



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Síntese de diaril putrescina com potencial inibitório contra
Trypanosoma cruzi e *Leishmania infantum***

Otília Höeller Guarnieri

Orientador: Prof. Dr Louis Pergaud Sandjo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Escorteganha Pollo

Florianópolis,
Dezembro/2024

Otília Höeller Guarnieri

**Síntese de diaril putrescina com potencial inibitório contra
Trypanosoma cruzi e *Leishmania infantum*.**

Relatório apresentado ao Departamento de Química da
Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial da disciplina de Estágio II (QMC 5512)

Orientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Escorteganha Pollo

Florianópolis
Dezembro/2024

*Dedico este trabalho ao Sol e a Lua,
estes corpos celestes que em sua eterna dança,
me cativaram e me motivaram a olhar sempre para cima.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, por ter lutado tão bravamente sendo uma mulher solteira, faxineira, e ter feito o impossível para não falhar com minha educação. Agradeço também por ter lutado contra a Ditadura Militar Brasileira de 1960, e que hoje eu possa desfrutar minimamente da liberdade democrática devido a sua coragem e persistência de olhar para o futuro. Obrigada mãe, por tudo. Eu te amo.

Agradeço à minha psicóloga Jéssica Fuchs por todas suas incontáveis sessões de terapias nas quartas-feiras às 13h00min. Sem suas visões, reflexões, puxões de orelha, risadas, lágrimas e desabafos, eu não seria a melhor versão de mim todos os dias. Obrigada por acreditar em mim.

Agradeço excepcionalmente ao professor Louis, por ter depositado sua fé científica de que eu poderia ter um começo mesmo com tantos medos e receios desse mundo. Agradeço por ser não apenas uma referência de cientista para mim, mas ser uma figura que me inspira a nunca esquecer quem eu sou e que não é errado eu ser assim.

Agradeço ao professor Luiz, por me abrir novas portas de conhecimento e me abraçar num momento de vulnerabilidade onde eu havia mais do que a necessidade de acolhimento e conforto. Obrigada por sempre estar ali quando eu preciso.

Agradeço a doutoranda Gabriella Barroso por todos os puxões de orelha, abraços, cafezinhos... você foi indispensável nessa trajetória para que eu fosse uma cientista mais madura.

Agradeço a equipe de cientistas que já compôs e que compõe o LQPN, pois de alguma forma todos vocês puderam contribuir para minha maturidade dentro do laboratório e do mundo científico.

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES, FAPESC, UFSC e excepcionalmente ao CNPq/BRICS, chamada CNPq/MCTI/BRICS-STI N° 04/2022, N° processo 440044/2022-7.

E por fim, mas não menos importante, eu agradeço ao meu marido Hendrew e minha esposa Viktoria, pois honestamente meus amores... faltam páginas para agradecer o quanto vocês me dão forças para me tirar da cama todos os dias. Obrigada por me dar um futuro e me permitir sonhar de novo, mas excepcionalmente olhar para cima, que é onde as estrelas orbitam e nossa história estará escrita.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Parametrização geral sobre Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs).....	11
2.2 Sobre os agentes etiológicos Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum.....	12
2.3 Sobre as estatísticas e o panorama geral de Trypanosoma cruzi e Leishmania infantum no Brasil.....	14
2.4 Utilização do mecanismo de Tripanotiona redutase como alvo de ação investigativa no estudo inibitório oxidativo dos sintéticos produzidos.....	15
3.0 OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Produção de Bases de Schiff.....	19
4.2 Produção de diaminas a partir da redução por borohidreto de sódio.....	20
4.3 Esquema reacional para produção de diaminas simétricas a partir de 1,4-diaminobutano.....	21
4.4 Avaliação da atividade inibitória dos compostos sintetizados a enzima Tripanotiona redutase.....	21
4.5 Avaliação de atividades biológicas dos compostos sintetizado.....	22
4.6 Segurança no laboratório.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Discussão sobre o efeito de simetria molecular via Ressonância Magnética Nuclear a partir da 1,4-diaminobutano como cadeia principal e o papel do Infravermelho na análise.....	26
5.2 Resultados sobre a testagem enzimática tripanotiona redutase.....	31
5.3 Resultados sobre a testagem inibitória in vitro contra a cepa tripomastigota T. cruzi.....	33
6 CONCLUSÕES.....	37

7 REFERÊNCIAS.....	38
8 - APÊNDICE.....	42
Apêndice A - Lista de figuras referente a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das bisaminas sintetizadas.....	42
Apêndice B - Lista de figuras referente ao ensaio de Infravermelho (IV) das bisaminas sintetizadas.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de ocorrência das DTNs pelos continentes.....	11
Figura 2: Estrutura química dos fármacos utilizados para tratamento da Doença de Chagas.....	13
Figura 3: Estrutura química de fármacos utilizados para tratamento da Leishmaniose.	14
Figura 4: Biossíntese da Tripanotona redutase.....	17
Figura 5: Mecanismo para produção de condensados de Schiff.....	20
Figura 6: Esquema reacional completo para produção de bisaminas.....	20
Figura 7: Perfil químico do produto final sintetizado.....	27
Figura 8: Exemplo de RMN de um dos compostos sintetizados no modo 1H em solvente CDCl ₃ , frequência 200 MHz.....	28
Figura 9: Exemplo de RMN de um dos compostos sintetizados no modo de 13C em solvente CDCl ₃ , frequência 50 MHz.....	29
Figura 10: Exemplo de IV de um dos compostos sintetizados a fim de monitorar o estiramento da amina.....	30
Figura 11: Espectro de RMN (200 MHz) de 1H do composto HTG-0-R.....	42
Figura 12: Espectro de RMN (50 MHz) de 13C do composto HTG-0-R.....	43
Figura 13: Espectro de RMN (200 MHz) de 1H do composto HTG-1-R.....	43
Figura 14: Espectro de RMN (50 MHz) de 13C do composto HTG-1-R.....	44
Figura 15: Espectro de RMN (300 MHz) de 1H do composto HTG-2-R.....	44
Figura 16: Espectro de RMN (50 MHz) de 13C do composto HTG-2-R.....	45
Figura 17: Espectro de RMN (200 MHz) de 1H do composto HTG-3-R.....	45
Figura 18: Espectro de RMN (50 MHz) de 13C do composto HTG-3-R.....	46
Figura 19: Espectro de RMN (300 MHz) de 1H do composto HTG-4-R.....	46
Figura 20: Espectro de RMN (75 MHz) de 13C do composto HTG-4-R.....	47
Figura 21: Espectro de RMN (200 MHz) de 1H do composto HTG-5-R.....	47
Figura 22: Espectro de RMN (50 MHz) de 13C do composto HTG-5-R.....	48
Figura 23: Espectro de RMN (200 MHz) de 1H do composto HTG-6-R.....	48
Figura 24: Espectro de RMN (50 MHz) de 13C do composto HTG-6-R	49

Figura 25: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-7-R.....	49
Figura 26: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-7-R.....	50
Figura 27: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-8-R.....	50
Figura 28: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-8-R.....	51
Figura 29: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-9-R.....	51
Figura 30: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-9-R.....	52
Figura 31: Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz) do composto HTG-10-R.....	52
Figura 32: Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 50 MHz) do composto HTG-10-R.....	53
Figura 33: Espectro de RMN (300 MHz) de ¹ H do composto HTG-11-R.....	53
Figura 34: Espectro de RMN (75 MHz) de ¹³ C do composto HTG-11-R.....	54
Figura 35: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-12-R.....	54
Figura 36: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-12-R.....	55
Figura 37: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-14-R.....	55
Figura 38: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-14-R.....	56
Figura 39: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-17-R.....	56
Figura 40: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-17-R.....	57
Figura 41: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-18-R.....	57
Figura 42: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-18-R.....	58
Figura 43: Espectro de RMN (200 MHz) de ¹ H do composto HTG-21-R.....	58
Figura 44: Espectro de RMN (50 MHz) de ¹³ C do composto HTG-21-R.....	59
Figura 45: Espectro de Infravermelho do composto HTG-0-R.....	60
Figura 46: Espectro de Infravermelho do composto HTG-1-R.....	60
Figura 47: Espectro de Infravermelho do composto HTG-2-R.....	61
Figura 48: Espectro de Infravermelho do composto HTG-3-R.....	61
Figura 49: Espectro de Infravermelho do composto HTG-4-R.....	62
Figura 50: Espectro de Infravermelho do composto HTG-5-R.....	62
Figura 51: Espectro de Infravermelho do composto HTG-6-R.....	63
Figura 52: Espectro de Infravermelho do composto HTG-7-R.....	63
Figura 53: Espectro de Infravermelho do composto HTG-8-R.....	64

Figura 54: Espectro de Infravermelho do composto HTG-9-R.....	64
Figura 55: Espectro de Infravermelho do composto HTG-10-R.....	65
Figura 56: Espectro de Infravermelho do composto HTG-11-R.....	65
Figura 57: Espectro de Infravermelho do composto HTG-12-R.....	66
Figura 58: Espectro de Infravermelho do composto HTG-14-R.....	66
Figura 59: Espectro de Infravermelho do composto HTG-17-R.....	67
Figura 60: Espectro de Infravermelho do composto HTG-21-R.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela I: lista dos compostos sintetizados e devidamente caracterizados via técnicas espectroscópicas.....	24
Tabela II: Porcentagem inibitória dos compostos em porcentagem e o desvio padrão (SD) expressos em 100 μ M em Tripanotiona redutase de Trypanosoma cruzi.....	31
Tabela III: Resultados preliminares obtidos relativos aos ensaios inibitórios para as formas e tripomastigotas de T. cruzi de cultivo celular.....	33

RESUMO

Trypanosoma cruzi e *Leishmania spp* são parasitos protozoários responsáveis pelas doenças tropicais negligenciadas conhecidas como doença de Chagas e Leishmaniose, respectivamente, estas sendo uma das causas de morbidade e mortalidade na América Latina. Os agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento dessas doenças, são benzonidazol para doença de Chagas, e anfotericina B e pentamidina para leishmaniose. Entretanto, esses fármacos causam diversos efeitos colaterais justificando a busca por novos candidatos antiparasitários para o desenvolvimento de novos terapêuticos, que sejam eficazes, menos tóxicos e mais acessíveis. Atualmente, o desenvolvimento de compostos sintéticos têm importância na busca de novas alternativas terapêuticas. Os planejamentos sintéticos facilitam a introdução de forma estratégica de funcionalidades em esqueletos que possam atenuar esses agentes infecciosos. A síntese de diaminas e seus análogos já foram relatados como potenciais agentes antiparasitários contra doenças como malária, tripanossomíase e leishmaniose. Esta pesquisa teve como objetivo sintetizar e caracterizar os derivados de diamina e avaliar suas atividades biológicas contra *T. cruzi* e *L. infantum*. Sintetizou-se bases de Schiff, seguida de redução, a fim de obter produtos derivados da putrescina. As estruturas químicas dos produtos obtidos foram caracterizadas por espectroscopia de RMN e no IV. Todos os compostos devidamente sintetizados e caracterizados foram submetidos à testagem em *Tripanotiona* redutase feito pelo próprio grupo de pesquisa, enquanto os resultados contra *T. cruzi in vitro* foram realizados em parceria com a FIOCRUZ. Todos os compostos apresentam atividade inibitória em ambos os ensaios, entretanto expressaram toxicidade elevada com exceção de alguns compostos.

Palavras-chave: bases de Schiff, *Tripanotiona* Redutase, *T. cruzi in vitro*, diaminas.

1 INTRODUÇÃO

O panorama que compõe as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são uma crescente preocupação em países em desenvolvimento sendo estes compreendidos na América do Sul e Central, África, Ásia Ocidental, Oriental, Meridional e Sudeste Asiático. Por afetar excepcionalmente a população de baixa renda e vivendo em condições precárias caracterizadas por falta de saneamento básico, convivência com animais domésticos infectados, considera-se doenças negligenciadas não apenas por isso, mas devido a falta de políticas públicas que tangenciam a problemática, e colocar pouco investimento no desenvolvimento de novos fármacos. ^[1,2,3].

No Brasil, excepcionalmente o interesse e o foco para pesquisa reside nos agentes etiológicos *Trypanosoma Cruzi* e *Leishmania infantum* que pertencem às DTNs. Estes parasitas afetam regiões do país que apresentam altos níveis de desigualdade e vulnerabilidade social, como Norte, Nordeste, Centro-Oeste e parte do Sudeste^[5,6].

Apesar de já haver medicamentos para tratamento destes parasitas, estes então fornecidos pelo SUS, como a Benzonidazol para *T. Cruzi*, ou a anfotericina B lipossomal para a *L. infantum*. Infelizmente, esses medicamentos de reposição apresentam diversos efeitos colaterais nocivos à saúde do paciente, além de uma relativa baixa efetividade do fármaco quando as doenças estão em estágios mais avançados. Os locais de difícil acesso geram também dificuldades sobre o acompanhamento na gestão eficiente dos pacientes, onde por muitas vezes este cenário corrobora a uma interrupção do uso destes medicamentos e a ocorrência de resistência dos protozoários ao tratamento^[5,6,10].

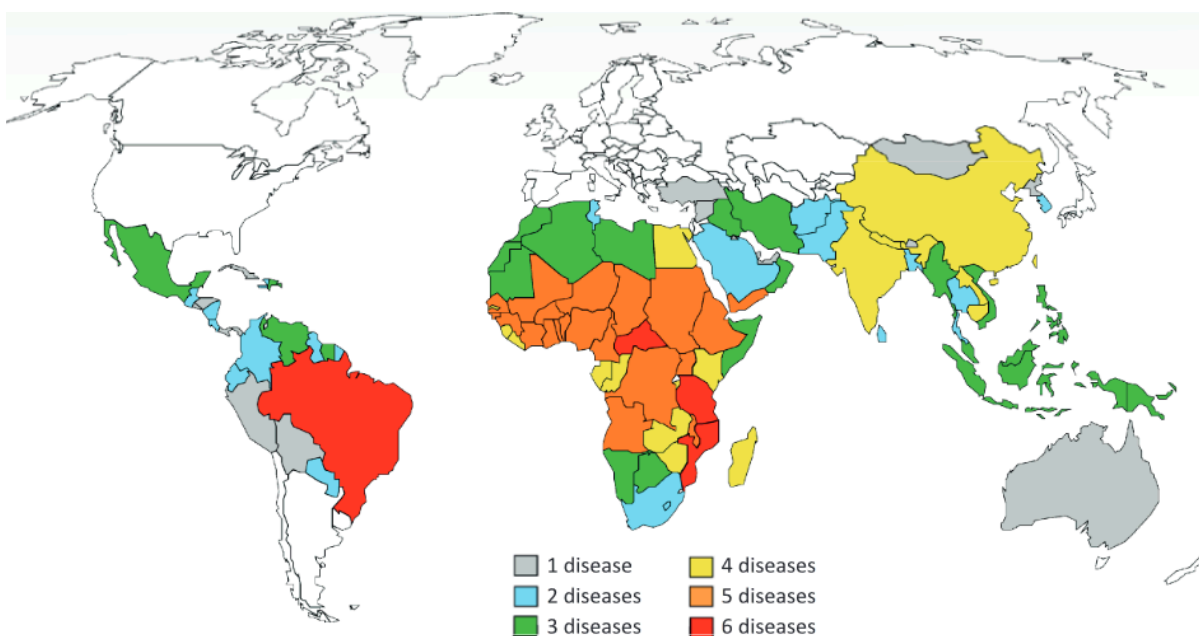
Reside, portanto, o interesse científico em desenvolver diferentes classes de compostos incluindo híbridos para combater esses parasitas. Por isto o presente trabalho foca em derivados de amina com potencial inibitório contra os protozoários *T. cruzi* e *L. infantum*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Parametrização geral sobre Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs)

A Organização Mundial da Saúde classifica e enquadra as Doenças Tropicais Negligenciadas em cerca de 20 doenças ao todo. Devido a abrangência das DTNs, dar-se-á enfoque para este trabalho na doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e leishmaniose visceral (*Leishmania infantum*), causadas pelos agentes etiológicos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* respectivamente^[4].

Figura 1: Distribuição de ocorrência das DTNs pelos continentes.



Fonte: Molyneux; Hotez; Fenwick, 2005.^[4]

Quando estuda-se a respeito sobre as Doenças Tropicais Negligenciadas, devemos parametrizar em três tópicos considerados essenciais que deve permear e capilarizar todo o trabalho:

1 - Pontua-se “tropical” porque os conjuntos das doenças ocorrem com frequência na região da Zona Tropical, está englobando partes dos continentes como a América do Sul e Central, África, Ásia Ocidental, Oriental, Meridional e Sudeste Asiático^[1].

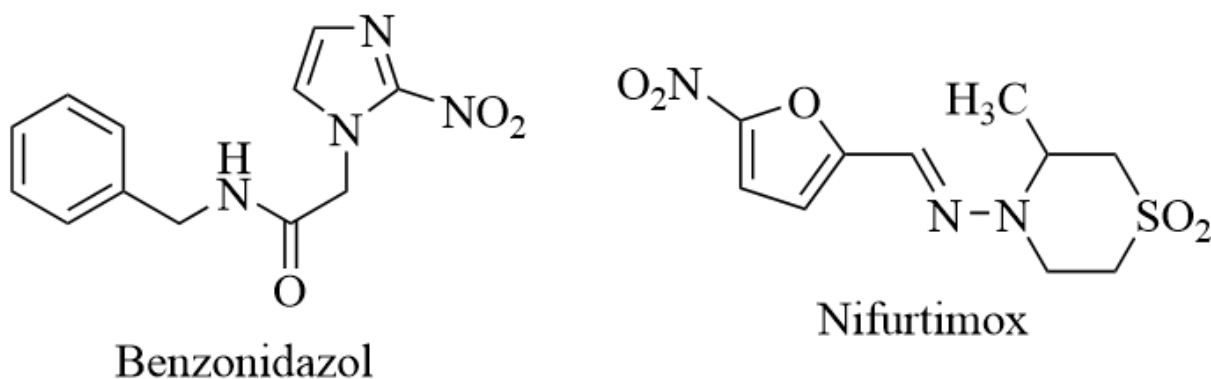
2 - Negligenciadas pois estas não possuem enfoque de investimento econômico e tecnológico por parte da indústria farmacêutica, gerando baixo estímulo na produção científica a procura de soluções para tais mazelas^[1,2].

3 - Estas doenças afetam excepcionalmente a população de baixa renda de países tidos como subdesenvolvidos, justamente devido a falta de acessibilidade a saneamento básico, qualidade de vida, acesso a saúde pública, entre outros fatores, onde, portanto, concentra-se a necessidade de políticas públicas que promovam acessibilidade a esta população marginalizada e em situação de vulnerabilidade social^[3].

2.2 Sobre os agentes etiológicos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário transmitido pelas fezes contaminadas dos insetos da subfamília Triatominae, estes pertencentes à família Reduviidae^[5]. Popularmente, aqui no Brasil, esses insetos são chamados de “barbeiro”. A maturação do protozoário se dá em espécies vertebradas e invertebradas (neste caso o vetor), podendo apresentar dois tipos de evolução: a amastigota (formato arredondado) e a tripomastigota (formato alongado)^[5,6]. Outras formas de contaminação são: transfusão de sangue contaminado, durante a gravidez ou ingestão de alimentos contaminados com as fezes do inseto^[5]. Os sintomas da doença de Chagas variam com o hospedeiro, entretanto os mais recorrentes são: inchaço do fígado e do baço, inflamação dos gânglios linfáticos, edema no local da mordida do inseto (chagoma), entre outros sintomas. O tratamento ocorre apenas por dois medicamentos: nifurtimox e benzonidazol, porém apenas um deles é usado no Brasil, este sendo o benzonidazol, pois é produzido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (Lafepe). O medicamento também é fornecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS)^[7,8].

Figura 2: Estrutura química dos fármacos utilizados para tratamento da Doença de Chagas



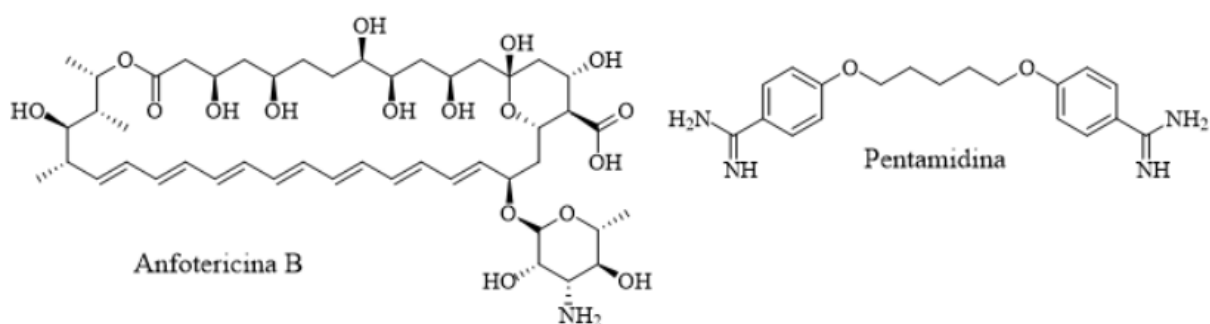
Fonte: autoria própria

O nome da doença é em homenagem ao cientista e médico infectologista Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, onde o pesquisador brasileiro, entre os anos de 1907 e 1908, foi o único médico na história a realizar a descrição completa de uma doença, isto é: descreveu o patógeno, o vetor, os hospedeiros, as manifestações clínicas e a epidemiologia. Devido a tal feito histórico, Carlos Chagas é um dos nomes mais importantes na história da construção da identidade da pesquisa brasileira, sendo laureado internacionalmente devido a seus feitos^[28]. Já o nome do protozoário é em homenagem a também um pesquisador brasileiro, Oswaldo Gonçalves Cruz, também cientista e médico infectologista, onde seus esforços, assim como Carlos Chagas, residiu no combate à malária e à febre amarela nas regiões mais internas do país. Além disso, destaca-se a importância de Oswaldo Cruz nas campanhas de promoção à saúde pública nos estados do norte do país, levando saneamento básico e assistência às pessoas mais carentes no ano de 1910^[29].

A *Leishmania infantum* é também um protozoário cujo vetor mais comum na região tropical são os de gênero *Phlebotomus*, pertencente à família *Psychodidae*. Este inseto é popularmente conhecido como “mosquito-palha”. Salienta-se que apenas as fêmeas deste gênero são as que transmitem o protozoário, devido a necessidade do consumo de sangue para maturação dos ovos. A problemática da doença está na situação de convívio com hospedeiros intermediários (também chamado de reservatórios) infectados, sendo os cachorros (*Canis lupus familiaris*) os mamíferos vertebrados mais comuns a serem afetados pela mazela. Ou seja: uma

fêmea não infectada coleta o sangue de um vetor intermediário contaminado com os protozoários, e devido a proximidade com o humano acaba então ocorrendo a transmissão do protozoário ao hospedeiro definitivo (ser humano). Em ambas doenças o ciclo de vida ocorre de forma intracelular obrigatória^[9]. Os sintomas mais comuns são: anemia, aumento do fígado e baço, perda de peso, entre outros. Apesar de ser uma doença crônica, ela possui tratamento disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) e dependendo da indicação médica, utiliza-se então um dos medicamentos: antimoniato de N-metil glucamina, a anfotericina B lipossomal, o desoxicolato de anfotericina B e o isetionato de pentamidina^[10,11].

Figura 3: Estrutura química de fármacos utilizados para tratamento da Leishmaniose



Fonte: autoria própria

2.3 Sobre as estatísticas e o panorama geral de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum* no Brasil

A principal incidência de doença de Chagas e leishmaniose no Brasil é a região Norte, porém existindo inúmeros casos registrados no Nordeste e Centro-Oeste do país. Por serem regiões onde o índice de desigualdade e vulnerabilidade social é acentuado, as casas (pau a pique, palafitas, etc.) dos residentes servem como um criadouro para o mosquito, sendo difícil de controlar essa mazela. Um boletim epidemiológico emitido em 2020 pela Secretaria de Vigilância em Saúde, em parceria com o Ministério da Saúde, ilustra que em todos os casos registrados desde Dez/2007 até Dez/2015 soma-se quase 1 milhão de infectados pela doença^[7,8]. Também em 2020, o estado de Mato Grosso do Sul emitiu um boletim epidemiológico informando que neste ano a enfermidade afeta em

média 3500 pessoas por ano, além de que para cada pessoa infectada, chegavam a existir 200 cães infectados^[10,11].

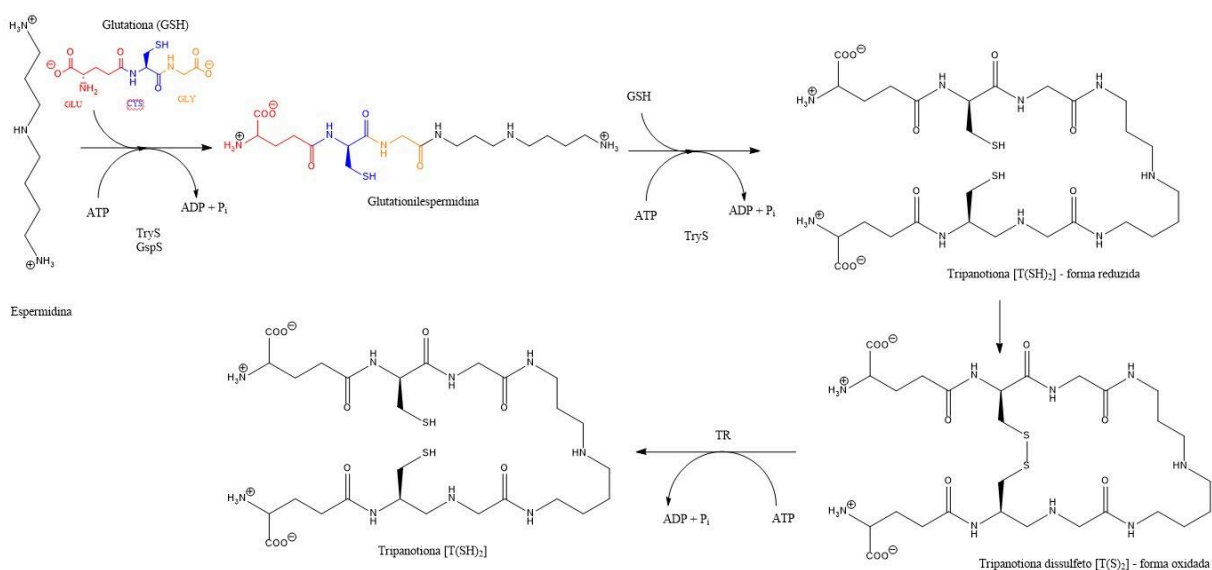
2.4 Utilização do mecanismo de Tripanotiona redutase como alvo de ação investigativa no estudo inibitório oxidativo dos sintéticos produzidos

O mecanismo de Tripanotiona redutase (Tr) é exclusivo de espécies Trypanosomatidae, sendo que os mamíferos não expressam tal enzima. É reportado na literatura que para fins comparativos e de monitoramento entre vetor e hospedeiro, a Tr é comparada diretamente a enzima Glutationa redutase (Gr), está presente em mamíferos, devido a uma similaridade estrutural de quase 40%. Esta afirmação está correlacionada a presença de glutations, um tripeptídeo Glu-Cys-Gly (GSH), associados a estrutura da tripanotiona, onde esta apresenta uma espermidina associada em sua cadeia principal.^[18,19,25]

As kinetoplastida, classe esta que designa os protozoários causadores dos flagelos de Chagas e Leishmaniose e demais doenças parasitárias pertencentes a este grupo, apresentam duas formas de estágio na desenvoltura de infecção extracelular: tripomastigota, sendo esta a forma não proliferativa do protozoário (extracelular), e a amastigota, está então sendo a forma proliferativa (intracelular). Ambos estágios apresentam formas infecciosas do parasita. No caso em específico das doenças em enfoque nesta pesquisa, é relatado na literatura que os parasitas dependem da tripanotiona, uma molécula de baixo peso molecular, para seu ciclo de vida^[25].

