



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
N,N'-DIARILBENZAMIDINAS COM ATIVIDADE LESHMANICIDA**

CLAUDIO EDUARDO RODRIGUES DOS SANTOS

*Sob a orientação da Professora
Aurea Echevarria*

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Magister Scientiae em Química
Orgânica, Área de Concentração em
Síntese

Seropédica, RJ
Maio de 2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

CLAUDIO EDUARDO RODRIGUES DOS SANTOS

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, Área de Concentração em Síntese, como requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae**, em maio de 2004.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: ____/____/____

Prof. Dr^a. Aurea Echevarria – Dequim - UFRRJ - Orientadora

Prof. Dr. Carlos Maurício R. Sant`Anna-Dequim - UFRRJ

Prof. Dr. Edson Ferreira da Silva - FIOCRUZ / RJ

Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho - Dequim-UFRRJ

O tempo é um inimigo implacável, não dá trégua um segundo, mesmo no momento que mais precisamos dele, porém, em determinadas situações, ele age como um amigo, dando-nos tranquilidade para continuar o nosso percurso no universo.

*Dedico este
trabalho à minha querida mãe,
pessoa no qual sempre viverá
em meu coração*

*Meu obrigado à
professora e amiga Dra. Áurea Echevarria,
pessoa boníssima,
cuja orientação e paciência,
tornou possível
a realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos e irmãs por estarem sempre ao meu lado.

Ao corpo docente do programa de pós-graduação pela formação acadêmica que permitiu a elaboração deste trabalho.

Aos funcionários técnico-administrativos.

Aos amigos e companheiros do laboratório: SILVANA, ALICE, GRAZIELLE, ANA PAULA, ANA PAULA AMORIN, ADILSON, MYRTEZ, ANDRESSA, AMANDA, KÊNIA, CAMILA e HELOISA.

Às amigas do “tibe”: TATIANA e ANDREA ROSI.

Aos demais colegas de curso: CRISTINA, ARI, ILDOMAR, BAUER, REGINA, LUCIANO, PIERRE, JULIO, JANAINA, MARLI, VIRGINIA, CLEBER, ADRIANA, MÁRIO SÉRGIO e CRISTIAN, pelo agradável convívio.

Ao grupo do Laboratório de Bioquímica de Tripanossamatídeo, do Departamento de Imunologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pela realização dos ensaios biológicos, em particular à GÉRZIA.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

À UENF pela realização de alguns espectros.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica, Instituto de Química, UFRRJ.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela bolsa concedida.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, direto ou indiretamente, citados ou não citados.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Compostos amidínicos, características e estrutura	01
1.1.1. Estrutura	02
1.1.2. Classificação das amidinas	04
1.1.3. Propriedades espectroscópicas	05
1.1.3.1. Espectroscopia de infravermelho	05
1.1.3.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C ...	05
1.1.4. Ionização	06
1.1.4.1. Importância da ionização	06
1.1.4.2. Basicidade das amidinas	07
1.1.5. Tautomerismo	08
1.1.6. Isomerismo geométrico	11
1.2. Métodos de síntese das Amidinas.....	13
1.2.1. Síntese de amidinas a partir de nitrilas	14
1.2.1.1. Reação de Pinner	14
1.2.1.2. Obtenção amidinas N-monossobstituídas a partir de nitrilas	14
1.2.1.3. Reação de aminas com nitrilas em presença de AlCl_3	15
1.2.1.4. Reação de Garipati	15
1.2.1.5. Obtenção de amidinas a partir de nitrilas e cisteína	16
1.2.1.6. Condensação de nitrilas a amidinas utilizando SmI_2	16
1.2.2. Síntese de amidinas a partir de ácidos bóricos, carboxílicos, diaminas e amidas	17
1.2.2. Síntese a partir de ácidos bóricos	17
1.2.3. Amidinas a partir de ácidos carboxílicos	17
1.2.4. Obtenção de amidinas a partir de diaminas	18
1.2.5. Síntese de amidinas a partir de amidas	18
1.3. Atividade biológica das Amidinas.....	19
1.3.1. Compostos amidínicos com atividade antitrombótica	19
1.3.2. Amidinas com atividades frente a Transcriptase reversa e com <i>Pneumocystis carinii</i>	20
1.3.3. Compostos amidínicos com atividade anestésica	20
1.3.4. Leishmaniose	21

1.3.4.1. Tratamento quimioterápico	22
1.3.4.2. Substâncias leishmanicidas em fase pré-clínica e em desenvolvimento.....	22
2. OBJETIVOS	25
3. PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1. Aparelhos e Materiais	26
3.1.1. Aparelhos	26
3.1.2. Materiais	26
3.1.2.1. Vidrarias	26
3.1.2.2. Solventes utilizados	26
3.1.2.3. Reagentes	27
3.1.2.4. Purificação dos reagentes	27
3.2. Sínteses	28
3.2.1. Síntese do cloreto de <i>p</i> -metoxibenzoíla	28
3.2.2. Síntese das anilidas	29
3.2.2.1. Caracterização das anilidas	30
3.2.3. Síntese das amidinas	32
3.2.3.1. Método A: Em meio seco	32
3.2.3.2. Método B: Em tolueno sob refluxo	33
3.2.3.3. Método C: Síntese das amidinas sob irradiação de microndas	34
3.2.3.4. Caracterização das amidinas	35
3.3. Determinação dos pKa (s)	39
3.3.1. Soluções	39
3.3.2. Procedimento	39
3.3.3. Cálculos	40
3.4. Modelagem molecular	42
3.4.1. Valores obtidos nos métodos semi-empíricos	43
3.5. Atividade anti-leishmania	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Síntese	48
4.1.1. Síntese das anilidas	49
4.1.2. Síntese das amidinas	50
4.2. Análise espectrométrica	56
4.2.1. Anilidas	56

4.2.2. Amidinas	59
4.2.2.1. Análise espectrométrica dos derivados 85 e 89	63
4.2.3. Espectrometria de massas das amidinas	70
4.3. Estudo de modelagem molecular e difração de raios-X	74
4.4. Determinação dos pKa (s) das amidinas	78
4.5. Atividade anti-leishmania	80
5. CONCLUSÕES	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
7. ANEXOS	92

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
CCF	cromatografia em camada fina
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
DMSO-d ₆	dimetilsulfoxido deuterado
d	dubleto
t	triplete
sl	singleto largo
PF	ponto de fusão
δ	deslocamento químico
H _f	entalpia de formação
ΔH _f	variação de entalpia de formação
g	grama
IV	infravermelho
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
EM	espectrometria de massas
m/z	razão massa carga
μM	micro molar (1μM = 10 ⁻⁶ M)
n.o	não observado
mL	mililitro
min	minuto
<i>J</i>	constante de acoplamento
Hz	hertz
CI ₅₀	concentração que inibe 50% do crescimento
NOEDIFF	efeito nuclear overhauser diferencial
H ¹ xH ¹ -COSY	correlação espectroscópica de hidrogênio
THF	tetraidrofurano
TFA	ácido trifluoracético

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01: Estruturas de ressonância do grupamento amídínico	02
Figura 02: Estrutura cristalográfica do composto 5	02
Figura 03: Estruturas dos compostos amídínicos 6, 7 e 8	03
Figura 04: Classificação das amidinas em função da substituição dos nitrogênios ..	04
Figura 05: A ionização de fármacos após a biofase	06
Figura 06: Exemplos de cicloguanidinas com a atribuição dos deslocamentos químicos de RMN ¹³ C	08
Figura 07: Exemplo de tautomerismo das di-hidropirimidinas	09
Figura 08: Exemplos de moléculas, derivados amídínicos, que apresentam tautomerismo	10
Figura 09: Exemplos de isomerismo geométrico	11
Figura 10: Gráfico da correlação entre ΔH_f e as conformações da glicoamidina	12
Figura 11: Reação de Pinner	14
Figura 12: Reação para obtenção de amidinas N-monossustituídas	14
Figura 13: Reação de Garipati	15
Figura 14: Estudo conformacional do derivado 85 EI utilizando os 3 43	

hamiltonianos	
Figura 15: Estudo conformacional do derivado 85 EA utilizando os 3 hamiltonianos	43
Figura 16: Estudo conformacional do derivado 85 ZI utilizando os 3 hamiltonianos	44
Figura 17: Estudo conformacional do derivado 85 ZA utilizando os 3 hamiltonianos	44
Figura 18: Estudo conformacional do derivado 89 EI utilizando os 3 hamiltonianos	45
Figura 19: Estudo conformacional do derivado 89 EA utilizando os 3 hamiltonianos	45
Figura 20: Estudo conformacional do derivado 89 ZI utilizando os 3 hamiltonianos	46
Figura 21: Estudo conformacional do derivado 89 ZA utilizando os 3 hamiltonianos	46
Figura 22: Retroanálise da síntese das amidinas.....	48
Figura 23: Anilidas sintetizadas	49
Figura 24: Rotas alternativas da síntese da amidina 83	51
Figura 25: Esquemas das rotas sintéticas utilizadas na etapa de formação da amidina	54
Figura 26: Gráfico H_f x coordenada da reação	55
Figura 27: Semelhanças da região aromática em função do tautomerismo	

prototrópico	60
Figura 28: Equilíbrio tautomérico do derivado 85	63
Figura 29: Parte do espectro de RMN de ^{13}C do derivado 85s	64
Figura 30: Espectros de RMN de ^{13}C da amidina 85	65
Figura 31: Parte do espectro de RMN de ^{13}C da amidina 89	67
Figura 32: Espectros de RMN de ^{13}C da amidina 89 e 89s	69
Figura 33: Proposta de fragmentação para as amidinas sem apresentar os fragmentos que dependem dos grupos metoxila e nitro	71
Figura 34: Proposta de fragmentação para as amidinas envolvendo os grupos metoxila	72
Figura 35: Fragmentos específicos do derivado 89	73
Figura 36: H_f (kcal/mol) x ω ($\text{H}_{16}\text{-N}_{16}\text{-C}_{\square}\text{-C}_1$) para composto 89 , utilizando PM3	75
Figura 37: Conformações <i>H-sin</i> e <i>H-anti</i> das benzamidinas	76
Figura 38: Estrutura cristalográfica do composto 84	77
Figura 39: Valores de pKa das amidinas x δ $\text{C}\alpha$	79
Figura 40: Atividade leishmanicida de amidinas em forma de sal	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01: Comprimento e ângulos de ligações aminicas e iminicas	03
Tabela 02: Deslocamentos químicos de carbono dos compostos 7 e 8	05
Tabela 03: Tabela de valores de pKa para algumas benzamidinas	07
Tabela 04: Atividade antileishmania da série N,N'-difenil- <i>p</i> -X-benzamidina.....	24
Tabela 05: Rendimentos e pontos de fusão das anilidas	29
Tabela 06: Rendimentos das amidinas	33
Tabela 07: Valores dos pKa (s) determinados potenciométricamente e dados utilizados para seus cálculos	41
Tabela 08: Rendimentos, pontos de fusão e estiramentos $\nu_{C=O}$ (cm ⁻¹)	49
Tabela 09: Pontos de fusão das amidinas nas formas de sais e neutras	52
Tabela 10: Dados de H _f (kcal/mol) dos derivados salinos	53
Tabela 11: Valores de absorção (cm ⁻¹) de IV das anilidas	56
Tabela 12: Deslocamentos químicos RMN de ¹ H para as anilidas	57
Tabela 13: Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H para as anilidas calculadas a partir da literatura (PRETSCH, 1980).....	58
Tabela 14: Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ¹³ C das anilidas	58
Tabela 15: Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C para as anilidas calculadas a partir do Kalinowski (1988) para a região aromática	59

Tabela 16: Valores de absorção de IV (cm^{-1}) das amidinas	59
Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para as amidinas	61
Tabela 18: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C das amidinas	62
Tabela 19: Assinalamentos dos hidrogênios do derivado 89	68
Tabela 20: Principais fragmentos obtidos dos espectros de massas das amidinas	70
Tabela 21: pKa (s) obtidos para as amidinas	78
Tabela 22: Valores das concentrações inibitórias dos derivados amidínicos contra <i>L. amazonensis</i> (promastigotas)	80
Tabela 23: Valores das concentrações inibitórias dos derivados amidínicos contra <i>L. braziliensis</i> e <i>L. chagasi</i> (promastigotas)	81

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 01: Espectro de IV (KBr) do derivado 79	93
Anexo 02: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado 79	94
Anexo 03: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado 79	95
Anexo 04: Espectro de IV (KBr) do derivado 80	96
Anexo 05: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado 80	97
Anexo 06: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado 80	98
Anexo 07: Espectro IV (KBr) do derivado 81	99
Anexo 08: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado 81	100
Anexo 09: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado 81	101
Anexo 10: Espectro IV (KBr) do derivado 82	102
Anexo 11: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado 82	103
Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado 82	104
Anexo 13: Espectro de IV (KBr) do derivado 83	105
Anexo 14: Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6) do derivado 83	106
Anexo 15: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado 83s	107

Anexo 16: EM do derivado 83s	108
Anexo 17: IV (KBr) do derivado 84	109
Anexo 18: RMN de ¹ H (DMSO –d ₆) do derivado 84	110
Anexo 19: RMN de ¹³ C (DMSO-d ₆) do derivado 84s	111
Anexo 20: EM do derivado 84s	112
Anexo 21: Espectro de IV (KBr) do derivado 85	113
Anexo 22: Espectro de RMN de ¹ H (DMSO-d ₆) do derivado 85	114
Anexo 23: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆) do derivado 85s	115
Anexo 24: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆) do derivado 85	116
Anexo 25: EM do derivado 85s	117
Anexo 26: Espectro de IV (KBr) do derivado 86	118
Anexo 27: Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) derivado 86	119
Anexo 28: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆) do derivado 86s	120
Anexo 29: EM do derivado 86	121
Anexo 30: Espectro de IV (KBr) do derivado 87	122
Anexo 31: Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) do derivado 87	123
Anexo 32: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆) do derivado 87s	124

Anexo 33: MS do derivado 87s	125
Anexo 34: Espectro de IV (KBr) do derivado 88	126
Anexo 35: Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) do derivado 88	127
Anexo 36: Espectro de RMN ¹³ C do derivado 88s	128
Anexo 37: EM do derivado 89s	129
Anexo 38: Espectro de IV (KBr) do derivado 89	130
Anexo 39: Espectro de RMN ¹ H (DMSO-d ₆) do derivado 89	131
Anexo 40: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆) do derivado 89s	132
Anexo 41: Espectro de RMN ¹³ C (DMSO-d ₆) do derivado 89	133
Anexo 42: Espectro de NOEDIF (DMSO-d ₆) do derivado 89	134
Anexo 43: Espectro de RMN ¹ H x ¹ H (DMSO-d ₆) do derivado 89	135
Anexo 44: EM do derivado 89s	136

RESUMO

Este trabalho relata a síntese de 14 derivados da classe das amidinas do tipo N,N'-diarilbenzamidinas nas formas de sais e neutras, através de duas diferentes rotas de obtenção. As duas rotas de síntese envolveram basicamente os mesmos reagentes sendo que uma delas foi realizada através de reações em meio sólido e a outra a refluxo.

A caracterização das amidinas foi realizada por técnicas espectrométricas como IV, Massas, RMN de ^1H e ^{13}C . A utilização da técnica de NOEDIFF, além das outras técnicas espectroscópicas, juntamente com o auxílio de cálculos de modelagem molecular, permitiu identificar a presença da forma isomérica *E* e o tautômero amínico em relação ao grupo substituinte metoxila para o derivado N-(*p*-metóxi-fenil)-N'-fenilbenzamidina e, a mistura *E* e *Z* com a forma imínica em relação ao grupo nitro para o derivado N-(*p*-nitro-fenil)-N'-fenilbenzamidina. Foi realizada a determinação dos valores de pKa(s) utilizando o método potenciométrico para as amidinas sintetizadas, os valores obtidos, correlacionaram-se linearmente com os deslocamentos químicos dos carbonos amidínicos, indicando a transmissão dos efeitos eletrônicos sobre a basicidade.

As novas amidinas obtidas foram submetidas a ensaios contra parasitas do gênero *Leishmania*, especificamente, *L. amazonensis*, *brasiliensis* e *chagasi*, indicando atividades bastante promissoras quando nas formas salinas. Os derivados dimetoxilados e o nitro-substituído apresentaram as melhores atividades anti-leishmania.

ABSTRACT

The synthesis of fourteen amidine derivatives of N,N'-diarylbenzamidine class in the neutral and saline forms were realized by two methodologies. Basically, in both synthetical methods the same starting reagents were utilized, but involving a solid reaction and reflux conditions, respectively.

The structural characterization was realized by spectroscopic techniques such as IR, MS, NMR ^1H and ^{13}C . The NOEDIF experiment, further the traditional spectrometric methods and molecular modeling calculations, allowed elucidate the *E* stereoisomer in aminic tautomeric form related to methoxy moiety in N-(*p*-methoxyphenyl)-N'-phenylbenzamidine and, *E* and *Z* mixture with iminic tautomeric form related to nitro group in N-(*p*-nitrophenyl)-N'-phenylbenzamidine derivative. The benzamidine pKa(s) values were determined by potentiometric method, and a linear correlation with amidinic carbon chemical shifts was verified indicating an electronic effect transmission over the basicity.

The new amidine derivatives were assayed against *Leishmania* genera parasites, such as *L. amazonensis*, *braziliensis* and *chagasi*, showing a promising activity in the saline forms. The di-methoxy and nitro-derivatives presented the best anti-leishmanial activities.

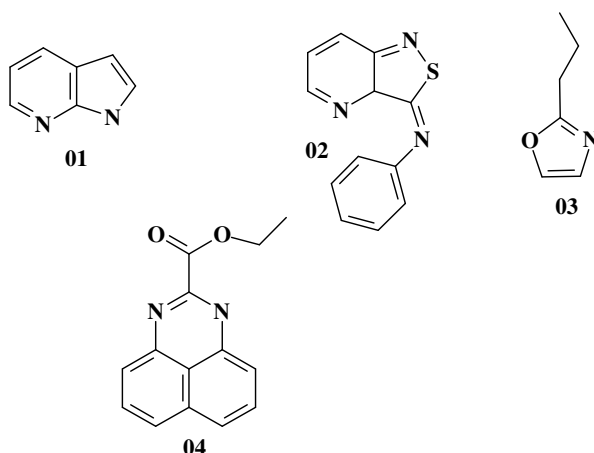
1. INTRODUÇÃO

O grupamento amidínico, com diferentes modelos de substituição, é freqüentemente uma parte importante de substâncias com atividade biológica (KOMBER *et al*, 2002).

As amidinas são amplamente empregadas como intermediários em síntese na obtenção de compostos acíclicos, mas em décadas recentes na síntese de compostos heterocíclicos como: aziridinas, pirróis (**01**), tiadiazóis (**02**), oxazóis (**03**), pirimidinas (**04**), entre outros (ECHEVARRIA *et al*, 1996).

Na química de coordenação, tem crescido o número de trabalhos utilizando amidinas como ligantes, fornecendo diversas estruturas de complexos com metais (BARKER & KILNER, 1994), do mesmo modo acontecendo para os polímeros, sendo que recentemente novas aplicações foram encontradas para estruturas poliméricas bem definidas contendo um grande número de grupamentos amidínicos (KOMBER *et al*, 2002).

As amidinas possuem um amplo espectro de atividades biológicas (KUSTURIN *et al*, 2002). O grupo funcional amidínico é encontrado em muitas moléculas que podem atuar como: antitrombóticos, agentes anestésicos, antibióticos, anti-helmínticos e diuréticos, (XU *et al*, 2002). Além disso, derivados amidínicos estão sendo utilizados no tratamento de pacientes com AIDS (MENEZES *et al*, 2000) e no tratamento da leishmaniose, doença endêmica no Brasil, causando mais de 30.000 casos por ano (GEREZ *et al*, 2002), sendo que o fracasso quimioterápico está se tornando um problema sério para esta moléstia (GENESTRA *et al*, 2003).



1.1 Compostos amidínicos, características e estrutura

1.1.1 Estrutura

As amidinas são interessantes isostéricos de ácidos carboxílicos e ésteres, combinando uma ligação dupla C=N, como as azometinas, e uma ligação simples C-N, como as amidas, tendo um caráter parcial de ligação dupla (SHRINER *et al*, 1944). Este caráter se deve ao efeito de ressonância envolvendo os grupamentos C-N e C=N, como indicado na figura 01.

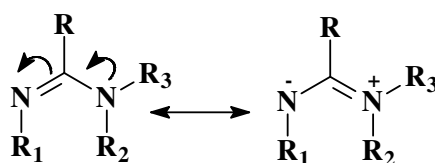


Figura 01: Estruturas de ressonância do grupamento amidínico.

Estudos de cristalografia de raios-X demonstraram que o grupamento amidínico tem uma certa planaridade e um efeito de conjugação eletrônica n-π acentuado, figura 01 (COTTON *et al*, 1997). As estruturas de raios-X para as amidinas **5-8** (figura 02 e 03) permitiram observar um encurtamento da ligação amínica em relação a amida (C-N, 1,47 Å) e alongamento da ligação imínica em relação a uma imina (C=N, 1,27 Å). Porém, esses feitos variam em função da substituição dos átomos de nitrogênio, efeitos estéricos, forças cristalinas, como exemplos menos pronunciados como mostrado na ta

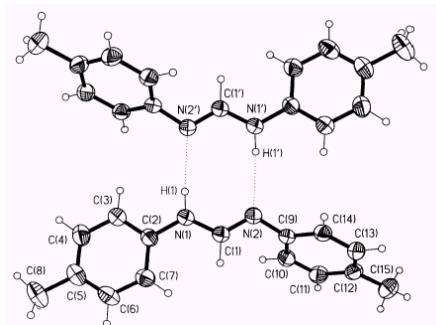
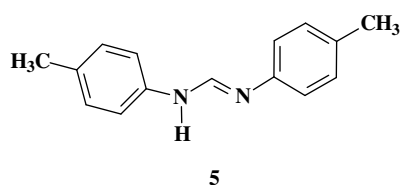


Figura 02: Estrutura cristalográfica do composto **5**.

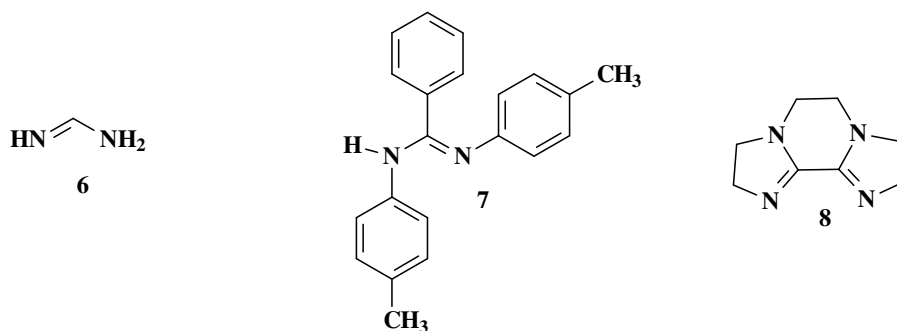


Figura 03: Estruturas dos compostos de compostos amidínicos **6**, **7** e **8**.

Os parâmetros geométricos obtidos a partir de modelagem molecular, utilizando cálculos *ab initio*, para algumas substâncias contendo o grupamento amidínico (**9** e **10**) têm fornecido boa concordância com os valores de comprimento e ângulos de ligação obtidos experimentalmente, como podemos ver na tabela 01 (REMKO *et al*, 2003).

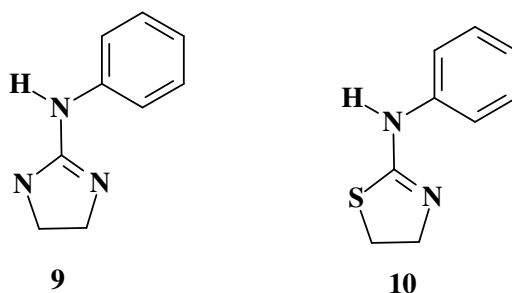


Tabela 01: Comprimento e ângulos de ligações aminicas e iminicas

Compostos	Comprimento de ligação (Å)		Ângulo de ligação (Å)
	amínica (C-N ₁)	íminica (C=N)	N-C=N
5	1,368	1,283	127,3
6	1,344	1,298	-
7	1,359	1,299	128,4
8	1,387	1,271	-
9	1,379	1,289	106,4
10	1,368	1,278	116,4

1.1.2 Classificação das amidinas

Em função da distribuição e do número de substituintes nos átomos de nitrogênio do grupamento amidínico, as amidinas podem ser classificadas em cinco tipos, de acordo com a figura 04 (SHRINER *et al*, 1944).

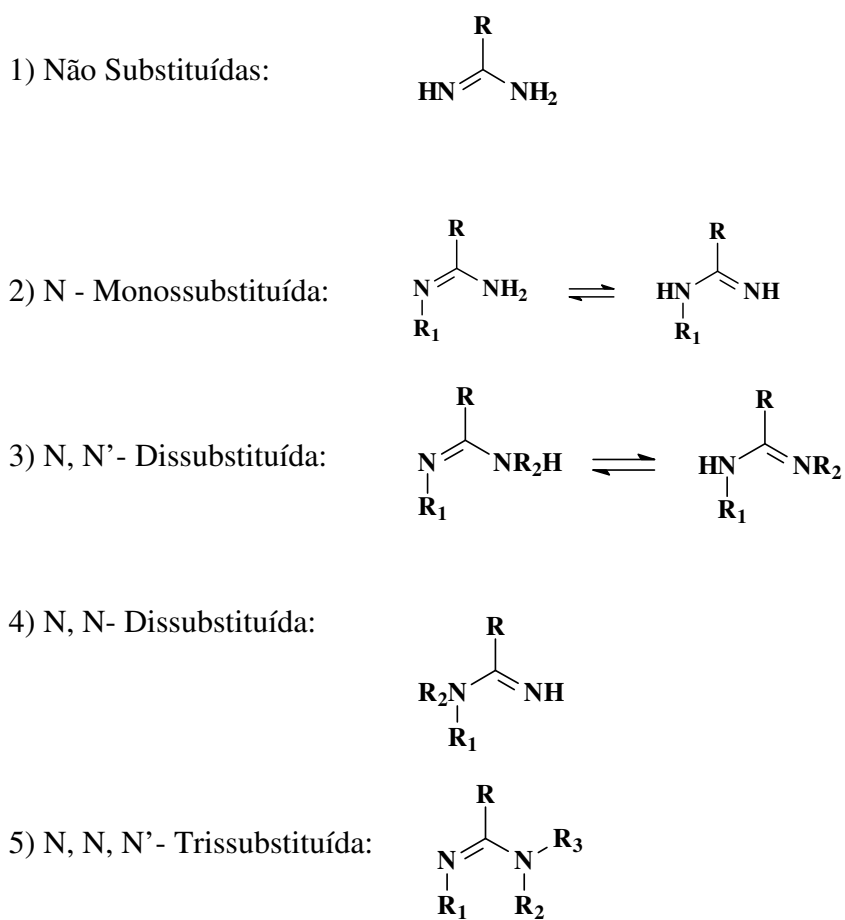


Figura 04: Classificação das amidinas em função da substituição dos nitrogênios.

1.1.3 Propriedades espectroscópicas

1.1.3.1 Espectroscopia de infravermelho

As bandas de absorção de IV do grupo amidínico são provenientes da deformação axial da ligação de C=N, por volta de 1689-1471 cm^{-1} e C-N em torno de 1400 cm^{-1} (SILVERSTEIN, 1994). Porém, estes valores podem variar em função dos substituintes tanto no carbono amidínico ou nos dois nitrogênios que podem apresentar efeito indutivo reduzindo a ordem de ligação C=N.

1.1.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C

Os valores de deslocamentos químicos dos carbonos amidínicos são afetados pela conjugação ou efeito indutivo dos substituintes no carbono ou nos dois nitrogênios. Os exemplos abaixo mostram claramente que substituintes doadores de elétrons blindam o carbono amidínico, conseqüentemente tendo deslocamentos mais baixos (campo alto) e retiradores de elétrons desblindam, apresentando deslocamentos mais altos (campo baixo) (SILVERSTEIN, 1994). Além disso, podemos notar que os efeitos são mais efetivos quando os substituintes estão no nitrogênio íminico do que no carbono amidínico comparando-se os deslocamentos químicos de cada série na tabela 02 (SANTOS, 1993).

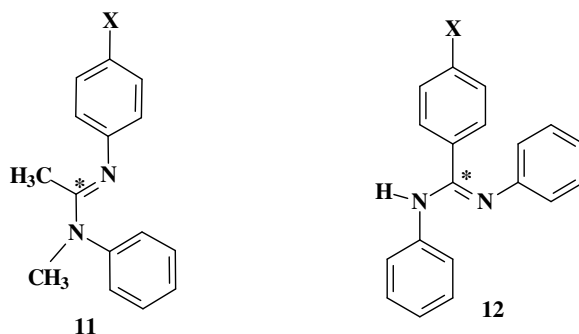
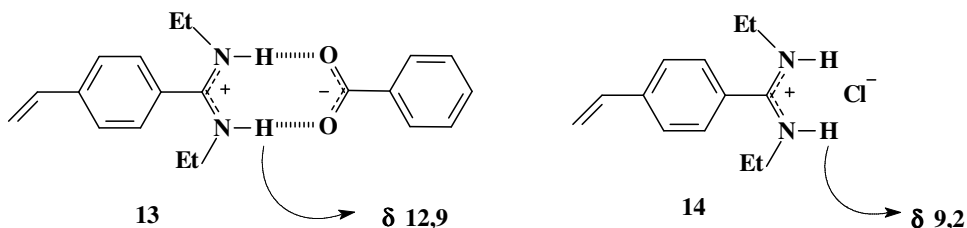


Tabela 02: Deslocamentos químicos do carbono amidínico de **11** e **12**.

substituinte	δ_{C^*} do composto 12	δ_{C^*} do composto 11
X = H	154,74	155,2
X = CH ₃	154,44	158,8
X = OCH ₃	154,20	157,9
X = Br	155,21	160,2

Os valores dos deslocamentos químicos de hidrogênio podem ser afetados pelos fatores acima citados, tipos de solvente ou pela formação de complexos, que possam vir a fazer ligações de hidrogênio entre a amidina ou cátion amidínico e os aniões correspondentes. O exemplo abaixo mostra um sinal de NH em δ 12,9 característico de uma forte ligação de hidrogênio entre o cátion amidínico e o ácido benzóico (KRAFT *et al.*, 2002).



1.1.4 Ionização

1.1.4.1 Importância da ionização

A maioria dos fármacos apresenta características ácidas ou básicas. A constante de ionização de um fármaco é capaz de expressar, dependendo de sua natureza química e do pH do meio, a contribuição percentual relativa das espécies ionizadas (A^- ou BH^+) e não ionizadas correspondentes (HA ou B). Essa propriedade é de fundamental importância na fase farmacocinética, uma vez que o grau de ionização é inversamente proporcional a lipofilicidade (BARREIRO & FRAGA, 2001). A figura 05 ilustra o comportamento de substâncias ionizáveis frente à membrana lipídica.

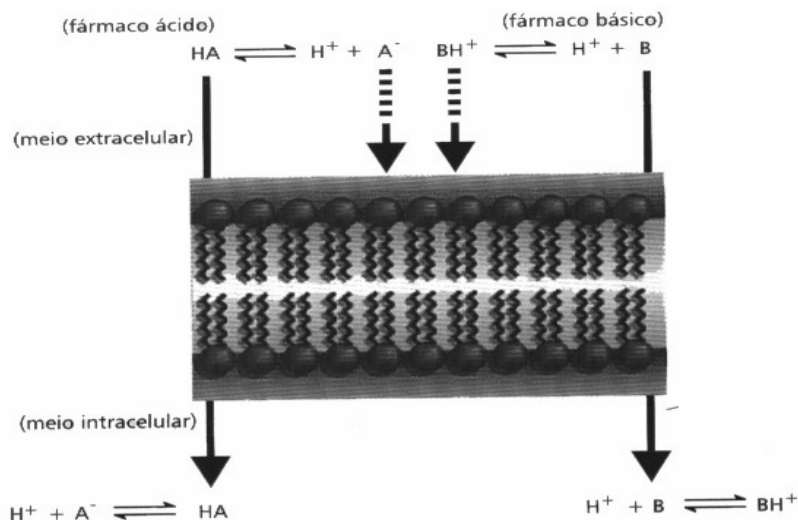


Figura 05: A ionização de fármacos após a biofase.

1.1.4.2 Basicidade das amidinas

As amidinas são bases fortes, influenciadas pela substituição dos átomos de carbono ou dos nitrogênios (OSZCZAPOWICZ & RACZYNSKA, 1984). Os efeitos dos substituintes na basicidade dessas substâncias, foi bastante estudado por Lorz e colaboradores utilizando amidinas do tipo N,N-dissubstituídas, **15** (LORZ & BALTZLY, 1949). Os autores surpreenderam-se ao substituir o grupo n-C₄H₉ pelo grupamento fenila, pois esperavam uma queda acentuada de pKa, mas sua determinação mostrou uma diminuição de menos de 1 unidade de pKa. Hoje sabe-se que a queda dos valores de pKa poderia ser mais brusca se o anel fenílico substituído estivesse no átomo do nitrogênio íminico. No entanto, os valores obtidos de pKa para os outros substituintes no anel benzamidínico foi de acordo com que Lorz em 1949 esperava (OSZCZAPOWICZ & RANCRNSKA, 1984). A tabela 03 ilustra os valores para os pKa (s) obtidos por Lorz e colaboradores para algumas benzamidinas substituídas.

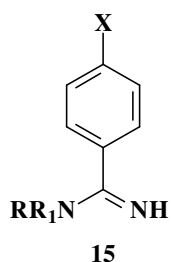
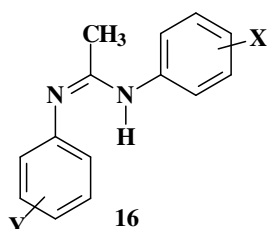


Tabela 03: Tabela de valores de pKa para algumas benzamidinas (LORZ & BAHZLR, 1949).

X	R	R ₁	pKa
-	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	11,27
-	C ₆ H ₆	n-C ₄ H ₉	10,40
4-MeO	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	11,50
4-OH	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	12,50
3-Cl	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	10,68

Os valores obtidos de pKa para as amidinas ao longo do tempo têm fornecido várias informações importantes como os parâmetros termodinâmicos, e o percentual de tautômeros (RACZYNSKA & OSZCZAPOWICZ, 1985). Estudos detalhados permitiram verificar que os tautômeros íminicos são favorecidos por grupos retiradores de elétrons.

Raczynska, determinou os pKa(s) para uma série de N-metil-N,N'-diarilacetamidas (**16**) com diferentes substituintes nos anéis fenílicos. A partir desses resultados foi possível verificar a existência de boas correlações com as constantes dos substituintes (σ). Verificou-se assim, a influência dos substituintes em cada átomo de nitrogênio (RACZYNSKA, 1985).



1.1.5 Tautomerismo

O tautomerismo das amidinas cíclicas tem sido extensivamente estudado, desde décadas passadas (JACKMAN & JEN, 1975). As formas estruturais das cicloguanidinas eram expressas na maior parte dos trabalhos em sua forma amínica (**17**). Um exemplo típico é o agente anti-hipertensivo clonidina (**17**). Através da síntese dos análogos da clonidina, **17** e **18**, observou-se que o sistema Ar-N=C-N- do composto **20** blindava mais os átomos de carbono da posição *ipso* e *para*, do que o sistema Ar-N-C=N- do composto **19**, realizando-se então, por analogia, a atribuição dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para os outros análogos (figura 06).

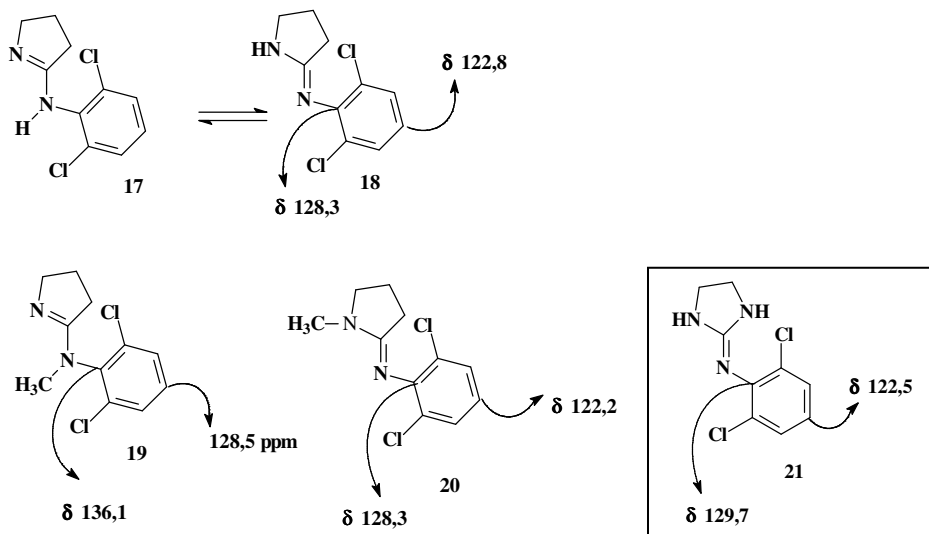


Figura 06: Exemplos de cicloguanidinas com a atribuição dos deslocamentos químicos de RMN ^{13}C .

Não só as cicloguanidinas, como também as diidropirimidinas (**22**) consideradas azo-análogos de diidropiridinas, tem sido extensivamente estudadas, podendo ser representadas por três formas tautoméricas, como indicado na figura 07 (KASHIMA *et al*, 1985).

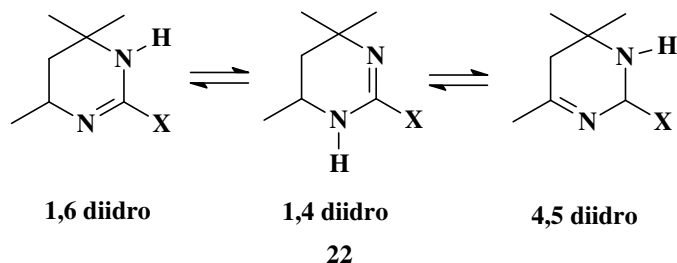


Figura 07: Exemplo de tautomerismo das diidropirimidinas

Weis em 1985 relatou que a espectroscopia de IV foi uma boa ferramenta para distinguir tautômeros do tipo di-hidropirimidinas. Observou que o grupo $N=C-N-C=C$ da 1,4 di-hidro absorveu próximo de 1690 cm^{-1} , enquanto que o grupamento $N-C=N-C=C$ da 1,6 dihidro absorveu próximo de 1650 cm^{-1} . Além disso, sugeriu que tautomerismo mostrado na figura 07 é afetado pela concentração de H_2O no solvente, microconcentração de ácidos em solução, impurezas paramagnéticas e teria também a dependência direta da concentração da amostra (WEIS, 1985).

A partir da década de 90 em diante, pelo menos para sistemas mais complexos, a espectrometria de IV (KOMBER *et al*, 1997) tornou-se menos utilizada para dar lugar a espectrometria de RMN ^1H , ^{13}C e ^{13}N , seja em solução ou estado sólido, como foi no caso das poliamidinas do tipo **23**, ciclo-tris-piridilformanidina (**24**) (KOMBER *et al*, 2002) e perimidinas (**25**) (YAVARI *et al*, 2002).

A modelagem molecular também vem recentemente conquistando seu espaço, pois através da utilização de métodos semi-empíricos vem sendo realizada a previsão das constantes tautoméricas em sistemas do tipo imidazólico **26** (RACZINSKA, 1997). A figura 08 ilustra com exemplos o tautomerismo para alguns derivados amidínicos.

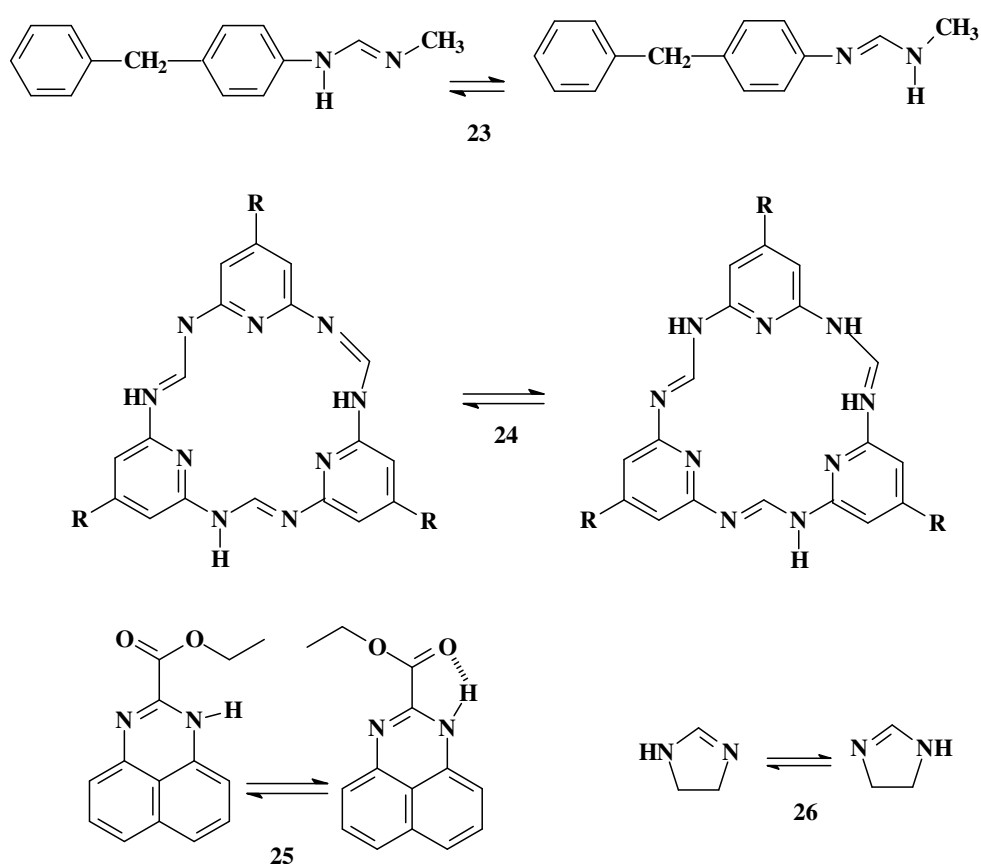


Figura 08: Exemplos de moléculas, derivados amidínicos, que apresentam tautomerismo.

1.1.6 Isomerismo geométrico

O processo de isomerização para as olefinas sem a presença de catalisadores requer uma alta energia, pois esta é necessária para romper o empareamento dos orbitais p na ligação π , necessitando de temperaturas que iniciam em 200°C podendo chegar até mais de 470°C (CURTIN *et al*, 1966). Mas, o mesmo não ocorre para as iminas (**27**), oximas de éteres (**28**), haloiminas (**29**), e amidinas (**30**) (JACKMAN & JEAN, 1975), pois o mecanismo de inversão isomérica, podendo ser chamado de “mecanismo de rotação intensa”, envolve a rotação da metade da molécula com a respectiva outra metade, num eixo através da dupla ligação e do átomo de nitrogênio necessitando de pouca energia (CURTIN *et al*, 1966).

A figura 09 mostra exemplos de amidinas que apresentam isomerismo geométrico.

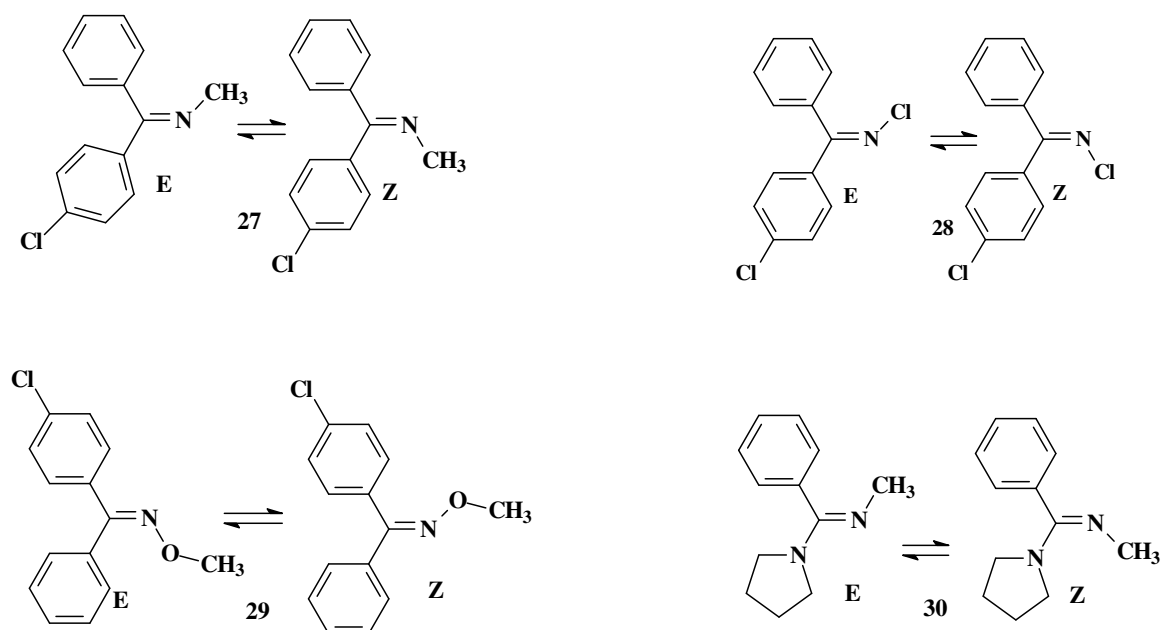
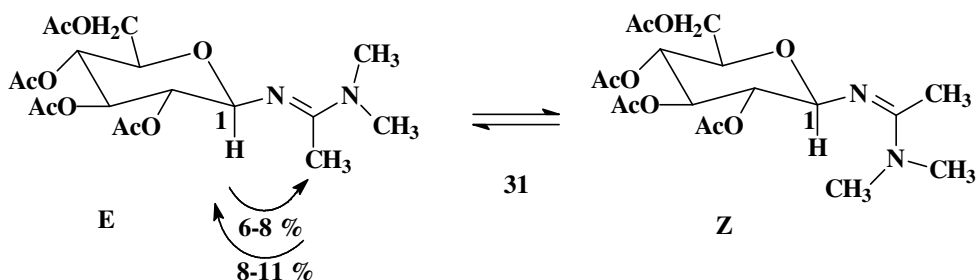


Figura 09: Exemplos de isomerismo geométrico para amidinas.

