

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTICÂNCER DE
HIDRAZINO-CARBOTIOAMIDAS E COMPOSTOS MESOIÔNICOS
DA CLASSE 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDAS**

DANILO SOUSA PEREIRA

2019



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

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTICÂNCER DE
HIDRAZINO-CARBOTIOAMIDAS E COMPOSTOS MESOIÔNICOS
DA CLASSE 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDAS**

DANILO SOUSA PEREIRA

Sob orientação da Professora

Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

e Co-orientação da Professora

Dra. Ana Paula Pereira da Silva

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

Seropédica-RJ
Março de 2019

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

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

P436s Pereira, Danilo Sousa, 1990-
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTICÂNCER DE
HIDRAZINO-CARBOTIOAMIDAS E COMPOSTOS MESOIÔNICOS DA
CLASSE 1,3,4-TIADIAZÓLIO-2-AMINIDAS / Danilo Sousa
Pereira. - 2019.
168 f.: il.

Orientadora: Aurea Echevarria Aznar Neves Lima.
Coorientadora: Ana Paula Pereira da Silva .
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA,
2019.

1. Câncer. 2. Hidrazino-Carbotioamida. 3.
Cloridrato Mesoiônico. 4. Enzima Tirosinase. 5. HTLV
1. I. Lima, Aurea Echevarria Aznar Neves , 1950-,
orient. II. da Silva , Ana Paula Pereira , -,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA. IV.
Título.

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

DANILO SOUSA PEREIRA

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

TESE APROVADA EM 29/03/2019.



Aurea Echevarria Aznar Neves Lima – IQ-UFRRJ
(Orientadora – presidente)



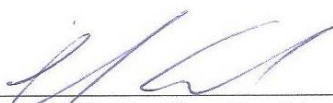
Luiz Carlos da Silva Pinheiro - FIOCRUZ-RJ



Ana Carolina Leal - INTO



Roberta Katlen Fusco Marra – IQ-UFRRJ



Cedric Stephan Graebin – IQ-UFRRJ

Dedico esta conquista aos meus queridos pais Dinalva e Dair, minhas irmãs Danielle e Diana e ao meu sobrinho amado Vinicius. À professora Aurea Echevarria, por seus ensinamentos sobre ciência e vida. É um prazer tê-la como orientadora! Também dedico ao Guilherme Andrade, obrigado pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À Professora Aurea Echevarria pela orientação e amizade.

Agradeço aos meus amigos Cayoco Ponzoni, Carla Goulart, Camilla dos Reis, Cristiane Frauches, Nathália Drummond, Carla Cristina, Igor Rezende, Lídia, Lohanne, Dandara e Margareth Rose pelo companheirismo durante minha vida acadêmica.

Ao meu grande amigo presente Ronaldo Amaral.

Às professoras pesquisadoras Márcia Cristina, Juliana Echevarria, Amanda Cavalcanti, Ana Paula Pereira, Maria Raquel Garcia e Andressa Esteves.

Ao mestre Otávio Chaves.

Aos meus muitos amigos espalhados pelo mundo.

Aos técnicos Aldir, Vinícius, Luciano, Francis, Carlão e Maurício.

Ao grupo de pesquisa NUSQUIMED-UFRRJ.

A todos os docentes da Pós-Graduação em Química da UFRRJ.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERJ e Petrobrás.

À UFRRJ.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SOUSA-PEREIRA, Danilo. **Síntese, caracterização e atividade anticâncer de hidrazino-carbotioamidas e compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas**. 2019. 200p. Tese (Doutorado em Química, Ciências Exatas). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células agressivas que poderão originar tumores e espalhar-se pelo corpo. É um dos principais problemas de saúde pública e necessita da contínua observação e estudo do cenário ao longo do tempo a fim de obter programas eficientes de sua prevenção e controle. Vários tipos de cânceres ainda não respondem adequadamente aos tratamentos disponíveis, tornando-se necessário alternativas para os tratamentos existentes, como na quimioterapia, onde a procura por novos agentes antineoplásicos se faz constante. Neste presente trabalho é apresentada a síntese de uma série de hidrazino-carbotioamidas e de três séries de cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida visando o estudo desses compostos frente a enzima tirosinase e, linhagens de células cancerígenas de fígado, osso e sangue. Foram sintetizados 39 compostos no total, sendo nove ainda inéditos. O estudo das metodologias de síntese foi realizado visando o uso de princípios da Química Verde para a obtenção dos compostos, sendo as hidrazino-carbotioamidas e compostos mesoiônicos obtidos em rendimentos satisfatórios. Todos os compostos sintetizados tiveram suas estruturas propostas caracterizadas via técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ^1H e ^{13}C . As hidrazino-carbotioamidas foram avaliadas quanto à inibição da tirosinase, enzima envolvida na formação de melanomas. Os resultados obtidos indicaram que os compostos **16** ($\text{IC}_{50} = 56,50 \mu\text{mol L}^{-1}$) e **17** ($\text{IC}_{50} = 22,60 \mu\text{mol L}^{-1}$) são promissores quanto à atividade inibitória da tirosinase. Os estudos de modelagem molecular bem como a interação com a soroalbumina humana confirmaram os resultados obtidos *in vitro*. Sais mesoiônicos sintetizados foram avaliados quanto a atividade citotóxica frente a três linhagens de leucemias humanas (C91, MT2 e Jurkat, sendo as duas primeiras infectadas com o vírus HTLV-1), uma linhagem de osteossarcoma (MG-63) e uma de hepatocarcinoma (HepG2), mostrando bons resultados. Os resultados obtidos neste trabalho de tese indicam que as hidrazino-carbotioamidas e sais mesoiônicos podem ser promissores enquanto agentes na quimioterapia do câncer.

Palavras-chave: Hidrazino-Carbotioamida, Cloridrato Mesoiônico, Enzima Tirosinase, HTLV-1, Atividade Citotóxica, Câncer.

ABSTRACT

SOUSA-PEREIRA, Danilo. **Synthesis, characterization and anticancer activity of hydrazine-carbothioamides and mesoionic compounds of 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide class**. 2019. 200p. Thesis (Doctorate in Chemistry, Exact Sciences). Chemistry Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Cancer is the name given to a set of diseases that have in common the disorderly growth of aggressive cells that can originate tumors and spread throughout the body. It is one of the main public health problems and needs continuous observation and study of the scenario over time in order to get programs efficient of prevention and control of cancer. Several types of cancers still do not adequately respond to the available treatments, being necessary new alternatives for existing treatments, such as chemotherapy, where the demand for new antineoplastic agents is constant. In this work the synthesis of a series of hydrazine-carbothioamides and of three series of mesoionic hydrochlorides of Class 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide aiming the study of these compounds against the enzyme tyrosinase and, strains of cancer cells of liver, bone and blood is presented. 39 compounds were synthesized in total, of which 9 are unpublished. The study of synthesis methodologies was carried out aiming at the use of green chemistry principles to obtain the compounds. The hydrazine-carbothioamides and mesoionic compounds did obtained in satisfactory yields. All synthesized compounds had their proposed structures characterized via spectroscopic techniques of IR and NMR ^1H and ^{13}C . Hydrazine-carbothioamides were evaluated for the inhibition of tyrosinase, an enzyme involved in the formation of melanomas. The results obtained indicated what the compounds **16** ($\text{IC}_{50} = 56.50 \mu\text{mol L}^{-1}$) and **17** ($\text{IC}_{50} = 22.60 \mu\text{mol L}^{-1}$) are promising inhibitory activity of tyrosinase. The study of molecular modelling well as of interaction with the Human Serum Albumin confirmed the results obtained in vitro. Synthesized mesoionic salts were evaluated for cytotoxic activity in the face of three human leukemia lines (C91, MT2 e Jurkat, being the first two infected with the virus HTLV-1), an osteosarcoma line (MG-63) and one of hepatocarcinoma (HepG2), showing good results. The results obtained in this work indicate that hydrazinecarbothioamides and mesoionic salts may be promising as agents in cancer chemotherapy.

Keywords: Hydrazine-carbothioamides, mesoionic hydrochloride, tyrosinase enzyme, HTLV-1, cytotoxic activity, cancer.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos e pontos de fusão das tiouréias obtidas.....	15
Tabela 2. Principais absorções na região do IV para as tiouréias.....	17
Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN de ^1H para as tiouréias <i>p</i> -R ₁ -fenil-substituídas.....	17
Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN ^{13}C para as tiouréias <i>p</i> -R ₁ -fenil-substituídas.	18
Tabela 5. Rendimentos dos isotiocianatos obtidos.....	19
Tabela 6. Rendimentos obtidos através das metodologias A e B, e pontos de fusão para as hidrazino-carbotioamidas sintetizadas.....	20
Tabela 7. Principais absorções na região do IV para as hidrazino-carbotioamidas obtidas.....	21
Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN ^1H para as hidrazino-carbotioamidas.....	22
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para as hidrazino-carbotioamidas.....	23
Tabela 10. Rendimentos e pontos de fusão dos sais mesoiônicos da série I.....	26
Tabela 11. Principais absorções na região do IV para os cloridratos mesoiônicos da série I.....	26
Tabela 12. Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os cloridratos mesoiônicos da série I (23-30).....	27
Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para os cloridratos mesoiônicos da série I (23-30).....	28
Tabela 14. Rendimentos e pontos de fusão dos sais mesoiônicos da série II.....	30
Tabela 15. Principais absorções na região do IV para os cloridratos mesoiônicos da série II.....	31
Tabela 16. Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os cloridratos mesoiônicos da série II (31-34).....	31
Tabela 17. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para os cloridratos mesoiônicos da série II (31-34).....	32
Tabela 18. Rendimentos e pontos de fusão dos sais mesoiônicos da série III.....	33
Tabela 19. Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os cloridratos mesoiônicos, série III.....	33
Tabela 20. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para os cloridratos mesoiônicos, série III.....	34
Tabela 21. Principais absorções na região do IV para os cloridratos mesoiônicos da série III.....	34
Tabela 22. Parâmetros cinéticos (K_m e V_m) para a atividade enzimática na ausência e na presença de diferentes concentrações das hidrazino-carbotioamidas 16 e 17 (0,00; 33,3; 50,0 e 83,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	36
Tabela 23. Constantes para a interação HSA:17 a 296 K, 303 K, e 310 K.....	39
Tabela 24. Valores de IC ₅₀ obtidos para os compostos da série I em culturas de 72 horas frente as linhagens de leucemias humanas C91, MT2 e Jurkat.....	40
Tabela 25. Valores de IC ₅₀ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para os compostos da série I em tratamento de 24 horas frente à linhagem HepG2.....	43
Tabela 26. Concentração inibitória de 50% das células viáveis (IC ₅₀) dos sais mesoiônicos sobre a linhagem celular de osteossarcoma MG-63.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas da arbutina a esquerda e do ácido kójico a direita.....	2
Figura 2. Estruturas químicas de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma.	2
Figura 3. (A) Estrutura do inibidor Ipilimumab ligado ao CTLA-4 humano; (B) estrutura do nivolumab-Fab e complexo de PD-1 (RCSB Protein Data Bank).	3
Figura 4. Regiões onde a infecção pelo HTLV-1 é endêmica (adaptado de RIBAS et al., 2002).....	4
Figura 5. Estruturas químicas dos compostos químicos que compõem o coquetel CHOP utilizado na quimioterapia de LLcTA.	5
Figura 6. Estruturas da zidovudina (AZT) a esquerda e do Interferon alfa (IFN- α) a direita (RCSB Protein Data Bank).....	5
Figura 7. (A) levantamento do periósteo com formação do triângulo de Codman (setas) e aparência em raios de sol em radiografia do osteossarcoma ; (B) tomografia computadorizada de tórax de paciente com nódulos pulmonares metastáticos (setas) (KUNDU, 2014; CEYLAN et al., 2010).	6
Figura 8. Estruturas da cisplatina (CIS), doxorubicina (DOX) e metotrexato (MTX).	7
Figura 9. Número de casos de hepatocarcinoma humano por 100.000 habitantes (Adaptado de GOMES, 2013).....	8
Figura 10. Estrutura química do sorafenibe.....	9
Figura 11. Estruturas da doxorubicina (DOX) e mitomicina C.	9
Figura 12. Estrutura química da hidrazino-carbotioamidas.....	9
Figura 13. Reações gerais para a preparação de hidrazino-carbotioamidas (adaptado de KATRITZKY et al., 2006).	10
Figura 14. Estrutura química genérica dos compostos mesoiônicos e estruturas representativas para os compostos do tipo A e B.	11
Figura 15. A - Síntese de mesoiônicos utilizando 1,1-dicloroiminas de arila e <i>N</i> -tioacilidrazinas. B - Reação de preparação do cloreto de 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, a partir do cloreto de benzoíla e 1,4-difeniltiosemicarbazida.....	11
Figura 16. Retrossíntese para as hidrazino-carbotioamidas e compostos mesoiônicos.	14
Figura 17. Reação para a preparação e estruturas para as tiouréias obtidas.....	15
Figura 18. Tiouréia não substituída (1) logo após ser isolada via filtração.....	15
Figura 19. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção das tiouréias.....	16
Figura 20. Reação de obtenção e estruturas para os isotiocianatos.	18
Figura 21. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos isotiocianatos utilizando clorobenzeno como solvente sob refluxo.	19
Figura 22. Esquema de síntese e estruturas para as hidrazino-carbotioamidas.	20
Figura 23. Mecanismo de reação proposto para a obtenção das hidrazino-carbotioamidas na presença de solvente aprótico (tolueno) ou ausência de solvente.	21
Figura 24. Estruturas dos cloridratos mesoiônicos sintetizados.....	24
Figura 25. Esquema de síntese para os sais mesoiônicos da série I.	25
Figura 26. Composto 24 em forma sólida (A) e em solução (B).....	25
Figura 27. Mecanismo de reação proposto para a obtenção dos sais mesoiônicos a partir de hidrazino-carbotioamidas e cloretos de ácido.	29
Figura 28. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos sais mesoiônicos utilizando aldeídos substituídos, hidrazino-carbotioamidas e SOCl ₂ como ácido de Lewis.....	29
Figura 29. Reação para a síntese dos sais mesoiônicos da série II.....	30
Figura 30. Reação para a obtenção dos sais mesoiônicos da série III.	32

Figura 31. Estruturas químicas para as hidrazino-carbotioamidas (12, 15, 16 e 17) que apresentaram maior eficiência frente à inibição da tirosinase.....	35
Figura 32. Gráfico Hanes-Woolf para o ensaio envolvendo a tirosinase na presença de L-DOPA e hidrazino-tiocarboamidas 16 (A) e 17 (B). As concentrações utilizadas foram: [L-DOPA] = 66,6; 100; 200; 333; 467 e 667 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e [3] = [4] = 0,00; 33,3; 50,0 e 83,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	36
Figura 33. Cinética de ação da enzima tirosinase em L-DOPA na presença de 17. (♦) [L-DOPA] = 170 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (■) [L-DOPA] = 170 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + [17] = 33 $\mu\text{mol L}^{-1}$	36
Figura 34. (A) Superposição das melhores poses de ancoragem para a interação entre tirosinase e hidrazino-carbotioamidas 12 (1), 15 (2), 16 (3) e 17 (4) na presença de L-DOPA (Função GoldScore). (B) superposição entre as hidrazino-carbotioamidas 16 (3) e 17 (4) e representação dos principais resíduos de aminoácidos que interagem com estes inibidores. L-DOPA e os resíduos de aminoácidos selecionados estão representados em violeta e ciano, respectivamente. As hidrazino-carbotioamidas 12, 15, 16 e 17 estão representados em amarelo (1), salmão (2), magenta (3) e laranja (4), respectivamente. Os átomos de cobre estão representados como esferas marrons. Cores dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro; bromo: vermelho, cloro: verde e enxofre: amarelo.	37
Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência para HSA livre e com adição do supressor 17 em pH 7,4 a 310 K. Inserção: Parcelas de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de HSA por 17 em 296 K, 303 K e 310 K. [HSA] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ e 17 = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e $1,32 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹	38
Figura 36. Estruturas químicas dos sais mesoiônicos avaliados frente às linhagens de células leucêmicas C91, MT2 e Jurkat.	39
Figura 37. Espectros de emissão de fluorescência após uma hora de incubação dos compostos 26, 27, 29 e 30 com DNA de esperma de salmão.....	40
Figura 38. Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 26, 27, 29 e 30 frente às linhagens C91, MT2 e Jurkat em cultura de 72 horas.....	41
Figura 39. Estruturas dos sais mesoiônicos avaliados frente a linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2.....	42
Figura 40. Efeito dos sais mesoiônicos sobre o crescimento das células HepG2 determinado pelo método do MTT. Os valores representam a média \pm S.E.M (erro padrão) (n > 4).	43
Figura 41. Estruturas dos sais mesoiônicos avaliados frente a linhagem de osteossarcoma MG-63.	44
Figura 42. Efeito dos sais mesoiônicos 24 (gráficos A e B) e 25 (gráficos C e D) na viabilidade de células de osteossarcoma após 24 e 48 horas de incubação. Os dados representam a média de três experimentos independentes em triplicata. Os resultados estão expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como veículo. *p<0,05; **p<0,001 e ***p<0,0001 denotam valores com diferença estatística significativa entre o composto e o veículo. A linha pontilhada representa 50% de viabilidade celular.	45
Figura 43. Citotoxicidade dos sais mesoiônicos 24 (gráfico A) 25 (gráfico B) sobre as células de osteossarcoma. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes em duplicata. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle. #p<0,05; ##p<0,001 e ###p<0,0001 denotam valores com diferença estatística significativa entre o composto e o veículo no tempo de 24h e *p<0,05; **p<0,001 e ***p<0,0001 no tempo de 48h.	46
Figura 44. Avaliação da indução de apoptose por citometria de fluxo. (A) Dot-plot mostrando perfil SSC x FSC (Side scattering x forward scattering) das células MG-63. A região delimitada (linha vermelha pontilhada) representa a população selecionada para avaliação. (B) Imagem representativa do perfil de Anexina V x PI do controle negativo (células incubadas	

com os compostos que não foram incubadas com Anexina V e PI). (C) As células foram tratadas com veículo (dimetilsulfóxido - DMSO), 24 e 25 por 24 horas nas concentrações indicadas e avaliadas quanto à exposição a fosfatidil serina e permeabilidade ao PI. Anexina V-FITC: Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína. PI: iodeto de propídeo. ... 47

Figura 45. Percentual de células MG-63 tratadas com as concentrações de 1 e 5 μ M dos sais 24 e 25. Quantificação dos resultados de três experimentos independentes (citometria de fluxo). Tratamento com o veículo (dimetilsulfóxido) no mesmo volume correspondente ao volume utilizado para ambas as concentrações. 48

Figura 46. Oxidação da L-DOPA a L-dopaquinona na presença da enzima tirosinase. 62

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B3LYP	Becke-3-Lee Yang Parr
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CIS	cisplatina
d	Dupleto
DANT	doenças e agravos não transmissíveis.
DFT	Teoria Funcional de Densidade
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	deoxyribonucleic acid
DOX	doxorubicina
ES	enzima-substrato
ESI	enzima-substrato-inibidor
<i>FSC</i>	<i>forward scattering</i>
HCC	Hepatocarcinoma
HTLV	<i>Human T-cell lymphotropic vírus</i>
IFN- α	interferon- α
IgG4	munoglobulina G4
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L-DOPA	cido (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-propanoico
LLA	leucemia linfocítica aguda
LLcTA	leucemia/linfoma de células T do adulto
LMA	leucemia mieloide aguda
LMC	leucemia mieloide crnica
MDR	multiple drug resistance
MO	micro-ondas
MTX	metotrexato
PET	paraparesia espamtica tropical
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
s	Simpleto
SFB	Soro Fetal Bovino
sl	Simpleto largo
SSC	<i>Side scattering</i>
t	Tripleto
TC	tomografia computadorizada
TMS	tetrametilsilano
TMZ	temozolomida
UV-Vis	Ultravioleta na região visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O câncer.....	1
1.1.1. A enzima tirosinase e o melanoma.....	1
1.1.2. A leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) e o vírus HTLV 1.....	3
1.1.3. O Osteossarcoma (OS).....	5
1.1.4 O Hepatocarcinoma (HCC).....	7
1.2. As hidrazino-carbotioamidas.....	9
1.3. Compostos Mesoioônicos.....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
3.1 Síntese.....	15
3.1.1. Síntese e caracterização dos intermediários tiouréias fenil-substituídas (1-6).....	15
3.1.2. Síntese dos isotiocianatos fenil-substituídos (7-11).....	18
3.1.3. Síntese e caracterização das hidrazino-carbotioamidas (12-17).....	19
3.1.4. Síntese dos Cloridratos Mesoioônicos (23-38).....	24
3.1.4.1. Síntese e caracterização dos cloridratos mesoioônicos da série I (23-30).....	25
3.1.4.2. Síntese e caracterização dos cloridratos mesoioônicos da série II (31-34).....	30
3.1.4.3. Síntese e caracterização dos cloridratos mesoioônicos da série III (35-38).....	32
3.2. Ensaio biológicos.....	35
3.2.1. Estudo envolvendo a enzima tirosinase frente a hidrazino-carbotioamidas: abordagem experimental e teórica.....	35
3.2.2. Estudo da viabilidade celular de células leucêmicas frente a sais mesoioônicos da série I.....	39
3.2.3. Estudo da viabilidade celular do hepatocarcinoma HepG2 frente a sais mesoioônicos.....	42
3.2.4. Estudo da viabilidade celular de osteossarcoma frente a sais mesoioônicos da série I.....	44
4. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	49
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50

5.1. Materiais	50
5.1.1. Equipamentos	50
5.1.2. Reagentes, solventes e meios de cultura.....	50
5.2. Métodos	52
5.2.1. Metodologias sintéticas	52
5.2.1.1. Preparação das tiouréias.....	52
5.2.1.2. Preparação dos isotiocianatos.....	54
5.2.1.3. Preparação das hidrazino-carbotioamidas N_1, N_4 -dissubstituídas.....	54
5.2.1.4. Preparação dos cloretos de ácido.....	56
5.2.1.5. Síntese dos cloridratos mesoiônico.....	57
5.2.2. Ensaio biológicos	62
5.2.2.1. Estudos envolvendo a inibição da enzima tirosinase frente às hidrazino-carbotioamidas	62
5.2.2.2. Estudo da viabilidade celular de células leucêmicas frente a sais mesoiônicos da série I	64
5.2.2.3. Estudo da viabilidade celular do hepatocarcinoma frente a sais mesoiônicos da série I	64
5.2.2.4. Estudo da viabilidade celular de osteossarcoma frente a sais mesoiônicos da série I	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7. ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1. O câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças não transmissíveis sendo um dos principais responsáveis pelo adoecimento e óbito da população no mundo. Essas doenças têm em comum a proliferação anormal de células através da divisão celular rápida e descontrolada. Diferente das células normais essas células se apresentam agressivas invadindo e se acumulam nos tecidos e órgãos originando tumores que podem espalhar-se pelo corpo (INCA, 2018).

A estimativa mundial mostra que, em 2008, 36 milhões dos óbitos ocorreram em consequência das doenças e agravos não transmissíveis (DANT), com destaque para o câncer que representa 21% das DANT. Em 2012, ocorreram cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer no mundo e, conseqüentemente, 8,2 milhões de óbitos (MALTA et al., 2014). As maiores taxas de incidência do câncer são observadas nos países desenvolvidos como Japão, Coreia do Sul, Austrália, Nova Zelândia e na América do Norte e Europa Ocidental. Nesses países predominam os cânceres de pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto, sendo associados à urbanização e ao desenvolvimento. Apesar da menor incidência do câncer nos países pouco desenvolvidos, a mortalidade representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo sendo associados a infecções no estômago, colo do útero, esôfago ou fígado. Segundo Ferlay, o impacto do câncer será cada vez maior nas próximas décadas (FERLAY et al., 2013). Estima-se, para o Brasil, a identificação de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano do biênio 2018-2019 (INCA, 2018).

Existem diferentes tipos de câncer sendo correspondentes aos diferentes tipos de células do corpo. Os carcinomas têm origem em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas. Já os sarcomas se originam nos tecidos conjuntivos, como o músculo, cartilagem ou osso (INCA, 2018).

O surgimento do câncer pode ser atribuído a diversas causas, sendo internas e/ou externas ao organismo. Dentre os casos de câncer, 10 a 20% estão associados às causas internas, sendo fatores genéticos ou estando essas ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Já entre 80% e 90% dos casos de câncer estão associados aos fatores de risco ambientais denominados cancerígenos ou carcinógenos, são os fatores externos.

O tratamento do câncer pode ser feito através da combinação ou não de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea (INCA, 2018).

1.1.1. A enzima tirosinase e o melanoma

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que representa 3% das neoplasias malignas do órgão sendo o tipo mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase. Esse câncer tem origem nas células produtoras de melanina (melanócitos) sendo predominante em adultos brancos. Estima-se 6.260 casos novos de melanoma no Brasil, sendo 2.920 em homens e 3.340 em mulheres (MS/INCA, 2018).

O maior fator de risco para o surgimento do melanoma é a exposição ao sol. Essa neoplasia pode ser prevenida evitando-se a exposição intensa ao sol e, quando exposto, se protegendo fazendo o uso de filtro solar (INCA, 2018).

A detecção precoce do tumor e a introdução dos novos medicamentos imunoterápicos têm melhorado a sobrevivência dos pacientes com melanoma.

A enzima tirosinase (EC 1.14.18.1) tem sido encontrada em todos os melanomas estudados. Os anticorpos contra tirosinase são usados como marcadores imuno-histoquímicos

no diagnóstico diferencial do melanoma maligno (FIGUEIREDO et al., 2003). É uma metaloenzima essencial para a pigmentação da pele através da biossíntese da melanina no processo de melanização (WU et al., 2015), estando diretamente relacionada a distúrbios da pigmentação em mamíferos (WANG et al., 2018). A sua atividade enzimática está relacionada à sua capacidade de catalisar a hidroxilação aeróbia da L-tirosina à L-DOPA e a subsequente oxidação da última à dopaquinona, o que acarreta na síntese de melanina e na hiperpigmentação (GENÇER et al., 2012). Várias doenças dermatológicas como manchas, sardas e melasmas podem ser causadas pela acumulação anormal de melanina e não apenas pela radiação ultravioleta. Assim, a ação inibitória sobre a atividade da tirosinase minimiza a ocorrência de distúrbios dermatológicos, principalmente melanomas, tornando-se o principal alvo no tratamento de distúrbios relacionados ao acúmulo anormal de melanina (GENÇER et al., 2012; CHAVES et al., 2018).

A arbutina e o ácido kójico (Figura 1) foram os inibidores mais populares da tirosinase. No entanto, devido aos seus efeitos colaterais graves foram limitados estimulando o desenvolvimento de novos inibidores, sejam naturais ou sintéticos (SILVÉRIO et al., 2013).

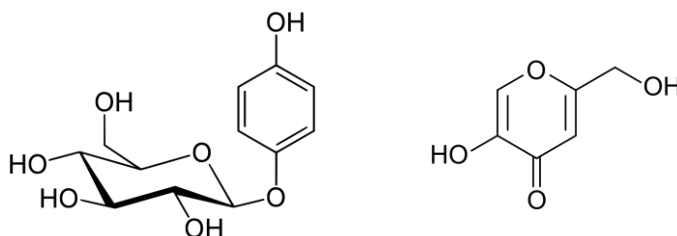


Figura 1. Estruturas químicas da arbutina a esquerda e do ácido kójico a direita

A cirurgia é o tratamento clínico mais indicado para o melanoma podendo ser combinada ou com a radioterapia e a quimioterapia. Entre os agentes quimioterápicos utilizados estão o paclitaxel, a dacarbazina (DTIC), o temozolomida (TMZ), a cisplatina e a carboplatina (Figura 2). No entanto, esses fármacos possuem muitos efeitos colaterais sendo suas taxas de respostas positivas individuais inferiores a 20% (MOUAWAD et al., 2010).

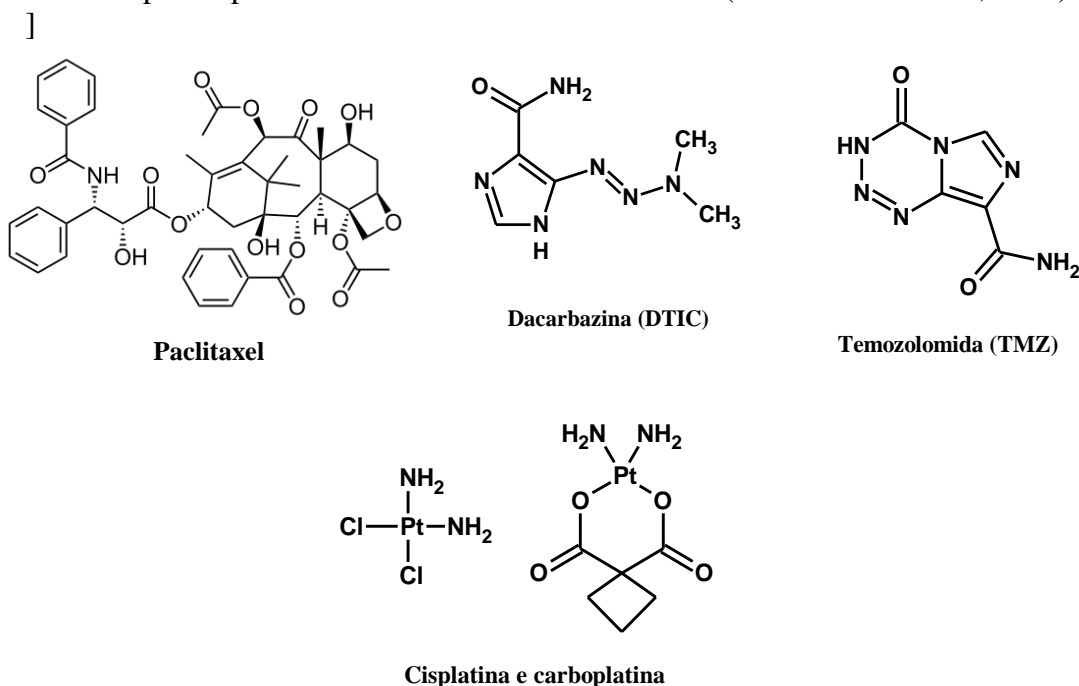


Figura 2. Estruturas químicas de agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do melanoma.

Em 2011, o ipilimumab foi aprovado para o tratamento do melanoma. Já em 2016 foi aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) uma classe de imunoterápicos, dentre eles o nivolumab que é um anticorpo monoclonal de imunoglobulina G4 (IgG4), cujo mecanismo de ação consiste em se ligar ao receptor de morte programada 1 (PD-1) bloqueando assim sua interação com PD-L1 e PD-L2 (Figura 3). Isso potencializa as respostas antitumorais. Seu uso foi aprovado em casos de melanoma que não podem ser extraídos por cirurgia ou que já possui metástase e em casos de câncer de pulmão.

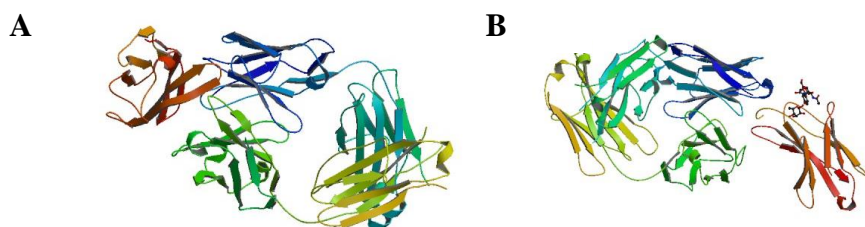


Figura 3. (A) Estrutura do inibidor Ipilimumab ligado ao CTLA-4 humano; (B) estrutura do nivolumab-Fab e complexo de PD-1 (RCSB Protein Data Bank).

O tratamento com o ipilimumab e o nivolumab combinados tem se mostrado melhor que qualquer outro tipo de terapia utilizada até o momento, sendo promissor não só para melanoma metastático, mas também para outros tipos de câncer (LARKIN et al., 2015)

1.1.2. A leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) e o vírus HTLV 1

A leucemia tem como principal característica o acúmulo de células anormais cancerosas que substituem as células sanguíneas saudáveis da medula óssea. Existem mais de 12 tipos de leucemia, sendo que os quatro cânceres primários são leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (INCA, 2018).

A leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) é uma neoplasia de linfócitos T maduros, associada à infecção pelo vírus HTLV 1 (*Human T-cell lymphotropic virus / vírus linfotrópico para células T humanas tipo 1*). Acomete cerca de 5% dos indivíduos infectados pelo vírus e manifesta-se, em geral, após longo período de latência que no Japão é de, aproximadamente 60 anos, enquanto que no Brasil é de 50 anos (BITTENCOURT et al., 2007). Essa doença maligna que ocorre na vida adulta, é agressiva e não responde à quimioterapia. Geralmente é fatal sendo a sobrevida inferior a 12 meses nos casos classificados como agudos (BITTENCOURT et al., 2007).

O HTLV 1 foi descoberto em 1980 sendo isolado de células de pacientes com leucemia cutânea. Em 1982, foi descoberto o HTLV 2 sendo semelhante ao HTLV-1 em 66% das sequências genômicas (BITTENCOURT et al., 2006; POIESZ et al., 1980; GONÇALVES et al., 2010). No entanto, com o isolamento do HIV (human immunodeficiency virus / vírus da imunodeficiência humana) em 1983 houve o declínio do ritmo de pesquisa sobre os vírus HTLV 1 e 2.

As pesquisas indicam que os problemas de saúde relacionados ao vírus HTLV geralmente são neurológicos degenerativos e casos de leucemia e linfomas. O HTLV 1 está associado a doenças graves como a paraparesia espasmática tropical (PET/HAM) e a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA). A LLcTA ocorre mais frequentemente em países nos quais a infecção pelo HTLV-1 é endêmica como no Japão, Caribe, Brasil, Colômbia, Peru, Argentina e em países que possuem emigrantes de origem africana e caribenha (Figura 4) (RIBAS et al., 2002).

As maiores soros prevalências de HTLV 1 no Brasil foram observadas em São Luís (10.0/1.000), Salvador (9.4/1.000), Belém (9.1/1.000) e Recife (7.5/1.000).

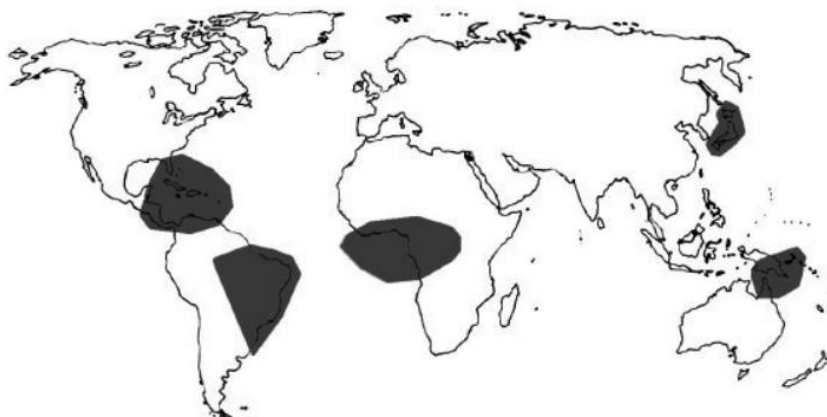


Figura 4. Regiões onde a infecção pelo HTLV-1 é endêmica (adaptado de RIBAS et al., 2002).

O HTLV-I pode ser transmitido através da amamentação, relação sexual desprotegida, transfusão sanguínea ou pelo uso compartilhado de instrumentos perfurocortantes contaminados (BITTENCOURT, 1998). Uma vez no organismo, a transmissão do HTLV 1 ocorre, principalmente, através da transferência do material viral de célula infectada para célula não infectada. O contato entre a célula infectada e a não infectada leva a formação de uma sinapse virológica entre as células envolvidas onde proteínas e genomas virais acumulam-se para, posteriormente, ocorrer a transferência do material viral para a célula não infectada. O HTLV-I pode infectar diversos tipos celulares possuindo tropismo especial por células T CD4+ (BANGHAM, 2003).

A detecção de anticorpos anti-HTLV 1 no soro é feita através do método imunoenzimático ELISA que deve ser confirmado pelo Western-blot, que diferencia os tipos 1 e 2 do HTLV.

A LLcTA é diagnosticada quando há a presença de anticorpos séricos para o HTLV 1 além da comprovação citológica ou histopatológica de leucemia e ou linfoma de células T maduras com antígenos de superfície CD4+/CD25+, presença de linfócitos T anormais em sangue periférico, principalmente das células "em flor", que são consideradas características de LLcTA e demonstração da integração monoclonal do HTLV-I (BITTENCOURT, et al., 2008; TAKATSUKI et al., 1996).

A literatura relata diversos protocolos de tratamento da LLcTA com resultados variáveis. Alguns protocolos empregam a quimioterapia, o uso de ziduidina (AZT)/interferon- α (IFN- α) e o transplante hematopoiético de células-tronco, podendo ocorrer de forma associada ou não em função da agressividade da doença (TSUKASAKI et al., 2009).

O tratamento mais utilizado frente às formas clínicas linfomatosas e agudas da LLcTA (mais agressivas) consiste no uso do coquetel CHOP: (C) ciclofosfamida; (H) hidroxildaunorrubicina (adriamicina); (O) oncovin (vincristina) e; (P) prednisona. A ciclofosfamida é um agente de alquilante que provoca a formação de ligações cruzadas com o ácido desoxirribonucleico (DNA - *deoxyribonucleic acid*), a hidroxildaunorrubicina danifica o DNA inserindo-se entre as bases (agente intercalante), o oncovin impede a duplicação celular através da ligação à proteína tubulina e, a prednisona age nas citocinas (processo inflamatório). Na Figura 5 estão apresentadas as estruturas dos quimioterápicos do CHOP.

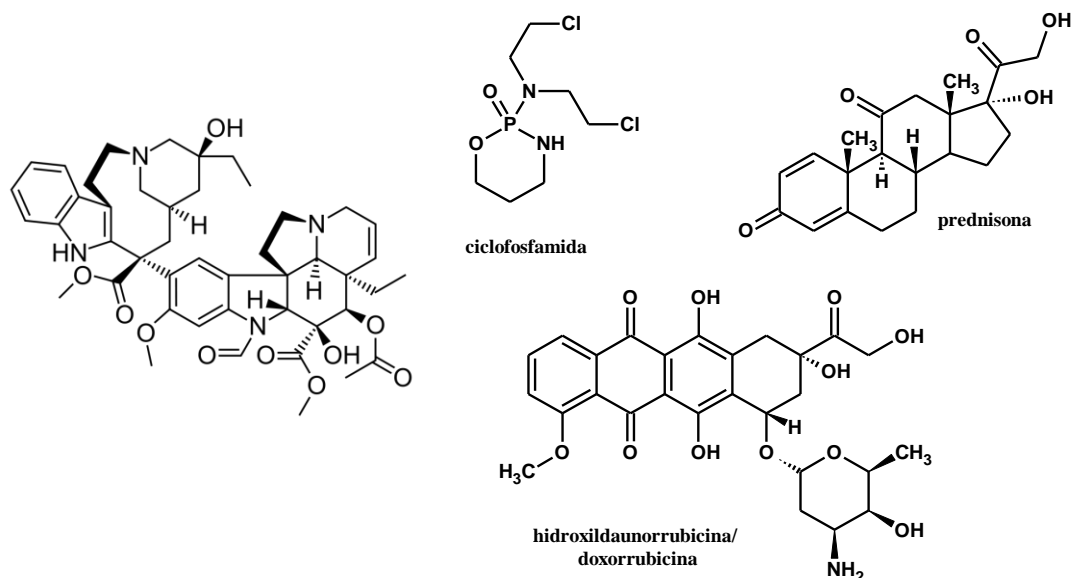


Figura 5. Estruturas químicas dos compostos químicos que compõem o coquetel CHOP utilizado na quimioterapia de LLcTA.

A associação AZT/IFN- α tem possibilitado bons resultados frente às formas aguda, crônica e indolente da LLcTA (Figura 6) (BAZARBACHI et al., 2007). Acredita-se que ocorra um efeito imunológico do IFN- α associado ao efeito citostático do AZT nas células linfoides.

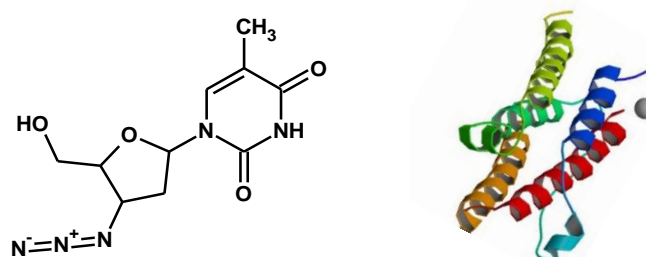


Figura 6. Estruturas da zidovudina (AZT) a esquerda e do Interferon alfa (IFN- α) a direita (RCSB Protein Data Bank).

A combinação AZT/IFN- α – CHOP tem apresentado sobrevida melhor em comparação com a quimioterapia isolada. No entanto a resistência à quimioterapia convencional, o aumento de proteínas responsáveis pela resistência a múltiplas drogas (MDR - *multiple drug resistance*), as disfunções hepáticas ou renais e o estado de imunodeficiência no decorrer do tratamento quimioterápico são ainda fatores associados ao insucesso dos tratamentos empregados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.1.3. O Osteossarcoma (OS)

As neoplasias são a segunda causa de morte na infância e adolescência (0 a 19 anos) e correspondem entre 2% e 3% de todos os tumores malignos (INCA, 2008). Estima-se que ocorram de 650 a 700 novos casos de câncer ósseo ao ano nesta faixa etária (MIRABELLO et al., 2009a).

O osteossarcoma representa 55% dos tumores ósseos malignos em crianças e adolescentes (DAMRON et al., 2007; MIRABELLO et al., 2009b; BERGOVEC et al., 2015) e se apresenta como um tumor altamente metastático. A sobrevida global está em torno de 25% nos Estados Unidos e Europa e de 12,5% no Brasil (PETRILLI et al., 2006; BIELACK et al., 2002).

A etiologia do osteossarcoma pode estar relacionada a mutações nas células progenitoras mesenquimais presentes no estroma da medula óssea mas também pode estar relacionada a fatores externos como a exposição à radiação (VISVADER & LINDEMAN, 2012; XIAO et al., 2013; MUTSAERS & WALKLEY, 2014; ABARRATEGI et al., 2016) ou ser resultante de outras patologias, síndromes e infarto ósseo (ENDO et al., 2013; STACY et al., 2015; MAI et al., 2017).

O maior acometimento se dá na região metafisária sendo relacionado à placa de crescimento, onde ocorre rápida proliferação celular (WHO, 2013; DENDULURI et al., 2016). A maioria dos pacientes atribui inicialmente a dor e edema local observados ao exercício físico intenso ou a traumas (SHIVES et al., 1986). No entanto, no caso do osteossarcoma a dor é constante e tende a piorar com a evolução da doença. A presença do tumor torna o osso frágil deixando-o susceptível a fraturas patológicas (TARAN et al., 2017). A ocorrência de fraturas pode estar relacionada ao aparecimento de recidiva e ao menor tempo de sobrevida livre de doença (SCULLY et al., 2002).

O diagnóstico do osteossarcoma é auxiliado pelos exames de imagem, exames laboratoriais, ressonância magnética (RM) e pela tomografia computadorizada (TC), sendo a TC do tórax necessária para detectar metástases pulmonares, comumente presentes em pacientes com osteossarcoma (BIELACK et al., 2016) (Figura 7).

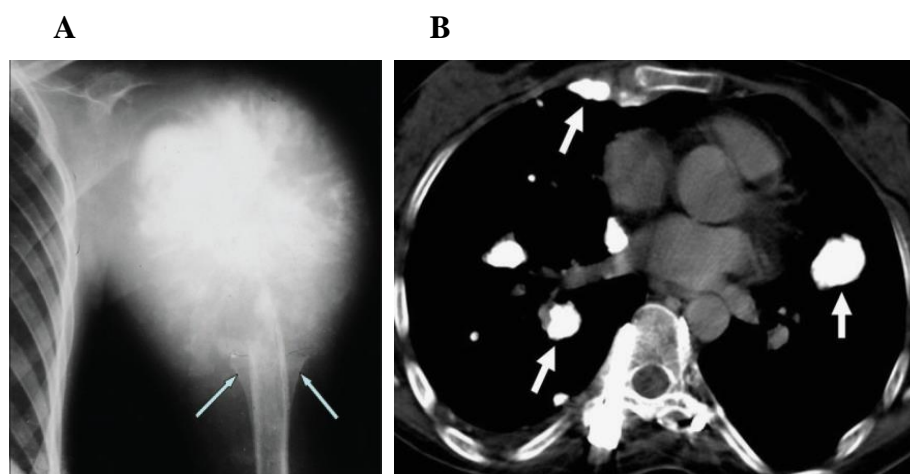


Figura 7. (A) levantamento do periósteo com formação do triângulo de Codman (setas) e aparência em raios de sol em radiografia do osteossarcoma ; (B) tomografia computadorizada de tórax de paciente com nódulos pulmonares metastáticos (setas) (KUNDU, 2014; CEYLAN et al., 2010).

Contudo o diagnóstico definitivo do osteossarcoma é confirmado através do estudo histológico no qual é caracterizada a presença de células mesenquimais malignas que produzem tecido osteóide (ABARRATEGI et al., 2016; ZHANG & ROSENBERG, 2017; WHO, 2013).

Os osteossarcomas podem ser agrupados em tumores de alto ou baixo grau histológico. Os de alto grau, como o osteossarcoma convencional, são considerados de pior prognóstico sendo caracterizados por maior atipia nuclear, celularidade, altas taxas de mitoses, células pouco diferenciadas e alta possibilidade de metástase. Já os osteossarcomas de baixo grau apresentam pouca atipia nuclear e baixa taxa de mitose sendo bem diferenciados como o osteossarcoma central de baixo grau. A resposta à quimioterapia é

evidenciada através da necrose tecidual no tumor de alto grau ressecado cirurgicamente enquanto os tumores de baixo grau histológico não respondem ao tratamento (WHO, 2013).

O tratamento do osteossarcoma tem a cirurgia como procedimento indispensável para a remoção completa do tumor. A fim de minimizar a taxa de recorrência local, que é de 46% em pacientes com osteossarcoma não metastático, a remoção deve se dar com margem cirurgica ou amputação quando necessária (ANDO et al., 2013; GRIMER, 2005; BACCI et al., 2006). A quimioterapia é empregada nos períodos pré e pós-operatórios à cirurgia de ressecção (ANDO et al., 2013). Já a radioterapia pode ser utilizada, dentre outros, com o intuito de controlar os sintomas de pacientes em quimioterapia, uma vez que o osteossarcoma é radio resistente.

Atualmente o tratamento quimioterapico neoadjuvante do osteossarcoma de alto grau consiste em cisplatina (CIS), adriamicina ou doxorrubicina (DOX) e metotrexato (MTX) (BOTTER et al., 2014; FERRARI & SERRA, 2015). Esses quimioterápicos induzem a necrose tumoral e controlam micrometástases que possam estar presentes no momento do diagnóstico (BACCI & LARI, 2001). No entanto, não possuem toxicidade específicas para células tumorais, sendo uma grande limitação dessas drogas.

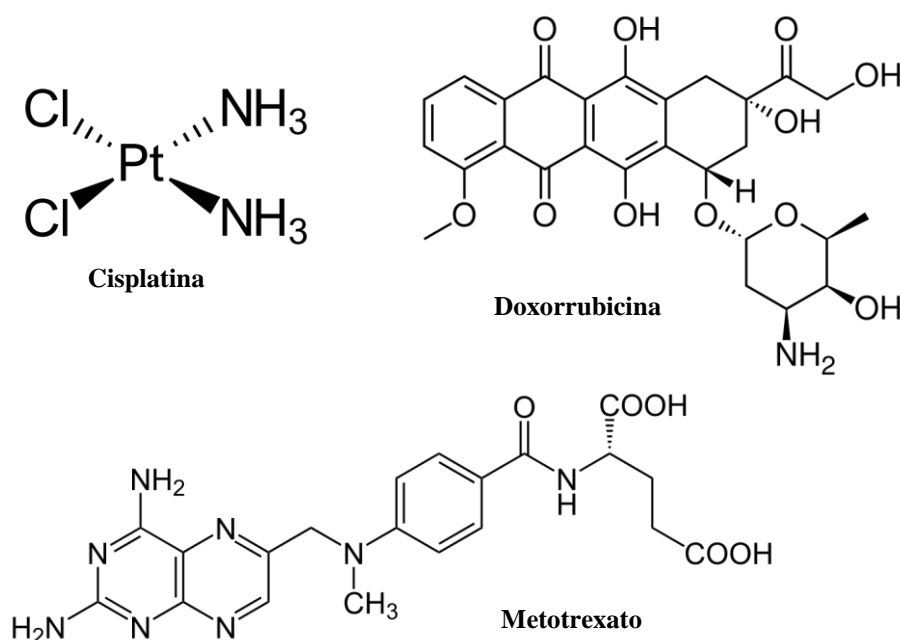


Figura 8. Estruturas da cisplatina (CIS), doxorrubicina (DOX) e metotrexato (MTX).

1.1.4 O Hepatocarcinoma (HCC)

O hepatocarcinoma tem apresentado importante aumento de sua incidência sendo a sexta neoplasia mais diagnosticada no mundo. É um câncer primário, originado no fígado e uma das causas mais comuns de mortalidade relacionadas ao câncer (INCA, 2018; YARBRO et al., 2009).

As maiores taxas de incidência do HCC encontram-se na África Subsaariana enquanto as menores taxas encontram-se na Europa, América do Norte e América do Sul (Figura 9). No Brasil, cerca de 80% dos casos de HCC estão associados à infecção pelos vírus da hepatite B ou C e à cirrose secundária (CARRILHO et al, 2010).



Figura 9. Número de casos de hepatocarcinoma humano por 100.000 habitantes (Adaptado de GOMES, 2013)

Os principais fatores de risco estão associados às infecções pelo vírus da hepatite B ou pelo vírus da hepatite C. Cerca de 50% dos casos de HCC estão relacionados com o vírus HBV onde o desenvolvimento da doença maligna se dá através de um processo inflamatório e devido à cirrose (MITALL & EL-SERAG, 2013). Logo, a vacina contra o vírus HBV é a principal prevenção do HCC. O tabagismo, obesidade, diabetes e a aflatoxina são causas menos comuns no desenvolvimento do HCC (GOMES et al., 2013). No entanto, a não exposição a esses e outros agentes etiológicos diminuem o risco de desenvolvimento do câncer de fígado em geral.

As chances de cura do HCC são maiores se a neoplasia for diagnosticada no estágio inicial. O diagnóstico definitivo da doença é efetuado através de tomografia computadorizada (TC) com contraste endovenoso e/ou ressonância magnética (RM) onde o HCC torna-se hiperdenso (*wash in*).

Os tratamentos disponíveis incluem radioterapia, quimioterapia, cirurgia e transplante de fígado. Na ausência de tratamento o tumor costuma crescer progressivamente, reduzir a função hepática e gerar metástases.

A ressecção do câncer é o tratamento mais indicado quando o tumor está restrito a uma parte do fígado e também nos casos metastáticos passíveis de serem ressecados de maneira curativa (INCA, 2018). Contudo, a intervenção cirúrgica é potencialmente curativa apenas à minoria dos casos de HCCs, sendo a quimioterapia sistêmica mais efetiva durante o tratamento (GERMANO & DANIELE, 2014).

O sorafenibe (Nexavar®) (Figura 10) é o antineoplásico mais utilizado no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento de HCC avançado não ressecável. Esse fármaco melhora estatisticamente a sobrevida global dos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; REIG et al., 2014; LLOVET et al., 2008).

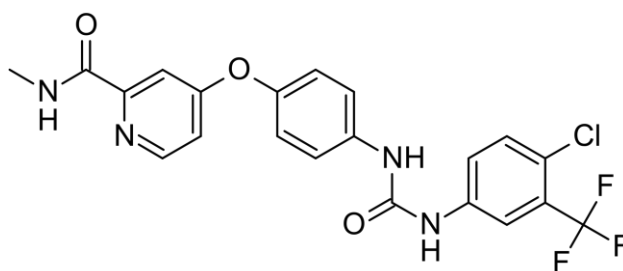
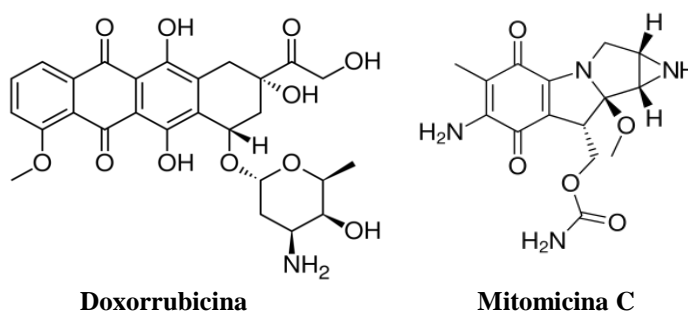


Figura 10. Estrutura química do sorafenibe.

Já a quimioembolização transarterial é uma terapia utilizada no tratamento do HCC a fim de provocar necrose isquêmica (necrose de coagulação) no tumor, fazendo com que este diminua de tamanho e, conseqüentemente, sua velocidade de crescimento. Em um dos tratamentos, o quimioterápico (doxorubicina (DOX), mitomicina C e cisplatina (CIS) ou combinação) é emulsionado com o lipiodol para ser infundido seletivamente no tumor. A solução de lipiodol tendo por objetivo expor as células tumorais à droga (CHEDID et al., 2017).

Contudo, a quimioembolização é um tratamento considerado paliativo. A solução de lipiodol possui baixa eficiência e os quimioterápicos elevada toxicidade em relação a células saudáveis. O HCC muitas vezes se encontra espalhado no órgão dificultando os procedimentos cirúrgicos. Logo, o desenvolvimento de compostos mais eficazes no tratamento dessa doença se faz necessário.



Doxorrubicina

Mitomicina C

Figura 11. Estruturas da doxorubicina (DOX) e mitomicina C.

1.2. As hidrazino-carbotioamidas

As hidrazino-carbotioamidas são substâncias químicas utilizadas como intermediários na síntese de diferentes compostos heteropolares que apresentam atividade biológica, como tiossemicarbazonas e mesoiônicos (DOS REIS et al., 2011a; MACIEL, 1998). Sua estrutura é composta por carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre, onde os átomos de hidrogênio podem ser substituídos por grupos alquila ou arila (Figura 12).

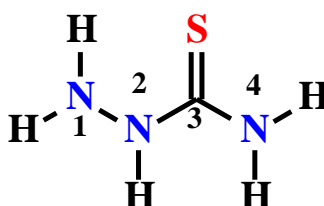


Figura 12. Estrutura química da hidrazino-carbotioamidas.

O método mais utilizado na preparação das hidrazino-carbotioamidas tem como reagentes isotiocianatos e hidrazinas (HUANG et al., 2010; L'ABBE et al., 1993).

Esses heterocompostos também podem ser obtidos a partir da redução de tiossemicarbazonas utilizando tetraidreto de boro e sódio (NaBH_4) quando $\text{R}_2 = \text{H}$ (YAMAMOTO et al., 1983) ou através de hidrazinas com derivados do ácido tiocarbâmico (FARHANULLAH et al., 2004).

Em 2006, Katritzky sintetizou hidrazino-carbotioamidas mono ou dissubstituídas a partir de ciano hidrazinas e sulfeto de hidrogênio ($\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{H}$). O autor também preparou essas substâncias tendo como reagentes compostos contendo tiocarbonilas, aminas e hidrazinas orgânicas (KATRITZKY et al., 2006).

A Figura 13 mostra as reações gerais de síntese empregadas na preparação das hidrazino-carbotioamidas.

A síntese desses compostos tem despertado grande interesse entre os químicos sintéticos devido às atividades biológicas relatadas na literatura, dentre elas estão as atividades antibacteriana (SARDARI et al., 2017), atividade antitumoral (YOUSEF, 2011), antiHIV (SIDDIQUI & SINGH, 2003), antifúngica (SIWEK et al., 2012) e anticonvulsivante (KULANDASAMY, 2010). Essas atividades podem estar relacionadas à capacidade que esses compostos têm de se difundirem através da membrana semipermeável das células.

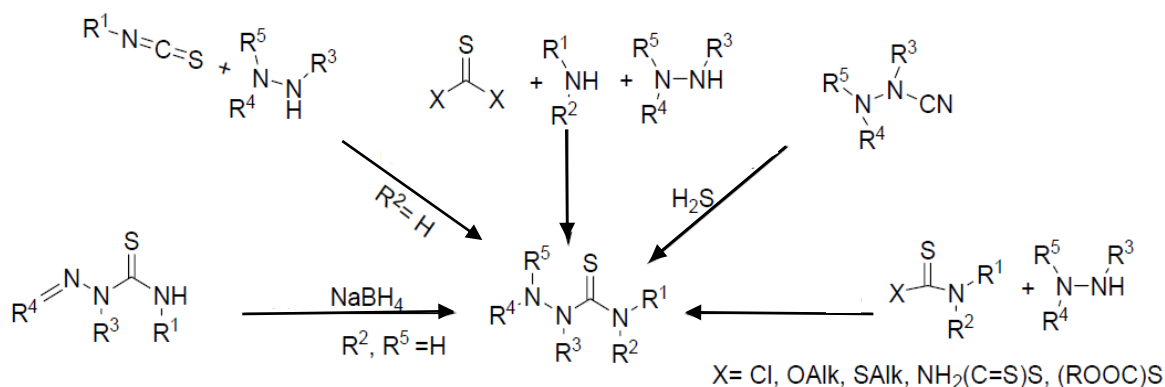


Figura 13. Reações gerais para a preparação de hidrazino-carbotioamidas (adaptado de KATRITZKY et al., 2006).

1.3. Compostos Meso-iônicos

Os compostos meso-iônicos são heterocíclicos de cinco membros com sexteto de elétrons π , suportando cargas positivas contrabalanceadas por cargas negativas no átomo exocíclico, sendo a, b, c, d, e, f comumente carbono, enxofre, nitrogênio, oxigênio ou selênio (Figura 14) (OLLIS & RAMSDEN, 1976; NEWTON & RAMSDEN, 1982). O anel meso-iônico possui caráter aromático e constitui um plano juntamente ao átomo alfa ao anel heterocíclico (ECHEVARRIA et al., 1992; KAI-CHUNG et al., 1993).

Esses compostos de estruturas dipolares são classificados de acordo com a natureza dos átomos que compõem o anel e com a origem dos elétrons π (tipo A ou B). Os números sobrescritos correspondem ao número de elétrons com que cada átomo contribui para formar os orbitais π (Figura 14). Os compostos meso-iônicos do tipo A fazem reações de cicloadição 1,3-dipolar enquanto os compostos do tipo B participam de reações com clivagem heterocíclica levando a formação do tautômero acíclico correspondente (NEWTON & RAMSDEN, 1982).

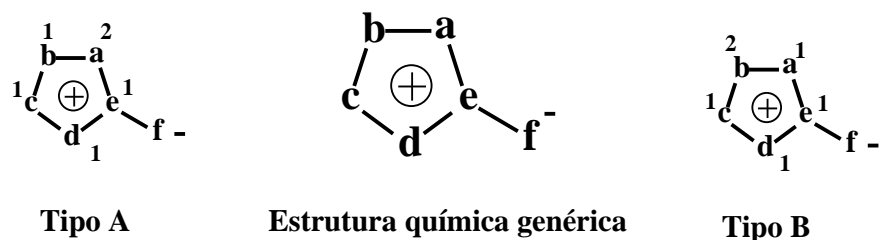


Figura 14. Estrutura química genérica dos compostos mesoiônicos e estruturas representativas para os compostos do tipo A e B.

Em 1971, Ollis e Ramsden relataram a preparação de sais mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas a partir de 1,1-dicloroiminas de arila e *N*-tioacilidrazinas. (Figura X-A) (OLLIS & RAMSDEN, 1971). Dos Reis sintetizou o cloreto de 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina via metodologia tradicional e utilizando a irradiação de micro-ondas como metodologia alternativa, onde os reagentes foram irradiados na ausência de solvente (Figura 15-B) (DOS REIS et al., 2011b).

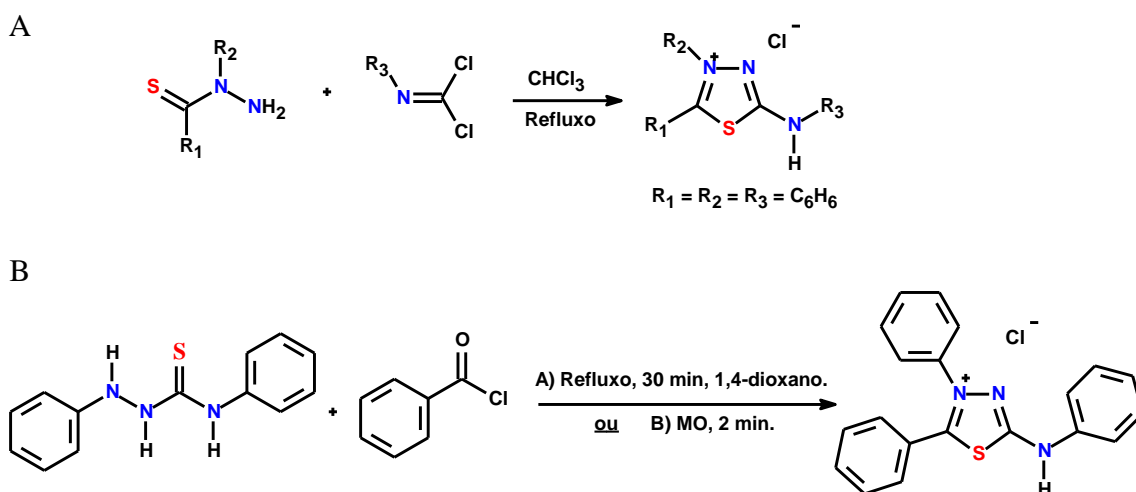


Figura 15. A - Síntese de mesoiônicos utilizando 1,1-dicloroiminas de arila e *N*-tioacilidrazinas. B - Reação de preparação do cloreto de 4,5-difenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, a partir do cloreto de benzoíla e 1,4-difeniltiosemicarbazida.

Os mesoiônicos têm apresentado grande interesse devido à sua diversificada atividade biológica. O potencial bioativo dessas substâncias é atribuído a algumas de suas características, estando dentre outras, o caráter aromático, o sistema altamente polarizável, caráter final neutro, possuir variação de densidade eletrônica no anel e à capacidade de atravessar membranas celulares (SILVA, 1997).

Dentre as diversas classes de compostos mesoiônicos está a com sistema heterocíclico 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida. Em 2011, Reis avaliou a citotoxicidade de compostos pertencente a essa classe de mesoiônicos frente à linhagem de leucemia humana K562 e ao linfoma Daudi, apresentando resultados promissores (REIS et al., 2011). Compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminida também apresentam atividade antimelanoma (SENFF-RIBEIRO et al., 2003; SENFF-RIBEIRO et al., 2004a; SENFF-RIBEIRO et al., 2004b) além de induzem apoptose ou necrose das células de câncer de fígado (HepG2) (GOZZI et al., 2015).

Assim, pelo exposto anteriormente, os compostos das classes das hidrazino-carbotioamidas e dos compostos mesoiônicos foram selecionados para serem sintetizados neste trabalho de tese, assim como, para realizar a investigação quanto a possível atividade anticâncer.

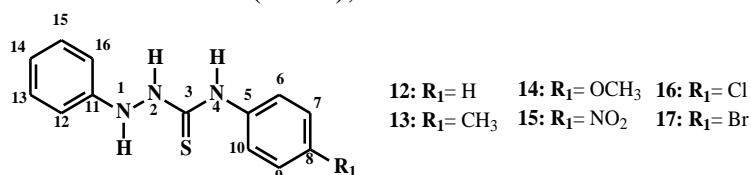
2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

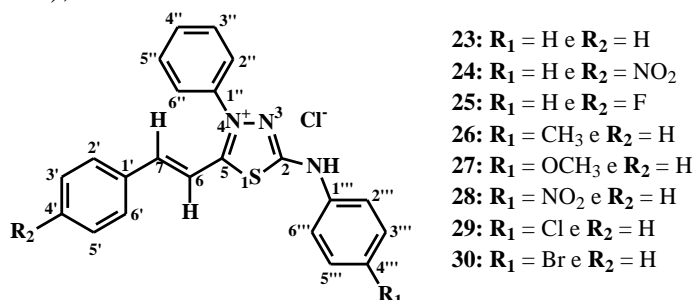
Sintetizar uma série de hidrazino-carbotioamidas e três séries de cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, bem como avaliar a atividade de inibição da enzima tirosinase e anticâncer.

2.2 Objetivos Específicos

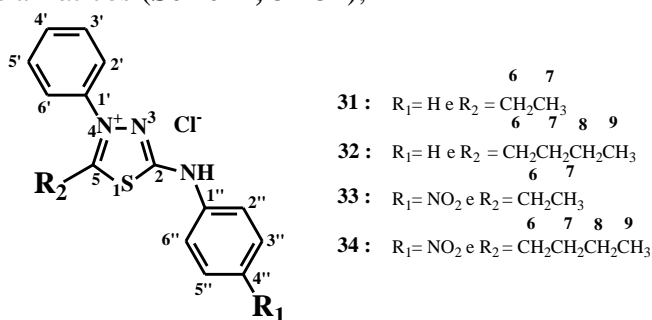
- i. Sintetizar e caracterizar os intermediários: aril-tiouréias (**1-6**), os respectivos isotiocianatos (**7-11**) e, por três metodologias, as hidrazino-carbotioamidas, derivadas de aril-isotiocianatos e fenil hidrazina (**12-17**);



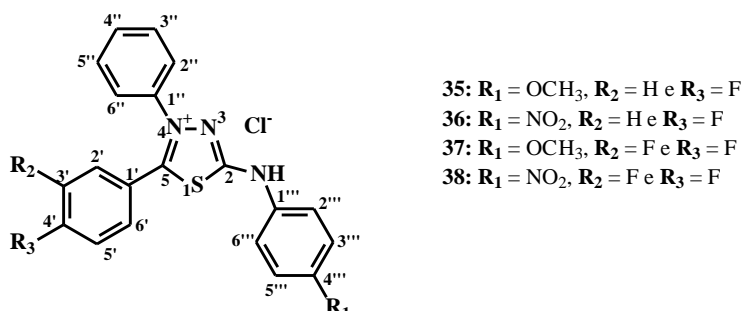
- ii. Sintetizar e caracterizar uma série de cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 5-estiril substituídos a partir das hidrazino-carbotioamidas e ácidos/aldeídos cinâmicos (**Série I; 23-30**);



- iii. Sintetizar e caracterizar uma série de cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 5-alkil substituídos a partir das hidrazino-carbotioamidas e cloretos de ácidos alifáticos (**Série II; 31-34**);



- iv. Sintetizar e caracterizar uma série de cloridratos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina 5-fenil substituídos a partir das hidrazino-carbotioamidas e aldeídos benzoicos fluorados (**Série III; 35-38**);



- v. Avaliar a atividade das hidrazino-carbotioamidas frente a enzima tirosinase e relacionar os resultados obtidos com os estudos experimentais e teóricos envolvendo a soro albumina humana;
- vi. Estudar a atividade antitumoral dos compostos mesoiônicos da série I frente a células leucêmicas infectadas ou não com o vírus HTLV-1;
- vii. Avaliar o efeito antitumoral e citotóxico dos sais mesoiônicos **24** e **25** (série I) na linhagem celular de osteossarcoma (MG-63);
- viii. Investigar a atividade antitumoral de sais mesoiônicos da série I sobre células derivadas de hepatocarcinoma humano (HepG2).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho visou dar continuidade ao estudo e investigação de uma das linhas de pesquisa do Núcleo de Síntese e Química Medicinal da UFRRJ (NUSQUIMED-UFRRJ), onde a síntese de compostos orgânicos heterocíclicos é planejada para a posterior avaliação de atividades biológicas, sendo os heteroátomos comumente nitrogênio e enxofre.

O estudo e aplicação de diferentes metodologias sintéticas levou à síntese de trinta e oito compostos orgânicos dos quais nove são inéditos, a fim de permitir novas avaliações de suas capacidades anticâncer frente a diferentes linhagens celulares.

Dentre os compostos preparados está uma série de hidrazino-carbotioamidas (**12-17**), e três séries de compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidas (série I: **23-30**, série II: **31-34** e série III: **35-38**). Inicialmente, foram preparados os compostos intermediários pertencentes a classe de tiouréias (**1-6**) e os isotiocianatos fenil-substituídos (**7-11**), para então serem sintetizadas as hidrazino-carbotioamidas (**12-17**) via reação de anidroacilação. Os cloretos de ácidos (**18-22**) foram previamente preparados e utilizados em uma das rotas de síntese dos cloridratos mesoiônicos substituídos com grupo estiril ou alquíil na posição 5 do anel heterocíclico (metodologia A, compostos **23-28** e **31-34**, respectivamente). Aldeídos benzóicos e cinâmicos comerciais foram empregados na síntese dos sais mesoiônicos, via metodologia B (**23-25**, **27-30** e **35-38**). A Figura 16 mostra o esquema de retrosíntese para a preparação desses compostos.

Os compostos da classe hidrazino-tiocarboamidas (**12-17**) foram avaliados quanto a inibição da tirosinase, enzima envolvida no processo de melanogênese, assim como foram estudados a partir da ancoragem molecular substrato-inibidor e interação com a albumina sérica humana. Os compostos mesoiônicos das séries I, II e III (**23-38**) foram avaliados quanto a atividade citotóxica frente a linhagem celular de hepatocarcinoma humano. Os cloridratos mesoiônicos **26**, **27**, **29** e **30** (série I), derivados de ácidos ou aldeídos cinâmicos, foram também avaliados quanto a atividade citotóxica frente a linhagens de células leucêmicas humanas e leucêmica infectada com o vírus HTLV-1. Os compostos **24** e **25** foram, ainda, avaliados na presença de células de osteossarcoma visando o estudo das suas atividades frente a esse tipo de câncer ósseo.

A seguir serão detalhados os processos e resultados de síntese e caracterização dos intermediários e das substâncias alvos desse trabalho, assim como, os ensaios biológicos realizados.

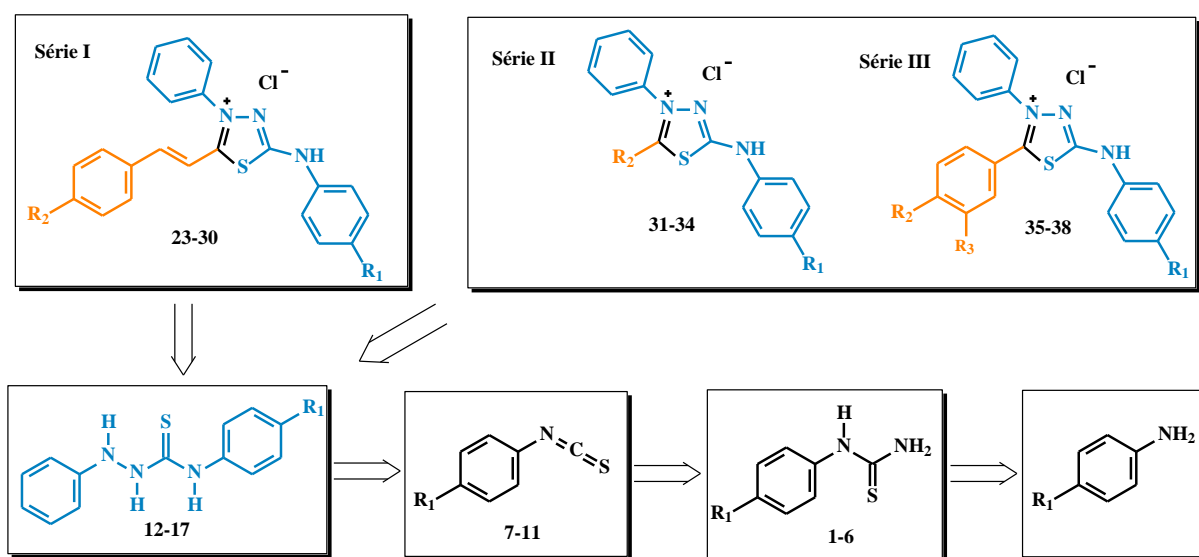


Figura 16. Retrossíntese para as hidrazino-carbotioamidas e compostos mesoiônicos.