Quando então a doença está na forma amastigota do parasita, a principal funcionalidade desta enzima será na atuação e capacidade de resistência a ambientes estressantes oxidativos, excepcionalmente para manter a funcionalidade no interior da célula do parasito. A biossíntese da tripanotiona utiliza a Tripanotiona síntase como catalisador para formação dos produtos, enquanto a Tripanotiona redutase fornece o meio reduzido necessário para manutenção do ciclo de vida do parasito e por consequência fornecer um meio favorável para que ocorra a reação química. Os substratos utilizados para esta biossíntese se dá a partir da interação da com a glutaciona, proveniente do ciclo da Glutationa redutase presente no organismo do mamífero vertebrado infectado, a espermidina, uma poliamina, e uma molécula

de ATP, esta responsável por fornecer a energia necessária, associada para a formação do intermediário glutationilpermidina. Numa segunda etapa, dependente também de uma molécula de ATP para a síntese, então é onde ocorre a gradativa mudança do sítio GSH para um resíduo de tiol, a dihidrotriptanotiona, $T(SH)_2$, esta possuindo um pKa próximo de 7,4 devido ao agrupamento de cisteínas, portanto também levando a uma maior reatividade do sítio^[19,25]. Neste estágio, a molécula formada está em sua forma reduzida, entretanto devido às atividades do corpo infectado, na ocasião em que é necessário a utilização desse substrato reduzido para manter o meio dessa forma, essa molécula torna-se a ditriptanotiona dissulfeto, $T(S)_2$, onde forma-se uma ligação dissulfeto entre os resíduos de cisteína. Salienta-se que a $T(S)_2$ é a forma oxidada da tripanotiona. Para que haja manutenção do ciclo de vida do parasita, a Tripanotiona redutase é responsável por reduzir a $T(S)_2$ em $T(SH)_2$ novamente. Isso revela, portanto, que para a sobrevivência do parasita há total dependência da enzima Tr e a inibição deste leva à falência do mesmo^[22,25]. Este ponto é reforçado a partir de reportes da literatura, em que a mudança estratégica do sequenciamento proteico da enzima Tr leva a desfuncionalização do parasita no organismo infectado, e por consequência os níveis de atividade celular do parasito são reduzidos drasticamente^[21].

Figura 4: Biossíntese da Tripanotona redutase.

Fonte: Autoria própria

É reportado na literatura que durante o ciclo de vida dos protozoários, observa-se grandes níveis de dependência relativos às poliaminas putrescina, espermina e espermidina, estas fundamentais para a síntese das respectivas estruturas químicas que fornece as características de um determinado protozoário^[26].

A partir disso, cria-se duas hipóteses para este trabalho e o porquê de utilizar a putrescina como cadeia principal:

1 - A partir dos hidrogênios disponíveis da putrescina e as possíveis interações dos substituintes dos aldeídos aromáticos, haverá interação com a cadeia lateral da tripanotona, isto é, com a porção de espermidina devido a semelhança estrutural entre as poliaminas e menor impedimento estérico, portanto gerando um estresse oxidativo no substrato e levando a falência da biossíntese;

2 - Semelhante à hipótese anterior, entretanto com o diferencial da ideia da possível interação com os aminoácidos presente no substrato, excepcionalmente a partir do resíduo de tiol devido às afinidades eletrônicas de grupos doadores de densidade eletrônica e/ou ligações de hidrogênio, além da contribuição de menor impedimento estérico da cadeia principal, e com isto levaria a mesma finalidade da primeira hipótese.

Nas referências utilizadas para abordar sobre este tópico, é acordado que a ciência hoje possui um bom repertório teórico sobre o mecanismo de ação do parasita no organismo humano e qual seria a melhor forma de inibição, entretanto ainda é desconhecido o que leva os fármacos então estudados possuírem níveis de toxicidade elevado nos ensaios realizados. Portanto, há um apelo para maior fomento na área de produtos naturais para desenvolvimento de potenciais fármacos contra a doença de Chagas e Leishmaniose, visto que procura-se alinhar os conhecimentos já estabelecidos sobre as atividades terapêuticas que produtos comestíveis naturais possuem e a baixa toxicidade ao corpo humano.

A fim de reforçar o parágrafo anterior, cita-se exemplos de demais pesquisadores(as) sobre a temática abordada, como Pinheiro *et al.* em seu artigo publicado em 2011, onde através dos compostos sintetizados a base de diaminas de cadeia aberta com a finalidade de avaliar a eficiência contra os parasitas da *Leishmania*, submeteu-se ao ensaio IC⁵⁰ e onde parte dos sintéticos obteve-se resultados significativos na amostragem, porém estes também apresentaram um alto índice de citotoxicidade para as células humanas^[26].

Em 2014, Velásquez *et al.* expede-se um artigo elucidando uma série de compostos sintetizados também a base de diaminas, com o diferencial de ter presente em suas estruturas o ferroceno, uma classe de organometálicos de enfoque biológico, com a finalidade de aumentar a efetividade das estruturas contra os parasitas *Trypanosoma*. Submetidos também ao ensaio IC⁵⁰, uma gama das estruturas produzidas resultou-se em valores promissores contra a doença, porém a citotoxicidade também demonstrou-se elevada^[27].

3.0 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo preparar os derivados de diaril putrescina e avaliar seus efeitos antiparasitários contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania infantum*.

3.2. Objetivos específicos

- Preparar os derivados de diaril bisaminas a partir de aldeídos aromáticos e putrescina;
- Purificar e caracterizar os produtos obtidos através das técnicas espectroscópicas de Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Submeter os derivados obtidos e identificados para avaliações antiparasitárias contra as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e *L. infantum*, realizados em parceria com o instituto FIOCRUZ, e tripanotiona redutase, realizado pelo grupo de pesquisa;
- Estudar e estabelecer a relação estrutura-atividade dos derivados obtidos em relação com as atividades biológicas investigadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

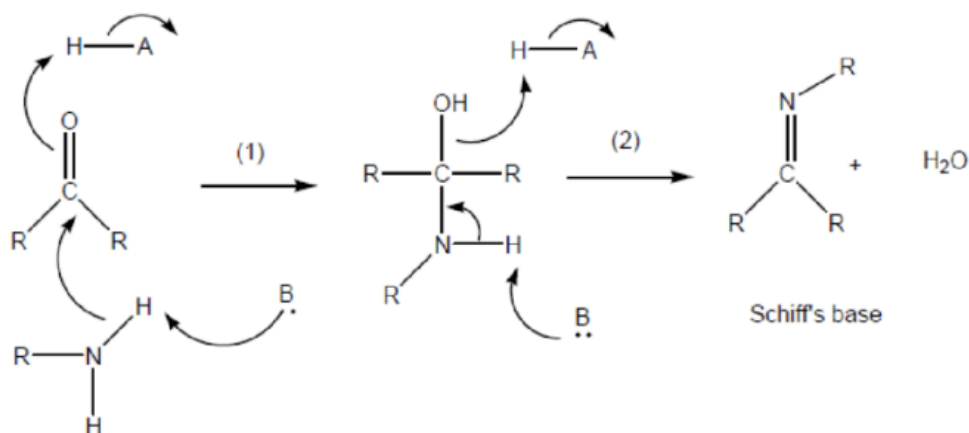
Todos os solventes e reagentes utilizados nas sínteses e/ou na purificação por recristalização foram adquiridos de fontes comerciais, com grau P.A e/ou pureza $\geq 98\%$, respectivamente. As análises de absorção na região do infravermelho foram realizadas num espectrômetro Bruker, modelo Alpha, utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr), vinculado à central de análise do Departamento de Química da UFSC. As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas nos espectrômetros Bruker® modelos Ac-200F a 200 MHz e Avance a 300 MHz, vinculados à central de análise do Departamento de Química e Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, respectivamente. Os núcleos de ^1H e ^{13}C foram observados utilizando TMS como padrão interno e os solventes adequados para solubilizar cada amostra.

4.1 Produção de Bases de Schiff

A síntese das bis-iminas ocorre em uma etapa, seguindo a metodologia de *Kouznetsov et al.* 2006 com adaptações^[12]. Estes compostos são conhecidos na literatura como bases de Schiff, os quais são formados a partir da condensação entre um aldeído e/ou cetona com uma amina primária. Assim, buscando maior variabilidade estrutural e ampliar o estudo da relação entre estrutura química *versus* atividades biológicas, serão utilizados 1 mol de putrescina (1,4-diaminobutano) como

amina primária e condensados com diferentes aldeídos aromáticos (2 mol, 500 mg), posteriormente reduzidos para obter o produto de interesse.

Figura 5: Mecanismo para produção de condensados de Schiff

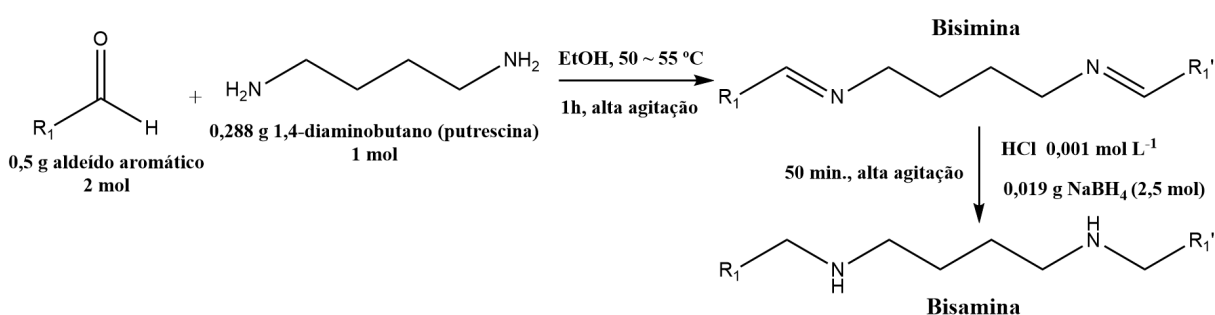


Fonte: Sani, Umar & Na'ibi, H & Adam, Dailami, 2017^[13]

4.2 Produção de diaminas a partir da redução por borohidreto de sódio

É relatado na literatura que as iminas são precursoras na síntese de diaminas, através de reações de redução por borohidreto de sódio^[14]. A modificação estrutural é caracterizada pela redução da ligação dupla entre um átomo de carbono e nitrogênio ($\text{R-HC=N-R}'$), formando uma ligação simples entre os átomos envolvidos ($\text{R-H}_2\text{C-NH-R}'$). O procedimento sintético seguirá a metodologia de Patil *et. al* 2014 com adaptações^[15].

Figura 6: Esquema reacional completo para produção de bisaminas.



Fonte: autoria própria

4.3 Esquema reacional para produção de diaminas simétricas a partir de 1,4-diaminobutano

Após otimizações reacionais prévias, optou-se por realizar as etapas de condensação seguido de redução na produção de bisaminas de forma que não houvesse isolamento do intermediário bisamina, respeitando portanto os princípios de uma reação one-pot, onde estima-se que a partir disso haverá otimização do tempo reacional e maiores rendimentos dos produtos almeçados.

Em um balão de fundo redondo, utiliza-se 1 mol de putrescina (1,4-diaminobutano) e se dissolve o composto com etanol P.A. Após isso, é inserido 2,5 mol do aldeído aromático (500 mg) substituído de interesse. A mistura então é submetida a alta agitação magnética e aquecida entre 50 e 55 °C via banho de óleo. Após 1 hora reacional, o meio é acidificado com 15 gotas de uma solução levemente ácida de 0,001 mol L⁻¹ de HCl. Dado um intervalo de 10 minutos, é adicionado então o agente redutor Borohidreto de Sódio (NaBH₄) na proporção de 2,5 mol. Dado 1 hora e 30 minutos reacionais, é cessado a temperatura e espera-se a solução esfriar em temperatura ambiente. Para os compostos que formam precipitado, estes são submetidos a filtração à vácuo utilizando um funil de Buchner e lavagens de pequenas porções de etanol a frio, onde o material coletado então é colocado para evaporação em capela com exaustão. Para os compostos que não formam uma fase definida, estes são submetidos a uma extração líquido-líquido, sendo a fase orgânica utilizada Acetato de Etila e a fase aquosa uma solução levemente básica de NaOH 0,001 mol L⁻¹. Para que haja menor grau de impurezas no composto, lava-se sucessivamente a fração orgânica com a solução levemente básica para garantir que todos os sais formados sejam eliminados nesse processo. Utiliza-se então o sal secante Sulfato de Sódio anidro (Na₂SO₄) para remoção de possíveis moléculas de H₂O que estejam presentes na solução. A solução é então filtrada e posteriormente colocada para secagem em capela com exaustão.

4.4 Avaliação da atividade inibitória dos compostos sintetizados a enzima Tripanotona redutase

Salienta-se que as testagens enzimáticas e as otimizações do ensaio foram realizadas em responsabilidade da Dr^a. Carime Lessa, integrante do grupo de pesquisa do laboratório. Os ensaios foram realizados no Laboratório de

Protozoologia, agregado ao Centro de Ciências Biológicas (CCB), em parceria com o Prof. Dr. Mário Steindel.

Para a realização do ensaio de inibição, a enzima tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi* foi expressa de forma heteróloga em *Escherichia coli* BL21DE3 e purificada por cromatografia de afinidade utilizando resina de níquel Ni-NTA (Qiagen). Os ensaios foram realizados em placas de 96 cavidades de acordo com a metodologia descrita por Hamilton e colaboradores (HAMILTON et al., 2003). O princípio do ensaio se baseia na capacidade da tripanotiona redutase de reduzir a tripanotiona T[S]₂ em T[SH]₂, em uma reação NADPH dependente. A adição do DTNB regenera a T[SH]₂ em T[S]₂, formando TNB, um substrato cromógeno que gera a cor amarela, o que possibilita a leitura.

Primeiramente foram adicionados os compostos (100 µM) ou extratos (50 µg/ml) (diluídos em DMSO 25% em tampão do ensaio) em triplicata e um branco da amostra. Em seguida, a mistura reacional foi adicionada, contendo tampão do ensaio (HEPES 40 mM, EDTA 1 mM pH 7.5), NADPH (150 µM) e tripanotiona T[S]₂ (1 µM). A tripanotiona redutase (0,31 mg/ml / 6 U) foi então adicionada às triplicatas e o ensaio incubado a 27 °C por 30 minutos. O volume final utilizado foi de 250 µL. A leitura foi então realizada em um espectrofotômetro Infinite M200 (TECAN) em 412 nm, onde a absorbância inicial foi medida e então o DTNB (25 µM) foi adicionado à placa. A absorbância em 412 nm foi acompanhada por 30 minutos para determinar a atividade enzimática, comparando os compostos testados com DMSO 1% (controle negativo) e clomipramina (controle positivo).

4.5 Avaliação de atividades biológicas dos compostos sintetizado

Para a realização dos ensaios de inibição, os compostos foram enviados para o instituto FIOCRUZ (Colaboração do projeto). As condições preparadas para o ensaio da atividade foram para as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* de cultivo celular, sendo as condições do ensaio: 37°C. Linhagem celular: L929. **Cepa de *T. cruzi*: Tulahuen** expressando beta-galactosidase. Infecção: 10 tripomastigotas/célula/2 horas. Desenvolvimento da infecção: 2 dias. Tempo de contato dos compostos: 4 dias. Concentração de uso: diluídos a partir da solução estoque no momento do ensaio. Solução estoque: 20 mg/mL em DMSO, preparada

no momento do ensaio. Concentrações dos compostos usados para a triagem *in vitro* foram 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL.

4.6 Segurança no laboratório

Entende-se por segurança no laboratório medidas preventivas para amenizar o risco de acidentes de diversas naturezas (químico, físico, entre outros), sendo que estas colocam em cheque a segurança e a saúde de todos/as que usufruem de um ambiente tido como profissional (leia-se profissional pessoas que são capacitadas e qualificadas para trabalhar num ambiente de alta periculosidade). Exemplos de medidas preventivas: ambiente de trabalho organizado, sinalizações adequadas para cada tipo de espaço do ambiente usado (se é necessário equipamentos específicos, apenas EPIs básicos, etc.), utilização de sapatos e calça fechada, jaleco de algodão puro com manga comprida, luvas para cada tipo de serviço (nitrílicas para uso geral, pano reforçado para manuseio de corpos aquecidos ou exercer força física, etc.), óculos de proteção, cabelos amarrados (para pessoas de cabelo comprido), entre outros fatores^[16].

Nota-se que o parágrafo anterior trata de uma forma abrangente as medidas necessárias, isto é: trata-se de um comportamento típico para um ambiente que lida com o uso de produtos químicos, ensaios físicos, sínteses, entre outros fatores. Especificamente ao laboratório químico os cuidados vão além da saúde humana, mas também engloba o manejo dos resíduos gerados para postergar os efeitos nocivos à saúde ambiental. Um forte exemplo de redutor de impactos ao laboratório químico é a presença e o uso de capela com exaustor é indispensável para um ambiente onde gera-se gases e vapores químicos de natureza tóxica. Exemplos disso são vapores/gases produzidos por compostos que contenham de mercúrio, chumbo, benzeno, diclorometano, metanol, selênio, entre outros exemplos. Classifica-se, portanto, que estes resíduos são perigosos, e devem ter uma vedação e identificação de forma adequada às normas técnicas responsáveis para o descarte apropriado às empresas que tratam tais resíduos^[17].

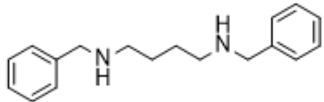
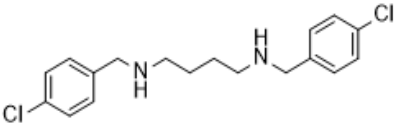
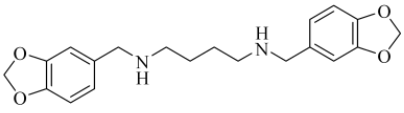
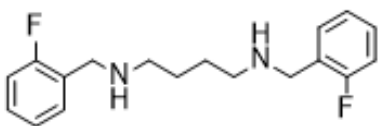
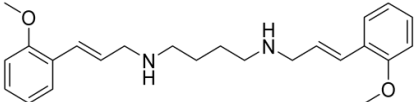
Como citado, os resíduos são classificados de acordo com as orientações adequadas seguindo as normas ABNT NBR 10004/2004 (resíduos sólidos e suas classificações) e 12809 (manuseio e descarte de resíduos da saúde). Para a primeira citada, temos então que os resíduos são categorizados como: Inflamáveis,

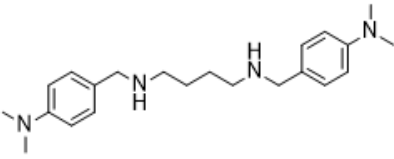
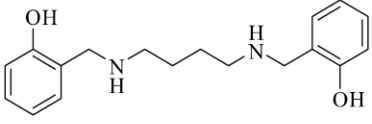
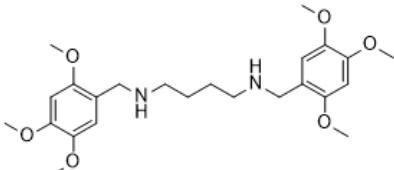
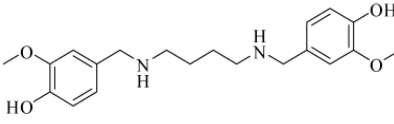
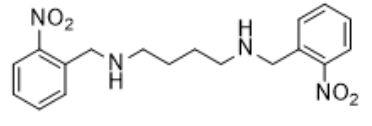
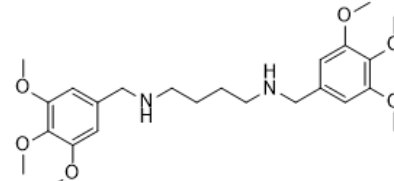
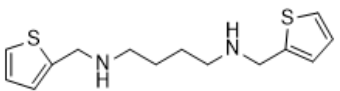
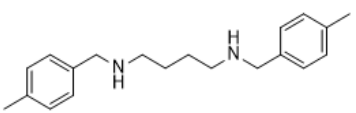
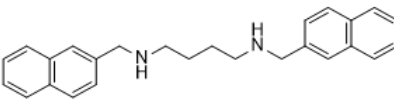
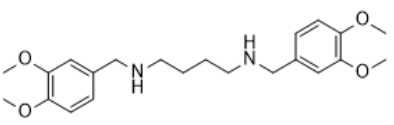
tóxicos, explosivos, agentes oxidantes, corrosivos, gases comprimidos, produtos sensíveis à água e produtos incompatíveis. Na norma também aborda sobre os resíduos tidos como não perigosos, podendo ser tratados no próprio ambiente de uso, como neutralização de ácidos e bases tendo seu descarte final a pia após este processo, entre outros exemplos.

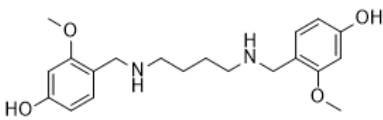
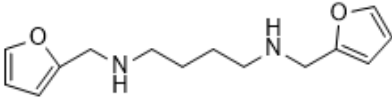
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela I, pode-se conferir as estruturas químicas então sintetizadas com suas respectivas massas molares e rendimentos registrados. Sintetizou-se ao todo 17 compostos, sendo a média do rendimento obtido de 44%.

Tabela I: lista dos compostos sintetizados e devidamente caracterizados via técnicas espectroscópicas

Nº	Código	Estrutura molecular	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Rendimento (%)
1	HTG-0-R		268,19	81
2	HTG-1-R		336,12	63
3	HTG-2-R		356,17	55
4	HTG-3-R		304,18	32
5	HTG-4-R		380,25	27

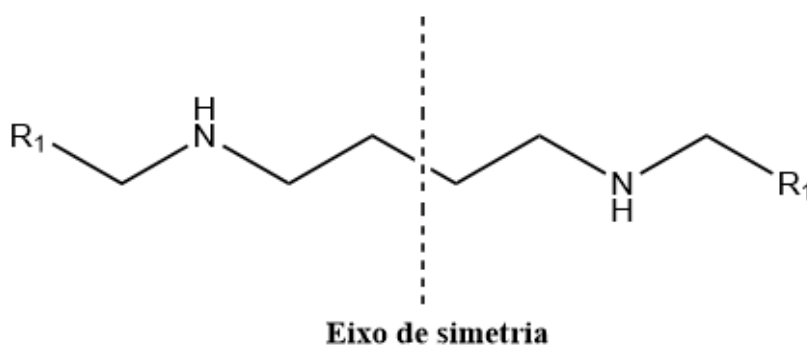
6	HTG-5-R		354,28	67
7	HTG-6-R		300,18	44
8	HTG-7-R		448,26	58
9	HTG-8-R		360,20	12
10	HTG-9-R		358,16	78
11	HTG-10-R		448,26	10
12	HTG-11-R		280,11	29
13	HTG-12-R		296,23	32
14	HTG-14-R		368,23	50
15	HTG-17-R		388,24	20

16	HTG-18-R		360,20	28
17	HTG-21-R		248,15	43

Para que houvesse uma maior gama investigativa durante o trabalho, sintetizou-se aldeídos aromáticos com diferentes substituintes para compreender e elucidar de forma coesa a correlação entre a diferenciação dos substituintes e a variação inibitória expressa em diferentes concentrações no ensaio enzimático, a fim de conferir os melhores candidatos relativo a inibição e toxicidade celular. Os compostos sintetizados foram submetidos às técnicas espectroscópicas Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Infravermelho (IV), onde via RMN as principais características a serem observados é para que se conferisse os sinais característicos das estruturas e a verificação da presença de impurezas, e IV conferisse os estiramentos característicos das funções orgânicas presente no anel aromático e do nitrogênio reduzido.

5.1 Discussão sobre o efeito de simetria molecular via Ressonância Magnética Nuclear a partir da 1,4-diaminobutano como cadeia principal e o papel do Infravermelho na análise

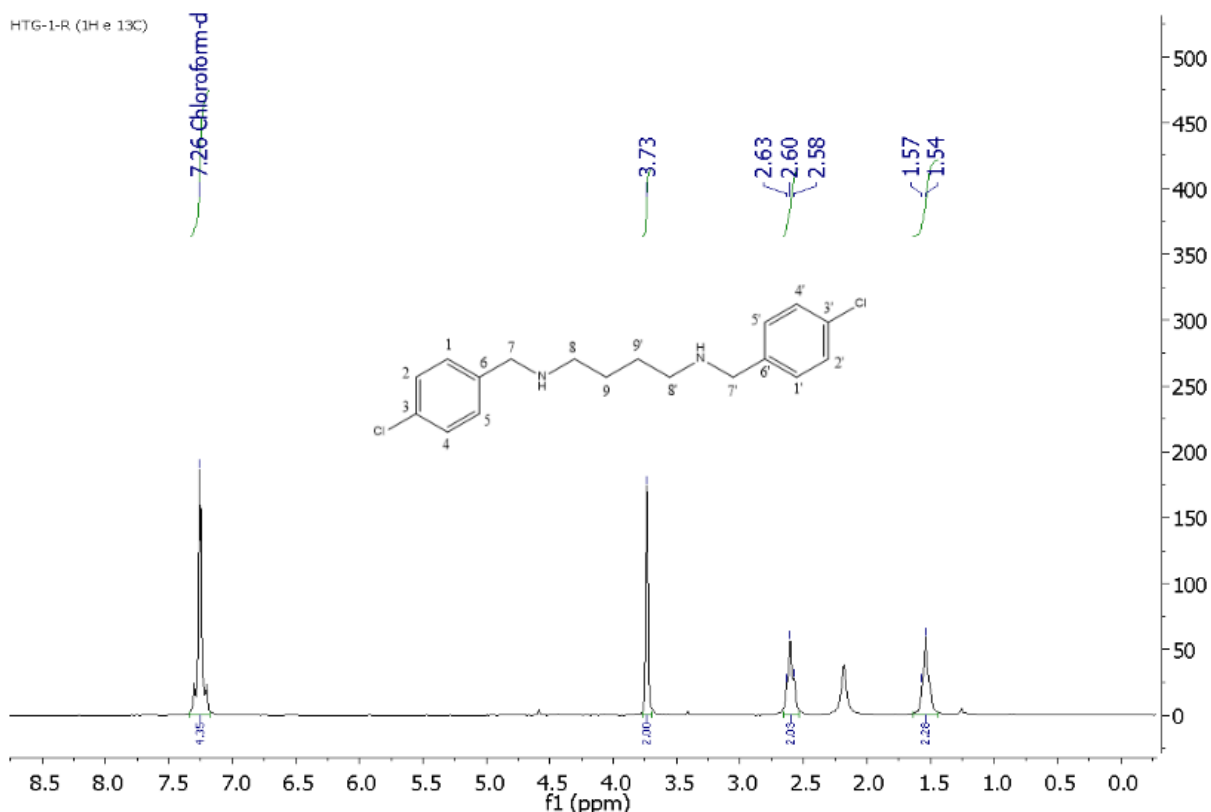
Na Figura 7 observa-se o perfil da cadeia principal dos produtos obtidos, notando-se simetria na molécula. Essa simetria é característico na técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), apresentando sinais apenas de uma parte da molécula, portanto este sendo um indicativo de êxito na obtenção do produto final.

