

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

**TESE**

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE**  
**COMPOSTOS MESOIÔNICOS DA CLASSE DOS 1,3,4-**  
**TIADIAZÓLIO-2-ARILAMINIDA**

**NATÁLIA DRUMOND LOPES**

**2018**



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

**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
COMPOSTOS MESOIÔNICOS DA CLASSE DOS 1, 3, 4-TIADIAZÓLIO-  
2-ARILAMINIDA**

**NATÁLIA DRUMOND LOPES**

*Sob orientação da Professora*

Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

*E co-orientação da Professora*

Dra. Márcia Cristina Campos de Oliveira

Tese submetida como  
requisito parcial para  
obtenção do grau de  
Doutora em Química, no  
Programa de Pós-  
Graduação em Química,  
Área de Concentração em  
Química.

Seropédica, RJ

Junho de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L864s      Lopes, Natália Drumond, 1986-  
             Síntese e avaliação da atividade biológica de  
             compostos mesoiônicos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2  
             arilaminida / Natália Drumond Lopes. - 2018.  
             176 f. : il.

             Orientadora: Aurea Echevarria Aznar Neves    Lima.  
             Coorientadora: Márcia Cristina Campos de Oliveira.  
             Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
             Rio de Janeiro, Pós Graduação em Química, 2018.

             1. Química Orgânica. 2. Síntese Orgânica. 3. Química  
             Medicinal. I. Lima, Aurea Echevarria Aznar Neves ,  
             1950-, orient. II. Oliveira, Márcia Cristina Campos  
             de, 1969-, coorient. III Universidade Federal Rural  
             do Rio de Janeiro. Pós Graduação em Química. IV. Título.

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

**NATÁLIA DRUMOND LOPES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Química**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração Química.

TESE APROVADA EM 26/06/2018.

---

Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima, UFRRJ

---

Dra. Kenia Pissinate, PUC-RS

---

Dr. Alessandro Bolis Costa Simas, UFRJ

---

Dr. Edson Ferreira da Silva, FIOCRUZ- RJ

---

Dr. Cedric Stephan Graebin, UFRRJ

---

Dra. Márcia Cristina Campos de Oliveira, UFRRJ

### **No meio do caminho**

No meio do caminho tinha uma pedra  
tinha uma pedra no meio do caminho  
tinha uma pedra  
no meio do caminho tinha uma pedra.

Nunca me esquecerei desse acontecimento  
na vida de minhas retinas tão fatigadas.  
Nunca me esquecerei de que no meio do caminho  
tinha uma pedra  
tinha uma pedra no meio do caminho  
no meio do caminho tinha uma pedra

*Carlos Drummond de Andrade, Rio de Janeiro, 1967.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por permitir que esse trabalho fosse possível.

A minha família, sempre compreensiva, me oferecendo força e incentivo.

A Professora Aurea Echevarria, por aceitar a orientação, depositar confiança e lutar por direitos, se tornando uma grande amiga trazendo aprendizado além do acadêmico.

A Professora Márcia de Oliveira, por aceitar a co-orientação, sempre dedicada, atuante em todos os momentos, se tornando uma companheira.

A todos os colegas do Laboratório 29 e 61, principalmente, aos amigos Cristiane Frauches, Danilo Sousa, Carla Cristina, João Paulo, Emanuel Hottes (Lab. 8), pela amizade, carinho, paciência e todo apoio recebido durante esse período de doutorado.

A coordenação do curso de Pós-Graduação e a todos os docentes e servidores pelas inúmeras colaborações.

A UFRRJ, pela oportunidade de ensino público, gratuito e de qualidade.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPERJ, CNPq e Petrobrás pelo financiamento dos projetos de pesquisa junto ao laboratório.

Aos colaboradores que realizaram ensaios de atividades biológicas.

A banca examinadora, por aceitar o convite.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

LOPES, Natália Drumond. **Síntese e avaliação da atividade biológica de compostos mesoiônicos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-arilaminidas**. 2018. 176p Tese (Doutorado em Química, Ciência exatas, síntese orgânica). Instituto de química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O câncer é um problema de saúde pública, sendo considerado a segunda maior causa de morte no Brasil e no mundo. Atualmente, os métodos terapêuticos empregados contra o câncer baseiam-se em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Embora a quimioterapia tenha avançado recentemente, vários tipos de cânceres ainda não dispõem de tratamento sistêmico e adequado, como o melanoma e a leucemia linfoma de células T de adulto, tornando-se necessário a procura de novos agentes antineoplásicos mais eficientes e menos tóxicos para as células saudáveis, a fim de aprimorar a eficácia de tratamento dessas doenças. Diante deste panorama, compostos heterocíclicos se mostram como substâncias promissoras para a atividade antitumoral, incluindo os compostos mesoiônicos. Neste presente trabalho é apresentado a síntese de 4 séries de compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-arilaminida, na forma de cloridratos, resultando em 24 compostos no total, sendo 20 inéditos. A metodologia de síntese para a série I foi orientada a partir dos princípios da Química Verde, realizando reações em ausência de solvente e uso de micro-ondas a partir de derivados do piperonal e de tiossemicarbazidas substituídas em rendimentos entre 60 e 95%. Os compostos das séries II, III e IV foram obtidos a partir dos cloretos de ácidos cinâmicos substituídos e tiossemicarbazidas também substituídas em 1,4-dioxano sob refluxo em rendimentos satisfatórios. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  confirmando as estruturas propostas. Os compostos da série I foram avaliados quanto a inibição da enzima tirosinase, marcador biológico para melanomas. Os resultados obtidos se mostraram promissores quanto à atividade inibitória da tirosinase para os derivados **16** ( $\text{IC}_{50}=124 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e **17** ( $\text{IC}_{50}=358 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). O estudo da interação com a soro albumina humana, bem como, estudos de modelagem molecular, foram realizados para esses compostos justificando os resultados obtidos *in vitro*. Os compostos da série II foram avaliados quanto a atividade citotóxica frente a três linhagens de leucemias humanas (Jurkat, MT2 e K562) mostrando bons resultados para os compostos **18** e **22**, enquanto que os ensaios para os demais compostos estão em andamento apresentando resultados preliminares promissores. Os resultados obtidos neste trabalho de tese indicam que os compostos mesoiônicos podem ser utilizados como protótipos para novos agentes na quimioterapia do câncer.

**Palavras-chave:** Cloridratos Mesoiônicos, Enzima Tirosinase, Atividade Citotóxica.

## ABSTRACT

LOPES, Natália Drumond. **Synthesis and evaluation of the biological activity of mesoionic compounds of the 1,3,4-thiadiazolium-2-arylamminides class**. 2018. 176p Thesis (Doctorate in Chemistry, Exact Sciences, organic synthesis). Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Cancer is a public health problem, being considered the second largest cause of death in Brazil. Currently, the therapeutic methods used against cancer are based on surgery, radiotherapy and chemotherapy. Although chemotherapy has been being improved recently, several types of cancer still do not have systemic and adequate treatment, such as melanoma and leukemia adult T-cell lymphoma, making it necessary to find new, more efficient and less toxic antineoplastic agents for healthy cells in order to improve the effectiveness of treatment of these diseases. Considering this scenery, heterocyclic compounds are shown to be promising substances for antitumor activity, including mesoionic compounds. In this work the synthesis of 4 series of mesoionic compounds of the class 1,3,4-thiadiazolium-2-arylamminide in the form of hydrochlorides is presented, resulting in 24 compounds in total, of which 20 are unpublished. The synthesis methodology for the serie I was oriented from the principles of Green Chemistry, performing reactions in absence of solvent and use of microwaves from piperonal derivatives and substituted thiosemicarbazides in yields between 60 and 95%. The compounds of series II, III and IV were obtained from chlorides of substituted cinnamic acids and thiosemicarbazides also substituted in 1,4-dioxane under reflux in satisfactory yields. All synthesized compounds were characterized by IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic techniques confirming the proposed structures. The compounds of series I were evaluated for inhibition of the enzyme tyrosinase, a biological marker for melanomas. The results obtained were promising for tyrosinase inhibitory activity for derivatives **16** ( $\text{IC}_{50} = 124 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and **17** ( $\text{IC}_{50} = 358 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). The study of interaction with human serum albumin, as well as molecular modeling studies, were performed for these compounds justifying the results obtained in vitro. The compounds of series II were evaluated for cytotoxic activity against three human leukemia lines (Jurkat, MT2 and K562) showing good results for compounds **18** and **22**, whereas the assays for the other compounds are in progress with promising preliminary results. The results obtained in this thesis indicate that mesoionic compounds can be used as prototypes for new agents in cancer chemotherapy.

**Keywords:** Mesoionic Compounds, Tyrosinase Enzyme, Cytotoxic Activity.

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos e pontos de fusão obtidos para as tiossemicarbazidas .....	19
Tabela 2. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos em acetona- $\text{d}_6$ para as tiossemicarbazidas $\text{N}_1, \text{N}_4$ -dissubstituídas.....	20
Tabela 3. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN de $^{13}\text{C}$ obtidos em acetona- $\text{d}_6$ para as tiossemicarbazidas $\text{N}_1, \text{N}_4$ -dissubstituídas.....	21
Tabela 4. Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os ácidos cinâmicos substituídos.....	22
Tabela 5. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ dos ácidos cinâmicos. ....	24
Tabela 6. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ para os ácidos cinâmicos substituídos. ....	25
Tabela 7. Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I).....	26
Tabela 8. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ ou MeOD dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I). ....	28
Tabela 9. Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ ou MeOD dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I) .....	29
Tabela 10. Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos (Série II) .....	30
Tabela 11. Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ dos cloridratos mesoiônicos (Série II). ....	32
Tabela 12. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ dos cloridratos mesoiônicos (Série II) .....	32
Tabela 13. Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos (Série III). ....	33
Tabela 14. Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ dos cloridratos mesoiônicos (Série III). ....	34
Tabela 15. Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ dos cloridratos mesoiônicos (Série III). ....	35
Tabela 16. Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos (Série IV). ....	36
Tabela 17. Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN $^1\text{H}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ dos cloridratos mesoiônicos da Série IV.....	37
Tabela 18. Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ obtidos em DMSO- $\text{d}_6$ dos cloridratos mesoiônicos Série IV .....	37
Tabela 19. Percentual de inibição para os compostos mesoiônicos (66,6 e 666 $\mu\text{M}$ ) na presença do substrato L-DOPA. ....	39
Tabela 20. Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos gráficos Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf para 16 na oxidação catalítica de L-DOPA pela tirosinase. ....	40
Tabela 21. Constantes de ligação ( $K_{\text{SV}}$ e $K_a$ ) para os complexos HSA:16 e HSA:17 a 296 K, 303 K e 310 K.....	43
Tabela 22. Valores de $\text{IC}_{50}$ obtidos para os compostos da Série II em culturas de 72 horas frente as linhagens de leucemias humanas Jurkat, MT2 e K562.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento celular em células normais e cancerosas (INCA, 2012). Fonte: Ilustração de Mariana F. Teles. ....	2
Figura 2. Representação da enzima tirosinase (Fonte: <a href="http://www.ac.uni-kiel.de/de/tuczek/forschungsgebiete/sauerstoffaktivierung">http://www.ac.uni-kiel.de/de/tuczek/forschungsgebiete/sauerstoffaktivierung</a> ) .....	4
Figura 3. Estruturas químicas dos fármacos que compõem o coquetel CHOP utilizado na quimioterapia de LLC <sub>T</sub> A. ....	6
Figura 4. Estruturas do Interferon alfa ( $\alpha$ IFN) (Fonte: RCSB Protein Data Bank) e da zidovudina (AZT). ....	6
Figura 5. Estrutura química do ácido trans-retinóico (ATRA). ....	7
Figura 6. Estrutura do inibidor Ipilimumab ligado ao CTLA-4 humano (Fonte: RCSB Protein Data Bank). ....	9
Figura 7. Estrutura do complexo de PD-1 e nivolumab-Fab (Fonte: RCSB Protein Data Bank). ....	9
Figura 8. Estrutura química da desidroditizona proposta por Fisher e Besthorn em 1882. ....	10
Figura 9. Formas canônicas da N-fenilsidnona. ....	10
Figura 10. Sobreposição dos orbitais p do anel das sidnonas (BADAMI, 2006). ....	11
Figura 11. Representações alternativas para os compostos mesoiônicos (SILVA, 1997). ....	11
Figura 12. Síntese de mesoiônicos utilizando N-tioacilidrazinas e dicloretos de isocianetos de arila (OLLIS & RAMSDEN, 1971). ....	12
Figura 13. Síntese de mesoiônicos utilizando N-alquil-N-tioacetilidrazinas com isotiocianatos substituídos com grupos alquila ou benzila (NEWTON et al., 1982). ....	12
Figura 14. Síntese de mesoiônicos utilizando dibromodiazobutadienos substituídos e N-tiobenzoilidrazinas, também substituídas (NEWTON et al., 1982). ....	12
Figura 15. Síntese de mesoiônicos utilizando cloretos de ácido e tiossemicarbazidas substituídas (MACIEL et al., 1998). ....	13
Figura 16. Síntese de mesoiônicos utilizando aldeídos aromáticos e 1,4-difeniltiossemicarbazida (FERREIRA et al., 2008). ....	13
Figura 17. Síntese de derivados da classe 1,3,4-tiadiazolio-2-fenilaminas. Reagentes e Condições: 1,4-dioxano, ácido de Lewis ( $\text{SOCl}_2$ ou TMS-Cl), MO, durante 5 min (a) ou durante 10 min (b) (REIS et al., 2011). ....	14
Figura 18. Estrutura química da SYD-1 com atividade antitumoral frente a carcinosarcoma Walker-256 (GALUPPO et al., 2016). ....	14
Figura 19 Estrutura química do cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitrocinamoil)-1,3,4-tiadiazolium-2-fenilamina (MI-D) com atividade antimelanoma e citotóxica frente a linhagens de leucemias (SEFFF-RIBEIRO et al., 2003; SEFFF-RIBEIRO et al., 2004; REIS et al., 2011). ....	15
Figura 20. Estrutura química dos derivados mesoiônicos que foram avaliados quanto aos efeitos antioxidantes em mitocôndrias: Cloridrato de 4-fenil-5-(2'-Y-4'-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazolium-2-fenilamina: MI-J (X = OH; Y = H), MI-4F (X = F; Y = H), MI-2,4diF (X = Y = F) e MI-D (X = NO <sub>2</sub> ; Y = H) (PIRES et al., 2016). ....	15
Figura 21. Cloridrato mesoiônico 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'-Y-fenilamina) com atividade antifúngica (PAIVA et al., 2015). ....	16
Figura 22. Mecanismo proposto para a obtenção das tiossemicarbazidas (MACIEL et al., 1998). ....	20
Figura 23. Mecanismo sugerido para obtenção de ácidos cinâmicos através da condensação de Knoevenagel-Dobner (SANTOS et al., 2001; RODRIGUES-SANTOS et al., 2007). ....	23
Figura 24. Estruturas de ressonância para os ácidos cinâmicos. ....	24
Figura 25. Retrossíntese para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I). ....	26

Figura 26. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos sais mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminadas utilizando $\text{SOCl}_2$ como ácido de Lewis (REIS, 2008). .....	27
Figura 27. Retrossíntese para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos da Série II. ....	30
Figura 28. Mecanismo de reação proposto para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos através da metodologia tradicional. ....	31
Figura 29. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk e (B) Gráfico de Hanes-Woolf para inibição de tirosinase, na ausência (controle ■) ou na presença de 16 (♦ $466 \mu\text{mol L}^{-1}$ e ▲ $333 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com L-DOPA como substrato. ....	39
Figura 30. Cinética de ação da enzima tirosinase em L-DOPA na presença de 16. (♦) L-DOPA ( $170 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (■) L-DOPA ( $170 \mu\text{M}$ ) + 16 ( $33 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). ....	40
Figura 31. (A) Superfície molecular da tirosinase e sua interação com os compostos mesoiônicos 12-17 (PMI-1 a PMI-6) na presença de L-DOPA. (B) Superposição das melhores poses de ancoragem para o interacção de tirosinase com 16 e 17 (PMI-5 e PMI-6) na presença de L-DOPA (função GoldScore). Os ligantes na representação do bastão estão em rosa, rosa claro e bege, respectivamente.	
Figura 32. Espectro de emissão de fluorescência para HAS livre e com adição de supressores (mesoiônicos) por alíquotas sucessivas de 16 (A) e 17 (B). HSA foi preparado com solução-tampão PBS (pH 7.4). $[\text{HSA}] = 1.00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , $[\text{16}] = [\text{17}] = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15$ e $1,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , $T = 310 \text{ K}$ , $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ . Inserção: Gráfico Stern-Volmer para supressão de fluorescência de HSA por 16 (A) e 17 (B) a 296 K, 303 K e 310 K.....	42
Figura 33. Gráfico de Stern-Volmer modificado de supressão de fluorescência para 16 (A) e 17 (B) a 296 K, 303 K e 310 K.....	43
Figura 34. Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 18 e 22 frente a linhagem Jurkat em cultura de 72 horas.....	45
Figura 35. Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 18, 20 e 22 frente a linhagem MT2 em cultura de 72 horas.....	45
Figura 36. Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 18, 20 e 21 frente a linhagem K562 em cultura de 72 horas.....	45

## ÍNDICE DE ESPECTROS

- Espectro 1. Espectro de IV da N, 2-difenil-hidrazina-carbotioamida 1. ... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 2. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da N, 2-difenil-hidrazina-carbotioamida 1 ..**Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 3. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da N, 2-difenil-hidrazina-carbotioamida 1 .**Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 4. Espectro de IV da N-(4-nitrofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 2. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da N-(4-nitrofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 2. . **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da N-(4-nitrofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 2. **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 7. Espectro de IV da N-(4-clorofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 3..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da N-(4-clorofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 3.. **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da N-(4-clorofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 3. **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 10. Espectro de IV da N-(4-bromofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 4. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da N-(4-bromofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 4  
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 12. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da N-(4-bromofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 4.  
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 13. Espectro de IV da 2-fenil-N-(*p*-toluil)-hidrazinacarbotioamida 5..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 2-fenil-N-(*p*-toluil)-hidrazinacarbotioamida 5..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 15. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da 2-fenil-N-(*p*-toluil)-hidrazinacarbotioamida 5..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 16. Espectro de IV da N-(4-metoxifenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 6..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 17. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da N-(4-metoxifenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 6.  
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 18. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da N-(4-metoxifenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 6.  
..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 19. Espectro de IV do 6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 7 ...**Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 20. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 7 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 21. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 7 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 22. Espectro de IV do 6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8.**Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 23. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8 ..... **Erro! Indicador não definido.**

- Espectro 24. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 25. Espectro de IV do ácido *p*-nitrocinâmico 9. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 26. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido *p*-nitro cinâmico 9 (400 MHz, DMSO-*d*6).. **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 27. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido *p*-nitrocinâmico 9 (100 MHz, DMSO-*d*6).. **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 28. Espectro de IV do ácido *p*-fluorcinâmico 10. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 29. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido *p*-fluorcinâmico 10 (400 MHz, DMSO-*d*6). **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 30. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido *p*-fluorcinâmico 10 (100 MHz, DMSO-*d*6). **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 31. Espectro de IV do ácido 6-nitro-(3,4-metilenodioxo)-cinâmico 11. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 32. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do ácido 6-nitro-(3,4-metilenodioxo)-cinâmico 11 (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD). .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 33. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido 6-nitro-(3,4-metilenodioxo)-cinâmico 11 (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD). .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 34. Espectro de IV do cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 12 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 35. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 12 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 36. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 12 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 37. Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-nitro-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 13 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 38. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-nitro-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 13 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 39. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-nitro-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 13 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 40. Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-bromo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 14 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 41. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-bromo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 14 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 42. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-bromo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 14 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 43. Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitrofenil)amina 15 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 44. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do Cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitrofenil)amina 15. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 45. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitrofenil)amina 15. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 46. Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-clorofenil)amina 16 ..... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-clorofenil)amina 16. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 48. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-clorofenil)amina 16. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Espectro 49. Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-bromofenil)amina 17 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 50. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxi-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-bromofenil)amina 17..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 51. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxi-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-bromofenil)amina 17..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 52. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 18..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 53. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 18..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 54. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 18..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 55. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-nitro-fenilamina) 19..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 56. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-nitro-fenilamina) 19..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 57. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-nitro-fenilamina) 19..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 58. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-cloro-fenilamina) 20..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 59. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-cloro-fenilamina) 20..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 60. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-cloro-fenilamina) 20..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 61. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-bromo-fenilamina) 21..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 62. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-bromo-fenilamina) 21..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 63. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-bromo-fenilamina) 21..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 64. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-toluilamina) 22..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 65. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-toluilamina) 22..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 66. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-toluilamina) 22..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 67. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metóxi-fenilamina) 23..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 68. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metóxi-fenilamina) 23..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 69. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metóxi-fenilamina) 23..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 70. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 24..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 71. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 24..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 72. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 24..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 73. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitrofenil)-amina 25..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 74. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitrofenil)-amina 25..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 75. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitrofenil)-amina 25 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 76. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(clorofenil)-amina 26..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 77. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(clorofenil)-amina 26 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 78. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(clorofenil)-amina 26 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 79. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromofenil)-amina 27..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 80. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromofenil)-amina 27 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 81. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromofenil)-amina 27 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 82. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 28 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 83. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 28 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 84. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 28 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 85. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 29..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 86. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 29 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 87. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 29 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 88. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2 fenilamina 30 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 89. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2 fenilamina 30**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 90. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2 fenilamina 30**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 91. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitro-fenil)-amina 31 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 92. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitro-fenil)-amina 31**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 93. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitro-fenil)-amina 31**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 94. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(cloro-fenil)-amina 32..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 95. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(cloro-fenil)-amina 32**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 96. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(cloro-fenil)-amina 32**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 97. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromo-fenil)-amina 33 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 98. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromo-fenil)-amina 33**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 99. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromo-fenil)-amina 33**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 100. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 34 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 101. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 34**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 102. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 34**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 103. Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 35 ..... **Erro! Indicador não definido.**

Espectro 104. Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 35**Erro! Indicador não definido.**

Espectro 105. Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 35**Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATRA	Ácido trans-retinóico
AZT	Zivozudina
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
d	Dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
HSA	Albumina sérica humana
HTLV-I e II	Vírus T-linfotrópico humano
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50%
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Acoplamento
Jurkat	Leucemia linfocítica de células T
K562	Leucemia eritrocítica
<i>K<sub>a</sub></i>	Constante de extensão de Stern-Volmer modificada
<i>K<sub>m</sub></i>	Constante de Michaelis
<i>K<sub>sv</sub></i>	Constante de extensão de Stern-Volmer
LLcTA	Leucemia/Linfoma de células T de adulto
M.O.	Micro-ondas
MeOD	Metanol deuterado
MT2	Leucemia linfocítica infectada com o vírus HTLV-I
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PBS	Soro bovino fetal
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SOCl <sub>2</sub>	Cloreto de tionila
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta e região visível
<i>V<sub>m</sub></i>	Velocidade da reação
αINF	Interferon-α
δ	Deslocamento químico
v	Estiramento

## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1. O Câncer.....	2
2.1.1. A leucemia/linfoma de células T do adulto e o HTLV .....	3
2.1.2. O melanoma e a enzima tirosinase .....	4
2.2. Os avanços na quimioterapia da leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) e do melanoma .....	5
2.2.1. Quimioterapia para LLcTA .....	5
2.2.2. Quimioterapia para melanoma.....	7
2.3. Os Compostos Mesoioônicos .....	9
2.3.1. Definições e aspectos históricos .....	9
2.3.2. Síntese de Compostos Mesoioônicos.....	11
2.3.3. Atividades biológicas dos mesoioônicos .....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo Geral .....	17
3.2. Objetivos Específicos .....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
4.1. Síntese dos Intermediários de Reação .....	19
4.1.1. Preparação das tiossemicarbazidas $N_1, N_4$ -dissubstituídas .....	19
4.1.2. Preparação dos aldeídos derivados do piperonal e dos ácidos cinâmicos substituídos .....	22
4.2. Síntese dos cloridratos mesoioônicos.....	25
4.2.1. Síntese dos cloridratos mesoioônicos derivados do piperonal (Série I) por irradiação de micro-ondas .....	25
4.2.2. Síntese dos cloridratos mesoioônicos da Série II através da metodologia tradicional.....	29
4.2.3. Síntese dos cloridratos mesoioônicos da Série III através da metodologia tradicional .....	33
4.2.4. Síntese dos cloridratos mesoioônicos da Série IV através da metodologia tradicional.....	36
4.3. Ensaios Biológicos .....	38
4.3.1. Estudos de inibição da enzima tirosinase para os compostos mesoioônicos derivados do piperonal (Série I) .....	38
4.3.2. Estudos de <i>docking</i> para a interação entre a tirosinase e os compostos mesoioônicos derivados do piperonal (Série I) .....	40
4.3.4. Estudos de atividade citotóxica frente a células leucêmicas para os compostos mesoioônicos da Série II .....	44

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	47
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
6.1 Materiais.....	48
6.1.1 Equipamentos.....	48
6.1.2 Reagentes e solventes.....	48
6.2. Metodologias Sintéticas.....	49
6.2.1. Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazidas $N_1, N_4$ - dissubstituídas.....	49
6.2.1.1 Caracterização espectroscópica das tiossemicarbazidas $N_1, N_4$ -substituídas .....	49
6.2.2. Procedimentos de síntese dos aldeídos aromáticos 6-X-substituídos derivados do piperonal .....	50
6.2.2.1 Caracterização espectroscópica dos derivados do piperonal .....	51
6.2.3. Procedimento geral para síntese dos ácidos cinâmicos através da reação de Knoevenagel-Doebner .....	51
6.2.3.1. Caracterização espectroscópica dos ácidos cinâmicos .....	51
6.2.4. Procedimento Geral para a Síntese dos Cloridratos Mesoiónicos da Série I através de Micro-ondas.....	52
6.2.2.1 Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos (Série I) ...	52
6.2.5. Procedimento Geral para a Síntese dos Cloridratos Mesoiónicos da Série II e III .....	54
6.2.5.1. Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos (Série II) ..	54
6.2.5.2. Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos (Série III).56	
6.2.6. Procedimento Geral para a Síntese dos Cloridratos Mesoiónicos da Série IV .....	57
6.3.1. Inibição da enzima tirosinase para os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I).....	58
6.3.2. Estudos de modelagem molecular .....	59
6.3.3. Estudos de interação com a albumina sérica humana (HSA) para os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I) .....	60
6.3.3. Ensaio de viabilidade celular frente a células leucêmicas para os compostos mesoiônicos da série II .....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62
8. ANEXO DE ESPECTROS.....	71

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública inquestionável, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que seu impacto na população corresponde a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025, segundo o documento World Cancer Report 2014 da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS) (STEWART & WILD, 2014).

No Brasil, o câncer é a segunda maior causa de morte, e a estimativa para o biênio 2016-2017, apontava a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos, sendo aproximadamente, 180 mil casos novos de câncer de pele não melanoma (INCA, 2016).

Atualmente, os métodos terapêuticos empregados contra o câncer baseiam-se em cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Nos últimos tempos, a quimioterapia apresentou um avanço significativo, com a descoberta de fármacos que apresentam eficácia parcial ou total contra alguns tipos de tumores. Entretanto, vários tumores ainda não dispõem de tratamento sistêmico e adequado, tornando-se necessário a procura de novos agentes antitumorais mais eficientes e menos tóxicos para as células sadias, para melhorar a eficácia de tratamento dessas doenças.

Diante deste panorama, compostos heterocíclicos se mostram como uma classe de substâncias promissoras para a atividade antitumoral, principalmente no que diz respeito aos compostos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio, incluindo os compostos mesoiônicos.

Neste presente trabalho é apresentado a síntese de 4 séries de compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-arilaminida, na forma de cloridratos, resultando em 24 compostos no total, sendo 20 inéditos. Posteriormente, avaliou-se a atividade citotóxica frente a três linhagens de leucemias humanas e quanto à inibição da enzima tirosinase, relacionada com o melanoma. Além disso foram realizados estudos de interação com a soro albumina humana e estudos de modelagem molecular, confirmando os resultados obtidos *in vitro*.

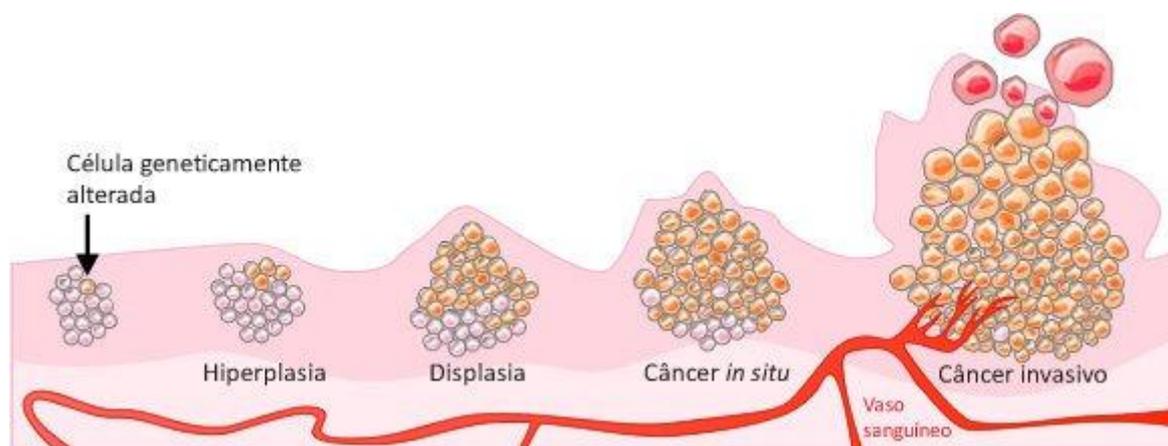
## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O Câncer

Câncer é um termo genérico para um conjunto de mais de 100 doenças que são caracterizadas pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos. Estas células dividem-se rapidamente e de maneira incontrolável, determinando a formação de tumores, que é o acúmulo de células cancerosas, ou neoplasias malignas. O câncer pode afetar quase qualquer parte do corpo e possui muitos subtipos anatômicos e moleculares que correspondem aos vários tipos de células do corpo, a velocidade de multiplicação das mesmas e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, chamado de metástase (INCA, 2016).

Em 2015, o câncer representou 8,8 milhões de mortes no mundo, sendo considerado a segunda principal causa de morte no mundo. Alguns tipos de câncer, como o de pulmão, próstata, colorretal, estomacal e hepático são os mais comuns nos homens, enquanto os cânceres mamários, colorretais, pulmonares, colo do útero e estomacais são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2018).

A proliferação celular das células cancerosas é diferente do crescimento das células normais. As células cancerosas continuam crescendo incontrolavelmente, formando outras novas células anormais. Dividem-se de forma rápida, agressiva e incontrolável, espalhando-se para outras regiões do corpo – acarretando transtornos funcionais. Na **Figura 1** podemos observar o crescimento celular das células normais e cancerígenas.



**Figura 1.** Crescimento celular em células normais e cancerosas (INCA, 2012).  
Fonte: Ilustração de Mariana F. Teles.

As causas de câncer são diversas, podendo ser externas ou internas ao organismo. As causas externas correspondem a cerca de 80 a 90% de todos os casos e estão relacionadas com o meio ambiente e hábitos do meio social. As causas internas correspondem a 10% do total de casos e estão relacionadas com questões genéticas de um indivíduo e à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade (INCA, 2018).

### 2.1.1. A leucemia/linfoma de células T do adulto e o HTLV

Dentre os diversos tipos de câncer, a leucemia é uma doença maligna dos leucócitos, geralmente, de origem desconhecida. A característica principal é o acúmulo de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. Existem diversos tipos de leucemias, sendo um deles a leucemia/linfoma de células T do adulto LLcTA (INCA, 2018).

Em 1980 foi descoberto o vírus linfotrópico para células T humanas tipo I (*Human T-cell lymphotropic virus* – HTLV-I), sendo isolado de células derivadas de paciente com linfoma cutâneo e, relacionado à leucemia/linfoma de células T do adulto (*adult T-cell leukemia/lymphoma* – LLcTA). Pouco depois da descoberta do HTLV-I, foi isolado outro retrovírus, o HTLV-II, que tem semelhança com o HTLV-I em 66% das sequências genômicas (GONÇALVES et.al., 2010; BITTENCOURT et.al., 2006).

Estima-se que haja no mundo cerca de 5 a 10 milhões de portadores de HTLV-I, sendo considerado endêmico, porém as taxas de soroprevalência diferem em diferentes regiões (GESSAIN & CASSAR, 2012). O HTLV-I pode ser transmitido ao indivíduo por: via vertical, através da amamentação ou através de relação sexual; por via parenteral, através de transfusão sanguínea ou pelo uso compartilhado de instrumentos perfurocortantes contaminados (BITTENCOURT et.al., 2007). O HTLV-I pode infectar diversos tipos celulares como linfócitos B, linfócitos T, fibroblastos e monócitos, possuindo tropismo especial por células T CD4+. A transmissão do HTLV-I no organismo ocorre, principalmente, célula a célula, havendo transferência do material viral de célula infectada para célula não infectada (BANGHAM, 2003).

Embora a maioria dos portadores do HTLV-I não desenvolva doenças associadas, alguns deles podem manifestar enfermidades de difícil controle, como a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA), a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I (HTLV-I – *associated myelopathy/tropical spasticparaparesis*– HAM/TSP), que envolve a medula espinhal, considerada uma doença incapacitante e, a dermatite infecciosa, que é um tipo de eczema infantil (BITTENCOURT et.al., 2006; KAMOI & MOCHIZUKI, 2012). O HTLV-1 age lentamente dentro do organismo, portanto, as doenças causadas pelo vírus podem emergir na idade adulta mesmo quando a infecção ocorreu no início da vida (TAJIMA & HINUMA, 1992). Os portadores de HTLV-1 tornam-se mais propensos a desenvolver outras doenças infecciosas, devido à desregulação do sistema imunológico, causando linfoproliferação espontânea e aumento da ativação das células T (CARVALHO et.al., 2001).

O diagnóstico de infecção pelo HTLV-1 é realizado através da determinação de anticorpos contra o vírus pelo método ELISA e a confirmação pelo Western Blot (WB), este último, está em processo de incorporação no Sistema Único de Saúde (SUS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As formas clínicas do LLcTA podem ser classificadas em quatro subtipos: leucêmico agudo, linfoma, crônico e *smoldering* (indolente). Além destes subtipos bem definidos, existe ainda um estado limítrofe entre indivíduos assintomáticos e LLcTA, que é denominado como fase pré-LLcTA, quando existe a presença de linfócitos atípicos circulantes que podem desaparecer espontaneamente (SILVA et.al., 2002).

A leucemia/linfoma de células T do adulto quando apresentado nas formas clínicas mais agressivas (linfoma e aguda) é uma doença que possui baixa resposta ao tratamento por quimioterapia, sendo considerada de alta letalidade. Estima-se uma sobrevida de no máximo 12 meses, mesmo sob tratamento (BITTENCOURT et.al., 2007).

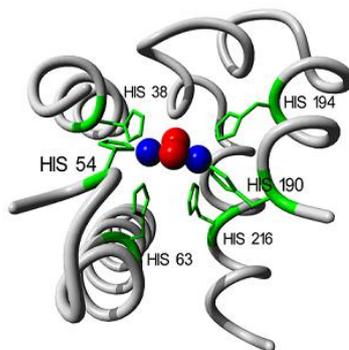
### 2.1.2. O melanoma e a enzima tirosinase

Segundo informações obtidas no site do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos e tem predominância em adultos brancos. Embora o câncer de pele seja o mais frequente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no País, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. Dados de 2013 apontam 1.547 casos de melanoma que culminaram em óbitos. A estimativa é que aumente o número de casos deste tipo de câncer a cada ano no Brasil (INCA, 2016).

Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevivência dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor, pois é fato que o prognóstico desse tipo de câncer é considerado bom, se detectado nos estágios iniciais. Portanto, estudos sobre a biologia molecular do melanoma cutâneo buscando a identificação de marcadores moleculares são interessantes na previsão do diagnóstico e na melhoria do prognóstico dos indivíduos com essa doença. Marcadores imuno-histoquímicos (Mel-CAM), enzimáticos (tirosinase), protéicos (integrinas; ICAM-1; ciclina D1) e genéticos (CDKN2A; p53; p21) podem ser utilizados para esse fim. Devido a isso, foi observado um grande avanço nos estudos do desenvolvimento dos mecanismos patogênicos do melanoma maligno (FIGUEIREDO et. al., 2003).

Alguns estudos realizados identificaram a presença da enzima tirosinase em todos os melanomas estudados, além de detectar a reatividade de 100% dos melanomas para o anticorpo HMB-45, que é um anticorpo monoclonal que reage com uma proteína chamada gp100 localizada dentro dos melanossomas. Tanto HMB-45, como os anticorpos contra tirosinase, são usados como marcadores imuno-histoquímicos no diagnóstico diferencial do melanoma maligno (FIGUEIREDO et. al., 2003).

A enzima tirosinase (E.C.1.14.18.1) também conhecida como fenoloxidase, é uma metaloenzima contendo cobre, amplamente distribuída em plantas, microorganismos e animais (**Figura 2**) (SEO et.al., 2003). É considerada como sendo uma enzima essencial para a biossíntese da melanina no processo de melanização (WU et. al., 2015). Nos mamíferos, ela está envolvida na transformação da L-tirosina para dopaquinona através de duas etapas, sendo uma hidroxilação seguida de uma oxidação. A dopaquinona será transformada posteriormente através de várias reações para produzir a melanina, pigmento responsável não apenas em definir importantes características fenotípicas humanas, mas principalmente na ação de fotoproteção devido à sua capacidade de absorver a radiação ultravioleta (VIDEIRA et al., 2013).



**Figura 2.** Representação da enzima tirosinase (Fonte: <http://www.ac.uni-kiel.de/de/tuczek/forschungsgebiete/sauerstoffaktivierung>)

A ação inibidora sobre a atividade da tirosinase é um objetivo importante no tratamento de distúrbios relacionados com pigmentação e no desenvolvimento de agentes de branqueamento ou agentes quimioterápicos (WU et. al., 2015). Vários compostos naturais ou sintéticos são relatados na literatura como inibidores da tirosinase (BRANDÃO et al., 2010; WANG et al., 2014; CHAN et al., 2014). Os inibidores mais populares foram a arbutina e o ácido kójico que, após a descoberta de efeitos secundários graves, levou a limitação do seu uso humano, estimulando a procura de novos inibidores de tirosinase, sejam naturais ou sintéticos (SILVÉRIO; CASTRO; MIRANDA, 2013).

## 2.2. Os avanços na quimioterapia da leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) e do melanoma

### 2.2.1. Quimioterapia para LLcTA

Embora a quimioterapia para o tratamento de diversos tipos de câncer tenha avançado ao longo dos anos, o tratamento da LLcTA está aquém do ideal. Os fatores que estão associados à falência do tratamento, geralmente, são:

Resistência à quimioterapia convencional,

Aumento de proteínas responsáveis pela resistência a múltiplas drogas (MDR),

Disfunções hepáticas ou renais,

Estado de imunodeficiência levando a infecções bacterianas, parasitárias e fúngicas no decorrer do tratamento quimioterápico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

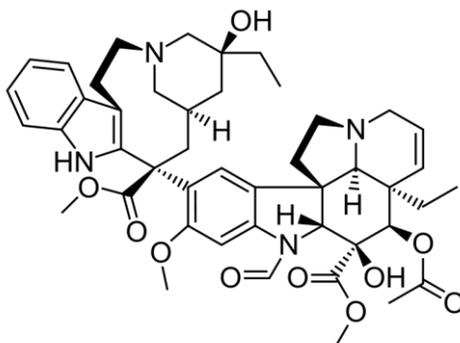
Na literatura estão descritas diversas formas de tratamento e a estratégia mais utilizada é o uso de CHOP, podendo vir seguido do uso de etoposídeo, vindesina, ranimustina e mitoxantrona com fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos (GCSF) (TAGUCHI et al., 1996; KATO & AKASHI, 2015). O CHOP (**Figura 3**) é um coquetel utilizado para tratar as formas linfomatoso e aguda da LLcTA. Consiste em:

(C) ciclofosfamida: um agente de alquilação que danifica o DNA por ligação a ele e provoca a formação de ligações cruzadas.

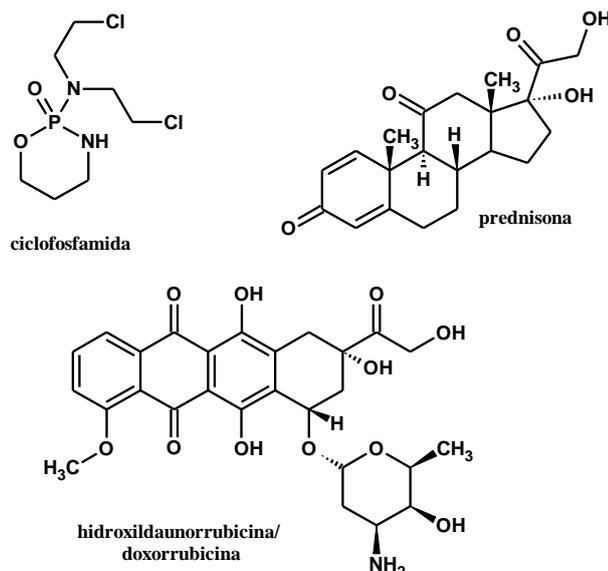
(H) hidroxildaunorubicina (adriamicina): um agente de intercalação de DNA (danifica inserindo-se entre as bases de DNA).

(O) oncovin (vincristina), que impede que as células de duplicação através da ligação à proteína tubulina

(P) prednisona, que é um corticoide que age nas citocinas (processo inflamatório).



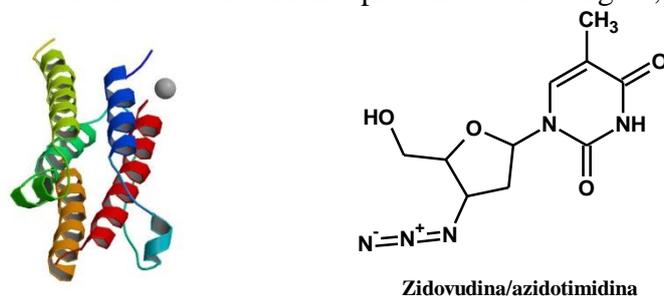
Oncovin/vincristina



**Figura 3.** Estruturas químicas dos fármacos que compõem o coquetel CHOP utilizado na quimioterapia de LLcTA.

Aqueles que apresentaram remissão completa (RC) ou parcial (RP) recebiam etoposídeo ( $50 \text{ mg/m}^2$ ) como tratamento de manutenção. As principais toxicidades deste esquema foram pancitopenia, neurite periférica e alopecia. No entanto, apesar da introdução de etoposídeo, a taxa de sobrevida mediana não ultrapassou nove meses para grande maioria dos casos e de 3 anos para 13% dos casos (TAGUCHI et al., 1996).

O tratamento mais utilizado no momento para LLcTA, principalmente nos casos menos agressivos da doença, é o uso de antivirais como a zidovudina (AZT) e interferon alfa ( $\alpha\text{INF-2b}$ ) (**Figura 4**) devido a sua baixa toxicidade e aos bons efeitos em causar remissão e prolongar a sobrevida. Embora o verdadeiro mecanismo de ação não seja completamente esclarecido, sugere-se que haja um efeito imunológico do  $\alpha\text{INF}$  associado ao efeito citostático do AZT nas células linfoides. Em pacientes que apresentam LLcTA agressivo, geralmente o tratamento é realizado com quimioterapia, antivirais e / ou transplante de medula óssea (TSUKASAKI et al., 2009). Para esses casos, o curso clínico é lento, até ocorrer à progressão da doença para forma aguda e não existem evidências de que o tratamento quimioterápico evitara essa transformação. O tratamento ainda poderá aumentar a morbidade, devido à imunodeficiência, levando a episódios de infecções e resistência aos quimioterápicos. Portanto, é recomendado o tratamento preventivo antifúngico, antiparasitário e antiviral.

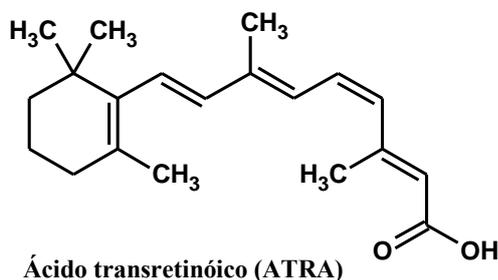


**Figura 4.** Estruturas do Interferon alfa ( $\alpha\text{INF}$ ) (Fonte: RCSB Protein Data Bank) e da zidovudina (AZT).

Estudos realizados por Hodson e colaboradores (2011), demonstraram que a inclusão de AZT /  $\alpha\text{INF}$  quando combinado com o tratamento quimioterápico convencional (CHOP), apresentou uma sobrevida melhor em comparação com a quimioterapia isolada. Em LLcTA

aguda, e a taxa de resposta para quimioterapia com AZT foi de 58%, com uma taxa de remissão completa (RC) de 42%. A quimioterapia isolada era inferior, com uma taxa de remissão completa de 31% (BAZARBACHI et al., 2010; HODSON et al., 2011).

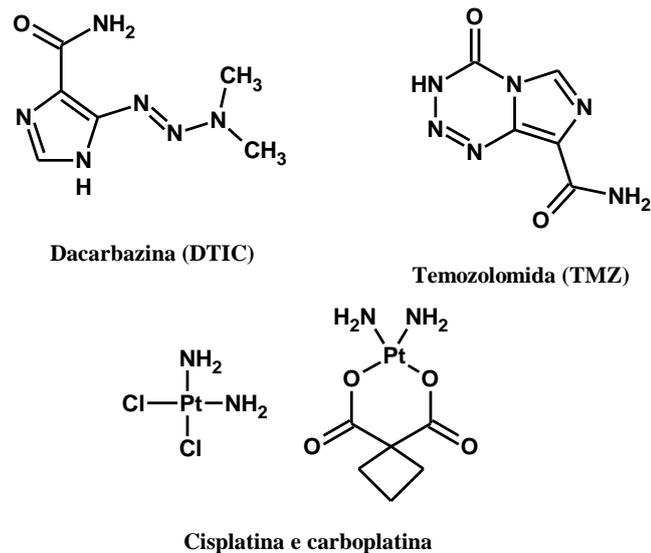
Atualmente, outros agentes quimioterápicos têm sido utilizados como possibilidade terapêutica para a LLcTA, como por exemplo, o ácido *trans*-retinóico (ATRA) (**Figura 5**) que inibe o crescimento das células da LLcTA *in vitro* e induz apoptose suprimindo a atividade de transcrição da proteína NF-κB no ciclo celular (MAEDA et.al., 2000; NAWATA et.al., 2001). Outro modificador biológico é o trióxido de arsênio (extremamente tóxico), que inibe o crescimento e induz apoptose das células infectadas pelo HTLV-I através da ativação da via das caspases e pela inativação da via NF-κB. Esta substância deve ser utilizada em associação com αINF ou ATRA, pois estudos sugerem que seu uso isoladamente poderia aumentar a produção viral e o número de células infectadas (MAEHIEUX et al., 2001).



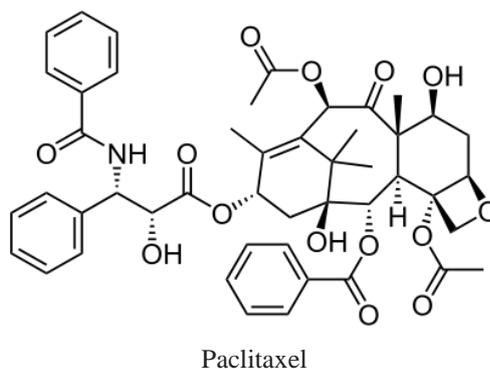
**Figura 5.** Estrutura química do ácido *trans*-retinóico (ATRA).

### 2.2.2. Quimioterapia para melanoma

O tratamento clínico aplicável para o melanoma é uma cirurgia combinada com radiação e quimioterapia. A cirurgia é a escolha de tratamento para melanoma cutâneo localizado (BATUS, et.al., 2013). Alguns dos quimioterápicos para melanoma maligno incluem dacarbazina (DTIC), temozolomida (TMZ), paclitaxel e compostos de platina. As estruturas químicas desses compostos podem ser observados nas **Figuras 6 e 7**. No entanto, a taxa de resposta para um único quimioterápico é inferior a 20%, e esses fármacos possuem muitos efeitos colaterais (MOUAWAD et.al., 2010). A resistência à quimioterapia também é um desafio no tratamento de melanoma maligno, portanto, uma orientação mais adequada para o tratamento e o controle da resistência à quimioterapia são importantes para melhorar a eficácia global (MARKMAN et.al., 2013; KAPSE-MISTRY et.al., 2014).



**Figura 6.** Estruturas químicas de compostos aplicáveis ao tratamento do melanoma.

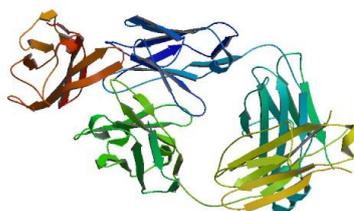


**Figura 7.** Estrutura química do Paclitaxel.

Uma revisão elaborada por Tang e colaboradores (2017) relata as diversas aplicações antitumorais da nanomedicina, incluindo a quimioterapia, interferência de RNA, terapia fototérmica e terapia fotodinâmica. Neste trabalho, o autor aponta que a nanomedicina permite que existam estruturas efectoras no local do tumor através de uma segmentação passiva ou ativa, permitindo maior especificidade terapêutica e redução dos efeitos colaterais (TANG et al., 2017).

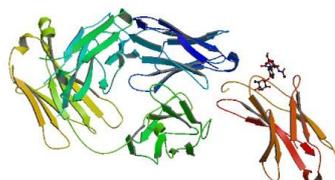
De acordo com o trabalho descrito por Larkin e colaboradores (2015), a combinação de ipilimumab e nivolumab é promissor como um tratamento não só para melanoma metastático mas também para outros tipos de cancer. A taxa de resposta de 50% em pacientes com doença avançada é consideravelmente superior ao alcançado com qualquer outro tipo de terapias até agora. Embora os agentes quimioterápicos atinjam diferentes caminhos moleculares, os mecanismos que eles usam para reforçar a atividade antitumoral das células T contra esses cânceres mortais estão intimamente relacionados.

O ipilimumab, aprovado para o tratamento do melanoma em 2011, representa um dos avanços mais significativos no tratamento de melanoma avançado nos últimos 30 anos. O mecanismo de ação consiste em bloquear o antígeno citotóxico de linfócitos T 4 (CTLA-4) proteína, o que retarda a ativação das células T (**Figura 8**) (WEBER et al., 2016; FDA, 2011).



**Figura 8.** Estrutura do inibidor Ipilimumab ligado ao CTLA-4 humano (**Fonte:** RCSB Protein Data Bank).

O nivolumab é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina G4 (IgG4) cujo mecanismo de ação consiste em se ligar ao receptor de morte programada 1 (PD-1) (**Figura 9**) e bloqueia sua interação com PD-L1 e PD-L2, potencializando as respostas das células T, incluindo respostas antitumorais. Este fármaco pertence à classe dos imunoterápicos que foi aprovado pela ANVISA em 2016 para uso em casos de câncer de pulmão e melanoma que não pode ser extraído por cirurgia ou que já possua metástase (ANVISA, 2016).



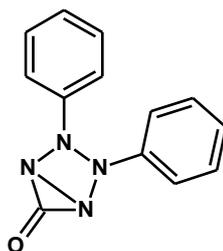
**Figura 9.** Estrutura do complexo de PD-1 e nivolumab-Fab (**Fonte:** RCSB Protein Data Bank).

O melanoma ainda é difícil de curar e as taxas de incidência aumentaram mais rapidamente nos últimos anos. É necessário a busca de novos agentes antineoplásicos mais eficientes, específicos e menos tóxicos. Neste contexto, compostos heterocíclicos se mostram como uma classe de substâncias promissoras para a atividade anticâncer, principalmente no que diz respeito aos compostos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio, incluindo os compostos mesoiônicos.

## 2.3. Os Compostos Mesoiónicos

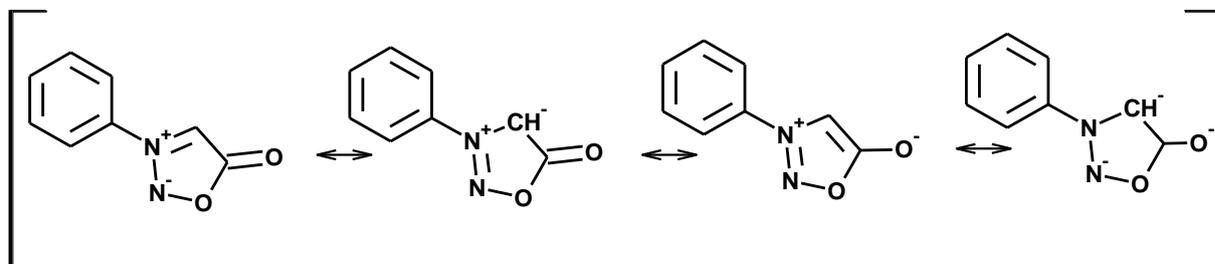
### 2.3.1. Definições e aspectos históricos

Os compostos classificados como mesoiônicos têm sido objeto de estudos desde 1882 quando Emil Fisher e Emil Besthorn sintetizaram o primeiro composto (ATHAYDE-FILHO et. al., 2011). Na época não se conheciam suas estruturas e foram propostas como bicíclicas. O primeiro composto a ser descrito foi a desidrotizona (**Figura 10**).



**Figura 10.** Estrutura química da desidroditizona proposta por Fisher e Besthorn em 1882.

Em 1949, em um estudo desenvolvido por Baker e colaboradores, foi criado o termo “mesoiônico”, sendo uma junção das palavras “mesomérico” e “iônico”, por serem compostos heterocíclicos que possuem características que oscilam entre os compostos mesoméricos e iônicos. Essa definição pode ser ilustrada através de estruturas canônicas para a sidnona, representando híbridos de ressonância (**Figura 11**). Além disso, Baker alegava que a sidnona não podia ser representada apenas por uma estrutura totalmente covalente ou polar. (BADAMI, 2006).

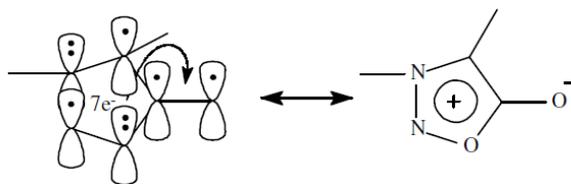


**Figura 11.** Formas canônicas da *N*-fenilsidnona.

O conceito de mesoiônico foi apresentado por Ollis e Ramsden (1976), da seguinte forma: "Um composto pode ser considerado mesoiônico se for um heterociclo de cinco membros que não pode ser representado satisfatoriamente por qualquer estrutura covalente ou polar e possui um sexteto de elétrons em associação com os cinco átomos do anel". Isso implica, embora não tenha sido especificado, caráter aromático. Em 1978, Potts também apresentou uma definição de compostos mesoiônicos, semelhante ao de Ollis e Ramsden, embora ele fosse mais específico em considerar que eles são aromáticos.

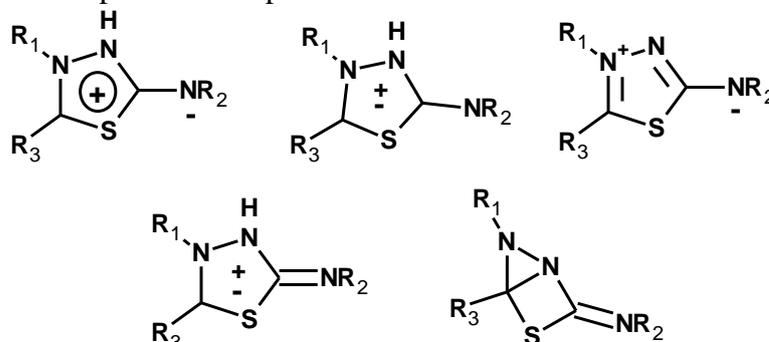
Um novo conceito foi proposto para os mesoiônicos fundamentado em estudos de difração de raios-X, cálculos teóricos e de reatividade química, sugerindo que o anel deve constituir um sistema planar ou quase planar, juntamente com o átomo  $\alpha$ -exocíclico e ainda possuir uma substancial separação de carga levando aos valores de momento dipolar em torno de 5 D (CHEUNG et al., 1992; ECHEVARRIA et al., 1992).

Cheung e colaboradores (1992) concluíram que a aromaticidade dos derivados da sidnona poderia ser explicada pela teoria clássica do sexteto de elétrons. Um total de sete elétrons  $2p_z$  é distribuído pelos cinco átomos do anel sendo um deles localizado no átomo exocíclico. O sexteto de elétrons vai ser obtido quando um dos sete elétrons  $2p_z$  estiver pareado com o elétron do átomo exocíclico. O círculo, normalmente utilizado na representação destas estruturas, indica a deslocalização dos seis elétrons como mostra a **Figura 12**. Esta polarização de cargas é evidenciada por grandes momentos dipolares (4-6 Debyes) para os compostos mesoiônicos.



**Figura 12.** Sobreposição dos orbitais p do anel das sidnonas (BADAMI, 2006).

Neste trabalho usaremos a definição dada por Oliveira e colaboradores (1996), que definem estes compostos como sendo: betaínas planas com cinco membros com pelo menos uma cadeia lateral cujo átomo  $\alpha$  também está no plano do anel e com momentos dipolo da ordem de 5D ( $1D = 3,33564 \times 10^{-30} \text{ cm}^{-1}$ ). Os elétrons estão deslocalizados sobre duas regiões: o anel e a cadeia lateral, separadas por duas ligações essencialmente simples. Uma região, a qual inclui o átomo  $\pi$  da cadeia lateral, está associada com o HOMO e uma carga  $\pi$  “negativa”, enquanto a outra está associada com o LUMO e uma carga  $\pi$  “positiva”. Os compostos mesoiônicos podem ser representados conforme demonstrado na **Figura 13**.



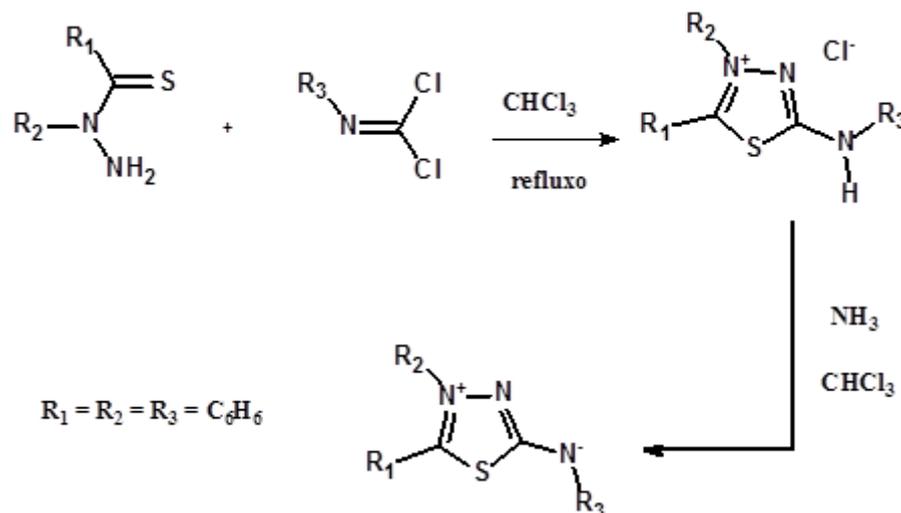
**Figura 13.** Representações alternativas para os compostos mesoiônicos (SILVA, 1997).

Devido às suas características estruturais especiais os mesoiônicos, ao longo dos anos, têm sido alvo de inúmeros estudos nas mais diversas áreas, podendo-se destacar pesquisas na área de cristais líquidos (SATO, 1996), na confecção de materiais com propriedades óticas não-lineares (MOURA et al., 1994), na síntese de corantes (EDWARD & SHEFFLER, 1979), como agentes anticorrosivos (CUNHA et al., 2009; ROSSI, 2007) e, principalmente, nas pesquisas em função de suas atividades biológicas bastante diversificadas.

### 2.3.2. Síntese de Compostos Meso-iônicos

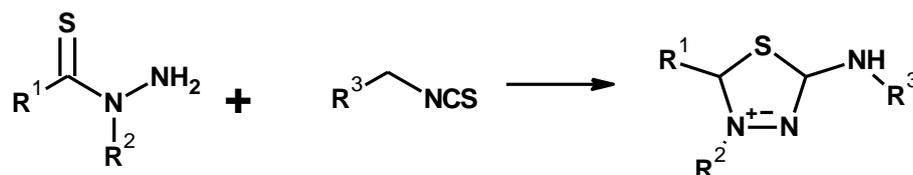
Diversas metodologias para a síntese de compostos mesoiônicos são encontradas na literatura, específicas para cada classe desses heterociclos. Neste presente trabalho, foram sintetizados compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida. Portanto, algumas rotas de síntese para compostos dessas classes são apresentadas a seguir.

Ollis e Ramsden (1971) relataram a primeira síntese de derivados da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminida, que consiste na reação de *N*-tioacilidrazinas com dicloretos de isocianetos de arila gerando os respectivos cloridratos (**Figura 14**), que originam as correspondentes bases livres a partir do tratamento das soluções em clorofórmio com amônia gasosa (OLLIS & RAMSDEN, 1971).



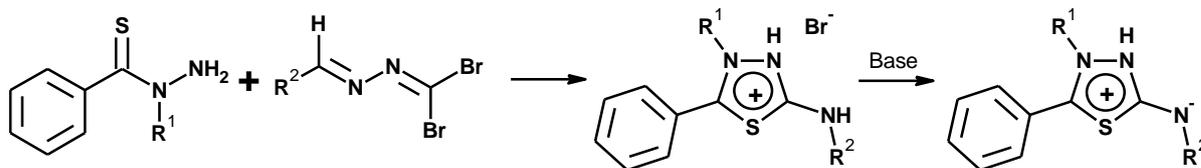
**Figura 146.** Síntese de mesoiônicos utilizando *N*-tioacilidrazinas e dicloretos de isocianetos de arila (OLLIS & RAMSDEN, 1971).

Posteriormente, Newton e colaboradores (1982) relataram metodologia para a síntese de compostos mesoiônicos envolvendo a condensação de *N*-alquil-*N*-tioacetilidrazinas com isotiocianatos substituídos com grupos alquila ou benzila (**Figura 15**).



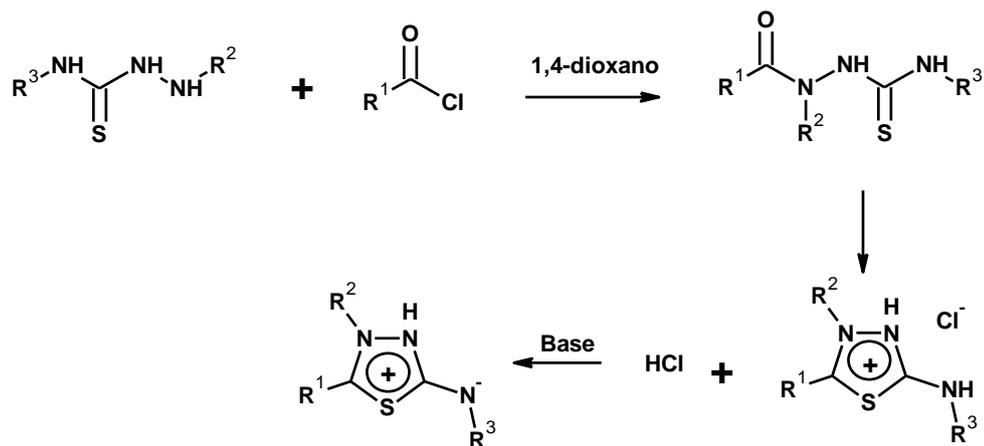
**Figura 15.** Síntese de mesoiônicos utilizando *N*-alquil-*N*-tioacetilidrazinas com isotiocianatos substituídos com grupos alquila ou benzila (NEWTON et al., 1982).

Em outro trabalho, foi descrito a síntese dos mesoiônicos da classe dos tiadiazólio-fenilaminidas a partir de dibromodiazobutadienos substituídos e *N*-tiobenzoilidrazinas, também substituídas (**Figura 16**) (NEWTON et al., 1982).



**Figura 76.** Síntese de mesoiônicos utilizando dibromodiazobutadienos substituídos e *N*-tiobenzoilidrazinas, também substituídas (NEWTON et al., 1982).

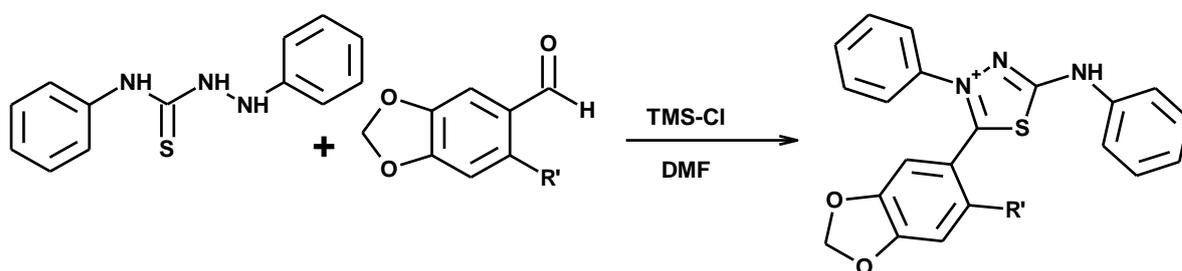
Um outro método utilizado para a obtenção dos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminidas é através da reação de desacilação anidra dos intermediários acil-tiossemicarbazidas, obtidos a partir dos correspondentes cloretos de ácidos e tiossemicarbazidas substituídas (**Figura 17**) (MACIEL et al., 1998).



**Figura 17.** Síntese de mesoiônicos utilizando cloretos de ácido e tiossemicarbazidas substituídas (MACIEL et al., 1998).

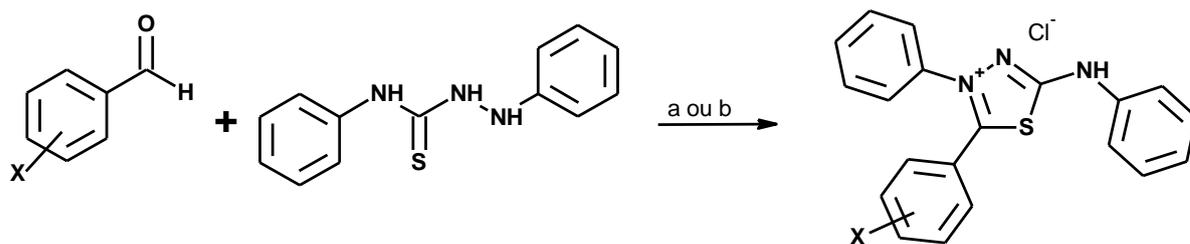
Uma abordagem alternativa utilizada para sintetizar os compostos mesoiônicos foi apresentada por Kappel e colaboradores (2004), envolvendo a ciclização entre um aldeído ligado a resina e uma tiossemicarbazida 1,4-dissubstituída na presença de TMS-Cl, seguido da clivagem do suporte sólido com o anel tiadiazólio resultante (KAPPEL et al., 2004).

Posteriormente, Ferreira e colaboradores (2008) relataram a síntese de derivados da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilaminidas utilizando como reagentes a 1,4-difeniltiossemicarbazida, aldeídos aromáticos e cloreto de trimetilsilano como catalisador (**Figura 18**) (FERREIRA et al., 2008).



**Figura 18.** Síntese de mesoiônicos utilizando aldeídos aromáticos e 1,4-difeniltiossemicarbazida (FERREIRA et al., 2008).

Uma nova e eficiente síntese de derivados da classe 1,3,4-tiadiazolium-2-fenilaminas foi descrita por Reis e colaboradores (2011), utilizando cloreto de tionila ou cloreto de trimetilsilano como catalisadores sob irradiação de micro-ondas (a) ou de ultrassom (b) (**Figura 19**). Os compostos foram obtidos com bons rendimentos e em tempo extraordinariamente curtos quando comparados com a metodologia descrita anteriormente por Ferreira e colaboradores (2008). Os melhores rendimentos foram obtidos usando irradiação de micro-ondas e, de maneira geral, usando o cloreto de tionila ao invés de cloreto de trimetilsilano (REIS et al., 2011).

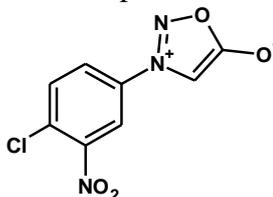


**Figura 89.** Síntese de derivados da classe 1,3,4-tiadiazolio-2-fenilaminas. Reagentes e Condições: 1,4-dioxano, ácido de Lewis ( $\text{SOCl}_2$  ou TMS-Cl), MO, durante 5 min (a) ou durante 10 min (b) (REIS et al., 2011).

### 2.3.3. Atividades biológicas dos mesoiônicos

Os compostos mesoiônicos possuem características estruturais, que tem despertado um considerável interesse nos pesquisadores envolvidos na área da Química Medicinal. Este potencial como substâncias bioativas tem sido atribuído, até o momento, aos seguintes fatores: caráter aromático; anéis heterocíclicos de pequenos tamanhos; sistema altamente polarizável; caráter final neutro, apesar da presença de cargas formais; variação de densidade eletrônica no anel; e às várias possibilidades da presença de heteroátomos diferentes, levando a capacidade de atravessar membranas celulares (SILVA, 1997).

Relatos há alguns anos, mostraram que derivados da sidnona apresentaram importantes atividades antitumorais contra o carcinoma de Ehrlich e o Sarcoma 180, além de toxicidade *in vitro* em várias linhas de células tumorais, sendo a SYD-1 a mais ativa (**Figura 20**) (GRYNBERG et al., 1992). Em estudo recente foi avaliada a atividade antitumoral deste composto mesoiônico contra o carcinosarcoma Walker-256. As células tumorais foram inoculadas subcutaneamente no membro traseiro de ratos Wistar machos. Os animais foram tratados oralmente durante 12 dias com SYD-1 (75 mg/kg) ou veículo. No final do tratamento, diminuiu consideravelmente o volume e peso tumoral nos animais tratados (GALUPPO et al., 2016). Em outro trabalho foi avaliado a atividade antitumoral em células humanas de câncer de fígado (HepG2) resultados mostram que o SYD-1 é capaz de alterar o metabolismo das células HepG2 e sugerir que sua citotoxicidade está relacionada ao comprometimento de metabolismo mitocondrial, indicando que o SYD-1 apresenta-se como candidato potencial para o tratamento com hepatocarcinoma (BRANDT et al., 2016).

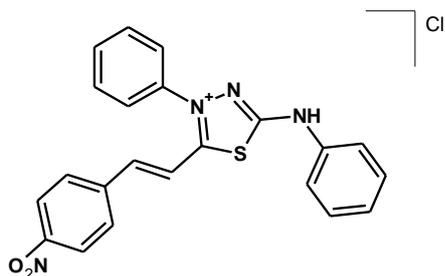


**Figura 20.** Estrutura química da SYD-1 com atividade antitumoral frente a carcinosarcoma Walker-256 (GALUPPO et al., 2016).

Senff-Ribeiro e colaboradores estudaram a atividade antimelanoma de linhagem humana e a relação estrutura-atividade dos cloridratos mesoiônicos da série 1,3,4-tiadiazólio, encontrando excelentes resultados para o derivado cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-estiril)-1,3,4-tiadiazolio-2-fenilamina (MI-D) (**Figura 21**), inibindo o crescimento de células tumorais em até 85% (SEFFF-RIBEIRO et al., 2003; SENFF-RIBEIRO et al., 2004).

Posteriormente, em trabalho realizado por Reis e colaboradores (2011) foram sintetizados oito derivados da classe 1,3,4-tiadiazolio-2-fenilaminas. A citotoxicidade destes compostos foi avaliada frente à linhagem de leucemia humana K562 e do linfoma Daudi,

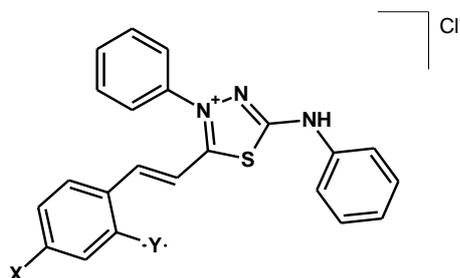
apresentando resultados promissores para o derivado nitro-substituído (MI-D) (REIS et al., 2011).



**Figura 21** Estrutura química do cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitrocinamoil)-1,3,4-tiadiazolium-2-fenilamina (MI-D) com atividade antimelanoma e citotóxica frente a linhagens de leucemias (SEFFF-RIBEIRO et al., 2003; SEFFF-RIBEIRO et al., 2004; REIS et al., 2011).

Em outro estudo realizado por Gozzi e colaboradores (2015), foi avaliado a citotoxicidade de compostos mesoiônicos (**Figura 22**) em células humanas de câncer de fígado (HepG2). Os resultados obtidos indicam que os compostos mesoiônicos induzem apoptose ou necrose das células. Foi possível concluir que os compostos da classe 1,3,4-tiadiazolium, especialmente o derivado hidroxilado MI-J, são candidatos promissores para investigações futuras em tratamento *in-vivo* (GOZZI et al., 2015).

Recentemente, Pires e colaboradores (2016) avaliaram parâmetros de estresse oxidativo utilizando mitocôndrias de fígado de rato para os mesmos derivados da classe 1,3,4-tiadiazolium-2-fenilamina (**Figura 22**). Os resultados apontaram que estes derivados exercem importantes efeitos antioxidantes nas mitocôndrias isoladas.



**Figura 22.** Estrutura química dos derivados mesoiônicos que foram avaliados quanto aos efeitos antioxidantes em mitocôndrias: Cloridrato de 4-fenil-5-(2'-Y-4'-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazolium-2-fenilamina: MI-J (X = OH; Y = H), MI-4F (X = F; Y = H), MI-2,4diF (X = Y = F) e MI-D (X = NO<sub>2</sub>; Y = H) (PIRES et al., 2016).

Em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, Paiva e colaboradores (2015) avaliaram a atividade biológica de 16 compostos mesoiônicos cloretos de 4-fenil-5-(4'-X-estiril)-1,3,4 tiadiazólio-2-fenilamina (série I) e cloretos de 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'-Y-fenilamina) (série II), contra diferentes fungos micotoxigênicos. O melhor resultado encontrado foi para o derivado metoxilado (**Figura 23**) contra *F. verticillioides* com valor de MIC 7,8 µg/mL, indicando a importância do grupamento doador de elétrons para a atividade antifúngica. Para os compostos mais ativos, foi avaliada a concentração total de lipídios da membrana fúngica através de RTLC e ficou evidenciado que esses compostos inibem a biossíntese do ergosterol essencial para a sobrevivência do fungo. O mecanismo de ação destes compostos ainda não foi bem compreendido, mas pode envolver a inibição do crescimento de *F. verticillioides*, controlando a produção micotóxica do fungo.



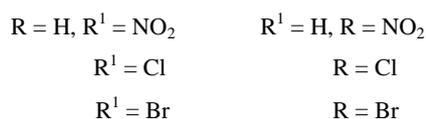
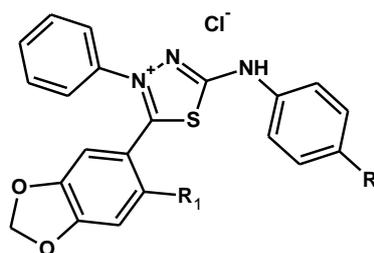
### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

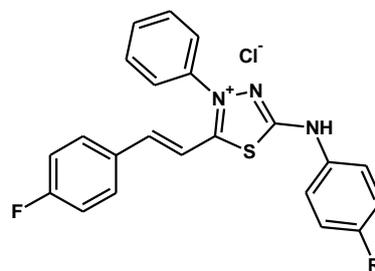
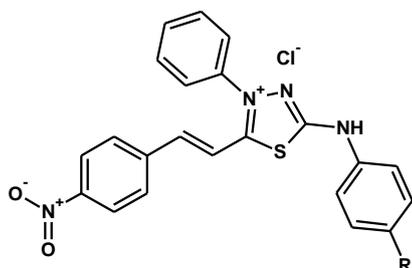
Sintetizar 4 séries de compostos mesoiônicos da classe 1,3,4- tiadiazólio-2-aminida, na forma de cloridratos, e avaliar atividade citotóxica e inibitória da tirosinase.

#### 3.2. Objetivos Específicos

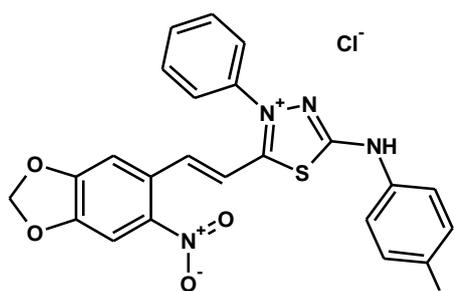
a) Sintetizar uma série de cloridratos mesoiônicos a partir de diferentes aldeídos derivados do piperonal 6-X-substituídos e das  $N^1$ -fenil- $N^4$ -(4'-X-fenil)-tiossemicarbazidas (Série I);



b) Sintetizar duas séries de cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio a partir dos ácidos  $p$ -NO<sub>2</sub> e  $p$ -F-cinâmicos e das  $N^1$ -fenil- $N^4$ -(4'-X-fenil)-tiossemicarbazidas (Série II e Série III);



c) Sintetizar uma série de cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio a partir do ácido cinâmico derivado do piperonal 6-NO<sub>2</sub>-substituído e das  $N^1$ -fenil- $N^4$ -(4'-X-fenil)-tiossemicarbazidas (Série IV);



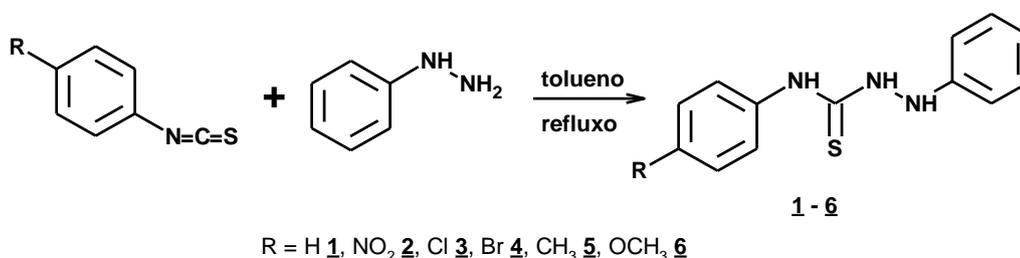
- d) Avaliar a atividade de inibição da tirosinase, para os compostos da Série I;
- e) Relacionar os resultados experimentais obtidos com ensaios biológicos experimentais frente a soro albumina humana e teóricos de modelagem molecular da Série I;
- f) Avaliar a atividade citotóxica dos compostos da Série II frente a linhagens de leucemias humanas sendo uma infectada pelo vírus HTLV-I.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste presente trabalho foram preparadas 4 séries de compostos heterocíclicos da classe dos 1,3,4-tiadiazólio-2-arilaminidas a partir da utilização de tiossemicarbazidas  $N_1, N_4$ -dissubstituídas e aldeídos derivados do piperonal ou ácidos cinâmicos como intermediários de reação, totalizando 24 compostos (20 inéditos). Esses compostos foram devidamente caracterizados pelos métodos convencionais de análise e, posteriormente, encaminhados para ensaios biológicos. Os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (série I), foram avaliados quanto a inibição da enzima tirosinase, assim como foram realizados estudos de interação com a albumina sérica humana (LOPES et al., 2018). Os compostos mesoiônicos derivados do ácido 4-nitro-cinâmico (série II) foram avaliados quanto a atividade citotóxica frente a linhagens de células leucêmicas humanas e leucêmica infectada com o vírus HTLV-1.