1.1 Síntese

1.1.1 Síntese e caracterização dos intermediários tiouréias fenil-substituídas (1-6)

As tiouréias **1-6** foram preparadas a partir da reação entre o tiocianato de amônio e fenil aminas devidamente substituídas ou não, em meio de água como solvente e ácido clorídrico como catalizador, durante 6 horas de refluxo conforme descrito na literatura (BRITTO et al., 2006). Esta metodologia permitiu a obtenção dos produtos desejados em alto grau de pureza e com rendimentos variando de 13 a 95%. A Figura 17 mostra o esquema de síntese e as estruturas para as tiouréias e a Tabela 1 os rendimentos e pontos de fusão obtidos.

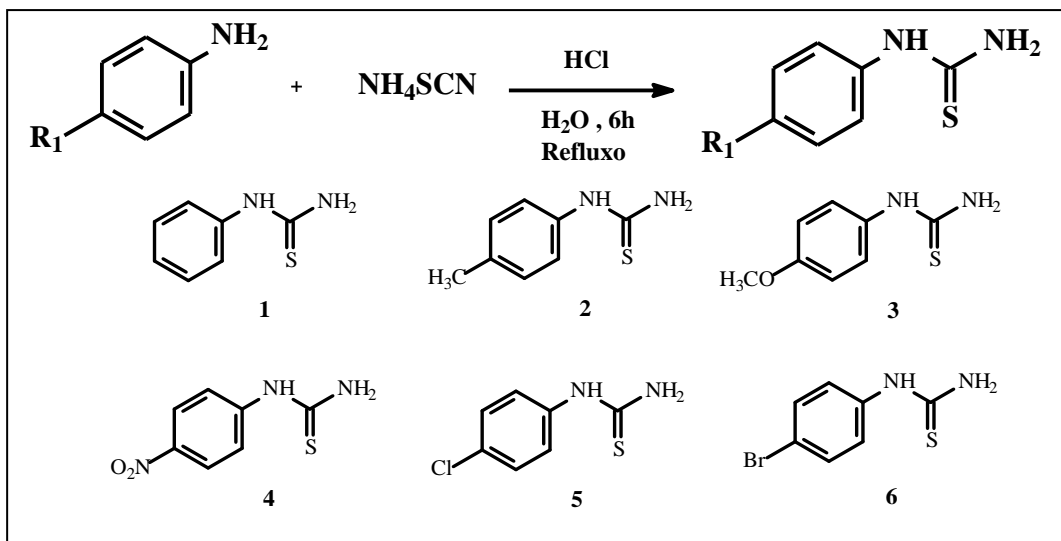


Figura 17. Reação para a preparação e estruturas para as tiouréias obtidas.

Tabela 1. Rendimentos e pontos de fusão das tiouréias obtidas.

Composto	R	Rendimento (%)	Ponto de fusão (°C)
1	H	45	146-148
2	CH ₃	13	183-185
3	CH ₃ O	95	210-212
4	NO ₂	71	211-213
5	Cl	67	210-212
6	Br	56	176-178



Figura 18. Tiouréia não substituída (**1**) logo após ser isolada via filtração.

O mecanismo proposto para a síntese das tiouréias envolveu, inicialmente, o ataque do par de elétrons do nitrogênio da anilina ao hidrogênio do ácido clorídrico o que confere ao nitrogênio uma carga formal positiva. Em seguida, ocorreu a abstração de um próton desta molécula pelo íon tiocianato e então o ataque nucleofílico da anilina ao carbono do tiocianato ocorrendo, assim, a consequente localização da carga negativa ao átomo de nitrogênio. Posteriormente, ocorreu abstração de hidrogênios pela água e então a ligação C=S foi formada localizando a carga negativa no átomo de nitrogênio 3, que abstraiu um hidrogênio do íon H_3O^+ dando origem a tiouréia alvo. A Figura 19 mostra o mecanismo de reação sugerido para a obtenção das tiouréias.

A caracterização das tiouréias foi realizada pela análise dos espectros de infravermelho (IV) e RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros encontram-se anexos.

Os espectros de IV foram obtidos em pastilha de KBr e apresentaram como principais absorções características a banda de estiramento da função amina secundária na faixa de 3446 a 3157 cm^{-1} , estiramento C-H de carbono aromático em torno de 3000 cm^{-1} , e uma banda em torno de 1200 cm^{-1} que indica a ligação entre o carbono e o enxofre (C=S). A seguir, na Tabela 2, estão listadas as principais bandas de absorção, no infravermelho, para as tiouréias obtidas.

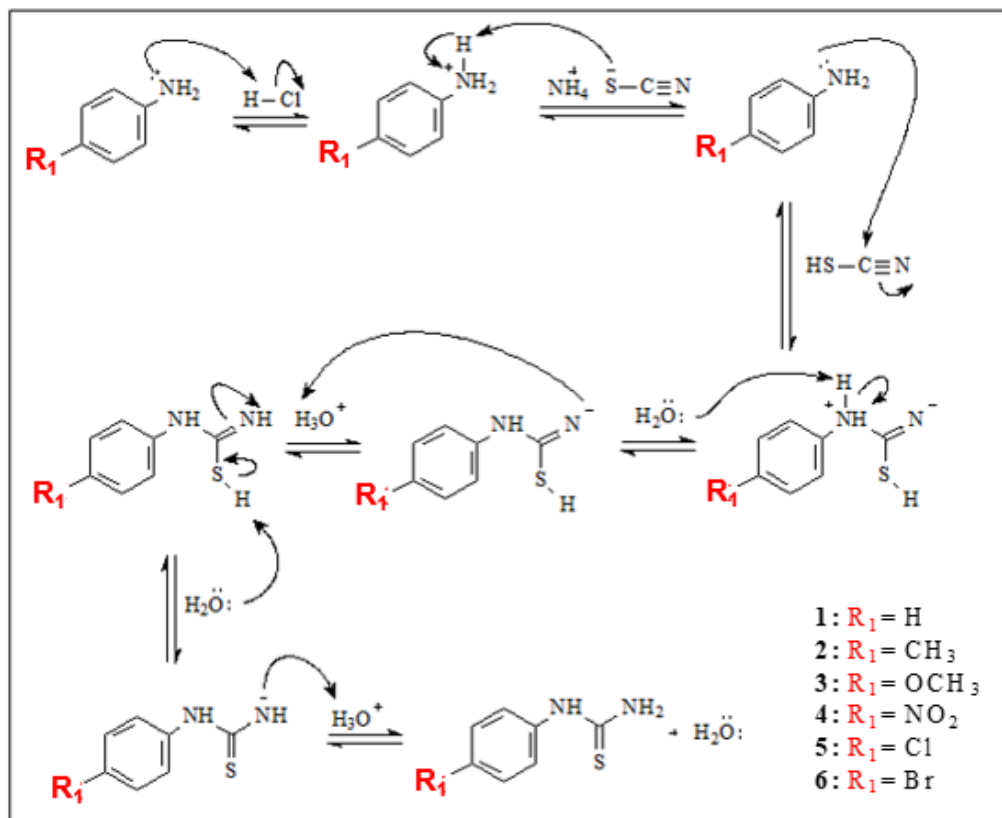


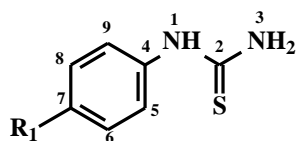
Figura 19. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção das tiouréias.

Nos espectros de RMN de ^1H das tiouréias foram observados sinais na faixa de δ 7,88-6,91, referentes aos deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos. Observaram-se, ainda, os singletos referentes à hidrogênios amínicos, quando não trocados pelo deutério presente no solvente de análise. Esses sinais são característicos dessa classe e se apresentaram na faixa de δ 10,38-9,55 para o hidrogênio 1 e δ 9,72-9,48 para o hidrogênio 3 (Tabela 3).

Tabela 2. Principais absorções na região do IV para as tiouréias.

Composto	Frequência de absorção (cm ⁻¹)					
	$\nu_{\text{N-H}}$	$\nu_{\text{C-H}}^*$	$\nu_{\text{C=C}}^{**}$	$\nu_{\text{C-X}}$	$\delta_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C=S}}$
1	3423; 3276; 3178	2999	1610;1517; 1446	-	810	1267
2	3437; 3273; 3167	3001	1614; 1535; 1463	2968	802	1261
3	3402; 3278; 3157	3008	1624; 1589; 1495	2979	810	1234
4	3377; 3290; 3184	3005	1608; 1595; 1471	1309	808	1244
5	3446; 3273; 3168	3010	1606; 1541; 1473	2225	-	1205
6	3406; 3257; 3184	3082	1616; 1506; 1454	2360	800	1226

*Estiramento C-H de aromático; **Vibração do esqueleto aromático.

Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN de ¹H para as tiouréias *p*-R₁-fenil-substituídas.

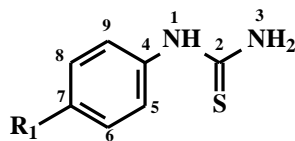
- 1:** R₁= H
2: R₁= CH₃
3: R₁= OCH₃
4: R₁= NO₂
5: R₁= Cl
6: R₁= Br

Hidrogênio	Composto					
	1	2	3	4	5	6
1	n.o.	9,60 (s, 1H)	n.o.	10,38 (s,1H)	9,55 (s, 1H)	9,77 (s, 1H)
3	9,72 (s, 2H)	n.o.	9,48 (s, 2H)	n.o.	n.o.	n.o.
5, 9	7,40 (d, 2H)	7,23 (d, 2H)	7,21 (d, 2H)	7,88 (d, 2H)	7,39 (d, 2H)	7,42 (d, 2H)
6, 8	7,33 (t, 2H)	7,14 (d, 2H)	6,91 (d, 2H)	8,18 (d, 2H)	7,16 (d, 2H)	7,48 (d, 2H)
CH₃	-	2,27 (s, 3H)	-	-	-	-
7	7,12 (t, 1H)	-	-	-	-	-
OCH₃	-	-	3,74 (s, 3H)	-	-	-

n.o. = hidrogênio não observado.

Nos espectros de RMN de ¹³C, observou-se principalmente sinais referentes ao carbono tiocarbonílico (C=S) em torno de δ 181,00. Nota-se ainda sinais relativos aos carbonos aromáticos entre δ 146,13 e 114,00. Os deslocamentos químicos obtidos para as tiouréias estão descritos a seguir, na Tabela 4.

Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN ^{13}C para as tiouréias *p*- R_1 -fenil-substituídas.



- 1:** $\text{R}_1 = \text{H}$
2: $\text{R}_1 = \text{CH}_3$
3: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$
4: $\text{R}_1 = \text{NO}_2$
5: $\text{R}_1 = \text{Cl}$
6: $\text{R}_1 = \text{Br}$

Carbono	Composto					
	1	2	3	4	5	6
2	181,00	180,95	181,13	181,31	181,21	181,14
4	139,11	136,43	131,73	140,80	143,96	138,66
5, 9	123,02	123,37	125,60	129,29	121,61	124,89
6, 8	128,70	129,21	114,00	122,26	132,85	131,40
7	124,39	133,76	156,61	146,13	119,12	116,25
CH₃	-	20,52	-	-	-	-
OCH₃	-	-	55,26	-	-	-

1.1.2 Síntese dos isotiocianatos fenil-substituídos (7-11)

Os isotiocianatos foram preparados, partindo-se das correspondentes tiouréias obtidas anteriormente (**1-6**). As tiouréias foram solubilizadas em clorobenzeno como solvente, sendo posteriormente aquecidas sob refluxo levando aos isotiocianatos correspondentes (**7-11**), via reação de desproporcionamento. A Figura 20 mostra a reação para a síntese e as estruturas para os isotiocianatos obtidos.

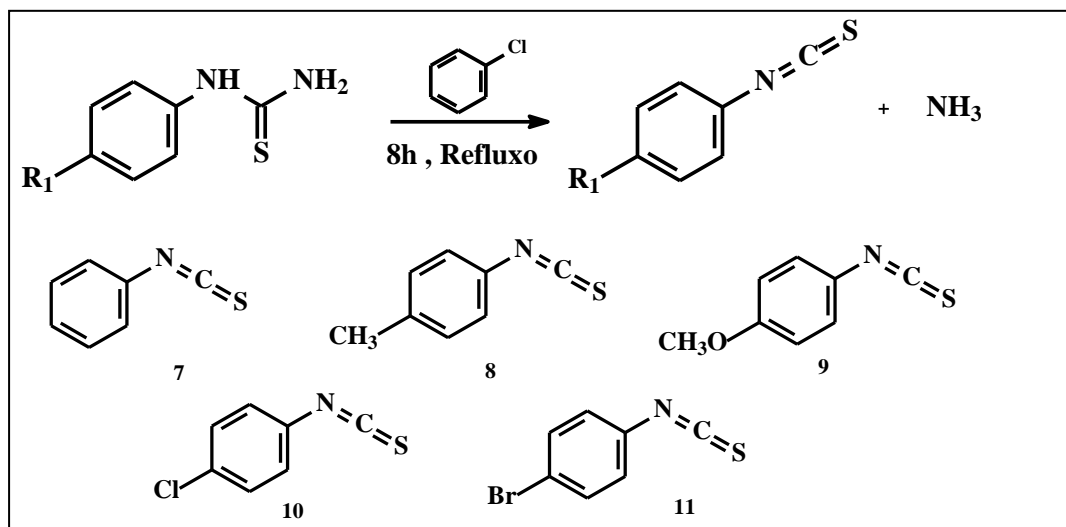


Figura 20. Reação de obtenção e estruturas para os isotiocianatos.

Os rendimentos de reação variaram de 40 a 72%, como mostra a Tabela 5. O isotiocianato nitro substituído utilizado na etapa de síntese posterior não foi sintetizado, mas obtido comercialmente.

Tabela 5. Rendimentos dos isotiocianatos obtidos.

Composto	R ₁	Rendimento (%)
7	H	55
8	CH ₃	68
9	CH ₃ O	72
10	Cl	40
11	Br	60

O mecanismo proposto para a síntese dos isotiocianatos envolve o rearranjo intramolecular 1,4 de hidrogênio, visto que a reação ocorreu na ausência de solvente prótico, e a consequente localização da carga negativa no átomo de enxofre. Em seguida, a ligação C=S foi refeita, liberando amônia ao meio, dando origem ao isotiocianato correspondente. A Figura 21 mostra o mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos isotiocianatos em clorobenzeno a refluxo.

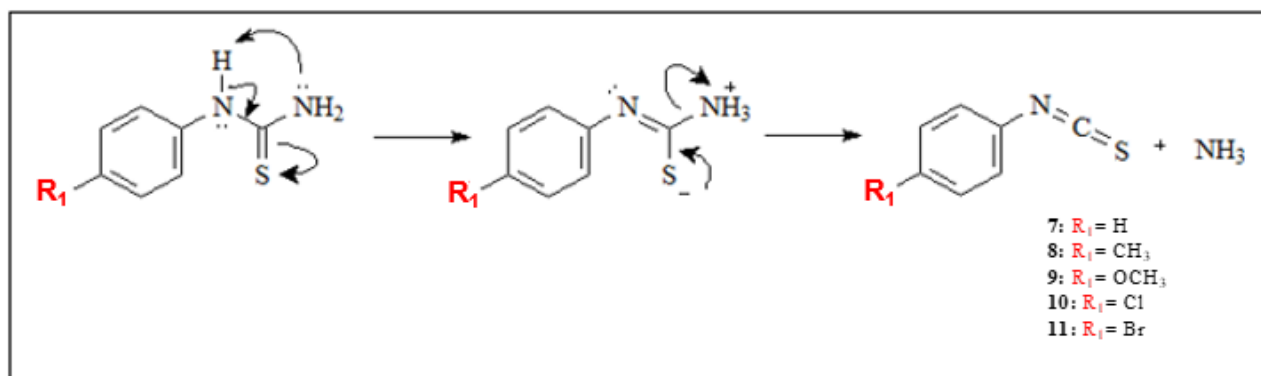


Figura 21. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos isotiocianatos utilizando clorobenzeno como solvente sob refluxo.

Os isotiocianatos obtidos foram imediatamente utilizados na etapa de síntese seguinte para a obtenção das hidrazino-carbotioamidas, sem purificação e caracterização devido à instabilidade dos mesmos. A formação dos isotiocianatos foi acompanhada por cromatografia em camada delgada.

1.1.3 Síntese e caracterização das hidrazino-carbotioamidas (12-17)

As hidrazino-carbotioamidas *N*₁,*N*₄-dissubstituídas (12-17) foram preparadas a partir de uma reação de anidroacilação via três metodologias distintas: (A) metodologia tradicional utilizando agitação magnética e refluxo em tolueno; (B) via irradiação de micro-ondas e (C) via mecano-química na ausência de solvente à temperatura ambiente.

Através da metodologia A os produtos foram obtidos com a reação entre a fenil-hidrazina e o respectivo isotiocianato, utilizando tolueno anidro, em ebulição, como solvente sob agitação magnética. Esta metodologia permitiu a obtenção dos produtos desejados com rendimentos variando de 68 a 95% em 60 minutos de refluxo.

A síntese via irradiação em reator de micro-ondas (metodologia B) possibilitou rendimentos de 73 a 83% em 30 minutos, e fazendo o uso da mecano-química na ausência de

solvente (metodologia C), as tiossemicarbazidas foram obtidas em rendimentos quantitativos e com alto grau de pureza em apenas 2 minutos.

O método na ausência de solvente mostrou-se o mais eficiente para a síntese das tiossemicarbazidas, pois proporcionou a obtenção quantitativa dos produtos desejados em apenas 2 minutos de reação sem o uso de solvente orgânico. A Figura 22 mostra a reação de obtenção e as estruturas das hidrazino-carbotioamidas *N*₄-substituídas (**12-17**).

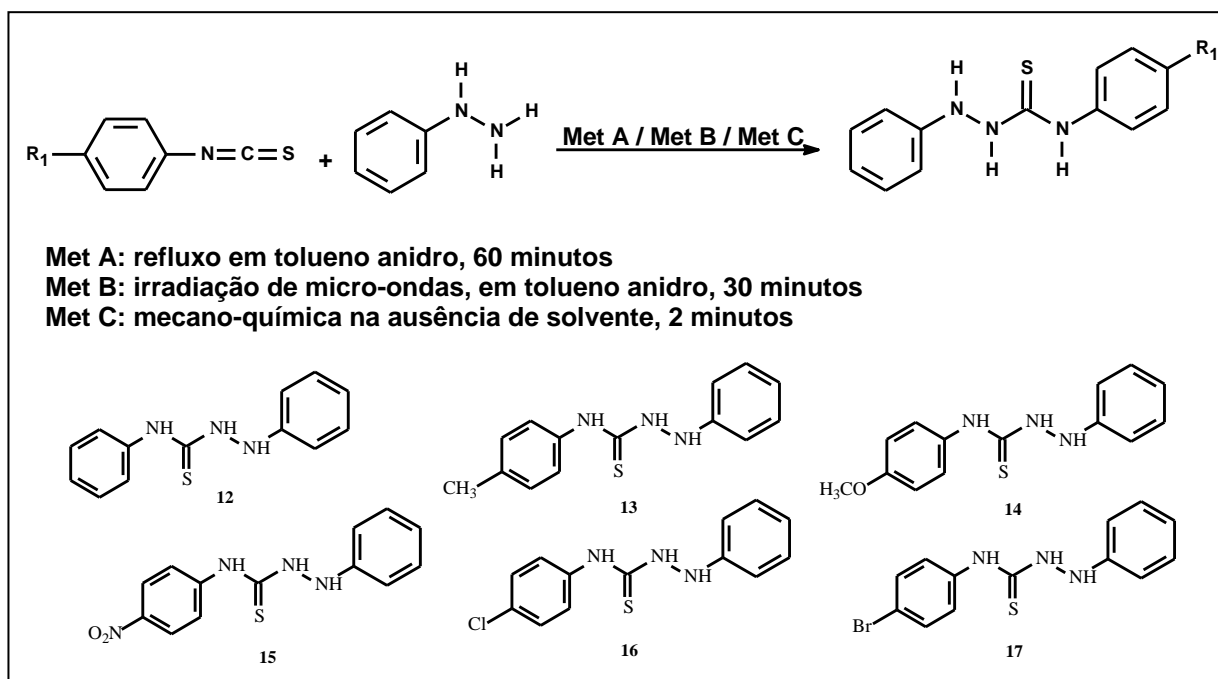


Figura 22. Esquema de síntese e estruturas para as hidrazino-carbotioamidas.

A Tabela 6 mostra os rendimentos obtidos via metodologias A e B e os pontos de fusão observados para os compostos sintetizados.

Tabela 6. Rendimentos obtidos através das metodologias A e B, e pontos de fusão para as hidrazino-carbotioamidas sintetizadas.

Composto	R ₁	Rendimento por método (%)		Ponto de fusão (°C)
		A	B	
12	H	92	83	171-173
13	CH ₃	92	78	174-175
14	CH ₃ O	77	80	184-186
15	NO ₂	95	73	185-187
16	Cl	68	*	233-234
17	Br	93	*	209-212

^A Refluxo por 60 minutos em tolueno; ^B Irradiação de micro-ondas em tolueno por 30 minutos; *Síntese não realizada.

O mecanismo proposto para a reação de obtenção das hidrazino-carbotioamidas, na presença de tolueno ou na ausência de solvente, envolve um ataque nucleofílico do par de elétrons do nitrogênio terminal da fenil-hidrazina ao carbono eletrofílico do isotiocianato ocorrendo, assim, a consequente localização da carga negativa no átomo de enxofre. Em

seguida, ocorre um rearranjo intramolecular 1,4 de hidrogênio e posteriormente a ligação C=S foi refeita dando origem aos compostos alvos. A Figura 23 mostra o mecanismo de reação sugerido na ausência de solvente prótico para a obtenção das hidrazino-carbotioamidas *N*₄-R₁-fenil-substituídas.

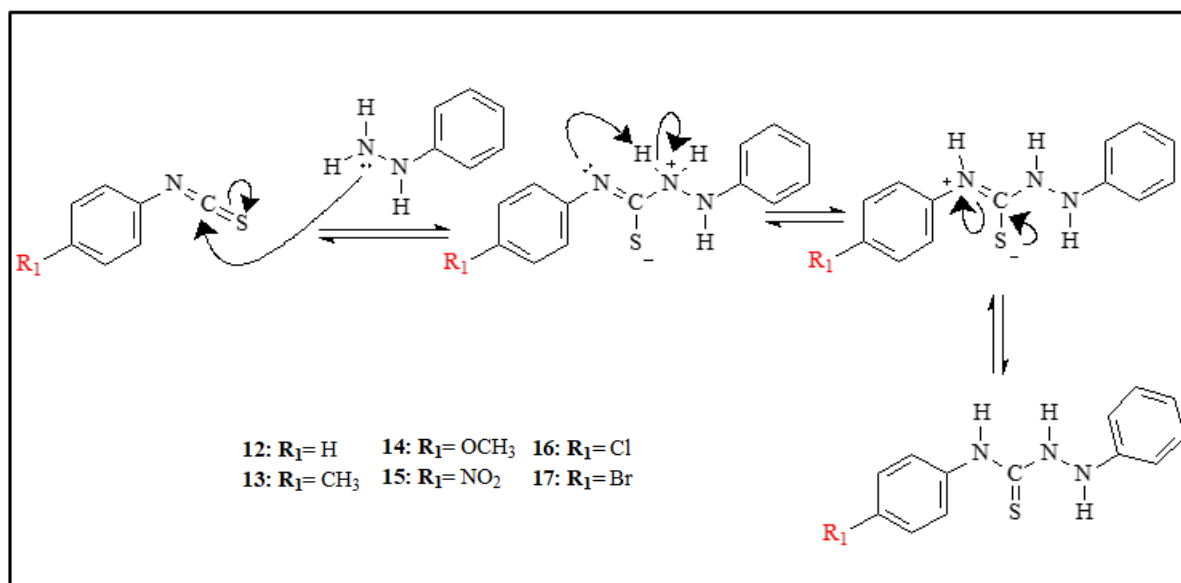


Figura 23. Mecanismo de reação proposto para a obtenção das hidrazino-carbotioamidas na presença de solvente aprótico (tolueno) ou ausência de solvente.

Os compostos foram caracterizados pelas técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ¹H e ¹³C. Os espectros de IV foram obtidos em pastilha de KBr e apresentaram como principais absorções características a banda de estiramento da função amina secundária na faixa de 3437 e 3091 cm⁻¹; bandas referentes à deformações axiais da ligações C=C de aromático, entre 1627 e 1490 cm⁻¹; deformação axial de C-H (carbono de aromático), em torno de 3030 cm⁻¹ e; uma banda na região compreendida entre 1199 e 1286 cm⁻¹ que indicou a deformação axial C=S. A seguir, na Tabela 7, estão listadas as principais bandas de absorção, no infravermelho, para as ligações mais características das hidrazino-carbotioamidas sintetizadas.

Tabela 7. Principais absorções na região do IV para as hidrazino-carbotioamidas obtidas.

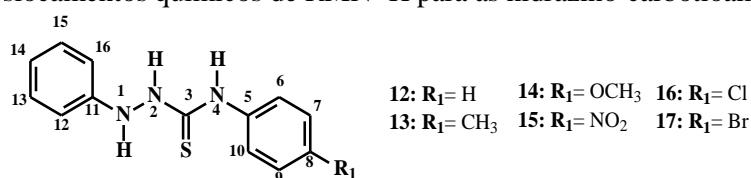
Composto	Frequência de absorção (cm ⁻¹)			
	ν _{N-H}	ν _{C=C} **	ν _{C-X}	ν _{C=S}
12	3282, 3212, 3170	1594, 1542, 1496	-	1207
13	3437, 3275, 3186	1627, 1550, 1490	-	1269
14	3267, 3161, 3091	1600, 1548, 1492	1170	1247
15	3435, 3203, 3143	1600, 1568, 1504	1504	1280
16	3435, 3315, 3140	1600, 1554, 1508	1209, 758	1286
17	3249, 3182	1597, 1585, 1489	1072, 769	1199

*Estiramento C-H de aromático**Vibração do esqueleto aromático

Nos espectros de RMN de ^1H , foram observados sinais na faixa de δ 8,20 a 6,76 referentes a deslocamentos químicos de hidrogênios aromáticos. Foram observados três sinais relativos a hidrogênios amínicos entre δ 10,20 e 7,38. Os sinais referentes ao hidrogênio 2 apareceram entre δ 10,20 e 7,38 enquanto os sinais referentes ao hidrogênio 4 foram observados na faixa de δ 8,63 a 10,04.

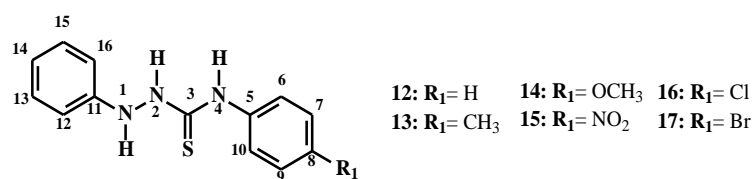
Os sinais observados nos espectros de RMN de ^{13}C indicando carbonos mais desprotegidos, na faixa de δ 183,64 a 180,83, foram atribuídos ao carbono tiocarbonílico (C-3) de cada composto, sendo esse sinal o mais característico para os compostos avaliados. Observaram-se, ainda, sinais referentes aos carbonos aromáticos entre δ 158,45 e 113,11. O maior valor de deslocamento químico referente ao carbono 5 foi observado para o composto **15**, hidrazino-carbotioamida 4-*N*-(*p*-NO₂-fenil)-substituída, em δ 146,84. Esse valor reflete o efeito de desproteção causado pelo grupo nitro, fortemente retirador de elétrons. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C atribuídos para as hidrazino-carbotioamidas estão descritos a seguir, nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. Os espectros encontram-se anexos.

Tabela 8. Deslocamentos químicos de RMN ^1H para as hidrazino-carbotioamidas.



Hidrogênio	Composto					
	12	13	14	15	16	17
1	7,42 (s,1H)	7,38 (s,1H)	8,02 (s,1H)	7,50 (s,1H)	8,15 (s,1H)	8,07 (s,1H)
2	9,66 (s,1H)	9,57 (s,1H)	9,69 (s,1H)	10,19 (s, 1H)	10,20 (s,1H)	9,79 (s,1H)
4	8,70 (s,1H)	8,63 (s,1H)	9,59 (s,1H)	9,04 (s,1H)	10,04 (s,1H)	9,92 (s,1H)
6, 10	7,56 (d, 2H)	7,57 (d,2H)	7,32 (d,2H)	8,20 (d,2H)	6,79 (d,2H)	7,50 (d,2H)
12,16	6,87 (d, 2H)	6,88 (d, 2H)	6,76 (d, 2H)	6,89 (d,2H)	7,93 (d, 2H)	7,50 (d, 2H)
8	7,12 (t, 1H)	-	-	-	-	-
7, 9	7,29 (t, 2H)	7,09 (d, 2H)	6,86 (d, 2H)	8,20 (d,2H)	7,76 (t, 2H)	7,47 (t, 2H)
13, 15	7,25 (t, 2H)	7,25 (t, 2H)	7,22 (t, 2H)	7,27 (t, 2H)	7,24 (t, 2H)	7,22 (t, 2H)
14	6,89 (t, 1H)	6,88 (t, 1H)	6,86 (t, 1H)	6,88 (t, 1H)	6,84 (t, 1H)	6,81 (t, 1H)
CH₃	-	2,28 (s, 3H)	-	-	-	-
OCH₃	-	-	3,72 (s, 3H)	-	-	-

Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para as hidrazino-carbotioamidas.



Carbono	Composto					
	12	13	14	15	16	17
3	183,18	182,90	183,64	182,97	180,83	181,12
5	140,45	137,52	133,35	146,84	147,75	138,68
6, 10	125,24	125,04	127,35	124,11	124,47	127,20
7, 9	129,22	129,38	114,42	125,03	132,08	130,66
8	125,95	135,16	158,45	145,06	119,03	116,88
11	149,03	148,73	149,18	148,84	147,77	147,93
12, 16	114,61	114,22	114,56	114,94	113,27	113,11
13, 15	130,25	129,89	130,26	130,45	128,92	128,88
14	122,00	121,60	121,91	122,46	120,10	119,87
CH₃	-	20,84	-	-	-	-
OCH₃	-	-	55,99	-	-	-

1.1.4 Síntese dos Cloridratos Meso-iônicos (23-38)

Foram obtidas três séries de compostos meso-iônicos a partir das hidrazino-carbotioamidas previamente sintetizadas, onde a série I (23-30) foi derivada de ácidos ou aldeídos cinâmicos, a série II (31-34) de ácidos alquílicos e a série III (35-38) de aldeídos benzoicos (Figura 24). Duas metodologias distintas foram empregadas na preparação desses compostos.

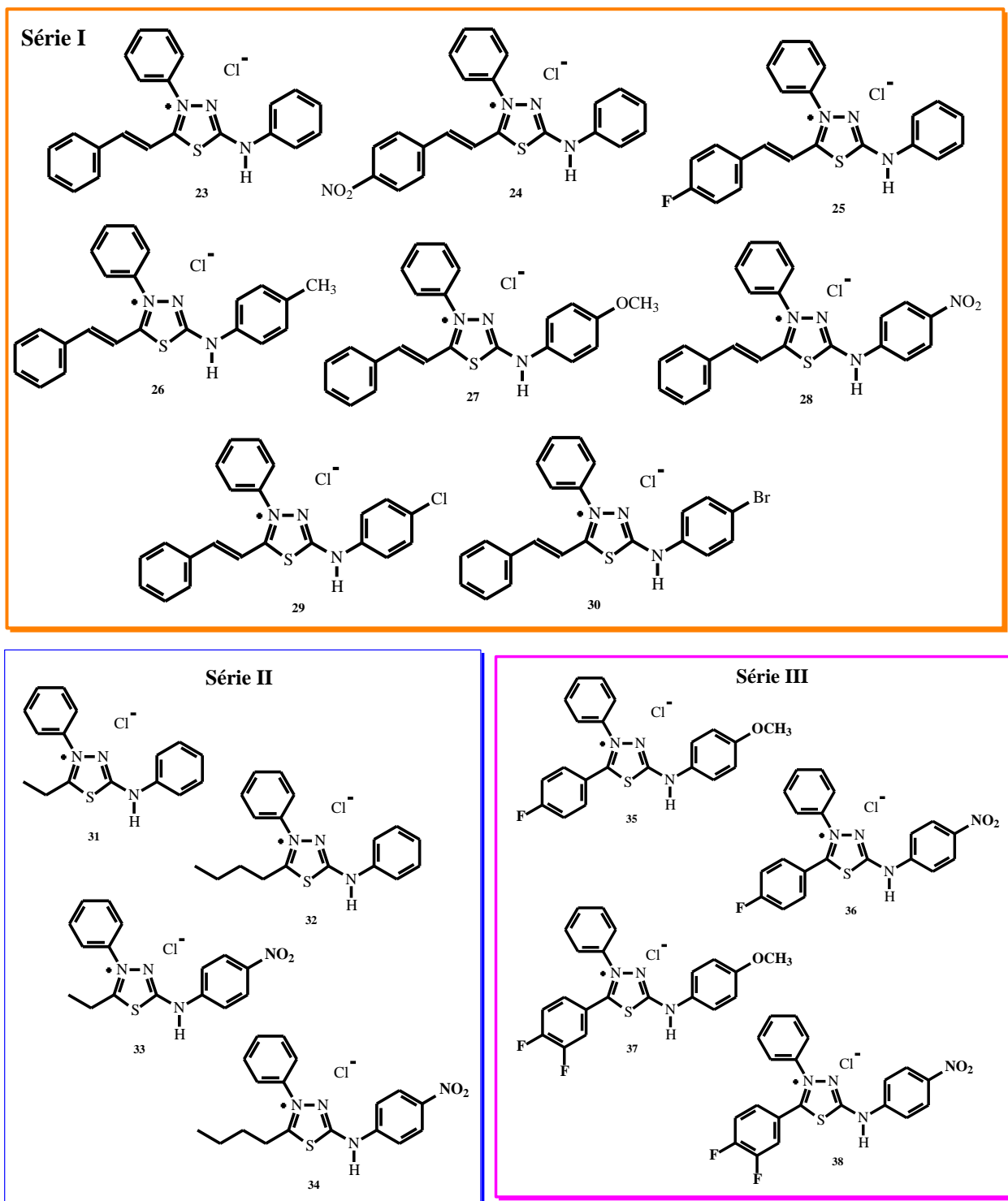
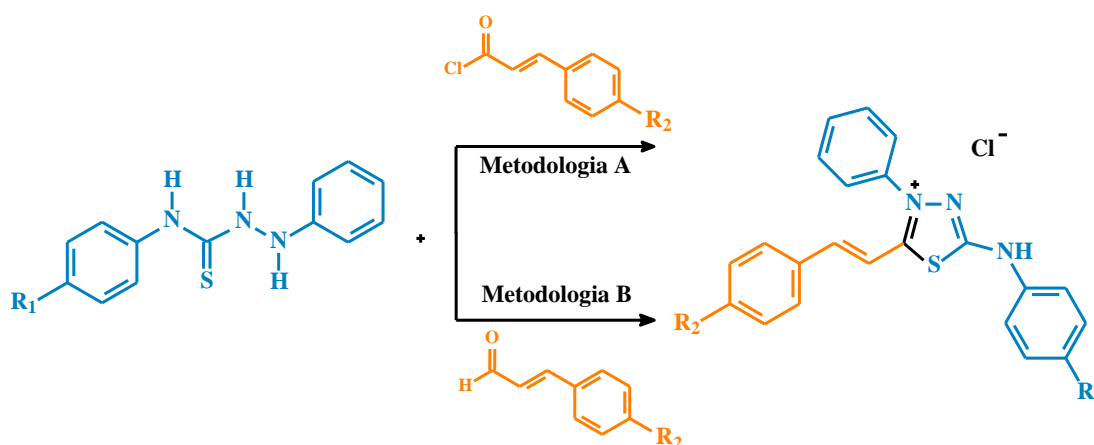


Figura 24. Estruturas dos cloridratos meso-iônicos sintetizados.

1.1.4.1 Síntese e caracterização dos cloridratos mesoiônicos da série I (23-30)

Os cloretos de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (**23-30**) foram sintetizados através de 2 metodologias diferentes. Os compostos foram obtidos a partir dos cloretos dos ácidos cinâmicos substituídos e a N_1,N_4 -difetil-hidrazino-carbotioamida adequada, em 1,4-dioxano como solvente, sob refluxo por quatro horas de reação (metodologia A). Na metodologia B os compostos foram obtidos a partir dos respectivos cinamaldeídos e N_1,N_4 -difetil-hidrazino-carbotioamidas na presença de cloreto de tionila em excesso, sob irradiação em reator de micro-ondas por cinco minutos (potência de 100 W). A formação dos produtos foi acompanhada por cromatografia em camada fina. Os produtos foram obtidos com rendimentos variando de 54 a 98%, utilizando a metodologia A (via refluxo), e de 93 a 98%, utilizando a metodologia B (via irradiação de micro-ondas). A Figura 25 mostra o esquema de síntese para os cloridratos mesoiônicos 5-estiril sintetizados e a Figura 26 ilustra o composto **24** em sua forma sólida (A) e em solução (B) de 1,4-dioxano. A Tabela 10 os rendimentos e pontos de fusão observados.



Metodologia A: refluxo em 1,4-dioxano

Metodologia B: irradiação de micro-ondas na presença de SOCl₂

Figura 25. Esquema de síntese para os sais mesoiônicos da série I.

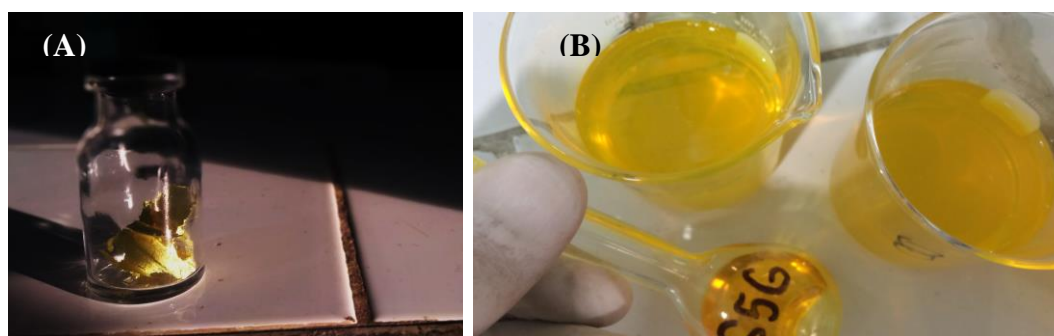


Figura 26. Composto **24** em forma sólida (A) e em solução (B).

Tabela 10. Rendimentos e pontos de fusão dos sais mesoiônicos da série I.

Composto	R ₁	R ₂	Rendimento por metodologia (%)		Ponto de fusão (°C)
			A	B	
23	H	H	58	97	266-268
24	H	NO ₂	78	93	274-276
25	H	F	80	*	238-239
26	CH ₃	H	98	98	286-287
27	OCH ₃	H	73	96	291-292
28	NO ₂	H	54	95	290-293
29	Cl	H	*	97	282-284
30	Br	H	*	96	296-298

^A Refluxo em 1,4-dioxano por 4 horas; ^B Irradiação de micro-ondas por 5 minutos, SOCl₂ (3x em excesso), 1,4-dioxano, 100 W; *Síntese não realizada.

Os sais mesoiônicos foram caracterizadas também utilizando as técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ¹H e ¹³C. Os espectros de infravermelho não se mostraram muito diferentes entre si, devido à semelhança estrutural dos compostos sintetizados, no entanto, indicaram absorções características nas faixas correspondentes aos grupos N-H, entre 3435 e 3410 cm⁻¹, C=NH⁺ entre 2746 e 2582 cm⁻¹. Foram observadas, também, absorções características para os grupamentos C=C vinílico entre 1622 e 1604 cm⁻¹, além das bandas típicas referentes às ligações C-H e C=C aromáticas indicando o perfil de substituição (Tabela 11).

Tabela 11. Principais absorções na região do IV para os cloridratos mesoiônicos da série I.

Composto	Frequência de absorção (cm ⁻¹)				
	ν _{N-H}	ν _{C-H} *	ν _{C=NH⁺}	ν _{C=C} **	ν _{C-X}
23	3432	3056	2670	1538, 1498 e 1448	-
24	3432	3048	2721	1616, 1571 e 1450	1519
25	3410	3047	2732	1596, 1509, 1449	1240
26	3431	3039	2746	1614, 1564 e 1452	-
27	3431	3043	2717	1595, 1575 e 1454	1109
28	3435	2997	2582	1627, 1585; 1496	1338
29	3433	2922	2586	1620, 1562 e 1492	1033
30	3432	3037	2663	1560, 1484 e 1442	948, 669

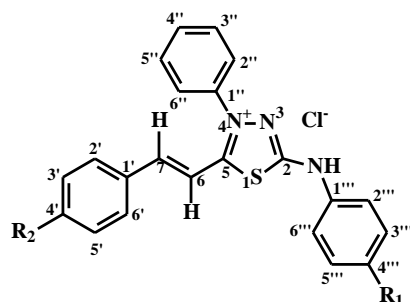
*Estiramento C-H de aromático e/ou vinílico **Vibração do esqueleto aromático

Os espectros de RMN de ¹H permitiram a atribuição dos valores de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios amínicos exocíclicos na faixa de δ 13,03 e 12,41, além dos sinais referentes ao H-6 na faixa de δ 7,25 a 7,04 e, para os H-7 na faixa de δ 8,13 a 8,01 (Tabela 12).

Nos espectros de RMN de ¹³C, foi possível observar os deslocamentos químicos característicos dos carbonos C-2 (δ 159,30-148,50) e C-5 (δ 163,36-159,75) do anel heterocíclico. Os carbonos C-6 e C-7 tiveram deslocamentos químicos refletindo o efeito retirador de elétrons do anel heterocíclico, ou seja, o C-7 mostrou-se sempre mais desprotegido (δ 148,23-142,81), enquanto que o C-6 mais protegido (δ 115,50-111,43). Foi

possível observar a variação dos valores de deslocamentos químicos para os carbonos C-4' e C-4''' nos diferentes compostos da série. Essa observação se deve aos diferentes grupos substituintes dos anéis aromáticos e seus correspondentes efeitos eletrônicos. O maior valor de C-4' foi referente ao composto **25** que possui como substituinte o átomo de flúor, sendo desdobrado em dois sinais δ 165,50 e 163,50, com constante de acoplamento de 250 Hz (Tabela 13).

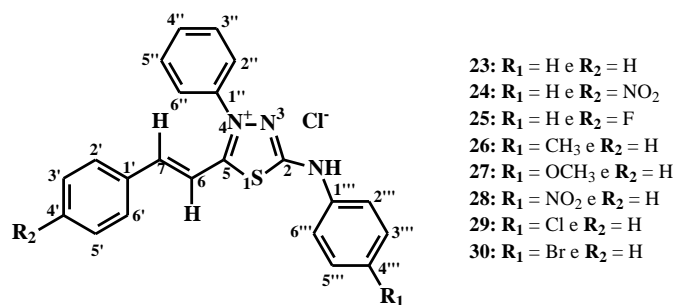
Tabela 12. Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os cloridratos mesoiônicos da série I (**23-30**).



- 23:** $\text{R}_1 = \text{H}$ e $\text{R}_2 = \text{H}$
24: $\text{R}_1 = \text{H}$ e $\text{R}_2 = \text{NO}_2$
25: $\text{R}_1 = \text{H}$ e $\text{R}_2 = \text{F}$
26: $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ e $\text{R}_2 = \text{H}$
27: $\text{R}_1 = \text{OCH}_3$ e $\text{R}_2 = \text{H}$
28: $\text{R}_1 = \text{NO}_2$ e $\text{R}_2 = \text{H}$
29: $\text{R}_1 = \text{Cl}$ e $\text{R}_2 = \text{H}$
30: $\text{R}_1 = \text{Br}$ e $\text{R}_2 = \text{H}$

Hidrogênio	Composto							
	23	24	25	26	27	28	29	30
6	7,05 (d, 1H)	7,26 (d, 1H)	7,04 (d, 1H)	7,25 (d, 1H)	7,24 (d, 1H)	7,10 (d, 1H)	7,04 (d, 1H)	7,04 (d, 1H)
7	8,01 (d, 1H)	8,13 (d, 1H)	8,03 (d, 1H)	8,10 (d, 1H)	8,09 (d, 1H)	8,11 (d, 1H)	8,02 (d, 1H)	8,03(d, 1H)
2', 6'	7,75 (m, 2H)	7,76 (m, 2H)	7,87 (m, 2H)	7,83 (m, 2H)	7,83 (m, 2H)	7,47 (m, 2H)	7,61 (d, 2H)	7,60 (d, 2H)
3', 5'	7,44 (m, 2H)	8,25 (d, 2H)	7,87 (m, 2H)	7,83 (m, 2H)	7,83 (m, 2H)	7,47 (m, 2H)	7,75 (m, 2H)	7,75 (m, 2H)
4'	7,44 (m, 1H)	-	-	7,83 (m, 1H)	7,83 (m, 1H)	7,47 (m, 1H)	7,47 (m, 1H)	7,47 (m, 1H)
2'', 6''	7,75 (m, 2H)	8,02 (d, 2H)	7,75 (m, 2H)	8,01 (d, 2H)	8,00 (d, 2H)	7,77 (m, 2H)	7,75 (m, 2H)	7,75 (m, 2H)
3'', 5''	7,84 (d, 2H)	7,85 (dd, 2H)	7,31 (t, 2H)	8,25 (d, 2H)	8,24 (d, 2H)	7,85 (m, 2H)	7,84 (dd, 2H)	7,83 (dd, 2H)
4''	7,75 (m, 1H)	7,76 (m, 1H)	7,75 (m, 1H)	7,83 (m, 1H)	7,83 (m, 1H)	7,77 (m, 1H)	7,75 (m, 1H)	7,75 (m, 1H)
2''', 6'''	7,58 (d, 2H)	7,61 (d, 2H)	7,42 (t, 2H)	7,22 (d, 2H)	7,52 (d, 2H)	7,77 (m, 2H)	7,47 (m, 2H)	7,47 (m, 2H)
3''', 5'''	7,44 (m, 2H)	7,41 (t, 2H)	7,63 (d, 2H)	7,47 (d, 2H)	6,99 (d, 2H)	8,32 (d, 2H)	7,47 (m, 2H)	7,54 (d, 2H)
4'''	7,15 (t, 1H)	7,14 (t, 1H)	7,14 (t, 1H)	-	-	-	-	-
CH ₃	-	-	-	2,27 (s, 3H)	-	-	-	-
OCH ₃	-	-	-	-	3,73 (s, 3H)	-	-	-
N-H	12,41 (s, 1H)	13,03 (s, 1H)	12,96 (s, 1H)	12,58 (s, 1H)	12,73 (s, 1H)	12,86 (s, 1H)	12,82 (s, 1H)	12,62 (s, 1H)

Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN ¹³C para os cloridratos mesoiônicos da série I (23-30).



	23	24	25	26	27	28	29	30
2	159,14	156,96	159,30	148,50	156,04	156,96	158,84	158,89
5	162,90	162,83	163,20	159,75	161,33	162,83	163,23	163,36
6	111,50	112,46	111,90	115,47	115,50	112,46	111,43	111,45
7	147,90	142,81	147,00	144,45	144,20	142,81	148,18	148,23
1'	136,98	137,58	131,00	136,98	139,98	137,58	136,93	136,94
2', 6'	130,17	130,00	132,20	130,18	130,15	130,00	129,15	129,18
3', 5'	129,51	139,13	118,90	130,07	130,03	128,24	130,16	130,20
4'	131,70	130,83	165,50 e 163,50	130,00	120,48	130,83	131,71	131,75
1''	133,81	134,38	137,50	133,61	137,00	134,38	133,78	133,80
2'', 6''	129,09	126,01	129,90	125,16	126,14	126,01	126,16	126,19
3'', 5''	129,22	128,24	130,60	129,90	130,03	139,13	120,07	120,47
4''	131,94	131,18	132,10	131,83	131,79	131,18	131,95	132,02
1'''	138,51	139,35	139,10	139,94	131,72	139,35	137,44	137,85
2''', 6'''	118,60	121,42	116,70	118,81	124,13	121,42	129,09	129,23
3''', 5'''	126,15	125,26	126,60	124,14	114,63	125,26	129,36	132,32
4'''	124,17	154,96	124,40	126,13	148,45	154,96	127,65	115,78
CH ₃	-	-	-	20,48	-	-	-	-
OCH ₃	-	-	-	-	55,30	-	-	-

O mecanismo sugerido para a etapa de heterociclização, pela metodologia tradicional (A), envolve inicialmente o ataque nucleofílico da hidrazino-carbotioamida 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 27 mostra o mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos cloridratos mesoiônicos em condições tradicionais, ou seja, utilizando cloretos de ácido como reagentes.

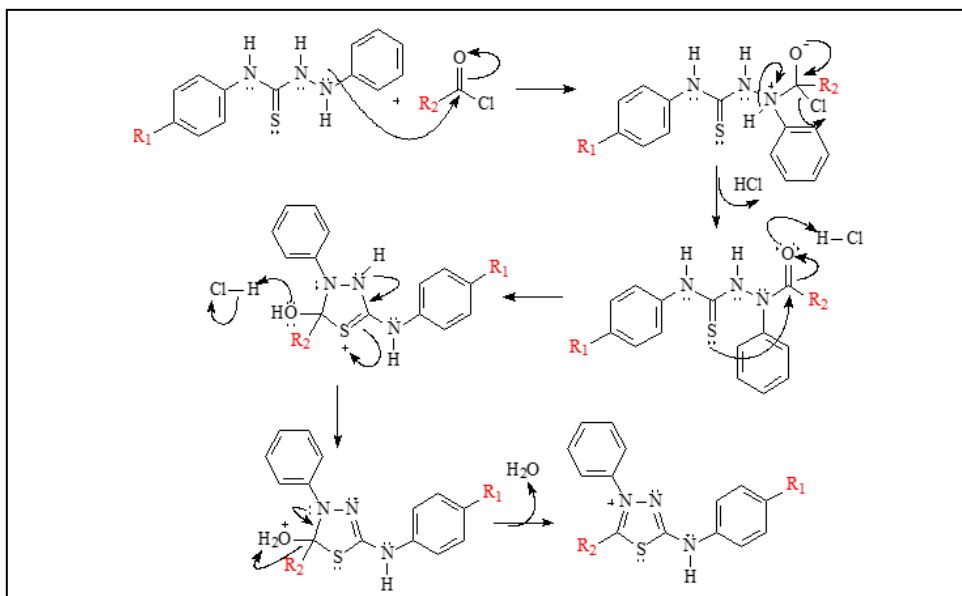


Figura 27. Mecanismo de reação proposto para a obtenção dos sais mesoiônicos a partir de hidrazino-carbotoioamidas e cloretos de ácido.

Já o mecanismo sugerido para a síntese dos mesmos compostos utilizando irradiação de micro-ondas (metodologia B) envolve inicialmente o ataque dos pares de elétrons não-ligantes do oxigênio da carbonila aldeídica ao átomo de enxofre do cloreto de tionila, formando um intermediário com um carbono de maior caráter eletrofílico. Em seguida, ocorre o ataque nucleofílico da hidrazino-carbotoioamida a este carbono eletrofílico formando um intermediário *N*-acilado, que posteriormente, foi atacado pelo átomo de enxofre do grupo tiocarbonila eliminando uma molécula de SO₂ e levando a formação do sistema cíclico. Posteriormente, ocorreu a aromatização do heterociclo com a saída de um hidrogênio pelo íon cloreto formando ácido clorídrico. A Figura 28 mostra o mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos sais mesoiônicos, utilizando cloreto de tionila como ácido de Lewis.

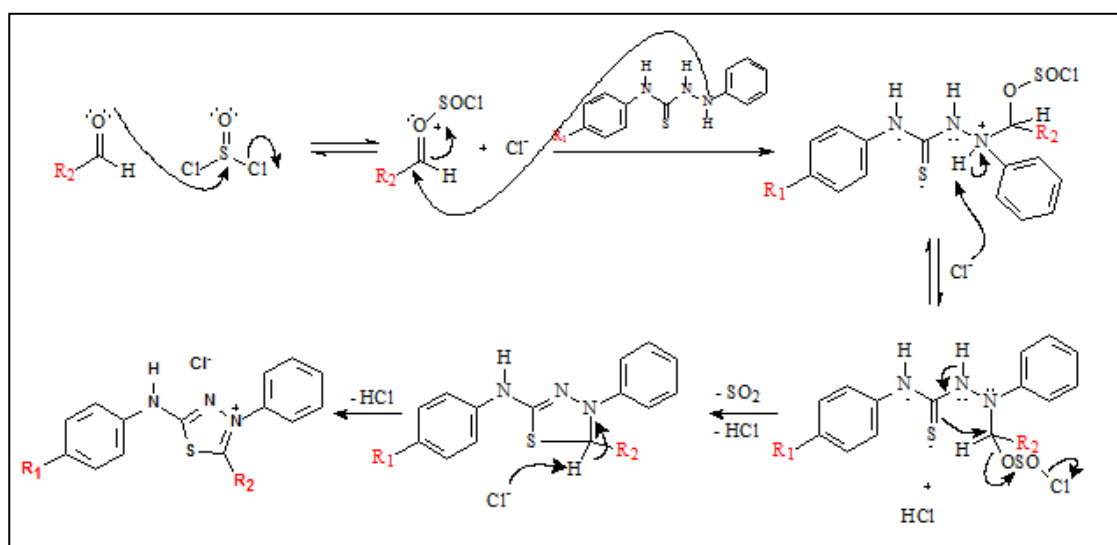


Figura 28. Mecanismo de reação sugerido para a obtenção dos sais mesoiônicos utilizando aldeídos substituídos, hidrazino-carbotoioamidas e SOCl₂ como ácido de Lewis.

1.1.4.2 Síntese e caracterização dos cloridratos mesoiônicos da série II (31-34)

Os cloridratos mesoiônicos 5-alkilados (31-34) foram sintetizados a partir da reação dos cloretos dos ácidos alquílicos previamente preparados e a *N*₁-fenil,*N*₄-*R*₁-fenil-hidrazino-carbotioamidas, nitro substituída ou não, em 1,4-dioxano sob refluxo por quatro horas (metodologia A). A formação dos produtos foi acompanhada por cromatografia em camada delgada. A Figura 29 mostra o esquema de síntese para os cloridratos mesoiônicos 5-alkil-substituídos.

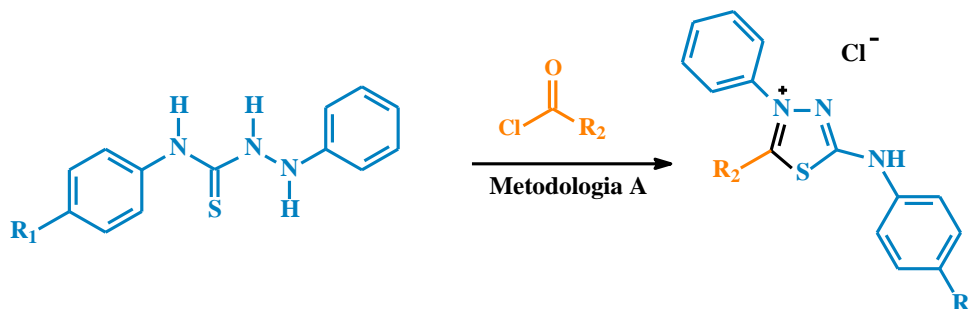


Figura 29. Reação para a síntese dos sais mesoiônicos da série II.

Os rendimentos de reação variaram de 39 a 62 %. Apesar de serem rendimentos satisfatórios foram, de maneira geral, inferiores aos obtidos para as reações de obtenção dos sais mesoiônicos da série I, os derivados de aldeídos ou ácidos cinâmicos. O ocorrido evidencia a diferença existente de reatividade e/ou disponibilidade em reação dos reagentes cinâmicos e alquílicos, envolvidos na síntese da série I e II, respectivamente. A Tabela 14 apresenta os rendimentos e pontos de fusão obtidos.

Tabela 14. Rendimentos e pontos de fusão dos sais mesoiônicos da série II.

Composto	R ₁	R ₂	Rendimento Met. A (%)	Ponto de fusão (°C)
31	H	-CH ₂ CH ₃	51	248-250
32	H	-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	62	239-240
33	NO ₂	-CH ₂ CH ₃	39	230-232
34	NO ₂	-CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	61	216-218

O mecanismo de reação é semelhante ao apresentado para a síntese dos mesoiônicos da série I (Figura 27), onde há inicialmente o ataque nucleofílico da hidrazino-carbotioamida ao carbono carbonílico do cloreto de ácido alquil, previamente preparado, formando um intermediário *N*-acilado que, em seguida, é atacado pelo átomo de enxofre do grupo tiocarbonila. Essa etapa estaria sendo dificultada uma vez que os grupos alquil são doadores de elétrons por indução o que poderia levar ao menor caráter eletrofílico dos cloretos de ácidos envolvidos. A aromatização do anel heterocíclico também ocorre com a saída de uma molécula de água.

Também podem ser observadas diferenças de rendimento em função do uso das hidrazino-carbotioamidas. Os produtos de reação derivados da hidrazino-carbotioamida nitro-substituída foram, de maneira geral, obtidos com rendimentos inferiores se comparados aos produtos derivados da hidrazino-carbotioamida não-substituída. Isso se deve à menor

disponibilidade dos pares de elétrons envolvidos no ataque nucleofílico inicial, uma vez que essas estão parcialmente comprometidos devido ao efeito fortemente retirador de elétrons do grupo nitro.

Os sais mesoiônicos da série II foram caracterizados utilizando as técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ^1H e ^{13}C . A Tabela 15 mostra as principais bandas de absorção para os cloridratos mesoiônicos da série II.

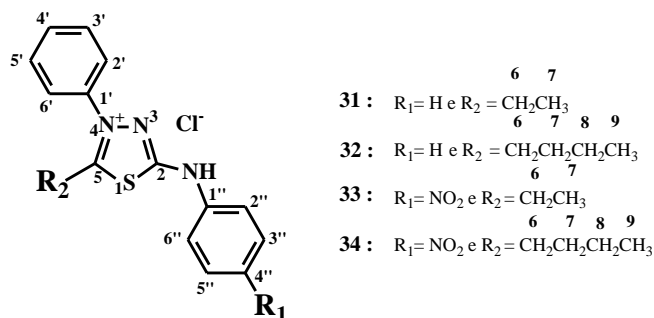
Os espectros de RMN de ^1H permitiram a atribuição dos valores de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios amínicos exocíclicos na faixa de δ 13,54 e 12,59, além dos sinais referentes aos hidrogênios alquílicos e aromáticos (Tabela 16). Nos espectros de RMN de ^{13}C , foi possível observar a inversão nos deslocamentos químicos característicos dos carbonos C-2 e C-5 do anel heterocíclico. Isso se deve aos menores deslocamentos químicos apresentados para o carbono 2 (C-2), uma vez que este está diretamente ligado à cadeia alifática com caráter doador de elétrons (Tabela 17).

Tabela 15. Principais absorções na região do IV para os cloridratos mesoiônicos da série II.

Composto	Frequência de absorção (cm^{-1})				
	$\nu_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C-H}^*}$	$\nu_{\text{C=NH}^+}$	$\nu_{\text{C=C}^{**}}$	$\nu_{\text{C-X}}$
31	2936	3026	2758	1609; 1569; 1451	-
32	2961	3048	2768	1616; 1572; 1485	-
33	2909	3097	2727	1625; 1549; 1483	1504
34	2958	3079	2656	1622; 1583; 1485	1502

*Estiramento C-H de aromático; **Vibração do esqueleto aromático

Tabela 16. Deslocamentos químicos de RMN ^1H para os cloridratos mesoiônicos da série II (**31-34**).



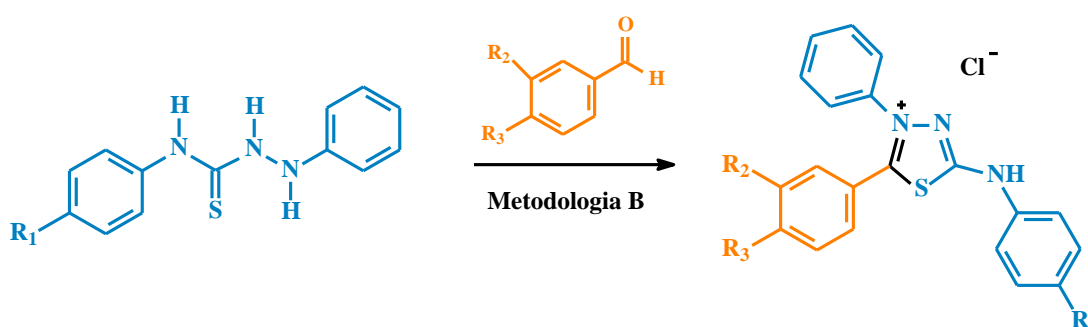
Hidrogênio	Composto			
	31	32	33	34
2', 4', 6'	7,72 (m, 3H)	7,73 (m, 3H)	7,77 (m, 3H)	7,71 (m, 3H)
3', 5'	7,82 (dd, 2H)	7,86 (m, 2H)	7,87 (m, 2H)	7,82 (m, 2H)
2'', 6''	7,57 (d, 2H)	7,59 (d, 2H)	7,81 (d, 2H)	7,74 (d, 2H)
3'', 5''	7,39 (t, 2H)	7,39 (t, 2H)	8,35 (d, 2H)	8,26 (d, 2H)
4''	7,10 (t, 1H)	7,11 (t, 1H)	-	-
N-H	12,59 (s, 1H)	12,85 (s, 1H)	13,44 (s, 1H)	13,54 (s, 1H)
6	3,06 (q, 2H)	3,06 (m, 2H)	3,12 (q, 2H)	3,05 (m, 2H)
7	1,27 (t, 3H)	1,65 (dq, 2H)	1,31 (t, 3H)	1,62 (ddd, 2H)
8	-	1,31 (dq, 2H)	-	1,28 (m, 2H)
9	-	0,16 (t, 3H)	-	0,75 (t, 3H)

Tabela 17. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para os cloridratos mesoiônicos da série II (31-34).

Carbono	Composto			
	31	32	33	34
2	172,23	170,62	174,44	172,83
5	160,24	160,18	160,56	160,57
1'	137,05	137,07	137,40	137,41
2', 6'	129,42	129,35	126,32	126,35
3', 5'	130,10	130,10	130,64	130,64
4'	131,67	131,64	132,30	132,28
1''	138,66	138,68	144,68	144,69
2'', 6''	118,19	118,14	118,46	117,10
3'', 5''	125,77	125,81	126,17	126,11
4''	123,75	123,65	142,75	142,69
6	23,02	30,56	23,58	31,08
7	13,14	28,43	13,64	28,97
8	-	21,51	-	21,96
9	-	13,28	-	13,73

1.1.4.3 Síntese e caracterização dos cloridratos mesoiônicos da série III (35-38)

Os cloretos de 4-fenil-5-fenil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (35-38) foram obtidos a partir de benzaldeídos substituídos e hidrazino-carbotioamidas flúor-substituídas na presença de cloreto de tionila (3 x em excesso), sob irradiação em reator de micro-ondas por cinco minutos (metodologia B; potência de 100 W). A formação dos produtos foi acompanhada por cromatografia em camada fina. Os produtos foram obtidos com rendimentos variando de 43 a 68%. A Figura 30 mostra a reação para a síntese para os cloridratos mesoiônicos da série III e, a Tabela 18, os rendimentos e pontos de fusão observados.



35: R₁=OCH₃, R₂=H, R₃=F

36: R₁=NO₂, R₂=H, R₃=F

37: R₁=OCH₃, R₂=R₃=F

38: R₁=NO₂, R₂=R₃=F

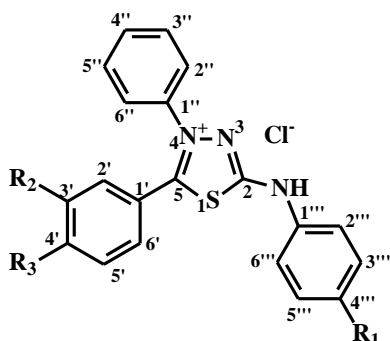
Figura 30. Reação para a obtenção dos sais mesoiônicos da série III.

Tabela 18. Rendimentos e pontos de fusão dos sais mesoiônicos da série III.

Composto	R ₁	R ₂	R ₃	Rendimento	
				Met. B (%)	Ponto de fusão (°C)
35	OCH ₃	H	F	57	265-267
36	NO ₂	H	F	68	244-247
37	OCH ₃	F	F	43	233-235
38	NO ₂	F	F	56	239-241

Os sais mesoiônicos foram caracterizadas utilizando as técnicas espectroscópicas de IV e RMN de ¹H e ¹³C.

Os espectros de RMN de ¹H permitiram a atribuição dos valores de deslocamentos químicos característicos de hidrogênios amínicos exocíclicos na faixa de δ 13,66 e 12,72, além dos sinais referentes aos hidrogênios aromáticos e dos grupos metoxila, quando presentes. Nos espectros de RMN de ¹³C, foi possível observar os sinais com deslocamentos químicos característicos dos carbonos C-2 e C-5 do anel heterocíclico, estando entre δ 164,67-160,61 e 166,69-161,00, respectivamente. Foram observados ainda diversos sinais referentes aos acoplamentos com flúor (C-F), dentre eles os acoplamentos com os carbonos C-3' e C-4', respectivamente (constante de acoplamento em torno de 250 Hz). Nas Tabelas 19 e 20 estão apresentados os valores referentes aos deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C para os compostos da série III.

Tabela 19. Deslocamentos químicos de RMN ¹H para os cloridratos mesoiônicos da série III.

35: R₁ = OCH₃, R₂ = H e R₃ = F

36: R₁ = NO₂, R₂ = H e R₃ = F

37: R₁ = OCH₃, R₂ = F e R₃ = F

38: R₁ = NO₂, R₂ = F e R₃ = F

Hidrogênio	Composto			
	35	36	37	38
2'	7,35 (t, 2H)	7,37 (t, 2H)	7,71 (m, 1H)	7,69-7,58 (m, 1H)
6'			7,42 (m, 1H)	7,41 (m, 1H)
5'	7,56 (t, 2H)	7,73 (t, 2H)	7,62 (m, 1H)	7,69-7,58 (m, 1H)
3',			-	-
2'', 6''	7,59-7,53 (m, 3H)	7,68-7,61 (m, 3H)	7,60 (m, 2H)	
4''			7,69 (m, 3H)	7,69-7,58 (m, 6H)
3'', 5''	7,65 (dd, 2H)	7,82 (m, 2H)		
2''', 6'''	7,51 (d, 2H)	7,91 (d, 2H)	7,55 (d, 2H)	7,82 (d, 2H)
3''', 5'''	6,99 (d, 2H)	8,29 (d, 2H)	7,02 (d, 2H)	8,32 (d, 2H)
N-H	13,54 (s, 1H)	14,22 (s, 1H)	12,72 (s, 1H)	13,66 (s, 1H)
OCH ₃	3,71 (s, 3H)	-	3,74 (s, 3H)	-

Tabela 20. Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C para os cloridratos mesoiônicos da série III.

Carbono	Composto			
	35	36	37	38
2	160,61	164,67	160,93	160,93
5	162,56	166,69	161,00	163,46
1'	119,71 e 119,68	120,00	120,38	120,16
2'			118,88 e 118,72	118,06 e 118,90
6'	133,05 e 132,97	134,19 e 134,11	119,91	120,39 e 120,23
3'			149,98 e 149,87 /	150,11 e 150,01 /
	120,06	118,99 e 118,94	148,00 e 147,90	148,13 e 148,03
5'			128,30	128,58
4'	165,25 e 163,24	165,70 e 165,63 / 161,43 e 161,34	152,83 e 152,73 / 150,81 e 150,71	153,14 e 153,04 / 151,10 e 151,01
1''	137,47	138,56	131,55	137,23
2'', 6''	126,00	127,06	125,99	126,21
3'', 5''	129,00	130,67	129,78	130,00
4''	131,28	132,27	131,39	131,71
1'''	131,60	145,06 e 144,88	137,26	143,89
2''', 6'''	116,64	117,53	120,07	118,23
3''', 5'''	114,55	126,09	114,55	125,77
4'''	155,79	143,48	155,82	142,56
OCH ₃	55,19	-	55,19	-

Os espectros de infravermelho também não se mostraram muito diferentes entre si, devido à semelhança estrutural dos compostos sintetizados, no entanto, indicaram absorções características nas faixas correspondentes às ligações C-H e C=C aromáticas indicando o perfil de substituição. Na Tabela 21 estão os valores atribuídos às principais bandas observadas.

Tabela 21. Principais absorções na região do IV para os cloridratos mesoiônicos da série III.

Composto	Frequência de absorção (cm ⁻¹)		
	νC-H*	νC-NH ⁺	νC=C**
35	3061	2694	1626; 1575; 1456
36	3048	2649	1620; 1575; 1476
37	3047	2776	1619; 1575; 1485
38	3047	2659	1615; 1575; 1496

*Estiramento C-H de aromático; **Vibração do esqueleto aromático

1.2 Ensaios biológicos

1.2.1 Estudo envolvendo a enzima tirosinase frente a hidrazino-carbotioamidas: abordagem experimental e teórica

As hidrazino-carbotioamidas (**12-17**), intermediários na síntese dos compostos mesoiônicos, foram investigadas quanto a atividade frente a enzima tirosinase envolvida no câncer de pele do tipo melanoma. Um *screening* inicial mostrou que os compostos avaliados (**12-17**) foram capazes de inibir a oxidação da L-DOPA, o substrato envolvido na atividade da difenolase da tirosinase. Para a continuidade do estudo foram selecionados os compostos que apresentaram inibição acima de 70%. Os valores de IC_{50} obtidos para os compostos mais ativos, ou seja, **12**, **15**, **16** e **17** foram de 623,00; 189,00; 56,50 e 22,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O ácido ascórbico foi utilizado como padrão positivo apresentado valor de $IC_{50} = 266,00 \mu\text{mol L}^{-1}$. A seguir, na Figura 31, estão apresentadas as estruturas desses compostos.

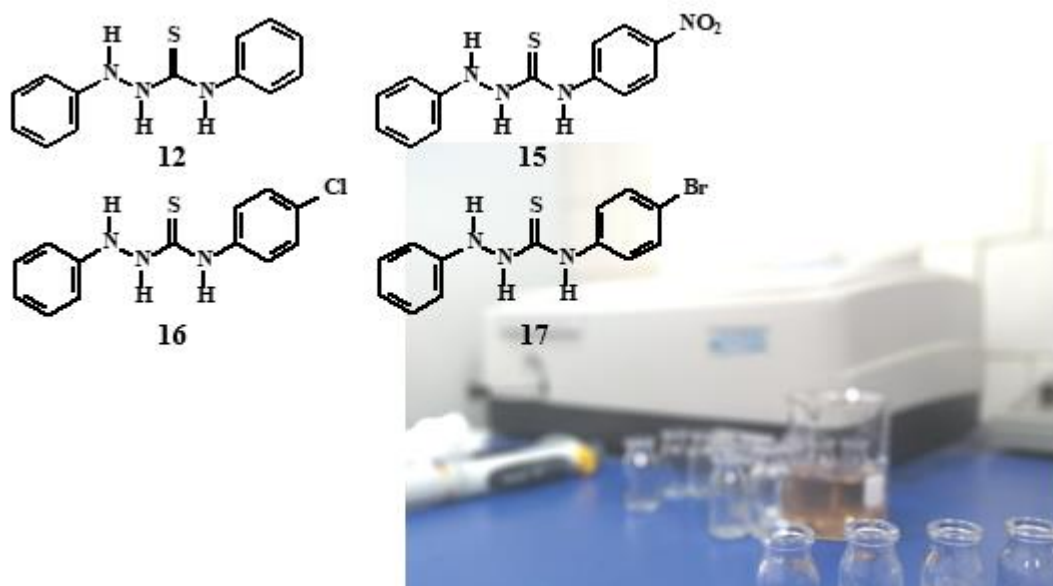


Figura 31. Estruturas químicas para as hidrazino-carbotioamidas (12, 15, 16 e 17) que apresentaram maior eficiência frente à inibição da tirosinase.

