

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA



Paulo Henrique Barcellos França

**Planejamento e Síntese de Novos Derivados Aminoguanidínicos Visando à  
Atividade Leishmanicida**

Maceió

2014

PAULO HENRIQUE BARCELLOS FRANÇA



**Planejamento e Síntese de Novos Derivados Aminoguanidínicos Visando à  
Atividade Leishmanicida**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo-Júnior

**MACEIÓ**

**2014**

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

F814p França, Paulo Henrique Barcellos.  
Planejamento e síntese de novos derivados aminoguanidínicos visando à atividade leishmanicida / Paulo Henrique Barcellos França. – 2014.  
112 f. : il.

Orientador: João Xavier de Araújo-Júnior.  
Coorientador: Thiago Mendonça de Aquino.  
Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 77-82.  
Anexos: f. 83-112.

1. Aminoguanidinas. 2. Guanidina – Derivados. 3. Atividade leishmanicida. I. Título.

CDU: 547.495.9:615.283



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

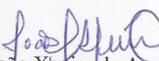


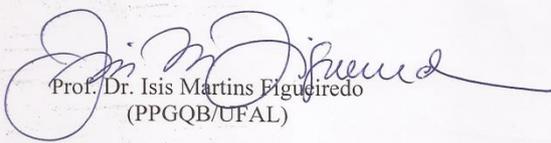
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone: (82) 3214-1144  
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Membros da Comissão Julgadora da defesa de Dissertação do mestrando **Paulo Henrique Barcellos França**, intitulada: **“Planejamento e Síntese de Novos Derivados Aminoguanidínicos Visando Atividade Leishmanicida”**, apresentada ao PPGQB/UFAL em 30 de abril de 2014, as 9 h, na Sala de Reuniões da Pós-Graduação do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

  
Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior  
(PPGQB/ESENFAR/UFAL)

  
Prof. Dr. Isis Martins Figueiredo  
(PPGQB/UFAL)

  
Prof. Dr.ª Elita Scio Fontes  
(UFJF)

## Agradecimentos

A Deus, pela Sua infinita bondade e pela graça da vida.

Ao Mestre Jesus, por vir a este mundo para nos ensinar o amor e a caridade.

Ao Professor Dr. João Xavier de Araújo Júnior, pela orientação deste trabalho, por todas as oportunidades concedidas durante o período de mestrado.

Ao professor Dr. Thiago Mendonça de Aquino pela co-orientação e por auxiliar nos períodos de maior entrave durante a realização do trabalho.

Ao professor Dr. Antônio Euzébio Goulart de Sant'ana pela concessão do espaço físico e material para a realização da maior parte do trabalho.

Aos meus pais, sem os quais jamais teria chegado até este ponto, por terem me apoiado nos momentos mais difíceis, por terem acreditado mesmo quando eu havia pensado em desistir e por terem me ajudado a ser uma pessoa melhor. Não existem palavras que possam expressar a gratidão e o amor que sinto por eles.

Aos meus irmãos, amigos devotados que têm me proporcionado apoio imensurável e me acompanhado carinhosamente nesta jornada.

A Merybeth, por estar ao meu lado, por ter me motivado e por seu auxílio nos ensejos de maior necessidade.

Aos colegas de orientação Daniel Lira, Pedro Gregório e Glauber Mendes por sempre estarem dispostos a auxiliar em todas as ocasiões.

Aos colegas de laboratório Edeildo, Carla, Ingrid, Vanderson, Aldy, Dona Margarida e Isis por seu companheirismo e pelos momentos de alegria compartilhados que certamente tornaram o ambiente de trabalho mais agradável.

À CAPES, pelo financiamento fornecido durante os dois anos de realização deste trabalho.

***“Embora eu saiba que não exista magia no mundo que possa mover e forçar a vontade - como alguns simplesmente acreditam -, é livre a nossa vontade, e não existe erva nem encanto que a force.”***

***Miguel de Cervantes***

## **Resumo**

Embora seja estimada como a nona maior causa de doenças infecciosas em indivíduos, a leishmaniose é amplamente ignorada na discussão das prioridades de doenças tropicais. Em adição, os fármacos já existentes apresentam elevada toxicidade ou teratogenicidade, além de eficácia reduzida devido à emergência de cepas resistentes. A função guanidina está presente em moléculas fármacos com as mais variadas atividades farmacológicas, e apresenta fundamental importância no processo de reconhecimento molecular devido às variadas interações que pode realizar. Diversos derivados sintéticos contendo o grupo guanidina também apresentam atividade leishmanicida. Neste trabalho, 18 análogos 2-arilidenoaminoguanidínicos foram sintetizados em micro-ondas com tempos reacionais de 20 minutos e sua atividade antileishmania foi estimada *in vitro*. Dentre eles, os compostos **LQM008**, **LQM010** e **LQM013** apresentaram valores de  $CI_{50}$  (0,49, 0,80 e 0,57  $\mu M$ , respectivamente) inferiores ao do padrão pentamidina (4,00  $\mu M$ ) e foram selecionadas para realizar modificações em uma região diferente da molécula para a obtenção de uma nova série de 15 análogos 2-benzilidenoaminoguanidínicos N-substituídos. Estes foram sintetizados em refluxo com rendimentos compreendidos entre 11 e 67%. Uma metodologia foi desenvolvida para a síntese em micro-ondas cujos tempos reacionais foram reduzidos para 40 minutos, com rendimentos comparáveis ao do método por refluxo. A relação estrutura-atividade mostrou que efeitos estéricos são importantes para a atividade de modo que substituintes volumosos promovem um incremento na atividade.

## ***Abstract***

Although it is estimated as the ninth leading cause of infectious diseases in subjects, leishmaniasis is largely ignored in the discussion of priorities of tropical diseases. In addition, existing drugs exhibit high toxicity or teratogenicity as well as reduced efficacy due to the emergence of resistant strains. The guanidine function is present in drug molecules which show different pharmacological activities, and it plays a fundamental role in molecular recognition process as a result of the variety of interactions which can be performed by this moiety. Several synthetic derivatives containing guanidine group also exhibit leishmanicidal activity. In this study, 18 arilideneaminoguanidine derivatives were synthesized by using a microwave-assisted procedure with reaction times of 20 minutes and their antileishmanial activity was estimated in vitro. Out of them compounds **LQM008**, **LQM010** and **LQM013** showed IC<sub>50</sub> values (0.49, 0.80 and 0.57 μM, respectively) lower than standard compound, pentamidine (4.00 μM) and were selected to carry out modifications in a different region of the molecule to obtain a series of 15 *N*-substituted 2-benzilideneaminoguanidine analogs. These were synthesized by conventional heating with yields ranging between 11 and 67%. A microwave-assisted method was developed and reaction times were decreased to 40 minutes. The structure-activity relationship showed that steric effects play an important role in the activity so that bulky substituents resulted in enhanced activity.

## ***Lista de Abreviaturas***

Boc = *tert*-butiloxicarbonil

BOD = demana biológica de oxigênio

BrCN = bromocianogênio

Cbz = carboxibenzil

CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> = diiodometano

CHCl<sub>3</sub> = clorofórmio

CI<sub>50</sub> = concentração inibitória média

CN = ciano

CuCl<sub>2</sub> = cloreto de cobre(II)

CuSO<sub>4</sub> = sulfato de cobre

d = duplete

DABCO = 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

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

DCM = diclorometano

DMAP = 4-dimetilaminopiridina

DMEM = meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMF = *N,N*-dimetilformamida

EDCI = 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

Et<sub>3</sub>N = trietilamina

EtOH = etanol

Fmoc = 9-fluorenilmetiloxicarbonil

H<sub>2</sub>O = água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

HgCl<sub>2</sub> = cloreto de mercúrio(II)

*i*-PrOH - 2-propanol

m = multiplete

Me<sub>3</sub>SiBr = bromotrimetilsilano

MO = micro-ondas

NaClO<sub>2</sub> = clorito de sódio

NaH = hidreto de sódio

NaIO<sub>4</sub> = metaperiodato de sódio

NaMoO<sub>4</sub> = molibdato de sódio

NH<sub>2</sub>CN = cianamida

NPFF1 = receptor de neuropeptídeo FF 1

NPFF2 = receptor de neuropeptídeo FF 2

Ph = fenila

Ph<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sup>+</sup>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> = permanganato de benziltriethylamônio

s = singleto

SFB = soro fetal bovino

SiO<sub>2</sub> = dióxido de silício

t.a. = temperatura ambiente

TBAF = fluoreto de tetrabutylamônio

*t*-Bu = *tert*-Butila

Tf = triflil

TFA = ácido trifluoroacético

THF = tetraidrofurano

TsOH = ácido *p*-toluenosulfônico

## Lista de esquemas

Esquema 1. Síntese de guanidinas a partir de tioureias em presença de sulfato de cobre e sílica gel	21
Esquema 2. Síntese de guanidinas diprotégidas com reagente de Mukayama	22
Esquema 3. Síntese de guanidinas a partir de tioureias e EDCI	22
Esquema 4. Síntese de guanidinas com tioureias e haletos de metais tiofílicos	23
Esquema 5. Síntese de guanidinas com tioureias e cloreto de mercúrio(II)	23
Esquema 6. Síntese de guanidinas a partir de carbamoiltioureias	23
Esquema 7. Síntese de <i>N</i> -hidroxiguanidinas com cloreto de mercúrio(II)	24
Esquema 8. Obtenção de acilguanidinas dissustituídas com reagentes de acoplamento	24
Esquema 9. Síntese de guanidinas monoprotégidas a partir de <i>N</i> -arilsulfonil- <i>S</i> -metilisotioureia	25
Esquema 10. Obtenção de guanidinas a partir de tiazetidinas	25
Esquema 11. Método de preparação de guanidinoureias	25
Esquema 12. Obtenção de guanidinas a partir de di-Boc- <i>S</i> -metilisotioureias e cloreto de mercúrio(II)	26
Esquema 13. Formação de guanidinoglicosídeos por meio de ciclização intramolecular de acilisotioureias protegidas	26
Esquema 14. Síntese de cianoguanidinas a partir de <i>S</i> -metilisotiourônio	27
Esquema 15. Síntese de guaniltioureias monossustituídas	27
Esquema 16. Síntese de guanidinas a partir de <i>N</i> -ariliminofosforanos	27
Esquema 17. Síntese de <i>N,N'</i> -diarilguanidinas por meio de cianamidas	28
Esquema 18. Formação de guanidinas via pirazol-1-carboximidamidas	28
Esquema 19. Obtenção de guanidinas a partir de derivados pirazólicos <i>N,N'</i> -protégidos	28
Esquema 20. <i>N</i> -Boc- <i>N'</i> -tosilpirazol-1-carboximidamida na obtenção de guanidinas	29
Esquema 21. Síntese de guanidinas monossustituídas a partir de derivados pirazólicos diprotégidos	29
Esquema 22. Formação de derivados guanidínicos a partir de trifilguanidinas protegidas	30
Esquema 23. Obtenção de guanidinas via ácidos aminoiminometanosulfônicos	30
Esquema 24. Oxidação de tioureias e formação de guanidinas	31
Esquema 25. Síntese de guanidinas em uma única etapa com permanganato de benziltriethylamônio	31
Esquema 26. Síntese de guanidinas por meio de benzotriazol-1-carboxamidínio	31
Esquema 27. Obtenção de guanidinas via di-(benzotriazolil)carboximidamidas	32
Esquema 28. Rota sintética e aldeídos utilizados na síntese dos derivados com variação da região 1	50
Esquema 29. Rota sintética e aminas utilizadas na síntese dos derivados com variação da região 2	51
Esquema 30. Mecanismo reacional para formação de guanilidrazonas	56
Esquema 31. Rota sintética inicial para as 2-benzilidenoaminoguanidinas <i>N</i> -sustituídas	56
Esquema 32. Rota sintética final para a obtenção dos derivados aminoguanidínicos	57
Esquema 33. Formação do sal de <i>S</i> -metilisotiossemicarbazona por substituição nucleofílica	58
Esquema 34. Formação da guanidina via mecanismo de adição-eliminação	58
Esquema 35. Metodologia utilizada por Rasmussen et al (1988)	59
Esquema 36. Deslocalização do par de elétrons livre da anilina	60
Esquema 37. Síntese dos derivados 2-benzilidenoaminoguanidínicos em micro-ondas	60

Esquema 39. Equilíbrio tautomérico das formas tiona e tiol de tiossemicarbazonas .....	66
--	----

## *Lista de tabelas*

Tabela 1. Atividades biológicas de guanidinas sintéticas.....	33
Tabela 2. Taxas de incidência de leishmaniose visceral e cutânea em estados brasileiros em 2012 .....	38
Tabela 3. Comparação entre os rendimentos reacionais das 2-arilidenoaminoguanidinas por micro-ondas e refluxo .....	54
Tabela 4. Rendimentos reacionais das 2-benzilidenoaminoguanidinas <i>N</i> -substituídas .....	59
Tabela 5. Rendimentos reacionais de 2-benzilidenoaminoguanidinas <i>N</i> -substituídas obtidas por meio de micro-ondas.....	61
Tabela 6. Dados de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) em DMSO-d <sub>6</sub> das arilidenoaminoguanidinas .....	62
Tabela 7. Dados de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) em DMSO-d <sub>6</sub> das tiossemicarbazonas.....	65
Tabela 8. Dados de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) em DMSO-d <sub>6</sub> das isotiossemicarbazonas.....	66
Tabela 9. Dados de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) em DMSO-d <sub>6</sub> das 2-benzilidenoaminoguanidinas <i>N</i> -substituídas .....	67
Tabela 10. Efeito leishmanicida dos derivados de aminoguanidina contra promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> após 48 horas de tratamento.....	70

## Lista de ilustrações

Figura 1. Estruturas e valores de pka de derivados de aminas .....	15
Figura 2. Configuração eletrônica de trimetilenemetano (III), íon guanidínio (II), e guanidina (I) .....	15
Figura 3. Deslocalização eletrônica dos íons amidínio e guanidínio .....	16
Figura 4. Interações do tipo eletrostática do grupo guanidina da arginina e outros resíduos de aminoácidos .....	17
Figura 5. Padrão de ligação de íons guanidínios com oxoânions .....	17
Figura 6. Interação $\pi$ -cátion entre a guanidina da arginina 79 e o anel indólico do tripofano 83 em uma $\alpha$ -hélice.....	18
Figura 7. Empilhamento $\pi$ entre o íon guanidínio e cadeias laterais aromáticas de resíduos de aminoácidos .....	18
Figura 8. Interação cátion-cátion entre guanidinas de resíduos de arginina de uma lisozima .....	19
Figura 9. Análise retrossintética da função guanidina .....	20
Figura 10. Ciclo biológico de espécies de <i>Leishmania</i> .....	36
Figura 11. Estado mundial da endemicidade de leishmaniose visceral em 2012.....	37
Figura 12. Estado mundial da endemicidade de leishmaniose cutânea em 2012.....	38
Figura 13. Estruturas químicas dos fármacos antileishmaniais.....	41
Figura 14. Compostos com atividade leishmanicida.....	42
Figura 15. Estrutura dos análogos diguanidínicos .....	43
Figura 16. Estrutura química da $\gamma$ -guanidinoxipropilamina .....	44
Figura 17. Estrutura dos análogos guanidínicos tricíclicos.....	44
Figura 18. Estrutura do derivado pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona com atividade antileishmania.....	45
Figura 19. Estruturas dos análogos (A) diidroquinazolinínicos e (B) tetraidroquinazolinínicos .....	45
Figura 20. Estruturas dos híbridos quinazolinônicos .....	46
Figura 21. Estruturas dos análogos de 2,4-diaminopiridina.....	46
Figura 22. Modificações estruturais planejadas para a síntese de derivados aminoguanidínicos.....	49
Figura 23. Formas tautoméricas das isotiossemicarbazonas .....	57
Figura 24. Valores de Cl <sub>50</sub> e estruturas dos análogos 2-arilidenoaminoguanidínicos.....	72

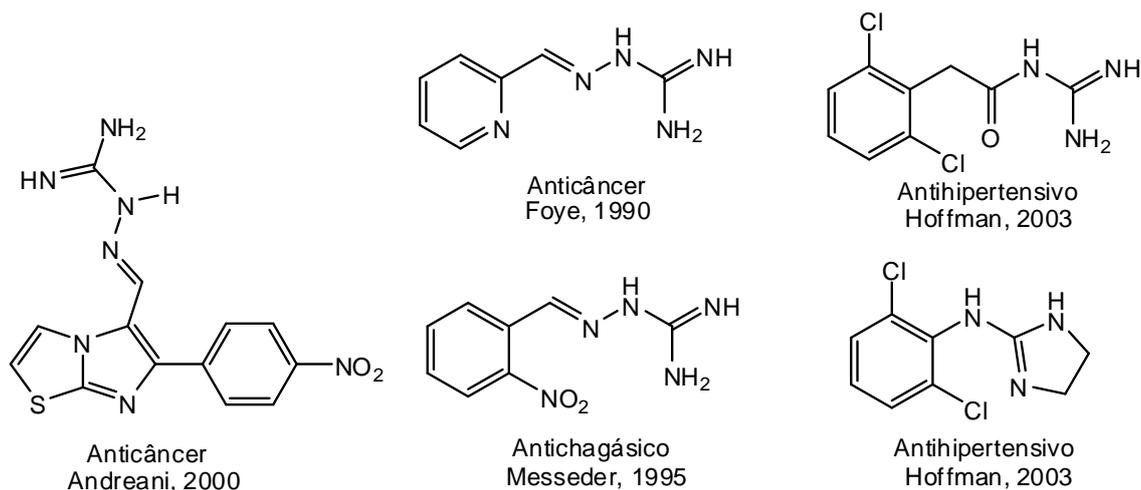
## Sumário

1. Introdução .....	14
1.1. Aspectos químicos e biológicos da guanidina.....	14
1.2. Métodos de obtenção de guanidinas.....	19
1.2.1. Tioureias.....	20
1.2.2. Isotioureias.....	24
1.2.3 Carbodiimidas e cianamidas.....	27
1.2.4. Pirazol-1-carboximidamidas.....	28
1.2.4. Trifilguanidinas .....	29
1.2.5. Ácidos aminoiminometanosulfônicos .....	30
1.2.6. Benzotriazóis .....	31
1.3. Atividades Biológicas de Guanidinas .....	32
1.4. Considerações Gerais sobre a Leishmaniose .....	36
1.5. Guanidinas e Leishmania .....	43
2. Objetivos.....	48
2.1. Geral .....	48
2.2. Específicos.....	48
3. Moléculas planejadas.....	49
4. Síntese e Mecanismos .....	54
5. Elucidação Estrutural.....	62
6. Avaliação da atividade leishmanicida.....	70
7. Relação Estrutura-Atividade .....	72
8. Experimental.....	74
8.3.1. Manutenção da linhagem macrófagos e infecção .....	74
8.3.2. Ensaio de toxicidade sobre formas promastigotas .....	75
8.4. Análise de Ressonância Magnética Nuclear .....	75
8.5. Purificação por cromatografia flash .....	76
9. Conclusões e Perspectivas.....	77
10. Referências Bibliográficas.....	78
11. Anexos .....	84

## 1. Introdução

### 1.1. Aspectos químicos e biológicos da guanidina

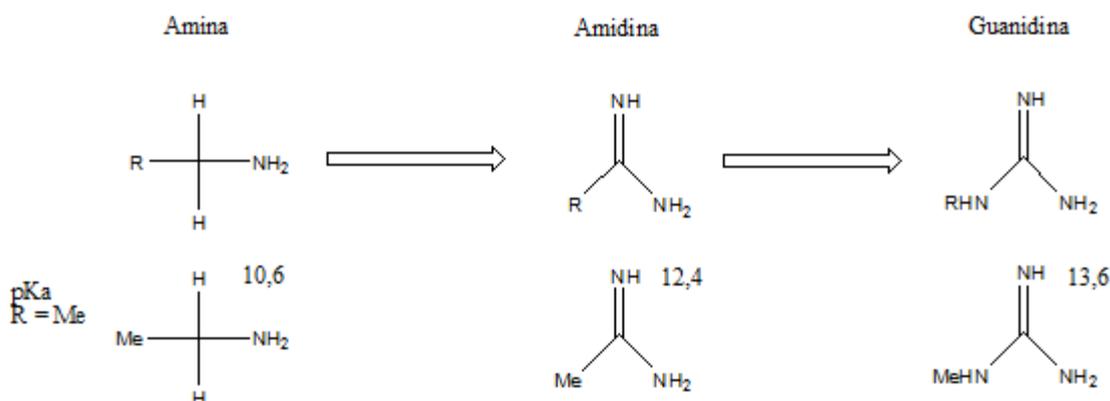
A função guanidina está presente em moléculas fármacos com as mais variadas atividades farmacológicas (ORNER; HAMILTON, 2001; HOFFMAN, 2003; LEMKE, 2008).



Em termos biológicos, o grupo guanidina é de fundamental importância no processo de reconhecimento molecular de proteínas e enzimas, pois por meio desta função se efetuam interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio (HANNON et al., 1993).

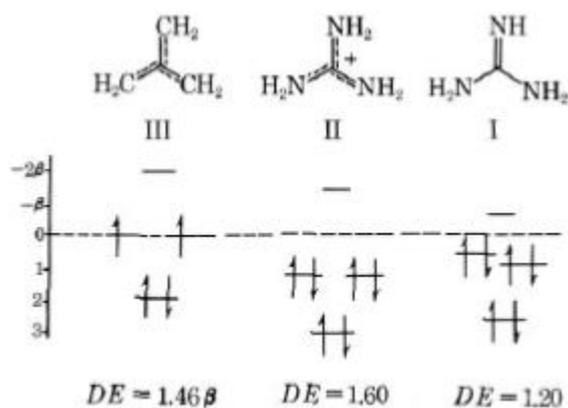
No campo da química orgânica, uma base é geralmente definida como um composto capaz de se ligar a um próton para dar uma espécie catiônica. A introdução de uma imina (=NH) sobre o carbono  $\alpha$  de uma amina constitui uma amidina, outra espécie de amina ainda mais básica. A guanidina, uma 2-aminoamidina, apresenta três funções nitrogenadas e mostra forte basicidade de acordo com Brønsted (HAFELINGER et al., 1991). Deste modo, a basicidade é proporcional ao número de átomos de nitrogênio, sendo comparável àquela do íon hidroxila (RACZYNSKA et al., 1994).

Figura 1. Estruturas e valores de pKa de derivados de aminas



A estabilização adquirida pela deslocalização dos elétrons  $\pi$  no cátion guanidínico acíclico planar lembra àquela gerada por aromaticidade. Uma vez os pares de elétrons não compartilhados heteronucleares entram em ressonância, este íon apresenta uma configuração com 6 elétrons  $\pi$  em orbitais de caráter ligante, o que resulta em uma energia de deslocalização de  $1,60\beta$ , comparado com  $2,0\beta$  do benzeno. No caso da guanidina, a remoção do próton ortogonal ao sistema  $\pi$  resulta em perturbação da simetria molecular e promove perda de degeneração dos orbitais, mas garantindo ainda uma energia de deslocalização de  $1,20\beta$ . Uma característica química que demonstra a importância de tal estabilização é a tendência da guanidina em reagir por substituição, ao invés de por adição (GUND., 1972).

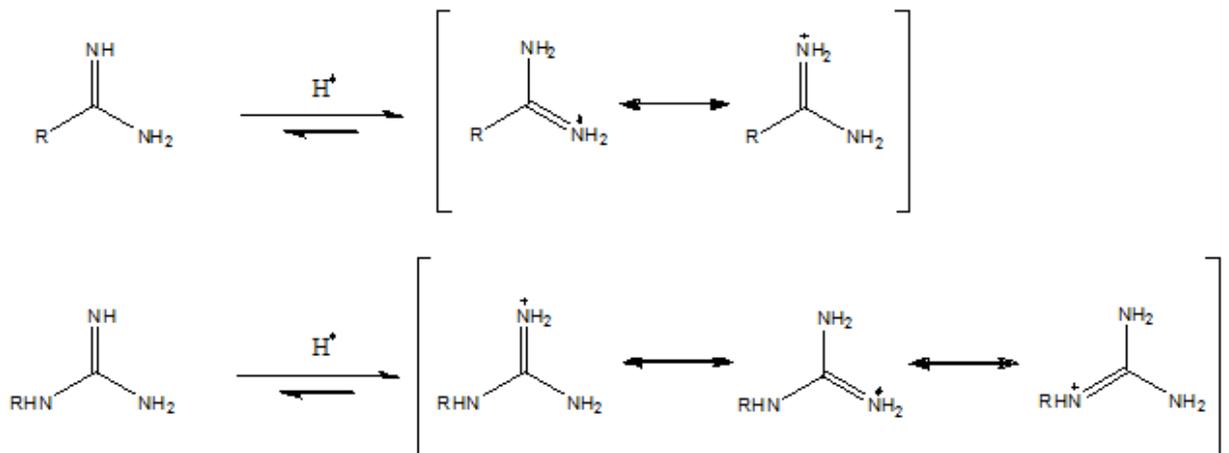
Figura 2. Configuração eletrônica de trimetilenemetano (III), íon guanidínio (II), e guanidina (I)



Adaptado de Gund (1972).

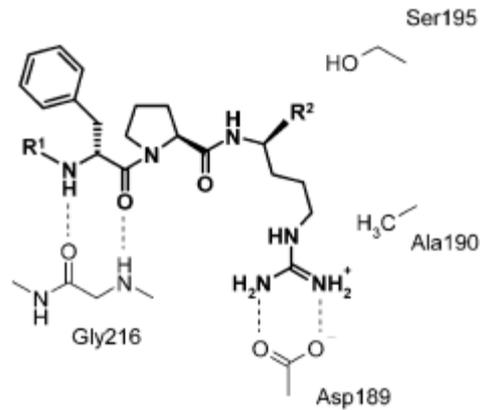
A protonação de guanidinas ocorre na posição do nitrogênio imínico, o que conduz a um cátion estabilizado por conjugação (HAFELINGER et al., 1991). Os dois aminoácidos básicos, lisina e arginina, possuem, respectivamente, os grupos amina primária e guanidina, e podem atuar como nucleófilos ou catalisadores alcalinos em processos biológicos importantes, tais como reações enzimáticas nos organismos vivos, utilizando um par livre de elétrons do nitrogênio (SCHILIPPE et al., 2005). Resíduos de arginina são comumente encontrados em sítios de interação de enzimas e proteínas (SUHS; KÖNIG, 2006). Um terceiro aminoácido proteico que apresenta a região amidina é a histidina, cujo núcleo imidazólico constitui um exemplo de amidina heterocíclica endógena. A basicidade destes derivados de aminas depende da deslocalização eletrônica que ocorre após protonação sob condições reversíveis. A basicidade é incrementada com o aumento do número de formas isoeletrônicas. Isto compreende o motivo pelo qual a guanidina é mais básica que a amidina (RACZYNSKA et al., 2003).

**Figura 3. Deslocalização eletrônica dos ions amidínio e guanidínio**



As interações que a guanidina pode realizar com uma proteína ou em um complexo ligante-receptor são muito complexas. Até agora, são conhecidos cinco tipos de interações. Em primeiro lugar, a guanidina pode efetuar uma interação do tipo eletrostática com uma carga negativa de um carboxilato proveniente, por exemplo, de um resíduo de aspartato ou de glutamato. Esta interação é mostrada na Figura 4. A segunda interação consiste na capacidade da guanidina em realizar ligações de hidrogênio (LANGE et al., 2003).

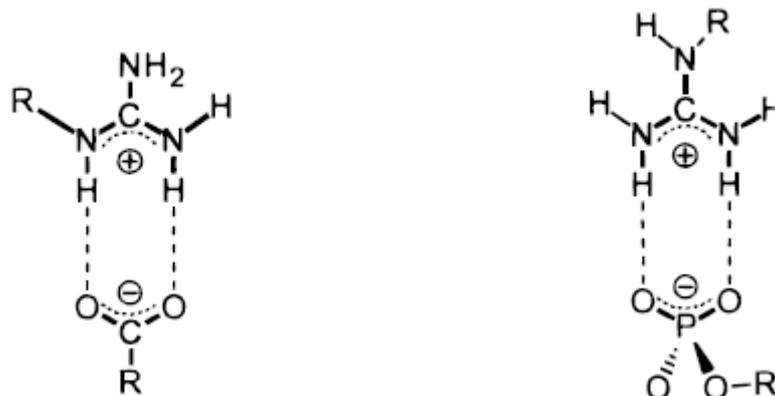
Figura 4. Interações do tipo eletrostática do grupo guanidina da arginina e outros resíduos de aminoácidos



Adaptado de Lange et al (2003).

O íon guanidínio apresenta um padrão de interação peculiar com oxoânions devido às interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio que ocorrem simultaneamente com o ânion em questão (SCHMIDTCHEN; BERGER, 1997). Este padrão de interação, acrescido da possibilidade de deslocalização da carga, confere propriedades únicas em termos de reconhecimento molecular e está intimamente relacionado com o fato de a arginina constituir um dos 20 aminoácidos básicos selecionados pela evolução (HAFELINGER et al., 1991).

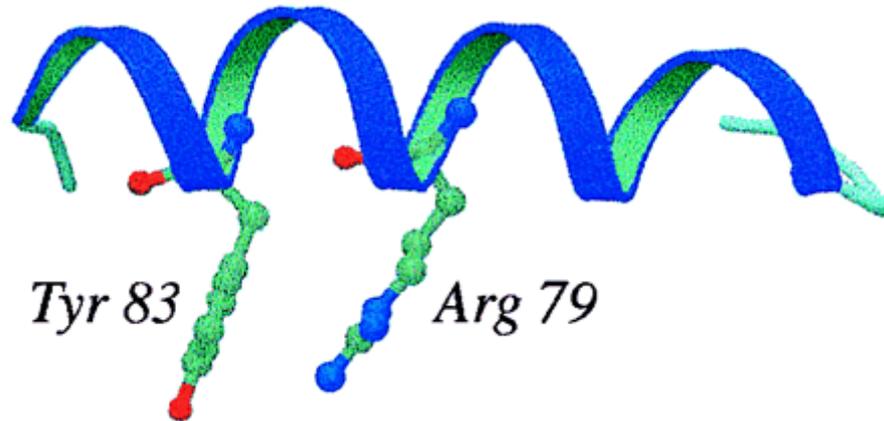
Figura 5. Padrão de ligação de íons guanidínios com oxoânions



Adaptado de Schmidtchen et al (1997).

O cátion guanidínio pode, a partir da deslocalização de sua carga positiva sobre os três átomos de nitrogênio, interagir com os orbitais  $\pi$  de núcleos aromáticos em um processo denominado de interação  $\pi$ -cátion (Figura 6) (GALLIVAN et al, 1999).

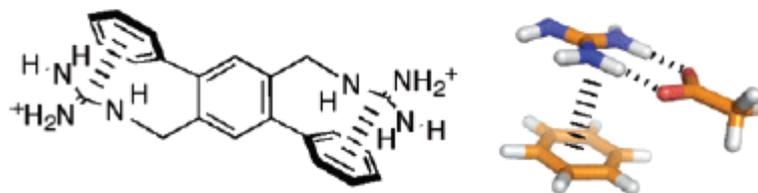
Figura 6. Interação  $\pi$ -cátion entre a guanidina da arginina 79 e o anel indólico do tripofano 83 em uma  $\alpha$ -hélice



Adaptado de Gallivan et al (1999).

O grupo guanidínio de resíduos de arginina também pode interagir com cadeias laterais aromáticas (Figura 7) de aminoácidos adjacentes por meio de empilhamento  $\pi$  (WANG et al., 2008).

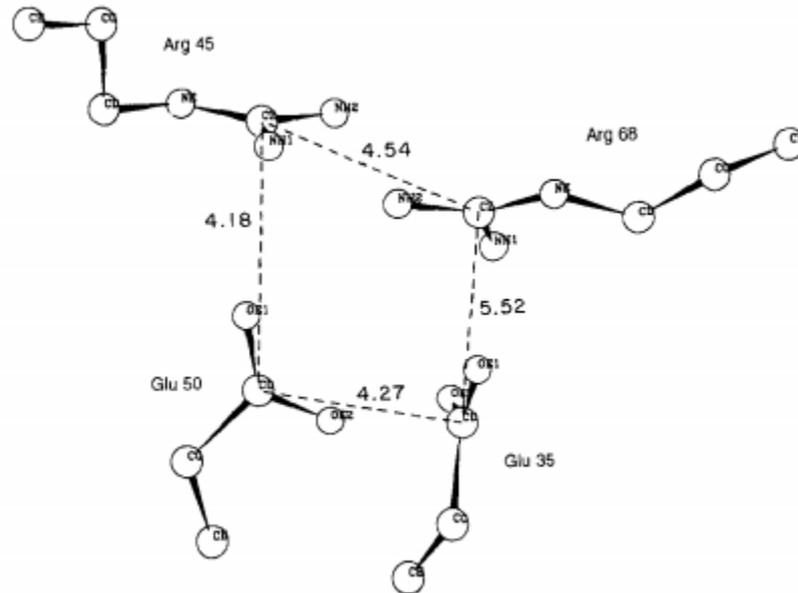
Figura 7. Empilhamento  $\pi$  entre o íon guanidínio e cadeias laterais aromáticas de resíduos de aminoácidos



Adaptado de Wang et al (2007).

Por fim, a interação cátion-cátion (Figura 8) foi evidenciada por modelagem molecular, particularmente no estudo sobre estruturas cristalinas de proteínas. Esta última envolve duas funções guanidinas que se encontram a uma distância relativamente curta, menores que 5 Å. É também importante notar que, no momento, estas interações foram observadas apenas em proteínas e não em complexos ligante-receptor. Por outro lado, elas são possíveis graças à presença de um grande número de moléculas de água que formam uma camada de solvatação em torno do complexo, permitindo, assim, sua estabilização do complexo mediante uma rede de ligações de hidrogênio (MAGALHAES et al., 1994).

Figura 8. Interação cátion-cátion entre guanidinas de resíduos de arginina de uma lisozima

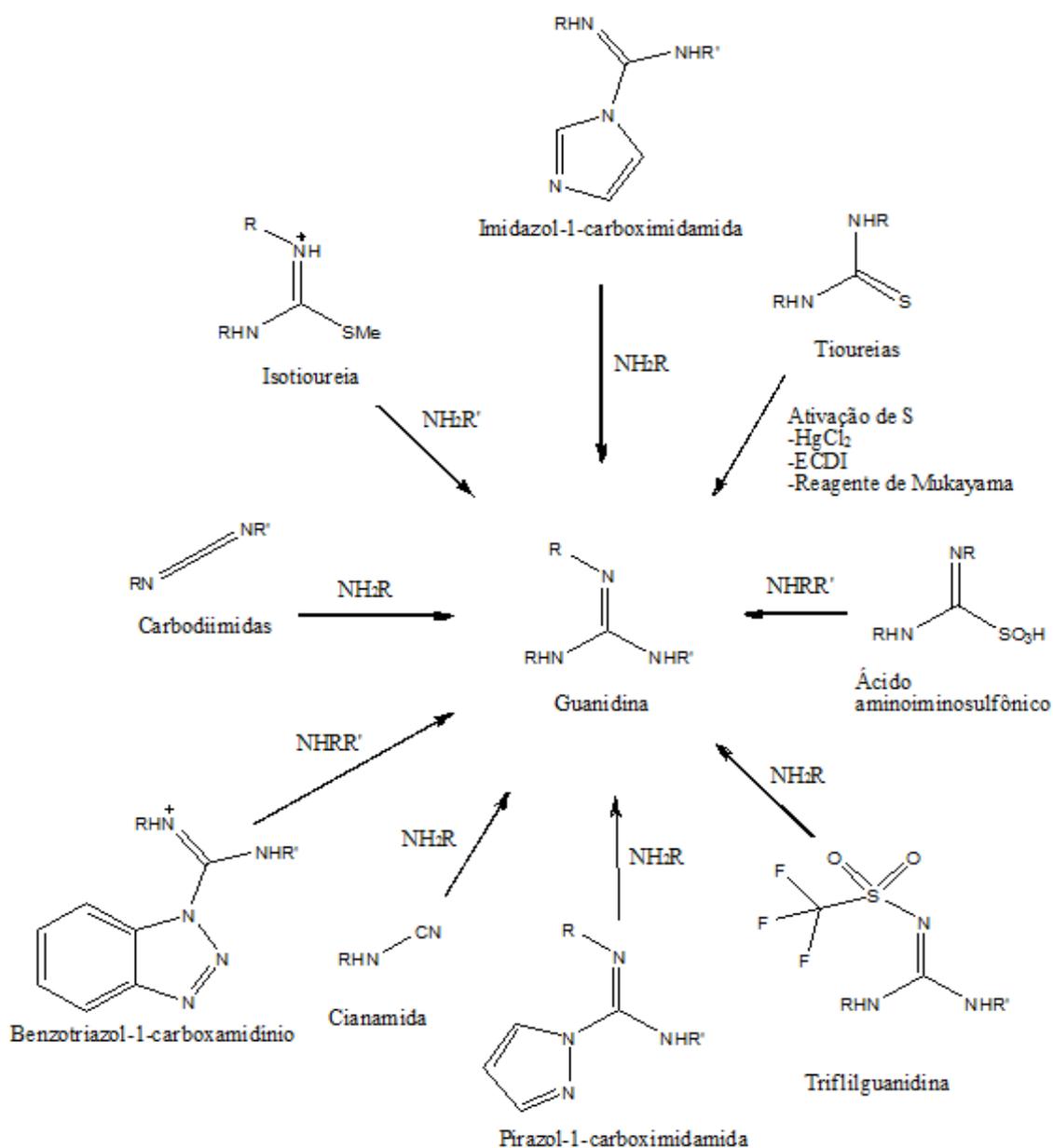


Adaptado de Magalhaes et al (1994).

## 1.2. Métodos de obtenção de guanidinas

Compostos guanidínicos são comumente obtidos a partir da reação de eletrófilos contendo um ou mais átomos de nitrogênio com aminas primárias ou secundárias. As abordagens sintéticas envolvem tanto reações de guanilação em solução (SUHS; KÖNIG, 2006), como em fase sólida (BURGESS, et al., 2000). A Figura 9 ilustra os precursores frequentemente utilizados para a obtenção de guanidinas.

Figura 9. Precursores utilizados na obtenção de guanidinas

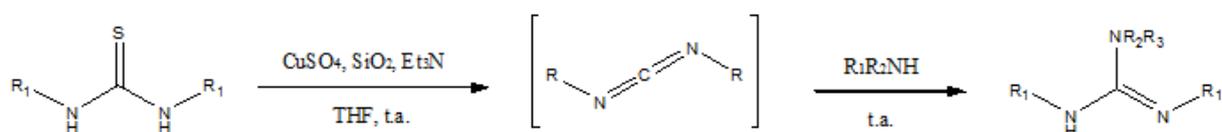


### 1.2.1. Tioureias

A função tioureia é comumente empregada como precursora de compostos guanidínicos. A conversão da tioureia em guanidina requer uma etapa inicial de ativação por meio do emprego de reagentes de acoplamento, a saber, *N,N*-dicicloexilcarbodiimida, 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimidas, cloreto de mercúrio(II) e reagente de Mukayama (SUHS; KÖNIG, 2006).

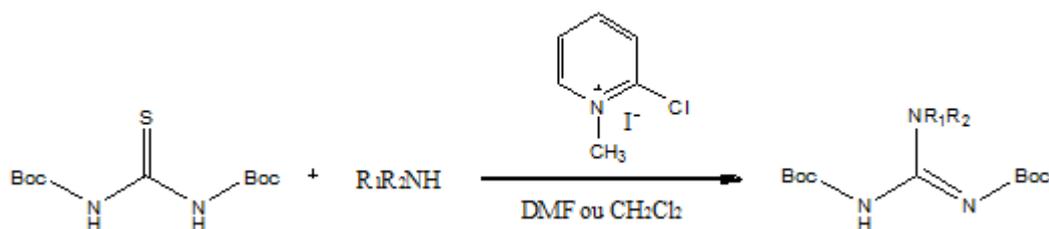
Um método simples de obtenção de guanidinas envolve a conversão de tioureias em presença de um solvente adequado (tetraidrofurano, acetonitrila, clorofórmio) contendo sulfato de cobre e sílica gel em presença de aminas terciárias (Esquema 1). A reação procede com a rápida formação do intermediário carbodiimida, em que o sulfato de cobre atua como agente dessulfurante devido ao caráter aceptor de elétrons do metal. A sílica gel e a amina terciária aceleram a etapa de dessulfuração. O procedimento permite a preparação de guanidinas com padrões de substituição variados e rendimentos entre 78 e 90% (RAMADAS; SRINIVASAN, 1995).

**Esquema 1. Síntese de guanidinas a partir de tioureias em presença de sulfato de cobre e sílica gel**



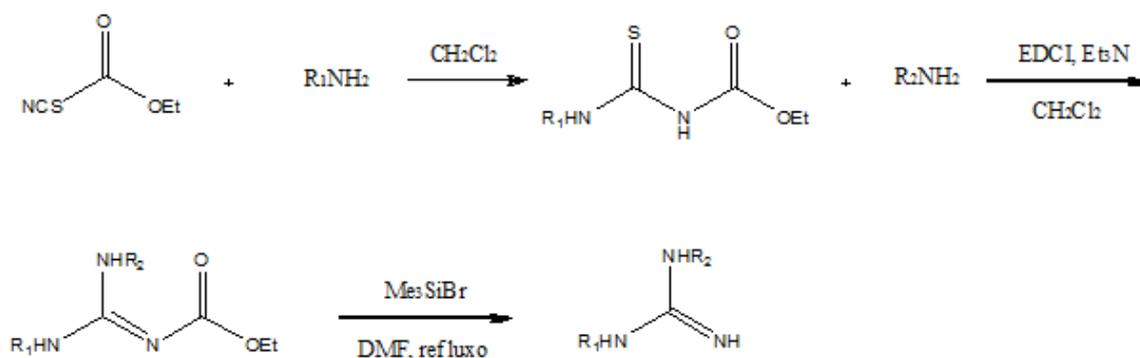
A inserção de grupos protetores eletrorretirados na tioureia resulta em maior reatividade do intermediário carbodiimida. O emprego do reagente de Mukayama (iodeto de 1-metil-2-cloropiridínio) como ativador procede com a reação entre a tioureia protegida e aminas primárias ou secundárias quando DMF ou diclorometano é utilizado como solvente (Esquema 2). O incremento no rendimento observado para aminas menos reativas ou dotadas de impedimento estérico, quando diclorometano é empregado como solvente deriva da instabilidade dos intermediários carbodiimidas. Quando o ataque nucleofílico por uma amina é lento, a decomposição competitiva da carbodiimida ocorre. Em diclorometano, as reações são heterogêneas por causa da menor solubilidade da tioureia protegida e o resultado é a produção mais lenta do intermediário e, por conseguinte, consumo mais eficiente da tioureia pelas aminas menos reativas. Por este método, foram obtidas as guanidinas correspondentes com rendimentos compreendidos entre 21 a 92% (YONG et al., 1997).

Esquema 2. Síntese de guanidinas diprotégidas com reagente de Mukayama



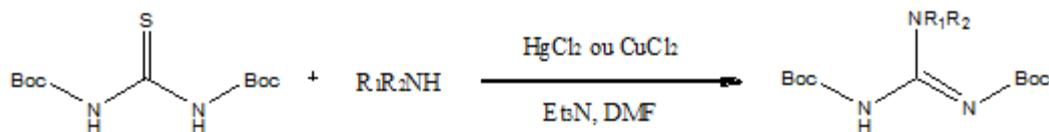
Tioureas substituídas com o grupo etoxicarbonila também foram utilizadas na obtenção de guanidinas. Este grupo protetor oferece a vantagem de menor impedimento estérico quando comparados com outros carbamatos utilizados como grupos protetores (Boc, Fmoc e Cbz). O deslocamento de enxofre em presença de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) ocorre em 48 horas sem a formação de produtos colaterais. O procedimento geral envolve a reação do tiocianato de potássio com um eletrófilo para formar o tiocianato protegido. Em seguida, a adição da amina ao tiocianato protegido resulta na obtenção da tiourea, a qual pode ser condensada com uma amina em presença do reagente de acoplamento (Esquema 3) (MANIMALA; ANSLYN, 2002)..

