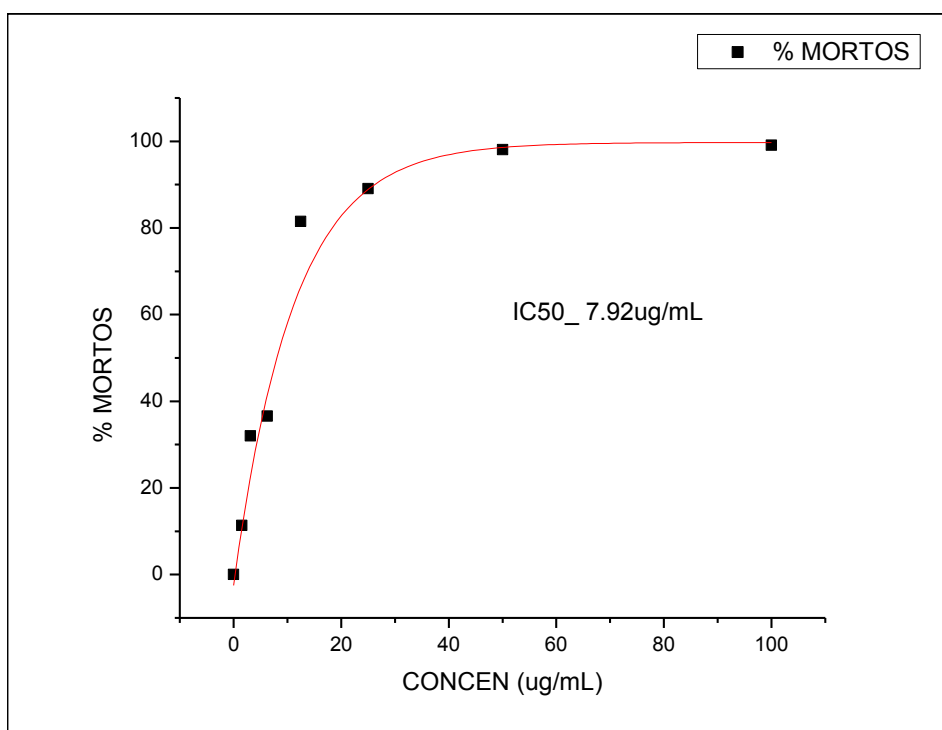
$$\% \text{ parasitas mortos} = \frac{(\Delta \text{Abs poço H} - \Delta \text{Abs poço A})}{\Delta \text{Abs poço H}} \times 100$$

Dessa forma, substituindo-se o termo “ Δ Abs poço A” da equação acima pelos Δ Abs dos demais poços, obteve-se a porcentagem de parasitas mortos em todos os poços, que possuíam diferentes concentrações do composto, conforme apresentado na tabela 9.

Tabela 9. Porcentagem de parasitas mortos em cada poço.

	[2] (ug/mL)	Δ Abs (A - B)	% parasitas mortos
A	100	-0,038600	105,36434
B	50	0,067900	90,56377
C	25	0,096150	86,63779
D	12,5	0,123783	82,79752
E	6,25	0,526750	26,79622
F	3,13	0,590617	17,92050
G	1,56	0,606033	15,77801
H	0	0,719567	0,00000

Com esses dados construiu-se um gráfico de % parasitas mortos VS concentração do composto (figura 43) e os valores de IC₅₀ foram determinados por regressão linear e obtidos em µg/mL.

**Figura 43.** Gráfico da porcentagem de parasitas mortos VS Concentração do composto.

Finalmente, os valores de IC₅₀ foram transformados para µM, utilizando-se as massas moleculares de cada composto. No caso do composto **LQOF-G2**, a massa molecular é 408 g/mol, então:

$$IC_{50} = \frac{7,92 \mu g}{1 mL} \times \frac{1 mol}{408 g} \times \frac{1000 mL}{1 L} = 19,4 \mu M$$

O procedimento apresentado acima foi aplicado aos demais compostos testados. A tabela 10 apresenta os valores de atividade leishmanicida *in vitro* dos compostos, assim como os valores de citotoxicidade e índices de seletividade.

Tabela 10. Atividade leishmanicida (IC₅₀) e citotóxica (CC₅₀) *in vitro* de compostos guanidínicos diluídos em DMSO (µmol.L⁻¹) e seus índices de seletividade (SI). Em negrito ressaltam-se os índices de seletividade dos compostos guanidínicos maiores de 10.

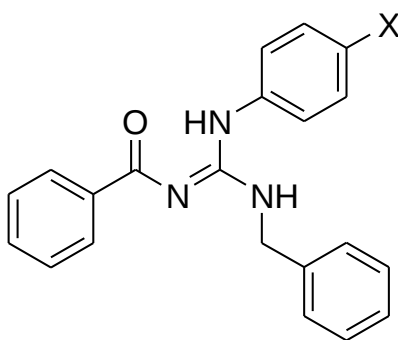
	Promastigota		Amastigota		Macrófago		Promastigota	Amastigota
Composto	IC ₅₀ (µM)	±	IC ₅₀ (µM)	±	CC ₅₀ (µM)	±	SI	SI
LQOF-G1	11.51	0.70	22.05	3.35	801.91	0.32	69.67	36.37
LQOF-G2	19.59	0.19			737.92	1.42	37.66	
LQOF-G3	19.70	0.04			827.36	1.59	42.00	
LQOF-G4	22.58	1.12			35.96	5.63	1.59	
LQOF-G5	20.89	0.47			876.09	1.68	41.94	
LQOF-G6	25.90	0.99			1118.92	105.44	43.21	
LQOF-G7	15.91	0.93	4.75	2.52	618.70	70.25	38.88	130.25
LQOF-G8	25.43	1.54			836.58	1.61	32.90	
LQOF-G9	21.90	1.79			865.51	1.66	39.52	
LQOF-G10	6,82	0,08	21,36	0,25				
LQOF-G12	49.85	3.55			391.46	11.35	7.85	
LQOF-G13	103.13	2.34			142.38	18.45	1.38	
LQOF-G15	108.57	3.42			924.62	1.78	8.52	
LQOF-G17	39.39	0.11			199.73	27.70	5.07	
Pentamidina	7.62	0.10			35.69	6.84	4.68	
Amfotericina B	3.22	0.03			23.10	2.52	7.17	

Com relação à atividade citotóxica, observa-se na tabela 10 que a maioria dos compostos foram relativamente inócuos para macrófagos peritoneais de camundongo. Destaca-se, por exemplo, o composto **LQOF-G6** que apresentou a

menor citotoxicidade frente a estas células ($CC_{50} = 1118,92 \mu\text{M}$). Adicionalmente, esta baixa citotoxicidade se vê refletida nos altos índices de seletividade (IS) destes compostos frente as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os compostos **LQOF-G1**, **LQOF-G2**, **LQOF-G3**, **LQOF-G5**, **LQOF-G6**, **LQOF-G7**, **LQOF-G8** e **LQOF-G9** mostraram IS maiores a 10, mostrando-se candidatos promissores para estudos de atividade *in vitro* frente as formas amastigotas intracelulares do parasita. Estes altos IS mostram que estas moléculas são atrativas do ponto de vista terapêutico.

Inicialmente realizamos a avaliação dos compostos **LQOF-G1**, **LQOF-G7** e **LQOF-G10** frente as formas intracelulares de *L. amazonensis* devido a sua alta toxicidade frente as formas promastigotas ($IC_{50} = 11,51, 15,91$ e $6,82 \mu\text{M}$, respectivamente), assim como pela alta seletividade frente ao parasita e pouco citotóxicos frente a macrófagos. O composto **LQOF-G7** apresentou alta toxicidade frente as formas amastigotas ($IC_{50} = 4,75 \mu\text{M}$). Os valores de IS destas moléculas frente as formas amastigotas (SI=130,25 para o composto **LQOF-G7** e 36,37 para o composto **LQOF-G1**) mostram que podem ser candidatos promissores para estudos *in vivo* para o tratamento da leishmaniose cutânea.

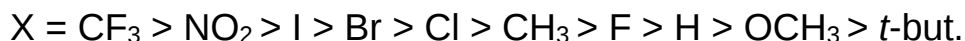
Os compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10** que correspondem àqueles com o substituinte benzila, diferem entre si apenas em relação ao substituinte X na posição *para* do anel aromático, conforme apresentado na figura 44.



LQOF-G1.	X = NO ₂
LQOF-G2.	X = Br
LQOF-G3.	X = Cl
LQOF-G4.	X = H
LQOF-G5.	X = CH ₃
LQOF-G6.	X = t-bu
LQOF-G7.	X = I
LQOF-G8.	X = OCH ₃
LQOF-G9.	X = F
LQOF-G10.	X = CF ₃

Figura 44. Estrutura geral dos compostos **LQOF-G1** a **LQOF-G10**.

Considerando a influência do substituinte X na atividade leishmanicida frente as formas promastigotas de *L. amazonensis*, a seguinte ordem decrescente de atividade foi observada:



Considerando o composto **LQOF-G4** (X=H) como modelo, podemos observar que compostos com o grupo X com característica eletroretirador na posição para do anel aromático apresentam maior atividade que **LQOF-G4**, enquanto compostos com grupo X com características eletrodoador na posição para do anel aromático apresentam menor atividade que **LQOF-G4** (exceto para **LQOF-G5** (X=CH₃)).

Os compostos **LQOF-G1** e **LQOF-G10**, que possuem os grupos eletroretiradores mais fortes entre esses compostos (X=NO₂ e X=CF₃, respectivamente), retirando carga tanto por efeito indutivo (-I) quanto por efeito mesomérico (-M), (no caso do grupo nitro) apresentaram os valores de IC₅₀ mais baixos, sendo o melhor valor de IC₅₀ encontrado entre todos os compostos testados frente as formas promastigotas (6,82 uM) o composto com o grupo CF₃.

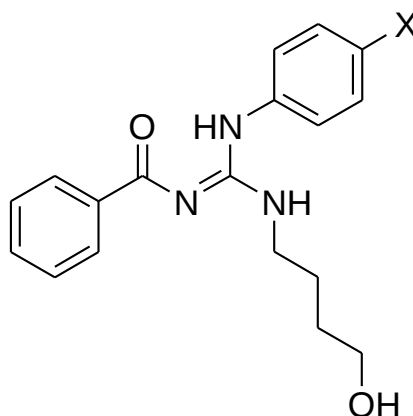
Considerando os efeitos eletrônicos exercidos pelos grupos *p*-substituídos, grupos eletroretiradores podem aumentar a deficiência eletrônica do núcleo guanidínico, possibilitando aumento de interações com determinados resíduos de aminoácidos. Podemos citar como exemplo uma possível interação com a cisteína protease, um dos alvos terapêuticos no tratamento de leishmania. As cisteínas proteases são enzimas presentes em *Leishmania* que estão diretamente relacionados ao processo de invasão do parasito, escape do sistema imune do hospedeiro e nutrição.^{10,105} A cisteína protease possui um grupo tiol em seu resíduo cisteína que sofre desprotonação por um resíduo próximo de histidina, gerando um nucleófilo tiolato que pode atacar/interagir com centros deficientes eletronicamente.^{10,106,107} A influência de grupos eletroretiradores, como o grupo trifluormetil ou nitro, na posição para do anel aromático, pode então aumentar a deficiência eletrônica do carbono guanidínico tornando-o um possível sítio de ataque nucleofílico para essa enzima.¹⁰

Os outros compostos que apresentaram melhores atividades quando comparados ao composto modelo **LQOF-G4**, foram aqueles que possuem um átomo de halogênio como *p*-substituinte. Os valores de IC₅₀ desses compostos foram de 15,9

uM para **LQOF-G7** (X=I), 19,6 uM para **LQOF-G2** (X=Br), 19,7 uM para **LQOF-G3** (X=Cl) e 21,9 uM para **LQOF-G9** (X=F). Considerando os efeitos eletrônicos dos halogênios, eles são eletroretiradores por efeito indutivo (-I), mas são doadores por efeito mesomérico (+M), sendo que a influência do efeito +M depende do tamanho do halogênio. Quanto maior o raio atômico do halogênio, menor é seu efeito +M, e, consequentemente, o predomínio do efeito -I aumenta. A ordem de atividade leishmanicida observada para os compostos que possuem um átomo de halogênio como *p*-substituente, evidencia que quanto maior é o efeito eletroretirador do substituinte, melhor é a atividade leishmanicida, pois o composto **LQOF-G7** (X=I) foi o que apresentou a melhor atividade quando comparados aos demais compostos halogenados. O átomo de iodo é o que possui maior raio atômico e, portanto, menor efeito +M, com uma predominância do efeito eletroretirador -I maior em relação aos outros halogênios. A atividade leishmanicida diminui em função da diminuição do raio atômico dos halogênios, sendo o composto **LQOF-G9** (X=F) o que apresentou a pior atividade (devido ao aumento do caráter +M).

Além dos efeitos eletrônicos, efeitos estéricos, como o tamanho e a orientação espacial dos compostos, podem influenciar no arranjo tridimensional dos mesmos e consequentemente influenciar na atividade inibitória. Quando comparamos o tamanho dos átomos de halogênio na posição para do anel aromático, observamos que quanto maior o raio atômico do halogênio, maior sua atividade, ou seja, substituintes X mais volumosos possuem maior atividade. Uma hipótese é que esse maior espaço ocupado no sítio de ligação favoreça interações com determinados sítios ativos, proporcionando um melhor “encaixe” do que compostos que possuem átomos com raio atômico pequenos como o flúor.

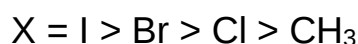
Quatro compostos com o substituinte 4-hidroxibutílica (**LQOF-G12**, **LQOF-G13**, **LQOF-G15** e **LQOF-G17**) foram também avaliados quanto à atividade leishmanicida frente às cepas promastigotas de *L. amazonensis*. A estrutura geral dos compostos avaliados é apresentado na figura 45.



LQOF-G12. X = Br
LQOF-G13. X = Cl
LQOF-G15. X = CH₃
LQOF-G17. X = I

Figura 45. Estrutura geral dos compostos **LQOF-G12**, **LQOF-G13**, **LQOF-G15** e **LQOF-G17**.

O padrão das atividades observado em relação aos efeitos eletrônicos foi semelhante ao padrão dos compostos com o substituinte benzila, ou seja, os compostos testados que possuem em sua estrutura efeitos eletroretiradores mais pronunciados apresentaram melhor atividade. A ordem decrescente de atividade, considerando o substituinte X foi:



Entretanto, comparando os compostos com os substituintes benzila e 4-hidroxibutila com o mesmo *p*-substituinte X, observa-se que um grupo lateral 4-hidroxibutila provocou uma significativa diminuição nas atividades quando comparados com os compostos com grupo lateral benzila. Por exemplo, o composto **LQOF-G7** (X=I com o grupo benzila) apresentou IC₅₀ = 15,9 uM, sendo apenas 2 vezes, aproximadamente, maior que da pentamidina. Já o composto **LQOF-G17** (X=I com o grupo 4-hidroxibutila), apresentou IC₅₀ = 39,4 uM, mais que o dobro do composto **LQOF-G7**. O mesmo ocorre para os demais compostos testados com o grupo 4-hidroxibutila. O composto **LQOF-G12** (X=Br) apresentou IC₅₀ = 49,8 uM, sendo aproximadamente, 2,5 vezes maior que o composto **LQOF-G2** (X=Br). Os compostos **LQOF-G13** (X=Cl) e **LQOF-G15** (X=CH₃), apresentaram IC₅₀ = 103,1 e

108,6 μM , respectivamente. Ambos foram cerca de 5 vezes menos ativos que os compostos com o mesmo *p*-substituinte com o grupo benzila. A figura 46 apresenta a comparação entre as estruturas e os valores de IC_{50} entre os compostos com o mesmo *p*-substituinte.

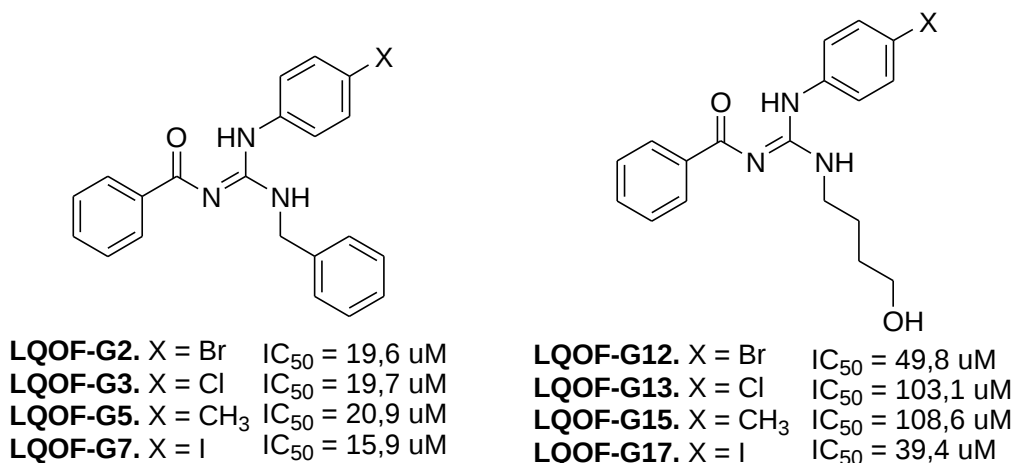


Figura 46. Comparação entre as estruturas e os valores de IC_{50} entre os compostos com os mesmos substituintes X.

Portanto, quando comparamos **LQOF-G2** com **LQOF-G12**, **LQOF-G3** com **LQOF-G13**, **LQOF-G5** com **LQOF-G15** e **LQOF-G7** com **LQOF-G17**, fica evidente que a mudança da porção benzila pela porção 4-hidroxibutila causa significativa diminuição na atividade.

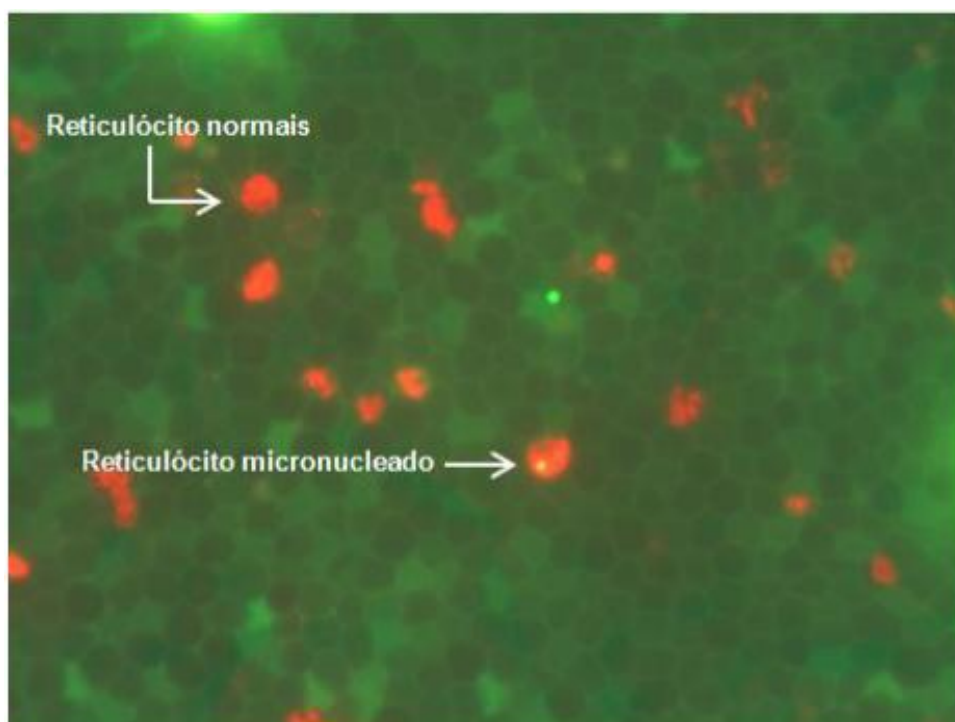
4.5.2. Determinação da mutagenicidade *in vivo* pelo teste de micronúcleo.

Dentre os testes preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo em sangue periférico de roedores é amplamente aceito e recomendado. A avaliação da mutagenicidade é realizada durante o processo de registro de novos produtos químicos e farmacêuticos, antes da entrada no mercado mundial.^{108,109}

O teste é capaz de detectar tanto lesões induzidas na estrutura dos cromossomos, os chamados efeitos clastogênicos, como também alterações na distribuição desses cromossomos durante o processo de divisão celular, os efeitos aneugênicos. Ambos são induzidos por substâncias químicas, através da formação de micronúcleos com fragmentos de DNA ou cromossomos inteiros.¹¹⁰

Durante a formação de eritrócitos policromáticos, o núcleo principal é expulso, se transformando assim em células anucleadas. Dessa forma, quando ocorre a

formação de um micronúcleo, este pode permanecer no citoplasma dessas células. O aumento na frequência desses eritrócitos micronucleados em animais tratados indica a ocorrência de danos cromossômicos induzidos.^{110,111} O corante utilizado nas lâminas permite a identificação de eritrócitos policromáticos (reticulócitos) ricos em RNA, por proporcionar coloração vermelha ao RNA e amarela ao DNA (Figura 47).



Fonte: Extraído de CHELUCCI, 2013¹¹²

Figura 47. Reticulócitos normais e reticulócito micronucleado.

A determinação da mutagenicidade in vivo pelo teste de micronúcleo foi realizado para os compostos **LQOF-G1**, **LQOF-G2**, **LQOF-G4**, **LQOF-G7** e **LQOF-G8**. Os resultados obtidos por animal, assim como a frequência média de cada grupo e o desvio padrão estão apresentados na tabela 11.

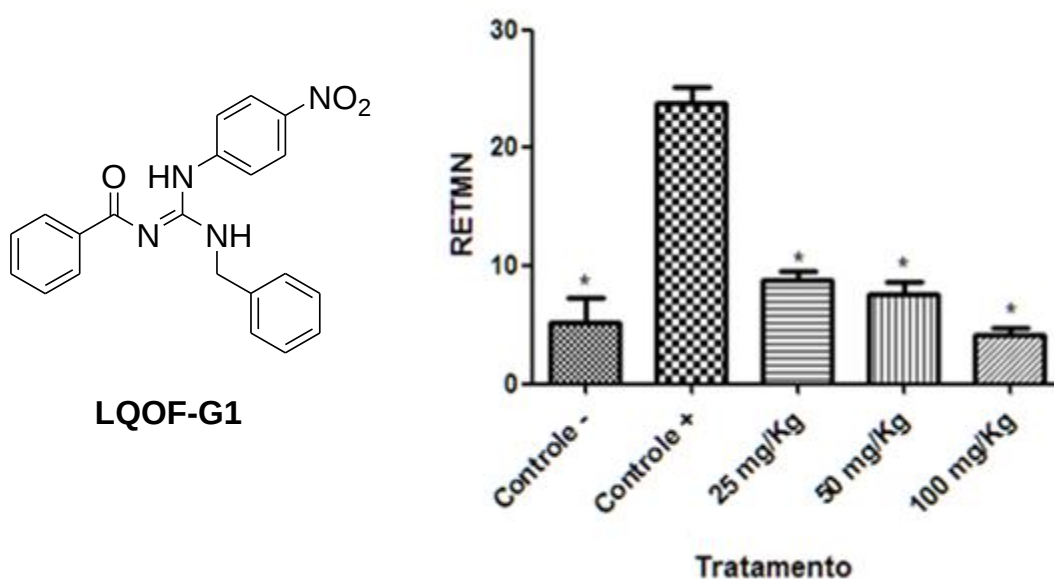
Os resultados dos controles (positivo, negativo) demonstraram que a frequência de micronúcleos no grupo exposto à ação do agente genotóxico ciclofosfamida foi significativamente maior em comparação aos grupos negativo (veículo: hidroxietilcelulose 0,5%).

As figuras 48 - 52 apresentam os resultados obtidos da formação de micronúcleos nos grupos de animais expostos aos diferentes tratamentos ($p < 0,05$).

Nos gráficos estão apresentadas as frequências médias de reticulócitos micronucleados dos compostos, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/Kg, dos controles positivo e negativo.

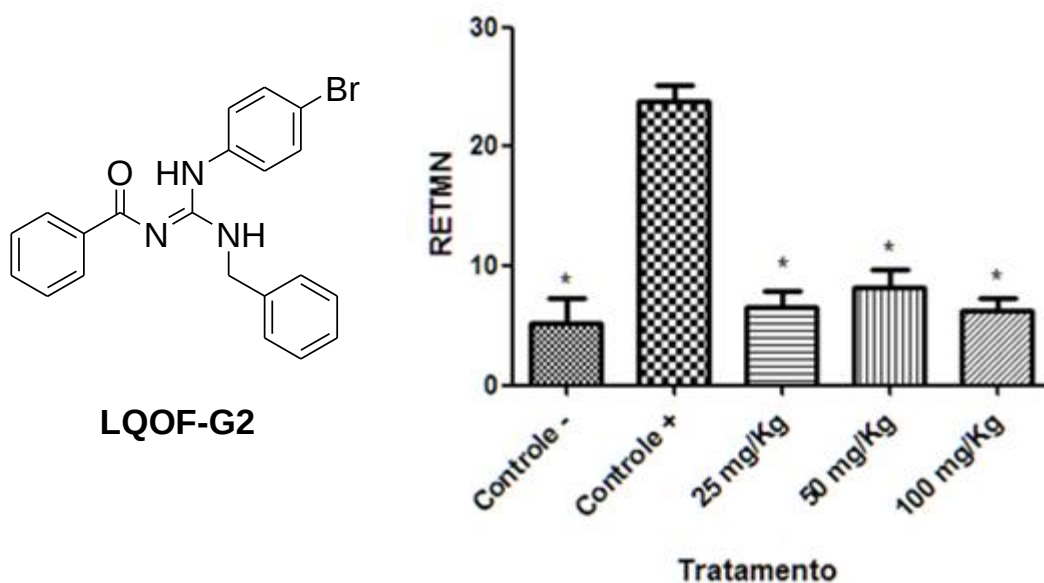
Tabela 11. Número de células micronucleadas em cada animal.

Tratamento (mg/Kg)	Animais					Média±DP
	1	2	3	4	5	
Controle – (H₂O)	1	5	2	5	13	5±5
Controle + (ciclofosfamida)	25	20	24	28	22	24±3
LQOF-G1						
25	10	7	10	7	10	9±2
50	5	5	10	9	9	8±2
100	5	6	3	4	3	4±1
LQOF-G2						
25	11	7	4	7	4	7±3
50	14	6	7	7	7	8±3
100	7	5	3	6	10	6±3
LQOF-G4						
25	1	3	3	5	3	3±1
50	4	3	7	5	0	4±3
100	7	0	2	2	1	2±3
LQOF-G7						
25	4	3	2	4	4	3±1
50	5	4	7	4	5	5±1
100	6	9	4	7	5	6±2
LQOF-G8						
25	12	8	9	10	10	10±1
50	11	9	10	7	9	9±1
100	12	10	6	6	8	8±3



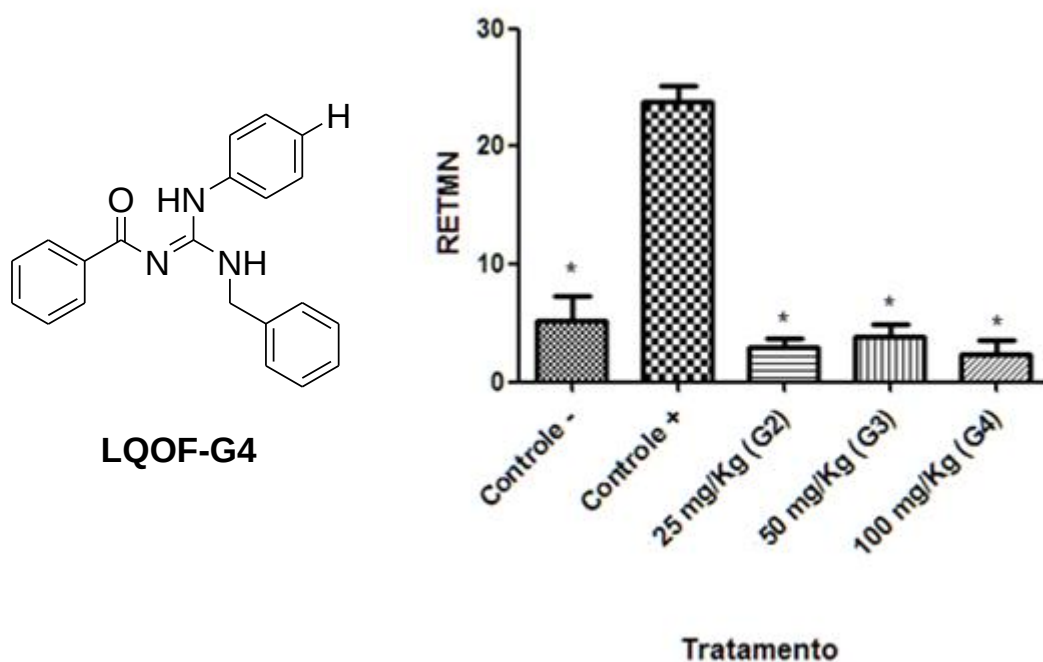
* p<0,05 (em relação ao controle positivo)

Figura 48. Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto **LQOF-G1** em diferentes concentrações.



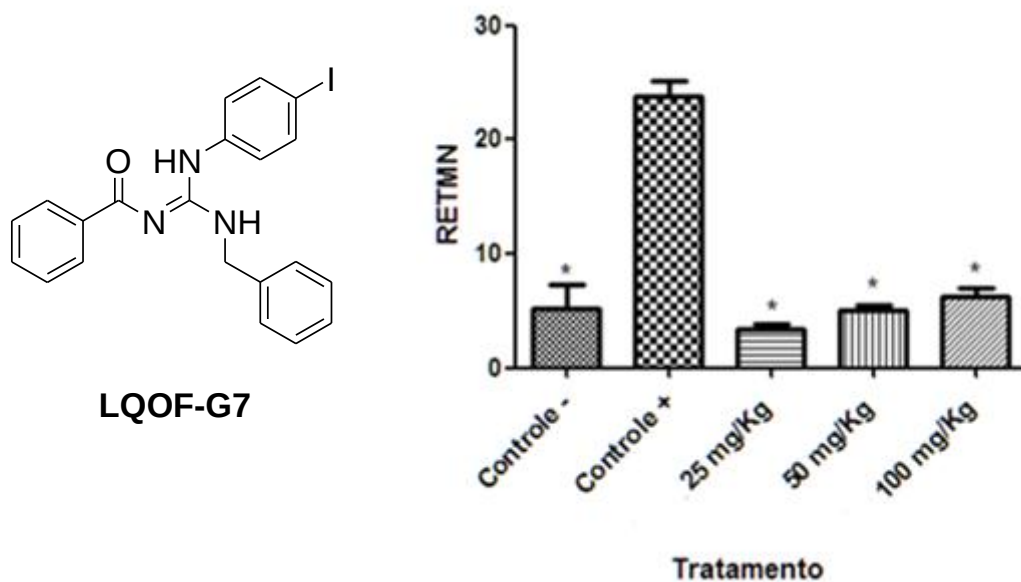
* p<0,05 (em relação ao controle positivo)

Figura 49. Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto **LQOF-G2** em diferentes concentrações.



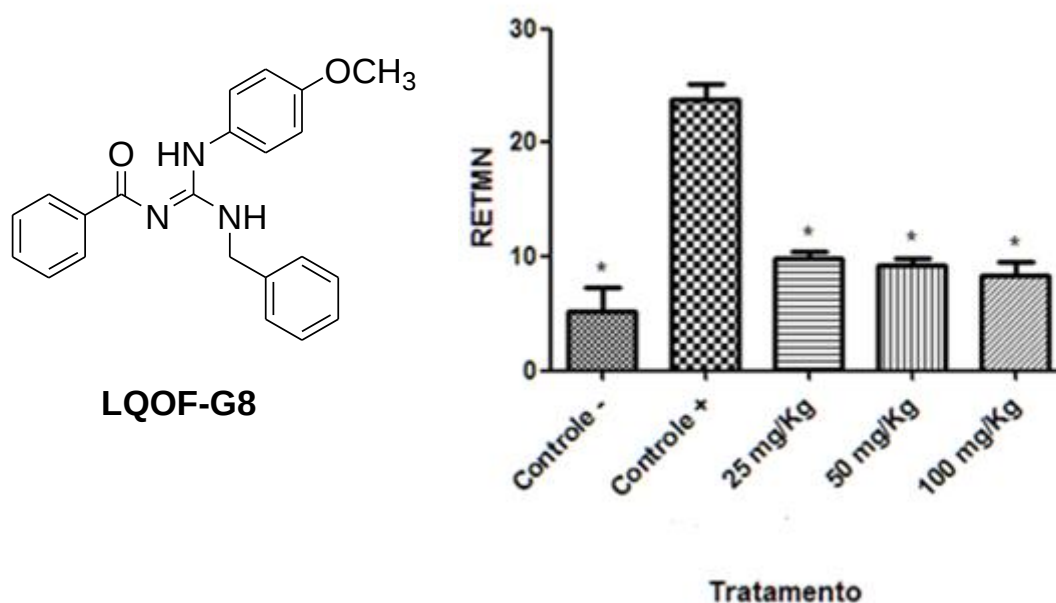
* $p < 0,05$ (em relação ao controle positivo)

Figura 50. Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto **LQOF-G4** em diferentes concentrações.



* $p < 0,05$ (em relação ao controle positivo)

Figura 51. Frequência média de reticulócitos micronucleados (RETMN) e desvio padrão (DP) do composto **LQOF-G7** em diferentes concentrações.



* $p < 0,05$ (em relação ao controle positivo)

Figura 52. Frequência média de reticulócitos micronucleados (RET MN) e desvio padrão (DP) do composto **LQOF-G8** em diferentes concentrações.

Os resultados demonstram que os compostos avaliados apresentaram frequência de células micronucleadas significativamente menor que o controle positivo ciclofosfamida. Também não foi observado diferenças significativa entre a frequência dos compostos obtidos quando comparados com o controle negativo, ou seja, pode-se dizer que os compostos se comportam como a água até a concentração de 100 mg/Kg. Os resultados obtidos sugerem que os compostos não são mutagênicos quando avaliados pelo teste de micronúcleo, mesmo nas concentrações mais altas utilizadas nos experimentos (100 mg/Kg).

4.5.3. Outros resultados: determinação do efeito inibitório sobre a enzima DHPS.

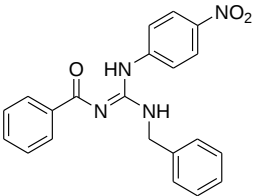
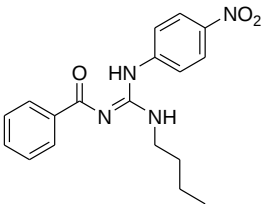
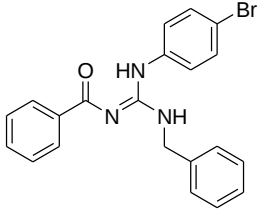
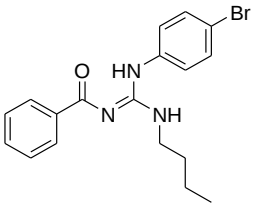
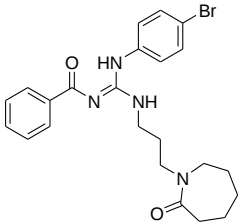
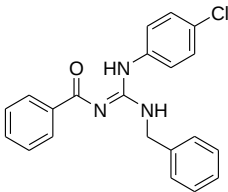
Além do fato de ter sido recentemente reportado que a biossíntese de hipusina ocorre em *Leishmania donovani*,³⁹ tornando a enzima DHPS (que catalisa a primeira etapa da biossíntese da hipusina) um alvo terapêutico no tratamento de leishmaniose, a inibição das enzimas biossintéticas de hipusina (DHPS e DOHH) exercem efeitos anti-proliferativos em células de mamíferos e alteram a proliferação e diferenciação

de células tumorais.^{23,45,47,48,49} Portanto, identificar novos compostos que tenham a capacidade de inibir a enzima DHPS humano pode contribuir tanto para a melhor compreensão da função bioquímica e relação entre DHPS e eIF5A, como também pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos anti-tumorais e/ou anti-inflamatórios, dadas as correlações funcionais de eIF5A com processos de proliferação celular e inflamação.¹⁰¹

Diante dos fatos mencionados, e considerando que o mais potente inibidor de DHPS humano conhecido até hoje (GC7, Figura 8), além de outros bons inibidores de DHPS possuírem o núcleo guanidínico, iniciou-se uma colaboração entre o LQOF da Unesp de Presidente Prudente e o Laboratório do Prof. Dr. Cleslei Zanelli da Faculdade de Ciencias Farmaceuticas da Unesp de Araraquara para realizar a avaliação na inibição enzimática de DHPS com seis dos derivados guanidínicos que foram publicados por nosso grupo.^{68,87}

As estruturas desses compostos, os resultados da porcentagem de inibição realizados na etapa de triagem, utilizando 500 uM dos compostos, e os valores de IC₅₀ encontrados para aqueles que apresentaram porcentagem de inibição maiores que 30% são apresentados na tabela 12. Apenas o composto **GBrBut** não apresentou porcentagem de inibição maior que 30%, então este foi eliminado na triagem, e os outros cinco compostos foram testados em diferentes concentrações, com a finalidade de calcular a concentração dos compostos capaz de inibir 50% da enzima DHPS (IC₅₀).

Tabela 12. Triagem da atividade inibitória da DHPS das benzoilguanidinas na concentração de 500 uM.

Identificação	Estrutura	% Inibição – IC ₅₀
LQOF-G1		57% – 312 uM
GNO ₂ But		83% – 111 uM
LQOF-G2		86% – 11,4 uM
GBrBut		6% – n.d.
GBrAPA		31% – >500 uM
LQOF-G3		71% – 79 uM

n.d. = não determinado

As diferenças estruturais entre os cinco compostos que foram determinados os valores de IC_{50} são em relação aos grupos *p*-substituídos (NO_2 , Br ou Cl), ou em relação aos grupos laterais em um dos nitrogênios do grupo guanidínico (Benzila, butila ou propilazepanona). O composto com o grupo propilazepanona (**GBrAPA**) foi o único que não apresentou atividade ($IC_{50} > 500$). Dos quatro compostos que apresentaram atividade, um possui a porção butila (**GNO₂But**, $IC_{50} = 111 \text{ uM}$), enquanto os outros três, **LQOF-G1** ($IC_{50} = 312 \text{ uM}$), **LQOF-G2** ($IC_{50} = 11,4 \text{ uM}$), e **LQOF-G3** ($IC_{50} = 79 \text{ uM}$) possuem a porção benzila em sua estrutura.

Como mencionado na seção justificativa, a partir desses resultados de inibição da enzima DHPS surgiu a elaboração dos compostos **LQOF-G1 - LQOF-G10** descrita nesse trabalho. Os demais compostos com o substituinte benzila (**LQOF-G4 – LQOF-G10**), são aqueles onde fixou-se o substituinte benzila, e realizaram-se modificações no grupo *p*-substituinte na porção anilina da guanidina, com a finalidade de estudar a relação estrutura-atividade desses compostos na inibição da enzima DHPS, assim como para avaliação como agentes leishmanicidas.

Os compostos **LQOF-G4 – LQOF-G19** estão atualmente com o Grupo do Prof. Dr. Cleslei Zaneli na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara onde estão sendo realizados os testes de inibição da enzima DHPS.

5. CONCLUSÃO

Quatorze compostos foram avaliados quanto à atividade leishmanicida frente às cepas promastigotas de *L. amazonensis* e também frente a macrófagos peritoneais de camundongo. Os três melhores resultados na inibição frente às formas promastigotas (**LQOF-G1**, **LQOF-G7** e **LQOF-G10**) foram avaliados frente as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Os valores de IS destas moléculas frente às formas amastigotas (SI=130,25 para o composto **LQOF-G7** e 36,37 para o composto **LQOF-G1**) mostram que podem ser candidatos promissores para estudos *in vivo* para o tratamento da leishmaniose cutânea. A análise dos resultados de atividade permitiu concluir que os compostos que possuem grupos *p*-substituintes eletroretiradores e volumosos no anel de anilina apresentaram melhor atividade. Além disso, a mudança do grupo lateral benzila pelo grupo 4-hidroxibutila causa significativa diminuição na atividade.

A avaliação da mutagenicidade pelo teste de micronúcleo foi realizada para cinco compostos, incluindo os três dos mais ativos contra *Leishmania* (**LQOF-G1**,

LQOF-G2 e **LQOF-G7**). Para todos os compostos avaliados não foram observados diferenças significativas entre a frequência de células micronucleadas quando comparados com o controle negativo (água), sugerindo que os compostos se comportam de maneira semelhante à água mesmo nas concentrações de 100 mg/kg utilizadas no presente estudo.

Finalmente, dos quatro compostos que apresentaram atividade na inibição da enzima DHPS humana, três possuem a porção benzila, sendo o composto **LQOF-G2** (X = Br) na posição *para* da porção anilina o mais potente ($IC_{50} = 11,4 \text{ uM}$).

6. REFERÊNCIAS

- [1] World Health Organization: Neglected tropical diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (acessado em dezembro de 2016).
- [2] Johnston, K. L.; Ford, L.; Taylor, M. J.; Overcoming the challenges of drug discovery for neglected tropical diseases: the A-WOL Experience. *J. Biomol. Screen*, **2014**, 19, 335-343.
- [3] Cavalli, A.; Bolognesi, M. L.; Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against Trypanosoma and Leishmania. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7339–7359.
- [4] Hotez, P. J.; Molyneux, D. H.; Fenwick, A.; Kumaresan, J.; Sachs, S. E.; Sachs, J. D.; Savioli, L.; Control of neglected tropical diseases. *N. Engl. J. Med.* **2007**, 357, 1018–1027.
- [5] Drugs for Neglected Diseases initiative: <http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas.html> (acessado em dezembro de 2016).
- [6] Chirac, P.; Torreele, E.; Médecins Sans Frontières, 75544 Paris cedex 11, France (PC); and Drugs for Neglected Diseases Initiative, Geneva, Switzerland (ET).
- [7] Seden, K.; Khoo, S.; Back, D.; Prevatt, N.; Lamorde, M.; Byakika-Kibwika, P.; Mayito, J.; Ryan, M.; Merry, C.; Drug-drug interactions between antiretrovirals and drugs used in the management of neglected tropical diseases: important considerations in the WHO 2020 Roadmap and London Declaration on Neglected Tropical Diseases. *AIDS*, **2013**, 27, 675-686.

- [8] World Health Organization. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO_Roadmap_five_years_of_collaboration/en/ (Acessado em 02/03/2017).
- [9] World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/index.html> (Acessado em Julho de **2015**).
- [10] Jornada, D. H.; Síntese e avaliação biológica de bioisósteros de nitrofurais ativos contra *Leishmania amazonensis*. *Dissertação de mestrado*. **2015**.
- [11] WHO (World and Health Organization) – Leishmaniasis, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. (Acessado em dezembro de **2016**).
- [12] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>. (Acessado em dezembro de **2016**).
- [13] Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H.; Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, 19, 111–126.
- [14] Murray, H. W.; Berman, J. D.; Davies, C. R.; Saravia, N. G.; Advances in leishmaniasis. *Lancet*. **2005**, 366, 1561–1577.
- [15] Le Pape, P.; Development of new antileishmanial drugs; current knowledge and future prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, 23, 708–718.
- [16] BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Série A – Normas e manuais técnicos. Brasília, Distrito Federal, 2. Ed. **2010**.
- [17] Croft, S. L.; Olliaro, P.; Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.*, **2011**, 17, 1478-1483.
- [18] Schröder, J.; Noack, S.; Marhöfer, R. J.; Mottram, J. C.; Coombs, G. H.; Selzer, P. M.; Identification of semicarbazones, thiosemicarbazones and triazine nitriles as inhibitors of *leishmania mexicana* cysteine protease CPB. *PLoS One*, **2013**, 10, 1-12.
- [19] BRASIL. Ministério da Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana. Diagnóstico diferencial. Série A – Normas e manuais técnicos, Brasília, Distrito Federal, 1. ed. **2006**.