As hidrazino-tiocarboamidas substituídas com grupos retiradores de elétrons, de maneira geral, apresentaram percentuais de inibição da tirosinase maiores que o do ácido ascórbico ($IC_{50} = 266,00 \mu\text{mol L}^{-1}$), utilizado como inibidor de referência (CHAVES et al., 2018). O composto **17** mostrou ser o mais promissor entre todos os compostos analisados.

O mecanismo de inibição enzimática foi investigado na presença dos dois melhores inibidores da tirosinase, **16** e **17**, via estudo dos parâmetros cinéticos envolvendo a enzima e o substrato em diferentes concentrações (Figura 32 e Tabela 22).

Os valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) e V_m (velocidade máxima) foram menores na presença dos inibidores **16** e **17**, em diferentes concentrações. O gráfico de Hanes-Woolf nos leva a concluir que o mecanismo de inibição da tirosinase por esses compostos pode ser incompetitivo (CHAVES et al., 2018), onde os potenciais inibidores ligam-se reversivelmente ao complexo enzima-substrato (ES) e não à enzima livre, proporcionando a formação do complexo ternário enzima-substrato-inibidor (ESI).

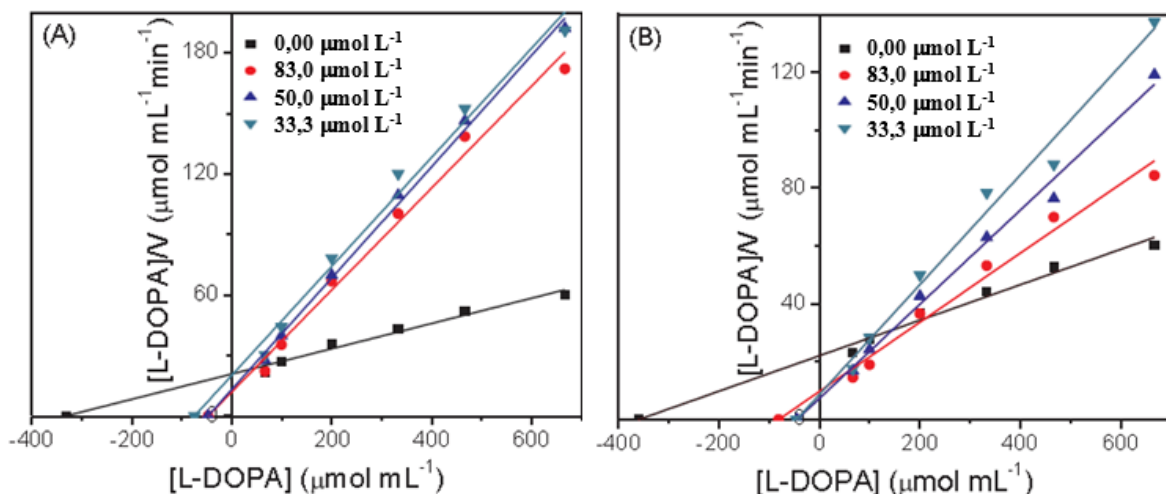


Figura 32. Gráfico Hanes-Woolf para o ensaio envolvendo a tirosinase na presença de L-DOPA e hidrazino-tiocarboamidas **16** (A) e **17** (B). As concentrações utilizadas foram: [L-DOPA] = 66,6; 100; 200; 333; 467 e 667 $\mu\text{mol L}^{-1}$, e [3] = [4] = 0,00; 33,3; 50,0 e 83,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Tabela 22. Parâmetros cinéticos (K_m e V_m) para a atividade enzimática na ausência e na presença de diferentes concentrações das hidrazino-carbotioamidas **16** e **17** (0,00; 33,3; 50,0 e 83,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Parâmetros cinéticos	Sem inibidor	83,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	33,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$
	16 / 17	16 / 17	16 / 17	16 / 17
K_m ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	$(3,00 / 2,79) \times 10^{-3}$	$(2,13 / 1,23) \times 10^{-2}$	$(2,11 / 2,24) \times 10^{-2}$	$(1,35 / 2,22) \times 10^{-2}$
V_m ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$)	20,8 / 22,10	11,8 / 9,72	13,1 / 7,28	20,1 / 8,67

O método *in vitro* para avaliar o efeito inibitório dos compostos orgânicos sobre a tirosinase possui um tempo padrão de 30 min (SEGEL, 1982). Após esse tempo padrão o percentual de inibição do ligante avaliado pode permanecer constante ou diminuir, indicando um mecanismo de inibição estável ou não, respectivamente.

A avaliação cinética da oxidação enzimática da L-DOPA na ausência e presença do composto **17** mostrou que a concentração de dopaquinona produzida durante o processo oxidativo é menor na presença do inibidor e se mantém após o tempo de reação. Isso indica que o inibidor interage de modo a formar um complexo estável, impedindo a oxidação da L-dopa.

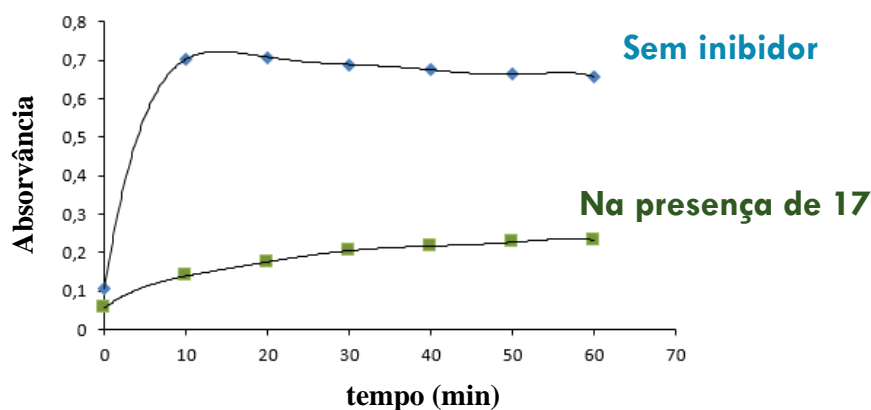


Figura 33. Cinética de ação da enzima tirosinase em L-DOPA na presença de **17**. (♦) [L-DOPA] = 170 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (■) [L-DOPA] = 170 $\mu\text{mol L}^{-1}$ + [17] = 33 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A fim de propor uma explicação a nível molecular sobre a inibição da tirosinase pelos quatro melhores inibidores (hidrazino-carbotioamidas **12**, **15**, **16** e **17**), foi realizado um estudo de *docking* molecular levando em consideração a formação de complexo ESI (mecanismo inibitório acompetitivo). Os cálculos de *docking* molecular assumiram um estado de desprotonação devido à interação entre uma das hidroxilas fenólicas da estrutura L-DOPA (substrato) com o Cu^{2+} . A Figura 34A retrata a melhor posição de encaixe para todas as hidrazino-carbotioamidas em estudo na presença de L-DOPA. Como esperado, as estruturas das hidrazino-carbotioamidas não se apresentam próximas o suficiente para coordenar com o sítio de cobre presente na enzima, sugerindo que a inibição da tirosinase por **12**, **15**, **16** e **17** não está relacionada com a capacidade desses se coordenar com Cu^{2+} , mas sim, com a L-DOPA.

Uma das hidroxilas pertencentes a L-DOPA se encontra perto o suficiente para se coordenar com o centro de Cu^{2+} , a uma distância de 2,30 Å. Os resultados de *docking* molecular ainda sugerem que as interações de **16** e **17** no sítio ativo da enzima são essencialmente de natureza hidrofóbica, sendo do tipo *T*-stacking com o anel aromático da L-DOPA (empilhamento em *t*). Por outro lado, os inibidores **12** e **15** não apresentaram interações intermoleculares significativas com este substrato (Figura 34A). Essas informações corroboram com os valores de IC_{50} observados no ensaio experimental realizado (**12**: 623,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$; **15**: 189,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$; **16**: 56,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e **17**: 22,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

A Figura 34B mostra os principais resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da tirosinase que interagem com os dois melhores inibidores experimentais da tirosinase (**16** e **17**). As estruturas dos inibidores estão sobrepostas na figura para uma comparação de seus perfis de interação. Apesar dos inibidores interagirem com a L-dopa via *T*-stacking, um dos grupos N-H desses compostos estaria fazendo uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Glu-321, a uma distância intermolecular da interação de 2,73 Å. Observa-se, também, interações hidrofóbicas entre as estruturas dos inibidores e resíduos Ala-79, His-243, Val-247, Phe-263 e Val-282.

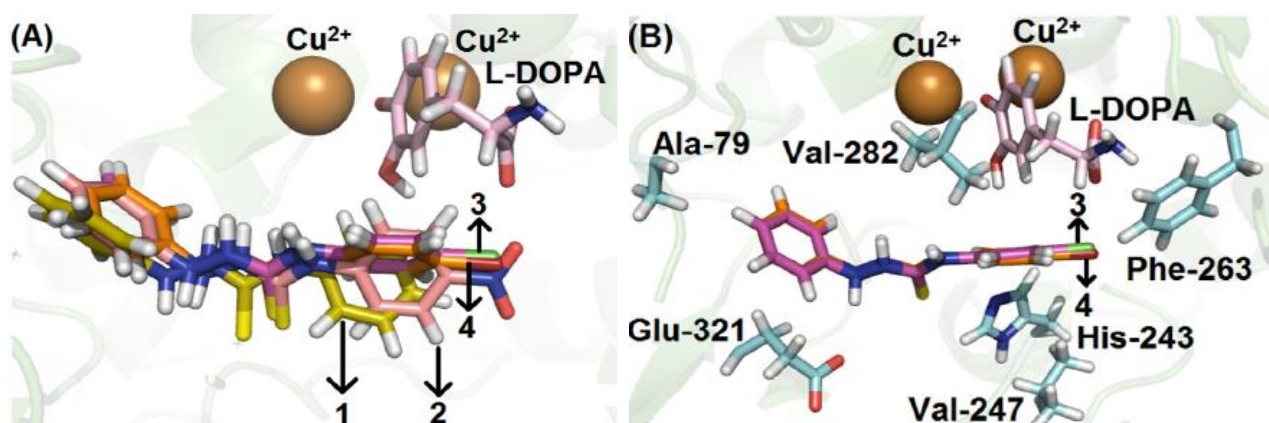


Figura 34. (A) Superposição das melhores poses de ancoragem para a interação entre tirosinase e hidrazino-carbotioamidas **12** (1), **15** (2), **16** (3) e **17** (4) na presença de L-DOPA (Função GoldScore). (B) superposição entre as hidrazino-carbotioamidas **16** (3) e **17** (4) e representação dos principais resíduos de aminoácidos que interagem com estes inibidores. L-DOPA e os resíduos de aminoácidos selecionados estão representados em violeta e ciano, respectivamente. As hidrazino-carbotioamidas **12**, **15**, **16** e **17** estão representados em amarelo (1), salmão (2), magenta (3) e laranja (4), respectivamente. Os átomos de cobre estão representados como esferas marrons. Cores dos elementos: hidrogênio: branco; oxigênio: vermelho; nitrogênio: azul escuro; bromo: vermelho, cloro: verde e enxofre: amarelo.

Posteriormente, foram realizados estudos de interação com a albumina sérica humana (HSA) para o composto **17**, hidrazino-carbotioamida, que apresentou a maior atividade experimental de inibição da tirosinase, via análise por supressão de fluorescência.

A supressão por fluorescência é considerada uma técnica efetiva utilizada na investigação da capacidade de transporte de HSA por pequenas moléculas (ZHANG et al., 2013). A supressão da fluorescência do triptofano (Trp) é amplamente utilizada como ferramenta para monitorar mudanças na estrutura proteica (LAKOWICZ, 2006). O resíduo de triptofano 214 (Trp-214) está inserido dentro da estrutura proteica da HSA, localizado em subdomínio IIA (CHAVES et al., 2015).

A Figura 35 apresenta o espectro de emissão de fluorescência resultante do resíduo Trp-214 na ausência e presença do melhor inibidor da tirosinase em estudo (composto **17**), a 310 K. Foi possível observar a diminuição da emissão de fluorescência após adições sucessivas do composto **17** na solução de HSA indicando a proximidade entre o inibidor e o resíduo de Trp-214 dentro da cavidade proteica (LIU et al., 2003). Não houve mudança significativa na posição de emissão máxima para HSA ($\lambda_{em} = 340$ nm, $\lambda_{exc} = 280$ nm) após ligação com o inibidor. Essa é uma indicação de que o ligante não perturba o microambiente em torno do resíduo de triptofano (CHAVES et al., 2015).

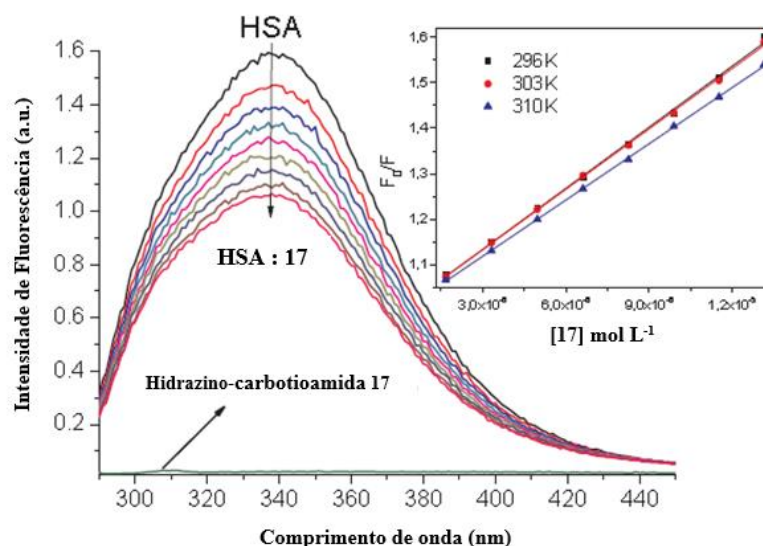


Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência para HSA livre e com adição do supressor **17** em pH 7,4 a 310 K. Inserção: Parcelas de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de HSA por **17** em 296 K, 303 K e 310 K. [HSA] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e **17** = 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15 e $1,32 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Essa supressão de fluorescência pode ser decorrente de um mecanismo dinâmico e/ou estático resultante de uma variedade de interações moleculares, incluindo a formação de complexos no estado fundamental, supressão colisional, reações de estado excitado, rearranjo molecular e transferência de energia (JANKOVIC et al., 2016). A análise de Stern-Volmer, dada pela equação 1 a seguir, pode ser usada para identificar qual mecanismo de fluorescência deve estar ocorrendo (NASO et al., 2016).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad \text{Equação 1}$$

onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência da HSA na ausência e presença de **17** a 340 nm, respectivamente. $[Q]$ é a concentração de supressor, K_{SV} e K_q são a constante Stern-Volmer e a constante da taxa de supressão bimolecular, respectivamente. τ_0 é o tempo de vida de fluorescência da HSA na ausência do supressor.

O estudo experimental indicou o valor médio para o tempo de vida de fluorescência da HSA em PBS como sendo $(5,75 \pm 0,10) \times 10^{-9}$ s. A Tabela 23 apresenta os valores de K_{SV} e K_q obtidos a partir da fluorescência envolvendo HSA:17 a 296 K, 303 K, e 310 K. Os valores de K_{SV} diminuíram com o aumento da temperatura indicando que o mecanismo de extinção de fluorescência é estático, onde há a associação no estado fundamental entre o fluoróforo (albumina) e o inibidor 17 (CHAVES et al., 2017a).

Tabela 23. Constantes para a interação HSA:17 a 296 K, 303 K, e 310 K.

	T (K)	$K_{SV} (\times 10^4)$ (mol L ⁻¹)	$K_q (\times 10^{12})$ ((mol L ⁻¹) ⁻¹ s ⁻¹)
HSA:17	296	4,47 ± 0,07	7,78
	303	4,41 ± 0,04	7,69
	310	4,12 ± 0,03	7,16

Os resultados experimentais e teóricos obtidos durante esse estudo foram possíveis devido à parceria com a Professora Doutora Márcia Cristina Campos de Oliveira e, com o Mestre Otávio Augusto Chaves, sob orientações dos Professores Doutores Carlos Maurício Sant'Anna e José Carlos Netto-Ferreira. Os estudos foram publicados no III Simpósio Ibero-Americano de Investigação em Câncer (SOUSA-PEREIRA et al., 2016) e no periódico Bioorganic Chemistry (SOUSA-PEREIRA et al., 2018), além de serem apresentados no 46º Congresso Mundial de Química (46th World Chemistry Congress) e na 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, sob convite para comunicação oral em sessão coordenada de Química Medicinal (SOUSA-PEREIRA et al., 2017).

1.2.2 Estudo da viabilidade celular de células leucêmicas frente a sais mesoiônicos da série I

Os compostos mesoiônicos 26, 27, 29 e 30, pertencentes à série I, foram avaliados frente as linhagens de células leucêmicas humanas C91, MT2 e Jurkat, sendo as duas primeiras linhagens infectadas com o vírus HTLV-1 e a última, linhagem de linfócitos T derivada da leucemia/linfoma de células T do adulto. As estruturas químicas dos sais mesoiônicos estudados estão apresentadas na Figura 36.

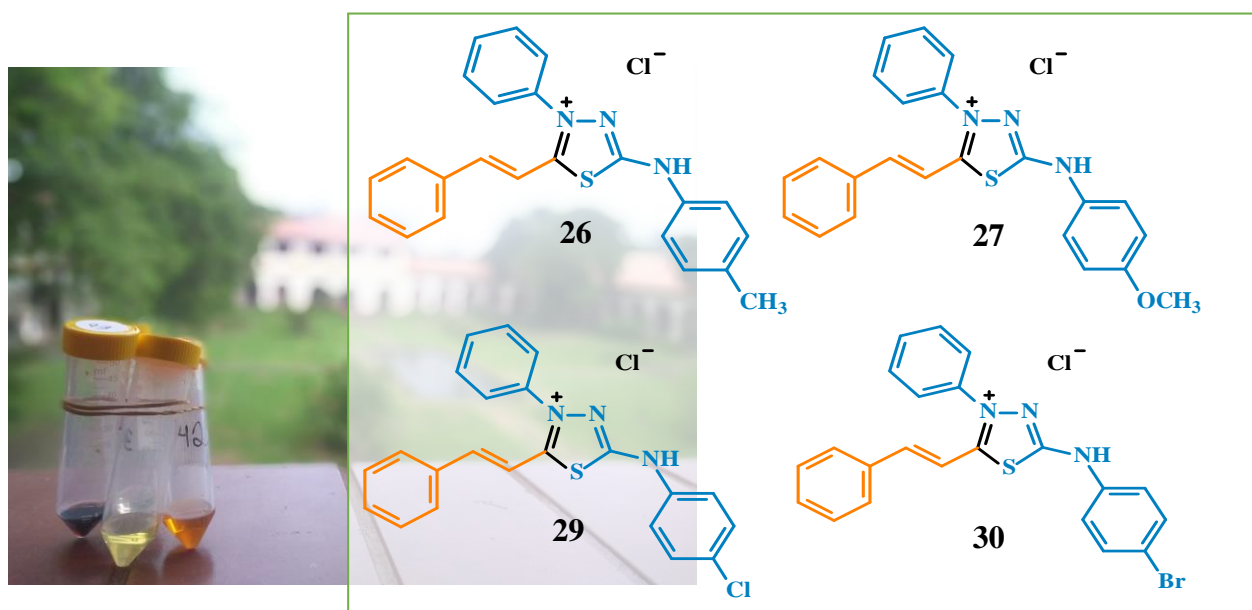


Figura 36. Estruturas químicas dos sais mesoiônicos avaliados frente às linhagens de células leucêmicas C91, MT2 e Jurkat.

A Tabela 24 apresenta os valores de IC₅₀ observados para os compostos avaliados, em culturas de 72 h, indicando, de maneira geral, resultados promissores para os sais mesoiônicos estudados obtidos através do método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT).

O crescimento celular na presença dos compostos estudados mostrou um comprometimento da morfologia celular, redução do tamanho e aumento da complexidade.

Entre as células de leucemia avaliadas, as de Jurkat apresentaram maior sensibilidade aos sais mesoiônicos, enquanto as células infectadas pelo HTLV-1 apresentaram sensibilidade semelhante com valores de IC₅₀ na faixa de 2,00 a 9,00 μmol L⁻¹. Esses resultados são promissores visto que as leucemias infectadas pelo HTLV-1 são extremamente agressivas e com baixas respostas aos tratamentos quimioterápicos.

Tabela 24. Valores de IC₅₀ obtidos para os compostos da série I em culturas de 72 horas frente as linhagens de leucemias humanas C91, MT2 e Jurkat.

Composto	IC ₅₀ por linhagem celular (μmol L ⁻¹)		
	C91 ^a	MT2 ^b	Jurkat ^c
26	2,73	2,00	1,92
27	3,26	8,11	1,82
29	9,00	5,10	1,87
30	3,50	8,55	2,87

^aLeucemia linfoblástica aguda; ^bleucemia T infectada com o vírus HTLV-1; ^cleucemia linfocítica.

Embora os compostos tenham sido citotóxicos para as células das linhagens de leucemias investigadas, os ensaios com as células mononucleares do sangue periférico humano não foram sensíveis a estas substâncias.

Além disso, foram realizados ensaios para investigar a possível interação dos compostos com o DNA de esperma de salmão. O estudo foi realizado utilizando a técnica de fluorescência em soluções contendo o DNA na ausência e presença dos compostos mesoiônicos. A Figura 37 permite a observação das alterações nos espectros de emissão de fluorescência, após uma hora de incubação, destes compostos com o DNA, mostrando assim, que os mesoiônicos têm a capacidade de interagir com a biomolécula.

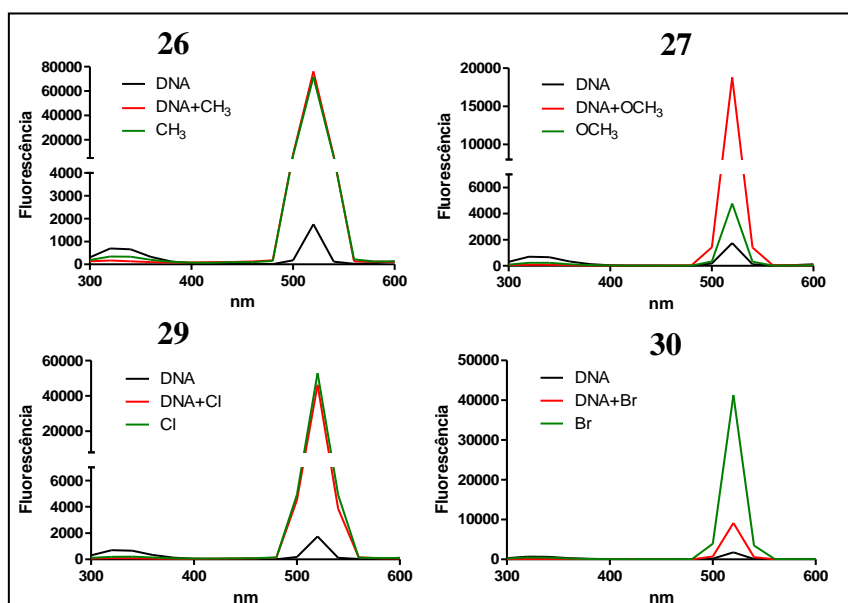


Figura 37. Espectros de emissão de fluorescência após uma hora de incubação dos compostos 26, 27, 29 e 30 com DNA de esperma de salmão.

Os gráficos de viabilidade celular, na ausência e presença dos compostos citotóxicos em seis concentrações diferentes, estão apresentados na Figura 38.

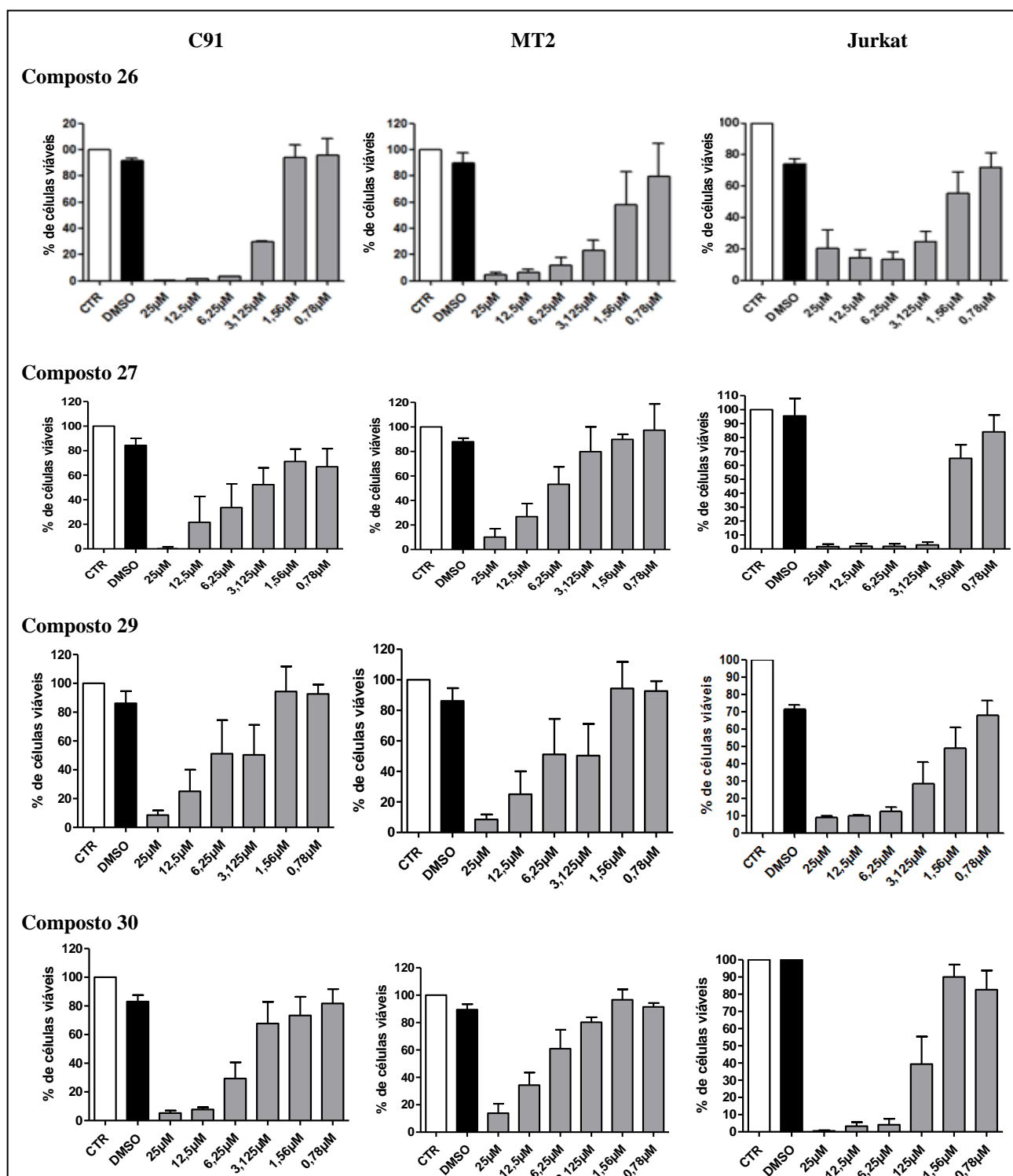


Figura 38. Gráficos de viabilidade celular dos mesoiônicos 26, 27, 29 e 30 frente às linhagens C91, MT2 e Jurkat em cultura de 72 horas.

Os resultados obtidos para a atividade citotóxica dos sais mesoiônicos foram coerentes e, de maneira geral, mais promissores que os descritos anteriormente para outros compostos mesoiônicos, pertencentes a mesma classe, avaliados frente às linhagens estudadas (LOPES et

al., 2018), ao linfoma de Daudi (DOS REIS et al., 2011a) e aos melanomas B16-F10, MEL-85, SK-MEL, A2058 e MEWO (SENFF-RIBEIRO et al., 2004a).

Logo, esse cenário mostra a importância da manutenção e continuidade da pesquisa em torno dos sais mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminidass frente ao câncer.

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a Professora Doutora Juliana Echevarria-Lima do Instituto de Microbiologia da UFRJ. Esses estudos foram publicados, até o momento, no 8º Simpósio Brasileiro de Química Medicinal (8th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem 2016) (SOUSA-PEREIRA et al., 2016).

1.2.3 Estudo da viabilidade celular do hepatocarcinoma HepG2 frente a sais mesoiônicos da série I

A capacidade de inibição da proliferação celular de HepG2 foi analisada após 24 horas de incubação na presença de diferentes sais mesoiônicos da série I (**23**, **24**, **27**, **28**, **29** e **30**) em concentrações entre 1,0 e 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, através do método do MTT. As células HepG2 foram previamente plaqueadas e cultivadas por 24 horas antes de serem incubadas com os compostos. Após o tratamento, as células foram incubadas durante 3 horas com o MTT (0,5 mg mL^{-1}) e a absorvância foi medida em comprimento de onda duplo (570 e 650 nm).

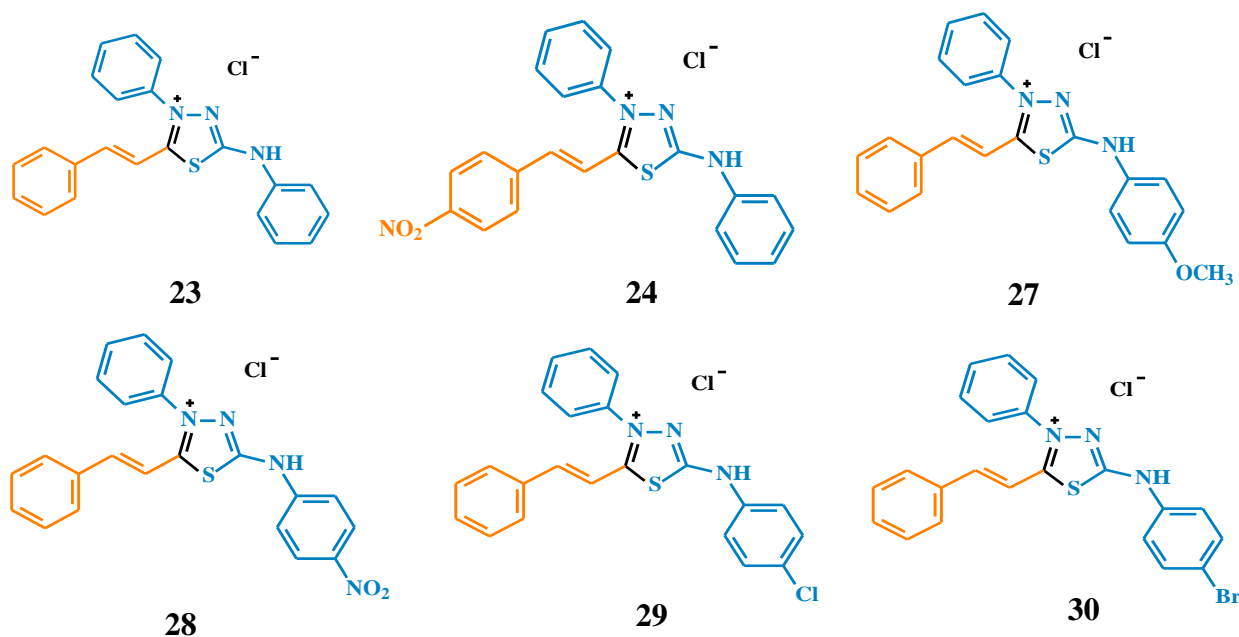


Figura 39. Estruturas dos sais mesoiônicos avaliados frente a linhagem de hepatocarcinoma humano HepG2.

Os sais mesoiônicos avaliados, de maneira geral, foram citotóxicos frente às células HepG2 reduzindo a viabilidade celular em relação ao controle (Figura 40). O aumento na inibição da proliferação celular foi observado de maneira dose dependente com as concentrações dos compostos testados. Os valores de IC_{50} obtidos para esses compostos frente ao hepatocarcinoma HepG2 estão apresentados na Tabela 25.

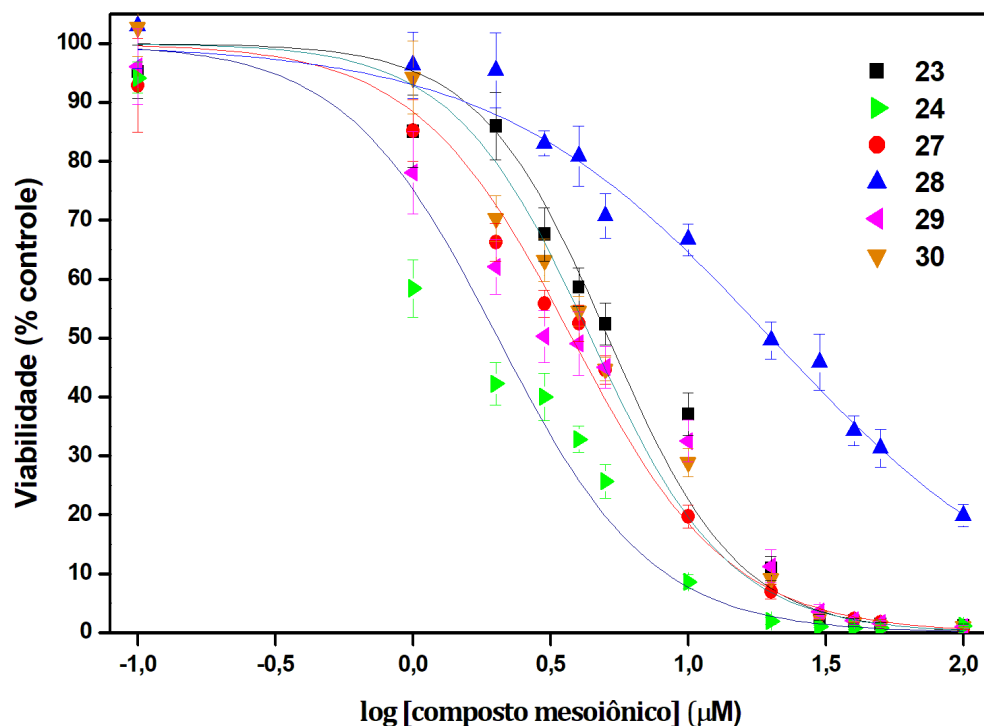


Figura 40. Efeito dos sais mesoiônicos sobre o crescimento das células HepG2 determinado pelo método do MTT. Os valores representam a média \pm S.E.M (erro padrão) ($n > 4$).

Tabela 25. Valores de IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) obtidos para os compostos da série I em tratamento de 24 horas frente à linhagem HepG2.

Composto	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
23	$5,12 \pm 0,22$
24	$2,03 \pm 0,26$
27	$3,78 \pm 1,29$
28	$19,98 \pm 0,61$
29	$3,65 \pm 0,26$
30	$4,42 \pm 0,14$

Os baixos valores de IC_{50} indicaram que os cloretos mesoiônicos testados, pertencentes à classe 1,3,4-tiadiazólio-2-arilaminas substituídos com o grupo cinamoil no carbono 5 do anel heterocíclico, são promissores agentes anticâncer e corroboram com os resultados anteriores para esses e/ou outros compostos pertencentes a essa classe de mesoiônicos. Em 2011, Pires e colaboradores avaliaram a viabilidade celular em cultura de HepG2 frente a sais mesoiônicos pertencentes a mesma classe, com nomenclatura geral 4-fenil-5-(2-Y-4-X-cinamoil)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina. Dentre outros compostos, estão o MI-J (Y = H e X = OH) e o MI-D (Y = H e X = NO_2), sendo o último equivalente ao composto **24** sintetizado e avaliado nesse trabalho. Esses compostos foram igualmente citotóxicos e promoveram a morte de 50% das células na concentração de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferente esquema de tratamento (PIRES et al., 2011).

O composto **24**, comumente reportado como MI-D, foi também previamente avaliado frente ao sarcoma 180 e ao carcinoma de Ehrlich (GRYNBERG et al., 1997), ao melanoma humano (SENFF-RIBEIRO et al., 2004a) e à células HeLa (Henrietta Lacks), uma linhagem

de câncer do colo de útero (MENDEZ-SANCHEZ, 2009). Ambos resultados foram favoráveis indicando a potencial atividade anticâncer desse composto que é reafirmada no presente estudo.

Os sais mesoiônicos da série II e III, **31-34** e **35-38**, respectivamente, também foram avaliados frente a células de HepG2. No entanto, os mesmos não apresentaram efeito citotóxico significativo na concentração máxima testada de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 24 horas de incubação. Esses resultados colocam em evidência a possível contribuição biológica dos diferentes grupos ligados ao carbono 5 do heterociclo, podendo ser o grupo estiril (série I), fenil (série III) ou ainda alquil (série II).

Contudo, os compostos mesoiônicos avaliados (**23**, **24**, **27**, **28**, **29** e **30** pertencentes à série I) foram capazes de inibir 50 % do crescimento celular de células HepG2 em concentrações menores (entre 2,03 e 19,98 $\mu\text{mol L}^{-1}$) que os compostos, de mesma classe de mesoiônicos, reportados na literatura (entre 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (GOZZI et al., 2015; PIRES et al., 2011). Essa observação reafirma a promissora atividade desses sais mesoiônicos no tratamento do hepatocarcinoma humano (HCC).

Esses estudos foram publicados, até o momento, no X Simpósio de Oncobiologia (MOURA et al., 2016).

1.2.4 Estudo da viabilidade celular de osteossarcoma frente a sais mesoiônicos da série I

A viabilidade das células de osteossarcoma foi avaliada após o tratamento da linhagem MG-63 com os sais mesoiônicos **24** e **25** (Figura 41), em concentrações entre 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ pelo ensaio de redução do MTT.

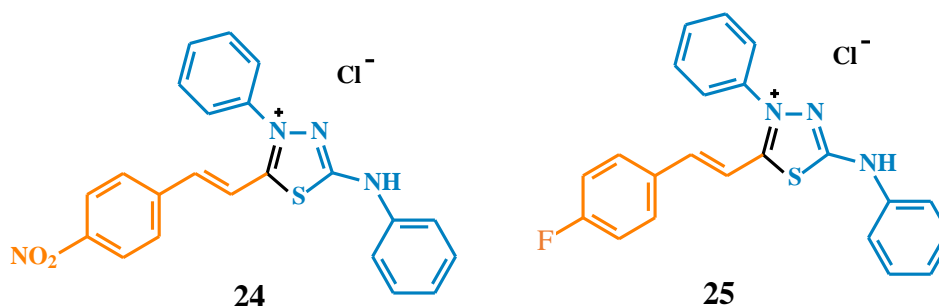


Figura 41. Estruturas dos sais mesoiônicos avaliados frente a linhagem de osteossarcoma MG-63.

Os compostos **24** e **25** reduziram a viabilidade relativa das células a partir das concentrações de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, em 24 horas de tratamento (Figura 42A e 42B). Após 48 horas de tratamento esses valores de concentrações foram 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o sal mesoiônico **24** e de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o composto **25** (Figura 42C e 42D).

As concentrações mínimas capazes de interferir com o metabolismo de 50% das células (IC_{50}) foram determinadas e estão representadas na Tabela 26.

Tabela 26. Concentração inibitória de 50% das células viáveis (IC_{50}) dos sais mesoiônicos sobre a linhagem celular de osteossarcoma MG-63.

Composto	IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	
	24 horas	48 horas
24	4,78 ± 0,02	2,02 ± 0,05
25	4,36 ± 0,08	1,93 ± 0,20

^amédia ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ± erro padrão de três experimentos independentes onde cada condição foi realizada em triplicata.

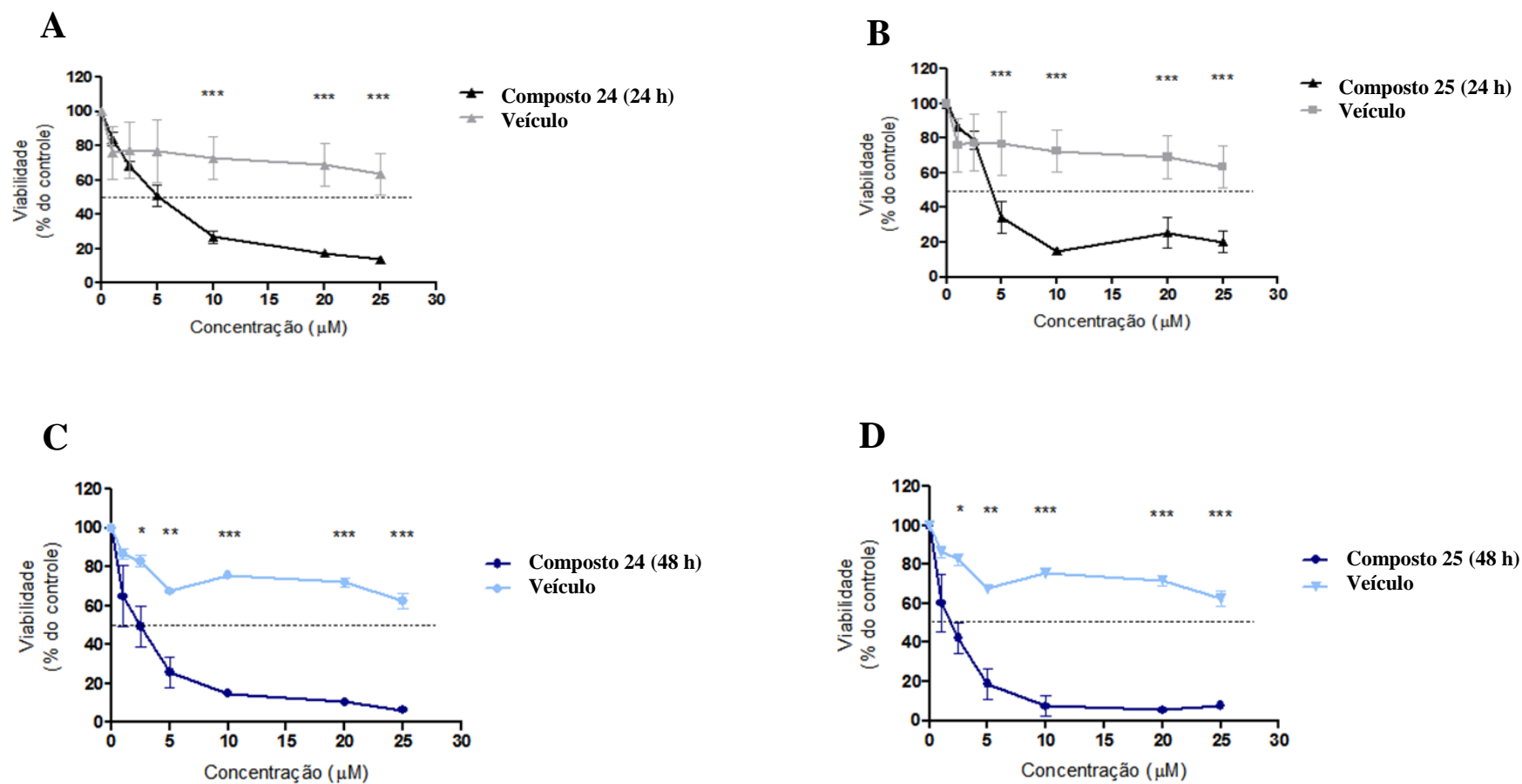


Figura 42. Efeito dos sais mesoiônicos **24** (gráficos A e C) e **25** (gráficos B e D) na viabilidade de células de osteossarcoma após 24 e 48 horas de incubação. Os dados representam a média de três experimentos independentes em triplicata. Os resultados estão expressos em percentual de viabilidade em relação ao controle. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como veículo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ denotam valores com diferença estatística significativa entre o composto e o veículo. A linha pontilhada representa 50% de viabilidade celular.

O ensaio de exclusão com azul de tripan possibilitou investigar se a redução da viabilidade celular relativa induzida pelos sais mesoiônicos **24** e **25** estaria relacionada com a citotoxicidade. Nesse ensaio as células viáveis e não viáveis foram contadas após serem tratadas com os compostos investigados em concentrações entre 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 24 e 48 horas.

O composto **24** foi citotóxico após 24 horas de tratamento com as concentrações de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com viabilidade respectiva de 54,6 %, 23,3 % e 3,1 %. Após 48 horas de tratamento a viabilidade celular foi reduzida para 53,5 %, 24,8 %, 7,1 % e 1,7 % com as concentrações de 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente (Figura 43A).

Já o composto **25** apresentou citotoxicidade em todas as concentrações utilizadas após 24 horas de tratamento. A viabilidade foi reduzida progressivamente de 66,7 % com 1 μM até 4,02 % com 25 μM . Com 48 horas de tratamento, esse efeito foi significativo a partir da concentração de 2,5 μM , que correspondeu a 64,1 % de viabilidade e chegou a citotoxicidade máxima (100 %) com 25 μM (Figura 43B).

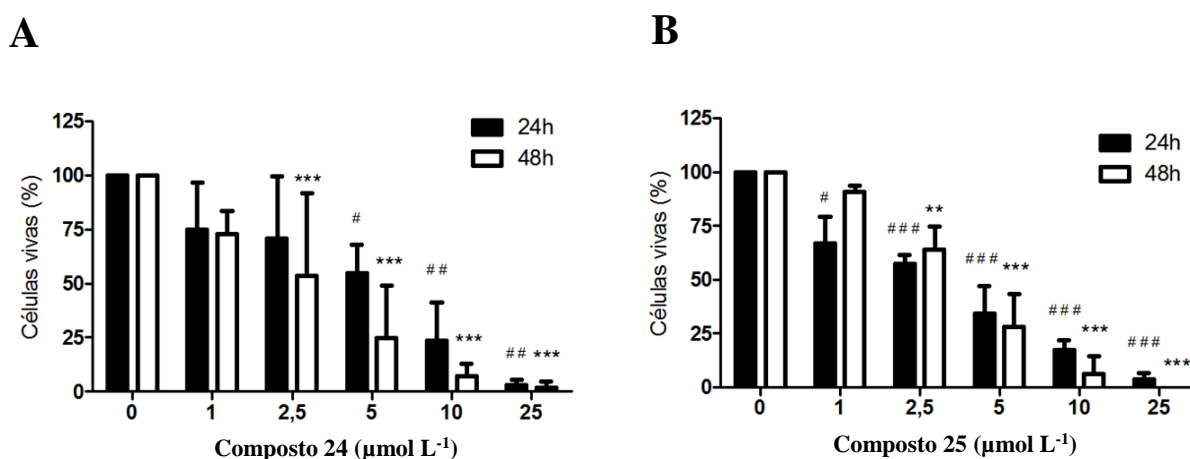


Figura 43. Citotoxicidade dos sais mesoiônicos **24** (gráfico A) **25** (gráfico B) sobre as células de osteossarcoma. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes em duplicata. Os resultados estão expressos em percentual em relação ao controle. # $p < 0,05$; ## $p < 0,001$ e ### $p < 0,0001$ denotam valores com diferença estatística significativa entre o composto e o veículo no tempo de 24h e * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ no tempo de 48h.

A fim de investigar se estes compostos mesoiônicos estariam induzindo apoptose nas células de osteossarcoma foi realizado um ensaio de citometria de fluxo com Anexina V e PI (iodeto de propídeo). As células foram tratadas com os compostos **24** e **25** nas concentrações de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por 24 horas. O percentual de células apoptóticas foi quantificado por citometria de fluxo considerando o somatório do percentual de células Anexina V positivas (+) PI negativas (-) mais o percentual de células Anexina V positivas (+) PI positivas (+).

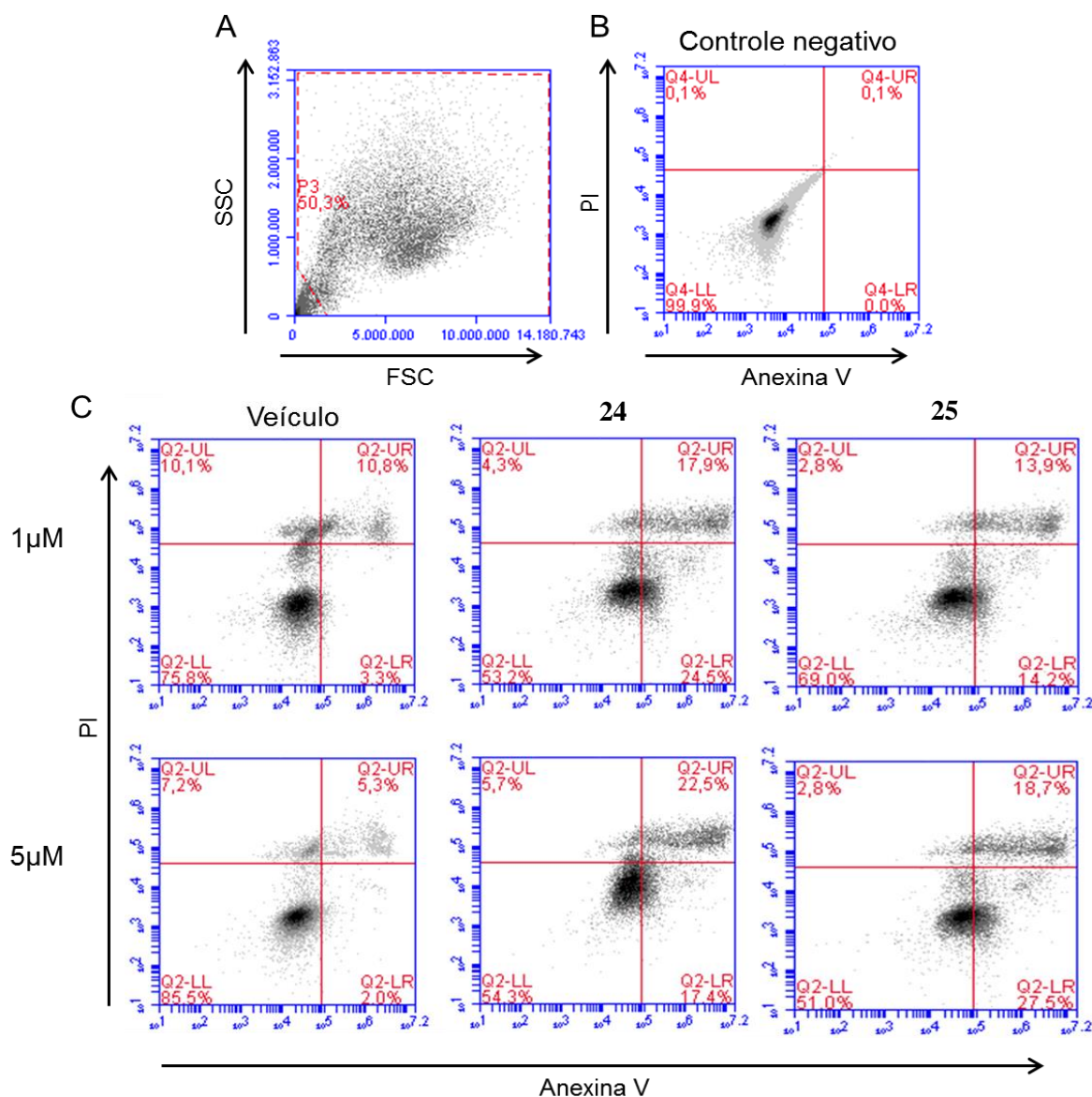


Figura 44. Avaliação da indução de apoptose por citometria de fluxo. (A) Dot-plot mostrando perfil SSC x FSC (Side scattering x forward scattering) das células MG-63. A região delimitada (linha vermelha pontilhada) representa a população selecionada para avaliação. (B) Imagem representativa do perfil de Anexina V x PI do controle negativo (células incubadas com os compostos que não foram incubadas com Anexina V e PI). (C) As células foram tratadas com veículo (dimetilsulfóxido - DMSO), 24 e 25 por 24 horas nas concentrações indicadas e avaliadas quanto à exposição a fosfatidil serina e permeabilidade ao PI. Anexina V-FITC: Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína. PI: iodeto de propídeo.

No tratamento das células MG-63 com o composto **24** a 1 e 5 µM o percentual de células em apoptose foi de $35,3 \pm 12,1$ % e de $42,9 \pm 4,2$ % (média \pm desvio padrão), respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,046$) entre as células tratadas com esse composto mesoiônico ($42,8 \pm 4,1$ %) e com o veículo correspondente a concentração de 5 µM ($8,5 \pm 1,7$ %). Para o composto **25** esses percentuais de células em apoptose foram de $29,3 \pm 11,4$ % e $35,9 \pm 16,3$ % (média \pm desvio padrão), respectivamente (Figuras 44 e 45).

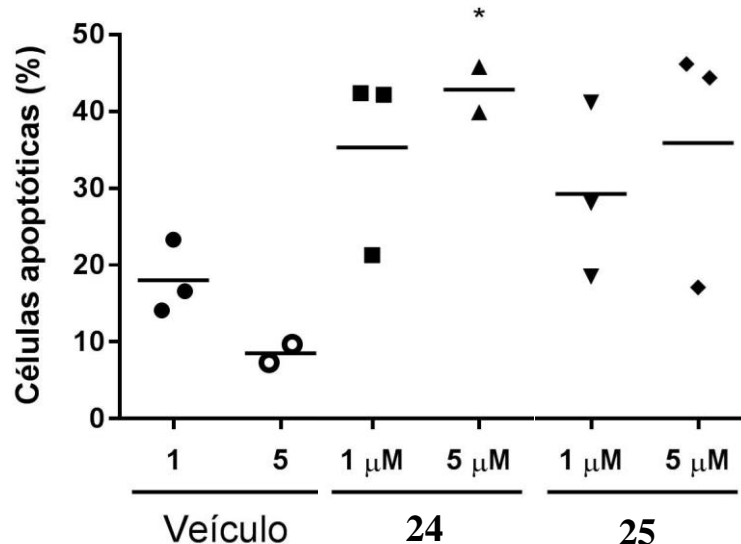


Figura 45. Percentual de células MG-63 tratadas com as concentrações de 1 e 5 μM dos sais **24** e **25**. Quantificação dos resultados de três experimentos independentes (citometria de fluxo). Tratamento com o veículo (dimetilsulfóxido) no mesmo volume correspondente ao volume utilizado para ambas as concentrações.

Considerando-se o tratamento do osteossarcoma e os efeitos adversos, os resultados obtidos nesse estudo indicaram que os compostos avaliados (**24** e **25**) são promissores agentes anticâncer frente ao osteossarcoma. A atividade inibitória *in vitro* desses sais é tão ou mais eficaz do que aquela provocada pelos agentes quimioterápicos comerciais já utilizados durante o tratamento do osteossarcoma, sendo as concentrações de cisplatina em torno de $0,03 \text{ g L}^{-1}$ e $0,15 \text{ g L}^{-1}$ (WU, W. et al., 2014; SONG et al., 2017) e de doxorrubicina $4 \mu\text{M}$ (HE et al., 2015) e $0,00002 \text{ g/L}$ (RONCUZZI et al., 2014).

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a Professora Doutora Amanda Cavalcanti do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad – INTO.

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As metodologias empregadas para a síntese dos compostos intermediários, hidrazino-carbotioamidas, e cloridratos mesoiônicos se mostraram eficientes, sendo os produtos obtidos em rendimentos e grau de pureza satisfatórios. Destaca-se, ainda, que as hidrazino-carbotioamidas foram obtidas com maior eficiência via mecano-química, método na ausência de solvente orgânico. Todas as estruturas químicas propostas foram confirmadas por análises espectroscópicas de IV, RMN de ^1H e ^{13}C .

As hidrazino-carbotioamidas, intermediários na síntese dos compostos mesoiônicos, foram capazes de inibir a oxidação da L-DOPA, o substrato envolvido na atividade da difenolase da tirosinase. Os compostos substituídos com grupos retiradores de elétrons, de maneira geral, apresentaram percentuais de inibição da tirosinase maiores que o do ácido ascórbico, utilizado como inibidor de referência. Os estudos experimentais com a enzima tirosinase e a HSA, além dos estudos teóricos, mostraram que o composto **17** é o mais promissor entre todos os analisados.

Os compostos mesoiônicos da Série I apresentaram resultados promissores frente às 3 linhagens de leucemias humanas, C91, MT2 e Jurkat, além de interagiram com o DNA de salmon.

Os resultados obtidos no estudo frente ao osteossarcoma mostraram que os cloridratos mesoiônicos testados são promissores agentes anticâncer. A atividade inibitória *in vitro* desses sais é tão ou mais eficaz do que a apresentada pelos agentes quimioterápicos comerciais já utilizados durante o tratamento do osteossarcoma.

Os sais mesoiônicos pertencentes à série I foram capazes de inibir 50% do crescimento celular de células HepG2 em concentrações menores que os compostos, de mesma classe de mesoiônicos, reportados na literatura. Os sais mesoiônicos da série II e III não apresentaram efeito citotóxico significativo na concentração máxima testada frente às células da linhagem HepG2.

A continuidade desse trabalho se dará com a avaliação das hidrazino-carbotioamidas frente às linhagens de leucemias, de osteossarcoma e de hepatocarcinoma e, dos mesoiônicos das séries II e III frente à tirosinase e as demais linhagens celulares estudadas nesse trabalho de tese.

Além disso, serão investigados os possíveis mecanismos de ação desses compostos para contribuir com o conhecimento químico e biológico da classe dos mesoiônicos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Materiais

5.1.1. Equipamentos

- I) Os pontos de fusão foram determinados utilizando aparelhos da marca Quimis Q-340S e Gehaka, modelo PF1500, e não foram corrigidos;
- II) Placas de aquecimento e agitação da marca Corning, Ika e Fisatom.
- IV) Foi utilizada uma balança de precisão com quatro casas decimais da marca OHAUS, para pesagem do material.
- V) Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Vertex70 da Bruker.
- VI) Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C e ^1H) foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance II 500 (^1H , 500 MHz; DEPT Q, 125 MHz) e 400 (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna.
- VI) O reator de micro-ondas utilizado na síntese dos compostos foi da marca CEM Discover System.
- VII) Leitor de Microplacas BioRad Model 680;
- VIII) Espectrofotômetro GloMax[®] (Promega, Madison, WI, EUA) com filtro de referência a 620 nm e filtro de leitura a 570 nm.
- IX) Citômetro BD Accuri C6[®] (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).
- X) Fluorímetro Jasco J-815 usando uma célula de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm) equipada com uma porta-Cuvette controlada por um Peltier térmico PFD-425S15F.
- XI) Espectrômetro Shimadzu UV-VIS UV mini 1240 (Kyoto, Japão).

5.1.2. Reagentes, solventes e meios de cultura

I) Os reagentes utilizados na síntese dos compostos foram das marcas Sigma Aldrich, Mallinckrodt, Maybiidge e Merck.

- 3,4-Diflúor-benzaldeído
- Ácido cinâmico
- Ácido clorídrico
- Ácido pentanóico
- Ácido propanoico
- Ácido-*p*-flúor-cinâmico
- Ácido-*p*-nitro-cinâmico
- Alumina neutra
- Carbonato de potássio
- Cinamaldeído
- Cloreto de cálcio
- Cloreto de tionila
- Fenil-amina
- Fenil-hidrazina
- Nitro-isotiocianato
- *p*-Bromo-fenil-amina
- *p*-Cloro- fenil-amina
- *p*-Flúor-benzaldeído
- *p*-Metil-fenil-amina

- *p*-Metóxi- fenil-amina
- *p*-Nitro- fenil-amina
- *p*-Nitro-cinamaldeído
- Tiocianato de amônio

II) Os solventes utilizados nas sínteses, purificação e cromatografia em camada delgada, excluindo a água destilada, foram de grau P. A. da Vetec e, quando necessário secos utilizando Na₂SO₄ e CaCl₂ anidros.

- 1,4-Dioxano
- Água destilada
- Clorobenzeno
- Diclorometano
- Etanol
- Metanol
- Tolueno

III) Os espectros de RMN foram obtidos em acetona, metanol e DMSO deuterados como solventes.

IV) Os reagentes, solventes e meios de cultura, utilizados nos ensaios com fins de avaliações biológicas, estão detalhados a seguir:

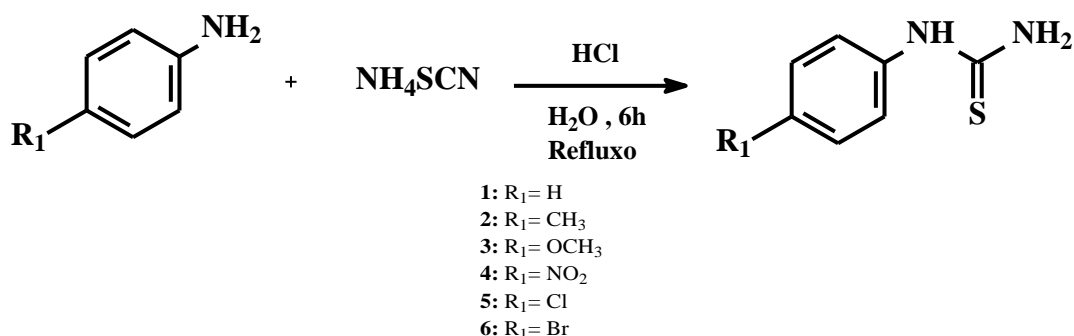
- Enzima tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* liofilizado da Sigma.
- A linhagem celular JURKAT foi isolada de sangue periférico de adolescente do sexo masculino, sendo proveniente de leucemia linfocítica aguda. Foram cedidas pela Dra. Ana Lúcia Giannini do Departamento de Genética do Instituto de Biologia da UFRJ.
- A linhagem MT2 foi 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 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.
- As células HepG2 que são derivadas de hepatocarcinoma humano foram obtidas através da ATCC USA (*American Type Culture Collection*).
- As linhagens comerciais de osteossarcoma humano, MG-63 e Saos-2, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro.
- Substrato, reagentes, solventes e meio de cultura utilizados no ensaio enzimático: ácido (S)-2-amino-3-(3,4-dihidroxifenil)-propanoico (L-DOPA), ácido 2,2',2'',2'''-(etano-1,2-diylbis(azan-etil))-tetra-acético (EDTA), dimetilsulfoxido (DMSO, grau espectroscópico), HSA, ácido ascórbico e tampão PBS (pH=7,4), todos comprados da Sigma-Aldrich Chemical Company. O metanol (grau espectroscópico) e tolueno foram obtidos da Tedia Ltd.
- As estruturas cristalográficas foram obtidas a partir do Banco de Dados Proteicos (PDB). Foram utilizados os códigos de acesso 2Y9X e 1N5U para a enzima tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* e de HSA, respectivamente (ISMAYA et al., 2011; WARDELL et al., 2002).

- O meio de cultura utilizado no estudo citotóxico frente as linhagens celulares K562, MT2 e Jurkat foi 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) em pH 7,4.
- O meio de cultura utilizado na avaliação citotóxica frente a células de HepG2 foi DMEM (Invitrogen Corporation, EUA, no 31600083) com L-glutamina 2 mM, D-glicose 5,5 mM. Este meio foi suplementado com soro fetal bovino 10%, bicarbonato de sódio 0,22% e Hepes 0,2%, pH 7,4.
- O meio de cultura utilizado junto a células MG-63 e Saos-2 foi DMEM-F12 (*Dulbecco's modified Eagle medium* com nutriente F-12, Gibco, Grand Island, NY, EUA) tamponado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco) e na proporção de 1% com uma solução de 100 UI/mL de penicilina G sódica, 100 µg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina (Sigma-Aldrich) 1% de CO₂.
- Na citometria de fluxo foram utilizados solução tampão salina fosfato (PBS), tripsina - ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Sigma-Aldrich), SFB, azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich), solução tampão (Annexin V BindingBuffer, Biolegend, San Diego, CA, EUA), isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Thermo Fischer Scientific) e iodeto de propídeo (PI) (Biolegend).

5.2. Métodos

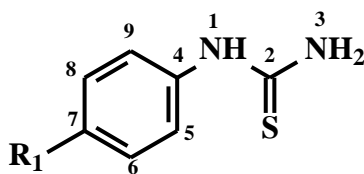
5.2.1. Metodologias sintéticas

5.2.1.1. Preparação das tiouréias



Em um balão de fundo redondo, equipado com condensador de refluxo, foram adicionados 23,5 mmol de *p*-R₁-anilina e 3,17 mL de H₂O destilada. Acrescentou-se, sob agitação, 23,5 mmol de ácido clorídrico concentrado. Posteriormente, foram adicionados 23,5 mmol de tiocianato de amônio à solução. A mistura reacional foi mantida em refluxo por 6 horas e após esse tempo formou-se um sólido. Resfriou-se à temperatura ambiente e então o sólido foi filtrado e lavado com água gelada. A formação do produto foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica utilizando diclorometano como eluente e luz ultravioleta como revelador. Os cristais foram secos a temperatura ambiente e posteriormente foram caracterizados (13-95%) (BRITTO et al., 2006).

Caracterização espectroscópica das tiouréias *p*-fenil-substituídas



- 1: R₁ = H
- 2: R₁ = CH₃
- 3: R₁ = OCH₃
- 4: R₁ = NO₂
- 5: R₁ = Cl
- 6: R₁ = Br

Fenil-tiouréia (1). Sólido bege; Ponto de fusão: 146-148 °C; Rendimento: 45%; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3423; 3276; 3178 (N-H), 2999 (C-H), 1610; 1517; 1446 (C=C), 1267 (C=S); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,72 (s, 1H, H-1), 7,40 (d, 2H, H-5, H-9), 7,33 (d, 2H, H-6, H-8) 7,12 (t, 1H, H-7); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 181,00 (C-2), 139,11 (C-4), 124,39 (C-7), 128,70 (C-5, C-9), 123,02 (C-6, C-8).

p-metil-fenil-tiouréia (2). Sólido branco; Ponto de fusão: 185-183 °C; Rendimento: 13%; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3437; 3273; 3167 (N-H), 3001 (C-H), 1614; 1535; 1463 (C=C), 1261 (C=S), 2968 (C-C); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,60 (s, 1H, H-1), 7,23 (d, 2H, H-5, H-9), 7,14 (d, 2H, H-6, H-8) 2,27 (t, 3H, CH₃); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 180,95 (C-2), 136,43 (C-4), 133,76 (C-7), 129,21 (C-6, C-8), 123,37 (C-5, C-9), 20,52 (CH₃).

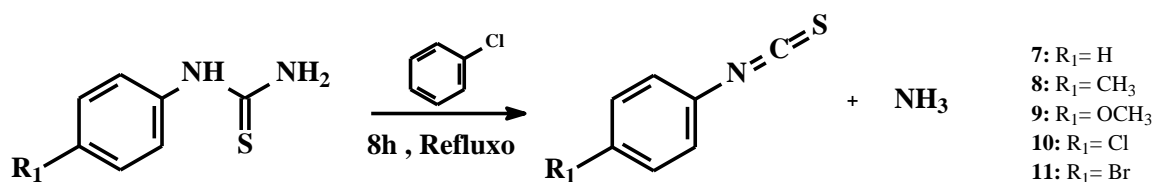
p-metóxi-fenil-tiouréia (3). Sólido branco; Ponto de fusão: 212-210 °C; Rendimento: 95%; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3402; 3278; 3157 (N-H), 3008 (C-H), 1624; 1589; 1495 (C=C), 1234 (C=S), 2979 (C-C); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,48 (s, 1H, H-1), 7,21 (d, 2H, H-5, H-9), 6,91 (d, 2H, H-6, H-8) 3,74 (t, 3H, OCH₃); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 181,13 (C-2), 131,73 (C-4), 156,61 (C-7), 125,60 (C-5, C-9), 114,00 (C-6, C-8), 55,26 (OCH₃).

p-nitro-fenil-tiouréia (4). Sólido bege; Ponto de fusão: 213-211 °C; Rendimento: 71%; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3377; 3290; 3184 (N-H), 3005 (C-H), 1608; 1595; 1471 (C=C), 1244 (C=S), 1309 (C-C); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,38 (s, 1H, H-1), 7,88 (d, 2H, H-5, H-9), 8,18 (d, 2H, H-6, H-8); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 181,31 (C-2), 140,80 (C-4), 146,13 (C-7), 122,26 (C-5, C-9), 129,29 (C-6, C-8).

p-cloro-fenil-tiouréia (5). Sólido branco; Ponto de fusão: 212-210 °C; Rendimento: 67%; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3446; 3273; 3168 (N-H), 3010 (C-H), 1606; 1541; 1473 (C=C), 1205 (C=S), 2225 (C-Cl); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,55 (s, 1H, H-1), 7,39 (d, 2H, H-5, H-9), 7,16 (d, 2H, H-6, H-8); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 181,21 (C-2), 143,96 (C-4), 132,85 (C-6, C-8), 121,61 (C-5, C-9), 119,12 (C-7).

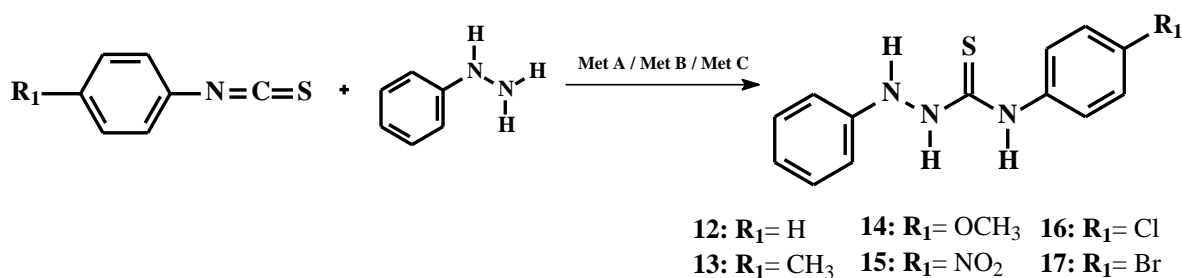
p-bromo-fenil-tiouréia (6). Sólido amarelo pálido; Ponto de fusão: 178-176 °C; Rendimento: 56%; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3406; 3257; 3184 (N-H), 3082 (C-H), 1616; 1506; 1454 (C=C), 1226 (C=S), 2360 (C-Br); RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9,77 (s, 1H, H-1), 7,42 (d, 2H, H-5, H-9), 7,48 (d, 2H, H-6, H-8); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 181,14 (C-2), 138,66 (C-4), 131,40 (C-6, C-8), 124,89 (C-5, C-9), 105,15 (C-7).

5.2.1.2. Preparação dos isotiocianatos



Foram mantidos sob refluxo 7 mmol de *p*-R₁-fenil-tiouréia em clorobenzeno por um período de 8 horas. Em seguida, a solução foi destilada a pressão reduzida, em banho-maria, para a remoção de todo o clorobenzeno. Os isotiocianatos sintetizados foram utilizados, imediatamente após seu isolamento, na preparação das hidrazino-carbotioamidas sem tratamento prévio (BRITTO et al., 2006). O isotiocianato nitro substituído foi obtido comercialmente.

5.2.1.3. Preparação das hidrazino-carbotioamidas N₁,N₄-dissubstituídas



- **Metodologia A: Agitação magnética**

Em um balão de fundo redondo adicionou-se tolueno e aqueceu-se até a ebulição. Em seguida, adicionou-se 25 mmol de isotiocianato e 25 mmol de fenil hidrazina, previamente destilada. A mistura reacional permaneceu sob agitação por 60 minutos até a atingir a temperatura ambiente. O produto formado precipitou no fundo do balão, foi filtrado, lavado com tolueno gelado e recristalizado em etanol (68-95%) (SOUSA-PEREIRA et al., 2018; DOS REIS et al., 2011b).

