



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

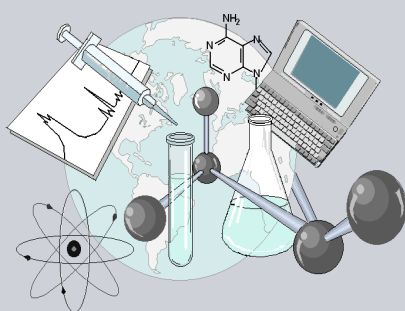
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“SÍNTESE, ATIVIDADE ANTI-*TRYPANOSOMA CRUZI*
E ANTITUMORAL DE ACILTIOSSEMICARBAZIDAS
E 1,3,4-TIADIAZÓIS DO *S*-(-) E *R*-(+)-LIMONENO”**

Dissertação apresentada por **Hugo Falzirolli** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

CCE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, Fevereiro/2014.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA E SÍNTESE ORGÂNICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Síntese, atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e antitumoral de aciltiossemicarbazidas e 1,3,4-tiadiazóis do S-(-) e R-(+)-limoneno

Mestrando: Hugo Falzirolli

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cleuza Conceição da Silva

Maringá, Fevereiro de 2014.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

F197s Falzirolli, Hugo
Síntese, atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e antitumoral de aciltiossemicarbazidas e 1,3,4-tiadiazóis do S-(-) e R-(+)-limoneno / Hugo Falzirolli. -- Maringá, 2014.
xxii, 166 f. : il. (algumas color.), figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cleuza Conceição da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Limoneno. 2. 1,3,4-tiadiazol. 3. Aciltiossemicarbazida. 4. Anti-*Trypanosoma* - Avaliação. 5. Antitumoral - Avaliação. I. Silva, Cleuza Conceição da, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 547.2

AMMA-001790

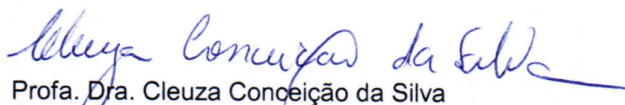


Universidade Estadual de Maringá


Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Hugo Falzirolli**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 28 de fevereiro de 2014.

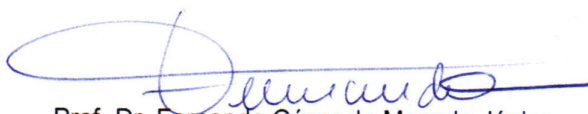
COMISSÃO JULGADORA:



Profa. Dra. Cleuza Conceição da Silva
Presidente - DQI/UEM



Prof. Dr. Emerson Meyer
Membro - DQI/UEM



Prof. Dr. Fernando César de Macedo Júnior
Membro - UEL

*Dedico este trabalho àquela que
sempre foi minha referência
e motivação: minha família.*

AGRADECIMENTOS

Ao Criador, Deus, o dom da vida e a permissão de ousarmos tentar decifrar um pouco de Sua lógica pela construção do conhecimento.

Aos meus pais, Cleonice e Djanir, o apoio incondicional em minhas escolhas e o ensinamento de todos os bons valores que dignificam a existência de um ser humano.

À minha irmã, Amanda, e às minhas tias, Aparecida e Elena, a presença em todos os momentos de minha vida e o constante incentivo às minhas decisões.

À minha primeira e, até agora, única “mãe científica”, professora Cleuza Conceição da Silva, cujo vocativo traduz todo o carinho, admiração e respeito que tenho por ela. Agradeço todos os ensinamentos e amizade nesses anos.

Aos professores Emerson Meyer e Maria Helena Sarragiotto as contribuições no exame de qualificação.

Aos professores que ministraram as matérias de pós-graduação, Ernani A. Basso, Emerson Giroto (e Cleuza C. Silva e Emerson Meyer, novamente) o conhecimento adquirido.

À Francieli Furlan, minha querida auxiliar de iniciação científica, a ajuda no desenvolvimento deste trabalho (e as incontáveis vezes de companhia no almoço!).

Aos alunos de iniciação Evandro A. Silva e Franciel L. Schweig a contribuição com parte das pesquisas envolvidas neste trabalho.

Ao professor João Carlos P. de Mello, a permissão do uso do polarímetro, e à sua aluna de doutorado, Leila, o acompanhamento nas análises de rotação óptica.

Ao professor Antonio Medina Neto, do departamento de Física da UEM, a disponibilização do aparelho de infravermelho, e à Andressa Santos o auxílio com as análises.

À Ivânia T. A. Schuquel não somente as ótimas análises de RMN, mas toda a simpatia e paciência nas explicações de manipulação dos fids e boas conversas.

À Ana Maria A. Barelli a realização de parte das análises de infravermelho que compõem este trabalho e o preparo das demais pastilhas.

Ao professor Celso V. Nakamura, do departamento de Ciências Básicas da Saúde da UEM a realização das análises anti-*Trypanosoma cruzi*, e às suas alunas, Vanessa e Talitha, o auxílio nas discussões destas atividades.

Ao professor João Ernesto de Carvalho e à Dra. Ana Lúcia T. G. Ruiz, do CPQBA da Unicamp, a realização dos ensaios antitumorais.

Às professoras Cecília M. A. de Oliveira e Lucília Kato, do Instituto de Química da UFG, as colaborações com este trabalho.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, Cristina (Cris) e Claudemir, os mais diversos auxílios.

Aos professores do DQI Silvana, Armando, Rosana, Expedito e Helena, as sugestões, ideias e experiência compartilhadas.

Aos amigos de pós do laboratório Josi, Thiago, Vanessa, Jucilene, José Eduardo, Manu, Plínio, Fábio e Ane Vanini a troca de conhecimentos, a companhia e as boas risadas da hora do café.

Aos amigos e colegas da Química, Sabrina Batista, Narcimário Coelho, Diogo Almeida, Kalil Christian, Renato Sonchini, Manu Panice, Eduardo Tanabe, Tayline Aizawa, Alexandre Avíncola, Karen Bedin e Laís Truzzi, as conversas amigas e os momentos de descontração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UEM, a possibilidade de realização deste trabalho.

À CAPES, o auxílio financeiro nestes 24 meses.

*“Trabalha como se tudo dependesse de ti
e confia como se tudo dependesse de Deus.”*

Santo Inácio de Loyola

Síntese, atividade antitumoral e anti-*Trypanosoma cruzi* de aciltiossemicarbazidas e 1,3,4-tiadiazóis do S-(-) e R-(+)-limoneno

RESUMO

A síntese de substâncias químicas a partir de substratos opticamente ativos isolados de fontes naturais é uma forma eficiente de obtenção de compostos quirais mais complexos e biologicamente ativos. Este trabalho implementou novas metodologias de síntese de 1,3,4-tiadiazóis e aciltiossemicarbazidas a partir do limoneno. O limoneno é um monoterpeneo abundante encontrado nas formas enantioméricas *R* e *S* e apresenta diversas atividades biológicas, incluindo antiprotozoária e antitumoral. Também apresentam estas atividades os 1,3,4-tiadiazóis, classe de compostos heteroaromáticos, e as aciltiossemicarbazidas, importante classe de intermediários de síntese. Derivados terpênicos nitrogenados, como isotiocianoterpenos e tiossemicarbazidas contendo a unidade terpênica em posição pouco usual, servem como precursores sintéticos para ambas as classes bioativas supracitadas e sua síntese já é consolidada no grupo de pesquisa ao qual pertence este estudo. A partir das tiossemicarbazidas do limoneno e aldeídos (benzaldeído, derivados de benzaldeído, cinamaldeído e aldeídos heteroaromáticos), 31 derivados 2-amino-1,3,4-tiadiazol do limoneno 5-substituídos – 21 do S-(-)-limoneno e 10 do R-(+)-limoneno – foram sintetizados em um procedimento *one-pot* envolvendo ciclização oxidativa por Fe(III), com rendimentos de 63-91%. Quatro 1-aciltiossemicarbazidas 4-substituídas de cada enantiômero do limoneno foram obtidas pela adição de hidrazidas aos isotiocianoterpenos, com rendimentos de 52-68%. Os precursores hidrazida também foram sintetizados por novo procedimento, com rendimentos de 82-98%. As aciltiossemicarbazidas e os 1,3,4-tiadiazóis foram avaliados *in vitro* como agentes antitumorais, sobre várias linhagens de células, e agentes anti-*Trypanosoma cruzi*. Nos ensaios antiproliferativos para células tumorais, os derivados do S-(-)-limoneno apresentaram os resultados de atividade mais expressivos dentre a série 1,3,4-tiadiazóis, enquanto que não houve correlação específica das atividades das aciltiossemicarbazidas com a quiralidade da porção terpênica. As aciltiossemicarbazidas apresentaram atividade inibitória mais pronunciada para células de ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), com o menor valor de concentração

inibitória (GI_{50}) de $2,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a 1-benzoil-tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno. Os menores valores de GI_{50} sobre uma linhagem celular específica ocorreram para o 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno ($0,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$, células de mama MCF-7) e para o 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno ($0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$, células de cólon HT29), que apresentou efeito citostático (TGI) e citocida (LC_{50}) mais pronunciado que o controle positivo doxorrubicina em algumas linhagens. Na avaliação de atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, a série do S-(-)-limoneno de 1,3,4-tiadiazóis novamente apresentou os resultados mais significativos em formas tripomastigotas do protozoário. Três derivados (5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazóis do R-(+) e do S-(-)-limoneno e 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno) foram mais ativos que o controle positivo benzimidazol, com o menor valor de concentração inibitória de $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do R-(+)-limoneno exibiu atividade expressiva para as formas tripomastigotas e epimastigotas do protozoário e um dos menores valores de toxicidade em células LLC-MK₂. Os resultados de atividades biológicas significativas para os derivados quirais 1,3,4-tiadiazóis e aciltiossemicarbazidas, sintetizados a partir do limoneno, com materiais de partida simples e procedimentos comuns, corroboraram o propósito deste trabalho.

Palavras-chave: Limoneno. 1,3,4-tiadiazol. Aciltiossemicarbazida.

Synthesis, anti-*Trypanosoma cruzi* and antitumor activities of acylthiosemicarbazides and 1,3,4-thiadiazoles from S-(-) e R-(+)-limonene

ABSTRACT

The synthesis of chemical substances employing chiral substrates isolated from natural sources is an efficient way of obtaining more complex and biologically active compounds. This work developed new methodologies to synthesize 1,3,4-thiadiazoles and acylthiosemicarbazides from limonene. Limonene is an abundant monoterpene existing in *R* and *S* enantiomeric forms and possesses a wide range of biological activities, such as antiprotozoal and antitumor. 1,3,4-thiadiazoles, a class of heteroaromatic compounds, and acylthiosemicarbazides, an important class of synthetic intermediates, also show those biological activities. Terpene-based nitrogen-containing derivatives, like isothiocyanoterpenes and thiosemicarbazides bearing a terpene moiety at an unusual position are useful synthetic precursors to both bioactive classes of chemicals previously described, as well as their synthesis protocol is already established in the research group to which this study belongs. Starting from limonene thiosemicarbazides and aldehydes (benzaldehyde, benzaldehyde derivatives, cinnamaldehyde and heteroaromatic aldehydes), thirty-one 5-substituted 2-amino-1,3,4-thiadiazoles from limonene – 21 from *S*-(-)-limonene e 10 from *R*-(+)-limonene – were synthesized by oxidative cyclization with Fe(III) via *one-pot* procedure in 63-91% yields. Addition of hydrazides to isothiocyanoterpenes yielded four 4-substituted 1-acylthiosemicarbazides from each enantiomer of limonene in 52-68%. Hydrazides precursors were also synthesized by new procedure in 82-98% yields. All acylthiosemicarbazides and 1,3,4-thiadiazoles were evaluated *in vitro* as antitumor agents for several cell lines and as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. The antiproliferative essays for tumor cells afforded the most expressive results for the *S*-(-)-limonene derivatives among the 1,3,4-thiadiazoles series, whereas no specific correlation was observed between the acylthiosemicarbazides activities and the chirality of the terpene moiety. Acylthiosemicarbazides presented remarkable activity for breast resistant NCI/ADR cancer cell line furnishing the lowest value of cellular growth inhibition (GI_{50}) as $2,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ for 1-benzoyl-thiosemicarbazide from *S*-(-)-limonene. The lowest values of GI_{50} for

a single cell line were found for 5-nitrothiophenyl-1,3,4-thiadiazole from *S*-(-)-limonene ($0,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$, breast MCF-7 cells) and for 5-nitrofuranyl-1,3,4-thiadiazole from *S*-(-)-limonene ($0,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$, colon HT29 cells). The latter also presented better cytostatic (TGI) and cytotoxic (LC₅₀) effects than the positive control doxorubicin for some of the cell lines. The anti-*Trypanosoma cruzi* evaluation also afforded the most meaningful results for the *S*-(-)-limonene series among the 1,3,4-thiadiazoles, against the protozoan trypomastigote forms. Three derivatives (5-nitrofuranyl-1,3,4-thiadiazole from *R*-(+) and *S*-(-)-limonene and 5-nitrothiophenyl-1,3,4-thiadiazole from *S*-(-)-limonene) were more active than the positive control benznidazole, being found $5,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ as the lowest value of inhibitory concentration. 1-(2-phenylacetyl)-thiosemicarbazide from *R*-(+)-limonene furnished pronounced inhibitory activities for both trypomastigote and epimastigote *T. cruzi* forms, besides one of the smallest cytotoxicity values upon LLC-MK₂ cells. The achievement of remarkable results of biological activities for chiral 1,3,4-thiadiazoles and acylthiosemicarbazides synthesized from limonene, employing simple starting materials and standard procedures, supported the aim of this work.

Keywords: Limonene. 1,3,4-thiadiazole. Acylthiosemicarbazide.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Síntese de <i>trans</i> -diaminas vicinais a partir do <i>R</i> -(+)-limoneno.....	9
Esquema 2. Formação diastereosseletiva de aziridinas a partir de óxidos do limoneno.	10
Esquema 3. Reações de (a) solvomercúriação-demercúriação e (b) formação de 2-isoxazolidinas a partir do <i>R</i> -(+)-limoneno.	11
Esquema 4. Síntese <i>one-pot</i> de aminas secundárias e terciárias derivadas do <i>R</i> -(+)-limoneno.	11
Esquema 5. Síntese de isotiocianato e tiocianato derivados do <i>R</i> -(+)-limoneno	12
Esquema 6. Síntese dos derivados tiossemicarbazida (a) e tiouréias (b) do <i>R</i> -(+)-limoneno.....	13
Esquema 7. Aciltiossemicarbazida (b) e tautômeros ceto/tiol (a) e enol/tiona (c).....	13
Esquema 8. Utilidade sintética de aciltiossemicarbazidas.....	14
Esquema 9. Síntese de aciltiossemicarbazidas por adição de hidrazidas a isotiocianatos.	17
Esquema 10. Síntese de aciltiossemicarbazidas por condensação de ésteres e tiossemicarbazida.	17
Esquema 11. Habilidade dos 1,3,4-tiadiazóis em formar sistemas mesoiônicos.	18
Esquema 12. Tautômeros de 2-amino-1,3,4-tiadiazóis: forma amino (a), forma imino (b) e forma <i>egzo</i> -amino (c).	19
Esquema 13. Metodologias de síntese de 1,3,4-tiadiazóis via tiossemicarbazidas. ...	27
Esquema 14. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis por ciclodesidratação de aciltiossemicarbazidas e análogo acilditiocarbazato.....	28
Esquema 15. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis a partir de ciclização oxidativa de tiossemicarbazonas.	29
Esquema 16. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis por metodologias multicomponente.	30
Esquema 17. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis a partir de hidrazidas e por conversão de 1,3,4-oxadiazóis.	30
Esquema 18. Rota sintética para obtenção de tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas terpênicas.	41

Esquema 19. Série de 1,3,4-tiadiazóis do <i>R</i> -(+)-limoneno sintetizados a partir de tiossemicarbonas.	43
Esquema 20. Síntese dos isotiocianoterpenos.....	45
Esquema 21. Proposta de intermediários de reação para formação do isotiocianoterpeno.....	46
Esquema 22. Síntese das tiossemicarbazidas do limoneno.....	47
Esquema 23. Proposta de intermediários de reação para formação da tiossemicarbazida do limoneno.	47
Esquema 24. Síntese dos 1,3,4-tiadiazóis do limoneno por metodologia <i>one-pot</i>	48
Esquema 25. Metodologia de síntese de 1,3,4-tiadiazóis do <i>R</i> -(+)-limoneno em duas etapas a partir da tiossemicarbazida do limoneno.	48
Esquema 26. Proposta de intermediários de reação para formação dos 1,3,4-tiadiazóis do limoneno através de ciclização oxidativa por íons Fe(III).	51
Esquema 27. Síntese de hidrazidas.....	54
Esquema 28. Proposta de intermediários para formação das hidrazidas.	55
Esquema 29. Síntese das aciltiossemicarbazidas do limoneno.....	55
Esquema 30. Proposta de intermediário para formação das aciltiossemicarbazidas do limoneno.	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Novos fármacos inseridos no mercado entre 1981 e 2010 de acordo com modo de obtenção.....	1
Figura 2. Conformações equivalentes mais estáveis do <i>R</i> -(+)-limoneno.	4
Figura 3. Os quatro núcleos tiadiazol.	18
Figura 4. Derivado 21 e cristalografia por raios-X evidenciando ligação hidrogênio C-H...S intramolecular.	19
Figura 5. Taxas brutas de incidência primária de câncer exceto pele não-melanoma estimadas para homens e mulheres em 2014 no Brasil. Valores por 100 mil indivíduos.	31
Figura 6. Estatísticas sobre causas de câncer.	32
Figura 7. Todas as drogas anticâncer aprovadas entre a década de 1940 e o ano de 2010, classificadas por modo de obtenção.....	33
Figura 8. Um bicho barbeiro (<i>Triatoma brasiliensis</i>) e seus estágios de vida.	35
Figura 9. Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
Figura 10. Evolução da doença de Chagas no homem.	37
Figura 11. Espectro de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) para reação <i>one-pot</i> da tiossemicarbazida do limoneno, 4-bromo-benzaldeído e FeCl ₃ , precipitada após 5 minutos da adição dos reagentes.....	50
Figura 12. Espectro de RMN de ¹ H (300,06MHz, CDCl ₃) para formação de 1,3,4-tiadiazóis com 0,5 equivalente de FeCl ₃	52
Figura 13. Espectros de absorção no infravermelho do <i>S</i> -(-)-limoneno (8a) e seu isotiocianoterpeno (67a).	60
Figura 14. Espectros de RMN de ¹ H (300,06 MHz, CDCl ₃) do <i>S</i> -(-)-limoneno (8a) e seu isotiocianoterpeno (67a).	61
Figura 15. Espectros de RMN de (a) ¹³ C (75,45MHz, CDCl ₃); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do <i>S</i> -(-)-limoneno (8a) e seu isotiocianoterpeno (67a).	62
Figura 16. Mapa de Contornos HSQC (¹ Hx ¹³ C) para o isotiocianoterpeno do <i>S</i> -(-)-limoneno (67a).	63
Figura 17. Espectros de absorção no infravermelho do isotiocianoterpeno (67a) e da tiossemicarbazida (68a) do <i>S</i> -(-)-limoneno.	64

Figura 18. Espectros de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do isotiocianoterpeno (67a) e da tiossemicarbazida (68a) do S-(-)-limoneno.....	65
Figura 19. Espectros de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do isotiocianoterpeno (67a) e da tiossemicarbazida (68a) do S-(-)-limoneno.....	66
Figura 20. Espectros de absorção no infravermelho da tiossemicarbazida (68a) e do 5-furanil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (69a).	69
Figura 21. Espectros de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) da tiossemicarbazida (68a) e do 5-furanil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (69a).....	70
Figura 22. Espectros de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° da tiossemicarbazida (68a) e do 5-furanil-1,3,4-tiadiazol (69a) do S-(-)-limoneno.	71
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (72a).	72
Figura 24. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (72a).	73
Figura 25. Expansão do mapa de contornos HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (72a).	74
Figura 26. Espectro de absorção no infravermelho para o (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (73a).	76
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (73a).	77
Figura 28. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (73a).	78
Figura 29. Expansão do mapa de contornos HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (73a).	78
Figura 30. Expansão do mapa de contornos HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (73a).	79
Figura 31. Expansão do mapa de contornos HSQC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (73a).	79
Figura 32. Espectro de absorção no infravermelho para o 5-(o-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (76a).	81
Figura 33. Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-(o-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (76a).	82

- Figura 34.** Expansão do mapa de contornos COSY ($^1\text{H}\times^1\text{H}$) (300,06 MHz, CDCl_3) para o 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**76a**)..... 83
- Figura 35.** Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**76a**). 84
- Figura 36.** Espectro de absorção no infravermelho para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**79a**). 86
- Figura 37.** Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**79a**). 87
- Figura 38.** Expansão do mapa de contornos HSQC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**79a**)..... 88
- Figura 39.** Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**79a**). 89
- Figura 40.** Espectro de absorção no infravermelho para o 5-[*p*-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**85a**). 91
- Figura 41.** Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-[*p*-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**85a**). 93
- Figura 42.** Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-[*p*-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**85a**). 94
- Figura 43.** Espectro de absorção no infravermelho para o acetato de Etila e a acetoidrazida (**90**). 98
- Figura 44.** Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) da benzoidrazida (**92**). 99
- Figura 45.** Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) da benzoidrazida (**92**). 100
- Figura 46.** Espectro de absorção no infravermelho para a 2-fenilacetoidrazida (**91**) e a 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do S(-)-limoneno (**95a**). 101
- Figura 47.** Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do isotiocianoterpeno (**67a**) e da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97a**) do S(-)-limoneno. 103
- Figura 48.** Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do isotiocianoterpeno (**67a**) e da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97a**) do S(-)-limoneno..... 104
- Figura 49.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat da doxorubicina (**Dox**). 111

- Figura 50.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat para 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (70a). 111
- Figura 51.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat para 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (72a). 112
- Figura 52.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat do 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (88a). 112
- Figura 53.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat do 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol do R-(+)-limoneno (70b). 116
- Figura 54.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat do 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do R-(+)-limoneno (72b). 116
- Figura 55.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat da 1-benzoil-tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno (96a). 120
- Figura 56.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat da 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do R-(+)-limoneno (95b). 120
- Figura 57.** Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida do R-(+)-limoneno (97b). 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento reacional para a síntese dos 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (série a) e R-(+)-limoneno (série b).....	53
Tabela 2. Rendimento e tempo reacional para síntese de hidrazidas.....	54
Tabela 3. Rendimento e tempo reacional para síntese das aciltiossemicarbazidas do R-(+)-limoneno por diferentes metodologias.....	57
Tabela 4. Rendimento e tempo reacional para a síntese das aciltiossemicarbazidas do S-(-)-limoneno (série a) e R-(+)-limoneno (série b)	58
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) do isotiocianoterpeno do S-(-)-limoneno (67a).....	63
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) da tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno (68a).....	67
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) dos 5-heteroaril-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (69-72a).....	74
Tabela 8. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45 MHz, CDCl_3) dos 5-heteroaril-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (69-72a).....	75
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) para o (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (73a).....	80
Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (74a) e dos 5-[(o-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (75-77a).....	85
Tabela 11. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) do 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (74a) e dos 5-[(o-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (75-77a).....	85
Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) dos 5-[(m-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (78-80a).....	89
Tabela 13. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) 5-[(m-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (78-80a).....	90
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) dos 5-[(p-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (81-85a).....	95
Tabela 15. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) dos 5-[(p-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (81-85a).....	95

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) dos 5-[(<i>p</i> -substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (86-89)a	96
Tabela 17. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) dos 5-[(<i>p</i> -substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (86-89)a	97
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) das hidrazidas (90-92)	100
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) das aciltiossemicarbazidas (94-97)a	105
Tabela 20. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) das aciltiossemicarbazidas (94-97)a	106
Tabela 21. Valores de GI_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), GI_{50} (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (69-89)a e o controle doxorrubicina (Dox)	109
Tabela 22. Valores de TGI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), TGI (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno com atividade citostática (70-72,75, 76, 78, 88)a e o controle doxorrubicina (Dox)	113
Tabela 23. Valores de GI_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), GI_{50} (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do R-(+)-limoneno (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b e o controle doxorrubicina (Dox)	115
Tabela 24. Valores de TGI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), TGI (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do R-(+)-limoneno com atividade citostática (70, 72)b e o controle doxorrubicina (Dox)	117
Tabela 25. Valores de GI_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), GI_{50} (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para as aciltiossemicarbazidas do S-(-)-limoneno (94-97)a , do R-(+)-limoneno (94-97)b e o controle doxorrubicina (Dox)	118
Tabela 26. Valores de TGI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), TGI (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para as aciltiossemicarbazidas com atividade citostática do S-(-)-limoneno (95-96)a , do R-(+)-limoneno (95-96)b e o controle doxorrubicina (Dox)	121
Tabela 27. Valores de atividade antiproliferativa sobre formas tripomastigotas (EC_{50}) de <i>Trypanosoma cruzi</i> para os 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno	

(69-89)a e do <i>R</i> -(+)-limoneno (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b e o padrão benzinidazol (Benz).....	123
Tabela 28. Valores de atividade antiproliferativa sobre formas epimastigotas (IC ₅₀) e tripomastigotas (EC ₅₀) de <i>Trypanosoma Cruzi</i> , valores de citotoxicidade (CC ₅₀) em células LLC-MK ₂ e índice de seletividade (IS) para as aciltiossemicarbazidas do <i>S</i> -(-)-limoneno (94-97)a e do <i>R</i> -(+)-limoneno (94-97)b e o padrão benzinidazol (Benz).....	125
Tabela 29. Aldeídos utilizados na síntese de 1,3,4-tiadiazóis do limoneno.....	133
Tabela 30. Condições reacionais empregadas na síntese de aciltiossemicarbazidas do limoneno.....	136
Tabela 31. Rotação específica (α^{20}_D) das tiossemicarbazidas (68), dos 1,3,4-tiadiazóis (69-89) e das aciltiossemicarbazidas (94-97) do <i>S</i> -(-)-limoneno (a) e do <i>R</i> -(+)-limoneno (b).....	137
Tabela 32. Valores médios de ponto de fusão (°C) e aspecto físico dos 1,3,4-tiadiazóis (69-89) e das aciltiossemicarbazidas (94-97) sintetizados..	138
Tabela 33. Linhagens de células humanas utilizadas na avaliação da atividade antiproliferativa.....	139

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Benz	Benzimidazol
CC	Cromatografia em coluna
CC₅₀	<i>Half maximal cytotoxic concentration</i> - concentração da droga que 50% do crescimento populacional (de células saudáveis) é inibido
CCD	Cromatografia em camada delgada
COSY	<i>Correlated spectroscopy</i> - Espectroscopia de correlação
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dddd	Duplo duplo duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i> - Intensificação sem distorção por transferência de polarização
dl	Dupleto largo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> - Meio de cultivo celular
Dox	Doxorrubicina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i> - concentração da droga em que 50% de seu efeito máximo é observado (em um estudo de viabilidade)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensaio de imunoadsorção enzimática
EPH	Eletrodo padrão de hidrogênio
GI₅₀	<i>Half total growth inhibition</i> - concentração da droga em que 50% do crescimento populacional é inibido (em um estudo de proliferação)
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation</i> - Correlação heteronuclear através de muitas ligações
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation</i> - Correlação heteronuclear de quantum-simples
IC₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> - concentração da droga em que 50% do crescimento populacional é inibido (em um estudo de viabilidade)
IS	Índice de seletividade
LC₅₀	<i>Median lethal concentration</i> - concentração da droga em que a populacional final é 50% de seu valor inicial

LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i> - Meio de cultivo de organismos
m	Multiplete
m-CPBA	Ácido m-cloroperoxibenzóico (<i>meta-Chloroperoxybenzoic acid</i>)
MG-MID	<i>Mean-Graph MidPoint</i> - valores da média dos pontos do gráfico
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i> - Concentração mínima inibitória
mult.	Multiplicidade
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NMP	<i>N</i> -metil-2-pirrolidona
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
POL	Polímero (resina para reação em estado sólido)
PTAB	Tribrometo de feniltrimetilamônio (<i>phenyltrimethylammonium tribromide</i>)
PTC	Di-(2-piridil)-tiocarbonato
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> - meio de cultivo de células e tecidos
s	Simpleto
SFB	Soro Fetal Bovino
sl	Sinal largo
SRB	Sulforrodamina B
t	Triplete
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic acid</i>)
td	Triplete de dupletos
TGI	<i>Total growth inhibition</i> - concentração da droga em que 100% do crescimento populacional é inibido
THF	Tetraidrofurano
tl	Triplete largo
TMS	Tetrametilsilano
TMSCI	Cloreto de trimetilsilano (<i>Trimethylsilyl chloride</i>)
α^20_D	Rotação específica (desvio da luz plano-polarizada) para a linha D do sódio (589,3 nm) a 20°C
Δ	Aquecimento
δ	Deslocamento químico (em ppm)
δ_C	Deslocamento químico de carbono-13 (em ppm)
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio (em ppm)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Compostos naturais, Síntese Orgânica e a produção de fármacos....	1
1.2.	Limoneno.....	3
1.2.1.	Aspectos gerais	3
1.2.2.	Atividades biológicas.....	5
1.2.3.	Derivados sintéticos nitrogenados.....	8
1.3.	Aciltiossemicarbazidas.....	13
1.3.1.	Aspectos gerais	13
1.3.2.	Atividades biológicas.....	15
1.3.3.	Metodologias de síntese	16
1.4.	1,3,4-tiadiazóis.....	18
1.4.1.	Aspectos gerais	18
1.4.2.	Atividades biológicas.....	20
1.4.3.	Metodologias de síntese	27
1.5.	Câncer	31
1.5.1.	Números da doença.....	31
1.5.2.	Causas e evolução do câncer	32
1.5.3.	Quimioterápicos no tratamento do câncer.....	33
1.6.	Tripanossomíase Americana (doença de Chagas).....	34
1.6.1.	Aspectos gerais e epidemiológicos	34
1.6.2.	Vetores, reservatórios e ciclo da doença.....	35
1.6.3.	Evolução da doença e tratamentos disponíveis	36
2.	PROPOSTA DE TRABALHO.....	40
3.	OBJETIVOS	44
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1.	Síntese	45
4.1.1.	Isotiocianoterpenos (67a-b)	45
4.1.2.	Tiossemicarbazidas do limoneno (68a-b).....	46
4.1.3.	2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos (69-89)a, (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b	47
4.1.4.	Hidrazidas (90-92)	54
4.1.5.	Aciltiossemicarbazidas (94-97)a, (94-97)b	55
4.2.	Análise espectral e caracterização estrutural.....	59
4.2.1.	Isotiocianoterpenos (67a-b)	59
4.2.2.	Tiossemicarbazidas do limoneno (68a-b).....	64
4.2.3.	2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos (69-89)a, (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b	67
4.2.3.1.	5-heteroaril-1,3,4-tiadiazol – Compostos 69-72	68
4.2.3.2.	(E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol – Composto 73.....	75

4.2.3.3. 5-fenil-1,3,4-tiadiazol e 5-[(<i>o</i> -substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazol – Compostos 74-77	80
4.2.3.4. 5-[(<i>m</i> -substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazol – Compostos 78-80 ...	86
4.2.3.5. 5-[(<i>p</i> -substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazol – Compostos 81-89	90
4.2.4. Hidrazidas (90-92)	97
4.2.5. Aciltiossemicarbazidas (94-97)a, (94-97)b	101
4.3. Atividades biológicas	107
4.3.1. Atividade antiproliferativa sobre células tumorais	107
4.3.1.1. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do <i>S</i> -(-)-limoneno 5-substituídos ..	108
4.3.1.2. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do <i>R</i> -(+)-limoneno 5-substituídos .	114
4.3.1.3. Aciltiossemicarbazidas do limoneno	118
4.3.2. Atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	122
4.3.2.1. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos	123
4.3.2.2. Aciltiossemicarbazidas do limoneno	125
6. CONCLUSÃO.....	128
7. PARTE EXPERIMENTAL	131
7.1. Instrumentação	131
7.2. Material cromatográfico	131
7.3. Reagentes e solventes	132
7.4. Procedimentos gerais para síntese dos compostos	132
7.4.1. Isotiocianoterpenos do limoneno (67a-b)	132
7.4.2. Tiossemicarbazidas do limoneno (68a-b).....	133
7.4.3. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos (69-89)a, (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b	133
7.4.4. Hidrazida (90-92)	134
7.4.4.1. Metodologia em solução.....	134
7.4.4.2. Metodologia em ausência de solvente.....	135
7.4.5. Aciltiossemicarbazidas do limoneno (94-97)a, (94-97)b.....	135
7.4.5.1. Metodologia por irradiação de micro-ondas	135
7.4.5.2. Metodologias em solução	135
7.5. Determinação da rotação específica.....	136
7.6. Determinação de ponto de fusão	138
7.7. Avaliação da atividade antiproliferativa sobre células tumorais.....	139
7.8. Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotoxicidade	141
7.8.1. Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	141
7.8.2. Viabilidade em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	141
7.8.1. Avaliação de citotoxicidade em células LLC-MK ₂ pelo método colorimétrico MTT	142
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
ANEXO A	160

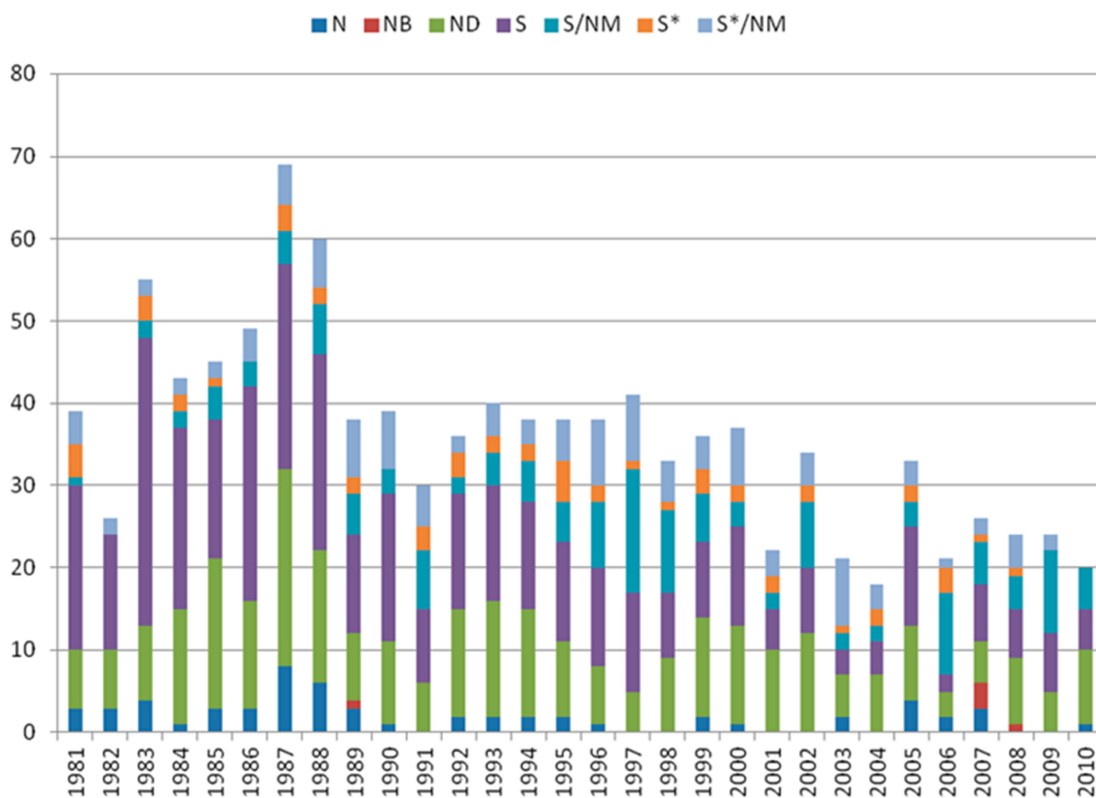
1. INTRODUÇÃO

1.1. Compostos naturais, Síntese Orgânica e a produção de fármacos

Na busca por compostos biologicamente ativos, a química medicinal é um ponto de união da Síntese Orgânica com Produtos Naturais. Através de substâncias isoladas de fontes naturais a Síntese Orgânica desenvolve fármacos semissintéticos, ou ela se baseia naquelas estruturas para obtenção de novos compostos bioativos. Em outros casos, a própria natureza fornece substâncias de alto potencial biológico e cabe à Síntese apenas reproduzi-las (Wilson & Danishefsky, 2006).

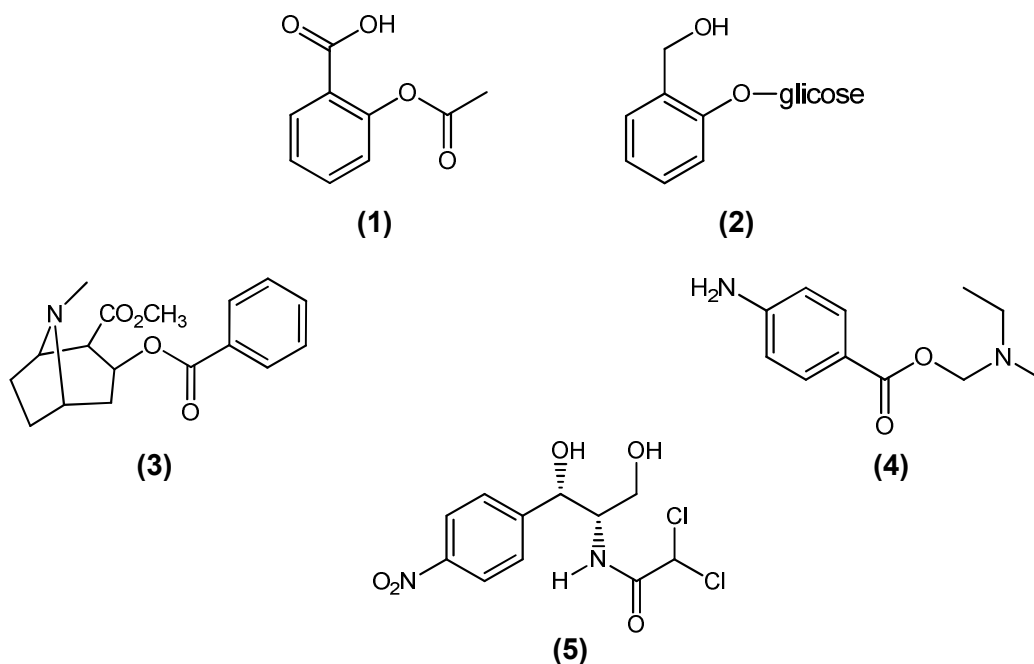
Segundo Newman & Cragg (2012), entre 1981 e 2010, quase 80% dos 1355 fármacos aprovados para comercialização ao redor do mundo eram substâncias de baixo peso molecular, frente a 20% de vacinas e derivados biológicos. Analisando o surgimento anual dos novos fármacos de baixo peso molecular (**Figura 1**), a maioria é de origem sintética e semissintética.

Figura 1. Novos fármacos inseridos no mercado entre 1981 e 2010 de acordo com modo de obtenção^A.



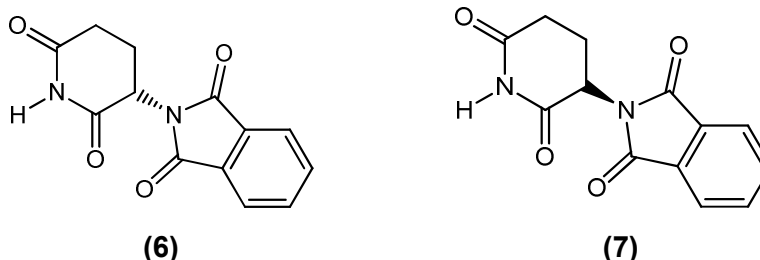
^A N – natural; NB – natural botânico; ND – derivado de produto natural ou semissintético; S – totalmente sintético; S* – realizado por síntese total, mas com grupo farmacofórico de produto natural; /NM – produtos naturais mimetizados (inibidores enzimáticos por competição com o substrato natural). Fonte: Newman & Cragg (2012).

Dentre os exemplos de fármacos produzidos com o auxílio da síntese, talvez o mais clássico é o analgésico e antipirético ácido acetilsalicílico (1), inspirado nos salicilatos isolados da casca do salgueiro (*S. alba*), especialmente a salicina (2) (Viegas *et al.*, 2006). Tendo como protótipo a cocaína (3), alcaloide natural alucinógeno, toda uma classe de anestésicos locais sem efeitos sobre o sistema nervoso central pôde ser desenvolvida sinteticamente, sendo a procaína (4) um de seus representantes (Barreiro, 1990). Já o cloranfenicol (5), vale ser destacado por ser o primeiro antibiótico com centros estereogênicos a ser produzido por síntese total em larga escala, enquanto era inicialmente isolado de fungos *Streptomyces Venezuela*. Assim como o cloranfenicol, muitos compostos quirais bioativos são obtidos inicialmente de fontes naturais, ou estas fornecem substratos que podem servir de blocos construtores quirais para moléculas mais complexas. (Menegatti *et al.*, 2011).



A presença de várias drogas quirais no mercado é justificada pela capacidade dos organismos de seres vivos em diferenciá-las. A pureza enantiomérica destes compostos pode determinar sua eficácia, visto que a atividade biológica pode ser exercida majoritariamente ou apenas por um dos isômeros e, mais do que isso, tal pureza pode garantir a segurança terapêutica do medicamento. O clássico efeito teratogênico do esteroisômero S da

talidomida (**6**) em contraste com o poder sedativo e hipnótico da forma *R* (**7**), ilustra tal afirmação e foi um marco na década de 60 para expor a importância da pureza enantiomérica de moléculas quirais bioativas (Barreiro, 1991; Barreiro *et al.*, 1997).



A partir das estruturas dispostas acima, nota-se que os compostos heterocíclicos e nitrogenados estão presentes na Química Medicinal. Já na década de 90, anéis com heteroátomos representavam mais da metade das substâncias bioativas no mercado, sendo que nove a cada dez delas apresentavam um átomo de nitrogênio e uma a cada quatro, um átomo de enxofre em suas estruturas (Barreiro, 1991). Ainda hoje esta mesma classe de compostos é a mais encontrada dentro da Química Medicinal (Isambert & Lavilla, 2008).

Desta forma, o estudo químico e biológico de estruturas heterocíclicas é considerado de valiosa importância, atraindo o interesse da Síntese Orgânica. Considerando também os diversos substratos e modelos que Produtos Naturais pode oferecer, justificam-se os trabalhos no campo da semissíntese de novos compostos bioativos.

1.2. Limoneno

1.2.1. Aspectos gerais

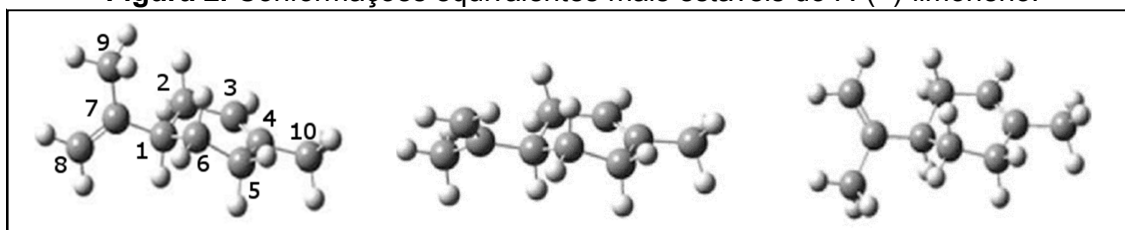
Óleos essenciais extraídos de plantas são utilizados desde a Antiguidade devido às suas propriedades medicinais, consistindo de uma mistura de compostos pertencentes majoritariamente à classe dos terpenos. O limoneno, 4-isopropenil-1-metil-cicloexeno, é o monoterpeneo mais abundante da natureza e está presente em mais de 300 espécies vegetais (Edris, 2007).

Devido à presença de um centro opticamente ativo, o limoneno é encontrado sob duas formas enantioméricas, *S*-(-)-limoneno ou *L*-limoneno (**8a**)

e *R*-(+)-limoneno ou *d*-limoneno (**8b**) (Barba *et al.*, 2013). Conforme estudos conformacionais feitos por Ureña e colaboradores (2009), o *R*-(+)-limoneno apresenta três conformações equivalentes, com o grupamento isopropenila em posição pseudo-equatorial em relação ao anel cicloexeno, como sendo as mais estáveis (**Figura 2**). Elas variam apenas pela rotação da ligação C1-C7, portanto rotâmeros, que juntos representam mais de 96% da população do monoterpeno em fase gasosa.



Figura 2. Conformações equivalentes mais estáveis do *R*-(+)-limoneno.



O limoneno é facilmente encontrado em excesso em uma de suas formas enantioméricas na natureza. O *S*-(-)-limoneno é obtido enantiomericamente puro de espécies de menta como a hortelã-verde (*Mentha spicata*) e a hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), enquanto o *R*-(+)-limoneno é o componente majoritário do óleo de alcarávia e dos óleos das cascas de limão e laranjas, nos quais pode atingir concentrações de até 96% (Barba *et al.*, 2013; Júnior & Pastore, 2007).

Nas plantas, os monoterpenos como o limoneno exercem funções de proteção contra o ataque de insetos e inibição de crescimento microbiano, bem como atuam na prevenção da desidratação das mesmas (Júnior, 2003). O aspecto lipofílico do limoneno é aproveitado na indústria farmacêutica como auxiliar na permeação de drogas administradas por via cutânea, sendo mais eficiente que álcoois de cadeia longa ou ácidos graxos (Edris, 2007). Aliado ao

seu aroma agradável, isto faz deste terpeno um importante aditivo na indústria de cosméticos e de agentes flavorizantes (Arruda *et al.*, 2009).

Devido à indústria cítrica mundial, o *R*-(+)-limoneno é recuperado em quantidades da ordem de dezenas de milhares de toneladas anualmente, como subproduto principalmente da produção de sucos de laranja concentrados. Tal fato o torna um subproduto industrial barato e de fácil acesso para uma série de outras áreas que fazem uso dele, incluindo a indústria químico-farmacêutica (Júnior & Pastore, 2007). Provavelmente por isso, muito mais estudos científicos e aplicações industriais são normalmente relatados para o *R*-(+)-limoneno do que para seu enantiômero.

1.2.2. Atividades biológicas

O limoneno apresenta diversas propriedades biológicas, dentre elas antimicrobiana (Aggarwal *et al.*, 2002), antifúngica (Marei *et al.*, 2012; Vuuren & Viljoen, 2007), larvicida (Ferrarini *et al.*, 2008a; Santos, S. *et al.*, 2011), antiprotozoária (Arruda *et al.*, 2009; Graebin *et al.*, 2010; Moura *et al.*, 2001), antitumoral (Crowell, 1997; Crowell & Gould, 1994; Kawamori *et al.*, 1996; Kelloff *et al.*, 1996; Miyazawa *et al.*, 2002; Vigushin *et al.*, 1998), cardiovascular (Santos, M. *et al.*, 2011), antioxidante (Roberto *et al.*, 2010) e anti-inflamatória (Hirota *et al.*, 2010).

Aggarwal e colaboradores (2002) relatam atividade antimicrobiana para ambos os enantiômeros do limoneno. A forma *R* mostrou forte atividade contra um amplo espectro de fungos e bactérias, incluindo a bactéria causadora da cárie *Streptococcus mutans*, enquanto que o *S*-limoneno foi pouco ativo nos micro-organismos avaliados.

Já para uma série de oito fungos avaliada por Vuuren & Viljoen (2007), o isômero *S* do limoneno apresentou atividade antifúngica igual ou superior à forma *R*, sendo até três vezes mais ativo para a cultura de *Staphylococcus aureus*. O melhor valor de concentração mínima inibitória (MIC) do isômero *S* foi de 3 mg.mL⁻¹, para *Bacillus cereus* e *Cryptococcus neoformans*, bactérias encontradas no solo. Os autores ainda destacam o efeito do sinergismo entre ambos os enantiômeros, tendo sido encontrados menores valores de MIC (1 mg.mL⁻¹) para uma mistura racêmica do terpeno que para qualquer uma de

suas formas enantioméricas puras (8 mg.mL⁻¹ para cada uma) em cultura de *Moraxella catarrhalis*, bactéria causadora de infecções das vias aéreas superiores. Segundo um estudo feito para a forma S por Marei e colaboradores (2012), o modo de ação do limoneno em fungos se dá pela inibição principalmente das enzimas pectina metil estearase (PME) e celulase destes organismos.

A atividade antioxidante do limoneno é relatada para o enantiômero R por Roberto e colaboradores (2010). Em estudos com camundongos, baixas concentrações de limoneno (até 50 µg.mL⁻¹) combatem o estresse oxidativo das células pela modulação de peróxido de hidrogênio no organismo. O monoterpeno inibe a formação de H₂O₂ no organismo e auxilia a proliferação celular, aumentando a atividade das enzimas catalase e peroxidase, reguladoras deste processo. Hirota e colaboradores (2010) também comprovam que o limoneno combate a produção de espécies reativas de oxigênio no organismo e evita a migração de células eosinófilas (classe de glóbulos brancos do organismo) em concentrações inferiores a 8 mmol.L⁻¹. Tais efeitos sugerem que o limoneno tem potencial anti-inflamatório.

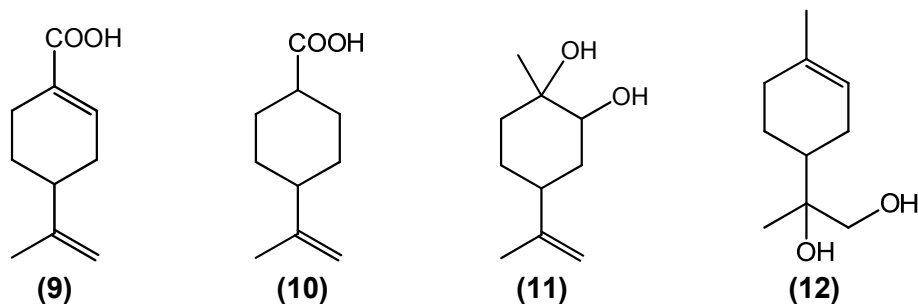
Em um artigo de revisão sobre efeitos cardiovasculares de monoterpenos, Santos, M. e colaboradores (2011) relatam o potencial do limoneno em diminuir a hipertrofia ventricular e hipertensão pulmonária induzidas por monocrotalina.

Existem diversos estudos sobre o efeito quimiopreventivo e quimioterapêutico do R-(+)-limoneno no tratamento do câncer (Kuttan *et al.*, 2011). Dietas contendo óleos ricos neste enantiômero possibilitaram uma regressão de câncer de mama em roedores, mostrando ação quimiopreventiva em casos iniciais do tumor e quimioterapêutica nos casos em que o tumor estava no estágio de progressão (Crowell, 1997).

Em camundongos, o limoneno foi eficaz contra modelos de carcinoma hepatocelular, câncer de pele e câncer de cólon, bem como aumentou a sobrevivência de ratos portando linfoma. Seu potencial clínico está atrelado à inibição do crescimento celular, interferindo em etapas de isoprenilação de proteínas e promoção da apoptose de células cancerígenas, conforme foi observado para camundongos com tumor gástrico, aos quais foi administrado R-(+)-limoneno (Edris, 2007; Kawamori *et al.*, 1996).

Vigushin e colaboradores (1998) relatam estudos clínicos em fase I e fase II do *R*-(+)-limoneno em pacientes com câncer em estágio avançado. O estudo em fase II com pacientes portadores de câncer de mama não mostrou resultados significativos. Porém na fase I foram observadas respostas parciais positivas ou estabilidade da doença em alguns casos. O estudo ainda mostrou que o limoneno não causa efeitos colaterais graves e pode ser tolerado em altas doses no organismo (8 mg.m^{-2}), quando começa a causar náuseas, vômitos e diarreia. Kelloff e colaboradores (1996) referenciam as altas doses do limoneno para sua eficácia clínica como um fator limitante de sua aplicação terapêutica, em que seriam necessárias doses diárias do terpeno que corresponderem de 1 a 5% da dieta alimentar.

Na avaliação da farmacocinética do limoneno e sua metabolização no organismo, foi observada rápida absorção e conversão do limoneno em derivados, os quais se acredita serem em boa parte responsáveis pelos efeitos biológicos do terpeno. Os principais derivados encontrados no plasma sanguíneo foram o ácido perílico (**9**), ácido dihidroperílico (**10**), limoneno-1,2-diol (**11**) e uroterpenol (**12**), além de outros metabólitos de menor quantidade. Tanto no plasma sanguíneo quanto na urina, a presença de limoneno foi detectada em quantidades mínimas após algumas horas da administração (Crowell *et al.*, 1994; Vigushin *et al.*, 1998).



Um estudo comparativo na diferença de metabolização do *R*-(+)- e do *S*-(-)-limoneno em camundongos machos e fêmeas é apresentado por Miyazawa e colaboradores (2002). Apesar de não discutir possíveis diferenças de efeito relativos à estereoisomeria dos compostos, o estudo indica que os derivados originados no organismo permanecem com o centro estereogênico inalterado.

Outros estudos biológicos incluem atividade acaricida e larvicida relatada para o limoneno. O isômero *R* foi capaz de inibir tanto o desenvolvimento de larvas quanto a eclosão de ovos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, carrapato que prejudica a criação de gado (Ferrarini *et al.*, 2008a). Em outro estudo, ambos os enantiômeros do limoneno mostraram grande potencial de inibição de larvas de *Aedes aegypti*, espécie de mosquito transmissora da dengue. Em concentrações de 100 ppm os terpenos induziram 100% da mortalidade das larvas em 24 horas, sendo constatado que sua alta lipofilicidade e a presença de ligação dupla são importantes para sua atividade. (Santos, S. *et al.*, 2011).

Dentre as atividades antiprotozoário, são relatados estudos *in vitro* para agentes causadores da malária, tripanossomíase e leishmaniose. Em testes *in vitro* contra um dos agentes causadores da malária, *Plasmodium falciparum*, o limoneno foi capaz de inibir o crescimento dos parasitas após o seu primeiro ciclo de vida, modulando a etapa de isoprenilação de algumas proteínas atuantes no desenvolvimento do mesmo. Graebin e colaboradores (2010) observaram que o limoneno não apresenta atividade contra *Trypanosoma cruzi* em concentração de até 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e são necessárias concentrações superiores a 850 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para evitar o crescimento de 50% de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, resultado confirmado por Ferrarini e colaboradores (2008b). Arruda e colaboradores (2009) avaliaram a atividade *in vitro* e *in vivo* do limoneno em vários gêneros de *Leishmania*. O limoneno foi capaz de inibir em 50% as formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* em concentrações de 185 a 354 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. No estudo *in vivo*, em concentrações de 300 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, o terpeno reduziu em até 78% a carga de formas amastigotas da espécie *L. amazonensis* no hospedeiro. Tratamento tópico com formulações contendo 10% de limoneno resultou em redução do tamanho das lesões cutâneas dos camundongos, promovendo a cura completa em até 86% dos casos.

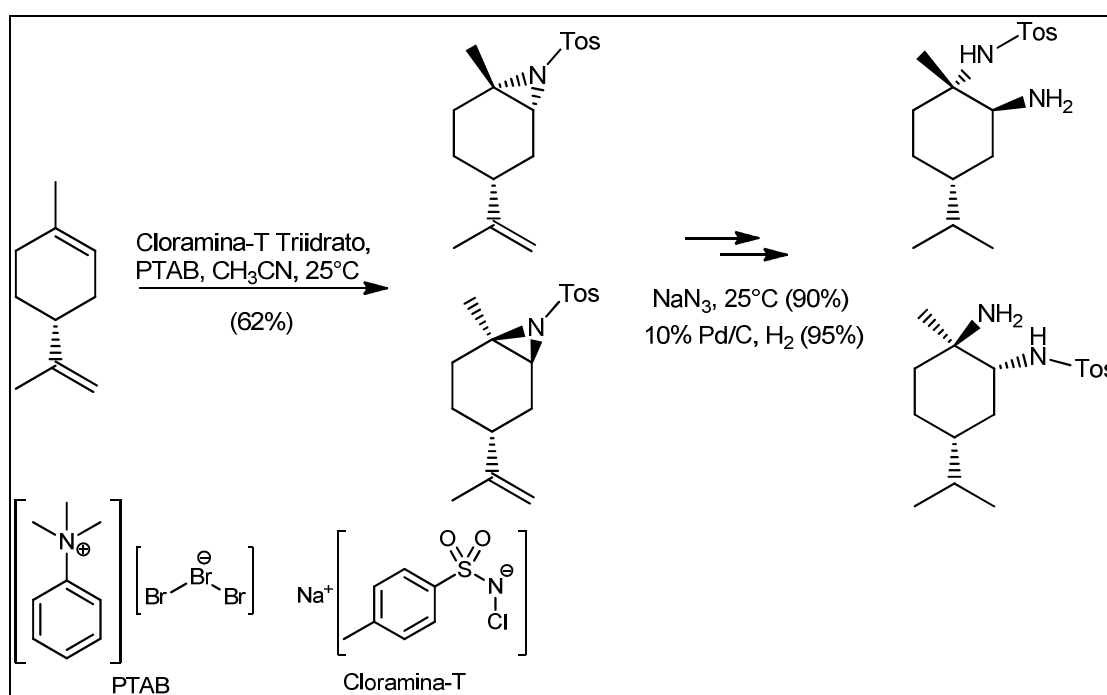
1.2.3. Derivados sintéticos nitrogenados

O limoneno encontra várias aplicações na Síntese Orgânica, pois apresenta ligações duplas que podem reagir seletivamente. É um bloco

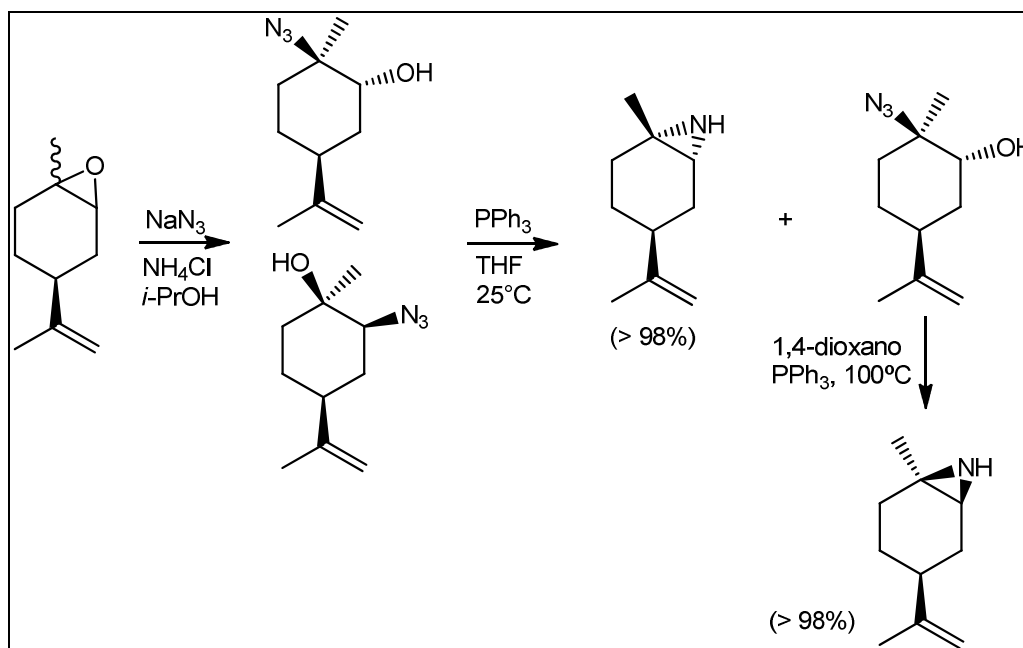
construtor versátil e de baixo custo para construção de moléculas quirais (Findik *et al.*, 2009; Graebin *et al.*, 2008; Voronkov *et al.*, 2005b).

A funcionalização da dupla endocíclica do limoneno é demonstrada por Roszkowski e colaboradores (2012) pela preparação de derivados *trans*-1,2-diaminas. Através de uma *N*-tosilaziridinação quimiosseletiva direta ao limoneno (**Esquema 1**) foi obtido um par diastereoisomérico de aziridinolimonenos. Subsequente abertura do anel aziridínico com azoteto de sódio e posterior hidrogenação catalítica levou às diaminas vicinais.

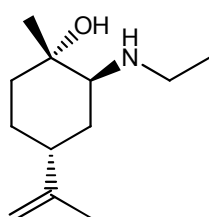
Esquema 1. Síntese de *trans*-diaminas vicinais a partir do *R*-(+)-limoneno.



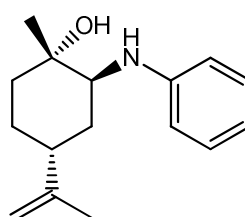
Voronkov e colaboradores (2005a) apresentam uma síntese diasterosseletiva de aziridinas (**Esquema 2**). Reagindo azoteto de sódio com uma mistura de epóxidos obtida do limoneno contendo os grupamentos metila e isopropenila *cis* e *trans*, azido-álcoois são formados. Estes são convertidos em mais de 98% de rendimento às respectivas aziridinas em etapas distintas, devido à diferença cinética de reação da azida secundária e terciária. Em trabalho posterior, Voronkov e colaboradores (2005b) bifuncionalizam os derivados aziridínicos através da abertura do anel com diferentes nucleófilos, incluindo *N*-, *P*-, e *S*-nucleófilos.

Esquema 2. Formação diastereosseletiva de aziridinas a partir de óxidos do limoneno.

Similarmente, Ferrarini e colaboradores (2008b) descrevem a preparação de β -aminoálcoois por aminólise regioseletiva do óxido do limoneno. *N*-alquil e *N*-aril aminas são incorporadas ao óxido de limoneno na posição menos substituída. Neste trabalho os autores avaliam a atividade antileishmania *in vitro* dos derivados em formas promastigotas de *L. braziliensis*, sendo dois dos derivados, os compostos (13) e (14), respectivamente cerca de 60 e 120 vezes mais potentes que a droga padrão e menos tóxicos para células do organismo.



(13)

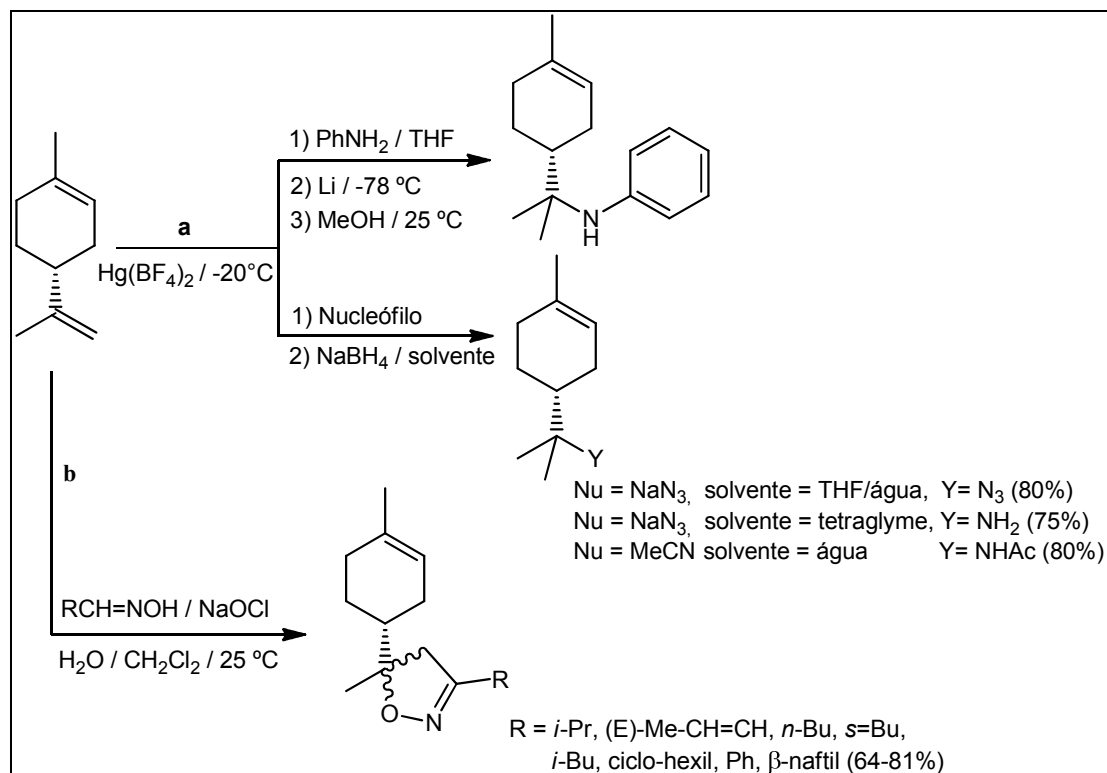


(14)

Modificações na dupla exocíclica do limoneno inclui trabalhos de Mattos e colaboradores (1992) e Mattos & Kover (1994). O primeiro estudo descreve, dentre outros procedimentos, solvemercuriações químio e regioespecíficas para o limoneno, utilizando $\text{Hg}(\text{BF}_4)_2$ e nucleófilo apropriado, seguido de NaBH_4 ou lítio para redução da ligação C-Hg (**Esquema 3 – a**). No estudo de 1994, verifica-se a ciclo-adição de óxidos de nitrila ao limoneno, levando à formação

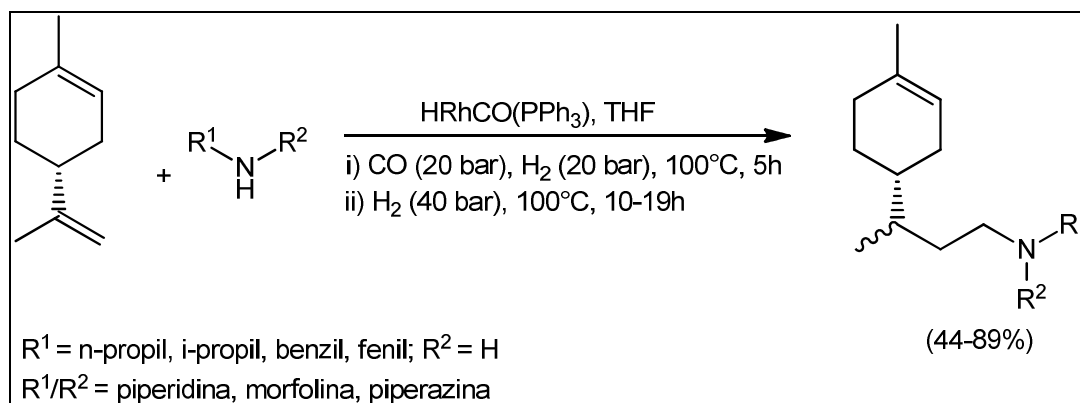
de 2-isoxazolininas. No procedimento, os óxidos de nitrila são gerados *in situ* pelo tratamento de aldoximas com hipoclorito de sódio em um ambiente bifásico (**Esquema 3 – b**).

Esquema 3. Reações de (a) solvomercúriação-demercúriação e (b) formação de 2-isoxazolidinas a partir do *R*-(+)-limoneno.

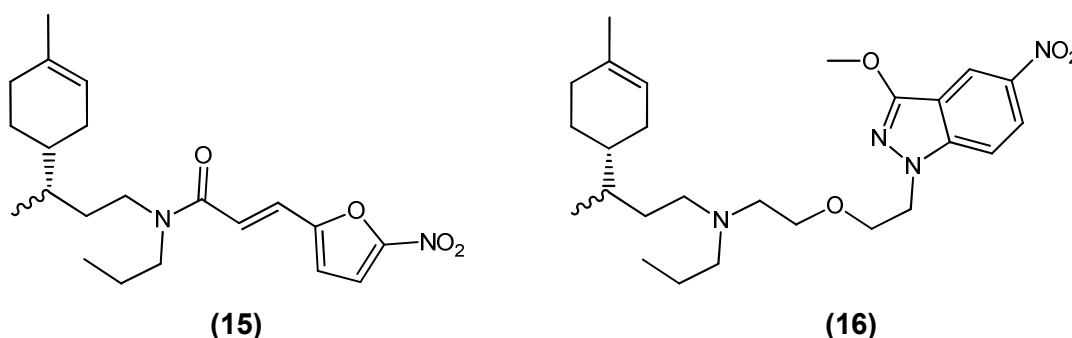


Graebin e colaboradores (2008) descrevem uma síntese *one-pot* de aminas secundárias e terciárias a partir do *R*-(+)-limoneno (**Esquema 4**). No processo, realiza-se a hidroaminometilação em duas etapas sequenciais, hidroformilação seguida de aminação redutiva, para diminuir o tempo reacional.

Esquema 4. Síntese *one-pot* de aminas secundárias e terciárias derivadas do *R*-(+)-limoneno.

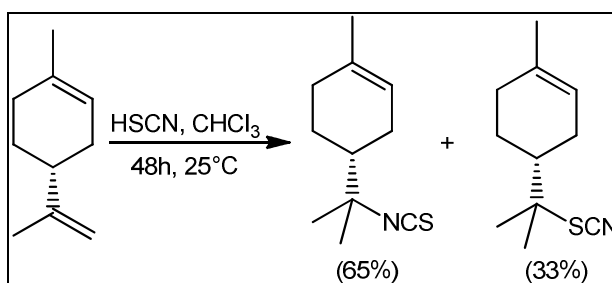


Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa relatou a incorporação de porções heterocíclicas na amina secundária derivada do limoneno e avalia a atividade *in vitro* contra *T. cruzi* (Álvarez *et al.*, 2010). Os derivados (15) e (16) foram os mais ativos, fornecendo valores de 5,6 e 5,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para inibição de 50% dos protozoários, valores menores que os das drogas padrão testadas.



