

UNESP- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE MATERIAIS – POSMAT

Luana Vitorino Gushiken Passianoto

**NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE NITROGÊNIO E ENXOFRE DO  
TIPO GUANIDINAS PARA O ESTUDO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA E  
SULFONAMIDAS PARA O ESTUDO DE ATIVIDADE INIBIDORA DE  
CANAIS IÔNICOS Kv3.1**

PRESIDENTE PRUDENTE

2020

Luana Vitorino Gushiken Passianoto

**NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE NITROGÊNIO E ENXOFRE DO  
TIPO GUANIDINAS PARA O ESTUDO DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA E  
SULFONAMIDAS PARA O ESTUDO DE ATIVIDADE INIBIDORA DE  
CANAIS IÔNICOS Kv3.1**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais (POSMAT) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, área de concentração Química Orgânica sob orientação do Prof. Dr. Eduardo René Pérez González.

PRESIDENTE PRUDENTE

2020

Passianoto, Luana Vitorino Gushiken.

Novos compostos de derivados de nitrogênio e enxofre do tipo guanidinas para o estudo de atividade leishmanicida e sulfonamidas para o estudo de atividade inibidora de canais iônicos  $K_v3.1$  / Luana Vitorino Gushiken Passianoto, 2021

101 p.

Orientador: Eduardo René Pérez González

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2021

1. Canais iônicos. 2.Sulfonamidas. 3.Leishmaniose.  
4. Guanidinas I. Universidade Estadual Paulista.  
Faculdade de Ciências. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Bauru



**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE LUANA VITORINO GUSHIKEN PASSIANOTO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.**

Aos 22 dias do mês de dezembro do ano de 2020, às 14:00 horas, no(a) por videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE Mestrado de LUANA VITORINO GUSHIKEN PASSIANOTO, intitulada **NOVOS COMPOSTOS DERIVADOS DE NITROGÊNIO E ENXOFRE DO TIPO GUANIDINAS E SULFONAMIDAS PARA O ESTUDO DE ATIVIDADES INIBIDORAS DE CANAIS IÔNICOS E LEISHMANICIDAS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PÉREZ GONZÁLEZ (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Química e Bioquímica / UNESP/Câmpus de Presidente Prudente, Prof. Dr. FELIPE VILELA GOMES (Participação Virtual) do(a) Farmacologia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Dra ANGELA MARIA ARENAS VELASQUEZ (Participação Virtual) do(a) Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. EDUARDO RENÉ PÉREZ GONZÁLEZ

*À toda minha família, em  
especial à minha avó Maria,  
com amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a essa força espiritual, essa energia que me impulsiona todos os dias que não posso definir ou explicar, mas posso sentir.*

*A toda minha família: obrigada Mãe, Gui, Tia Fabi, Julinha, Tia Mara, Tia Cida, Tio Dê, Tio Vê, vô Natal, Pai, Rô, Tio End, Clarissa, Marcos e Nara, não tenho palavras para mensurar o quanto eu gostaria de retribuir tudo o que vocês agregaram na minha vida e puderam me proporcionar. Meu agradecimento especial para minha avó Maria, me espelho em você.*

*Ao meu orientador, Professor Eduardo, obrigada por todo conhecimento que você compartilhou sobre química e sobre a vida. Obrigada pela paciência em ensinar e todo seu tempo dedicado para isso.*

*Professora Márcia Graminha e sua aluna Ângela Velásquez da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara agradeço por todos os testes de atividade leishmanicida e por tudo que pude aprender com esse trabalho conjunto. Obrigada também, pela presença na qualificação e defesa.*

*Professor Wamberto Antônio Varanda e ao seu aluno Carlos Alberto Zanutto Bassetto Junior da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto obrigada pelos estudos da atividade bloqueadora de canais iônicos de potássio dependentes de voltagem.*

*Professor Gil Valdo da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP) e ao aluno Vinicius, agradeço pelas análises de RMN.*

*Todos os professores da POSMAT agradeço pelos ensinamentos e ao professor Felipe Villela Gomes da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto obrigada por aceitar participar da banca de qualificação e defesa.*

*Aos meus amigos do LQOF, Luaninha, Marina, Lays, Du, Vitor, Tainá, Rafael, agradeço pelo companheirismo de todos os dias, os cafés, as risadas, tudo que pudemos viver juntos. Em especial agradeço a Suzi, que pude construir uma amizade para vida durante esse tempo de laboratório. Obrigada cajibrina pelo companheirismo sem igual, pelos cafés&vinhos, os almoços, as caronas, as risadas, as musiquinhas e chororôs, você é uma irmã!*

*Aos técnicos de laboratório, em especial Sidnei e meu amigo Gabriel, agradeço as conversas e a horta.*

*Agradeço todo o pessoal da sessão de manutenção pelos cafés, em especial ao palmeirense seu Écio.*

*Aos presentes que a vida me deu: Roberta, Karen, Carlinhos, Lê Guns, Rafa, Iza, Rafinha C., Soninho, Vivi filhinho, Manco, Tarsila, Cami, João, Gabi, Allan, Gio, Ene, Karenzinha, Issy (thank you), Cotô, Pri, Levorato, Karol, o grupão Apocalipso, Bia (por me ajudar segurar a barra e tudo mais), meu obrigada especial por iluminarem a minha vida e pelos churrascos, jantas, drinks, pelo companheirismo de sempre, esse ano de pandemia vocês ajudaram a me redescobrir, aprender suportar e ser suporte, todos estão no meu coração.*

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

*“A normalidade é como uma estrada  
pavimentada: confortável de se andar, mas flores  
nunca crescerão nela”.*

*Vincent Van Gogh*

## RESUMO

O transporte de íons através das membranas é muito importante para garantir funções celulares e como as membranas são impermeáveis a espécies com carga, existem proteínas que auxiliam na passagem desses íons, como os canais iônicos. O mau funcionamento de alguns desses canais, leva a efeitos fisiológicos profundos e as doenças do canal (canalopatias) são diversas, como exemplo doenças cardíacas, diabetes, câncer, transtornos de ansiedade, epilepsia e mal de Alzheimer. Bloqueadores dos canais podem melhorar algumas dessas patologias, os canais de potássio  $K_v3.1$  podem servir como moduladores da taxa do disparo do potencial de ação em neurônios com altas taxas de disparo, assim, bloqueadores de  $K_v3.1$  podem modular essas células neuronais. No presente trabalho, sulfonamidas foram sintetizadas e caracterizadas para o estudo de bloqueio de canais iônicos  $K_v3.1$ . A molécula SMD2 apresentou melhor  $IC_{50}$  ( $9.3 \pm 0.6$ ), demonstrando afinidade pelo canal e um efeito reversível. Os testes eletrofisiológicos foram realizados em colaboração com o professor Wamberto Antônio Varanda da Universidade de São Paulo (USP) e seu aluno Carlos Zanutto Bassetto Junior. Adicionalmente, foram realizadas sínteses e caracterizações de benzoilguanidinas para testes de atividade leishmanicida *in vitro* contra amastigotas de *L. amazonensis*, e estudo *in vivo* de atividade leishmanicida do composto LQOF-G2, que apresentou melhores índices de seletividade 37,7 (promastigota) e 131,8 (amastigota) *in vitro*. Os testes de atividade leishmanicida foram realizados em colaboração com a professora Márcia Aparecida Silva Graminha da Universidade Estadual Paulista (UNESP) e sua aluna Angela Maria Arena Velásquez. As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *leishmania* e transmitidas por picadas de insetos hematófagos. As causas estão relacionadas a condições socioeconômicas e ambientais, desnutrição, sistema imunológico fraco e, além do tratamento ser caro, pode deixar cepas resistentes. Segundo a OMS, é estimado 30.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea por ano, sendo necessário novas formas de tratamento mais eficazes e menos tóxicas. As guanidinas são moléculas orgânicas biologicamente ativas, amplamente reportadas com atividade leishmanicida contra diversos tipos de *leishmania*. As moléculas aqui apresentadas foram caracterizadas por RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , EI-MS, HRESIMS, LC/UV/MS.

**Palavras-chave:** guanidinas, sulfonamidas, leishmaniose, canais iônicos.

## ABSTRACT

The transport of ions through membranes is very important to assure cell functions, as membranes are impermeable to charged species, there are proteins that permit the passage of these ions, as ion channels. The mal function of some of these channels leads to profound physiological effects and diseases of the channel (channelopathies) are diverse, as heart disease, diabetes, epilepsy, anxiety disorders, cancer, Alzheimer's. Channel blockers have been reported to treat these pathologies, the Kv3.1 channel, can serve as modulator of the rate of the action potential firing in neurons with high rates of firing, thus, Kv3.1 blockers can modulate the activity of these neuronal cells. In the present work, sulfonamides were synthesized and characterized to be studied as Kv3.1 ion channel blockers. The SMD2 molecule showed a better  $IC_{50}$  ( $9,3 \pm 0.6$ ) showing affinity for the channel and reversible effect. These tests were carried out in collaboration with professor Wamberto Antônio Varanda and his student Carlos Zanutto Bassetto Junior from University of São Paulo (USP). Synthesis and characterizations of benzoylguanidines were also carried out for the leishmanicidal tests against *L. amazonensis* parasites and for *in vivo* study of leishmanicidal activity of the LQOF-G2, compound that presented better selectivity indexes *in vitro*, 37,7 (promastigote) and 131,8 (amastigote). These tests were carried out in collaboration with professor Márcia Aparecida Silva Graminha and her student Angela Maria Arena Velásquez from São Paulo State University (UNESP). Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of *leishmania* and transmitted by bites of flebotomines. The causes are related to socioeconomic and environmental conditions, malnutrition, weak immune system and besides the treatment being expensive, it can leave resistant strains. According to the WHO, is estimated 30,000 new cases of visceral leishmaniasis and more than 1 million cases of cutaneous leishmaniasis per year, requiring new, more effective and less toxic forms of treatment. Guanidines are biologically active organic molecules, widely reported to have leishmanicidal against various types of *leishmania*. The molecules presented here were characterized by RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , EI-MS, HRESIMS, LC/UV/MS.

**Keywords:** guanidines, sulfonamides, leishmaniasis, ion channels.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Canais de potássio e seus domínios transmembranares. Figura retirada de: Frances Ashcroft (1999). <sup>11</sup> .....	21
Figura 2. Estrutura química do medicamento Metformin, uma diguanidina utilizada no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Autoria própria. ....	26
Figura 3. Estrutura química do composto Mirabilin. Apresentou boa atividade anti-leishmania (IC <sub>50</sub> : 17µg/ml) contra <i>L. donovani</i> . Autoria própria. ....	27
Figura 4. Sulfonamida com grupamento guanidínico que apresentou atividade leishmanicida contra <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> e <i>L. amazonensis</i> . Autoria própria. ....	27
Figura 5. Estrutura da Batzeladina L, composto guanidínico que apresentou atividade leishmanicida contra promastigotas de <i>L. infantum</i> e produção de espécies reativas de oxigênio.....	28
Figura 6. Esquema de reação de hidrólise da TBD. Autoria própria. ....	35
Figura 7. Esquema de reação de hidrólise da DBN. Autoria própria.....	35
Figura 8. Esquema de reação geral de formação das sulfonamidas. Autoria própria. ....	36
Figura 9. Esquema de reação de síntese das sulfonamidas substituídas. Autoria própria.....	36
Figura 10. Esquema de síntese das tiouréias: <b>a.</b> para obtenção do isotiocianato de benzofila e <b>b.</b> para obtenção das tiouréias. Autoria própria. ....	38
Figura 11. Esquema de síntese das guanidinas (procedimento <b>c</b> ). Autoria própria. ....	38
Figura 12. Representação das correntes de um único canal. Quando o canal está fechado a corrente através dele é nula, quando o canal se abre e os íons começam a passar, é criada uma corrente. Adaptado de Frances Ashcroft (1999). <sup>10</sup> .....	50
Figura 13. Sulfonamidas estudadas para bloqueio de canais iônicos de potássio dependentes de voltagem K <sub>v</sub> 3.1. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019) <sup>134</sup> .....	51
Figura 14. Respostas representativas da corrente na presença de moléculas a uma concentração de 100 µM. O preto representa controle, cinza claro as correntes na presença de 100 µM de uma determinada molécula e cinza escuro é a resposta após a lavagem da droga. As moléculas Amostra 7, amostra 8, Sar_APA e Sar_APP não geraram bloqueio do canal. Figura adaptada de Bassetto Junior et al. (2019) <sup>134</sup> .....	52
Figura 15. Respostas representativas da corrente na presença de moléculas a uma concentração de 100 µM. O preto representa controle, cinza claro as correntes na presença de 100 µM de uma determinada molécula e cinza escuro é a resposta após a lavagem da droga. As moléculas SMD2, SMD3, SMD2_APP,	

SMD3_APP, SMD2_SN e SMD3_SN foram capazes de bloquear o canal. Figura adaptada de Bassetto Junior et al. (2019) <sup>134</sup> .....	52
Figura 16. Curso de tempo do efeito de 100 µM dos vários compostos aplicados às células na carga normalizada transferida (Q / QCTRL) através dos canais. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019) <sup>134</sup> .....	54
Figura 17. Corrente representativa para várias concentrações de uma determinada molécula indicada em à parte superior de cada painel. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019) <sup>134</sup> .....	54
Figura 18. Relações dose-resposta. <b>a, b.</b> A fração da corrente permanecendo no final do pulso de despolarização (~70 ms) após o tratamento com uma determinada concentração de droga contendo butil e furfuril grupos em suas estruturas, respectivamente. <b>c.</b> IC <sub>50</sub> em gráficos de barras. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019) <sup>134</sup> .....	55
Figura 19. Efeito in vitro de LQOF-G2, G3, G7 e G9 em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> . Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019. <sup>123</sup> .....	59
Figura 20. Carga do parasita após o tratamento de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> com LQOF-G2. Cinco grupos contendo cinco camundongos BALB / c infectados com <i>L. amazonensis</i> foram tratados diariamente com LQOF-G2 ou anfotericina B por 15 dias. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019. <sup>123</sup> .....	60
Figura 21. Redução de lesões nas patas em camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> tratados com LQOF-G2. Os valores de volume das lesões nos pés foram monitorados a cada 5 dias para validar a eficácia <i>in vivo</i> de LQOF-G2. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019. <sup>123</sup> .....	61
Figura 22. Níveis plasmáticos de biomarcadores de função renal e lesão hepática em camundongos BALB/c não infectados e infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com 0,13 ou 0,25 mg/kg/dia de LQOF-G2. (A) níveis de creatinina; (B) Níveis de uréia; (C) Níveis totais; (B) Níveis de uréia; (C) Níveis totais de bilirrubina; (D) níveis de ALP; (E) níveis de AST; (F) Níveis de ALT. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019. <sup>123</sup> .....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de canais de potássio dependentes de voltagem $K_v3$ , suas funções fisiológicas e substâncias capazes de bloquear esses canais. Adaptado de George Gutman (2005). <sup>10</sup> .....	20
Tabela 2. Valores de $IC_{50}$ e coeficiente de Hill. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019) <sup>134</sup> .....	55
Tabela 3. Atividades antiparasitárias ( $IC_{50}$ -pro/ama, metade da concentração inibitória máxima, mM), toxicidade de células de mamíferos ( $CC_{50}$ , concentração de citotoxicidade metade máxima, mM) e índice de seletividade ( $SI = \frac{1}{4} CC_{50}/IC_{50}$ ) dos compostos de guanidina. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019. <sup>123</sup> .....	58

## LISTA DE ABREVIACÕES

RMN: Ressonância magnética nuclear

EI-MS: Espectrometria de massas por impacto de elétrons

HRESIMS: Espectrometria de massas de alta resolução com ionização por electrospray

ESI-MS: Espectrometria de massas com ionização por eletronspray

UV-Vis: Espectroscopia no ultravioleta visível

LC/UV/MS: cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de diodos acoplada à espectrometria de massas.

ATP: Adenosina trifosfato

ADP: Adenosina difosfato

PABA: Ácido 4-aminobenzóico

OMS: Organização Mundial de Saúde

LPG: Lipofosfoglicano

iNOS: Óxido nítrico sintetase

IFN- $\gamma$ : Interferon-gama

DBN: 1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene

DBU: 1,8- diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno

TBD: 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno

DMSO: Dimetilsulfóxido

ACN: Acetonitrila

NaOH: Hidróxido de sódio

NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de sódio

HCl: Ácido clorídrico

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

$\text{MgSO}_4$ : Sulfato de magnésio

$\text{NaHSO}_3$ : Bissulfito de sódio

$\text{MeOH}$ : Metanol

$\text{IC}_{50}$ : Metade da concentração inibitória máxima

$\text{CC}_{50}$ : Concentração citotóxica para 50% da amostra

IS: Índice de seletividade

ALT: Alanino transaminase

AST: Aspartato transaminase

ALP: Alcalino fosfatase

PF: Ponto de fusão

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1 Canais iônicos</b> .....	18
<b>1.1.1 Canais iônicos de potássio dependentes de voltagem</b> .....	19
<b>1.1.2 Sulfonamidas</b> .....	22
<b>1.2 Leishmaniose</b> .....	22
<b>1.2.1 Tratamento da Leishmaniose</b> .....	24
<b>1.2.2 Guanidinas</b> .....	26
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>3.1 Materiais e técnicas analíticas</b> .....	30
<b>3.1.1 Sulfonamidas:</b> .....	30
<b>3.1.2 Guanidinas:</b> .....	30
<b>3.1.3 Análises de ponto de fusão</b> .....	30
<b>3.1.4 Análises por EI-MS (Introdução Direta)</b> .....	30
<b>3.1.5 Análises Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	31
<b>3.1.6 Análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (HRESIMS)</b> .....	31
<b>3.2. Estudo de atividade biológica</b> .....	32
<b>3.2.1. Sulfonamidas</b> .....	32
<b>3.2.2. Bloqueadoras de canais iônicos de potássio Kv3.1</b> .....	32
<b>3.2.2 Guanidinas – Atividade leishmanicida</b> .....	32
<b>3.2.2.1 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida in vitro</b> .....	32
<b>3.2.2.1.1 Parasitas</b> .....	32
<b>3.2.2.1.2 Compostos</b> .....	33
<b>3.2.3 Avaliação da atividade amastigota in vitro e citotoxicidade</b> .....	33
<b>3.2.4 Cálculo do índice de seletividade</b> .....	34

3.2.5 Avaliação anti-leishmania <i>in vivo</i> .....	34
3.2.6 Ensaio de toxicidade para camundongos BALB/c .....	34
3.2.7 Declaração de ética .....	35
3.2.8 Análise estatística.....	35
3.3 Procedimentos de Síntese.....	35
3.3.1 Sulfonamidas.....	35
3.3.1.1 Procedimento geral da reação de hidrólise das bases DBN e TBD.....	35
3.3.1.2 Procedimento geral para obtenção das sulfonamidas. ....	35
3.3.2 Guanidinas .....	36
3.3.2.1 Procedimento geral de síntese das guanidinas. ....	36
3.3.2.2 Procedimento utilizando hidroperóxido de tert-butila.....	38
3.4 Dados experimentais dos compostos .....	39
3.4.1 Sulfonamidas.....	39
3.4.2 Tiouréia .....	43
3.4.3 Guanidinas .....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1 Sulfonamidas.....	49
4.2 Guanidinas .....	56
5. CONCLUSÕES .....	64
6. REFERÊNCIAS .....	65
ANEXOS.....	81
SEÇÃO DE ESPECTROS .....	81

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Canais iônicos

A membrana plasmática separa o meio extracelular e intracelular e é seletiva para vários compostos necessários para o metabolismo das células. Como as membranas são impermeáveis a maioria das substâncias com cargas ou polares, os canais iônicos facilitam a passagem dos íons.<sup>1</sup> Canais iônicos são proteínas que formam poros aquosos para facilitar a passagem de íons através da membrana, sua abertura ou fechamento acontece por mudanças conformacionais que são determinadas por sinais elétricos, mecânicos ou químicos.<sup>2</sup> Os movimentos iônicos através da membrana plasmática da célula geram diferentes concentrações de íons no meio extra e intracelular gerando um gradiente de concentração eletroquímica, de forma que podemos medir a diferença de potencial (voltagem) de ambos os meios e teremos o potencial de membrana.

O potencial de repouso envolve três circunstâncias: a distribuição de cargas desiguais em cada lado da membrana, a permeabilidade e ação das bombas ativas e passivas.<sup>1</sup> Nesse caso, temos o interior da célula carregado negativamente em relação ao meio externo. Os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  são os íons que contribuem predominantemente para o potencial de repouso da membrana, que está em um estado não excitado.<sup>3</sup>

Dentro da célula, majoritariamente, estão os íons potássio, no meio extracelular o maior constituinte são os íons sódio e o ânion cloreto. A permeabilidade da membrana, por ser maior para o potássio, vai ocasionar o fluxo desses íons para o meio extracelular por um gradiente químico, formando-se então, um potencial negativo dentro da célula. Com a grande quantidade de ânions no meio intracelular, a diferença de voltagem leva uma força eletrostática ao fluxo de íons  $\text{K}^+$  para dentro da célula. Assim, de forma geral, a célula atua sob forças que agem de maneiras opostas (gradiente elétrico e gradiente químico).<sup>4,5</sup>

Quando essas forças contrárias são iguais, é atingido o potencial de equilíbrio que pode ser calculado pela equação de Nernst:<sup>6</sup>

$$V_x = V_{int} - V_{ext} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_{ext}}{[X]_{int}}$$

Onde  $V_x$  é o potencial de equilíbrio,  $V_{int} - V_{ext}$  é a diferença de voltagem transmembrana,  $T$  é temperatura em Kelvin,  $F$  é a constante de Faraday (96500 °C.mol<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>),  $R$  é a constante ideal de um gás ( $8,314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $z$  é a valência do íon,  $[X]_{ext}$  e  $[X]_{int}$  são as concentrações extra e intracelulares, respectivamente, do íon X.

Outro determinante, as chamadas bombas ATPásicas, atuam como geradores de corrente pelo movimento dos íons através da membrana. A bomba ATPásica ( $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ) é dependente da degradação do ATP em ADP e fosfato, e bombeia três íons  $\text{Na}^+$  para fora da célula e dois íons  $\text{K}^+$  para dentro da célula. São responsáveis por regular as concentrações de íons no meio extra e intracelular.<sup>7</sup>

### 1.1.1 Canais iônicos de potássio dependentes de voltagem

Os canais iônicos de potássio dependentes de voltagem são canais que sofrem mudanças conformacionais de acordo com a mudança do potencial de membrana, são dependentes de sinais elétricos entre o meio extra e intracelular para sua abertura ou fechamento.<sup>2</sup> Quando estímulos são capazes de elevar o potencial de membrana para um valor positivo são chamados de despolarizantes, mas quando esse valor se torna negativo são chamados de hiperpolarizantes. Se ocorrer uma despolarização que aumenta o potencial de membrana acima do valor limiar, teremos um potencial de ação ou disparo.<sup>8,9</sup> A propagação de sinais elétricos é muito importante para regular diversas funções fisiológicas dependentes de voltagem. A excitabilidade celular e mudança de voltagem geram e propagam potenciais de ação que aumentam a quantidade de íons intracelulares e liberam moléculas químicas ou hormônios.<sup>1</sup> Esses eventos são responsáveis por batimentos cardíacos, movimentos musculares, impulsos nervosos, proliferação celular e regulação da pressão arterial, por exemplo.<sup>10</sup> Nos canais de potássio, existem 12 subfamílias que são divididas pelo local onde o canal se encontra e por sua maneira de expressão, apresentando diferentes funções fisiológicas como é demonstrado em alguns exemplos na tabela abaixo<sup>10</sup>:

<b>Canal</b>	<b>Funções fisiológicas</b>	<b>Bloqueadores</b>
K <sub>v</sub> 3.1	Importante para interneurônios com alta frequência de disparo como do sistema auditivo e GABAérgicos de disparo rápido.	4-aminopiridina (29 µM), capsaicina (158 µM), resiniferatoxina (46 µM), flecainida (108 µM), nifedipina (131 µM), diltiazem (97 µM), cromakalin 237 µM, tetraetilamônio (0,2 mM).
K <sub>v</sub> 3.2	Complexos proteicos com K <sub>v</sub> 3.1; Importante para interneurônios GABAérgicos de disparo rápido e liberação de GABA via regulação da duração do potencial de ação em terminais pré-sinápticos, modulado pela proteína quinase <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	4-aminopiridina (0,1 mM), 8-bromo-cGMP, 3-isobutil-1-metilxantina, D-NONOate, tetraetilamônio (0,1 mM), verapamil, ShK.
K <sub>v</sub> 3.3	Não estabelecido.	4-aminopiridina (1,2 µM), tetraetilamônio (0,14 mM), também bloqueado por hipóxia
K <sub>v</sub> 3.4	Junto com a proteína MiRP2 forma canais de potássio ativadores de baixa voltagem que regulam o potencial de repouso do músculo esquelético.	BDS-I (47 nM), tetraetilamônio (0,3 mM)

*Tabela 1.* Exemplos de canais de potássio dependentes de voltagem K<sub>v</sub>3, suas funções fisiológicas e substâncias capazes de bloquear esses canais. Adaptado de George Gutman (2005).<sup>10</sup>

Os canais de potássio são divididos de acordo com seus domínios transmembranares e subdivididos conforme sua família de genes. Importantes para repolarização do potencial de ação, para que a membrana retorne ao potencial de repouso, o mau funcionamento desses canais podem prejudicar células excitáveis como nervos e músculos, assim como transmissões sinápticas e secreção celular.<sup>11</sup> A tabela abaixo mostra os canais de potássio de 6 domínios transmembranares:

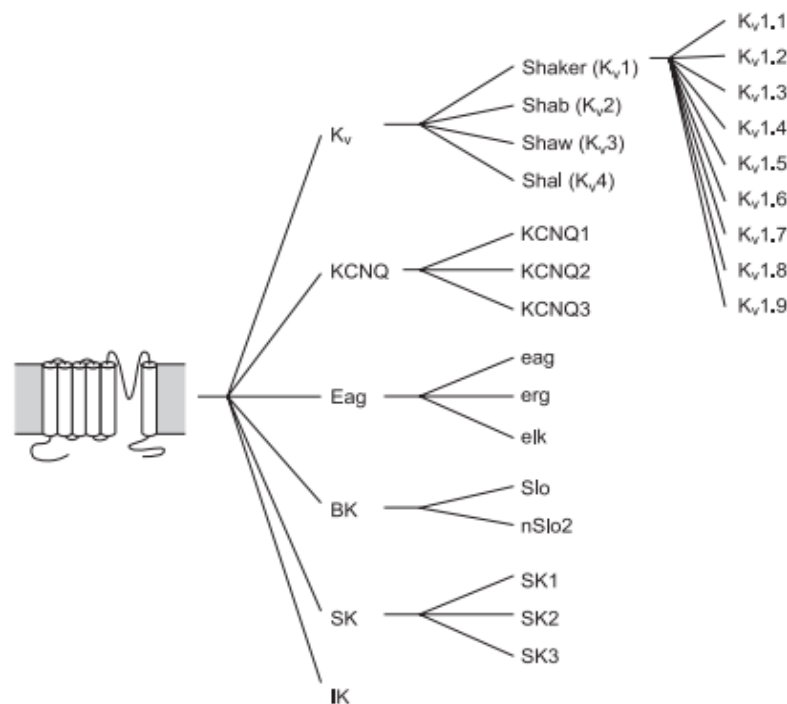


Figura 1. Canais de potássio e seus domínios transmembranares. Figura retirada de: Frances Ashcroft (1999).<sup>11</sup>

Os canais do tipo Shaw inicialmente foram isolados de uma mosca chamada *Drosophila melanogaster* e são expressos em células excitáveis do sistema nervoso central, neurônios pré-sinápticos, músculos e já foram identificadas em células T.<sup>12-14</sup> A informação é consequência de modificações na despolarização da membrana e por sua transmissão sináptica; o efluxo de íons potássio através da célula após o potencial de repouso, leva a hiperpolarização da membrana.<sup>15</sup> Hodge et al, demonstraram que a superexpressão anormal dos canais Shaw no sistema nervoso resultou em massa corporal reduzida e letalidade.<sup>15</sup> Esses canais também parecem estar envolvidos no ritmo circadiano.<sup>16</sup> Muona e colaboradores identificaram que uma mutação genética do canal Kv3.1 é uma das principais causas de epilepsia mioclônicas progressivas, um grupo incomum de epilepsia que apresentam contração, tremores e espasmos do músculo, regressão do desenvolvimento neuropsicomotor e deterioração cognitiva.<sup>17,18</sup> Estudos posteriores demonstraram que novas variantes dos canais Kv3.1 além de causarem epilepsias mioclônicas, também influenciaram no aparecimento de deficiência intelectual e convulsões, onde as variantes identificadas levaram a um disparo deficiente de interneurônios GABAérgicos, antecipando desinibição neuronal.<sup>19</sup>

Os bloqueadores de canais  $K_v3.1$  podem servir como moduladores da taxa de disparo do potencial de ação em neurônios com altas taxas de disparos, como aqueles do sistema auditivo, interneurônios neocorticais e neurônios do hipocampo.<sup>20-23</sup>

Se faz necessário novas pesquisas relacionadas aos canais iônicos  $K_v3.1$  para que tenhamos melhores intervenções terapêuticas contra doenças relacionadas a esses canais.

### 1.1.2 Sulfonamidas

A sulfonamidas iniciaram uma revolução contra infecções bacterianas. O Prontosil<sup>®</sup> foi a primeira sulfonamida e dentro de alguns anos depois de ser patenteado, conseguiu combater doenças sérias como infecções estreptocócicas, meningite bacteriana, disenteria, gonorreia e infecções do trato urinário.<sup>24</sup> Já foram demonstradas atividades antitumorais<sup>25</sup>, antivirais<sup>26</sup>, analgésicas e anti-inflamatórias.<sup>27</sup> Benzenossulfonamidas, sulfonamidas derivadas do ácido sulfanílico, compartilham semelhanças com o PABA em sua estrutura e possuem diferentes atividades farmacológicas<sup>28</sup> além de facilmente serem sintetizadas.<sup>29</sup> Moléculas derivadas de sulfonamidas foram descritas como inibidores de  $K_v1.5$ <sup>30-32</sup> e, mais recentemente, de canais de potássio dependentes de voltagem  $K_v3.1$ .<sup>33</sup>

Em estudos recentes do Laboratório de Química Orgânica Fina, demonstrou-se a síntese e a caracterização química de N-alkuilbenzenossulfonamidas<sup>34,35</sup> e seus efeitos biofísicos sobre os canais  $K_v3.1$ .<sup>33</sup> Adicionalmente, novas sulfonamidas foram sintetizadas e caracterizadas para futuros testes em diferentes canais iônicos.

### 1.2 Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças zoonóticas causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). É comum em países de clima quente e úmido e, as manifestações clínicas principais são as formas tegumentar, que leva a lesões ulceradas na pele, e a visceral, letal se não for tratada pois atinge baço, fígado e medula.<sup>36</sup> A forma monocutânea, menos comum, leva a lesões na face e vias respiratórias.<sup>37</sup> Estão entre as seis maiores doenças nos países em desenvolvimento, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), são estimados 30.000 novos casos de leishmaniose visceral e mais de 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea por ano<sup>38</sup>, encontram-se em franca expansão no Brasil, com aumento significativo do número de casos desde os anos 90.<sup>39</sup> O tratamento é caro e pode deixar cepas de leishmania resistentes. A dificuldade de

se controlar o vetor, sacrificar os reservatórios domésticos e a falta do diagnóstico preciso dos pacientes, tem levado a ocorrência cada vez mais frequente de óbitos.