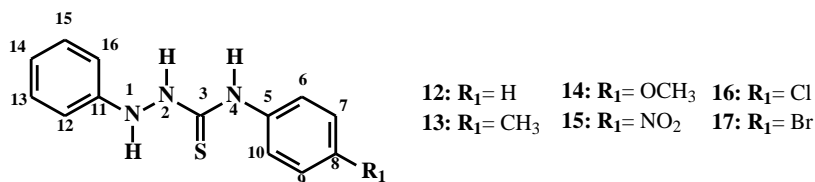
- **Metodologia B: Irradiação de micro-ondas**

Em um balão de fundo redondo adicionou-se 25 mmol de isotiocianato, 25 mmol de fenil hidrazina, previamente destilada, e tolueno como solvente orgânico. Irradiou-se a mistura da reação em reator de micro-ondas por 30 minutos e 110 °C a 100 W de potência. Obteve-se a precipitação de cristais que foram filtrados, lavados com tolueno gelado e recristalizados em etanol (73-83%) (SOUSA-PEREIRA et al., 2018; DOS REIS et al., 2011b).

- **Metodologia C: Reação sólido-líquido**

Em um gral foram misturados 0,74 mmol de isotiocianato e 0,74 mmol de fenil hidrazina, previamente destilada. Os reagentes foram macerados vigorosamente com pistilo por 2 minutos na ausência de solvente orgânico. O sólido formado foi obtido em alto grau de pureza sem necessidade de recristalização (>99%) (SOUSA-PEREIRA et al., 2018).

Caracterização espectroscópica das hidrazino-carbotioamidas



N-2-difenil-hidrazino-carbotioamida (**12**). Sólido branco; Ponto de fusão: 173-171 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3282, 3212, 3170 (N-H), 1594, 1542, 1496 (C=C), 1207 (C=S); RMN ¹H (500 MHz, acetona-*d*₆) δ 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 DEPT Q (125 MHz, acetona-*d*₆) δ 183,18 (C-3), 149,03 (C-11), 140,45 (C-5), 130,25 (C-13, C-15), 129,22 (C-7, C-9), 125,95 (C-8), 125,24 (C-6, C-10), 122,00 (C-14), 114,61 (C-12, C-16).

N-(4-metil-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (**13**). Sólido branco; Ponto de fusão: 175-174 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3437; 3275; 3186 (N-H), 3020 (C-H), 1627, 1550, 1490 (C=C), 1269 (C=S); RMN ¹H (500 MHz, acetona-*d*₆) δ 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; CH₃); RMN DEPT Q (125 MHz, acetona-*d*₆) δ 182,90 (C-3), 148,73 (C-11), 137,52 (C-5), 135,16 (C-8), 129,89 (C-13, C-15), 129,38 (C-7, C-9), 125,04 (C-6, C-10), 121,60 (C-14), 114,22 (C-12, C-16), 20,84 (CH₃).

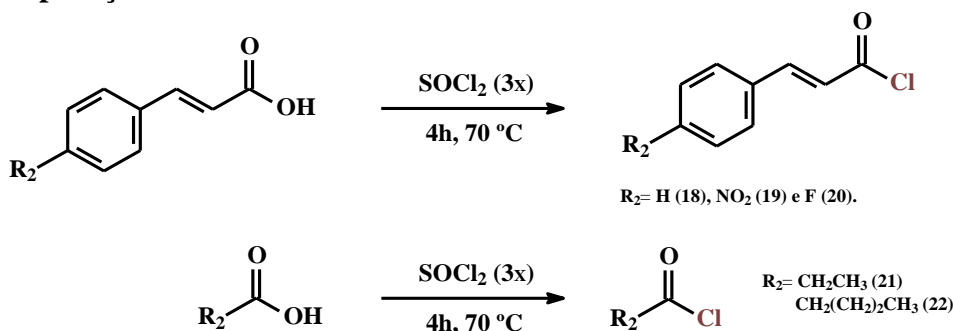
N-(4-metóxi-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (**14**). Sólido branco; Ponto de fusão: 186-184 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3267, 3161, 3091 (N-H), 3028 (C-H), 1600, 1548, 1492 (C=C), 1247 (C=S); 1170 (ArC-O); 1026 (confirmação Ar-O-C); RMN ¹H (500 MHz, acetona-*d*₆) δ 9,51 (s, 1H, H-2), 8,60 (s, 1H, H-4), 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, OCH₃); RMN DEPT Q (125 MHz, acetona-*d*₆) δ 183,64 (C-3), 158,45 (C-8), 149,18 (C-11), 133,35 (C-5), 130,26 (C-13, C-15), 127,35 (C-6, C-10), 121,91 (C-14), 114,56 (C-12, C-16), 114,42 (C-7, C-9), 55,99 (OCH₃).

N-(4-nitro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (**15**). Sólido amarelo; Ponto de fusão: 234-233 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3435; 3249; 3190 (N-H), 1600, 1568, 1504 (C=C), 1280 (C=S); 1504 (C-NO₂); RMN ¹H (500 MHz, acetona-*d*₆) δ 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 DEPT Q (125 MHz, acetona-*d*₆) δ 182,97 (C-3), 148,84 (C-11), 146,84 (C-5), 145,06 (C-8), 130,45 (C-13, C-15), 125,03 (C-7, C-9), 124,11 (C-6, C-10), 122,46 (C-14), 114,94 (C-12, C-16).

N-(4-cloro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (**16**). Sólido branco; Ponto de fusão: 234-233 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3435, 3315, 3140 (N-H), 1600, 1554, 1508 (C=C), 1286 (C=S); 1209, 758 (C-Cl); RMN ¹H (500 MHz, acetona-*d*₆) δ 9,79 (s, 1H, H-2), 8,85 (s, 1H, H-4), 7,77 (d, 3H, H-7, H-9), 7,45 (s, 1H, H-1), 7,31 (t, 2H, H-3, H-5), 7,25 (t, 3H, H-13, H-15), 6,89 (t, 1H, H-14), 6,88 (d, 2H, H-12, H-16); RMN DEPT Q (125 MHz, acetona-*d*₆) δ 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), 121,8 (C-14), 114,5 (C-12, C-16).

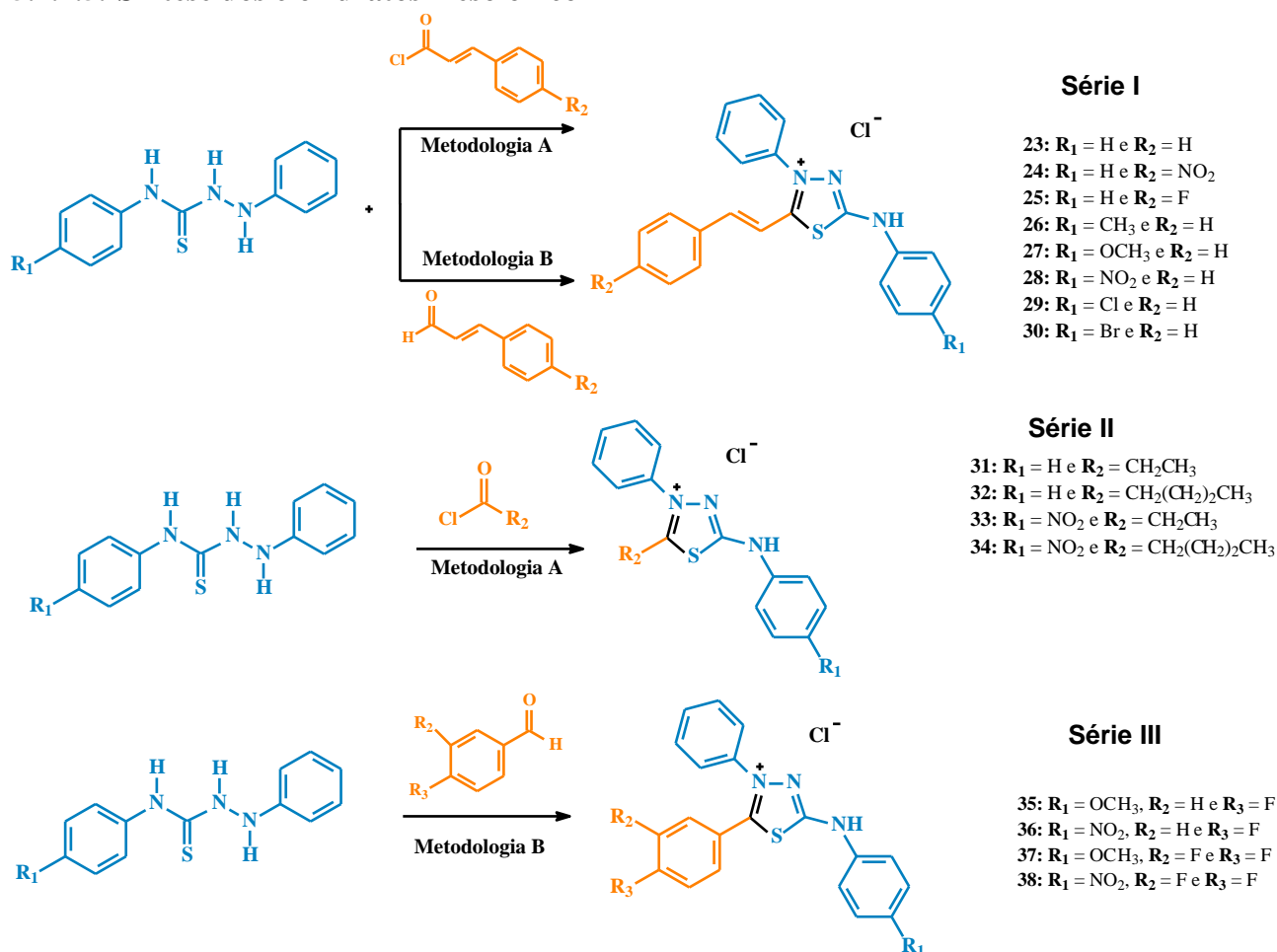
N-(4-bromo-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (**17**). Sólido branco; Ponto de fusão: 212-209 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3249, 3182 (N-H), 1597, 1585, 1489 (C=C), 1199 (C=S); 1072, 769 (C-Br); RMN ^1H (500 MHz, acetona- d_6) δ 9,81 (s, 1H, H-2), 8,85 (s, 1H, H-4), 7,74 (d, 3H, H-7, H-9), 7,46 (s, 1H, 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 DEPT Q (125 MHz, acetona- d_6) δ 181,12 (C-3), 147,93 (C-11), 138,68 (C-5), 130,66 (C-7, C-9), 128,88 (C-13, C-15), 127,20 (C-6, C-10), 119,87 (C-14), 116,88 (C-8), 113,11 (C-12, C-16).

5.2.1.4. Preparação dos cloretos de ácido



Em um balão de fundo redondo de 25 mL foram adicionados 22 mmol do ácido carboxílico. Posteriormente, foram adicionados 66 mmol de cloreto de tionila. A reação foi mantida a 70 °C, em agitação por aproximadamente 4 horas. As reações com os ácidos cinâmicos foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada analítica, observando-se o éster metílico correspondente formado através da reação instantânea entre o cloreto de acila e o metanol usado como solvente para diluir a alíquota investigada. Ao balão foi adaptado um tubo de cloreto de cálcio na extremidade. O excesso de cloreto de tionila foi removido em evaporador rotatório, restando apenas o cloreto de ácido que foi utilizado sem tratamento, devido à sua instabilidade em atmosfera úmida.

5.2.1.5. Síntese dos cloridratos mesoiônico



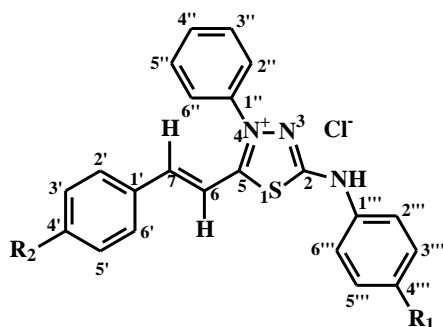
- **Metodologia A: Refluxo em 1,4-dioxano**

A uma suspensão de 17 mmol de hidrazino-carbotoioamida N_1, N_4 -substituída em 15 mL de 1,4-dioxano anidro, foi adicionado uma solução 17 mM do cloreto de ácido cinâmico substituído em 4 mL de 1,4-dioxano. Após 4 horas de agitação sob refluxo o produto precipitou. A solução foi deixada em repouso por 24 horas. O precipitado foi filtrado e lavado com 1,4-dioxano.

- **Metodologia B: Irradiação de micro-ondas**

Em um balão de fundo redondo de 50 ml adicionou-se 0,38 mmol de hidrazino-carbotoioamida N_1, N_4 -substituída e 0,38 mmol de cinaldeído devidamente substituído, na presença de cloreto de tionila (3x excesso) como ácido de Lewis e 1,4-dioxano em quantidade suficiente para homogeneizar os reagentes. A mistura reacional foi mantida sob irradiação de micro-ondas por 5 minutos em 100 W de potência. Posteriormente, a mistura 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, assim, os cinco produtos finais puros em rendimentos satisfatórios.

Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos da série I (23-30)



- 23:** $R_1 = H$ e $R_2 = H$
24: $R_1 = H$ e $R_2 = NO_2$
25: $R_1 = H$ e $R_2 = F$
26: $R_1 = CH_3$ e $R_2 = H$
27: $R_1 = OCH_3$ e $R_2 = H$
28: $R_1 = NO_2$ e $R_2 = H$
29: $R_1 = Cl$ e $R_2 = H$
30: $R_1 = Br$ e $R_2 = H$

Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenil-amina (23). Sólido amarelo; Ponto de fusão: 268-266 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3432 (N-H); 3056 (C-H aromático e/ou vinílico); 2670 (C=NH⁺); 1604 (C=C vinílico); 1567 (C=N); 1538, 1498 e 1448 (C=C aromático); 1330 (C-S); 954 (C-H vinílico); 746 e 690 ($A_{r}C-H$ no plano – 5H viz).RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 12,41 (s, 1H, N-H), 8,01 (d, 1H, H-7), 7,58 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 7,84 (d, 2H, H-3'', H-5''), 7,15 (t, 1H, H-4'''), 7,75 (m, 5H, H-2', H-6', H-2'', H-4'', H-6''), 7,44 (m, 5H, H-3', H-5', H-4', H-3''', H-5'''), 7,05 (d, 1H, H-6);RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 162,90 (C-5), 159,14 (C-2), 147,90 (C-7), 138,51 (C-1'''), 136,98 (C-1'), 131,94 (C-4''), 131,70 (C-4'), 130,17 (C-2', C-6'), 129,51 (C-3', C-5'), 129,22 (C-3'', C-5''), 129,09 (C-2'', C-6''), 126,15 (C-3''', C-5'''), 124,17 (C-4'''), 118,60 (C-2''', C-6'''), 111,50 (C-6).

Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenil-amina (24). Sólido laranja; Ponto de fusão: 276-274 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3432 (N-H); 3048 (C-H aromático e/ou vinílico); 2721 (C=NH⁺); 1616 (C=C vinílico); 1571 (C=N); 1519 (C-NO₂ e/ou ν C=C aromático); 1450 (C=C aromático); 1342 (N=O e ν C-S); 956 (C-H vinílico); 840 ($A_{r}C-H$ no plano - 2H viz); 746 e 688 (C-H aromático no plano - 5H viz); RMN ¹H (500MHz,DMSO-*d*₆) δ 13,03 (s, 1H, N-H), 8,25 (d, 2H, H-3', H-5'), 8,13 (d, 1H, H-7), 8,02 (d, 2H, H-2'', H-6''), 7,85 (dd, 2H, H-3'', H-5''), 7,76 (m, 3H, H-2', H-6', H-4''), 7,61 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 7,41 (t, 2H, H-3''', H-5'''), 7,26 (d, 1H,H-6), 7,14 (t, 1H, H-4'''); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 162,83 (C-5), 156,96 (C-2), 154,96 (C-4'''), 142,81 (C-7), 139,35 (C-1'''), 137,58 (C-1'), 134,38 (C-1''), 131,18 (C-4''), 130,83 (C-4'), 130,00 (C-2', C-6'), 139,13 (C-3', C-5'), 128,24 (C-3'', C-5''), 126,01 (C-2'', C-6''), 125,26 (C-3''', C-5'''), 121,42 (C-2''', C-6'''), 112,46 (C-6).

Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-estiril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenil-amina (25). Sólido amarelo; Ponto de fusão: 238-239 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3410 (N-H); 3047(C-H aromático e/ou vinílico); 2732 (C=NH⁺), 1596, 1509, 1449 (C=C aromático), 1568 (C=N), 1240 (C-F); 748, 688 (C-H aromático no plano - 5H viz); RMN ¹H (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,96 (s, NH), 8,03 (d, 1H, H-7), 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, 2H, H-3''', H-5'''), 7,42 (t, 2H, H-2''', H-6'''), 7,31 (t, 2H, 3'', 5''), 7,14 (t, 1H, H-4'''), 7,04 (d, 1H, H-6); RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163,2 (C-5), 165,5 e 163,5 (C-4'), 159,3 (C-2), 147,0 (C-7), 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-6).

Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metil-fenil)amina (26). Sólido laranja, Ponto de fusão:287-286 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3431 (N-H); 3039 (C-H aromático e/ou vinílico); 2922 (C-H alifático); 2746 (C=NH⁺); 1614 (C=C vinílico); 1564 e 1452 (C=C aromático); 1523 (C=N); 1340 (C-S); 1114 (C-H vinílico); 823 ($A_{r}C-H$ no plano - 2H viz); 763 e 688 (C-H aromático no plano - 5H viz); RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 12,58 (s, 1H, N-H), 8,25

(d, 2H, H-3'', H-5''), 8,10 (d, 1H, H-7), 8,01 (d, 2H, H-2'' e H-6''), 7,83-7,75 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-4''), 7,47 (d, 2H, H-3''', H-5'''), 7,25 (d, 1H, H-6), 7,22 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 2,27 (s, 3H, CH₃); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 159,75 (C-5), 148,50 (C-2), 144,45 (C-7), 139,94 (C-1'''), 136,98 (C-1'), 133,61 (C-1''), 131,83 (C-4''), 130,18 (C-2', C-6'), 130,07 (C-3', C-5'), 129,90 (C-3'', C-5''), 126,13 (C-4'''), 125,16 (C-2'', C-6''), 124,14 (C-3''', C-5'''), 118,81 (C-2''', C-6'''), 115,47 (C-6), 20,48 (CH₃).

Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metoxi-fenil)amina (27). Sólido vermelho, Ponto de fusão: 292-291 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3431 (N-H); 3043 (C-H aromático e/ou vinílico); 2929 (C-H alifático); 2717 (C=NH⁺); 1622 (C=C vinílico); 1595, 1575 e 1454 (C=C aromático); 1512 (C=N);; 1342 (C-S); 1244 (ArC-O); 1109 (O-CH₃); 1029 (confirmação Ar-O-R); 954 (C-H vinílico); 829 (ArC-H no plano - 2H viz); 773 e 694 (C-H aromático no plano - 5H viz); RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 12,73 (s, 1H, N-H), 8,24 (d, 2H, H-3'', H-5''), 8,09 (d, 1H, H-7), 8,00 (d, 2H, H-2'' e H-6''), 7,83-7,75 (m, 6H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6', H-4''), 7,52 (d, 2H, H-2''', H-6'''), 7,24 (d, 1H, H-6), 6,99 (d, 2H, H-3''', H-5'''), 3,73 (s, 3H, OCH₃); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 161,33 (C-5), 156,04 (C-2), 148,45 (C-4'''), 144,20 (C-7), 139,98 (C-1'), 137,00 (C-1''), 131,79 (C-4''), 131,72 (C-1'''), 130,15 (C-2', C-6'), 130,03 (C-3'', C-5''), 126,14 (C-2'', C-6''), 124,13 (C-2''', C-6'''), 120,48 (C-4'), 115,50 (C-6), 114,63 (C-3''', C-5'''), 55,30 (OCH₃).

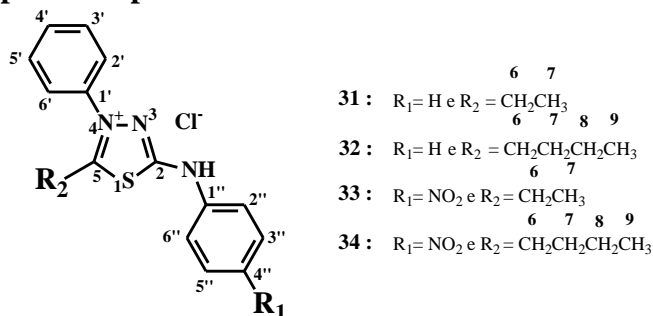
Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (28). Sólido laranja, Ponto de fusão: 293-290 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3435 (N-H); 2997 (C-H aromático); 2582 (C=NH⁺); 1541 (C=N); 1338 (C-NO₂); 1627; 1585; 1496 (C=C aromático); 1338 (C-S); 850 (ArC-H no plano - 2H viz); 769 e 690 (C-H aromático no plano - 5H viz); RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 12,86 (s, 1H, N-H), 8,32 (d, 2H, H-3''', H-5'''), 8,11 (d, 1H, H-7), 7,85 (m, 2H, H-5'' e H-3''), 7,77 (m, 5H, H-2'', H-6'', H-4'', H-2''', H-6'''), 7,47 (m, 5H, H-2', H-6', H-4', H-3', H-5'), 7,10 (d, 1H, H-6); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 162,83 (C-5), 156,96 (C-2), 154,96 (C-4'''), 142,81 (C-7), 139,35 (C-1'''), 137,58 (C-1'), 134,38 (C-1''), 131,18 (C-4''), 130,83 (C-4'), 130,00 (C-2', C-6'), 139,13 (C-3', C-5'), 128,24 (C-3'', C-5''), 126,01 (C-2'', C-6''), 125,26 (C-3''', C-5'''), 121,42 (C-2''', C-6'''), 112,46 (C-6).

Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29). Sólido laranja, Ponto de fusão: 284-282 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3433 (N-H); 2922 (C-H aromático e/ou vinílico); 2586 (C=NH⁺); 1620 (C=C vinílico); 1562 e 1492 (C=C aromático); 1537 (C=N); 1249 (C-S); 1097 (C-H vinílico); 1033 (C-Cl); 817 (ArC-H no plano - 2H viz); 761 e 686 (C-H aromático no plano - 5H viz). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 12,82 (s, 1H, N-H), 8,02 (d, 1H, H-7), 7,84 (dd, 2H, H-3'', H-5''), 7,75 (m, 5H, H-2'', H-6'', H-4'', H-3', H-5'), 7,61 (d, 2H, H-2', H-6'), 7,47 (m, 5H, H-2''', H-6''', H-3''', H-5''', H-4'), 7,04 (d, 1H, H-6); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 163,23 (C-5), 158,84 (C-2), 148,18 (C-7), 137,44 (C-1'''), 136,93 (C-1'), 133,78 (C-1''), 131,95 (C-4''), 131,71 (C-4'), 130,16 (C-3', C-5'), 129,36 (C-3''', C-5'''), 129,09 (C-2''', C-6'''), 129,15 (C-2', C-6'), 127,65 (C-4'''), 126,16 (C-2'', C-6''), 120,07 (C-3'', C-5''), 111,43 (C-6).

Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30). Sólido laranja, Ponto de fusão: 298-296 °C; IV (KBr, ν cm⁻¹) 3432 (N-H); 3037 (C-H aromático e/ou vinílico); 2663 (C=NH⁺); 1604 (C=C vinílico); 1560, 1484 e 1442 (C=C aromático); 1540 (C=N); 1309 (C-S); 1114 (C-H vinílico); 948, 669 (C-Br); 827 (ArC-H no plano - 2H viz); 755 e 690 (C-H aromático no plano - 5H viz). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 12,62 (s, 1H, N-H), 8,03 (d, 1H, H-7), 7,83 (dd, 2H, H-3'', H-5''), 7,75 (m, 5H, H-2'', H-6'', H-4'', H-3', H-5'), 7,60 (d, 2H, H-2', H-6'), 7,54 (d, 2H, H-3''', H-5'''), 7,47 (m, 5H, H-2''', H-6''', H-4'), 7,04 (d, 1H,

H-6); RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ 163,36 (C-5), 158,89 (C-2), 148,23 (C-7), 137,85 (C-1'''), 136,94 (C-1'), 133,80 (C-1''), 132,32 (C-3''', C-5'''), 132,02 (C-4''), 131,75 (C-4'), 130,20 (C-3', C-5'), 129,23 (C-2''', C-6'''), 129,18 (C-2', C-6'), 126,19 (C-2'', C-6''), 120,47 (C-3'', C-5''), 115,78 (C-4'''), 111,45 (C-6).

Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos da série II (31-34)



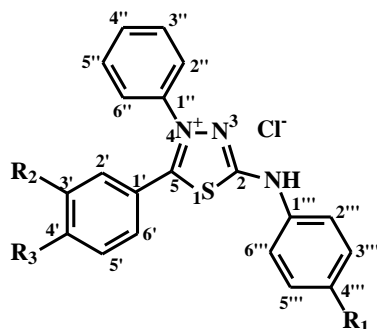
Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenil-amina (31). Sólido amarelo, Ponto de fusão: 232-235 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3026 (C-H aromático); 2936 (C-H alifático); 2758 (C=NH $^+$); 1609 (C=C vinílico); 1569, 1451 (C=C aromático). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 12,59 (s, 1H, N-H), 7,82 (dd, 2H, H-3', H-5'), 7,72 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 7,57 (d, 2H, H-2'', H-6''), 7,39 (t, 2H, H-3'', H-5''), 7,10 (t, 1H, H-4''), 3,06 (q, 2H, H-6), 1,27 (t, 3H, H-7); RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ 172,23 (C-2), 160,24 (C-5), 138,66 (C-1'''), 137,05 (C-1'), 131,67 (C-4'), 130,10 (C-3', C-5'), 129,42 (C-2', C-6'), 125,77 (C-3'', C-5''), 123,75 (C-4''), 118,19 (C-2'', C-6''), 23,02 (C-6), 13,14 (C-7).

Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenil-amina (32). Sólido marrom, Ponto de fusão: 230-233 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3048 (C-H aromático); 2961 (C-H alifático); 2768 (C=NH $^+$); 1616, 1572 e 1485 (C=C aromático). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 12,85 (s, 1H, N-H), 7,86 (m, 2H, H-3', H-5'), 7,73 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 7,59 (d, 2H, H-2'', H-6''), 7,39 (t, 2H, H-3'', H-5''), 7,11 (t, 1H, H-4''), 3,06 (m, 2H, H-6), 1,65 (dq, 2H, H-7), 1,31 (dq, 2H), 0,16 (t, 3H); RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ 170,62 (C-2), 160,18 (C-5), 138,68 (C-1'''), 137,07 (C-1'), 131,64 (C-4'), 130,10 (C-3', C-5'), 129,35 (C-2', C-6'), 125,81 (C-3'', C-5''), 123,65 (C-4''), 118,14 (C-2'', C-6''), 30,56 (C-6), 28,43 (C-7), 21,51 (C-8), 13,28 (C-9).

Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (33). Sólido marrom, Ponto de fusão: 219-223°C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3097 (C-H aromático); 2909 (C-H vinílico); 2727 (C=NH $^+$); 1625, 1549 e 1483 (C=C aromático); 1504 (C-NO $_2$). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 13,44 (s, 1H, N-H), 7,87 (m, 2H, H-3', H-5'), 7,77 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 7,81 (d, 2H, H-2'', H-6''), 8,35 (d, 2H, H-3'', H-5''), 3,12 (q, 2H, H-6), 1,31 (t, 3H, H-7); RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ 174,44 (C-2), 160,56 (C-5), 144,68 (C-1'''), 137,40 (C-1'), 132,30 (C-4'), 130,64 (C-3', C-5'), 126,32 (C-2', C-6'), 126,17 (C-3'', C-5''), 142,75 (C-4''), 118,46 (C-2'', C-6''), 23,58 (C-6), 13,64 (C-7).

Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (34). Sólido bege, Ponto de fusão: 202-204 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3079 (C-H aromático); 2656 (C=NH $^+$); 1622, 1583 e 1485 (C=C aromático); 1502 (C-NO $_2$). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 13,54 (s, 1H, N-H), 7,82 (m, 2H, H-3', H-5'), 7,71 (m, 3H, H-2', H-4', H-6'), 7,74 (d, 2H, H-2'', H-6''), 8,26 (d, 2H, H-3'', H-5''), 3,05 (m, 2H, H-6), 1,62 (ddd, 2H, H-7), 1,28 (m, 2H), 0,75 (t, 3H); RMN ^{13}C (DMSO- d_6) δ 172,83 (C-2), 160,57 (C-5), 144,69 (C-1'''), 137,41 (C-1'), 132,28 (C-4'), 130,64 (C-3', C-5'), 126,35 (C-2', C-6'), 126,11 (C-3'', C-5''), 142,69 (C-4''), 117,10 (C-2'', C-6''), 31,08 (C-6), 28,97 (C-7), 21,96 (C-8), 13,73 (C-9).

Caracterização espectroscópica dos cloridratos mesoiônicos da série III (35-38)



35: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$ e $R_3 = \text{F}$

36: $R_1 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{H}$ e $R_3 = \text{F}$

37: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{F}$ e $R_3 = \text{F}$

38: $R_1 = \text{NO}_2$, $R_2 = \text{F}$ e $R_3 = \text{F}$

Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (35). Sólido amarelo, Ponto de fusão: 265-267 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3061 (C-H aromático); 2694 (C=NH⁺); 1626, 1575 e 1456 (C=C aromático). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 13,54 (s, 1H, N-H), 7,65 (dd, $J=6,9$, 2H, H-3'', H-5''), 7,59-7,53 (m, 3H, H-2'', H-4'' e H-6''), 7,56 (t, 2H, H-3', H-5'), 7,51 (d, $J=8,8$, 2H, H-2''', H-6'''), 7,35 (t, $J=8,7$, 2H, H-2', H-6'), 6,99 (d, $J=8,8$, 2H, H-3''', H-5'''), 3,71 (s, 3H, OCH₃); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 162,56 (C-2), 160,61 (C-5), 119,71 e 119,68 (C-1', $J=3,63$), 133,05 e 132,97 (C-2', C-6', $J=9,99$), 120,06 (C-3', C-5'), 165,25 e 163,24 (C-4', $J=283,4$), 137,47 (C-1''), 126,00 (C-2'', C-6''), 129,77 (C-3'' e C-5''), 131,28 (C-4''), 131,60 (C-1'''), 116,64 e 116,46 (C-2''' e C-6''', $J=22,71$), 114,55 (C-3''' e C-5'''), 155,79 (C-4'''), 55,19 (OCH₃).

Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (36). Sólido amarelo, Ponto de fusão: 244-247 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3048 (C-H aromático); 2649 (C=NH⁺); 1620, 1575, 1476 (C=C aromático). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 14,22 (s, 1H, N-H), 7,82 (d, 2H, H-3'', H-5''), 7,68-7,61 (m, 3H, H-2'', H-4'' e H-6''), 7,73 (t, $J=8,80$, 2H, H-3', H-5'), 7,91 (d, $J=8,83$, 2H, H-2''', H-6'''), 7,37 (t, $J=8,80$, 2H, H-2', H-6'), 8,29 (d, $J=8,83$, 2H, H-3''', H-5'''); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 166,69 (C-2), 164,67 (C-5), 120 (C-1'), 134,19 e 134,11 (C-2', C-6', $J=9,99$), 118,99 e 118,94 (C-3', C-5', $J=6,36$), 165,70 e 165,63 / 161,43 e 161,34 (C-4', $J=527,70$ e 9,08), 138,56 (C-1''), 127,06 (C-2'', C-6''), 130,67 (C-3'' e C-5''), 132,27 (C-4''), 145,06 e 144,88 (C-1''', $J=22,0$), 117,53 (C-2''' e C-6''', $J=22,0$), 126,09 (C-3''' e C-5'''), 143,48 (C-4''').

Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-diflúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (37). Sólido marrom, Ponto de fusão: 233-235 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3047 (C-H aromático); 2776 (C=NH⁺); 1619, 1575 e 1485 (C=C aromático). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 12,72 (s, 1H, N-H), 7,69 (m, 2H, H-3'', H-5''), 7,60 (m, 2H, H-2'' e H-6''), 7,62 (m, 1H, H-5'), 7,55 (d, $J=8,8$, 2H, H-2''', H-6'''), 7,71 (m, 1H, H-2'), 7,42 (m, 1H, H-6'), 7,02 (d, $J=8,8$, 2H, H-3'' e H-5'') 3,74 (s, 3H, OCH₃); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆) δ 161,00 (C-2), 160,93 (C-5), 120,38 (C-1'), 152,83 e 152,73 / 150,81 e 150,71 (C-4', $J=250$ e 13), 149,98 e 149,87 / 148,00 e 147,90 (C-3', $J=250$ e 13), 128,30 (C-5'), 119,91 (C-6'), 118,88 e 118,72 (C-2', $J=18,0$), 131,55 (C-1''), 125,99 (C-2'' e C-6''), 129,78 (C-3'' e C-5''), 131,39 (C-4''), 137,26 (C-1'''), 120,07 (C-2''' e C-6'''), 114,55 (C-3''' e C-5'''), 155,82 (C-4'''), 55,19 (OCH₃).

Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-diflúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (38). Sólido amarelo, Ponto de fusão: 239-241 °C; IV (KBr, ν cm^{-1}) 3047 (C-H aromático); 2659 (C=NH⁺); 1615, 1575 e 1496 (C=C aromático). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ 13,66 (s, 1H, N-H), 7,69-7,58 (m, 7H, H-2', H-5', H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' e H-6''), 7,82 (d, $J=8,5$, 2H, H-2''', H-6'''), 7,41 (m, 1H, H-6'), 8,32 (d, $J=8,5$, 2H, H-3''' e H-5'''); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆)

8163,46 (C-2), 160,93 (C-5), 120,16 (C-1'), 153,14 e 153,04 / 151,10 e 151,01(C-4', $J=250$ e 13), 150,11 e 150,01 / 148,13 e 148,03(C-3', $J=250$ e 13), 128,58 (C-5'), 120,39 e 120,23(C-6', $J=19$), 118,06 e 118,90 (C-2', $J=19$), 137,23 (C-1''), 126,21 (C-2'' e C-6''), 130,00 (C-3'' e C-5''), 131,71 (C-4''), 143,89 (C-1'''), 118,23 (C-2''' e C-6'''), 125,77 (C-3''' e C-5'''), 142,56 (C-4''').

5.2.2. Ensaio biológicos

5.2.2.1. Estudos envolvendo a inibição da enzima tirosinase frente às hidrazino-carbotioamidas

Ensaio experimentalis

Inicialmente, as soluções dos compostos hidrazino-carbotioamidas **12-17** (2,50 mM) foram preparadas em DMSO. Em seguida, foram adicionados à cada solução L-DOPA (0,17 mM), EDTA (0,22 mM) e tirosinase (50–100 unidades), em PBS (pH=7,4). Devido a diferenças na solubilidade dos compostos **12-17** no meio reacional as concentrações utilizadas para determinar o percentual de inibição foram 666; 466; 333; 66,6; 167; e 167 μM , respectivamente. A absorvância foi imediatamente medida após a adição da enzima tirosinase, a 475 nm. A formação de L-dopaquinona foi monitorada por 30 minutos (Figura 46) e a percentagem de inibição foi calculada de acordo com a Equação 2 (SOUSA-PEREIRA et al., 2018). Os espectros de absorção UV-VIS obtidos para as medições de atividade enzimática foram registrados em um espectrômetro Shimadzu UV-VIS UV mini 1240 (Kyoto, Japão), à temperatura ambiente (AMORIM et al., 2013).

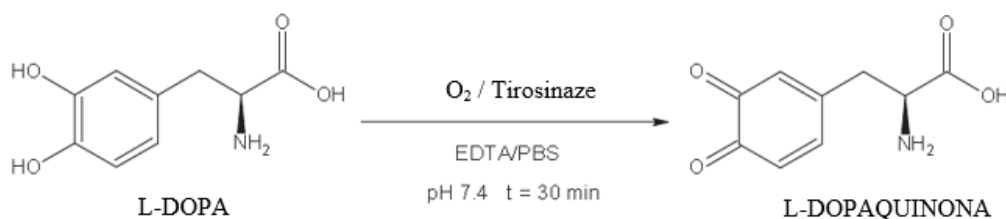


Figura 46. Oxidação da L-DOPA a L-dopaquinona na presença da enzima tirosinase.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{[(B_{30} - B_0) - (A_{30} - A_0)]_x}{(B_{30} - B_0)} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

onde B_0 e B_{30} são a absorvância de L-dopa + tirosinase em $t = 0$ min e $t = 30$ min, respectivamente. A_0 e A_{30} são a absorvância do inibidor L-dopa + tirosinase + em $t = 0$ min e $t = 30$ min, respectivamente. A possível interferência da absorvância de compostos orgânicos foi subtraída.

Os valores de IC_{50} para as hidrazino-carbotioamidas foram calculados a partir da equação gerada por um ajuste polinomial dos dados experimentais (Software Origin, função estatística ANOVA). O ácido ascórbico ($\text{IC}_{50} = 266 \mu\text{M}$) foi utilizado como controle positivo (SOARES, et al., 2017).

O mecanismo de inibição para a reação de oxidação da L-dopa pela tirosinase frente aos compostos **16** e **17** foi determinado a partir de gráficos Hanes-Woolf. Nesta análise, diferentes concentrações de L-dopa (66,6; 100; 200; 333; 467; e 667 μM) como substrato e diferentes concentrações de hidrazino-carbotioamidas **16** e **17** (0; 33,3; 50,0; e 83,0 μM) foram utilizadas. A formação de L-dopaquinona foi observada na ausência e presença dos inibidores após incubação por 30 min a 37 °C.

Análise de docking molecular

As estruturas cristalográficas foram obtidas a partir do Banco de Dados Proteicos (PDB). Foram utilizados os códigos de acesso 2Y9X (ISMAYA et al., 2011) e 1N5U (WARDELL et al., 2002) para a enzima tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* e de HSA, respectivamente. As estruturas químicas das hidrazino-carbotioamidas em estudo e da L-dopa foram construídas e minimizadas na Teoria Funcional de Densidade (DFT) com o funcional *Becke-3-Lee Yang Parr* (B3LYP), utilizando o conjunto de bases Set 6-31G *, disponível no programa Spartan'14 (HEHRE, 2003).

Os estudos de *docking* foram realizados com o programa Gold 5.2 (CCDC, centro de dados Cristalográficos de Cambridge). Átomos de hidrogênio foram adicionados a cada estrutura protéica de acordo com os dados de ionização e estados tautoméricos inferidos pelo programa. Para a tirosinase, uma cavidade esférica de 10 Å em torno do centro de di-cobre (cavidade D) foi definida para os cálculos de acoplamento molecular com os ligantes estudados (**12-17**). Essa definição se deu com base nos melhores resultados obtidos pelos estudos de *redocking* com o ligante cocrystalizado na estrutura 2Y9X, tropolona. Para a cavidade de interação molecular na proteína HSA foi estabelecida um raio de 10 Å em torno do resíduo de triptofano (TRP-214, *Sudlow's site I*, subdomínio IIA) (SUN et al., 2016). As funções de pontuações utilizadas foram GoldScore e *Chem PLP*, para o estudo da tirosinase e para os estudos de ancoragem de HSA, respectivamente (CHAVES et al., 2015; KORB et al., 2009; SOARES et al., 2017).

Análise espectroscópica da interação entre a hidrazino-carbotioamida **17** e HSA

Espectros de UV-VIS e fluorescência no estado estacionário foram medidos em um fluorímetro Jasco J-815 usando uma célula de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm) equipada com uma porta-Cuvette controlada por um Peltier térmico PFD-425S15F. O espectro UV-VIS de **17** (1.32×10^{-5} M, em PBS) foi medido na escala de 200–400 nm a 37 °C. Uma vez que, tanto o composto/ligante **17** e a HSA mostraram absorver a luz UV na faixa de 200–300 nm, o efeito provavelmente observado no espectro de absorção UV-VIS, devido a adição do ligante, será em função da contribuição do último com absorção e não devido à formação do complexo ligante-proteína.

O valor da intensidade de fluorescência, utilizando a Equação 3, a fim de compensar o efeito do filtro interno. A absorção do ligante **17** foi estudada no comprimento de onda de excitação $\lambda = 280$ nm e emissão $\lambda = 340$ nm (CHAVES et al., 2016).

$$F_{cor} = F_{obs} 10^{[(A_{ex}+A_{em})/2]} \quad \text{Equação 3}$$

onde F_{cor} e F_{obs} são os valores da intensidade da fluorescência corrigida e observada, respectivamente. A_{ex} é o valor da absorvância experimental no comprimento de onda de

excitação em PBS (280 nm, $\varepsilon = 7845 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A_{em} é o valor de absorvância experimental no comprimento de onda de emissão em PBS (340 nm, $\varepsilon = 1454 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Utilizando uma micro seringa, foram adicionadas sucessivas alíquotas de uma solução estoque do ligante **17** a uma solução de 3,0 ml de HSA ($1,00 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a pH = 7,4), levando a concentrações finais de 0,17; 0,33; 0,50; 0,66; 0,83; 0,99; 1,15; e $1,32 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros de fluorescência de estado estacionário foram obtidos na faixa de 290-450 nm a 23, 30 e 37 °C, com $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$.

5.2.2.2. Estudo da viabilidade celular de células leucêmicas frente a sais mesoiônicos da série I

Cultura das células

As linhagens celulares K562, MT2 e Jurkat foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Lonza ou LGC Biotechnologia) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (Cultilab), inativado penicilina (1000 UI/mL, LGC Biotechnologia) e estreptomicina (1000 UI/mL, LGC Biotechnologia) em pH 7,4. As células foram mantidas a 37 °C, atmosfera úmida e 5 % CO₂. O subcultivo celular foi realizado em intervalos de 3 a 4 dias.

Viabilidade celular

A citotoxicidade das células foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), onde desidrogenases induzem a formação de cristais de formazan (coloração azulada) em células viáveis. A quantificação desses sais dissolvidos, por espectrofotometria, permitiu a avaliação da capacidade redutora da célula estudada (MOSMANN, 1983).

Os ensaios foram realizados em experimentos independentes para cada linhagem e em triplicata. Em placas de 96 poços, 1×10^4 células/poço foram incubadas em meio RPMI + 10% de SFB na presença ou ausência de diferentes concentrações das substâncias sintéticas avaliadas (**26**, **27**, **29** e **30**), sendo elas 25; 12,5; 6,25; 3,125 e $1,56 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O tempo de incubação foi de 72 horas em atmosfera úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. As placas foram então centrifugadas a 200 x g por 7 minutos. O meio com MTT foi retirado e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 200 μL de dimetilsulfóxido. A absorvância foi medida em 490 nm.

Análise estatística

O programa OriginPro 8.0[®] (OriginLab Corporation, USA) foi utilizado na análise estatística e para a construção dos gráficos. Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão para n experimentos independentes.

5.2.2.3. Estudo da viabilidade celular do hepatocarcinoma frente a sais mesoiônicos da série I

Cultura das células

As células HepG2 foram incubadas em câmara úmida a 37 °C e 5 % de CO₂. A cultura das células foi realizada em meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de soro fetal

bovino, HEPES 0,2 % e bicarbonato de sódio 0,22 % em pH 7,4. A densidade de células nas placas foi 10^5 células mL^{-1} . A passagem de célula foi realizada de duas a três vezes por semana com a remoção das células da superfície através da adição de solução de tripsina – EDTA 0,25 % a 37 °C e, com posterior transferência para novas garrafas de cultivo em meio de cultura com volume adequado para o crescimento. Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços e com 24 horas de crescimento das células.

Viabilidade celular

A viabilidade celular também foi avaliada pelo método do MTT, onde diferentes concentrações (1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) das soluções dos compostos mesoiônicos estudados (**23-30**) foram adicionadas nas culturas celulares com 24 horas de crescimento. Após 24 horas de incubação, a 37°C em atmosfera de 5 % de CO_2 , o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com BSS (Na_2HPO_4 0,16 g/L, NaCl 8 g/L, KCl 0,4 g/L, CaCl_2 0,16 g/L, MgSO_4 0,154 g/L, glicose 1,1 g/L, pH 7,4) e incubadas novamente, por 3 horas a 37°C, com solução de MTT (0,5 mg/mL) preparada em BSS. O controle utilizado foi somente o meio de cultura ou DMSO. Após o período de incubação, a solução de MTT foi removida e o sal de formazan formado foi dissolvido com a adição de isopropanol ácido. Em seguida, a absorvância foi medida em 570 e 650 nm.

A diferença entre os valores de absorvância obtidos a 570 e 650 nm (usado como “background”) foi considerada como um índice de viabilidade celular e os resultados foram expressos como % de viabilidade em relação ao controle.

Análise estatística

O programa OriginPro 8.0® (OriginLab Corporation, USA) foi utilizado na análise estatística e para a construção dos gráficos. Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão para n experimentos independentes.

5.2.2.4. Estudo da viabilidade celular de osteossarcoma frente a sais mesoiônicos da série I

Cultura das células

As células MG-63 foram incubadas em placas com meio DMEM-F12 tamponado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco) e na proporção de 1% com uma solução de 100 UI/mL de penicilina G sódica, 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina e 25 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina. As células foram mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO_2 .

Tratamento in vitro com os compostos mesoiônicos

Tendo cerca de 70% de confluência (24 h de incubação) as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos mesoiônicos solubilizados em DMSO (compostos **24** e **25**), misturados ao meio DMEM-F12 isento de soro. Em placas de 96 poços, contendo 100 μL do meio de cultura nas condições citadas anteriormente, foram utilizadas cerca de 5.000 células da linhagem MG-63 por poço. Os ensaios foram feitos em quadruplicata técnica e em três experimentos independentes, onde o controle negativo foi de células cultivadas apenas

com o meio de cultura isento de SFB e o branco de DMSO, valor a ser descontado da média das absorvâncias de cada condição.

As células foram então incubadas por mais 24 horas nas mesmas condições. Após esse período foram adicionados 10 µL/poço de uma solução de 5 mg/mL de MTT com mais 2 horas de incubação a 37 °C durante. Foram adicionados 50 µL/poço de DMSO e a placa foi mantida sob agitação durante 15 minutos. A absorvância foi mensurada em espectrofotômetro com filtro de referência a 620 nm e filtro de leitura a 570 nm. Os resultados foram expressos sobre a forma de percentual em relação ao controle, considerado como 100 % de viabilidade.

Citometria de fluxo

Foram utilizadas cerca de $1,5 \times 10^5$ células da linhagem MG-63 por poço, em triplicata técnica, em placas de 6 poços contendo 3 mL de meio de cultura por poço. Após o tratamento, o sobrenadante foi removido e as células lavadas com solução tampão PBS e incubadas com uma solução de 0,05 % de tripsina-EDTA por 5 minutos em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂. Ao fim da incubação, todo o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 1.500 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente suspendidas em 1 mL de PBS com 3 % de SFB e contadas em câmara de Neubauer com solução de Azul de Trypan 0,4 %. Cerca de $1,0 \times 10^5$ células de cada condição foram separadas, novamente centrifugadas e ressuspendidas em 200 µL de solução tampão (Annexin V Binding Buffer) e armazenado em gelo por 30 minutos. As células foram então incubadas sob proteção da luz e temperatura ambiente com 5 µL de Anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e com 10 µL de Iodeto de Propídeo (PI), por 5 minutos. Após a incubação, foram adicionados 300 µL da solução tampão e as células centrifugadas a 1.500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 200 µL de solução tampão para leitura em citômetro BD Accuri C6®. Foram adquiridos 50.000 eventos por condição.

Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos nos experimentos *in vitro* foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego California EUA). Resultados de pelo menos três experimentos independentes foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por pós-teste de Bonferroni. Os dados estão representados como média \pm desvio padrão sendo considerado o intervalo de confiança de 95% e os valores de $p < 0,05$ significativos. Já a análise dos resultados de citometria de fluxo foi feita no *software* do citômetro BD Accuri C6®.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARRATEGI, A.; TORNIN, J.; MARTINEZ-CRUZADO, L.; HAMILTON, A.; MARTINEZ-CAMPOS, E.; RODRIGO, J.P.; GONZALEZ, M.V.; BALDINI, N.; GARCIA-CASTRO, J.; RODRIGUEZ, R. Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells Int*, v.2016, p.3631764, 2016.

AMORIM, A.P.O.; DE OLIVEIRA, M.C.C.; AMORIM, T.A.; ECHEVARRIA, A. Antioxidant, iron chelating and tyrosinase inhibitory activities of extracts from *Talinum triangulare* Leach stem. *Antioxidants*, v.2, p.90–99, 2013.

ANDO, K.; HEYMANN, M.F.; STRESING, V.; MORI, K.; REDINI, F.; HEYMANN, D. Current therapeutic strategies and novel approaches in osteosarcoma. *Cancers (Basel)*, v.5, n.2, p.591-616, 2013.

ANVISA. Produto biológico novo para tratamento de câncer é aprovado pela Anvisa (2016). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/id/5312685. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

BACCI, G.; LARI, S. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in osteosarcoma. *Chir. Organi. Mov.*, v.86, n.4, p.253-68, 2001.

BACCI, G.; LONGHI, A.; VERSARI, M.; MERCURI, M.; BRICCOLI, A.; PICCI, P. Prognostic factors for osteosarcoma of the extremity treated with neoadjuvant chemotherapy: 15-year experience in 789 patients treated at a single institution. *Cancer*, v.106, n.5, p.1154-61, 2006.

BANGHAM, C.R. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J. Gen. Virol.* v.84, 3177-89, 2003.

BAZARBACHI, A.; PANELATTI, G.; RAMOS, J. C.; TORTEVOYE, P.; OTROCK, Z.; TAYLOR, G. A worldwide meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alpha for the treatment of adult T-cell *leukemia/lymphoma*. *Blood.*, v.110, p.610-611, 2007.

BERGOVEC, M.; KUBAT, O.; SMERDELJ, M.; SEIWERTH, S.; BONEVSKI, A.; ORLIC, D. Epidemiology of musculoskeletal tumors in a national referral orthopedic department. A study of 3482 cases. *Cancer Epidemiol.* v.39, n.3, p.298-302, 2015.

BIELACK, S. S.; HECKER-NOLTING, S.; BLATTMANN, C.; KAGER, L. Advances in the management of osteosarcoma. *F1000Res*, v.5, p.2767, 2016.

BIELACK, S.S.; KEMPF-BIELACK, B.; DELLING, G.; EXNER, G.U.; FLEGE, S.; HELMKE, K.; KOTZ, R.; SALZER-KUNTSCHIK, M.; WERNER, M.; WINKELMANN, W.; ZOUBEK, A.; JURGENS, H.; WINKLER, K. Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol.*, v.20, n.3, p.76-90, 2002.

BITTENCOURT, A. L.; BARBOSA, H. S.; PIMENTA, A.; FARRE, L. A case of adult-T-cell leukemia/ lymphoma (ATL) with a survival of more than 13 years. *Acta Oncol.*, v.47, p.981-983, 2008.

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. *Am. J. Clin. Pathol.* v.5, 875–882, 2007.

BITTENCOURT, A. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.40, p.245-251, 1998.

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

BOTTER, S.M.; NERI, D.; FUCHS, B. Recent advances in osteosarcoma. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v.16, p.15-23, 2014.

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

CARRILHO, F. J.; KIKUCHI, L.; BRANCO, F.; GONCALVES, C. S.; MATTOS, A. A. Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil. *Clinics.*, v.65, p.1285–1290 , 2010.

CEYLAN, N.; BAYRAKTAROGLU, S.; SAVAS, R.; ALPER, H. CT findings of high-attenuation pulmonary abnormalities. *Insights Imaging*, v.1, n.4, p.287-292, 2010.

CHAVES, O. A.; MATHEW, B.; CESARIN-SOBRINHO, D.; LAKSHMINARAYANAN, B.; JOY, M.; MATHEW, G. E.; SURESH, J.; NETTO-FERREIRA, J. C. Spectroscopic zeta potential and molecular docking analysis on the interaction between human serum albumin and halogenated thienyl chalcones. *J. Mol. Liq.*, v.242, p.1018-1026, 2017a.

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, p.19526 –19539, 2015.

CHAVES, O.A.; SANTOS, M.R.L.; OLIVEIRA, M.C.C. DE; SANT'ANNA, C.M.R.; FERREIRA, R.C.; ECHEVARRIA, A.; NETTO-FERREIRA, J.C.. Synthesis, tyrosinase inhibition and transportation behavior of novel β -enamino thiosemicarbazide derivatives by human serum albumin, *J. Mol. Liq.* v.254, p280–290, 2018.

CHEDID, M. F.; KRUEL, C. R. P.; PINTO, M. A.; GREZZANA-FILHO, T. J. M.; LEIPNITZ, I.; KRUEL, C. D. P.; SCAFFARO, L. A.; CHEDID, A. D. Carcinoma hepatocelular: diagnóstico e manejo cirúrgico. *ABCD, arq. bras. cir. dig.*, v.30, n.4, 2017.

- DAMRON, T.A.; WARD, W.G.; STEWART, A. Osteosarcoma, chondrosarcoma, and Ewing's sarcoma: National Cancer Data Base Report. *Clin. Orthop. Relat. Res.* v.459, 40-7, 2007.
- DENDULURI, S.K.; WANG, Z.; YAN, Z.; WANG, J.; WEI, Q.; MOHAMMED, M.K.; HAYDON, R.C.; LUU, H.H.; HE, T.C. Molecular pathogenesis and therapeutic strategies of human osteosarcoma. *J. Biomed. Res.* v.30, n.1, p. 5-18, 2016.
- DOS REIS, C.M.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; MIRANDAA, A.F.; ECHEVARRIA A. Improved synthesis of 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamines using microwave and ultrasound irradiation and investigation of their cytotoxic activity. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.22, p.1505-1510, 2011(a).
- DOS REIS, C.M.; SOUSA-PEREIRA, D.; PAIVA, R.O.; KNEIPP, L.F.; ECHEVARRIA, A. Microwave-Assisted Synthesis of New *N1,N4*-Substituted Thiosemicarbazones. *Molecules*, v.16, p.10668-10684, 2011(b).
- 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 Cryst.*, v.48, p.1471-1474, 1992.
- ENDO, M.; YOSHIDA, T.; YAMAMOTO, H.; ISHII, T.; SETSU, N.; KOHASHI, K.; MATSUNOBU, T.; IWAMOTO, Y.; ODA, Y. Low-grade central osteosarcoma arising from bone infarct. *Hum. Pathol.* v. 44, n. 6, p. 1184-9, 2013.
- Farhanullah; Sil, D.; Tripathi, B.K.; Srivastava, A.K.; Ram, V.J. Synthesis and glucose-6-phosphatase inhibitory activity of (thiouriedo)alkanoic acid esters. *Bio. Med. Chem. Lett.*, v.14, n.10, p.2571-2574, 2004.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARA, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 09 de fevereiro de 2019.
- FERRARI, S.; SERRA, M. An update on chemotherapy for osteosarcoma. *Expert. Opin. Pharmacother.*, v.16, n.18, p.2727-36, 2015.
- 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. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 49, n.3, p.179-183, 2003.
- GENÇER, N.; DEMIR, D.; SONMEZ, F.; KUCUKISLAMOGLU, M. New saccharin derivatives as tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* v.20, p.2811-2821, 2012.
- GERMANO, D.; DANIELE, B. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *World J. Gastroenterol.*, v.20, n.12, p.3087-3099, 2014.
- GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, v.59, n.5, p.514-524, 2013.

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. *Clin. Microbiol. Rev.* v.23, p.577–589, 2010.

GOZZI, G.J.; PIRES ADO, R.; VALDAMERI, G.; ROCHA, M.E.; MARTINEZ, G. R.; NOLETO, G.R.; ACCO, A.; ALVES DE SOUZA, C.E.; ECHEVARRIA, A.; MORETTO DOS REIS, C.; DI PIETRO, A.; SUTER CORREIA CADENA, S.M. Selective Cytotoxicity of 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Derivatives on Hepatocarcinoma Cells (HepG2). *PLoS One*, v.10, n.6, p.e0130046, 2015.

GRIMER, R.J. Surgical options for children with osteosarcoma. *Lancet. Oncol.*, v.6, n.2, p.85-92, 2005.

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*, v.8, p.88-91, 1997.

HE, Z.; HU, B.; TANG, L.; ZHENG, S.; SUN, Y.; SHENG, Z.; YAO, Y.; LIN, F. The overexpression of MRP4 is related to multidrug resistance in osteosarcoma cells. *J. Cancer Res. Ther.*, v.11, n.1, p.18-23, 2015.

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

HUANG, H.; CHEN, Q., KU, X.; MENG, L.; LIN, L.; WANG, X.; ZHU, C.; WANG, Y.; CHEN, Z.; LI, M.; JIANG, H.; CHEN, K.; DING, J.; LIU, H. A Series of r-Heterocyclic Carboxaldehyde Thiosemicarbazones Inhibit Topoisomerase II α Catalytic Activity. *J. Med. Chem.*, v.53, p.3048-3064, 2010.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA). Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

INCA. Câncer na criança e no adolescente no brasil - dados dos registros de base populacional e de mortalidade. Brasil: 2008. ISBN 978-85-7318-139-5.

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, p.39452–39459, 2016.

KAI-CHUNG, K.; ECHEVARRIA, A.; GALLEMBECK, S.; MACIEL, M.A.; MILLER, J.; RUMJANEK, V.; SIMAS, A. Mesoionic compounds 4. Structure of 1,4,5-triphenyl-1,2,4-triazolium-3-thiolate. *Acta Cryst.*, v.49, p.1092-1094, 1993.

KATRITZKY, A.R.; KHASHAB, N.M.; GROMOVA, A.V. Preparations of diversely substituted thiosemicarbazides and *N*-hydroxythioureas. *ARKIVOC*, v.2006, n.3, p.226-236, 2006

KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T.E.J. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v.49, p.84–96, 2009.

KULANDASAMY, R.; ADHIKARI, A. V.; TARANALLI, A.; VENKATASWAMY, T. New hydrazides and thiosemicarbazides derived from ethylenedioxythiophene as potential anticonvulsants. *Phosp. Sulfur. and Silic.*, v.185, p.1358-1368, 2010.

KUNDU, Z.S. Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma. *Indian J. Orthop.*, v.48, n.3, p.238-46, 2014.

L'ABBE, G.; LEURS, S.; SANNEN, I.; DEHAEN, W. Synthesis of thiazolo[4,3-*a*]isoindoles by intramolecular cycloaddition-elimination reactions of 4-methyl-5-(substituted)imino- Δ^2 -1,2,3,4-thiatriazolines. *Tetrahedron.*, v.49, n. 20, 1993, p.4439-4446, 1993.

LAKOWICZ, J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd 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, *N. Engl. J. Med.* v.373, p.23–34, 2015.

LIU, J.; TIAN, J.N.; ZHANG, J.; HU, X. Interaction of magnolol with bovine serum albumin: a fluorescence –quenching study, *Anal. Bioanal. Chem.*, v.376, p.864 –867, 2003.

LLOVET, M.J.; RICCI, S.; MAZZAFERRO, V.; HILGARD, P.; GANE, E.; BLANC, J.L.; OLIVEIRA, A.C.; SANTORO, A.; RAOUL, J.L.; FORNER, A.; SCHWARTZ, M.; PORTA, C.; ZEUZEM, S.; BOLONDI, L.; GRETEN, T.F.; GALLE, P.R.; SEITZ, J.F.; BORBATH, I.; HAUSSINGER, D.; GIANNARIS, T.; SHAN, M.; MOSCOVICI, M.; VOLIOTIS, D.; BRUIX, J. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, v.359, p.378-389, 2008.

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. *Int J Biol Macromol.*, v.112, p.1062–1072, 2018.

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

MAI, P.L.; KHINCHA, P. P.; LOUD, J. T.; DECASTRO, R. M.; BREMER, R. C.; PETERS, J. A.; LIU, C. Y.; BLUEMKE, D. A.; MALAYERI, A. A.; SAVAGE, S. A. Prevalence of Cancer at Baseline Screening in the National Cancer Institute Li-Fraumeni Syndrome Cohort. *JAMA Oncol.*, v.3, n.12, 1640-1645, 2017.

MALTA, D.C.; MOURA, L. DE; PRADO, R.R. DO; ESCALANTE, J.C.; SCHMIDT, M.I.; BARTHOLOW, B. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, v.23, n.4,599-608, 2014.

MENDEZ-SANCHEZ, S.C. **Efeito do composto mesoiônico MI-D e da imida cíclica S2.2 sobre mecanismos relacionados à indução de morte celular por via mitocondrial.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

MOURA, T. C.; PEREIRA-DA-SILVA, A.P; SOUSA-PEREIRA D.; RODRIGUES, V. C.; FELIPPE, W. Q.; ECHEVARRIA, A. . Mesoionic 5-cinnamoyl-1,3,4-thiadiazolium-2-(4-X-phenyl)amine derivatives inhibits human hepatocellular carcinoma HepG2 cells proliferation and causes mitochondrial dysfunction.. In: X Simpósio de Oncobiologia, 2016, Rio de Janeiro. X Simpósio de Oncobiologia, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia do manejo clínico de infecção pelo HTLV (2014). Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2014/guia-de-manejo-clinico-da-infeccao-pelo-htlv>. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sorafenibe para carcinoma hepatocelular (CHC) irrissecável ou avançado. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2018/Sociedade/ReSoc86_TOSILATO_hep_atocarcinoma.pdf. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

MIRABELLO, L. TROISI, R.J. SAVAGE, S.A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer*, v.125(1), 229-34, 2009a.

MIRABELLO, L.; TROISI, R. J.; SAVAGE, S. A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*, v.115(7), 1531-43, 2009b.

MITALL, S.; EL-SERAG, H.B. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma Consider the Population. *J. Clin. Gastroenterol.*, v.47, n.1, p.3-6, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.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.

MS/INCA (Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em 09 de fevereiro de 2019.

MUTSAERS, A.J., WALKLEY, C.R. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone*, v.62, 56-63, 2014.

NASO, L.; MARTÍNEZ, V.R.; LEZAMA, L.; SALADO, C.; VALCARCEL, M.; FERRER, E.G.; WILLIAMS, P.A.M. Antioxidant, anticancer activities and mechanistic studies of the flavone glycoside diosmin and its oxovanadium(IV) complex. Interactions with bovine serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.*, v.24, p.4108–4119, 2016.

NEWTON, C. G., RAMSDEN, C.A. Mesoionic heterocycles. *Tetrahedron*, v.38, n.20, p.2965-3011, 1982.

OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Mesoionic compounds. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v.19, p. 120-121, 1976.

OLLIS, W.D.; RAMSDEN, C.A. Synthesis of mesoionic anhydro-2-arylamino-1,3,4-oxadiazolium hidroxides. *J. Chem. Soc. D*, v.0, p.1222-1223, 1971.

PETRILLI, A. S.; DE CAMARGO, B.; FILHO, V. O.; BRUNIERA, P.; BRUNETTO, A. L.; JESUS-GARCIA, R.; CAMARGO, O. P.; PENA, W.; PERICLES, P.; DAVI, A.; PROSPERO, J. D.; ALVES, M. T.; OLIVEIRA, C. R.; MACEDO, C. R.; MENDES, W. L.; ALMEIDA, M. T.; BORSATO, M. L.; DOS SANTOS, T. M.; ORTEGA, J.; CONSENTINO, E. Results of the Brazilian Osteosarcoma Treatment Group Studies III and IV: prognostic factors and impact on survival. *J. Clin. Onco.* v.24(7), 1161-8, 2006.

PIRES, A.R.A.; NOLETO, G.R.; ECHEVARRIA, A; REIS, C.M.; ROCHA, M.E.M.; CARNIERI, E.G.S.; MARTINEZ, G.R.; NOLETO, G.R.; CADENA, S.M.S.C. Interaction of 1,3,4-thiadiazolium mesoionic derivatives with mitochondrial membrane and scavenging activity: involvement of their effects on mitochondrial energy-linked functions. *Chem. Biol. Interact.*, v.189, n.1-2, p.17-25, 2011.

POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v7, n.12, p.7415-7419, 1980.

REIG, M.; GAZZOLA, A.; DONATO, R.; BRUIX, J. Systemic treatment. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v.28, p.921-935, 2014.

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. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.22, n.8, p.1505-1510, 2011.

RIBAS, J. G. R.; MELO, G. C. N. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humanode células T do tipo 1 (HTLV-1). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.35, n.4, p.377-384, 2002.

RONCUZZI, L.; PANCOTTI, F.; BALDINI, N. Involvement of HIF-1alpha activation in the doxorubicin resistance of human osteosarcoma cells. *Oncol. Rep.*, v.32, n.1, p.389-94, 2014.

SARDARI, S.; FEIZI, S.; REZAYAN, A.H.; AZERANG, P.; SHAHCHERAGH, S.M.; GHAVAMI, G.; HABIBI, A. Synthesis and Biological Evaluation of Thiosemicarbazide Derivatives Endowed with High Activity toward Mycobacterium Bovis. *Iran J. Pharm. Res.*, v.16, n.3, p.1128-1140, 2017.

SCULLY, S.P.; GHERT, M.A.; ZURAKOWSKI, D.; THOMPSON, R.C.; GEBHARDT, M.C. Pathologic fracture in osteosarcoma : prognostic importance and treatment implications. *J. Bone Joint. Surg. Am.*, v. 84-a, n. 1, p. 49-57, 2002.

SEGEL, I. H. Cálculos de Bioquímica, Acribia, 2a Ed., 1982.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; FRANCO, C.R.C.; VEIGA, S.S.; OLIVEIRA, M.B.M. Cytotoxic Effect of a new 1,3,4-Thiadiazolium Mesoionic Compound (MI-D) on Cell Lines of Human Melanoma. *Brit. J. Cancer*, v.91, p.297-304, 2004a.

SENFF-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, p.269–275, 2004b.

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, p.465–471, 2003.

SHIVES, T.C.; DAHLIN, D. C.; SIM, F. H.; PRITCHARD, D.J.; EARLE, J.D. Osteosarcoma of the spine. *J. Bone. Joint. Surg. Am.*, v.68, n.5, p.660-8, 1986.

SIDDIQUI N.; SINGH, O. Antibacterial activity of some 4-N-substituted thiosemicarbazides and thiosemicarbazones. *Indian J. Pharm. Sci.* v.65, n.4, p.423-425, 2003.

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

SILVÉRIO, 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, n.15, p.59-65, 2013.

SIWEK, A.; STEFANSKA, J.; DZITKO, K.; RUSZEZAK, A. Antifungal effect of 4-arylthiosemicarbazides against Candida species. Search for molecular basis of antifungal activity of thiosemicarbazide derivatives. *J. Mol. Model.* v.18, p. 4159-4170, 2012.

SOARES, M.A.; ALMEIDA, M.A.; MARINS-GOULART, C.; CHAVES, O.A.; ECHEVARRIA, A.; DE OLIVEIRA, M.C.C. Thiosemicarbazones as inhibitors of tyrosinase enzyme. *Bioorg. Med. Chem.*, v.27, p.3546–3550, 2017.

SONG, L.; DUAN, P.; GAN, Y.; LI, P.; ZHAO, C.; XU, J.; ZHANG, Z.; ZHOU, Q. MicroRNA-340-5p modulates cisplatin resistance by targeting LPAATbeta in osteosarcoma. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.50, n.5, p.e6359, 2017.

SOUSA-PEREIRA, D.; ALVES, G. B. D.; OLIVEIRA, M. C. C.; ECHEVARRIA, A. Thiosemicarbazides as inhibitors of tyrosinase enzyme and their photoprotective effect targeting anti-skin cancer activity. In: IUPAC-2017, 2017, SÃO PAULO.

SOUSA-PEREIRA, D.; CHAVES, O. A.; DOS REIS, C. M.; DE OLIVEIRA, M. C. C.; SANT'ANNA, C. M. R.; NETTO-FERREIRA, J. C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and biological evaluation of N-aryl-2-phenyl-hydrazinecarbothioamides: Experimental and theoretical analysis on tyrosinase inhibition and interaction with HSA. *Bioorg. Chem.*, v.81, p.79-87, 2018.

SOUSA-PEREIRA, D.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; CISTIA, C. N.; ECHEVARRIA, A. Synthesis of mesoionic compounds and investigation of their cytotoxic activity against cell lines infected by HTLV-1. In: 8th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2016, BÚZIOS. 8thBrazilianSymposiumonMedicinalChemistry, 2016.

SOUSA-PEREIRA, D.; LOPES, N. D.; OLIVEIRA, M. C. C.; ECHEVARRIA, A. Inibição da enzima tirosinase por tiosemicarbazidas difenil substituídas visando a atividade antimelanoma. In: VIII Simpósio Ibero-americano de Plantas Medicinais e III Simpósio Ibero-americano de Investigação em Câncer, 2016, ITAJAÍ.

STACY, G.S., LO, R., MONTAG, A. Infarct-Associated Bone Sarcomas: Multimodality Imaging Findings. *AJR Am. J. Roentgenol.*, v.205, n.4, p.W432-41, 2015.

SUN, H.; LIU, Y.; LI, M.; HAN, S.; YANG, X.; LIU, R. Toxic effects of chrysoidine on human serum albumin: isothermal titration calorimetry and spectroscopic investigations. *Luminescence*, v.31, p.335–340, 2016

TAKATSUKI, K.; MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, K. Adult T-cell leukemia. *Japan. J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, v.13, Suppl1:S15-19, 1996.

TARAN, S.J.; TARAN, R.; MALIPATIL, N.B. Pediatric Osteosarcoma: An Updated Review. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.*, v.38, n.1, p.33-43, 2017.

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. *J. Clin. Oncol.* v.27, n.3, 453–459, 2009.

VISVADER, J.E.; LINDEMAN, G.J. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell. Stem. Cell.*, v.10(6), 717-28, 2012.

WANG, Y.; HAO, M.-M.; SUN, Y.; WANG, L.-F.; WANG, H.; ZHANG, Y.-J.; LI, H.-Y.; ZHUANG, P.-W.; YANG, Z. Synergistic promotion on tyrosinase inhibition by antioxidants. *Molecules*. v.23, p.106–118, 2018.

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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.291, p.813–819, 2002.

WHO. **Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone**. 4th. Lyon, France: 2013.

WU, W.; LI, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, C. Inhibition of beclin1 affects the chemotherapeutic sensitivity of osteosarcoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, v.7, n.10, p.7114-22, 2014.

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. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* v.25, n.7, p.1476-8, 2015.

XIAO, W., MOHSENY, A.B., HOGENDOORN, P. C., CLETON-JANSEN, A.M. Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis. *Clin. Sarcoma Res.*, v.3(1),10, 2013.

YAMAMOTO, I; ABE, I.; NOZAWA, M.; KOTANI, M.; MOTOYOSHIYA, J.; GOTOH, H.; MATSUZAKI, K. Synthesis and some reactions of 2-imino-2,5-dihydro-1,3,4-thiadiazoles. Formation of β -lactams. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, v.0, p.2297-2301, 1983.

YARBRO, C. H.; WUJCIK, D.; GOBEL, B. H. **Cancer Nursing: Principles and practice**. 7ed. Estados Unidos: Jones and Bartlett, p.1400, 2009.

YOUSEF, T.A.; BADRIA F.A.; GHAZY S.E.; EL-GAMMAL O.A.; ABU EL-REASH, G.M. *In-vitro* and *in-vivo* antitumor activity of some synthesized 4-(2-pyridyl)-3-Thiosemicarbazides derivatives. *Inter. J. Med. Med. Sci.*, v.3, n.2, p.37–46, 2011.

ZHANG, L.; CHANG, J.-J.; ZHANG, S.-L.; DAMU, G.L.V.; GENG, R.-X.; ZHOU, C.-H. Synthesis and bioactive evaluation of novel hybrids of metronidazole and berberine as new type of antimicrobial agents and their transportation behavior by human serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.*, v.21, p.4158–4169, 2013.