- [20] Seifert, K.; Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, **2011** v. 5, p. 31-39.
- [21] Hassan, P.; Fergusson, D.; Grant, K. M.; Mottran, J. C.; The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **2001**, v. 113, n. 2, p. 189-198.
- [22] Assan, R.; Perronne, C.; Assan, D.; Chotard, L.; Mayaud, C.; Matheron, S.; Zucman, D.; Pentamidine- induced derangements of glucose homeostasis. *Diabetes Care*, **1995**, v. 18, n. 1, p. 47-55.
- [23] Chawla, B.; Madhubala, R.; Drug targets in *Leishmania*. *J Parasit Dis*, **2010**, 34, 1–13.
- [24] Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K.; Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, **2012**, 485-497.
- [25] Then, R. L.; Antimicrobial Dihydrofolate Reductase Inhibitors -Achievements and Future Options: Review. *J. of Chemotherapy*, **2004**, 16, 3-12.
- [26] Gregson, C. V. P.; Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacol Rev*, **2005**, 57, 117–145.
- [27] Cavazzuti, G. P.; Hunter, W. N.; Gamarro, F.; Piras, S.; Loriga, M.; Alleca, S.; Corona, P.; McLuskey, K.; Tulloch, L.; Gibellini, F.; Ferrari, S.; Costi, M. P.; Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. *PNAS*, **2008**, 105, 1448–1453.
- [28] Zuccotto, F.; Martin, A. C. R.; Laskowskib, R. A.; Thornton, J. M.; Gilbert, I. H.; Dihydrofolate reductase: A potential drug target in trypanosomes and *Leishmania*. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **1998**, 12, 241–257.
- [29] Senkovich, O.; Schormanna, N.; Chattopadhyay, D.; Structures of dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Trypanosoma cruzi* in the folate-free state and in complex with two antifolate drugs, trimetrexate and methotrexate. *Acta Cryst.*, **2009**, D65, 704–716.
- [30] Tavares, J.; Ouaisi, A.; Lin, P. K. T.; Tomás, A.; Cordeiro-da-Silva, A.; Differential effects of polyamine derivative compounds against *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. *International Journal for Parasitology*, **2005**, 35, 637–646.

- [31] Vannier-Santos, M. A.; Menezes, D.; Oliveira, M. F.; de Mello, F. G.; The putrescine analogue 1,4-diamino-2-butanone affects polyamine synthesis, transport, ultrastructure and intracellular survival in *Leishmania amazonensis*. *Microbiology*, **2008**, 154, 3104–3111.
- [32] Baiocco, P.; Colotti, G.; Franceschini, S.; Ilari, A.; Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 2603–2612.
- [33] Heby, O.; Persson, L.; Rentala, M.; Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids*, **2007**, 33, 359–366.
- [34] Reguera, R. M.; Tekwani, B. L.; Balanã-Fouce, R.; Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, **2005**, 140, 151–164.
- [35] Seiler, N.; Thirty Years of Polyamine-Related Approaches to Cancer Therapy. Retrospect and Prospect. Part 1. Selective Enzyme Inhibitors. *Current Drug Targets*, **2003**, 4, 537-564.
- [36] Mishra, J.; Saxena, A.; Singh, S.; Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. *Frontiers in Medicinal Chemistry*, **2012**, 6, 97-130.
- [37] Shukla, A. K.; Singh, B. K.; Patra, S.; Dubey, V. K.; Rational Approaches for Drug Designing Against Leishmaniasis. *Appl Biochem Biotechnol*, **2010**, 160, 2208–2218.
- [38] Werbovetz, K. A.; Target-Based Drug Discovery for Malaria, Leishmaniasis, and Trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, **2000**, 7, 835-860.
- [39] Chawla, B.; Jhingran, A.; Singh, S.; Tyagi, N.; Park, M. H.; Srinivasan, N.; Roberts, S. C.; Madhubala, R.; Identification and characterization of a novel deoxyhypusine synthase in *leishmania donovani*. *J Biol Chem*. **2010b**, 285, 453-63.
- [40] Park, M. H.; Cooper, H. L.; Folk, J. E.; The Biosynthesis of protein-bound Hypusine (N(4-Amino-2-hydroxybutyl)Lysine). *The journal of Biological Chemistry*. **1982**, 257, 7217-7222.
- [41] Chen, K. Y.; Dou, Q. P.; NAD⁺ stimulated the spermidine-dependent hypusine formation on the 18 kDa protein in cytosolic lysates derived from NB-15 mouse neuroblastoma cells. *FEBS Lett.*, **1988**, 14, 229, 325-8.
- [42] Murphey, R. J.; Gerner, E. W.; Hypusine Formation in Protein by a Two-step Process in Cell Lysates. **1987**, 262, 15033-15036.

- [43] Park, M. H.; Wolff, E. C.; Cell-free Synthesis of Deoxyhypusine. *The Journal of Biological Chemistry*, **1988**, 263, 15264-15269.
- [44] Wolff, E. C.; Park, M. H.; Folk, J. E.; Cleavage of Spermidine as the First Step in Deoxyhypusine Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, **1990**, 265, 4794-4799.
- [45] Umland, T. C.; Wolff, E. C.; Park, M. H.; Davies, D. R.; A New Crystal Structure of Deoxyhypusine Synthase Reveals the Configuration of the Active Enzyme and of an Enzyme NAD Inhibitor Ternary Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, **2004**, 279, 28697–28705.
- [46] Abbruzzese,; Park, M. H.; Folk, J. E.; Deoxyhypusine Hydroxylase from Rat Testis partial purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, **1986**, 261, 3085-3089.
- [47] Castagnolo, D.; Schenone, S.; Botta, M.; Guanylated Diamines, Triamines, and Polyamines: Chemistry and Biological Properties. *Chem. Rev.*, **2011**, 111, 5247–5300.
- [48] Park, M. H.; Wolff, E. C.; Lee, Y. B.; Folk, J. E.; Antiproliferative Effects of Inhibitors of Deoxyhypusine Synthase: Inhibition of Growth of Chinese Hamster Ovary Cells by Guanyl Diamines. *The Journal of Biological Chemistry*, **1994**, 269, 27827-27632.
- [49] Nishimura, K.; Murozumi, K.; Shirahata, A.; Park, M. H.; Kashiwagi, K.; Igarashi, K.; Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem. J.* **2005**, 385, 779–785.
- [50] Jakus, J.; Wolff, E. C.; Park, M. H.; Folk, J. E.; Features of the Spermidine-binding Site of Deoxyhypusine Synthase as Derived from Inhibition Studies. *The Journal of Biological Chemistry*, **1993**, 268, 18, 13151-13159.
- [51] Rossi, D.; Kuroshu, R.; Zanelli, C. F.; Valentini, S. R.; eIF5A and EF-P: two unique translation factors are now traveling the same road. *WIREs RNA*, **2014**, 5, 209–222.
- [52] Taylor, J. E.; Bull, S. D.; Williams, J. M. J.; Amidines, isothioureas, and guanidines as nucleophilic catalysts. *Chem Soc Rev*, **2012**, 41:2109–2121.
- [53] Pérez, E. R.; Silva, M. O.; Costa, V. C.; Rodrigues-Filho, U. P.; Franco, D. W.; Efficient and clean synthesis of N-alkyl carbamates by transcarboxylation and O-alkylation coupled reactions using a DBU-CO₂ zwitterionic carbamic complex in aprotic polar media. *Tetrahedron Lett*, **2002**, 43:4091-4093.

- [54] Pérez, E. R.; Santos, R. H. A.; Gambardella, M. T. P.; Macedo, L. G. M.; Rodrigues-Filho, U. P.; Launay, J-C.; Franco, D. W.; Activation of Carbon Dioxide by Bicyclic Amidines. *J Org Chem*, **2004**, 69:8005-8011.
- [55] McGhee, W. D.; Riley, D.; Christ, K.; Pan, Y.; Parnas, B.; Carbon dioxide as a phosgene replacement: synthesis and mechanistic studies of urethanes from amines, CO₂, and alkyl chlorides. *J Org Chem*, **1995**, 60:2820-2830;
- [56] Casadei, M. A.; Inesi, A.; Rossi, L.; Electrochemical activation of carbon dioxide: synthesis of organic carbonates. *Tetrahedron Lett*, **1997**, 38:3565-3568;
- [57] Hooker, J. M.; Reibel, A. T.; Hill, S. M.; Schuller, M. J.; Fowler, J. S.; One-pot, direct incorporation of [11C]CO₂ into carbamates. *Angew Chem*, **2009**, 121:3534-3537;
- [58] Endo, T.; Nagai, D.; Monma, T.; Yamaguchi, H.; Ochiai, B.; A novel construction of a reversible fixation-release system of carbon dioxide by amidines and their polymers. *Macromolecules*, **2004**, 37:2007-2009;
- [59] Darensbourg, D. J.; Mackiewicz, R. M.; Role of the cocatalyst in the copolymerization of CO₂ and cyclohexene oxide utilizing chromium salen complexes. *J Am Chem Soc*, **2005**, 127:14026-14038.
- [60] Yamada, T.; Lukac, P. J.; George, M.; Weiss, R. G.; Reversible, room-temperature ionic liquids. Amidinium carbamates derived from amidines and aliphatic primary amines with carbon dioxide. *Chem Mater*, **2007**, 19:967-969;
- [61] Amatore, C.; Savéan, J-M.; Mechanism and kinetic characteristics of the electrochemical reduction of carbon dioxide in media of low proton availability. *J Am Chem Soc*, **1981**, 103:5021-5023;
- [62] Villiers, C.; Dognon, J-P.; Pollet, R.; Thuéry, P.; Ephritikhine, M.; An isolated CO₂ adduct of a nitrogen base: crystal and electronic structures. *Angew Chem*, **2010**, 122:3543 –3546;
- [63] Villiers, C.; Dognon, J-P.; Pollet, R.; Thuéry, P.; Ephritikhine, M.; An isolated CO₂ adduct of a nitrogen base: crystal and electronic structures. *Angew Chem Int Ed*, **2010**, 49:3465–3468.
- [64] Ma, J.; Zhang, X.; Zhao, N.; Theoretical study of TBD-catalyzed carboxylation of propylene glycol with CO₂. *J Mol Catal A: Chem*, **2010**, 315:76-81;
- [65] Mizuno, T.; Okamoto, N.; Ito, T.; Miyata, T.; Synthesis of 2,4-dihydroxyquinazolines using carbon dioxide in the presence of DBU under mild conditions. *Tetrahedron Lett*, **2000**, 41:1051-1053.

- [66] Santo, R. D. E.; Capitão, R. M.; González, E. R. P.; Guanidines as catalysts for direct and indirect CO₂ capture and activation. *Chapter of the series Topics in Heterocyclic Chemistry*. **2015**. pp 1 – 48.
- [67] Ishikawa, T.; Superbases for organic synthesis: guanidines, amidines and phosphazenes and related organocatalysts. John Wiley & Sons, **2009**.
- [68] Santo, R. D. E.; Simas, R. C.; Magalhães, A.; Santos, V. G.; Regiani, T.; Isler, A. C.; Martins, N. G.; Eberlin, M. N.; González, E. R. P.; Experimental NMR and MS study of benzoylguanidines. Investigation of E/Z isomerism. *J Phys Org Chem*, **2013**, 26:315–321.
- [69] Zhang, W-Z.; Shi, L-L.; Liu, C.; Yang, X-T.; Wang, Y-B.; Luo, Y.; Lu, X-B.; Sequential carboxylation/intramolecular cyclization reaction of o-alkynyl acetophenone with CO₂. *Org Chem Front*, **2014**, 1:275–283.
- [70] Short, J.H.; Wayne Ours, C.; Ranus, W. J.; Sympathetic nervous system blocking agents. V. Derivatives of isobutyl-, tert-butyl-, and neopentylguanidine. *J. Med. Chem.* **1968**; 11, 1129 – 1135.
- [71] Satoh, T.; Muramatu, M.; Ooi, Y.; Miyataka, H.; Nakajima, T.; Umeyama, M.; Medicinal Chemical Studies on Synthetic Protease Inhibitors, trans-4-Guanidinomethylcyclohexanecarboxylic Acid Aryl Esters. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**; 33, 647 – 654.
- [72] Miyamoto, Y., Hirose, H., Matsuda, H., Nakano, S., Ohtani, M., Kaneko, M., Sishigaki, K., Nomura, F., Kitamura, H., Kawashima, Y.; Analysis of complement activation profile during cardiopulmonary bypass and its inhibition by FUT-175. *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*. **1985**; 31, 508 – 511.
- [73] Okumura, K.; Kiyohara, Y.; Komada, F.; Iwakawa, S.; Hiral, M.; Fuwa, T.; Improvement in Wound Healing by Epidermal Growth Factor (EGF) Ointment. I. Effect of Nafamostat, Gabexate, or Gelatin on Stabilization and Efficacy of EGF. *Pharm. Res.* **1990**; 7, 1289 – 1293.
- [74] Muramatsu, I.; Oshita, M.; Yamanaka, K.; Selective alpha-2 blocking action of DG-5128 in the dog mesenteric artery and rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1983**; 227, 194 – 198.
- [75] Umezawa, S.; Takahashi, Y.; Usui, T.; Tsuchiya, T.; Total synthesis of streptomycin. *J. Antibiot.* **1974**; 27, 997 – 999.
- [76] Marriner, S.; Anthelmintic drugs. *Vet. Rec.* **1986**; 118, 181 – 184.

- [77] Freedlander, B. L.; French, F. A.; Carcinostatic Action of Polycarbonyl Compounds and Their Derivatives. *Cancer Res.* **1958**; 18, 360 – 363.
- [78] Greenhill, J. V.; Lue, P.; *Prog. Med. Chem.* **1993**; 30, 203-326. Para reviews de produtos naturais contend o núcleo guanidínico, ver: (a) Berlinck, R. G. S.; Kossuga, M. H.; *Nat. Prod. Rep.* **2005**; 22, 516-550. (b) Berlinck, R. G. S.; *Nat. Prod. Rep.* **2002**; 19, 617-649. (c) Faulkner, D. J.; *Nat. Prod. Rep.* **1999**; 16, 155-198. (d) Berlinck, R. G. S.; *Nat. Prod. Rep.* **1999**; 16, 339-365. (e) Berlinck, R. G. S.; *Nat. Prod. Rep.* **1996**; 13, 377-409.
- [79] Hirsch, J. A.; Structure-activity relationship between guanidine alkyl derivatives and norepinephrine release: site(s) and mechanism(s) of action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* **1984**; 230, 3, 710-717.
- [80] Santo, R. D. E.; Machado, M. G. M.; Santos, J. L.; González, E. R. P.; Chin, M. C.; Use of guanidine compounds in the treatment of neglected tropical diseases. *Curr. Org. Chem.* **2014**, 18:2572-2602.
- [81] Stephens, C. E.; Brun, R.; Salem, M. M.; Werbovetz, K. A.; Tanious, F.; Wilson, W. D.; Boykin, D. W.; The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 2065-2069.
- [82] Hua, H.; Peng, J.; Fronczek, F. R.; Kelly, M.; Hamann, M. T.; Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 6461-6464.
- [83] Costa, E. V.; Pinheiro, M. L. B.; Xavier, C. M.; Silva, J. R. A.; Amaral, A. C. F.; Souza, A. D. L.; Barison, A.; Campos, F. R.; Ferreira, A. G.; Machado, G. M. C.; Leon, L. L. P.; A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69, 29 -294.
- [84] Agarwal, K. C.; Sharma, V.; Shakya, N.; Gupta, S.; Design and synthesis of novel substituted quinazoline derivatives as antileishmanial agentes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 5474-5477.
- [85] Dea-Ayuela, M. A.; Castillo, E.; Gonzalez-Alvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Bolás-Fernández, F.; Borrás, J.; González-Rosende, M. E.; In vivo and in vitro anti-leishmanial activities of 4-nitro-N-pyrimidin and N-pyrazin-2-ylbenzenesulfonamides, and N2-(4-nitrophenyl)-N1-Propylglycinamide. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 7449-7456.

- [86] Bilbao-Ramos, P.; Galiana-Roselló, C.; Dea-Ayuela, M. A.; González-Alvarez, M.; Vega, C.; Rolón, M.; Pérez-Serrano, J.; Bolás-Fernández, F.; González-Rosende, M. E.; Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. *Parasit. Inter.*, **2012**, 61, 604-613.
- [87] Santo, R. D. E.; Síntese, caracterização e estudo do isomerismo E/Z de benzoilguanidinas. Dissertação de mestrado. 2013. Disponível em: <http://www2.fc.unesp.br/BibliotecaVirtual/DetalhaDocumentoAction.do?idDocumento=536>.
- [88] Sullivan, M. C. O.; Dalrymple, D. M.; Zhou, Q.; Inhibiting effects of spermidine derivatives on Trypanosoma Cruzz Trypanothione Reductase. *J. Enzyme Inhib.* **1996**, 11, 97 – 114.
- [89] Pereira, D. G.; Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 171-177.
- [90] Li, J. Q.; Yang, C. L.; Synthesis and Crystal Structure of a Compound with Two Conformational Isomers: *N*-(2-methylbenzoyl)-*N'*-(4-nitrophenyl)thiourea. *J. Chem Crystallogr.* **2008**; 38, 927-930.
- [91] Cunha, S.; Lima, B. R.; Souza, A. R.; Bismuth nitrate pentahydrate: a new and environmentally benign reagent for guanidylation of *N*-benzoylthioureas. *Tetrahedron Lett.* **2002**; 43, 49–52.
- [92] Velásquez, A. M. A. et al. Antiprotozoal Activity of the Cyclopalladated Complexes Against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2016**, v. 0, n. 0, p. 1–8.
- [93] Mosmann, T.; Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, **1983**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63.
- [94] Dutta, A.; Bandyopadhyay, S.; Mandal, C.; Chatterjee, M.; Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*, **2005**, v. 54, n. 2, p. 119-122.
- [95] 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*, **2000**, v. 86, n. 12, p. 999-1002.
- [96] Wass, J. A.; Origin 7.0. Biotech Software and Internet Report, **2002**, v. 3, n. 5/6, p. 130-133.

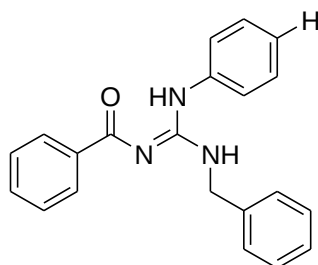
- [97] Fiocruz, M. D. S.; Curso de manipulação de animais de laboratório. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Salvador, **2005**. Disponível em: <www.cpqgm.fiocruz.br/arquivos/bioterio/bioterio_apostilha.pdf>.
- [98] Carlos, I. Z.; Carli, C. B. A.; Maia, D. C. G.; Benzatti, F. P.; Lopes, F. C. M.; Roese, F. M.; Watanabe, M.; Micheletti, A. C.; Dos Santos, L. C.; Vilegas, W.; Honda, N. K.; Immunostimulatory effects of the phenolic compounds from lichens on nitric oxide and hydrogen peroxide production. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2009**, v. 19, n. 4, p. 6.
- [99] Passalacqua, T. G. et al. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, v. 25, n. 16, p. 3342–3345.
- [100] Bollini, M.; Casal, J. J.; Alvarez, D. E.; Boiani, L.; González, M.; Cerecetto, H.; Bruno, A. M.; New potent imidazoisquinolinone derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, v. 17, n. 4, p. 1437-1444.
- [101] Silva, A. P. B.; Descoberta e planejamento de novos inibidores da enzima desoxi-hipusina sintase humana: biologia celular e química medicinal. Dissertação de mestrado. **2014**
- [102] Zhang, W-X.; Xu, L.; Xi, Z.; Recent development on the synthetic methods of guanidines via transition metal catalysis. *ChemComm*, **2014**, accepted manuscript, DOI: 10.1039/c0xx00000x e artigos citados nele.
- [103] Cunha, S.; Costa, M. B.; Napolitano, H. B.; Lariucci, C.; Vencato, I.; Study of N-benzoyl-activation in the HgCl₂-promoted guanylation reaction of thioureas. Synthesis and structural analysis of N-benzoyl-guanidines. *Tetrahedron*. **2001**; 57, 1671-1675
- [104] Cunha, S.; Rodrigues Jr, M. T. ; The first bismuth(III)-catalyzed guanylation of thioureas. *Tetrah. Lett.*, **2006**, 47, 6955-6956.
- [105] Bocedi, A.; Gradoni, L.; Menegatti, E.; Ascenzi, P.; Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2004**, v. 35, p. 710-718.
- [106] Steverding, D.; Caffrey, C. R.; Sajid, M.; Cysteine proteinase inhibitors as therapy for parasitic diseases: advances in inhibitor design. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **2006**, v. 6, n. 9, p. 1025-1032.

- [107] Sajid, M.; Mckerrow, J. H.; Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **2002**, v. 120, n.1, p. 1-21.
- [108] Choy, W. N.; Regulatory genetic toxicology tests. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy, W. N.ed.), Marcel Dekker, Inc, New York, **2001**.
- [109] Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K.; Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, **2003**.
- [110] Heddle, J. A.; Salamone, M. F.; Hite, M.; Kirkhart, B.; Mavournin, K.; Macgregor, J. G.; Newell, G. W.; The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity. *Mutation Res.* **1983**, 123, 61-118.
- [111] Macgregor, J. T.; Wehr, C. M.; Henika, P. R.; Shelby, M. E.; The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. *Fund. Appl. Toxicol.*, **1990**, 14, 513-522.
- [112] Chelucci, R. C.; Obtenção de híbridos LAPDES FUR-FD e atividade anti-inflamatória com potencial atividade neuroprotetora. Dissertação de mestrado. **2013**.

APÊNDICE A: Seção de espectros.

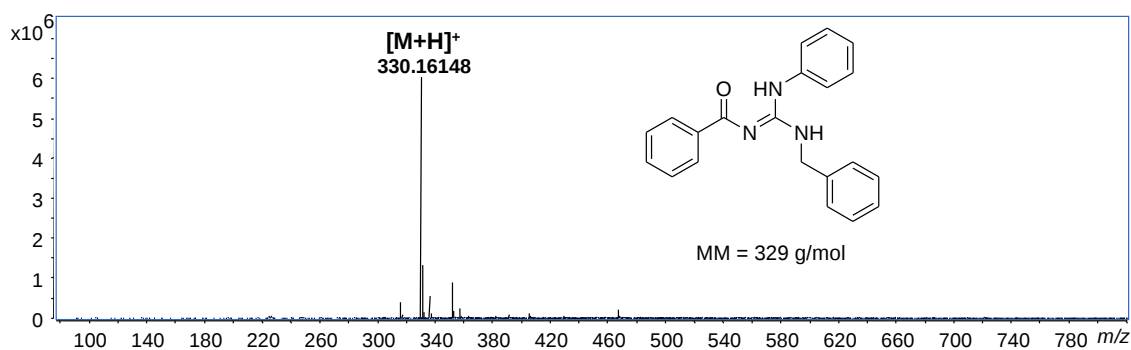
- Os espectros dos compostos **LQOF-G1**, **LQOF-G2** e **LQOF-G3** podem ser encontrados nas referências 68 e 87.

- **Composto LQOF-G4:**

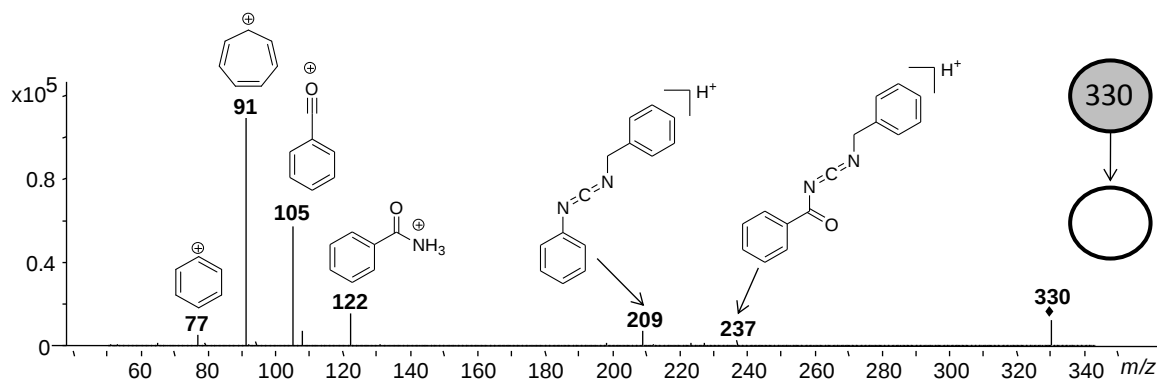


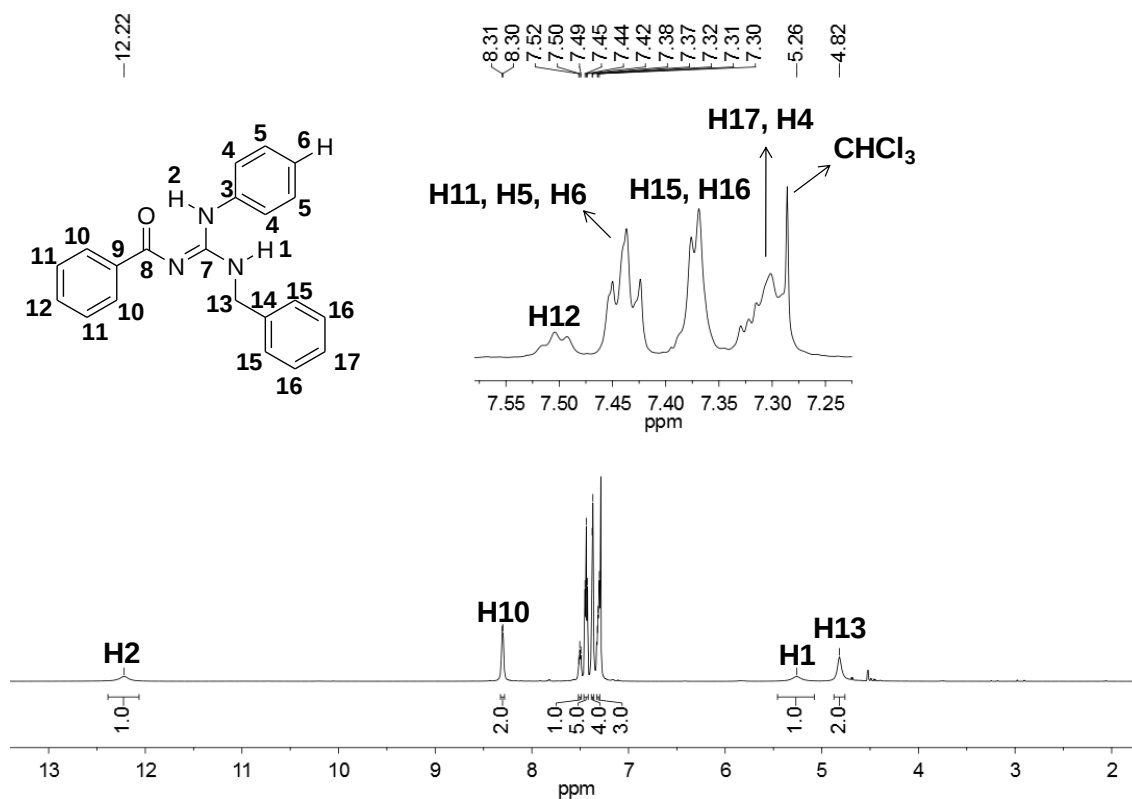
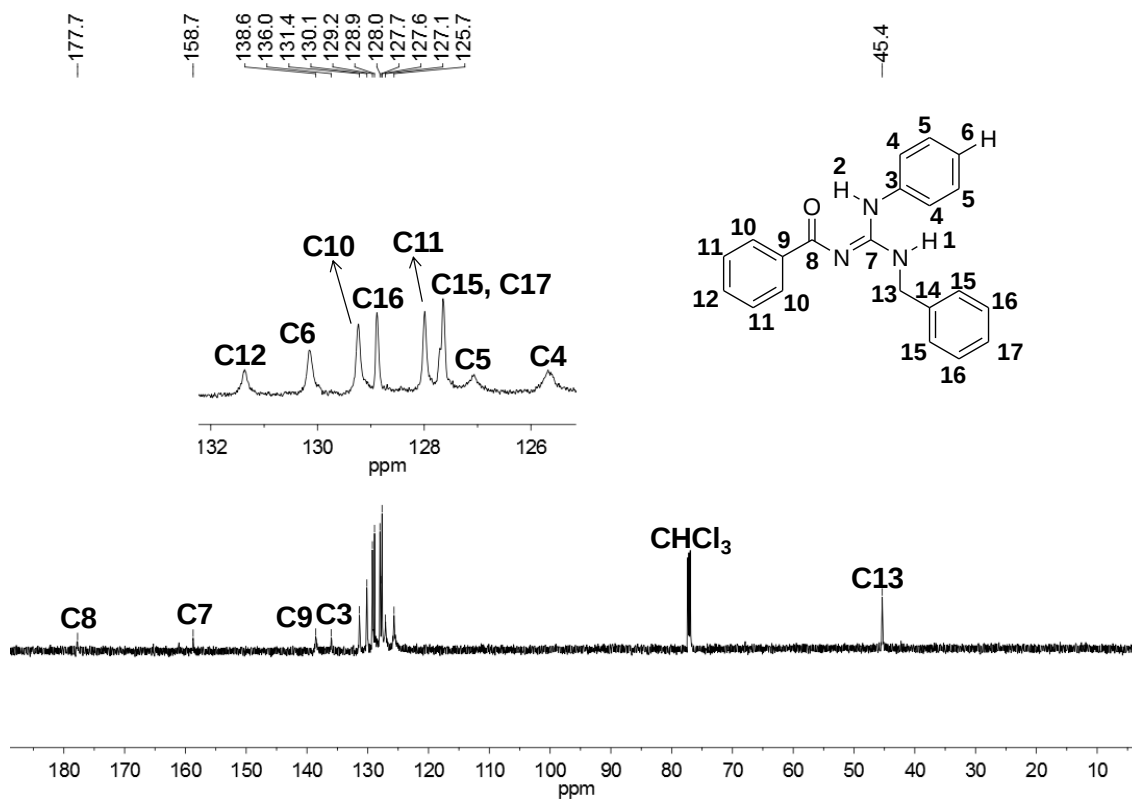
Rendimento: 88,8%

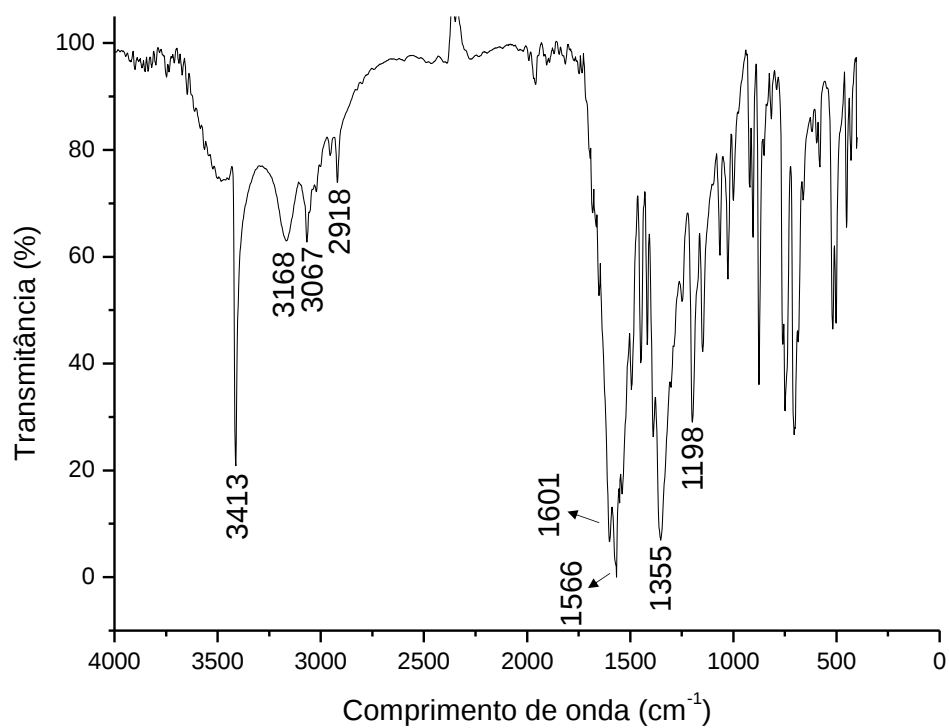
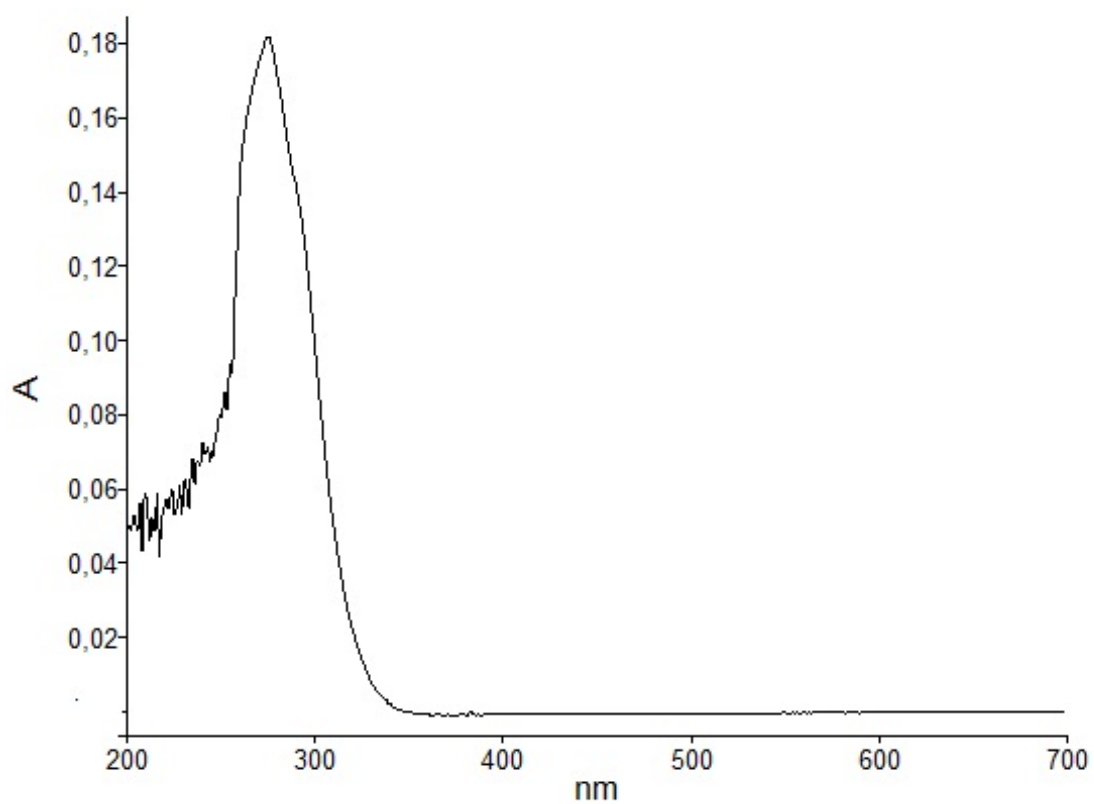
ESI(+)-MS



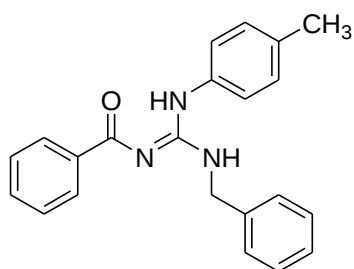
ESI(+)-MS/MS



^1H NMR **^{13}C NMR**

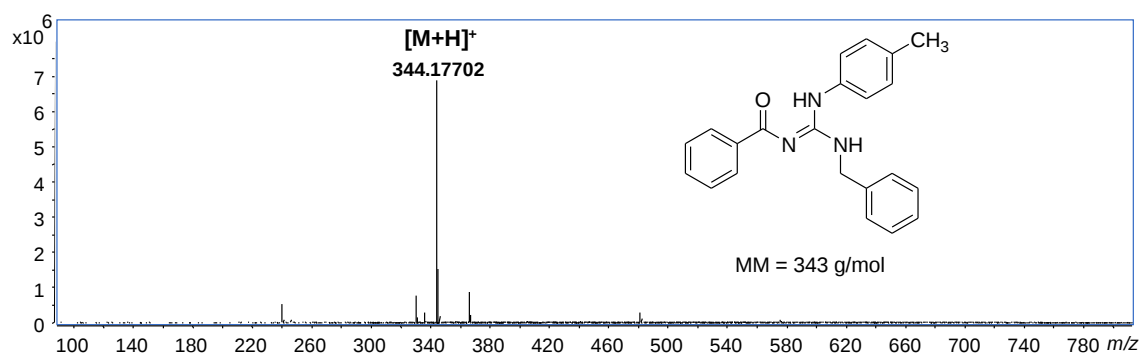
FT-IV:**UV-Vis:**

➤ **Composto LQOF-G5:**

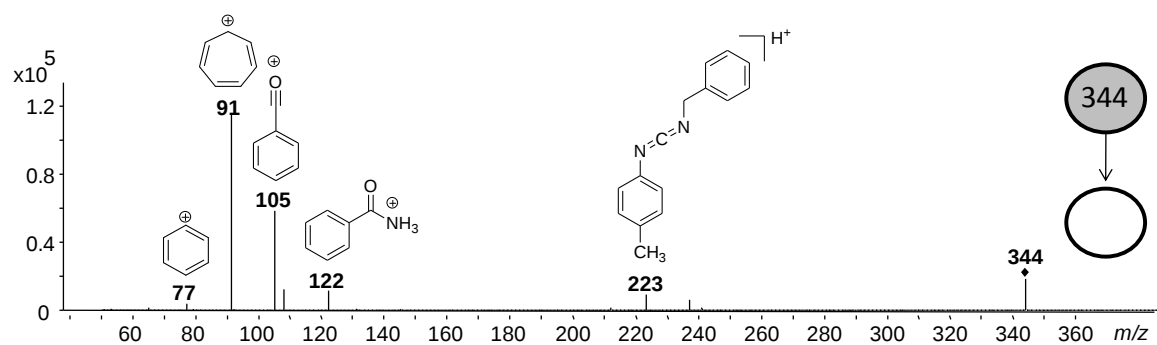


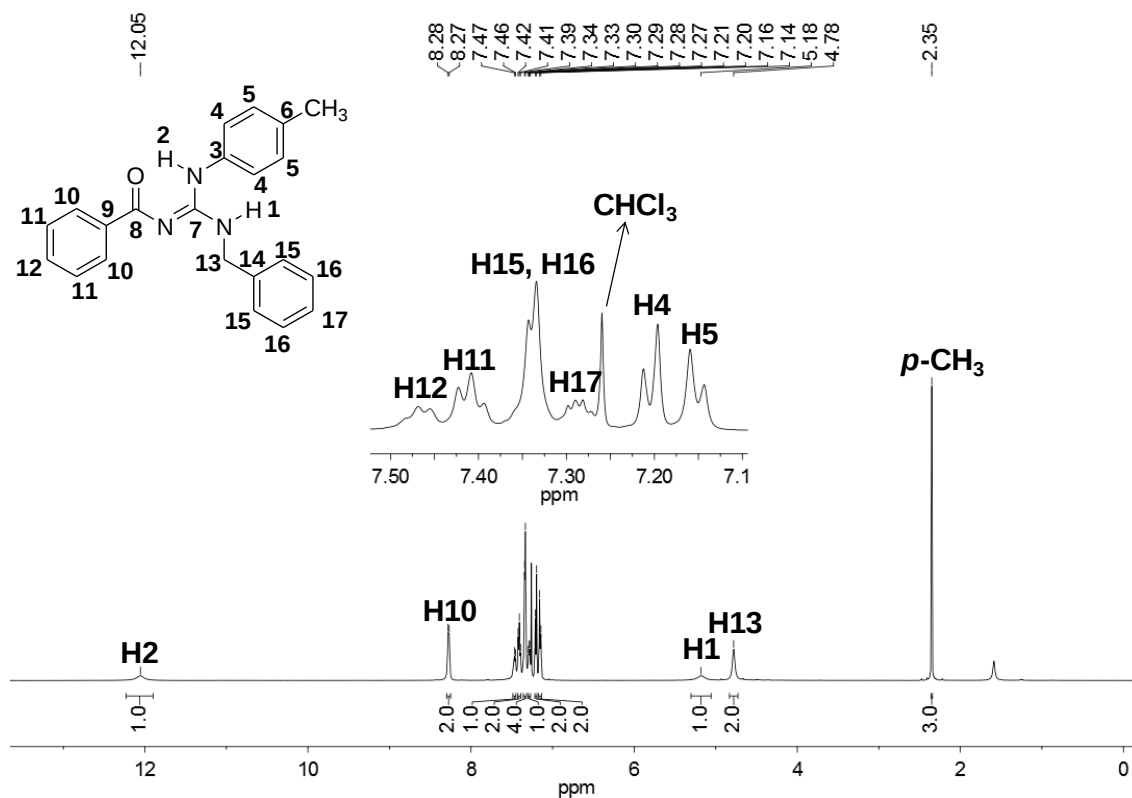
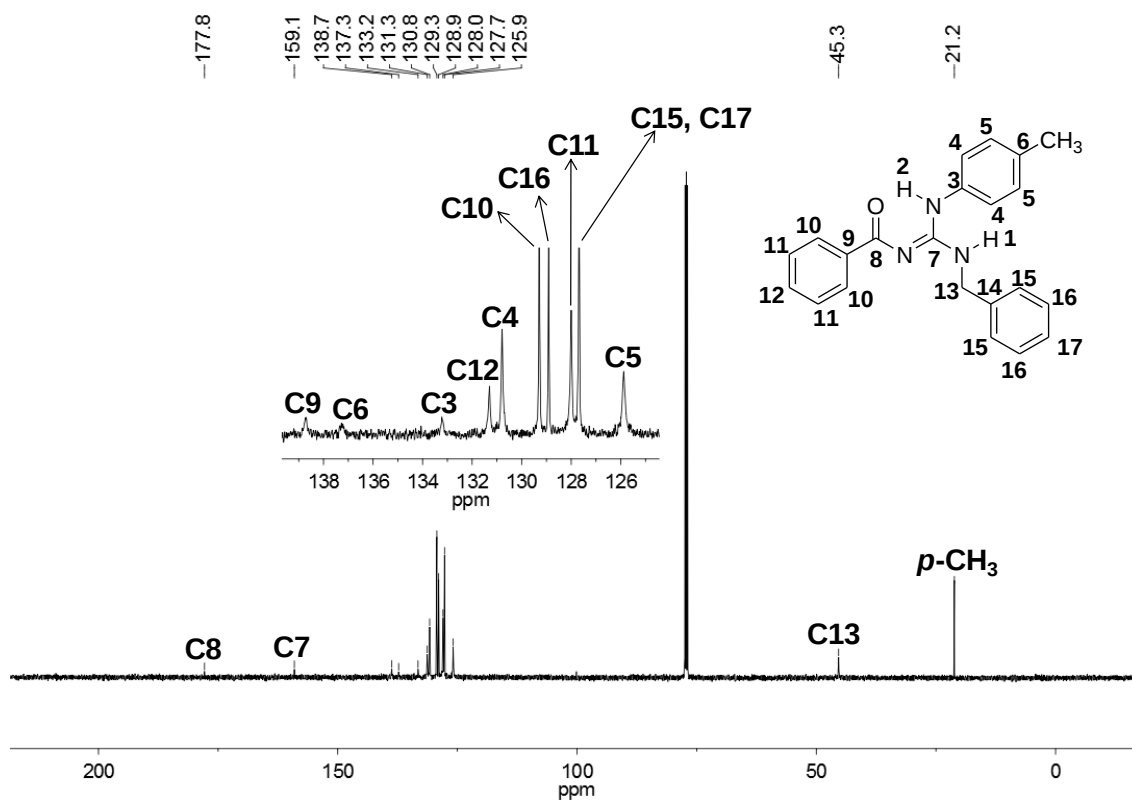
Rendimento: 53%