Os parasitas de *Leishmania* existem sob duas formas: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas são flageladas, móveis, extracelulares e quando adentram a célula do hospedeiro vertebrado se modificam para amastigotas, formas sem flagelo que se multiplicarão dentro das células fagocíticas por fissão binária.<sup>40</sup> A característica do parasita e resposta imunitária são importantes fatores para determinar o estabelecimento da infecção, a *Leishmania* é capaz de se evadir de mecanismos de defesa que envolvem respostas imunes e adaptativas<sup>41</sup> e apresentam muitas particularidades que tornam a capacidade de deter a doença uma tarefa difícil para os pesquisadores. Entender esses processos de sobrevivência e transmissão é crucial para desenvolvimento de novos medicamentos e métodos de tratamento.

Apesar do parasita relacionar-se com diversos tipos de células do hospedeiro, a maioria dos estudos são focados na interação com macrófagos, neutrófilos e células dendríticas.<sup>42</sup> Os neutrófilos são fagócitos de vida curta e parecem servir para transportar os parasitas silenciosamente para dentro dos macrófagos e células dendríticas, os alvos de *Leishmania*.<sup>43</sup> Neutrófilos apoptóticos com parasitas que são fagocitados por macrófagos são chamados de “Cavalos de Tróia” e os neutrófilos apoptóticos junto com os promastigotas livres que escaparam, são chamados de “Coelhos de Tróia”; sugere-se que por conta da liberação de fosfatidilserina pelos neutrófilos, indicando sua apoptose, há uma resposta amenizada dos macrófagos.<sup>44</sup> As células dendríticas são derivadas da medula óssea e fazem parte das células apresentadoras de antígenos, necessárias para a ativação das células efectoras T.<sup>41</sup> A captura de neutrófilos por células dendríticas pode atrasar a resposta imune adaptativa, importante para neutralização do patógeno.<sup>44</sup>

Após o flebotomíneo depositar os parasitas através da picada no hospedeiro, os macrófagos desempenham papel fundamental no futuro da doença, ajudando a replicação e proliferação do parasita ou combatendo efetivamente a infecção como células efectoras e imunoreguladores; o que parece depender da ativação da resposta imune apropriada.<sup>45</sup>

A fagocitose depende de receptores de complemento como RC1 e RC3 e pode acontecer com ativação do componente C3, aproximação da glicoproteína (gp63) com RC3 e lipofosfoglicano com RC1 e RC3.<sup>46</sup> O parasita utiliza mecanismos da resposta imune para facilitar sua sobrevivência, como o lipofosfoglicano, por exemplo. Estudos tem sugerido

que o LPG é importante para a proteção do parasita do ataque enzimático e na adesão do parasita ao intestino do flebotomíneo, impedindo a expulsão no bolo fecal.<sup>47</sup> Os macrófagos podem ter a ativação clássica e a alternativa, onde a ativação clássica é mediada por linfócitos Th1 e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), esse último estimula a produção da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), uma molécula que catalisa a formação de óxido nítrico através da oxidação do nitrogênio guanidínico terminal do aminoácido L-arginina.<sup>48-50</sup> O óxido nítrico fornece um ambiente oxidante importante para neutralização dos parasitas.<sup>50,51</sup> Em contraste, a ativação alternativa é induzida por citocinas da resposta em Th2 como interleucina IL-4 reguladora da enzima arginase, que à partir da L-arginina leva a produção de poliaminas, promovendo a proliferação do parasita e produção de tripanotiona que protege-o de oxidantes.<sup>52</sup>

Alguns estudos demonstraram que camundongos BALB/c infectados com *L. Major*<sup>53</sup> demonstraram doença visceralizante, enquanto que camundongos da linhagem C57BL/62, C3H/HeJ e CBA foram capazes de controlar a infecção. Os camundongos BALB/c apresentaram suscetibilidade à doença por ter uma resposta em Th1 com baixa produção de IFN- $\gamma$ , impossibilitando a produção de óxido nítrico. A ativação dos macrófagos parece ser um dos fatores chave para determinar o futuro da infecção.

A dificuldade de se controlar os vetores, falta de vacinas, reincidência de cepas de *Leishmania*, toxicidade e o custo dos medicamentos utilizados, são obstáculos para o tratamento efetivo da doença. Diante disso, é muito importante encontrar novas drogas efetivas contra leishmaniose.

### **1.2.1 Tratamento da Leishmaniose**

A quimioterapia das leishmanioses se baseia principalmente na utilização de fármacos antimoniais pentavalentes (SbV) (antimoniato de *N*-metilglucamina e estibogluconato sódico), o antibiótico antifúngico anfotericina B e o antimicrobiano pentamidina.<sup>54</sup>

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não é totalmente compreendido, mas tem sido reportado que para que exista a atividade leishmanicida, o antimônio pentavalente requer uma redução para sua forma trivalente.<sup>55</sup> O medicamento já foi associado a ligações com os grupos sulfidrilas do parasita<sup>56</sup>, inibição de enzimas glicolíticas, oxidação de ácidos graxos e inibição na síntese de macromoléculas.<sup>57</sup> Além

do tratamento demorado e da alta toxicidade, existem casos de resistência do parasita à droga<sup>58</sup>, e podem estar relacionados com a farmacocinética do medicamento.<sup>59</sup> A amplificação de um gene de glicoproteína-P em leishmania também foi relatada. As glicoproteínas funcionam como bomba de extrusão, conferindo uma resistência a drogas citotóxicas por um sistema de efluxo.<sup>60</sup> Os antimônios pentavalentes são muito tóxicos para o pâncreas durante o tratamento, causam problemas gastrointestinais, hepáticos e insuficiência renal.<sup>61,62</sup> Seus efeitos tóxicos juntamente com a resistência ao medicamento levaram ao uso da anfotericina B ou pentamidina como segunda opção de drogas.

A anfotericina B é um antifúngico que interage com o ergosterol (um dos componentes da membrana celular do parasita) e forma poros aquosos permeáveis para cátions, ânions e alguns metabólitos, causando morte celular.<sup>63</sup> Estudos com promastigotas de *Leishmania donovani* relataram uma substituição de esterol por ergosterol na membrana celular, o que permite alterações na fluidez da membrana e uma fraca afinidade da anfotericina B por tais membranas modificadas.<sup>64</sup> Mutações na esterol 14a-desmetilase também foram descritas, uma enzima crucial para biossíntese do ergosterol.<sup>65</sup> Brotherton, et al. fizeram análises proteômicas de mutantes de *Leishmania infantum* e seus estudos demonstraram que algumas enzimas envolvidas na neutralização de espécies reativas de oxigênio foram reguladas pelos mutantes, a tripanotiona redutase e duas tryparedoxin peroxidases, sugerindo que o aumento de tióis reduzidos pode estar envolvido com uma melhor defesa antioxidante.<sup>66</sup> A anfotericina B pode se ligar ao colesterol presente nas paredes celulares humanas, portanto, exibe efeitos tóxicos, como insuficiência renal, febre, dores nos ossos, parada cardíaca (raro) e requer hospitalização prolongada.<sup>67,68</sup>

A pentamidina é a droga de escolha em cepas de *Leishmania* recidivadas por arsênico ou antimônio. Por sua semelhança estrutural com as poliaminas, um mecanismo de ação proposto é que ela é capaz de deslocar a espermidina do local de interação com macromoléculas, inibindo a via biossintética<sup>69</sup>, a privação de espermidina pode levar a um desequilíbrio oxidativo e peroxidação lipídica no parasita.<sup>70</sup> Também apresenta toxicidade renal, hepática e cardíaca; além de outros efeitos adversos como náusea, dor de cabeça e menos comumente diabete mellitus irreversível dependente de insulina.<sup>71</sup>

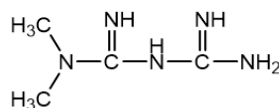
Muitas estruturas estão sendo reportadas com atividade leishmanicida. Acridinas<sup>72-77</sup>, imidazóis<sup>78-80</sup>, triazóis<sup>81</sup>, pirazóis<sup>82</sup>, benzimidazóis<sup>83</sup>, aminotiazóis<sup>84-86</sup>, piridinas<sup>87-89</sup>,

guanidinas<sup>90</sup> apresentaram atividade antileishmanicida contra diversos tipos de *Leishmania*.

### 1.2.2 Guanidinas

As guanidinas são encontradas na natureza e frequentemente sintetizadas, constituindo uma classe de compostos de ampla utilidade e aplicação na Química Orgânica. Reportadas com diversas atividades biológicas,<sup>91,92,93</sup> são fortes bases nitrogenadas, apresentando potencial mais básico que outros compostos contendo o nitrogênio ligado ao carbono (N-amino ou N-imino) como piridinas, aminas e amidinas; são responsáveis por várias reações catalíticas, interação com proteínas, ligações de hidrogênio e solvatação.<sup>94</sup> A literatura já demonstrou atividade hipoglicêmica<sup>95</sup> que gerou pesquisas com antidiabéticos<sup>96-99</sup>, propriedades antibacterianas<sup>100-104</sup>, antivirais<sup>105</sup>, analgésicas<sup>106,107</sup>, antiinflamatórias<sup>108,109</sup>, antiparasitárias<sup>110,111</sup> e, recentemente, demonstrou-se um estudo de docking usando guanidinas policíclicas contra o novo SARS-CoV-2.<sup>112</sup>

A Figura 2 apresenta a estrutura do antidiabético Metformin, amplamente utilizado:

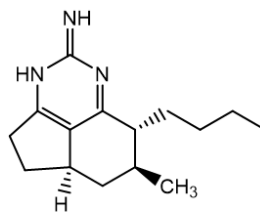


**Metformin**

*Figura 2.* Estrutura química do medicamento Metformin, uma diguanidina utilizada no tratamento do diabetes mellitus tipo 2. Autoria própria.

Abaixo são apresentadas estruturas guanidínicas reportadas com atividade leishmanicida.

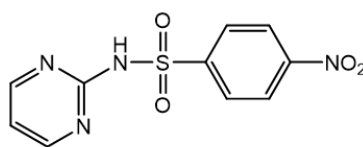
Uma série de alcaloides de guanidina foram sintetizados, três desses compostos foram estudados para verificar atividade antimicrobiana, anti-HIV e antituberculose, bem como sua citotoxicidade. Um desses alcaloides, Mirabilin B, apresentou além de atividade antifúngica, atividade antiprotozoária contra *Leishmania donovani* (IC<sub>50</sub>: 17µg/ml) e baixa citotoxicidade.<sup>113</sup>



**Mirabilin**

Figura 3. Estrutura química do composto Mirabilin. Apresentou boa atividade anti-leishmania ( $IC_{50}$ :  $17\mu\text{g/ml}$ ) contra *L. donovani*. Autoria própria.

Sulfonamidas substituídas apresentaram atividade leishmanicida contra *Leishmania infantum* e o estudo foi estendido para promastigotas de diferentes tipos de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e para a forma epimastigota do parasita causador da doença de Chagas: *Trypanosoma cruzi*.<sup>114</sup> O composto **1a** (Figura 3) que contém o grupo guanidínico, além de apresentar atividade leishmanicida contra todos os tipos de *Leishmania*, não apresentou toxicidade.



**1a**

4-nitro-N-(2-pirimidinil)-benzenossulfonamida

Figura 4. Sulfonamida com grupamento guanidínico que apresentou atividade leishmanicida contra *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. Autoria própria.

Alcalóides com estruturas guanidínicas extraídos da planta *Monanchora ascusula* foram testados contra promastigotas de *L. infantum* e tripomastigotas de *T. Cruzi*.<sup>115</sup> No estudo, dois deles foram investigados quanto sua atividade frente *L. infantum*, mostrando aumento na permeabilidade na membrana do parasita, que gera uma deficiência energética. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) também foi verificada, pela suscetibilidade dos parasitas ao estresse oxidativo. O composto Batzeladina L (Figura 5) quando incubado com os parasitas, induziu um alto aumento da produção de EROs quando comparado com os não tratados.<sup>115</sup>

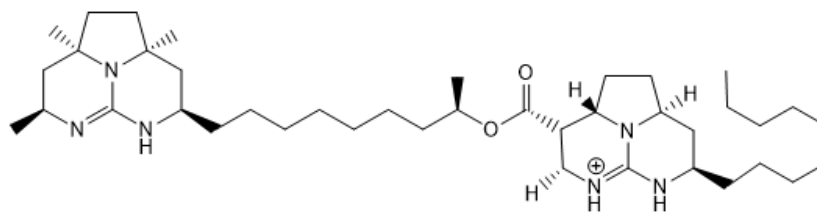


Figura 5. Estrutura da Batzeladina L, composto guanidínico que apresentou atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. infantum* e produção de espécies reativas de oxigênio.

Existem muitas alternativas de guanilação na literatura, mas devido a dificuldade na síntese dos intermediários ou catalisadores e o tempo de reação<sup>116-119</sup>, utilizamos a metodologia desenvolvida por *Cunha e colaboradores*.<sup>120</sup> Realizamos a síntese da LQOF-G2 por outra metodologia que acreditávamos ser mais promissora devido a utilização da água como solvente e a purificação mais simples, porém, o baixo rendimento (18%) impossibilitou essa alternativa.<sup>121</sup>

SANTO (2017) anteriormente demonstrou a síntese das guanidinas para testes contra *L. amazonensis*.<sup>122</sup> Essas moléculas foram novamente sintetizadas e purificadas para a continuidade aos trabalhos.<sup>123</sup> As moléculas LQOF-G2 e LQOF-G7 apresentaram melhores resultados, com baixa citotoxicidade e IC<sub>50</sub> frente amastigotas de 5,6 e 7,1, respectivamente. Adicionalmente, novas guanidinas foram sintetizadas e caracterizadas para futuros testes contra diversos tipos de *leishmania*.

As análises utilizadas para caracterização das moléculas foram RMN, LC-UV, MS (EI), ESI-MS, infravermelho (IV) e UV-VIS. Nem todas as análises puderam ser realizadas com todas as amostras pela indisponibilidade dos equipamentos, mas nos testes acessíveis, concluímos que os compostos estavam com a pureza necessária para os testes biológicos.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a síntese, purificação e caracterização físico-química de novas guanidinas como agentes leishmanicidas e sulfonamidas como bloqueadores de canais iônicos de potássio dependentes de voltagem.

## 2.1 Objetivos específicos:

- Síntese e purificação de sulfonamidas e guanidinas novas e seus intermediários para caracterização por diversas técnicas, tais como DI-MS, RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C, ESI-MS, LC/UV e análises físico-químicas.
- Avaliação da corrente na presença de sulfonamidas para verificar o bloqueio dos canais iônicos de potássio Kv3.1.
- Avaliação da carga transferida através do canal na presença de sulfonamidas.
- Avaliação da relação da concentração das sulfonamidas e diminuição da corrente.
- Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos compostos LQOF-G1 a LQOF-G10 frente amastigotas de *L.Amazonensis*.
- Avaliação da atividade *in vivo* da LQOF-G2.
- Avaliação do efeito tóxico da LQOF-G2.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 Materiais e técnicas analíticas**

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

##### **3.1.1 Sulfonamidas:**

1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (DBN), 1,8- diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU), e 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno (TBD), cloreto de 4-cloro-3-nitrobenzóico, cloreto de 4-cloro-3-nitrobenzenossulfônico, cloreto de 4- clorobenzenossulfônico, N-(3-aminopropil)-2-pirrolidona, adamantilmetilamina, benzilamina, furfurilamina, 4-clorobenzilamina, ácido clorídrico. Os solventes utilizados foram acetonitrila, éter de petróleo, éter etílico e dimetilsulfóxido.

##### **3.1.2 Guanidinas:**

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram cloreto de benzoíla, isotiocianato de amônio, anilina, 4-nitroanilina, 4-bromoanilina, 2,4-bromoanilina, 3-aminopiridina, 4-cloroanilina, 4-fluoranilina, 4- iodoanilina, 4-metoxianilina, toluidina, 4-t-butilanilina, adamantanometilamina, benzilamina, trietilamina, nitrato de bismuto penta-hidratado. Os solventes utilizados foram N,N-dimetilformamida, acetonitrila, éter de petróleo, éter etílico e diclorometano.

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

##### **3.1.3 Análises de ponto de fusão**

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

##### **3.1.4 Análises por EI-MS (Introdução Direta)**

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

temperatura inicial: 50°C, com aquecimento de 20°C.min<sup>-1</sup> até 350°C e tempo de espera de 10 min.

### **3.1.5 Análises Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN foram registrados em um equipamento Bruker Advance III - 400 MHz (Bruker, Bremen - Alemanha). A frequência de ressonância para <sup>1</sup>H NMR foi de 400,13 MHz e para <sup>13</sup>C NMR 100,61 MHz. Os deslocamentos químicos para <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN são referenciados utilizando trimetilsilano (TMS). As análises foram realizadas em D<sub>2</sub>O ou CDCl<sub>3</sub> e todos os desvios químicos foram relatados em ppm (δ). Os dados são apresentados da seguinte forma: deslocamento químico, multiplicidade (s = singuleto, d = duplete, dd = duplete de duplete, t = tripleto, qua = quadruplete, qu = quintuplete, m = multiplete, br s = amplo singuleto), as constantes de integração e de acoplamento (em Hertz).

### **3.1.6 Análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (HRESIMS)**

Os espectros de HRESIMS foram obtidos usando um espectrômetro de massas Micromass híbrido quadrupolo/tempo de voo (QToF) operando com resolução de 7000 e 5 ppm de precisão. A solução é infundida diretamente na fonte de electro spray por meio de uma seringa a uma razão de fluxo de 10 µL/min. O ESI-MS foi adquirido usando um Q-ToF em modo iônico positivo de uma solução de acetona com 0.1% de ácido fórmico, e usando as seguintes condições de operação: voltagens do cone e do capilar são selecionadas para 3500 e 45V, respectivamente, com uma temperatura de desolvatação de 100°C.

## **3.2. Estudo de atividade biológica**

### **3.2.1. Sulfonamidas**

### **3.2.2. Bloqueadoras de canais iônicos de potássio K<sub>v</sub>3.1**

Antes do uso, as moléculas foram dissolvidas em 0.5 M de NaOH resultando em uma solução estoque de 10 mM, até a concentração desejada. Os registros eletrofisiológicos foram realizados de acordo com Hamill et al (1981)<sup>124</sup> e Bassetto Junior et al. (2017).<sup>33</sup> Foram utilizadas linhagens de células L-929 transfectadas com K<sub>v</sub>3.1 para medir a corrente de potássio como descrito em Grissmer (1994).<sup>125</sup> As células L929 foram cultivadas e mantidas em meio de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) contendo 10% soro fetal bovino inativado por calor (Cultilab, Campinas, Brasil), Napiruvato 1 mM, gentamicina G-418-sulfato (0,25 mg/ml), 100 U/ml de penicilina-G de sódio e 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina em uma incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> (Revco Elite II, KendroLaboratoryProducts, Asheville,NC, EUA) à 37°C. A solução de banho com a seguinte composição (em mM): 155 NaCl, 1,0 MgCl<sub>2</sub>, 2,0 CaCl<sub>2</sub>, 5,0 HEPES e 4.5 KCl, pH 7,4 (NaOH) e a pressão osmótica de 300-310 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. A solução da pipeta foi composta por (em mM): 155 KF, 5.0 EGTA, 10 HEPES, 2,0 MgCl<sub>2</sub> e 1,0 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2 (KOH) e a pressão osmótica de 290-300 mOsm/Kg H<sub>2</sub>O. A resistência em série foi eletronicamente compensada até 80% quando as correntes ultrapassaram 2.0 nA. O sinal foi filtrado a 5,0 KHz e adquirido a 20 KHz, através de um amplificador de AxoPacth 200B (AxonInstruments®, Foster City, CA, U.S.A.), conectado a um conversor A/D e D/A Digidata 1440A (AxonInstruments®). Aquisição de dados e geração de pulso de tensão foram realizadas usando o software WinWCP (Strath clyde Electrophysiology Software, © John Dempster, University of Strath clyde, Glasgow, Escócia) e o potencial de retenção era - 88 mV para todos os experimentos.

### **3.2.2 Guanidinas – Atividade leishmanicida**

#### **3.2.2.1 Bioensaio para avaliar a atividade leishmanicida in vitro**

##### **3.2.2.1.1 Parasitas**

As formas promastigotas da cepa (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) de *L. amazonensis* foram mantidas em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)<sup>126</sup> suplementado com 10% de soro fetal bovino que foi inativado por calor à 28°C (Gibco), até a fase tardia de crescimento (1,0x10<sup>7</sup> parasitas.mL<sup>-1</sup>). As formas amastigotas foram obtidas a partir da inoculação de formas promastigotas.

### 3.2.2.1.2 Compostos

Os compostos guanidínicos LQOF-G1 a LQOF-G10 e os controles (pentamidina e anfotericina B (Sigma-Aldrich)) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) fornecendo uma solução estoque (16,7 mg/mL) de cada composto. Dez soluções com concentrações variando de 0,5 a 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para cada composto (concentração final de DMSO de 0,1%) foram adicionadas à suspensão do parasita em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*).<sup>126</sup>

### 3.2.3 Avaliação da atividade amastigota *in vitro* e citotoxicidade

A atividade anti-leishmania dos derivados de guanidina contra a forma amastigota intracelular de *L. amazonensis*, assim como detalhado por Velásquez (2016)<sup>127</sup> foi determinada. Os macrófagos peritoneais foram distribuídos em placas de 24 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço) em lamínulas (13 mm diâmetro), esses poços continham previamente RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os macrófagos obtidos como descrito anteriormente por Passalacqua (2015)<sup>128</sup> foram incubados em estufa à 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 4 horas para aderência e infectados com promastigotas na proporção de 5:1 (promastigotas:macrófagos). Após a remoção dos parasitas não internalizados por lavagem, as culturas infectadas foram incubadas em meio RPMI por 18h à 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a multiplicação dos parasitas. A cultura foi incubada na presença de diferentes concentrações dos compostos guanidínicos, Anfotericina B ou pentamidina por 24h. As células foram fixadas com etanol e coradas com corante de Giemsa e os parasitas foram contados em microscópio óptico.

O índice de infecção foi obtido pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados por o número médio de amastigotas por macrófagos infectados. A concentração que causou uma diminuição de 50% na inibição do crescimento em comparação com o controle também foi determinada por análise de regressão e expresso com o IC<sub>50</sub>-ama em  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

A determinação da citotoxicidade foi demonstrada previamente por SANTO (2017)<sup>122</sup> e descrita por Velasquez (2016).<sup>127</sup> Realizou-se o método MTT<sup>129</sup> que consiste na incubação de células (nesse caso macrófagos, alvo do parasita de *leishmania*) com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio de cor amarelo pálido que quando reduzido, transforma-se em um produto chamado formazan de cor roxa. O MTT

só é reduzido por células vivas e metabolicamente ativas, mede-se a capacidade dos compostos de reduzir em 50% a densidade óptica das células vivas em relação ao controle.

### 3.2.4 Cálculo do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) foi determinado pela relação dos resultados de citotoxicidade dos macrófagos peritoniais de camundongos ( $CC_{50}$ ) e dos parasitos ( $IC_{50}$ )  $CC_{50}/IC_{50}$ . O composto é considerado mais promissor se índices superiores a 10 forem atingidos.

### 3.2.5 Avaliação anti-leishmania *in vivo*

Para avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* da LQOF-G2 foram utilizados animais infectados não tratados, infectados tratados e animais não infectados.

Para o grupo de animais infectados foram inoculados subcutaneamente  $1 \times 10^7$  parasitas/mL de promastigotas infectantes de *L. amazonensis*, nas almofadas traseiras esquerdas de camundongos fêmeas BALB/c ( $20 \pm 4$ g) (CEMIB, UNICAMP). Os camundongos BALB/c foram escolhidos pela suscetibilidade à doença visceralizante. Seis semanas após a inoculação, já com presença de lesão, o grupo de animais infectados tratados foram separados aleatoriamente em seis grupos, com cinco animais cada. Foram administradas doses intraperitoneais diárias de LQOF-G2 (0,13 e 0,25 mg/kg/dia) durante 15 dias. Soluções estoque de LQOF-G2 foram preparadas diariamente em solução fosfato salina (PBS 1X) após solubilização em DMSO (concentração final de 0,1% de DMSO). Um grupo de camundongos infectados foi tratado com a droga de referência anfotericina B (2 mg/kg/dia diluída em água estéril de acordo com as instruções do fabricante) ou o veículo e PBS.

Para a verificação da progressão da infecção, a lesão nos pés era monitorada e mensurada através de um mostrador caliper (MitutoyoCorp, Japão) a cada cinco dias. A eficácia do tratamento foi determinada pela carga parasitária de pés infectados.<sup>130,131</sup>

### 3.2.6 Ensaio de toxicidade para camundongos BALB/c

Amostras de sangue dos camundongos BALB/c ao final dos tratamentos foram coletadas para avaliação dos níveis plasmáticos de bilirrubina total, aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), uréia e creatinina, utilizando kits comerciais (Labtest Diagnostica S.A., Brasil).<sup>132</sup>

### 3.2.7 Declaração de ética

Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Escola de Ciências Farmacêuticas (CEUA/FCF/CAR n 33/2016, 44 /2016 e 48/2016) de acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### 3.2.8 Análise estatística

Todos os ensaios antiparasitários *in vitro* foram realizados em triplicata. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas usando o teste de análise de variância unilateral (ANOVA) seguido por Teste de Comparações Múltiplas de Student-Newman-Keuls (GraphPad Software InStat) ou teste de Tukey (GraphPad Prism).<sup>133</sup>

## 3.3 Procedimentos de Síntese

### 3.3.1 Sulfonamidas

#### 3.3.1.1 Procedimento geral da reação de hidrólise das bases DBN e TBD.

Em um balão de fundo redondo, adiciona-se à 2 ml de água, 2 mmol de TBD ou DBN. O balão foi acoplado a um condensador de refluxo e a mistura foi deixada sob agitação por 6 horas, sendo acompanhada por GC-MS (DI).

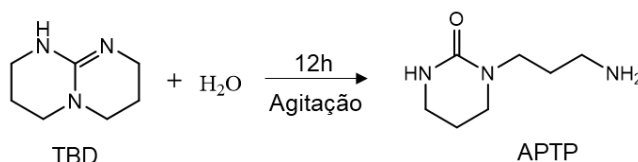


Figura 6. Esquema de reação de hidrólise da TBD. Autoria própria.

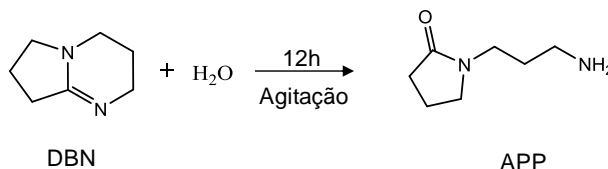


Figura 7. Esquema de reação de hidrólise da DBN. Autoria própria.

#### 3.3.1.2 Procedimento geral para obtenção das sulfonamidas.

A. Dissolveu-se 2 mmol do cloreto de 4-cloro-nitro nitrobenzenossulfônica ou 4-cloro-3-nitrobenzenossulfônica em 10 ml de acetonitrila, em seguida adicionou-se excesso da amina, 4 mmol. A mistura foi adicionada em um balão acoplado a um

condensador de refluxo, agitando-se por 2 horas à 85°C. Após a evaporação do solvente, lavou-se a mistura com solução de 15% de NaHCO<sub>3</sub> e água gelada, formou-se um precipitado que foi filtrado por pressão reduzida e analisado no GC-MS (DI).

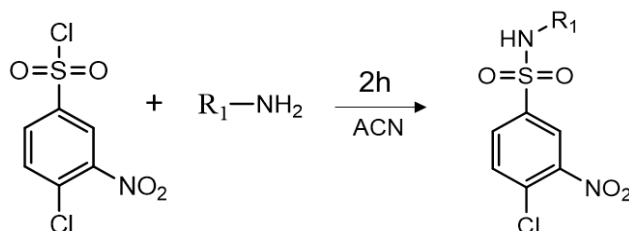


Figura 8. Esquema de reação geral de formação das sulfonamidas. Autoria própria.

**B.** Adicionou-se as sulfonamidas sintetizadas anteriormente em 6 ml de DMSO, aprox. 1 mmol. Em seguida adicionou-se sob agitação 2 mmol de TBD hidrolisada (1-(3-aminopropil) tetrahydro-2(1H)-pirimidinona (AFTP) ou DBN hidrolisada (N-(3-aminopropil)-2-pirrolidona (APP)) ou butilamina. A mistura foi deixada em um sistema de refluxo a 85 °C sob agitação magnética por 12 horas. Após o término da reação, adicionou-se uma solução de HCl (5%) gota-a-gota até que o meio ficasse levemente ácido. Em seguida verteu-se o produto em um béquer com gelo, levando para o congelador. O sólido foi separado por filtração à pressão reduzida e lavado com uma mistura de éter de petróleo/éter etílico (40:60). Os produtos foram analisados no GC-MS (DI).

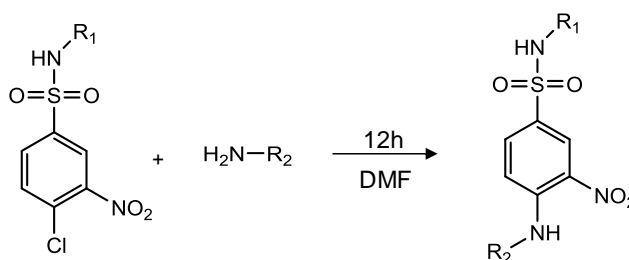


Figura 9. Esquema de reação de síntese das sulfonamidas substituídas. Autoria própria.

### 3.3.2 Guanidinas

#### 3.3.2.1 Procedimento geral de síntese das guanidinas.

**A.** Em um balão de fundo redondo contendo uma solução de isotiocianato de amônio (0,76 g, 10 mmol) em acetonitrila (20 mL) adiciona-se o cloreto de benzoíla (1,40 g, 10 mmol), e a mistura resultante foi submetida a refluxo, sob agitação magnética constante durante 1 hora à temperatura de 75°C. Na sequência, a mistura de reação foi

filtrada a frio sob pressão reduzida utilizando um funil de Büchner. O filtrado contendo o isotiocianato de benzoíla guarda-se sob refrigeração para a sua utilização na síntese das tioureias.

**B.** Para síntese das tiouréias 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.

**C.** Em um balão de fundo redondo em uma solução de 1 mmol de tioureia em 5 ml de *N,N*-dimetilformamida foi dissolvido 2 mmol de benzilamina ou adamantanometilamina ou 3-aminopiridina, 4 mmol de trietilamina e em seguida adiciona-se 1 mmol de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . A solução foi aquecida à 100°C e mantida sob agitação magnética constante por 24 horas. Após esse tempo, a suspensão foi filtrada sob pressão reduzida utilizando-se um funil de vidro sinterizado com uma camada de celite seguido da extração do produto orgânico da celite com 20 mL de diclorometano. Diluiu-se o extrato orgânico com água (4 x 15 mL) e descartou-se a fase aquosa. Na sequência, a fase orgânica foi dessecada por adição de  $\text{MgSO}_4$  anidro e depois filtrou-se sob pressão reduzida utilizando um funil de Büchner. O óleo formado foi cristalizado em água e recristalizado com etanol ou uma mistura de éter etílico/éter de petróleo 8:2.