ZHANG, Y.; ROSENBERG, A. E. Bone-Forming Tumors. *Surg. Pathol. Clin.*, v.10, n.3, p.513-535, 2017.

7 ANEXOS

A.	ESPECTROS DAS TIOURÉIAS.....	82
I.	Espectro de IV da fenil-tiouréia (1) obtido em pastilha de KBr.....	82
ii.	Espectro de RMN ¹ H da fenil-tiouréia (1).....	83
iii.	Espectro de RMN ¹³ C da fenil-tiouréia (1).....	84
iv.	Espectro de IV da <i>p</i> -metil-feniltiouréia (2) obtido em pastilha de KBr obtido em pastilha de KBr.....	85
v.	Espectro de RMN ¹ H da <i>p</i> -metil-feniltiouréia (2) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	86
vi.	Espectro de RMN ¹³ C da <i>p</i> -metil-feniltiouréia (2) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	87
vii.	Espectro de IV da <i>p</i> -metoxi-feniltiouréia (3) obtido em pastilha de KBr obtido em pastilha de KBr.....	88
viii.	Espectro de RMN ¹ H da <i>p</i> -metoxi-feniltiouréia (3) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	89
X.	Espectro de IV da <i>p</i> -nitro-fenil-tiouréia (4) obtido em pastilha de KBr.....	91
xi.	Espectro de RMN ¹ H da <i>p</i> -nitro-feniltiouréia (4) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	92
xii.	Espectro de RMN ¹³ C da <i>p</i> -nitro-feniltiouréia (4) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	93
xiii.	Espectro de IV da <i>p</i> -cloro-feniltiouréia (5) obtido em pastilha de KBr.....	94
xiv.	Espectro de RMN ¹ H da <i>p</i> -cloro-feniltiouréia (5) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	95
xv.	Espectro de RMN ¹³ C da <i>p</i> -cloro-feniltiouréia (5) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	96
xvi.	Espectro de IV da <i>p</i> -bromo-feniltiouréia (6) obtido em pastilha de KBr.....	97
xvii.	Espectro de RMN ¹ H da <i>p</i> -bromo-feniltiouréia (6) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	98
xviii.	Espectro de RMN ¹³ C da <i>p</i> -bromo-feniltiouréia (6) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	99
B.	ESPECTROS DAS HIDRAZINO-CARBOTIOAMIDAS.....	100
i.	Espectro de IV da N-2-difenil-hidrazino-carbotioamida (12) obtido em pastilha de KBr	100
ii.	Espectro de RMN ¹ H da N-2-difenil-hidrazino-carbotioamida (12) obtido em acetona- <i>d</i> ₆	101
iii.	Espectro DEPTQ da N-2-difenil-hidrazino-carbotioamida (12) obtido em acetona- <i>d</i> ₆	102
iv.	Espectro de IV da N-(4-metil-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (13) obtido em pastilha de KBr.....	103
v.	Espectro de RMN ¹ H da N-(4-metil-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (13) obtido em acetona- <i>d</i> ₆	104

vi.	Espectro DEPTQ da <i>N</i> -(4-metil-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (13) obtido em acetona- <i>d</i> ₆	105
vii.	Espectro de IV da <i>N</i> -(4-metóxi-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (14) obtido em pastilha de KBr	106
viii.	Espectro de RMN ¹ H da <i>N</i> -(4-metóxi-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (14)107	
ix.	Espectro DEPTQ da <i>N</i> -(4-metóxi-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (14)...	108
X.	Espectro de IV da <i>N</i> -(4-nitro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (15) obtido em pastilha de KBr	109
xi.	Espectro de RMN ¹ H da <i>N</i> -(4-nitro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (15) obtido em acetona- <i>d</i> ₆	110
xii.	Espectro DEPTQ da <i>N</i> -(4-nitro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (15) obtido em acetona- <i>d</i> ₆	111
xiii.	Espectro de IV da <i>N</i> -(4-cloro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (16) obtido em pastilha de KBr	112
xiv.	Espectro de RMN ¹ H da <i>N</i> -(4-cloro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (16) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	113
xv.	Espectro DEPTQ da <i>N</i> -(4-cloro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (16) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	114
xvi.	Espectro de IV da <i>N</i> -(4-bromo-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (17) obtido em pastilha de KBr	115
xvii.	Espectro de RMN ¹ H da <i>N</i> -(4-bromo-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (17) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	116
xviii.	Espectro de RMN ¹³ C da <i>N</i> -(4-bromo-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (17) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	117
C.	ESPECTROS DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS DA SÉRIE I	118
i.	Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em pastilha de KBr	118
ii.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	119
iii.	Expansão do espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	120
iv.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	121

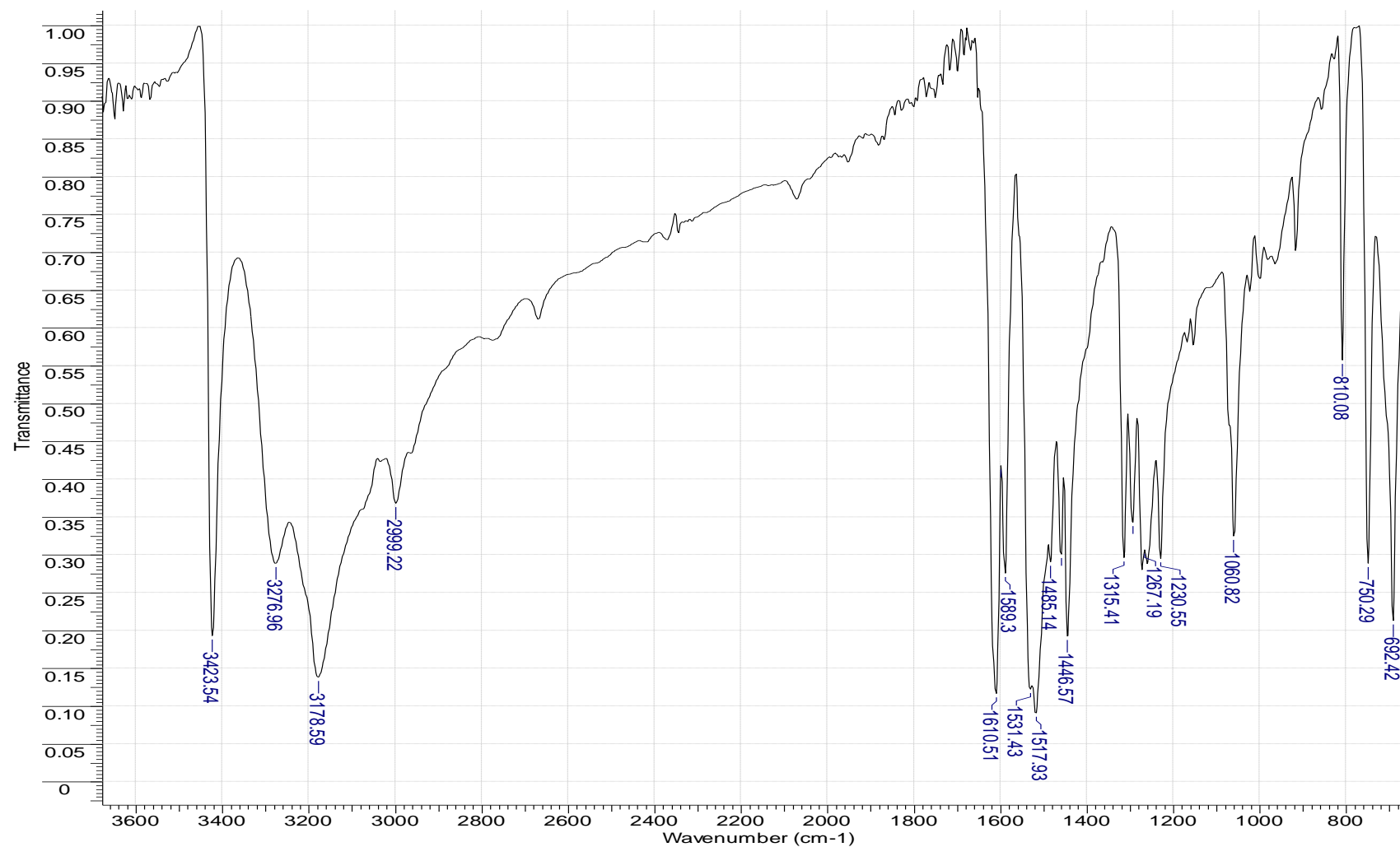
v.	Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em pastilha de KBr	122
vi.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	123
vii.	Expansão do espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	124
viii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	125
ix.	Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (25) obtido em pastilha de KBr	126
x.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (25) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	127
xi.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (25) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	128
xii.	Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em pastilha de KBr	129
xiii.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	130
xiv.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	131
xv.	Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	132
xvi.	Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em pastilha de KBr.....	133
xvii.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	134
xviii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	135
xix.	Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	136
xxi.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (28) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	138

xxii.	Expansão do espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (28) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	139
xxiii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (28) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	140
xxiv.	Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (28) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	141
xxv.	Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em pastilha de KBr.....	142
xxvi.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	143
xxvii.	Expansão do espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	144
xxviii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	145
xxix.	Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	146
xxx.	Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em pastilha de KBr.....	147
xxxi.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	148
xxxii.	Expansão do espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	149
xxxiii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	150
xxxiv.	Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	151
D.	ESPECTRO DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS DA SÉRIE II.....	152
i.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (31) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	152
ii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (31) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	153
iii.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (32) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	154

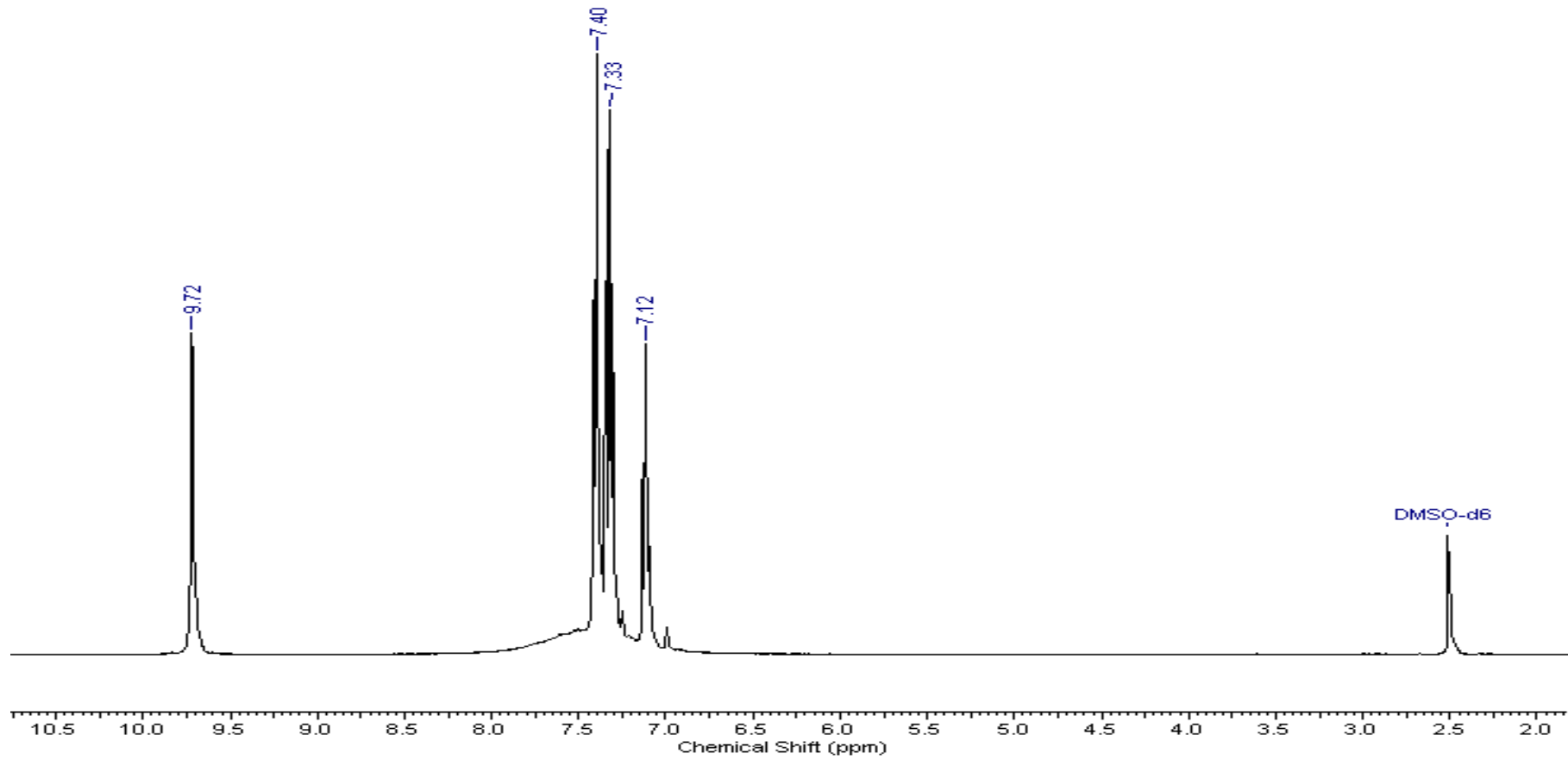
v.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (33) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	156
vi.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (33) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	157
vii.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (34) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	158
viii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (34) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	159
E.	ESPECTRO DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS DA SÉRIE III.....	160
i.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (35) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	160
ii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (35) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	161
iii.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (36) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	162
iv.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (36) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	163
v.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-diflúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (37) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	164
vi.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-diflúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (37) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	165
vii.	Espectro de RMN ¹ H do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-diflúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (38) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	166
viii.	Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-diflúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (38) obtido em DMSO- <i>d</i> ₆	167

A. ESPECTROS DAS TIURÉIAS

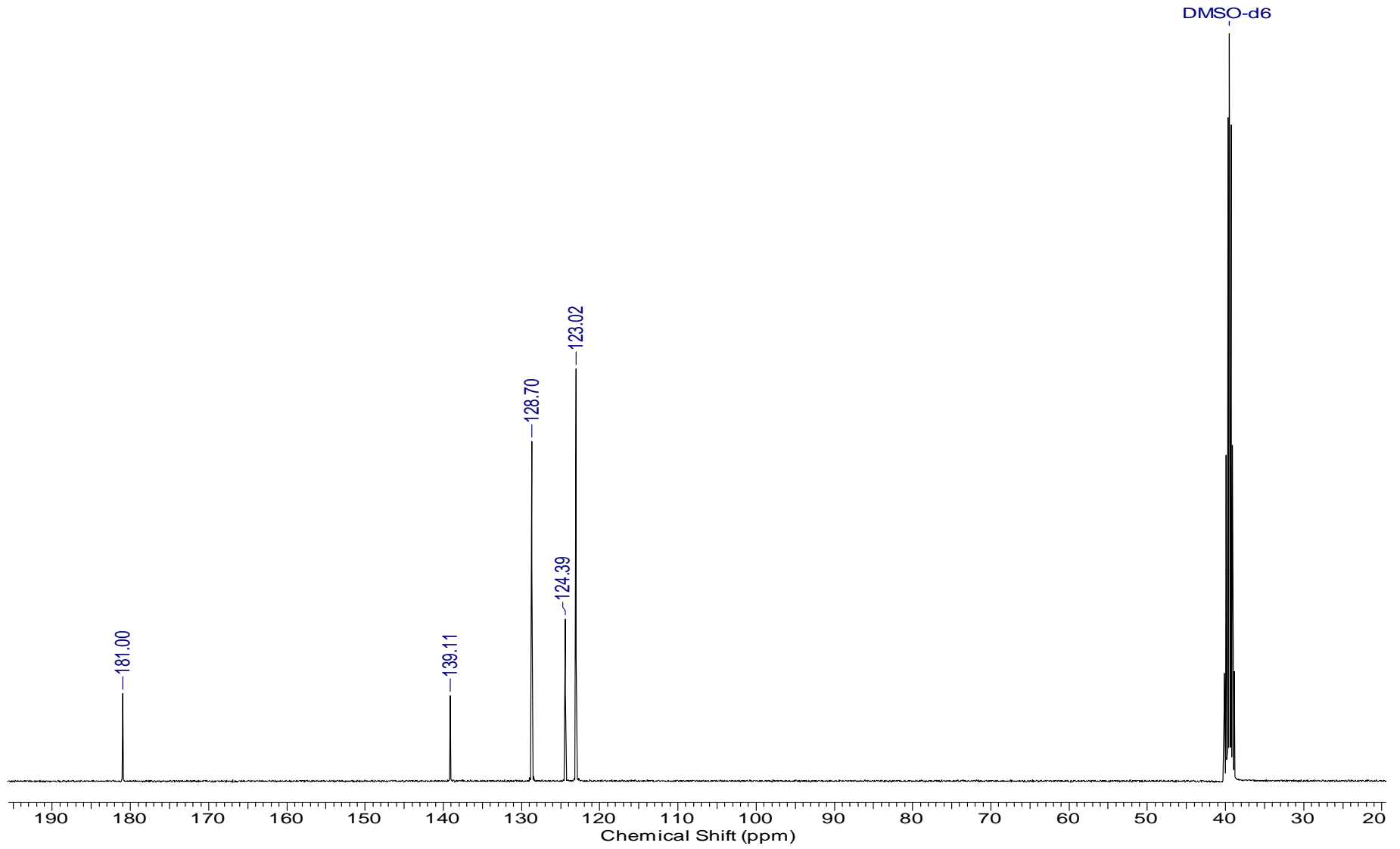
I. Espectro de IV da fenil-tiouréia (1) obtido em pastilha de KBr



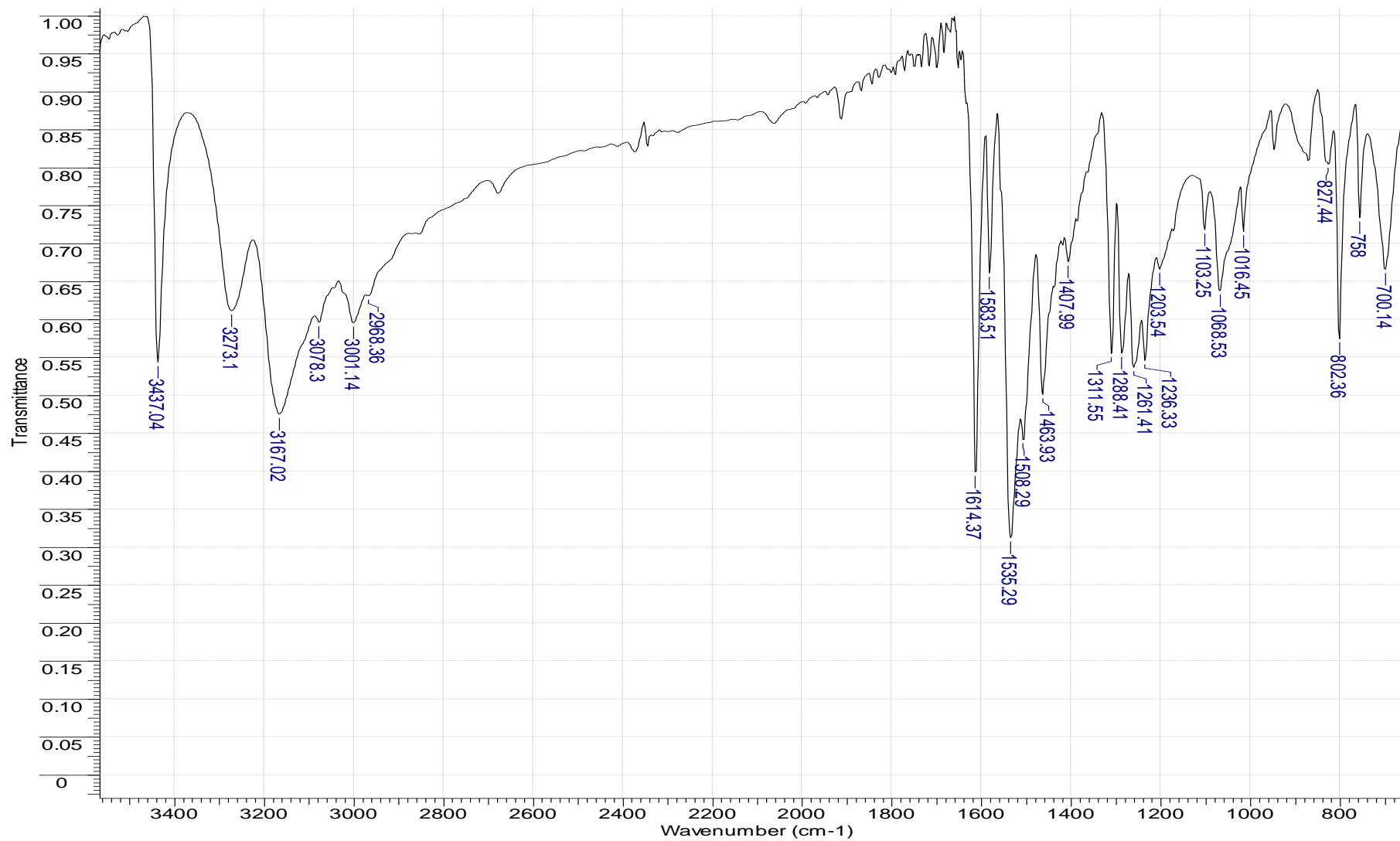
ii. Espectro de RMN ^1H da fenil-tiouréia (1)



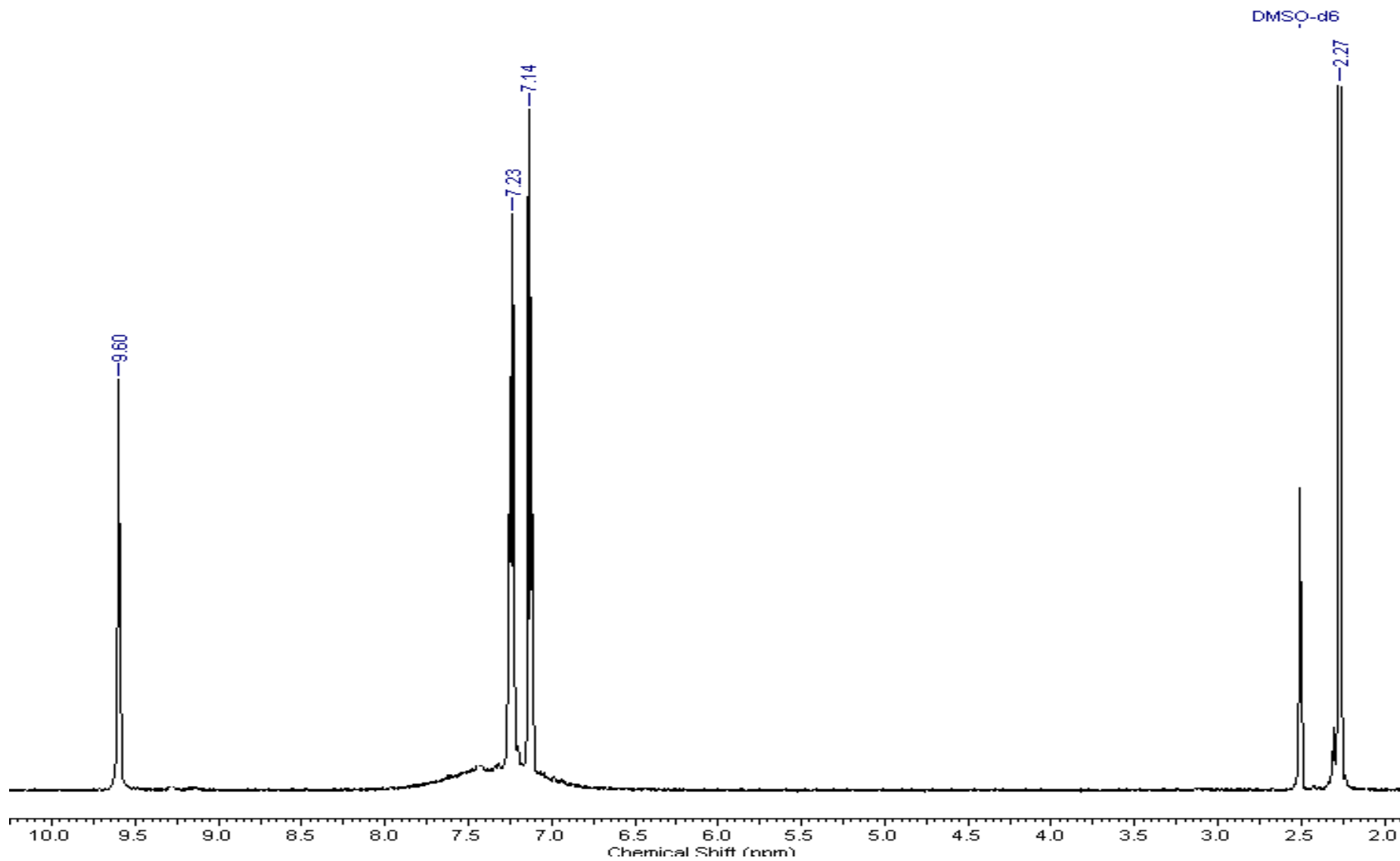
iii. Espectro de RMN ^{13}C da fenil-tiouréa (1)



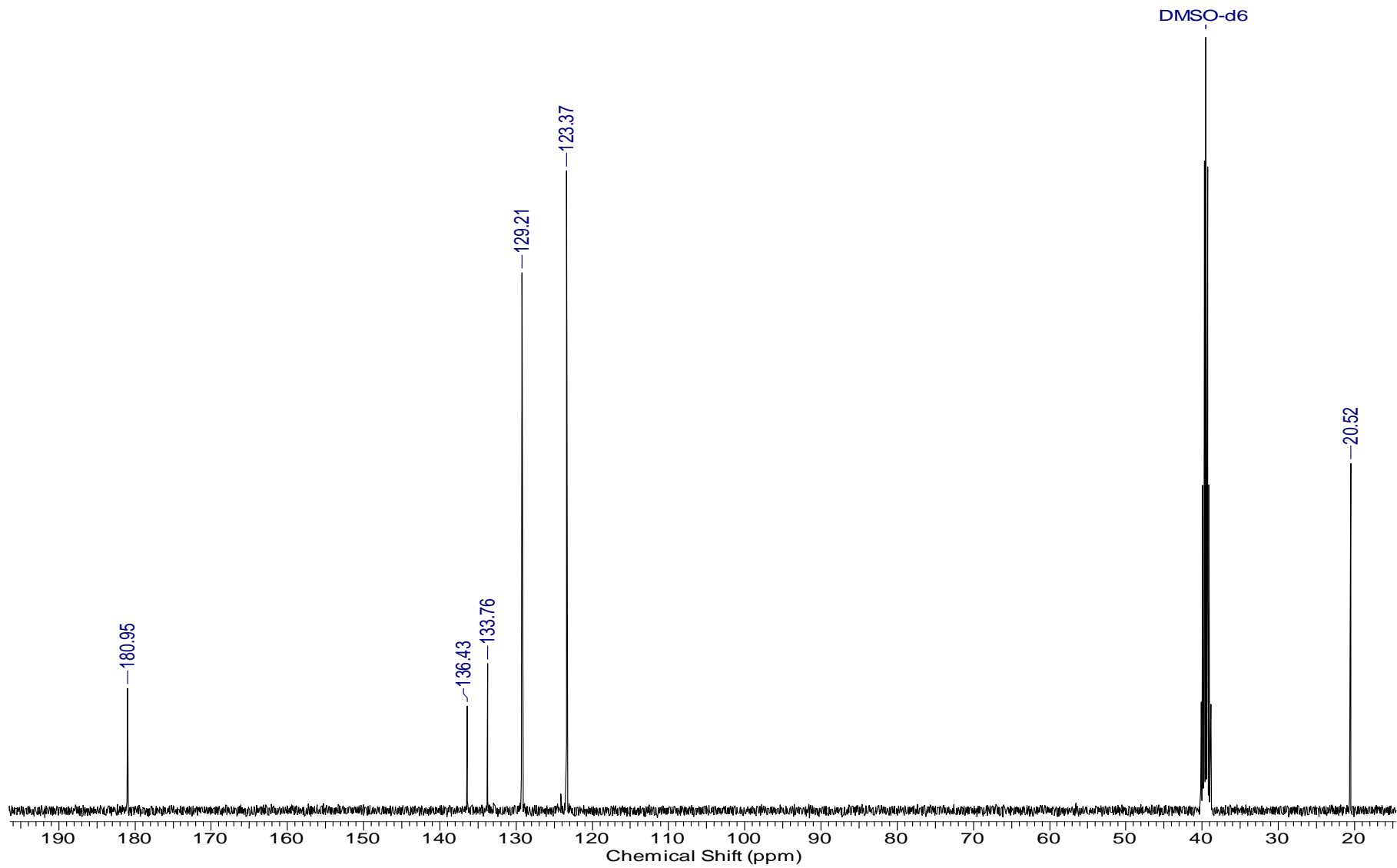
iv. Espectro de IV da p-metil-feniltiouréia (2) obtido em pastilha de KBr obtido em pastilha de KBr



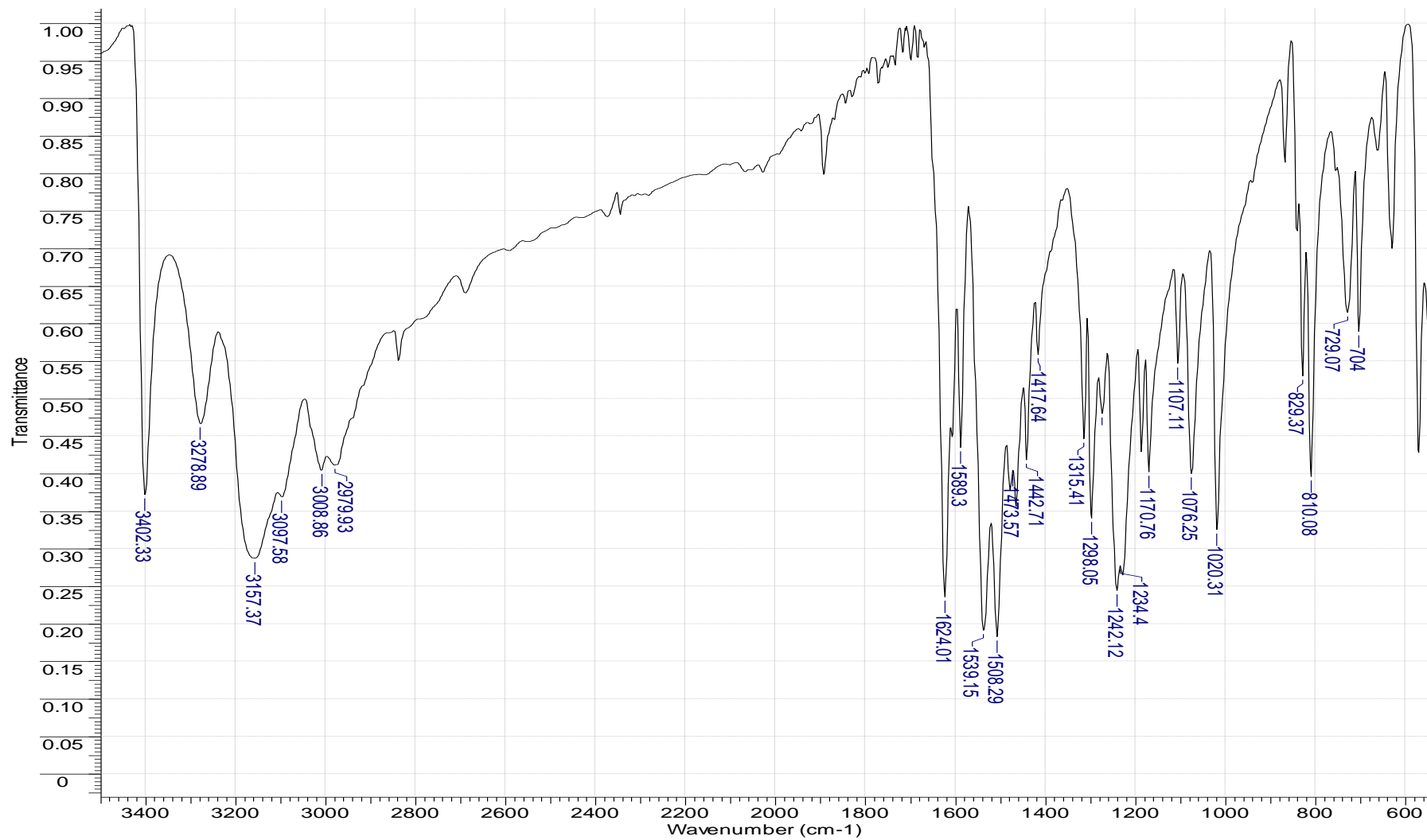
v. Espectro de RMN ^1H da *p*-metil-feniltiouréia (2) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



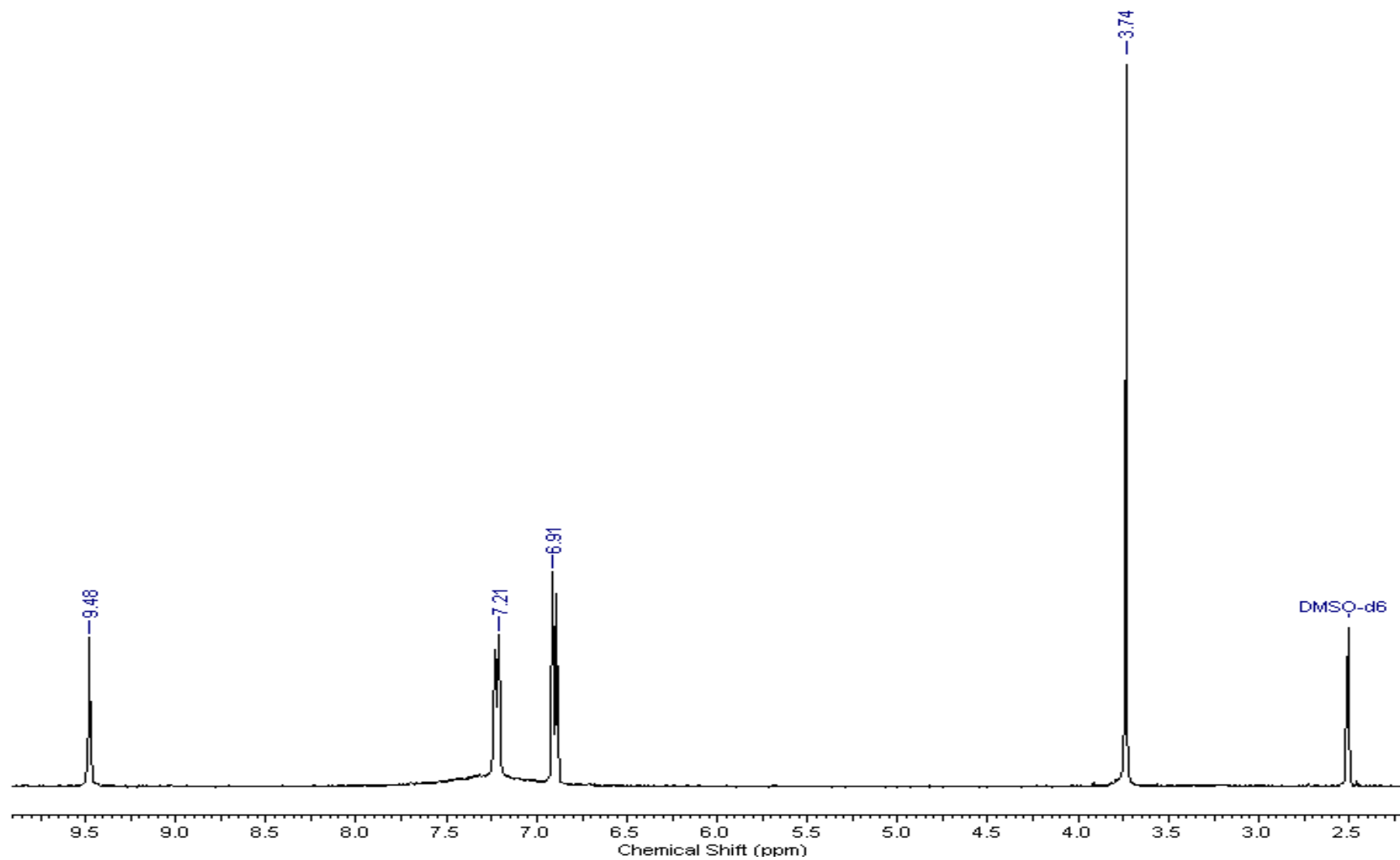
vi. Espectro de RMN ^{13}C da *p*-metil-feniltiouréia (2) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



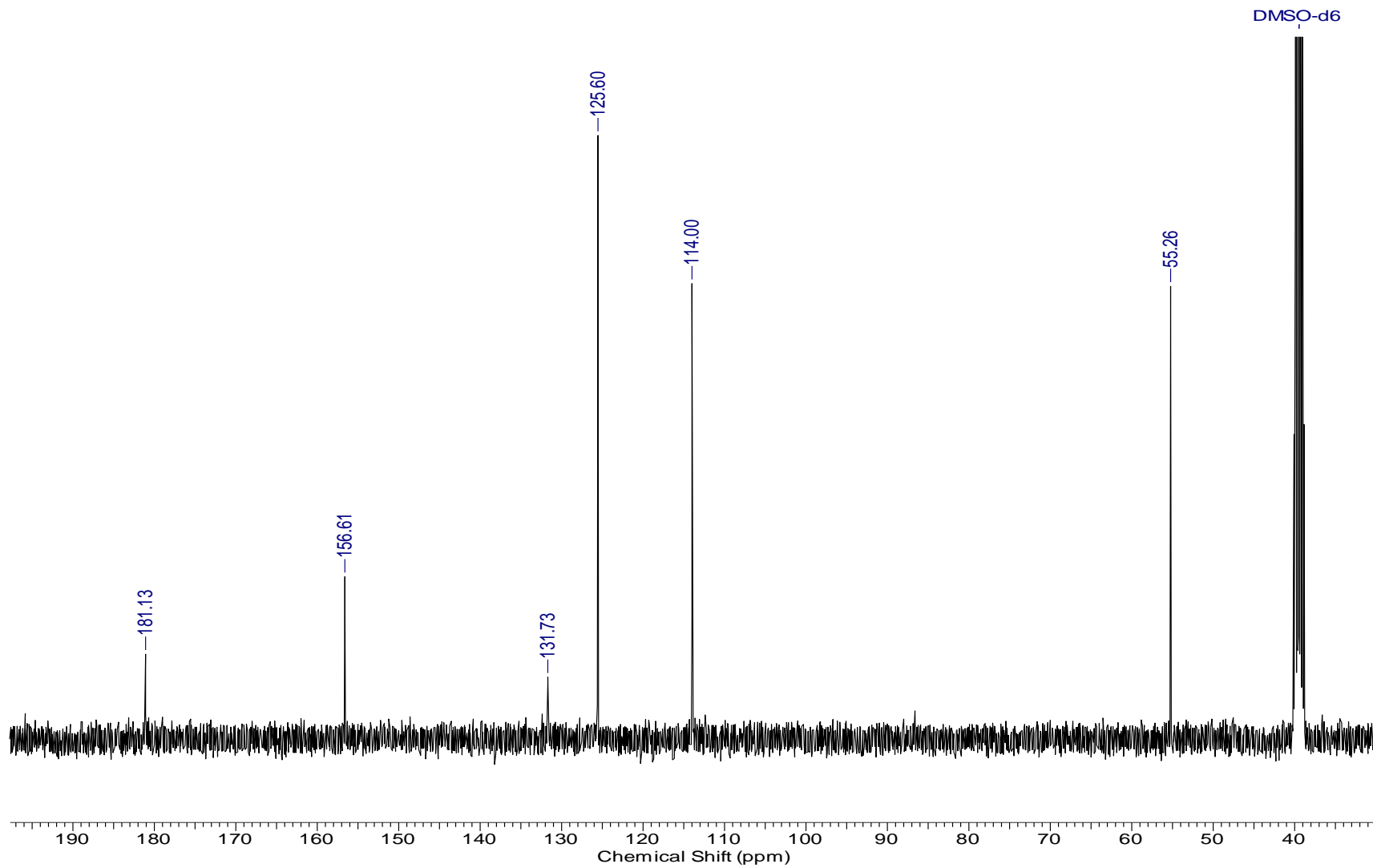
vii. Espectro de IV da *p*-metoxi-feniltiouréia (3) obtido em pastilha de KBr obtido em pastilha de KBr



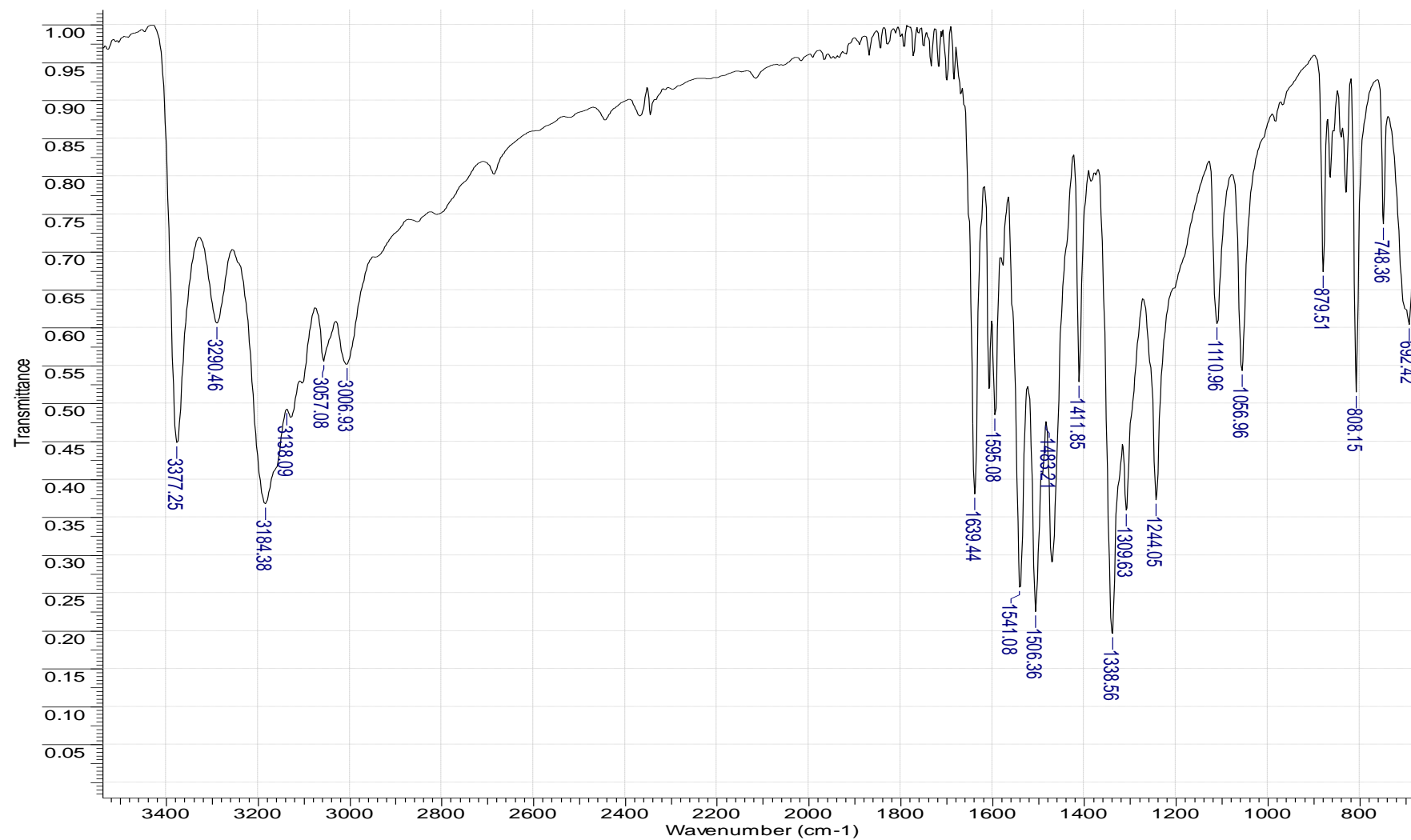
viii. Espectro de RMN ^1H da *p*-metoxi-feniltiouréia (3) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



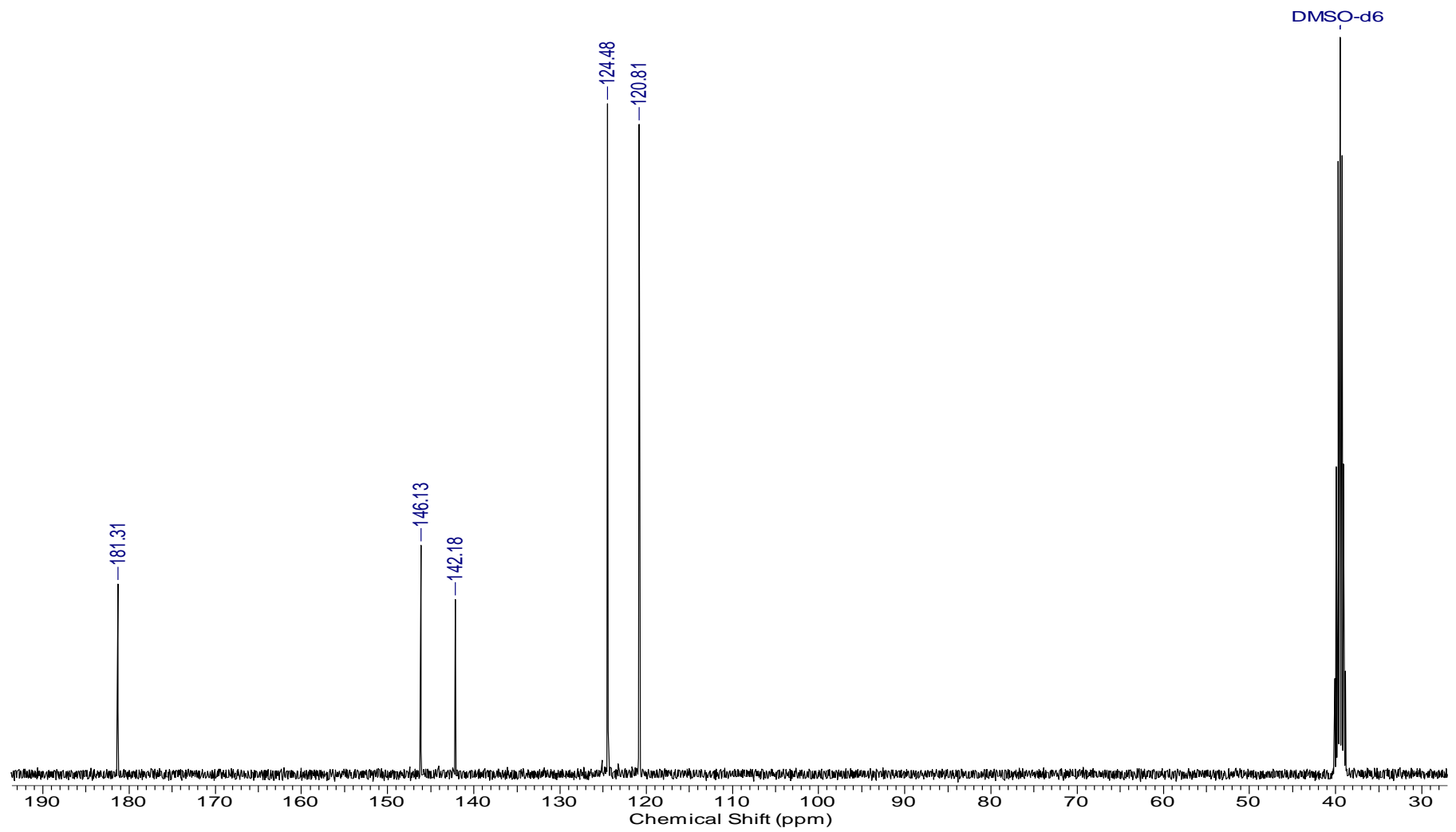
ix. Espectro de RMN ^{13}C da *p*-metoxi-feniltiouréia (3) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



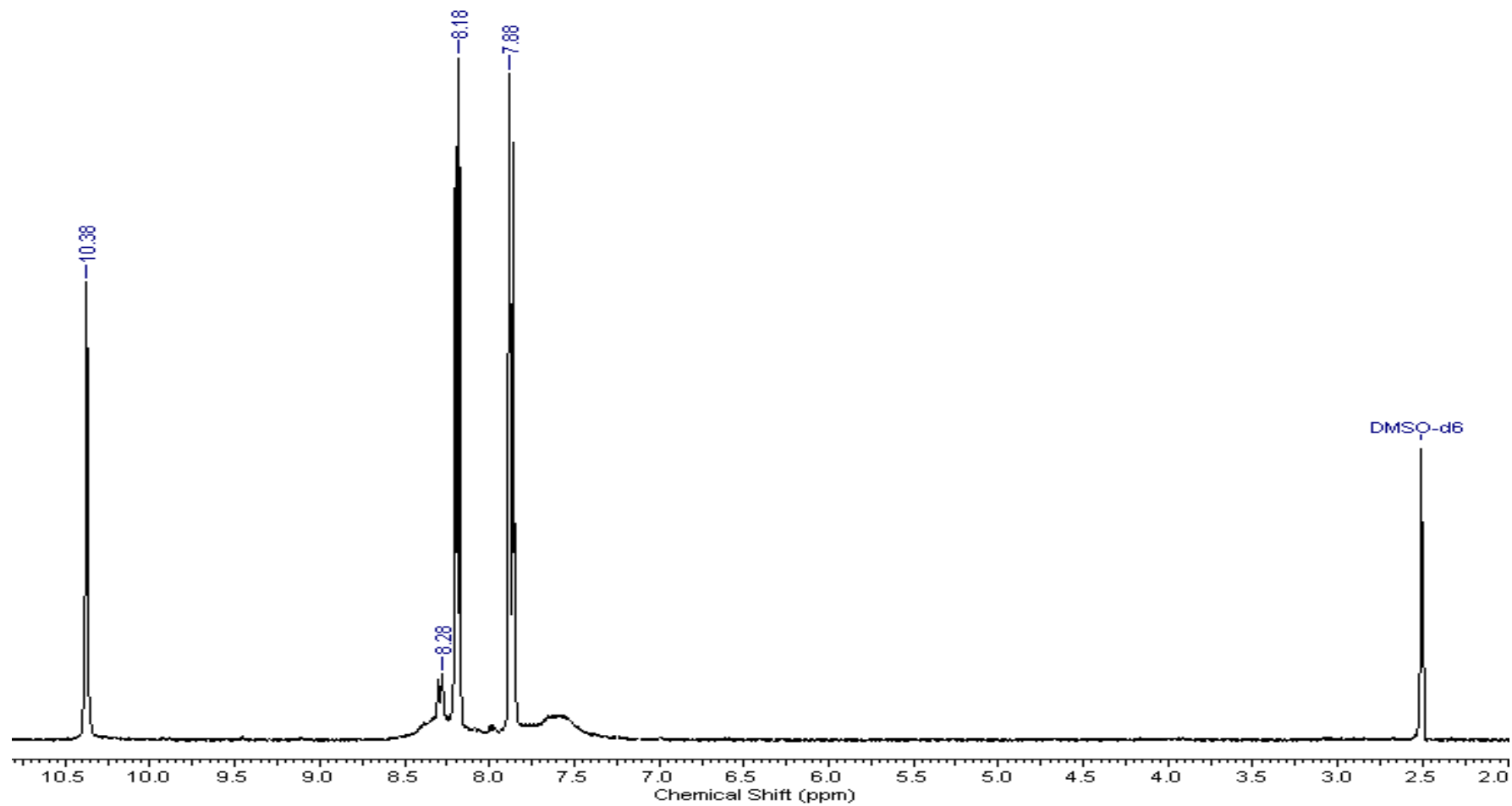
X. Espectro de IV da *p*-nitro-fenil-tiouréia (4) obtido em pastilha de KBr



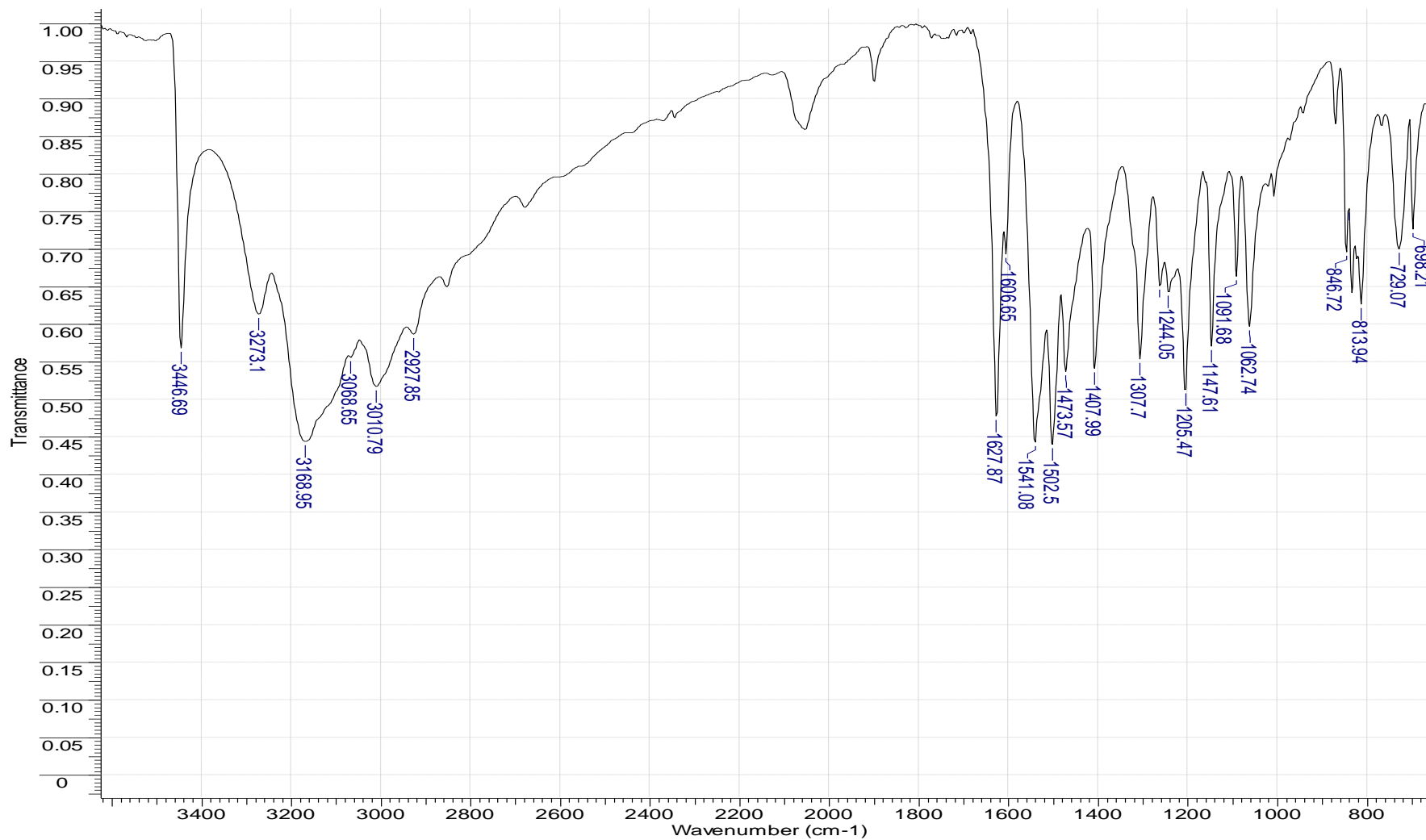
xi. Espectro de RMN ^{13}C da *p*-nitro-feniltiouréia (4) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



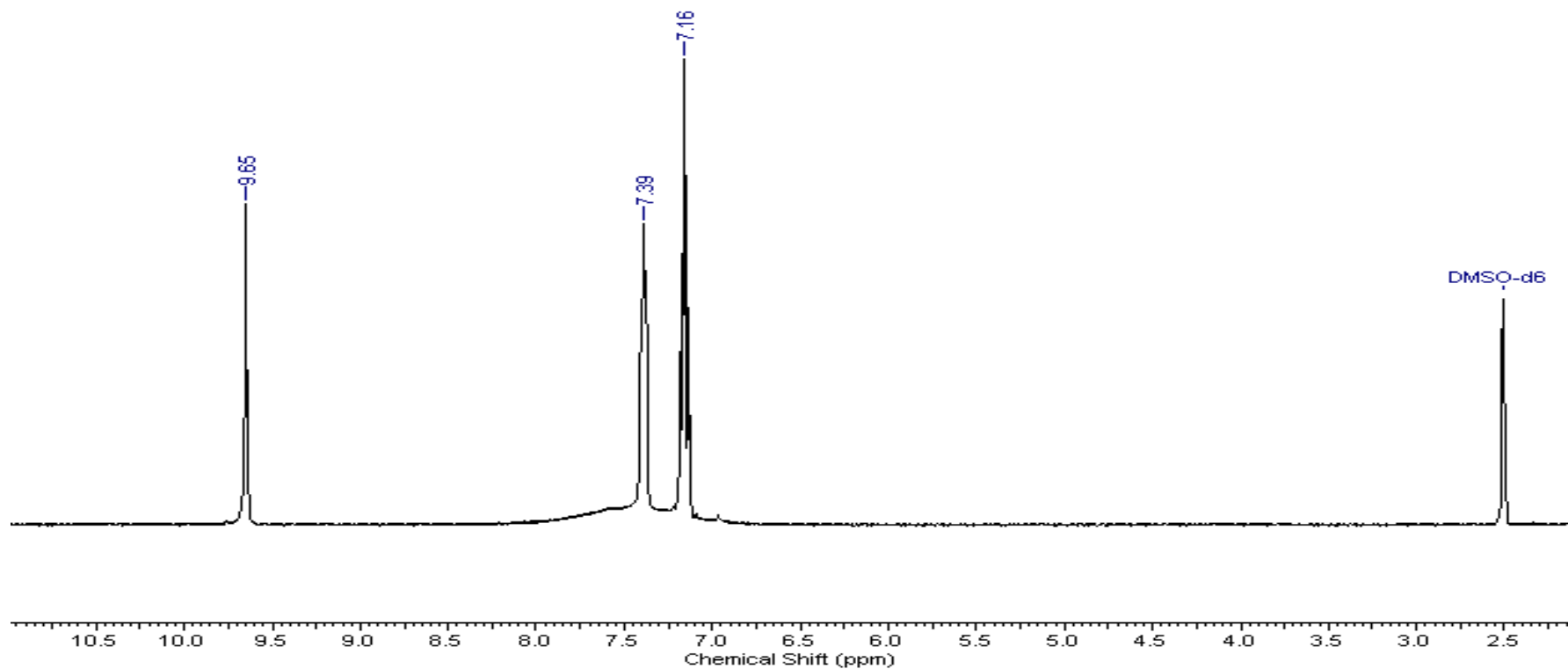
xii. Espectro de RMN ^{13}C da *p*-nitro-feniltiouréia (4) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



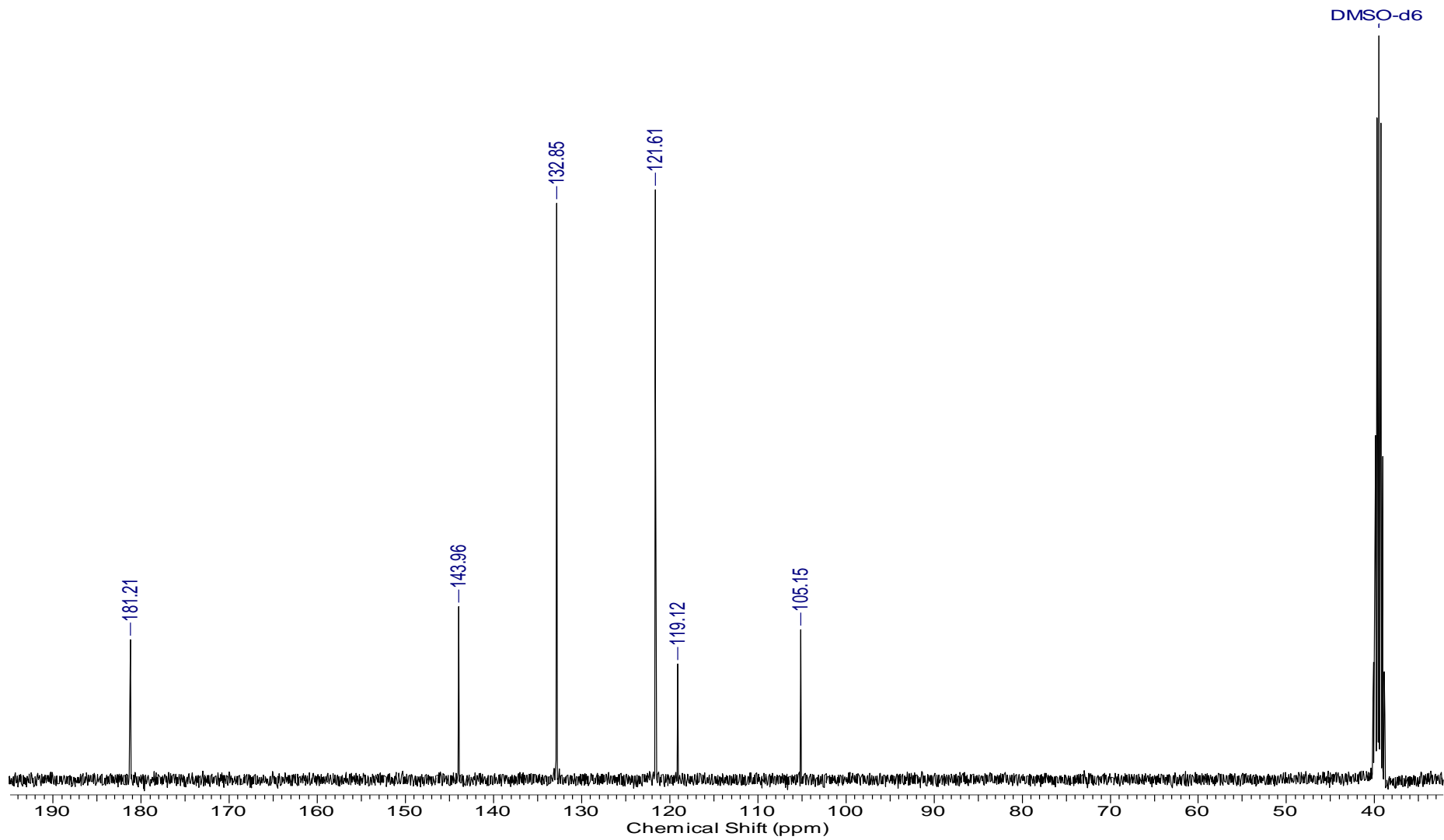
xiii. Espectro de IV da *p*-cloro-feniltiouréia (5) obtido em pastilha de KBr



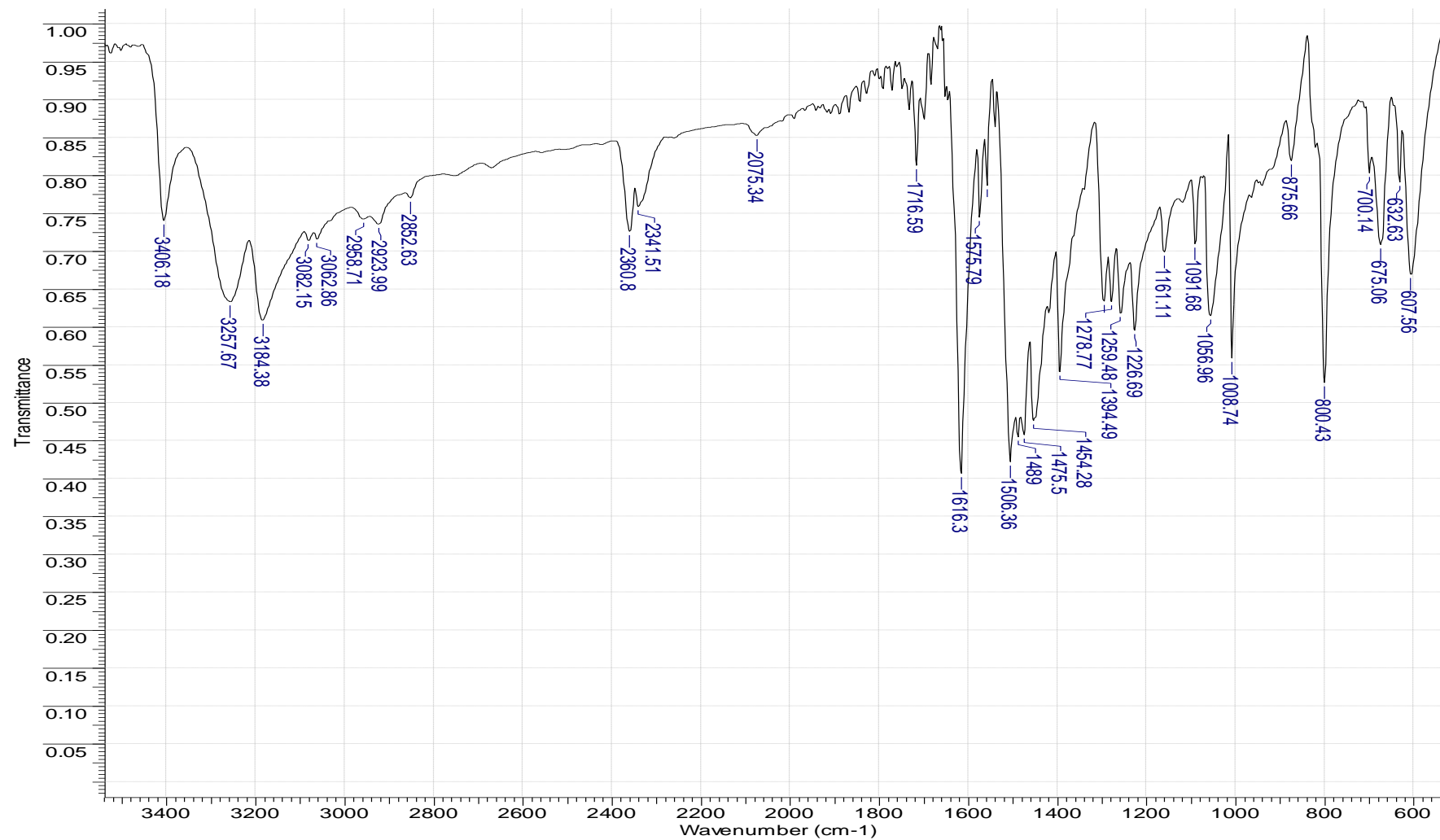
xiv. Espectro de RMN ^1H da *p*-cloro-feniltiouréia (5) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



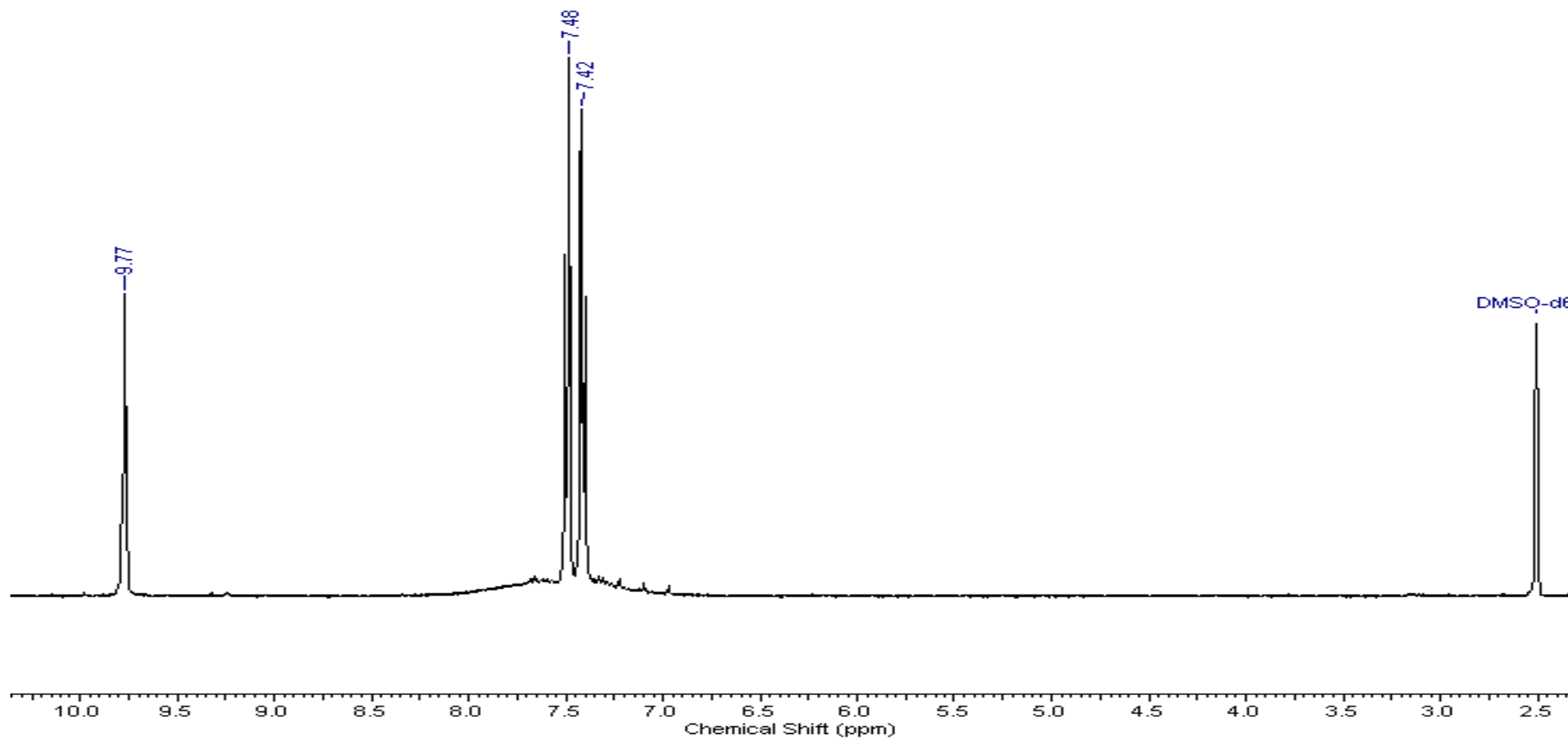
xv. Espectro de RMN ^{13}C da *p*-cloro-feniltiouréia (5) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