Figura 7: Perfil químico do produto final sintetizado

Fonte: autoria própria

Como já abordado, os compostos almejados possuem a característica de simetria, portanto este padrão é esperado ao longo de todas as moléculas sintetizadas independente do substituinte presente no anel aromático. Observando a Figura 7 como exemplo sobre esse comportamento o espectro de RMN de 1H em frequência 200 MHz e solvente $CDCl_3$, os sinais referentes aos deslocamentos de interesse está primeiramente no simpleto deslocado entre 3.6 e 3.8 ppm, este sendo característico dos hidrogênios alfa ao nitrogênio então reduzido. Além disso, entre 1.3 - 1.6 e 2.4 - 2.8 ppm de deslocamento, observa-se simpletos protegidos característicos da cadeia principal composta por carbonos alifáticos^[31]. Por fim, na região de deslocamento entre 6.5 - 7.3 ppm é característico a região de aromaticidade, sendo conferido como um multiplete que, no caso deste exemplo, pode ser lido como um tripleto^[24].

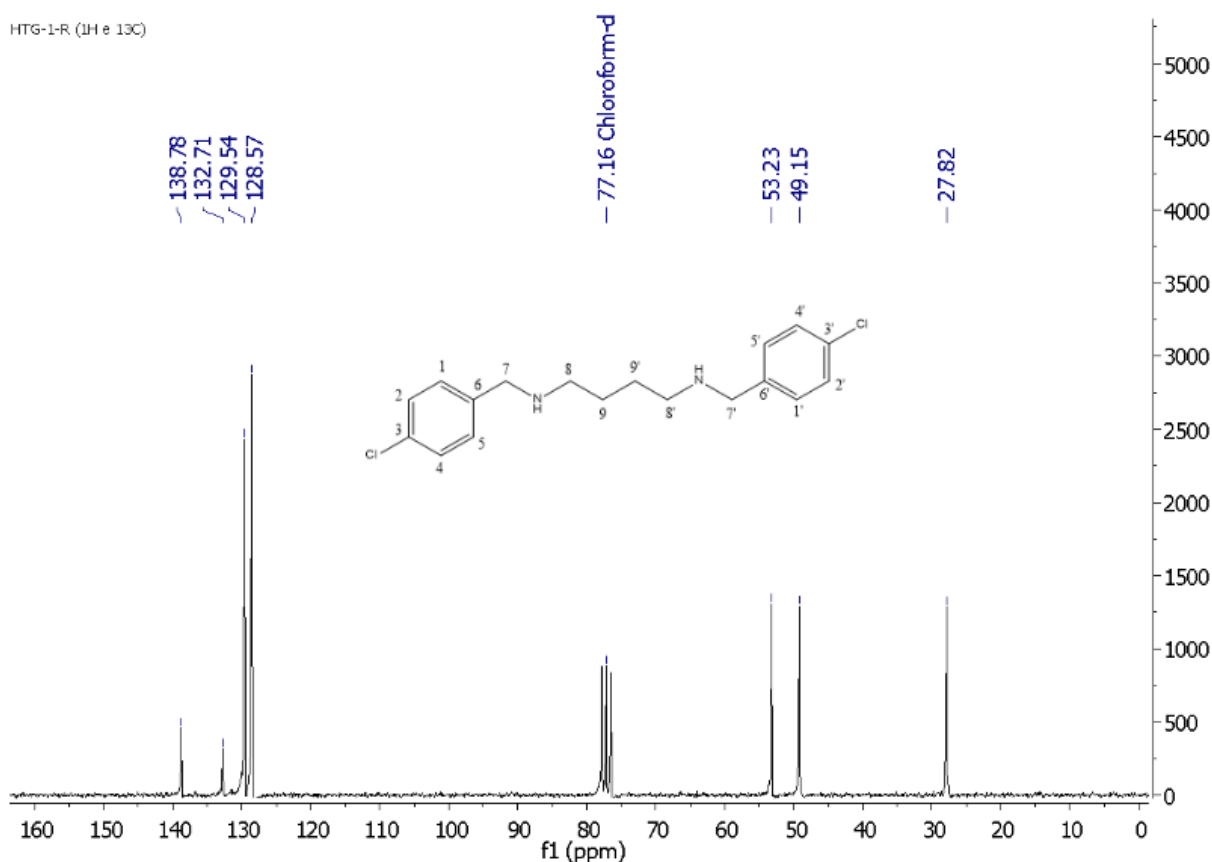
Figura 8: Exemplo de RMN de um dos compostos sintetizados no modo ^1H em solvente CDCl_3 , frequência 200 MHz



Fonte: autoria própria

Para os espectro de ^{13}C (exemplo na Figura 9), espera-se a contabilização de 9 carbonos essenciais: 1 relativo a condensação, 2 provindos da cadeia principal e 6 oriundos do anel aromático. O sinal de carbono característico a ser observado é pertencente a posição alfa da condensação porém agora reduzido, deslocado entre 46 - 49 ppm, um carbono protegido, pertencente à cadeia principal, deslocado entre 25 - 28 ppm, outro carbono da cadeia principal, porém este sendo mais desprotegido, deslocado entre 50 - 55 ppm, e por fim os carbonos aromáticos, deslocados entre 125 - 155 ppm. Salienta-se que a flutuação desses valores de deslocamento observados, tanto de ^1H e ^{13}C , é referente aos efeitos dos substituintes no anel aromático, efeitos anisotrópicos e estéricos, e o grau de qualidade do solvente utilizado na análise (pode haver presença de moléculas de H_2O agregados a estrutura devido a higroscopia), podendo causar efeitos que afetam diretamente a proteção ou desproteção dos sinais^[24].

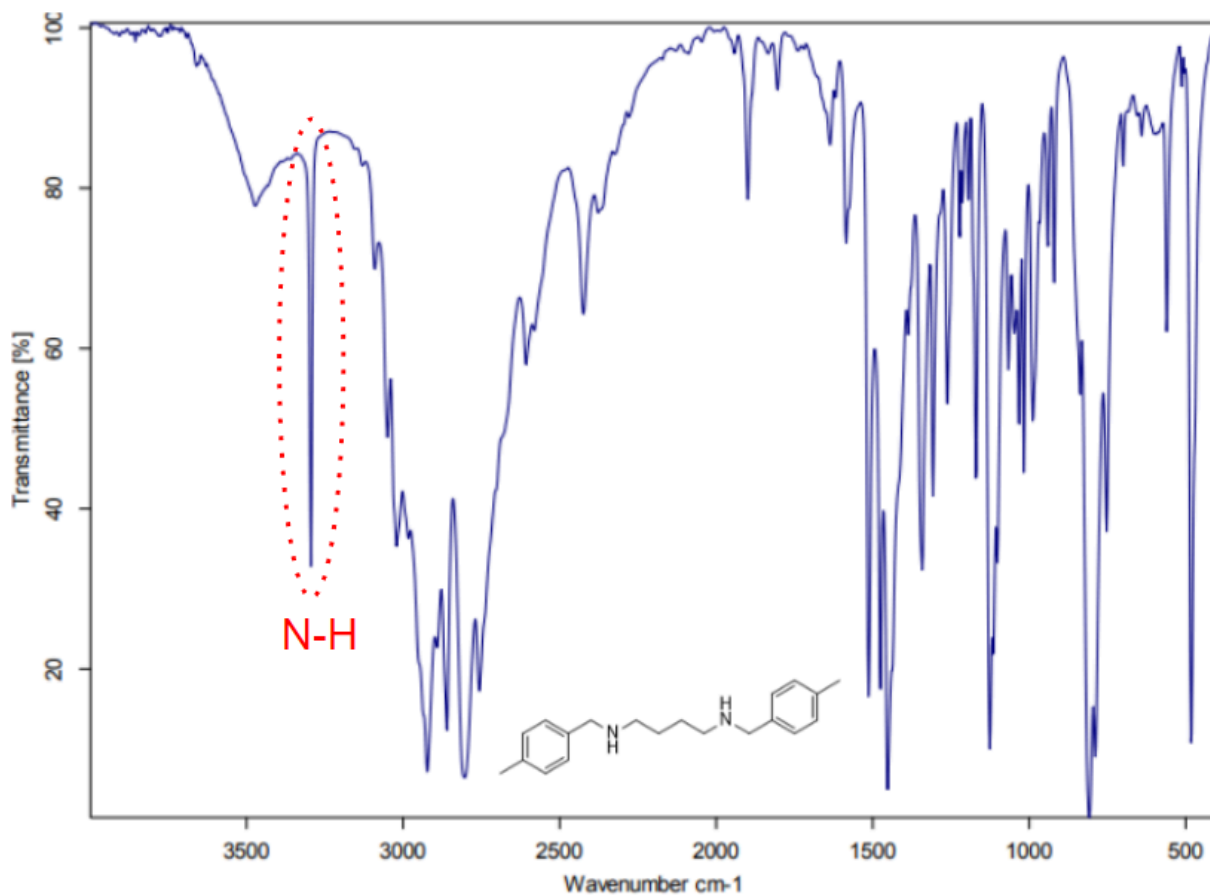
Figura 9: Exemplo de RMN de um dos compostos sintetizados no modo de ^{13}C em solvente CDCl_3 , frequência 50 MHz



Fonte: autoria própria

É relatado na literatura que para visualização via RMN do sinal de hidrogênio característico da amina reduzida depende excepcionalmente do solvente deuterado utilizado na análise e da intensidade do campo magnético aplicado pelo equipamento, portanto tornando-se uma leitura complexa. A partir disso, a proposta na utilização do Infravermelho (IV) como técnica auxiliar para monitorar esta função orgânica vem a ser sugestivo, pois observa-se um pico característico de amina na região entre $3200 - 3350 \text{ cm}^{-1}$, como sinalizado e observado na Figura 10. Portanto, utiliza-se da técnica de RMN a fim de confirmar os sinais simétricos da cadeia principal e de aromaticidade, enquanto a técnica de IV confirma o estiramento característico de amina, e assim sinaliza-se a obtenção dos produtos finais almeçados.

Figura 10: Exemplo de IV de um dos compostos sintetizados a fim de monitorar o estiramento da amina



Fonte: autoria própria

No Apêndice A, pode-se conferir todas as demais figuras respectivas das estruturas sintetizadas. No Apêndice B, confere-se todos os espectros de Infravermelho das estruturas sintetizadas.

5.2 Resultados sobre a testagem enzimática tripanotiona redutase

Os compostos submetidos à testagem enzimática Tripanotiona Redutase (TcTR) podem ser conferidos na Tabela II, juntamente com os resultados de inibição da estrutura frente a enzima exposta. Os compostos que apresentaram atividade inibitória acima de 50% foram submetidos também ao ensaio de IC₅₀.

A “ideação” deste teste, portanto, é o monitoramento dos melhores candidatos relativo aos substituintes do anel aromático frente ao escopo de porcentagem de inibição contra a enzima responsável pelo ciclo de vida do parasito, e que em paralelo este composto não possua uma toxicidade elevada expressada no ensaio de IC₅₀.

Tabela II: Porcentagem inibitória dos compostos em porcentagem e o desvio padrão (SD) expressos em 100 µM em Tripanotiona redutase de *Trypanosoma cruzi*

Código	Avaliação TcTR (100 µM)		IC ₅₀	
	Inibição (%)	Desvio Padrão (SD)	µM	Desvio Padrão (SD)
HTG-1-R	62,01	3,46	55,58	18,565
HTG-2-R	10,91	8,94	–	–
HTG-3-R	83,15	1,35	7,535	1,36
HTG-4-R	77,16	1,87	3,858	1,846
HTG-5-R	0,0	5,31	–	–
HTG-6-R	85,75	1,11	2,774	1,014
HTG-7-R	0,0	12,21	–	–
HTG-8-R	58,66	1,44	6,949	4,6565
HTG-9-R	20,69	8,51	–	–
HTG-12-R	0,0	22,6	–	–
HTG-14-R	87,29	3,70	Em avaliação	–

Os compostos HTG-4-R e HTG-6-R apresentaram uma inibição promissora contra a tripanotiona redutase com valores de IC₅₀ de 3,858 e 2,774 µM respectivamente.

Observando as correlações entre porcentagem de inibição e estrutura química, nota-se que os compostos HTG-1-R e HTG-3-R pertencem a classe de compostos halogenados em diferentes posições do anel aromático, sendo o resultado mais expressivo na posição orto. A possível explicação se dá na capacidade que o Flúor possui na concentração da densidade de carga no momento da quelação, onde a aproximação com o sítio ativo da enzima fica suficientemente disponível para que o hidrogênio da amina reduzida então possa realizar uma ligação de hidrogênio. Além disso, os resultados de IC_{50} expressam que o substituinte Flúor possui menor toxicidade comparado com o composto HTG-1-R.

Relativo aos compostos que possuem um tipo de ciclo associado ao anel benzênico, estes sendo os compostos HTG-2-R, contendo um heterociclo de ciclo membros composto por metilenodioxí, e o HTG-14-R, contendo um anel aromático que classifica a molécula como um derivado do naftaleno, o resultado de maior inibição veio a ser do composto HTG-14-R. Apesar de não apresentar uma forma de complexação direta com o sítio ativo da enzima, a capacidade em que este grupo volumoso possui em criar ressonância e momento dipolo gera estabilidade para a possibilidade do hidrogênio livre da amina reduzida em ligar-se via ligação de hidrogênio com o resíduo de tiol da enzima.

Sobre os compostos HTG-5-R, HTG-7-R e HTG-10-R, estes característicos de serem doadores de densidade eletrônica para o anel benzênico e ativadores da posição orto, não expressaram atividade inibitória em concentração 100 μ M.

Referente aos compostos HTG-6-R e HTG-9-R, o substituinte hidroxila é quem demonstrou maior porcentagem de inibição e menor toxicidade entre todos os compostos expressos em 100: 85,75% e 2,774, respectivamente. Nota-se que, apesar da capacidade em que o grupo nitro possui em realizar ressonância devido aos oxigênios, este não gera estabilidade para inibir de forma eficaz a enzima. O grupamento fenólico possui a capacidade de gerar uma estrutura que complexa-se pelo oxigênio e pelo hidrogênio livre da amina reduzida, gerando uma estrutura bidentada e por consequência maior estabilidade no momento de quelação.

Os compostos HTG-4-R, derivado do cinamaldeído com uma metoxila na posição orto, e HTG-8-R, derivado da vanilina, apesar de não possuírem uma semelhança estrutural, estes possuem em comum grupos funcionais que doam

densidade eletrônica para o anel aromático, funcionalizando portanto na aproximação e estabilidade com a enzima. Ambos os compostos expressaram boa porcentagem de inibição, 77,16% e 58,66%, respectivamente, além de baixa toxicidade avaliada no ensaio de IC₅₀, 3,858 e 6,949, respectivamente.

5.3 Resultados sobre a testagem inibitória *in vitro* contra a cepa tripomastigota *T. cruzi*

Os compostos submetidos à testagem inibitória *in vitro* contra a cepa tripomastigota *T. cruzi* podem ser conferidos na tabela III. A testagem foi feita em parceria com o laboratório FIOCRUZ.

Salienta-se que o uso das células L929 possui a finalidade para testagem citotóxica, servindo então como modelo padrão para avaliar a biocompatibilidade de substratos e os efeitos tóxicos na célula^[20].

Tabela III: Resultados preliminares obtidos relativos aos ensaios inibitórios para as formas e tripomastigotas de *T. cruzi* de cultivo celular.

Código	Concentração do composto (µg/mL)	Atividade ¹ (%)	IC ₅₀ sobre o parasita ² (µg/mL)	CC ₅₀ sobre células L929 ³ (µg/mL)
HTG-0-R	50* 25	72,1 0,0	42,34	–
HTG-1-R	50 25	100 100	Toxicidade elevada	–
HTG-2-R	50 25	100 100	Toxicidade elevada	–
HTG-4-R	50 25	100 100	Toxicidade elevada	–
HTG-5-R	50 25	100 100	Toxicidade elevada	–
HTG-6-R	50 25	100 93,8	16,39	Indicado para CC50
HTG-7-R	50	4,9	79,21	–

	25	0		
HTG-8-R	50 25	0,6 0	43,66	–
HTG-9-R	50 25	100 97,9	Toxicidade elevada	–
HTG-10-R	50 25	1,4 0,0	74,65	–
HTG-11-R	50 25	100 53,8	21,40	Indicado para CC50
HTG-12-R	50 25	99,3 94,0	Toxicidade elevada	–
HTG-14-R	50 25	98,9 98,4	Toxicidade elevada	–
HTG-17-R	50 25	41,5 41,0	86,64	–
HTG-18-R	50 25	100 51,4	21,11	Indicado para CC50
HTG-21-R	50 25	80,3 51,7	21,34	Indicado para CC50
Benzonidazol	–	–	3,81 (1 µg/mL)	2.381 (625 µg/mL)

² Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário.

³ Concentração do composto que induz 50% de morte celular (L929).

Até o presente momento, quatro compostos apresentaram resultados promissores para a continuação de estudo e indicados de CC₅₀, estes sendo HTG-6-R, HTG-11-R, HTG-18-R e HTG-21-R. De acordo com os resultados preliminares obtidos neste estudo, em concentração de 25 µg/mL os compostos HTG-6-R, HTG-11-R, HTG-18-R e HTG-21-R inibiram em 93,8, 53,8, 51,4 e 51,7% de enzima, respectivamente, e não apresentaram a sua toxicidade sobre células L929. Na concentração de 50 µg/mL foi observado a morte de 50% das células hospedeiras L929.

A partir dos resultados observados na Tabela III, nota-se que todos os compostos testados possuem potencial inibitório abaixo de 25 µg/mL no meio de cultivo, com exceção dos compostos HTG-0-R, HTG-7-R, HTG-8-R e HTG-10-R.

Em um perfil comparativo entre os compostos que não possuíram atividade inibitória abaixo de 50 µg/mL, o diferencial do perfil químico entre as estruturas HTG-0-R e HTG-10-R é a presença de metoxilas em diferentes posições do anel aromático. Traçando um paralelo, notamos que os compostos cuja estrutura são monossustituídas, HTG-4-R e HTG-12-R, respectivamente, estes possuindo grupos orgânicos menos volumosos, possuem uma atividade inibitória mais expressiva em concentrações mais baixas no meio de cultivo, entretanto o ensaio de IC₅₀ revela que estes possuem toxicidade elevada.

A combinação destes fatores leva a hipótese que o composto HTG-18-R, este sendo dissustituído, possuindo um perfil químico semelhante aos compostos HTG-4-R e HTG-12-R, porém com o diferencial que em seu anel aromático tem a presença de uma hidroxila, notando-se que o potencial inibitório é suprimido em concentrações abaixo de 50 µg/mL, porém sua toxicidade é expressivamente menor em comparação aos monossustituídos. Uma importante observação que reforça a hipótese sobre o grupo hidroxila ser uma possível chave entre atividade inibitória versus toxicidade é quando comparamos o composto HTG-17-R, este também sendo dissustituído, porém possuindo duas metoxilas na composição do anel aromático, possui uma atividade inibitória que flutua entre 35 e 55%, enquanto sua toxicidade é superior comparado ao composto HTG-18-R. Esta hipótese é reforçada a partir do composto HTG-6-R, monossustituído por uma hidroxilada na posição orto, onde sua inibição foi de 93,8% em 25 µg/ml, possuindo a menor toxicidade expressada em IC₅₀ relativo às demais moléculas.

Relativo aos compostos que possuem um heterociclo como substituintes, HTG-11-R e HTG-21-R, respectivamente, nota-se que as atividades inibitórias são praticamente semelhantes nas diferentes concentrações do composto no meio de cultivo. Não se sabe ao certo a natureza desta semelhança, cabendo uma investigação via simulação computacional para tentar explicar esse perfil observado.

Sobre os resultados do composto HTG-14-R, este sendo um derivado do naftaleno, observa-se uma atividade inibitória consistente entre 90% em diferentes níveis de concentração para atividade inibitória. Entretanto, a molécula mostrou com toxicidade elevada para maiores investigações. Como uma possível perspectiva futura, assim como feito com os demais compostos, é necessário a síntese de

demais derivados para comparar o perfil químico relativo a interação enzimática inibição-substrato para maior compreensão dos papéis dos substituintes no anel aromático.

6 CONCLUSÕES

Relativo a elucidação dos compostos frente às técnicas espectroscópicas selecionadas, caracterizou-se 17 compostos a partir das estruturas idealizadas sendo os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C coesos com o teórico, além do IV confirmar os estiramentos das funções orgânicas então com as estruturas desenhadas.

Sobre o rendimento dos compostos, a massa média obtida foi de 49%, sendo esperado este valor relativamente baixo devido os empregos para obtenção de um produto final puro: para produtos já precipitados, aplicou-se uma etapa de recristalização utilizada para purificação dos compostos sólidos, enquanto para os compostos que houve a necessidade de precipitação utilizou-se da separação líquido-líquido, portanto é esperado que haja perdas do produto durante estes processos.

Frente aos ensaios inibitórios de Tripanotiona redutase realizado pelo grupo de pesquisa, as moléculas HTG-4-R (inibição 77,16% e IC_{50} 3,858) e HTG-6-R (inibição 88,75% e IC_{50} 2,774) mostraram-se os melhores candidatos relativo aos nove testados, sendo o HTG-6-R o que possui a maior porcentagem de inibição e a menor toxicidade comparado aos demais.

Baseado nos resultados preliminares obtidos até o presente momento para o ensaio *in vitro* de *T. Cruzi*, quatro compostos (HTG-6-R, HTG-11-R, HTG-18-R e HTG-21-R) apresentaram resultados com percentagem de inibição acima de 50% e com baixa toxicidade frente à célula L929 em concentrações de 25 $\mu\text{g/mL}$. Para estes compostos está previsto a realização do ensaio de CC_{50} , e os demais derivados baseados em melhores resultados estão sendo realizados para a continuação de novos ensaios biológicos a fim de expandir a gama do trabalho.

Como perspectivas futuras do trabalho, há necessidade de maiores investigações a partir de simulações teóricas, como Ancoragem Molecular, a fim de elucidar melhor as interações enzima-substrato propostas nas discussões, já que assim confirma-se as hipóteses mencionadas. Para além disso, também é necessário uma maior compreensão do perfil químico submetido à testagem *in vitro* para em Tripanotiona redutase, a fim de compreender as correlações da enzima com o parasita na forma tripomastigota testada.

7 REFERÊNCIAS

- [1] - ZICKER, F.; ALBUQUERQUE, P. C.; FONSECA, B. de P. F. e. Doenças Tropicais Negligenciadas: uma agenda inacabada. Rio de Janeiro: **Fundação Oswaldo Cruz**, 2019. 45 p. (Série Saúde Amanhã). Textos para Discussão 35.
- [2] - TROUILLER, P. *et al.* Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 2002.
- [3] - ANNAN, K. Poverty biggest enemy of health in developing world, secretary-general tells world health assembly, 2001. Disponível em: <<https://www.un.org/press/en/2001/sgsm7808.doc.htm>>. Acesso em: 12/10/2023.
- [4] - HOTEZ, P. J.; FENWICK, A.; MOLYNEUX, D. H. Collateral Benefits of Preventive Chemotherapy — Expanding the War on Neglected Tropical Diseases. **New England Journal of Medicine**, 2019.
- [5] - DIAS, J. C. P. Notas sobre o Trypanosoma cruzi e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 4, p. 370–375, ago. 2006.
- [6] - CARVALHO, T. U. *et al.* **Organização Estrutural – Portal da Doença de Chagas**. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/>>. Acesso em: 14/10/2023.
- [7] - AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS (Brasil). doença de Chagas. Rio de Janeiro: **FIOCRUZ**, data desconhecida. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acesso em: 14/10/2023.
- [8] - BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas. Secretária de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico, Brasília. n. especial, Abr. 2020. Disponível em:

<http://chagas.fiocruz.br/wp-content/uploads/2021/11/Boletim-epidemiologico-2020.pdf>
. Acesso em: 14/10/2023.

[9] - MICHEL, G. *et al.* Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. **Acta Tropica**, v. 119, n. 2-3, p. 69–75, 2011.

[10] - AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS (Brasil). Leishmaniose. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, data desconhecida. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>. Acesso em 14/10/2023.

[11] - BRASIL. Ministério da Saúde. Semana Nacional de Controle e Combate à Leishmaniose Visceral (LV). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim epidemiológico, Mato Grosso do Sul. n. 32, Ago. 2020. Disponível em: <https://www.vs.saude.ms.gov.br/wp-content/uploads/2020/08/Boletim-Epidemiol%C3%B3gico-Leishmaniose-SE-32.pdf>. Acesso em: 14/10/2023.

[12] - KOUZNETSOV, V. V., AMADO, D. F., BAHASAS, A., AMARO-LUIS, J. (2006), Synthesis and spectral data of new 1,2-*bis*-(2-hetaryl-4-oxothiazolidin-3-yl)ethanes and 1,4-*bis*-(2-hetaryl-4-oxothiazolidin-3-yl)butanes. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, 43: 447-452. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jhet.5570430228>.

[13] - Sani, Umar & Na'ibi, H & Adam, Dailami. (2017). In vitro Antimicrobial and Antioxidant Studies on N-(2-hydroxybenzylidene) pyridine-2-amine and its M(II) Complexes. **Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences**. doi: 25.10.4314/njbas.v25i1.11.

[14] - BRUICE, P. Y. Organic Chemistry, 4th ed. **Prentice Hall**, 2003.

[15] - PATIL, A. O. *et al.* **ExxonMobil Chemical Patents Inc.** 2013.

[16] - UNICAMP, Segurança em Laboratórios Químicos, Diretoria de Segurança do Trabalho – **Instituto de Química**. Disponível em http://www.iqm.unicamp.br/sites/default/files/seg_lab_quimico.pdf. Acesso em: 07/11/2023.

[17] - SCHNEIDER, R.P.; GAMBA, R.C.; ALBERTINI, L.B. Manuseio de Produtos Químicos. Capítulo 8 Procedimentos para Tratamento e Disposição Final de Produtos Químicos. **São Paulo: ICBII USP**, 2011. 28 p. Protocolo da Rede PROSAB Microbiologia. Área: Métodos Básicos.

[18] - RICHARDSON, John L. et al. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. **ChemMedChem**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 1333– 1340, 2009. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900097>

[19] - SCHMIDT, A., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Curr Top Med Chem**. 2002 Nov;2(11):1239-59. doi: 10.2174/1568026023393048. PMID: 12171583.

[20] - Células L929. Disponível em:
<<https://www.cytion.com/pt/Celulas-L929/400260>>. Acesso em: 14 nov. 2024.

[21] - KHAN, M.O.F. Trypanothione Reductase: A Viable Chemotherapeutic Target for Antitrypanosomal and Antileishmanial Drug Design. **Drug Target Insights**. 2007;2. doi:10.1177/117739280700200007

[22] - LEAL, S. M. et al. *In Vitro* antileishmanial, trypanocidal, and mammalian cell activities of diverse N,N'-dihetaryl substituted diamines and related compounds. *Scientia Pharmaceutica*, v. 81, n. 1, p. 43–55, 2013.

[23] - YAMANAKA, C. N. et al. Assessment of leishmanicidal and trypanocidal activities of aliphatic diamine derivatives. *Chemical Biology and Drug Design*, v. 82, n. 6, p. 697–704, 2013.

[24] - PAVIA, D. L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VVYAN, J. R. Introduction of Spectroscopy. 4th ed. Belmont, CA: Cengage Learning, 2009.

[25] - IRIGOÍN, F., *et al.* Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 45, issue 6, 2008, p. 733-742, ISSN 0891-5849.

[26] - PINHEIRO, A. C, *et al.* Synthesis, cytotoxicity, and in vitro antileishmanial activity of mono-t-butyloxycarbonyl-protected diamines. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Vol. 71, Issue 3, 2011, Pages 273-278, ISSN: 0732-8893.