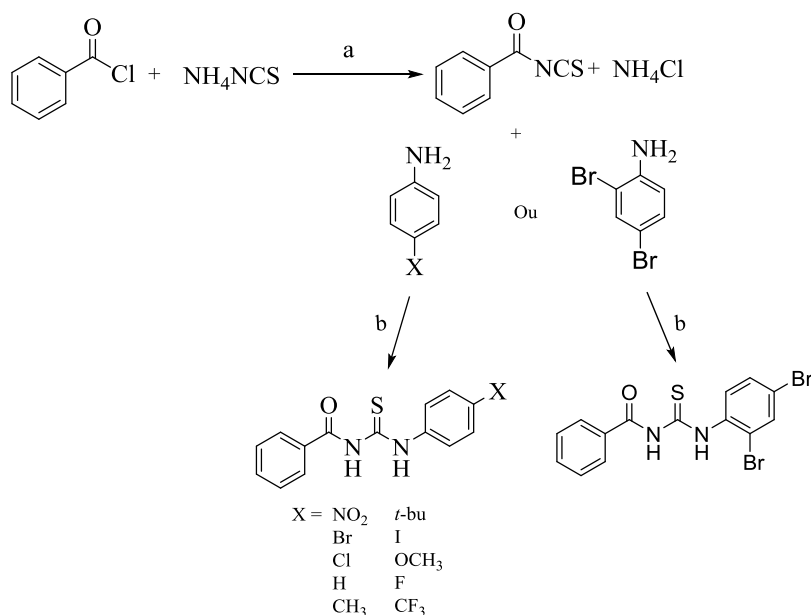


Figura 10. Esquema de síntese das tiouréias: **a.** para obtenção do isotiocianato de benzofila e **b.** para obtenção das tiouréias. Autoria própria.

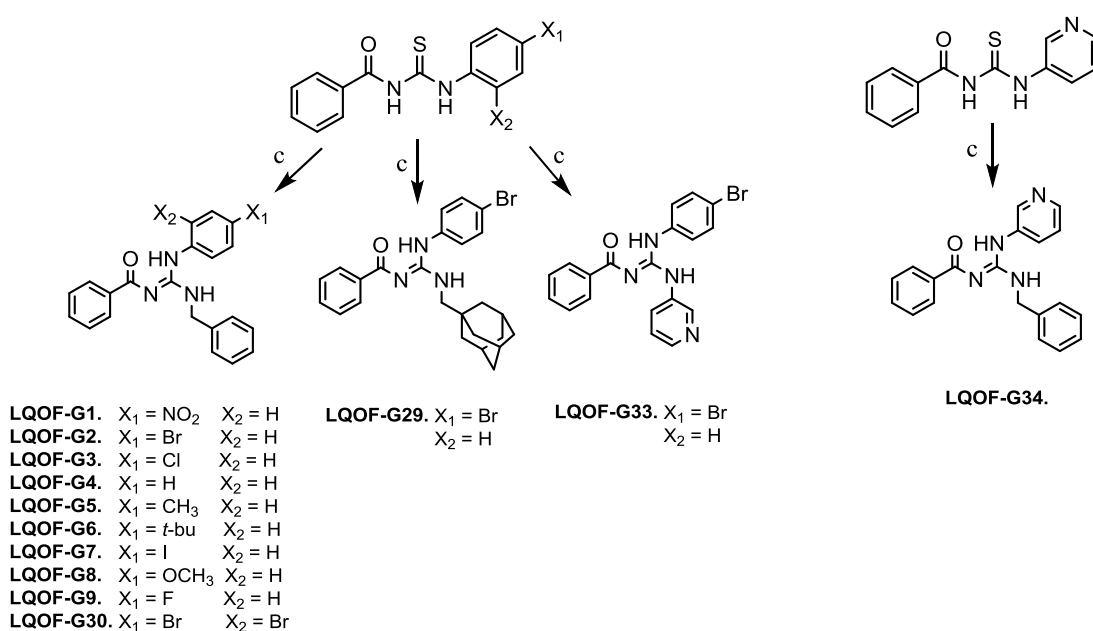


Figura 11. Esquema de síntese das guanidinas (procedimento c). Autoria própria.

### 3.3.2.2 Procedimento utilizando hidróperóxido de tert-butila

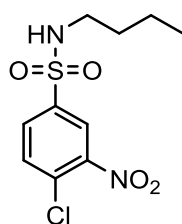
Tentamos um novo método de síntese para LQOF-G2. O método tem uma maior facilidade na purificação das etapas subsequentes e usam-se reagentes menos tóxicos, porém, o rendimento ficou muito abaixo do esperado (18%).

Em um balão de fundo redondo contendo uma solução/suspensão da benzoiltiourea (1,00 mmol) em acetonitrila (10 ml) sob agitação magnética a 0°C, foram adicionados, respectivamente, trietilamina (1 mmol), a amina nucleofílica (1 mmol) e hidroperóxido de terc-butila (64% (m/m) em H<sub>2</sub>O; 3 mmol; 0,45 ml). A solução foi aquecida gradualmente até a temperatura ambiente. Após 24h de reação, adicionou-se a solução em funil de separação carregado de uma solução saturada de NaHSO<sub>3</sub> (50 ml), agitou-se, e extraiu-se com diclorometano (3 x 15 ml). A fase orgânica foi seca sobre MgSO<sub>4</sub> anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi recristalizado utilizando MeOH/H<sub>2</sub>O para fornecer a guanidina correspondente.

### 3.4 Dados experimentais dos compostos

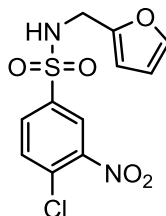
#### 3.4.1 Sulfonamidas

##### 4-cloro-3-nitro-N-butilbenzenosulfonamida – SMD2



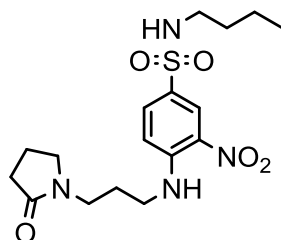
<sup>1</sup>H NMR (400.13 MHz, DMSO) δ 8.42 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 8.05 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.95 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 2.80 (dd, J = 12.8, 6.9 Hz, 2H), 1.40–1.32 (m, 2H), 1.24 (sext, J = 14.0, 7.0 Hz, 2H), 0.81 (t, J = 7.3 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO) δ 147.45, 140.88, 133.09, 131.26, 129.12, 123.86, 42.21, 31.05, 19.12, 13.40. MS/DI (m/z 291,02): 156, 220, 249, 292. Rendimento: 87,9%.

##### 4-cloro-3-nitro-N-furfurilbenzenosulfonamida – SMD3



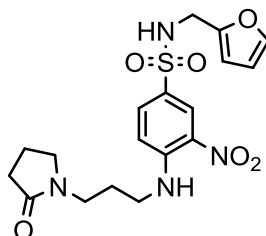
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8.62 (s, 1H), 8.31 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.40 (dd, J = 1.8, 0.8 Hz, 1H), 6.24 (dd, J = 3.2, 1.9 Hz, 1H), 6.17 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.13 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO) δ 149.87, 147.13, 142.59, 141.09, 132.82, 131.25, 129.01, 123.86, 110.27, 108.51, 39.16. MS/DI (m/z 314,98): 81, 95, 220, 249, 316. Rendimento: 73%.

**4-[N-(3'-Aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-N-butilbenzenesulfonamida  
- SMD2\_APP**



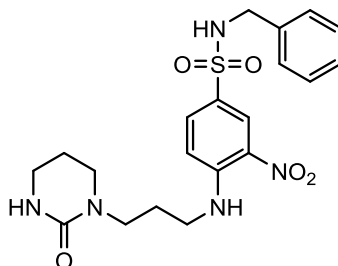
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.63 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H), 8.42 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J = 9.1, 1.9$  Hz, 1H), 7.52 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 7.24 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H), 3.40 (q,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 3.35 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 3.27 (t,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.71 (dd,  $J = 13.1, 6.8$  Hz, 2H), 2.22 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 1.95 – 1.89 (m, 2H), 1.79 (qu,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 1.37 – 1.32 (m, 2H), 1.26 – 1.20 (m, 2H), 0.79 (t,  $J = 7.3$  Hz, 3H) ppm. RMN de  $^{13}\text{C}$  (151 MHz, DMSO)  $\delta$  174.22, 146.63, 133.21, 129.79, 126.01, 125.90, 115.54, 46.34, 42.14, 40.10, 39.30, 30.99, 30.40, 25.86, 19.22, 17.53, 13.43 ppm. MS/DI ( $m/z$  399,13): 98, 142,280,363. Rendimento: 65%.

**4-[N-(3'-Aminopropil)-2-pirrolidona]-3-nitro-N-furfurilbenzenesulfonamida-  
SMD3\_APP**



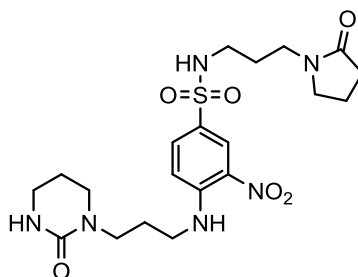
$^1\text{H}$  NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  8.64 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 8.31 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 8.19 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 7.71 (dd,  $J = 9.2, 2.3$  Hz, 1H), 7.29 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.22 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.17 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 4.01 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 3.44 – 3.39 (m, 2H), 3.38 – 3.36 (m, 2H), 3.28 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.24 (t,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 1.98 – 1.90 (m, 2H), 1.79 (qu,  $J = 6.7$  Hz, 2H) ppm. RMN de  $^{13}\text{C}$  (151 MHz, DMSO)  $\delta$  174.71, 150.74, 147.04, 142.90, 133.65, 130.16, 126.51, 115.77, 110.72, 108.55, 46.83, 40.53, 39.77, 39.67, 30.88, 26.33, 18.00 ppm. MS/DI ( $m/z$  423,13): 81, 98, 142, 304, 387. Rendimento: 58%.

**4-[1-(3-aminopropil)tetrahidro-2(1H)pirimidinona]-3-nitro-N-benzilbenzenosulfonamide - LQOF-S7**



$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.69 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 1H), 8.63 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H), 7.78 (dd,  $J$  = 9.1,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 7.28-7.17 (m, 1H), 6.88 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H), 6.03 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 4.88 (bs, 1H), 4.18 (d,  $J$  = 6.0, 2H), 3.45 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.40 (q,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.29 (dt,  $J$  = 5.9,  $J$  = 2.6 Hz, 2H), 3.28 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 1.96 (quint,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 1.86 (quint,  $J$  = 5.9 Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 156.8 (C=O), 147.1 (C), 136.5 (C), 133.6 (CH), 130.8 (C-NO<sub>2</sub>), 128.6 (CH), 128.1 (CH), 127.7 (CH), 127.5 (CH), 126.2 (C), 114.2 (CH), 47.3 (CH<sub>2</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 22.3 (CH<sub>2</sub>). MS/DI (m/z 447,5035): 66, 77, 91, 106, 314, 412. Rendimento: 63,1%.

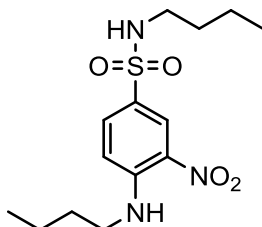
**4-[1-(3-aminopropil)tetrahidro-2(1H)pirimidinona]-3-nitro-N-(3'-aminopropil-2-pirrolidona)benzenosulfonamide-LQOF - S8**



$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.74 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 8.61 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H), 7.81 (dd,  $J$  = 9.0 Hz,  $J$  = 2.9 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 6.70 (t,  $J$  = 6.3, 1H), 5.26 (bs, 1H), 3.50 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.43 (dt,  $J$  = 7.0 Hz,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 3.38 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 3.37 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 3.34 (dt,  $J$  = 5.9 Hz,  $J$  = 2.5 Hz, 2H), , 3.31 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 2.94 (q,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 2.36 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 2.02 (quint,  $J$  = 8.0 Hz, 3H), 1.98 (quint,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 1.88 (quint,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 1.76 (quint,  $J$  = 6.3 Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 175.9 (N-C=O), 156.9 (HN-C=O), 147.0 (C-NH), 133.7 (CH), 130.8 (C-NO<sub>2</sub>), 127.1 (CH), 126.6 (C), 114.3 (CH), 47.5 (CH<sub>2</sub>), 45.7 (CH<sub>2</sub>),

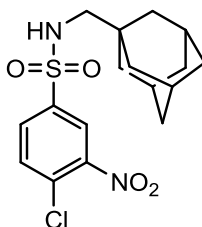
45.0 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 40.5 (CH<sub>2</sub>), 39.7 (CH<sub>2</sub>), 30.8 (CH<sub>2</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 18.0 (CH<sub>2</sub>). MS/DI (m/z 482,5484): 56, 70, 77, 98, 113, 126, 241, 323, 447. pureza: 98.88%. mp: 158.7-159.5°C. Rendimento: 54,3%

#### 4-butil-3-nitro-N-butilbenzenosulfonamida - LQOF-S9



<sup>1</sup>H NMR (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.6 (d, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.8 (dd, 2H), 7.2 (s, 1H), 6.9 (d, 2H), 3.39 (q, 2H), 2.98 (q, 2H), 1.78 (quint, 2H), 1.44-1.55 (m, 2H), 1.27-1.35 (m, 2H), 1.0 (t, 3H), 0.88 (t, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100.61 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 147.56 (C-N), 133,87 (CH<sub>2</sub>), 130.96 (NO<sub>2</sub>), 127,57 (CH<sub>2</sub>), 126.40 (C-S), 114.68 (CH<sub>2</sub>), 43.28 (CH<sub>2</sub>), 43.15 (CH<sub>2</sub>), 31.87 (CH<sub>2</sub>), 31.04 (CH<sub>2</sub>), 20.37 (CH<sub>2</sub>), 19.92 (CH<sub>2</sub>), 13.88 (CH<sub>3</sub>), 13.72 (CH<sub>3</sub>). MS/DI (m/z 329,4112): 58, 77, 91, 104, 257, 286. pureza: 99,73%. mp: 129.3-129.7°C. Rendimento:78%.

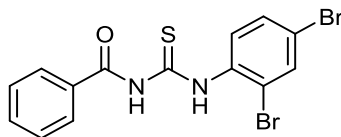
#### 4-cloro-3-nitro-N-adamantilmetilbenzenosulfonamida - LQOF-S10



<sup>1</sup>H NMR (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 8.35 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 7.98 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.77 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 2.64 (d, 6.5 Hz, 2H), 1.99 (m, 3H), 1.72 (m, 3H), 1.60 (m, 3H), 1.45 (m, 3H); <sup>13</sup>C NMR (100.61 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 148.0 (C-NO<sub>2</sub>), 140.8 (C-S), 132.9 (CH), 131.4 (C-Cl), 131.0 (CH), 124.3 (CH), 55.1 (CH<sub>2</sub>), 40.0 (3CH<sub>2</sub>), 36.7 (3CH<sub>2</sub>), 28.1 (3CH). MS/DI (m/z 384,09): 135, 164, 220. Rendimento: 75%.

### 3.4.2 Tiouréia

#### 1-benzoil-3-(2,4-bromofenil) tiouréia - LQOF-T2

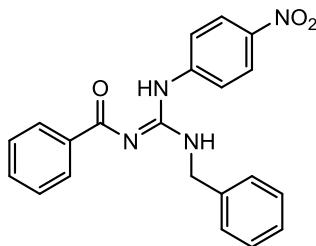


MS/DI (m/z 414,11): 77, 105, 293, 335, 380. ESI-(+)-MS/MS: 105.0336, 122.0598, 251.8832, 414.8928. pureza: 99,25%. mp: 166,6-167,1°C. Rendimento: 80%.

### 3.4.3 Guanidinas

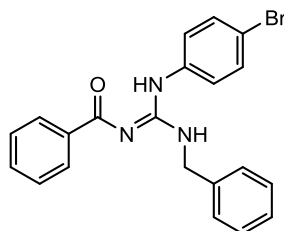
As guanidinas LQOF-G1 a LQOF-G10 foram previamente sintetizadas e caracterizadas por Rafael Dias do Espírito Santo (2017).<sup>122</sup>

#### 1-benzil-2-benzoil-3-(4-nitrofenil) guanidina – LQOF-G1



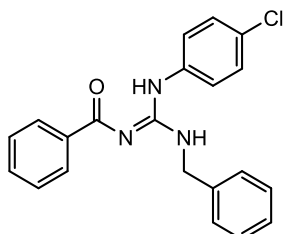
<sup>1</sup>H NMR - 60 °C (400.13 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ Z isomer = 12.63 (s, 1H), 5.99 (t, 1H), 4.92 (d, 2H). δ E isomer = 11.33 (t, 1H), 8.73 (s, 1H), 4.64 (d, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100.61 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ Z isomer = 177.7 (C=O), 156.9 (N=C), 144.2 (C-NO<sub>2</sub>), 142.6 (C), 137.8 (C), 134.8 (C), 132.0 (p-CH), 129.0 (2CH), 128.9 (2CH), 127.9 (2CH), 127.8 (2CH), 127.0 (p-CH), 125.8 (2CH), 123.6 (2CH), 45.1 (N-CH<sub>2</sub>). δ E isomer = 178.1 (C=O); 157.7 (N=C), 144.1 (C-NO<sub>2</sub>), 142.2 (C), 137.2 (C), 129.5 (C), 129.3 (p-CH), 128.3 (2CH), 128.2 (2CH), 127.9 (2CH), 126.9 (2CH), 126.1 (p-CH), 124.7 (2CH), 121.8 (2CH), 45,5 (N-CH<sub>2</sub>). MS/DI (m/z 375,14): 77, 91, 105, 253, 375. HRESIMS m/z 375.1449 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>, 375.1452, Δ = 0.7ppm). Tempo de retenção: 34.95 min, pureza: 95.3%. pf: 136.6-137.8. Rendimento: 62%.

### 1-benzil-2-benzoil-3-(4-bromofenil) guanidina – LQOF-G2



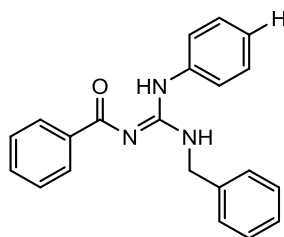
$^1\text{H}$  NMR - 60 °C (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  Z isomer = 12.15 (s, 1H), 8.29 (d, 2H), 7.54 – 7.48 (m, 5H), 7.41 – 7.35 (m, 5H), 7.14 (d, 2H), 5.45 (t, 1H), 4.85 (d, 2H).  $\delta$  E isomer = 11.16 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.5 (C=O), 158.1 (C=N), 138.2 (C), 137.6 (C), 134.1 (C), 133.1 (2CH), 131.6 (p-CH), 128.9 (2CH), 128.8 (2CH), 128.1 (2CH), 127.7 (2CH + p-CH), 127.4 (2CH), 120.6 (C-Br), 44.8 (N-CH<sub>2</sub>). MS/DI (m/z 408,07): 77, 91, 105, 287, 409. HRESIMS  $m/z$  408.0701 [M+H]<sup>+</sup> (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BrN}_3\text{O}^+$ , 408.0706,  $\Delta$  = 1.2 ppm). Tempo de retenção: 37.52 min, pureza: 96.5%. pf: 94.8-96.1°C. Rendimento: 85%.

### 1-benzil-2-benzoil-3-(4-clorofenil) guanidina – LQOF-G3



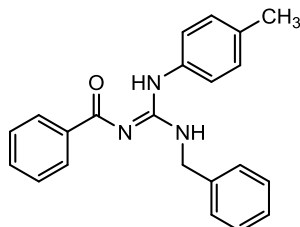
$^1\text{H}$  NMR -60 °C (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  Z isomer = 12.16 (s, 1H), 8.29 (d, 2H,  $J$  = 7,6 Hz), 7.56 (t, 1H,  $J$  = 7,2 Hz), 7.48 (t, 2H,  $J$  = 7,5 Hz), 7.42 – 7.37 (m, 6H), 7.31 (m, 1H), 7.21 (d, 2H,  $J$  = 8,5 Hz), 5.44 (t, 1H,  $J$  = 5,8 Hz), 4.85 (d, 2H,  $J$  = 5,8 Hz).  $\delta$  E isomer = 11.20 (t, 0,1H,  $J$  = 5,1 Hz), 10.00 (s, 0,1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.5 (C=O), 158.2 (N=C), 138.2 (C), 137.6 (C), 133.6 (C), 132.5 (p-CH), 131.5 (2CH), 130.1 (2CH), 128.9 (2CH), 128.7 (2CH), 128.0 (p-CH), 127.6 (2CH), 127.1 (2CH), 44.8 (N-CH<sub>2</sub>). MS/DI (m/z 364,12): 77, 91, 105, 242, 363. HRESIMS  $m/z$  364.1208 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{ClN}_3\text{O}^+$ , 364.1211,  $\Delta$  = 0.8 ppm). Tempo de retenção: 36.95 min, pureza: 88.5%. pf: 87.3-88.5°C. Rendimento: 65%.

### 1-benzil-2-benzoil-3-(4-fenil) guanidina – LQOF-G4

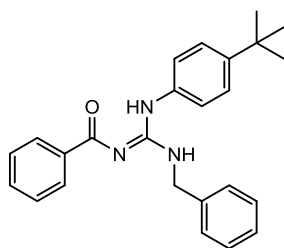


$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.22 (br, 1H), 8.30 (br, 2H), 7.50 (t,  $J$  = 6,8 Hz, 1H), 7.44 (m, 5H), 7.37 (d, 4H), 7.33 – 7.30 (m, 3H), 5.26 (br, 1H), 4.82 (br, 2H).  $^{13}\text{C}$  (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.7 (C=O), 158.7 (N=C), 138.6 (C), 136.0 (C), 131.4 (p-CH), 130.1 (C-H), 129.2 (2CH), 128.9 (2CH), 128.0 (2CH), 127.7 (2CH), 127.6 (p-CH), 127.1 (2CH), 125.7 (2CH), 45.4 (N- $\text{CH}_2$ ). MS/DI ( $m/z$  330,16): 77, 91, 105, 208, 330. HRESIMS  $m/z$  330.1601  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}^+$ , 330.1601,  $\Delta$  = -0.1 ppm). Tempo de retenção: 35.12 min, pureza: 93.5%. pf: 94.4-94.9°C. Rendimento: 89%.

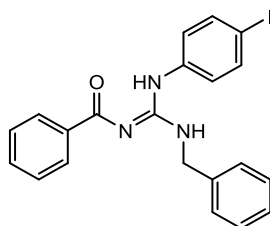
### 1-benzil-2-benzoil-3-(4-metilfenil) guanidina – LQOF-G5



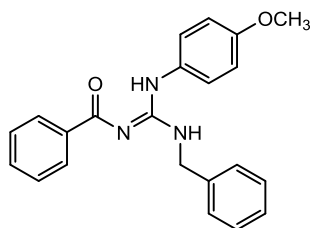
$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.05 (br, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 7,1 Hz, 2H), 7.46 (t,  $J$  = 7,0 Hz, 1H), 7.41 (t,  $J$  = 7,3 Hz, 2H), 7.33 (d,  $J$  = 4,5 Hz, 4H), 7.29 (dd,  $J$  = 8,7, 4,5 Hz, 1H), 7.20 (d,  $J$  = 8,1 Hz, 2H), 7.15 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 2H), 5.18 (br, 1H), 4,78 (br, 2H), 2,35 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.8 (C=O), 159.1 (N=C), 138.7 (C), 137.3 (C), 133.2 (C), 131.3 (p-CH), 130.8 (2CH), 129.3 (2CH), 128.9 (2CH), 128.0 (2CH), 127.7 (2CH + p-CH), 125.9 (2CH), 45.3 (N- $\text{CH}_2$ ), 21.2 (p- $\text{CH}_3$ ). MS/DI ( $m/z$  344,17): 77, 91, 105, 222, 344. HRESIMS  $m/z$  344.1758  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}^+$ , 344.1757,  $\Delta$  = -0.1 ppm). Tempo de retenção: 36.67 min, pureza: 96.0%. pf: 91.2-91.7°C. Rendimento: 53%.

**1-benzil-2-benzoil-3-(4-tert-butilfenil) guanidine – LQOF-G6**

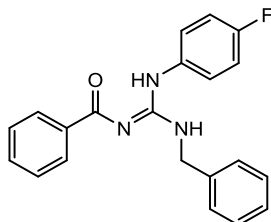
$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12,09 (br, 1H), 8,27 (d,  $J$  = 7,1 Hz, 2H), 7,48 – 7,44 (m, 1H), 7,42 (m, 2H), 7,40 (m, 2H), 7,35 (m, 4H), 7,29 (m, 1H), 7,19 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 2H), 5,27 (br, 1H), 4,79 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 2H), 1.31 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.9 (C=O), 159.1 (N=C), 150.4 (C), 138.8 (C), 133.2 (C), 131.4 (p-CH), 129.3 (2CH), 128.9 (2CH), 128.0 (2CH), 127.7 (2CH + p-CH), 127.2 (2C1H), 125.5 (2CH), 45.3 (N-CH<sub>2</sub>), 34.8 [p-t-bu (C)], 31.5 [p-t-bu (CH<sub>3</sub>)]. MS/DI ( $m/z$  386,2): 77, 91, 105, 207, 238, 264, 385. HRESIMS  $m/z$  386.2227 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}^+$ , 386.2227,  $\Delta$  = -0.0 ppm). Tempo de retenção: 41.04 min, pureza: 95.8%. pf: 124.4-125.7°C. Rendimento: 65%.

**1-benzil-2-benzoil-3-(4-iodofenil) guanidina – LQOF-G7**

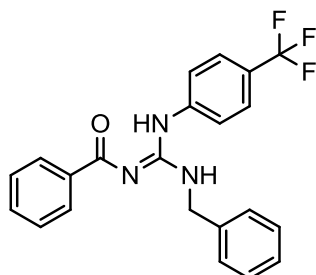
$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.21 (br, 1H), 8.25 (br, 2H), 7.71 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 2H), 7.49 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 7.42 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.35 (m, 4H), 7.30 (m, 1H), 7.02 (br, 2H), 5.16 (br, 1H), 4.76 (br, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 178.0 (C=O), 158.4 (N=C), 139.2 (C), 138.3 (C), 131.5 (p-CH), 129.3 (2CH), 129.0 (2CH), 128.0 (2CH), 127.9 (2CH), 127.7 (2CH + p-CH), 127.3 (2CH), 45.4 (N-CH<sub>2</sub>). FT-IR (KBr)  $\nu$  3353, 3055, 2931, 1654, 1603, 1566, 1508, 1354 e 1207  $\text{cm}^{-1}$ . MS/DI ( $m/z$  456,05): 77, 91, 105, 334, 456. HRESIMS  $m/z$  456.0566 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{IN}_3\text{O}^+$ , 456.0567,  $\Delta$  = -0.3 ppm). Tempo de retenção: 38.35 min, pureza: 90.9%. 99.6-101.0°C. Rendimento: 68%.

**1-benzil-2-benzoil-3-(4-metoxifenil) guanidina – LQOF-G8**

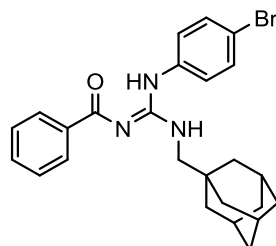
$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 11.93 (br, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H), 7.46 (m, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.33 (m, 4H), 7.29 (m, 1H), 7.19 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.92 (dt,  $J$  = 8.9 Hz, 2H), 5.06 (br, 1H), 4.77 (br, 2H), 3.81 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.7 (C=O), 159.4 (C), 158.7 (C=N), 138.6 (C), 131.1 (p-CH), 129.2 (2CH), 128.8 (2CH), 128.2 (C), 127.8 (p-CH), 127.7 (2CH), 127.5 (2CH), 122.2 (2CH), 115.3 (2CH), 55.5 (p-OCH<sub>3</sub>), 45.2 (N-CH<sub>2</sub>). MS/DI ( $m/z$  360,17): 77, 91, 105, 238, 361. HRESIMS  $m/z$  360.1711 [M+H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>22</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>, 360.1707,  $\Delta$  = 1.4 ppm). Tempo de retenção: 34.83 min, pureza 93.7%. pf: 107.1-107.6°C. Rendimento: 85%.

**1-benzil-2-benzoil-3-(4-fluorofenil) guanidina – LQOF-G9**

$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 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).);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.9 (C=O), 159.0 (N=C), 138.4 (C), 131.8 (C), 131.3 (p-CH), 129.2 (2CH), 129.1 (2CH), 128.8 (2CH), 127.9 (p-CH), 127.7 (2CH), 127.5 (2CH), 127.0 (2CH), 45.3 (N-CH<sub>2</sub>). MS/DI ( $m/z$  348,15): 77, 91, 105, 227, 347. HRESIMS  $m/z$  348.1509 [M+H]<sup>+</sup> (calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>FN<sub>3</sub>O<sup>+</sup>, 348.1507,  $\Delta$  = -0.8 ppm). Tempo de retenção: 34.97 min, pureza: 95.1%. pf: 123.2-123.6°C. Rendimento: 73%.

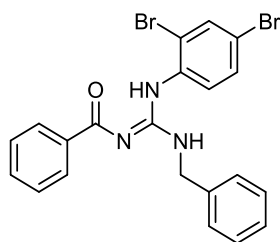
**1-benzil-2-benzoil-3-((4-trifluorometil)fenil) guanidine – LQOF-G10**


$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 9.29 (s, 1H), 9.16 (t,  $J$ =5.2 Hz, 1H), 8.12 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 7.93 (d,  $J$ =7.2 Hz, 2H), 7.61 (t,  $J$ =7.4 Hz, 1H), 7.52 (d,  $J$ =7.9 Hz, 2H), 7.43 (m, 2H), 7.36 (m, 4H), 7.30 (m, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.59 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.5 (C=O), 156.5 (N=C), 131.7 (p-CH), 129.1 (2CH), 128.9 (2CH), 128.7 (2CH), (2CH+CH), 127.6 (p-CH), 127.5 (2CH), 125.7 (2CH), 57.0 ( $\text{CF}_3$ ), 45.5 (N- $\text{CH}_2$ ). HRESIMS  $m/z$  398.1488  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}^+$ , 398.1480,  $\Delta$  = (2.0 ppm). Rendimento: 42%.

**1-adamantanometilamina-2-benzoil-3-(4-bromofenil) guanidina – LQOF-G29**


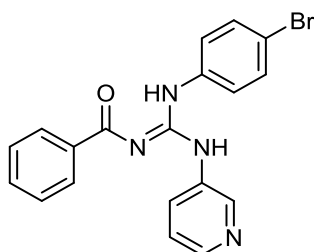
$^1\text{H}$  NMR (400.13 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 12.19 (s, 1H), 8.27 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 7.60 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 7.50 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 7.45 (t, 7.3 Hz, 2H), 7.19 (d, 8.1 Hz, 2H), 4.95 (t,  $J$  = 6,0 Hz, 1H), 3.31 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 2.0 (s, 3H), 1.73-1.62 (s, 3H), 1.50 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100.61 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 177.7 (C=O), 159.4 (C), 158.7 (C=N), 138.6 (C), 131.1 (p-CH), 129.2 (2CH), 128.8 (2CH), 128.2 (C), 127.8 (p-CH), 127.7 (2CH), 127.5 (2CH), 122.2 (2CH), 115.3 (2CH), 55.5 (p- $\text{OCH}_3$ ), 45.2 (N- $\text{CH}_2$ ). MS/DI ( $m/z$  467): 77, 91, 105, 135, 149, 330, 467. pf: 174.6-174.9. pureza: 99,73%. Rendimento: 62%.

### 1-benzil-2-benzoil-3-(2,4-bromofenil) guanidina - LQOF-G30



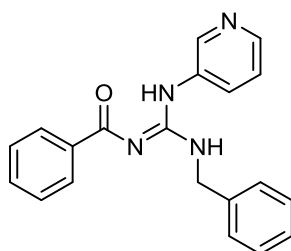
MS/DI (m/z 487,18): 77, 91, 105, 406, 487. ESI-(+)-MS/MS: 91,0506, 105,0332, 122,0598, 212,1060, 237,1016, 288,0071, 328,1445, 366,9258, 384,9361, 487,9790. pureza: 99,82%. mp:131,2-131,7. Rendimento: 84%.

### 1-(3-aminopiridina)-2-benzoil-3-(4-bromofenil) guanidina - LQOF-G33



MS/DI (m/z 395,25): 77, 105, 121, 171, 275, 289, 395. ESI-(+)-MS/MS: 105.0337, 122.0599, 224,0811, 273,9968, 395,0496. pureza: 98,25%. mp:153,9-154,3°C. Rendimento: 76%.