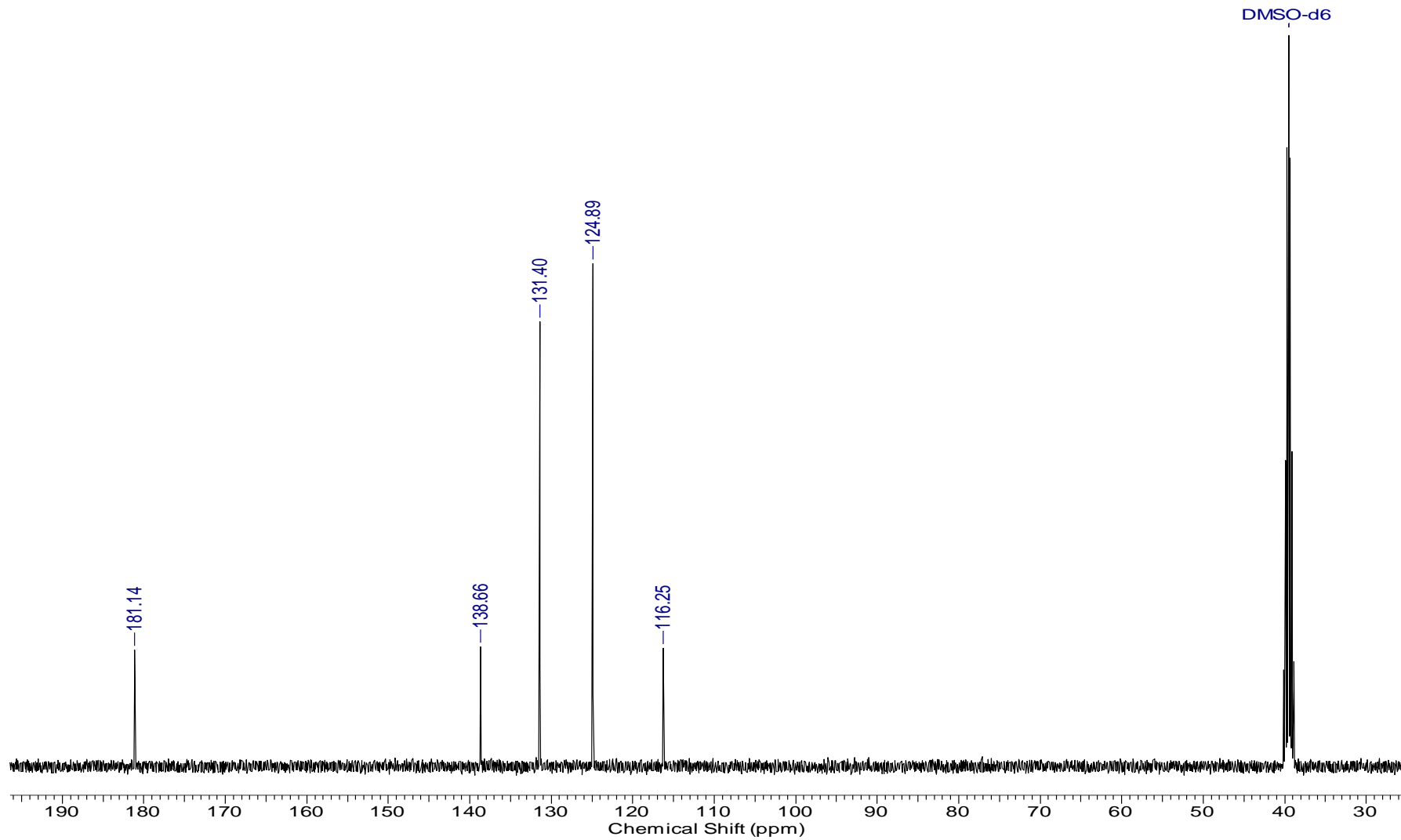
xvi. Espectro de IV da *p*-bromo-feniltiouréia (6) obtido em pastilha de KBr



xvii. Espectro de RMN ^1H da *p*-bromo-feniltiouréia (6) obtido em $\text{DMSO-}d_6$

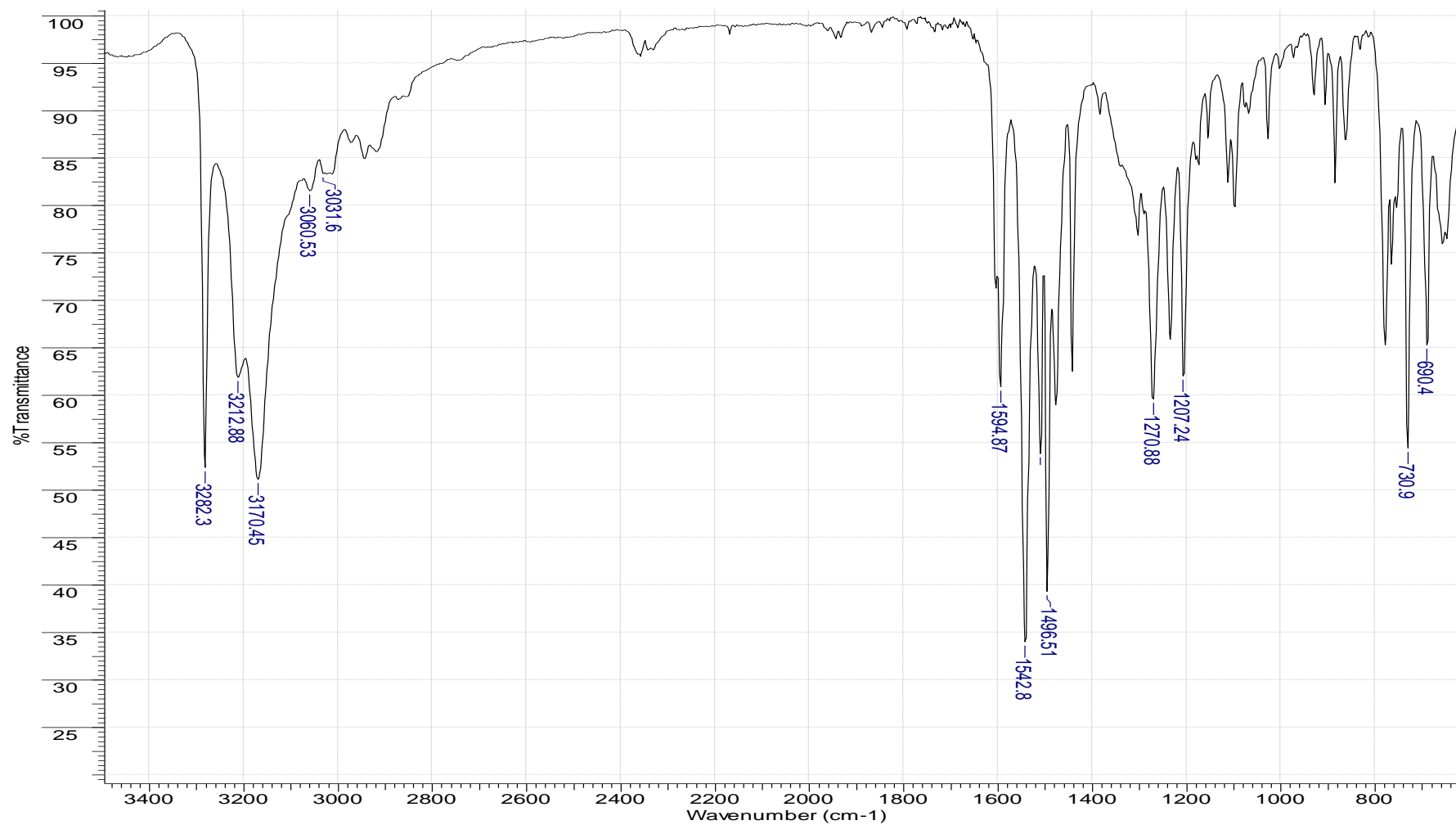


xviii. Espectro de RMN ^{13}C da *p*-bromo-feniltiouréia (6) obtido em $\text{DMSO-}d_6$

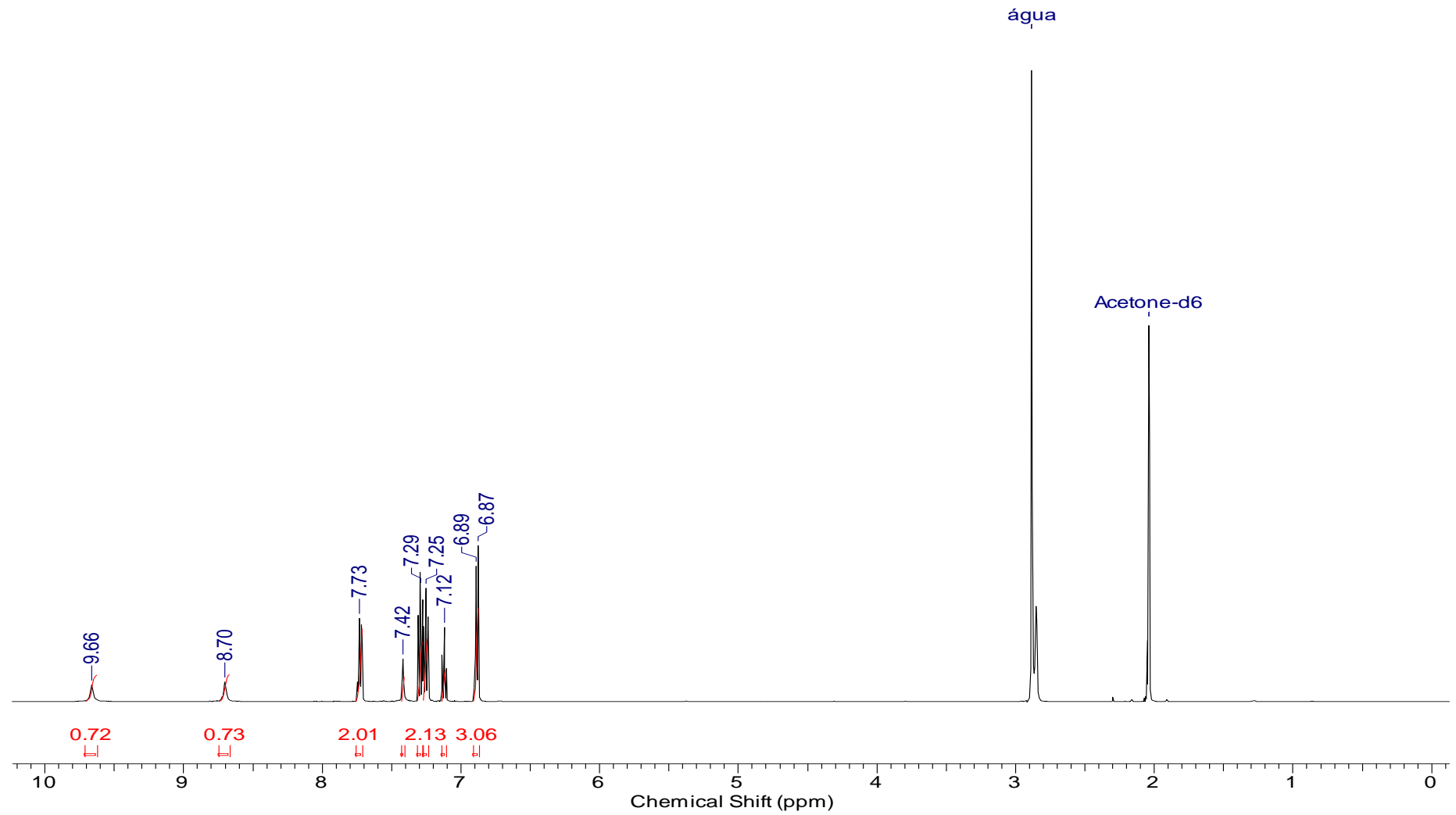


B. ESPECTROS DAS HIDRAZINO-CARBOTIOAMIDAS

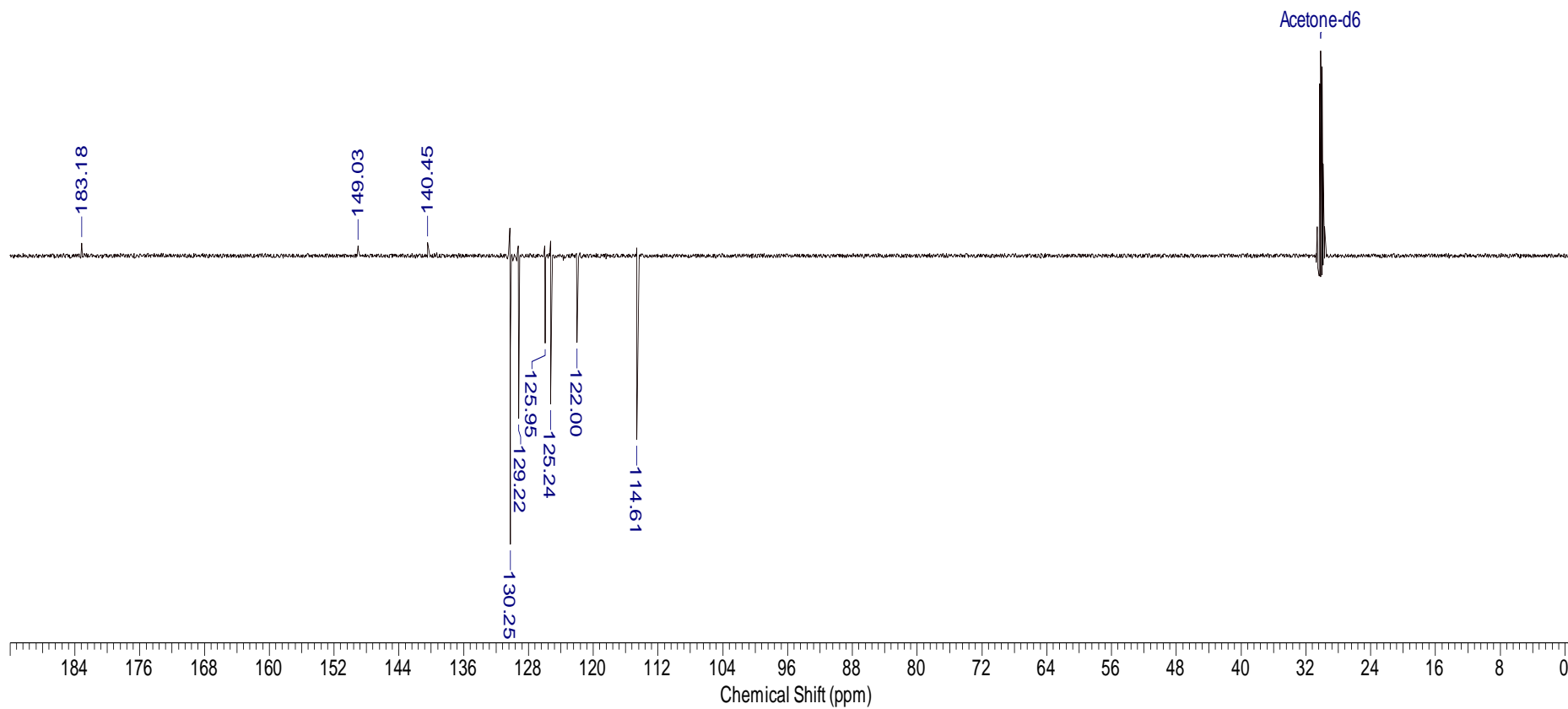
i. Espectro de IV da N-2-difenil-hidrazino-carbotioamida (12) obtido em pastilha de KBr



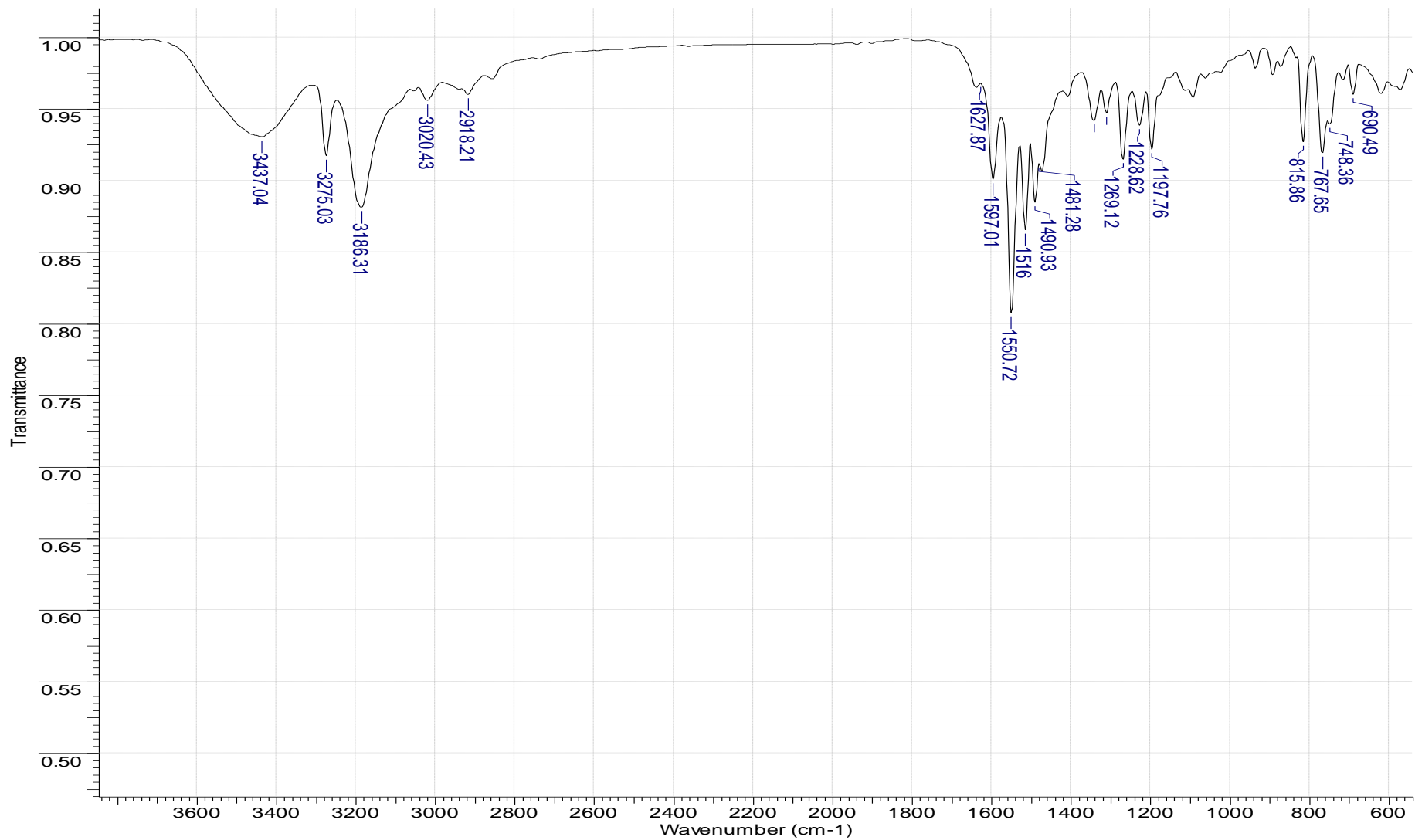
ii. Espectro de RMN ^1H da N-2-difenil-hidrazino-carbotioamida (12) obtido em acetona- d_6



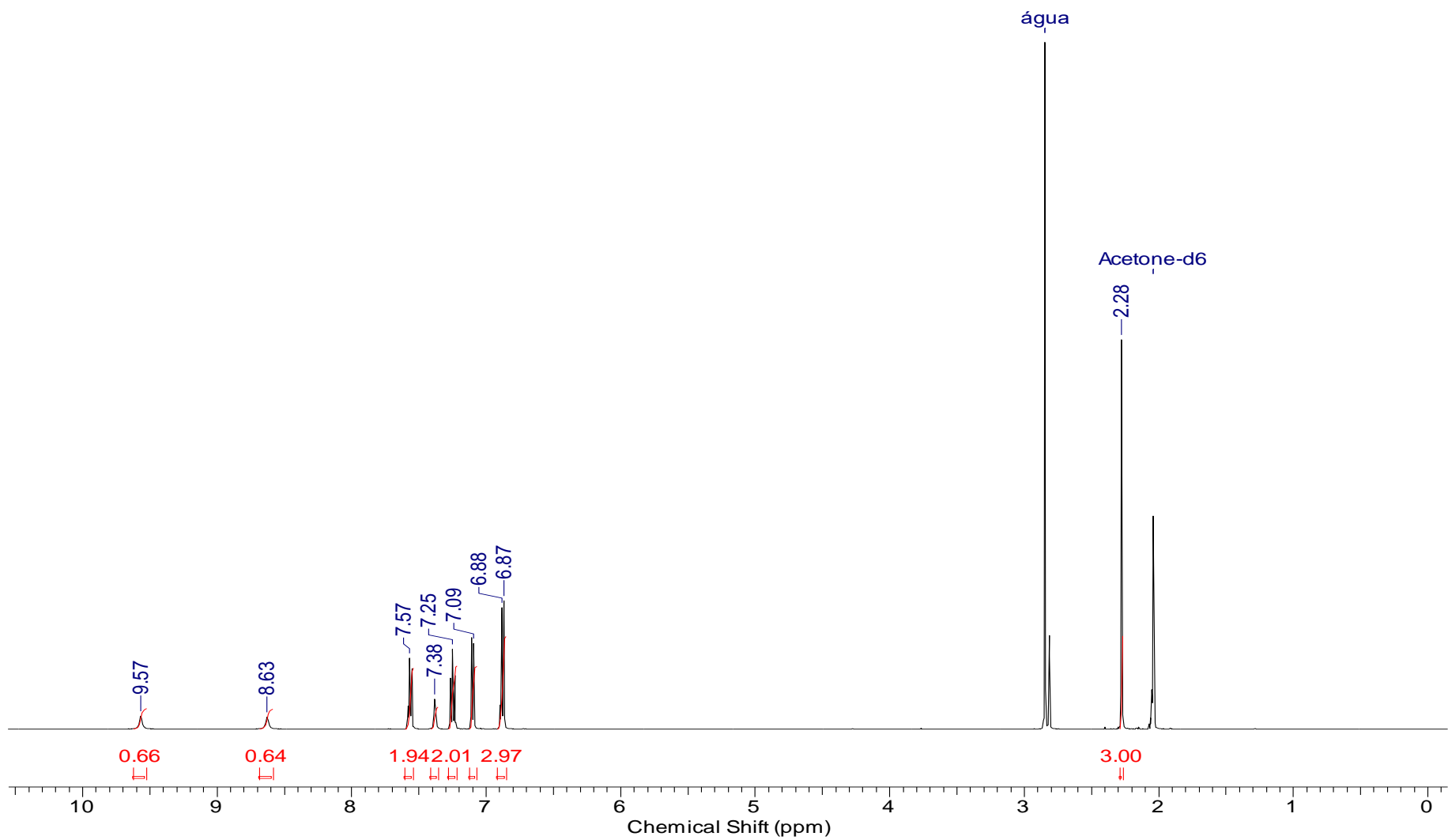
iii. Espectro DEPTQ da N-2-difenil-hidrazino-carbotioamida (12) obtido em acetona-d₆



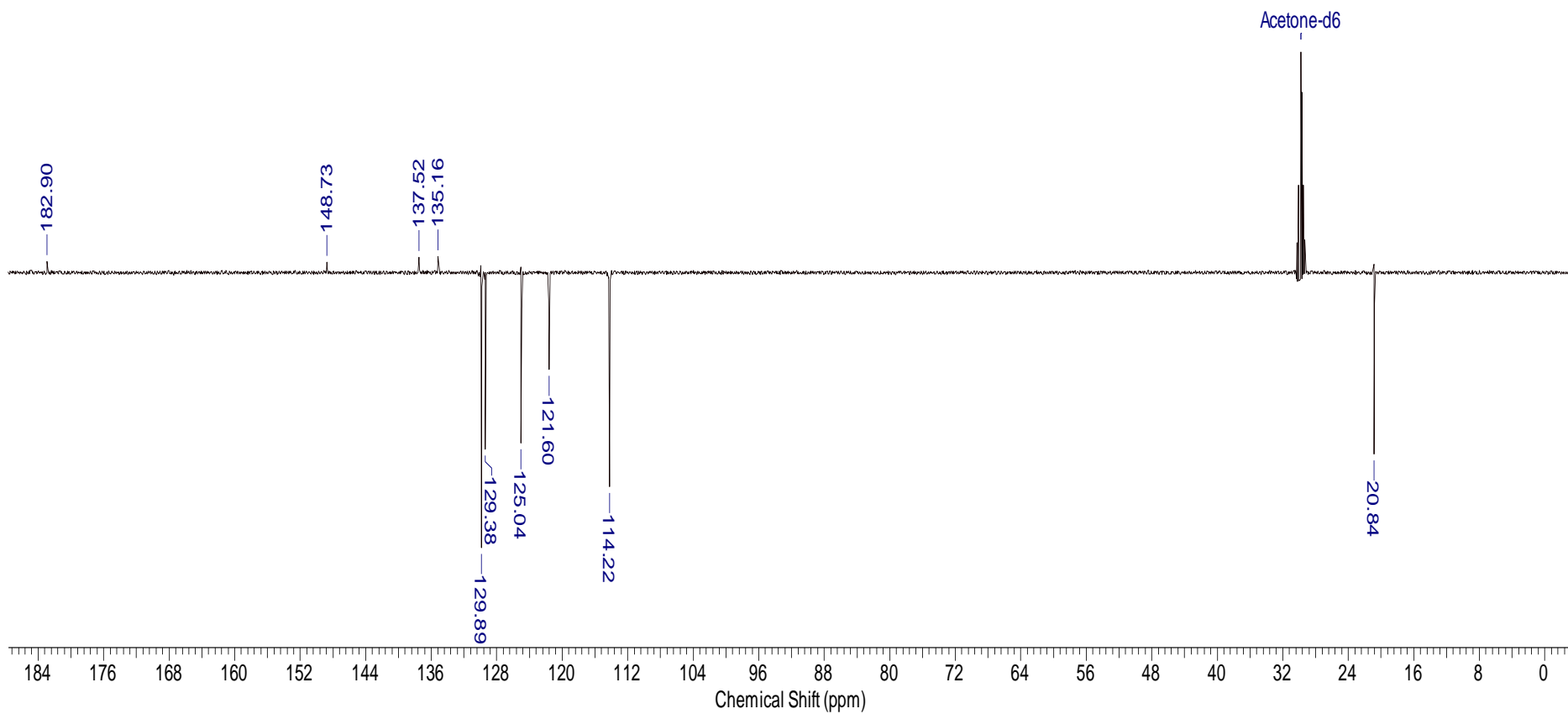
iv. Espectro de IV da *N*-(4-metil-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (13) obtido em pastilha de KBr



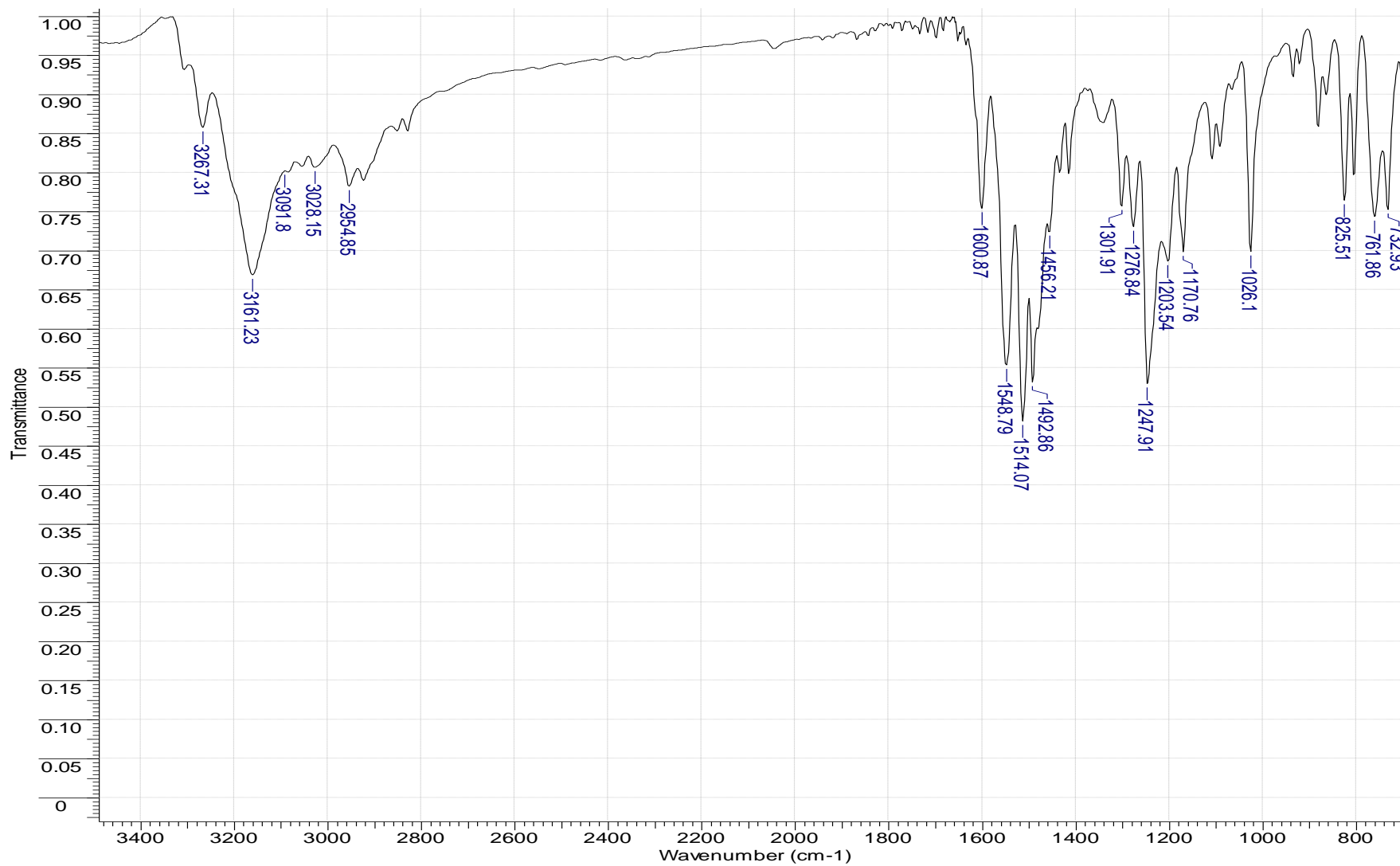
v. Espectro de RMN ^1H da *N*-(4-metil-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (13) obtido em acetona- d_6



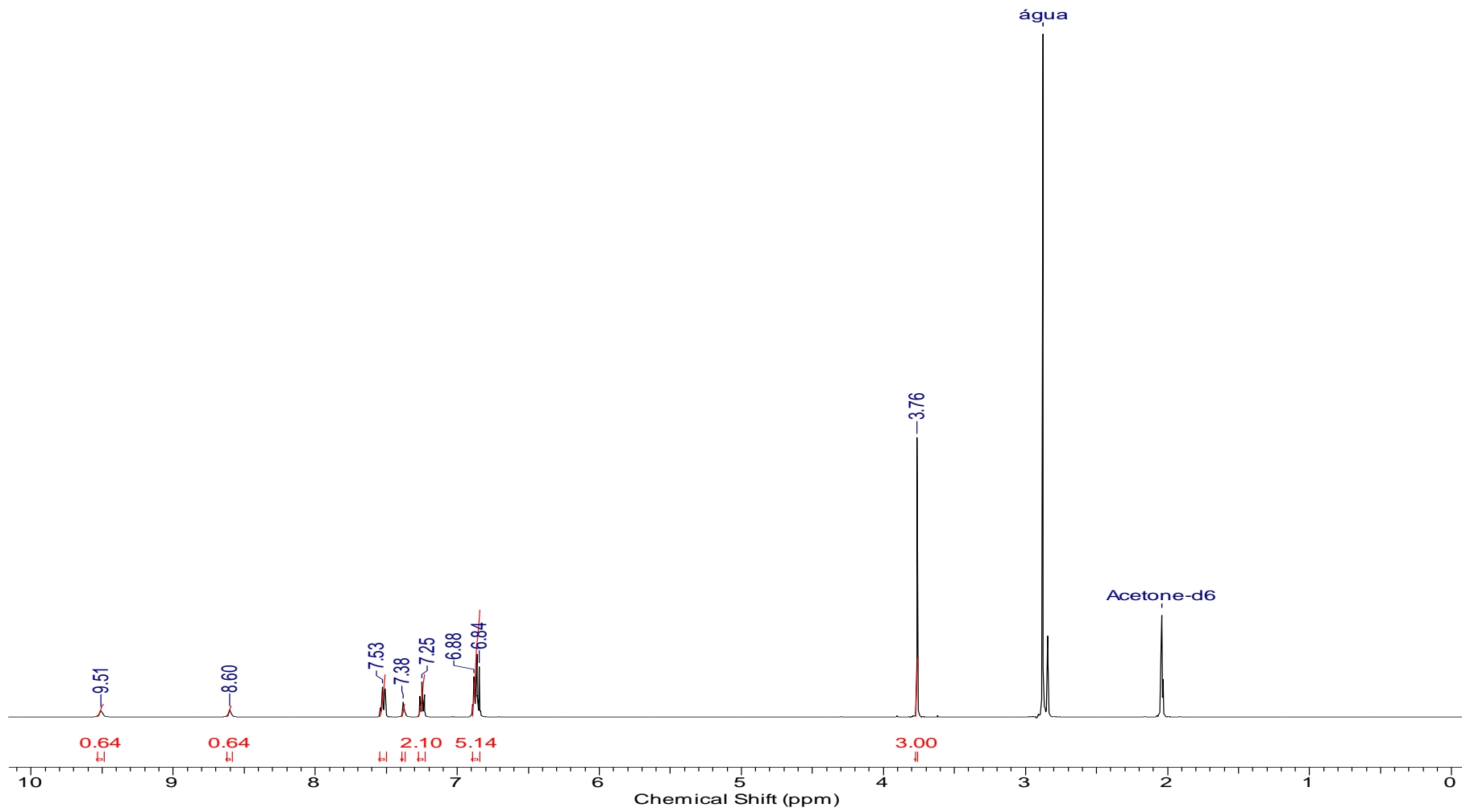
vi. Espectro DEPTQ da *N*-(4-metil-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (13) obtido em acetona-*d*₆



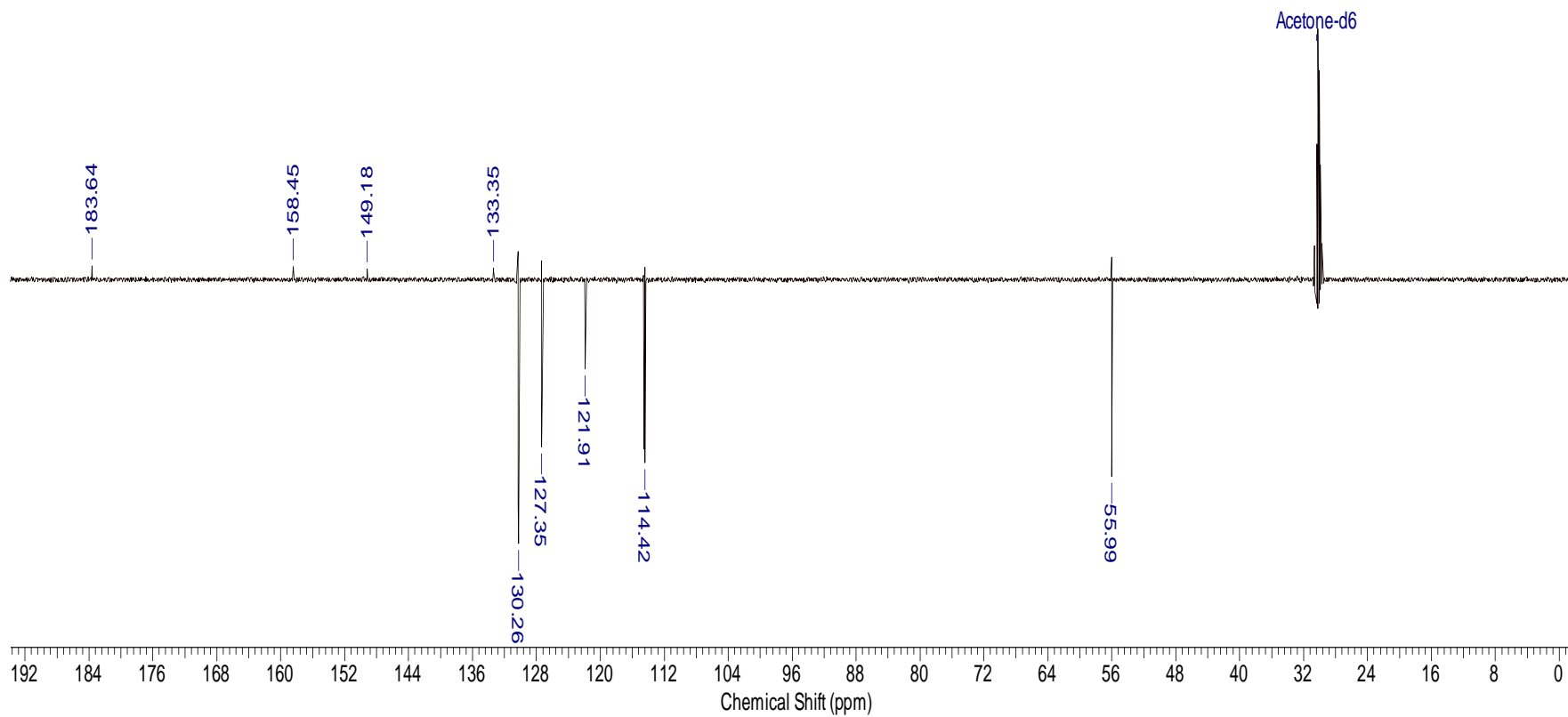
vii. Espectro de IV da *N*-(4-metóxi-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (14) obtido em pastilha de KBr



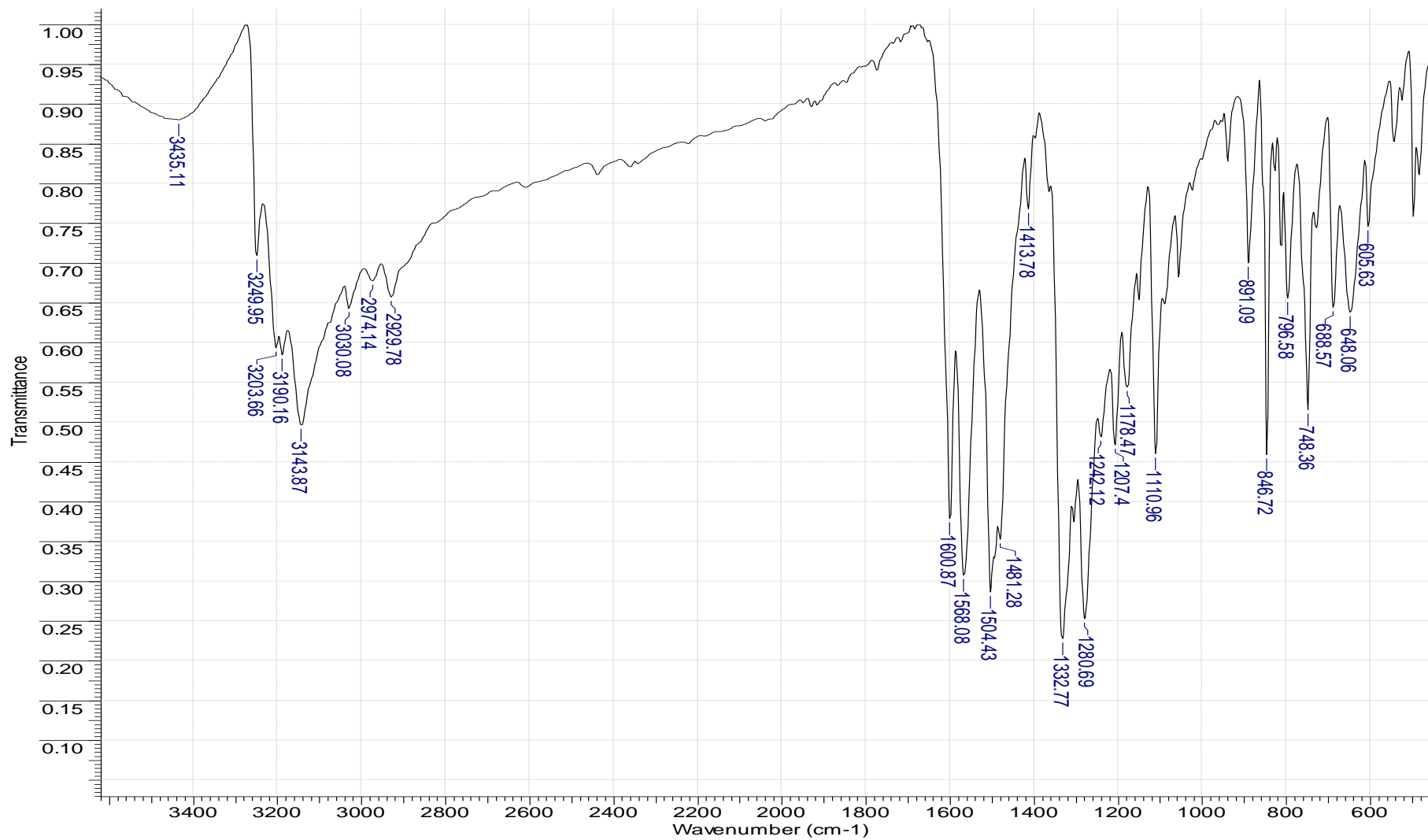
viii. Espectro de RMN ^1H da *N*-(4-metóxi-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (14)



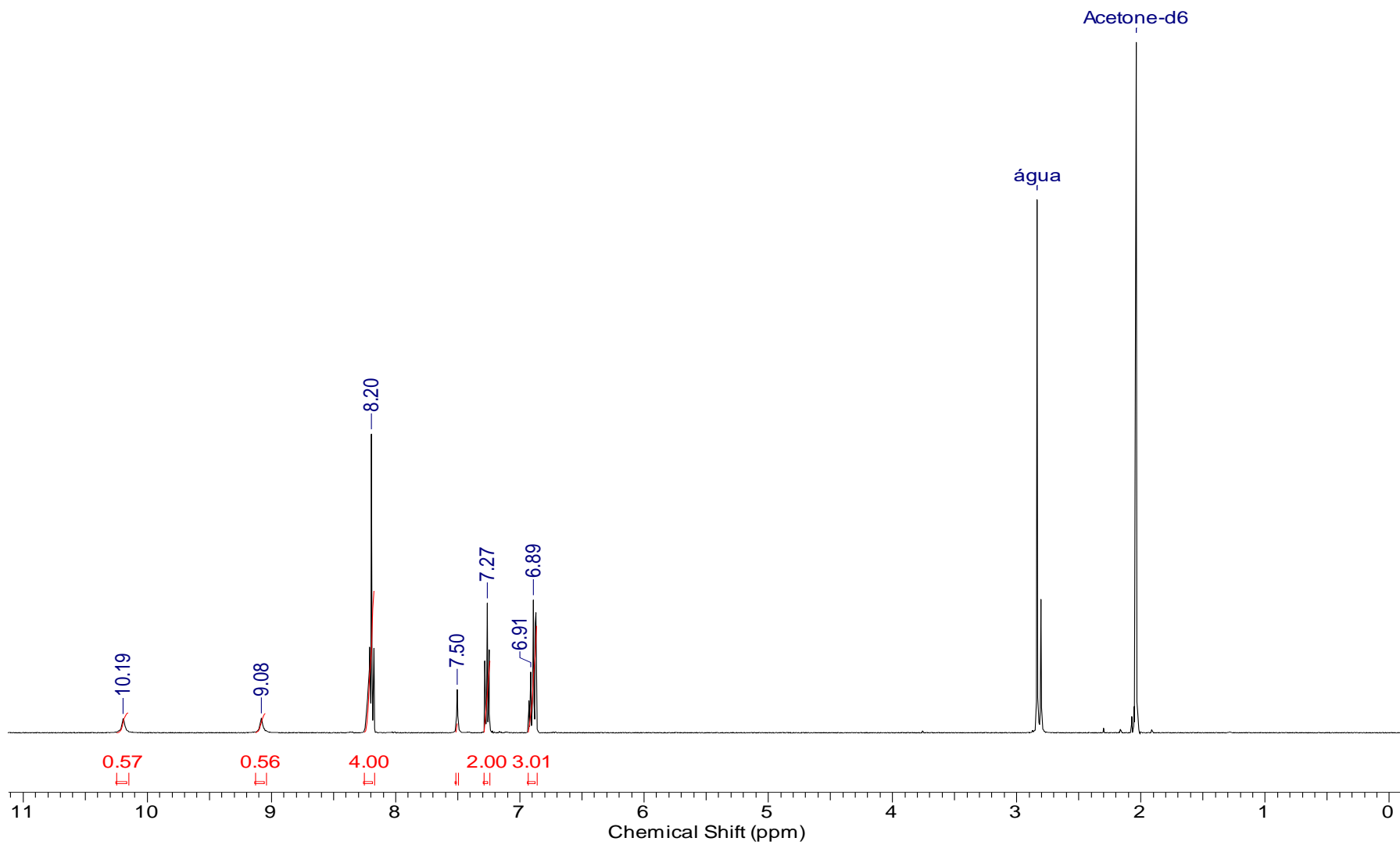
ix. Espectro DEPTQ da *N*-(4-metóxi-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (14)



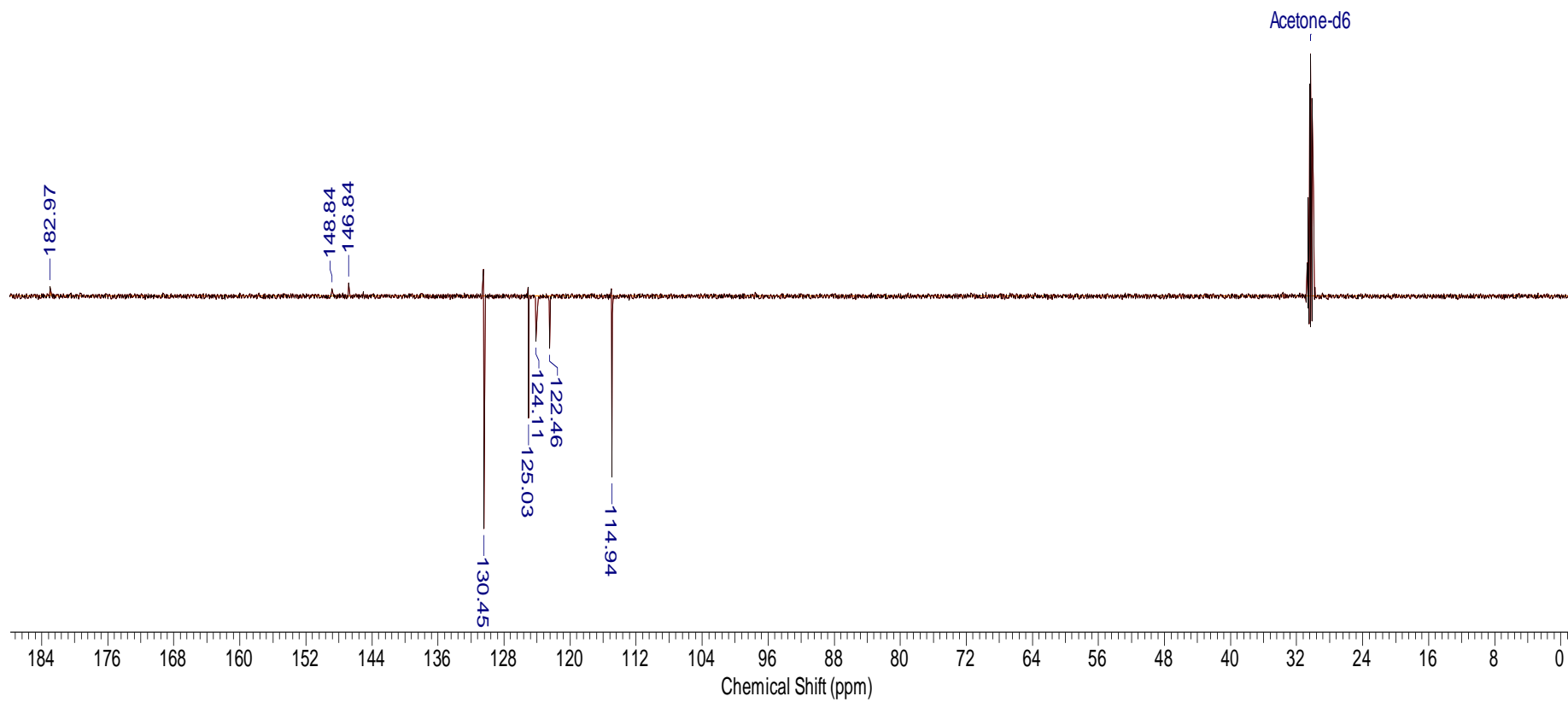
X. Espectro de IV da *N*-(4-nitro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (15) obtido em pastilha de KBr



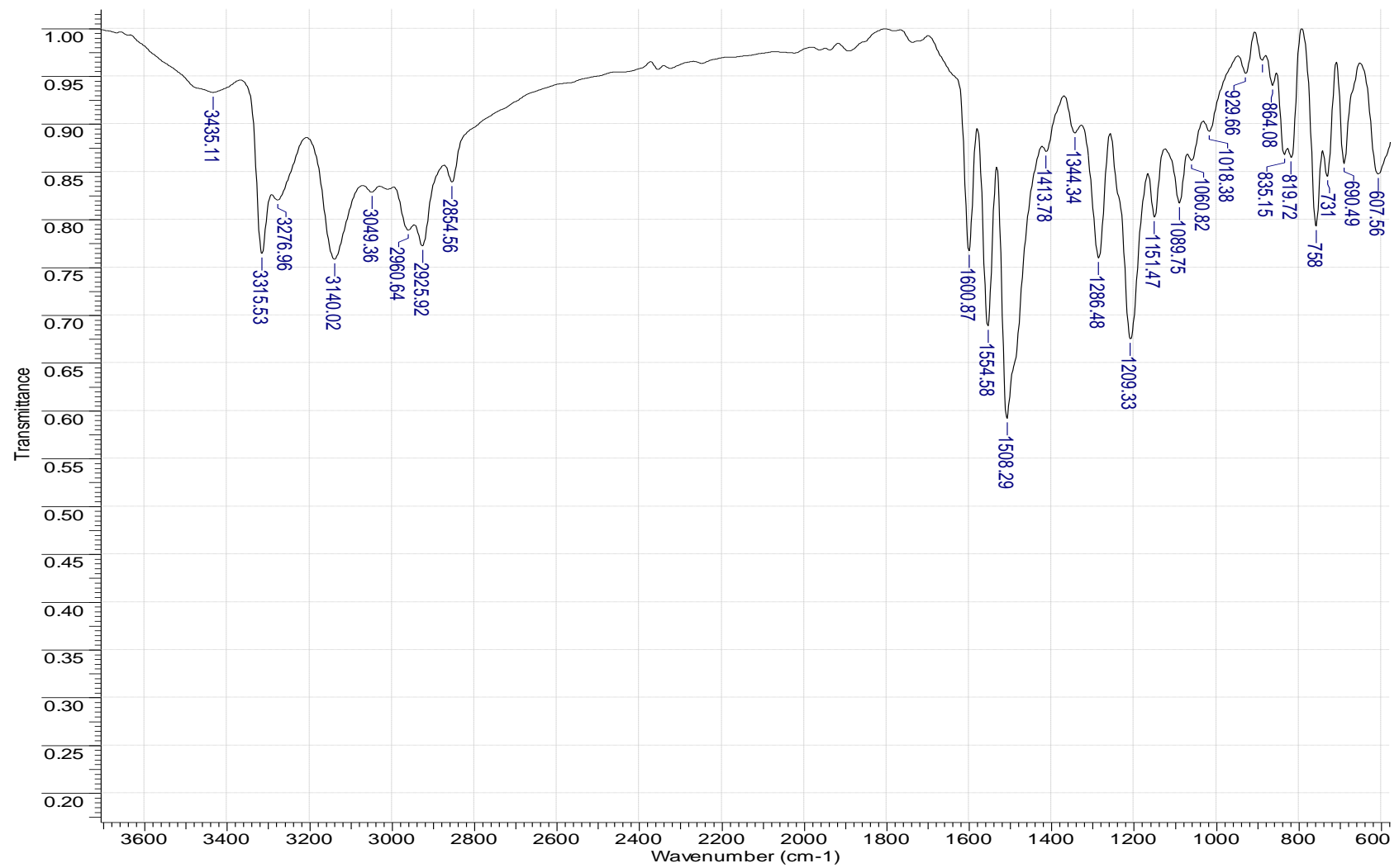
xi. Espectro de RMN ^1H da *N*-(4-nitro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (15) obtido em acetona- d_6



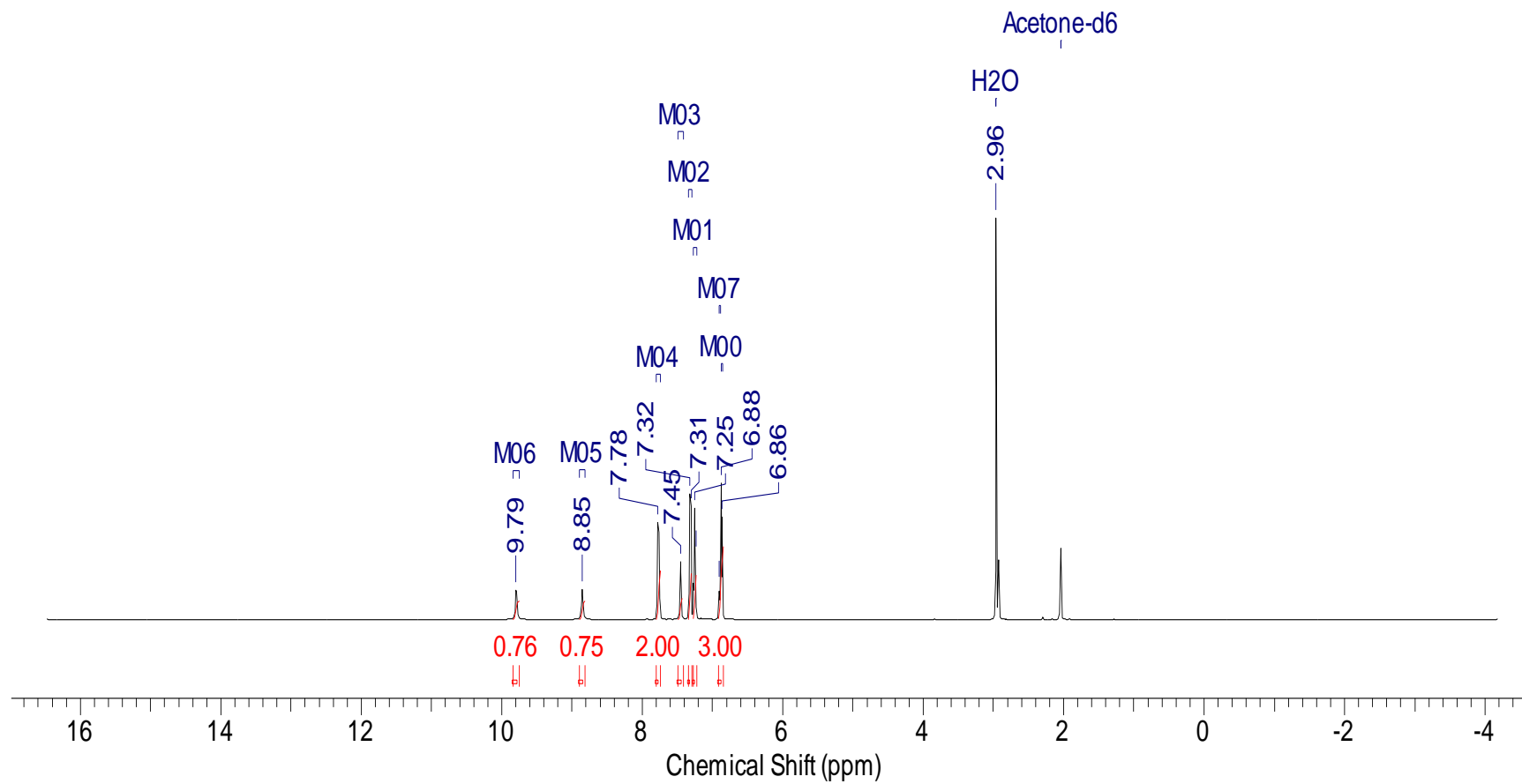
xii. Espectro DEPTQ da *N*-(4-nitro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (15) obtido em acetona-*d*₆



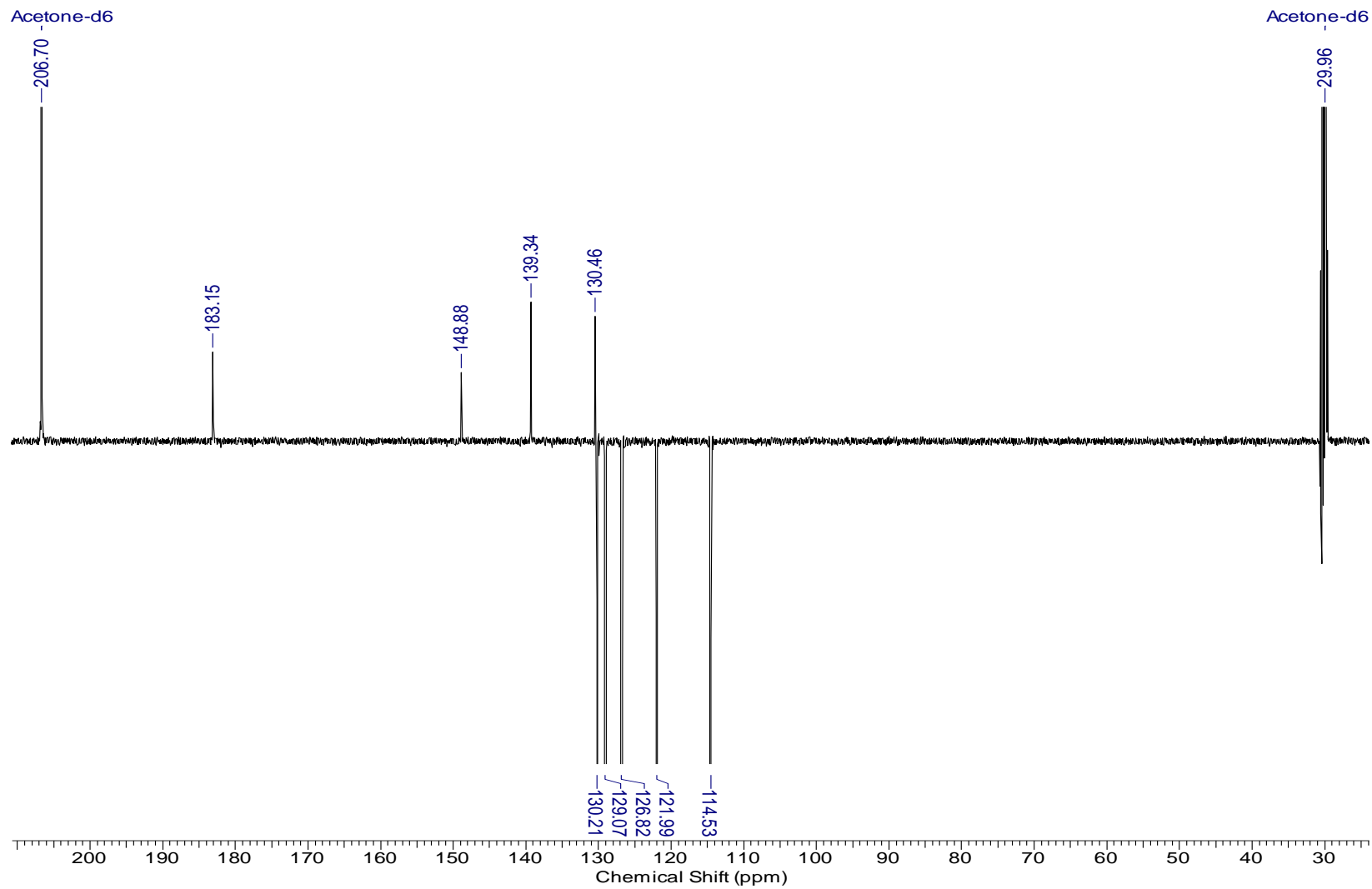
xiii. Espectro de IV da *N*-(4-cloro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (16) obtido em pastilha de KBr



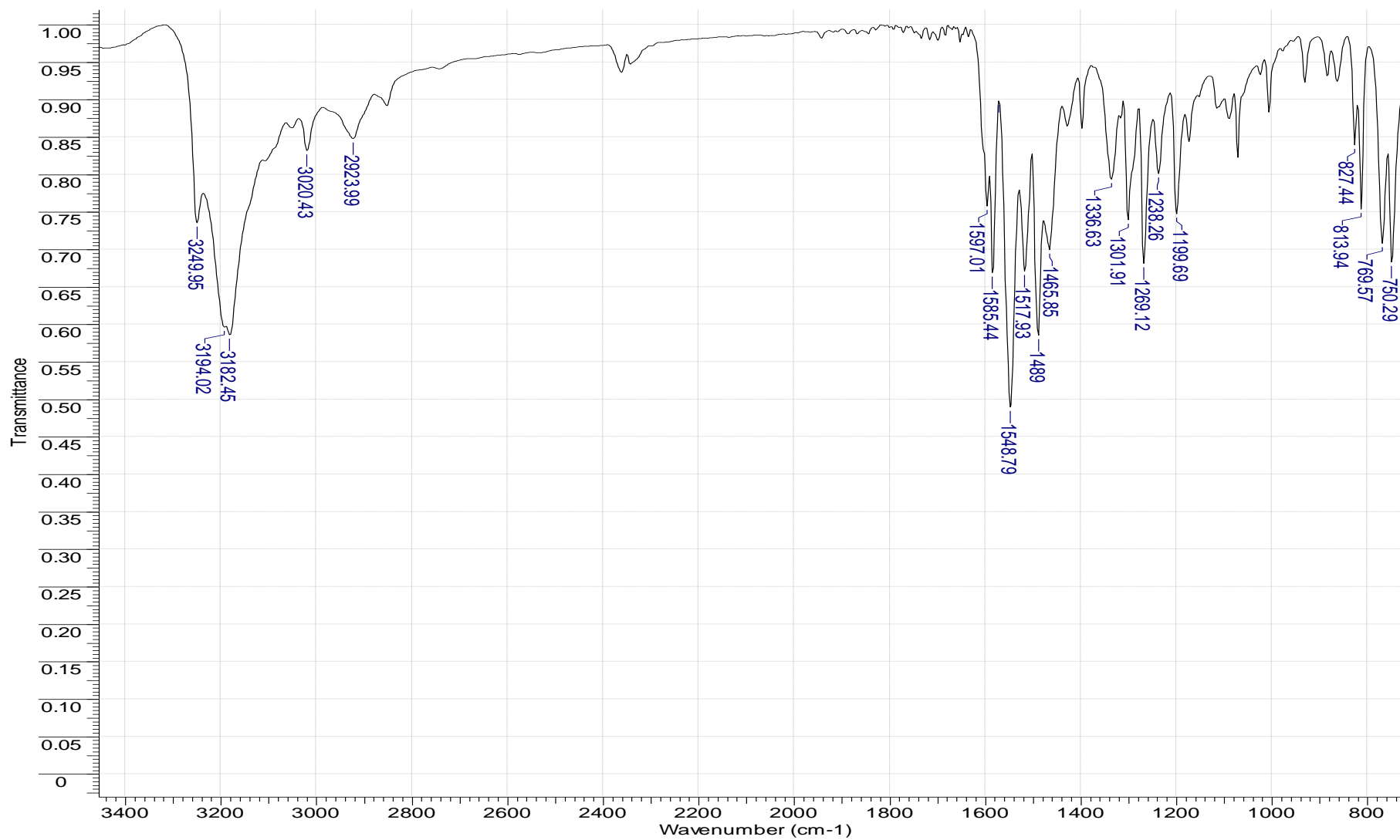
xiv. Espectro de RMN ^1H da *N*-(4-cloro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (16) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



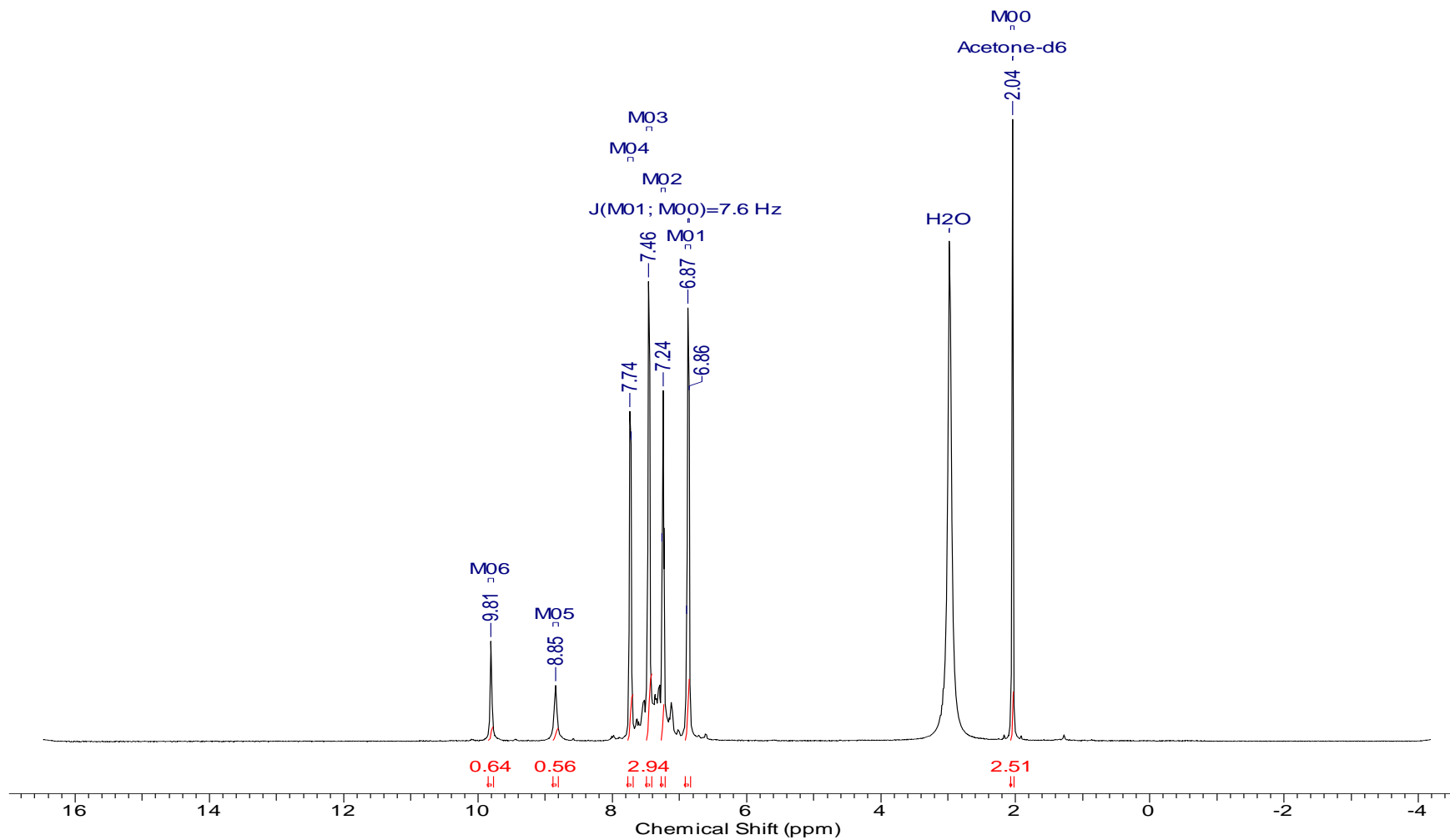
xv. Espectro DEPTQ da *N*-(4-cloro-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (16) obtido em DMSO-*d*₆



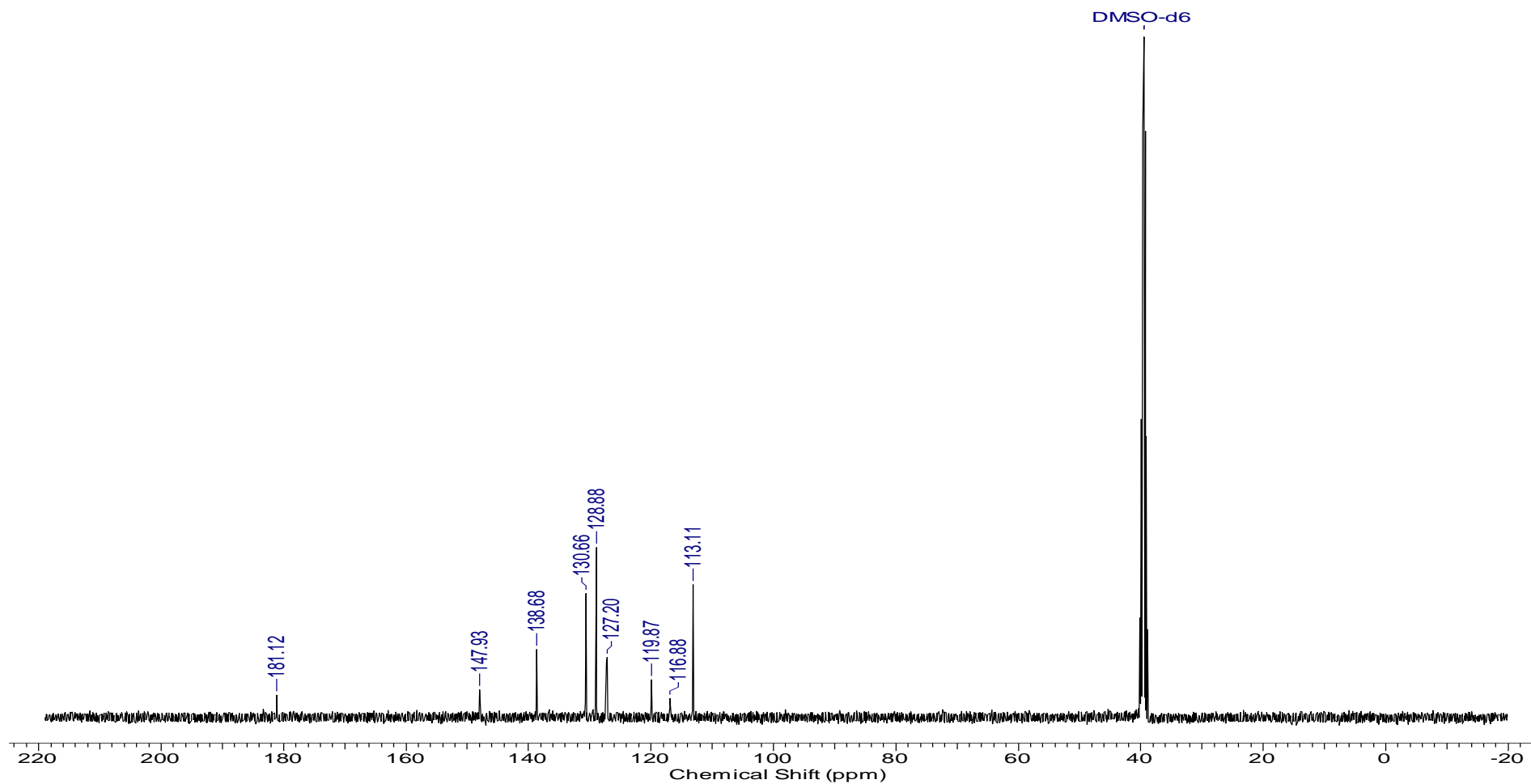
xvi. Espectro de IV da *N*-(4-bromo-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (17) obtido em pastilha de KBr



xvii. Espectro de RMN ^1H da *N*-(4-bromo-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (17) obtido em $\text{DMSO-}d_6$