### 4.1. Síntese dos Intermediários de Reação

#### 4.1.1. Preparação das tiossemicarbazidas $N_1, N_4$ -dissubstituídas



As tiossemicarbazidas  $N_1, N_4$ -dissubstituídas **1** - **6** foram preparadas de forma eficiente a partir da reação entre fenil-hidrazina e os aril-isotiocianatos correspondentes, em meio de tolueno como solvente através da metodologia tradicional, com 1 hora de agitação a temperatura ambiente (Reis, 2008). Esta metodologia permitiu a obtenção dos produtos desejados com grau de pureza e rendimentos satisfatórios variando de 68-95%. A **Tabela 1** apresenta os rendimentos obtidos para as tiossemicarbazidas.

Todos os compostos foram analisados por cromatografia em camada fina, para verificar a pureza dos mesmos, e caracterizados através de ponto de fusão e da análise dos espectros de IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e, os valores encontrados estão de acordo com a literatura (BRITTO et al., 2006).

**Tabela 1.** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para as tiossemicarbazidas

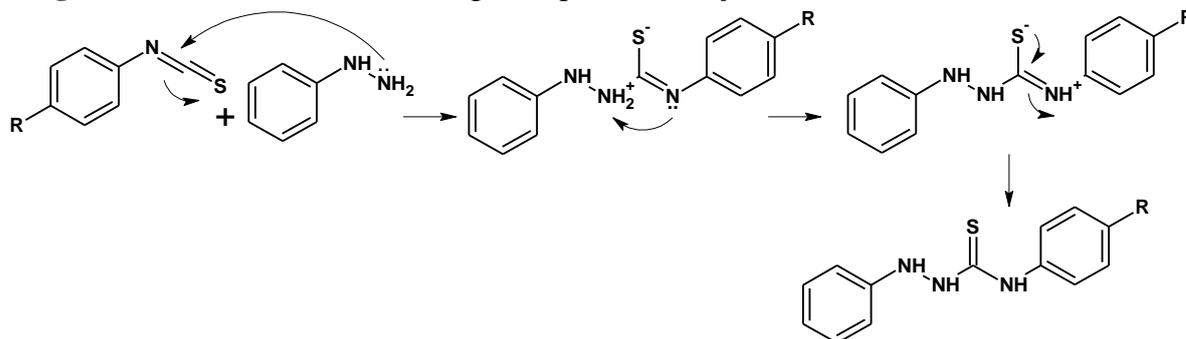
Composto	R	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C) / Lit.
<b>1</b>	H	93	171-173 / 178 <sup>a</sup>
<b>2</b>	NO <sub>2</sub>	95	233-234 / 234-236 <sup>b</sup>
<b>3</b>	Cl	68	233-234 / 202-204 <sup>b</sup>
<b>4</b>	Br	93	209-212 / 207-208 <sup>b</sup>
<b>5</b>	CH <sub>3</sub>	78	174-175 / 177-179 <sup>b</sup>
<b>6</b>	OCH <sub>3</sub>	80	184-185 / 184-186 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> CAS; <sup>b</sup> BRITTO et al., 2006

#### ➤ Proposta do mecanismo de reação para a obtenção das tiossemicarbazidas

O mecanismo sugerido para a obtenção das tiossemicarbazidas inicia-se com o ataque nucleofílico do nitrogênio terminal da fenil-hidrazina ao carbono eletrofílico do isotiocianato,

e posteriormente, a ligação C=S é restabelecida originando a tiossemicarbazida de interesse. A **Figura 24** mostra o mecanismo sugerido para a obtenção das tiossemicarbazidas.



**Figura 24.** Mecanismo proposto para a obtenção das tiossemicarbazidas (MACIEL et al., 1998).

### ➤ Caracterização espectroscópica das tiossemicarbazidas

A caracterização dos produtos foi realizada pelas técnicas espectroscópicas de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

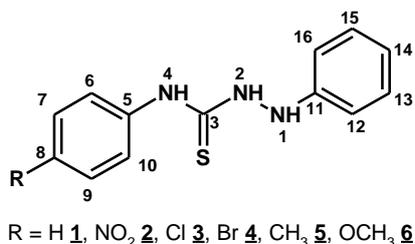
#### *Infravermelho*

Nos espectros de infravermelho das tiossemicarbazidas foi possível observar bandas de absorção características para esses compostos, como as bandas de N-H variando entre 3437 e 3249  $\text{cm}^{-1}$ , além das absorções características das ligações C-H e C=C de anel aromático e da banda de absorção de C=S, variando entre 1207 e 1286  $\text{cm}^{-1}$ .

#### *Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$*

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das tiossemicarbazidas apresentaram-se bem similares dentro de uma mesma classe, no entanto, de alta relevância para a caracterização desses compostos. Os sinais mais característicos desta classe foram os singletos referentes aos hidrogênios 1, 2 e 4, que estão ligados aos átomos de nitrogênio. O sinal referente ao hidrogênio 2 apareceu na faixa entre 9,51 a 10,19 ppm. Já o sinal de H-4 foi observado na faixa de 8,60 a 9,08 ppm, confirmando o efeito doador de elétrons quando presente o substituinte fenila em N-4. O sinal referente ao hidrogênio (H-1) pode ser observado na faixa de 7,38 a 7,53 ppm. A **Tabela 2** apresenta os principais deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  para as tiossemicarbazidas  $N_1, N_4$ -dissubstituídas.

**Tabela 2.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em acetona- $d_6$  para as tiossemicarbazidas  $N_1, N_4$ -dissubstituídas



Deslocamento químico ( $\delta$ )						
H	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
1	7,42	7,50	7,45	7,46	7,38	7,53
2	9,66	10,19	9,79	9,81	9,57	9,51
4	8,70	9,08	8,85	8,85	8,63	8,60
6	7,56	8,20	n.o. <sup>a</sup>	7,46	7,57	6,84
7	7,29	8,20	7,77	7,74	7,09	7,38
8	7,12	----	----	----	----	----
9	7,29	8,20	7,77	7,74	7,09	7,38
10	7,56	8,20	n.o.	7,46	7,57	6,84
12	6,87	6,89	6,88	6,87	6,88	7,53
13	7,25	7,27	7,25	7,24	7,25	7,25
14	6,89	6,88	6,89	6,90	6,88	6,88
15	7,25	7,27	7,25	7,24	7,25	7,25
16	6,87	6,89	6,88	6,87	6,88	7,53

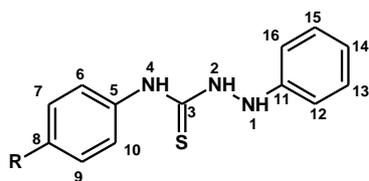
<sup>a</sup> não observado.

### Ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C

Os sinais característicos das tiossemicarbazidas nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C foram referentes à tiocarbonila (C-3), observados na região de 181,1 a 183,6 ppm.

Os sinais referentes ao carbono 5 foram assinalados na faixa de 133,4 a 146,8 ppm, sendo os maiores deslocamentos para o derivado *p*-nitro substituído, valores que já eram esperados devido ao efeito de desproteção causado pelo grupo nitro, fortemente retirador de elétrons. O mesmo efeito pode ser observado com relação ao carbono 8, com sinais na faixa de 116,9 a 158,5 ppm, sendo o menor deslocamento para o derivado substituído com o átomo de bromo.

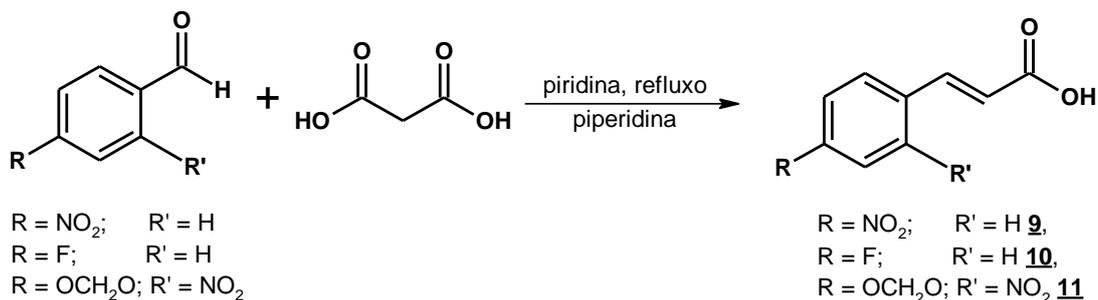
**Tabela 3.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN de <sup>13</sup>C obtidos em acetona-d<sub>6</sub> para as tiossemicarbazidas N<sub>1</sub>,N<sub>4</sub>-dissubstituídas



R = H 1, NO<sub>2</sub> 2, Cl 3, Br 4, CH<sub>3</sub> 5, OCH<sub>3</sub> 6

Deslocamentos químicos ( $\delta$ )						
C	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
3	183,2	183,0	183,2	181,1	182,9	183,6
5	140,5	146,8	139,3	138,7	137,5	133,4
6	125,2	124,1	126,8	127,2	125,0	127,4
7	129,2	125,0	129,1	130,7	129,4	114,4
8	126,0	145,1	130,5	116,9	135,2	158,5
9	129,2	125,0	129,1	130,7	129,4	114,4
10	125,2	124,1	126,8	127,2	125,0	127,4
11	149,0	148,8	148,9	147,9	148,7	149,2
12	114,6	114,9	114,5	113,1	114,2	114,6
13	130,3	130,5	130,2	128,9	129,9	130,3
14	122,0	122,5	121,8	119,9	121,6	121,9
15	130,3	130,5	130,2	128,9	129,9	130,3
16	114,6	114,9	114,5	113,1	114,2	114,6
CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	20,8	----
OCH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	56,0

#### 4.1.2. Preparação dos aldeídos derivados do piperonal e dos ácidos cinâmicos substituídos



Os aldeídos derivados do piperonal 6-X-substituídos (**7** e **8**) encontravam-se já sintetizados e disponíveis em nosso grupo de pesquisa (MELOS, 2012; MELOS et al, 2015).

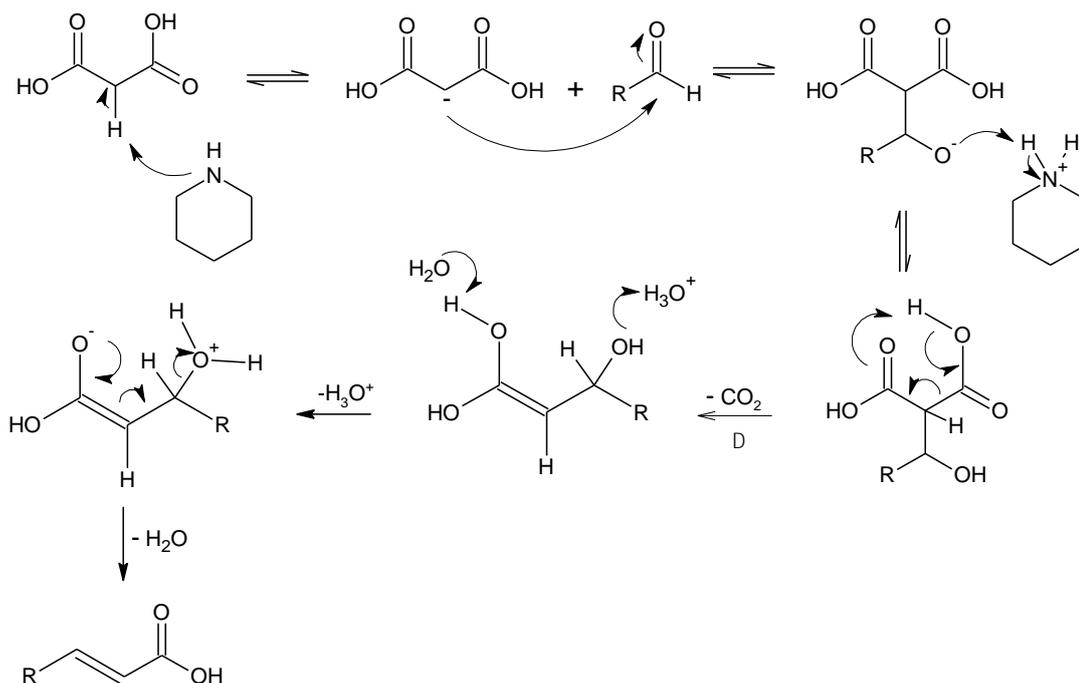
A reação de preparação dos ácidos cinâmicos foi realizada através da condensação de Knoevenagel-Doebner, envolvendo a reação do benzaldeído substituído com o ácido malônico em meio de piridina e piperidina, como catalisador, sob refluxo por 2 horas. Foi adicionado uma solução de HCl 20% (v/v) e o precipitado obtido foi filtrado e lavado com esta mesma solução e água destilada, ambas geladas, obtendo-se os produtos finais puros em rendimentos satisfatórios conforme apresentado na **Tabela 4**. Todos os compostos foram analisados por cromatografia em camada fina para verificar a pureza dos mesmos, e caracterizados através de ponto de fusão e da análise dos espectros de IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.

**Tabela 4.** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os ácidos cinâmicos substituídos.

Composto	R'	R	Rendimento (%)	PF (°C)
<b>9</b>	H	NO <sub>2</sub>	91	>250
<b>10</b>	H	F	95	178-180
<b>11</b>	NO <sub>2</sub>	OCH <sub>2</sub> O	82	224

#### ➤ Proposta de mecanismo para obtenção dos ácidos cinâmicos

A reação de condensação de Knoevenagel ocorre entre aldeídos e um composto carbonílico que possui um hidrogênio ácido para gerar compostos α,β-insaturados através da utilização da piperidina como catalisador. A modificação de Doebner sugere a condensação na presença de grupos de ácidos carboxílicos, como neste caso, o ácido malônico ao invés dos ésteres malônicos, além do uso do refluxo em meio de piridina em para induzir a descarboxilação. A **Figura 25** apresenta o mecanismo sugerido para a obtenção dos ácidos cinâmicos.



**Figura 95.** Mecanismo sugerido para obtenção de ácidos cinâmicos através da condensação de Knoevenagel-Dobner (SANTOS et al., 2001; RODRIGUES-SANTOS et al., 2007).

### ➤ Caracterização espectroscópica dos ácidos cinâmicos

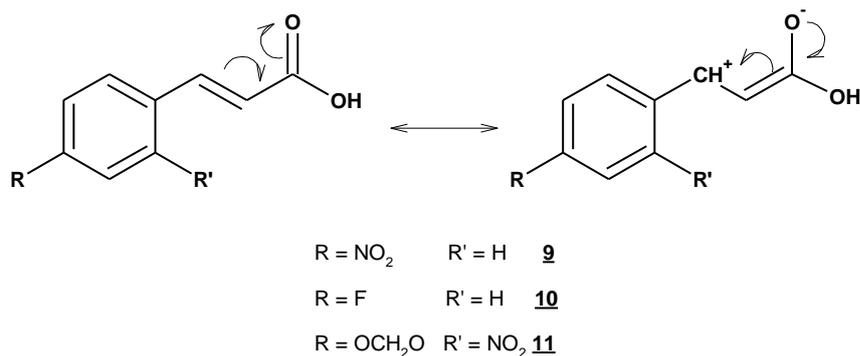
A caracterização espectroscópica foi realizada pela técnica espectroscópica de IV, RMN <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C.

#### *Infravermelho*

Nos espectros de infravermelho dos ácidos cinâmicos substituídos, foi possível observar algumas bandas características, como a de absorção da hidroxila na faixa de 3434 a 3112 cm<sup>-1</sup>, além das absorções do grupo C=O na faixa de 1683 a 1696 cm<sup>-1</sup>. Foi possível observar, também, as bandas de absorção características para o anel aromático.

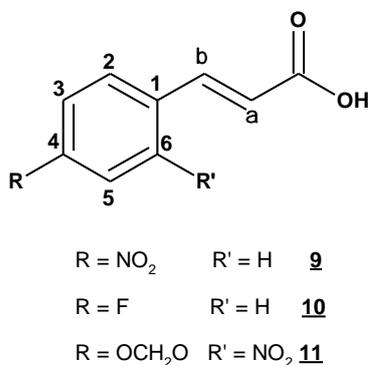
#### *Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H*

Nos espectros de RMN <sup>1</sup>H dos ácidos cinâmicos, foi possível observar os deslocamentos químicos característicos do hidrogênio da hidroxila da carboxila na faixa de 12,45 a 12,73 ppm, além dos hidrogênios α e β à carbonila na faixa de 6,36 a 6,75 ppm e, 7,61 a 7,96 ppm, respectivamente. Os sinais referentes ao H-β apresentaram maiores deslocamentos químicos quando comparados ao H-α, devido ao efeito de ressonância existente na dupla ligação conjugada a carboxila, ocasionando sua desproteção, conforme demonstrado na **Figura 26**. Na **Tabela 5** são apresentados os principais deslocamentos químicos para os ácidos cinâmicos 9-11.



**Figura 26.** Estruturas de ressonância para os ácidos cinâmicos.

**Tabela 5.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em  $\text{DMSO-d}_6$  dos ácidos cinâmicos.



<b>Deslocamento químicos (<math>\delta</math>)</b>			
<b>H</b>	<b><u>9</u></b>	<b><u>10</u></b>	<b><u>11</u></b>
COOH	12,73	12,45	n.o. <sup>a</sup>
$\alpha$	6,75	6,52	6,36
$\beta$	7,71	7,61	7,96
1	----	----	----
2 e 6	7,99	7,78	7,23
3	8,85	7,26	----
5	8,25	7,26	7,55
OCH <sub>2</sub> O	----	----	6,18

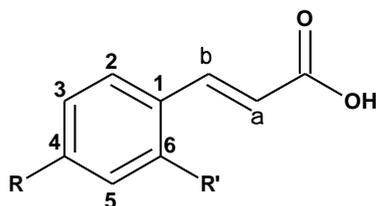
<sup>a</sup> não observado.

### ***Ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$***

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos ácidos cinâmicos substituídos foi possível observar os principais deslocamentos químicos característicos dos carbonos carboxílicos, além dos carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  à carboxila. Os carbonos carboxílicos apresentaram deslocamento químico entre 168,0 e 167,1 ppm e, o C- $\alpha$  entre 123,5 e 119,6 ppm. Para o C- $\beta$ , o deslocamento químico foi assinalado entre 143,2 e 141,8 ppm, evidenciando a desproteção ocasionada pelo efeito de ressonância. Observou-se, também, valores elevados de deslocamento químico para o C-4, tendo em vista o efeito retirador de elétrons dos substituintes. No composto **10**, foram observados dois sinais relativos ao deslocamento químico de C-4 em 164,9 e 162,4 ppm, uma vez que o átomo de flúor realiza acoplamento com o carbono (KALINOWSKI et al., 1988; BRANCO et al., 2015). No composto **11**, assinalou-se o sinal relativo ao carbono do

grupamento metilenodioxi em 103,8 ppm. A **Tabela 6** apresenta os principais deslocamentos químicos para os ácidos cinâmicos **9-11**.

**Tabela 6.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos em DMSO- $d_6$  para os ácidos cinâmicos substituídos.



R = NO<sub>2</sub>    R' = H    **9**

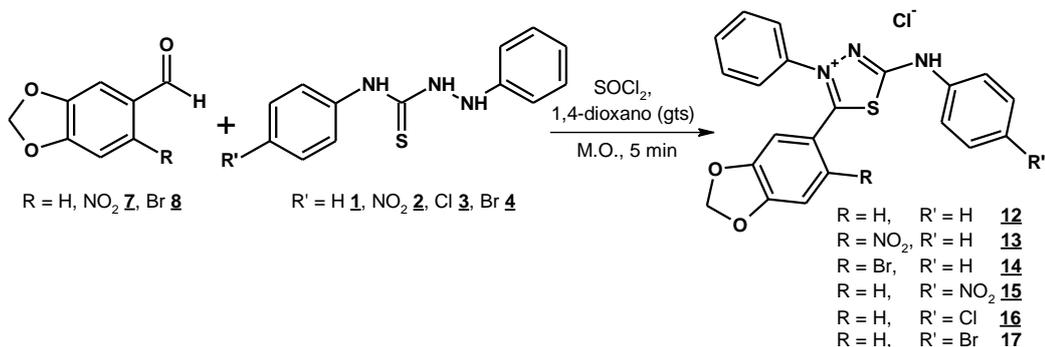
R = F        R' = H    **10**

R = OCH<sub>2</sub>O    R' = NO<sub>2</sub> **11**

Deslocamentos químicos ( $\delta$ )			
C	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
COOH	167,5	168,0	167,1
$\alpha$	123,5	119,6	122,7
$\beta$	141,8	143,2	143,2
1	141,2	131,0	125,8
2	129,7	131,3	105,3
3	124,4	116,5	148,9
4	148,4	164,9 e 162,4	148,9
5	124,4	116,2	107,0
6	129,7	131,3	151,8
OCH <sub>2</sub> O	----	----	103,8

## 4.2. Síntese dos cloridratos mesoiônicos

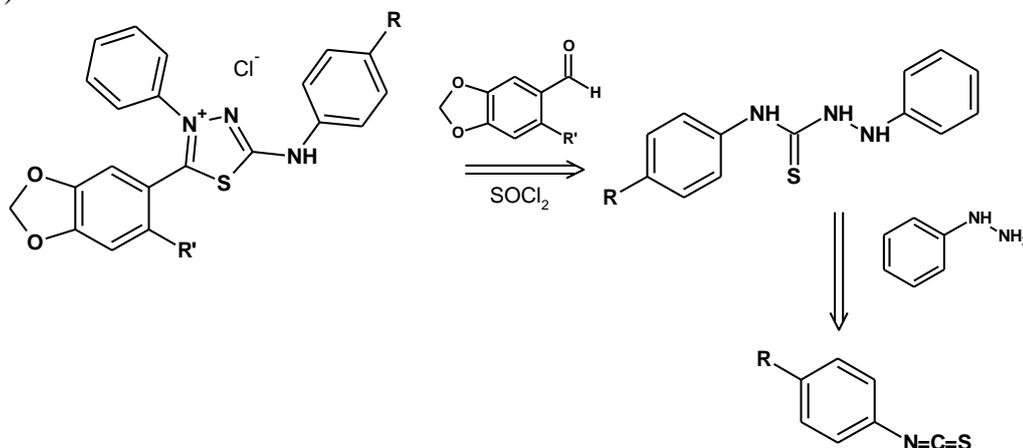
### 4.2.1. Síntese dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I) por irradiação de micro-ondas



Os cloridratos mesoiônicos da Série I foram obtidos utilizando uma metodologia alternativa visando a diminuição nos tempos de reação, bem como a diminuição de uma etapa, adequando a preparação desses compostos aos princípios da Química Verde. Na **Figura 27** é apresentada a análise retrossintética para obtenção destes compostos. A síntese dos cloridratos mesoiônicos envolveu a reação entre as tiossemicarbazidas  $N_1, N_4$ -dissubstituídas e os aldeídos aromáticos derivados do piperonal em quantidades equivalentes, em presença de cloreto de tionila (3 eq.), atuando como ácido de Lewis, e 1,4-dioxano como solvente, em quantidade

suficiente apenas para homogeneizar os reagentes. O tempo de exposição à irradiação das micro-ondas foi de 5 minutos em 100 W de potência. Posteriormente, a mistura de reação foi vertida em 1,4-dioxano e deixada em repouso por 24 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com 1,4-dioxano gelado e água destilada, também gelada, obtendo-se os produtos finais puros em rendimentos satisfatórios conforme apresentado na **Tabela 7**. O uso do aldeído e do ácido de Lewis visou a eliminação de uma etapa de reação em relação à metodologia tradicional (DA SILVA et al., 2002), que utilizava o ácido carboxílico e a posterior preparação do respectivo cloreto de ácido, bem como a diminuição do tempo de obtenção dos compostos, que na metodologia tradicional é de 4 horas (REIS, 2008).

Todos os compostos foram analisados por cromatografia em camada fina para verificar a pureza dos mesmos, e caracterizados através de ponto de fusão e da análise dos espectros de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Na Série I foram obtidos 6 (seis) compostos sendo 4 (quatro) inéditos.



**Figura 107.** Análise retrossintética para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I).

**Tabela 7.** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I).

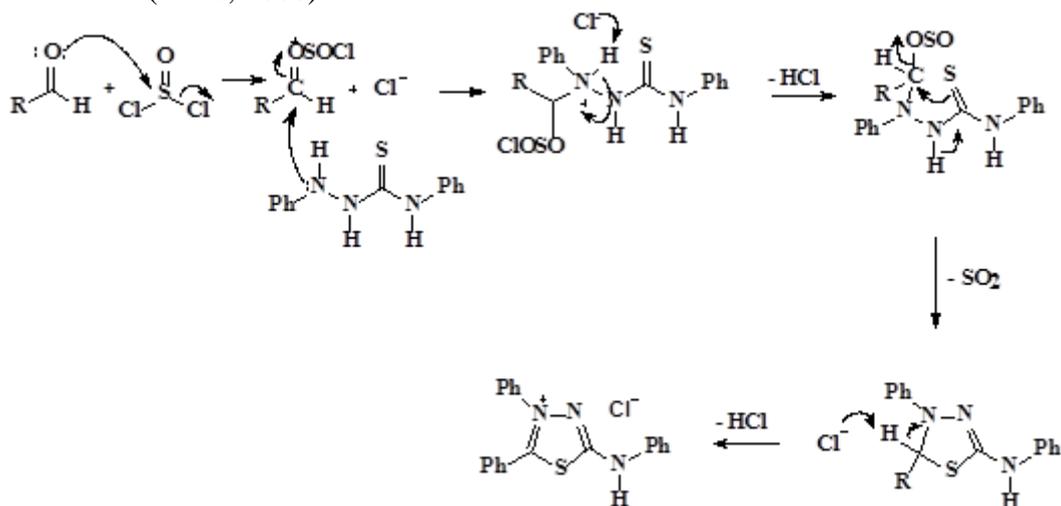
Composto	R'	R	Rendimento (%)	PF (°C)
<b>12</b>	H	H	92	286-287 <sup>a</sup>
<b>13</b>	NO <sub>2</sub>	H	95	265-266 <sup>a</sup>
<b>14</b>	Br	H	90	278-279
<b>15</b>	H	NO <sub>2</sub>	89	243-244
<b>16</b>	H	Cl	60	309-310
<b>17</b>	H	Br	65	280-281

<sup>a</sup> Ponto de fusão = 286-287 °C (**12**) e 264-266 °C (**13**) (FERREIRA et al., 2008).

#### ➤ Proposta do mecanismo para a etapa de heterociclicização

O mecanismo sugerido para a síntese dos cloridratos mesoiônicos utilizando  $\text{SOCl}_2$  envolve inicialmente o ataque dos pares de elétrons não-ligantes do oxigênio da carbonila do aldeído ao átomo de enxofre do cloreto de tionila, formando um intermediário com um carbono com maior caráter eletrofílico. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico da 1,4-difenil-tiossemicarbazida substituída a este carbono eletrofílico formando um intermediário *N*-acilado, que posteriormente é atacado pelo átomo de enxofre do grupo tiocarbonila eliminando uma molécula de  $\text{SO}_2$  e levando a formação do sistema cíclico. Posteriormente, ocorre a aromatização do heterociclo com a retirada de um hidrogênio pelo íon cloreto

formando ácido clorídrico. A **Figura 28** mostra o mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos sais mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida, utilizando cloreto de tionila como ácido de Lewis (REIS, 2008).



**Figura 118.** Mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos sais mesoiônicos 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas utilizando  $\text{SOCl}_2$  como ácido de Lewis (REIS, 2008).

### ➤ Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I)

A caracterização espectroscópica foi realizada pelas técnicas espectroscópicas de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ .

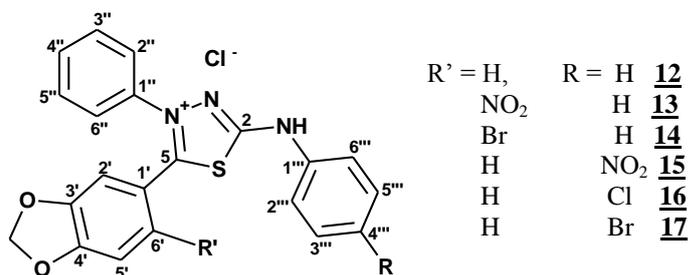
#### *Infravermelho*

Nos espectros de infravermelho dos compostos mesoiônicos, foi possível observar algumas bandas características, como a absorção de anel aromático na faixa de 3008,7 a 3053,1  $\text{cm}^{-1}$ , além das absorções características de vibração do esqueleto. Foi observado, também, absorção do grupamento (C=N) e (C-S) do esqueleto heterocíclico na faixa de 1539,0 a 1568,0  $\text{cm}^{-1}$  e na faixa de 1311,5 a 1330,7  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Outra banda de absorção identificada confirma a presença do grupamento metilenedioxílico na faixa de 1240,0 a 1247,8  $\text{cm}^{-1}$ . Para os mesoiônicos **12** e **13**, os valores encontrados estão de acordo com a literatura (FERREIRA et al., 2008).

#### *Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$*

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos da Série 1, foi possível observar os deslocamentos químicos característicos do N-H exocíclico na faixa de 12,37 a 13,00 ppm, além dos hidrogênios do grupo metilenedioxi na faixa de 6,11 a 6,38 ppm. Para os mesoiônicos **12** e **13**, os valores encontrados estão de acordo com a literatura (FERREIRA et al., 2008). A **Tabela 8** apresenta os principais deslocamentos químicos para os cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal **12-17**.

**Tabela 8.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em DMSO- $\text{d}_6$  ou MeOD dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I).



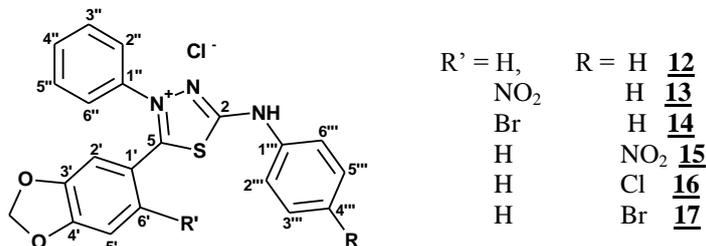
Deslocamentos químicos ( $\delta$ )						
H	<b><u>12</u></b>	<b><u>13</u></b>	<b><u>14</u></b>	<b><u>15</u></b>	<b><u>16</u></b>	<b><u>17</u></b>
NH	12,37	12,75	13,00	n.o. <sup>a</sup>	n.o.	12,95
2'	6,94	n.o.	7,64	6,87	6,85	6,95
5'	7,15	7,95	7,64	7,22	7,99	7,11
6'	7,15	-----	-----	7,01	7,18	7,11
2''	7,72	7,65	7,64	7,83	7,68	7,63
3''	7,62	7,58	7,64	7,70	7,62	7,63
4''	7,62	7,58	7,64	7,70	7,62	7,63
5''	7,62	7,65	7,64	7,70	7,62	7,63
6''	7,72	7,58	7,65	7,83	7,68	7,63
2'''	7,62	7,46	7,46	7,70	7,44	7,63
3'''	7,46	7,58	7,46	8,34	7,65	7,63
4'''	7,15	7,19	7,18	-----	-----	-----
5'''	7,46	7,58	7,46	8,34	7,65	7,63
6'''	7,62	7,46	7,46	7,70	7,44	7,63
OCH <sub>2</sub> O	6,17	6,38	6,21	6,12	6,11	6,16

<sup>a</sup>não observado.

### ***Ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$***

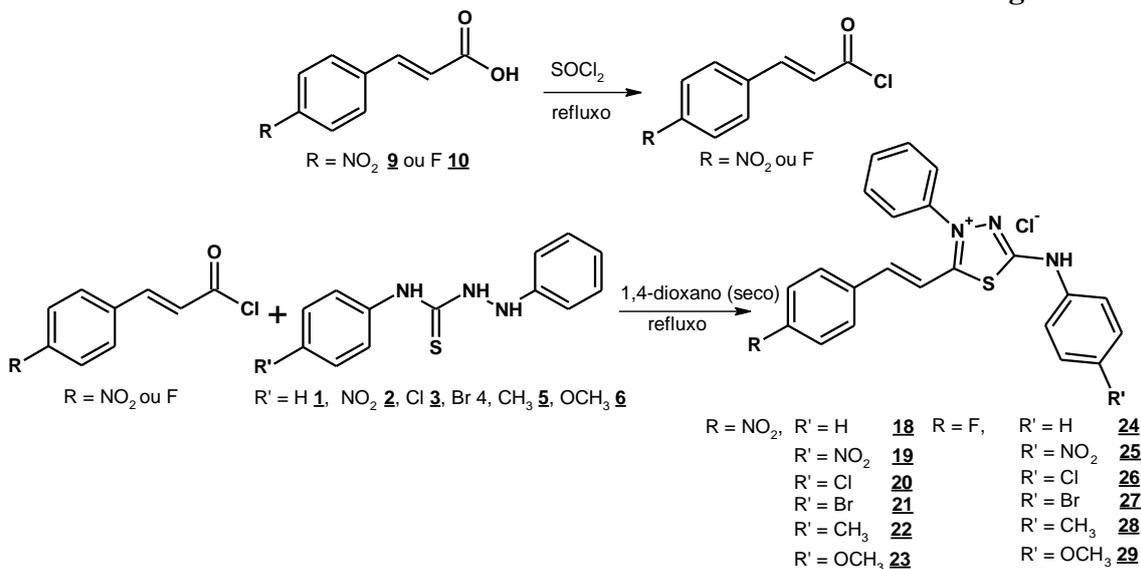
Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos mesoiônicos derivados do piperonal, foram observados os deslocamentos químicos característicos dos carbonos C-2 e C-5 do anel heterocíclico, além do carbono do grupo metilenodioxi. O C-5 foi assinalado com os maiores valores de deslocamentos químicos, na faixa de 162,5 a 164,8 ppm e, o C-2 com os menores deslocamentos químicos 160,3 a 162,2 ppm, em relação aos primeiros, ambos carbonos quaternários. Para o carbono do grupamento metilenodioxi, o deslocamento químico foi assinalado entre 103,0 a 105,6 ppm. Para os mesoiônicos **12** e **13**, os valores encontrados estão de acordo com a literatura (FERREIRA et al., 2008). Os demais compostos, **14-17**, são inéditos. A **Tabela 9** apresenta os principais deslocamentos químicos para os cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal **12-17**.

**Tabela 9.** Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos em DMSO- $d_6$  ou MeOD dos cloridratos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I)

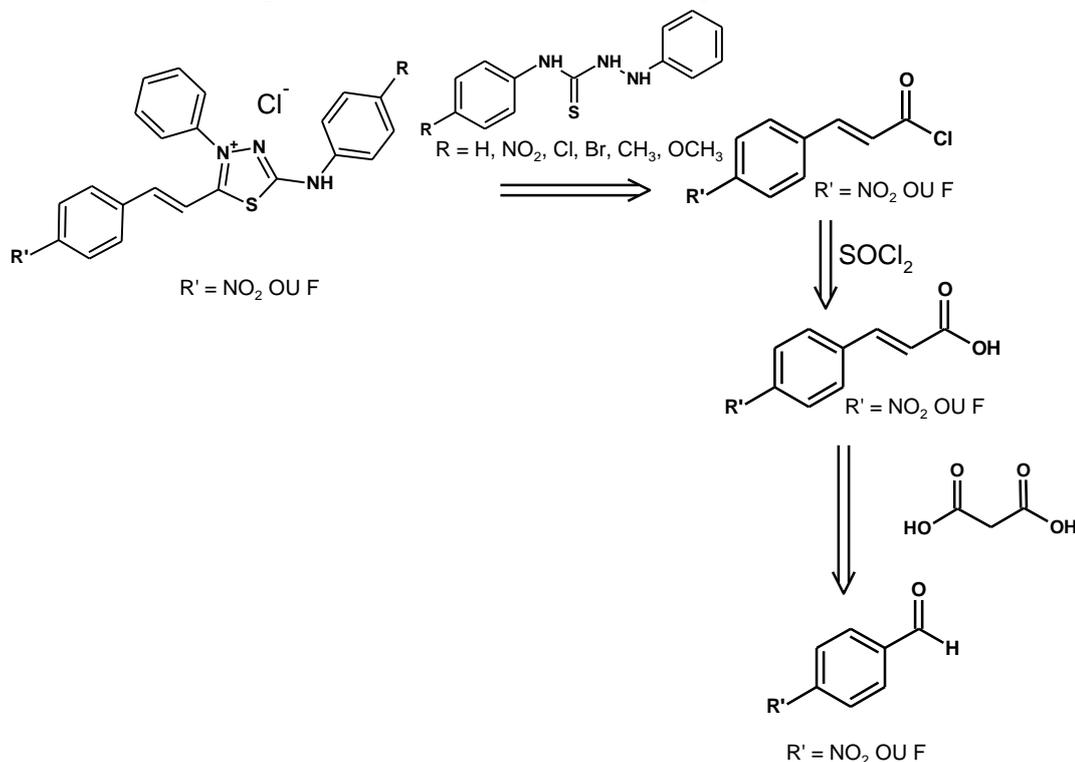


Deslocamentos químicos ( $\delta$ )						
C	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>
2	160,6	161,8	162,2	160,4	160,8	160,3
5	164,4	163,2	162,5	166,1	164,8	164,7
1'	116,5	114,6	116,7	115,6	129,2	116,5
2'	109,8	106,7	112,2	108,8	108,7	109,7
3'	152,7	151,7	147,9	153,0	148,8	148,3
4'	148,3	142,8	152,4	148,9	152,8	152,0
5'	109,6	111,2	113,6	109,1	109,0	109,8
6'	127,0	152,8	115,2	126,8	129,5	130,5
1''	138,9	138,7	137,8	137,9	137,0	n.o. <sup>a</sup>
2''	126,6	125,6	130,0	125,7	126,6	127,0
3''	130,0	130,0	130,3	130,0	129,9	131,9
4''	131,9	132,2	132,1	131,6	131,5	132,8
5''	130,0	130,0	130,3	130,0	129,9	131,9
6''	126,6	125,6	130,0	125,7	126,6	127,0
1'''	138,3	137,5	138,7	143,5	137,9	138,3
2'''	118,8	119,0	119,0	118,3	120,1	120,7
3'''	130,9	130,5	125,8	125,0	125,6	126,6
4'''	124,5	124,7	124,7	143,6	115,8	116,0
5'''	130,9	130,5	125,8	125,0	125,6	126,6
6'''	118,8	119,0	119,0	118,3	120,1	120,7
OCH <sub>2</sub> O	103,2	105,6	104,0	103,1	103,0	103,2

#### 4.2.2. Síntese dos cloridratos mesoiônicos da Série II através da metodologia tradicional



Os cloridratos mesoiônicos da Série II foram obtidos a partir da reação de anidroacilação dos cloretos dos ácidos cinâmicos substituídos e a *N*<sub>1</sub>,*N*<sub>4</sub>-difeníltiossemicarbazida substituída em 1,4-dioxano sob refluxo (SILVA et al., 2002). A **Figura 29** mostra a retróssíntese para a obtenção dos compostos da Série II. A **Tabela 10** apresenta os rendimentos e pontos de fusão para os compostos obtidos. Todos os compostos foram analisados por cromatografia em camada fina para verificar a pureza dos mesmos, e caracterizados através de ponto de fusão e da análise dos espectros de IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.



**Figura 129.** Retrossíntese para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos da Série II.

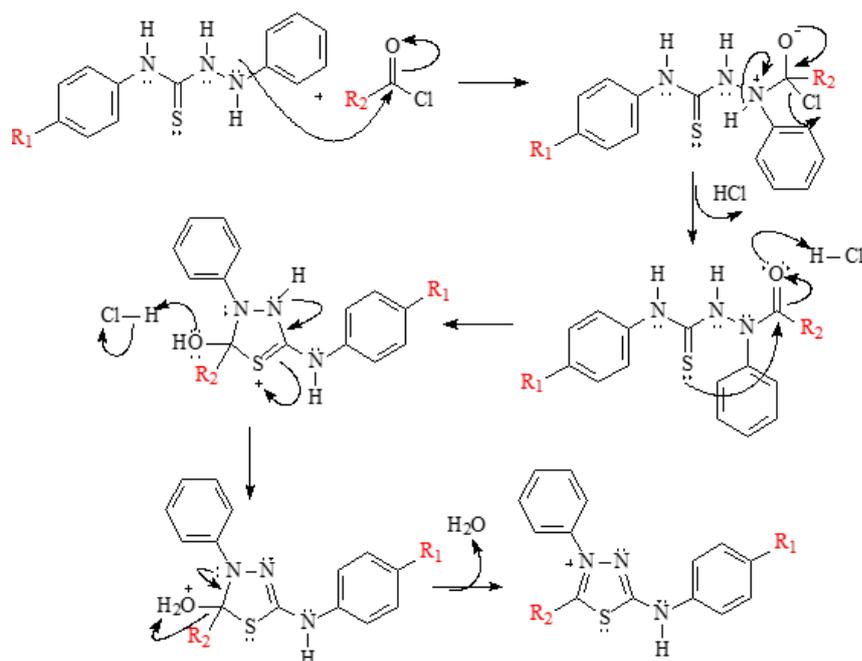
**Tabela 10.** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos (Série II)

Composto	R'	R	Rendimento (%)	PF (°C)
18	H	NO <sub>2</sub>	55	280-281 <sup>a</sup>
19	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	50	220-221
20	Cl	NO <sub>2</sub>	66	260-261
21	Br	NO <sub>2</sub>	46	243-244
22	CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	57	283-284
23	OCH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	40	263-264

<sup>a</sup> Ponto de fusão = 280-281 °C (GRYNBERG et al., 1997).

➤ **Proposta de mecanismo para heterociclicação dos cloridratos mesoiônicos da Série II**

O mecanismo sugerido para a etapa de heterociclicação, pela metodologia tradicional, envolve inicialmente o ataque nucleofílico da tiossemicarbazida ao carbono carbonílico do cloreto de ácido formando um intermediário *N*-acilado que, em seguida, foi atacado pelo átomo de enxofre do grupo tiocarbonila. Posteriormente, ocorre a aromatização do anel heterocíclico com a saída de uma molécula de água. A **Figura 30** apresenta o mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos em condições tradicionais, ou seja, utilizando refluxo.



**Figura 30.** Mecanismo de reação proposto para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos através da metodologia tradicional.

➤ **Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos da Série II**

A caracterização espectroscópica foi realizada utilizando-se as técnicas espectroscópicas de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ . Para o mesoiônico **18**, os valores encontrados estão de acordo com a literatura (GRYNBERG et al., 1997). Os demais compostos, **19-23**, são inéditos.

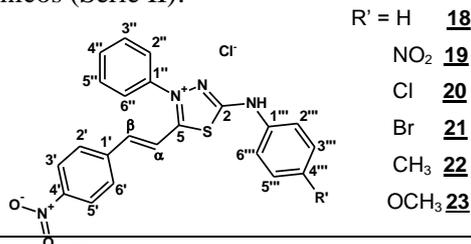
**Infravermelho**

Nos espectros de infravermelho dos compostos mesoiônicos da Série II, foram observadas algumas bandas características, como a absorção de C-H aromático na faixa de 3041 a 3058  $\text{cm}^{-1}$ , além das absorções de vibração do esqueleto. Foi observado, também, absorção dos grupos (C=N) e (C-S) do esqueleto heterocíclico na faixa de 1566 a 1575  $\text{cm}^{-1}$  e na faixa de 1332 a 1340  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Outra banda de absorção identificada confirmou a presença do grupamento nitro em 1515 a 1519  $\text{cm}^{-1}$ .

**Ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$**

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos mesoiônicos da Série II, foram atribuídos os deslocamentos químicos característicos do N-H exocíclico na faixa de 12,64 a 13,56 ppm, além dos sinais referentes ao H- $\alpha$  na faixa de 7,27 a 7,34 ppm e, para os H- $\beta$  na faixa de 8,11 a 8,18 ppm. A **Tabela 11** apresenta os principais deslocamentos químicos para os cloridratos mesoiônicos da Série II, **18-23**.

**Tabela 11.** Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em DMSO- $d_6$  dos cloridratos mesoiônicos (Série II).



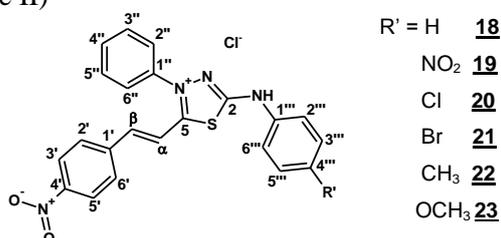
Deslocamentos químicos ( $\delta$ )						
H	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>
NH	13,00	13,56	12,97	12,90	12,66	12,64
$\alpha$	7,28	7,34	7,30	7,30	7,30	7,27
$\beta$	8,16	n.o. <sup>a</sup>	8,18	8,18	8,15	8,11
2'	8,04	7,90	8,05	8,05	8,05	8,03
3'	8,27	8,28	8,28	8,28	8,28	8,27
5'	8,27	8,28	8,28	8,28	8,28	8,27
6'	8,04	7,90	8,06	8,05	8,05	8,03
2''	7,87	7,84	7,86	7,85	7,87	7,81
3''	7,76	8,35	7,78	7,77	7,78	7,81
4''	7,76	7,72	7,78	7,77	7,78	7,81
5''	7,76	8,35	7,78	7,77	7,78	7,81
6''	7,87	7,84	7,86	7,85	7,87	7,81
2'''	7,63	8,06	7,51	7,58	7,51	7,54
3'''	7,43	8,28	7,64	7,64	7,25	7,01
4'''	7,16	----	----	----	----	----
5'''	7,43	8,28	7,64	7,64	7,25	7,01
6'''	7,63	8,06	7,51	7,58	7,51	7,54
CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	3,37	----
OCH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	3,75

<sup>a</sup> não observado

### Ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos mesoiônicos da Série II, observaram-se os deslocamentos químicos característicos dos carbonos C-2 e C-5 do anel heterocíclico além dos C- $\alpha$  e C- $\beta$  (**Tabela 12**). O átomo de C-5 foi assinalado com os maiores valores de deslocamentos químicos, na faixa de 161,9 a 163 ppm e, o C-2 com os menores deslocamentos químicos 156,7 a 160,0 ppm, em relação aos primeiros, ambos carbonos quaternários. Para o C- $\alpha$  o deslocamento químico foi assinalado entre 113,8 a 115,9 ppm, e para o C- $\beta$  o deslocamento químico entre 144,8 a 146,1. Foi possível observar a variação do deslocamento químico do C-4''' ao longo da série, explicado pelos diferentes grupos substituintes e seus correspondentes efeitos eletrônicos. O menor valor foi referente ao composto que possui como substituinte o átomo de bromo, em 116,4 ppm, e o maior valor foi referente ao composto que possui como substituinte o grupo metóxi em 157,6 ppm.

**Tabela 12.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos em DMSO- $d_6$  dos cloridratos mesoiônicos (Série II)



Deslocamento químico ( $\delta$ )						
H	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>	<u>21</u>	<u>22</u>	<u>23</u>
2	160,0	159,8	159,9	159,9	160,2	156,7
5	162,4	164,2	162,9	163,0	162,2	161,9
$\alpha$	115,9	115,8	115,9	115,9	115,9	113,8
$\beta$	145,0	146,1	145,4	145,4	144,9	144,8
1'	137,5	137,7	137,4	137,4	136,5	132,0
2'	132,3	132,4	132,3	132,8	132,3	132,3
3'	124,6	129,4	129,9	126,7	130,4	124,6
4'	149,0	149,1	149,0	149,0	149,0	148,9
5'	124,6	129,4	129,9	126,7	130,4	124,6
6'	132,3	130,7	132,3	132,4	132,3	132,3
1''	139,0	140,3	137,8	138,2	137,5	137,4
2''	129,9	124,6	126,7	130,6	126,6	121,3
3''	130,5	126,7	130,6	130,7	130,6	126,5
4''	130,6	126,2	130,7	130,7	130,7	130,6
5''	130,5	126,7	130,6	130,7	130,6	126,5
6''	129,9	124,6	126,7	130,6	126,6	121,3
1'''	140,4	143,0	140,4	140,3	140,0	140,4
2'''	119,0	118,9	120,6	124,6	119,3	115,2
3'''	126,6	122,8	124,6	121,0	124,6	115,9
4'''	126,6	144,5	128,3	116,4	134,1	157,6
5'''	126,6	122,0	124,6	121,0	124,6	115,9
6'''	119,0	118,9	120,6	124,6	119,3	115,2
CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	21,0	----
OCH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	55,8

#### 4.2.3. Síntese dos cloridratos mesoiônicos da Série III através da metodologia tradicional

A síntese dos cloridratos mesoiônicos da Série III foi realizada através da mesma metodologia da Série II (SILVA et al., 2002), através das reações entre os cloretos de ácido derivados do ácido 4-F-cinâmico e *N*<sub>1</sub>-fenil-*N*<sub>4</sub>-X-feniltiossemicarbazidas sob refluxo em 1,4-dioxano. A análise retrossintética para a obtenção dessa série é similar à mostrada para a Série II (**Figura 29**). Todos os compostos foram analisados por cromatografia em camada fina para verificar a pureza dos mesmos, e caracterizados através de ponto de fusão e da análise dos espectros de IV, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. A **Tabela 13** apresenta os rendimentos e pontos de fusão para os compostos obtidos.

**Tabela 13.** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos (Série III).

Composto	R'	R	Rendimento(%)	PF (°C)
<b>24</b>	H	F	80	238-239
<b>25</b>	NO <sub>2</sub>	F	40	265-266
<b>26</b>	Cl	F	56	259-260
<b>27</b>	Br	F	50	245-246
<b>28</b>	CH <sub>3</sub>	F	42	231-232
<b>29</b>	OCH <sub>3</sub>	F	60	234-235

O mecanismo sugerido para a heterociclização para os compostos da Série III é o mesmo que foi apresentado para a Série II.

### ➤ Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos da Série III

A caracterização espectroscópica foi realizada através das técnicas espectroscópicas de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ . Para o mesoiônico **24**, os valores encontrados estão de acordo com a literatura (SENFF-RIBEIRO et al., 2004). Os demais compostos da série, **25-29**, são inéditos.

#### *Infravermelho*

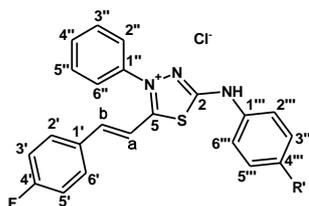
Nos espectros de infravermelho dos compostos mesoiônicos da Série III, atribuiu-se algumas bandas características, como a de absorção do C-H do anel aromático em  $3047\text{ cm}^{-1}$ , além das absorções características de vibração do esqueleto. Foi observado, também, as absorções dos grupos (C=N) e (C-S) do esqueleto heterocíclico na faixa de  $1557$  a  $1582\text{ cm}^{-1}$  e, na faixa de  $1308$  a  $1335\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

#### *Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$*

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos mesoiônicos da Série III, atribuiu-se os deslocamentos químicos característicos do N-H exocíclico na faixa de 12,66 a 13,24 ppm. Os sinais referentes ao H- $\alpha$  foram observados na faixa de 7,01 a 7,05 ppm e os referentes ao H- $\beta$  na faixa de 7,99 a 8,06 ppm.

A **Tabela 14** apresenta os principais deslocamentos químicos para os cloridratos mesoiônicos da Série III, **24-29**.

**Tabela 14.** Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em DMSO- $d_6$  dos cloridratos mesoiônicos (Série III).



R' = H **24**, NO<sub>2</sub> **25**, Cl **26**, Br **27**, CH<sub>3</sub> **28**, OCH<sub>3</sub> **29**

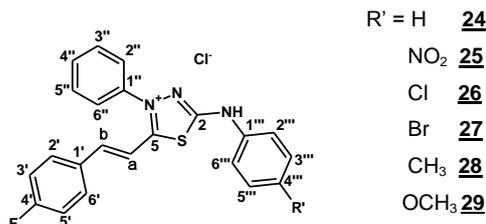
H	Deslocamento químico ( $\delta$ )					
	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>
NH	12,96	11,05	13,14	13,24	12,66	12,70
$\alpha$	7,04	7,11	7,05	7,04	7,04	7,01
$\beta$	8,03	8,15	8,06	8,05	8,01	7,99
2'	7,87	7,83	7,87	7,87	7,85	7,85
3'	7,87	n.o. <sup>a</sup>	7,87	7,87	7,85	7,85
5'	7,87	n.o.	7,87	7,87	7,85	7,85
6'	7,87	7,83	7,87	7,87	7,85	7,85
2''	7,75	8,02	7,49	7,76	7,75	7,74
3''	7,31	8,28	7,32	7,31	7,31	7,30
4''	7,75	8,28	7,77	7,76	7,75	7,74
5''	7,31	8,28	7,32	7,31	7,31	7,30
6''	7,75	8,02	7,49	7,76	7,75	7,74
2'''	7,42	7,71	7,77	7,60	7,23	7,54
3'''	7,63	8,35	7,65	7,60	7,50	7,01
4'''	7,14	----	----	----	----	----
5'''	7,63	8,35	7,65	7,60	7,50	7,01
6'''	7,42	7,71	7,77	7,60	7,23	7,54
CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	2,28	----
OCH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	3,74

<sup>a</sup> não observado.

### Ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos mesoiônicos da Série III, foi possível observar os deslocamentos químicos característicos dos carbonos C-2 e C-5 do anel heterocíclico além dos C- $\alpha$  e C- $\beta$  (**Tabela 15**). O C-5 foi assinalado com os deslocamentos químicos, na faixa de 163,5 a 157,9 ppm e, o C-2 com os menores deslocamentos químicos 156,4 a 159,4 ppm, em relação aos primeiros, ambos carbonos quaternários. Para o C- $\alpha$  o deslocamento químico foi atribuído entre 111,8 a 111,9 ppm, e para o C- $\beta$  o deslocamento químico na faixa de 146,7 a 147,3.

**Tabela 15.** Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos em DMSO- $d_6$  dos cloridratos mesoiônicos (Série III).

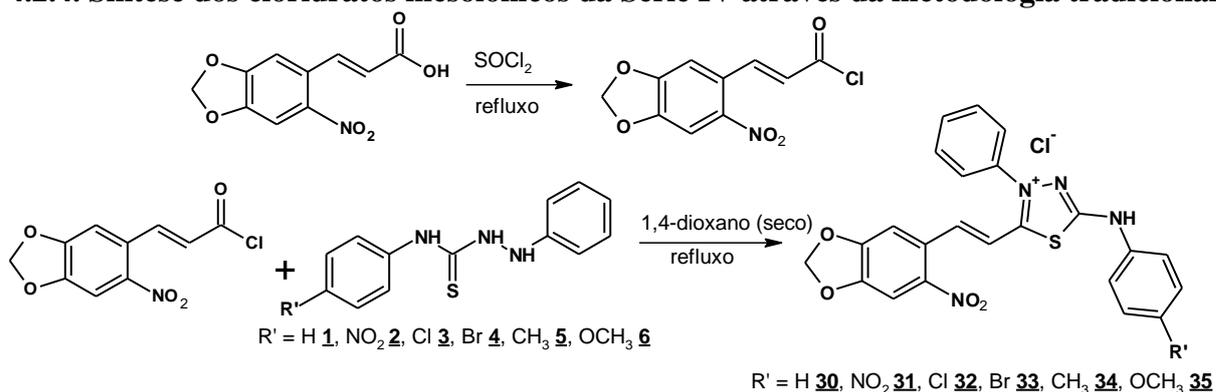


Deslocamento químico ( $\delta$ )						
H	<u>24</u>	<u>25</u>	<u>26</u>	<u>27</u>	<u>28</u>	<u>29</u>
2	159,3	154,0	159,1	159,0	159,4	156,4
5	163,2	157,9	163,3	163,5	163,0	162,6
$\alpha$	111,9	111,7	111,8	111,8	111,9	111,9
$\beta$	147,0	148,2	147,3	147,3	146,9	146,7
1'	131,0	130,9	131,0	131,0	133,8	131,1
2'	132,2	130,7	132,3	132,7	132,2	132,2
3'	118,9	117,4	116,7	116,7	119,1	116,7
4'	165,5 e	159,1	165,8 e	165,5 e	165,5 e	165,5 e
	163,5		163,6	163,6	163,5	163,4
5'	118,9	117,4	116,9	116,9	119,1	116,9
6'	132,2	130,7	132,3	132,7	132,2	132,2
1''	137,5	137,3	137,4	137,4	136,7	132,3
2''	129,9	122,0	129,8	120,8	130,0	126,6
3''	130,6	122,8	130,6	130,6	130,6	130,6
4''	132,1	126,1	132,2	132,2	132,1	132,1
5''	130,6	122,8	130,6	130,6	130,6	130,6
6''	129,9	122,0	129,8	120,8	130,0	126,6
1'''	139,1	144,4	138,0	138,4	137,5	137,5
2'''	116,7	116,8	120,4	126,7	116,9	120,8
3'''	126,6	118,8	126,7	126,7	126,6	115,0
4'''	124,4	146,2	128,0	116,0	131,0	159,4
5'''	126,6	118,8	126,7	126,7	126,6	115,0
6'''	116,7	116,8	120,4	126,7	116,9	120,8
CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	20,9	----
OCH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	55,7

<sup>a</sup> não observado.

Observou-se a variação do deslocamento químico do C-4''' ao longo da série, explicado pelos efeitos eletrônicos dos diferentes grupos substituintes. O menor valor foi referente ao composto que possui como substituinte o átomo de bromo em 116,0 ppm e, o maior valor foi referente ao composto que possui como substituinte o grupo metóxi em 159,4 ppm. Com relação ao C-4' foram observados os acoplamentos do C-F em posição ipso, com  $J = 250$  Hz ((KALINOWSKI et al., 1988; BRANCO et al., 2015)).

#### 4.2.4. Síntese dos cloridratos mesoiônicos da Série IV através da metodologia tradicional



A síntese dos cloridratos mesoiônicos da Série IV foi realizada através da mesma metodologia da Série II, partindo-se neste caso, do cloreto do ácido 6-nitro-piperonal-cinâmico e das tiossemicarbazidas substituídas, sendo a mistura da reação submetida a refluxo em 1,4-dioxano. Todos os compostos foram analisados por cromatografia em camada fina para verificar a pureza dos mesmos, e caracterizados através de ponto de fusão e da análise dos espectros de IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A **Tabela 16** apresenta os rendimentos e pontos de fusão para os compostos obtidos.

**Tabela 16.** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os cloridratos mesoiônicos (Série IV).

Composto	R'	Rendimento (%)	PF (°C)
<b>30</b>	H	45	267-268
<b>31</b>	NO <sub>2</sub>	71	236-237
<b>32</b>	Cl	50	260-261
<b>33</b>	Br	60	255-256
<b>34</b>	CH <sub>3</sub>	40	266-267
<b>35</b>	OCH <sub>3</sub>	40	270-271

A proposta de mecanismo sugerida para a heterociclicização para os compostos da Série IV é a mesma apresentada para a Série II.

#### ➤ Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos da Série IV

A caracterização espectroscópica foi realizada através das técnicas espectroscópicas de IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ . Para o mesoiônico **30**, os valores encontrados estão de acordo com a literatura (FERREIRA et al., 2008). Os demais compostos, **31-35**, são inéditos.

#### *Infravermelho*

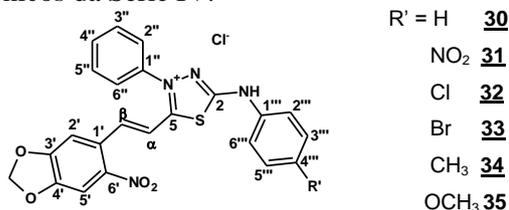
Nos espectros de infravermelho dos compostos mesoiônicos da Série IV, atrinuiu-se algumas bandas características, como a de absorção do C-H do anel aromático na faixa de 3027 a 3052  $\text{cm}^{-1}$ , além das absorções características de vibração do esqueleto. Foram observadas, também, as absorções do grupamento (C=N) do esqueleto heterocíclico na faixa de 1564 a 1582  $\text{cm}^{-1}$  e, na faixa de 1281 a 1283  $\text{cm}^{-1}$ , as absorções de (C-O) do grupamento metilenodioxí.

#### *Ressonância magnética nuclear de $^1\text{H}$*

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos mesoiônicos da série IV, derivados do ácido 6-nitropiperonal-cinâmico, foi possível observar os deslocamentos químicos característicos do

N-H exocíclico na faixa de 12,29 a 13,60 ppm, além dos sinais referentes ao H- $\alpha$  na faixa de 7,07 a 7,12 ppm e dos sinais referentes ao H- $\beta$  na faixa de 8,09 a 8,22 ppm (**Tabela 17**). Foi possível, também, assinalar os sinais referentes aos hidrogênios do grupamento metilenodioxi em 6,30 ppm.

**Tabela 17.** Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos hidrogênios nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  obtidos em DMSO- $d_6$  dos cloridratos mesoiônicos da Série IV.

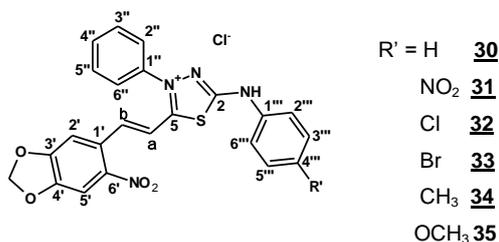


Deslocamento químico ( $\delta$ )						
H	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>
NH	12,52	13,60	13,00	13,00	12,60	12,29
$\alpha$	7,11	7,12	7,09	7,09	7,07	7,08
$\beta$	8,13	8,22	8,15	8,15	8,09	8,09
2''	7,52	7,54	7,52	7,52	7,51	7,52
5''	7,74	7,76	7,75	7,75	7,75	7,75
2'''	7,86	7,83	7,74	7,75	7,75	7,75
3'''	7,75	7,89	7,87	7,86	7,85	7,85
4'''	7,75	7,76	7,74	7,75	7,75	7,75
5'''	7,75	7,89	7,87	7,86	7,85	7,85
6'''	7,86	7,83	7,74	7,75	7,75	7,75
2''''	7,60	7,76	7,50	7,57	7,23	7,52
3''''	7,44	8,34	7,63	7,62	7,48	7,02
4''''	7,17	----	----	----	----	----
5''''	7,44	8,34	7,63	7,62	7,48	7,02
6''''	7,60	7,76	7,50	7,57	7,23	7,52
OCH <sub>2</sub> O	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30	6,30
CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	2,30	----
OCH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	3,75

### Ressonância magnética nuclear de $^{13}\text{C}$

Nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos mesoiônicos da série IV, observou-se os deslocamentos químicos característicos dos carbonos C-2 e C-5 do anel heterocíclico além dos C- $\alpha$  e C- $\beta$ . O C-5 foi assinalado com os maiores deslocamentos químicos, na faixa de 161,9 a 164,2 ppm e, o C-2 com os menores deslocamentos químicos 156,6 a 159,9 ppm, em relação aos primeiros, ambos carbonos quaternários. O C- $\alpha$  foi assinalado entre 106,1 a 114,8 ppm, e o C- $\beta$  na faixa de 143,2 a 144,5 ppm. A **Tabela 18** apresenta os principais deslocamentos químicos para os cloridratos mesoiônicos **30-35**.

**Tabela 18.** Principais deslocamentos químicos ( $\delta$ ) dos carbonos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos em DMSO- $d_6$  dos cloridratos mesoiônicos Série IV



C	Deslocamento químico ( $\delta$ )					
	30	31	32	33	34	35
2	159,9	159,5	159,6	159,6	159,9	156,6
5	162,6	164,2	162,9	162,9	162,2	161,9
$\alpha$	114,8	106,1	106,1	106,1	106,1	106,1
$\beta$	143,6	144,5	n.o. <sup>a</sup>	143,8	143,3	143,2
1'	125,8	125,7	128,2	125,8	134,0	125,8
2'	108,1	114,6	n.o. <sup>a</sup>	114,9	114,9	121,1
3'	150,3	152,4	152,4	152,4	152,4	152,4
4'	144,2	144,5	144,2	144,2	144,1	144,2
5'	106,1	108,1	n.o. <sup>a</sup>	108,1	108,1	108,1
6'	152,4	150,4	150,3	150,3	150,3	150,3
1''	137,4	137,4	137,4	137,4	136,5	132,1
2''	130,0	126,7	129,8	130,6	130,3	129,3
3''	130,6	130,6	130,6	132,2	130,6	130,6
4''	132,2	132,3	n.o. <sup>a</sup>	132,7	132,1	132,1
5''	130,6	130,6	130,6	132,2	130,6	130,6
6''	130,0	126,7	129,8	130,6	130,3	129,3
1'''	138,9	144,3	137,9	138,3	137,4	137,4
2'''	119,1	118,8	120,6	120,9	119,2	126,6
3'''	126,6	126,1	126,6	126,6	126,6	115,1
4'''	124,7	143,0	125,8	116,2	125,8	n.o.
5'''	126,6	126,1	126,6	126,6	126,6	115,1
6'''	119,1	118,8	120,6	120,9	119,2	126,6
OCH <sub>2</sub> O	104,7	104,7	104,7	104,7	104,6	104,6
CH <sub>3</sub>	----	----	----	----	20,9	----
OCH <sub>3</sub>	----	----	----	----	----	55,8

<sup>a</sup> não observado

Foi possível observar a variação do deslocamento químico do C-4''' ao longo da série, explicado pelos diferentes efeitos eletrônicos dos grupos substituintes. O menor valor foi atribuído ao C-4''' do composto que possui como substituinte o átomo de bromo em 116,2 ppm e o maior valor atribuído ao C-4''' do composto que possui como substituinte o grupo nitro em 143,0 ppm. O sinal referente ao carbono do grupamento metilenodióxi foi atribuído em 104,7 ppm.

### 4.3. Ensaios Biológicos

#### 4.3.1. Estudos de inibição da enzima tirosinase para os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I)

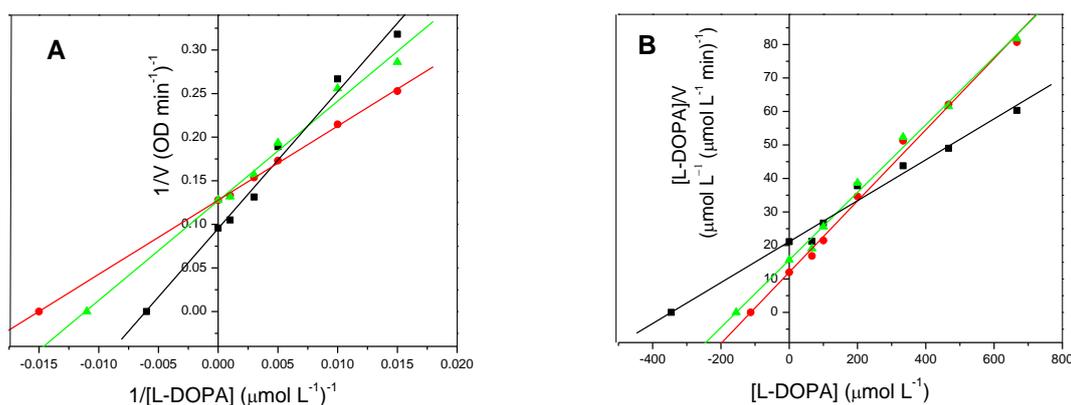
Os estudos de inibição enzimática se iniciaram através da realização de um *screening* sobre o potencial inibitório dos compostos mesoiônicos na enzima tirosinase. Os compostos **12**, **13**, **14**, **16** e **17** foram testados em concentrações de 66,6 e 666  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com exceção do **15**, que era insolúvel na concentração de 666  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Portanto, o composto **15** foi testado apenas em uma solução 10 vezes mais diluída (66,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). Os resultados obtidos para este ensaio inicial são apresentados na **Tabela 19**.

**Tabela 19.** Percentual de inibição para os compostos mesoiônicos (66,6 e 666  $\mu\text{M}$ ) na presença do substrato L-DOPA.

Composto	R'	R	% inibição (66,6 $\mu\text{M}$ )	% inibição (666 $\mu\text{M}$ )
<b>12</b>	H	H	10	23
<b>13</b>	$\text{NO}_2$	H	2	29
<b>14</b>	Br	H	1	22
<b>15</b>	H	$\text{NO}_2$	4	----
<b>16</b>	H	Cl	35	89
<b>17</b>	H	Br	10	79

Para os dois melhores compostos inibidores da tirosinase, **16** e **17**, foram calculados os valores de  $\text{IC}_{50}$ , sendo  $124 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $358 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. O composto **16** mostrou o resultado mais promissor da inibição da enzima mostrando-se altamente eficaz, sendo mais eficiente que o ácido ascórbico, o inibidor de referência (neste trabalho,  $\text{IC}_{50} = 260 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (KIM & UYAMA, 2005).

O mecanismo de inibição enzimática também foi investigado para o composto mesoiônico mais ativo, **16**, através da realização de um estudo cinético da tirosinase com diferentes concentrações do substrato L-DOPA. Os gráficos obtidos são os de Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf, apresentados na **Figura 31A e B**, respectivamente.



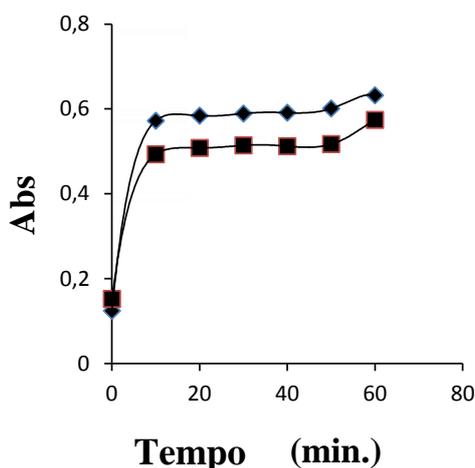
**Figura 3113.** (A) Gráfico de Lineweaver-Burk e (B) Gráfico de Hanes-Woolf para inibição de tirosinase, na ausência (controle ■) ou na presença de **16** (♦  $466 \mu\text{mol L}^{-1}$  e ▲  $333 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com L-DOPA como substrato.

O gráfico Lineweaver-Burk mostra que o composto **16** agiu aparentemente como inibidor incompetitivo, e claramente não como um inibidor competitivo, porque os valores de  $K_m$  e  $V_m$  diminuíram na presença do inibidor. Uma forma de distinguir entre inibidores competitivos e incompetitivos pode ser realizada empregando o gráfico de Hanes-Woolf (SEGEL, 1982). Neste gráfico, uma inibição competitiva exhibe linhas paralelas, ao passo que se ocorrer uma intersecção entre as linhas este será mecanismo incompetitivo. Além disso, os valores de  $K_m$  e  $V_m$  obtidos no gráfico de Hanes-Woolf confirmaram o mecanismo incompetitivo (**Tabela 20**). No mecanismo incompetitivo, o inibidor liga-se reversivelmente ao complexo formado entre a enzima e o substrato (complexo ES) e não se liga a enzima livre.

**Tabela 20.** Parâmetros cinéticos obtidos a partir dos gráficos Lineweaver-Burk e Hanes-Woolf para **16** na oxidação catalítica de L-DOPA pela tirosinase.

Parâmetros Cinéticos		Concentração Inibitória ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		
Ausência do inibidor		0	466	333
Lineweaver-Burk	$K_m$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	166,6	66,6	90,9
	$V_m$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	10,4	7,8	7,8
Hanes-Woolf	$K_m$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	345,8	112,6	155,2
	$V_m$ ( $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	16,4	9,4	9,9

O método *in vitro* para avaliar o efeito inibitório dos compostos orgânicos sobre a tirosinase possui um tempo padrão de 30 min (SEGEL, 1982). Depois desse tempo, o poder de inibição da amostra de teste pode diminuir ou permanecer constante, conferindo um mecanismo de inibição estável. Com base nisso, foi avaliada a cinética da oxidação de L-DOPA pela tirosinase na ausência e presença do composto **16** (Figura 32).



**Figura 32.** Cinética de ação da enzima tirosinase em L-DOPA na presença de **16**. (♦) L-DOPA ( $170 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e (■) L-DOPA ( $170 \mu\text{M}$ ) + **16** ( $33 \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

O resultado mostrou que concentração de dopacromona produzida durante o processo oxidativo foi menor na presença de inibidor, diminuindo assim, o poder de inibição, o que confirma o mecanismo acompetitivo.

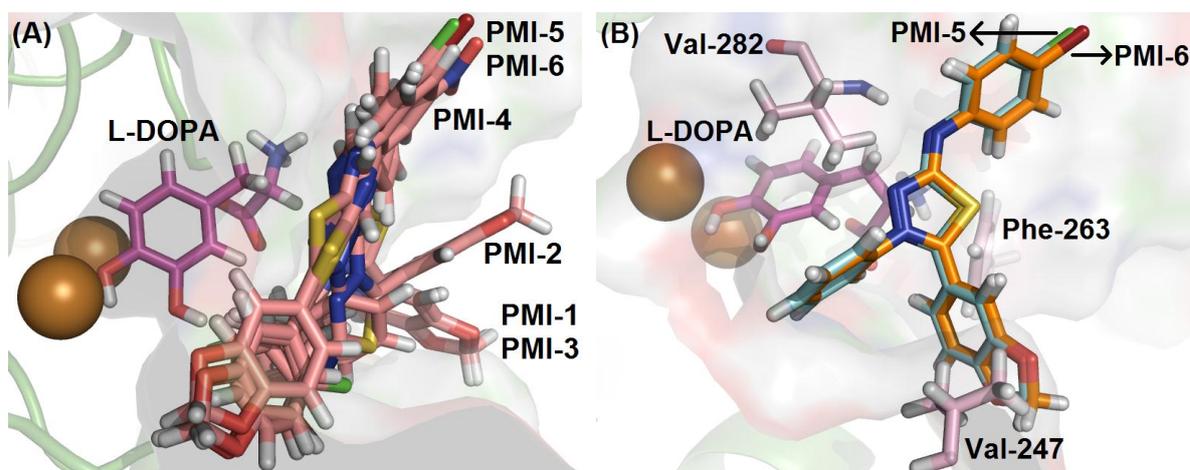
#### 4.3.2. Estudos de *docking* para a interação entre a tirosinase e os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I)

Os resultados experimentais do ensaio de inibição da tirosinase demonstraram que compostos mesoiônicos da série I apresentam mecanismo inibitório acompetitivo, onde os inibidores se ligam reversivelmente ao complexo formado entre a enzima e o substrato L-DOPA (complexo ES) e não na enzima livre. Com base nessas informações experimentais, foi realizado um estudo de *docking* molecular para oferecer uma explicação a nível molecular sobre a inibição da tirosinase pelos compostos mesoiônicos **12–17**. A Figura 33 A apresenta o melhor encaixe para todos compostos mesoiônicos na presença de L-DOPA. Conforme

esperado com a presença dos mesoiônicos (inibidores) e do substrato (L-DOPA), o grupo piperonal substituído por doadores de elétrons e o anel heterocíclico 1,3,4-tiadiazólio presentes nas estruturas dos mesoiônicos não se apresentaram próximos o suficiente para coordenar com o sítio de cobre presente na enzima. O resultado da modelagem molecular sugeriu que a inibição da tirosinase pelos **12–17** não está relacionada com a capacidade de coordenação com o  $\text{Cu}^{2+}$ , mas sim, com sua interação com a L-DOPA que está dentro do sítio ativo da enzima.

Os resultados do *docking* molecular, também, sugeriram que os inibidores **16** e **17**, que apresentaram melhor percentual de inibição experimental, adotam posturas muito semelhantes dentro do sítio ativo da proteína. Além disso, os resultados do *docking* molecular também sugeriram que o **15** (analisado em uma solução 10 vezes mais diluída), também pode interagir de forma semelhante ao **16** e **17**. Os outros compostos mesoiônicos são acomodados diferentemente dentro da cavidade proteica.

A **Figura 33B** apresenta a sobreposição dos melhores encaixes para **16** e **17** dentro do sítio ativo da tirosinase interagindo com a L-DOPA, mostrando os principais resíduos de aminoácidos da enzima que interagem com estes dois inibidores. O resíduo Phe-263 interage via empilhamento em *t* com o anel aromático do grupo piperonal com uma distância de 2,70 Å e, o resíduo de aminoácido Val-247 via interações hidrofóbicas com o mesmo anel aromático, a uma distância de 2,60 Å. Observa-se, também, uma ligação de hidrogênio entre o hidrogênio NH peptídico do resíduo Val-282 e o nitrogênio exocíclico do ligante, com uma distância de 2,30 e 2,50 Å, para **16** e **17**, respectivamente.



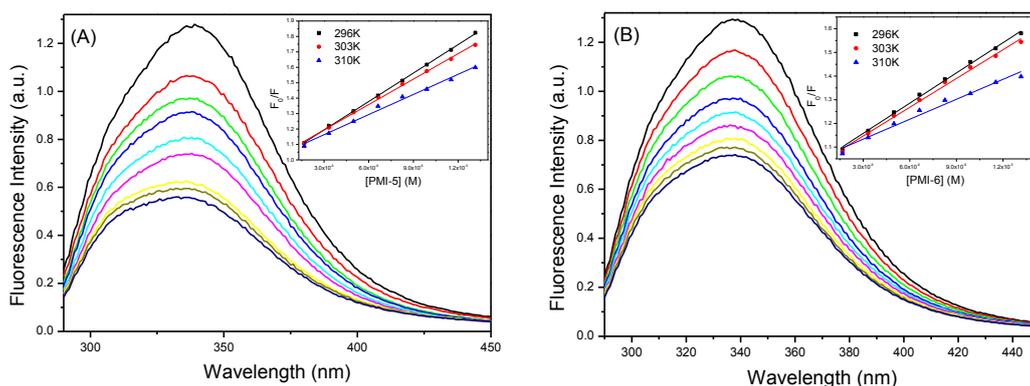
**Figura 33.** (A) Superfície molecular da tirosinase e sua interação com os compostos mesoiônicos **12–17** (PMI-1 a PMI-6) na presença de L-DOPA. (B) Superposição das melhores poses de ancoragem para o interação de tirosinase com **16** e **17** (PMI-5 e PMI-6) na presença de L-DOPA (função GoldScore). Os ligantes na representação do bastão estão em rosa, rosa claro e bege, respectivamente. Na Figura 33B, **16** e **17** são representados em ciano e laranja, respectivamente. Átomos de cobre estão representados como esferas em marrom. Cores dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro; bromo: vermelho acastanhado e cloro: verde.