Assim como na análise de tautômeros, a espectrometria de RMN de ^1H , ^{13}C e ^{15}N vem sendo usada como ótima ferramenta para elucidação de isômeros geométricos (KRAFT *et al*, 2002), e em particular as técnicas para detectar NOE. Como exemplo, a série de glicoamidinas do tipo **31** foi estudada e observou-se que a irradiação efetuada no grupo metila ligado ao carbono amidínico gerou NOE no hidrogênio H-1 e vice versa, indicando o isômero **E** como predominante (AVALOS *et al*, 1996).



Recentemente, estudos teóricos de modelagem molecular, sejam *ab initio* ou semi-empíricos, vem auxiliando na determinação de isômeros (REMEKO *et al*, 2003). Avalos e colaboradores utilizaram o cálculo semi-empírico com operador hamiltoniano MNDO para verificar as diferenças de energia entre os isômeros da amidina **31**, onde observou diferenças significativas de acordo com o gráfico da figura 10 (AVALOS *et al*, 1996).

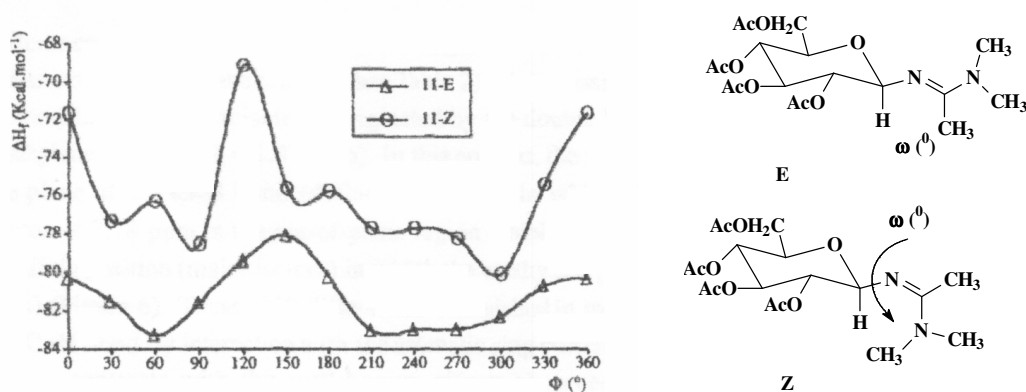
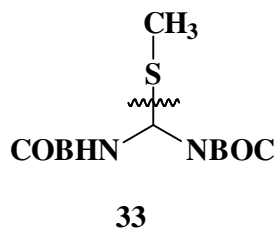
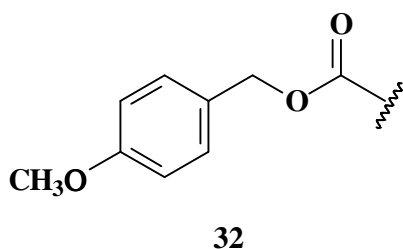


Figura 10: Gráfico da correlação entre ΔH_f e as conformações da glicoamidina.

1.2 Métodos de síntese das amidinas

Devido a estes fatores mencionados, o número de métodos de síntese de amidinas tem aumentando consideravelmente (YET, 2000), onde podemos citar a síntese combinatória, a qual permite convenientemente a obtenção de diversas moléculas (KEUNG *et al*, 2004). Mesmo ainda hoje, se tem pouca informação relacionada diretamente com grupos protetores amidinicos. Destacam-se principalmente os grupos protetores *p*-metoxibenzilcarbonil (**32**) (BAILER *et al*, 1999) e o agente de guanidação (**33**) (KUSTRVIN *et al*, 2002).



1.2.1 Síntese de amidinas a partir de nitrilas

1.2.1.1 Reação de Pinner

A reação clássica de Pinner, descoberta por Klein Pinner em 1800, é provavelmente o método mais comum de transformação de nitrilas a amidinas (YET, 2000). Nitrilas (**34**) são levadas a intermediários de sais de ésteres imídicos (**35**) sob condições anidras, que reagem com aminas *in situ*, ou depois de isolados, levando a amidina (**36**) correspondente, figura 11.

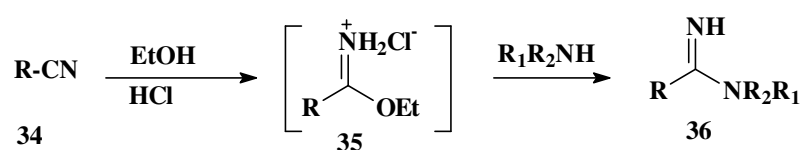


Figura 11: Reação de Pinner.

1.2.1.2 Obtenção amidinas N-monossubstituídas a partir de nitrilas

Amidinas N-monossubstituídas podem ser preparadas em bons rendimentos pelo aquecimento equimolar de nitrilas e aminas primárias com um equivalente de sódio ou sodamida (COOPER & PARTRIDGE, 1953). Porém, este método é limitado não podendo ser utilizado para a preparação de N,N-diaril e N-aryl-N-aquil amidinas, pois a presença de dois substituintes no mesmo átomo de N não gera estrutura de estabilização do tipo **37** (figura 12).

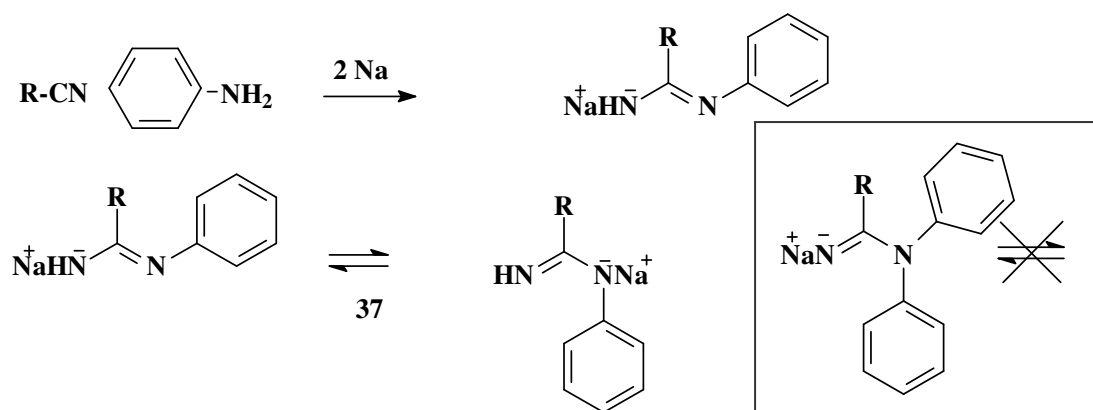
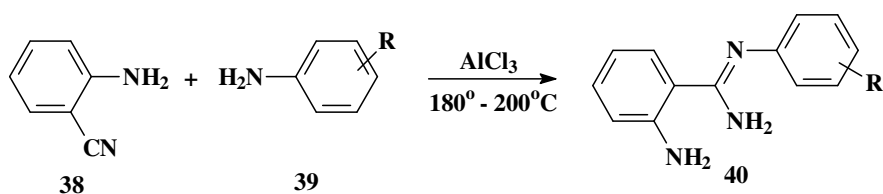


Figura 12: Reação para obtenção de amidinas N-monossubstituídas.

1.2.1.3 Reação de aminas com nitrilas em presença de AlCl₃

Nesta metodologia os melhores rendimentos para a preparação de amidinas foram obtidos usando 50% de excesso de anilina (**39**) e cloreto de alumínio em relação à concentração de *o*-aminobenzonitrila (**38**). Os rendimentos dependeram da substituição do anel benzênico das aminas de partida. Substituintes fortemente retiradores de elétrons baixaram o rendimento ou evitaram a formação de amidinas (**40**), devido à baixa nucleofilicidade de grupo amino (SZCZEPANKICWIEZ *et al* 2000).



1.2.1.4 Reação de Garipati

Garipati registrou que alquil e arilnitrilas eram eficientemente convertidas a amidinas em uma única etapa de reação com amideto de metil-cloro-alumínio, como mostra a figura 13. O reagente de alumínio originalmente desenvolvido por Weneib (MOSS *et al*, 1995) foi convencionalmente preparado a partir da adição de NH₄Cl ao triametilalumínio obtido comercialmente. O complexo formado, posteriormente, foi hidrolisado na presença de gel de sílica, mostrando rendimento razoável por volta de 70%, figura 13.

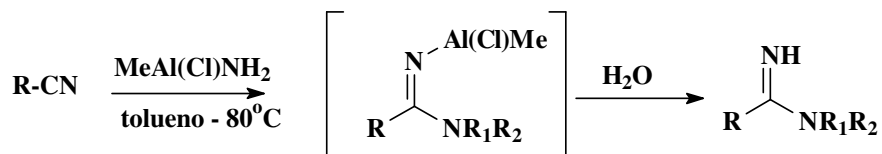
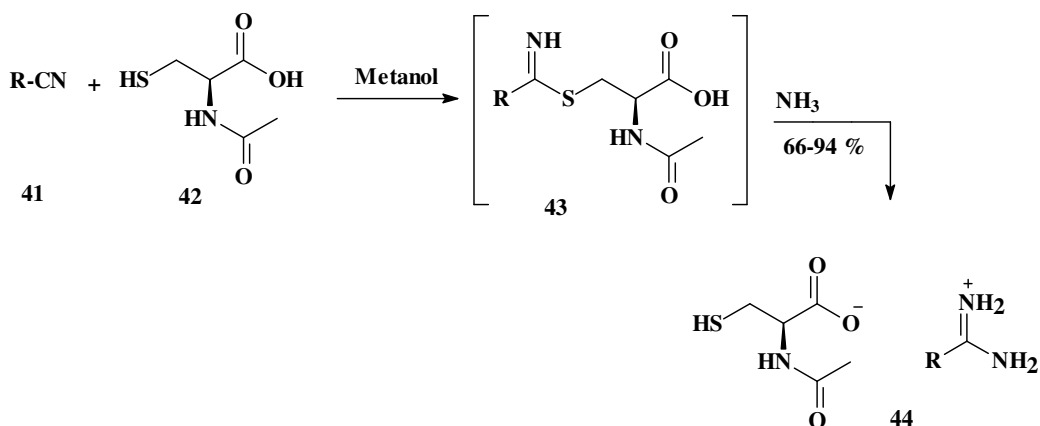


Figura 13: Reação de Garipati.

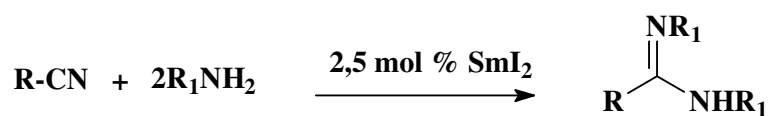
1.2.1.5 Obtenção de amidinas a partir de nitrilas e cisteína

Shafin empregou a N-acetilcisteína (**42**) para transformar nitrilas (**41**) a intermediários tioamidas (**43**), que reagem com amônia dando sais de amônia (**44**), em bons rendimentos (YET, 2000).



1.2.1.6. Condensação de nitrilas a amidinas utilizando SmI₂

Recentemente tem sido explorada a utilização de SmI₂ como catalisador para a formação de ligação C-N (Xu *et al*, 2002). Investigações mostraram resultados de bons a moderados na condensação de aminas com nitrilas para preparação de amidinas N,N'-disubstituídos. Porém, o excesso de nitrila poderá formar triazinas em presença de SmI₂ levando a uma queda do rendimento.



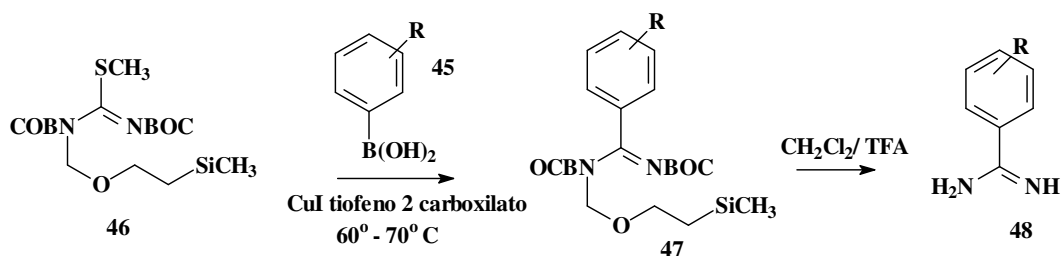
R = alquil

R₁ = alquil, aril

1.2.2 Síntese de amidinas a partir de ácidos bóricos, carboxílicos, diaminas e amidas

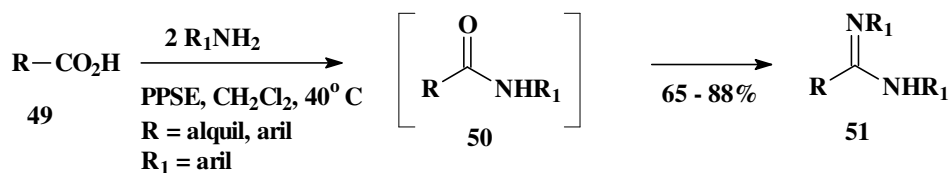
1.2.2 Síntese a partir de ácidos bóricos

Um novo método tem sido empregado na síntese de amidinas utilizando ácidos bóricos (**45**) e um reagente de guanilação (**46**), permitindo gerar diversas benzamidinas protegidas (**47**) em presença de diversas funções do tipo: aldeído, cetona e éster. Os rendimentos obtidos com a utilização dessa metodologia estão na faixa de 40-91%, podendo ser facilmente desprotegidas em presença de TFA e CH_2Cl_2 ou dioxano (KUSTURIN *et al*, 2002).



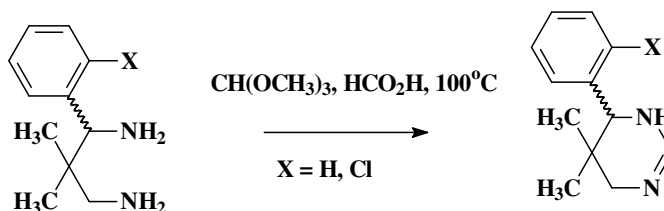
1.2.3 Amidinas a partir de ácidos carboxílicos

Kalkimoto mostrou a síntese a direta de amidinas a partir de ácidos carboxílicos (**49**) e aminas via o intermediário **50**, usando o éster trimetilsilano polifosfórico (PPSE), gerado *in situ*, a partir de pentóxido de fósforo e hexametildisiloxano, como agente de condensação (Yet, 2000).



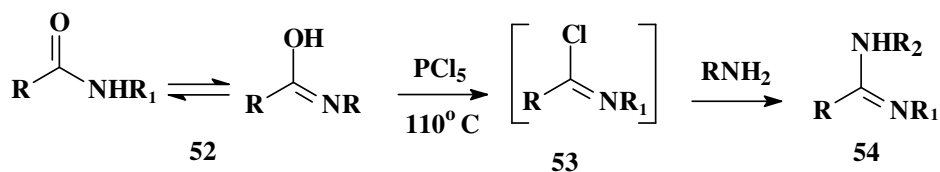
1.2.4 Obtenção de amidinas a partir de diaminas

Amidinas cíclicas opticamente ativas são compostos básicos que podem servir como auxiliares em análise de misturas enantioméricas por RMN. Wyberg sintetizou amidinas cíclicas a partir de diaminas com trimetilortoformito e ácido fórmico (Yet, 2000).



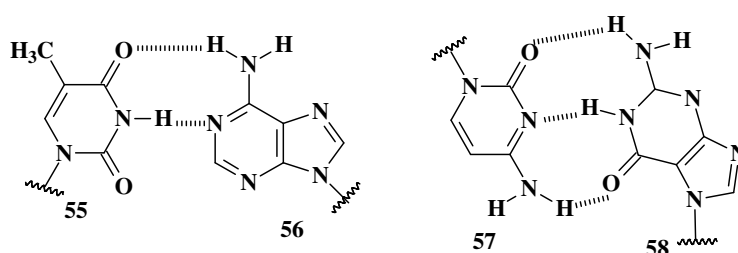
1.2.5 Síntese de amidinas a partir de amidas

A obtenção de amidinas a partir de amidas (**52**) é conhecida desde longa data, (MENDEEL & HILL, 1954), sendo considerada uma boa metodologia de síntese para amidinas di-N,N' e tri-N,N'substituídas. Assim, ainda hoje esse método é utilizado, principalmente através do uso do intermediário, cloreto de imidoíla **53** (FATHALLA *et al*, 2001; FALLALHA & PAZDINA, 2002 & ECHEVARRIA, *et al*, 1996). O método consiste em gerar um intermediário, cloreto de imidoíla a partir da amida correspondente, que posteriormente reage *in situ* com aminas.



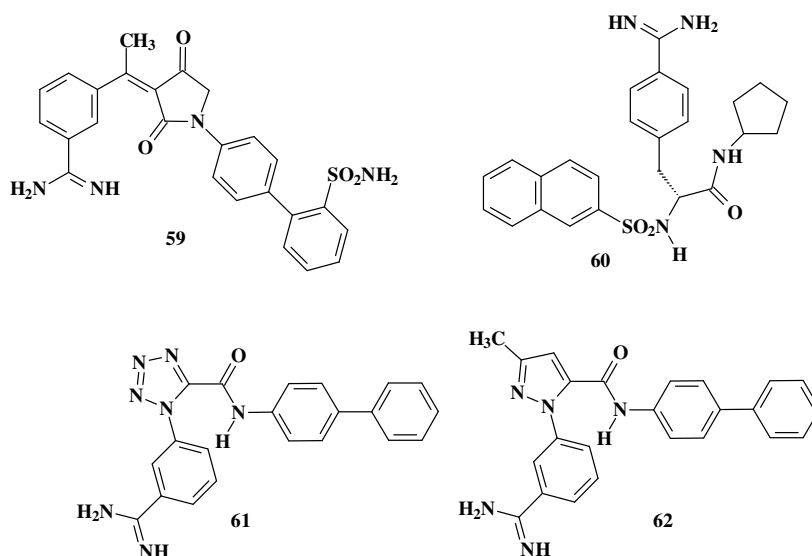
1.3 Atividade biológica da amidinas

Muitos derivados amidínicos possuem atividades biológicas, sendo sugerido que em parte essas atividades são devido a semelhança da função amidínica com sistemas biológicas importantes como pirimidinas e purinas (**55** - **58**), entre outros (ECHEVARRIA *et al*, 1996). Em seguida, serão apresentados alguns derivados amidínicos com atividade biológica em doenças do tipo AIDS, trombose e agindo como agentes anestésicos, sendo tratado com mais detalhes a leishmaniose, um dos pontos de estudo desta tese.



1.3.1 Compostos amidínicos com atividade antitrombótica

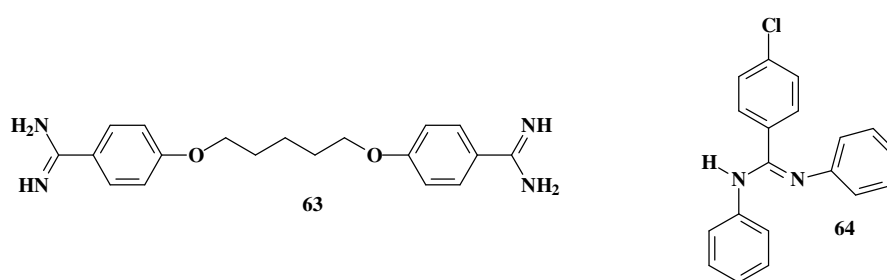
Na terapia antitrombótica, onde o principal alvo é a trombina, uma enzima crucial na cascata de coagulação do sangue (LEE *et al*, 2002), diversas amidinas têm sido avaliadas, como por exemplo, as moléculas **59** (SONG *et al*, 2003), **60** (LEE *et al*, 2002), **61** (Quan *et al*, 2003) e **62** (JIM *et al*, 2002), mostrando ótimos resultados. Porém, análises posteriores mostraram que devido a alta basicidade das amidinas, estas apresentam uma baixa biodisponibilidade.



1.3.2 Amidinas com atividades frente a Transcriptase reversa e *Pneumocystis carinii*

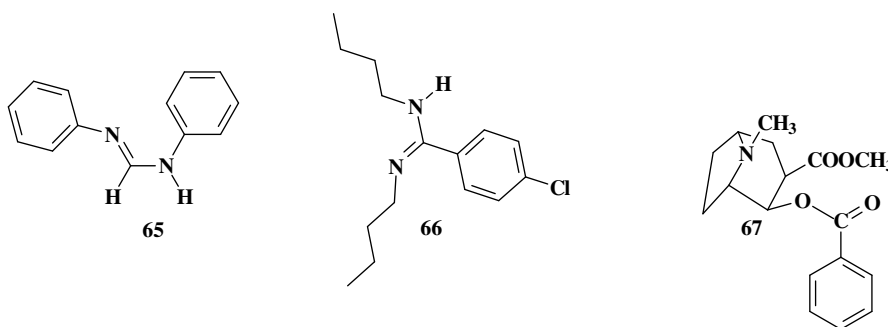
AIDS é uma doença fatal, sendo que os tratamentos utilizados ainda não alcançaram nenhum sucesso terapêutico completo. Pacientes que sofrem desta doença são também suscetíveis a pneumonia provocada por *Pneumocystis carinii* (PCP), a qual conduz a razão de 100% de mortes (MENEZES *et al*, 2000).

A pentamidina (**63**) é uma bisamidina altamente flexível e vem sendo bastante usada em pacientes com AIDS (MONTANARI, *et al*, 1998) que apresentam PCP, e que embora prolongue a vida dos pacientes, exibem vários efeitos colaterais. Um outro exemplo de amidinas que apresentam atividade de inibição *in vitro* frente a enzima transcriptase reversa foram os derivados da série N, N'-difeníl-*p*-X-benzamidina, onde o derivado cloro-substituído **64** mostrou a maior a atividade (ECHEVARRIA *et al*, 1996).



1.3.3 Compostos amidínicos com atividade anestésica

Sabe-se desde décadas passadas (SINTOV, *et al*, 1949) que as formamidinas (**65**), juntamente com a benzamidina **66**, que é 7,4 vezes mais potente que a cocaína (**67**), exibem atividade anestésica local (LORZ & BALTAZI, 1949).



1.3.4 Leishmaniose

Leishmaniose é uma infecção parasitária, transmitida ao homem pela fêmea infectada de um inseto pertencente ao gênero flebótomo (CANTO-CAVALHEIRO *et al*, 1997). Este parasita pode existir em duas formas: promastigotas encontrado em vetores, ou amastigotas encontrada em mamíferos (CROFT & COOMBS, 2003).

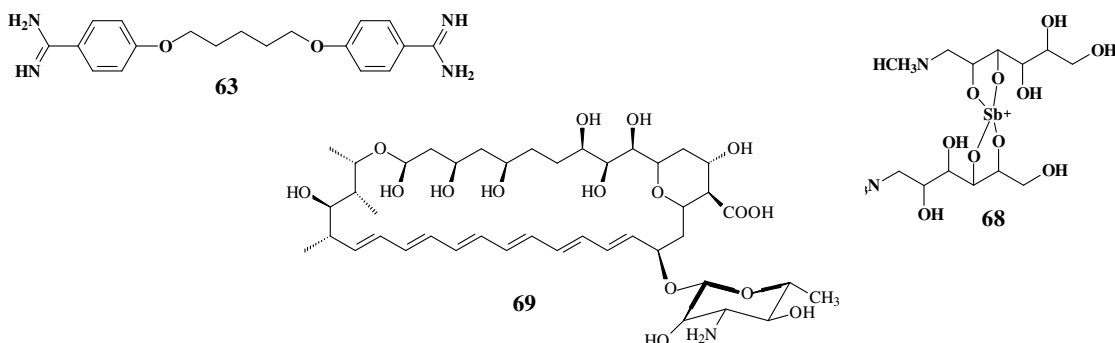
A leishmaniose pode se manifestar de três formas: cutânea, mucocutânea e visceral (CANTO-CAVALHEIRO *et al*, 1997). Em 2002 registrou-se 59.000 casos de mortes causadas por leishmaniose e em 2003 estimou-se que 350.000 pessoas estavam correndo risco de contaminação (CROFT & COOMBS, 2003).

A leishmania americana cutânea é endêmica no Brasil (GEREZ *et al*, 2002) com uma estimativa de 30.000 casos por ano. Existem pelo menos seis espécies do gênero *Leishmania* dermatrópica no Brasil que afetam os homens, sendo que todas estão presentes na região amazônica: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) naifti*. Entre elas a *L. (L.) amazonensis* tem uma importância particular, por ser uma das espécies mais freqüentemente encontrada nos homens (GEREZ *et al*, 2002).

Por muito tempo a leishmaniose era associada à doença ocupacional de trabalhadores florestais, (PETERSON & SHAW, 2003), mas hoje já se sabe que pode ser transmitida em ambientes domésticos como acontece em muitos lugares da América latina, onde as condições de vida são precárias. No vale do rio Jequitinhonha em Minas Gerais, uma das áreas mais pobres do Brasil, há freqüentes surtos de leishmaniose (GONTIJO *et al*, 2002). Mas, a leishmaniose consegue ultrapassar as fronteiras do país, e tem aumentado o número de pessoas infectadas que não habitam em área de risco, como por exemplo, aquelas que vem para América latina fazer turismo e acabam sendo infectadas (ZLOTOGORLSKI *et al*, 1998).

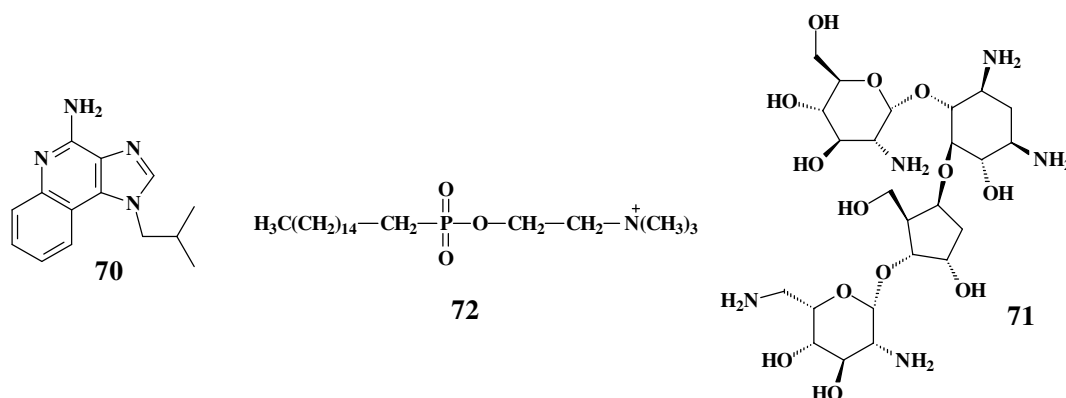
1.3.4.1 Tratamento quimioterápico

A quimioterapia atualmente disponível para o tratamento da leishmaniose está longe de ser satisfatória (CROFT & COOMBS, 2003). Os fármacos de primeira linha de tratamento são compostos antimoniais do tipo antimoniato de meglumina (Glucantima, **68**), que são rapidamente excretadas pelo fígado com praticamente nenhuma acumulação no sangue, porém causam diarreias, náuseas, convulsões e também cardiotoxicidade (PITZER, *et al*, 1998). Os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B (**69**) e a pentamidina (**63**) que também apresentam sérios efeitos colaterais, em particular a pentamidina, que é altamente tóxica.

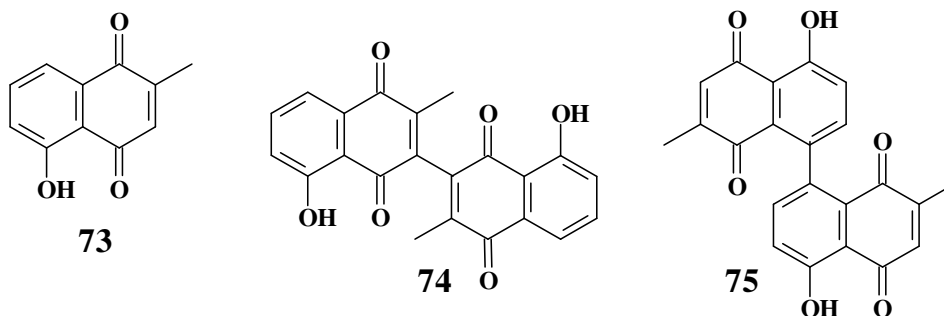


1.3.4.2 Substâncias leishmanicidas em fase pré-clínica e em desenvolvimento

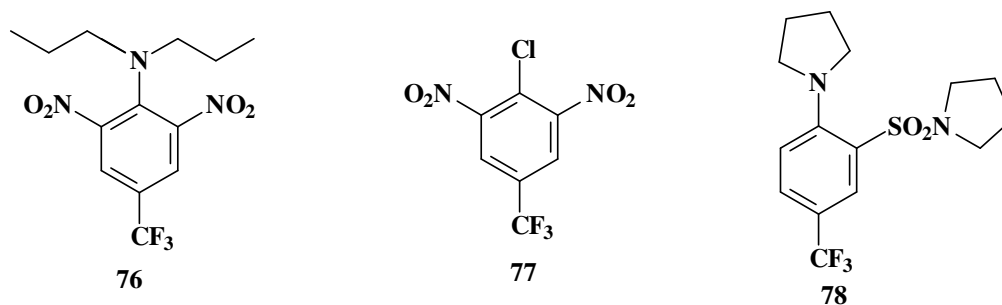
Devido à ineficácia e/ou efeitos adversos dos fármacos utilizados na quimioterapia de leishmaniose, novas substâncias tem sido testadas. É o caso de **70**, **71** e **72** que possuem atividade leishmanicida e se encontram em fase pré-clínica (CROFT & COOMBS, 2003).



A planta boliviana *Peru benesis* é usada na medicina popular no tratamento da leishmaniose. Estudos demonstraram que o extrato clorofórmico dessa planta continha as naftoquinonas **73**, **74** e **75**, que mostraram ótimos resultados quanto à atividade leishmanicida, com especial destaque para o composto **73** (FOURNET *et al*, 1992).



A triflurina (**76**) um herbicida comercial usado nos Estados Unidos desde 1960, juntamente com seu precursor cloralina (**77**) mostraram-se ativos contra *Leishmania amazonensis*. O derivado **78**, obtido a partir de cloralina também apresentou alta atividade leishmanicida *in vitro*, porém nula *in vivo* (PITZER, *et al*, 1998).



Nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores (GOMES-CARDOSO *et al*, 1999; CANTO-CAVALHEIRO *et al*, 1997) relatou que alguns derivados do tipo N,N'-difênil-*p*-X-benzamidínicos (**08**) apresentaram atividade contra *Leshmania amazonensis* e *Trypanossoma evansi* nas formas evolutivas amastigota e promastigota, como mostra o gráfico na figura 14 (CANTO-CAVALHEIRO, 2000). A partir desses resultados observou-se que o derivado *p*-metoxi-substituído apresentava uma atividade antileishmania significativa e promissora nos ensaios realizados *in vitro* e *in vivo* (TEMPORAL *et al*, 2002).

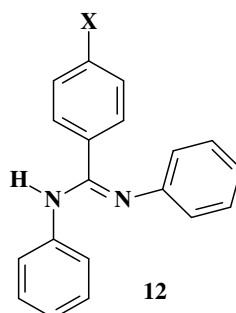


Tabela 04: Atividade leishmanicida da série N,N'-difênil-*p*-X-benzamidina.

Derivados	Promastigotas CI ₅₀ (μM)	Amastigotas CI ₅₀ (μM)
Pentamidina*	0,46 ± 0,08	118 ± 7,31
X = H	628 ± 10	1183 ± 19
X = OCH ₃	14 ± 1,4	280 ± 24
X = Br	22 ± 14	341 ± 39
X = NO ₂	28 ± 3	417 ± 9
X = CN	263 ± 18	> 1700
X = Cl	41 ± 26	888 ± 9
X = CH ₃	285 ± 23	1277 ± 18

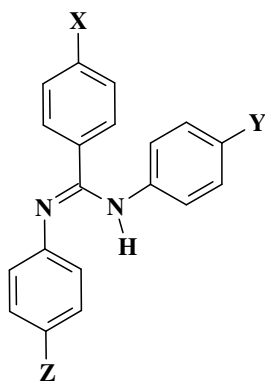
* Controle

Tendo em vista a relevância dos resultados obtidos para o derivado N,N'-difênil-*p*-metoxi-benzamidina, neste trabalho decidiu-se adicionar o grupo metoxila em outros anéis aromáticos com intuito de elevar a atividade anti-leishmania.

2. OBJETIVOS

Diante da importância da busca de substâncias com atividade anti-leishmania, este trabalho tem como principais objetivos:

- Sintetizar novos derivados da série N,N'-diarilbenzamidinas *p*-metoxi-substituídos nas formas neutras e salinas.



- 83** X=Y=Z = H
- 84** X=OCH₃, Y= Z = H
- 85** X=Y= H, Z=OCH₃
- 86** X=Y=OCH₃, Z=H
- 87** X= H, Y=Z=OCH₃
- 88** X=Y=Z =OCH₃

- Sintetizar o derivado N-(4-nitro-fenil),N'-fenilbenzamidina (**89**) para estudo de tautomerismo
- Caracterizar os derivados por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ¹³C e ¹H (1D 2D).
- Realizar um estudo do tautomerismo e isomerismo para os derivados **85** e **89**, através de técnicas espectroscópicas RMN e modelagem molecular.
- Determinar os valores de pKa (s) para as amidinas sintetizadas.
- Avaliar a atividade *in vitro* frente de *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania chagasi*, na forma promastigota.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipamentos e Materiais

3.1.1 Equipamentos

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro da Bruker, modelo AC 200 (200 MHz para ^1H e 50,3 MHz para ^{13}C) e JEOL – 400 (400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C) utilizando DMSO- d_6 ou CDCl_3 como solventes.

Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro Nicolet, modelo FTIR-740, em pastilhas de KBr.

Os pontos de fusão foram determinados utilizando um aparelho da marca QUIMIS e não foram corrigidos.

Os cálculos de modelagem molecular foram realizado em um microcomputador AMD-ATLON 1,25 GHz.

Os pKa (s) foram determinados utilizado-se o potenciômetro da Metrom-Herisau modelo E 536 acoplado a bureta automática Dosimatic 665 com agitador magnético E 549.

O microondas utilizado foi da marca Cònsul frequência de 2450 MHz.

Saturn CG/MS coluna de CP-SIL8CB (30m x 25 x 25mm) Temperatura 200° C/10minutos –290 ° C/20minutos.

3.1.2 Materiais

3.1.2.1 Vidrarias

Balões de fundo redondo

- | | | | |
|-----------------|--------------------|------------------|------------------------|
| . Provetas | . Béquer | . Funis de vidro | . Adaptadores |
| . Condensadores | . Bastões de vidro | . Pipetas | . Pipetas volumétricas |

3.1.2.2 Solventes utilizados

Os principais solventes utilizados foram: metanol, tolueno, acetona, clorofórmio e piridina.

Todos os solventes utilizados foram de grau P. A. provenientes da Vetec ou do grupo Química.

O tolueno foi purificado por destilação fracionada à pressão normal a 110°C (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1972).

3.1.2.3 Reagentes

- . NaOH (Vetec)
- . Anilina (Aldrich)
- . *p*-Metoxi-anilina (Aldrich)
- . Ácido anísico (Aldrich)
- . Cloreto de benzoíla (Merck)
- . Cloreto de tionila (Merck)
- . PCl₅ (Merck)

3.1.2.4 Purificação dos Reagentes

Cloreto de tionila

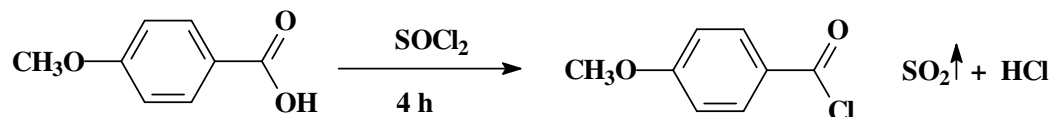
Foi purificado por destilação fracionada à pressão normal a 78 °C (VOGEL, 1986).

Anilina

Anilina foi submetida a refluxo com Zn em pó por 2 horas, e posteriormente destilada a pressão normal, em 184 °C (VOGEL, 1986).

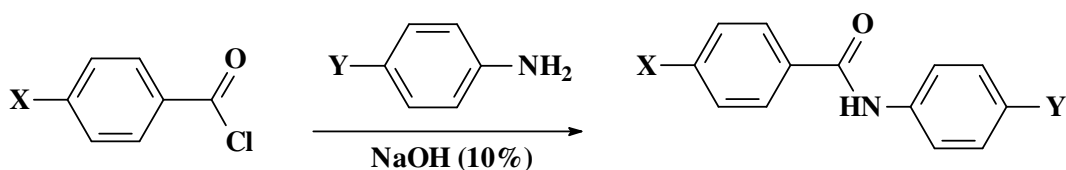
3.2 Sínteses

3.2.1 Síntese do cloreto de *p*-metoxibenzoíla



Misturam-se 0,07 mol de ácido *p*-metoxibenzóico com 0,12 mol de cloreto de tionila redestilado, sob refluxo com agitação magnética em banho de óleo por 4 horas (VOGEL, 1956), através de cromatografia em camada fina foi verificado o término da reação, eluindo-se em hexano/acetato em uma proporção de 6:4. A solução foi submetida à destilação para retirada do excesso de cloreto de tionila, originando o cheiro característico de cloreto de ácido. O rendimento obtido foi de 85%.

3.2.2 Síntese das anilidas



- 79** X = Y = H
80 X = OCH₃, Y = H
81 X = H, Y = OCH₃
82 X = Y = OCH₃

Dissolveram-se 0,06 mol de anilina recém destilada em 45 ml de solução de hidróxido de sódio a 10% (p/v). A esta solução, mantida sob agitação, adicionou-se aos poucos 0,03 mol dos respectivos cloretos de ácido. Agitou-se a mistura em um erlenmeyer fechado por cerca de 30-45 minutos, através do monitoramento em cromatografia em camada fina foi verificado o término da reação, eluindo-se em hexano/acetato em uma proporção de 7:3. Após este tempo o odor característico não era mais perceptível. O precipitado foi filtrado e o produto recristalizado em metanol. Os rendimentos e os pontos de fusão obtidos estão na tabela 05.

Tabela 05: Rendimentos e pontos de fusão das anilidas.

Código	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
79	89	163-166 ^a
80	90	169-171
81	85	155-158
82	87	200-202

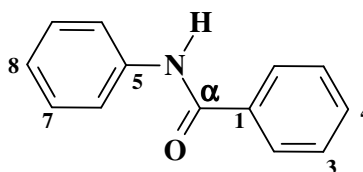
^aVOGEL, (1951): 163 °C.

3.2.2.1 Caracterização das anilidas

N-fenilbenzanilida (79)

Rendimento: 89 %

PF: 163-166 °C



IV (cm⁻¹): 3342 (N-H); 1655 (C=O); 3047 (C-H, aromático); 1529 (C-N); 750 e 713 (C-H, 5H vizinhos).

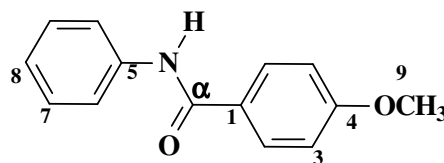
RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,92 (2H₂; d; J = 6,46 Hz); 7,51 (3H₃; t; J = 7,16 e 7,18 Hz); 7,75 (2H₆; d; J = 7,88 Hz); 7,32 (2H₇; t; J = 7,54 e 7,88 Hz); 7,06 (1H₈; t; J = 7,54 e 7,88 Hz); 10,22 (1H; s; N-H).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 135,05 (C₁); 128,62 (C₂); 128,38 (C₃); 131,53 (C₄); 139,24 (C₅); 120,40 (C₆); 127,93 (C₇); 123,68 (C₈); 165,62 (C_α).

N-fenil-*p*-metoxibenzanilida (80)

Rendimento: 90 %

PF: 169-170 °C

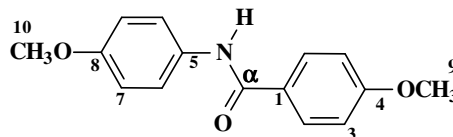


IV (cm⁻¹): 3350 (N-H); 1655 (C=O); 3047 (C-H, aromático); 1522 (C-N); 1601 (C-H, aromático); 1248 (C-O-C); 755 (C-H, 5H aromático).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,93 (2H₂; d; J = 8,3 Hz); 7,03 (2H₃; d; J = 8,83 Hz); 7,74 (2H₆; d; J = 7,80 Hz); 7,31 (3H_{7, 8}; t; J = 7,58); 3,81 (3H₉; s); 10,07 (1H; s; N-H).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 129,90 (C₁); 128,63 (C₂); 113,65 (C₃); 161,96 (C₄); 139,43 (C₅); 120,40 (C₆); 127,08 (C₇); 123,51 (C₈); 165,01 (C_α); 55,43 (C₉).

N-*p*-metoxifenil-*p*-metoxibenzanilida (82)



Rendimento: 87 %

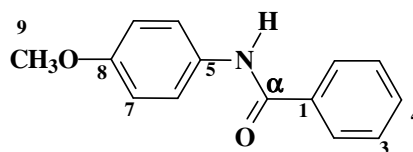
PF: 200-202 °C

IV (cm⁻¹): 3320 (N-H); 1646 (C=O); 3050 (C-H, aromático); 1605 (C-N); 1513 (C-H, aromático); 1248 (C-O-C); 1027 (C-O-C).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,91 (2H₂; d; *J* = 8,34 Hz); 7,01 (2H₃; d; *J* = 8,34 Hz); 7,62 (2H₆; d; *J* = 8,36 Hz); 6,88 (2H₈; t; *J* = 8,34); 3,81 (3H₉; s); 3,79 (3H₁₀; s); 9,94 (1H; s; N-H).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 127,10 (C₁); 131,70 (C₂); 113,65 (C₃); 161,80 (C₄); 132,41 (C₅); 122,01 (C₆); 113,65 (C₇); 155,46 (C₈); 164,60 (C_□); 55,42 (C₉); 55,20 (C₁₀).

N-*p*-metoxifenilbenzanilida (81)



Rendimento: 85 %

PF: 155-158 °C

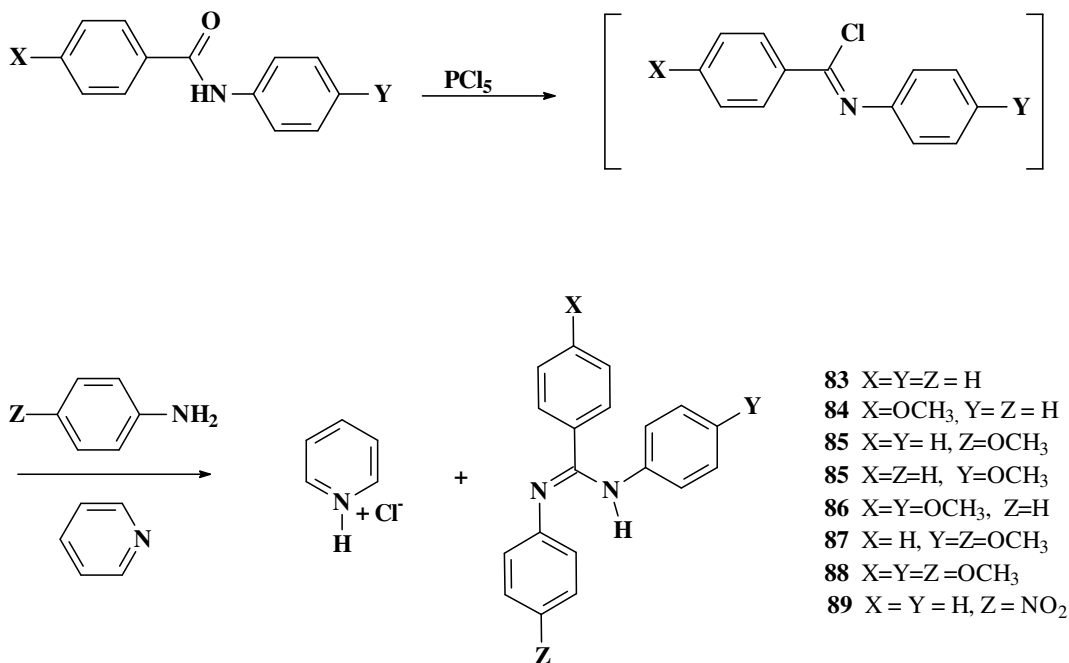
IV (cm⁻¹): 3330 (N-H); 1647 (C=O); 3045 (C-H, aromático); 2960 (CH₃); 1577 (C-N); 1518 (C-H, aromático); 1247 (C-O-C); 1029 (C-O-C).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,92 (2H₂; d; *J* = 6,54 Hz); 7,51 (3H_{3,4}; d; *J* = 7,02 Hz); 7,65 (2H₆; d; *J* = 8,48 Hz); 6,90 (2H₇; t; *J* = 8,48); 3,72 (3H; s); 10,13 (1H; s; N-H).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 135,15 (C₁); 128,45 (C₂); 127,66 (C₃); 131,48 (C₄); 132,30 (C₅); 122,17 (C₆); 113,83 (C₇); 155,71 (C₈); 165,32 (C_□); 55,21 (C₉).