### 1-benzil-2-benzoil-3-(3-aminopiridina) guanidina - LQOF-G34



MS/DI (m/z 330,38): 77, 91, 105, 209, 330. pureza: 99,33%. mp:109,4-109,7°C. Rendimento: 82%.

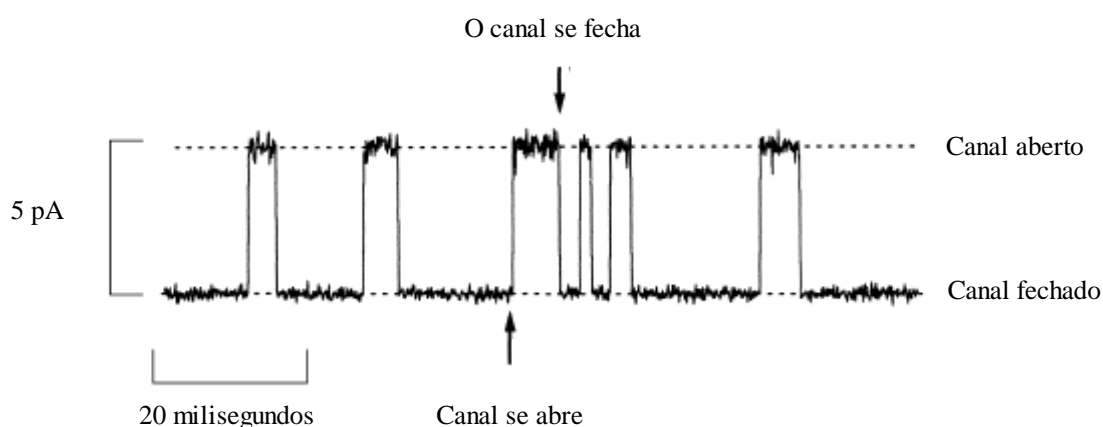
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Sulfonamidas

A princípio, as benzenossulfonamidas foram sintetizadas por Carina Couto Martins (2015).<sup>34</sup> O objetivo desse trabalho foi a síntese e purificação dessas sulfonamidas para

continuação dos testes aqui apresentados, assim como a síntese, purificação e caracterização de novas sulfonamidas para testes futuros. Os resultados aqui apresentados foram publicados em conjunto com Carlos Alberto Zanutto Bassetto (2019).<sup>134</sup>

A Figura 12 representa o funcionamento de um canal em um potencial de membrana fixo. A amplitude da corrente quando o canal está aberto é constante, e a abertura ou fechamento ocorre aleatoriamente. A magnitude da corrente é determinada pelas concentrações de íons em cada lado da membrana, pelo seu potencial através da membrana e pela permeabilidade a determinados íons.<sup>10</sup> Se a molécula consegue bloquear o canal, podemos enxergar a diminuição da corrente através da membrana.



*Figura 12.* Representação das correntes de um único canal. Quando o canal está fechado a corrente através dele é nula, quando o canal se abre e os íons começam a passar, é criada uma corrente. Adaptado de Frances Ashcroft (1999).<sup>10</sup>

As benzenossulfonamidas e seus análogos (Figura 13), foram avaliadas quanto o bloqueio dos canais  $K_v3.1$  medindo as correntes de íons potássio. Os  $K_v$  atuam em resposta a despolarização da membrana, foram aplicados pulsos de tensão despolarizante (-88 a +32 mV) por 70 milissegundos. As células foram perfundidas com solução controle, depois com 100  $\mu$ M das sulfonamidas separadamente e durante os últimos 5 min, as células foram perfundidas novamente com solução de controle para avaliar a reversibilidade do efeito.<sup>134</sup>

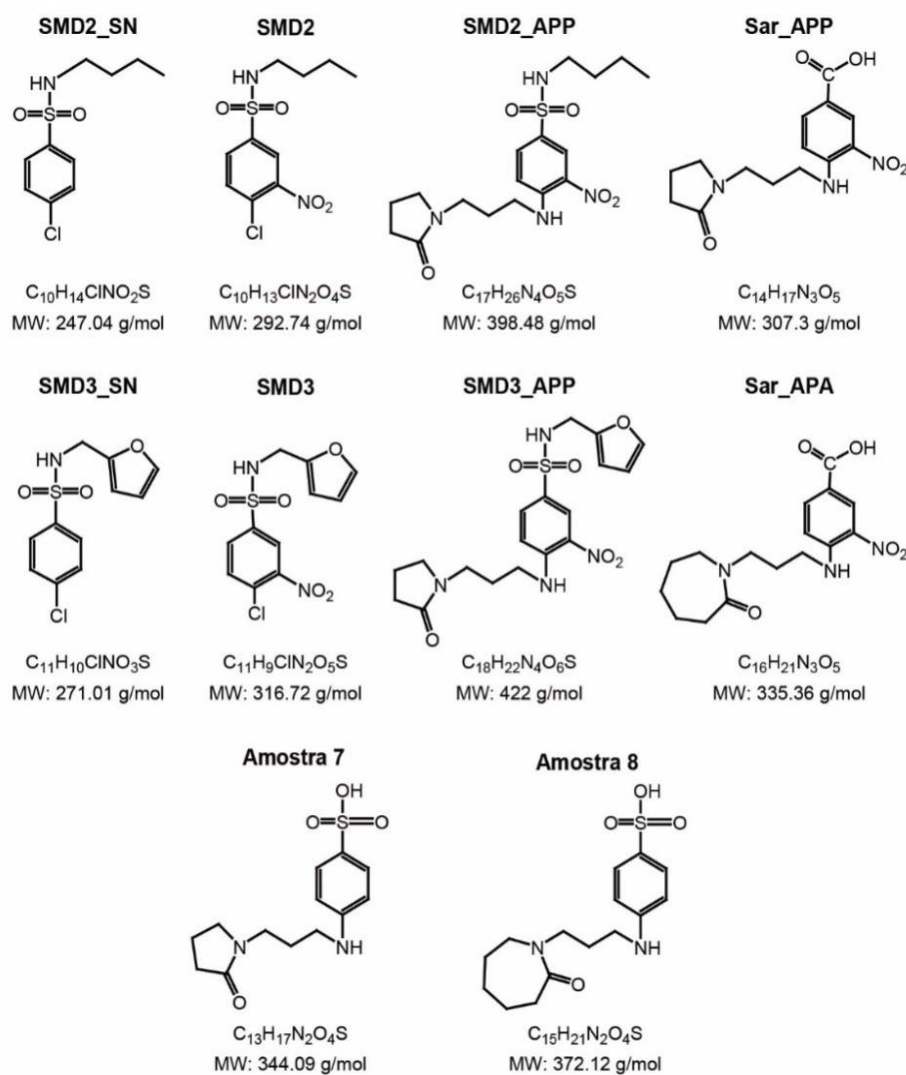


Figura 13. Sulfonamidas estudadas para bloqueio de canais iônicos de potássio dependentes de voltagem  $K_v3.1$ . Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup>

A amostra 7, amostra 8, Sar\_APA e Sar\_APP (Figura 14) não apresentaram alteração nas correntes registradas na presença de 100  $\mu$ M de cada uma delas, mas comparando os registros controle com as moléculas SMD2, SMD3, SMD2\_APP, SMD3\_APP, SMD2\_SN e SMD3\_SN (Figura 15) observamos uma expressiva redução dessas correntes, sugerindo que esses compostos foram capazes de bloquear  $K_v3.1$ .

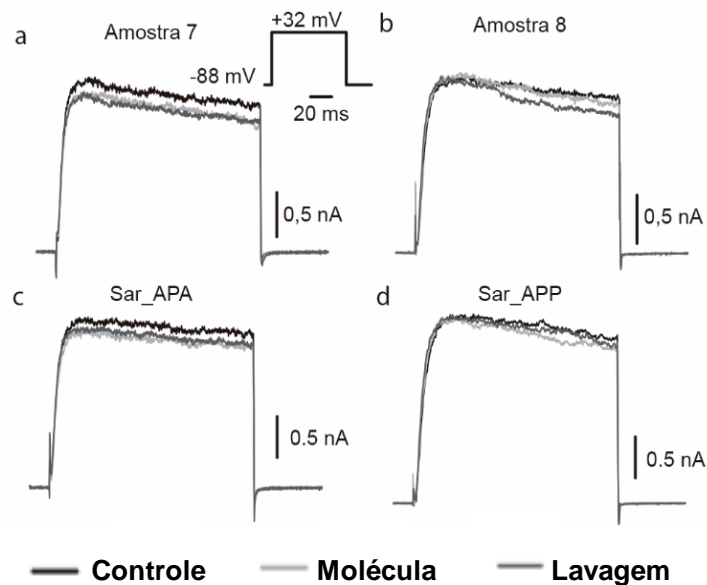


Figura 14. Respostas representativas da corrente na presença de moléculas a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ . O preto representa controle, cinza claro as correntes na presença de 100  $\mu\text{M}$  de uma determinada molécula e cinza escuro é a resposta após a lavagem da droga. As moléculas Amostra 7, amostra 8, Sar\_APA e Sar\_APP não geraram bloqueio do canal. Figura adaptada de Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup>

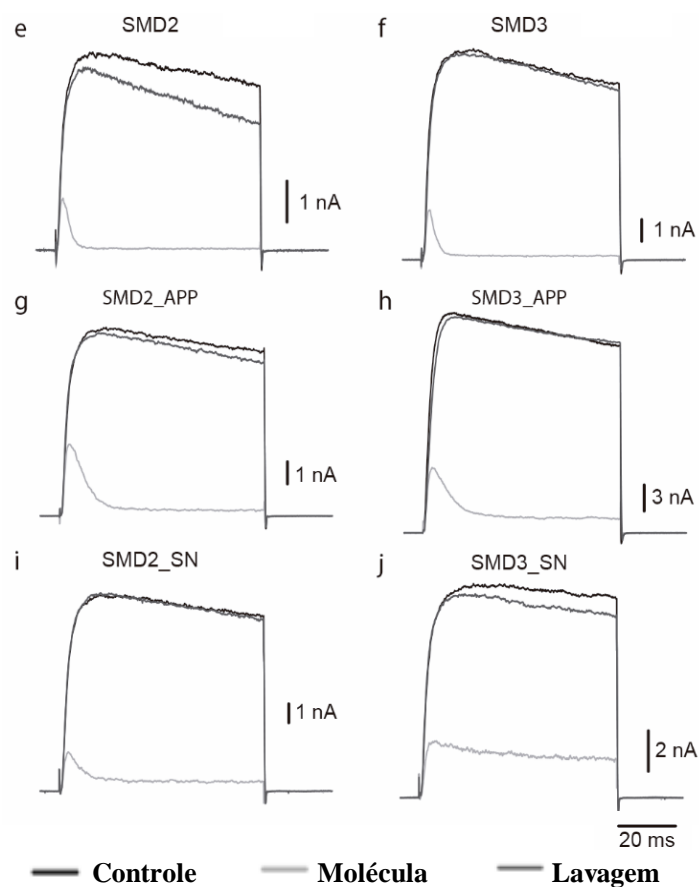
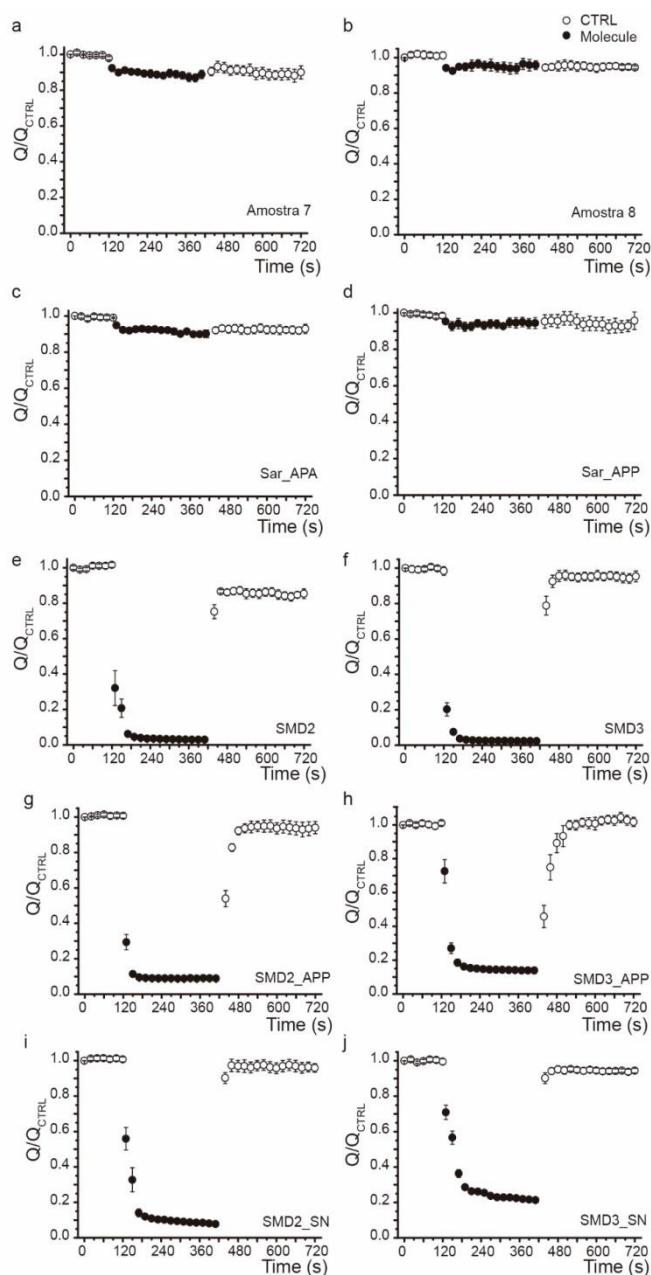


Figura 15. Respostas representativas da corrente na presença de moléculas a uma concentração de 100  $\mu\text{M}$ . O preto representa controle, cinza claro as correntes na presença

de 100  $\mu\text{M}$  de uma determinada molécula e cinza escuro é a resposta após a lavagem da droga. As moléculas SMD2, SMD3, SMD2\_APP, SMD3\_APP, SMD2\_SN e SMD3\_SN foram capazes de bloquear o canal. Figura adaptada de Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup>

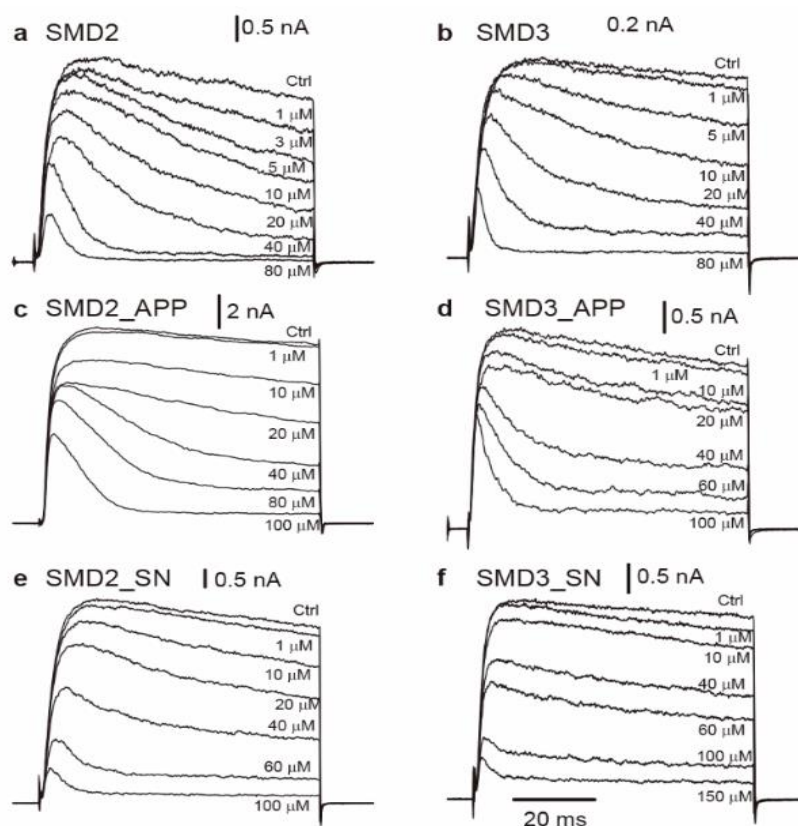
A Figura 16 mostra a carga total transferida através do canal em função do tempo de aplicação do medicamento. O bloqueio dos efeitos foi totalmente reversível para todas as moléculas em menos de 2 minutos. As moléculas SMD2 (e) e SMD3 (f) apresentaram os melhores resultados, onde a carga transferida foi diminuída a 0 e se manteve constante até que houvesse a superfusão do controle, demonstrando seu efeito reversível.



*Figura 16.* Curso de tempo do efeito de 100  $\mu\text{M}$  dos vários compostos aplicados às células na carga normalizada transferida ( $Q / Q_{\text{CTRL}}$ ) através dos canais. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup>

Foram medidas as correntes na presença de várias concentrações das moléculas que apresentaram efeitos bloqueadores do canal  $\text{Kv}3.1$  (Figura 17). A molécula SMD2 obteve o melhor resultado onde teve a maior decadência da corrente com a menor concentração 80  $\mu\text{M}$ . Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup> ressaltou:

A observação básica neste tipo de experimento é que a fase de decadência da corrente é acelerada e dependente da concentração das moléculas na solução do banho. Além disso, mesmo para as maiores concentrações de moléculas presentes no banho ( $\sim 100\text{--}200 \mu\text{M}$ ), um pequeno pico de corrente ainda é observado. Isso indica que o canal deve primeiro abrir, antes de o bloqueador interagir com o seu local de ligação. Isso é típico para bloqueadores de canais abertos, como foi sugerido por outros.<sup>135-139</sup> (Bassetto Junior et al. 2019).



*Figura 17.* Corrente representativa para várias concentrações de uma determinada molécula indicada em à parte superior de cada painel. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup>

A Tabela 2 mostra a magnitude das correntes no final do pulso de voltagem ( $\sim 70$  ms) plotado contra a concentração das várias moléculas usadas. A equação de Hill foi

ajustada (linhas sólidas) para os dados experimentais e  $IC_{50}$ . A molécula SMD2 obteve o menor  $IC_{50}$  indicando que é mais potente em bloquear os canais  $K_v3.1$  do que as outras. A Figura 18 mostra a relação dose-resposta entre a concentração das moléculas e a fração não bloqueada da corrente, conforme a concentração das moléculas aumentaram, a fração não bloqueada diminuiu.

Molecule	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	N
SMD2	$9.3 \pm 0.6$	$1.9 \pm 0.1$
SMD3	$11.3 \pm 0.7$	$1.5 \pm 0.1$
SMD2_APP	$20.5 \pm 1$	$1.6 \pm 0.1$
SMD3_APP	$29.9 \pm 1.9$	$1.7 \pm 0.1$
SMD2_SN	$29.7 \pm 2.3$	$1.7 \pm 0.1$
SMD3_SN	$53.1 \pm 2.2$	$2.2 \pm 0.1$

Tabela 2. Valores de  $IC_{50}$  e coeficiente de Hill. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup>

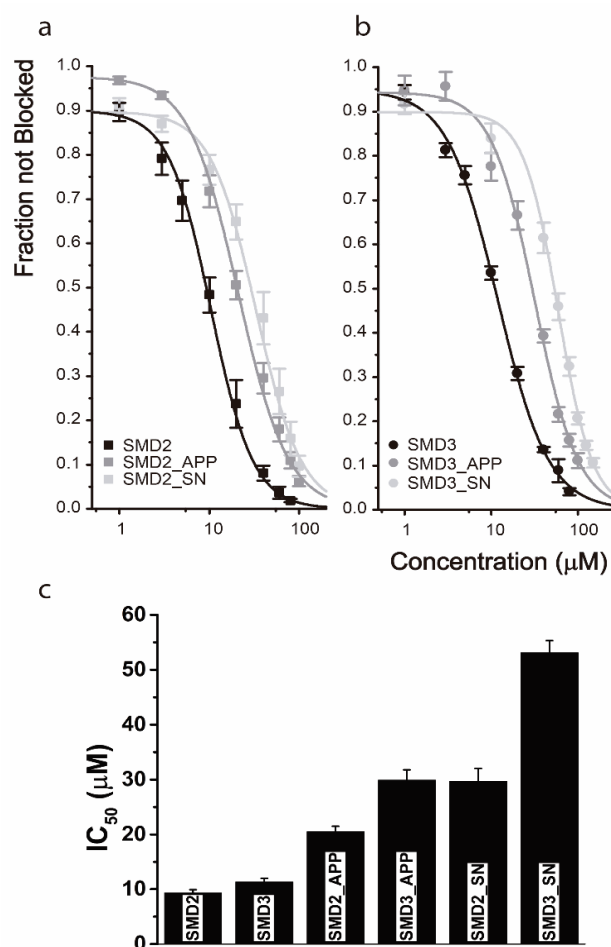


Figura 18. Relações dose-resposta. **a**, **b**. A fração da corrente permanecendo no final do pulso de despolarização (~70 ms) após o tratamento com uma determinada concentração

de droga contendo butil e furfúril grupos em suas estruturas, respectivamente. c.  $IC_{50}$  em gráficos de barras. Figura retirada de Bassetto Junior et al. (2019)<sup>134</sup>

As moléculas SMD2 e SMD3 apresentaram melhores resultados, sequencialmente SMD2\_APP e SMD3\_APP, demonstrando que os substituintes “para” nas sulfonamidas, contribuiu para diminuição do bloqueio. As moléculas SMD2\_SN e SMD3\_SN sem o grupo nitro na posição “meta” também tiveram sua atividade diminuída.

Moléculas análogas ao PABA (ácido paraminobenzóico): Sar\_APP e Sar\_APA contêm ácido carboxílico no substituinte "sulfonamida", mas substituintes diferentes na posição “para” aminopropilpirrolidona em Sar\_APP e aminopropilazepanona em Sar\_APA; a amostra 7 e 8, contendo o grupo OH- no substituinte sulfonamida e no grupo “para” aminopropilpirrolidona na Amostra 7 e aminopropilazepanona no Amostra 8, não apresentaram efeitos inibitórios em canais  $K_v3.1$  como pode-se observar nas figuras 14 e 16 (a,b,c,d).

As moléculas serem reversíveis é um achado importante, pois leva a um entendimento de que após o bloqueio há a uma recuperação de suas propriedades biofísicas intrínsecas e função normal.

Comparando os valores  $IC_{50}$  calculado a partir da equação de Hill, podemos notar que SMD2 foi a molécula mais potente no bloqueio de  $K_v3.1$ . Esses estudos são promissores, pois os canais  $K_v3.1$  estão envolvidos em muitos processos biológicos e canalopatias que podem ser tratadas pela modulação desses canais.

## 4.2 Guanidinas

Inicialmente, SANTO (2017)<sup>122</sup> sintetizou e caracterizou os dez compostos (LQOF-G1 a LQOF-G10) que foram avaliados *in vitro* contra promastigotas de *L. Amazonensis* e sua citotoxicidade frente a macrófagos. Os compostos testados obtiveram bons resultados quando comparados com os medicamentos usuais para o tratamento de leishmaniose (anfotericina B e pentamidina). Os três compostos LQOF-G1, LQOF-G7 e LQOF-G10 por se apresentarem mais tóxicos contra formas promastigotas ( $IC_{50} = 11,51, 15,91$  e  $6,82 \mu M$ , respectivamente) e baixo índice de citotoxicidade, foram testados *in vitro* contra amastigotas de *leishmania*. Entre as três, o composto LQOF-G7 apresentou o melhor resultado de atividade leishmanicida contra as formas intracelulares ( $IC_{50} = 7,1 \mu M$ ) e foi o menos tóxico para os macrófagos ( $CC_{50} = 618,7 \mu M$ ).

O presente trabalho teve como objetivo realizar a síntese e purificação das guanidinas, para a continuação dos testes biológicos com as formas amastigotas e estendeu-se para a avaliação *in vivo* da molécula LQOF-G2; verificando sua influência no sistema renal e hepático em camundongos BALB/c. Esses resultados foram publicados.<sup>123</sup> Também foram sintetizadas novas tiouréias intermediárias e guanidinas que presumimos interessantes para futuros testes de atividade leishmanicida.

As formas promastigotas são extracelulares, residem no intestino do flebotomíneo e se locomovem com seu flagelo para probóscide.<sup>47</sup> Durante uma refeição de sangue o mosquito deposita seus parasitas no hospedeiro vertebrado e quando adentram nas células fagocíticas, se transformam em formas amastigotas. Nessa fase é crucial para os parasitas escapar dos importantes mecanismos de defesa do indivíduo, posteriormente se multiplicando por fissão binária para infectarem outros macrófagos.<sup>41</sup> Sob aspecto clínico as formas amastigotas são mais relevantes, pois estão no hospedeiro vertebrado, levando à doença de leishmaniose.

Considerando a atividade anti-amastigota, os compostos LQOF-G2 e LQOF-G7 foram os mais potentes na eliminação do parasita (Tabela 3). Ambos apresentaram valores próximos de IC<sub>50</sub> em comparação com a pentamidina e anfotericina B, mas valores maiores de CC<sub>50</sub>, um resultado bastante promissor. O IC<sub>50</sub> (metade da concentração inibitória máxima) é um parâmetro para medir a atividade de um composto e corresponde à dose necessária para matar 50% dos parasitas, quanto menor seu valor mais ativo. Já o parâmetro CC<sub>50</sub> (concentração citotóxica para 50% das células) refere-se à concentração necessária para matar 50% das células, nesse caso, os macrófagos; e quanto maior sua concentração, mais inócuo o composto. A seletividade de um novo fármaco é de extrema importância, por interagir apenas com um órgão ou sistema responsável pela patologia. As moléculas LQOF-G2 e LQOF-G7 apresentaram melhores índices de seletividade em relação a LQOF-G1, LQOF-G3, LQOF-G6, LQOF-G8, LQOF-G9. Por conta disso, os estudos posteriores foram conduzidos com a LQOF-G2, molécula que apresentou o resultado mais favorável. O composto LQOF-G4 não apresentou nenhuma atividade anti-amastigota.

		<i>Leishmania amazonensis</i>				Macrofágo		Índice de Seletividade	
Composto	X	IC <sub>50</sub> pro	SD	IC <sub>50</sub> ama	SD	CC <sub>50</sub>	SD	Promastigota	Amastigota
LQOF-G1	NO <sub>2</sub>	11.5	0.7	22.1	3.3	801.9	0.3	<b>69.7</b>	<b>36.4</b>
LQOF-G2	Br	19.6	0.2	5.6	2.5	737.9	1.4	<b>37.7</b>	<b>131.8</b>
LQOF-G3	Cl	19.7	0.1	41.2	4.1	827.4	1.5	<b>42.0</b>	<b>20.1</b>
LQOF-G4	H	22.6	1.1	ND	ND	35.9	5.6	1.6	ND
LQOF-G5	CH <sub>3</sub>	20.9	0.5	24.2	5.2	876.1	1.7	<b>41.9</b>	<b>36.2</b>
LQOF-G6	t-Bu	25.9	0.9	17.2	2.1	1118.9	105.4	<b>43.2</b>	<b>65.0</b>
LQOF-G7	I	15.9	0.9	7.1	0.8	618.7	70.2	<b>38.9</b>	<b>87.1</b>
LQOF-G8	CH <sub>3</sub> O	25.4	1.5	21.1	3.6	836.6	1.6	<b>32.9</b>	<b>39.6</b>
LQOF-G9	F	21.9	1.8	19.0	4.6	865.5	1.7	<b>39.5</b>	<b>45.5</b>
LQOF-G10	CF <sub>3</sub>	6.8	0.2	21.4	0.6	18.6	2.9	2.7	0.8
Pentamidina		7.6	0.1	5.07	1.14	35.7	6.8	4.7	7.0
AmpB		3.2	0.1	4.92	0.14	23.1	2.5	7.2	4.7

Tabela 3. Atividades antiparasitárias (IC<sub>50</sub>-pro/ama, metade da concentração inibitória máxima, mM), toxicidade de células de mamíferos (CC<sub>50</sub>, concentração de citotoxicidade metade máxima, mM) e índice de seletividade (SI  $\frac{1}{4}$  CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>) dos compostos de guanidina. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019.<sup>123</sup>

Os valores de SI em negrito indicam compostos com baixa toxicidade a mamíferos e alta toxicidade a parasitas. Cada valor é a média de três experiências realizadas em triplicado  $\pm$  desvio padrão. Pro: promastigota, ama: amastigota.

A Figura 19 demonstra o índice de infecção no eixo y (porcentagem de macrófagos infectados multiplicado pela média de amastigotas por macrófago) e o tratamento com concentração de 25  $\mu$ M do controle negativo, pentamidina, anfotericina B, LQOF-G2, LQOF-G7, LQOF-G9 e LQOF-G3 no eixo x. A LQOF-G2 e a LQOF-G7 foram capazes de reduzir a infecção (86%, 78%, respectivamente) de forma semelhante

a pentamidina (81%) e anfotericina B (84%). Os outros compostos LQOF-G9 e LQOF-G3 tiveram resultados menos favoráveis (70% e 19%, respectivamente).

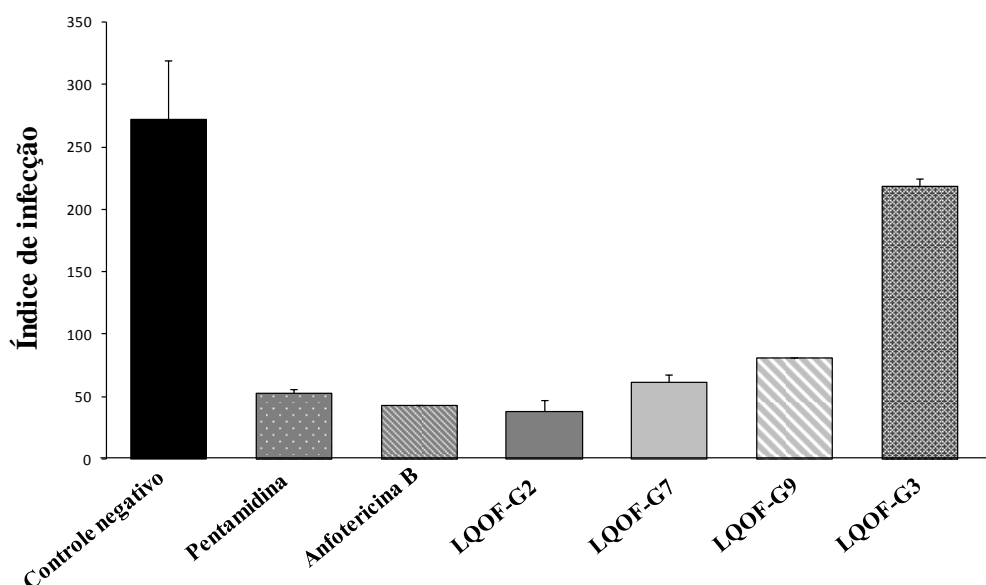


Figura 19. Efeito in vitro de LQOF-G2, G3, G7 e G9 em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019.<sup>123</sup>

Como sugerido por Do Espírito Santo et al. (2019):<sup>123</sup>

É razoável supor que a presença de um substituinte na quarta posição da porção anilina é fundamental para a atividade antileishmania dos compostos N1-benzoil-N2-benzil investigados, os átomos Br e I foram considerados as melhores substituições para a atividade anti-amastigota. (Do Espírito Santo et al. 2019).