Silva e colaboradores (1993) descrevem a preparação de isotiocianatos terpênicos através de uma adição química e regioseletiva de ácido tiocianico ao limoneno, dentre outros terpenos (**Esquema 5**). A reação é descrita como uma metodologia útil para sintetizar derivados que antes só eram obtidos de fontes naturais marinhas.

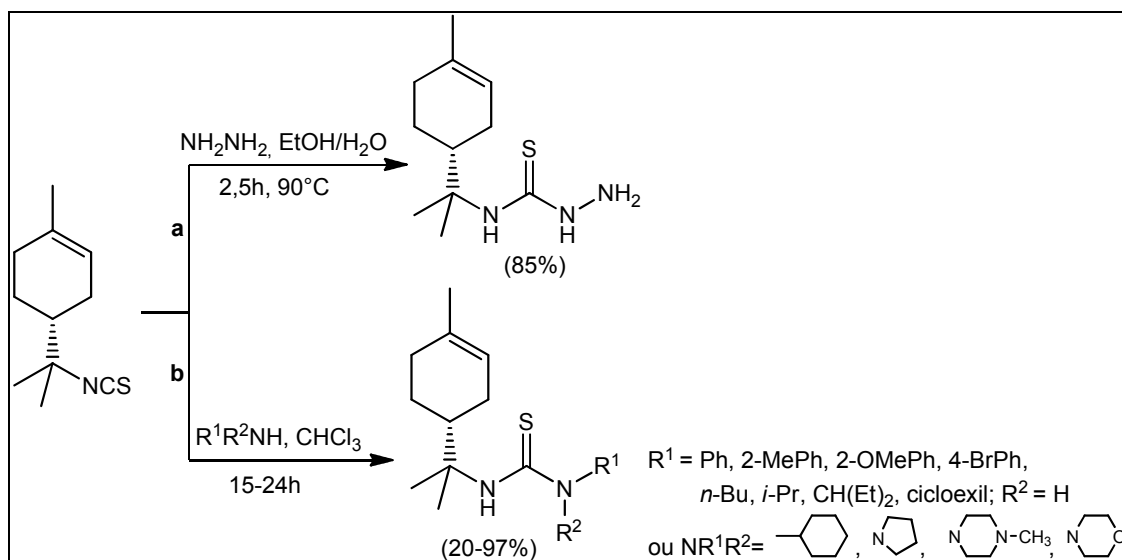
Esquema 5. Síntese de isotiocianato e tiocianato derivados do *R*-(+)-limoneno



A partir do isotiocianato do limoneno, é relatada a síntese da tiossemicarbazida deste terpeno pela adição de hidrazina (**Esquema 6 – a**), com estudos sobre sua reatividade (Silva, A. *et al.*, 2011) e atividade antifúngica (Yamaguchi *et al.*, 2009) em *Trichophyton mentagrophytes*, um dos fungos mais comumente presentes em dermatites. O derivado apresentou valor de concentração mínima inibitória de 110 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, valor inferior ao apresentado pelo terpeno ou pela tiossemicarbazida não terpênica. A adição de aminas primárias e secundárias ao isotiocianoterpeno (**Esquema 6 – b**) foi realizada por Figueiredo e colaboradores (2006) para síntese de uma série de

tiouréias visando à avaliação de sua atividade antitumoral. No mesmo trabalho os autores descrevem a síntese de *S*-metiltiouréias, pela reação de seus derivados com iodeto de metila. As tiouréias apresentaram atividade antitumoral relevante, em alguns casos mais potentes que a droga padrão, como o derivado *N*-[1-(4*R*)-(4-isopropil-1-metilcicloexenil)]-*N'*-[2-(cicloexil)]tiouréia, com $GI_{50} = 3,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para células tumorais de ovário (OVCAR).

Esquema 6. Síntese dos derivados tiossemicarbazida (a) e tiouréias (b) do *R*-(+)-limoneno

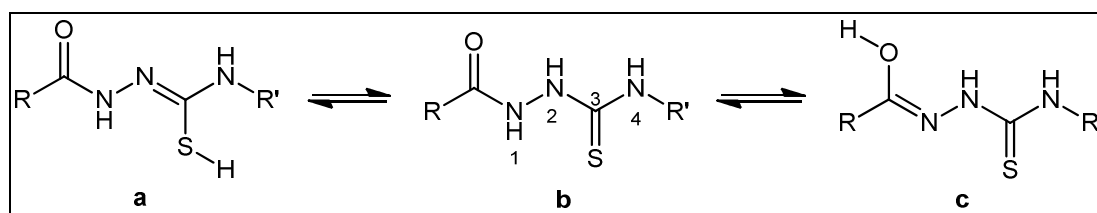


1.3. Aciltiossemicarbazidas

1.3.1. Aspectos gerais

As aciltiossemicarbazidas (**Esquema 7**) são uma subclasse de tiossemicarbazidas que apresentam um grupamento carbonílico ligado a *N*-1. Além da forma representativa ceto/tiona, os compostos podem apresentar os tautômeros ceto/tiol e enol/tiona (Angelusiu *et al.*, 2009).

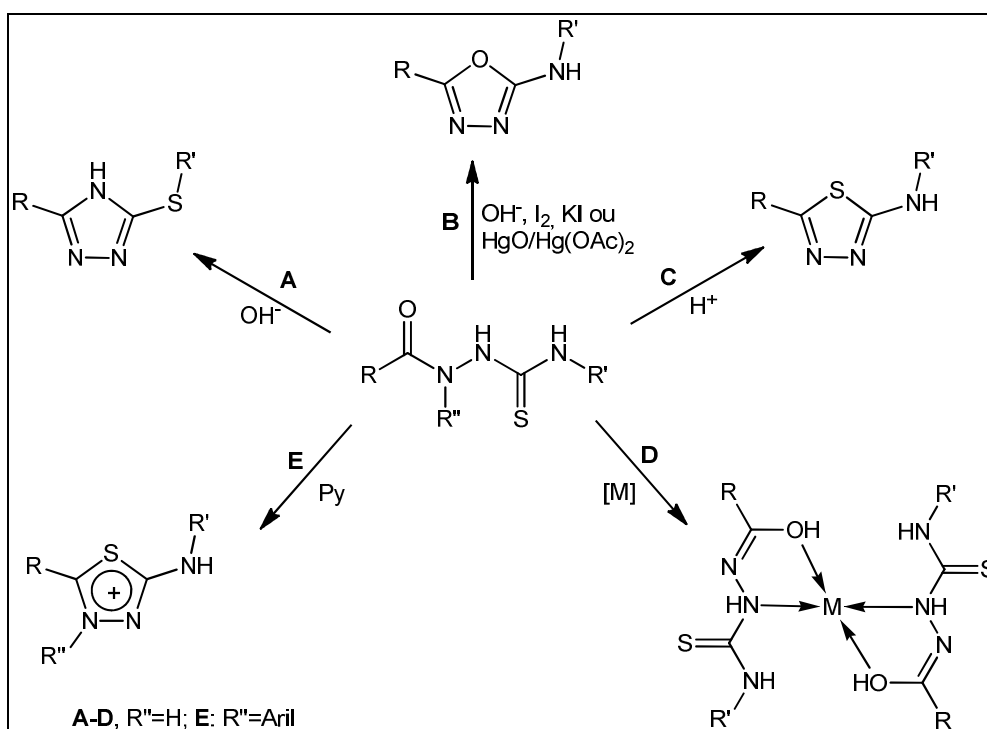
Esquema 7. Aciltiossemicarbazida (b) e tautômeros ceto/tiol (a) e enol/tiona (c).



Estes compostos são empregados principalmente como intermediários de síntese e representam uma estratégia clássica para a síntese de diversos heterociclos nitrogenados (Metwally *et al.*, 2011) (**Esquema 8 – A, B e C**). Dentre os produtos mais comuns de ciclização de aciltiossemicarbazidas estão 1,2,4-triazóis ou 5(4H)-tiona-1,2,4-triazóis formados em meio básico (Gomha & Riyadh, 2011; Salgin-Gökşen *et al.*, 2007), 1,3,4-tiadiazóis obtidos em meio ácido (Chen *et al.*, 2010; Kadi *et al.*, 2010) e 1,3,4-oxadiazóis originados em presença de sal de mercúrio (Ebrahimi, 2010; Gomha & Riyadh, 2011) ou em meio básico com sal de iodo (Palaska *et al.*, 2002).

Outra utilidade sintética de aciltiossemicarbazidas inclui a formação de complexos metálicos (**Esquema 8 – D**), uma vez que possui hidrogênios lábeis e seus átomos de oxigênio, enxofre e nitrogênio podem atuar como sítios de coordenação, sob diferentes formas tautoméricas (Angelusiu *et al.*, 2009). Para derivados dissubstituídos em *N4* é possível a síntese de heterociclos mesoiônicos (**Esquema 8 – E**) – por definição, compostos dipolares de 5 ou 6 membros contendo cargas positiva e negativa deslocalizadas, em que a primeira está associada aos átomos do anel e a última, a um nitrogênio ou outro átomo da família 16, externos ao anel (IUPAC, 2012) – que apresentam grande interesse biológico (Maciel *et al.*, 1998).

Esquema 8. Utilidade sintética de aciltiossemicarbazidas.

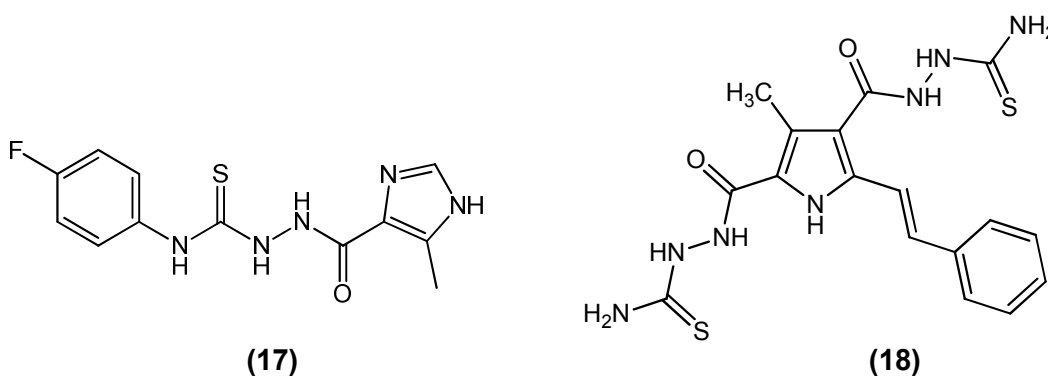


1.3.2. Atividades biológicas

Uma vez que a maioria de seus derivados heterocíclicos apresenta um amplo perfil farmacológico, as aciltiossemicarbazidas são indiretamente consideradas de grande utilidade para a Química Medicinal (Foroughifar *et al.*, 2009). Desta forma, em virtude dos muitos trabalhos científicos avaliarem apenas as atividades biológicas dos produtos finais de suas rotas sintéticas, há poucos relatos das atividades biológicas destes compostos.

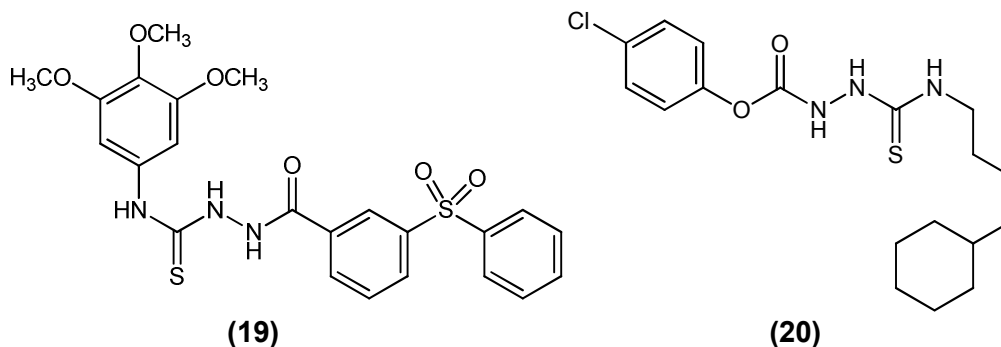
Liesen e colaboradores (2010) relatam atividade anti-toxoplasma para 4-fenil-1-[(5-metil-1*H*-imidazol-4-il)carbonil]tiossemicarbazidas, sendo estas fortemente ativas contra o parasita intracelular e as células infectadas com *Toxoplasma gondii*. Destaque para o derivado 4-fluorfenil (**17**), mais ativo que as drogas de referência, com $DL_{50} = 0,05$ e $0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$ para parasitas e células infectadas, respectivamente.

Atividade anticonvulsivante é descrita por Idhayadhulla e colaboradores (2011b), com destaque para o composto 2,2'-[[3-metil-5-(2-feniletetil)-1*H*-pirrol-2,4-diil]dicarbonil]dihidrazinocarbotioamida (**18**). A redução da duração de convulsões induzidas em camundongos chegou a 66% para doses de 10 mg.Kg^{-1} do composto.



As aciltiossemicarbazidas também apresentam atividade antimicrobiana. De acordo com Barbuceanu e colaboradores (2012), os melhores resultados foram obtidos para a bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus* e a bactéria Gram-negativa *Acinetobacter baumannii*, encontradas normalmente no solo. A 1-[4-(4-fenilsulfonil)benzoil]-4-(3,4,5-(trimetoxi)fenil)tiossemicarbazida (**19**), um dos derivados mais ativos, forneceu $MIC = 16$ e $32 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para estas bactérias, respectivamente.

Maingot e colaboradores (2013) classificam aciltiossemicarbazidas como potenciais medicamentos contra osteoartrite (artrose), doença degenerativa caracterizada pela perda da cartilagem de articulações, a qual não possui tratamento por medicamentos. As aciltiossemicarbazidas, intermediários da síntese de 1,2,4-triazol-3-tióis, pulmão tipo células não pequenas mostraram grande inibição da ADAMTS-5 (agrecanase), uma importante metaloprotease envolvida na degradação das cartilagens. A partir de uma triagem com mais de novecentas aciltiossemicarbazidas, o derivado 1-(4-clorofenoxiacetil)-4-cicloexilbutil-tiossemicarbazida, (**20**), apresentou $IC_{50} = 0,17 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sendo bastante seletivo em relação a outras metaloproteases, sugerindo ser um excelente candidato a fármaco para esta doença e mais ativo que os 1,2,4-triazóis.

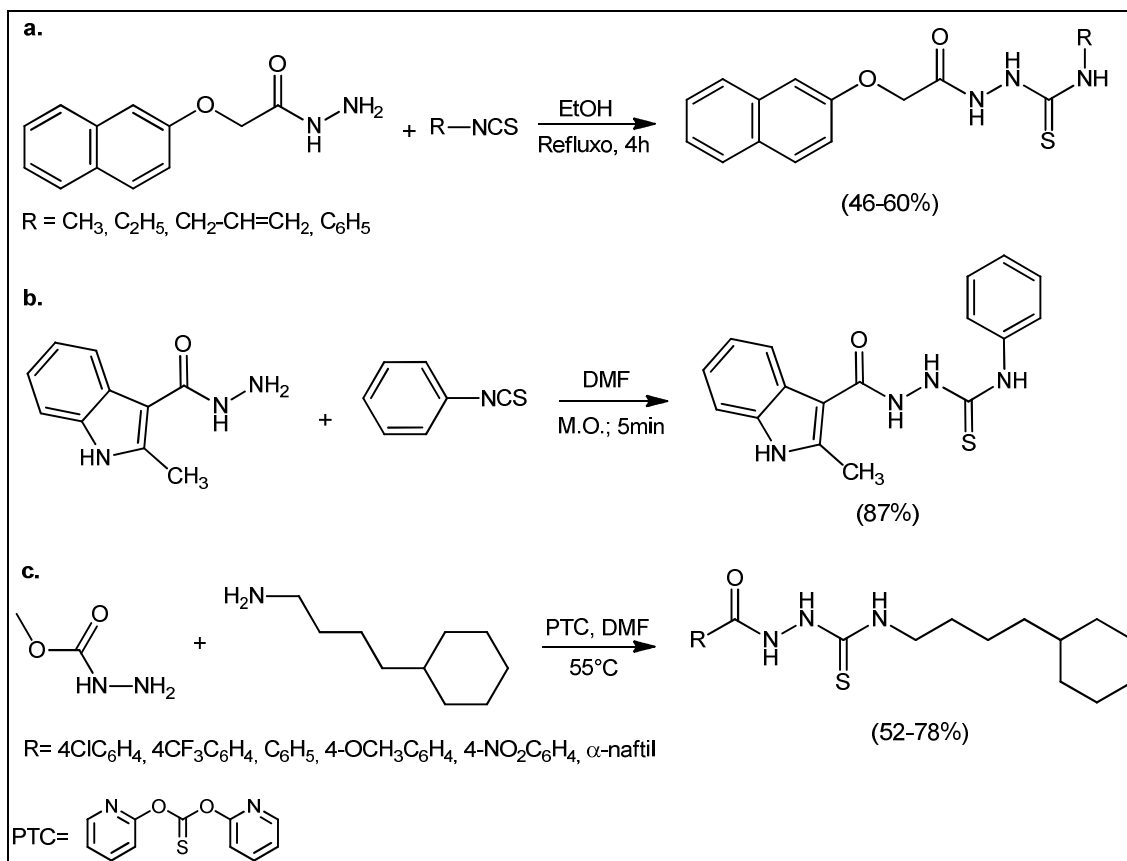


1.3.3. Metodologias de síntese

As metodologias de síntese de aciltiossemicarbazidas mais comuns são a adição de hidrazidas a isotiocianatos, e a condensação de tiossemicarbazidas com ésteres.

A maioria das sínteses realizada a partir da primeira metodologia envolve isotiocianatos fenílicos ou ligados a grupos alquílicos primários (Angelusiu *et al.*, 2009; Demirbas *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2012; Liesen *et al.*, 2010; Palaska *et al.*, 2002; Tomasciková *et al.*, 2008) ou secundários (Ebrahimi, 2010). As reações são normalmente feitas em meio alcoólico, sob aquecimento ou refluxo por 2 a 8 horas. Gomha & Riyadh (2011) descrevem a síntese em micro-ondas dos mesmos compostos, como alternativa mais rápida e eficiente, e Maingot e colaboradores (2013) apresentam um procedimento *one-pot*, em que o isotiocianato é formado *in situ* pela reação de amina e di-(2-piridil)-tionocarbonato (PTC), seguido da adição de hidrazida (**Esquema 9**).

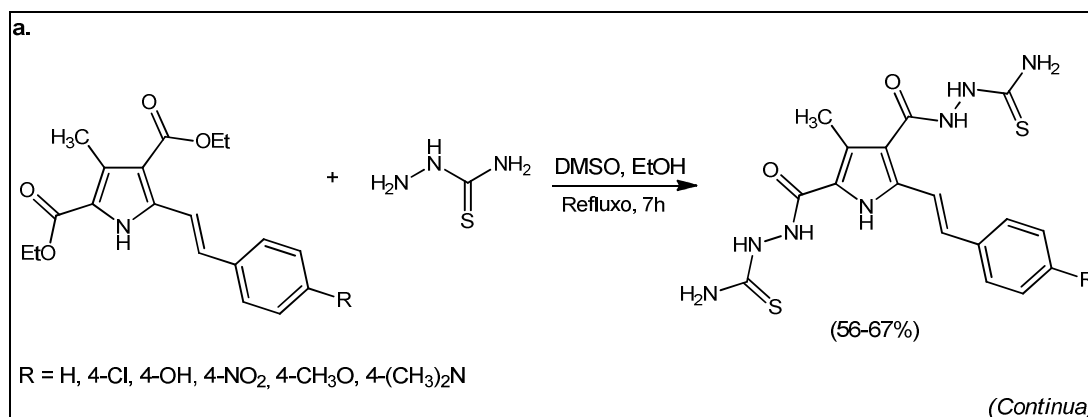
Esquema 9. Síntese de aciltiossemicarbazidas por adição de hidrazidas a isotiocianatos.

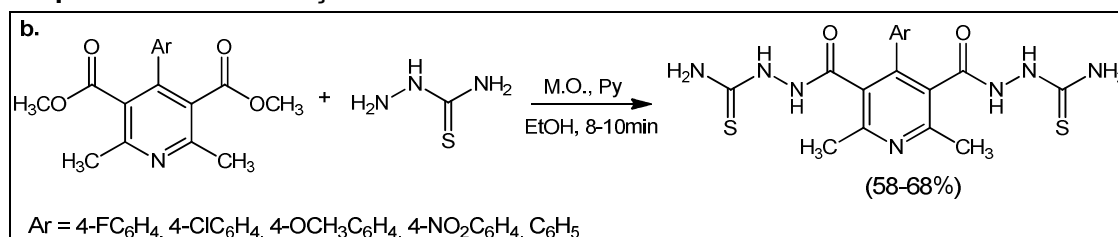


Ref.: a. Palaska *et al.*, 2002; b. Gomha & Riyadh, 2011; c. Maingot *et al.*, 2013;

A condensação de ésteres e hidrazidas é apresentada por Idayadhulla e colaboradores (2011a), usando meio alcoólico em refluxo e pequenas quantidades de dimetilsulfóxido. Mehta e colaboradores (2007) descrevem procedimento a partir dos mesmos reagentes, empregando irradiação por micro-ondas e quantidade catalítica de piridina (**Esquema 10**).

Esquema 10. Síntese de aciltiossemicarbazidas por condensação de ésteres e tiossemicarbazida.



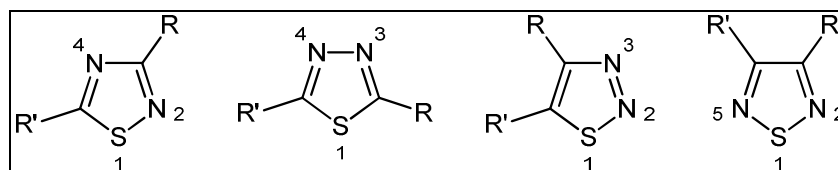
Esquema 10. Continuação.

Ref.: a. Idhayadhulla *et al.*, 2011a; b. Mehta *et al.*, 2007;

1.4.1,3,4-tiadiazóis1.4.1. Aspectos gerais

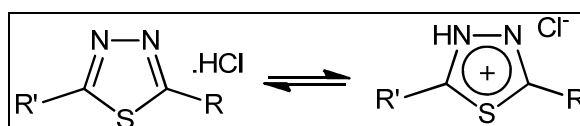
Dentre os núcleos heterocíclicos existentes, os tiadiazóis vêm apresentando destaque por comportarem diversas atividades biológicas e utilidade sintética (Kumar *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Dentre os quatro tipos de núcleos tiadiazólicos existentes, 1,2,4-, 1,3,4-, 1,2,3- e 1,2,5-tiadiazol (**Figura 3**), os dois primeiros são os mais comumente investigados.

Figura 3. Os quatro núcleos tiadiazol.



O 1,3,4-tiadiazol é um núcleo heteroaromático, que apresenta dois átomos de nitrogênio e um átomo de enxofre dispostos simetricamente. Segundo (Li *et al.*, 2013), os 1,3,4-tiadiazóis podem se comportar como sistemas mesoiônicos (**Esquema 11**), os quais, por serem altamente polarizáveis e ao mesmo tempo neutros, têm permeação em membranas celulares facilitada, trazendo-lhes habilidade diferenciada para interagir com alvos biológicos.

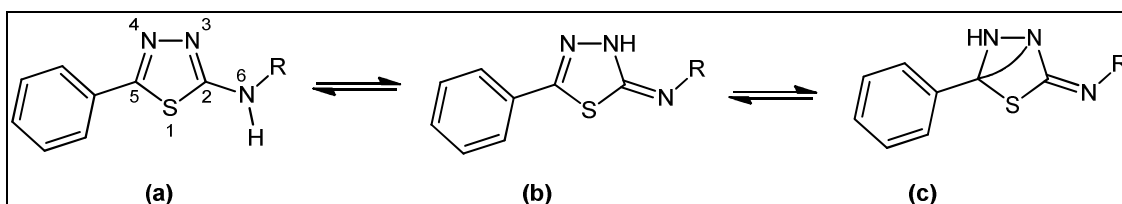
Esquema 11. Habilidade dos 1,3,4-tiadiazóis em formar sistemas mesoiônicos.



De acordo com os substituintes nas posições 2 e 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol, este pode apresentar-se sob diferentes formas tautoméricas.

2-amino-1,3,4-tiadiazóis possuindo anéis fenílicos ou piridínicos ligados à posição 5 são descritos sob a forma imínica e *egzo*-amínica, além da forma amínica comum (**Esquema 12**). No estado sólido foi evidenciada a presença da forma *egzo*-amínica, e diversas ressonâncias na forma de birradicais foram observadas em solução (Strzemecka *et al.*, 2003; Strzemecka & Urbańczyk-Lipkowska, 2010).

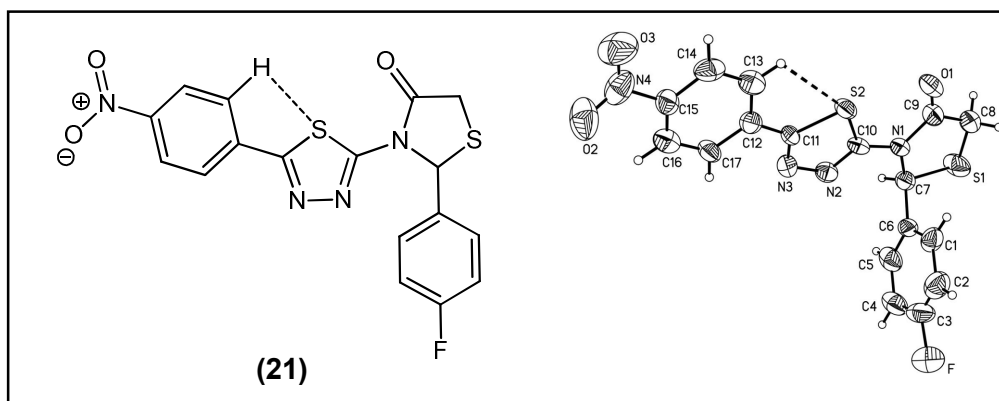
Esquema 12. Tautômeros de 2-amino-1,3,4-tiadiazóis: forma amino (a), forma imino (b) e forma *egzo*-amino (c).



Ainda de acordo com Strzemecka & Urbańczyk-Lipkowska (2010), foi evidenciada através de cristalografia de raios X a habilidade do núcleo em estabelecer ligações hidrogênio. Ligação hidrogênio intermolecular foi verificada entre o hidrogênio de *N6* e *N3* ou *N4*.

Já Yu e colaboradores (2010), descrevem uma forte interação hidrogênio intramolecular C-H \cdots S para o derivado 2-(4-fluorofenil)-3-[5-(4-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-1,3-tiazolidin-4-ona (**21**). O autor a classifica como ligação hidrogênio, ocorrendo entre o átomo de *S* e o átomo de *H* em posição *orto* no anel fenílico ligado à posição 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol, mostrando uma quase coplanaridade entre estas duas porções da molécula (**Figura 4**).

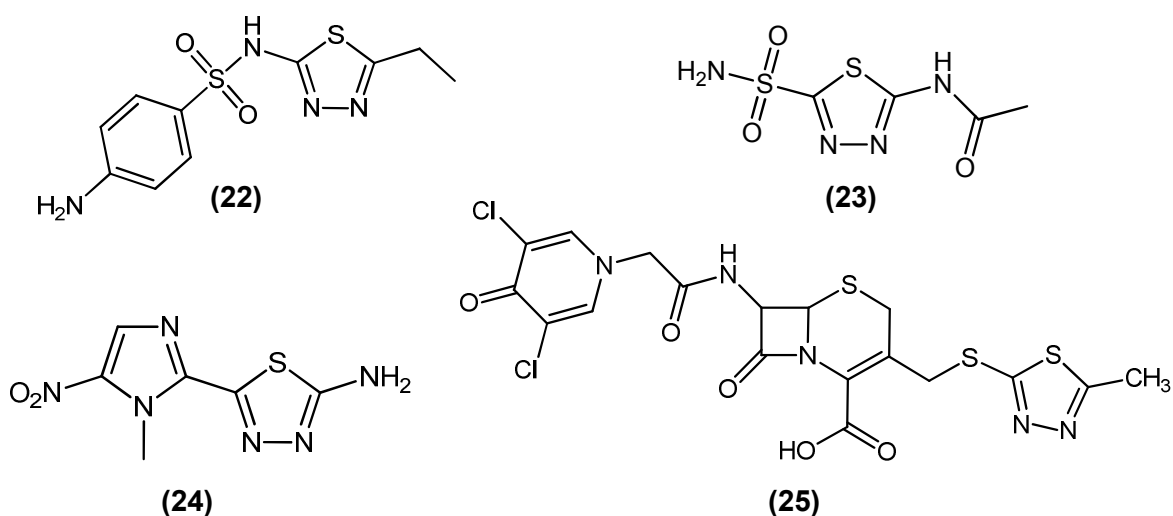
Figura 4. Derivado 21 e cristalografia por raios-X evidenciando ligação hidrogênio C-H \cdots S intramolecular.



1.4.2. Atividades biológicas

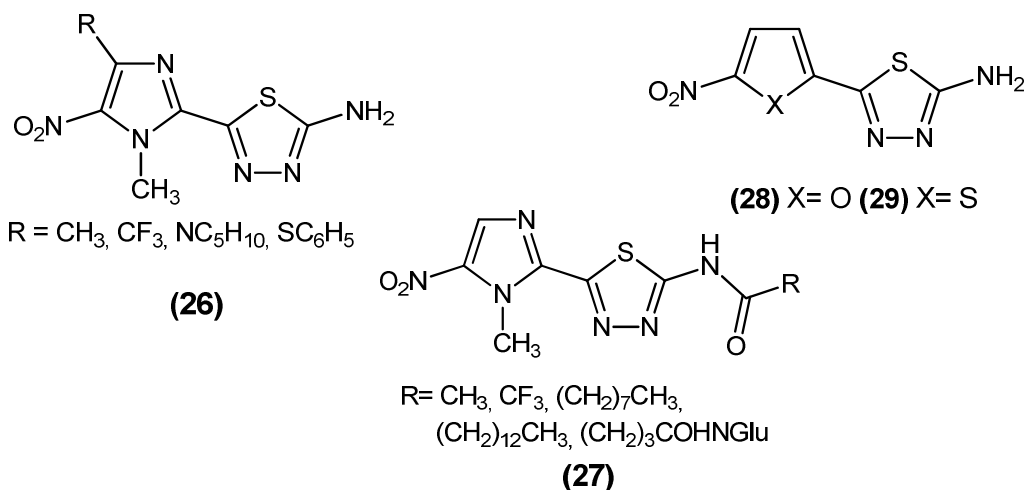
No campo da Química Medicinal, o núcleo 1,3,4-tiadiazol isolado ou em conjunto com outros grupos farmacofóricos apresenta ou potencializa uma série de atividades biológicas, como é bem relatado nos artigos de revisão de Jain e colaboradores (2013) e de Li e colaboradores (2013). Dentre elas, estão as atividades anticonvulsivante e ansiolítica (Dogan *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2013), anticâncer (Kumar *et al.*, 2012; Rzeski *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2012b; Zheng *et al.*, 2008), anti-inflamatória (Palaska *et al.*, 2002; Varandas *et al.*, 2005), antiviral (Chen *et al.*, 2010), antifúngica (Idhayadhulla *et al.*, 2011b; Matysiak & Malinski, 2007), antiprotozoária (Foroumadi *et al.*, 2005a; Tahghighi *et al.*, 2011) e antimicrobiana (Demirbas *et al.*, 2004; Kadi *et al.*, 2010; Liesen *et al.*, 2010; Padmavathi *et al.*, 2009).

Alguns compostos bioativos contendo núcleo 1,3,4-tiadiazol são conhecidos há várias décadas, como a globucida (**22**), uma sulfonamida com atividade antibacteriana já não mais utilizada. A acetazolamida (**23**), desenvolvida em 1954, foi o primeiro fármaco diurético não contendo mercúrio e ainda é indicada em tratamentos de glaucoma, epilepsia, úlcera e insuficiência cardíaca congestiva (Barboiu *et al.*, 1996; Kilburn *et al.*, 2003). Sintetizado em 1968 para atuar como agente antimicrobiano (Berkelhammer & Asato, 1968), o Megazol (**24**) revelou-se como um dos mais eficazes agentes tripanomicida conhecidos, porém foi posteriormente descartado por induzir efeitos mutagênicos (Poli *et al.*, 2002). Outros fármacos contendo núcleo 1,3,4-tiadiazol incluem alguns antibióticos β -lactâmicos, como a cefazolina (**25**).

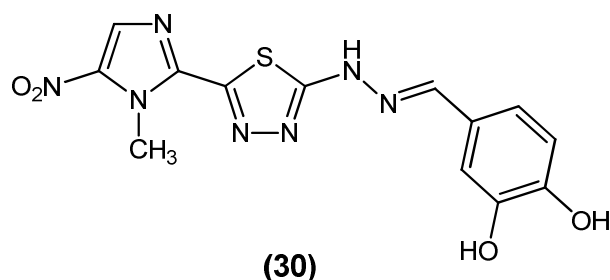


Assim como a acetazolamida (**23**), núcleos 2-sulfonamido-1,3,4-tiadiazóis são conhecidos por serem inibidores de enzimas anidrase carbônica. Estas enzimas atuam na regulação e interconversão de gás carbônico e bicarbonato e sua inibição pode auxiliar no tratamento de doenças como glaucoma, problemas cardíacos, úlceras gástricas, epilepsia e outras desordens neurológicas. Os grupos sulfonamido ligados a uma porção 1,3,4-tiadiazol estão entre os inibidores mais potentes destas anidrases (Ozensoy *et al.*, 2005).

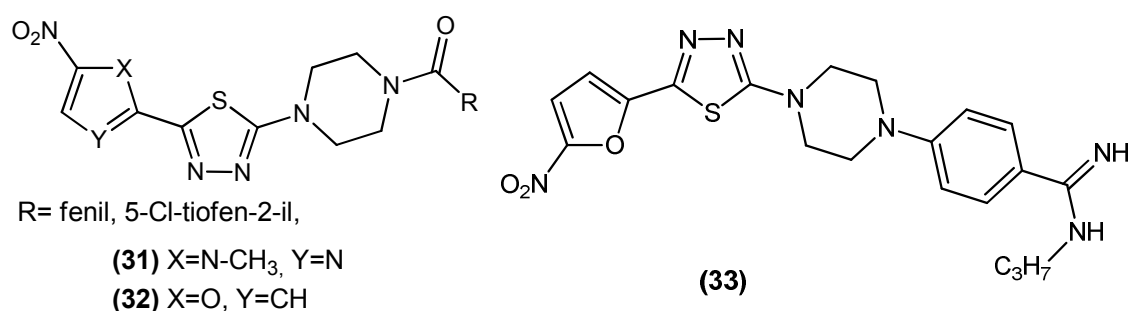
Tendo como referência o Megazol (**24**), diversos compostos antiprotozoários envolvem seus análogos. Chauvière e colaboradores (2003) apresentam uma série de nitro-heterociclos, investigando suas atividades contra *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania infantum*. Dentre eles estão derivados substituídos na posição 4 do anel imidazólico (**26**), derivados apresentando substituição no grupamento amínico ligado ao núcleo 1,3,4-tiadiazol (**27**) e derivados com o núcleo imidazol substituído por 5-nitrofurano (**28**) e 5-nitro-tiofeno (**29**). Apesar de ativos, nenhum dos derivados foi mais potente que o composto inicial.



Carvalho e colaboradores (2004) investigaram a atividade de análogos do Megazol contendo um grupamento aril-hidrazona na porção NH₂. O derivado 3,4-diidroxibenzaldeído-[5-(1-metil-5-nitro-1*H*-imidazol-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-hidrazina (**30**), “Brazilizona A”, apresentou IC₅₀ de 5,3 μmol.L⁻¹, sendo mais ativo que o Megazol para atividade *in vitro* contra formas promastigotas de *T. cruzi*, porém testes posteriores *in vivo* mostraram que o composto não foi eficaz no organismo (Salomão *et al.*, 2010).



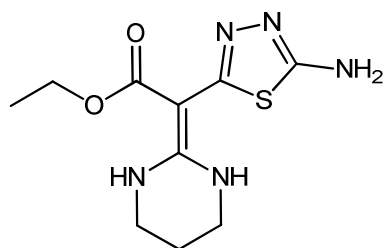
Diversos trabalhos relatam a atividade antileishmania dos 1,3,4-tiadiazóis. Poorrajab e colaboradores (2009) apresentam testes *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania sp.*, além de citotoxicidade e possível mecanismo de ação de três séries de 1,3,4-tiadiazóis, substituídos com grupamentos piperazino-derivados na posição 2 e núcleos nitro-imidazol, nitro-tiofeno ou nitro-furano na posição 5. As três séries mostraram-se ativas nos testes *in vitro* para espécies *L. major*, *L. infantum* e *L. tropica*, relacionadas com formas viscerais e cutâneas da doença, destacando-se os grupos de derivados **(31)** e **(32)** como os mais ativos ($IC_{50} = 8,34-16,45 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Testes *in vivo* mostraram que os derivados **(31)** estão entre os mais ativos e menos tóxicos, apresentando índice de seletividade entre 8 e 11. O mesmo grupo de pesquisa relata a incorporação de porção benzamidino à porção piperazino, obtendo o composto **(33)**, com $IS=78,5$ em testes *in vivo* para *L. major* (Tahghighi *et al.*, 2011).



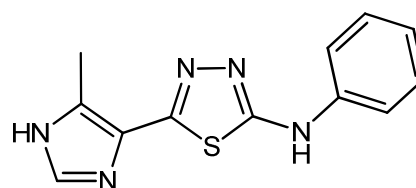
Atividades contra *L. donovani* são descritas por Ram e colaboradores (1997). O acetato de 5-amino-1,3,4-tiadiazol-2-il-hexaidropirimidin-2-ilideno de etila **(34)** apresentou inibição de 73% da forma promastigota *in vitro* e 45% da forma amastigota *in vivo*.

Ainda há descrição de atividade antiprotozoária de 1,3,4-tiadiazóis contra *Toxoplasma gondii*. O composto *N*-fenil-5-(5-metil-1*H*-imidazol-4-il)-

1,3,4-tiadiazol-2-amino (**35**) foi o mais ativo e menos tóxico de uma série avaliada para formas intracelulares do protozoário (Liesen *et al.*, 2010).

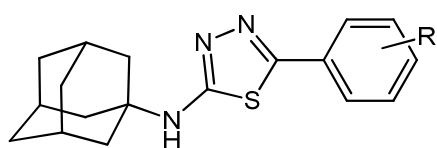


(34)

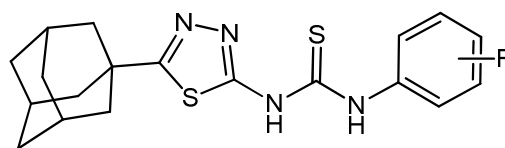


(35)

No campo das atividades antimicrobianas, vários trabalhos apresentam compostos contendo o núcleo 1,3,4-tiadiazol como ativos em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Kadi e colaboradores (2007) relatam a atividade de 2-adamantilamino-5-aryl-1,3,4-tiadiazóis (**36**) para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, enquanto que em outro trabalho os autores destacam 2-adamantil-1,3,4-tiadiazóis com porções ariltiouréias na posição 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol (**37**) como também tóxicos a várias bactérias Gram-positivas (Kadi *et al.*, 2010).



(36)

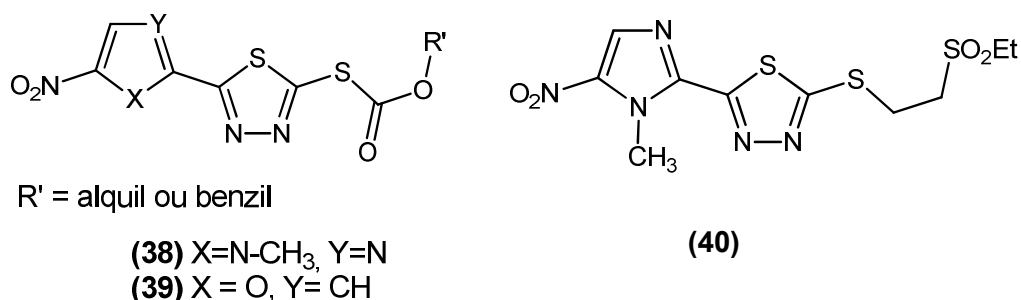


(37)

Gomha & Riyadh (2011) relatam atividades de derivados 1,3,4-tiadiazol contendo um núcleo indólico, enquanto que Dua e colaboradores (2010) e Thomasco e colaboradores (2003), respectivamente, apresentam o potencial de 1,3,4-tiadiazóis dissustituídos com núcleos tiazolidinonas e oxazolidinonas.

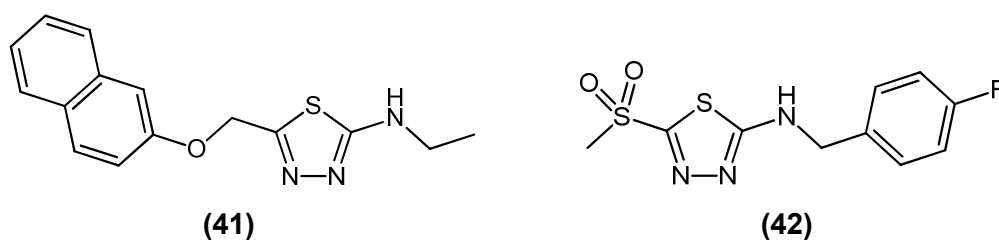
Vários 1,3,4-tiadiazóis contendo uma porção tioéter ou grupo sulfônico também apresentam atividades antimicrobianas, como a série apresentada por Padmavathi e colaboradores (2009). 2-Nitroaryl-5-tioxo-1,3,4-tiadiazóis são descritos como potentes agentes antituberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), sendo que entre os derivados nitro-imidazolil (**38**) e derivados nitro-furanil (**39**), os últimos mostraram-se menos tóxicos (Foroumadi *et al.*, 2005b). Os mesmos autores também apresentam 5-nitroaryl-1,3,4-tiadiazóis, porém com derivados sulfônicos na posição 2, como potentes agentes contra *Helicobacter pylori*, uma das bactérias com maior variedade genética conhecida, causadora de diversos

problemas gástricos. O derivado (40) foi o mais promissor da série (Foroumadi *et al.*, 2008).



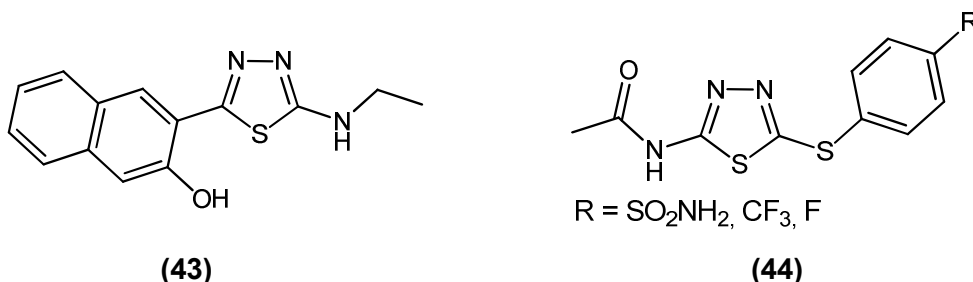
Atividades antifúngicas são relatadas por Matysiak & Malinski (2007) mostrando inibição de variedades resistentes de *candida albicans* e *não-albicans* spp. para uma série de mais de sessenta derivados 5-substituídos-2-amino-1,3,4-tiadiazóis. Alguns deles mostraram atividades comparáveis ou superiores aos fungicidas padrões.

Na busca por anti-inflamatórios não-esteroidais, Palaska e colaboradores (2002) apresentam uma série de 1,3,4-tiadiazóis contendo uma porção naftil, sendo que o mais ativo 5-aminoetil-2-(2-naftiloximetil)-1,3,4-tiadiazol (41), reduziu em apenas 34% o edema em pata de rato induzido por carragenina. Já Varandas e colaboradores (2005), apresentam o derivado *N*-(4-fluorbenzil)-5-(metilsulfonil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (42) como mais ativo que as drogas de referência utilizadas no mesmo tipo de teste anti-inflamatório *in vivo*.

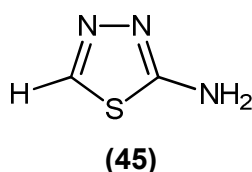


Núcleos 1,3,4-tiadiazóis também são reconhecidamente agentes atuantes sobre o sistema nervoso central. Dogan e colaboradores (2002) relatam o potencial anticonvulsivante de 1,3,4-tiadiazóis com porção naftil, destacando-se o derivado *N*-(etil)-5-(3-hidroxi-2-naftil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (43), que chegou a proteger em 90% convulsões induzidas em ratos pelo composto pentilenotetrazol. Comparados com drogas padrão, os derivados sintetizados por Sharma e colaboradores (2013) *N*-[5-(4-fenilsulfanil)-1,3,4-tiadiazol-2-il]acetamida (44) apresentaram excelentes atividades

antidepressiva, ansiolítica e anticonvulsivante. O autor destaca o incremento na lipofilicidade pela associação do grupamento aril ao núcleo 1,3,4-tiadiazol como importante para obtenção de boas atividades.

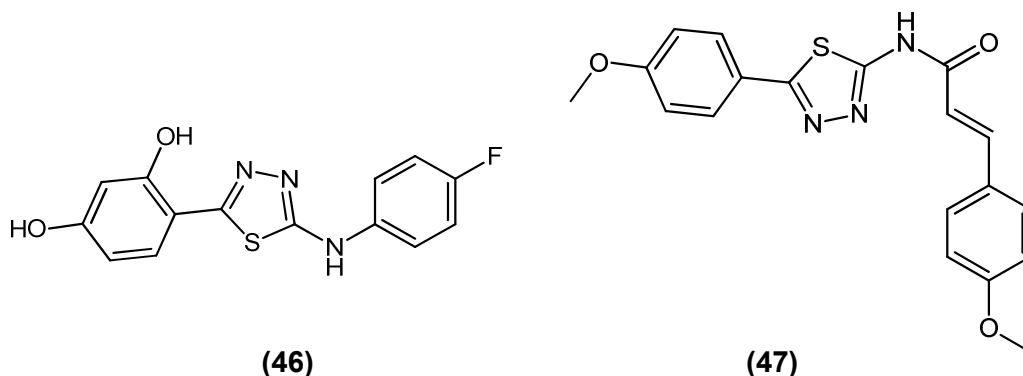


A molécula 2-amino-1,3,4-tiadiazol (**45**), também conhecida como ATDA ou NCS 4728, é alvo de diversos estudos clínicos anticâncer. No último deles, Asbury e colaboradores (1996) relatam seu uso em estudos clínicos de fase II para pacientes com câncer uterino mesodérmico misto. Análogos 2-amino-1,3,4-tiadazóis têm estimulado o interesse como antineoplásicos devido ao fato de não causarem forte mielossupressão e apresentarem pouca toxicidade hematológica. Acredita-se que este grupo de compostos atue bloqueando a polimerização de adenosina e guanossina monofosfato, o que leva ao aumento de ácido úrico como efeito colateral (Asbury *et al.*, 1996).

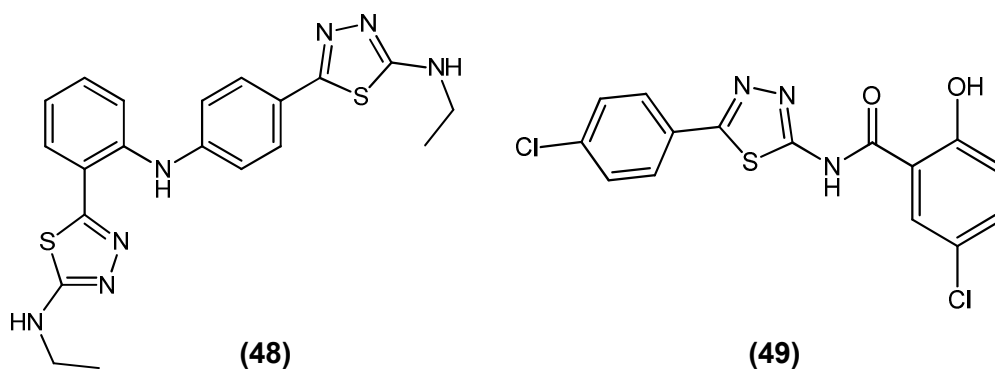


Derivados 2-fenilamino-5-fenil-1,3,4-tiadiazóis foram obtidos por Kumar e colaboradores (2011) e por Matysiak & Opolski (2006), dentre os quais diversos compostos foram encontrados como bons agentes antiproliferativos. O derivado 2-(4-fluorfenilamino)-5-(2,4-dihidroxifenil)-1,3,4-tiadiazol (**46**) recebeu destaque por apresentar atividade comparável à da cisplatina nos testes *in vitro* e também seletividade para alguns tipos de câncer (Matysiak & Opolski, 2006). Em trabalhos posteriores, o grupo de pesquisa caracterizou o composto por estudos computacionais (Rzeski *et al.*, 2007), bem como estudou seu mecanismo de ação em tumores de pulmão tipo células não pequenas (A549), sugerindo que o núcleo 1,3,4-tiadiazol atua inibindo a fosforilação de proteínas e não afeta a expressão gênica.

Atividades antineoplásicas são relatadas também para séries de 2-fenilamino-1,3,4-tiadiazóis contendo na posição 5 um grupamento indol-substituído (Kumar *et al.*, 2012), ou uma porção 5-fluoracil (Zheng *et al.*, 2008), ou uma porção cinamoilamida (Yang *et al.*, 2012a). Da última série, destaca-se o derivado (*E*)-3-(4-metoxifenil)-*N*-[5-(4-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol-2-il]acrilamida (**47**), que apresentou IC₅₀ de 0,28 µg.mL⁻¹ e 0.52 µg.mL⁻¹ para células tumorais de mama (MCF-7) e de pulmão tipo não pequenas (A549), respectivamente. Este estudo ainda avalia os 1,3,4-tiadiazóis como excelentes agentes antitubulínicos.



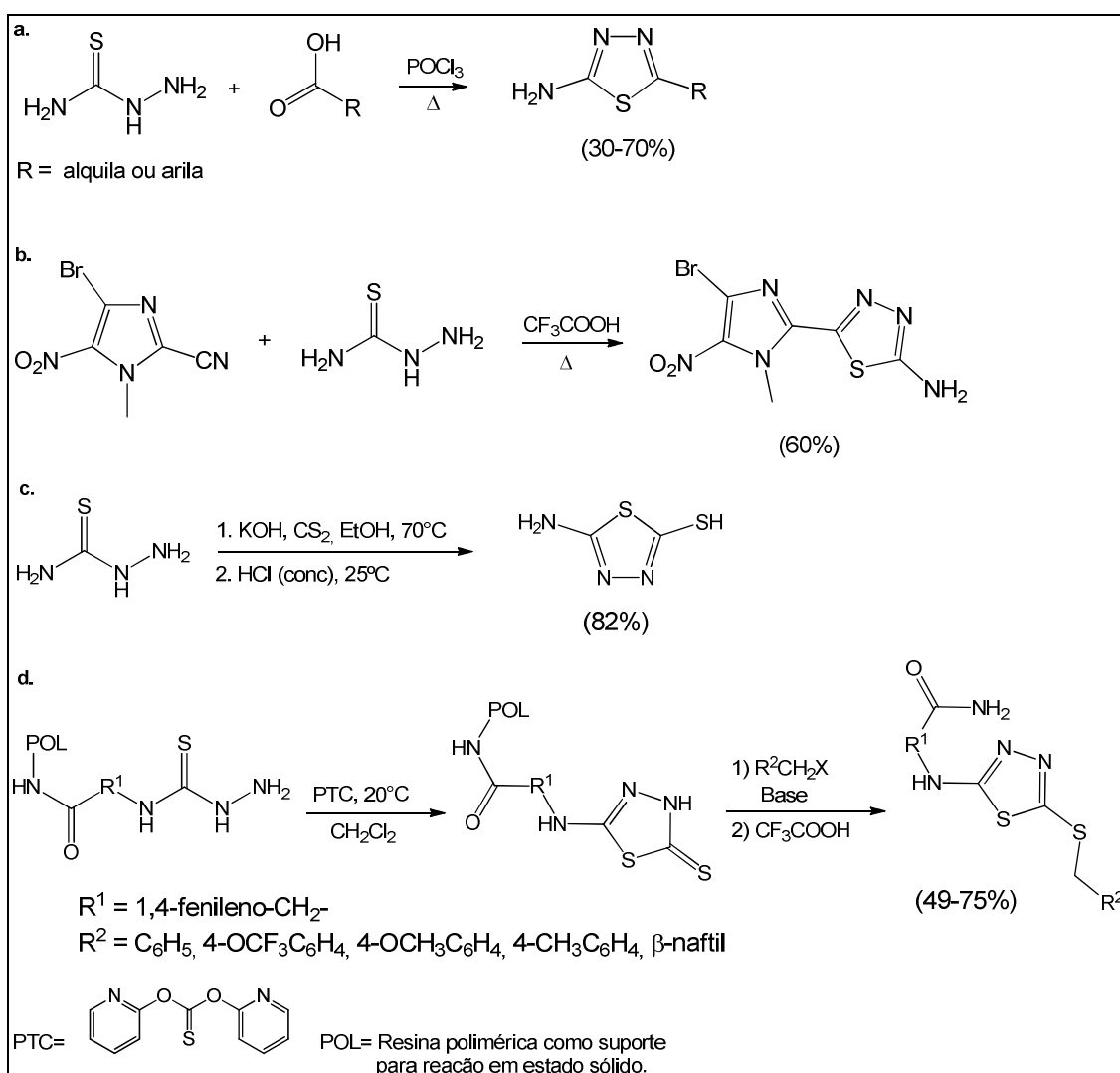
Bis-1,3,4-tiadiazóis sintetizados por Abou-seri (2010), também destacam-se entre os antineoplásicos, com o *N*-etil-5-{2-[4-(5-(etilamino)-1,3,4-tiadiazol-2-il)fenilamino]-fenil}-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**48**) apresentando IC₅₀ = 0,94 µmol.L⁻¹ para células tumorais de mama (MCF-7). 2-Arilamido-5-fenil-derivados foram avaliados contra células MCF-7 (câncer de mama) e B16-F10 (melanoma) por Yang e colaboradores (2012b). O derivado *N*-[5-(4-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-5-cloro-2-hidroxibenzamida (**49**) foi o mais ativo, com IC₅₀ de 0,45 e 0,31 µmol.L⁻¹, respectivamente para as linhagens citadas anteriormente.



1.4.3. Metodologias de síntese

Várias abordagens fornecem núcleos 1,3,4-tiadiazol a partir de tiossemicarbazidas (**Esquema 13**). Estas podem reagir com: ácido carboxílico em presença de oxicloreto de fósforo (Ferrari *et al.*, 2011), nitrilas em presença de ácido trifluoroacético (Ahad *et al.*, 2011; Chauvière *et al.*, 2003), dissulfeto de carbono em meio básico (Wang *et al.*, 2008), ou di-(2-piridil)-tionocarbonato (PTC) em suporte sólido (Kilburn *et al.*, 2003).

Esquema 13. Metodologias de síntese de 1,3,4-tiadiazóis via tiossemicarbazidas.

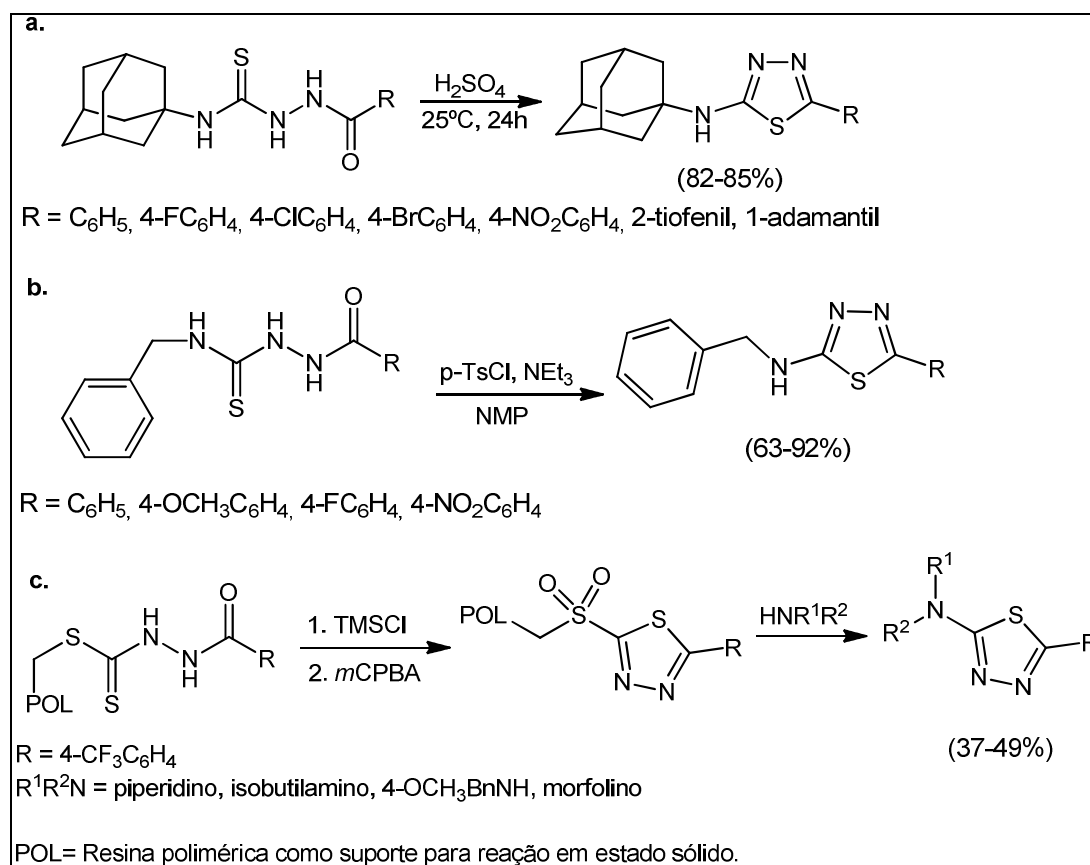


Ref: a. Ferrari *et al.*, 2011, b. Chauvière *et al.*, 2003, c. Wang *et al.*, 2008, d. Kilburn *et al.*, 2003.

A ciclodesidratação de aciltiossemicarbazidas, subclasse de tiossemicarbazidas, é outra metodologia bastante empregada na síntese de 1,3,4-tiadiazóis (**Esquema 14**). Este procedimento normalmente é realizado em

meio fortemente ácido (Chen *et al.*, 2010; Kadi *et al.*, 2007; Palaska *et al.*, 2002; Salgin-Gökşen *et al.*, 2007). Também é realizada síntese regioseletiva de 1,3,4-tiadiazóis a partir de aciltiossemicarbazidas com cloreto de tosila em *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) (Yang & Lee, 2012), com formação de 1,3,4-oxadiazóis como subproduto. Análogos acilditiocarbazatos também fornecem 1,3,4-tiadiazóis por ciclodesidratação em suporte sólido (Hwang *et al.*, 2005). No trabalho, os autores discutem a seletividade de reagentes, sendo que a melhor condição para síntese do núcleo sulfurado envolveu cloreto de trimetilsilano (TMSCl) e ácido *m*-cloroperoxibenzóico (*m*CPBA).

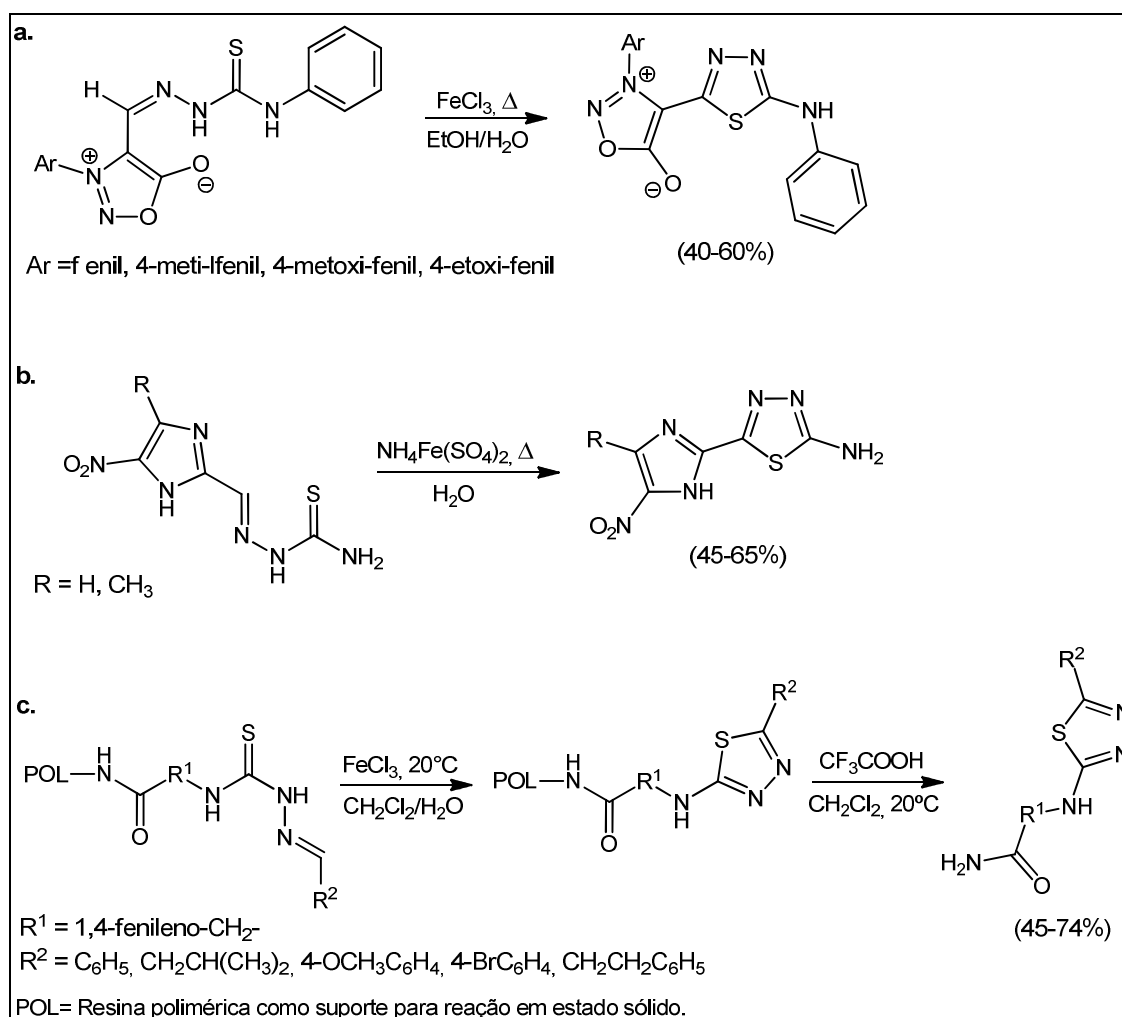
Esquema 14. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis por ciclodesidratação de aciltiossemicarbazidas e análogo acilditiocarbazato.



Ref: a.Kadi *et al.*, 2007; b. Yang & Lee, 2012; c. Hwang *et al.*, 2005.

A ciclização oxidativa de tiossemicarbazonas também fornece núcleos 1,3,4-tiadiazóis (**Esquema 15**). Nesta metodologia, íons Fe³⁺ são normalmente utilizados como agentes oxidantes, na forma de cloreto férrico, FeCl₃ (Shih & Wu, 2005), ou sulfato férrico de amônio, NH₄Fe(SO₄)₂ (Chauvière *et al.*, 2003; Foroumadi *et al.*, 2005a). O mesmo procedimento com cloreto férrico é descrito em fase sólida por (Kilburn *et al.*, 2003).

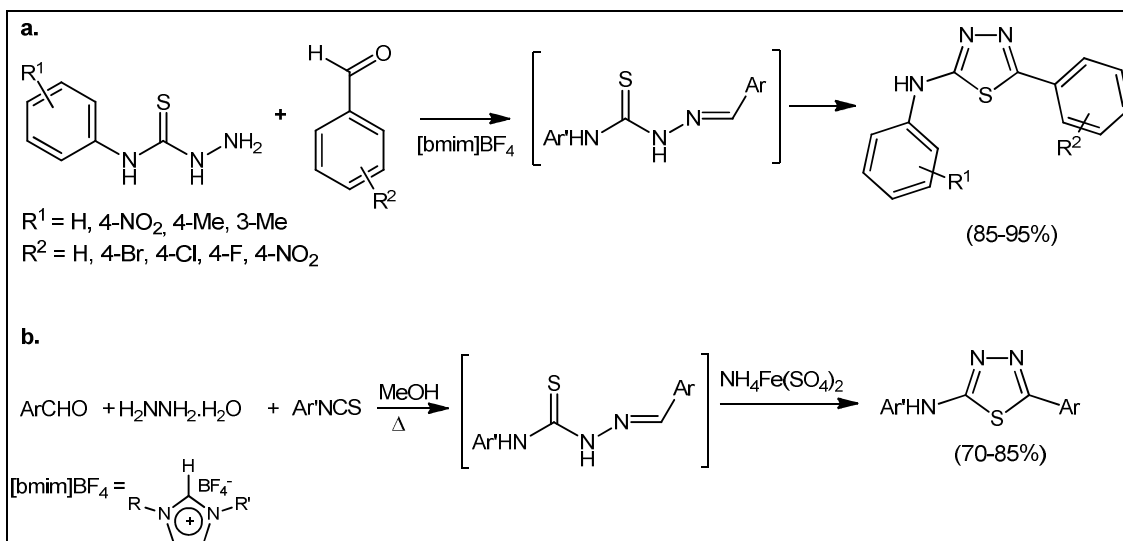
Esquema 15. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis a partir de ciclização oxidativa de tiossemicarbazonas.



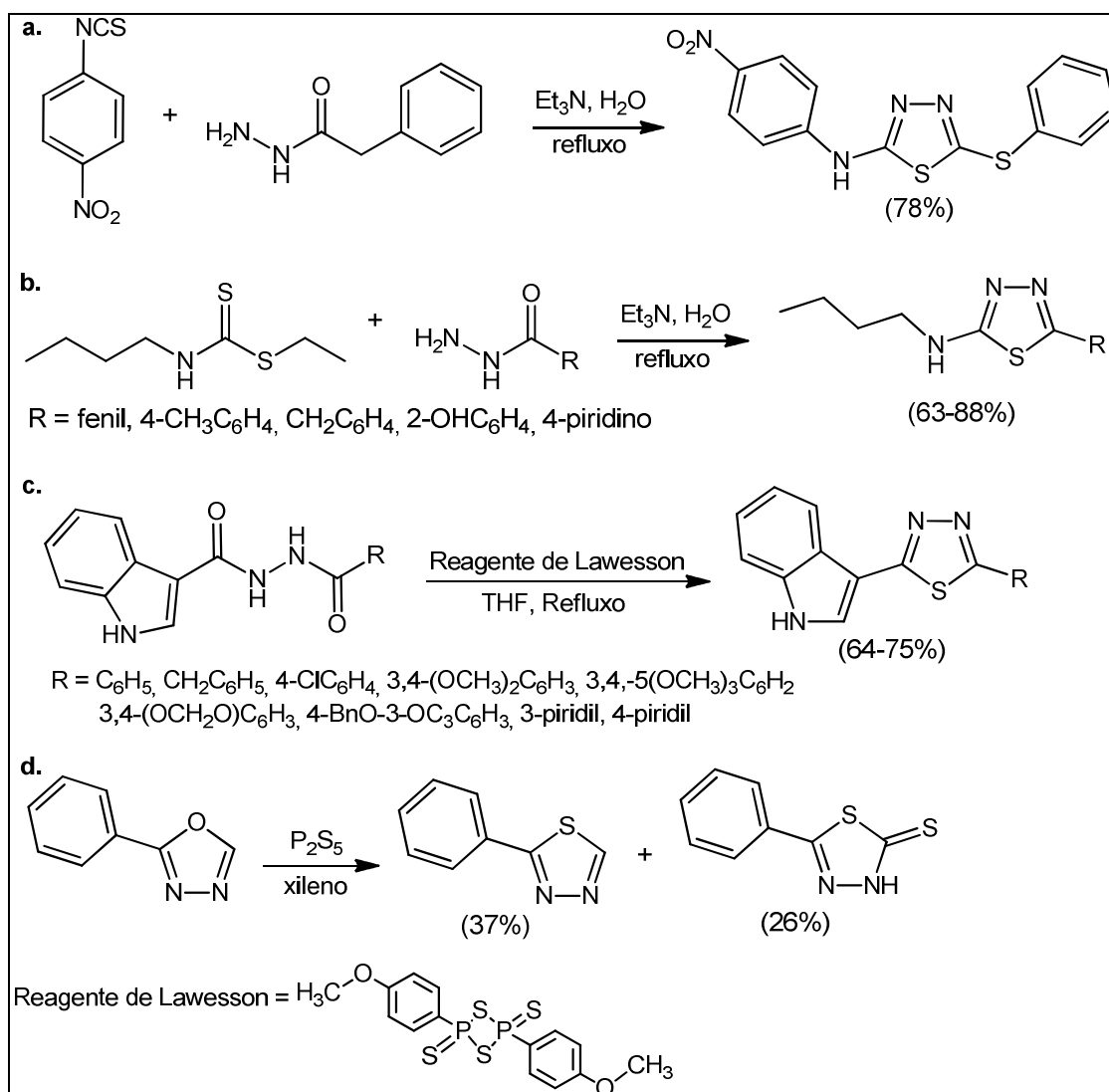
Ref: a. Shih & Wu, 2005; b. Chauvière *et al.*, 2003; c. Kilburn *et al.*, 2003.