Esquema 3. Síntese de guanidinas a partir de tioureas e EDCI



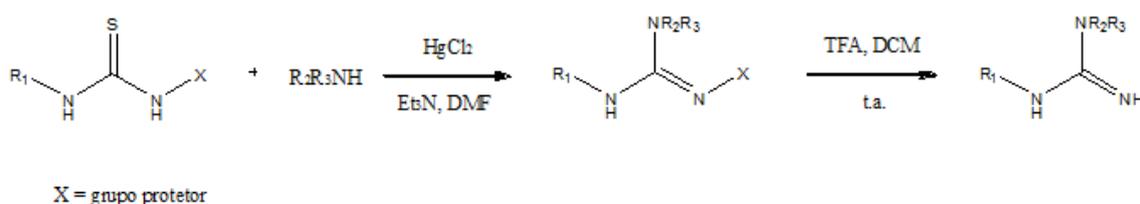
Tioureas protegidas com di-*tert*-butoxicarbonilas podem ser convertidas em guanidinas pela reação com aminas em presença de cloreto de mercúrio(II) ou de cobre(II) e trietilamina. O emprego do sal favorece a dessulfuração via formação de um complexo com o átomo de enxofre da tiourea (KIM; QIAN, 1993).

Esquema 4. Síntese de guanidinas com tioureias e haletos de metais tiofílicos



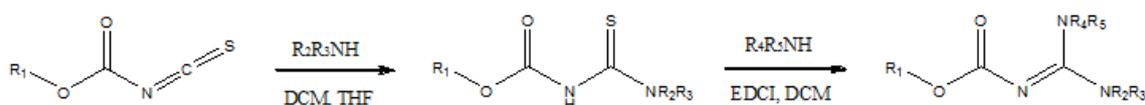
O cloreto mercúrico também foi utilizado para a obtenção de guanidinas a partir de tioureias cuja proteção é realizada em apenas um dos grupamentos amina (*N*-*boc*-*N'*-monossustituídas). Em contraste com as tioureias com di-*tert*-butoxicarbonilas, que permitem apenas a obtenção de guanidinas terminais, este método permite a formação de guanidinas internas, após a desproteção com ácido trifluoroacético (LEVAUET et al., 1997).

Esquema 5. Síntese de guanidinas com tioureias e cloreto de mercúrio(II)



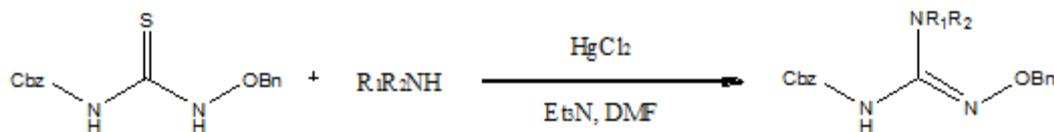
O emprego de isotiocianatos para a obtenção de guanidinas foi explorado. Estes reagentes fornecem um grupo protetor por toda a síntese. Em adição, o carbamato aumenta a reatividade do isotiocianato, o que permite a reação com aminas estericamente impedidas. A segunda etapa procede com a reação de uma segunda amina com a carbamoiltioureia para formar uma guanidina multissubstituída por meio do emprego de  $\text{EDCI}$ . Este método apresenta como vantagem adicional, a possibilidade da síntese em uma única etapa (LINTON et al., 2000).

Esquema 6. Síntese de guanidinas a partir de carbamoiltioureias



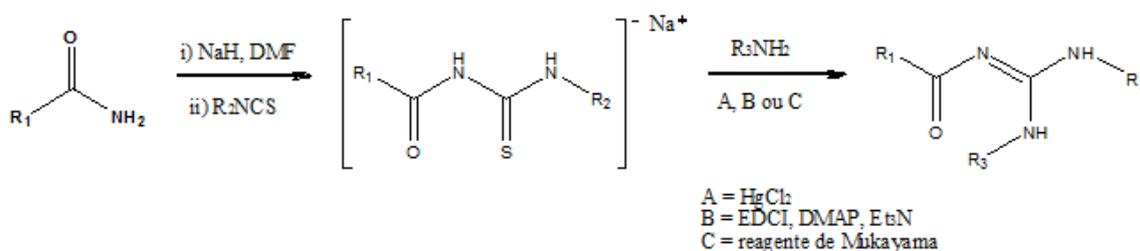
*N*-hidroxiguanidinas foram preparadas a partir da 1-benziloxi-3-Cbz-tioureia em um processo que possibilita a remoção simultânea dos grupos benziloxi e Cbz. O uso de cloreto mercúrico permite a dessulfuração da tioureia (JIRGENSONS et al., 1997).

Esquema 7. Síntese de *N*-hidroxiguanidinas com cloreto de mercúrio(II)



A síntese de acilguanidinas pode ser realizada em uma única etapa a partir de amidas, isotiocianatos e aminas, com o auxílio de um agente ativador (ZHANG et al., 2002). O intermediário iônico aciltiourônio formado pela reação de um ânion de amida primária com um tiocianato, fornece a acilguanidina *N,N'*-dissubstituída pela abstração de enxofre por um reagente tiofílico.

Esquema 8. Obtenção de acilguanidinas dissubstituídas com reagentes de acoplamento



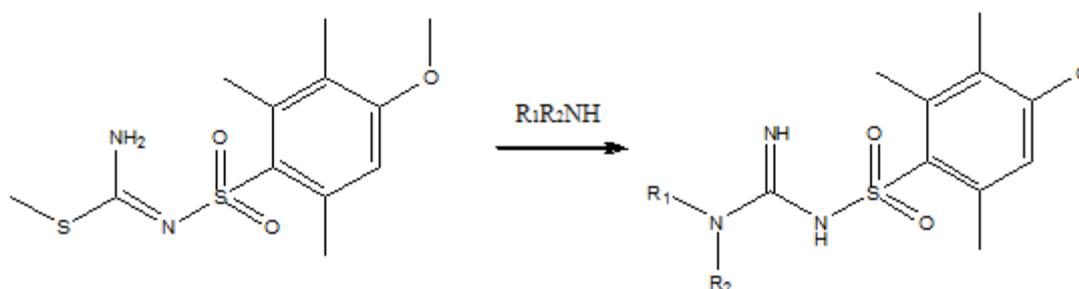
### 1.2.2. Isotioureias

Uma estratégia frequente na obtenção de guanidinas envolve a *S*-alquilação de tioureias para obter o sal de isotiourônio correspondente. Comumente, iodometano é utilizado como agente alquilante. A reação de uma amina primária ou secundária com um sal de *S*-alquilisotiourônio para formar guanidinas monossubstituídas é conhecida como procedimento de Rathke.

O mecanismo para esta reação envolve o ataque nucleofílico da amina sobre o tioéter por meio de uma rota de adição-eliminação. A guanilação é acompanhada pela liberação do gás nocivo metanotiol. Não obstante, este processo continua sendo um dos mais utilizados para a obtenção de guanidinas devido à facilidade de preparação, rendimentos elevados e variedade de aminas primária e secundárias que podem ser usadas (RATHKE, 1884).

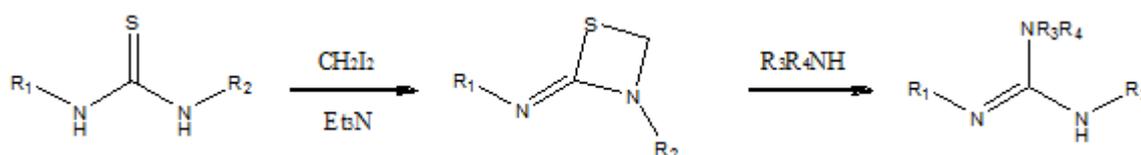
Guanidinas foram preparadas a partir de *N*-arilsulfonyl-*S*-metilisotiureias. O composto 4-metoxi-2,3,6-trimetilfenilsulfonyl foi reagido com piperidina ou anilina em presença de trietilamina e perclorato mercúrico ou perclorato de prata em refluxo de THF para formar guanidinas monoprotegidas (KENT et al., 1996).

**Esquema 9. Síntese de guanidinas monoprotegidas a partir de *N*-arilsulfonyl-*S*-metilisotiureia**



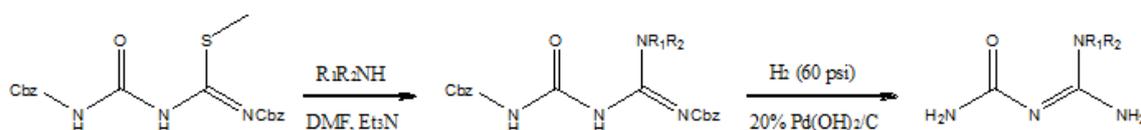
Compostos heterocíclicos com anéis pequenos são suscetíveis à abertura de anel devido à tensão anelar. Isto foi explorado quando guanidinas foram sintetizadas a partir da conversão de tioureias em tiazetidinas pela ação do diiodometano. Este método possibilita a formação de derivados tri e tetrassubstituídos com rendimentos satisfatórios (OKAJIMA; OKADA, 1991).

**Esquema 10. Obtenção de guanidinas a partir de tiazetidinas**



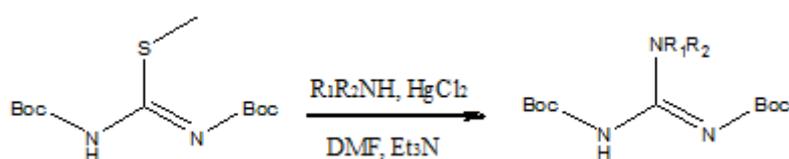
Guanidinourea foram preparadas a partir da reação de acil-ureido-*S*-metilisotiureias *N,N'*-protegidas com grupos benziloxycarbonil e aminas primárias ou secundárias. Na reação com butilamina, um produto colateral triazinadiona foi formado, mas em todos os outros casos o método forneceu exclusivamente guanidinas. A remoção do grupo Cbz ocorre por hidrogenólise catalisada por paládio (YUAN; WILLIAMS, 1996).

**Esquema 11. Método de preparação de guanidinoureas**



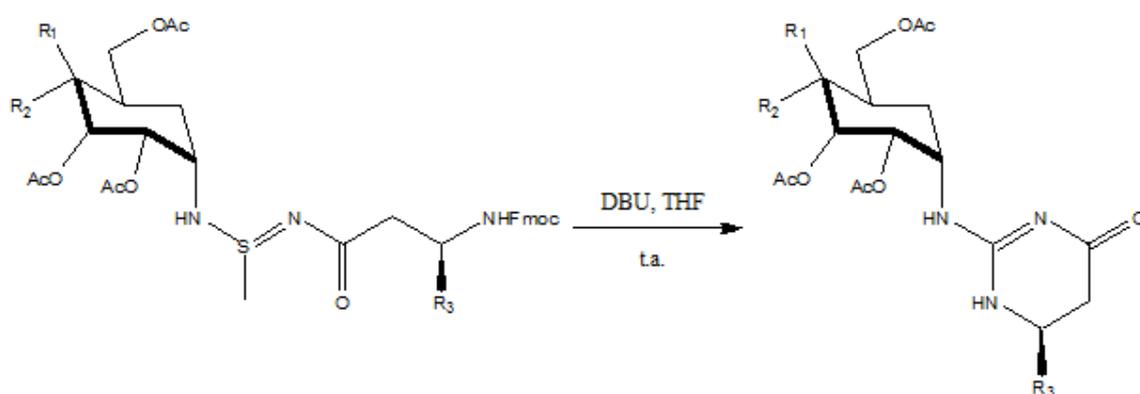
A reação entre di-Boc-S-metilisotioureias comercialmente disponíveis e aminas em presença de cloreto mercúrico a baixas temperaturas resultou em guanidinas diversas. Os produtos obtidos ilustram a aplicabilidade da reação, uma vez que a síntese pode ser empregada com aminas estericamente impedidas e aminas aromáticas. Anilinas com grupos eletrorretiradores reagem mais lentamente do que aquelas com grupos eletrodoadores (GUO et al., 2000).

**Esquema 12. Obtenção de guanidinas a partir de di-Boc-S-metilisotioureias e cloreto de mercúrio(II)**



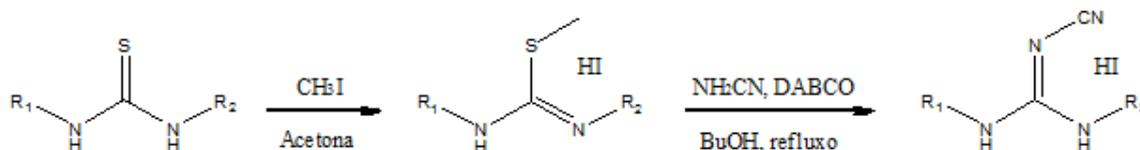
Guanidinoglicosídeos foram preparados pela ciclização intramolecular de  $\beta$ -amino-*N*-Fmoc-acilisotioureias. Quantidades catalíticas de DBU são utilizadas para que a reação ocorra em menos de uma hora (PEISHAN et al., 2003).

**Esquema 13. Formação de guanidinoglicosídeos por meio de ciclização intramolecular de acilisotioureias protegidas**



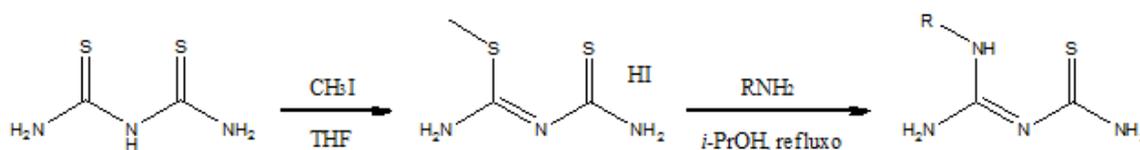
Cianoguanidinas foram preparadas a partir de sais de *S*-metilisotiourônio previamente obtidos pela reação entre aminas e isotiocianatos diversos, seguida de uma etapa de metilação com iodometano. Os sais foram submetidos à reação com cianamida em presença de quantidades catalíticas de 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano em refluxo de butanol. Os rendimentos variaram de 67 a 77% (NOVÁK et al., 1999).

Esquema 14. Síntese de cianoguanidinas a partir de *S*-metilisotiourônio



O ditiobiureto foi empregado como produto de partida para a síntese de guanidinas. Por ação do iodometano em THF, o sal de *S*-metilisotiourônio correspondente foi obtido. Este último, por sua vez, foi submetido à reação com aminas em refluxo de isopropanol para formar as guaniltioureias monossubstituídas (REITER et al. 1996).

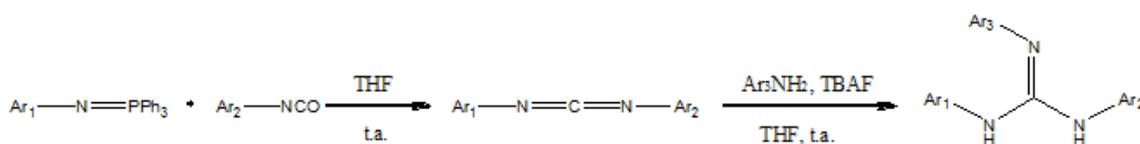
Esquema 15. Síntese de guaniltioureias monossubstituídas



### 1.2.3 Carbodiimidas e cianamidas

*N*-ariliminofosforanos foram convertidos em  $N^1, N^2, N^3$ -trialilguanidinas por reação com isocianatos, seguida pelo tratamento dos intermediários  $N^1, N^2$ -diarilcarbodiimidas com aminas aromáticas em presença de TBAF. O TBAF pode conduzir à formação de um intermediário altamente reativo fluoroformamida ou, ainda, pode atuar como uma base forte, levando a um incremento na reatividade do nucleófilo nitrogenado (MOLINA et al., 2003).

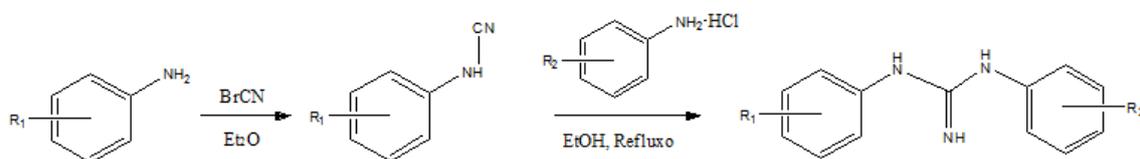
Esquema 16. Síntese de guanidinas a partir de *N*-ariliminofosforanos



Cianamidas também servem como produtos de partida para a obtenção de guanidinas.  $N, N'$ -Diarilguanidinas foram preparadas por meio da reação entre cloridratos de

aminas aromáticas e arilcianamidas previamente formadas a partir de brometo de cianogênio e anilinas. (REDDY et al., 1998).

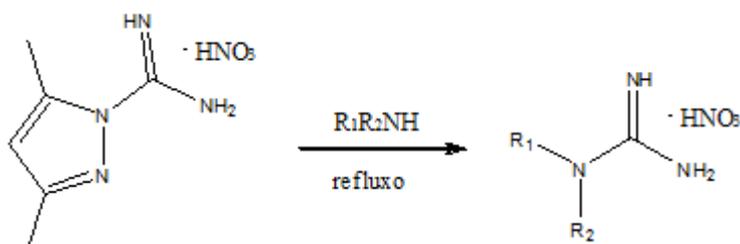
**Esquema 17. Síntese de *N,N'*-diarilguanidinas por meio de cianamidas**



#### 1.2.4. Pirazol-1-carboximidamidas

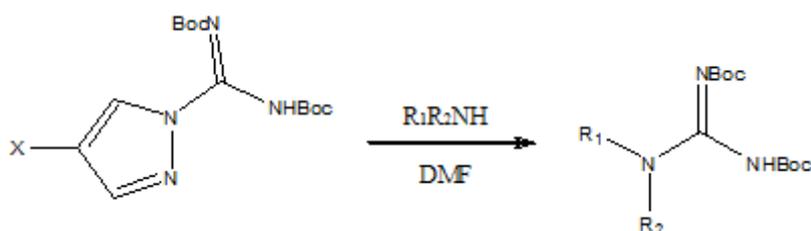
Estes compostos são frequentemente utilizados para a preparação de guanidinas. Em 1953, a reação entre 2,4-dimetilpirazol-1-carboximidamida e aminas foi considerada anormal porque o intuito inicial era substituir o grupo amino em analogia a ureias e compostos relacionados (KATRITZKY; ROGOVOY, 2005).

**Esquema 18. Formação de guanidinas via pirazol-1-carboximidamidas**



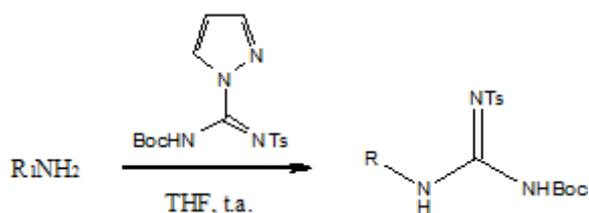
A presença de grupos eletrorretiradores no anel pirazólico ou nos nitrogênios da carboximidamida conduz a um aumento da eletrofilicidade, uma vez que as reações em que o pirazol apresenta grupamento nitro na posição 4 do anel forneceram as guanidinas protegidas derivadas de aminas estericamente impedidas ou aminas de baixa nucleofilicidade (YONG et al., 1999).

**Esquema 19. Obtenção de guanidinas a partir de derivados pirazólicos *N,N'*-protegidos**



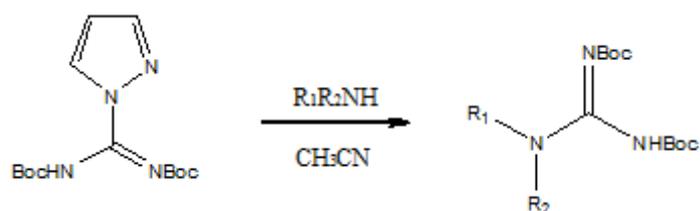
A reação de aminas primárias com *N*-Boc-*N'*-tosilpirazol-1-carboximidamida resulta na obtenção de guanidinas protegidas com sulfonamida. O método foi empregado com sucesso para síntese de peptídeos em solução e com suporte sólido. Os rendimentos foram quantitativos, exceto quando piperidina ou *p*-nitroanilina são empregadas (GHOSH et al., 2001).

Esquema 20. *N*-Boc-*N'*-tosilpirazol-1-carboximidamida na obtenção de guanidinas



Guanidinas monossustituídas foram preparadas a partir da reação entre várias aminas e di-Boc-pirazol-1-carboximidamida. Vários aminoácidos foram adicionalmente convertidos em guanidinoácidos a partir deste procedimento. Apesar da baixa solubilidade dos aminoácidos em solventes orgânicos, as reações puderam ser realizadas, de modo geral, em acetonitrila, devido à natureza polar aprótica e à facilidade de remoção deste solvente em etapas de purificação (DRAKE et al., 1994).

Esquema 21. Síntese de guanidinas monossustituídas a partir de derivados pirazólicos diprotetidos

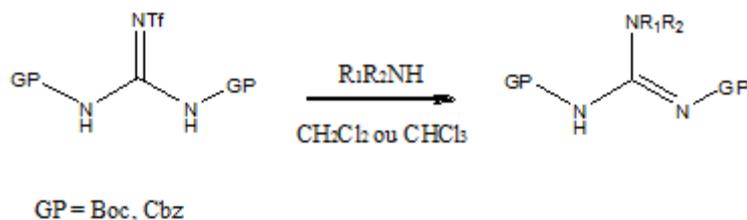


#### 1.2.4. Trifilguanidinas

*N,N'*-di-Boc-*N'*-trifilguanidinas e *N,N'*-di-Cbz-*N'*-trifilguanidinas foram descritas como produtos de partida para reações de guanilação em 1998 (FEICHTINGER; SINGS; et al., 1998)

(FEICHTINGER; ZAPF; et al., 1998). Guanidinas monossubstituídas foram obtidas a partir de aminas primárias e secundárias com rendimentos elevados.

Esquema 22. Formação de derivados guanidínicos a partir de trifilguanidinas protegidas

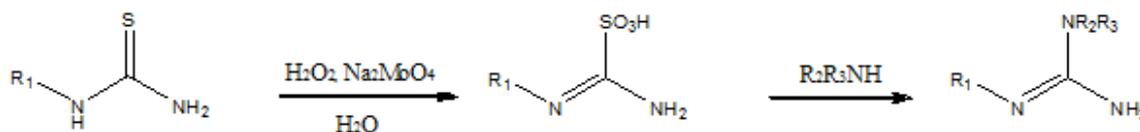


### 1.2.5. Ácidos aminoiminometanosulfônicos

Os ácidos aminoiminometanosulfônicos e aminoiminometanosulfínicos são utilizados como precursores de guanidinas. Os intermediários sulfônicos são termicamente estáveis à temperatura ambiente e, portanto, são os intermediários preferidos (MARYANOFF et al., 1986).

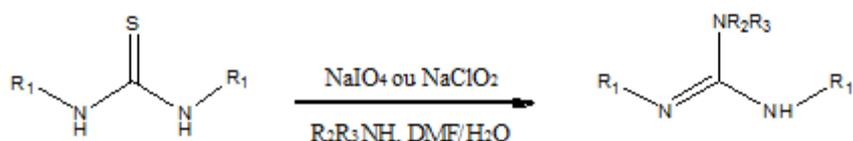
Os ácidos aminoiminosulfônicos são obtidos pela oxidação de tioureias com peróxido de hidrogênio em presença do catalisador molibdato de sódio. A segunda etapa na sequência envolve o deslocamento do enxofre oxidado por aminas nucleofílicas para fornecer as guanidinas via mecanismo de adição-eliminação.

Esquema 23. Obtenção de guanidinas via ácidos aminoiminometanosulfônicos



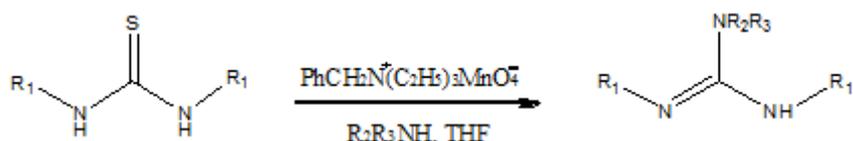
A formação de guanidinas foi realizada por ação de diversas aminas alifáticas e aromáticas em meio aquoso sobre derivados aminoiminometanosulfônicos gerados in situ com auxílio de clorito de sódio ou metaperiodato de sódio. A adição de trietilamina se fez necessária para acelerar a velocidade de oxidação dos derivados alifáticos (RAMADAS et al., 1997).

Esquema 24. Oxidação de tioureias e formação de guanidinas



A síntese de guanidinas em uma única etapa foi realizada em presença de permanganato de benziltriethylamônio cujo emprego, diferentemente do permanganato de potássio, não está restrito ao uso de meio aquoso no qual os substratos apresentam baixa solubilidade (SRINIVASAN; RAMADAS, 2001).

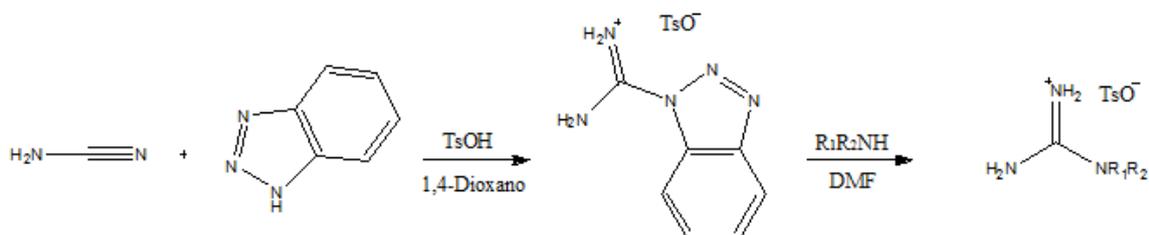
Esquema 25. Síntese de guanidinas em uma única etapa com permanganato de benziltriethylamônio



### 1.2.6. Benzotriazóis

Uma abordagem diferente consiste no emprego de tosilato de benzotriazol-1-carboxamidamídínio para formar guanidinas substituídas a partir de aminas. O intermediário foi obtido a partir da reação entre benzotriazol e cianamida em refluxo de dioxano.com ácido *p*-toluenosulfônico. A etapa de formação da guanidina é realizada em DMF ou acetonitrila, uma vez que o produto precipita durante a reação nestes solventes, o que facilita o processo de purificação (KATRITZKY et al., 1995).

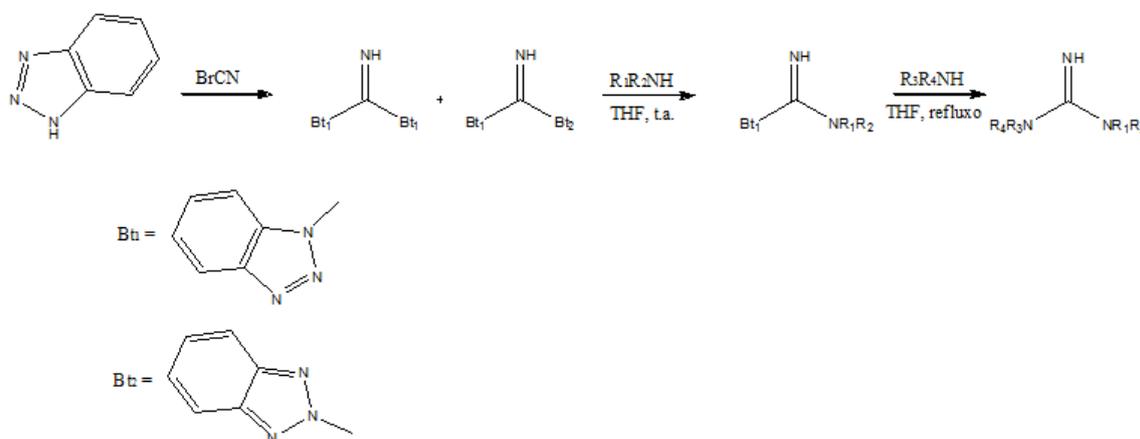
Esquema 26. Síntese de guanidinas por meio de benzotriazol-1-carboxamidamídínio



A introdução dos grupos protetores eletrorretiradores *tert*-butiloxicarbonílicos na região amidínica e de grupos nitro ou cloro na região do anel benzotriazólico favorece este último como grupo abandonador para formar a guanidina (MUSIOL; MORODER, 2001).

Di-(benzotriazolil)carboximidamidas foram utilizadas na síntese de guanidinas tri e tetrassubstituídas. A condensação sequencial de duas aminas com a carboximidamida não depende de efeitos estéricos ou eletrônicos, o que permite o uso de uma ampla variedade de aminas e guanidinas como bases livres, incluindo aminas estericamente impedidas (KATRITZKY et al., 2000).

#### Esquema 27. Obtenção de guanidinas via di-(benzotriazolil)carboximidamidas



### 1.3. Atividades Biológicas de Guanidinas

Devidos às várias formas de interação que o grupo guanidina pode realizar com macromoléculas biológicas, derivados guanidínicos apresentam um amplo espectro de atividades. As propriedades farmacológicas de algumas guanidinas de origem sintética foram revisadas em artigo de revisão (BERLINCK et al., 2010) e algumas atividades são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Atividades biológicas de guanidinas sintéticas

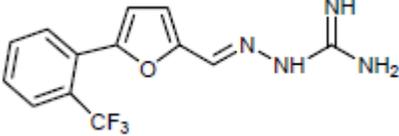
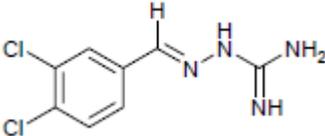
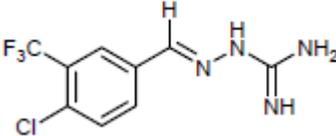
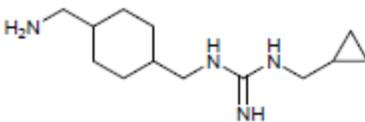
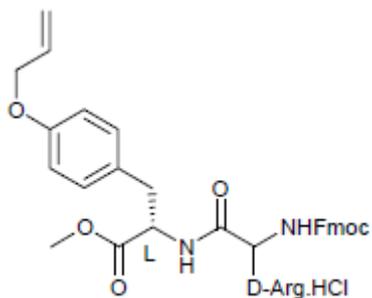
Entrada	Composto	Atividade	Referência
1		Inibidor de NPFF1 e NPFF2	(GAUBERT et al., 2009).
2		Inibidor de NPFF1 e NPFF2	(GAUBERT et al., 2009).
3		Inibidor de NPFF1 e NPFF2	(GAUBERT et al., 2009).
4		Anti-hiperglicêmico	(TASSONI et al., 2008).

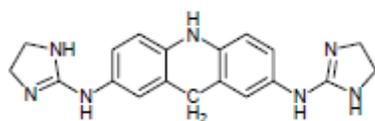
Tabela 1. *Continuação*

5



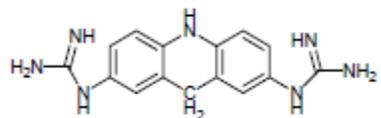
Atividade contra (BOYLE et al., 2008).  
*Staphylococcus aureus*

6



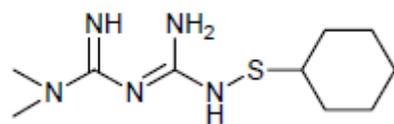
Antitripanosoma in (RODRÍGUEZ et al., 2008).  
vitro

7



Antiplasmódio in (RODRÍGUEZ et al., 2008).  
vitro

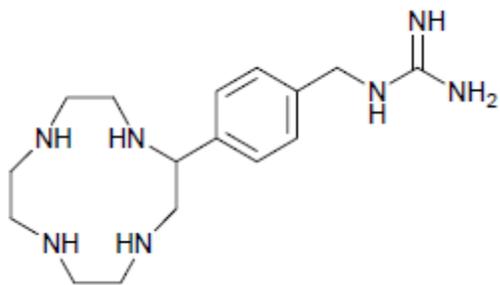
8



Antidiabético (HUTTUNEN et al., 2009).

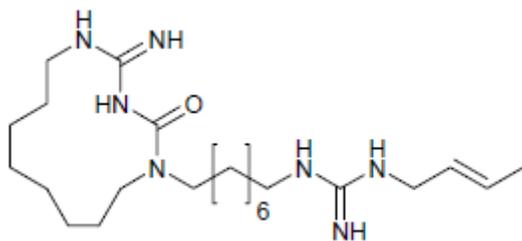
Tabela 1. *Continuação*

9



Antitripanosoma (REID et al., 2008).

10

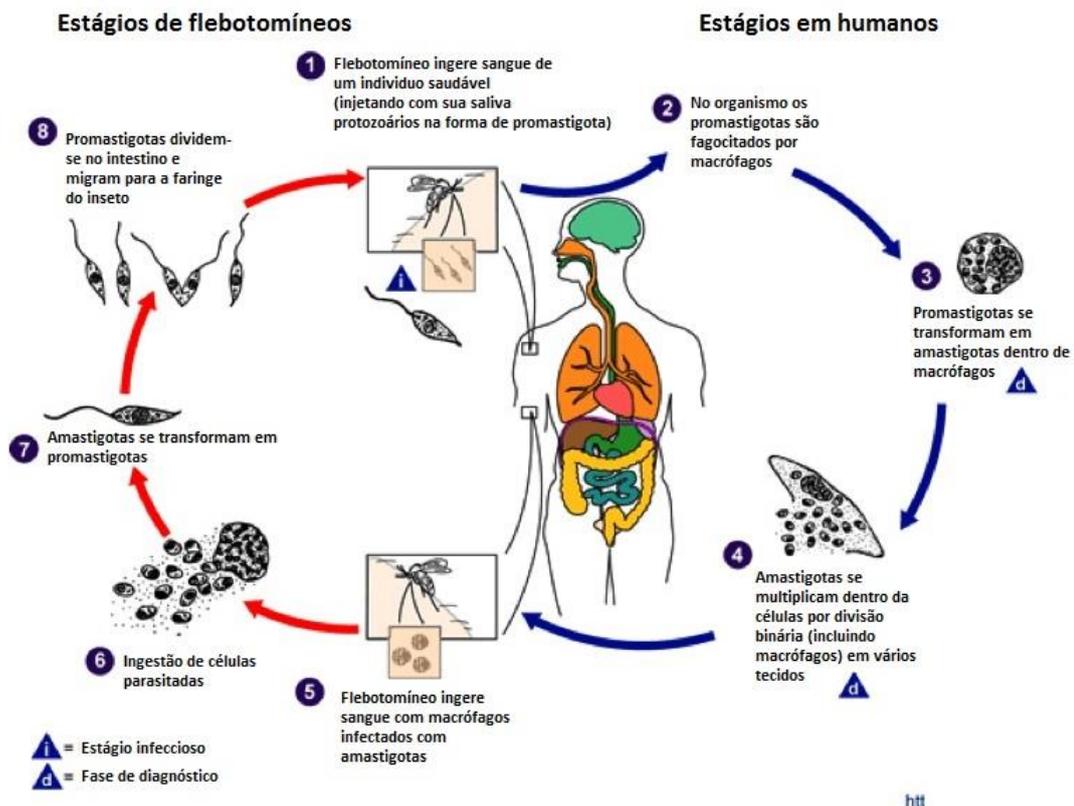


Antifúngico (MANETTI et al., 2009).

#### 1.4. Considerações Gerais sobre a Leishmaniose

Embora seja estimada como a nona maior causa de doenças infecciosas em indivíduos, a leishmaniose é amplamente ignorada na discussão das prioridades de doenças tropicais. Esta entrega ao esquecimento crítico resulta de sua complexa ecologia e epidemiologia, da falta de ferramentas simples e de fácil aplicação para administrar os casos, além da escassez de dados atualizados sobre incidência. Todos esses fatores agrupados resultam frequentemente na falha, por parte dos gestores políticos, em reconhecer a importância desta doença (ALVAR et al., 2012).

Figura 10. Ciclo biológico de espécies de *Leishmania*



Traduzido de <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

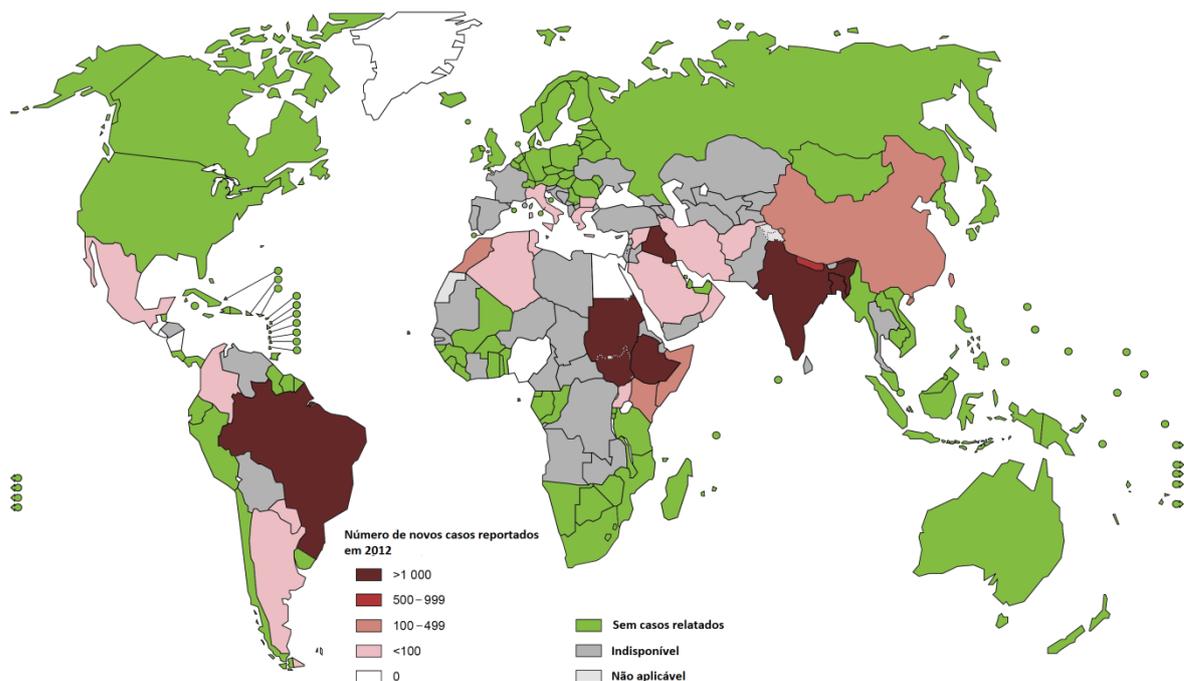
A transmissão de leishmaniose ocorre através vetores hematófagos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Os parasitas se multiplicam no trato digestivo do vetor, e são transmitidos para o hospedeiro mamífero durante alimentação. Nos vetores, as espécies de *Leishmania* estão sob as formas de promastigotas, que são alongadas e extracelulares. No

hospedeiro vertebrado, o parasita se multiplica dentro dos macrófagos como amastigotas, que são esféricas, com um flagelo internalizado. O protozoário é capaz de sobreviver a condições de estresse, destroem os macrófagos, e são fagocitados por nova célula hospedeira (MONZOTE, 2009).

A leishmaniose é prevalente em 98 países e em 5 continentes. Aproximadamente 1,3 milhão de casos ocorrem anualmente, dos quais 1 milhão são cutâneos ou mucocutâneos. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países, a saber, Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 11). A leishmaniose cutânea, por sua vez, ocorre principalmente em Afeganistão, Algéria, Arábia Saudita, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Síria e Tunísia (Figura 12). Em contraste, a leishmaniose mucocutânea ocorre quase que exclusivamente na América Latina, com aproximadamente 90% dos casos incidindo em Bolívia, Brasil e Peru.

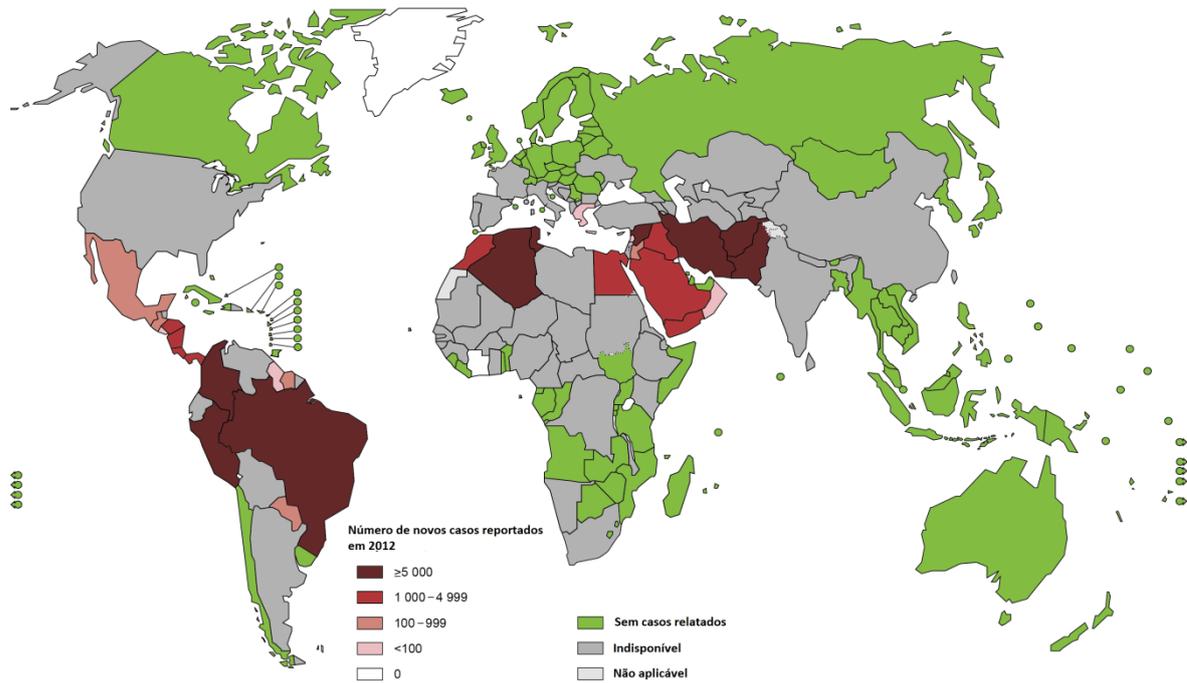
É estimado que cerca de 20.000 a 40.000 indivíduos são mortos pela leishmaniose visceral anualmente. Na África Oriental, particularmente no Sudão do Sul e Sudão, epidemias da doença visceral são frequentes.

**Figura 11. Estado mundial da endemicidade de leishmaniose visceral em 2012.**



Adaptado de [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_VL\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png)

Figura 12. Estado mundial da endemicidade de leishmaniose cutânea em 2012.



Adaptado de [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_CL\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png)

No Brasil, segundo dados fornecidos pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde com base no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, a maior taxa de incidência de leishmaniose visceral ocorre no estado de Tocantins, com 23,77 novos casos por 100.000 habitantes (Tabela 2). Com relação à leishmaniose cutânea, as maiores taxas de incidência também se concentram na região Norte do país, com destaque Acre e Amapá, que apresentam taxas de incidência de 144,31 e 100,06 por 100.000 habitantes, respectivamente.