As ligações de halogênios estão presentes em muitos sistemas biológicos e podem gerar afinidade, seletividade e permeabilidade dependendo do sítio ativo da proteína. Os agrupamentos carbonila presentes nos aminoácidos, agem como bases de Lewis (eletrons não ligantes sobre o átomo de oxigênio) que doam pares de elétrons para o átomo de halogênio ligado no anel benzênico e formando assim a ligação de halogênio (O-X), as que também podem se formar por ligações dos grupos –OH, que existem na moléculas dos aminoácidos serina, tirosina e treonina.<sup>140</sup> Estudos recentes mostraram que ligações de halogênio com oxigênio, por exemplo, com bromo (Br-O) aumentam a eficácia dos

agonistas do subtipo  $\alpha 4\beta 2$  do receptor nicotínico de acetilcolina e dos inibidores da protease NS3-NS4A do vírus da hepatite C.<sup>141,142</sup>

Como demonstrado na Figura 20, camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (seis semanas após a infecção) foram tratados diariamente por 15 dias com duas doses diferentes de LQOF-G2 e anfotericina B. A LQOF-G2 nas duas concentrações (0,13 e 0,25 mg/kg/dia) teve a carga parasitária mais reduzida (46 e 60%, respectivamente) que a anfotericina B (41%) em uma concentração muito maior (2 mg/kg/dia). O tratamento com LQOF-G2 também diminuiu o tamanho da lesão em ambas as doses em comparação com animais infectados não tratados e animais infectados tratados com PBS e anfotericina B. O composto guanidínico obteve um resultado muito semelhante a anfotericina B em uma dose 4 vezes menor.

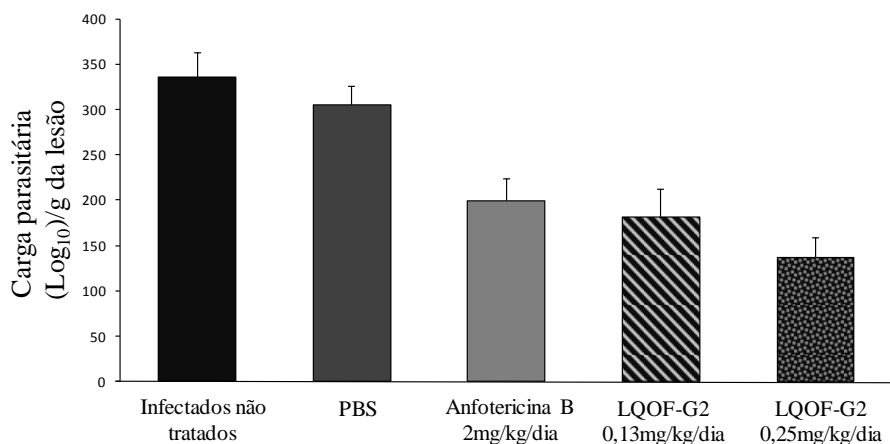


Figura 20. Carga do parasita após o tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* com LQOF-G2. Cinco grupos contendo cinco camundongos BALB / c infectados com *L. amazonensis* foram tratados diariamente com LQOF-G2 ou anfotericina B por 15 dias. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019.<sup>123</sup>

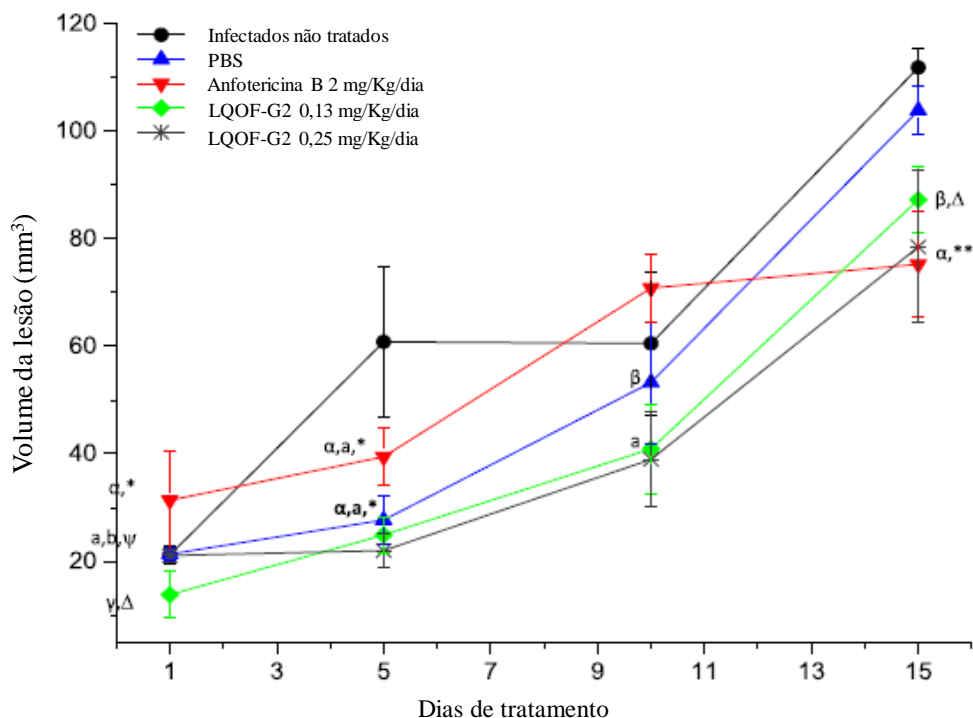


Figura 21. Redução de lesões nas patas em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* tratados com LQOF-G2. Os valores de volume das lesões nos pés foram monitorados a cada 5 dias para validar a eficácia *in vivo* de LQOF-G2. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019.<sup>123</sup>

Para avaliar a toxicidade hepática da LQOF-G2, os níveis plasmáticos de creatinina e uréia (biomarcadores da função renal), ALT, AST e ALP (biomarcadores de dano hepático) e bilirrubina (marcador da função hepática) foram monitorados.

O fígado é um órgão humano importante para diversas funções metabólicas como secretar a bile, armazenar glicose, sintetizar o colesterol e desintoxicar o organismo de drogas.<sup>143</sup>

Alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e alcalino fosfatase (ALP) são enzimas encontradas no fígado e desempenham importantes funções, ALT e AST são utilizadas no metabolismo de aminoácidos e são liberadas no sangue em consequência de dano hepático<sup>144</sup> e ALP tem sua concentração aumentada quando os ductos biliares estão bloqueados. O acúmulo de bilirrubina demonstra a incapacidade do fígado conjuga-la com o ácido glicurônico para ser excretada.<sup>145</sup>

A creatinina e uréia são resultado da metabolização de proteínas da alimentação e eliminados pelos rins. Quando os rins não estão funcionando de forma inadequada, os

níveis de uréia e creatinina tendem a aumentar, logo, podem ser utilizados como biomarcadores renais.<sup>146</sup>

Não pudemos observar alteração nos níveis de creatinina (Figura 22A) e ureia (Figura 22B) no plasma de todos os animais, sugerindo que LQOF-G2 não prejudicou os rins. Os níveis plasmáticos de bilirrubina aumentaram em animais infectados com *L. amazonensis*, tratados ou não (Figura 22C), indicando que o aumento desses níveis é devido à infecção, e não por razão da administração do composto. Os marcadores hepáticos ALP, AST e ALT tiveram seu nível aumentado nos animais infectados, mostrando que a doença por si só prejudica o fígado (Figuras 22D-F). O composto LQOF-G2 foi capaz de reduzir os níveis de ALP (Figura 22D) e ALT (Figura 22F) em todas as doses testadas, e estiveram nos níveis dos animais saudáveis, demonstrando o efeito protetor da molécula LQOF-G2 contra consequências prejudiciais ao fígado da infecção por *L. amazonensis*.

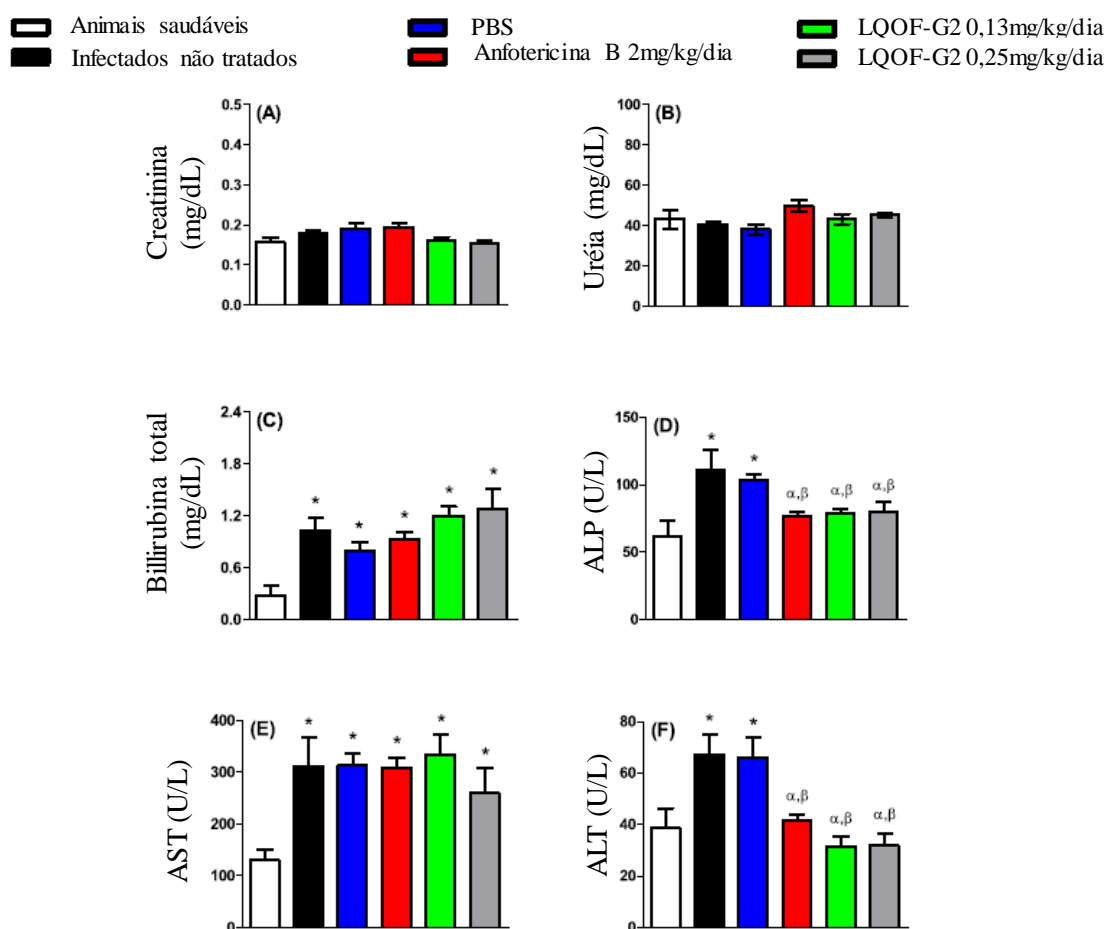


Figura 22. Níveis plasmáticos de biomarcadores de função renal e lesão hepática em camundongos BALB/c não infectados e infectados com *L. amazonensis* e tratados com 0,13 ou 0,25 mg/kg/dia de LQOF-G2. (A) níveis de creatinina; (B) Níveis de uréia; (C)

Níveis totais; (B) Níveis de uréia; (C) Níveis totais de bilirrubina; (D) níveis de ALP; (E) níveis de AST; (F) Níveis de ALT. Tabela adaptada de Do Espírito Santo et. al. 2019.<sup>123</sup>

A anfotericina B e pentamidina, apesar de serem os principais medicamentos para o tratamento da leishmaniose, são tóxicos e com muitos efeitos colaterais relatados. O mecanismo de ação da anfotericina se relaciona principalmente com a formação de poros na membrana celular do parasita, isso acontece pela formação de um complexo entre sua estrutura poliênica com o ergosterol, levando à morte celular.<sup>147</sup> No entanto, a molécula pode interagir com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) muito expressadas no tecido renal e com proteínas de alta densidade (HDL) expressadas no retículo endotelial.<sup>148</sup> A nefrotoxicidade é um efeito bem conhecido na terapia com Anfotericina B que além de interagir com o colesterol das membranas tubulares, provoca vasoconstrição e consequentemente redução da taxa de filtração glomerular.<sup>149</sup> A droga é mal absorvida pelo trato gastrointestinal e apresenta além da toxicidade renal, toxicidade hematológica e hepática, reações agudas infusionais como cefaleia, vômito, febre, náuseas, taquicardia, anemia, alterações de enzimas hepáticas, etc.<sup>150-152</sup>

As formulações lipossomais diminuíram os efeitos colaterais, mas tem alto custo, impossibilitando o tratamento adequado para pacientes com problemas socioeconômicos.<sup>153</sup>

A pentamidina também tem efeitos colaterais relatados como náuseas, tontura, pancreatite, hipoglicemia, cefaleia, arritmias cardíacas, insuficiência renal e diabetes mellitus pela toxicidade aguda sobre células beta-pancreáticas.<sup>154,155</sup>

Visto todos os problemas enfrentados para o tratamento de leishmaniose e necessidade de buscar atividade leishmanicida com menor toxicidade para o hospedeiro, os resultados da LQOF-G2 são bastante animadores. Sua maior seletividade motiva a continuação dos trabalhos com essa molécula e com outros compostos guanidínicos como perspectivas futuras.

## 5. CONCLUSÕES

As sulfonamidas antes reportadas pelo Laboratório de Química Organica Fina (LQOF) foram novamente sintetizadas, obtendo-se bons rendimentos. As mesmas foram testadas frente ao bloqueio de canais iônicos  $K_v3.1$  e demonstraram atividade bloqueadora reversível nos canais, sugerindo, portanto, a elaboração de novas bibliotecas de compostos com atividades nestes canais que possam ser estudados contra diversas patologias associadas ao funcionamento anormal desses canais de potássio.

Novas sulfonamidas foram sintetizadas e caracterizadas por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas (LC/UV/MS) e poderão servir para estudos futuros com canais iônicos.

A molécula LQOF-G2 demonstrou melhor atividade *in vitro* e foi testada *in vivo* contra *L.amazonensis*, apresentando índice de seletividade maior que os medicamentos de tratamento para leishmaniose. A LQOF-G2 não apresentou alterações renais e hepáticas, além de baixa toxicidade frente a macrófagos. Sugere-se a continuação dos trabalhos com a molécula e planejamento, síntese e estudo de novos compostos estruturalmente relacionados com a molécula de LQOF-G2.

Outras guanidinas como a LQOF-G6 e LQOF-G7 mostraram bons resultados nos testes *in vitro* contra *L. amazonensis* e devem ser estudadas *in vivo*.

Uma tioureia e novas guanidinas foram sintetizadas e caracterizadas por técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS), espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS), cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas (LC/UV/MS), apresentando alta pureza. Essas novas moléculas poderão ser testadas para atividade leishmanicida.

## 6. REFERÊNCIAS

- [1] GOLAN, David E. et al. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacologia. **Rio de Janeiro: GEN**, 2014.
- [2] PETKOV, Georgi V. Ion channels. In: **Pharmacology**. Academic Press, 2009. p. 387-427.
- [3] WRIGHT, Stephen H. Generation of resting membrane potential. **Advances in physiology education**, v. 28, n. 4, p. 139-142, 2004.
- [4] HOSOUME, Juliana Mayumi. Ação de anestésicos gerais em canais iônicos. 2016.
- [5] CHRYSAFIDES, Steven M.; SHARMA, Sandeep. Physiology, Resting Potential. **StatPearls [Internet]**, 2020.
- [6] HAMMOND, Constance. **Cellular and molecular neurophysiology**. Academic Press, 2014.
- [7] HOLMGREN, Miguel et al. Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 898-901, 2000.
- [8] PICKARD, Barbara G. Action potentials in higher plants. **The Botanical Review**, v. 39, n. 2, p. 172-201, 1973.
- [9] LETERRIER, Christophe. The axon initial segment: na updated viewpoin. *Journal of Neuroscience*, v. 38, n. 9, p. 2135-2145, 2018.
- [10] GUTMAN, George A. et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. **Pharmacological reviews**, v. 57, n. 4, p. 473-508, 2005.
- [11] ASHCROFT, Frances M. **Ion channels and disease**. Academic press, 1999.
- [12] MARTÍNEZ-PADRÓN, Manuel; FERRÚS, Alberto. Presynaptic Recordings from *Drosophila*: Correlatin of Macroscopic and Single-Channel K<sup>+</sup> Currents. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 3412-3424, 1997.

- [13] BROOKE, Ruth E. et al. Kv3 voltage-gated potassium channels regulate neurotransmitter release from mouse motor nerve terminals. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 3313-3321, 2004.
- [14] GRISSMER, Stephan et al. The Shaw-related potassium channel gene, Kv3. 1, on human chromosome 11, encodes the type I K<sup>+</sup> channel in T cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 29, p. 20971-20979, 1992.
- [15] HODGE, James JL. Ion channels to inactivate neurons in Drosophila. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 2, p. 13, 2009.
- [16] SMITH, Philip et al. Shaw and Shal voltage-gated potassium channels mediate circadian changes in Drosophila clock neuron excitability. **The Journal of physiology**, v. 597, n. 23, p. 5707-5722, 2019.
- [17] MUONA, Mikko et al. A recurrent de novo mutation in KCNC1 causes progressive myoclonus epilepsy. **Nature genetics**, v. 47, n. 1, p. 39-46, 2015.
- [18] LFM, Siqueira. Epilepsias Mioclônicas Progressivas: revisão de aspectos clínicos e moleculares. **Rev Neurocienc**, v. 18, p. 561-71, 2010.
- [19] PARK, Joohyun et al. KCNC1-related disorders: new de novo variants expand the phenotypic spectrum. **Annals of clinical and translational neurology**, v. 6, n. 7, p. 1319-1326, 2019.
- [20] GAN, Li; KACZMAREK, Leonard K. When, where, and how much? Expression of the Kv3. 1 potassium channel in high-frequency firing neurons. **Journal of neurobiology**, v. 37, n. 1, p. 69-79, 1998.
- [21] LIEN, Cheng-Chang; JONAS, Peter. Kv3 potassium conductance is necessary and kinetically optimized for high-frequency action potential generation in hippocampal interneurons. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 2058-2068, 2003.
- [22] MCCROSSAN, Zoe A. et al. MinK-related peptide 2 modulates Kv2. 1 and Kv3. 1 potassium channels in mammalian brain. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 22, p. 8077-8091, 2003.

- [23] LI, Wenge; KACZMAREK, Leonard K.; PERNEY, Teresa M. Localization of two high-threshold potassium channel subunits in the rat central auditory system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 437, n. 2, p. 196-218, 2001.
- [24] LESCH, John E. **The first miracle drugs: how the sulfa drugs transformed medicine**. Oxford University Press, USA, 2007.
- [25] OZAWA, Y. et al. E7070, a novel sulphonamide agent with potent antitumour activity in vitro and in vivo. **European journal of cancer**, v. 37, n. 17, p. 2275-2282, 2001.
- [26] BETZ, Ulrich AK et al. Potent in vivo antiviral activity of the herpes simplex virus primase-helicase inhibitor BAY 57-1293. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1766-1772, 2002.
- [27] WALTER, Maria Elena et al. Antinociceptive properties of chloromaleinimides and their sulphonyl derivatives. **Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry**, v. 337, n. 4, p. 201-206, 2004.
- [28] KLUCZYK, Alicja et al. Drug evolution: p-aminobenzoic acid as a building block. **Current medicinal chemistry**, v. 9, n. 21, p. 1871-1892, 2002.
- [29] GONÇALVES, Renato S. et al. Synthesis of potentially bioactive PABA-related N-(aminoalkyl) lactamic amino acids and esters via selective SN Ar reactions. **Amino acids**, v. 40, n. 1, p. 197-204, 2011.
- [30] GROSS, Michael F. et al. Aryl sulfonamido indane inhibitors of the Kv1. 5 ion channel. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 10, p. 2849-2853, 2007.
- [31] LLOYD, John et al. Benzopyran sulfonamides as KV1. 5 potassium channel blockers. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 12, p. 3271-3275, 2007.
- [32] OLSSON, Roine I. et al. Lactam sulfonamides as potent inhibitors of the Kv1. 5 potassium ion channel. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 5, p. 1269-1273, 2014.
- [33] JUNIOR, Carlos Alberto Zanutto Bassetto; VARANDA, Wamberto Antonio; GONZÁLEZ, Eduardo René Pérez. 4-Chloro-3-nitro-N-butylbenzenesulfonamide acts

on KV 3.1 channels by an open-channel blocker mechanism. **Amino acids**, v. 49, n. 11, p. 1895-1906, 2017.

[34] MARTINS, Carina Couto. Síntese de N-Alquilsulfonamidas análogas do PABA com potencial atividade antagonista de canais iônicos. 2015.

[35] MARTINS, Carina C. et al. Mass spectrometry study of N-alkylbenzenesulfonamides with potential antagonist activity to potassium channels. **Amino acids**, v. 48, n. 2, p. 445-459, 2016.

[36] KEDZIERSKI, Lukasz; EVANS, Krystal J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544, 2014.

[37] MOTA, Luiz Alberto Alves; MIRANDA, Roberta Ribeiro. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 15, n. 3, p. 376-381, 2011.

[38] World Health Organization. (2018). *Health topics, Leishmaniasis*. Retirado de <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>.

[39] GONTIJO, Célia Maria Ferreira; MELO, Maria Norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

[40] Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). *Leishmaniose*. Disponível em: <https://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishtext/html/morfologia.htm>.

[41] DE FREITAS, José CC; PINHEIRO, Diana CSN. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências veterinárias**, v. 109, n. 55, p. 11-20, 2010.

[42] DE MENEZES, Juliana Perrone; SARAIVA, Elvira M.; DA ROCHA-AZEVEDO, Bruno. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2016.

[43] RITTER, Uwe; FRISCHKNECHT, Freddy; VAN ZANDBERGEN, Ger. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009.

- [44] KUPANI, Manu; PANDEY, Rajeev K.; MEHROTRA, Sanjana. Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 4, p. 2255-2267, 2021.
- [45] LIU, Dong; UZONNA, JUDE EZEH. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.
- [46] UENO, Norikiyo; WILSON, Mary E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends in parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012.
- [47] FREITAS, Vanessa Cabreira de et al. **O processo de interação de Leishmania (Leishmania) chagasi com Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis e a importância do lipofosfoglicano (LPG)**. 2010. Tese de Doutorado.
- [48] PALMER, Richard MJ; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, n. 6174, p. 664-666, 1988.
- [49] FONSECA, Simone G. et al. TNF- $\alpha$  mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis. **European journal of immunology**, v. 33, n. 8, p. 2297-2306, 2003.
- [50] DRAPIER, Jean-Claude; WIETZERBIN, Juana; HIBBS JR, John B. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **European journal of immunology**, v. 18, n. 10, p. 1587-1592, 1988.
- [51] HIBBS JR, John B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 157, n. 1, p. 87-94, 1988.
- [52] COLOTTI, Gianni; ILARI, Andrea. Polyamine metabolism in Leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino acids**, v. 40, n. 2, p. 269-285, 2011.
- [53] SCOTT, Phillip; SCHARTON, Tanya. Interaction between the Innate and the Acquired Immune System following Infection of Different Mouse Strains with

Leishmania major a. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 730, n. 1, p. 84-92, 1994.

[54] ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and treatment of leishmaniasis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical infectious diseases**, v. 63, n. 12, p. e202-e264, 2016.

[55] ROYCHOUDHURY, Jayeeta; ALI, Nahid. Sodium stibogluconate: Therapeutic use in the management of leishmaniasis. **Indian journal of biochemistry & biophysics**, v. 45, n. 1, p. 16-22, 2008.

[56] ROBERTS, William L.; BERMAN, Jonathan D.; RAINEY, Petrie M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1234-1239, 1995.

[57] BERMAN, JONATHAN D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 27, n. 6, p. 916-920, 1985.

[58] SANGSHETTI, Jaiprakash N. et al. Antileishmanial drug discovery: comprehensive review of the last 10 years. **Rsc Advances**, v. 5, n. 41, p. 32376-32415, 2015.

[59] EL-YAZIGI, Adnan et al. Pharmacokinetics of antimony in patients treated with sodium stibogluconate for cutaneous leishmaniasis. **Pharmaceutical research**, v. 12, n. 1, p. 113-116, 1995.

[60] OULLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. Mechanisms of drug resistance in Leishmania. **Parasitology Today**, v.9, n.5, p. 150-153, 1993.

[61] ZAGHLOUL, I. Y.; AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 98, n. 8, p. 793-800, 2004.

[62] HEPBURN, Neill C. et al. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **Journal of postgraduate medicine**, v. 49, n. 1, p. 50, 2003.

- [63] RAMOS, H. et al. Amphotericin B kills unicellular leishmanias by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. **The Journal of membrane biology**, v. 152, n. 1, p. 65-75, 1996.
- [64] MBONGO, Nicolas et al. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 352-357, 1998.
- [65] MWENECHANYA, Roy et al. Sterol 14 $\alpha$ -demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, p. e0005649, 2017.
- [66] BROTHERTON, Marie-Christine et al. Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 126-132, 2014.
- [67] ELLIS, MICHAEL E. et al. Double-blind randomized study of the effect of infusion rates on toxicity of amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 1, p. 172-179, 1992.
- [68] BALAÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.
- [69] CALONGE, María M. et al. Effects of cationic diamidines on polyamine metabolism in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. **Life sciences**, v. 59, n. 12, p. PL191-PL197, 1996.
- [70] BERGER, B. J.; FAIRLAMB, A. H. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. **Parasitology**, v. 105, n. S1, p. S71-S78, 1992.
- [71] SUNDAR, Shyam; CHATTERJEE, Mitali. Visceral leishmaniasis-current therapeutic modalities. **Indian Journal of Medicinal Research**, v. 123, n.3, p. 345, 2006.
- [72] DE LIMA SERAFIM, Vanessa et al. New thiophene-acridine compounds: Synthesis, antileishmanial activity, DNA binding, chemometric, and molecular docking studies. **Chemical biology & drug design**, v. 91, n. 6, p. 1141-1155, 2018.

- [73] MAUEL, J. et al. 9-Anilinoacridines as potential antileishmanial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 991-996, 1993.
- [74] WERBOVETZ, K. A. et al. Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania* promastigotes in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 2, p. 495-497, 1992.
- [75] DI GIORGIO, Carole et al. In vitro activities of 7-substituted 9-chloro and 9-amino-2-methoxyacridines and their bis- and tetra-acridine complexes against *Leishmania infantum*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 174-180, 2003.
- [76] DI GIORGIO, Carole et al. Synthesis and antileishmanial activity of 6-mono-substituted and 3, 6-di-substituted acridines obtained by acylation of proflavine. **European journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1277-1284, 2007.
- [77] DELMAS, Florence et al. Synthesis and antileishmanial activity of (1, 3-benzothiazol-2-yl) amino-9-(10H)-acridinone derivatives. **European journal of medicinal chemistry**, v. 39, n. 8, p. 685-690, 2004.
- [78] SRINIVAS, Nagarapu et al. Aryloxy cyclohexyl imidazoles: a novel class of antileishmanial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 2, p. 324-327, 2009.
- [79] MARHADOUR, Sophie et al. Synthesis and biological evaluation of 2, 3-diarylimidazo [1, 2-a] pyridines as antileishmanial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 58, p. 543-556, 2012.
- [80] AL-QAHTANI, Ahmed et al. Inhibition of growth of *Leishmania donovani* promastigotes by newly synthesized 1, 3, 4-thiadiazole analogs. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 17, n. 3, p. 227-232, 2009.
- [81] SURYAWANSHI, S. N. et al. Chemotherapy of leishmaniasis. Part XII: Design, synthesis and bioevaluation of novel triazole integrated phenyl heteroterpenoids as antileishmanial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 10, p. 2925-2928, 2013.

- [82] DOS SANTOS, Maurício S. et al. Synthesis and antileishmanial evaluation of 1-aryl-4-(4, 5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)-1H-pyrazole derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 24, p. 7451-7454, 2011.
- [83] CHAWLA, Anshul; KAUR, Ramandeep; GOYAL, Anju. Importance of microwave reactions in the synthesis of novel benzimidazole derivatives. **ChemInform**, v. 43, n. 14, p. no-no, 2012.
- [84] PAPADOPOULOU, Maria V. et al. Antitrypanosomal activity of 5-nitro-2-aminothiazole-based compounds. **European journal of medicinal chemistry**, v. 117, p. 179-186, 2016.
- [85] RODRIGUES, Carina Agostinho et al. 4-Phenyl-1, 3-thiazole-2-amines as scaffolds for new antileishmanial agents. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2018.
- [86] BHUNIYA, Debnath et al. Aminothiazoles: Hit to lead development to identify antileishmanial agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 102, p. 582-593, 2015.
- [87] DE MELLO, Heloisa et al. Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure– activity relationship analysis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 47, n. 22, p. 5427-5432, 2004.
- [88] MISHRA, Bhuwan B. et al. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 1, p. 107-123, 2009.
- [89] SANGSHETTI, Jaiprakash N. et al. Synthesis, antileishmanial activity and docking study of N'-substitutedbenzylidene-2-(6, 7-dihydrothieno [3, 2-c] pyridin-5 (4H)-yl) acetohydrazides. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 6, p. 1605-1610, 2014.
- [90] STEPHENS, Chad E. et al. The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2, 5-diarylfurans versus Trypanosoma cruzi and Leishmania donovani. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, n. 12, p. 2065-2069, 2003.

[91] GREENHILL, J. V.; Lue, P.; Prog. Med. Chem. 1993; 30, 203-326. To reviews of natural products containing the guanidine nuclei, see: (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.

[92] D. DO ESPIRITO SANTO, Rafael et al. Use of guanidine compounds in the treatment of neglected tropical diseases. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 20, p. 2572-2602, 2014.

[93] SCHLOSSER, Manfred et al. Superbases for organic synthesis. **Pure Appl. Chem**, v. 60, n. 11, p. 1627-1634, 1988.

[94] SACZEWSKI, Franciszek; BALEWSKI, Łukasz. Biological activities of guanidine compounds. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 19, n. 10, p. 1417-1448, 2009.

[95] WATANABE, C. K. Studies in the Metabolic Changes Induced by Administration of Guanidine Bases. II. The Influence of Guanidine upon Urinary Ammonia and Acid Secretion. **J. Biol. Chem.**, v. 34, p. 51, 1918.

[96] BAILEY, Clifford J. Metformin: historical overview. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1566-1576, 2017.

[97] MEGLASSON, MARTIN D. et al. Antihyperglycemic Action of Guanidinoalkanoic Acids: 3-Guanidinopropionic Acid Ameliorates Hyperglycemia in Diabetic KKA<sup>y</sup> and C57BL6J ob/ob Mice and Increases Glucose Disappearance in Rhesus Monkeys. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 266, n. 3, p. 1454-1462, 1993.

[98] TILTON, Ronald G. et al. Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines: inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation. **Diabetes**, v. 42, n. 2, p. 221-232, 1993.

[99] PERLA, Venu; JAYANTY, Sastry S. Biguanide related compounds in traditional antidiabetic functional foods. **Food chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1574-1580, 2013.

- [100] SZÚCS, Zsolt et al. N-Terminal guanidine derivatives of teicoplanin antibiotics strongly active against glycopeptide resistant *Enterococcus faecium*. **The Journal of antibiotics**, p. 1-12, 2020.
- [101] FAIR, Richard J. et al. Selectively guanidinylated aminoglycosides as antibiotics. **ChemMedChem**, v. 7, n. 7, p. 1237-1244, 2012.
- [102] TENG, Peng et al. Novel bis-cyclic guanidines as potent membrane-active antibacterial agents with therapeutic potential. **Chemical Communications**, v. 53, n. 87, p. 11948-11951, 2017.
- [103] ZAMPERINI, Claudio et al. Identification, synthesis and biological activity of alkyl-guanidine oligomers as potent antibacterial agents. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.
- [104] PASERO, Carolina et al. Alkyl-guanidine compounds as potent broad-spectrum antibacterial agents: chemical library extension and biological characterization. **Journal of medicinal chemistry**, v. 61, n. 20, p. 9162-9176, 2018.
- [105] CHANG, LengChee; WHITTAKER, Noel F.; BEWLEY, Carole A. Crambescidin 826 and dehydrocrambine A: new polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Monanchora* sp. that inhibit HIV-1 fusion. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 11, p. 1490-1494, 2003.
- [106] PORTOGHESE, Philip S. Molecular recognition at kappa opioid receptors. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 9, p. 1387-1391, 2001.
- [107] CLARK, Robin D. et al. Discovery and SAR development of 2-(phenylamino)imidazolines as postacyclin receptor antagonists. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, n. 4, p. 1053-1056, 2004.
- [108] VOETS, Thomas et al. Sensing with TRP channels. **Nature chemical biology**, v. 1, n. 2, p. 85-92, 2005.
- [109] QUINTANAR-AUDELO, Martina et al. Design and synthesis of indole-based peptoids as potent noncompetitive antagonists of transient receptor potential vanilloid 1. **Journal of medicinal chemistry**, v. 50, n. 24, p. 6133-6143, 2007.