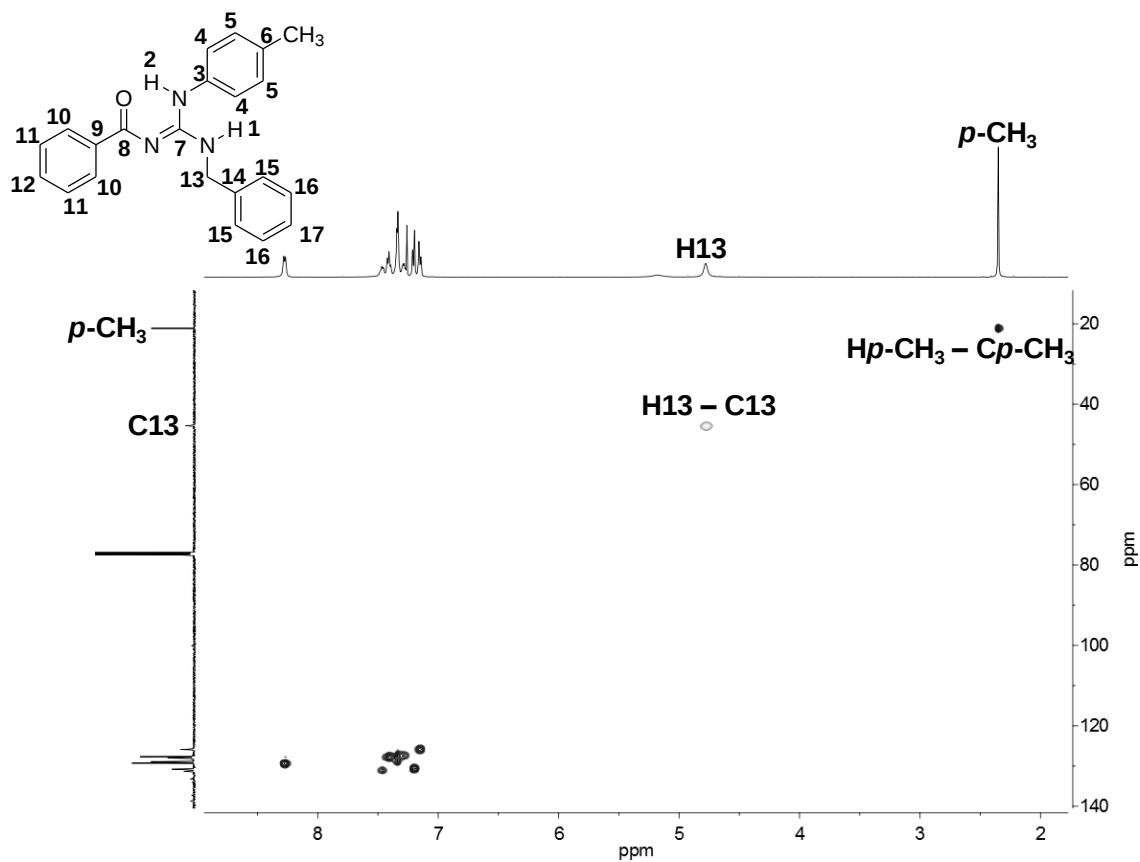
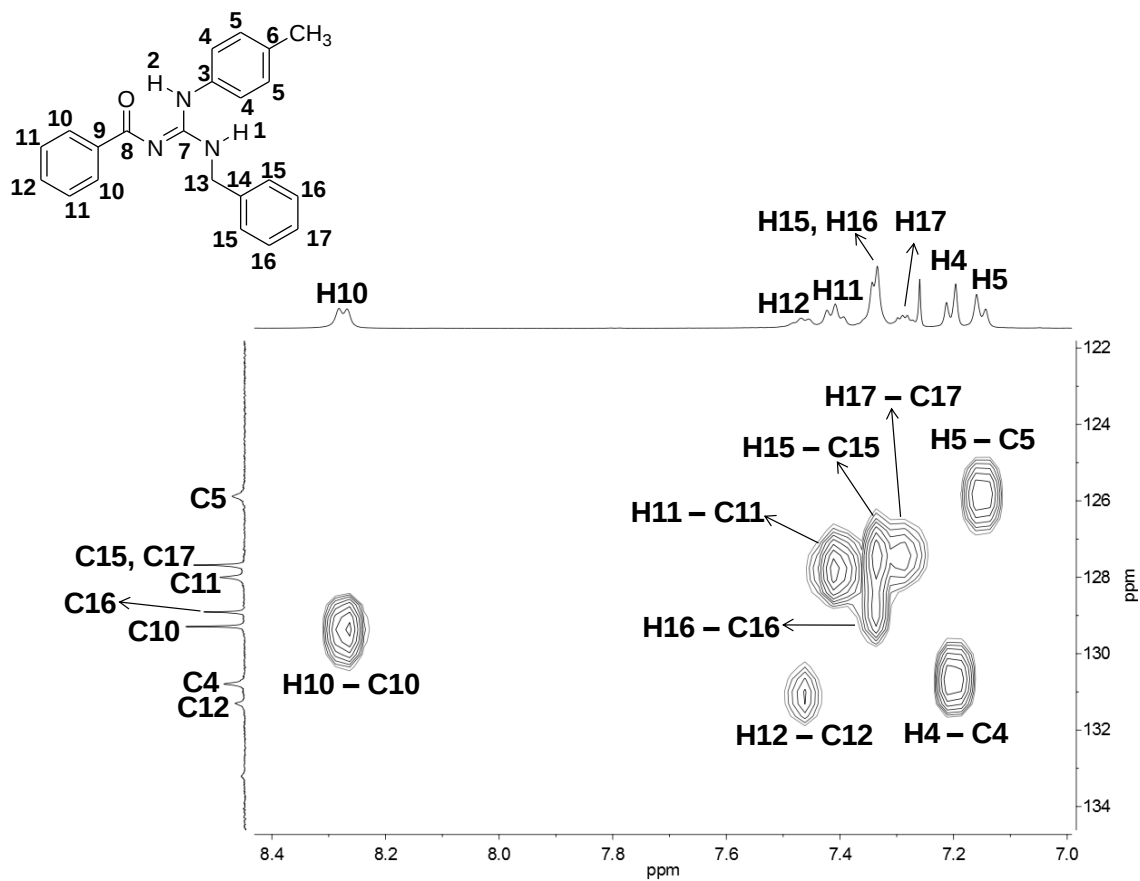
ESI(+)-MS:

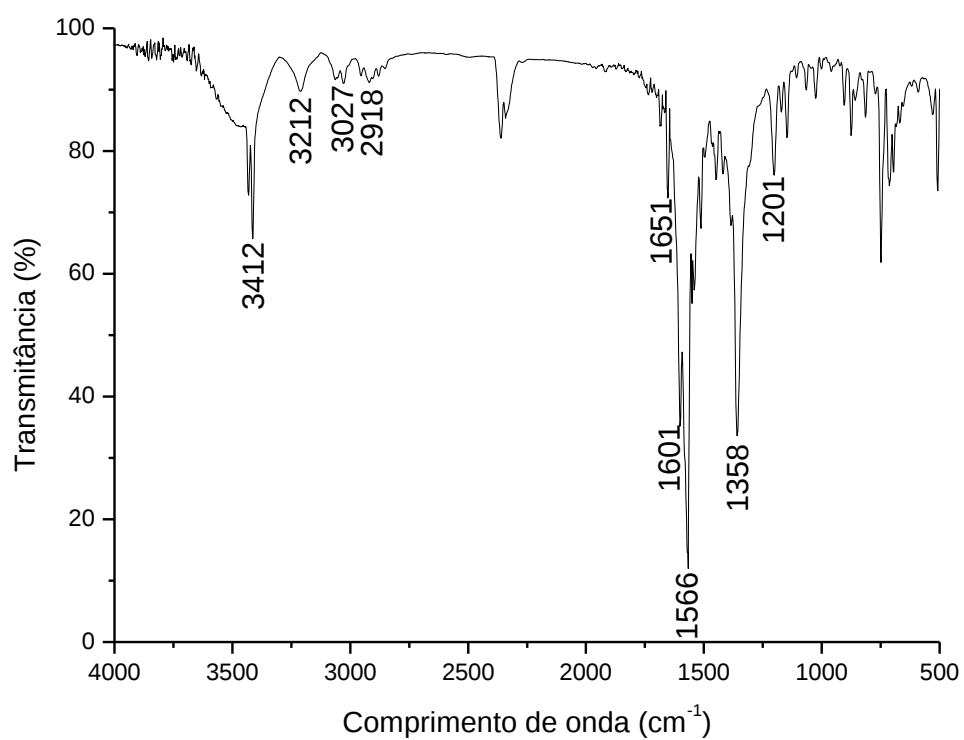
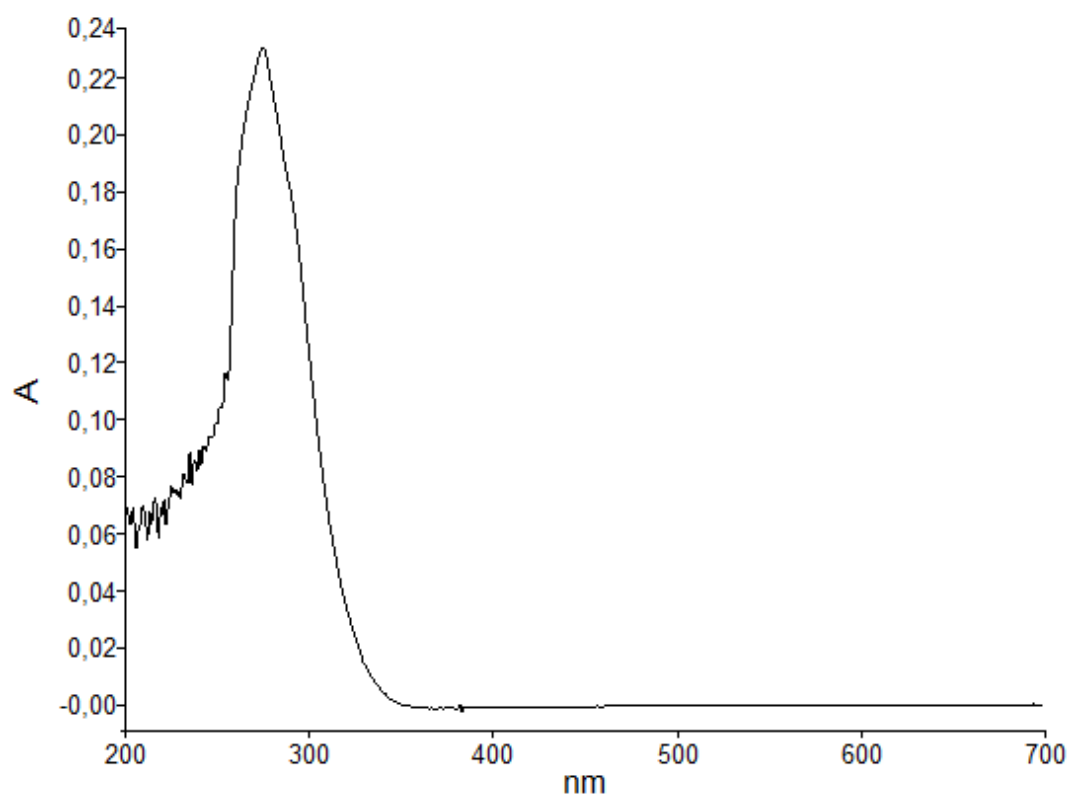


ESI(+)-MS/MS

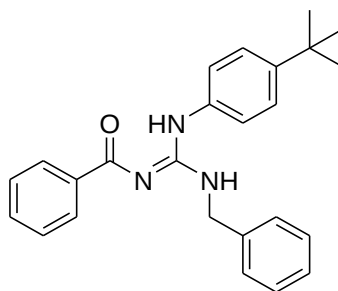


^1H NMR **^{13}C NMR**

$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC (ampliação da região aromática)

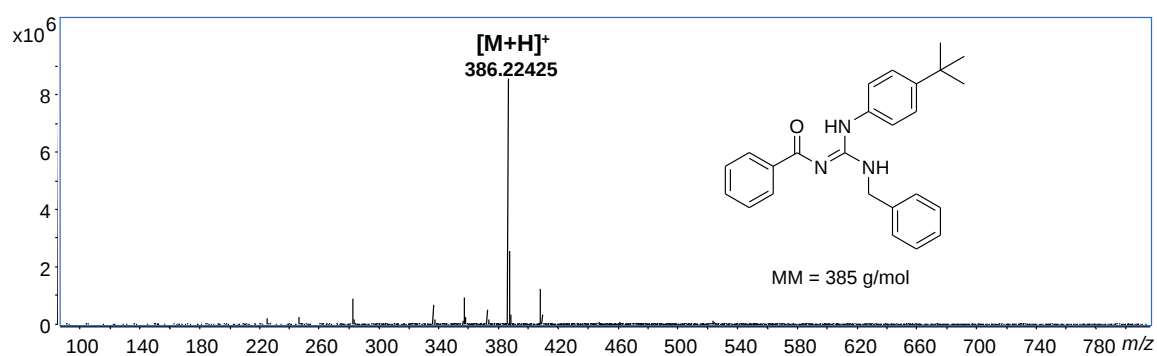
FT-IV:**UV-Vis:**

➤ **Composto LQOF-G6:**

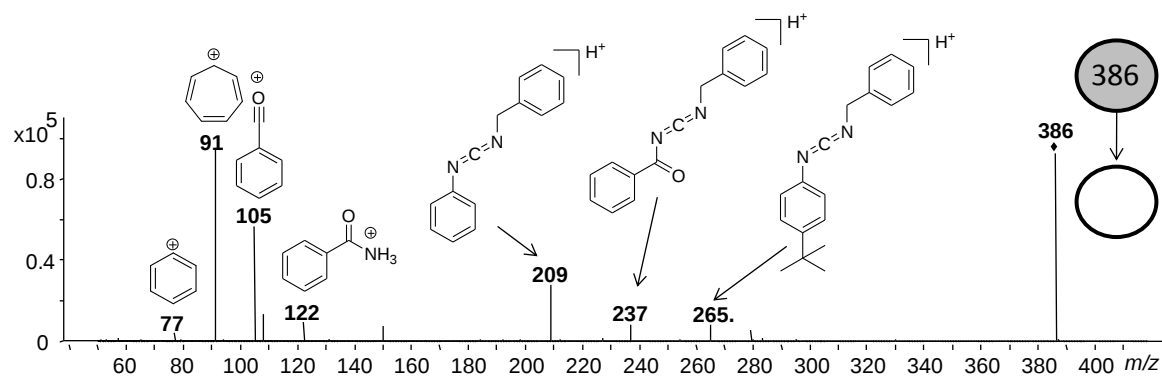


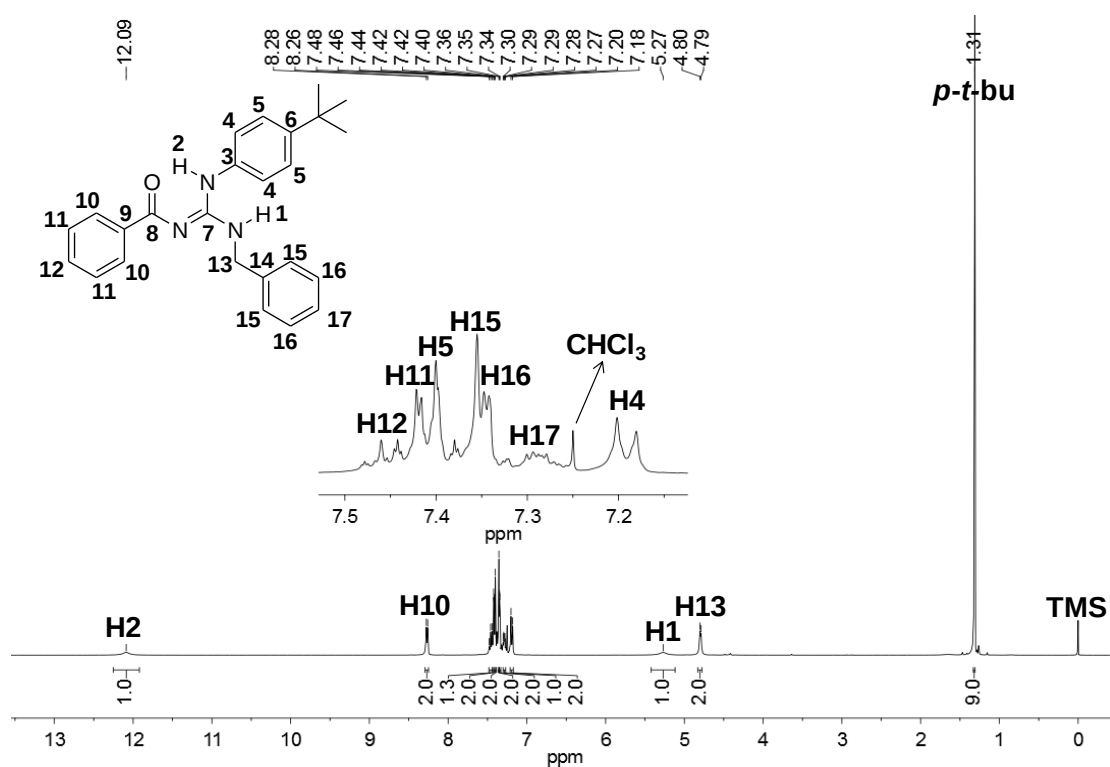
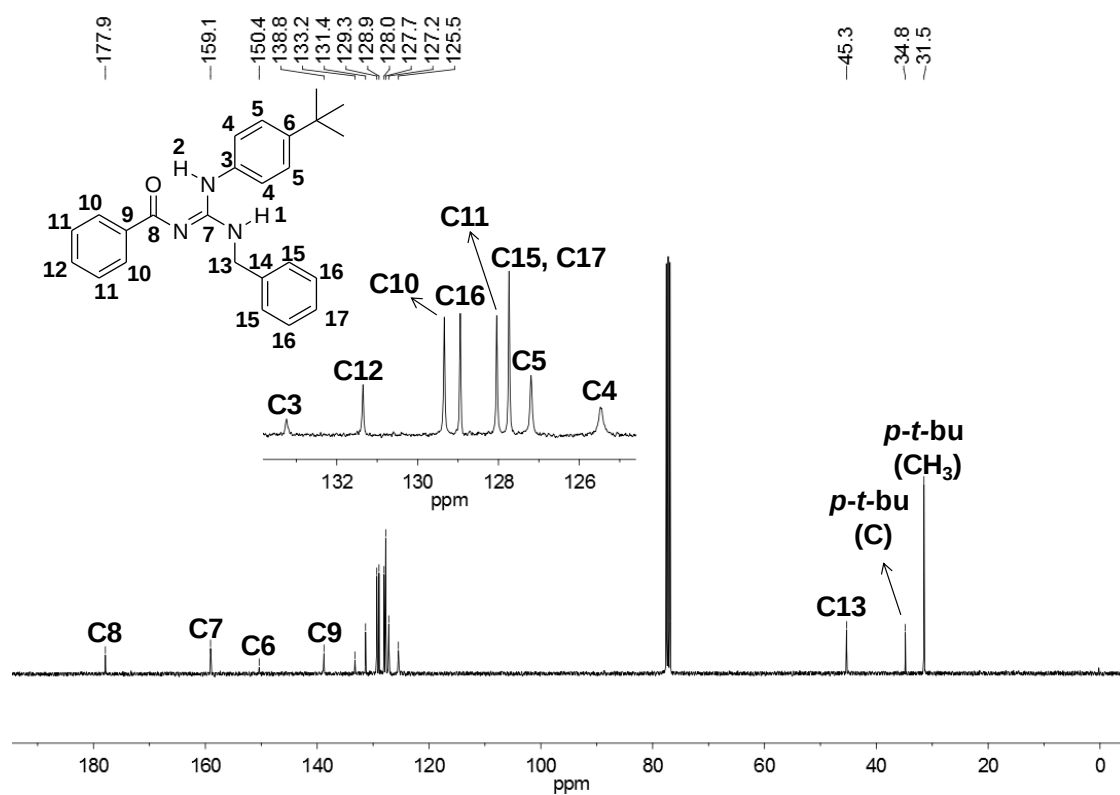
Rendimento: 44,2%

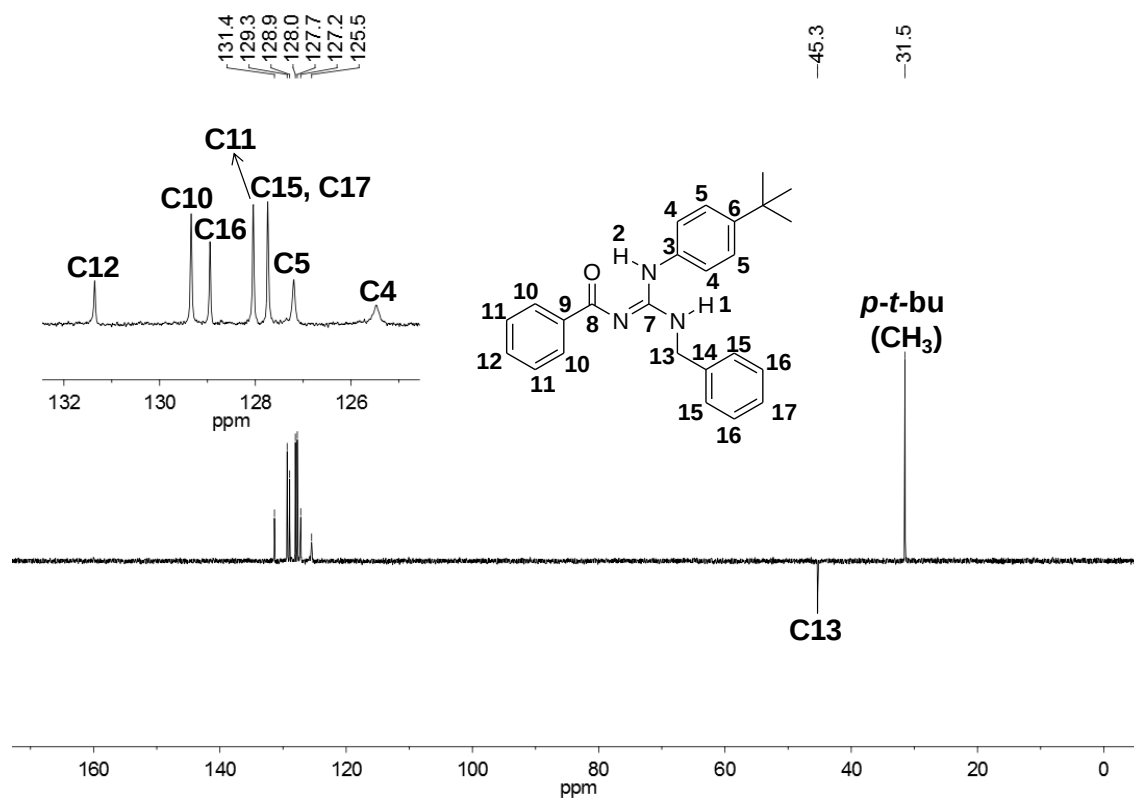
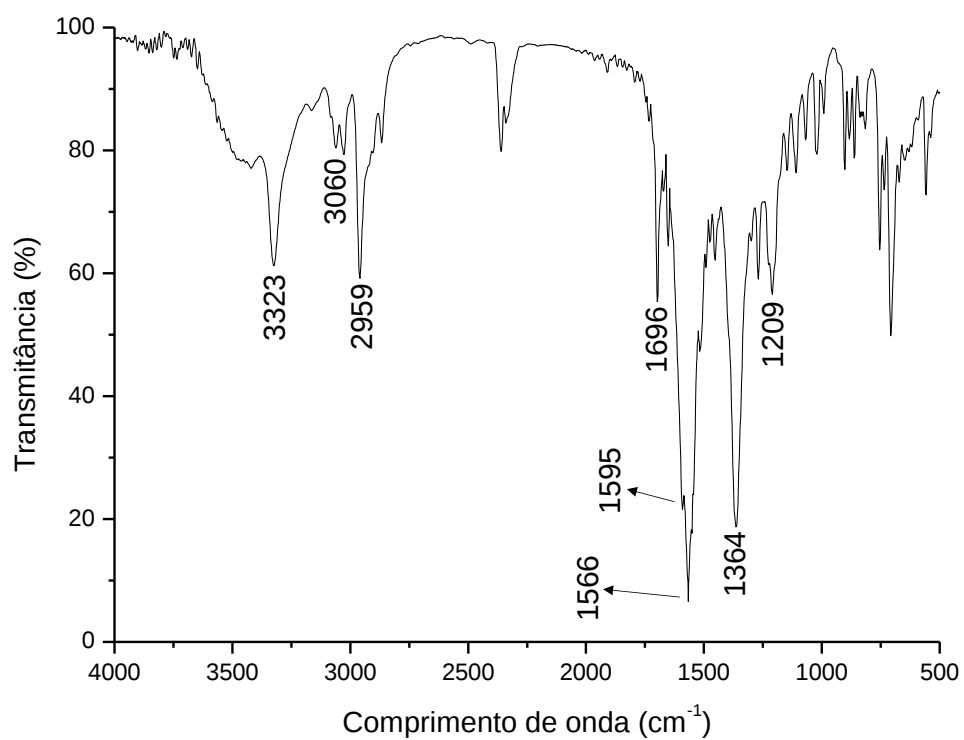
ESI(+)-MS:

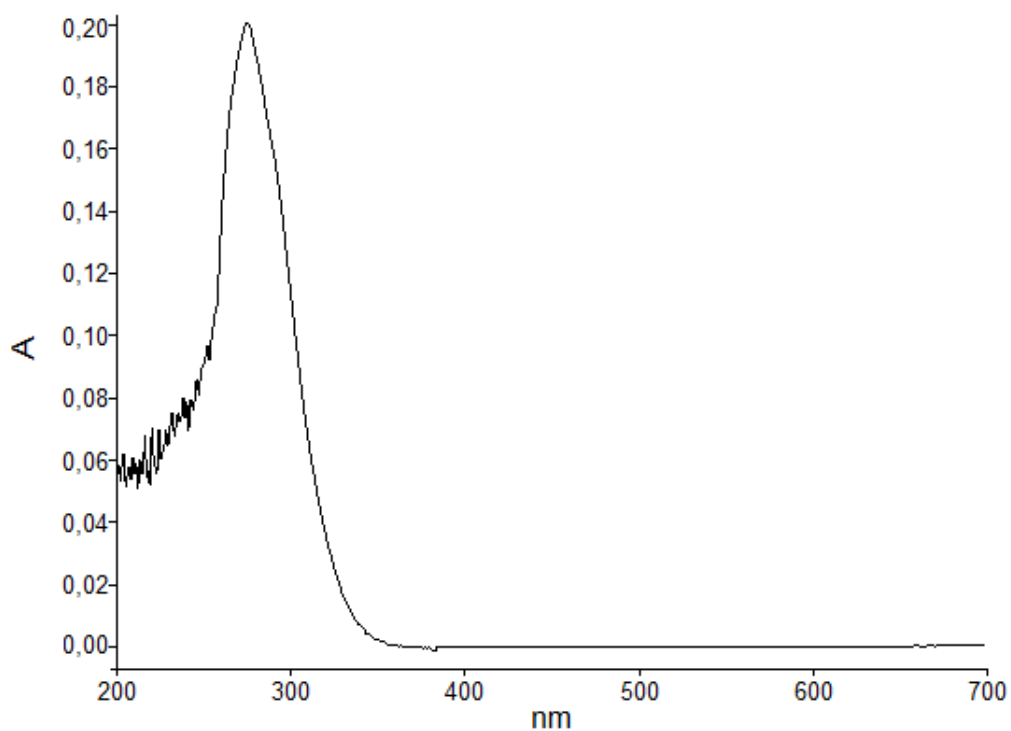
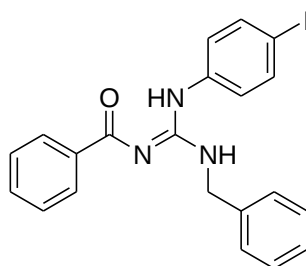
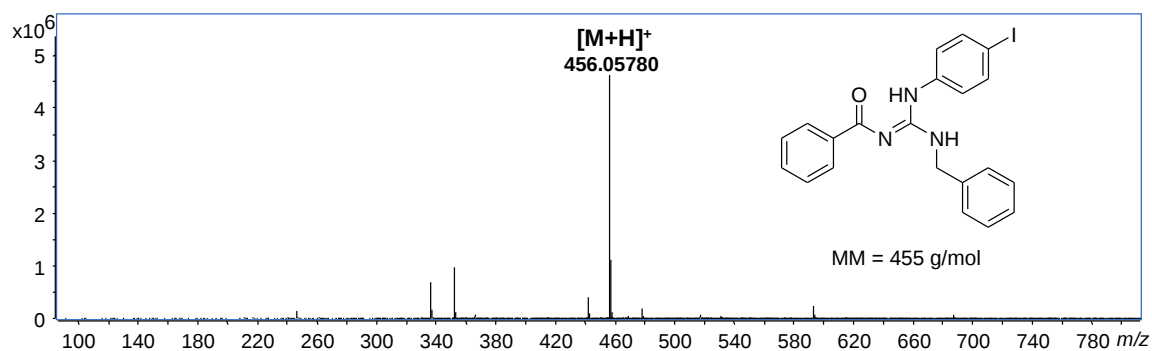


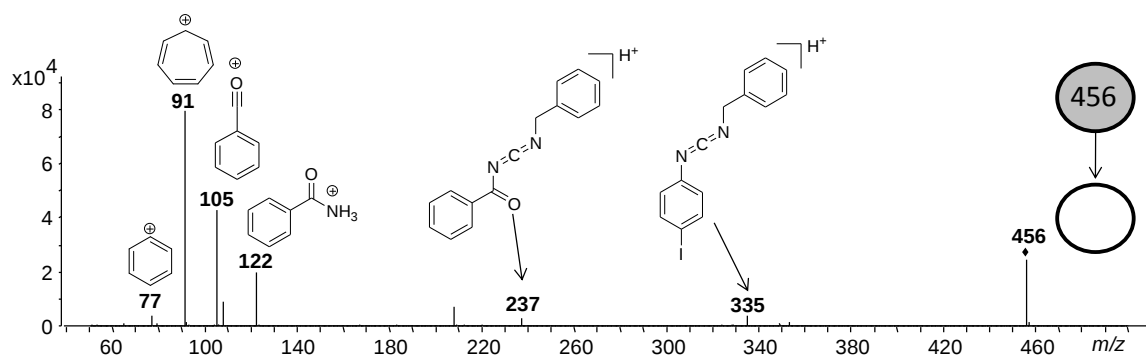
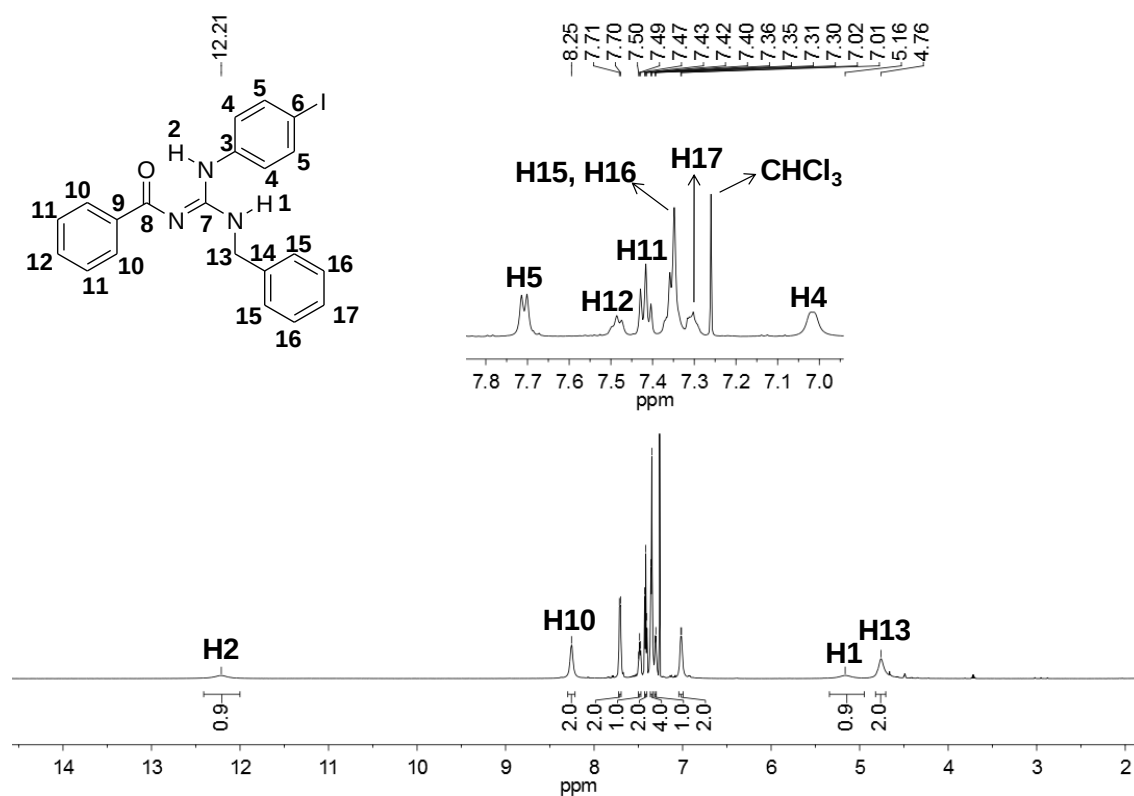
ESI(+)-MS/MS

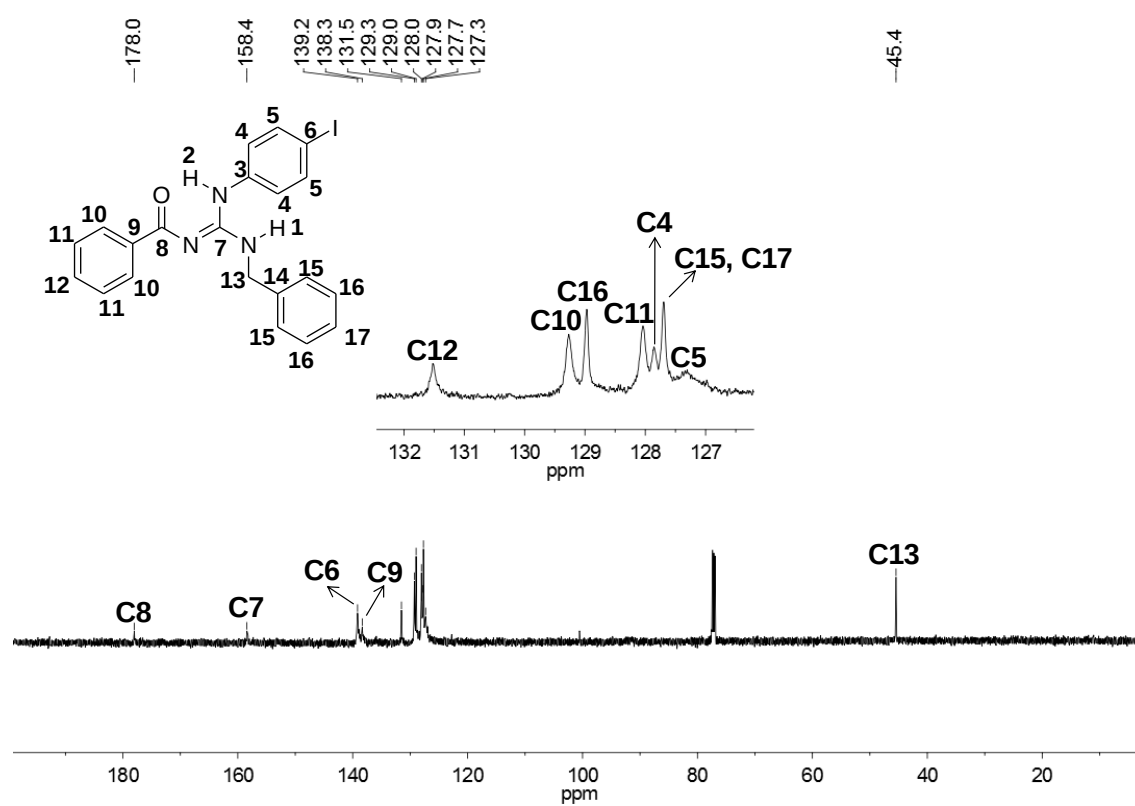
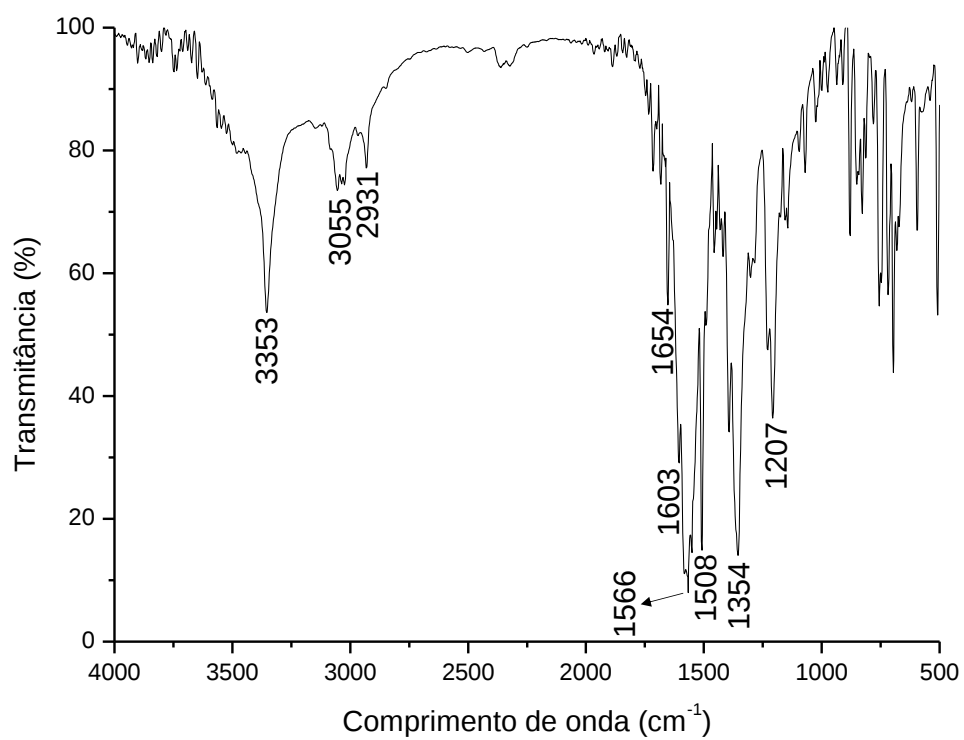


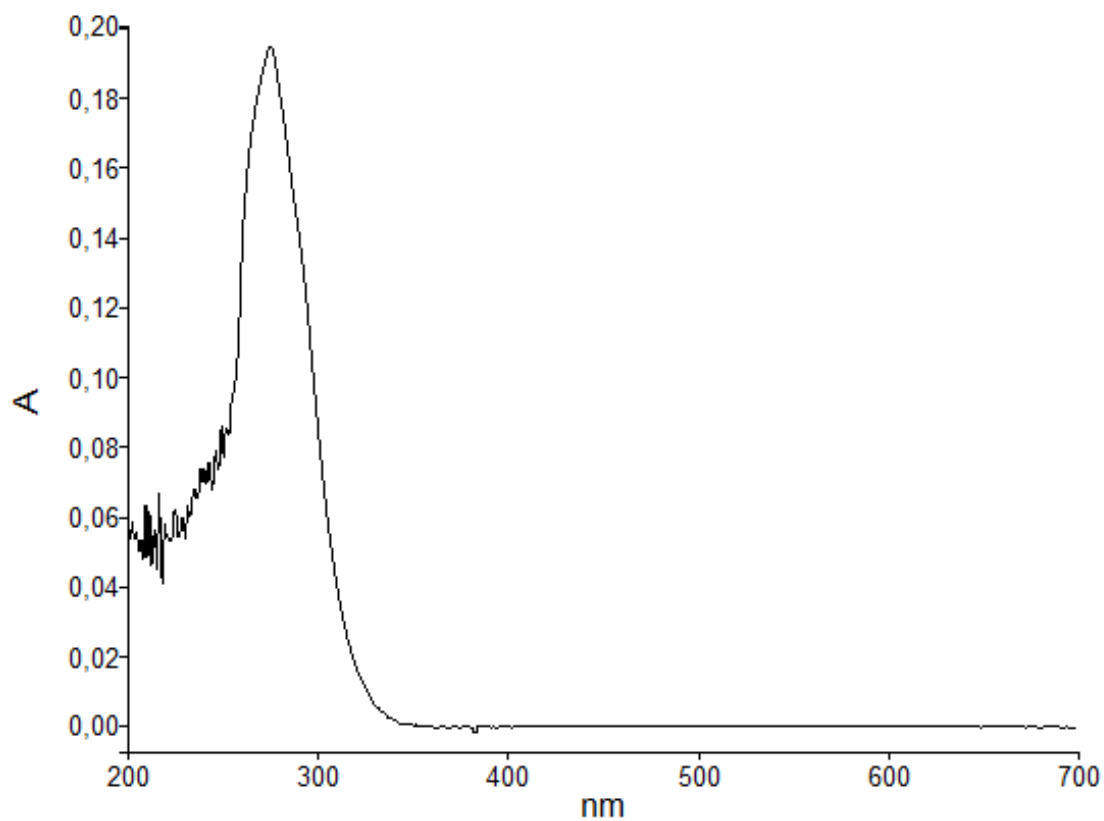
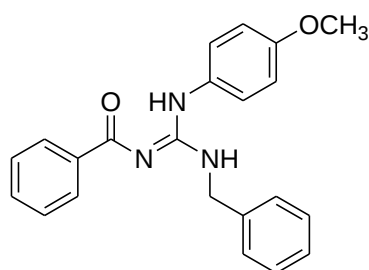
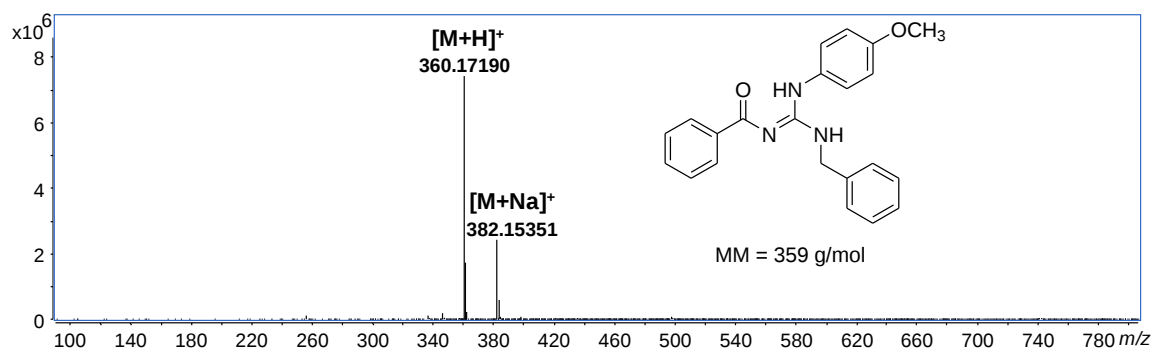
^1H NMR **^{13}C NMR**

DEPT135**FT-IV:**

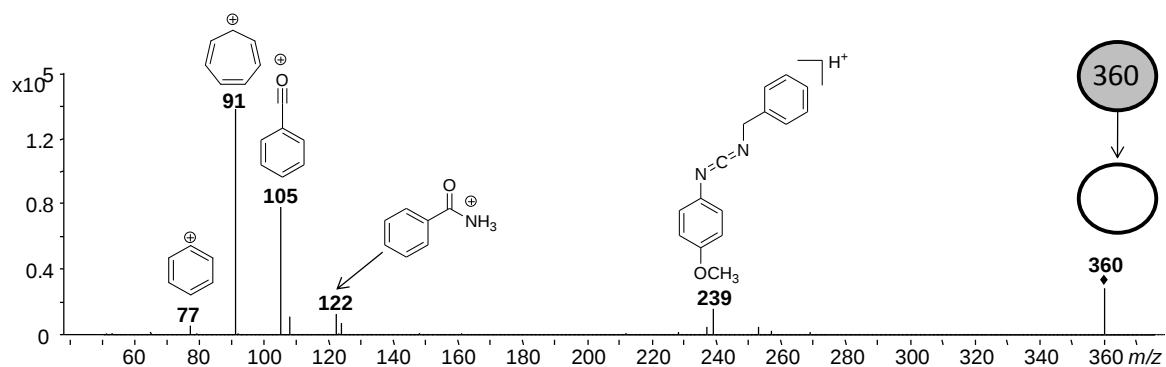
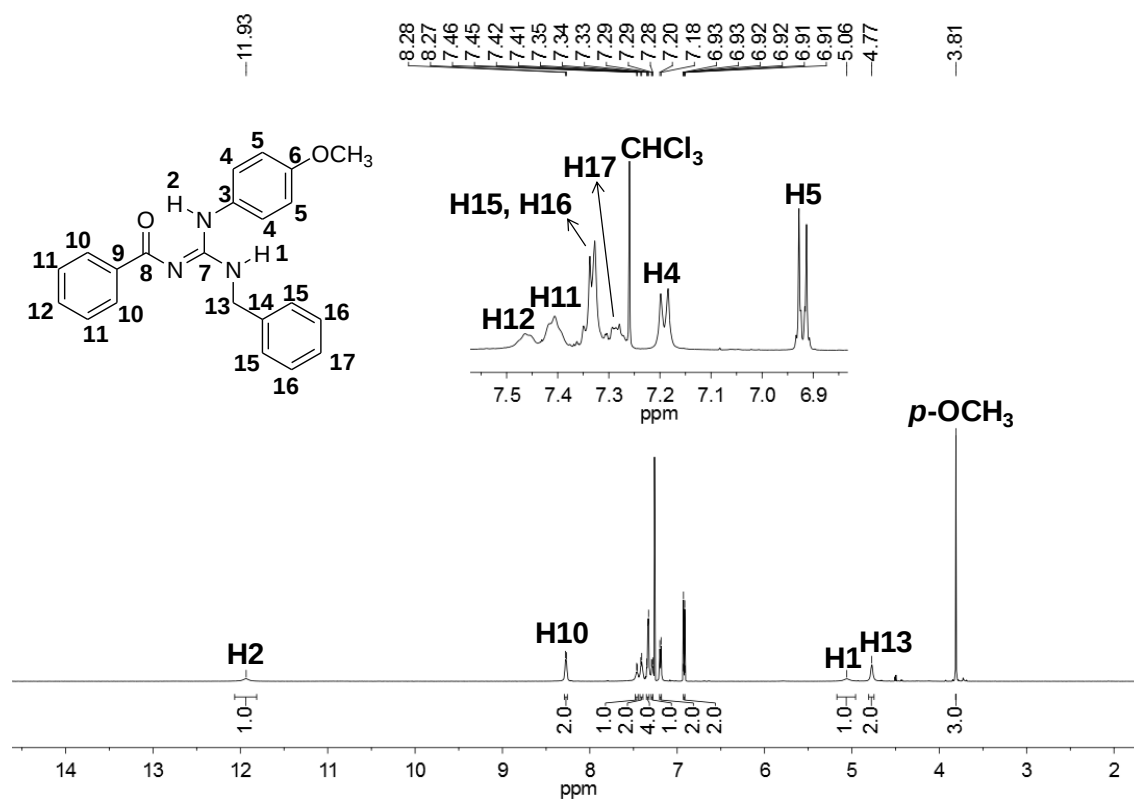
UV-Vis:**➤ Composto LQOF-G7:****Rendimento: 50%****ESI(+)-MS:**