#### 4.3.3. Estudos de interação com a albumina sérica humana (HSA) para os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I) – Análise por supressão de fluorescência

A supressão por fluorescência pode ser usada como uma técnica para medir afinidade de ligação entre macromoléculas e ligantes agindo como supressores. A supressão da fluorescência do triptofano (Trp) é amplamente utilizada como uma ferramenta para monitorar mudanças na estrutura da proteína e fazer inferências em relação à estrutura e

dinâmica locais (LAKOWICZ, 2006). Há apenas um resíduo de triptofano (Trp-214) na estrutura de HSA, que está localizado em subdomínio IIA, inserido dentro da estrutura da proteína (CHAVES et al., 2015). Como pode ser observado na **Figura 34**, o espectro de fluorescência do HSA apresenta uma forte emissão com máximo a 340 nm ( $\lambda_{exc} = 280$  nm).

Dessa forma, após sucessivas adições na solução de HSA dos dois compostos mesoiônicos que mostraram a maior inibição para tirosinase, isto é, **16** e **17** (conforme **item 4.3.1**), a emissão de fluorescência resultante do resíduo Trp-214 mostrou claramente uma diminuição da intensidade de emissão da fluorescência, indicando que as moléculas devem estar próximas do resíduo de triptofano dentro da cavidade da proteína (LIU et al., 2003). Os experimentos com a HSA foram realizados em três temperaturas diferentes.



**Figura 34.** Espectro de emissão de fluorescência para HAS livre e com adição de supressores (mesoiônicos) por alíquotas sucessivas de **16** (A) e **17** (B). HSA foi preparado com solução-tampão PBS (pH 7.4).  $[HSA] = 1.00 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, **[16]** = **[17]** = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, T = 310 K,  $\lambda_{exc} = 280$  nm. Inserção: Gráfico Stern-Volmer para supressão de fluorescência de HSA por **16** (A) e **17** (B) a 296 K, 303 K e 310 K.

Uma variedade de interações moleculares pode resultar em dois possíveis mecanismos de extinção de uma espécie fluorescente, isto é, dinâmico ou estático. Essas interações incluem a formação de complexos no estado fundamental, supressão colisional, reações de estado excitado, rearranjo molecular e transferência de energia (JANKOVIC et al., 2016). Em geral, a análise de Stern-Volmer, através da equação a seguir, é útil para estimar a acessibilidade da molécula de extinção (inibidor) para o resíduo de triptofano em proteínas, bem como na compreensão do mecanismo envolvido neste processo (LAKOWICZ, 2006).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv} [Q]$$

onde,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência para HSA na ausência e na presença de **16** ou **17**, respectivamente;  $K_{sv}$  é a constante de extinção do Stern-Volmer (CHAVES et al., 2015).

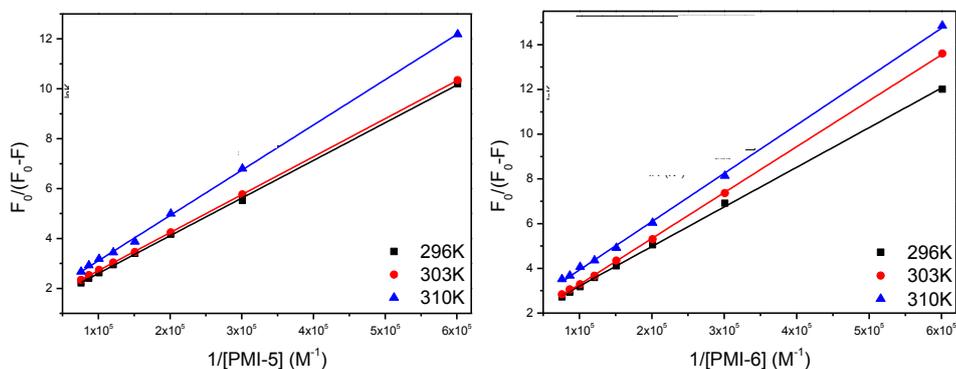
A **Tabela 21** apresenta os valores de  $K_{sv}$  obtidos a partir da fluorescência envolvendo HSA:**16** e HSA:**17**. Os valores de  $K_{sv}$  diminuiram com o aumento da temperatura, mostrando que o mecanismo provável de extinção de fluorescência é estático (GENTILI et al., 2008). Supressão estática é devido à formação de uma associação no estado fundamental entre o fluoróforo (albumina) e o inibidor (**16** ou **17**) (CHAVES et al., 2017).

Para obter informações sobre a capacidade de ligação na interação HSA:**16** e HSA:**17**, a constante de ligação de Stern-Volmer modificada ( $K_a$ ) foi calculada empregando a equação correspondente a seguir:

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK_a[Q]} + \frac{1}{f}$$

onde,  $F_0$  e  $F$  são as intensidades de fluorescência de HSA sem e com o ligante a 340 nm, respectivamente;  $K_a$  é a constante de ligação de Stern-Volmer modificada;  $f$  é a fração da fluorescência inicial que é acessível ao inibidor e  $[Q]$  é a concentração do ligante.

Os valores de  $K_a$  para a associação HSA:**16** e HSA:**17** estão na ordem de grandeza de  $10^4 \text{ mol L}^{-1}$ , mostrando uma interação moderada entre os ligantes e HSA (CHAVES et al., 2016; TIAN et al., 2005). Do ponto de vista farmacológico, se fármacos são metabolizados e excretados do corpo muito rapidamente devido a baixa ligação proteica eles não serão capazes de fornecer seu efeito terapêutico. Por outro lado, se os fármacos se ligarem muito fortemente à proteína e forem metabolizados e excretados muito lentamente, a meia-vida *in vivo* desses fármacos pode aumentar excessivamente, o que pode levar a efeitos colaterais indesejáveis. Portanto, uma constante de ligação moderada à albumina sérica é esperada para um possível candidato a fármaco (BARROS et al., 2016). A diminuição dos valores de  $K_a$  com o aumento da temperatura está em total concordância com o mecanismo de extinção de fluorescência estático proposto discutido acima (CHAVES et al., 2017).



**Figura 35.** Gráfico de Stern-Volmer modificado de supressão de fluorescência para **16** (A) e **17** (B) a 296 K, 303 K e 310 K.

**Tabela 21.** Constantes de ligação ( $K_{SV}$  e  $K_a$ ) para os complexos HSA:**16** e HSA:**17** a 296 K, 303 K e 310 K.

Ligante	T (K)	$K_{SV} \times 10^4$ (mol L <sup>-1</sup> )	$K_a \times 10^4$ (mol L <sup>-1</sup> )
<b>16</b>	296	(6.14±0.05)	(7.80±0.05)
	303	(5.49±0.09)	(7.49±0.05)
	310	(4.35±0.15)	(7.13±0.06)
<b>17</b>	296	(4.26±0.08)	(8.08±0.06)
	303	(4.05±0.10)	(7.22±0.05)
	310	(2.81±0.16)	(5.96±0.08)

Obs.:  $r^2 = 0.9997-0.9918$  para todas as medidas listadas acima.

Os experimentos envolvendo a interação dos compostos mesoiônicos com a HSA e o estudo de modelagem molecular foram realizados em colaboração com os professores Otávio Augusto Chaves, Carlos Maurício R. Sant' Anna e José Carlos Ferreira Netto da UFRRJ.

#### 4.3.4. Estudos de atividade citotóxica frente a células leucêmicas para os compostos mesoiônicos da Série II

##### Determinação dos valores de IC<sub>50</sub>

Os compostos mesoiônicos da Série II foram avaliados frente a três linhagens de células leucêmicas humanas: Jurkat uma linhagem de linfócitos T derivada da leucemia/linfoma de células T do adulto, MT2 leucemia linfocítica infectada com o HTLV-I e K562 leucemia eritrocítica, em culturas de 72 horas.

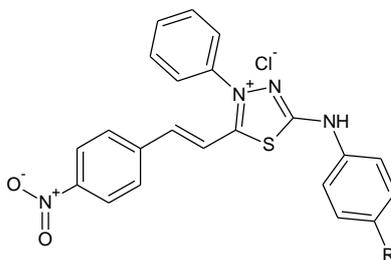
Os resultados obtidos mostraram-se promissores, considerando que para alguns compostos os ensaios ainda estão em andamento. A **Tabela 22** apresenta os resultados obtidos até o momento.

**Tabela 22.** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os compostos da Série II em culturas de 72 horas frente as linhagens de leucemias humanas Jurkat, MT2 e K562.

Composto	R	Linhagem celular		
		Jurkat <sup>a</sup> IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	MT2 <sup>b</sup> IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	K562 <sup>c,d</sup> IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )
<u>18</u>	H	2,90±0,15	6,25±0,71	7,08±0,08
<u>22</u>	CH <sub>3</sub>	26,83±0,43	26,42±0,32	n.d. <sup>e</sup>
<u>20</u>	Cl	n.d. <sup>e</sup>	> 25	25 – 12,5
<u>21</u>	Br	n.d. <sup>e</sup>	n.d. <sup>e</sup>	> 50

<sup>a</sup> leucemia linfocítica; <sup>b</sup> leucemia T infectada com o vírus HTLV-1; <sup>c</sup> leucemia eritrocítica;

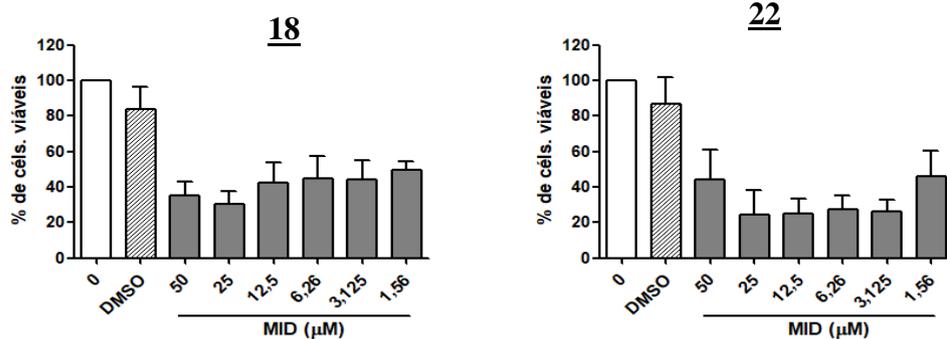
<sup>d</sup> Reis et al., 2011; <sup>e</sup> não determinado.



Os valores de IC<sub>50</sub> observados indicaram uma maior eficiência para o composto 18 frente as linhagens ensaiadas destacando-se a MT2 infectada pelo HTLV-I, uma leucemia extremamente agressiva e com baixa resposta ao tratamento quimioterápico. O composto 22 apresentou IC<sub>50</sub> na faixa de 26 μmol L<sup>-1</sup> sendo menos ativo, porém promissor.

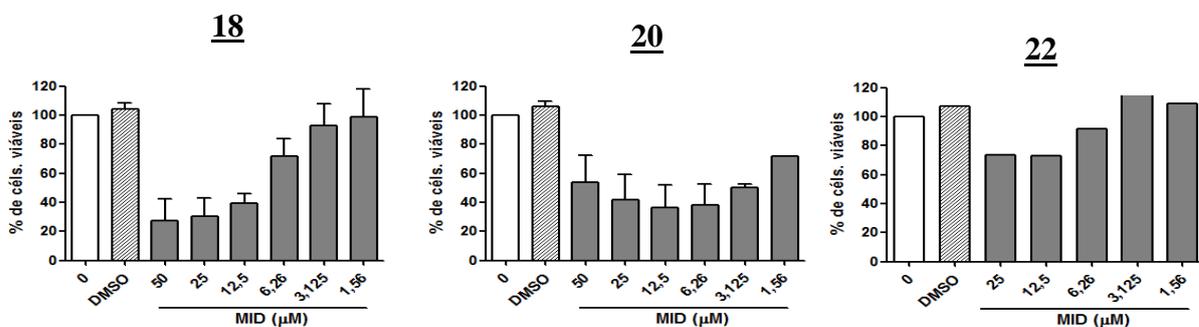
##### Resultados de viabilidade celular

Os compostos 18, 20, 21 e 22 foram avaliados com relação a atividade citotóxica em culturas de 72 horas em 6 concentrações diferentes. Os gráficos de viabilidade celular para a linhagem Jurkat estão apresentados na **Figura 36**, para a linhagem MT2 na **Figura 37** e para a linhagem K562 na **Figura 38**.



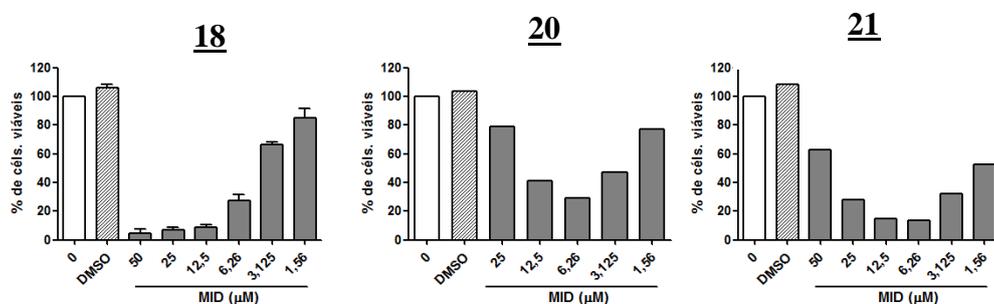
**Figura 36.** Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 18 e 22 frente a linhagem Jurkat em cultura de 72 horas.

Os gráficos de viabilidade celular da linhagem Jurkat confirmaram que os compostos 18 e 22 apresentam atividade significativa.



**Figura 37.** Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 18, 20 e 22 frente a linhagem MT2 em cultura de 72 horas.

Observando-se os gráficos de viabilidade celular frente a linhagem MT2 concluiu-se que os compostos 18 e 22 foram mais ativos em comparação com o 20. A **Figura 38** apresenta os gráficos de viabilidade celular frente a linhagem K562 e, claramente pode ser observada a maior eficiência do composto 18 em comparação com o 20 e 21.



**Figura 38.** Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 18, 20 e 21 frente a linhagem K562 em cultura de 72 horas.

Os resultados obtidos para a atividade citotóxica foram coerentes com os descritos anteriormente para outras linhagens onde o composto 18 mostrou-se com excelente atividade,

como por exemplo, frente ao linfoma de Daudi (em cultura de 72 horas,  $IC_{50}=7,97 \mu\text{mol L}^{-1}$ , REIS et al., 2011), frente ao melanoma B16-F10 (em cultura de 72 horas, 1% de células viáveis na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , SENFF-RIBEIRO et al., 2004) e frente aos melanomas MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO (em culturas de 48 horas, apresentou viabilidade celular de 50% entre 5 e  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , SENFF-RIBEIRO et al., 2004).

Assim, os resultados obtidos até o momento mostraram a importância da continuidade dos ensaios com os compostos da Série II, bem como com os das outras séries ainda não investigadas, pois, apresentaram atividade citotóxica significativa levando a necessidade de estudos sobre o possível mecanismo de ação.

Os ensaios de atividade citotóxica foram realizados em colaboração com a Dra. Juliana Echevarria-Lima do Instituto de Microbiologia da UFRJ.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As metodologias empregadas para síntese dos cloridratos mesoiônicos se mostraram eficientes, sendo possível sua obtenção com altos rendimentos e grau de pureza satisfatórios. A metodologia com o emprego de micro-ondas apresentou melhores rendimentos, mostrando vantagem em relação a metodologia tradicional considerando-se menor tempo de reação e número menor de etapas. As análises espectroscópicas confirmam as estruturas propostas.

Os compostos da Série I, derivados do 6-X-piperonal se mostraram promissores quanto a atividade de inibição da enzima tirosinase destacando-se os derivados **16** e **17** com maior ação inibitória e mais eficiente do que o ácido ascórbico utilizado como referência positiva.

O estudo de Modelagem Molecular se apresentou como uma importante ferramenta para confirmação da atividade inibitória da tirosinase utilizando a técnica de *docking* com a enzima e o substrato.

O estudo da interação dos compostos **16** e **17** com a HSA mostrou que os mesmos poderiam ser utilizados como protótipos para fármacos devido à ordem de grandeza, moderada, da constante de interação de Stern-Volmer modificada.

Os compostos da Série II apresentaram resultados promissores frente às 3 linhagens de leucemias humanas (Jurkat, MT2 e K562) destacando o composto **18** como o mais ativo da série dentre os que foram avaliados.

Na continuidade desse trabalho, serão finalizados os estudos sobre a atividade citotóxica, bem como a investigação do possível mecanismo de ação desses compostos.

Além disso, os compostos das Séries III e IV serão avaliados quanto as atividades de inibição da tirosinase e citotóxica frente a linhagens de células tumorais.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Materiais

#### 6.1.1 Equipamentos

- I) Os pontos de fusão foram determinados utilizando um aparelho da marca Gehaka, modelo PF1500, e não foram corrigidos;
- II) Placas de aquecimento e agitação da marca Ika e Fisatom;
- III) Foi utilizada uma balança de precisão com quatro casas decimais de OHAUS, para pesagem do material.
- IV) Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Vertex Bruker 70;
- V) Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ ) foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance II 400 ( $^1\text{H}$ , 400 MHz;  $^{13}\text{C}$ , 100 MHz) utilizando TMS como referência interna;
- VI) O reator de micro-ondas utilizado na síntese foi da marca CEM Discover System.

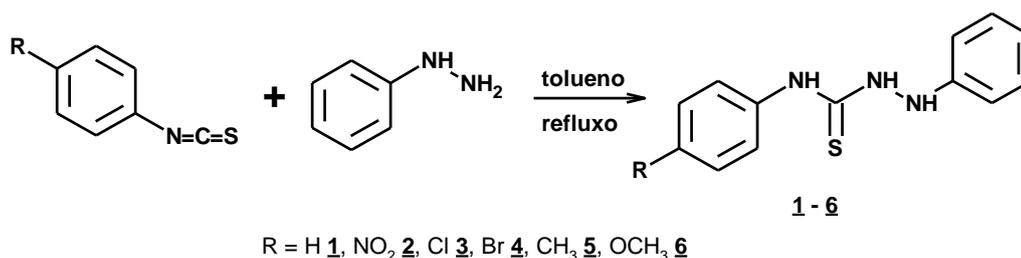
#### 6.1.2 Reagentes e solventes

- I) Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se acetona, metanol,  $\text{CHCl}_3$  e DMSO deuterados como solventes;
- II) Os solventes utilizados nas sínteses, purificações e cromatografia em camada fina foram todos de grau P.A. da Vetec, sendo eles:
  - Clorofórmio
  - Acetato de etila
  - Hexano
  - Tolueno
  - 1,4-dioxano
  - Etanol
  - Diclorometano
  - Metanol
  - Éter etílico
  - Piridina
- III) Os reagentes utilizados nas sínteses dos intermediários e dos compostos mesoiônicos foram das marcas Merck, Aldrich e Vetec:
  - Fenilisotiocianato
  - *p*-Nitro-fenilisotiocianato
  - *p*-Metóxi-fenilisotiocianato
  - *p*-Toluil-isotiocianato
  - *p*-Clorometil-fenilisotiocianato
  - Fenil-hidrazina
  - Hidrazina hidrato
  - Cinamaldeído
  - Ácido malônico
  - Cloreto de tionila
  - Ácido clorídrico

- Ácido acético
- Piperonal
- Piperidina
- Ácido *p*-nitrobenzóico
- Ácido *p*-fluorbenzóico

## 6.2. Metodologias Sintéticas

### 6.2.1. Procedimento geral para a síntese das tiossemicarbazidas *N*<sub>1</sub>,*N*<sub>4</sub>-disubstituídas



Em um balão de fundo redondo de 50 mL adicionou-se 25 mmol de aril-isotiocianato, 25 mmol de fenil-hidrazina e 20 mL de tolueno como solvente orgânico. A mistura reacional foi submetida a refluxo por 30 minutos. A formação do produto foi acompanhada por CCDA. Ao final, obteve-se a precipitação de cristais que foram filtrados e lavados com tolueno gelado. Os rendimentos variaram entre 70-85%.

#### 6.2.1.1 Caracterização espectroscópica das tiossemicarbazidas *N*<sub>1</sub>,*N*<sub>4</sub>-substituídas

***N*-2-difenil-hidrazina-carbotioamida 1**. Sólido branco; Ponto de fusão: 171-173 °C; IV (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>): 3282, 3212, 3170 (N-H), 1594, 1542, 1496 (C=C), 1207 (C=S); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  9,66 (s, 1H, H-2); 8,70 (s, 1H, H-4); 7,56 (d, 2H, H-6, H-10); 7,42 (s, 1H, H-1); 7,29 (t, 2H, H-7, H-9); 7,25 (t, 2H, H-13, H-15); 7,12 (t, 1H, H-8), 6,89 (t, 1H, H-14), 6,87 (d, 2H, H-12, H-16). RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  183,2 (C-3); 149,0 (C-11); 140,5 (C-5); 130,3 (C-13, C-15); 129,2 (C-7, C-9); 126,0 (C-8); 125,2 (C-6, C-10); 122,0 (C-14); 114,6 (C-12, C-16).

***N*-(4-nitrofenil)-2-fenil-hidrazina-carbotioamida 2**. Sólido amarelo; Ponto de fusão: 233-234°C; IV (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>) 3435; 3249; 3190 (N-H), 1600, 1568, 1504 (C=C), 1280 (C=S); 1504 (C-NO<sub>2</sub>); 1332 (N=O); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10,19 (s, 1H, H-2), 9,08 (s, 1H, H-4), 8,20 (d, 2H, H-6, H-10), 8,20 (t, 2H, H-7, H-9), 7,50 (s, 1H, H-1), 7,27 (t, 2H, H-13, H-15), 6,89 (d, 2H, H-12, H-16), 6,88 (t, 1H, H-14); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  183,0 (C-3), 148,8 (C-11), 146,8 (C-5), 145,1 (C-8), 130,5 (C-13, C-15), 125,0 (C-7, C-9), 124,1 (C-6, C-10), 122,5 (C-14), 114,9 (C-12, C-16).

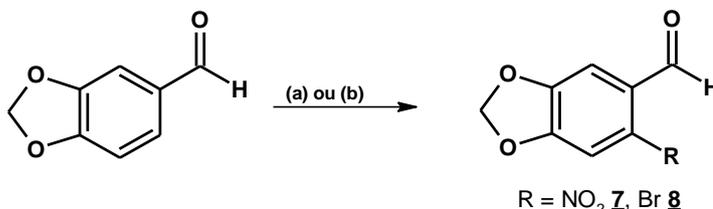
***N*-(clorofenil)-2-fenil-hidrazina-carbotioamida 3**. Sólido branco; Ponto de fusão: 233-234°C; IV (KBr,  $\nu$  cm<sup>-1</sup>) 3435, 3315, 3140 (N-H), 1600, 1554, 1508 (C=C), 1286 (C=S); 1209, 758 (C-Cl); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  9,79 (s, 1H, H-2), 8,85 (s, 1H, H-4), 7,77 (d, 2H, H-7, H-9), 7,45 (s, 1H, H-1), 7,31 (t, 2H, H-3, H-5), 7,25 (t, 2H, H-13, H-15), 6,89 (t, 1H, H-14), 6,88 (d, 2H, H-12, H-16); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  183,2 (C-3), 148,9 (C-11), 139,3 (C-5), 130,5 (C-8), 130,2 (C-13, C-15), 129,1 (C-7, C-9), 126,8 (C-6, C-10), 120,10 (C-14), 114,5 (C-12, C-16).

**N-(4-bromofenil)-2-fenil-hidrazina-carbotioamida 4.** Sólido branco; P.F. 209-212 °C; IV (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3249, 3182 (N-H), 1597, 1585, 1489 (C=C), 1199 (C=S), 1072, 769 (C-Br); RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  9,81 (s, 1H, H-2), 8,85 (s, 1H, H-4), 7,74 (d, 3H, H-7, H-9), 7,46 (s, 1H, H-1), 7,46 (t, 2H, H-6, H-10), 7,24 (t, 3H, H-13, H-15), 6,90 (t, 1H, H-14), 6,87 (d, 2H, H-12, H-16); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  181,1 (C-3), 147,9 (C-11), 138,7 (C-5), 130,7 (C-7, C-9), 128,9 (C-13, C-15), 127,2 (C-6, C-10), 119,9 (C-14), 116,9 (C-8), 113,1 (C-12, C-16).

**N-(toluil)- 2-fenil-hidrazina-carbotioamida 5.** Sólido branco; P.F. 174-175 °C; IV (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3437, 3275, 3186 (N-H), 3020 (C-H), 1627, 1550, 1490 (C=C), 1269 (C=S); RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  9,57 (s, 1H, H-2), 8,63 (s, 1H, H-4), 7,57 (d, 2H, H-6, H-10), 7,38 (s, 1H, H-1), 7,25 (t, 2H, H-13, H-15), 7,09 (t, 2H, H-7, H-9), 6,88 (t, 1H, H-14), 6,88 (d, 2H, H-12, H-16), 2,28 (s, 3H;  $\text{CH}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  182,9 (C-3), 148,7 (C-11), 137,5 (C-5), 135,2 (C-8), 129,9 (C-13, C-15), 129,4 (C-7, C-9), 125,0 (C-6, C-10), 121,6 (C-14), 114,2 (C-12, C-16), 20,8 ( $\text{CH}_3$ ).

**N-(4-metoxifenil)-2-fenil-hidrazina-carbotioamida 6.** Sólido branco; P.F. 184-186 °C; IV (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3267, 3161, 3091 (N-H), 3028 (C-H), 1600, 1548, 1492 (C=C), 1247 (C=S), 1170 (ArC-O), 1026 (Ar-O-C); RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  9,51 (s, 1H, H-2), 8,60 (s, 1H, H-4), 7,53 (s, 1H, H-1), 7,53 (d, 2H, H-12, H-16), 7,38 (d, 2H, H-7, H-9), 7,25 (t, 2H, H-13, H-15), 6,88 (t, 1H, H-14), 6,84 (d, 2H, H-6, H-10), 3,76 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, acetona- $d_6$ )  $\delta$  183,6 (C-3), 158,5 (C-8), 149,2 (C-11), 133,4 (C-5), 130,3 (C-13, C-15), 127,4 (C-6, C-10), 121,9 (C-14), 114,6 (C-12, C-16), 114,4 (C-7, C-9), 56,0 ( $\text{OCH}_3$ ).

## 6.2.2. Procedimentos de síntese dos aldeídos aromáticos 6-X-substituídos derivados do piperonal



Condições reacionais: (a) ácido acético,  $\text{HNO}_3$ , t.a.; (b) Metanol,  $\text{Br}_2$ , t.a.

### ➤ Síntese do 6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 7

Em um balão de fundo redondo foi adicionado 0,1000 mol (5 g) de piperonal e 0,0875 mol (5mL) de ácido acético glacial. Em seguida, adicionou-se 0,1500 mol (6,35mL) de ácido nítrico concentrado à 65%. A reação foi mantida com a temperatura entre 20-25 °C usando banho de gelo, sob agitação, durante 30 minutos. Após a conclusão da reação, acompanhada por CCDA, foi realizado uma filtração simples, obtendo-se um sólido amorfo, amarelo claro. O produto obtido foi recristalizado em mistura de etanol e água 1:1. O rendimento foi de 77%, após a recristalização (DUARTE et al., 2007; MELOS, 2015).

### ➤ Síntese do 6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8

Em um balão de fundo redondo, foi adicionado 0,0133 mol (2,0 g) de piperonal que foram dissolvidos em 14,0 mL de metanol e duas gotas de ácido acético glacial. Em seguida, foi adicionado 5,75 g (1,84 mL) de solução de bromo 0,0359  $\text{mol.L}^{-1}$ . A reação foi mantida

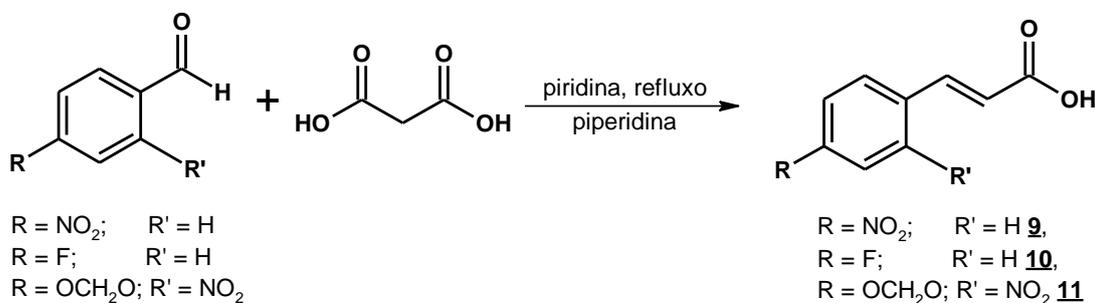
em agitação por 2 h. A reação foi acompanhada por CCDA e após o consumo de todo piperonal, foi adicionada à água gelada para fornecer um precipitado de cor laranja ao qual se adicionou 9,60 mL de uma solução 1,0 mol.L<sup>-1</sup> de bissulfito de sódio para remover o bromo remanescente. O precipitado foi filtrado e observou-se o aparecimento de um sólido amorfo branco, que foi recristalizado em metanol. O rendimento foi de 70% (LUO et al., 2002; MELOS, 2015).

### 6.2.2.1 Caracterização espectroscópica dos derivados do piperonal

**6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 7.** Sólido amarelo. Ponto de Fusão: 91-92 °C. IV (KBr;  $\nu$  cm<sup>-1</sup>) 2927 (C-H), 1683(C=O), 1597 e 1419 (C=C), 1521 (NO<sub>2</sub>), 1338, 1278 (COC), 1031 (C-O) e 879(C-N); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10,07 (s, 1H, CHO); 7,75 (s, 1H, H-5); 7,32 (s, 1H, H-2 ); 6,36 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  188,60 (CHO); 152,38 (C-3); 151,77 (C-4); 127,95 (C-1); 105,43 (C-5); 107,42 (C-2); 146,14 (C-6); 104,49(OCH<sub>2</sub>O).

**6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8.** Sólido branco. Ponto de fusão: 129-130°C. IV (KBr;  $\nu$  cm<sup>-1</sup>) 2922, 1674, 1616, 1413, 1259, 1031 e 669; RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10,06 (s, 1H, CHO); 7,43 (s,1H, H-2); 7,29 (s, 1H, H-5); 6,23 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  190,49 (CHO); 153,95 (C-4); 148,60 (C-3); 127,84 (C-1); 121,22 (C-6); 113,76 (C-5); 107,87 (C-2); 103,81 (OCH<sub>2</sub>O).

### 6.2.3. Procedimento geral para síntese dos ácidos cinâmicos através da reação de Knoevenagel-Doebner



Em um balão de fundo redondo com 50 mL de capacidade foram adicionados 25 mmol do benzaldeído selecionado, 50 mmol de ácido malônico, 10 mL de piridina e gotas de piperidina. O sistema foi conectado a um condensador de refluxo e a mistura foi mantida a 90 °C durante 2 horas, e depois por mais 15 minutos sob refluxo. Após o resfriamento, a mistura reacional foi acidificada com uma solução de HCl (20% v/v) até pH 3. Os cristais precipitados foram filtrados e lavados com 20 mL de uma solução de HCl (20%) e depois com água gelada. Os rendimentos variaram entre 82-95 %.

#### 6.2.3.1. Caracterização espectroscópica dos ácidos cinâmicos

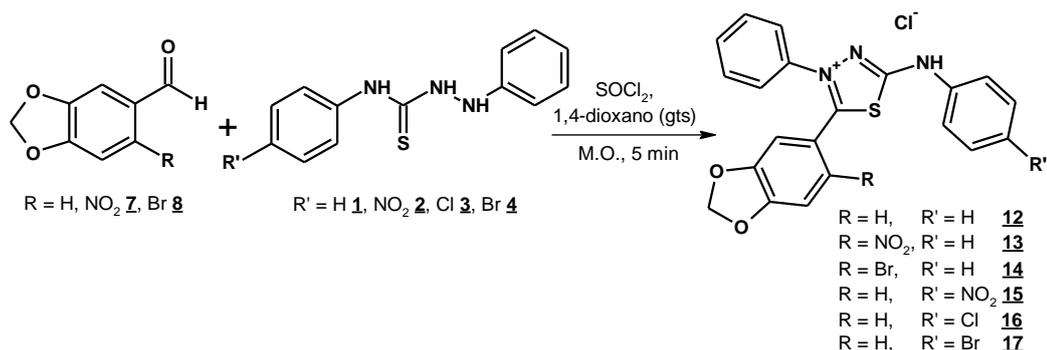
**Ácido 4-nitrocinâmico 9.** Sólido amarelo; Ponto de Fusão > 250 °C; IV (KBr;  $\nu$  cm<sup>-1</sup>) 3112 (C-H), 2982 (C-H), 1684 (C=O), 1603, 1520, 1496 (C=C); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12,73 (sl, 1H, OH), 8,25 (d, 2H, H-3, H-5), 7,99 (d, 2H, H-2, H-6), 7,71 (d, *J* 16,0, 1H, H- $\beta$ ),

6,75 (d, *J* 16,0, 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  167,5 (C=O), 148,4 (C-4), 141,8 (C- $\beta$ ), 141,2 (C-1), 129,7 (C-2, C-6), 124,4 (C-3, C-5), 123,5 (C- $\alpha$ ).

**Ácido 4-fluorcinâmico 10.** Sólido branco; Ponto de Fusão 178-180 °C; IV (KBr;  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ) 2982 (C-H), 1683 (C=O), 1626, 1593, 1505 (C=C); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,45 (sl, 1H, OH), 7,78 (dd, *J* 8,8; 5,8, 2H, H-2, H-6), 7,61 (d, *J* 16,0, 1H, H- $\beta$ ), 7,26 (d, *J* 8,8, 2H, H-3, H-5), 6,52 (d, *J* 16,0, 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  168,0 (C=O), 164,9 e 162,4 (C-4), 143,2 (C- $\beta$ ), 131,3 (C-2, C-6), 131,0 (C-1), 116,5 (C-3), 116,2 (C-5), 119,6 (C- $\alpha$ ).

**Ácido 6-nitro-(3,4-metilenodioxo)-cinâmico 11.** Sólido amarelo; Ponto de Fusão 224-226 °C; IV (KBr;  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ) 3434 (OH), 3069 (C-H), 2925 (C-H), 1696 (C=O), 1626, 1600, 1428 (C=C), 1518 (N=O), 1229 (C-O-C), 975; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OH}$ )  $\delta$  7,96 (d, *J*= 16,1, 1H, H- $\beta$ ), 7,55 (s, 1H, H-5), 7,23 (s, 1H, H-2), 6,36 (d, *J*=15,8, 1H, H- $\alpha$ ), 6,18 (sl, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OH}$ )  $\delta$  167,1 (C=O), 151,8 (C-6), 148,9 (C-3, C-4), 143,2 (C- $\beta$ ), 125,8 (C-1), 122,7 (C- $\alpha$ ), 107,0 (C-5), 105,3 (C-2), 103,8 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ).

#### 6.2.4. Procedimento Geral para a Síntese dos Cloridratos Meso-iônicos da Série I através de Micro-ondas



Em um balão de fundo redondo de 50 mL adicionou-se 0,38 mmol de difeniltiossemicarbazida substituída com 0,38 mmoles do aldeído e gotas de 1,4-dioxano para homogeneizar a mistura de reação. Em seguida acrescentou-se 1,14 mmoles de cloreto de tionila (3 eq.). Posteriormente, submeteu-se a mistura de reação a 5 minutos de irradiação em reator de micro-ondas a 100 W de potência. Após a irradiação a mistura reacional ficou em repouso por 24 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado sucessivamente com 1,4-dioxano gelado e água destilada gelada. Os produtos foram obtidos com rendimentos entre 60-95% e grau de pureza satisfatórios.

##### 6.2.2.1 Caracterização espectroscópica dos cloridratos meso-iônicos (Série I)

**Cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 12** Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 286-287 °C; IV (KBr,  $\nu$  /  $\text{cm}^{-1}$ ) 3053, 2902, 2642, 1604, 1566, 1498, 1448, 1311, 1242, 754 e 692; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  12,37 (s, 1H, NH), 7,72 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7,62 (m, 4H, H-3'', H-4'', H-5'', H-2'''), 7,46 (t, 2H, *J* 7,6 Hz, H-3''', H-5'''), 7,15 (m, 3H, H-5', H-6', H-4'''), 6,94 (s, 1H, H-2'), 6,17 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{O}$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  164,4 (C-5), 160,6 (C-2), 152,7 (C-3'), 148,3 (C-4'), 138,9 (C-1''), 138,3 (C-1'''), 131,9 (C-4'''), 130,9 (C-3'''), 130,0 (C-3'''), 127,0 (C-6'), 126,6

(C-2''), 124,6 (C-4'''), 118,9 (C-2'''), 116,5 (C-1'), 109,8 (C-2'), 109,7 (C-5'), 103,2 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-nitro-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 13.**

Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 264-266 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3008, 1602, 1566, 1494, 1450, 1365, 1326, 1267, 752 e 688; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12,75 (s, 1H, NH), 7,95 (s, 1H, H-5'), 7,65 (d, *J* 7,6 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7,58 (m, 5H, H-3''', H-4'', H-5'', H-3''', H-5'''), 7,46 (t, 2H, *J* 7,9 Hz, H-2''', H-6'''), 7,19 (t, *J* 7,4 Hz 1H, H-4'''), 6,38 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  163,2 (C-5), 161,8 (C-2), 152,9 (C-6'), 151,7 (C-3'), 142,8 (C-4'), 138,8 (C-1''), 137,5 (C-1'''), 132,2 (C-4''), 130,6 (C-3'''), 130,0 (C-3''), 125,6 (C-2''), 124,7 (C-4'''), 119,0 (C-2'''), 114,6 (C-1'), 111,2 (C-5'), 106,7 (C-2'), 105,6 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-bromo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 14.**

Sólido amarelo; Ponto de Fusão 278-279 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3012, 1604, 1568, 1498, 1469, 1244, 748 e 688; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  13,00 (s, 1H, NH), 7,64 (m, 7H, H-2', H-5', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 7,46 (m, 4H, H-2''', H-3''', H-5''', H-6'''), 7,18 (t, 1H, *J* 7,3 Hz, H-4'''), 6,21 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162,5 (C-5), 162,2 (C-2), 152,4 (C-4'), 148,0 (C-3'), 138,7 (C-1'''), 137,8 (C-1''), 132,1 (C-4''), 130,3 (C-3''), 130,0 (C-2''), 125,8 (C-3'''), 124,7 (C-4'''), 119,0 (C-2'''), 116,7 (C-1'), 115,2 (C-6'), 113,6 (C-5'), 112,2 (C-2'), 104,0 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitrofenil)amina 15.**

Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 243-244 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 2892, 1620, 1539, 1500, 1450, 1330 e 1243; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD)  $\delta$  8,34 (d, 2H, *J* 9,0 Hz, H-3''', H-5'''), 7,83 (d, 2H, *J* 9,0 Hz, H-2'', H-6''), 7,70 (m, 5H, H-3'', H-4'', H-5'', H-2''', H-6'''), 7,22 (d, 1H, *J* 8,3, 1,5 Hz, H-6'), 7,01 (d, 1H, *J* 8,3 Hz, H-5'), 6,87 (s, 1H, *J* 1,5 Hz, H-2'), 6,12 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD)  $\delta$  166,2 (C-5), 160,4 (C-2), 153,0 (C-3'), 148,9 (C-4'), 143,6 (C-4'''), 143,5 (C-1'''), 137,9 (C-1''), 131,6 (C-4''), 130,0 (C-3''), 126,9 (C-6'), 125,7 (C-2''), 125,0 (C-3'''), 118,3 (C-2'''), 115,6 (C-1'), 109,1 (C-5'), 108,8 (C-2'), 103,1 (OCH<sub>2</sub>O).

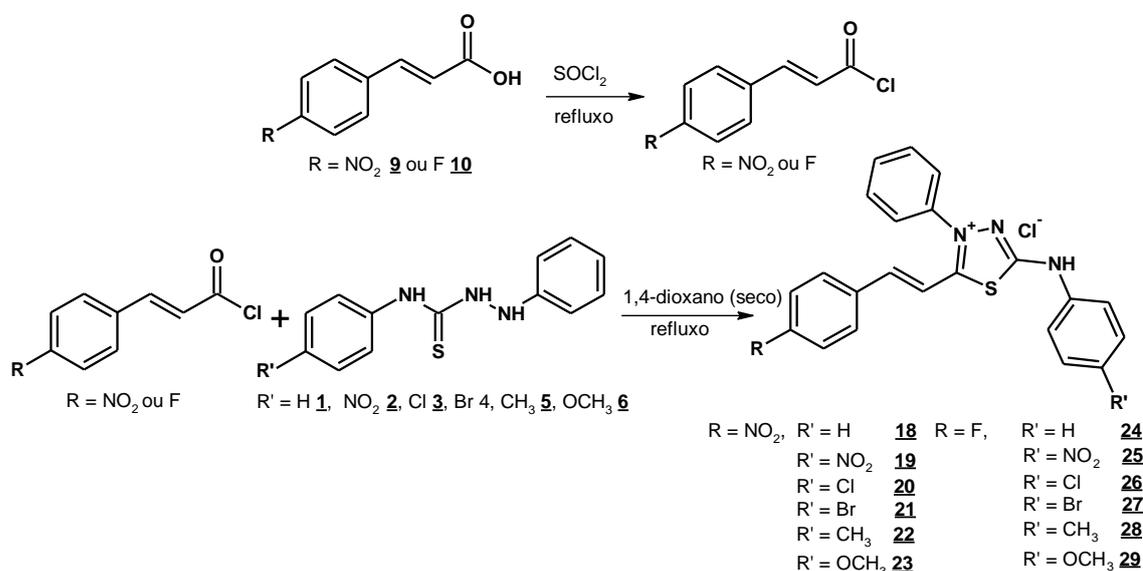
**Cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-clorofenil)amina 16.**

Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 309-310 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 2730, 1616, 1562, 1494, 1469, 1330 e 1240; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, MeOD)  $\delta$  7,65 (m, 7H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-3''', H-5'''), 7,44 (d, 2H, *J* 8,8 Hz, H-2''', H-6'''), 7,18 (dd, 1H, *J* 8,2, 1,9 Hz, H-6'), 6,99 (d, 1H, *J* 8,3 Hz, H-5'), 6,85 (d, 1H, *J* 1,8 Hz, H-2'), 6,11 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, MeOD)  $\delta$  164,8 (C-5), 160,8 (C-2), 152,8 (C-4'), 148,9 (C-3'), 138,0 (C-1'''), 137,1 (C-1''), 131,5 (C-4''), 129,9 (C-3''), 129,5 (C-6'), 129,2 (C-1'), 126,6 (C-2''), 125,6 (C-3'''), 120,2 (C-2'''), 115,9 (C-4'''), 109,0 (C-5'), 108,7 (C-2'), 103,1 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-bromofenil)amina 17.**

Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 280-281 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3402, 1616, 1562, 1494, 1470, 1330 e 1242; RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12,95 (s, 1H, NH), 7,63 (m, 9H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-2''', H-3''', H-5''', H-6'''), 7,11 (d, 2H, *J* 9,8 Hz, H-5', H-6'), 6,95 (s, 1H, H-2'), 6,16 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  164,7 (C-5), 160,3 (C-2), 152,0 (C-4'), 148,3 (C-3'), 138,3 (C-1'''), 132,8 (C-4''), 131,9 (C-3''), 130,5 (C-6'), 127,0 (C-2''), 126,6 (C-3'''), 120,7 (C-2'''), 116,5 (C-1'), 116,1 (C-4'''), 109,8 (C-5'), 109,7 (C-2'), 103,2 (OCH<sub>2</sub>O).

## 6.2.5. Procedimento Geral para a Síntese dos Cloridratos Mesoioônicos da Série II e III



Em um balão de fundo redondo com 25 mL de capacidade, acoplado a um borbulhador, foi adicionado 1,834 mmol do ácido cinâmico correspondente sob atmosfera inerte. Em seguida foi adicionado 1,834 mmol de cloreto de tionila (SOCl<sub>2</sub>). A reação foi mantida em refluxo por 2 horas sob agitação constante. Após verificar que a reação havia se completado, sendo verificada por CCDA, o excesso de SOCl<sub>2</sub> foi removido no evaporador rotatório, restando apenas o cloreto de acila, que foi utilizado sem tratamento, devido a sua instabilidade em atmosfera úmida.

A este intermediário foi adicionado uma solução formada por 1,4-difeniltiossemicarbazida correspondente em 15 mL de 1,4-dioxano. A reação foi mantida em agitação sob temperatura ambiente até a precipitação do cloridrato mesoioônico desejado. A mistura reacional foi deixada em repouso por 24 h, até completa precipitação do produto. Em seguida, foi filtrado e lavado com 1,4-dioxano. Os produtos foram obtidos com grau de pureza elevado e os rendimentos variaram entre 35-80%.

### 6.2.5.1. Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoioônicos (Série II)

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 18.** Sólido laranja; Ponto de Fusão: 280-281 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3045 (C-H), 2723 (C=NHAr), 1614, 1496, 1452 (C=C), 1571 (C=N), 1340 (C-S), 744, 686 (C-H); RMN <sup>1</sup>H (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  13,00 (s, NH), 8,27 (d, *J*=8,83, 2H, H-3',H-5'), 8,16 (d, *J*=16,0, 1H, H- $\beta$ ), 8,04 (d, *J*=8,8, 2H, H-2', H-6'), 7,87 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7,76 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 7,63 (d, *J*=7,8, 2H, H-2''', H-6'''), 7,43 (t, *J* = 7,8, 2H, H-3''', H-5'''), 7,28 (d, *J*=16,0, 1H, H- $\alpha$ ), 7,16 (t, 1H, H-4'''); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162,4 (C-5), 160,0 (C-2), 149,0 (C-4'), 145,0 (C- $\beta$ ), 140,4 (C-1'''), 139,0 (C-1''), 137,5 (C-1'), 132,3 (C-2', C-6'), 130,6 (C-4''), 130,5 (C-3'', C-5''), 129,9 (C-2'', C-6''), 126,6 (C-3''', C-4''', C-5'''), 124,6 (C-3', C-5'), 119,0 (C2''', C6'''), 115,9 (C- $\alpha$ ).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitrofenil)-amina 19.** Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 220-221 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3058 (C-H), 2707 (C=NHAr), 1620, 1515, 1452 (C=C), 1583 (C=N), 1332 (C-S), 746, 688 (C-H); RMN <sup>1</sup>H (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  13,56 (s, NH), 8,35 (d, *J*=9,1, 2H, H-3'',H-5''), 8,28 (d, *J* = 8,8, 4H,

H-3''', H-5''', H-3', H-5'), 8,06 (d,  $J=8,5$ , 2H, H-2''', H-6'''), 7,90 (d,  $J=7,8$ , 2H, H-2', H-6'), 7,84 (d,  $J=9,1$ , 2H, H-2'', H-6''), 7,72 (d,  $J=9,1$ , 1H, H-4''), 7,34 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  164,2 (C-5), 159,8 (C-2), 149,1 (C-4'), 146,1 (C- $\beta$ ), 144,5 (C-4'''), 143,0 (C-1'''), 140,3 (C-1''), 137,7 (C-1'), 132,4 (C-2'), 130,7 (C-6'), 129,4 (C-3', C-5'), 126,7 (C-3'', C-5''), 126,2 (C-4''), 124,6 (C-2'', C-6''), 122,8 (C-3'''), 122,0 (C-5'''), 118,9 (C-2''', C-6'''), 115,8 (C- $\alpha$ ).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-clorofenil)-amina 20.**

Sólido laranja; Ponto de Fusão: 260-261 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3043 (C-H), 2711 (C=NHAr), 1618, 1519, 1492 (C=C), 1567 (C=N), 1340 (C-S), 773, 680 (C-H); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,97 (s, NH), 8,28 (d,  $J=7,6$ , 2H, H-3', H-5'), 8,18 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 8,05 (d,  $J=7,6$ , 2H, H-2', H-6'), 7,86 (m, 2H, H-2'', H-6''), 7,78 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 7,64 (d,  $J=6,9$ , 2H, H-3''', H-5'''), 7,51 (t,  $J=7,8$ , 2H, H-2''', H-6'''), 7,30 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162,9 (C-5), 159,9 (C-2), 149,0 (C-4'), 145,4 (C- $\beta$ ), 140,4 (C-1'''), 137,8 (C-1''), 137,4 (C-1'), 132,3 (C-2', C-6'), 130,7 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 129,9 (C-3', C-5'), 128,3 (C-4'''), 126,7 (C-2'', C-6''), 124,6 (C-3''', C-5'''), 120,6 (C-2''', C-6'''), 115,9 (C- $\alpha$ ).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromofenil)-amina 21.**

Sólido laranja; Ponto de Fusão: 243-244 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 2707 (C=NHAr), 1614, 1519, 1488 (C=C), 1566 (C=N), 1340 (C-S); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,90 (s, NH), 8,28 (d,  $J=8,5$ , 2H, H-3', H-5'), 8,18 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 8,05 (d,  $J=8,5$ , 2H, H-2', H-6'), 7,85 (d, 2H, H-2'', H-6''), 7,77 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 7,64 (d, 2H, H-3''', H-5'''), 7,58 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 7,30 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163,0 (C-5), 159,9 (C-2), 149,0 (C-4'), 145,4 (C- $\beta$ ), 140,3 (C-1'''), 138,2 (C-1''), 137,4 (C-1'), 132,8 (C-2'), 132,4 (C-6'), 130,7 (C-3'', C-4'', C-5''), 126,7 (C-3', C-5'), 124,6 (C-2'', C-6''), 121,0 (C-3''', C-5'''), 116,4 (C-4'''), 115,9 (C- $\alpha$ ).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-toluil-amina 22.**

Sólido laranja; Ponto de Fusão: 283-284 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3041 (C-H), 2723 (C=NHAr), 1618, 1517, 1456 (C=C), 1569 (C=N), 1340 (C-S); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,66 (s, NH), 8,28 (d,  $J=8,8$ , 2H, H-3', H-5'), 8,15 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 8,05 (d,  $J=8,8$ , 2H, H-2', H-6'), 7,87 (d, 2H, H-2'', H-6''), 7,78 (m, 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 7,51 (d,  $J=8,5$ , 2H, H-2''', H-6'''), 7,25 (d,  $J=8,2$ , 2H, H-3''', H-5'''), 7,30 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ), 3,37 (s, 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162,2 (C-5), 160,2 (C-2), 149,0 (C-4'), 144,9 (C- $\beta$ ), 140,4 (C-1'''), 137,5 (C-1''), 136,5 (C-1'), 132,3 (C-2', C-6'), 134,1 (C-4'''), 130,7 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 130,4 (C-3', C-5'), 126,6 (C-2'', C-6''), 124,6 (C-3''', C-5'''), 119,3 (C-2''', C-6'''), 115,9 (C- $\alpha$ ), 21,0 (CH<sub>3</sub>).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4'-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metoxi)-amina 23.**

Sólido vermelho; Ponto de Fusão: 263-264 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3041 (C-H), 2723 (C=NHAr), 1620, 1508, 1456 (C=C), 1575 (C=N), 1340 (C-S); 1242 (C-O); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,64 (s, NH), 8,27 (d,  $J=6,9$ , 2H, H-3', H-5'), 8,11 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 8,03 (d,  $J=6,6$ , 2H, H-2', H-6'), 7,81 (m, 5H, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-6''), 7,54 (d,  $J=6,6$ , 2H, H-2''', H-6'''), 7,01 (d,  $J=7,2$ , 2H, H-3''', H-5'''), 7,27 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ), 3,75 (s, 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162,2 (C-5), 160,2 (C-2), 149,0 (C-4'), 144,9 (C- $\beta$ ), 140,4 (C-1'''), 137,5 (C-1''), 136,5 (C-1'), 132,3 (C-2', C-6'), 134,1 (C-4'''), 130,7 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 130,4 (C-3', C-5'), 126,6 (C-2'', C-6''), 124,6 (C-3''', C-5'''), 119,3 (C-2''', C-6'''), 115,9 (C- $\alpha$ ), 21,0 (CH<sub>3</sub>).

### 6.2.5.2. Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos (Série III)

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 24.** Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 238-239 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3047, 2732 (C=NHAr), 1596, 1509, 1449 (C=C), 1568 (C=N), 748, 688; RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,96 (s, NH), 8,03 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,87 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7,75 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-5''), 7,63 (d,  $J=7,8$ , 2H, H-3''', H-5'''), 7,42 (t,  $J=7,8$ , 2H, H-2''', H-6'''), 7,31 (t, 2H,  $J=8,7$ ), 7,14 (t, 1H,  $J=7,41$ , H-4'''), 7,04 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163,2 (C-5), 165,5 e 163,5 (C-4'), 159,3 (C-2), 147,0 (C- $\beta$ ), 139,1 (C-1'''), 137,5 (C-1''), 132,2 (C-2', C-6'), 132,1 (C-4''), 131,0 (C-1'), 130,6 (C-3'', C-5''), 124,4 (C-4'''), 129,9 (C-2'', C-6''), 126,6 (C-3''', C-5'''), 118,9 (C-3', C-5'), 116,7 (C-2''', C-6'''), 111,9 (C- $\alpha$ ).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitrofenil)-amina 25.** Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 265-266 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 2613 (C=NHAr), 1626, 1507, 1445 (C=C), 1582 (C=N), 1335 (C-S); RMN  $^1\text{H}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11,05 (s, NH), 8,35 (d,  $J=9,3$ , 2H, H-3''', H-5'''), 8,28 (t,  $J=8,9$ , 3H, H-3'', H-4'', H-5''), 8,15 (d,  $J=15,8$ , 1H, H- $\beta$ ), 8,02 (d, 2H, H-2'', H-6''), 7,83 (d,  $J=9,3$ , 2H, H-2', H-6'), 7,71 (d,  $J=8,8$ , 2H, H-2''', H-6'''), 7,11 (d,  $J=15,8$ , 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159,1 (C-5), 157,9 (C-4'), 154,0 (C-2), 148,2 (C- $\beta$ ), 146,2 (C-4'''), 144,4 (C-1'''), 137,3 (C-1''), 130,9 (C-1'), 130,7 (C-2', C-6'), 126,1 (C-4''), 122,8 (C-3'', C-5''), 122,0 (C-2'', C-6''), 118,8 (C-3''', C-5'''), 117,4 (C-5', C-3'), 116,8 (C-2''', C-6'''), 111,7 (C- $\alpha$ ).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-clorofenil)-amina 26.** Sólido laranja; Ponto de Fusão: 259-260 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 2655 (C=NHAr), 1618, 1506, 1445 (C=C), 1564 (C=N); RMN  $^1\text{H}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13,14 (s, NH), 8,06 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,87 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7,77 (m, 3H, H-2''', H-4''', H-6'''), 7,65 (d,  $J=9,0$ , 2H, H-3''', H-5'''), 7,49 (t,  $J=8,8$ , 2H, H-2'', H-6''), 7,32 (t, 2H,  $J=8,8$ , H-3'', H-5''), 7,05 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163,3 (C-5), 165,8 e 163,6 (C-4'), 159,1 (C-2), 147,3 (C- $\beta$ ), 138,0 (C-1'''), 137,4 (C-1''), 132,3 (C-2', C-6'), 132,2 (C-4''), 131,0 (C-1'), 130,6 (C-3'', C-5''), 129,8 (C-2'', C-6''), 128,0 (C-4'''), 126,7 (C-3''', C-5'''), 116,9 (C-5'), 116,7 (C-3'), 120,4 (C-2''', C-6'''), 111,8 (C- $\alpha$ ).

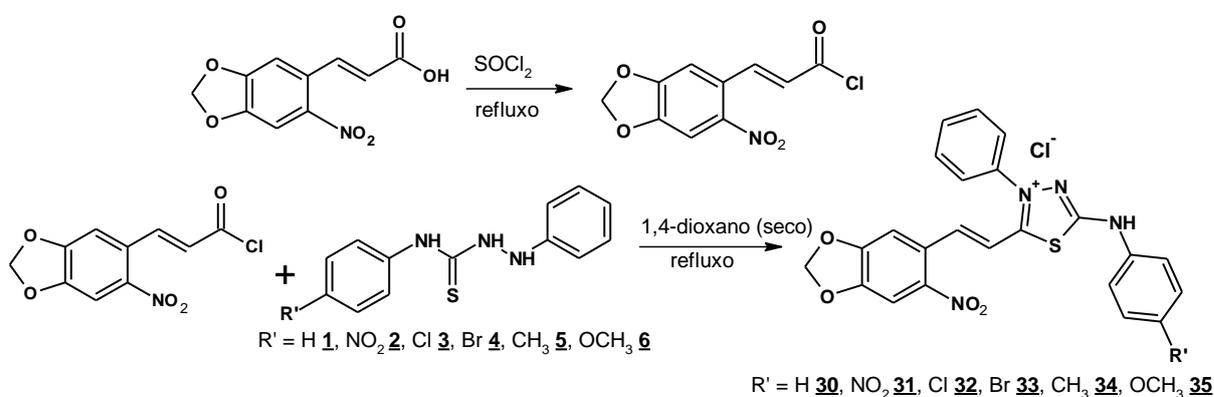
**Cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromofenil)-amina 27.** Sólido amarelo; Ponto de Fusão: 245-246 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3055, 2585 (C=NHAr), 1600, 1511, 1447 (C=C), 1557 (C=N), 1308 (C-S); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  13,24 (s, NH), 8,06 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,87 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7,76 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''), 7,60 (m, 4H, H-2''', H-3''', H-5''', H-6'''), 7,31 (t, 2H,  $J=8,8$ , H-3'', H-5''), 7,04 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163,5 (C-5), 165,5 e 163,6 (C-4'), 159,0 (C-2), 147,3 (C- $\beta$ ), 138,4 (C-1'''), 137,4 (C-1''), 132,7 (C-2', C-6'), 132,2 (C-4''), 131,0 (C-1'), 130,6 (C-3'', C-5''), 126,7 (C-2''', C-3''', C-5''', C-6'''), 120,8 (C-2'', C-6''), 116,0 (C-4'''), 116,9 (C-5'), 116,7 (C-3'), 111,8 (C- $\alpha$ ).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-toluil-amina 28.** Sólido laranja; Ponto de Fusão: 231-232 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 2982, 1616, 1506, 1449 (C=C), 1568 (C=N); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12,66 (s, NH), 8,01 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,85 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7,75 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''), 7,50 (d, 2H,  $J=8,2$ , H-3''', H-5'''), 7,31 (t, 2H,  $J=8,7$ , H-3'', H-5''), 7,23 (d, 2H,  $J=8,2$ , H-2''', H-6'''), 7,04 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\alpha$ ), 2,28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  163,0 (C-5), 165,5 e 163,5 (C-4'), 159,4 (C-2), 146,9 (C- $\beta$ ), 137,5 (C-1'''), 136,7 (C-1''), 133,8 (C-1'), 132,2 (C-2', C-

6'), 132,1 (C-4''), 131,0 (C-4'''), 130,6 (C-3'', C-5''), 130,0 (C-2'', C-6''), 126,6 (C-3''', C-5'''), 119,1 (C-3', C-5'), 116,9 (C-2''', C-6'''), 111,9 (C- $\alpha$ ), 20,9 (CH<sub>3</sub>).

**Cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metoxi-fenil)-amina 25.** Sólido laranja; Ponto de Fusão: 234-235 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 1608, 1506, 1447 (C=C), 1569 (C=N), 1242 (C-O); RMN <sup>1</sup>H (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12,70 (s, NH), 7,99 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,85 (m, 4H, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7,74 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''), 7,54 (d, 2H,  $J=8,8$ , H-2''', H-6'''), 7,30 (t, 2H,  $J=8,7$ , H-3'', H-5''), 7,01 (m, 3H, H-3''', H-5''', H- $\alpha$ ), 3,74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162,6 (C-5), 165,5 e 163,4 (C-4'), 159,4 (C-4'''), 156,4 (C-2), 146,7 (C- $\beta$ ), 137,5 (C-1'''), 132,3 (C-1''), 131,1 (C-1'), 132,2 (C-2', C-6'), 132,1 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 126,6 (C-2'', C-6''), 120,8 (C-2''', C-6'''), 116,9 (C-5'), 116,7 (C-3'), 115,0 (C-3''', C-5'''), 111,9 (C- $\alpha$ ), 55,7 (OCH<sub>3</sub>).

## 6.2.6. Procedimento Geral para a Síntese dos Cloridratos Meso-iônicos da Série IV



### 6.2.6.1. Caracterização espectroscópica dos cloridratos meso-iônicos (Série IV)

**Cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 30.** Sólido vermelho; Ponto de Fusão: 267-268 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3048 (C-H), 2654 (C=NHAr), 1620, 1509, 1483 (C=C), 1570 (C=N), 1281 (C-O); RMN <sup>1</sup>H (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12,52 (s, NH), 8,13 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,86 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7,75 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''), 7,74 (s, 1H, H-5'), 7,60 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 7,52 (s, 1H, H-2'), 7,44 (t, 2H, H-3''', H-5'''), 7,17 (t, 1H, H-4'''), 7,11 (d, 1H,  $J=16,0$ , H- $\alpha$ ), 6,30 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  162,6 (C-5), 159,9 (C-2), 152,4 (C-6'), 150,3 (C-3'), 144,2 (C-4'), 143,6 (C- $\beta$ ), 138,9 (C-1'''), 137,4 (C-1''), 132,2 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 130,0 (C-2'', C-6''), 126,6 (C-3''', C-5'''), 125,8 (C-1'), 124,7 (C-4'''), 119,1 (C-2''', C-6'''), 114,8 (C- $\alpha$ ), 108,1 (C-2'), 106,1 (C-5'), 104,7 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitrofenil)-amina 31.** Sólido laranja; Ponto de Fusão: 236-237 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3052 (C-H), 1622, 1520, 1480 (C=C), 1582 (C=N), 1345 (C-S), 1281 (C-O); RMN <sup>1</sup>H (500MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  13,60 (s, NH), 8,34 (d,  $J=8,5$ , 2H, H-3''', H-5'''), 8,22 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,89 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7,83 (d,  $J=8,8$ , 2H, H-2'', H-6''), 7,76 (m, 4H, H-5', H-4'', H-2''', H-6'''), 7,54 (s, 1H, H-2'), 7,12 (d, 1H,  $J=16,0$ , H- $\alpha$ ), 6,30 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  164,2 (C-5), 159,5 (C-2), 152,4 (C-3'), 150,4 (C-6'), 144,5 (C-4'), 144,5 (C- $\beta$ ), 144,3 (C-1'''), 143,0 (C-4'''), 137,4 (C-1''), 132,3 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 126,7 (C-2'', C-6''), 126,1 (C-3''', C-5'''), 125,7 (C-1'), 118,8 (C-2''', C-6'''), 114,6 (C-2'), 108,1 (C-5'), 106,1 (C- $\alpha$ ), 104,7 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''''-clorofenil)-amina 32.** Sólido laranja; Ponto de Fusão: 260-261 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3038 (C-H), 2600 (C=NHAr), 1622, 1510, 1483 (C=C), 1567 (C=N), 1345 (C-S), 1283 (C-O); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  13,00 (s, NH), 8,15 (d,  $J=16,0$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,87 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7,75 (s, 1H, H-5'), 7,74 (m, 3H, H-2'', H-4'', H-6''), 7,63 (d,  $J=8,8$ , 2H, H-3''', H-5'''), 7,52 (s, 1H, H-2'), 7,50 (d,  $J=8,8$ , 2H, H-2''', H-6'''), 7,09 (d, 1H,  $J=16,0$ , H- $\alpha$ ), 6,30 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  162,9 (C-5), 159,6 (C-2), 152,4(C-3'), 150,3 (C-6'), 144,2 (C-4'), 137,9 (C-1'''), 137,4 (C-1''), 130,6 (C-3'', C-5''), 129,8 (C-2'', C-6''), 128,2 (C-1'), 126,6 (C-3''', C-5'''), 125,8 (C-4'''), 120,6 (C-2''', C-6'''), 106,1 (C- $\alpha$ ), 104,7 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''''-bromofenil)-amina 33.** Sólido vermelho; Ponto de Fusão: 255-256 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3042 (C-H), 2613 (C=NHAr), 1620, 1509, 1482 (C=C), 1564 (C=N), 1343 (C-S), 1281 (C-O); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  13,00 (s, NH), 8,15 (d,  $J=15,7$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,62 (d, 2H, H-3''', H-5'''), 7,86 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7,75 (m, 4H, H-2'', H-4'', H-5', H-6''), 7,57 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 7,52 (s, 1H, H-2'), 7,09 (d, 1H,  $J=15,7$ , H- $\alpha$ ), 6,30 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  162,4 (C-5), 159,6 (C-2), 152,4(C-3'), 150,3 (C-6'), 144,2 (C-4'), 143,8 (C- $\beta$ ), 138,3 (C-1'''), 137,4 (C-1''), 132,7 (C-4''), 132,2 (C-3'', C-5''), 130,6 (C-2'', C-6''), 126,6 (C-3''', C-5'''), 125,8 (C-1'), 120,9 (C-2''', C-6'''), 116,2 (C-4'''), 114,9 (C-2'), 108,1 (C-5'), 106,1 (C- $\alpha$ ), 104,7 (OCH<sub>2</sub>O).

**Cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-toluil-amina 34.** Sólido vermelho; Ponto de Fusão: 266-267 °C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3042 (C-H), 2672 (C=NHAr), 1625, 1506, 1483 (C=C), 1568 (C=N), 1314 (C-S), 1283 (C-O); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  12,60 (s, NH), 8,09 (d,  $J=15,7$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,85 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7,75 (m, 4H, H-5', H-2'', H-4'', H-6''), 7,48 (d, 2H, H-3''', H-5'''), 7,51 (s, 1H, H-2'), 7,23 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 7,07 (d, 1H,  $J=15,7$ , H- $\alpha$ ), 6,30 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 2,30 (s, 3H); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  162,2 (C-5), 159,9 (C-2), 152,4(C-3'), 150,3 (C-6'), 144,1 (C-4'), 143,3 (C- $\beta$ ), 137,4 (C-1'''), 136,5 (C-1''), 132,1 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 130,3 (C-2'', C-6''), 134,0 (C-1'), 126,6 (C-3''', C-5'''), 125,8 (C-4'''), 119,2 (C-2''', C-6'''), 114,9 (C-2'), 108,1 (C-5'), 106,1 (C- $\alpha$ ), 104,6 (OCH<sub>2</sub>O), 20,9 (CH<sub>3</sub>).

**Cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''''-metoxi-fenil)-amina 35.** Sólido vermelho; Ponto de Fusão: 270-271°C; IV (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3027 (C-H), 2687 (C=NHAr), 1608, 1506, 1482 (C=C), 1575 (C=N), 1320 (C-S), 1283 (C-O); RMN  $^1\text{H}$  (500MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  12,29 (s, NH), 8,09 (d,  $J=15,7$ , 1H, H- $\beta$ ), 7,85 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7,75 (m, 4H, H-5', H-2'', H-4'', H-6''), 7,02 (d,  $J=8,5$ , 2H, H-3''', H-5'''), 7,52 (m, 3H, H-2', H-2''', H-6'''), 7,08 (d, 1H,  $J=15,7$ , H- $\alpha$ ), 6,30 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>O), 3,75 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, DMSO-*d*6)  $\delta$  161,9 (C-5), 156,6 (C-2), 152,4(C-3'), 150,3 (C-6'), 144,2 (C-4'), 143,2 (C- $\beta$ ), 137,4 (C-1'''), 132,1 (C-1''), 132,1 (C-4''), 130,6 (C-3'', C-5''), 129,3 (C-2'', C-6''), 125,8 (C-1'), 115,1 (C-3''', C-5'''), 126,6 (C-2''', C-6'''), 121,1 (C-2'), 108,1 (C-5'), 106,1 (C- $\alpha$ ), 104,6 (OCH<sub>2</sub>O), 55,8 (OCH<sub>3</sub>).

### 6.3. Ensaios Biológicos

#### 6.3.1. Inibição da enzima tirosinase para os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I)

➤ **Determinação dos valores de IC<sub>50</sub>**

A atividade da enzima tirosinase foi determinada através da oxidação de L-DOPA (0,17 mmol L<sup>-1</sup>) em dopacromona em meio de tampão de fosfato (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 6,8) na presença de EDTA (0,022 mmol L<sup>-1</sup>), tirosinase (50-100 unidades) e diferentes concentrações de cada composto mesoiônico investigado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A formação da dopaquinona foi determinada através do monitoramento da absorvância em 475 nm à temperatura ambiente. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão. O percentual de inibição para cada composto mesoiônico foi calculado aplicando a equação abaixo.

$$\text{Inibição \%} = \frac{[(B_{30} - B_0) - (A_{30} - A_0)]}{(B_{30} - B_0)} \times 100$$

Nesta equação, B<sub>0</sub> e B<sub>30</sub> são os valores de absorvância do controle no tempo zero e no tempo 30 minutos, respectivamente. A<sub>0</sub> e A<sub>30</sub> são as absorvâncias do teste no tempo zero e no tempo 30 minutos, respectivamente. A interferência de possível absorvância do composto orgânico foi subtraída.

Para calcular o IC<sub>50</sub> dos compostos mesoiônicos **16** e **17** (os mais promissores para inibição da tirosinase) o aumento da absorção em 475 nm foi determinado para diferentes concentrações de inibidores. O valor de IC<sub>50</sub> foi calculado através da equação polinomial gerada pelos dados experimentais, usando o software Origin, função estatística ANOVA).

➤ **Determinação do mecanismo de inibição**

O mecanismo de inibição para o composto **16** na enzima tirosinase pela oxidação da L-DOPA foi determinado através do gráfico de Lineweaver-Burk. O gráfico de Lineweaver-Burk é um método largamente utilizado para determinação de importantes parâmetros em cinética enzimática, como K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub> e K<sub>i</sub>. Nesta análise foi utilizada a mesma metodologia que para determinação do IC<sub>50</sub>, porém com diferentes concentrações de L-DOPA (33; 66; 100; 200; 333; 466 and 666 μmol mL<sup>-1</sup>) como substrato e diferentes concentrações para o composto **16** (0; 330; 460 and 660 μmol mL<sup>-1</sup>). Após a incubação por 30 minutos a 37 °C, a absorvância foi medida em 475 nm. A produção de dopaquinona foi analisada na presença e na ausência dos inibidores, nas mesmas condições do teste de inibição, porém a absorção foi determinada no intervalo de 0 à 60 minutos, com 10 minutos de entre os intervalos.

### 6.3.2. Estudos de modelagem molecular

As estruturas cristalográficas da enzima tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* e de HSA foram obtidos a partir da Protein Data Bank (PDB) com códigos de acesso 2Y9X (ISMAYA et al., 2011) e 1N5U (WARDELL et al., 2002), respectivamente. As estruturas dos compostos mesoiônicos foram construídas e minimizadas com o programa Spartan'14 (*Wavefunction, Inc.*) na Densidade Teoria Funcional (DFT) com o Becke-3-Lee Yang Parr (B3LYP) funcional, utilizando o conjunto de bases 6-31G \* (HEHRE, 2003).

O estudo de *docking* para ambas as estruturas de proteínas foi realizado com o programa GOLD 5.2 (CCDC). Átomos de hidrogênio foram adicionados à proteína de acordo com a ionização e estados tautoméricos inferidos pelo programa. A estrutura cristalográfica da tirosinase é composta por quatro cadeias (A, B, C e D) e cada cadeia contém um centro de cobre responsável pela atividade da tirosinase (ISMAYA et al., 2011). A fim de propor uma explicação molecular para os dados experimentais de inibição da tirosinase, um domínio raio-esférico em torno do centro de cobre na cadeia D foi definido para os cálculos de acoplamento molecular com os ligantes (**12**, **13**, **14**, **15**, **16** e **17**). A cadeia D foi definida para os estudos de

*docking* devido aos melhores resultados obtidos pelos estudos de *redocking* com o ligante cocristalizado na estrutura 2Y9X, tropolona. Como os compostos mesoiônicos apresentaram inibição não competitiva, primeiramente um complexo tirosinase: L-DOPA foi obtido selecionando a melhor posição correspondente de um *docking* do substrato dentro da enzima implementada com GOLD 5.2. Este complexo foi então usado para um segundo *docking* com os ligantes de **12** a **17**. Por outro lado, a partir dos estudos de supressão da fluorescência e deslocamentos de fármacos específicos para cada local, a principal cavidade HSA para **16** e **17** é *Sudlow's site I* (subdomínio IIA), onde o resíduo Trp-214 pode ser encontrado (SUN et al., 2016). A fim de identificar os principais resíduos de aminoácidos que contribuíram para a associação de **16** e **17** com HSA, definiu-se um domínio radiosférico de 10 Å em torno do resíduo de triptofano e em seguida, cálculos de *docking* com ambos os ligantes foram realizados.

A pontuação de cada posição identificada é calculada como negativa da soma de uma série de termos de energia envolvidos no processo de interação proteína-ligante, de forma que quanto mais positiva a pontuação, melhor é a interação. O número de operações genéticas (crossover, migração, mutação) em cada *docking* utilizado no procedimento foi definido em 100.000. O programa otimiza as geometrias de ligação de hidrogênio, rotação de todos os grupos hidroxila e amino das cadeias laterais de aminoácidos. A função de pontuação utilizada para realizar o estudo da tirosinase foi GoldScore, a melhor função de pontuação identificada no estudo de *redocking* tropolona. Para os estudos de ancoragem de HSA, foi utilizado *ChemPLP*, que é a função padrão do programa GOLD 5.2 (KORB et al., 2009). As figuras das posições de encaixe com o maior valor de pontuação de encaixe foram geradas com o programa PyMOL Delano Scientific LLC (DELANO, 2002).

### 6.3.3. Estudos de interação com a albumina sérica humana (HSA) para os compostos mesoiônicos derivados do piperonal (Série I)

Espectros de fluorescência e UV-Vis foram obtidos no fluorímetro Jasco J-815 utilizando uma célula de quartzo (via óptica de 1 cm) e utilizando um suporte termostático de cuvete Jasco PFD-425S15F. Todos os espectros foram registrados com correções de fundo apropriadas.

A uma solução de 3,0 ml contendo uma concentração apropriada de HSA ( $1,00 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>), alíquotas sucessivas de uma solução-estoque dos correspondentes compostos mesoiônicos, **16** e **17** ( $1,00 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>) foram adicionados, levando a concentrações finais de 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e  $1,32 \cdot 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. A adição foi feita manualmente usando uma micro seringa. Os espectros de fluorescência foram medidos na faixa de 290-450 nm, a 23 °C, 30 °C e 37 °C, com comprimento de onda de excitação a 280 nm. Os espectros de UV-Vis para soluções de **16** e **17** ( $1,00 \cdot 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, em metanol) foram medidos na faixa de 200-450 nm a 37 °C. A fim de compensar o efeito de filtro interno, os valores da intensidade de fluorescência foram corrigidos para a absorção de cada derivado mesoiônico estudado no comprimento de onda de excitação e emissão usando a equação abaixo:

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{[(A_{ex} + A_{em})/2]}$$

onde  $F_{cor}$  e  $F_{obs}$  são os valores da intensidade de fluorescência corrigida e observada, respectivamente;  $A_{ex}$  e  $A_{em}$  representam os valores experimentais de absorvância no comprimento de onda de excitação (280 nm) ( $\epsilon = 14942$  mol L<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para **16** e  $\epsilon = 16966$  mol

$L^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para **17**) e comprimento de onda de emissão (340 nm;  $\epsilon = 10454 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para **16** e  $\epsilon = 8363 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para **17**), respectivamente.

### **6.3.3. Ensaio de viabilidade celular frente a células leucêmicas para os compostos mesoiônicos da série II**

#### **➤ Cultura de Células**

Este trabalho utilizou como modelo as linhagens celulares K562, Jurkat e MT2. A linhagem celular JURKAT, é proveniente de leucemia linfocítica aguda, isolada de sangue periférico de adolescente do sexo masculino. As células Jurkat foram gentilmente cedidas pela Dra. Ana Lúcia Giannini do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UFRJ. A linhagem MT2 é derivada de co-cultivo de células provenientes de cordão umbilical de bebê do sexo masculino com linfócitos T provenientes de paciente do sexo feminino diagnosticada com leucemia T do adulto. Essa linhagem foi gentilmente cedida pelo Dr. Otávio Espindola do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - RJ). A linhagem K562 é uma eritroleucemia, gentilmente, cedida pela Dra. Vivian M. Rumjanek do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis da UFRJ.

O cultivo das linhagens celulares foi realizado em meio RPMI 1640 (Lonza ou LGC Biotechnology) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab), inativado penicilina (1000 UI/mL, LGC Biotechnology) e estreptomicina (1000 UI/mL, LGC Biotechnology), pH 7,4. As células foram mantidas em atmosfera úmida a 37 °C com 5% CO<sub>2</sub>. Foram realizadas passagens das células em intervalos de 3 a 4 dias.

#### **➤ Ensaio de Citotoxicidade (MTT)**

A citotoxicidade das células foi determinada a partir do teste MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich). O MTT (sal de tetrazólio) é convertido em sal de formazana, em células vivas através da atividade da succinato desidrogenase mitocondrial. A enzima induz a formação de cristais de coloração azulada (sal de formazana) nas células viáveis, que ao serem dissolvidos, permite sua quantificação por espectrofotometria, permitindo avaliar a capacidade redutora da célula (MOSMANN, 1983).