[27] - VELÁSQUEZ, A. M. A., *et al.* Synthesis and tripanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Volume 24, Issue 7, 2014, Pages 1707-1710, ISSN: 0960-894X.

[28] - KROPF, S. P. Carlos Chagas. Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz. Disponível em: <<https://chagas.fiocruz.br/historia/carlos-chagas/>>. Acesso em: 12/12/2024.

[29] - A trajetória do médico Oswaldo Cruz dedicado à ciência. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/trajetoria-do-medico-dedicado-ciencia>>. Acesso em: 12/12/2024.

8 - APÊNDICE

Apêndice A - Lista de figuras referente a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das bisaminas sintetizadas

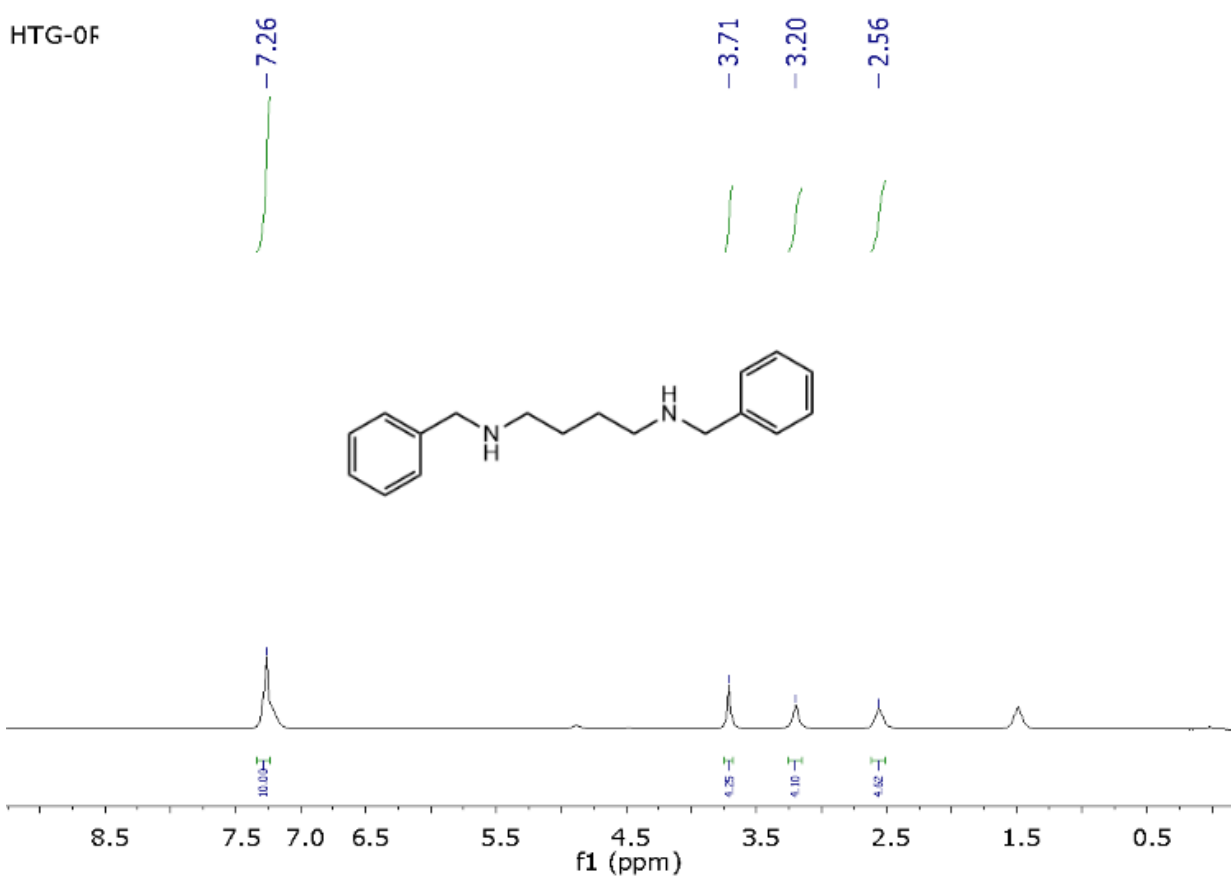
Figura 11: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-0-R

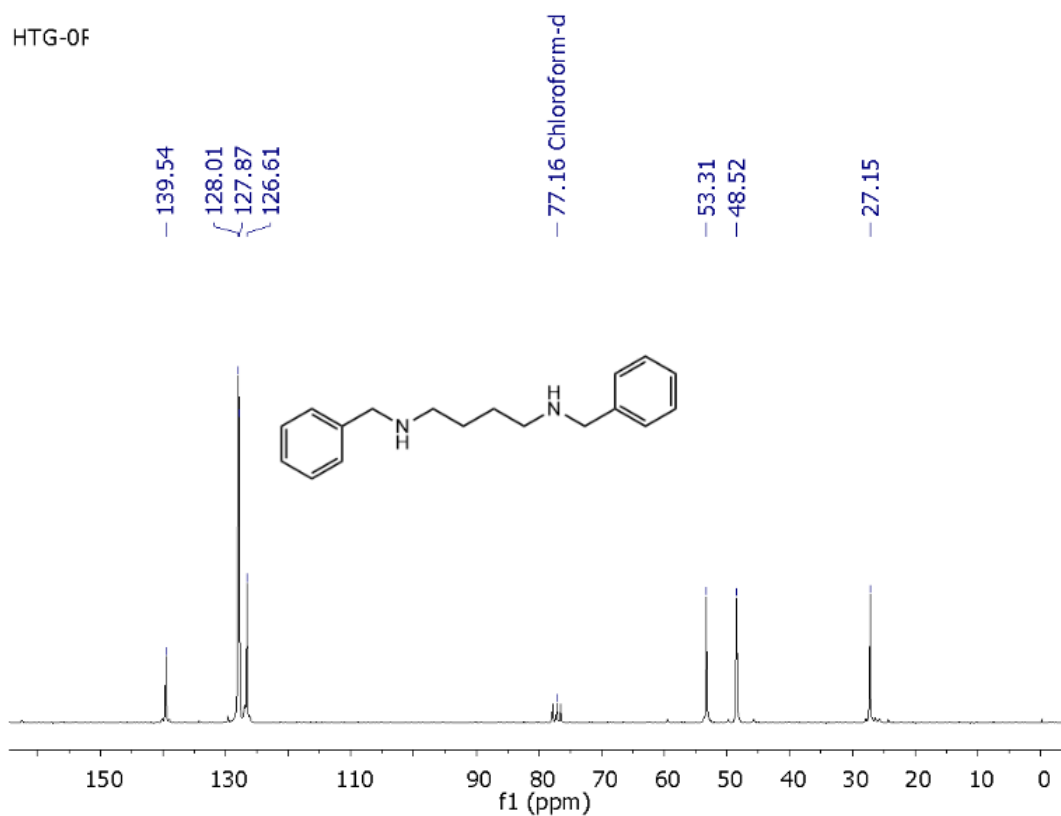
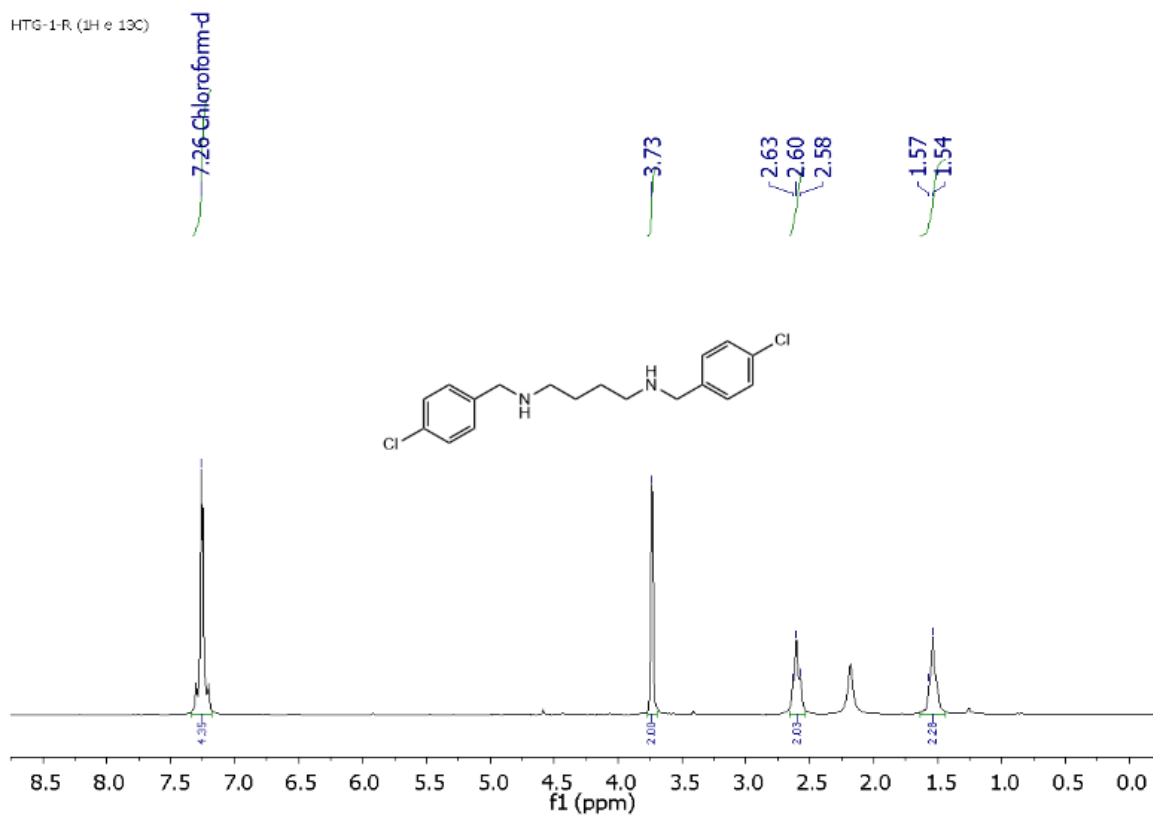
Figura 12: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-0-R**Figura 13:** Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-1-R

Figura 14: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-1-R

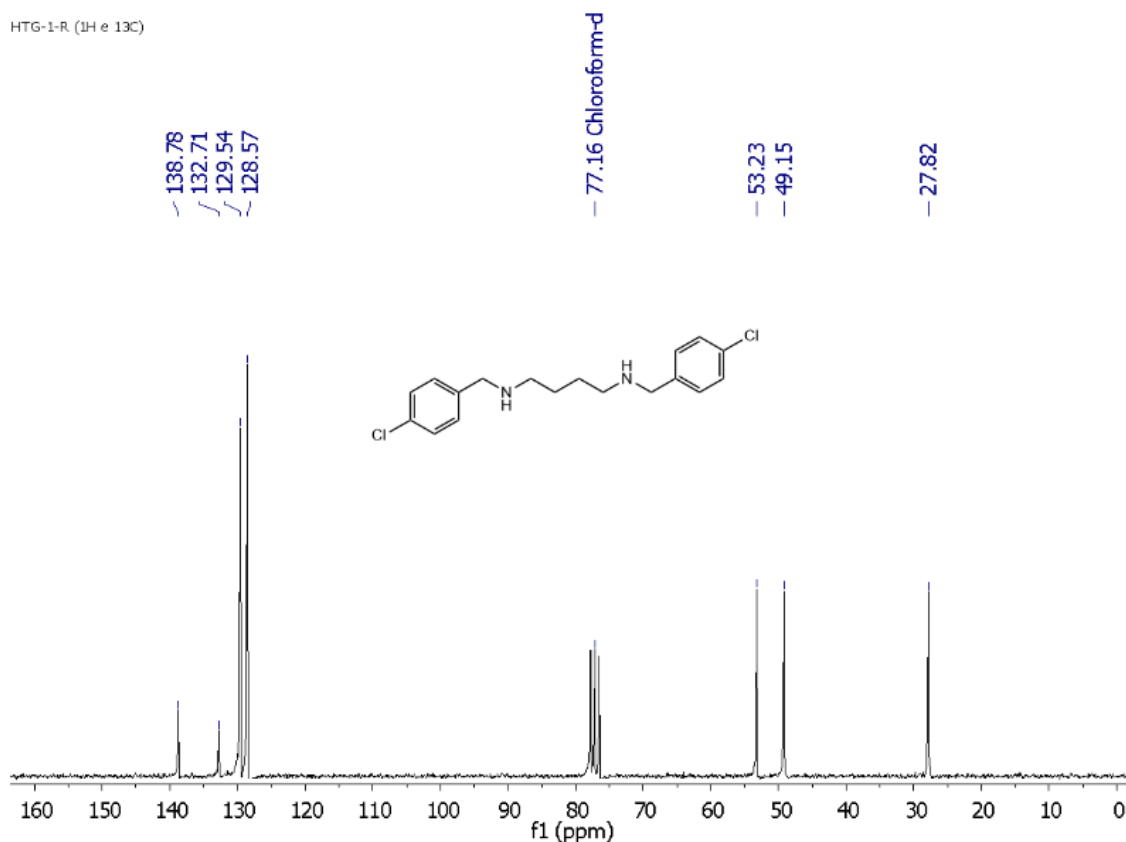


Figura 15: Espectro de RMN (300 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-2-R

HTG-2-R (H e C)ok

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 6.80 (s, 2H), 6.73 (s, 4H), 5.92 (d, $J = 0.9$ Hz, 4H), 3.67 (s, 4H), 2.60 (t, $J = 5.8$ Hz, 4H), 1.57 – 1.48 (m, 4H).

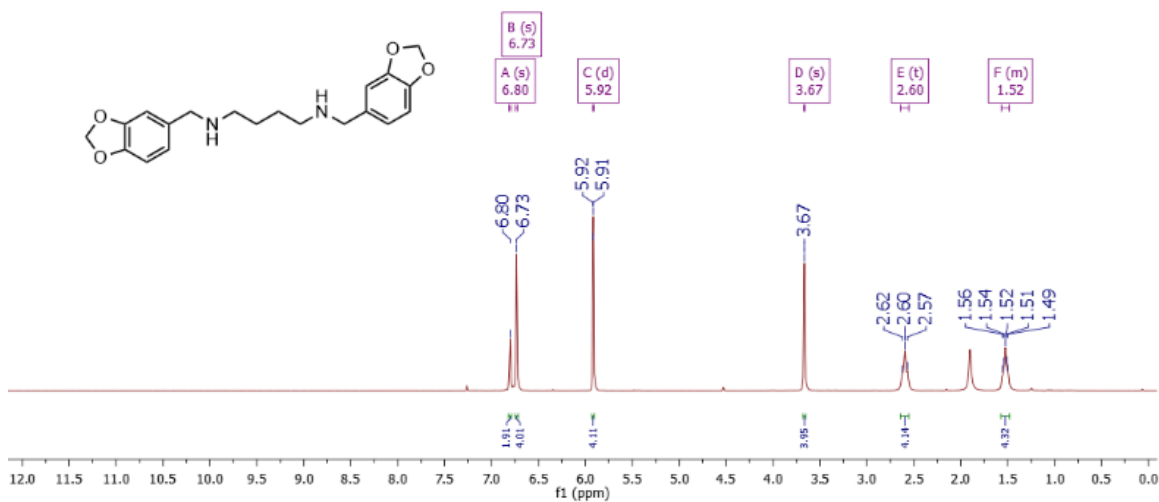


Figura 16: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-2-R

HTG-2-R (H e C)ok

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 147.65, 146.45, 134.24, 121.17, 108.64, 108.03, 100.83, 53.66, 48.96, 27.77.

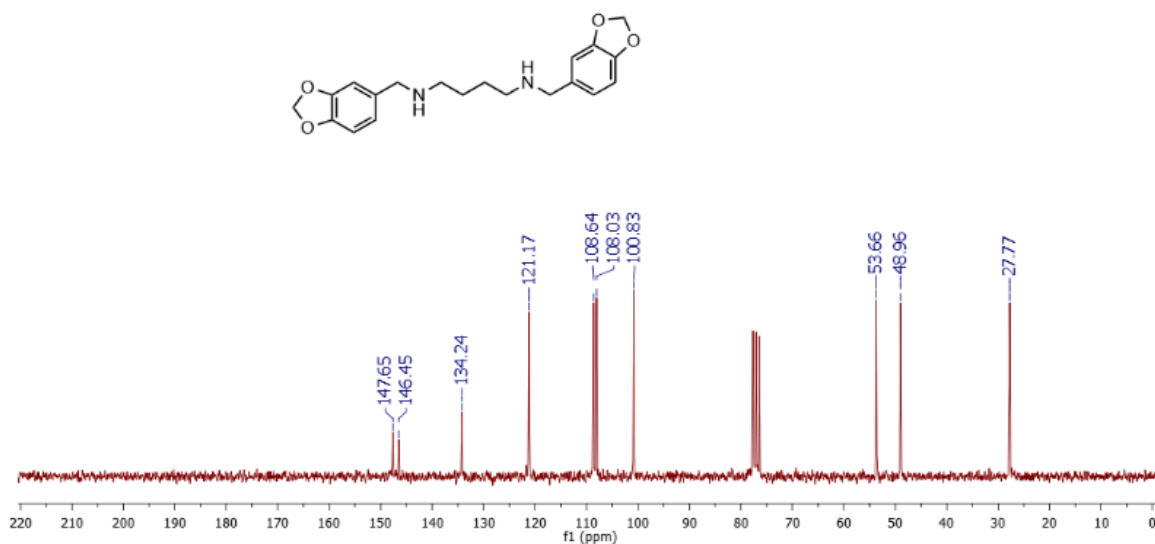


Figura 17: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-3-R

HTG-3-R (H e C)

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.38 – 7.16 (m, 4H), 7.15 – 6.95 (m, 4H), 3.82 (s, 4H), 2.62 (t, $J = 6.2$ Hz, 4H), 1.59 – 1.50 (m, 4H).

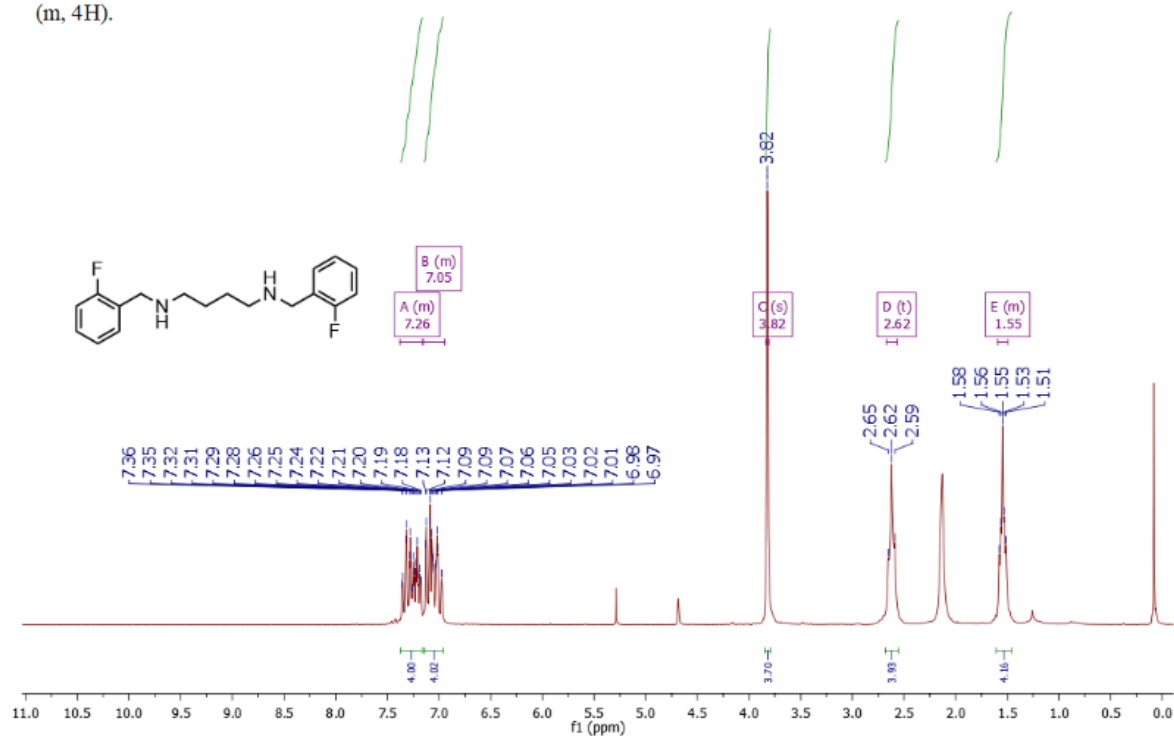


Figura 18: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-3-R

HTG-3-R (H e C)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 161.15 (d, $J = 245.2$ Hz), 130.37 (d, $J = 4.6$ Hz), 128.62 (d, $J = 8.2$ Hz), 127.02 (d, $J = 15.1$ Hz), 124.00 (d, $J = 3.2$ Hz), 115.19 (d, $J = 21.8$ Hz), 48.92, 47.13, 27.66.

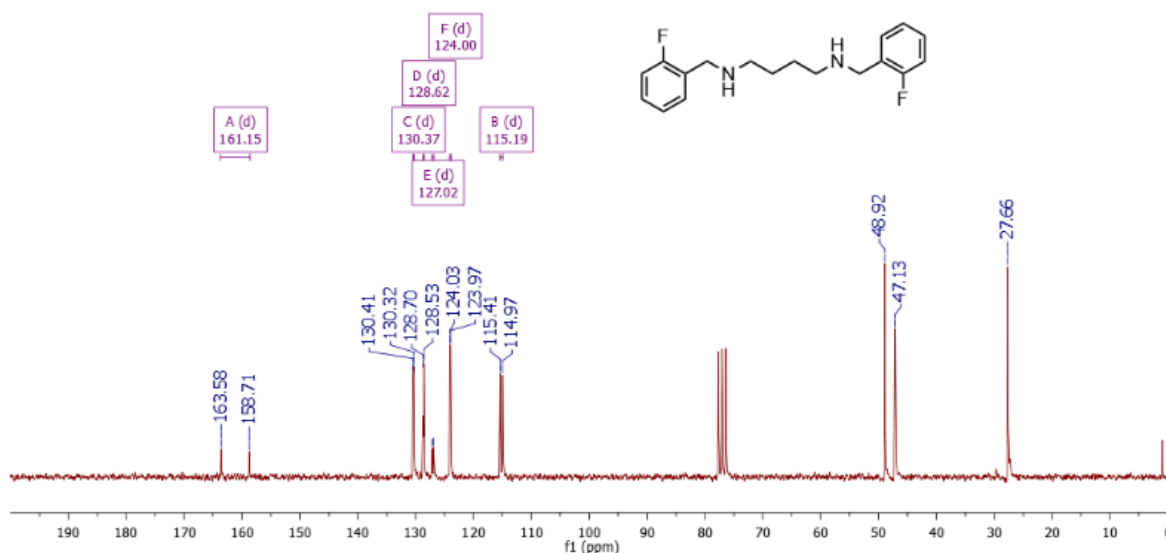


Figura 19: Espectro de RMN (300 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-4-R

HTG-4-R'

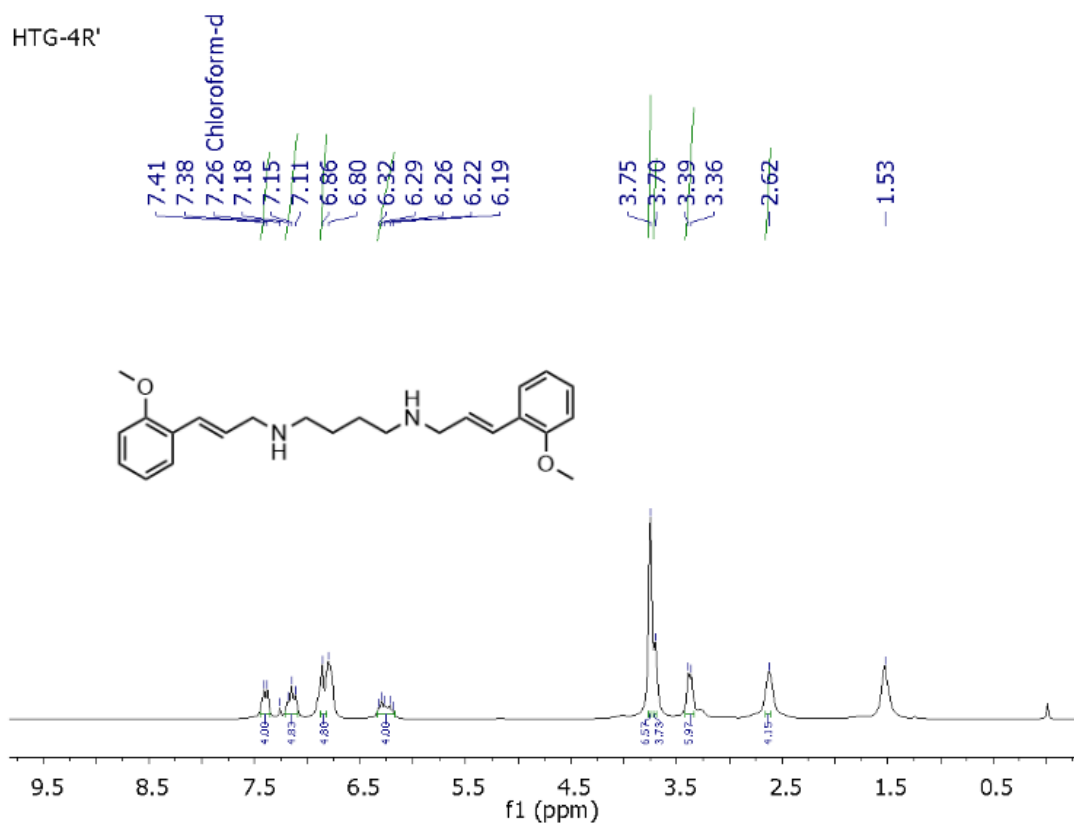


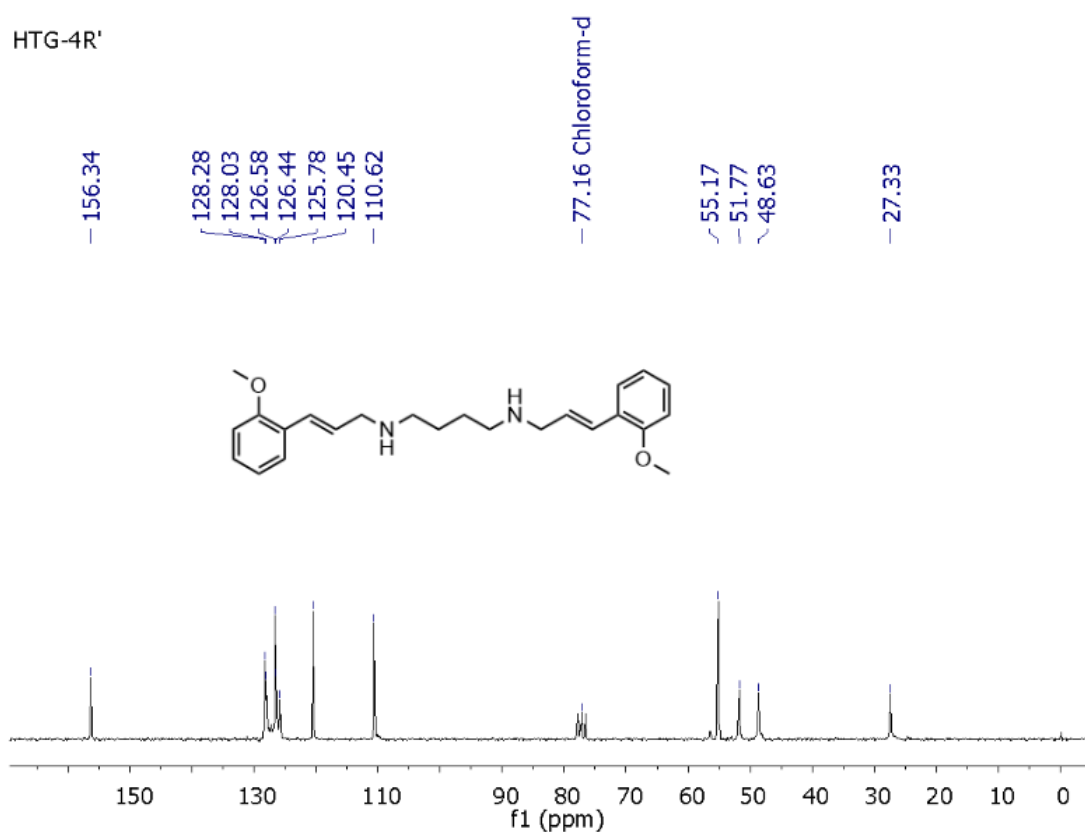
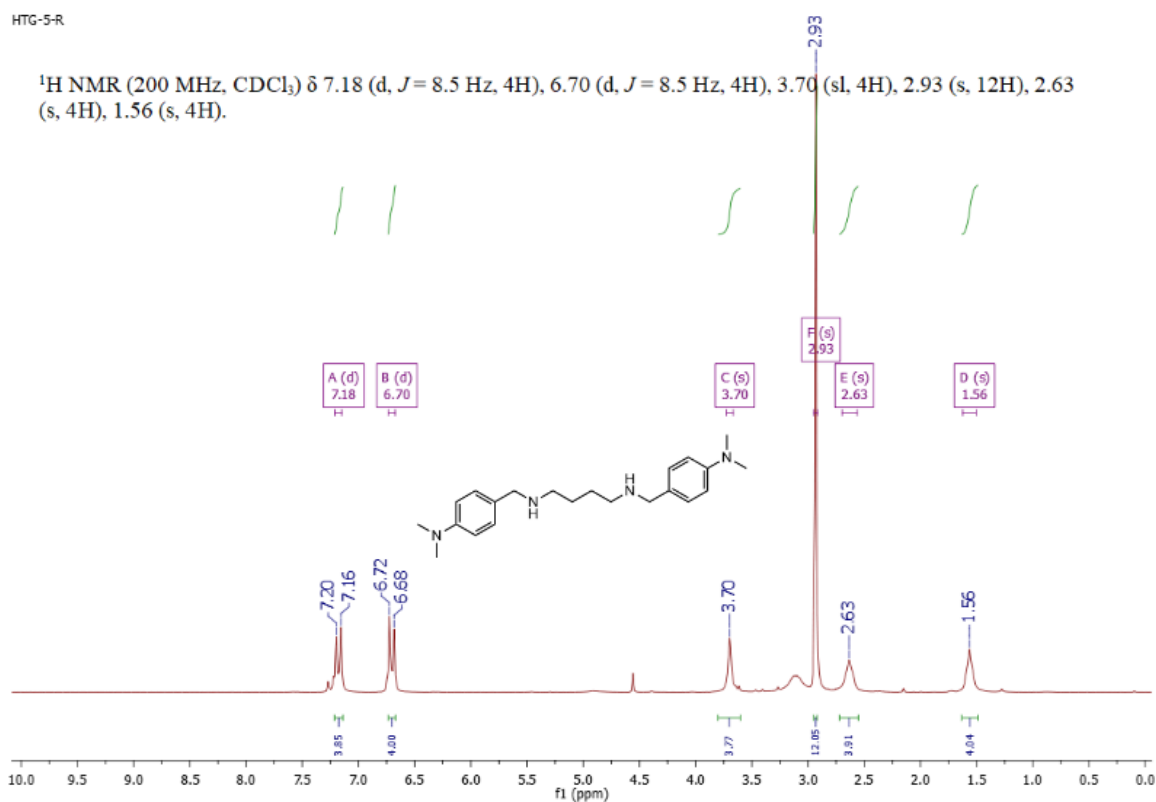
Figura 20: Espectro de RMN (75 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-4-R**Figura 21:** Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-5-R