3.2.3 Síntese das amidinas

3.2.3.1 Método A: Em meio seco



Misturou-se 0,013 mol de pentacloreto de fósforo com 0,013 mol da anilida correspondente, sob agitação magnética em banho de óleo a temperatura de 110°C por cerca de 45 minutos (SANTOS, 1993). Após este tempo a temperatura foi elevada à 160°C por cerca 3 horas, até cessar a evolução de HCl.

Adicionou-se lentamente à mistura, através de um funil de adição, 0,013 mol de anilina correspondente e 0,014 mol de piridina, também recém destilada. A mistura continuou sendo aquecida até o desaparecimento da coloração vermelha. O sólido obtido foi filtrado e tratado com solução de amônia sob leve aquecimento e agitação magnética por cerca de duas horas. Após este tratamento o produto foi submetido a lavagens sucessivas com a acetona (tabela 05), sendo verificado sua pureza por cromatografia em camada fina utilizando hexano/acetado em uma proporção de 7:3.

3.2.3.2 Método B: Em tolueno sob refluxo

Uma mistura de benzanilida (0,5g, 2,25 mmol) e pentacloreto de fósforo (0,5g, 2,4 mmol) em tolueno seco foi refluxada por aproximadamente 8 horas sob atmosfera inerte, dando um óleo bruto de coloração castanha (FATHALLA & PAZDERA, 2002). Este óleo foi adicionado aos poucos a uma solução contendo anilina, devidamente substituída, em tolueno sob refluxo em atmosfera inerte onde permaneceram por 6 horas. Logo após foi obtido um precipitado, sendo filtrado à vácuo.

A purificação do produto foi feita através de lavagens sucessivas com acetona, sendo assim obtido o derivado purificado. Em seguida, o sólido foi submetido a agitação magnética em meio de NaHCO₃ (10% p/v) por volta de 4 horas, com exceção do produto **88** que permaneceu por aproximadamente 24 horas, sendo posteriormente extraído com CH₂Cl₂. Os rendimentos obtidos encontram-se na tabela 06.

Tabela 06: Rendimentos das amidinas.

Código	Rendimento da metodologia B (%)	Rendimento da metodologia A (%)
83	65	87
83	-	69 ^a
83	-	71 ^b
83	-	88 ^c
85	45	-
85^d	89	-
84	92	-
87	60	63
86	65	-
88	70	-
89	82	-

^a Com uso de SOCl₂ ao invés do PCl₅.

^b Com uso de 2 mols de anilina.

^c A mistura reacional da anilida com PCl₅ permaneceu por 10 horas.

^d Amidina obtida a partir da N-*p*-metoxi-fenilbenzanilida (**81**)

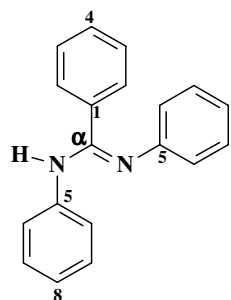
3.2.3.3 Método C: Síntese das amidinas sob irradiação de microondas

Juntou-se 0,2 g (1,3 mmol) de **81** com 0,12 ml (1,3 mmol) de anilina recém destilada e gel de sílica ativada (seca em estufa a mais ou menos 150° C por 3 horas) em um becher. Tampou-se o becher com vidro de relógio, e em seguida foi colocado em pirex com tampa, e levado ao microondas, deixando-se por um período de 15 minutos (RODRIGUES-SANTOS *et al*, 2000).

A extração do produto foi feita com CH₂Cl₂. Em seguida, usou-se acetona e depois, metanol, deixando por 2 horas em banho de ultra-som. A formação do produto foi observada através da comparação com o Rf de uma amostra pura, anteriormente preparada, por cromatografia em camada fina.

3.2.3.4 Caracterização das amidinas

N,N'-difenilbenzamidina:



Rendimento: 87 %

PF: 138-140 °C

IV (cm⁻¹): 3293 (N-H); 1587 (C=N); 3055

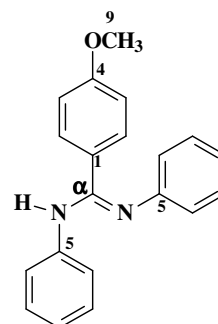
(C-H, aromático); 1531 (C-N); (CH₃); 754 e 696 (5H vizinho).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ): 7.81 (2H₂; sl); 7.32 (2H₃; sl); 6.62 (1H₄; sl); 7.30 (2H₆; sl); 7.13 (3H_{7,8}; sl); 9.35 (N-H, s).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 133,11 (C₁); 131,59 (C₂); 128,80 (C₃); 130,50 (C₄); 136,26 (C₅); 120,56 (C₆); 127,01 (C₇); 124,02 (C₈); 161,07 (C_□).

EM (m/z): 272 (M⁺; 15%); 180 (100%); 77 (27%); 51 (15%).

N,N'-difenil-*p*-metoxibenzamidina (84)



Rendimento: 87 %

PF: 133-134 °C

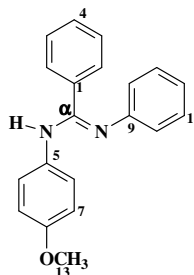
IV (cm⁻¹): 3312 (N-H); 2927 (CH₃); 2835 (C-H, CH₃); 1627 (C=N); 1591 (aromático); 1533 (C-N); 1252 (C-O-C); 1030 (C-O-C); 789 (5H vizinho).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,88 (2H₂; sl); 6,76 (2H₃; sl); 7,23 (4H₃;sl); 7,0 (4H₇; sl); 6,85 (2H₈; sl); 7; 3,68 (3H; s)

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 133,11 (C₁); 128,99 (C₂); 114,25 (C₃); 160,43 (C₄); 136,45 (C₅); 120,34 (C₆); 126,86 (C₇); 124,38 (C₈); 163,50 (C_□); 55,81 (C₉).

EM (m/z): 302 (M⁺; 13%); 286 (1%); 210 (100%); 77 (15%); 51 (9%).

N-(*p*-metoxi-fenil)-N'-fenilbenzamidina (85)



Rendimento: 80 %

PF: 110-111 °C

IV (cm⁻¹): 2935 (CH₃); 2839 (C-H, CH₃)

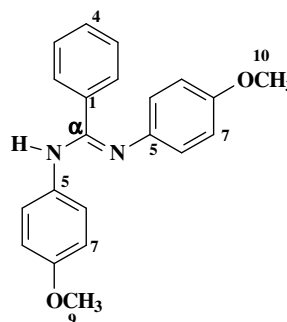
1632 (C=N); 1513 (aromático); 1242 (C-O-C); 1026 (C-O-C); 730 e 639 (5H vizinho).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 400 MHz, δ): 7,83 (2H₂; sl); 7,30 (2H₃); 6,74 (1H₄; sl); 7,30 (2H₆; s); 6,57 (2H₇; s); 7,02 (2H₁₀; s); 6,86 (3H_{11,12}; sl); 3,70/3,63 (3H₁₃).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 133,08 (C₁); 130,59 (C₂); 128,68 (C₃); 132,35 (C₄); 114,19 (C₇); 158,10 (C₈); 122,28 (C₁₀); 126,86 (C₁₁); 125,01 (C₁₂); 161,95 (C_□); 55,45 (C₁₃).

EM (m/z): 302 (M⁺; 50%); 286 (1%); 210 (100%); 180 (75%); 77 (32%); 51 (16%).

N,N'-*p*-dimetoxidifenilbenzamidina (87)



Rendimento: 60 %

PF: 119-120 °C

IV (cm⁻¹): 3352 (N-H); 3055 (C-H; aromático);

2933 (C-H; CH₃); 2834 (C-H, CH₃); 1625 (C=N); 1505 (C-H; aromático); 1241 (C-O-C); 1032 (C-O-C); 831 (C-H; 2H vizinho).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,39 (2H₂; sl); 6,96 (3H_{3,4}; sl); 7,28 (2H₆; d; *J* = 7,0 Hz); 6,76 (2H₇; d; *J* = 7,56 Hz); 3,74 (6H;s).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 136,02 (C₁); 128,65 (C₂); 126,83 (C₃); 130,32 (C₄); 132,32 (C₅); 121,10 (C₆); 113,97 (C₇); 157,88 (C₈ e C₁₂); 162,46 (C_□); 55,42 (C₉ e C₁₀).

EM (m/z): 332 (M⁺; 33%); 210 (100%); 77 (10%); 51 (5%).

N-(*p*-metoxi-fenil)-N'-fenil-*p*-metoxibenzamidina (86)

Rendimento: 65 %

PF: 45-50 °C

IV (cm⁻¹): 3334 (N-H); 3037 (C-H; aromático);

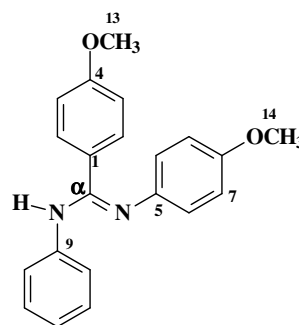
2950 (C-H; CH₃); 2833 (C-H, CH₃); 1626 (C=N);

1592 (C-H; aromático); 1533 (C-N); 1505 (C-H, aromático); 1244 (C-O-C); 1030 (C-O-C); 832 (C-H; 2H vizinho).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,76 (2H₂; d; *J* = 6,06Hz); 6,53 (2H₃; d; *J* = 5,36 Hz); 7,18 (2H₆; d; *J* = 7,92 Hz); 6,82 (2H₇; d; *J* = 8,16 Hz); 7,02 (2H₁₀); 6,74 (3H_{11, 12}; sl); 3,69 (6H_{13, 14}; s); 8,95 (N-H; s).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 130,57 (C₁); 128,36 (C₂); 113,62 (C₃ e C₇); 159,59 (C₄); 121,23 (C₆); 154,41 (C₈); 119,56 (C₁₀); 127,24 (C₁₁); 122,23 (C₁₂); 55,15 (C₁₃ e C₁₄).

EM (m/z): 332 (M⁺; 47%); 240 (100%); 211 (90%); 77 (21%); 51 (11%).



N,N'-*p*-dimetoxidifenil-*p*-metoxibenzamidina (88)

Rendimento: 70 %

PF: 119 – 121 °C

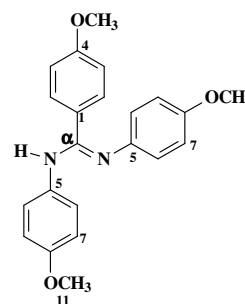
IV (cm⁻¹): 3414 (N-H), 3065 (C-H, aromático);

2837 (C-H, CH₃); 1606 (N=C); 1551 (N-C); 1512 (C-H, aromático); 1458 (C-H, aromático); 1253 (C-O-C); 1027 (C-O-C).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,62 (2H₂; d; *J* = 7,88Hz); 7,15 (4H₆; d; *J* = 8,82 Hz); 6,82 (4H₇; d; *J* = 8,58 Hz); 6,69 (2H₃; sl).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 126,65 (C₁); 128,38 (C₂); 114,16 (C₃); 161,95 (C₄); 132,71 (C₅); 119,89 (C₆); 114,16 (C₇); 157,73 (C₈); 55,72 (C₉); 55,42 (C₁₀).

EM (m/z): 362 (M⁺; 100%); 241 (100%); 226 (30%); 197 (10%); 123 (15%); 77 (27%).



N-(*p*-nitro-fenil)-N'-fenilbenzamidina (89)

Rendimento: 80 %

PF: 185-187 °C

IV (cm⁻¹): 3351 (N-H); 3059

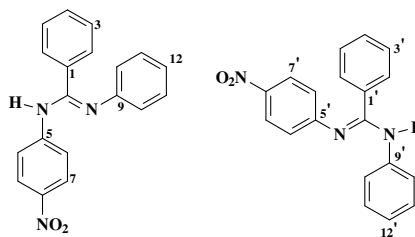
(C-H, aromático); 1630 (C=N); 1528 (C-N);

1491 (C-H; aromático); 750 e 697 (5H vizinho).

RMN ¹H (DMSO-d₆, 200 MHz, δ): 7,90 (2H₇; d; *J* = 9,96 Hz); 6,72 (2H₆; d; *J* = 8,96 Hz); 7,31 (5H_{10, 3, 4}; d; *J* = 7,83 e 10,45 Hz); 7,76 (2H₂; d; *J* = 7,54 Hz); 7,02 (2H₁₁; d; *J* = 7,54 Hz); 6,60 (1H₁₂; d; *J* = 7,54 Hz); 9,63 e 9,91 (1H; N-H).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, 50,3 MHz, δ): 133,87 (C₁); 128,98 (C₂); 128,38 (C₃); 129,80 (C₄); 155,61 (C₅); 154,67 (C_{5'}); 119,04 (C₆); 118,70 (C_{6'}); 124,68 (C₇); 124,47 (C_{7'}); 149,61 (C₈); 147,58 (C_{8'}); 140,87 (C₉); 140,51 (C_{9'}); 120,16 (C₁₀); 128,47 (C₁₁); 122,74 (C₁₂); 122,01 (C_{12'}); 158,10 (C_□).

EM (m/z): 317 (M⁺; 12%); 302 (17%); 180 (73%); 77 (10%); 51 (6%).



3.3 Determinação dos pKa (s)

O método utilizado foi o potenciômetro. As soluções preparadas com as amidinas foram tituladas potenciométricamente, utilizando-se como titulante uma solução padronizada de HCl, e a curva de titulação foi obtida pelo potenciômetro.

3.3.1 Soluções

Foram preparadas soluções das amidinas em metanol grau P. A. na concentração de 0,0265 M, utilizando-se balões volumétricos de 5 ml. A solução de HCl como titulante, foi padronizada potenciométricamente contra tetraborato de sódio decahidratado como padrão primário. A molaridade obtida para o HCl foi de $0,0432 \pm 0,001$ M.

3.3.2 Procedimento

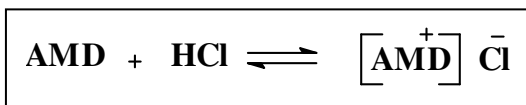
Foram pipetados 1 ml de solução metanólica das amidinas com concentração 0,0265 M, e transferidos para os respectivos bechers, aos quais foram adicionados mais 20 ml de MeOH e 20 ml de H₂O (utilizando pipetas volumétricas).

Estas novas soluções foram tituladas potenciométricamente com HCl e as curvas registradas em potenciômetro. Este procedimento foi repetido por três vezes para cada solução inicial das amidinas.

Através dos gráficos obtivemos os valores do pH (s) nos pontos de inflexão das curvas de titulação. Foram também lidos os volumes de HCl gastos nos pontos de equivalência para cada solução de amidina, com estes valores foram calculados os pKa (s), mostrados na tabela 06.

3.3.3 Cálculos

Reação:



No ponto de equivalência temos:

$$[\text{AMD}^+] \bar{\text{Cl}} = \frac{n\text{AMD}_0 - n \text{AMD}^+ \bar{\text{Cl}}}{V_t}$$

$n\text{AMD}_0$: número de mols inicial da amidina

$n\text{AMD}^+ \bar{\text{Cl}}$: número de mols do sal formado

$[\text{AMD}^+] \bar{\text{Cl}}$: concentração molar de sal

V_t : volume total (volume inicial a ser titulado mais volume gasto de HCl)

Os pKa (s) foram calculados utilizando a seguinte equação (OHLWILER, 1976):

$$\text{pH} = 7 - \frac{1}{2} (\text{pK}_b + \log [\text{AMD}^+] \bar{\text{Cl}})$$

pH = pH no ponto de equivalência

$$\text{pKa} = 14 - \text{pK}_b$$

Tabela 07: Valores dos pKa (s) determinados potenciométricamente e dados utilizados para os cálculos.

Derivados	V ^a _{HCl} (ml)	pH ^b	pKa
84	0,73	4,76	8,34 ± 0,3
85	0,77	5,38	7,74 ± 0,06
87	0,72	5,78	8,41 ± 0,2
86	0,78	6,08	8,81 ± 0,3
88	0,88	5,65	8,40 ± 0,04

^aV_{HCl} = valor médio do volume gasto de HCl no ponto de equivalência (obtidos em triplicata).

^bpH = valor médio do pH no ponto de equivalência (obtidos em triplicata).

3.4 Modelagem molecular

Os cálculos de modelagem molecular foram aplicados para a determinação do ΔH_f de tautômeros e isômeros geométricos dos derivados **85** e **89**.

Este trabalho foi realizado em um micro computador pessoal ATHLON 1,25 GHz, sob o sistema operacional Windows 98. Os cálculos foram realizados utilizando o programa Mopac 6,0²² (STEWART, 1989)

Os sistemas foram desenhados no programa Pc Model (programa de mecânica molecular) e gravados como arquivos de extensão .mop, sendo em seguida transportados para a janela do programa Mopac versão 6,0/ Windows 95 para serem efetuados os cálculos. Os métodos semi-empíricos utilizados foram MNDO, AM1 e PM3. As palavras chaves foram:

AM1 ou MNDO ou PM3 estes são os operadores hamiltonianos

POINT = n, define o número de pontos em um caminho de reação.

STEP = n, define o incremento do caminho de uma reação

BONDS, calcula as ordens de ligação entre todos os pares de átomos

VECTORS, para permitir a impressão dos coeficientes dos orbitais

PRECISE, os critérios de otimização da geometria são tornados mais estritos por um fator de 100.

Após as estruturas terem sido otimizadas pelo MOPAC, houve a criação de arquivos de saída MNO e ARC, de onde foram retirados os dados. Os valores de ΔH_f foram fornecidos pelo arquivo MNO. Todas as estruturas possíveis foram calculadas utilizando os três hamiltonianos, MNDO PM3 e AM1, como mostrado nos resultados.

3.4.1 Valores obtidos nos métodos semi-empíricos

Para calcular a entalpia de formação de cada conformero foram realizados giros de 30° variando de 0° a 360° entre o ângulo diedro ω [H-N-C=N] para encontrar a conformação de menor energia para cada tautômero ou isômero geométrico, utilizando os hamiltonianos MNDO, PM3 e AM1.

Os gráficos a seguir mostram e comparam os valores de ΔH_f para as possíveis estruturas utilizando os 3 hamiltonianos, que permitiram escolher o PM3 para a discussão dos resultados.

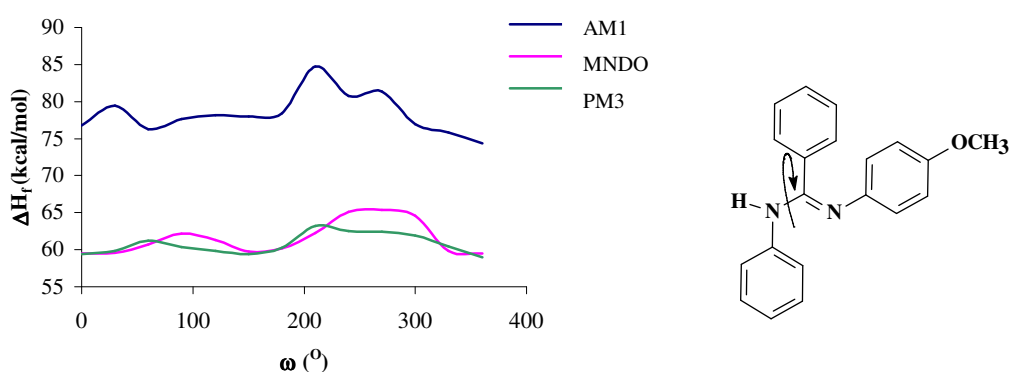


Figura 14: Estudo conformacional do derivado **85 EI** utilizando os 3 hamiltonianos

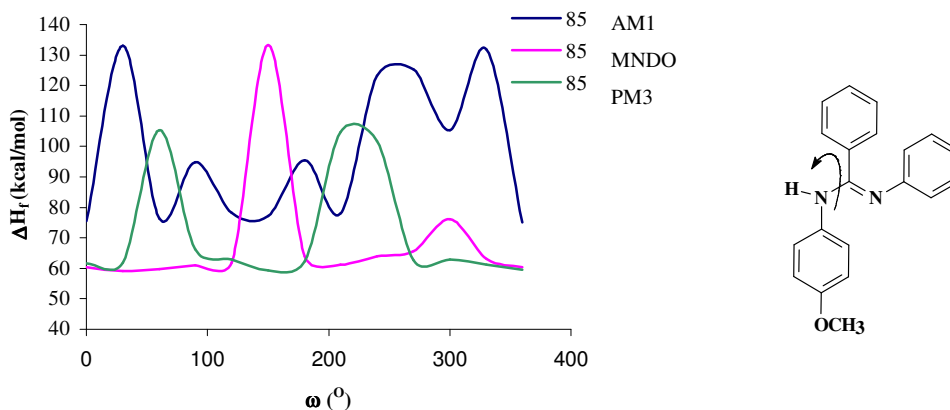


Figura 15: Estudo conformacional do derivado **85 EA** utilizando os 3 hamiltonianos

Legenda:

E = isômero E

A = forma amínica em relação ao substituinte

I = forma imínica em relação ao substituinte

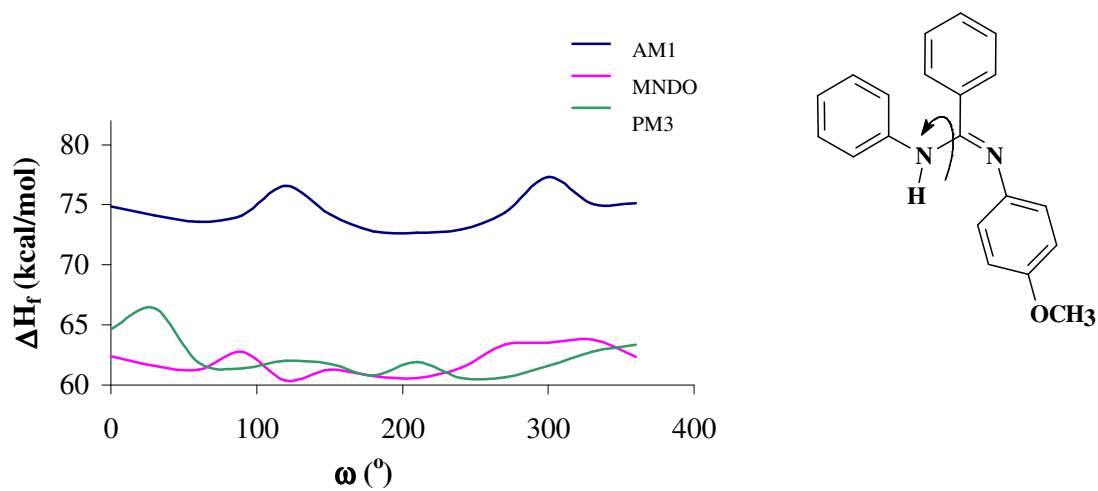


Figura 16: Estudo conformacional do derivado **85 ZI** utilizando os 3 hamiltonianos

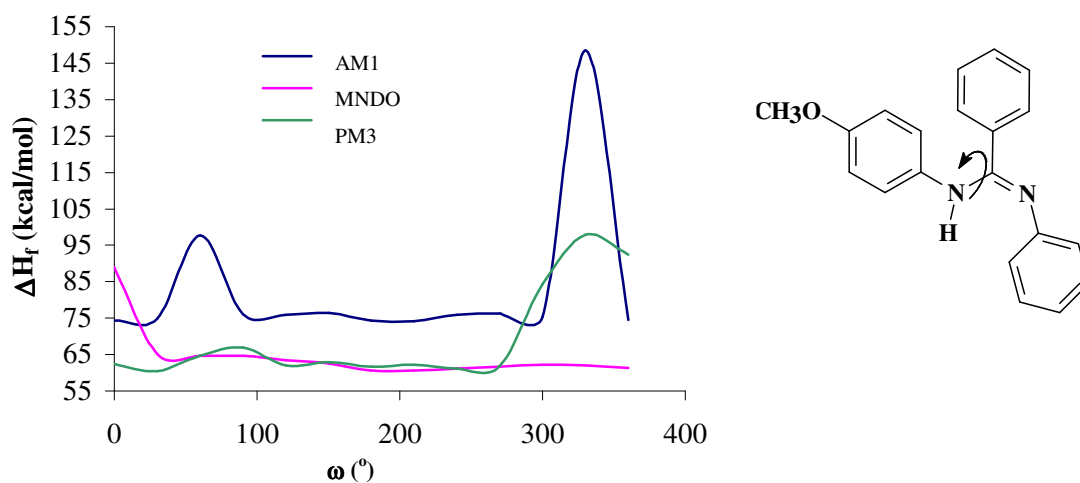


Figura 17: Estudo conformacional do derivado **85 ZA** utilizando os 3 hamiltonianos

Legenda:

Z = isômero Z

A = forma amínica em relação ao substituinte

I = forma imínica em relação ao substituinte

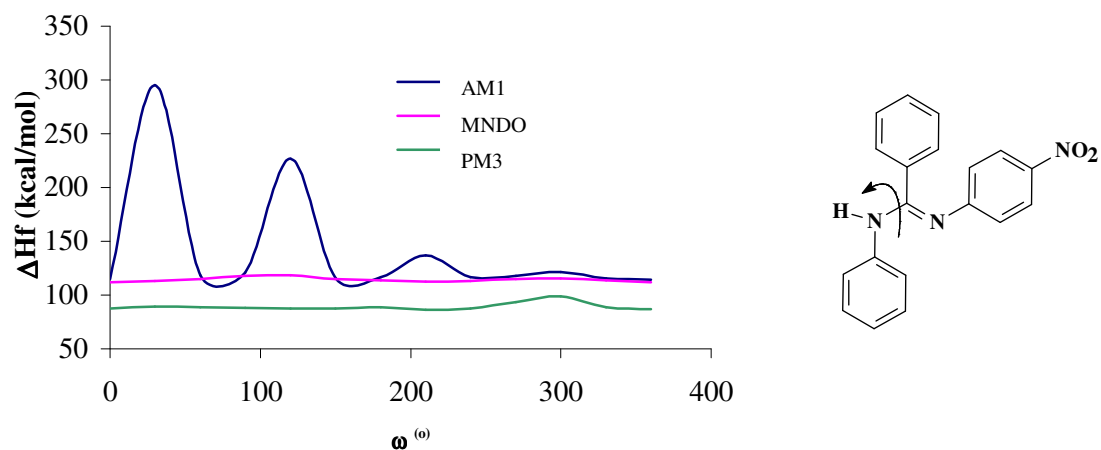


Figura 18: Estudo conformacional do derivado **89 EI** utilizando os 3 hamiltonianos

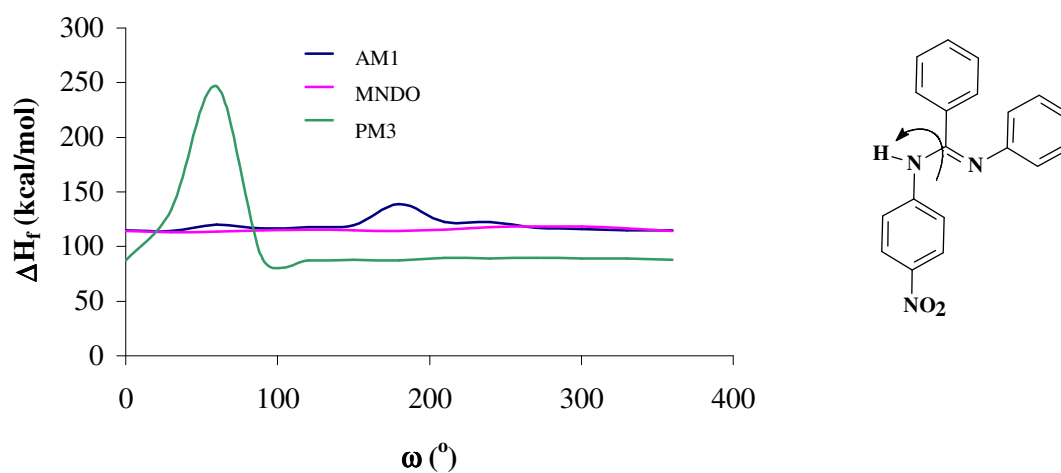


Figura 19: Estudo conformacional do derivado **89 EA** utilizando os 3 hamiltonianos

Legenda:

E = isômero E

I = forma imínica em relação ao substituinte

A = forma amínica em relação ao substituinte

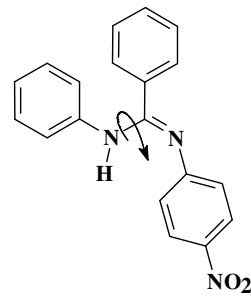
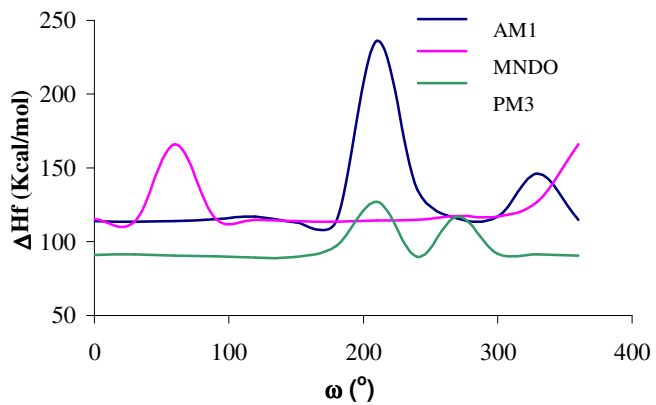


Figura 20: Estudo conformacional do derivado **89 ZI** utilizando os 3 hamiltonianos.

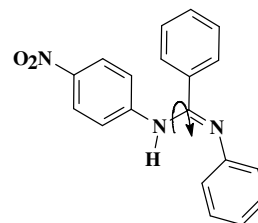
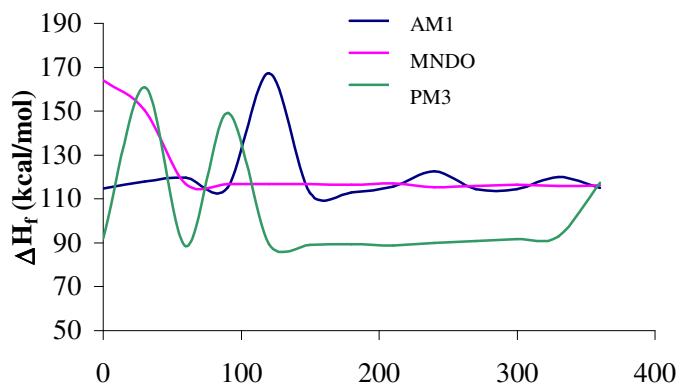


Figura 21: Estudo conformacional do derivado **89 ZA** utilizando os 3 hamiltonianos

Legenda:

Z = isômero Z

A = forma amínica em relação ao substituinte

I = forma imínica em relação ao substituinte

3.5 Atividade anti-leishmania

Os ensaios para a avaliação da atividade anti-leishmania foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, Departamento de Imunologia do Instituto de Oswaldo Cruz. Segue uma breve descrição da metodologia utilizada (GENESTRA *et al*, 2003).

Os derivados amidínicos foram ensaiados frente a *Leishmania amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* na forma evolutiva de promastigotas, em cultura de meio Sheneider em pH 7,2, suplementado com 20 % de soro fetal bovino. As culturas foram incubadas a 32 °C, por 24 horas em atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, os parasitas vivos foram contados em câmara de Neubauer. Todos os derivados foram ensaiados em triplicata.

A concentração que inibe em 50% do crescimento dos parasitas foi calculada através da equação da reta obtida por regressão linear dos valores de log da concentração da substância versus o percentual de parasitas vivos em cada faixa de concentração.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese

Neste trabalho de tese foram sintetizadas 14 benzamidas, sete em forma de sais cloridratos (indicado com a letra *s* após o número do composto) e sete neutras, sendo duas não substituídas (**83s** - **83**), dez N,N'-mono, di e trissubstituídas com grupos metoxila (**84** - **88** e **84s** - **88s**) e duas delas N,N'-mono-nitro-substituídas (**89s** - **89**), onde três delas (**83**, **84** e **85**) já descritas na literatura (ECHEVARRIA *et al*, 1996; RACZYSNKA & OSZCZAPOWICZ, 1985). A escolha da natureza dos substituintes, grupos metoxilas, ocorreu em função dos resultados anteriores para a atividade anti-leishmania, conforme apresentados na Introdução.

A retroanálise utilizada envolveu 4 etapas, figura 22. A seguir serão detalhadas as preparações dos intermediários, anilidas, e das correspondentes amidinas e seus sais.

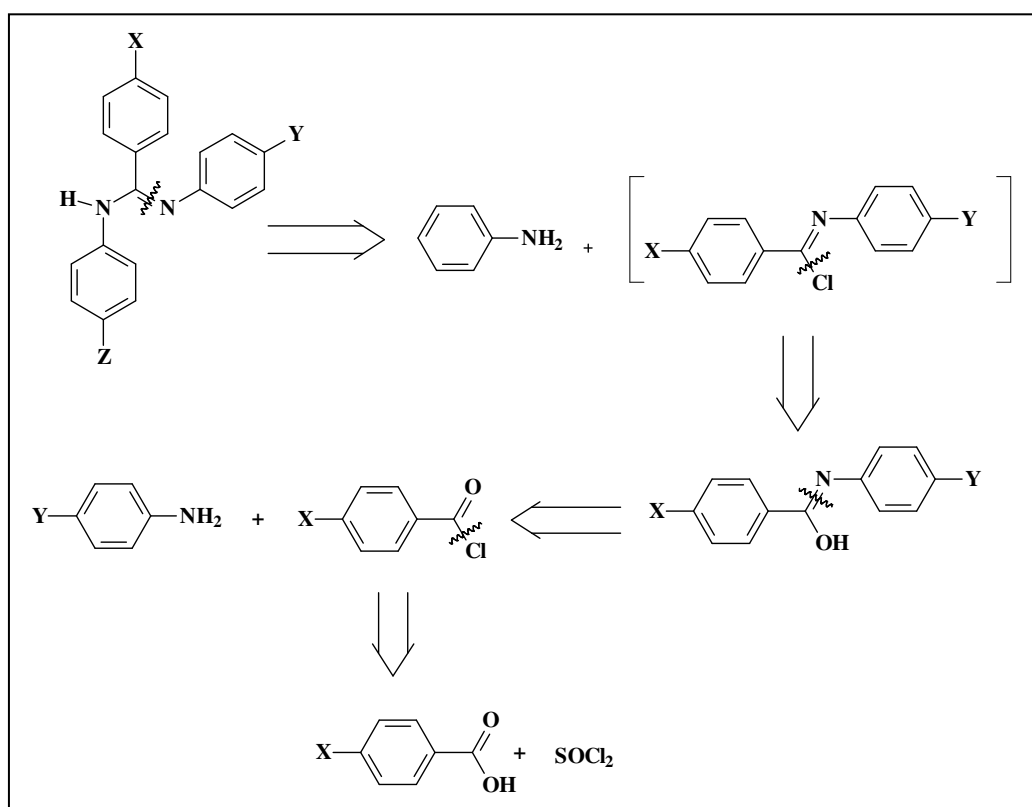


Figura 22: Retroanálise da síntese das amidinas.

4.1.1 Síntese das anilidas

Foram sintetizadas quatro anilidas, com substituintes metoxila nos anéis aromáticos provenientes do ácido benzóico e da anilina correspondentes, como pode ser verificado na figura 23. A metodologia utilizada foi a tradicional, ou seja, a partir dos cloretos de ácido e das anilinas correspondentes.

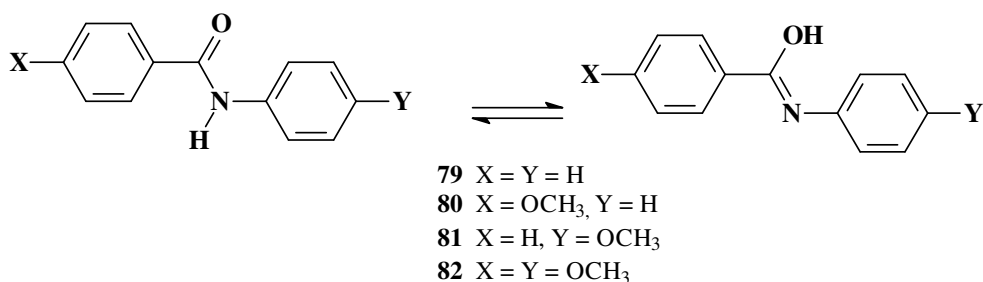


Figura 23: Anilidas sintetizadas.

As anilidas foram obtidas em altos rendimentos (87-90%), como mostra a tabela 08 e recristalizadas em metanol. Os produtos apresentaram-se como cristais em forma de escamas e caracterizados devidamente por ponto de fusão e técnicas espectrométricas de IV e RMN de ¹³C e ¹H, apresentados no item 4.2.

Tabela 08: Rendimentos, pontos de fusão e estiramentos $\nu_{C=O}$ (cm⁻¹).

Código	Rendimento (%)	Pontos de fusão (°C)	$\nu_{C=O}$ (cm ⁻¹)
79	89	163-166*	1655
80	90	169-171	1655
81	85	155-158	1647
82	87	200-202	1646

VOGEL, (1951): 163 °C.

4.1.2 Síntese das amidinas

As amidinas foram preparadas através de duas metodologias, utilizando-se reações em fase sólida (metodologia **A**) e em refluxo (metodologia **B**).

Inicialmente foi preparado o derivado N,N'-difenilbenzamidina (**83**), onde foram testadas várias condições de reação utilizando a metodologia **A**, objetivando encontrar as melhores condições de síntese.

A metodologia **A** envolveu a reação em fase sólida entre a anilida e PCl_5 à 110 °C, fornecendo o intermediário cloreto de imidoíla. Posteriormente, adicionou-se a anilina convenientemente substituída ao meio reacional, contendo o intermediário para gerar a amidina correspondente. Essa metodologia mostrou-se bons rendimentos brutos, porém a purificação das amidinas foi bastante difícil, levando a perda drástica de produto puro.

Com o intuito de otimizar o processo de obtenção das amidinas na metodologia **A**, decidiu-se fazer a substituição do agente halogenante (PCl_5) por SOCl_2 , na etapa de formação do cloreto de imidoíla para preparação do derivado **83**. O resultado foi interessante, obtendo-se um rendimento de 70 % para a amidina, havendo, no entanto, uma diminuição no rendimento em relação ao uso de PCl_5 (87%), mas ainda levando a grande perda na purificação.

Foi também utilizado ainda na metodologia **A**, excesso de 2 mols de anilina para a reação com cloreto de imidoíla. O rendimento após essa modificação foi de 70 %, similar ao obtido quando utilizado SOCl_2 , apresentando as mesmas dificuldades de purificação do produto final.

Como a amidina na metodologia **A**, foi gerada em meio seco (sem solvente), resolveu-se utilizar o forno de microondas, pois com isso seria eliminada a etapa de halogenação de acordo com a figura 24.

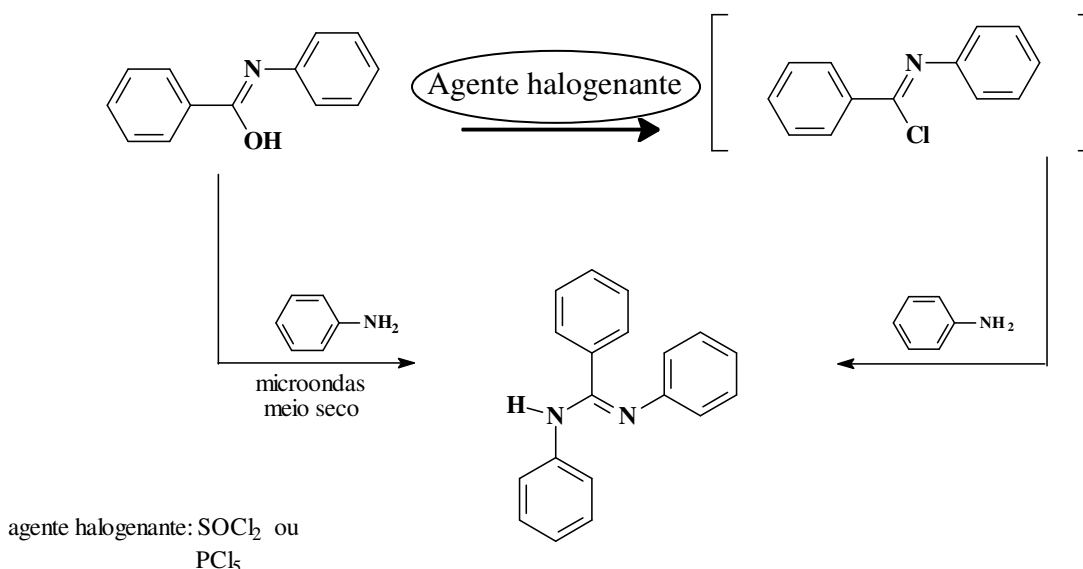


Figura 24: Rotas alternativas da síntese da amidina **83**.

Misturaram-se os reagentes em ausência de solvente, a anilina, a anilida **79** e sílica gel (ativada) como suporte sólido, levando-se à irradiação em forno de microondas. A reação foi monitorada por cromatografia em camada fina, utilizando hexano/acetato 7:3 como eluente, sendo verificado o aparecimento do produto esperado. Observou-se que a amidina **83** estava sendo formada em pequena proporção em relação ao desaparecimento dos reagentes. Assim, foram feitas variações do tempo de reação na tentativa de otimização dos resultados. O produto obtido após 15 minutos de reação sob irradiação de microondas, foi extraído com CH_2Cl_2 , seguido por acetona e metanol. A pureza do produto foi verificada por cromatografia em camada fina onde se confirmou sua formação, através da comparação do R_f com a amostra anteriormente preparada e caracterizada.

O método sob irradiação de microondas não foi eficiente, pois apesar da formação do produto em menor rendimento, houve dificuldades em sua extração do suporte sólido utilizado, tendo sido tentado também o uso de banho de ultra-som.

O método **B** consistiu-se na reação das anilidas e o reagente halogenante em refluxo na presença de solvente. O intermediário cloreto de imidoíla foi gerado a partir da anilida correspondente com leve excesso de PCl_5 , utilizando tolueno seco como solvente em refluxo por 8 horas em atmosfera inerte de N_2 . Logo após, o meio reacional contendo o cloreto de imidoíla foi adicionada a uma solução da anilina correspondente em tolueno seco sob atmosfera de N_2 , sendo refluxada por mais 6 horas.

É interessante destacar que após 40 minutos da adição da anilina sobre a mistura reacional contendo o cloreto de imidoíla pré formado, observou-se o início da precipitação do produto em forma de sal.

As amidinas na forma de cloridratos foram obtidas em bons rendimentos na faixa de 60 a 92 %. A purificação foi realizada através de lavagens sucessivas em acetona, devido à grande insolubilidade desses sais nesse solvente. Assim, as benzamidinas **83s** – **89s** na forma de sais, apresentaram-se como pós amorfos de cor branca e foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C apresentadas no item **4.2**. As correspondentes benzamidinas e suas formas neutras foram obtidas pela desprotonação, realizada em presença de uma solução de NaHCO_3 (10% p/v) em agitação por volta de 4 horas, seguida de uma extração por CH_2Cl_2 . Após a evaporação do CH_2Cl_2 a temperatura ambiente, foram obtidas as benzamidinas neutras em forma de pó de cor amarelo pálido. Essas substâncias foram caracterizadas por ponto de fusão e RMN de ^1H . A tabela 09 mostra os pontos de fusão obtidos para as benzamidinas nas formas de sais e neutras.

Tabela 09: Pontos de fusão das amidinas nas formas de sais e neutras.

Amidinas	P.F (°C)	Amidinas	P.F (°C)
83s	-	83	138 -140
84s	-	84	133 -134
85s	236-237	85	110 -111
86s	244-245	86	45 - 60
87s	236-238	87	119 - 120
88s	248-249	88	120 -122
89s	245-247	89	185 -187

Para o derivado **88s**, trimetoxilado, as condições de desprotonação citadas não foram eficazes, utilizando-se então uma solução de NH₄OH (10% p/v), por ser uma base mais forte, porém houve a formação de uma resina após a extração. Então, voltou-se ao uso da solução de NaHCO₃ (10% p/v) deixando-se por 24 horas sob agitação, sendo possível fazer a extração do produto em sua forma neutra.