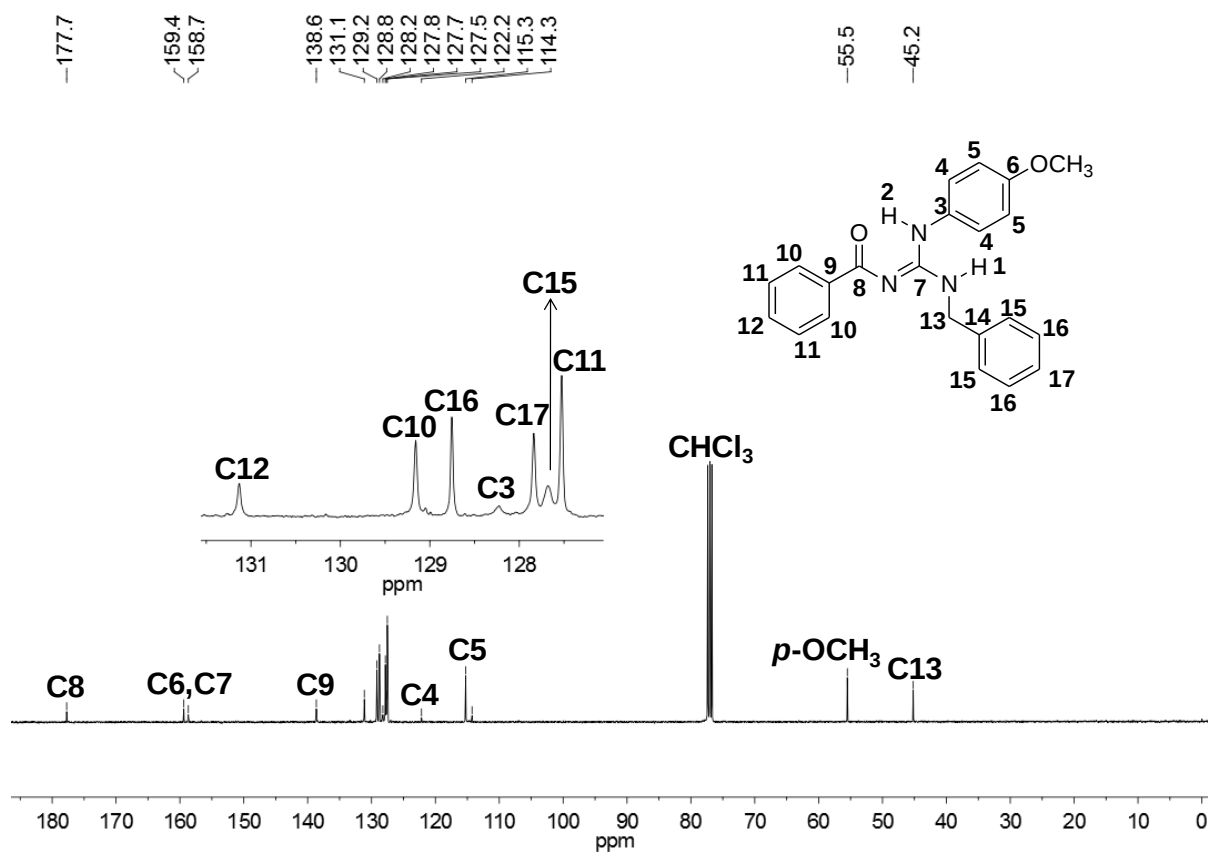
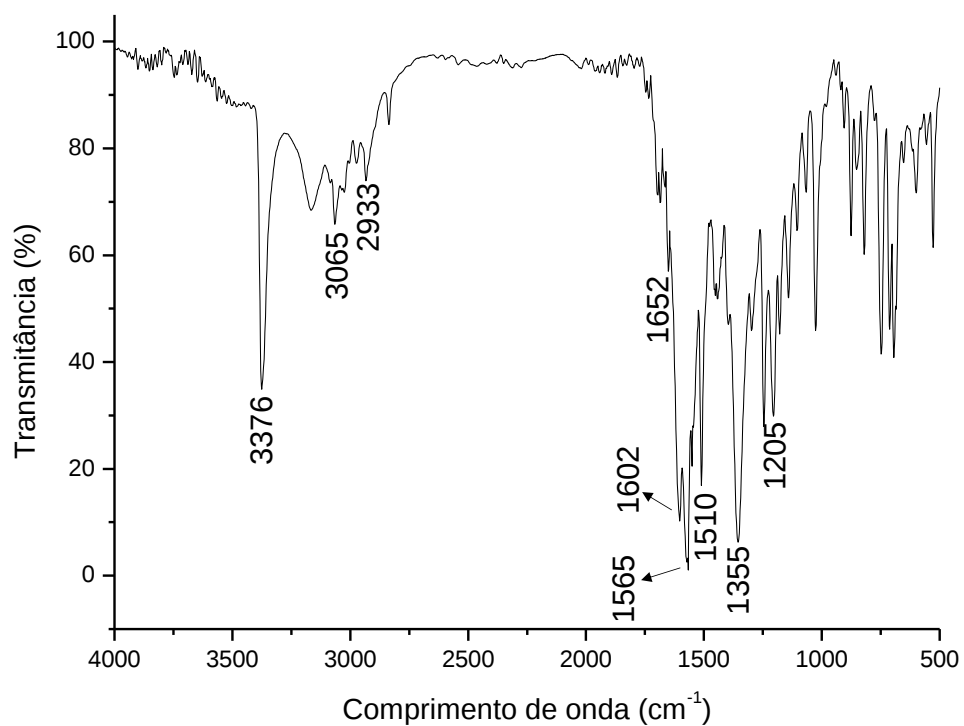
ESI(+)-MS/MS**¹H NMR**

^{13}C NMR**FT-IV:**

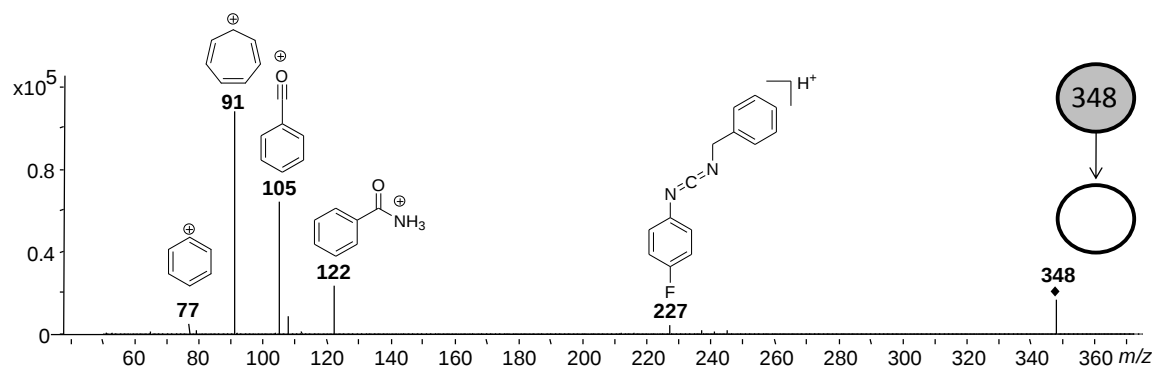
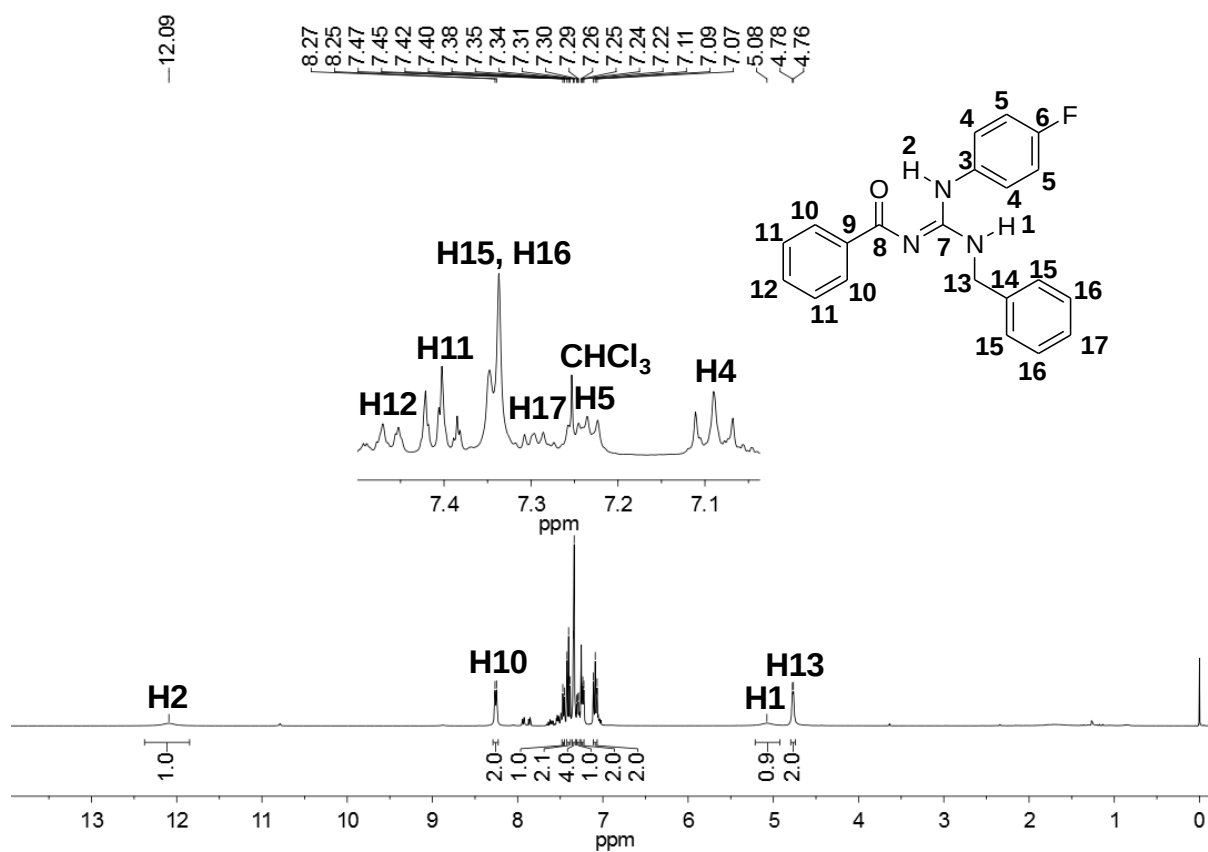
UV-Vis:**➤ Composto LQOF-G8:****Rendimento: 84,9%****ESI(+)-MS:**

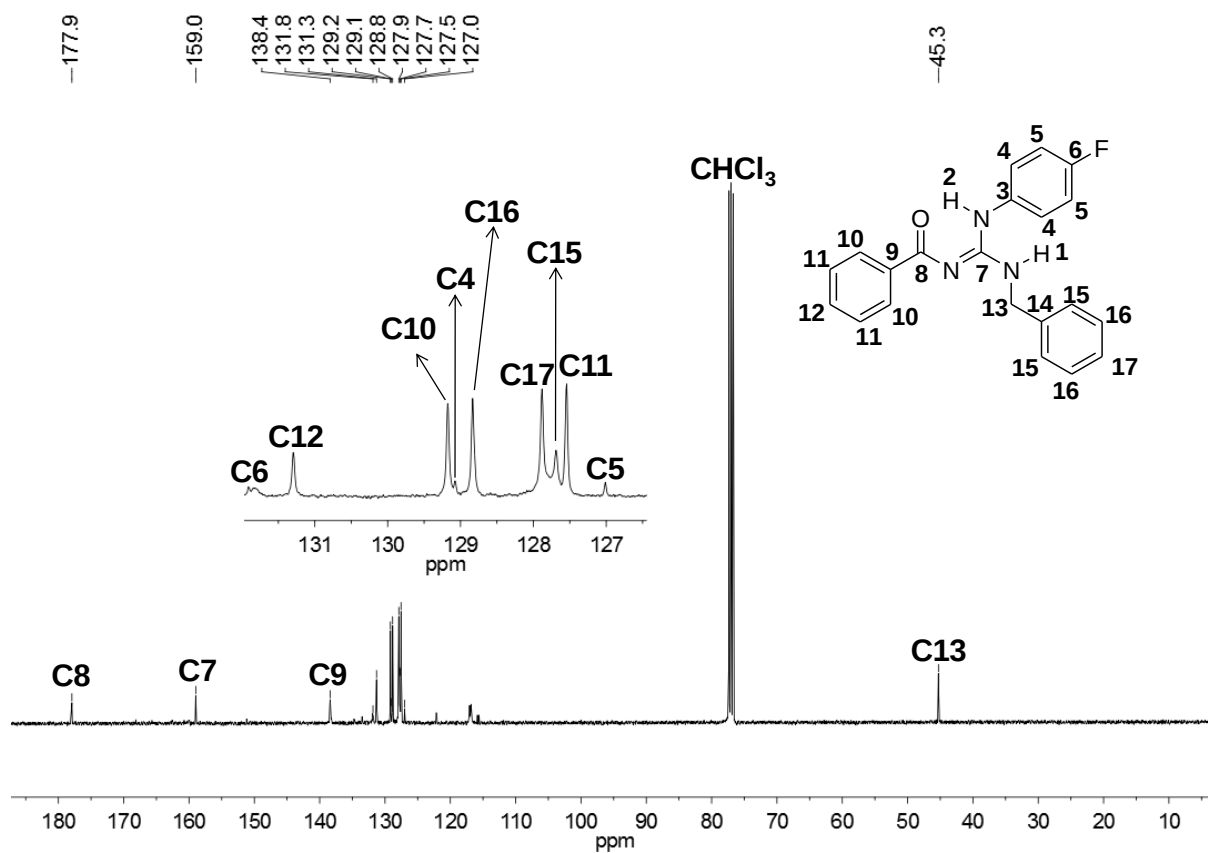
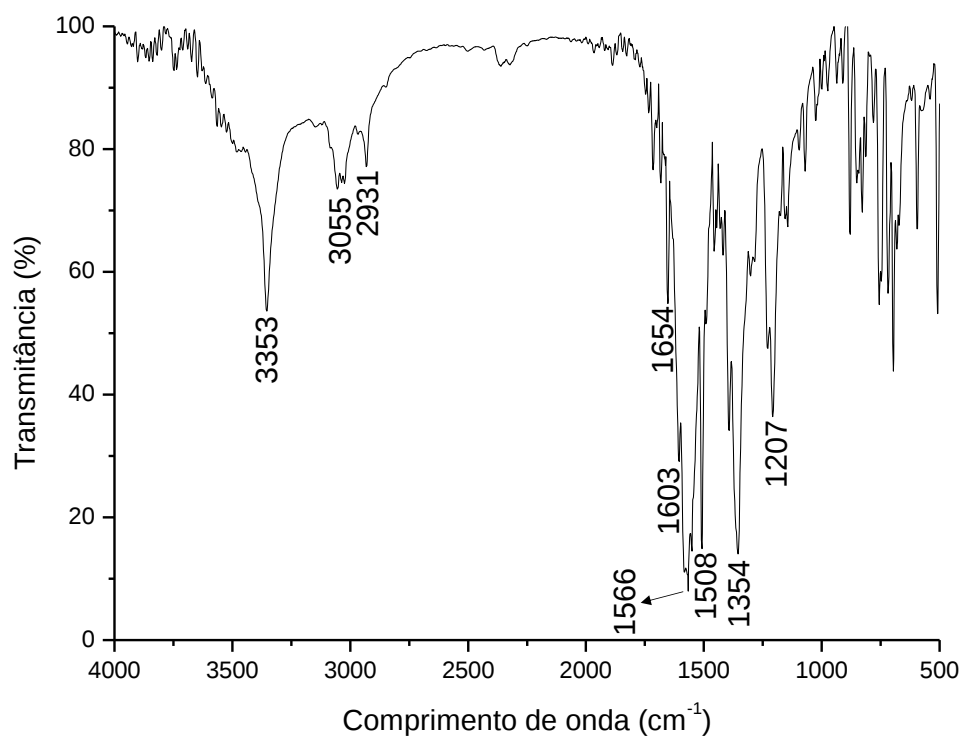
ESI(+)-MS/MS

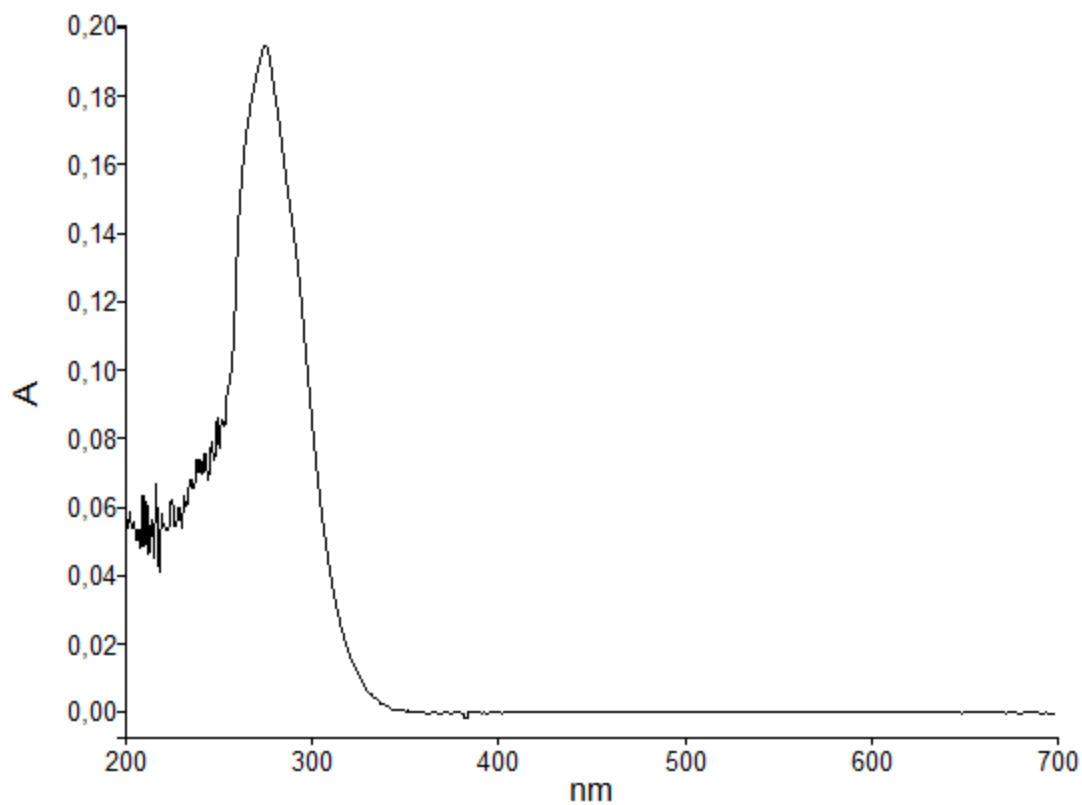
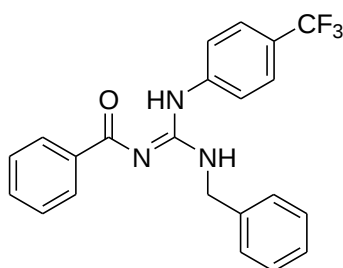
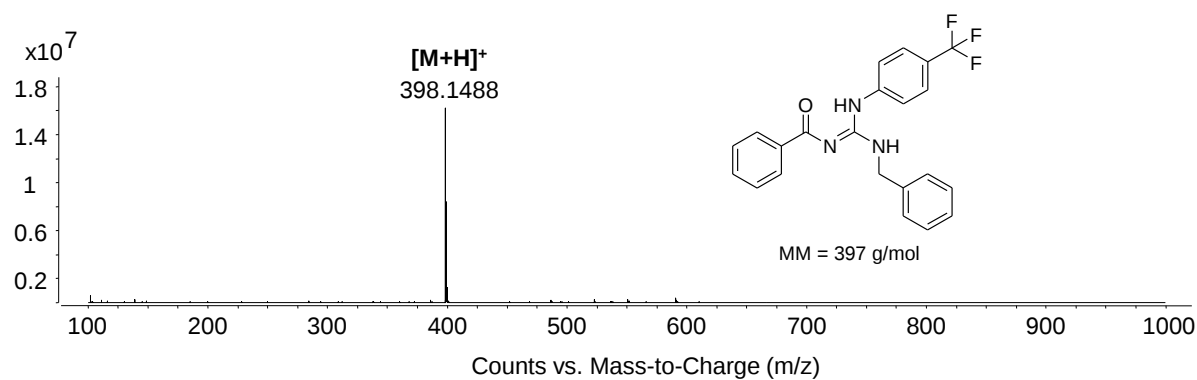
¹H NMR

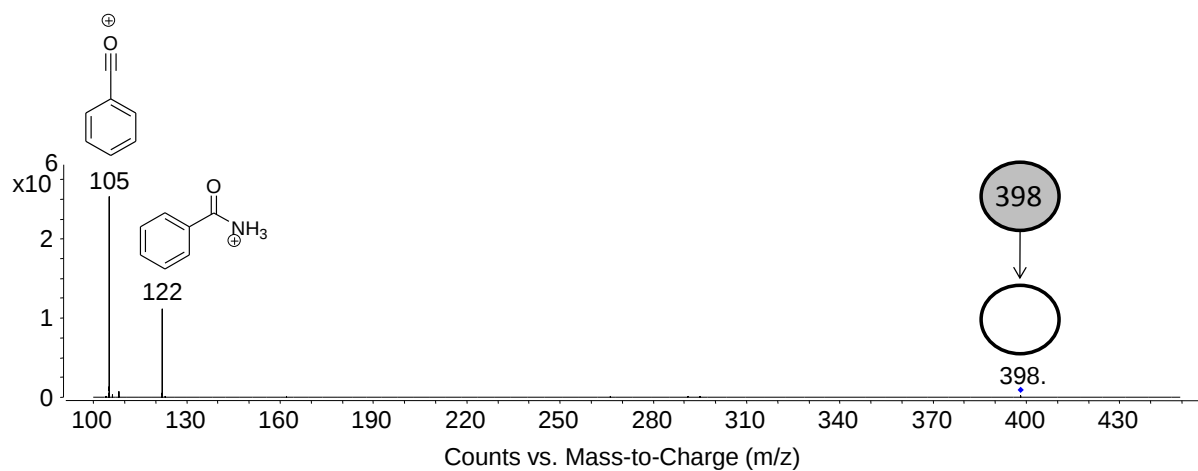
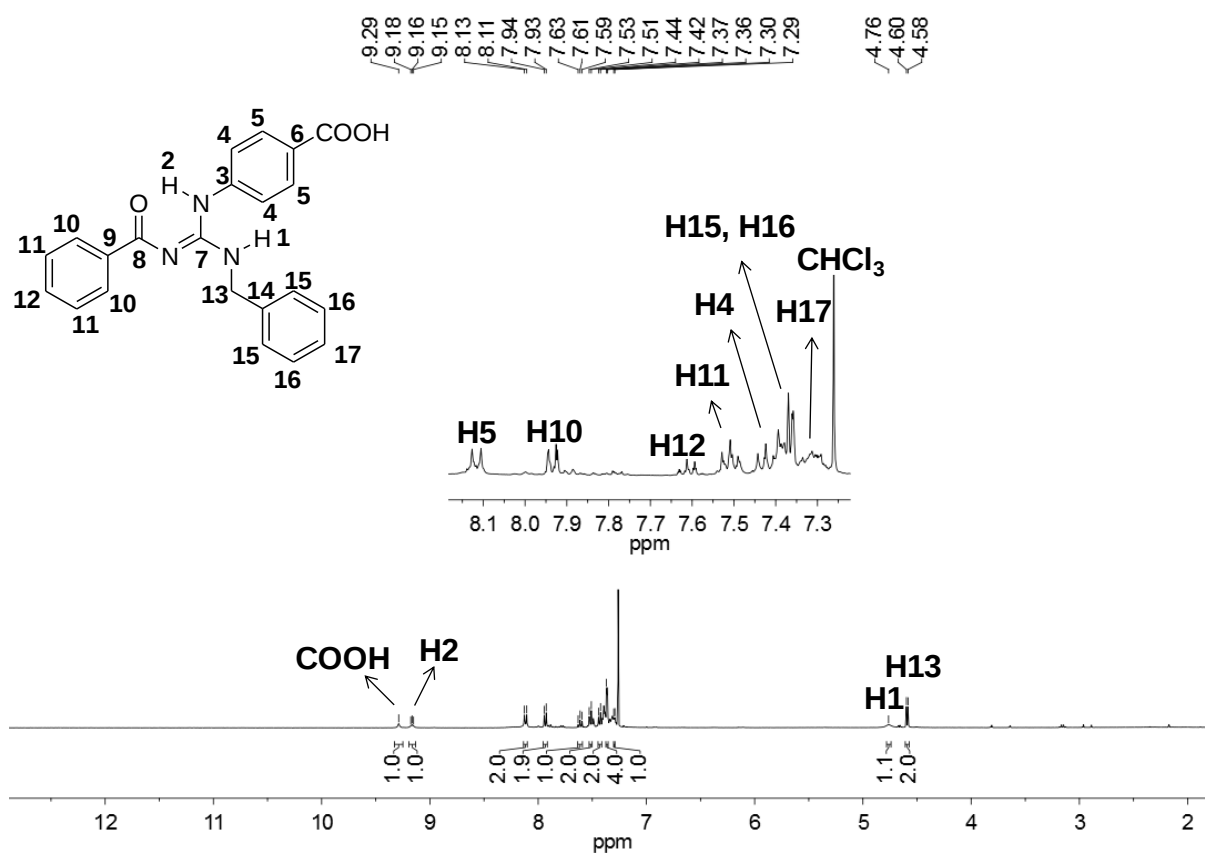
^{13}C NMR**FT-IV:**

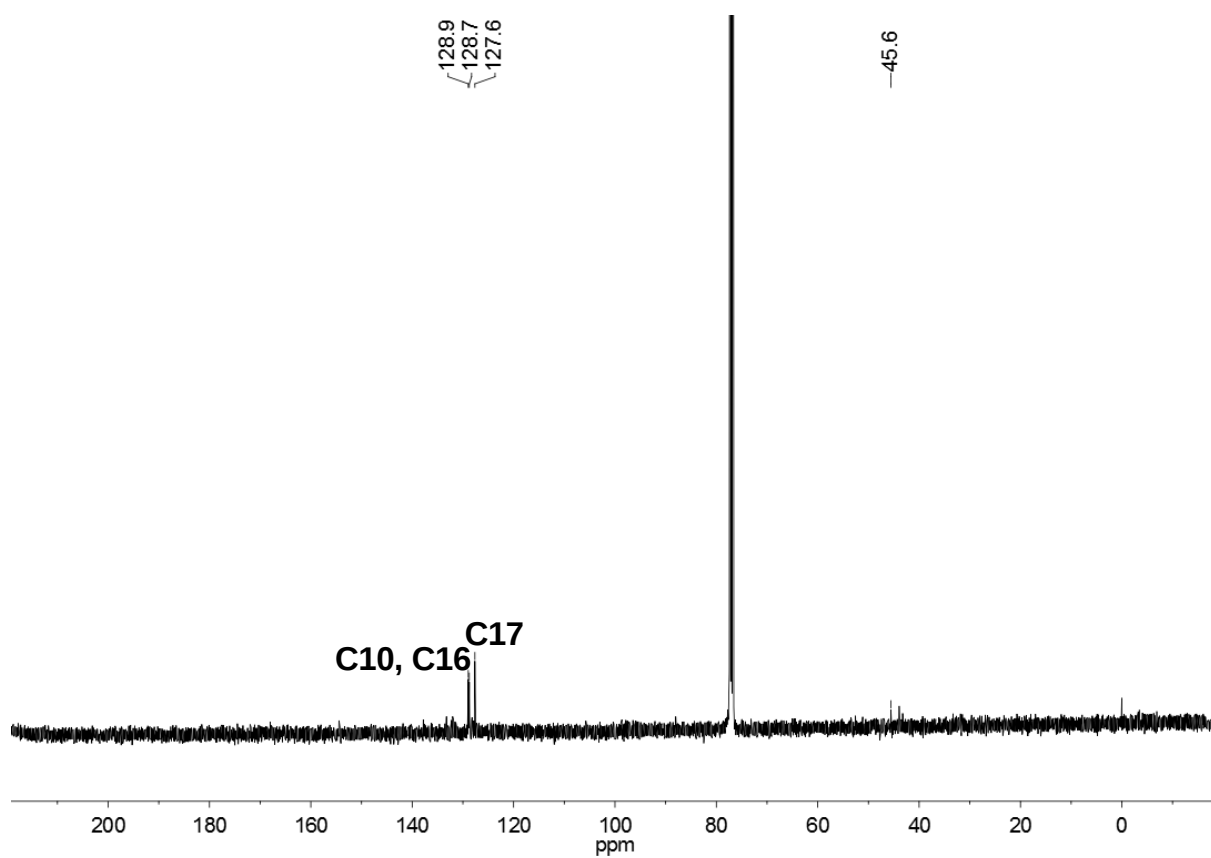
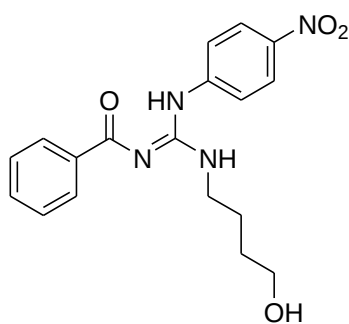
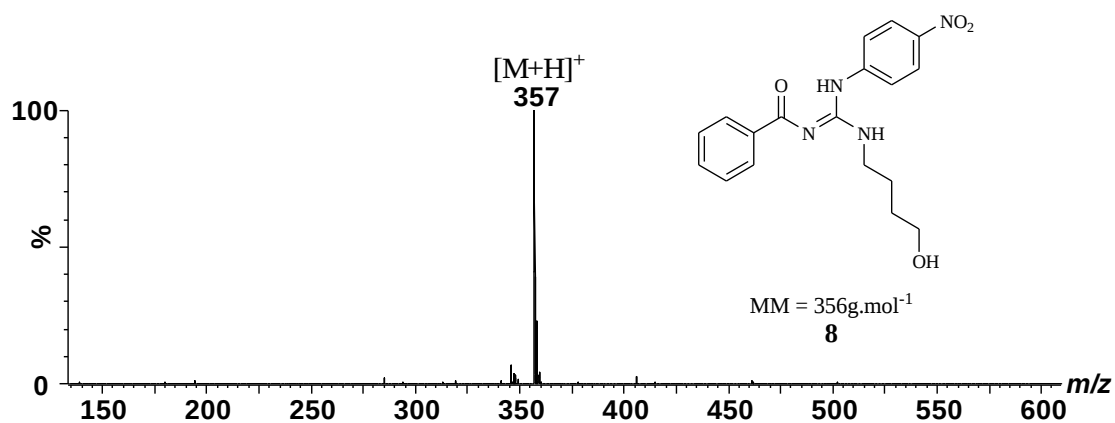
ESI(+)-MS/MS

¹H NMR

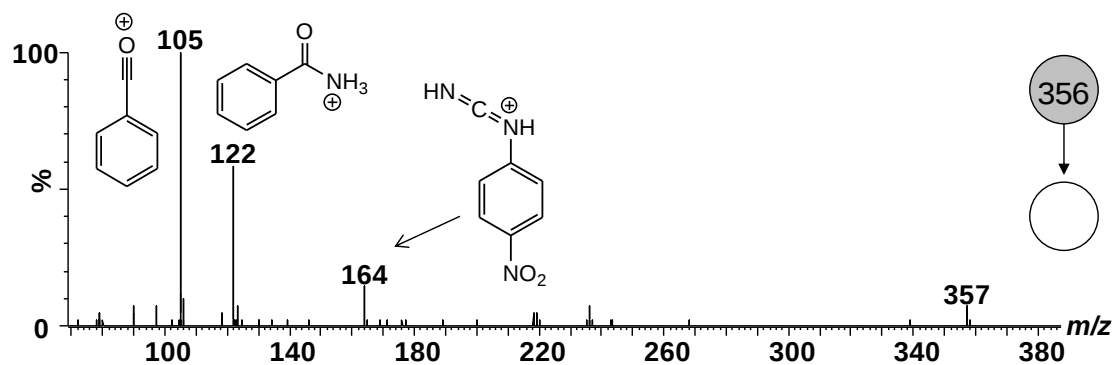
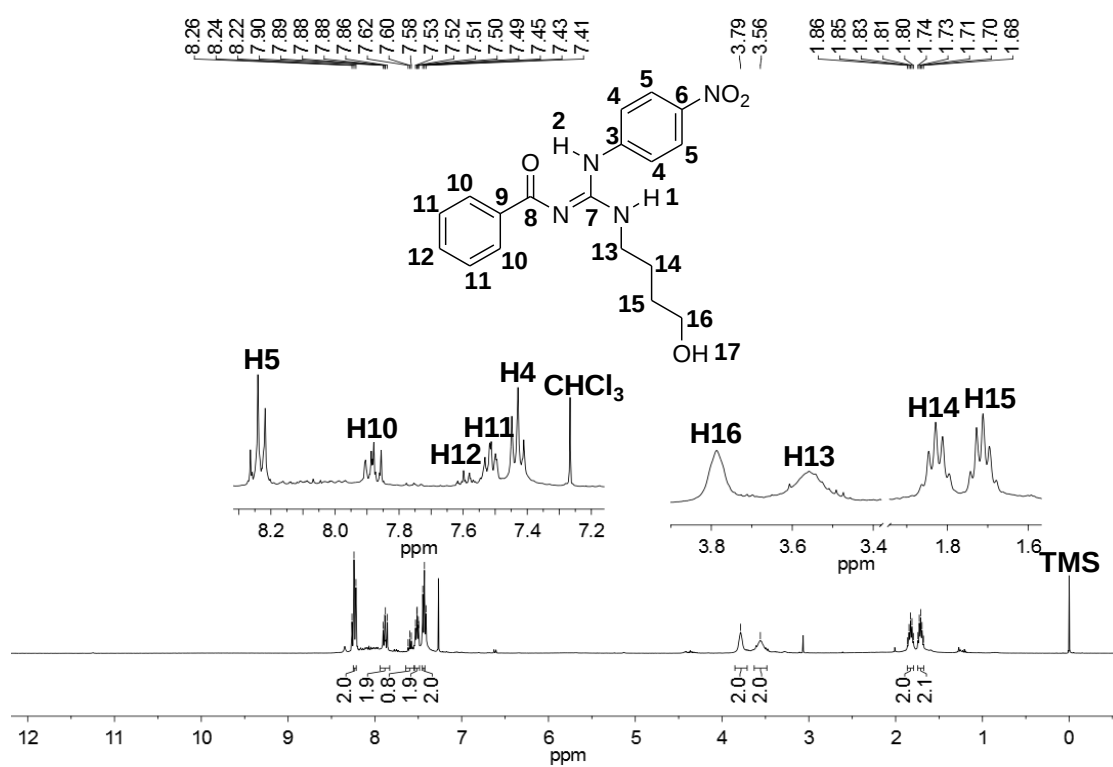
^{13}C NMR**FT-IV:**

UV-Vis:➤ **Composto LQOF-G10:****Rendimento: 42%****ESI(+)-MS:**

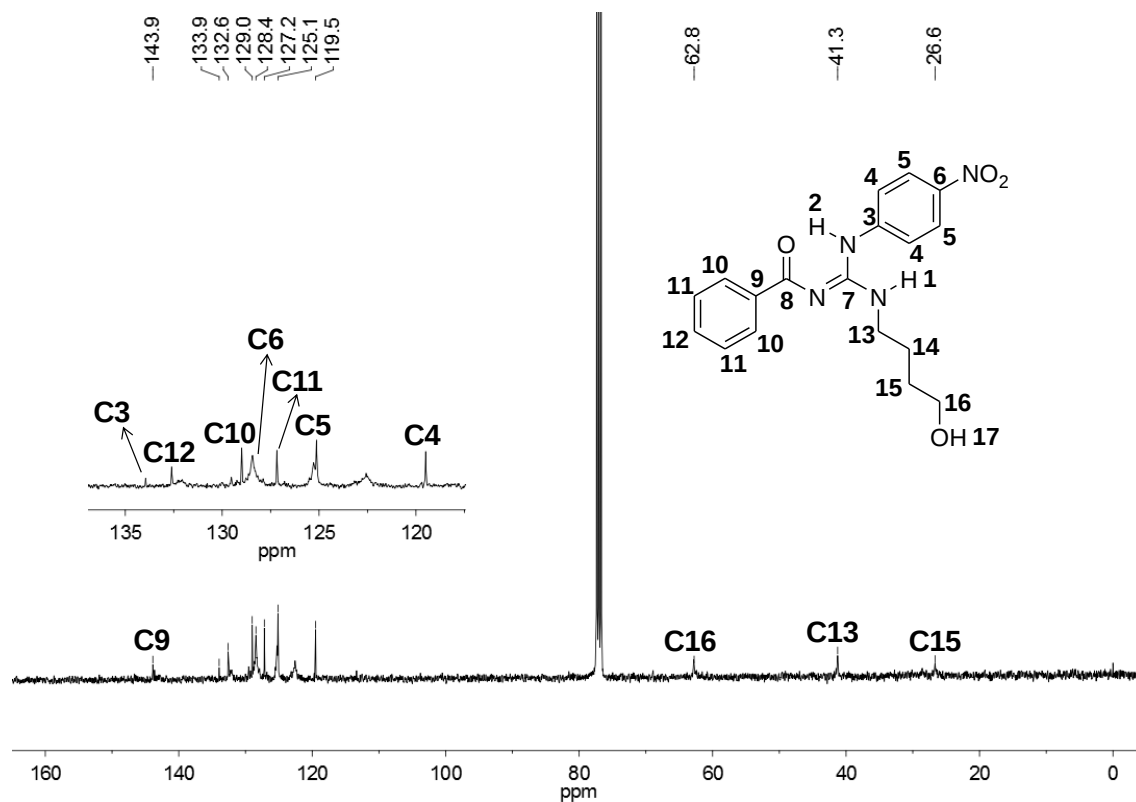
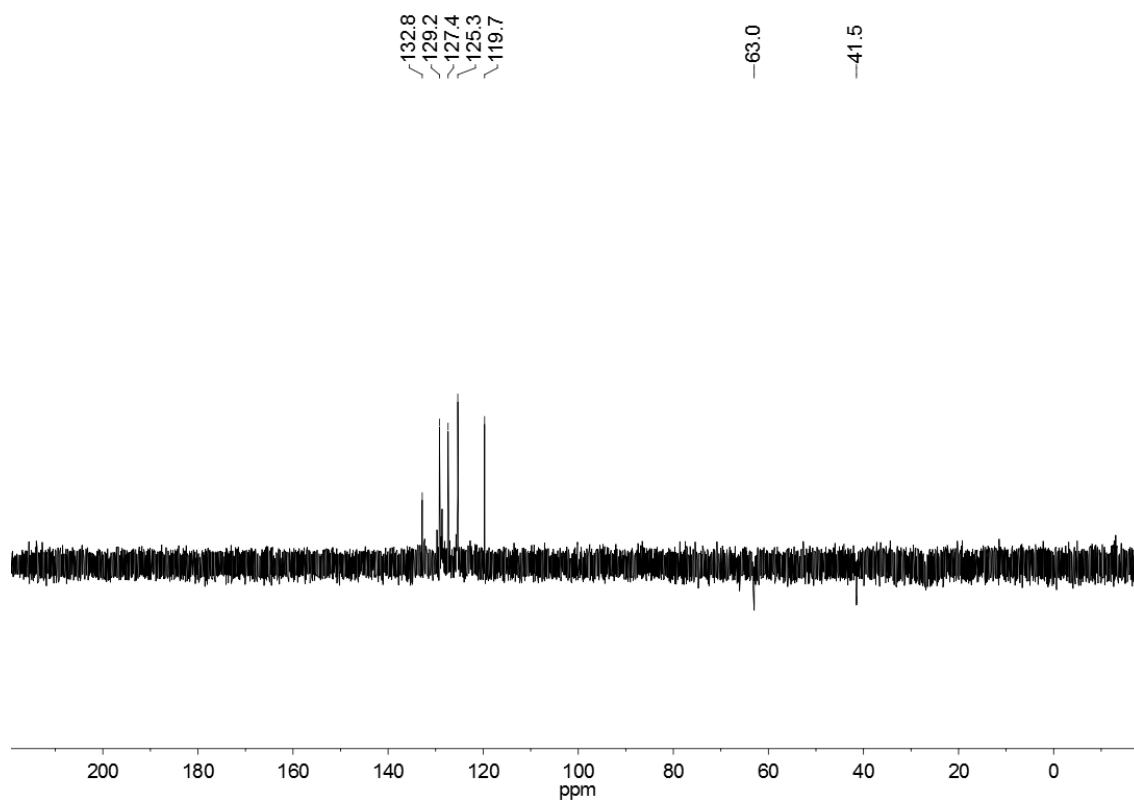
ESI(+)-MS/MS **^1H NMR**

^{13}C NMR**➤ Composto LQOF-G11:****Rendimento: 53%****ESI(+)-MS:**

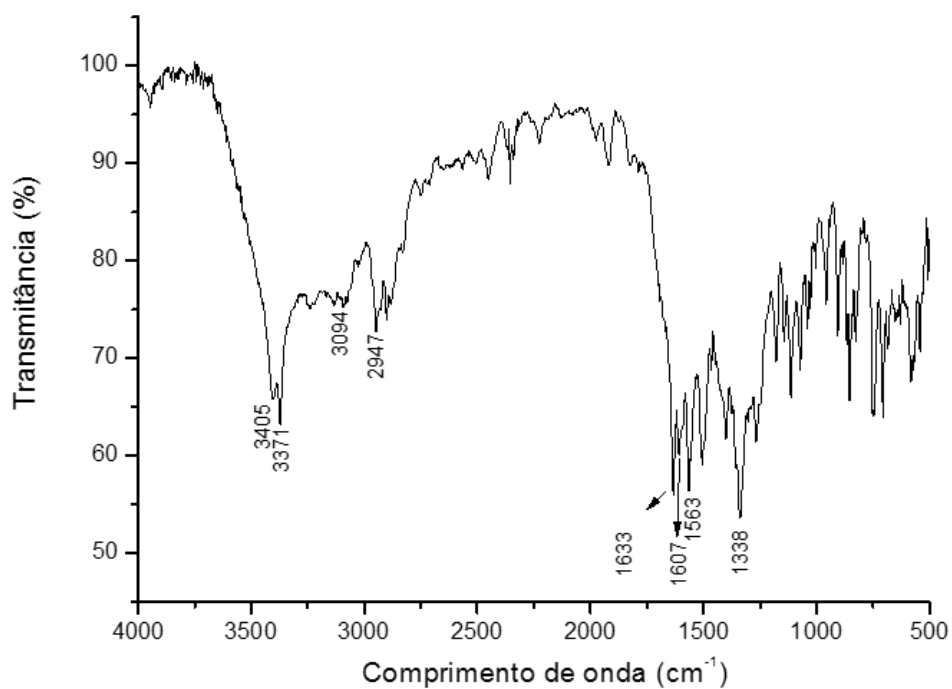
ESI(+)-MS/MS

 ^1H NMR

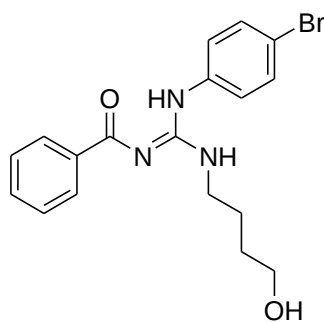
^{13}C NMR

**DEPT135**

FT-IV:

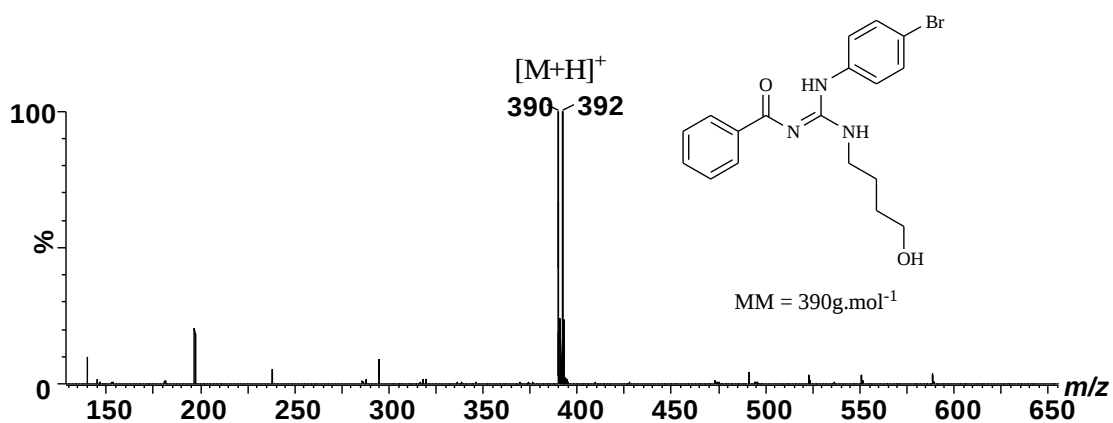


➤ Composto LQOF-G12:

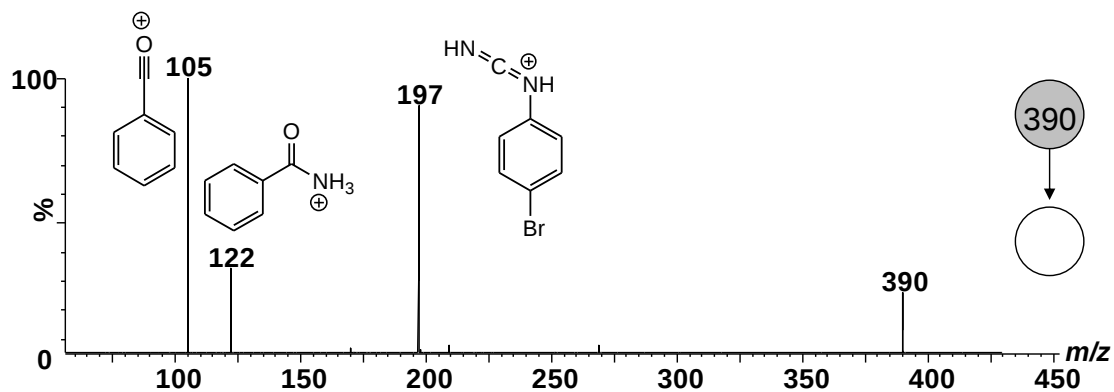
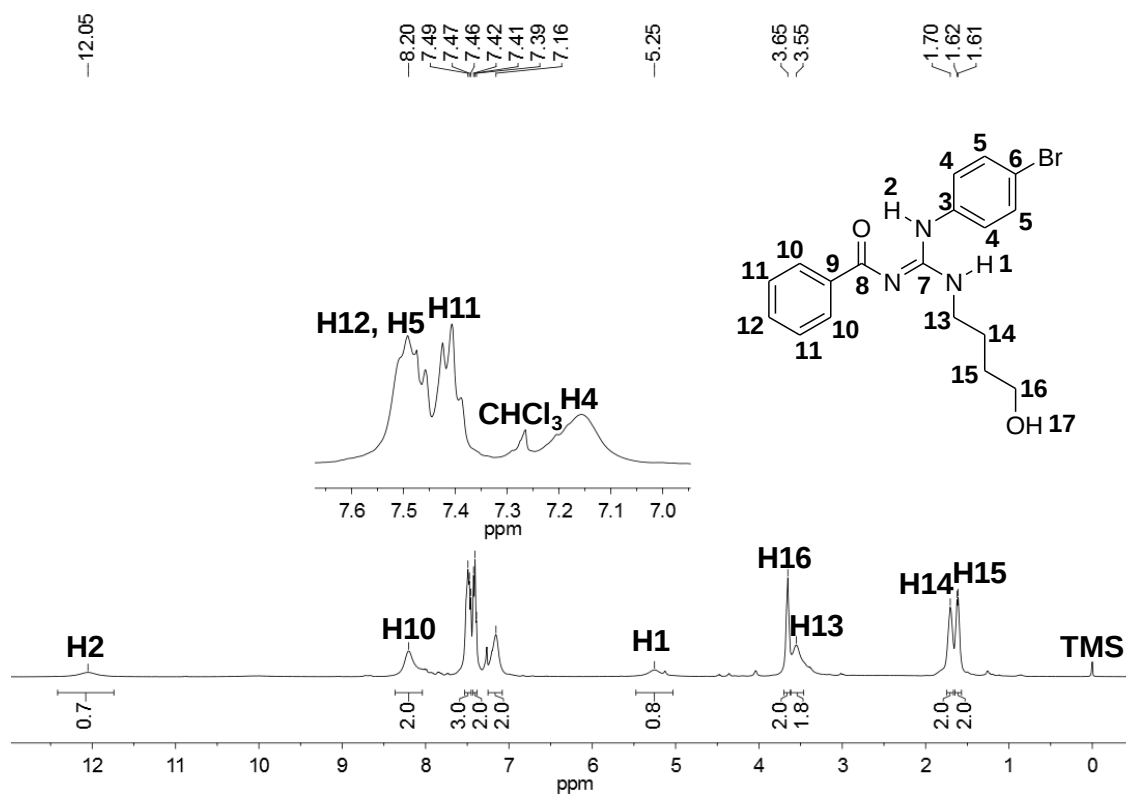


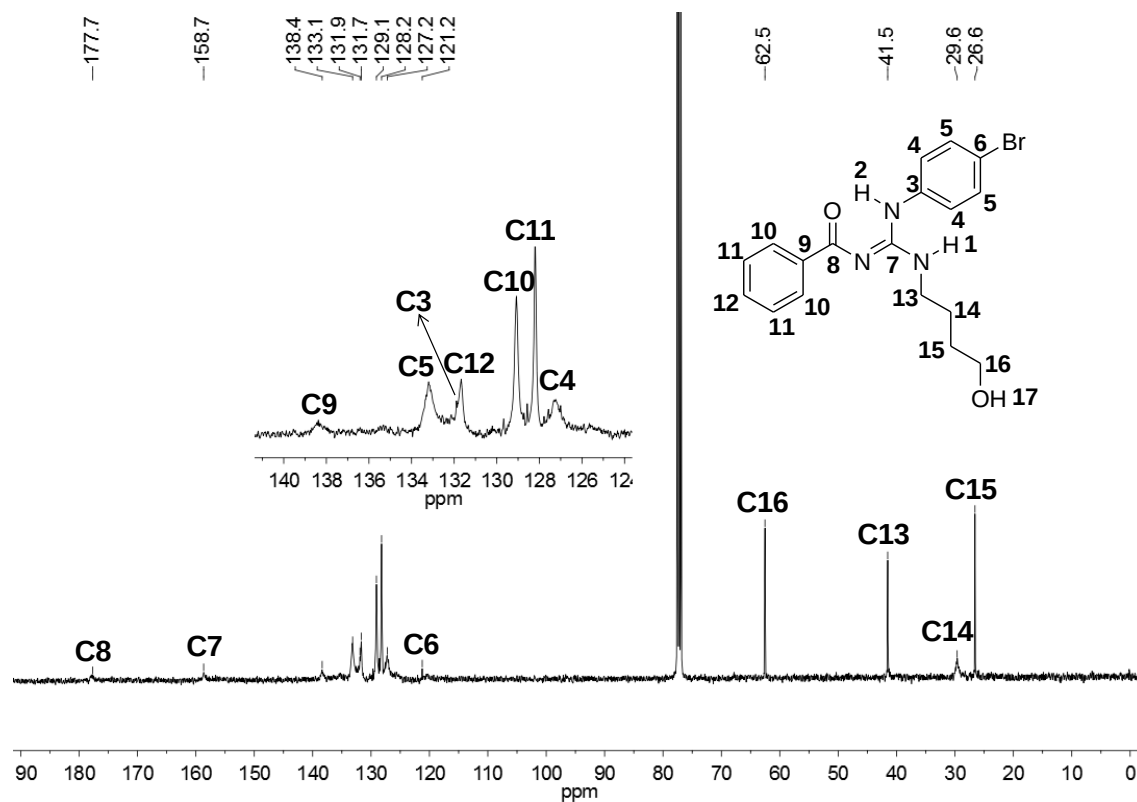
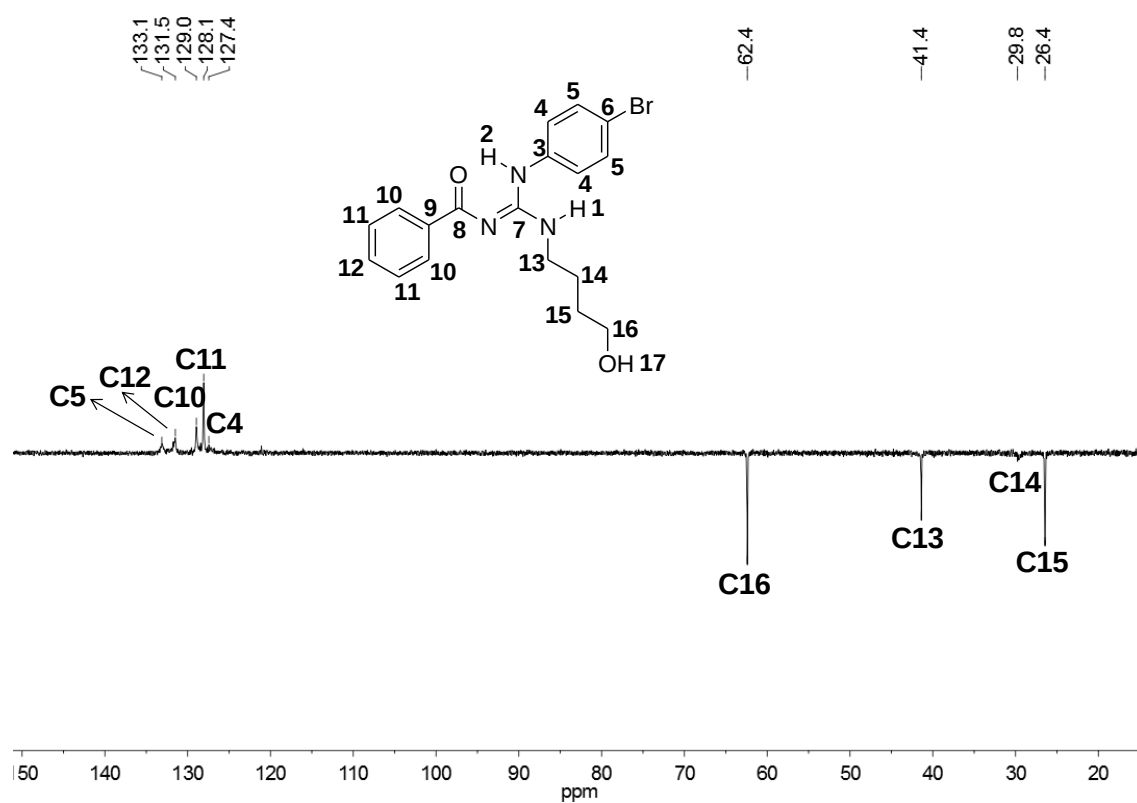
Rendimento: 60%

ESI(+)-MS:

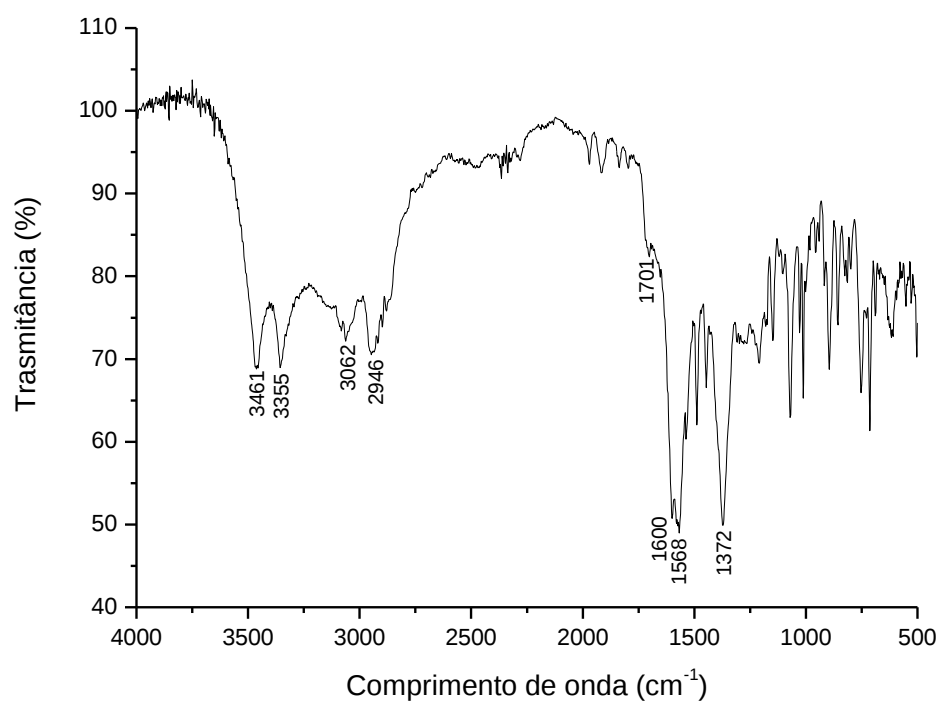


ESI(+)-MS/MS

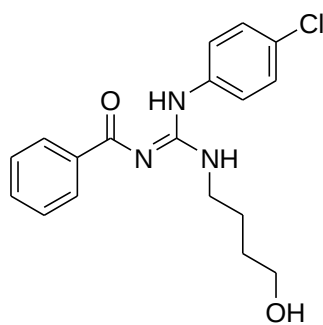
 ^1H NMR

^{13}C NMR**DEPT135**

FT-IV:

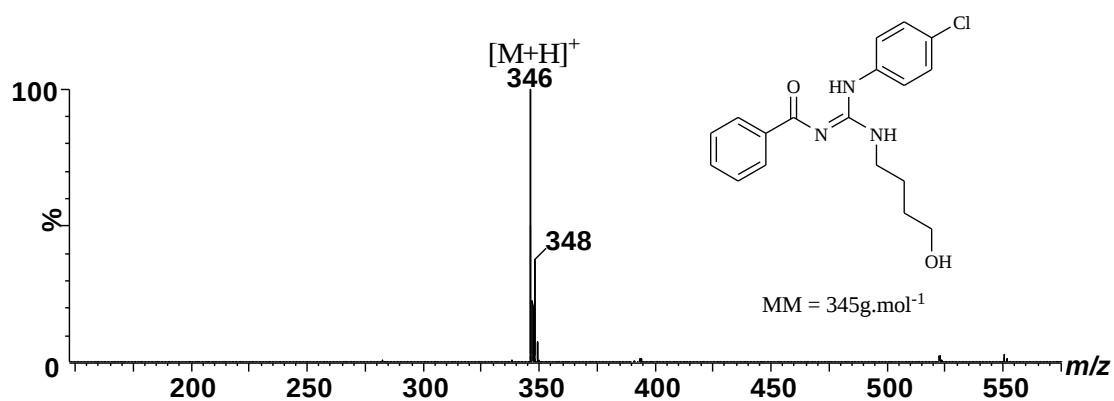


➤ Composto LQOF-G13:

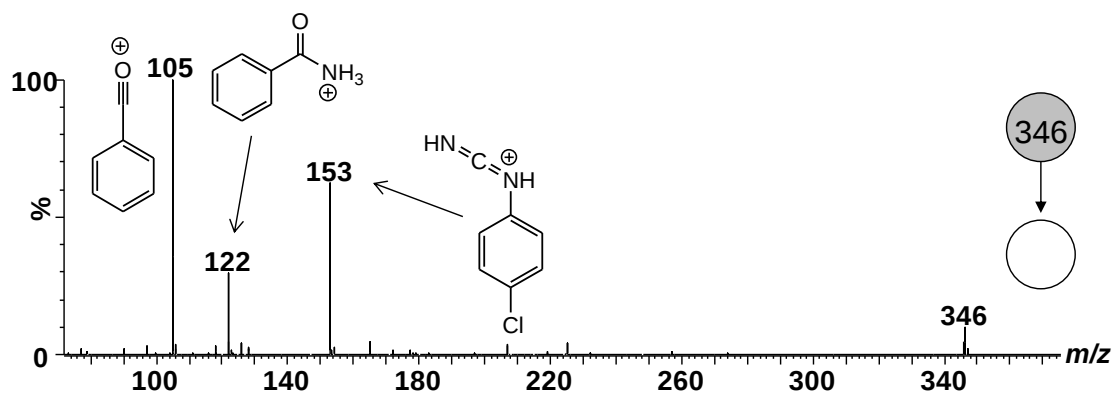
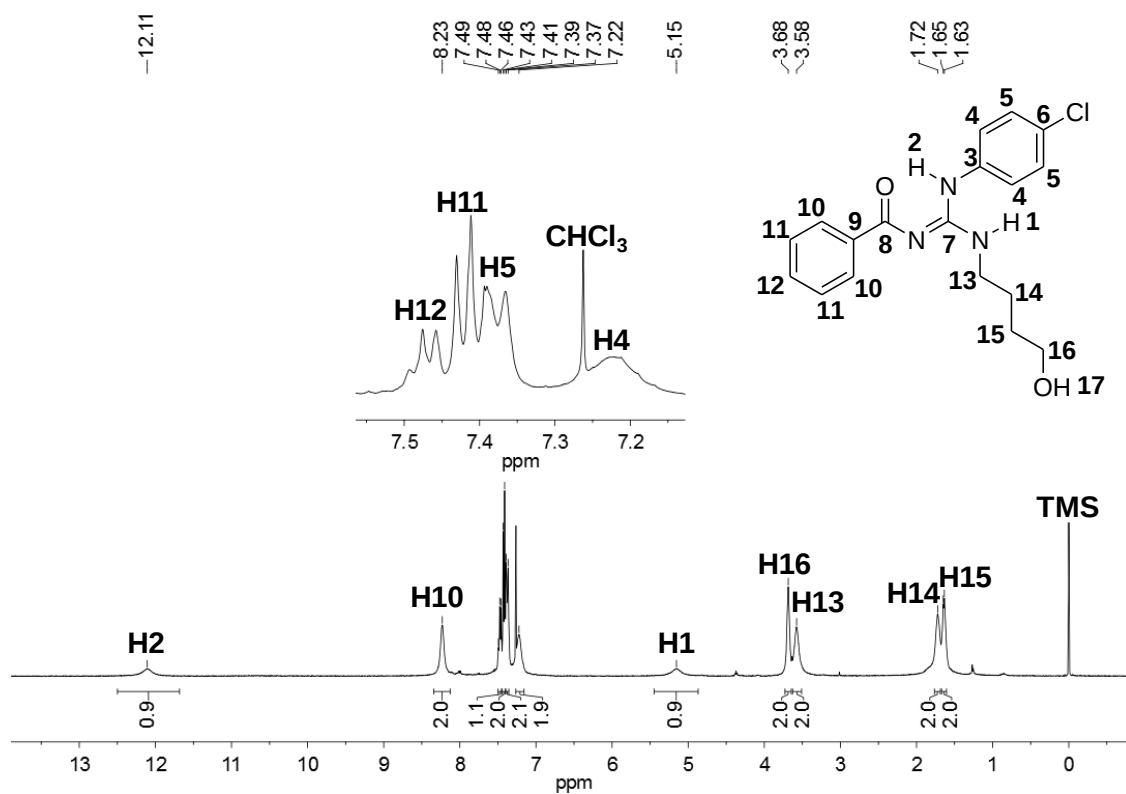


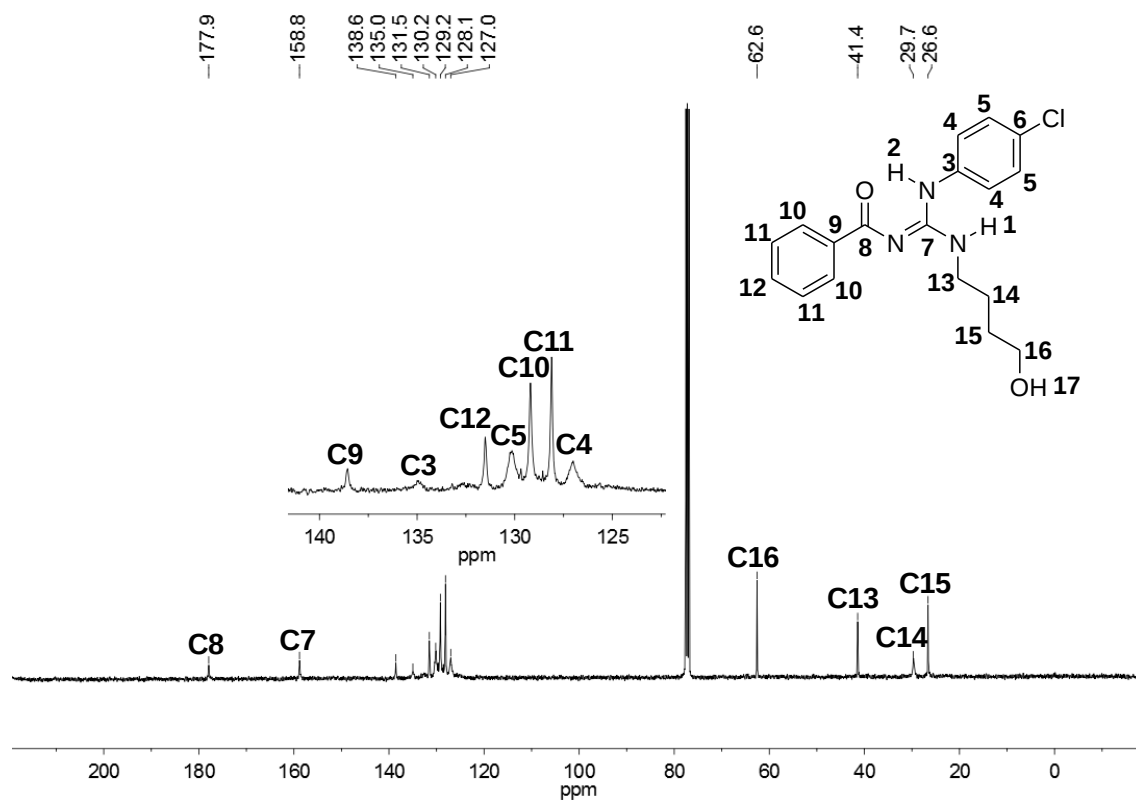
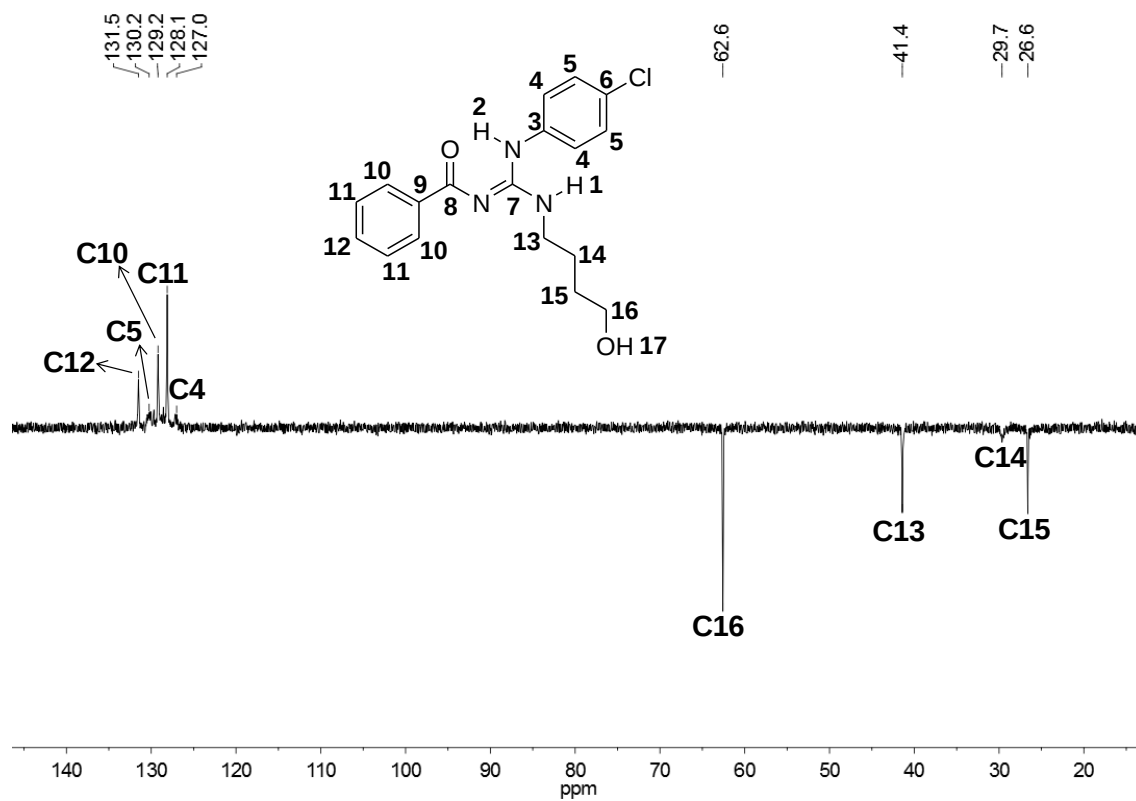
Rendimento: 49%

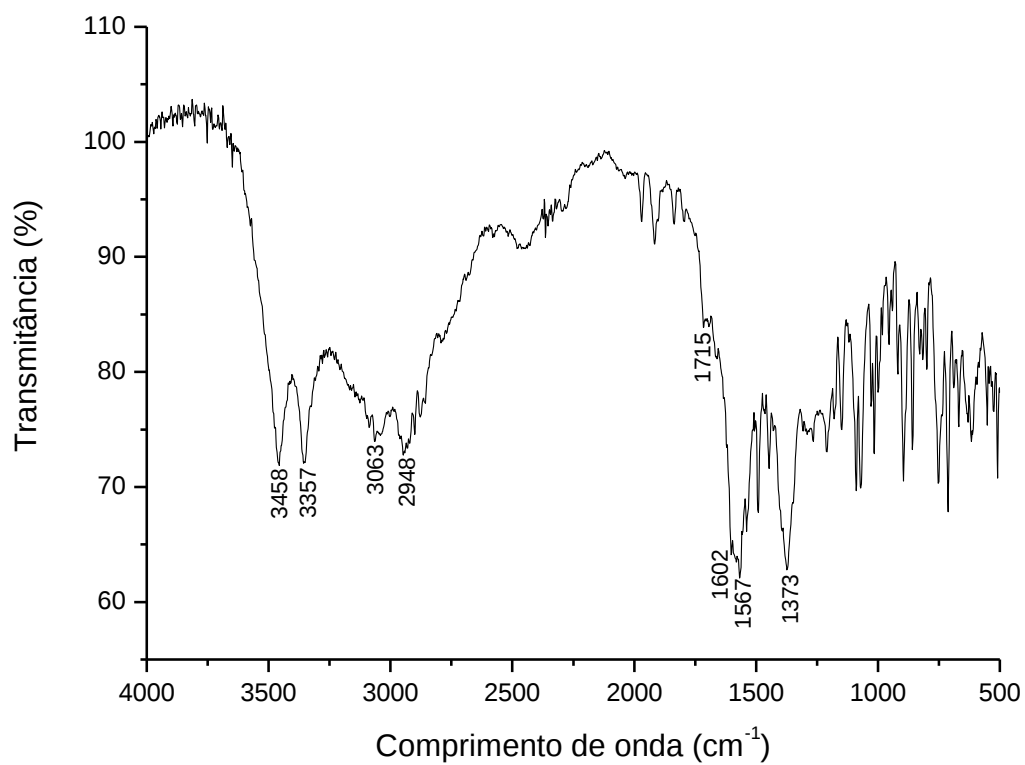
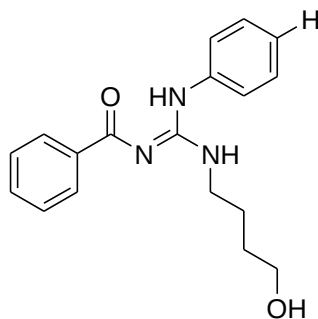
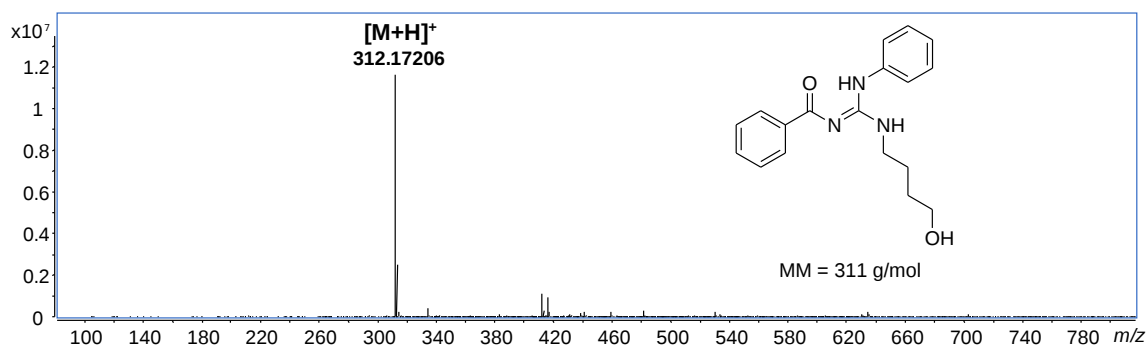
ESI(+)-MS:

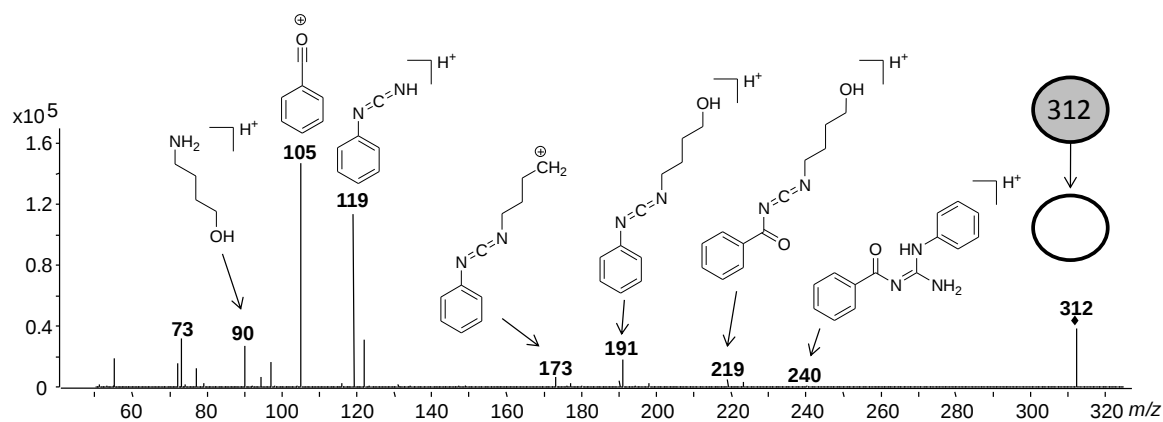
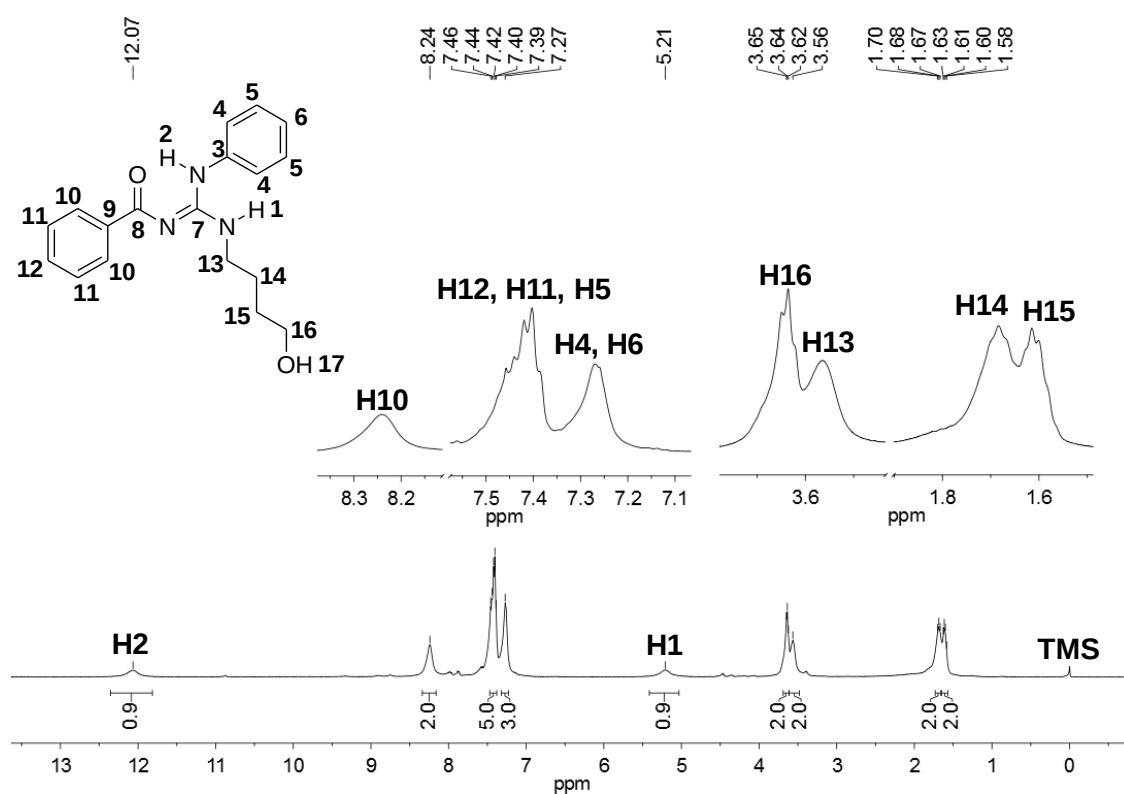


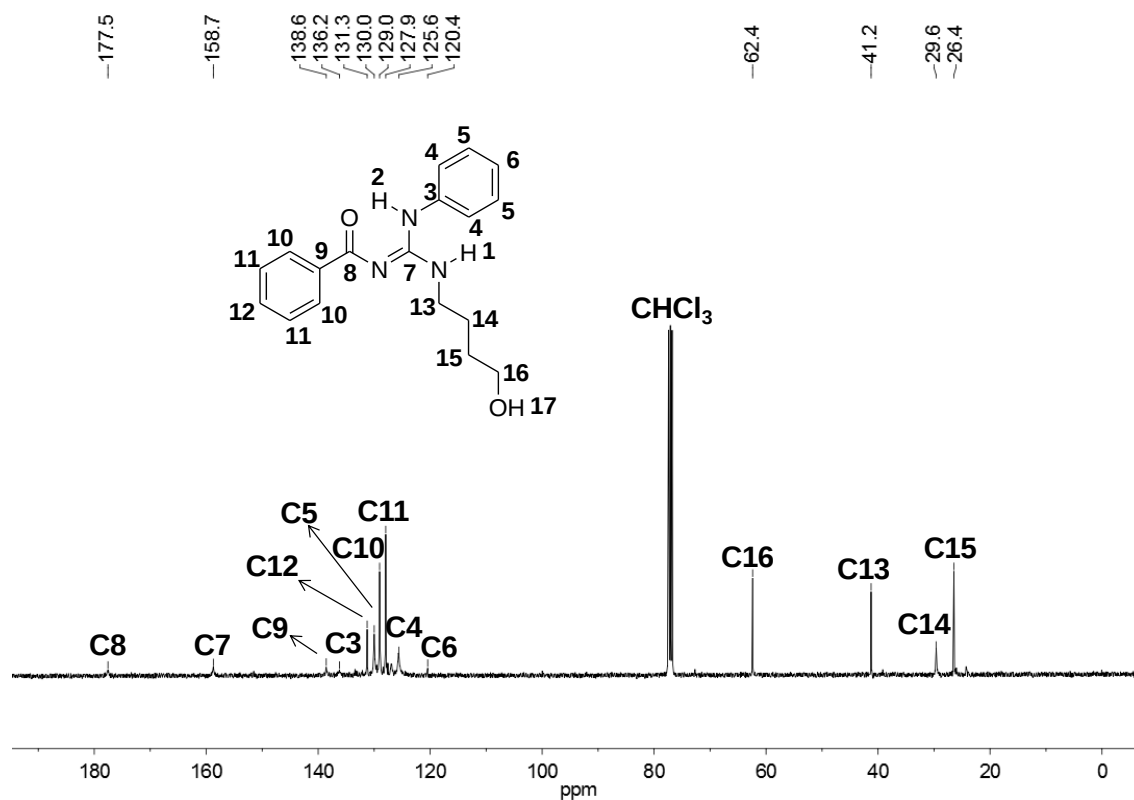
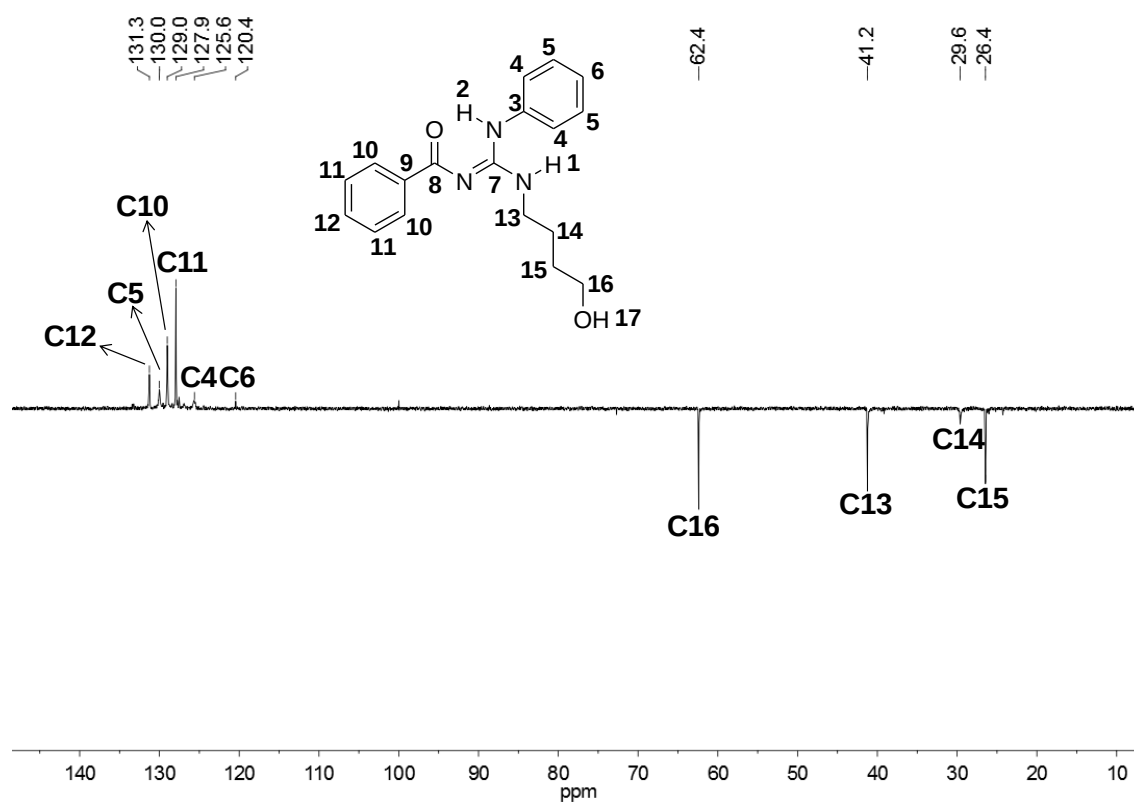
ESI(+)-MS/MS

 ^1H NMR

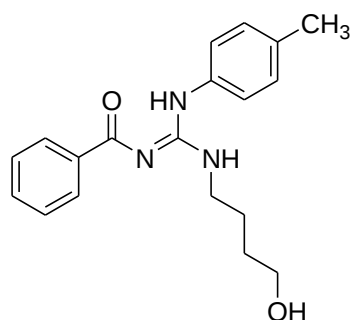
^{13}C NMR**DEPT135**

FT-IV:➤ **Composto LQOF-G14:****Rendimento: 76,7%****ESI(+)-MS:**

ESI(+)-MS/MS**¹H NMR**

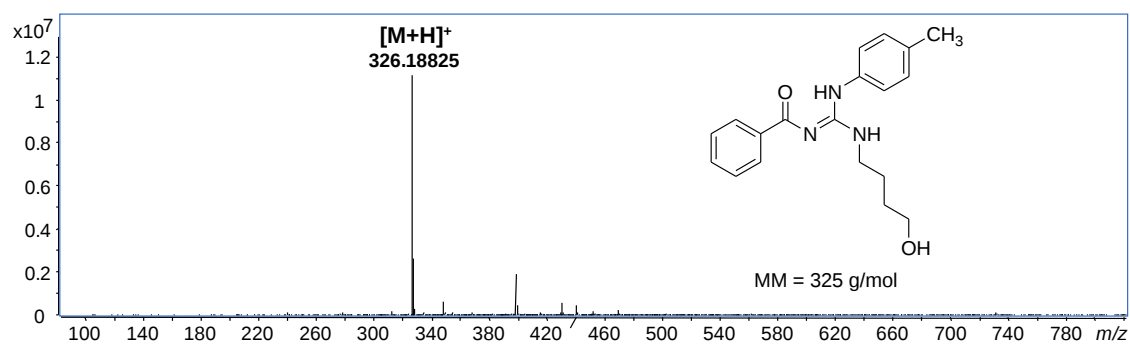
^{13}C NMR**DEPT135**

➤ **Composto LQOF-G15:**

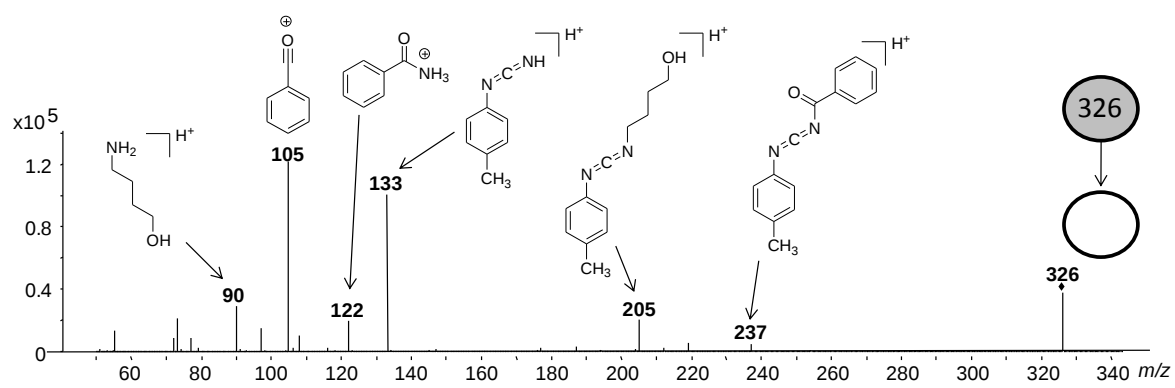


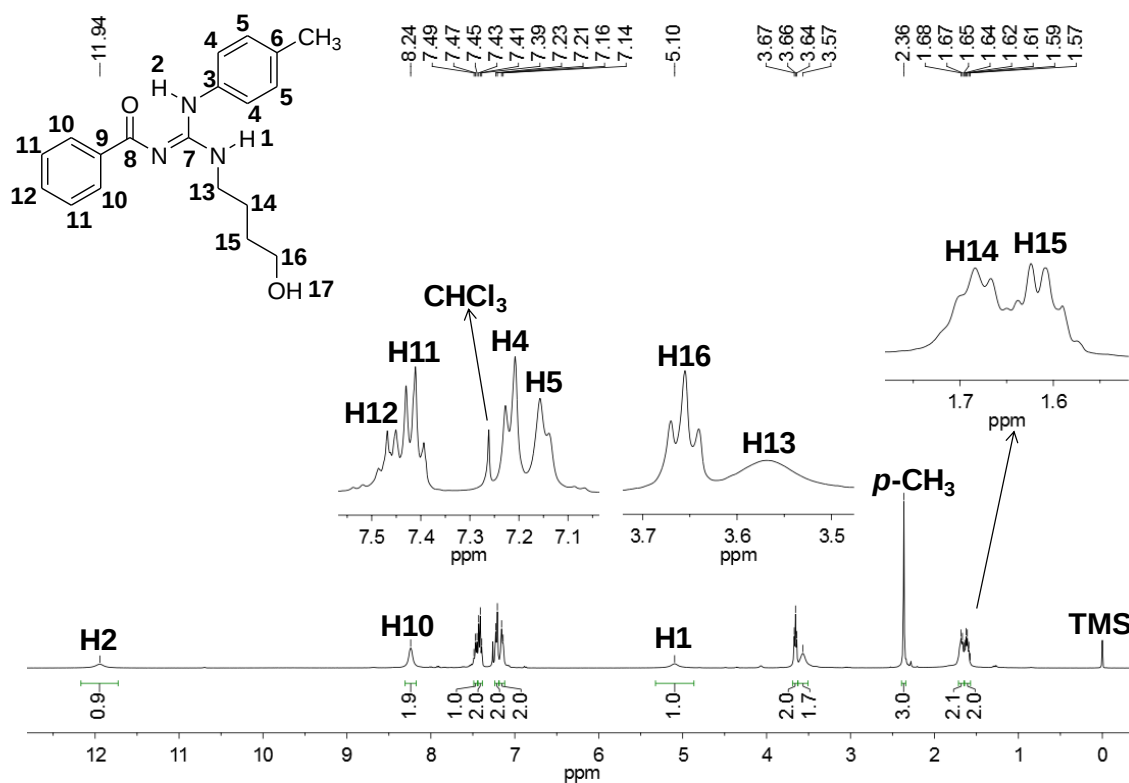
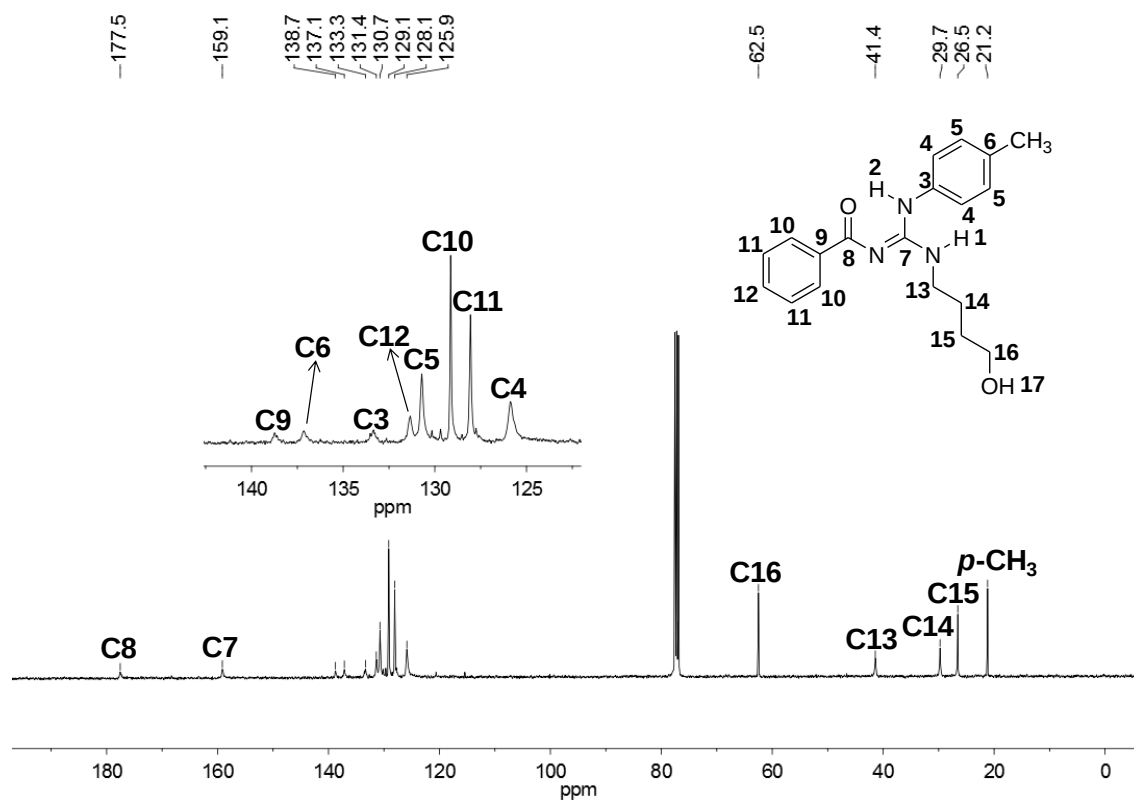
Rendimento: 78,4%