Figura 22: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-5-R

HTG-5-R

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 149.89, 129.73, 129.28, 128.51, 127.35, 112.68, 64.94, 52.98, 48.59, 40.69, 27.51.

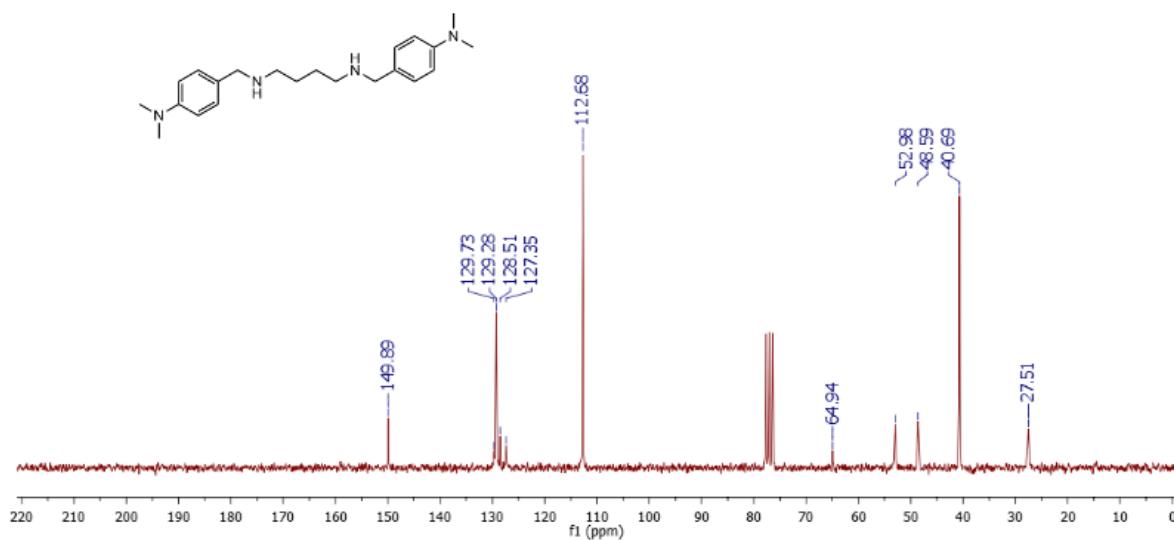


Figura 23: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-6-R.

HTG-6-R

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.16 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 6.78 (dd, $J = 14.3, 7.4$ Hz, 4H), 3.98 (s, 4H), 2.68 (s, 4H), 1.59 (s, 4H).

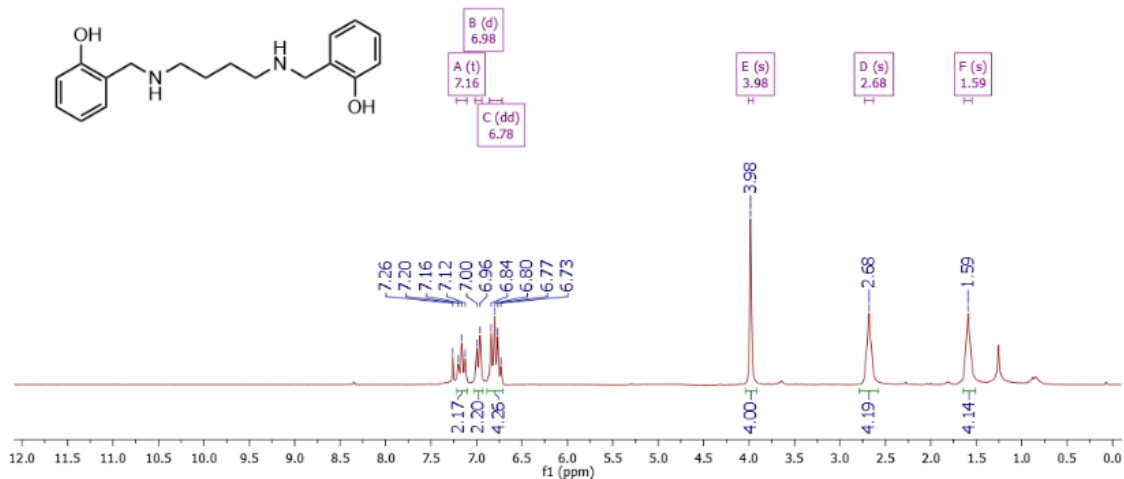


Figura 24: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-6-R .

HTG-6-R (1H e 13C)

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 158.19, 128.68, 128.27, 122.41, 118.98, 116.33, 52.66, 48.33, 27.16.

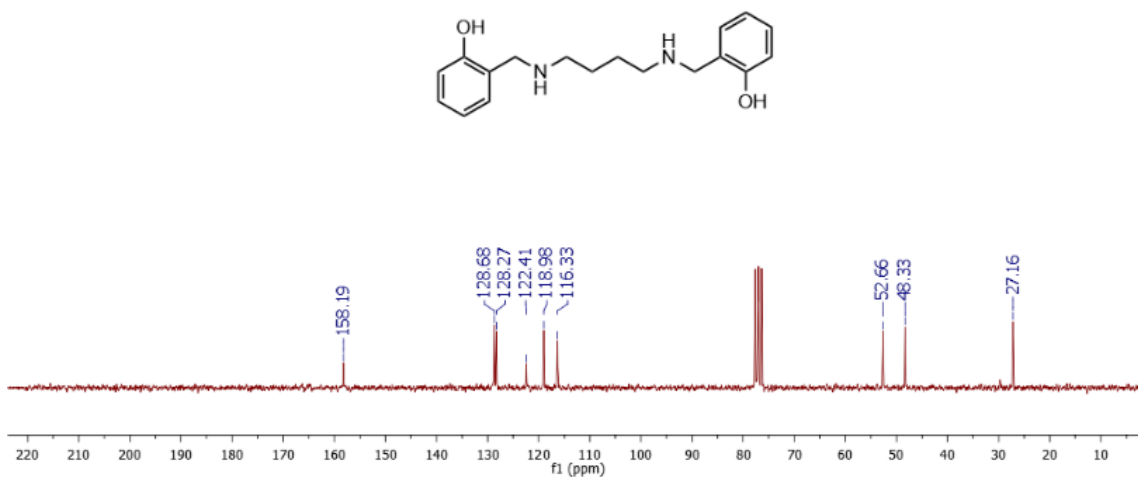


Figura 25: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-7-R.

Gabriela5_HTG-7-R_CD30

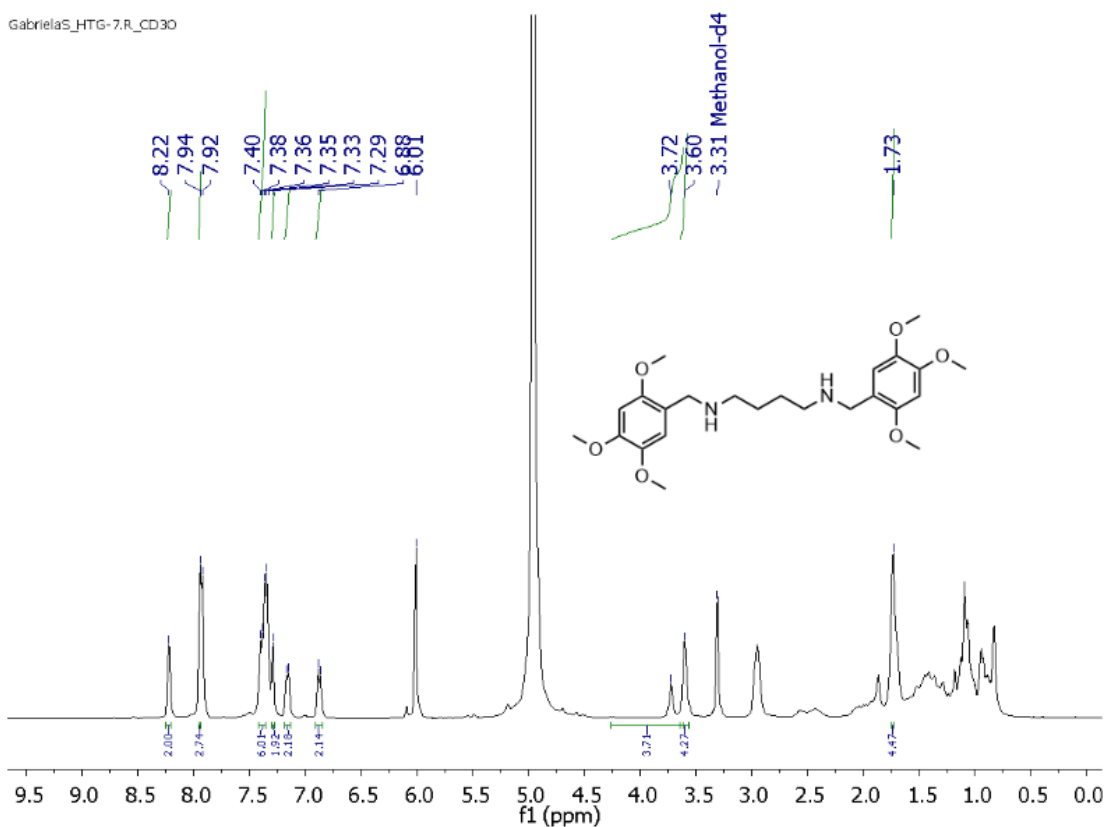


Figura 26: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-7-R.

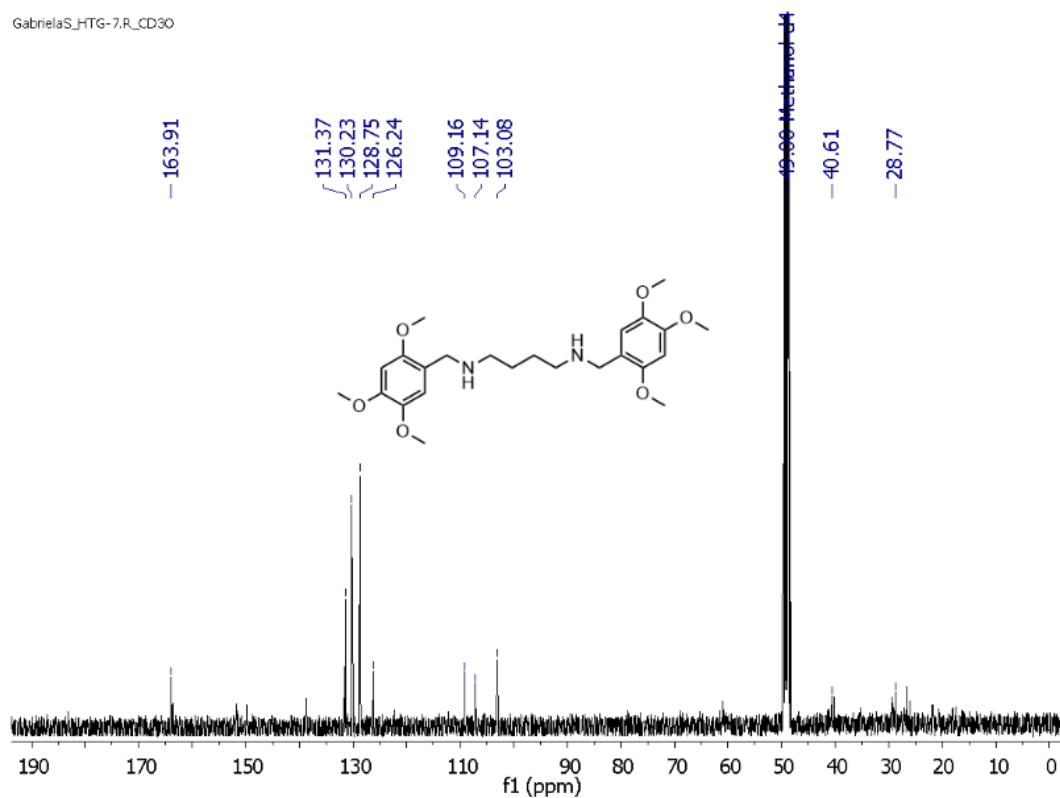


Figura 27: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-8-R.

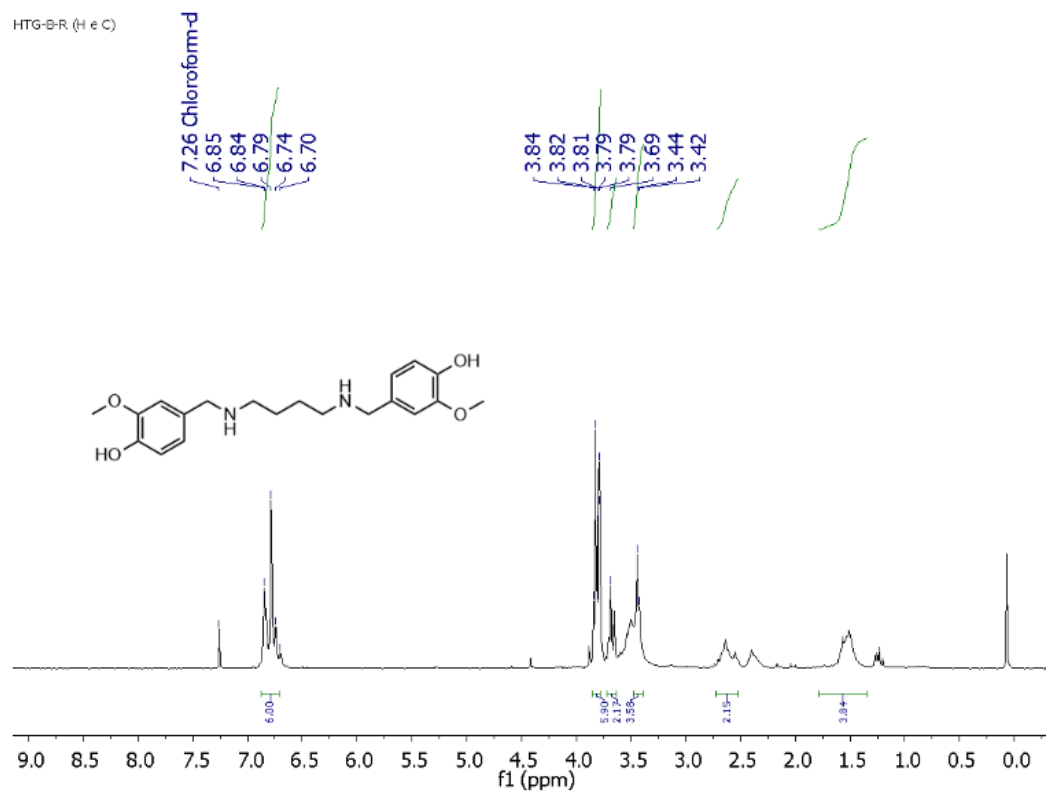


Figura 28: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-8-R.

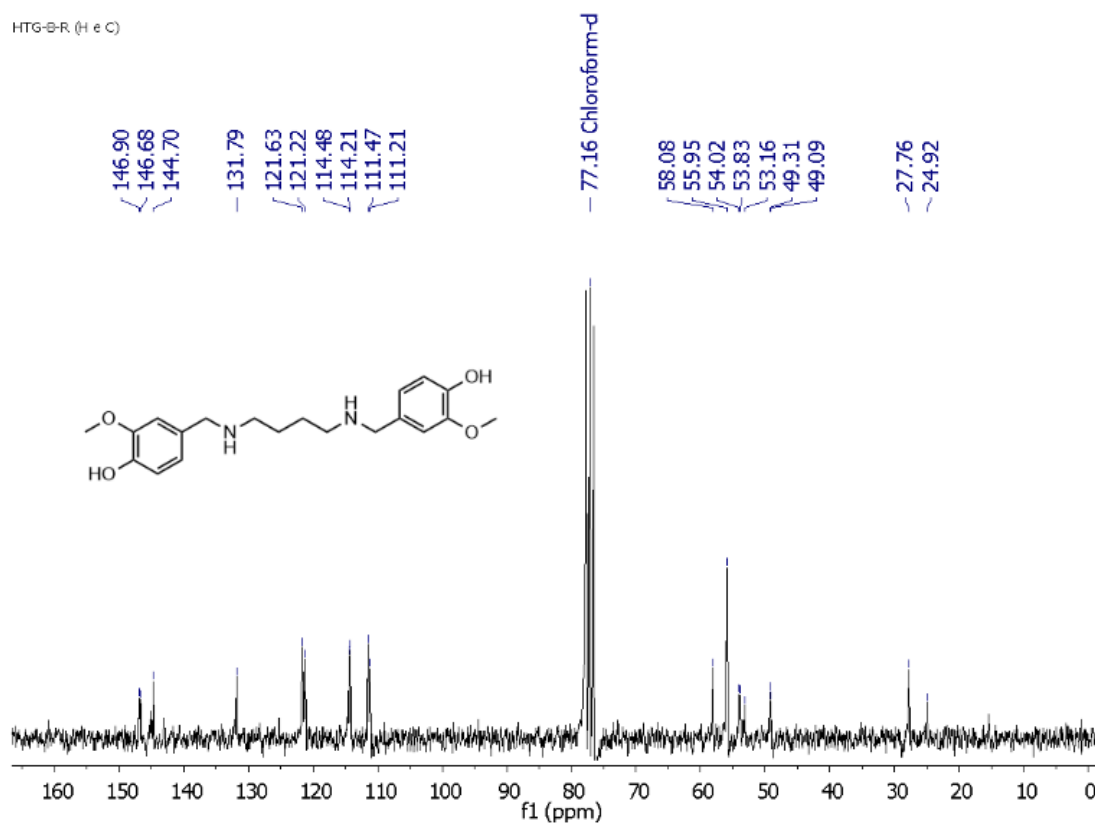


Figura 29: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-9-R

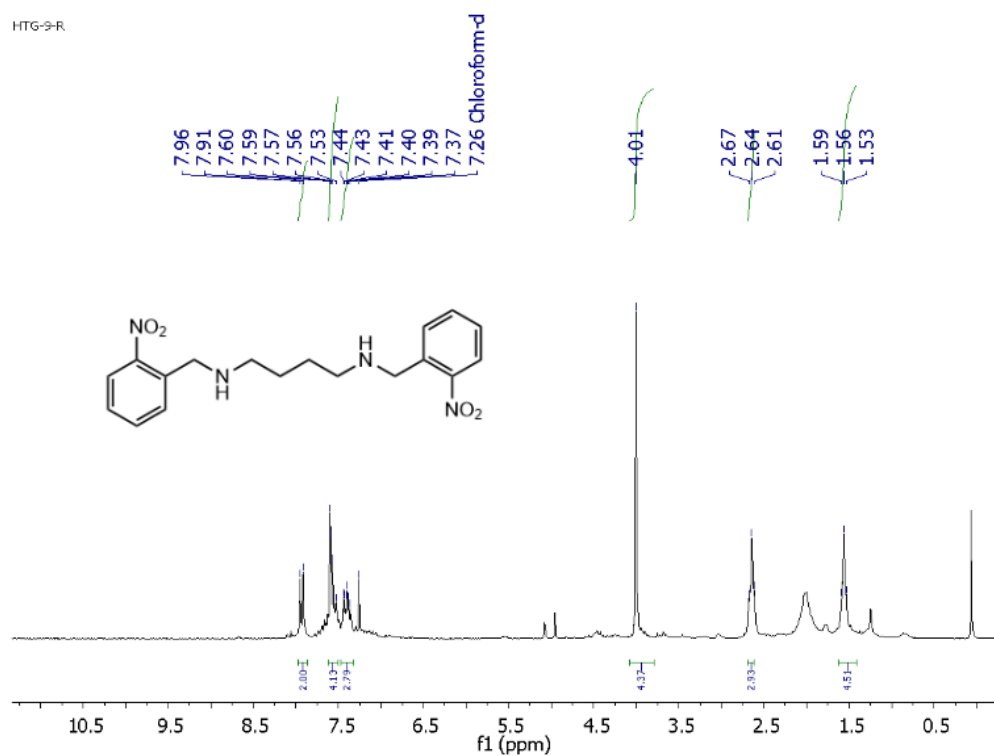


Figura 30: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-9-R

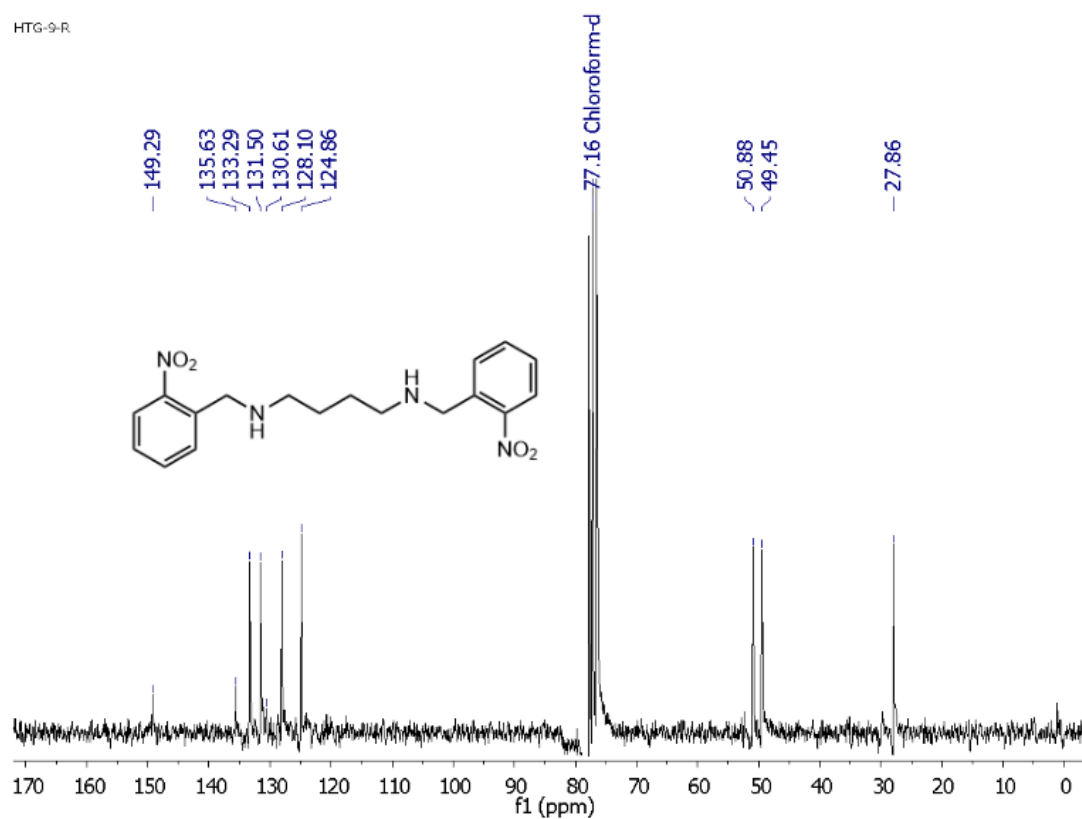


Figura 31: Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) do composto HTG-10-R