Com o objetivo de compreender a facilidade da desprotonação dos derivados **83s** – **87s** quando comparado com o **88s**, realizou-se um estudo de modelagem molecular utilizando o método semi-empírico com o operador hamiltoniano MNDO. Os resultados obtidos para os valores de ΔH_f, considerando a equação abaixo, tabela 10, não mostrou nenhuma diferença significativa de desprotonação do **88s**. Sugerindo-se então que a dificuldade de desprotonação poderia vir do efeito estérico causado pelas três metoxilas.

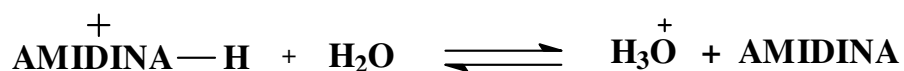


Tabela 10: Dados de ΔH_f (kcal/mol) de desprotonação dos derivados salinos.

Amidinas	ΔH _f (kcal/mol)
83s - 83	59,36
84s - 84	56,84
85s - 85	59,05
86s - 86	56,59
87s - 87	59,96
88s - 88	59,95

O derivado **85**, monometoxilado no anel derivado da anilina, foi obtido partindo-se de duas diferentes anilidas (figura 26), para verificar-se a rota de melhor rendimento.

Partindo-se da anilida **79** (não substituída) gerou-se o cloreto de imidoíla não substituído (**91**) adicionando-se posteriormente a *p*-metoxianilina, fornecendo o **85** em rendimento de 45 %. Utilizando-se a anilida **81**, seguindo a mesma metodologia **B**, adicionou-se após a formação do cloreto de imidoíla correspondente (**90**) a anilina, para fornecer a mesma amidina **85** em 89 % de rendimento. A figura 25 mostra o esquema das reações envolvidas.

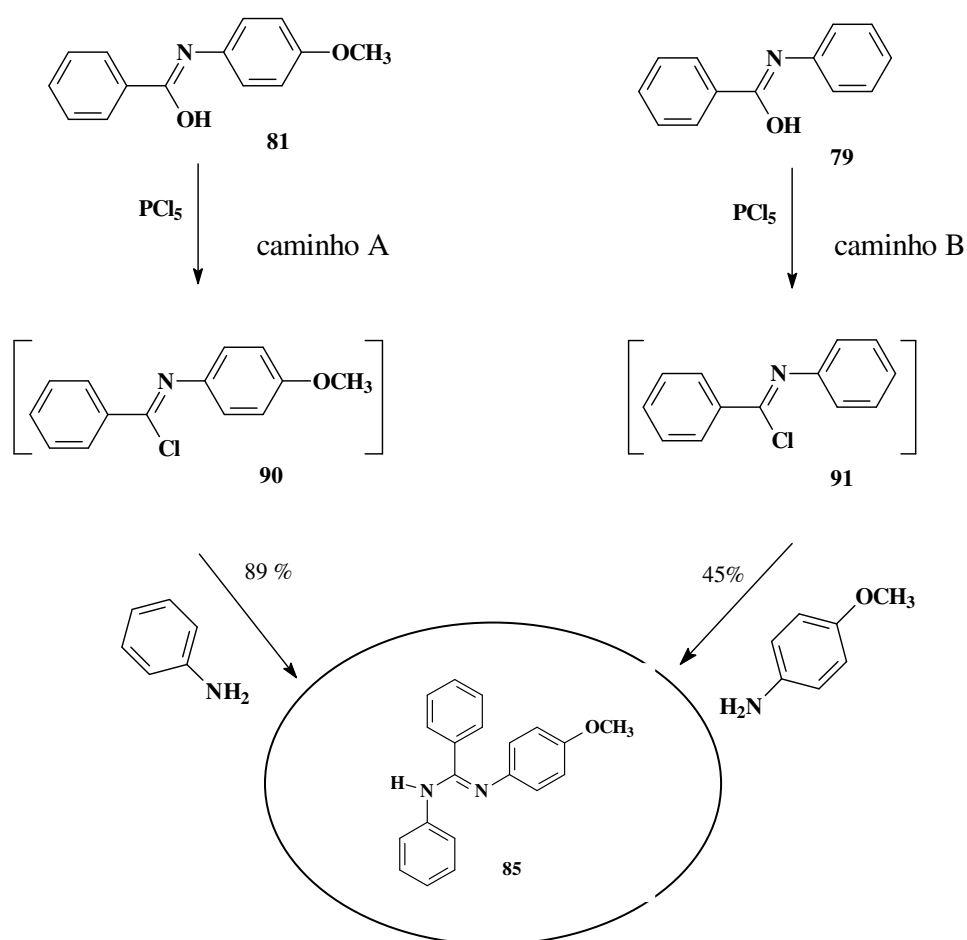


Figura 25: Esquemas das rotas sintéticas utilizadas na etapa de formação da amidina.

Neste caso, também foram utilizados os valores de ΔH_f , obtidos por modelagem molecular usando o hamiltoniano PM3, para tentar justificar as diferenças de rendimentos obtidos entre os caminhos A e B para a obtenção da amidina **85**. A figura 26 ilustra as diferenças de ΔH_f para os dois caminhos de obtenção da amidina.

Como podemos ver na figura 27, o caminho B precisa de 36,02 kcal/mol para obter a amidina **85**, já no caminho A existe uma liberação de $-39,44$ kcal/mol para obter a mesma amidina. Assim, pôde ser sugerido que o caminho A levaria ao produto como maior facilidade, devido à liberação de energia (reação exotérmica) para chegar a amidina, o que foi confirmado experimentalmente devido ao seu alto rendimento.

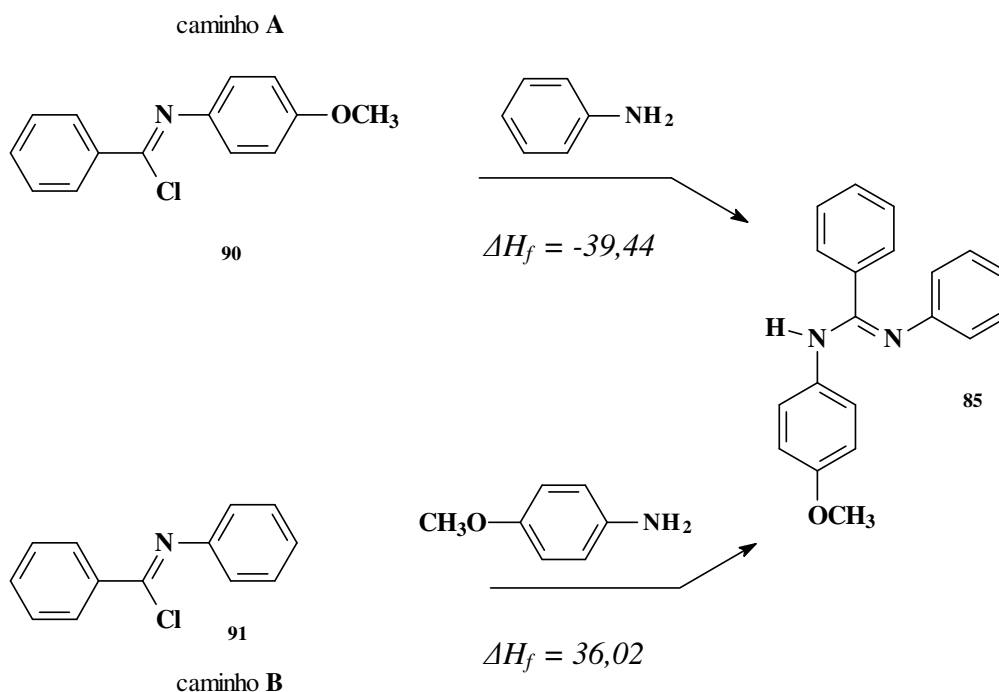


Figura 26: Valores de ΔH_f para as diferentes rotas de obtenção do derivado **85**.

4.2 Análise espectrométrica

4.2.1 Anilidas

A caracterização das anilidas foi feita através da análise dos espectros de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C .

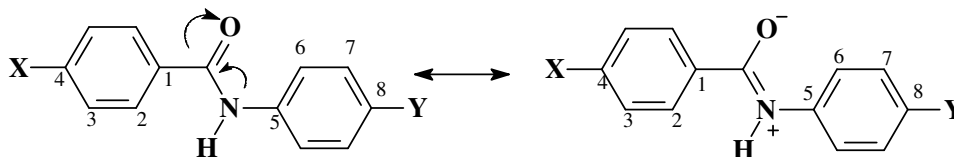
Os espectros na região do infravermelho para as anilidas mostraram absorções características dos grupamentos amida na faixa de 1655 a 1646 cm^{-1} , em função do efeito eletrônico exercido pelo grupo metoxila sobre a natureza da ligação amídica. As demais absorções ocorreram de acordo com os valores esperados, tabela 11.

Tabela 11: Valores de absorção (cm^{-1}) de IV das anilidas.

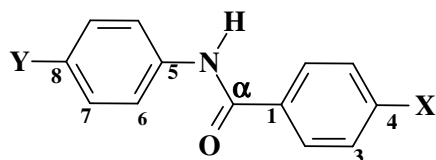
	$\nu_{\text{as}}^{\text{a}} / \nu_{\text{s}}^{\text{b}}$ N-H	ν^{c} C=O	ν^{c} C-H ^d	δ^{e} C-C ^d	ν C-N	$\nu_{\text{as}} / \nu_{\text{s}}$ C-O-C	δ C-H ^d	$\nu_{\text{as}} / \nu_{\text{s}}$ CH ₃
79	3342	1655	3047	1598	1529	-	750/713	-
80	3350	1655	-	1601	1522	1248	755	
81	3330	1646	3045	1577	1518	1247 / 1029	824	2960 / 2836
82	3320	1646	3050	1605	1513	1230 / 1027	822	2954 / 2834

$\nu_{\text{as}}^{\text{a}}$ = deformação assimétrica; $\nu_{\text{s}}^{\text{b}}$ = deformação simétrica; ν^{c} = deformação; ν^{d} aromático; δ^{e} = deformação angular

Os espectros de RMN de ^1H permitiram caracterizar os hidrogênios ligados aos carbonos do anel aromático de todas as anilidas, onde pôde ser verificado um maior deslocamento químico para os hidrogênios ligados ao C₂ devido ao efeito de desblindagem causado pela carbonila. O mesmo efeito ocorreu com os hidrogênios ligados ao C₆, devido ao caráter positivo do nitrogênio em função da ressonância deste com o grupo carbonila.



As demais atribuições foram realizadas com base nas constantes de acoplamento, valores de integrações e nos cálculos de deslocamento químico, tabela 13 (PRETSCH, 1980). Os valores dos deslocamentos químicos RMN de ^1H para as anilidas estão na tabela 12.



- 79** X = Y = H
80 X = OCH₃, Y = H
81 X = H, Y = OCH₃
82 X = Y = OCH₃

Tabela 12: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para as anilidas.

δ H (J em Hz)				
H	79	80	81	82
2	7,92 (2H; d; J = 6,46)	7,93 (2H; d; J = 8,3)	7,92 (2H ₂ ; d; J = 6,54)	7,91 (2H; d; J = 8,34)
3	7,51 (3H; t; J = 7,16 e 7,18)	7,03 (2H; d; J = 8,83)	7,51 (3H; d; J = 7,02)	7,01 (2H;d; J= 8,34)
4	7,51 (3H; t; J = 7,16 e 7,18)	-	7,51 (3H; d; J = 7,02)	-
6	7,75 (2H; d; J = 7,88)	7,74 (2H; d; J = 7,80)	7,65 (2H; d; J = 8,48)	7,01 (2H; d; J = 8,34)
7	7,32 (2H; t; J = 7,54; 7,88)	7,31 (3H; t; J = 7,58)	6,90 (2H; t; J = 8,48)	6,88 (2H; t; J = 8,34)
8	7,06 (1H; t; J = 7,54; 7,88)	7,31 (3H; t; J = 7,58)	-	-
9	-	3,81 (3H; s)	-	3,79 (3H; s)
10	-	-	3,72 (3H; s)	3,81 (3H; s)
N-H	10,22 (1H; s)	10,07 (1H; s)	10,13 (1H; s)	9,94 (1H; s)

Tabela 13: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para as anilidas calculados a partir da literatura (PRETSCH, 1980).

H	δ H			
	79	80	81	82
2	7,87	7,78	7,87	7,78
3	7,36	6,88	7,36	6,88
4	7,43	-	7,43	-
6	7,38	7,38	7,29	7,29
7	7,19	7,19	6,71	6,71
8	6,98	6,98	-	-

As análises dos espectros de RMN de ^{13}C das anilidas, da mesma forma que para os de ^1H , mostraram deslocamentos químicos para os carbonos dependentes dos efeitos eletrônicos. A tabela 14 apresenta os valores dos deslocamentos para os carbonos nos espectros de RMN ^{13}C .

Os carbonos carbonílicos tiveram deslocamentos químicos na faixa de δ 164,59 a 165,65, enquanto que os carbonos dos anéis aromáticos apresentaram os valores esperados de acordo com os efeitos eletrônicos dos grupos substituintes OCH_3 e amida secundária.

Tabela 14: Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^{13}C das anilidas.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C _{α}	C ₉	C ₁₀
79	135,05	128,38	127,93	131,51	139,24	120,56	128,62	123,68	165,65	-	-
80	127,04	129,82	113,55	161,91	139,36	120,40	128,52	123,40	164,98	55,36	-
82	127,10	129,38	113,67	161,80	132,41	122,01	113,67	155,46	164,59	55,20	55,42
81	132,30	128,45	127,66	131,48	135,15	122,17	113,83	155,71	165,32	-	55,21

Tabela 15: Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para as anilidas calculadas a partir do Kalinowski (1988) para a região aromática.

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
79	133,5	129,7	128,6	131,9	138,2	120,4	128,7	124,1
80	125,8	129,7	114,1	159,9	138,2	120,4	128,7	124,1
81	133,5	129,7	128,6	131,9	131,0	121,4	114,3	155,5
82	125,8	129,7	114,1	159,9	131	121,4	114,3	155,5

4.2.2 Amidinas

As análises dos espectros de infravermelho foram bastante informativas, devido ao desaparecimento da banda C=O por volta de 1646 cm^{-1} oriunda das anilidas e, o aparecimento da banda C=N na faixa de $1587\text{ a }1632\text{ cm}^{-1}$ característica do grupamento amidínico (tabela 16).

Tabela 16: Valores de absorção de IV (cm^{-1}) das amidinas

	$\nu_{\text{as}}^{\text{a}} / \nu_{\text{s}}^{\text{b}} \text{ N-H}$	$\nu^{\text{c}} \text{ C=N}$	$\nu^{\text{c}} \text{ C-H}^{\text{d}}$	$\delta^{\text{e}} \text{ C-C}^{\text{d}}$	$\nu \text{ C-N}$	$\nu_{\text{as}} / \nu_{\text{s}} \text{ C-O-C}$	$\delta \text{ C-H}^{\text{d}}$	$\nu_{\text{as}} / \nu_{\text{s}} \text{ CH}_3$
83	3293	1587	3055	-	1531	-	751 / 696	-
84	3312	1627	-	1591	1533	1252 / 1030	789	2927 / 2835
85	-	1632	-	-	1513	1242 / 1026	730 / 639	2935 / 2839
86	3334	1626	3037	1592	1533	1244 / 1030	832	2950 / 2833
87	3352	1625	3055	1505	-	1241 / 1032	831	2933 / 2834
88	3414	1606	3065	1551	1512	1253 / 1027	-	-
89	3351	1630	3059	1491	1528	-	-	-

$\nu_{\text{as}}^{\text{a}}$ = deformação assimétrica; $\nu_{\text{s}}^{\text{b}}$ = deformação simétrica; ν^{c} = deformação; ν^{d} aromático; δ^{e} = deformação angular

Os espectros de RMN foram obtidos para as amidinas na forma neutra em função da melhor resolução dos mesmos.

Os assinalamentos, dos deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C , foram realizados com base nos espectros das anilidas correspondentes. Ao contrário das anilidas, alguns espectros de RMN ^1H não permitiram a atribuição dos deslocamentos de cada hidrogênio na região de absorção dos aromáticos, pois estes apresentaram-se em multipletos, tabela 17. No entanto, a integração dos sinais na região dos hidrogênios aromáticos forneceu a quantidade de hidrogênios presentes, apoiando as estruturas propostas. As amidinas, conforme mencionado na Introdução, apresentam tautomerismo e os derivados **83**, **84**, **87**, **88** tiveram suas atribuições realizadas considerando-se os tautômeros equivalentes. A figura 27 mostra as semelhanças dos hidrogênios e carbonos da região aromática oriunda do tautomerismo prototrópico.

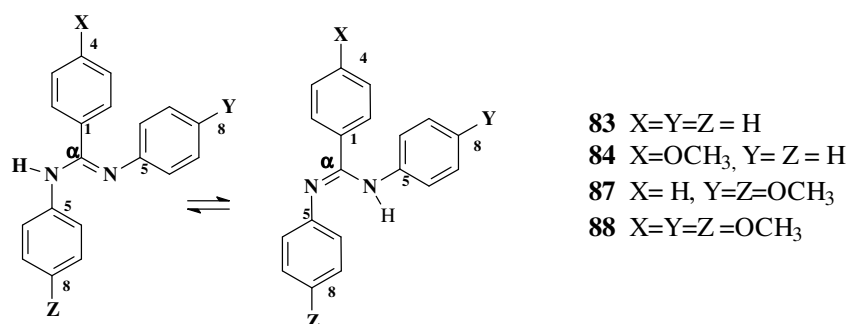


Figura 27: Semelhanças da região aromática em função do tautomerismo prototrópico.

Tabela 17: Deslocamentos químicos de RMN de ^1H para as amidinas.

δ H					
H	83	84	86	87	88
2	7.81 (2H; sl)	7,88 (2H; sl)	7,76 (2H; d; $J = 6,06\text{Hz}$)	7,39 (2H; sl)	7.62 (2H; d; $J = 7.88\text{Hz}$);
3	7.32 (2H; sl)	6,76 (2H, m)	6,53 (2H; d; $J = 5,36\text{ Hz}$)	6,96 (3H; sl)	6.69 (2H; sl)
4	6.62 (1H; sl)	-	-	6,96 (3H; sl)	-
6	7.30 (2H; sl)	7,23 (4H, m)	7,18 (2H; d; $J = 7,92\text{ Hz}$)	7,28 (2H d; $J = 7,0\text{ Hz}$)	7,15 (4H; d; $J = 8.82\text{ Hz}$)
7	7.13 (3H; sl)	7,00 (4H, m)	6,82 (2H; d; $J = 8,16\text{ Hz}$)	6,76 (2H; d; $J = 7,56\text{ Hz}$);	6.82 (4H; d; $J = 8,58\text{ Hz}$)
8	7.13 (3H; sl)	6,85 (2H, m)	-	-	-
10			7,02 (2H; sl)		
11			6,74 (3H; sl)		
12			6,74 (3H; sl)		
13	-	3,68 (3H; s)	(6H; s)	3,74 (6H; s).	
14	-	-	(6H; s);	3,74 (6H; s).	
N-H	9.35 (s).	9,11	8,95 (s)		

Os assinalamentos dos deslocamentos de RMN de ^{13}C para as amidinas foram realizados com base nos respectivos valores para os carbonos das anilidas correspondentes, da mesma forma que para os hidrogênios. A tabela 18 mostra os valores atribuídos para os deslocamentos químicos das amidinas **83-88**.

Observou-se que o efeito eletrônico do grupamento amidínico sobre os carbonos do anel aromático foi menos intenso quando comparado com o grupo amídico levando a menores deslocamentos químicos do que nas respectivas anilidas. Além disso, os carbonos amidínicos (C_{\square}) tornou-se mais blindado (δ 161,07 – 163,5) quando comparado com os carbonílicos ou amídicos das anilidas correspondentes (δ 164,59 – 165,65).

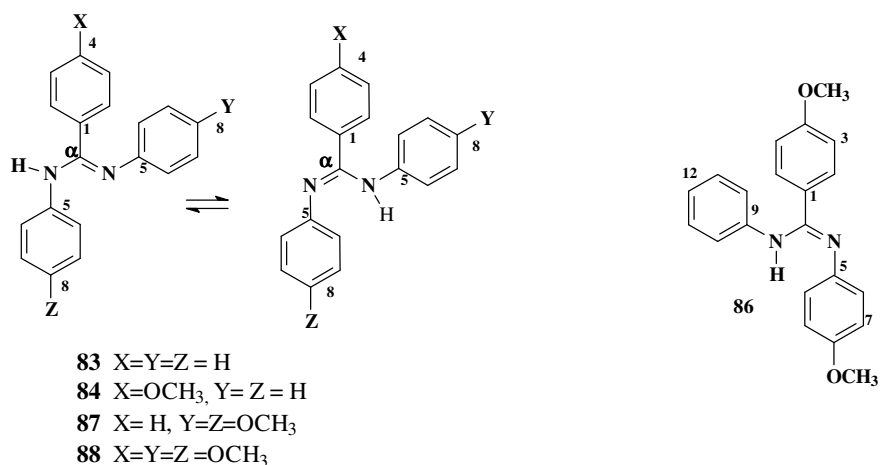


Tabela 18: Deslocamentos químicos de RMN de ¹³C das amidinas

δC					
C	83	84	86	87	88
1	133,11	133,11	130,57	136,02	n.o ^a
2	131,59	128,99	128,36	128,65	128,38
3	128,80	114,25	113,62	126,83	114,16
4	130,5	160,43	159,9	130,32	161,95
5	136,26	136,45	n.o ^a	132,2	132,71
6	120,56	120,34	121,23	121,10	119,89
7	127,01	126,86	113,62	113,97	114,16
8	124,02	124,38	154,41	157,88	157,73
9	-	-	n.o ^a	-	
10	-	-	119,56	-	
11	-	-	127,24	-	
12	-	-	122,23	-	
13	-	55,81	55,10	-	55,72
14	-	-	55,10	55,42	55,42
15	-	-	-	55,42	55,42
□	161,07	163,5	n.o ^a	161,46	n.o ^a

^an.o. = não observado.

4.2.2.1 Análise espectrométrica dos derivados **85** e **89**

As amidinas **85** e **89**, mono-metoxi e mono-nitro-substituídas, respectivamente, foram escolhidas para análise mais detalhada, com objetivo de avaliar o possível efeito de tautomerismo prototrópico e isomerismo geométrico.

Os trabalhos de Raczynska e colaboradores (RACZYNSKA & OSZCZAPOWICZ, 1985) mostraram que benzamidinas substituídas com grupos retiradores de elétrons apresentam no equilíbrio tautomérico maior proporção do tautômero imínico (*I*) substituído. Assim, assumindo que o contrário estaria ocorrendo, ou seja, no caso da presença de grupos doadores de elétrons o tautômero amínico (*A*) substituído seria o mais abundante. A figura 28 mostra o equilíbrio prototrópico para **85**.

Inicialmente, a amidina **85** teve seus espectros de RMN de ^{13}C obtidos nas formas neutra e salina, figura 29 e 30.

Além disso, sugeriu-se que o isomerismo geométrico observado poderia corresponder ao diastereoisômero *E*, em função dos resultados obtidos por modelagem molecular que serão melhor discutidos no item 4.3 de modelagem molecular.

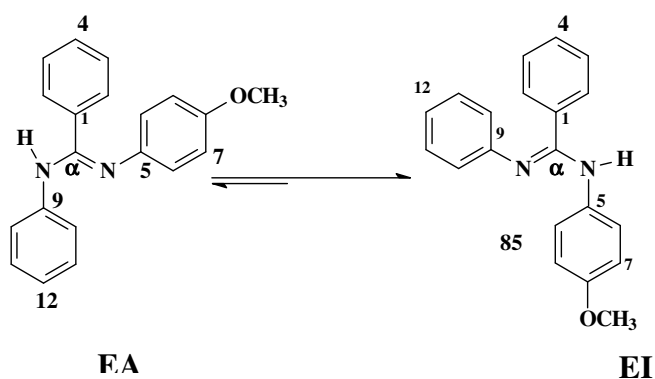


Figura 28: Equilíbrio tautomérico do derivado **85**.

Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos para **85** na forma neutra e salina, apresentando-se com baixa resolução, indicando a presença de apenas um isômero geométrico e um tautômero.

A amidina **85** teve seus espectros de RMN de ^{13}C obtidos na forma neutra e salina, figura 29.

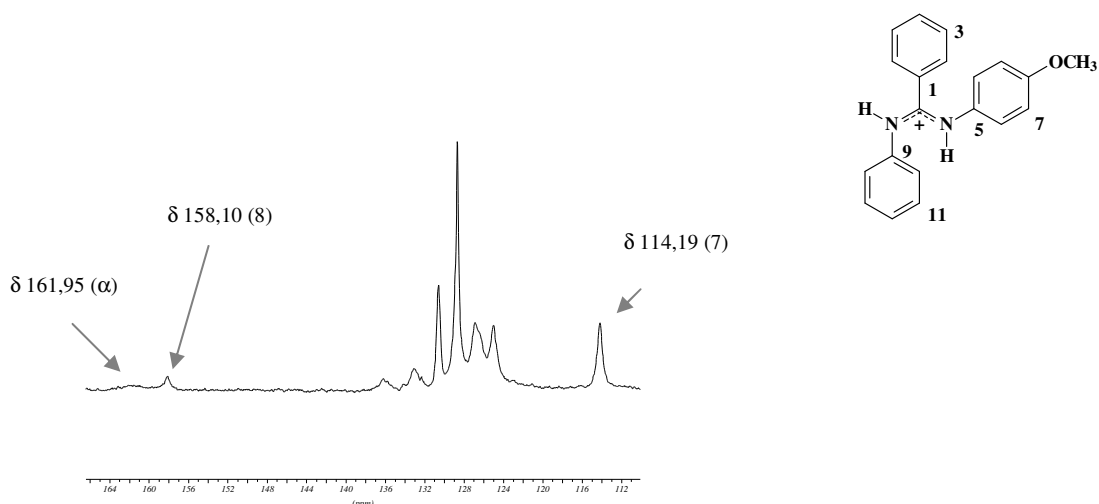


Figura 29: Parte do espectro de RMN de ^{13}C do derivado **85s**.

De maneira geral, o espectro do derivado em forma de sal apresentou-se com baixa resolução na região aromática. Este fato pode ser devido à ausência de ressonância do par de elétrons do átomo de nitrogênio para dentro do anel aromático.

O composto **85** em sua forma neutra mostrou um espectro de ^{13}C com maior resolução, indicando também a presença de apenas um isômero geométrico (*E*) e um tautômero que corresponderia ao amínico metoxi-substituído. A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos \square e aromáticos foi realizada por partes da molécula comparadas com estruturas similares (ECHEVARRIA *et al*, 1985, 1999) e valores tabelados da literatura (KALINOWISKY, 1988).

A atribuição dos deslocamentos químicos dos carbonos permitiu o assinalamento do tautômero amínico metoxi-substituído, sendo que muitos dos carbonos aromáticos não puderam ser assinalados inequivocamente devido à grande similaridade entre os sinais. A figura 30 mostra o espectro de RMN de ^{13}C e as estruturas utilizadas para a atribuição dos sinais.

Após comparar as partes similares da estrutura da amidina **85**, pudemos observar que o deslocamento δ 150,52 foi fundamental para a atribuição da forma amínica (A), atribuído ao C₉ devido a similaridade com a unidade A.

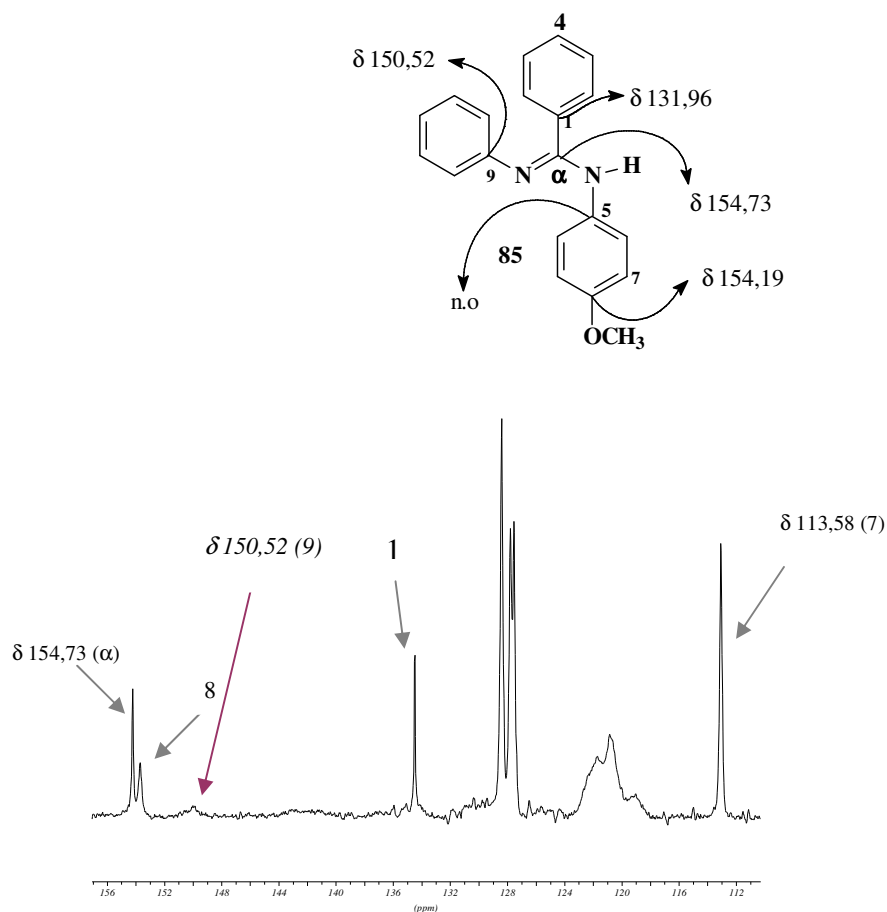
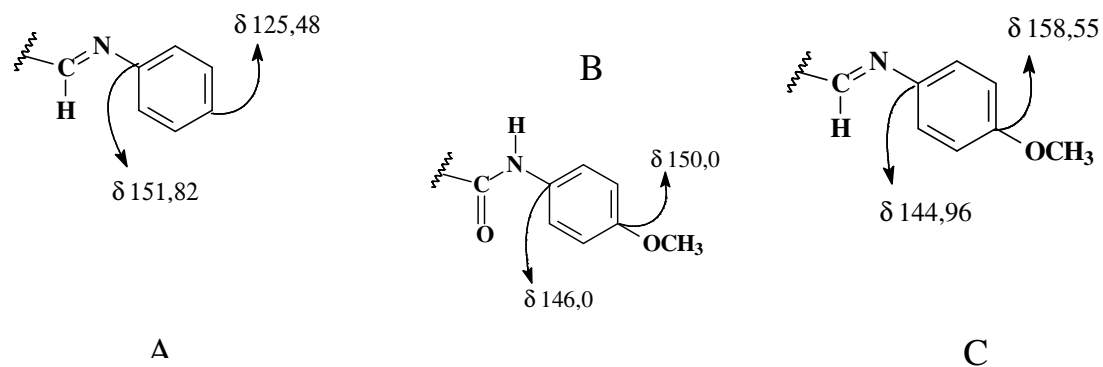


Figura 30: Espectros de RMN de ^{13}C da amidina **85** na forma neutra.

O espectro de ^{13}C da amidina **89s** (forma de sal) mostrou, assim como no espectro do **85s**, baixa resolução em comparação com sua forma neutra, sendo que sinais de C quaternários também desapareceram devido ao tempo de relaxação ser maior. Pudemos observar que o espectro desprotonado apresentou deslocamento químico para o C $_{\square}$ em δ 158,10, indicando uma blindagem, devido ao efeito de ressonância do átomo de N em comparação com δ 160,39 para o C $_{\square}$ na forma de sal. Além disso, pôde ser observado no espectro de **89** na forma neutra, o aparecimento de sinais duplos indicando a presença de dois tautômeros ou dois isômeros geométricos.

Considerando os trabalhos de Raczyńska (RACZYŃSKA & OSZCZAPOWICZ, 1985) admitiu-se a predominância do tautômero imínico nitro-substituído, por ser um grupo retirador de elétrons. Assim, assumindo-se a forma imínica como nitro-substituída, realizou-se a atribuição por partes da molécula utilizando-se a comparação com valores calculados para estruturas similares da literatura (ECHEVARRIA *et al.*, 1985, 1999), valores tabelados (KALINOWISKY, 1988) e com o auxílio de espectros utilizando técnicas bidimensionais (2D) de RMN de ^1H .

Após a observação de sinais dobrados para cada carbono com valores de deslocamentos químicos próximos e considerando-se a presença da forma imínica, realizou-se um estudo de modelagem molecular que permitiu sugerir a presença dos estereoisômeros *E* e *Z* (detalhado no item 4.3).

A figura 31 mostra as estruturas utilizadas como referência para a atribuição dos deslocamentos químicos dos principais carbonos, permitiu assinalar o tautômero imínico nitro-substituído.

Os sinais que apareceram dobrados de maior intensidade foram atribuídos ao tautomêro imínico (*I*) na forma isomérica *E*, pois a ausência do tautômero amínico foi confirmada pelo não aparecimento de sinais em torno de δ 144, como é visto no modelo **B**, e o surgimento dos sinais em δ 149,01 e 147,59, de acordo com o modelo **C**. A forma diastereoisomérica *E* foi confirmada pela técnica especial de NOEDIF, como veremos a seguir e, apoiado com modelagem molecular (item 4.3).

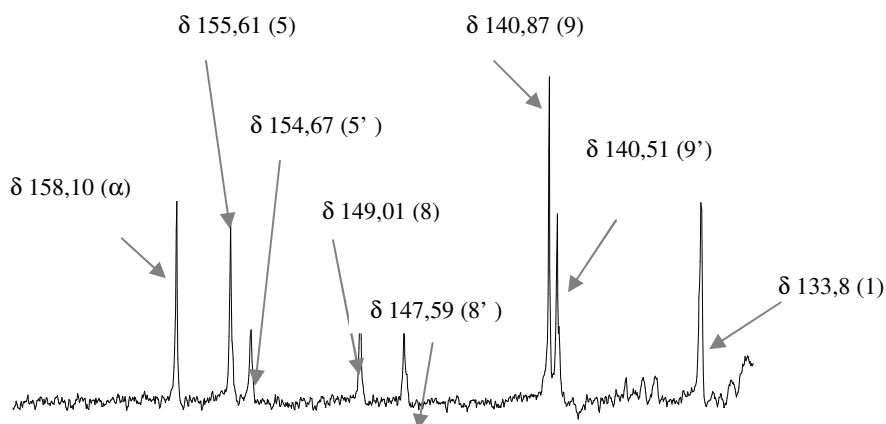
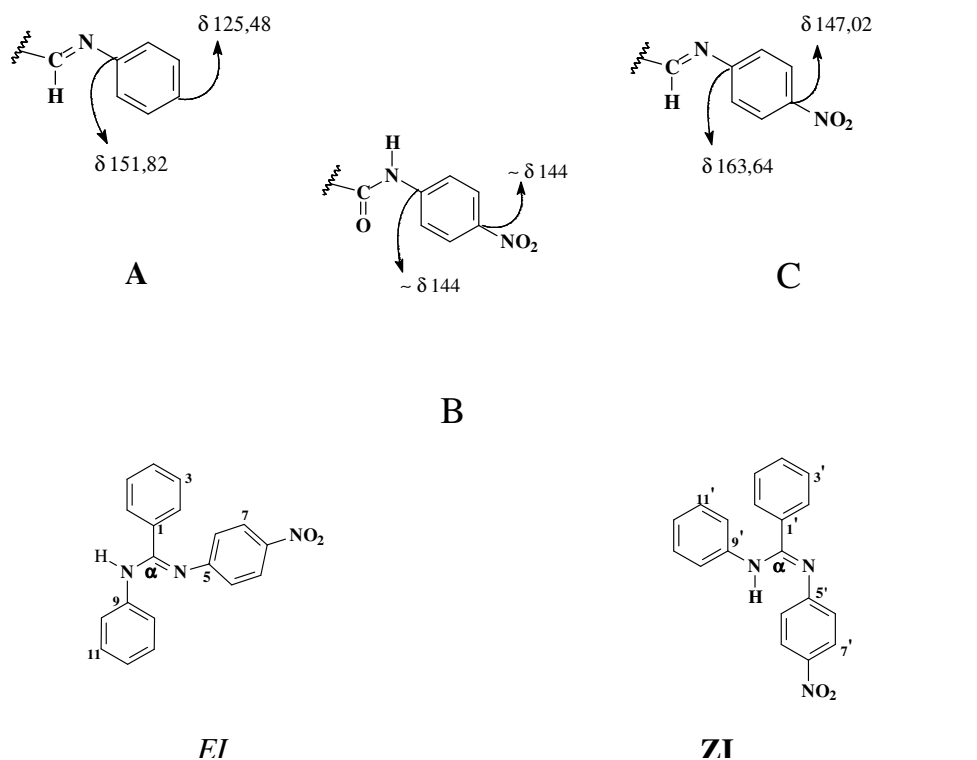


Figura 31: Parte do espectro de RMN de ^{13}C da amidina **89** em sua forma neutra.

Os espectros de RMN ^1H para **89** também foram obtidos em forma de sal e neutra, sendo que na forma neutra apresentou melhor resolução. O espectro de hidrogênio mostrou claramente dois sinais referentes a N-H em δ 9,63 e 9,91 com integração relativa de 66 e 34% respectivamente. Os hidrogênios aromáticos puderam ser atribuídos de acordo com sua constante de acoplamento e espectro H^1xH^1 -COSY, tabela 19.

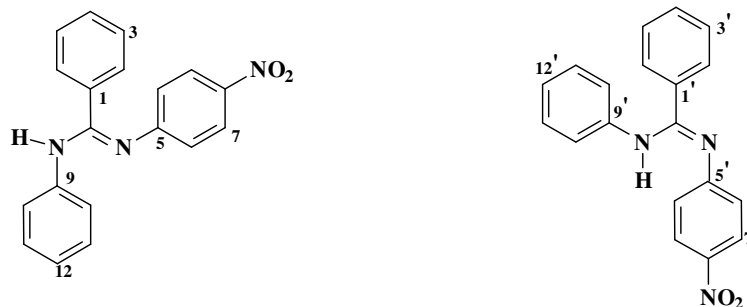


Tabela 19: Assinalamentos dos hidrogênios do derivado **89**.

H	δ H	$^1\text{H x } ^1\text{H-COSY}$	NOE
2	7,76 (2H; d; $J = 7,54$ Hz)	3	-
3	7,31 (6H; d; $J = 7,83$ Hz)	4	-
4	7,31 (6H; d; $J = 7,83$ Hz)	3	-
6	6,72 (2H; d; $J = 8,96$ Hz)	7	-
7	7,90 (2H; d; $J = 8,96$ Hz)	6	-
10	7,31 (6H; d; $J = 7,83$ Hz)	11	-
11	7,02 (2H; d; $J = 7,54$ Hz)	10 / 12	-
12	6,60 (2H; d; $J = 7,54$ Hz)	11	-
N-H	9,63	-	2 / 10
N-H	9,91	-	2' / 10' / 6'

A análise dos espectros de RMN de ^1H obtidos com irradiação dupla e diferença de espectros permitiu confirmar o tautômero íminico (*I*) da unidade contendo o grupo nitro. A irradiação na frequência do N-H em δ 9,91 (34%) gerou NOE em H2', H10' e em H6', sugerindo o distereoisômero *Z*. Já a irradiação em δ 9,63 (66%) gerou NOE em H2 e H10 confirmando o isômero *E*. A ausência do NOE efetivo no sistema AA'BB' reforça a idéia de apenas um tautômero.

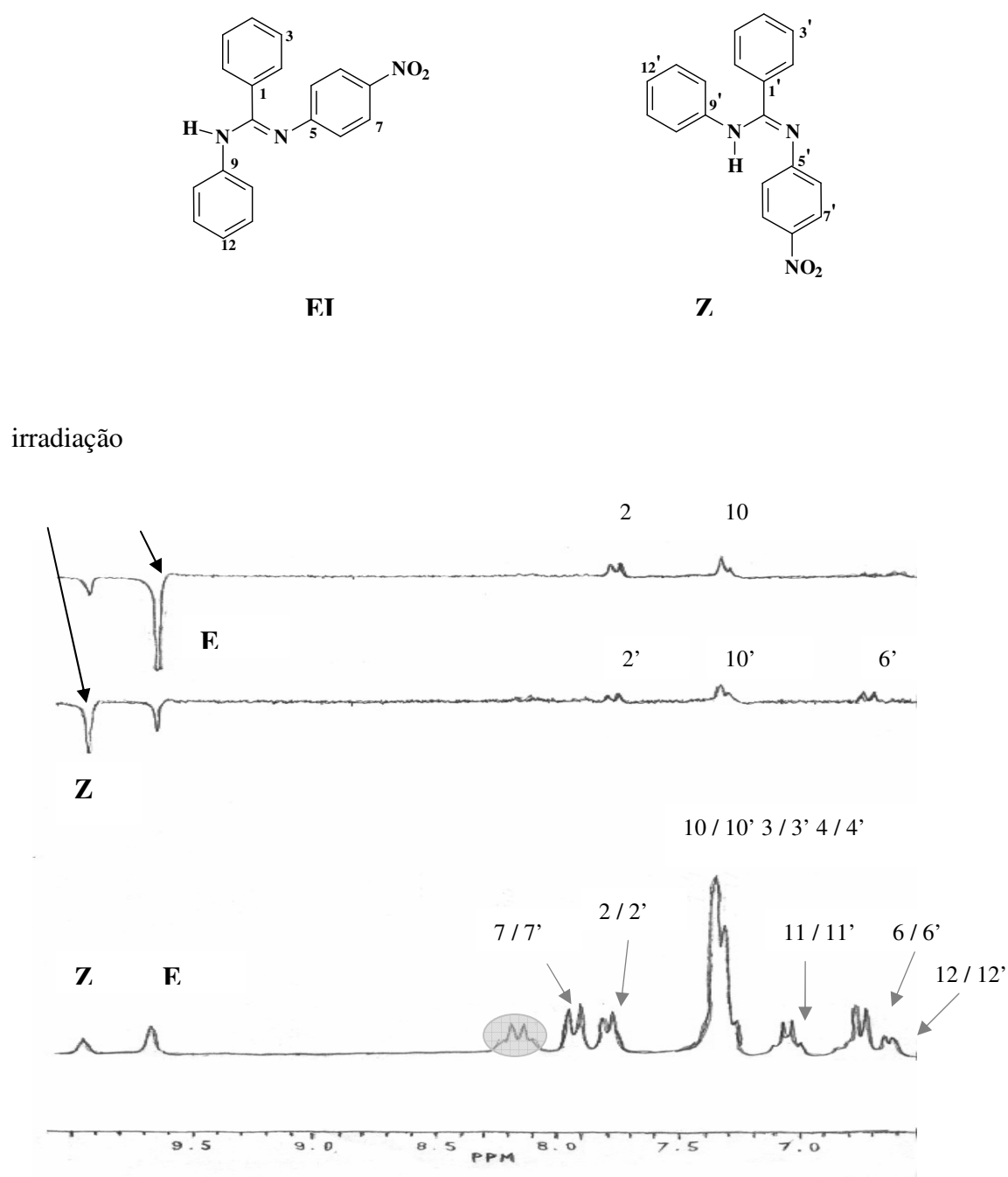


Figura 32: Espectros de RMN de ^1H e NOEDIF da amidina **89** sua forma neutra.

4.2.3 Espectrometria de massas das amidinas

Foram obtidos os espectros de CG-MS para as amidinas **83s** – **89s**, mostrando picos correspondentes ao íon molecular em abundância relativa que variou de 8 a 50%.

A tabela 20 mostra os principais picos registrados nos espectros de massas dos derivados sintetizados neste trabalho. Podemos observar que os fragmentos $m/z = 241$, 240 210 e 180 são fragmentos estáveis devido a sua alta percentagem registrada no espectro, ganhando destaque o fragmento $m/z = 210$ para os derivados **88s**, **85s** e **87s** os quais foram computados como pico base. Podemos observar que o fragmento $m/z = 167$ está presente em todos os fragmentogramas, exceto para a amidina **88**. De forma geral, podemos verificar um perfil de fragmentação semelhante, destacando-se a presença do íon m/z 77 em todos os espectros.