Os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes para cada linhagem. As células foram semeadas em placas de 96 poços, a  $1 \times 10^4$  células/poço e incubadas em meio RPMI + 10% de SFB na presença ou ausência de diferentes concentrações das substâncias avaliadas, sendo elas:  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $12,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $6,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ ;  $3,125 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $1,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

As placas foram incubadas por 72 horas em atmosfera úmida a 37 °C com CO<sub>2</sub> 5%. Posteriormente, as placas contendo as culturas celulares foram centrifugada a 200 x g por 7 minutos. O meio com MTT foi retirado e os cristais de formazana formados foram dissolvidos em 200  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO; Vetec). O valor de absorbância foi medido a um comprimento de onda de 490 nm (SpectraMax Paradigm®).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA acessado em 16/01/2018 <http://portal.anvisa.gov.br/produto-biologico-novo-para-tratamento-de-cancer-e-aprovado-pela-anvisa>

ATHAYDE-FILHO, P.F., MILLER, J., SIMAS, A.M.; Mesoionic Compounds: Amphiphilic Heterocyclic Betaines. *Synthesis*. v. 11, 1565-1568, 2011.

BADAMI, B.V.; Mesoionic Compounds: An Unconventional Class of Aromatic Heterocycles. *Resonance*, 2006.

BAKER, W., OLLIS, W. D., POOLE, V. D. *Journal of the Chemical Society*. 307, 1949.

BANGHAM, C.R.; The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *Journal of General Virology*. v. 84, 3177-89, 2003.

BARROS, L.S., CHAVES, O.A., SCHAEFFER, E., SANT'ANNA, C.M.R., FERREIRA, A.B.B., CESARIN-SOBRINHO, D., DA SILVA, F.A., NETTO-FERRERIA, J.C.; Evaluating the interaction between difluorinated chalcones and plasmatic albumin. *Journal of Fluorine Chemistry*. v. 190, 81 –88, 2016.

BATUS, M., WAHEED, S., RUBY, C., PETERSEN, L., BINES, S. D., KAUFMAN, H. L., Optimal Management of Metastatic Melanoma: Current Strategies and Future Directions. *American Journal Clinical Dermatology*. v. 14,179–194, 2013.

BAZARBACHI, A., PLUMELLE, Y., CARLOS RAMOS, J., TORLEVOYE, P., OTROCK, Z., TAYLOR, G. GESSAIN, A., HARRINGTON, W., PANELATTI, G., HERMINE, O., Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *Journal of Clinical Oncology*. v. 28, 4177-4183, 2010.

BITTENCOURT, A. L., VIEIRA, M. G., BRITES, C.R., FARRE, L., BARBOSA, H. S.; Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia. Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. *American Journal of Clinical Pathology*. v.5, 875–882, 2007.

BITTENCOURT, A.L., PRIMO, J., DE OLIVEIRA, M. F.; Manifestations of the *human T-cell lymphotropic virus* type I infection in childhood and adolescence. *Journal of Pediatrics*. v. 82, 411-420, 2006.

BRANCO, F. S. C., SILVA, B. V., RIO, G. F., SANTANA, M. J., QUEIROZ-JUNIOR, L. H. K., PINTO, A. C., BOECHAT, N., LIÃO, L. M.; Ressonância magnética nuclear de substâncias organofluoradas: um desafio no ensino de espectroscopia. *Química Nova*. 38, 9, 1237-1246, 2015.

BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A. P.; Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*. v. 33, 6, 1359-1369, 2010.

BRANDT, A. P., GOZZI, G. J., PIRES, A. R. A., MARTINEZ, G. R., CANUTO, A. V. S., ECHEVARRIA, A., PIETRO, A., CADENA, S. M. S. C.; Impairment of oxidative phosphorylation increases the toxicity of SYD-1 on hepatocarcinoma cells (HepG2). *Chemico-Biological Interactions*. v. 256, 154-160, 2016.

BRITTO, M. M., ALMEIDA, T. M. G., LEITÃO, A., DONNICI, C. L., LOPES, M. T. P., MONTANARI, C. A.; Synthesis of Mesoionic 4-(p-substituted Phenyl-5-2,4-dichlorophenyl)-1,3,4-thiadiazolium-2-aminides by direct Cyclization via Acylation of Thiosemicarbazides. *Synthetic Communications*. v. 36, 3359-3369, 2006.

CARVALHO, E. M., BACELLAR, O., PORTO, A. F., BAGA, S., GALVÃO-CASTRO, B., NEVA, F.; Cytokine profile and immuno modulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. v.27, 1-6, 2001.

CHAN, C.F., LAI, S.T., GUO, Y.C., CHEN, M.J.; Inhibitory effects of novel synthetic methimazole derivatives on mushroom tyrosinase and melanogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* v. 22, 2809-2815, 2014.

CHAVES, O. A., JESUS, C.S.H., HENRIQUES, E.S., BRITO, R.M.M., SERPA, C.; In situ ultra-fast heat deposition does not perturb the structure of serum albumin. *Photochemical Photobiological Science* v. 15, 1524-1535, 2016.

CHAVES, O. A., AMORIM, A. P. O., CASTRO, L. H. E., SANT'ANNA, C. M. R., OLIVEIRA, M. C. C., CESARIN-SOBRINHO, D., NETTO-FERREIRA, J. C., FERREIRA, A. B. B.; Fluorescence and docking studies of the interaction between human serum albumin and pheophytin. *Molecules* v. 20, 19526-19539, 2015.

CHAVES, O. A., DA SILVA, V. A, SANT'ANNA, C. M. R., FERREIRA, A. B. B., RIBEIRO, T. A. N., CARVALHO, M. G., CESARIN-SOBRINHO, D., NETTO-FERREIRA, J. C.; Binding studies of lophirone B with bovine serum albumin (BSA): combination of spectroscopic and molecular docking techniques. *Journal of Molecular Structure*. v.1128, 606-611, 2017.

CHAVES, O.A., O.A. CESARIN-SOBRINHO, SANT'ANNA, C.M.R, CARVALHO, M.G., SUZART, L.R., CATUNDA-JUNIOR, F.E., NETTO-FERREIRA, J.C., FERREIRA, A.B.B.; Probing the interaction between 7-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-6-(3-methylbut-2-enyl)-5,4-dihydroxy flavonol with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Photochemical Photobiology A Chemistry*. v. 336, 32-41, 2017.

CHAVES, O.A., SOARES, B.A., MACIEL, M.A.M., SANT'ANNA, C.M.R., NETTO-FERREIRA, J.C., CESARIN-SOBRINHO, D., FERREIRA, A.B.B.; A study of the interaction between transdehydrocrotonin, a bioactive natural 19-nor-clerodane, and serum albumin. *Journal of Brazilian Chemistry Society*. v. 27, 1858-1865, 2016.

CHEUNG, K. K.; GALEMBECK, S. E.; MILLER, J., OLIVEIRA, M. B., PESSOA, A. B., SIMAS, A.M.; *Acta Crystallographica*, 2360, 1992.

CUNHA, J. D., SILVA, F. N., SILVA, D. R., MACIEL, M. A. M., ECHEVARRIA, A., GUARACIARA, C. F. T. ROSSI. Avaliação de inibidores de corrosão solubilizados em sistema microemulsionado para aplicação em meio salino com CO<sub>2</sub>. 32° RASBQ, 2009.

DA SILVA, E. F., ECHEVARRIA, A., BRAZ, V.R., CANTO-CAVALHEIRO, M., CYSNE-FINSKELSTEIN, L.; LEON, L. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 37, 979-984, 2002.

DELANO, W.L., PyMOL User's Guide, DeLano Scientific LLC, USA, 2002

DUARTE, C. D., TRIBUTINO, J. L. M., LACERDA, D. I., MARTINS, M. V., ALEXANDREMOREIRA, M. S., DUTRA, F., BECHARA, E. J. H., De PAULA, F. S., GOULART, M. O. F., FERREIRA, J., CALIXTO, J. B., NUNES, M. P., BERTHO, A. L., MIRANDA, A. L. P., BARREIRO, E. J., FRAGA, C. A. M.; Synthesis, pharmacological evaluation and electrochemical studies of novel 6-nitro-3,4-methylenedioxyphenyl-N-acylhydrazone derivatives: Discovery of LASSBio-881, a new ligand of cannabinoid receptors. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. v.15, 2421, 2007.

ECHEVARRIA, A., CHUNG, K. K., GALLEMBECK, S., MACIEL, M. A., MILLER, J., RUMJANEK, V.; SIMAS, A.; Mesoionic compound.3. Structure of the hydrochloride of 5-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-1,3,4-thiadiazolium-2-phenylaminide. *Acta Crystallographica*, v. 48, 1471-1474, 1992.

EDWARD, J. T., SHEFFLER, R. H.; Mesoionic dipyrido [1, 2, A, 1', 2', E] Imidazolium compounds from the Binz-Mark reaction. *Journal American Chemical Society*. 168, 1979.

FERREIRA, W. S., LIMA, L. F., SARAIVA, V. B., SILVA, F. A., PREVIATO, L. M., PREVIATO, J. O., ECHEVARRIA, A., LIMA, M. E. F.; Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 16, 2984–2991, 2008.

FIGUEIREDO, L. C., CORDEIRO, L. N., ARRUDA, A. P., CARVALHO, M. D. F., RIBEIRO, E. M., COUTINHO, H. D. M.; Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2003.

FISCHER, E., BESTHORN, E.; Ueber die hydrazinverbindungen. *European Journal of Organic Chemistry*. v. 212, 316-339, 1882.

FISCHER, E., BESTHORN, E.; *Liebigs Annalen der Chemie* v. 212, 312, 1882.

GALUPPO, L. F., LÍVERO, F. A. R., MARTINS, G. G., CARDOSO, C. C., BELTRAME, O. C., KLASSEN, L. M. B., CANUTO, A. V. S., ECHEVARRIA, A., TELLES, J. E. Q., KLASSEN, G., ACCO, A.; Sydnone 1: A Mesoionic Compound with Antitumoral and Haematological Effects In Vivo. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. v.119, 41–50, 2016.

GENTILI, P. L., ORTICA, F., FAVARO, G.; Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV-visible

absorption and fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry. B* v.112, 16793 – 16801, 2008.

GESSAIN, A., CASSAR, O.; Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers Microbiology*. v. 3, 388, 2012.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A. C. S.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anti-Cancer Drugs*. 8, 88-91, 1997.

GRYNBERG, N., GOMES, R., SHINZATO, T., ECHEVARRIA, A., MILLER, J. Some new aril-sydnonones: effects on murine tumours. *Anticancer Research*. v.12, 1025-1028, 1992.

GONÇALVES, D. U., PROIETTI, F. A., RIBAS, J. G., ARAUJO, M. G., PINHEIRO, S. R., GUEDES, A. C., CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clinical Microbiology Review*. v. 23, 577–589, 2010.

GOZZI, G. J., PIRES, A. R. A., VALDAMERI, G., ROCHA, M. E. M., MARTINEZ, G. R., NOLETO, G. R., ACCO, A., SOUZA, C. E. A., ECHEVARRIA, A., REIS, C. M., PIETRO, A., CADENA, S. M. S. C.; Selective Cytotoxicity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Hepatocarcinoma Cells (HepG2). *PLoS ONE*. v.10, 2015.

Guia do manejo clínico de infecção pelo HTLV. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014.

KALINOWSKI, H., BERGER, S., BRAUN, S.; Carbon-13 NMR Spectroscopy. John & Wiley Sons Ltda. Toronto, 1988.

HEHRE, W.J.; A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations, Wavefunction, Inc., Irvine, USA, 2003.

HODSON, A., CRICHTON, S., MONTONO, S., MIR, N., MATUTES, E., CWCYNARSKI, K., KUMARAN, T., ARDESHNA, K. M., PAGLIUCA, A., TAYLOR, G. P., FIELDS, P. A.; Use of Zidovudine and Interferon Alfa with Chemotherapy Improves Survival in Both Acute and Lymphoma Subtypes of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. v. 29 (35),4696-4701, 2011.

<http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/>, Accessed date: July 2017.

INCA [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)., acessado em 09 de janeiro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2012. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro\\_abc\\_2ed.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_abc_2ed.pdf) , acessado em 09 de janeiro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>, acessado em 09 de janeiro de 2018.

ISMAYA, W.T., ROZEBOOM, H.J., WEIJN, A., MESS, J.J., FUSETTI, F., WICHERS, H.J., DIJKSTRA, B.W., Crystal structure of *agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*. v. 50, 5477–5486, 2011.

JANKOVIC, N., MUSKINJA, J., RATKOVIC, Z., BUGARCI, B., RANKOVIC, B., KOSANIC, M., STEFANOVIC, S.; Solvent-free synthesis of novel vanillidene derivatives of Meldrum's acid: biological evaluation, DNA and BSA binding study. *RSC Advance*. v. 6, 39452–39459, 2016.

KAMOI, K., MOCHIZUKI, M.; HTLV infection and the eye. *Current Opinion Ophthalmology*. v. 23, 557–561, 2012.

KAPPEL, J. C., YOKUM, T. S., BARANY, G.; Parallel Solid-Phase Syntheses of 1,3,4-Thiadiazolium-2-Aminides. *Journal of Combinatorial Chemistry*, v.6, 746-752, 2004.

KAPSE-MISTRY, S., GOVENDER, T., SRIVASTAVA, R.; Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Frontier Pharmacology*. v. 5, 159, 2014.

KATO, K., AKASHI, K.; Recent advances in therapeutic approaches for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Viruses*. v. 7, 6604–12, 2015.

KIM, Y. J., UYAMA, K.; Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Science*. v. 62, 1707–1723, 2005.

KORB, O., STÜTZLE, T., EXNER, T.E.J.; Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*. v. 49, 84–96, 2009.

LAKOWICZ, J. R.; Principles of Fluorescence Spectroscopy, 1st ed. Springer, New York, NY, USA, 2006.

LARKIN, V., CHIARION-SILENI, R., GONZALEZ, J. J., GROB, J. J., COWEY, C. L., LAO, C. D., SCHADENDORF, D., DUMMER, R., SMVLIE, M., RUTKOWSKI, P., FERRUCCI, P. F., HILL, A., WAGSTAFF, J., CARLINO, M.S., HAANEN, J. B., MAIO, M., MARQUEZ-RODAS, I., MCARTHUR, G. A., ASCIERTO, P. A., LONG, G. V., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., GROSSMANN, K., SZNOL, M., DRENO, B., BASTHOLT, L., YANG, A., ROLLIN, L. M., HORAK, C., HODI, F. S., WOLCHOK, J. D.; Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *New England Journal of Medicine*. 373, 23–34, 2015.

LIU, J., TIAN, J. N., ZHANG, J., HU, X.; Interaction of magnolol with bovine serum albumin: a fluorescence –quenching study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 376, 864–867, 2003.

LOPES, N. D., CHAVES, O. A., OLIVEIRA, M. C. C., SANT' ANNA, C. M. R., SOUSA-PEREIRA, D., NETTO-FERREIRA, J. C., ECHEVARRIA, A.; Novel piperonal 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamines mesoionic derivatives: Synthesis, tyrosinase inhibition evaluation and HSA binding study. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 112, 1062–1072, 2018.

LUO, M.; MA, H. Z.; SU, Q. D. & LI, Q. R. Synthesis and crystal structure of 6-bromopiperonal-dimethyl-acetal. *Chinese Journal of Structural Chemistry*. v. 21, 538, 2002.

MACIEL, M. A. M., ECHEVARRIA, A., RUMJANEK, V. M.; Isolamento e caracterização de acil-tiossemicarbazidas como intermediários na síntese de compostos mesoiônicos. *Química Nova*. v. 21, 569-572, 1998.

MAEDA, Y., NAIKI, Y., SONO, H., MIYATAKE, J., SUMIMOTO, Y., SAKAGUCHI, M., MATSUDA, M., KANAMARU, A.; Clinical application of all-trans retinoic acid (tretinoin) for adult T-cell leukemia. *Brazilian Journal of Haematology*. v.109, 677, 2000.

MAHIEUX, R., PISE-MASISON, C., BRADY, J., GESSAIN, A., YAMAOKA, S., FRANCHINI, G.; Arsenic trioxide induces apoptosis in human T-cell leukemia virus type I and type II infected cells by a caspase- 3-dependent mechanism involving Bcl-2 cleavage. *Blood*. v. 98(13), 3762-3769, 2001.

MARKMAN, J. L., REKECHENETSKIY, A., HOLLER, E., LJUBIMOVA, J.Y. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* v. 65, 1866-1879, 2013.

MELOS, J. L. R.; Síntese e caracterização de tiossemicarbazonas, carbimidotioatos e derivados benzotriazocínicos. Avaliação da atividade antiparasitária de tiossemicarbazonas derivadas do núcleo 3,4- metilenidioxila. *Tese de Doutorado*, PPGQ-UFRRJ, 2012.

MELOS, J. L. R., TORRES-SANTOS, E. C., FAIÕES, V. S., NIGRIS DEL CISTIA, C., SANT'ANNA, C. M. R., RODRIGUES-SANTOS, C. E., ECHEVARRIA, A. Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 103, 409-417, 2015.

MOSMANN, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v.65, 55-63, 1983.

MOUAWAD, R., SEBERT, M., MICHELS, J., BLOCH, J., SPANO, J. P., KHAVAT, D.; Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v. 74, 37-39, 2010.

MOURA, G. L. C., SIMAS, A., MILLER, J. Mesoionic Rings as efficient Bridges for the Design of Compounds with Large Optical Nonlinearities. 2nd Conference on Molecular Modeling, Rio de Janeiro (RJ), 26-28, 1994.

NAWATA, H., MAEDA, Y., SUMIMOTO, Y., MIYATAKE, J., KANAMARU, A.; A mechanism of apoptosis induced by of all-trans retinoic acid on adult Tcell leukemia cells: a possible involvement of the Tax/NF-kB signaling pathway. *Leuk Res*. v. 25, 323-331, 2001.

- NEWTON, C. G., RAMSDEN, C.A.; Mesoionic heterocycles. *Tetrahedron*. v. 38, 2965-3011, 1982.
- OLIVEIRA, M. B., MILLER, J., PEREIRA, A. B., GALEMBECK, S. E., MOURA, G. L. C., SIMAS, A. M.; *Phosphorus, Sulfur and Silicon*. v.180, 74, 1996.
- OLLIS, W. D., RAMSDEN, C. A. *Advanced Heterocycles. Chemistry* v.19, 1, 1976.
- OLLIS, W. D., RAMSDEN, C. A.; Synthesis of mesoionic anhydro-2-arylamino-1,3,4-oxadiazoliumhydroxides. *Journal of the Chemical Society*. v. 19, 1222-1223, 1971.
- PAIVA, R. O.; KNEIPP, L. F.; REIS, C. M.; ECHEVARRIA, A. Mesoionic compounds with antifungal activity against *Fusarium verticillioides*. *BMC Microbiology*. v.15,11, 2015.
- PIRES, A. R. A, GOZZI, G. J., NOLETO, G. R., ECHEVARRIA, A., REIS, C. M., ROCHA, M. E. M.; Martinez, G. R.; Cadena, S. M. S. C. Antioxidant effect of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives on isolated mitochondria. *European Journal of Pharmacology*. v. 770, 78-84, 2016.
- REIS, C. M. Síntese, Utilizando Metodologias Alternativas, e Avaliação Citotóxica de Compostos Mesoiónicos da Classe 1,3,4-Tiadiazólio-2-Aminida. *Dissertação de mestrado*, PPGQ-UFRRJ, 2008.
- REIS, C.M., ECHEVARRIA-LIMA, J., MIRANDA, A. F., Echevarria, A.; Improved Synthesis of 1,3,4-Thiadiazolium-2-phenylamines using Microwave and Ultrasound Irradiation and Investigation of their Cytotoxic Activity. *Journal of Brazilian Chemical Society*. v. 22, 8, 1505-1510, 2011.
- RODRIGUES-SANTOS, C. E.; ECHEVARRIA, A. An efficient and fast synthesis of 4-aryl-3,4-dihydrocoumarins by (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Y catalysis under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*. 48, 26, 4505-4508, 2007.
- ROSS, P.D., SUBRAMANIAN, S.; Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. v. 20, 3096-3102, 1981.
- ROSSI, C.G.F.T.; Inibição à corrosão do aço AISI 1020, em meios ácido e salino, por tensoativos e substâncias nitrogenadas microemulsionados. Tese (Doutorado), UFRN, Centro de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química, Natal, 2007.
- SANTOS, A. C. S, ECHEVARRIA, A.; Electronic effects on <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of substituted 1,3,4-thiadiazolium salts. *Magnetic Resonance Chemistry*. 39: 182-186, 2001.
- SATO, M., UJIIE, S. *Chemistry Citation Index*, jan-dec, 1996.
- SEGEL, I. H.; Cálculos de Bioquímica, Acribia, 2a Ed., 1982.
- SENFF-RIBEIRO, A., ECHEVARRIA, A., SILVA, E. F., VEIGA, S. S., OLIVEIRA, M. B. M.; Effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on B16-F10 murine melanoma. *Melanoma Research*. v.13, 465-471, 2003.

SENEFF-RIBEIRO, A., ECHEVARRIA, A., SILVA, E. F., VEIGA, S. S., OLIVEIRA, M. B. M.; Antimelanoma activity of 1,3,4-thiadiazolium mesoionics: a structure-activity relationship study. *Anti-Cancer Drugs*. v.15, 269–275, 2004.

SEO, S. Y., SHARMA, V. K., SHARMA, N., Mushroom Tyrosinase: recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003.

SILVA, E. F. Mesoiônicos, 1,3,4-tiadiazólio-2-amidinas: Síntese, Solvatocromismo & Citotoxicidade. Dissertação de Mestrado, UFRuralRJ. 1997.

SILVA, F. A., MEIS, E., DOBBIN, J. A., OLIVEIRA, M. S. P.; Leucemia-linfoma de células T do adulto no Brasil: epidemiologia, tratamento e aspectos controversos. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 48, 585-595, 2002.

SILVERIO, M. D. O., CASTRO, C.F.S., MIRANDA, A. R. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.1, (15),59-65, 2013.

STEWART, B. W.; WILD, C. P.; World Cancer Report 2014. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. 2014.

SUN, Z., XU, H., CAO, Y., WANG, F., MI, W.; Elucidating the interaction of propofol and serum albumin by spectroscopic and docking methods. *Journal of Molecular Liquids*. v. 219, 405–410, 2016.

TAGUCHI, H., KINOSHITA, K., TAKATSUKI, K., TOMONAGA, M., ARAKI, K., IKEDA, S.; UOZUMI, K., KOHNO, H., KAWANO, F., KIKUCHI, H., TAKAHASHI, H., TAMURA, K., CHIYODA, S., TSUDA, H., NISHIMURA, H., HOSOKAWA, T., MATSUZAKI, H., MOMITA, S., YAMADA, O., MIYOSHI, I.; An intensive chemotherapy of adult T-cell leukemia/lymphoma: CHOP followed by etoposide, vindesine, ranimustine, and mitoxantrone with granulocyte colony-stimulating factor support. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. v.12, 182-186, 1996.

TAJIMA, K., HINUMA, Y.; Epidemiology of HTLV-I/II in Japan and the world. In: Yoshida M (ed.) Gann monograph on cancer research. Japan: *Japan Science Societies Press*, 129–149, 1992.

TANG, J.Q., HOU, X.Y., YANG, C.S., LI, Y.X., XIN, Y., GUO, W.W., WEI, Z.P., LIU, Y.Q., JIANG, G.; Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment Running title: Nanomedicine for melanoma treatment. *International Journal of Cancer*. 2017.

TIAN, J.N., LIU, J., HU, Z.D, CHEN, X.G.; Interaction of wogonin with bovine serum albumin. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. v. 13, 4124–4129, 2005.

TSUKASAKI, K., HERMINE, O., BAZARBACHI, A., RATNER, L., RAMOS, J. C., HARRINGTON, W., O'MAHONY, D., JANIK, J. E., BITTENCOURT, A. L., TAYLOR, G. P., YAMAGUCHI, K., UTSUNOMIYA, A., TOBINAI, K., WATANABE, T.; Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *Journal of Clinical Oncology*. v.27(3),453–459, 2009.

US FDA.FDA labeling information — Yervoy. *FDA website* [online], [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2011/125377s0000lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/125377s0000lbl.pdf) (2011).

VIDEIRA, I. F. S., MOURA, D. F. L., MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2013.

WANG, Y., CURTIS-LONG, M.J., LEE, B.W., YUK, H.J., KIM, D.W., TAN, X.F., PARK, K.H., Inhibition of tyrosinase activity by polyphenol compounds from Flemingia philippinensis roots. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v. 22, 1115–1120, 2014.

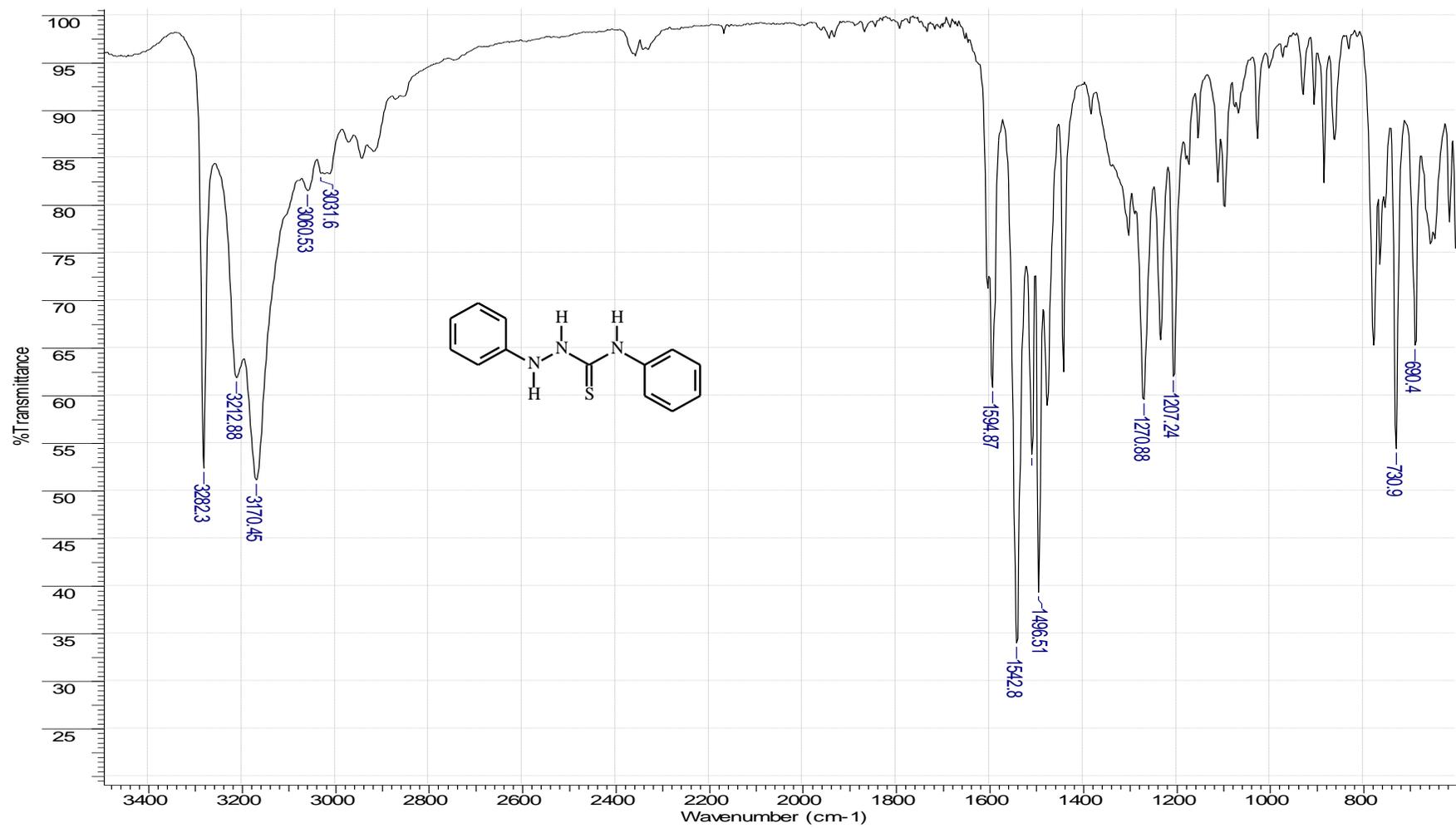
WARDELL, M., WANG, Z., HO, J.X., ROBERT, J., RUKER, F., RUBLE, J., CARTER, D.C.; The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. v. 291, 813–819, 2002.

WEBER, J. S., GIBNEY, G., SULLIVAN, R. J., SOSMAN, J. A., SLINGLUFF, C. L., LAWRENCE, D. P., LOGAN, T. F., SCHUCHTER, L. M., NAIR, S., FECHER, L., BUCHBINDER, E. I., BERGHORN, E., RUISI, M., KONG, G., JIANG, J., HORAK, C., HODI, S., Sequential administration of nivolumab and ipilimumab with a planned switch in patients with advanced melanoma (CheckMate 064): an open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. v.17, 943–945, 2016.

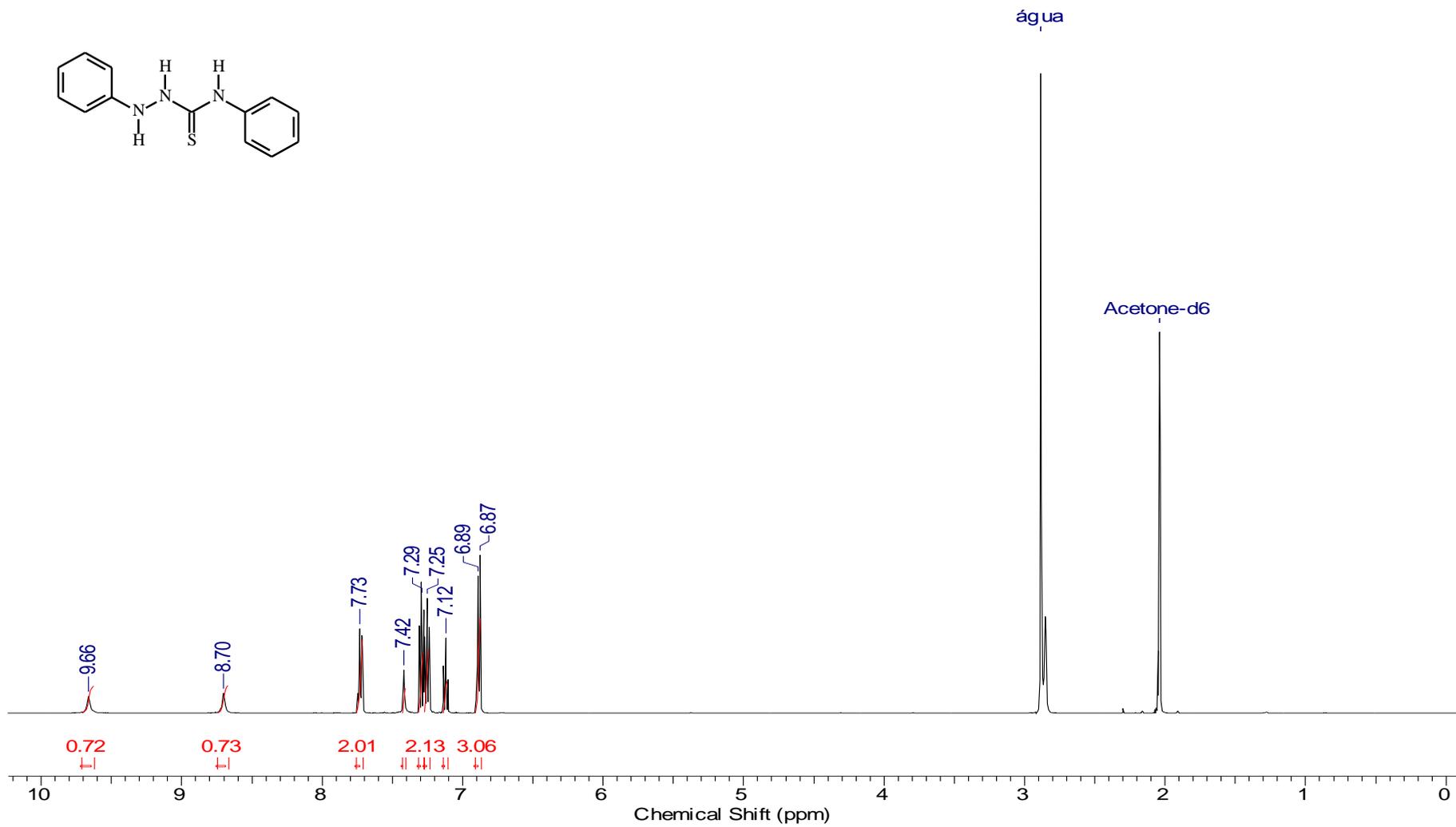
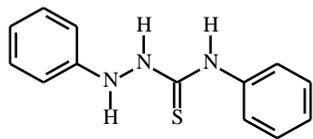
WHO. <http://www.who.int/cancer/en/> acessado em 09 de janeiro de 2018.

WU, Y., WU, Z-R, CHEN, P., YANG-LI, DENG, W-R, WANG, Y-Q, LI, H-Y. Effect of the tyrosinase inhibitor (S)-N-trans-feruloyloctopamine from garlic skin on tyrosinase gene expression and melanine accumulation in melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015.

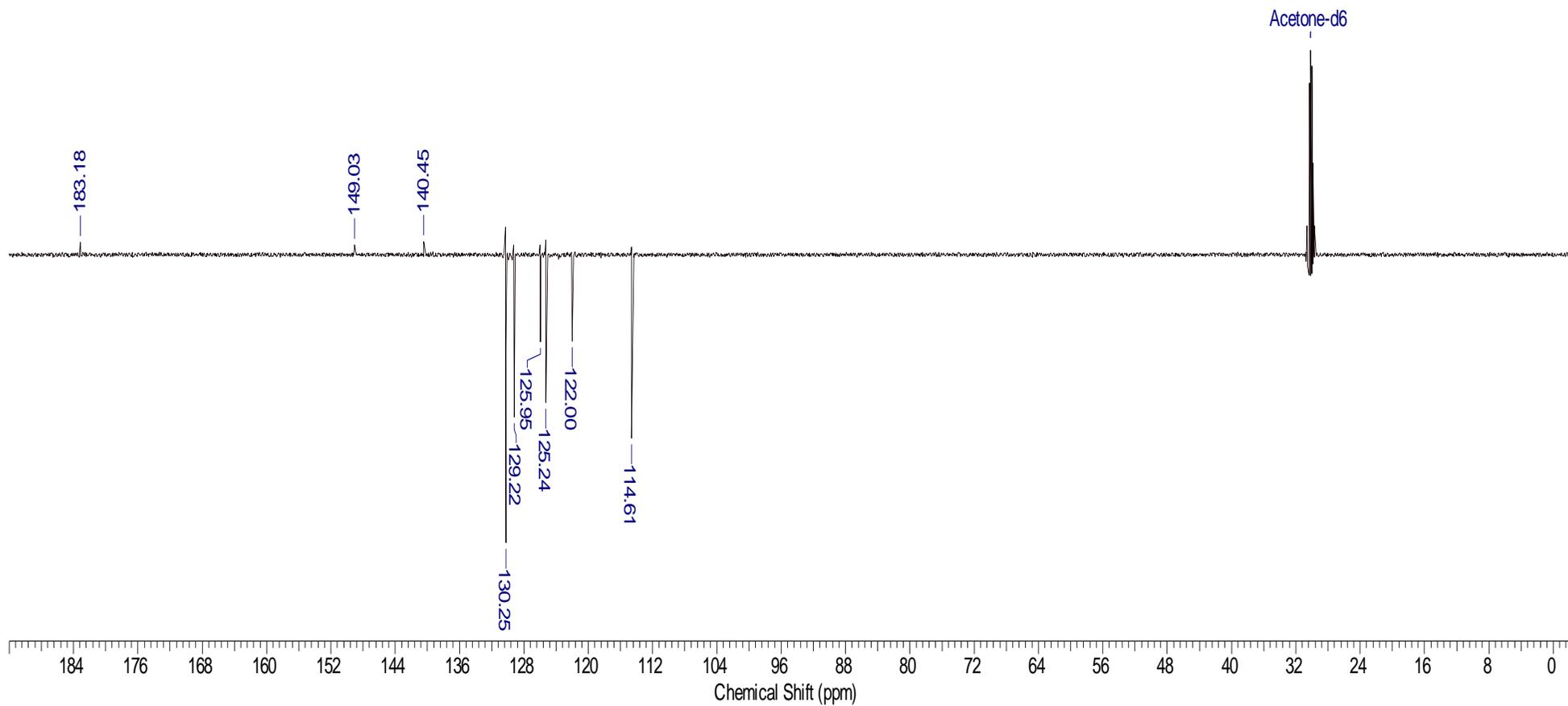
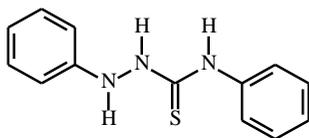
## **8. ANEXO DE ESPECTROS**



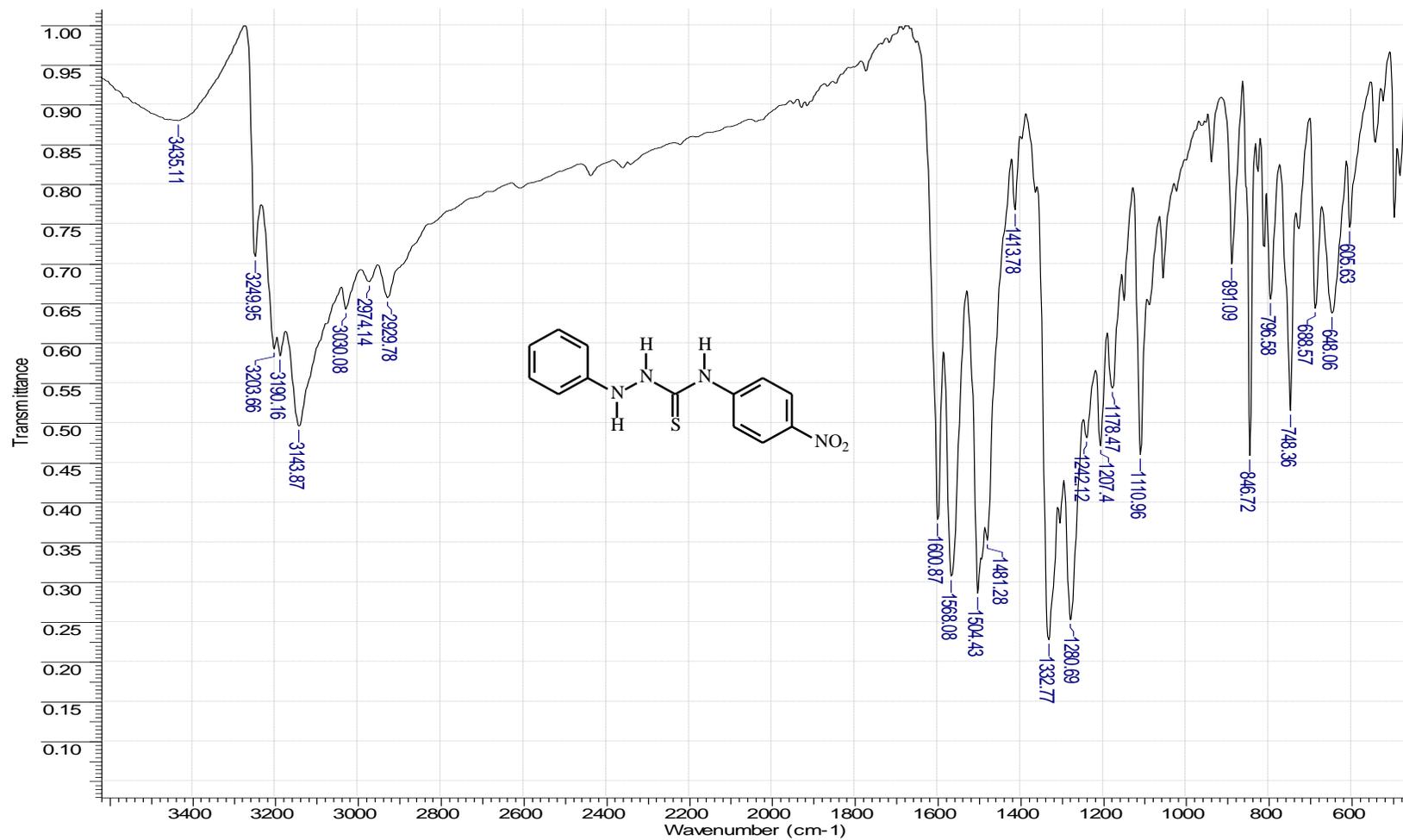
**Espectro 1.** Espectro de IV da N, 2-difenil-hidrazina-carbotioamida 1.



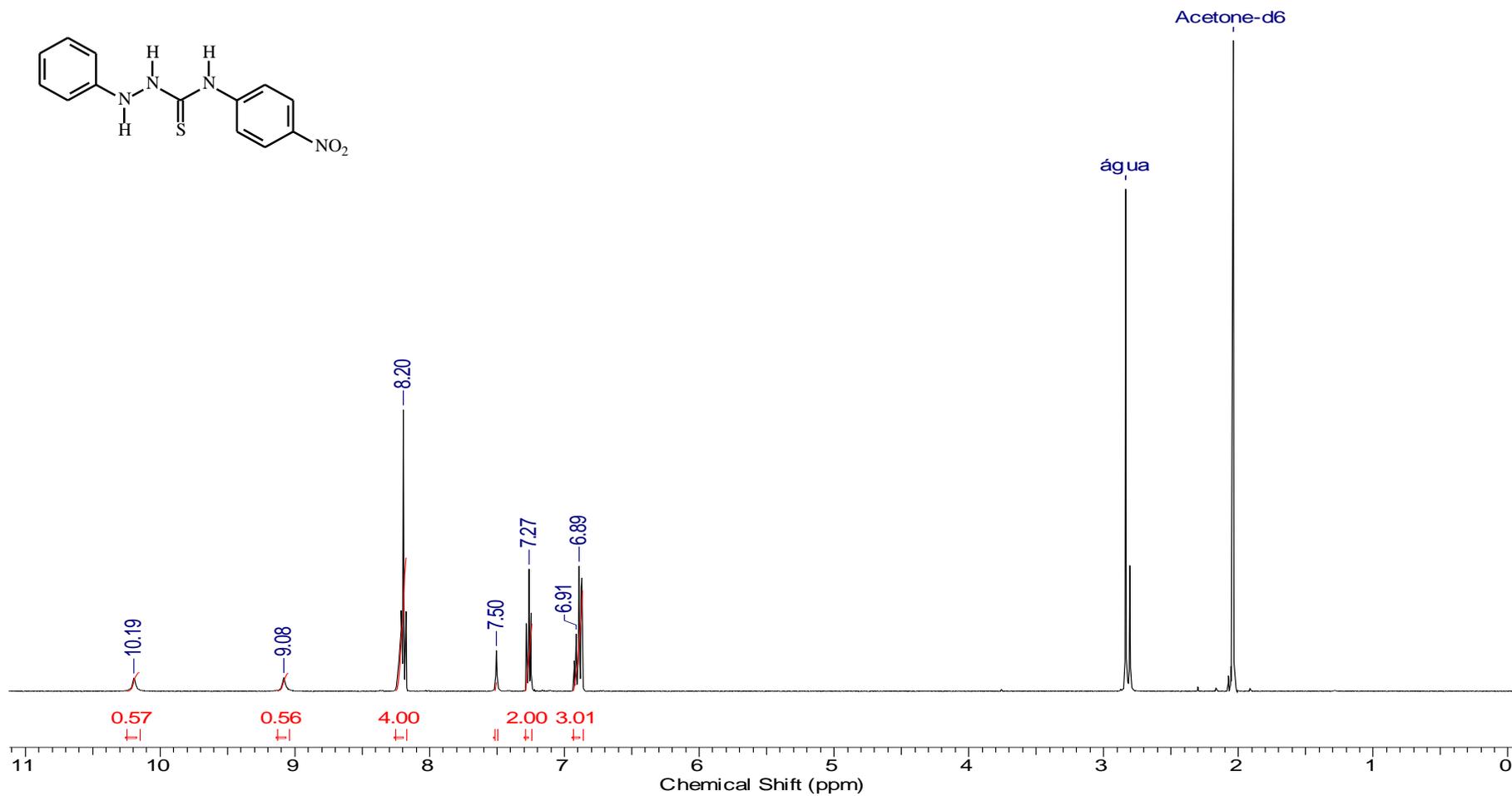
**Espectro 2.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da *N*, 2-difenil-hidrazina-carbotioamida 1



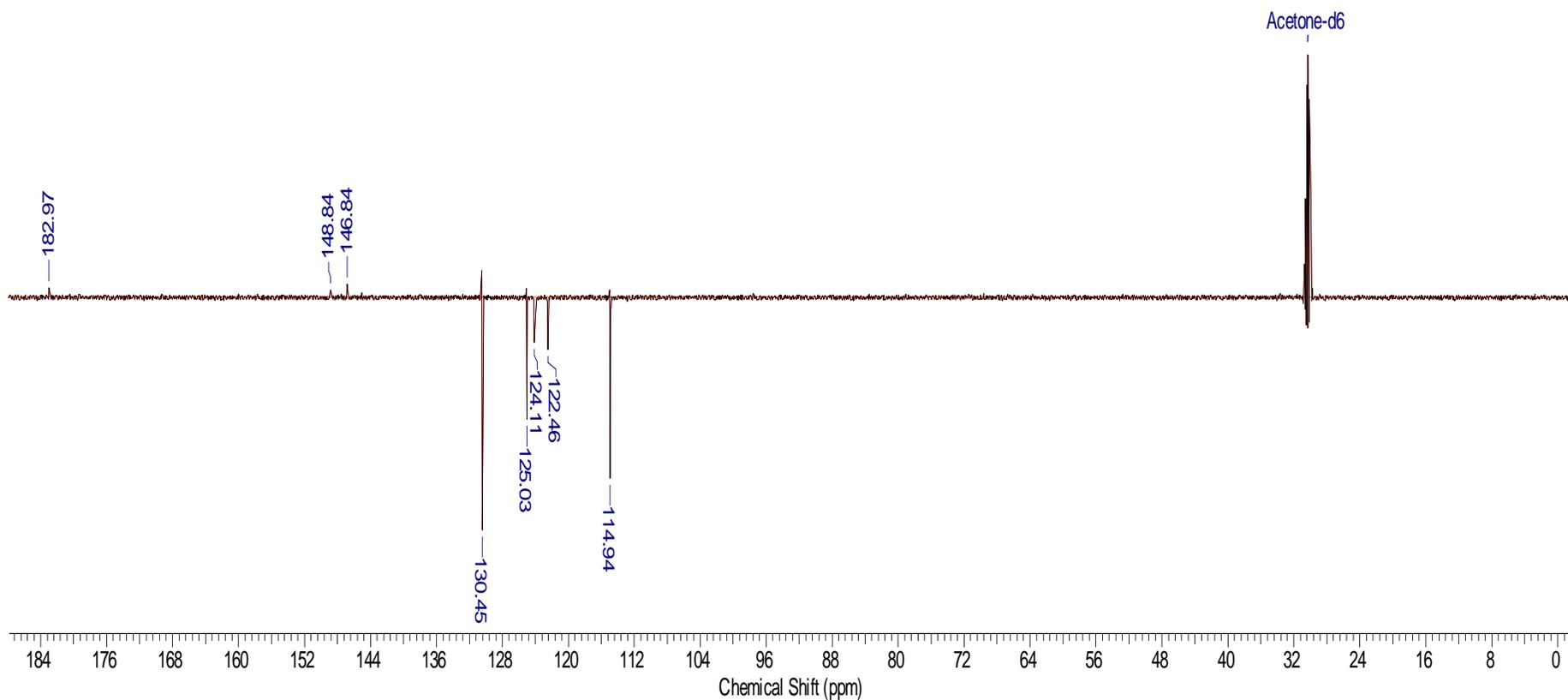
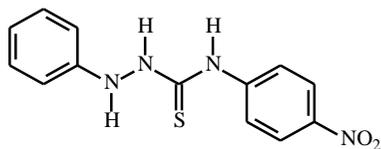
**Espectro 3.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da *N*, 2-difenil-hidrazina-carbotioamida **1**



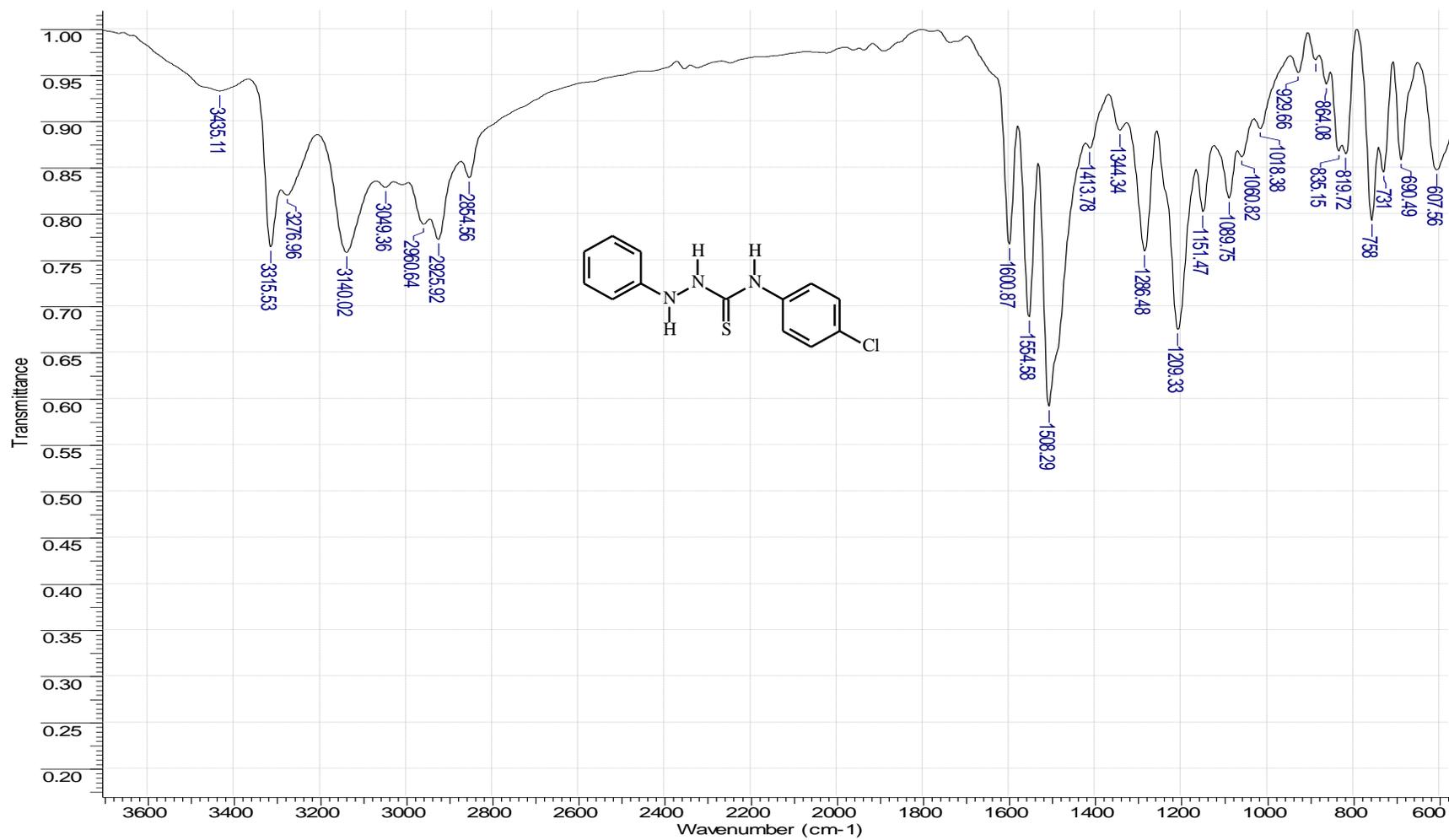
**Espectro 4.** Espectro de IV da *N*-(4-nitrofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotoamida 2.



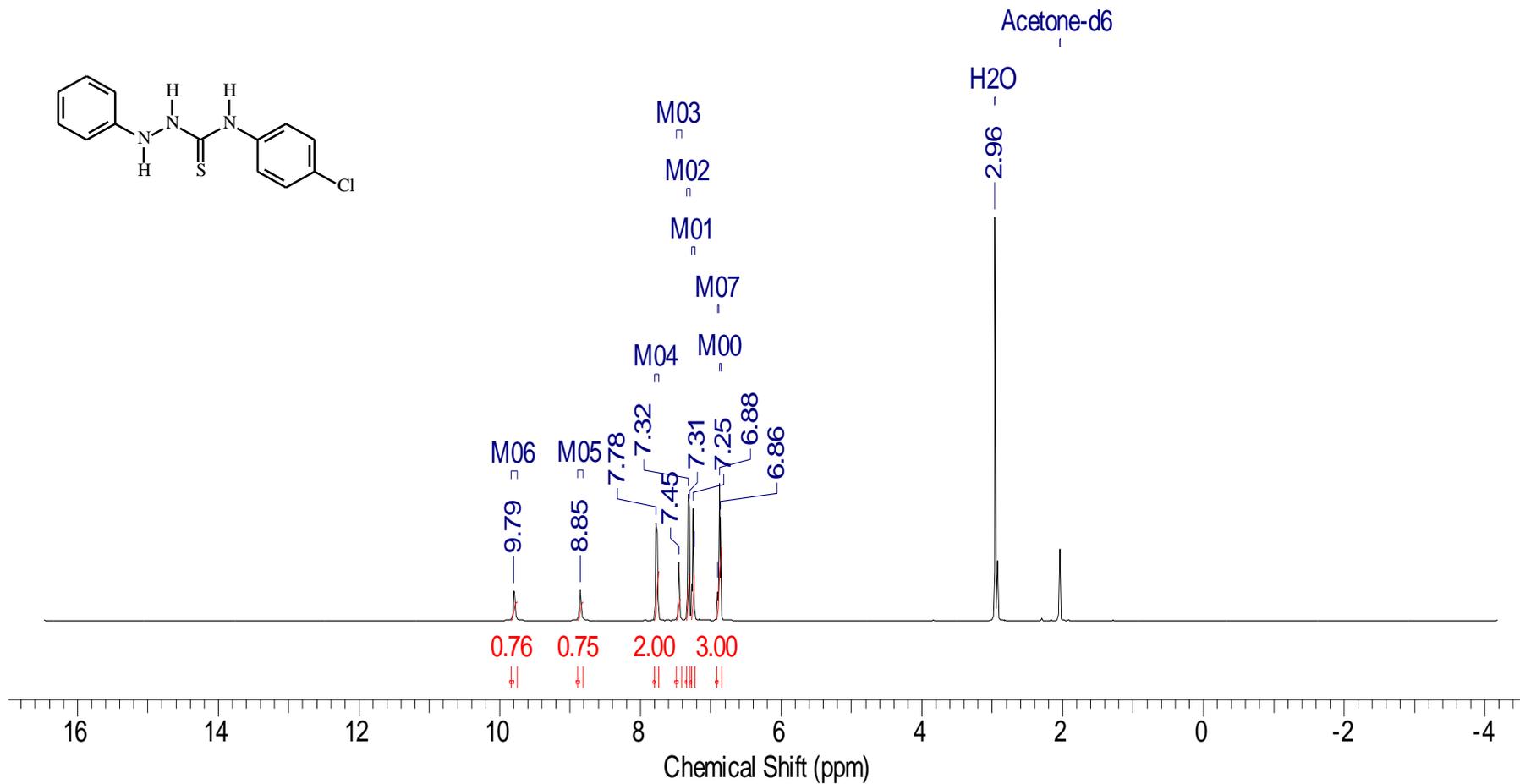
**Espectro 5.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da *N*-(4-nitrofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotoamida **2**.



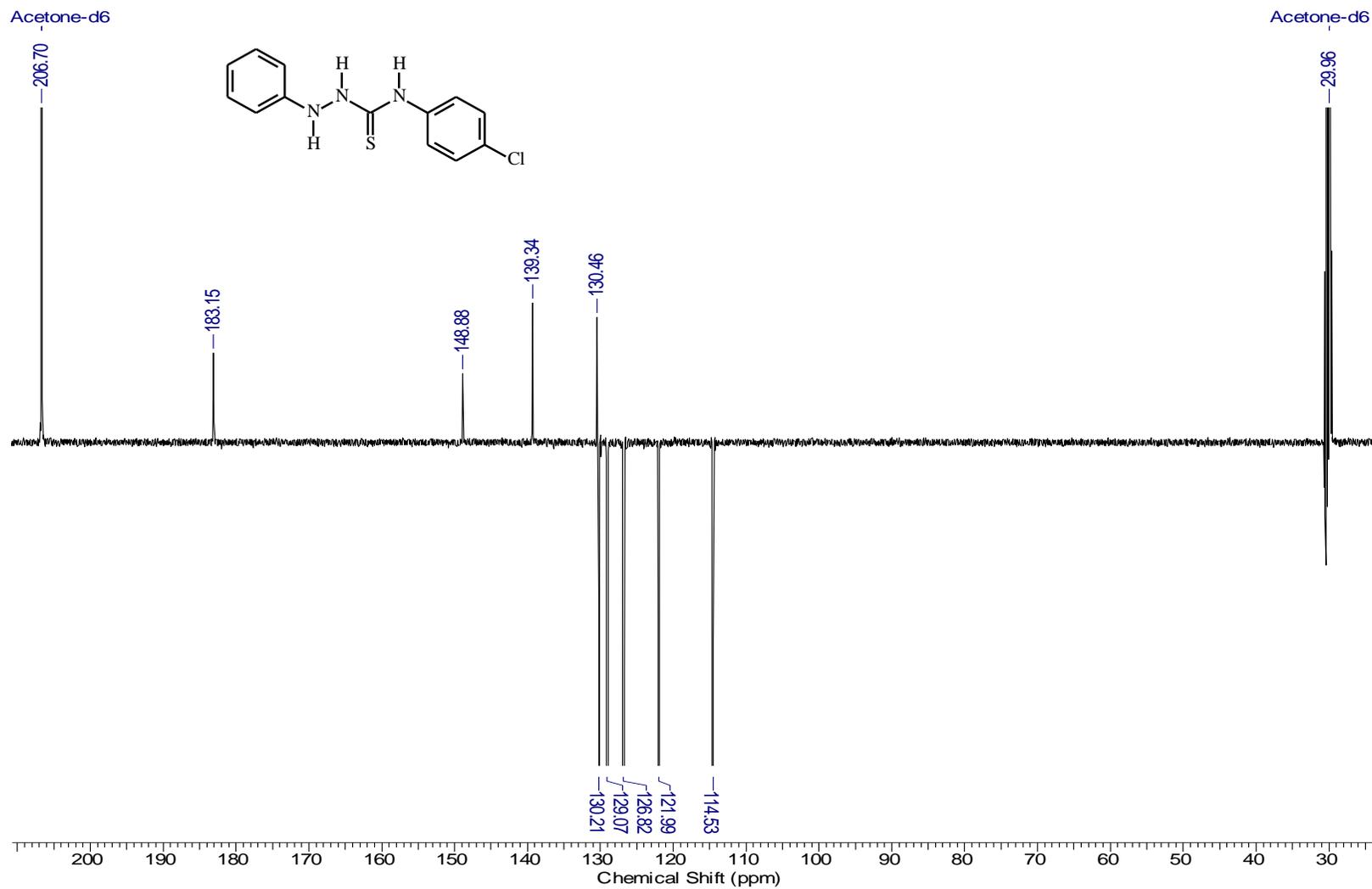
**Espectro 6.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da *N*-(4-nitrofenil)-2-fenil-hidrazinacarbotoamida 2.



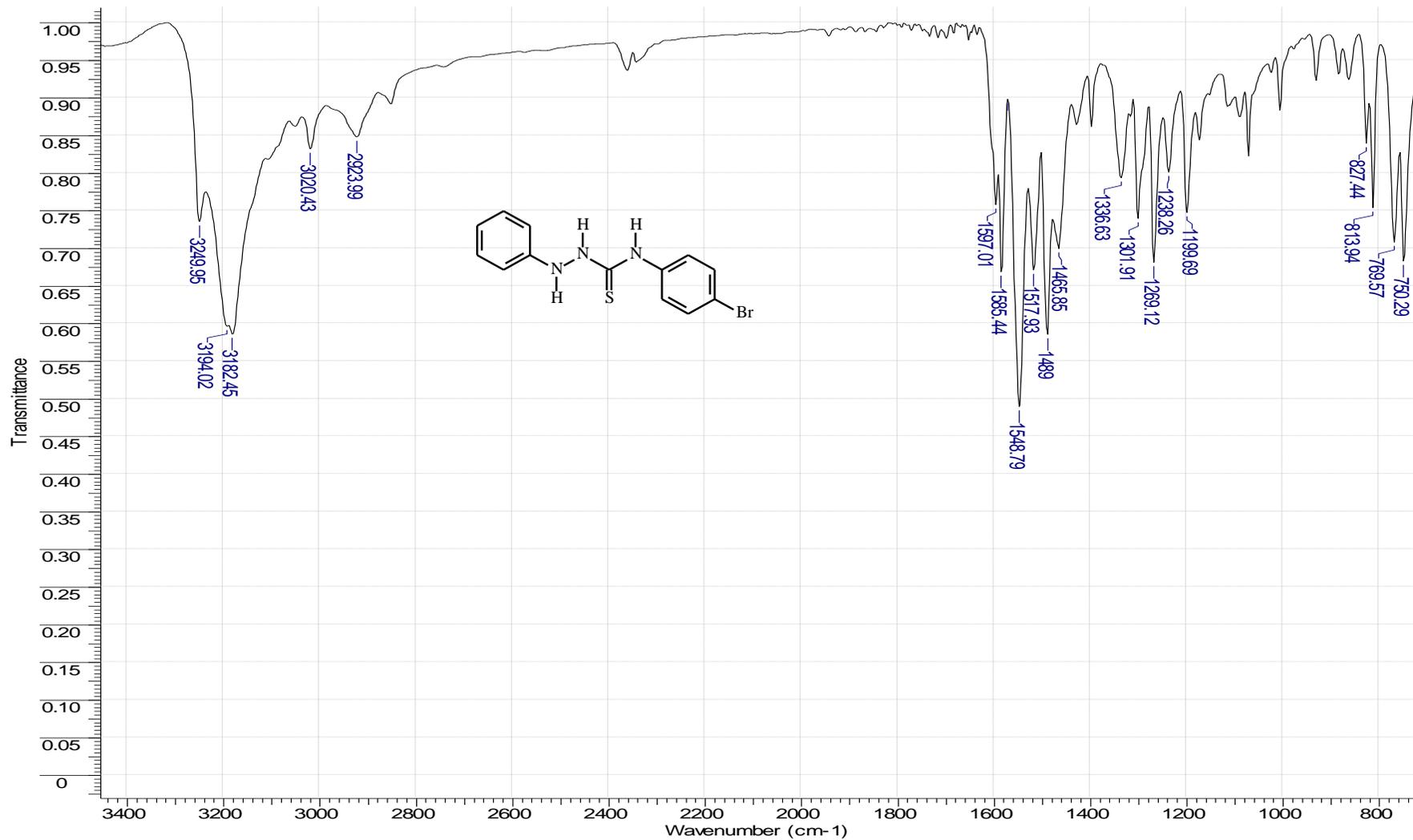
**Espectro 7.** Espectro de IV da *N*-(4-clorofenil)-2-fenil-hidrazinecarbotioamida 3.



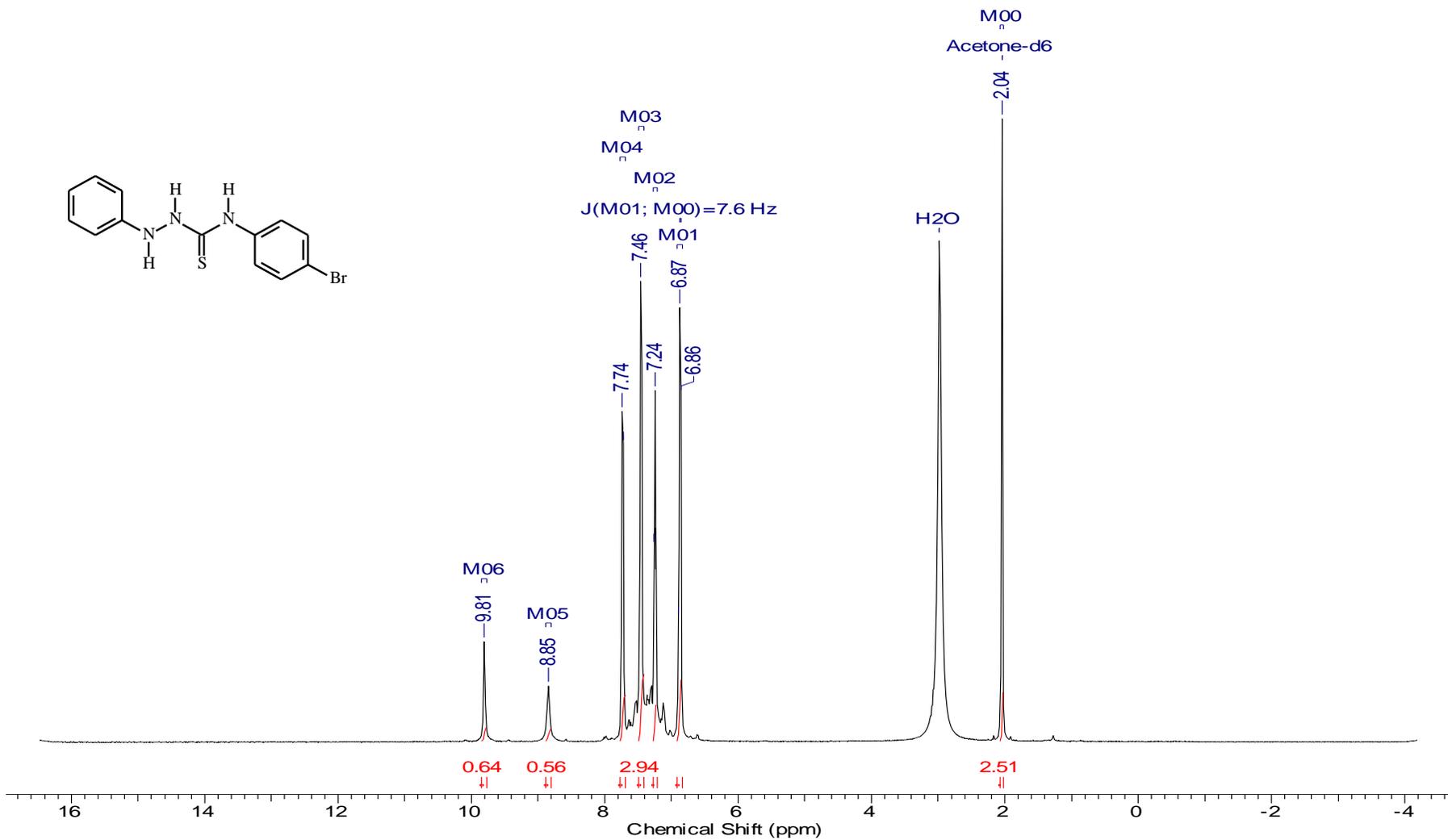
**Espectro 8.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da *N*-(4-clorofenil)-2-fenil-hidrazinecarbotioamida 3.



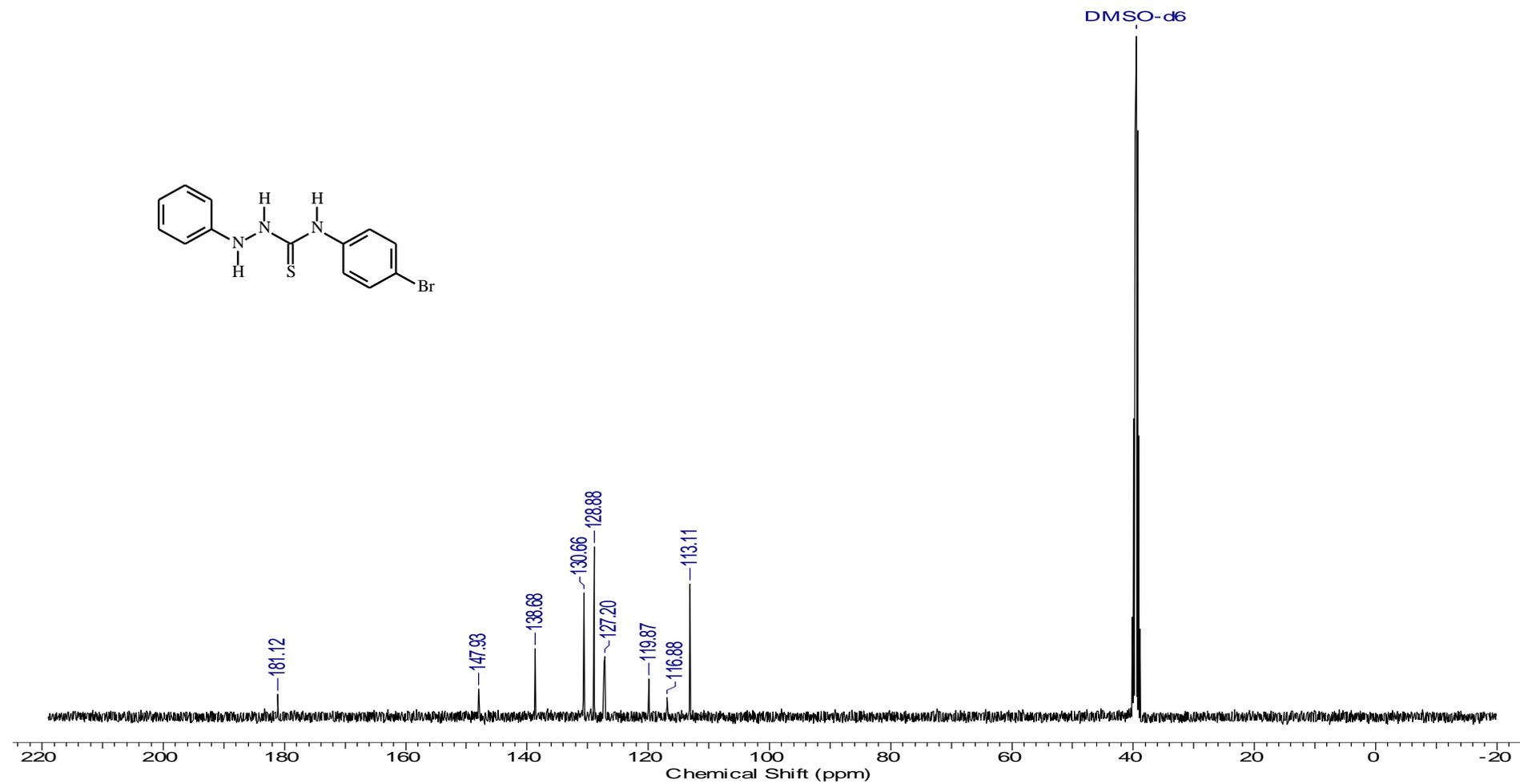
**Espectro 9.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C da *N*-(4-clorofenil)-2-fenil-hidrazinecarbotioamida 3.



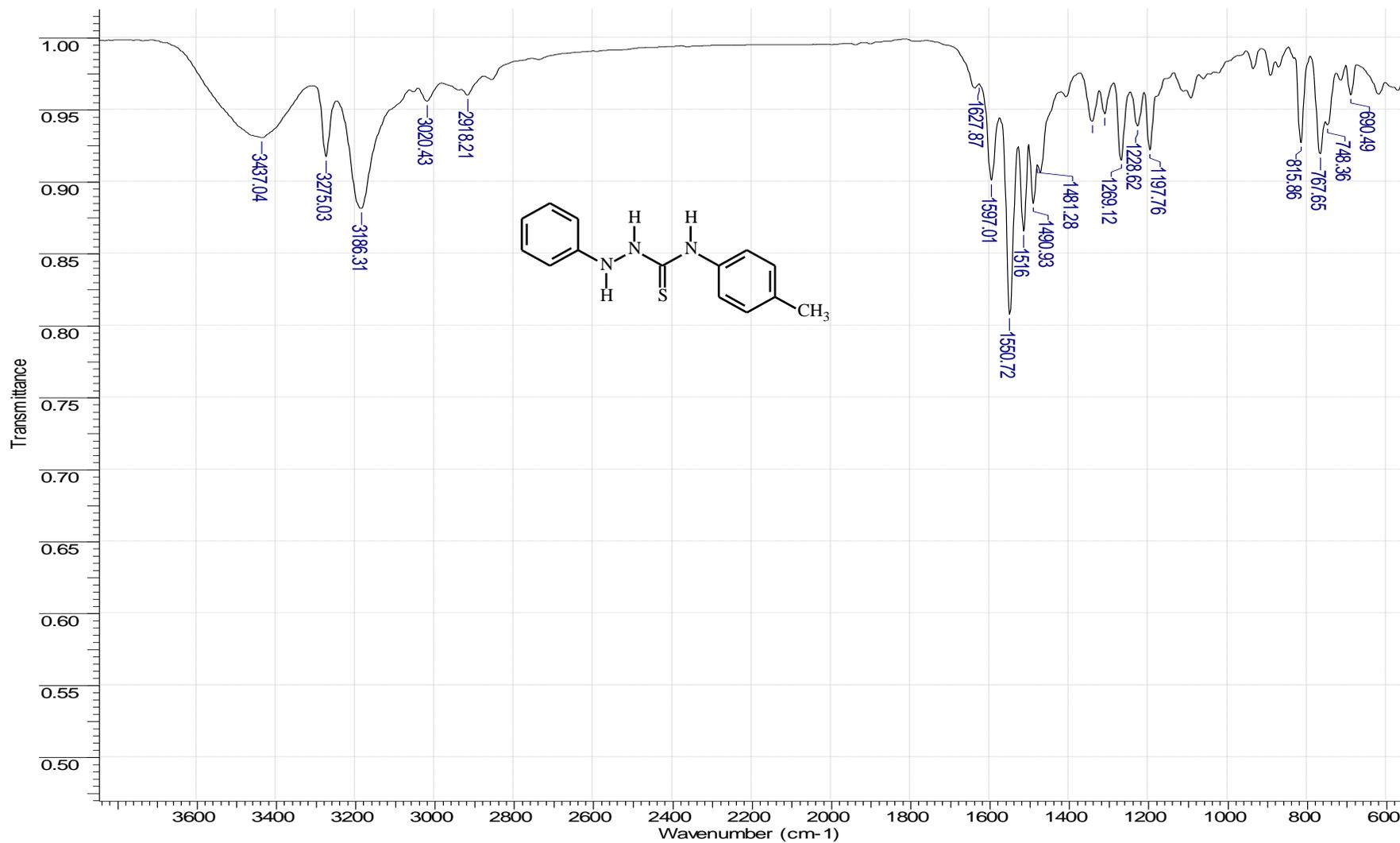
**Espectro 10.** Espectro de IV da *N*-(4-bromofenil)-2-fenil-hidrazinecarbotioamida 4.



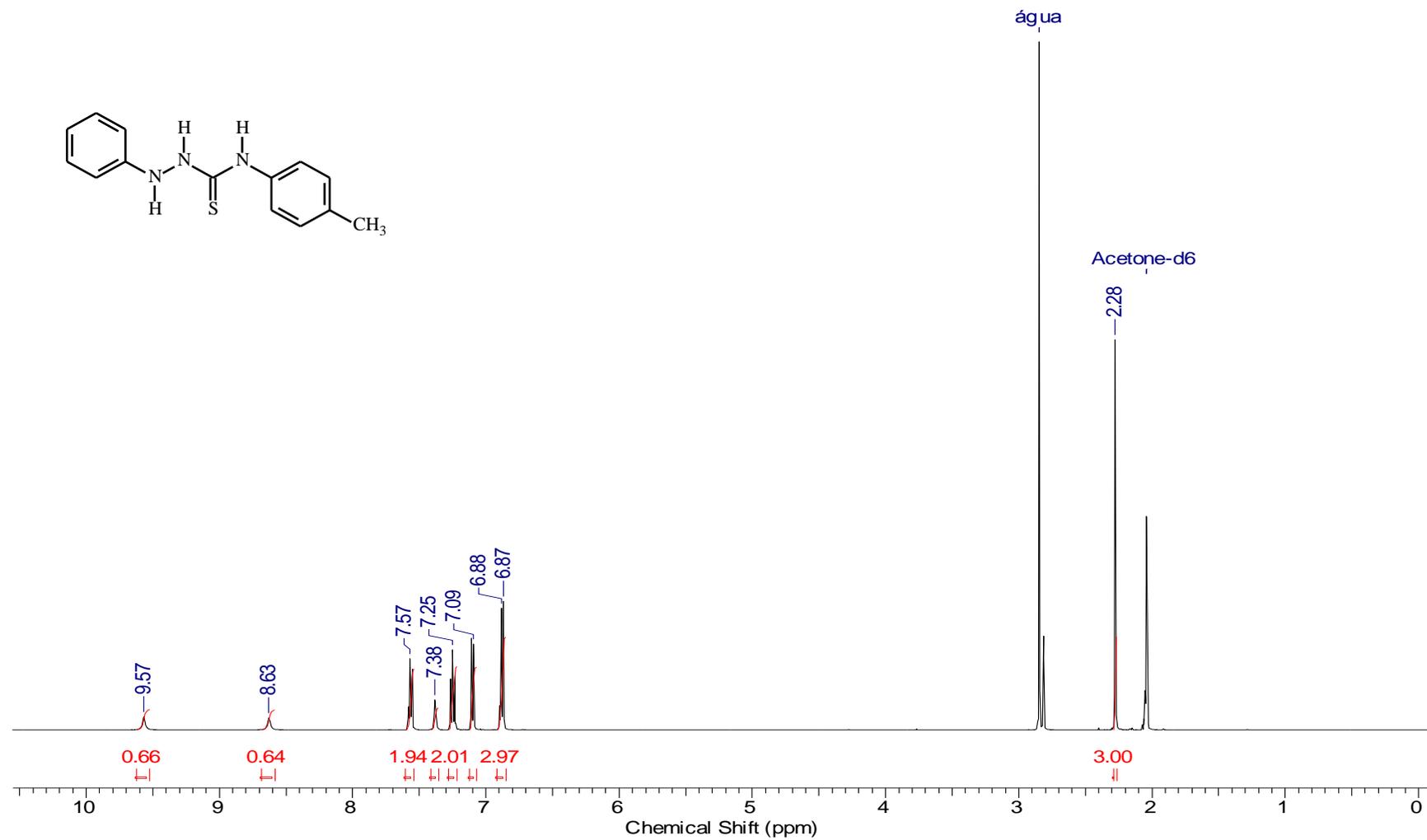
**Espectro 11.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da *N*-(4-bromofenil)-2-fenil-hidrazinecarbotioamida 4



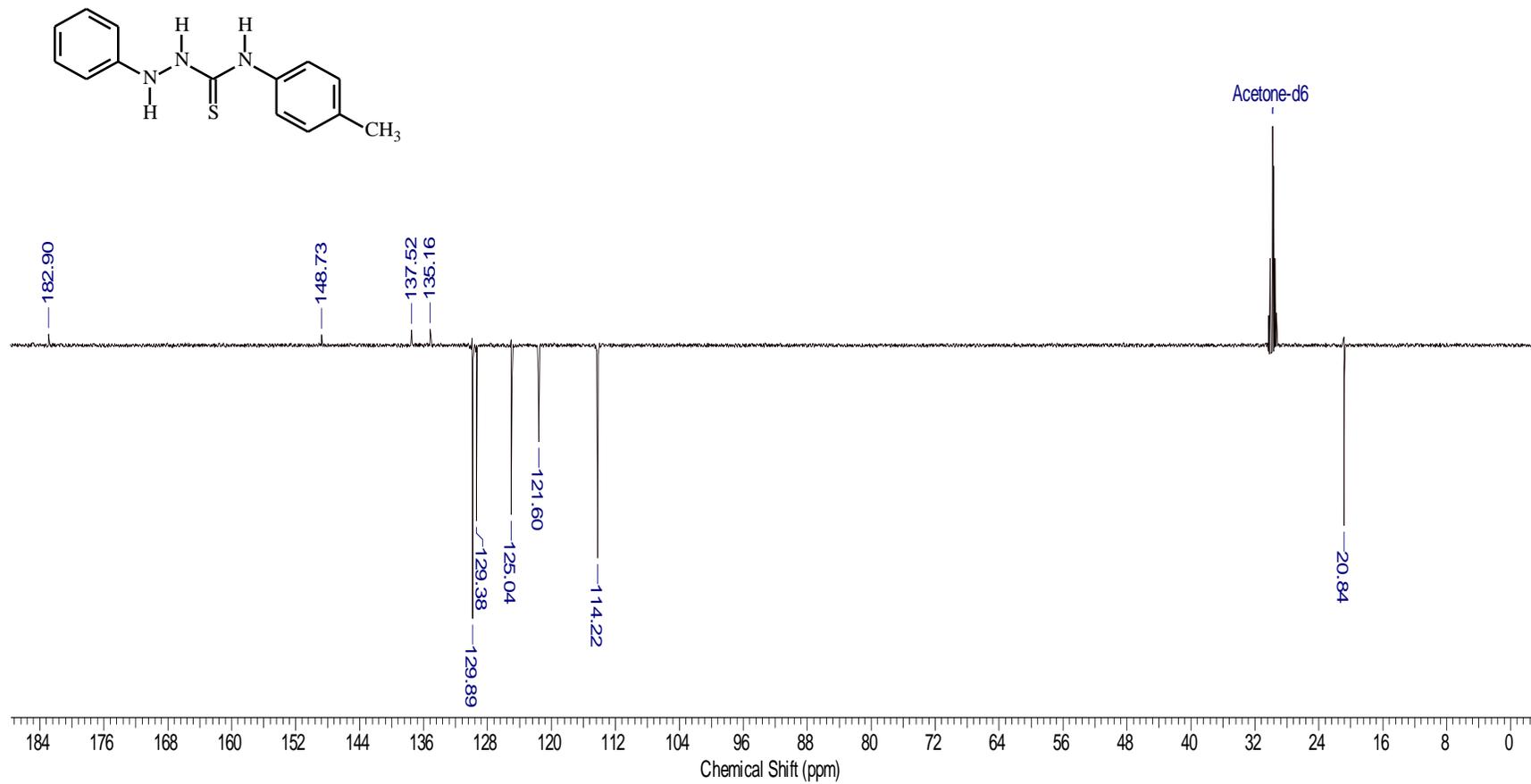
**Espectro 12.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C da *N*-(4-bromofenil)-2-fenil-hidrazinecarbotioamida 4.