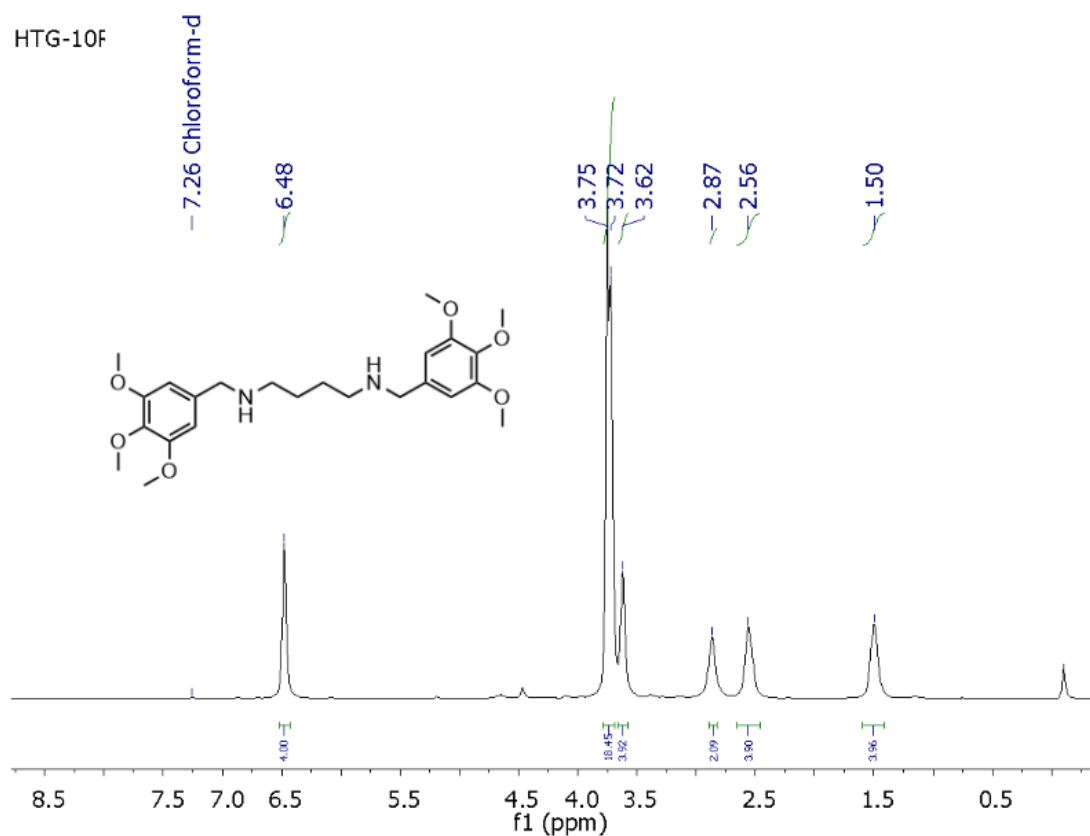
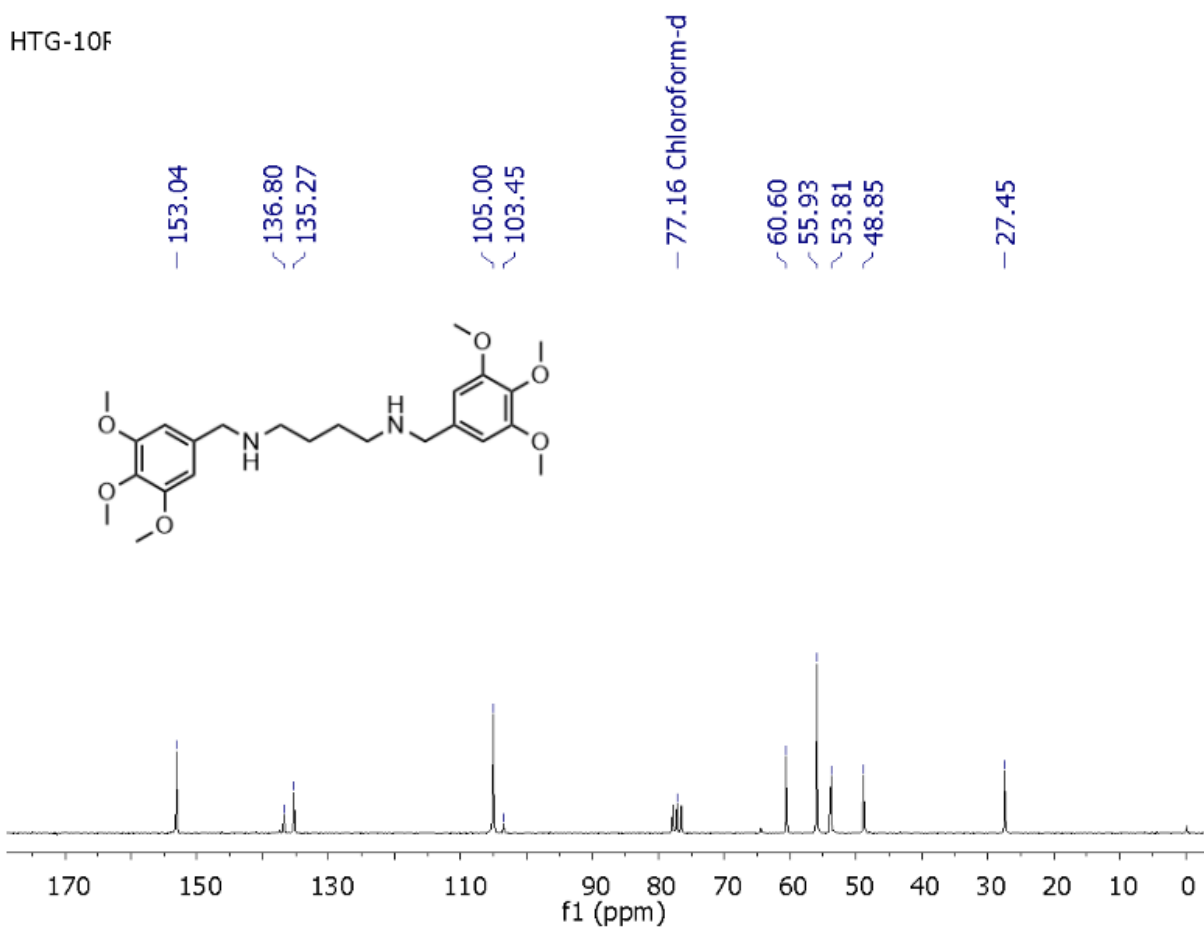


Figura 32: Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do composto HTG-10-R**Figura 33:** Espectro de RMN (300 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-11-R

HTG-11R (repetição)

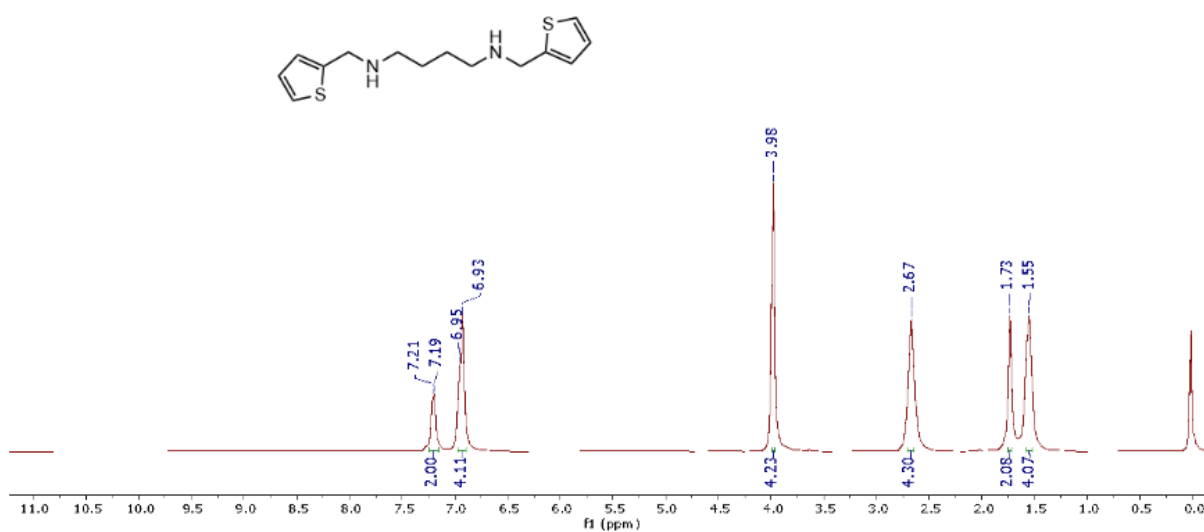


Figura 34: Espectro de RMN (75 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-11-R

HTG-11R (repetição)

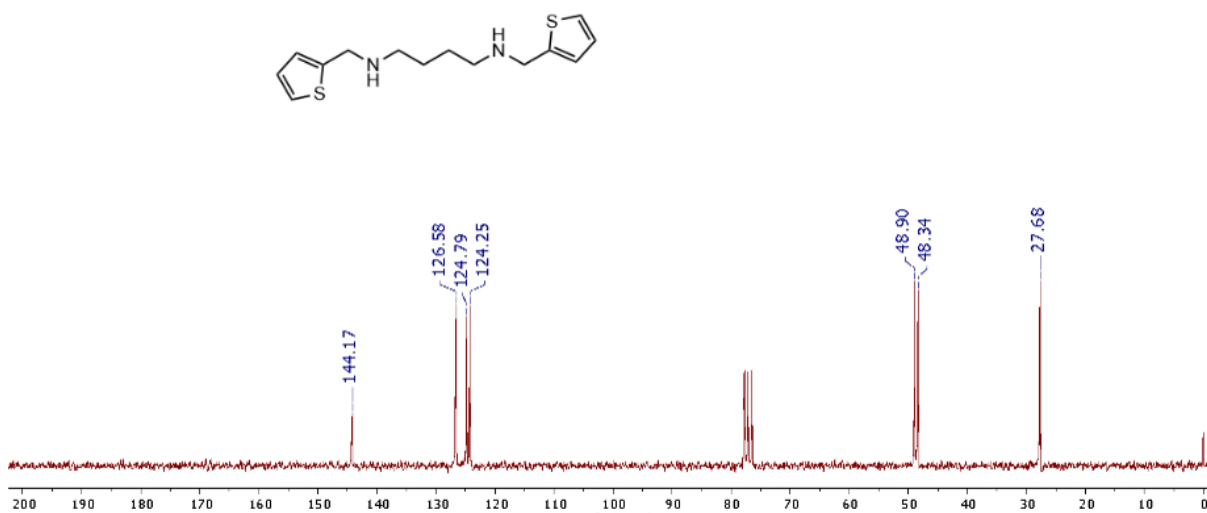
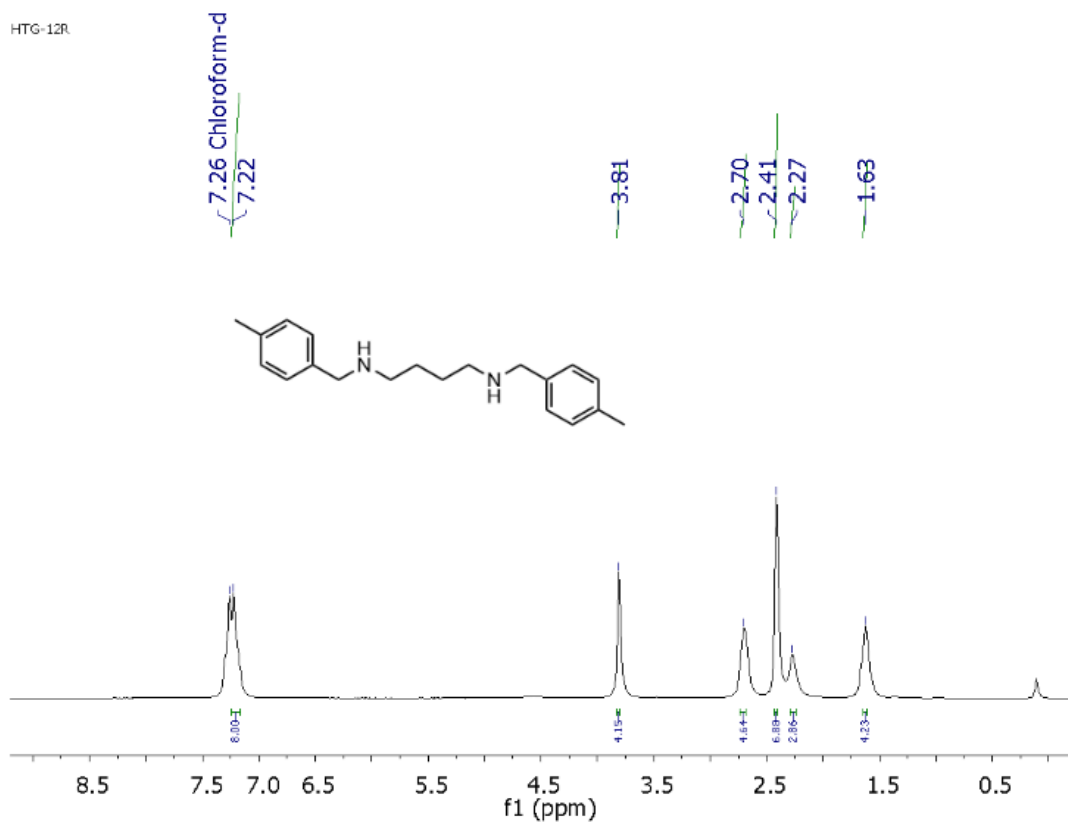
 ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) 144.17, 126.58, 124.79, 124.25, 48.90, 48.34, 27.68.**Figura 35:** Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-12-R.

Figura 36: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-12-R.

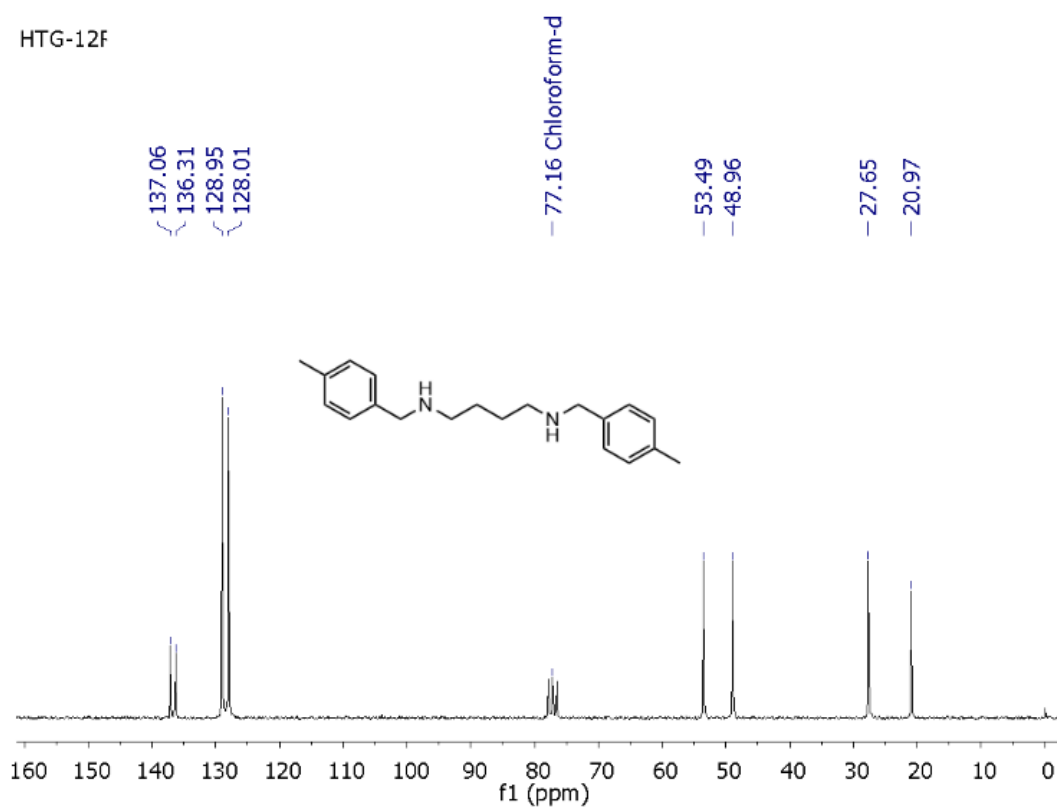


Figura 37: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-14-R.

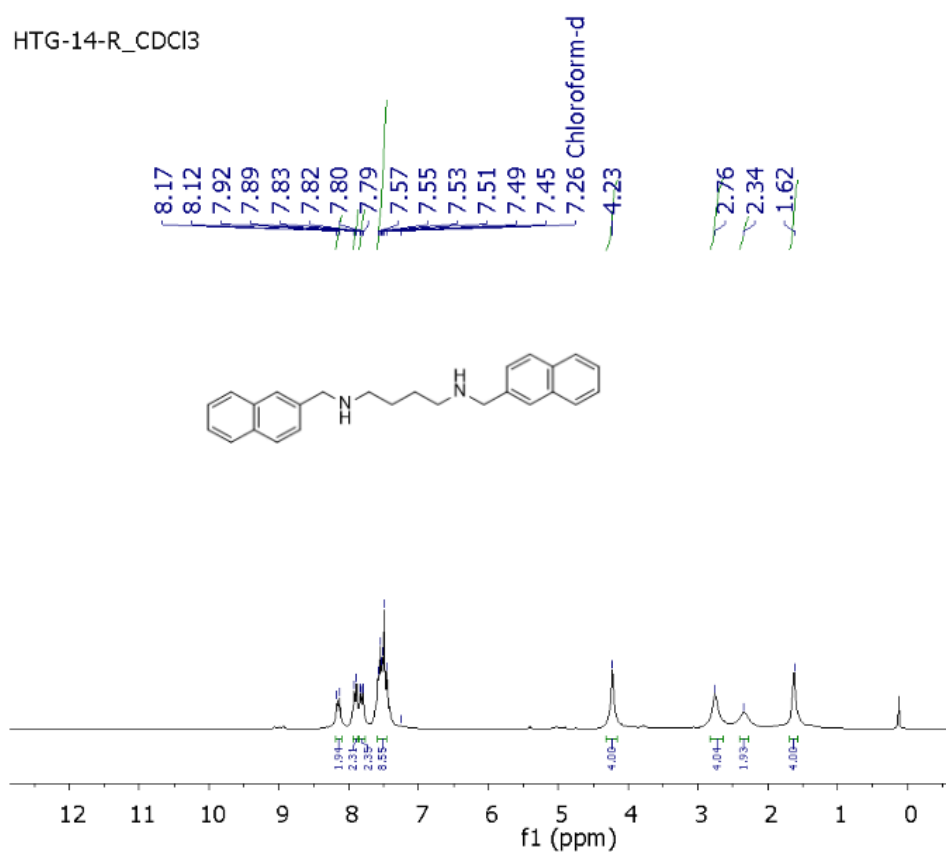


Figura 38: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-14-R.

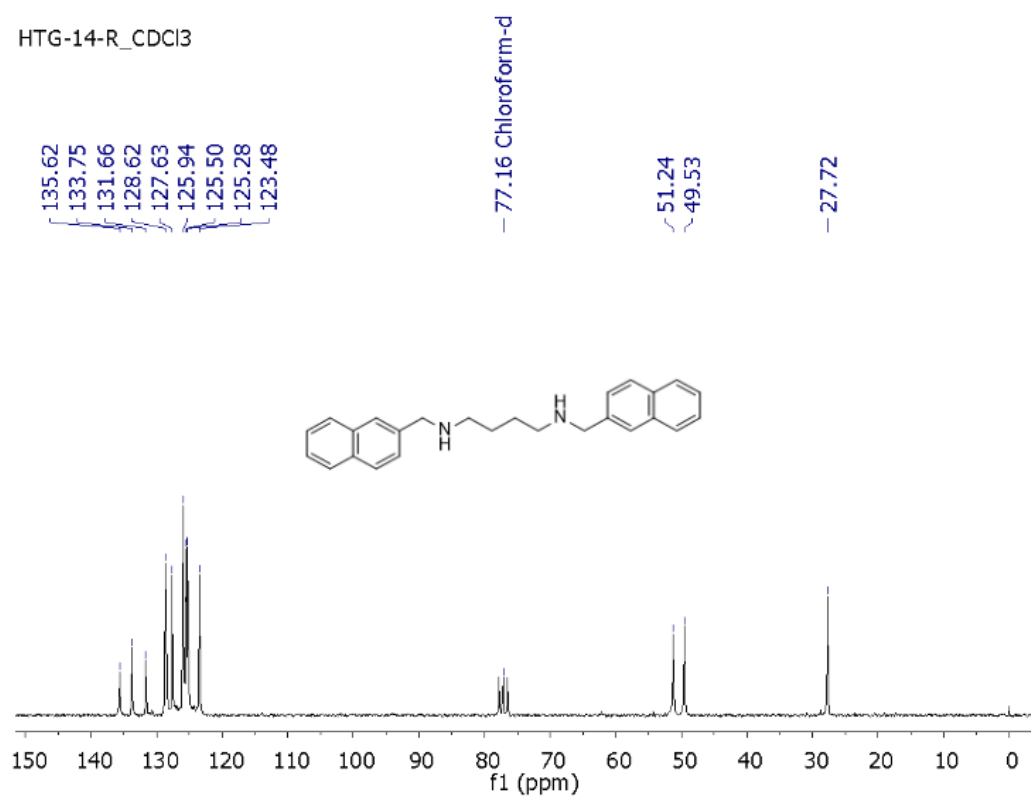


Figura 39: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-17-R.

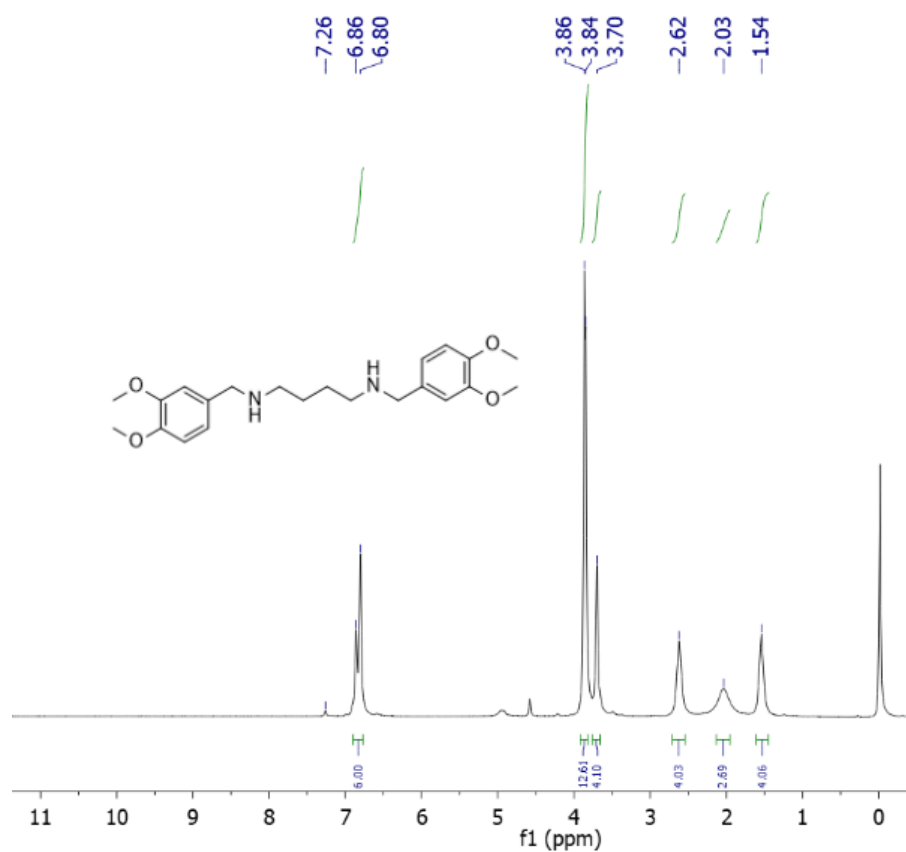


Figura 40: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-17-R.

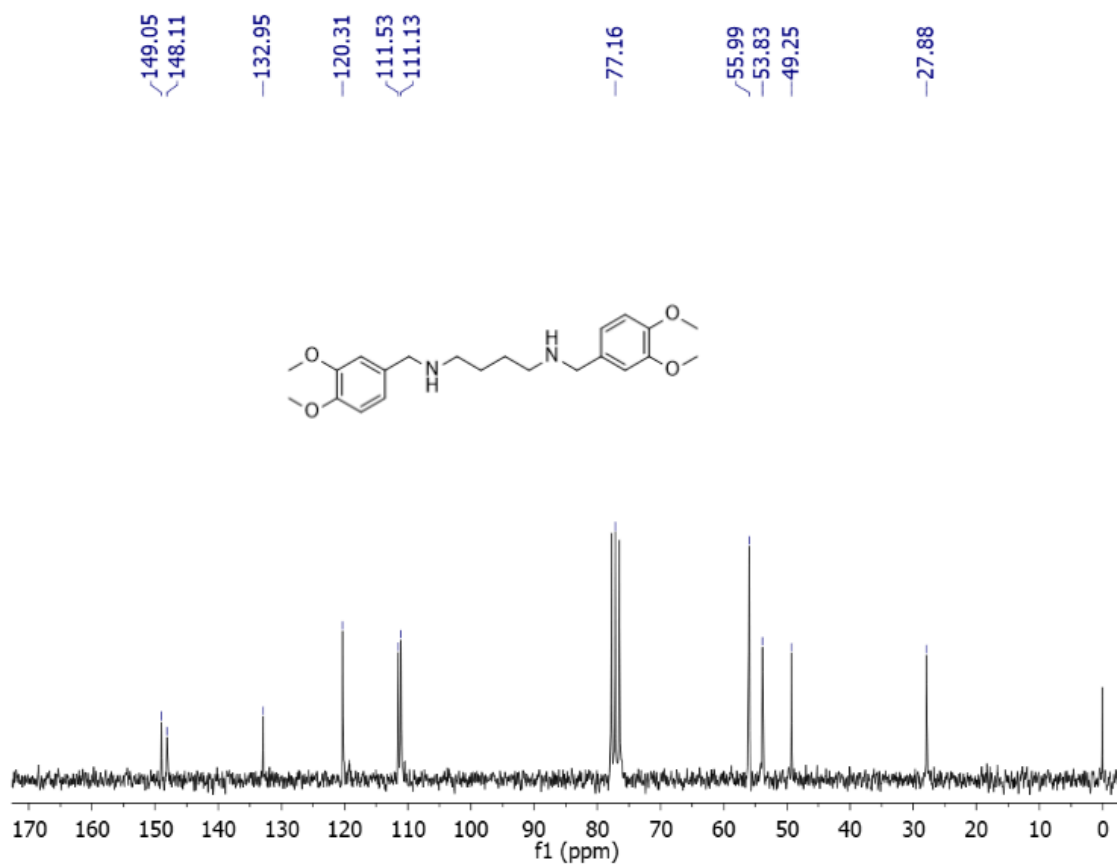


Figura 41: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-18-R.