Tabela 20: Principais picos registrados nos espectros de massas das amidinas.

	m/z (%)	83	84	85	86	87	88	89
M ⁺ (%)		272 (8)	302 (13)	302 (50)	332 (47)	332 (32)	362 (20)	317 (12)
	317	-	-	-	(2)	-	-	-
	271	-	-	-	-	-	-	(1)
	241	-	-	-	-	-	(100)	-
	240	-	-	-	(100)	-	-	-
	226	-	-	-	-	-	(8)	-
	225	-	-	-	-	-	-	(20)
	211	-	-	-	(90)	-	-	-
	210	-	(100)	(100)	(25)	(100)	-	-
	197	-	-	-	(8)	-	(3)	-
	195	(1)	(1)	(5)	-	(3)	-	-
	180	(100)	-	(75)	-	-	-	(73)
	167	(1)	(4)	(5)	(8)	(5)	-	(3)
	123	-	-	-	-	-	-	-
	122	-	-	(1)	(3)	(3)	(3)	-
	92	-	-	(5)	(5)	(5)	(4)	-
	77	(27)	(15)	(33)	(21)	(10)	(1)	(10)
	65	(6)	(5)	(6)	(8)	-	-	-
	51	(15)	(9)	(16)	(11)	(5)	-	(6)

A figura 34 mostra a proposta de fragmentação para as amidinas que dependem do grupo metoxila para gerar os fragmentos. Pôde ser verificado que todos os fragmentos contêm o grupamento metoxila, exceto para o de $m/z = 197$. Porém, houve a dependência do grupo, pois sugeriu-se a migração de um hidrogênio da metoxila para o anel aromático quebrando a aromaticidade, conseqüentemente gerando um cátion e saindo o radical $O=CH^{\cdot}$.

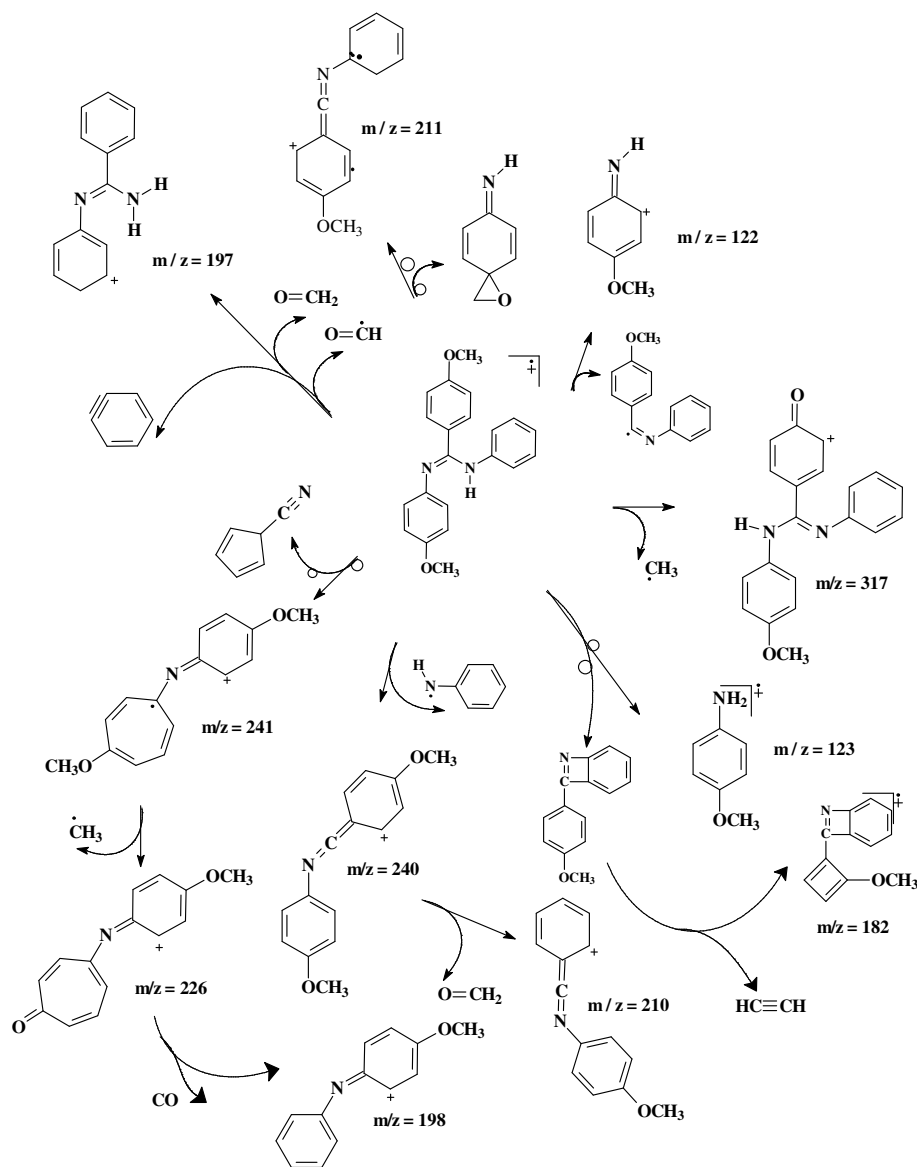


Figura 34: Proposta de fragmentação para as amidinas envolvendo os grupos metoxila .

A figura 35 mostra dois fragmentos específicos observados no espectro de massas do derivado **89**.

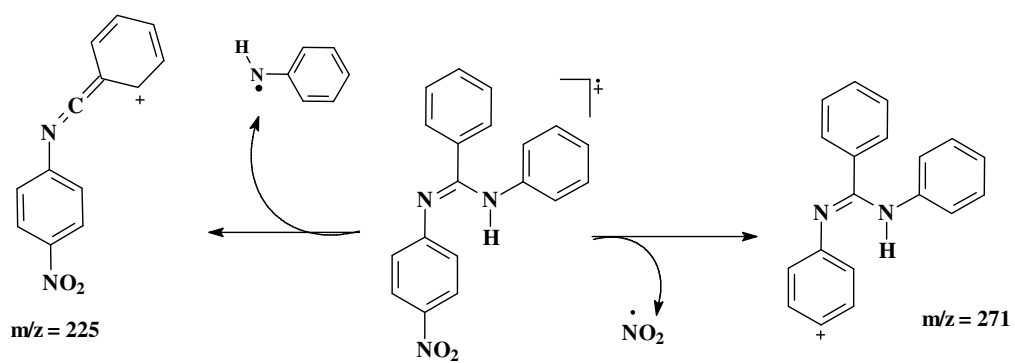


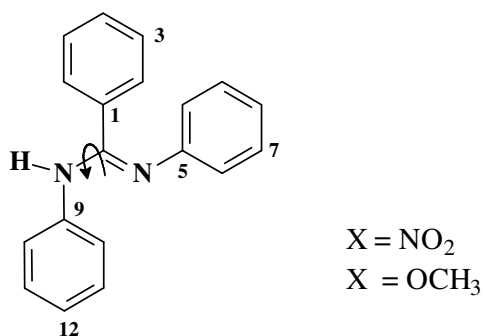
Figura 35: Fragmentos específicos do derivado **89**.

4.3 Estudo de modelagem molecular e difração de raios-X.

Foi realizado um estudo de modelagem molecular utilizando o método semi-empírico com os operadores hamiltonianos MNDO, PM3 e AM1. A partir do ângulo diedro estabelecido entre os átomos ω ($H_{16}-N_{16}-C_{\square}-C_1$) para os derivado **85** e **89**, foi realizada uma varredura de 13 pontos com incrementos de 30° , para encontrar os mínimos de energias locais. Pode-se observar que de um modo geral, entre os três hamiltonianos utilizados, o MNDO forneceu energias mais altas e o PM3 as mais baixas, conforme indicado graficamente na Parte Experimental.

Avalos e colaboradores (1996) mostraram diferenças de energia significativas em isômeros geométricos para glicoamidinas utilizando o método semi-empírico MNDO.

Porém, neste trabalho para derivados do tipo N,N'-diarilbenzamidinas não foi observada uma diferença significativa utilizando o mesmo hamiltoniano.



O método AM1 não conseguiu fornecer diferenças significativas de energias entre isômeros ou tautômeros, já o PM3 forneceu pequenas diferenças de energias entre isômeros geométricos para o composto **89** em sua forma imínica em relação ao grupo nitro. Este resultado mostra-se com boa concordância com nossos resultados espectrométricos e com a literatura (RACYNSKA & OSZCZAPOWICZ, 1985) que relata, como mencionado na determinação estrutural, a presença de grupos retiradores de elétrons favorecem as formas imínicas, mostrando ainda que o de menor energia correspondendo ao isômero *E*.

Analisando o gráfico da figura 36 observa-se o perfil de energia para os estereoisômeros *E* e *Z* do derivado **89** quando realizados giros de 30° na faixa de 0°-180°. Considerando-se a faixa de 0°-180° observa-se o mesmo perfil de variação de energia, para ambos os isômeros geométricos.

Comparando-se os mínimos de energia para os estereoisômeros *E* e *Z*, na forma imínica (*I*), observa-se que ocorrem em 150°, sendo a variação entre eles de $\Delta H_f = 8,32$ kJ/mol, e os maiores valores de energia correspondem a conformação próximo de 180°.

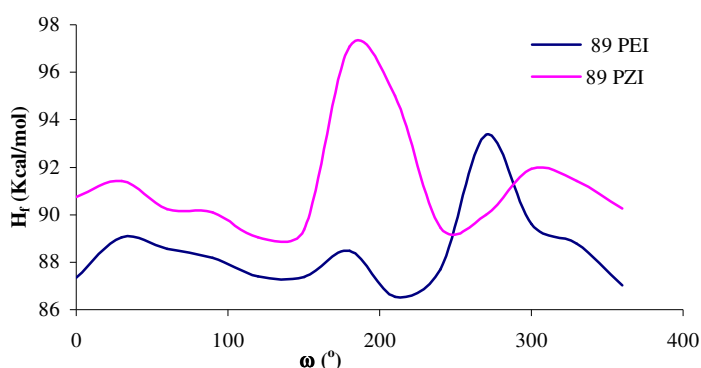


Figura 36 : H_f (kcal/mol) x ω ($H_{16}-N_{16}-C_{\square}-C_1$) para composto **89**, utilizando PM3.

Os resultados da modelagem molecular mostraram-se coerentes com os experimentais, uma vez que através da espectroscópica de RMN de 1H e ^{13}C também foram observados os estereoisômeros *E* e *Z* na forma imínica (*I*), sendo o primeiro mais abundante e de menor energia pelos cálculos teóricos.

O mesmo não ocorreu para o derivado **85**, onde não foram observados significativas diferenças de energias para os estereoisômeros *E* e *Z* metoxi-substituídos. De fato, a análise espectroscópica por RMN 1H e ^{13}C também não mostrou a presença dos dois estereoisômeros.

A partir de cristais transparentes e bem formados da amidina **84** foi obtido o espectro de raios-X, onde pôde ser observada também uma boa concordância com a prática.

A estrutura cristalográfica obtida (figura 38), mostrou uma conformação que pode ser chamada de *H-anti*, correspondendo no estudo de modelagem molecular a conformação em 0° em relação ao diedro $H_{16}-N_{16}-C_{16}-C_1$ (figura 29). Como mostrado na figura 36 as maiores energias ficaram próximos a 180° que corresponderia a conformação oposta chamada de *H-sin*. Pôde ser sugerido que o aumento de energia para a conformação *H-sin* resultaria da maior interação entre os anéis aromáticos, como, por exemplo, o anel B com o A, figura 37.

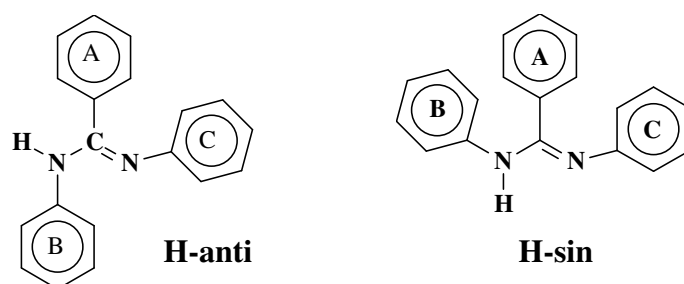


Figura 37: Conformações *H-sin* e *H-anti* das benzamidinas.

De acordo com os dados fornecidos pela estrutura cristalográfica obtida para a amidina **84**, podemos verificar que o comprimento da ligação C=N é de 1,283 Å e C-N é de 1,372 Å, observando-se que há um alongamento da ligação dupla e um encurtamento da ligação simples. Este fato é devido ao caráter de ressonância do grupo amidínico de acordo com a literatura (SHRINER *et al*, 1954; COTTON *et al*, 1997; REMKO *et al*, 2003).

Outro fato que podemos notar na estrutura cristalográfica é a conformação preferencial *H-anti* que foi citado anteriormente. Esta conformação impede a formação de dímeros cíclicos, pois haveria forte interação de natureza estérica entre os anéis aromáticos.

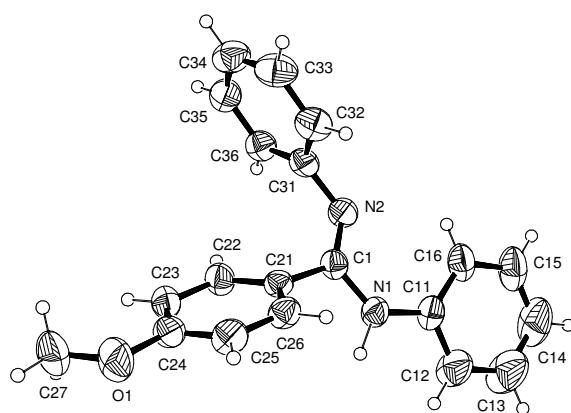
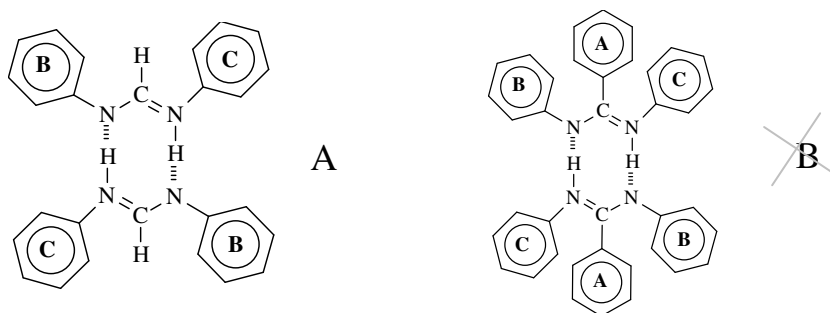


Figura 38: Estrutura cristalográfica do composto **84**.

Assim, conseqüentemente, estes derivados não fazem auto associação do tipo B para formar dímeros cíclicos como as formamidinas A (BUREIKO & CHERNYSHOVA, 1991), N,N'-trietil benzamidina (KRAFT *et al*, 2002) entre outros.



4.4 Determinação dos pKa (s) das amidinas

A determinação do pKa (s) foi realizada utilizando o método potenciométrico, com uma solução padronizada de HCl, para as amidinas **84** – **88**. Os valores dos pKa (s) foram calculados através das equações citadas na Parte Experimental, e mostrados na tabela 21.

Tabela 21: pKa (s) obtidos para as amidinas

Derivados	pKa
84	8,34 ± 0,3
85	7,74 ± 0,06
87	8,41 ± 0,2
86	8,81 ± 0,3
88	8,40 ± 0,04

RACZYNSKA & OSZCZAPOWICZ, (1985) determinaram valores de pKa para uma série de benzamidinas substituídas visando posteriores estudos de tautomerismo. Assim, o derivado **85**, também estudado pelos referidos pesquisadores, apresentou valor de pKa = 6,78 em condições experimentais diferentes (em etanol 96% v/v) das utilizadas neste trabalho, tendo sido obtido pKa = 7,56 em solução de metanol/água 50:50.

Os valores dos pKa(s) obtidos foram correlacionados com os deslocamentos químicos dos carbonos amidínicos. O resultado obtido mostrou uma razoável correlação ($r = 0,9113$) indicando uma linearidade na transmissão dos efeitos eletrônicos dos substituintes sobre o carbono amidínico. A figura 39 mostra o gráfico e a equação obtida.

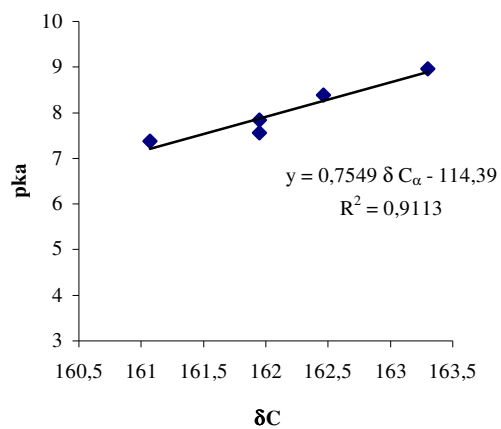


Figura 39: Valores de pKa das amidinas x δC_{α} .

Como pode ser notado, quanto maior o pKa, mais desblindado o carbono amidínico, em outras palavras, quando a amidina está sob a forma de sal, mais desblindado o seu carbono amidínico.

4.5 Atividade anti-leishmania

As benzamidinas preparadas neste trabalho foram ensaiadas frente a diferentes espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. Os ensaios foram realizados com as amidinas na forma de sal e neutra, sendo que os resultados para os ensaios frente a *Leishmania amazonensis* mostram atividade significativa para os derivados na forma de sal. A tabela 22 mostra os resultados obtidos. As amidinas dimetóxi-substituídas apresentaram as maiores atividades, **87s** (CI₅₀ = 42 μM) e **86s** (CI₅₀ = 49,2 μM), indicando a importância da presença de mais um grupo metoxila, independente do anel substituído. No entanto, o derivado trimetoxilado mostrou-se com menor atividade.

Tabela 22: Valores das concentrações inibitórias dos derivados amidínicos contra *L. amazonensis* (promastigotas)

Derivado (sal)	CI ₅₀ (□M)	Derivado (neutra)	CI ₅₀ (□M)
84s	80,2	84	n.t ^a
85s	103,8 ± 15,0	85	636,9 ± 60,8
86s	49,2 ± 0,9	86	645 ± 9,6
87s	42 ± 11,1	87	177,3 ± 11,4
88s	364,0 ± 7,7	88	n.t
89s	49,2 ± 6,4	89	n.t
Pentamidina^b	0,46 ± 0,08	-	-

^a não testado ^b Controle

Os ensaios frente à *Leishmania braziliensis* e *L. chagasi* foram realizados, até a presente data, com apenas parte dos derivados sintetizados.

Os resultados obtidos mostraram que as amidinas ensaiadas frente a *L. chagasi* apresentaram menor atividade, ou seja, os valores de CI₅₀ (μM) foram acima de 100 μM.

No entanto, os resultados para a *Leishmania braziliensis* mostraram-se mais interessantes, sendo que o derivado **86** na forma neutra e salina (**86s**), apresentou a maior atividade com CI_{50} (μM) 33,71 e 26,6 μM , respectivamente. A tabela 23 indica os resultados obtidos.

Tabela 23: Valores das concentrações inibitórias dos derivados amidínicos contra *L. braziliensis* e *L. chagasi* (promastigotas)

L. chagasi		L. amazonensis	
	CI_{50} (μM)		CI_{50} (μM)
85s	144,3 \pm 7,3	86	33,71 \pm 6,8
86s	111,6 \pm 8,9	86s	26,6 \pm 9,7
88	326,79 \pm 27,2	85	65,51 \pm 5,0
		87	177,3 \pm 11,4

De acordo com o nosso objetivo da preparação de derivados metoxilados benzamidínicos visando a busca de novas substâncias anti-leishmania e de maior solubilidade em água, pudemos comparar os valores obtidos de CI_{50} (μM) frente a *L. amazonensis* incluindo o derivado na forma de sal (**84s**) que motivou este estudo. A figura 40 mostra o gráfico da comparação entre os valores de CI_{50} (μM) para as amidinas na forma

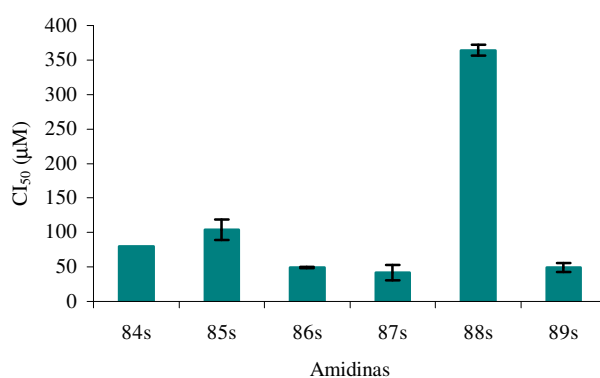


Figura 40: Atividade leishmanicida de amidinas em forma de sal frente a *L. amazonensis* (promastigotas).

5. CONCLUSÕES

1. A síntese de todas as amidinas propostas, mostrou-se mais eficiente através da metodologia **B** levando a produtos com alto grau de pureza e bons rendimentos.
2. A caracterização dos derivados amidínicos por técnicas espectroscópicas de rotina foi coerente com as estruturas propostas. A utilização da experiência de NOEDIF juntamente com as outras técnicas espectroscópicas mostrou a existência de isômeros geométricos para o derivado nitro-substituído, indicando o isômero *E* como predominante.
3. O estudo de modelagem molecular contribuiu para a compreensão dos diferentes rendimentos obtidos nas diferentes rotas na metodologia **B**, e auxiliou na determinação dos isômeros *E/Z*, indicando o tautômero íminico em relação ao grupo nitro-substituído como predominante.
4. Os novos derivados metoxilados obtidos apresentaram interessante atividade anti-leishmania, particularmente na forma salina, ganhando destaque os derivados di-metoxilados.
5. A determinação dos valores de pKa (s) utilizando o método potenciométrico para as amidinas sintetizadas, verificou-se uma correlação linear com os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos amidínicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, M. A.; ÚBEDA, J. I.; AVENDAÑO, C.; MENÉNDEZ, J. C.; VILLACAMPA, M. New findings on the vilsmeier-haack approach to quinoline derivatives. **Tetrahedron**, v. 49, n. 47, p. 10997-11008, 1993.

AVALOS, M.; BABIANO, R.; CINTAS, P.; DURÁN, C. J.; JIMÉNEZ, J. L.; PALACIOS, J. C. NMR studies and semiempirical calculations on the structure of glycoamidines. **Tetrahedron**, v. 52, n. 27, p. 9263-9274, 1996.

BAILEY, C.; BAKER, E.; HAYLER, J.; KANE, P. Amidine protection for solution phase library synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 4847-4850, 1999.

BAKER, J.; KILNER, M. The coordination chemistry of the amidine ligand. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 133, p. 219-300, 1994.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

BORDWELL, F. G.; JI, G. Z. Effects of structural changes on acidities and hemolytic bond dissociation energies of the H-N bonds in amidines, carboxamides, and thiocarboxamides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 8398-8401, 1991.

BUREIKO, S. F.; CHERNYSHOVA, I. V. Spectroscopic study of structure and intermolecular interactions of diphenylformamidine and diphenylacetamidine in solution. **Journal of Molecular Structure**, v. 263, p. 37-44, 1991.

CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ECHEVARRIA, A.; ARAUJO, C. A. C.; BRAVO, M. F.; SANTOS, L. H. S.; JANSEN, A. M.; LEON, L. L. The potential effects of new synthetic drugs against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Microbios**, v. 90, n. 51, 1997.

CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ECHEVARRIA, A.; SOUZA, M. A. S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TORRES, M. A. D.; LEON, L. L. Effect of amidine derivatives on

Leishmania amazonensis axenic amastigotes. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 50, n. II, p. 925-928, 2000.

COOK, M. J.; DASSANYAKE, N. L.; JOHNSON, C. D.; KATRITZKY, A. R.; TOONE, T. W. Aromaticity and tautomerism. Part IV. Free energy: enthalpy correlations for protonation of pyridine bases and azine *N*-oxides and temperature variations of the H_0 and H_A acidity functions. **Journal of Chemical Society Perkin II**, p. 1069-1075, 1974.

COOPER, F. C.; PARTRIDGE, M. W. Preparation of *N*-substituted amidines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, p. 255-260, 1953.

COTTON, F. A.; HAEFNER, S. C.; MATONIC, J. H.; WANG, X.; MURILLO, C. A. Structural studies of formamidine compounds: from neutral to anionic and cationic species. **Polyhedron**, v. 16, n. 3, p. 541-550, 1997.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CURTIN, D. Y.; GRUBBS, E. J.; McCARTY, C. G. Uncatalyzed *syn-anti* isomerization of imines, oxime ethers, and haloimines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 12, p. 2775-2786, 1966.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBISCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. AM1: A new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

ECHEVARRIA, A.; MILLER, J.; NASCIMENTO, M. G. ^{13}C NMR and Azomethine ^1H NMR spectra of substituted *N*-benzylideneanilines and hammett correlations. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 809-813, 1985.

ECHEVARRIA, A.; SANTOS, L. H.; MILLER, J.; MAHMOOD, N. Synthesis, characterization, and anti-HIV activity of some 2-*p*-X-phenyl-1,3-*N,N'*-diphenyl-

amidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 16, p. 1901-1904, 1996.

ECHEVARRIA, A.; NASCIMENTO, M. G.; GERÔNIMO, V.; MILLER, J.; GIESBREDIT, S. NMR spectroscopy, hammet correlations and biological activity of some schiff bases derived from piperonal. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 10, p. 60-64, 1999.

EXNER, O.; BUDĚĚJINSKÝ, M. Dipole moments of amidines and electron distribution within their functional group. **Journal of Molecular Structure**, v. 178, p. 147-159, 1988.

FATHALLA, W. M.; ČAJAN, M.; MAREK, J.; PAZDERA, P. One-pot quinazolin-4-ylidenethiourea synthesis via *N*-(2-Cyanophenyl)benzimidoyl isothiocyanate. **Molecules**, v. 6, p. 574-587, 2001.

FATHALLA, W. M.; PAZDERA, P. Synthesis of heterocyclic skeletons by the reaction of *N*¹-(2-Cyanophenyl)-benzimidoyl chloride with thioamides. **Molecules**, v. 7, p. 96-103, 2002.

FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 159-164, 1992.

GARCEZ, L. M.; GOTO, H.; RAMOS, P. K.; BRIGIDO, M. C.; GOMES, P. A. F.; SOUZA, R. A.; DE LUCA, P. M.; MENDONÇA, S. C.; MUNIZ, J. A. P. C.; SHAW, J. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* - induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1755-1764, 2002.

GENESTRA, M.; ECHEVARRIA, A.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; VIGNÓLIO-ALVES, L.; LEON, L. L. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by

Leishmania amazonensis promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide**, v. 8, p. 1-6, 2003.

GOMES-CARDOSO, L.; ECHEVARRIA, A.; AGUIAR-ALVES, F.; JANSEN, A. M.; LEON, L. L. Amidine derivatives are highly effective against *Trypanosoma evansi* trypomastigotes. **Microbios**, v. 100, p. 181-187, 1999.

GONTIJO, C. M. F.; SILVA, E. S.; FUCCIO, M. B.; SOUZA, M. C. A.; PACHECO, R. S.; DIAS, E. S.; ANDRADE FILHO, J. D.; BRAZIL, R. P.; MELO, M. N. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, v. 81, p. 143-150, 2002.

HUANG, W.; ZHANG, P.; ZUCKETT, J. F.; WANG, L.; WOOLFREY, J.; SONG, Y.; JIA, Z. J.; CLIZBE, L. A.; SU, T.; TRAN, K.; HUANG, B.; WONG, P.; SINHA, U.; PARK, G.; REED, A.; MALINOWSKI, J.; HOLLENBACH, S. J.; SCARBOROUGH, R. M.; ZHU, B. Y. Design, synthesis and structure-activity relationships of benzoxazinone-based factor xa inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 561-566, 2003.

JACKMAN, L. M.; JEN, T. ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance studies on the tautomerism, geometrical isomerism, and conformation of some cyclic amidines, guanidines, and related systems. **Journal of the American Chemical Society**, v. 97, n. 10, p. 2811-2818, 1975.

JIA, Z. J.; WU, Y.; HUANG, W.; GOLDMAN, E.; ZHANG, P.; WOOLFREY, J.; WONG, P.; HUANG, B.; SINHA, U.; PARK, G.; REED, A.; SCARBOROUGH, R. M.; ZHU, B. Y. Design, synthesis and biological activity of novel non-amidine factor xa inhibitors. Part 1: P_1 structure-activity relationships of the substituted 1-(2-Naphthyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxylamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 1651-1655, 2002.

KALINOWSKI, H. O.; BERGER, S. **Carb-13 NMR Spectroscopy**. 21. ed. New York: John Wiley Sons, 1988.

KASHIMA, C.; SHIMIZU, M.; OMOTE, Y. The tautomeric study in 2-substituted 1,6-dihydro-4,6,6-trimethyl-pyrimidine systems. **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 41, p. 5057-5060, 1985.

KEUNG, W.; BAKIR, F.; PATRON, A. P.; ROGERS, D.; PRIEST, C. D.; DARMOHUSODO, V. Novel α -amino amidine synthesis via scandium (III) triflate mediated 3CC Ugi condensation reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 733-737, 2004.

KOMBER, H.; KLINGER, C.; BÖHME, F. ^1H , ^{13}C and ^{15}N nuclear magnetic resonance studies of polyamidines prepared from di(4,4'-aminophenyl) methane and different triethyl orthoesters - polymers with a prototropic tautomerism. **Polymer**, v. 38, n. 11, p. 2603-2608, 1997.

KOMBER, H.; LIMBACH, H. H.; BÖHME, F.; KUNERT, C. NMR studies of the tautomerism of cyclo-tris(4-R-2,6-pyridylformamidine) in solution and in the solid state. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 11955-11963, 2002.

KRAFT, A.; PETERS, L.; POWELL, H. R. Hydrogen-bonding between benzoic acid and an N,N'-diethyl-substituted benzamidine. **Tetrahedron**, v. 58, p. 3499-3505, 2002.

KUSTURIN, C. L.; LIEBESKIND, L. S.; NEUMANN, W. L. A new catalytic cross-coupling approach for the synthesis of protected aryl and heteroaryl amidines. **Organic Letters**, v. 4, n. 6, p. 983-985, 2002.

LEE, K.; JUNG, W. H.; PARK, C. W.; PARK, H. D.; LEE, S. H.; KWON, O. H. Noncovalent tripeptidic thrombin inhibitors incorporating amidrazone, amine and amidine functions at P1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 1017-1022, 2002.

LORZ, E.; BALTZLY, R. N,N-Disubstituted amidines. II. Benzamidines. The effect of substitution on basicity. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 3992-3994, 1949.

MANDEL, H. G.; HILL, A. J. The conversion of formamides into formamidines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 3978-3982, 1954.

MEAWAD, O. B. Selective heat therapy in cutaneous leishmaniasis: a preliminary experience using the 585 nm pulsed dye laser. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 8, p. 241-244, 1997.

MENEZES, F. A. S.; MONTANARI, C. A.; BRUNS, R. E. 3D-WHIM pattern recognition study for bisamidines. A structure-property relationship study. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 393-397, 2000.

MONTANARI, C. A.; TRENT, J. O.; JENKINS, T. C. Molecular recognition of B-DNA minor-groove binders: the rigid analogue approach to synthesise antileishmaniasis compounds. A molecular modeling study. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 2, p. 175-180, 1998.

MOSS, R. A.; MA, W.; MERRER, D. C.; XUE, S. Conversion of 'obstinate' nitriles to amidines by Garigipati's reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 48, p. 8761-8764, 1995.

OHWEILER, O. A. **Química analítica quantitativa**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico S.A., 1976. 465 p.

OSZCZAPOWICZ, J.; RACZYŃSKA, E. Amidines. Part 13. Influence of substitution at imino nitrogen atom on pK_a values of N^1N^1 -dimethylacetamidines. **Journal of Chemical Society Perkin Trans. II**, p. 1643-1646, 1984.

PETERSON, A. T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology**, v. 33, p. 919-931, 2003.

PITZER, K. K.; WERBOVETZ, K. A.; BRENDLE, J. J.; SCOVILL, J. P. Synthesis and biological evaluation of 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride analogues as

antileishmanial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 4885-4889, 1998.

PRETSCH, E.; CIERC, T.; SEIBL, J.; SIMON, W. **Tablas para la elucidacion estructural de compuestos organicos por metodos espectroscopicos**. España: At Hembra, 1980.

QUAN, M. L.; ELLIS, C. D.; HE, M. Y.; LIAUW, A. Y.; WOERNER, F. J.; ALEXANDER, R. S.; KNABB, R. M.; LAM, P. Y. S.; LUETTGEN, J. M.; WONG, P. C.; WRIGHT, M. R.; WEXLER, R. R. Nonbenzamidine tetrazole derivatives as factor xa inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 369-373, 2003.

RACZYŃSKA, E. D. Application of semiempirical method (AM1) to the study of tautomeric equilibria in the gas phase for simple compounds containing the amidine group: 4(5)-substituted imidazoles. **Analytica Chimica Acta**, v. 348, p. 431-441, 1997.

RACZYŃSKA, E.; OSZCZAPOWICZ, J. Amidines - XVIII. Tautomeric equilibria and pK_a values of N,N'-disubstituted amidines, substituent effects. **Tetrahedron**, v. 41, n. 22, p. 5175-5179, 1985.

RACZYŃSKA, E. D.; OSZCZAPOWICZ, J.; WALCZAK, M. Amidines. Part 15. Influence of substitution at imino and amino nitrogen atoms on pK_a values of N¹-Methyl-N¹N²-diarylacetamidines. **Journal of Chemical Society Perkin Translation**, v. II, p. 1087-1090, 1985.

REMKO, M.; VAN DUIJNEN, P. Th.; SWART, M. Theoretical study on molecular structure, tautomerism, and geometrical isomerism of N-methyl- and N-phenyl-substituted cyclic imidazolines, oxazolines, and thiazolines. **Structural Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 271-278, 2003.

SANTOS, C. E. R.; ECHEVARRIA, A.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. Síntese e tautomerismo de novos derivados da N,N'-difeníl-benzamidina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 25., 2002, São Paulo. **Anais ...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2002.

SANTOS, L. H. S. **N,N'-difenilbenzamidinas: síntese, correlações de Hammet e atividade biológica**. 1993. 110 f. Tese (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

SHRINER, R. L.; NEUMANN, F. W. The Chemistry of the amidines. **Chemical Review**, v. 35, p. 351-415, 1944.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SINTOV, N. J.; RODIA, J. S.; TURSICH, J. A.; DAVIS, H. L.; WEBSTER, G. L. Methoxysubstituted benzamidines as local anesthetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 71, p. 3990-3992, 1949.

SONG, Y.; CLIZBE, L.; BHAKTA, C.; TENG, W.; WONG, P.; HUANG, B.; TRAN, K.; SINHA, U.; PARK, G.; REED, A.; SCARBOROUGH, R. M.; ZHU, B. Y. Design and synthesis of factor xa inhibitors and their prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 297-300, 2003.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical. Methods II. Applications. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 221-264, 1989.

SZCZEPANKIEWICZ, W.; SUWIŃSKI, J.; BUJOK, R. Synthesis of 4-arylaminoquinazolines and 2-aryl-4-arylaminoquinazolines from 2-aminobenzonitrile, anilines and formic acid or benzaldehydes. **Tetrahedron**, v. 56, p. 9343-9349, 2000.

TEMPORAL, R. M.; FINKELSTEIN, L. C.; ECHEVARRIA, A.; SOUZA, M. A. S.; SERTÃ, M.; SILVA-GONÇALVES, A. J.; PIRMEZ, C.; LEON, L. L. Effects of amidine derivatives on parasite-macrophage interaction and evaluation of toxicity. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 52, n. 6, p. 489-493, 2002.

VOGEL, A. L. **Text-book of practical chemistry**. 3. ed. New York: John Willey & Sons, 1956.

VOGEL, A. L. **Química Orgânica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico S.A., 1986.

WEIS, A. L. The factors affecting possibility of observation of annular tautomerism in dihydropyrimidine systems. **Tetrahedron Letters**, v. 23, n. 4, p. 449-452, 1982.

WIDLICKA, D. W.; WONG, E. H.; WEISMAN, G. R.; SOMMER, R. D.; INCARVITO, C. D.; RHEINGOLD, A. L. A sterically-hindered tricyclic biimidazoline ligand which is also a precursor to a novel tetramethyl-cyclen. **Inorganica Chimica Acta**, v. 431, p. 45-53, 2002.

XU, F.; SUN, J.; SHEN, Q. Samarium diiodide promoted synthesis of *N,N'*-disubstituted amidines. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 1867-1869, 2002.

YAVARI, I.; ADIB, M.; JAHANI-MOGHADDAM, F.; BIJANZADEH, H. R. Vinylphosphonium salt mediated simple synthesis of 7-oxo-7*H*-pyrido[1,2,3-*cd*]perimidine derivatives. Dynamic NMR spectroscopic study of prototropic tautomerism in ethyl 1*H*-perimidine-2-carboxylate. **Tetrahedron**, v. 58, p. 6901-6906, 2002.

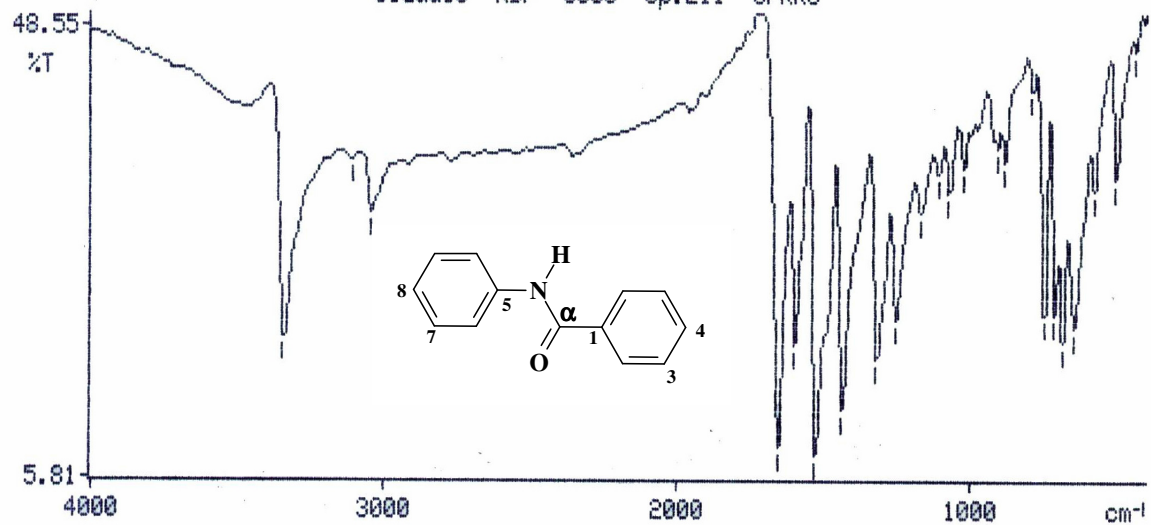
YET, L. A survey of amidine synthesis. **Technical Reports**, v. 4, n. 3, p. 1-13, 2000.

ZLOTOGORSKI, A.; GILEAD, L.; JONAS, F.; HOREV, L.; KLAUS, S. N. South American cutaneous leishmaniasis: report of ten cases in Israeli travelers. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 11, p. 32-36, 1998.

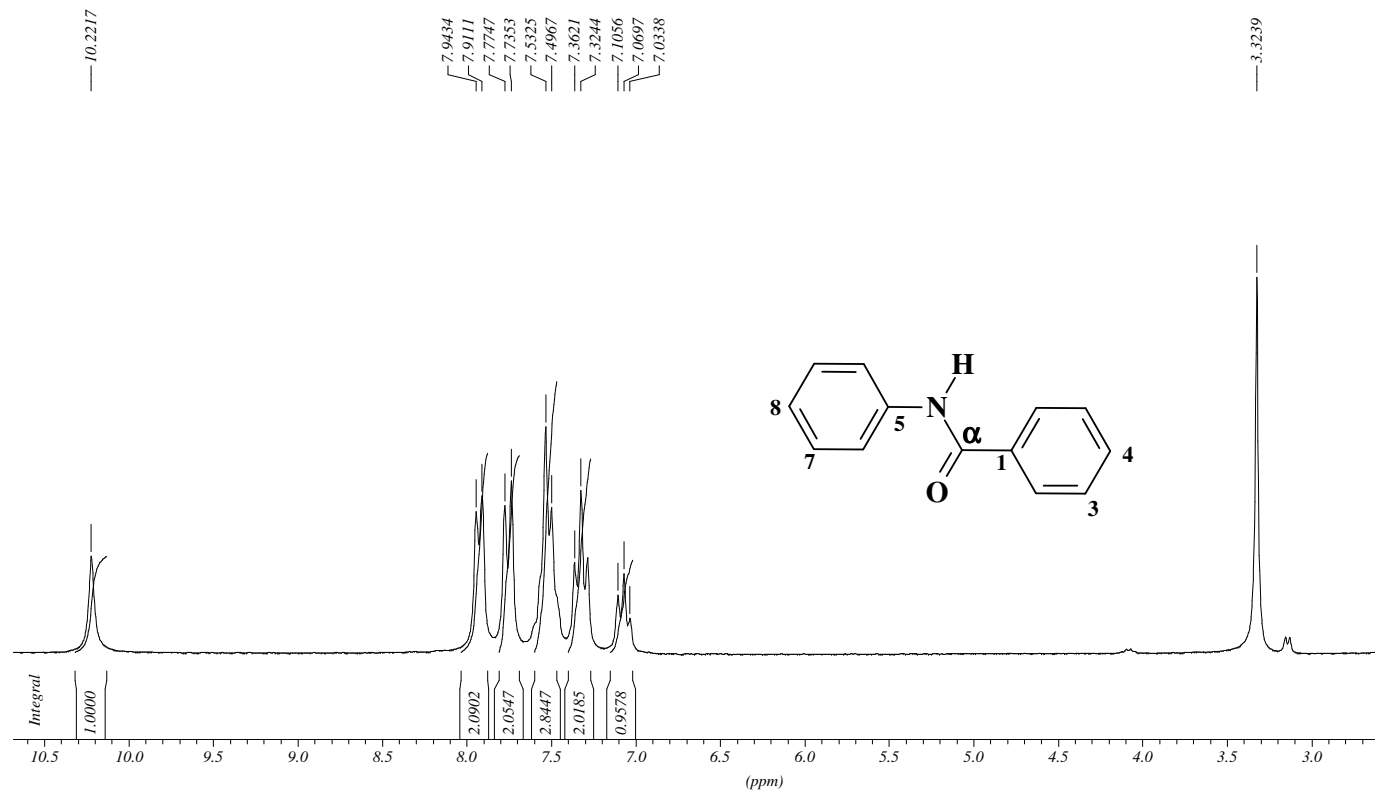
7. ANEXOS

3342.6, 3109.2, 3047.2, 1655.3, 1598.2, 1529.4, 1437.1, 1319.7=
1255.4, 1171.7, 1111.1, 1073.1, 1025.4, 909.5, 884.0, 788.7=
750.0, 713.9, 688.3, 647.5, 580.3, 505.6, 438.8=

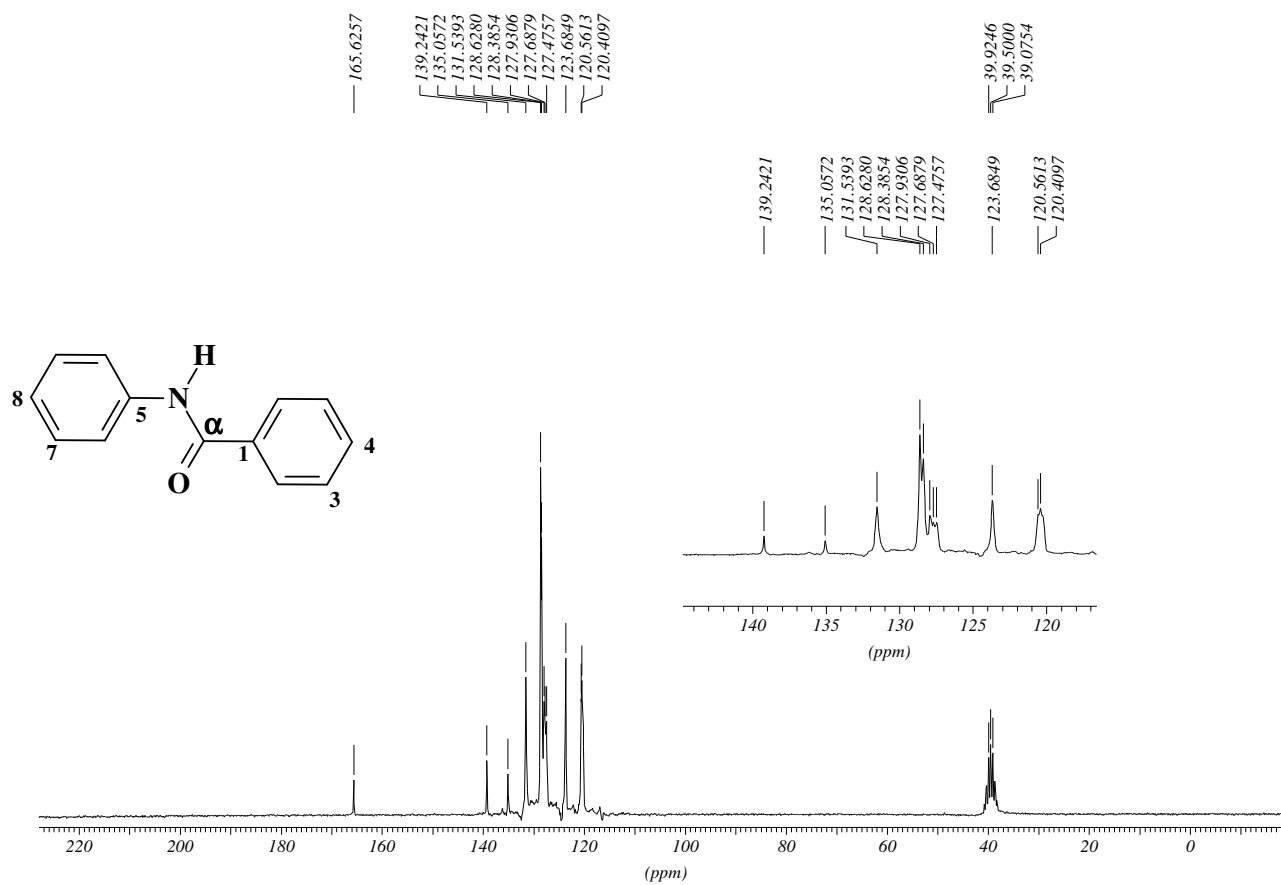
Claudio KBr 6803 Op.Eli UFRRJ



Anexo 01: Espectro de IV (KBr) do derivado 79.