Metodologias multicomponente para síntese de 1,3,4-tiadiazóis, passando por intermediários tiossemicarbazona são descritas por Rostamizadeh e colaboradores (2008) em líquido iônico, a partir de tiossemicarbazida e aldeídos, e por Kumar e colaboradores (2011), a partir de isotiocianato, hidrazina e aldeídos (**Esquema 16**).

Outras metodologias de síntese de 1,3,4-tiadiazóis envolvem hidrazidas em presença de isotiocianatos e ditiocarbamatos (Aryanasab *et al.*, 2010), ou 2-acilidrazidas em presença do reagente de Lawesson para promover a tiocarbonilação (Kumar *et al.*, 2010), sendo que a ciclodesidratação ocorre diretamente em ambos os casos. A conversão de 1,3,4-oxadiazóis a 1,3,4-tiadiazóis é possível com pentassulfeto de fósforo, porém a metodologia fornece tiadiazolina-5-tiona como subproduto (Ainsworth, 1958). Estes procedimentos são apresentados no **Esquema 17**.

Esquema 16. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis por metodologias multicomponente.


Ref: a. Rostamizadeh *et al.*, 2008; b. Kumar *et al.*, 2011.

Esquema 17. Síntese de 1,3,4-tiadiazóis a partir de hidrazidas e por conversão de 1,3,4-oxadiazóis.


Ref: a, b. Aryanasab *et al.*, 2010; c. Kumar *et al.*, 2010; d. Ainsworth, 1958.

1.5. Câncer

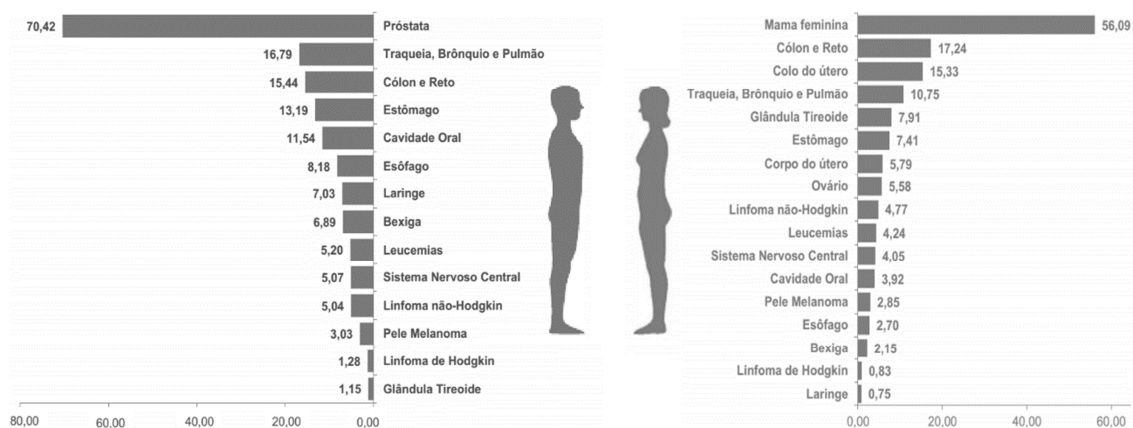
O câncer é um termo genérico utilizado para a um conjunto de mais de 100 doenças que podem afetar qualquer parte do corpo humano. O aspecto em comum deste grupo de doenças é o crescimento rápido e anormal de células, que podem se espalhar para órgãos e tecidos, comprometendo várias partes do organismo de um indivíduo (Organização Mundial da Saúde, 2013a).

1.5.1. Números da doença

Em 2012 estima-se que a doença foi diagnosticada em 14,1 milhões de novos pacientes, bem como levou 8,2 milhões de pessoas a óbito, sendo uma das principais causas de morte no mundo. As novas incidências mais frequentes foram os cânceres de pulmão, mama e cólon, e as maiores causas de morte foram os cânceres de pulmão, fígado e estômago (International Agency for Research on Cancer, 2013).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (2013a), a doença continuará a avançar nos próximos anos, causando mais de 13,1 milhões de mortes em 2030. No Brasil, esperam-se cerca de 580 mil casos novos da doença para o ano de 2014, com o câncer de pele tipo não melanoma sendo o de maior incidência, seguido por próstata e mama. O número de casos esperados para homens e mulheres no país para cada tipo de câncer é apresentado na **Figura 5** (INCA, 2013).

Figura 5. Taxas brutas de incidência primária de câncer exceto pele não-melanoma estimadas para homens e mulheres em 2014 no Brasil. Valores por 100 mil indivíduos.

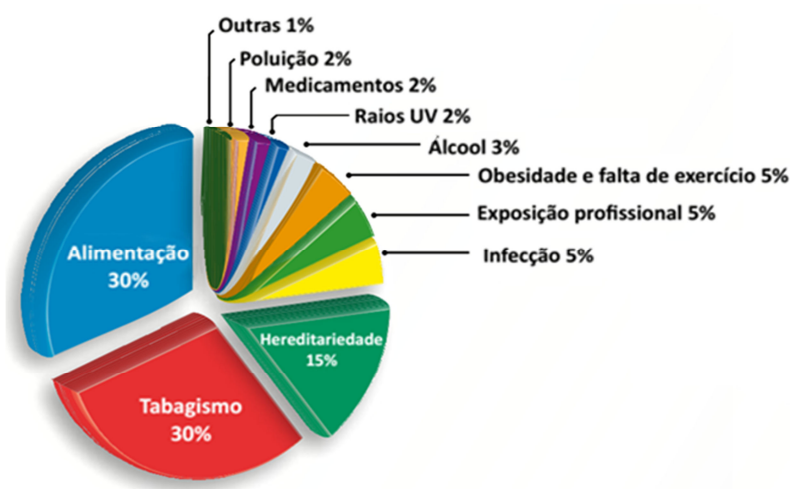


(Fonte: Inca, 2013)

1.5.2. Causas e evolução do câncer

O processo de formação do câncer (oncogênese) geralmente acontece lentamente, podendo levar anos até o seu estabelecimento. Seu surgimento pode estar associado a fatores internos (predeterminações genéticas) ou externos (exposição a carcinógenos físicos, químicos ou biológicos) ao organismo. Até 85% dos casos de câncer são associados aos fatores externos, como pode ser observado na **Figura 6** (Organização Mundial da Saúde, 2013a; Ministério da Saúde & INCA, 2014).

Figura 6. Estatísticas sobre causas de câncer. Fonte: Inca, 2012.



A partir da combinação de fatores externos e internos, uma célula normal pode ser geneticamente modificada por um processo multi-estágios e passar a se proliferar. No caso de tumores benignos ou displasias, o crescimento celular é lento e se dá de forma organizada, cessando após o término do estímulo que o induziu. Porém, caso este crescimento seja descontrolado e persista de maneira excessiva, mesmo após o fim do estímulo, tem-se caracterizado o tumor maligno, também denominado câncer ou neoplasia maligna.

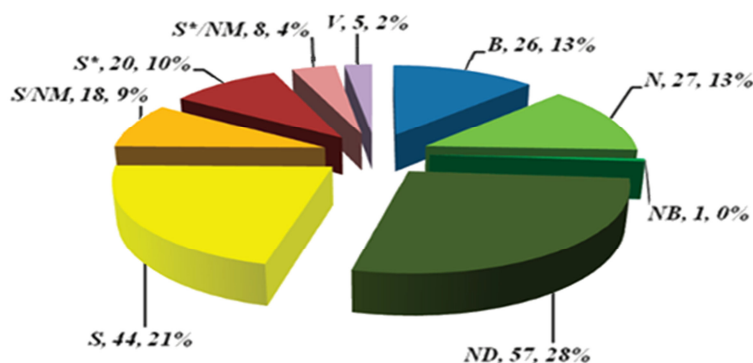
A maioria dos tumores malignos invade tecidos vizinhos, dissemina-se pelo organismo do indivíduo e inicia novos focos de tumor. Este processo, denominado metástase, é o que torna mais difícil o tratamento de cânceres e é o principal motivo das mortes provocadas pela doença (Ministério da Saúde, 2013).

1.5.3. Quimioterápicos no tratamento do câncer

A quimioterapia é um dos três principais tipos de tratamento para o câncer, ao lado da radioterapia e de procedimentos cirúrgicos. Seu objetivo pode ser a cura, o prolongamento da vida útil e/ou a melhora na qualidade de vida do paciente (INCA, 2012).

Segundo o último levantamento apresentado por Newman & Cragg (2012), até 2010 eram 206 o número de quimioterápicos aprovados em todo o mundo para o tratamento do câncer. Classificados em biológicos (B – proteínas ou cadeias maiores que 45 resíduos de peptídeos), produtos naturais (N) ou natural botânico (NB), derivados de produto natural ou semissintéticos (ND), totalmente sintéticos (S), realizados por síntese total, mas com grupo farmacofórico de produto natural (S*), vacinas (V) e produtos naturais mimetizados (/NM), os 206 compostos descobertos a partir da década de 1940 estão categorizados na **Figura 7**. Excetuando-se compostos de alta massa molecular (V e B), são 175 substâncias químicas existentes para terapias oncológicas. Quase dois terços desta quantidade são produtos sintéticos ou semissintéticos.

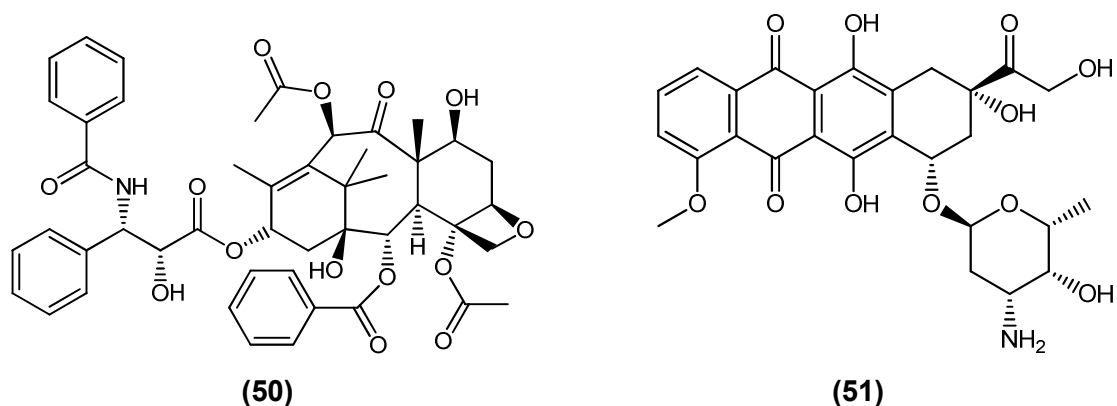
Figura 7. Todas as drogas anticâncer aprovadas entre a década de 1940 e o ano de 2010, classificadas por modo de obtenção.



Fonte: Newman & Cragg, 2012.

Os quimioterápicos apresentam mecanismos de ação variados, atuando sobre diversas etapas do ciclo celular e sua regulação. Eles podem ser subdivididos em mais de dez classes, como por exemplo agentes tubulínico-interativos, inibidores de proteína quinase, inibidores de topoisomerases, agentes DNA-interativos, agentes indutores de apoptose, dentre outros (Cragg *et al.*, 2009).

Dentre estes compostos, estão drogas padrão comumente utilizadas para ensaios pré-clínicos e *in vitro* de atividades biológicas, como o paclitaxel (50), um agente tubulínico-interativo, aprovado em 1993, e a doxorubicina (51), um inibidor de topoisomerase II, introduzido no mercado em 1966 (Cragg *et al.*, 2009; Suggitt & Bibby, 2005).



1.6. Tripanossomíase Americana (doença de Chagas)

1.6.1. Aspectos gerais e epidemiológicos

A tripanossomíase americana, ou doença de Chagas, é uma infecção parasitária causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, endêmica de 21 países da América Latina. A doença acomete cerca de 7 a 8 milhões de pessoas no mundo e, segundo o último levantamento nacional, 3 milhões no Brasil (Organização Mundial da Saúde, 2013b; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

Identificada pelo médico sanitário brasileiro Carlos Chagas em 1909, esta doença está associada a áreas de moradias rudimentares, principalmente em regiões rurais e periurbanas (Coura & Dias, 2009). Hoje, é classificada como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde, sendo a mais impactante dentre as doenças parasitárias na economia dos países em que é endêmica (Guhl & Lazdins-Helds, 2007; Organização Mundial da Saúde, 2010).

A principal forma de transmissão desta antropozoonose é através de insetos-vetores infectados com o protozoário *T. cruzi*, por meio de sua picada e fezes. Formas secundárias de contrair a doença incluem transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão vertical (transplacentária ou no parto), acidental (manejo dos vetores ou acidentes de laboratório) e ingestão de

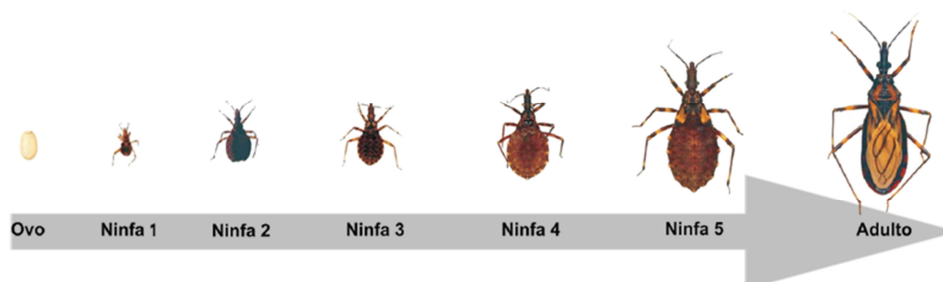
alimentos contaminados, incluindo o leite materno (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011).

1.6.2. Vetores, reservatórios e ciclo da doença

A doença de Chagas pode ser transmitida a mamíferos como o homem, animais domésticos e silvestres, totalizando mais de 150 reservatórios possíveis para o *T. cruzi* (Rassi & Marin-Neto, 2010). Aves, répteis e anfíbios não são infectáveis com o protozoário, porém são fontes de alimentação para os insetos transmissores (Rassi & Marcondes de Rezende, 2012).

Os vetores da doença de Chagas são todos percevejos hematófagos conhecidos popularmente como “bicho barbeiro” ou “chupança” (**Figura 8**), pertencentes à subfamília *triatominae*, que é composta de 137 espécies. Destas, as principais responsáveis por infectar o homem e animais domésticos são: *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. sordida*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus* (Argolo *et al.*, 2008). A espécie *T. infestans*, a única que se propaga em ambiente estritamente doméstico, vem sendo ou já está erradicada em alguns países da América Latina, como forma de prevenção da doença (Coura & Dias, 2009).

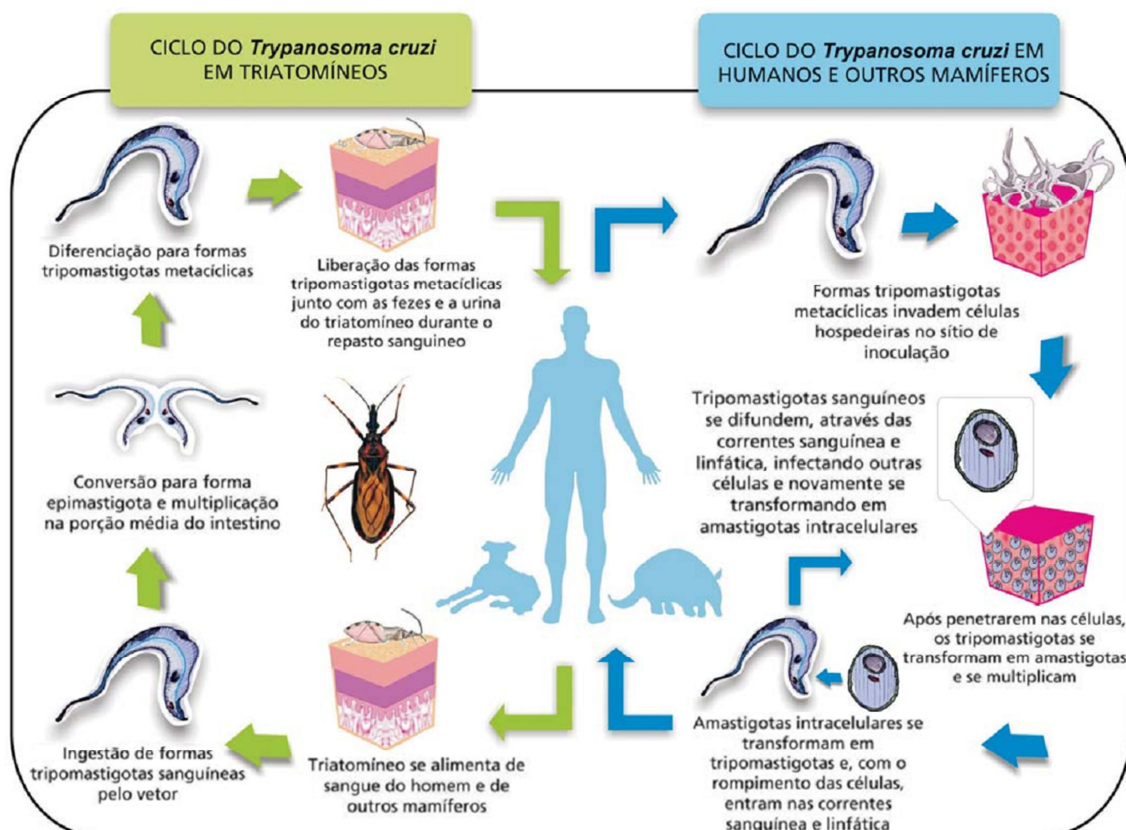
Figura 8. Um bicho barbeiro (*Triatoma brasiliensis*) e seus estágios de vida.



Os triatomíneos em qualquer estágio de vida são infectados ao sugar o sangue de um animal que já contém o *T. cruzi*. Uma vez portador do protozoário, o vetor transmite a doença ao picar outro mamífero sadio e defecar próximo ao local da picada. São as fezes deste barbeiro que apresentam o *T. cruzi* na forma tripomastigota (alongada e flagelada) e que levam à contaminação do hospedeiro se esta é introduzida no orifício da picada (Argolo *et al.*, 2008).

Uma vez no organismo do hospedeiro, o ciclo da doença se desenvolve como apresentado na **Figura 9**. As células próximas ao local da picada tornam-se infectadas por formas amastigotas do protozoário (ovoides e não flagelada). Após se multiplicarem no tecido do hospedeiro, os protozoários vão para a corrente sanguínea e sistema linfático, onde reassumem a forma tripomastigota, espalham-se pelo organismo e infectam mais tecidos.

Figura 9. Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Fonte: Argolo *et al.*, 2008.



A forma tripomastigota sugada por um triatomíneo juntamente com o sangue de um hospedeiro infectado, ao picá-lo, sofre diferenciação para epimastigota no organismo do inseto. Ela é a forma típica do *T. cruzi* nos vetores e converte-se novamente em tripomastigota apenas na porção média do intestino do mesmo (Argolo *et al.*, 2008).

1.6.3. Evolução da doença e tratamentos disponíveis

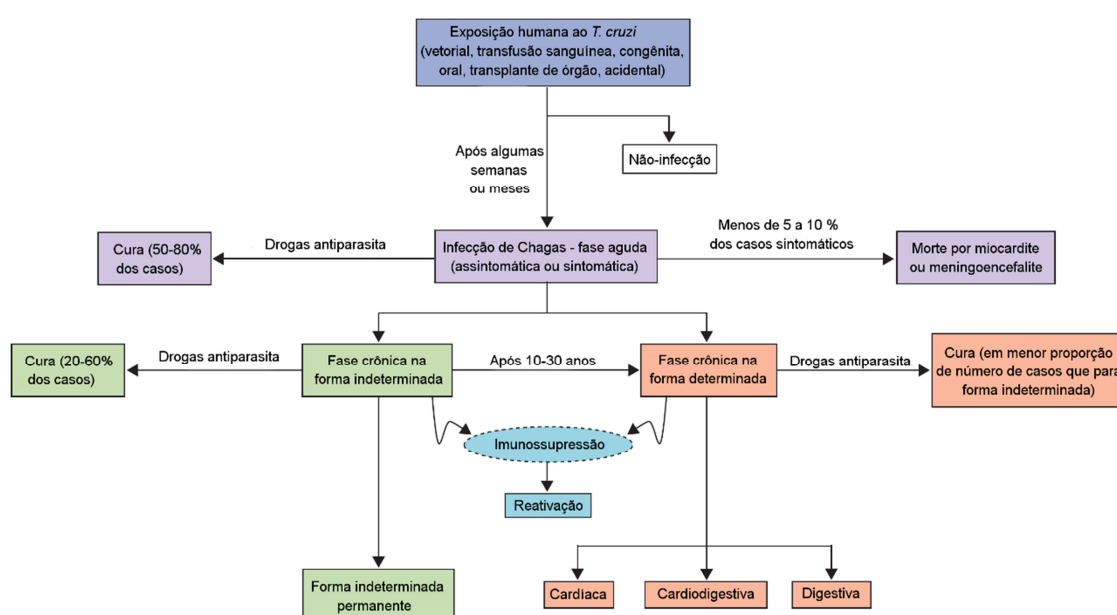
A doença de Chagas apresenta classicamente duas fases clínicas: uma aguda, ou inicial, que evolui para uma fase crônica. De acordo com suas

manifestações clínicas, a segunda pode ser categorizada em forma indeterminada, cardíaca ou digestiva (Nunes *et al.*, 2013).

A fase aguda se dá nas primeiras semanas ou meses de contração da doença, período de nível elevado de protozoários tripomastigotas na corrente sanguínea do hospedeiro. Neste estágio a doença pode ser assintomática ou apresentar sintomas inespecíficos. No caso da transmissão vetorial, sinais como lesão e inchaço ao redor do local da picada (chagoma) ou inchaço em uma das pálpebras (Romaña) podem aparecer (Rassi & Marin-Neto, 2010).

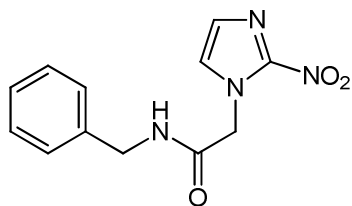
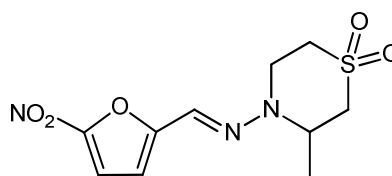
A fase crônica apresenta formas amastigotas do protozoário alocadas em tecidos-alvo, especialmente no coração e nos músculos digestivos, existindo poucos parasitas na corrente sanguínea. Inicialmente esta fase é assintomática e não há comprometimento do sistema cardíaco ou digestivo do paciente. Esta forma indeterminada da doença é vitalícia na maioria dos pacientes, mas pode evoluir tardiamente para outras complicações. A doença pode evoluir para a forma cardíaca, levando a problemas no coração e sistema cardíaco, ou para a forma digestiva, promovendo aumento do esôfago e do cólon. Em alguns casos pode-se verificar complicações tanto no sistema digestivo quanto cardíaco, caracterizando a forma cardiodigestiva da doença (Organização Mundial da Saúde, 2010; Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011). Toda a evolução da doença é resumida na **Figura 10**.

Figura 10. Evolução da doença de Chagas no homem.



Fonte: Rassi & Marin-Neto, 2010.

O tratamento da doença de Chagas é recomendado para todos os casos em fase aguda ou crônica em estágio inicial, situações em que há mais chances de cura (**Figura 10**). Os dois medicamentos existentes para o tratamento da doença de Chagas, desenvolvidos há mais de quatro décadas, são o benzinidazol (**52**), droga padrão, comercializada com o nome de Rochagan[®] no Brasil, e o nifurtimox (**53**), de nome comercial Lampit[®] (Coura, 2009).

**(52)****(53)**

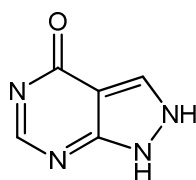
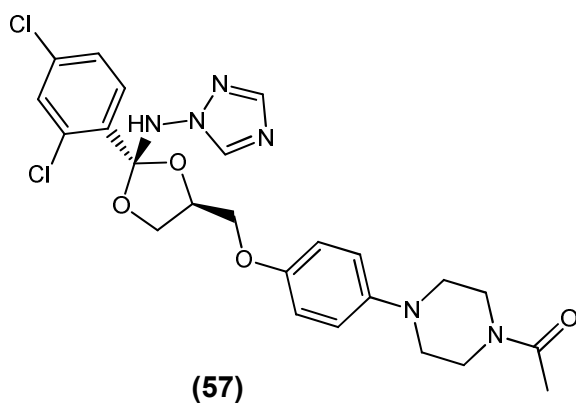
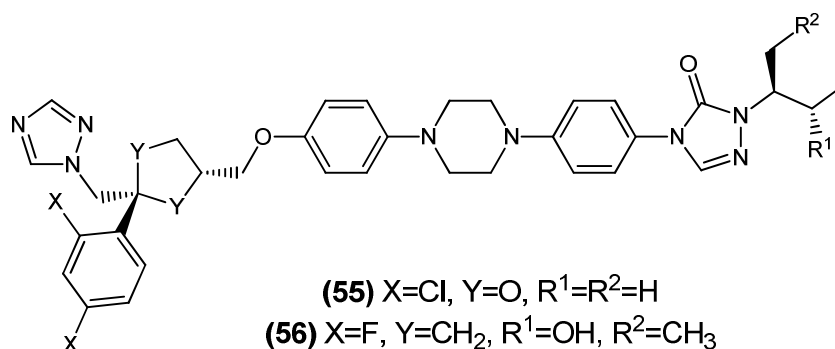
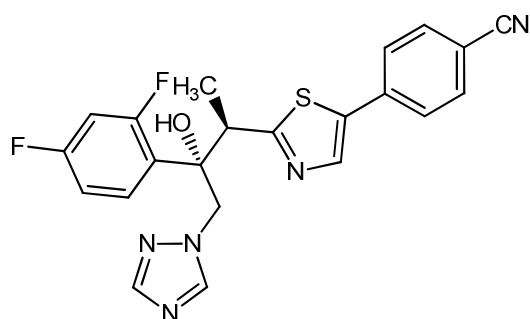
Nenhuma destas drogas segue os preceitos de medicamento ideal definido pela Organização Mundial da Saúde – (i) cura parasitológica de casos agudos e crônicos; (ii) eficácia em até poucas doses; (iii) baixo custo de aquisição; (iv) não provocar efeitos colaterais; (v) não exigir hospitalização para o tratamento; (vi) não induzir resistência ao princípio ativo. Ao contrário, a eficácia dos medicamentos é mínima para casos crônicos avançados, o tratamento recomendado se estende por meses, há diversos efeitos colaterais graves e algumas cepas do *T. cruzi* são resistentes à medicação. Entretanto, estas continuam sendo as drogas de primeira linha (Coura & Castro, 2002; Coura, 2009).

Estas duas substâncias apresentam mecanismos de ação distintos no organismo. O nifurtimox age através de estresse oxidativo, formando radicais nitro-aniônicos e liberando agentes como O^{2-} e H_2O_2 que são tóxicos ao *T. cruzi*. Já o benznidazol fornece derivados reduzidos ao ser metabolizado no organismo, que se ligam covalentemente a macromoléculas do protozoário, como o DNA e outras proteínas, levando-o à morte (Coura, 2009; Maya *et al.*, 2003).

Na tentativa de melhorar a eficácia dos medicamentos, são relatados novos sistemas de entrega das drogas no organismo, como formas micro e nanoparticuladas dos compostos, transformações dos mesmos em complexos

metálicos, incorporação de porções lipossômicas à estrutura primária dos mesmos, dentre outros (Salomon, 2012).

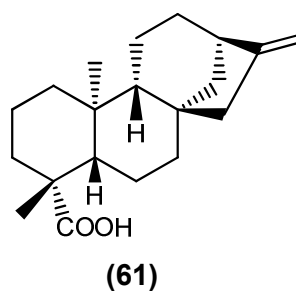
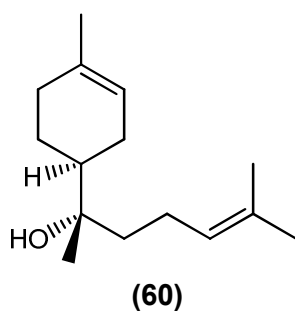
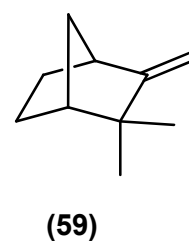
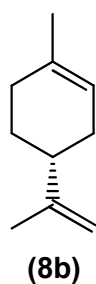
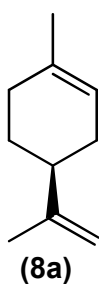
Recentemente, drogas existentes para outros fins e que mostraram boa atividade antiprotozoário vêm sendo submetidas a testes clínicos contra o *T. cruzi*. É o caso do alopurinol (**54**), um análogo de hipoxantina, e agentes antifúngicos, como o itraconazol (**55**), o posoconazol (**56**), cetoconazol (**57**), ravuconazol (**58**), dentre outros triazóis (Urbina & Docampo, 2003). Alguns autores sugerem a associação destes compostos com um dos medicamentos padrão, embora sua eficácia ainda seja controversa (Coura, 2009; Silva *et al.*, 2012).

**(54)****(57)****(58)**

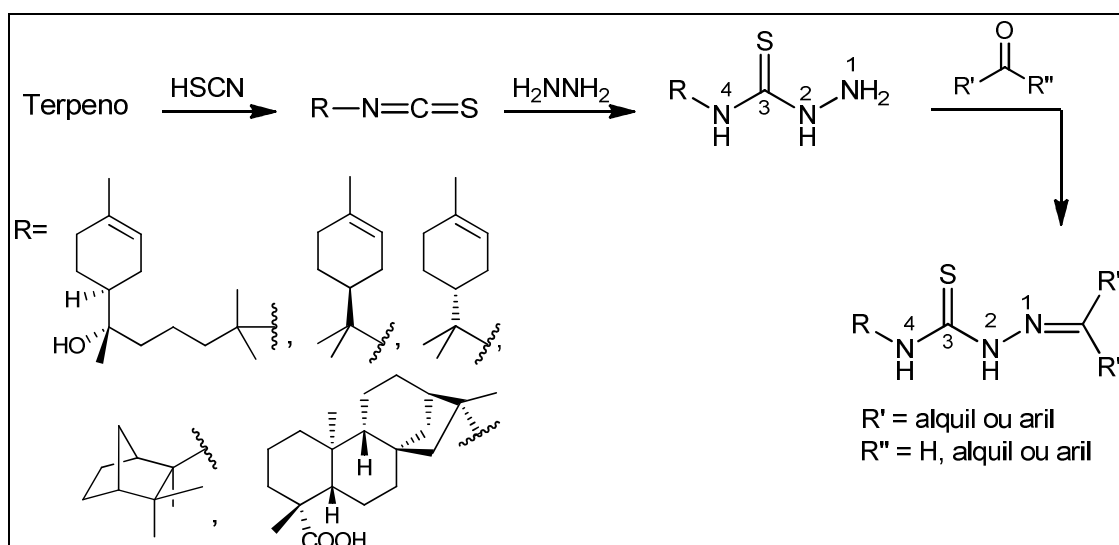
2. PROPOSTA DE TRABALHO

Os 1,3,4-tiadiazóis apresentam um amplo potencial farmacológico e podem ser obtidos através de diversas metodologias, enquanto que as aciltiossemicarbazidas são intermediários sintéticos de grande utilidade na formação de diversos núcleos heteroaromáticos. Ao mesmo tempo, o limoneno apresenta vasta gama de atividades biológicas e é um importante bloco sintético de construção abundante e de baixo custo para novas moléculas opticamente ativas.

A partir da metodologia de síntese de isotiocianoterpenos desenvolvida pela orientadora deste trabalho (Silva *et al.*, 1993), nosso grupo de pesquisa estabeleceu como linha de pesquisa sintética o desenvolvimento de compostos nitrogenados tendo estes derivados terpênicos como precursores. Com isto, foram desenvolvidos trabalhos de síntese de tiossemicarbazidas e séries de tiossemicarbazonas (**Esquema 18**) dos monoterpenos *S*-(-)-limoneno (**8a**) (Batista, 2010), *R*-(+)-limoneno (**8b**) (Silva, 2010; Vandresen, 2011) e (-)-canfeno (**59**) (Coelho, 2011), do sesquiterpeno α -bisabolol (**60**) (Silva, 2009) e do diterpeno ácido caurenóico (**61**) (Haraguchi, 2009).

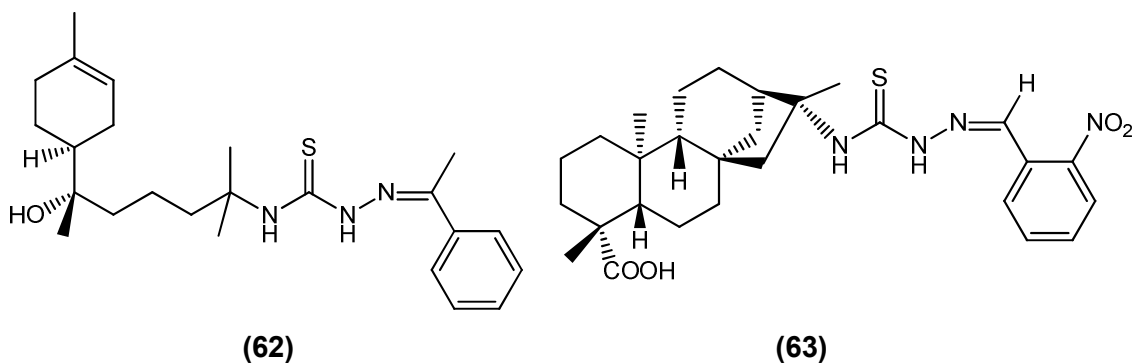


Esquema 18. Rota sintética para obtenção de tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas terpênicas.

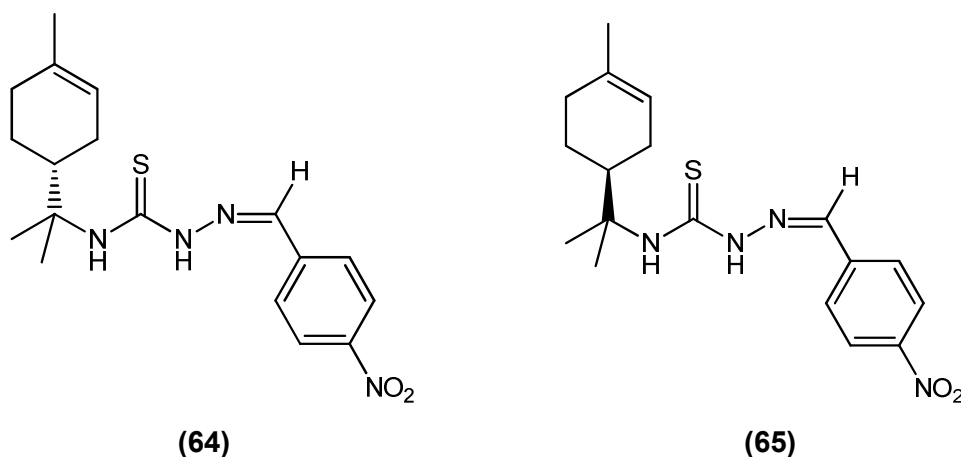


As tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas sintetizadas em nosso grupo de pesquisa têm como diferencial o substituinte terpênico na posição *R* em *N*-4. Até o início destes trabalhos, que tinham por objetivo a junção de moléculas bioativas visando estudar seu efeito cooperativo, não havia relatos na literatura de compostos com esta classe de substituintes naturais em *N*-4.

A grande maioria dos compostos sintetizados mostrou-se biologicamente ativa e vários resultados promissores já foram obtidos. A série de tiossemicarbazonas benzaldeídicas e cetônicas derivadas do α -bisabolol apresentou potente atividade antiproliferativa *in vitro* para células tumorais, especialmente contra leucemia (Silva *et al.*, 2010). O derivado *N*(1)-(fenil-metil-cetona)-*N*(4)-{[(2*S*)-2-hidroxi-6-metil-2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1il]heptan-6-il]}tiossemicarbazona (**62**) foi o mais ativo da série, com $\text{TGI} = 0,07 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $\text{IS} = 505$ para as células tumorais de leucemia (K-562). Submetidos à atividade antitripanossômica *in vitro*, algumas tiossemicarbazonas do ácido caurenóico chegaram a apresentar IC_{50} da ordem de micromolar, como o derivado (**63**) *N*(4)-(ácido ent-cauren-16 β -metil-19-óico)-*N*(1)-(*E*)-(2-nitrofenil)-tiossemicarbazona para formas epimastigotas de *T. cruzi* ($\text{IC}_{50} = 2,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$), apesar de considerável citotoxicidade (para células LLC-MK₂) (Haraguchi *et al.*, 2011).



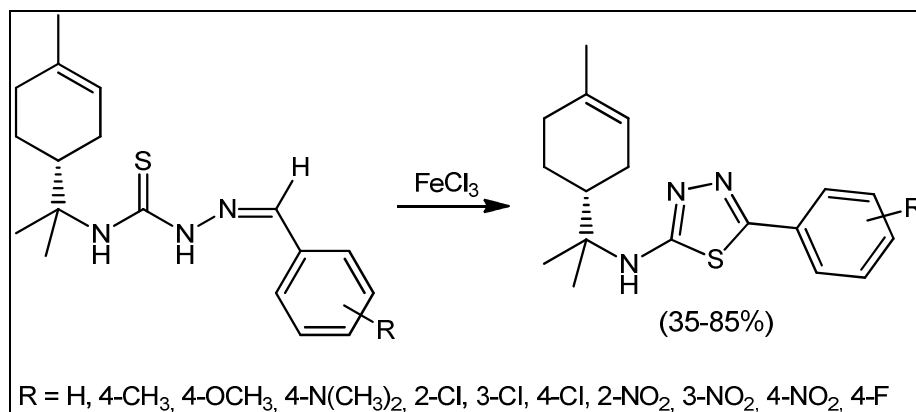
Enfatizando a diferença de bioatividade de estereoisômeros, merece destaque as atividades biológicas das 4-nitro-benzaldeidotiossemicarbazonas derivadas do *R*-(+)-limoneno (**64**) (Silva, 2010) e do *S*-(-)-limoneno (**65**) (Batista, 2010). Ambas foram avaliadas *in vitro* em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, encontrando-se excelentes resultados de atividade ($IC_{50} = 3,00$ e $2,44 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente). Porém a citotoxicidade apresentada pelo derivado *N*(4)-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-*N*(1)-(4-nitrobenzaldeído)tiossemicarbazona (**65**) foi vinte vezes menor ($CC_{50} > 2800 \mu\text{mol.L}^{-1}$) que de seu enantiômero. O composto está na etapa de testes *in vivo* e foi patenteado (Silva, C. *et al.*, 2011), por ser um potencial agente antileishmania.



A partir das tiossemicarbazonas, uma série de 1,3,4-tiadiazóis derivada do *R*-(+)-limoneno foi sintetizada (**Esquema 19**). Avaliações antitumoral e antileishmania *in vitro* dos heterocíclicos mostraram grande potencial biológico dos mesmos, como por exemplo, do derivado 5-(*p*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol para células tumorais de rim 746-0 ($GI_{50} = 1,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e dos derivados 5-[*p*-(dimetilamino)fenil]-1,3,4-tiadiazol e 5-(*p*-metilfenil)-1,3,4-tiadiazol em

formas promastigotas de *L. amazonensis*, cujos IC_{50} foram ambos de $5,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Vandresen, 2011).

Esquema 19. Série de 1,3,4-tiadiazóis do *R*-(+)-limoneno sintetizados a partir de tiossemicarbazonas.



A partir do que foi exposto, nota-se o grande potencial biológico dos derivados terpênicos nitrogenados sintetizados pelo nosso grupo de pesquisa, incluindo a diferença de atividades e seletividade que estereoisômeros podem apresentar. De tal forma, o presente trabalho visa a complementação da série de 1,3,4-tiadiazóis do *R*-(+)-limoneno e a síntese de seus enantiômeros, avaliando e, quando possível, comparando o potencial biológico destes. Este trabalho ainda busca estabelecer uma rota sintética de aciltiossemicarbazidas do limoneno, a fim de que possam servir como compostos bioativos ou como intermediários sintéticos em trabalhos futuros, para novos derivados heterocíclicos com potencial biológico.

3. OBJETIVOS

Considerando-se o potencial biológico para ambos enantiômeros do limoneno, para o núcleo 1,3,4-tiadiazol e para as aciltiossemicarbazidas, bem como o respaldo sintético para obtenção destes núcleos a partir de terpenos insaturados, este trabalho tem por objetivos:

- Desenvolver uma rota de síntese de aciltiossemicarbazidas, para ser obtida uma série de quatro aciltiossemicarbazidas de cada enantiômero do limoneno, a partir dos ésteres acetato de etila, benzoato de metila, 2-fenilacetato de metila e da isonicotinoidrazida;
- Aperfeiçoar a metodologia de obtenção de 1,3,4-tiadiazóis pela rota de ciclização oxidativa, para sintetizar as séries de 1,3,4-tiadiazóis:
 - Do *S*-(-)-limoneno a partir dos aldeídos tiofenocarboxaldeído, 5-nitrotiofenocarboxaldeído, furaldeído, 5-nitrofuraldeído, cinamaldeído, benzaldeído e dos derivados 2-nitro, 3-nitro, 4-nitro, 2-cloro, 3-cloro, 4-cloro, 2-flúor, 3-flúor, 4-flúor, 4-bromo, 4-metil, 4-metóxi, 4-*terc*-butil, 4-trifluormetil e 4-dimetilamino do benzaldeído;
 - Do *R*-(+)-limoneno a partir dos aldeídos tiofenocarboxaldeído, 5-nitrotiofenocarboxaldeído, furaldeído, 5-nitrofuraldeído, cinamaldeído, benzaldeído e dos derivados 2-flúor, 3-flúor, 4-bromo, 4-*terc*-butil e 4-trifluormetil do benzaldeído;
- Avaliar a atividade anti-*Trypanosoma cruzi in vitro*:
 - De todos os 1,3,4-tiadiazóis sintetizados em formas tripomastigotas de *T. cruzi*;
 - De todas as aciltiossemicarbazidas sintetizadas em formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e citotoxicidade dos compostos ativos;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* de todos os 1,3,4-tiadiazóis e aciltiossemicarbazidas sintetizados em diversas linhagens de células tumorais e na linhagem não tumoral queratinócito.

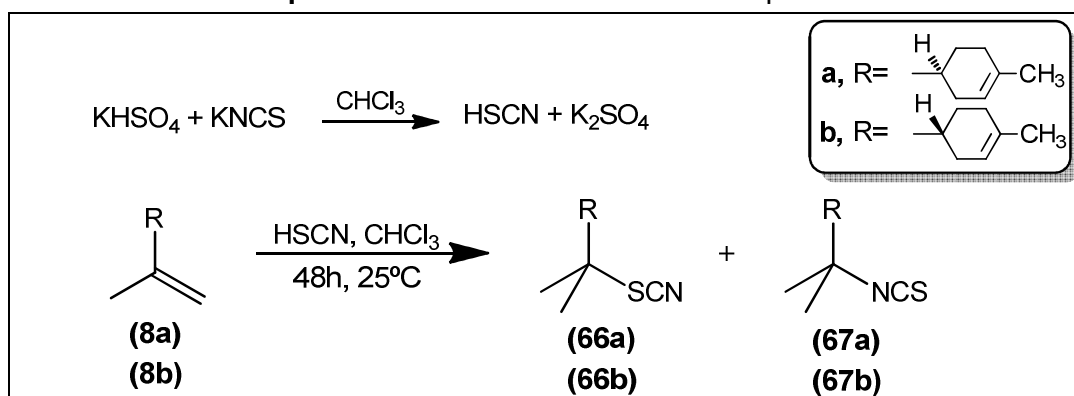
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer desta seção será utilizada uma nomenclatura simplificada em detrimento da nomenclatura sistemática, a fim de facilitar a referência aos compostos sintetizados. Ambas as nomenclaturas para os compostos sintetizados encontram-se no **Anexo A**, ao final desta dissertação.

4.1. Síntese

4.1.1. Isotiocianoterpenos (**67a-b**)

Esquema 20. Síntese dos isotiocianoterpenos.



Os isotiocianoterpenos do limoneno (**67a-b**) foram preparados conforme metodologia da literatura descrita para o enantiômero *R* (Oliveira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 1993) e obtidos juntamente com os respectivos tiocianoterpenos (**66a-b**) (**Esquema 20**).

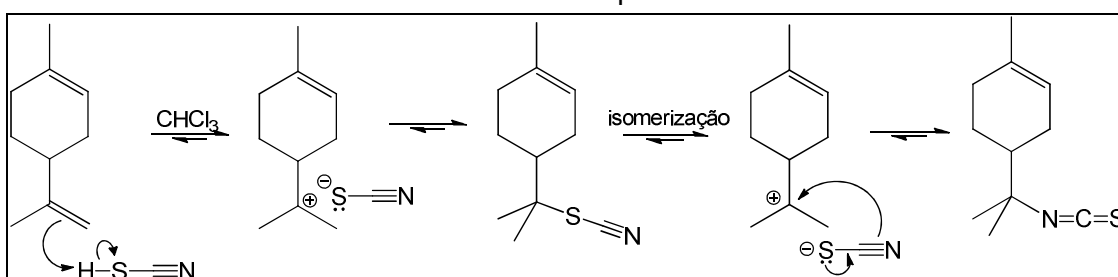
O ácido tiociânico foi gerado através da maceração dos sais bissulfato de potássio e tiocianato de potássio diretamente em clorofórmio para evitar sua volatilização, e adicionado ao meio reacional contendo o *S*-(-)-limoneno (**8a**) ou o *R*-(+)-limoneno (**8b**) enantiomericamente puros, na proporção de 5:1 mol de ácido:terpeno. A reação foi mantida em temperatura ambiente e na ausência de luz para minimizar a formação de produtos de polimerização em decorrência do ácido e garantir quantidade de HSCN suficiente para reagir com o substrato.

Ao término da reação, uma extração líquido-líquido foi realizada com solução aquosa de bicarbonato de sódio 5% para neutralização do excesso de ácido. Após secagem da fração clorofórmica com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente sob baixa pressão, os produtos reacionais foram separados por cromatografia em coluna de gel de sílica eluída com hexano em modo isocrático. Os isotiocianoterpenos (**67a-b**) foram eluídos primeiro e

obtidos como produtos majoritários, numa proporção aproximada de 8:1 em relação aos tiocianoterpenos (**66a-b**). Em algumas repetições da reação, pequenas quantidades do terpeno sem reagir foram isoladas nas primeiras frações da separação cromatográfica, antes da eluição dos isotiocianoterpenos.

A reação do ácido tociânico (eletrófilo) com o terpeno (nucleófilo) é química e regioseletiva (**Esquema 21**). O próton do ácido adiciona-se ao carbono menos substituído da ligação dupla do substrato com menor impedimento estérico (Oliveira *et al.*, 2001), e o carbocátion terciário formado tem provável estabilização por par iônico íntimo, uma vez que o solvente utilizado tem baixa polaridade.

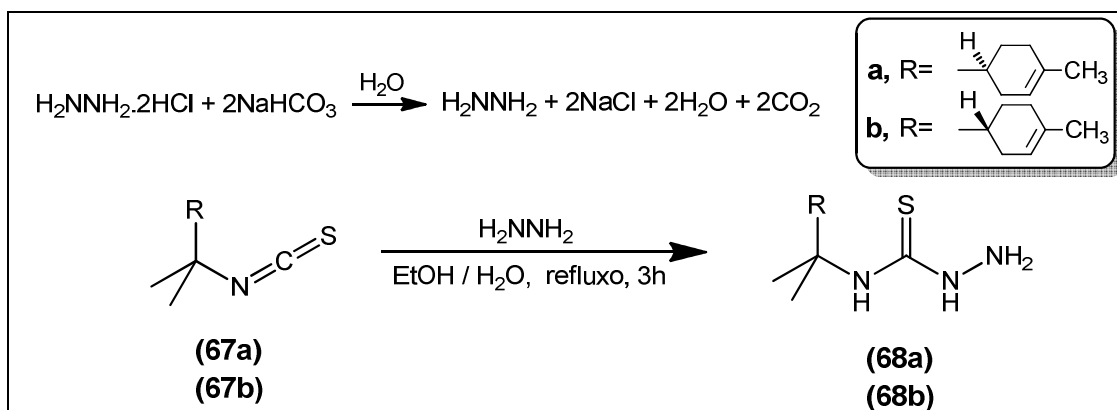
Esquema 21. Proposta de intermediários de reação para formação do isotiocianoterpeno.



A base conjugada (^-SCN) do ácido tociânico é ambidentada, porém se adiciona ao carbocátion terciário inicialmente pelo enxofre, átomo mais nucleofílico nas condições reacionais, fornecendo o tiocianoterpeno do limoneno (**66a**) ou (**66b**) como produto cinético e intermediário de reação. Através de provável colapso do par iônico íntimo, há a isomerização para o produto mais estável (termodinâmico), o respectivo isotiocianoterpeno (**67a**) ou (**67b**) (Silva *et al.*, 1993).

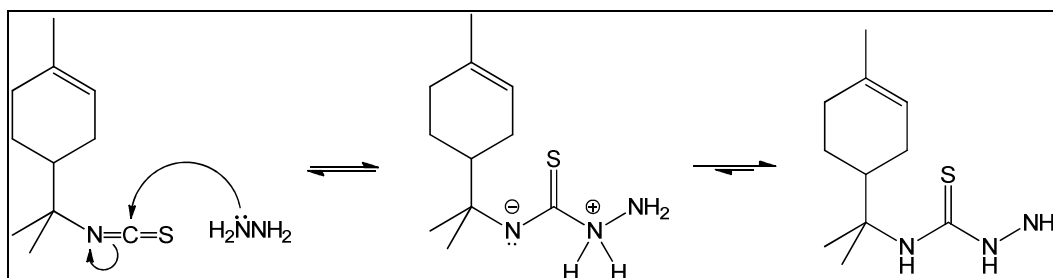
4.1.2. Tiossemicarbazidas do limoneno (**68a-b**)

As tiossemicarbazidas do limoneno (**68a-b**) foram preparadas segundo metodologia da literatura descrita para o enantiômero *R* (Silva, A. *et al.*, 2011; Yamaguchi *et al.*, 2009) (**Esquema 22**). Inicialmente, o cloridrato de hidrazina foi tratado com uma solução contendo o dobro em relação molar de bicarbonato de sódio para gerar a hidrazina livre (neutra), a qual foi adicionada à solução etanólica contendo o isotiocianoterpeno do *S*-(-)-limoneno (**67a**) ou do *R*-(+)-limoneno (**67b**).

Esquema 22. Síntese das tiossemicarbazidas do limoneno.

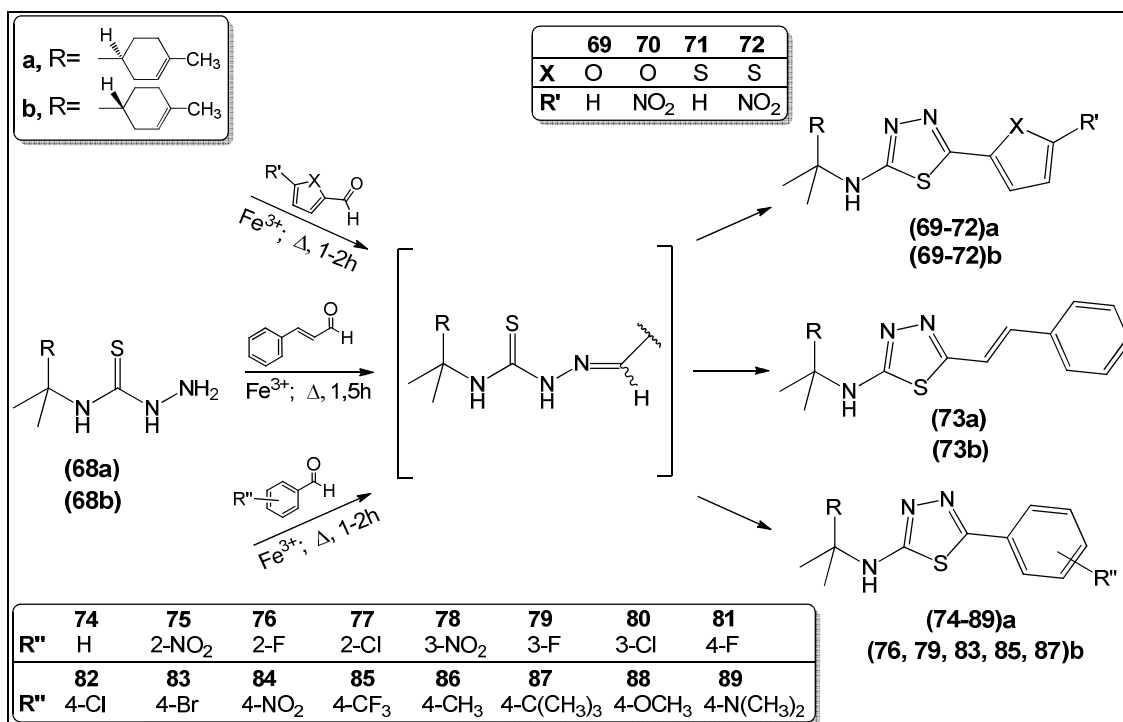
Ao término da reação, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o sólido obtido foi purificado por lavagem com hexano para remoção de resíduos de isotiocianato e lavagem com água para remoção dos sais formados na etapa de neutralização da hidrazina. As tiossemicarbazidas **(68a-b)** foram obtidas com rendimento de 75%.

A formação da tiossemicarbazida ocorre através de uma adição nucleofílica. Há a adição do nucleófilo hidrazina ao grupo isotiocianato do derivado terpênico, eletrófilo, seguido de prototropismo (**Esquema 23**).

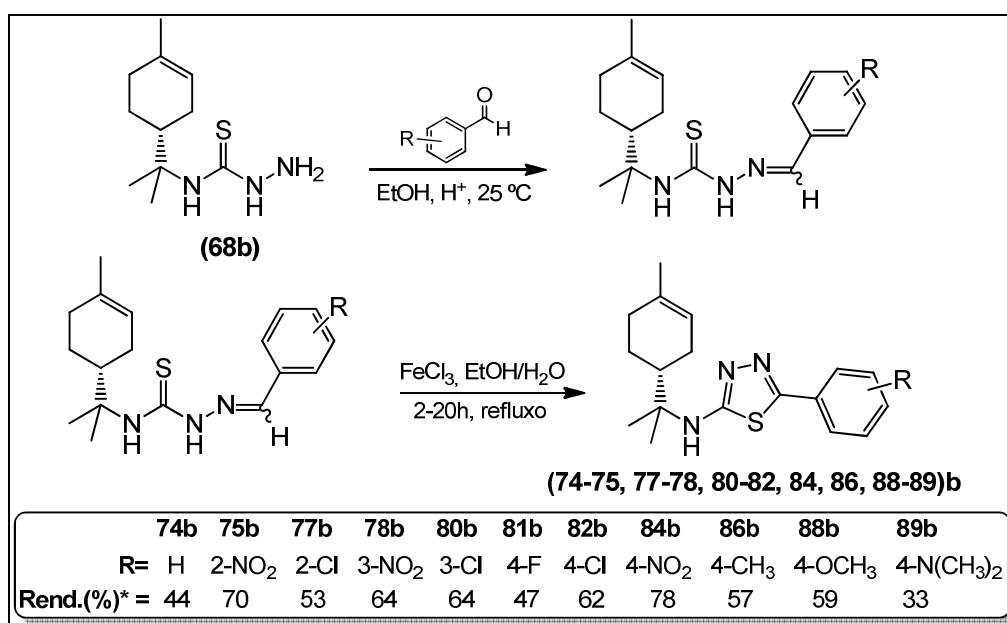
Esquema 23. Proposta de intermediários de reação para formação da tiossemicarbazida do limoneno.

4.1.3. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos **(69-89)a, (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b**

As séries de 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno **(69-89)a** e do R-(+)-limoneno **(69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b** foram obtidas através de uma metodologia *one-pot* (**Esquema 24**), desenvolvida a partir de modificação de métodos da literatura (Kumar *et al.*, 2011; Shih & Wu, 2005) a fim de aperfeiçoar a rota sintética utilizada em nosso grupo de pesquisa (Vandresen, 2011).

Esquema 24. Síntese dos 1,3,4-tiadiazóis do limoneno por metodologia *one-pot*.

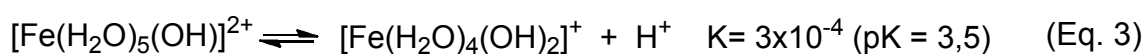
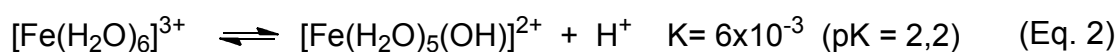
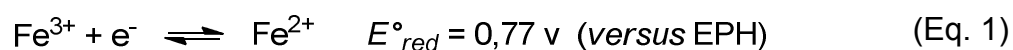
Em trabalho anterior, a tiossemicarbazida terpênica era condensada com aldeídos para fornecer as tiossemicarbazonas, as quais eram isoladas do meio reacional e purificadas. Numa segunda etapa, as tiossemicarbazonas eram colocadas em presença de FeCl₃, para fornecerem os respectivos 1,3,4-tiadiazóis por ciclização oxidativa (Vandresen, 2011) (**Esquema 25**).

Esquema 25. Metodologia de síntese de 1,3,4-tiadiazóis do R-(+)-limoneno em duas etapas a partir da tiossemicarbazida do limoneno.

*Rendimento combinado das duas etapas. (Silva, 2010; Vandresen, 2011).

A síntese dos 1,3,4-tiadiazóis diretamente a partir da tiossemicarbazida do limoneno foi proposta observando-se as similaridades do meio reacional (polar prótico), bem como a não formação de subprodutos na síntese das tiossemicarbazonas (Silva, 2010; Vandresen, 2011).

O cloreto férrico atua não apenas como agente oxidante através de seu cátion Fe(III) (Eq. 1), mas também como um ácido de Lewis em água, diminuindo o pH do meio reacional, por formação de bases conjugadas de seu cátion, que se encontra na forma hexahidratada em solução aquosa (Eq. 2 e Eq. 3) (Mahan & Myers, 1995). Desta forma, em uma mistura etanol/água, o cloreto férrico contribui para a formação de meio ácido propício à formação de iminas (Tenório *et al.*, 2005), além de atuar como agente oxidante para levar estes compostos ao núcleo 1,3,4-tiadiazol como produto final (Shih & Wu, 2005).

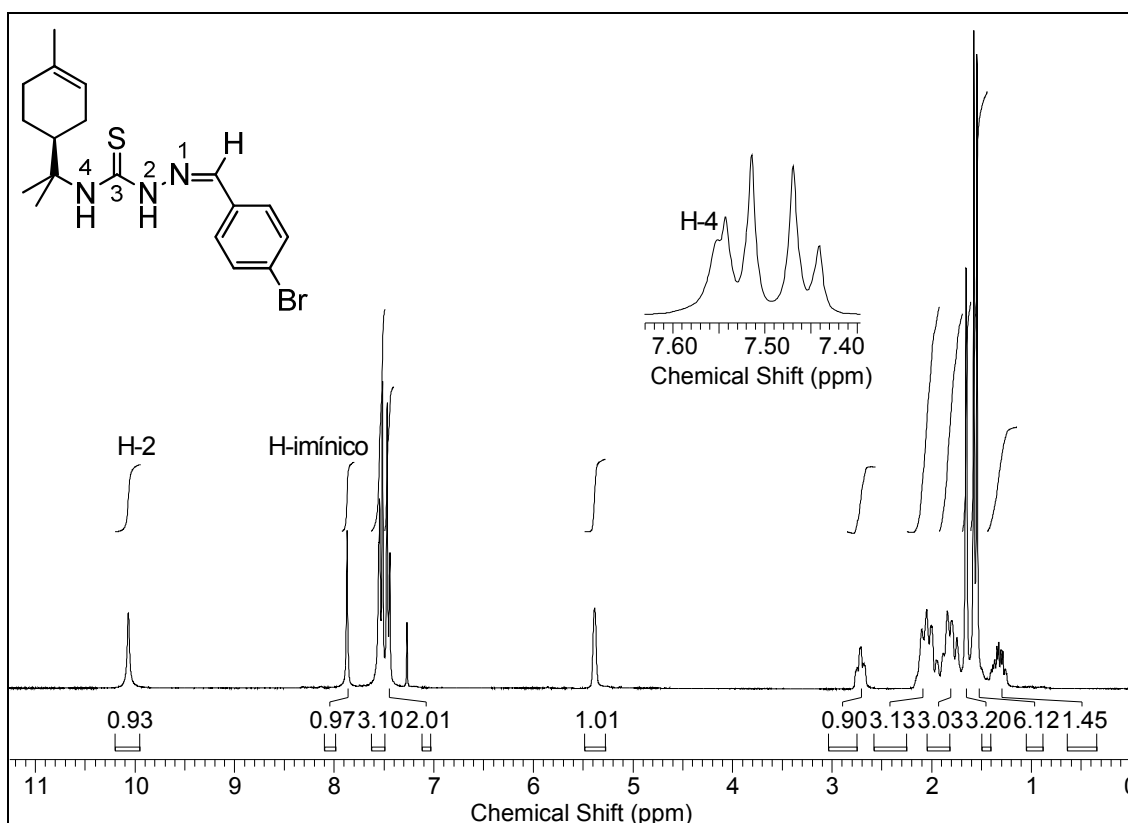


De fato, foi observado por técnicas de RMN e de IV (cuja discussão espectral será detalhada em tópico posterior) que a mistura de aldeído, tiossemicarbazida e cloreto férrico em meio hidro alcoólico leva diretamente à formação dos 1,3,4-tiadiazóis. O acompanhamento dessas reações por CCD mostrou que após cerca de 5 minutos da adição dos reagentes não era mais verificada presença da tiossemicarbazida no meio reacional. Porém, as condições cromatográficas de camada delgada utilizadas não permitiram prever se o produto formado era a tiossemicarbazona ou o 1,3,4-tiadiazol, visto que estes apresentam o mesmo índice de retenção, de acordo com testes realizados para seus padrões, mesmo para diferentes eluentes.

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 11**) de uma reação interrompida após cerca de 5 minutos de adição dos reagentes sob aquecimento e agitação, verificou-se a ausência dos sinais do hidrogênio ligado à carbonila do aldeído (acima de 10 ppm) e daqueles do NH_2 da tiossemicarbazida (entre 3-4 ppm), indicando que os mesmos reagiram, como sugerido pela CCD. O surgimento

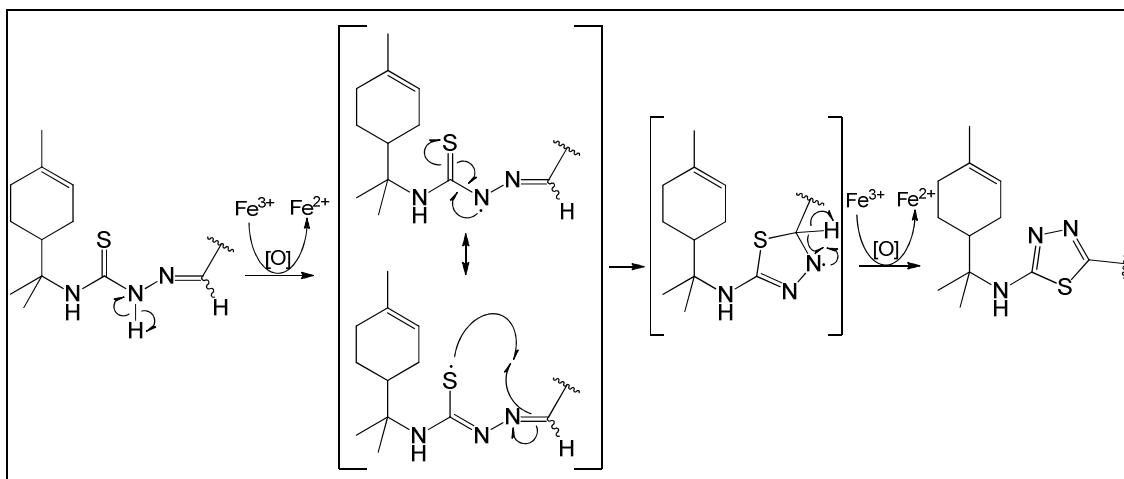
de simpletos em δ_H 10,07, δ_H 7,80 e δ_H 7,55 foram atribuídos a hidrogênios ligados a N2, N4 e ao carbono imínico do grupamento tiossemicarbazona, indicando que neste momento ela seria o único composto presente em solução em quantidades apreciáveis. Desta forma, os dados experimentais sugerem a formação da tiossemicarbazona *in situ*, sendo este composto um intermediário antes da ciclização do núcleo 1,3,4-tiadiazol.

Figura 11. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) para reação *one-pot* da tiossemicarbazida do limoneno, 4-bromo-benzaldeído e FeCl_3 , precipitada após 5 minutos da adição dos reagentes.



Deixando a reação ocorrer entre 1 e 2 horas, sob agitação e aquecimento, os 1,3,4-tiadiazóis são obtidos como produto único. Sua formação a partir do intermediário tiossemicarbazona, segundo proposta da literatura (Shih & Wu, 2005), ocorre através de um processo radicalar, em que os íons Fe(III) promovem a ciclização oxidativa da tiossemicarbazona, havendo a perda de dois átomos de hidrogênio (**Esquema 26**).

Esquema 26. Proposta de intermediários de reação para formação dos 1,3,4-tiadiazóis do limoneno através de ciclização oxidativa por íons Fe(III).

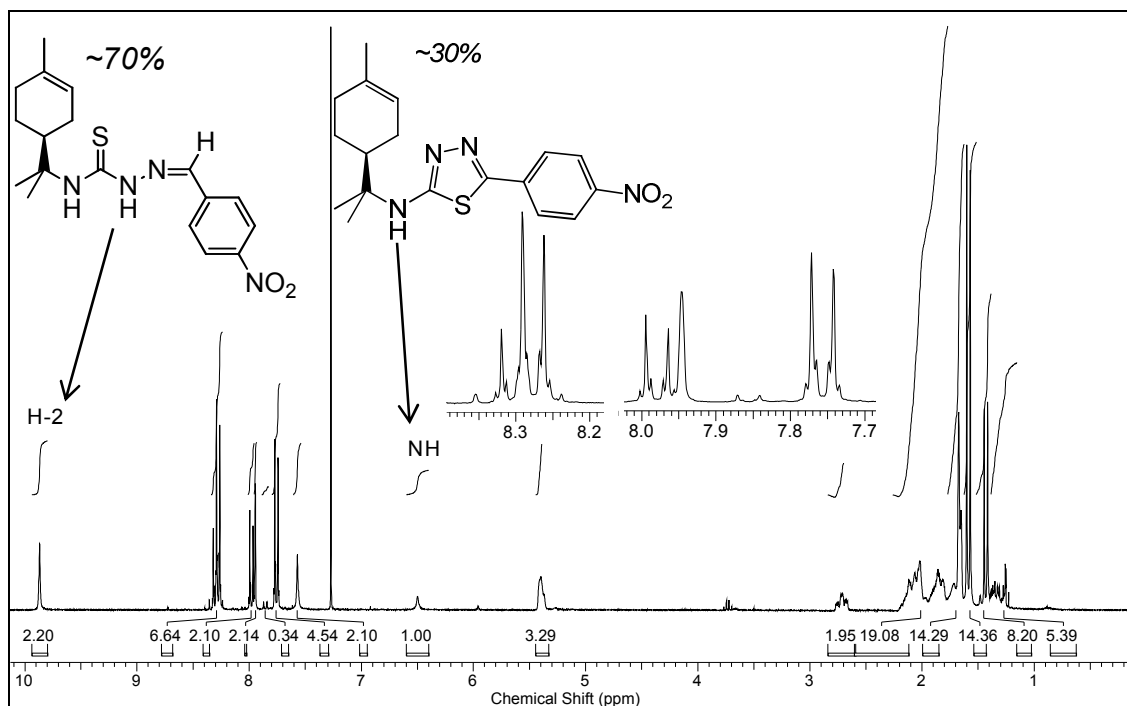


Sendo os íons Fe(III) os únicos agentes oxidantes do meio reacional, a proposta mecanística sugere que a ciclização de todo o substrato envolveria dois equivalentes do metal (um para cada hidrogênio retirado). A quantidade de cloreto férrico necessária para a reação se completar foi investigada através de uma reação teste com 0,5 equivalente de FeCl₃, 1 equivalente de tiossemicarbazida e 1 equivalente de 4-nitrobenzaldeído.