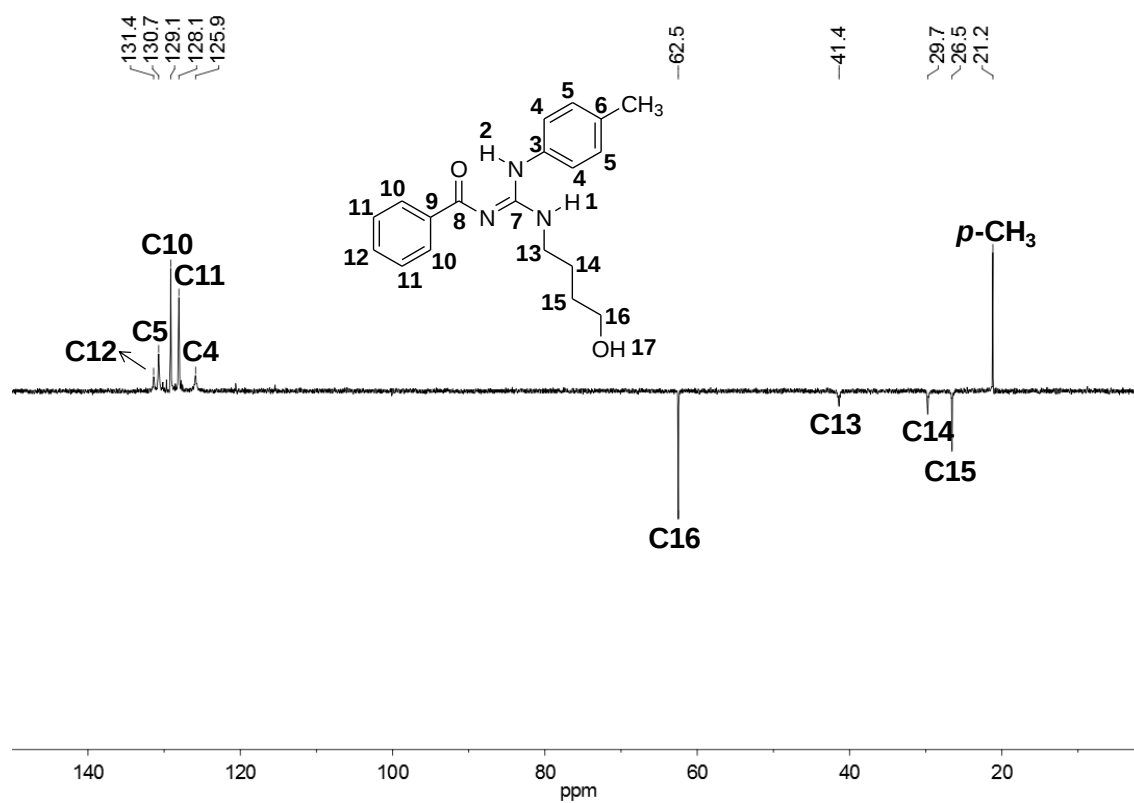
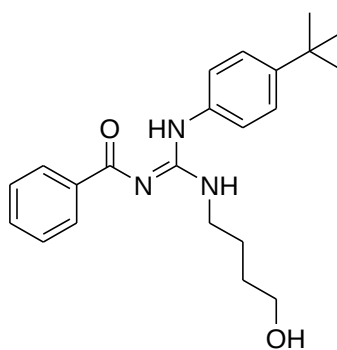
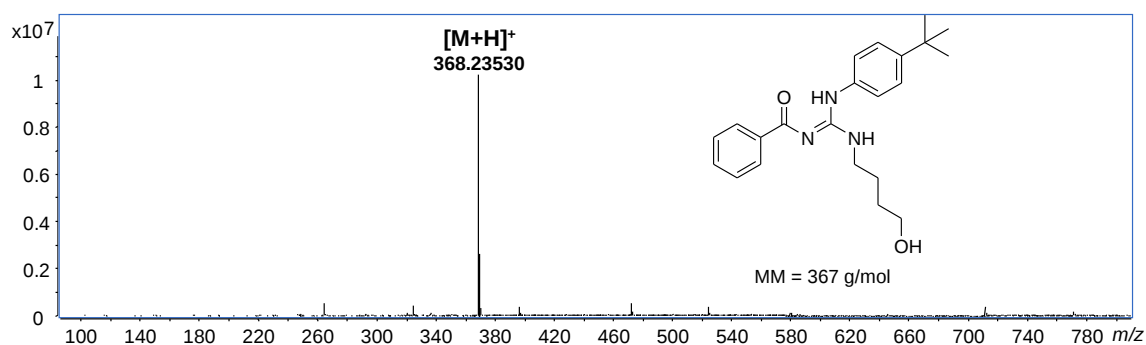
ESI(+)-MS:

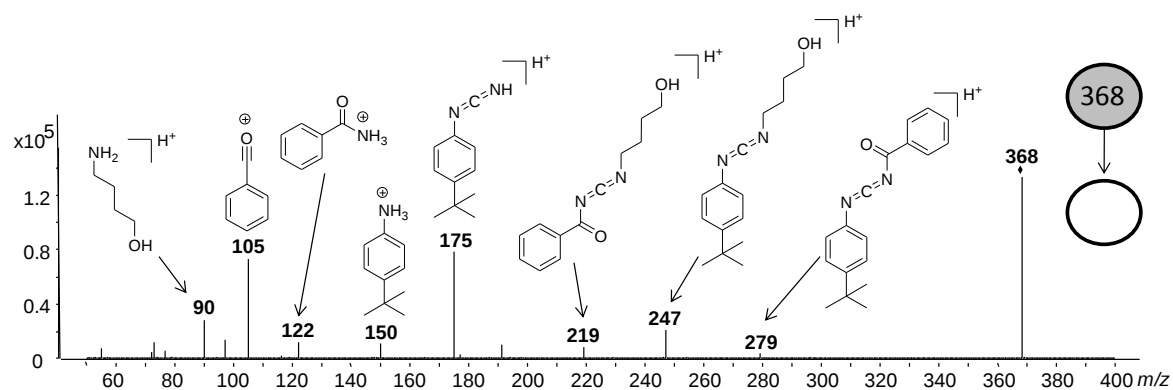
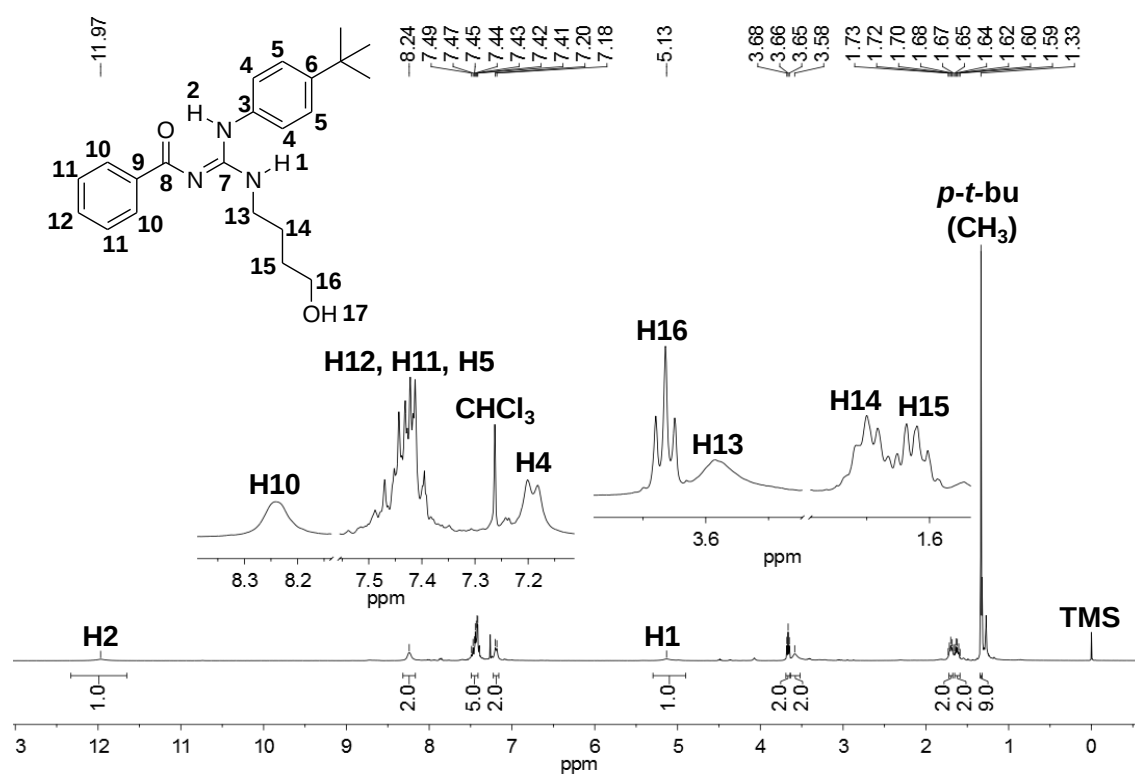


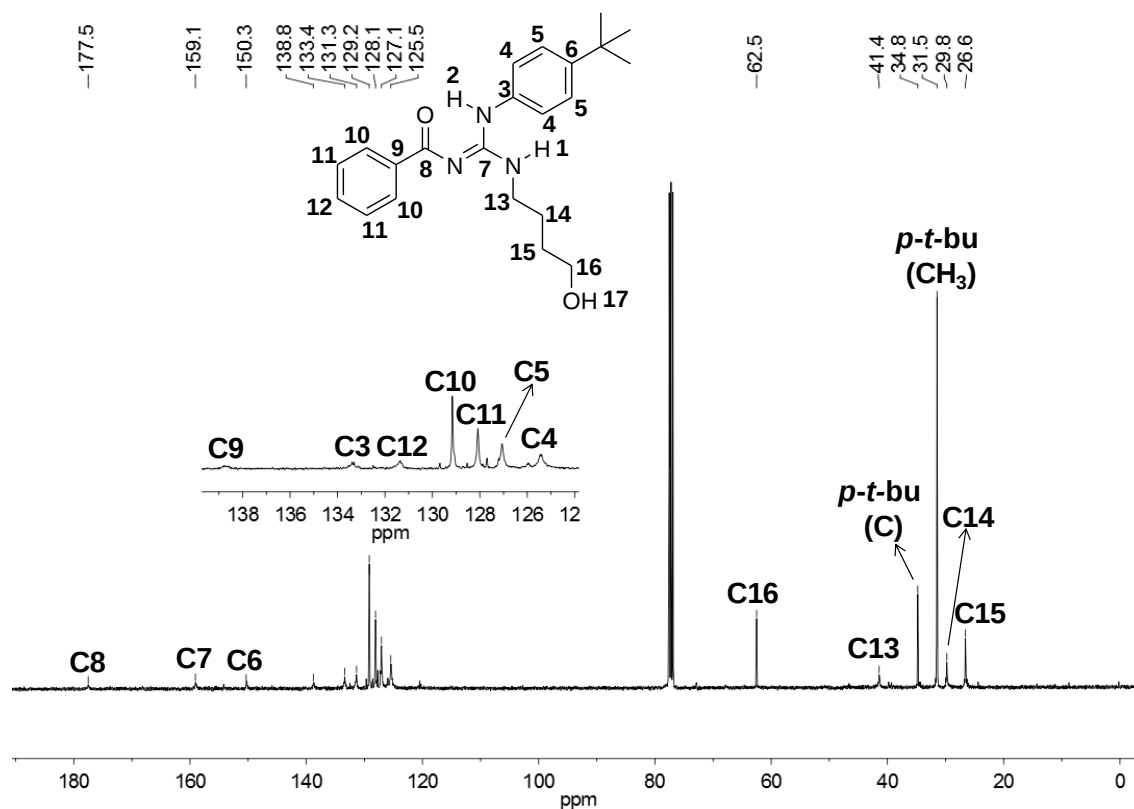
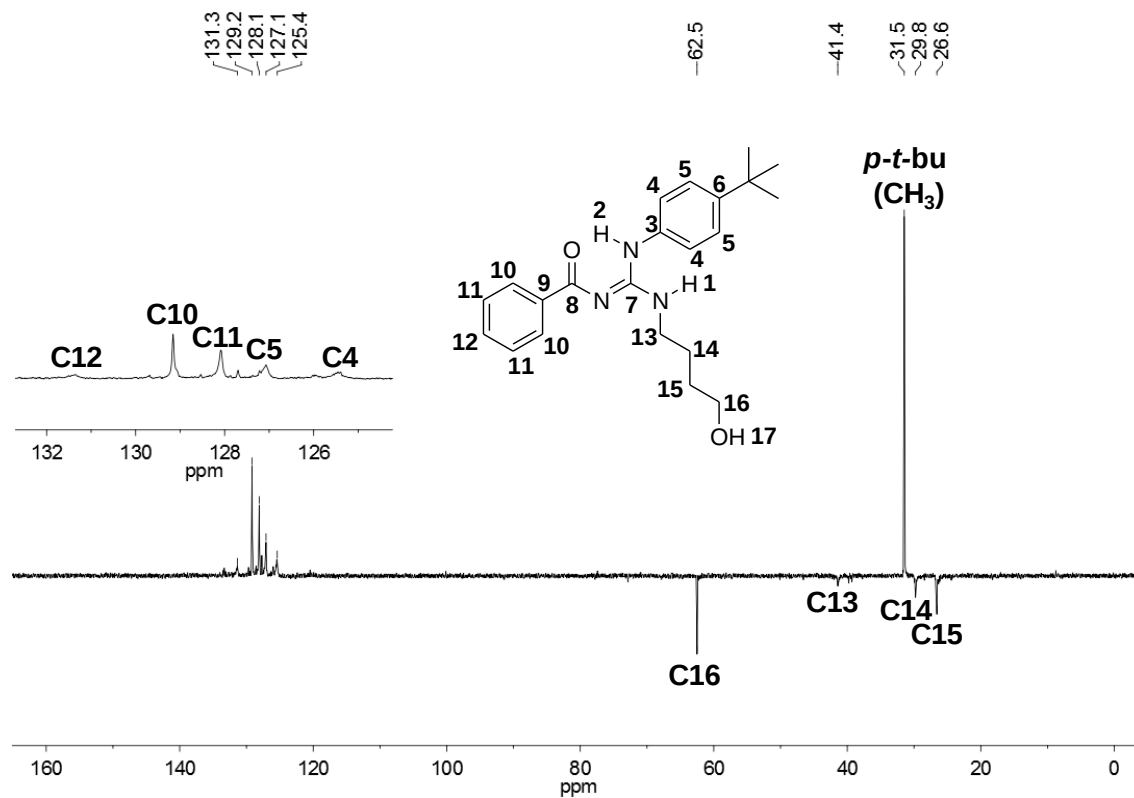
ESI(+)-MS/MS

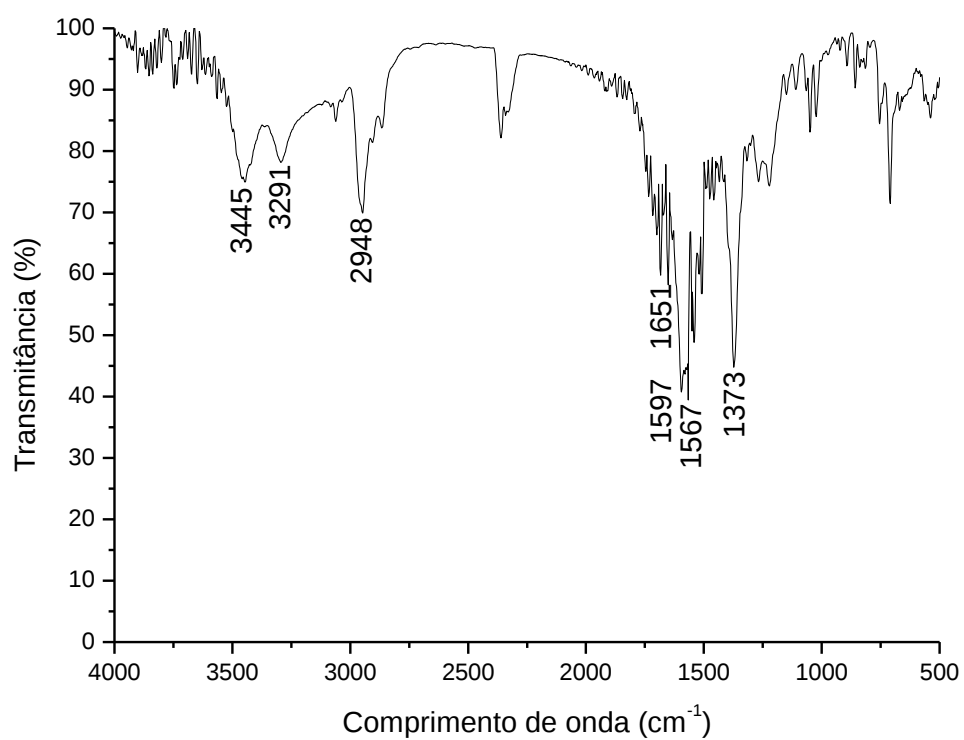
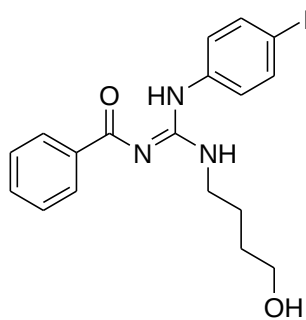
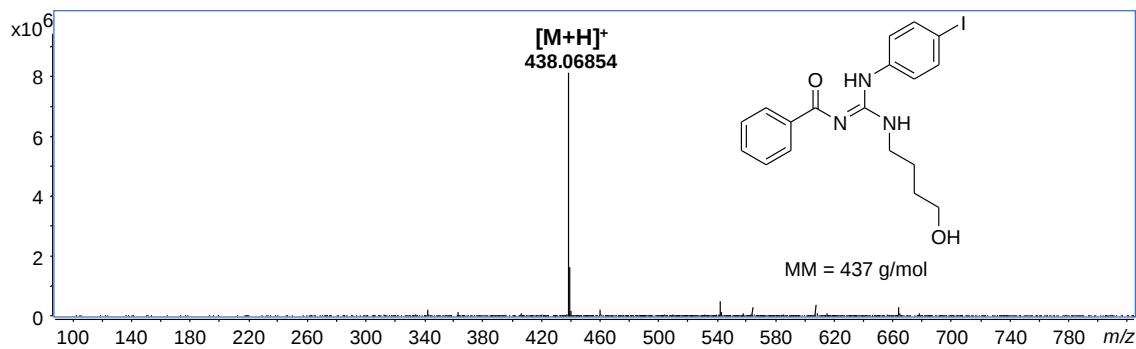


^1H NMR **^{13}C NMR**

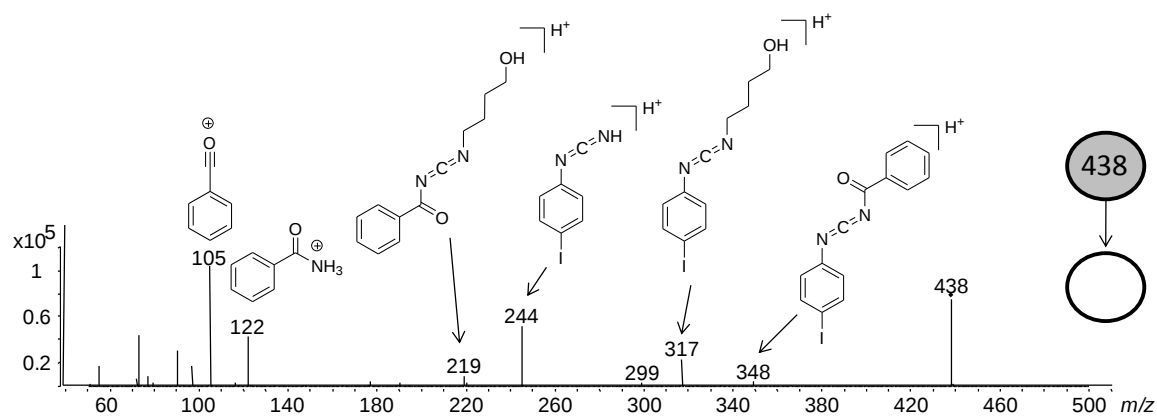
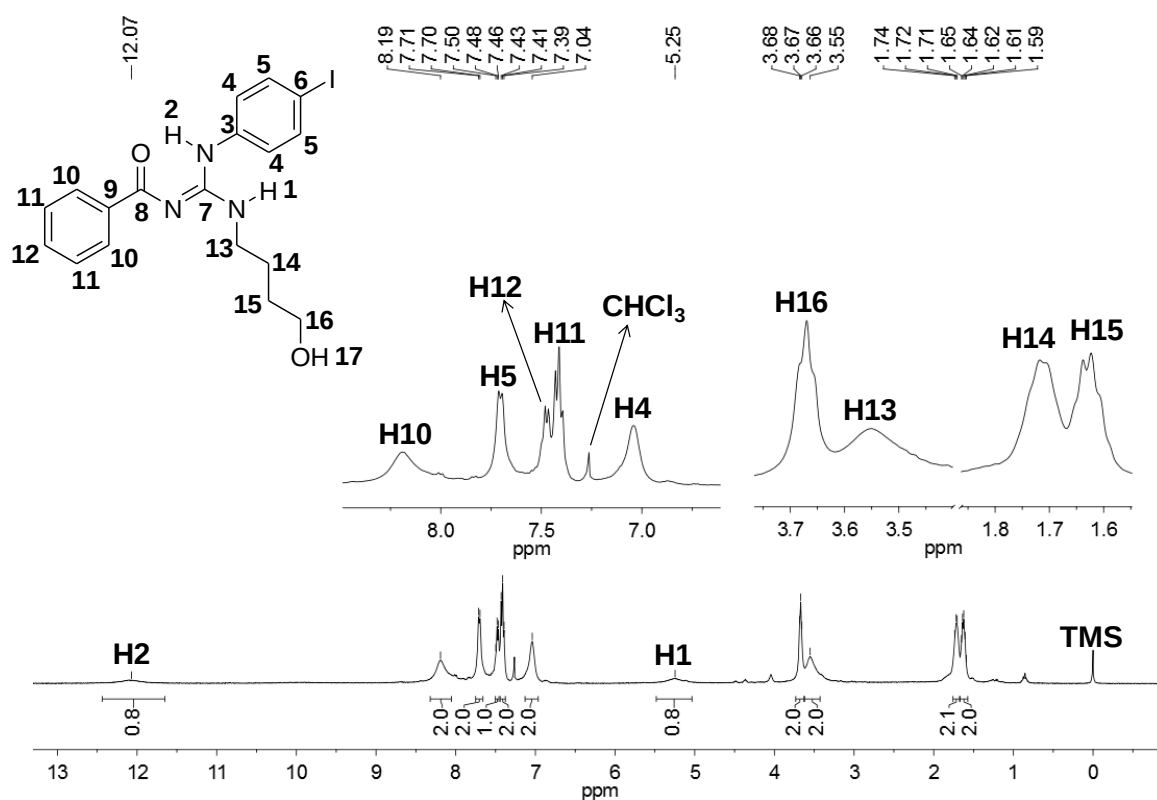
DEPT135➤ **Composto LQOF-G16:****Rendimento: 56,1%****ESI(+)-MS:**

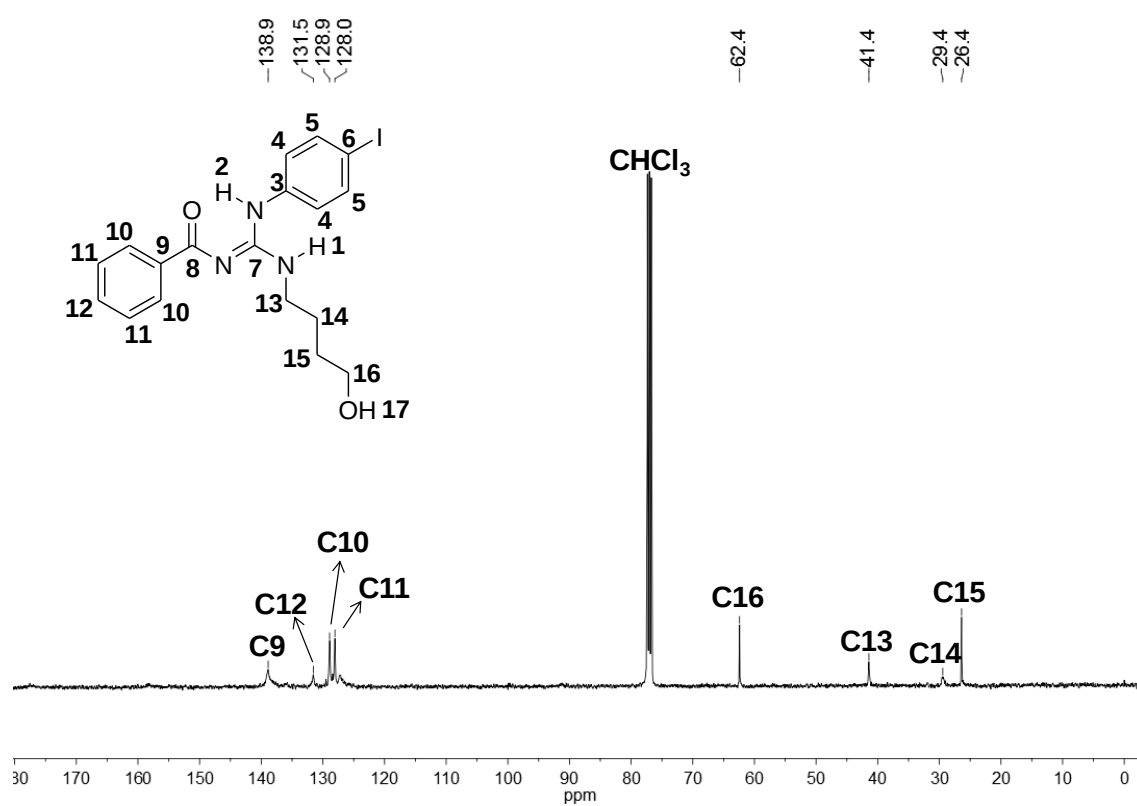
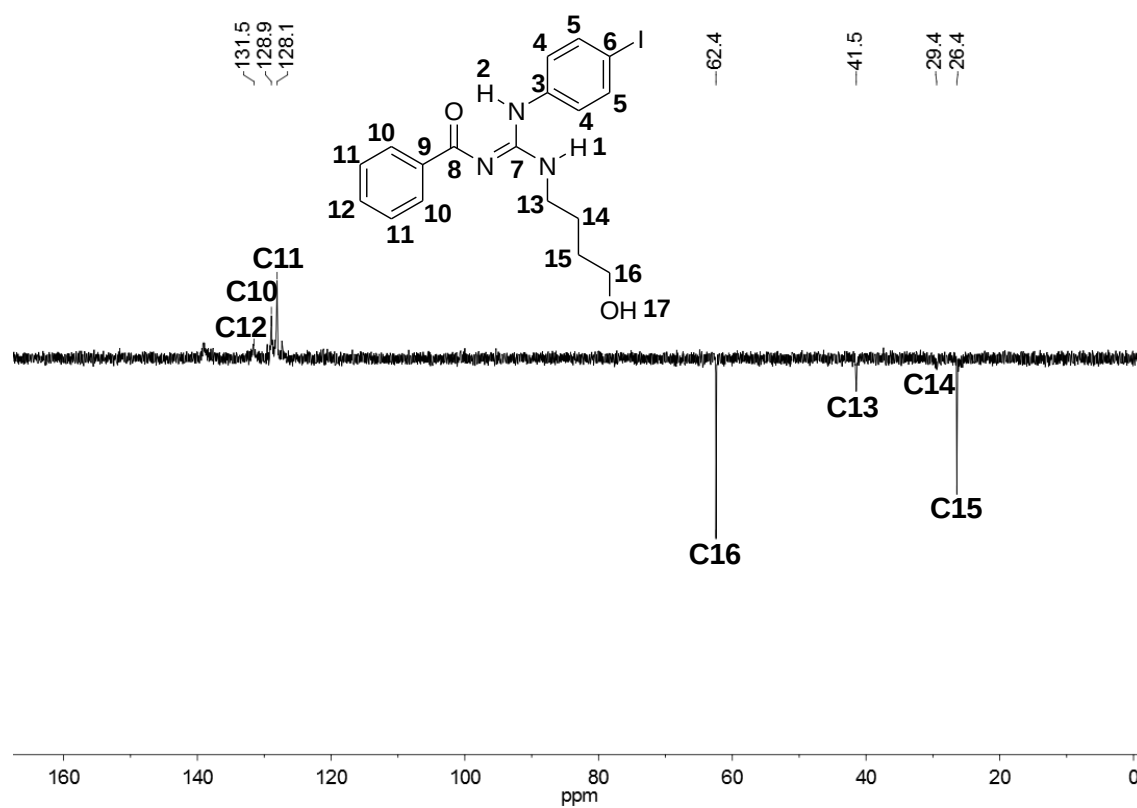
ESI-(+)MS/MS**¹H NMR**

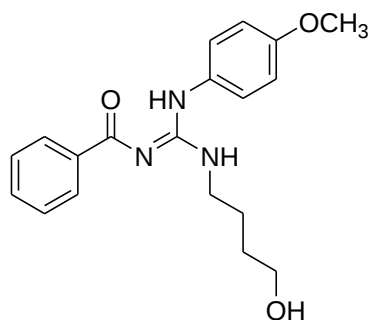
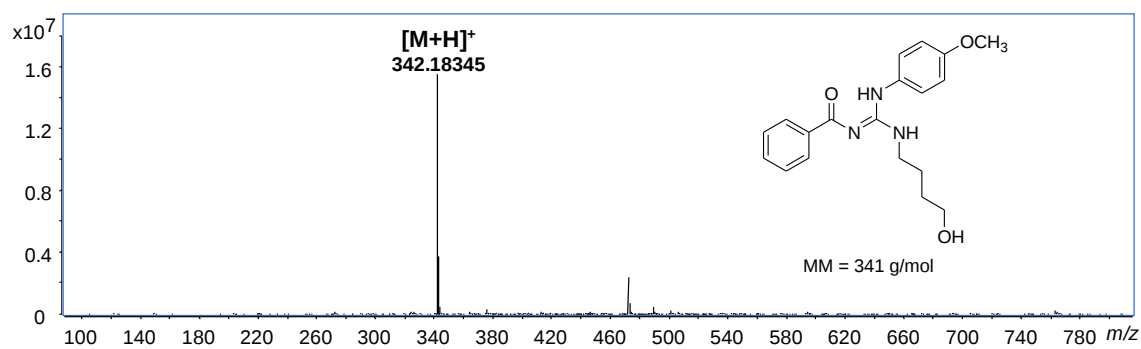
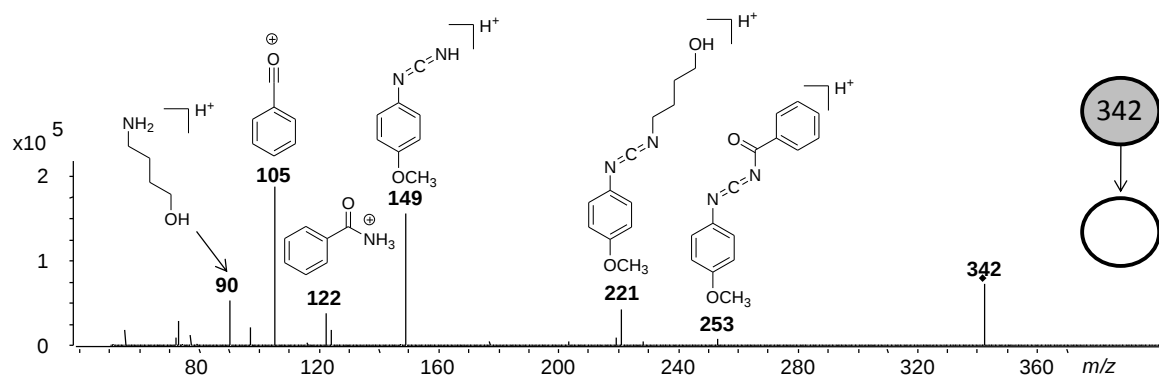
^{13}C NMR**DEPT135**

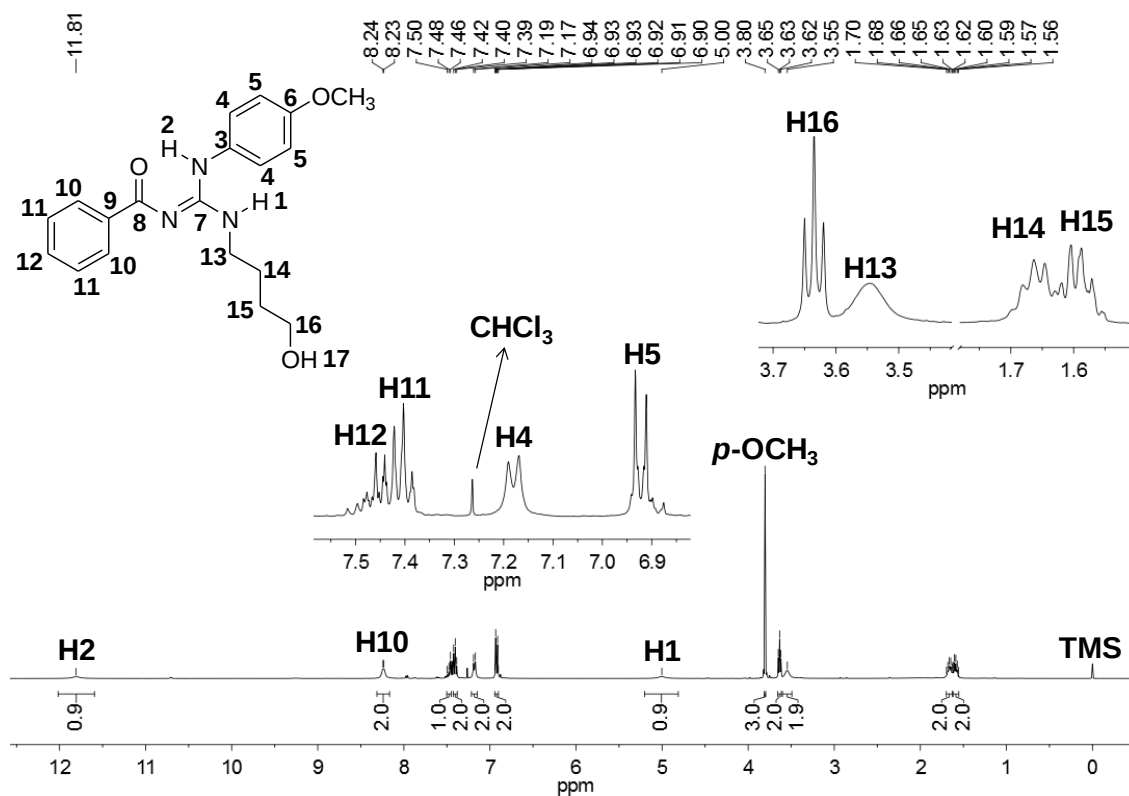
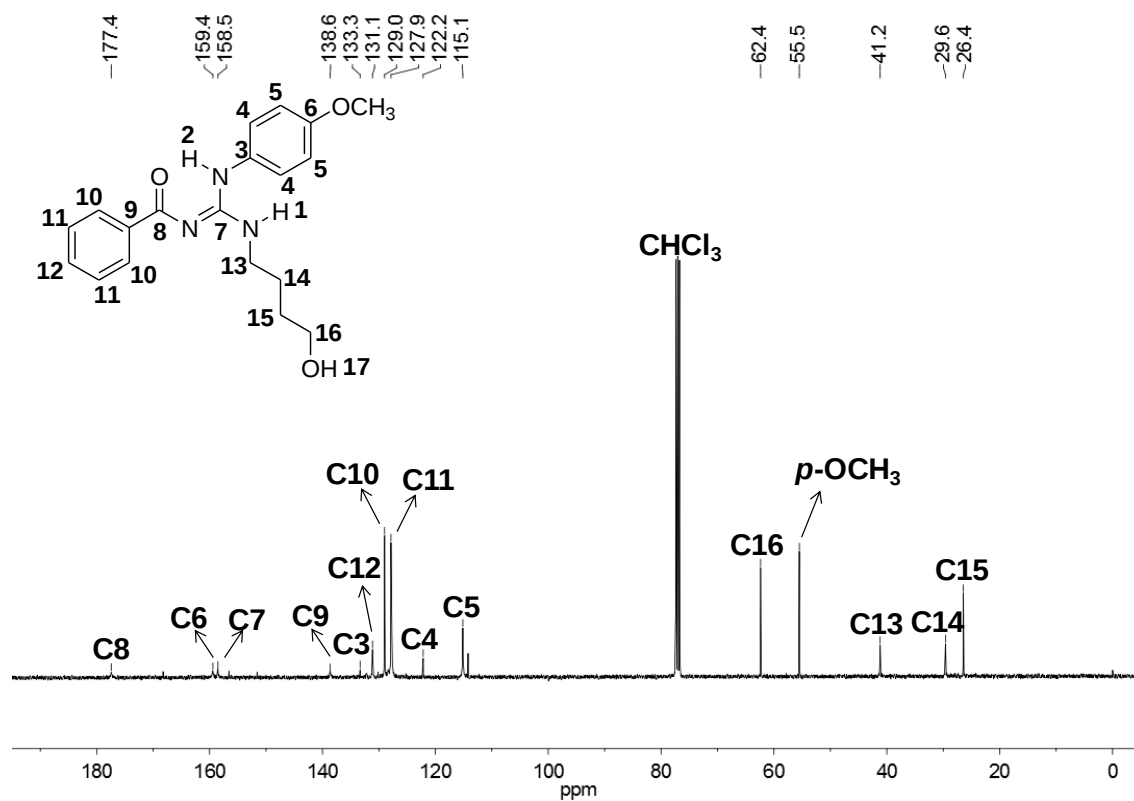
FT-IV:➤ **Composto LQOF-G17:****Rendimento: 25%****ESI(+)-MS:**

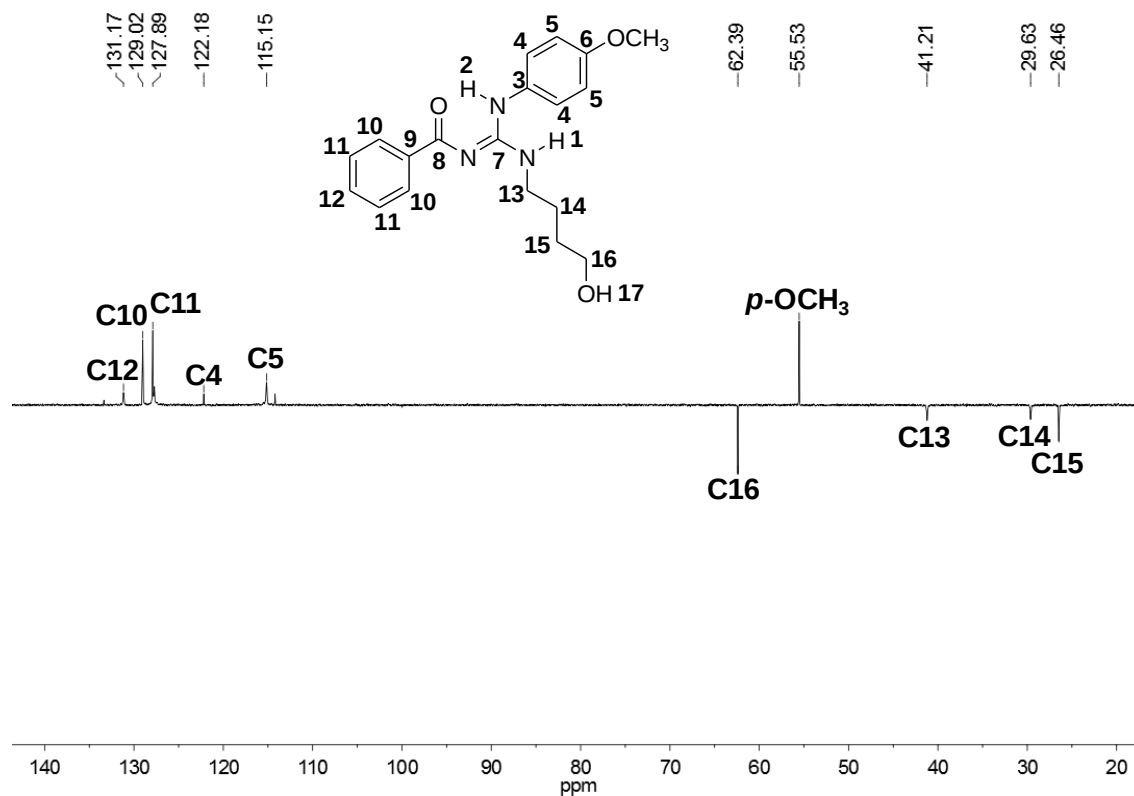
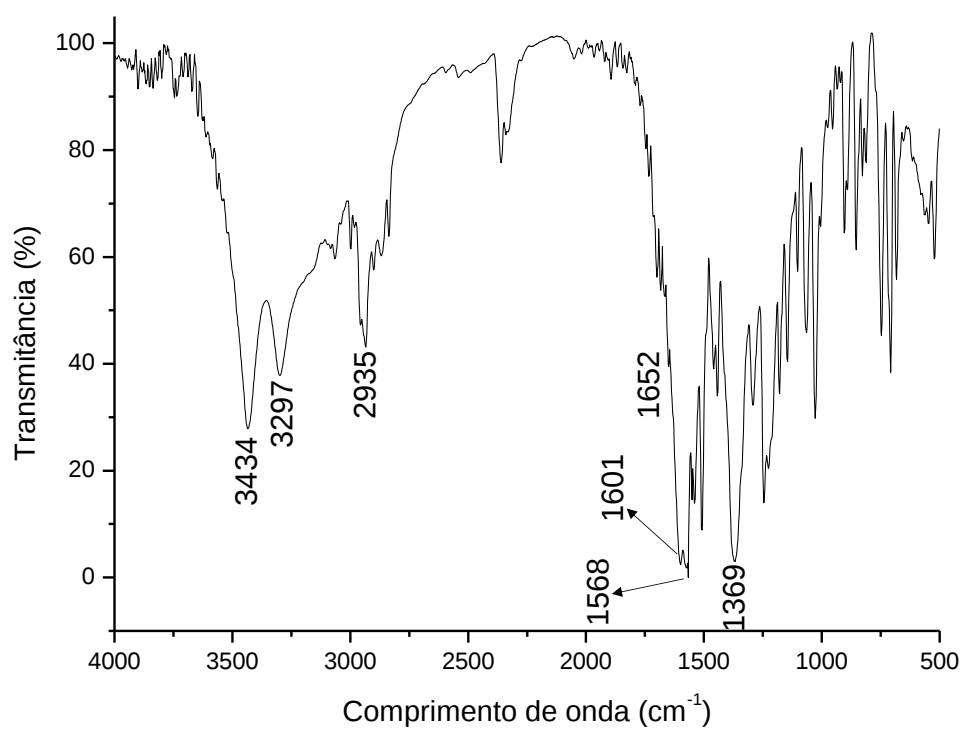
ESI(+)-MS/MS