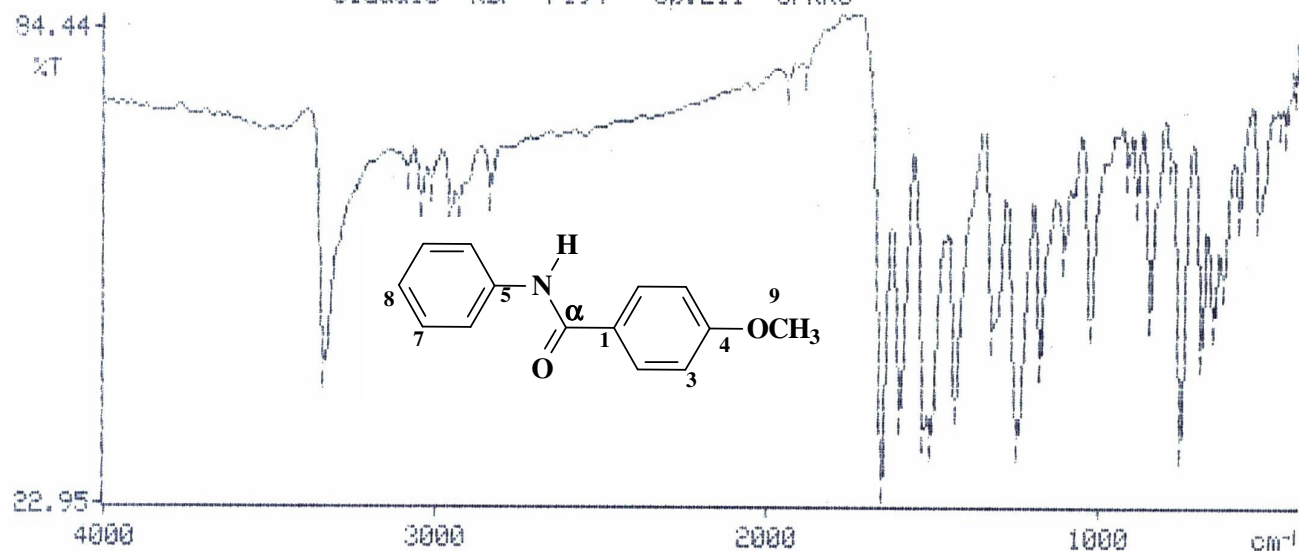
Anexo 02: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado **79**.



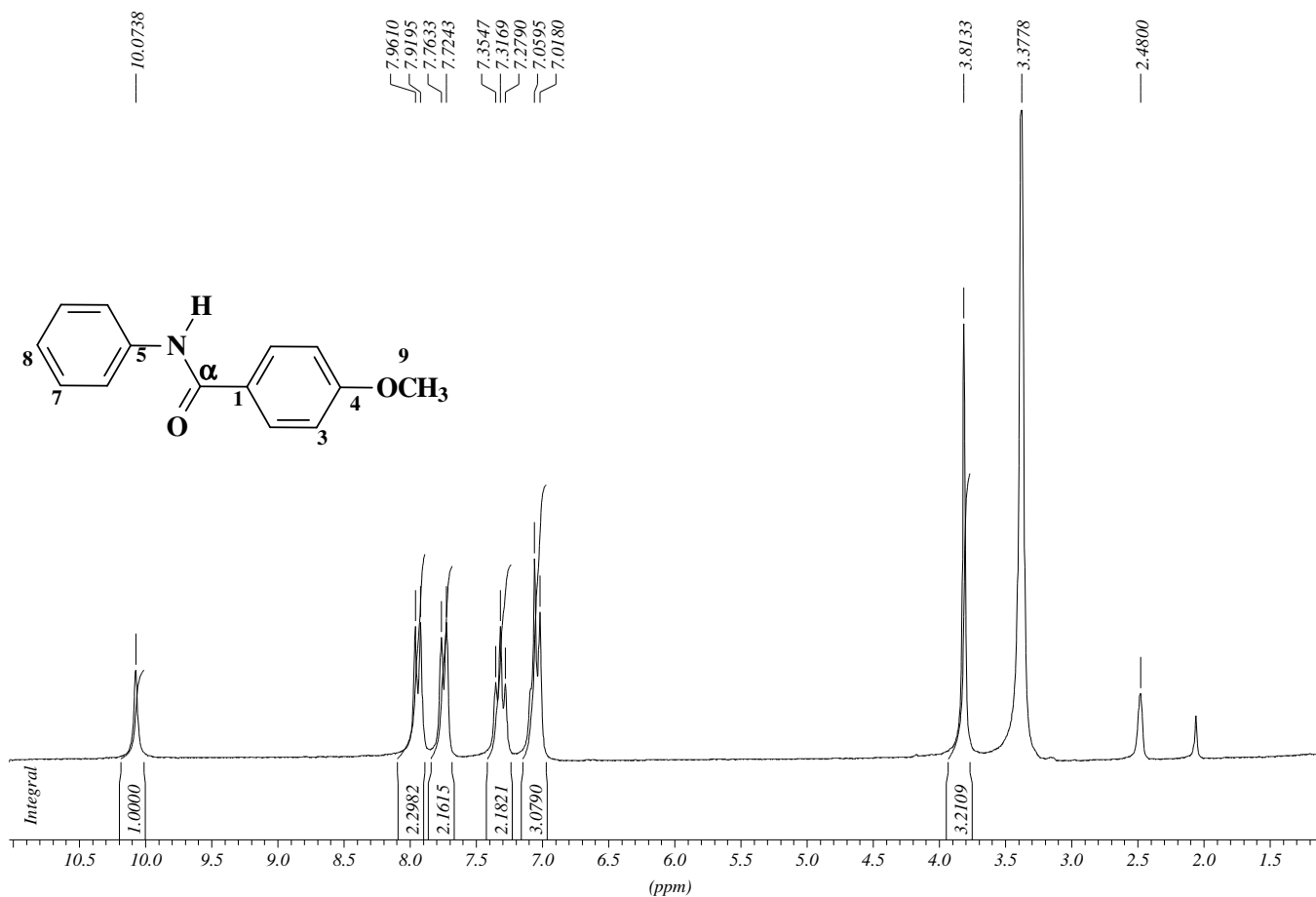
Anexo 03: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado 79.

3336.7,3088.5,3049.1,3017.8,2957.8,2933.1,2838.0,1939.6,1882.3=
1655.2,1599.3,1527.5,1506.5,1434.5,1322.6,1246.0,1179.4,1106.2=
1026.8,913.7,886.5,846.7,786.6,753.6,690.7,655.2=
625.6,578.6,519.5,455.4,439.5,409.1=

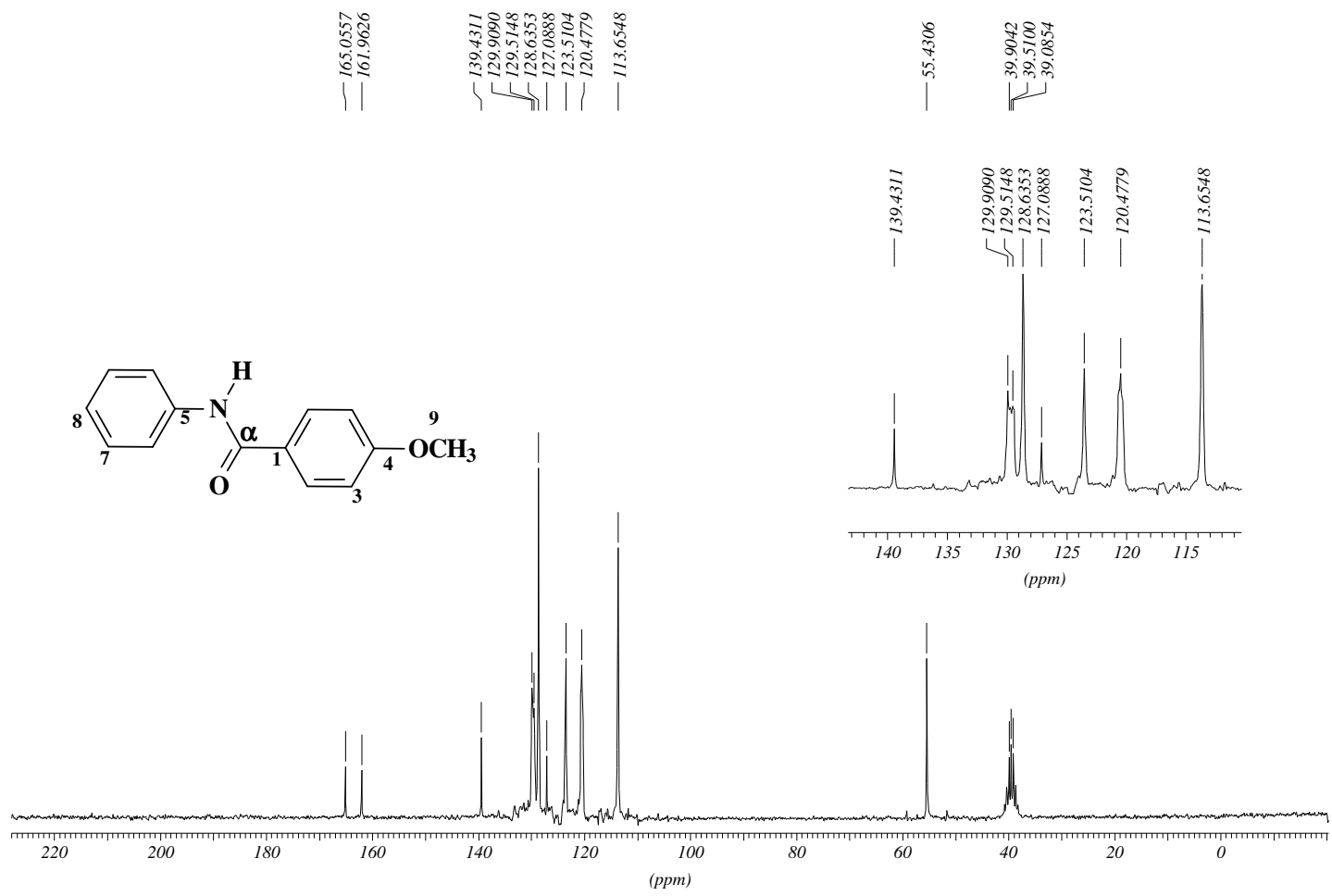
Claudio KBr 7194 Op.Eli UFRRJ



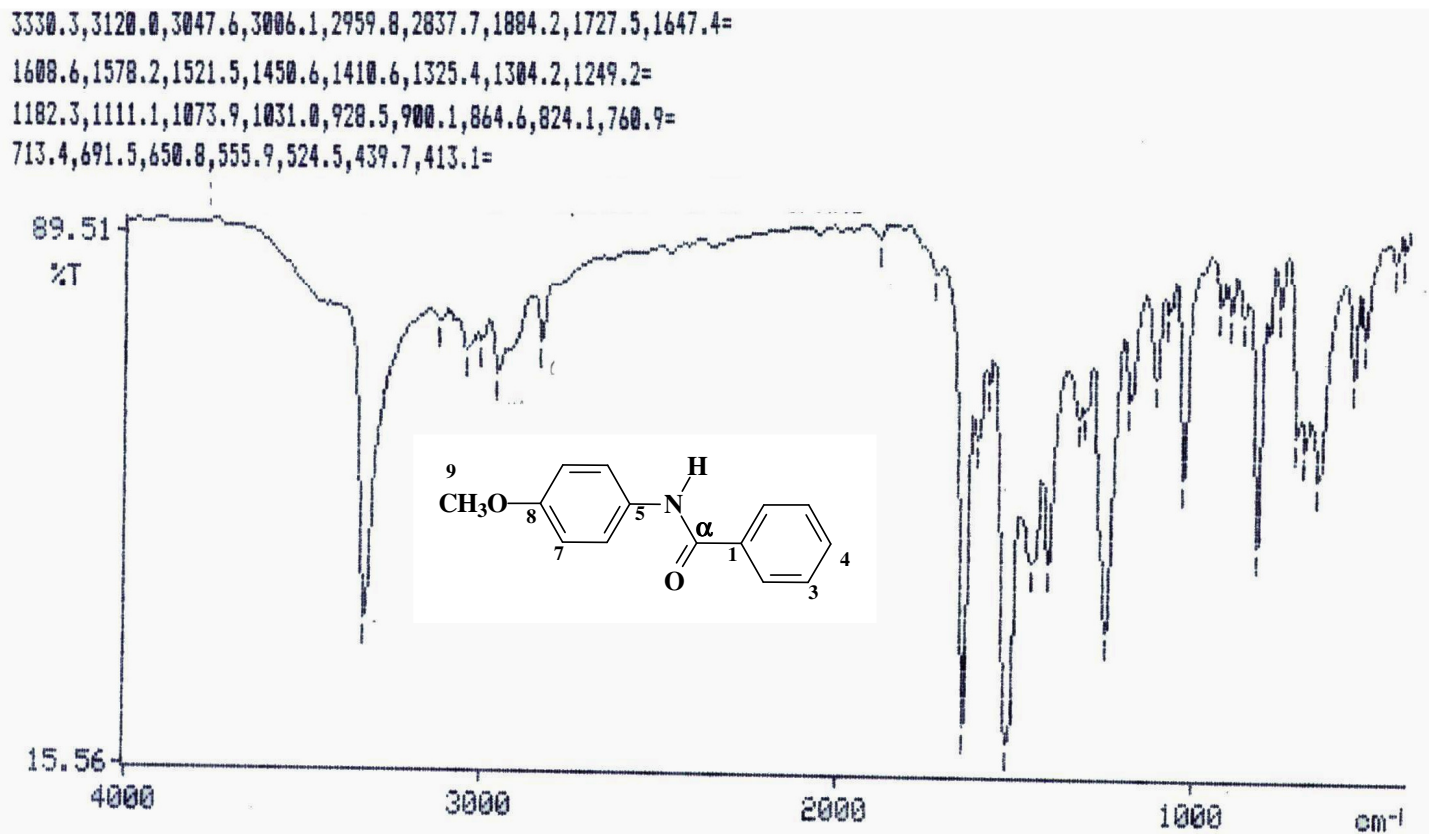
Anexo 04: Espectro de IV (KBr) do derivado **80**.



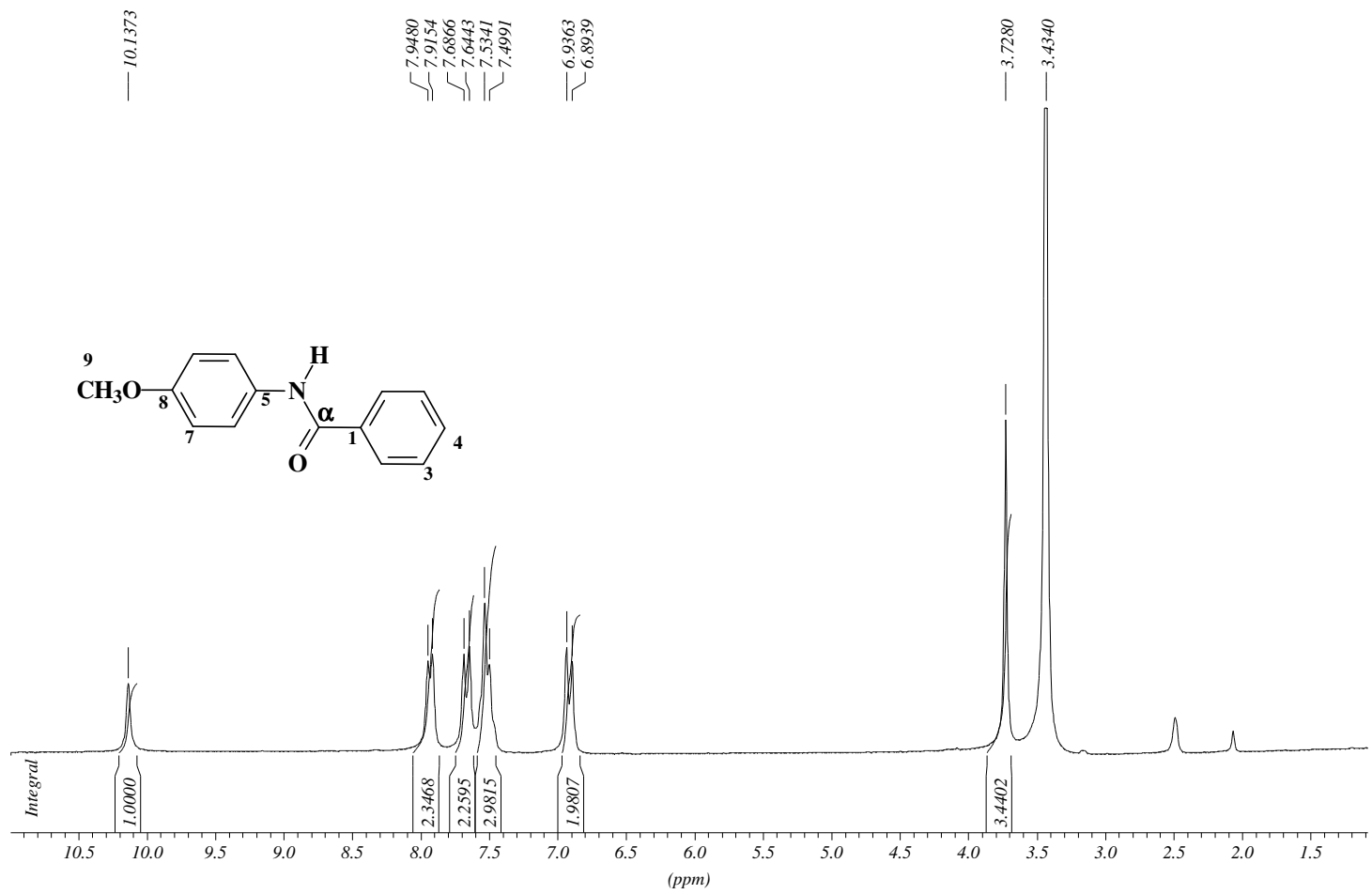
Anexo 05: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado **80**.



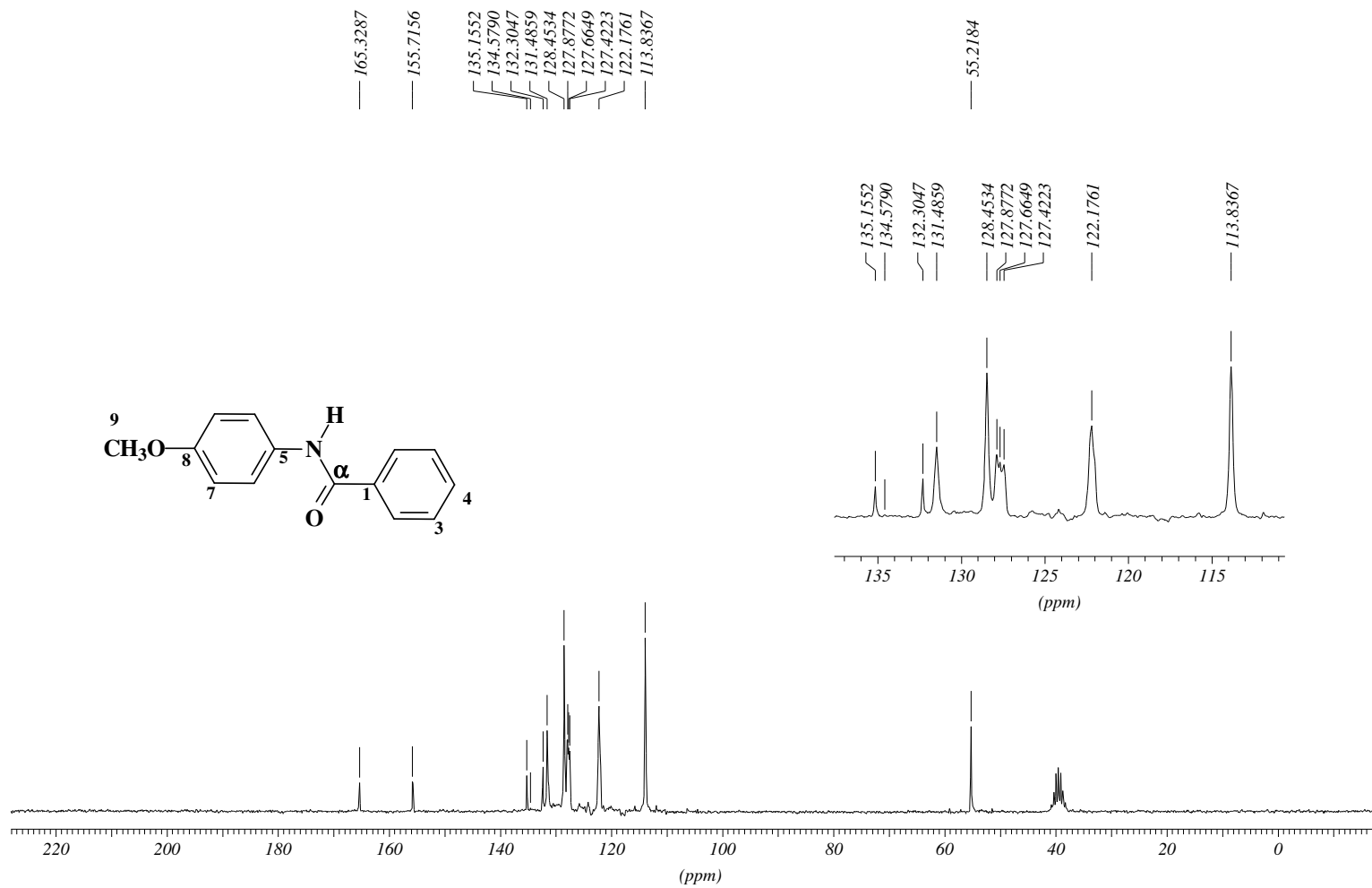
Anexo 06: Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆) do derivado **80**.



Anexo 07: Espectro IV (KBr) do derivado 81.



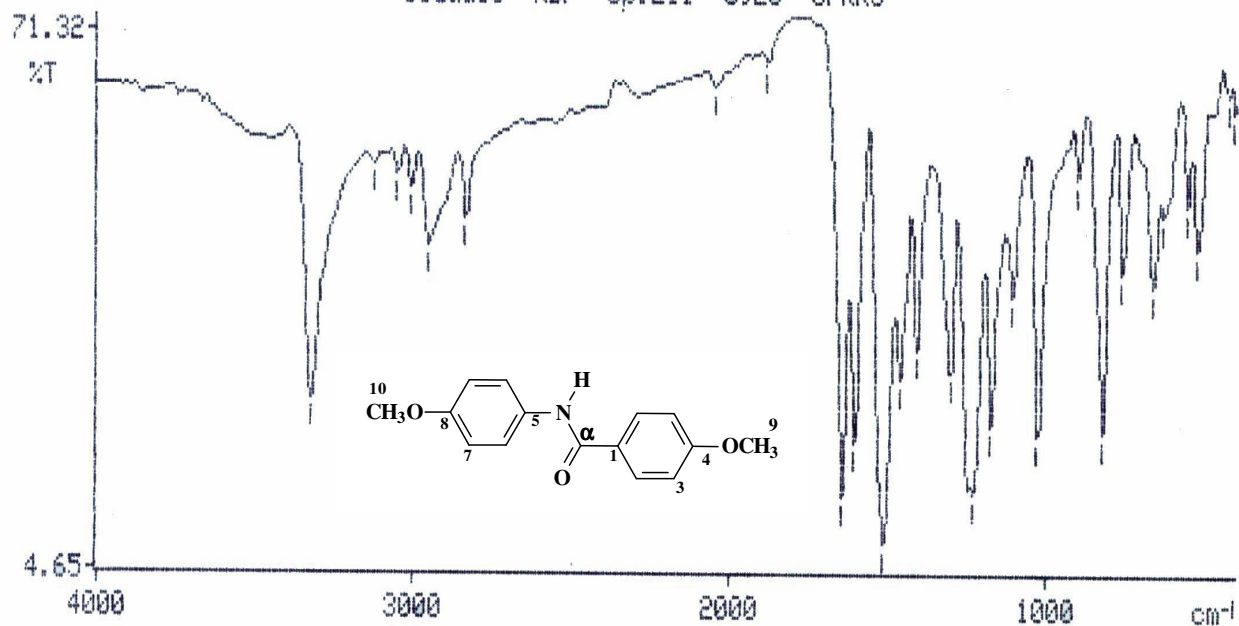
Anexo 08: Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆) do derivado 81.



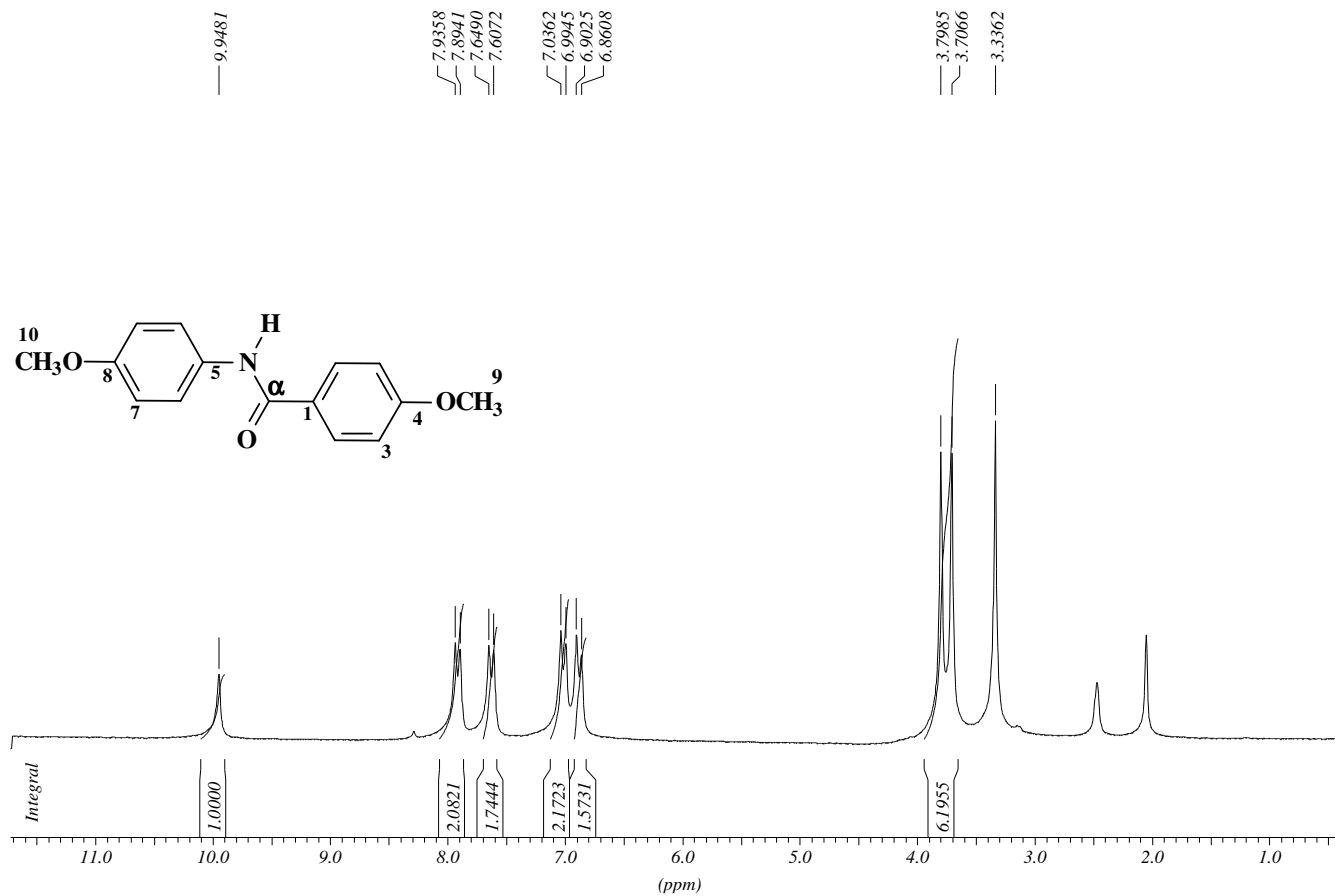
Anexo 09: Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆) do derivado **81**.

3324.9, 3123.0, 3050.6, 3009.2, 2954.1, 2834.9, 2045.8, 1881.8=
1646.3, 1605.7, 1513.9, 1463.3, 1410.7, 1303.8, 1230.5, 1175.9=
1106.1, 1027.5, 899.3, 822.9, 759.9, 663.1, 627.8, 554.8=
523.8, 424.3, 407.8=

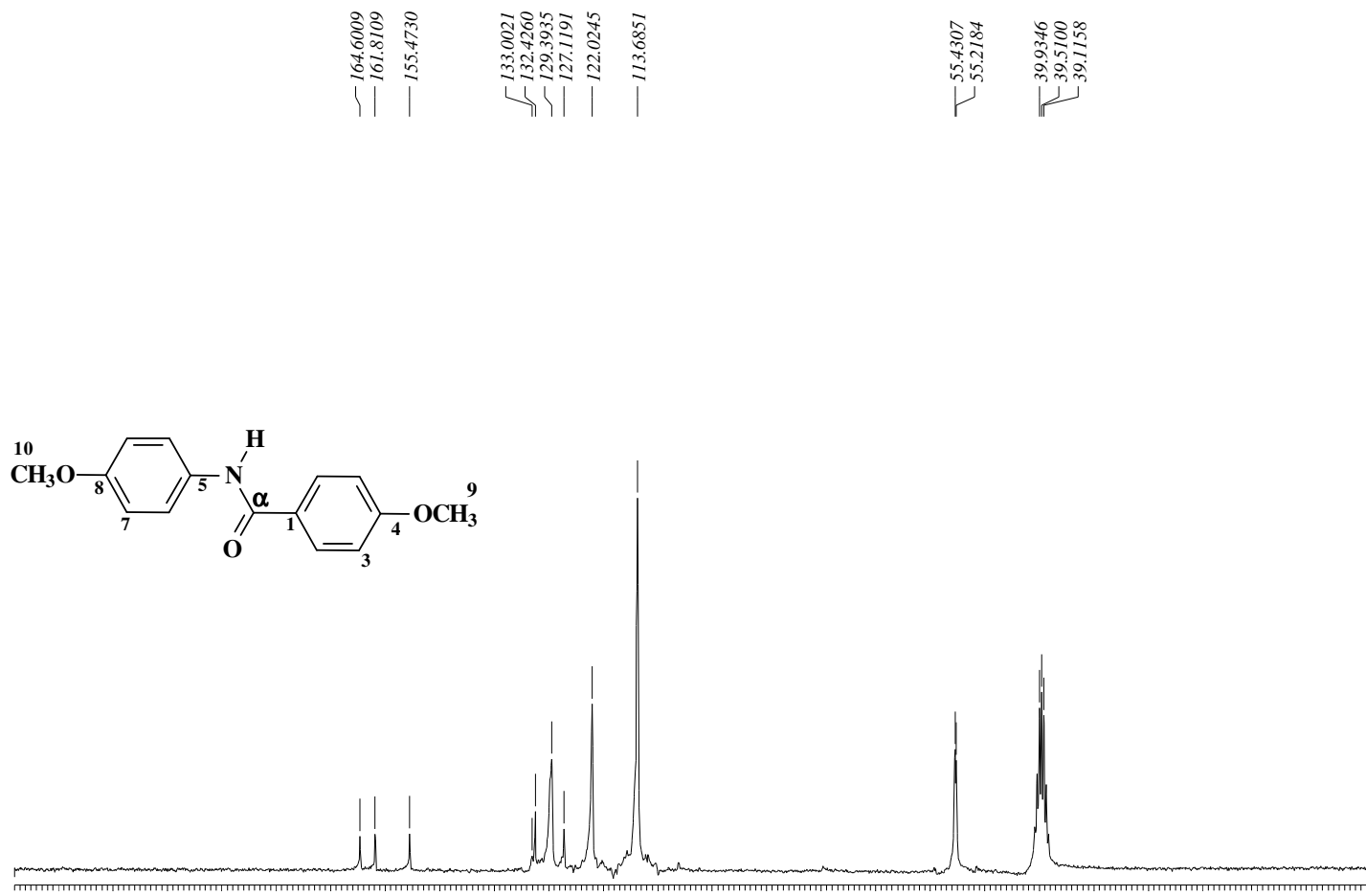
Claudio KBr Op.Eli 6920 UFRRJ



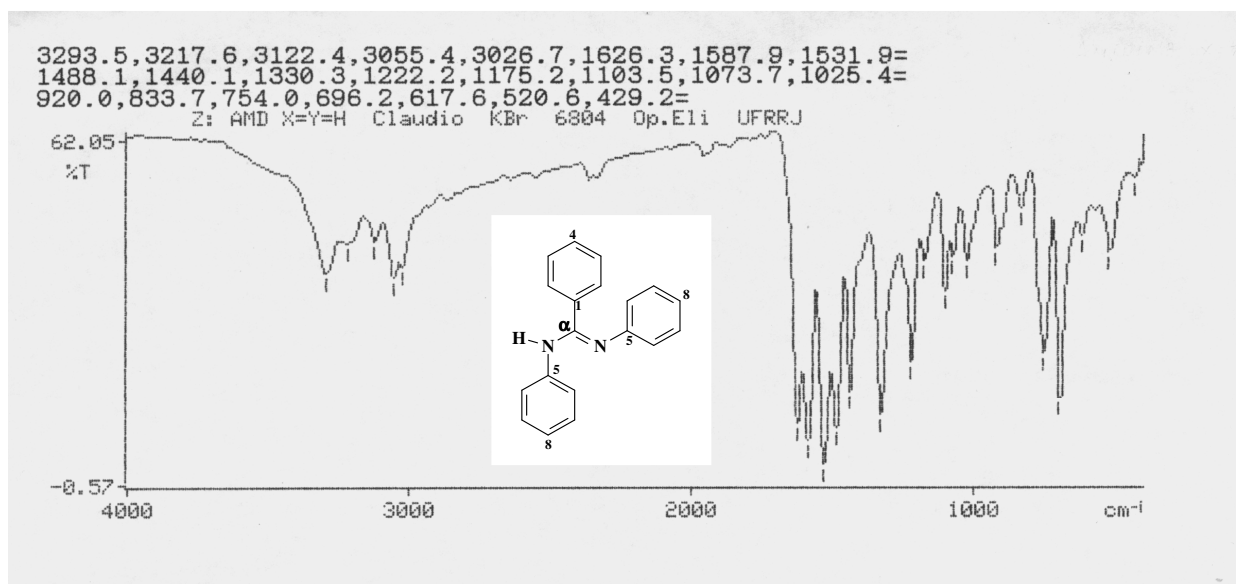
Anexo 10: Espectro IV (KBr) do derivado 82.



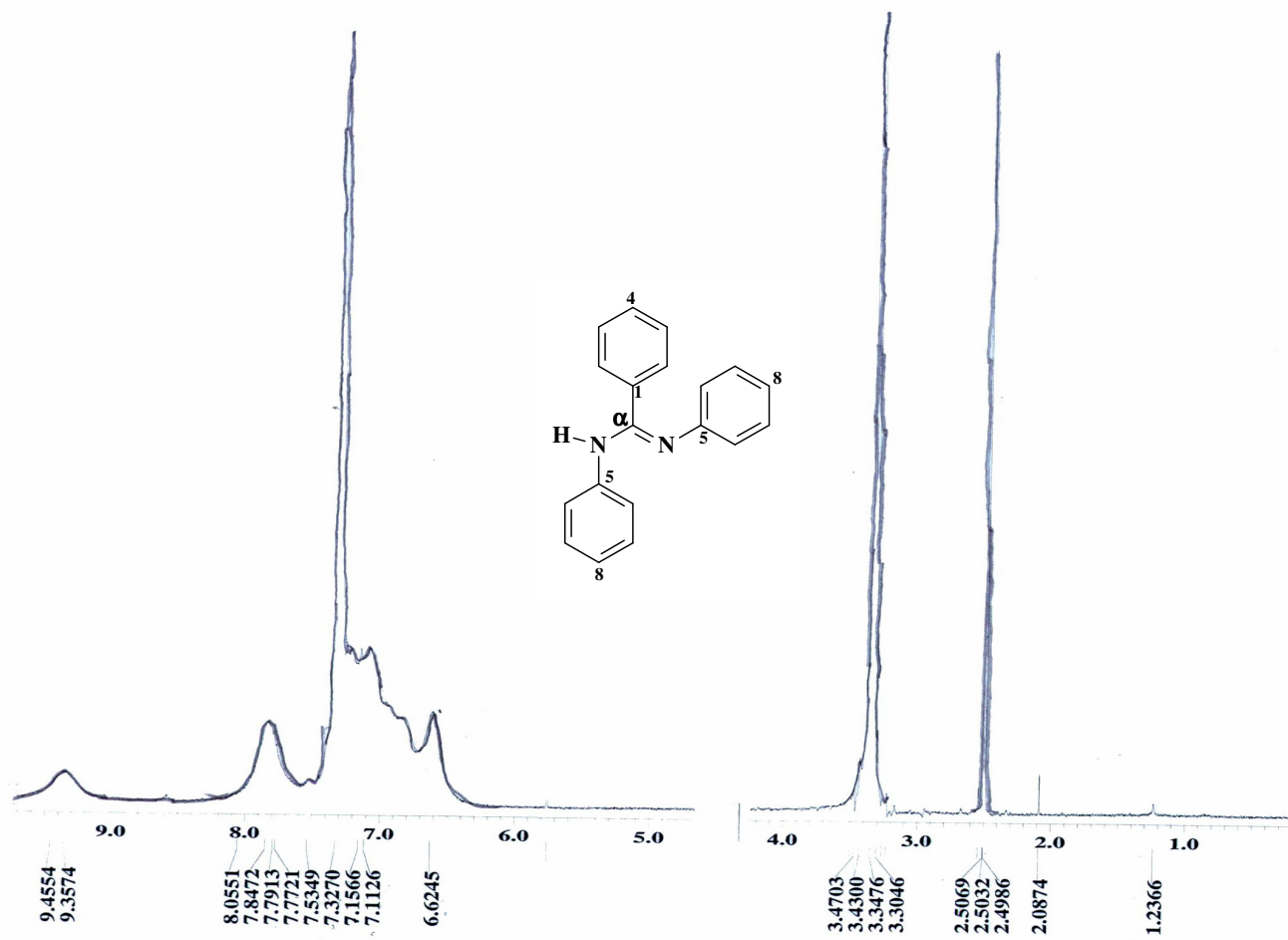
Anexo 11: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado **82**.



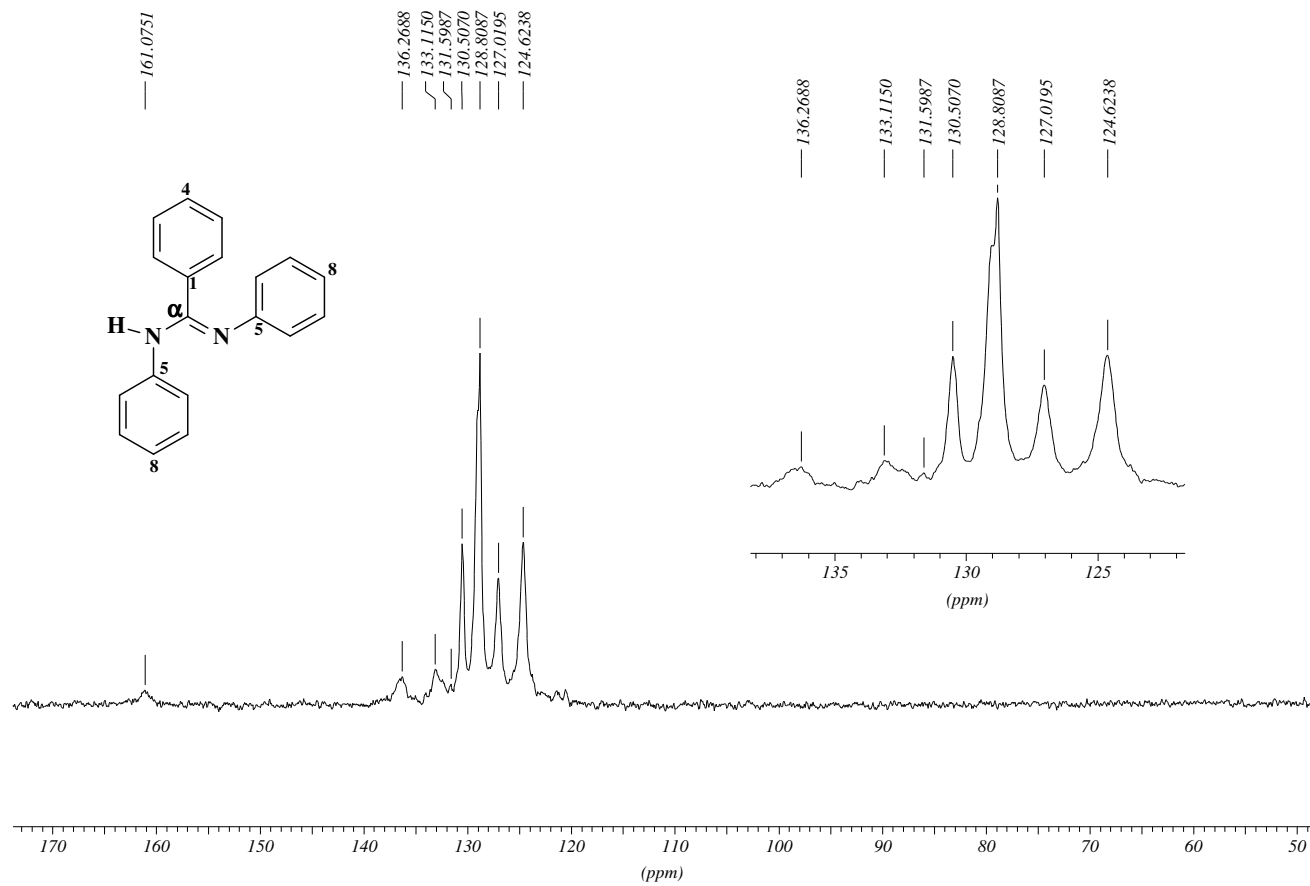
Anexo 12: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado 82.



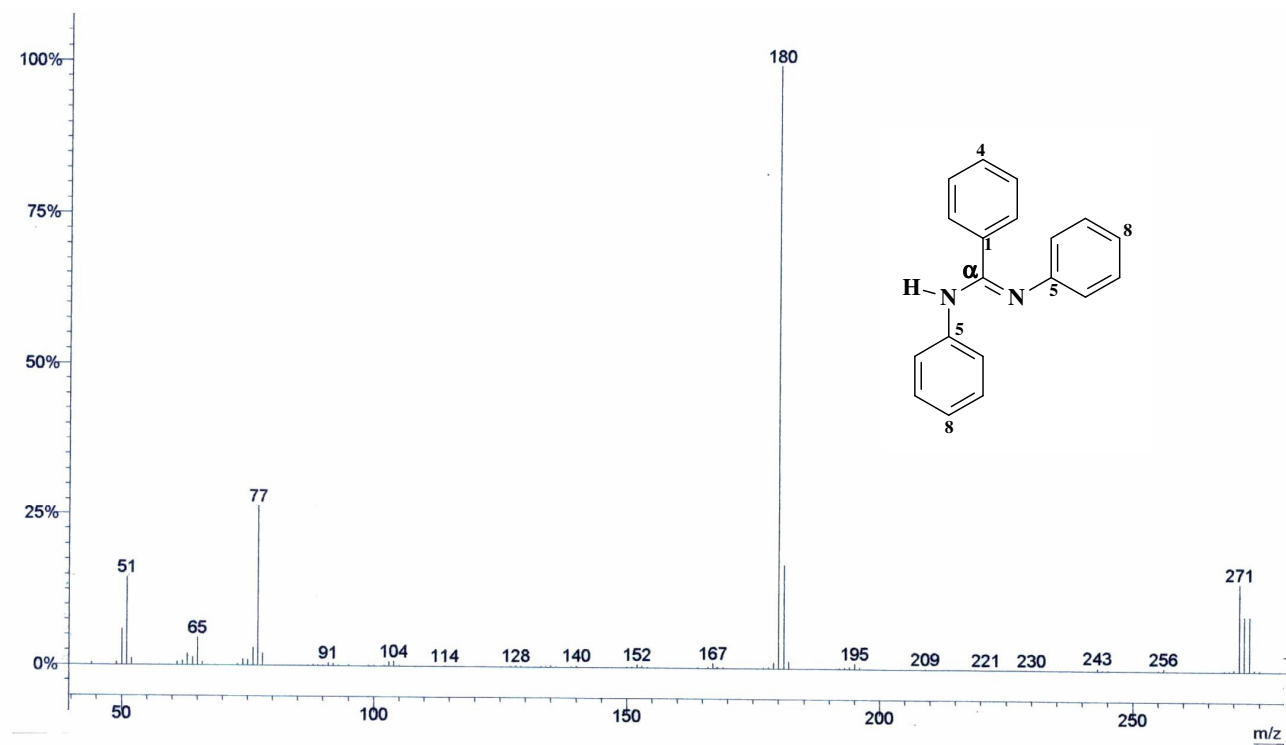
Anexo 13: Espectro de IV (KBr) do derivado **83**.