Após ocorrer a ausência de íons Fe(III) em solução – verificada através de adição de KSCN, fonte de íons tiocianato, indicador específico para ferro 3+ (Skoog *et al.*, 2009) – seus produtos foram precipitados. O espectro de RMN de ¹H (**Figura 12**) de uma amostra do precipitado apresentou uma mistura de cerca de 70% de tiossemicarbazona (identificada, por exemplo, pelo sinal do hidrogênio de N2 em 9,88 ppm) e de 30% de 1,3,4-tiadiazol (identificado, por exemplo, pelo sinal do hidrogênio ligado a nitrogênio em 6,49 ppm).

Considerando que a tiossemicarbazona e o 1,3,4-tiadiazol do limoneno têm polaridades similares (como se observa pelo índice de retenção em CCD) e precipitam quase em sua totalidade em meio predominantemente aquoso, as quantidades encontradas no espectro de RMN se assemelham à real proporção dos compostos presentes no meio reacional. A relação encontrada através deste espectro (70% de tiossemicarbazona e 30% de 1,3,4-tiadiazol – **Figura 12**) está próxima daquela esperada para uma reação que envolvesse 2 equivalentes de ferro para completar a síntese, mas executada com apenas 0,5 equivalente de cloreto férrico (que teoricamente forneceria 75% de tiossemicarbazona e 25% de 1,3,4-tiadiazol).

Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, CDCl_3) para formação de 1,3,4-tiadiazóis com 0,5 equivalente de FeCl_3 .



Desta forma, as sínteses de 1,3,4-tiadiazóis foram realizadas com pouco mais de que 2 equivalentes de ferro (2,2 equivalentes) para garantir total oxidação e ciclização do substrato. Este valor é consideravelmente inferior aos relatados na literatura (Kilburn *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2011; Shih & Wu, 2005), que chega a usar 10 equivalentes do agente oxidante.

Com estas observações, a síntese dos 1,3,4-tiadiazóis foi realizada por metodologia *one-pot* (**Esquema 24**), deixando a reação ocorrer a 60°C , por período de 1-2 horas.

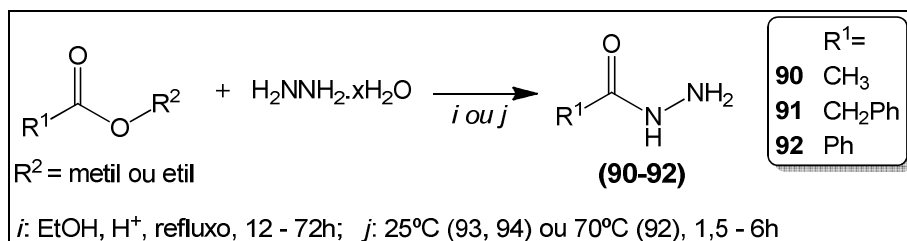
A proporção de etanol/água utilizada na reação foi adequada para manter os reagentes e produtos solubilizados a quente e promover sua precipitação ao serem resfriados para temperatura ambiente. Posterior adição de banho de gelo favoreceu maior precipitação dos produtos. O resfriamento lento foi essencial para formação de precipitados filtráveis (adição direta de água resfriada ou banho de gelo levaram à formação de sólidos de difícil filtração ou coloides, contaminados com ferro).

Os produtos puros foram obtidos após lavagem dos precipitados com água destilada. Nos casos em que houve permanência de íons ferro no produto (observados especialmente pelo alargamento de sinais nos espectros de RMN de ^1H devido a íons Fe(III) paramagnéticos), os sólidos foram reprecipitados.

Os rendimentos reacionais variaram de 63% a 91% para as séries derivadas do limoneno (**Tabela 1**). Estes valores foram superiores aos da síntese em duas etapas para obtenção do núcleo heterocíclico (**Esquema 25**), com as vantagens de não necessitar isolar e purificar os produtos intermediários tiossemicarbazona, bem como utilizar menor quantidade de agente oxidante.

Tabela 1. Rendimento reacional para a síntese dos 1,3,4-tiadiazóis do *S*-(-)-limoneno (série **a**) e *R*-(+)-limoneno (série **b**).

Composto	-R	Série a Rend. (%)	Série b Rend. (%)
69	furan-2-il	86	70
70	5-nitrofuran-2-il	80	76
71	tiofen-2-il	70	71
72	5-nitrotiofen-2-il	81	67
73	estiril	72	63
74	fenil	69	***
75	2-nitrofenil	91	***
76	2-fluorfenil	79	71
77	2-clorofenil	72	***
78	3-nitrofenil	83	***
79	3-fluorfenil	76	84
80	3-clorofenil	77	***
81	4-fluorfenil	77	***
82	4-clorofenil	78	***
83	4-bromofenil	81	86
84	4-nitrofenil	81	***
85	4-(trifluorometil)-fenil	82	69
86	4-metilfenil	76	***
87	4-terc-butilfenil	74	91
88	4-metoxifenil	76	***
89	4-(dimetilamino)-fenil	68	***

4.1.4. Hidrazidas (90-92)**Esquema 27.** Síntese de hidrazidas.

A síntese das hidrazidas (**90-92**) (**Esquema 27**) foi realizada inicialmente através de metodologias da literatura (Idhayadhulla *et al.*, 2011b; Khan *et al.*, 2003). O emprego de agitação e refluxo à mistura de éster e hidrazina aquosa, em meio alcoólico sob catálise ácida apresentou rendimentos pouco satisfatórios (31 - 61 %, **Tabela 2**).

Uma metodologia modificada foi adota para síntese das hidrazidas, a fim de melhorar o rendimento reacional. O emprego apenas de agitação dos reagentes, na ausência de solvente, forneceu as hidrazidas (**90-92**) mais rapidamente e em melhores rendimentos (82 - 98%, **Tabela 2**).

Tabela 2. Rendimento e tempo reacional para síntese de hidrazidas.

$$R^1-C(=O)-OR^2 + H_2NNH_2 \cdot xH_2O \longrightarrow R^1-C(=O)-NH-NH_2$$
(90-92)

Metodologia		Literatura		Modificada	
Composto		Tempo (h)	Rend. (%)	Tempo (h)	Rend. (%)
90	$R^1 = -CH_3$	72	31 ^a	6	82 ^b
91	$R^1 = -CH_2Ph$	8	61 ^a	1,5	98 ^c
92	$R^1 = -Ph$	12	46 ^a	2	95 ^c

^a EtOH Absoluto em Refluxo; ^b 70°C; ^c 25°C; R² = metil ou etil

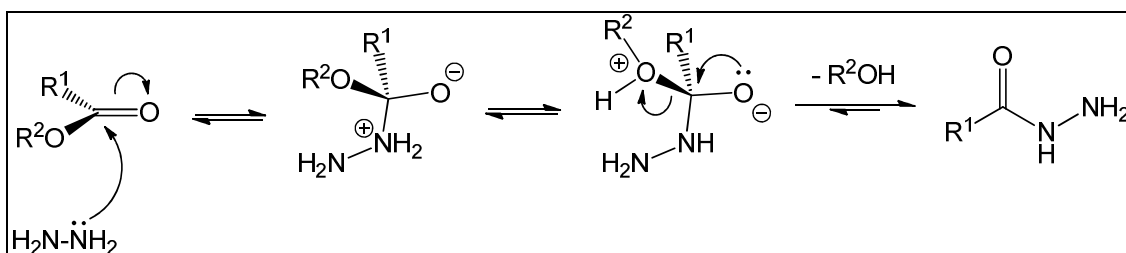
Na ausência de solvente, à medida que a reação progrediu à temperatura ambiente, a 2-fenilacetoidrazida (**91**) e a benzoidrazida (**92**) precipitaram, possivelmente contribuindo para sua formação mais rápida e completa. A não formação de precipitado durante a síntese da acetoidrazida (**90**) pode ter sido a razão de a reação não se completar em nesta temperatura, mesmo após vários dias em sistema fechado. Neste caso, aquecimento de

70°C foi empregado, para acelerar a reação, em sistema aberto, com excesso de acetato de etila. Após cerca de 6 horas de reação nestas condições, a análise por CCD indicou o total consumo da hidrazina e, após o resfriamento e evaporação de quantidade residual de éster, o produto sólido foi obtido.

A lavagem com hexano sob filtração a vácuo, em ambas as metodologias, removeu quantidades residuais de ésteres ou hidrazina, os quais foram arrastados pelo solvente de lavagem, fornecendo os produtos puros.

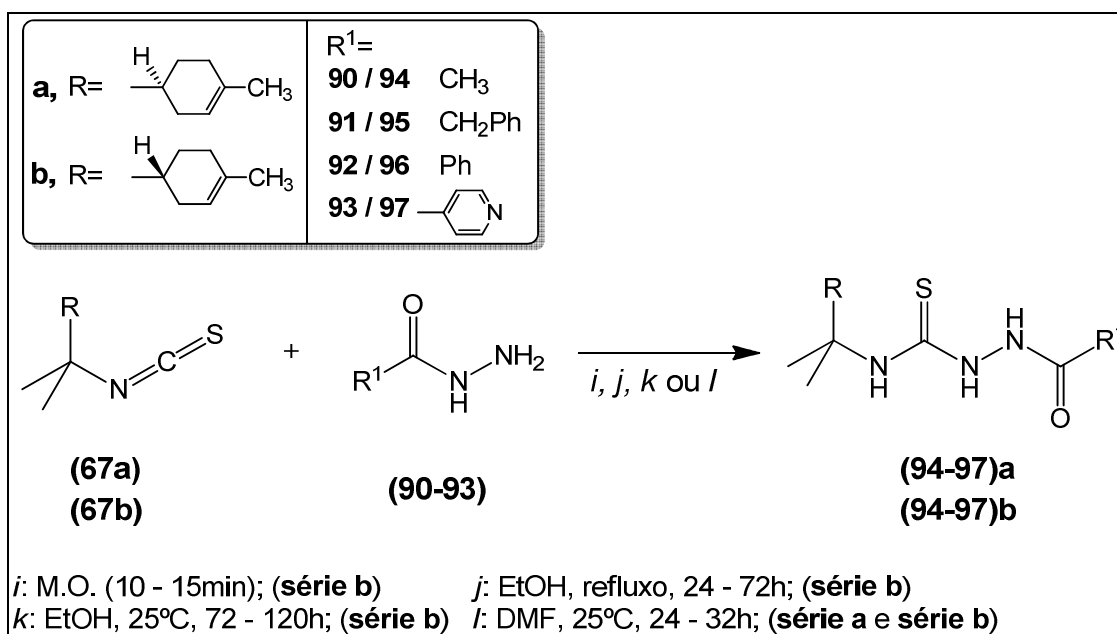
A formação das hidrazidas ocorre através de uma adição nucleofílica seguida de eliminação no carbono acílico (substituição nucleofílica acílica) (**Esquema 28**). O nucleófilo hidrazina adiciona-se ao carbono acílico do éster, levando à formação de um intermediário tetraédrico. Uma molécula de álcool é eliminada após prototropismo, regenerando a ligação dupla carbono-oxigênio.

Esquema 28. Proposta de intermediários para formação das hidrazidas.



4.1.5. Aciltiossemicarbazidas (94-97)a, (94-97)b

Esquema 29. Síntese das aciltiossemicarbazidas do limoneno.



A síntese de aciltiossemicarbazidas foi realizada em quatro condições reacionais diferentes (**Esquema 29**), inicialmente testadas para a *série b* e, a partir dos melhores rendimentos, repetida para a *série a*.

Inicialmente a síntese das aciltiossemicarbazidas (**94-97**)**b** foi realizada de acordo com a maioria dos procedimentos da literatura (Angelusiu *et al.*, 2009; Demirbas *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2012; Liesen *et al.*, 2010; Tomasciková *et al.*, 2008), envolvendo a mistura do isotiocianoterpeno (**67b**) e das hidrazidas (**90-93**) em etanol e refluxo.

Esta metodologia forneceu rendimentos baixos a medianos, porém nenhum deles superiores a 50% (**Tabela 3**). A adição da hidrazida ao substrato terciário demandou tempo de reação superior aos relatados pela literatura (mais de 24h ante 2-8h da literatura), evidenciando a maior dificuldade de formação de aciltiossemicarbazidas devido à possível contribuição de efeitos estéricos e eletrônicos, provocando também uma menor reatividade do substrato.

O aquecimento prolongado levou ao surgimento de subprodutos de reação, especialmente por degradação de quantidade parcial do isotiocianoterpeno em períodos superiores a 5 horas, conforme foi acompanhado por CCD. Ao final da síntese, esta análise normalmente evidenciava a hidrazida sem reagir, o produto aciltiossemicarbazida e diversos subprodutos.

A purificação do produto bruto foi realizada por lavagem com hexano, para remoção de derivados do isotiocianato e lavagem com solução resfriada água/etanol 50% para solubilizar ao mínimo o produto aciltiossemicarbazida e remover subprodutos mais polares e a hidrazida.

A síntese das aciltiossemicarbazidas (**94-97**)**b** foi repetida em temperatura ambiente, nas mesmas condições anteriores, a fim de se evitar a degradação do isotiocianoterpeno. Nestas condições, observou-se a formação de menos subprodutos em análises por CCD, porém a reação não se completou no tempo avaliado, de até 5 dias (**Tabela 3**).

Repetições deste procedimento com a mesma hidrazida e uma diferença de até 48 horas de tempo reacional mostraram rendimentos similares, indicando um equilíbrio no meio reacional que não permitiu o consumo total da hidrazida e do substrato, ou uma cinética lenta nesta temperatura, o que tornou

o procedimento inviável em virtude dos altos tempos reacionais. Emprego de catalisadores nucleofílicos, como trietilamina ou piridina em uma variação da metodologia, não provocou diminuição do tempo reacional. Após a mesma purificação descrita anteriormente, os produtos foram obtidos com rendimentos inferiores ao procedimento envolvendo aquecimento (**Tabela 3**).

Tabela 3. Rendimento e tempo reacional para síntese das aciltiossemicarbazidas do *R*-(+)-limoneno por diferentes metodologias.

	<i>Metodologia</i>	Irradiação de M.O.		EtOH / Δ		EtOH / 25°C	
<i>Composto</i>		<i>Tempo*</i>	<i>Rend (%)</i>	<i>Tempo</i>	<i>Rend (%)</i>	<i>Tempo</i>	<i>Rend (%)</i>
94b	$R^1 = -CH_3$	25 min	40	48 h	50	120 h	42
95b	$R^1 = -CH_2Ph$	30 min	41	72 h	44	96 h	35
96b	$R^1 = -Ph$	25 min	40	55h	35	120 h	31
97b	$R^1 = \text{Piridin-4-il}$	20 min	35	24h	15	N.R.**	

*Contabilizado apenas tempo sob irradiação; **Não realizada;

Baseando-se na metodologia de Gomha & Riyadh (2011), a síntese das aciltiossemicarbazidas (**94-97**)b foi realizada envolvendo irradiação de microondas. Esta metodologia apresentou tempo reacional significativamente inferior às tentativas anteriores (até 1h de reação, 30min de irradiação de M.O. – **Tabela 3**), porém grande formação de subprodutos. Conforme análises em CCD, após cerca de 10 períodos de irradiação (1 minuto sob M.O. na potência mínima do aparelho, seguido de 1 minuto de agitação manual), começaram a se formar subprodutos, principalmente de decomposição de isotiocianoterpeno, notando-se a presença dos produtos aciltiossemicarbazida (**94-97**), quantidade residual da hidrazida e outros subprodutos, ao final da síntese.

Lavagens com hexano e etanol/água do produto bruto não foram suficientes para purificação, sendo normalmente necessário solubilização dos produtos em etanol sob aquecimento e reprecipitação por resfriamento lento da solução, o que contribuiu para diminuição dos rendimentos reacionais.

A metodologia envolvendo M.O. mostrou ser um método razoável para a síntese das aciltiossemicarbazidas, principalmente devido ao menor tempo reacional exigido. Entretanto, a purificação dos produtos se mostrou mais trabalhosa do que nas outras metodologias, para obtenção de rendimentos similares ou inferiores àquelas em solução de etanol (**Tabela 3**).

Apesar de a adição de hidrazidas a isotiocianatos em meio polar aprótico não ser descrita na literatura, esta tentativa foi realizada, a fim de se obterem melhores rendimentos reacionais. O isotiocianoterpeno (**67b**) foi reagido com as hidrazidas (**90-93**) em dimetilformamida, e sem aquecimento para se evitar sua degradação. O método apresentou rendimentos superiores aos demais e tempo consideravelmente inferior às reações em meio polar prótico. Sendo a melhor metodologia obtida para a síntese das aciltiossemicarbazidas, o mesmo procedimento de síntese foi repetido para o isotiocianoterpeno do *S*-(-)-limoneno (**67a**), e as duas séries de aciltiossemicarbazidas (**94-97**)**a** e (**94-97**)**b** foram sintetizadas, com os dados de tempo e rendimento apresentados na **Tabela 4**. Menor tempo reacional ainda foi buscado para esta metodologia, pela adição de catalisadores nucleofílicos como piridina ou trietilamina ao meio reacional, porém este resultado não foi observado.

Tabela 4. Rendimento e tempo reacional para a síntese das aciltiossemicarbazidas do *S*-(-)-limoneno (série **a**) e *R*-(+)-limoneno (série **b**).

(67a) ou (67b) + (90-93) $\xrightarrow[25\text{ }^{\circ}\text{C}]{\text{DMF}}$ (94-97)a ou (94-97)b

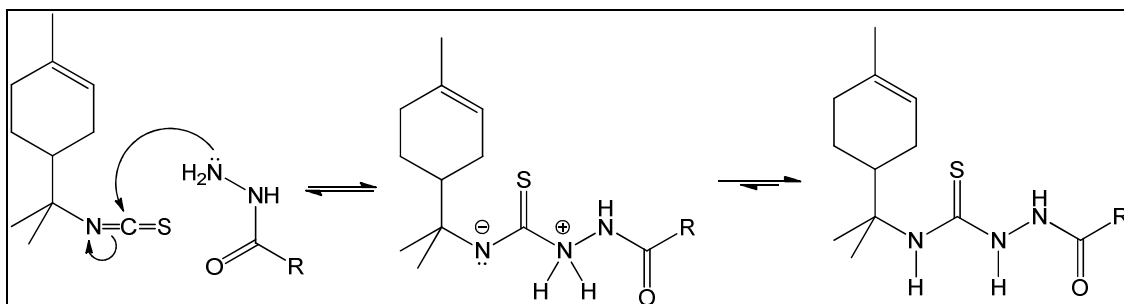
Composto	-R ¹	Série a		Série b	
		Tempo (h)	Rend. (%)	Tempo (h)	Rend. (%)
94	R ¹ = -CH ₃	24	57	24	52
95	R ¹ = -CH ₂ Ph	30	64	30	63
96	R ¹ = -Ph	30	54	30	53
97	R ¹ =Piridin-4-il	32	68	32	54

O método mais eficiente para extração dos produtos do meio reacional com DMF foi sua precipitação pela adição de água, embora possa ter havido

perda do produto. Esta metodologia apresentou menor formação de subprodutos, embora tenham sido necessárias as lavagens com hexano e solução etanol/água para purificação do produto bruto.

A proposta de intermediário para a formação das aciltiossemicarbazidas é análoga àquela para a síntese das tiossemicarbazidas (**68a-b**). A hidrazida atua como nucleófilo, e seu nitrogênio terminal promove um ataque ao carbono do grupo NCS do isotiocianoterpeno, o eletrófilo (**Esquema 30**). O ataque da hidrazida leva a um intermediário dipolar que origina a aciltiossemicarbazida após prototropismo.

Esquema 30. Proposta de intermediário para formação das aciltiossemicarbazidas do limoneno.



4.2. Análise espectral e caracterização estrutural

Os isotiocianoterpenos (**67**), tiossemicarbazidas (**68**), 1,3,4-tiadiazóis (**69-89**), hidrazidas (**90-92**) e aciltiossemicarbazidas (**94-97**) sintetizados foram caracterizados por técnicas de absorção no infravermelho (IV), e técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais (^1H e ^{13}C) e bidimensionais (COSY, HSQC e/ou HMBC) quando foi necessário.

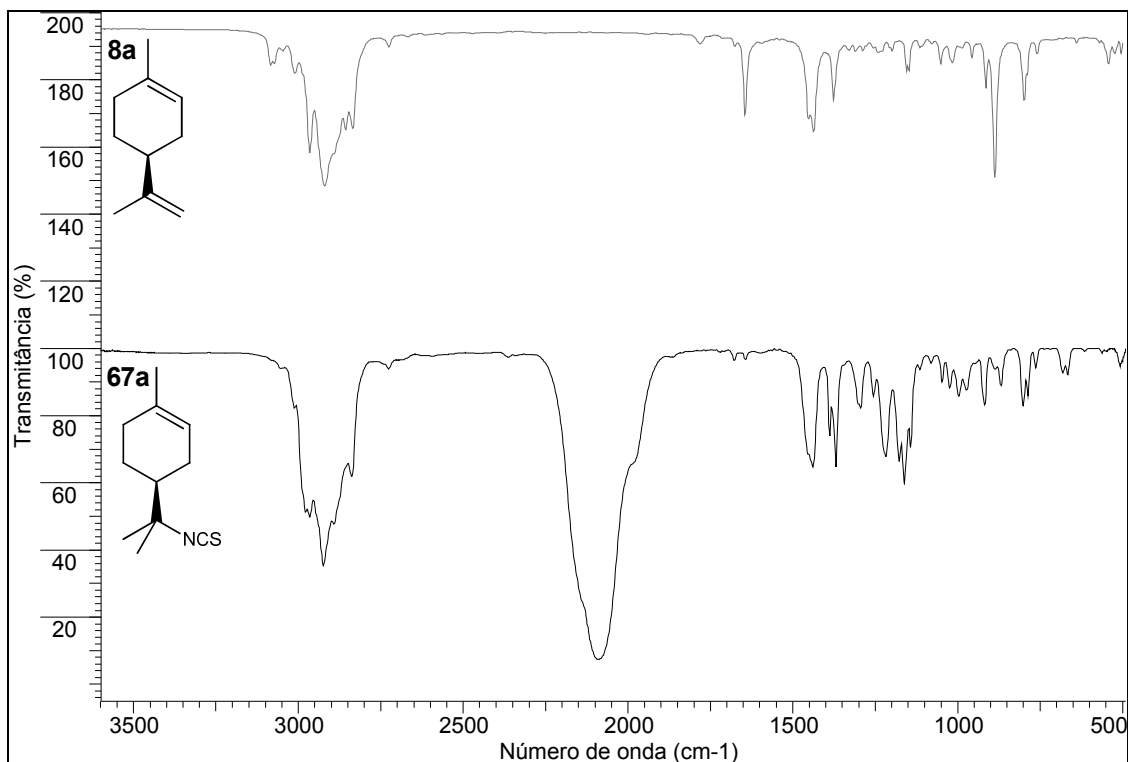
Cada par enantiomérico de compostos apresentou, como esperado, espectros de RMN e de IV essencialmente idênticos entre si (salvo sinais de RMN de ^1H que podem sofrer variação, como hidrogênios ligados a nitrogênio), como exemplificado na primeira discussão espectral para 1,3,4-tiadiazóis (**subseção 4.2.3.1**). Desta forma, os espectros ou tabelamento de dados serão apresentados apenas para os enantiômeros derivados do S-(-)-limoneno.

4.2.1. Isotiocianoterpenos (67a-b)

Na comparação do espectro de absorção no infravermelho do isotiocianoterpeno **67a** com seu precursor, S-(-)-limoneno (**8a**) (**Figura 13**),

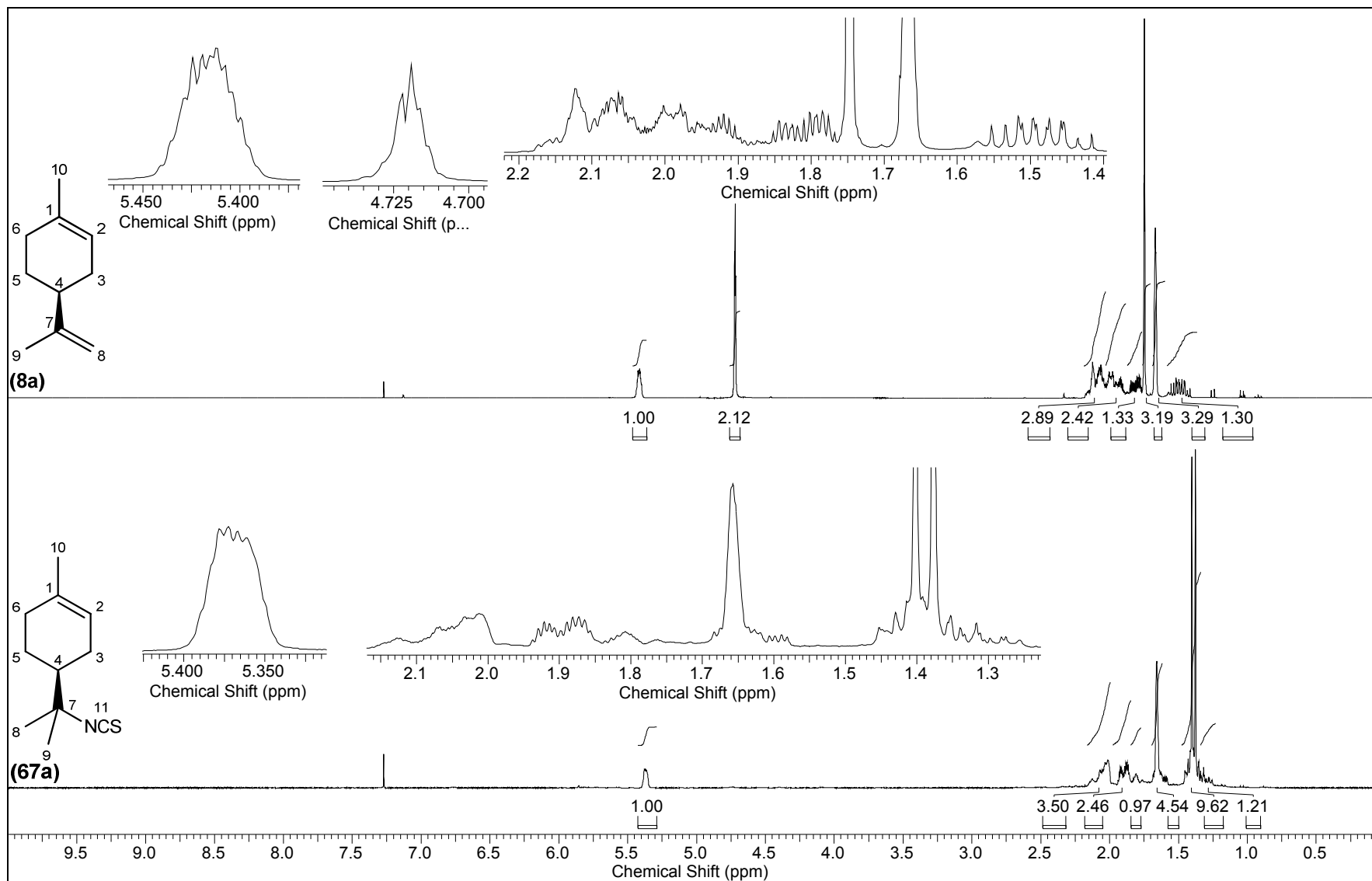
destaca-se o surgimento de banda em 2089 cm^{-1} da ligação dupla cumulada NCS, que comprova a incorporação desta porção ao terpeno. Bandas de deformações axiais das ligações C-H ocorreram na região de $3050\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$.

Figura 13. Espectros de absorção no infravermelho do S-(-)-limoneno (**8a**) e seu isotiocianoterpeno (**67a**).



Na comparação do espectro de RMN de ^1H do derivado **67a** com o de seu precursor **8a** (**Figura 14**) houve a ausência do multipeto em δ_{H} 4,70, referente aos hidrogênios da ligação dupla exocíclica, deslocamento do simpleto referente aos hidrogênios metílicos 9 de δ_{H} 1,66 para δ_{H} 1,40 e surgimento do simpleto referente aos hidrogênios metílicos 8 em δ_{H} 1,38. Ainda foram observados no espectro do isotiocianoterpeno do S-(-)-limoneno (**67a**) a presença de multipeto em δ_{H} 5,37 referente ao hidrogênio vinílico e simpleto em δ_{H} 1,66 correspondente aos hidrogênios do grupamento metila 10. Os demais hidrogênios apresentaram deslocamentos químicos entre δ_{H} 1,60-2,07.

Na comparação dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT do derivado **67a** com o de seu precursor **8a** (**Figura 15**), houve desaparecimento do sinal referente ao carbono insaturado C8 (δ_{C} 108,6) no espectro do S-(-)-limoneno. Deslocamentos significativos foram observados para C7 e C9, que variaram, respectivamente, de δ_{C} 150,7 para δ_{C} 64,0 e de δ_{C} 21,0 para δ_{C} 26,4.

Figura 14. Espectros de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do *S*-(-)-limoneno (**8a**) e seu isotiocianoterpeno (**67a**).

Ainda foram observados, no espectro de RMN de ^{13}C e DEPT do isotiocianoterpeno do *S*-(-)-limoneno (**67a**) (**Figura 15**), sinais em δ_{C} 134,0, δ_{C} 119,6 e em δ_{C} 44,4 referentes a C1, C2 e C4, respectivamente. Os carbonos dos grupamentos metileno 3, 5 e 6, apresentaram deslocamentos químicos em δ_{C} 26,7, δ_{C} 24,1 e δ_{C} 30,6, e os sinais dos carbonos dos grupamentos metila 8 e 10 ocorreram em δ_{C} 27,0 e δ_{C} 23,2. As correlações observadas no mapa de contornos HSQC (**Figura 16**) confirmam as atribuições tabeladas.

Os dados observados para os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C do isotiocianoterpeno do limoneno (**67a-b**) foram concordantes com os da literatura (Silva *et al.*, 1993), e constam na **Tabela 5**.

Figura 15. Espectros de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90° ; (c) DEPT 135° do *S*-(-)-limoneno (**8a**) e seu isotiocianoterpeno (**67a**).

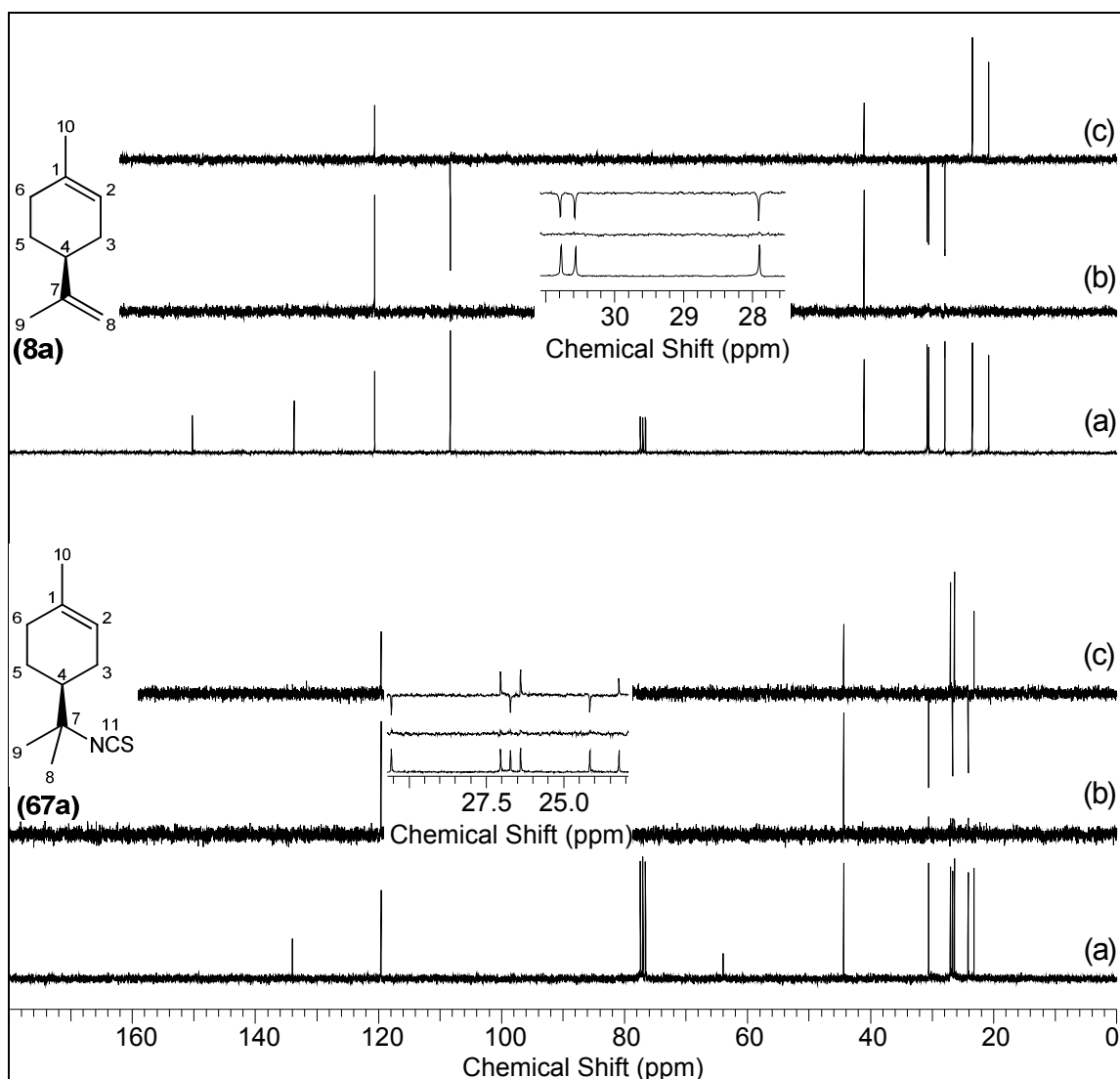


Figura 16. Mapa de Contornos HSQC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o isotiocianoterpeno do S-(-)-limoneno (**67a**).

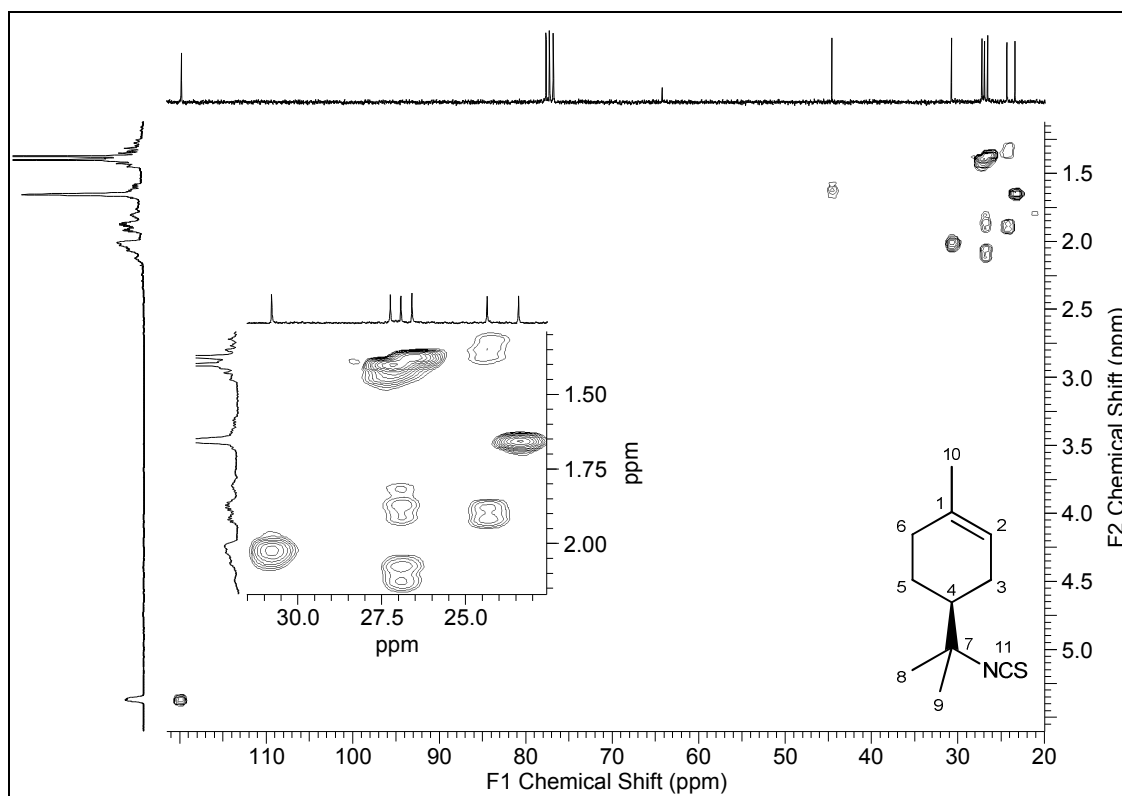
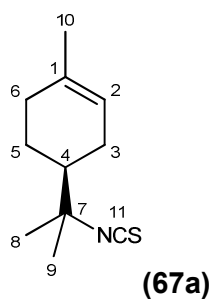


Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C /DEPT (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) do isotiocianoterpeno do S-(-)-limoneno (**67a**).

C/H	δ_{H} (mult.)	δ_{C} (DEPT)	C/H	δ_{H} (mult.)	δ_{C} (DEPT)
1	–	134,0 (C)	7	–	64,0 (C)
2	5,37 (m)	119,6 (CH)	8	1,38 (s)	27,0 (CH_3)
3	2,07 (m)	26,7 (CH_2)	9	1,40 (s)	26,4 (CH_3)
4	1,60 (m)	44,4 (CH)	10	1,66 (s)	23,2 (CH_3)
5	1,87 (m)	24,1 (CH_2)	11	–	N.O.*
6	2,02 (m)	30,6 (CH_2)			

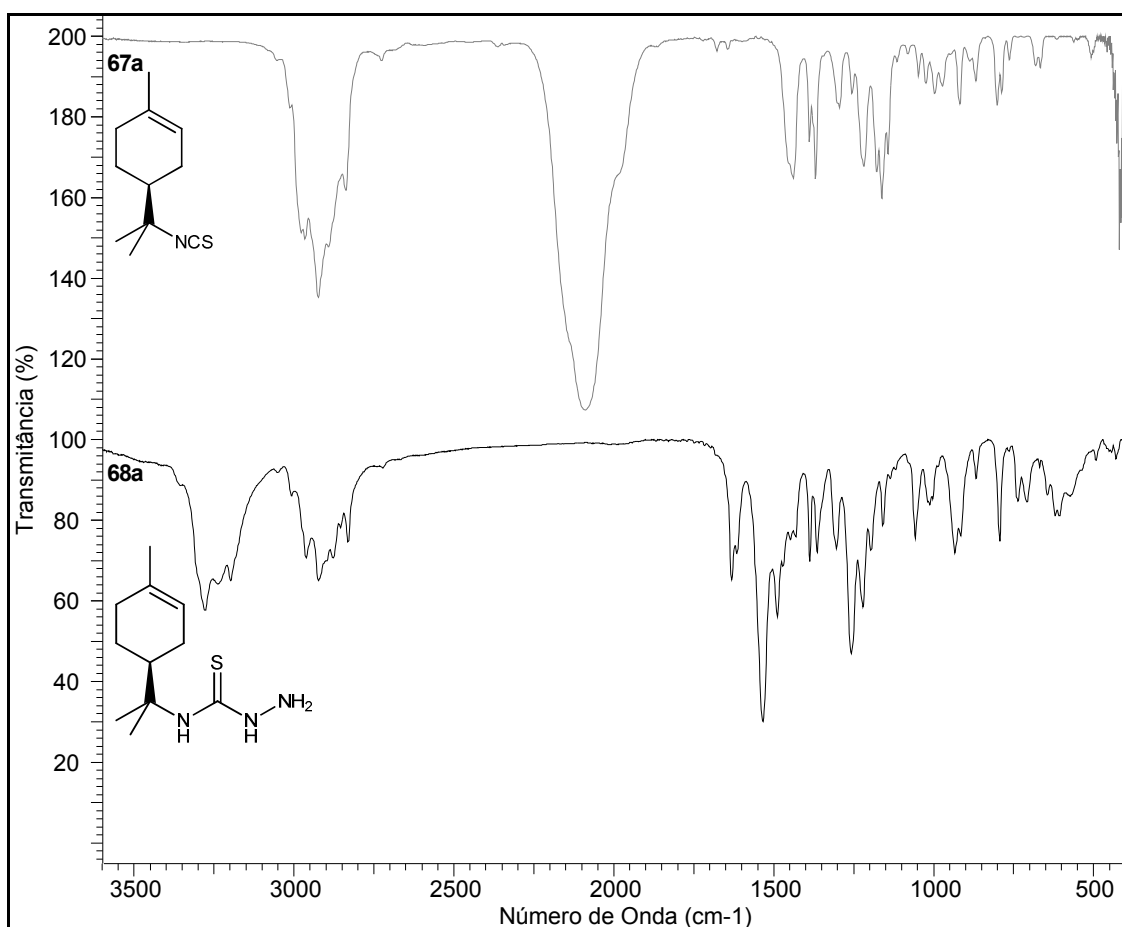
*Não Observado.



4.2.2. Tiossemicarbazidas do limoneno (**68a-b**)

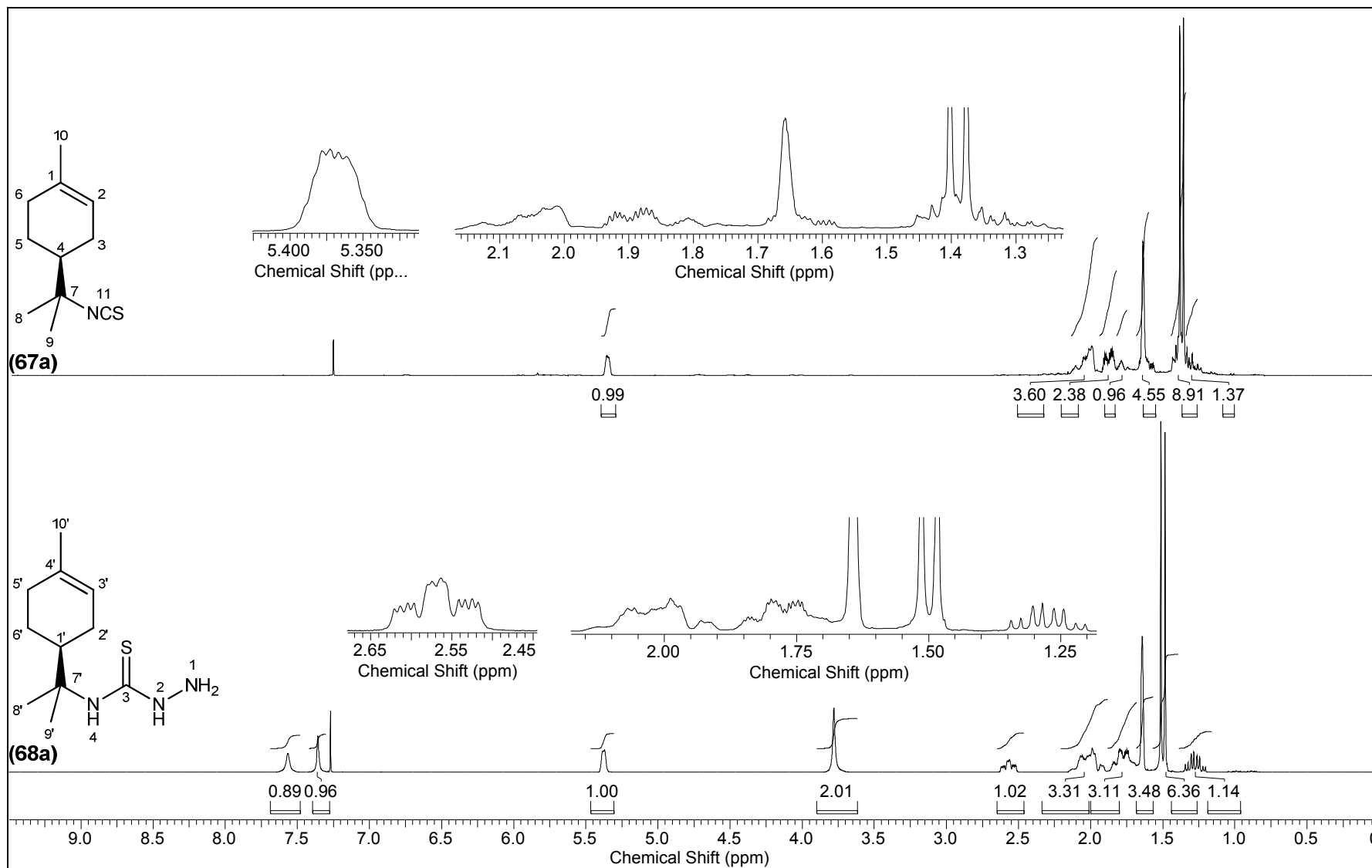
Na comparação do espectro de absorção no infravermelho da tiossemicarbazida do limoneno (**68a**) com seu precursor, o isotiocianoterpeno **67a** (**Figura 17**), notou-se o desaparecimento da banda do grupamento NCS. Como principais bandas do grupamento tiossemicarbazida, destacam-se estiramentos do grupo tiocarbonila em 1540 cm^{-1} e deformações axiais para as ligações N-H, na região de $3350\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$.

Figura 17. Espectros de absorção no infravermelho do isotiocianoterpeno (**67a**) e da tiossemicarbazida (**68a**) do S-(-)-limoneno.



Na comparação dos espectros de RMN de ^1H do derivado **68a** com o de seu precursor **67a** (**Figura 18**), observa-se o surgimento de sinais largos para H2 e H4 em δ_{H} 7,57 e 7,36, e para H1 em δ_{H} 3,78, referentes aos hidrogênios ligados a nitrogênio. O multiplete correspondente ao hidrogênio do grupo metínico (H1') foi observado em δ_{H} 2,57 e os demais sinais correspondentes à porção terpênica apresentaram pouca ou nenhuma variação.

Figura 18. Espectros de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do isotiocianoterpeno (**67a**) e da tiossemicarbazida (**68a**) do *S*-(-)-limoneno.



Na comparação dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT do derivado **68a** com o de seu precursor **67a** (**Figura 19**) destaca-se o surgimento do sinal em δ_{C} 180,5, referente ao carbono tiocarbonílico C3. Alteração mais significativa de deslocamento químico ocorreu para C7' (δ_{C} 64,0 para δ_{C} 58,3, devida a uma leve blindagem, o que também ocorreu para C8, C9 e C4, porém menos pronunciadamente.

Os dados observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C para as tiossemicarbazidas (**68a-b**) mostraram-se concordantes com a literatura (Yamaguchi *et al.*, 2009) e são apresentados na **Tabela 6**.

Figura 19. Espectros de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do isotiocianoterpeno (**67a**) e da tiossemicarbazida (**68a**) do S-(-)-limoneno.

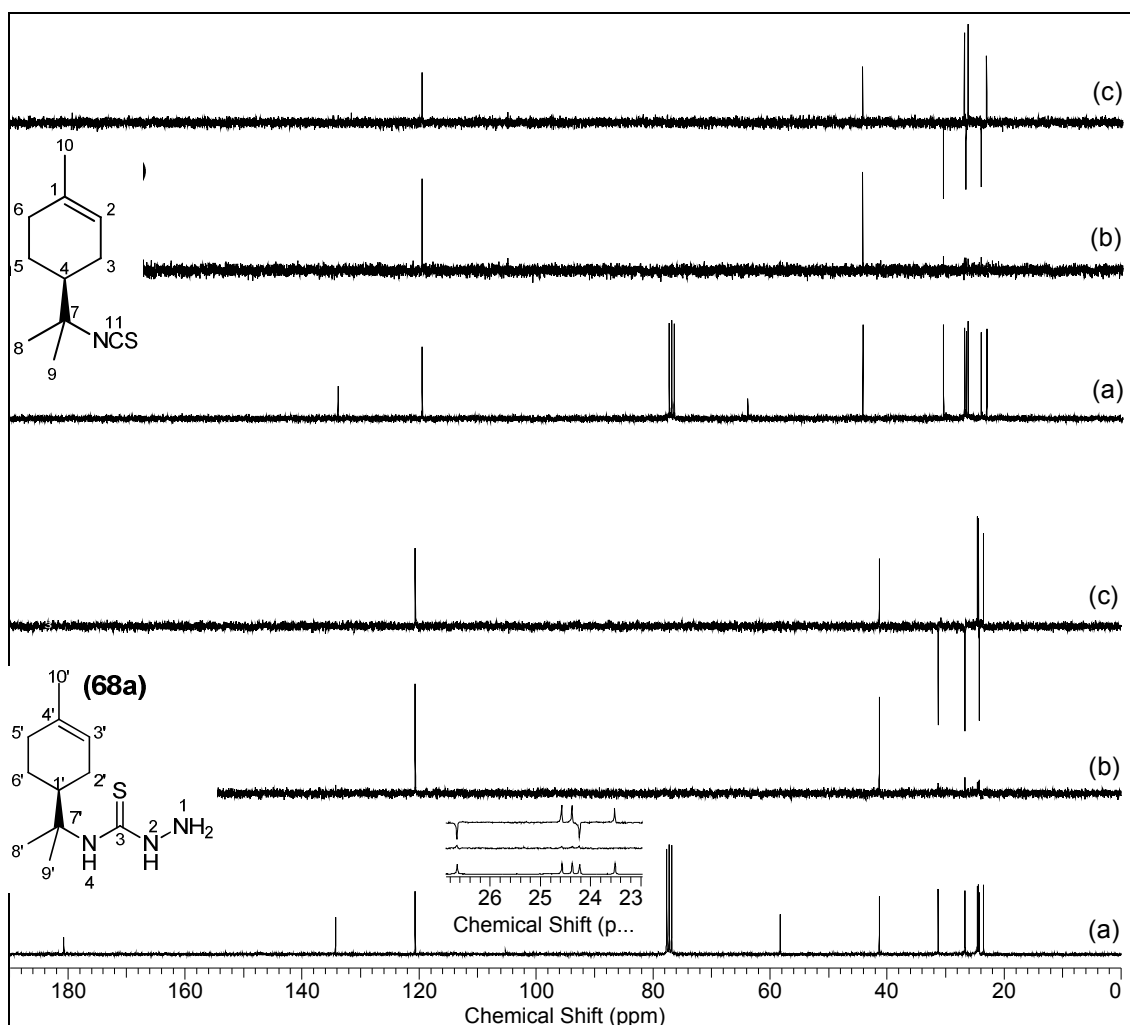
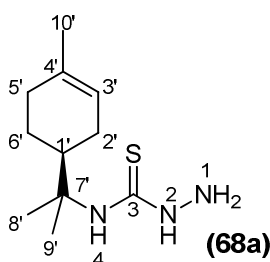


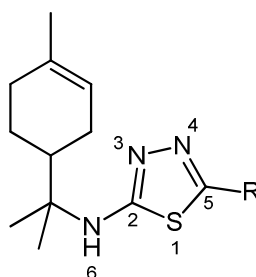
Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) da tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno (**68a**).

C/H	δ_{H} (mult.)	δ_{C} (DEPT)	C/H	δ_{H} (mult.)	δ_{C} (DEPT)
1	3,78 (sl)	–	4'	–	134,0 (C)
2	7,57* (sl)	–	5'	1,97-2,07 (m)	31,0 (CH_2)
3	–	180,5 (C)	6'	1,74-1,81 (m)	24,0 (CH_2)
4	7,36* (sl)	–	7'	–	58,3 (C)
1'	2,57 (m)	41,1 (CH)	8'	1,51 (s)	24,4 (CH_3)
2'	1,83-1,98 (m)	26,4 (CH_2)	9'	1,48 (s)	24,1 (CH_3)
3'	5,38 (m)	120,4 (CH)	10'	1,64 (s)	23,3 (C)

* Os valores podem estar invertidos.



4.2.3. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos (69-89)a, (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b



Para os espectros de absorção no IV do núcleo 1,3,4-tiadiazol, bandas referentes às deformações de $\text{C}=\text{N}$ (aromático) e $\text{C}=\text{N}-\text{N}=\text{C}$ ocorrem na região média do infravermelho ($1600-1450\text{ cm}^{-1}$ e $1500-1450\text{ cm}^{-1}$, respectivamente), ao passo que bandas $\text{C}-\text{S}-\text{C}$ e $\text{C}-\text{N}$ são verificadas mais dificilmente, abaixo de 1000 cm^{-1} (Carvalho *et al.*, 2008; Turan *et al.*, 2011). A porção 2-amino fornece uma banda única acima de 3100 cm^{-1} , devida ao estiramento da ligação NH .

Em todos os espectros de RMN de ^1H dos derivados 1,3,4-tiadiazol houve a manutenção dos deslocamentos químicos da porção terpênica em relação ao precursor tiossemicarbazida (**68a-b**), com exceção do multipletto

referente a H1', que se deslocou de δ_H 2,57 para δ_H 2,12-2,18. Os hidrogênios ligados a N-6 apresentaram-se na forma de sinal largo, na região de δ_H 5,38 a 6,63, sendo o sinal característico para o RMN de 1H deste grupo de compostos.

Para todos os espectros de RMN de ^{13}C dos 1,3,4-tiadiazóis, também foi verificada a manutenção dos deslocamentos químicos da porção terpênica em relação ao precursor tiossemicarbazida (**68a-b**). Para a porção 1,3,4-tiadiazol, os sinais característicos no RMN de ^{13}C foram os de C2, entre δ_C 165,3-168,5, e de C5, entre δ_C 148,9-159,1, este sempre mais blindado que C2.

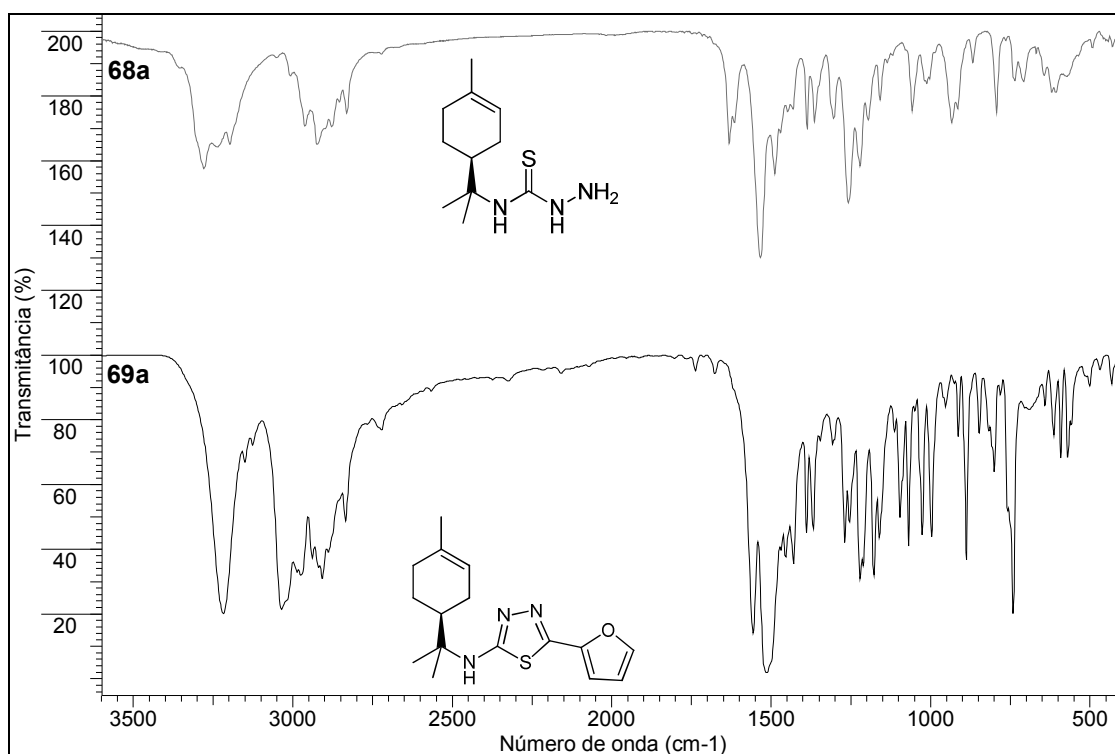
Os demais sinais de cada derivado 1,3,4-tiadiazol, assim como a discussão espectral para elucidação dos mesmos, são apresentados nas próximas seções para cada subgrupo de compostos. Figuras e tabelas justificam os dados apresentados nos parágrafos anteriores serão referenciadas juntamente com cada grupo de derivados, conforme as discussões que seguem.

4.2.3.1. 5-heteroaril-1,3,4-tiadiazol – Compostos **69-72**

Na comparação dos espectros de absorção no infravermelho para a tiossemicarbazida (**68a**) e ambos derivados 5-furanil-1,3,4-tiadiazol (**69a-b**) (**Figura 20**), nota-se a formação de única banda de estiramento de NH em 3220 cm^{-1} e aumento de intensidade de deformação axial de C-H de grupos aromáticos ($3080\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$). Houve desaparecimento do estiramento da tiocarbonila em 1540 cm^{-1} , para originar deformações do anel 1,3,4-tiadiazol, como C=N e C=N-N=C, em 1576 cm^{-1} e em $1528\text{-}1493\text{ cm}^{-1}$. Os demais 1,3,4-tiadiazóis deste grupo (**70-72**), apresentaram a banda de NH entre 3230 e 3180 cm^{-1} e estiramentos do núcleo tiadiazol entre $1530\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$.

Os dados espectrais de RMN para os derivados do limoneno 5-furanil-1,3,4-tiadiazol (**69**), 5-nitrofuranyl-1,3,4-tiadiazol (**70**), 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol (**71**) e 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol (**72**) constam na **Tabela 7** (1H) e na **Tabela 8** (^{13}C /DEPT). Como os pares **69** e **71**, **70** e **72** apresentaram os mesmos padrões de sinais nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C , apenas os compostos **69a** e **72a** deste grupo terão seus espectros apresentados.

Figura 20. Espectros de absorção no infravermelho da tiossemicarbazida (**68a**), do 5-furanil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**69a**).

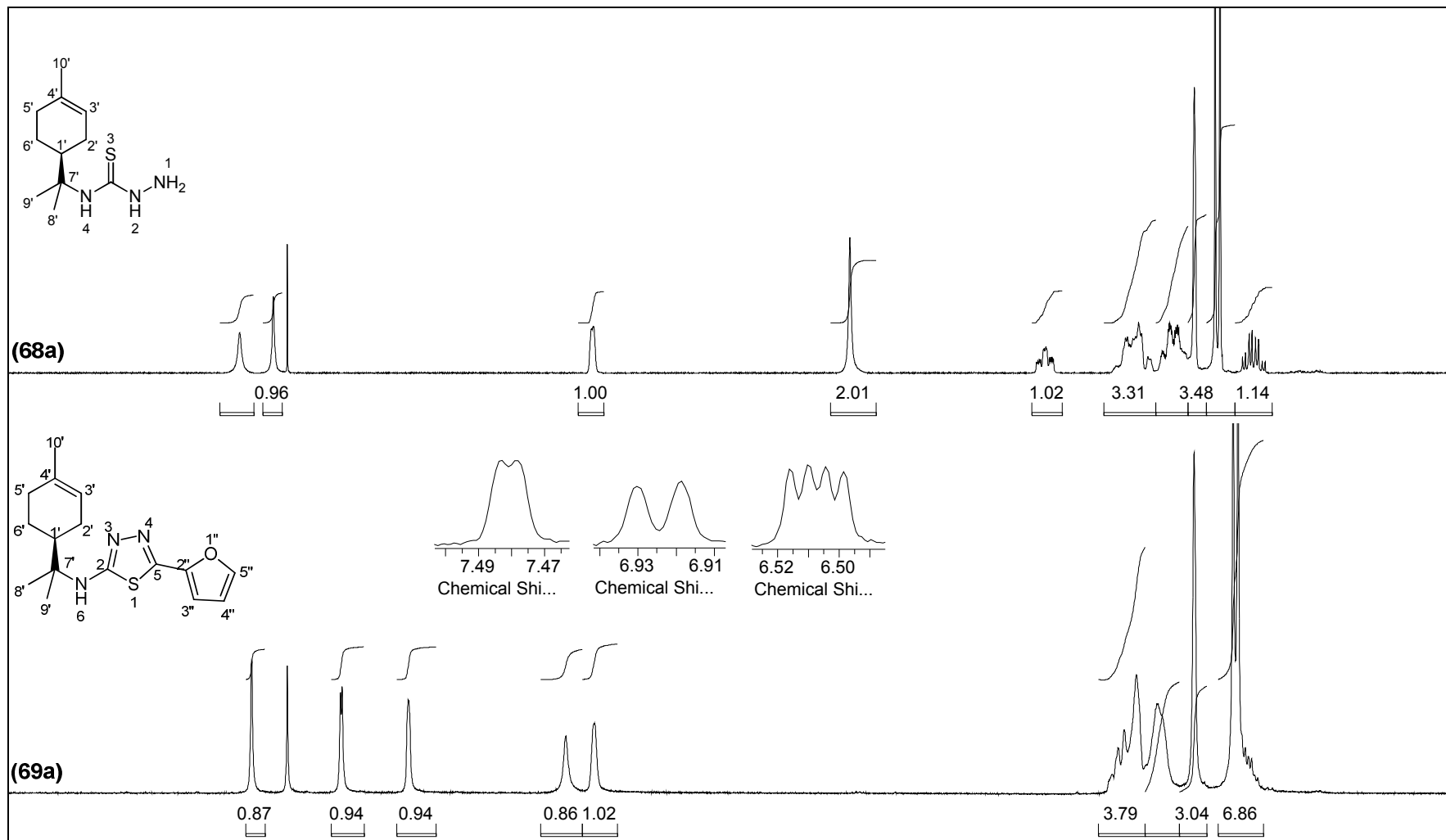


Na **Figura 21**, são apresentados os espectros de RMN de ^1H de ambos os 5-furanil-1,3,4-tiadiazóis (**69a-b**), para se comprovar a correspondência dos sinais espectrais dos enantiômeros. Os espectros foram idênticos entre si, com exceção do sinal largo para H6 que ocorreu em δ_{H} 5,54 para o derivado **69a** e em δ_{H} 5,77 para o derivado **69b**. Na mesma figura, é apresentado o espectro de RMN de ^1H do precursor tiossemicarbazida **68a**, a título de comparação.

Nos espectros dos derivados 1,3,4-tiadiazol (**69a-b**) notou-se o desaparecimento dos sinais largos de H2 e H1 da tiossemicarbazida (em δ_{H} 7,57 e δ_{H} 3,78 no espectro desta) e deslocamento do sinal referente a H6 dos 1,3,4-tiadiazóis de δ_{H} 7,36 para δ_{H} 5,77-5,54. A porção incorporada do aldeído forneceu dupletos em δ_{H} 7,48 ($J=1,8\text{Hz}$) e 6,92 ($J=3,5\text{Hz}$) para H5'' e H3'', respectivamente, e duplo duplete em δ_{H} 6,51 ($J=1,8$ e 3,5 Hz) para H4''. Os valores de J foram típicos para o núcleo furano (Silverstein *et al.*, 2006).

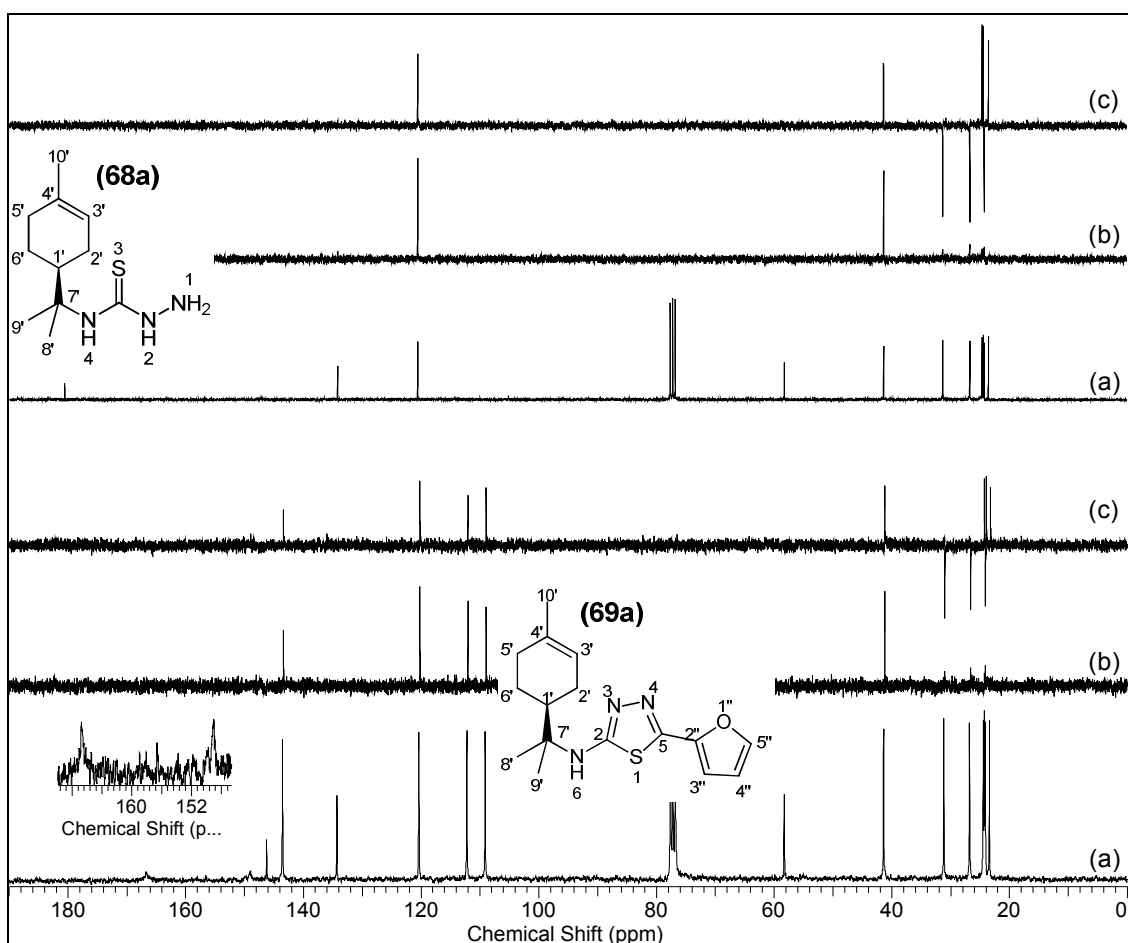
Os deslocamentos químicos de H3'' e H4'' para o derivado **69** foram menores que para os mesmos hidrogênios do 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol (**71**) (δ_{H} 7,31 e 7,06) mostrando efeito de doação de densidade eletrônica mais eficiente pelo oxigênio. H5'' quase não apresentou variação.

Figura 21. Espectros de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) da tiossemicarbazida (**68a**) e do 5-furanil-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**69a**).



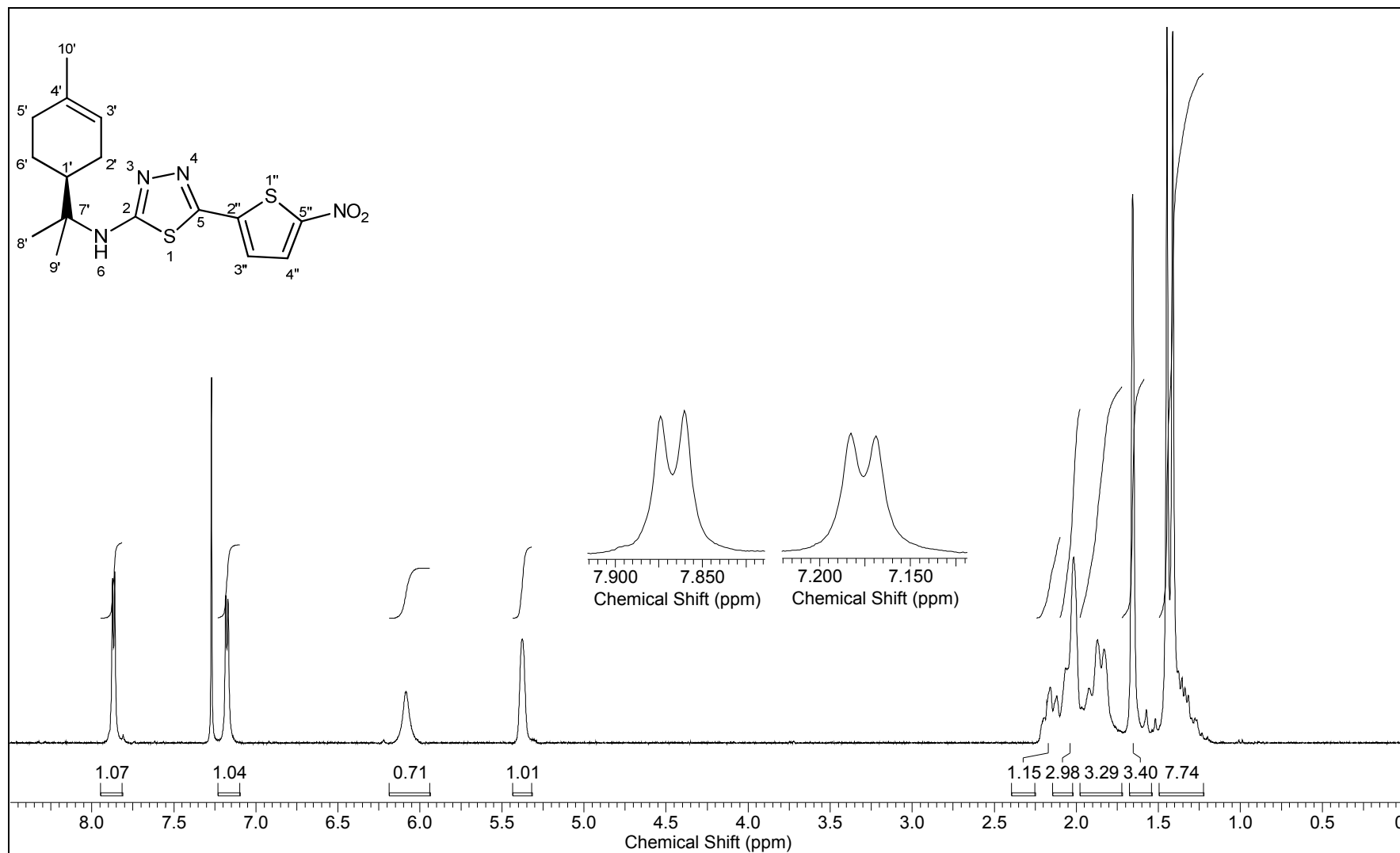
Na comparação dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT do 5-furânil-1,3,4-tiadiazol **69a** com seu precursor **68a** (**Figura 22**), houve ausência do carbono tiocarbônico (δ_{C} 180,5 para a tiossemicarbazida) e surgimento dos sinais em δ_{C} 166,8 e δ_{C} 149,0 referentes a C2 e C5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol. Sinais decorrentes da incorporação do núcleo furano ocorreram em δ_{C} 146,2 (C2''), δ_{C} 143,3 (C5''), δ_{C} 112,0 e 108,9 (C3'' e C4''). O 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol do limoneno (**71**) apresentou maior deslocamento químico para C2'' (δ_{C} 133,5) do que para os demais carbonos do núcleo heteroarômico (δ_{C} 127,0-127,4).