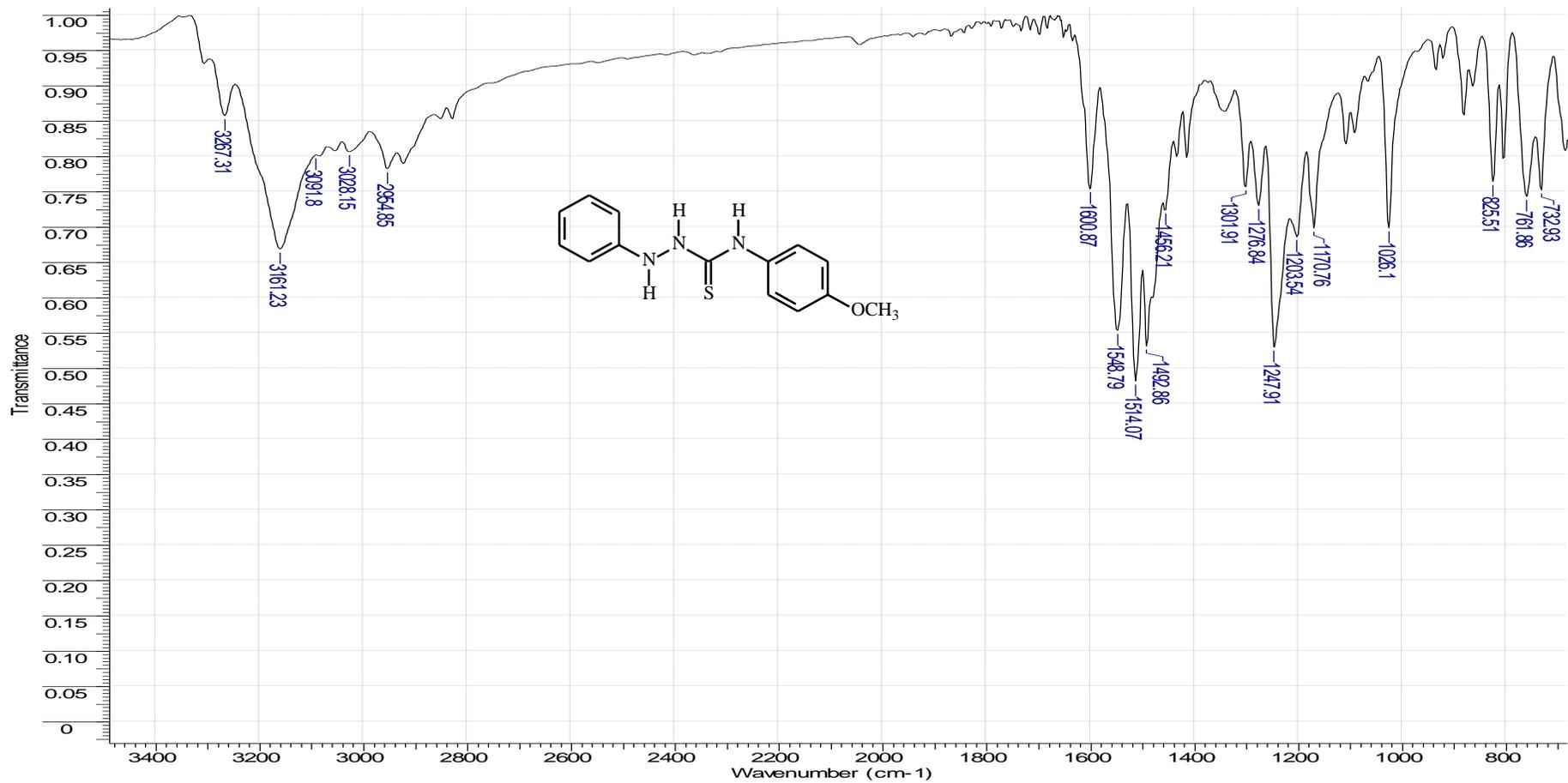
**Espectro 13.** Espectro de IV da 2-fenil-*N*-(*p*-toluol)-hidrazinacarbotoamida 5.



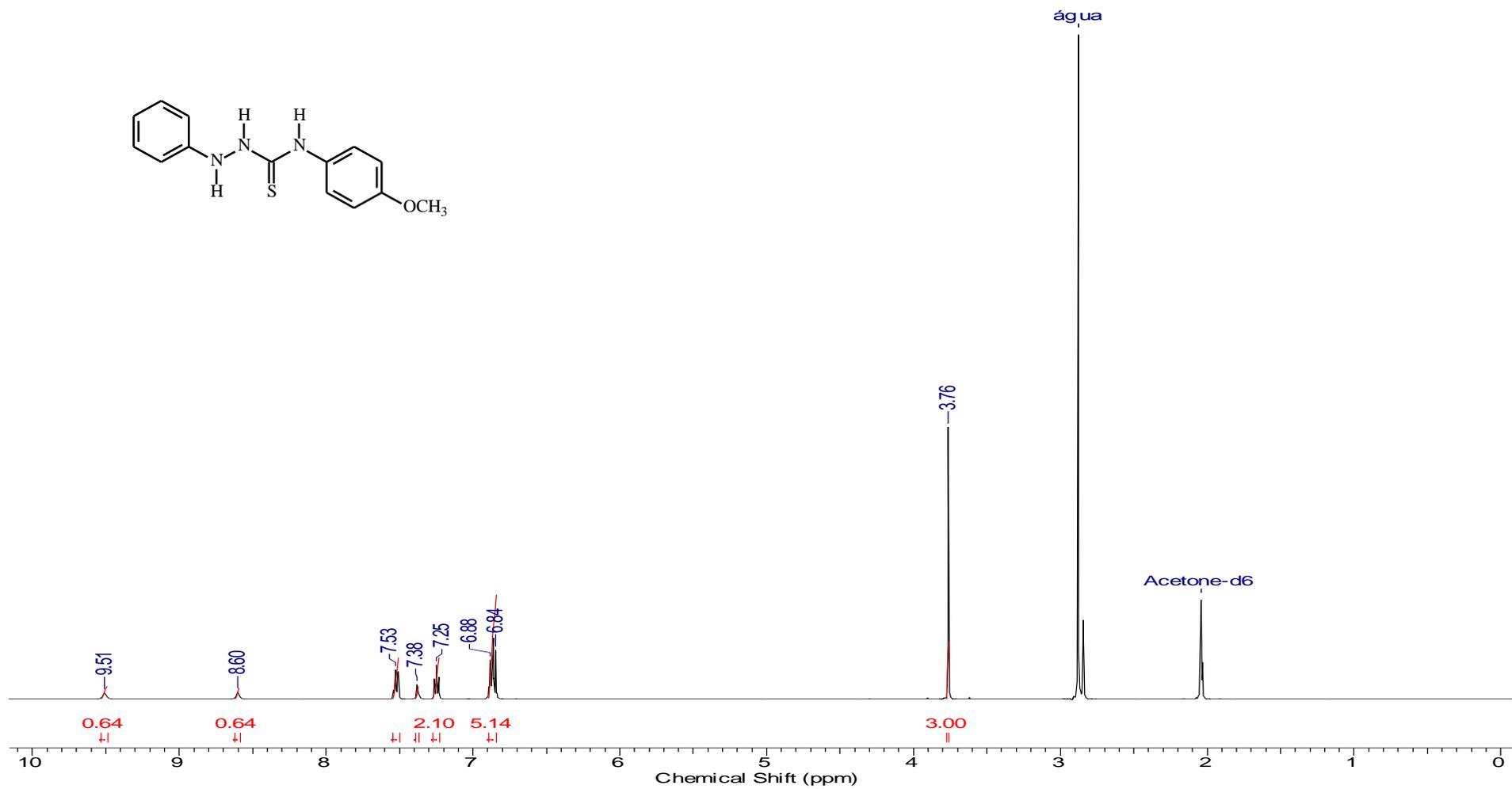
**Espectro 14.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da 2-fenil-N-(p-toluidil)-hidrazinacarbotoamida 5



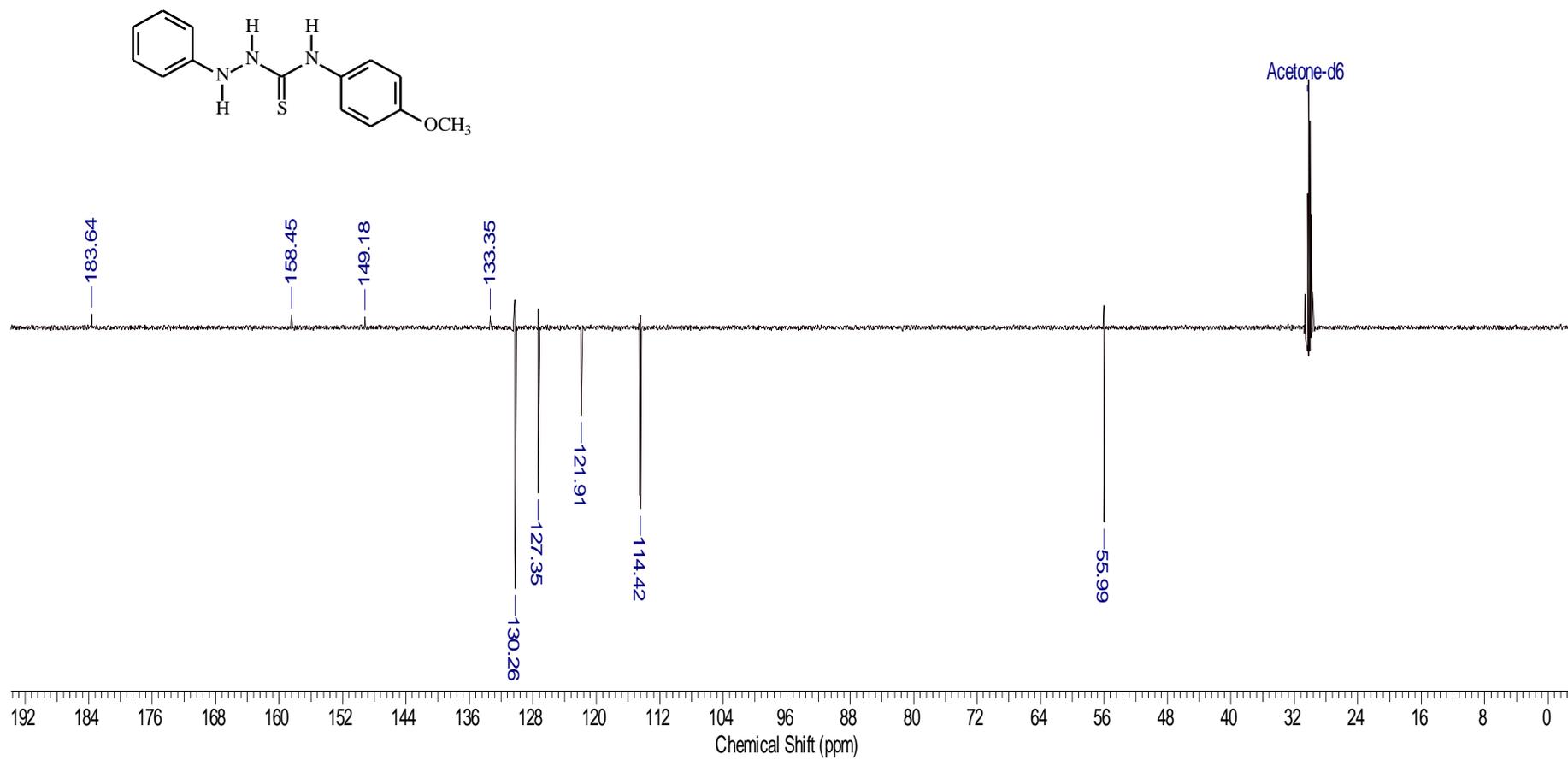
**Espectro 15.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C da 2-fenil-N-(p-toluil)-hidrazinacarbotoamida 5.



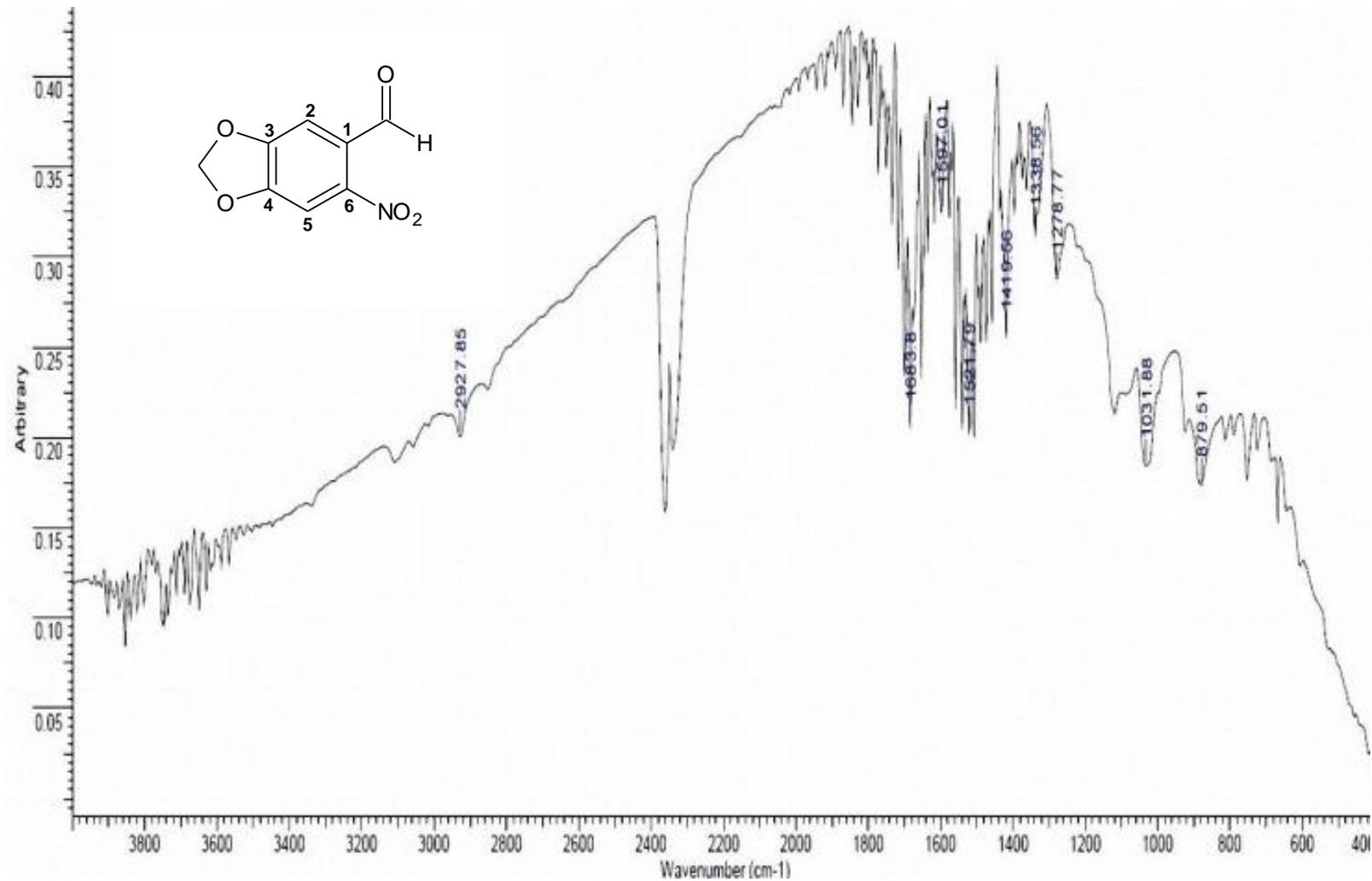
**Espectro 16.** Espectro de IV da *N*-(4-metoxifenil)-2-fenil-hidrazinacarbotoamida 6.



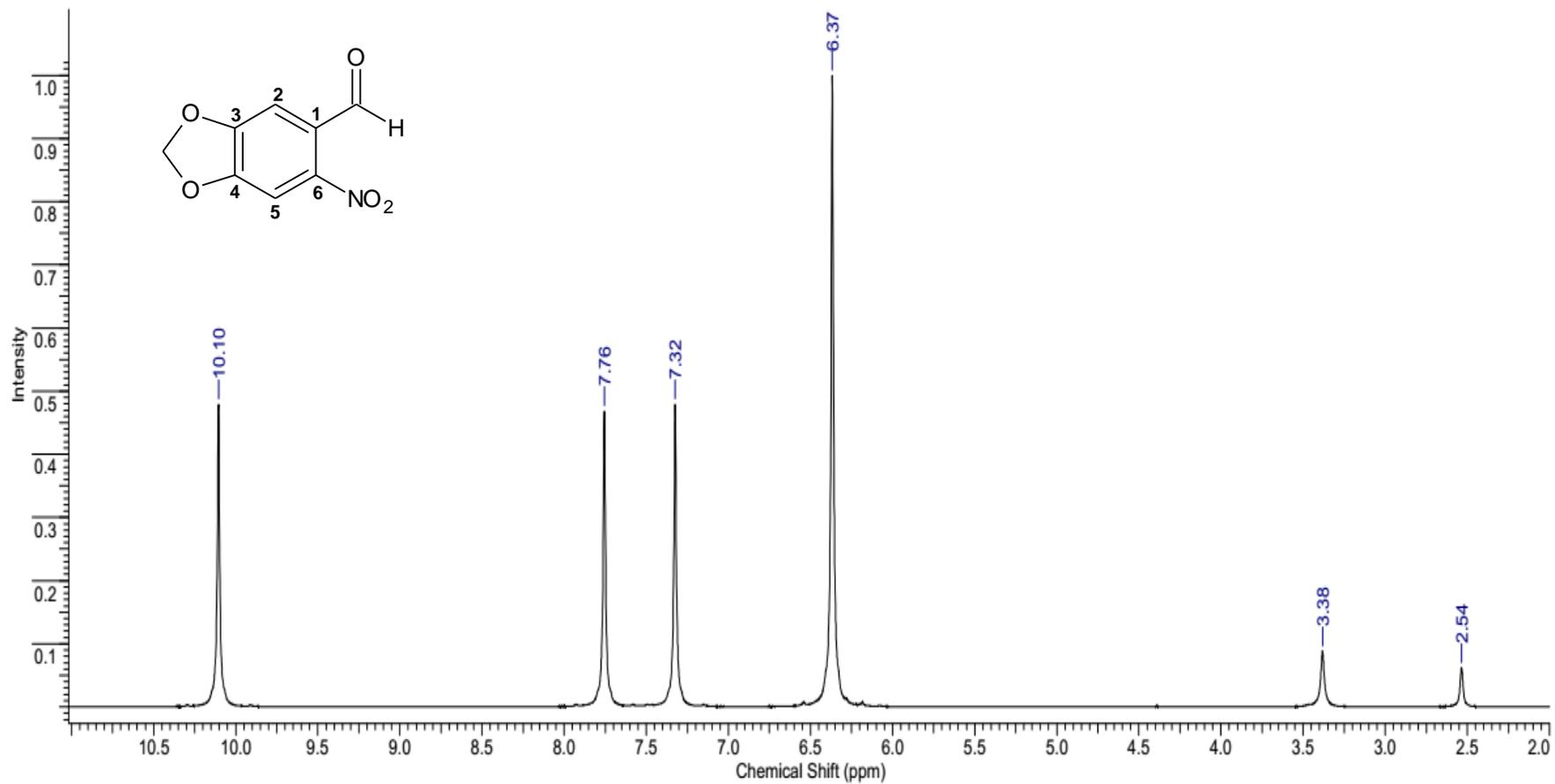
**Espectro 17.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da *N*-(4-metoxifenil)-2-fenil-hidrazinacarbotioamida 6.



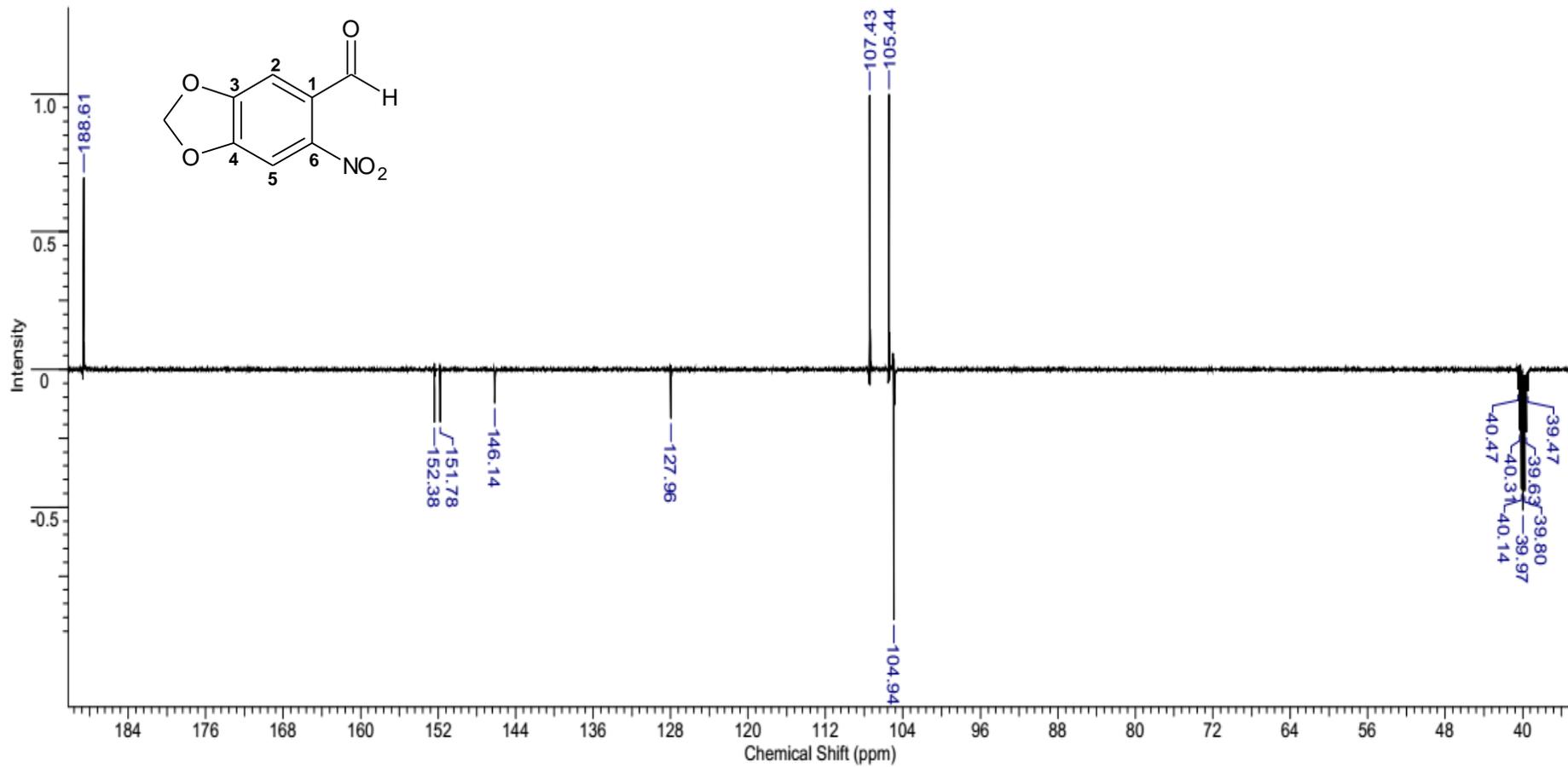
**Espectro 18.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C da *N*-(4-metoxifenil)-2-fenil-hidrazinacarbotoamida 6.



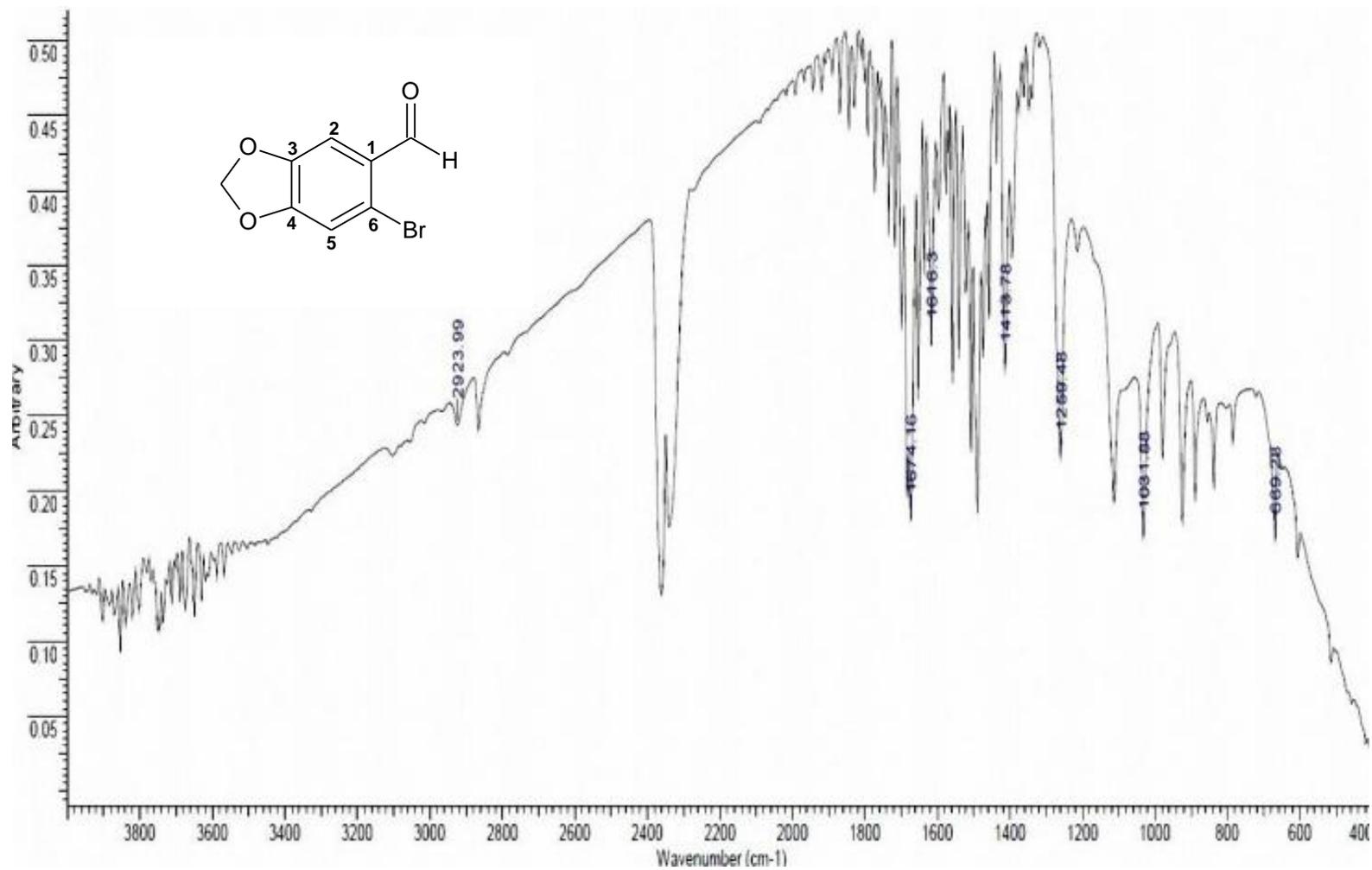
**Espectro 19.** Espectro de IV do 6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 7



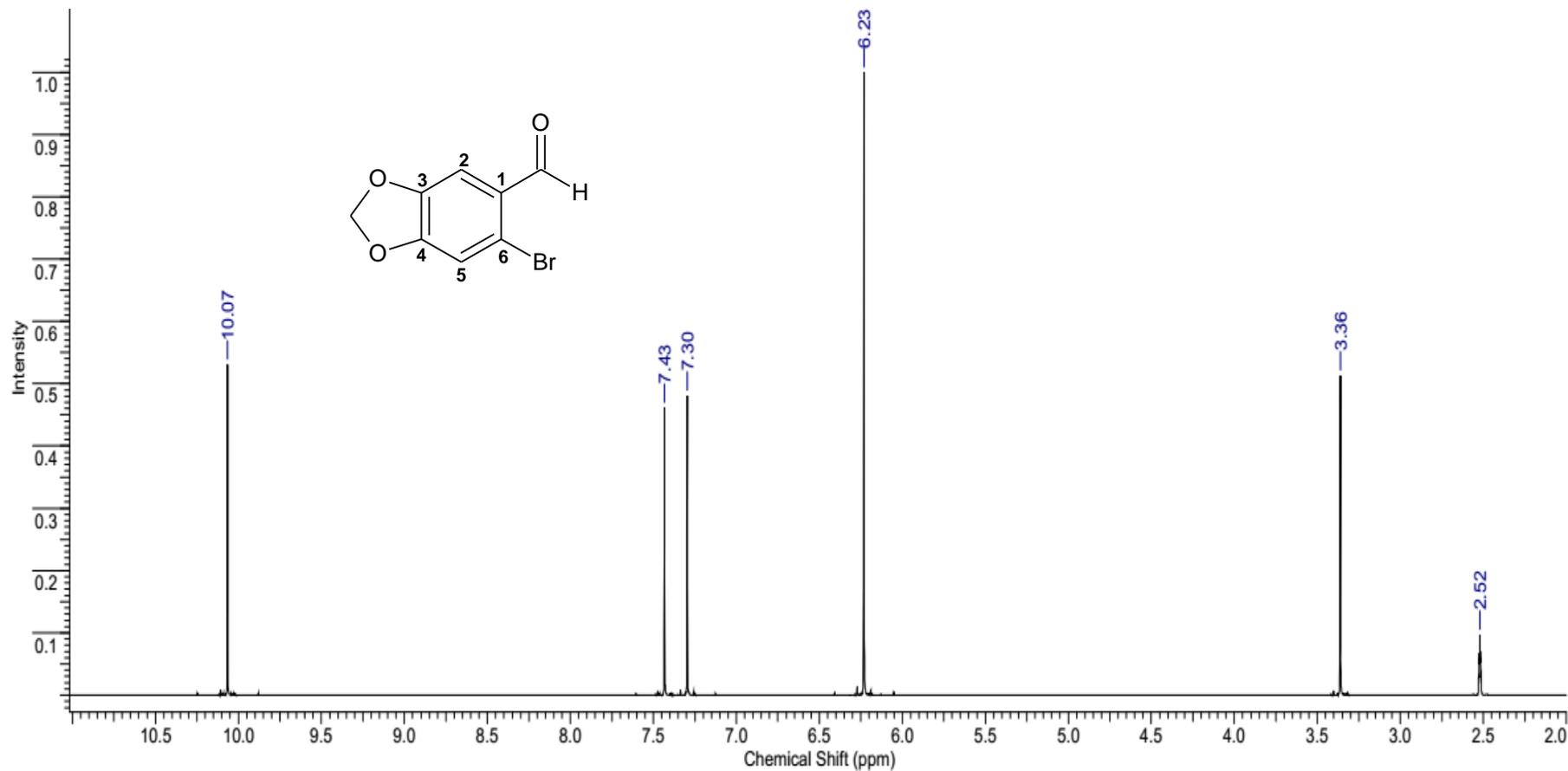
**Espectro 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído **7**



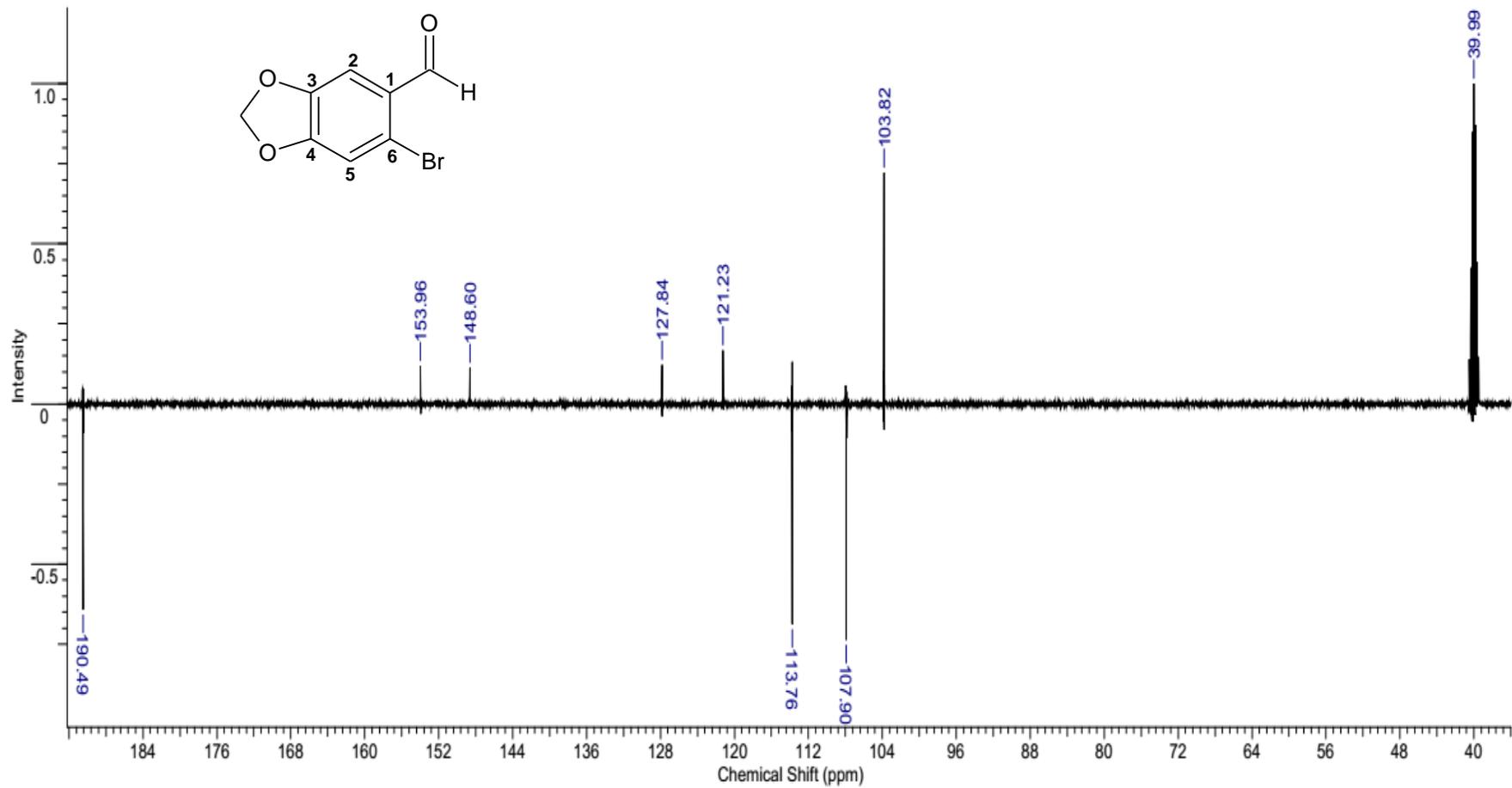
**Espectro 21.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 6-nitro-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 7



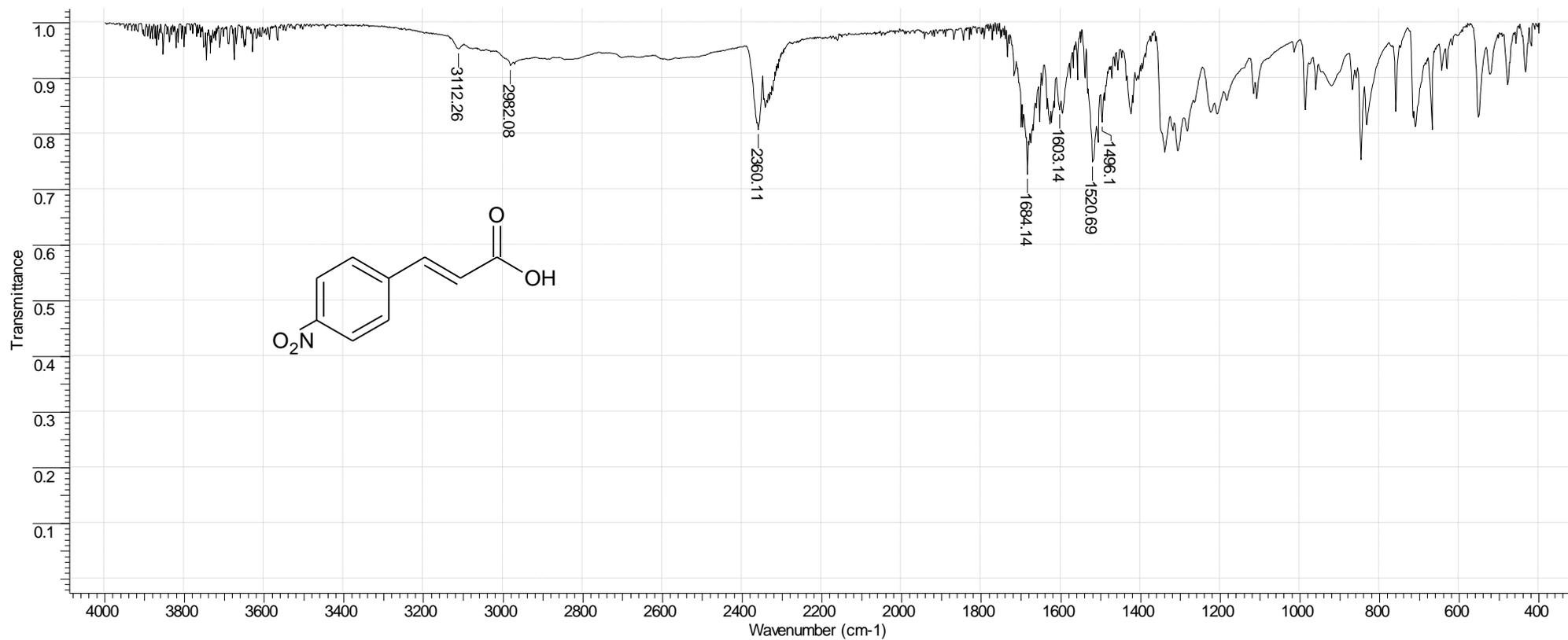
**Espectro 22.** Espectro de IV do 6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8



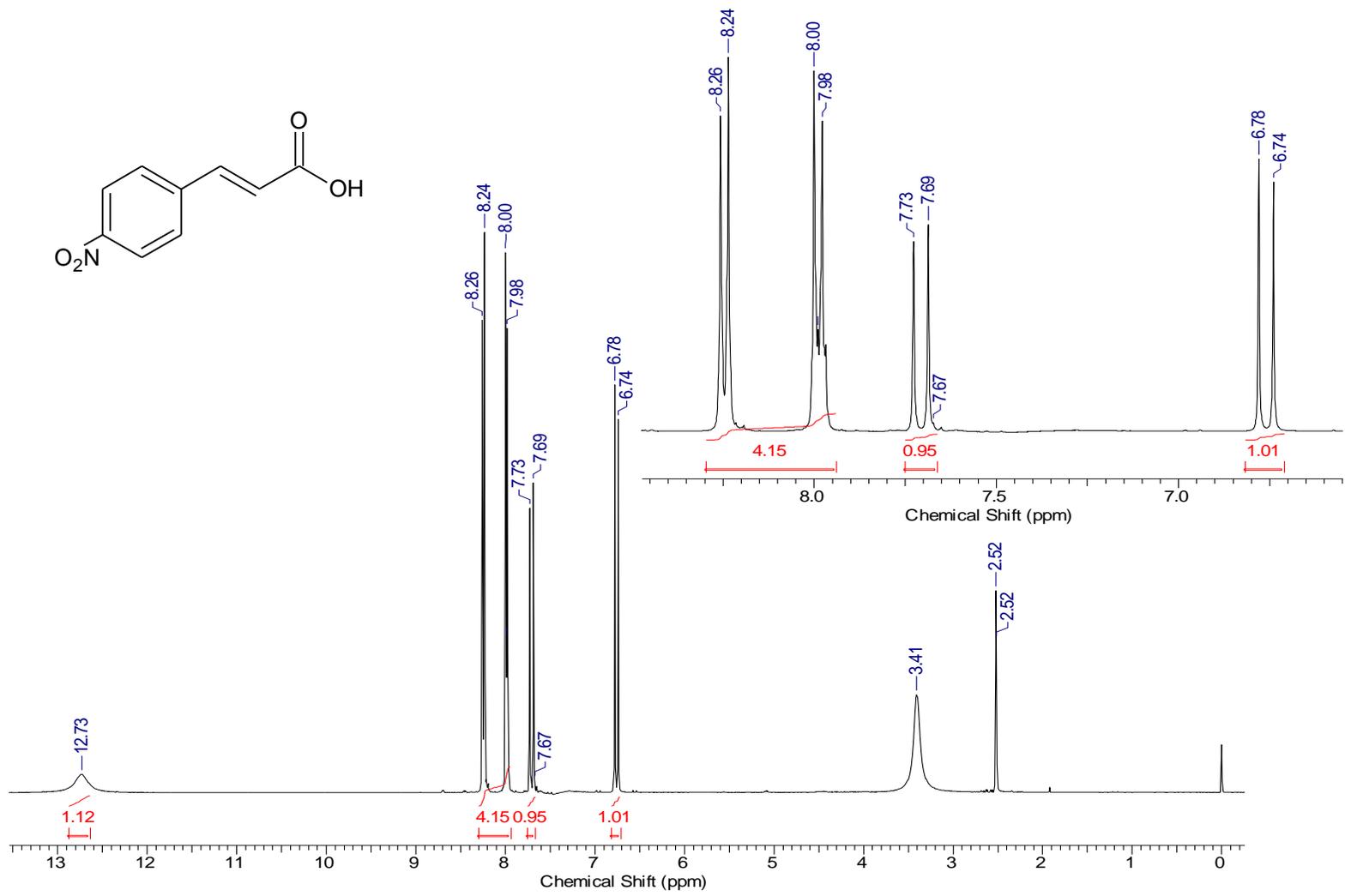
**Espectro 23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do 6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8



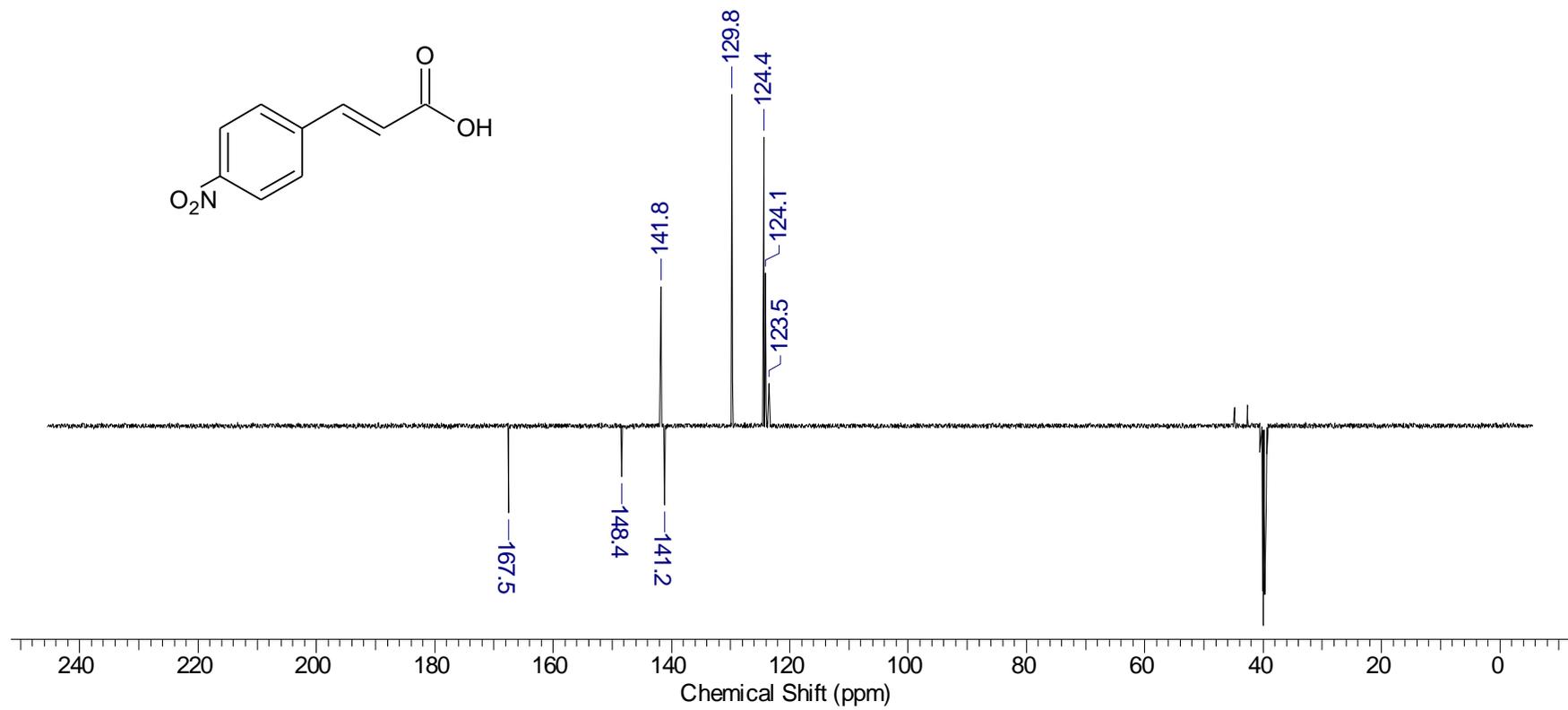
**Espectro 24.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do 6-bromo-1,3-benzodioxol-5-carboxaldeído 8



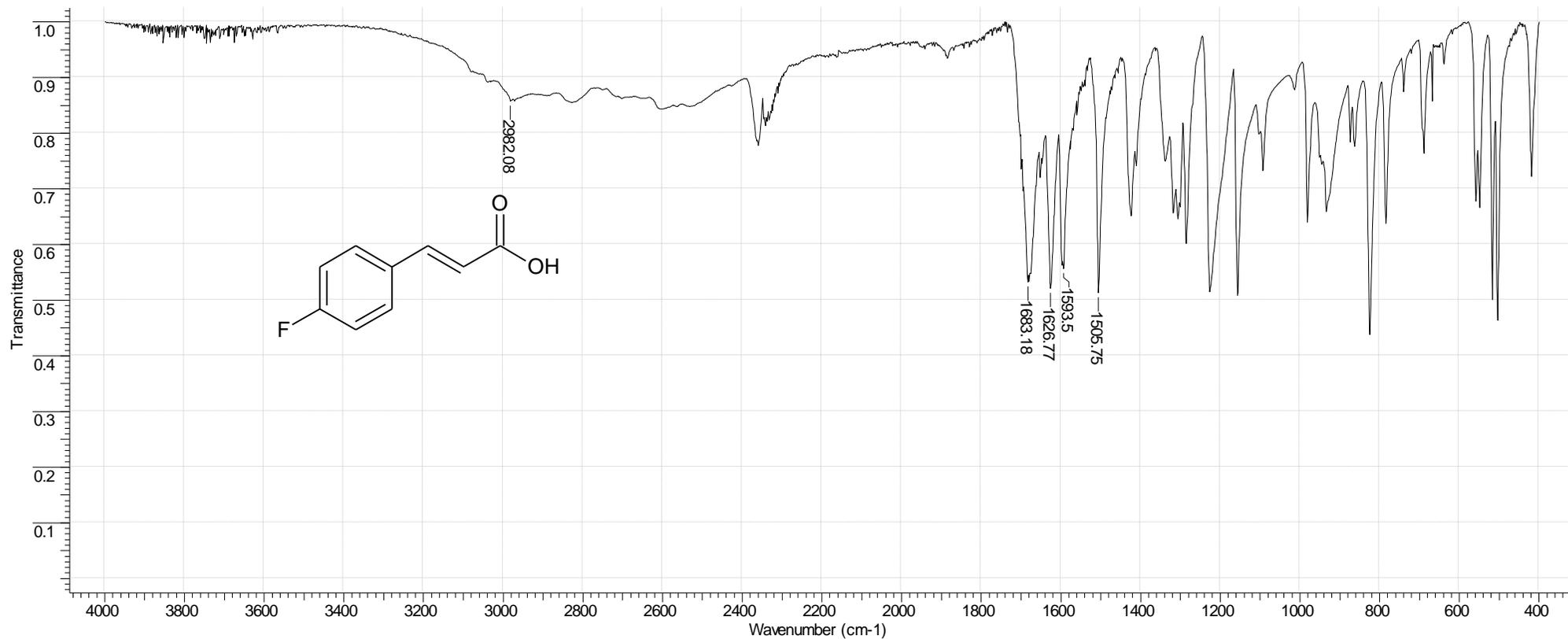
**Espectro 25.** Espectro de IV do ácido *p*-nitrocínâmico 9.



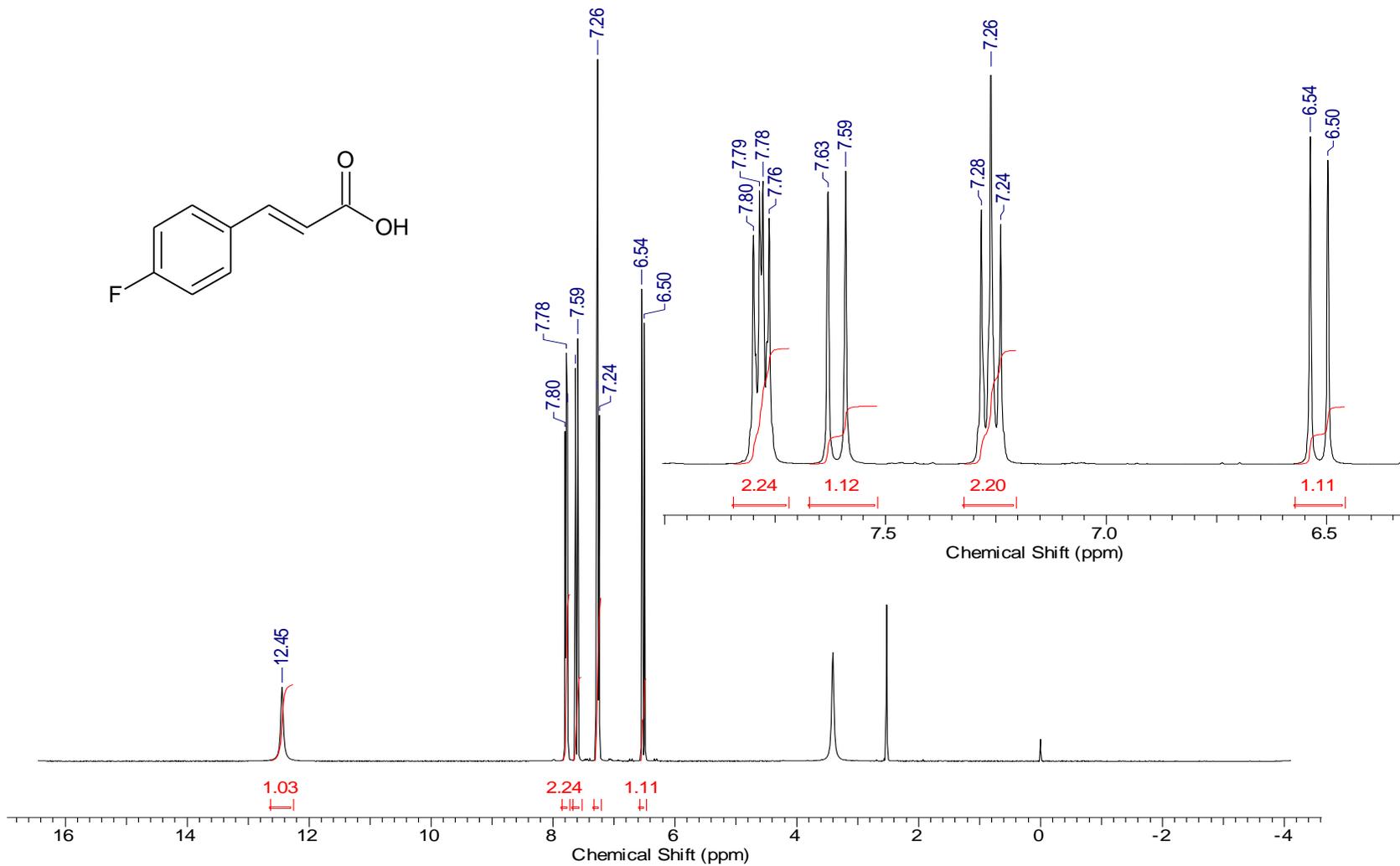
**Espectro 26.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do ácido *p*-nitro cinâmico 9 (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



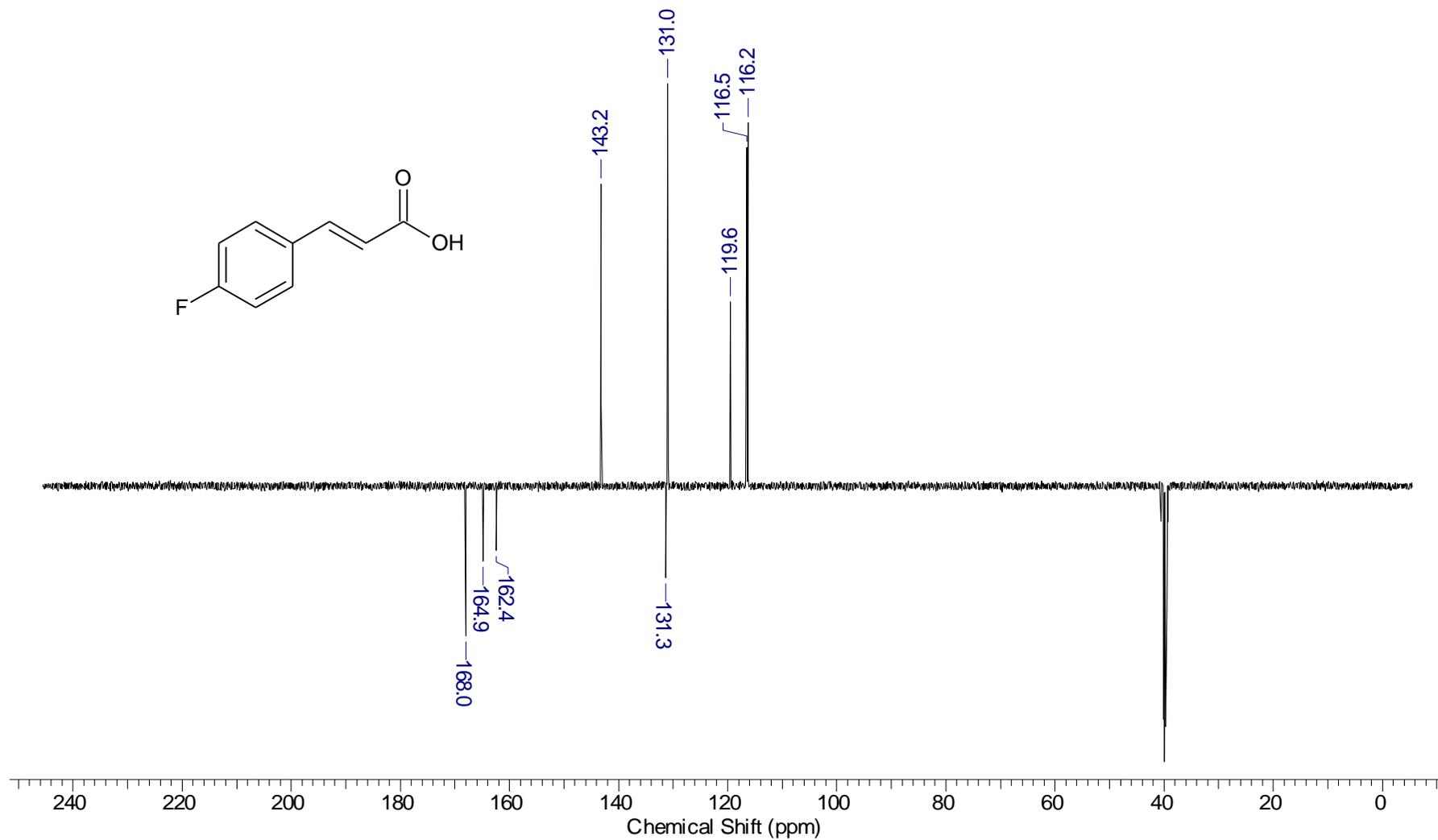
**Espectro 27.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do ácido *p*-nitrocinâmico 9 (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



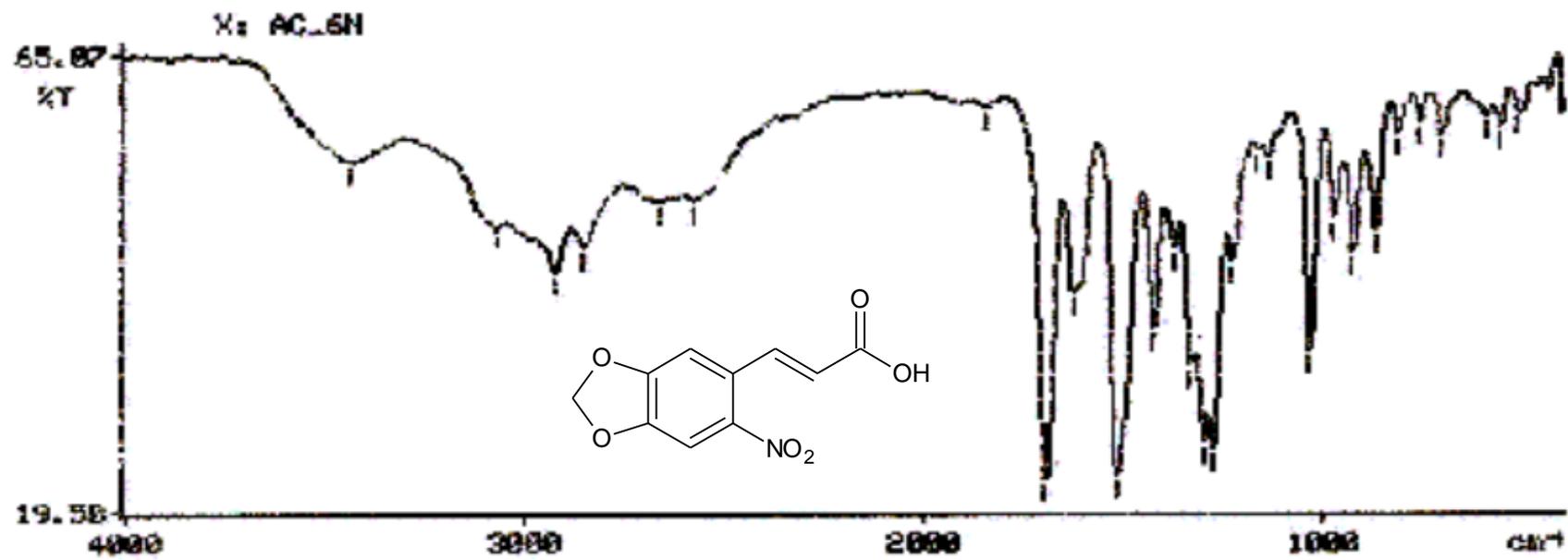
**Espectro 28.** Espectro de IV do ácido *p*-fluorcinâmico 10.



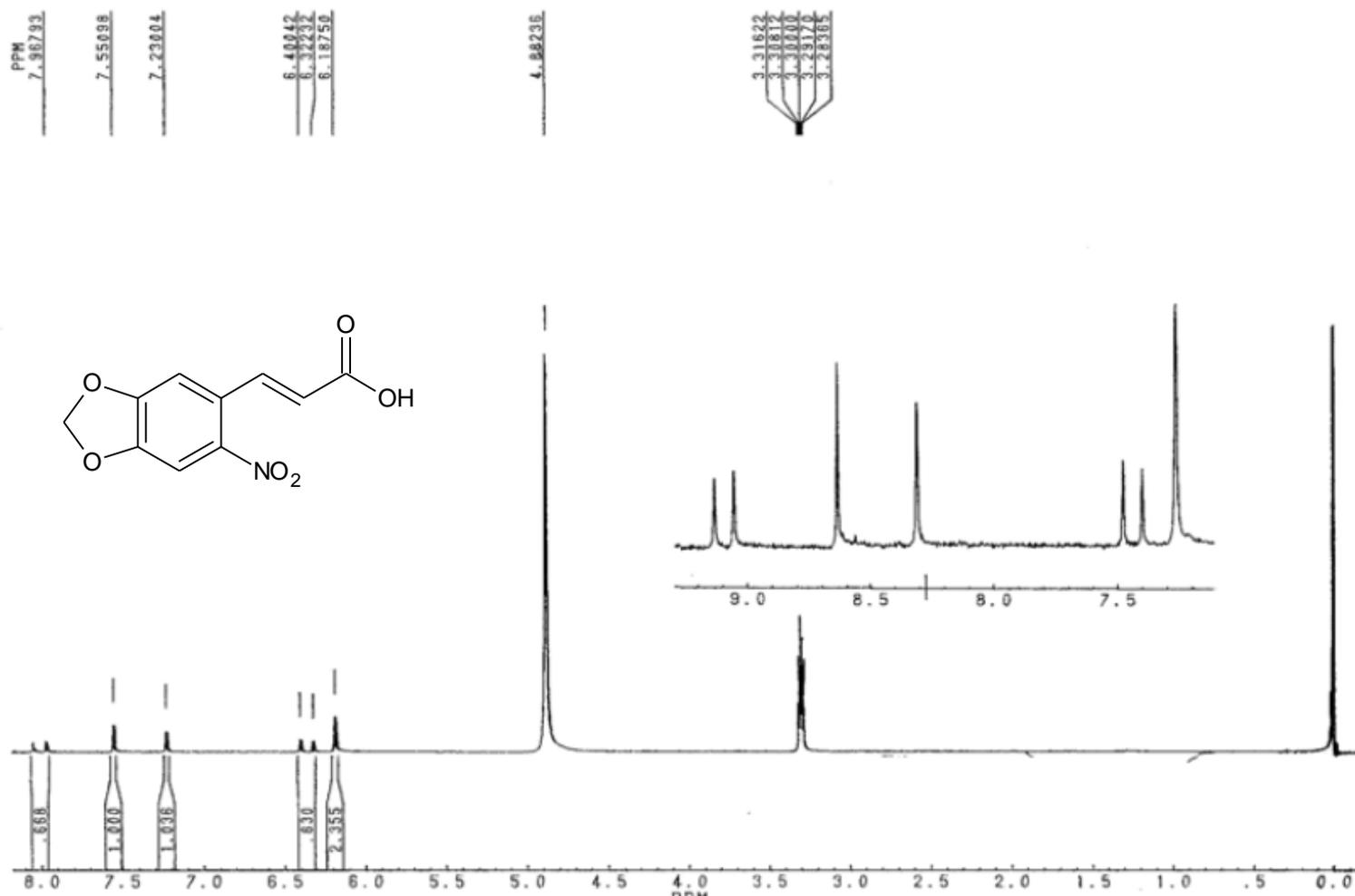
**Espectro 29.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do ácido *p*-fluorocinâmico 10 (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



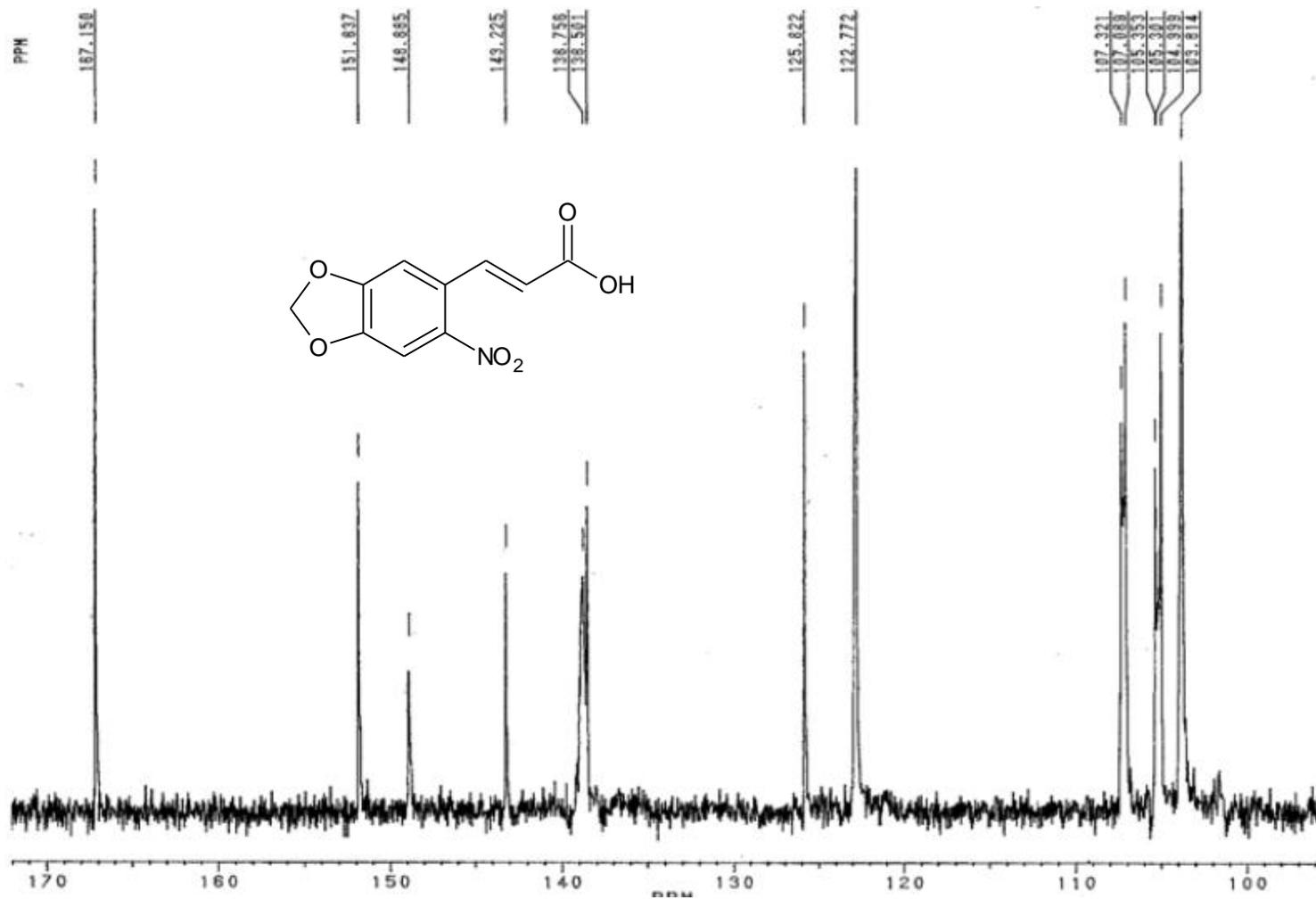
**Espectro 30.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do ácido *p*-fluorcinâmico 10 (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>).