- [110] DARDONVILLE, Christophe et al. DNA binding affinity of bisguanidine and bis (2-aminoimidazoline) derivatives with in vivo antitrypanosomal activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 49, n. 12, p. 3748-3752, 2006.
- [111] GUETZOYAN, Lucie et al. In vitro efficiency of new acridyl derivatives against Plasmodium falciparum. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 15, n. 9, p. 3278-3289, 2007.
- [112] AMR, El-Demerdash et al. Comprehensive Virtual Screening of the Antiviral Potentialities of Marine Polycyclic Guanidine Alkaloids against SARS-CoV-2 (Covid-19)(preprint). 2020.
- [113] HUA, Hui-ming et al. Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge Monanchora unguifera. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 24, p. 6461-6464, 2004.
- [114] BILBAO-RAMOS, Pablo et al. Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. **Parasitology international**, v. 61, n. 4, p. 604-613, 2012.
- [115] SANTOS, Mario FC et al. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge Monanchora arbuscula. **Journal of natural products**, v. 78, n. 5, p. 1101-1112, 2015.
- [116] LINTON, Brian R. et al. A versatile one-pot synthesis of 1, 3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates. **The Journal of organic chemistry**, v. 65, n. 5, p. 1566-1568, 2000.
- [117] SINGH, Atul K.; CHAWLA, Ruchi; YADAV, Lal Dhar S. In situ slow release of isocyanates: synthesis and organocatalytic application of N-acylureas. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 37, p. 5099-5102, 2013.
- [118] WU, Yong-Qian et al. Direct synthesis of guanidines using di (imidazole-1-yl) methanimine. **The Journal of organic chemistry**, v. 67, n. 21, p. 7553-7556, 2002.
- [119] YU, Yongping; OSTRESH, John M.; HOUGHTEN, Richard A. Solid-phase synthesis of 1, 5-disubstituted 2-aryliminoimidazolidines. **The Journal of organic chemistry**, v. 67, n. 9, p. 3138-3141, 2002.

- [120] CUNHA, Silvio; RODRIGUES JR, Manoel T. The first bismuth (III)-catalyzed guanylation of thioureas. **Tetrahedron letters**, v. 47, n. 39, p. 6955-6956, 2006.
- [121] ESTEVES, H.; Síntese de benzoilguanidinas a partir de benzoiltioureas utilizando hidroperóxido de terc-butila: abordagens clássica e "on-water" e estudos mecanísticos. Dissertação de mestrado. – Universidade Estadual de Londrina (UEL), 2016.
- [122] SANTO, Rafael Dias do Espírito. Síntese e caracterização de compostos guanidínicos e estudo da atividade leishmanicida. 2017.
- [123] DO ESPIRITO SANTO, Rafael Dias et al. N, N', N''-trisubstituted guanidines: Synthesis, characterization and evaluation of their leishmanicidal activity. **European journal of medicinal chemistry**, v. 171, p. 116-128, 2019.
- [124] HAMILL, Owen P. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. **Pflügers Archiv**, v. 391, n. 2, p. 85-100, 1981.
- [125] GRISSMER, Stephan et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1. 1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 6, p. 1227-1234, 1994.
- [126] FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, Olga. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Experimental parasitology**, v. 18, n. 2, p. 195-202, 1966.
- [127] VELÁSQUEZ, Angela et al. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1032-1039, 2016.
- [128] PASSALACQUA, Thais Gaban et al. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 16, p. 3342-3345, 2015.
- [129] MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

- [130] LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 80-82, 1997.
- [131] DE ALMEIDA, Letícia et al. In vivo antileishmanial activity and histopathological evaluation in *Leishmania infantum* infected hamsters after treatment with a furoxan derivative. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 536-547, 2017.
- [132] VELÁSQUEZ, Angela Maria Arenas et al. Efficacy of a binuclear cyclopalladated compound therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis* and its inhibitory effect on topoisomerase 1B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, 2017.
- [133] EDWARDS, Phillip M. Origin 7.0: scientific graphing and data analysis software. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 42, n. 5, p. 1270-1271, 2002.
- [134] JUNIOR, Carlos Alberto Zanutto Bassetto et al. Benzenesulfonamides act as open-channel blockers on KV 3.1 potassium channel. **Amino acids**, v. 51, n. 2, p. 355-364, 2019.
- [135] SNYDERS, J. et al. Time-, voltage-, and state-dependent block by quinidine of a cloned human cardiac potassium channel. **Molecular pharmacology**, v. 41, n. 2, p. 322-330, 1992.
- [136] ARMSTRONG, Clay M. Inactivation of the potassium conductance and related phenomena caused by quaternary ammonium ion injection in squid axons. **The Journal of general physiology**, v. 54, n. 5, p. 553-575, 1969.
- [137] CHOI, Bok Hee et al. Effects of norfluoxetine, the major metabolite of fluoxetine, on the cloned neuronal potassium channel Kv3. 1. **Neuropharmacology**, v. 41, n. 4, p. 443-453, 2001.
- [138] KIM, Sung Eun et al. Open channel block of A-type, kv4. 3, and delayed rectifier K<sup>+</sup> channels, Kv1. 3 and Kv3. 1, by sibutramine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, n. 2, p. 753-762, 2007.

- [139] SUNG, Min Ji et al. Open channel block of Kv3. 1 currents by fluoxetine. **Journal of pharmacological sciences**, v. 106, n. 1, p. 38-45, 2008.
- [140] WILCKEN, Rainer et al. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1363-1388, 2013.
- [141] ROHDE, Line Aagot Hede et al. Intersubunit bridge formation governs agonist efficacy at nicotinic acetylcholine  $\alpha 4\beta 2$  receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 6, p. 4248-4259, 2012.
- [142] LEMKE, Christopher T. et al. Combined X-ray, NMR, and kinetic analyses reveal uncommon binding characteristics of the hepatitis C virus NS3-NS4A protease inhibitor BI 201335. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 11434-11443, 2011.
- [143] CAMPBELL, Iain. Liver: functional anatomy and blood supply. **Anaesthesia & intensive care medicine**, v. 7, n. 2, p. 49-51, 2006.
- [144] NELSON, David L.; COX, Michael M. Leninger princípios de bioquímica. In: **Leninger princípios de bioquímica**. 2002. p. 975-975.
- [145] YANG, Xi et al. Hepatic toxicity biomarkers. In: **Biomarkers in Toxicology**. Academic Press, 2014. p. 241-259.
- [146] PERES, Luis Alberto Batista et al. Biomarcadores da injúria renal aguda. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 35, n. 3, p. 229-236, 2013.
- [147] LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin b. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151-162, 2005.
- [148] WALSH, Thomas J. et al. Safety, Tolerance, and Pharmacokinetics of High-Dose Liposomal Amphotericin B (AmBisome) in Patients Infected with *Aspergillus* Species and Other Filamentous Fungi: Maximum Tolerated Dose Study. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3487-3496, 2001.
- [149] MONZOTE, Lianet. Current treatment of leishmaniasis: a review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, n. 1, 2009.

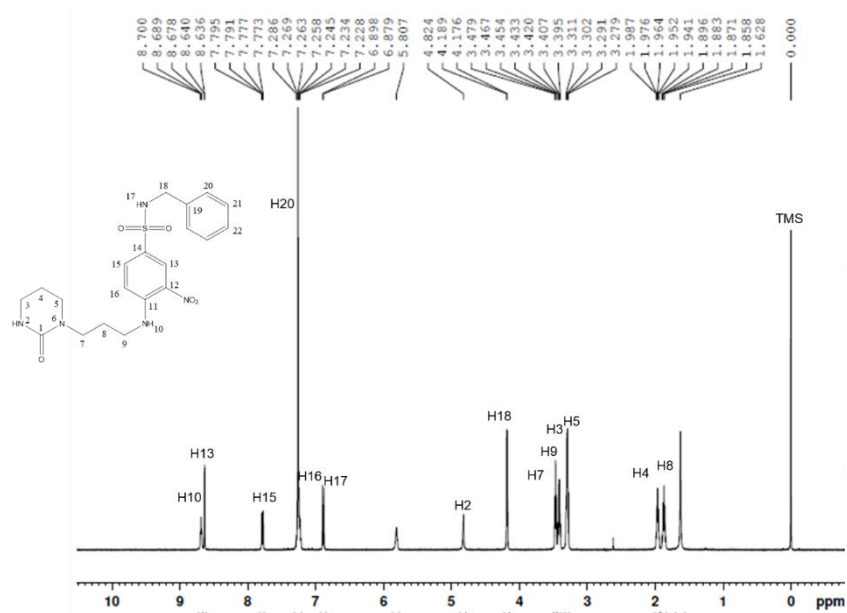
- [150] LANIADO-LABORÍN, Rafael; CABRALES-VARGAS, Maria Noemí. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista iberoamericana de micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.
- [151] ELLIS, MICHAEL E. et al. Double-blind randomized study of the effect of infusion rates on toxicity of amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 36, n. 1, p. 172-179, 1992.
- [152] MOYSSAKIS, Ioannis et al. Reversible dilated cardiomyopathy associated with amphotericin B treatment. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 444-447, 2005.
- [153] FALCI, Diego Rodrigues; PASQUALOTTO, Alessandro Comaru. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, 2015.
- [154] AMATO, Valdir Sabbaga et al. Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana, com lesão em mucosa, por meio do isotionato de pentamidina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, p. 477-481, 1996.
- [155] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.: il.

# ANEXOS

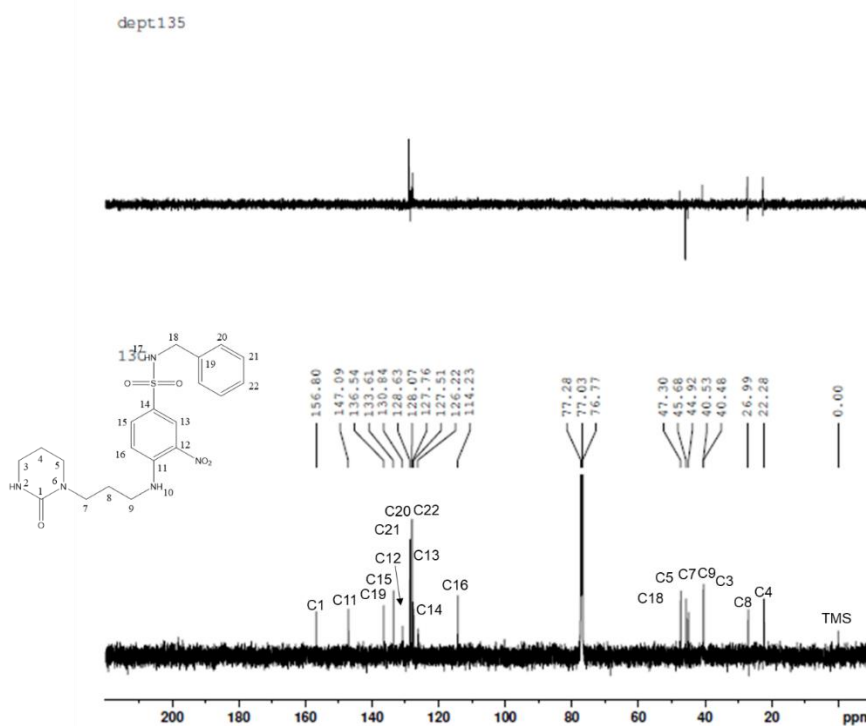
## SEÇÃO DE ESPECTROS

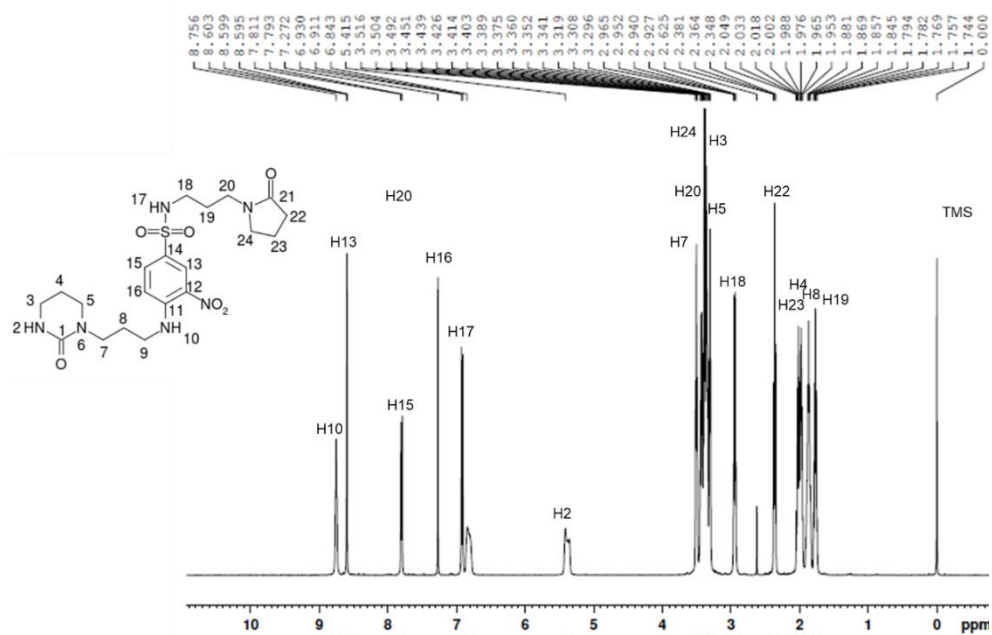
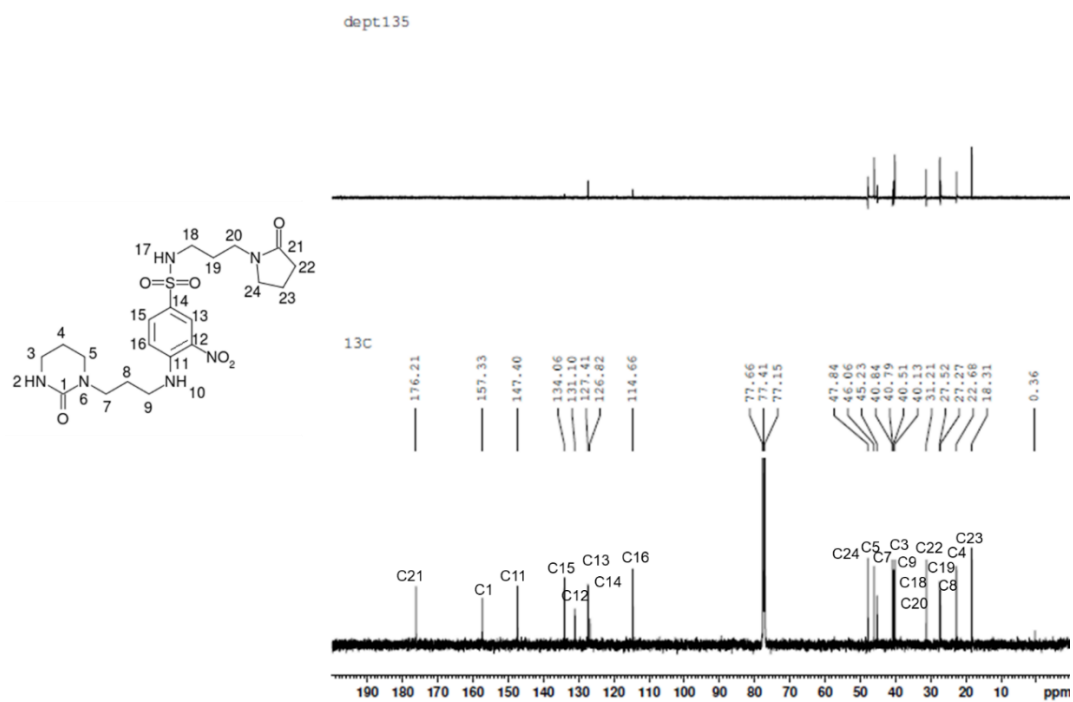
# RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

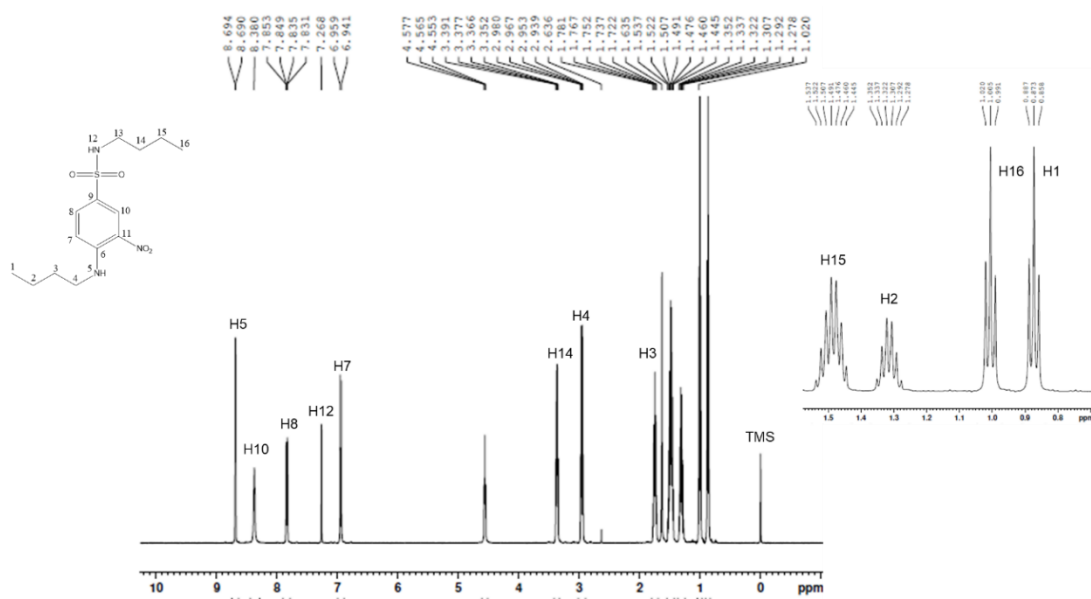
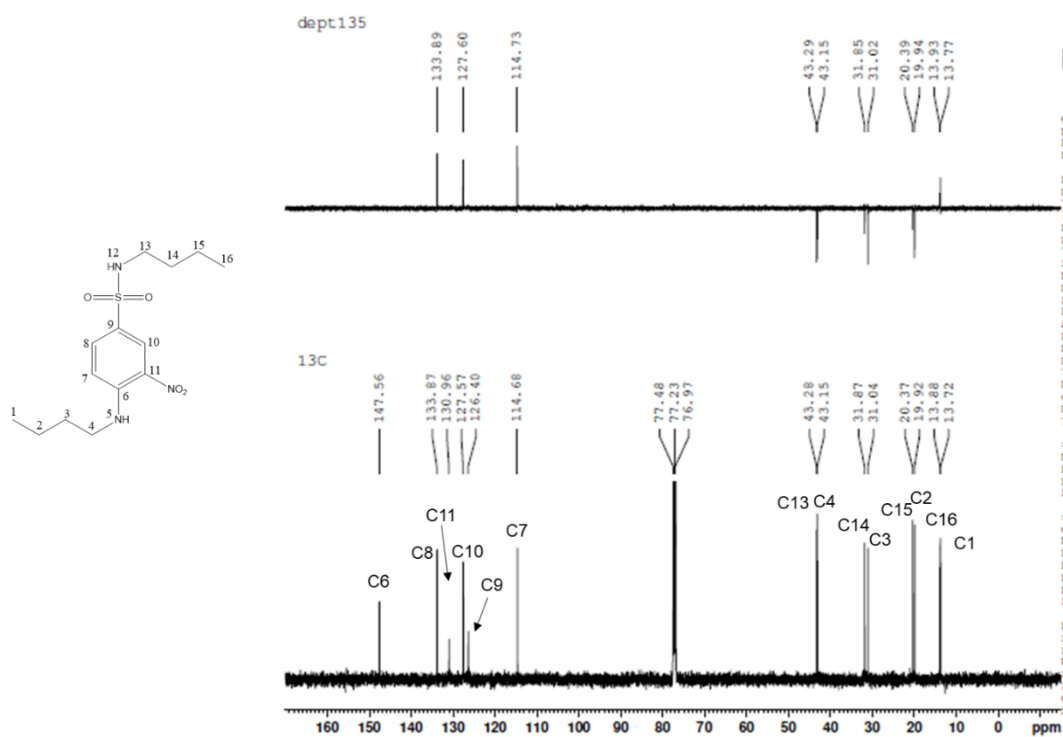
## LQOF-S7 - RMN de $^1\text{H}$

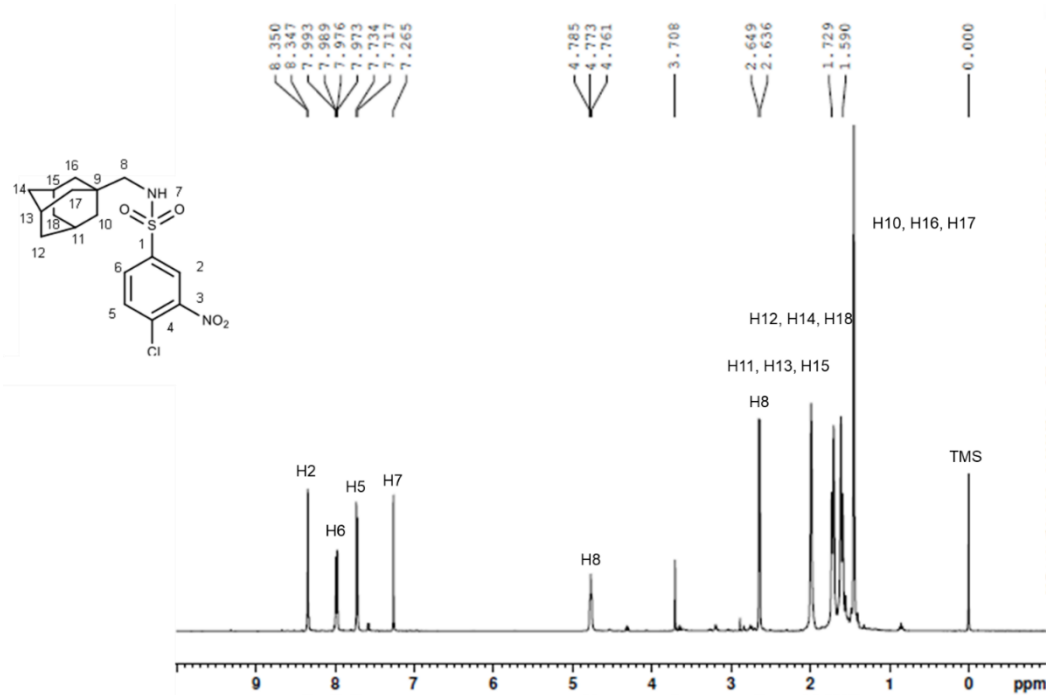
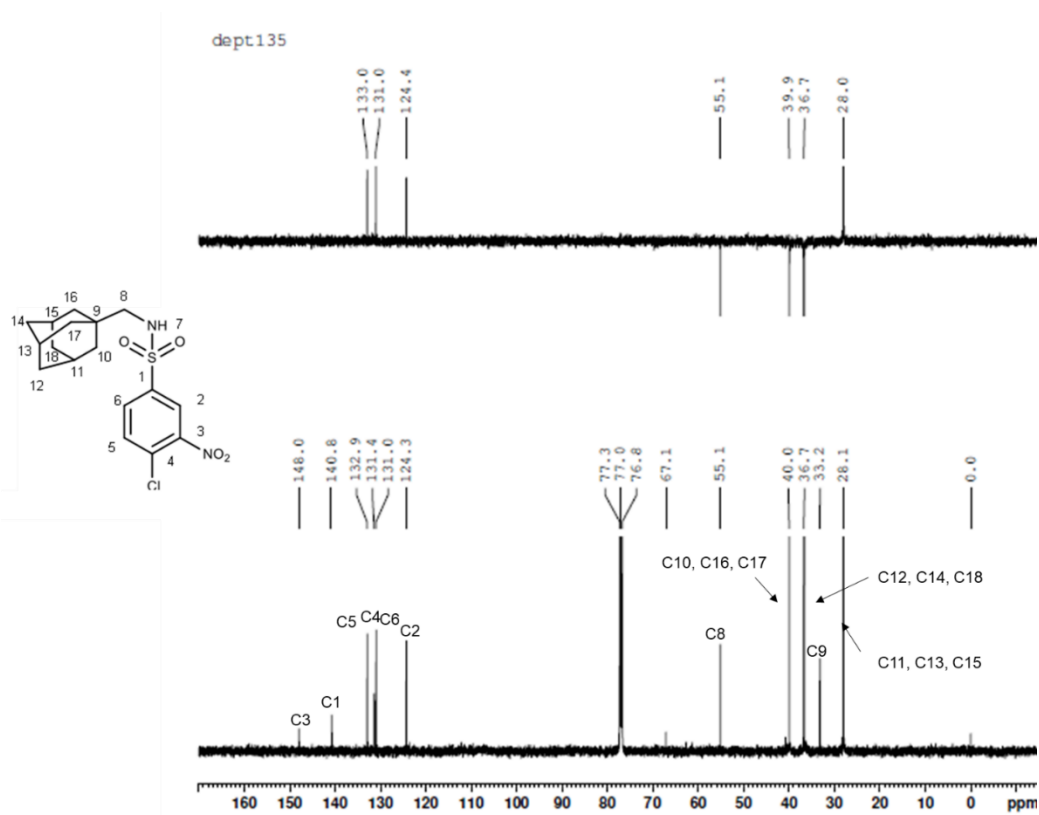


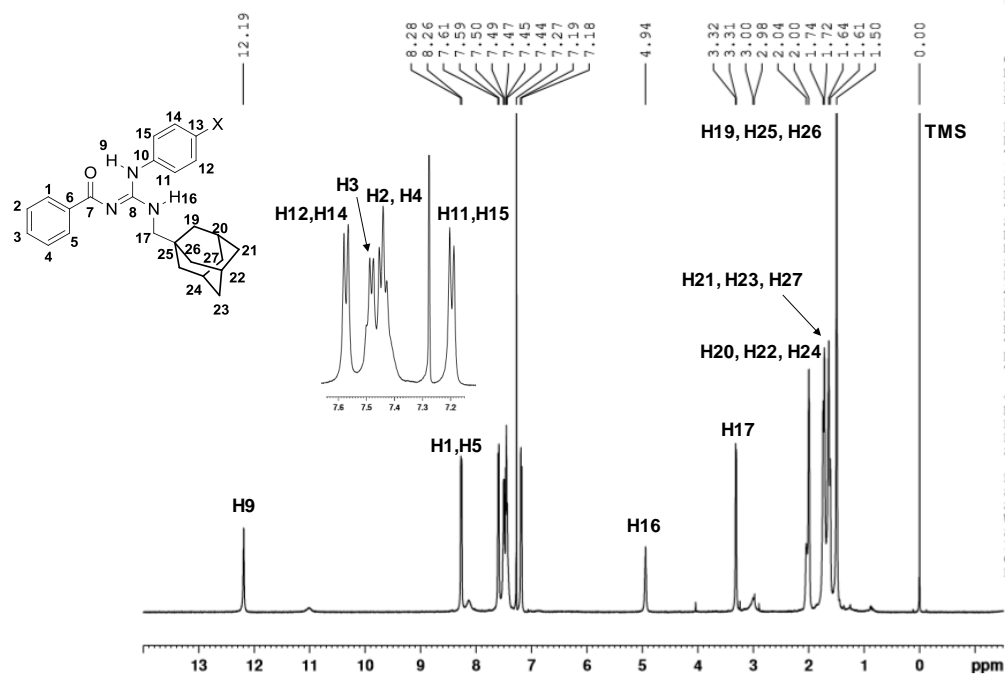
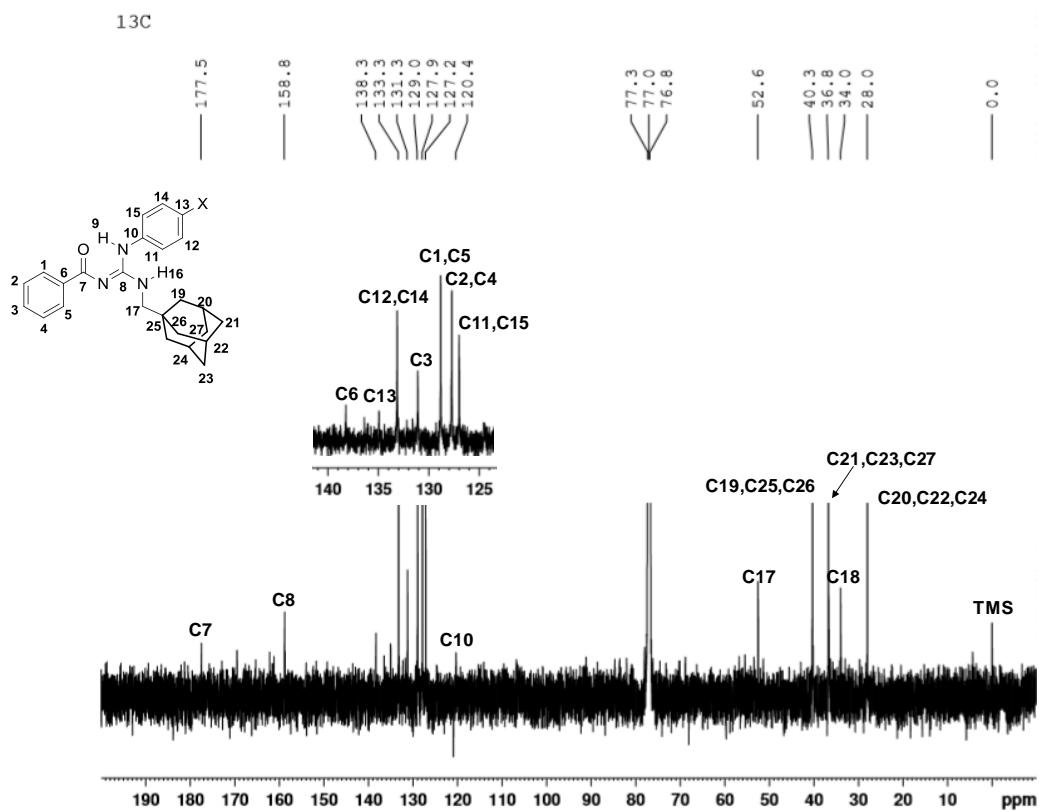
## LQOF-S7 - RMN de $^{13}\text{C}$