Tabela 2. Taxas de incidência de leishmaniose visceral e cutânea em estados brasileiros em 2012

Estado	Taxa de Incidência <sup>a</sup> (Leishmaniose visceral)	Taxa de Incidência <sup>a</sup> (Leishmaniose cutânea)
Rondônia	0,13	71,01
Acre	-	144,31
Amazonas	0,03	62,66
Roraima	2,13	95,20

Pará	3,21	50,13
<b>Tabela 2. Continuação</b>		
Amapá		100,06
Tocantins	23,77	31,18
Maranhão	4,99	35,39
Piauí	5,79	3,13
Ceará	4,23	10,69
Rio Grande do Norte	2,97	0,15
Paraíba	1,02	1,70
Pernambuco	0,72	3,72
Alagoas	1,11	2,21
Sergipe	2,51	0,38
Bahia	2,05	29,97
Minas Gerais	1,85	4,73
Espírito Santo	0,03	2,91
Rio de Janeiro	0,03	0,28
São Paulo	0,53	0,62
Paraná	0,03	3,86
Santa Catarina	0,03	0,19
Rio Grande do Sul	-	0,06
Mato Grosso do Sul	11,86	5,63
Mato Grosso	1,86	84,58
Goiás	0,47	5,09
Distrito Federal	0,42	1,28

Adaptado de Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Dados disponíveis em <http://tabnet.datasus.gov.br/>

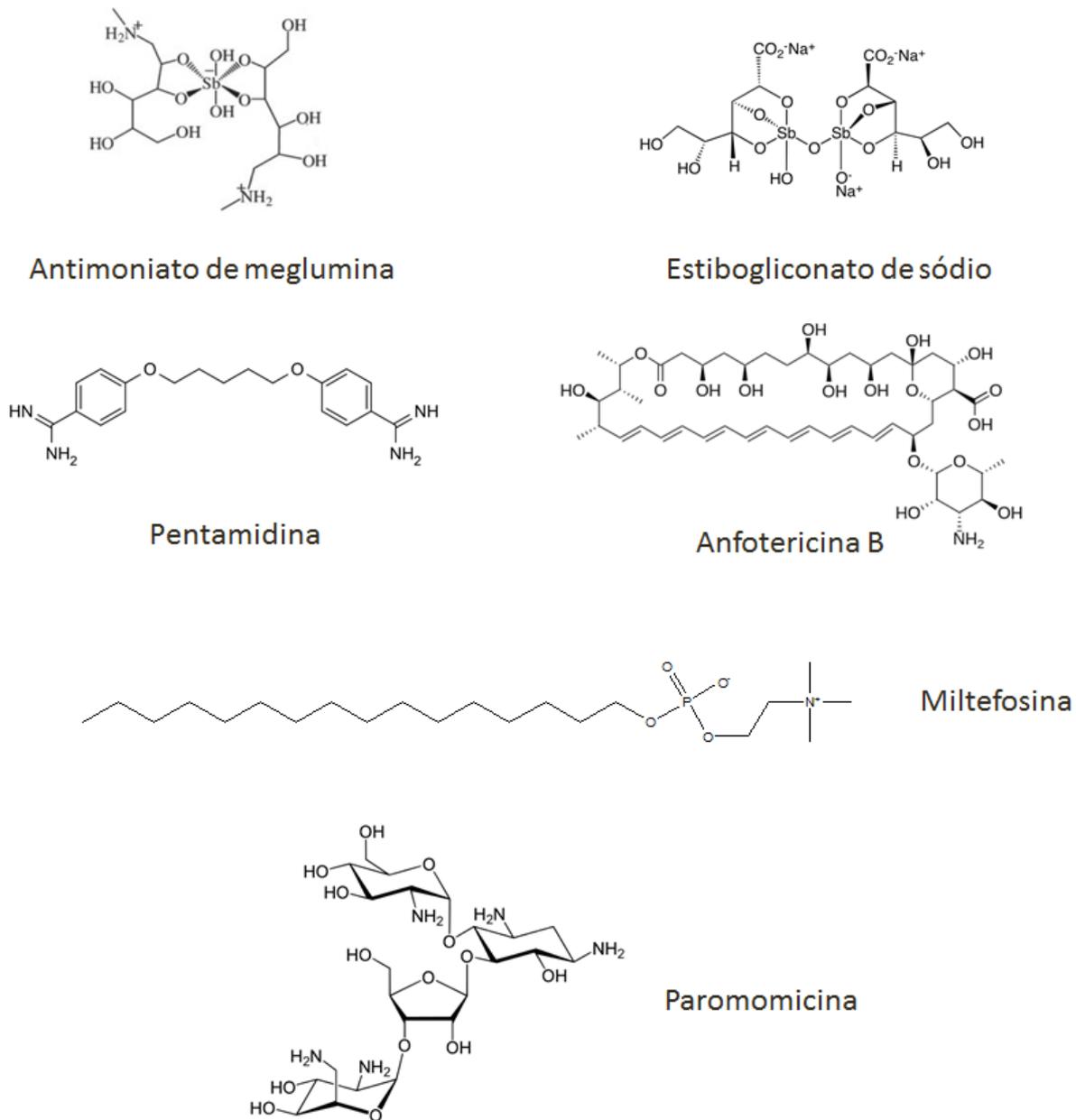
<sup>a</sup>Taxa de incidência: número de casos por 100.000 habitantes

Já que vacinas ainda estão em desenvolvimento, as estratégias atuais de controle da leishmaniose dependem do gerenciamento de casos, o que envolve tanto o diagnóstico precoce, como o acompanhamento do paciente durante a farmacoterapia para garantir não haja abandono durante o tratamento, além do controle de vetores e de reservatórios naturais. Atenção tem sido dada principalmente às estratégias de prevenção da leishmaniose visceral, a forma com a mais alta taxa de mortalidade. Não obstante, as estratégias de prevenção também devem ser consideradas para a leishmaniose cutânea, que é também um grande encargo para determinadas áreas, com efeitos psicossociais graves (DAWIT et al., 2013).

A leishmaniose visceral, causada por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, apresenta sintomas característicos como hepato-esplenomegalia e pancitopenia, o que resulta da infecção de macrófagos no sistema retículo endotelial, pele, e mucosas nasal e oral. A infecção pode levar a morte em 90 % dos casos quando não é tratada. No presente, esta doença é combatida com complexos de antimônio pentavalente e/ou sais de pentamidina, bem como o antifúngico anfotericina B (MANSON-BAHR, 1982).

Entretanto, como para a maioria das doenças infecciosas, custo, toxicidade e resistência são obstáculos constantes de tratamento em massa. De modo geral, o tratamento tem sido centrado em antimoniais pentavalentes. No entanto, tem ocorrido um crescente aumento da resistência contra os antimoniais e, por conseguinte, a anfotericina B tornou-se o fármaco de escolha em regiões com alta prevalência de cepas resistentes aos complexos de antimônio. Apesar do índice de cura de cerca de 100%, este tratamento requer um acompanhamento minucioso, uma vez que inclui o risco de graves, e até mesmo fatais, efeitos colaterais, o que o torna inviável para muitos países subdesenvolvidos ou comunidades empobrecidas (MACMORRIS-ADIX, 2008)..

Figura 13. Estruturas químicas dos fármacos antileishmaniais

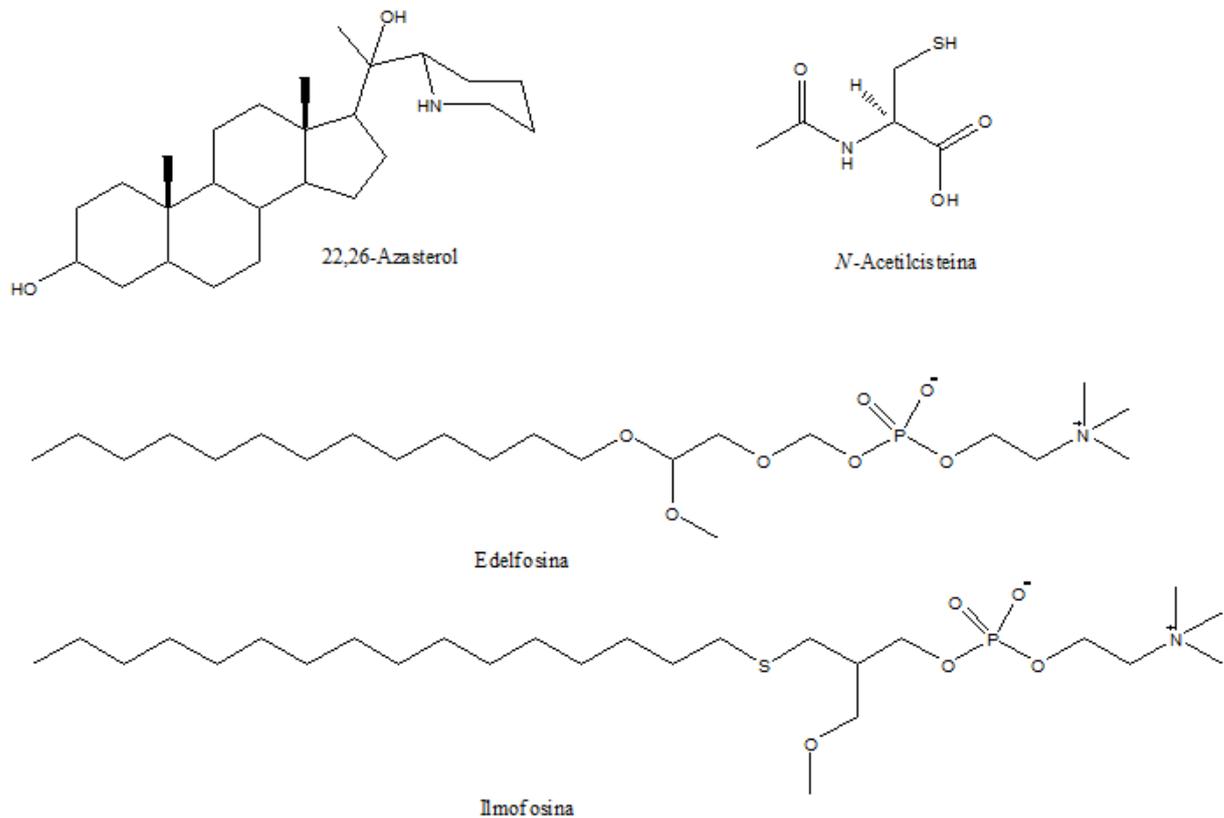


Outros fármacos cujo emprego foi mais recente para controle da leishmaniose, miltefosina e paromomicina, ainda não apresentaram resistência clínica descrita. Por outro lado, ambos exibem limitações que comprometem sua eficácia terapêutica. A miltefosina foi originalmente desenvolvida como agente antineoplásico e foi o primeiro fármaco a ser administrado por via oral para quimioterapia da leishmaniose visceral. O fármaco tem uma meia-vida longa, de aproximadamente 152 horas, o que poderia resultar no surgimento de resistência clínica. Além disso, tem ação teratogênica e, portanto, seu uso é limitado durante

a gestação. A paromomicina, por sua vez, tem ação nas formas cutânea e visceral da doença, mas tem sua disponibilidade limitada, o que a torna pouco acessível em áreas endêmicas (SINGH et al., 2012).

Nos últimos anos, grandes avanços foram realizados no que concerne à compreensão da biologia do protozoário, pois os genomas de várias espécies de *Leishmania* foram sequenciados, enquanto que a análise pós-genômica destes parasitas e da resposta do hospedeiro passou a progredir mais rapidamente. Em adição, recombinação sexual entre parasitas foi demonstrada, e os pormenores do ciclo no interior do vetor e da transmissão natural têm sido aprofundados (KAYE; SCOTT, 2011).

Figura 14. Compostos com atividade leishmanicida



Com relação ao desenvolvimento de novos fármacos, vários produtos de origem sintética apresentam potencial atividade contra espécies de *Leishmania*. Por exemplo, azasteróis são inibidores de 24-metiltransferase e mostraram atividade contra promastigotas de *L. donovani* e amastigotas de *L. amazonensis*. Os compostos edelfosina e ilmofosina, novos derivados alquil-lisofosfolipídicos exibiram elevada atividade in vitro contra promastigotas e amastigotas de *L. donovani*. A *N*-acetilcisteína, precursor da

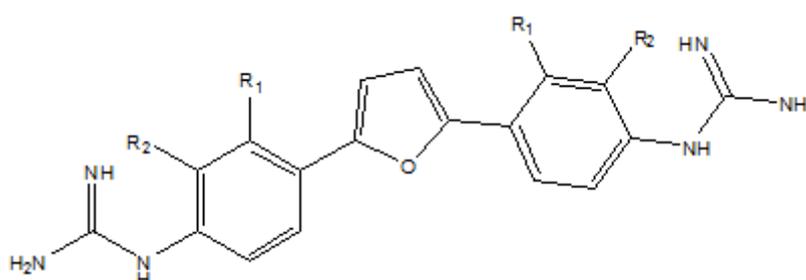
glutaciona, mostrou atividade in vivo contra *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, enquanto que quinolinas 3-substituídas atuaram como potenciais ativadores de macrófagos, além de apresentar atividade in vitro contra promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* (PATIL et al., 2012).

### 1.5. Guanidinas e Leishmania

Algumas moléculas sintéticas descritas na literatura com atividade antileishmania apresentam o grupo guanidina em suas estruturas. Em algumas delas, este grupo está incorporado em esqueletos rígidos, como nos casos de derivados pirimidínicos e quinazolínicos.

A pentamidina (Figura 10) apresenta dois centros catiônicos, que correspondem aos grupos amidínicos. Com base nesta particularidade estrutural, diversos derivados diamidínicos têm sido desenvolvidos, visando à maior eficácia e menor toxicidade em comparação com o composto protótipo. A troca do grupo amidina por guanidina conduz igualmente à obtenção de espécies dicatiônicas. Com base nesta premissa, uma série de compostos diguanidínicos foi sintetizada e seus efeitos sobre *Leishmania donovani* foram avaliados in vitro. O composto mais potente da série apresentou  $CI_{50}$  igual a  $3,3 \mu M$  contra amastigotas da espécie citada, em comparação com  $2,6 \mu M$  mostrada pela pentamidina (STEPHENS et al., 2003).

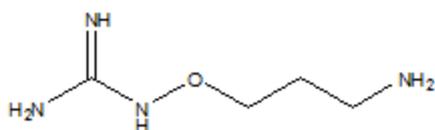
Figura 15. Estrutura dos análogos diguanidínicos



O composto  $\gamma$ -guanidinoxipropilamina foi testado contra cepas selvagens e superexpressoras de ornitina descarboxilase de *L. donovani*. Os resultados mostraram que

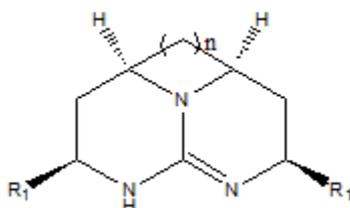
este derivado é capaz de mimetizar o estado protonado da putrescina e inibir o transporte desta última (SINGH et al., 2008).

**Figura 16. Estrutura química da  $\gamma$ -guanidinoxipropilamina**



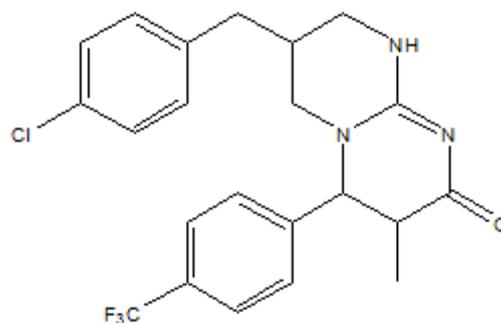
A partir do alcaloide policíclico isolado de *Batzella* spp., batzelanina K, foram elaborados 50 análogos tricíclicos com o grupo guanidina. Os candidatos mais promissores contra *L. donovani* foram aqueles com grupos nonilas como substituintes dos anéis, cujo valor de  $CI_{50}$  correspondeu a 2,34 mM contra amastigotas, em comparação com 2,94  $\mu$ M da pentamidina (AHMED et al., 2012).

**Figura 17. Estrutura dos análogos guanidínicos tricíclicos**



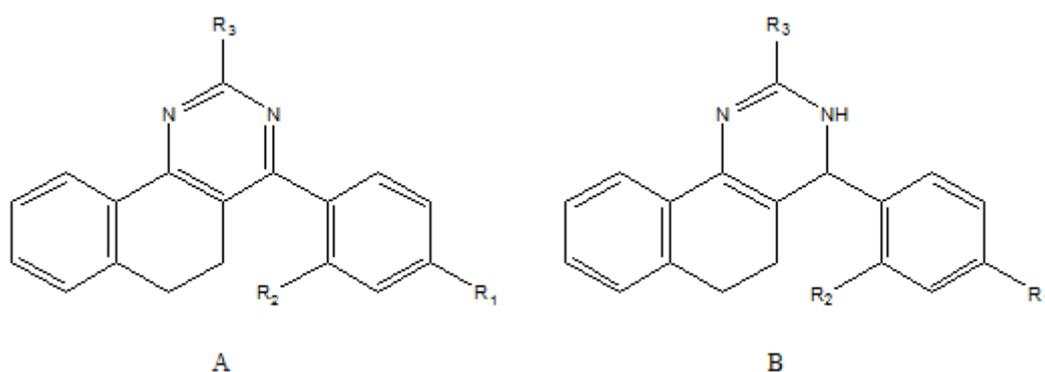
Com base em modelagem molecular, 12 compostos foram planejados como inibidores da enzima pteridina redutase 1, um alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos. Dentre eles, os efeitos de uma pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona sobre *L. donovani* foram investigados. Os resultados do ensaio revelaram uma  $CI_{50}$  igual a 3  $\mu$ M para amastigotas, enquanto que para promastigotas o valor foi igual a 29  $\mu$ M (KAUR et al., 2011).

Figura 18. Estrutura do derivado pirimido[1,2-a]pirimidin-2-ona com atividade antileishmania



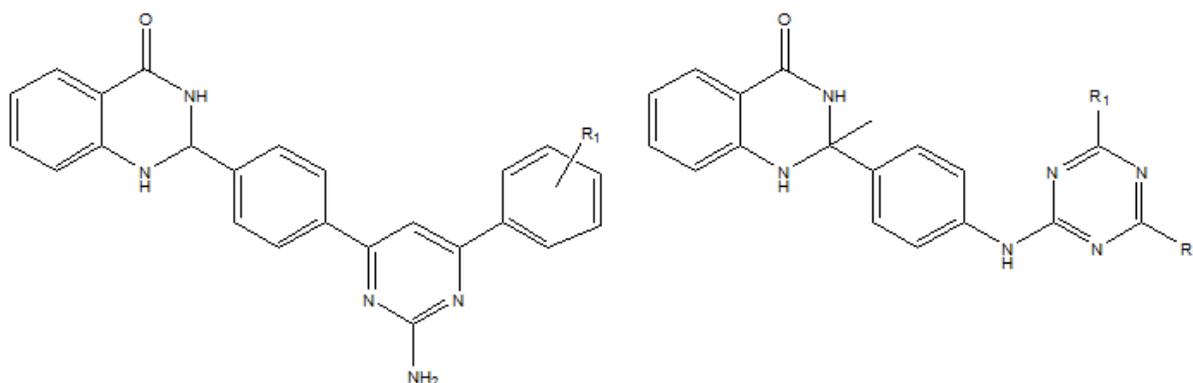
Derivados quinazolinícos diversamente substituídos foram sintetizados e a atividade destes compostos contra *L. donovani* foi determinada. Todos os derivados tetraidroquinazolinícos (B) mostraram inibições próximas a 100% contra promastigotas, enquanto que os análogos diidroquinazolinícos (A) mostraram atividade inferior. Os compostos com grupo 1-piridin-2-il-piperazina em R<sub>3</sub> apresentaram as menores atividades na série. Em adição, quando o substituinte em R<sub>1</sub> é um átomo de cloro, outro grupo eletrorretirador na posição *orto* (R<sub>2</sub>) resulta em substâncias mais ativas, em comparação com os análogos não substituídos. Na ausência de um substituinte na posição *orto*, os compostos destituídos de um substituinte em posição *para* foram mais ativos do que aqueles com grupos eletrorretiradores nesta mesma posição, o que demonstra sua importância para a atividade (AGARWAL et al., 2009).

Figura 19. Estruturas dos análogos (A) diidroquinazolinícos e (B) tetraidroquinazolinícos



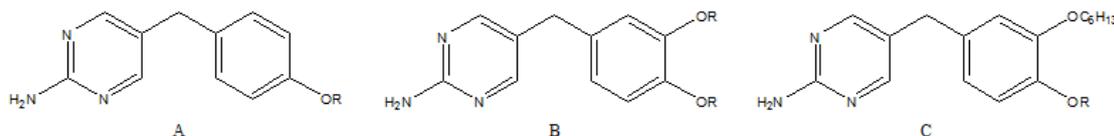
Uma série de derivados quinazolinônicos foi sintetizada a partir de hibridização molecular visando à atividade antileishmania. Com base em esqueletos de produtos naturais ativos contra os parasitas, os híbridos quinazolinônicos foram obtidos por meio da introdução de sistemas heterocíclicos pirimidínico e triazínico. O protótipo mais potente apresentou valor de  $Cl_{50}$  iguais a  $0,65 \mu\text{M}$  contra amastigotas e  $1,75 \mu\text{M}$  contra promastigotas de *L. donovani* (SHARMA et al., 2013).

**Figura 20. Estruturas dos híbridos quinazolinônicos**



Ensaio *in vitro* também demonstraram que uma série de 2,4-diaminopirimidinas apresenta atividade contra amastigotas de *L. donovani*, além de inibir a enzima diidrofolato redutase. O composto mais potente exibiu valor de  $Cl_{50}$  correspondente a  $3,7 \mu\text{M}$  (PEZ et al., 2003).

**Figura 21. Estruturas dos análogos de 2,4-diaminopiridina**



Com base no que foi exposto, é evidente a necessidade de buscar novos protótipos de fármacos antileishmaniais. Apesar de ser uma parasitose de ocorrência frequente, a leishmaniose é uma doença negligenciada, uma vez que sua incidência predomina em países tropicais subdesenvolvidos. Em adição, os fármacos já existentes apresentam elevada toxicidade ou teratogenicidade, além de eficácia reduzida devido à emergência de cepas resistentes. O grupo guanidina também está presente em moléculas ativas contra as

espécies de *Leishmania*. Com base nestas premissas, este trabalho visa à obtenção de derivados novos guanidínicos com atividade leishmanicida.

## 2. Objetivos

### 2.1. Geral

Sintetizar derivados 2-arilidenoaminoguanidínicos e 2-benzilidenoaminoguanidínicos *N*-substituídos com atividade leishmanicida.

### 2.2. Específicos

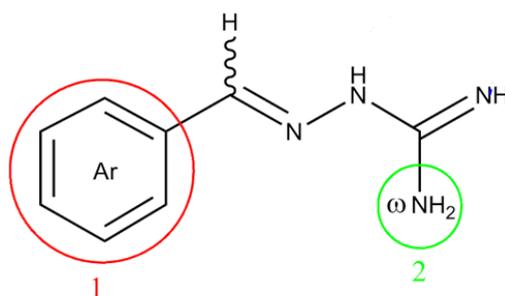
- Otimizar os tempos reacionais para obtenção de derivados 2-arilidenoaminoguanidínicos;
- Sintetizar derivados 2-benzilidenoaminoguanidínicos *N*-substituídos;
- Avaliar o efeito leishmanicida dos derivados 2-arilidenoaminoguanidínicos sobre promastigotas de *Leishmania braziliensis*;
- Realizar estudo de relação estrutura-atividade qualitativa dos derivados 2-arilidenoaminoguanidínicos.

### 3. Moléculas planejadas

Os derivados foram planejados com base em alterações realizadas em diferentes regiões da molécula da arilidenoaminoguanidina para que se possa realizar um estudo de relação estrutura-atividade. Com isso, deverá ser estudada a influência:

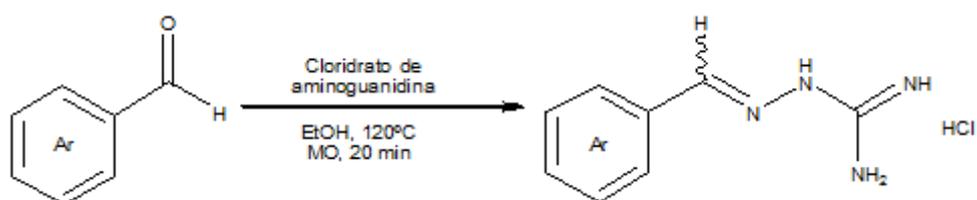
1. Da substituição do anel aromático, o posicionamento da fenila e a substituição da fenila por alguns heterociclos.
2. Da substituição da amina  $\omega$  da região guanidínica.

Figura 22. Modificações estruturais planejadas para a síntese de derivados aminoguanidínicos



A ação do cloridrato de aminoguanidina sobre os aldeídos mostrados no Esquema 28 conduz aos análogos de 2-arilidenoaminoguanidinas.

Esquema 28. Rota sintética e aldeídos utilizados na síntese dos derivados com variação da região 1.

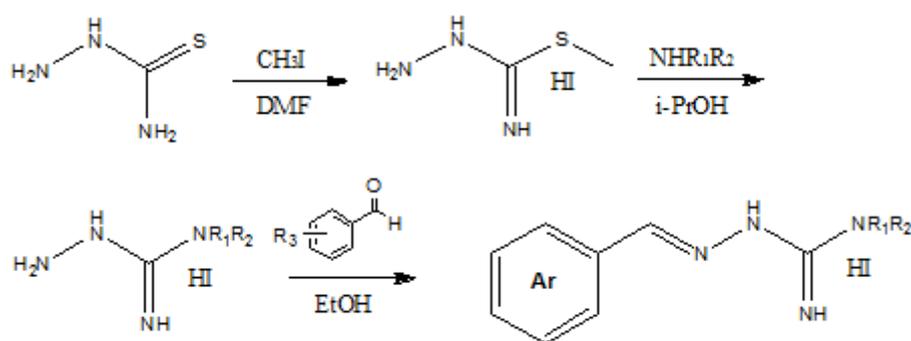


Substância	Ar	Substância	Ar	Substância	Ar
LQM001		LQM007		LQM013	
LQM002		LQM008		LQM014	
LQM003		LQM009		LQM015	
LQM004		LQM010		LQM016	
LQM005		LQM011		LQM017	
LQM006		LQM012		LQM018	

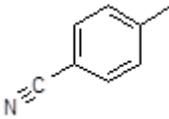
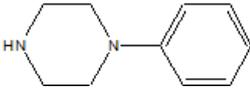
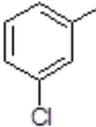
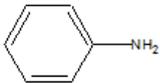
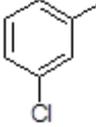
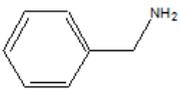
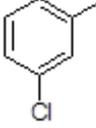
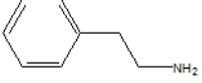
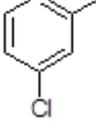
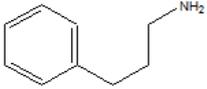
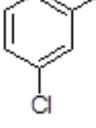
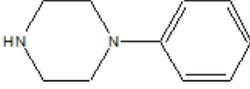
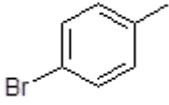
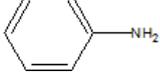
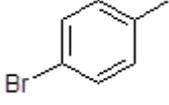
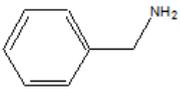
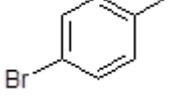
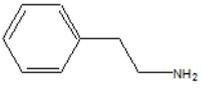
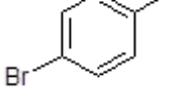
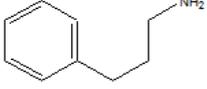
Este estudo tem como objetivo avaliar a importância dos substituintes arila na atividade contra promastigotas de *L. braziliensis*. Por isso, a modificação do padrão de substituição do anel aromático e/ou substituição por outros heterociclos foi estudada.

Com base nos valores de  $CI_{50}$  dos análogos **8**, **10** e **13** (0,49, 0,80 e 0,57  $\mu\text{M}$ , respectivamente), que foram inferiores ao da pentamidina (4,70  $\mu\text{M}$ ), novos derivados foram preparados pela introdução de substituintes na amina  $\omega$ , de modo a obter uma série de 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas.

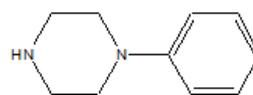
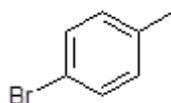
Esquema 29. Rota sintética e aminas utilizadas na síntese dos derivados com variação da região 2.



Substância	Ar	$\text{NR}_1\text{R}_2$
LQM021		
LQM022		
LQM023		
LQM024		

LQM025		
LQM026		
LQM027		
LQM028		
LQM029		
LQM030		
LQM031		
LQM032		
LQM033		
LQM034		

LQM035



#### 4. Síntese e Mecanismos

A síntese das substâncias **LQM001- LQM018** encontra-se descrita em Epifânio (2011). No presente trabalho, a preparação dos mesmos compostos foi realizada com metodologia adaptada para micro-ondas, conforme informações da literatura (MARTINS, 2004), com a finalidade de melhorar os tempos reacionais para a obtenção destes análogos.

**Tabela 3. Comparação entre os rendimentos reacionais das 2-arilidenoaminoguanidinas por micro-ondas e refluxo**

<b>Substância</b>	<b>Rendimento em micro-ondas(%)<sup>a</sup></b>	<b>Rendimento em refluxo (%)<sup>b</sup></b>
<b>1</b>	83	89
<b>2</b>	94	95
<b>3</b>	94	93
<b>4</b>	98	92
<b>5</b>	88	98
<b>6</b>	92	81
<b>7</b>	90	85
<b>8</b>	93	89
<b>9</b>	91	71
<b>10</b>	92	91
<b>11</b>	96	92
<b>12</b>	80	89
<b>13</b>	94	83
<b>14</b>	90	71
<b>15</b>	85	92
<b>16</b>	85	90
<b>17</b>	90	71
<b>18</b>	85	91

<sup>a</sup> Tempo reacional igual a 20 minutos; <sup>b</sup> Tempos reacionais maiores que 19 horas, conforme Epifânio (2011)

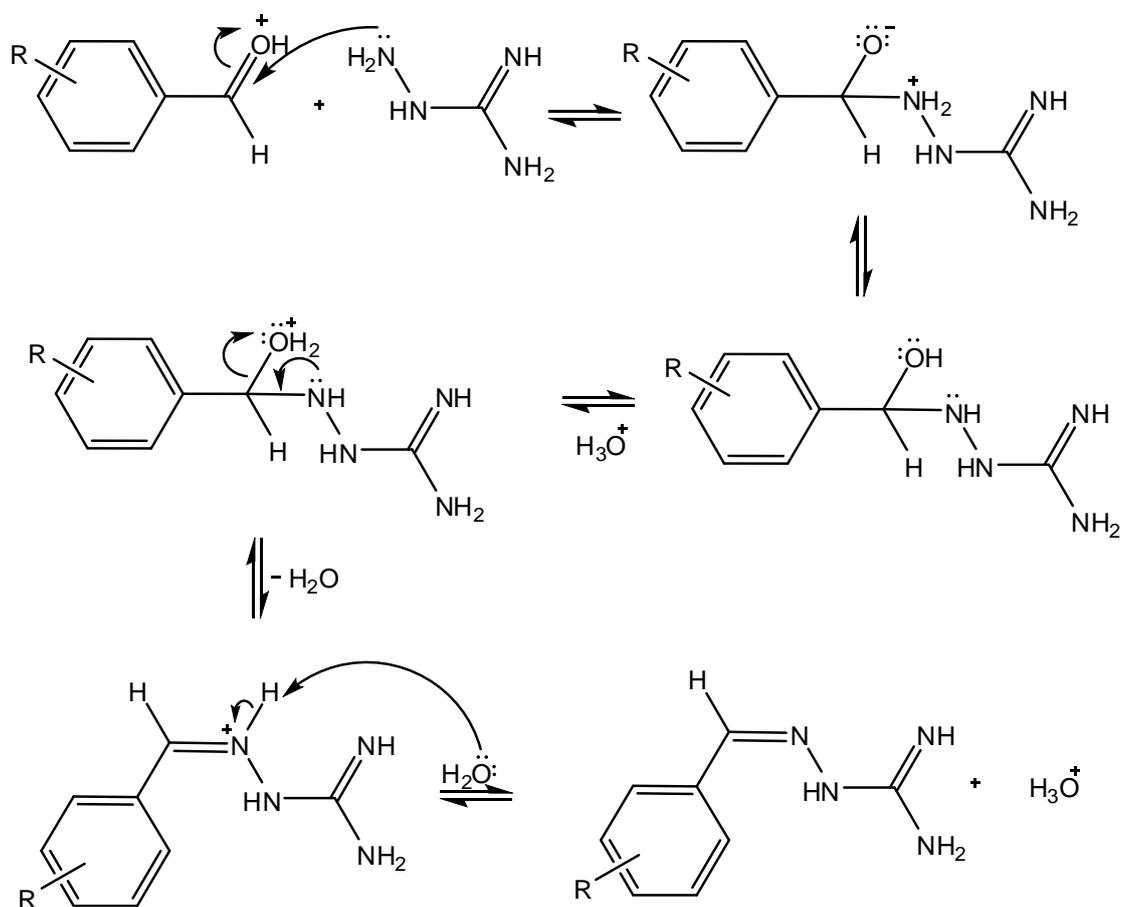
É possível perceber que a síntese em micro-ondas possibilita a obtenção das substâncias com rendimentos comparáveis àqueles obtidos por meio de refluxo, estando compreendidos entre 83 e 98%. A vantagem do método reside na considerável diminuição dos tempos reacionais, uma vez que a técnica em refluxo demonstra tempos superiores a 19 horas para que as reações sejam concluídas, enquanto que os mesmos produtos podem ser preparados em apenas 20 minutos após irradiação do meio reacional com micro-ondas.

O mecanismo reacional é semelhante ao de formação de iminas. Inicia-se com a protonação do grupo carbonila seguida da adição da aminoguanidina a este grupo para formar um intermediário dipolar tetraédrico, seguida da transferência intermolecular do próton do nitrogênio para o oxigênio, produzindo um aminoálcool. A reação avança com a protonação do oxigênio, o que produz um bom grupo abandonador. A perda de uma molécula de água leva ao íon imínio, ocorrendo, por fim, a perda de um próton para a água e formando a guanilidrazona (EPIFÂNIO, 2011).

Com base nos análogos da primeira etapa cujos valores de  $CI_{50}$  foram calculados (compostos **LQM008**, **LQM010** e **LQM013** com valores de  $CI_{50}$  iguais a 0,49, 0,80 e 0,57  $\mu\text{M}$ , respectivamente) como inferiores ao da pentamidina (4,70  $\mu\text{M}$ ), novos derivados foram planejados realizando-se a introdução de substituintes na amina  $\omega$ . Esta etapa visa ao estudo dos efeitos estéricos provocados por substituintes volumosos sobre a atividade.

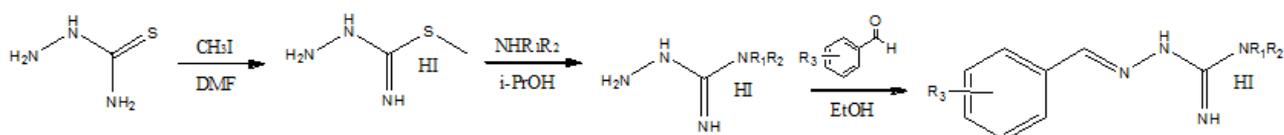
As aminoguanidinas  $\omega$ -substituídas foram obtidas por meio de amins que apresentem um anel aromático, para avaliar adicionalmente o efeito do aumento da distância entre o substituinte aromático e o grupo guanidina. Para tanto, anilina, benzilamina, feniletilamina, 3-fenil-1-propilamina e *N*-fenilpiperazina foram empregadas.

Esquema 30. Mecanismo reacional para formação de guanilidrazonas



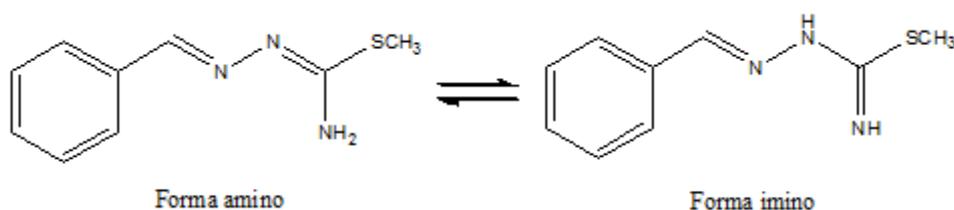
Adaptado de EPIFÂNIO, 2011

Inicialmente a rota sintética utilizada para a preparação das aminoguanidinas consistiu na preparação do iodidrato de *S*-metilisotiossemicarbazida, seguida pela etapa de guanidinilação da amina e a subsequente condensação das aminoguanidinas com os aldeídos aromáticos, conforme ilustra o esquema.

Esquema 31. Rota sintética inicial para as 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas

Este procedimento foi escolhido para que se pudesse utilizar intermediários comuns na obtenção dos produtos finais. Além disso, uma vez que existe equilíbrio tautomérico em isotiosemicarbazonas e ocorre a predominância da forma amino ao invés da imino (YAMAZAKI, 1975), a condensação com o aldeído previamente à guanidinilação resulta em menor eletrofilicidade do carbono da isotiourea, já que este passa a receber densidade eletrônica do anel por conjugação.

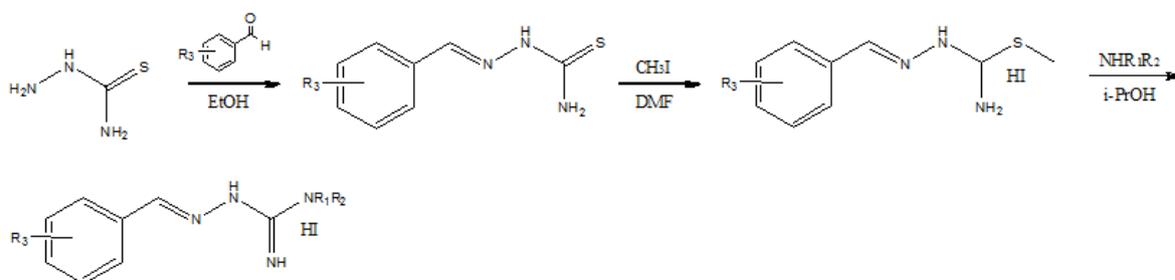
Figura 23. Formas tautoméricas das isotiosemicarbazonas



No entanto, este método não forneceu resultados satisfatórios, pois durante a etapa de guanidinilação da amina foram notados diversos produtos colaterais que dificultavam a purificação. Estes contaminantes podem consistir em guanidinas *N,N'*-substituídas, *N,N',N''*-substituídas e tetrazinas, conforme informações de autores que realizaram procedimentos reacionais semelhantes (DURANT et al., 1966; MCKAY et al., 1963; SCOTT et al., 1954).

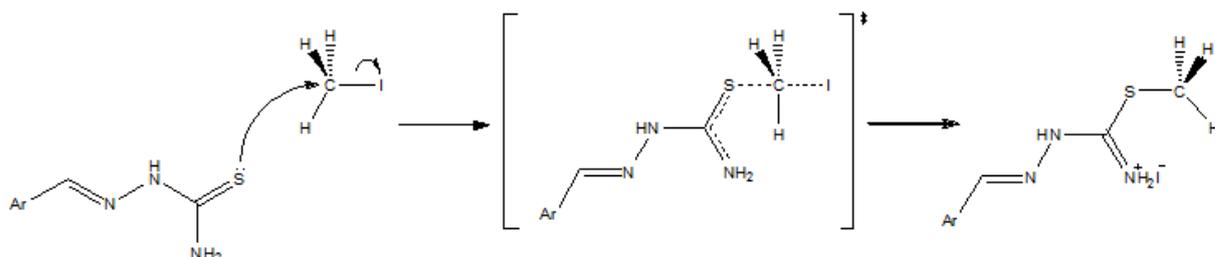
Dessa forma, a rota foi modificada de modo a evitar a formação dos produtos colaterais. Foi obtida primeiramente a tiossemicarbazona correspondente a cada aldeído por meio de condensação deste último com tiossemicarbazida. Em seguida, procedeu-se com a etapa de metilação, para formar o sal de *S*-metilisotiossemicarbazona. Por fim, foi realizada a guanidinilação da amina, para formar a 2-benzilidenoaminoguanidina *N*-substituída.

Esquema 32. Rota sintética final para a obtenção dos derivados aminoguanidínicos



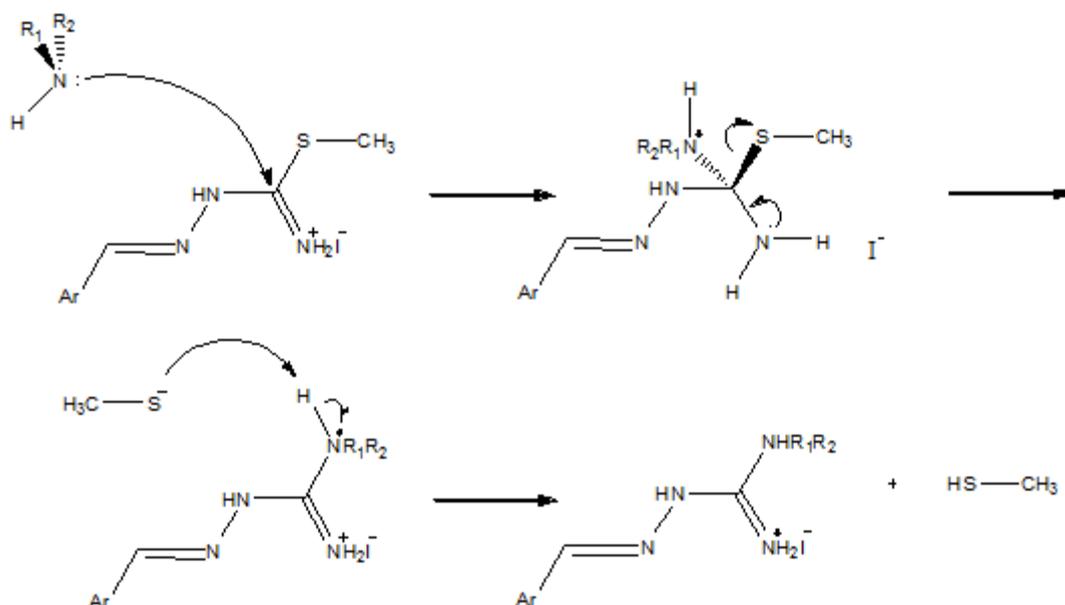
O ataque nucleofílico da tiossemicarbazona sobre o iodometano leva à formação do sal de *S*-metilisotiossemicarbazona via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (BUTLER, 1975).

Esquema 33. Formação do sal de *S*-metilisotiossemicarbazona por substituição nucleofílica



Por ação de aminas primárias e secundárias, o sal formado a partir da tiossemicarbazida é convertido nas guanidinas correspondentes por meio de mecanismo de adição-eliminação. A reação procede com ataque nucleofílico da amina sobre o carbono eletrofílico da *S*-metilisotiossemicarbazida, com formação do intermediário tetraédrico, seguido pela eliminação de metanotiol (MARYANOFF et al., 1986).

Esquema 34. Formação da guanidina via mecanismo de adição-eliminação



Os rendimentos para as 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas obtidas por este método são mostrados na Tabela 4.

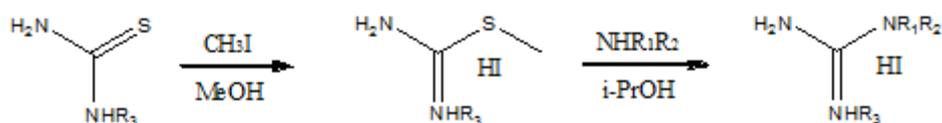
Tabela 4. Rendimentos reacionais das 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas

Substância	Rendimento (%) <sup>a</sup>	Substância (%)	Rendimento (%) <sup>b</sup>	Substância (%)	Rendimento (%) <sup>c</sup>
LQM021	35	LQM026	<sup>d</sup>	LQM031	53
LQM022	48	LQM027	44	LQM032	34
LQM023	20	LQM028	30	LQM033	34
LQM024	48	LQM029	11	LQM034	51
LQM025	67	LQM030	48	LQM035	<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Tempo reacional menor 15 horas; <sup>b</sup> Tempo reacional menor que 20 horas; <sup>c</sup> Tempo reacional maior que 24 horas; <sup>d</sup> Não foi possível calcular rendimento, pois o produto apresentava impurezas após cromatografia.

Os rendimentos obtidos estão próximos àqueles descritos na literatura para substâncias similares. Rasmussen et al (1988) realizaram a síntese de 99 guanidinas *N,N,N'*-trissubstituídas (Esquema 35) utilizando o iodidrato de *S*-metilisotiourônio como produto de partida. A introdução de substituintes aromáticos em R<sub>3</sub> prolonga os tempos reacionais dos compostos sintetizados, já que a conjugação diminui a eletrofilicidade do carbono da isotioureia. A presença de substituintes eletrorretiradores no anel aumenta a reatividade do sal de *S*-metilisotiourônio, já que removem densidade eletrônica, o que resulta em maior caráter eletrofílico no átomo de carbono desta região.