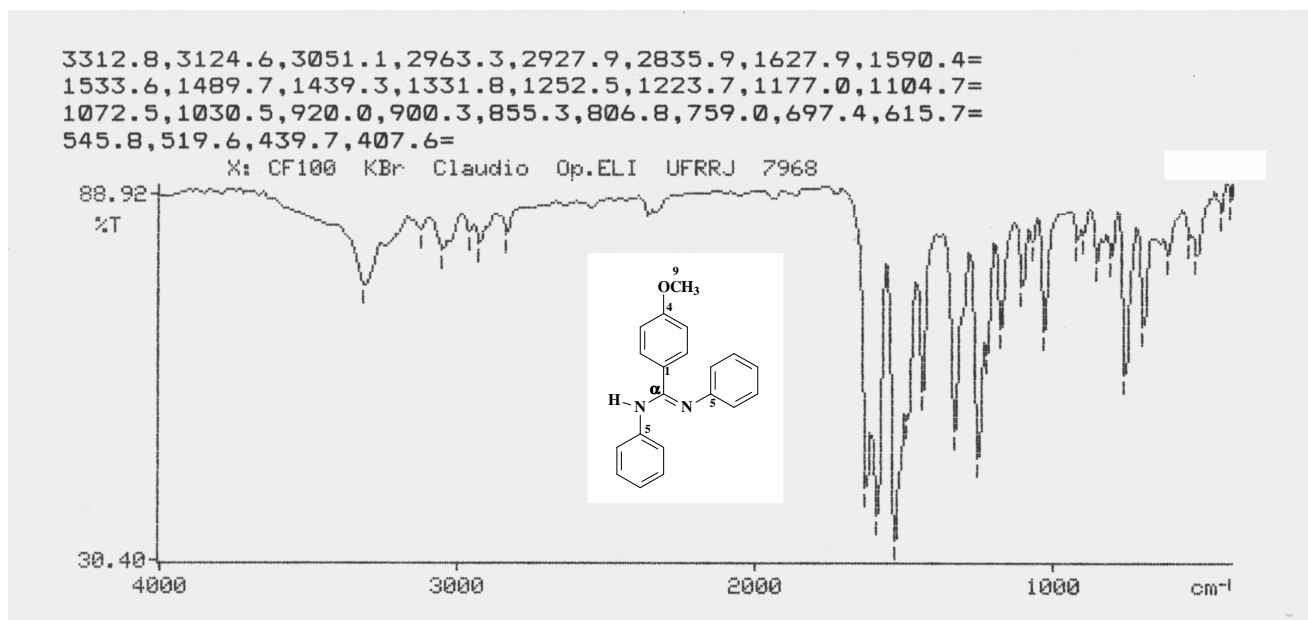
Anexo 14: Espectro de RMN de ^1H (DMSO-d_6) do derivado **83**.



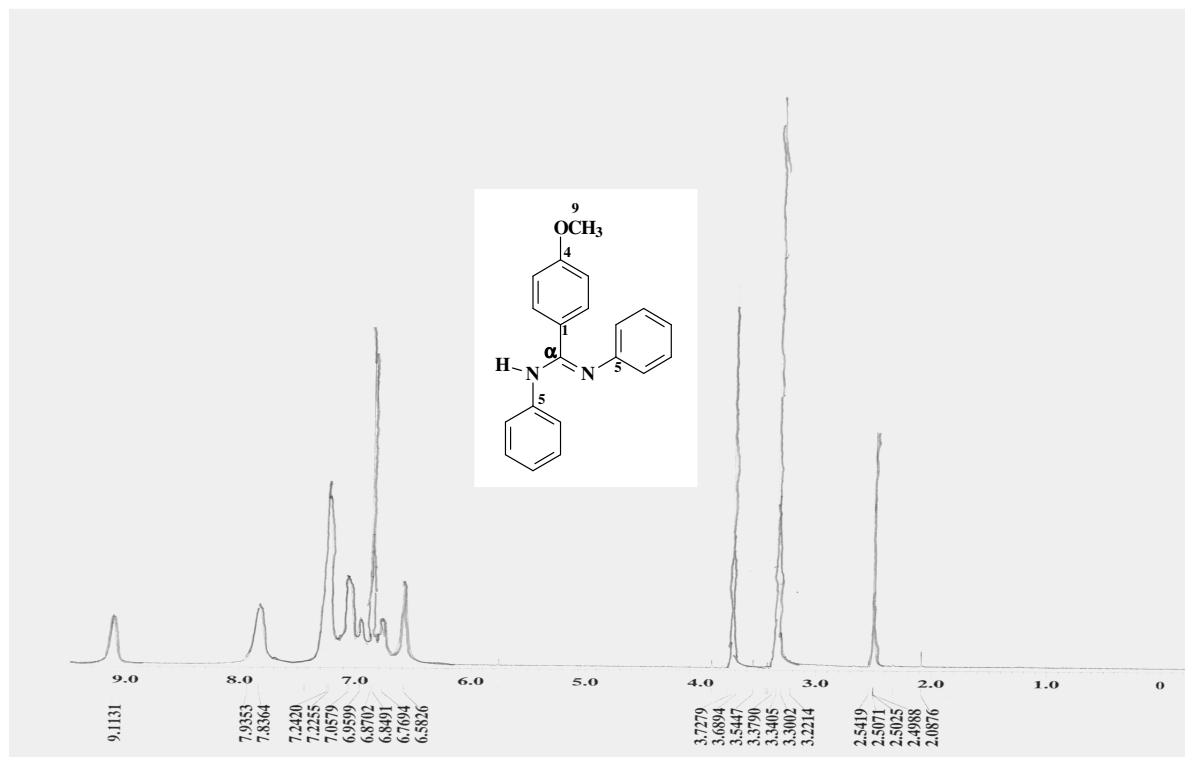
Anexo 15: Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado **83s**.



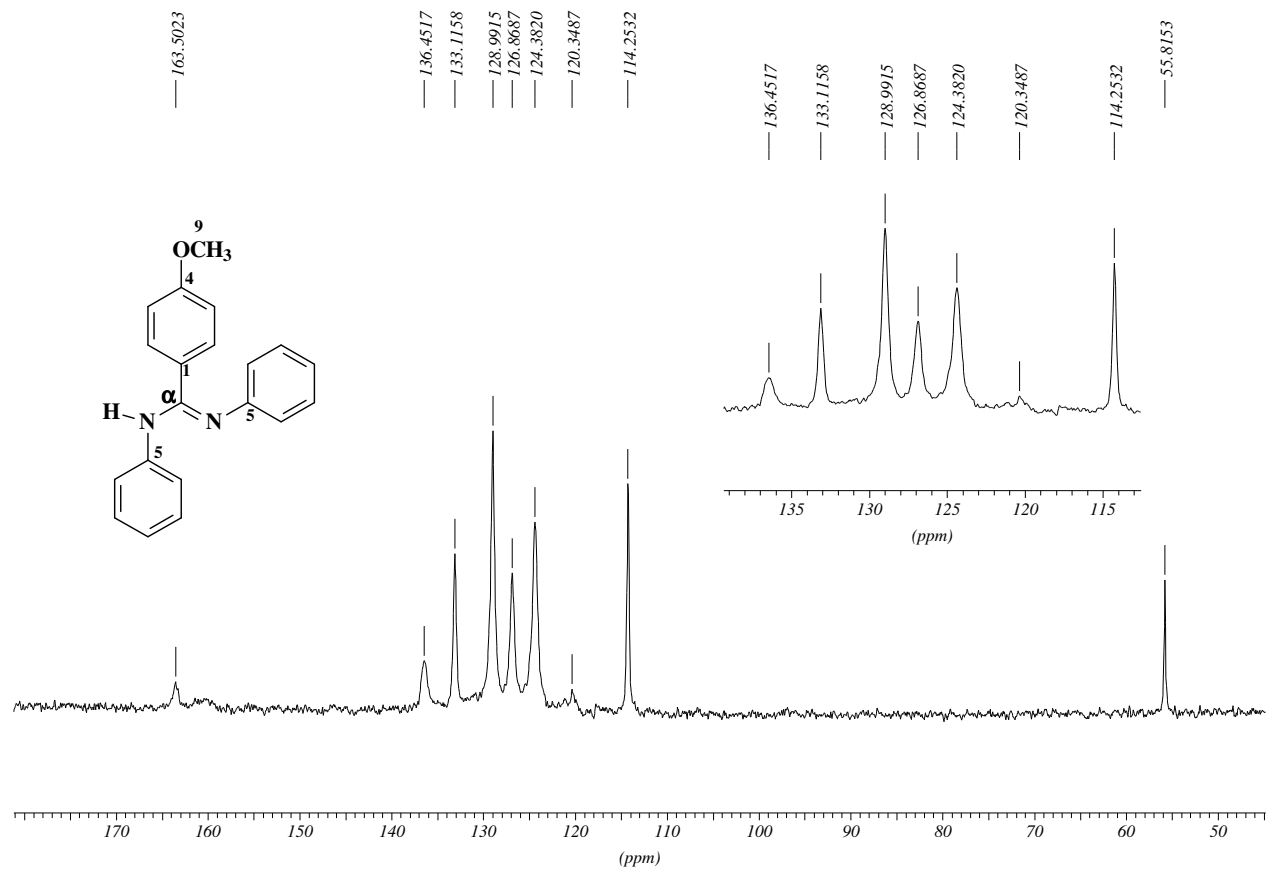
Anexo 16: EM do derivado 83s.



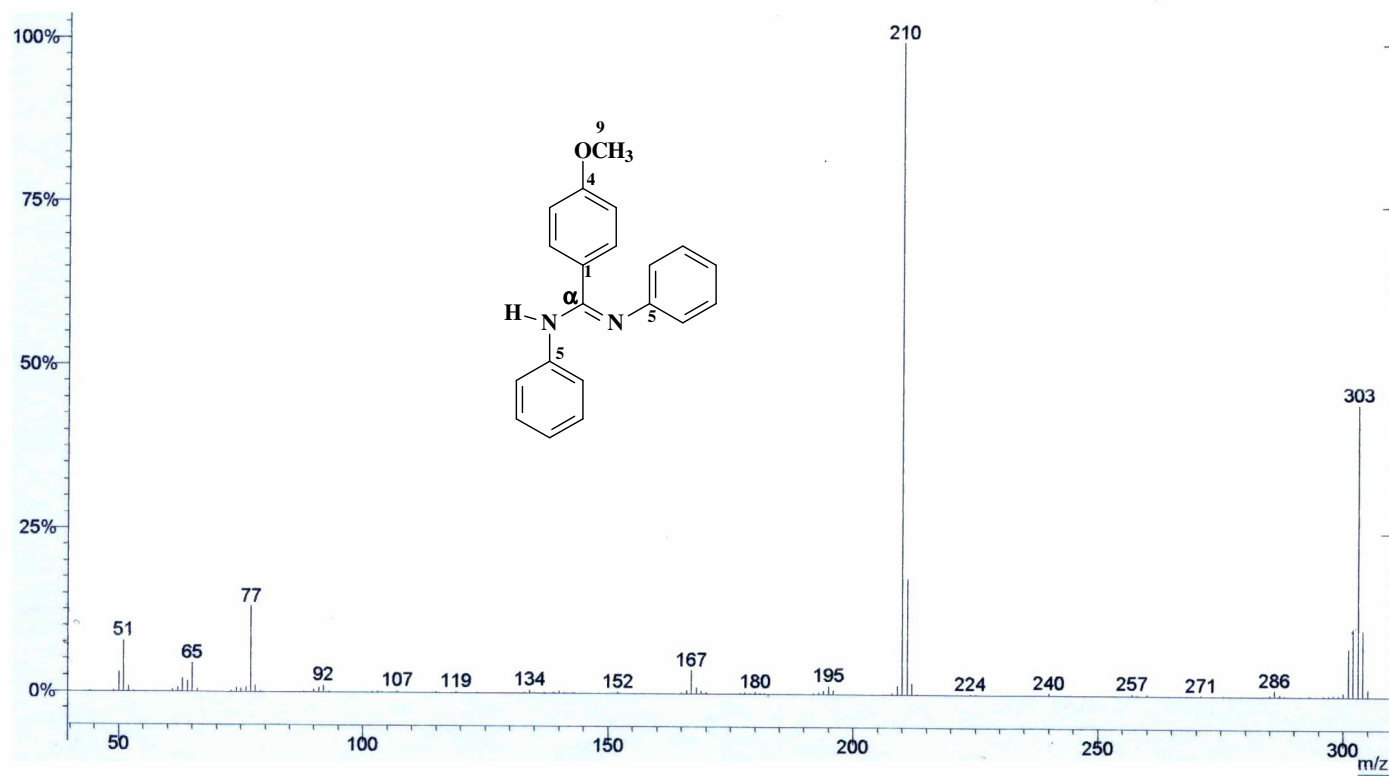
Anexo 17: IV (KBr) do derivado **84**.



Anexo 18: RMN de ¹H (DMSO -d₆) do derivado **84**.



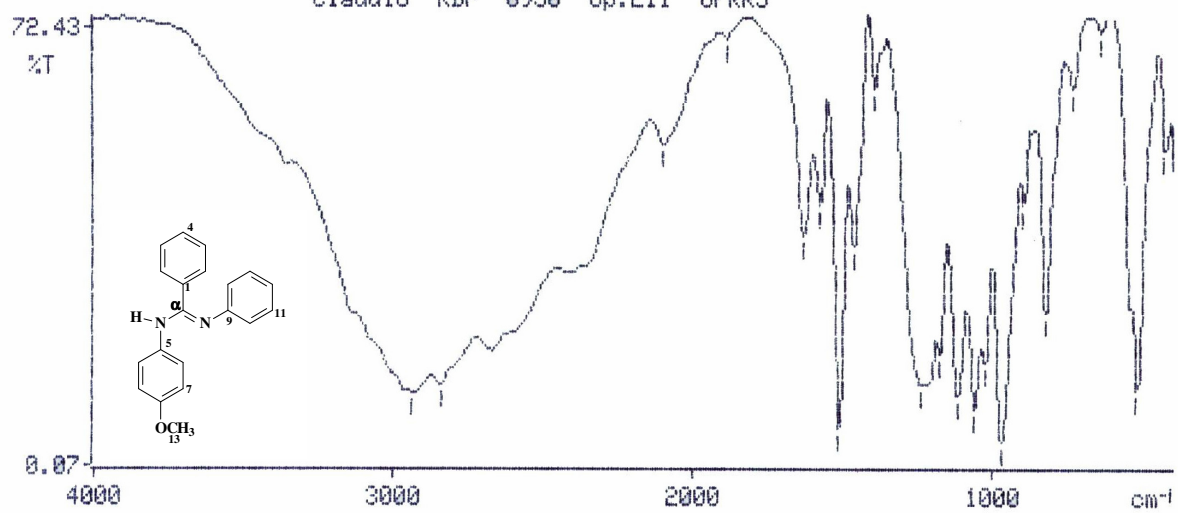
Anexo 19: RMN de ¹³C (DMSO-d₆) do derivado **84s**.



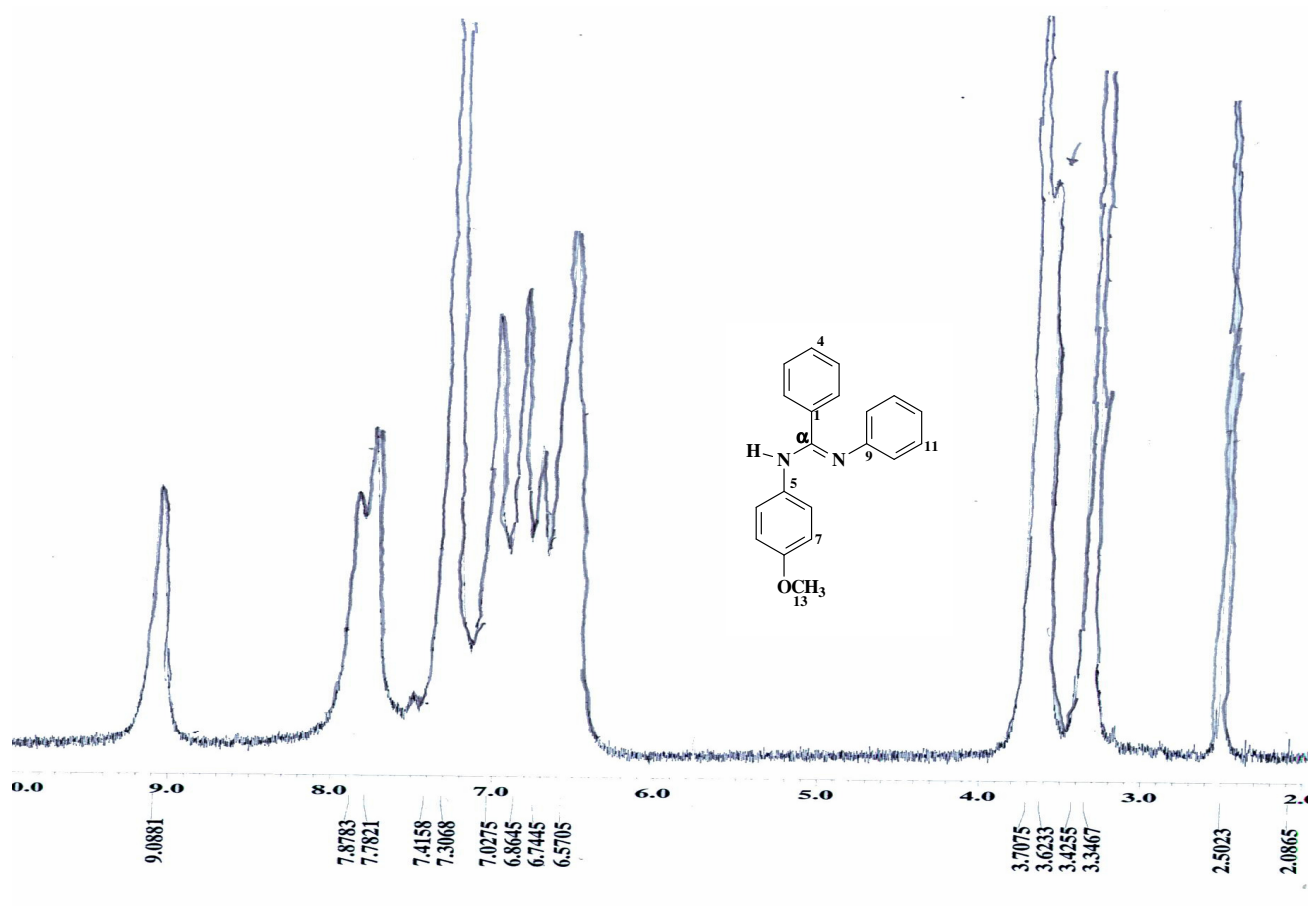
Anexo 20: EM do derivado 84s

2935.0,2839.2,2097.4,1884.9,1632.4,1575.5,1513.9,1465.0=
1394.6,1242.1,1178.9,1118.7,1061.7,1026.7,972.4,897.5=
826.9,730.9,639.5,520.1,427.8=

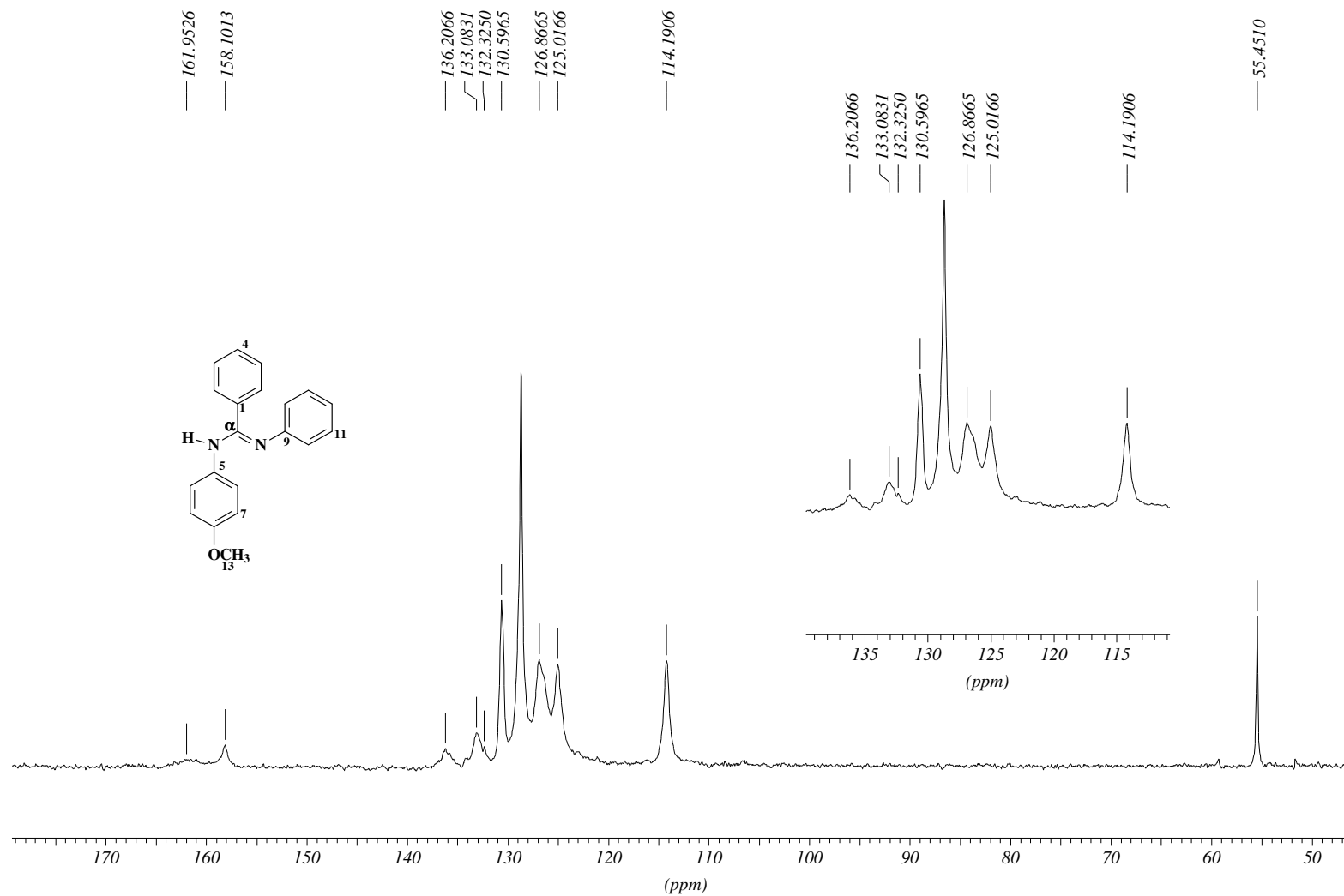
Claudio KBr 6958 Op.Eli UFRRJ



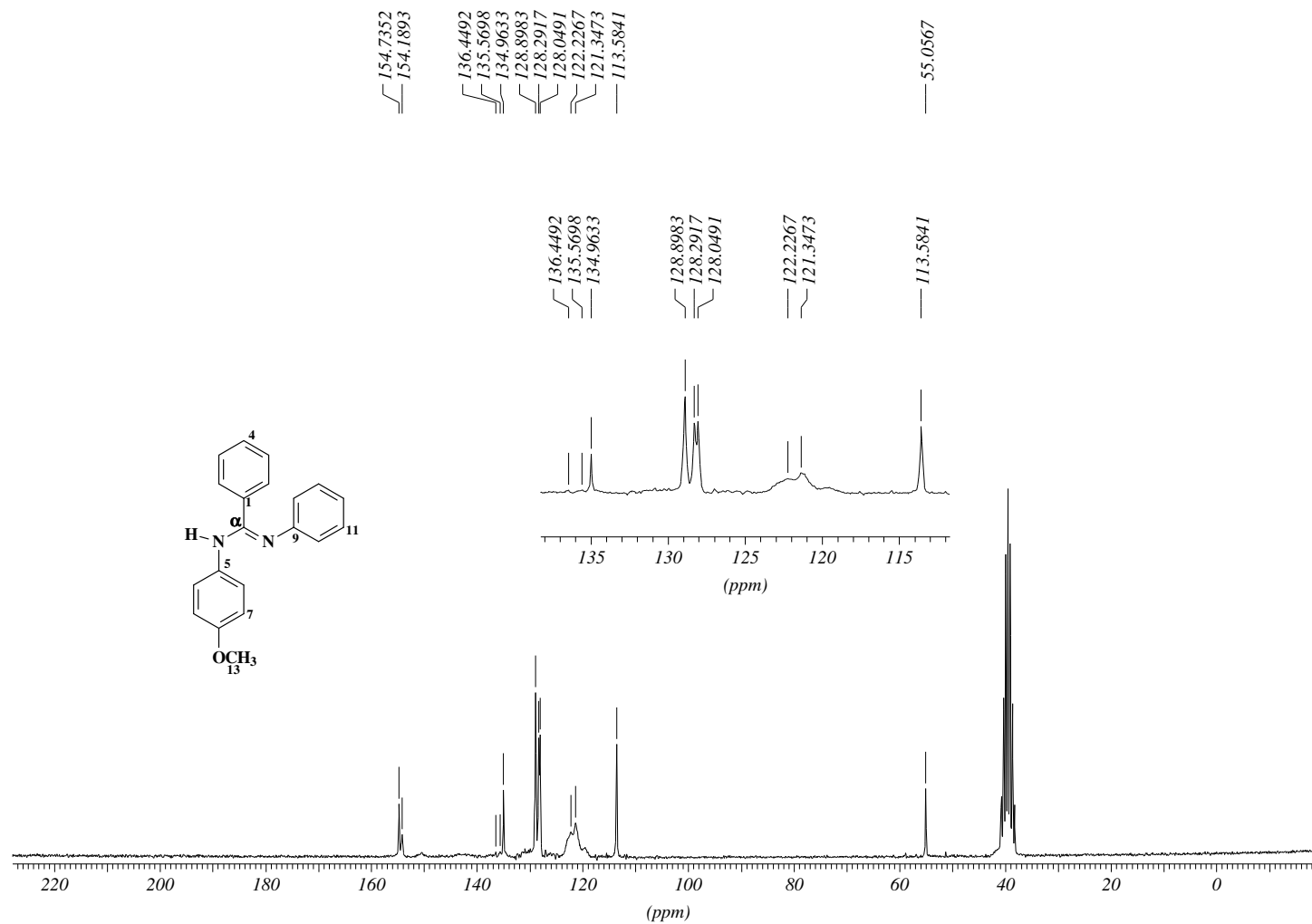
Anexo 21: Espectro de IV (KBr) do derivado 85.



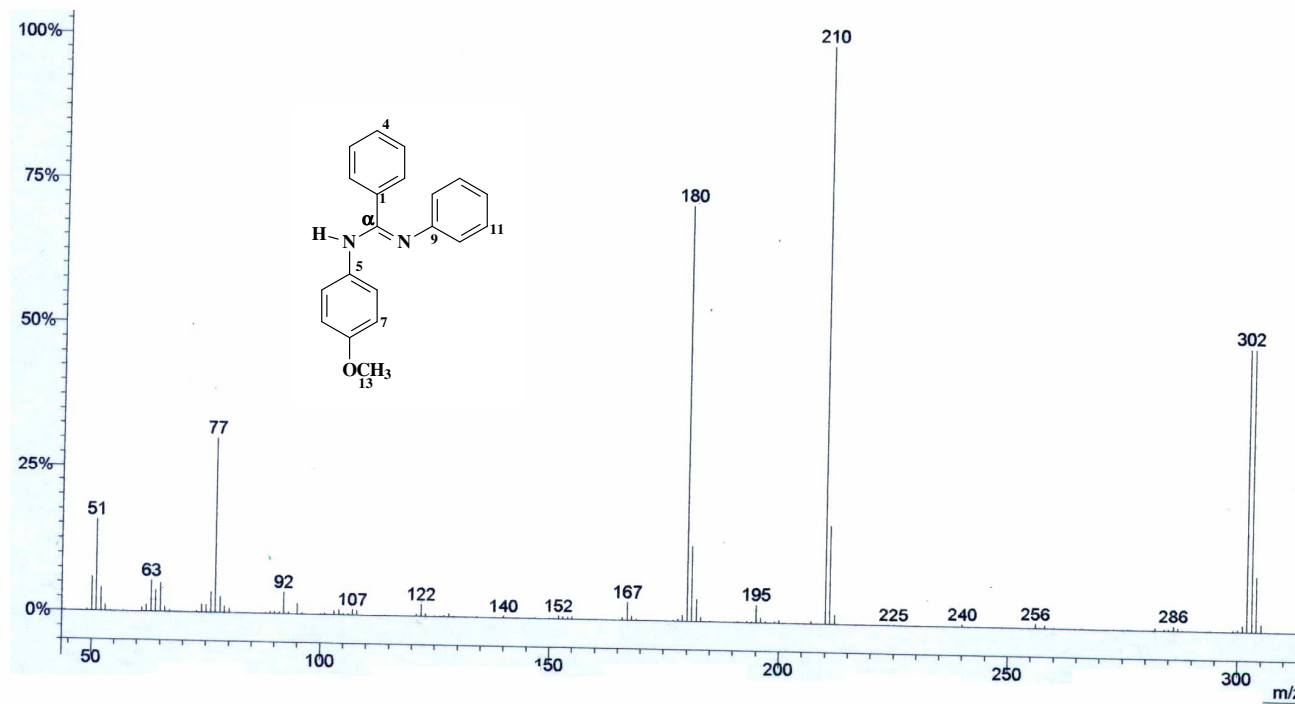
Anexo 22: Espectro de RMN de ¹H (DMSO-d₆) do derivado 85.



Anexo 23: Espectro de RMN ¹³C (DMSO-d₆) do derivado **85s**.

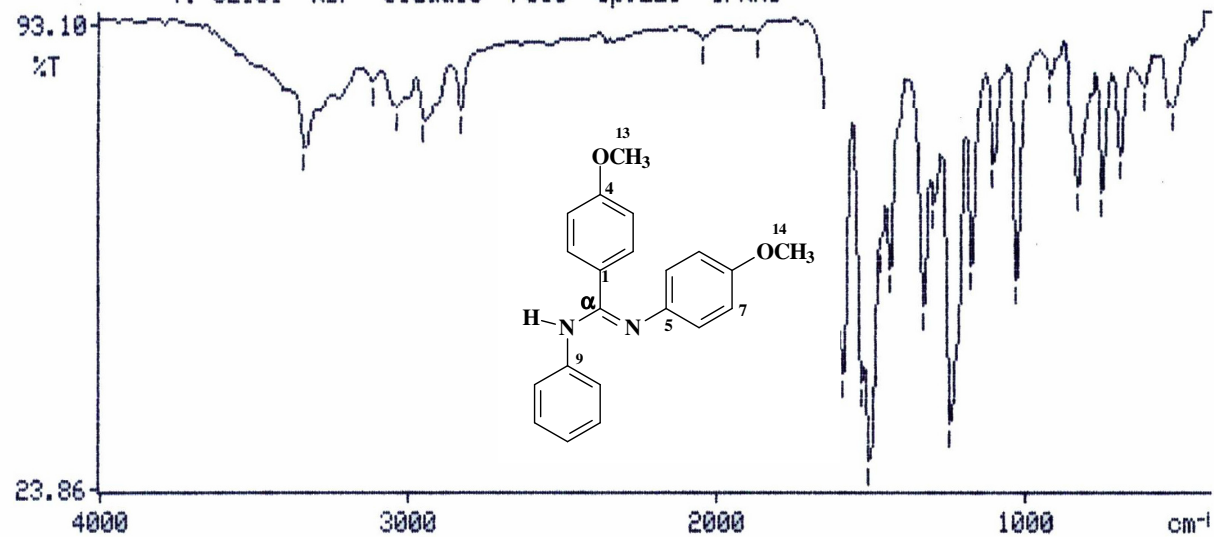


Anexo 24: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado **85**.

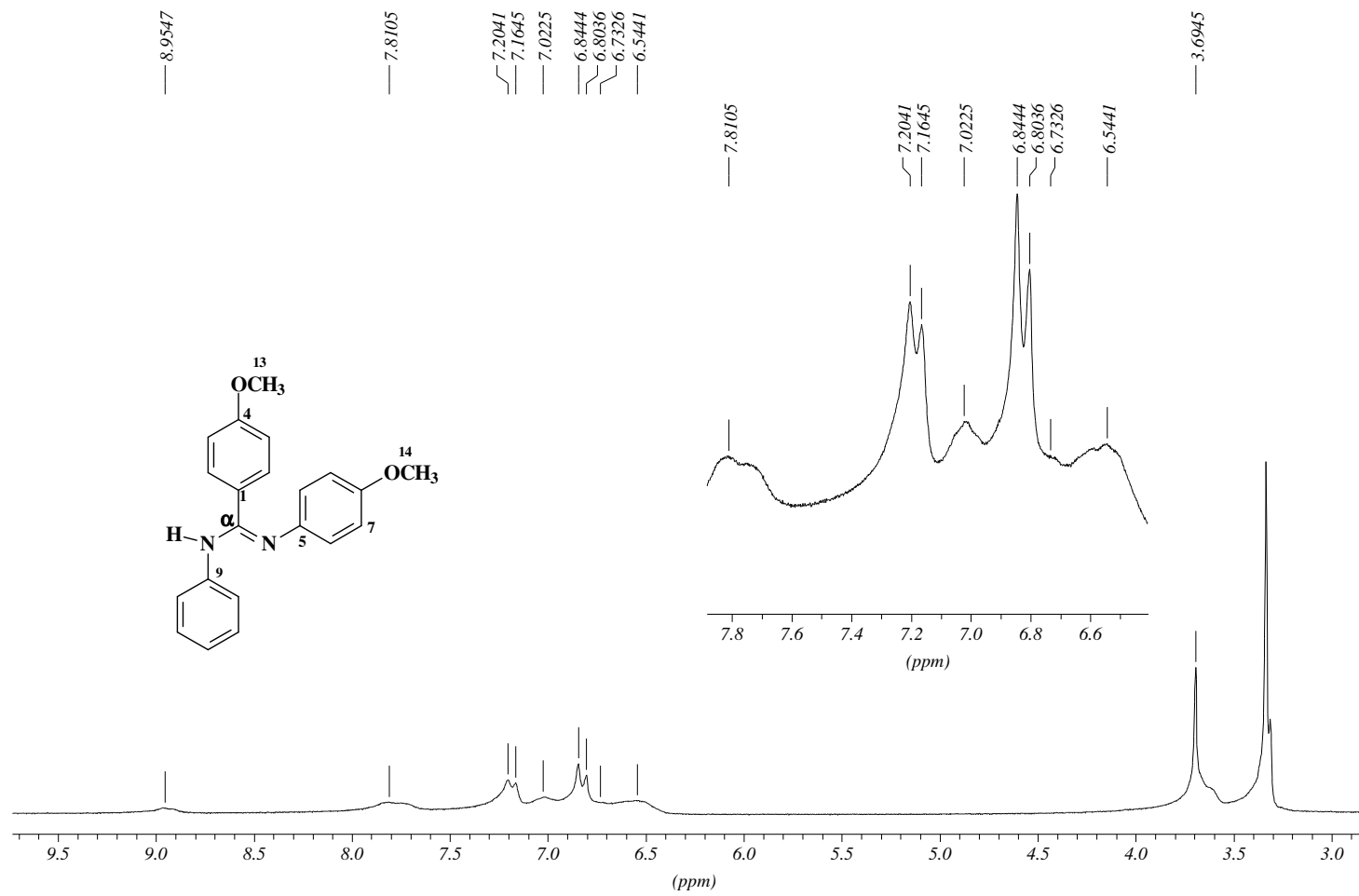


Anexo 25: EM do derivado 85s.

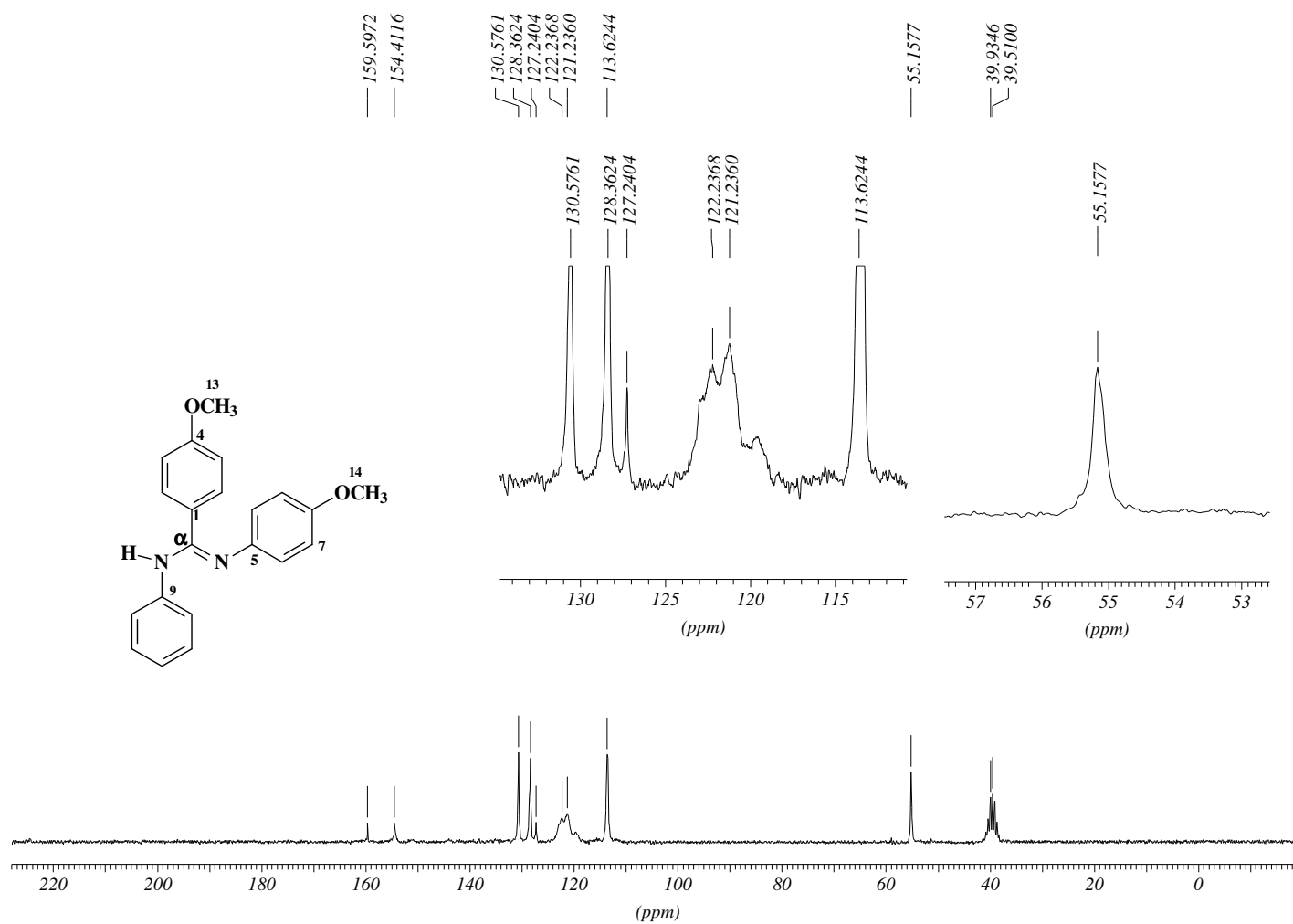
3334.7,3117.6,3037.5,2950.3,2833.5,2045.4,1871.5,1626.5=
1592.2,1533.3,1505.7,1466.1,1439.7,1331.5,1297.5,1244.6=
1176.7,1104.7,1030.3,922.1,832.8,754.1,694.6,618.2,524.9=
Y: CE101 KBr Claudio 7858 Op.ELI UFRRJ



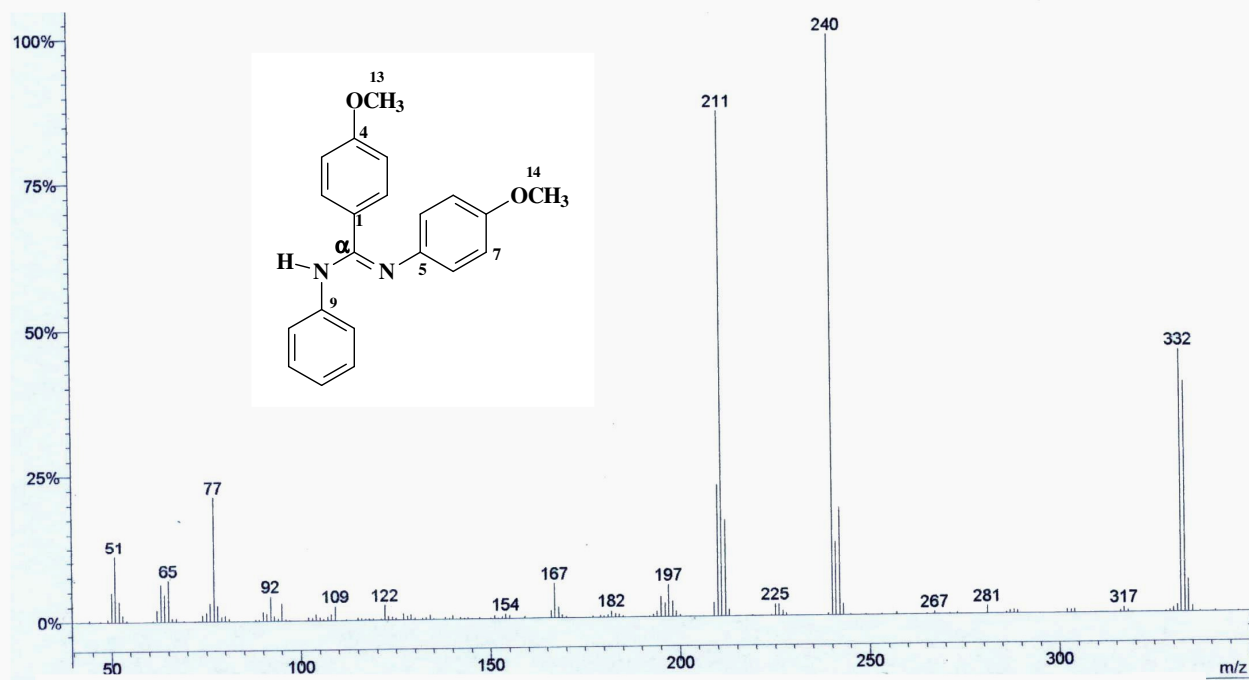
Anexo 26: Espectro de IV (KBr) do derivado 86.



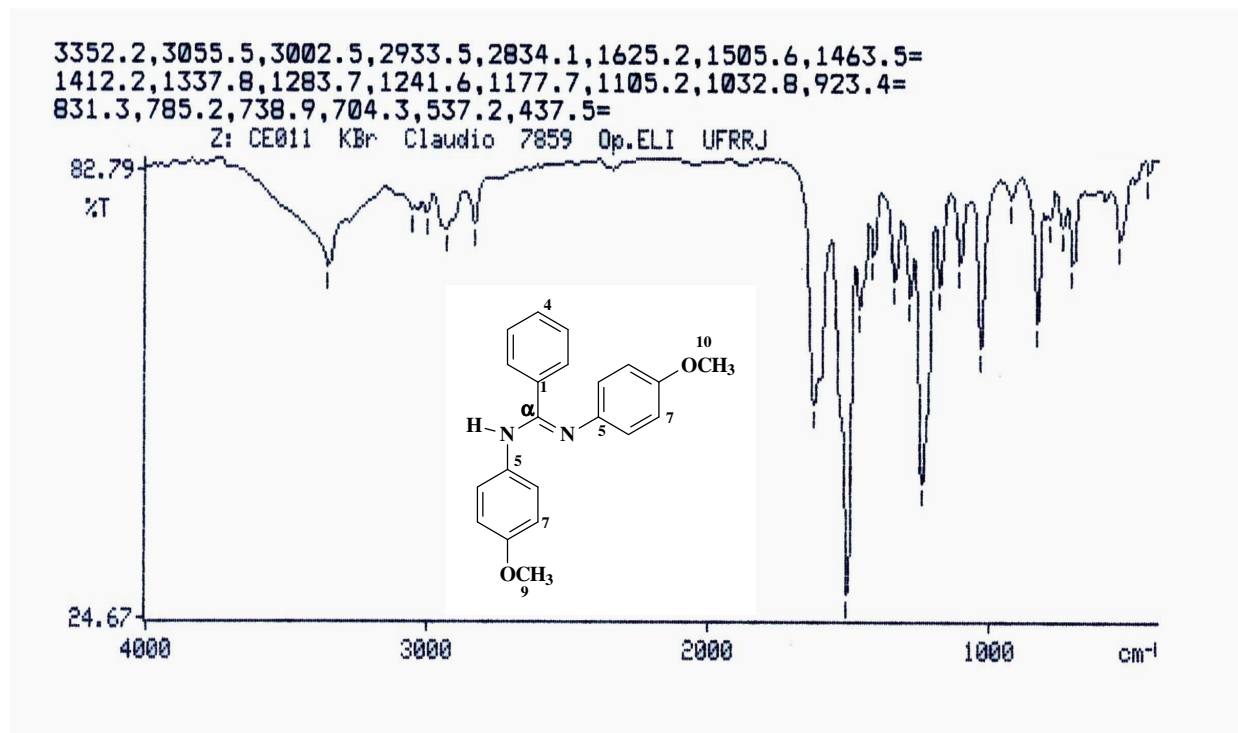
Anexo 27: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) derivado **86**.