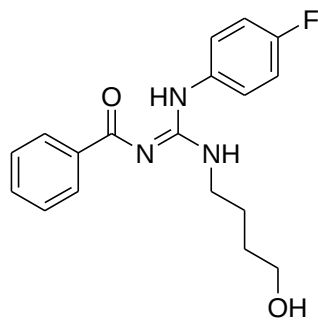
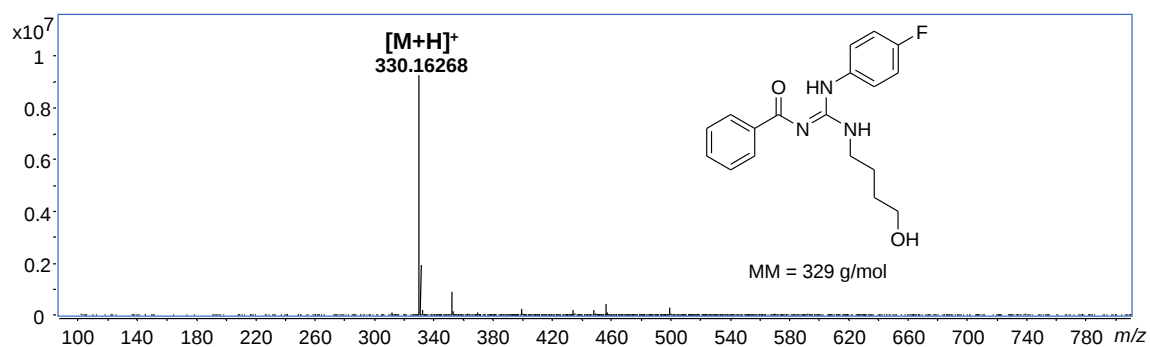
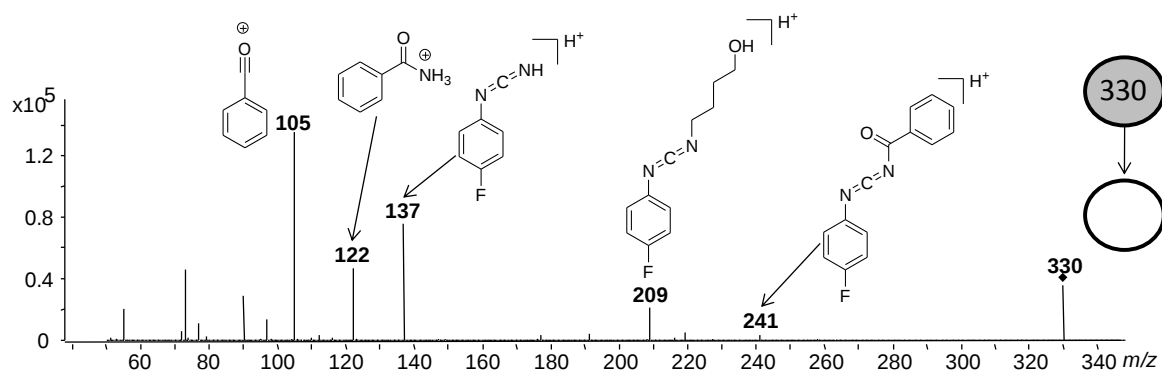
¹H NMR

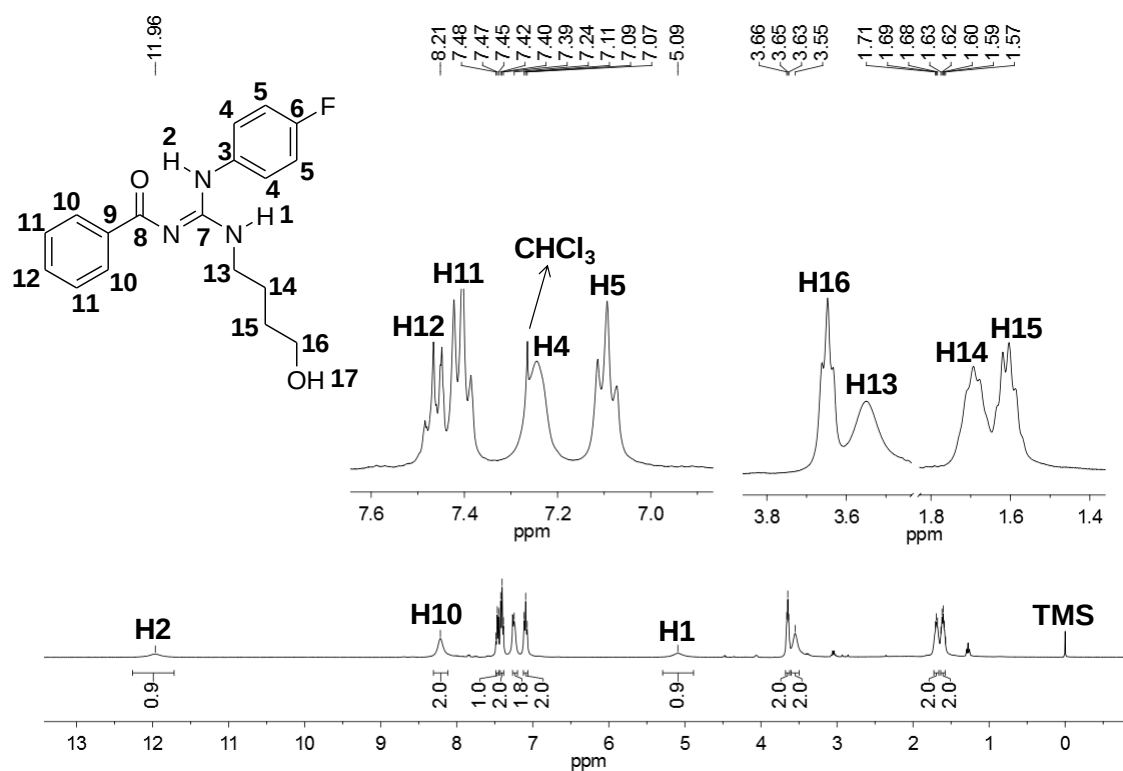
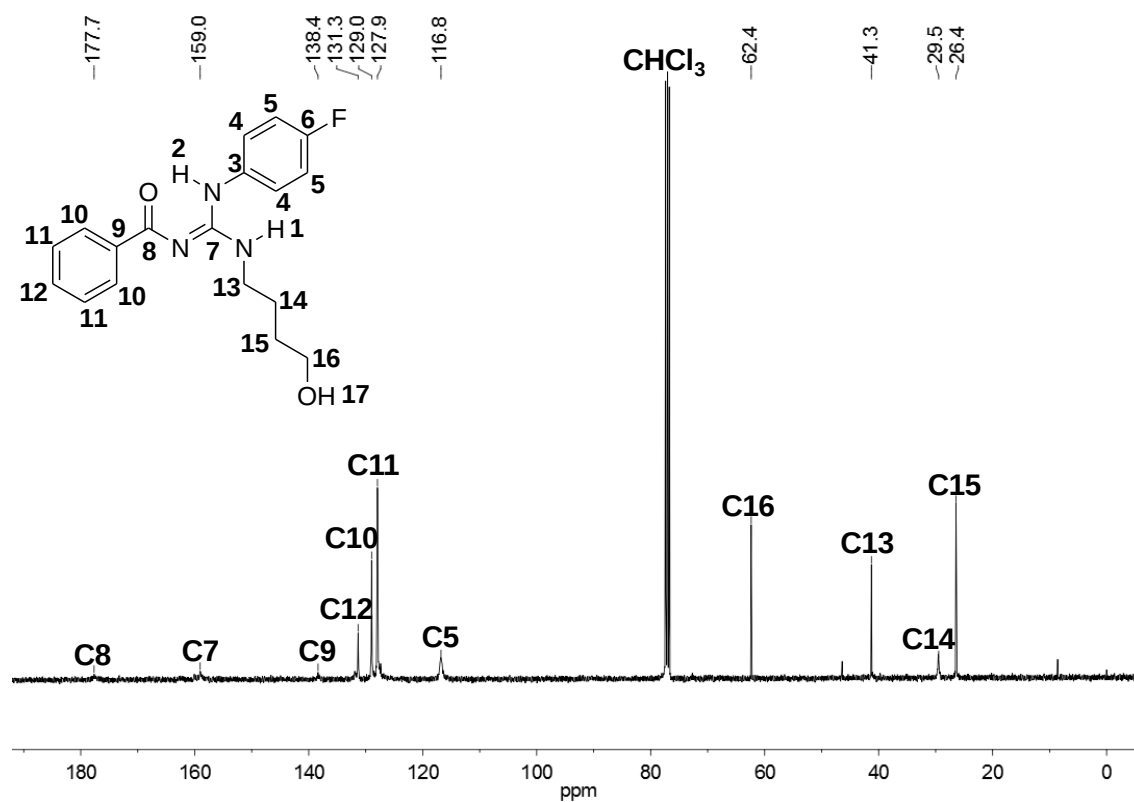
^{13}C NMR**DEPT135**

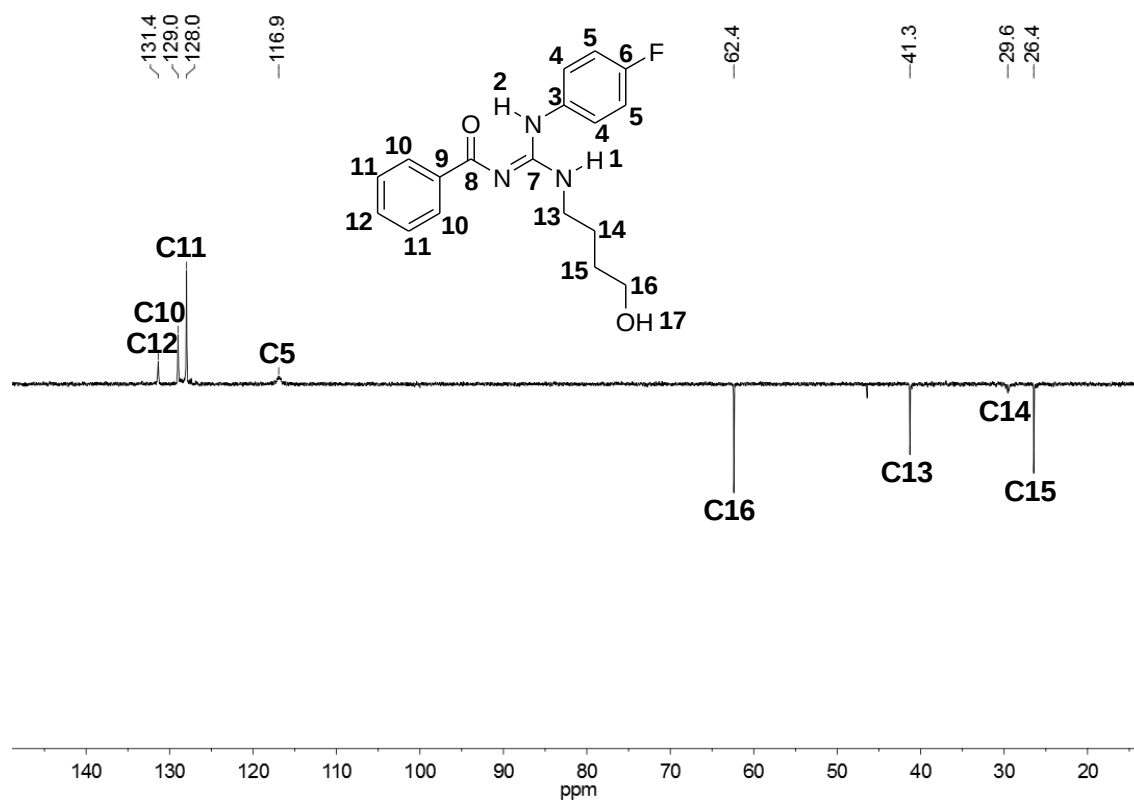
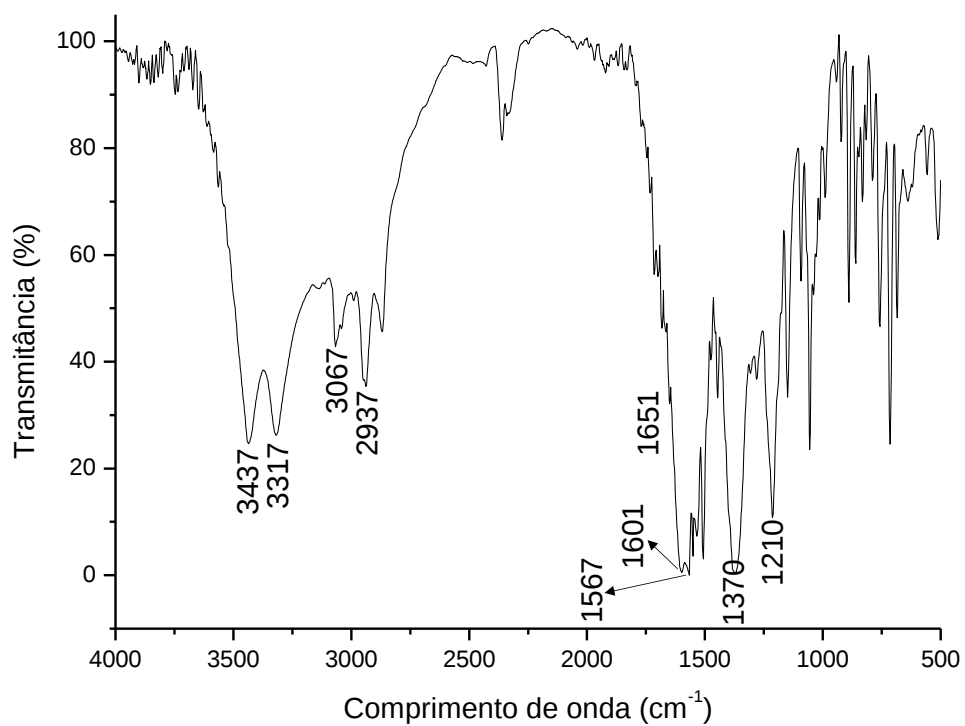
➤ **Composto LQOF-G18:****Rendimento: 69,3%****ESI(+)-MS:****ESI(+)-MS/MS**

^1H NMR **^{13}C NMR**

DEPT135**FT-IV:**

Composto LQOF-G19:**Rendimento: 62%****ESI(+)-MS:****ESI(+)-MS/MS**

^1H NMR **^{13}C NMR**

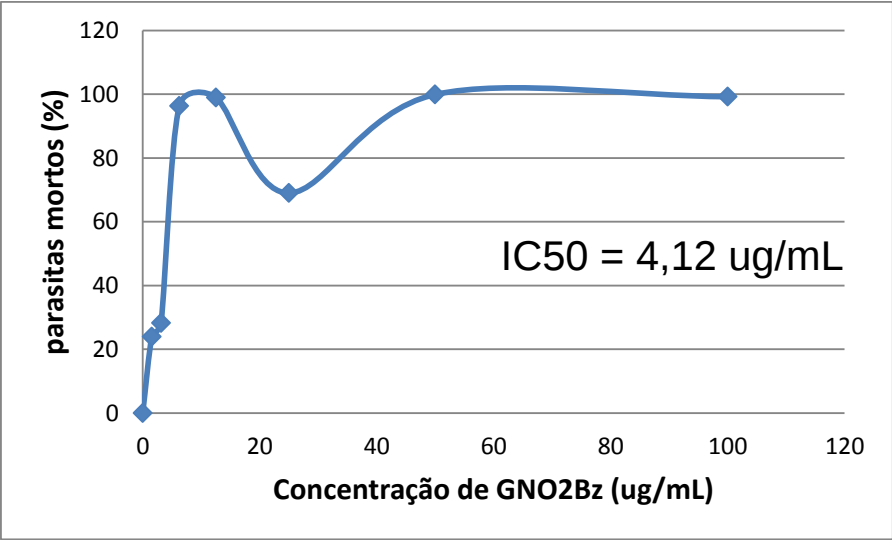
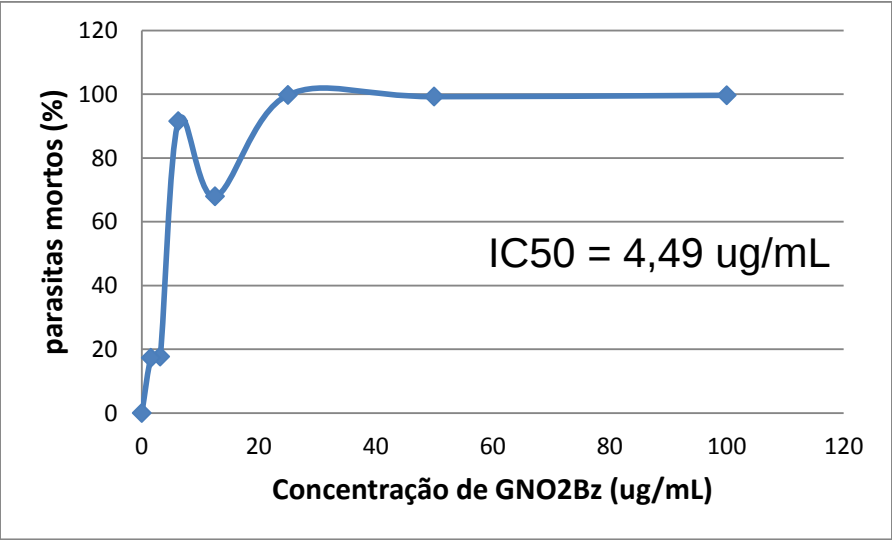
DEPT135**FT-IV:**

APÊNDICE B: Dados das atividades leishmanicidas.

➤ LQOF-G1

[] GNO2Bz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GNO2Bz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3252	0,3177	0,3206	0,3212	0,003781971	0,3195	0,3152	0,3257	0,3201	0,00527858	0,001033	100	99,69040
50	0,3227	0,3105	0,3186	0,3173	0,006208327	0,3159	0,3	0,3285	0,3148	0,014281802	0,002467	50	99,26096
25	0,3187	0,3138	0,3144	0,3156	0,002672694	0,3129	0,31	0,3218	0,3149	0,006148978	0,000733	25	99,78029
12,5	0,5777	0,3571	0,33	0,4216	0,135863943	0,3194	0,3007	0,3234	0,3145	0,012117337	0,107100	12,5	67,91171
6,25	0,3423	0,3353	0,3348	0,3375	0,004193246	0,3051	0,3047	0,3175	0,3091	0,007277365	0,028367	6,25	91,50105
3,13	0,5773	0,6197	0,5566	0,5845	0,032165890	0,3163	0,2953	0,3177	0,3098	0,012548038	0,274767	3,13	17,67702
1,56	0,6065	0,5384	0,6209	0,5886	0,044066654	0,3123	0,3031	0,3222	0,3125	0,009552143	0,276067	1,56	17,28753
0	0,6738	0,6016	0,6566	0,6440	0,037713129	0,309	0,3001	0,3216	0,3102	0,010802928	0,333767	0	0,00000

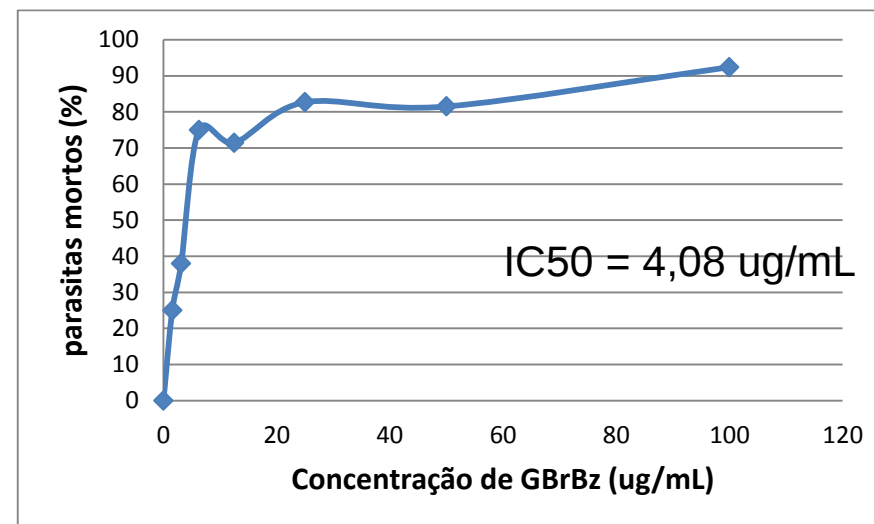
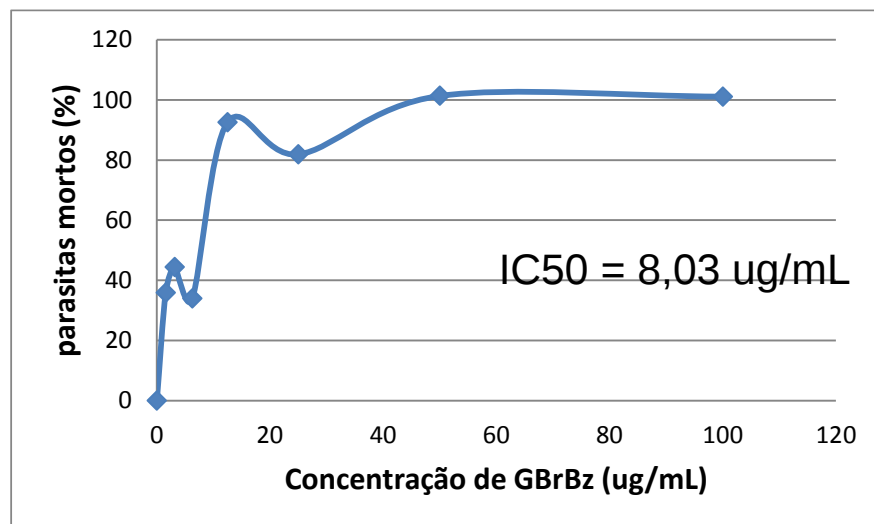
[] GNO2Bz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GNO2Bz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3281	0,3162	0,3163	0,3202	0,006841783	0,3248	0,3131	0,3142	0,3174	0,00646091	0,002833	100	99,23754
50	0,318	0,3237	0,3135	0,3184	0,005111763	0,3184	0,3128	0,3232	0,3181	0,005205124	0,000267	50	99,92824
25	0,3367	0,3128	0,6455	0,4317	0,185570273	0,3198	0,3166	0,3132	0,3165	0,003300501	0,115133	25	69,01686
12,5	0,3412	0,3236	0,3155	0,3268	0,013139382	0,327	0,3246	0,3175	0,3230	0,004939974	0,003733	12,5	98,99534
6,25	0,3492	0,3378	0,3179	0,3350	0,015841194	0,3228	0,319	0,3221	0,3213	0,002022378	0,013667	6,25	96,32221
3,13	0,6311	0,607	0,5227	0,5869	0,056917857	0,3209	0,322	0,3184	0,3204	0,001844813	0,266500	3,13	28,28310
1,56	0,6451	0,6006	0,5606	0,6021	0,042269973	0,319	0,313	0,3259	0,3193	0,006455228	0,282800	1,56	23,89666
0	0,6844	0,6792	0,692	0,6852	0,006437378	0,3157	0,3098	0,3153	0,3136	0,003296964	0,371600	0	0,00000



➤ LQOF-G2

[] GBrBz (ug/mL)	Abs composto (A)					Abs brancos (B)					Δ Abs (A - B)	[] GBrBz (ug/mL)	% parasitas mortos
				Média (A)	Desvio Padrão (A)				Média (B)	Desvio Padrão (B)			
100	0,7324	0,6284	0,7784	0,7554	0,076846153	0,7911	0,7349	0,6434	0,7630	0,074549741	-0,007600	100	101,08657
50	1,172	0,6124	0,5526	0,5825	0,341658857	0,5817	0,6017	0,6382	0,5917	0,028648714	-0,009200	50	101,31532
25	0,6898	0,6227	0,5781	0,6302	0,056226420	0,4968	0,5113	0,5025	0,5035	0,007305033	0,126667	25	81,89053
12,5	1,1284	0,5824	0,5319	0,5572	0,330776465	0,5543	0,5017	0,5087	0,5052	0,028563155	0,051950	12,5	92,57274
6,25	1,1036	0,8926	0,8627	0,8776	0,131306163	0,4319	0,399	0,3469	0,4154	0,042859892	0,462200	6,25	33,91951
3,13	0,9266	0,8378	0,8748	0,8563	0,044605057	0,499	0,3719	0,4352	0,4671	0,063550174	0,389200	3,13	44,35628
1,56	0,8489	0,7796	0,8251	0,8370	0,035211689	0,403	0,3734	0,3323	0,3882	0,035505534	0,448800	1,56	35,83530
0	1,1612	1,123	1,0938	1,1421	0,033800048	0,4642	0,4211	0,3698	0,4426	0,047259314	0,699450	0	0,00000

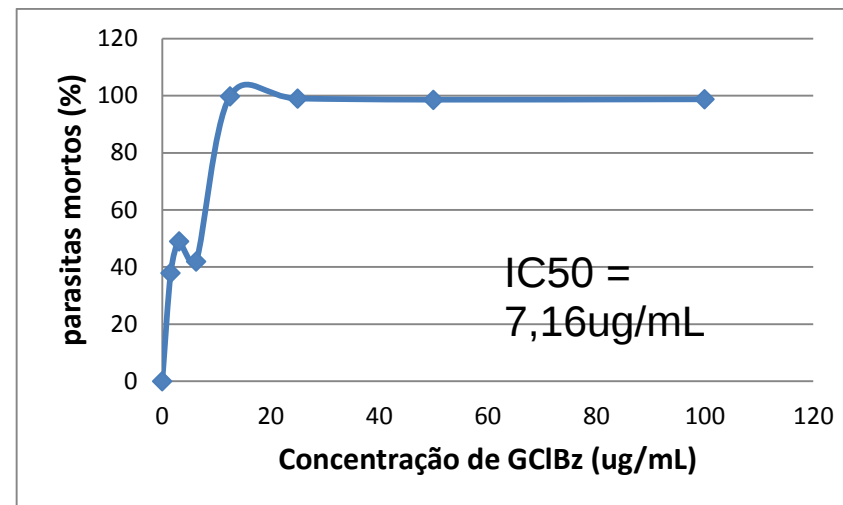
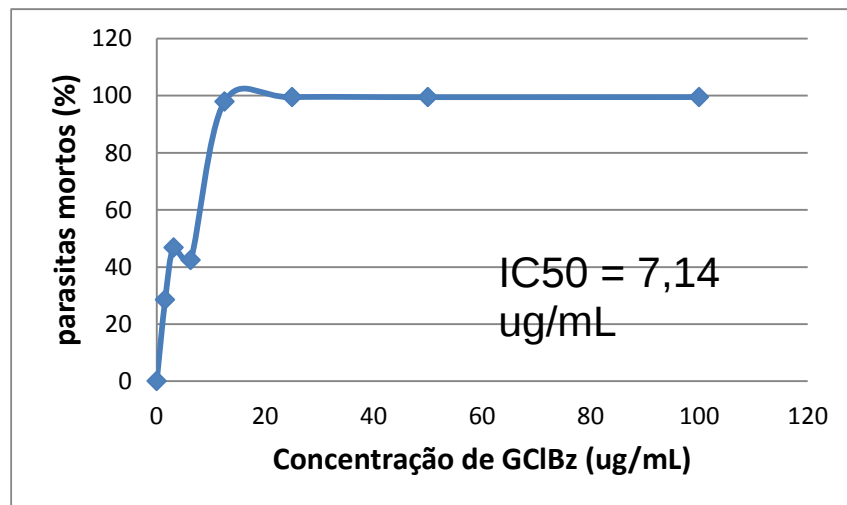
[] GBrBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GBrBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,5756	0,6365	0,5626	0,5691	0,039452534	0,5562	0,5234	0,5305	0,5367	0,017256606	0,032400	100	92,40506
50	0,6308	0,5559	0,6215	0,6262	0,040824563	0,5494	0,5451	0,4981	0,5472	0,028458075	0,078900	50	81,50491
25	0,4291	0,4007	0,4044	0,4114	0,015439888	0,3701	0,3447	0,3302	0,3374	0,020196618	0,073950	25	82,66526
12,5	0,4519	0,4881	0,3408	0,4700	0,076758218	0,38	0,3406	0,3241	0,3482	0,028721131	0,121767	12,5	71,45648
6,25	0,5742	0,4573	0,3986	0,4280	0,089392989	0,3205	0,3124	0,3306	0,3212	0,009118287	0,106783	6,25	74,96874
3,13	0,7255	0,5968	0,5982	0,5975	0,073904127	0,3431	0,3329	0,3222	0,3327	0,010451002	0,264767	3,13	37,93561
1,56	0,6445	0,6215	0,6476	0,6379	0,014258441	0,3141	0,3177	0,3225	0,3181	0,004214258	0,319767	1,56	25,04297
0	0,7629	0,7241	0,6879	0,7435	0,037507504	0,3176	0,3167	0,3164	0,3169	0,000624508	0,426600	0	0,00000



➤ **LQOF-G3**

[] GClBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GClBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3176	0,3719	0,3101	0,3139	0,033724320	0,3236	0,3062	0,305	0,3116	0,010409606	0,002250	100	99,51810
50	0,3096	0,3768	0,3058	0,3077	0,039940126	0,3148	0,3007	0,3004	0,3053	0,008228606	0,002400	50	99,48597
25	0,3093	0,373	0,3128	0,3110	0,035809634	0,319	0,3055	0,3014	0,3086	0,009208873	0,002417	25	99,48240
12,5	0,3191	0,3678	0,3093	0,3142	0,031331505	0,3102	0,3036	0,2994	0,3044	0,005444264	0,009800	12,5	97,90105
6,25	0,5634	0,5706	0,4686	0,5670	0,056925195	0,3021	0,3009	0,292	0,2983	0,005517554	0,268667	6,25	42,45735
3,13	0,5305	0,6258	0,4916	0,5493	0,069047018	0,3044	0,2985	0,299	0,3006	0,003271594	0,248667	3,13	46,74091
1,56	0,6223	0,6405	0,5269	0,6314	0,061015530	0,2986	0,2925	0,3015	0,2975	0,004593838	0,333867	1,56	28,49289
0	0,7575	0,857	0,6837	0,7661	0,086967009	0,2981	0,301	0,2984	0,2992	0,001594781	0,466900	0	0,00000

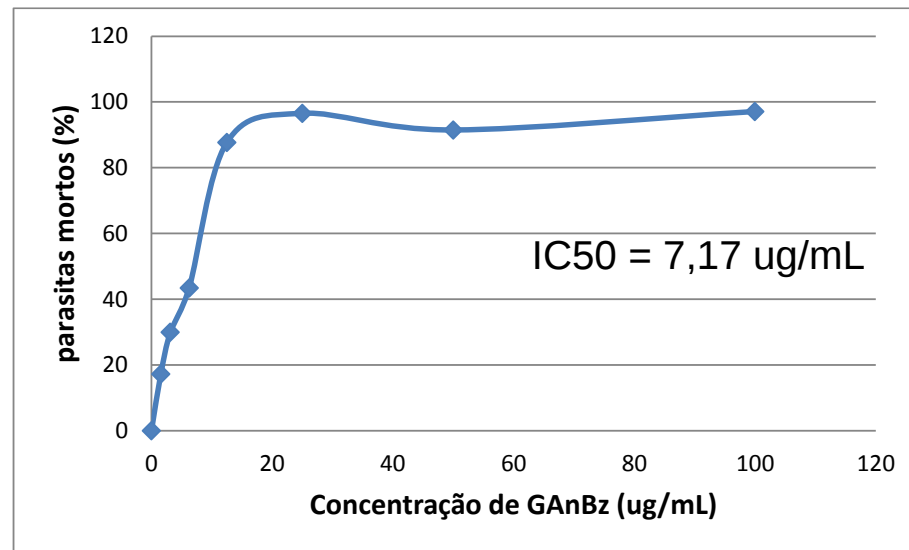
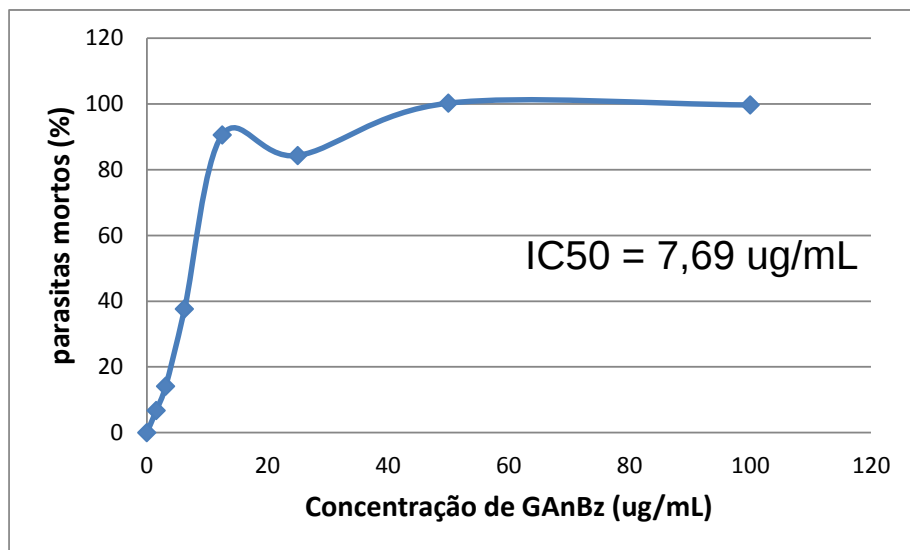
[] GClBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GClBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3127	0,3159	0,3187	0,3158	0,003002213	0,3144	0,1404	0,3076	0,3110	0,098554611	0,004767	100	98,75240
50	0,316	0,3146	0,3704	0,3153	0,031819706	0,3101	0,3079	0,312	0,3100	0,002051825	0,005300	50	98,61281
25	0,3187	0,3053	0,3415	0,3120	0,018302287	0,3146	0,2998	0,3104	0,3083	0,007627137	0,003733	25	99,02286
12,5	0,3082	0,3033	0,3077	0,3064	0,002696300	0,3086	0,3016	0,3071	0,3058	0,003685555	0,000633	12,5	99,83424
6,25	0,5316	0,5026	0,5219	0,5267	0,014762444	0,3098	0,3008	0,3047	0,3051	0,004513316	0,221650	6,25	41,98656
3,13	0,4907	0,5067	0,5028	0,5001	0,008342847	0,3105	0,3027	0,3021	0,3051	0,004686143	0,194967	3,13	48,97051
1,56	0,5397	0,5534	0,5411	0,5447	0,007538117	0,3062	0,309	0,3068	0,3073	0,001474214	0,237400	1,56	37,86425
0	0,6308	0,6773	0,7412	0,6831	0,055428043	0,3085	0,2973	0,2973	0,3010	0,006466312	0,382067	0	0,00000



➤ LQOF-G4

[] GAnBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GAnBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3125	0,2909	0,2973	0,3002	0,011094745	0,2904	0,2981	0,3086	0,2990	0,009135832	0,001200	100	99,67135
50	0,3046	0,2858	0,2973	0,2959	0,009477865	0,2861	0,3008	0,3031	0,2967	0,009222974	-0,000767	50	100,20997
25	0,4721	0,2913	0,2933	0,3522	0,103812388	0,287	0,2916	0,3062	0,2949	0,010024637	0,057300	25	84,30710
12,5	0,3441	0,3131	0,3275	0,3282	0,015513000	0,289	0,2891	0,3032	0,2938	0,008169664	0,034467	12,5	90,56053
6,25	0,6628	0,5286	0,5154	0,5220	0,081558421	0,2861	0,2993	0,2975	0,2943	0,00715821	0,227700	6,25	37,63922
3,13	0,6507	0,5791	0,5802	0,6033	0,041024400	0,2808	0,293	0,2958	0,2899	0,007975791	0,313467	3,13	14,15008
1,56	0,6599	0,6152	0,6317	0,6356	0,022603775	0,2914	0,292	0,3018	0,2951	0,005838963	0,340533	1,56	6,73727
0	0,6794	0,6173	0,6391	0,6453	0,031505950	0,2714	0,2813	0,2877	0,2801	0,008212386	0,365133	0	0,00000

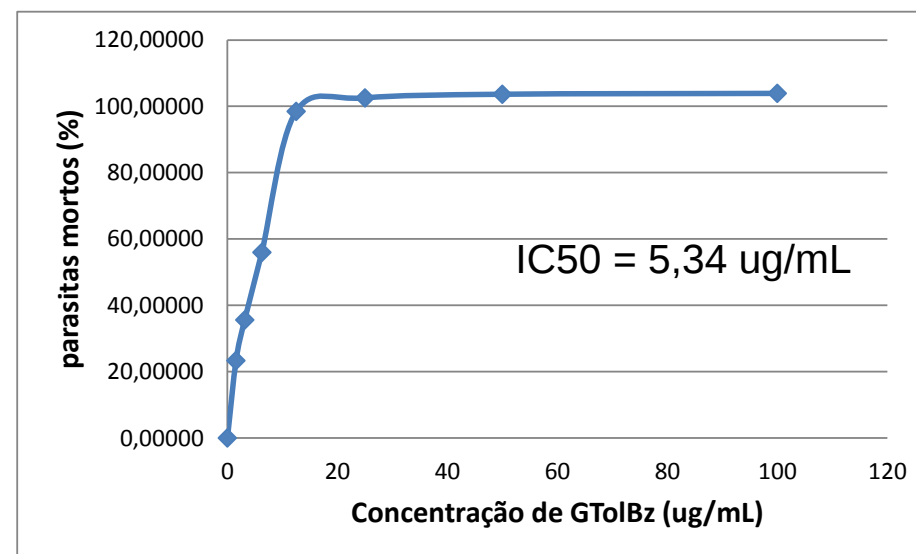
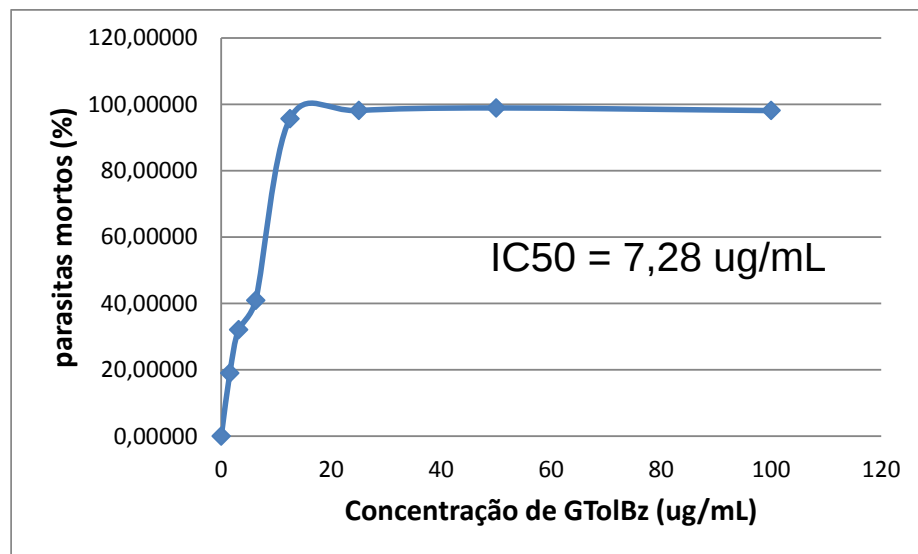
[] GAnBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GAnBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3075	0,2974	0,297	0,3006	0,005950076	0,284	0,2962	0,2904	0,2902	0,006102457	0,010433	100	97,10855
50	0,3028	0,3015	0,3502	0,3182	0,027749295	0,2848	0,2901	0,2875	0,2875	0,002650165	0,030700	50	91,49192
25	0,2965	0,2959	0,3028	0,2984	0,003822308	0,2904	0,2876	0,2799	0,2860	0,00543721	0,012433	25	96,55428
12,5	0,3301	0,3224	0,3449	0,3325	0,011435185	0,2906	0,2847	0,289	0,2881	0,003051227	0,044367	12,5	87,70439
6,25	0,4698	0,5329	0,4785	0,4937	0,034197110	0,2912	0,2883	0,2897	0,2897	0,00145029	0,204000	6,25	43,46420
3,13	0,5414	0,5317	0,5532	0,5421	0,010767075	0,2892	0,29	0,2886	0,2893	0,000702373	0,252833	3,13	29,93071
1,56	0,5824	0,6218	0,5709	0,5917	0,026693997	0,2933	0,2877	0,2988	0,2933	0,005550072	0,298433	1,56	17,29329
0	0,6435	0,6063	0,691	0,6469	0,042454245	0,2855	0,2845	0,2883	0,2861	0,001969776	0,360833	0	0,00000



➤ **LQOF-G5**

[] GTolBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GTolBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3065	0,2975	0,2992	0,3011	0,004781550	0,3006	0,2949	0,2913	0,2956	0,004689346	0,005467	100	98,13530
50	0,2972	0,2985	0,3003	0,2987	0,001556710	0,2993	0,2955	0,2919	0,2956	0,003700438	0,003100	50	98,94258
25	0,3022	0,2928	0,2977	0,2976	0,004701408	0,2918	0,2889	0,2959	0,2922	0,0035171	0,005367	25	98,16941
12,5	0,3102	0,3079	0,3072	0,3084	0,001569497	0,3021	0,2939	0,2915	0,2958	0,005558176	0,012600	12,5	95,70210
6,25	0,4837	0,4486	0,4701	0,4675	0,017697557	0,2996	0,2958	0,2875	0,2943	0,006187897	0,173167	6,25	40,93235
3,13	0,4872	0,4846	0,5115	0,4944	0,014837228	0,2929	0,2974	0,2958	0,2954	0,002281083	0,199067	3,13	32,09778
1,56	0,5505	0,5107	0,5454	0,5355	0,021656951	0,2945	0,2999	0,2999	0,2981	0,003117693	0,237433	1,56	19,01080
0	0,5722	0,5734	0,6038	0,5831	0,017907906	0,289	0,293	0,2879	0,2900	0,002683909	0,293167	0	0,00000