Esquema 35. Metodologia utilizada por Rasmussen et al (1988)

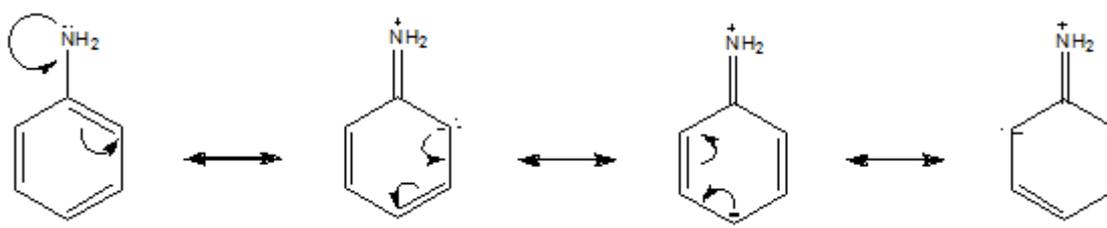


Na série de 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas abordadas no presente trabalho, foram observados menores tempos reacionais para os derivados contendo o grupo ciano na posição 4 ou cloro na posição 3 do anel aromático. Estes grupos apresentam fortes

efeitos indutivos eletrorretiradores, o que explica os menores tempos reacionais, graças a um aumento do caráter eletrofílico do carbono da tioureia, favorecendo o ataque nucleofílico por parte da amina. Por outro lado, os derivados contendo bromo na posição 4 do anel, apresentaram tempos reacionais mais longos, provavelmente por causa do efeito mesomérico de caráter eletrodoador dos halogênios.

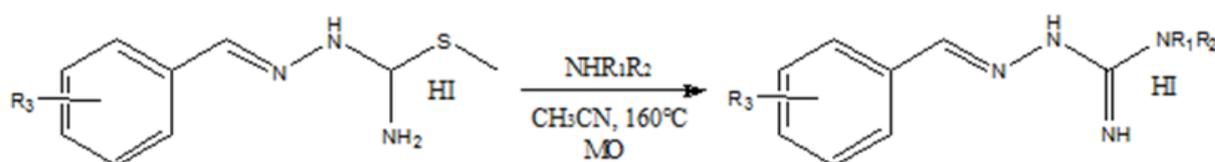
É interessante notar que, apesar do reduzido caráter nucleofílico da anilina, foi possível obter os derivados correspondentes a partir da metodologia empregada no presente trabalho. A anilina, em virtude da ressonância do par de elétrons livre do átomo de nitrogênio com o anel aromático, se apresenta como a amina de menor nucleofilicidade, sendo esperados tempos reacionais mais longos ou até mesmo a ausência de reação.

**Esquema 36.** Deslocalização do par de elétrons livre da anilina

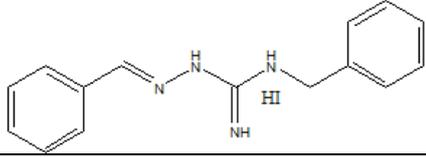
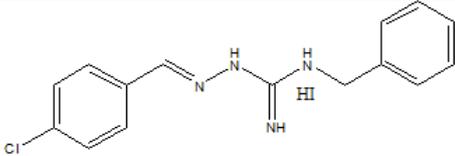


Visando à redução dos tempos reacionais, a etapa de guanidinilação foi adaptada para micro-ondas. A mistura reacional contendo 1 equivalente do iodidrato de isotiossemicarbazona e 1 equivalente de benzilamina em acetonitrila foi irradiada a 160 graus Celsius durante 40 minutos. Os rendimentos para dois compostos oriundos de produtos de partida diferentes são mostrados na seguinte Tabela 5.

**Esquema 37.** Síntese dos derivados 2-benzilidenoaminoguanidínicos em micro-ondas



**Tabela 5. Rendimentos reacionais de 2-benzilidenoaminoguanidinas N-substituídas obtidas por meio de micro-ondas**

Composto	Rendimento (%)
	33
	45

O procedimento de micro-ondas utilizado foi baseado no método empregado por Sandin et al (2003). Em investigações sobre a obtenção de guanidinas cíclicas, tempos de reações superiores a três dias eram necessários para formar os produtos almejados em refluxo. Visando à redução dos tempos reacionais, uma metodologia foi desenvolvida para síntese em micro-ondas. Entretanto, os autores observaram que a reação entre aminas e o iodidrato de *S*-metilisotiourônio resultava na tiourea, ao invés da guanidina correspondente. Isto se deve ao ataque nucleofílico do íon iodeto sobre o grupo metila da isotiourea para gerar o iodeto de metila, que reage prontamente com a amina e desloca o equilíbrio químico no sentido da formação da tiourea. Uma possível solução para este problema consiste na conversão do iodidrato em um sal cujo contraíon apresente menor caráter nucleofílico como, por exemplo, trifluoroacetato.

Com este resultado, fica evidente que a síntese em micro-ondas proporciona um método alternativo para a obtenção das 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas, cuja grande vantagem consiste na redução dos tempos reacionais, além de manter rendimentos comparáveis com a síntese em refluxo.

## 5. Elucidação Estrutural

A partir da análise do RMN  $^1\text{H}$  de 2-arilidenoaminoguanidinas, pode-se verificar um singlete de hidrogênio desblindado referente ao hidrogênio da posição imínica, a qual presente em todas as substâncias. Este sinal aparece em torno de  $\delta$  8,0. Os sinais que correspondem aos hidrogênios aromáticos e não aromáticos de cada molécula encontram-se na Tabela 6. Os deslocamentos químicos, bem como os desdobramentos de sinais dos hidrogênios estão em acordo com aqueles descritos por Epifânio (2011).

Tabela 6. Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) em DMSO- $d_6$  das arilidenoaminoguanidinas

Composto	Estrutura	RMN $^1\text{H}$		
		$^1\text{H}$ imínico	$^1\text{H}$ aromáticos ( $J$ em Hz)	Demais $^1\text{H}$
LQM001		8,19 (s, 1H)	<b>3-5:</b> 7,43 (m, 3H); <b>2 e 6:</b> 7,84 (m, 2H)	
LQM002		8,06 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 6,83 (d, 2H, $J=8,5$ ) <b>2 e 6:</b> 7,66 (d, 2H, $J=8,5$ )	
LQM003		8,04 (s, 1H)	<b>2:</b> 7,50 (d, 1,8, 1H) <b>5:</b> 6,83 (d, 1H, $J=8,0$ ) <b>6:</b> 7,13 (dd, 1H, $J=8,0$ e 1,8)	$\text{H}_3\text{CO}$ : 3,81 (s, 3H)
LQM004		8,04 (s, 1H)	<b>2:</b> 7,33 (d, 1H, $J=2,0$ ) <b>5:</b> 5,95 (d, 1H, $J=8,3$ ) <b>6:</b> 7,18 (dd, 1H, $J=8,3$ e 2,0)	$\text{H}_3\text{CO}$ : 3,79 (s, 3H)
LQM005		8,09 (s, 1H)	<b>2:</b> 7,54 (s, 1H) <b>5:</b> 6,97 (d, 1H, $J=7,9$ ) <b>6:</b> 7,23 (d, 1H, $J=7,9$ )	2 $\text{H}_3\text{CO}$ : 3,80 (s, 3H) 3,77 (s, 3H)
LQM006		8,07 (s, 1H)	<b>2:</b> 7,64 (d, 1H, $J=1,6$ ) <b>5:</b> 6,94 (d, 1H, $J=8,0$ ) <b>6:</b> 7,17 (dd, 1H, $J=8,0$ e 1,6)	$\text{CH}_2$ : 6,05 (s, 2H);

Tabela 6. *Continuação*

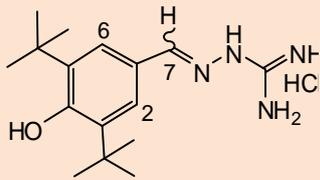
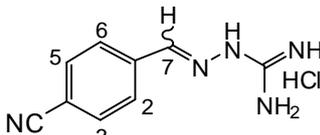
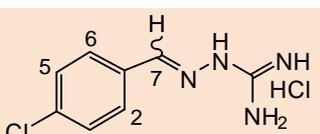
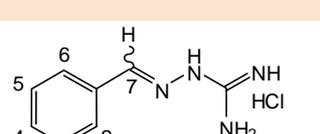
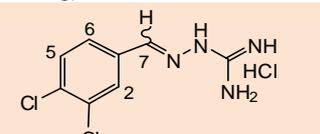
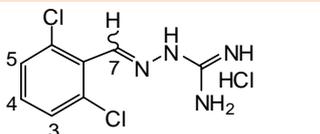
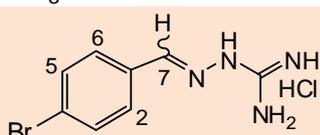
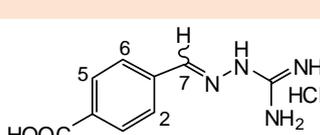
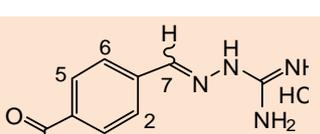
LQM007		8,09 (s, 1H).	<b>2 e 6:</b> 7,50 (s, 2H)	6 CH <sub>3</sub> : 1,38 (s, 18H)
LQM008		8,24 (s, 1H)	<b>2 e 6:</b> 8,04 (d, 2H, J=8,5) <b>3 e 5:</b> 7,87 (d, 2H, J=8,5)	
LQM009		8,15 (s, 1H)	<b>2 e 6:</b> 7,85 (d, 2H, J=8,5) <b>3 e 5:</b> 7,45 (d, 2H, J=8,5)	
LQM010		8,17 (s, 1H)	<b>4 e 5:</b> 7,47 (m, 2H) <b>6:</b> 7,74 (dl, 1H, J=8,0) <b>2:</b> 8,06 (s)	
LQM011		8,16 (s, 1H)	<b>5:</b> 7,68 (d, 1H, J=8,4) <b>6:</b> 7,79 (dd, 1H, J=8,4 e 2,0) <b>2:</b> 8,24 (d, 1H, J=2,0)	
LQM012		8,42 (s, 1H)	<b>4:</b> 7,45 (m, 1H); <b>3 e 5:</b> 7,57 (d, 2H, J=7,9);	
LQM013		8,17 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,63 (d, 2H, J= 8,5) <b>2 e 6:</b> 7,81 (d, 2H, J=8,5)	
LQM014		8,20 (s, 1H)	<b>2, 3, 5 e 6:</b> 7,90 (s, 4H)	
LQM015		8,25 (s, 1H)	<b>2, 3, 5 e 6:</b> 7,98 (s, 4H)	CH <sub>3</sub> O: 3,84 (s, 3H)

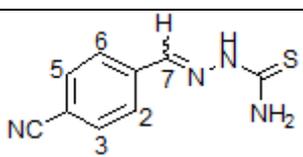
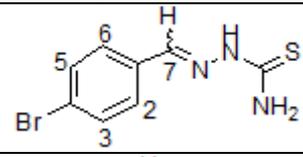
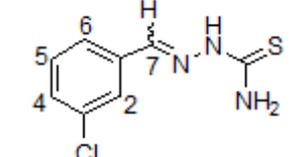
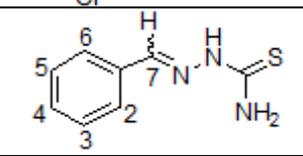
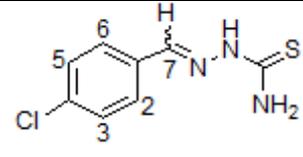
Tabela 6. Continuação

<b>LQM016</b>		8,24 (s, 1H)	<b>2'-6'</b> : 7,47 (m, 5H) <b>2 e 6</b> : 7,74 (d, 2H, $J=8,4$ ) <b>3 e 5</b> : 7,94 (d, 2H, $J=8,4$ )
<b>LQM017</b>		8,36 (s, 1H)	<b>2</b> : 7,8 (s, 1H) <b>5</b> : 7,45 (d, 1H, $J=7,2$ ) <b>6</b> : 7,12 (t, 1H, $J=7,2$ ) <b>7</b> : 7,19 (t, 1H, $J=7,7$ ) <b>8</b> : 8,28 (d, 1H, $J=7,2$ )
<b>LQM018</b>		9,05 (s, 1H)	<b>6</b> : 7,72 (t, 1H, $J=7,5$ ); <b>7</b> : 7,84 (t, 1H, $J=7,5$ ); <b>8</b> : 8,09 (d, 1H, $J=8,2$ ); <b>5</b> : 8,40 (d, 1H, $J=8,2$ ); <b>3</b> : 8,18 (d, 1H, $J=4,3$ ); <b>2</b> : 8,98 (d, 1H, $J=4,3$ );

Adaptado de EPIFÂNIO, 2011.

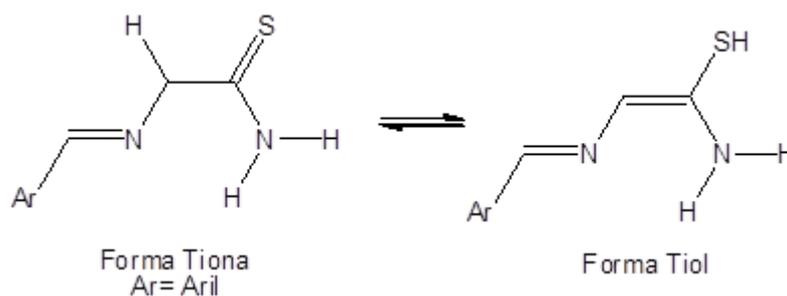
Os valores de deslocamento químico dos hidrogênios das tiossemicarbazonas, utilizadas como produtos de partida para a síntese das 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas, são mostrados na tabela abaixo. O aparecimento do sinal da posição imínica em torno de  $\delta$  8,0 ppm em combinação com os sinais dos hidrogênios aromáticos indica a formação da tiossemicarbazona, além do padrão de substituição do anel aromático.

Tabela 7. Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) em DMSO- $d_6$  das tiossemicarbazonas

Substâncias	RMN $^1\text{H}$	
	$^1\text{H}$ imínico	$^1\text{H}$ aromáticos ( $J$ em Hz)
	8,05 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,85 (d, 2H, $J=8,3$ ); <b>2 e 6:</b> 8,01 (d, 2H, $J=8,3$ )
	8,00 (s, 1H,)	<b>3 e 5:</b> 7,74 (d, 2H, $J=8,0$ ) <b>2 e 6:</b> 7,57 (d, 2H, $J=8,0$ )
	8,04 (s, 1H)	<b>2:</b> 8,00 (s, 1H) <b>4 e 6:</b> 7,41 (m, 2H) <b>5:</b> 7,63 (m, 1H)
	8,044 (s, 1H)	<b>3-5:</b> 7,39 (m, 3H); <b>2 e 6:</b> 7,78 (m, 2H)
	8,01 (s, 1H)	<b>2 e 6:</b> 6,97 (d, 2H, $J=8,4$ ) <b>3 e 5:</b> 7,54 (d, 1H, $J=8,4$ )

As tiossemicarbazonas podem coexistir na forma tiona ou tiol em equilíbrio tautomérico. A deslocalização eletrônica resulta em caráter parcialmente duplo da ligação C-N e pode ser evidenciado nos espectros obtidos. Os hidrogênios do  $\text{NH}_2$  da carbotoamida apresenta dois sinais não equivalentes, em virtude da rotação restrita da ligação C- $\text{NH}_2$  por causa da dupla ligação parcial que resulta em hidrogênios diastereotópicos (TENÓRIO et al, 2005).

Esquema 38. Equilíbrio tautomérico das formas tiona e tiol de tiossemicarbazonas



A metilação da tiona conduz às isotiossemicarbazonas, cujo espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra adicionalmente a presença de um singlete intenso em torno de  $\delta$  2,72 ppm e que se refere aos hidrogênios do grupo S-metil. Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  é possível visualizar o carbono do da metila em torno de  $\delta$  14 ppm, o carbono imínico ao redor de  $\delta$  151 ppm, e o carbono da guanidina em cerca de  $\delta$  166 ppm.

Tabela 8. Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) em DMSO- $d_6$  das isotiossemicarbazonas

Substâncias	RMN $^1\text{H}$		
	$^1\text{H}$ imínico	$^1\text{H}$ aromáticos ( $J$ em Hz)	Demais $^1\text{H}$
	8,36 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 8,15 (d, 2H, $J=8,4$ ); <b>2 e 6:</b> 7,95 (d, 2H, $J=8,4$ )	<b>8:</b> 2,75 (s, 3H)
	8,29 (s, 1H,)	<b>3 e 5:</b> 7,9 (d, 2H, $J=8,0$ ) <b>2 e 6:</b> 7,69 (d, 2H, $J=8,0$ )	<b>8:</b> 2,72 (s, 3H)
	8,31 (s, 1H)	<b>2:</b> 8,16 (s, 1H) <b>4 e 6:</b> 7,55 (m, 2H) <b>5:</b> 7,83 (m, 1H)	<b>8:</b> 2,71 (s, 3H)
	8,33 (s, 1H)	<b>3-5:</b> 7,50 (m, 3H); <b>2 e 6:</b> 7,95 (m, 2H)	<b>8:</b> 2,72 (s, 3H)
	8,31 (s, 1H)	<b>2 e 6:</b> 7,56 (d, 2H, $J=8,5$ ) <b>3 e 5:</b> 7,98 (d, 2H, $J=8,5$ )	<b>8:</b> 2,73 (s, 3H)

Os valores dos deslocamentos químicos dos hidrogênios relevantes para a elucidação estrutural das aminoguanidinas obtidas são mostrados na Tabela 6. A análise dos resultados confirma o desaparecimento do singlete referente à metila da isotiossemicarbazida e o padrão de substituição do anel aromático. Os hidrogênios metilênicos, quando existentes, aparecem regiões de maior frequência como singletos ou multipletos.

Tabela 9. Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) em DMSO- $d_6$  das 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas

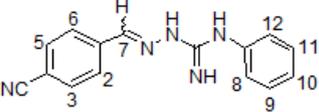
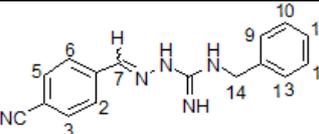
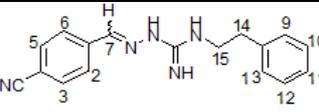
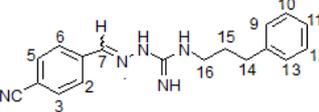
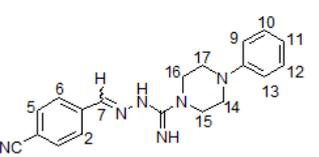
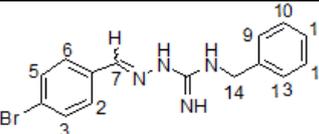
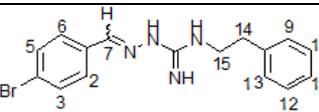
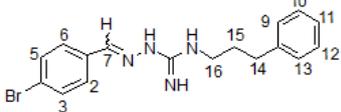
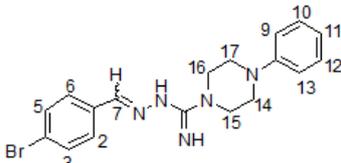
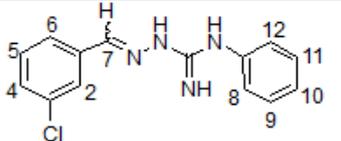
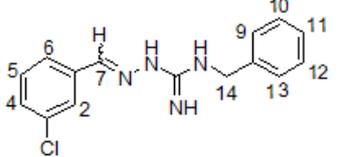
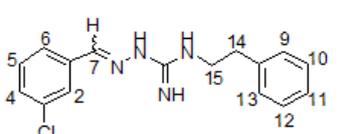
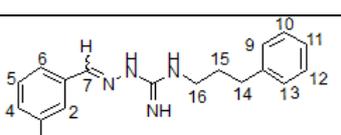
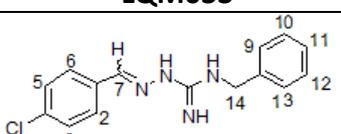
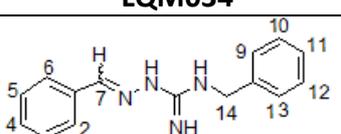
Substância	RMN $^1\text{H}$		
	$^1\text{H}$ imínico	$^1\text{H}$ aromáticos ( <i>J</i> em Hz)	Demais $^1\text{H}$
 <b>LQM021</b>	8,24 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,96 (d, 2H, <i>J</i> =7,8) <b>2 e 6:</b> 7,76 (d, 2H, <i>J</i> =7,8) <b>9-13:</b> 7,51 (s base larga, 2H); 7,29 (s base larga, 2H); 6,98 (s base larga, 1H)	
 <b>LQM022</b>	8,26 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 8,10 (d, 2H, <i>J</i> =7,8) <b>2 e 6:</b> 7,89 (d, 2H, <i>J</i> =7,8) <b>9-13:</b> 7,35 (m, 5H)	<b>14:</b> 4,59 (s, 2H)
 <b>LQM023</b>	8,07 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,84 (s, 2H) <b>2 e 6:</b> 7,75 (s, 2H) <b>9-13:</b> 7,26 (m, 5H)	<b>14:</b> 2,80 (m, 2H) <b>15:</b> 3,41 (m, 2H)
 <b>LQM024</b>	8,05 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,83 (s base larga, 2H) <b>2 e 6:</b> 7,73 (s base larga, 2H) <b>9-13:</b> 7,24 (m, 5H)	<b>14:</b> 2,60 (m, 2H) <b>15:</b> 1,77 (m, 2H) <b>16:</b> 3,17 (m, 2H)
 <b>LQM025</b>	8,28 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 8,01 (s base larga, 2H) <b>2 e 6:</b> 7,80 (s base larga, 2H) <b>9-13:</b> 7,22 (s base larga, 2H); 6,96 (s base larga, 2H); 6,83 (s base larga, 1H)	<b>14 e 17:</b> 3,31 (s base larga, 4H) <b>15 e 16:</b> 3,23 (s base larga, 4H)
 <b>LQM026</b>	8,02 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,68 (s base larga, 2H) <b>2 e 6:</b> 7,53 (s base larga, 2H) <b>9-13:</b> 7,32 (s base larga, 4H), 7,23 (s base larga, 1 H)	<b>14:</b> 4,40 (s, 2H)
 <b>LQM027</b>	8,03 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,70 (d, 2H, <i>J</i> =8,1) <b>2 e 6:</b> 7,55 (d, 2H, <i>J</i> = 8,1) <b>9-13:</b> 7,28 (m, 5H)	<b>14:</b> 2,81 (m, 2H) <b>15:</b> 3,41 (m, 2H)

Tabela 9. Continuação

 <p><b>LQM028</b></p>	7,99 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,63 (d, 2H, $J=8,2$ ) <b>2 e 6:</b> 7,50 (d, 2H, $J=8,2$ ) <b>9-13:</b> 7,21 (m, 5H)	<b>14:</b> 2,60 (s base larga, 2H) <b>15:</b> 1,76 (s base larga, 2H) <b>16:</b> 3,14 (s base larga, 2H)
 <p><b>LQM029</b></p>	8,24 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,79 (s base larga, 2H) <b>2 e 6:</b> 7,58 (s base larga, 2H) <b>9-13:</b> 7,22 (s base larga, 2H); 6,96 (s base larga, 2H); 6,82 (s base larga, 1H)	<b>14 e 17:</b> 3,64 (s base larga, 4H) <b>15 e 16:</b> 3,32 (s base larga, 4H)
 <p><b>LQM030</b></p>	8,20 (s, 1H)	<b>2:</b> 7,97 (s, 1H) <b>5:</b> 7,68 (s base larga, 1H) <b>4 e 6:</b> 7,50 (s base larga, 2H) <b>9-13:</b> 7,36 (m, 5H)	
 <p><b>LQM031</b></p>	8,02 (s, 1H)	<b>2:</b> 7,83 (s base larga, 1H) <b>5:</b> 7,58 (s base larga, 1H) <b>4, 6, 9-13:</b> 7,31 (m, 7H)	<b>14:</b> 4,40 (s, 2H)
 <p><b>LQM032</b></p>	8,17 (s, 1H)	<b>2:</b> 8,08 (s base larga, 1H) <b>5:</b> 7,77 (s base larga, 1H) <b>4 e 6:</b> 7,48 (s base larga, 1H) <b>9, 10, 12, 13:</b> 7,31 (s base larga, 4H) <b>11:</b> 7,23 (s base larga, 1H):	<b>14:</b> 2,87 (s base larga, 2H) <b>15:</b> 3,39 (s base larga, 2H)
 <p><b>LQM033</b></p>	8,17 (s, 1H)	<b>2:</b> 8,08 (s base larga, 1H) <b>5:</b> 7,75 (s base larga, 1H) <b>4 e 6:</b> 7,47 (s base larga, 2H) <b>9-13:</b> 7,24 (m, 5H)	<b>14:</b> 2,65 (s base larga, 2H) <b>15:</b> 1,84 (s base larga, 2H) <b>16:</b> 3,32 (s base larga, 2H)
 <p><b>LQM034</b></p>	8,20 (s, 1H)	<b>3 e 5:</b> 7,94 (d, 2H, $J=8,4$ ) <b>2 e 6:</b> 7,53 (d, 2H, $J=8,4$ )	<b>14:</b> 4,55 (s, 2H)
 <p><b>LQM035</b></p>	8,21 (s, 1H)	<b>2 e 6:</b> 7,89 (s base larga, 2H) <b>3-5:</b> 7,45 (s base larga, 3H) <b>9-13:</b> 7,35 (m, 5H)	<b>14:</b> 4,56 (s base larga, 2H)

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  mostram que é possível observar o sinal referente ao carbono imínico em torno de  $\delta$  145 ppm, enquanto que o do carbono da guanidina varia

entre  $\delta$  155 ppm a  $\delta$  160 ppm. Os carbonos das moléculas que apresentam metileno aparecem em maior frequência, ocorrendo entre  $\delta$  34 ppm e  $\delta$  44 ppm.

## 6. Avaliação da atividade leishmanicida

A Tabela 10 traz a concentração inibitória de 50% (Cl<sub>50</sub>) e o efeito máximo (EM) dos derivados. Nela é possível observar que os derivados **LQM008**, **LQM010**, e **LQM013** mostraram uma potência na mesma ordem de grandeza da pentamidina, o fármaco padrão utilizado, destacando-se o composto **LQM013** que apresentou uma Cl<sub>50</sub> de 0,57 ± 0,03 µM (Cl<sub>50</sub> pentamidina = 4,70 ± 0,49 µM) e um efeito máximo de 90,19 ± 0,18, comparável ao da pentamidina que foi de 92,20 ± 4,13.

**Tabela 10.** Efeito leishmanicida dos derivados de aminoguanidina contra promastigotas de *Leishmania braziliensis* após 48 horas de tratamento.

Tratamento	<i>Leishmania braziliensis</i>	
	Cl <sub>50</sub> <sup>a</sup> (µM)	EM <sup>b</sup> (µM)
Pentamidina	4,70 ± 0,49	92,20 ± 4,13***
LQM001	<0,1	-
LQM002	<0,1	-
LQM003	>100	NA
LQM004	>100	NA
LQM005	<0,1	-
LQM006	4,00 ± 0,67	85,81 ± 1,69***
LQM007	<0,1	-
LQM008	0,49 ± 0,03	67,60 ± 0,46***
LQM009	5,6- ± 0,55	85,46 ± 0,46***
LQM010	0,80 ± 0,06	79,68 ± 0,70***
LQM011	82,13 ± 1,56	62,17 ± 1,32***
LQM012	<0,1	-
LQM013	0,57 ± 0,03	90,19 ± 0,18***
LQM014	<0,1	-
LQM015	<0,1	-
LQM016	<0,1	-
LQM017	<0,1	-
LQM018	<0,1	-

<sup>a</sup>Concentração letal de 50 (Cl<sub>50</sub>) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; <sup>b</sup>Efeito máximo (EM) que é expresso como média do citotoxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando \*\*p < 0,05, \*\*\*p < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%; <sup>NA</sup>Substância não apresenta atividade letal significativa para promastigotas de *L. braziliensis* até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO; Não foi possível calcular a Cl<sub>50</sub>, sendo necessário diminuir a concentração.

É importante ressaltar que os compostos **LQM001, LQM002, LQM005, LQM007, LQM0012, LQM0014, LQM0015, LQM0016, LQM0017 e LQM0018** nas concentrações empregadas provocaram a morte de mais de 50% das promastigotas de *L. braziliensis*, o que indica a possibilidade de análogos com valores de  $CI_{50}$  inferiores a 0,1  $\mu$ M.

## 7. Relação Estrutura-Atividade

Vários substituintes do anel aromático foram utilizados, permitindo correlacionar, de modo qualitativo, os efeitos biológicos com as características eletrônicas e estéricas destes substituintes. Partindo da observação de que as substâncias mais potentes foram aquelas cuja  $Cl_{50}$  deve ser obtida com concentrações menores que  $0,1 \mu\text{M}$ , é possível obter informações sobre a relação estrutura-atividade.

Figura 24. Valores de  $Cl_{50}$  e estruturas dos análogos 2-arilidenoaminoguanidínicos

Substância	Ar	$Cl_{50} (\mu\text{M})$	Substância	Ar	$Cl_{50} (\mu\text{M})$	Substância	Ar	$Cl_{50} (\mu\text{M})$
LQM001		<0,1	LQM007		<0,1	LQM013		$0,57 \pm 0,03$
LQM002		<0,1	LQM008		$0,49 \pm 0,03$	LQM014		<0,1
LQM003		>100	LQM009		$5,6 \pm 0,55$	LQM015		<0,1
LQM004		>100	LQM010		$0,80 \pm 0,06$	LQM016		<0,1
LQM005		<0,1	LQM011		$82,13 \pm 1,56$	LQM017		<0,1
LQM006		$4,00 \pm 0,67$	LQM012		<0,1	LQM018		<0,1
Pentamidina		$4,70 \pm 0,49$			<0,1			

O composto protótipo **LQM001**, cujo anel não apresenta substituintes, mostra-se ativo contra as promastigotas do parasita, e até a concentração de  $0,1 \mu\text{M}$  promoveu a morte de mais de 50% das células leishmaniais. O composto **LQM002**, com hidroxila na posição 4, também foi capaz de matar mais de 50% das promastigotas até a menor concentração utilizada,  $0,1 \mu\text{M}$ . Entretanto, a introdução de um segundo grupo eletrodoador em combinação com a hidroxila, nas posições 3 ou 4, resulta em menor potência, mesmo

que este segundo grupo seja um doador relativamente mais fraco como a metoxila, tal qual pode ser observado para os análogos **LQM003** e **LQM004**, com valores de  $CI_{50}$  superiores a  $100 \mu M$ . Já a introdução de duas metoxilas resulta em um composto potente, embora a presença de um grupo metilenodioxo no anel resulte em uma substância com atividade semelhante à da pentamidina, com  $CI_{50}$  igual a  $4 \mu M$ . Por outro lado, a presença de dois grupos volumosos *tert*-butila adjacentes à hidroxila da posição 4, como em **LQM007**, também resulta em composto cuja  $CI_{50}$  não possível determinar até  $0,1 \mu M$ .

A introdução de halogênios não é tão bem tolerada, já que dentre os cinco análogos halogenados, apenas um tende a apresentar valor de  $CI_{50}$  inferior a  $0,1 \mu M$ . O análogo com cloro na posição 3 (**LQM010**) apresenta valor de  $CI_{50}$  inferior à pentamidina ( $0,8 \mu M$ , em comparação com  $4,70 \mu M$  da pentamidina), mas o mesmo não ocorre para o derivado com cloro em posição 4 (**LQM009**), cujo valor de  $CI_{50}$  foi de  $5,6 \mu M$ . É interessante notar que a substituição do cloro por bromo na posição 4 em **LQM013** conduz a uma melhoria da atividade não apenas em termos de  $CI_{50}$  ( $0,57 \mu M$ ).

A presença de substituintes eletrorretiradores na posição 4, como nos análogos **LQM008**, **LQM014** e **LQM015**, resulta em compostos ativos, de modo que o composto **LQM008** apresenta  $CI_{50}$  igual a  $0,49 \mu M$ , enquanto que para os análogos **LQM014** e **LQM015** os valores de  $CI_{50}$  não puderam ser calculados até a menor concentração utilizada, que foi de  $0,1 \mu M$ . Já a introdução de um segundo anel fenila ou substituição por um anel heteroaromático nos compostos **LQM016**, **LQM017** e **LQM018**, também conduz a compostos cujos valores de  $CI_{50}$  não foram obtidos até a menor concentração empregada ( $0,1 \mu M$ ) e mostram que grupos volumosos contribuem para uma melhor atividade. Portanto, efeitos estéricos podem estar implicados na ação destes análogos.

## **8. Experimental**

Os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich e solventes de grau P.A. foram empregados nos procedimentos reacionais e de purificação.

### **8.1 Procedimento geral para a obtenção das arilidenoaminoguanidinas**

A uma solução contendo 250 mg de aldeído em 3 mL de etanol, foi adicionado 1 equivalente de cloridrato de aminoguanidina e a mistura reacional foi irradiada com micro-ondas a 120 °C por 20 minutos. Após arrefecimento do meio reacional, o solvente foi removido sob pressão reduzida. O material resultante foi suspenso em acetato de etila, foi filtrado, e lavado com este mesmo solvente. O material foi seco a vácuo, para obter o produto sob a forma de um sólido.

### **8.2 Procedimento geral para a obtenção das 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas**

A uma suspensão contendo 250 mg de iodidrato de *S*-metilisotiossemicarbazona em 2-propanol foi adicionado 1,5 equivalente da amina correspondente. A mistura reacional foi submetida a aquecimento a 80 graus Celsius. Após o completo consumo da isotiossemicarbazona, o solvente foi removido sob pressão reduzida e o material resultante foi tratado com excesso de uma solução saturada de bicarbonato de sódio. A fase aquosa foi lavada com acetato de etila e a fase orgânica obtida foi seca sob pressão reduzida para formar um óleo viscoso, que foi purificado por cromatografia flash em sílica gel com gradiente de acetato de etila em hexano.

### **8.3. Avaliação da atividade leishmanicida**

#### **8.3.1. Manutenção da linhagem macrófagos e infecção**

Macrófagos da linhagem J774 foram mantidos em garrafas de cultura em 5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato e 2 mM de aminoácidos não-essenciais. No momento do uso, as células foram contadas,

ajustadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB na concentração de  $3 \times 10^5$  células/mL, e 1 mL dessa suspensão foi distribuída em poços de placa de 24 poços. Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania* na fase estacionária de crescimento, numa proporção de 10 parasitas: 1 macrófago. A placa foi incubada por 4 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após 4 horas de infecção, os macrófagos foram lavados com DMEM sem soro, para remoção dos parasitas não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com DMEM suplementado com 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato e 2 mM de aminoácidos não-essenciais, e foram mantidos em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Após esse período, os poços contendo os macrófagos infectados foram lavados com DMEM sem soro, seguido pelo acréscimo de meio de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2% de urina humana, 2 mM de L-glutamina e 2 mM de aminoácidos não-essenciais. A placa foi mantida em estufa BOD a 27 °C por 3-4 dias para que fosse possível a saída de novas formas promastigotas de *Leishmania* dos macrófagos. A manutenção dessas novas formas promastigotas foi feita em garrafas de cultura com 5 mL de meio de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2% de urina humana e 2 mM de L-glutamina e 2 mM de aminoácidos não-essenciais.

### **8.3.2. Ensaio de toxicidade sobre formas promastigotas**

Formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* foram cultivadas em triplicatas em placa de 96 poços com meio de Schneider suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 2% de urina humana numa concentração de  $1 \times 10^5$  parasitos/poço num volume de 100µL. Foram adicionadas aos poços contendo as promastigotas diferentes concentrações dos compostos e a placa foi incubada em estufa tipo BOD a 27 °C por 48 horas. Após esse período, os parasitos foram homogeneizados e 50µL da suspensão serão transferidos para um tubo contendo 5 mL de isoton e o número de parasitos foi determinado em contador automático de células.

### **8.4. Análise de Ressonância Magnética Nuclear**

Os espectros de RMN (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz) foram obtidos em espectrômetros da BRUKER DPX-500 (ETTLINGER, ALEMANHA), no Laboratório Ressonância Magnética

Nuclear da UFAL. Sinal residual do solvente não deuterado foi utilizado como referência interna.

### **8.5. Purificação por cromatografia flash**

As separações cromatográficas foram feitas em aparelho de cromatografia flash da marca AIT France. A coluna utilizada para a purificação foi de sílica gel com granulometria de 20-40  $\mu\text{M}$ , do modelo Simply Connect BP-SUP e produzida pelo mesmo fabricante. A vazão utilizada foi de 12 mL/min e foram coletadas frações de 28 mL.

## 9. Conclusões e Perspectivas

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que a metodologia utilizada para a síntese das arilidenoaminoguanidinas em micro-ondas permitiu a diminuição considerável dos tempos reacionais para a obtenção dessas substâncias, mantendo ao mesmo tempo, os rendimentos elevados do método em refluxo. Aliado a esta vantagem está o menor consumo de solvente, uma vez que a irradiação em micro-ondas permite alcançar temperaturas acima do ponto de ebulição do solvente, enquanto que em procedimentos baseados em refluxo a temperatura do meio reacional é limitada pela ponto de ebulição do solvente, sendo necessário maiores volumes para solubilizar os produtos de partida.

Os protótipos **LQM008**, **LQM010** e **LQM013** 2-arilidenoaminoguanidínicos apresentaram potências comparáveis à da pentamidina contra promastigotas de *L. braziliensis*, com valores de  $CI_{50}$  iguais a 0,49, 0,80 e 0,57  $\mu$ M, respectivamente. Não obstante a necessidade de utilizar menores concentrações para determinar a  $CI_{50}$  de vários dos protótipos sintetizados, aí reside a possibilidade de se obter substâncias mais potentes que a pentamidina.

As modificações que resultaram na preparação das 2-benzilidenoaminoguanidinas *N*-substituídas visam avaliar o efeito da introdução de um segundo anel aromático sobre a atividade, já que muitas das substâncias descritas na literatura apresentam anéis benzênicos ou equivalentes heterocíclicos. Portanto, espera-se avaliar o efeito dessa nova série de análogos sobre espécies de leishmania e estabelecer a relação estrutura-atividade desses compostos.

## 10. Referências Bibliográficas

AGARWAL, K. C.; SHARMA, V.; SHAKYA, N.; GUPTA, S. Design and synthesis of novel substituted quinazoline derivatives as antileishmanial agents. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 18, p. 5474–7, 2009.

AHMED, N.; BRAHMBHATT, K. G.; KHAN, S. I.; et al. Synthesis and biological evaluation of tricyclic guanidine analogues of batzelladine K for antimalarial, antileishmanial, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities. **Chemical Biology & Drug Design**, p. 491-498, 2012.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

BERLINCK, R. G. S.; BURTOLOSO, A. C. B.; TRINDADE-SILVA, A. E.; et al. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural product reports**, v. 27, n. 12, p. 1871–907, 2010.

BOYLE, T. P.; BREMNER, J. B.; COATES, J.; et al. New cyclic peptides via ring-closing metathesis reactions and their anti-bacterial activities. **Tetrahedron**, v. 64, n. 49, p. 11270–11290, 2008.

BURGESS, K. **Solid-phase Synthesis of Guanidines**. In: Solid-phase Organic Synthesis. John Wiley & Sons, 2000, p. 1-23.

BUTLER, A.R. **Organic Reaction Mechanisms**. John Wiley & Sons, 1975, p. 355

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 04, n. 02, 2013.

DRAKE, B.; PATEK, M. LEBL, M. **Synthesis**, n.,6 p. 579-582, 1994.

DURANT, G.J.; SMITH, G.M.; SPICKETT, R.G.; WRIGHT, S.H.B. Biologically active guanidines and related compounds. II. Some antiinflammatory aminoguanidines. **J. Med. Chem.**, v. 9, n. 1, p. 22-27, 1966.

EPIFÂNIO, W. **Síntese de derivados aminoguanidínicos planejados como protótipos de fármacos antineoplásicos**. UFAL, 2011. Universidade de Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia (Mestrado em Ciências), 2011.

FEICHTINGER, K.; SINGS, H. L.; BAKER, T. J.; MATTHEWS, K.; GOODMAN, M. Triurethane-Protected Guanidines and Triflyldiurethane-Protected Guanidines: New Reagents for Guanidinylation Reactions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 23, p. 8432–8439, 1998.

FEICHTINGER, K.; ZAPF, C.; SINGS, H. L.; GOODMAN, M. Diprotected Triflylguanidines : A New Class of Guanidinylation Reagents. **The Journal of organic chemistry**, v. 3263, n. 98, p. 3804–3805, 1998.

GALLIVAN, J. P.; DOUGHERTY, D. A. Cation- $\pi$  interactions in structural biology. **PNAS**, v. 96, n. 17, p. 9459-9464, 1999.

GAUBERT, G.; BERTOZZI, F.; KELLY, N. M.; et al. Discovery of selective nonpeptidergic neuropeptide FF2 receptor agonists. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 21, p. 6511–4, 2009.

GHOSH, A. K.; HOL, W. G. J.; FAN, E. Solid-Phase Synthesis of N -Acyl- N ' -Alkyl / Aryl Disubstituted Guanidines. **J. Org. Chem**, v. 66, p. 2161–2164, 2001.

GUND, P. Guanidine, Trimethylenemethane, and “Y-Delocalization.” **J. Chem. Educ.**, v. 49, n. 2, p. 100, 1972.

GUO, Z.-X.; CAMMIDGE, A. N.; HORWELL, D. C. A Convenient and Versatile Method for the Synthesis of Protected Guanidines. **Synthetic Communications**, v. 30, n. 16, p. 2933–2943, 2000.

HAFELINGER, G. ; KUSKE, F.K.H. **General and Theoretical Aspects of Amidines and Related Compounds**. In: The Chemistry of Amidines and Imidates. v. 2. Springer, 1991, p. 1-100.

HANNON, C. L.; ANSLYN, E. V. **The Guanidinium Group: Its Biological Role and Synthetic Analogs**. In: Bioorganic Chemistry Frontiers, v. 3. Springer Berlin Heidelberg, 1993, p.193-255.

HOFFMAN, B. B.; Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos e antagonistas dos receptores adrenérgicos. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN J.G.; LIMBIRD L.E. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 10a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003. Pág. 163-203.

HUTTUNEN, K. M.; MANNILA, A.; LAINE, K.; et al. The first bioreversible prodrug of metformin with improved lipophilicity and enhanced intestinal absorption. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 14, p. 4142–8, 2009.

JIRGENSONS, A.; KUMS, I.; KAUSS, V.; KALVINS, I. A Convenient Reagent for N-hydroxyguanylation. **Synthetic Communications**, v. 27, n. 2, p. 315–322, 1997.

KATRITZKY, A. R.; PARRIS, R. L.; ALLIN, S. M. Benzotriazole-1-Carboxamidinium Tosylate: an alternative Method for the Conersion of amines to Guanidines. **Synthetic Communications**, v. 25, n. 8, p. 1173–1186, 1995.

KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B. V. Recent developments in guanylation agents. **ARKIVOC**, v. 2005, n. iv, p. 49–87, 2005.

- KATRITZKY, A. R.; ROGOVOY, B. V.; CHASSAING, C.; VVEDENSKY, V. Di(benzotriazol-1-yl)methanimine: a new reagent for the synthesis of tri- and tetrasubstituted guanidines. **The Journal of organic chemistry**, v. 65, n. 23, p. 8080–2, 2000.
- KAUR, J.; KUMAR, P.; TYAGI, S.; et al. In silico screening, structure-activity relationship, and biologic evaluation of selective pteridine reductase inhibitors targeting visceral leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 659–66, 2011.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–15, 2011.
- KENT, D. R.; CODY, W. L.; DOHERTY, A. M. TWO NEW reagents for the guanylation of primary, secondary and aryl amines. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 48, p. 8711–8714, 1996.
- KIM, S. K.; QIAN, L. Improved Method for the Preparation of Guanidines. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 48, p. 7677–7680, 1993.
- LANGE, E. E. W.; BAUCKE, D.; HORNBERGER, W.; MACK, H.; SEITZ, W.; HOFFKEN, H. W. D-Phe-Pro-Arg type inhibitors: unexpected selectivity by modification of the P1 moiety. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 13, n. 12, p. 2029–2033, 2003.
- LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. ROCHE, V. F. ZITO, S. W. **Foye's principles of Medicinal Chemistry**, 6<sup>a</sup> Ed. Baltimore: Wolter Kluer, Lippincott Williams & Wilkins, 2008, p. 728–785.
- LEVAUET, C.; LERPINIÈRE, J.; KO, S. Y. The HgCl<sub>2</sub>-Promoted Guanylation Reaction : The Scope and Limitations. **Tetrahedron**, v. 53, n. 14, p. 5291–5304, 1997.
- LIN, P.; HENG, C. H.; SIM, M. M. Syntheses of Guanidinoglycosides with the Inventive use of Mitsunobu Conditions and 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene. **Synthesis**, n. 2, p. 0255–0261, 2003.
- LINTON, B.; CARR, A.; ORNER, B.; HAMILTON, A. A versatile one-Pot synthesis of 1,3-substituted guanidines from carbamoyl isothiocyanates. **The Journal of organic chemistry**, v. 65, n. 5, p. 1566–8, 2000.
- MACMORRIS-ADIX, M. Leishmaniasis : A review of the disease and the debate over the origin and dispersal of the causative parasite Leishmania. **Macalester Review in Biogeography**, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2008.
- MAGALHAES, A; MAIGRET, B.; HOFACK, J.; GOMES, J. N.; SCHERAGA, H. A. Contribution of unusual arginine-arginine short-range interactions to stabilization and recognition in proteins. **Journal of protein chemistry**, v. 13, n. 2, p. 195–215, 1994.
- MANETTI, F.; CASTAGNOLO, D.; RAFFI, F.; et al. Synthesis of new linear guanidines and macrocyclic amidinourea derivatives endowed with high antifungal activity against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 23, p. 7376–9, 2009.