LQOF-S8 - RMN de  $^1\text{H}$ LQOF-S8 - RMN de  $^{13}\text{C}$ 

LQOF-S9 - RMN de  $^1\text{H}$ LQOF-S9 - RMN de  $^{13}\text{C}$ 

LQOF-S10 - RMN de  $^1\text{H}$ LQOF-S10 - RMN de  $^{13}\text{C}$ 

LQOF-G29 - RMN de  $^1\text{H}$ LQOF-G29 - RMN de  $^{13}\text{C}$ 

## ESI-(+)-MS/MS

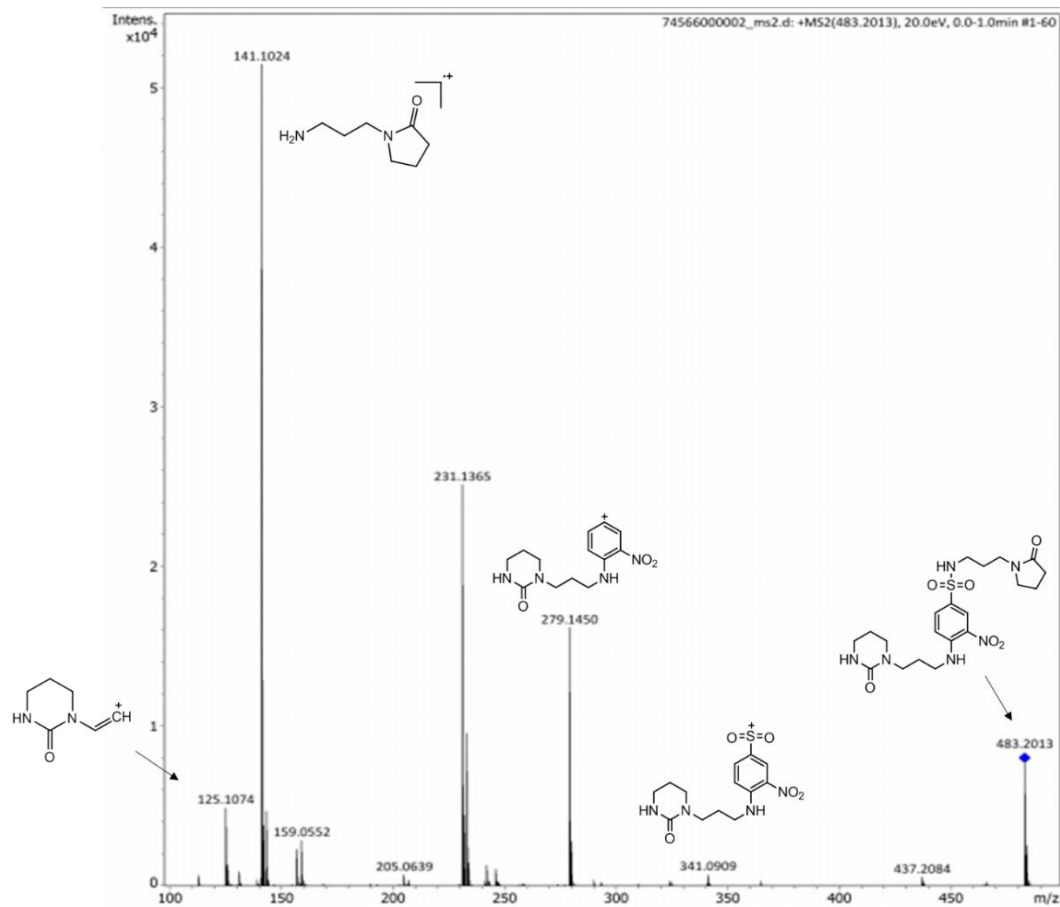
### LQOF-S8 ESI-(+)MS



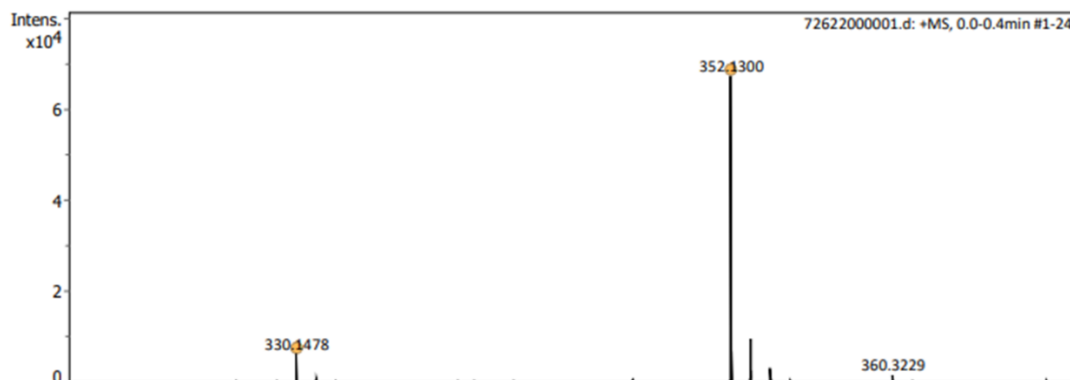
**m/z 483,2019:** C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S

**m/z 505,1840:** C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>6</sub>S

### LQOF-S8 ESI-(+)MS/MS



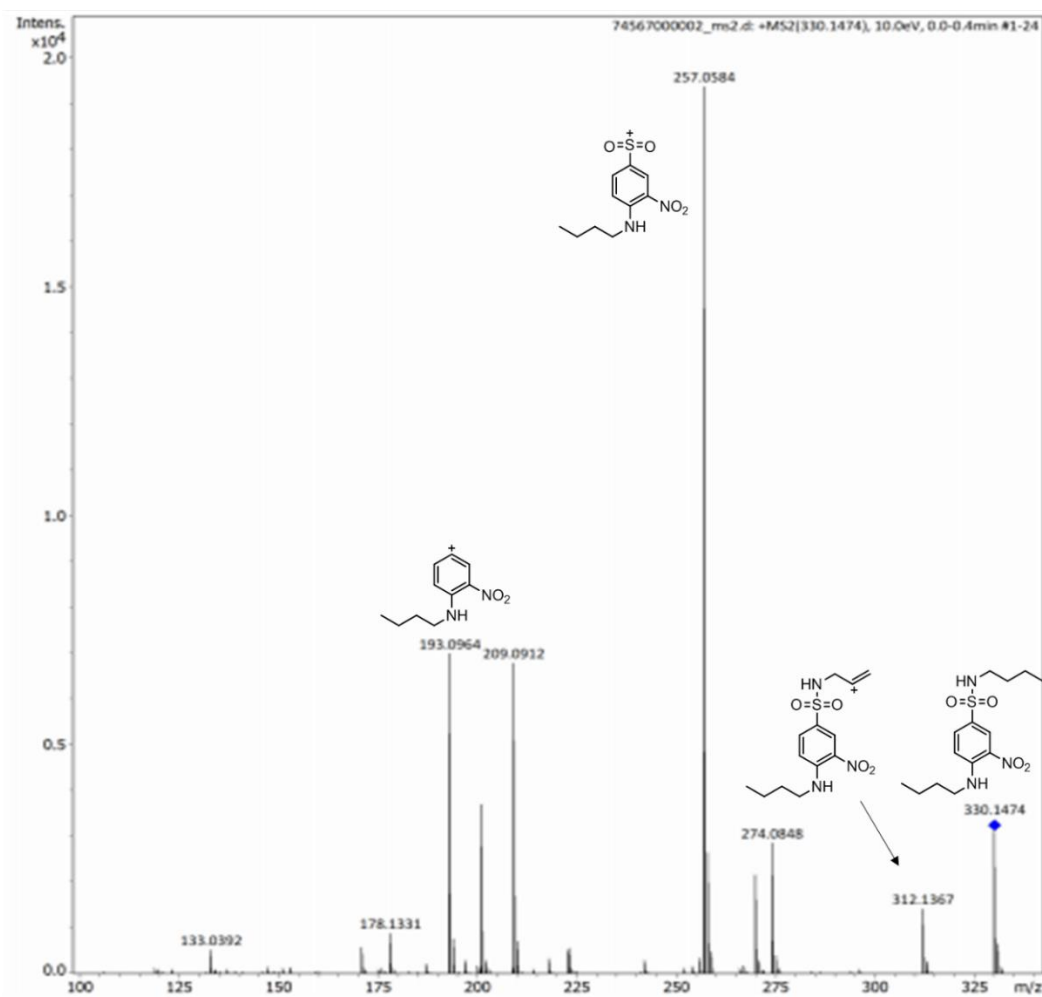
### LQOF-S9 ESI-(+)MS

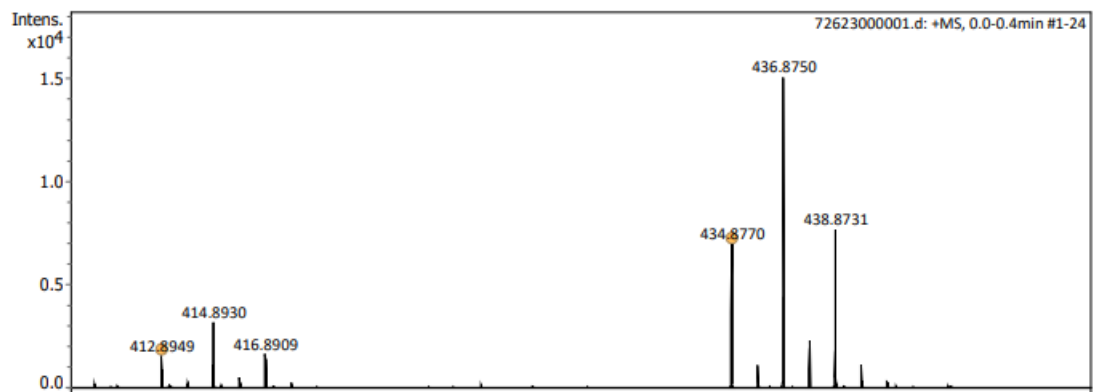


**m/z 330,1478:** C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

**m/z 352,1300:** C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub>S

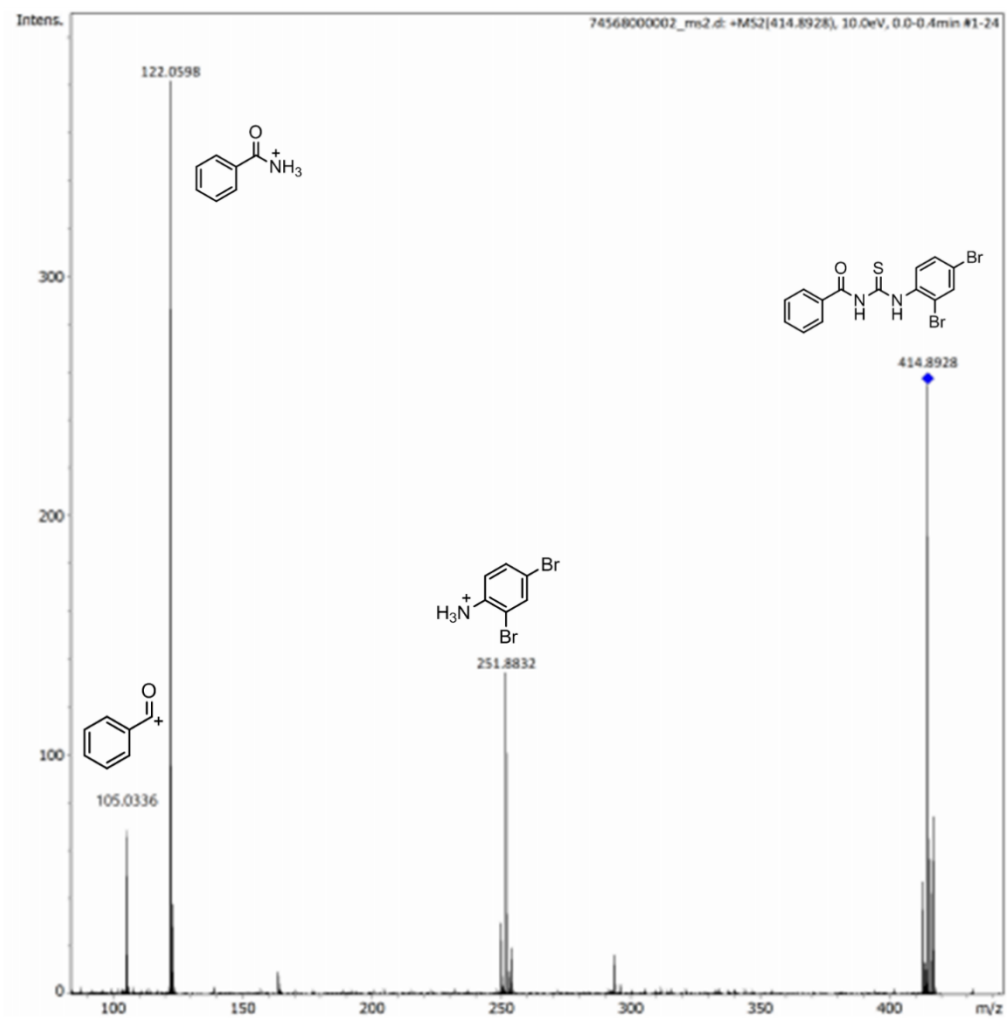
### LQOF-S9 ESI-(+)MS/MS



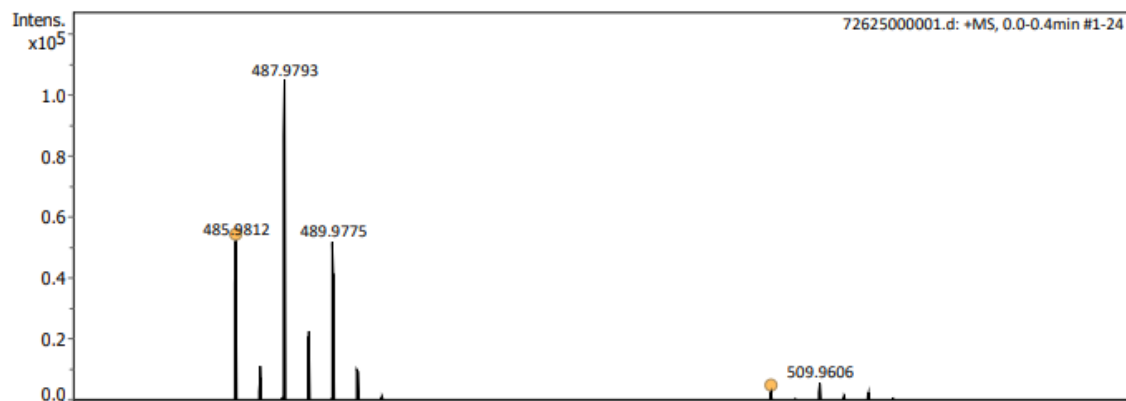
**LQOF-T2 ESI-(+)MS**

**m/z 412,8949:** C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS

**m/z 434,8770:** C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>2</sub>NaOS

**LQOF-T2 ESI-(+)MS/MS**

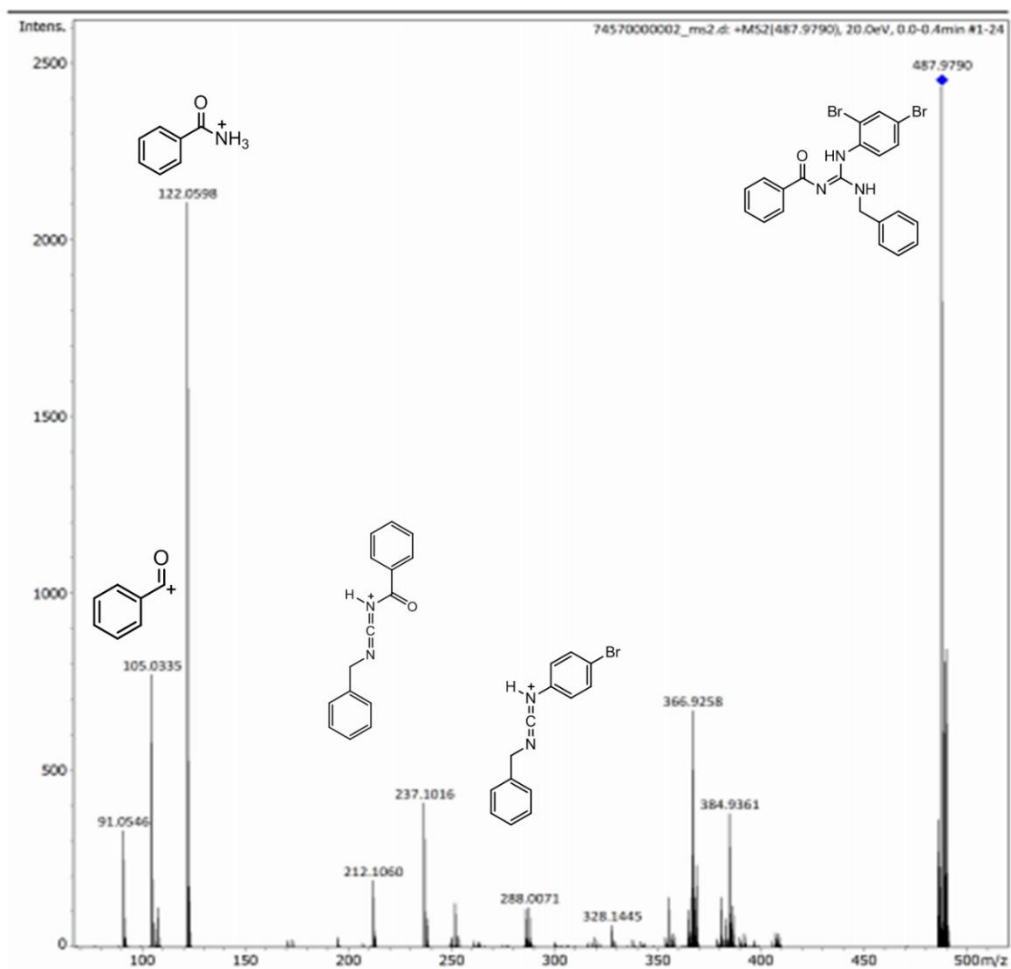
### LQOF-G30 ESI-(+)MS

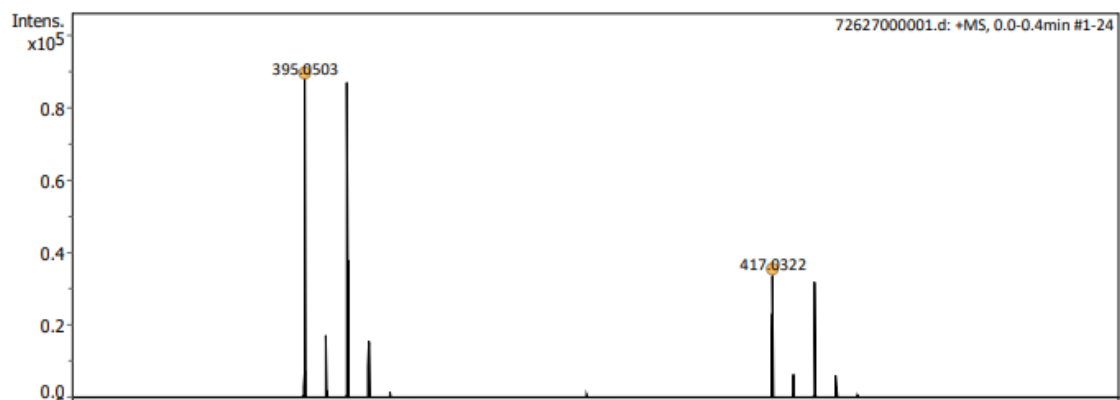


**m/z 485,9812:**  $C_{21}H_{17}Br_2N_3O$

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

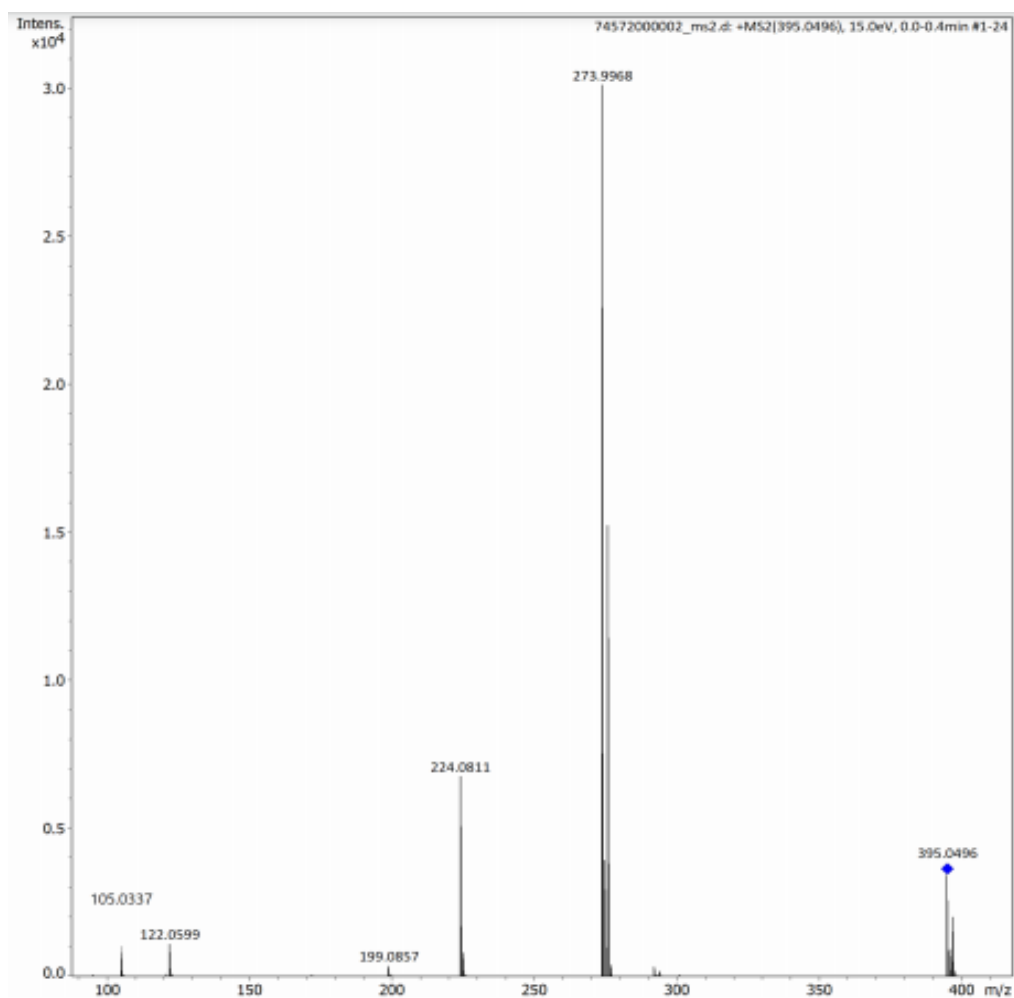
### LQOF-G30 ESI-(+)MS/MS

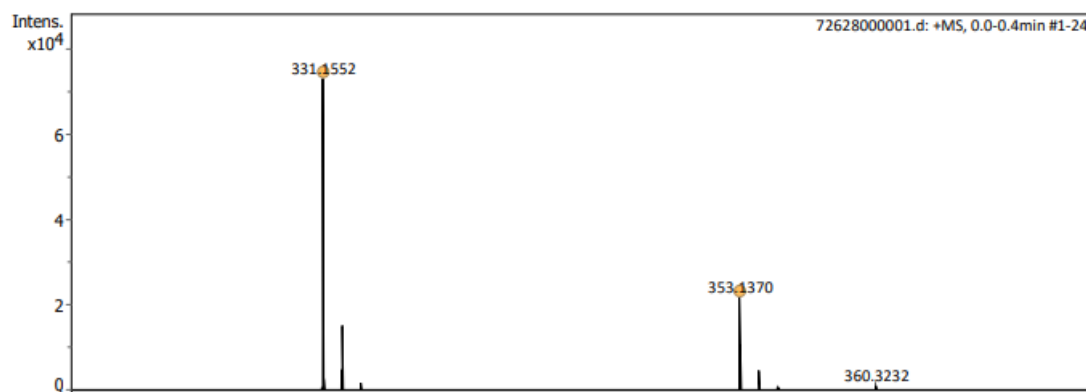


**LQOF-G33 ESI-(+)MS**

**m/z 395,0503:**  $C_{19}H_{15}BrN_4O$

**m/z 417,0322**  $C_{19}H_{14}BrNaN_4O$

**LQOF-G33 ESI-(+)MS/MS**

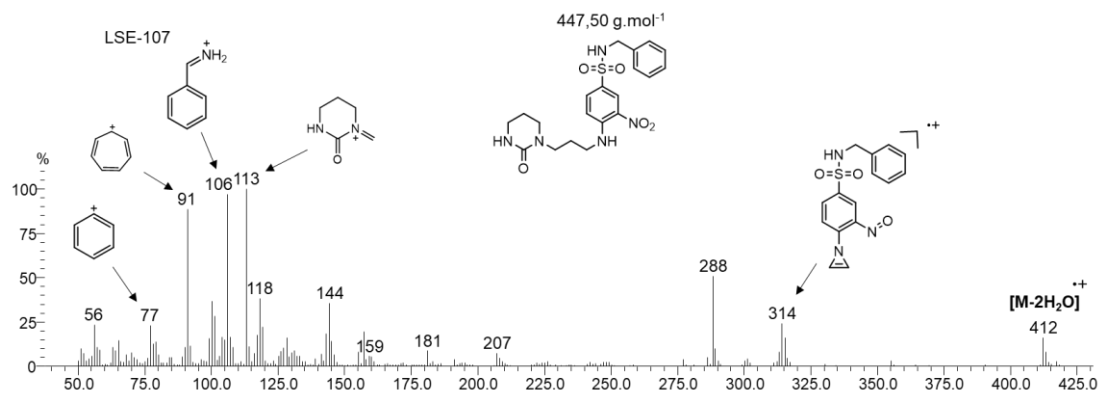
**LQOF-G34 ESI-(+)MS**

**m/z 331,1552:** C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

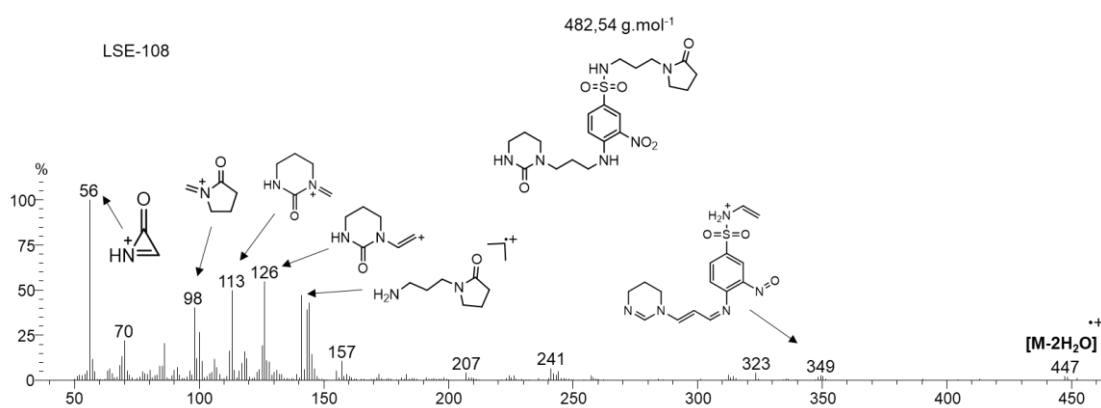
**m/z 353,1370** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>5</sub>