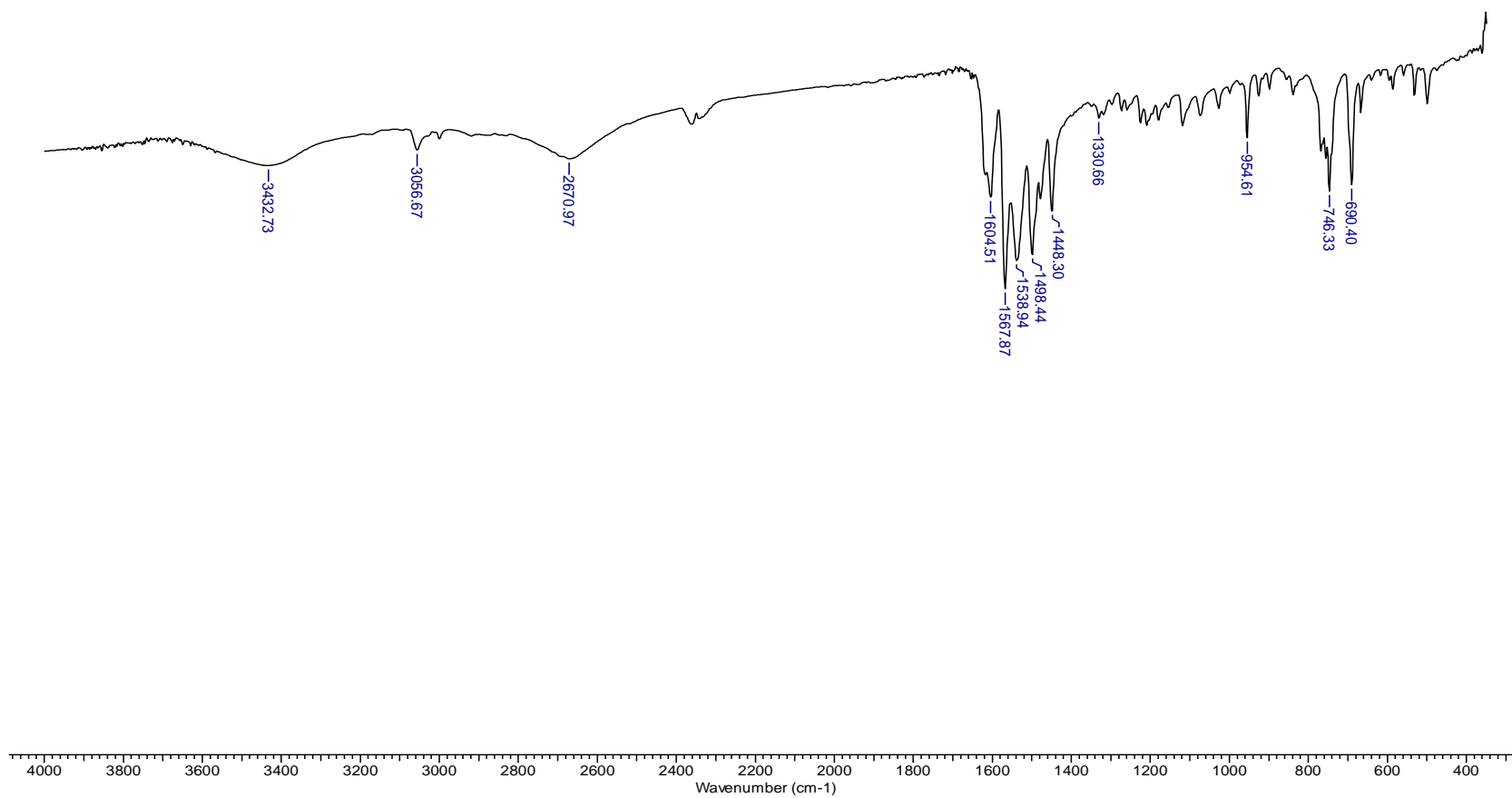


xviii. Espectro de RMN ^{13}C da *N*-(4-bromo-fenil)-2-fenil-hidrazino-carbotioamida (17) obtido em $\text{DMSO-}d_6$

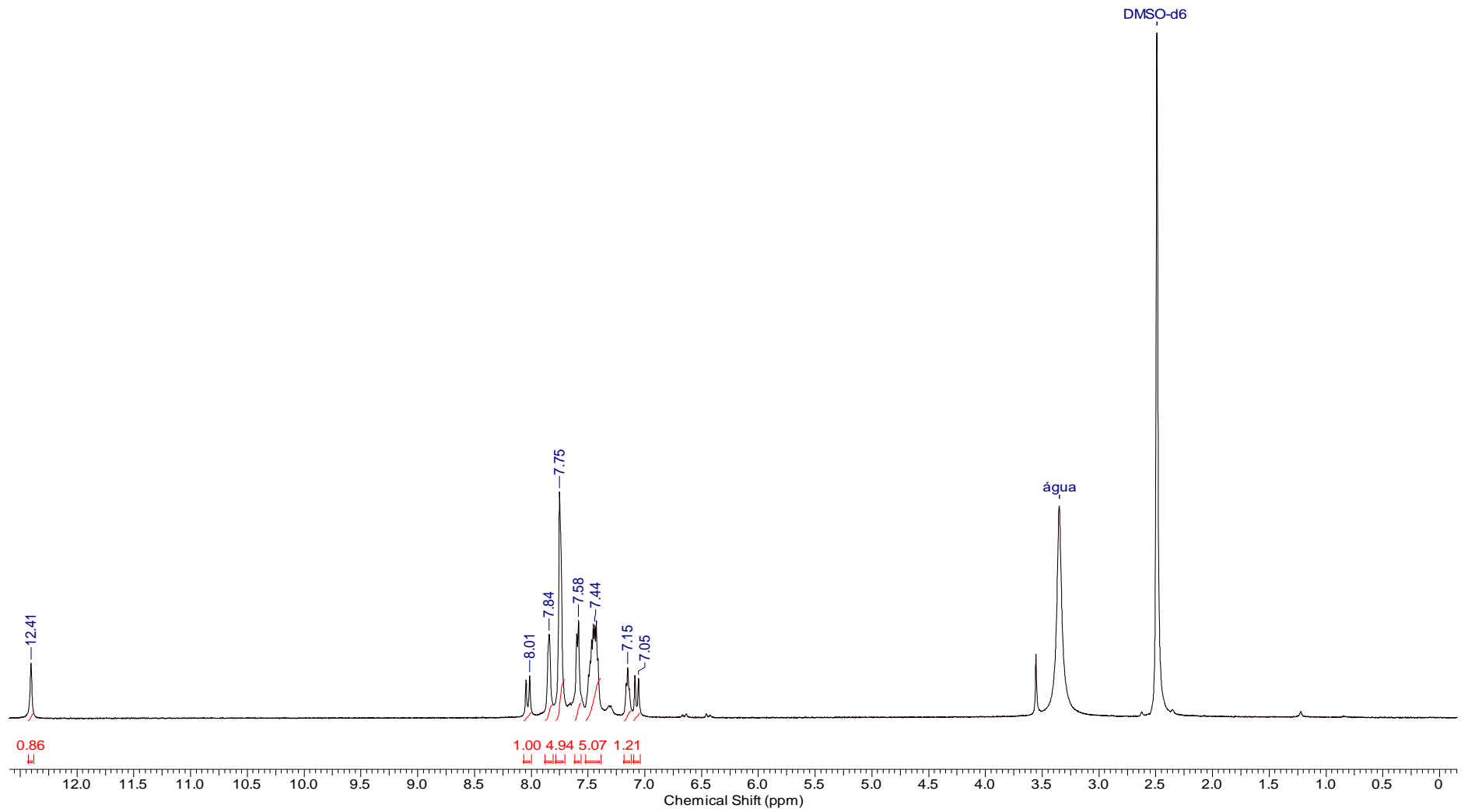


C. ESPECTROS DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS DA SÉRIE I

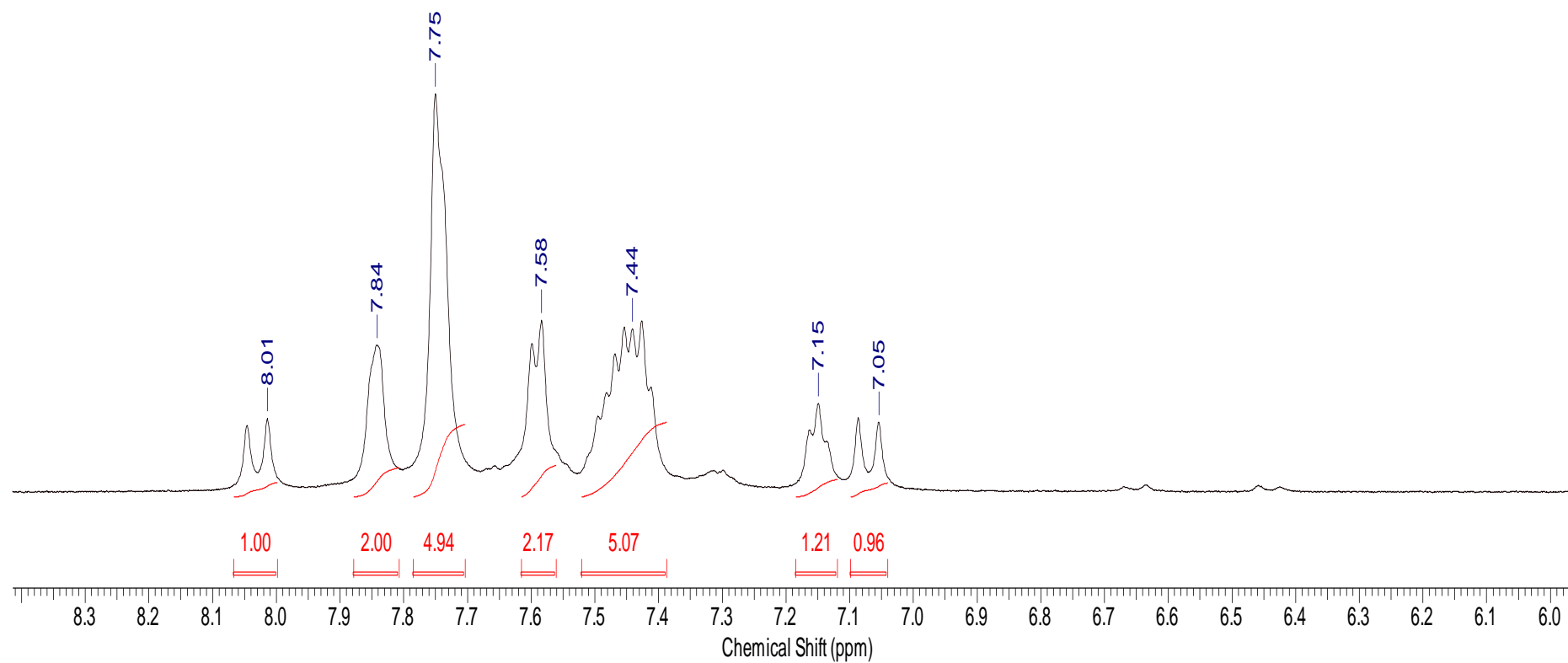
i. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em pastilha de KBr



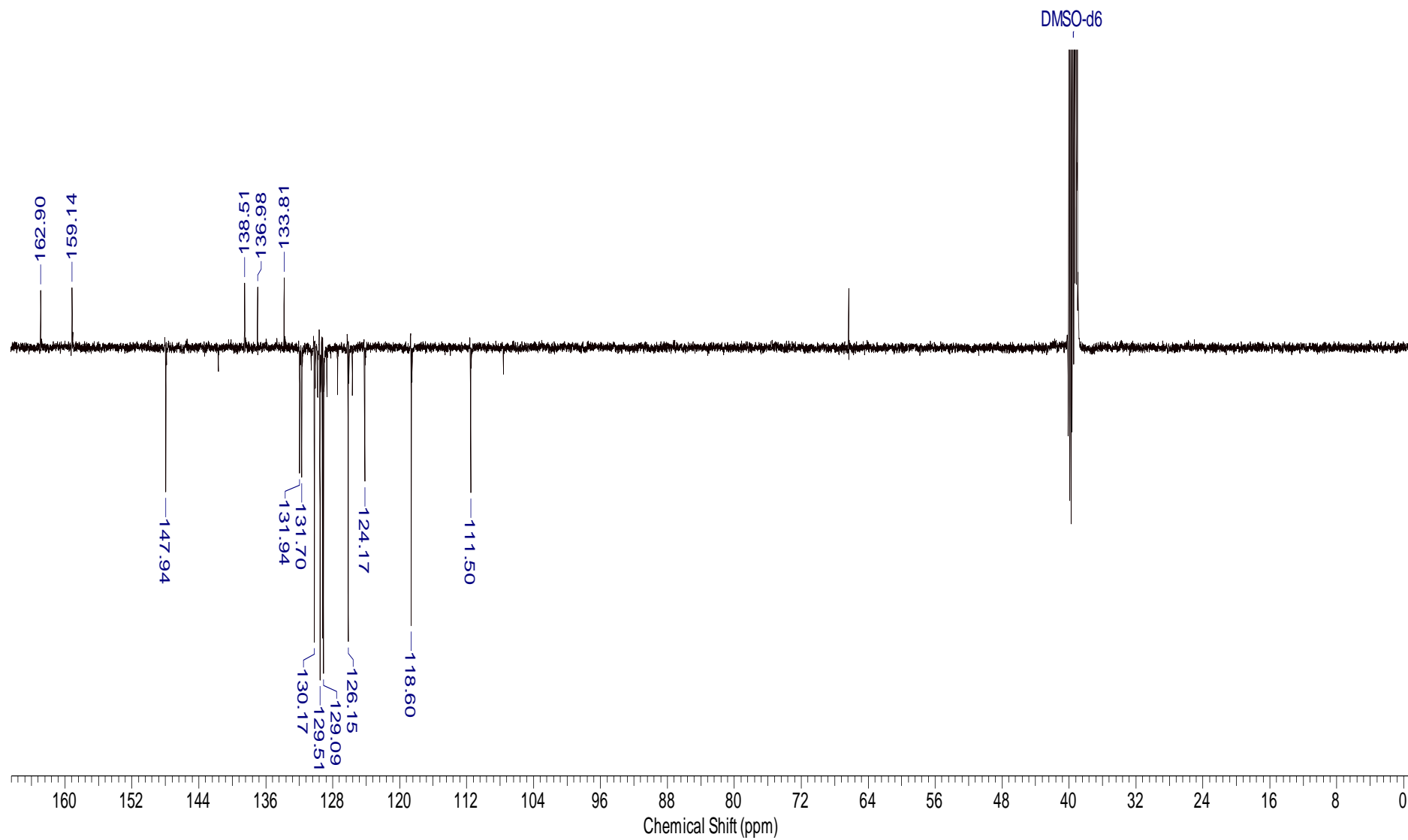
ii. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



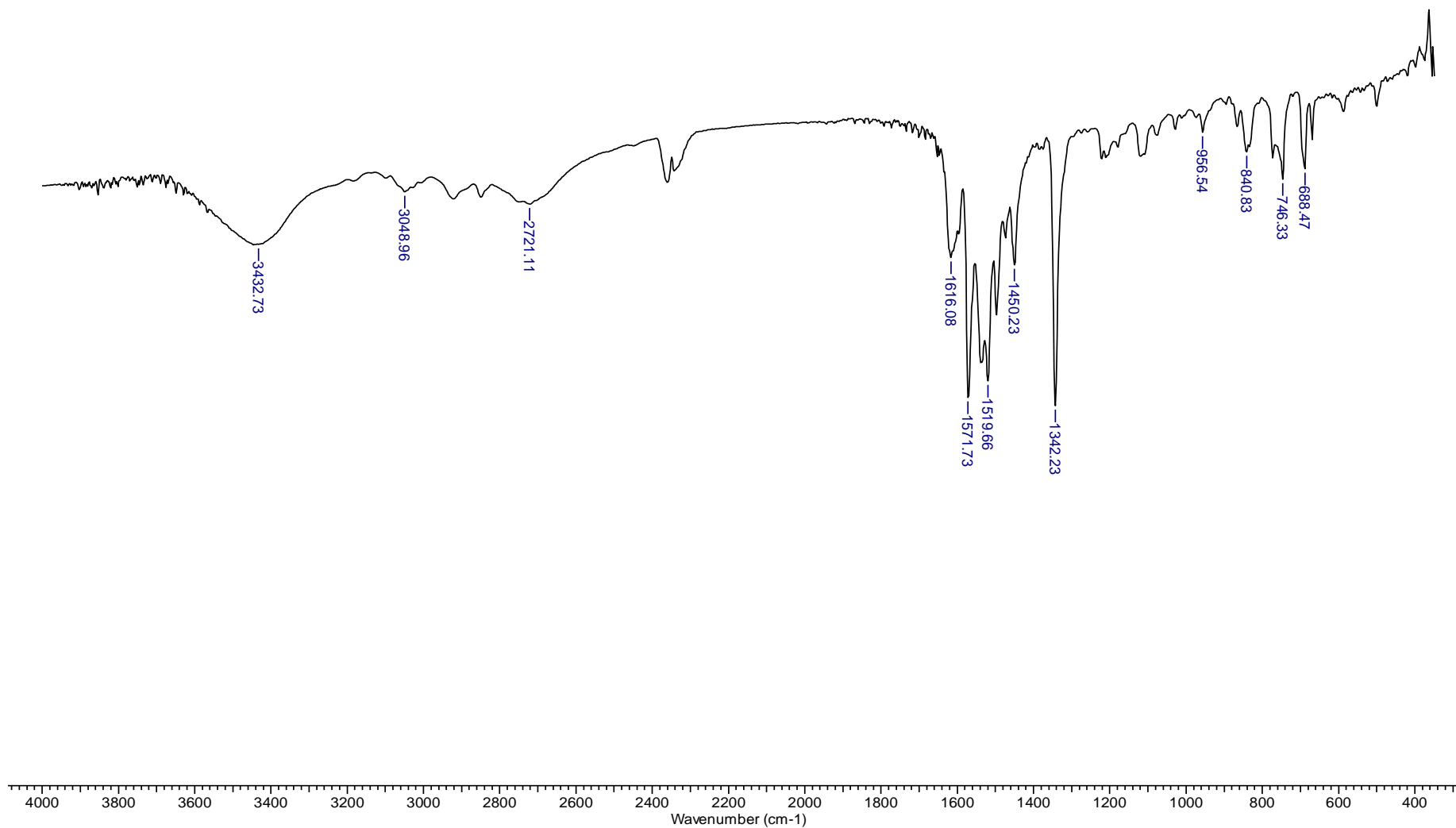
iii. Expansão do espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



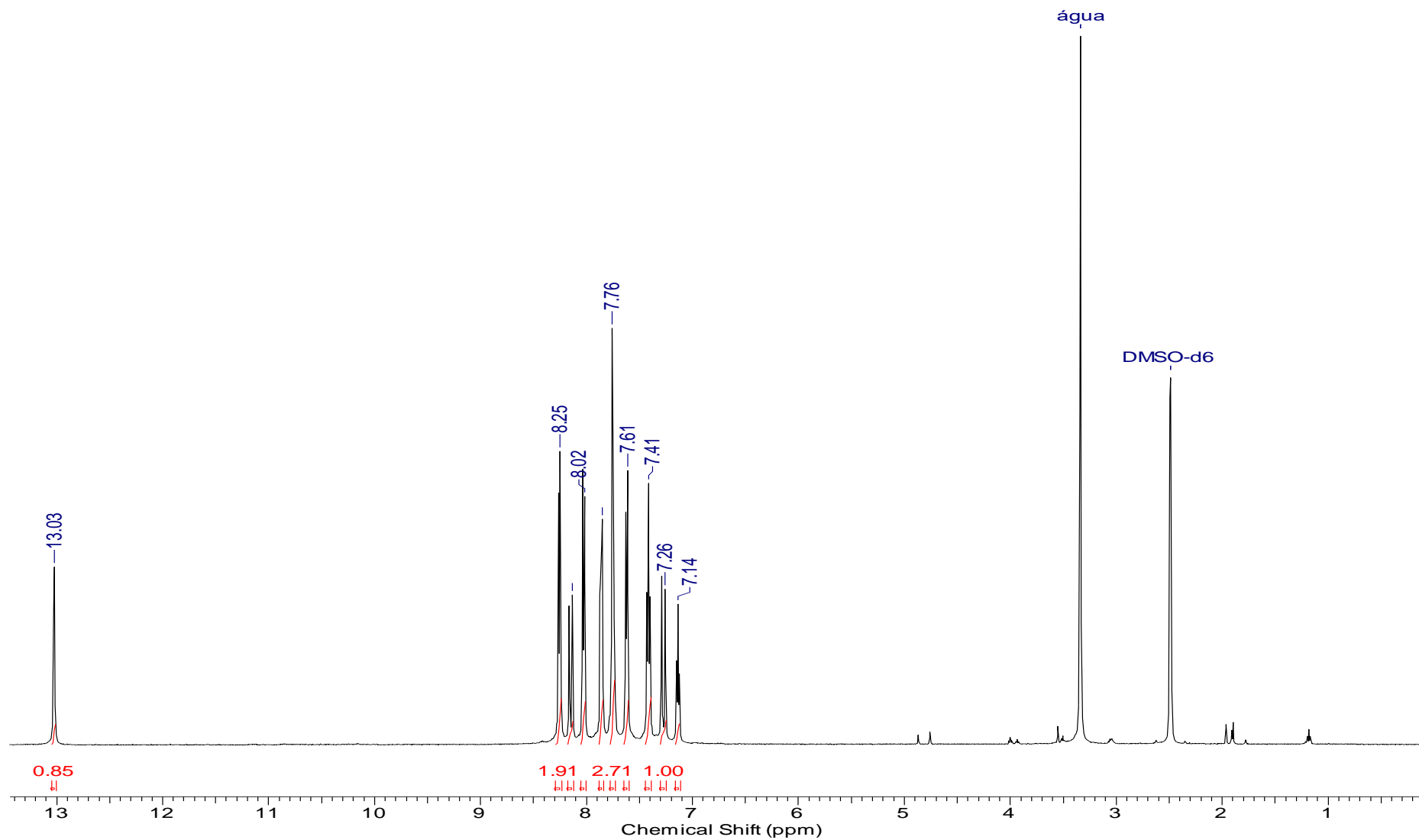
iv. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-estiril-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (23) obtido em DMSO-*d*₆



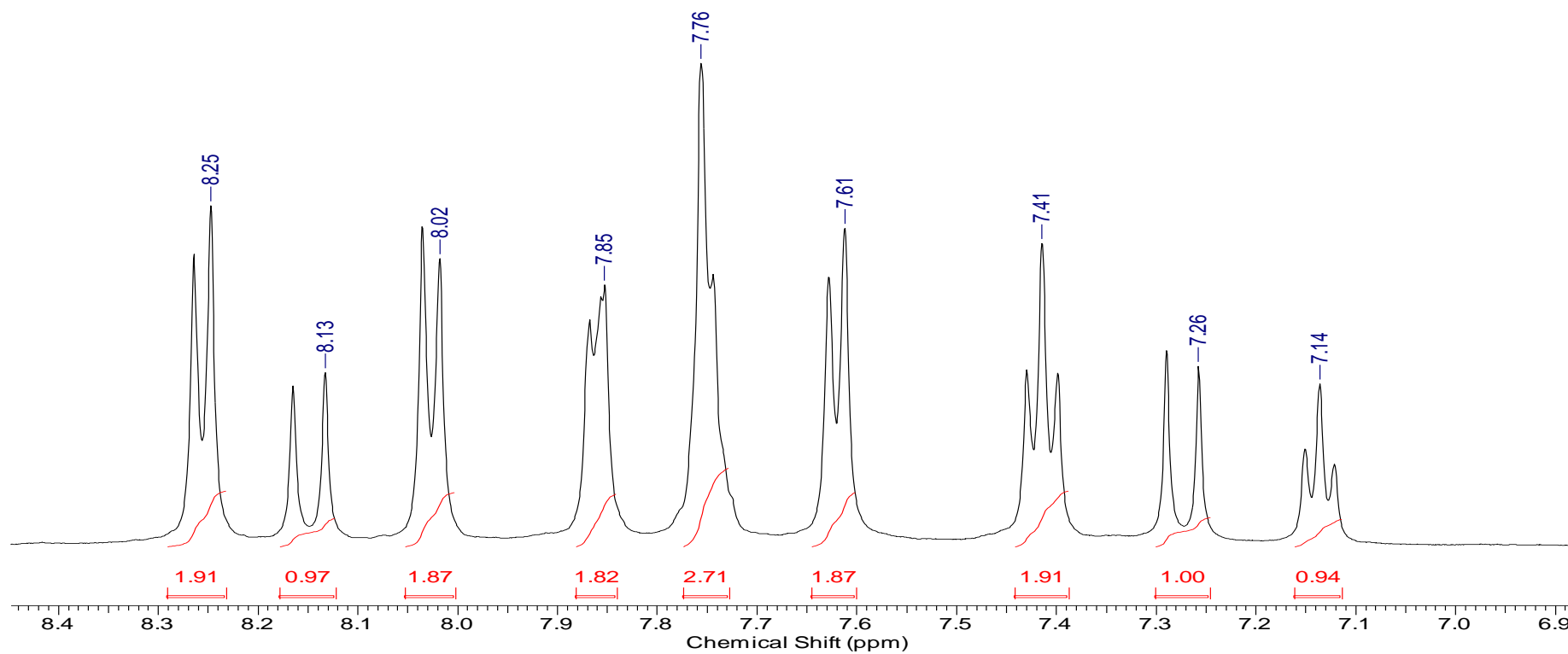
v. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em pastilha de KBr



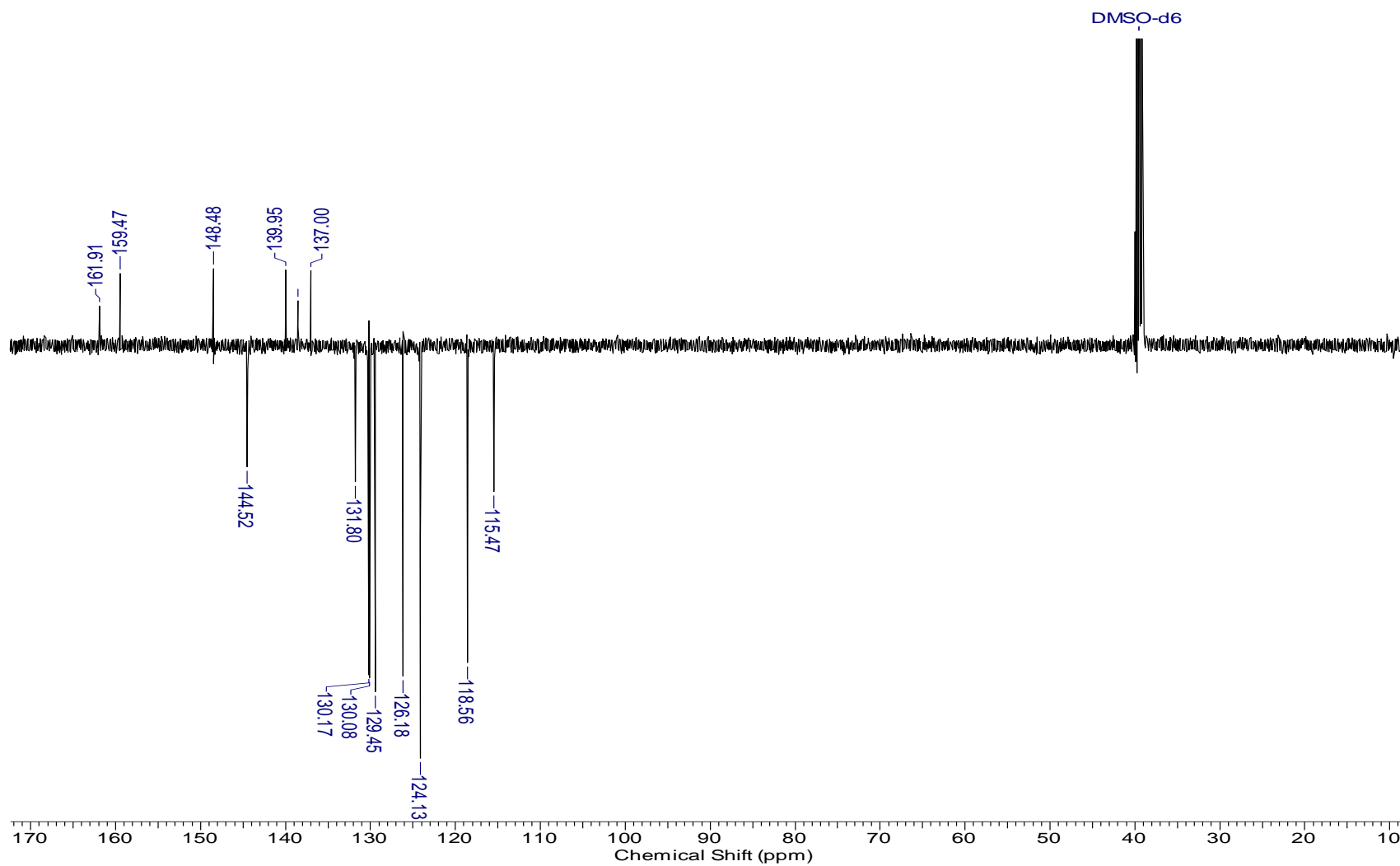
vi. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



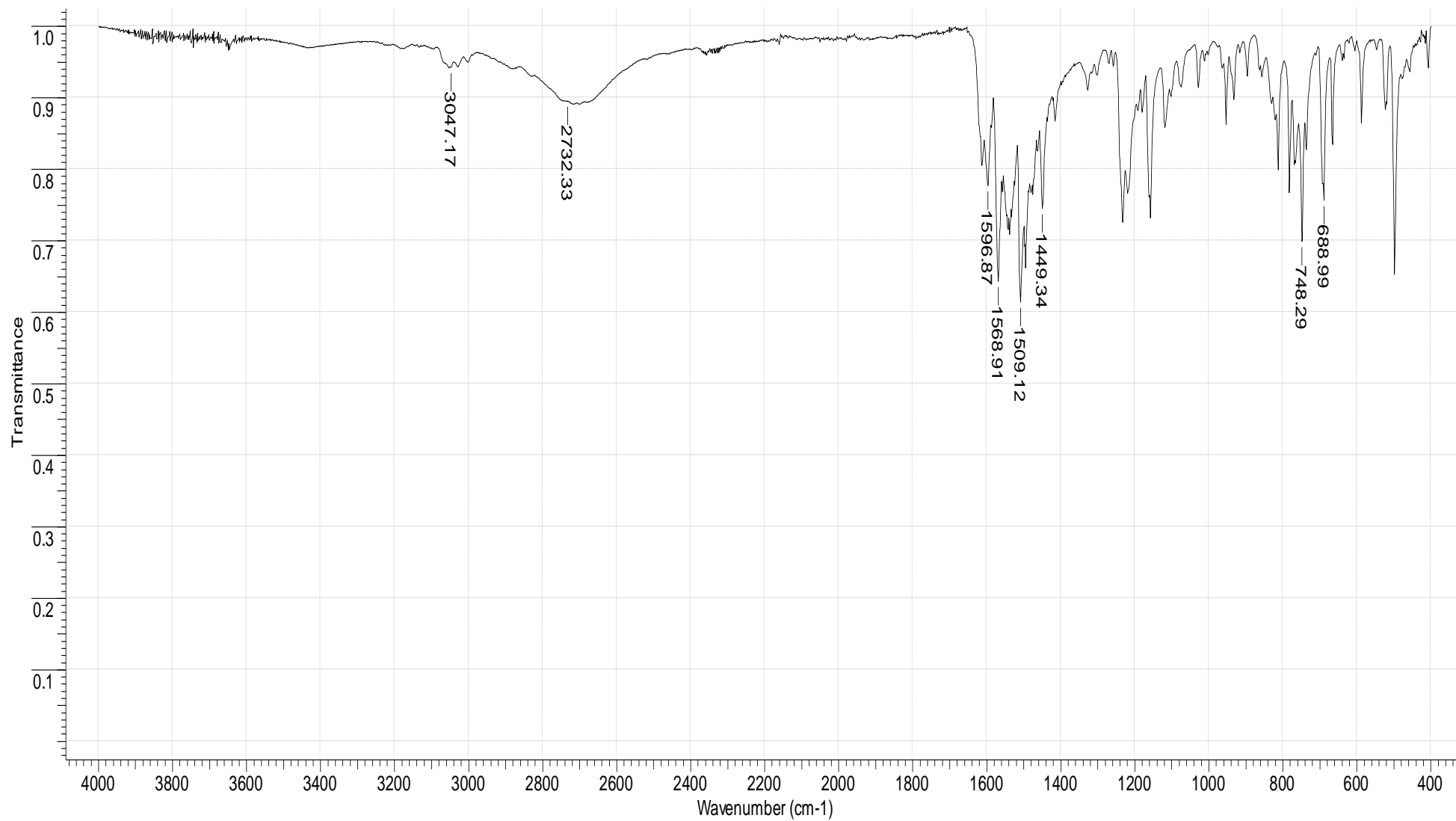
vii. Expansão do espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



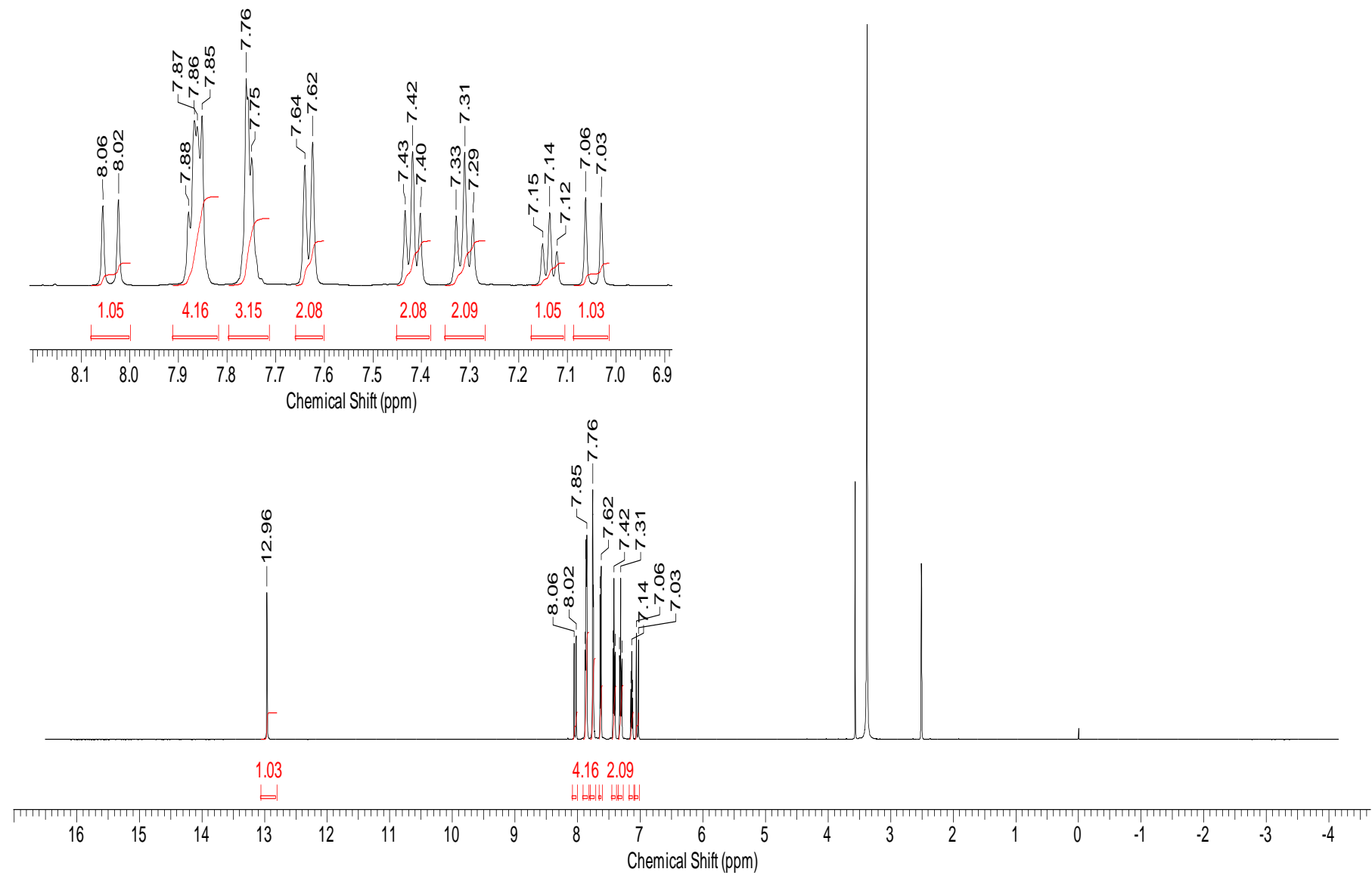
viii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-nitro-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (24) obtido em DMSO-*d*₆



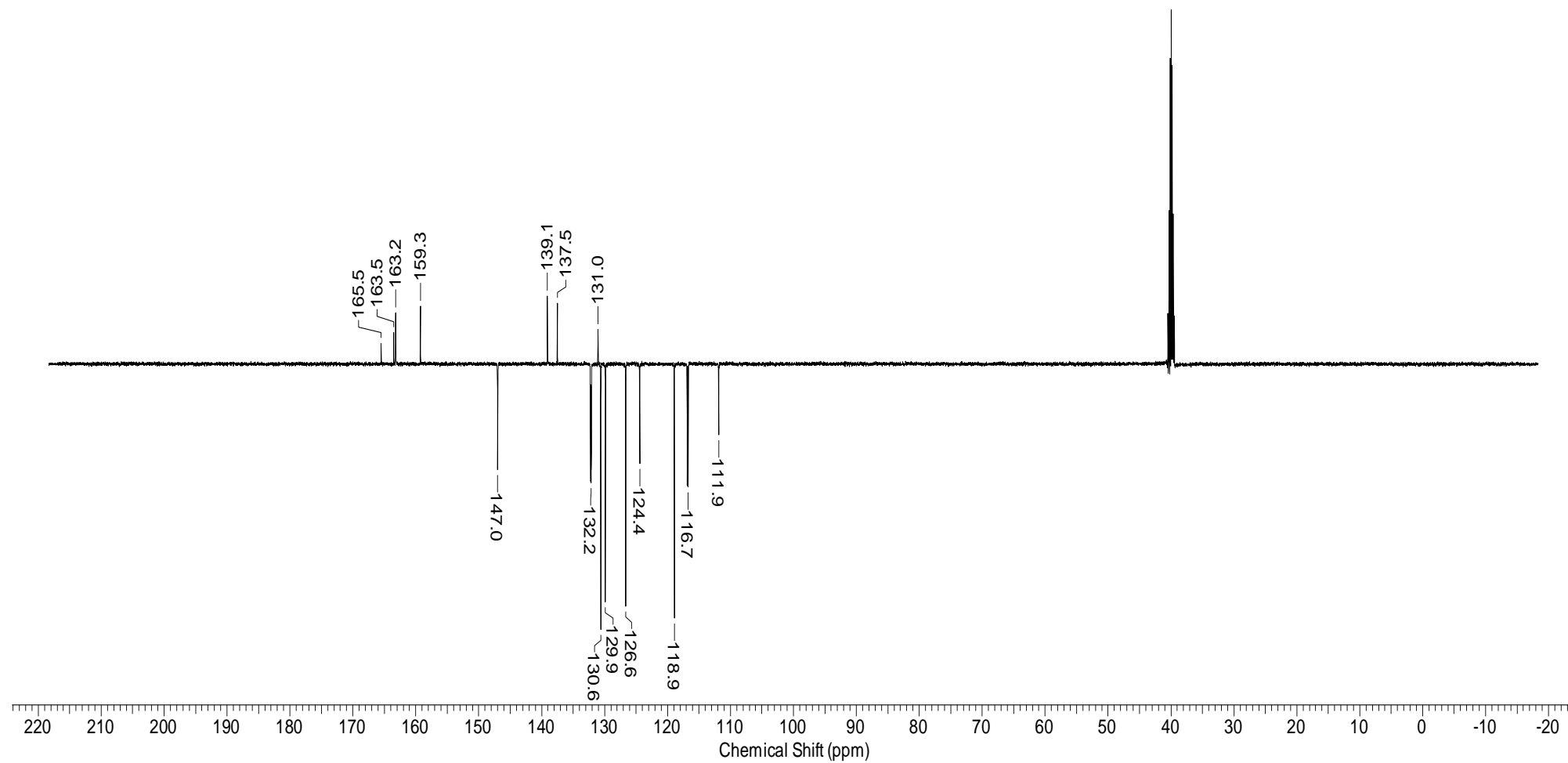
ix. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (25) obtido em pastilha de KBr



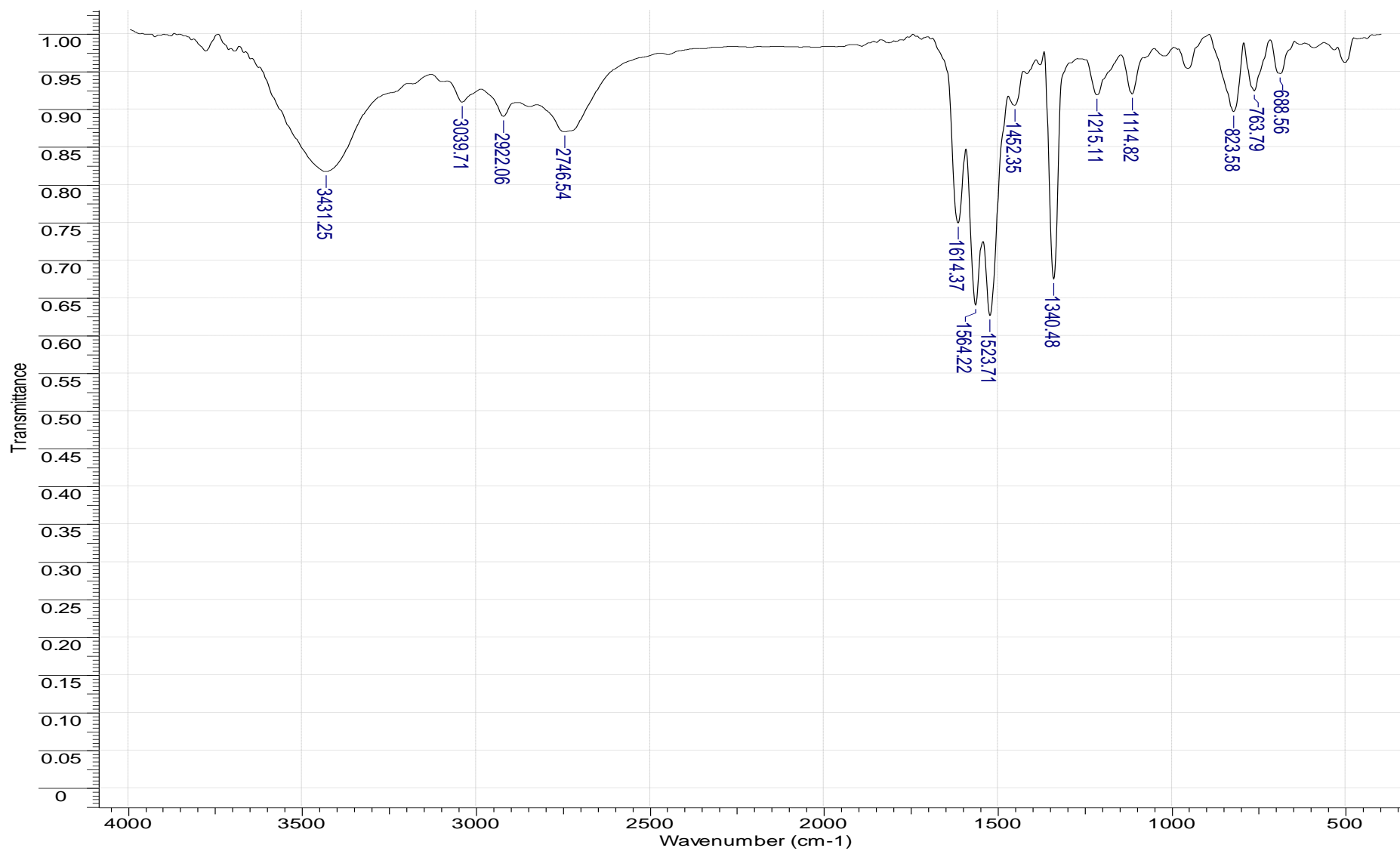
x. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (25) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



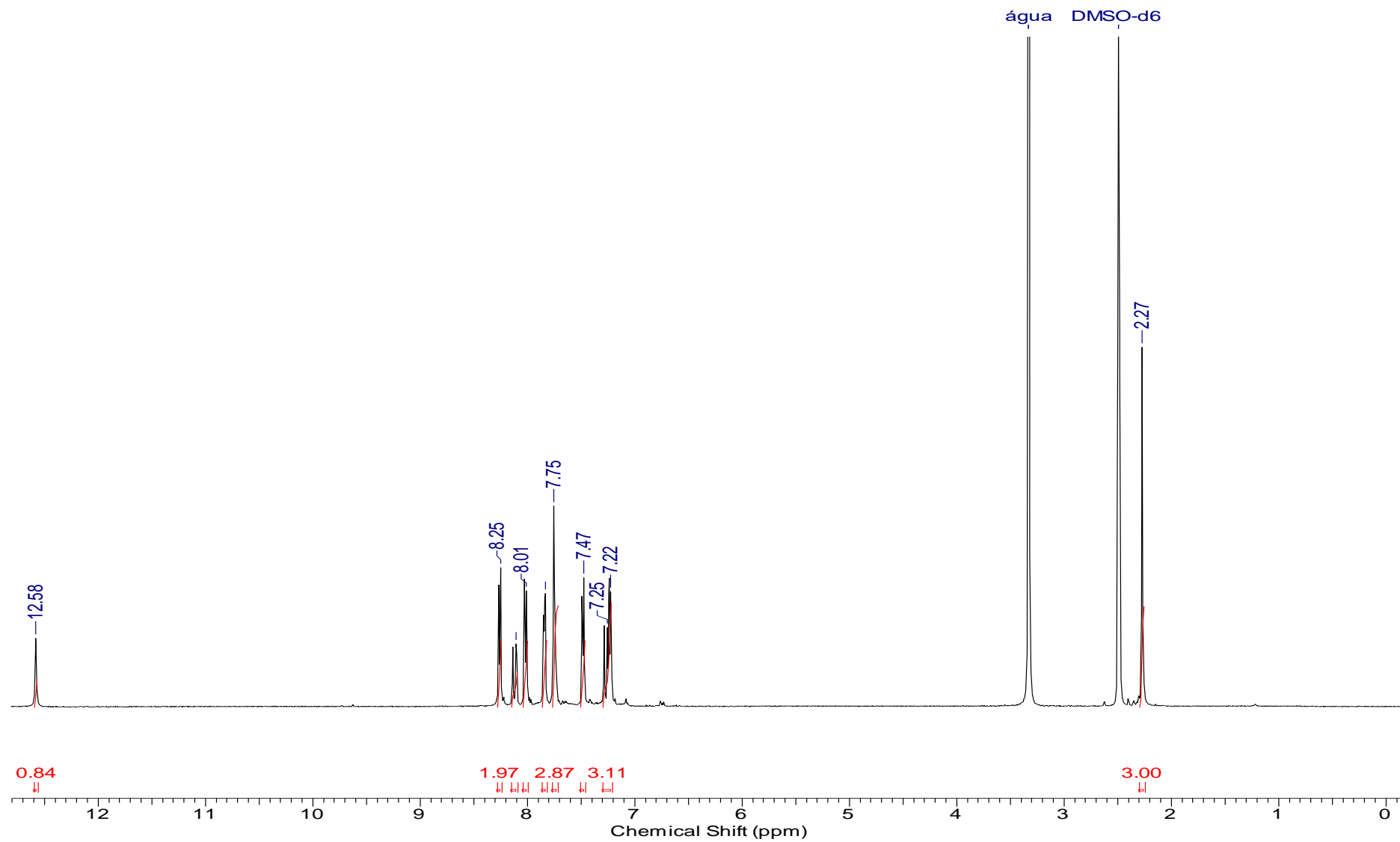
xi. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-esteril)-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (25) obtido em DMSO-*d*₆



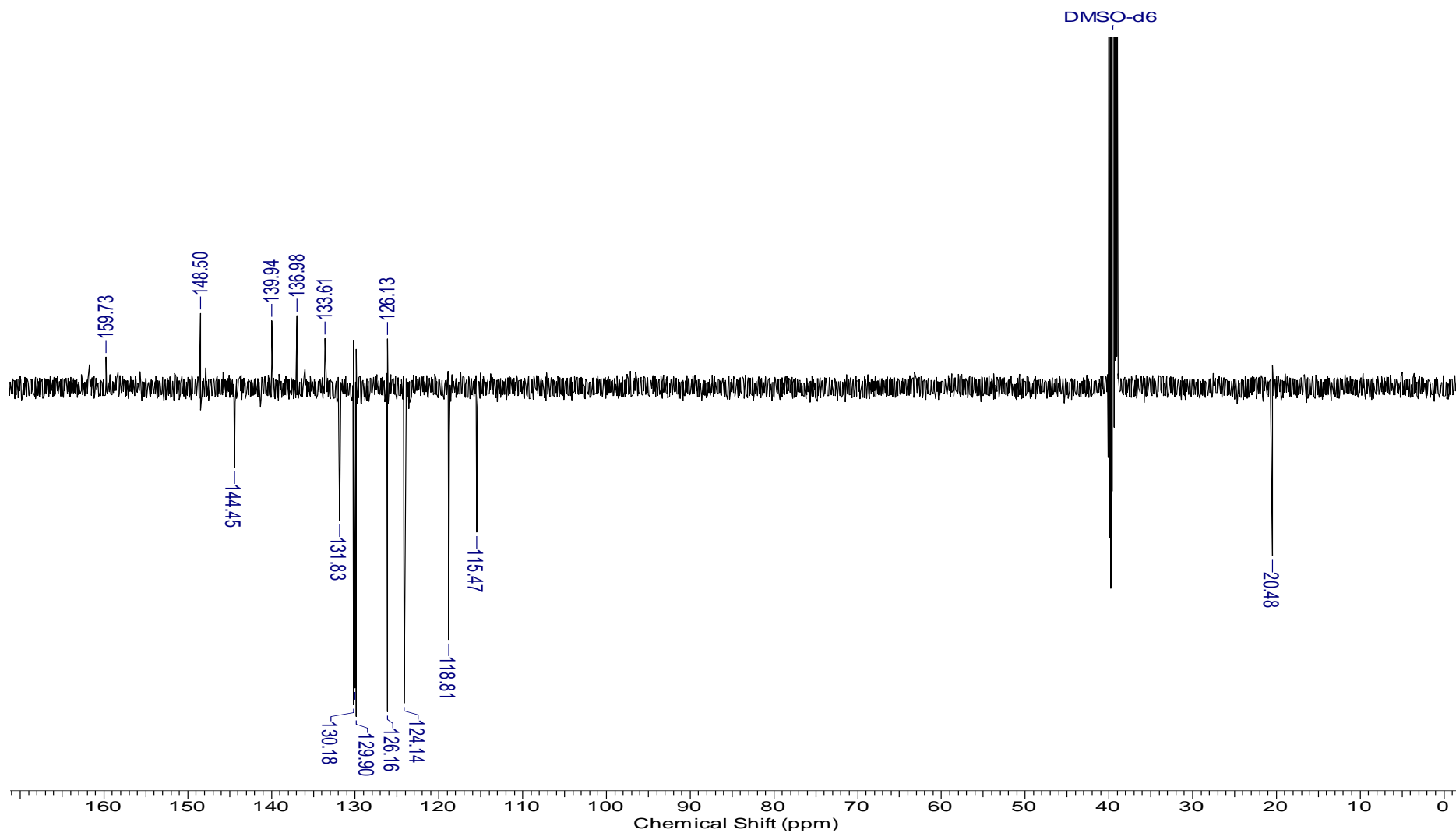
xii. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em pastilha de KBr



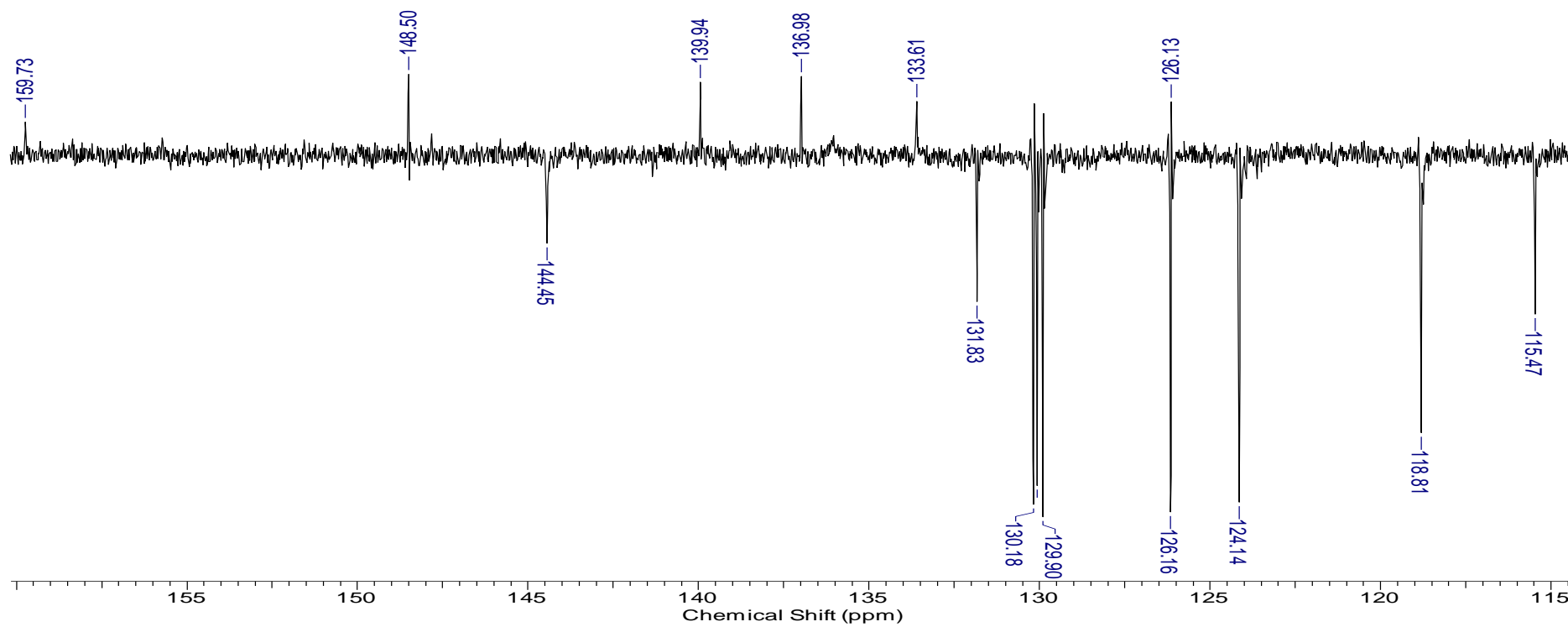
xiii. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



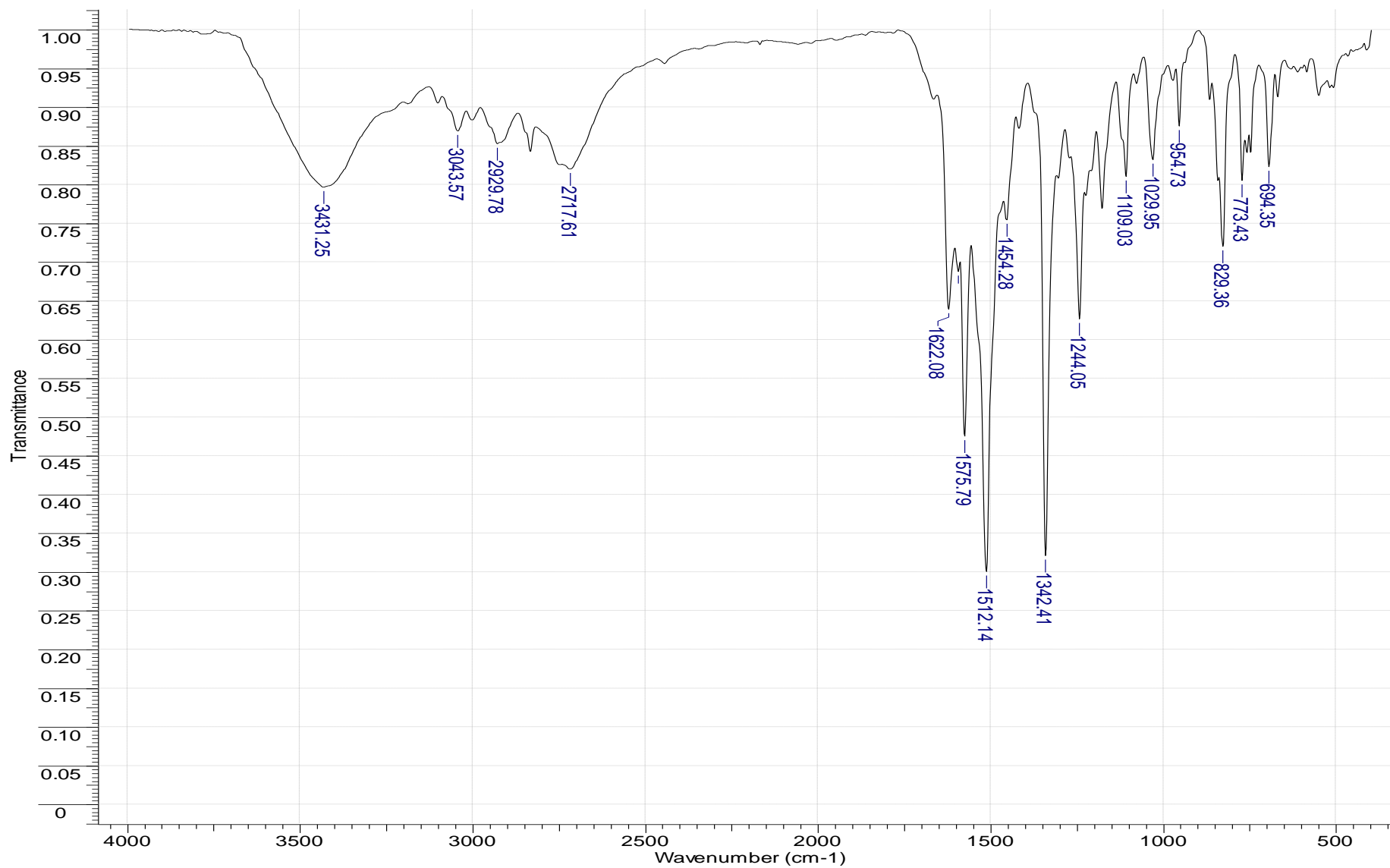
xiv. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em DMSO-*d*₆



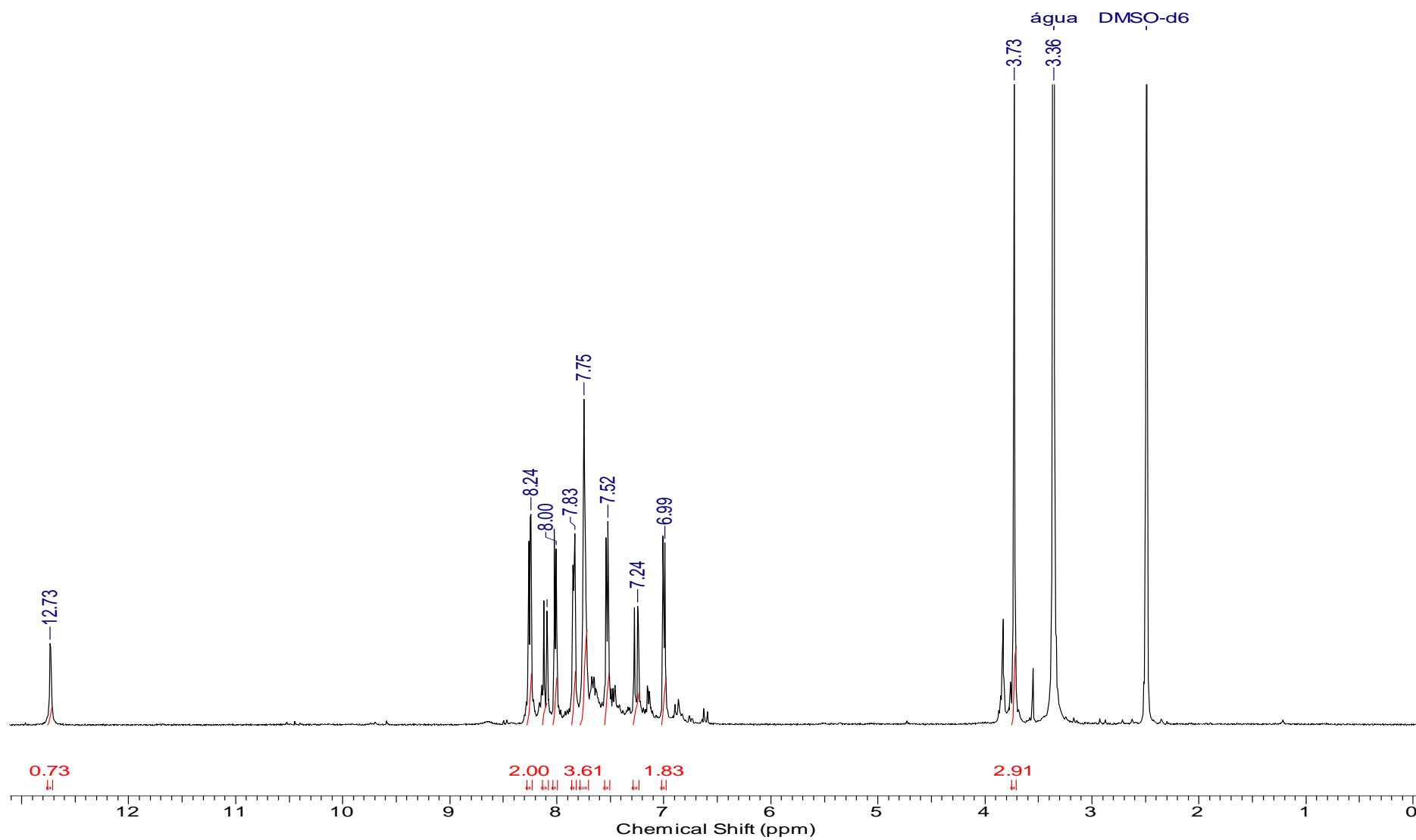
xv. Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metil-fenil)amina (26) obtido em DMSO-*d*₆



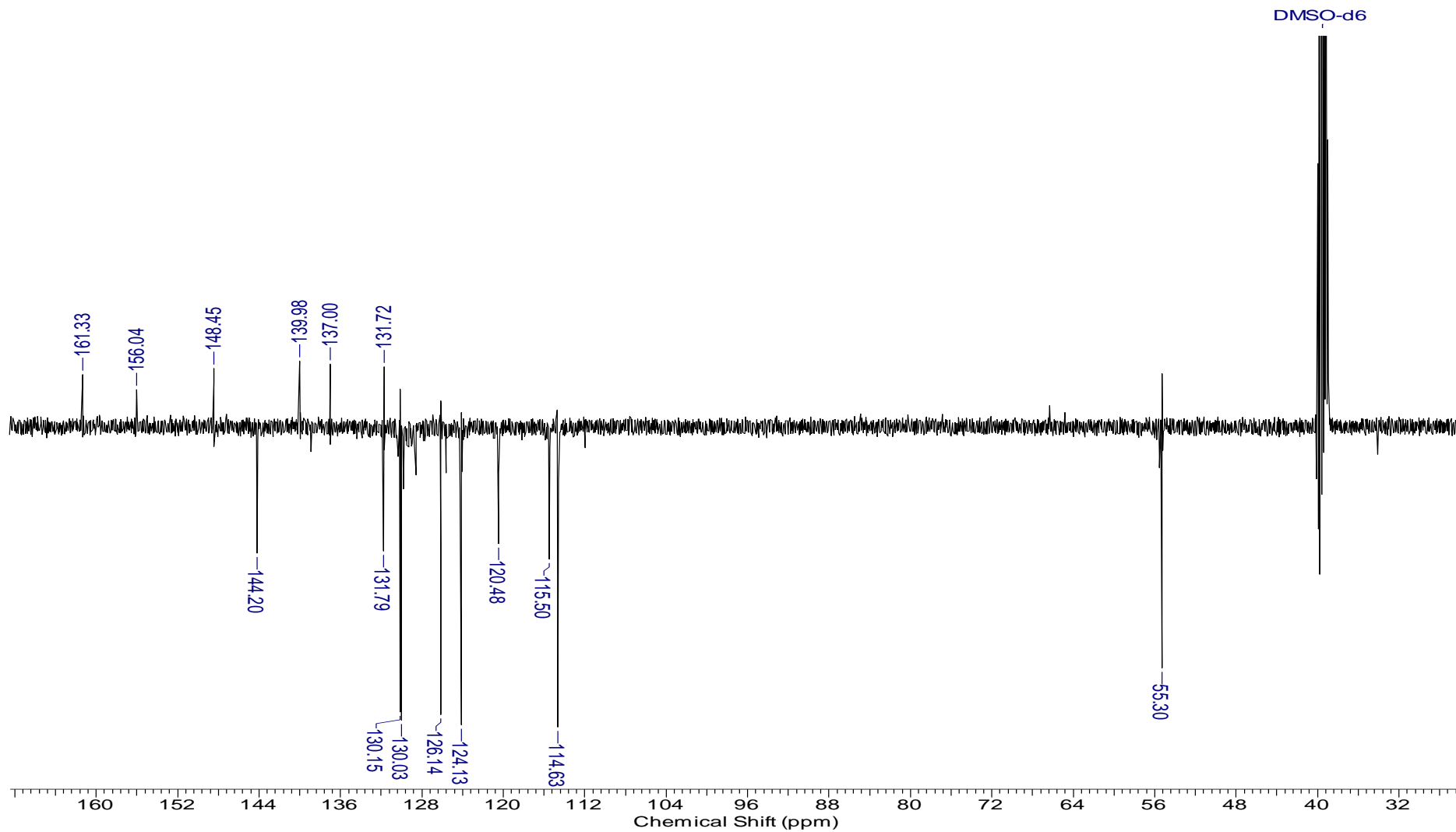
xvi. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em pastilha de KBr



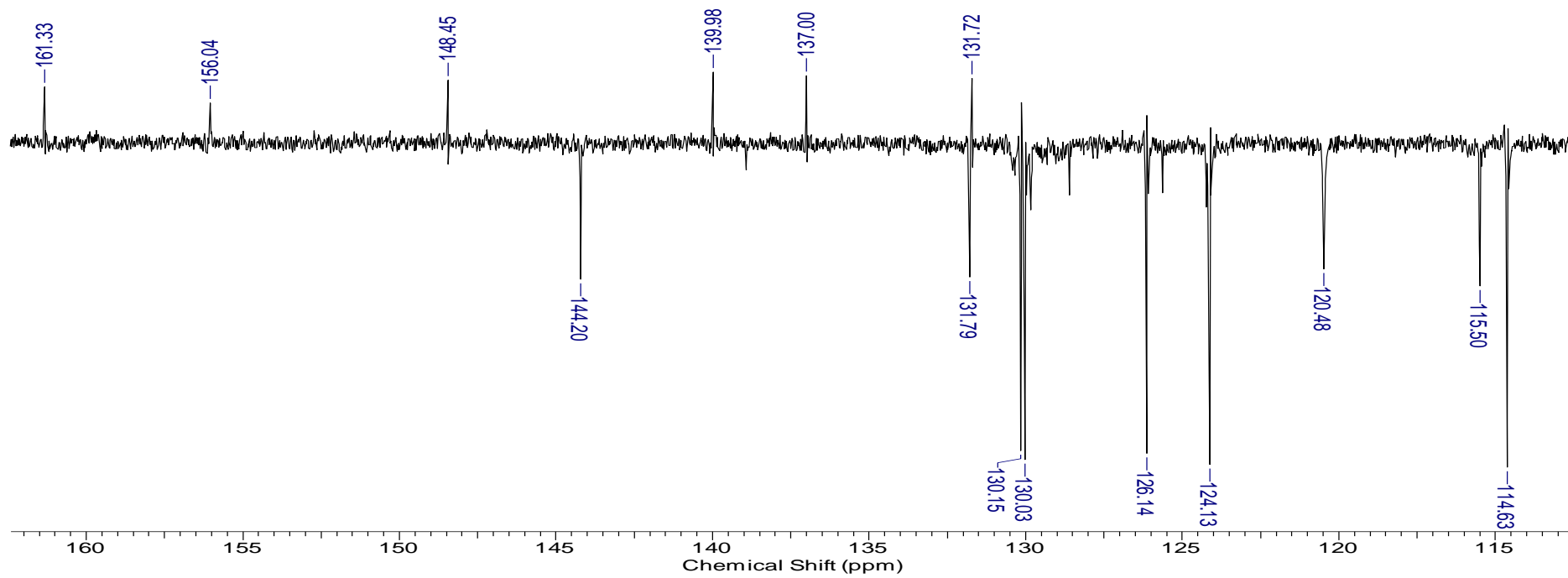
xvii. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



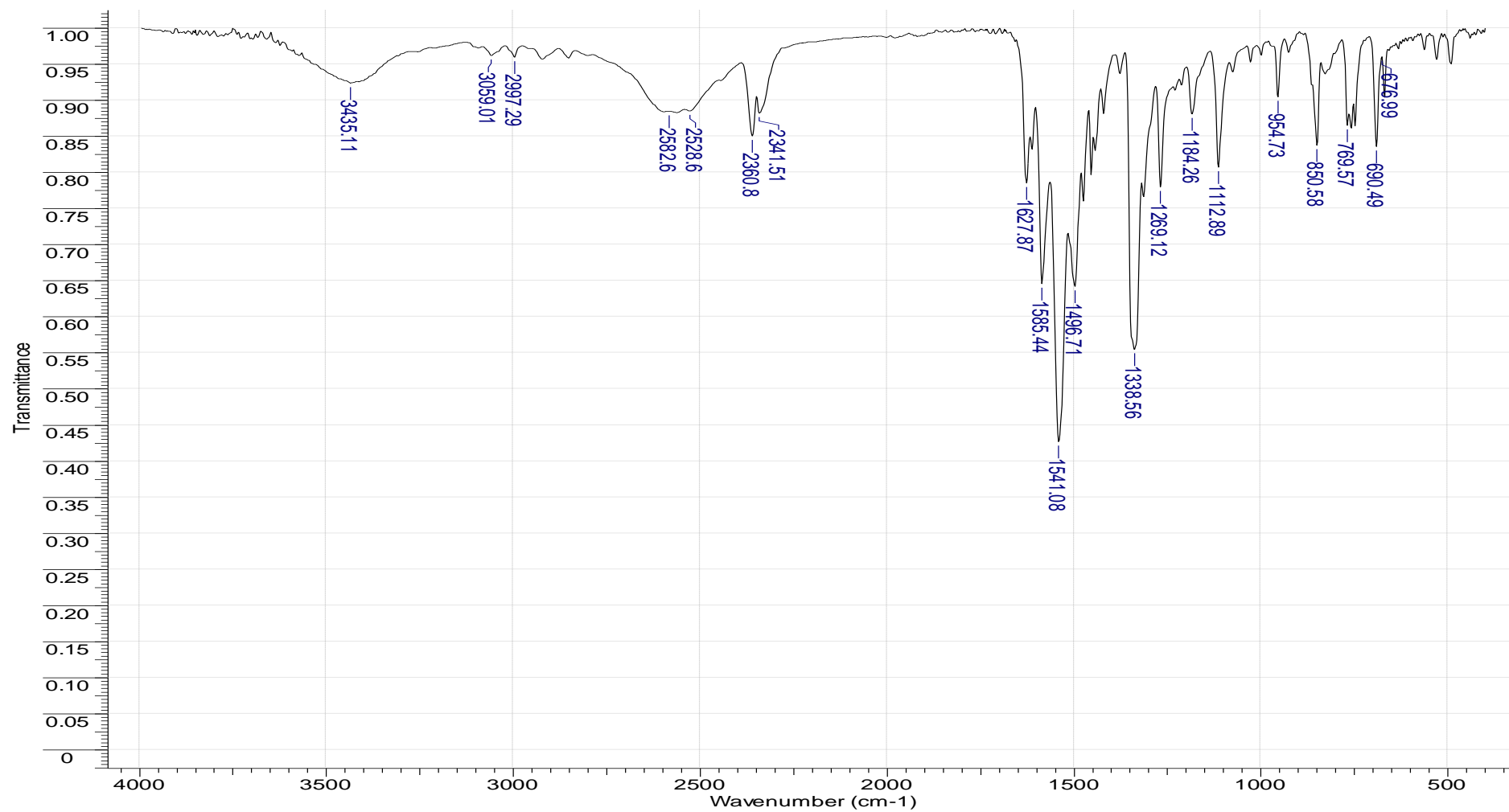
xviii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em DMSO- d_6