MANIMALA, J. C.; ANSLYN, E. V. A highly efficient method for the synthesis of guanidinium derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 4, p. 565–567, 2002.

MANSON-BAHR, P. E. C. **Manson's Tropical Diseases**. Ed 18. Londres: Bailliere Tindall, 1982.

MARTINS, T.L.C.; FRANÇA, FRANÇA, T. C. C.; RAMALHO, T. C.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Synthesis of Guanylhydrazones Under Microwave Irradiation. **Synthetic Communications**, v. 34, n. 21, p. 3891-3899, 2004.

MARYANOFF, C. A.; STANZIONE, R. C.; PLAMPIN, J. N.; MILLS, J. E. A Convenient Synthesis of Guanidines from Thioureas. **The Journal of organic chemistry**, v. 51, n. 10, p. 1882–1884, 1986.

MCKAY, A.F.; GARMAISE, D.L.; BAKER, H.A.; HAWKINS, L.R.; FALTA, V.; FAUDRY, R.; PARIS, G.Y. Bacteriostats. VI. Bacteriostatic activities of some substituted guanidines. **J. Med. Chem.**, v.6, p.587-595, 1963.

MOLINA, P.; ALLER, E.; LORENZO, A. One-flask Conversion of N-Aryliminophosphoranes into N1, N2, N3-Triaryl- guanidines Promoted by TBAF. **Synlett**, v. 5, p. 714–716, 2003.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis : A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, p. 9–19, 2009.

MUSIOL, H.-J.; MORODER, L. N,N'-Di-tert-butoxycarbonyl-1H-Guanidinyllating Reagents. **Organic letters**, v. 3, n. 24, p. 3859–3861, 2001.

NOVÁK, L.; HANANIA, M.; KOVÁCS, P.; et al. A Convenient Route To Cyanoguanidines. **Synthetic Communications**, v. 29, n. 10, p. 1757–1766, 1999.

OKAJIMA, N.; OKADA, Y. Synthesis and reaction of 2-imino-1,3-thiazetidines and 2-imino-1,3-dithietanes. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 177–185, 1991.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases**. Organização Mundial de Saúde, 2013, p. 67-71.

ORNER, B. P.; HAMILTON, A. D. The Guanidinium Group in Molecular Recognition: Design and Synthetic Approaches. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 41, n. 1-4, p. 141–147, 2001. Kluwer Academic Publishers.

PATIL, R. S.; PATIL, M. S.; KSHIRSAGAR, S. S.; et al. Synthetic and Natural Products Against Leishmaniasis : A Review. **World J Public Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 7–22, 2012.

PEZ, D.; LEAL, I.; ZUCCOTTO, F.; et al. 2,4-Diaminopyrimidines as inhibitors of Leishmanial and Trypanosomal dihydrofolate reductase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4693–4711, 2003.

RAMADAS, K.; JANARTHANAN, N.; PRITHA, R. A Short and Concise Synthesis of Guanidines. **Synlett**, p. 1053, 1997.

RAMADAS, K.; SRINIVASAN, N. An expedient synthesis of substituted guanidines. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 16, p. 2841–2844, 1995.

RASMUSSEN, C.R.; VILLANI, F.J.; REYNOLDS, B.E.; PLAMPIN, J.N.; HOOD, A.R.; HECKER, L.R.; NORTRY, S.O.; HASLIN, A.; COSTANZO, M.J.; HOWSE, R.M.; MOLINARI, A.J. A versatile synthesis of novel N,N'N''-trisubstituted guanidines. **Synthesis**, p.460-466, 1988.

RATHKE, B. Ueber Verbindungen des Schwefelharnstoffs. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 17, n. 1, p. 297–309, 1884.

REDDY, N. L.; FAN, W.; MAGAR, S. S.; et al. Synthesis and pharmacological evaluation of N,N'-diarylguanidines as potent sodium channel blockers and anticonvulsant agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 41, n. 17, p. 3298–302, 1998.

REID, C. M.; EBIKEME, C.; BARRETT, M. P.; et al. Synthesis of novel benzamidine- and guanidine-derived polyazamacrocycles: Selective anti-protozoal activity for human African trypanosomiasis. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, n. 20, p. 5399–401, 2008.

REITER, L. A.; BRIGHTY, K. E.; BRYANT, R. A.; GOLDSMITH, M. E. Synthesis of Mono N-Substituted Guanylthioureas. **Synthetic Communications**, v. 26, n. 7, p. 1423–1429, 1996.

RODRÍGUEZ, F.; ROZAS, I.; KAISER, M.; et al. New bis(2-aminoimidazoline) and bisguanidine DNA minor groove binders with potent in vivo antitrypanosomal and antiplasmodial activity. **J. Med. Chem.**, v. 51, n. 4, p. 909–23, 2008.

SANDIN, H.; SWANSTEIN, M.; WELLNER, E. A fast and parallel route to cyclic isothioureas and guanidines with use of microwave-assisted chemistry. **J. Org. Chem.**, v. 69, n. 5, p. 1571-1580, 2004.

SCHLIPPE, Y.V.G. ; HEDSTROM, L. A twisted base? The role of arginine in enzyme catalysed proton abstractions. **Arch. Biochem. Biophys.**, 433, 266-278, 2005.

SCHMIDTCHEN, F. P.; BERGER, M. Artificial Organic Host Molecules for Anions. **Chemical reviews**, v. 97, n. 5, p. 1609–1646, 1997.

SCOTT, F.L.; O'SULLIVAN, D.A.; REILLY, J. Observations on the preparation of diaminoguanidine. **J. Appl. Chem.**, v. 2, p. 184-186, 1954.

SHARMA, M.; CHAUHAN, K.; SHIVAHARE, R.; et al. Discovery of a new class of natural product-inspired quinazolinone hybrid as potent antileishmanial agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, n. 11, p. 4374–92, 2013.

SRINIVASAN, N.; RAMADAS, K. Role of quaternary ammonium permanganates in the synthesis of substituted guanidines—a comparative study. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 2, p. 343–346, 2001.

STEPHENS, C. E.; BRUN, R.; SALEM, M. M.; et al. The Activity of Diguanidino and “Reversed” Diamidino 2,5-Diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, p. 2065–2069, 2003.

SUHS, T.; KÖNIG, B. Synthesis of Guanidines in Solution. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 315–331, 2006.

TASSONI, E.; GIANNESI, F.; BRUNETTI, T.; et al. Novel substituted aminoalkylguanidines as potential antihyperglycemic and food intake-reducing agents. **J. Med. Chem.**, v. 51, n. 11, p. 3073–6, 2008.

WANG, X.; SARYCHEVA, O. V.; KOIVISTO, B. D.; et al. A Terphenyl Scaffold for  $\pi$ -Stacked Guanidinium Recognition Elements. **Organic letters**, v. 10, n. 2, p. 8–11, 2008.

YAMAZAKI, C.; The structure of isothiosemicarbazones. **Can. J. Chem.**, v. 53, p. 610–615, 1975.

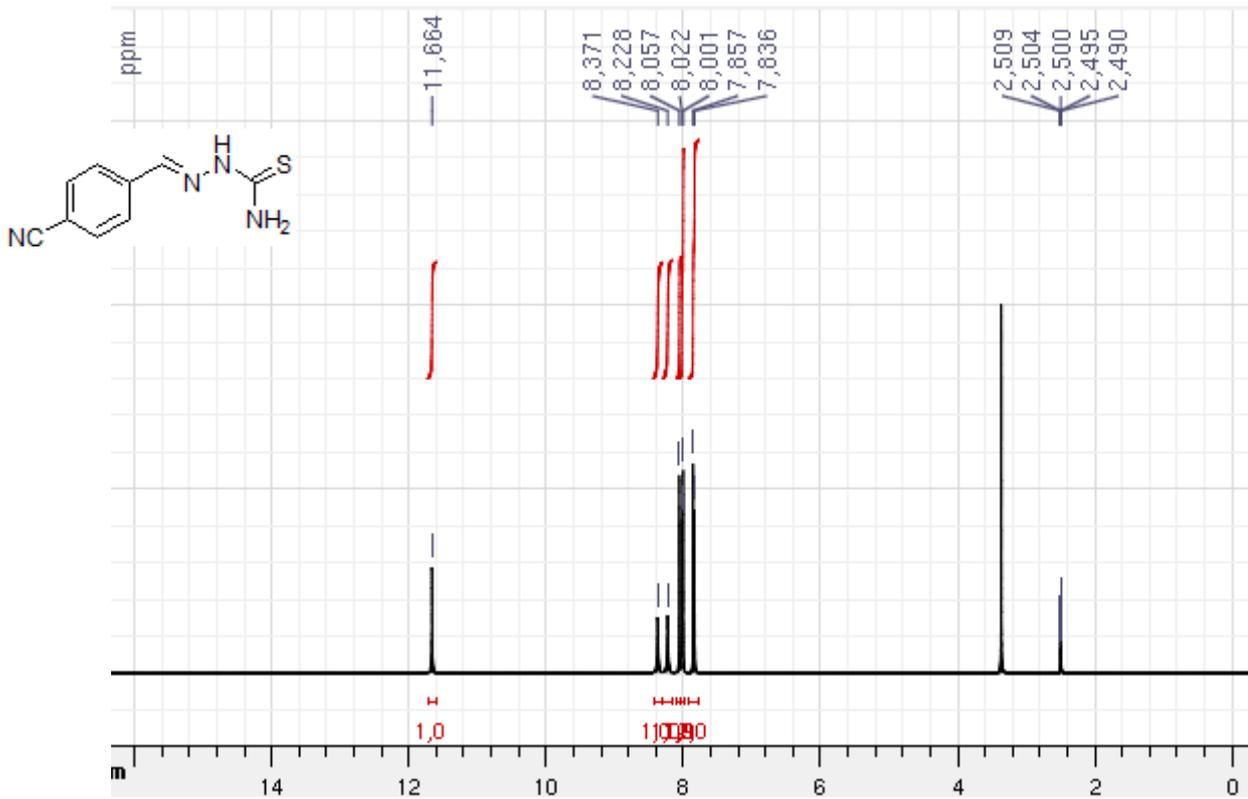
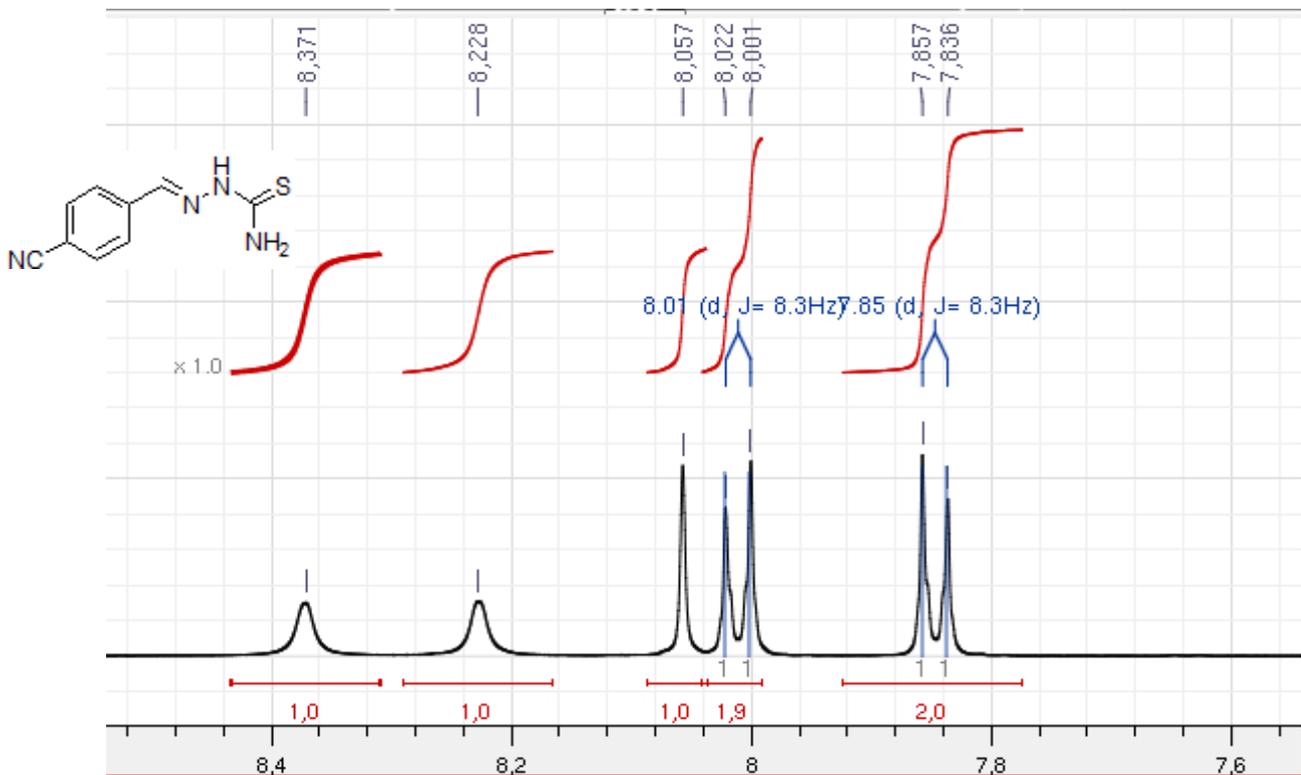
YONG, Y. F.; KOWALSKI, J. A.; LIPTON, M. A. Facile and Efficient Guanylation of Amines Using Thioureas and Mukaiyama's Reagent. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1540–1542, 1997.

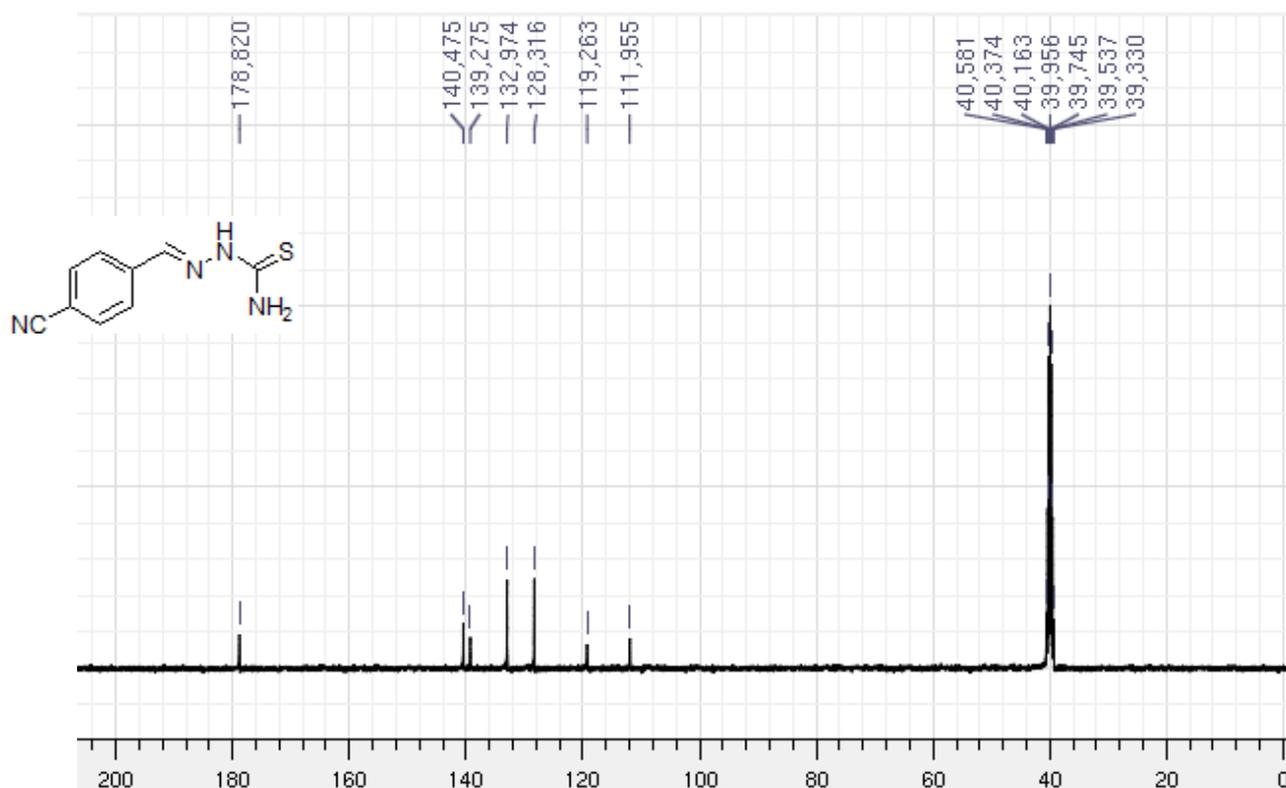
YONG, Y. F.; KOWALSKI, J. A.; THOEN, J. C.; LIPTON, M. A. A New Reagent for Solid and Solution Phase Synthesis of Protected Guanidines from Amines. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 53–56, 1999.

YUAN, C.; WILLIAMS, R. M. An Efficient Method for the Preparation of Amidinoureas. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 12, p. 1945–1948, 1996.

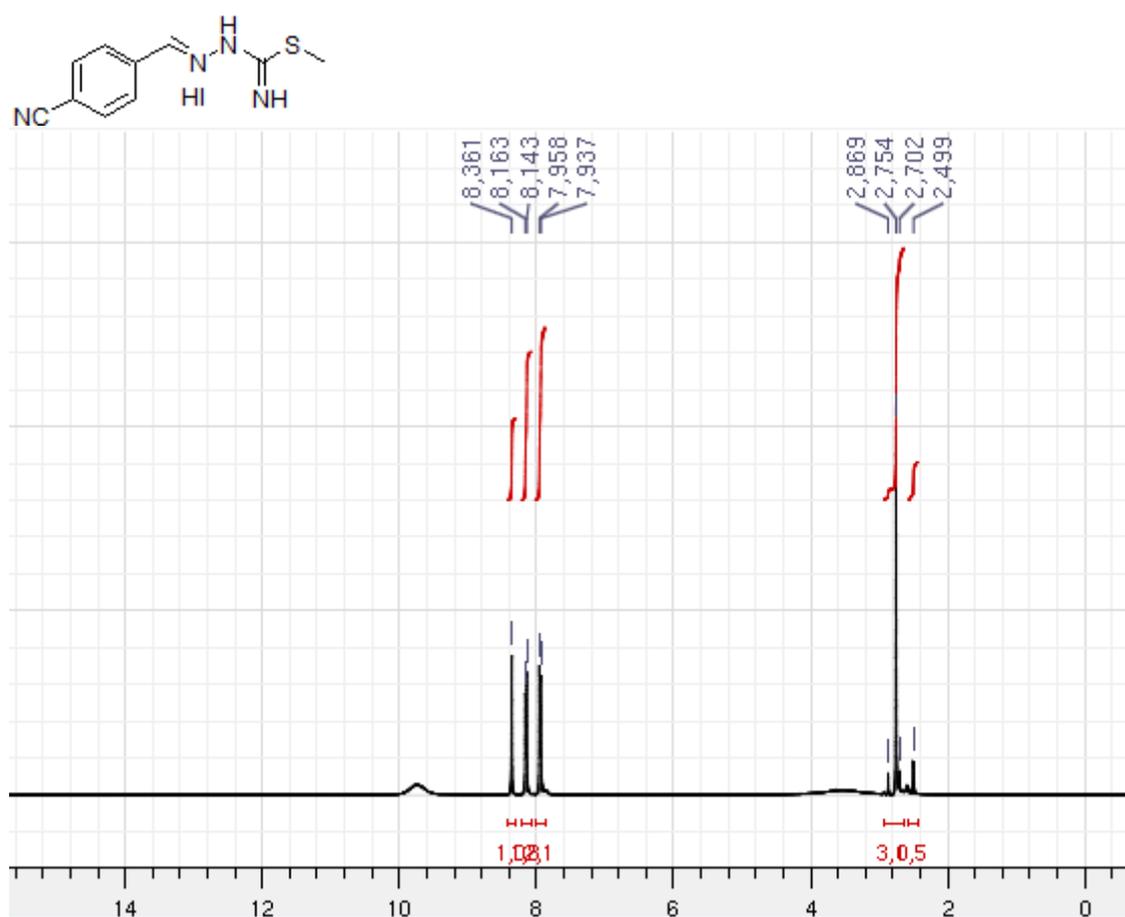
ZHANG, J.; SHI, Y.; STEIN, P.; ATWAL, K.; LI, C. One-pot synthesis of N,N'-disubstituted acylguanidines. , v. 43, p. 57–59, 2002.

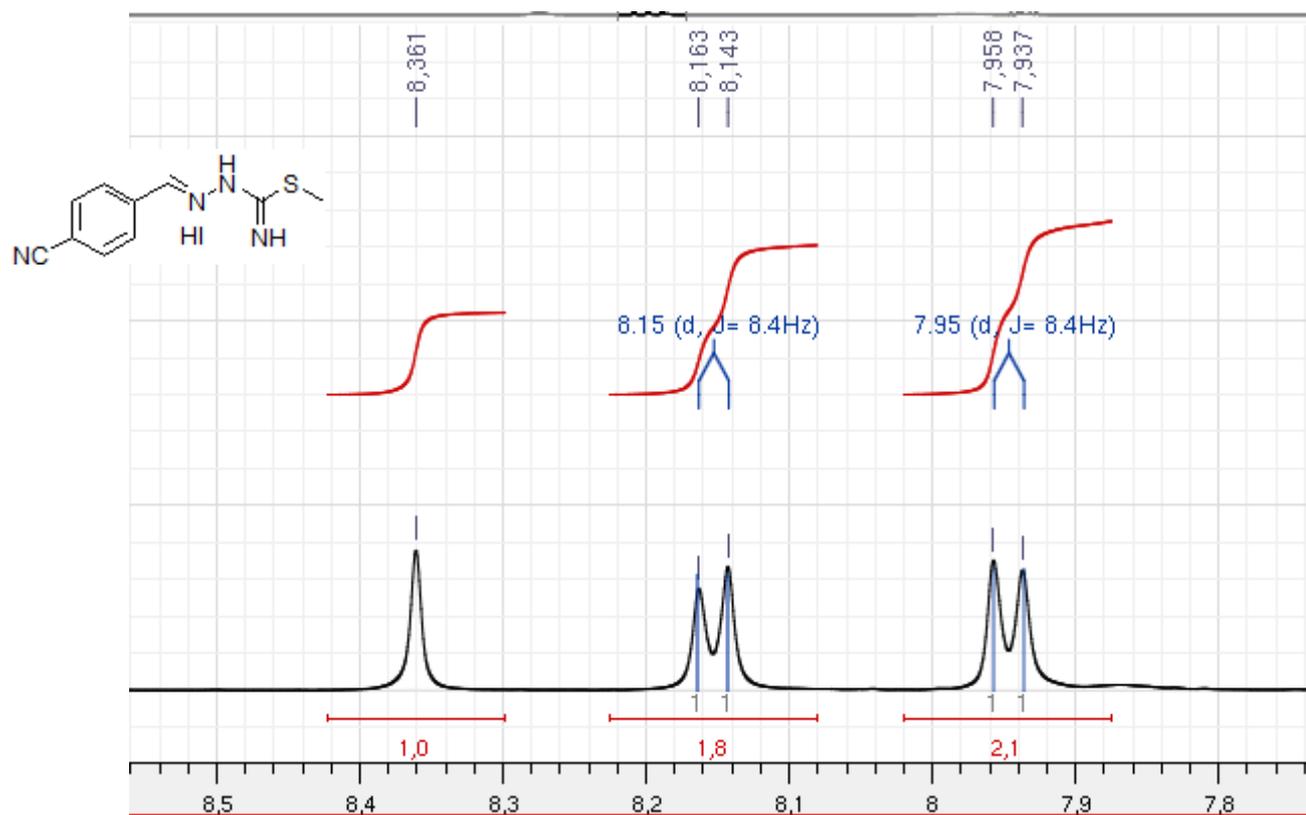
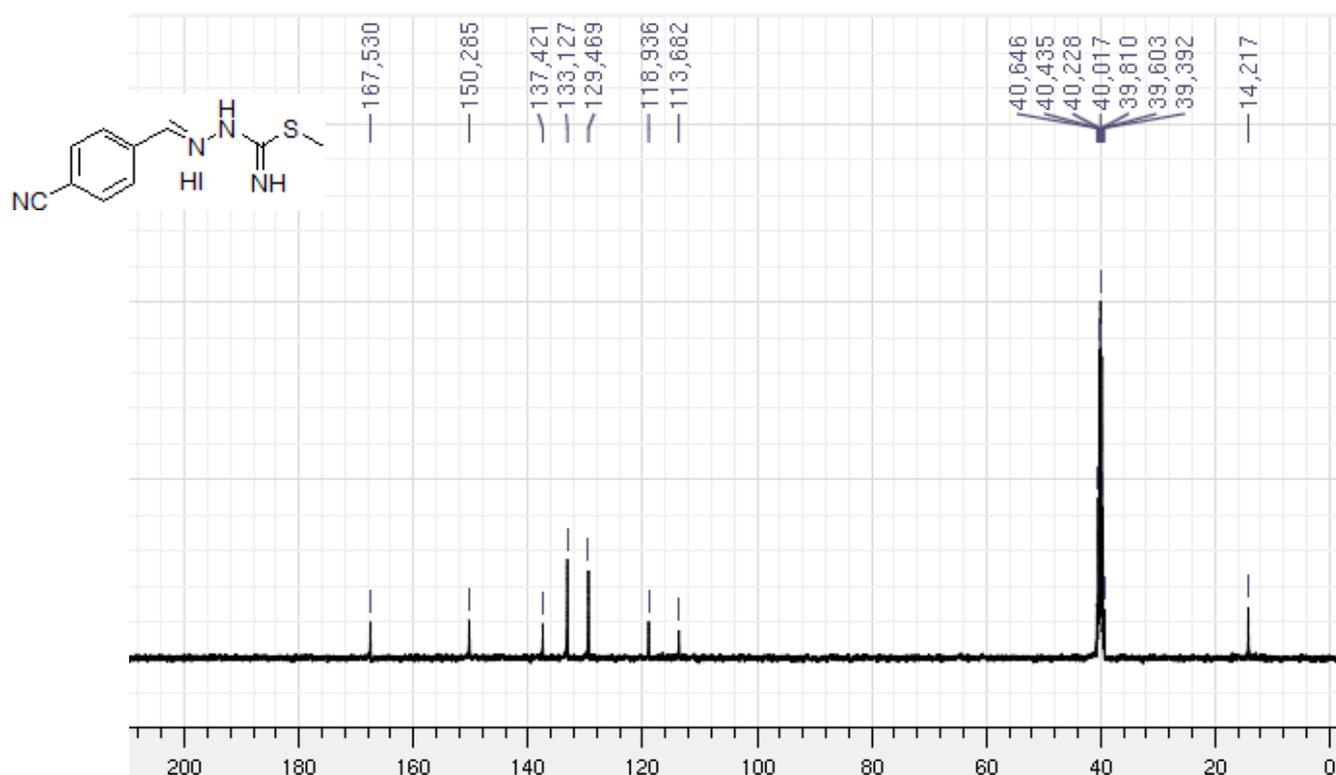
## 11. Anexos

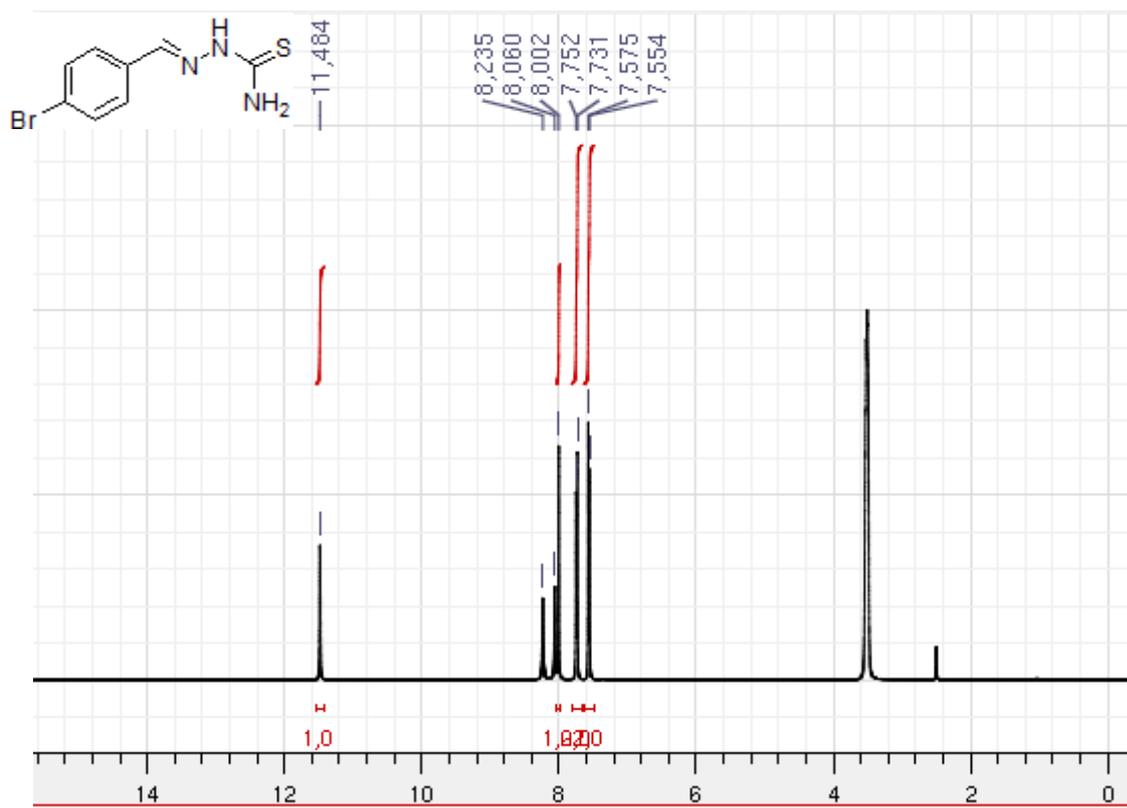
Espectro 1. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $\text{d}_6$  do intermediário tiossemicarbazonaEspectro 2. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $\text{d}_6$  do intermediário tiossemicarbazona



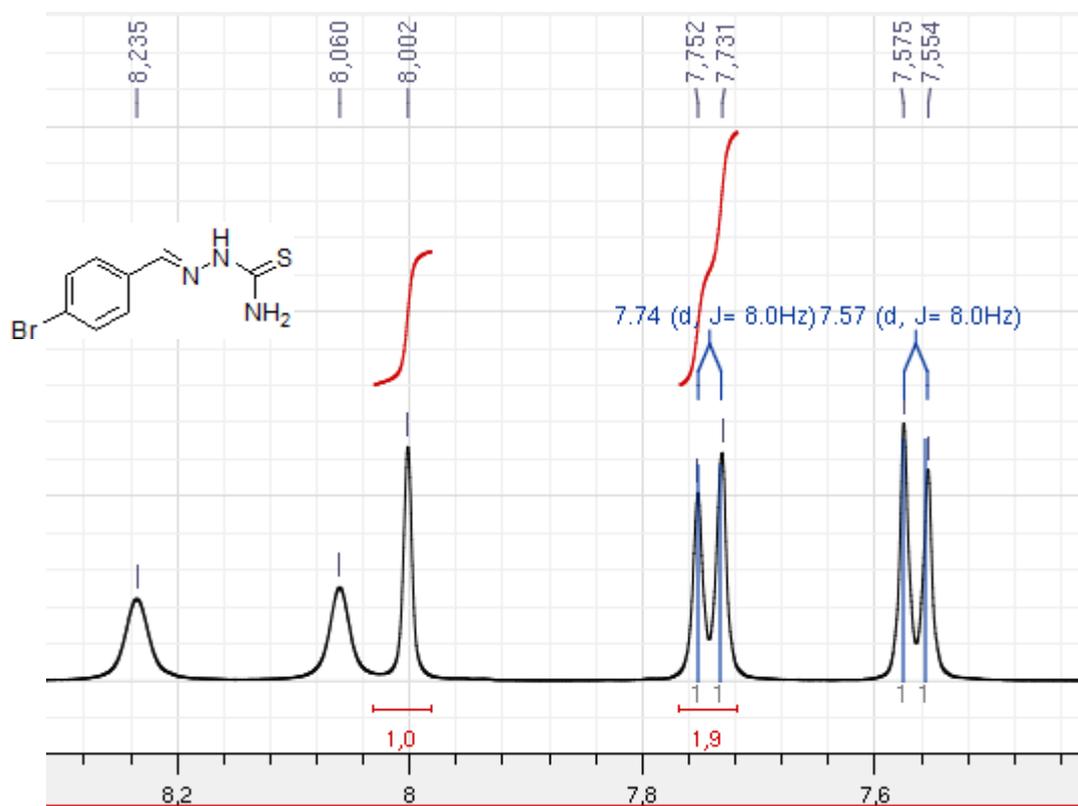
Espectro 3. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $\text{d}_6$  do intermediário tiossemicarbazona



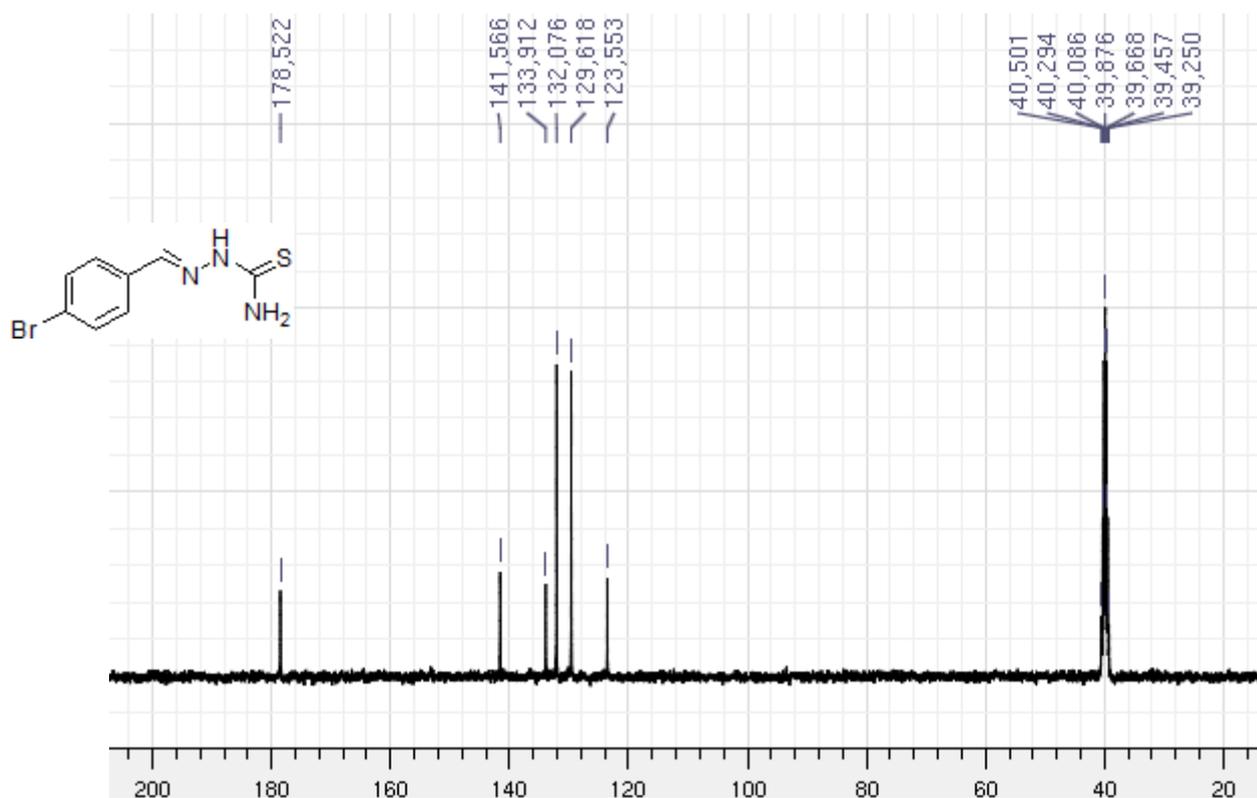
Espectro 4. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazonaEspectro 5. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazonaEspectro 6. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



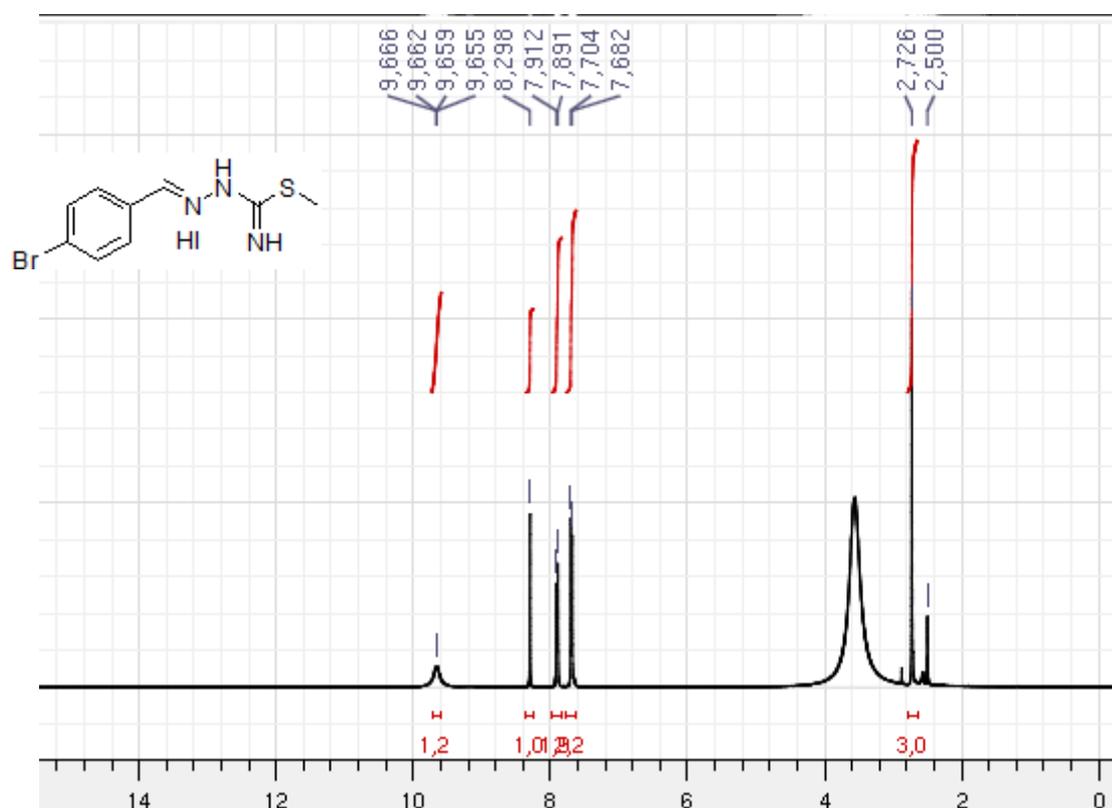
Espectro 7. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



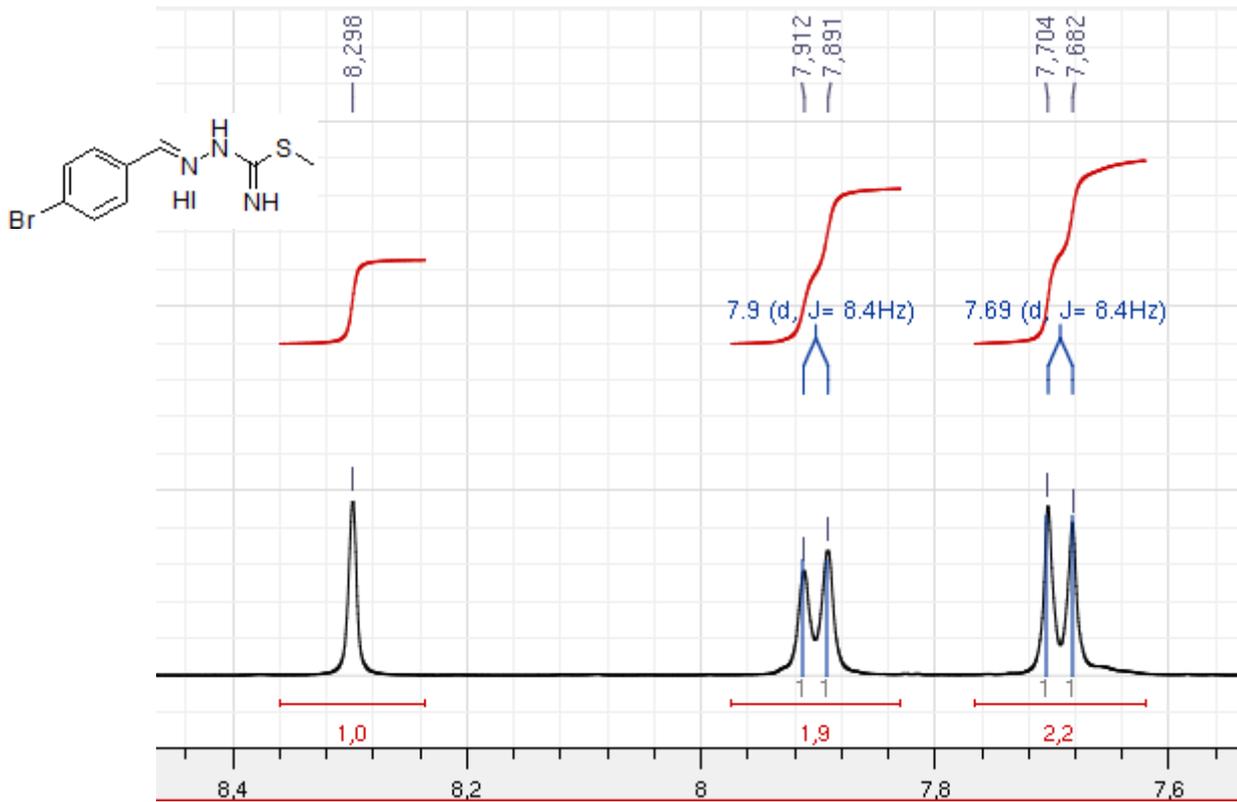
Espectro 8. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