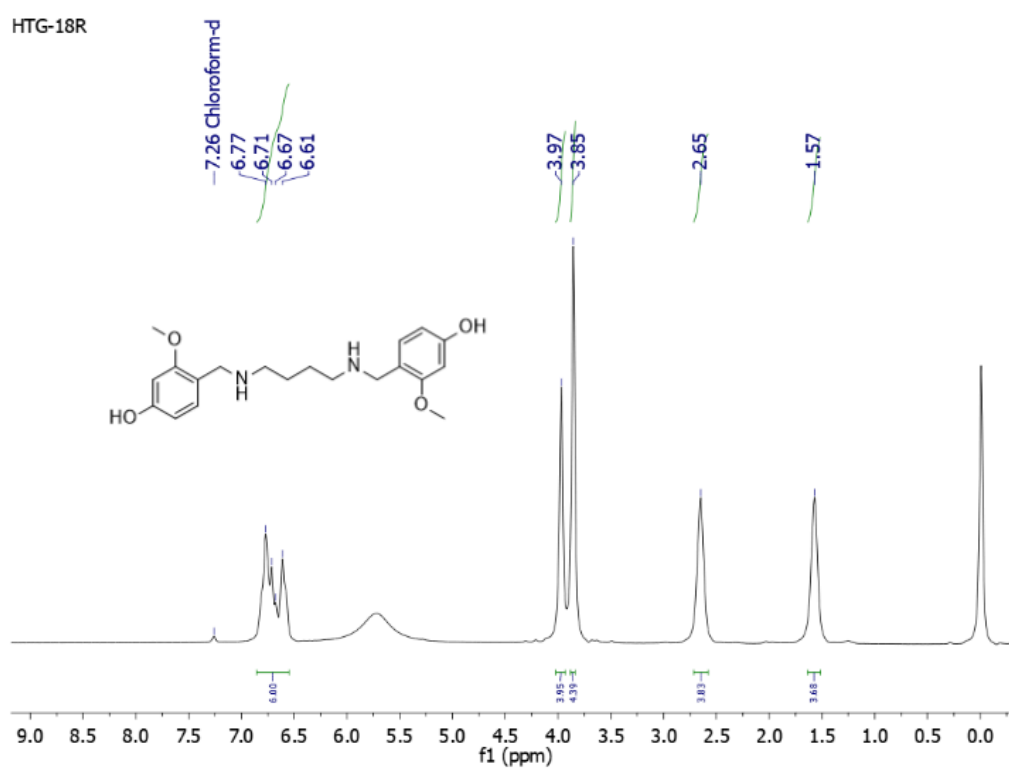


Figura 42: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-18-R

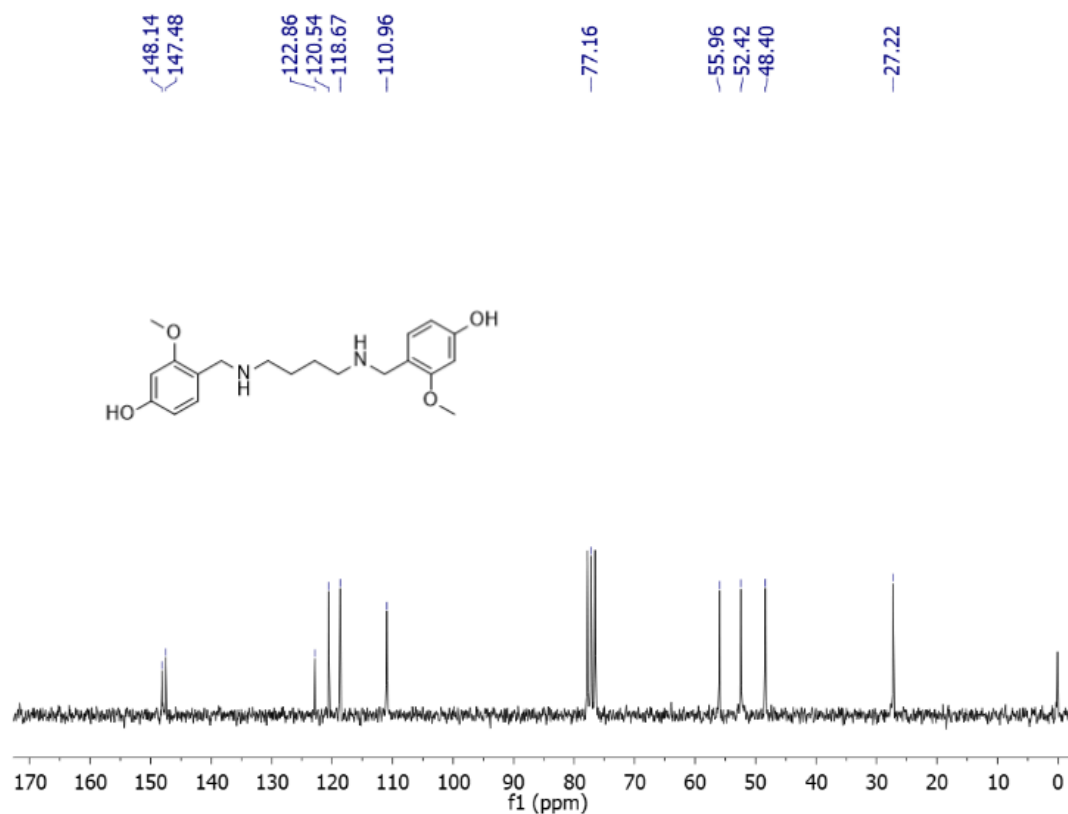


Figura 43: Espectro de RMN (200 MHz, CDCl_3) de ^1H do composto HTG-21-R

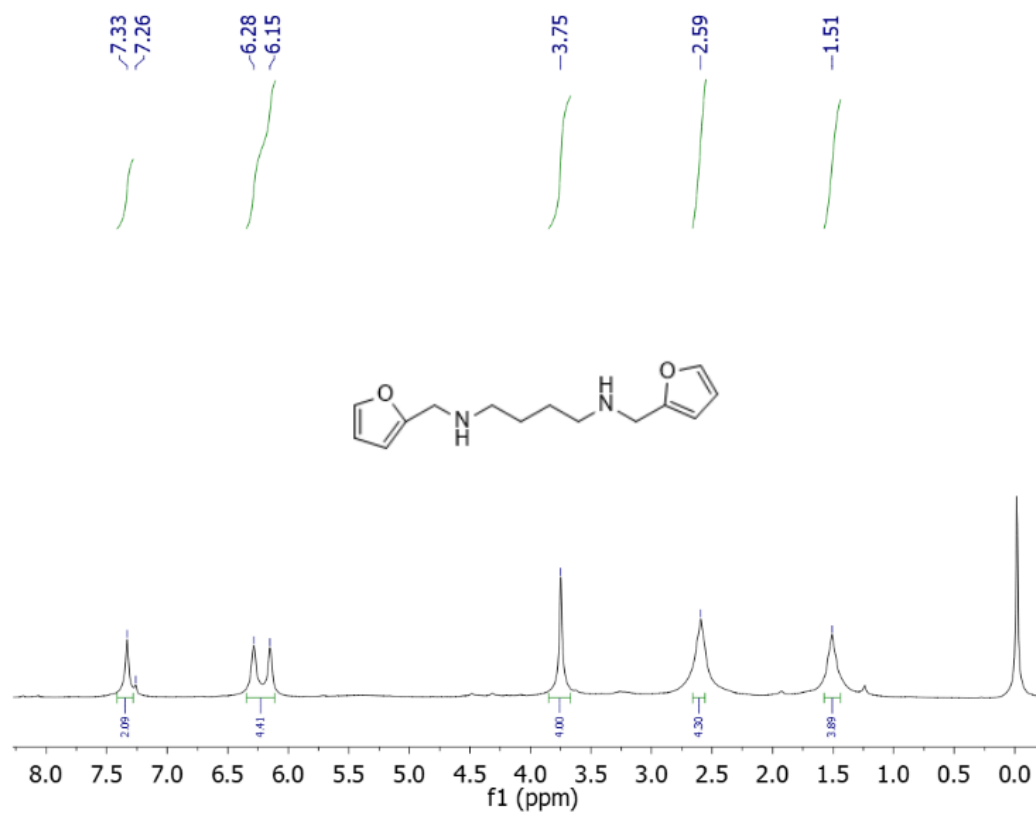
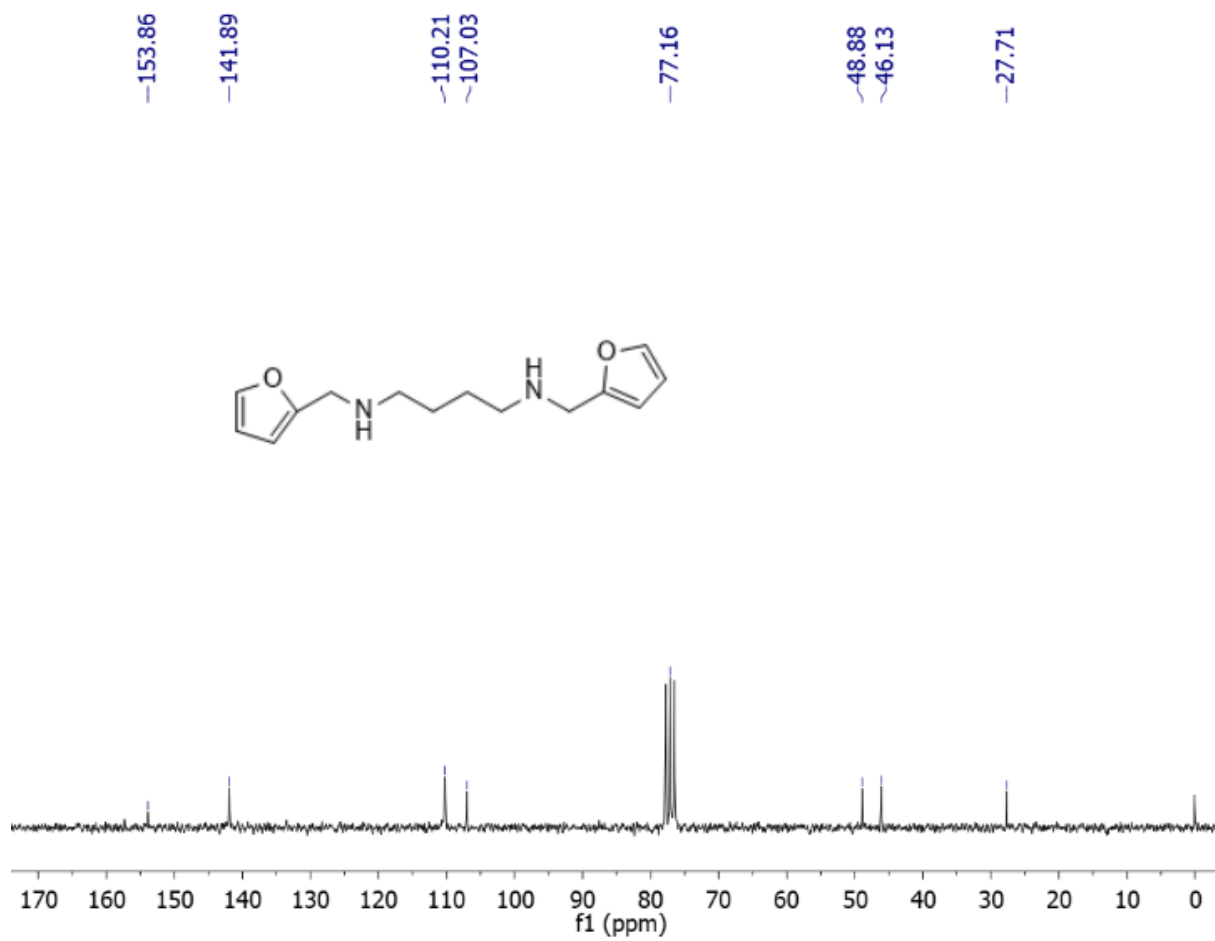


Figura 44: Espectro de RMN (50 MHz, CDCl_3) de ^{13}C do composto HTG-21-R

Apêndice B - Lista de figuras referente ao ensaio de Infravermelho (IV) das bisaminas sintetizadas

Figura 45: Espectro de Infravermelho do composto HTG-0-R (KBr).

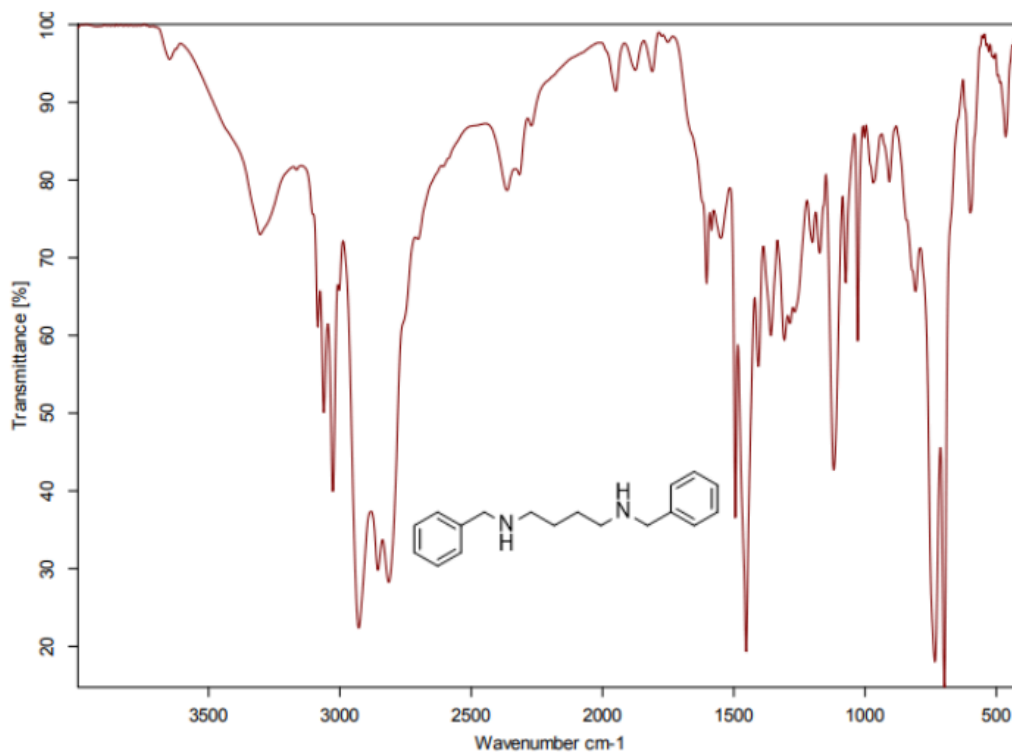


Figura 46: Espectro de Infravermelho do composto HTG-1-R (KBr).

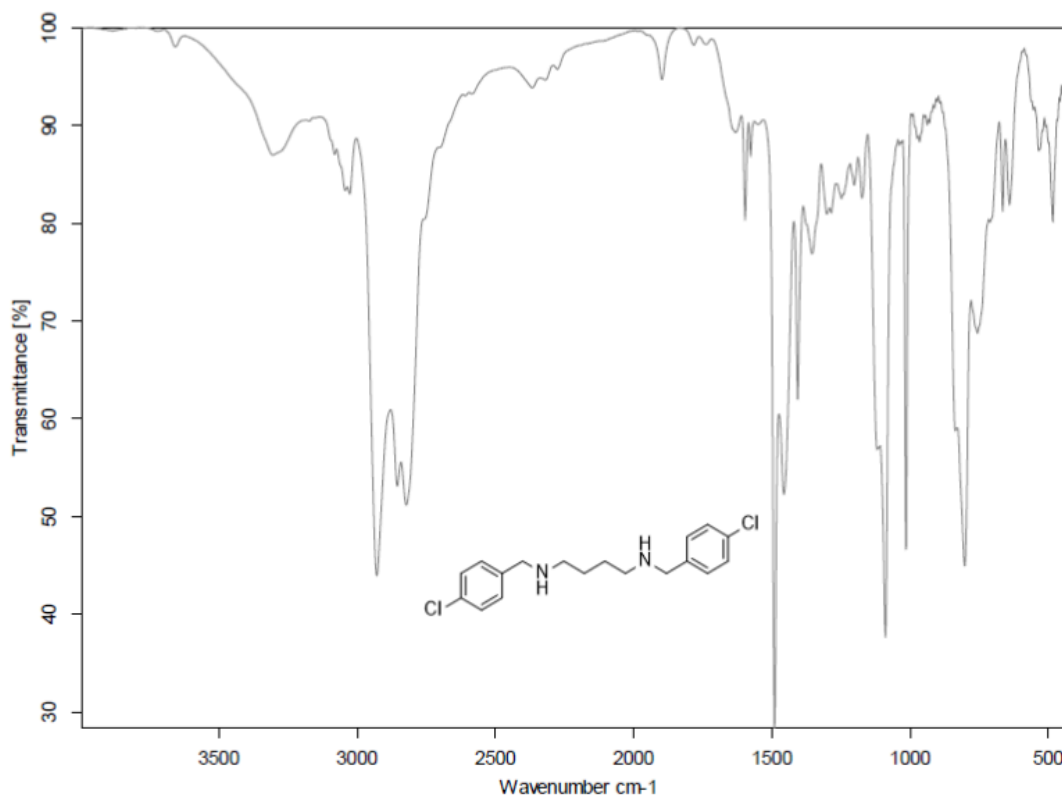


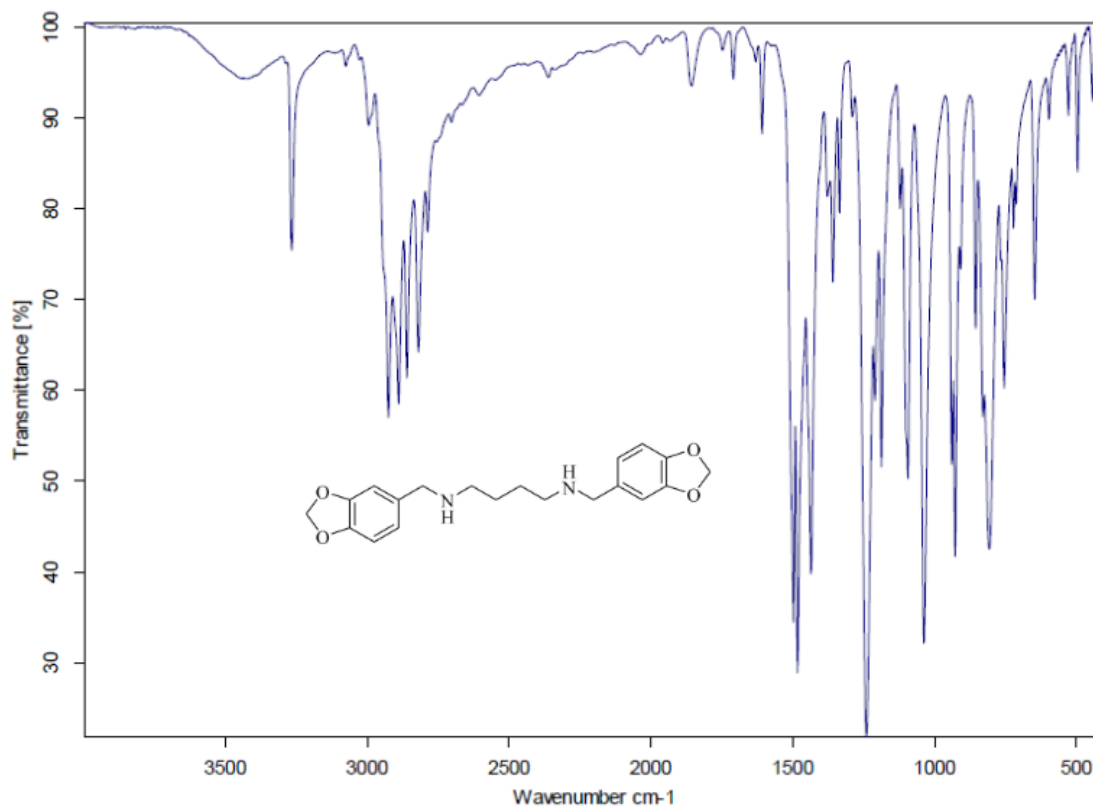
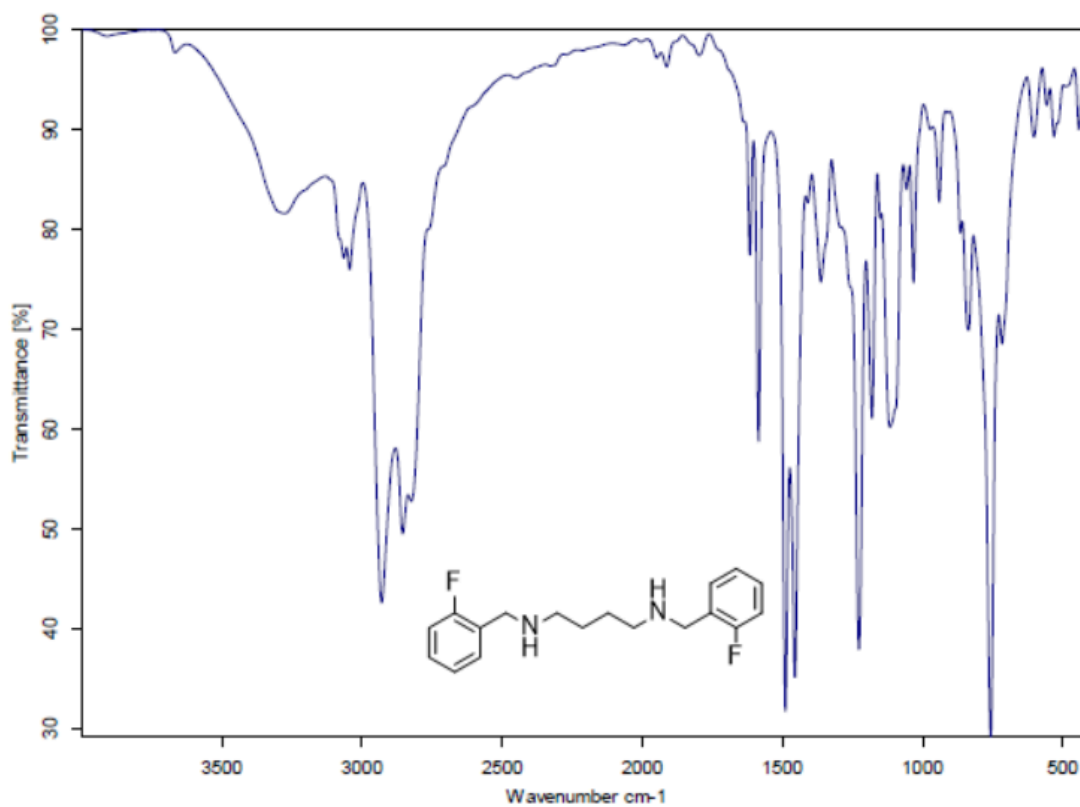
Figura 47: Espectro de Infravermelho do composto HTG-2-R (KBr).**Figura 48:** Espectro de Infravermelho do composto HTG-3-R (KBr).

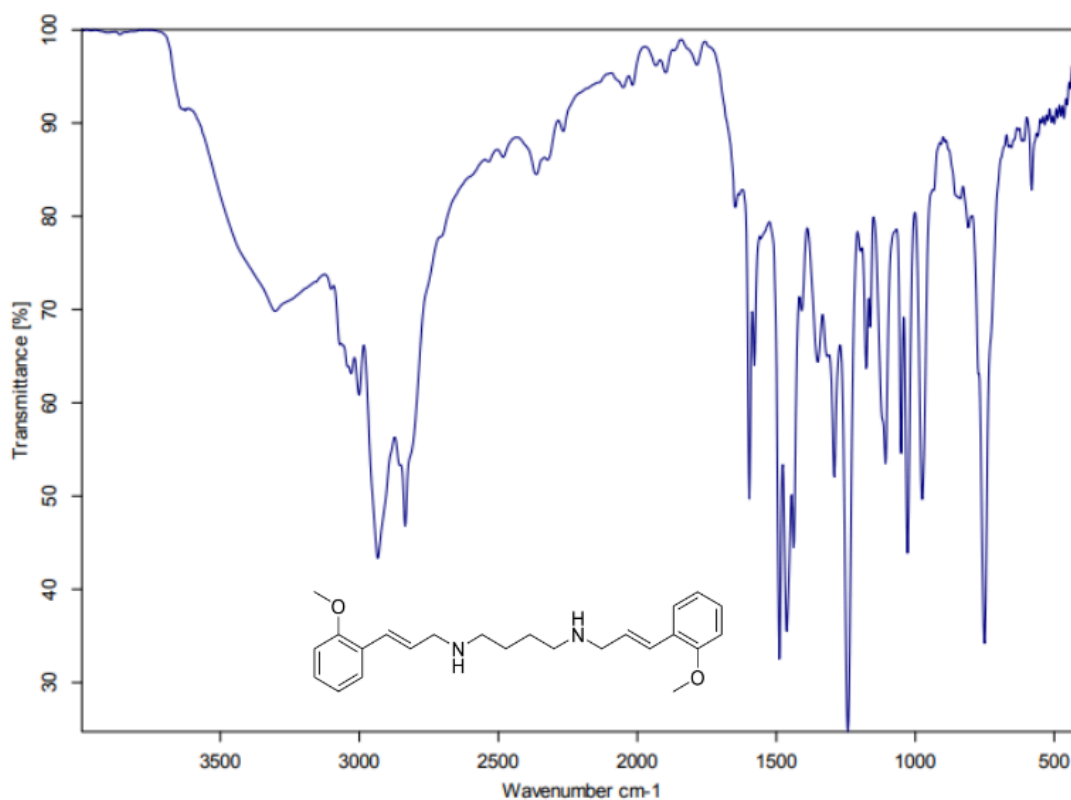
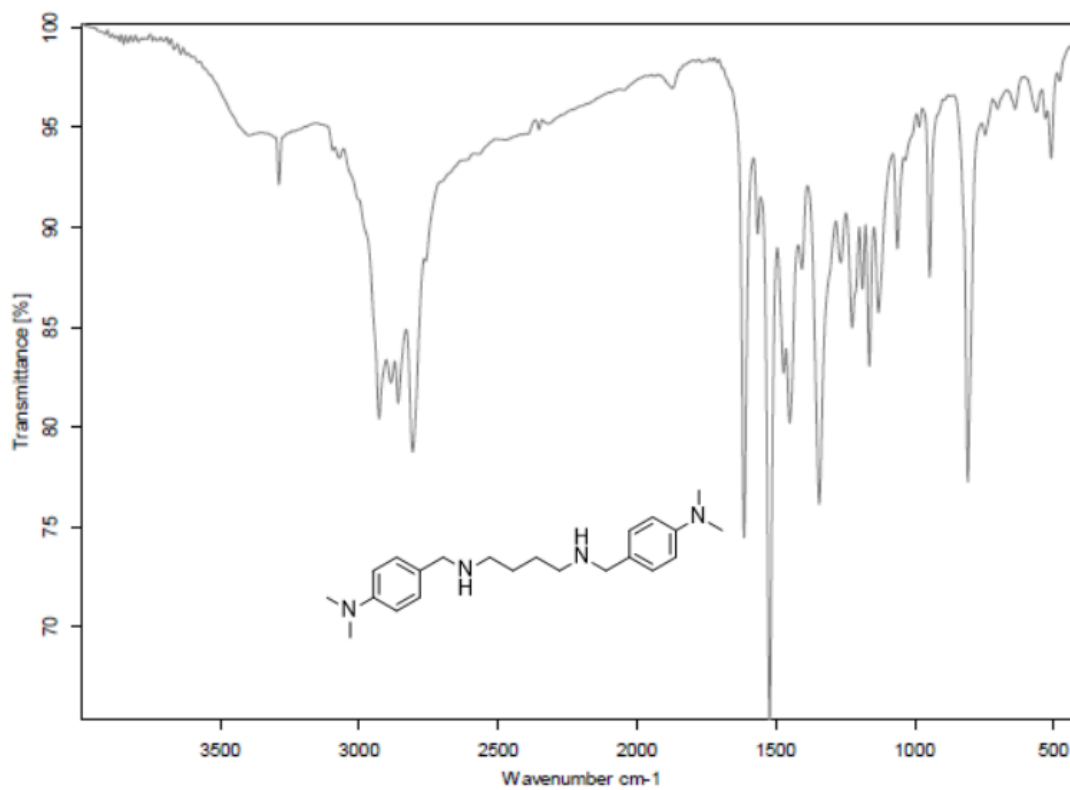
Figura 49: Espectro de Infravermelho do composto HTG-4-R (KBr).**Figura 50:** Espectro de Infravermelho do composto HTG-5-R (KBr).