Figura 22. Espectros de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° da tiossemicarbazida (**68a**) e do 5-furânil-1,3,4-tiadiazol (**69a**) do S(-)-limoneno.



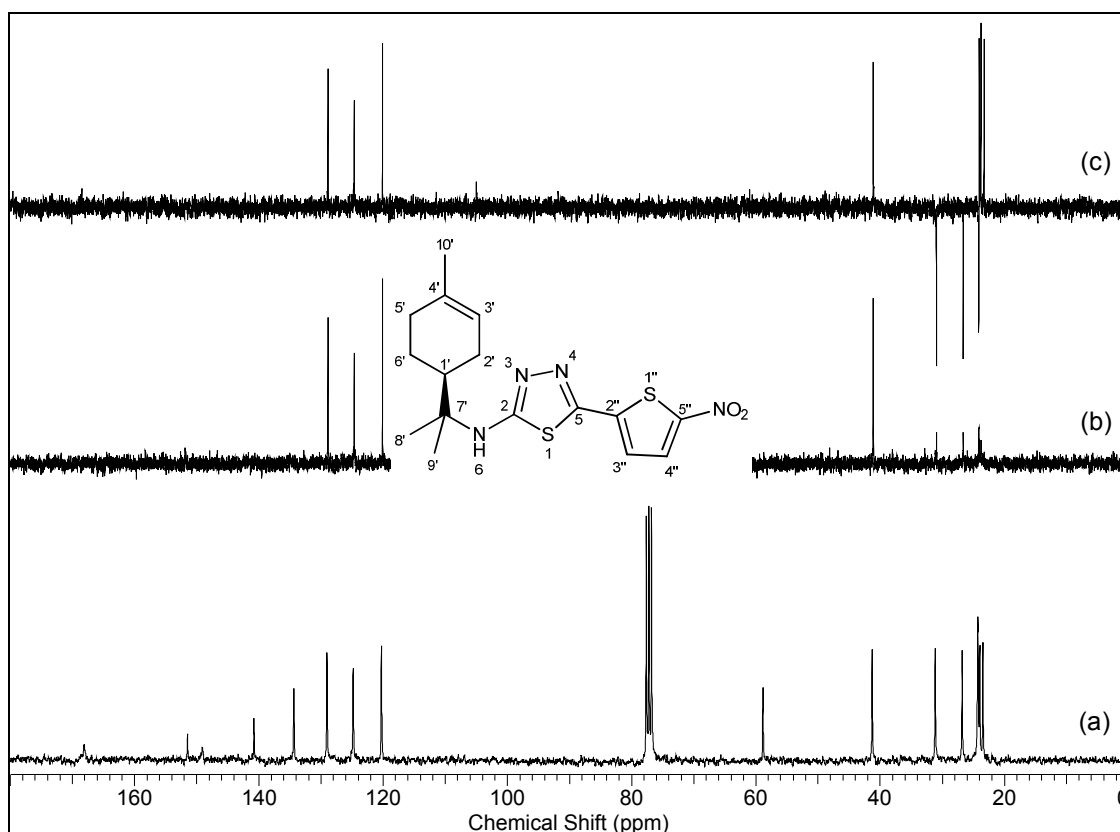
No espectro de RMN de ^1H (**Figura 23**) do 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**72a**) o sinal de H6 ocorreu em δ_{H} 6,08 e foi observada maior desblindagem para H4'' do que para H3'', que apresentaram dupletos em δ_{H} 7,87 e 7,18 ($J=4,1$ Hz). O efeito foi decorrente da retirada de densidade eletrônica pelo grupamento NO_2 , mesmo comportamento observado para o 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol (**70**), com δ_{H} 7,44 para H4'' e δ_{H} 7,15 para H3''.

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-nitrofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**72a**).



Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT do derivado **72a** (Figura 24), os deslocamentos químicos para C2 e C5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol ocorreram em δ_{C} 167,9 e δ_{C} 148,9. Sinais correspondentes ao núcleo nitro-tiofeno foram observados em δ_{C} 140,6 e 151,3 (referentes a C2'' e C5''), e δ_{C} 124,6 e 128,9 (referentes aos carbonos ligados a hidrogênio C3'' e C4''). Para o 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol do limoneno (**70**), C2'' e C5'' apresentaram deslocamentos químicos análogos ao do 5-nitrotiofenil, enquanto que C3'' e C4'' ocorreram em região inferior do espectro (δ_{C} 110,6 e 113,8).

Figura 24. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**72a**).



As atribuições de carbono e hidrogênio para ambos os núcleos heteroaromáticos do derivado **72a** foram confirmadas por correlações $^1\text{Hx}^{13}\text{C}$ a longa distância (Figura 25). No mapa de contornos HMBC puderam ser observados acoplamentos a duas ligações ($^2J_{\text{CH}}$) entre H4'' e C3''; H3'' e C2''; H3'' e C4''; e acoplamentos a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre H4'' e C2''; H3'' e C5''; H3'' e C5''.

Figura 25. Expansão do mapa de contornos HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**72a**).

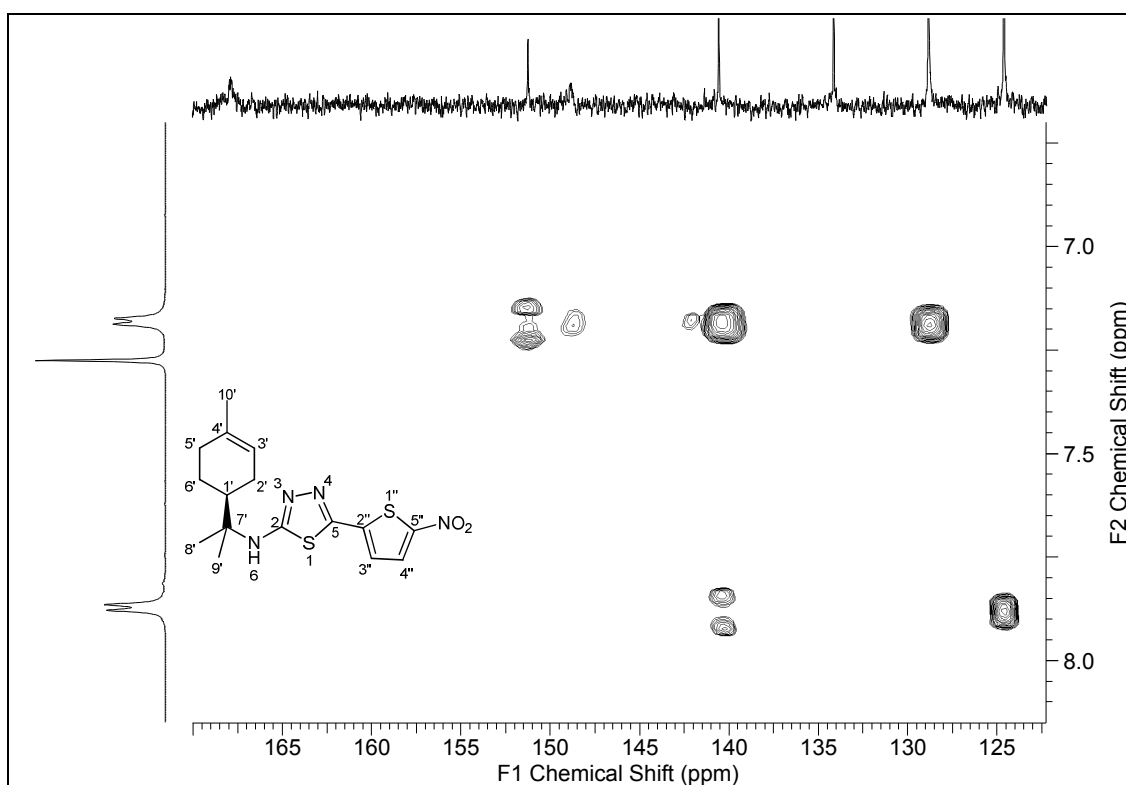


Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) dos 5-heteroaril-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**69-72a**).

H	69a δ_{H} (mult., J em Hz)	70a δ_{H} (mult., J em Hz)	71a δ_{H} (mult., J em Hz)	72a δ_{H} (mult., J em Hz)
6	5,54 (sl)	6,11 (sl)	5,53 (sl)	6,08 (sl)
1'	2,12 (m)	2,16 (m)	2,14 (m)	2,17 (m)
2'	2,06 (m)	2,05 (m)	2,06 (m)	2,06 (m)
3'	5,37 (m)	5,37 (m)	5,37 (m)	5,38 (m)
5'	2,00 (m)	2,00 (m)	2,01 (m)	2,01 (m)
6'	1,87 (m)	1,86 (m)	1,87 (m)	1,87 (m)
8'	1,40 (s)	1,44 (s)	1,41 (s)	1,45 (s)
9'	1,37 (s)	1,41 (s)	1,37 (s)	1,41 (s)
10'	1,64 (s)	1,65 (s)	1,65 (s)	1,66 (s)
3''	6,92 (d, J=3,5)	7,15 (d, J=3,8)	7,31 (dd, J=3,7; 1,0)	7,18 (d, J=4,1)
4''	6,51 (dd, J=3,5; 1,8)	7,44 (d, J=3,8)	7,06 (dd, J=5,1; 3,7)	7,87 (d, J=4,1)
5''	7,48 (d, J=1,8)	—	7,36 (dd, J=5,1; 1,0)	—

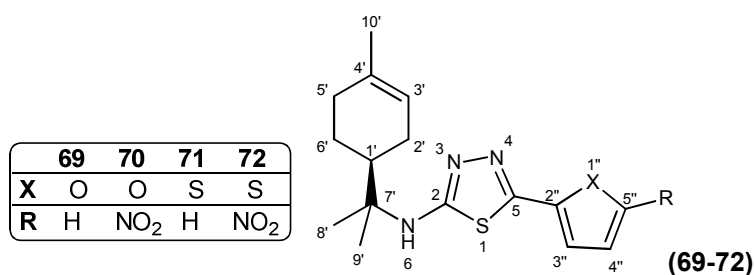
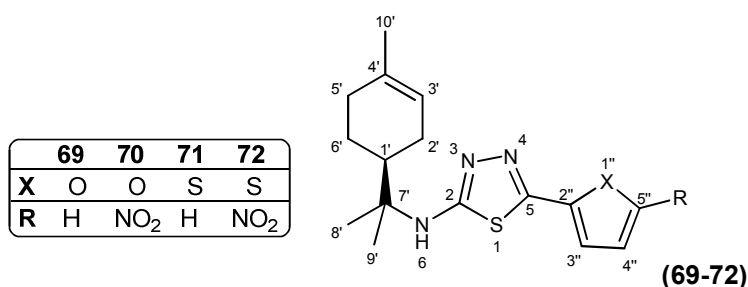


Tabela 8. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45 MHz, CDCl_3) dos 5-heteroaril-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**69-72**)a.

C	69a δ_c (DEPT)	70a δ_c (DEPT)	71a δ_c (DEPT)	72a δ_c (DEPT)
2	166,8 (C)	167,9 (C)	166,0 (C)	167,9 (C)
5	149,0 (C)	151,6 (C)	152,0 (C)	148,9 (C)
1'	41,2 (CH)	41,0 (CH)	41,2 (CH)	41,1 (CH)
2'	26,5 (CH_2)	26,6 (CH_2)	26,6 (CH_2)	26,6 (CH_2)
3'	120,2 (CH)	119,9 (CH)	120,2 (CH)	120,1 (CH)
4'	134,1 (C)	134,1 (C)	134,1 (C)	134,1 (C)
5'	30,9 (CH_2)	31,0 (CH_2)	31,0 (CH_2)	30,9 (CH_2)
6'	24,1 (CH_2)	24,2 (CH_2)	24,1 (CH_2)	24,1 (CH_2)
7'	58,1 (C)	59,0 (C)	58,2 (C)	58,6 (C)
8'	24,3 (CH_3)	23,9 (CH_3)	24,3 (CH_3)	24,0 (CH_3)
9'	23,9 (CH_3)	23,6 (CH_3)	24,0 (CH_3)	23,8 (CH_3)
10'	23,2 (CH_3)	23,2 (CH_3)	23,2 (CH_3)	23,3 (CH_3)
2''	146,2 (C)	144,7 (C)	133,5 (C)	140,6 (C)
3''	112,0* (CH)	110,6 (CH)	127,4* (CH)	124,6 (CH)
4''	108,9* (CH)	113,8 (CH)	127,0* (CH)	128,9 (CH)
5''	143,3 (CH)	148,0 (C)	127,1* (CH)	151,3 (C)

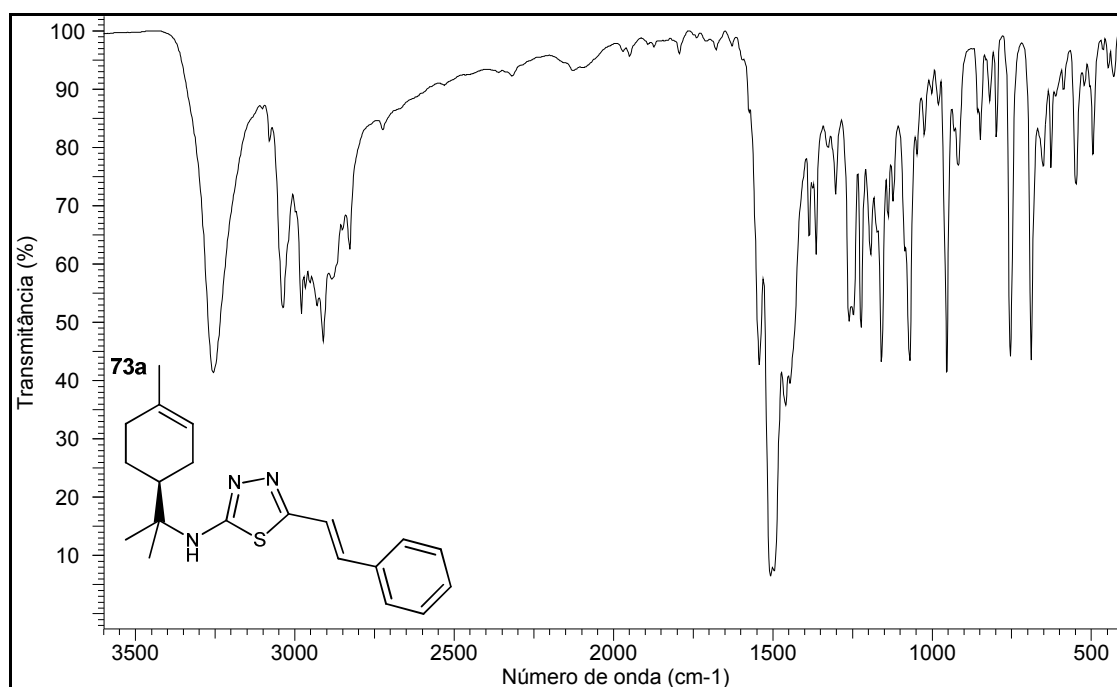
* Os valores podem estar invertidos;



4.2.3.2. (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol – Composto 73

O espectro de absorção na região do infravermelho para o (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**73a**) (**Figura 26**) apresenta banda em 3035 e 3003 cm^{-1} de deformação axial de CH de alquenos e de anéis aromáticos, respectivamente. A banda de estiramento NH pode ser observada em 3258 cm^{-1} , provável banda de deformação angular de CH em alquenos, em 954 cm^{-1} , e de deformações C=N (aromática) e C=N-N=C do núcleo 1,3,4-tiadiazol, entre 1571-1461 cm^{-1} .

Figura 26. Espectro de absorção no infravermelho para o (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**73a**).



O espectro de RMN de ^1H para o derivado **73** (**Figura 27**) apresentou deslocamentos químicos em δ_{H} 7,49 (m, H4''/H8'') e em δ_{H} 7,36 (m, H5''/H6''/H7'') para os hidrogênios do anel benzênico monossustituído. Dupletos em δ_{H} 6,99 e δ_{H} 7,30 foram referentes a H2'' e H1'', respectivamente, com constante de acoplamento de 16,1 Hertz, confirmando configuração *E* da ligação dupla. O sinal largo referente a H6 ocorreu em δ_{H} 6,63.

Nos espectros de RMN de ^{13}C /DEPT deste derivado (**Figura 28**) foram observados sinais em δ_{C} 119,5 e δ_{C} 134,8 (CH) referentes aos carbonos da ligação dupla C1'' e C2'', em δ_{C} 135,8 para C3'' e entre δ_{C} 126,7-128,8 para carbonos ligados a hidrogênio do anel benzênico. Os deslocamentos químicos respectivos a C2 e C5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol foram δ_{C} 165,7 e δ_{C} 157,8.

Os acoplamentos $^3J_{\text{CH}}$ no mapa de contornos HMBC (**Figura 29** e **Figura 30**) de H2'' (δ_{H} 6,99) com C5 (δ_{C} 157,8) e com C4''/C8'' (δ_{C} 126,7), e de H1'' (δ_{H} 7,30) com C3'' (δ_{C} 135,8) comprovam as atribuições dos hidrogênios da ligação dupla. As demais atribuições aos hidrogênios do anel benzênico, bem como aos carbonos do anel benzênico e da ligação dupla são confirmadas pelas correlações observadas no mapa de contornos HSQC (**Figura 31**). Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C observados para o (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol (**73a-b**) constam na **Tabela 9**.

Figura 27. Espectro de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**73a**).

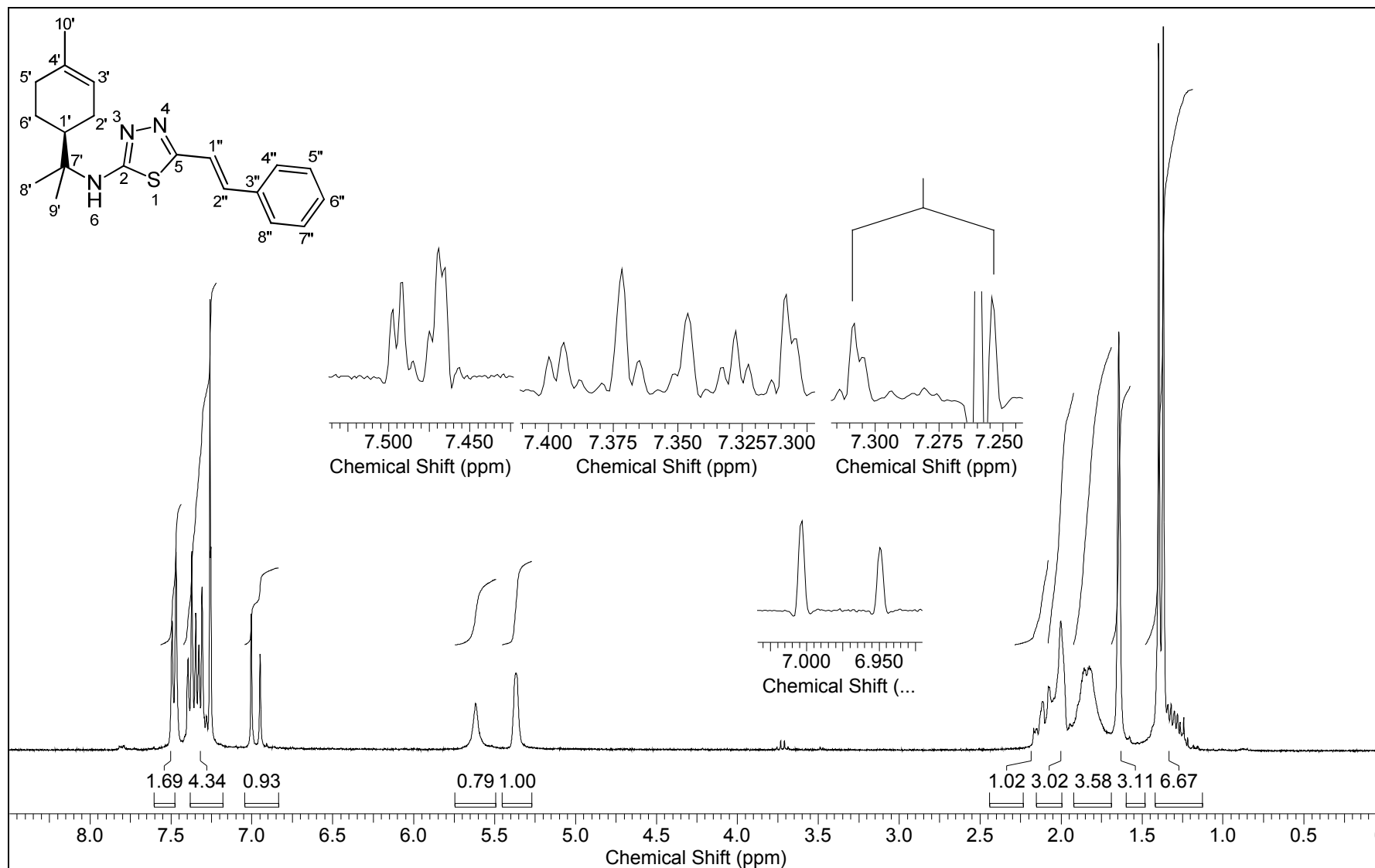


Figura 28. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90° ; (c) DEPT 135° do (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**73a**).

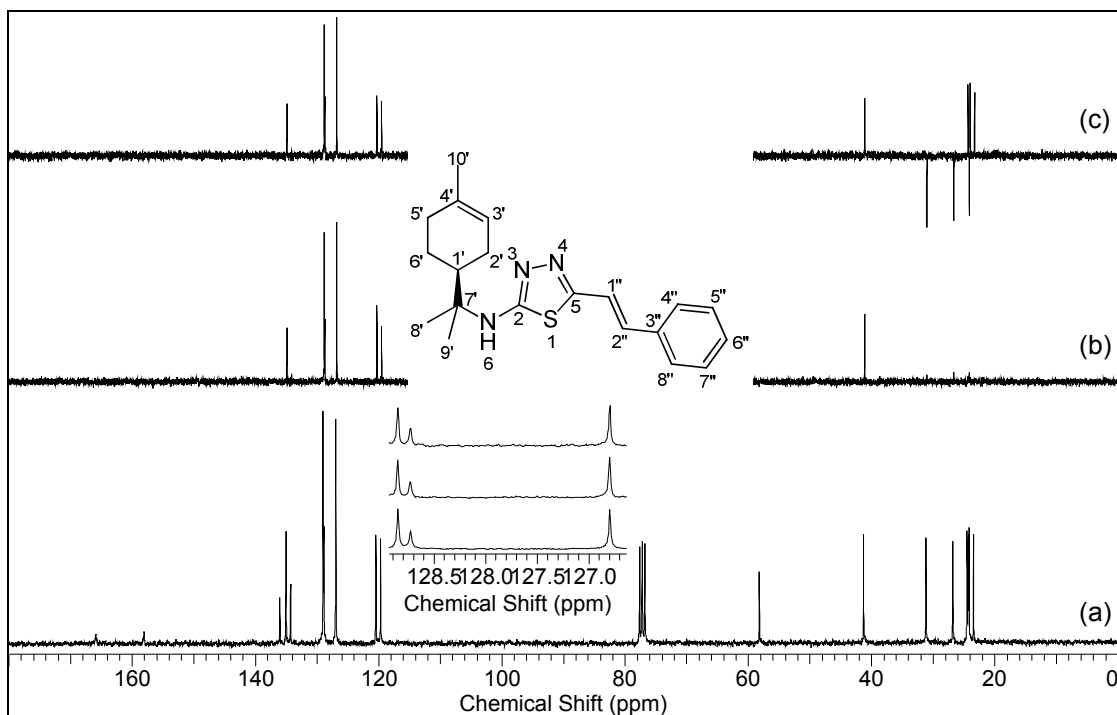


Figura 29. Expansão do mapa de contornos HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**73a**).

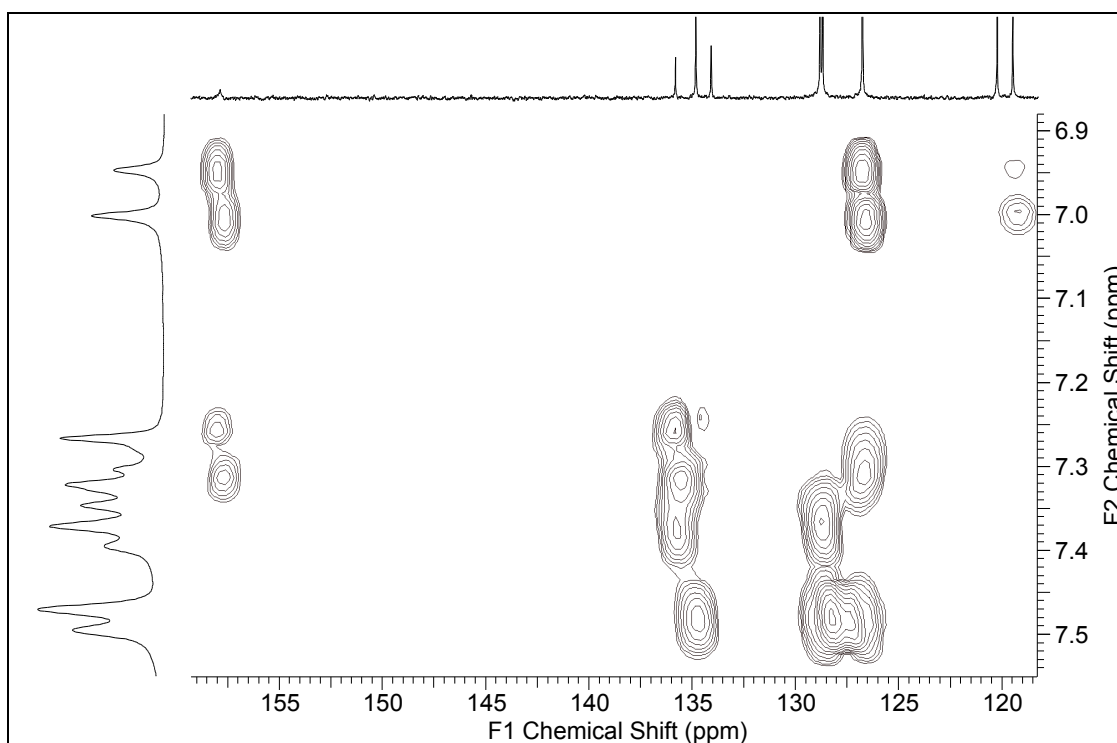


Figura 30. Expansão do mapa de contornos HMBC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**73a**).

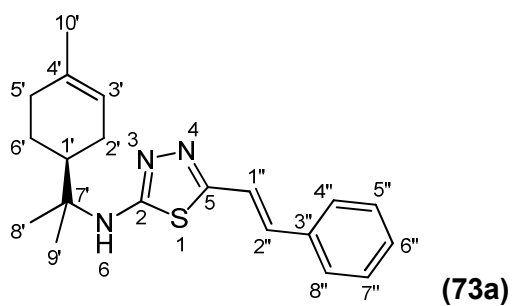
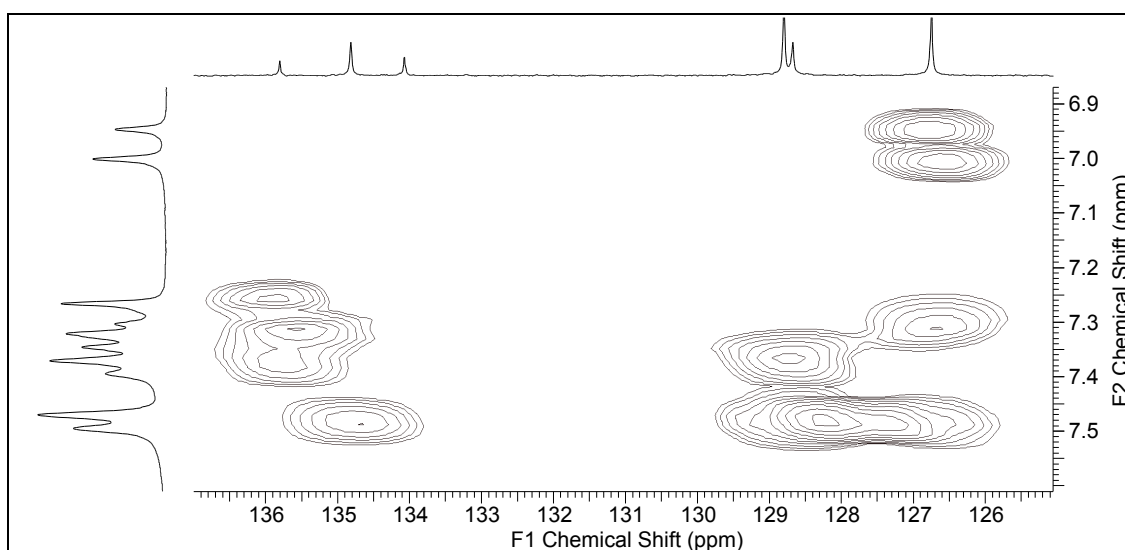


Figura 31. Expansão do mapa de contornos HSQC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**73a**).

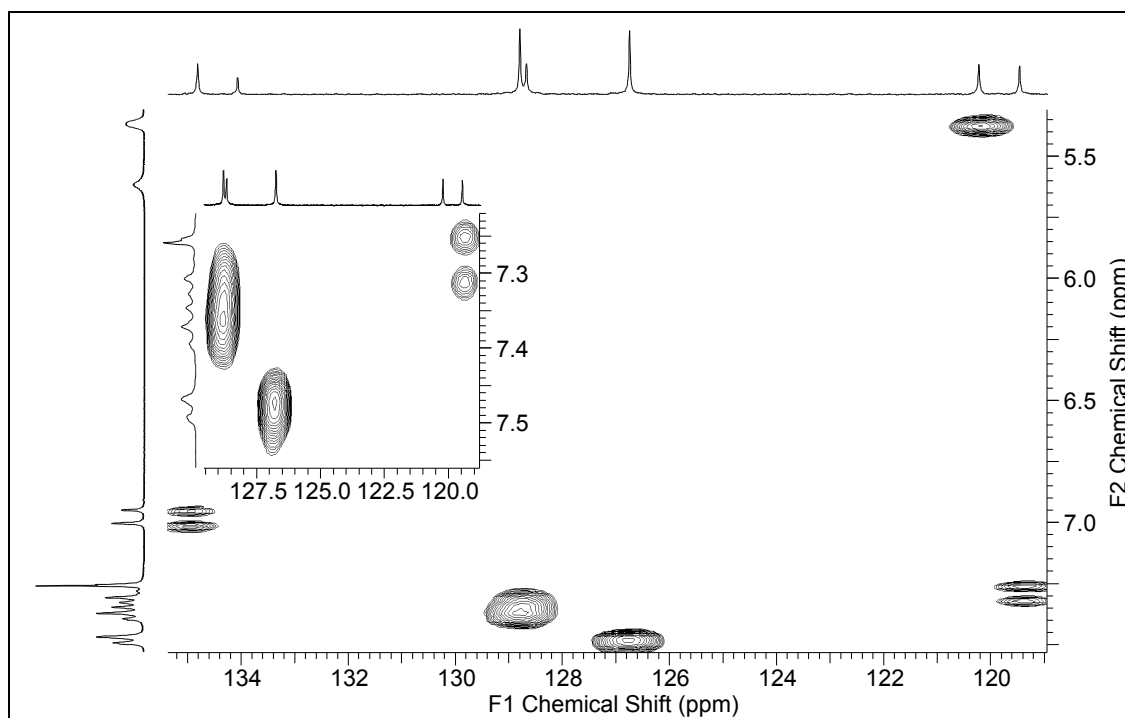
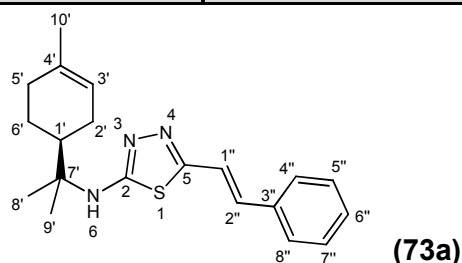


Tabela 9. Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) para o (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**73a**).

H/C	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C} (DEPT)	H/C	δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ_{C} (DEPT)
2	–	165,7 (C)	9'	1,38 (s)	24,0 (CH_3)
5	–	157,8 (C)	10'	1,65 (s)	23,2 (CH_3)
6	6,63 (sl)	–	1''	7,30 (d, <i>J</i> =16,1)	119,5 (CH)
1'	2,14 (m)	41,1 (CH)	2''	6,99 (d, <i>J</i> =16,1)	134,8 (CH)
2'	2,09 (m)	26,6 (CH_2)	3''	–	135,8 (C)
3'	5,38 (m)	120,2 (CH)	4''	7,49 (m)	126,7 (CH)
4'	–	134,1 (C)	5''	7,36 (m)	128,8 (CH)
5'	2,01 (m)	31,0 (CH_2)	6''	7,36 (m)	128,7 (CH)
6'	1,86 (m)	24,1 (CH_2)	7''	7,36 (m)	128,8 (CH)
7'	–	58,0 (C)	8''	7,49 (m)	126,7 (CH)
8'	1,41 (s)	24,3 (CH_3)			

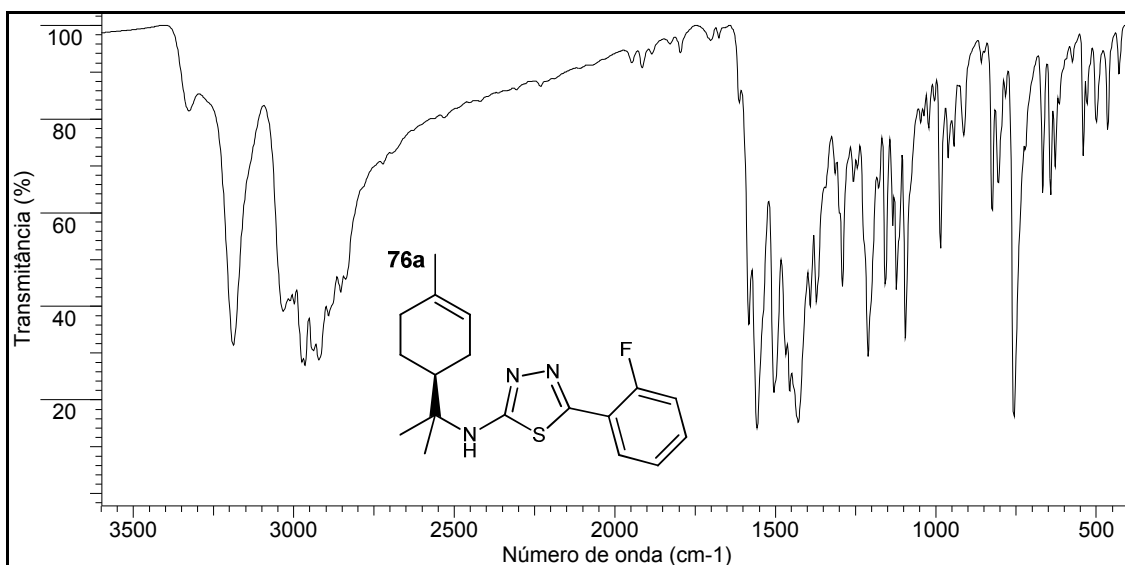


4.2.3.3. 5-fenil-1,3,4-tiadiazol e 5-[(*o*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazol – Compostos **74-77**

Na análise de absorção na região do infravermelho, os compostos **74**, **75** e **77** apresentaram a deformação NH entre $3222\text{-}3174\text{ cm}^{-1}$, bandas de CH aromático entre $3115\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ e bandas de C=N (aromático) e C=N-N=C entre $1564\text{-}1483\text{ cm}^{-1}$. O espectro de absorção no infravermelho para o 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**76a**) apresentou banda de alta intensidade referente à ligação CF em 765 cm^{-1} , além do estiramento para ligação NH em 3233 cm^{-1} e para ligações do núcleo 1,3,4-tiadiazol entre $1581\text{-}1488\text{ cm}^{-1}$. Estiramento de ligação carbono-halogênio também foi verificado para o 5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol do limoneno (**77**) em 754 cm^{-1} .

Para a discussão das análises de RMN deste grupo de 1,3,4-tiadiazóis, serão apresentados apenas os espectros do 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**76a**), visto a maior riqueza de sinais. Os dados de RMN do 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (**74**), 5-(*o*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**75**), 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**76**) e 5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**77**) do limoneno encontram-se na **Tabela 10** (^1H) e na **Tabela 11** ($^{13}\text{C}/\text{DEPT}$).

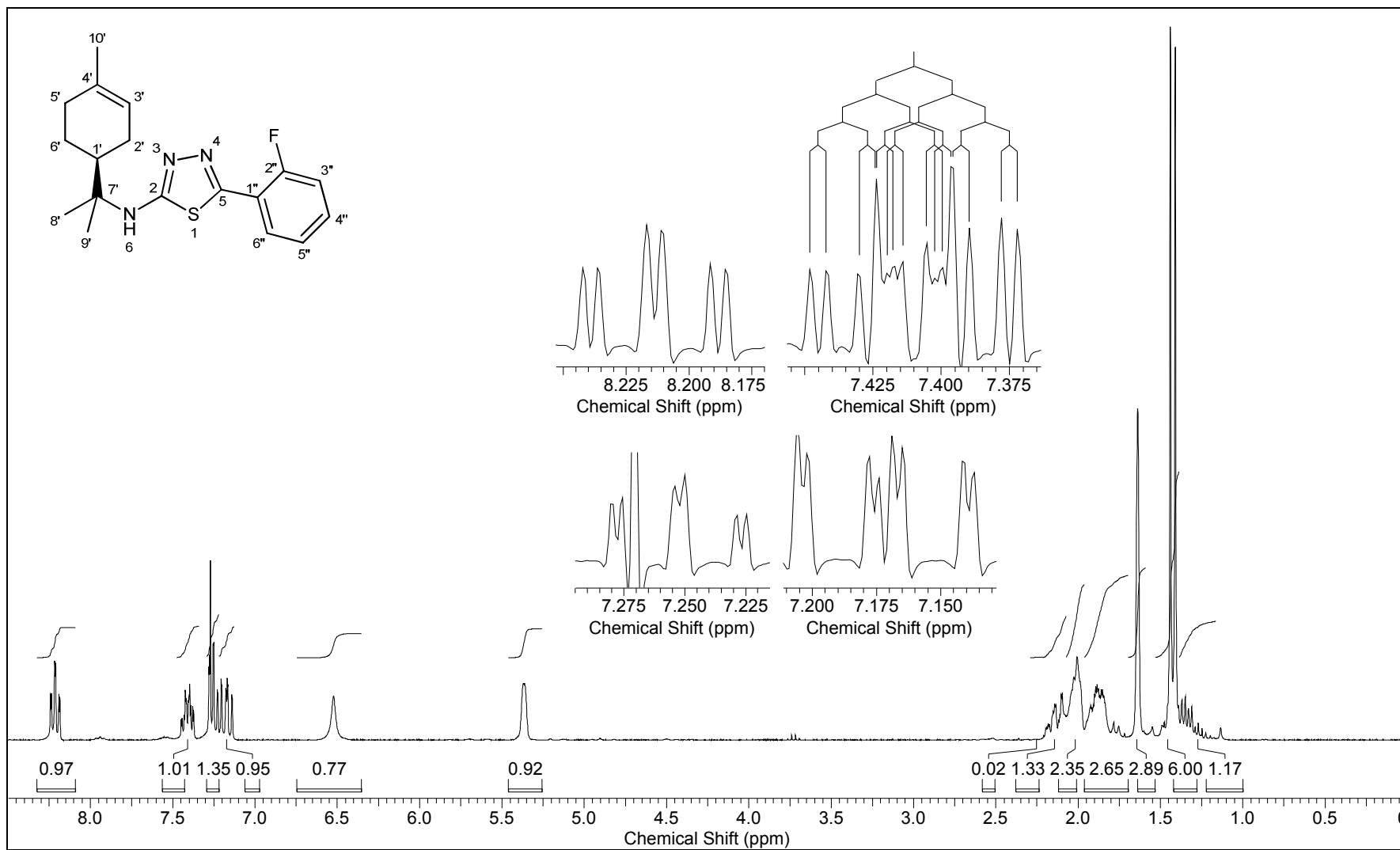
Figura 32. Espectro de absorção no infravermelho para o 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**76a**).



Na análise do espectro de RMN de ^1H para o derivado 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (**74**) foram observados sinais entre δ_{H} 7,41-7,81 referentes aos hidrogênios de anel benzênico monossustituído. Para o 5-(*o*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**75**) foram observados duplos dupletos para H3'' e H6'' em δ_{H} 7,88 e δ_{H} 7,78 e tripletos de dupletos para H4'' e H5'' em δ_{H} 7,58 e em δ_{H} 7,66. O 5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**77**) apresentou sobreposição de sinais para hidrogênios do anel benzênico em seu espectro e não foi possível a definição de multiplicidades. O deslocamento químico mais elevado foi atribuído a H6'' (δ_{H} 8,18) e os demais hidrogênios apresentaram sinais entre δ_{H} 7,35-7,45.

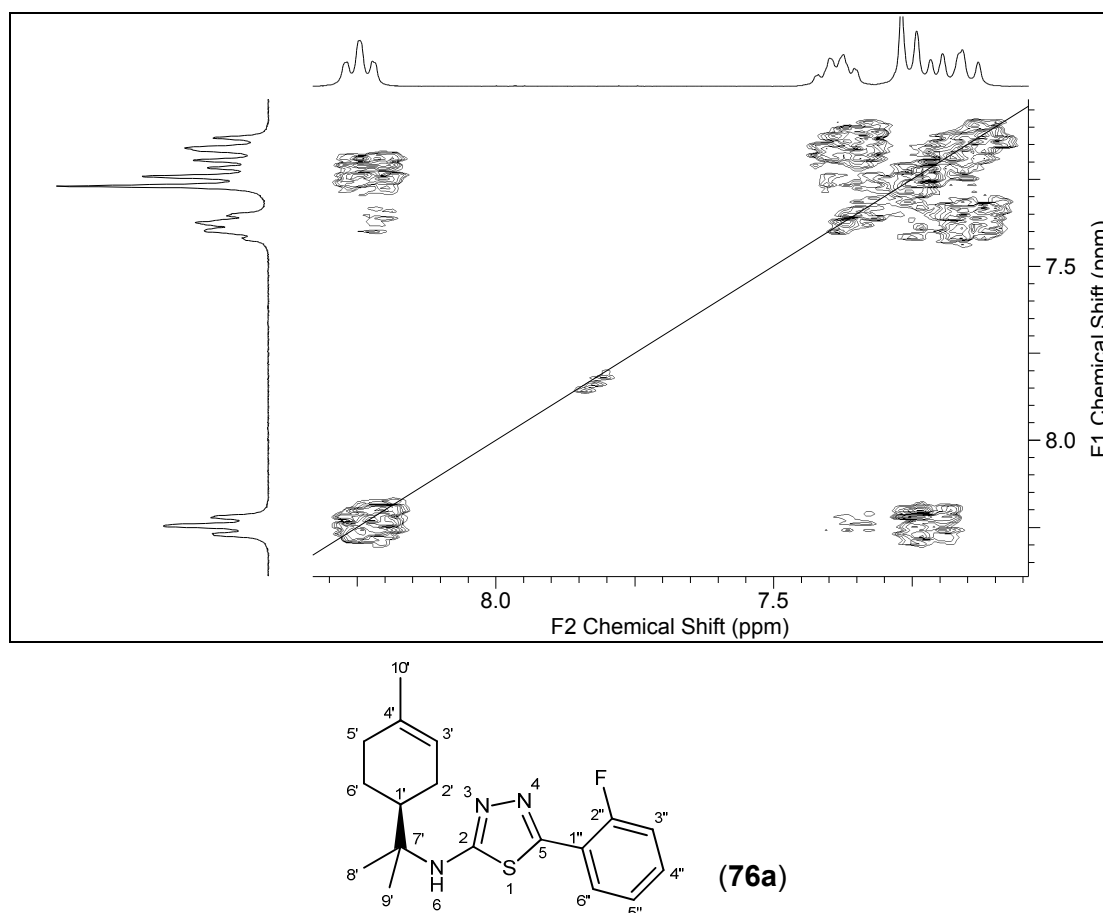
No espectro de RMN de ^1H para o 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**76a**) (**Figura 33**) foram observados acoplamentos ^1H - ^{19}F com valores típicos de J (Silverstein *et al.*, 2006). H6'' e H5'' apresentaram-se como tripletos de dupletos em δ_{H} 8,22 ($J=7,6$ e 1,8 Hz) e δ_{H} 7,25 ($J=7,6$ e 1,5 Hz), respectivamente. Para H5'' a maior constante de acoplamento ocorreu devido a $^2J_{\text{CH}}$ com H6'' e H4'', enquanto que para H6'', o mesmo valor de constante equivaleu a $^2J_{\text{CH}}$ com H5'' e com átomo de flúor em relação *meta*. Foi observado duplo duplo duplete para H3'' em δ_{H} 7,17, em que o acoplamento correspondente a ^1H - ^{19}F foi o de maior valor ($J=11,1\text{Hz}$). H4'' apresentou δ_{H} 7,41, acoplando-se com todos os hidrogênios do anel benzênico e com o átomo de flúor ($J=5,3$ Hz). O sinal em δ_{H} 6,52 foi atribuído a H6.

Figura 33. Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**76a**).



O mapa de correlações COSY para o 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**76a**) (Figura 34) confirma as atribuições de acoplamento de H6'' com H4''/H5'', de H5'' com H3''/H4''/H6'', de H3'' com H4''/H5'' e de H4'' com demais hidrogênios do anel benzênico.

Figura 34. Expansão do mapa de contornos COSY ($^1\text{H}\times^1\text{H}$) (300,06 MHz, CDCl_3) para o 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**76a**).



Nas análises de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, o 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (**74**) apresentou deslocamento químico para C1'' em δ_{C} 131,0 e sinais para CH do anel benzênico entre δ_{C} 126,8-129,5. O 5-(*o*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**75**) apresentou maior incremento no deslocamento químico para o C2'' (δ_{C} 148,4), ligado diretamente ao substituinte NO_2 , enquanto que os demais sinais do anel benzênico ocorreram entre δ_{C} 124,4-132,5. Para o 5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**77**), foi observado leve incremento no deslocamento químico para o C2'' (δ_{C} 131,4) e leve blindagem em C1'' (δ_{C} 129,8) e C3'' (δ_{C} 127,1) em relação ao anel monossustituído. Os demais sinais de CH do anel benzênico para o derivado **77** ocorreram em δ_{C} 130,3 e 130,4.

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do limoneno (**76a**) (**Figura 35**) foram observados sinais em forma de dupletos para carbonos distantes em até 5 ligações do átomo de flúor devido a acoplamento entre os núcleos ^{13}C e ^{19}F . Dupletos em δ_{C} 168,0 ($^5J_{\text{CF}} = 6,1$ Hz) e 149,6 ($^3J_{\text{CF}} = 7,7$ Hz) foram atribuídos aos carbonos 2 e 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol. Para o anel benzênico, o maior deslocamento químico foi observado para C2'' (δ_{C} 158,8, $^1J_{\text{CF}} = 250,5$ Hz), enquanto que houve blindagem em C1'' (δ_{C} 118,5, $^2J_{\text{CF}} = 12,2$ Hz) e C3'' (δ_{C} 116,0, $^2J_{\text{CF}} = 21,6$ Hz). Os demais carbonos apresentaram dupletos entre δ_{C} 124,8-131,4, com constantes de acoplamento de 2-3 Hz para C5'' ($^4J_{\text{CF}}$) e C6'' ($^3J_{\text{CF}}$), e 8,8 Hz para C4'' ($^3J_{\text{CF}}$).

Figura 35. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**76a**).

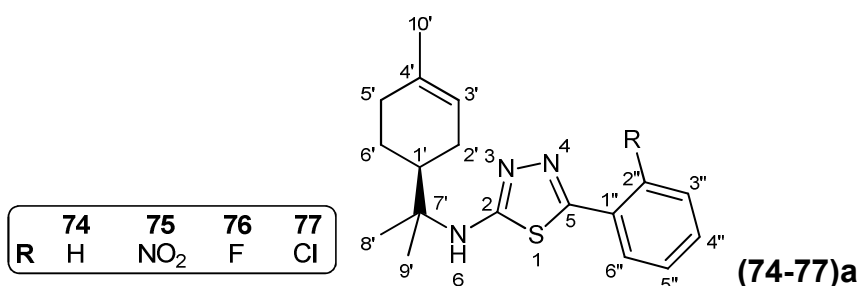
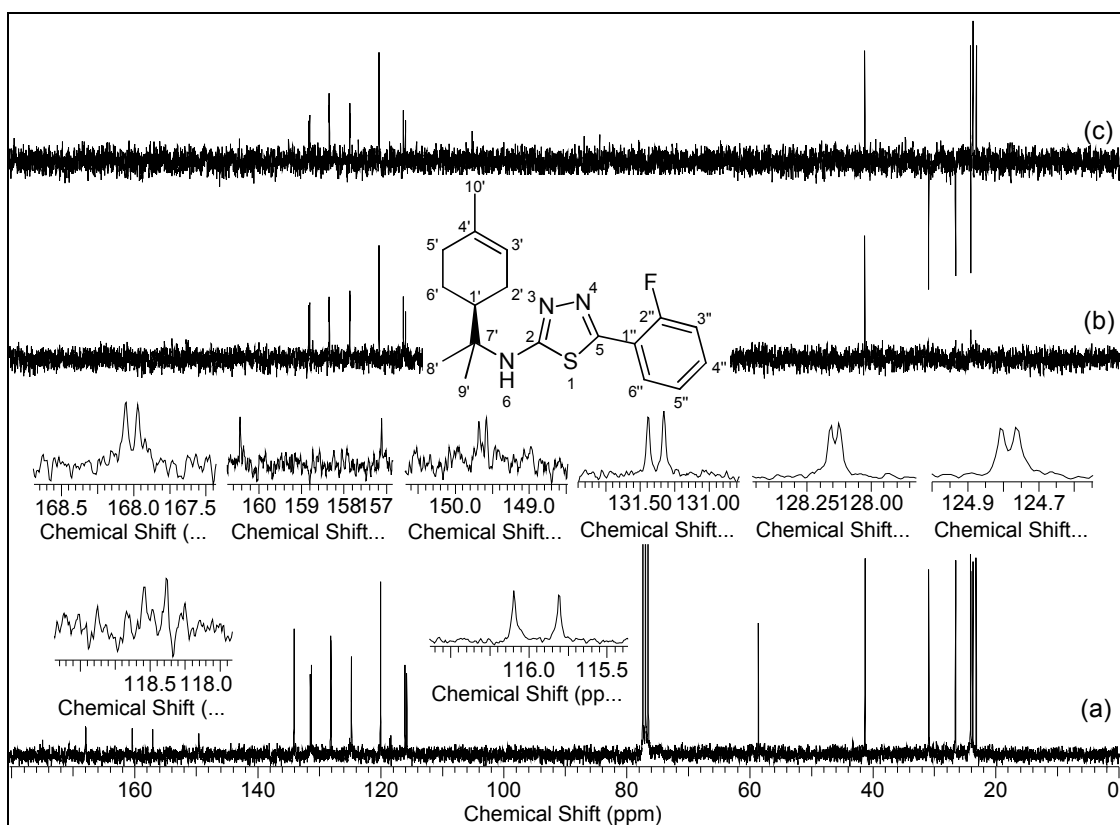


Tabela 10. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (**74a**) e dos 5-[(*o*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**75-77a**).

H	74a δ_{H} (mult., J em Hz)	75a δ_{H} (mult., J em Hz)	76a δ_{H} (mult., J em Hz)	77a δ_{H} (mult., J em Hz)
6	5,60 (sl)	6,01 (sl)	6,52 (sl)	5,60 (sl)
1'	2,18 (m)	2,12 (m)	2,18 (m)	2,16 (m)
2'	2,04 (m)	2,02 (m)	2,05 (m)	2,03 (m)
3'	5,38 (m)	5,38 (m)	5,37 (m)	5,37 (m)
5'	2,01 (m)	2,00 (m)	2,00 (m)	2,00 (m)
6'	1,87 (m)	1,87 (m)	1,87 (m)	1,87 (m)
8'	1,42 (s)	1,42 (s)	1,43 (s)	1,43 (s)
9'	1,39 (s)	1,39 (s)	1,40 (s)	1,40 (s)
10'	1,64 (s)	1,65 (s)	1,64 (s)	1,64 (s)
2''	7,81 (m)	–	–	–
3''	7,41 (m)	7,88 (dd, J=7,8; 1,3)	7,17 (ddd, J=11,1; 8,3; 1,5)	7,35* (m)
4''	7,41 (m)	7,58 (td, J=7,8; 1,5)	7,41 (dddd, J=8,3; 7,6; 5,3; 1,8)	7,45 (m)
5''	7,41 (m)	7,66 (td, J=7,8; 1,3)	7,25 (td, J=7,6; 1,5)	7,35 (m)
6''	7,81 (m)	7,78 (dd, J=7,8; 1,5)	8,22 (td, J=7,6; 1,8)	8,18* (m)

* Os valores podem estar invertidos.

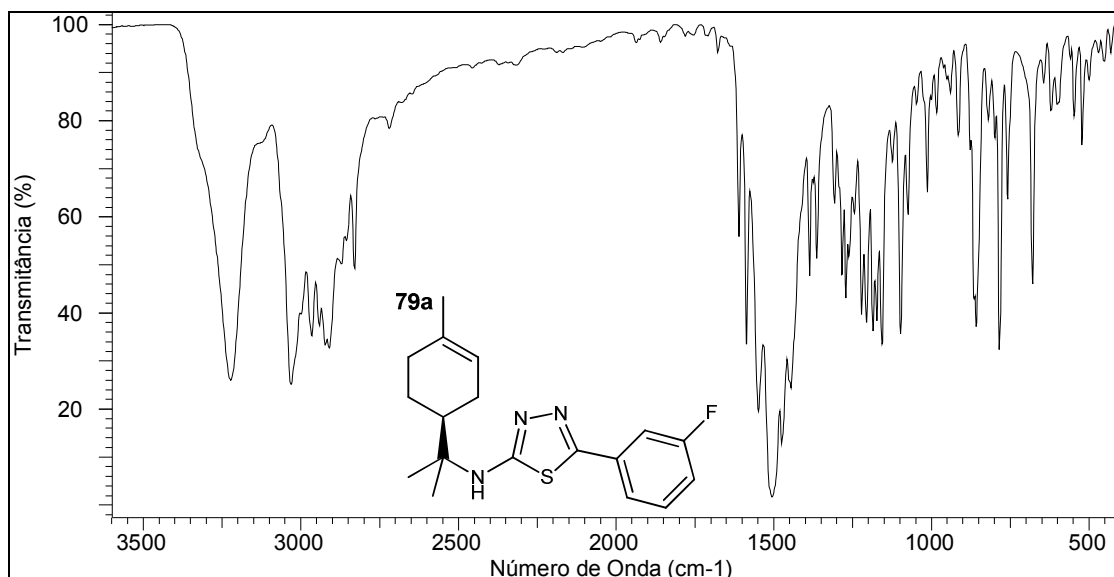
Tabela 11. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) do 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (**74a**) e dos 5-[(*o*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**75-77a**).

C	74a δ_{C} (DEPT)	75a δ_{C} (DEPT)	76a δ_{C} (DEPT; mult., J em Hz)	77a δ_{C} (DEPT)
2	166,6 (C)	168,4 (C)	168,0 (C; d, J=6,1)	168,5 (C)
5	158,0 (C)	151,2 (C)	149,6 (C; d, J=7,7)	153,1 (C)
1'	41,2 (CH)	41,2 (CH)	41,3 (CH; s)	41,2 (CH)
2'	26,6 (CH ₂)	26,6 (CH ₂)	26,6 (CH ₂ ; s)	26,6 (CH ₂)
3'	120,2 (CH)	120,2 (CH)	120,1 (CH; s)	120,2 (CH)
4'	134,1 (C)	134,1 (C)	134,1 (C; s)	134,1 (C)
5'	31,0 (CH ₂)	31,0 (CH ₂)	30,9 (CH ₂ ; s)	31,0 (CH ₂)
6'	24,1 (CH ₂)	24,1 (CH ₂)	24,1 (CH ₂ ; s)	24,1 (CH ₂)
7'	58,1 (C)	58,2 (C)	58,6 (C; s)	58,1 (C)
8'	24,3 (CH ₃)	24,2 (CH ₃)	24,2 (CH ₃ ; s)	24,3 (CH ₃)
9'	24,0 (CH ₃)	23,9 (CH ₃)	23,8 (CH ₃ ; s)	23,9 (CH ₃)
10'	23,2 (CH ₃)	23,3 (CH ₃)	23,2 (CH ₃ ; s)	23,3 (CH ₃)
1''	131,0 (C)	125,0 (C)	118,5 (C; d, J=12,2)	129,8 (C)
2''	126,8 (CH)	148,4 (C)	158,8 (C; d, J=250,5)	131,4 (C)
3''	128,9 (CH)	124,4 (CH)	116,0 (CH; d, J=21,6)	127,1 (CH)
4''	129,5 (CH)	130,3 (CH)	131,4 (CH; d, J=8,8)	130,4 (CH)
5''	128,9 (CH)	131,8 (CH)	124,8 (CH; d, J=3,3)	130,3 (CH)
6''	126,8 (CH)	132,5 (CH)	128,1 (CH; d, J=2,2)	130,3 (CH)

4.2.3.4. 5-[(*m*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazol – Compostos **78-80**

Na análise de absorção na região do infravermelho, para os compostos **78-80** observaram-se bandas de NH entre 3251-3178 cm^{-1} , de CH aromático entre 3093-3028 cm^{-1} e de estiramentos do núcleo 1,3,4-tiadiazol em 1560-1493 cm^{-1} . O espectro de absorção no infravermelho para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**79a**) (**Figura 36**) apresentou a deformação NH em 3246 cm^{-1} , estiramentos N=C e N=C-N=C entre 1589 e 1504 cm^{-1} e provável banda de estiramento de ligação carbono-halogênio em 783 cm^{-1} . O 5-(*m*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**80**) apresentou estiramento C-Cl em 736 cm^{-1} .

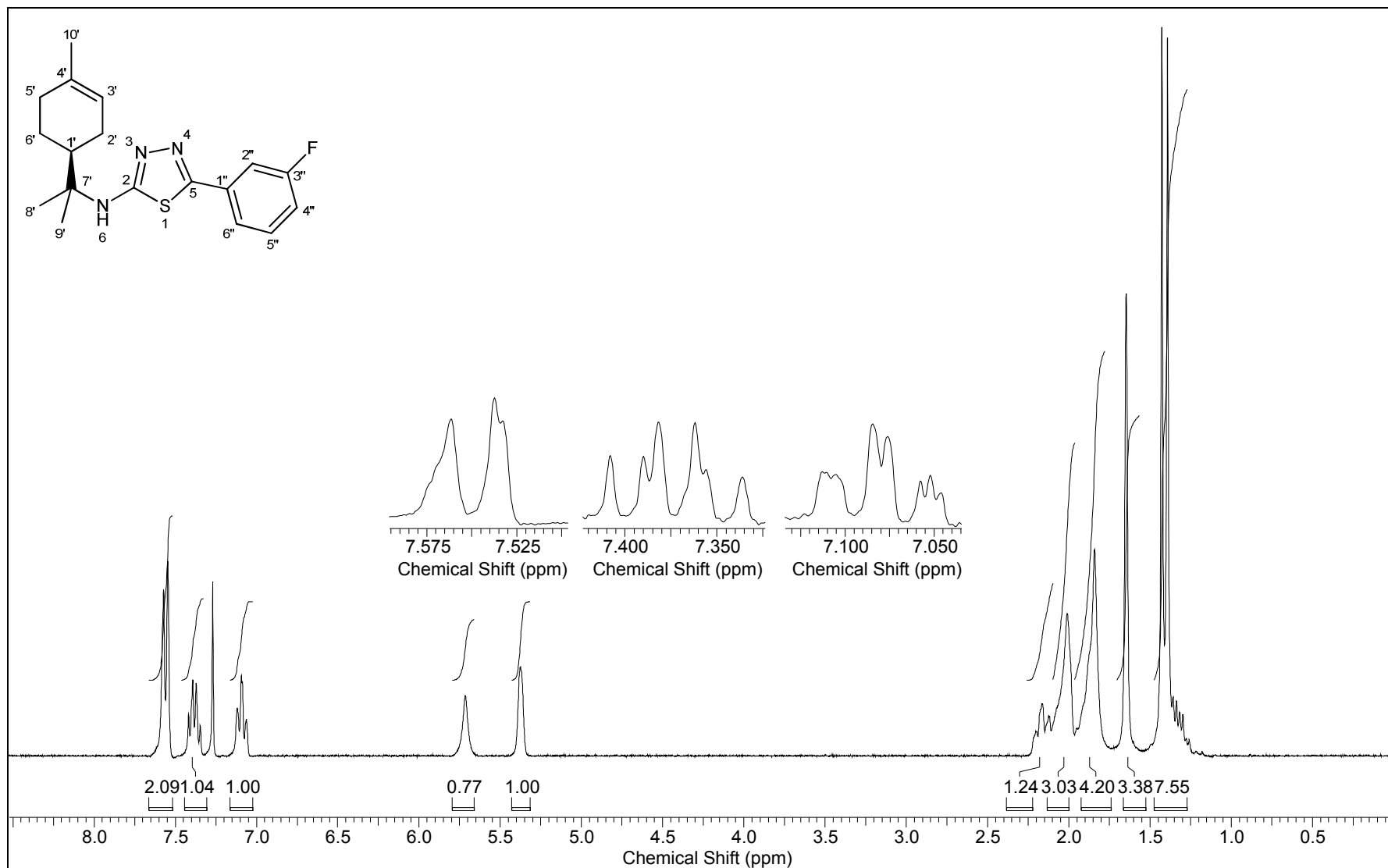
Figura 36. Espectro de absorção no infravermelho para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**79a**).



Os dados espectrais de RMN para o 5-(*m*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**78**), 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**79**) e 5-(*m*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**80**) do limoneno encontram-se na **Tabela 12** (^1H) e na **Tabela 13** (^{13}C /DEPT). Na discussão das análises de RMN deste grupo de 1,3,4-tiadiazóis, seguem apenas os espectros do 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**79a**).

O espectro de RMN de ^1H para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**79a**) (**Figura 37**) evidenciou o menor deslocamento químico da porção benzênica para H4'' δ_{H} 7,09 (tl, $J = 8,0$ Hz). Duplete largo em δ_{H} 7,56 ($J = 7,3$ Hz) foi atribuído a H2'' e H6'', e o tripleto de duplete em δ_{H} 7,37 ($J=8,0$ e 5,7 Hz) foi atribuído a H5'', com o menor J resultante do acoplamento *meta* ^1H - ^{19}F . Correlações $^1\text{H}\times^{13}\text{C}$ no mapa de contornos HSQC (**Figura 38**) confirmaram as atribuições para estes hidrogênios.

Figura 37. Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**79a**).



Na análise de RMN de ^1H para o 5-(*m*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**78**), observaram-se tripletos para H2'' em δ_{H} 8,58 ($J=1,9$ Hz) e para H5'' 7,62 ($J = 8,1$ Hz), sendo estes os hidrogênios com maior e menor deslocamento químico para o anel benzênico, respectivamente. Os demais hidrogênios da porção benzênica apresentaram sinais em δ_{H} 8,22-8,24. O 5-(*m*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**80**) apresentou sinal largo para H2'' em δ_{H} 7,81, e multipletos para os demais hidrogênios da porção benzênica, entre δ_{H} 7,35-7,70.

Nas análises de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, o 5-(*m*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**78**) apresentou maior deslocamento químico para o C3'', ligado diretamente ao substituinte NO_2 (δ_{C} 148,5), enquanto que os demais sinais do anel benzênico ocorreram entre δ_{C} 121,5-132,7. Para o 5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**80**), foi observado deslocamento químico em δ_{C} 134,9 para C3'' e em δ_{C} 124,8 para C6''. Os demais sinais do anel benzênico ocorreram em δ_{C} 126,6-132,7.

Nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**79a**) (**Figura 39**) foram observados dupletos para todos os carbonos do anel benzênico devido acoplamento $^{13}\text{C}-^{19}\text{F}$. O maior deslocamento químico da porção benzênica ocorreu para C3'' em δ_{C} 162,9 ($^1J_{\text{CF}} = 246,6$ Hz) e os efeitos de blindagem mais pronunciados ocorreram em C2'' (δ_{C} 113,4, $^2J_{\text{CF}} = 22,7$ Hz) e C4'' (δ_{C} 116,5, $^2J_{\text{CF}} = 23,2$ Hz). C6'' apresentou duplete em δ_{C} 122,5 ($^4J_{\text{CF}} = 2,8$ Hz), enquanto que os sinais de C1'' e C5'' ocorreram em δ_{C} 133,0 e 130,4, ambos com $^3J_{\text{CF}} = 8,3$ Hz.

Figura 38. Expansão do mapa de contornos HSQC ($^1\text{H}\times^{13}\text{C}$) para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno (**79a**).

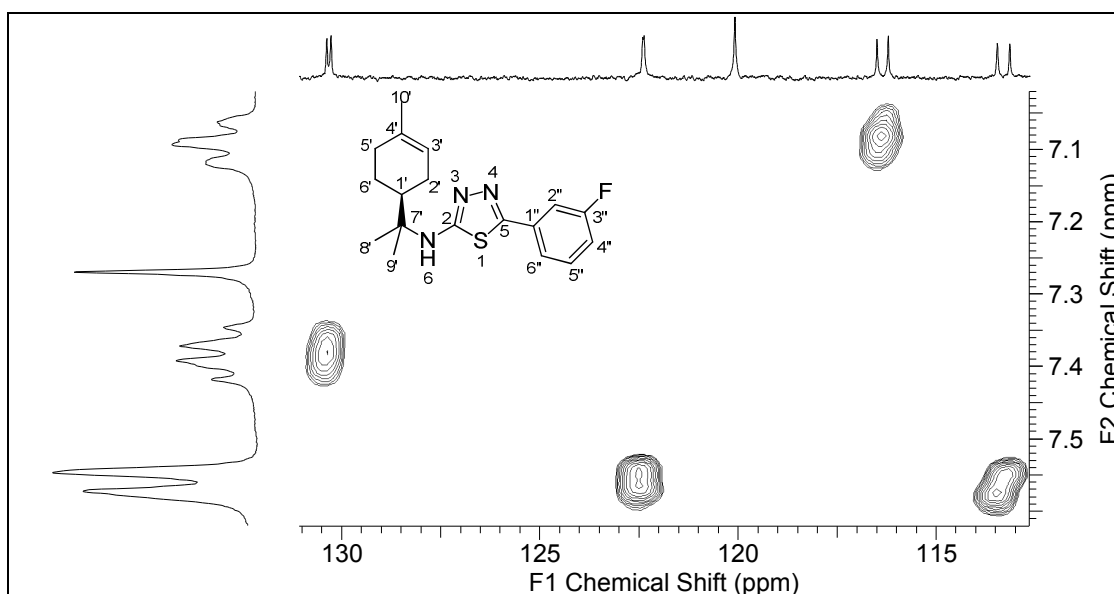


Figura 39. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**79a**).