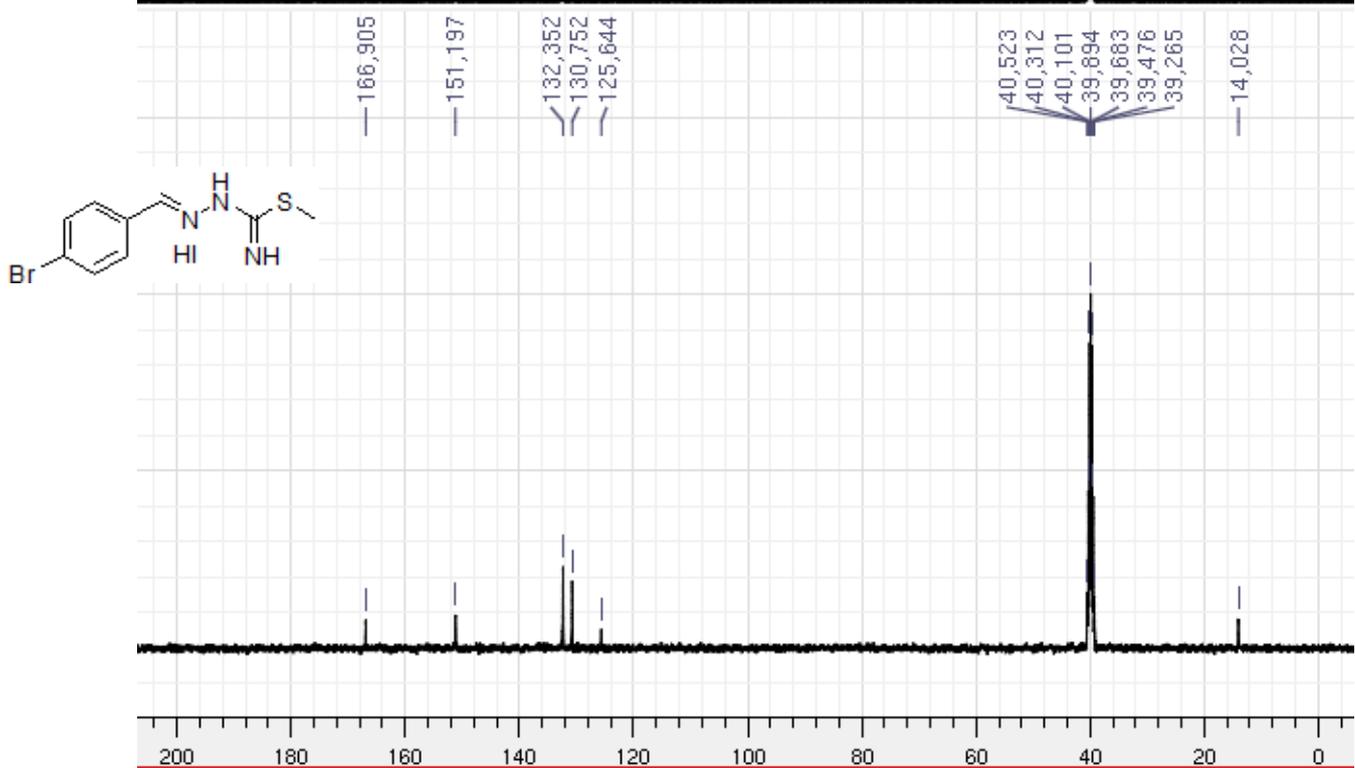
Espectro 9. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



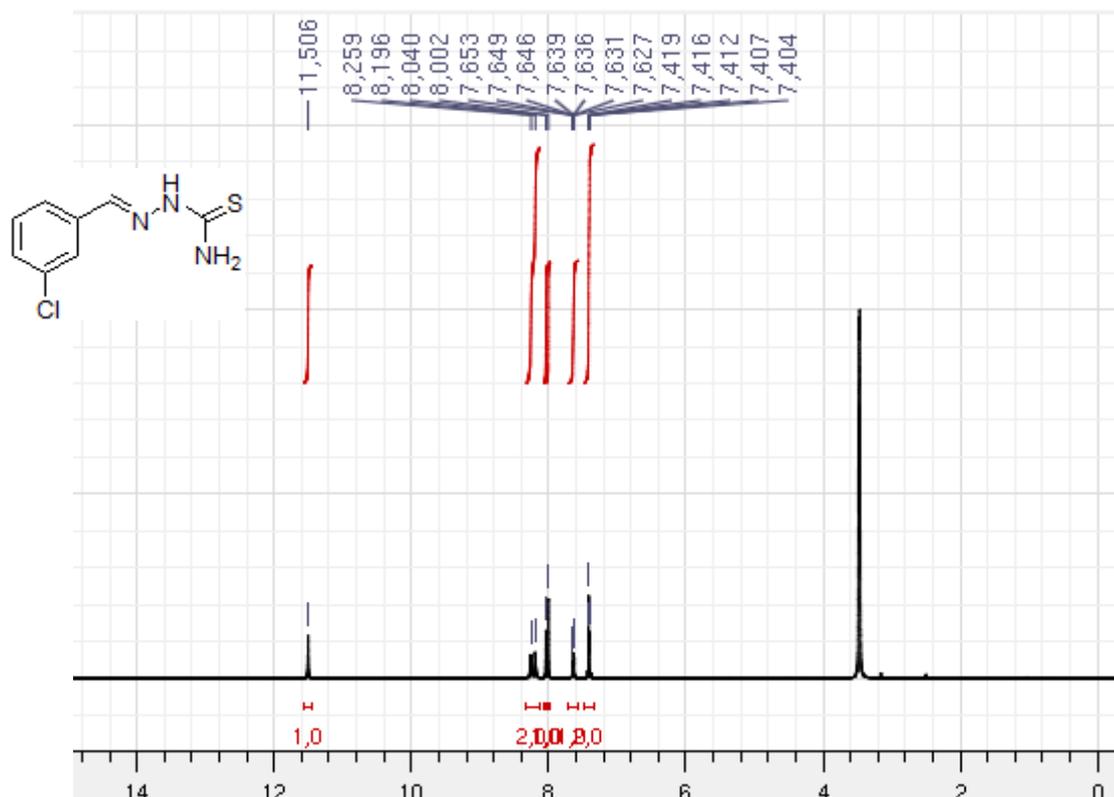
Espectro 10. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



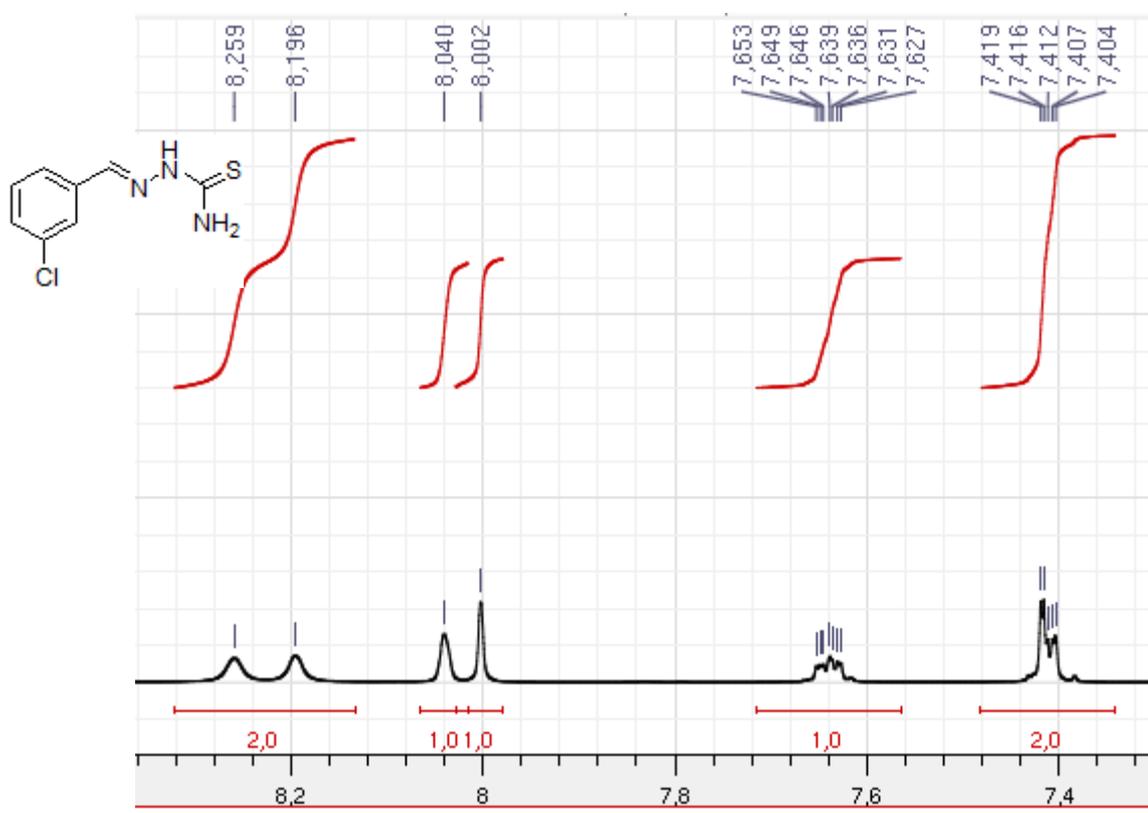
Espectro 11. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



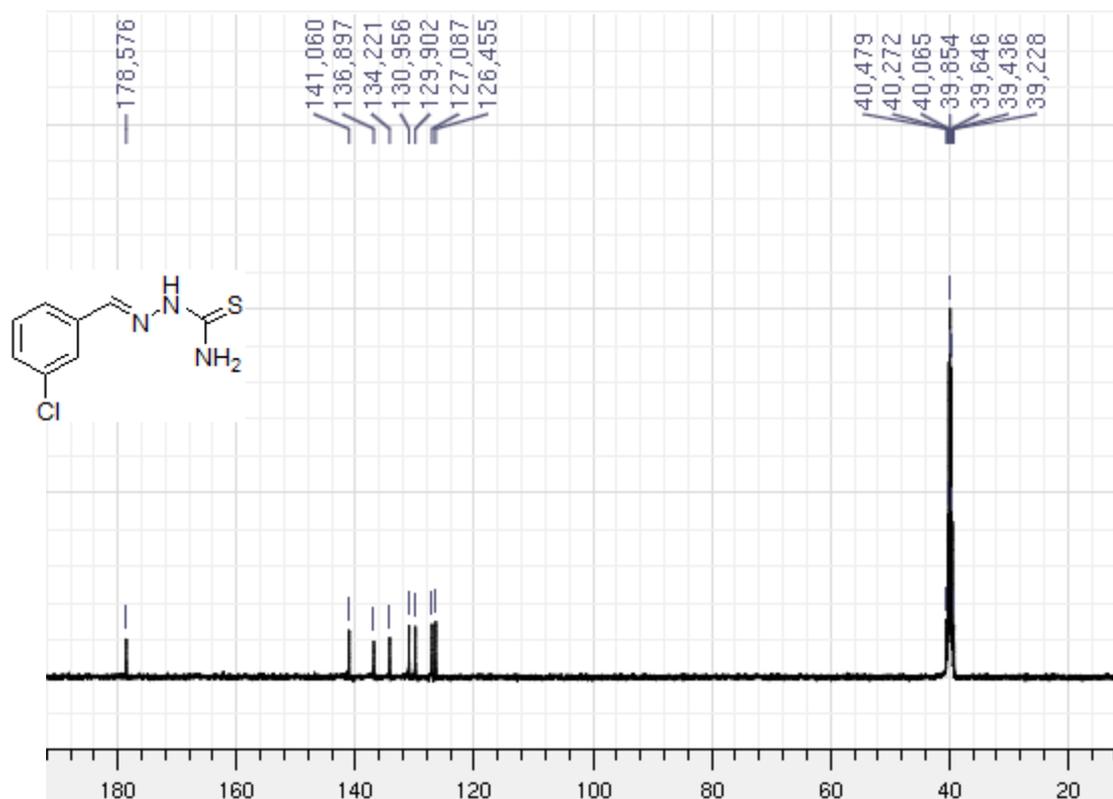
Espectro 12. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



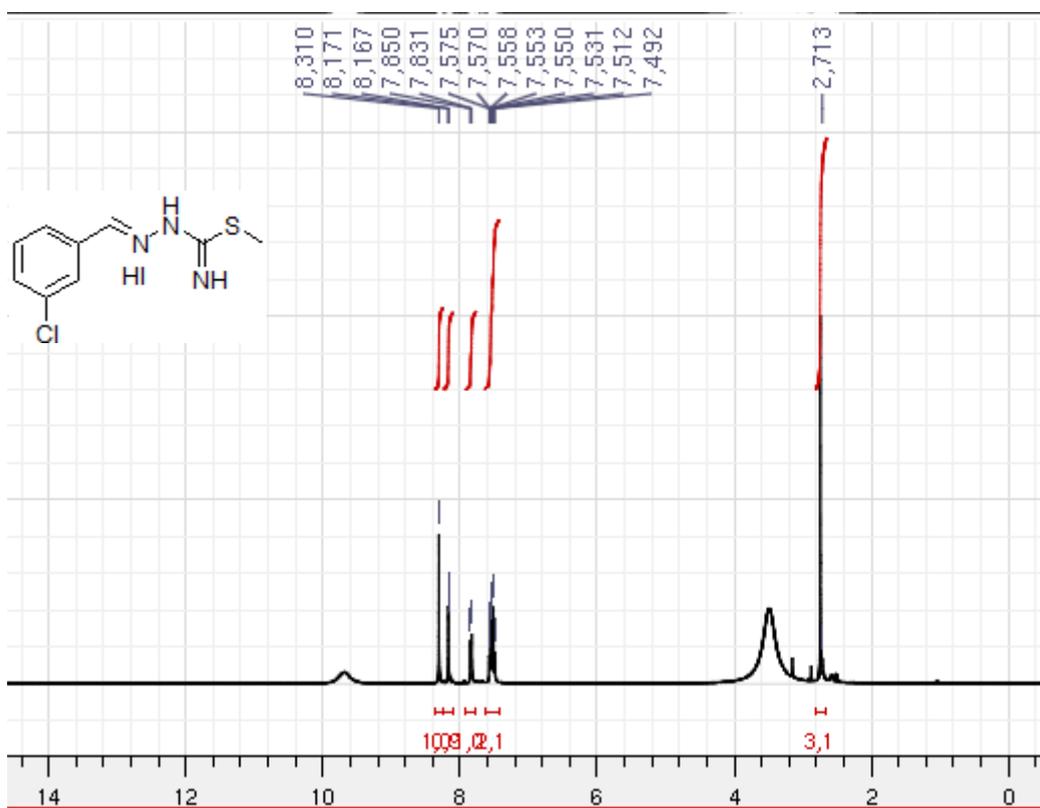
Espectro 13. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



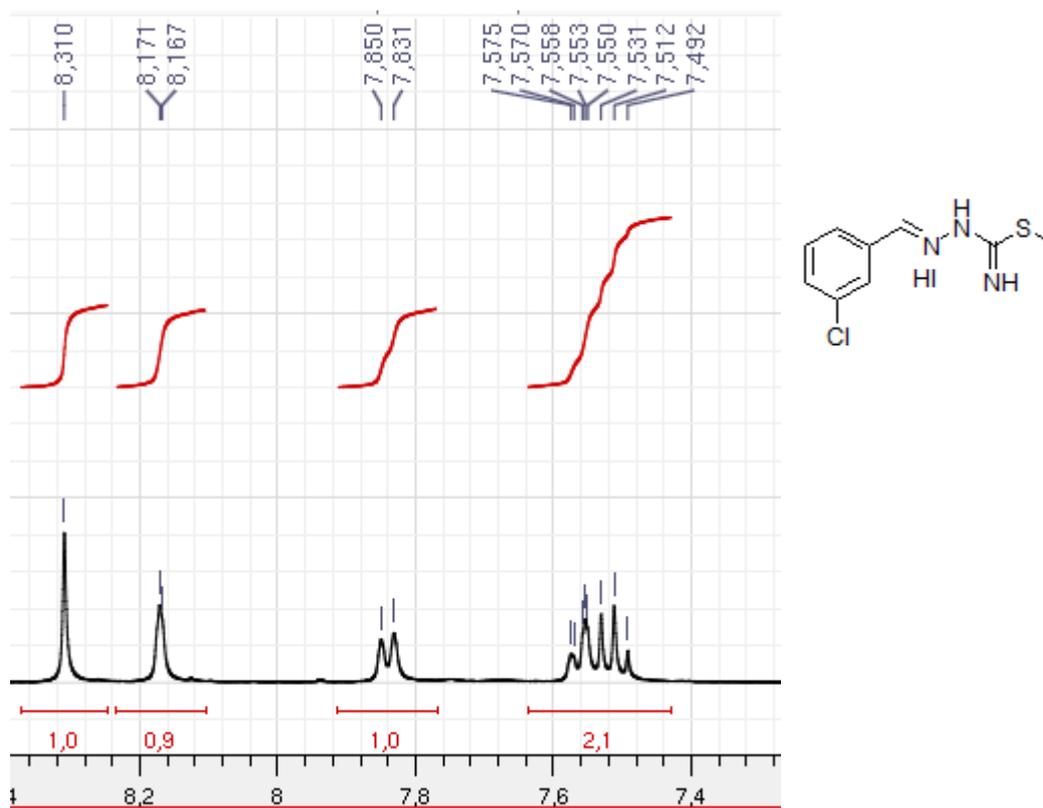
Espectro 14. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



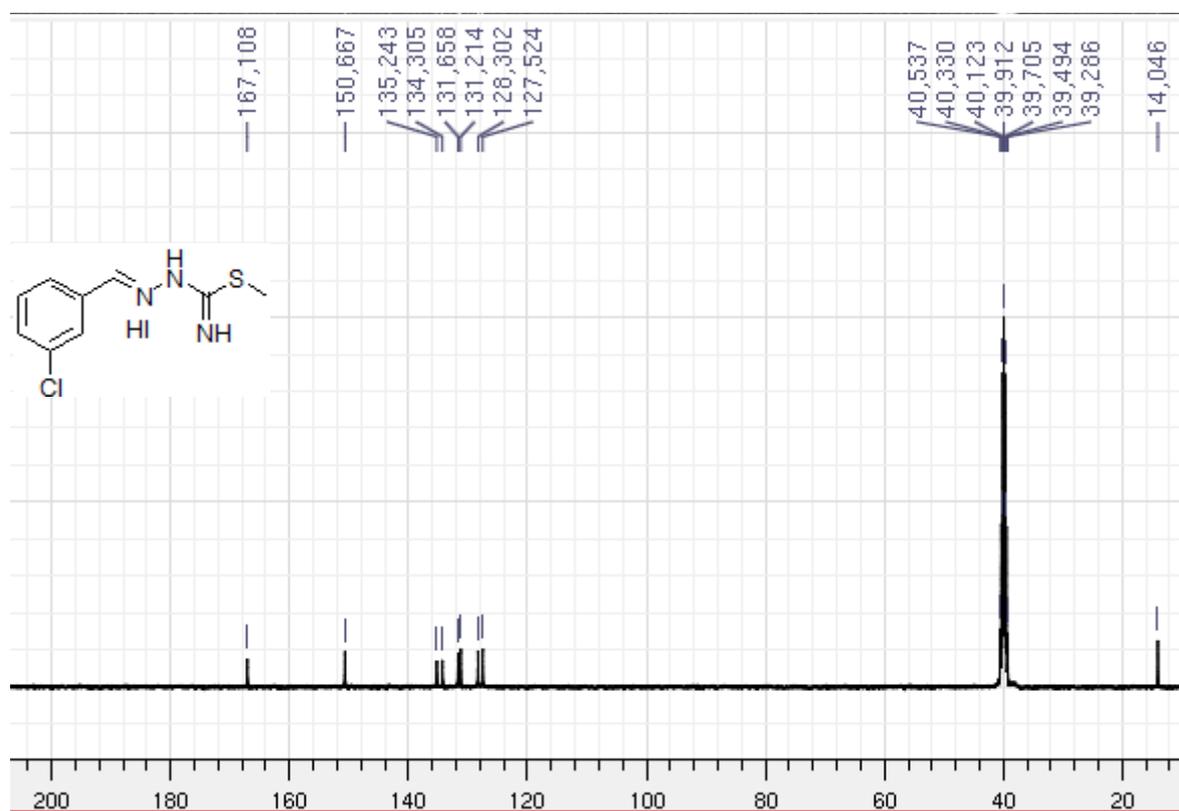
Espectro 15. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário tiossemicarbazona



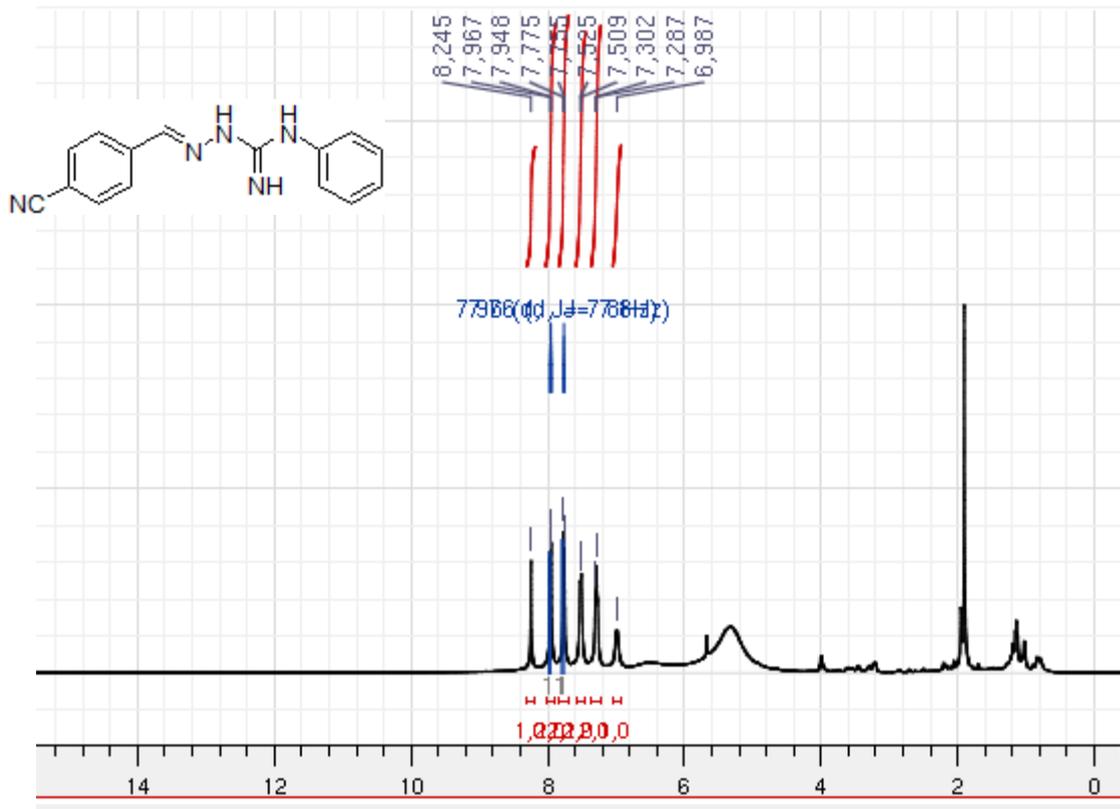
Espectro 16. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do intermediário isotiossemicarbazona



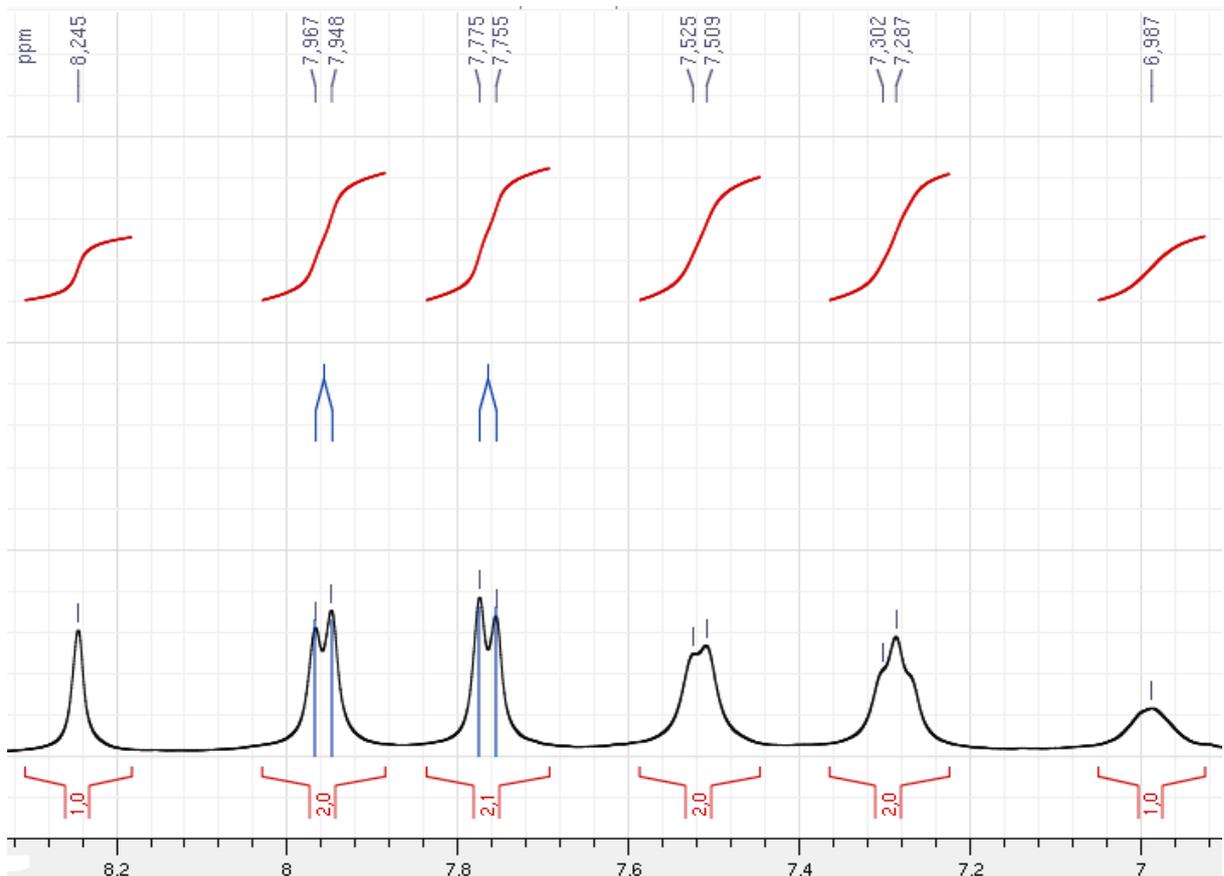
Espectro 17. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em  $\text{DMSO-d}_6$  do intermediário isotiossemicarbazona

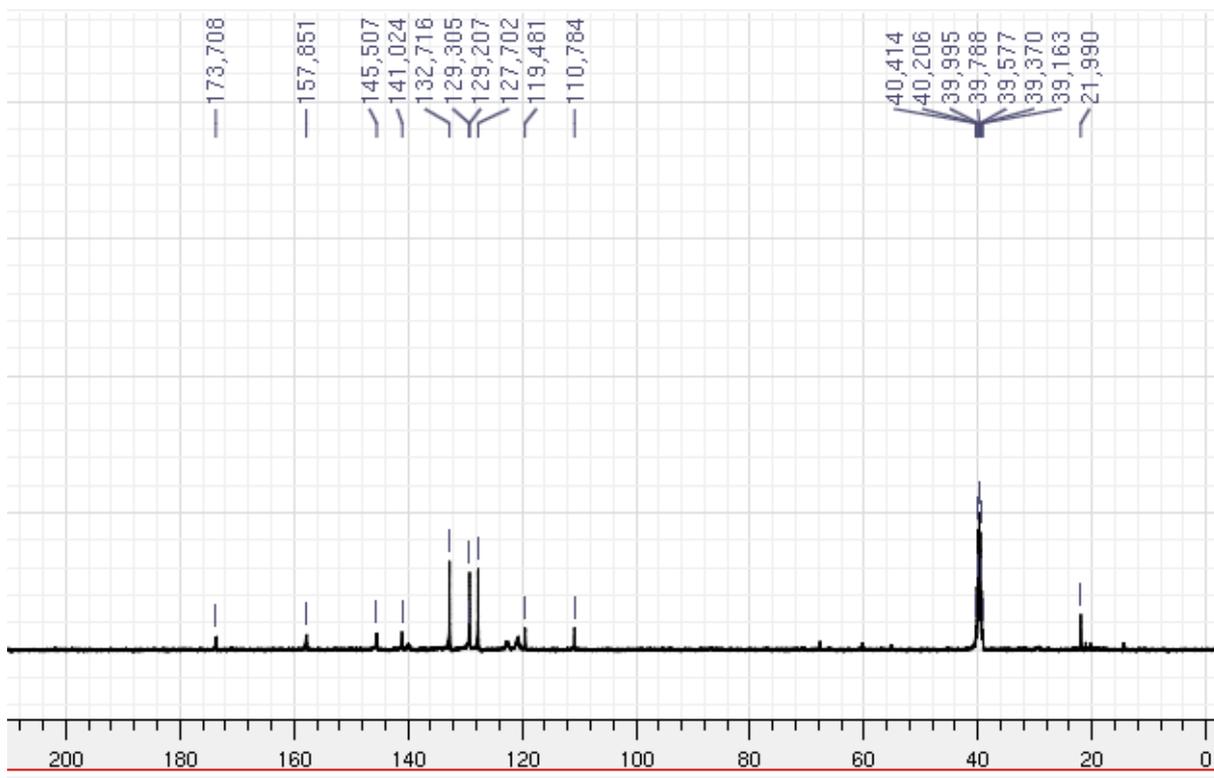
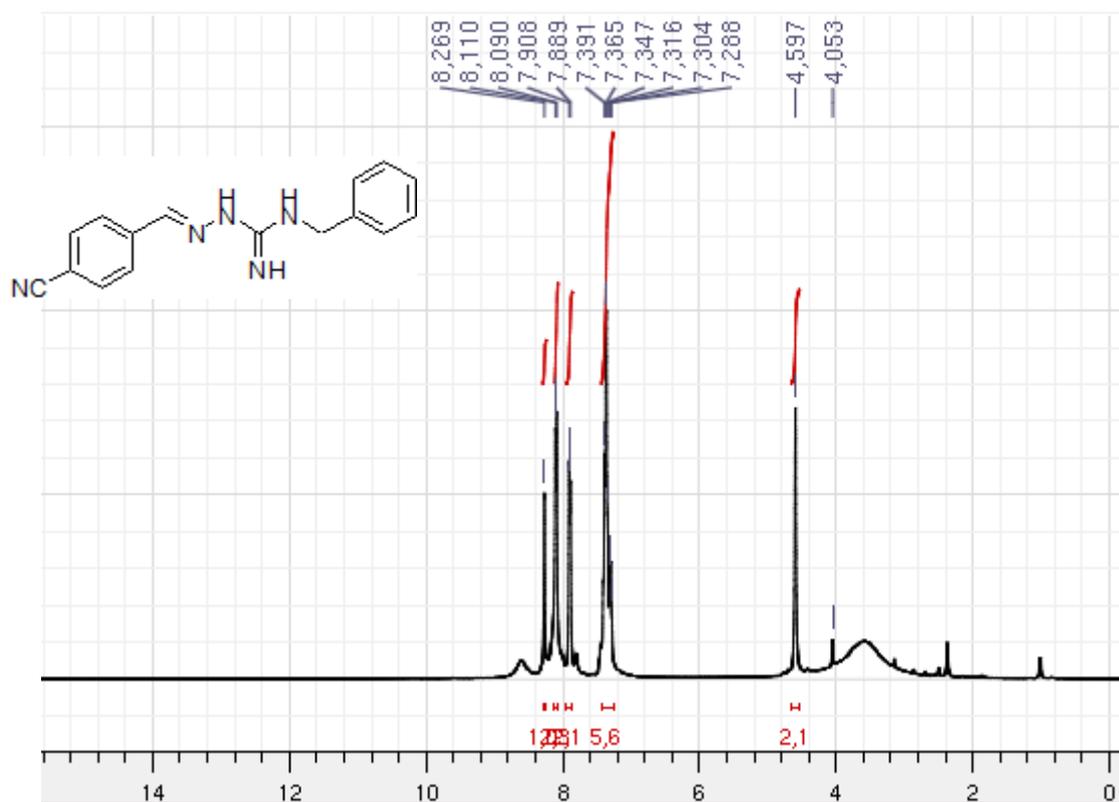


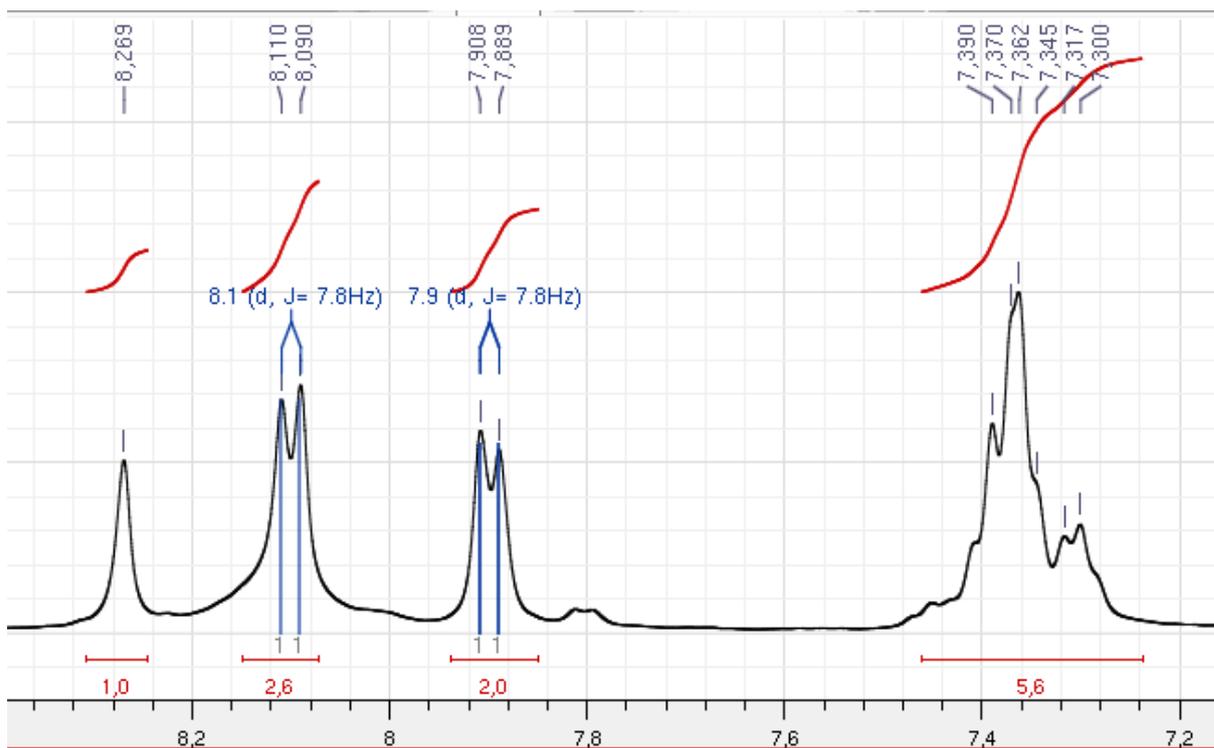
Espectro 18. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em  $\text{DMSO-d}_6$  do intermediário isotiossemicarbazona



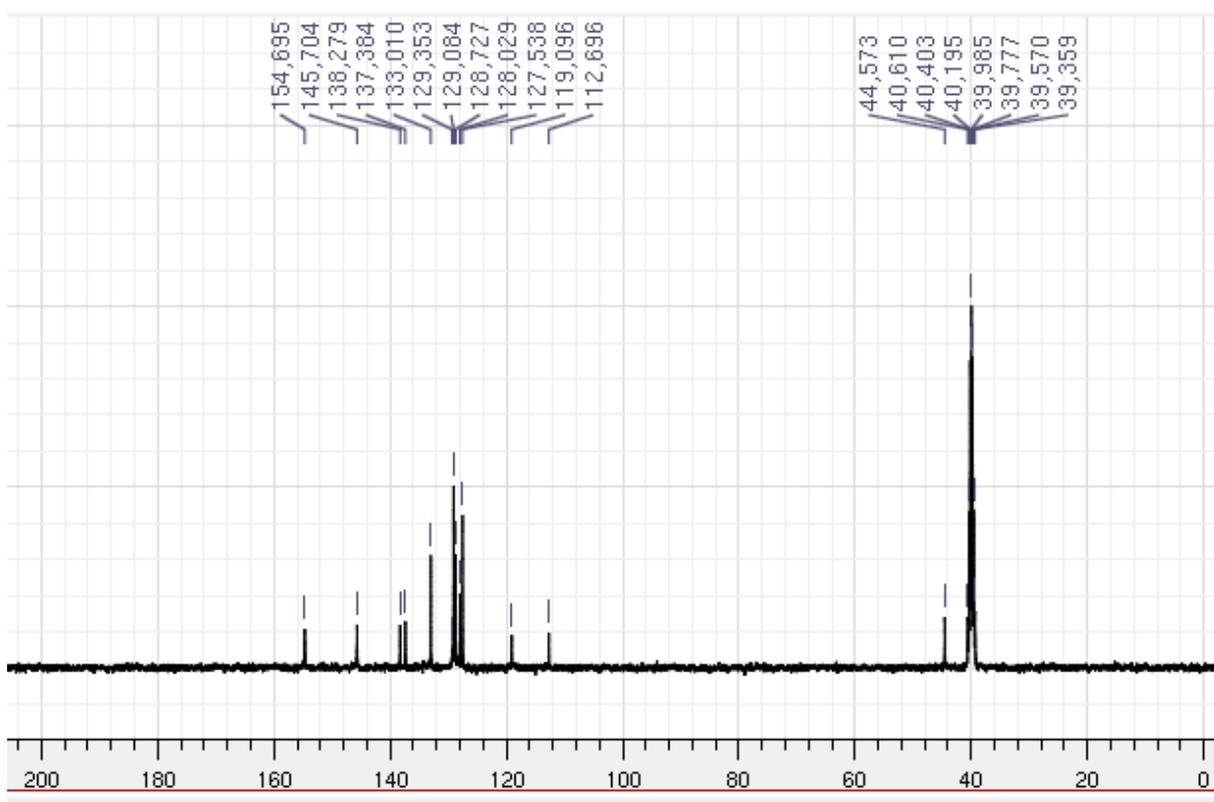
Espectro 19. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM021**



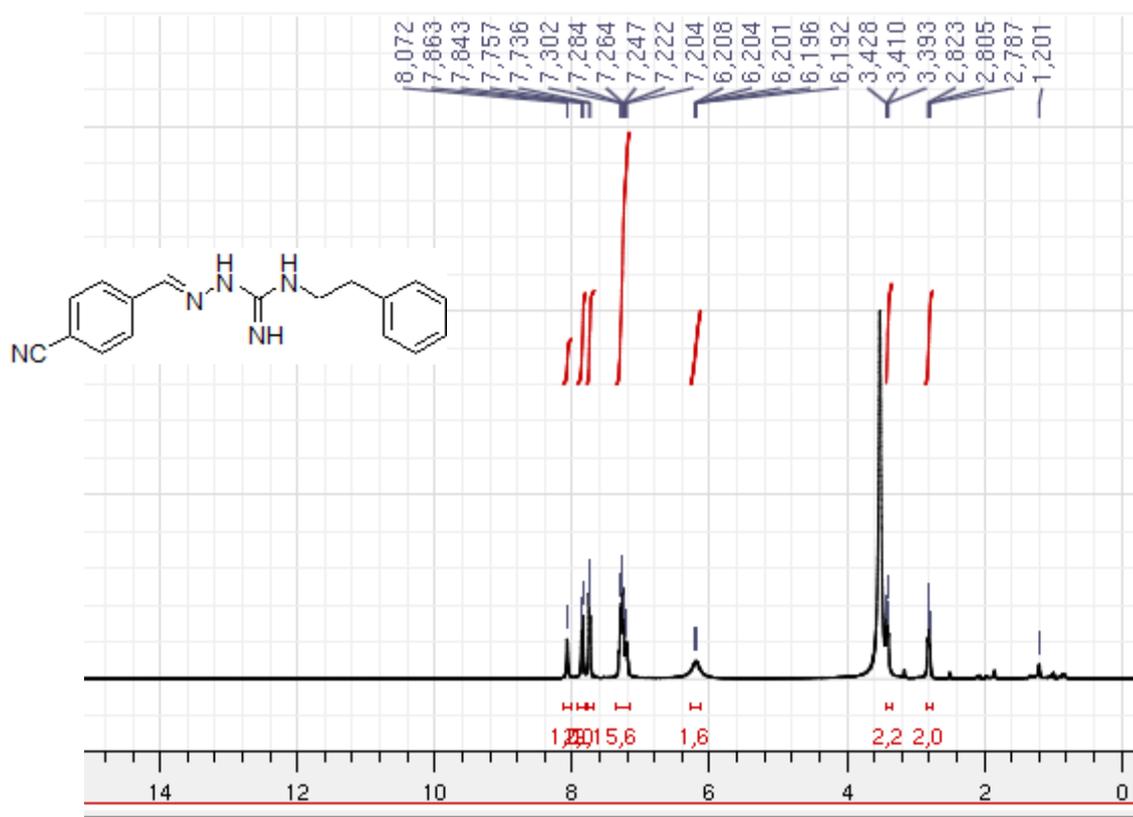
Espectro 20. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do composto **LQM021**Espectro 21. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM021**Espectro 22. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM022**



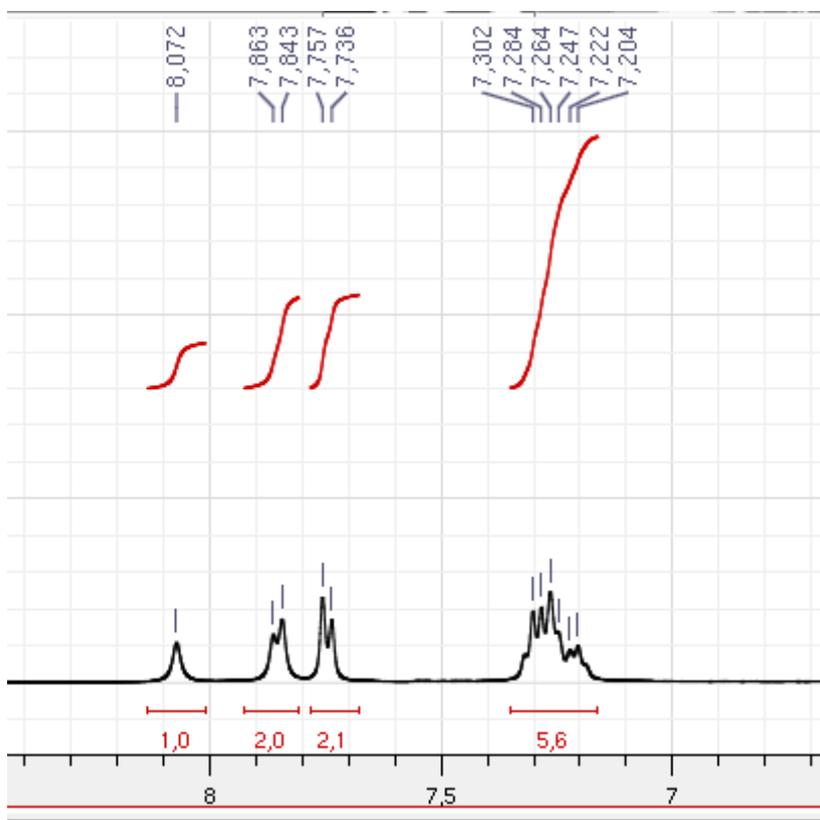
Espectro 23. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $\text{d}_6$  do composto **LQM022**