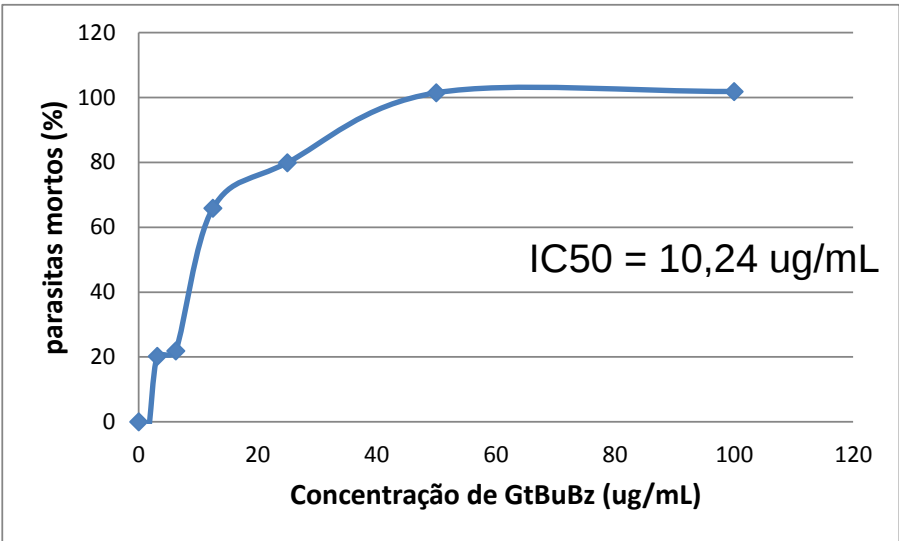
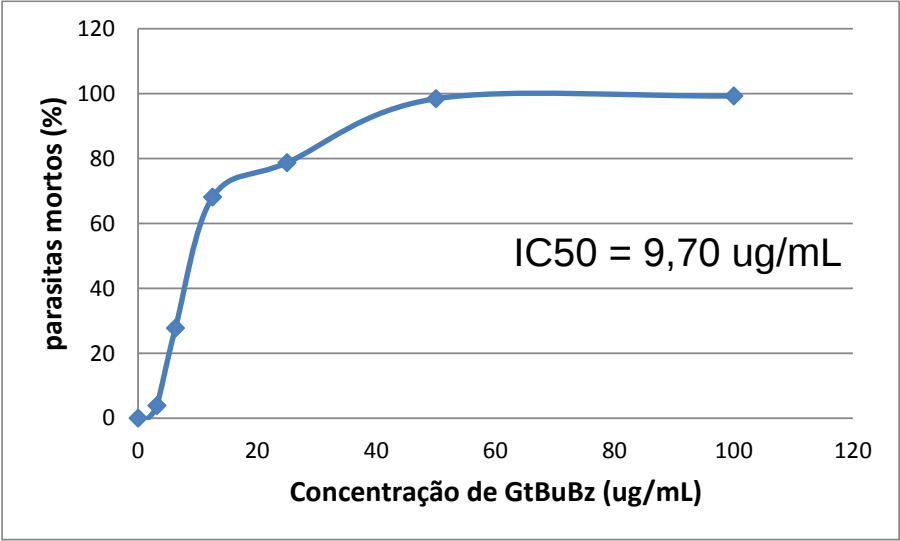
[] GTolBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GTolBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2922	0,2953	0,298	0,2952	0,002902302	0,3031	0,3022	0,3136	0,3063	0,006337989	-0,011133	100	103,90095
50	0,2857	0,2881	0,2944	0,2894	0,004493334	0,3	0,2977	0,3017	0,2998	0,002007491	-0,010400	50	103,64401
25	0,2865	0,2969	0,2936	0,2923	0,005314443	0,294	0,2986	0,3061	0,2996	0,006107652	-0,007233	25	102,53445
12,5	0,2997	0,3227	0,3027	0,3084	0,012503329	0,2979	0,3099	0,3041	0,3040	0,006001108	0,004400	12,5	98,45830
6,25	0,4152	0,433	0,4393	0,4292	0,012498936	0,3055	0,3039	0,3009	0,3034	0,002335231	0,125733	6,25	55,94487
3,13	0,4697	0,486	0,4976	0,4844	0,014015815	0,2999	0,3015	0,3003	0,3006	0,000832664	0,183867	3,13	35,57580
1,56	0,5203	0,5113	0,5355	0,5224	0,012231638	0,3001	0,3027	0,3076	0,3035	0,003808319	0,218900	1,56	23,30063
0	0,5561	0,5911	0,5969	0,5814	0,022072893	0,2978	0,2948	0,2953	0,2960	0,001607271	0,285400	0	0,00000



➤ LQOF-G6

[] GtBuBz (ug/mL)	Abs composto (A)					Abs brancos (B)					Δ Abs (A - B)	[] GtBuBz (ug/mL)	% parasitas mortos
	Média (A)	Desvio Padrão (A)				Média (B)	Desvio Padrão (B)						
100	0,3052	0,2918	0,2907	0,2959	0,008072806	0,2917	0,2965	0,292	0,2934	0,002688864	0,002500	100	99,30511
50	0,2915	0,2908	0,2995	0,2939	0,004833554	0,2886	0,2917	0,2848	0,2884	0,003455919	0,005567	50	98,45270
25	0,3124	0,3454	0,4514	0,3697	0,072624606	0,2924	0,2997	0,2876	0,2932	0,006092883	0,076500	25	78,73622
12,5	0,4053	0,4086	0,3949	0,4029	0,007150061	0,2891	0,2901	0,2852	0,2881	0,002589081	0,114800	12,5	68,09043
6,25	0,4889	0,5326	0,6318	0,5511	0,073224242	0,286	0,2953	0,2919	0,2911	0,004705667	0,260033	6,25	27,72168
3,13	0,6114	0,5891	0,7183	0,6396	0,069062207	0,2914	0,2984	0,2918	0,2939	0,003931088	0,345733	3,13	3,90068
1,56	0,6327	0,6318	0,7058	0,6568	0,042466489	0,2937	0,2995	0,2965	0,2966	0,002900564	0,360200	1,56	-0,12044
0	0,6463	0,6337	0,6722	0,6507	0,019629150	0,295	0,2913	0,2866	0,2910	0,004209906	0,359767	0	0,00000

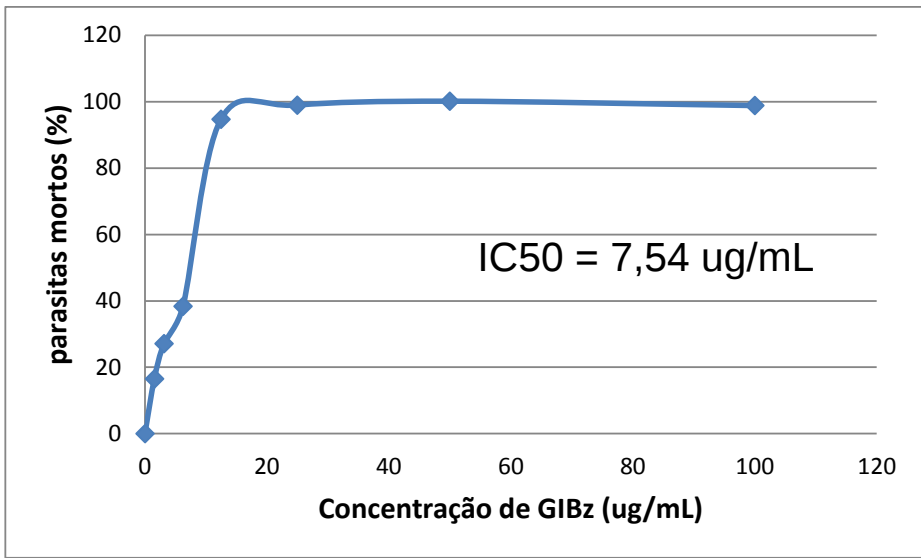
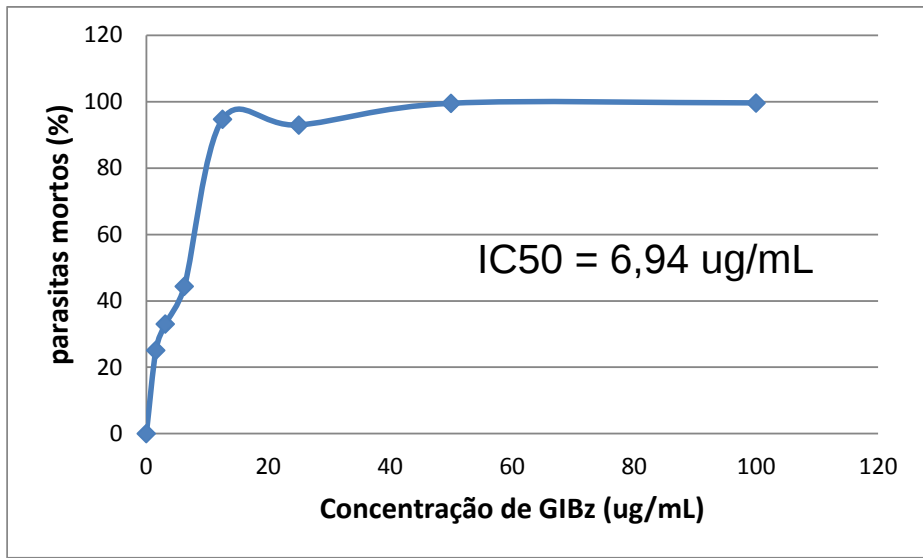
[] GtBuBz (ug/mL)	Abs composto (A)					Abs brancos (B)					Δ Abs (A - B)	[] GtBuBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2857	0,2898	0,2893	0,2883	0,002236812	0,2857	0,2924	0,3048	0,2943	0,009690722	-0,006033	100	101,83906
50	0,2909	0,2941	0,2917	0,2922	0,001665328	0,2906	0,2936	0,3066	0,2969	0,008504904	-0,004700	50	101,43264
25	0,4679	0,3095	0,3021	0,3598	0,093661591	0,2913	0,285	0,3055	0,2939	0,010500637	0,065900	25	79,91262
12,5	0,4338	0,4009	0,3802	0,4050	0,027030421	0,2839	0,284	0,3111	0,2930	0,015675143	0,111967	12,5	65,87076
6,25	0,6179	0,5119	0,5188	0,5495	0,059307701	0,2895	0,2856	0,3049	0,2933	0,010205057	0,256200	6,25	21,90611
3,13	0,6098	0,5336	0,5243	0,5559	0,046909810	0,2904	0,2889	0,3036	0,2943	0,008088893	0,261600	3,13	20,26012
1,56	0,686	0,61	0,6114	0,6358	0,043480098	0,2876	0,2931	0,3071	0,2959	0,010054015	0,339867	1,56	-3,59683
0	0,644	0,5798	0,6138	0,6125	0,032118730	0,2783	0,2818	0,2933	0,2845	0,007847511	0,328067	0	0,00000



➤ **LQOF-G7**

[] GIBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GIBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2972	0,2984	0,2993	0,2983	0,001053562	0,2953	0,2972	0,2986	0,2970	0,001656292	0,001267	100	99,63567
50	0,2972	0,2985	0,2975	0,2977	0,000680687	0,2919	0,2917	0,3046	0,2961	0,007390756	0,001667	50	99,52061
25	0,2922	0,3609	0,3066	0,3199	0,036229692	0,2943	0,2959	0,2964	0,2955	0,001096973	0,024367	25	92,99137
12,5	0,315	0,3127	0,32	0,3159	0,003732286	0,2979	0,2933	0,3012	0,2975	0,003967786	0,018433	12,5	94,69799
6,25	0,4833	0,489	0,4862	0,4862	0,002850142	0,2891	0,2959	0,2937	0,2929	0,003469871	0,193267	6,25	44,41036
3,13	0,5188	0,5229	0,541	0,5276	0,011812846	0,2949	0,2941	0,2958	0,2949	0,000850497	0,232633	3,13	33,08725
1,56	0,5518	0,568	0,5528	0,5575	0,009078186	0,2993	0,2963	0,2956	0,2971	0,00196553	0,260467	1,56	25,08149
0	0,6557	0,6045	0,6369	0,6324	0,025899308	0,2807	0,288	0,2854	0,2847	0,003699996	0,347667	0	0,00000

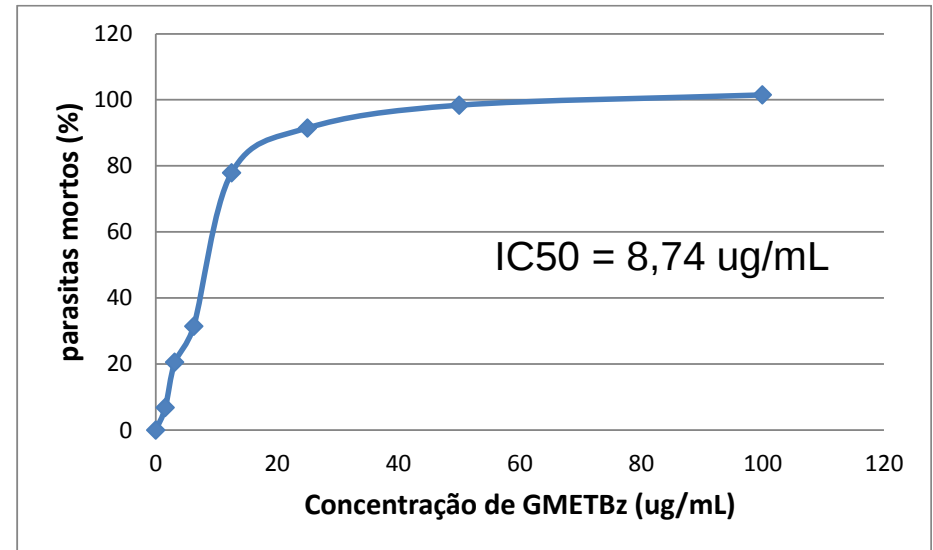
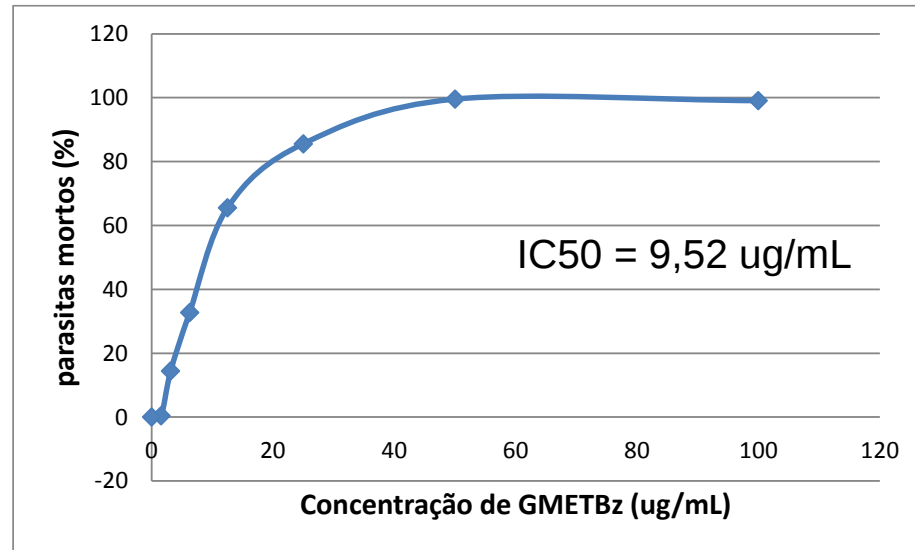
[] GIBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GIBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2986	0,2987	0,3087	0,3020	0,005802585	0,2975	0,2974	0,2995	0,2981	0,001184614	0,003867	100	98,82698
50	0,2954	0,3059	0,2997	0,3003	0,005278580	0,2997	0,3013	0,3014	0,3008	0,000953943	-0,000467	50	100,14157
25	0,3017	0,3051	0,3011	0,3026	0,002157161	0,2968	0,298	0,303	0,2993	0,003288368	0,003367	25	98,97867
12,5	0,3165	0,3168	0,3188	0,3174	0,001250332	0,2983	0,3009	0,3011	0,3001	0,00156205	0,017267	12,5	94,76186
6,25	0,4995	0,5111	0,5037	0,5048	0,005873095	0,2997	0,2969	0,308	0,3015	0,005772635	0,203233	6,25	38,34563
3,13	0,559	0,5253	0,5337	0,5393	0,017542045	0,2984	0,3026	0,2961	0,2990	0,003295958	0,240300	3,13	27,10081
1,56	0,5673	0,5667	0,5897	0,5746	0,013109274	0,299	0,299	0,3004	0,2995	0,000808287	0,275100	1,56	16,54363
0	0,6253	0,623	0,6188	0,6224	0,003295964	0,293	0,2915	0,2937	0,2927	0,001123985	0,329633	0	0,00000



➤ LQOF-G8

[] GMETBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GMETBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3098	0,3254	0,2964	0,3105	0,014513894	0,3056	0,3187	0,2987	0,3077	0,010158896	0,002867	100	99,05918
50	0,3062	0,306	0,2993	0,3038	0,003927261	0,2934	0,3143	0,2997	0,3025	0,010721169	0,001367	50	99,55147
25	0,397	0,3142	0,3291	0,3468	0,044136645	0,299	0,3131	0,2964	0,3028	0,008985733	0,043933	25	85,58144
12,5	0,5718	0,4374	0,3835	0,4105	0,096975469	0,2969	0,3181	0,3014	0,3055	0,011169751	0,104983	12,5	65,54534
6,25	0,6298	0,5381	0,4802	0,5091	0,075433716	0,2944	0,3186	0,2993	0,3041	0,012794139	0,205050	6,25	32,70430
3,13	0,5942	0,5777	0,5171	0,5630	0,040597683	0,2938	0,3165	0,2965	0,3023	0,012400141	0,260733	3,13	14,42949
1,56	0,6046	0,6295	0,5911	0,6084	0,019479983	0,2973	0,3155	0,3025	0,3051	0,009374423	0,303300	1,56	0,45947
0	0,5867	0,6042	0,6091	0,6000	0,011775805	0,2903	0,3048	0,2908	0,2953	0,008231036	0,304700	0	0,00000

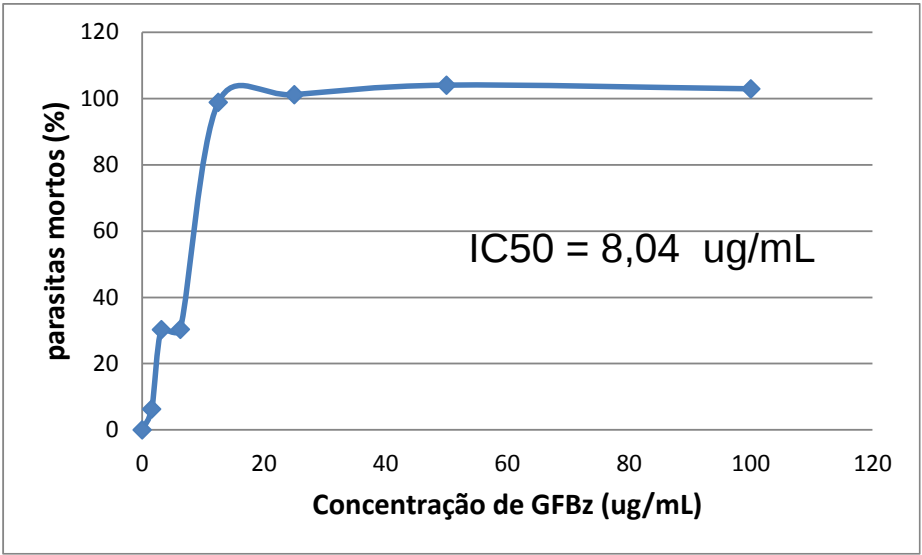
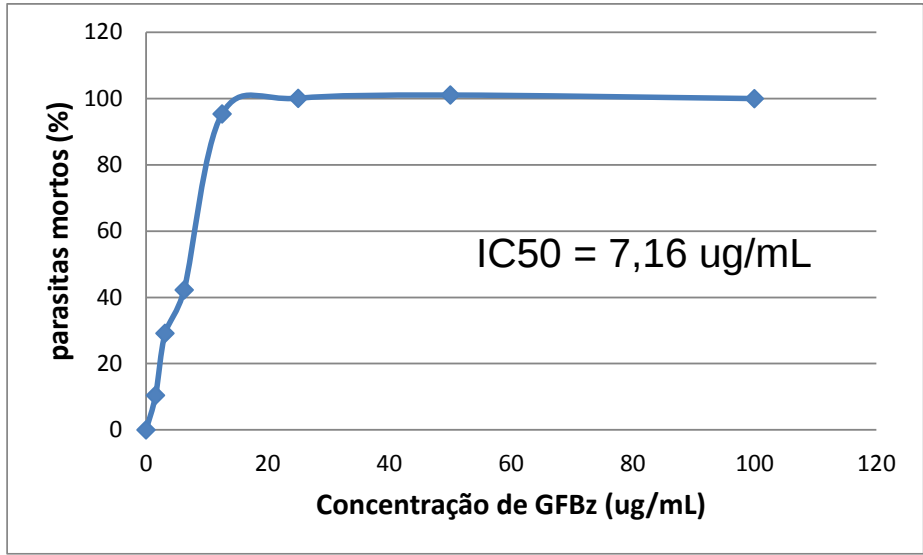
[] GMETBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GMETBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3065	0,3098	0,3087	0,3083	0,001680283	0,315	0,3131	0,3109	0,3130	0,002051826	-0,004667	100	101,49079
50	0,3151	0,3174	0,3078	0,3134	0,005012327	0,309	0,3091	0,307	0,3084	0,001184614	0,005067	50	98,38143
25	0,3399	0,3327	0,3364	0,3363	0,003600449	0,3092	0,3066	0,3133	0,3097	0,003377875	0,026633	25	91,49185
12,5	0,3898	0,3486	0,3675	0,3787	0,020623375	0,3111	0,3098	0,3076	0,3095	0,001769188	0,069150	12,5	77,90970
6,25	0,5147	0,5203	0,5342	0,5231	0,010040099	0,3081	0,3063	0,311	0,3085	0,002371346	0,214600	6,25	31,44500
3,13	0,5847	0,5463	0,5427	0,5579	0,023279172	0,3115	0,3064	0,3098	0,3092	0,002596798	0,248667	3,13	20,56224
1,56	0,614	0,5999	0,583	0,5990	0,015521070	0,3117	0,3024	0,3075	0,3072	0,00465725	0,291767	1,56	6,79373
0	0,5959	0,6232	0,635	0,6180	0,020055503	0,3099	0,299	0,3061	0,3050	0,005532628	0,313033	0	0,00000



➤ **LQOF-G9**

[] GFBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GFBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2912	0,3143	0,3016	0,3024	0,011569062	0,3022	0,3012	0,3035	0,3023	0,001153254	0,000067	100	99,97969
50	0,2861	0,3144	0,3001	0,3002	0,014150259	0,3057	0,2979	0,3072	0,3036	0,004993006	-0,003400	50	101,03554
25	0,2848	0,3092	0,2919	0,2953	0,012550294	0,2956	0,2949	0,2962	0,2956	0,000650644	-0,000267	25	100,08122
12,5	0,3012	0,3194	0,3194	0,3133	0,010507781	0,3014	0,2953	0,298	0,2982	0,003056686	0,015100	12,5	95,40101
6,25	0,4487	0,5155	0,4878	0,4840	0,033561733	0,2966	0,2891	0,2976	0,2944	0,004645795	0,189567	6,25	42,26396
3,13	0,4752	0,5598	0,5559	0,5303	0,047757831	0,3034	0,2919	0,2983	0,2979	0,005762233	0,232433	3,13	29,20812
1,56	0,538	0,6299	0,6146	0,5942	0,049239652	0,3022	0,2984	0,2997	0,3001	0,00193131	0,294067	1,56	10,43655
0	0,548	0,6014	0,7232	0,6242	0,089797793	0,29	0,3034	0,2942	0,2959	0,006853718	0,328333	0	0,00000

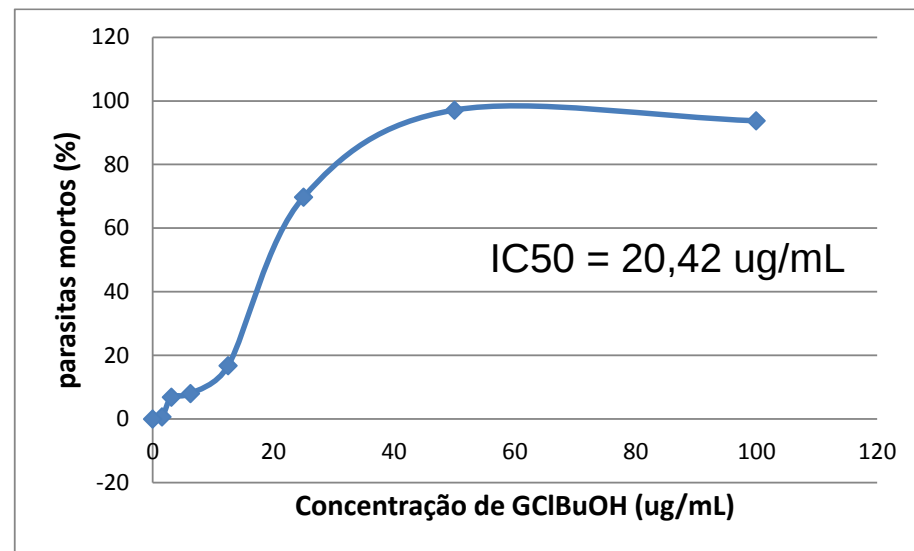
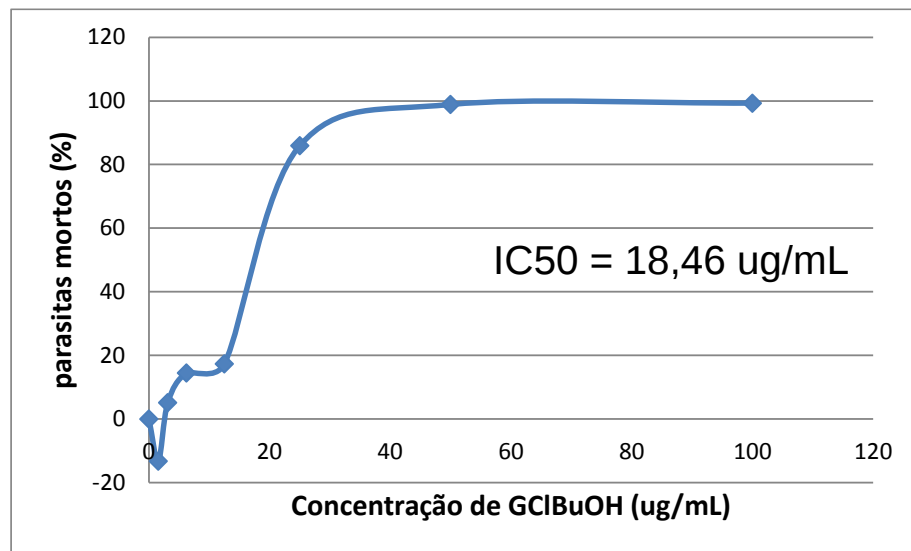
[] GFBz (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GFBz (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3028	0,3032	0,3003	0,3021	0,001571624	0,3038	0,3106	0,3182	0,3109	0,007203705	-0,008767	100	102,92938
50	0,2958	0,2999	0,2978	0,2978	0,002050201	0,3046	0,3134	0,3117	0,3099	0,004667973	-0,012067	50	104,03208
25	0,2986	0,3019	0,305	0,3018	0,003200530	0,2999	0,3026	0,3134	0,3053	0,007143531	-0,003467	25	101,15839
12,5	0,3055	0,3161	0,3128	0,3115	0,005424327	0,3041	0,3034	0,3164	0,3080	0,007311853	0,003500	12,5	98,83048
6,25	0,5274	0,5116	0,5166	0,5185	0,008075477	0,3042	0,2985	0,328	0,3102	0,015648115	0,208300	6,25	30,39652
3,13	0,4997	0,5412	0,4992	0,5134	0,024105661	0,2956	0,3038	0,3148	0,3047	0,009633967	0,208633	3,13	30,28514
1,56	0,5827	0,5967	0,5785	0,5860	0,009529618	0,2961	0,3036	0,3172	0,3056	0,010695955	0,280333	1,56	6,32658
0	0,6402	0,5696	0,5912	0,6003	0,036175331	0,293	0,3046	0,3056	0,3011	0,007003797	0,299267	0	0,00000



➤ LQOF-G12

[] GBrBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GBrBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2912	0,2894	0,3007	0,2938	0,006071517	0,2945	0,2919	0,2881	0,2915	0,003218691	0,002267	100	99,31334
50	0,2923	0,2947	0,2929	0,2933	0,001249004	0,2908	0,2919	0,2862	0,2896	0,003023806	0,003667	50	98,88923
25	0,3021	0,3176	0,3862	0,3353	0,044756790	0,2911	0,2913	0,2842	0,2889	0,00404268	0,046433	25	85,93355
12,5	0,553	0,5799	0,5608	0,5646	0,013839942	0,2933	0,2923	0,2889	0,2915	0,002306518	0,273067	12,5	17,27759
6,25	0,5724	0,5537	0,5945	0,5735	0,020423615	0,2917	0,2928	0,2889	0,2911	0,002010815	0,282400	6,25	14,45017
3,13	0,6169	0,5906	0,6049	0,6041	0,013166757	0,2944	0,2908	0,2878	0,2910	0,003304539	0,313133	3,13	5,13985
1,56	0,677	0,6486	0,6821	0,6692	0,018050030	0,2959	0,2908	0,2994	0,2954	0,004324732	0,373867	1,56	-13,25861
0	0,6209	0,6181	0,6157	0,6182	0,002602547	0,2828	0,2937	0,2879	0,2881	0,005453755	0,330100	0	0,00000

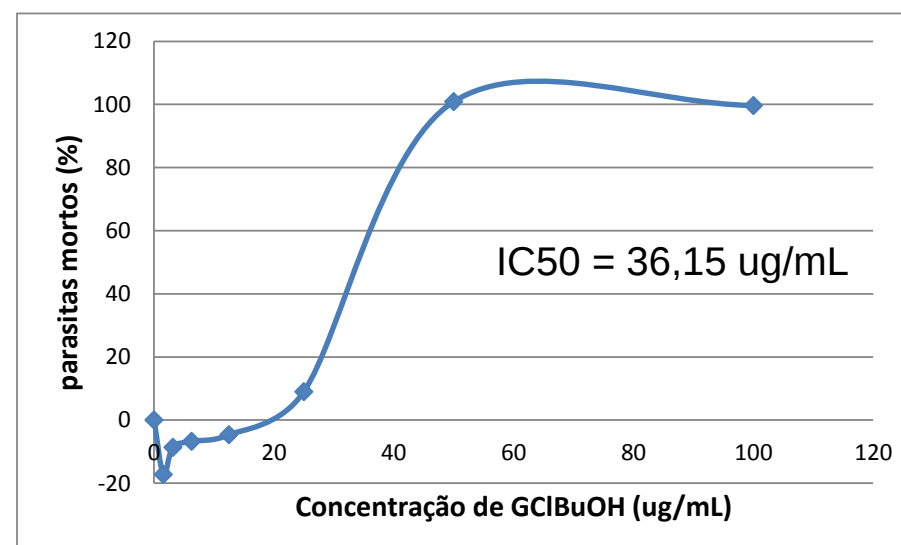
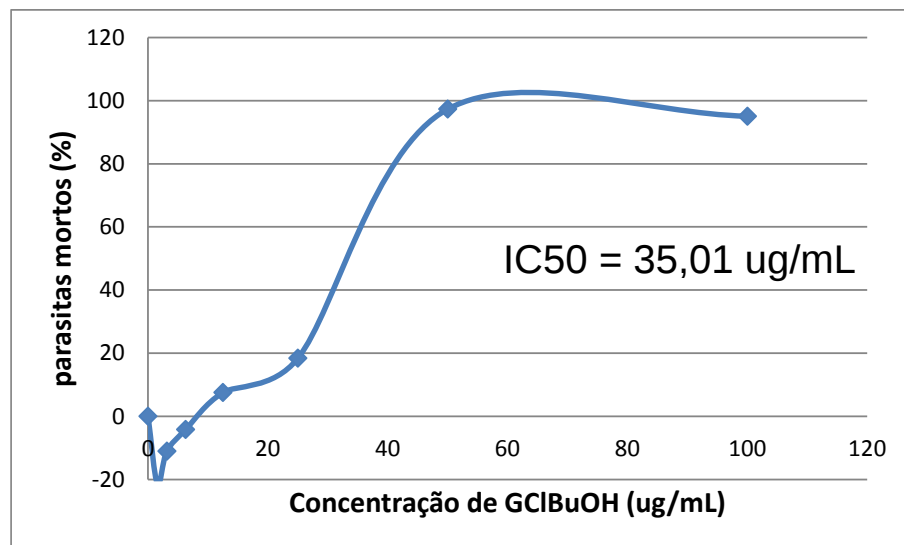
[] GBrBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GBrBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2968	0,3145	0,3019	0,3044	0,009110990	0,2875	0,286	0,2776	0,2837	0,005335735	0,020700	100	93,73992
50	0,2874	0,3002	0,2948	0,2941	0,006425979	0,2838	0,2842	0,2859	0,2846	0,001115042	0,009500	50	97,12702
25	0,3576	0,4094	0,4605	0,3835	0,051450396	0,2831	0,2881	0,2792	0,2835	0,004461323	0,100033	25	69,74799
12,5	0,5655	0,5745	0,5418	0,5606	0,016891715	0,2814	0,293	0,2811	0,2852	0,006785531	0,275433	12,5	16,70362
6,25	0,5877	0,6091	0,5761	0,5910	0,016740763	0,2872	0,2904	0,2824	0,2867	0,004026572	0,304300	6,25	7,97379
3,13	0,6028	0,609	0,5847	0,5988	0,012626315	0,2903	0,2937	0,2881	0,2907	0,00282135	0,308133	3,13	6,81451
1,56	0,625	0,6438	0,6028	0,6239	0,020523486	0,291	0,3032	0,2917	0,2953	0,006850547	0,328567	1,56	0,63508
0	0,6618	0,6109	0,5987	0,6238	0,033469561	0,3009	0,2894	0,2891	0,2931	0,00672781	0,330667	0	0,00000



➤ **LQOF-G13**

[] GCIBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GCIBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3171	0,3015	0,3012	0,3066	0,009094499	0,2904	0,2935	0,2871	0,2903	0,00320053	0,016267	100	95,07121
50	0,3	0,2924	0,2905	0,2943	0,005026939	0,2825	0,2886	0,2852	0,2854	0,003056686	0,008867	50	97,31340
25	0,5728	0,5249	0,5581	0,5519	0,024538181	0,2811	0,2867	0,2799	0,2826	0,003629508	0,269367	25	18,38199
12,5	0,6196	0,575	0,5765	0,5904	0,025327919	0,2825	0,2884	0,285	0,2853	0,002961416	0,305067	12,5	7,56489
6,25	0,6474	0,6285	0,6136	0,6298	0,016939406	0,2865	0,2856	0,2854	0,2858	0,000585948	0,344000	6,25	-4,23190
3,13	0,7388	0,6325	0,599	0,6568	0,072990848	0,2876	0,2951	0,2875	0,2901	0,004359282	0,366700	3,13	-11,10998
1,56	0,692	0,6984	0,6553	0,6819	0,023257461	0,2783	0,2838	0,2813	0,2811	0,002753795	0,400767	1,56	-21,43218
0	0,6157	0,5951	0,5895	0,6001	0,013797104	0,2716	0,2687	0,2699	0,2701	0,001457169	0,330033	0	0,00000

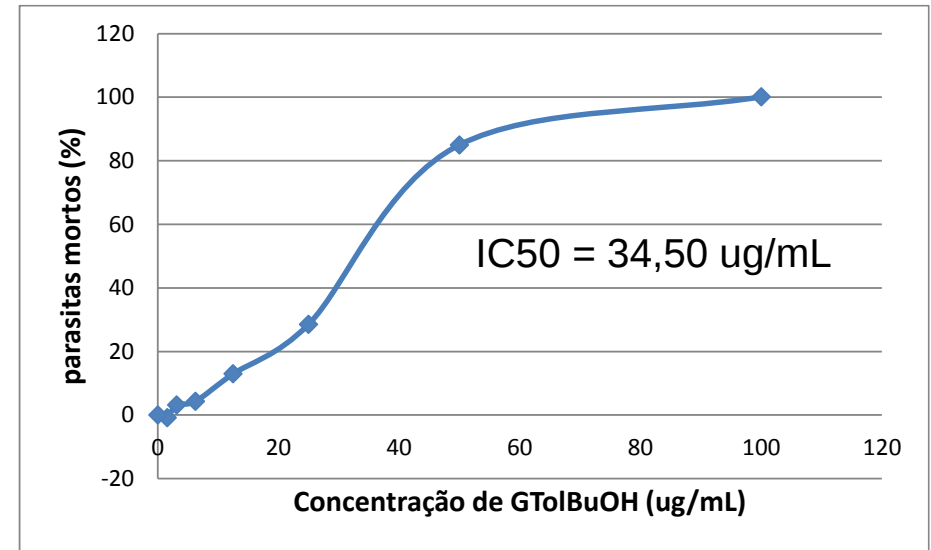
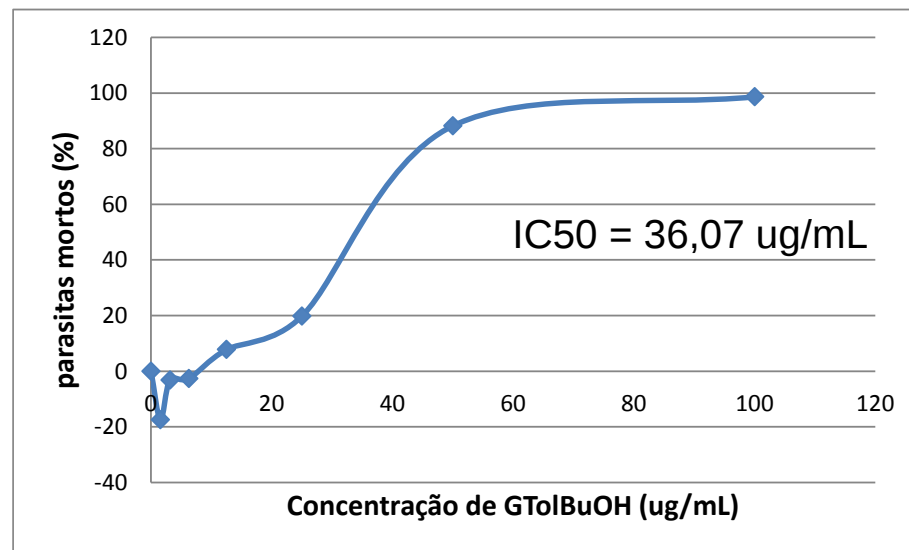
[] GCIBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GCIBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,3102	0,305	0,3027	0,3060	0,003842305	0,2901	0,3139	0,3113	0,3051	0,013055263	0,000867	100	99,66339
50	0,3033	0,2943	0,2979	0,2985	0,004529902	0,2951	0,3018	0,3053	0,3007	0,005182983	-0,002233	50	100,86743
25	0,5511	0,4838	0,5631	0,5327	0,042742991	0,2893	0,3056	0,3003	0,2984	0,008314443	0,234267	25	9,01087
12,5	0,5827	0,5658	0,5571	0,5685	0,013017048	0,2911	0,3025	0,3038	0,2991	0,00698737	0,269400	12,5	-4,63491
6,25	0,5629	0,5661	0,5913	0,5734	0,015555496	0,2896	0,3038	0,3025	0,2986	0,007850043	0,274800	6,25	-6,73227
3,13	0,6047	0,562	0,5736	0,5801	0,022079655	0,2959	0,305	0,3005	0,3005	0,004550102	0,279633	3,13	-8,60953
1,56	0,6139	0,578	0,6006	0,5975	0,018149654	0,2899	0,2965	0,3007	0,2957	0,005444264	0,301800	1,56	-17,21906
0	0,5665	0,5456	0,5402	0,5508	0,013890411	0,2854	0,2998	0,2947	0,2933	0,007301371	0,257467	0	0,00000



➤ LQOF-G15

[] GTolBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)					Abs brancos (B)					Δ Abs (A - B)	[] GTolBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
	Média (A)	Desvio Padrão (A)				Média (B)	Desvio Padrão (B)						
100	0,2946	0,3063	0,3062	0,3024	0,006726314	0,2983	0,2983	0,2972	0,2979	0,000635087	0,004433	100	98,62390
50	0,34	0,326	0,3427	0,3362	0,008964559	0,2895	0,3043	0,3007	0,2982	0,007718383	0,038067	50	88,18417
25	0,5546	0,5858	0,5651	0,5599	0,015875447	0,2986	0,3003	0,3054	0,3014	0,003538844	0,258417	25	19,78790
12,5	0,5936	0,5924	0,6037	0,5966	0,006206708	0,2968	0,3003	0,3011	0,2994	0,002286922	0,297167	12,5	7,75996
6,25	0,6394	0,6301	0,635	0,6348	0,004652236	0,2983	0,3075	0,3063	0,3040	0,005001339	0,330800	6,25	-2,67977
3,13	0,5964	0,6749	0,6418	0,6377	0,039410263	0,305	0,3012	0,3093	0,3052	0,004052573	0,332533	3,13	-3,21779
1,56	0,6111	0,7438	0,6999	0,6849	0,067604147	0,3047	0,3076	0,3072	0,3065	0,001571631	0,378433	1,56	-17,46507
0	0,5968	0,6317	0,6381	0,6222	0,022228574	0,2992	0,3016	0,2993	0,3000	0,001357704	0,322167	0	0,00000

[] GTolBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)					Abs brancos (B)					Δ Abs (A - B)	[] GTolBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2974	0,3047	0,3064	0,3028	0,004781561	0,3015	0,3075	0,3006	0,3032	0,003751007	-0,000367	100	100,10959
50	0,3158	0,35	0,4069	0,3576	0,046018935	0,3042	0,3106	0,3074	0,3074	0,003200009	0,050167	50	85,00548
25	0,5482	0,5388	0,5476	0,5449	0,005262441	0,3065	0,3031	0,3077	0,3058	0,002386078	0,239100	25	28,53442
12,5	0,6054	0,6075	0,591	0,6013	0,008981648	0,3103	0,308	0,312	0,3101	0,00200749	0,291200	12,5	12,96204
6,25	0,6357	0,662	0,6033	0,6337	0,029402790	0,3093	0,3175	0,3136	0,3135	0,004101621	0,320200	6,25	4,29412
3,13	0,6159	0,6474	0,6384	0,6339	0,016225003	0,3084	0,3108	0,3104	0,3099	0,001285814	0,324033	3,13	3,14835
1,56	0,6861	0,6404	0,6264	0,6510	0,031221207	0,3255	0,3009	0,3149	0,3138	0,012339097	0,337200	1,56	-0,78708
0	0,6662	0,6122	0,63	0,6361	0,027517491	0,3026	0,3022	0,2999	0,3016	0,001457165	0,334567	0	0,00000



➤ LQOF-G17

[] GIBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GIBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2831	0,2912	0,2851	0,2865	0,004219401	0,2758	0,2858	0,2457	0,2691	0,020872711	0,017367	100	94,69720
50	0,2899	0,2857	0,2811	0,2856	0,004401515	0,2742	0,2855	0,2747	0,2781	0,006384617	0,007433	50	97,73028
25	0,3017	0,2949	0,2877	0,2948	0,007000952	0,2767	0,2915	0,2731	0,2804	0,009751588	0,014333	25	95,62341
12,5	0,5597	0,5444	0,4968	0,5336	0,032803097	0,2745	0,2844	0,2809	0,2799	0,005020279	0,253700	12,5	22,53436
6,25	0,6005	0,5647	0,5531	0,5728	0,024708159	0,2748	0,2849	0,275	0,2782	0,005774372	0,294533	6,25	10,06617
3,13	0,6288	0,6251	0,6683	0,6407	0,023944992	0,2754	0,2862	0,2797	0,2804	0,005437204	0,360300	3,13	-10,01526
1,56	0,63	0,6497	0,6404	0,6400	0,009855113	0,2765	0,288	0,2908	0,2851	0,007578266	0,354933	1,56	-8,37658
0	0,5842	0,5815	0,651	0,6056	0,039369582	0,2753	0,277	0,2819	0,2781	0,003426848	0,327500	0	0,00000

[] GIBuOH (ug/mL)	Abs composto (A)			Média (A)	Desvio Padrão (A)	Abs brancos (B)			Média (B)	Desvio Padrão (B)	Δ Abs (A - B)	[] GIBuOH (ug/mL)	% parasitas mortos
100	0,2809	0,2908	0,2917	0,2878	0,005992498	0,279	0,2895	0,2823	0,2836	0,005369351	0,004200	100	98,59657
50	0,285	0,2884	0,2929	0,2888	0,003962743	0,2785	0,2937	0,2845	0,2856	0,007655944	0,003200	50	98,93072
25	0,2916	0,298	0,5337	0,2948	0,137966090	0,2832	0,2928	0,2802	0,2854	0,006581797	0,009400	25	96,85899
12,5	0,4938	0,5164	0,5525	0,5209	0,029607600	0,2833	0,2958	0,2804	0,2865	0,008183515	0,234400	12,5	21,67521
6,25	0,5724	0,6442	0,6195	0,6120	0,036477734	0,2854	0,2934	0,2879	0,2889	0,004092669	0,323133	6,25	-7,97505
3,13	0,6455	0,6167	0,6915	0,6512	0,037728157	0,2832	0,2944	0,2882	0,2886	0,00561071	0,362633	3,13	-21,17398
1,56	0,6144	0,6472	0,6998	0,6538	0,043080850	0,2925	0,2941	0,2883	0,2916	0,002995541	0,362167	1,56	-21,01805
0	0,5272	0,5906	0,6338	0,5839	0,053618055	0,2836	0,2853	0,2849	0,2846	0,000888814	0,299267	0	0,00000