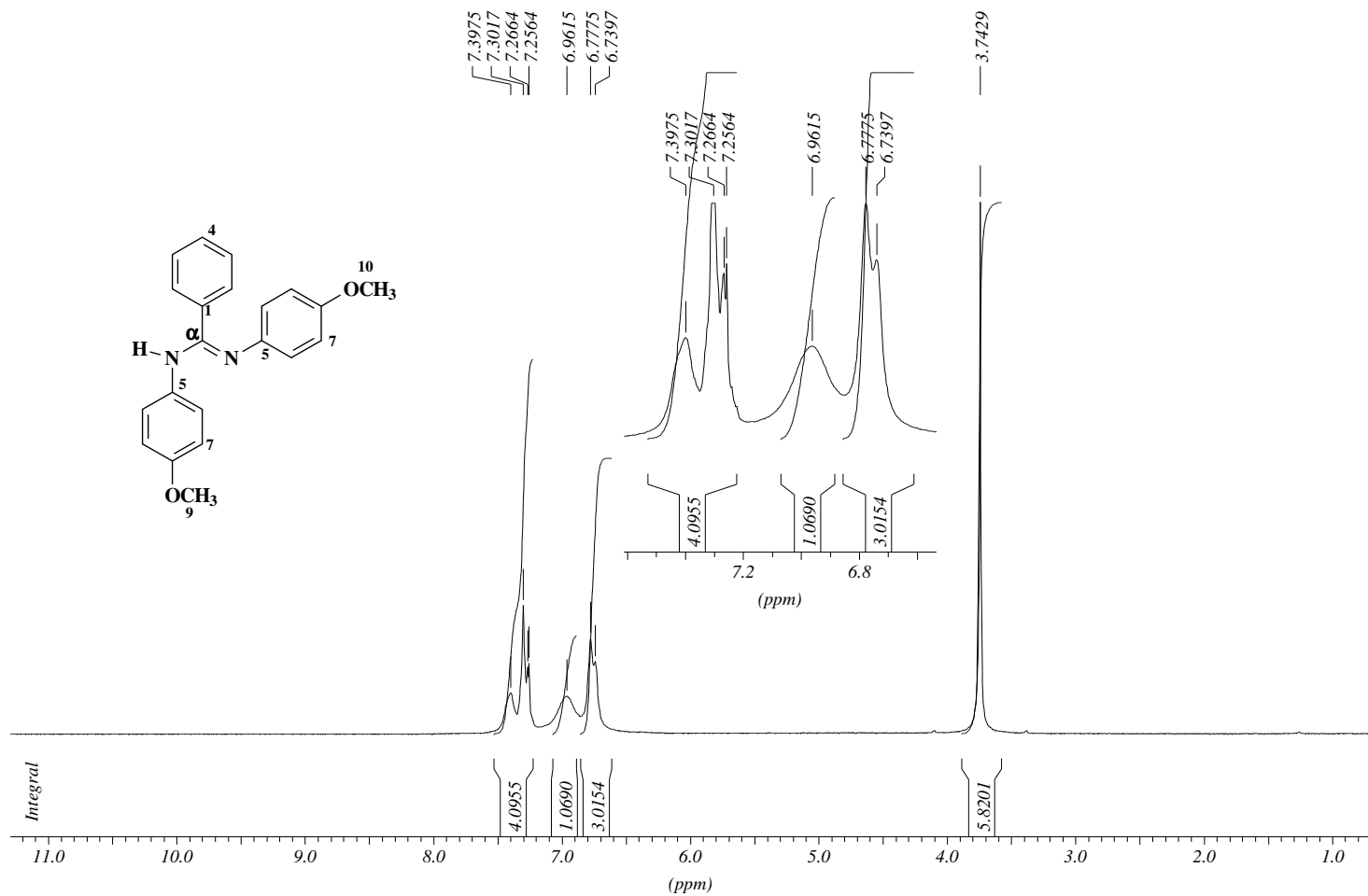
Anexo 28: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO-d_6) do derivado **86s**.



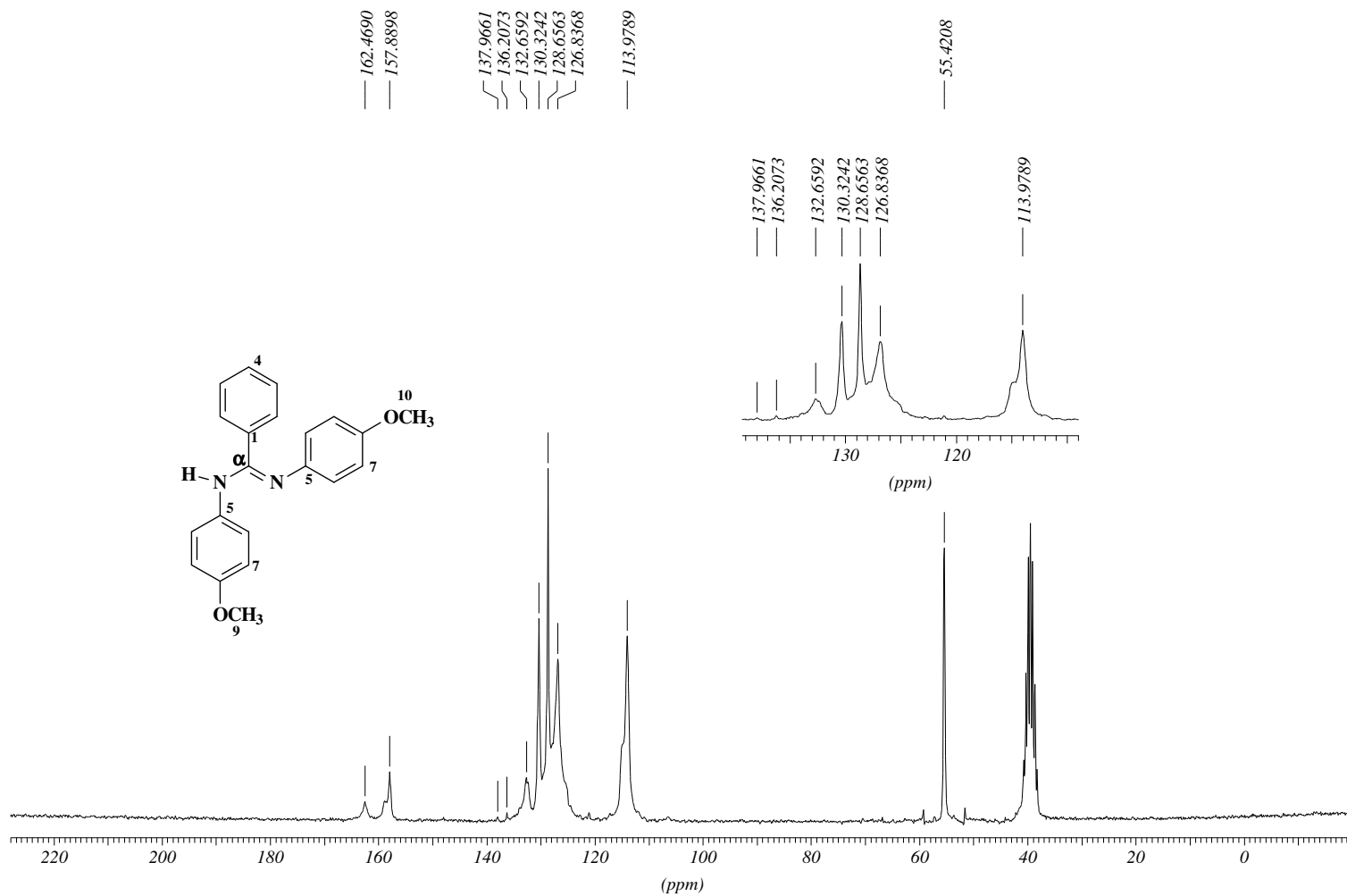
Anexo 29: EM do derivado 86.



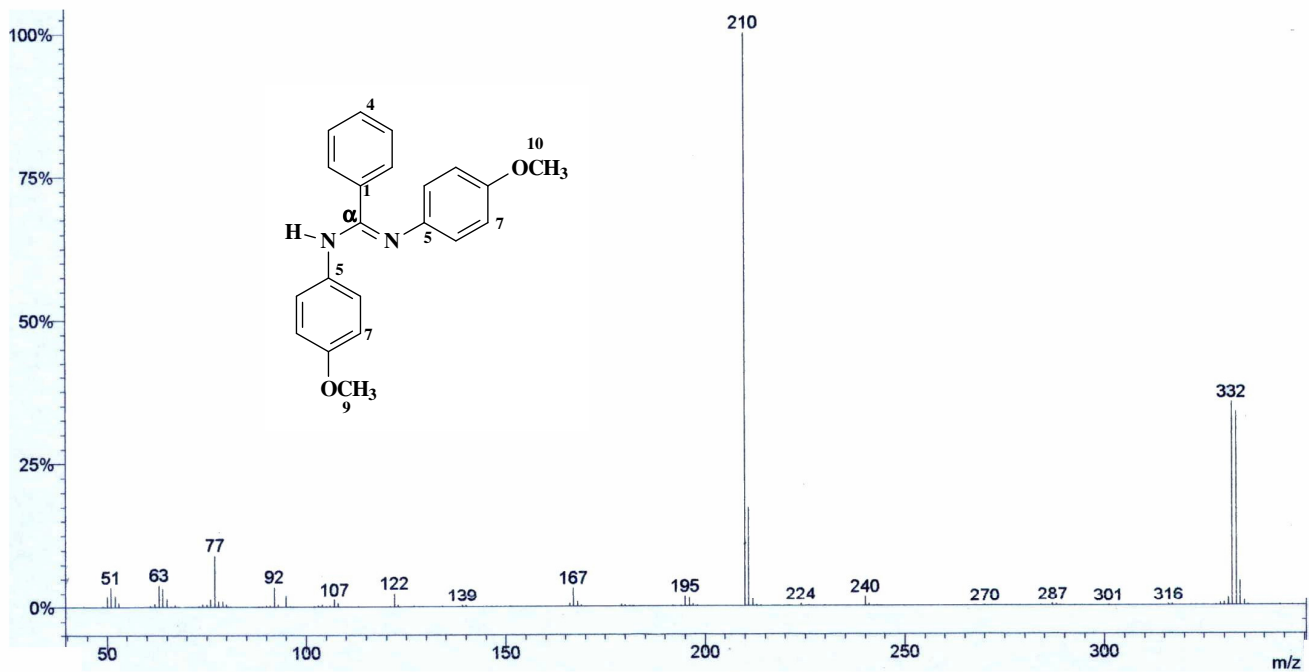
Anexo 30: Espectro de IV (KBr) do derivado **87**.



Anexo 31: Espectro de RMN ^1H (DMSO- d_6) do derivado **87**.



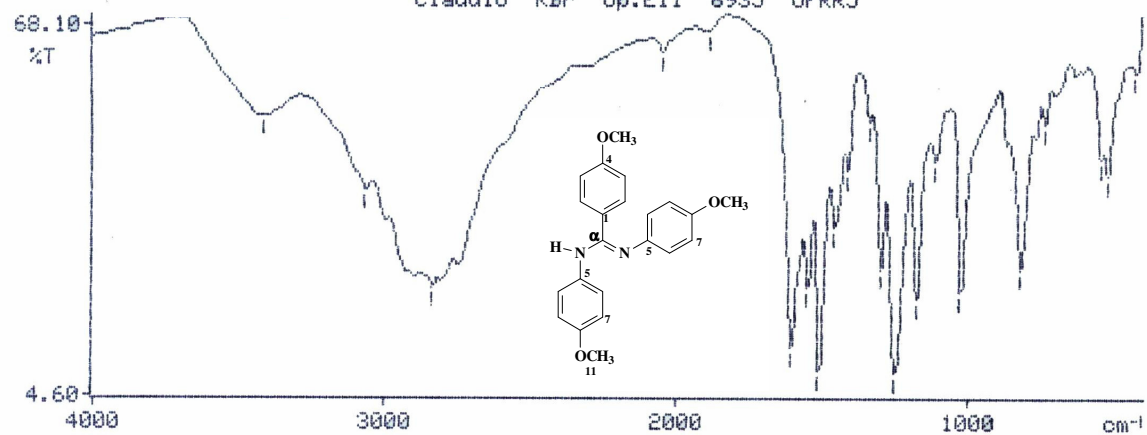
Anexo 32: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado **87s**.



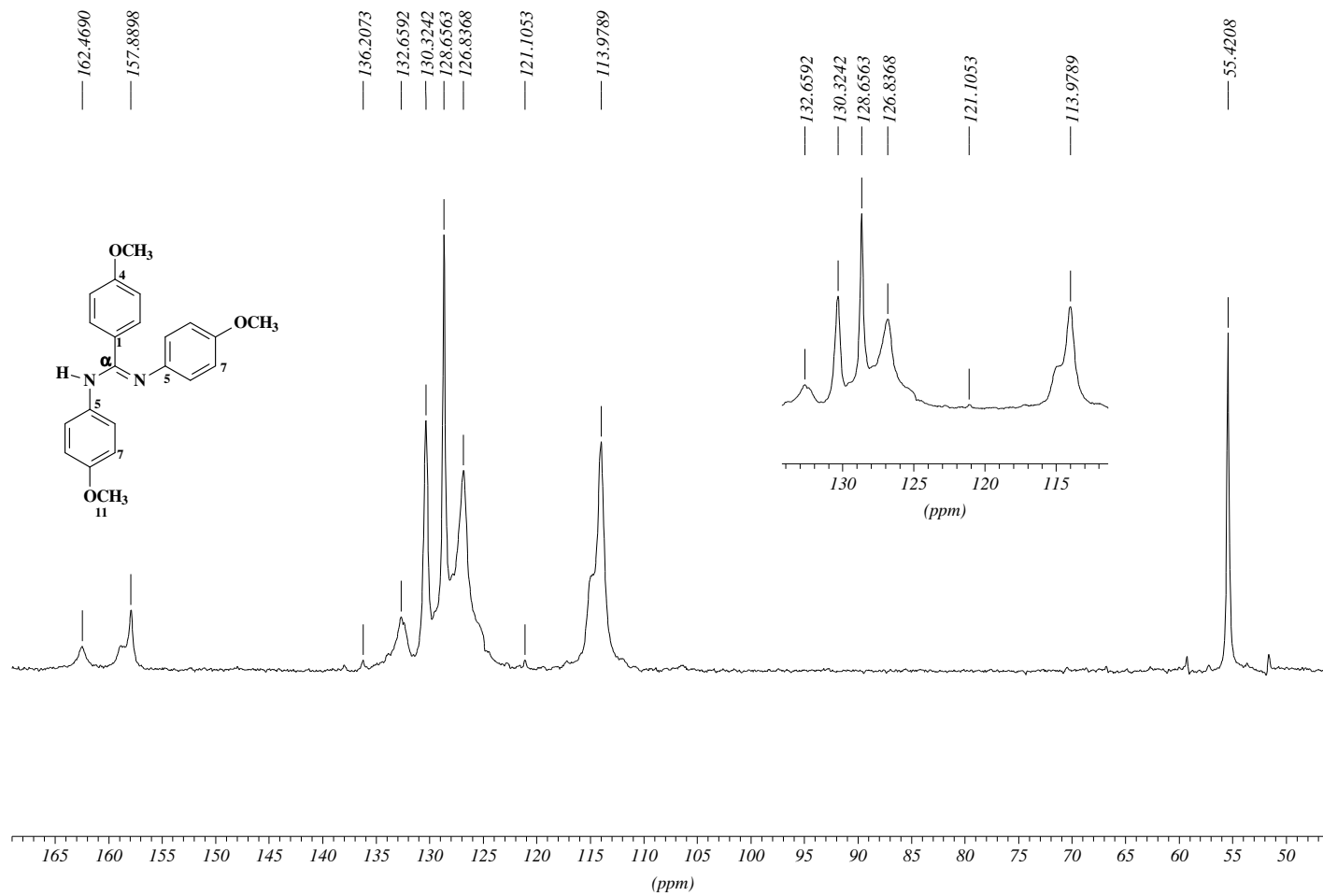
Anexo 33: EM do derivado 87s.

3414.4,3065.5,2837.0,2048.0,1887.2,1606.7,1551.2,1512.0=
1458.7,1414.9,1340.1,1301.0,1253.1,1180.1,1113.2,1027.2=
823.5,739.7,549.7,526.1,428.2=

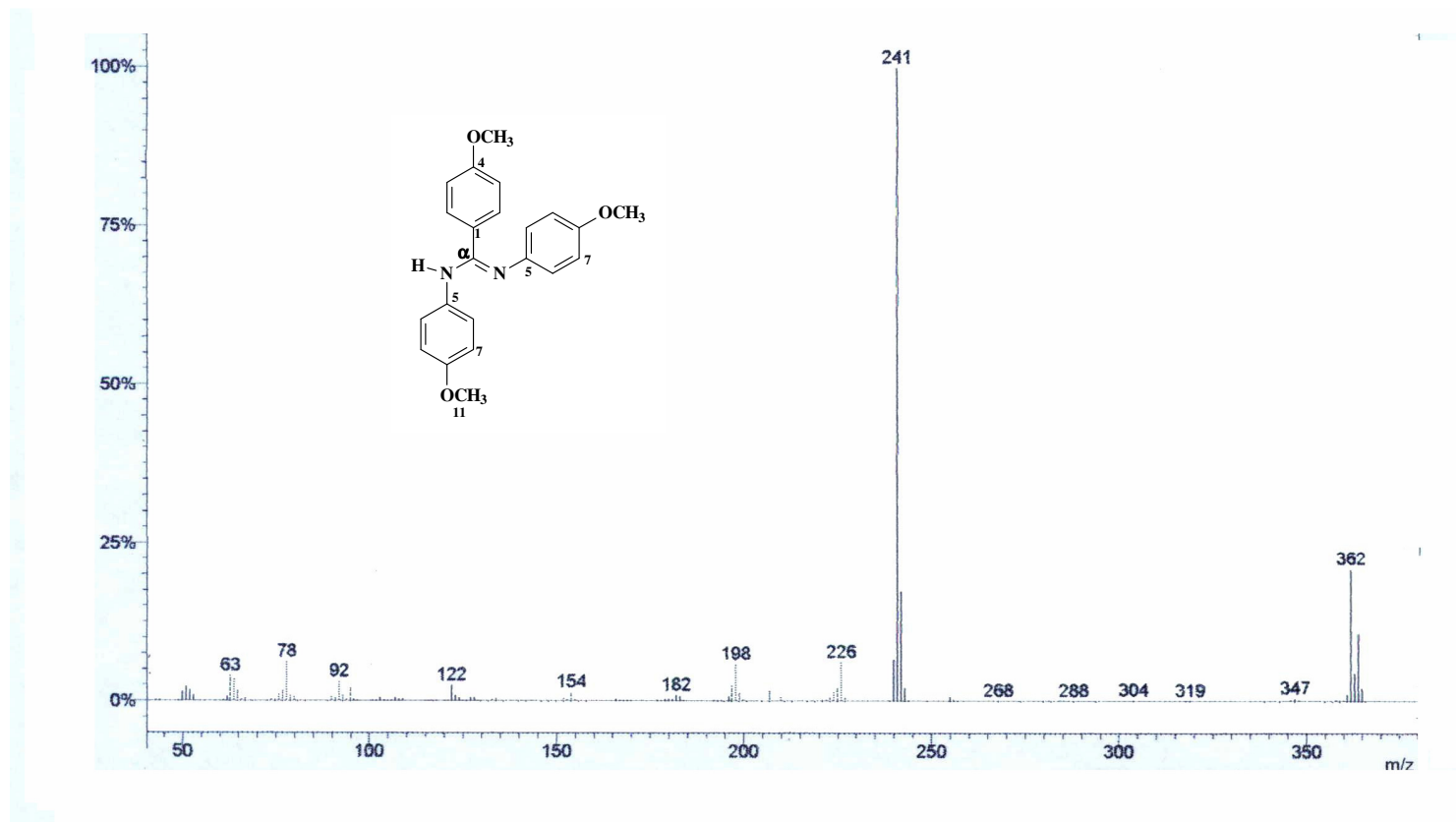
Claudio KBr Op.Eli 6935 UFRRJ



Anexo 34: Espectro de IV (KBr) do derivado 88.

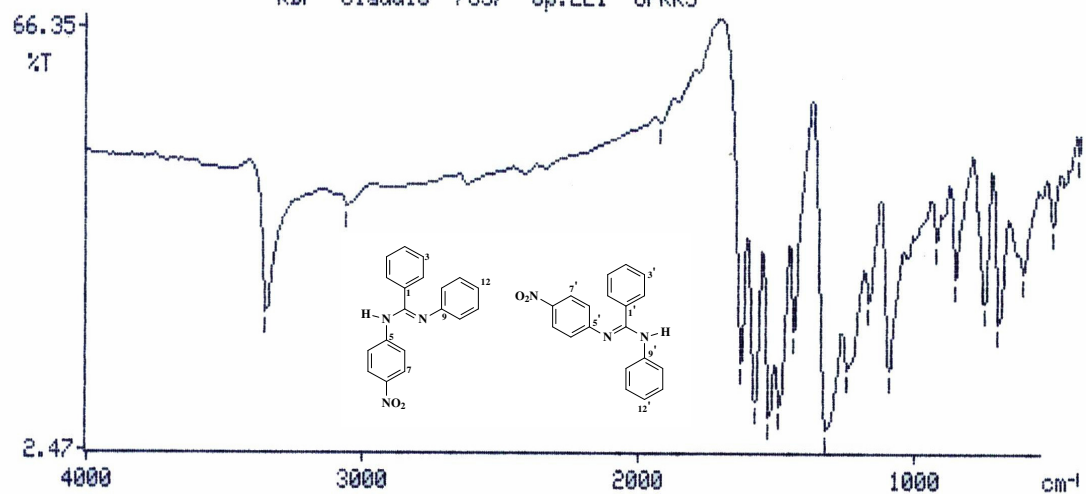


Anexo 36: Espectro de RMN ^{13}C do derivado **88s**.

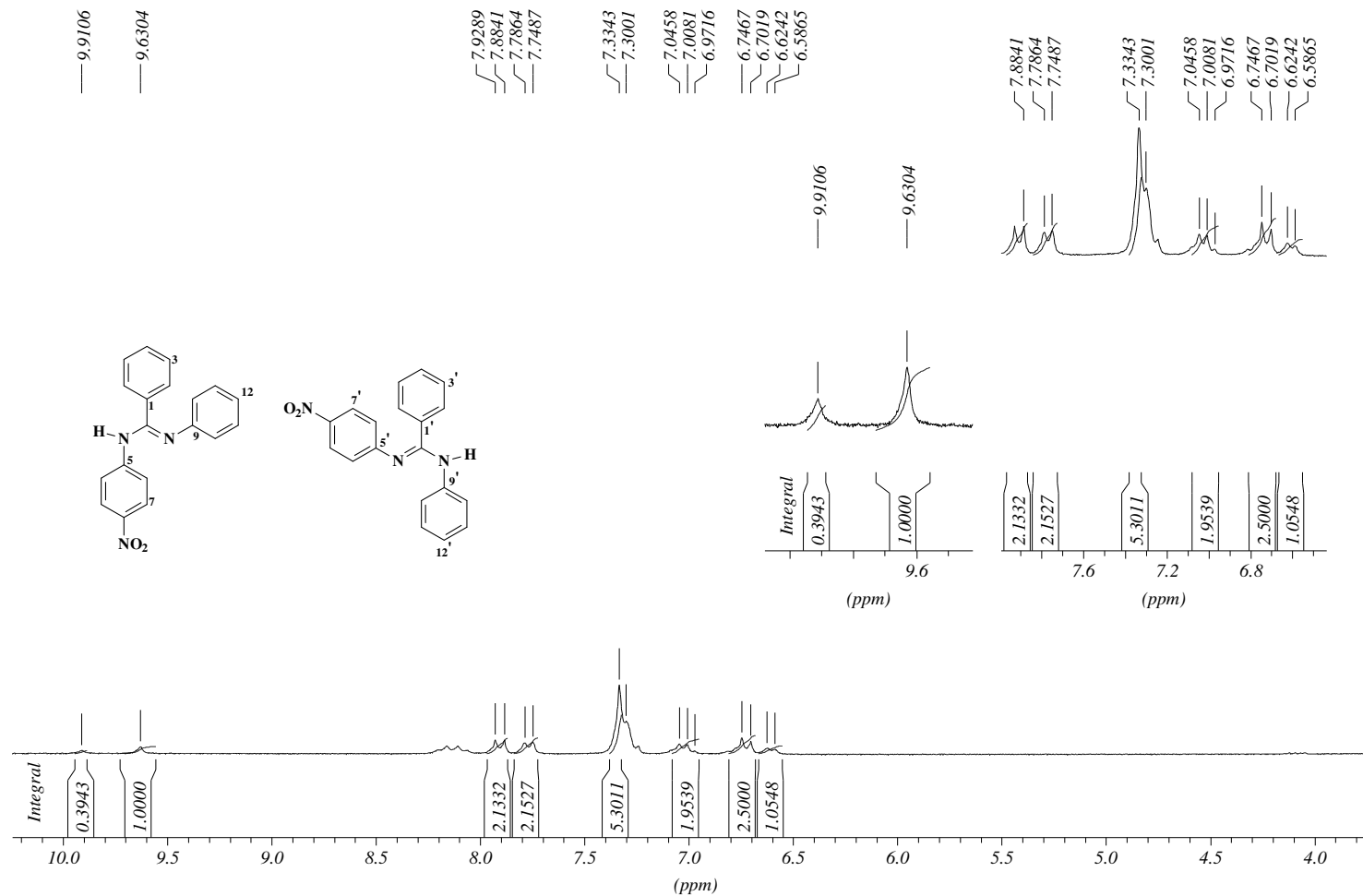


Anexo 37: EM do derivado 88s.

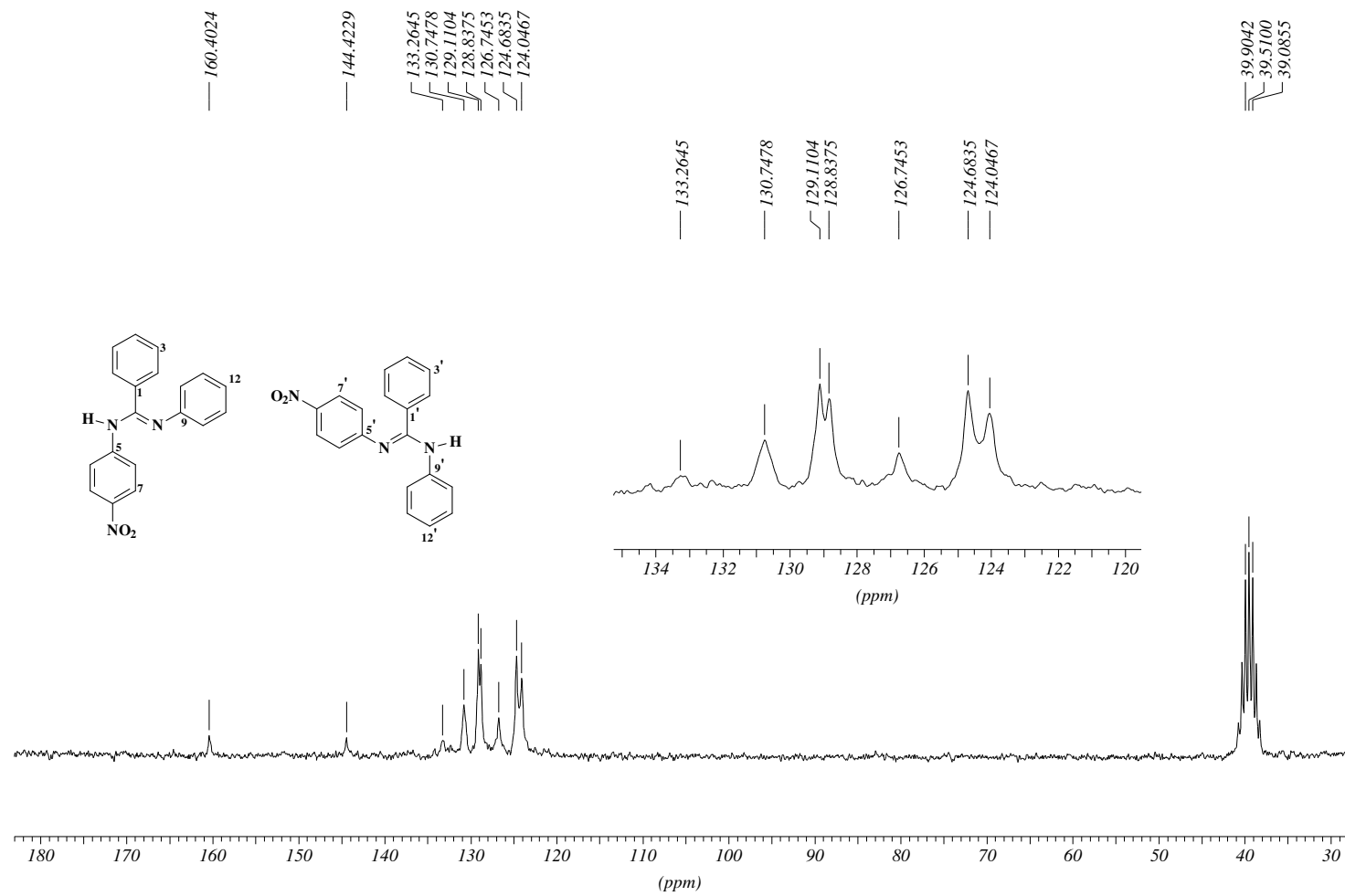
3351.2,3059.2,1919.9,1630.7,1580.4,1528.1,1491.9,1438.6,1322.8=
1246.7,1167.0,1095.4,923.2,854.6,750.0,697.3,608.2,502.6,408.2=
KBr Claudio 7857 Op.ELI UFRRJ



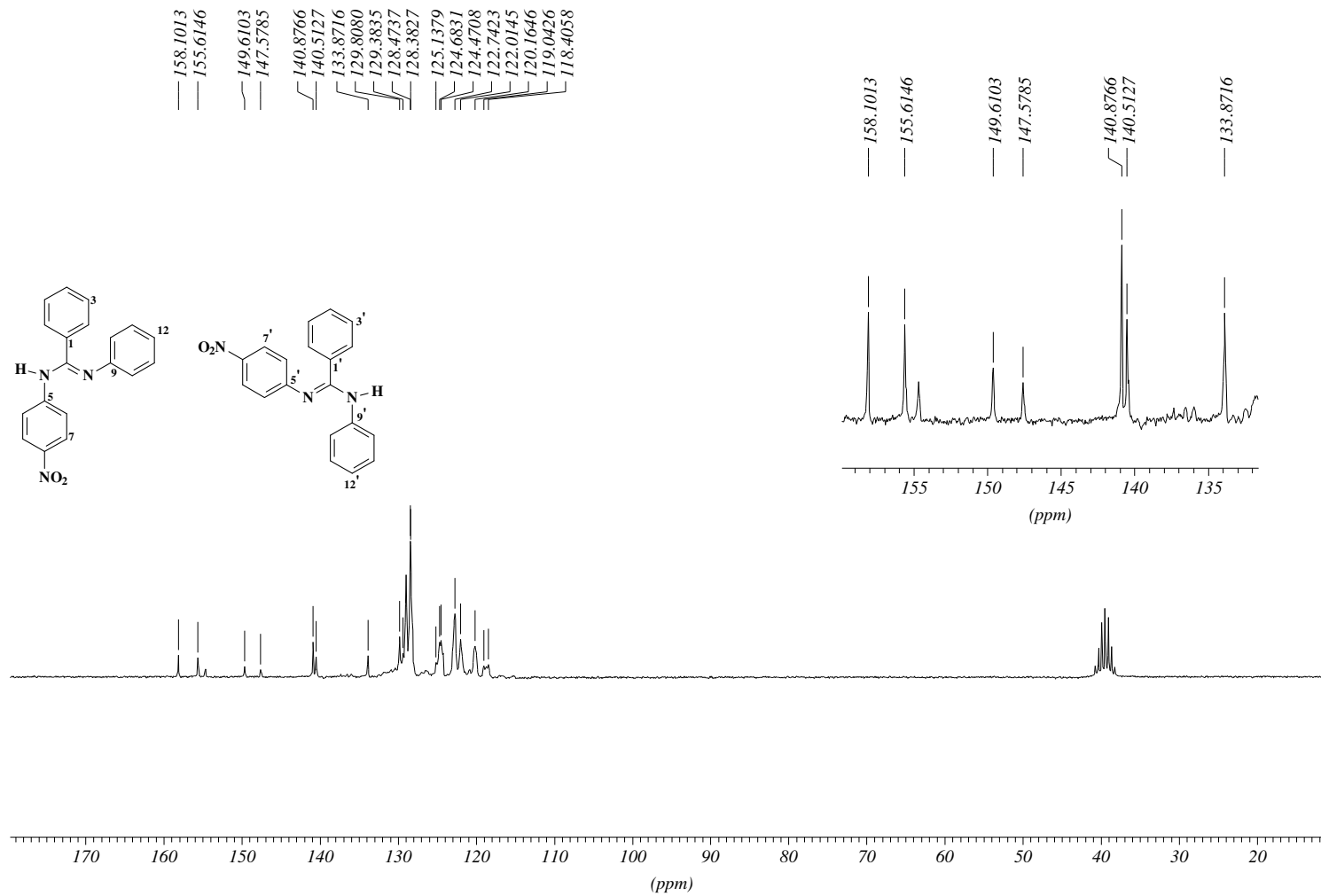
Anexo 38: Espectro de IV (KBr) do derivado 89.



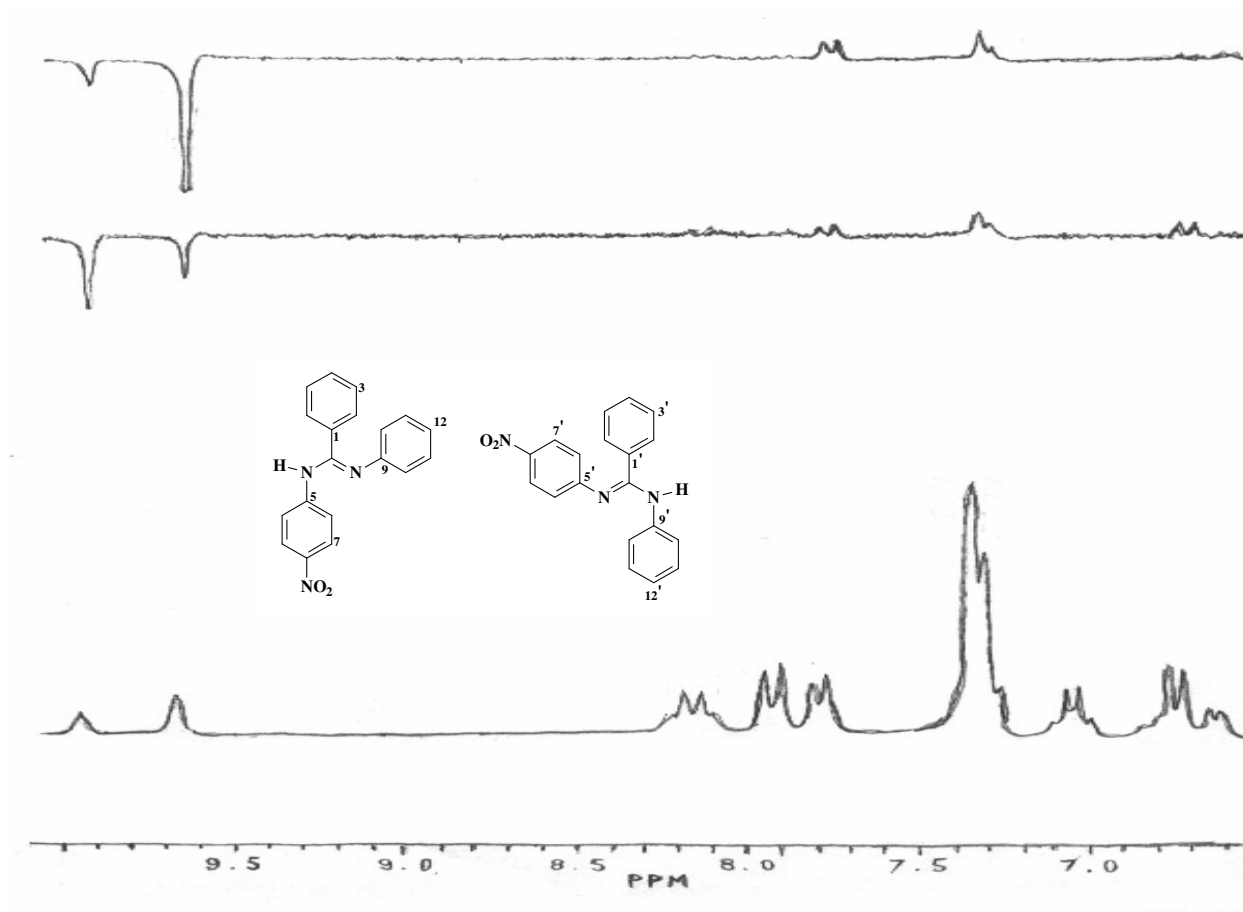
Anexo 39: Espectro de RMN ¹H (DMSO-d₆) do derivado **89**.



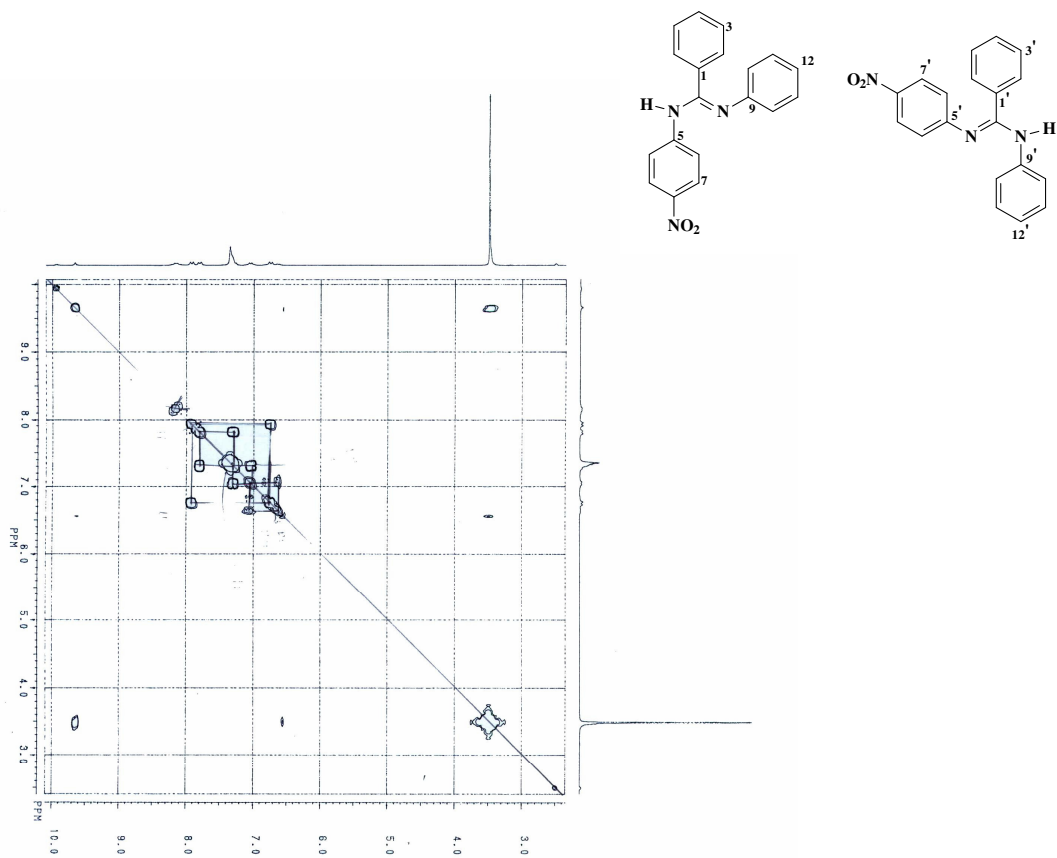
Anexo 40: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado **89s**.



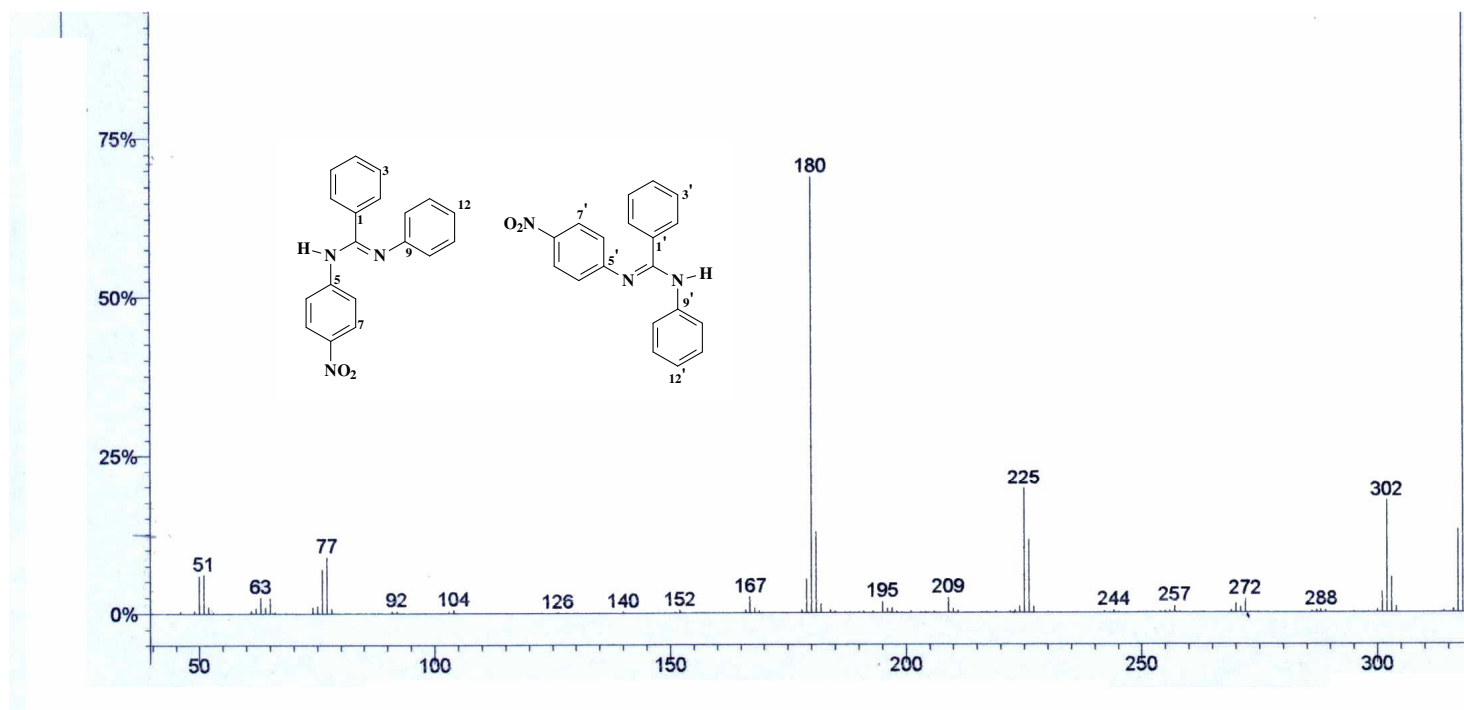
Anexo 41: Espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6) do derivado **89**.



Anexo 42: Espectro de NOEDIF (DMSO-d₆) do derivado **89**.



Anexo 43: Espectro de RMN ^1H x ^1H (DMSO-d_6) do derivado **89**.



Anexo 44: EM do derivado 89s.