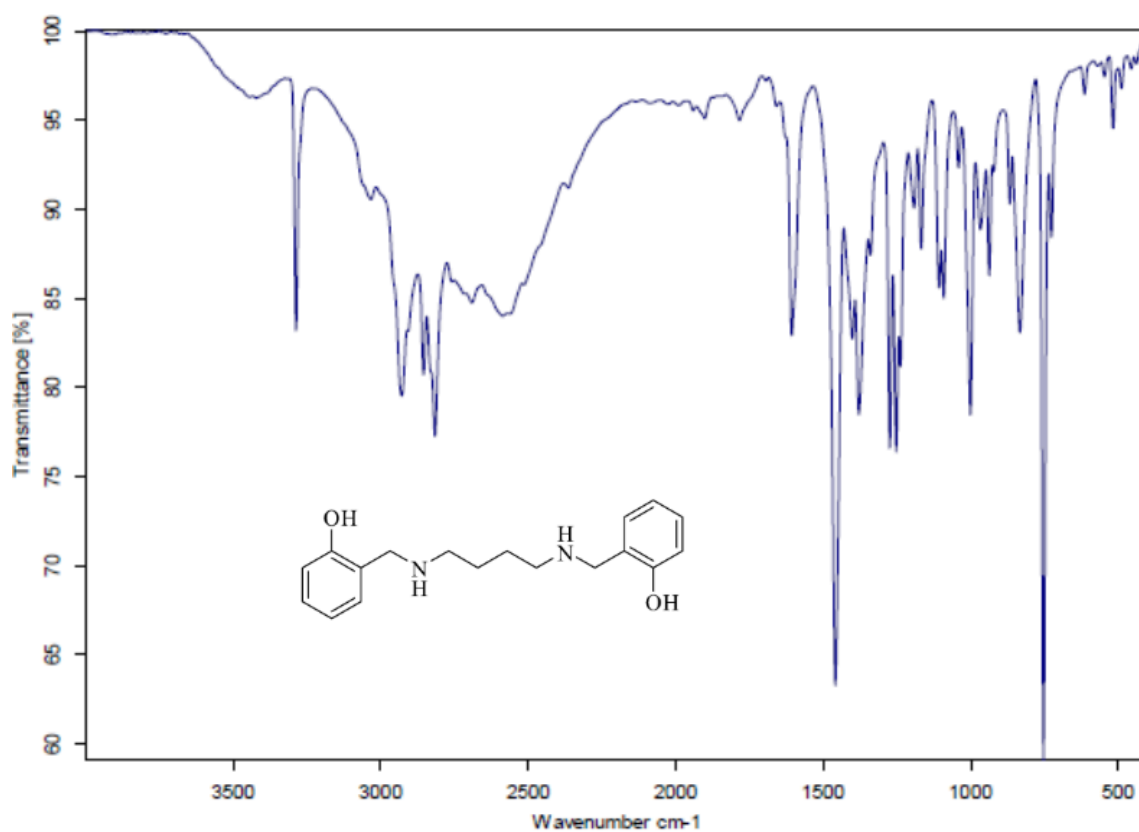
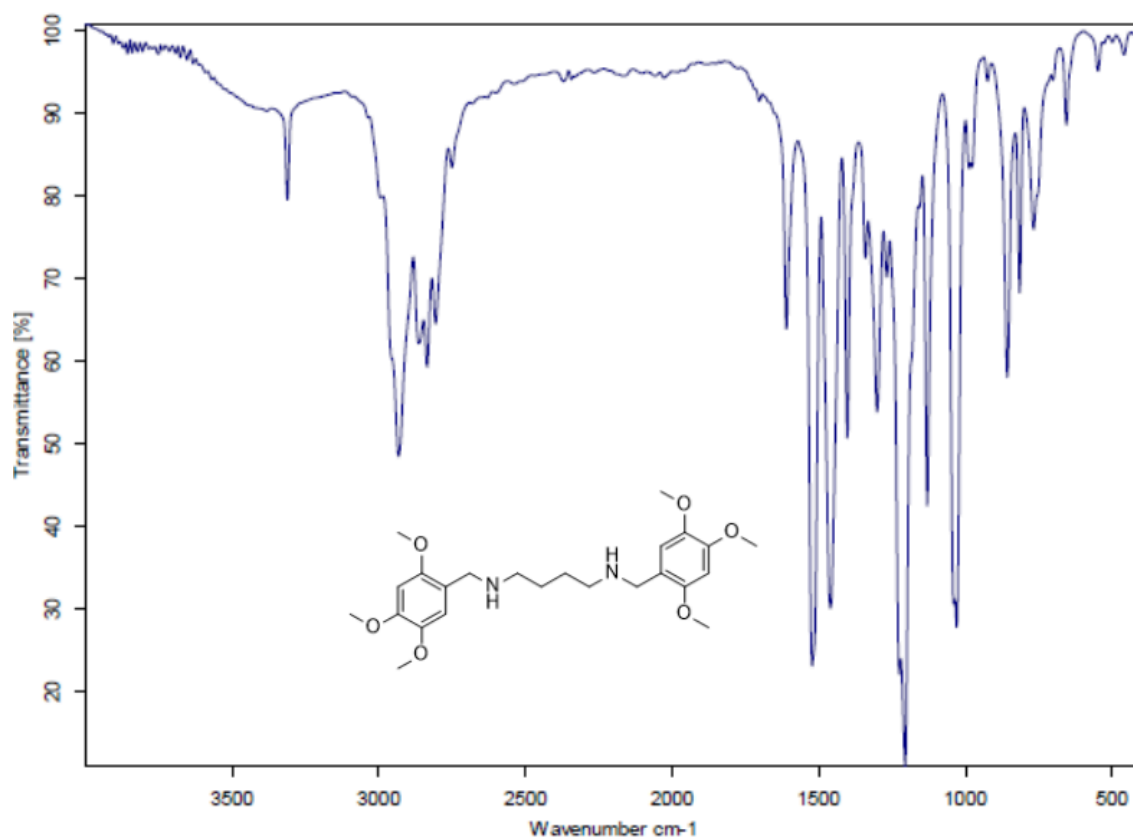
Figura 51: Espectro de Infravermelho do composto HTG-6-R (KBr).**Figura 52:** Espectro de Infravermelho do composto HTG-7-R (KBr)

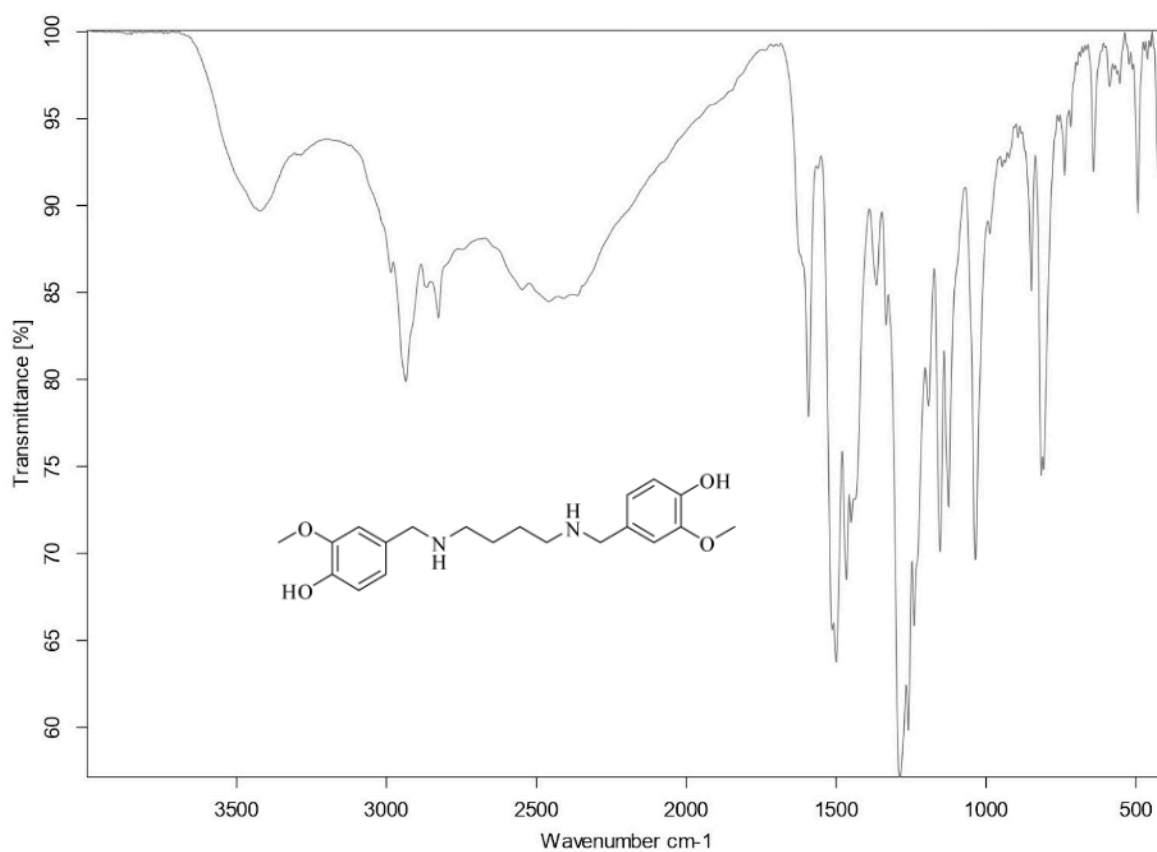
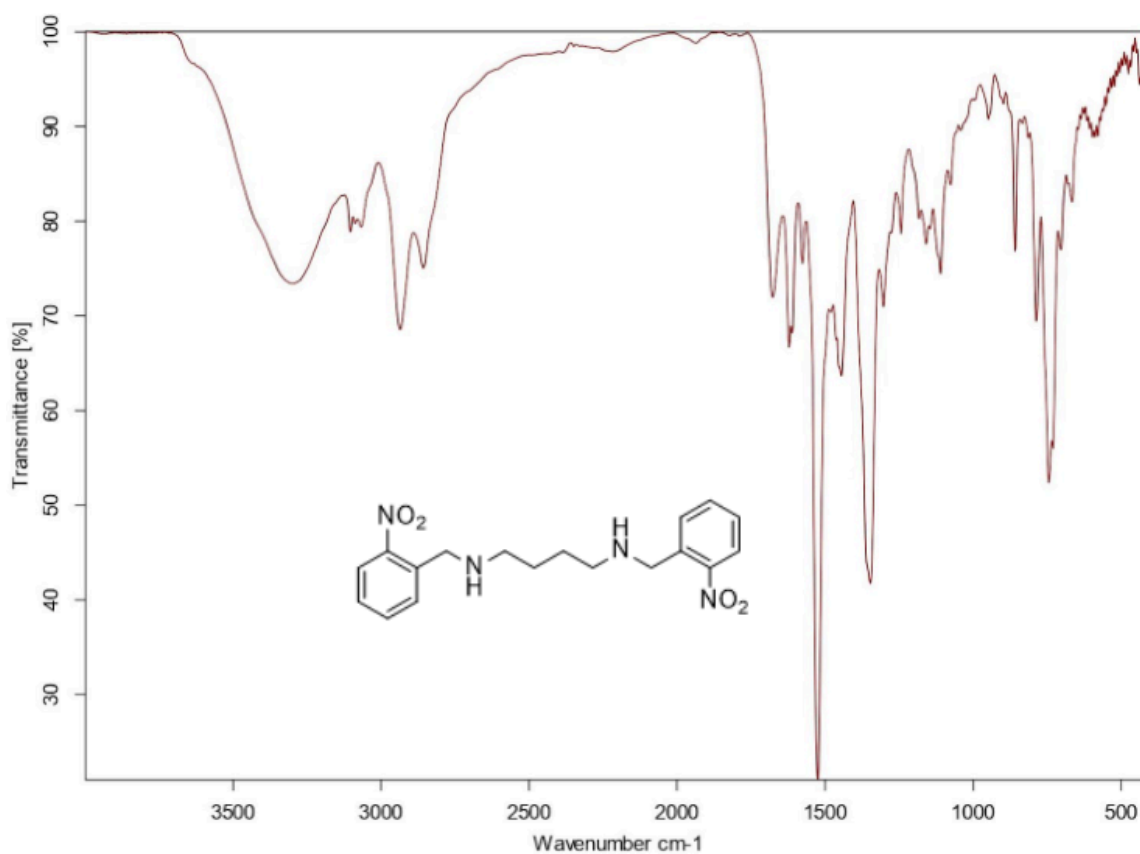
Figura 53: Espectro de Infravermelho do composto HTG-8-R (KBr)**Figura 54:** Espectro de Infravermelho do composto HTG-9-R (KBr)

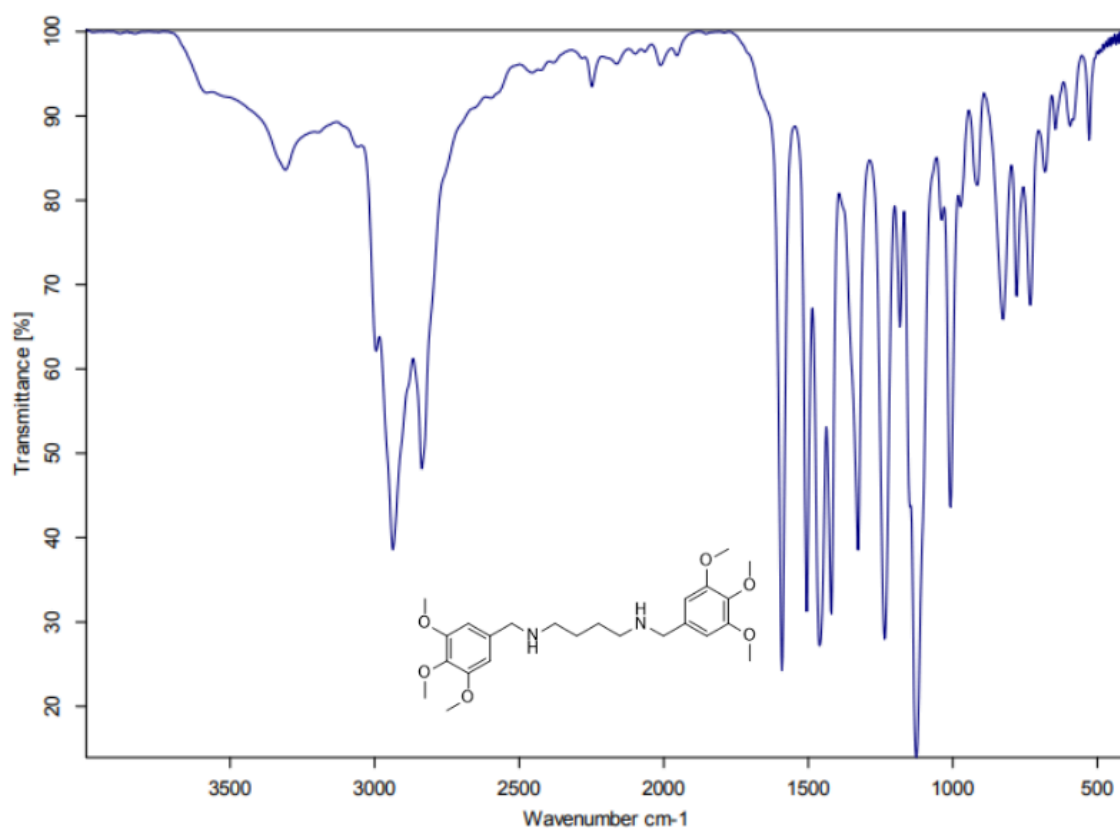
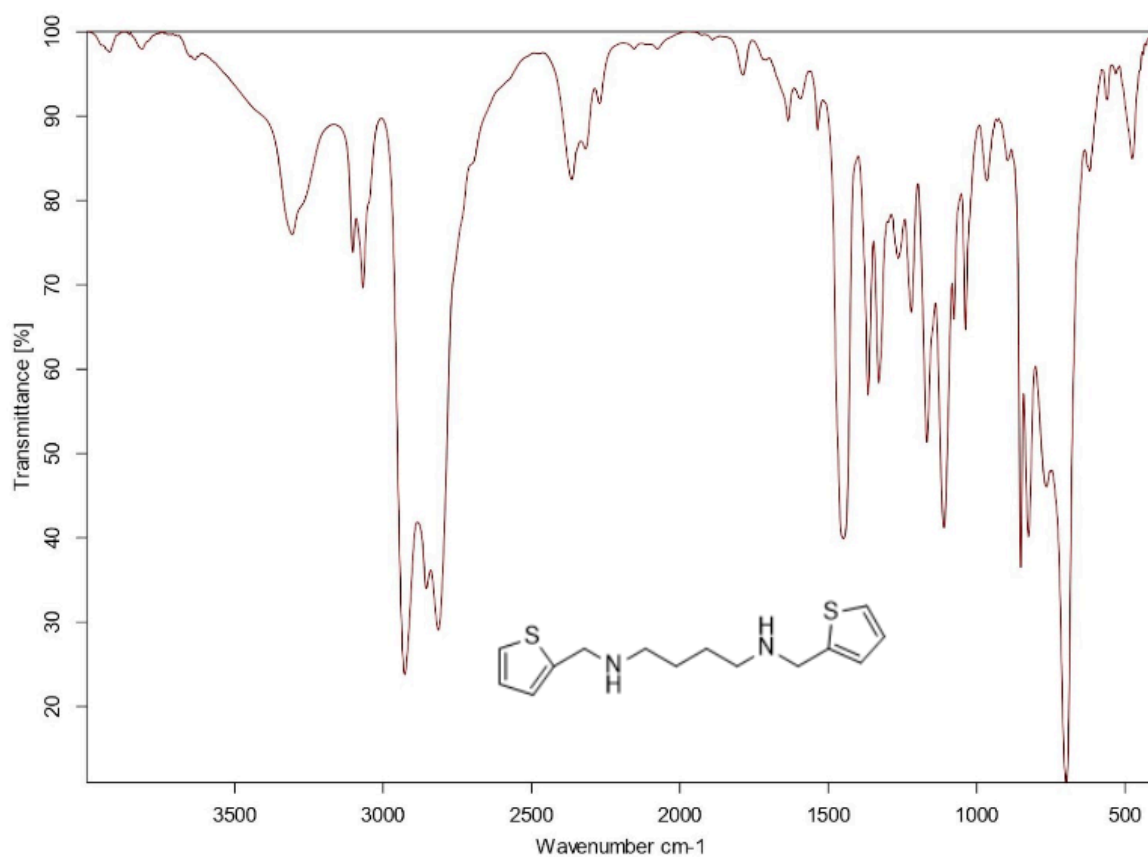
Figura 55: Espectro de Infravermelho do composto HTG-10-R (KBr)**Figura 56:** Espectro de Infravermelho do composto HTG-11-R (KBr)

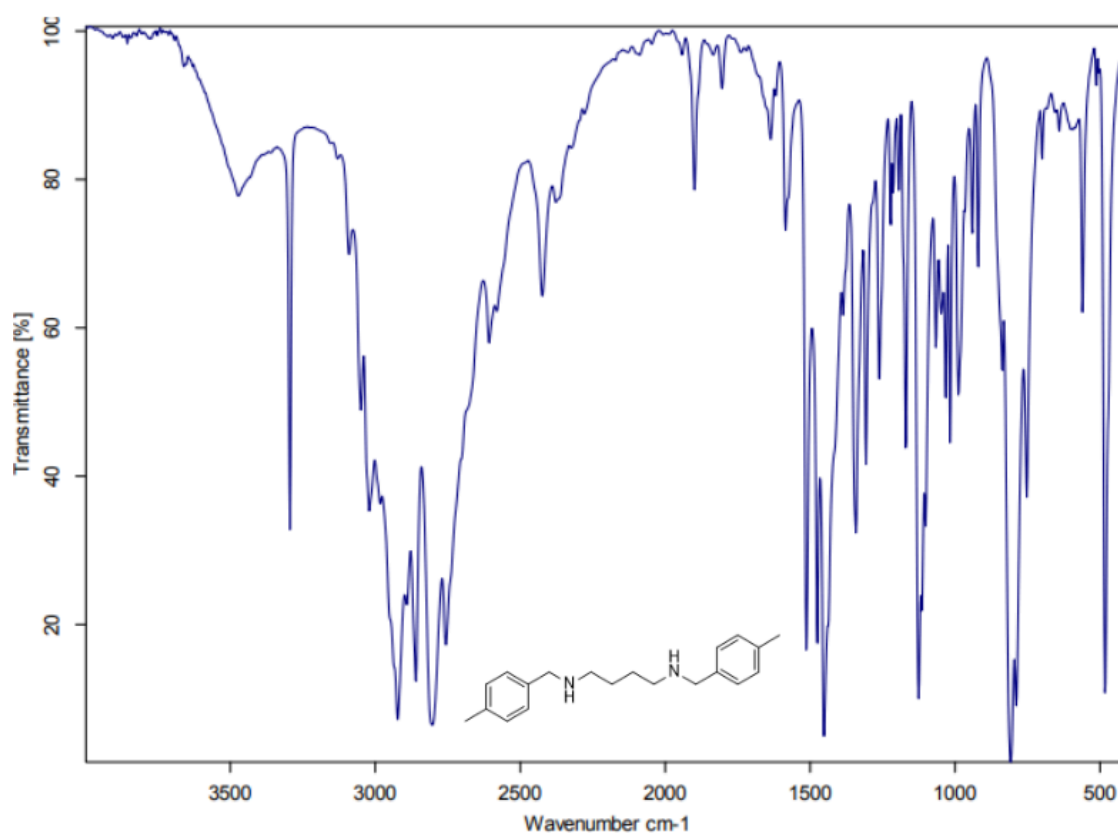
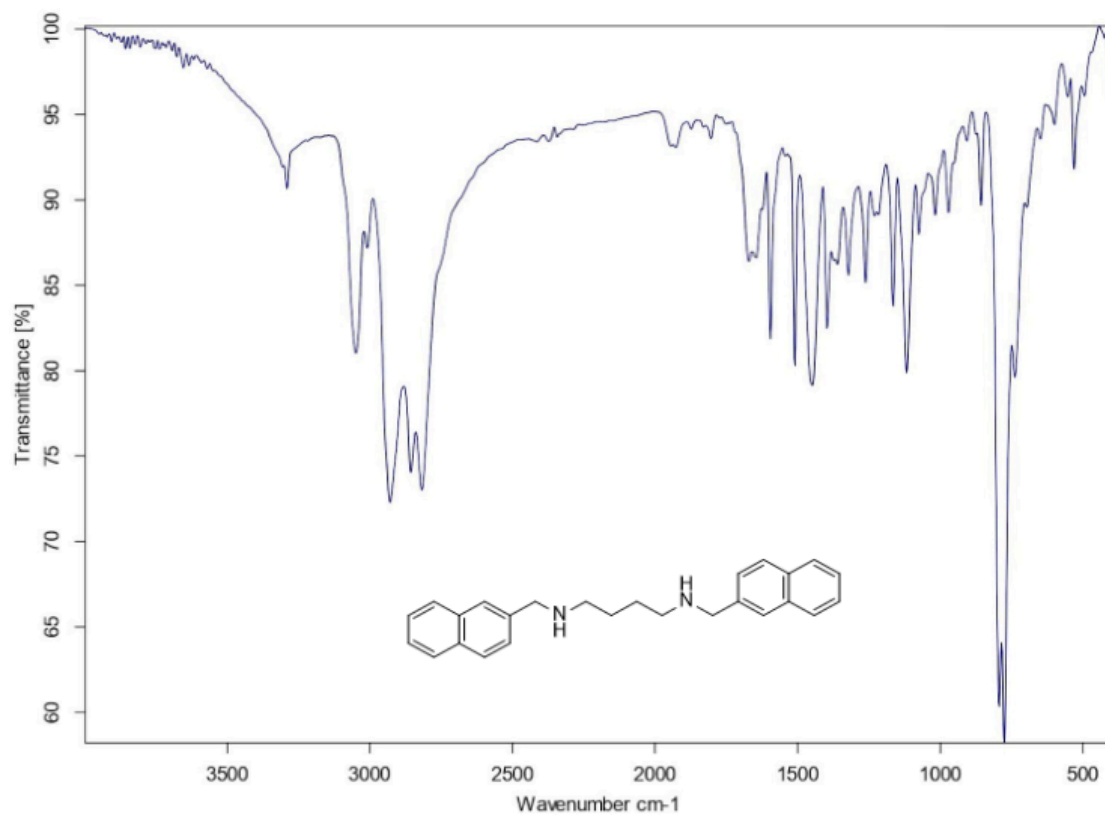
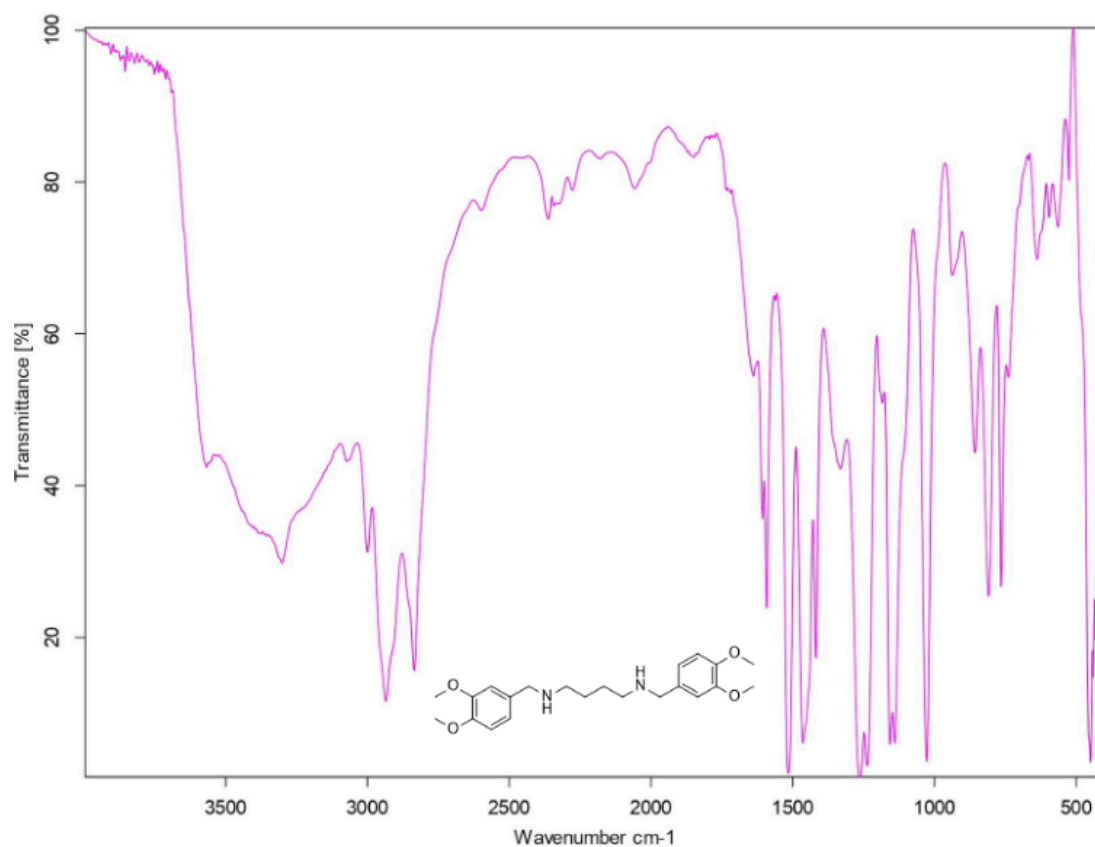
Figura 57: Espectro de Infravermelho do composto HTG-12-R (KBr)**Figura 58:** Espectro de Infravermelho do composto HTG-14-R (KBr)

Figura 59: Espectro de Infravermelho do composto HTG-17-R (KBr)**Figura 60:** Espectro de Infravermelho do composto HTG-21-R (KBr)