**Espectro 31.** Espectro de IV do ácido 6-nitro-(3,4-metilenodioxi)-cinâmico 11.

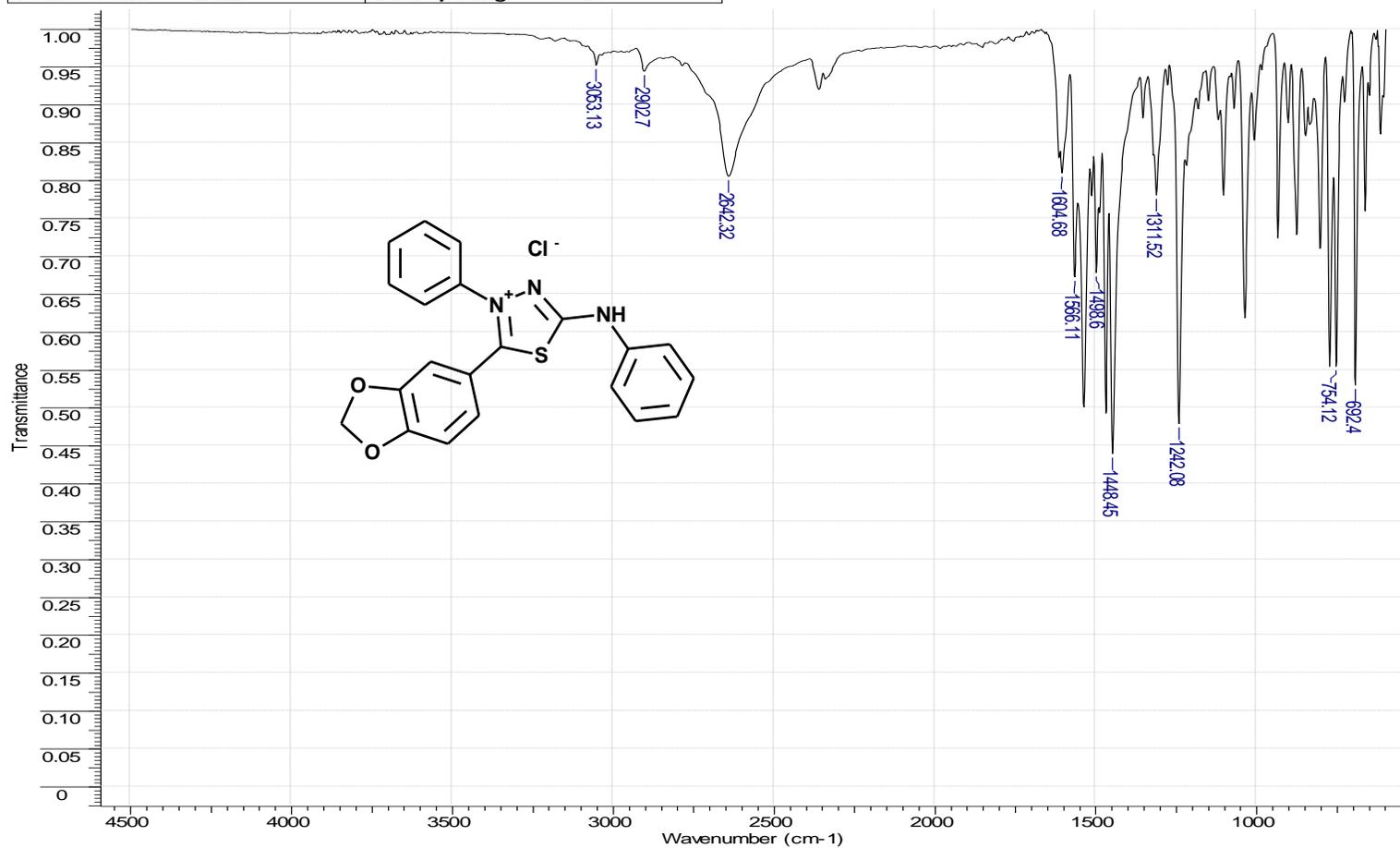


**Espectro 32.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do ácido 6-nitro-(3,4-metilenodioxo)-cinâmico 11 (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



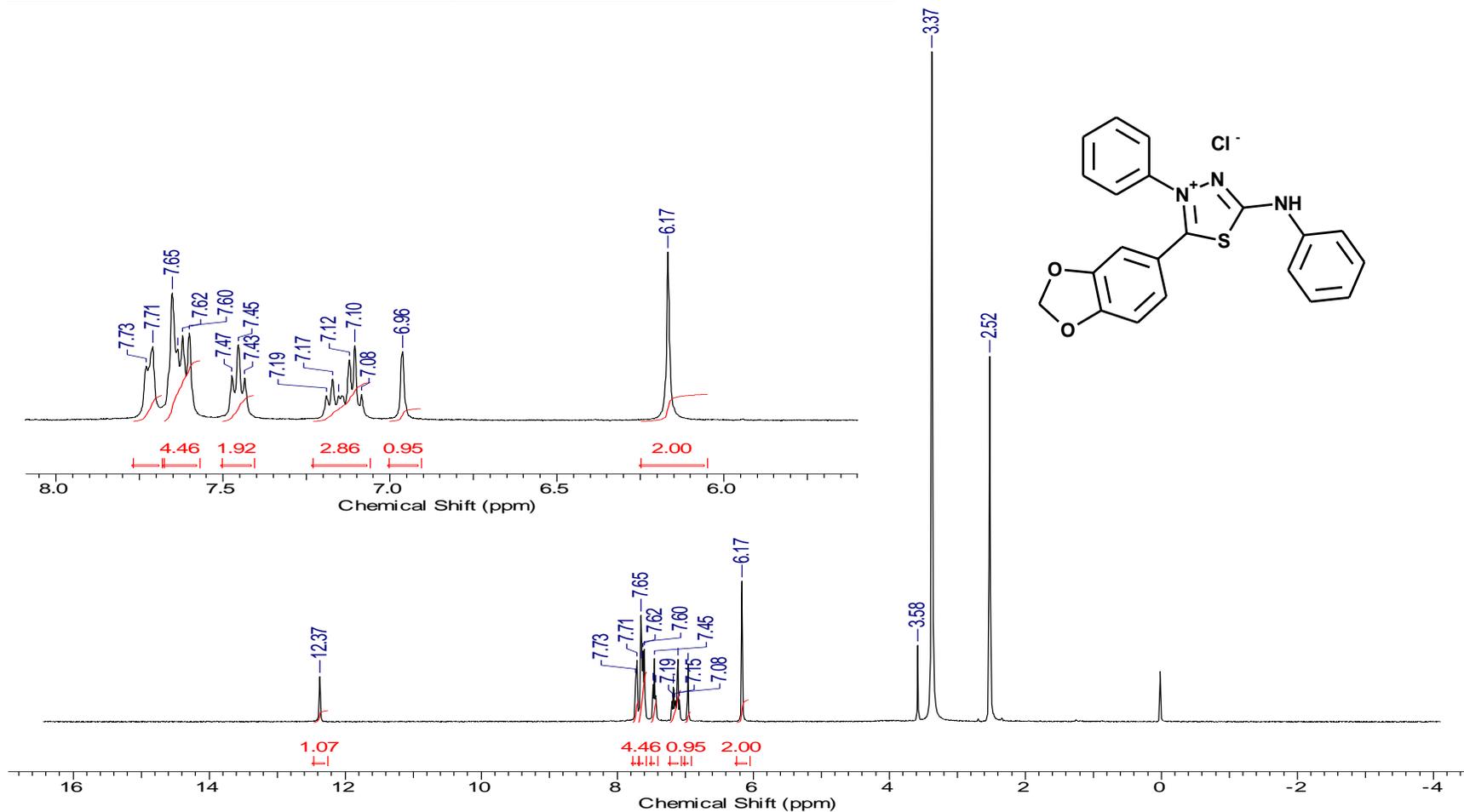
**Espectro 33.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido 6-nitro-(3,4-metilenodioxo)-cinâmico 11 (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

<b>Date</b>	10 Jun 2015 16:27:08	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	NIR-IR
<b>Y Axis</b>	Transmittance	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Points Count</b>	2022	<b>Spectrum Range</b>	599.8262 - 4497.7319
		<b>Data Spacing</b>	1.9287



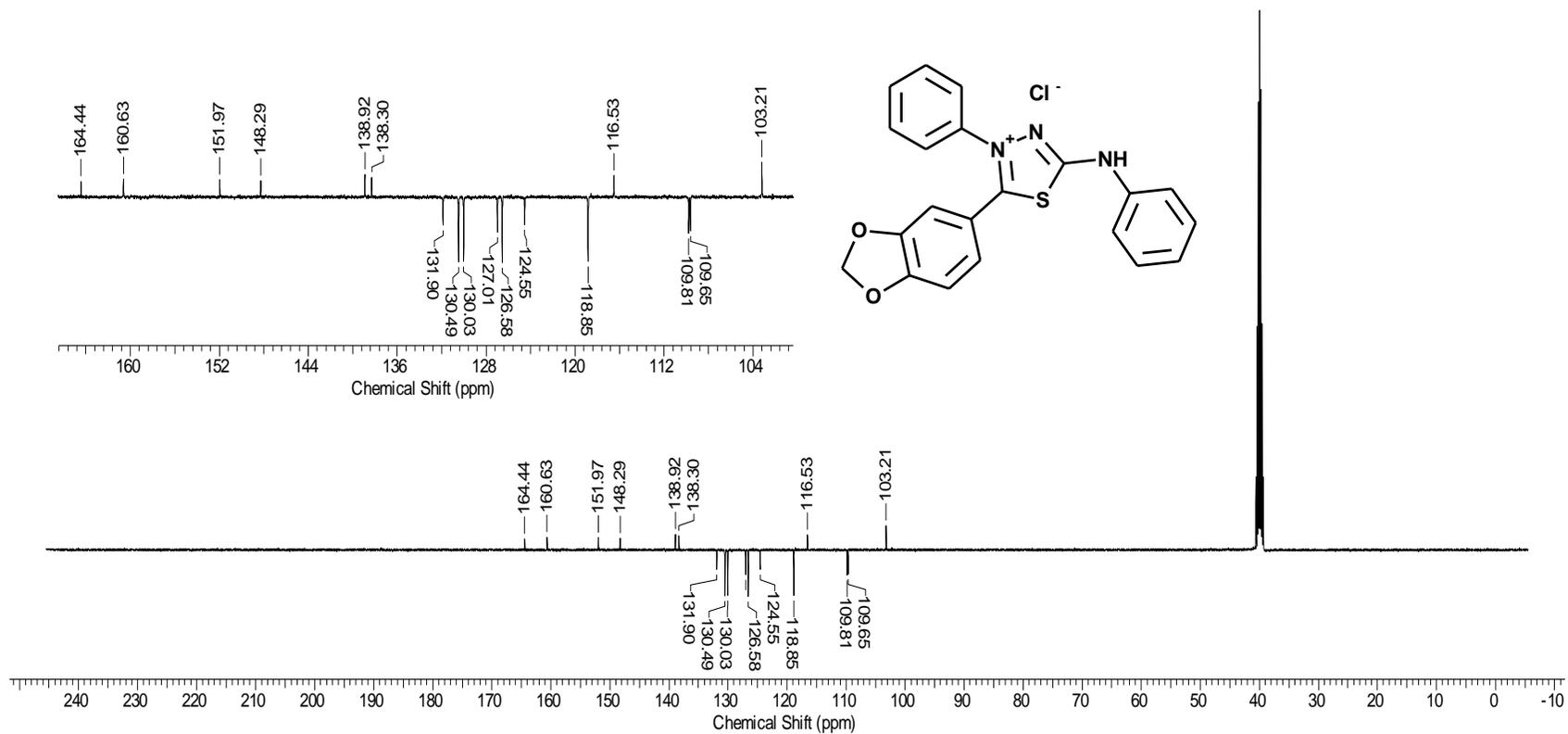
**Espectro 34.** Espectro de IV do cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 12

<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	DMSO-D6
<b>Sweep Width (Hz)</b>	8223.68	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000		



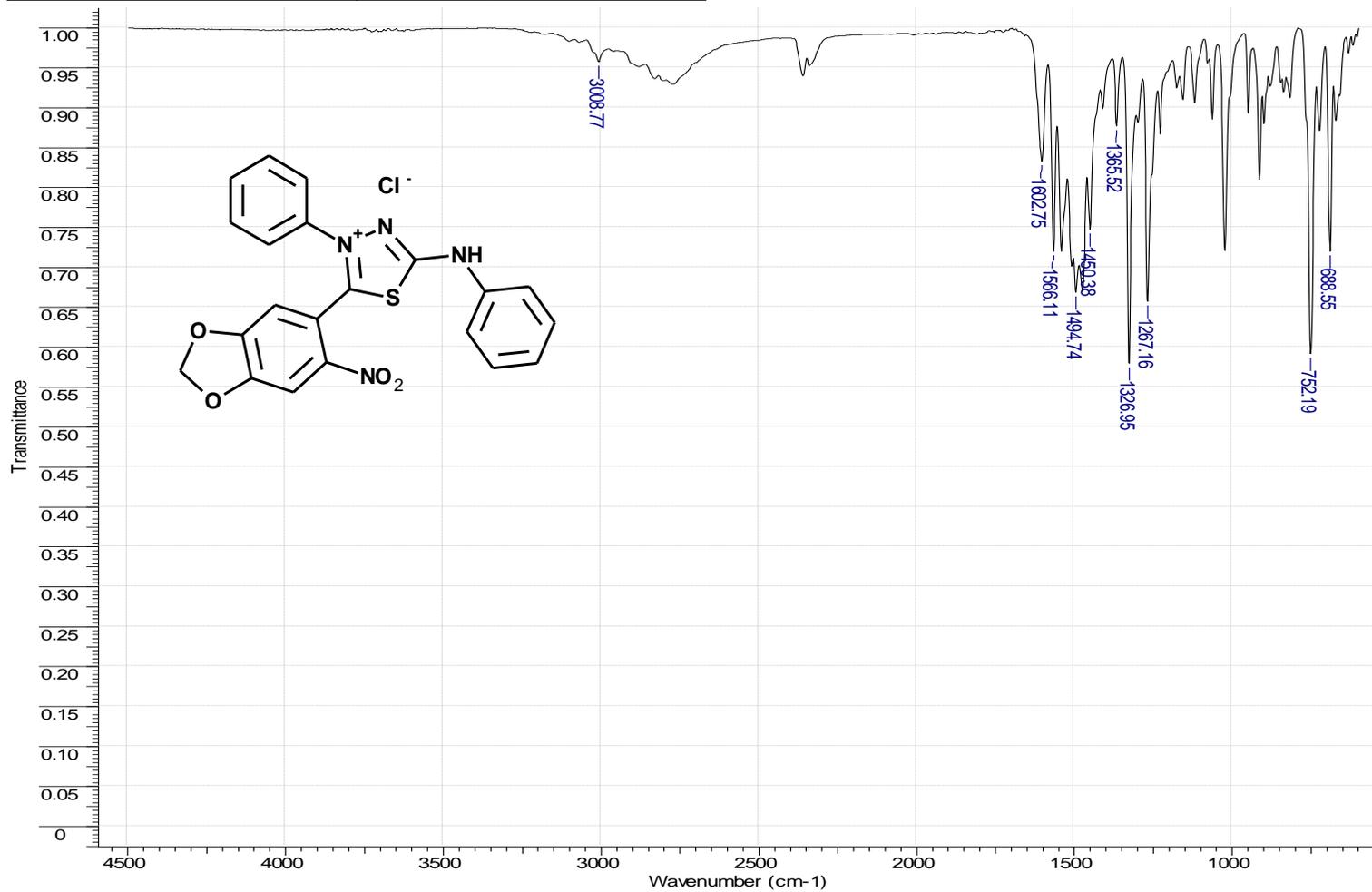
**Espectro 35.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 12

Acquisition Time (sec)	1.2976	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	13C
Number of Transients	18297	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	25252.53	Temperature (degree C)	27.000
				Pulse Sequence	deptqgppsp



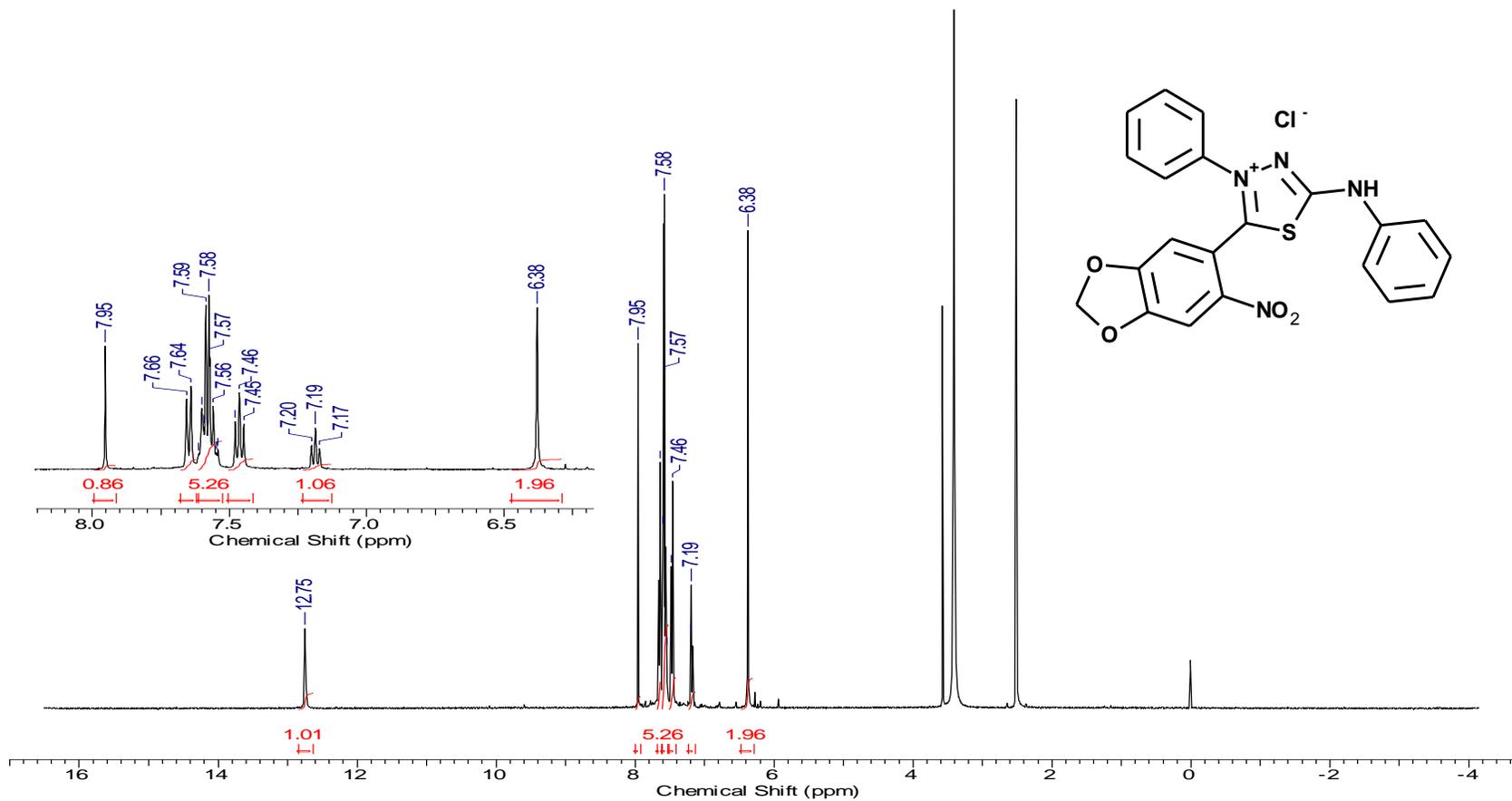
**Espectro 36.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 12

<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	NIR-IR	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Y Axis</b>	Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	599.8262 - 4497.7319	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Points Count</b>	2022	<b>Data Spacing</b>	1.9287		



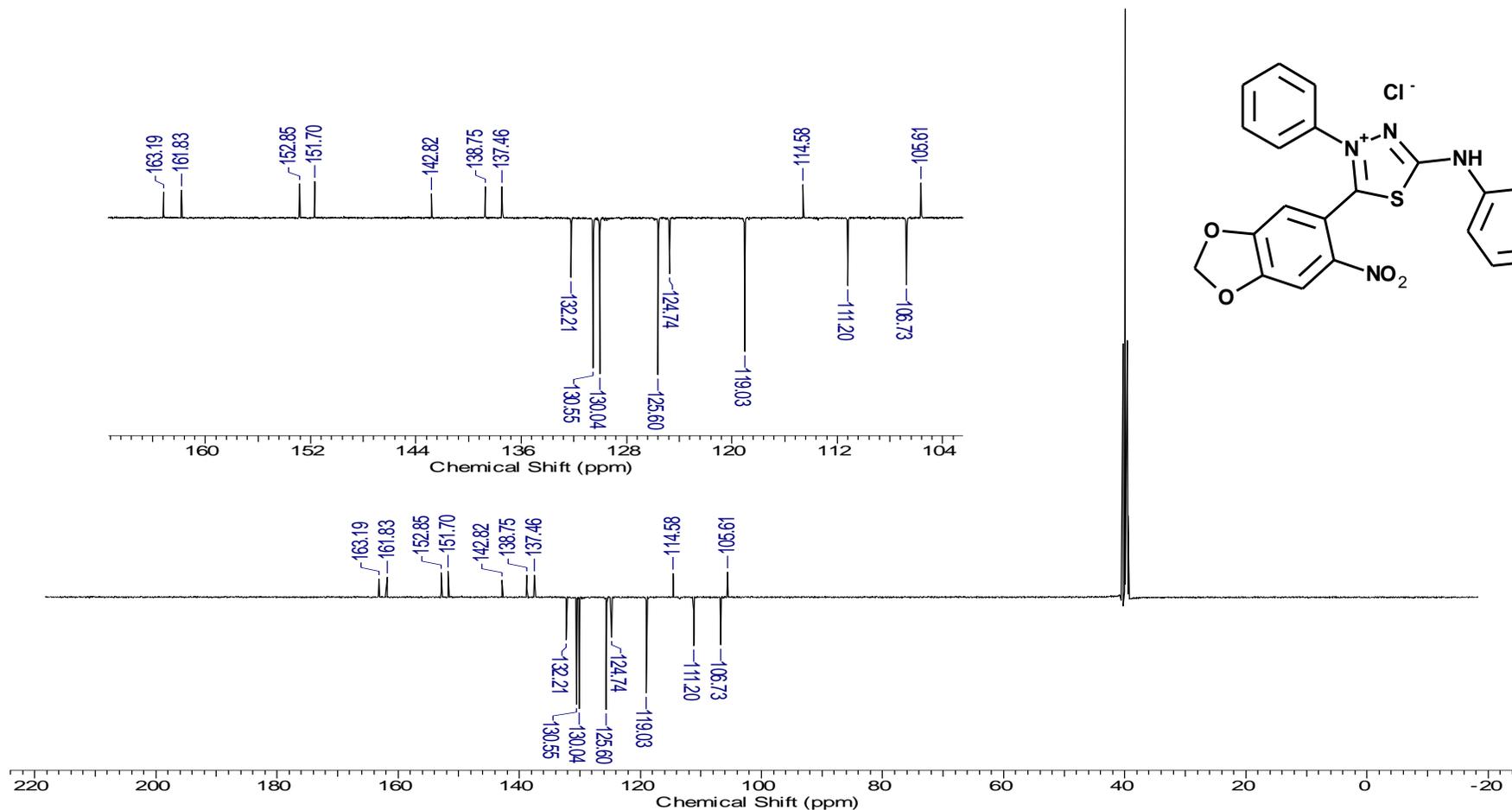
**Espectro 37.** Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-nitro-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 13

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.1719	<b>Frequency (MHz)</b>	500.13	
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>
<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	20.260	DMSO-D6



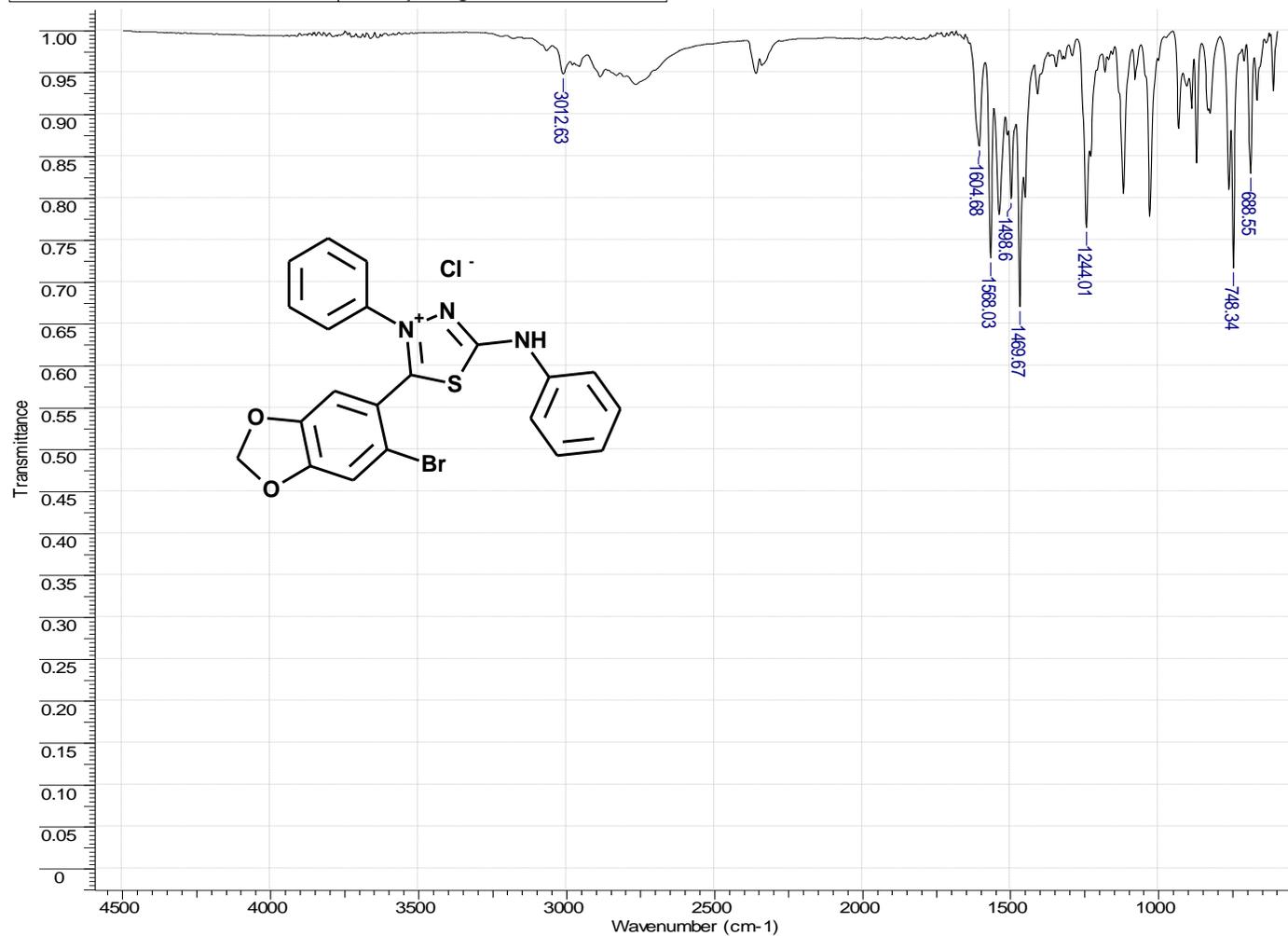
**Espectro 38.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-nitro-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 13

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.1010	<b>Nucleus</b>	<sup>13</sup> C	<b>Number of Transients</b>	16976
<b>Frequency (MHz)</b>	125.76	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp
<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Sweep Width (Hz)</b>	29761.90	<b>Temperature (degree C)</b>	20.560
<b>Solvent</b>	DMSO-D6				



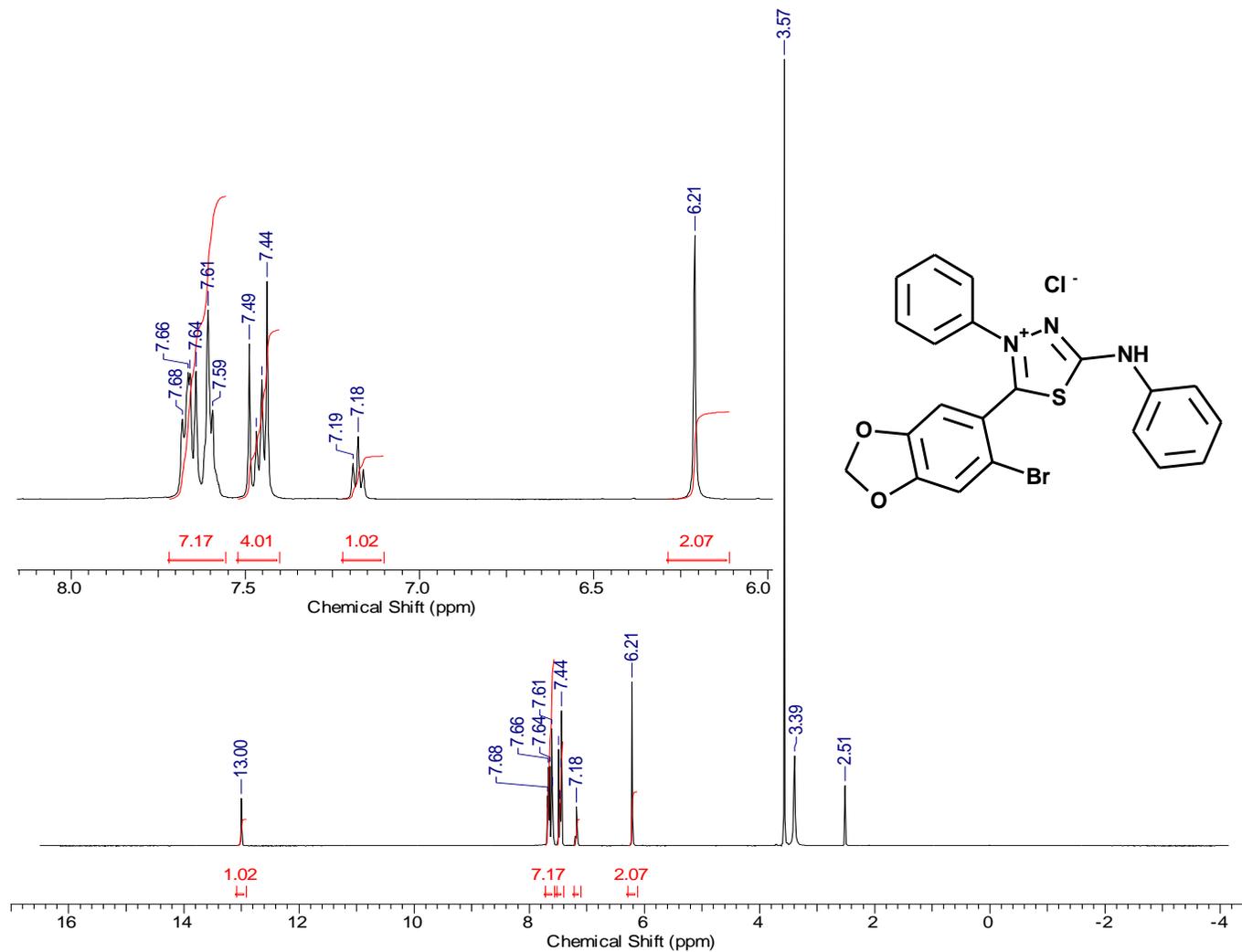
**Espectro 39.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-nitro-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 13

<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	NIR-IR	<b>Technique</b>	Infrared
<b>Y Axis</b>	Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	599.8262 - 4497.7319	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>Points Count</b>	2022	<b>Data Spacing</b>	1.9287		



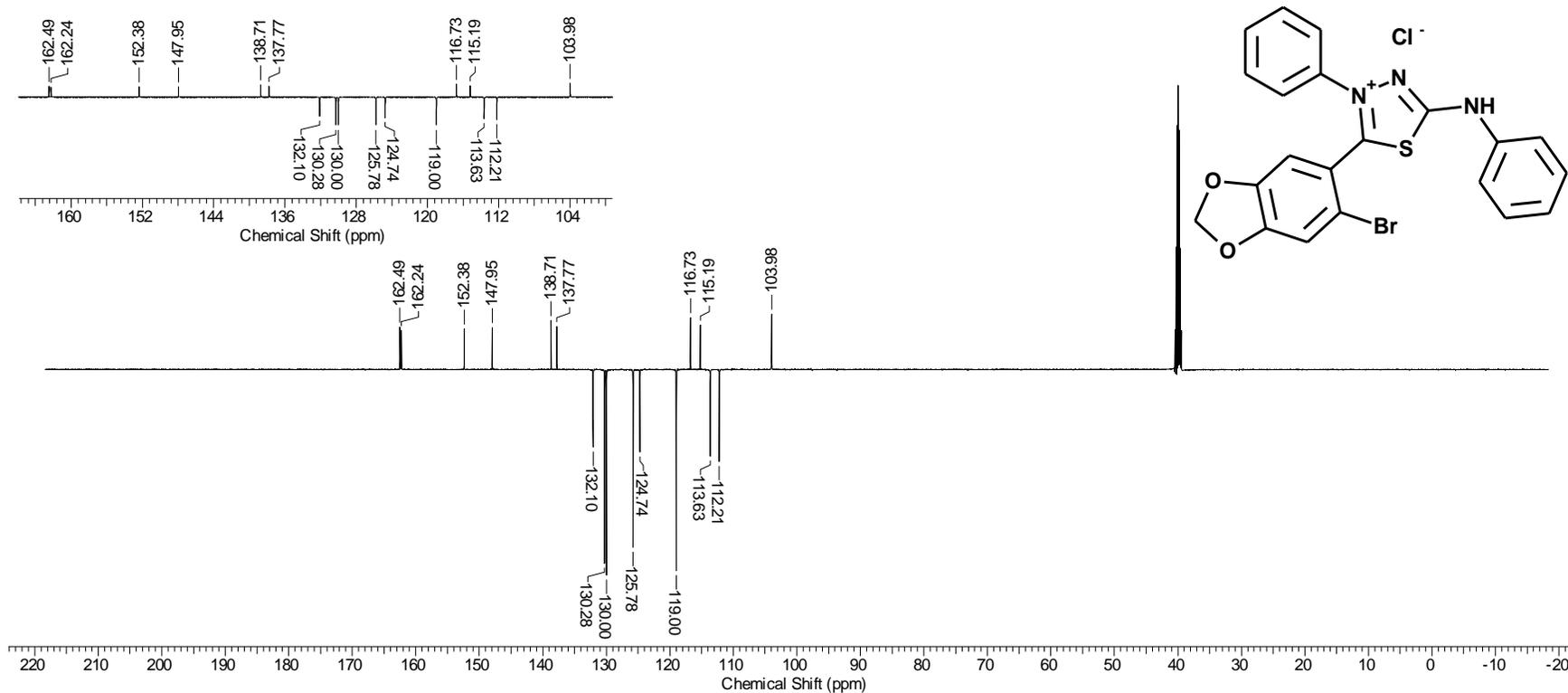
**Espectro 40.** Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxi-6'-bromo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 14

<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Frequency (MHz)</b>	500.13
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Sweep Width (Hz)</b>	10330.58	<b>Temperature (degree C)</b>	20.160	<b>Solvent</b>	DMSO-D6



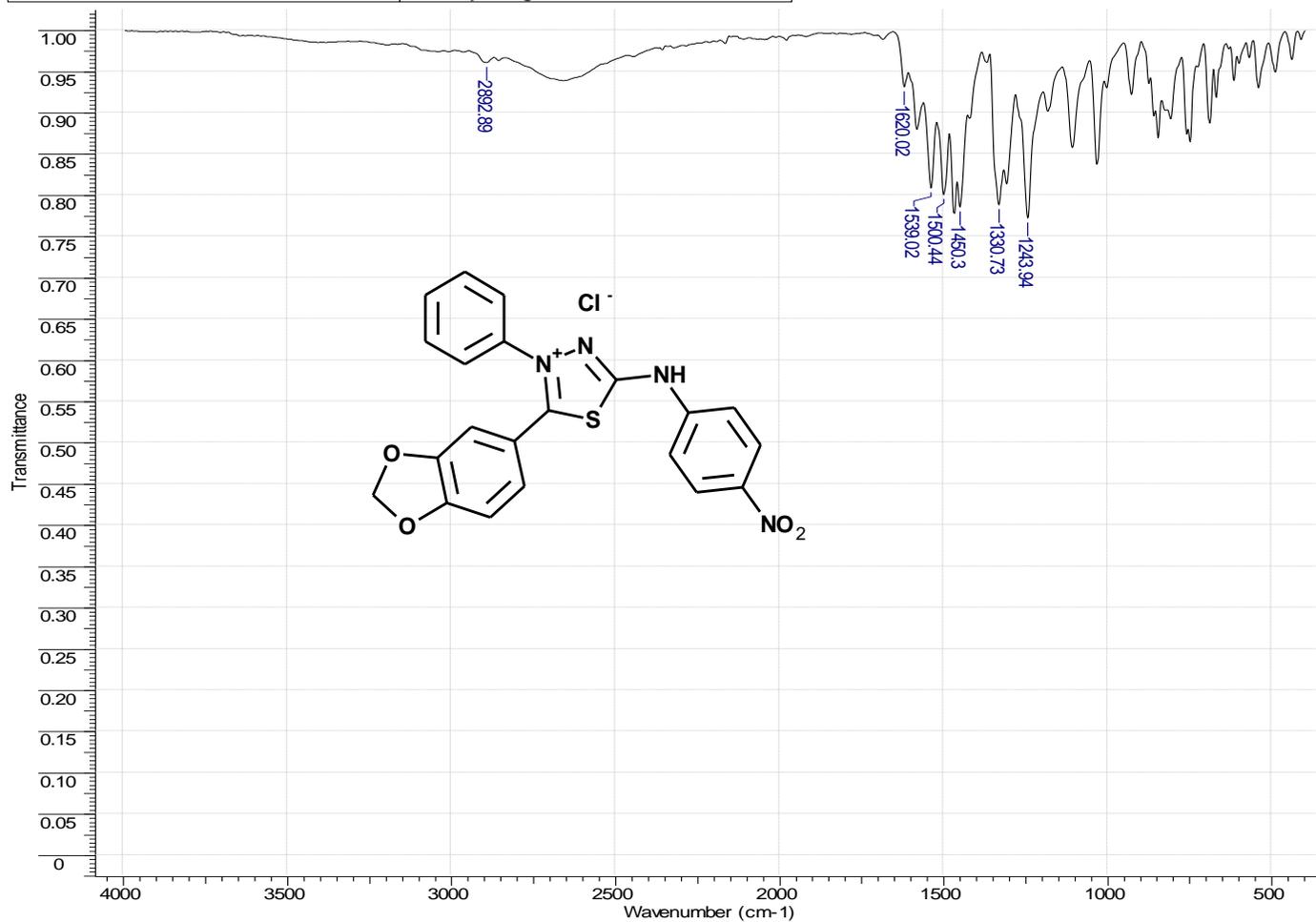
**Espectro 41.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-bromo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 14

Acquisition Time (sec)	1.1010	Nucleus	<sup>13</sup> C	Number of Transients	18842	Original Points Count	32768
Frequency (MHz)	125.76	Pulse Sequence	deptqgppsp	Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	29761.90
Points Count	32768						
Temperature (degree C)	20.560						



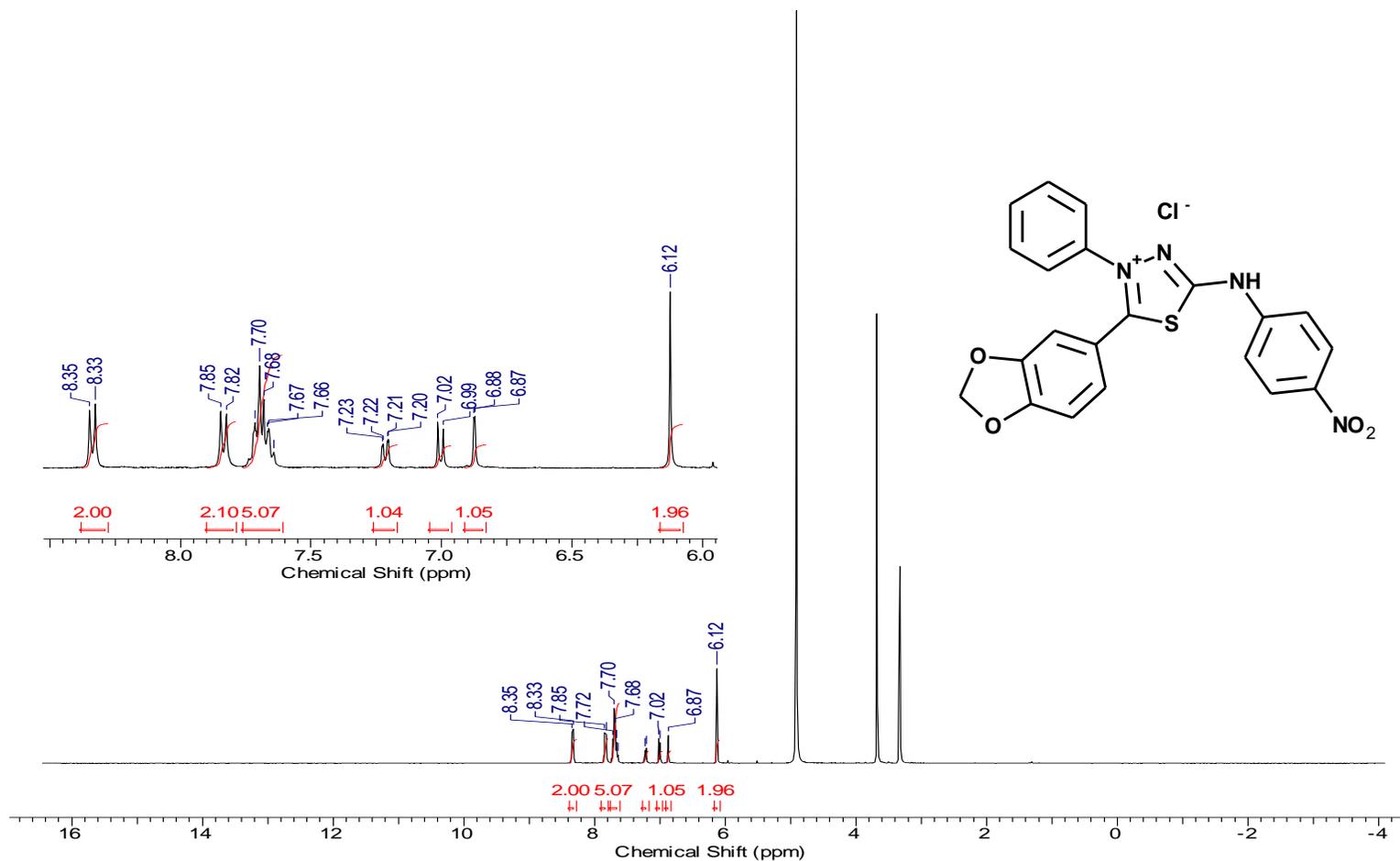
**Espectro 42.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxo-6'-bromo-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 14

<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>Spectral Region</b>	IR
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	Transmittance	<b>Spectrum Range</b>	399.2184 - 3997.9701
<b>Points Count</b>	1867	<b>Data Spacing</b>	1.9286		



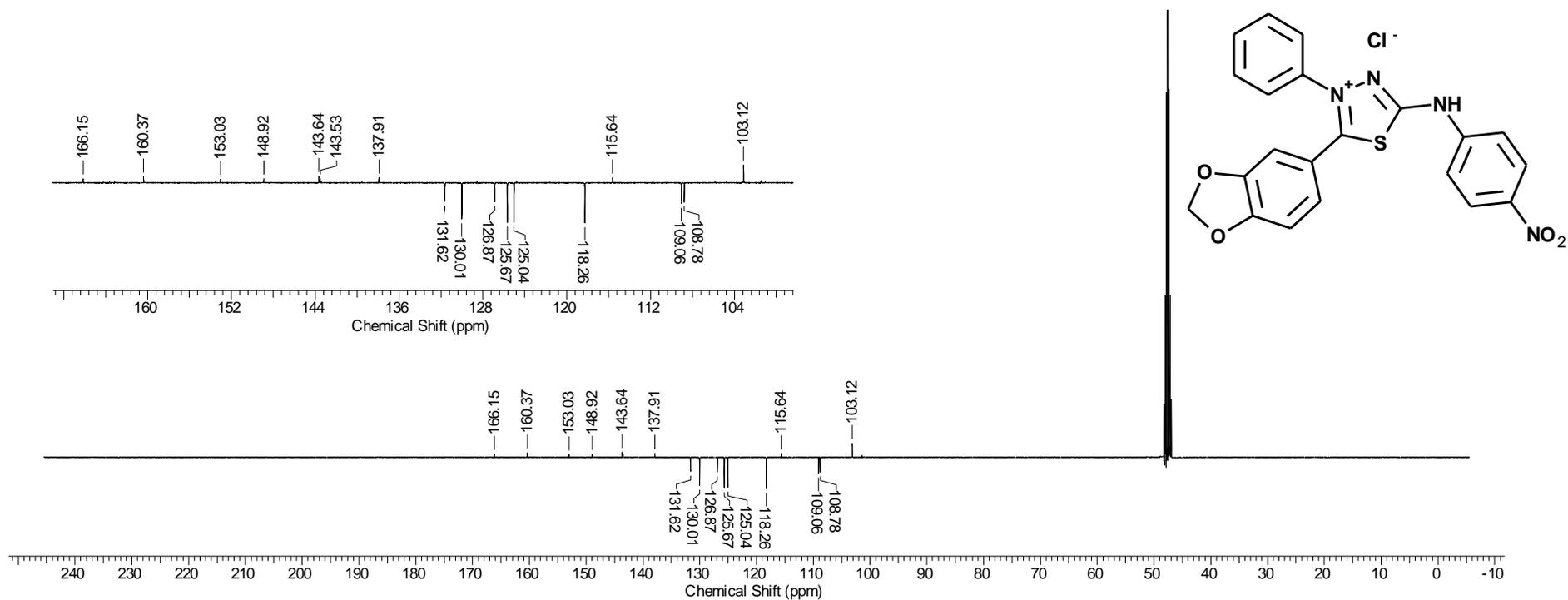
**Espectro 43.** Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxi-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitrofenil)amina 15

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9846	<b>Frequency (MHz)</b>	400.11		
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30	<b>Solvent</b>	MeOD
<b>Sweep Width (Hz)</b>	8223.68	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000		



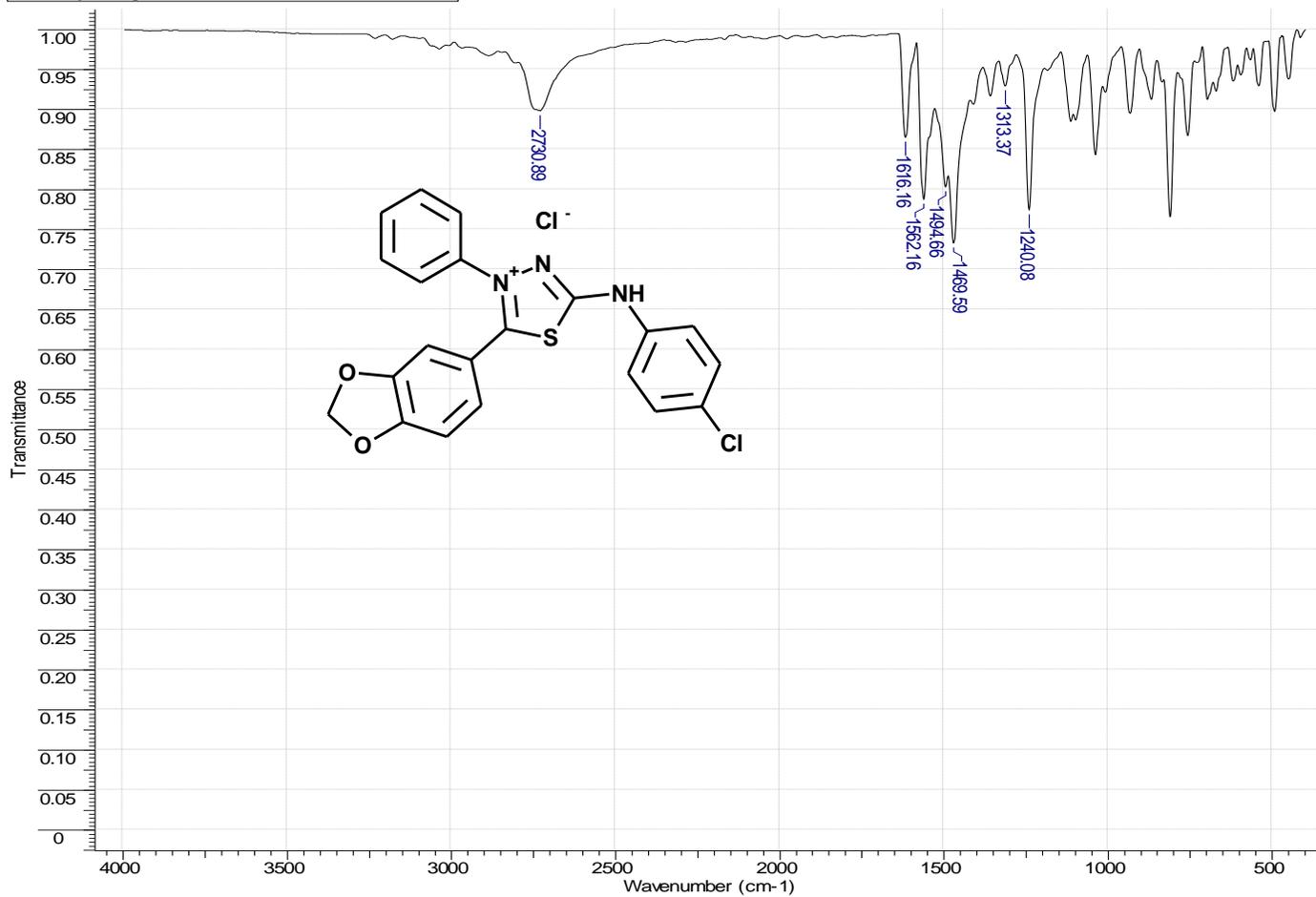
**Espectro 44.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do Cloreto de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitrofenil)amina 15.

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.2976	<b>Frequency (MHz)</b>	100.61	<b>Nucleus</b>	13C
<b>Number of Transients</b>	25000	<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Points Count</b>	32768
<b>Solvent</b>	MeOD	<b>Sweep Width (Hz)</b>	25252.53	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000
				<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp



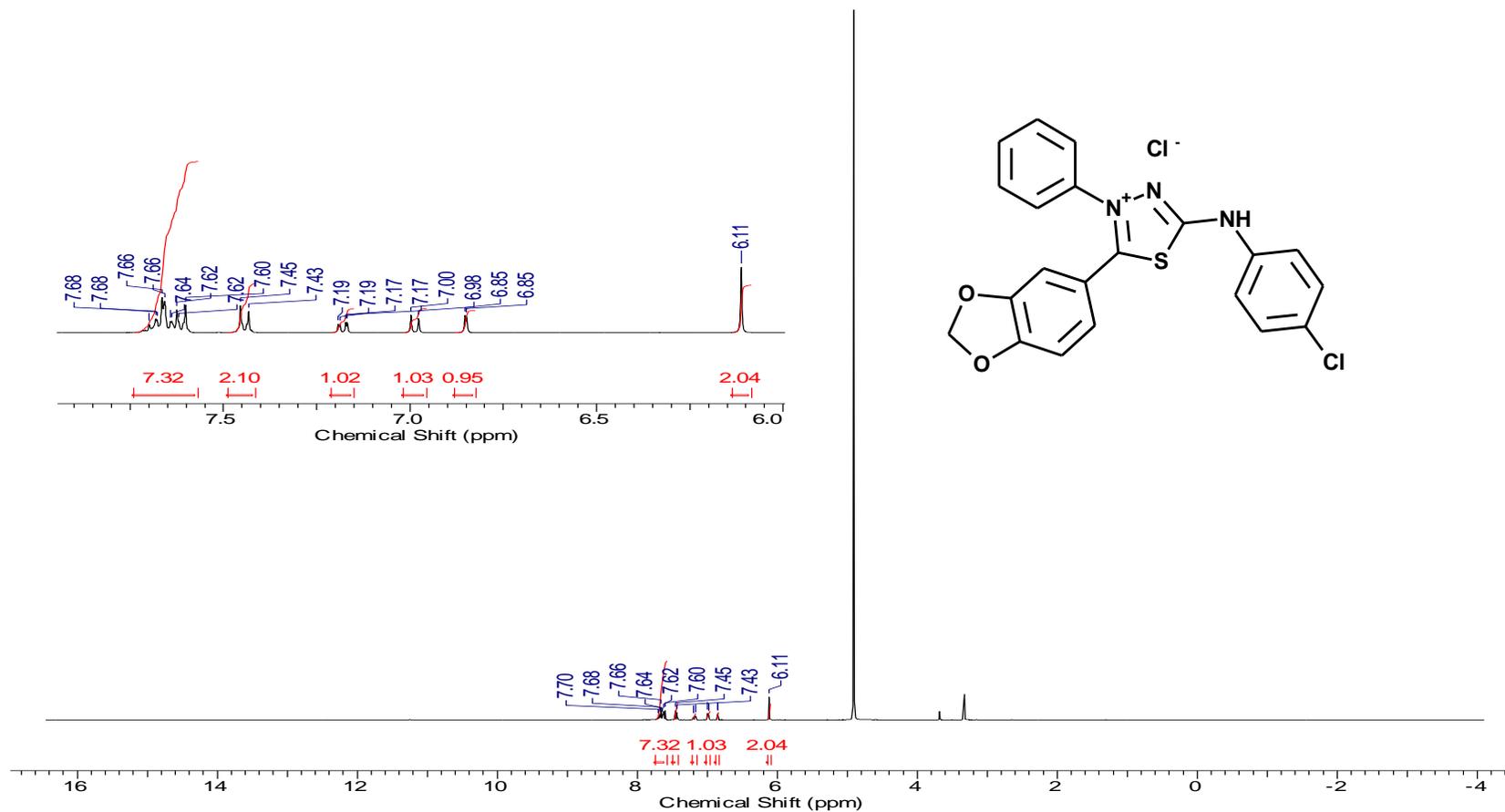
**Espectro 45.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxi-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitrofenil)amina 15

<b>Technique</b>	Infrared	<b>Spectral Region</b>	IR
<b>Instrument</b>	VERTEX 70	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)
<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	Transmittance
<b>Spectrum Range</b>	399.2184 - 3997.9701	<b>Points Count</b>	1867
<b>Data Spacing</b>	1.9286		



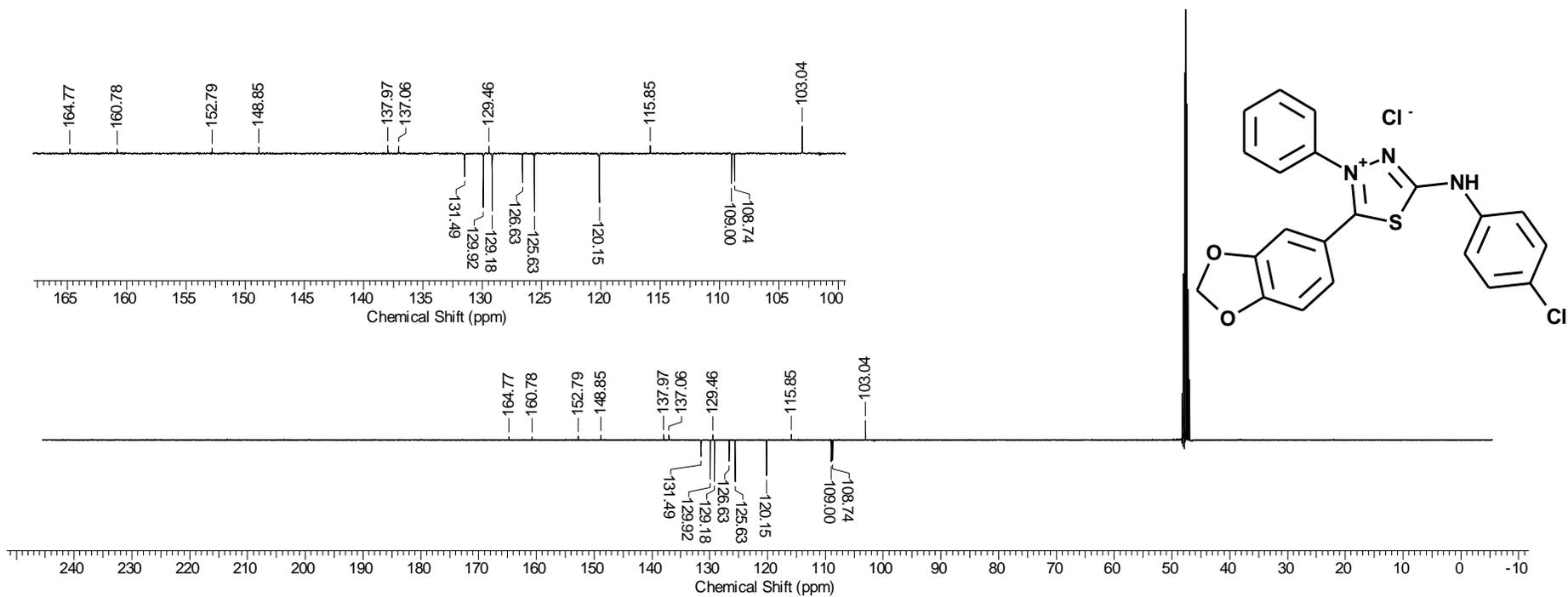
**Espectro 46.** Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxi-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-clorofenil)amina 16

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9846	<b>Frequency (MHz)</b>	400.11	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16	<b>Solvent</b>	MeOD
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30		
<b>Sweep Width (Hz)</b>	8223.68	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000		



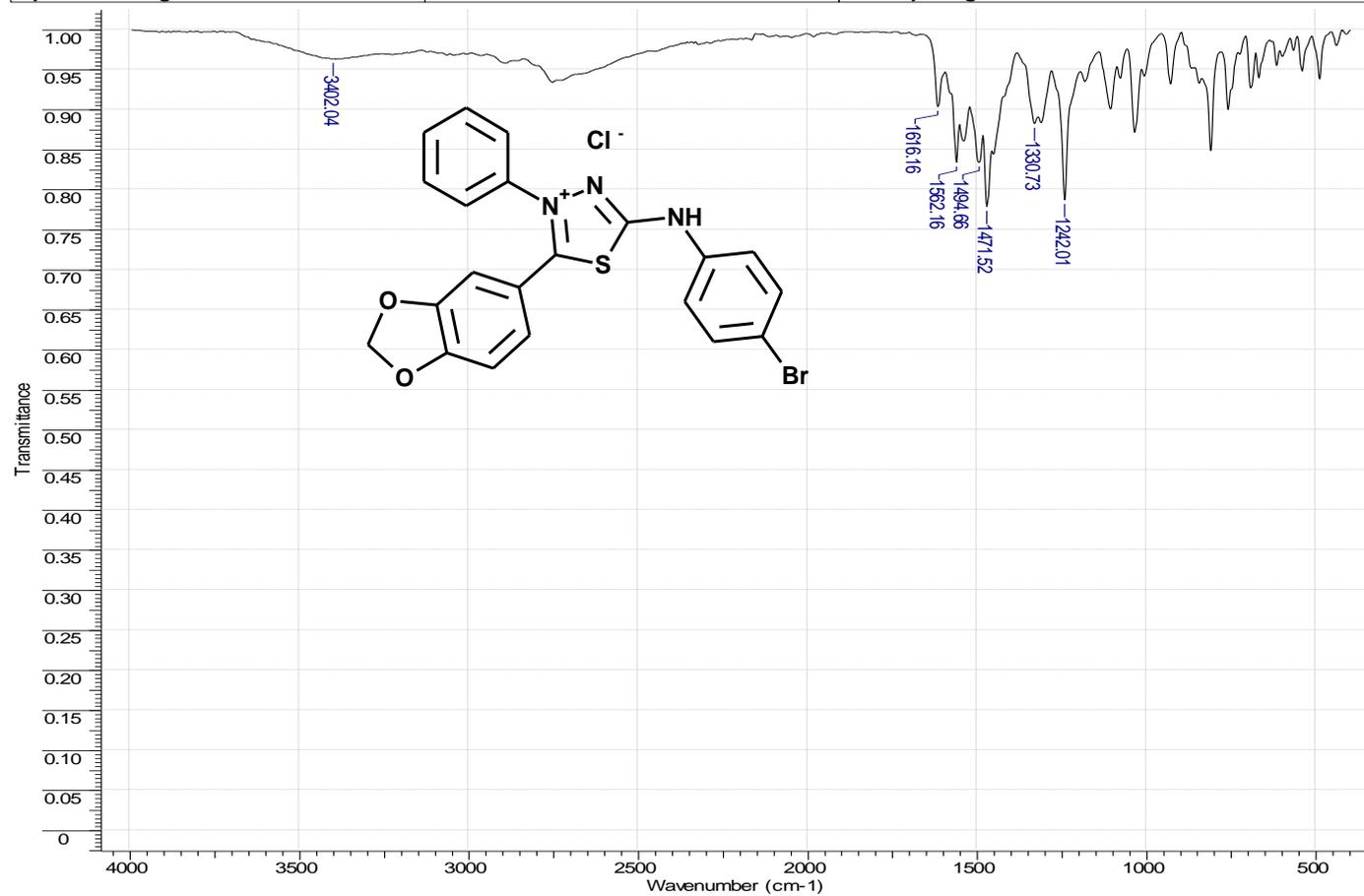
**Espectro 47.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'-clorofenil)amina 16

<b>Acquisition Time (sec)</b>	1.2976	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	17868	<b>Original Points Count</b>	32768
<b>Frequency (MHz)</b>	100.61	<b>Pulse Sequence</b>	deptqgppsp	<b>Solvent</b>	MeOD	<b>Sweep Width (Hz)</b>	25252.53
<b>Points Count</b>	32768						
<b>Temperature (degree C)</b>	27.000						



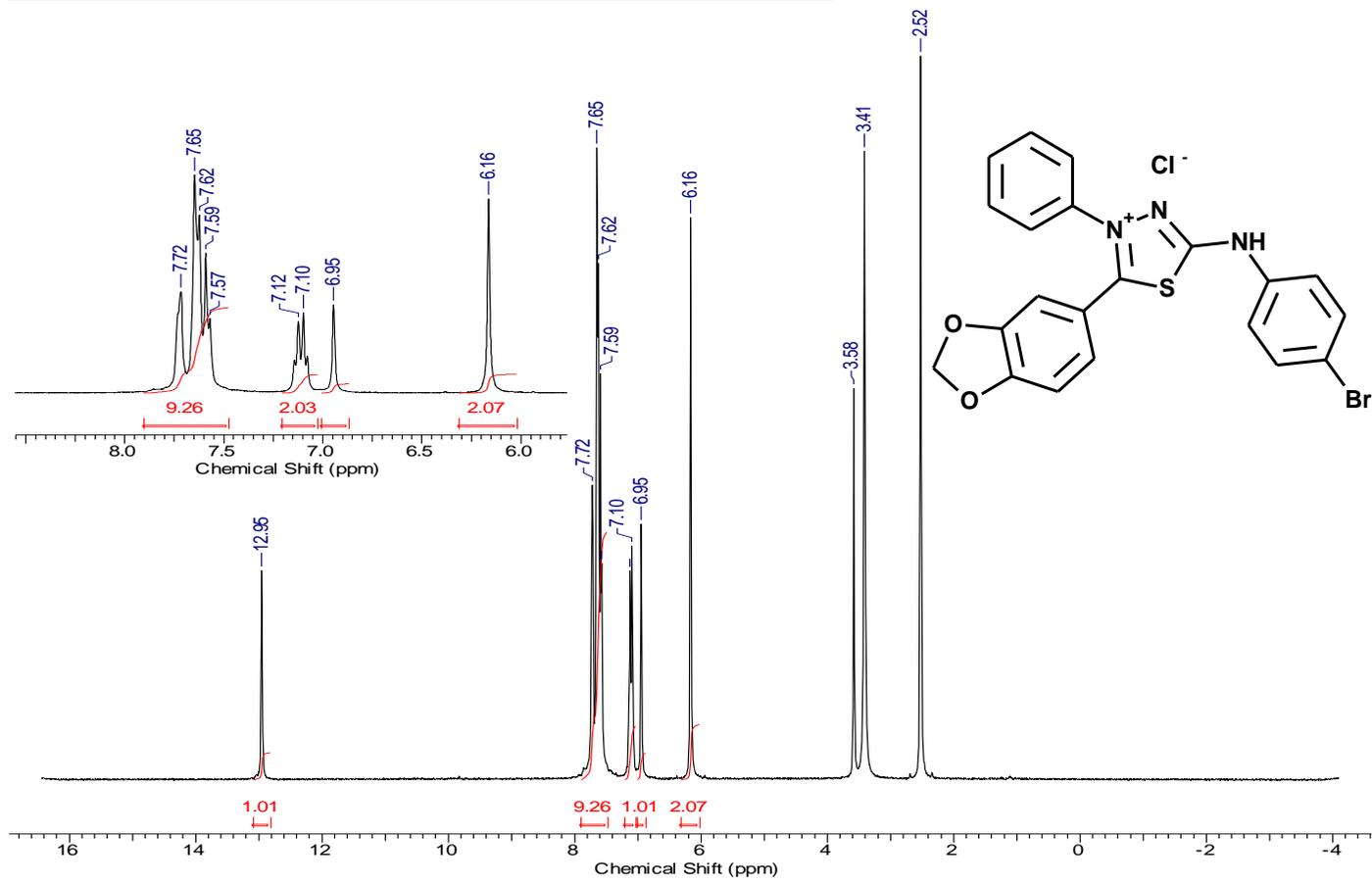
**Espectro 48.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'-clorofenil)amina 16.

<b>Date</b>	15 Feb 2017 15:22:16	<b>Technique</b>	Infrared	<b>Instrument</b>	VERTEX 70
<b>Spectral Region</b>	IR	<b>X Axis</b>	Wavenumber (cm-1)	<b>Y Axis</b>	Transmittance
<b>Spectrum Range</b>	399.2184 - 3997.9701	<b>Points Count</b>	1867	<b>Data Spacing</b>	1.9286



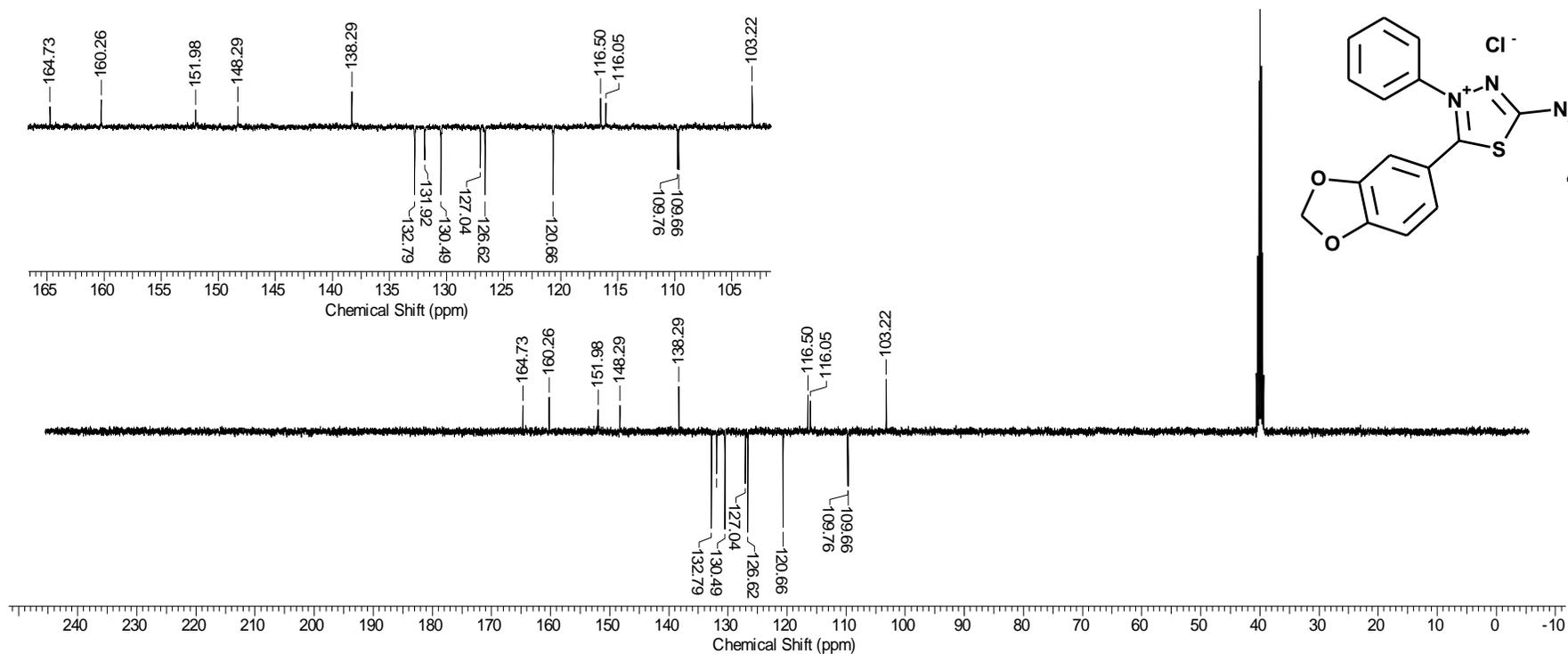
**Espectro 49.** Espectro de IV do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-bromofenil)amina 17

<b>Acquisition Time (sec)</b>	3.9846	<b>Frequency (MHz)</b>	400.11
<b>Nucleus</b>	1H	<b>Number of Transients</b>	16
<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zg30
<b>Sweep Width (Hz)</b>	8223.68	<b>Temperature (degree C)</b>	27.000
		<b>Original Points Count</b>	32768
		<b>Solvent</b>	DMSO-D6

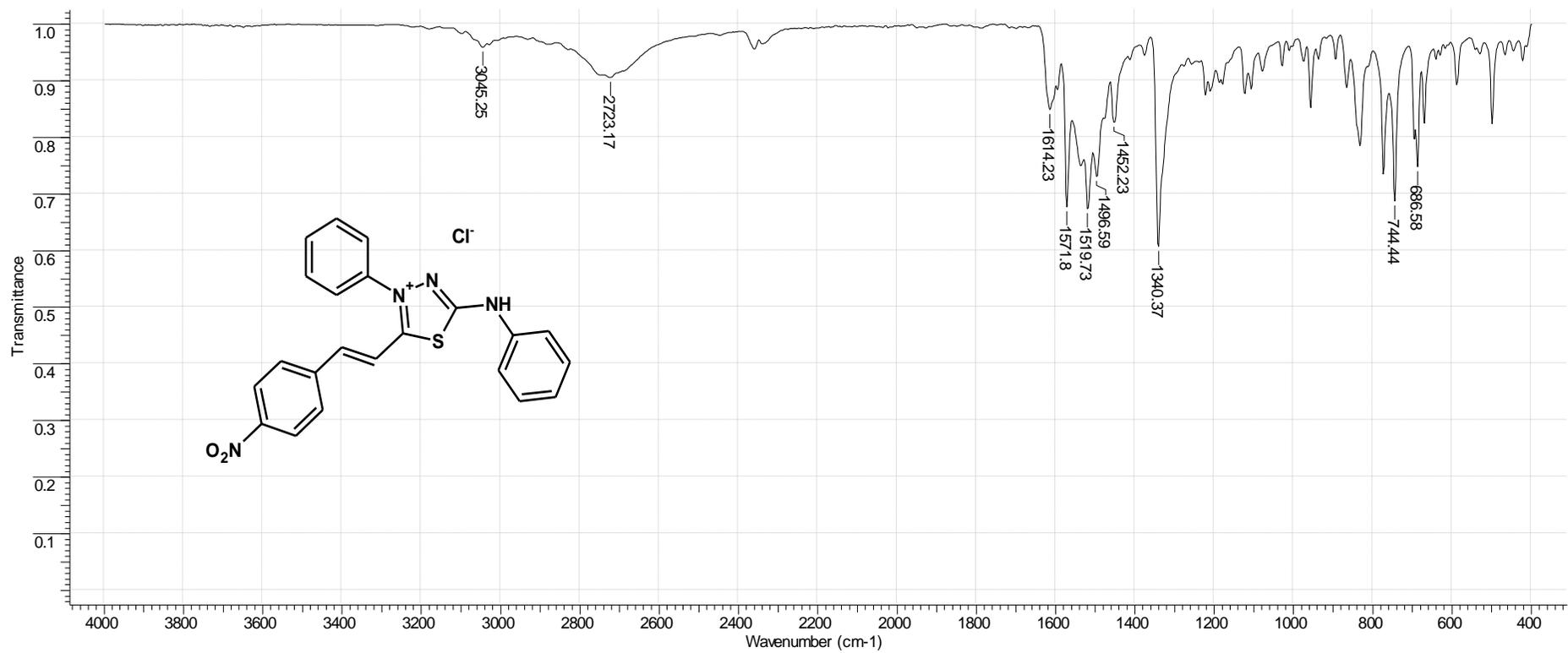


**Espectro 50.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxifenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'-bromofenil)amina 17

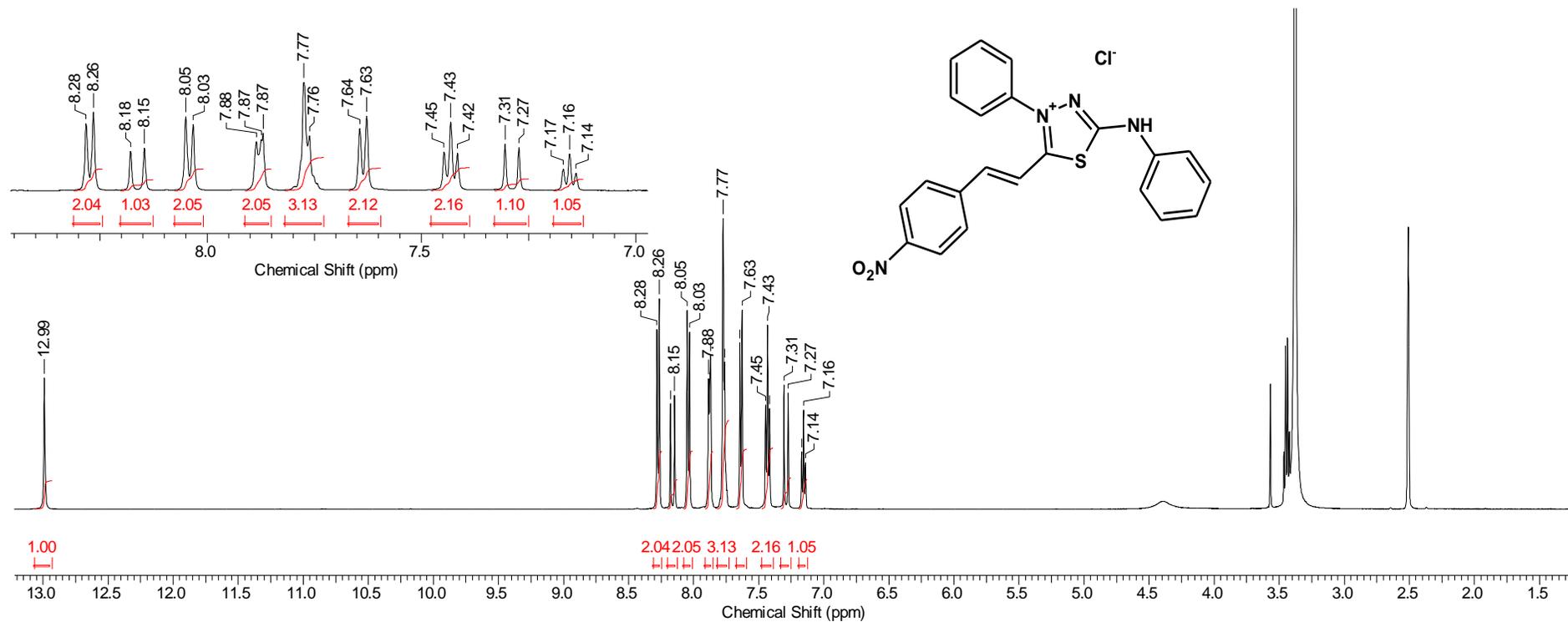
Acquisition Time (sec)	1.2976	Frequency (MHz)	100.61	Nucleus	<sup>13</sup> C
Number of Transients	1024	Original Points Count	32768	Points Count	32768
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	25252.53	Temperature (degree C)	27.000
				Pulse Sequence	deptqgppp



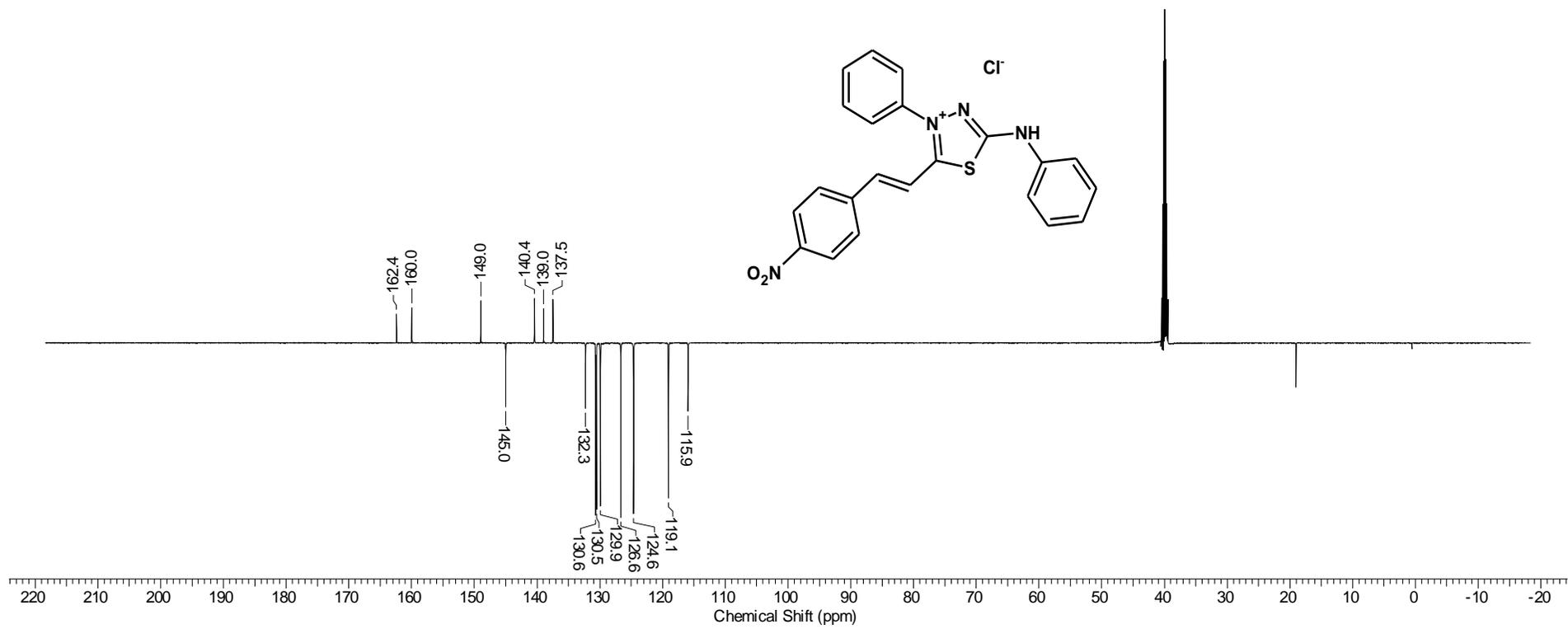
**Espectro 51.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloreto de 5-(3,4-metilenodioxi-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-bromofenil)amina 17



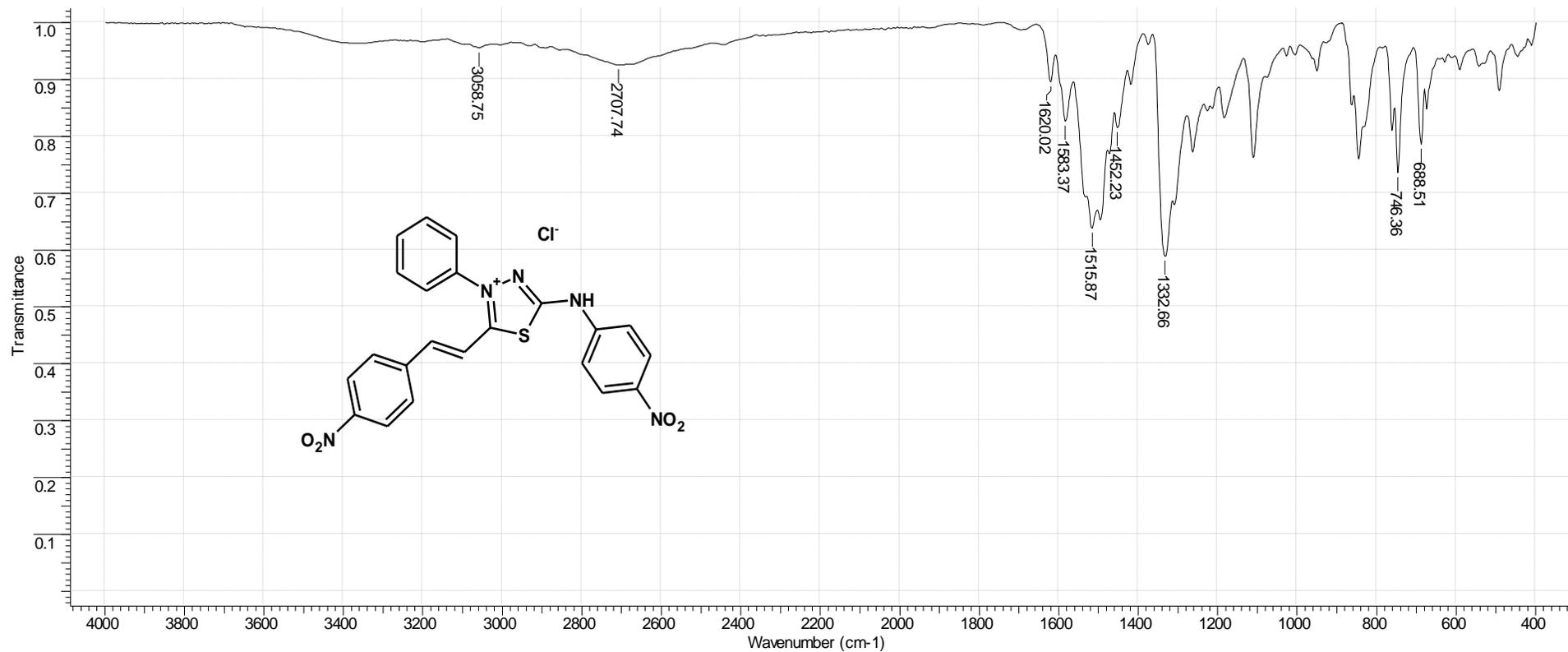
**Espectro 52.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 18



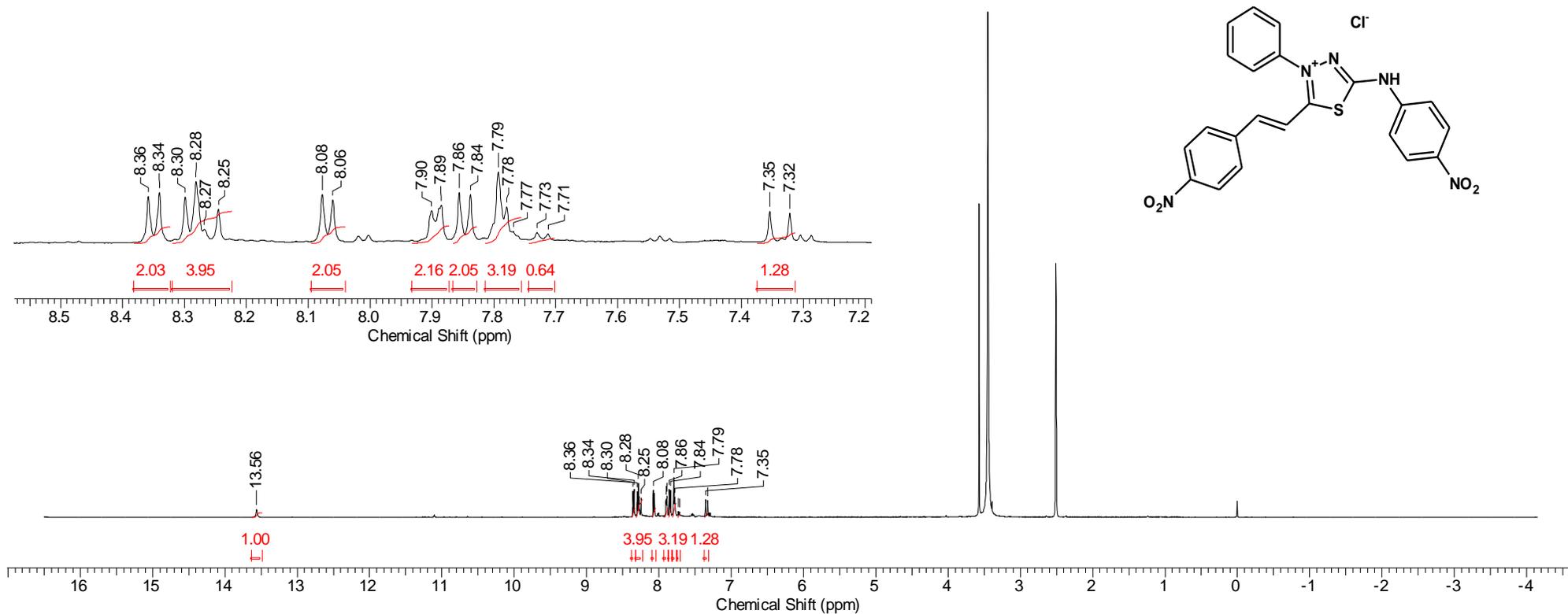
**Espectro 53.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 18