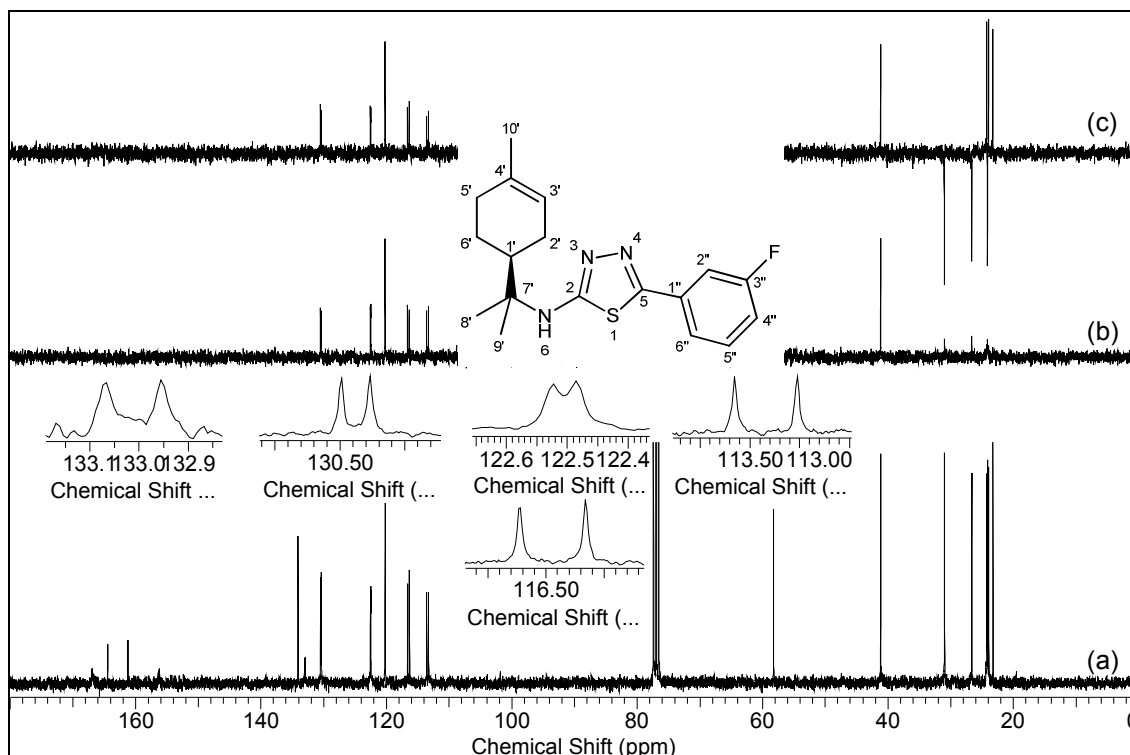


Tabela 12. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) dos 5-[(*m*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do *S*-(-)-limoneno (**78-80a**).

H	78a δ_{H} (mult., J em Hz)	79a δ_{H} (mult., J em Hz)	80a δ_{H} (mult., J em Hz)
6	5,90 (sl)	5,72 (sl)	5,68 (sl)
1'	2,18 (m)	2,17 (m)	2,16 (m)
2'	2,06 (m)	2,07 (m)	2,05 (m)
3'	5,38 (m)	5,38 (m)	5,38 (m)
5'	2,01 (m)	1,99 (m)	1,98 (m)
6'	1,88 (m)	1,82 (m)	1,86 (m)
8'	1,45 (s)	1,43 (s)	1,43 (s)
9'	1,42 (s)	1,39 (s)	1,39 (s)
10'	1,65 (s)	1,65 (s)	1,65 (s)
2''	8,58 (t, $J=1,9$)	7,56 (dl, $J=7,3$)	7,81 (sl)
3''	–	–	–
4''	8,24* (ddd, $J=8,1; 1,9; 0,9$)	7,09 (tl, $J=8,0$)	7,37 (m)
5''	7,62 (t, $J=8,1$)	7,37 (td, $J=8,0; 5,7$)	7,70 (m)
6''	8,22* (dt, $J=8,1\text{Hz}; 0,9\text{Hz}$)	7,56 (dl, $J=7,3$)	7,35 (m)

* Os valores podem estar invertidos.

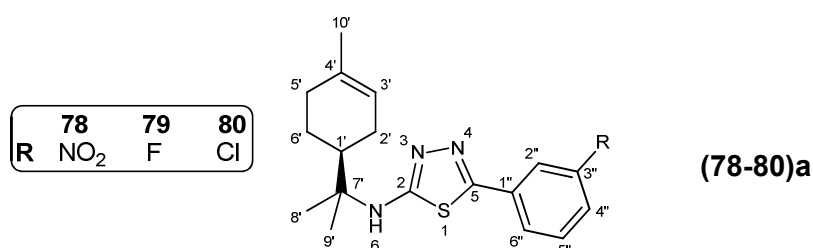


Tabela 13. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) 5-[(*m*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**78-80**)a.

C	78a δ_c (DEPT)	79a δ_c (DEPT; mult., J em Hz)	80a δ_c (DEPT)
2	167,3 (C)	166,9 (C; s)	166,9 (C)
5	155,0 (C)	156,3 (C; s)	156,2 (C)
1'	41,1 (CH)	41,1 (CH; s)	41,2 (CH)
2'	26,6 (CH ₂)	26,6 (CH ₂ ; s)	26,6 (CH ₂)
3'	120,1 (CH)	120,2 (CH; s)	120,2 (CH)
4'	134,2 (C)	134,1 (C; s)	134,1 (C)
5'	31,0 (CH ₂)	31,0 (CH ₂ ; s)	31,0 (CH ₂)
6'	24,1 (CH ₂)	24,1 (CH ₂ ; s)	24,1 (CH ₂)
7'	58,4 (C)	58,2 (C; s)	58,3 (C)
8'	24,2 (CH ₃)	24,2 (CH ₃ ; s)	24,3 (CH ₃)
9'	24,0 (CH ₃)	23,9 (CH ₃ ; s)	24,0 (CH ₃)
10'	23,2 (CH ₃)	23,2 (CH ₃ ; s)	23,2 (CH ₃)
1''	132,7 (C)	133,0 (C; d, J=8,3)	132,7 (C)
2''	121,5 (CH)	113,4 (CH; d, J=22,7)	126,6 (CH)
3''	148,5 (C)	162,9 (C; d, J=246,6)	134,9 (C)
4''	124,0 (CH)	116,5 (CH; d, J=23,2)	130,1 (CH)
5''	130,0 (CH)	130,4 (CH; d, J=8,3)	129,5 (CH)
6''	132,0 (CH)	122,5 (CH; d, J=2,8)	124,8 (CH)

4.2.3.5. 5-[(*p*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazol – Compostos **81-89**

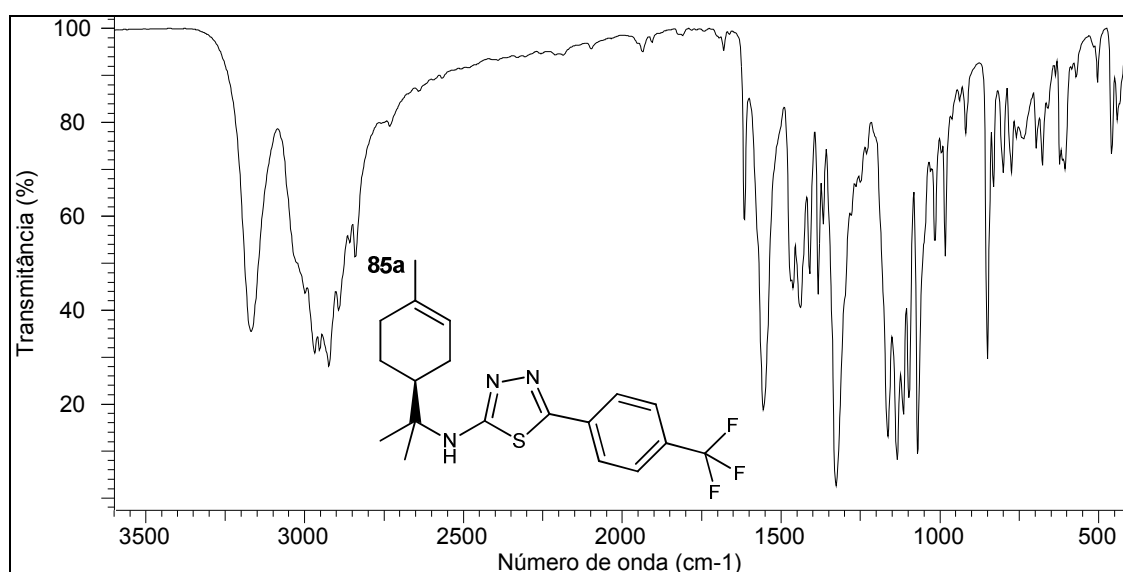
Na análise de absorção na região do infravermelho, os compostos **81-89** apresentaram a deformação NH entre 3215-3168 cm^{-1} , bandas de CH de sistema aromático entre 3057-3010 cm^{-1} e bandas referentes ao núcleo 1,3,4-tiadiazol entre 1592-1495 cm^{-1} . Estiramentos de ligações carbono-halogênio não foram facilmente identificáveis nos espectros dos compostos **81-83**, apresentando-se com média ou baixa intensidades. O mesmo ocorreu com bandas de deformação angular de ligações O-C ou N-C, para os compostos **88-89**, sendo as mesmas de difícil atribuição.

O espectro de absorção no infravermelho para o 5-[(*p*-trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**85a**) (**Figura 40**) apresentou a banda de NH em 3172 cm^{-1} e de provável N=C aromático em 1554 cm^{-1} , além de banda de alta intensidade referente ao grupamento CF_3 em 1323 cm^{-1} .

Para a discussão das análises de RMN deste grupo de 1,3,4-tiadiazóis, serão apresentados apenas os espectros do 5-[(*p*-trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol (**85**), visto a maior riqueza de sinais principalmente para o espectro de

^{13}C . Os dados espectrais de RMN para o 5-(*p*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**81**), 5-(*p*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**82**), 5-(*p*-bromofenil)-1,3,4-tiadiazol (**83**) e 5-(*p*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**84**) do limoneno, encontram-se na **Tabela 14** (^1H) e na **Tabela 15** ($^{13}\text{C}/\text{DEPT}$). Os mesmos dados para o 5-[*p*-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol (**85**), 5-(*p*-metilfenil)-1,3,4-tiadiazol (**86**), 5-[*p*-(*tert*-butil)fenil]-1,3,4-tiadiazol (**87**), 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol (**88**) e 5-[(*p*-(dimetilamino)fenil)-1,3,4-tiadiazol (**89**) do limoneno, encontram-se na **Tabela 16** (^1H) e na **Tabela 17** ($^{13}\text{C}/\text{DEPT}$).

Figura 40. Espectro de absorção no infravermelho para o 5-[*p*-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**85a**).



A análise dos espectros de RMN de ^1H deste grupo de 1,3,4-tiadiazóis mostrou padrão de substituição típico para anel benzênico *p*-substituído (duplete para $\text{H}2''/\text{H}6''$ e duplete para $\text{H}3''/\text{H}5''$), como foi observado para os 1,3,4-tiadiazóis **82-89** do limoneno, em concordância com dados anteriores da série do *R*-(+)-limoneno (Vandresen, 2011). O duplete correspondente aos hidrogênios vizinhos ao núcleo 1,3,4-tiadiazol $\text{H}2''/\text{H}6''$ ocorreram em uma pequena faixa de deslocamento químico (δ_{H} 7,67-7,98), enquanto que o deslocamento do duplete referente a $\text{H}3''/\text{H}5''$ sofreu maior influência do substituinte da posição 4: valores abaixo de δ_{H} 7,00 em derivados com substituintes doadores fortes e moderados de elétrons (como **88-89**), entre δ_{H} 7,20-7,60 para aqueles com substituintes retiradores fracos de densidade eletrônica (como os halogenados **82-83**) ou que têm fraco efeito de doação de elétrons (como **86-87**) e valores próximos ou acima de δ_{H} 8,00 para

substituintes com efeito de forte retirada de elétrons (como **84-85**). No caso do 5-(*p*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**81**), foi observado duplo duplete para H2''/H6'' em δ_{H} 7,79 ($J=8,5$ e $5,3$ Hz) e tripleto para H3''/H5'' em δ_{H} 7,11($J=8,5$ Hz) devido a acoplamento entre ^1H - ^{19}F .

Ainda foram observados simpletos para os compostos **86-89** referentes a CH_3 do substituinte na posição 4'' em δ_{H} 2,39 (3H), δ_{H} 1,33 (9H), δ_{H} 3,85 (3H) e δ_{H} 3,02 (6H), para a referida ordem de compostos.

No espectro de RMN de ^1H para o 5-[*p*-(trifluorfenil)]-1,3,4-tiadiazol (**85**) (**Figura 41**) nota-se o duplete referente a H3''/H5'' mais deslocado em δ_{H} 7,92 ($J = 7,9$ Hz), e o duplete referente a H2''/H6'' em δ_{H} 7,67 ($J = 8,2$ Hz). O sinal largo referente a H6 ocorreu em δ_{H} 5,72.

Nas análises de RMN de ^{13}C /DEPT dos compostos **81-89** foi observado sinal correspondente a C1'' entre δ_{C} 118,9-136,8 e sinais equivalentes para C2''/C6'' entre δ_{C} 125,8-128,6. Os carbonos C3''/C5'' também apresentaram sinais equivalentes, ocorrendo entre δ_{C} 124,3-129,5 para maioria dos derivados, exceto para o 5-(*p*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**81**), 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol (**88**) e 5-[*p*-(dimetilamino)fenil]-1,3,4-tiadiazol (**89**), onde o efeito de doação eletrônica promoveu a blindagem destes carbonos, fornecendo deslocamentos químicos abaixo de δ_{C} 120,0. Os deslocamentos químicos referentes a C4'' variaram de acordo com o substituinte ligado a este átomo, ocorrendo desde δ_{C} 123,7 para o 5-(*p*-bromofenil)-1,3,4-tiadiazol (**83**), até δ_{C} 163,5 para o 5-(*p*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**81**). O acoplamento ^{13}C - ^{19}F forneceu dupletos para os carbonos do anel benzênico do derivado **81**, com constantes de acoplamento conforme apresentadas na **Tabela 15**.

Ainda foram observados sinais referentes aos carbonos do substituinte na posição 4'' para os derivados **86** (δ_{C} 21,4, CH_3), **87** (δ_{C} 31,2, 3CH_3 , e δ_{C} 34,8, C), **88** (δ_{C} 55,4, CH_3) e **89** (δ_{C} 40,2, 2CH_3).

No espectro de RMN de ^{13}C /DEPT do 5-[*p*-(trifluorfenil)]-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**85**) (**Figura 42**) nota-se a presença de quartetos para C4'' (δ_{C} 131,6, $J=32,6$ Hz), para C3''/C5'' (δ_{C} 126,0, $J=3,7$ Hz) e para o carbono ligado diretamente aos três átomos de flúor (δ_{C} 123,7, $J=272,6$ Hz), devido ao acoplamento ^{13}C - ^{19}F . C2''/C6'' foi observado na forma de simpleto em δ_{C} 126,9, o mesmo ocorrendo para C1'' em δ_{C} 134,6. Sinais em δ_{C} 167,0 e δ_{C} 155,3 foram atribuídos aos carbonos 2 e 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol, respectivamente.

Figura 41. Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) do 5-[*p*-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**85a**).

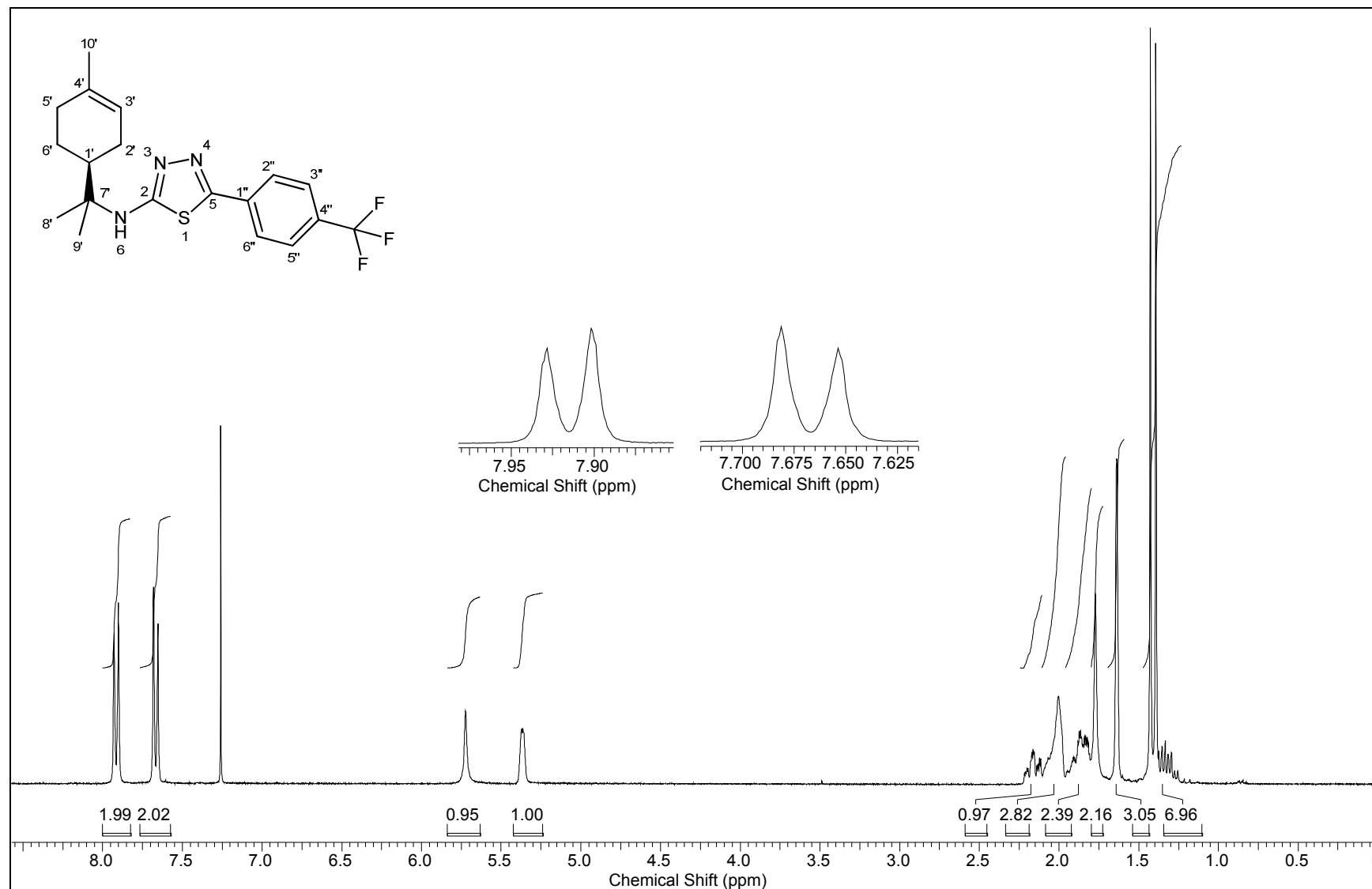


Figura 42. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, CDCl_3); (b) DEPT 90°; (c) DEPT 135° do 5-[*p*-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**85a**).

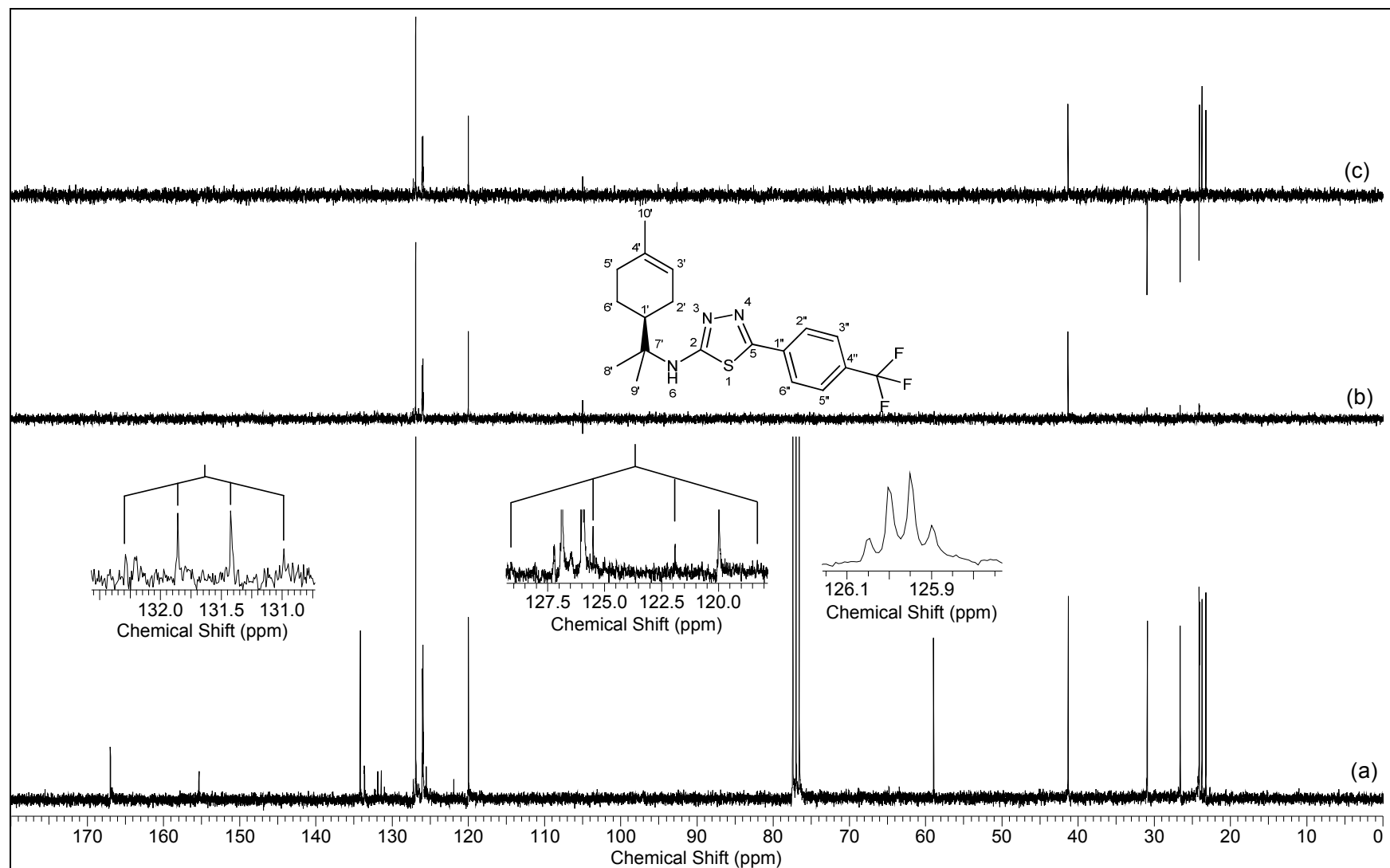


Tabela 14. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) dos 5-[(*p*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**81-85a**).

H	81a δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	82a δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	83a δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	84a δ_{H} (mult., <i>J</i> em Hz)
6	6,01 (sl)	5,61 (sl)	5,57 (sl)	5,92 (sl)
1'	2,12 (m)	2,16 (m)	2,16 (m)	2,18 (m)
2'	2,02 (m)	2,06 (m)	2,05 (m)	2,06 (m)
3'	5,38 (m)	5,38 (m)	5,37 (m)	5,38 (m)
5'	2,00 (m)	2,01 (m)	2,00 (m)	2,01 (m)
6'	1,87 (m)	1,87 (m)	1,86 (m)	1,85 (m)
8'	1,42 (s)	1,42 (s)	1,42 (s)	1,45 (s)
9'	1,39 (s)	1,39 (s)	1,38 (s)	1,42 (s)
10'	1,65 (s)	1,65 (s)	1,64 (s)	1,65 (s)
2''	7,79 (dd, <i>J</i> =8,5; 5,3)	7,74 (d, <i>J</i> =9,1)	7,68 (d, <i>J</i> =8,7)	7,98 (d, <i>J</i> =8,2)
3''	7,11 (t, <i>J</i> =8,5)	7,38 (d, <i>J</i> =9,1)	7,55 (d, <i>J</i> =8,7)	8,29 (d, <i>J</i> =8,5)
4''	–	–	–	–
5''	7,11 (t, <i>J</i> =8,5)	7,38 (d, <i>J</i> =9,1)	7,55 (d, <i>J</i> =8,7)	8,29 (d, <i>J</i> =8,5)
6''	7,79 (dd, <i>J</i> =8,5; 5,3)	7,74 (d, <i>J</i> =9,1)	7,68 (d, <i>J</i> =8,7)	7,98 (d, <i>J</i> =8,2)

Tabela 15. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) dos 5-[(*p*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**81-85a**).

C	81a δ_{C} (DEPT; mult., <i>J</i> em Hz)	82a δ_{C} (DEPT)	83a δ_{C} (DEPT)	84a δ_{C} (DEPT)
2	165,6 (C; s)	166,7 (C)	166,7 (C)	167,6 (C)
5	156,7 (C; s)	156,6 (C)	156,7 (C)	155,0 (C)
1'	41,2 (CH; s)	41,2 (CH)	41,2 (CH)	41,1 (CH)
2'	26,6 (CH ₂ ; s)	26,6 (CH ₂)	26,6 (CH ₂)	26,6 (CH ₂)
3'	120,2 (CH; s)	120,2 (CH)	120,2 (CH)	120,1 (CH)
4'	134,1 (C; s)	134,1 (C)	134,1 (C)	134,2 (C)
5'	31,0 (CH ₂ ; s)	31,0 (CH ₂)	31,0 (CH ₂)	31,0 (CH ₂)
6'	24,1 (CH ₂ ; s)	24,2 (CH ₂)	24,1 (CH ₂)	24,1 (CH ₂)
7'	58,2 (C; s)	58,3 (C)	58,2 (C)	58,6 (C)
8'	24,3 (CH ₃ ; s)	24,3 (CH ₃)	24,3 (CH ₃)	24,2 (CH ₃)
9'	24,0 (CH ₃ ; s)	24,0 (CH ₃)	24,0 (CH ₃)	23,9 (CH ₃)
10'	23,2 (CH ₃ ; s)	23,2 (CH ₃)	23,2 (CH ₃)	23,3 (CH ₃)
1''	127,3 (C; d, <i>J</i> =3,3)	129,6 (C)	130,0 (C)	136,8 (C)
2''	128,6 (CH; d, <i>J</i> =8,3)	127,9 (CH)	128,1 (CH)	127,1 (CH)
3''	116,0 (CH; d, <i>J</i> =22,1)	129,1 (CH)	132,0 (CH)	124,3 (CH)
4''	163,5 (C; d, <i>J</i> =249,9)	135,5 (C)	123,7 (C)	148,0 (C)
5''	116,0 (CH; d, <i>J</i> =22,1)	129,1 (CH)	132,0 (CH)	124,3 (CH)
6''	128,6 (CH; d, <i>J</i> =8,3)	127,9 (CH)	128,1 (CH)	127,1 (CH)
R	–	–	–	–

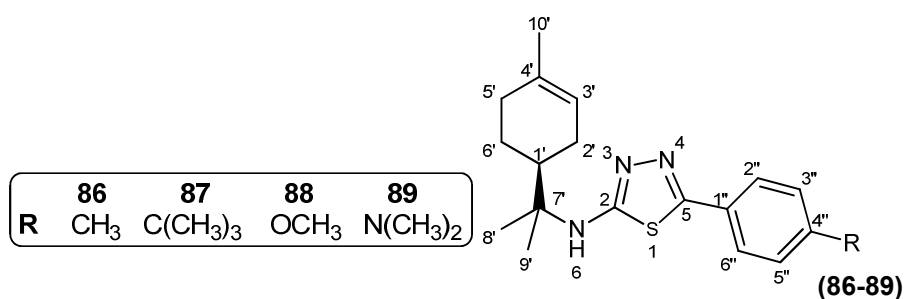
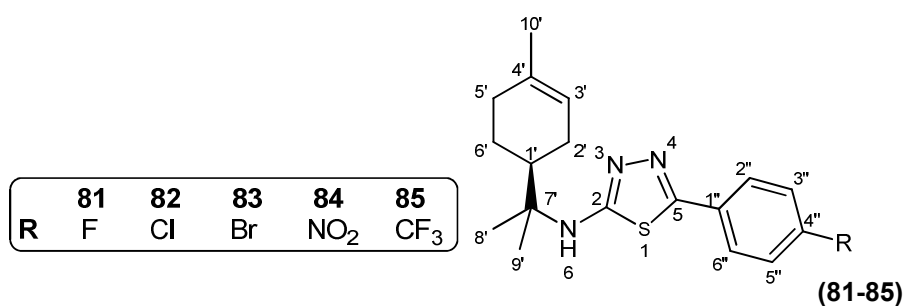


Tabela 16. Dados de RMN de ¹H (300,06 MHz, CDCl₃) dos 5-[(*p*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**86-89**)a.

H	85a δ _H (mult., J em Hz)	86a δ _H (mult., J em Hz)	87a δ _H (mult., J em Hz)	88a δ _H (mult., J em Hz)	89a δ _H (mult., J em Hz)
6	5,72 (sl)	5,45 (sl)	5,42 (sl)	5,45 (sl)	5,38 (sl)
1'	2,16 (m)	2,18 (m)	2,16 (m)	2,17 (m)	2,15 (m)
2'	2,05 (m)	2,09 (m)	2,03 (m)	2,05 (m)	2,03 (m)
3'	5,37 (m)	5,37 (m)	5,36 (m)	5,37 (m)	5,38 (sl)
5'	1,99 (m)	2,01 (m)	1,97 (m)	1,99 (m)	1,98 (m)
6'	1,87 (m)	1,87 (m)	1,86 (m)	1,88 (m)	1,88 (m)
8'	1,43 (s)	1,41 (s)	1,40 (s)	1,41 (s)	1,40 (s)
9'	1,39 (s)	1,38 (s)	1,37 (s)	1,37 (s)	1,37 (s)
10'	1,64 (s)	1,65 (s)	1,64 (s)	1,64 (s)	1,64 (s)
2''	7,67 (d, J=8,2)	7,70 (d, J=7,9)	7,73 (d, J=8,5)	7,74 (d, J=8,8)	7,67 (d, J=9,1)
3''	7,92 (d, J=7,9)	7,22 (d, J=7,9)	7,42 (d, J=8,5)	6,94 (d, J=8,8)	6,70 (d, J=9,1)
4''	–	–	–	–	–
5''	7,92 (d, J=7,9)	7,22 (d, J=7,9)	7,42 (d, J=8,5)	6,94 (d, J=8,8)	6,70 (d, J=9,1)
6''	7,67 (d, J=8,2)	7,70 (d, J=7,9)	7,73 (d, J=8,5)	7,74 (d, J=8,8)	7,67 (d, J=9,1)
R		2,39 (s, 3H)	1,33 (s, 9H)	3,85 (s, 3H)	3,02 (s, 6H)

Tabela 17. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) dos 5-[(*p*-substituído)fenil]-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**86-89a**).

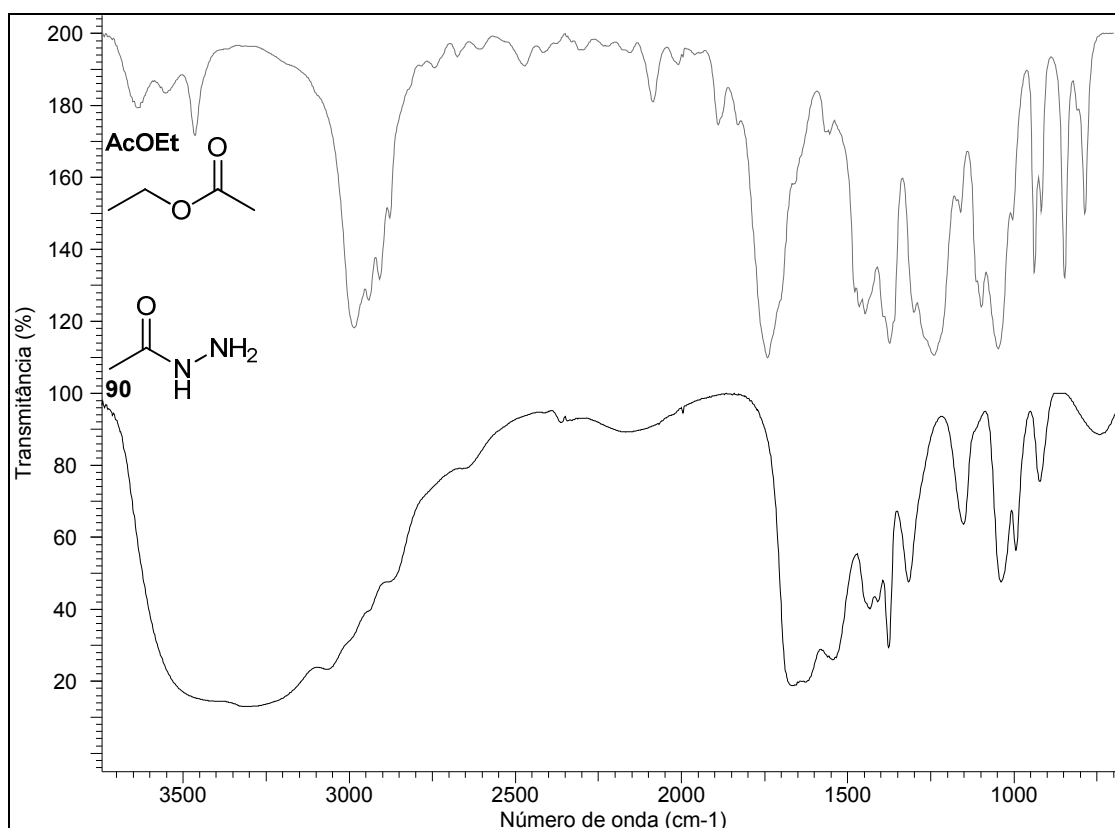
C	85a δ_c (DEPT; mult., <i>J</i> em Hz)	86a δ_c (DEPT)	87a δ_c (DEPT)	88a δ_c (DEPT)	89a δ_c (DEPT)
2	167,0 (C; s)	166,3 (C)	166,3 (C)	166,1 (C)	165,3 (C)
5	155,3 (C; s)	158,3 (C)	158,1 (C)	158,0 (C)	159,1 (C)
1'	41,3 (CH; s)	41,3 (CH)	41,2 (CH)	41,3 (CH)	41,2 (CH)
2'	26,6 (CH ₂ ; s)	26,6 (CH ₂)	26,6 (CH ₂)	26,7 (CH ₂)	26,6 (CH ₂)
3'	120,0 (CH; s)	120,3 (CH)	120,3 (CH)	120,3 (CH)	120,3 (CH)
4'	134,2 (C; s)	134,1 (C)	134,1 (C)	134,1 (C)	134,0 (C)
5'	30,9 (CH ₂ ; s)	31,0 (CH ₂)	31,0 (CH ₂)	31,0 (CH ₂)	31,0 (CH ₂)
6'	24,1 (CH ₂ ; s)	24,1 (CH ₂)	24,1 (CH ₂)	24,1 (CH ₂)	24,1 (CH ₂)
7'	59,0 (C; s)	58,1 (C)	58,1 (C)	58,1 (C)	57,9 (C)
8'	24,1 (CH ₃ ; s)	24,3 (CH ₃)	24,3 (CH ₃)	24,4 (CH ₃)	24,4 (CH ₃)
9'	23,7 (CH ₃ ; s)	24,0 (CH ₃)	24,0 (CH ₃)	24,1 (CH ₃)	24,1 (CH ₃)
10'	23,2 (CH ₃ ; s)	23,2 (CH ₃)	23,2 (CH ₃)	23,2 (CH ₃)	23,2 (CH ₃)
1''	133,6 (C; s)	128,3 (C)	128,2 (C)	123,8 (C)	118,9 (C)
2''	126,9 (CH; s)	126,7 (CH)	125,8 (CH)	128,2 (CH)	127,9 (CH)
3''	126,0 (CH; q, <i>J</i> =3,7)	129,5 (CH)	126,5 (CH)	114,2 (CH)	111,8 (CH)
4''	131,6 (C; q, <i>J</i> =32,6)	139,9 (C)	153,0 (C)	160,8 (C)	151,2 (C)
5''	126,0 (CH; q, <i>J</i> =3,7)	129,5 (CH)	126,5 (CH)	114,2 (CH)	111,8 (CH)
6''	126,9 (CH, s)	126,7 (CH)	125,8 (CH)	128,2 (CH)	127,9 (CH)
R	123,7 (C; q, <i>J</i> =272,6)	21,4 (CH ₃)	34,8 (C); 31,2 (CH ₃)	55,4 (CH ₃)	40,2 (CH ₃)

4.2.4. Hidrazidas (90-92)

Na comparação dos espectros de absorção no infravermelho para o acetato de etila e seu derivado acetoidrazida (**90**) (**Figura 43**), nota-se diminuição da frequência para a deformação axial de C=O, que ocorreu em 1732 cm^{-1} para o acetato de etila e em 1695 cm^{-1} para a acetoidrazida (**90**). Deformações angulares de NH se sobrepuseram à banda de carbonila de amida, ocorrendo entre $1700\text{-}1520\text{ cm}^{-1}$ e as deformações axiais de NH foram observadas entre $3680\text{-}2860\text{ cm}^{-1}$, encobrendo as demais bandas desta região do espectro do derivado **90**.

Para a 2-fenilacetoidrazida (**91**) e a benzoidrazida (**92**), a banda de deformação axial C=O foi verificada em 1644 cm^{-1} e em 1620 cm^{-1} , respectivamente, enquanto que as bandas de deformação axial NH destes compostos ocorreu entre $3320\text{-}3126\text{ cm}^{-1}$.

Figura 43. Espectro de absorção no infravermelho para o acetato de Etila e a acetoidrazida (**90**).

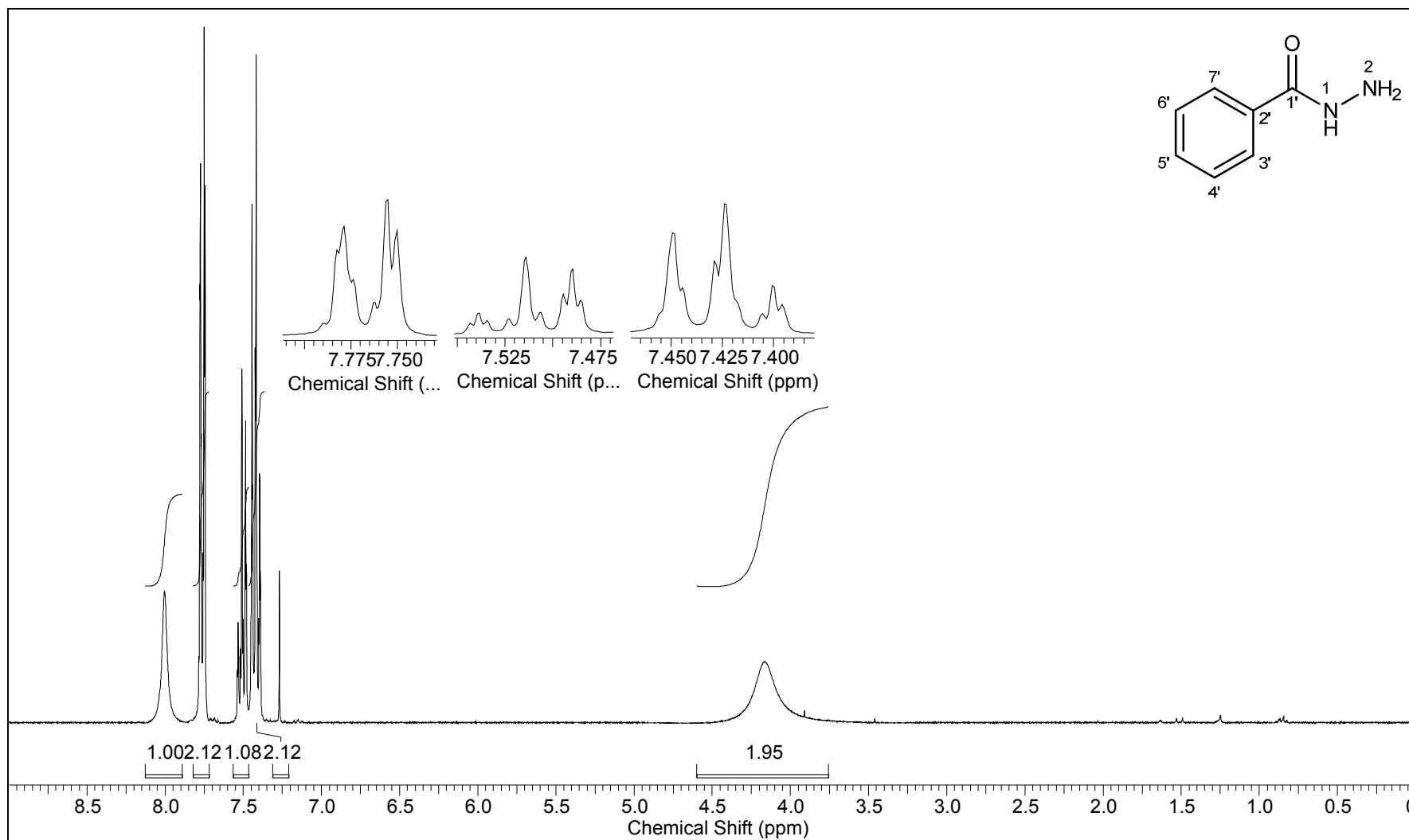


Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C para a acetoidrazida (**90**), a 2-fenilacetoidrazida (**91**) e a benzoidrazida (**92**), são apresentados na **Tabela 18**. Apenas o composto **92** deste grupo terá seus espectros apresentados.

Na análise dos espectros de RMN de ^1H foram observados sinais largos para os compostos **90-92** entre δ_{H} 7,05-8,01, referentes a H1, e entre δ_{H} 3,80-4,17, referentes a H2. A acetoidrazida (**90**) apresentou simpleto em δ_{H} 1,98 referente aos hidrogênios metílicos. Para a 2-fenilacetoidrazida (**91**), simpleto em δ_{H} 3,54 e multipletos entre δ_{H} 7,21-7,37 foram atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios metilênicos e aos hidrogênios da porção benzênica.

No espectro de RMN de ^1H para a benzoidrazida (**92**) (**Figura 44**), além dos multipletos entre δ_{H} 7,39-7,79, referentes aos hidrogênios do anel benzênico, são observados os sinais largos para H1 em δ_{H} 4,17 e para H2 em δ_{H} 8,01.

Figura 44. Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) da benzoidrazida (**92**).



Na análise dos espectros de RMN de ^{13}C das hidrazidas (**90-92**) foram observados sinais referentes ao carbono carbonílico 1' em δ_{C} 171,1 para a acetoidrazida (**90**), δ_{C} 171,6 para a 2-fenilacetoidrazida (**91**) e em δ_{C} 168,7 para a benzoidrazida (**92**). O derivado **90** também apresentou sinal em δ_{C} 20,8 relativo ao carbono metílico 2' e o derivado **91**, sinal em δ_{C} 41,8 referente ao carbono metilênico 2'. Os sinais entre δ_{C} 127,4-133,9 e δ_{C} 126,9-132,6 foram atribuídos aos carbonos do anel aromático da 2-fenilacetoidrazida (**91**) e benzoidrazida (**92**), respectivamente. O espectro de RMN de ^{13}C do último composto é apresentado na **Figura 45**.

Figura 45. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45 MHz, CDCl_3) da benzoidrazida (**92**).

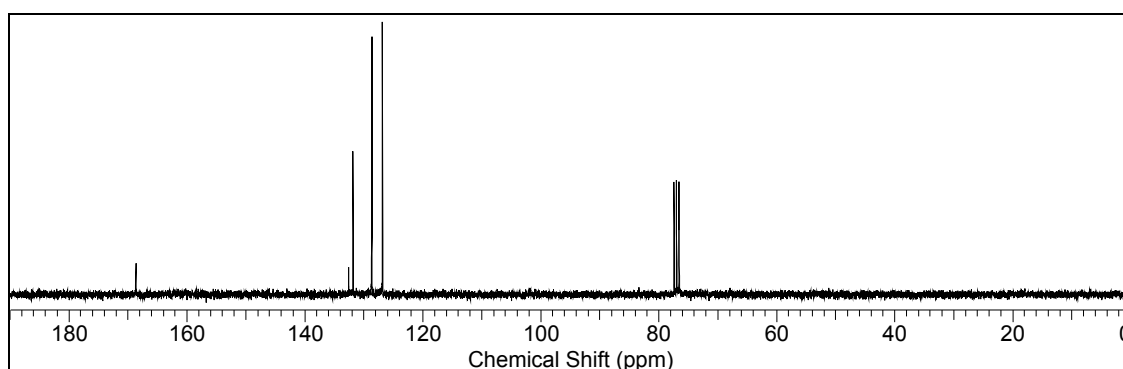
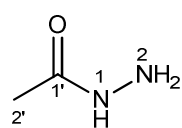
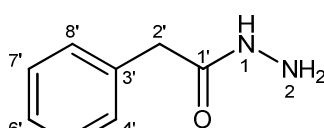


Tabela 18. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (300,06 e 75,45MHz, CDCl_3) das hidrazidas (**90-92**).

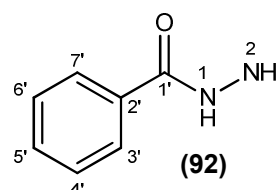
H/C	90		91		92	
	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J em Hz)	δ_{C}
1	7,65 (sl)	–	7,05 (sl)	–	8,01 (sl)	–
2	3,98 (sl)	–	3,80 (sl)	–	4,17 (sl)	–
1'	–	171,1	–	171,6	–	168,7
2'	1,98 (s)	20,8	3,54 (s)	41,8	–	132,6
3'	–	–	–	133,9	7,77 (m)	128,7
4'	–	–	7,29 (m)	128,9	7,42 (m)	126,9
5'	–	–	7,29 (m)	129,3	7,51 (m)	131,8
6'	–	–	7,29 (m)	127,4	7,42 (m)	126,9
7'	–	–	7,29 (m)	129,3	7,77 (m)	128,7
8'	–	–	7,29 (m)	128,9	–	–



(90)



(91)



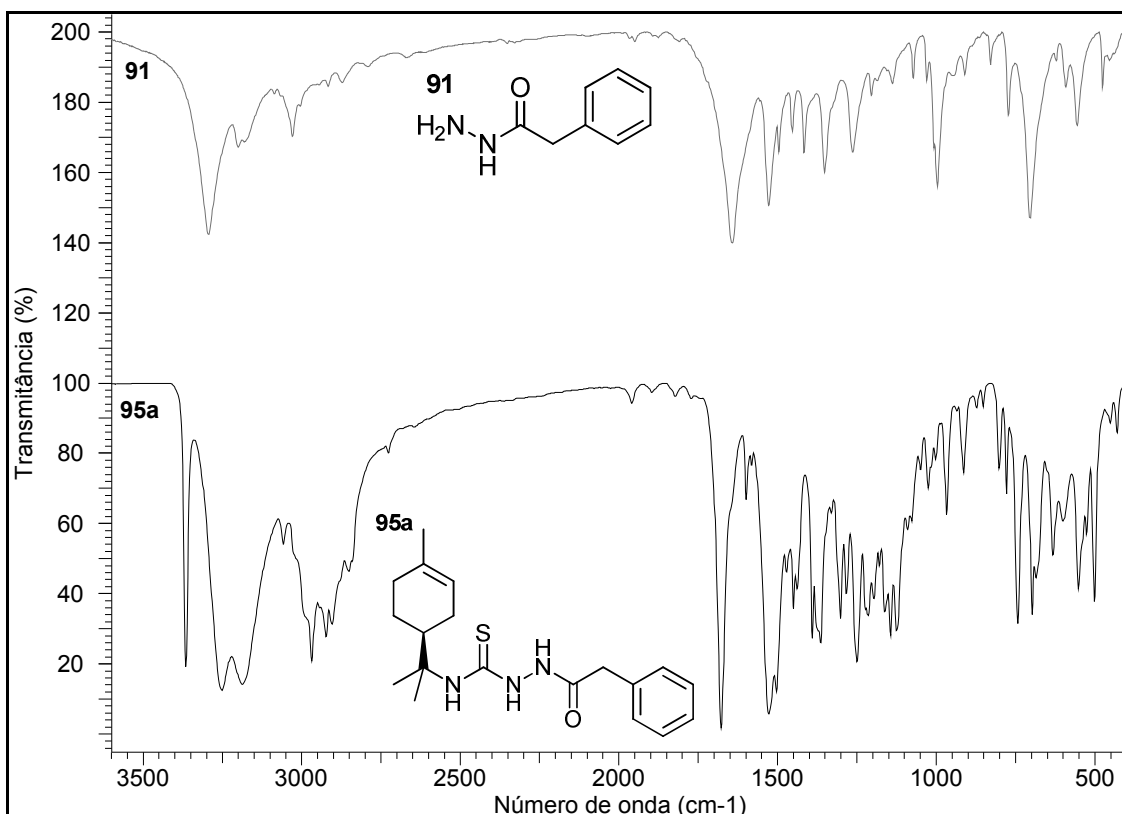
(92)

4.2.5. Aciltiossemicarbazidas (94-97)a, (94-97)b

Na comparação dos espectros de absorção no infravermelho a 2-fenilacetoidrazida (**91**) com seu derivado 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno (**95a**) (**Figura 46**), nota-se leve aumento da frequência para a deformação axial de C=O, que ocorreu em 1644 cm^{-1} para a hidrazida (**91**) e em 1677 cm^{-1} para seu derivado (**95**). Variações nas deformações axiais de NH também puderam ser observadas, além de surgimento de bandas entre $2998\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ referentes a CH alifáticos e estiramentos da tiocarbonila entre $1546\text{-}1503\text{ cm}^{-1}$.

Nos espectros das demais aciltiossemicarbazidas (**94**, **96-97**), estiramentos C=O ocorreram em frequência superior às respectivas hidrazidas, entre $1666\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$. Deformações axiais de NH foram observadas na região de $3349\text{-}3114\text{ cm}^{-1}$ e de tiocarbonilas, entre $1556\text{-}1502\text{ cm}^{-1}$.

Figura 46. Espectro de absorção no infravermelho para a 2-fenilacetoidrazida (**91**) e a 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno (**95a**).



Os dados espectrais de RMN para a 1-acetil-tiossemicarbazida (**94**), 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida (**95**), 1-benzoil-tiossemicarbazida (**96**) e 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97**) do limoneno, encontram-se na **Tabela 19**

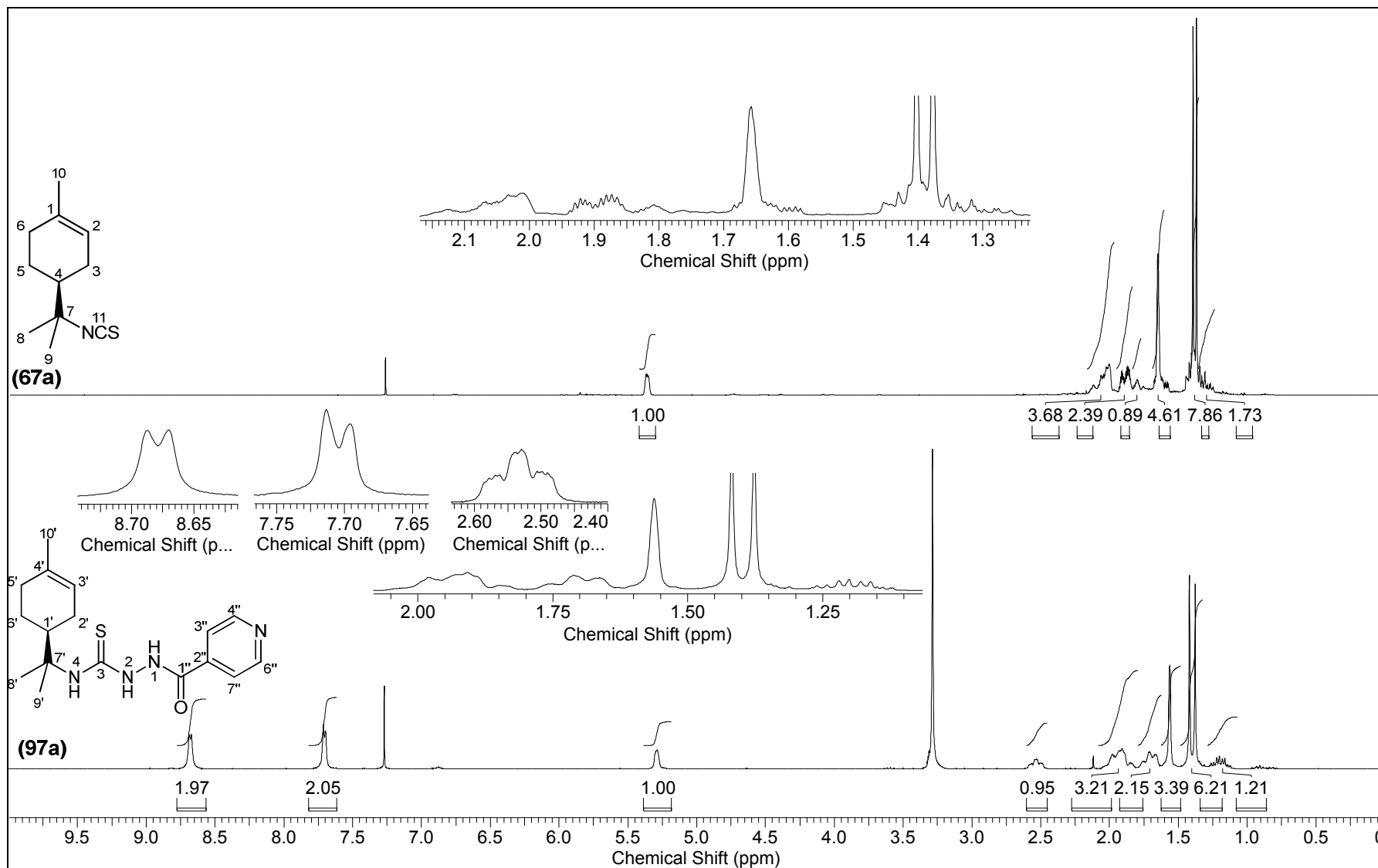
(^1H) e na **Tabela 20** ($^{13}\text{C}/\text{DEPT}$). Para a discussão das análises de RMN das aciltiossemicarbazidas, serão apresentados apenas os espectros da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida do S(-)-limoneno (**97a**).

Na análise dos espectros de RMN de ^1H para as aciltiossemicarbazidas **94-97**, foram observados os mesmos deslocamentos para os hidrogênios da porção terpênica em relação ao espectro dos isotiocianoterpenos **67a-b**. Apenas houve leve desblindagem para o hidrogênio metínico H1' das aciltiossemicarbazidas, que passou a ocorrer em δ_{H} 2,45-2,54. Com base na literatura (Dundar *et al.*, 2007; Palaska *et al.*, 2002), sinais largos entre δ_{H} 9,09-10,22 foram atribuídos aos hidrogênios ligados a nitrogênio H1 e H2, sendo H1 mais deslocado que H2, e sinais largos entre δ_{H} 6,76-7,10 foram atribuídos ao hidrogênio ligado ao nitrogênio N4. Esses sinais não foram observados para os compostos **97a** e **97b**, uma vez que suas análises de RMN foram realizadas em mistura de clorofórmio-metanol deuterados. Os sinais referentes às porções acíclicas das aciltiossemicarbazidas **94-96** também se mantiveram essencialmente os mesmos de seus respectivos precursores, hidrazidas **90-92**.

Na comparação do espectro de RMN de ^1H da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97a**) com o de seu precursor isotiocianoterpeno (**67a**) do S(-)-limoneno (**Figura 47**), foi verificada a presença de dupletos referentes aos hidrogênios do anel piridínico em δ_{H} 7,71 (H3''/H7'') e δ_{H} 8,68 (H4''/H6'') com $J=5,3$ Hz. O hidrogênio H1' deslocou-se para δ_{H} 2,54, enquanto que os demais sinais referentes à porção terpênica mantiveram-se praticamente inalterados em relação ao isotiocianoterpeno **67a**.

Nas análises de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ para as aciltiossemicarbazidas **94-97**, deslocamentos químicos dos sinais referentes à porção terpênica apresentaram grande semelhança com o espectro das tiossemicarbazidas do limoneno (**68a-b**). Os carbonos tiocarbonílicos, C3, apresentaram deslocamentos químicos (δ_{C} 177,7-178,1) nas aciltiossemicarbazidas levemente inferiores que na tiossemicarbazida (δ_{C} 180,5). Para os derivados **94-96** foram verificados os mesmos deslocamentos da porção acíclica em relação aos precursores hidrazidas (**90-92**), com exceção de leve blindagem dos carbonos carbonílicos C1'', que ocorreram entre δ_{C} 163,0 e 167,2 para as aciltiossemicarbazidas, ante a valores próximos a 170 ppm nos precursores.

Figura 47. Espectro de RMN ^1H (300,06 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$) do isotiocianoterpeno (**67a**) e da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97a**) do S-(-)-limoneno.



Na comparação dos espectros de RMN de ^{13}C /DEPT da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97a**) com o de seu precursor isotiocianoterpeno (**67a**) do *S*-(-)-limoneno (**Figura 48**), foi observada leve blindagem de $\text{C}1'$, $\text{C}7'$, $\text{C}8'$ e $\text{C}9'$ da aciltiossemicarbazida, além de surgimento de sinal em δ_{C} 179,9, referente ao carbono tiocarbônico C3. Ainda foram observados sinais referentes a CH do anel piridínico em δ_{C} 121,3 ($\text{C}3''/\text{C}7''$) e em maior deslocamento, δ_{C} 150,0, para os carbonos vizinhos ao átomo de nitrogênio ($\text{C}4''/\text{C}6''$). $\text{C}2''$ apresentou deslocamento químico de δ_{C} 139,4, e o carbono carbonílico $\text{C}1''$, sinal em δ_{C} 163,2.

Figura 48. Espectro de RMN de (a) ^{13}C (75,45MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$); (b) DEPT 90° ; (c) DEPT 135° do isotiocianoterpeno (**67a**) e da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97a**) do *S*-(-)-limoneno.

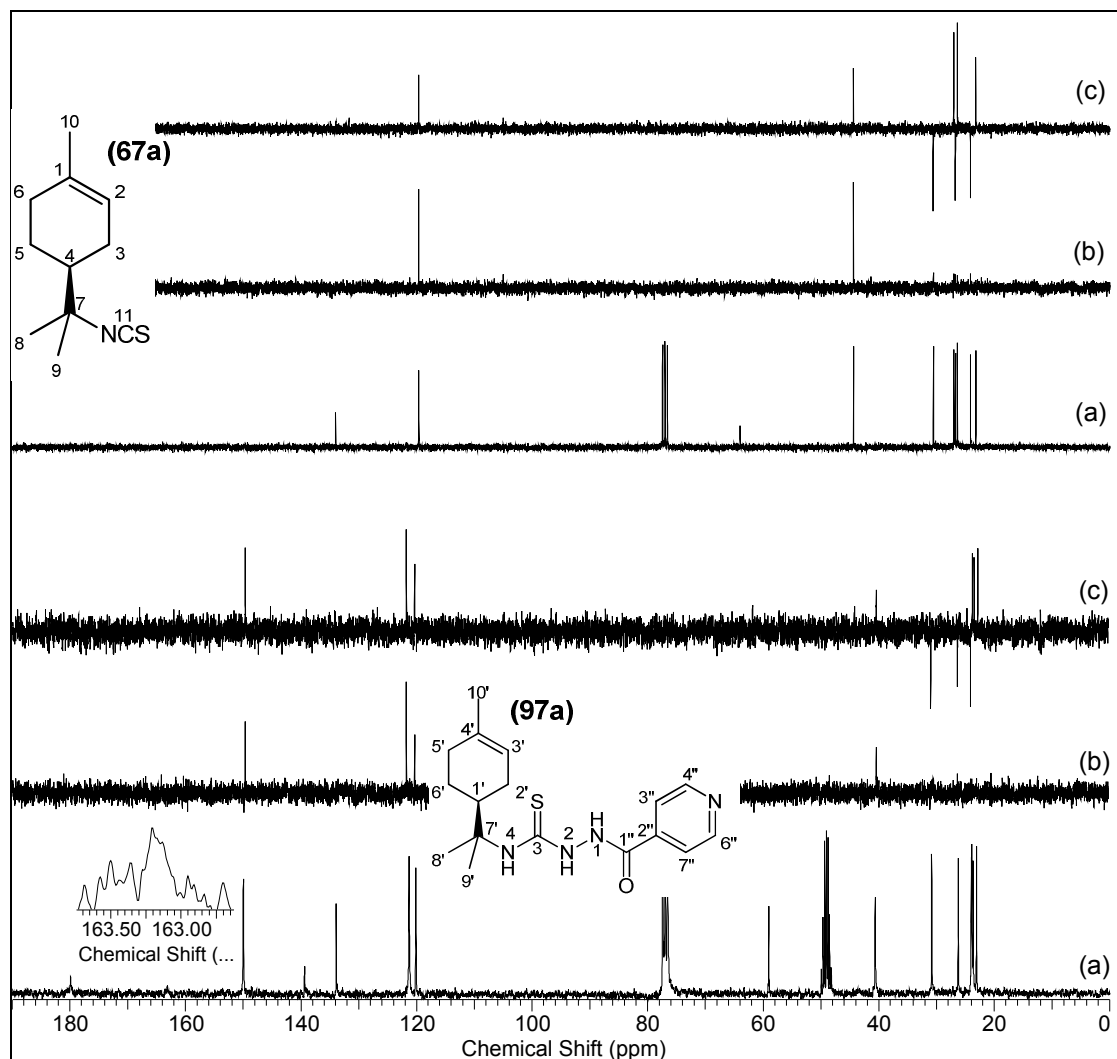
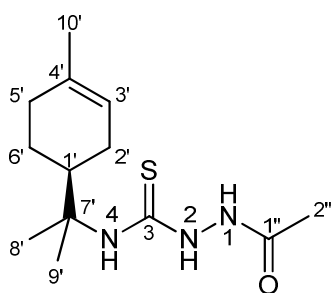


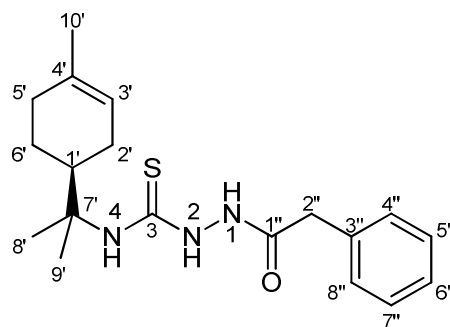
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (300,06 MHz, CDCl_3) das aciltiossemicarbazidas (**94-97**)a.

H	94a δ_{H} (mult., J em Hz)	95a δ_{H} (mult., J em Hz)	96a δ_{H} (mult., J em Hz)	97a δ_{H} (mult., J em Hz)
1	9,24 (sl)	9,29 (sl)	10,22 (sl)	N.O.*
2	9,09 (sl)	9,12 (sl)	10,16 (sl)	N.O.*
4	6,89 (sl)	6,76 (sl)	7,10 (sl)	N.O.*
1'	2,48 (m)	2,45 (m)	2,54 (m)	2,54 (m)
2'	2,05 (m)	1,98 (m)	2,04 (m)	1,98 (m)
3'	5,37 (m)	5,34 (m)	5,30 (m)	5,29 (m)
5'	1,99 (m)	1,92 (m)	1,98 (m)	1,89 (m)
6'	1,79 (m)	1,73 (m)	1,75 (m)	1,69 (m)
8'	1,49 (s)	1,37 (s)	1,45 (s)	1,42 (s)
9'	1,45 (s)	1,32 (s)	1,42 (s)	1,38 (s)
10'	1,64 (s)	1,62 (s)	1,58 (s)	1,56 (s)
2''	2,08 (s)	3,60 (s)	–	–
3''	–	–	7,83 (m)	7,71 (d, J=5,3)
4''	–	7,31 (m)	7,47 (m)	8,68 (d, J=5,3)
5''	–	7,31 (m)	7,57 (m)	–
6''	–	7,31 (m)	7,47 (m)	8,68 (d, J=5,3)
7''	–	7,31 (m)	7,83 (m)	7,71 (d, J=5,3)
8''	–	7,31 (m)	–	–

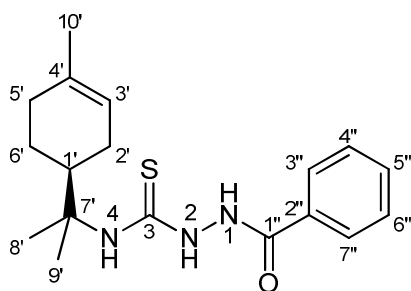
* Não observado.



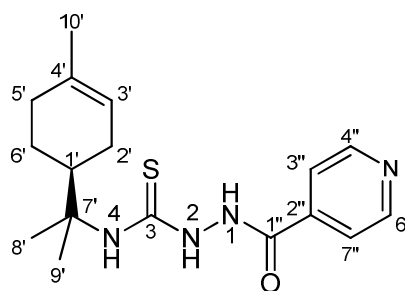
(94)



(95)



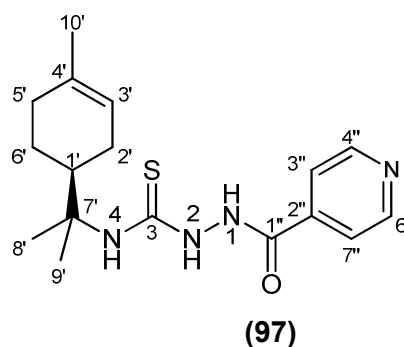
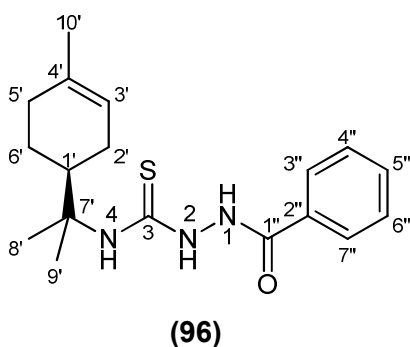
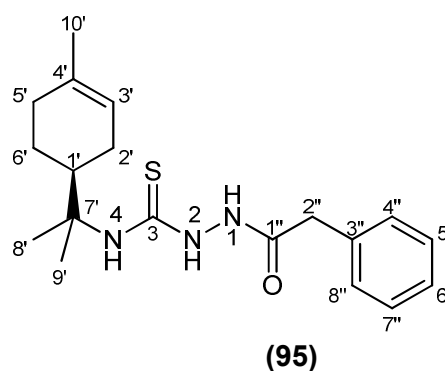
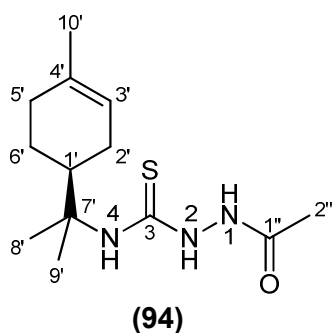
(96)



(97)

Tabela 20. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (75,45MHz, CDCl_3) das aciltiossemicarbazidas (**94-97**)a.

C	94a δ_c	95a δ_c (DEPT)	96a δ_c (DEPT)	97a δ_c (DEPT)
3	178,1	178,1 (C)	177,7 (C)	179,9 (C)
1'	41,0	40,9 (CH)	40,9 (CH)	40,6 (CH)
2'	26,4	26,3 (CH_2)	26,4 (CH_2)	26,2 (CH_2)
3'	120,3	120,4 (CH)	120,3 (CH)	120,1 (CH)
4'	134,0	134,0 (C)	133,9 (C)	134,0 (C)
5'	31,0	31,0 (CH_2)	30,9 (CH_2)	30,9 (CH_2)
6'	24,1	23,9 (CH_2)	24,0 (CH_2)	24,0 (CH_2)
7'	59,1	59,0 (C)	59,2 (C)	59,1 (C)
8'	24,2	24,1 (CH_3)	24,3 (CH_3)	23,9 (CH_3)
9'	24,0	24,0 (CH_3)	24,1 (CH_3)	23,7 (CH_3)
10'	23,3	23,3 (CH_3)	23,3 (CH_3)	23,1 (CH_3)
1''	166,2	167,2 (C)	163,0 (C)	163,2 (C)
2''	20,9	41,6 (CH_2)	131,3 (C)	139,4 (C)
3''	–	133,1 (C)	128,9 (CH)	121,3 (CH)
4''	–	129,1 (CH)	127,0 (CH)	150,0 (CH)
5''	–	129,2 (CH)	132,4 (CH)	–
6''	–	127,7 (CH)	127,0 (CH)	150,0 (CH)
7''	–	129,2 (CH)	128,9 (CH)	121,3 (CH)
8''	–	129,1 (CH)	–	–



4.3. Atividades biológicas

4.3.1. Atividade antiproliferativa sobre células tumorais

Todos os compostos inéditos sintetizados tiveram sua atividade antiproliferativa avaliada em células tumorais. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com métodos presentes na literatura (Monks *et al.*, 1991; Shoemaker, 2006; Skehan *et al.*, 1990).