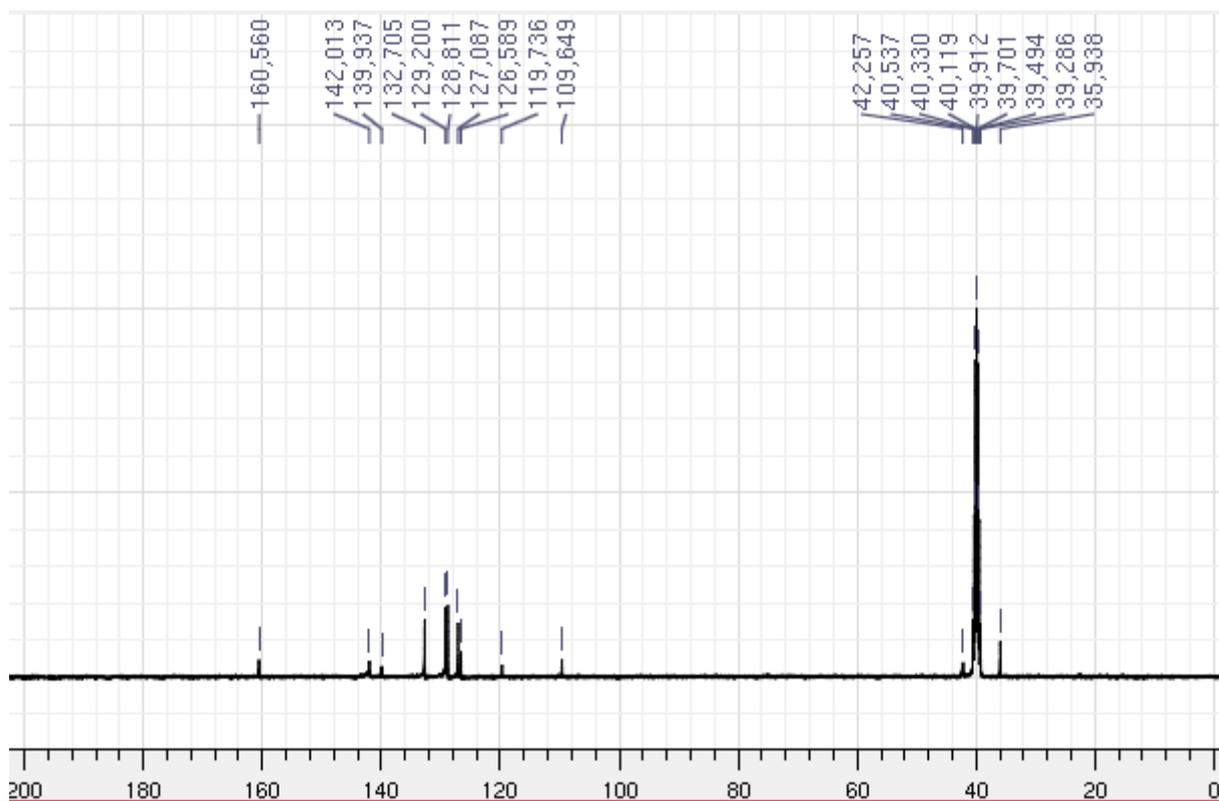
Espectro 24. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $\text{d}_6$  do composto **LQM022**



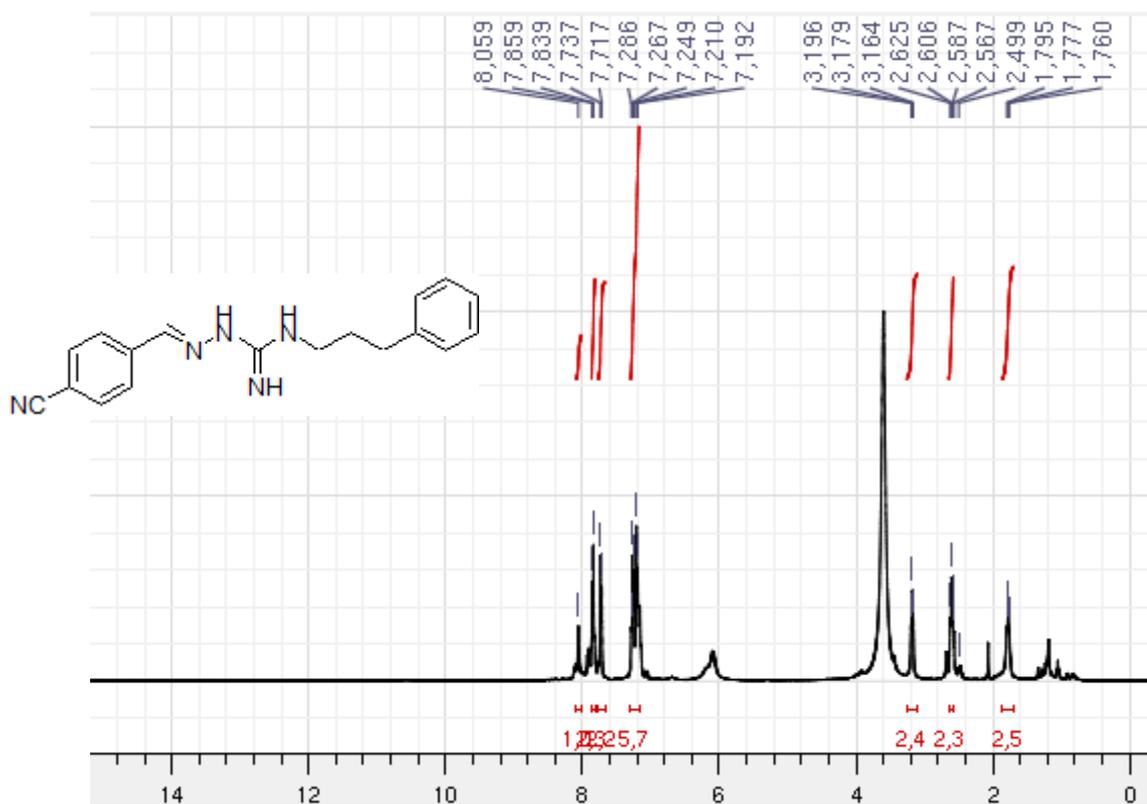
Espectro 25. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM023**



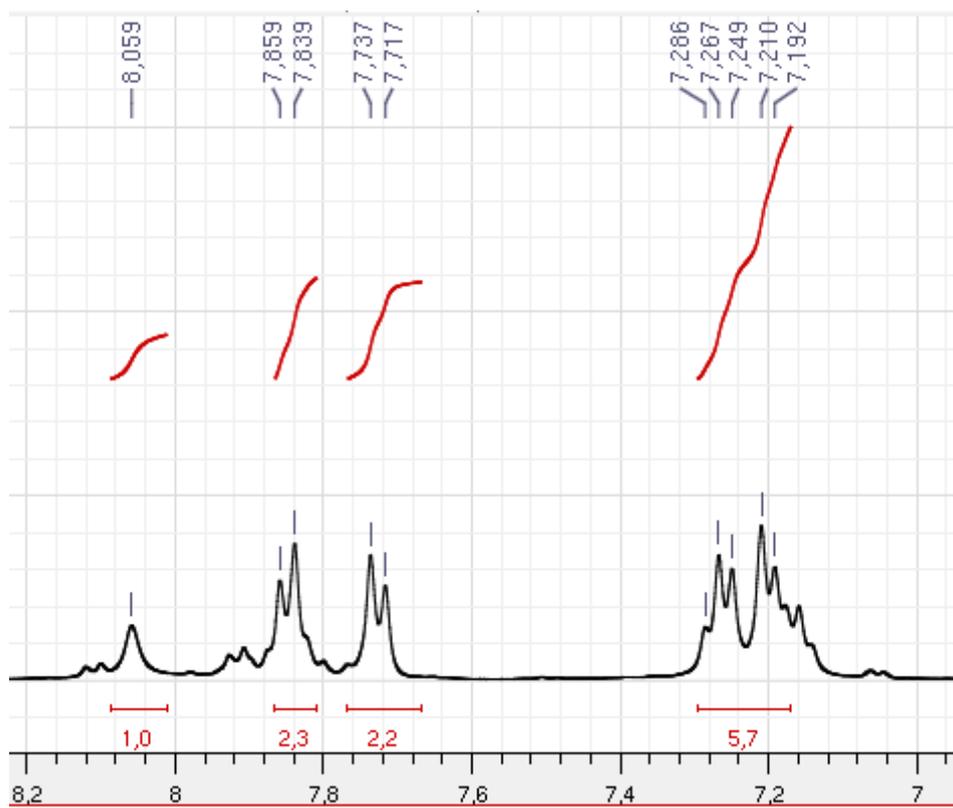
Espectro 26. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) ampliado em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM023**



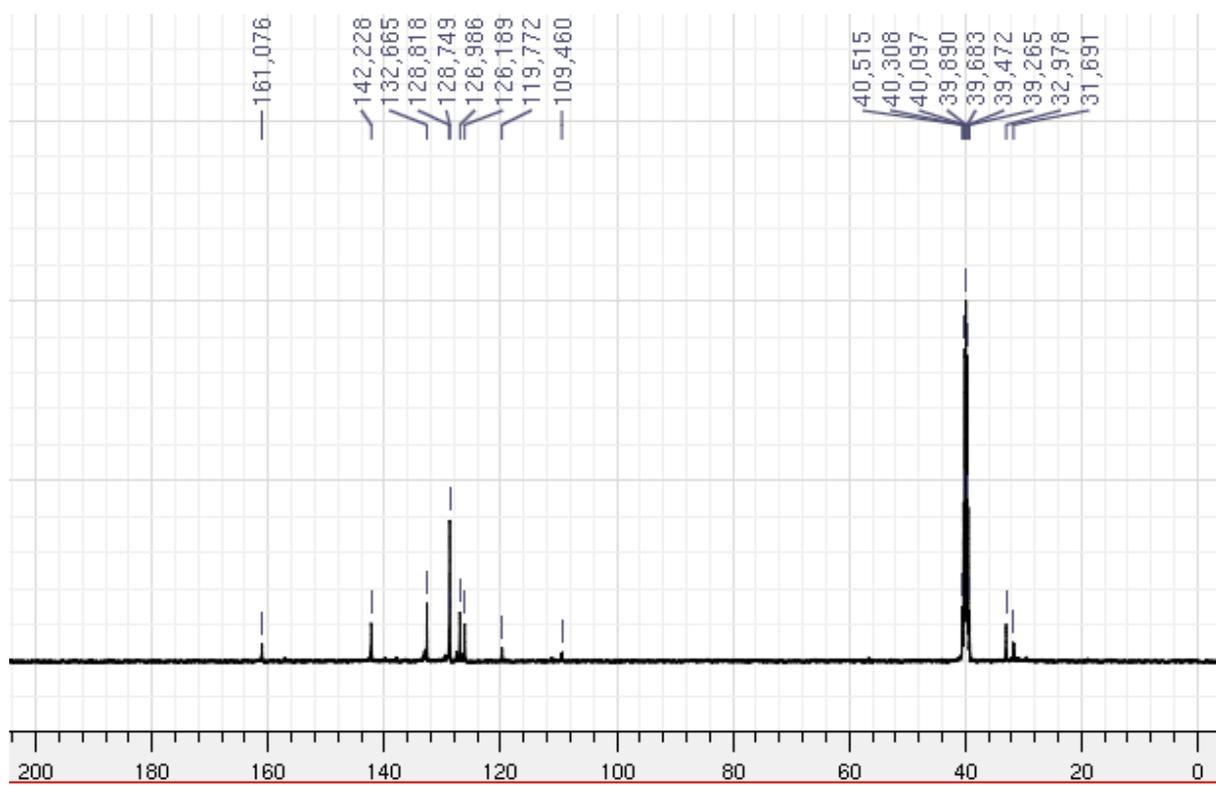
Espectro 27. RMN <sup>13</sup>C (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM023**



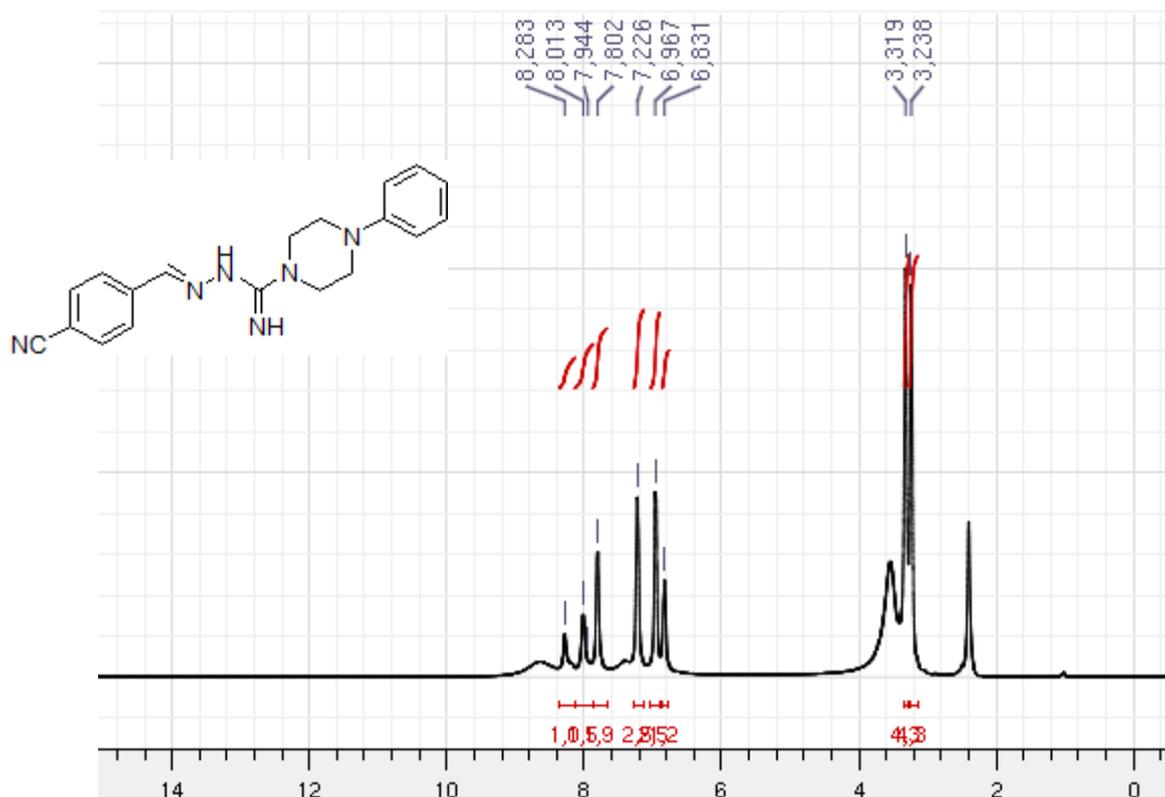
Espectro 28. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM024**



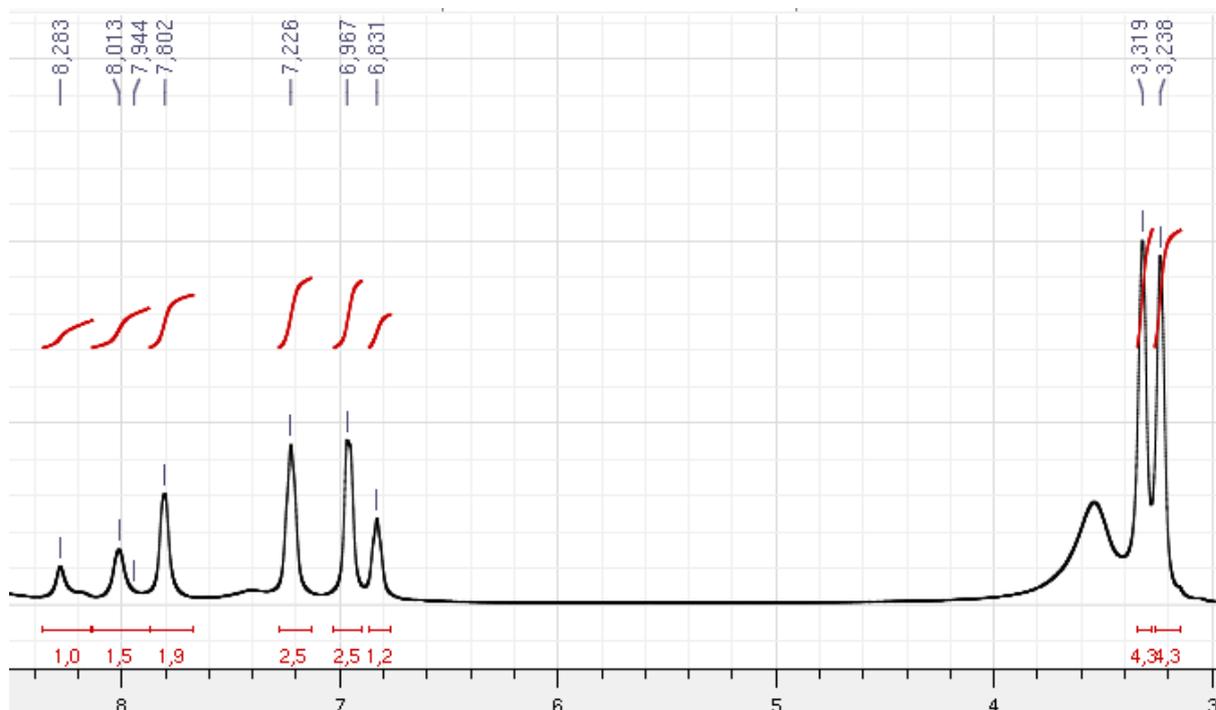
Espectro 29. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) ampliado em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM024**



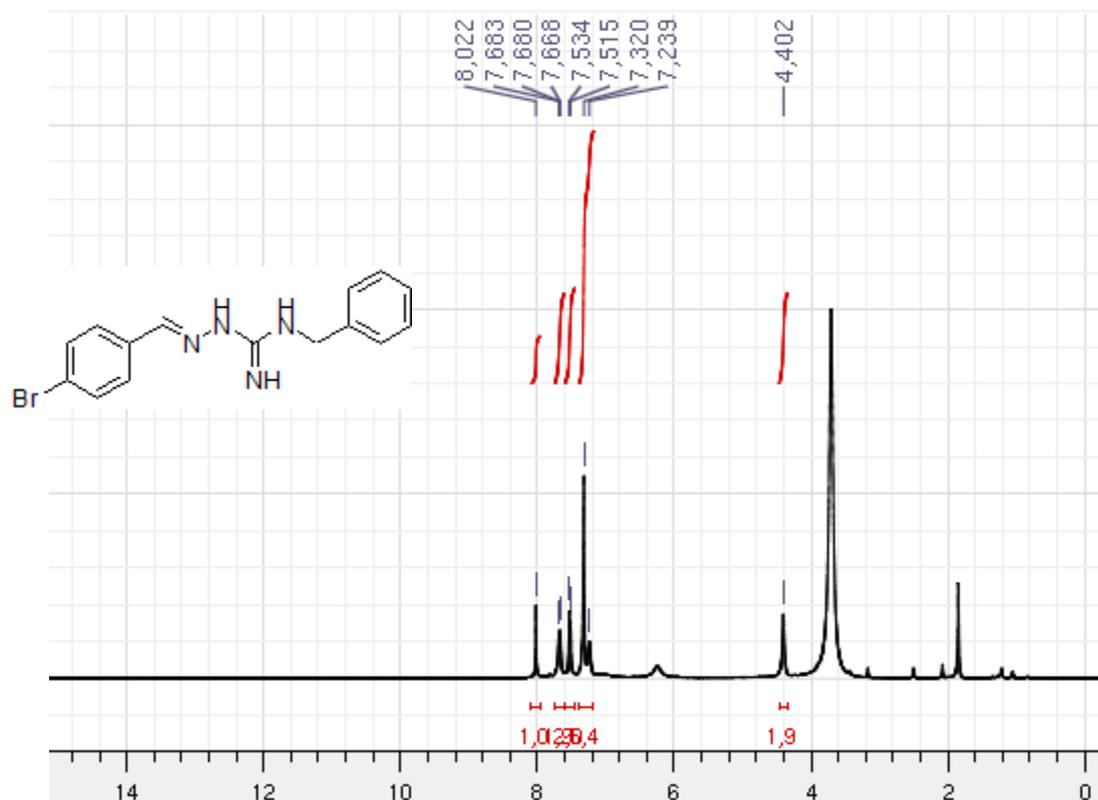
Espectro 30. RMN <sup>13</sup>C (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM024**



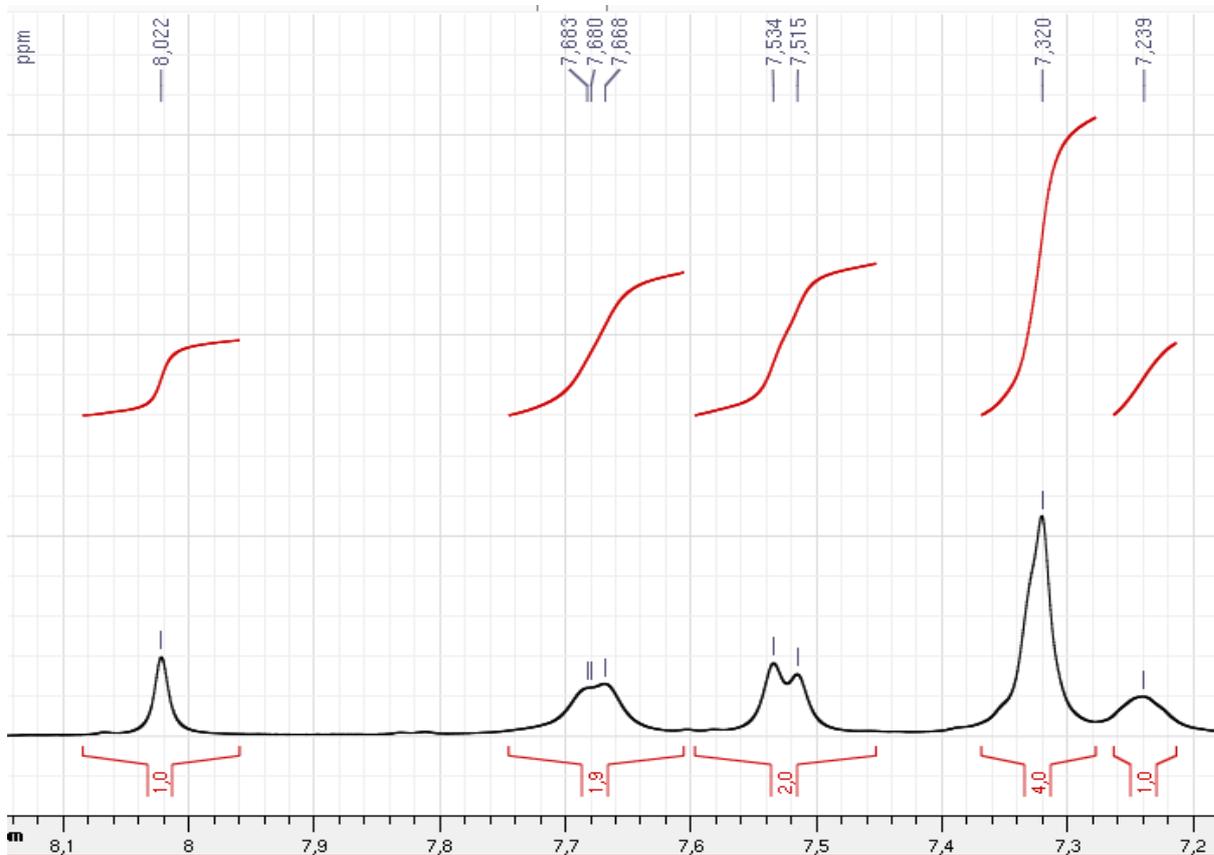
Espectro 31. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM025**



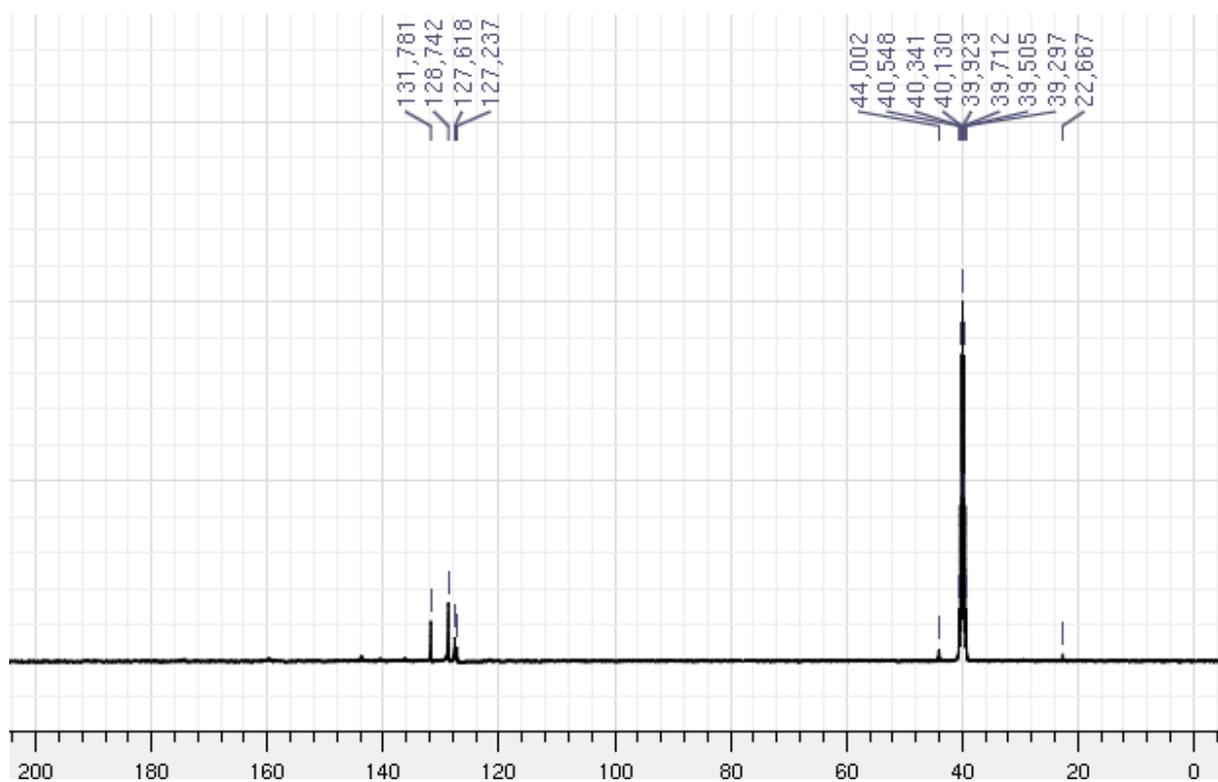
Espectro 32. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) ampliado em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM025**



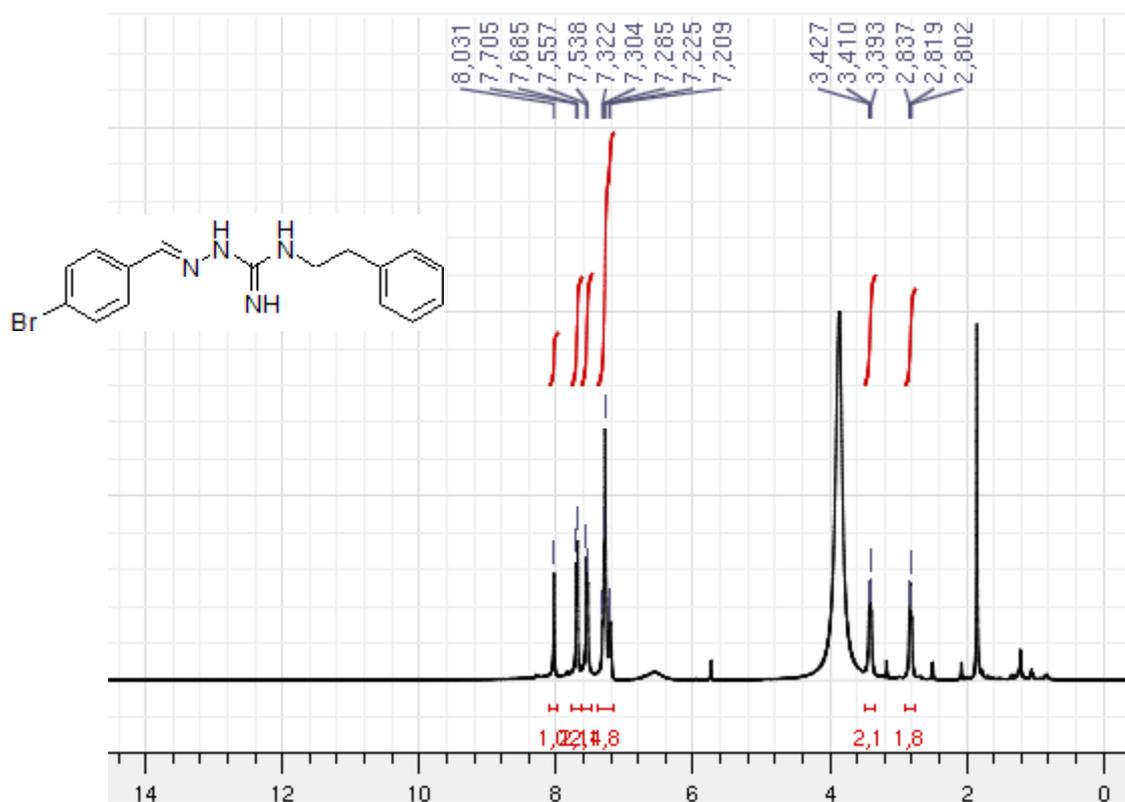
Espectro 33. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em  $\text{DMSO-d}_6$  do composto **LQM030**



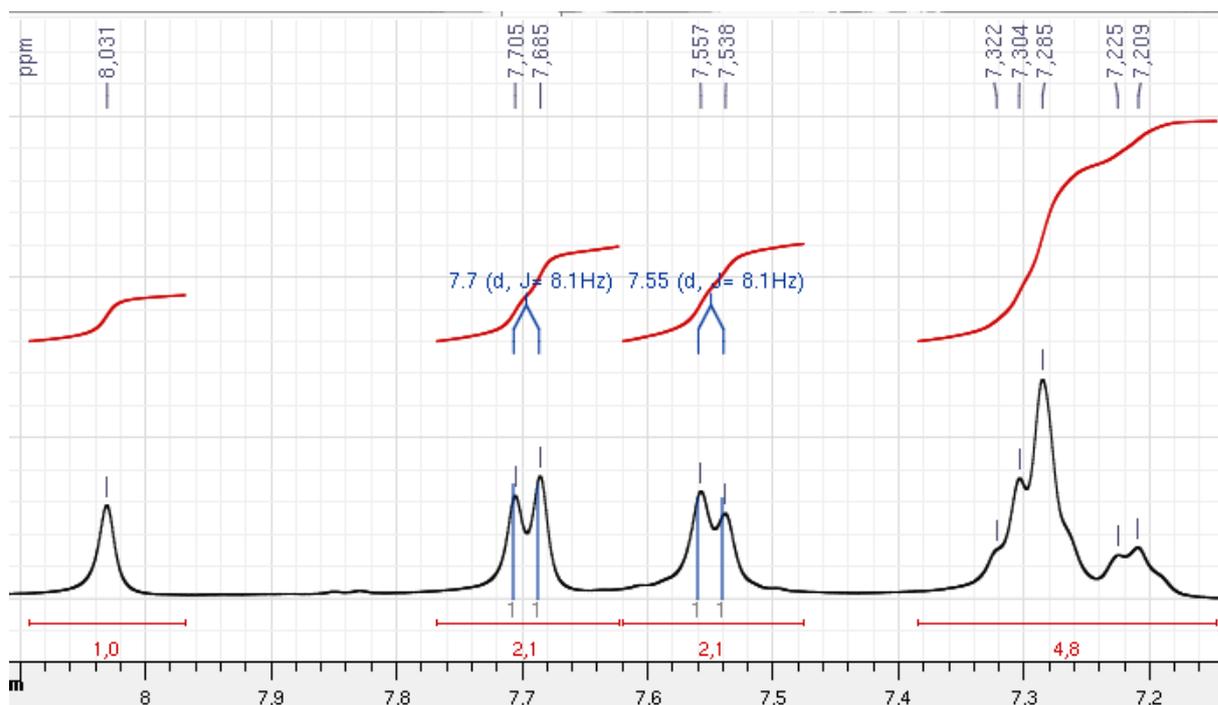
Espectro 34. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em  $\text{DMSO-d}_6$  do composto **LQM030**



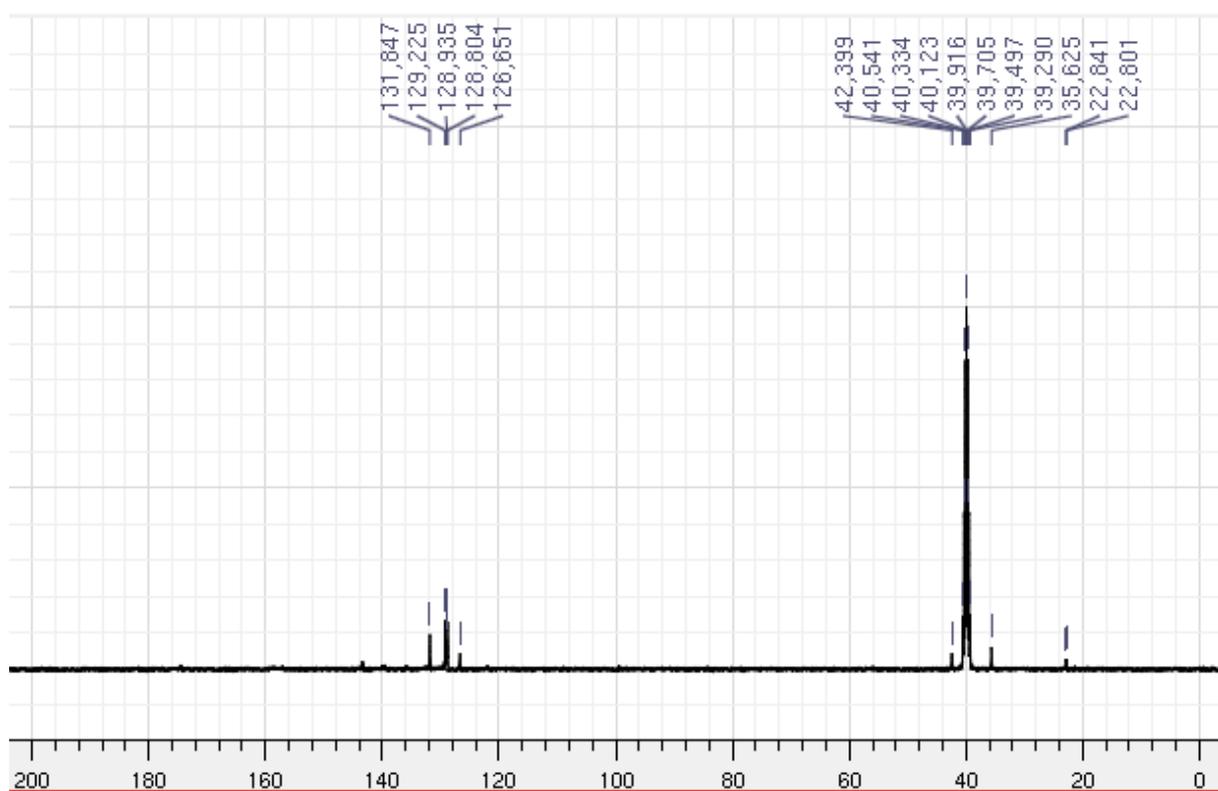
Espectro 35. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM030**



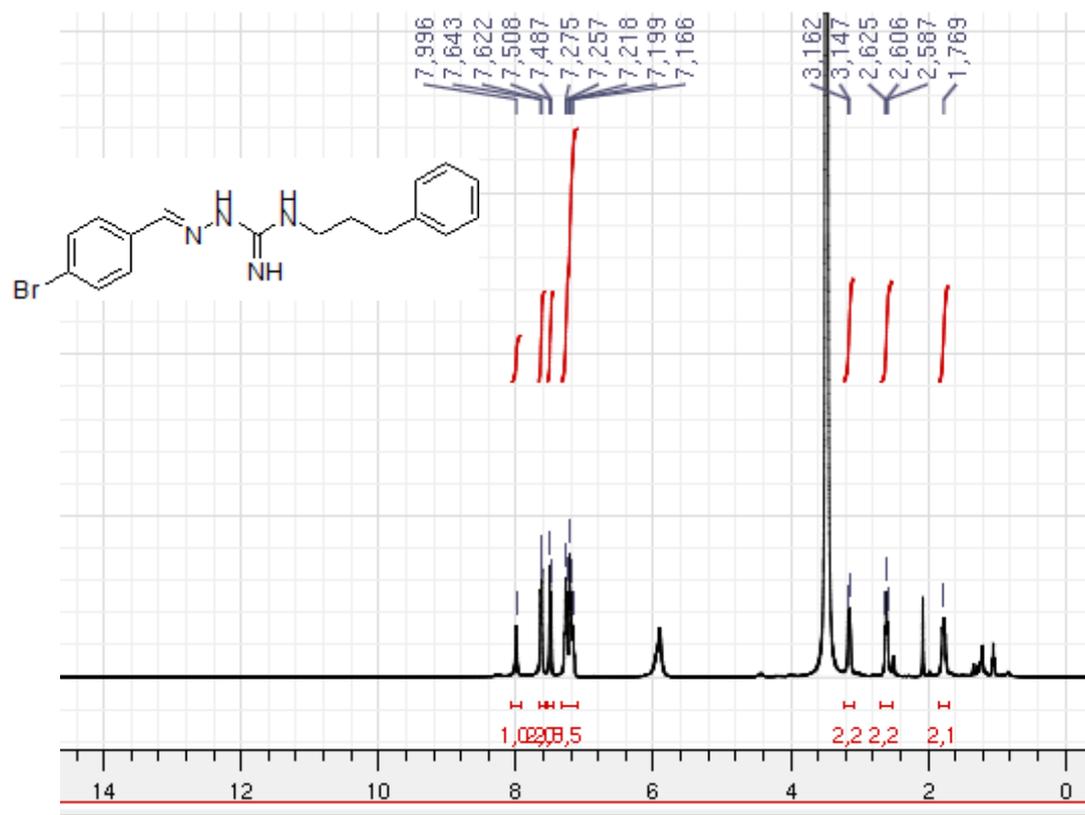
Espectro 36. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM031**



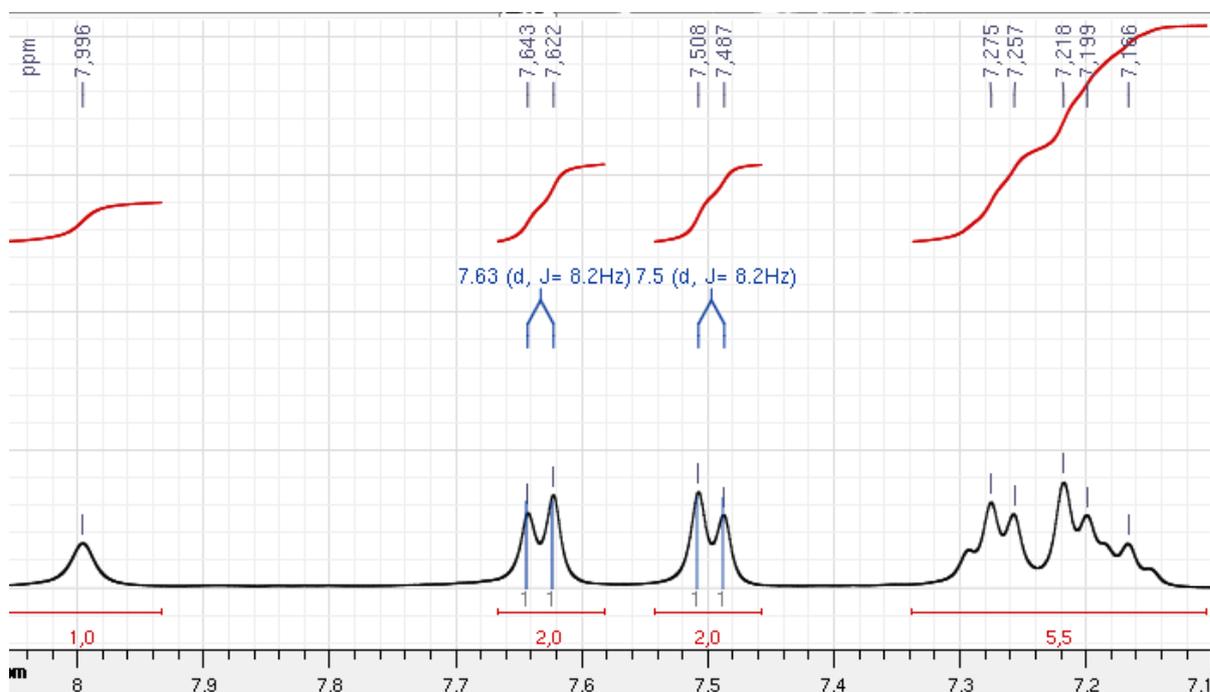
Espectro 37. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do composto **LQM031**



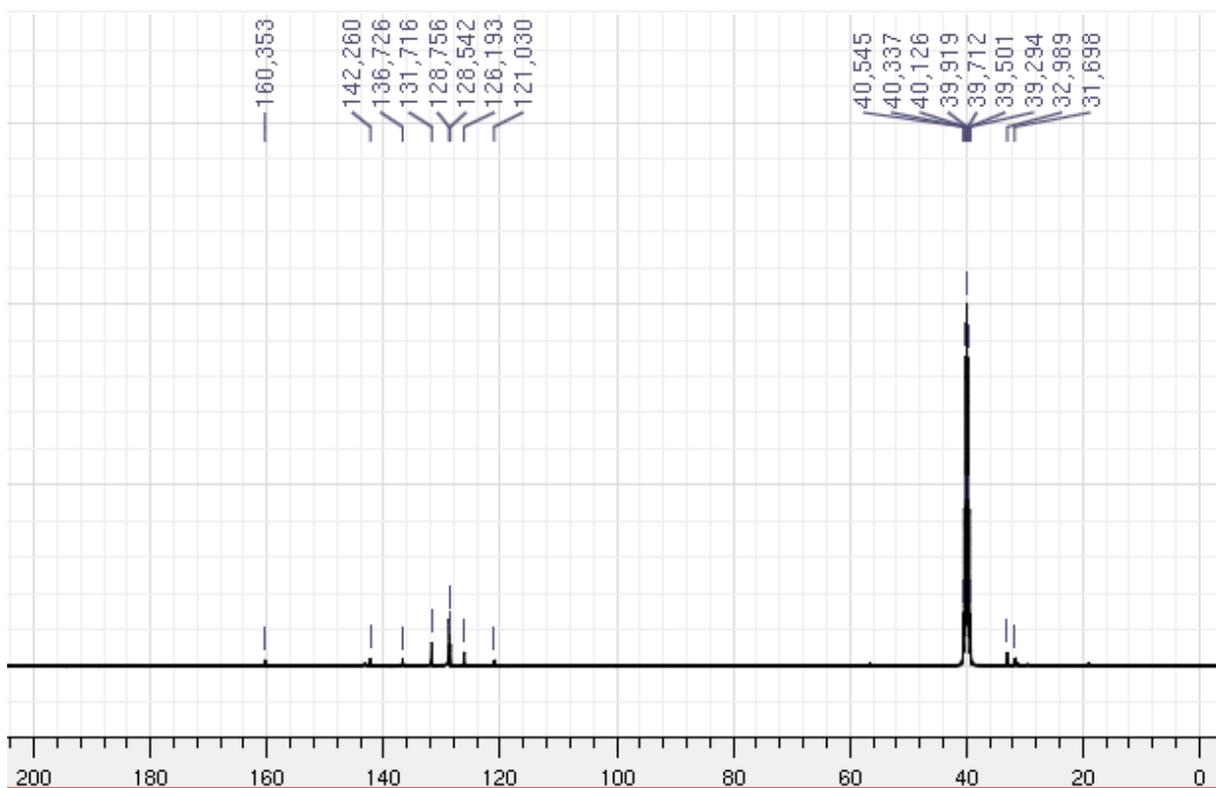
Espectro 38. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM031**