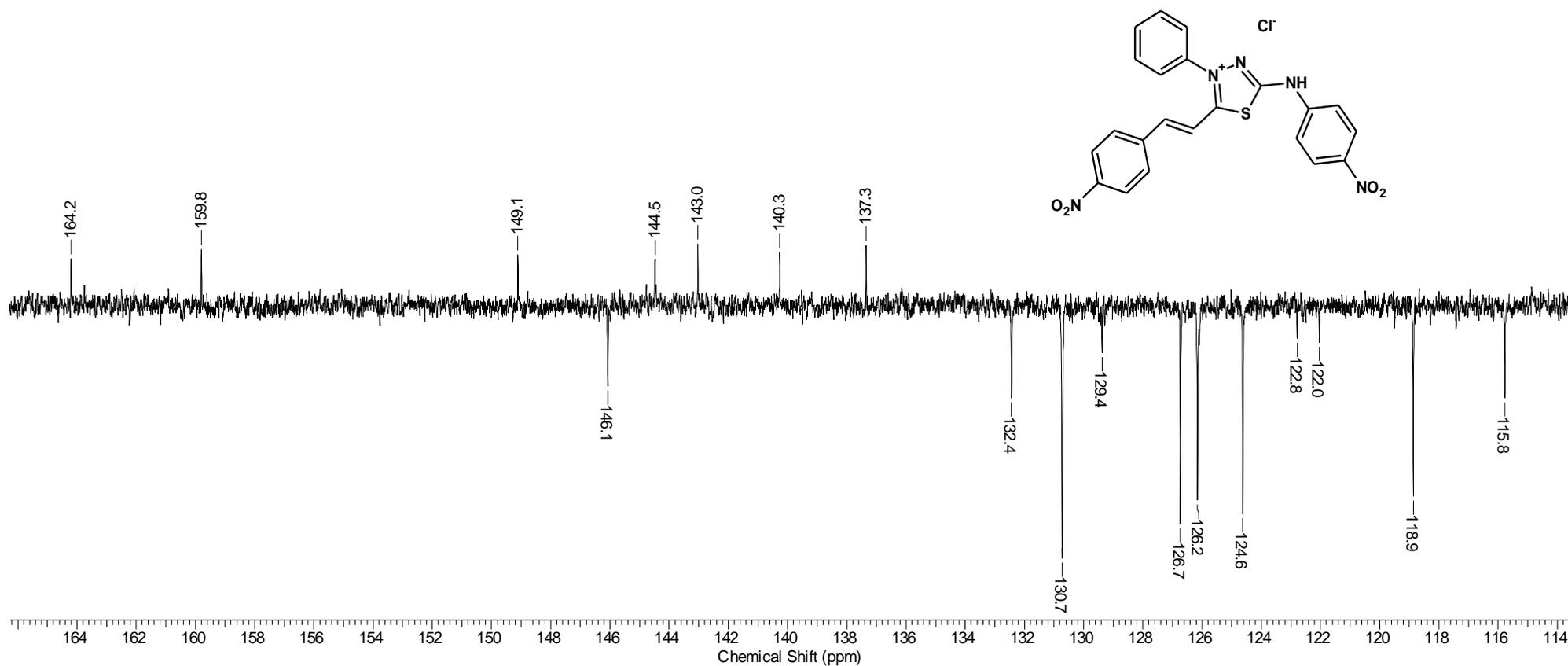
**Espectro 54.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamóil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 18



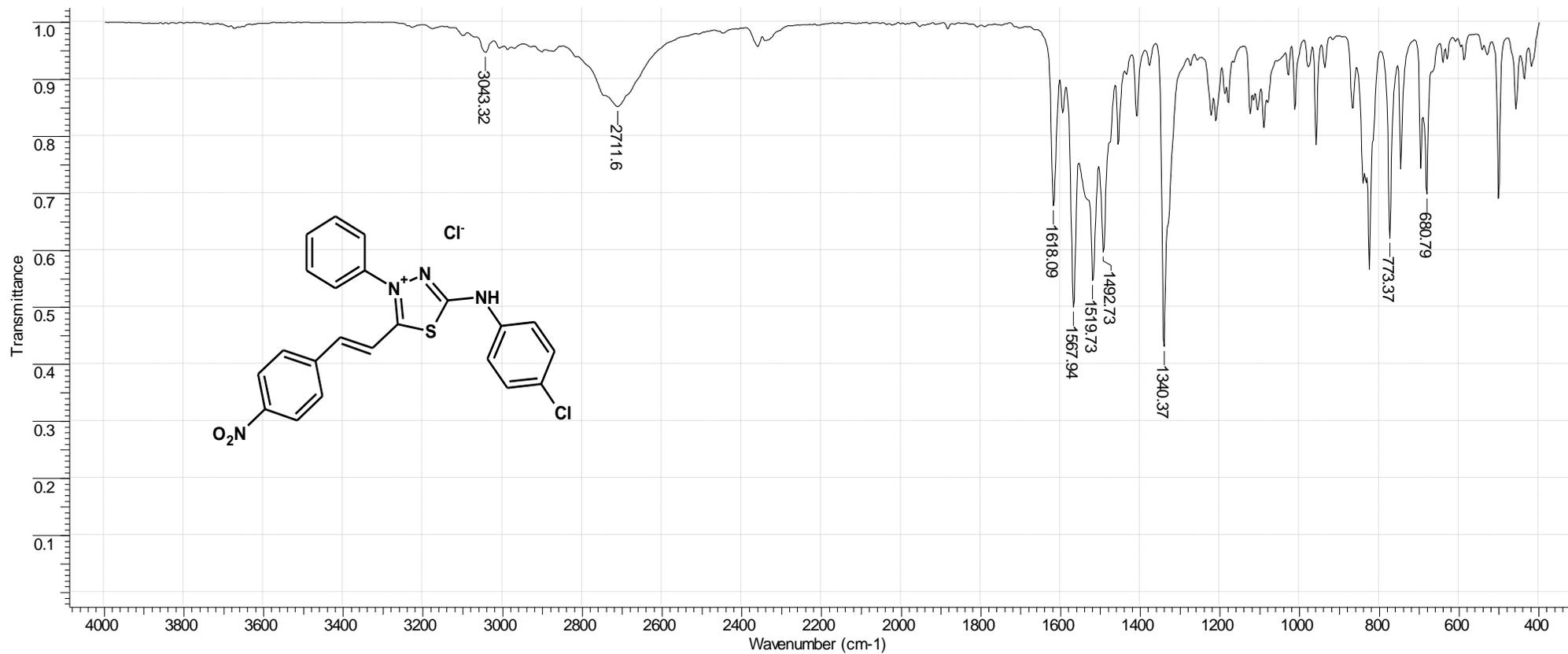
**Espectro 55.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-nitro-fenilamina) 19



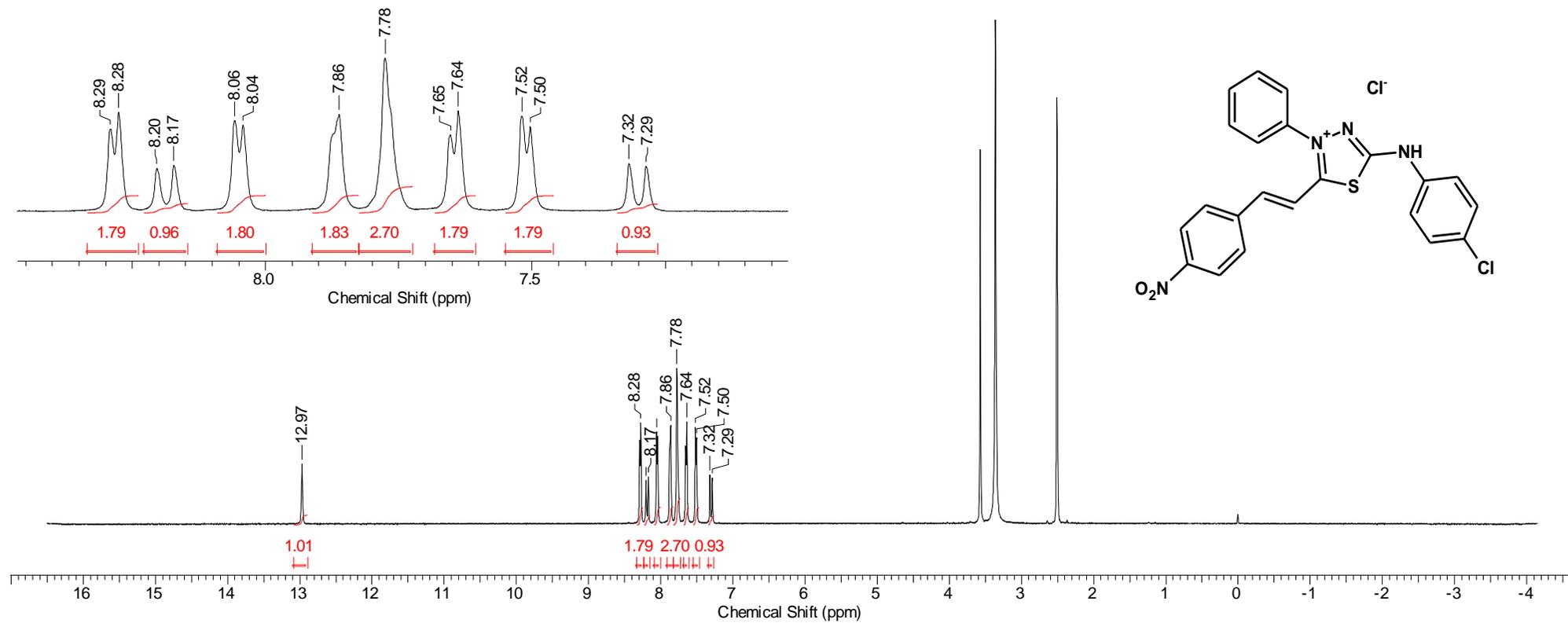
**Espectro 56.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-nitro-fenilamina) **19**



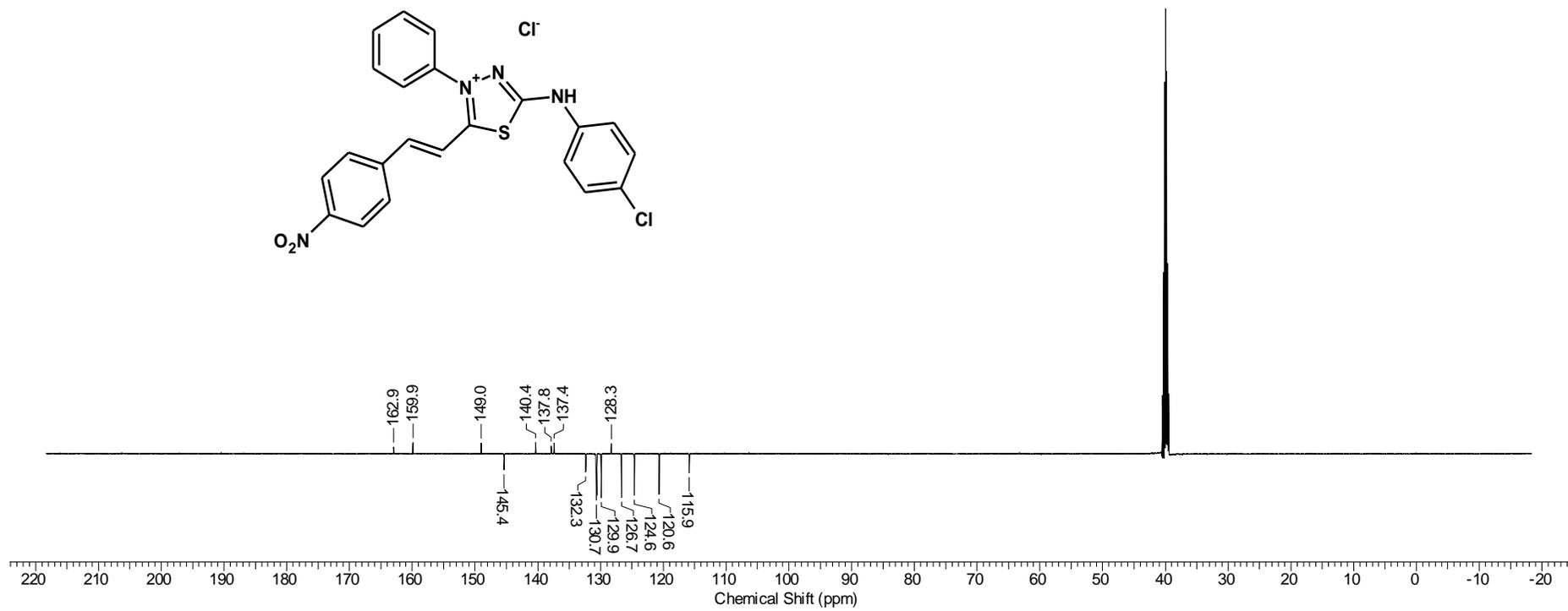
**Espectro 57.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-nitro-fenilamina) 19



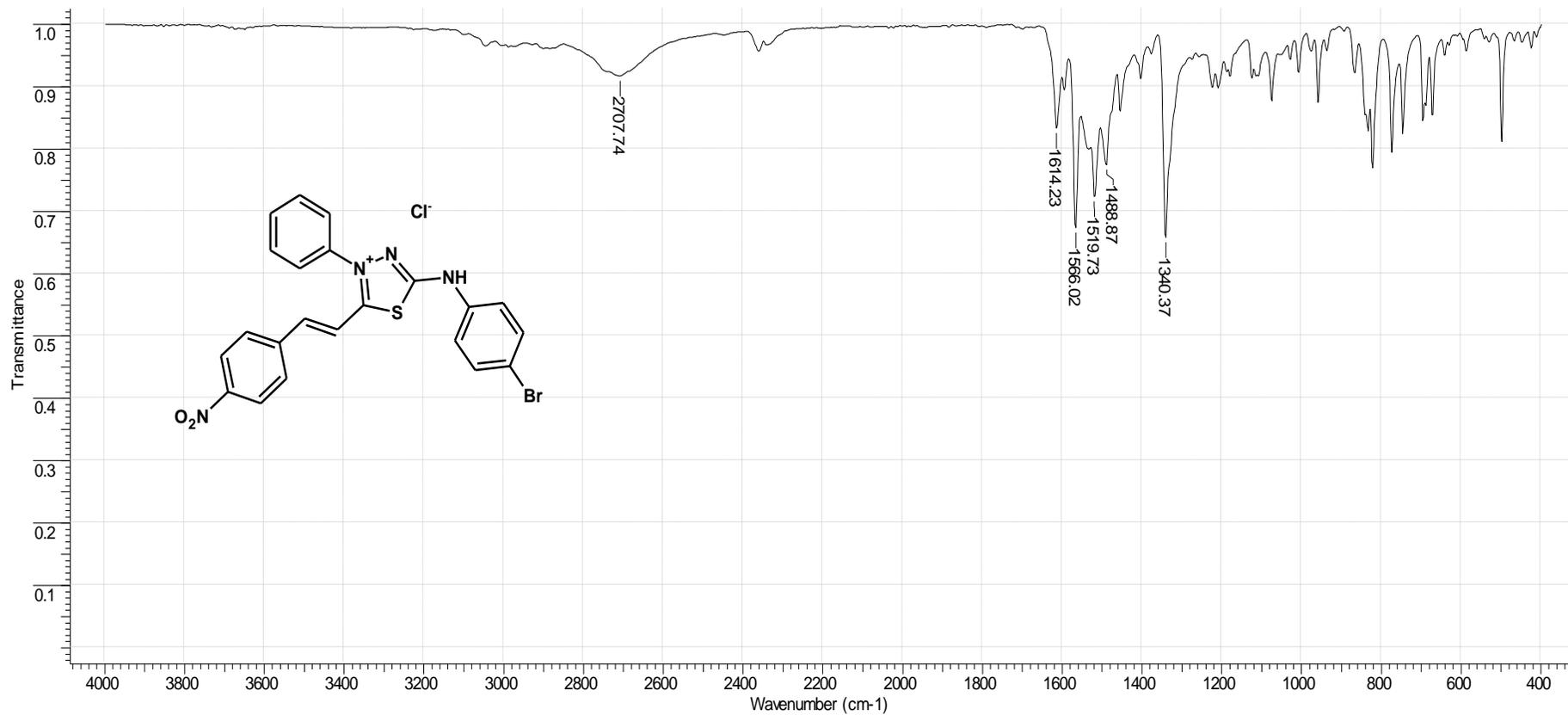
**Espectro 58.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-cloro-fenilamina) 20



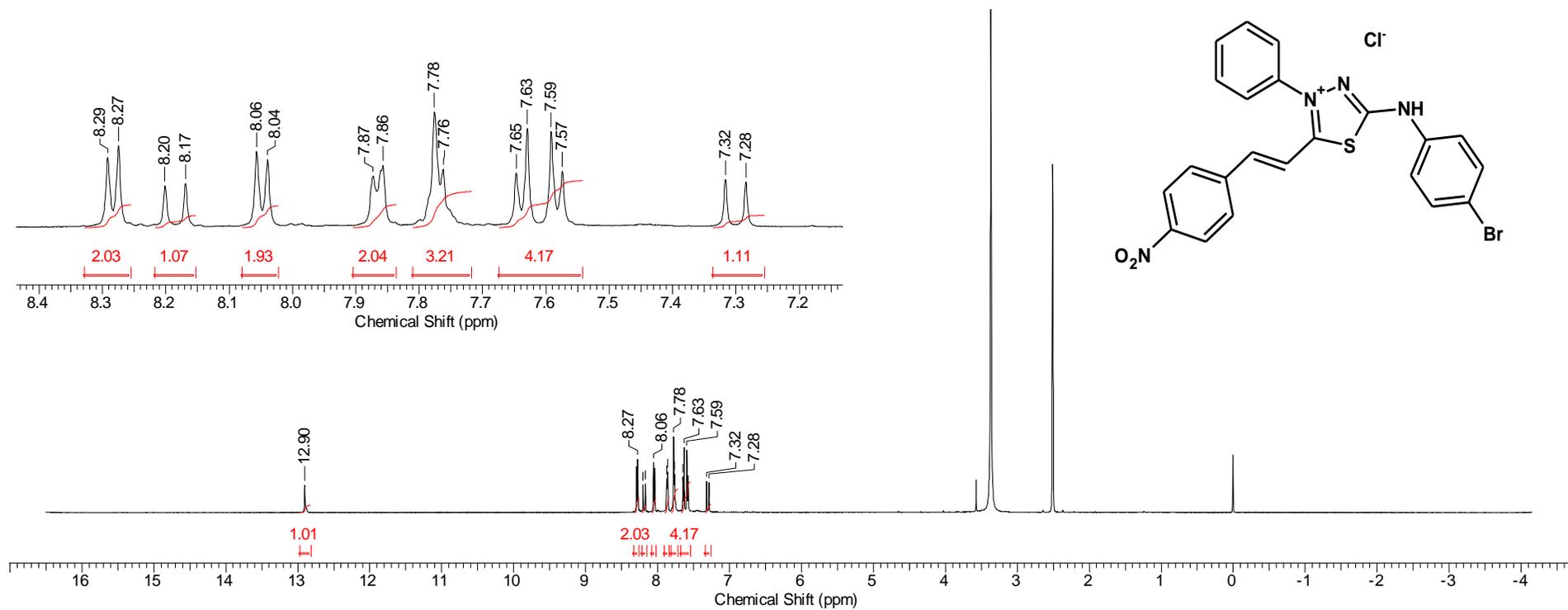
**Espectro 59.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-cloro-fenilamina) 20



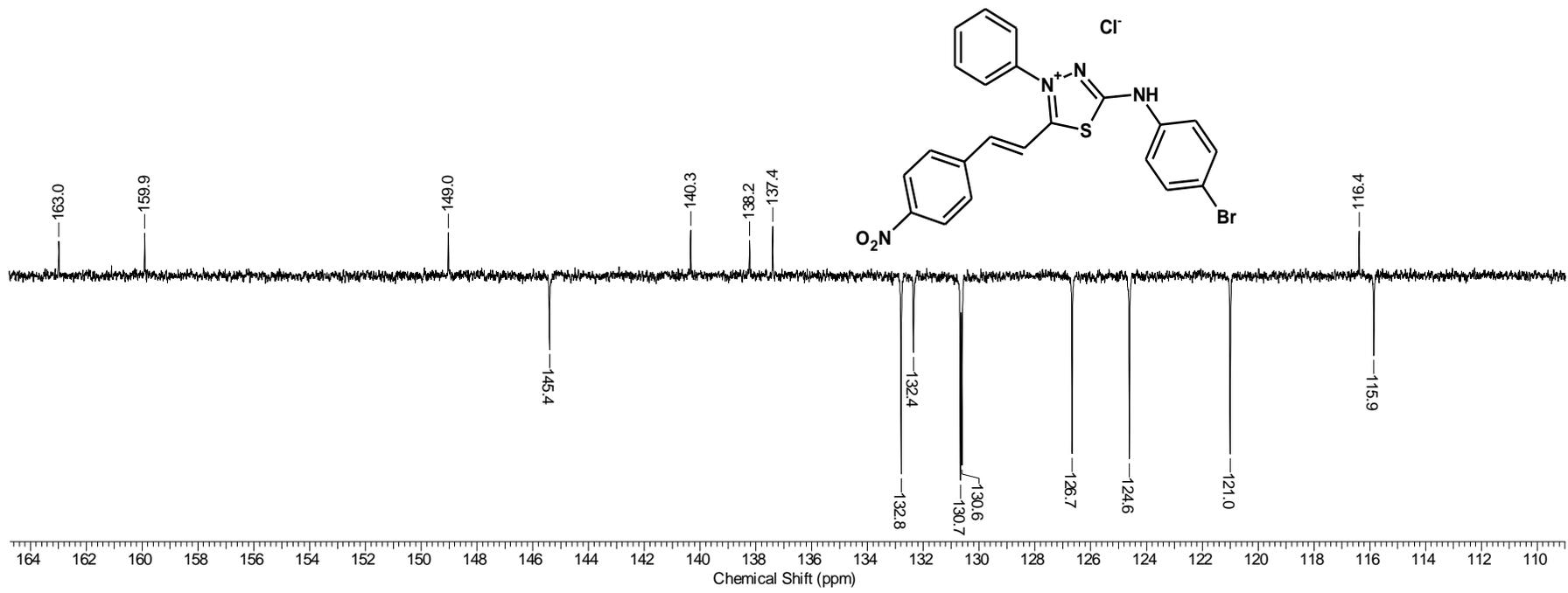
**Espectro 60.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-cloro-fenilamina) 20



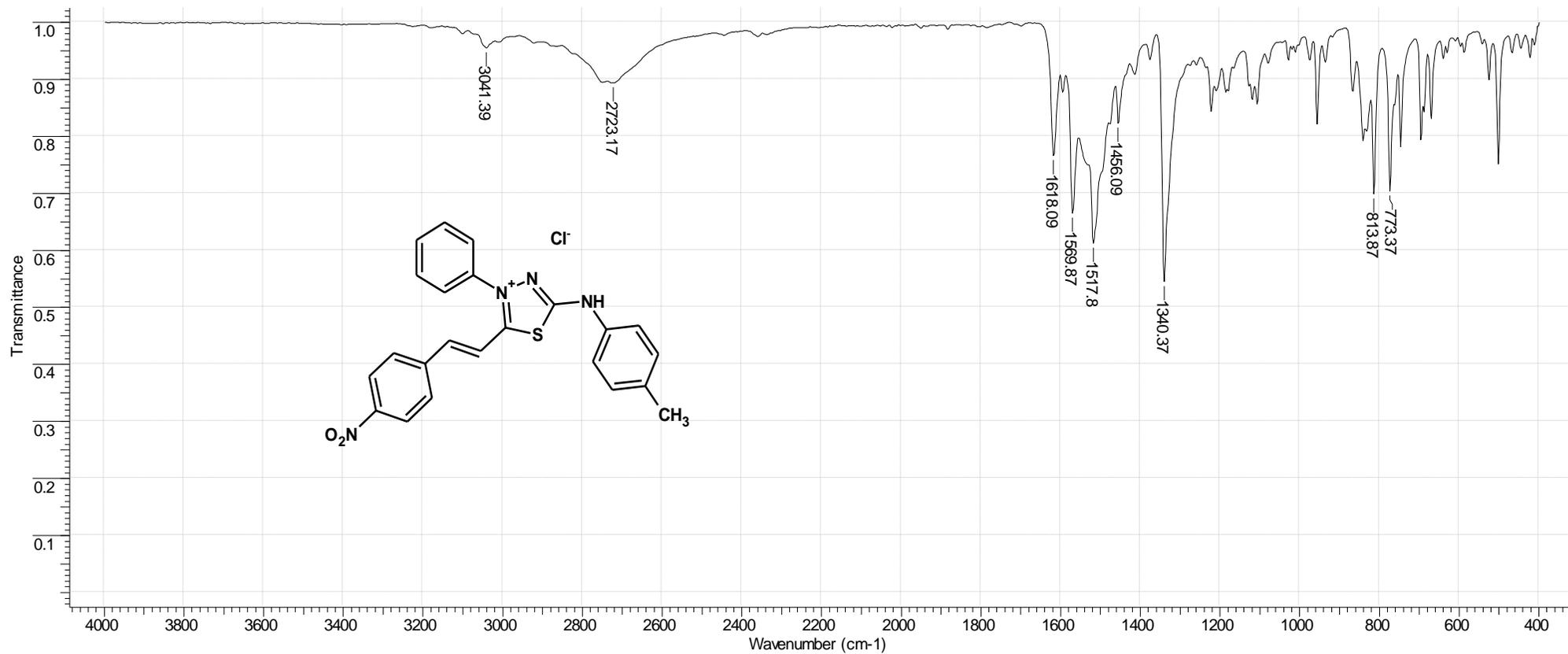
**Espectro 61.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-bromo-fenilamina) 21



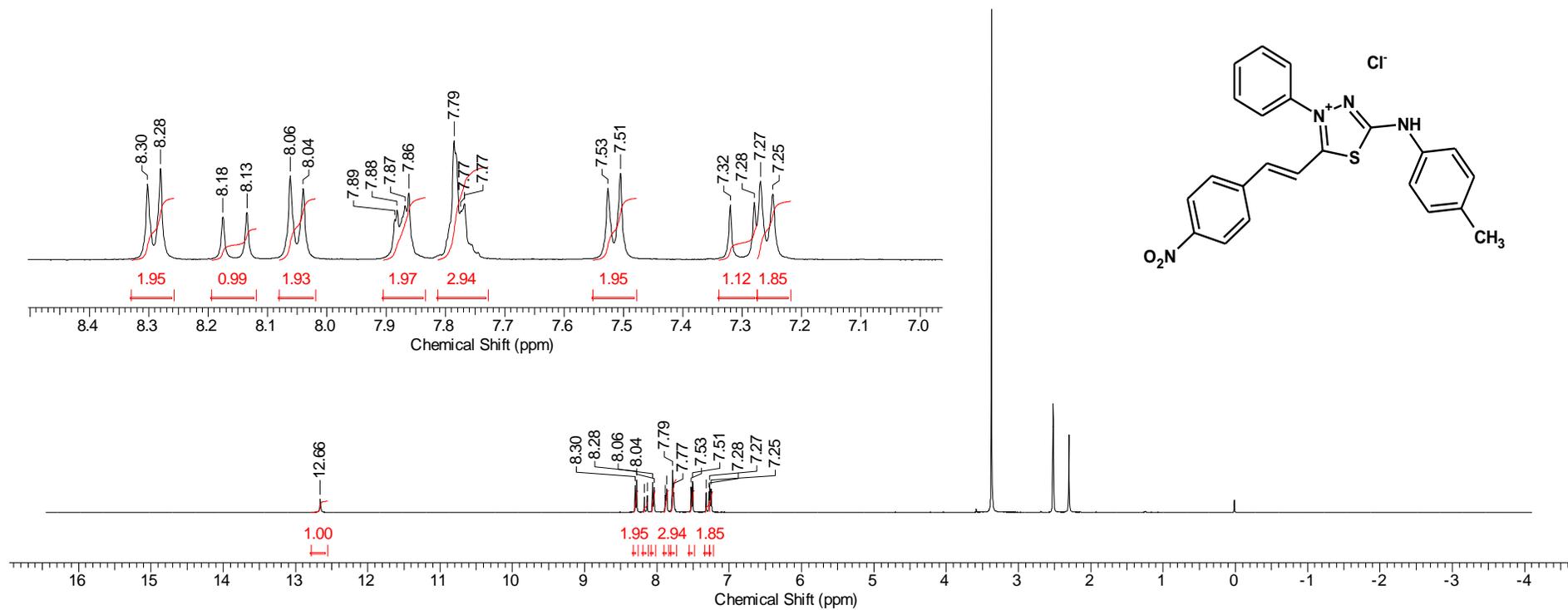
**Espectro 62.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-bromo-fenilamina) 21



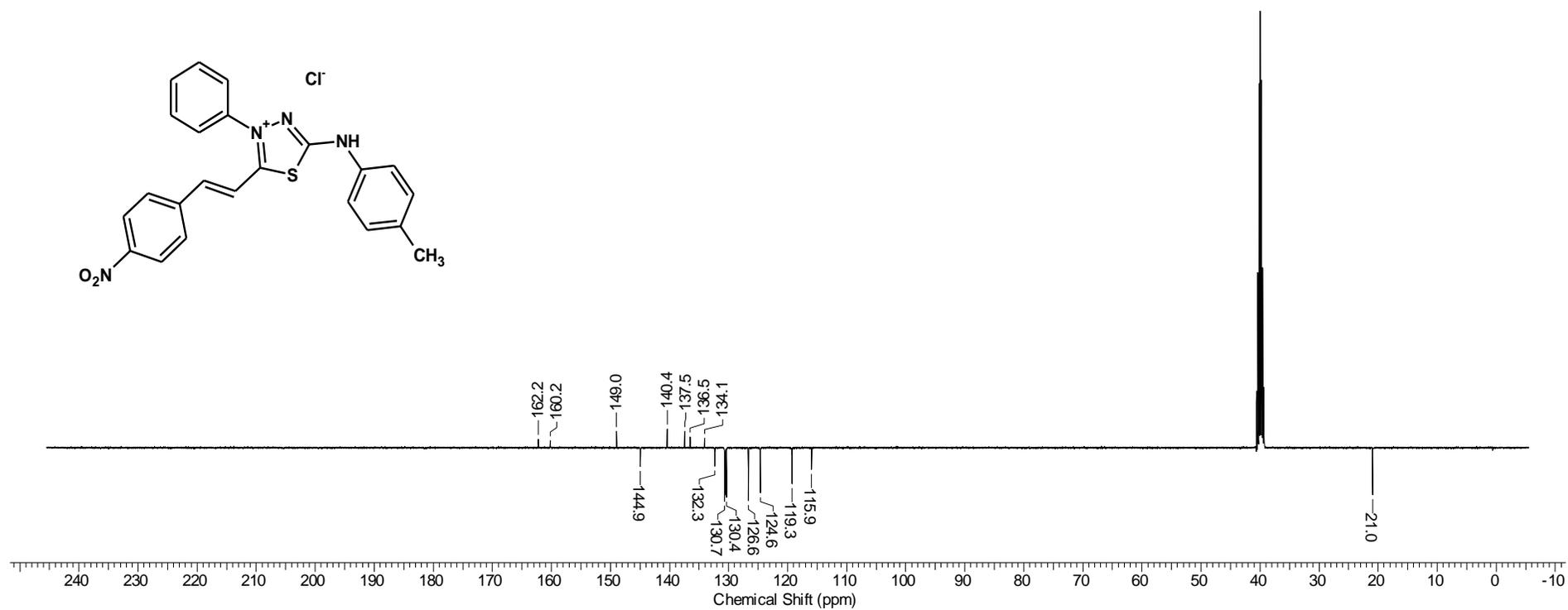
**Espectro 63.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamóil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-bromo-fenilamina) 21



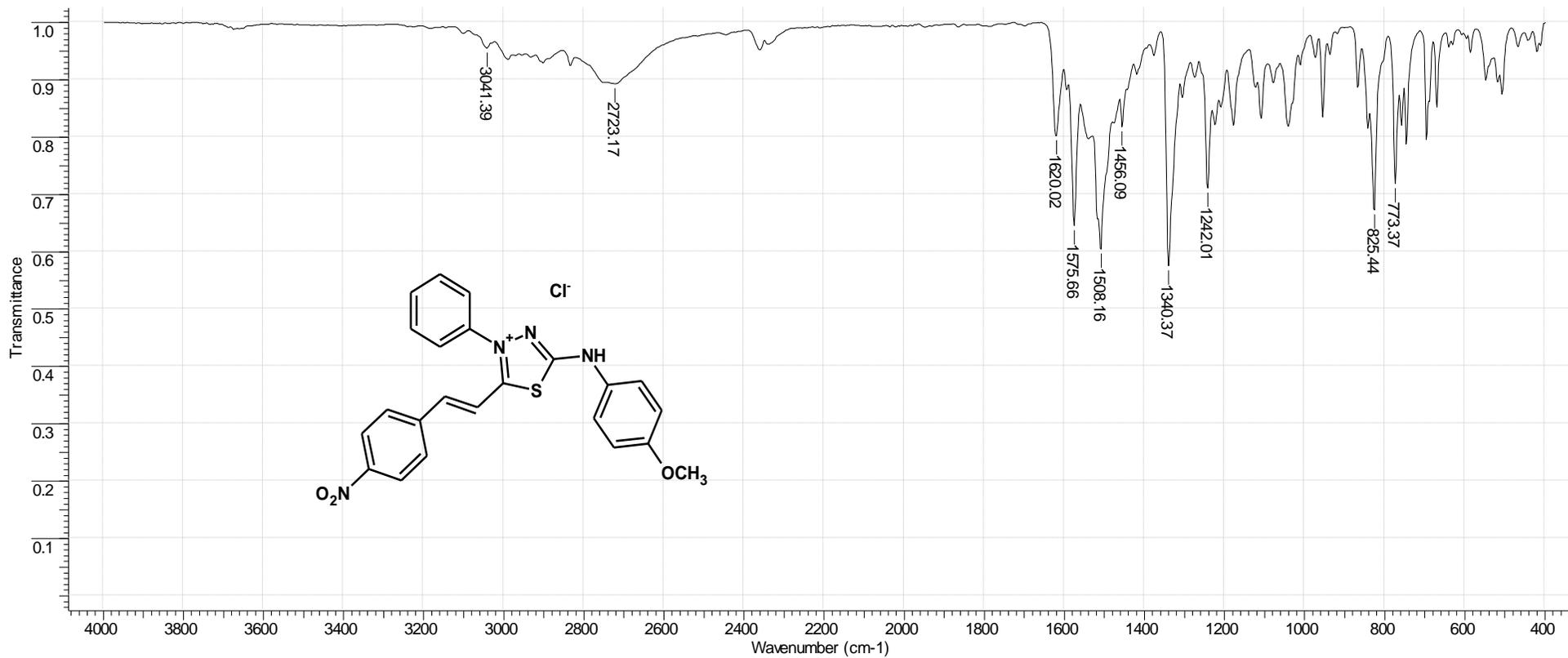
**Espectro 64.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-toluilamina) 22



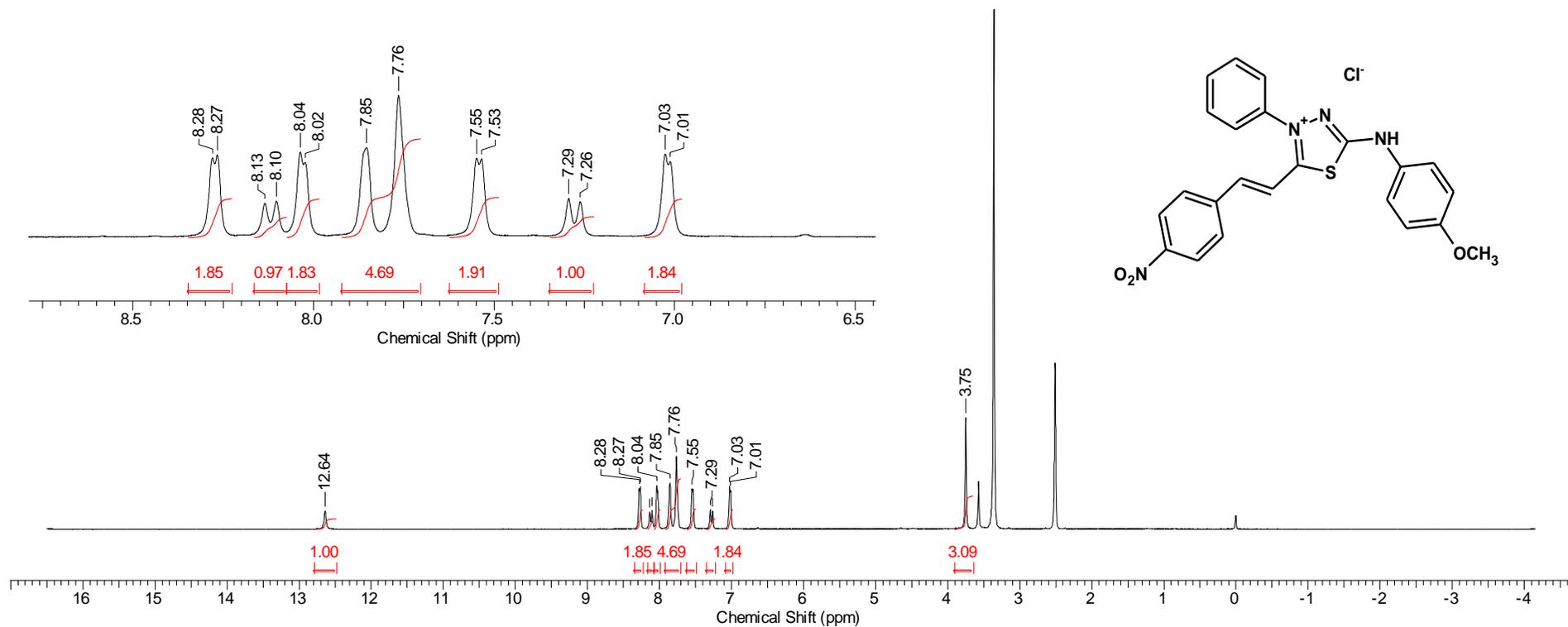
**Espectro 65.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-toluilamina) 22



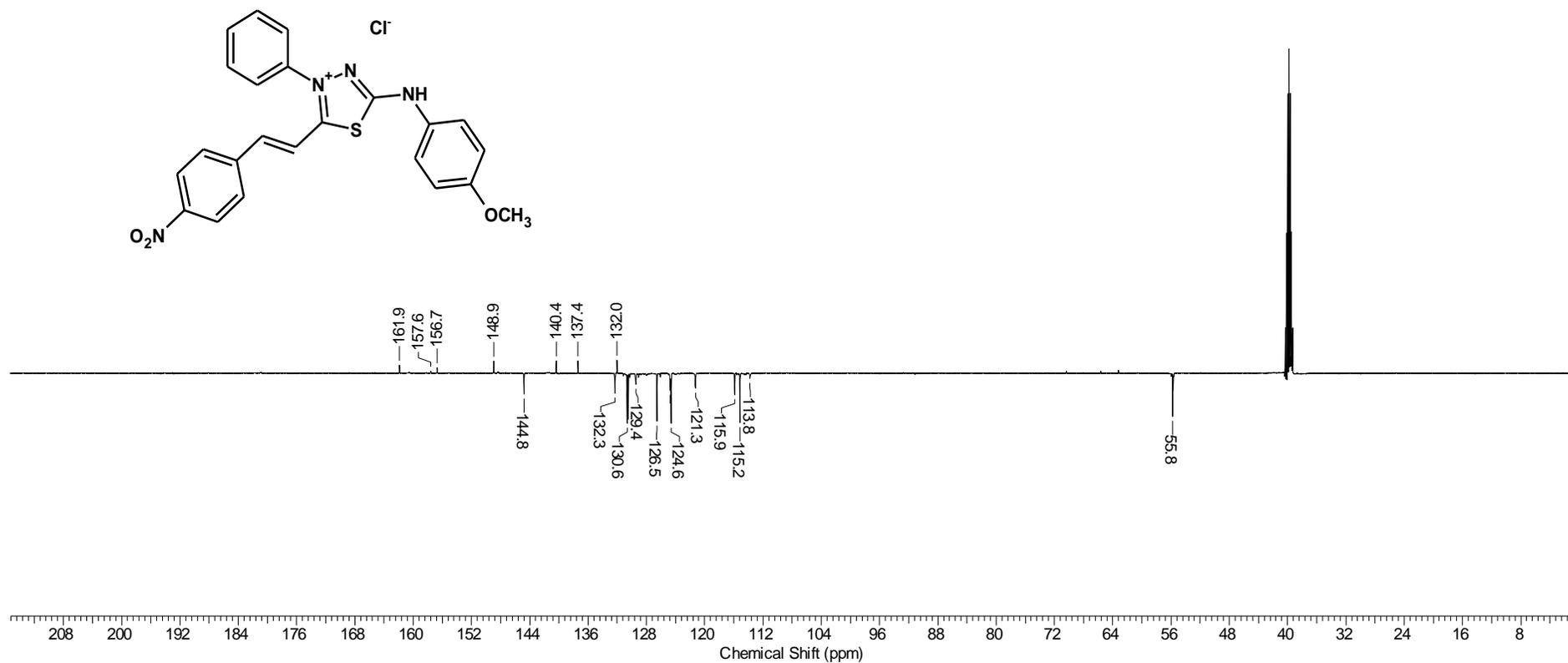
**Espectro 66.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-toluilamina) 22



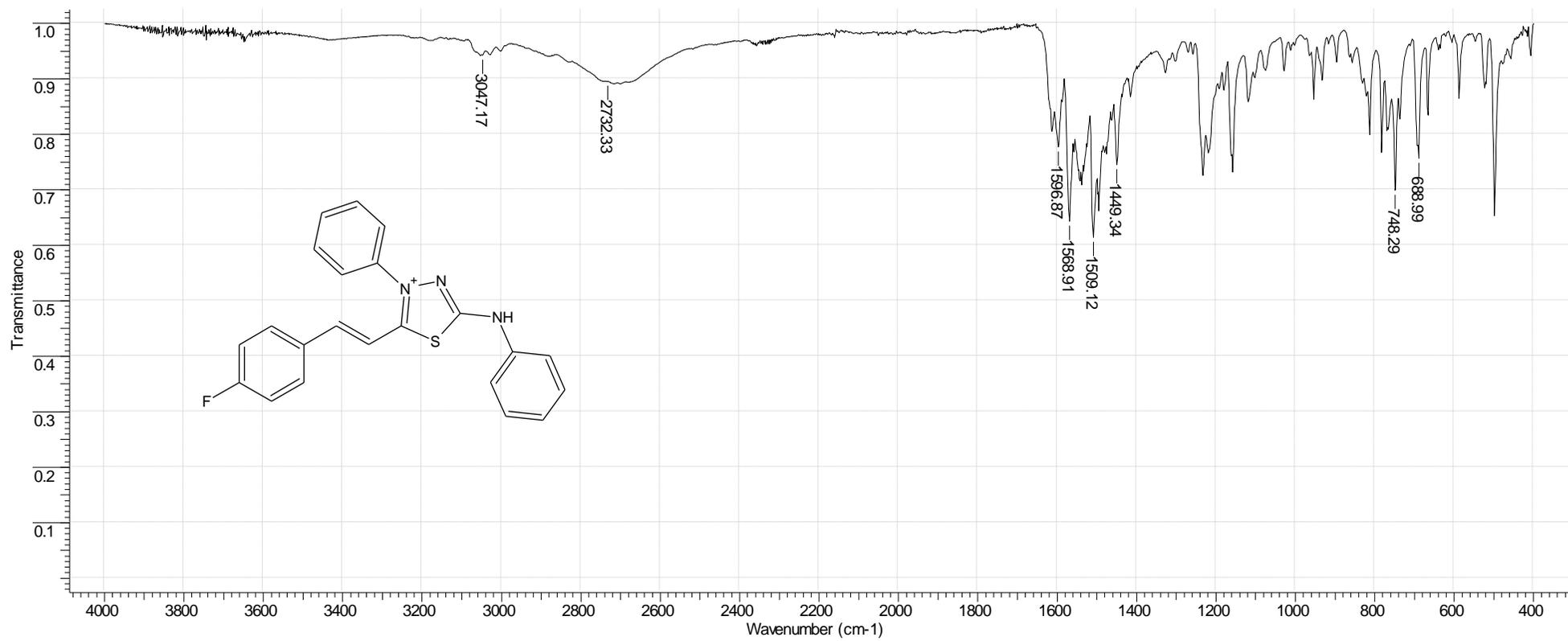
**Espectro 67.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metóxi-fenilamina) 23



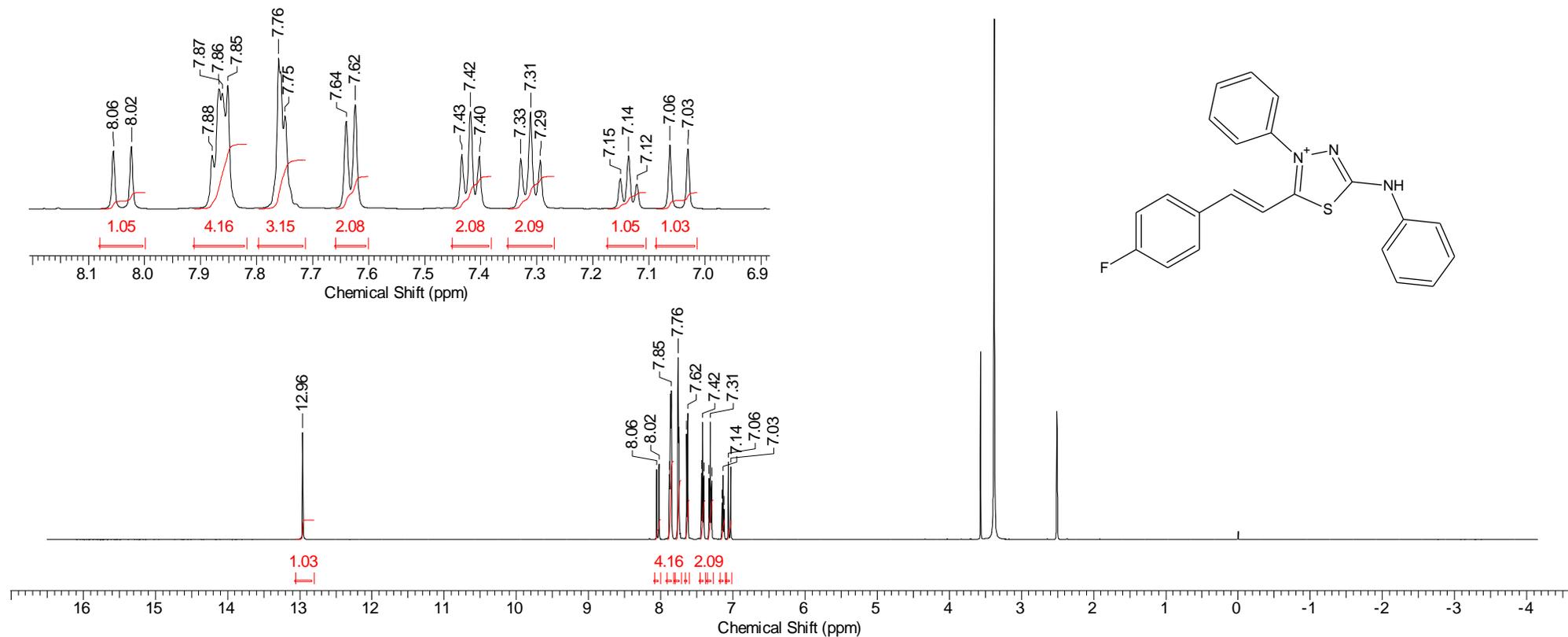
**Espectro 68.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metóxi-fenilamina) 23



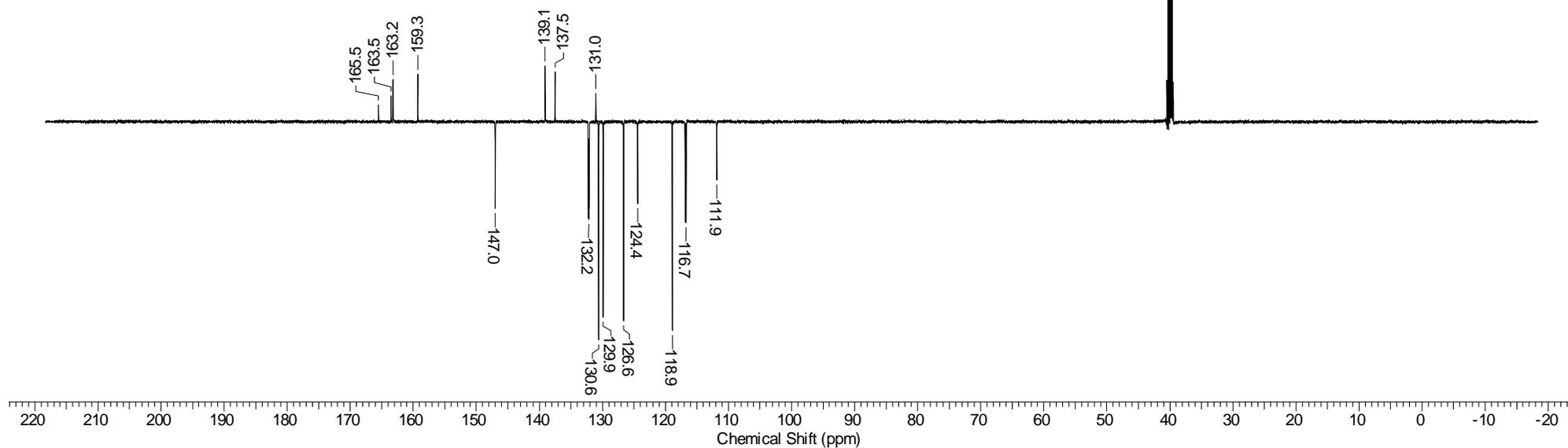
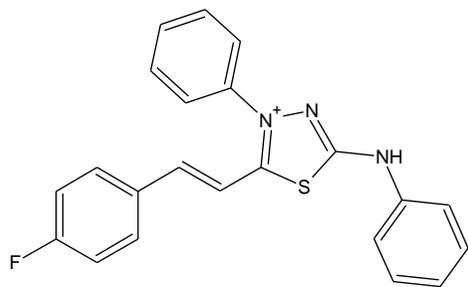
**Espectro 69.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-nitro-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metóxi-fenilamina) 23



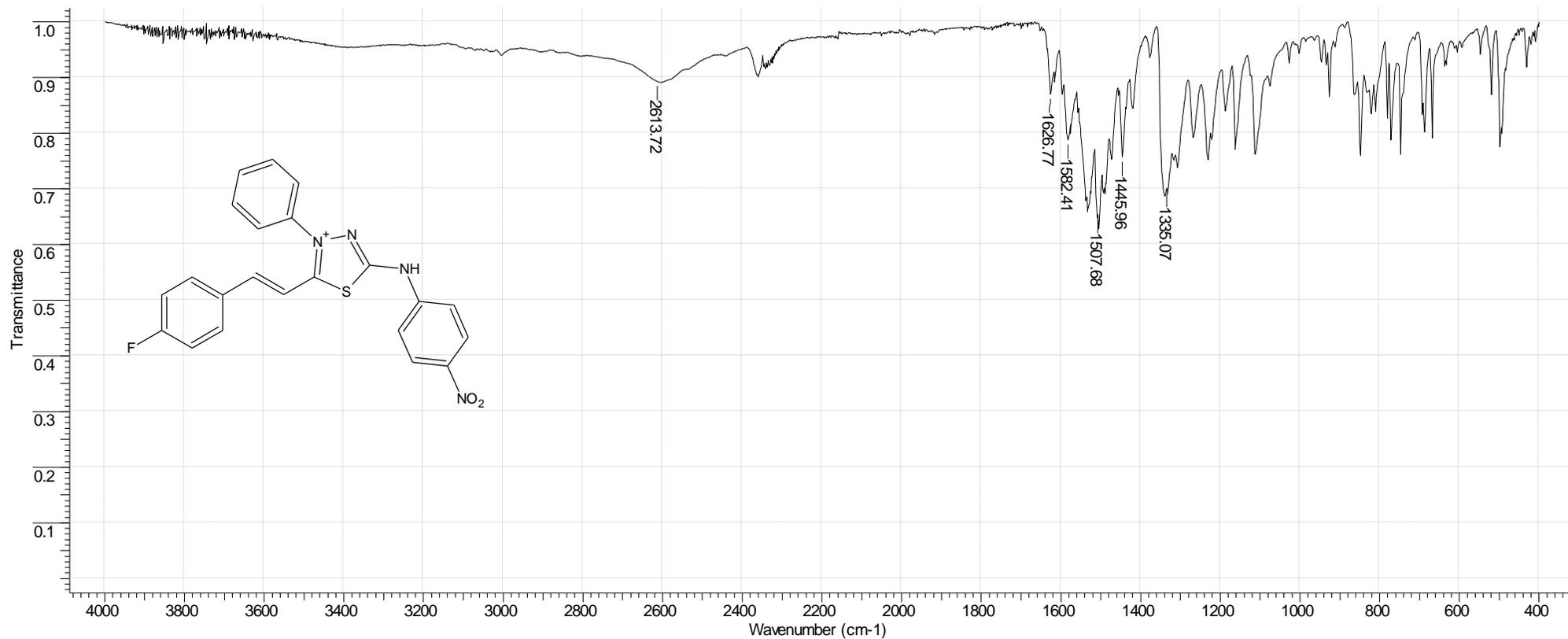
**Espectro 70.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 24



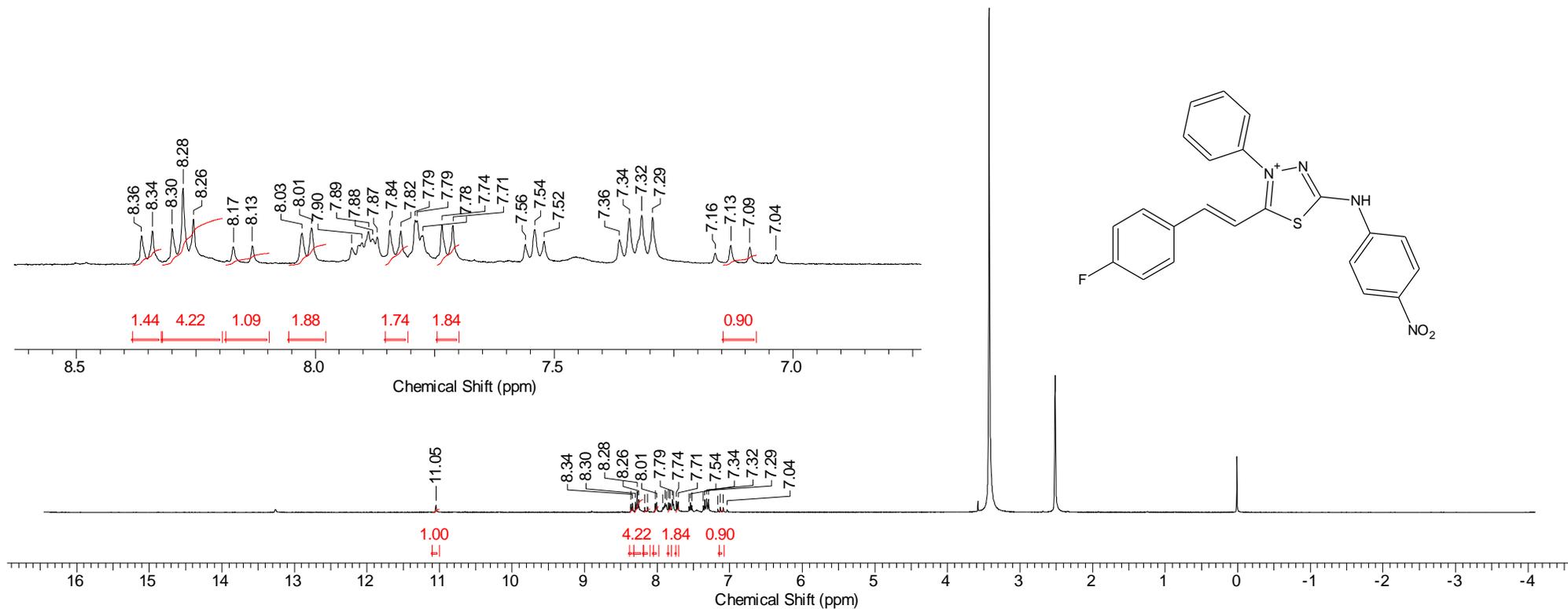
**Espectro 71.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 24



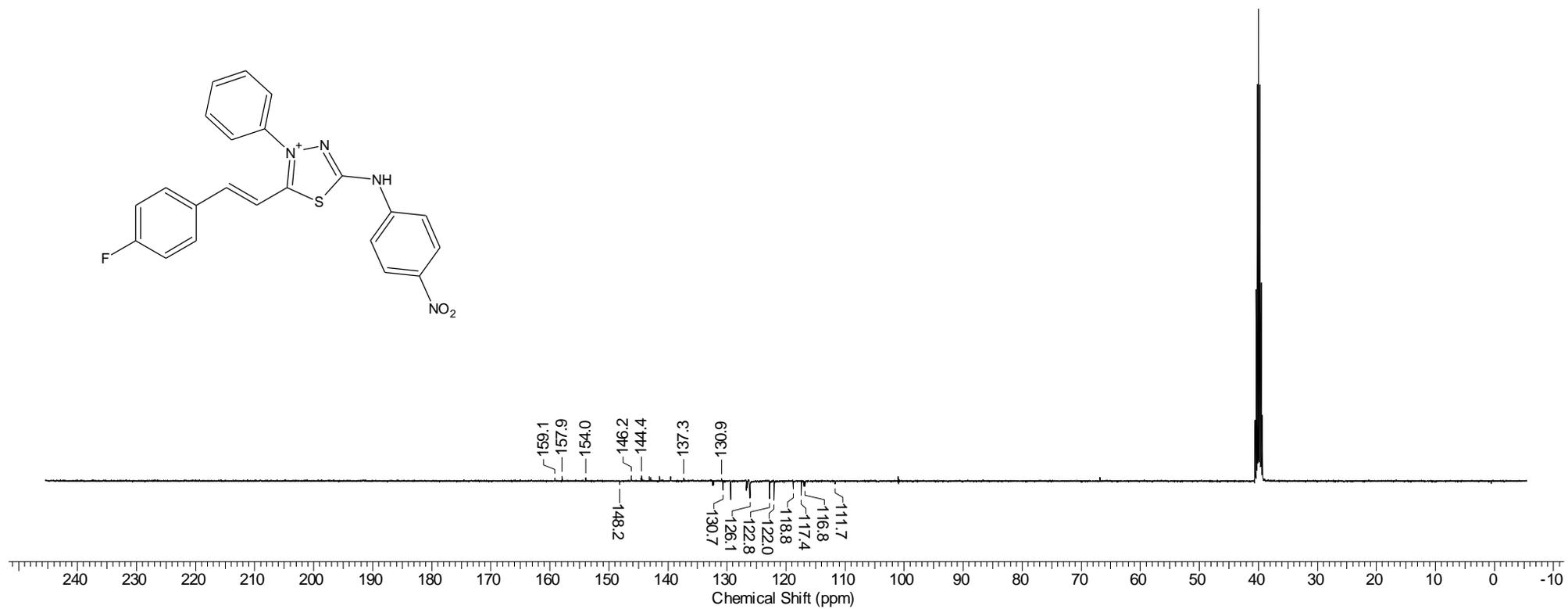
**Espectro 72.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 24



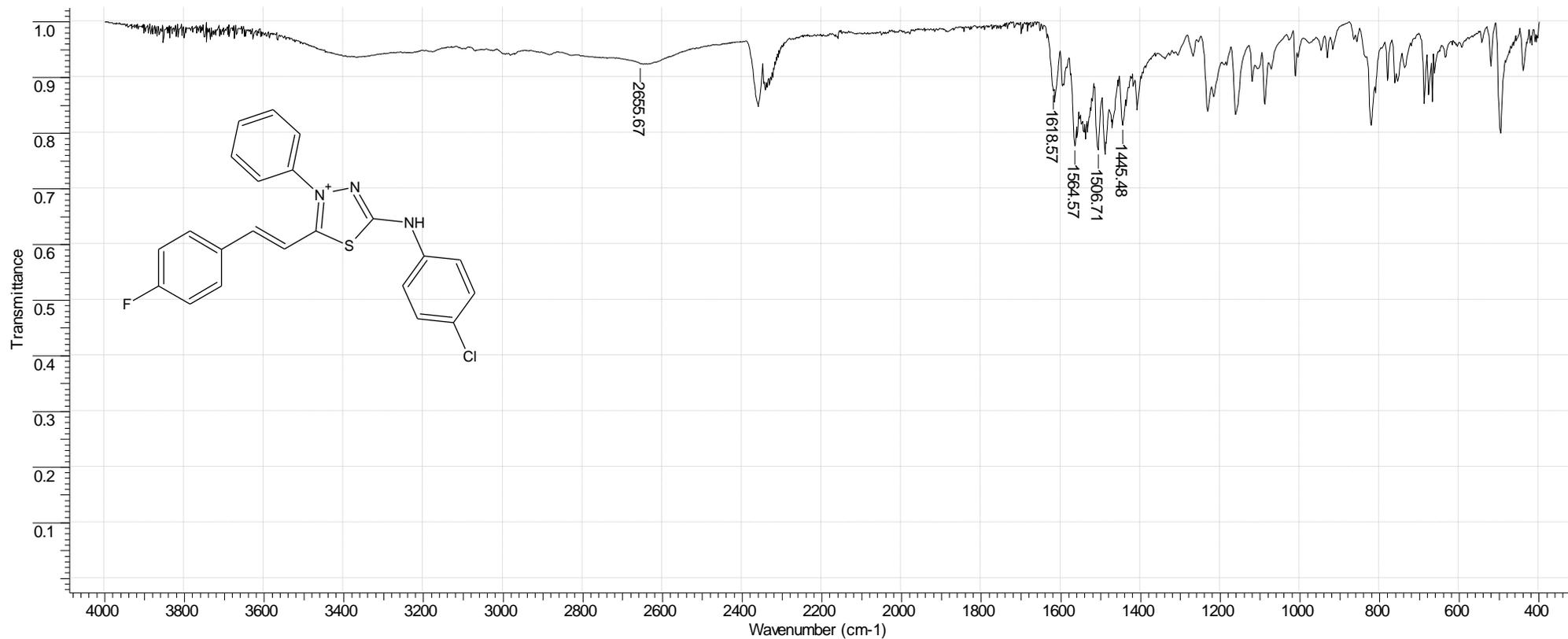
**Espectro 73.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitrofenil)-amina 25



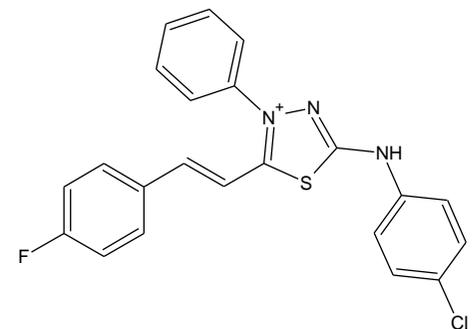
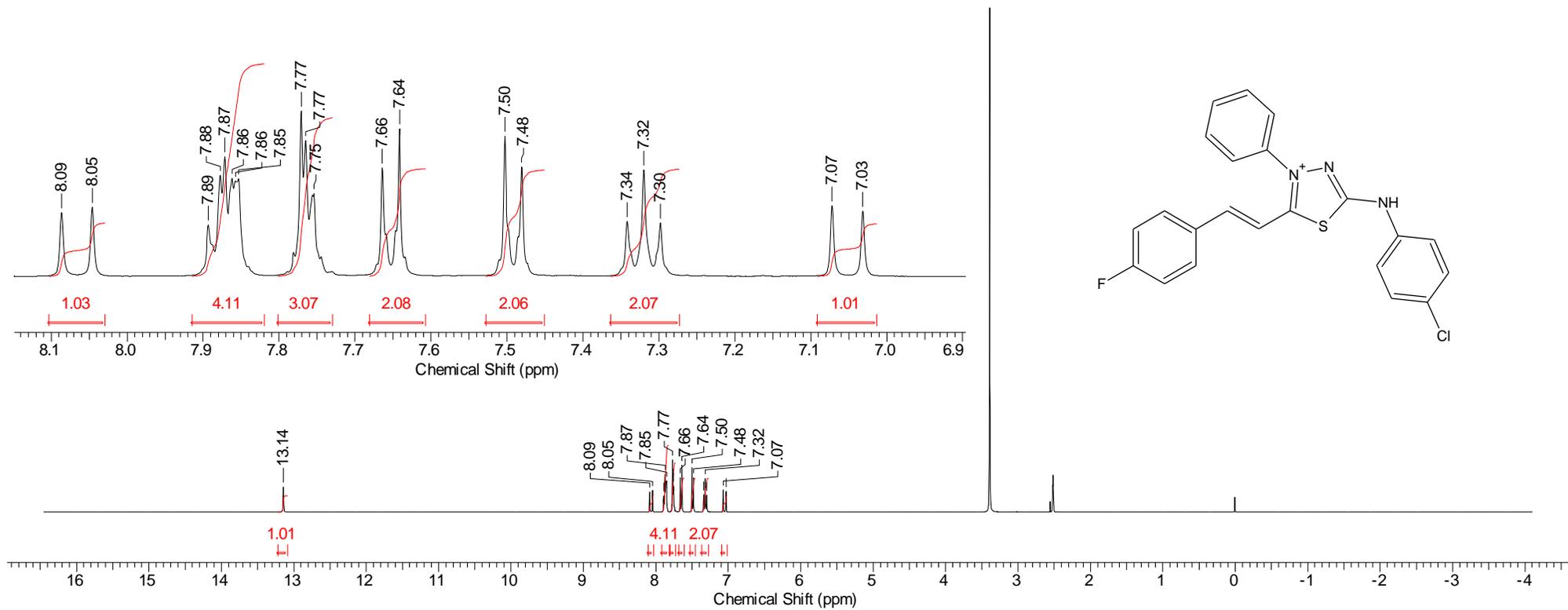
**Espectro 74.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitrofenil)-amina 25



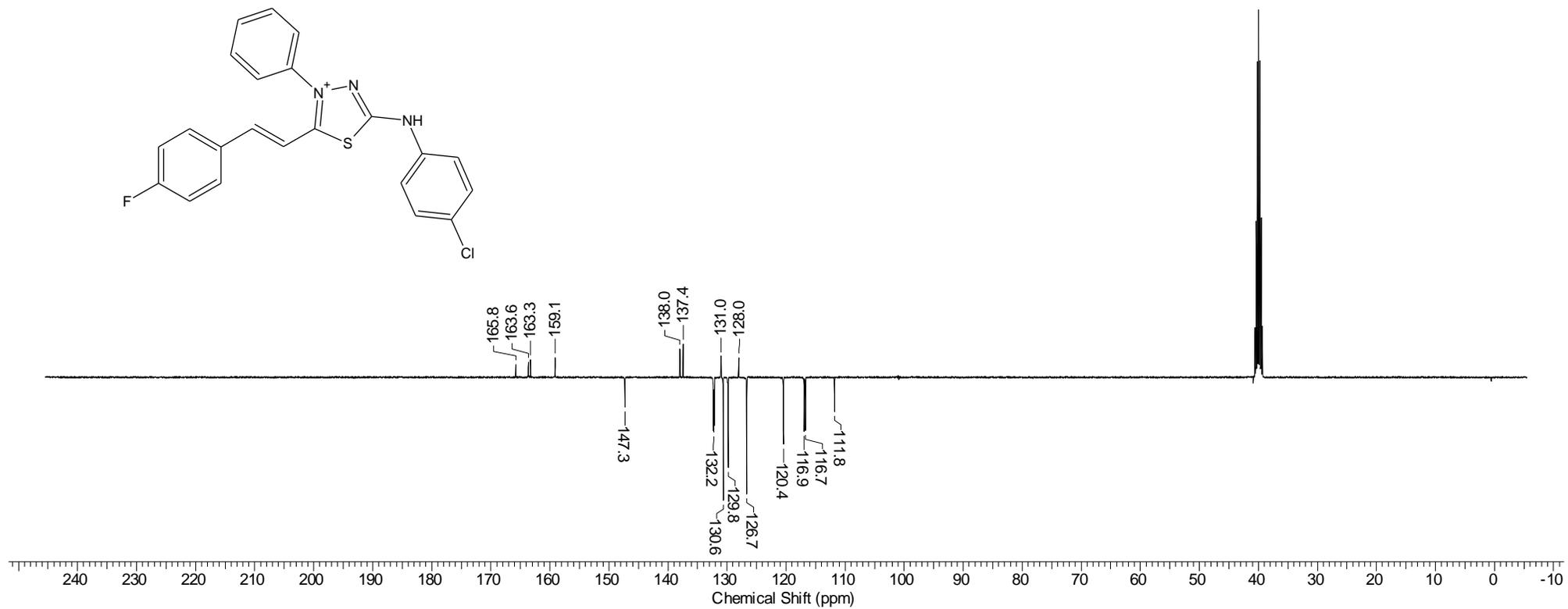
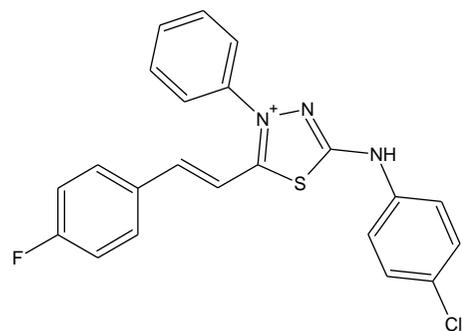
**Espectro 75.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitrofenil)-amina 25



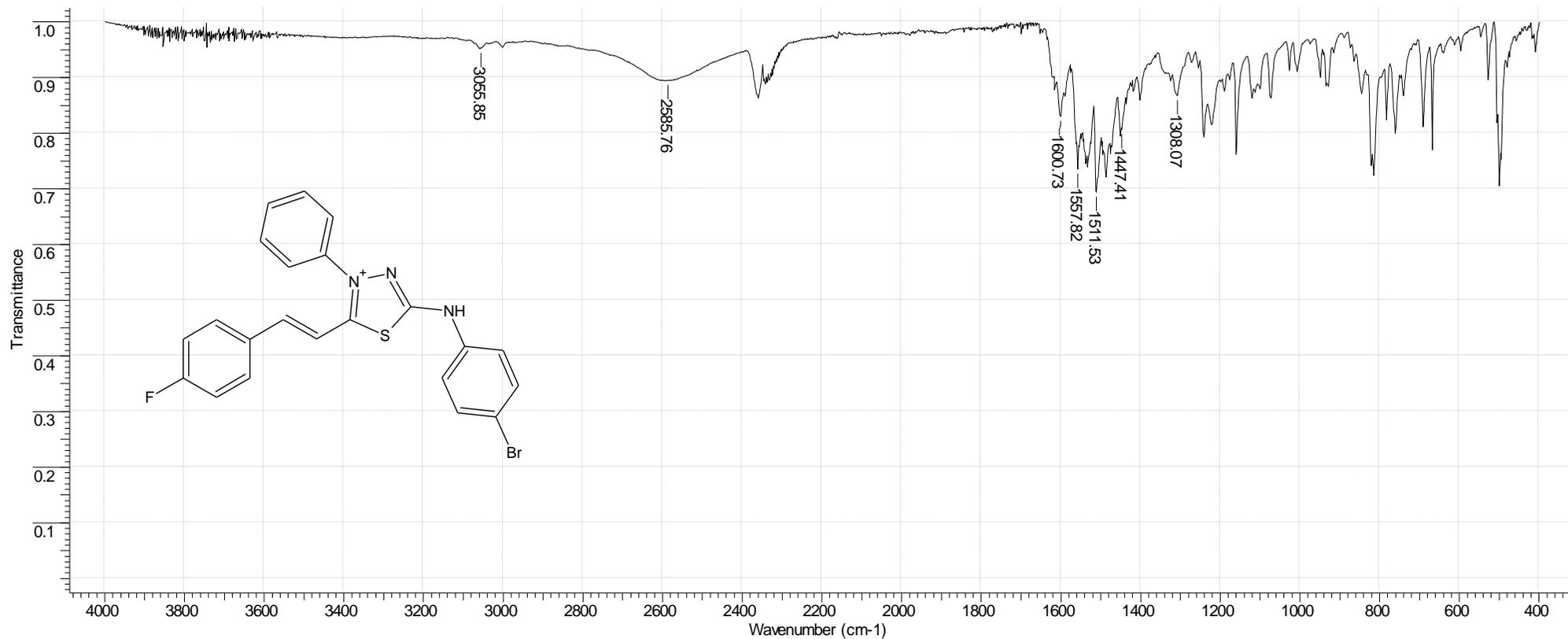
**Espectro 76.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(clorofenil)-amina 26



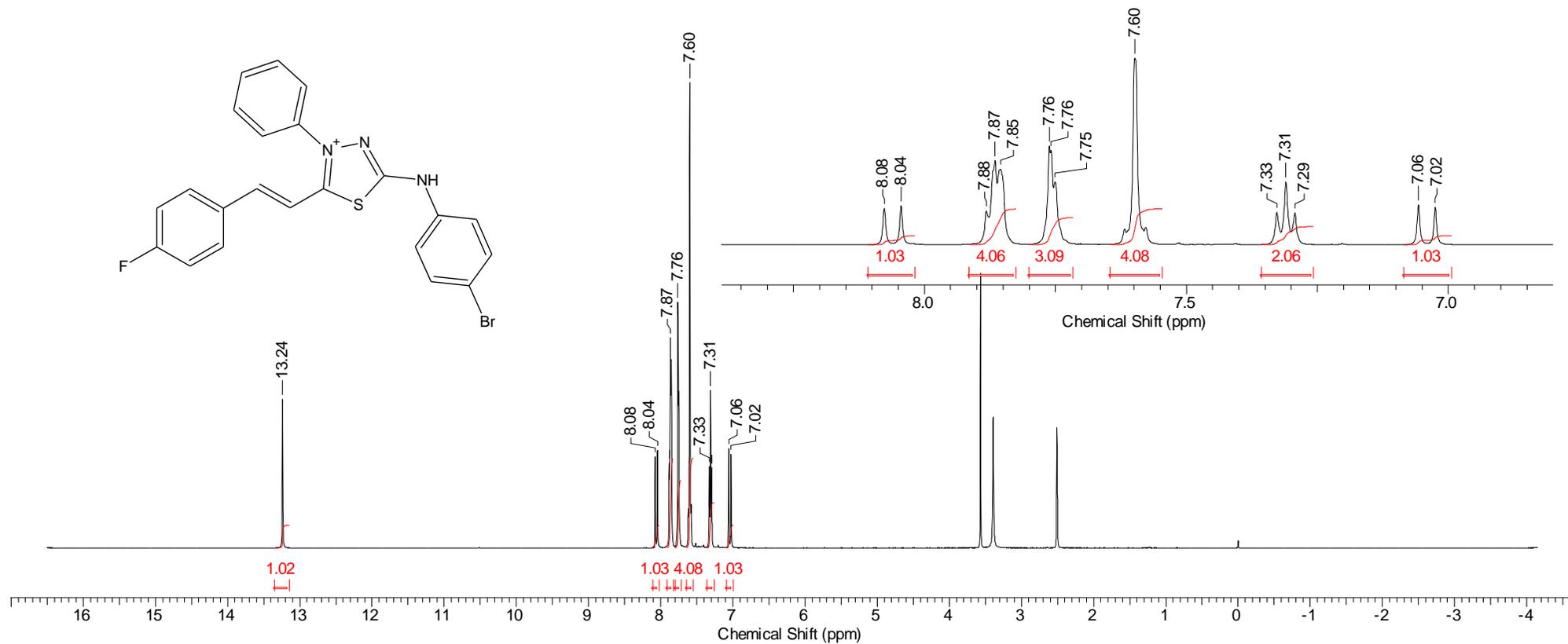
**Espectro 77.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(clorofenil)-amina 26



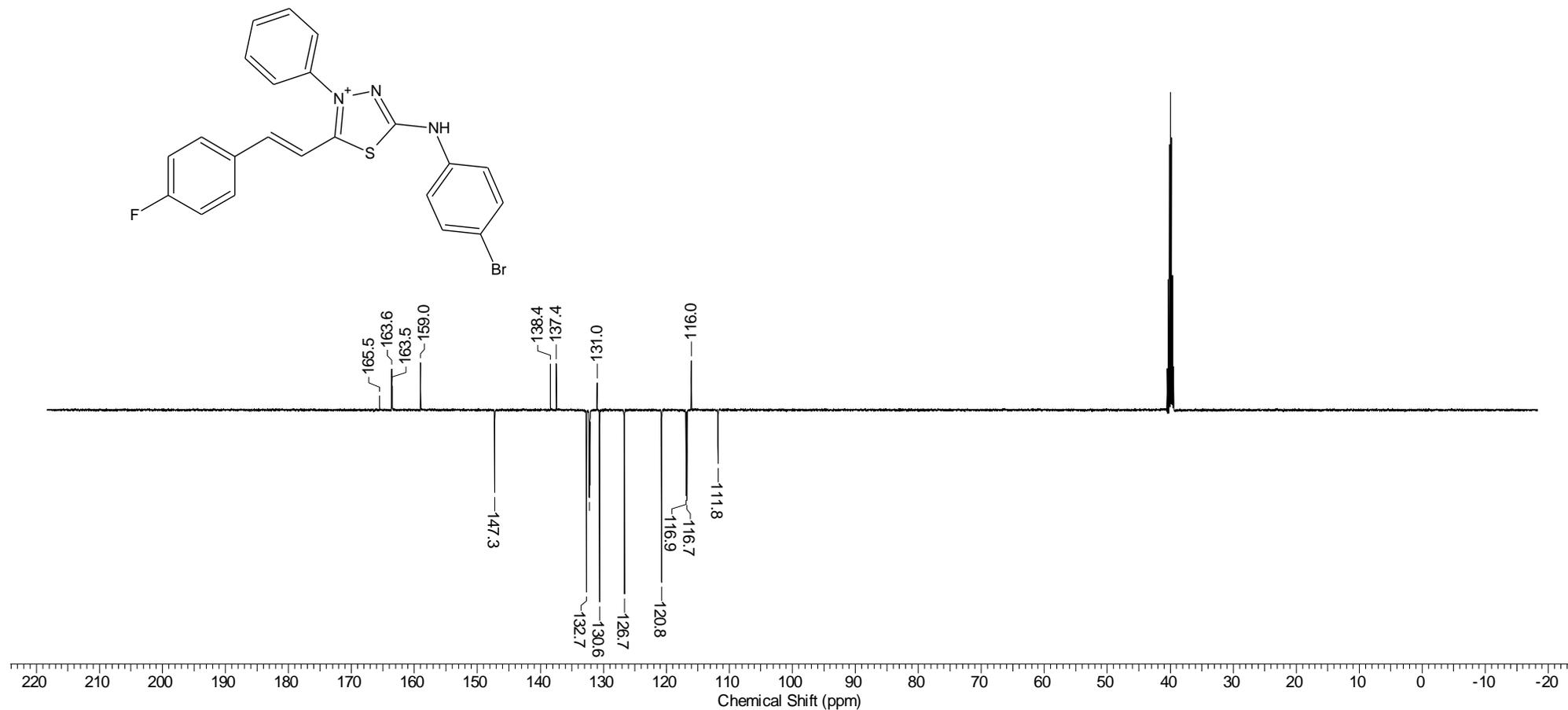
**Espectro 78.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(clorofenil)-amina 26