As aciltiossemicarbazidas **(94-97)a** e **(94-97)b** foram avaliadas contra seis linhagens de células tumorais humanas: glioma (U251), mama (MCF-7), ovário resistente a múltiplos fármacos (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão tipo não pequenas células (NCI-H460) e cólon (HT29). Os 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno **(69-89)a** foram avaliados contra as seis linhagens citadas anteriormente e leucemia (K-562). Os 1,3,4-tiadiazóis do R-(+)-limoneno **(69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b** foram avaliados contra as sete linhagens citadas anteriormente, próstata (PC-3) e ovário (OVCAR-3). Para todos os compostos, a linhagem celular humana queratinócito (HaCaT) foi utilizada como parâmetro de avaliação da citotoxicidade dos mesmos sobre célula não-tumoral e a doxorubicina **(51)** foi utilizada como controle positivo.

A partir do gráfico de concentração *versus* porcentagem de inibição de crescimento para cada um dos compostos e as linhagens de células testadas, três parâmetros de resposta à avaliação foram calculados: GI₅₀, TGI e LC₅₀. O parâmetro GI₅₀ corresponde à concentração de droga necessária para inibir em 50% o crescimento celular, ou seja, corresponde à atividade inibitória. O parâmetro TGI corresponde à concentração de droga necessária para inibir em 100% o crescimento celular, ou seja, corresponde à atividade citostática. O parâmetro LC₅₀ corresponde à concentração de droga necessária para reduzir a quantidade final de células a 50% do valor no início do experimento, ou seja, corresponde à atividade citocida.

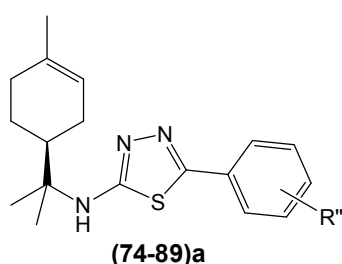
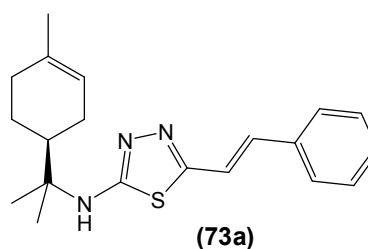
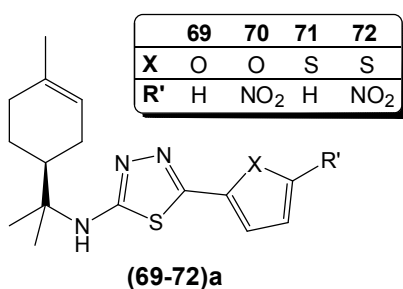
Para cada um dos três parâmetros de um composto avaliado, foi calculado o valor médio da concentração referente àquela atividade (MG-MID). O MG-MID (*mean-graph midPoint* ou valor das médias dos pontos do gráfico) foi obtido pelo anti-logaritmo da média dos logaritmos dos valores de GI₅₀, TGI ou LC₅₀ de todas as linhagens de células tumorais (Rostom, 2006).

O índice de seletividade (IS) da atividade de um composto para uma linhagem celular tumoral específica foi calculado através da razão entre o valor do respectivo MG-MID e o valor de GI_{50} , TGI ou LC_{50} para aquela linhagem celular. A seletividade foi considerada baixa quando $IS < 10$, moderada quando $10 < IS < 100$ e elevada quando $IS > 100$ (Formagio *et al.*, 2008).

Substâncias com valores de GI_{50} maiores que $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foram consideradas não ativas e com valores inferiores a $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, fortemente ativas (Formagio *et al.*, 2008). Os valores de seletividade serão apresentados apenas para compostos que tenham atividade ao menos moderada e estes forem relevantes.

4.3.1.1. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno 5-substituídos

Os valores obtidos na avaliação de atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno (**69-89**)a são apresentados na **Tabela 21** (parâmetro GI_{50} , para todos os compostos) e na **Tabela 22** (parâmetro TGI, para os compostos que exibiram atividade citostática em concentrações inferiores a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$).



74	75	76	77
R''	H	2-NO ₂	2-F
	2-Cl		
78	79	80	81
R''	3-NO ₂	3-F	3-Cl
	4-F		
82	83	84	85
R''	4-Cl	4-Br	4-NO ₂
	4-CF ₃		
86	87	88	89
R''	4-CH ₃	4-C(CH ₃) ₃	4-OCH ₃
			4-N(CH ₃) ₂

Os derivados do S-(-)-limoneno 5-furanil-1,3,4-tiadiazol (**69a**), 5-(*p*-bromofenil)-1,3,4-tiadiazol (**83a**), 5-(*p*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**84a**), 5-(*p*-metilfenil)-1,3,4-tiadiazol (**86a**), 5-[*p*-(*terc*-butil)fenil]-1,3,4-tiadiazol (**87a**) e 5-[*p*-(dimetilamino)fenil]-1,3,4-tiadiazol (**89a**) mostraram-se inativos nas linhagens de células tumorais testadas até a concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

A partir dos valores médios de concentração inibitória (MG-MID para GI_{50}), pode-se notar que os compostos mais ativos foram os 1,3,4-tiadiazóis substituídos na posição 5 com grupamento nitro-heteroaromático, derivados **70a** (3,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e **72a** (5,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Os compostos 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol (**71a**), 5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**77a**), 5-(*m*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**78a**) e 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol (**88a**) do S-(-)-limoneno apresentaram um valor moderado para a média dos valores de concentração inibitória, com MG-MID para o parâmetro GI_{50} entre 15,5 e 25,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os demais derivados do S-(-)-limoneno (**73-76**, **79**, **80**, **81**, **82**, **85a**) apresentaram atividade mais fraca, com valor de MG-MID para GI_{50} igual ou superior a 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, embora em alguns casos, certa seletividade foi notada para algumas linhagens celulares.

Atividade forte ($\text{GI}_{50} < 1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi obtida para os derivados 5-nitrofuranyl-1,3,4-tiadiazol (**70a**) e 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol (**72a**) em células tumorais de cólon HT29 e mama MCF-7, respectivamente. O composto **70a** ainda apresentou $\text{GI}_{50} < 2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em células de glioma U251, ovário resistente a múltiplos fármacos NCI-ADR/RES e pulmão tipo células não pequenas NCI-H460. Para os compostos que apresentaram valor de MG-MID para GI_{50} moderado, destacam-se as atividades do 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol (**71a**) e do 5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**77a**) para mama e ovário resistente (GI_{50} de 9,3 e 9,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 12,1 e 6,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, para os respectivos compostos e linhagens), do 5-(*m*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**78a**) para mama e leucemia K-526 (GI_{50} de 7,0 e 11,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente) e do 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol (**88a**) sobre células de leucemia ($\text{GI}_{50} = 3,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Dentre os compostos com MG-MID para $\text{GI}_{50} > 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, merecem ser destacadas as atividades do 5-fenil-1,3,4-tiadiazol (**74a**) sobre células de ovário resistente ($\text{GI}_{50} = 12,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$), do 5-(*o*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**75a**) sobre células de glioma ($\text{GI}_{50} = 19,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e do 5-(*m*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol (**80a**) sobre

Figura 51. Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat para 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**72a**).

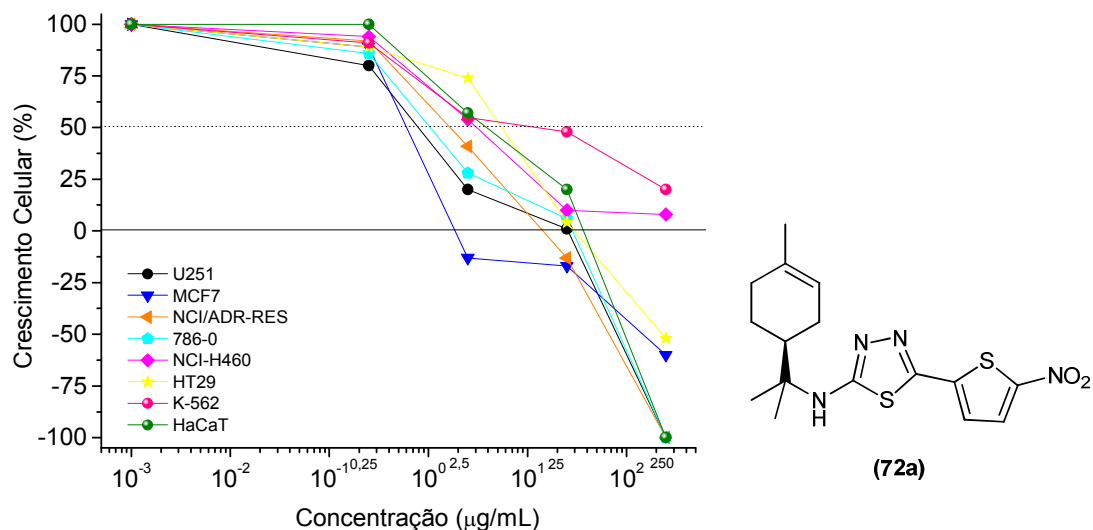
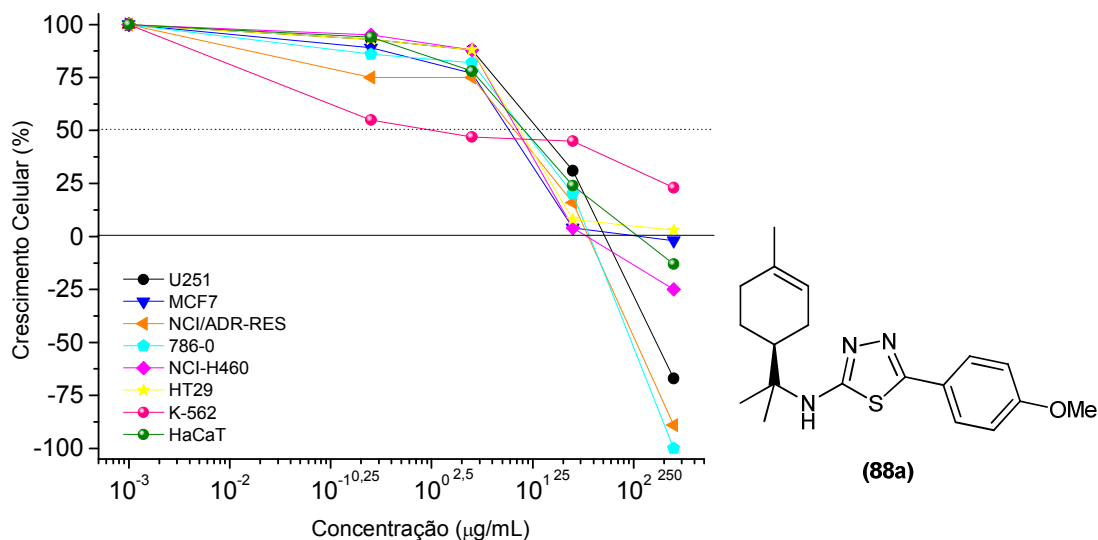


Figura 52. Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat do 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol do S-(-)-limoneno (**88a**).



Os 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno apresentaram baixos índices de seletividade (IS) para as linhagens de células testadas, sendo os maiores deles 5,8; 5,0 e 4,5 para os derivados **72a** (linhagem MCF-7), **74a** (linhagem NCI-ADR/RES) e **88a** (linhagem K-562). De uma forma geral, pode-se notar que, com exceção do 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol (**88a**), todos os 1,3,4-tiadiazóis com grupamento fenil *p*-substituído apresentaram atividades pouco expressivas ($\text{GI}_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) para as linhagens de células avaliadas, enquanto que a

substituição em *orto* ou *meta* no anel benzênico não forneceu um padrão claro de efeito de atividade. A presença do grupo NO₂ nos derivados com núcleo heteroaromático tiofeno e furano promoveu um grande aumento de atividade destes compostos, tornando os derivados **70a** e **72a** os mais ativos da série do S-(-)-limoneno. A inserção de uma ligação dupla entre o anel benzênico e o núcleo 1,3,4-tiadiazol provocou uma perda de atividade para todas as linhagens tumorais testadas (comparação dos valores de GI₅₀ dos compostos **73a** e **74a**) e, em contrapartida, aumentou a toxicidade do composto para a linhagem de células não-tumorais HaCat.

Tabela 22. Valores de TGI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), TGI (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno com atividade citostática (**70-72,75, 76, 78, 88a**) e o controle doxorubicina (**Dox**).

	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	K-562	HT29	HaCat	MG-MID
Dox	1,0	6,9	3,2	0,7	1,1	> 45	> 45	0,5	4,4
70a	9,7 (2,6)	6,3 (4,1)	30,5	36,7	20,9	> 100	7,2 (3,6)	33,5	25,7
71a	72,5	94,2	> 100	96,3	> 100	> 100	> 100	87,5	> 100
72a	26,2 (3,1)	17,7 (4,6)	31,9 (2,5)	34,1 (2,4)	> 100	> 100	93,3	74,3	80,6
75a	> 100	> 100	82,0	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
76a	> 100	> 100	98,7	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
78a	> 100	72,5	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
88a	> 100	> 100	86,1	91,6	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

Os derivados 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol (**70a**), 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol (**71a**) e 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol (**72a**) apresentaram as atividades citostáticas mais expressivas. Também apresentaram efeito citostático até a concentração de 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ os compostos 5-(*o*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**75a**), 5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**76a**) e 5-(*m*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol (**78a**) para uma única linhagem celular, e o 5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol (**88a**) para duas linhagens celulares.

O derivado **70a** foi também o composto com atividade citostática mais pronunciada, sendo que para as linhagens de mama MCF-7 e cólon HT29 foram obtidos valores de TGI de 6,3 e 7,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Esta atividade é mais forte que a da droga padrão, doxorrubicina (com TGI de 6,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e superior a 45 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para as respectivas linhagens), ao mesmo tempo que o composto **70a** foi 67 vezes menos tóxico que a doxorrubicina para células não tumorais de queratinócito HaCat. Merecem destaque ainda as atividades do derivado **70a** em células de glioma U251 (TGI = 9,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e do derivado **72a** em células tumorais de mama (TGI = 17,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

O único composto a apresentar efeito citocida para a série dos 1,3,4-tiadiazóis do S-(-)-limoneno foi o 5-nitrofuranyl-1,3,4-tiadiazol (**70a**), que forneceu valores de $\text{LC}_{50} = 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para células tumorais de mama MCF-7 e $\text{LC}_{50} = 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para células de glioma HT29, concentrações inferiores à da droga padrão, doxorrubicina, que não apresentou atividade para as concentrações testadas ($\text{LC}_{50} > 45 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

4.3.1.2. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do R-(+)-limoneno 5-substituídos

Os valores de atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do R-(+)-limoneno (**69-73**, **76**, **79**, **83**, **85**, **87**)**b** são apresentados na **Tabela 23** (parâmetro GI_{50}) e na **Tabela 24** (parâmetro TGI, para os compostos que exibiram atividade citostática em concentrações inferiores a 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$).

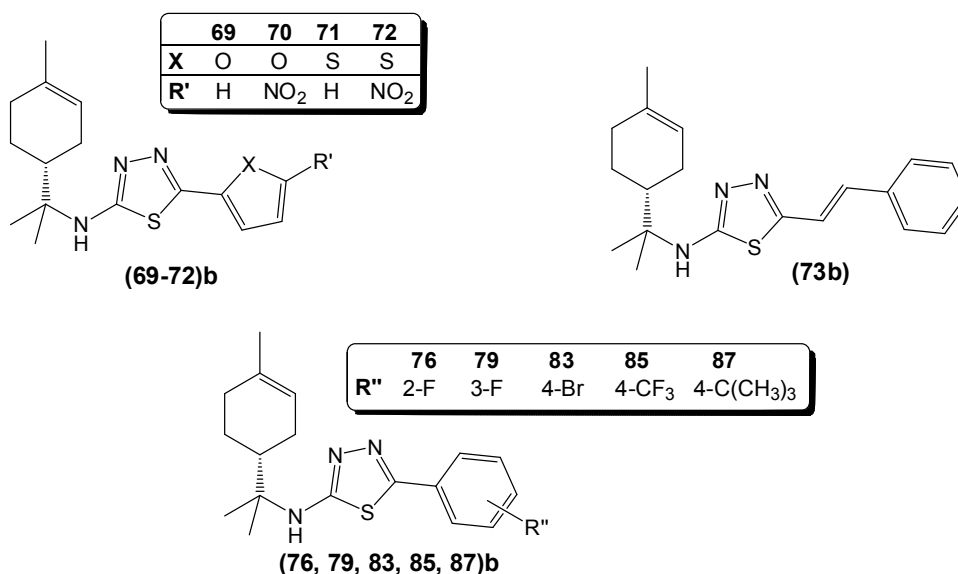


Tabela 23. Valores de GI_{50} ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), GI_{50} (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do R-(+)-limoneno (**69-73**, **76**, **79**, **83**, **85**, **87**)**b** e o controle doxorrubicina (**Dox**).

	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	K-562	HT29	HaCat	MG-MID
Dox	0,08	0,09	1,09	0,08	0,04	0,09	0,23	0,12	0,68	0,05	0,15
69b	>100	>100	>100	>100	>100	>100	N.T.*	>100	>100	>100	>100
70b	5,6	1,4 (2,5)	4,7	3,9	2,5	1,6 (2,1)	6,6	2,8	6,5	4,4	3,4
71b	77,2	71,3	77,6	78,4	100	39,1	70,8	30,4	68,8	68,6	64,5
72b	20,3	29,8	18,4	8,8 (2,0)	32,3	27,9	6,8 (2,6)	7,4 (2,4)	42,0	18,7	17,9
73b	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
76b	>100	73,5	>100	>100	>100	95,5	78,4	55,1	67,9	61,5	>100
79b	73,0	55,1	76,8	72,7	67,6	65,9	66,7	14,9 (3,8)	66,5	69,6	57,3
83b	>100	30,0	>100	>100	>100	>100	74,2	>100	>100	>100	>100
85b	80,2	>100	92,0	71,4	71,0	>100	63,6	>100	>100	>100	>100
87b	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

* N.T.: não testado.

Pelos valores de GI_{50} , nota-se que o 5-furanil-1,3,4-tiadiazol (**69b**), o (E)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol (**73b**) e o 5-[p-(terc-butil)fenil]-1,3,4-tiadiazol (**87b**) foram inativos para todas as linhagens de células testadas. Da mesma forma, os compostos correspondentes **69a** e **87a** derivados do S(-)-limoneno também foram inativos nas concentrações descritas. Os 1,3,4-tiadiazóis com substituintes nitro-heteroaromáticos **70b** e **72b** foram os mais ativos da série, assim como ocorreu para a série dos 1,3,4-tiadiazóis do S(-)-limoneno, exibindo valor médio de concentração inibitória (MG-MID para GI_{50}) de $3,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $17,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente (ambos valores maiores que para os derivados do S(-)-limoneno). Os demais compostos (**71b**, **73b**, **76b**, **83b** e **85b**) foram de moderada a fracamente ativos, com MG-MID $> 50 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

O 5-nitrofuranyl-1,3,4-tiadiazol (**70b**) exibiu os menores valores de concentração inibitória da série ($GI_{50} < 7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para todas as linhagens), destacando-se GI_{50} de 1,4 e $1,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ respectivamente para células de

mama MCF-7 e próstata PC-3. O 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol (**72b**) apresentou valores de GI_{50} inferiores a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para células de ovário OVCAR-3 ($6,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$), leucemia K-262 ($7,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e rim 786-0 ($8,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Apesar da atividade moderada, vale destacar a maior seletividade do 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**79b**) para células K-562 (GI_{50} de $14,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e do 5-(*p*-bromofenil)-1,3,4-tiadiazol (**83b**) para mama (GI_{50} de $30,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$). O gráfico de crescimento celular *versus* concentração para os dois derivados mais ativos, **70b** e **72b**, são apresentados, na **Figura 53** e na **Figura 54**.

Figura 53. Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat do 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol do *R*-(+)-limoneno (**70b**).

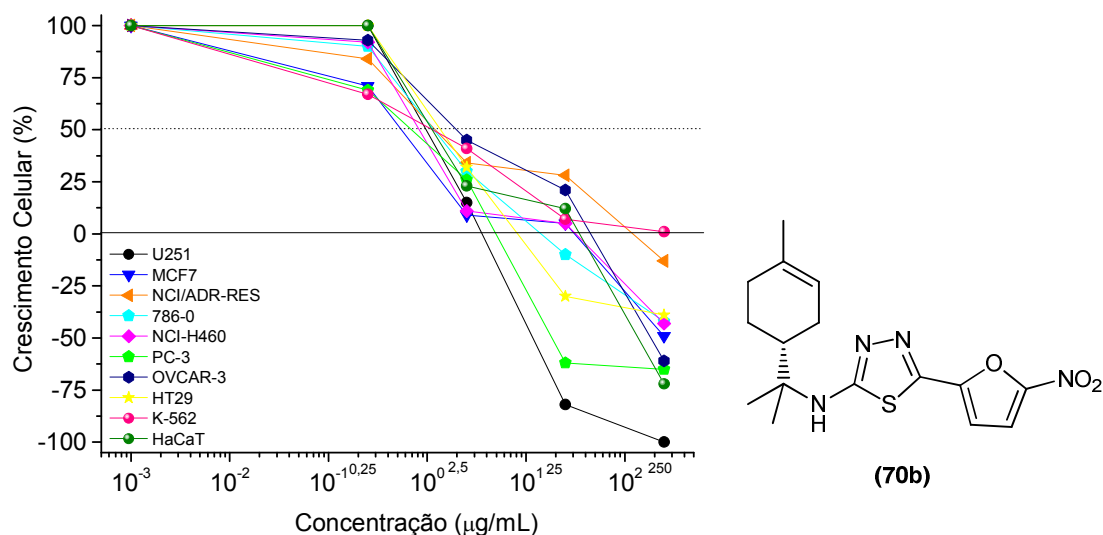
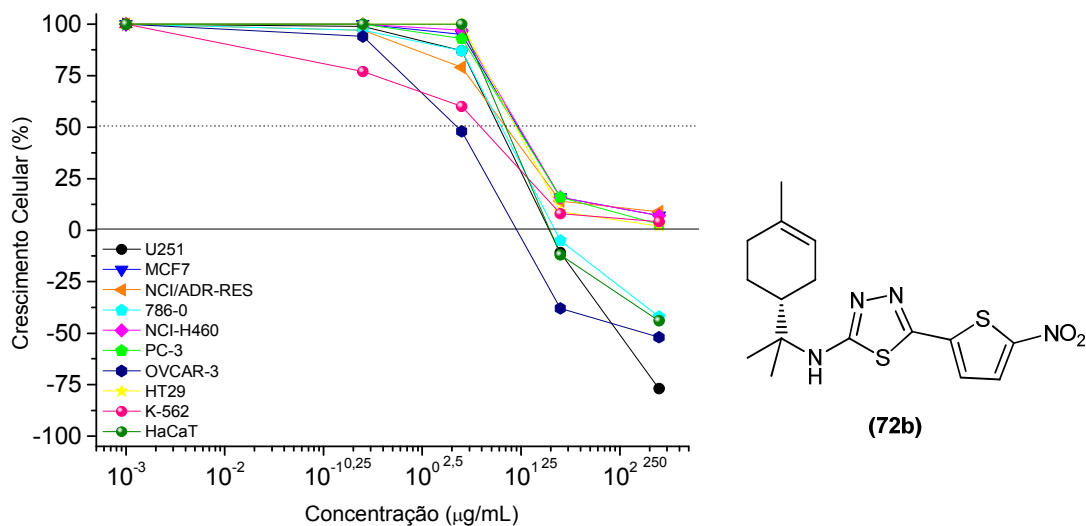


Figura 54. Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat do 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do *R*-(+)-limoneno (**72b**).



Todos os 1,3,4-tiadiazóis do *R*-(+)-limoneno, para os quais foi possível calcular o índice de seletividade, apresentaram valores baixos deste índice ($IS < 4$), sendo o maior deles de 3,8 para o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol (**79b**) em células de leucemia K-562. De forma geral, a atividade antiproliferativa para a linhagem não tumoral HaCat acompanhou os valores médios de atividade inibitória (MG-MID), não indicando uma grande diferenciação entre células saudáveis e as linhagens tumorais nas concentrações avaliadas.

Tabela 24. Valores de TGI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$), TGI (MG-MID, $\mu\text{mol.L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis do *R*-(+)-limoneno com atividade citostática (**70**, **72b**) e o controle doxorrubicina (**Dox**).

	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVCAR-3	K-562	HT29	HaCat	MG-MID
Dox	6,4	9,8	17,5	1,3	0,18	1,5	1,7	46,0	20,1	0,40	4,4
70b	9,2 (6,7)	41,3	>100	55,1	57,4	13,2 (4,7)	89,3	>100	41,6	51,7	61,6
72b	60,1 (> 4)	>100	>100	>100	>100	>100	33,5 (> 7)	>100	>100	92,5	>100

O 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol (**70b**) e o 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol (**72b**) do *R*-(+)-limoneno apresentaram efeito citostático, sendo que o primeiro composto foi o mais potente, exibindo efeito citostático para a maioria das linhagens. O derivado **70b** forneceu TGI de $9,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para células de glioma U251 e de $13,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para células de próstata PC-3 como melhores resultados. O primeiro valor foi apenas 1,5 vezes maior (menos potente) que o da droga padrão, com $IS = 6,7$, ao passo que o derivado **70b** foi 129 vezes menos tóxico que a da doxorrubicina (para linhagem HaCat). O derivado **72b** apresentou efeito citostático apenas para células de glioma, queratinócito e ovário, sendo o menor valor de TGI para a linhagem OVCAR-3 ($33,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

O 5-nitrofurânil-1,3,4-tiadiazol (**70b**) também apresentou efeito citocida, o qual ocorreu para as linhagens de glioma ($LC_{50} = 58,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e próstata ($LC_{50} = 67,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Os demais 1,3,4-tiadiazóis do *R*-(+)-limoneno foram inativos em relação a este parâmetro.

Ao se comparar os dados de atividade antitumoral das séries de 1,3,4-tiadiazóis do *R*-(+)-limoneno com os compostos correspondentes do

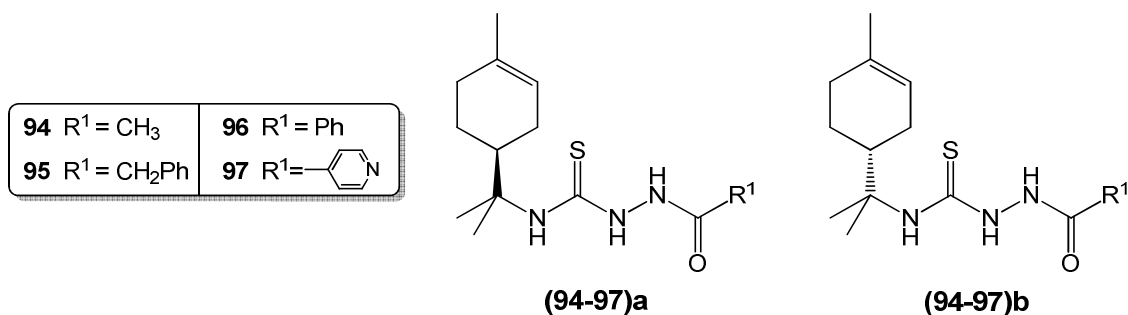
S-(-)-limoneno, verificou-se que, em termos de MG-MID, a série derivada do S-(-)-limoneno apresentou menores valores, no geral, tanto de concentração inibitória (GI₅₀) quanto de concentração citostática (TGI), indicando que esta série foi mais ativa. Apenas o 5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do R-(+)-limoneno (**79b**) apresentou menor concentração do MG-MID (para GI₅₀) que seu enantiômero. Porém, observando os valores específicos para cada linhagem de células, enantiômeros de ambas as séries se alternaram apresentando os melhores valores de atividade. Logo, a seletividade e o potencial antitumoral dos compostos não apresentou uma tendência clara para nenhuma das séries.

4.3.1.3. Aciltiossemicarbazidas do limoneno

Os valores de atividade antitumoral para as aciltiossemicarbazidas do S-(-)-limoneno (**94-97a**) e do R-(+)-limoneno (**94-97b**) são apresentados na **Tabela 25** (parâmetro GI₅₀, para todos os compostos) e na **Tabela 26** (parâmetro TGI, para os compostos que exibiram atividade citostática em concentrações inferiores a 100 µmol.L⁻¹).

Tabela 25. Valores de GI₅₀ (µmol.L⁻¹), GI₅₀ (MG-MID, µmol.L⁻¹) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para as aciltiossemicarbazidas do S-(-)-limoneno (**94-97a**), do R-(+)-limoneno (**94-97b**) e o controle doxorubicina (**Dox**).

	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	HT29	HaCat	MG-MID
Dox	0,04	0,04	0,38	0,05	0,01	0,16	0,06	0,06
94a	39,0	88,3	11,1 (6,3)	62,7	>100	>100	75,3	69,9
95a	7,8	11,8	7,8	7,6	35,2	14,8	18,5	11,9
96a	7,7	7,6	2,4 (3,4)	8,4	16,5	14,7	14,0	8,1
97a	9,0	12,0	12,3	22,6	23,5	21,4	38,2	15,7
94b	36,9	>100	29,8	26,5	>100	98,1	61,4	66,7
95b	13,1	14,8	2,9 (6,4)	12,5	80,1	67,9	70,0	18,3
96b	32,1	7,8	8,4	7,2	64,4	18,5	12,7	16,2
97b	12,6	12,3	3,6 (4,3)	23,2	26,8	40,9	30,7	15,6



A partir dos dados de GI_{50} para as aciltiossemicarbazidas nota-se que todos derivados foram ativos contra as linhagens de células testadas, especialmente em células tumorais de ovário resistente NCI-ADR/RES, cujos GI_{50} variaram entre $2,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $29,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Pela avaliação da concentração inibitória média (MG-MID para GI_{50}), as 1-(acetil)-tiossemicarbazidas (**94a-b**) foram os compostos menos ativos, apresentando os maiores valores de MG-MID (entre 66 e $70 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A 1-benzoil-tiossemicarbazida (**96a**) foi o composto mais ativo da série do *S*-(-)-limoneno (MG-MID de $8,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e a 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida (**97b**) foi o derivado mais ativo da série do *R*-(+)-limoneno (MG-MID de $15,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Os menores valores de concentração inibitória (GI_{50}) foram obtidos para a linhagem NCI-ADR/RES, pela 1-benzoil-tiossemicarbazida **96a**, 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida **95b** e 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida **97b**, com valores de GI_{50} de $2,4$, $2,9$ e $3,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. GI_{50} inferiores a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ainda foram encontrados para as linhagens de células tumorais de glioma U251, mama MCF-7 e rim 786-0 para aciltiossemicarbazidas tanto do *R*-(+) quanto do *S*-(-)-limoneno. Os gráficos de crescimento celular *versus* concentração dos três derivados com menores valores de GI_{50} são apresentados na **Figura 55** (derivado **96a**), **Figura 56** (derivado **95b**) e **Figura 57** (derivado **97b**).

As aciltiossemicarbazidas mostraram baixa seletividade para as linhagens de células tumorais testadas, sendo os melhores valores obtidos para a 1-acetil-tiossemicarbazida **94a** (IS=6,3) e 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida **95b** (IS=6,4), ambas para a linhagem NCI-ADR/RES. Os valores de GI_{50} para a linhagem não tumoral HaCat acompanharam os valores médios de concentração inibitória (MG-MID para GI_{50}), indicando pouca diferenciação entre células tumorais e saudáveis pelos compostos, nas

concentrações avaliadas. Apenas a 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida **95b** merece destaque, uma vez que apresentou $GI_{50} = 70,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a linhagem não tumoral queratinócito (HaCat), valor 3,8 vezes maior que o respectivo MG-MID do composto, 24,1 vezes maior que o GI_{50} para a linhagem NCI-ADR/RES e 1167 vezes maior (menos tóxico) que o GI_{50} da doxorubicina sobre a linhagem HaCat.

Figura 55. Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat da 1-benzoil-tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno (**96a**).

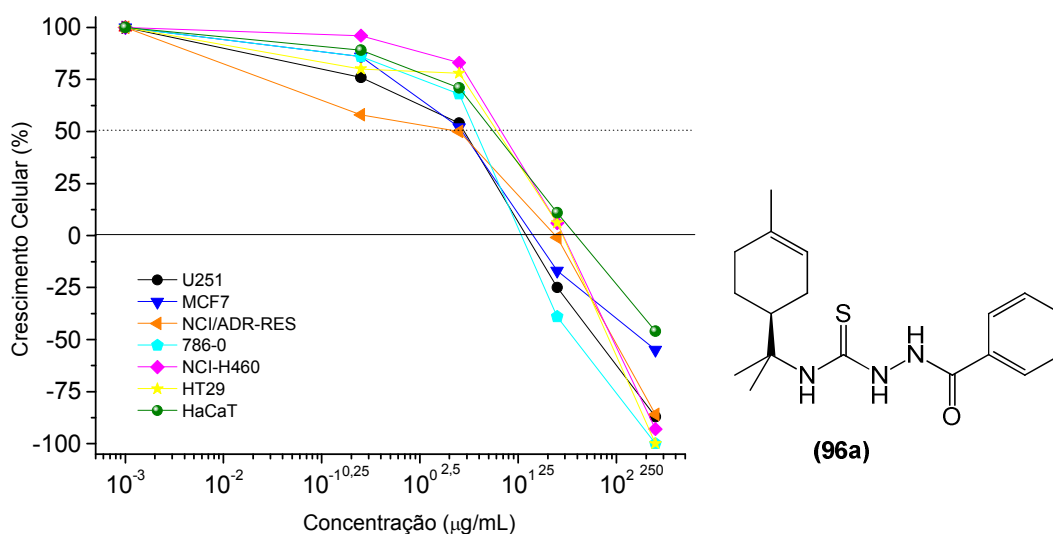


Figura 56. Gráfico de crescimento celular (%) *versus* concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat da 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do R-(+)-limoneno (**95b**).

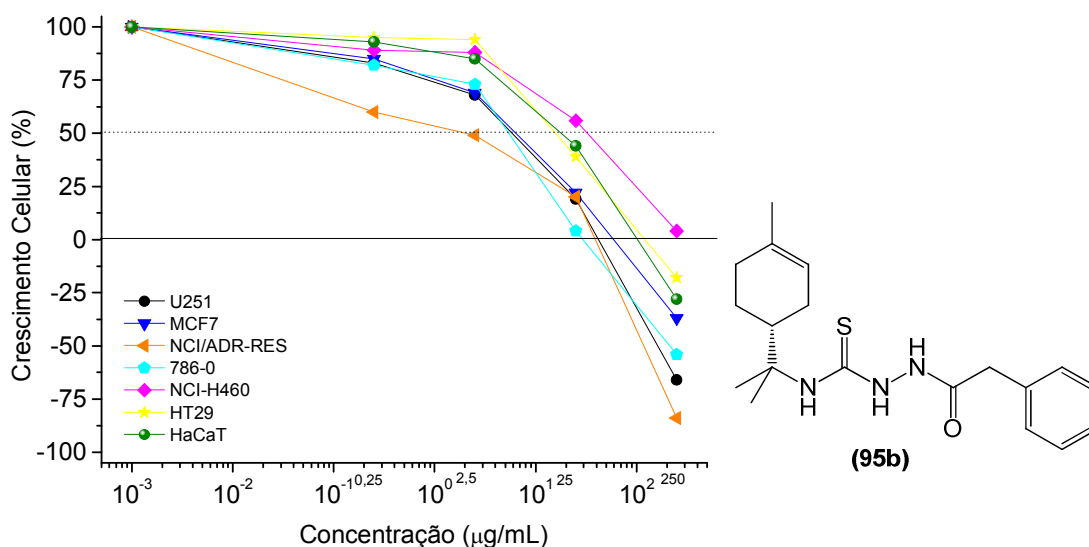


Figura 57. Gráfico de crescimento celular (%) versus concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para a avaliação da atividade antiproliferativa em linhagens de células tumorais e não tumoral HaCat da 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno (**97b**).

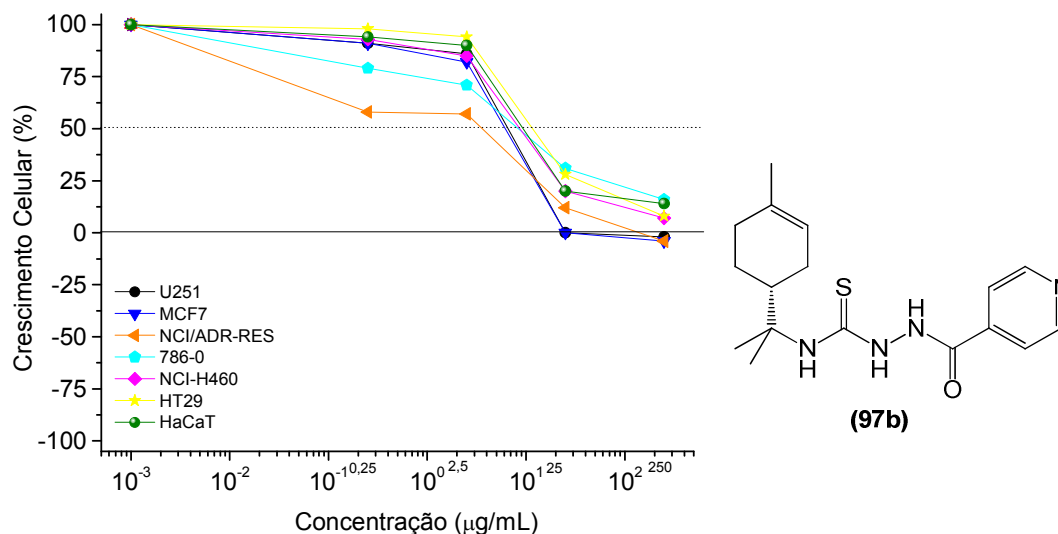


Tabela 26. Valores de TGI ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), TGI (MG-MID, $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e IS (valores entre parênteses) de avaliação da atividade antitumoral para as aciltiossemicarbazidas com atividade citostática do *S*-(-)-limoneno (**95-96a**), do *R*-(+)-limoneno (**95-96b**) e o controle doxorrubicina (**Dox**).

	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	HT29	HaCat	MG-MID
Dox	0,6	4,5	11,3	1,5	>45	>45	6,9	6,8
95a	34,7	53,6	42,2	34,1	79,8	76,1	>100	50,3
96a	56,4	>100	28,5 (2,6)	17,7 (4,2)	>100	>100	>100	74,3
95b	61,4	43,5	62,8	53,0	88,1	83,4	90,8	63,5
96b	>100	>100	59,4	93,5	>100	>100	>100	> 100

As 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazidas (**95a-b**) e 1-benzoil-tiossemicarbazidas (**96a-b**) apresentaram efeito citostático para várias linhagens de células tumorais. Merece destaque o valor de TGI do derivado **96a** para células tumorais de rim 786-0 ($17,7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e de ovário resistente NCI-ADR/RES ($28,5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo o último apenas 2,5 vezes menos ativo que a droga padrão, ao passo que 13 vezes menos tóxico que a mesma. Os demais compostos apresentaram valores fracos a moderados de TGI, sendo que, em média, o derivado **95a** foi o mais ativo, com MG-MID de $50,3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Efeito citocida das aciltiossemicarbazidas do limoneno foi verificado apenas para os derivados 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida **95a** e 1-benzoil-tiossemicarbazida **96a**. O derivado **95a** apresentou LC_{50} de $75,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em células tumorais de rim 786-0 e de $60,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em células tumorais de ovário resistente NCI-ADR/RES, enquanto que o derivado **96a** apresentou LC_{50} de $79,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para a linhagem 786-0.

4.3.2. Atividade anti-*Trypanosoma cruzi*

Todos os compostos inéditos sintetizados tiveram sua atividade antiproliferativa avaliada para o protozoário *Trypanosoma cruzi*. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com métodos presentes na literatura (Brener, 1962; Mosmann, 1983).

Os compostos que apresentaram valores de concentração inibitória próximos ou menores que aquele do controle positivo, benzinidazol, foram considerados fortemente ativos. Derivados com concentração inibitória próxima ao limite máximo avaliado ($250 \mu\text{mol.L}^{-1}$), foram considerados pouco ativos.

Os 1,3,4-tiadiazóis do *S*-(-)-limoneno (**69-89a**) e do *R*-(+)-limoneno (**69-73, 76, 79, 83, 85, 87b**) foram avaliados em formas tripomastigotas (forma infectante, presente na corrente sanguínea de animais hospedeiros do protozoário) de *T. cruzi*, sendo determinados os valores de EC_{50} (concentração efetiva sobre 50% dos protozoários) para cada composto. O benzinidazol (**52**) foi utilizado como controle positivo. Todos os dados de atividade referentes aos 1,3,4-tiadiazóis do limoneno são apresentados na **Tabela 27**.

As aciltiossemicarbazidas (**94-97a**) e (**94-97b**) foram avaliadas em formas epimastigotas (forma presente no vetor transmissor da doença de Chagas) e tripomastigota de *T. cruzi*, sendo determinados, respectivamente, os valores de IC_{50} (concentração inibitória de 50% dos protozoários) e EC_{50} (concentração efetiva sobre 50% dos protozoários). O benzinidazol (**52**) foi utilizado como controle positivo e a linhagem celular LLC-MK₂ foi utilizada como parâmetro de avaliação de citotoxicidade (CC_{50}) das aciltiossemicarbazidas. A razão do valor de CC_{50} pelo valor de IC_{50} ou EC_{50} forneceu o índice de seletividade (IS) das aciltiossemicarbazidas para cada forma do protozoário. Todos os dados de atividade referentes às aciltiossemicarbazidas são apresentados na **Tabela 28**.

4.3.2.1. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos

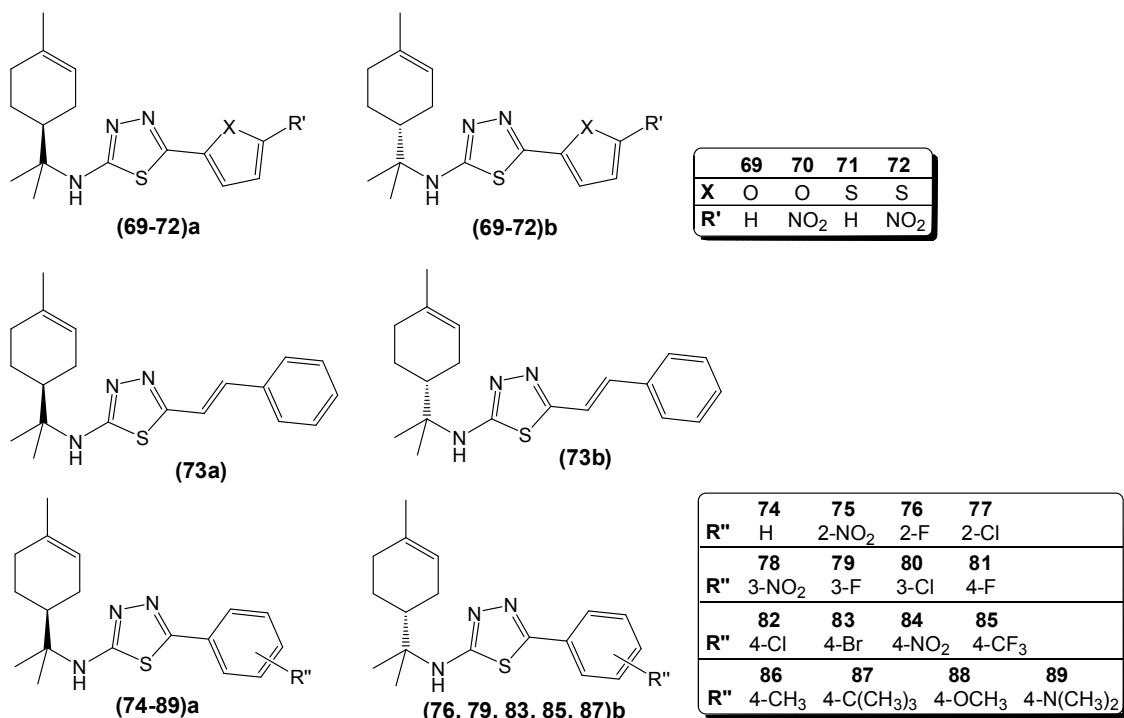


Tabela 27. Valores de atividade antiproliferativa sobre formas tripomastigotas (EC_{50}) de *Trypanosoma cruzi* para os 1,3,4-tiadiazóis do S(-)-limoneno (**69-89**)a e do R-(+)-limoneno (**69-73**, **76**, **79**, **83**, **85**, **87**)b e o padrão benzinidazol (**Benz**).

Composto	EC_{50} * (Média \pm DP)	Composto	EC_{50} * (Média \pm DP)	Composto	EC_{50} * (Média \pm DP)
Benz	34,5 \pm 7,6	79a	> 250	69b	> 250
69a	> 250	80a	> 250	70b	20,0 \pm 0,6
70a	17,5 \pm 4,0	81a	> 250	71b	> 250
71a	116,8 \pm 19,9	82a	> 250	72b	50,5 \pm 11,5
72a	5,49 \pm 1,60	83a	210,3 \pm 1,8	73b	191,5 \pm 16,7
73a	96,2 \pm 15,1	84a	> 250	76b	> 250
74a	244,1 \pm 24,9	85a	> 250	79b	232,3 \pm 19,8
75a	> 250	86a	> 250	83b	> 250
76a	181,0 \pm 12,8	87a	> 250	85b	> 250
77a	> 250	88a	97,5 \pm 2,1	87b	> 250
78a	> 250	89a	> 250		

* Valores expressos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Para a série dos 1,3,4-tiadiazóis substituídos na posição 5 com grupamento fenílico – compostos **(74-89)a** e **(76, 79, 83, 85, 87)b** – e para os (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazóis **(73a-b)**, os resultados antiproliferativos sobre formas tripomastigotas não foram muito expressivos. Com exceção do 5-(*p*-metoxifeil)-1,3,4-tiadiazol e do (*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno **(73a e 88a)**, que apresentaram $EC_{50} = 96,2$ e $97,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente, os demais 1,3,4-tiadiazóis deste grupo mostraram-se fracamente ativos, apresentando $EC_{50} > 180 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Dentre a série de 1,3,4-tiadiazóis substituídos na posição 5 com grupamento heteroaromático – compostos **(69-72)a** e **(69-72)b** – os 5-furanil-1,3,4-tiadiazóis **(69a-b)** e o 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol do *R*-(+)-limoneno **(71b)** apresentaram-se inativos, enquanto que o 5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno **(71a)** exibiu atividade pouco pronunciada, com EC_{50} de $116,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Para os derivados nitrados, foi encontrada concentração efetiva de $50,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do *R*-(+)-limoneno **(72b)** e potente atividade para os demais compostos, com valores inferiores ao do benzinidazol. O 5-nitrofuranil-1,3,4-tiadiazol do *R*-(+)-limoneno **(70b)** apresentou $EC_{50} = 20,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o 5-nitrofuranil-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno **(70a)** apresentou $EC_{50} = 17,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (2,0 vezes mais ativo que o benzinidazol) e o 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno **(72a)** exibiu $EC_{50} = 5,49 \mu\text{mol.L}^{-1}$, valor 6,2 vezes menor que a concentração inibitória da droga padrão sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

A forte atividade antiproliferativa dos derivados nitrados **(70a-b e 72a)** está possivelmente relacionada ao potencial de formação de radicais nitroaniônicos e espécies oxidantes no meio celular, com atuação por estresse oxidativo, como é o mecanismo de drogas com grupamentos nitroheteraromáticos (Chauvière *et al.*, 2003; Coura & Castro, 2002; Coura, 2009).

Ainda vale destacar que o valor de concentração inibitória *in vitro* para formas tripomastigotas de *T. cruzi* do 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno **(72a)** foi equiparável aos obtidos para outros compostos da literatura, como a arilidrazona Brazilizona A **(30)**, de $5,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e o Megazol **(24)**, de $9,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Carvalho *et al.*, 2004). Apenas se faz uma ressalva de que as cepas de *T. cruzi* avaliadas em diferentes trabalhos podem não serem

as mesmas, de forma que comparações diretas de valores de atividade de diferentes estudos podem não implicar na relação real de suas atividades. De qualquer forma, o derivado **72a** foi o mais ativo da série de 1,3,4-tiadiazóis do limoneno contra formas tripomastigotas do protozoário avaliado. É, portanto, um candidato a futuros testes de toxicidade e de outras avaliações de atividade para *Trypanosoma cruzi*.

4.3.2.2. Aciltiossemicarbazidas do limoneno

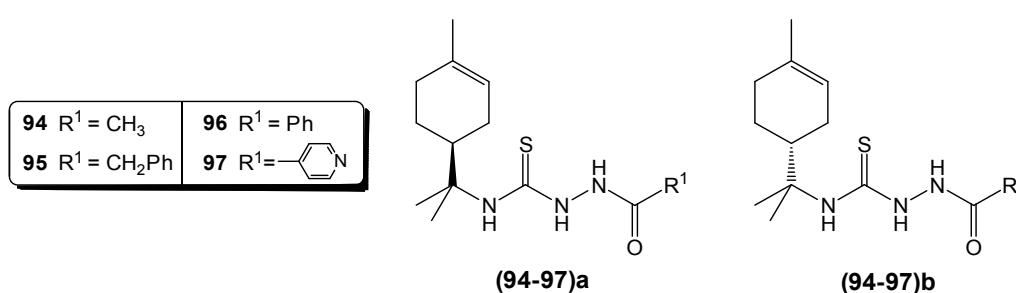


Tabela 28. Valores de atividade antiproliferativa sobre formas epimastigotas (IC_{50}) e tripomastigotas (EC_{50}) de *Trypanosoma Cruzi*, valores de citotoxicidade (CC_{50}) em células LLC-MK₂ e índice de seletividade (IS) para as aciltiossemicarbazidas do S(-)-limoneno (**94-97a**) e do R(+)-limoneno (**94-97b**) e o padrão benzinidazol (**Benz**).

	Epimastigotas		Tripomastigotas		Células LLC-MK ₂
	IC_{50}^* (Média \pm DP)	IS	EC_{50}^* (Média \pm DP)	IS	CC_{50}^* (Média \pm DP)
Benz	6,5 \pm 0,7	94,6	34,5 \pm 7,6	17,8	614,7 \pm 115,2
94a	86,9 \pm 22,8	0,8	83,4 \pm 19,1	0,8	65,5 \pm 0,7
95a	34,1 \pm 12,2	7,9	92,8 \pm 11,6	2,9	269,2 \pm 10,9
96a	24,2 \pm 1,8	1,7	48,2 \pm 4,0	0,8	41,2 \pm 11,1
97a	> 100	< 1	47,9 \pm 3,8	1,3	61,0 \pm 9,9
94b	34,1 \pm 5,5	1,8	26,4 \pm 9,6	2,4	62,5 \pm 3,5
95b	24,4 \pm 2,9	9,6	36,8 \pm 5,7	6,4	235,0 \pm 46,5
96b	22,4 \pm 4,3	2,9	69,6 \pm 25,3	0,9	65,0 \pm 1,4
97b	90,6 \pm 16,3	0,3	50,6 \pm 1,2	0,5	25,8 \pm 3,0

* Valores expressos em $\mu\text{mol.L}^{-1}$

Na série das aciltiossemicarbazidas, **(94-97)a** e **(94-97)b**, os melhores valores de atividade antitripanossômica para formas epimastigotas (IC_{50}) ocorreram para as 1-benzoil-tiossemicarbazidas, com $IC_{50} = 22,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o derivado do *R*-(+)-limoneno (**96b**) e $IC_{50} = 24,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para o derivado do *S*-(-)-limoneno (**96a**), e para a 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno (**95b**), com $IC_{50} = 24,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. As 1-isonicotinoil-tiossemicarbazidas (**98a-b**) foram os compostos menos ativos sobre estas formas do parasita, apresentando valores de concentração inibitória superiores a $90 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Atividades mais expressivas em formas tripomastigotas foram encontradas para a 1-acetil-tiossemicarbazida ($EC_{50} = 26,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e para a 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida ($EC_{50} = 36,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) do *R*-(+)-limoneno (**94-95b**), cujos valores foram muito próximos ou até inferiores ao do controle benzinidazol ($34,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Contrariamente, estes mesmos derivados do *S*-(-)-limoneno (**94-95a**), foram os menos ativos sobre a mesma forma do protozoário.

Em relação à citotoxicidade, recebe grande destaque as 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazidas (**95a-b**), que apresentaram valores de CC_{50} superiores a $230 \mu\text{mol.L}^{-1}$, sendo até 9 vezes menos tóxicas que os demais compostos testados. Isto forneceu aos derivados **95a-b** os maiores índices de seletividade, sendo obtidos $8 < IS < 10$ para formas epimastigotas. Para formas tripomastigotas, o composto **95b** apresentou $IS = 6,4$ enquanto que **95a**, foi menos seletivo, com $IS = 2,9$. Apesar destes valores, nenhum composto chegou a apresentar seletividade equiparável à droga padrão. A 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno foi mais tóxica para a linhagem celular LLC-MK₂ (CC_{50} de $25,8 \mu\text{mol.L}^{-1}$) do que para as formas do *T. cruzi*, resultando no composto com menores índices de seletividade.

Desta forma, dentre os compostos **(94-97)a** e **(94-97)b**, recebe maior destaque a 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno (**95b**), que apresentou um dos menores valores de IC_{50} e EC_{50} (este último comparável ao da droga padrão), bem como forneceu um dos maiores valores de CC_{50} (baixa toxicidade) da série, com índices de seletividade superiores a 6. Merece atenção também a 1-acetil-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno (**94b**),

composto mais ativo que a referência sobre formas tripomastigotas. O bom resultado da avaliação sobre formas tripomastigotas é importante, uma vez que esta forma do parasita é aquela que circula no corpo do hospedeiro e, portanto, a droga interrompe o ciclo da doença no organismo humano. De forma geral, os derivados do *R*-(+)-limoneno mostraram melhor atividade que seus respectivos enantiômeros.

6. CONCLUSÃO

A realização deste trabalho permitiu avanços na síntese de 1,3,4-tiadiazóis e aciltiossemicarbazidas derivados dos terpenos *S*-(-)-limoneno e *R*-(+)-limoneno. As rotas sintéticas utilizaram materiais de partida simples, bem como procedimentos comuns para fornecimento de compostos quirais com grande potencial de atividades biológicas.

A série de 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos foi obtida pelo método de ciclização oxidativa com íons Fe(III), em que foi possível a implementação de um procedimento *one-pot* a partir da tiossemicarbazida terpênica. Empregando-se o benzaldeído ou derivados *o*-, *m*- e *p*-substituídos deste, o cinamaldeído ou aldeídos heteroaromáticos, foram sintetizados 31 derivados 1,3,4-tiadiazol inéditos – 21 do *S*-(-)-limoneno e 10 do *R*-(+)-limoneno – com bons rendimentos (63% a 91%). O novo procedimento, comparado com a metodologia inicial, eliminou uma etapa de síntese e purificação de compostos para obtenção dos 1,3,4-tiadiazóis, empregou menores tempos reacionais, diminuiu em mais de 2 vezes a quantidade de agente oxidante utilizada e forneceu maiores rendimentos.

Quatro aciltiossemicarbazidas inéditas de cada enantiômero do limoneno foram sintetizadas com rendimentos satisfatórios (52% a 68%). Estes compostos foram obtidos a partir de metodologias adaptadas da literatura, em que modificações do meio reacional foram necessárias para tornar o isotiocianoterpeno terciário reativo frente às hidrazidas utilizadas. Os precursores hidrazida também foram sintetizados por um procedimento diferenciado, na ausência de solvente, com excelentes rendimentos (82% a 98%).

Todos os derivados inéditos sintetizados foram avaliados como agentes antitumorais e anti-*Trypanosoma cruzi*, tendo sido possível verificar a bioatividade destes compostos e analisar a influência da quiralidade do grupo terpênico e dos substituintes agregados ao núcleo 1,3,4-tiadiazol ou à tiossemicarbazida.

Em relação à atividade antitumoral, as aciltiossemicarbazidas apresentaram bons resultados, sendo verificada uma maior seletividade e menor valor de atividade para a linhagem tumoral NCI-ADR/RES (ovário

resistente a múltiplos fármacos) para metade dos compostos. Os menores valores de atividade inibitória (GI_{50}) foram obtidos pela 1-benzoil-tiossemicarbazida do *S*-(-)-limoneno (**96a**) e 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno (**95b**). Os compostos foram 7-8 vezes menos ativos que o padrão doxorubicina para células NCI-ADR/RES, porém até 1167 vezes menos tóxicos que a mesma para células não tumorais HaCat. Em termos de atividade média (MG-MID), o derivado **96a** foi a aciltiossemicarbazida mais ativa. O potencial de bioatividade ou toxicidade dos compostos não apresentou uma correlação direta com a quiralidade da porção terpênica. Apenas foi observado que os derivados apresentando anel aromático foram mais ativos.

Da série dos 1,3,4-tiadiazóis, a maioria dos 5-[(*p*-substituído)-fenil]-1,3,4-tiadiazóis apresentaram atividade antitumoral fraca ou foram inativos até $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Derivados com substituintes nitro-heteroaromáticos na posição 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol foram os compostos mais ativos das séries de 1,3,4-tiadiazóis, sendo o 5-nitrofuranyl-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno (**70a**) o que apresentou menor atividade média (MG-MID). Forte atividade (GI_{50} inferior a $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foi obtida para o 5-nitrofuranyl-1,3,4-tiadiazol **70a** (para células tumorais de cólon HT29) e 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol **72a** (para células tumorais de mama MCF-7). O composto **70a** ainda apresentou efeito citostático (para células de mama MCF-7 e cólon HT29) e citotóxico (para células de mama MCF-7 e glioma U251) mais pronunciado que a droga padrão doxorubicina. Todos os compostos foram menos tóxicos que o padrão doxorubicina, porém sem seletividade significativa para alguma linhagem de células tumorais. Apesar de serem obtidos bons valores de atividade antitumoral para ambas as séries de enantiômeros, os resultados mais significativos foram obtidos para a série do *S*-(-)-limoneno.

Na avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* frente à forma tripomastigota dos 1,3,4-tiadiazóis, derivados substituídos na posição 5 com grupamento fenil, fenil-substituído ou com ligação dupla entre o núcleo 1,3,4-tiadiazol e o grupo fenil tiveram resultados pouco expressivos. Assim como ocorreu para a atividade antitumoral, os compostos mais ativos foram aqueles com substituintes nitro-heteroaromáticos na posição 5 do núcleo 1,3,4-tiadiazol. Os derivados **70a**, **72a** e **70b** apresentaram EC_{50} inferiores ao da droga padrão, benzinidazol, sendo o 5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do

S-(-)-limoneno (**72a**), o composto mais ativo, com $EC_{50} = 5,49 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (6,2 vezes mais potente que o padrão). Similarmente à atividade antitumoral, os resultados mais significativos de atividade dos 1,3,4-tiadiazóis para atividade antitripanossômica para formas tripomastigotas foram obtidos para a série do S-(-)-limoneno.

Na série das aciltiossemicarbazidas, os melhores valores de atividade antitripanossômica para formas epimastigotas (IC_{50}) ocorreram para as 1-benzoil-tiossemicarbazidas (**96a-b**) do limoneno. A atividade frente à forma tripomastigota (EC_{50}) foi mais expressiva para a 1-acetil-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno (**94b**), com valor inferior ao do controle benzinidazol. As 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazidas (**95a-b**) apresentaram os menores valores de citotoxicidade para células LLC-MK2, sendo até 9 vezes menos tóxicas que os demais compostos. No geral, o melhor derivado para a atividade anti-*Trypanosoma cruzi* foi a 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do *R*-(+)-limoneno (**95b**), que apresentou um dos menores valores de IC_{50} e EC_{50} , bem como foi um dos compostos menos tóxicos da série.

Desta forma, este trabalho não somente contribuiu com avanços na síntese de diversos derivados 1,3,4-tiadiazol e aciltiossemicarbazida do limoneno, mas também na investigação de novos possíveis fármacos antitumorais e antitripanossômicos, visto o bom perfil das atividades biológicas encontrado para a maioria dos compostos. Os vários resultados expressivos, alguns melhores que aqueles de drogas padrão avaliadas, justifica e corrobora a síntese destes compostos, bem como servem de guia para a síntese de novos derivados ainda mais ativos e possibilitam a continuação dos ensaios biológicos.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. Instrumentação

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos através de um espectrômetro VARIAN modelo Mercury Plus, operando a 300,06 MHz para ^1H e 75,45 MHz para ^{13}C , tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS).

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro BOMEM, modelo MB-100, em placa de NaCl para os isotiocianoterpenos (**67a-b**) e em pastilha de KBr para as tiossemicarbazidas (**68a-b**) e as hidrazidas (**90-93**). Os espectros dos demais compostos foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker, modelo Vertex 70v, em pastilha de KBr na região de 400 a 4000 cm^{-1} , sob vácuo.

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho digital de ponto de fusão Microquímica modelo MQAPF-301.

A polarimetria dos compostos (desvio da luz plano-polarizada – α^20_{D}) foi medida em um polarímetro Perkin Elmer, modelo 343, a 20°C e 589 nm, com cela de caminho óptico de 10 milímetros.

As reações com irradiação de micro-ondas foram realizadas em um aparelho da marca Philco, modelo PMS18N2.

7.2. Material cromatográfico

As cromatografias em coluna (CC) foram realizadas em colunas de vidro, utilizando-se gel de sílica 60 Merck (0,063-0,200 mm) (70-230 mesh ASTM) como fase estacionária. A quantidade de fase estacionária variou de acordo com a quantidade de material a ser submetida à cromatografia, utilizando-se massa de sílica equivalente a 20-30 vezes a massa do material.

Para a realização das cromatografias em camada delgada (CCD) utilizaram-se placas de vidro de 5,0 x 20,0 cm, em aplicações analíticas. A espessura da camada de gel de sílica (gel de sílica 60G e 60GF₂₅₄ – Merck) utilizada na confecção das placas foi de aproximadamente 0,25 milímetros. As análises em CCD utilizaram iodo como revelador.

7.3. Reagentes e solventes

Utilizou-se os solventes hexano P.A., clorofórmio P.A., etanol P.A. (marcas Nuclear, Dinâmica, FMaia ou Vetec) e água previamente destilados, acetato de etila P.A. (Cromoline), dimetilformamida P.A. (FMaia) e como solventes deuterados clorofórmio-D e metanol-D4 (Cambridge Isotope Laboratories – D=99,8%).

Empregou-se aldeídos marcas Acros Organics, Merck, Sigma-Aldrich e Vetec (purezas 97-99%), ésteres marcas SAFC e Aldrich (purezas \geq 98%), isonicotinohidrazida (Fluka, 99%), *R*-(+)-limoneno (Sigma, 97%), *S*-(-)-limoneno (SAFC, \geq 95%), bissulfato de potássio P.A. (Vetec), tiocianato de potássio P.A. (Vetec), dicloreto de hidrazínio (Sigma-Aldrich, 98%), hidrato de hidrazina (Merck, solução aquosa 80%) e cloreto férrico hexahidratado P.A. (Dinâmica).

7.4. Procedimentos gerais para síntese dos compostos

7.4.1. Isotiocianoterpenos do limoneno (67a-b)

21,4 g de tiocianato de potássio (0,220 mol) e 30,0 g de bissulfato de potássio (0,220 mol) foram triturados durante 5 minutos com auxílio de pistilo e almofariz. Clorofórmio (4 x 50 mL) foi adicionado durante a maceração e as suspensões foram filtradas sobre algodão e recolhidas diretamente em balão contendo 6,00g (0,0440 mol) de *S*-(-)-limoneno (**8a**) ou *R*-(+)-limoneno (**8b**).

A reação foi mantida à temperatura ambiente na ausência de luz, sob agitação durante 48 horas e acompanhada por CCD eluída com hexano. Na sequência foi realizada partição com solução de bicarbonato de sódio 5%. A fase clorofórmica foi seca com sulfato de sódio anidro, evaporada em evaporador rotativo sob pressão reduzida e purificada por CC eluída com hexano, fornecendo o tiocianoterpeno (**66a**) do *S*-(-)-limoneno ou (**66b**) do *R*-(+)-limoneno como subproduto (líquido incolor, 0,7 g, rendimento de 8%) e isotiocianoterpeno (**67a**) do *S*-(-)-limoneno ou (**67b**) do *R*-(+)-limoneno como produto principal (líquido incolor, 5,2 g, rendimento de 60%), além de quantidade residual do terpeno.

7.4.2. Tiossemicarbazidas do limoneno (68a-b)

2,31g de cloridrato de hidrazina (0,022 mol) foi tratado com solução aquosa contendo 3,70 g de bicarbonato de sódio (0,044 mol) e adicionado a 4,30 g (0,022 mol) do isotiocianoterpeno (**67a**) ou (**67b**) em 100 mL de etanol. A reação foi mantida sob agitação e refluxo durante 3 horas e seu progresso acompanhado por CCD eluída com hexano/acetato de etila 40%. A mistura reacional foi concentrada em evaporador rotativo e o sólido resultante foi lavado com hexano, filtrado a vácuo, lavado com água e filtrado a vácuo novamente, fornecendo a tiossemicarbazida do S-(-)-limoneno (**68a**) ou do R-(+)-limoneno (**68b**) (sólido branco, 3,8 g, rendimento de 75%).

7.4.3. 2-amino-1,3,4-tiadiazóis do limoneno 5-substituídos (69-89)a, (69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b

0,150 g (0,660 mmol) da tiossemicarbazida (**68a**) ou (**68b**) foi solubilizada em etanol a quente (15 mL), juntamente com 0,660 mmol de um dos aldeídos descritos na **Tabela 29** para a respectiva série de compostos. 0,392 g (1,45 mmol) de cloreto férrico hexahidratado solubilizado em água (10 mL) foi adicionado ao meio reacional e este foi mantido sob agitação e aquecimento de 60°C entre 1 e 2 horas, com acompanhamento por CCD eluída com hexano/acetato de etila 30%.

Tabela 29. Aldeídos utilizados na síntese de 1,3,4-tiadiazóis do limoneno.

Aldeído	Produto 1,3,4-tiadiazol	
	S-(-)-limoneno	R-(+)-limoneno
Furaldeído	69a	69b
5-Nitrofuraldeído	70a	70b
Tiofenocarboxaldeído	71a	71b
5-Nitrotiofenocarboxaldeído	72a	72b
Cinamaldeído	73a	73b
Benzaldeído	74a	*
2-Nitrobenzaldeído	75a	*
2-Fluorbenzaldeído	76a	76b
2-Clorobenzaldeído	77a	*
3-Nitrobenzaldeído	78a	*
3-Fluorbenzaldeído	79a	79b
3-Clorobenzaldeído	80a	*

Tabela 29. (Continuação)

Aldeído	Produto 1,3,4-tiadiazol	
	<i>S</i> -(-)-limoneno	<i>R</i> -(+)-limoneno
4-Fluorbenzaldeído	81a	*
4-Clorobenzaldeído	82a	*
4-Bromobenzaldeído	83a	83b
4-Nitrobenzaldeído	84a	*
4-(Trifluormetil)-benzaldeído	85a	85b
4-Metilbenzaldeído	86a	*
4-(<i>terc</i> -Butil)-benzaldeído	87a	87b
4-Metoxibenzaldeído	88a	*
4-(Dimetilamino)-benzaldeído	89a	*

*Realizado em trabalho anterior (Vandresen, 2011);

A mistura reacional foi resfriada lentamente sob agitação para precipitação do produto e posteriormente colocada em banho de gelo. Após uma hora, a suspensão foi filtrada e o sólido lavado exaustivamente com água. Nos casos em que os íons ferro não foram eliminados totalmente pela lavagem, o produto foi solubilizado em etanol/água a quente e reprecipitado por resfriamento lento. Foram obtidos os 1,3,4-tiadiazóis **(69-89)a** do *S*-(-)-limoneno (rendimentos entre 68% e 91%) e **(69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b** do *R*-(+)-limoneno com rendimentos entre 63% e 91%.

7.4.4. Hidrazida (90-92)

7.4.4.1. *Metodologia em solução*

A 0,510 g (6,00 mmol) de hidrazina hidratada (solução 80%), foi adicionada quantidade equimolar de um dos ésteres acetato de etila (0,529 g), 2-fenilacetato de metila (0,901 g) ou benzoato de metila (0,721 g), 20 mL de etanol absoluto e uma gota de solução de ácido diluída (HCl ou H₂SO₄). A mistura reacional foi submetida a agitação e refluxo entre 12 e 72 horas e seu progresso acompanhado por CCD eluída com acetato de etila/metanol 5%. O produto bruto foi concentrado em evaporador rotativo, o sólido formado foi lavado com hexano e filtrado a vácuo, levando às respectivas hidrazidas **(90-92)**, com rendimentos de 31 a 61%.

7.4.4.2. Metodologia em ausência de solvente

A 0,510 g (6,00 mmol) de hidrazina hidratada (solução 80%), foi adicionado um excesso de acetato de etila (1,00 g) ou quantidade equimolar de um dos ésteres 2-fenilacetato de metila (0,901 g) ou benzoato de metila (0,721 g). A mistura reacional foi submetida a agitação (sob aquecimento de 70°C para o acetato de etila e em temperatura ambiente para os demais ésteres) entre 1,5 e 6 horas e seu progresso acompanhado por CCD eluída com acetato de etila/metanol 5%. O sólido formado foi lavado com hexano e filtrado a vácuo, fornecendo as respectivas hidrazidas (**90-92**) com rendimentos de 82% a 98%.