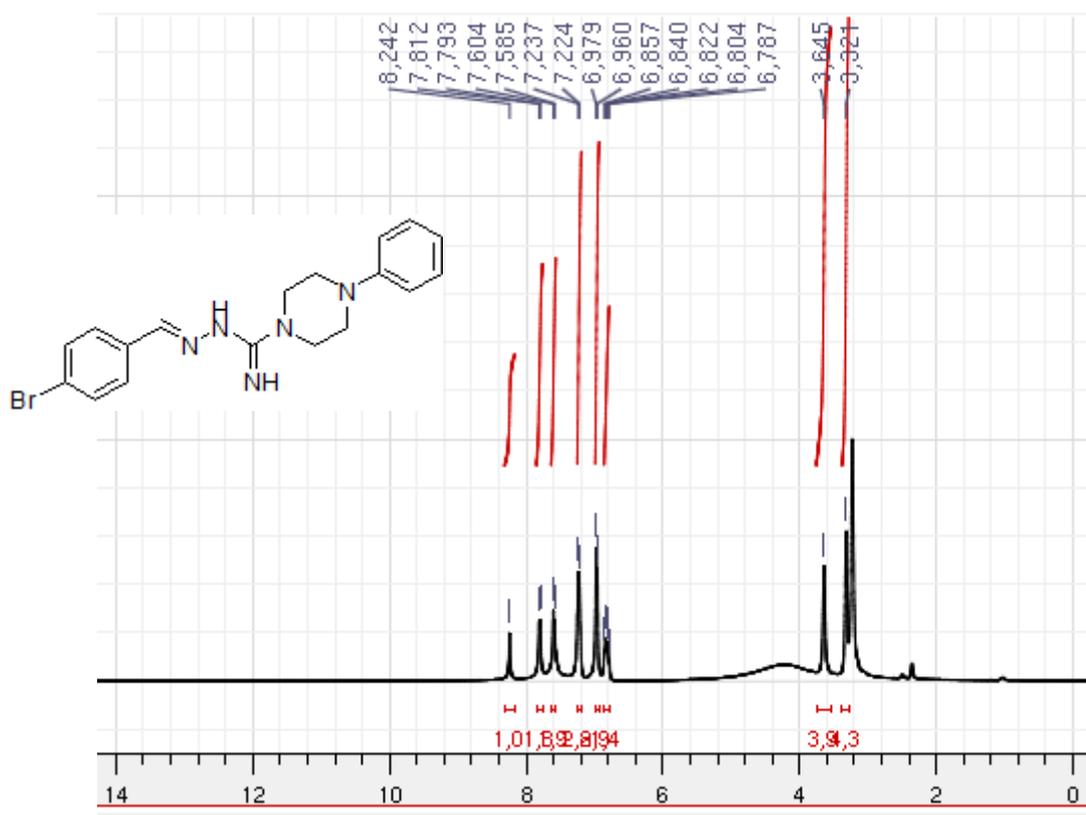
Espectro 39. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM032**



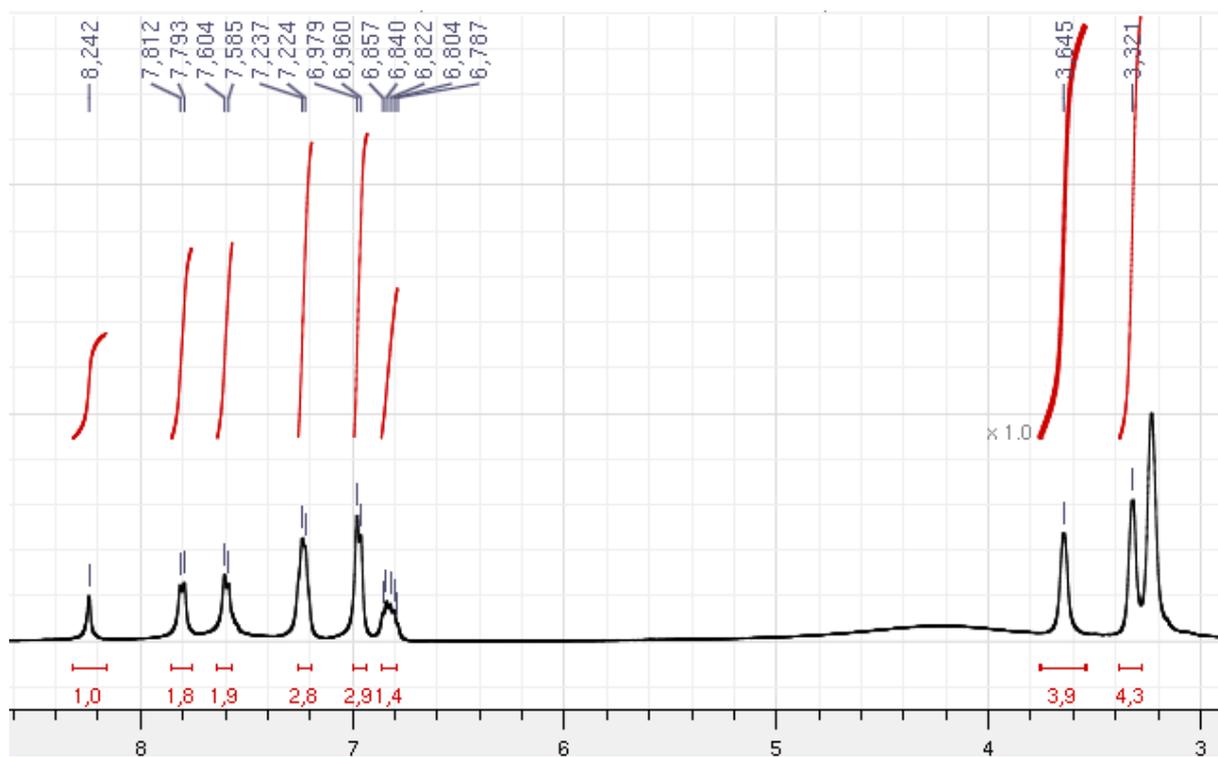
Espectro 40. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do composto **LQM032**



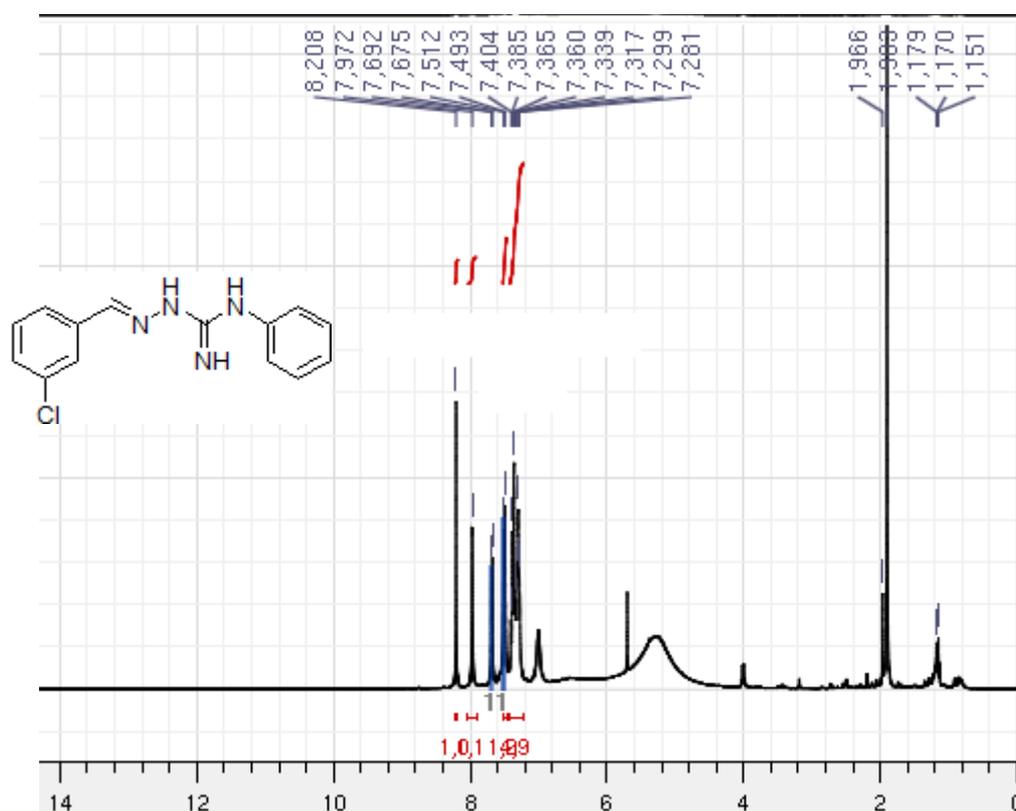
Espectro 41. RMN <sup>13</sup>C (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM032**



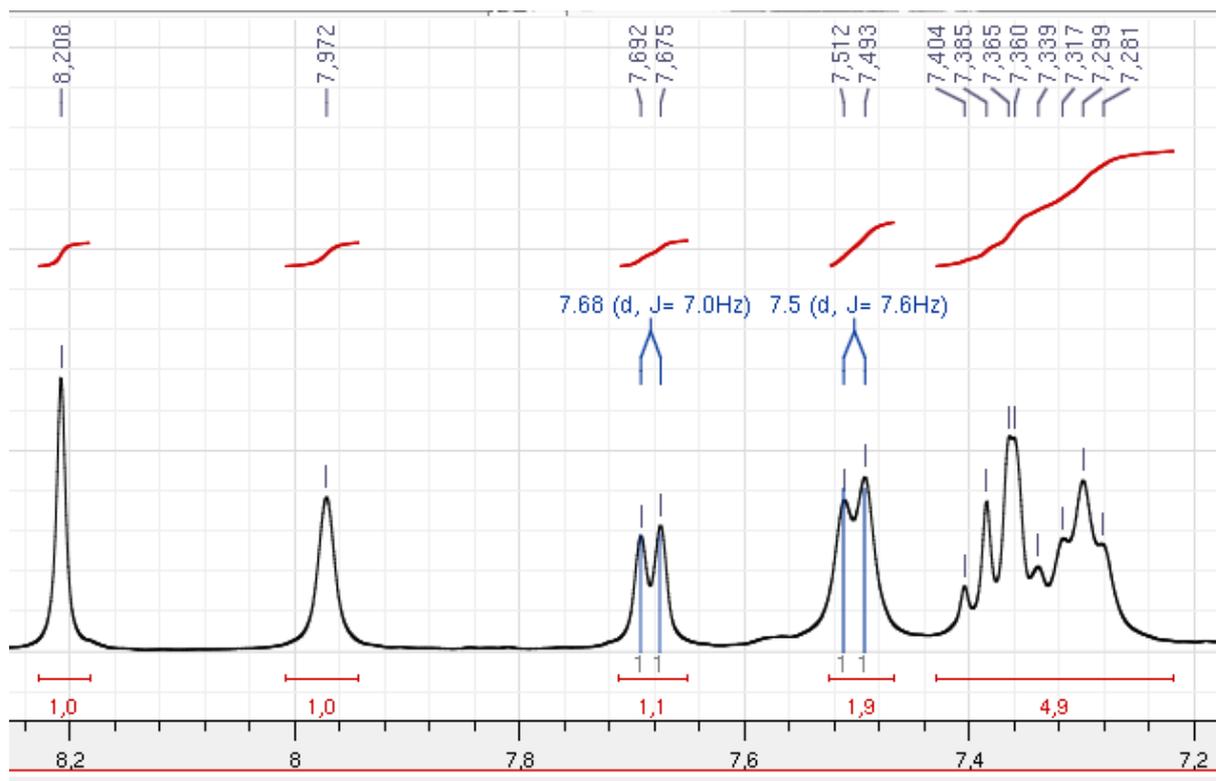
Espectro 42. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM033**



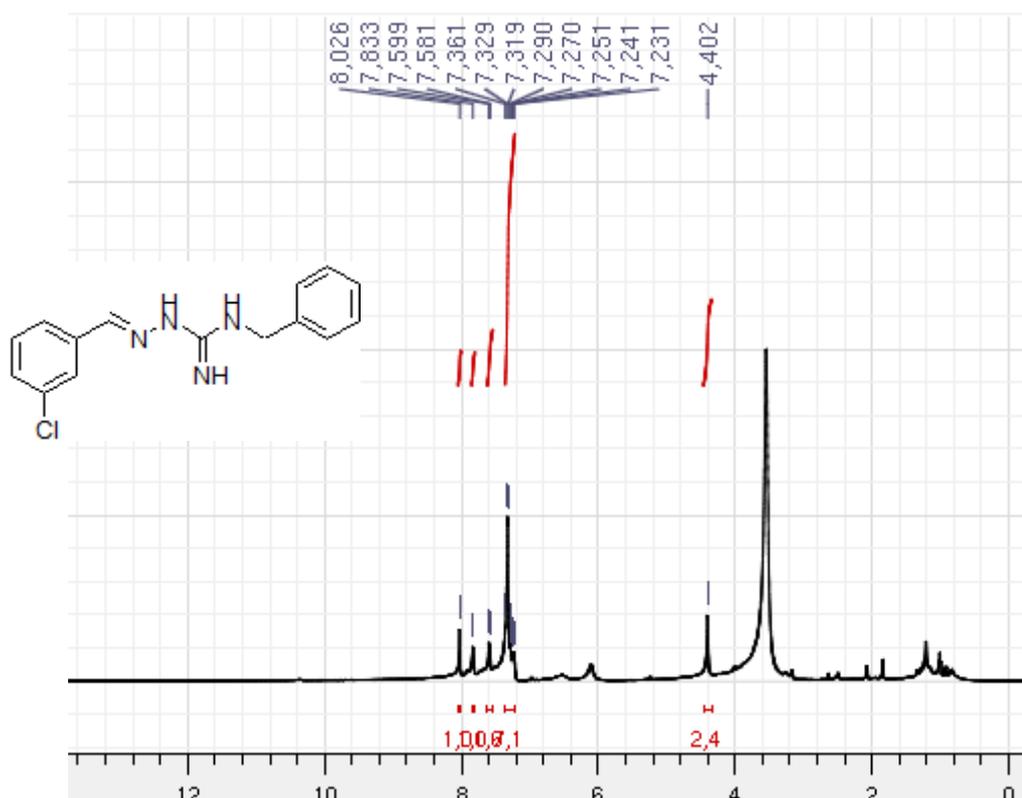
Espectro 43. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do composto **LQM033**



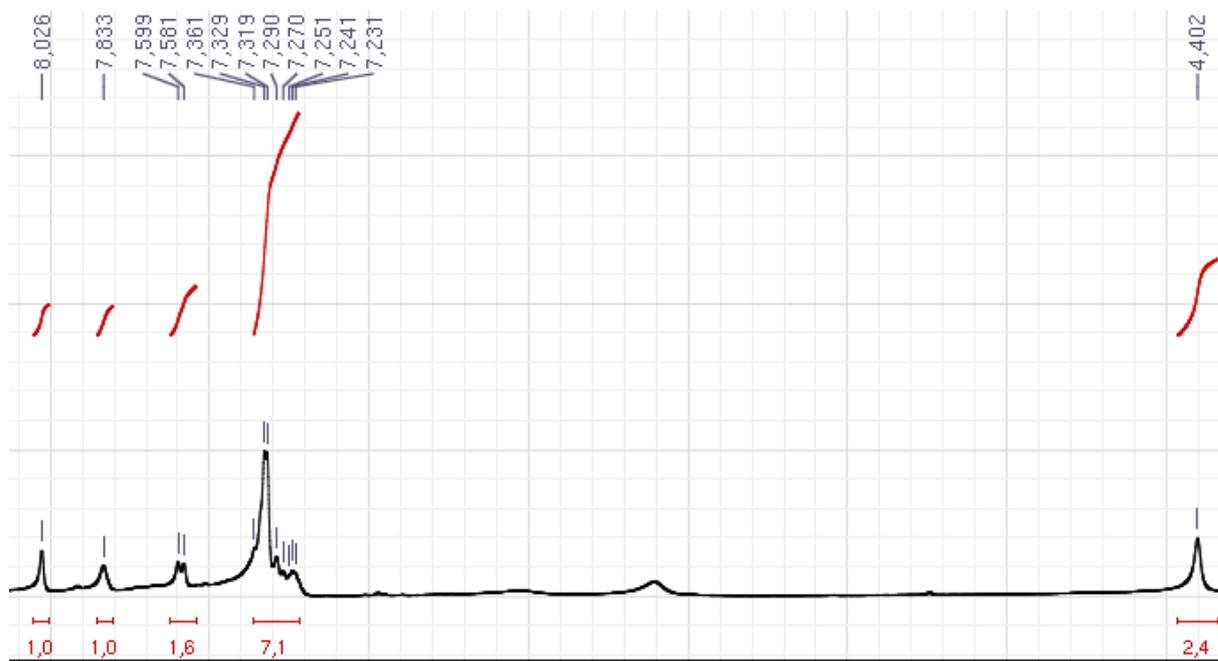
Espectro 44. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM026**



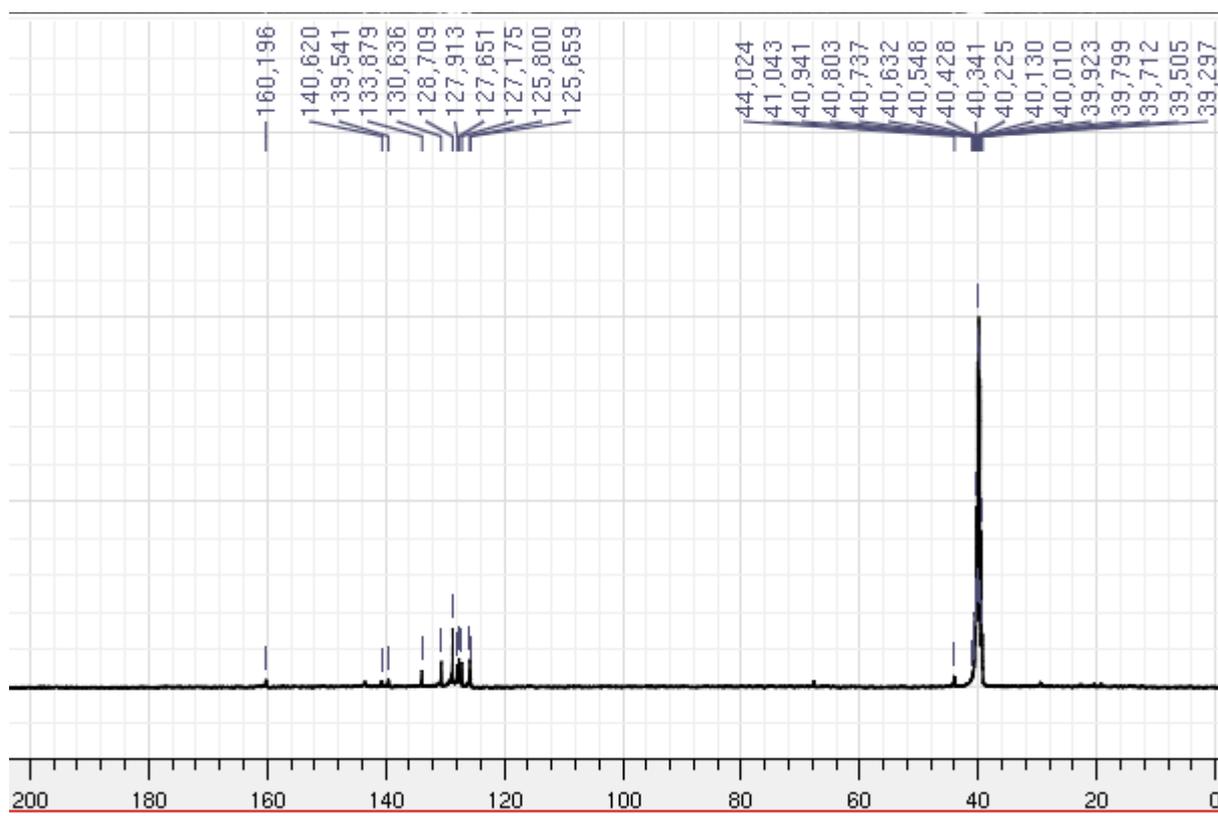
Espectro 45. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $\text{d}_6$  do composto **LQM026**



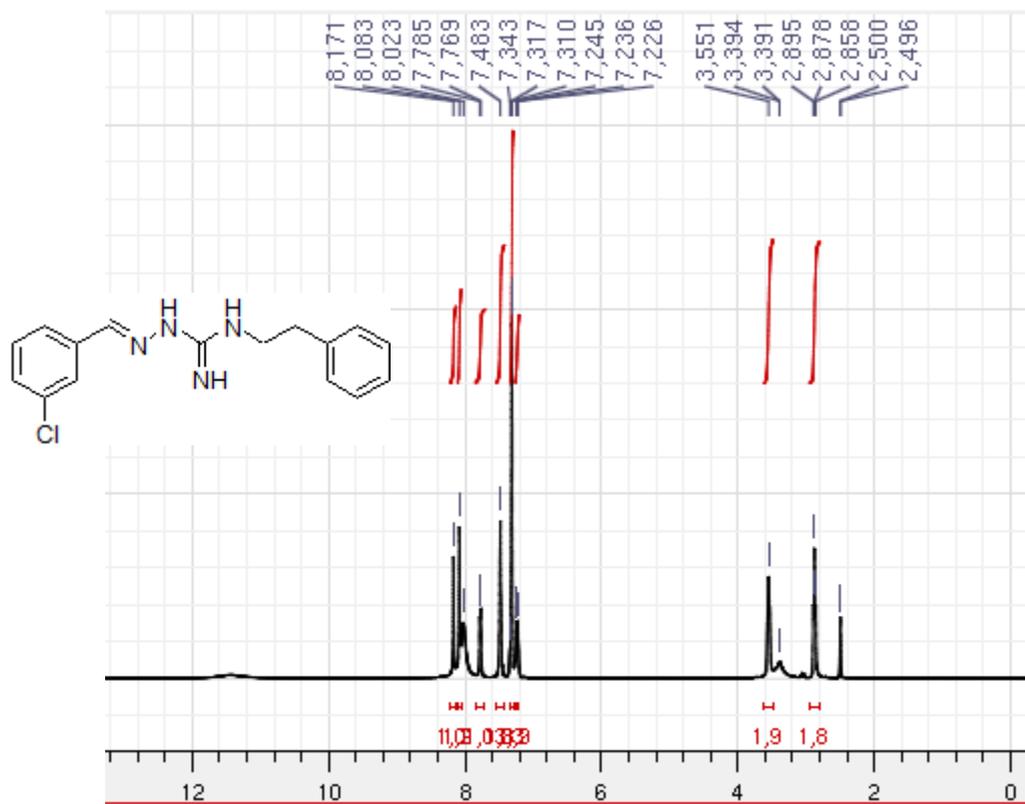
Espectro 46. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em DMSO- $\text{d}_6$  do composto **LQM027**



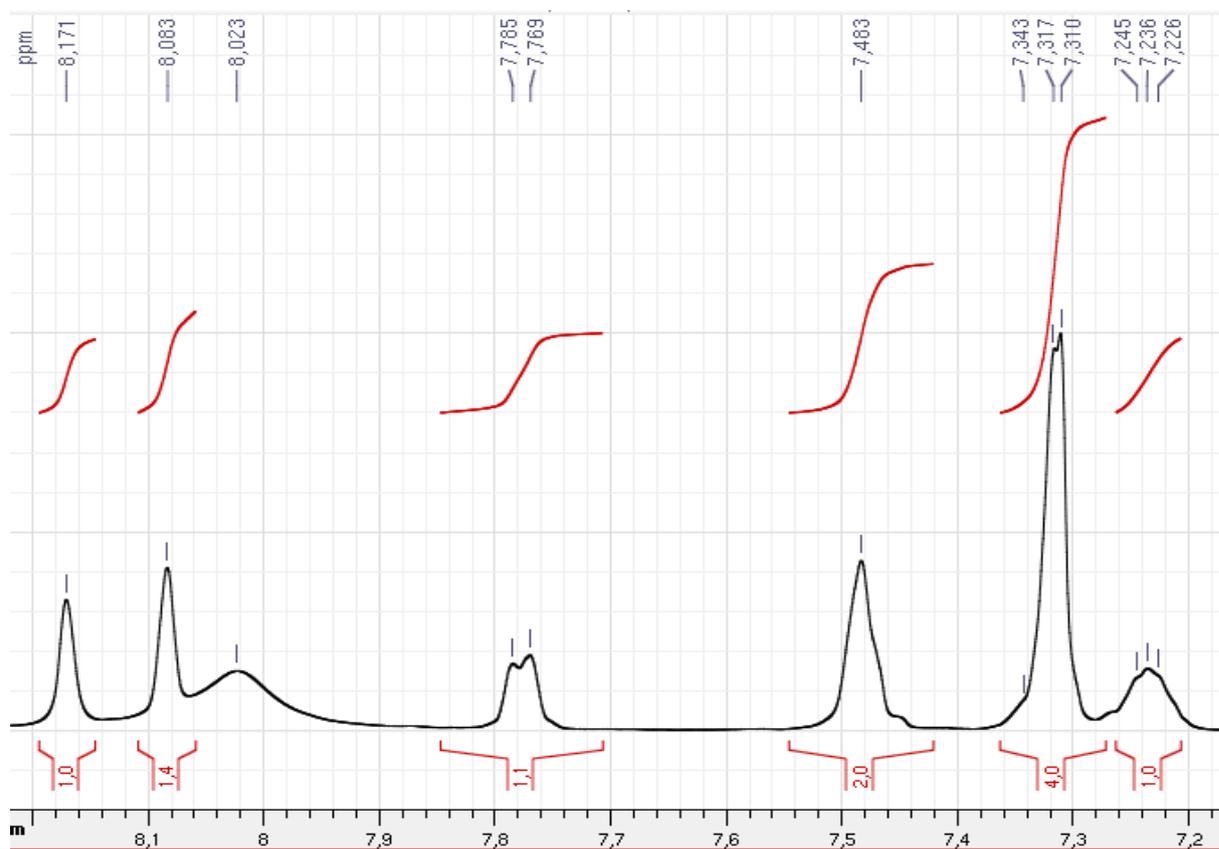
Espectro 47. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do composto **LQM027**



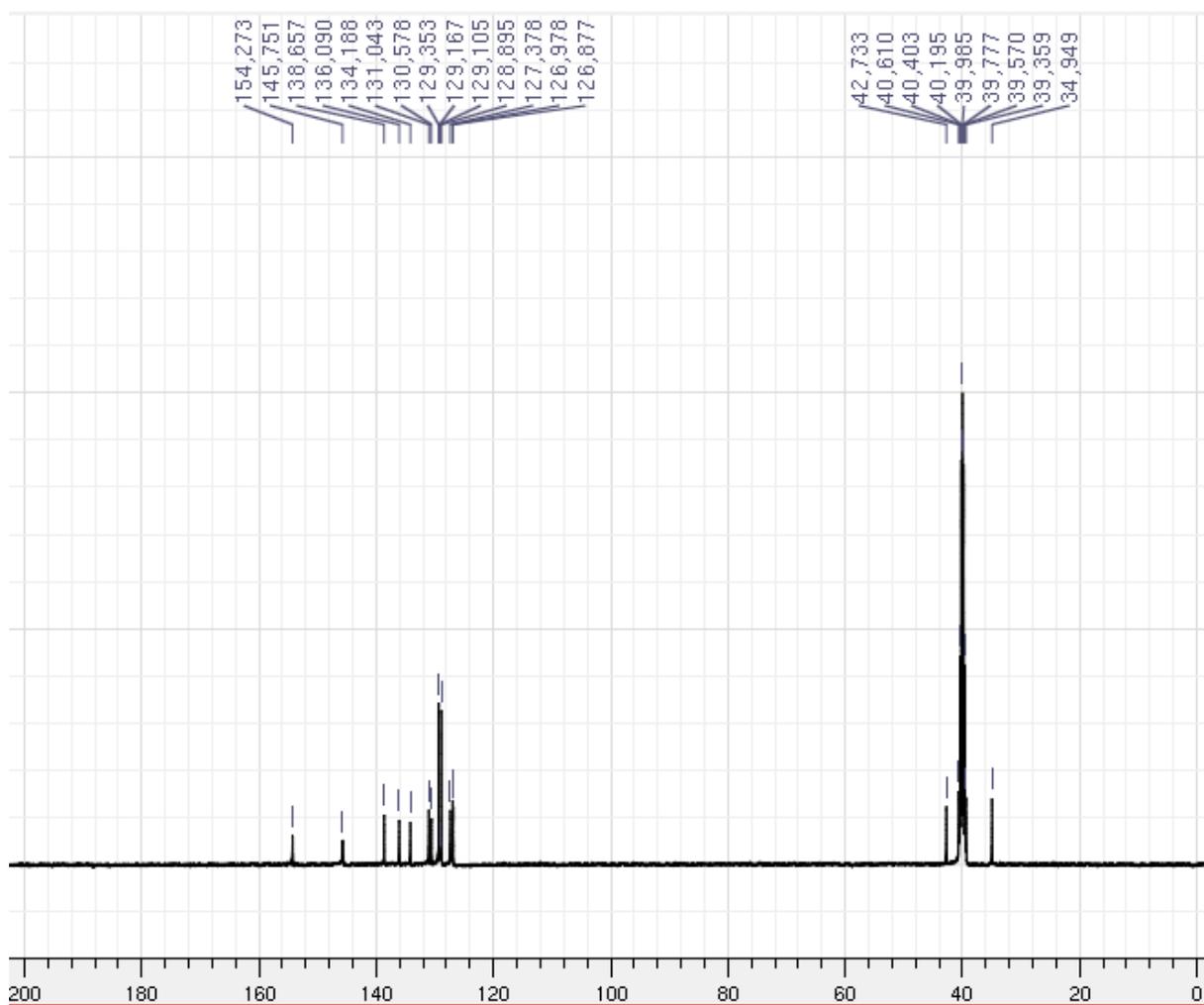
Espectro 48. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM027**



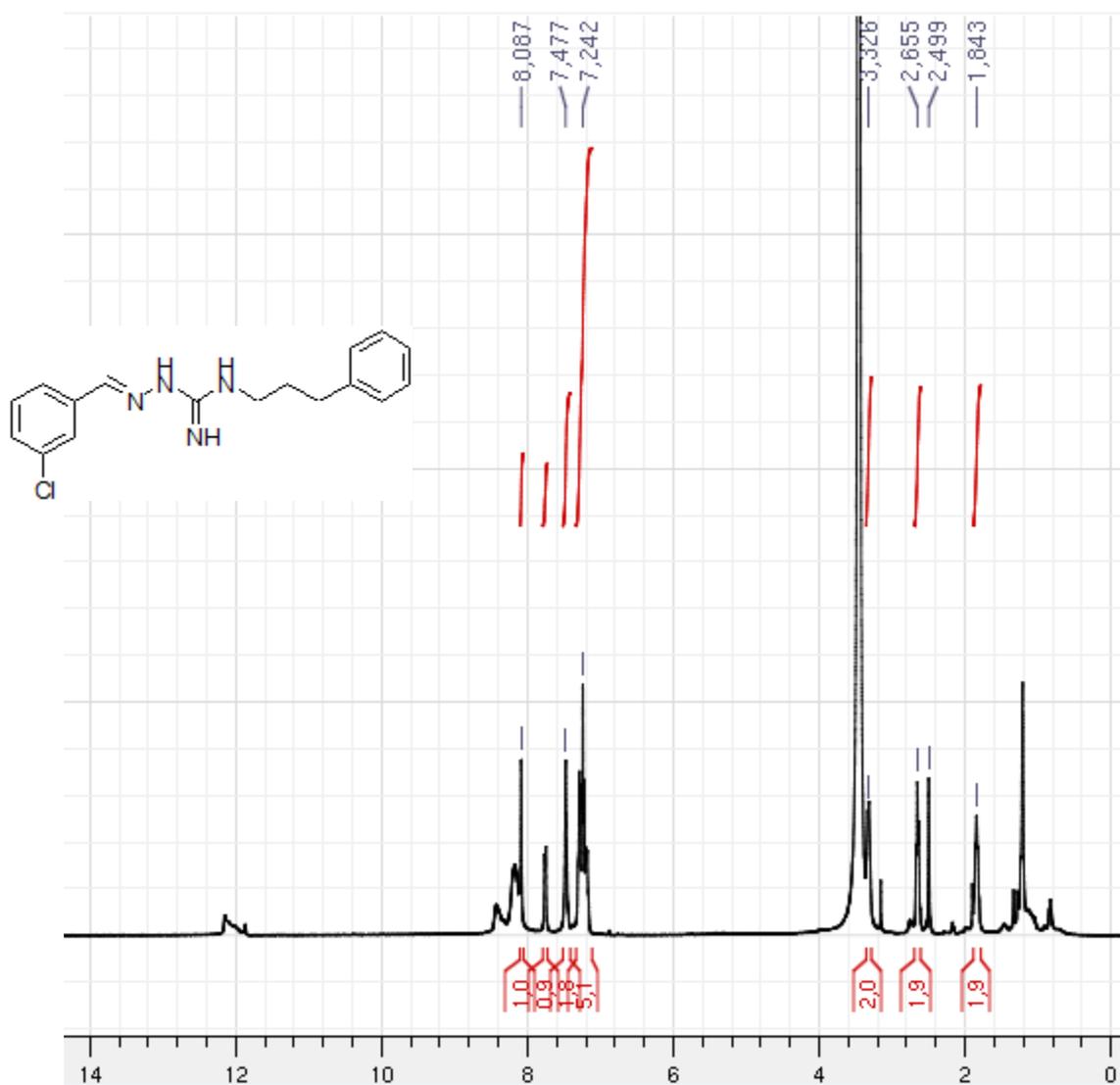
Espectro 49. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM028**



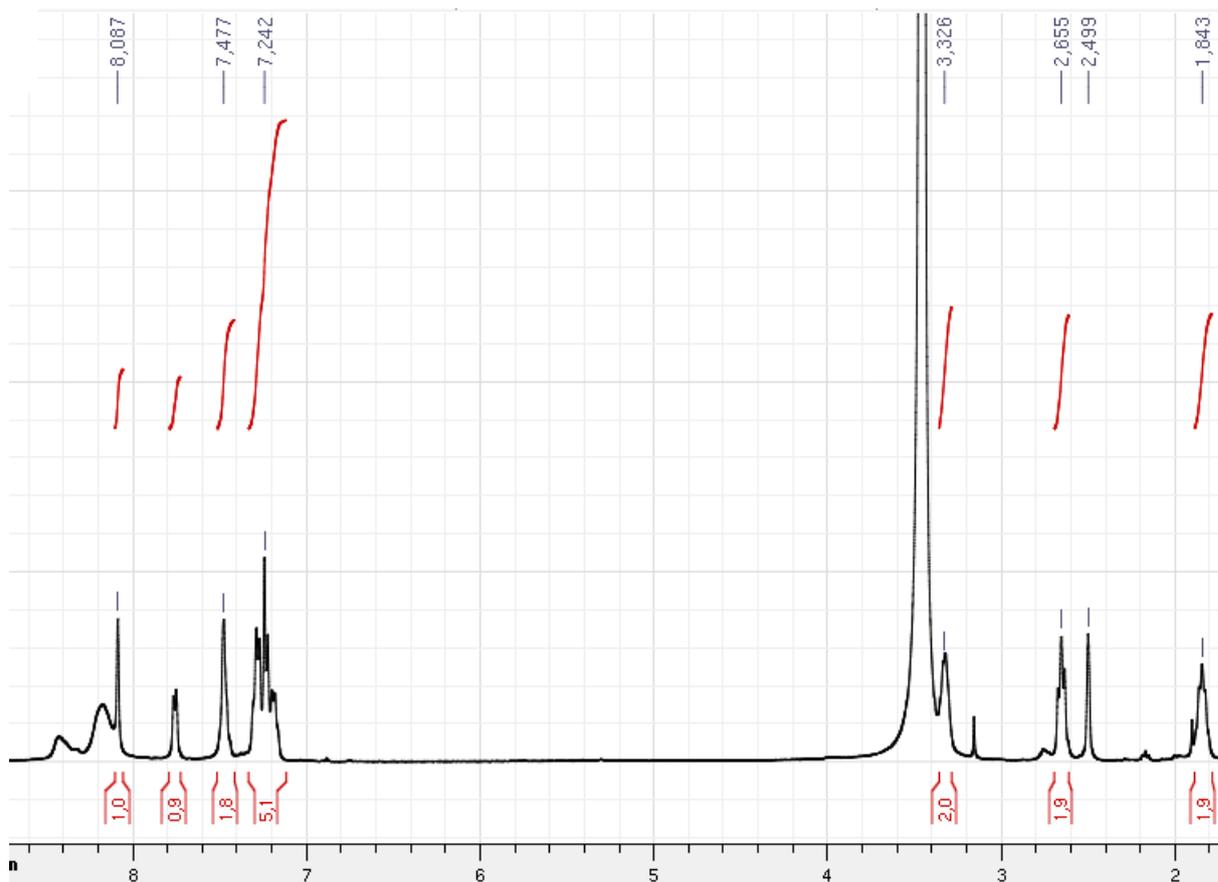
Espectro 50. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) ampliado em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM028**



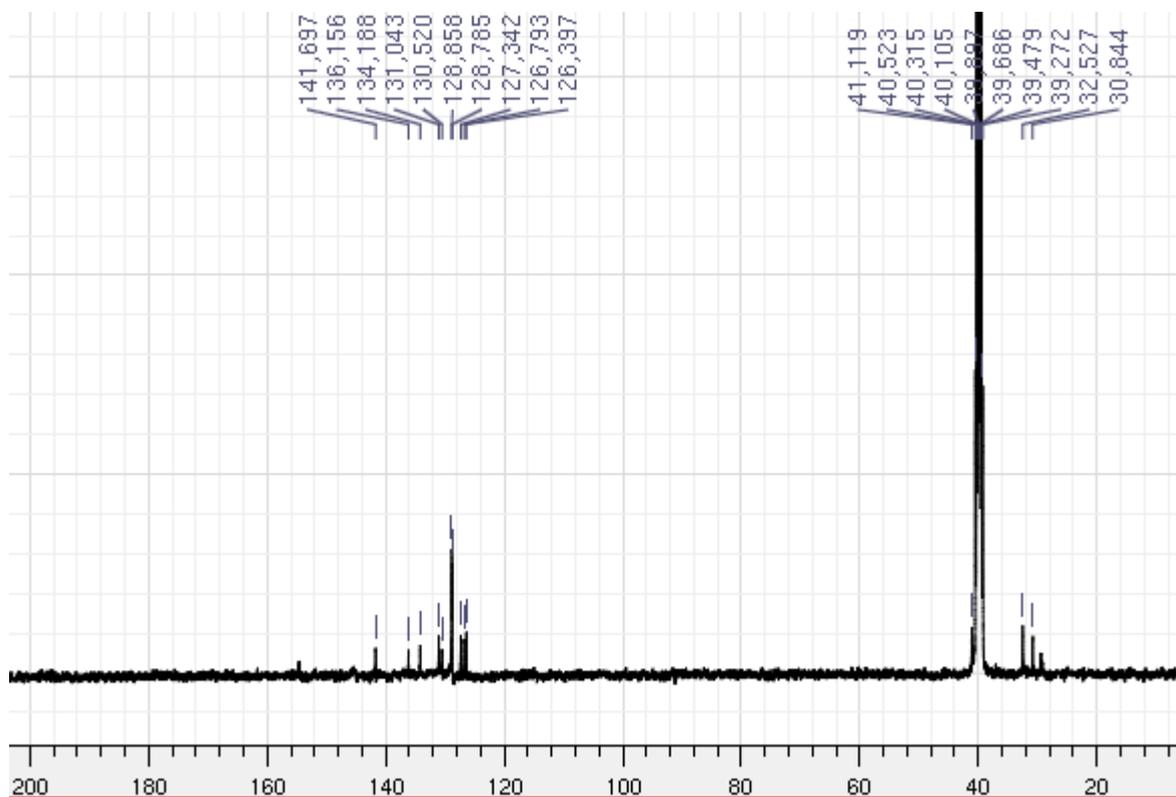
Espectro 51. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM028**



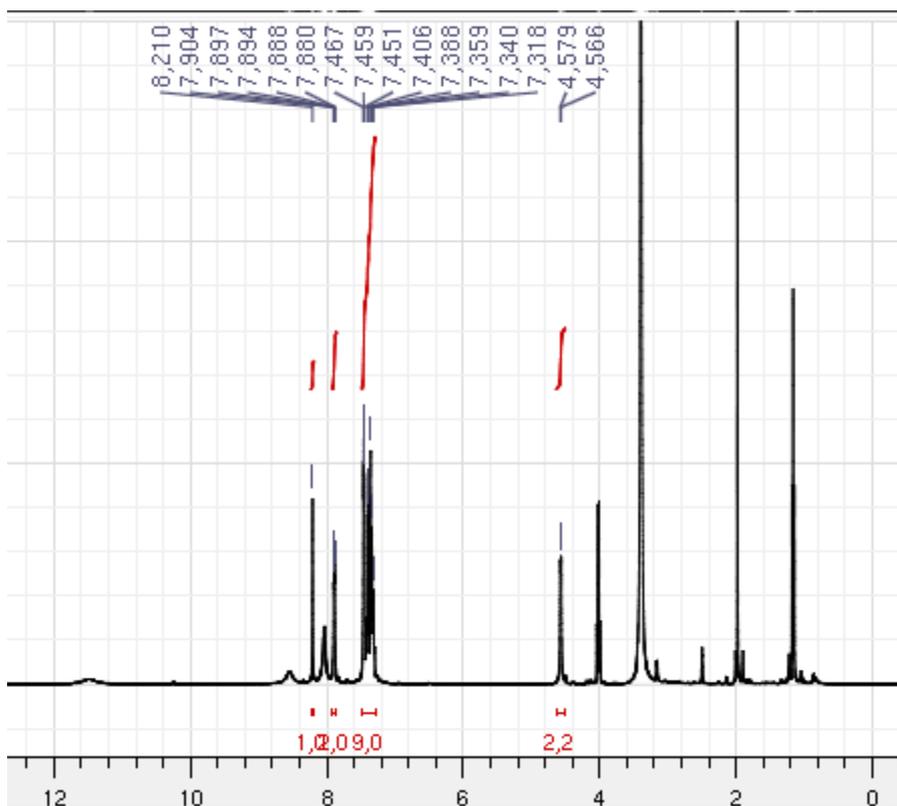
Espectro 52. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) em  $\text{DMSO-d}_6$  do composto **LQM029**



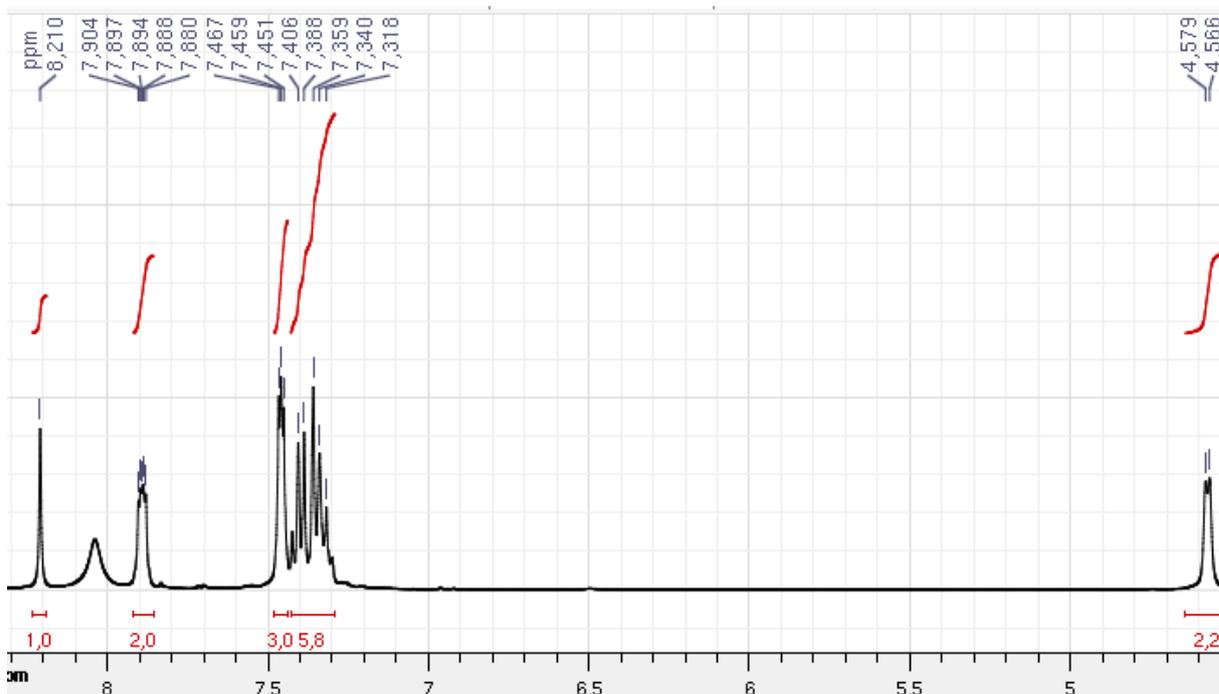
Espectro 53. RMN  $^1\text{H}$  (400MHz) ampliado em DMSO- $d_6$  do composto **LQM029**



Espectro 54. RMN  $^{13}\text{C}$  (400MHz) em DMSO- $d_6$  do composto **LQM029**



Espectro 55. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM034**



Espectro 56. RMN <sup>1</sup>H (400MHz) ampliado em DMSO-d<sub>6</sub> do composto **LQM034**