# EI-MS

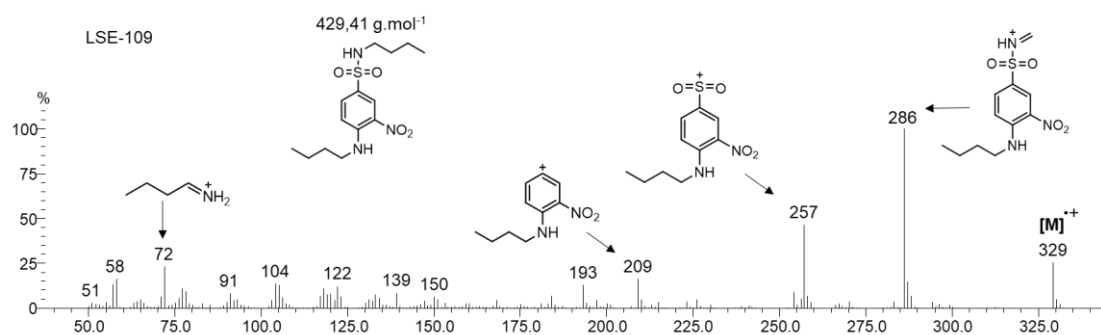
## LQOF-S7 EI-MS



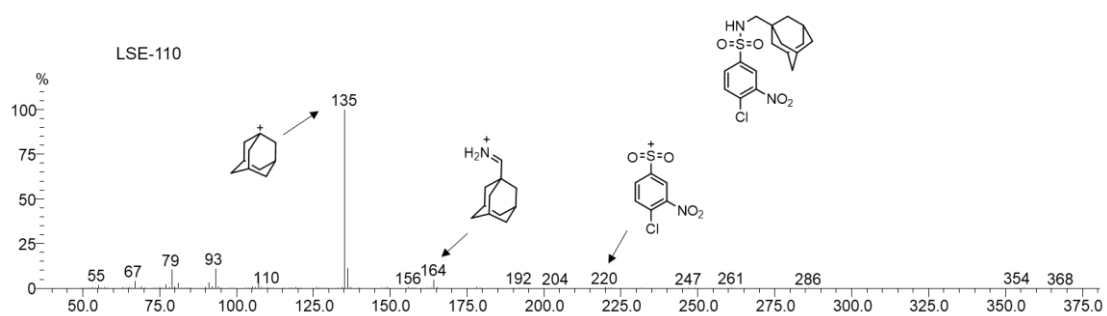
## LQOF-S8 EI-MS



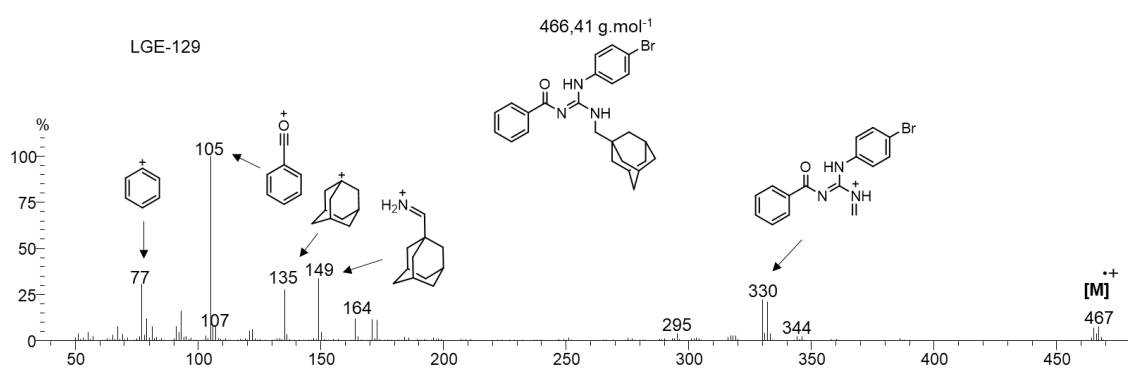
## LQOF-S9 EI-MS



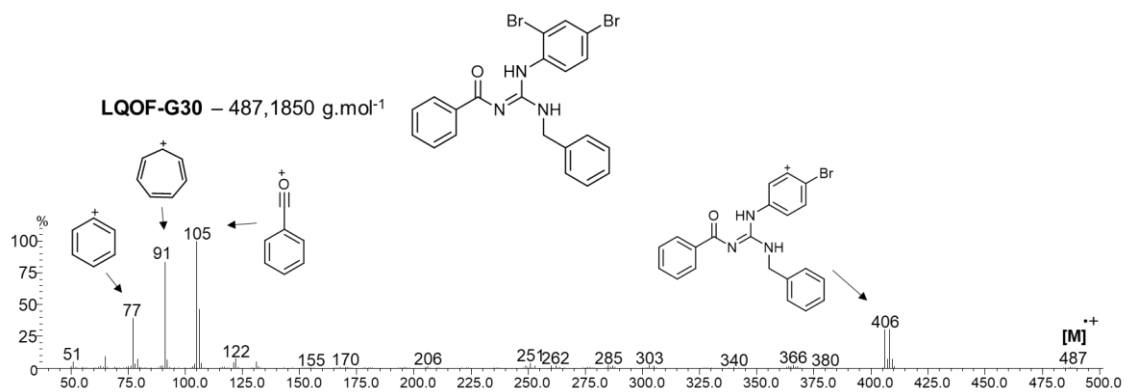
### LQOF-S10 EI-MS



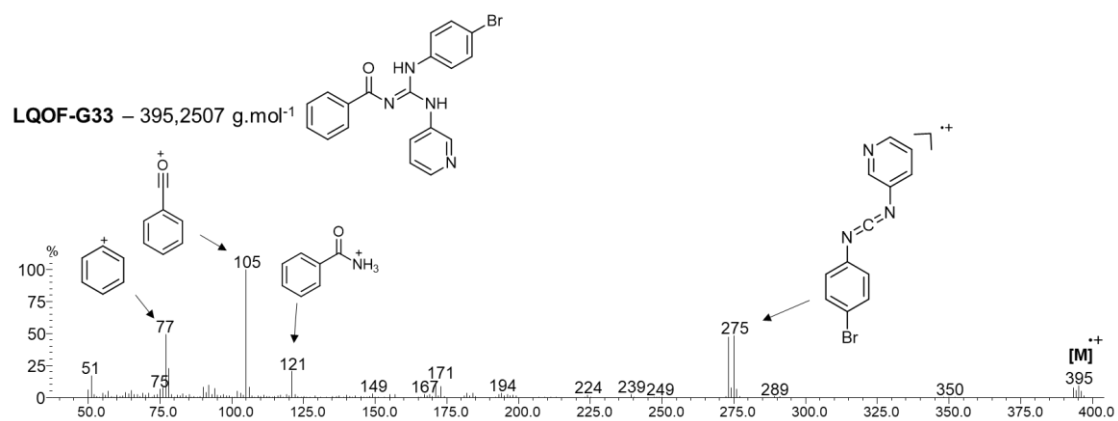
### LQOF-G29 EI-MS



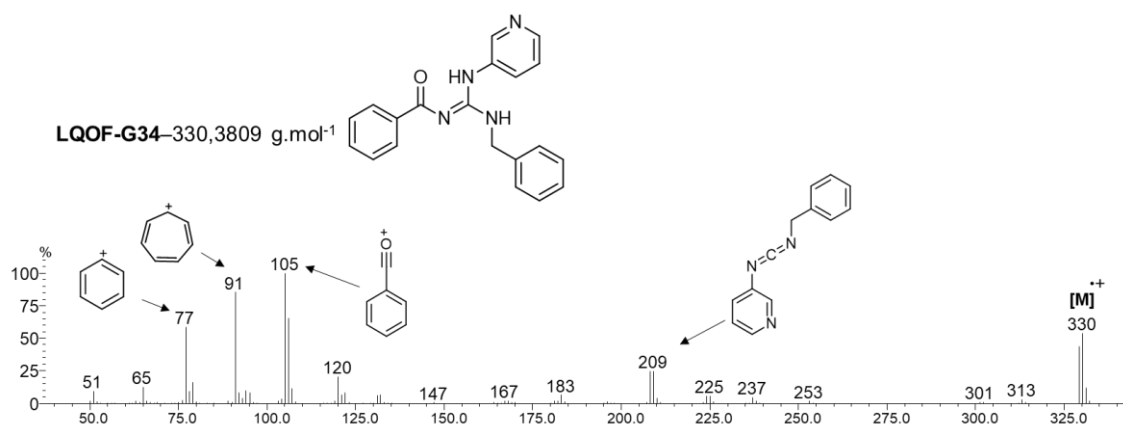
### LQOF-G30 EI-MS



### LQOF-G33 EI-MS



### LQOF-G34 EI-MS

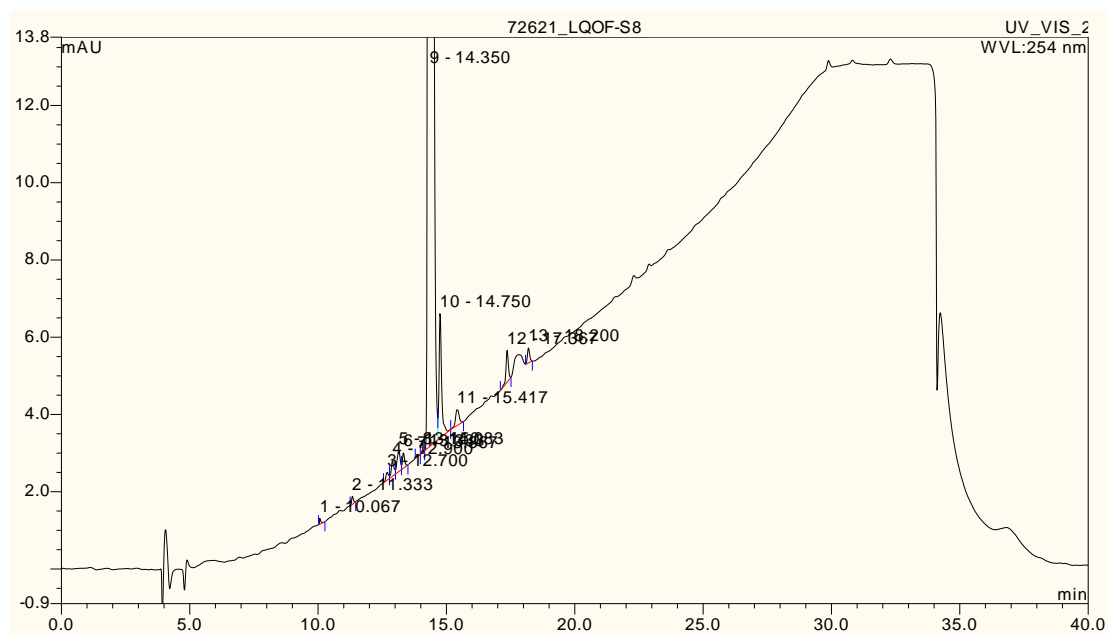
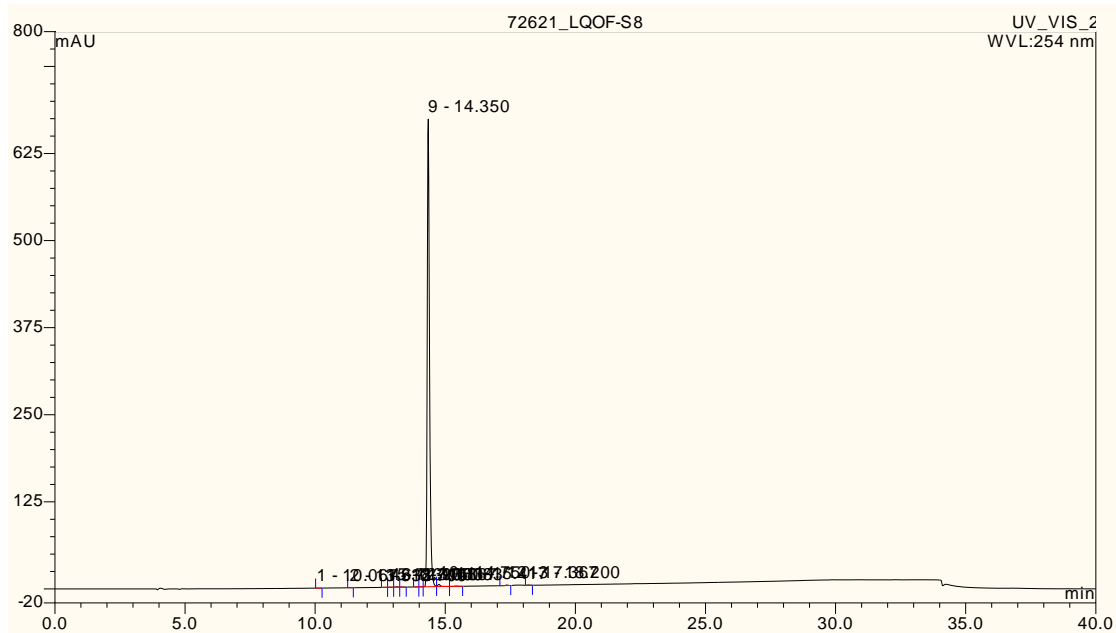


---

# LC/UV/MS

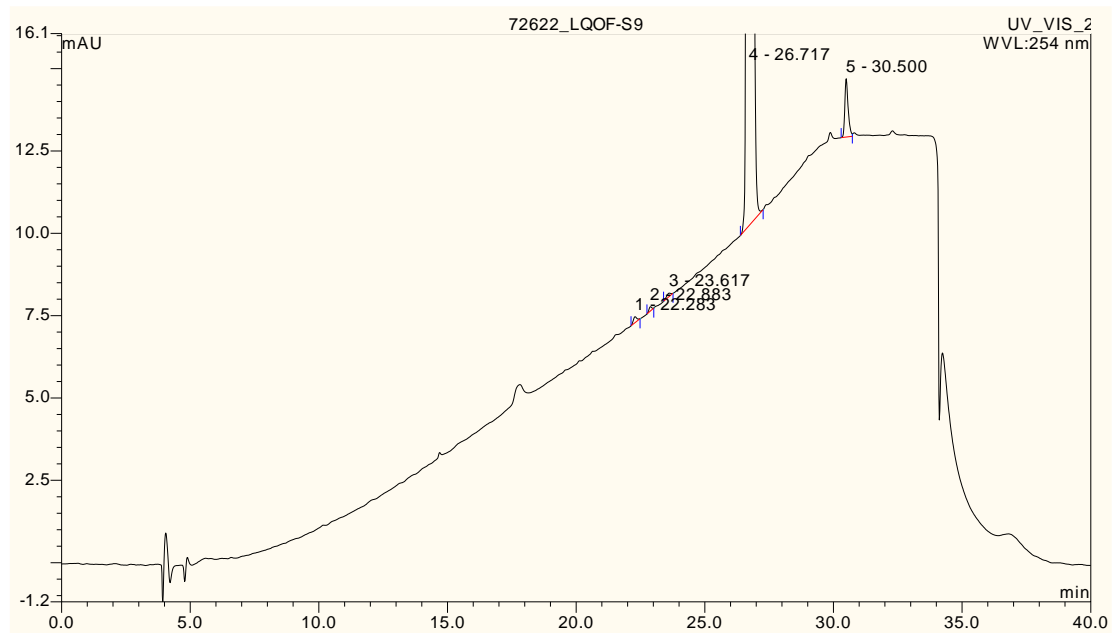
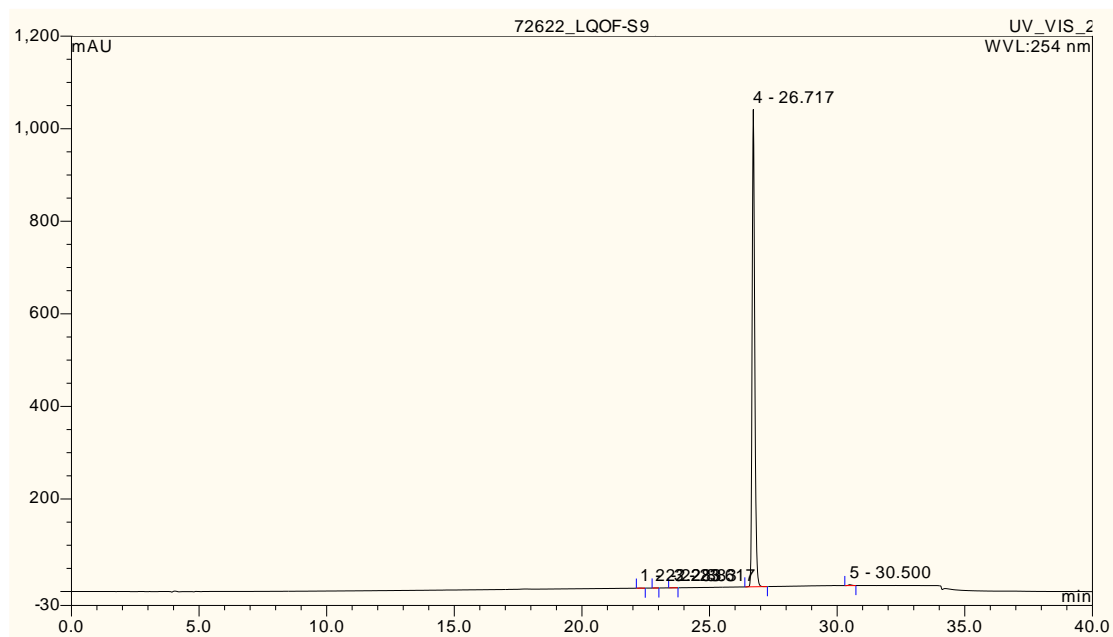
---

## LQOF-S8 LC/UV/MS



**Tempo de retenção: 14.35 min**

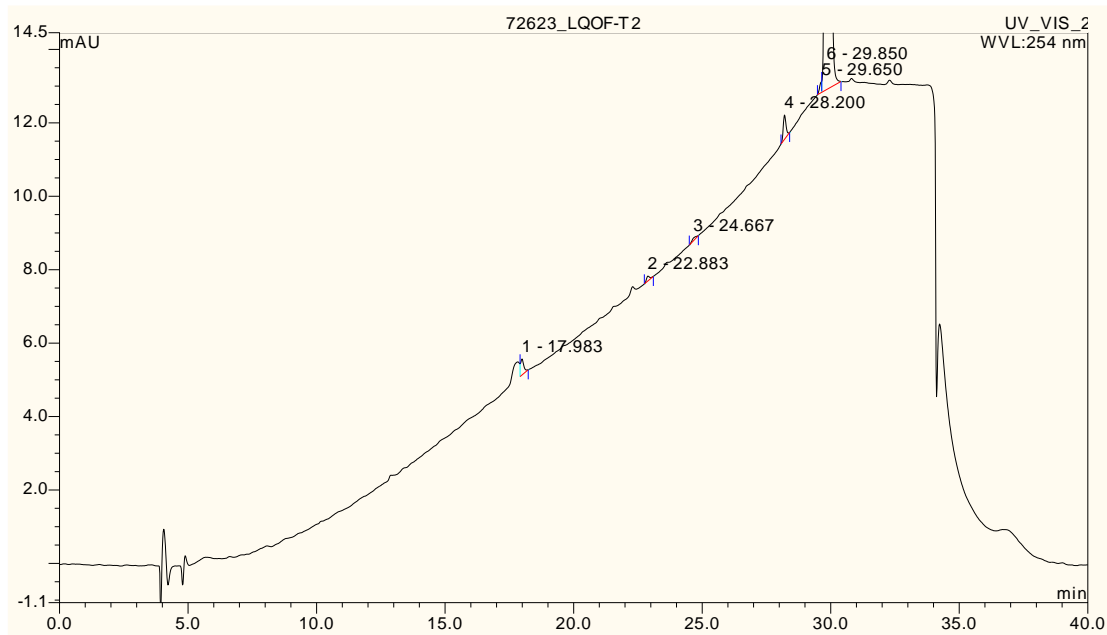
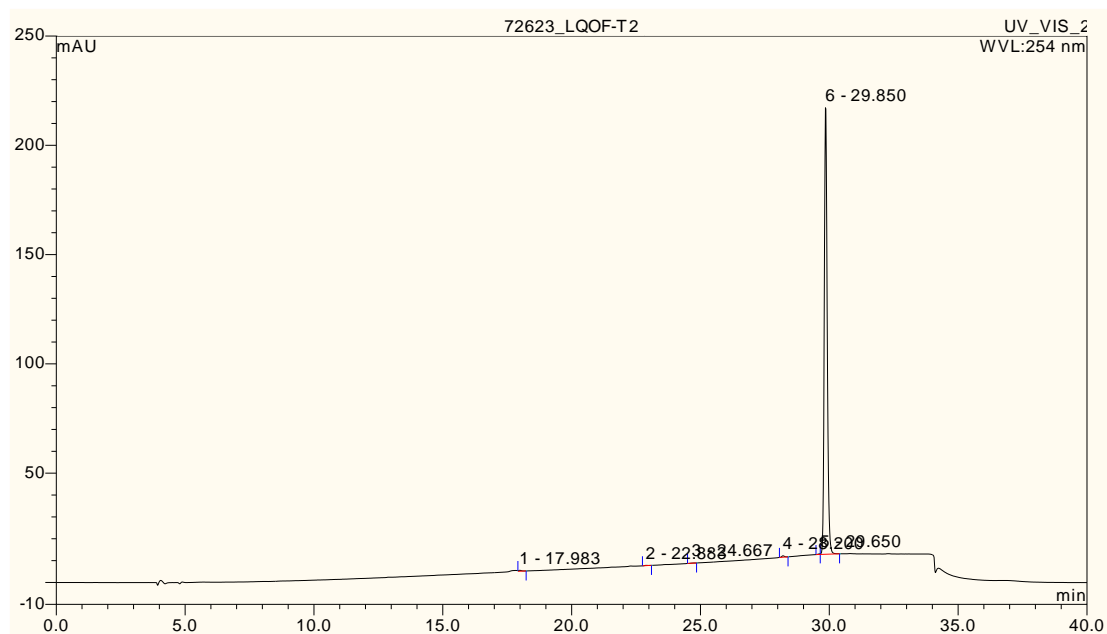
**Pico de área relativa: 98.88%**

**LQOF-S9 LC/UV/MS**

**Tempo de retenção: 26.72 min**

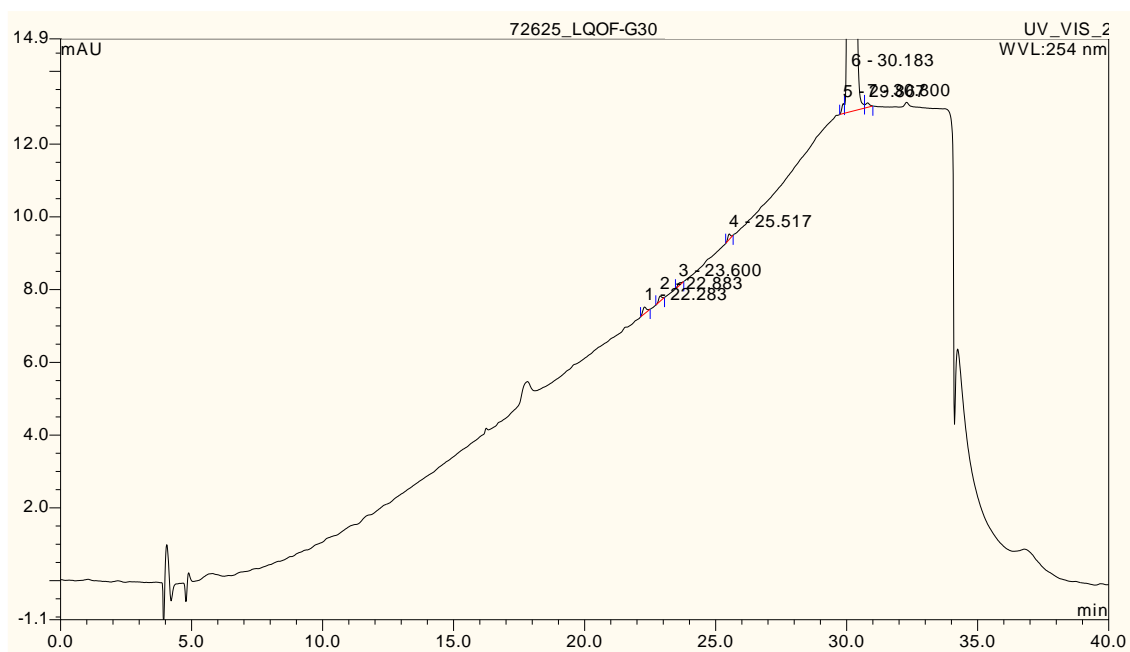
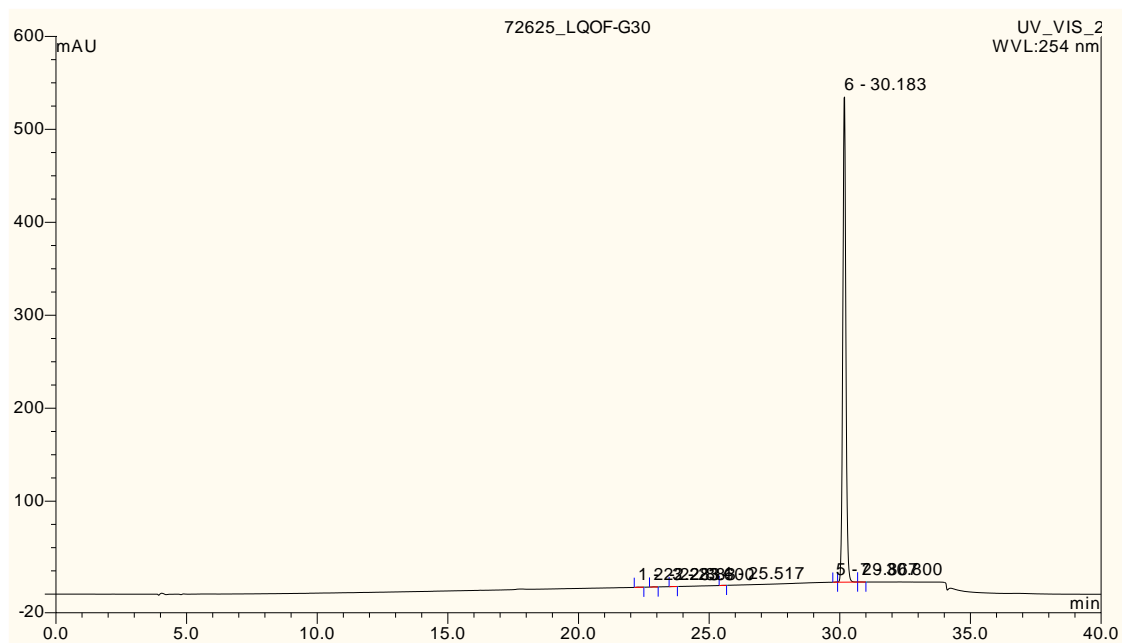
**Pico de área relativa: 99.73%**

## LQOF-T2 LC/UV/MS



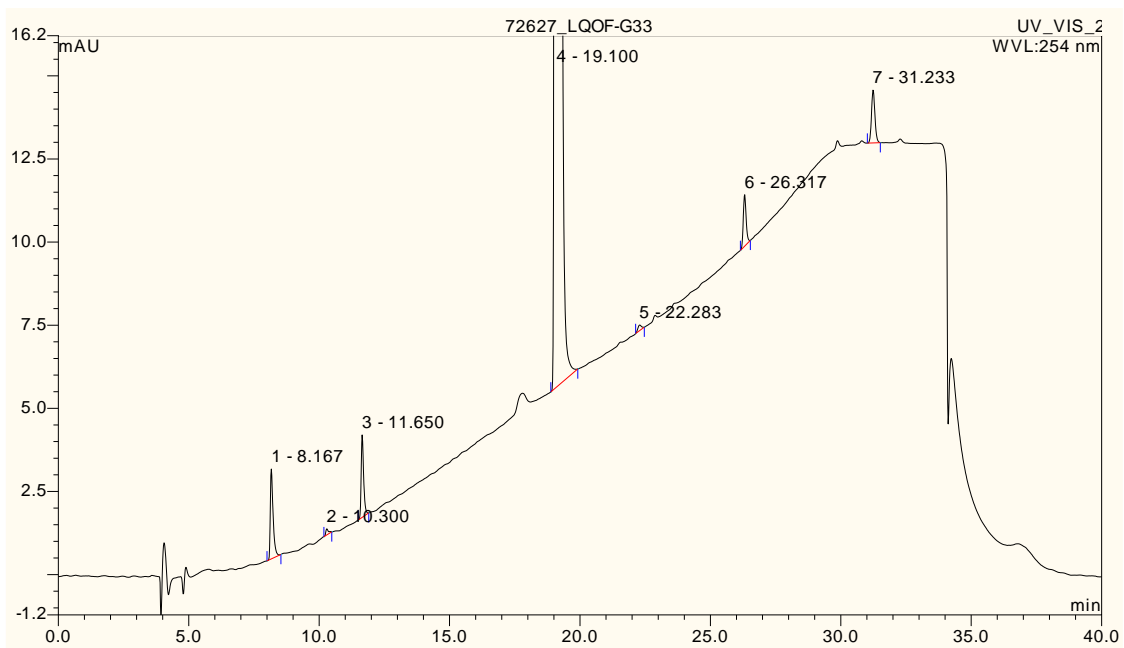
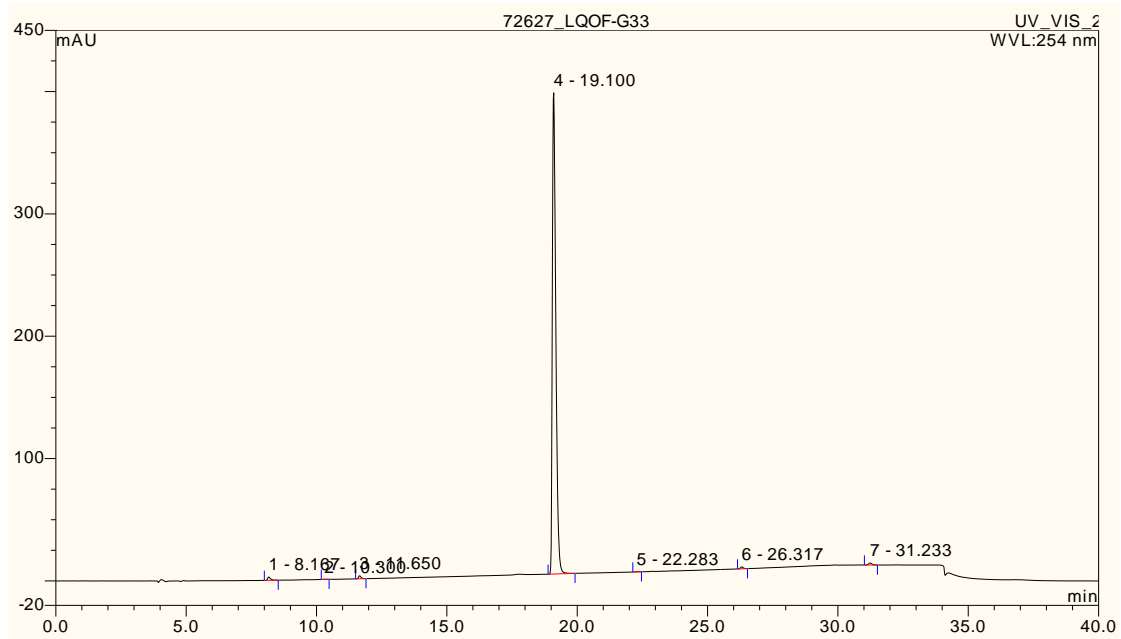
**Tempo de retenção: 29.85 min**

**Pico de área relativa: 99.25%**

**LQOF-G30 LC/UV/MS**

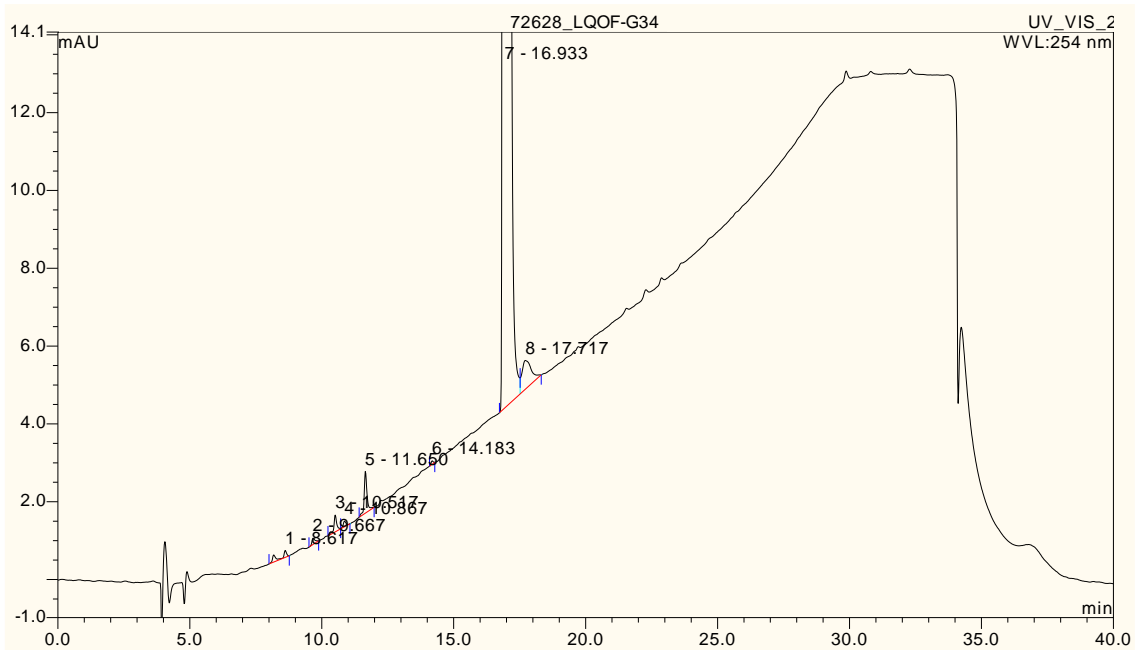
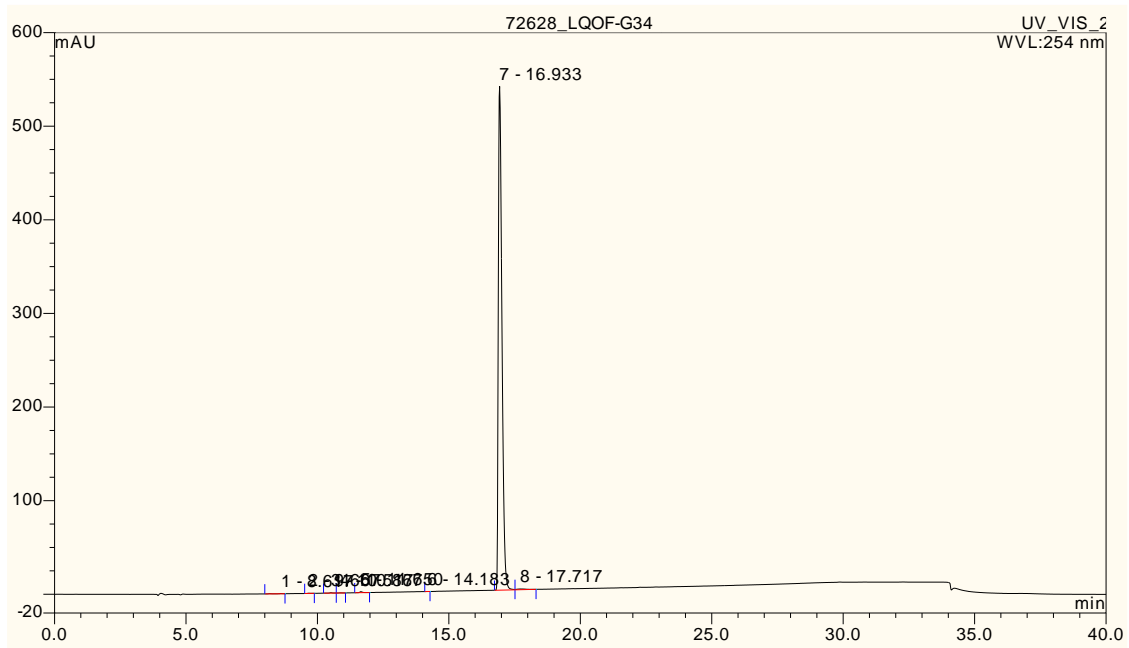
**Tempo de retenção: 30.18 min**

**Pico de área relativa: 99.82%**

**LQOF-G33 LC/UV/MS**

**Tempo de retenção: 19.10 min**

**Pico de área relativa: 98.25%**

**LQOF-G34 LC/UV/MS**

**Tempo de retenção: 16.93 min**

**Pico de área relativa: 99.33%**