7.4.5. Aciltiossemicarbazidas do limoneno (94-97)a, (94-97)b

7.4.5.1. Metodologia por irradiação de micro-ondas

Em um tubo de ensaio 0,200 g (0,88 mmol) do isotiocianoterpeno (**67b**) e quantidade equimolar de uma das hidrazidas (**90-93**) foram submetidos a irradiação em forno de micro-ondas em potência mínima por 60 segundos, intercalado com intervalo de igual período de agitação. O processo foi repetido entre 20 e 30 vezes e o progresso da reação foi acompanhado por CCD eluída com hexano/acetato de etila 60%. O produto bruto foi lavado com hexano, filtrado a vácuo, lavado com solução resfriada etanol/água 50% e filtrado a vácuo novamente. Nos casos em que foram constatados subprodutos após as purificações acima descritas, o sólido obtido foi solubilizado em etanol a quente e reprecipitado por resfriamento lento, fornecendo as respectivas aciltiossemicarbazidas (**94-97**)b do *R*-(+)-limoneno (sólidos brancos com rendimentos entre 35 e 41%).

7.4.5.2. Metodologias em solução

Empregando três condições reacionais distintas, 0,300g (1,32 mmol) do isotiocianoterpeno (**67b**) (para as metodologias 1, 2 e 3) ou (**67a**) (para a metodologia 3) e quantidade equimolar de uma das hidrazidas (**90-93**) foram reagidos sob as condições apresentadas na **Tabela 30**, com acompanhamento por CCD eluída com hexano/acetato de etila 60%.

Tabela 30. Condições reacionais empregadas na síntese de aciltiossemicarbazidas do limoneno.

Condição	Temperatura	Solvente	Tempo Reacional
1	78 °C (refluxo)	Etanol (15 mL)	24-72 horas
2	Ambiente	Etanol (30 mL)	72-120 horas
3	Ambiente	Dimetilformamida (3 mL)	24-32 horas

Nas metodologias 1 e 2, o produto bruto foi concentrado em evaporador rotativo e o sólido obtido foi lavado com hexano, filtrado a vácuo, lavado com solução resfriada etanol/água 50% e filtrado a vácuo novamente.

Na metodologia 3, 300 mL de água foi adicionado ao meio reacional para precipitação do produto e este foi deixado em banho de gelo por 3 horas. A suspensão foi filtrada a vácuo, e o sólido foi lavado com hexano, filtrado a vácuo, lavado com solução resfriada etanol/água 50% e filtrado a vácuo novamente.

Nos casos em que foram constatados subprodutos após as purificações acima descritas, o sólido obtido foi solubilizado em etanol a quente e reprecipitado por resfriamento lento, fornecendo as respectivas aciltiossemicarbazidas **(94-97)a** do S-(-)-limoneno ou **(94-97)b** do R-(+)-limoneno.

7.5. Determinação da rotação específica

A determinação da rotação óptica da luz plano-polarizada foi realizada para as tiossemicarbazidas **(68a-b)** e para os novos compostos sintetizados. Uma solução de concentração conhecida de cada composto foi preparada em clorofórmio e teve sua leitura realizada no polarímetro. O α_D^{20} foi calculado através da equação abaixo (Eq. 4), onde $[\alpha]$ é a leitura fornecida pelo aparelho, b é o caminho óptico (0,1dm) e c é a concentração (g.mL^{-1}). Os dados de concentração das amostras e α_D^{20} encontram-se na **Tabela 31**.

$$\alpha_D^{20} = \frac{[\alpha]}{b \cdot c} \quad (\text{Eq. 4})$$

Tabela 31. Rotação específica (α_D^{20}) do S-(-)-limoneno (**8a**), do R-(+)-limoneno (**8b**), dos 1,3,4-tiadiazóis (**69-89**) e das aciltiossemicarbazidas (**94-97**) do S-(-)-limoneno (**a**) e do R-(+)-limoneno (**b**) em CHCl₃.

Composto	C (mg.mL ⁻¹)	α_D^{20}	Composto	C (mg.mL ⁻¹)	α_D^{20}
8a	15,0	-35,8	8b	11,0	+93,7
69a	16,7	+17,9	69b	15,0	-28,0
70a	14,0	+4,3	70b	16,1	-55,1
71a	16,9	+22,5	71b	14,6	-28,8
72a	13,4	+42,4	72b	11,0	-60,0
73a	13,9	+31,0	73b	13,9	-48,4
74a	15,6	+11**	***	***	***
75a	14,1	+7,1	***	***	***
76a	15,6	+20,6	76b	11,4	-23,7
77a	15,3	+17,0	***	***	***
78a	14,4	+24,3	***	***	***
79a	13,9	+20,2	79b	10,6	-25,6
80a	15,6	+11,6	***	***	***
81a	14,0	+13,6	***	***	***
82a	15,9	+10,1	***	***	***
83a	13,9	+23,1	83b	9,6	-28,2
84a	12,0	+31,7	***	***	***
85a	10,3	+22,4	85b	14,3	-25,2
86a	15,6	+19**	***	***	***
87a	14,3	+18,2	87b	15,9	-29,0
88a	14,7	+24,5	***	***	***
89a	13,7	+29,2	***	***	***
94a	11,6	-20,7	94b	11,1	+28,8
95a	10,0	-15,0	95b	10,2	+16,7
96a	11,4	-1,8	96b	11,0	+4,5
97a	6,8*	-8,8	97b	7,7*	+22,1

*A solução foi uma mistura CHCl₃:MeOH 2:1.

**A medição não apresentou valor constante.

7.6. Determinação de ponto de fusão

O ponto de fusão dos 1,3,4-tiadiazóis (**69-89**) e das aciltiossemicarbazidas (**94-97**) foi determinado em duplicata para cada amostra com taxa de aquecimento próxima à faixa de fusão controlada em $2,0\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A faixa de valores iniciais e finais de fusão obtida para cada composto ou par de enantiômero sintetizado é apresentado na **Tabela 32**. Na mesma tabela estão dispostas as respectivas colorações dos compostos.

Tabela 32. Faixas de ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$) e aspecto físico dos 1,3,4-tiadiazóis (**69-89**) e das aciltiossemicarbazidas (**94-97**) sintetizados.

Composto	Aspecto Físico	P. F. ($^{\circ}\text{C}$)	Composto	Aspecto Físico	P. F. ($^{\circ}\text{C}$)
69	Sólido amarelo	169,0-171,2	82	Sólido branco	166,0-168,2
70	Sólido alaranjado	169,6-172,8	83	Sólido branco	174,3-177,8
71	Sólido marrom claro	158,9-160,8	84	Sólido amarelo	219,2-221,1
72	Sólido alaranjado	181,1-183,4	85	Sólido branco	158,8-159,4
73	Sólido marrom claro	169,0-170,3	86	Sólido branco	203,1-204,3
74	Sólido branco	129,3-130,1	87	Sólido branco	180,0-181,5
75	Sólido amarelo	157,2-158,5	88	Sólido branco	175,4-176,8
76	Sólido branco	134,1-137,0	89	Sólido alaranjado	206,2-208,6
77	Sólido branco	136,4-137,9	94	Sólido branco	145,9-147,1
78	Sólido amarelo	135,6-136,0	95	Sólido branco	139,4-141,1
79	Sólido branco	138,3-139,8	96	Sólido branco	123,3-125,8
80	Sólido branco	141,1-142,0	97	Sólido branco	155,3-157,4
81	Sólido branco	157,8-158,8			

7.7. Avaliação da atividade antiproliferativa sobre células tumorais

Os ensaios biológicos foram realizados pela divisão de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), sob a supervisão do professor Dr. João Ernesto de Carvalho e da Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz.

As linhagens de células humanas utilizadas para a realização dos testes antiproliferativos estão listadas na **Tabela 33**. As linhagens tumorais foram cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI) dos Estados Unidos e a linhagem não-tumoral queratinócito foi doada pelo professor Dr. Ricardo Della Coletta, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Unicamp.

As aciltiossemicarbazidas **(94-97)a** e **(94-97)b** foram avaliadas para as linhagens 1-6 e 10, os 1,3,4-tiadiazóis derivados do S(-)-limoneno **(69-89)a** foram avaliados para as linhagens 1-7 e 10 e os 1,3,4-tiadiazóis derivados do R-(+)-limoneno **(69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b** foram avaliados para todas as linhagens listadas na **Tabela 33**. Em cada experimento, cloridrato de doxorubicina (0,025, 0,25, 2,5 e 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi utilizado como controle.

Tabela 33. Linhagens de células humanas utilizadas na avaliação da atividade antiproliferativa

Linhagem*	Código	Tipo de Célula
1	U251	Glioma
2	MCF-7	Mama
3	NCI-ADR/RES	Ovário resistente
4	786-0	Rim
5	NCI-H460	Pulmão tipo células não pequenas
6	HT29	Cólon
7	K562	Leucemia
8	PC-3	Próstata
9	OVCAR-3	Ovário
10	HaCaT	Queratinócito

*Linhagens 1-9: tumoral; linhagem 10: não-tumoral;

A cultura das células foi realizada em meio contendo RPMI 1640 (GIBCOR BRL), suplementado com 5% de SFB/penicilina/estreptomicina. As células foram adicionados em placas de 96 poços (100 $\mu\text{L.poço}^{-1}$) e incubadas por 24h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido.

Após este período, uma placa controle foi fixada pela adição de ácido trifluoracético (TCA) para determinação da quantidade de células no momento da adição das drogas (T_0). Nas demais placas, os compostos (solubilizados em DMSO/RPMI) foram adicionados nas concentrações 0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido de incubação por 48h e centrifugação por 3 min a 2000 rpm. Na sequência as placas foram fixadas com 50 μL de TCA a 50% para células aderidas e 80% para as células em suspensão (K562), seguido de incubação por 1h a 4°C, 4 lavagens com água destilada para remoção dos resíduos do ácido, do meio de incubação e das drogas testadas, resultando a quantidade de células que resistiram ao composto (T). As placas foram mantidas em temperatura ambiente até secagem completa. O procedimento foi repetido para células sem adição de droga no meio de cultura para determinação da quantidade total de células no momento final do experimento (T_1).

50 μL do corante proteico sulforrodamina B (SRB) a 0,4% foram adicionados às placas e estas foram incubadas a 4°C durante 30 min, lavadas 4 vezes com solução de ácido acético 1% para remoção de resíduos e mantidas em temperatura ambiente para secagem. O complexo corante-proteína foi solubilizado com 150 μL de uma solução 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Trizma Base e pH=10,5 por 5 min em ultrassom.

A quantificação da proliferação celular foi realizada por leitura espectrofotométrica em um leitor de microplacas a 560 nm, obtendo-se as absorbâncias de T_0 , T_1 e T. Para análise dos resultados foram calculadas as médias de cada absorbância, descontando-se os valores de branco. Se $T > T_1$, a droga estimulou o crescimento celular e não houve inibição do crescimento; se $T_0 \leq T < T_1$, a droga apresentou efeito citostático; e se $T < T_0$, a droga apresentou efeito citocida. Com isto foram calculados três parâmetros de avaliação para cada composto: GI_{50} (concentração de inibição do crescimento celular em 50%), TGI (concentração de inibição do crescimento celular em 100%) e LC_{50} (concentração que mata 50% das células). Os gráficos foram obtidos a partir de regressão linear tipo não-sigmoidal, utilizando o software OriginLab 8.0. Os resultados obtidos para a avaliação antitumoral estão dispostos da **Tabela 21** à **Tabela 26**.

7.8. Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* e citotoxicidade

Os ensaios biológicos foram realizados pelo Departamento de Ciências Básicas da Saúde (DBS) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob a supervisão do professor Dr. Celso Vataru Nakamura.

As séries de 1,3,4-tiadiazóis **(69-79)a** e **(69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b** foram avaliadas em formas tripomastigotas *in vitro* de *Trypanosoma cruzi* e os valores de atividade para estes compostos são apresentados na **Tabela 27**. As aciltiossemicarbazidas **(94-97)a** e **(94-97)b** foram testadas em formas epimastigotas *in vitro* e tripomastigotas *in vitro* do mesmo protozoário e tiveram sua citotoxicidade avaliada para a linhagem celular LLC-MK₂ (células epiteliais de rim de *Macaca mulatta*). Os dados das atividades referentes às aciltiossemicarbazidas são apresentados na **Tabela 28**. Todas as análises tiveram como controle positivo a droga benzinidazol.

7.8.1. Atividade antiproliferativa *in vitro* em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Após 96 horas de cultivo, formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* em concentração inicial de $1,0 \times 10^6$ parasitos.mL⁻¹ foram cultivadas em meio *LiverInfusionTryptose* (LIT) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), na presença ou ausência de diferentes concentrações das substâncias **(94-97)a** e **(94-97)b**, em placas estéreis de 24 poços. A leitura foi realizada por meio de contagem em câmara de Neubauer após 96 horas de incubação a 28 °C e a substância de referência utilizada foi o Benzinidazol.

A atividade antileishmania foi expressa por meio do percentual de inibição do crescimento de 50% das formas epimastigotas em relação ao controle (IC₅₀). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em duplicata, e a análise, por meio de regressão linear.

7.8.2. Viabilidade em formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, obtidas do sobrenadante de culturas de células epiteliais de rim de *Macaca mulata* (LLC-MK₂) infectadas, foram ressuspensas em meio DMEM (1×10^7 parasitos.mL⁻¹) suplementado com 5%

de SFB e cultivadas em microplacas de 96 poços na presença ou ausência de diferentes concentrações das substâncias **(69-89)a**, **(69-73, 76, 79, 83, 85, 87)b**, **(94-97)a** e **(94-97)b**, por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O benzinidazol foi utilizado como controle positivo. Após o período de incubação, a viabilidade dos parasitos foi avaliada por microscopia óptica, através da contagem de células móveis segundo o método de Pizzi-Brener (Brener, 1962; Mosmann, 1983).

A concentração efetiva das substâncias em que 50% dos parasitos apresentam-se viáveis (EC₅₀) foi determinada através de regressão linear. Os resultados obtidos são referentes a três experimentos independentes realizados em duplicata.

7.8.1. Avaliação de citotoxicidade em células LLC-MK₂ pelo método colorimétrico MTT

A avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada em células LLC-MK₂, por meio do método de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) a cristais de formazan.

A cultura das células foi realizada em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e L-glutamina 2 mmol.L⁻¹, 50 mg.mL⁻¹ de gentamicina e tamponado com bicarbonato de sódio até pH 7,6, conforme a *American Type Culture Collection* (ATCC®). A cultura foi mantida em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Suspensão com 2,5x10⁵ células.mL⁻¹, em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB foi colocada em placas de 96 poços e incubada a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas para a formação de uma monocamada de células. Na sequência as substâncias **(94-97)a** e **(94-97)b** (solubilizados em DMEM) foram adicionadas às placas em diferentes concentrações. Após 96 horas de incubação, a monocamada foi lavada com PBS (tampão fosfato-salino) e adicionou-se a solução de MTT (2 mg.mL⁻¹).

As placas foram incubadas por 4 horas na ausência de luz, em estufa úmida, para que ocorresse a redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais das células. Em seguida, adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais púrpura precipitados de formazan. A leitura dos

experimentos foi realizada em leitor ELISA (Bio-Tek-FL-600 *MicroplateFluorescence Reader*) a 492 nm.

A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi determinada como a concentração de substância capaz de reduzir 50% da densidade óptica das células tratadas, em comparação com o controle negativo. Todos os ensaios foram realizados em três experimentos independentes, em triplicata.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-SERI, S. M. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4'-bis substituted diphenylamines as anticancer agents and potential epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 4113-4121, 2010.
- AGGARWAL, K. K.; KHANUJA, S. P. S.; AHMAD, A. A.; KUMAR, T. R. S.; GUPTA, V. K.; KUMAR, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(1), 59-63, 2002.
- AHAD, A. M.; ZUOHE, S.; DU-CUNY, L.; MOSES, S. A.; ZHOU, L. L.; ZHANG, S.; POWIS, G.; MEUILLET, E. J.; MASH, E. A. Development of sulfonamide AKT PH domain inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(6), 2046-2054, 2011.
- AINSWORTH, C. The investigation of some substituted 1, 3, 4-thiadiazoles. *Journal of the American Chemical Society*, 80, 5201-5203, 1958.
- ÁLVAREZ, G.; GERPE, A.; BENITEZ, D.; GARIBOTTO, F.; ZACCHINO, S.; GRAEBIN, C. S.; ROSA, R. G. DA; EIFLER-LIMA, V. L.; CERECETTO, H. New limonene-hybrid derivatives with anti-*T. cruzi* activity. *Letters in Drug Design & Discovery*, 7(6), 452-460, 2010.
- ANGELUSIU, M. V.; ALMAJAN, G. L.; ROSU, T.; NEGOIU, M.; ALMAJAN, E.-R.; ROY, J. Copper(II) and uranyl(II) complexes with acylthiosemicarbazide: synthesis, characterization, antibacterial activity and effects on the growth of promyelocytic leukemia cells HL-60. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(8), 3323-3929, 2009.
- ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. *Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil*. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio, 63 p, 2008.
- ARRUDA, D. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63(9), 643-649, 2009.
- ARYANASAB, F.; HALIMEHJANI, A. Z.; SAIDI, M. R. Dithiocarbamate as an efficient intermediate for the synthesis of 2-amino-1,3,4-thiadiazoles in water. *Tetrahedron Letters*, 51(5), 790-792, 2010.
- ASBURY, R. M. D.; BLESSING, J. A.; MOORE, D. M. D. A phase II trial of aminothiadiazole in patients with mixed mesodermal tumors of the uterine corpus: A Gynecologic Oncology Group study. *American Journal of Clinical Oncology*, 19(4), 400-402, 1996.

- BARBA, C.; SANTA-MARÍA, G.; HERRAIZ, M.; MARTÍNEZ, R. M. Direct enantiomeric analysis of *Mentha* essential oils. *Food Chemistry*, 141(1), 542-547, 2013.
- BARBOIU, M.; CIMPOESU, M.; GURAN, C.; SUPURAN, C. T. Synthesis and Biological Activity of Metal Complexes of 5-(2-Aminoethyl)-2-Amino-1,3,4-Thiadiazole. *Metal-Based Drugs*, 3(5), 227-232, 1996.
- BARBUCEANU, S.-F.; SARAMET, G.; ALMAJAN, G. L.; DRAGHICI, C.; BARBUCEANU, F.; BANCESCU, G. New heterocyclic compounds from 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole class bearing diphenylsulfone moieties. Synthesis, characterization and antimicrobial activity evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 417-423, 2012.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Química Nova*, 13(1), 29-39, 1990.
- BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos na produção de medicamentos. *Química Nova*, 14(3), 179-188, 1991.
- BARREIRO, E. J.; FERREIRA, V. F.; COSTA, P. R. R. Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): a questão dos fármacos quirais. *Química Nova*, 20(6), 647-656, 1997.
- BATISTA, S. A. DE A. *Síntese, atividade antileishmania e citotoxicidade de aldeídotiossemicarbazonas e cetonatiossemicarbazonas derivadas do S-(-)-limoneno*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- BERKELHAMMER, G.; ASATO, G. 2-Amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. *Science*, 162(3858), 1146, 1968.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4, 389-396, 1962.
- CARVALHO, S. A.; LOPES, F. A. S.; SALOMÃO, K.; ROMEIRO, N. C.; WARDELL, S. M. S. V.; CASTRO, S. L. DE; SILVA, E. F. DA; FRAGA, C. A. M. Studies toward the structural optimization of new brazilzone-related trypanocidal 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(1), 413-421, 2008.
- CARVALHO, S. A.; SILVA, E. F. DA; SANTA-RITA, R. M.; CASTRO, S. L. DE; FRAGA, C. A. M. Synthesis and antitrypanosomal profile of new functionalized 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives, designed as non-mutagenic megazol analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14(24), 5967-5970, 2004.

- CHAUVIÈRE, G.; BOUTEILLE, B.; ENANGA, B.; ALBUQUERQUE, C. DE; CROFT, S. L.; DUMAS, M.; PÉRIÉ, J. Synthesis and biological activity of nitro heterocycles analogous to megazol, a trypanocidal lead. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(3), 427-440, 2003.
- CHEN, Z.; XU, W.; LIU, K.; YANG, S.; FAN, H.; BHADURY, P. S.; HU, D.-Y.; ZHANG, Y. Synthesis and antiviral activity of 5-(4-chlorophenyl)-1,3,4-thiadiazole sulfonamides. *Molecules*, 15(12), 9046-9056, 2010.
- COELHO, N. P. *Síntese de Tiossemicarbazonas Aldeídicas e Cetônicas Derivadas do (-)-canfeno*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, 2011.
- COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(4), 549-554, 2009.
- COURA, J. R.; CASTRO, S. L. DE. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 3-24, 2002.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl (i), 31-40, 2009.
- CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*, 109(7), 3012-3043, 2009.
- CROWELL, P. L. Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Research and Treatment*, 46, 191-197, 1997.
- CROWELL, P. L.; ELSON, C. E.; BAILEY, H. H.; ELEGBEDE, A.; HAAG, J. D.; GOULD, M. N. Human metabolism of the experimental cancer therapeutic agent *d*-limonene. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 35, 31-37, 1994.
- CROWELL, P. L.; GOULD, M. N. Chemoprevention and Therapy of Cancer by *d*-Limonene. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 5(1), 1-22, 1994.
- DEMIRBAS, N.; KARAOGLU, S. A.; DEMIRBAS, A.; SANCAK, K. Synthesis and antimicrobial activities of some new 1-(5-phenylamino-[1,3,4]thiadiazol-2-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole and 1-(4-phenyl-5-thioxo-[1,2,4]triazol-3-yl)methyl-5-oxo-[1,2,4]triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39(9), 793-804, 2004.
- DOGAN, H. N.; DURAN, A.; ROLLAS, S.; SENER, G.; UYSAL, M. K.; GÜLEN, D. Synthesis of new 2, 5-disubstituted-1, 3, 4-thiadiazoles and preliminary evaluation of anticonvulsant and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10(9), 2893-2898, 2002.

- DUA, R.; SONWANE, S. K.; SRIVASTAVA, S. D.; SRIVASTAVA, S. K. Synthesis and antimicrobial activity of some 2-[(2-substituted-phenyl-5-methyl-1,3-thiazolidin-4-one)-5-(2'-methylamino-4-phenyl-1',3'-thiazolyl)]-1,3,4-thiadiazoles. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 1(3), 358-364, 2010.
- DUNDAR, Y.; ÇAKIR, B.; KÜPELİ, E.; SAHİN, M. F.; NOYANALPAN, N. Synthesis of some new 1-acylthiosemicarbazides and 1,2,4-triazol-5-thiones, and their analgesic and anti-inflammatory activities. *Turkish Journal of Chemistry*, 31, 301-303, 2007.
- EBRAHIMI, S. Synthesis of some pyridyl and cyclohexyl substituted 1,2,4-triazole, 1,3,4-thiadiazole and 1,3,4-oxadiazole derivatives. *European Journal of Chemistry*, 1(4), 322-324, 2010.
- EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21, 308-323, 2007.
- FERRARI, S.; MORANDI, F.; MOTIEJUNAS, D.; NERINI, E.; HENRICH, S.; LUCIANI, R.; VENTURELLI, A.; LAZZARI, S.; CALÒ, S.; GUPTA, S.; HANNAERT, V.; MICHELS, P. A. M.; WADE, R. C.; COSTI, M. P. Virtual screening identification of nonfolate compounds, including a CNS drug, as antiparasitic agents inhibiting pteridine reductase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1), 211-221, 2011.
- FERRARINI, S. R.; DUARTE, M. O.; ROSA, R. G. DA; ROLIM, V.; EIFLER-LIMA, V. L.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V. L. S. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*, 157(1-2), 149-153, 2008a.
- FERRARINI, S. R.; GRAEBIN, C. S.; LIMBERGER, J.; CANTO, R. F. S.; DIAS, D. O.; ROSA, R. G. DA; MADEIRA, M. DE F.; EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis of limonene β -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(8), 773-777, 2008b.
- FIGUEIREDO, I. M.; SANTOS, L. V.; COSTA, W. F.; CARVALHO, J. E.; SILVA, C. C.; SACOMAN, J. L.; KOHN, L. K.; SARRAGIOTTO, M. H. Synthesis and antiproliferative activity of novel limonene derivatives with a substituted thiourea moiety. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(5), 954-960, 2006.
- FINDIK, E.; DINGIL, A.; KARAMAN, I.; BUDAK, Y.; CEYLAN, M. Synthesis of Multi-substituted 4,5-Dihydrofuran Derivatives from (S)-Limonene and 1,3-Dicarbonyl Compounds and their Biological Activities. *E-Journal of Chemistry*, 6(S1), S53-S58, 2009.

- FORMAGIO, A. S. N.; TONIN, L. T. D.; FOGGIO, M. A.; MADJAROF, C.; DE CARVALHO, J. E.; DA COSTA, W. F.; CARDOSO, F. P.; SARRAGIOTTO, M. H. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) β -carboline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(22), 9660-9667, 2008.
- FOROUGHIFAR, N.; MOBINIKHALEDI, A.; MOGHANIAN, H. Simple and Efficient Method for Synthesis of Novel 4-Substituted 1-Acylthiosemicarbazides via *One-Pot* Multicomponent Reactions. *Synthetic Communications*, 39(20), 3668-3676, 2009.
- FOROUMADI, A.; POURNOURMOHAMMADI, S.; SOLTANI, F.; ASGHARIAN-REZAEI, M.; DABIRI, S.; KHARAZMI, A.; SHAFIEE, A. Synthesis and *in vitro* leishmanicidal activity of 2-(5-nitro-2-furyl) and 2-(5-nitro-2-thienyl)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(8), 1983-1985, 2005a.
- FOROUMADI, A.; RINEH, A.; EMAMI, S.; SIAVOSHI, F.; MASSARRAT, S.; SAFARI, F.; RAJABALIAN, S.; FALAHATI, M.; LOTFALI, E.; SHAFIEE, A. Synthesis and anti-*Helicobacter pylori* activity of 5-(nitroaryl)-1,3,4-thiadiazoles with certain sulfur containing alkyl side chain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(11), 3315-3320, 2008.
- FOROUMADI, A.; SOLTANI, F.; MOALLEMZADEH-HAGHIGHI, H.; SHAFIEE, A. Synthesis, *in vitro*-antimycobacterial activity and cytotoxicity of some alkyl α -(5-aryl-1,3,4-thiadiazole-2-ylthio)acetates. *Archiv Der Pharmazie*, 338(2-3), 112-116, 2005b.
- GOMHA, S. M.; RIYADH, S. M. Synthesis under microwave irradiation of [1,2,4]triazolo[3,4-b] [1,3,4]thiadiazoles and other diazoles bearing indole moieties and their antimicrobial evaluation. *Molecules*, 16(10), 8244-8256, 2011.
- GRAEBIN, C. S.; EIFLER-LIMA, V. L.; ROSA, R. G. DA. *One-pot* synthesis of secondary and tertiary amines from *R*(+)-limonene by tandem hydroformylation/reductive amination (hydroaminomethylation). *Catalysis Communications*, 9(6), 1066-1070, 2008.
- GRAEBIN, C. S.; MADEIRA, M. D. F.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. B.; BENITEZ, D.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; ROSA, R. G. DA; EIFLER-LIMA, V. L. Synthesis and *in vitro* activity of limonene derivatives against *Leishmania* and *Trypanosoma*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(4), 1524-1528, 2010.
- GUHL, F.; LAZDINS-HELDS, J. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. *Grupo de Trabajo Científico sobre la enfermedad de Chagas: World Health Organization*, 104 p. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas/en/>>. Acesso: novembro de 2013.

- HARAGUCHI, S. K. *Síntese e Avaliação Anti-tripanosoma e Citotóxica de Benzaldeído-tiossemicarbazonas Derivadas do Ácido Caurenóico*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- HARAGUCHI, S. K.; SILVA, A. A.; VIDOTTI, G. J.; SANTOS, P. V. DOS; GARCIA, F. P.; PEDROSO, R. B.; NAKAMURA, C. V.; OLIVEIRA, C. M. A. DE; SILVA, C. C. DA. Antitrypanosomal activity of novel benzaldehyde-thiosemicarbazone derivatives from kaurenoic acid. *Molecules*, 16(2), 1166-1180, 2011.
- HIROTA, R.; ROGER, N. N.; NAKAMURA, H.; SONG, H.-S.; SAWAMURA, M.; SUGANUMA, N. Anti-inflammatory effects of limonene from Yuzu (*Citrus junos Tanaka*) essential oil on eosinophils. *Journal of Food Science*, 75(3), H87-H92, 2010.
- HWANG, J. Y.; CHOI, H.-S.; LEE, D.-H.; GONG, Y.-D. Solid-phase synthesis of 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives via selective, reagent-based cyclization of acyldithiocarbamate resins. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 7(6), 816-819, 2005.
- IDHAYADHULLA, A.; KUMAR, R.; NASSER, A.; MANILAL, A. Synthesis of some new pyrrole derivatives and their antimicrobial activity. *Der Pharma Chemica*, 3(4), 210-218, 2011a.
- IDHAYADHULLA, A.; KUMAR, R. S.; NASSER, A. J. A.; KAVIMANI, S.; INDUMATHY, S.; KUMAR, R. S.; NASSER, A. J. A. Synthesis and anticonvulsant activity of some new series of pyrrole derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 21(11), 3699-3708, 2011b.
- INCA. *ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Inca, 2012. 129 p. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_abc_2ed.pdf>. Acesso: Dezembro 2013.
- INCA. Inca e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014>. Acesso: Dezembro 2013.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Latest world cancer statistics Press release n° 223. Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2013/pdfs/pr223_E.pdf>. Acesso: Dezembro 2013.
- ISAMBERT, N.; LAVILLA, R. Heterocycles as key substrates in multicomponent reactions: the fast lane towards molecular complexity. *Chemistry - A European Journal*, 14, 8444-8454, 2008.

- IUPAC. Mesoionic compounds. In:_____. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology (The "Gold Book")*. Versão 2.3.2, 2012. p. 913. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org/>>. Acesso: Janeiro 2014.
- JAIN, A. K.; SHARMA, S.; VAIDYA, A.; RAVICHANDRAN, V.; AGRAWAL, R. K. 1,3,4-Thiadiazole and Its Derivatives: a Review on Recent Progress in Biological Activities. *Chemical Biology & Drug Design*, 81, 557-576, 2013.
- JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 26(3), 390-400, 2003.
- JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, 30(2), 382-387, 2007.
- KADI, A. A.; AL-ABDULLAH, E. S.; SHEHATA, I. A.; HABIB, E. E.; IBRAHIM, T. M.; EL-EMAM, A. A. Synthesis, antimicrobial and anti-inflammatory activities of novel 5-(1-adamantyl)-1,3,4-thiadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(11), 5006-5011, 2010.
- KADI, A. A.; EL-BROLLOSY, N. R.; AL-DEEB, O. A.; HABIB, E. E.; IBRAHIM, T. M.; EL-EMAM, A. A. Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of novel 2-(1-adamantyl)-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles and 2-(1-adamantylamino)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(2), 235-242, 2007.
- KAWAMORI, T.; TANAKA, T.; HIROSE, Y.; OHNISHI, M.; MORI, H. Inhibitory effects of *d*-limonene on the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis*, 17(2), 369-372, 1996.
- KELLOFF, G. J.; BOONE, C. W.; CROWELL, J. A.; STEELE, V. E.; LUBET, R. A.; DOODY, L. A.; MALONE, W. F.; HAWK, E. T.; SIGMAN, C. C. New agents for cancer chemoprevention. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 26, 1-28, 1996.
- KHAN, K. M.; RASHEED, M.; ULLAH, Z.; HAYAT, S.; KAUKAB, F.; CHOUDHARY, M. I.; ATTA-UR-RAHMAN; PERVEEN, S. Synthesis and *in vitro* leishmanicidal activity of some hydrazides and their analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 11(7), 1381-1387, 2003.
- KILBURN, J. P.; LAU, J.; JONES, R. C. F.; Solid-phase synthesis of substituted 1,3,4-thiadiazoles. *Tetrahedron Letters*, 44(42), 7825-7828, 2003.
- KUMAR, D.; KUMAR, N. M.; CHANG, K.-H.; SHAH, K. Synthesis and anticancer activity of 5-(3-indolyl)-1,3,4-thiadiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(10), 4664-4648, 2010.

- KUMAR, D.; KUMAR, N. M.; NOEL, B.; SHAH, K. A series of 2-arylamino-5-(indolyl)-1,3,4-thiadiazoles as potent cytotoxic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 55, 432-438, 2012.
- KUMAR, D.; VADDULA, B. R.; CHANG, K.-H.; SHAH, K. One-pot synthesis and anticancer studies of 2-arylamino-5-aryl-1,3,4-thiadiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(8), 2320-2323, 2011.
- KUMAR, K. A.; KUMAR, G. V.; RENUKA, N. Thiadiazoles: Molecules of Diverse Applications-A Review. *International Journal of Pharmtech Research*, 5(1), 239-248, 2013.
- KUTTAN, G.; PRATHEESHKUMAR, P.; MANU, K. A.; KUTTAN, R. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharmaceutical Biology*, 49(10), 995-1007, 2011.
- LI, Y.; GENG, J.; LIU, Y.; YU, S.; ZHAO, G. Thiadiazole - a promising structure in medicinal chemistry. *ChemMedChem*, 8, 27-41, 2013.
- LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M. DE; CARVALHO, C. S.; LIMA, V. T.; ARAÚJO, J. M. DE; LIMA, J. G. DA; FARIA, A. R. DE; MELO, E. J. T. DE; ALVES, A. J.; ALVES, E. W.; ALVES, A. Q.; GÓES, A. J. S. Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(9), 3685-3691, 2010.
- MACIEL, M. A. M.; ECHEVARRIA, A.; RUMJANEK, V. M. Isolamento e caracterização de acil-tiosemicarbazidas como intermediários na síntese de compostos mesoiônicos. *Química Nova*, 21(5), 569-572, 1998.
- MAHAN, B. M.; MYERS, R. J. Química dos Metais de Transição. In:_____. *Química: Um curso universitário*. 4ª ed. São Paulo: Blucher, 1995. Cap 16.5, p. 444-445.
- MAINGOT, L.; ELBAKALI, J.; DUMONT, J.; BOSCH, D.; COUSAERT, N.; URBAN, A.; DEGLANE, G.; VILLOUTREIX, B.; NAGASE, H.; SPERANDIO, O.; LEROUX, F.; DEPREZ, B.; DEPREZ-POULAIN, R. Aggrecanase-2 inhibitors based on the acylthiosemicarbazide zinc-binding group. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 69, 244-261, 2013.
- MAREI, G. I. K.; RASOUL, M. A. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 56-61, 2012.
- MATTOS, M. C. S. DE; KOVER, W. B. Ciclo-Adição de Óxidos de Nitrila ao Limoneno: Síntese Químico e Regioespecífica de 2-Isoxazolinas 3-Substituídas. *Química Nova*, 17(2), 119-123, 1994.

- MATTOS, M. C. S. DE; KOVER, W. B.; AZNAR, F.; BARLUENGA, J. Solvomercuration-demercuration of limonene with $\text{Hg}(\text{BF}_4)_2$; A chemo- and regioselective route to 8-substituted *p*-menthenes. *Tetrahedron Letters*, 33(34), 4863-4866, 1992.
- MATYSIAK, J.; MALINSKI, Z. 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole analogues: Antifungal activity *in vitro* against *Candida* species. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 33(6), 594-601, 2007.
- MATYSIAK, J.; OPOLSKI, A. Synthesis and antiproliferative activity of *N*-substituted 2-amino-5-(2,4-dihydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(13), 4483-4489, 2006.
- MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J. A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ, J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurans derivatives. *Biochemical Pharmacology*, 65(6), 999-1006, 2003.
- MEHTA, S.; SWARNKAR, N.; VYAS, R.; VARDIA, J.; PUNJABI, P. B.; AMETA, S. C. Microwave Assisted Synthesis of Some Pyridine Derivatives Containing Mercaptotriazole and Thiazolidinone as a New Class of Antimicrobial Agents. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, 183, 105-114, 2007.
- MENEGATTI, R.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J. A importância da síntese de fármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, 3, 16-22, 2011.
- METWALLY, M. A.; BONDOCK, S.; EL-AZAP, H.; KANDEEL, E.-E. M. Thiosemicarbazides: synthesis and reactions. *Journal of Sulfur Chemistry*, 32(5), 489-519, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de bases técnicas da oncologia - SIA/SUS - Sistema de informações ambulatoriais*. 15ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 119 p. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/manual_oncologia_15_edicao_06_09_2013.pdf>. Acesso: Dezembro 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA. Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil. 2014. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226/Apresentacao+Estimativa+2014_final+corrigido+tireoide.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=0129ba0041fbbc01aa4fee936e134226>. Acesso: Janeiro 2014.
- MIYAZAWA, M.; SHINDO, M.; SHIMADA, T. Sex Differences in the Metabolism of (+)- and (-)-Limonene Enantiomers to Carveol and Perillyl Alcohol Derivatives by Cytochrome P450 Enzymes in Rat Liver Microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 15(1), 15-20, 2002.
- MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF,

- A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766 1991.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63, 1983.
- MOURA, I. C.; WUNDERLICH, G.; UHRIG, M. L.; COUTO, A. S.; PERES, V. J.; KATZIN, A. M.; KIMURA, E. A. Limonene Arrests Parasite Development and Inhibits Isoprenylation of Proteins in *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2553-2558, 2001.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311-335, 2012.
- NUNES, M. C. P.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767-776, 2013.
- OLIVEIRA, C. M.; SILVA, C. C. DA; COLLINS, C. H.; MARSAIOLI, A. J. Controlling factors determining the selective HSCN addition to double bonds and their application to the synthesis of 7-isothiocyano-7,8- α -dihydro-bisabolene. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(5), 661-666, 2001.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. *Avanços para superar o impacto global de doenças. Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas*. 2010. 172 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44440/3/9789248564093_por.pdf>. Acesso: Novembro 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Cancer Fact Sheet nº 297 (revised in January 2013), 2013a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso: Novembro 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Fact Sheet nº 340 (revised in march 2013), 2013b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso: Dezembro 2013.
- OZENSOY, O.; NISHIMORI, I.; VULLO, D.; PUC CETTI, L.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the human transmembrane isozyme XIV with a library of aromatic/heterocyclic sulfonamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(22), 6089-6093, 2005.
- PADMAVATHI, V.; REDDY, G. S.; PADMAJA, A.; KONDAIAH, P.; ALI-SHAZIA. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-

- thiadiazoles and 1,2,4-triazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(5), 2106-2012, 2009.
- PALASKA, E.; ŞAHIN, G.; KELICEN, P.; DURLU, N. T.; ALTINOK, G. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-oxadiazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. *Il Farmaco*, 57(2), 101-107, 2002.
- POLI, P.; MELLO, M. A. DE; BUSCHINI, A.; MORTARA, R. A.; ALBUQUERQUE, C. N. DE; SILVA, S. DA; ROSSI, C.; ZUCCHI, T. M. A. D. Cytotoxic and genotoxic effects of megazol, an anti-Chagas' disease drug, assessed by different short-term tests. *Biochemical Pharmacology*, 64(11), 1617-1627, 2002.
- POORRAJAB, F.; ARDESTANI, S. K.; FOROUMADI, A.; EMAMI, S.; KARIMINIA, A.; BEHROUZI-FARMOGHADAM, M.; SHAFIEE, A. Selective leishmanicidal effect of 1,3,4-thiadiazole derivatives and possible mechanism of action against *Leishmania* species. *Experimental Parasitology*, 121(4), 323-330, 2009.
- RAM, V. J.; GOEL, A.; KANDPAL, M.; MITTAL, N.; GOYAL, N.; TEKWANI, B. L.; GURU, P. Y.; RASTOGI, A. K. Tetraazaacenaphthene, tetraazaphenalene and 1, 3, 4-thiadiazole derivatives as potential leishmanicides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7(6), 651-656, 1997.
- RASSI, A.; REZENDE, J. M. DE. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275-291, 2012.
- RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388-1402, 2010.
- ROBERTO, D.; MICUCCI, P.; SEBASTIAN, T.; GRACIELA, F.; ANESINI, C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 106(1), 38-44, 2010.
- ROSTAMIZADEH, S.; ARYAN, R.; GHAIENI, H. R.; AMANI, A. M. An efficient one-pot procedure for the preparation of 1,3,4-thiadiazoles in ionic liquid BF₄ as dual solvent and catalyst. *Heteroatom Chemistry*, 19(3), 320-324, 2008.
- ROSTOM, S. A. F. Synthesis and *in vitro* antitumor evaluation of some indeno[1,2-c]pyrazol(in)es substituted with sulfonamide, sulfonylurea(-thiourea) pharmacophores, and some derived thiazole ring systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(19), 6475-6485, 2006.
- ROSZKOWSKI, P.; MAURIN, J. K.; CZARNOCKI, Z. Novel (*R*)-(+)-limonene-derived ligands: synthesis and application in asymmetric transfer hydrogenations. *Tetrahedron: Asymmetry*, 23(14), 1106-1110, 2012.

- RZESKI, W.; MATYSIAK, J.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M. Anticancer, neuroprotective activities and computational studies of 2-amino-1,3,4-thiadiazole based compound. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(9), 3201-3207, 2007.
- SALGIN-GÖKŞEN, U.; GÖKHAN-KELEKÇİ, N.; GÖKTAŞ, O.; KÖYSAL, Y.; KILIÇ, E.; IŞIK, S.; AKTAY, G.; OZALP, M. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(17), 5738-5751, 2007.
- SALOMÃO, K.; SOUZA, E. M. DE; CARVALHO, S. A.; SILVA, E. F. DA; FRAGA, C. A. M.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. DE. *In vitro* and in vivo activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazone derivatives of megalon against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2023-2031, 2010.
- SALOMON, C. First century of Chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(3), 888-895, 2012.
- SANTOS, S. R. L.; MELO, M. A.; CARDOSO, A. V.; SANTOS, R. L. C.; SOUSA, D. P. DE; CAVALCANTI, S. C. H. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. *Chemosphere*, 84(1), 150-153, 2011.
- SANTOS, M. R. V.; MOREIRA, F. V.; FRAGA, B. P.; SOUZA, D. P. DE; BONJARDIM, L. R.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(4), 764-771, 2011.
- SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica: Doença de Chagas. CID 10 B 57. 2011 Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1530>. Acesso: Novembro 2013.
- SHARMA, R.; PRASAD, Y.; MISHRA, G. P.; CHATURVEDI, S. C. Some substituted 1,3,4-thiadiazoles: a novel centrally acting agents. *Medicinal Chemistry Research*, 23(1), 252-258, 2014.
- SHIH, M.-H.; WU, C.-L. Efficient syntheses of thiadiazoline and thiadiazole derivatives by the cyclization of 3-aryl-4-formylsydnone thiosemicarbazones with acetic anhydride and ferric chloride. *Tetrahedron*, 61(46), 10917-10925, 2005.
- SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews. Cancer*, 6(10), 813-823, 2006.

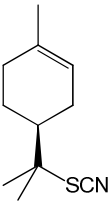
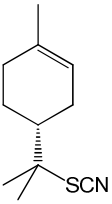
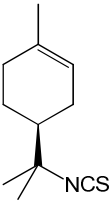
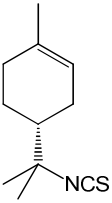
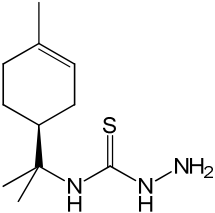
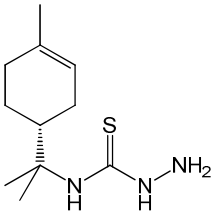
- SILVA, A. P. DA. *Síntese e Avaliação de Atividade Antitumoral de Tiossemicarbazonas derivadas do α -Bisabolol*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- SILVA, A. P. B. DA. *Síntese e atividade antileishmania e antifúngica de benzaldeídotiossemicarbazonas derivadas do (-)-canfeno e do R(+)-limoneno e dos seus complexos de Cobre (II)*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual de Maringá, 2010.
- SILVA, A. P. DA; GAUZE, G. DE F.; COELHO, N. P.; SILVA, C. C. DA; BASSO, E. A. Addition of hydrazine to natural terpene-based isothiocyanates derivatives: density functional theory investigation. *Tetrahedron Letters*, 52(1), 62-64, 2011.
- SILVA, A. P. DA; MARTINI, M. V.; OLIVEIRA, C. M. A. DE; CUNHA, S.; CARVALHO, J. E. DE; RUIZ, A. L. T. G.; SILVA, C. C. DA. Antitumor activity of (-)- α -bisabolol-based thiosemicarbazones against human tumor cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45(7), 2987-2993, 2010.
- SILVA, C. C. DA; ALMAGRO, V.; MARSAIOLI, A. J. A direct route to terpene isothiocyanates. *Tetrahedron Letters*, 34(42), 6717-6720, 1993.
- SILVA, C. C. DA; OLIVEIRA, C. M. A.; ALMEIDA, S. A.; NAKAMURA, C. V.; BRITTA, E.; VANDRESEN, F.; FALZIROLLI, H.; SILVA, A. P. B. Tiossemicarbazonas incorporadas ao S(-)-limoneno com atividade antileishmania. BR. PI 1104693-7, 2011.
- SILVA, F. C. DA; FERREIRA, S. B.; ROCHA, D. R. DA; FERREIRA, V. F. Chagas Disease: Challenges in Developing New Trypanocidal Lead Compounds. *Revista Virtual de Química*, 4(1), 46-72, 2012.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Espectrometria de RMN de hidrogênio. In:_____. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. Cap. 3, p.192-193.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI/ Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107-1112, 1990.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Indicadores Específicos. In:_____. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2009. Cap.19, Seção E-2, p. 521.
- STRZEMECKA, L.; MACIEJEWSKA, D.; URBANCZYK-LIPKOWSKA, Z. The structure of *N*-allyl derivatives of (5-(2'-pyridyl)- [1,3,4]thiadiazol-2-yl) amine in solution and the solid state studied by the ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR

- spectroscopy, X-ray crystallography and DFT computations. *Journal of Molecular Structure*, 648(1-2), 107-113, 2003.
- STRZEMECKA, L.; URBAŃCZYK-LIPKOWSKA, Z. The structure of *N*-allyl-(5-phenyl-[1,3,4]thiadiazol-2-yl) amine in solution and the solid state studied by the ^1H , ^{13}C , ^{15}N NMR spectroscopy and X-ray crystallography. *Journal of Molecular Structure*, 970(1-3), 1-13, 2010.
- SUGGITT, M.; BIBBY, M. C. 50 Years of Preclinical Anticancer Drug Screening: Empirical To Target-Driven Approaches. *Clinical Cancer Research*, 11, 971-981, 2005.
- TAHGHIGHI, A.; MARZNAKI, F. R.; KOBARFARD, F.; DASTMALCHI, S.; MOJARRAD, J. S.; RAZMI, S.; ARDESTANI, S. K.; EMAMI, S.; SHAFIEE, A.; FOROUMADI, A. Synthesis and antileishmanial activity of novel 5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazoles with piperazinyl-linked benzamidine substituents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(6), 2602-2608, 2011.
- TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G. DE; FARIA, A. R. DE; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. DE. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, 28(6), 1030-1037, 2005.
- THOMASCO, L. M.; GADWOOD, R. C.; WEAVER, E. A.; OCHOADA, J. M.; FORD, C. W.; ZURENKO, G. E.; HAMEL, J. C.; STAPERT, D. M.; JUDY, K.; SCHAADT, R. D.; YAGI, B. H. The synthesis and antibacterial activity of 1,3,4-thiadiazole phenyl oxazolidinone analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(23), 4193-4196, 2003.
- TOMASCIKOVÁ, J.; IMRICH, J.; DANIHEL, I.; BÖHM, S.; KRISTIAN, P.; PISARCÍKOVÁ, J.; SABOL, M.; KLIKA, K. D. Regioselectivity and tautomerism of novel five-membered ring nitrogen heterocycles formed via cyclocondensation of acylthiosemicarbazides. *Molecules*, 13(3), 501-518, 2008.
- TURAN, N.; TOPÇU, M. F.; ERGIN, Z.; SANDAL, S.; TUZCU, M.; AKPOLAT, N.; YILMAZ, B.; SEKERCİ, M.; KARATEPE, M. Pro-oxidant and antiproliferative effects of the 1,3,4-thiadiazole-based Schiff base and its metal complexes. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(4), 369-378, 2011.
- URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology*, 19(11), 495-501, 2003.
- UREÑA, F. P.; MORENO, J. R. A.; GONZÁLEZ, J. J. L. Conformational study of (*R*)-(+)-limonene in the liquid phase using vibrational spectroscopy (IR, Raman, and VCD) and DFT calculations. *Tetrahedron: Asymmetry*, 20(1), 89-97, 2009.

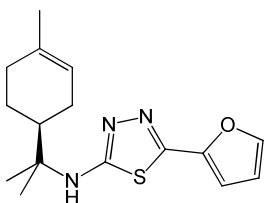
- VANDRESEN, F. *Síntese e atividades antileishmania e antitumoral de tiosemicarbazonas e de 1,3,4-tiadiazóis derivados do R-(+)-limoneno*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá. 2011.
- VARANDAS, L. S.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; BARREIRO, E. J. Design, synthesis and pharmacological evaluation of new nonsteroidal antiinflammatory 1,3,4-thiadiazole derivatives. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2(1), 62-67, 2005.
- VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais ea química medicinal moderna. *Química Nova*, 29(2), 325-337, 2006.
- VIGUSHIN, D. M.; POON, G. K.; BODDY, A.; ENGLISH, J.; HALBERT, G. W.; PAGONIS, C.; JARMAN, M.; COOMBES, R. C. Phase I and pharmacokinetic study of *d*-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 42, 111-117, 1998.
- VORONKOV, M. V.; GONTCHAROV, A. V.; KANAMARLAPUDI, R. C.; RICHARDSON, P. F.; WANG, Z.-M. Scaleable Syntheses of Isomeric Limonene Aziridines from the Commercially Available Mixture of *cis*- and *trans*-Limonene Oxides. *Organic Process Research & Development*, 9(2), 221-224, 2005a.
- VORONKOV, M. V.; KANAMARLAPUDI, R. C.; RICHARDSON, P. Regio- and diastereoselective synthesis of bifunctionalized limonenes. *Tetrahedron Letters*, 46(40), 6907-6910, 2005b.
- VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 540-544, 2007.
- WANG, T.; ZHANG, Y. H.; YU, S.; JI, H.; LAI, Y. S.; PENG, S. X. Synthesis and biological evaluation of novel thalidomide analogues as potential anticancer drugs. *Chinese Chemical Letters*, 19(8), 928-930, 2008.
- WILSON, R. M.; DANISHEFSKY, S. J. Small molecule natural products in the discovery of therapeutic agents: the synthesis connection. *The Journal of Organic Chemistry*, 71(22), 8329-8351, 2006.
- YAMAGUCHI, M. U.; SILVA, A. P. B DA; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, C. C. DA; NAKAMURA, C. V. Effects of a thiosemicarbazide camphene derivative on Trichophyton mentagrophytes. *Molecules*, 14(5), 1796-1807, 2009.
- YANG, S.; LEE, S. Regioselective Synthesis of 2-Amino-Substituted 1, 3, 4-Oxadiazole and 1,3,4-Thiadiazole Derivatives via Reagent-Based Cyclization of Thiosemicarbazide. *The Journal of Organic Chemistry*, 78(2), 438-444, 2012.

- YANG, X.-H.; WEN, Q.; ZHAO, T.-T.; SUN, J.; LI, X.; XING, M.; LU, X.; ZHU, H.-L. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of cinnamic acyl 1,3,4-thiadiazole amide derivatives as novel antitubulin agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(3), 1181-1187, 2012a.
- YANG, X.-H.; XIANG, L.; LI, X.; ZHAO, T.-T.; ZHANG, H.; ZHOU, W.-P.; WANG, X.-M.; GONG, H.-B.; ZHU, H.-L. Synthesis, biological evaluation, and molecular docking studies of 1,3,4-thiadiazol-2-amide derivatives as novel anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(9), 2789-2795, 2012b.
- YU, P.; AN, K.; HE, Q.; ZHANG, J.-Q.; WAN, R. 2-(4-Fluoro-phen-yl)-3-[5-(4-nitro-phen-yl)-1,3,4-thia-diazol-2-yl]-1,3-thia-zolidin-4-one. *Acta Crystallographica. Section E, Structure Reports Online*, 66(Pt 7), o1737, 2010.
- ZHENG, K. B.; HE, J.; ZHANG, J. Synthesis and antitumor activity of N1-acetylamino-(5-alkyl/aryl-1,3,4-thiadiazole-2-yl)-5-fluorouracil derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 19(11), 1281-1284, 2008.

ANEXO A

Composto	Nomenclaturas
<p>66a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> (S)-4-(2-tiocianatopropan-2-il)-1-metilcicloex-1-eno</p> <p><u>Simplificada:</u> Tiocianoterpeno do S(-)-limoneno</p>
<p>66b</p> 	<p><u>Sistemática:</u> (R)-4-(2-tiocianatopropan-2-il)-1-metilcicloex-1-eno</p> <p><u>Simplificada:</u> Tiocianoterpeno do R(+)-limoneno</p>
<p>67a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> (S)-4-(2-isotiocianatopropan-2-il)-1-metilcicloex-1-eno</p> <p><u>Simplificada:</u> Isotiocianoterpeno do S(-)-limoneno</p>
<p>67b</p> 	<p><u>Sistemática:</u> (R)-4-(2-isotiocianatopropan-2-il)-1-metilcicloex-1-eno</p> <p><u>Simplificada:</u> Isotiocianoterpeno do R(+)-limoneno</p>
<p>68a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> 4-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazida</p> <p><u>Simplificada:</u> Tiossemicarbazida do S(-)-limoneno</p>
<p>68b</p> 	<p><u>Sistemática:</u> 4-{2-[(1R)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazida</p> <p><u>Simplificada:</u> Tiossemicarbazida do R(+)-limoneno</p>

69a

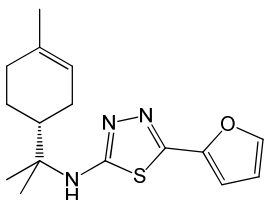
Sistemática:

5-(furan-2-yl)-N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-furanil-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno

69b

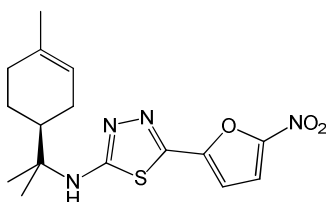
Sistemática:

5-(furan-2-yl)-N-{2-[(1R)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-furanil-1,3,4-tiadiazol do R(+)-limoneno

70a

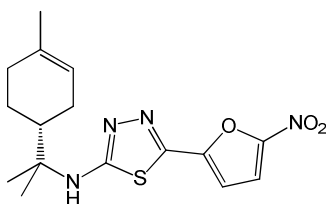
Sistemática:

N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(5-nitrofuran-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-nitrofuranil-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno

70b

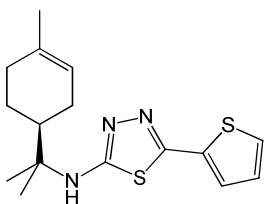
Sistemática:

N-{2-[(1R)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(5-nitrofuran-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-nitrofuranil-1,3,4-tiadiazol do R(+)-limoneno

71a

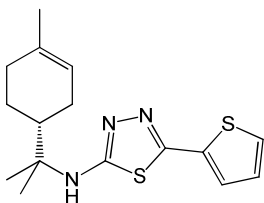
Sistemática:

N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(tiofen-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno

71b

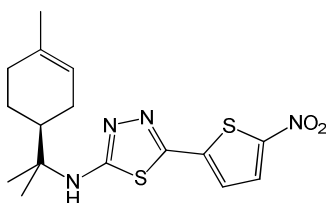
Sistemática:

N-{2-[(1R)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(tiofen-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-tiofenil-1,3,4-tiadiazol do R(+)-limoneno

72a

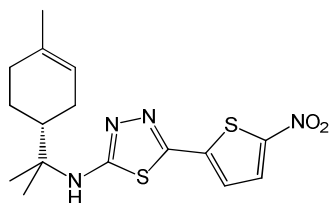
Sistemática:

N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(5-nitrotiofen-2-il)-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-nitrotiofenil-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno

72b

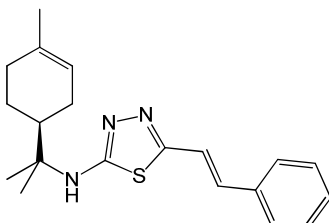
Sistemática:

N-{2-[(1*R*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(5-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-nitrofenil-1,3,4-tiadiazol do *R*(+)-limoneno

73a

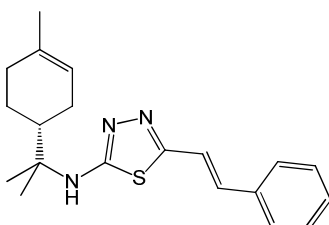
Sistemática:

5-[(*E*)-2-feniletetil]-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

(*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *S*(-)-limoneno

73b

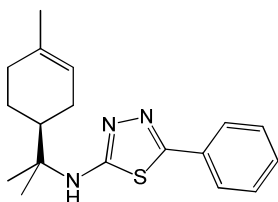
Sistemática:

5-[(*E*)-2-feniletetil]-*N*-{2-[(1*R*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

(*E*)-5-estiril-1,3,4-tiadiazol do *R*(+)-limoneno

74a

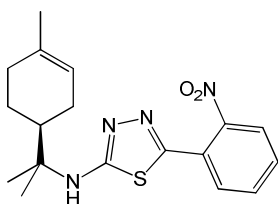
Sistemática:

5-fenil-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-fenil-1,3,4-tiadiazol do *S*(-)-limoneno

75a

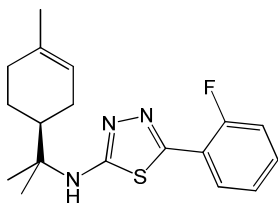
Sistemática:

N-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(2-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-(*o*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*(-)-limoneno

76a

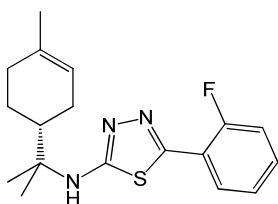
Sistemática:

5-(2-fluorfenil)-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina

Simplificada:

5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*(-)-limoneno

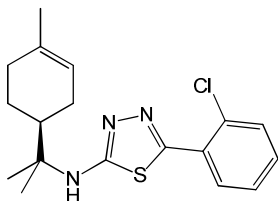
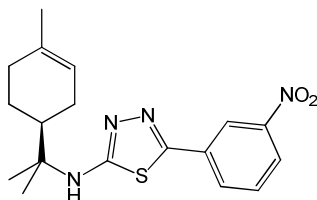
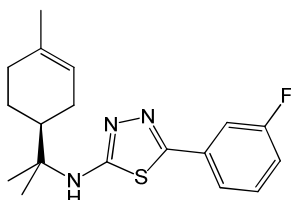
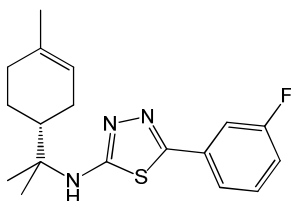
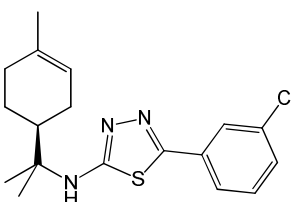
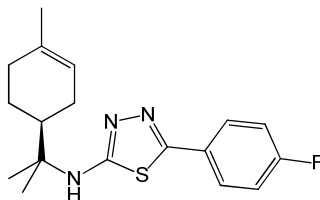
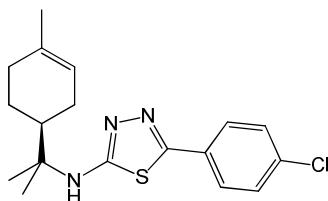
76b

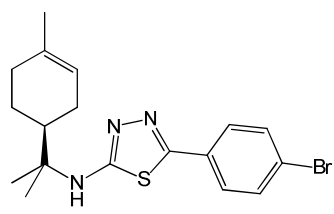
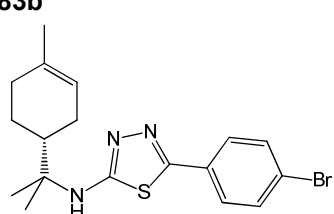
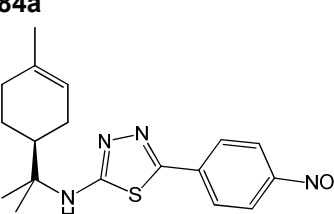
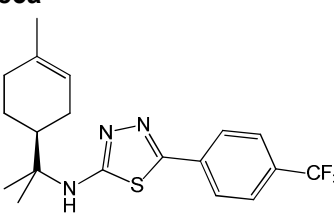
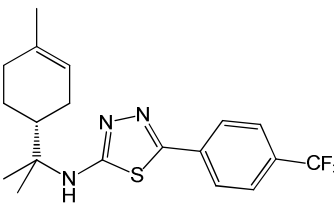
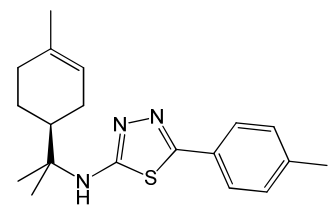
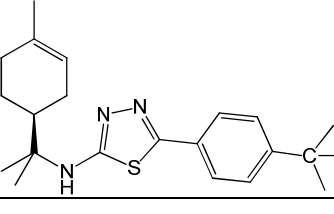
Sistemática:

5-(2-fluorfenil)-*N*-{2-[(1*R*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina

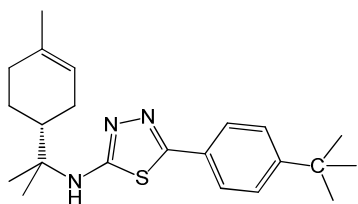
Simplificada:

5-(*o*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *R*(+)-limoneno

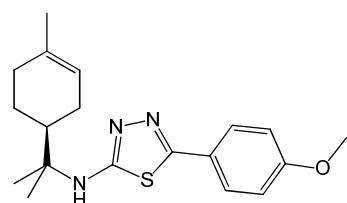
77aSistemática:5-(2-clorofenil)-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*o*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno**78a**Sistemática:*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(3-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*m*-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno**79a**Sistemática:5-(3-fluorfenil)-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno**79b**Sistemática:5-(3-fluorfenil)-*N*-{2-[(1*R*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*m*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *R*-(+)-limoneno**80a**Sistemática:5-(3-clorofenil)-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*m*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno**81a**Sistemática:5-(4-fluorfenil)-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*p*-fluorfenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno**82a**Sistemática:5-(4-clorofenil)-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*p*-clorofenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno

<p>83a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> 5-(4-bromofenil)-N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina</p> <p><u>Simplificada:</u> 5-(<i>p</i>-bromofenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno</p>
<p>83b</p> 	<p><u>Sistemática:</u> 5-(4-bromofenil)-N-{2-[(1R)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina</p> <p><u>Simplificada:</u> 5-(<i>p</i>-bromofenil)-1,3,4-tiadiazol do R(+)-limoneno</p>
<p>84a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(4-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina</p> <p><u>Simplificada:</u> 5-(<i>p</i>-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno</p>
<p>85a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-[4-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol-2-amina</p> <p><u>Simplificada:</u> 5-[<i>p</i>-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno</p>
<p>85b</p> 	<p><u>Sistemática:</u> N-{2-[(1R)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-[4-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol-2-amina</p> <p><u>Simplificada:</u> 5-[<i>p</i>-(trifluormetil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do R(+)-limoneno</p>
<p>86a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(4-metilfenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina</p> <p><u>Simplificada:</u> 5-(<i>p</i>-metilfenil)-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno</p>
<p>87a</p> 	<p><u>Sistemática:</u> 5-[4-(<i>terc</i>-butil)fenil]-N-{2-[(1S)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-amina</p> <p><u>Simplificada:</u> 5-[<i>p</i>-(<i>terc</i>-butil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do S(-)-limoneno</p>

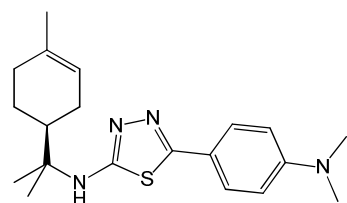
87b

Sistemática:5-[4-(*terc*-butil)fenil]-*N*-{2-[(1*R*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-[*p*-(*terc*-butil)fenil]-1,3,4-tiadiazol do *R*-(+)-limoneno

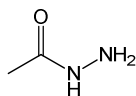
88a

Sistemática:*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-5-(4-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-(*p*-metoxifenil)-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno

89a

Sistemática:5-[4-(dimetilamino)fenil]-*N*-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1,3,4-tiadiazol-2-aminaSimplificada:5-[*p*-(dimetilamino)fenil]-1,3,4-tiadiazol do *S*-(-)-limoneno

90

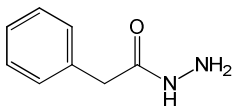
Sistemática:

Etil-hidrazida

Simplificada:

Acetoidrazida

91

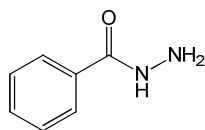
Sistemática:

2-[(fenil)etil]-hidrazida

Simplificada:

2-fenilacetoidrazida

92

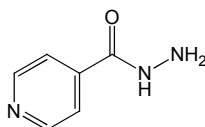
Sistemática:

Fenil-hidrazida

Simplificada:

Benzoidrazida

93

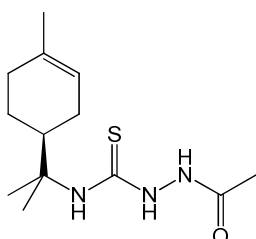
Sistemática:

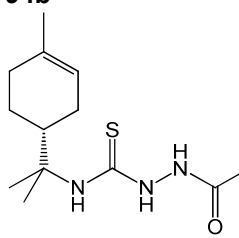
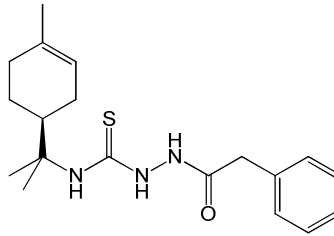
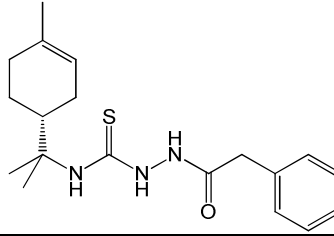
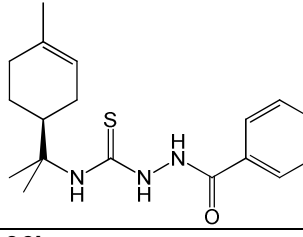
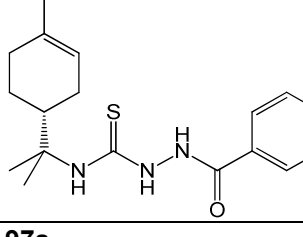
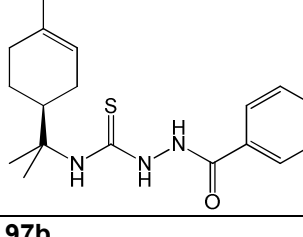
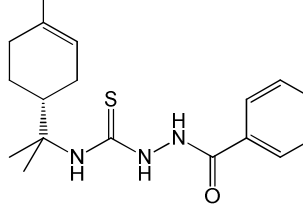
Piridin-4-il-hidrazida

Simplificada:

Isonicotinoidrazida

94a

Sistemática:1-etanoil-4-{2-[(1*S*)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazidaSimplificada:1-acetil-tiossemicarbazida do *S*-(-)-limoneno

<p>94b</p> 	<p>Sistemática: 1-etanoil-4-{2-[(1<i>R</i>)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazida</p> <p>Simplificada: 1-acetil-tiossemicarbazida do <i>R</i>-(+)-limoneno</p>
<p>95a</p> 	<p>Sistemática: 1-(2-feniletanoil)-4-{2-[(1<i>S</i>)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazida</p> <p>Simplificada: 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do <i>S</i>-(-)-limoneno</p>
<p>95b</p> 	<p>Sistemática: 1-(2-feniletanoil)-4-{2-[(1<i>R</i>)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazida</p> <p>Simplificada: 1-(2-fenilacetil)-tiossemicarbazida do <i>R</i>-(+)-limoneno</p>
<p>96a</p> 	<p>Sistemática: 1-(fenilmetanoil)-4-{2-[(1<i>S</i>)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazida</p> <p>Simplificada: 1-benzoil-tiossemicarbazida do <i>S</i>-(-)-limoneno</p>
<p>96b</p> 	<p>Sistemática: 1-(fenilmetanoil)-4-{2-[(1<i>R</i>)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}tiossemicarbazida</p> <p>Simplificada: 1-benzoil-tiossemicarbazida do <i>R</i>-(+)-limoneno</p>
<p>97a</p> 	<p>Sistemática: 4-{2-[(1<i>S</i>)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1-[(piridin-4-il)metanoil]tiossemicarbazida</p> <p>Simplificada: 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida do <i>S</i>-(-)-limoneno</p>
<p>97b</p> 	<p>Sistemática: 4-{2-[(1<i>S</i>)-4-metilcicloex-3-en-1-il]propan-2-il}-1-[(piridin-4-il)metanoil]tiossemicarbazida</p> <p>Simplificada: 1-isonicotinoil-tiossemicarbazida do <i>R</i>-(+)-limoneno</p>