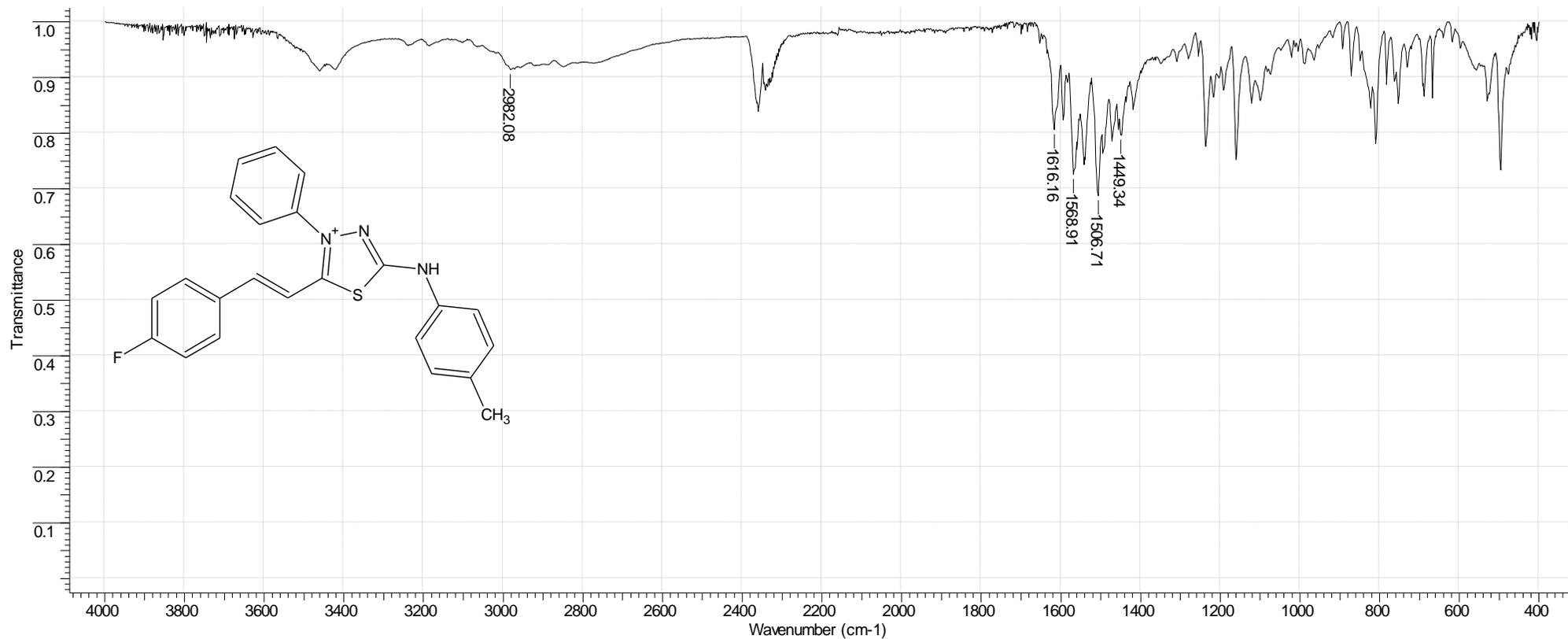
**Espectro 79.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromofenil)-amina 27



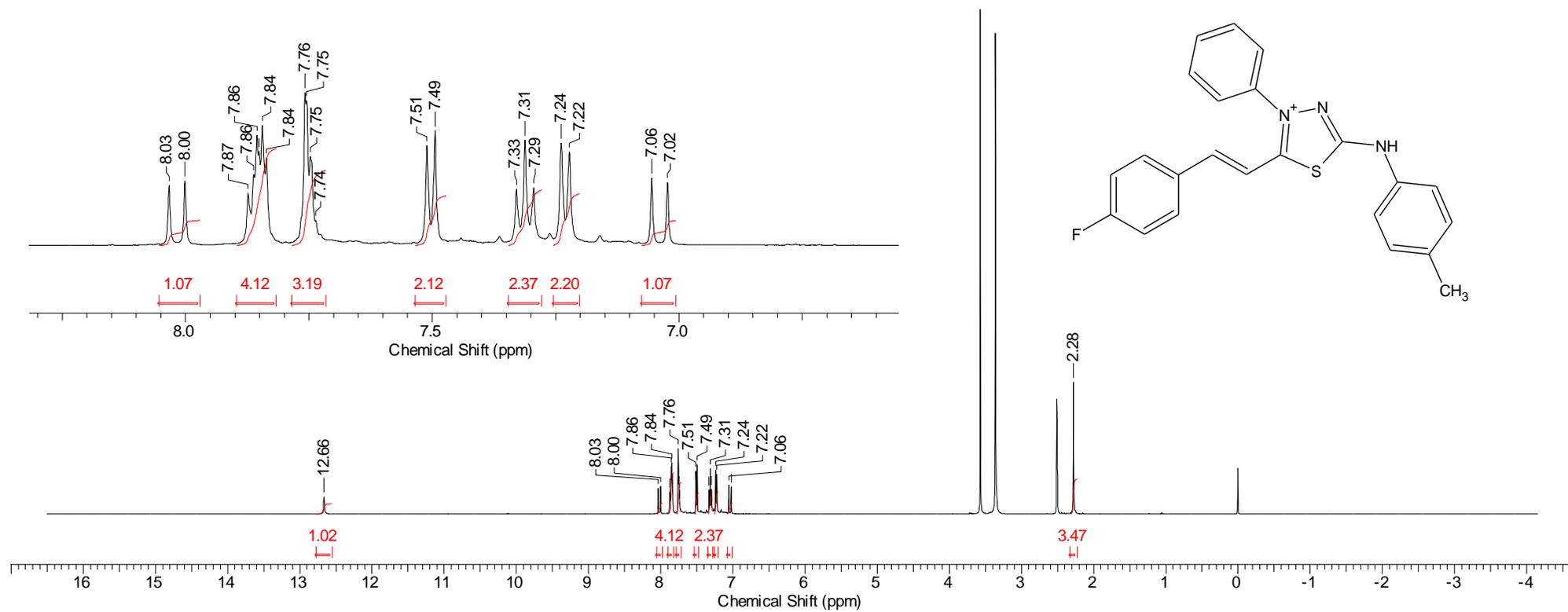
**Espectro 80.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromofenil)-amina 27



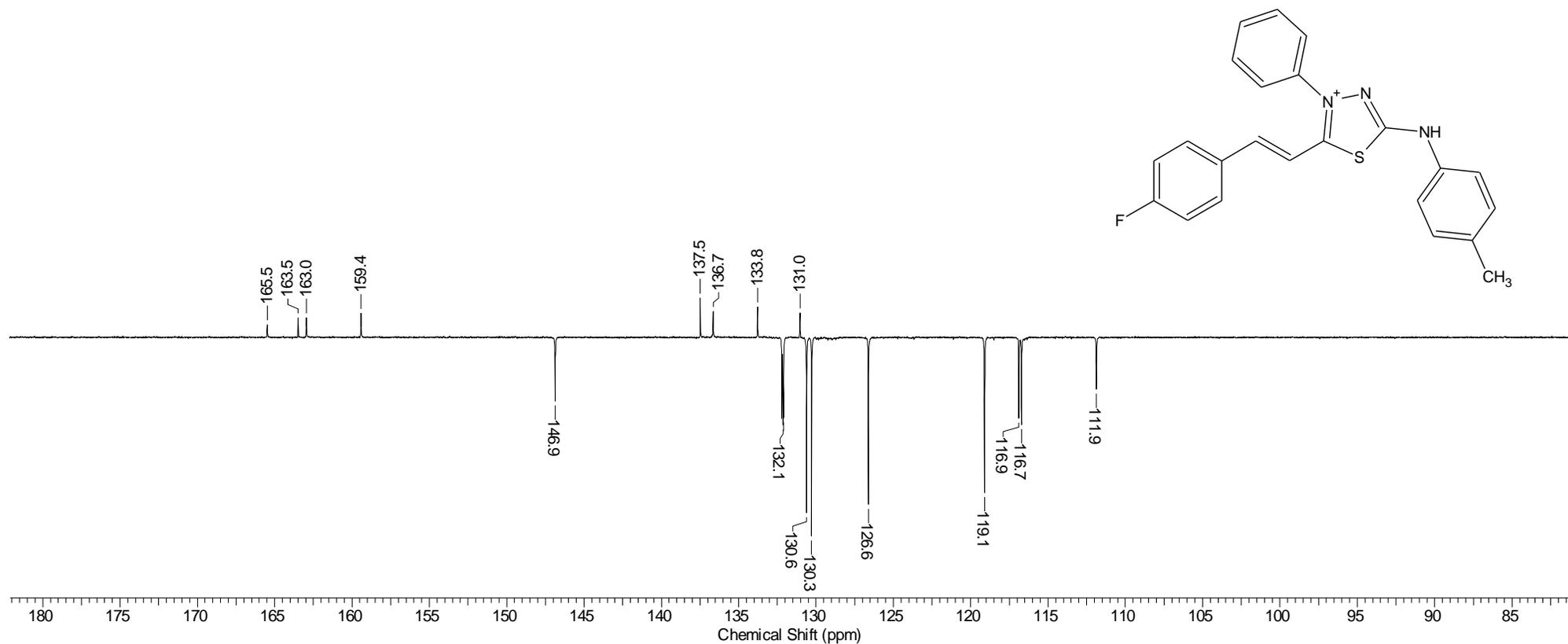
**Espectro 81.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromofenil)-amina 27



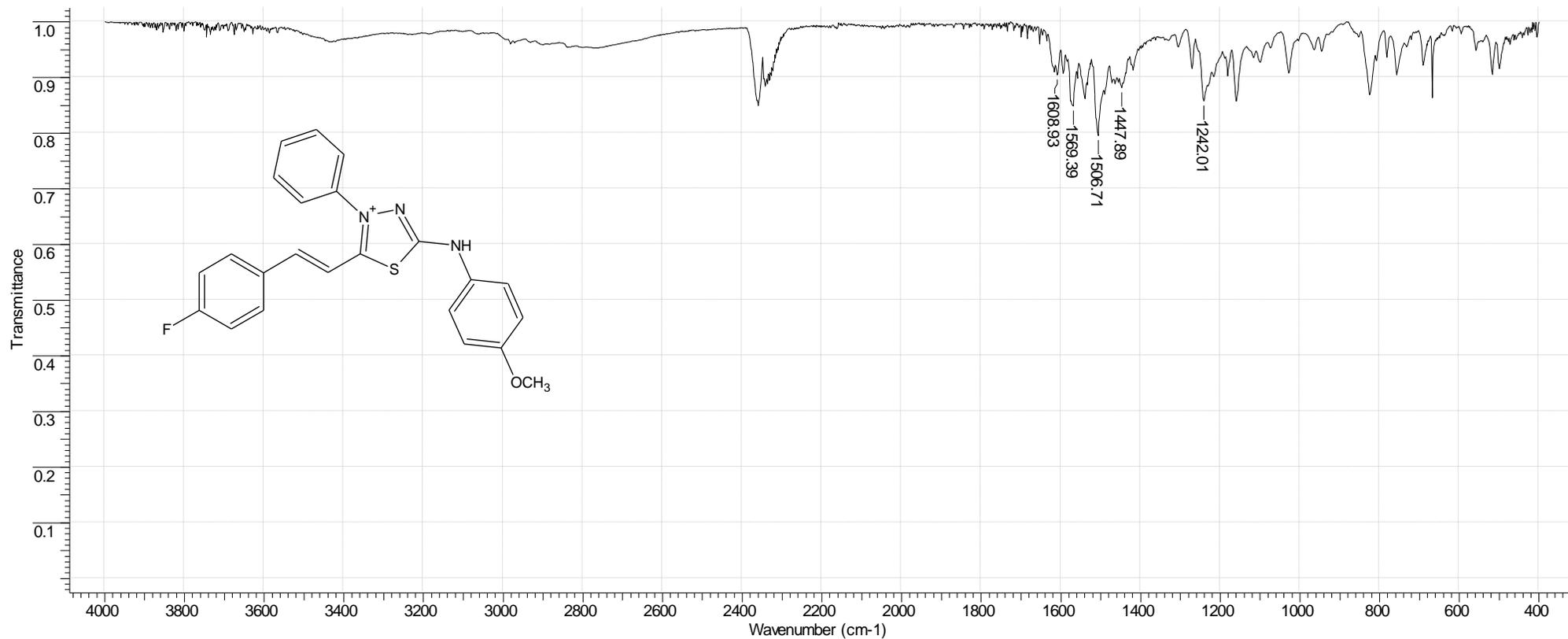
**Espectro 82.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 28



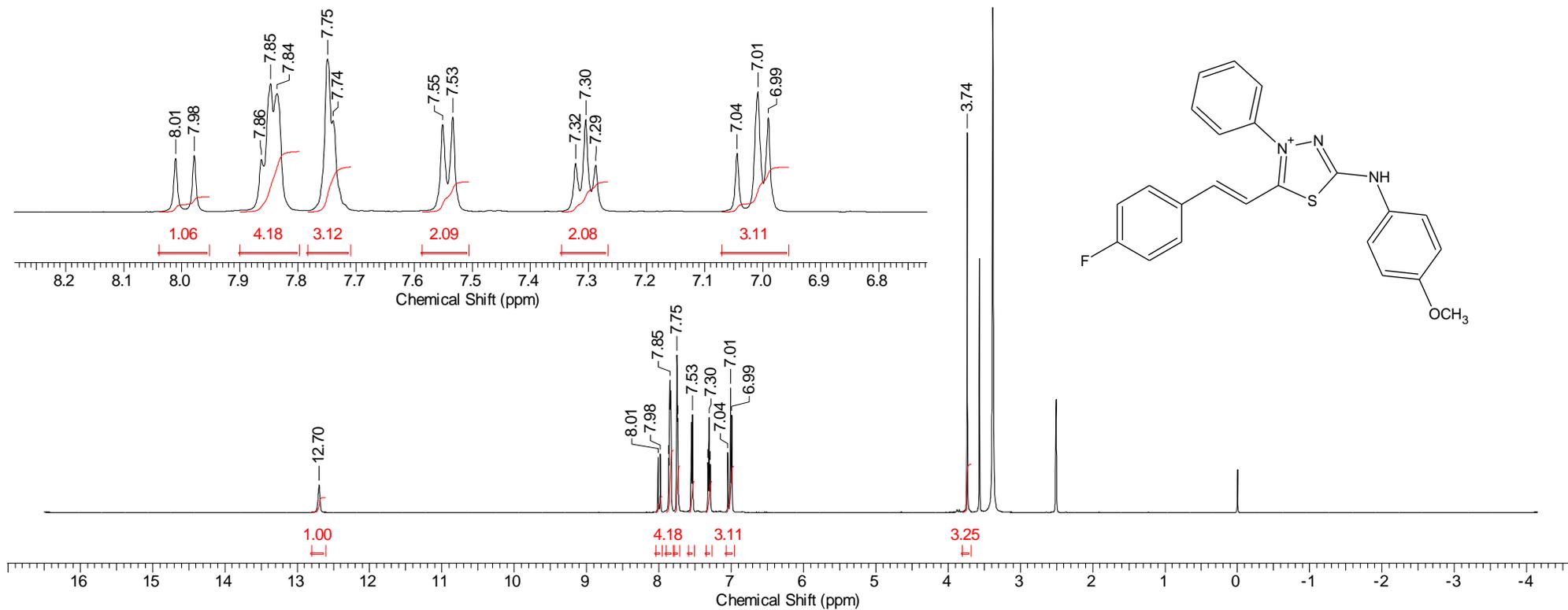
**Espectro 83.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 28



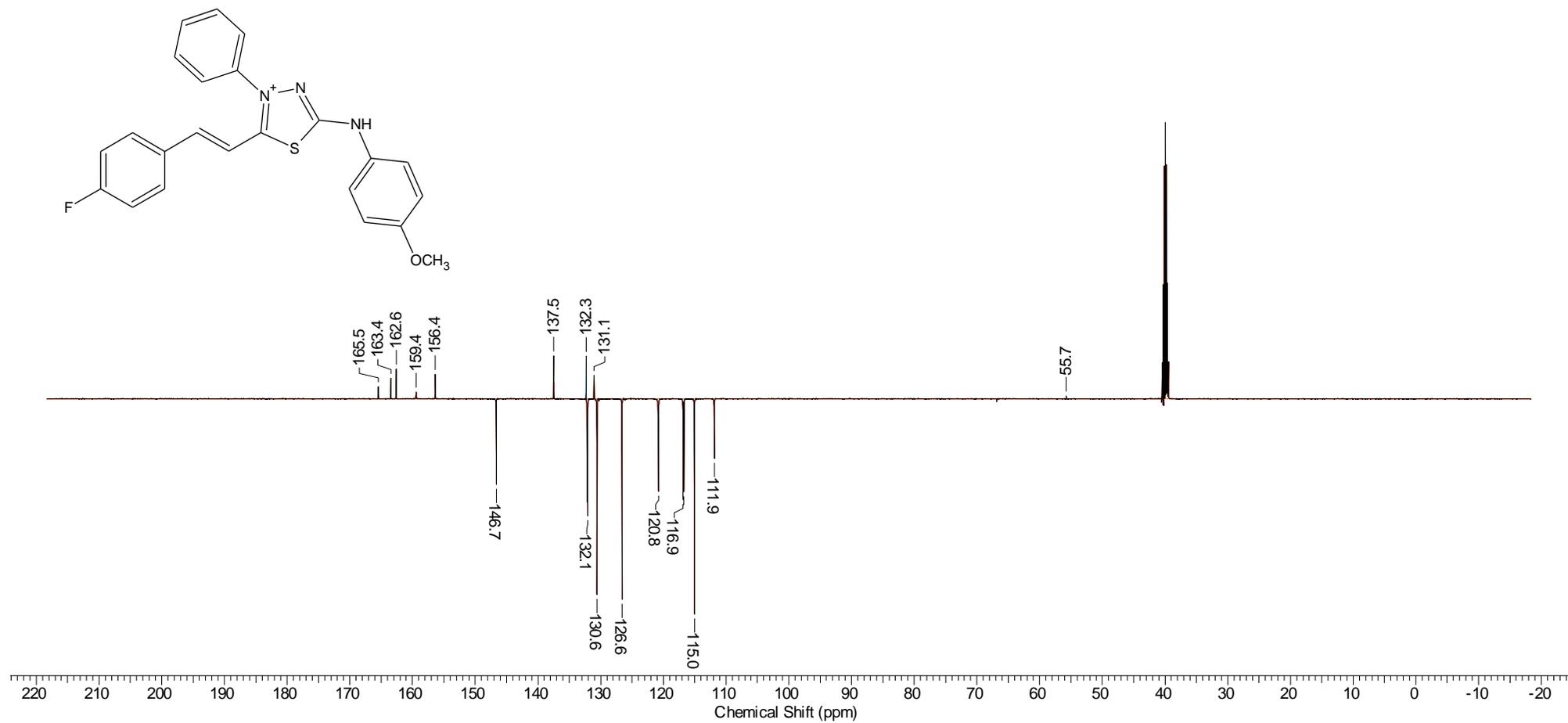
**Espectro 84.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 28



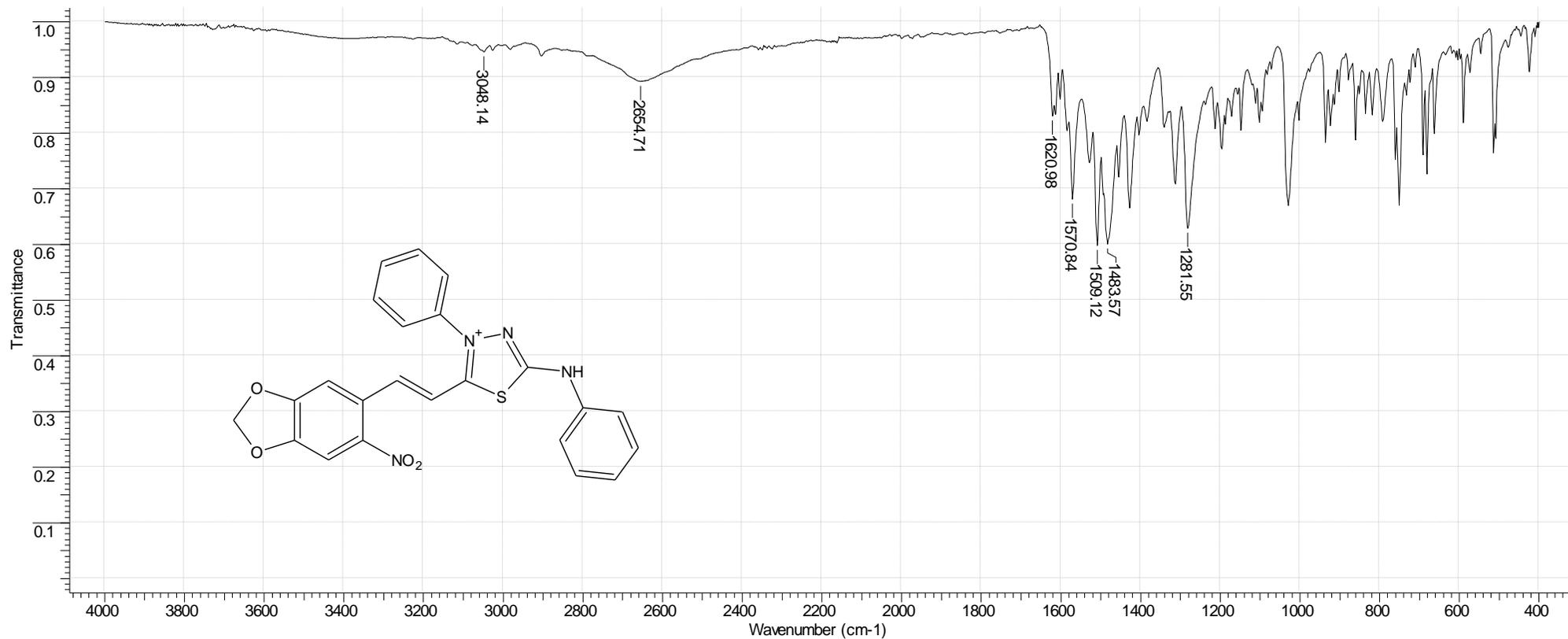
**Espectro 85.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 29



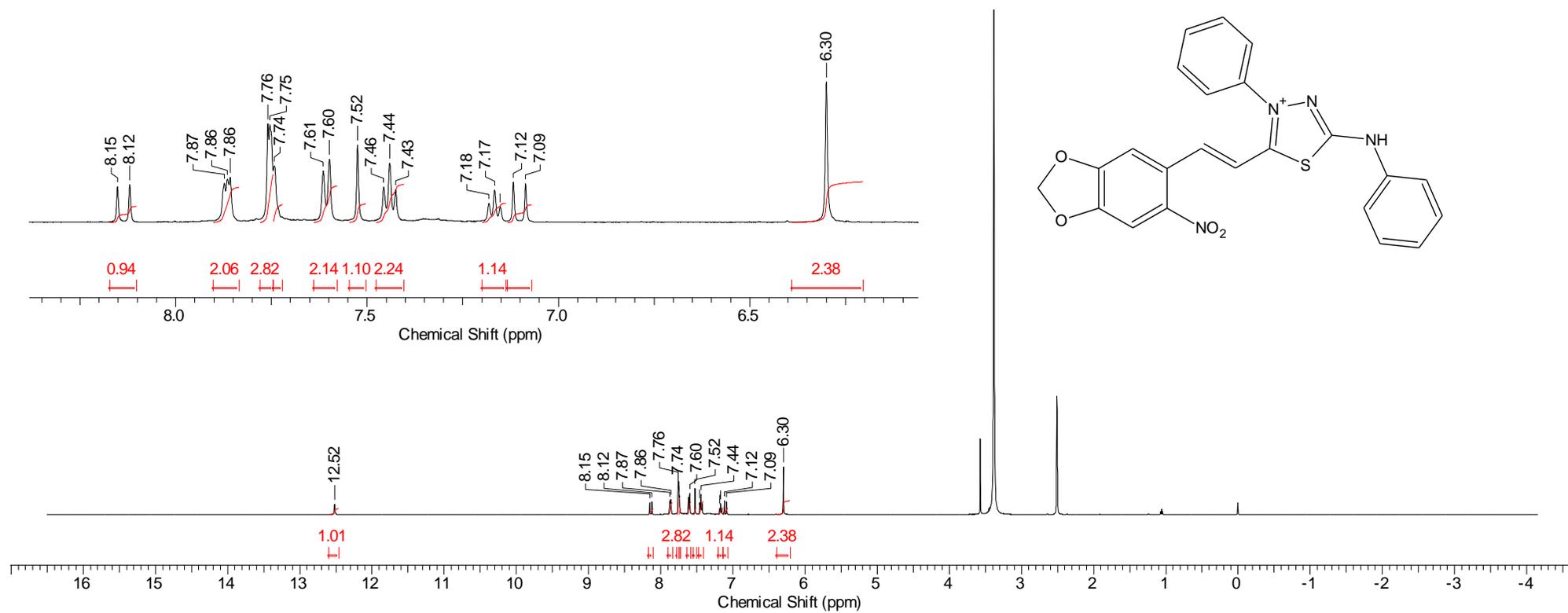
**Espectro 86.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 29



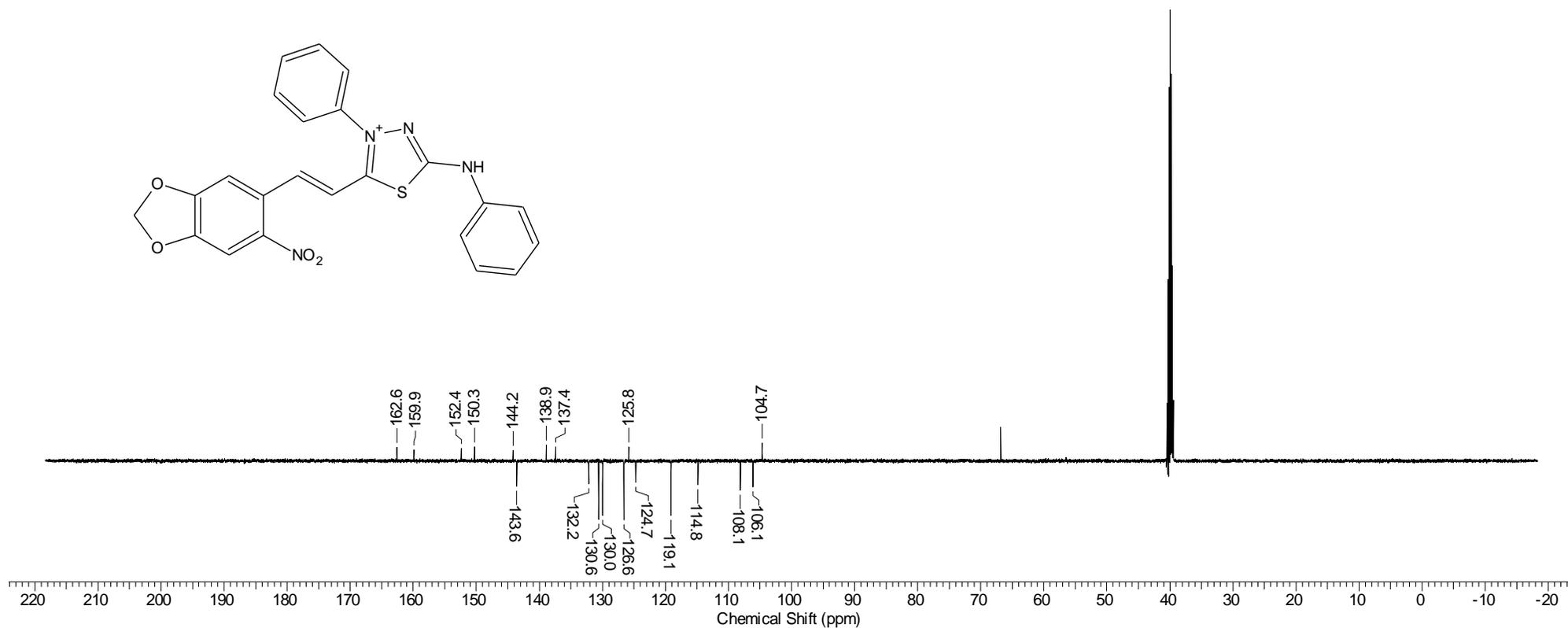
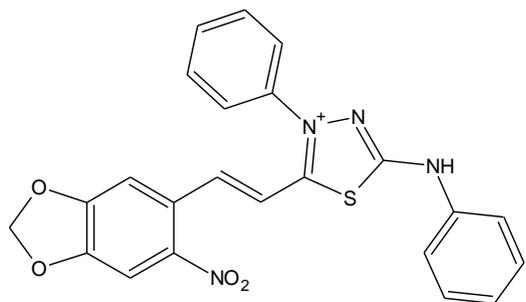
**Espectro 87.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-(4-fluor-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 29



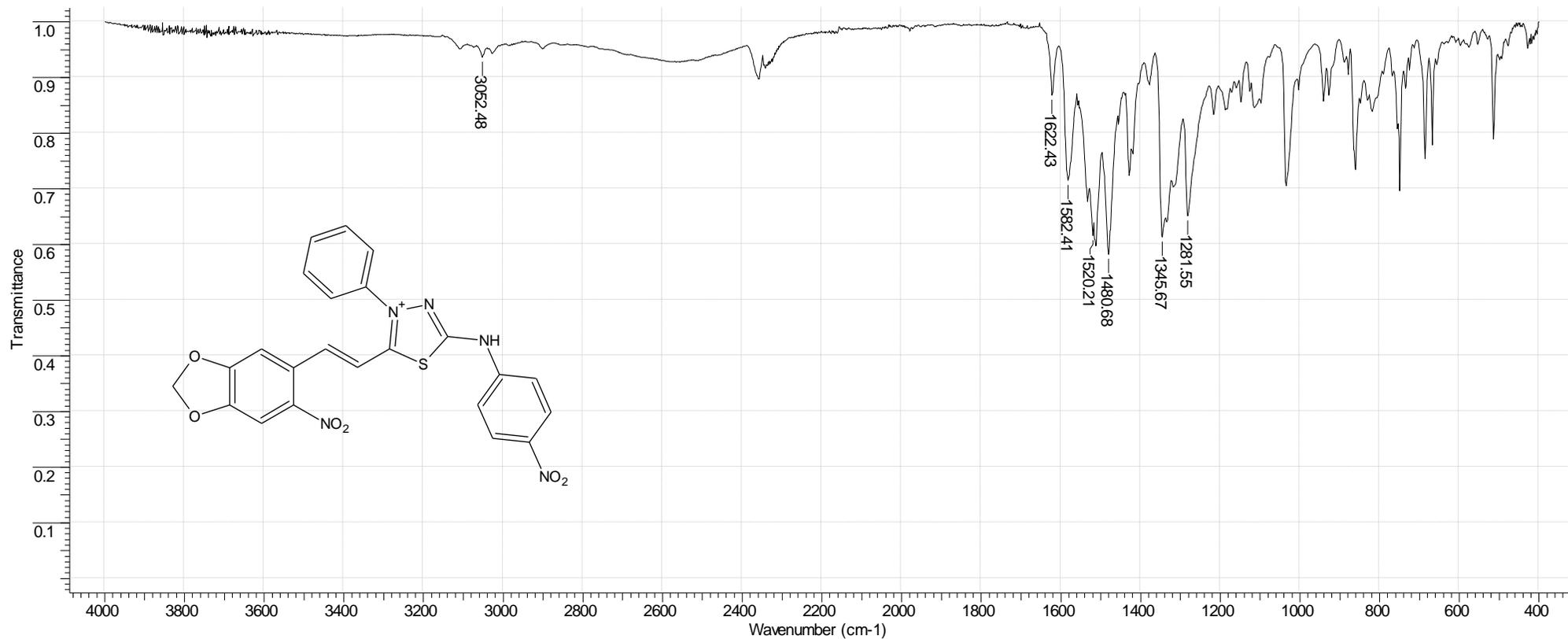
**Espectro 88.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2 fenilamina 30



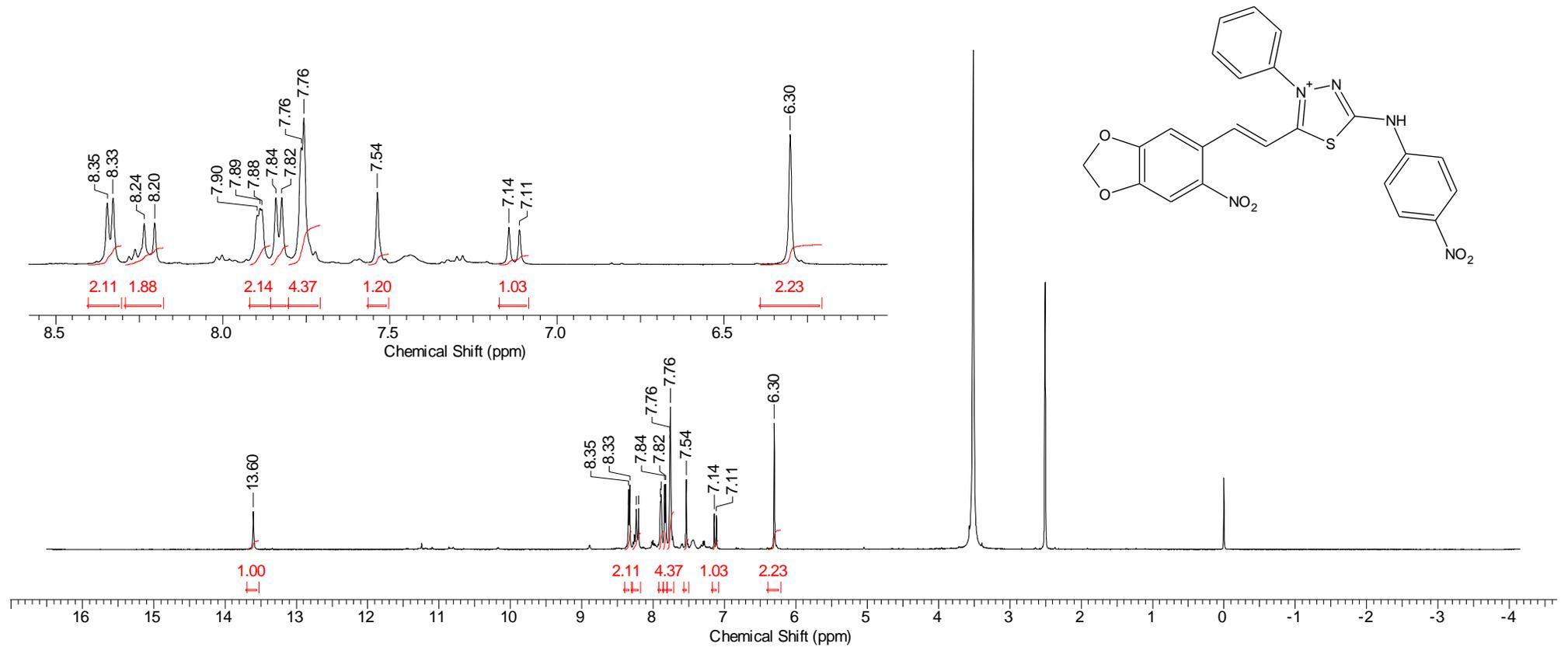
**Espectro 89.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilendioxiifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2 fenilamina **30**



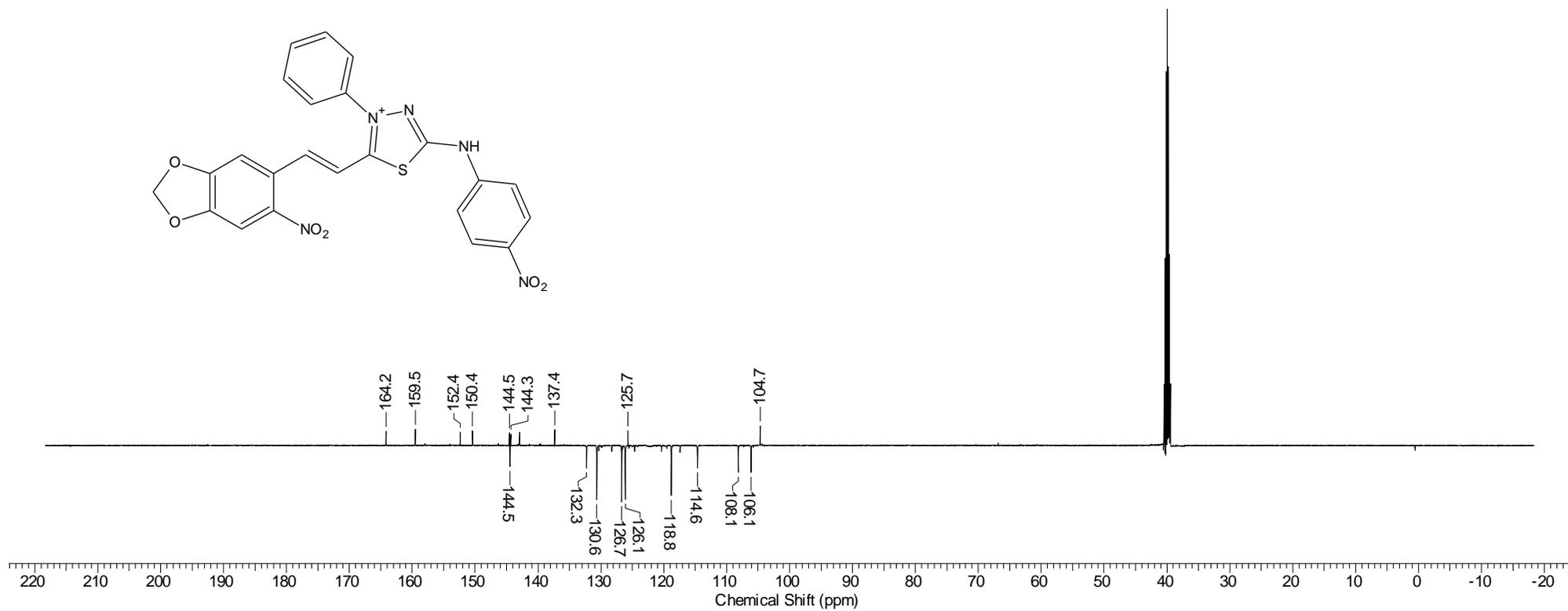
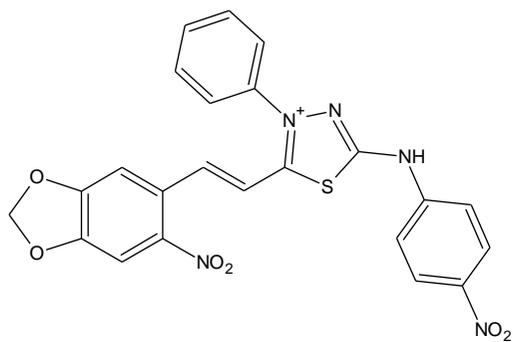
**Espectro 90.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiazólio-2 fenilamina 30



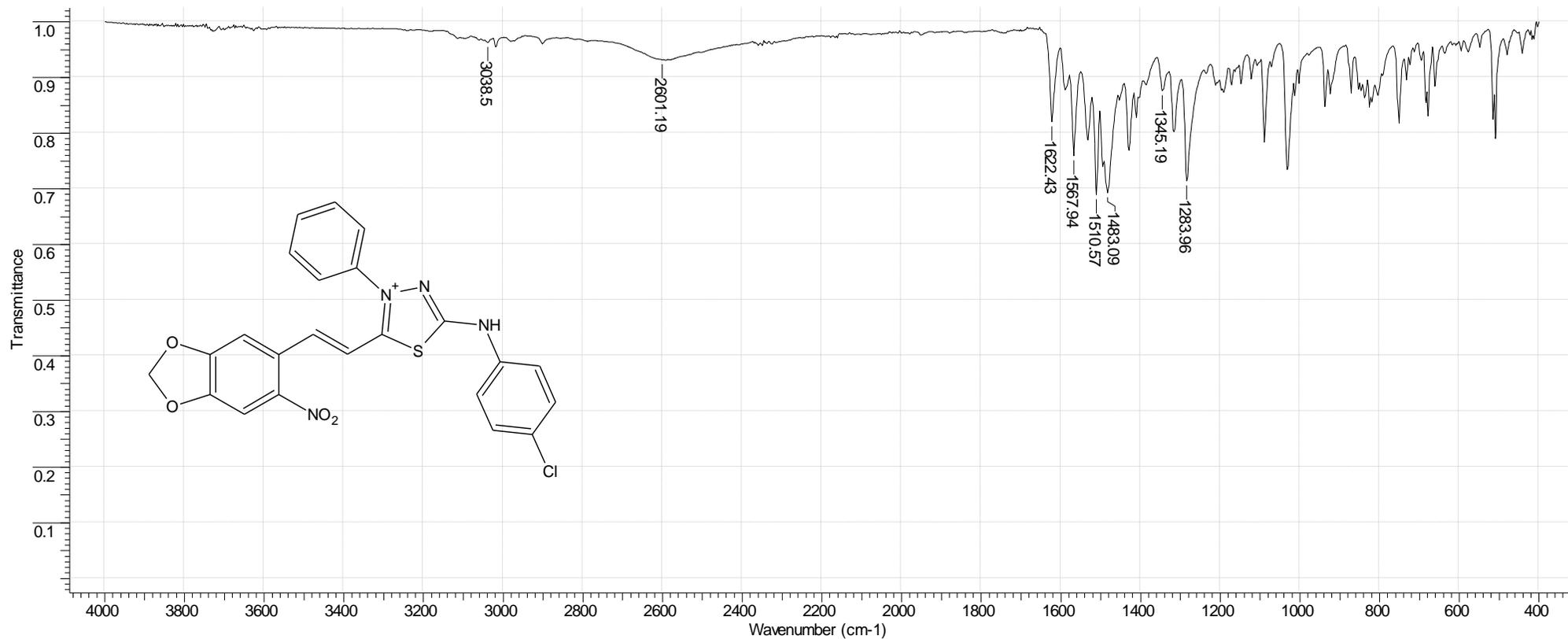
**Espectro 91.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitro-fenil)-amina 31



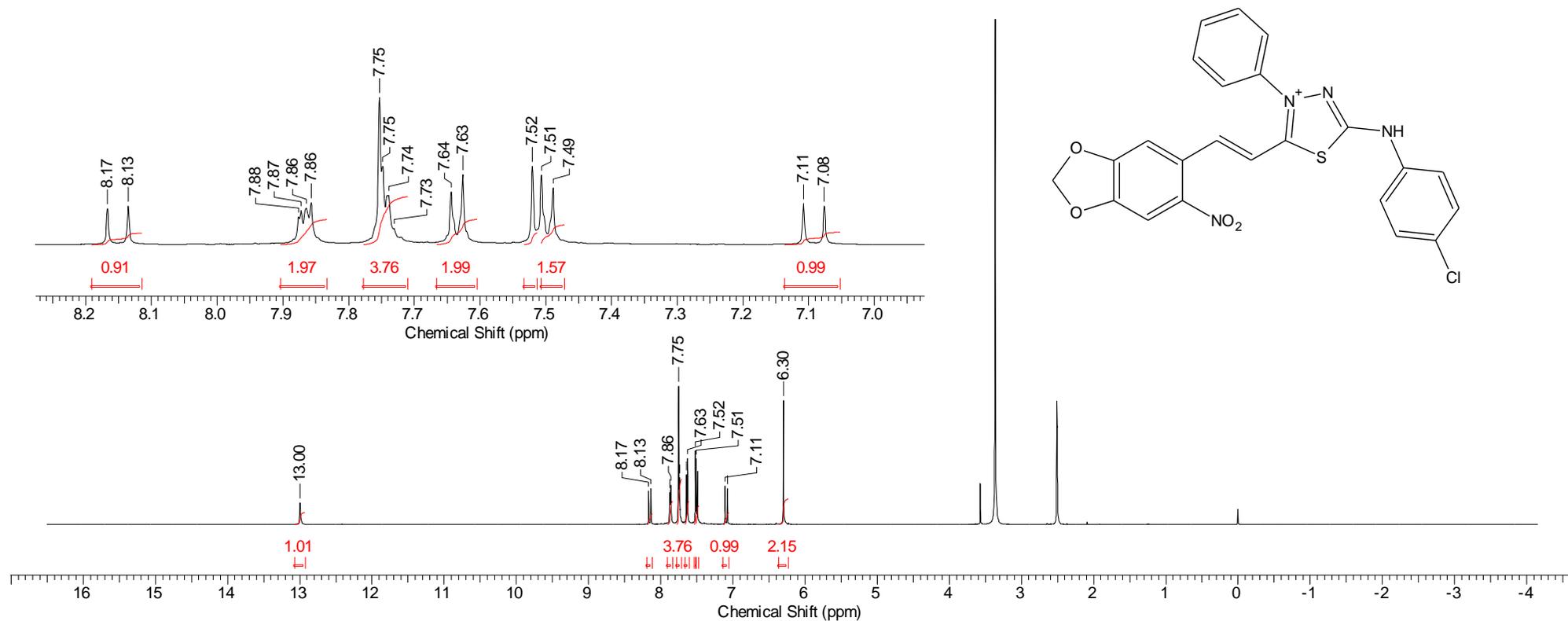
**Espectro 92.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilendioxiifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitro-fenil)-amina 31



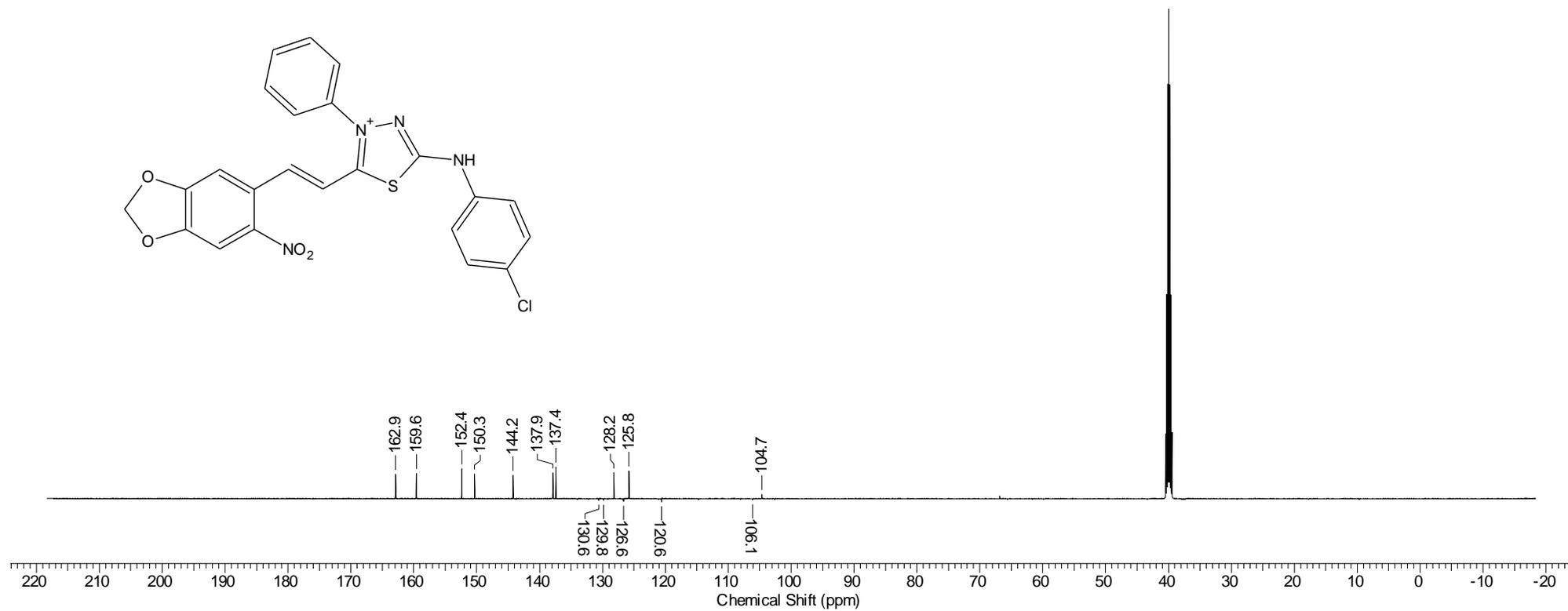
**Espectro 93.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(nitro-fenil)-amina 31



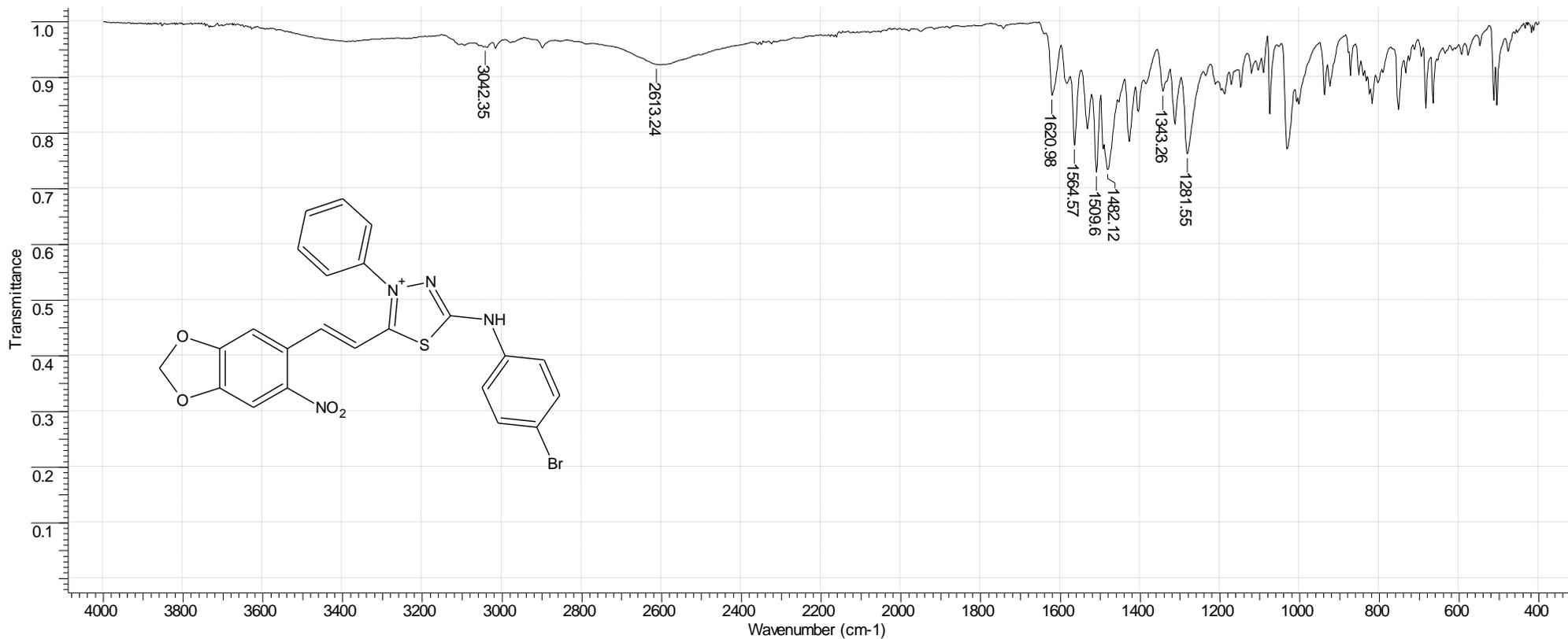
**Espectro 94.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(cloro-fenil)-amina 32



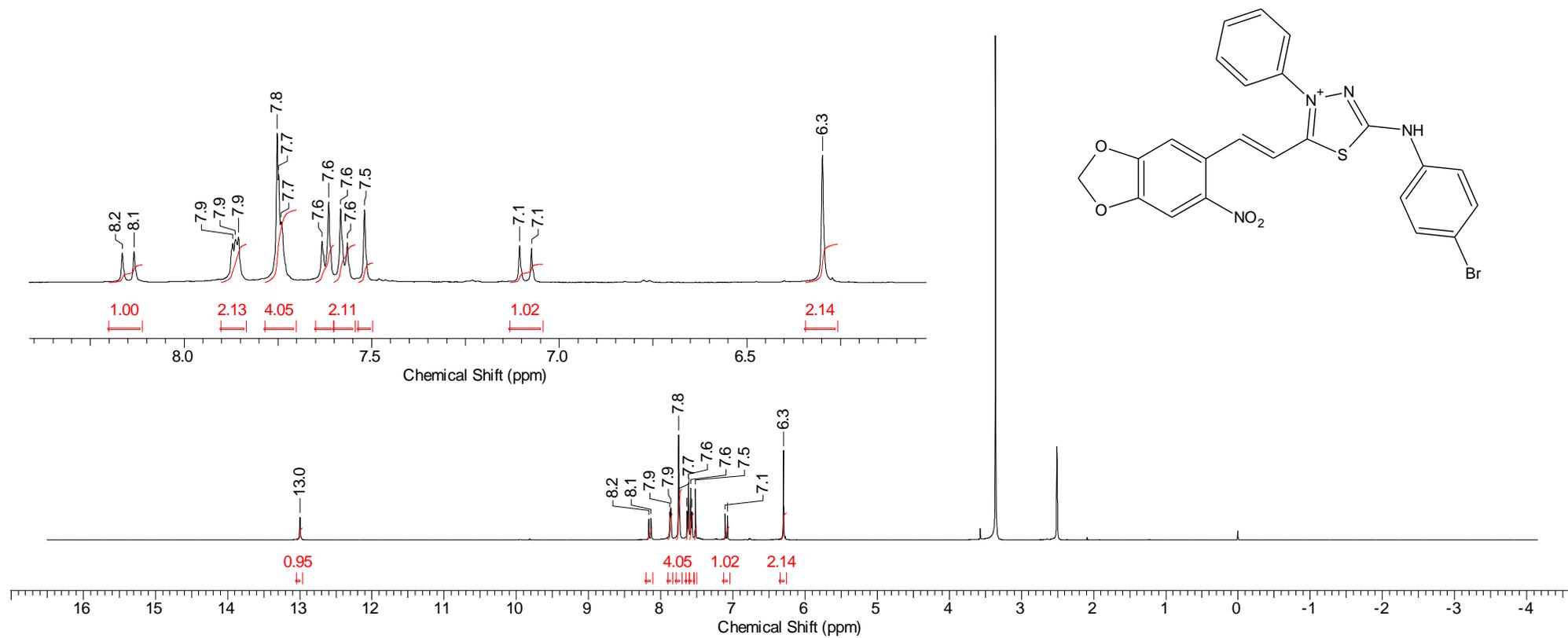
**Espectro 95.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(cloro-fenil)-amina 32



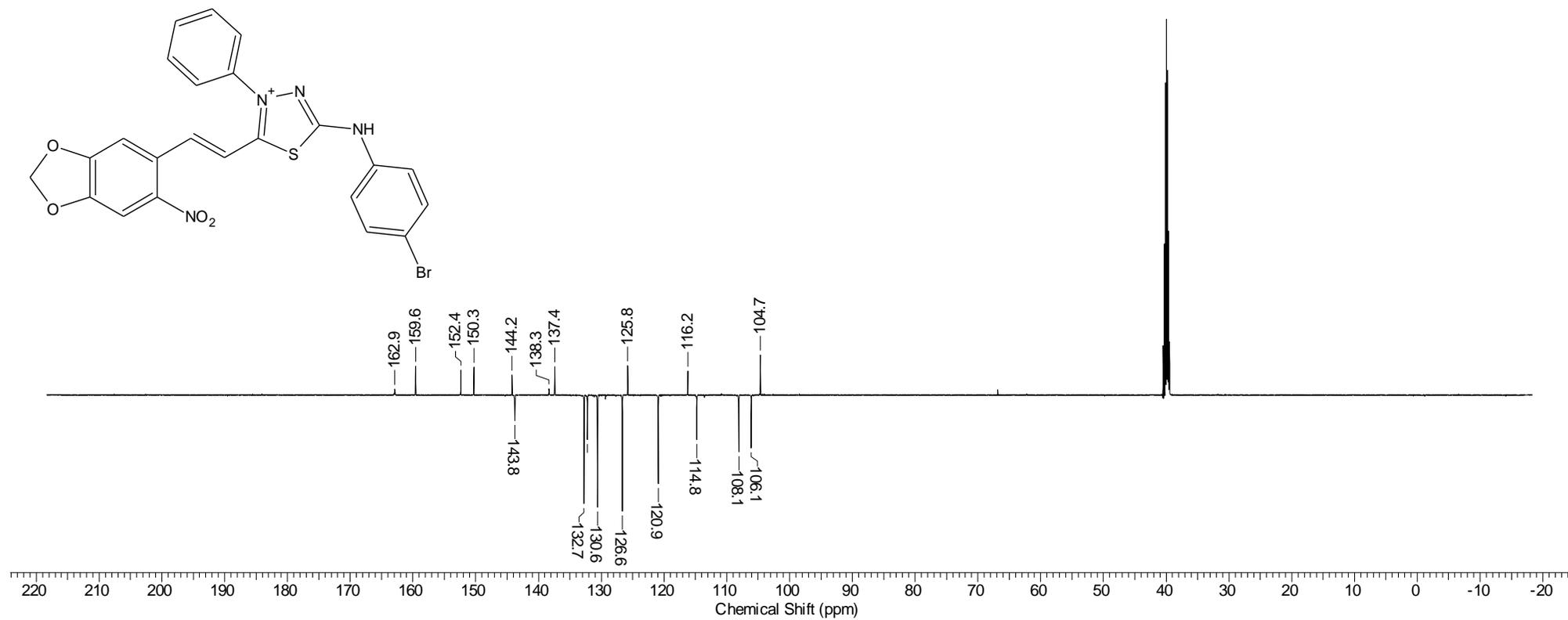
**Espectro 96.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(cloro-fenil)-amina 32



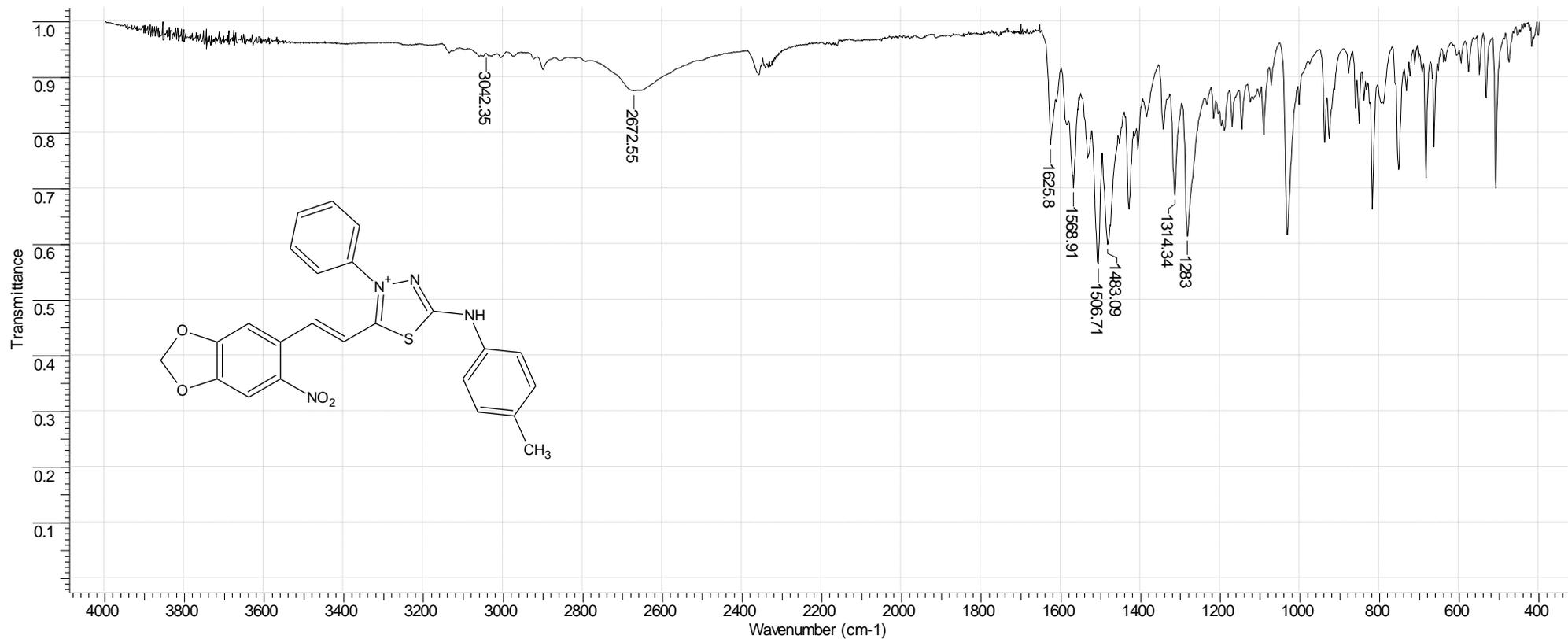
**Espectro 97.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromo-fenil)-amina 33



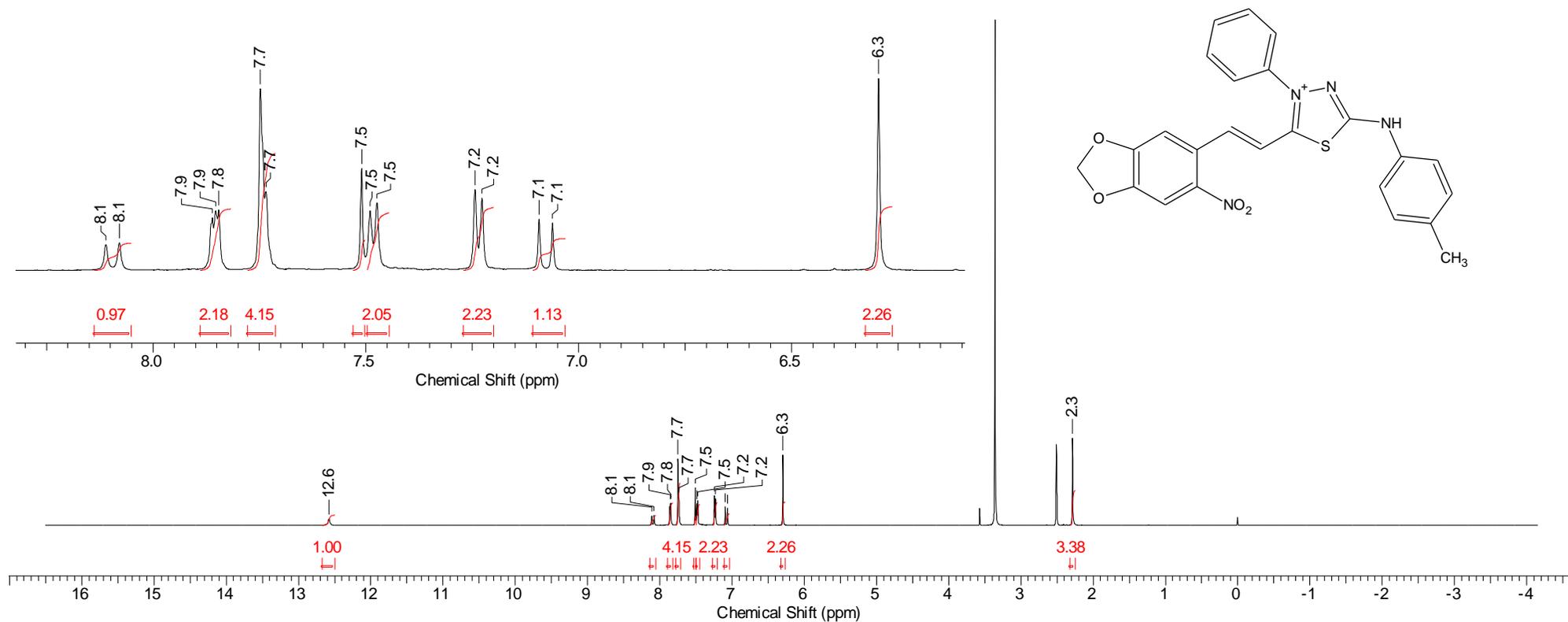
**Espectro 98.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromo-fenil)-amina 33



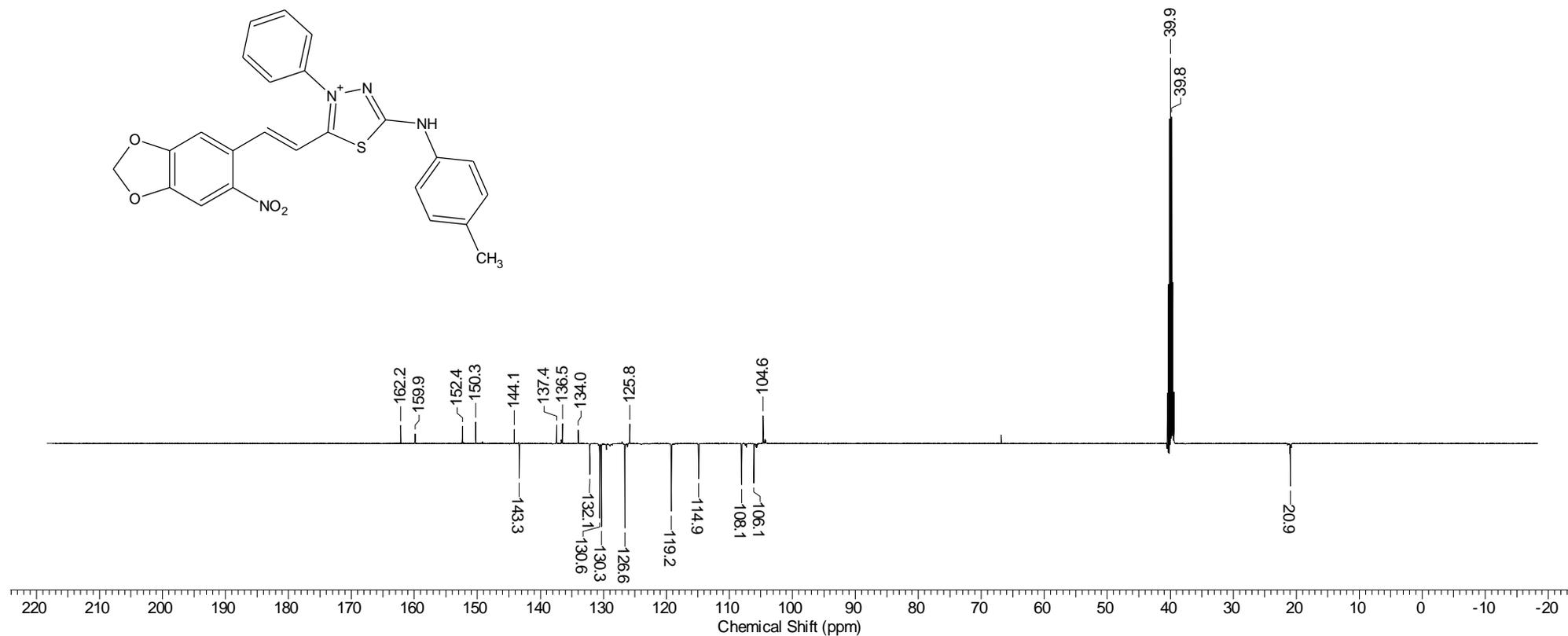
**Espectro 99.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilendioxiifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(bromo-fenil)-amina 33



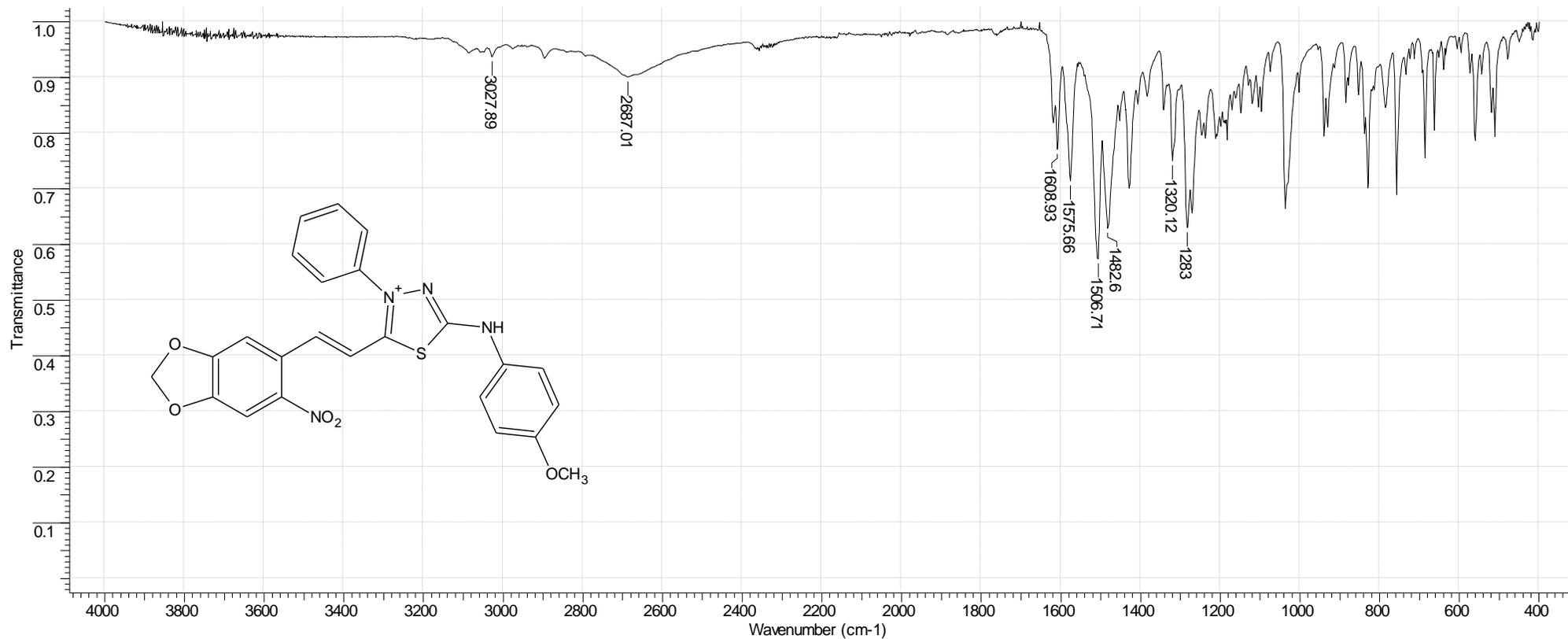
**Espectro 100.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 34



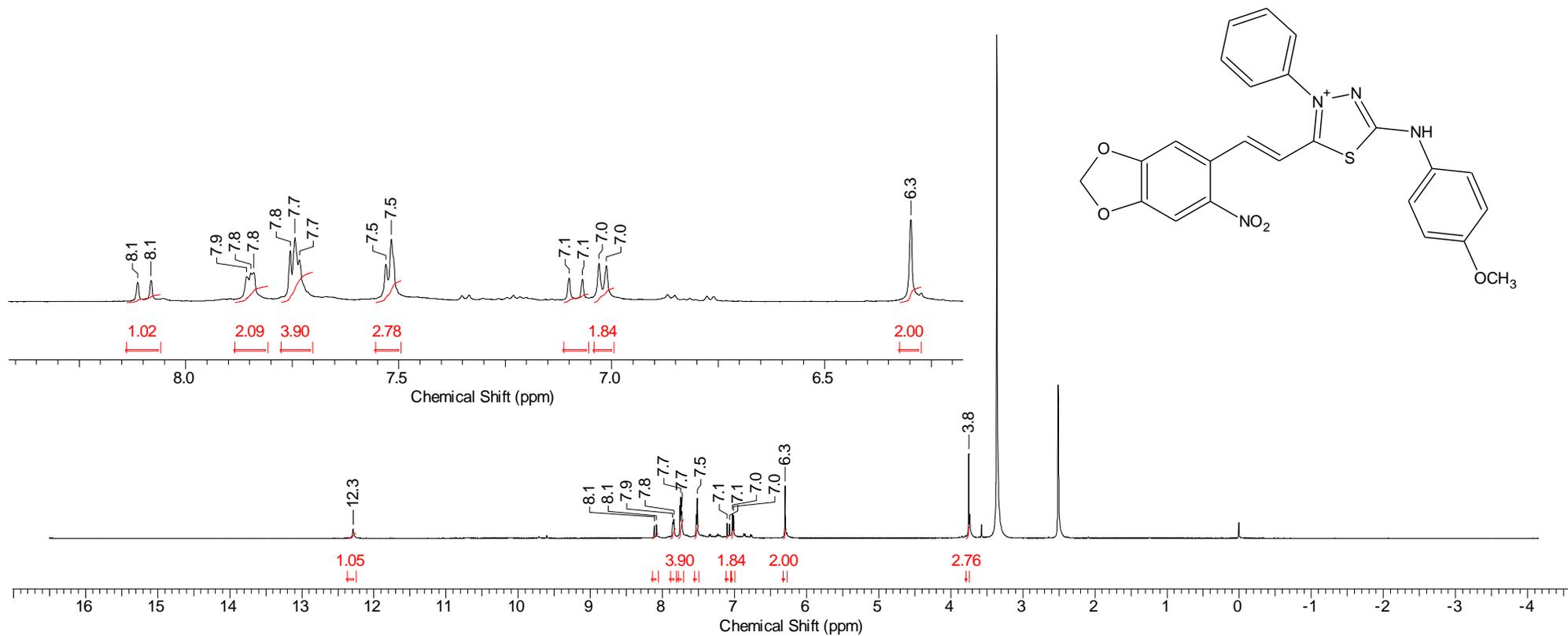
**Espectro 101.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilendioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina **34**



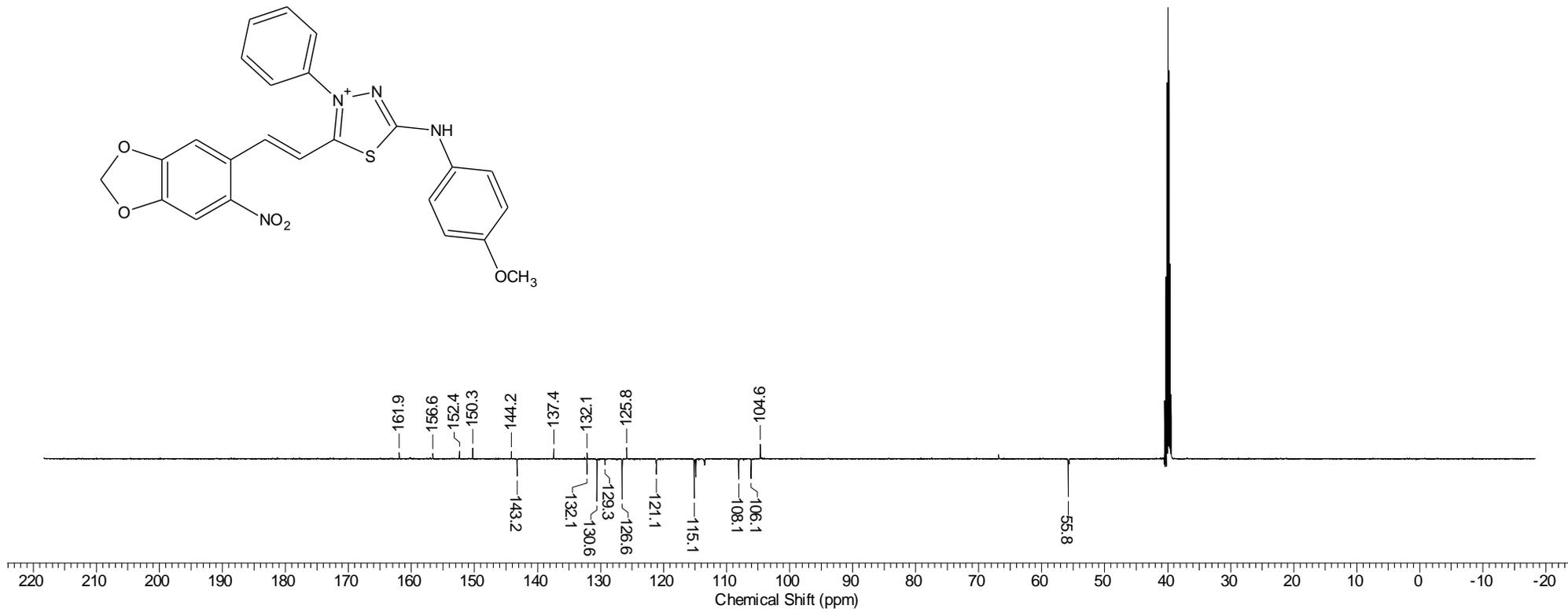
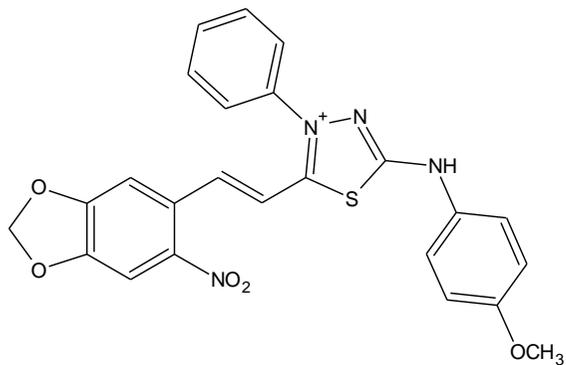
**Espectro 102.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(toluil)-amina 34



**Espectro 103.** Espectro de IV do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilendioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 35



**Espectro 104.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilenodioxifenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina 35



**Espectro 105.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do cloridrato de 4-fenil-5-[2-(6'-nitro-3',4'-metilendioxi-fenil)-(E)-etenil]-1,3,4-tiadiazólio-2-(metoxi-fenil)-amina