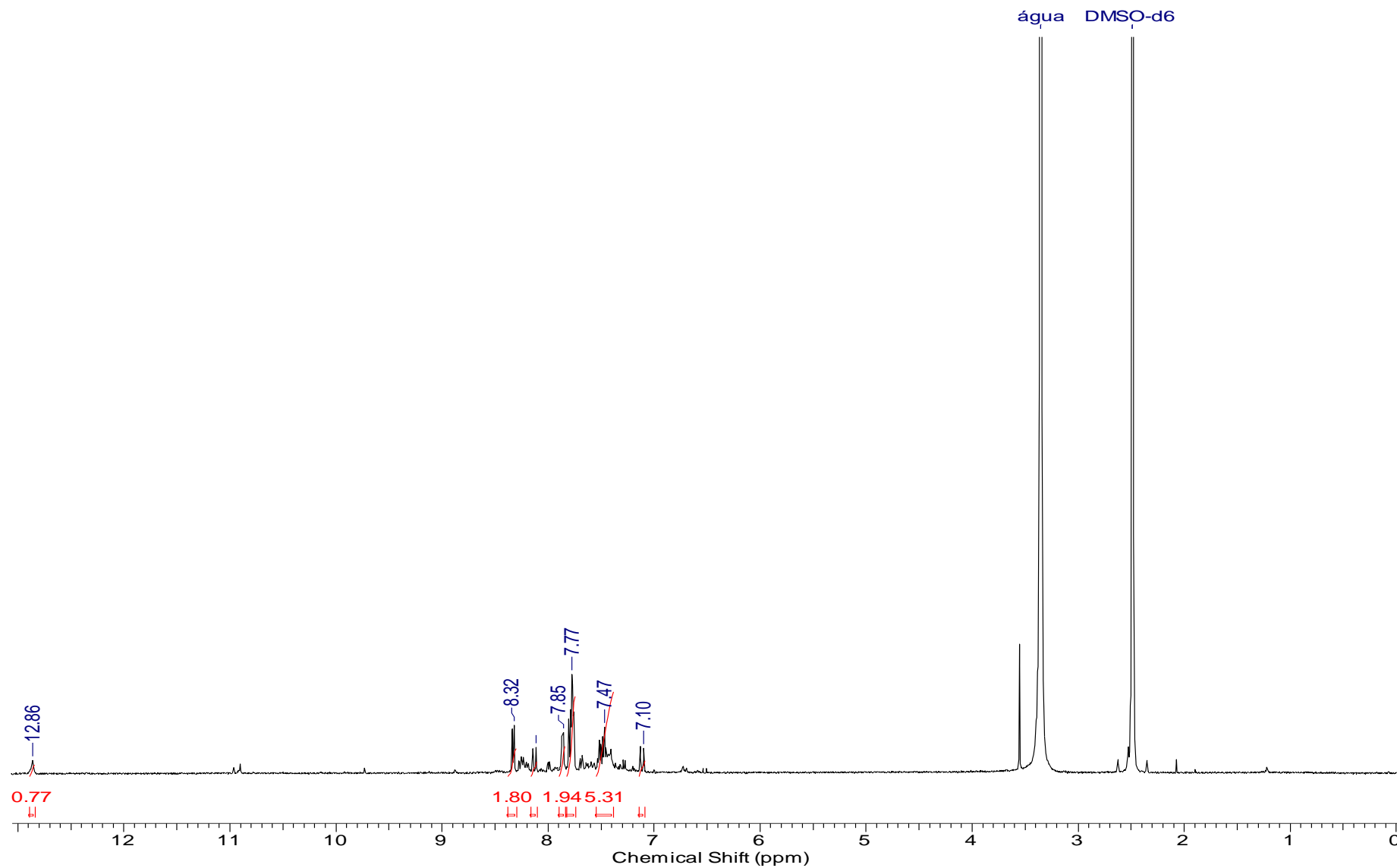
xix. Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-esteril-1,3,4-tiadiazólio-2-(4-metoxi-fenil)amina (27) obtido em DMSO- d_6



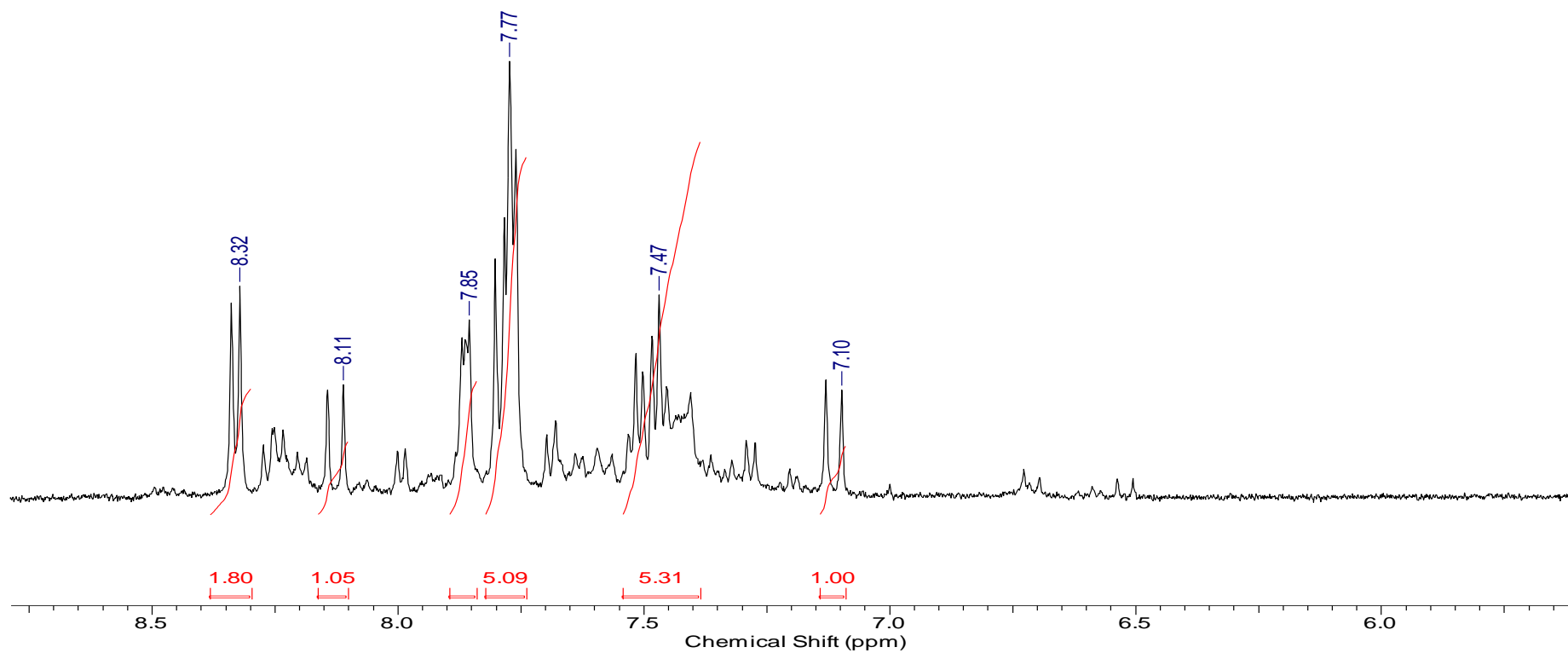
xx. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (28) obtido em pastilha de KBr



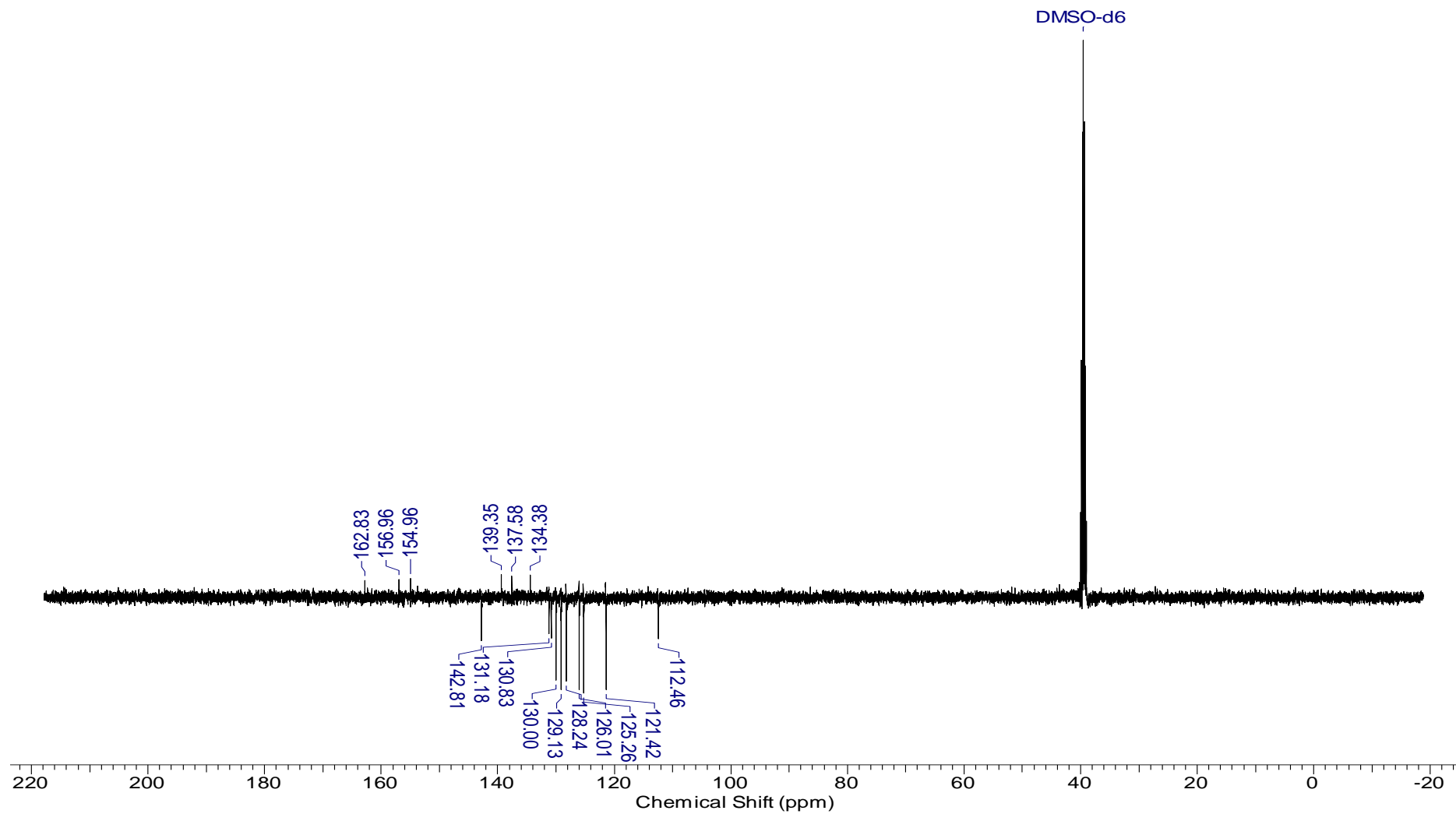
xxi. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (28) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



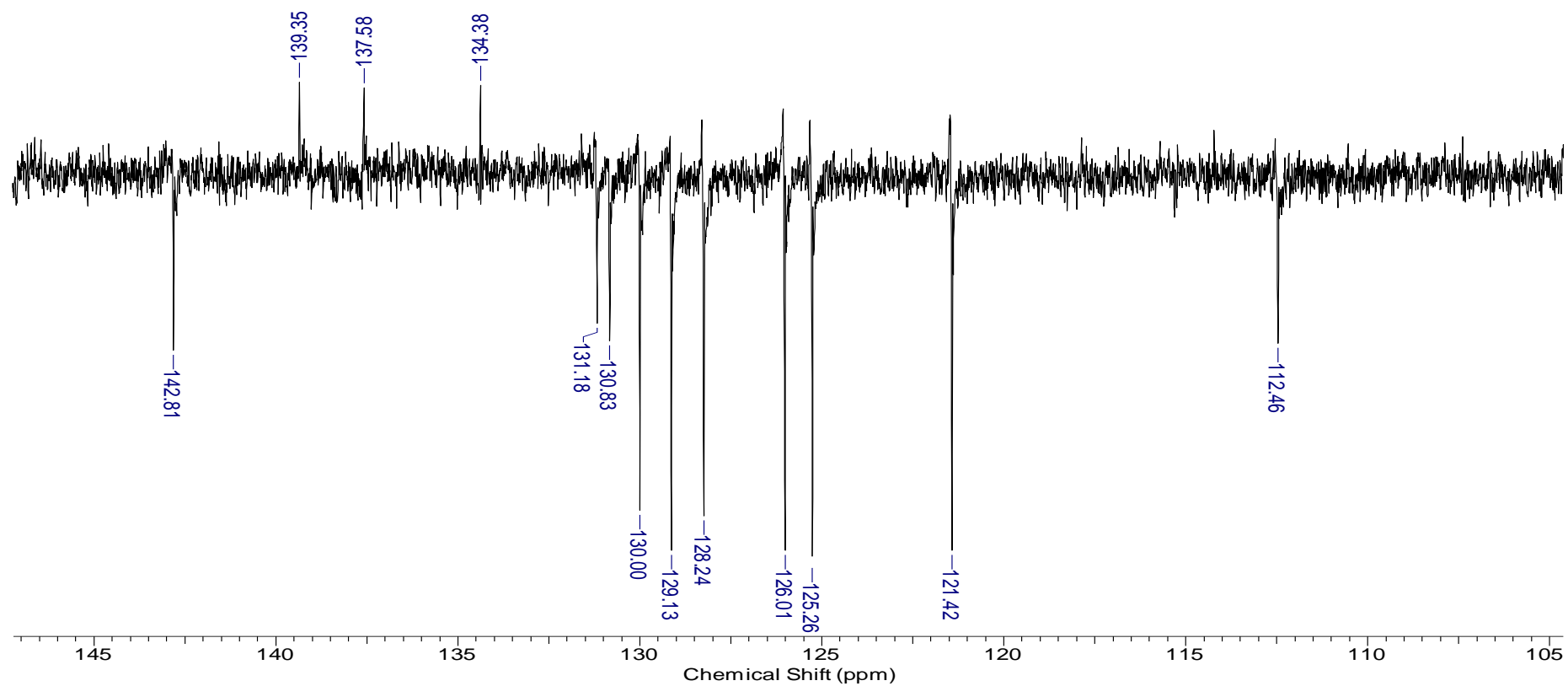
xxii. Expansão do espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (28) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



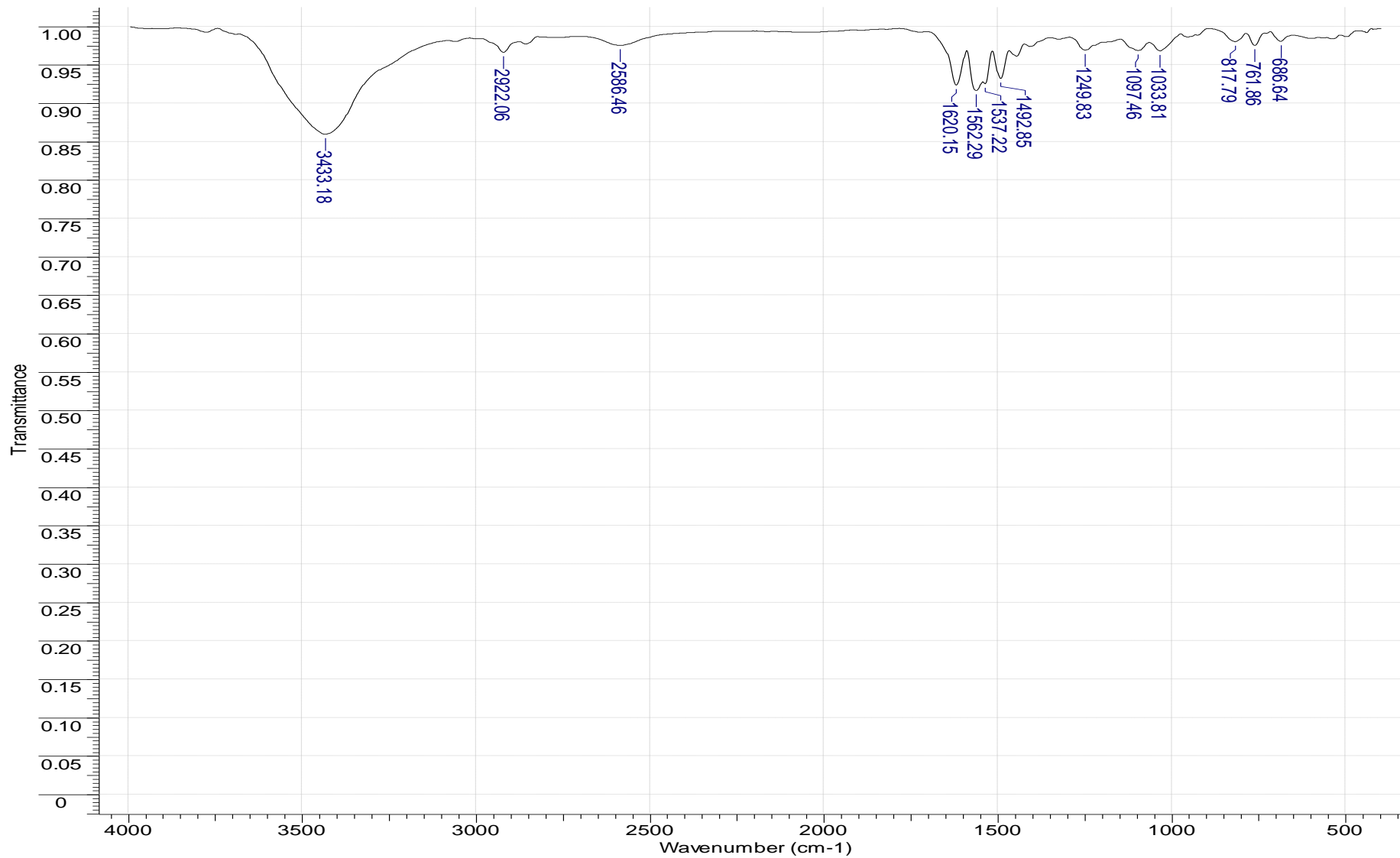
xxiii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (28) obtido em DMSO-*d*₆



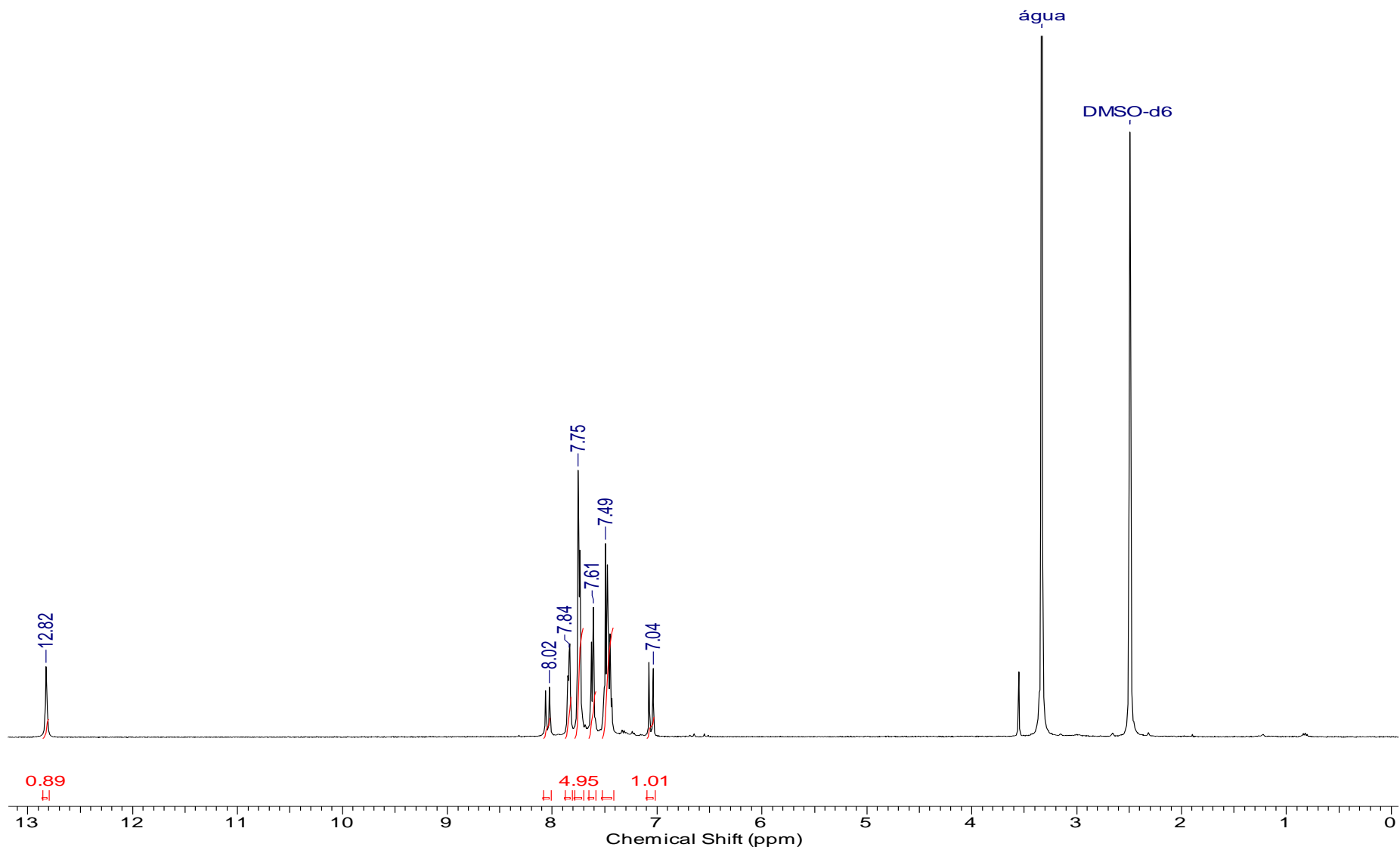
xxiv. Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (28) obtido em DMSO-*d*₆



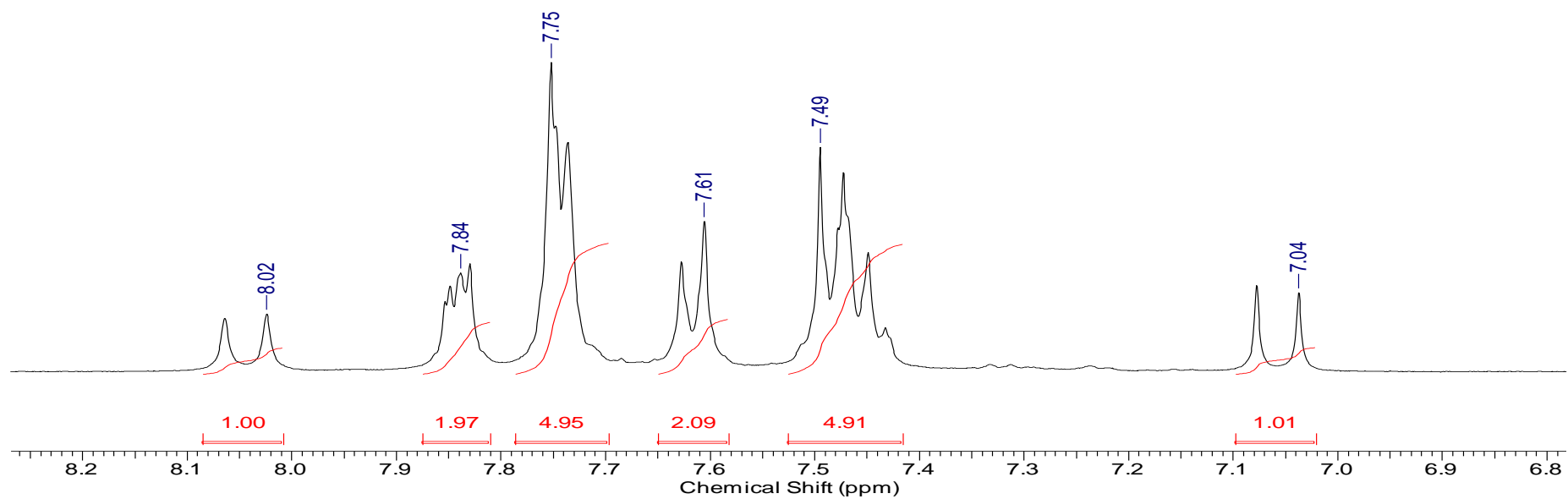
xxv. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-cloro-fenil)amina (29) obtido em pastilha de KBr



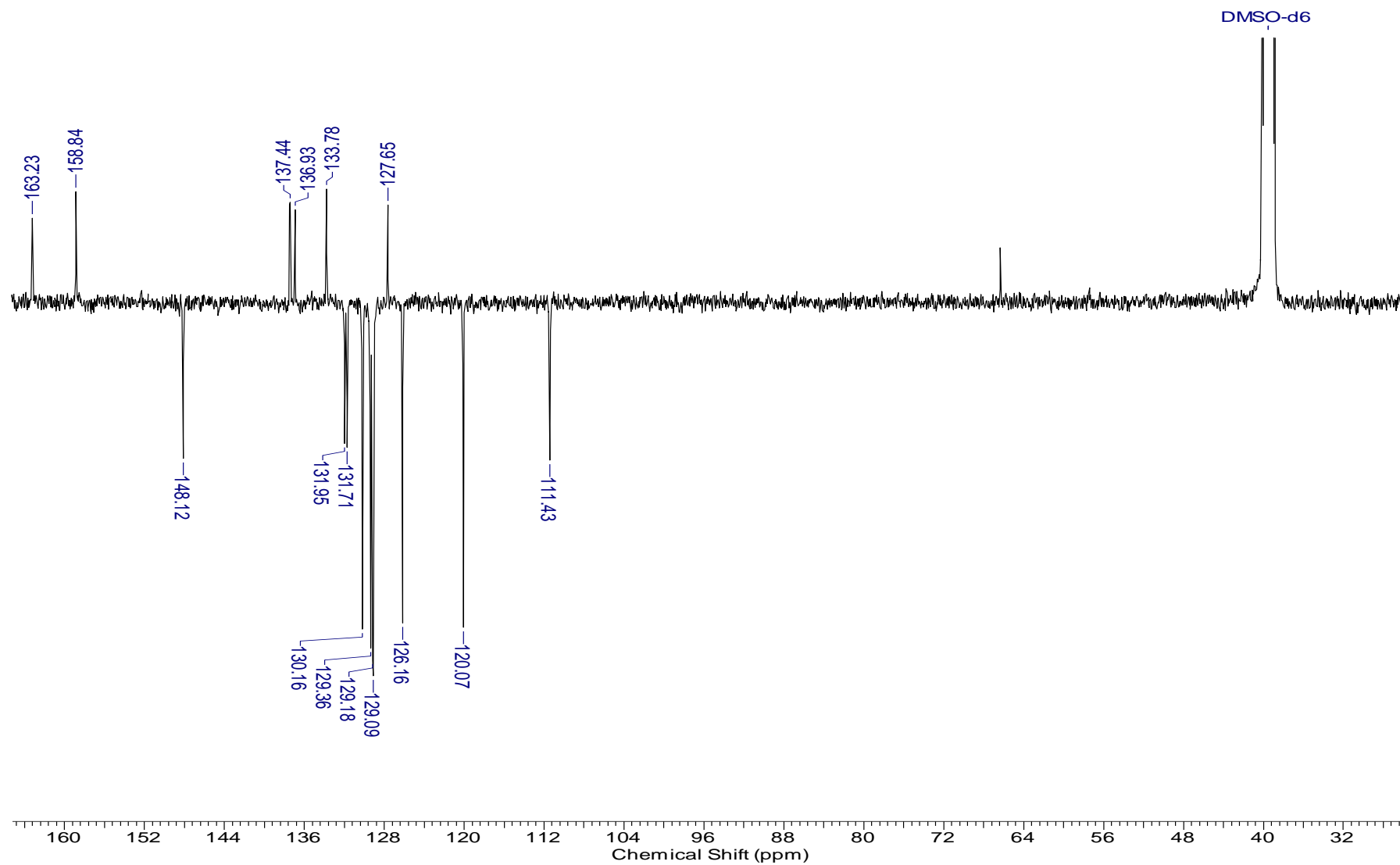
xxvi. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



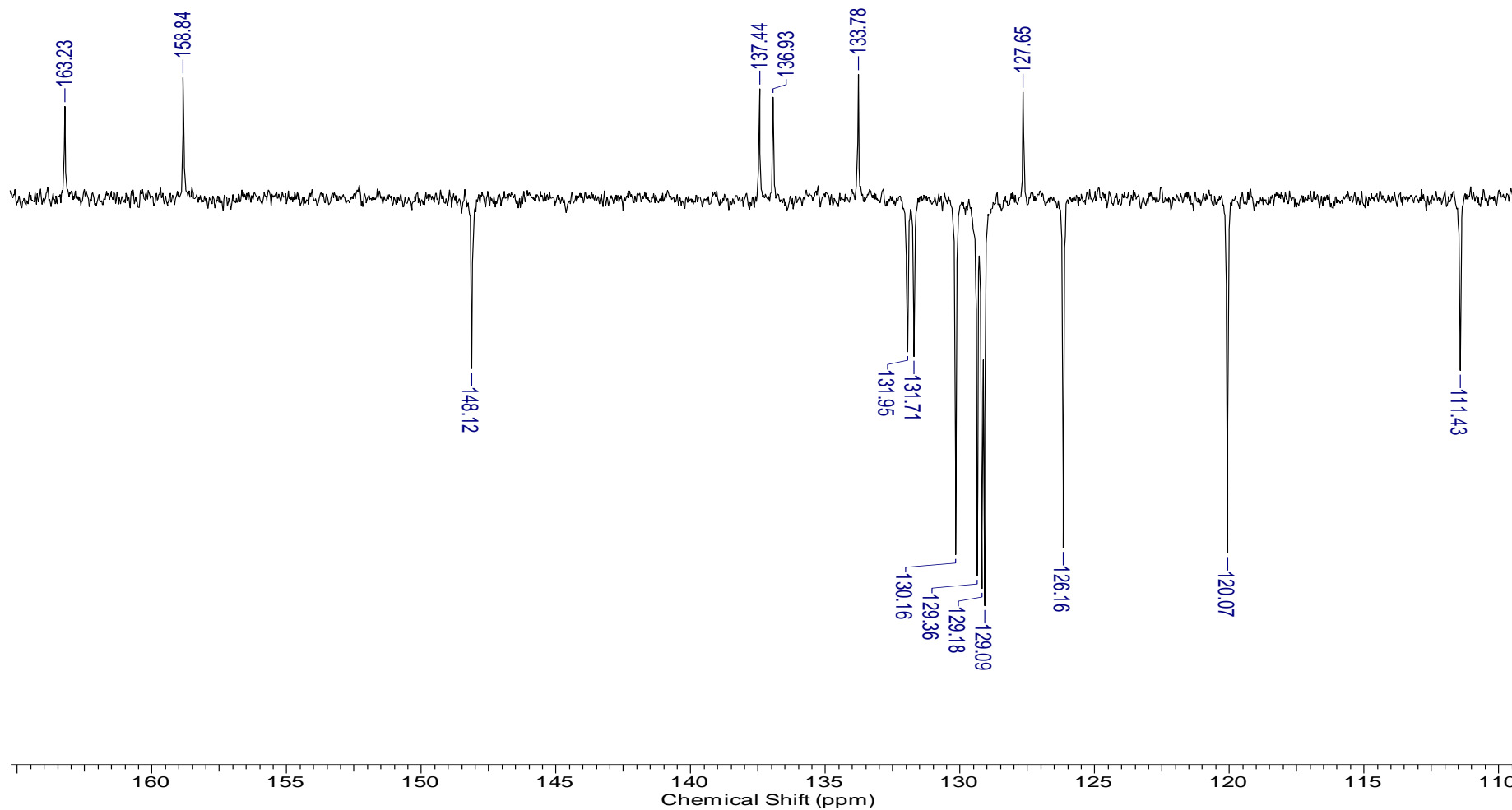
xxvii. Expansão do espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



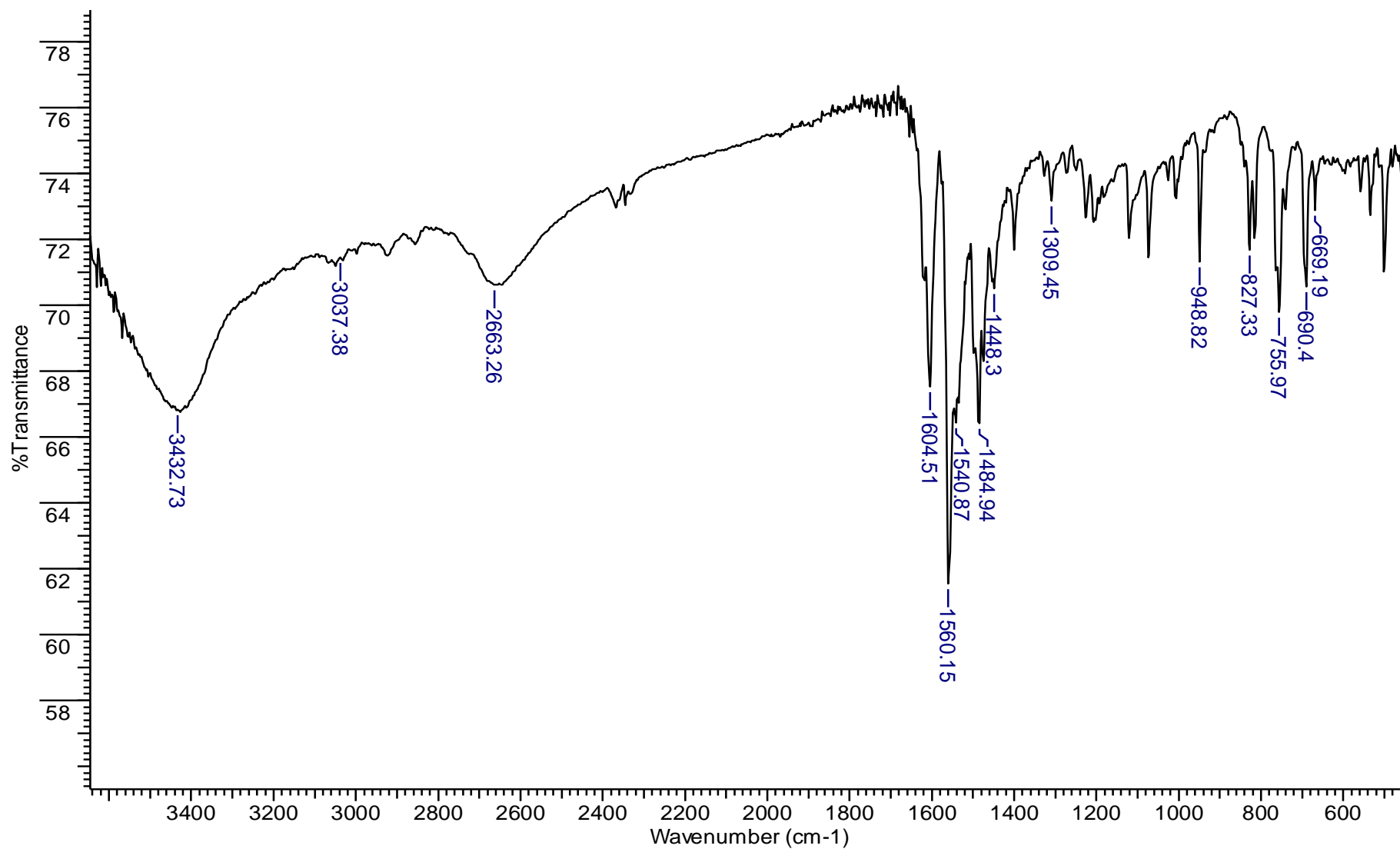
xxviii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5--1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-cloro-fenil)amina (29) obtido em DMSO-*d*₆



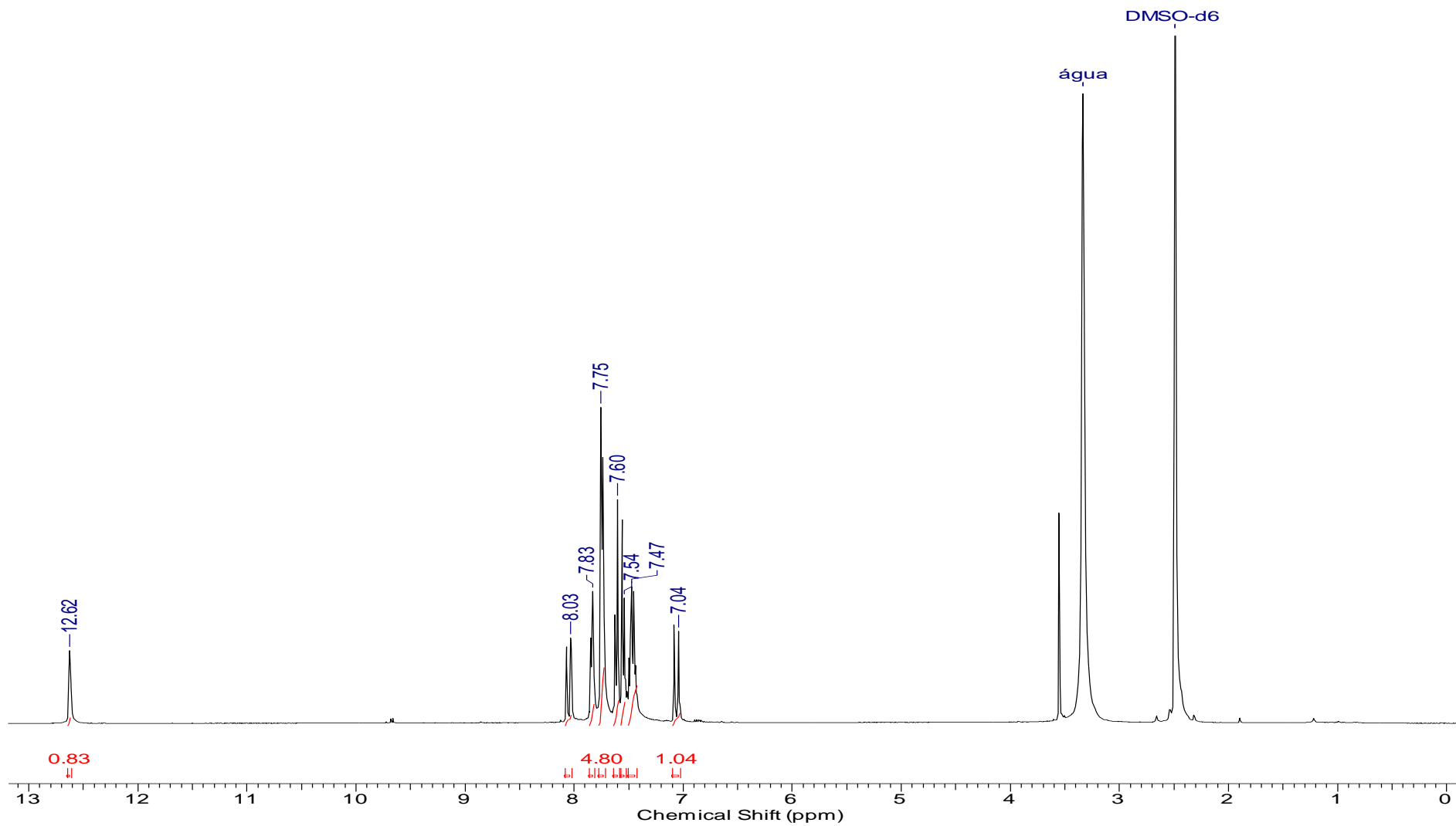
xxix. Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-cloro-fenil)amina (29) obtido em DMSO-*d*₆



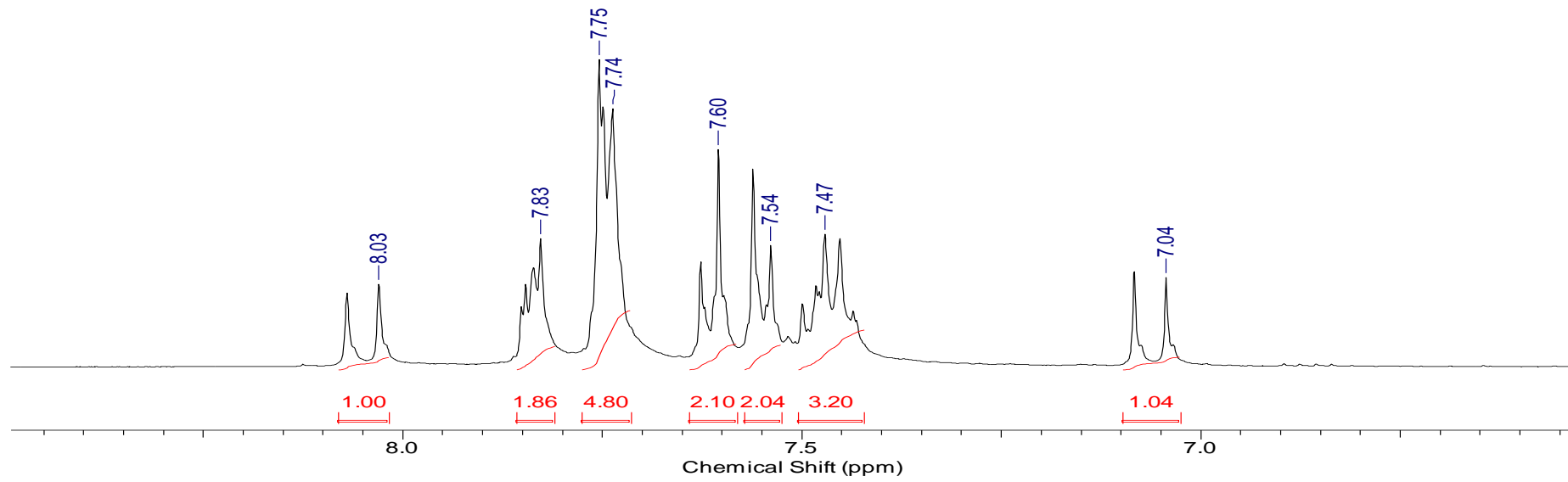
xxx. Espectro de IV do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-bromo-fenil)amina (30) obtido em pastilha de KBr



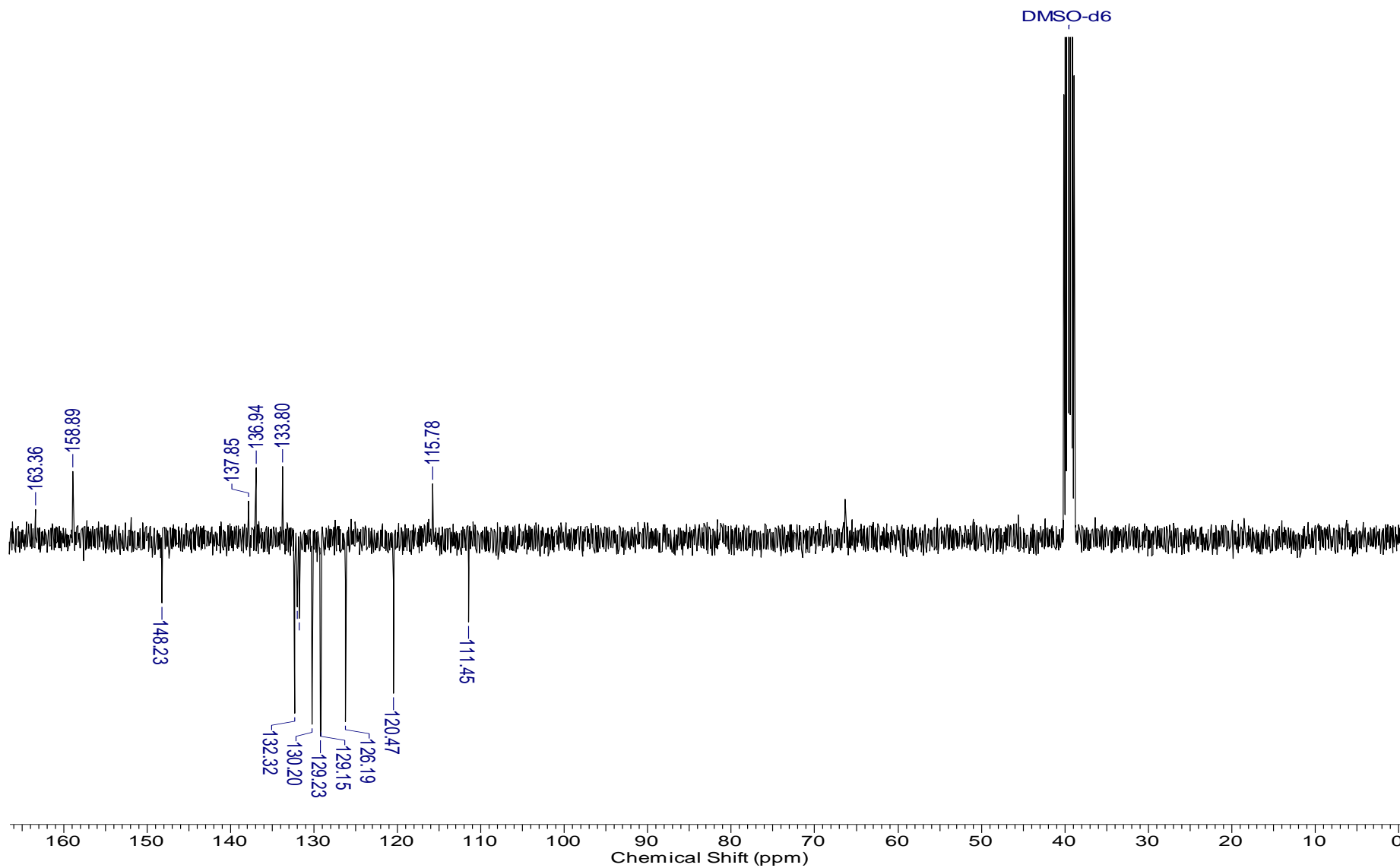
xxvi. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



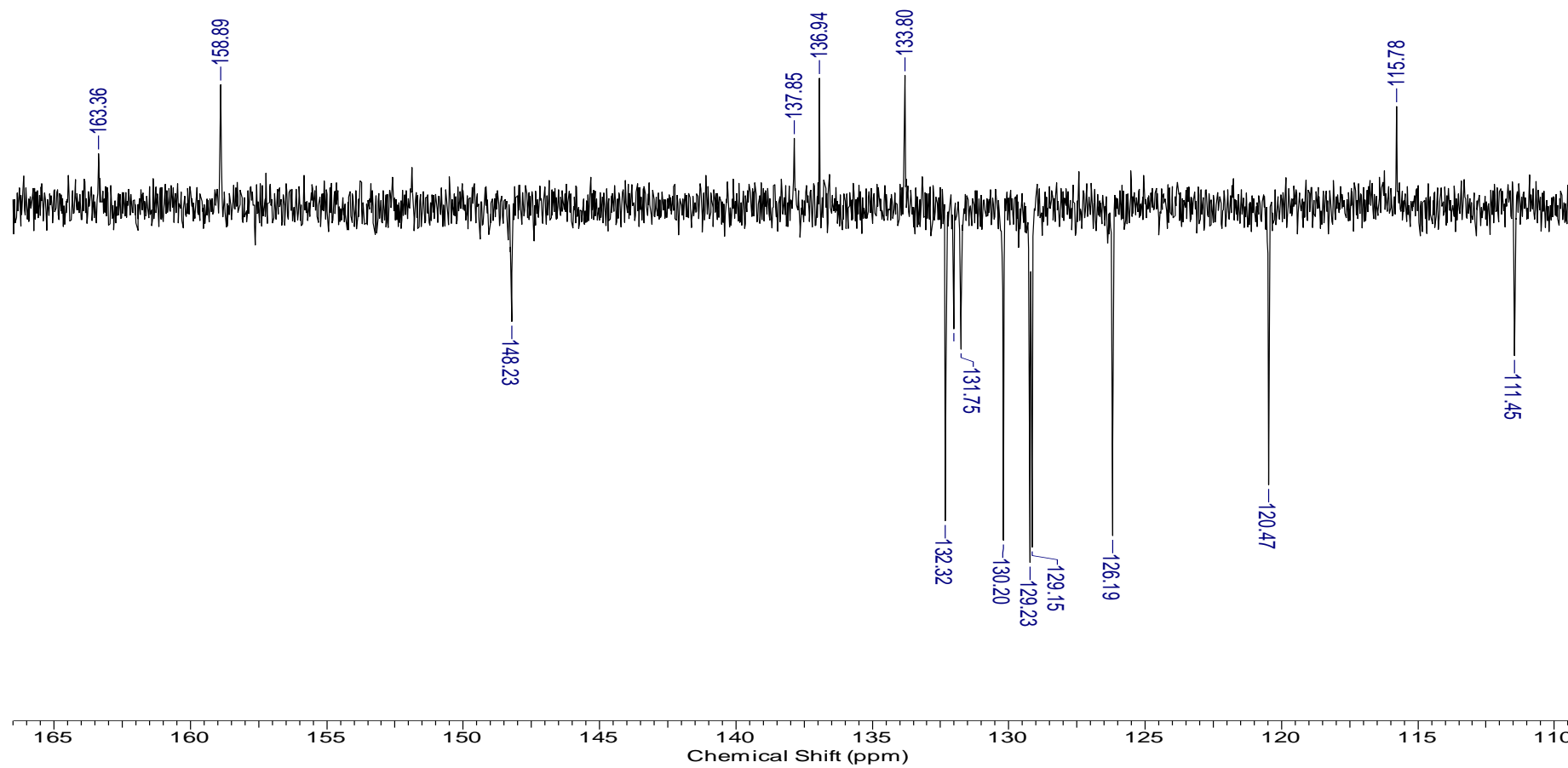
xxxii. Expansão do espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''''-bromo-fenil)amina (30) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



xxxiii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em DMSO-*d*₆

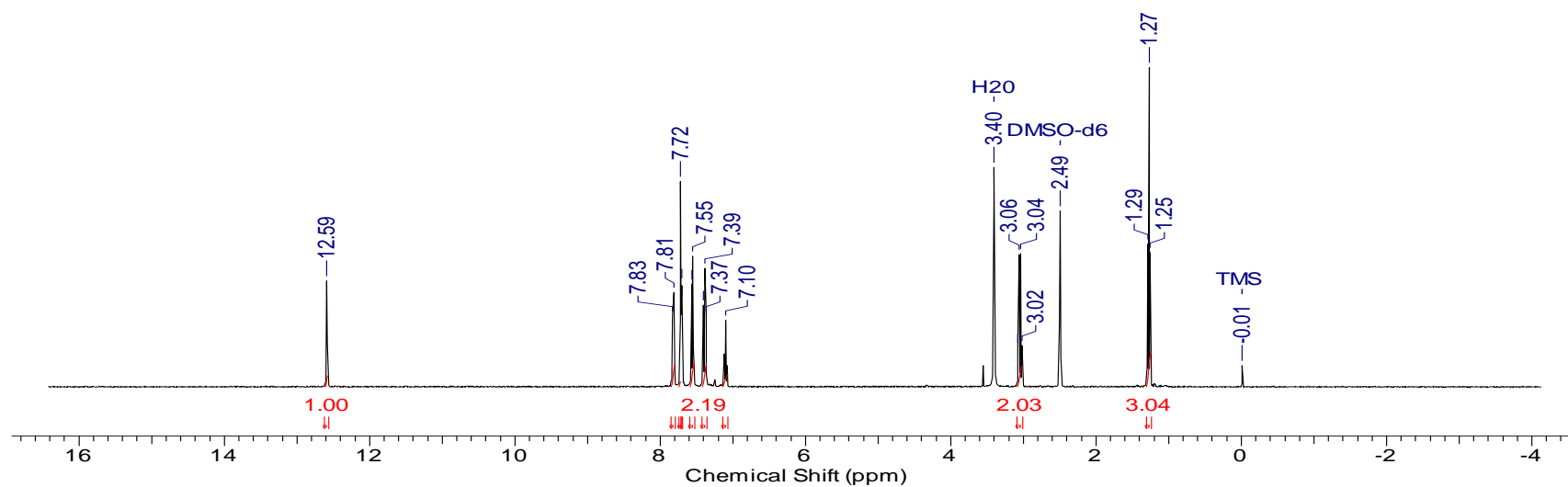
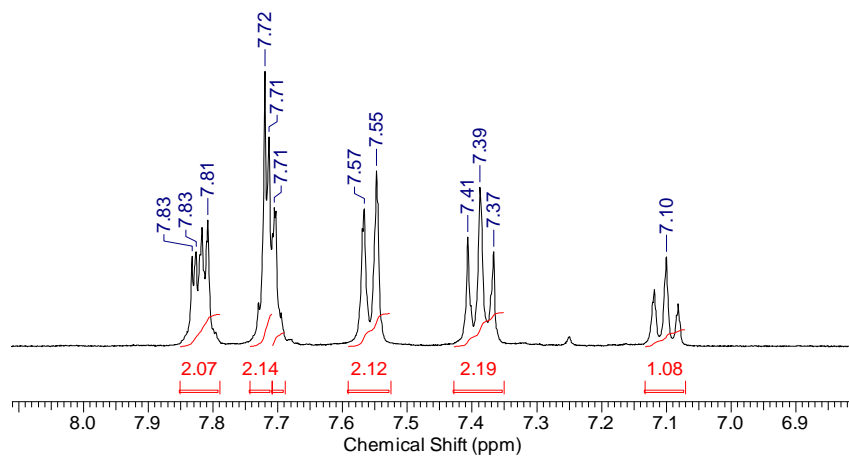


xxxiv. Expansão do DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-bromo-fenil)amina (30) obtido em DMSO-*d*₆

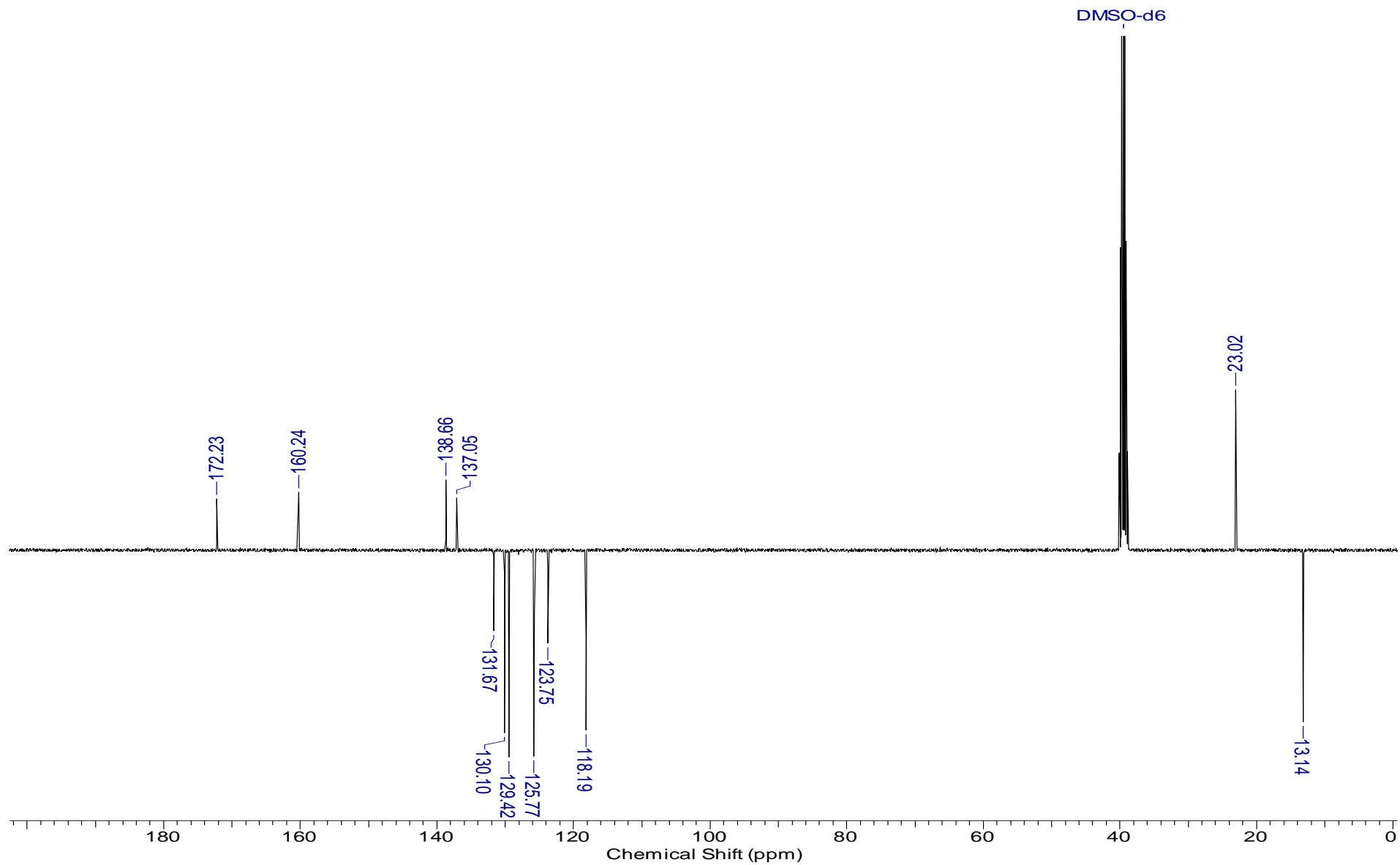


D. ESPECTRO DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS DA SÉRIE II

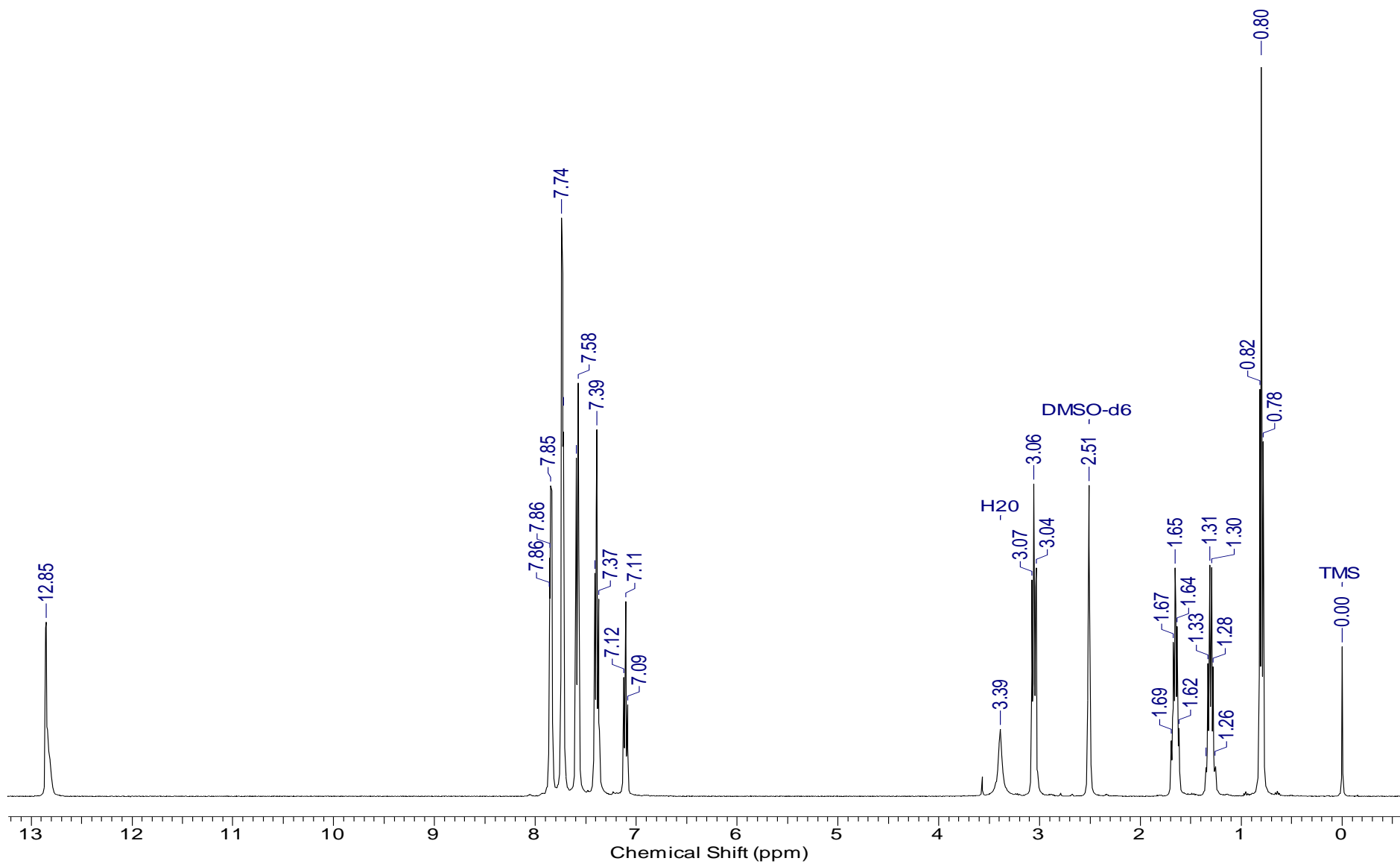
i. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (31) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



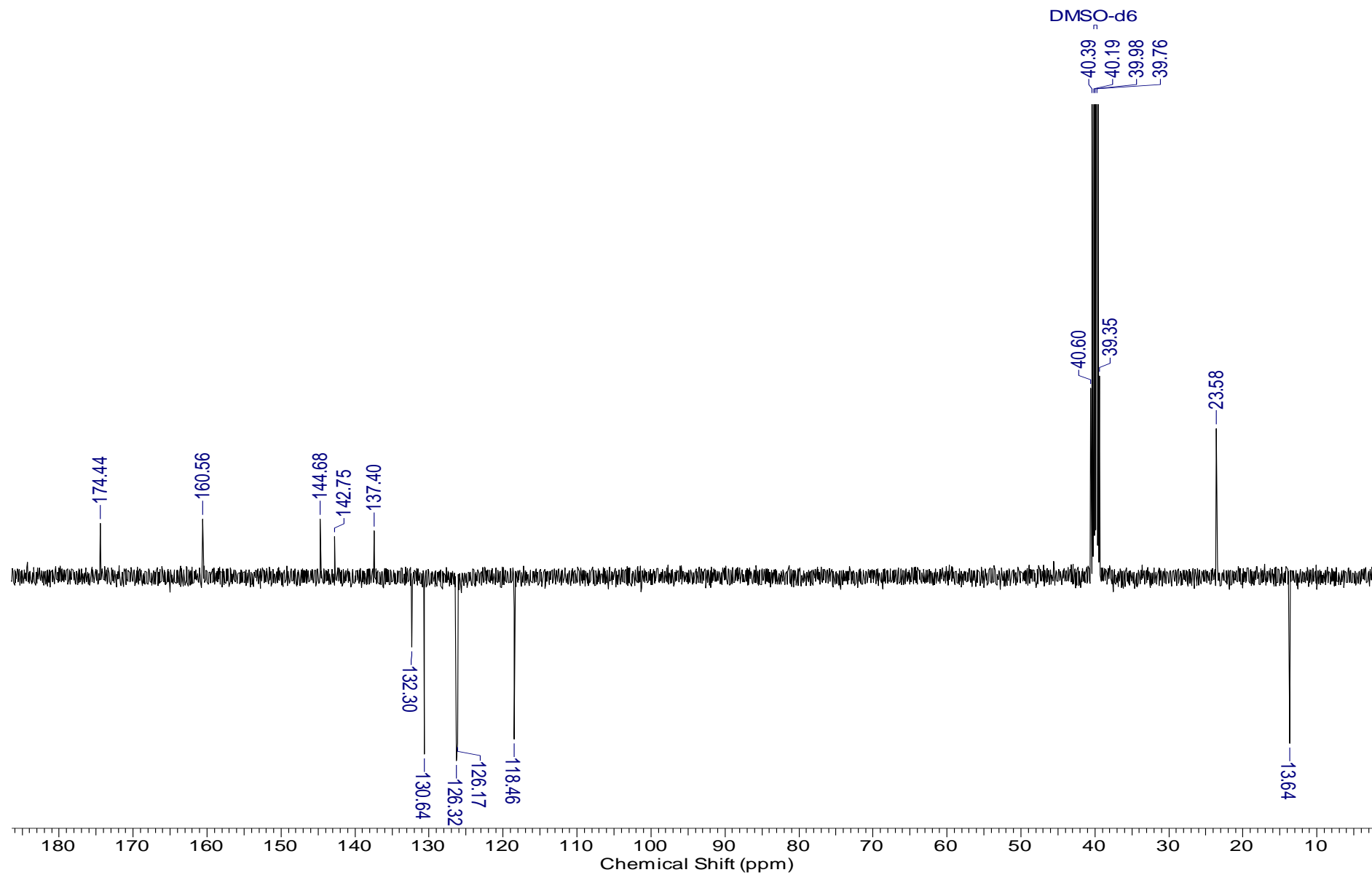
ii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (31) obtido em DMSO- d_6



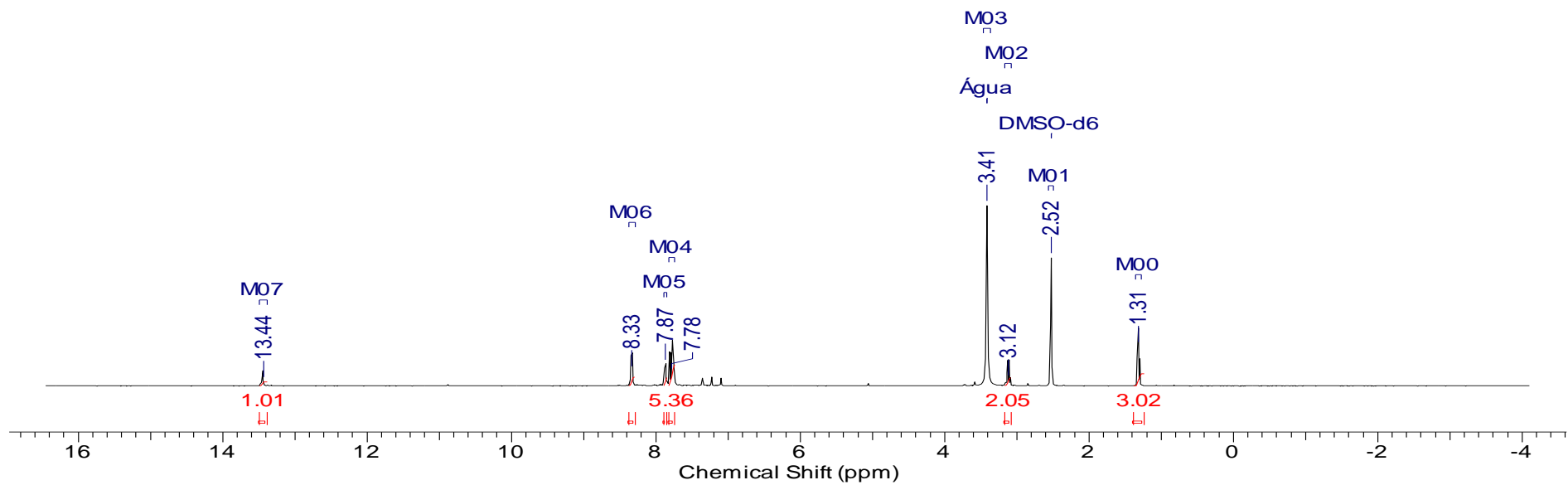
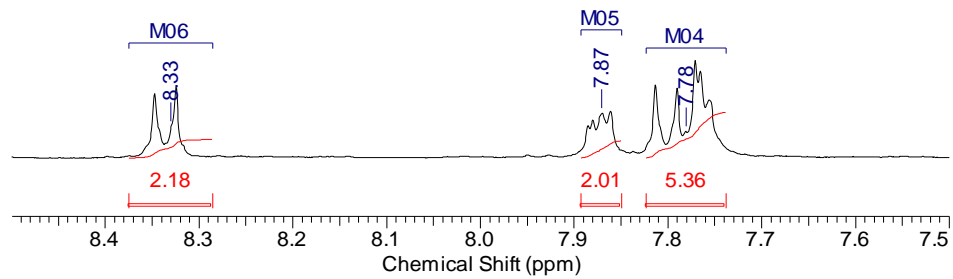
iii. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (32) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



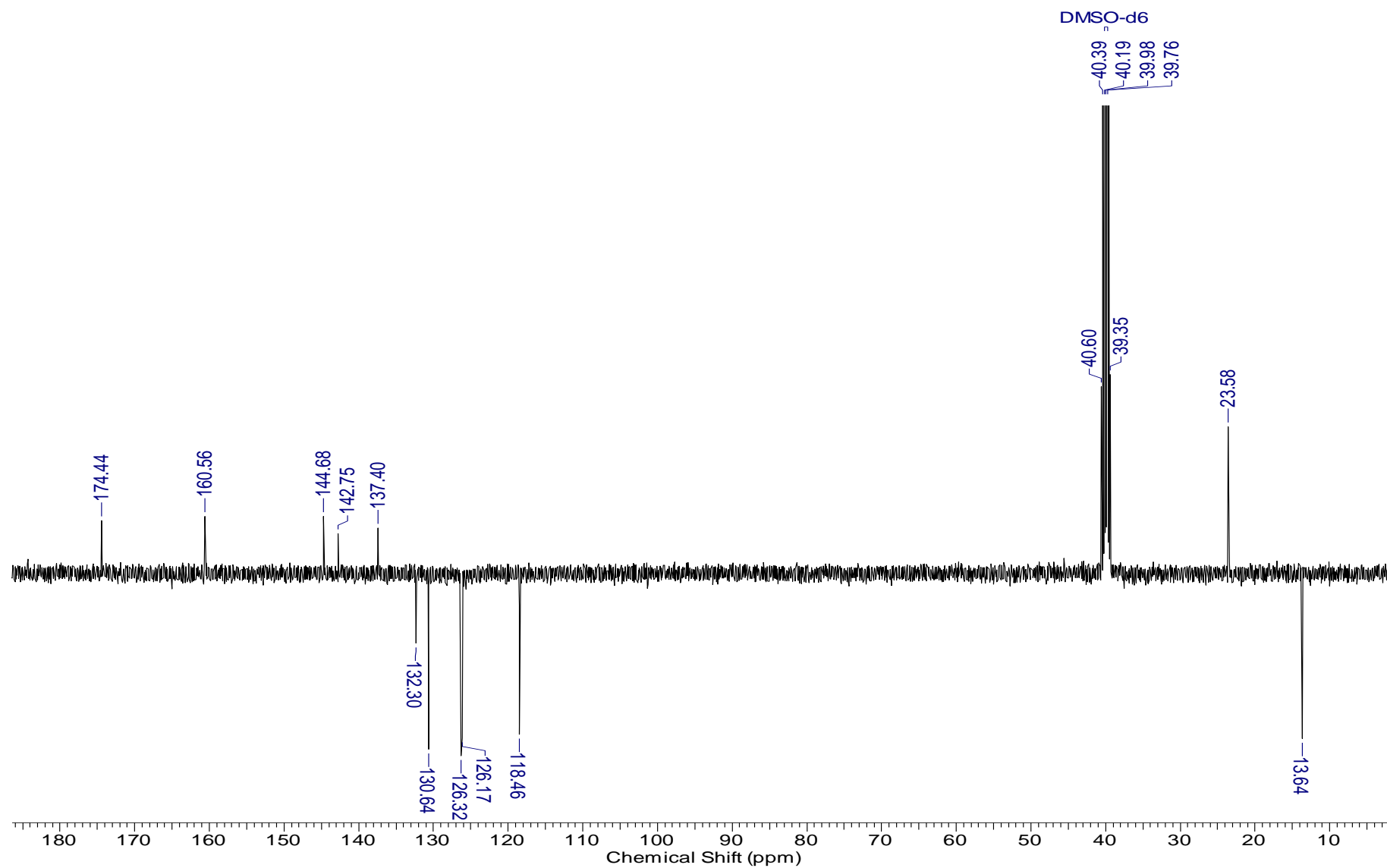
iv. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina (32) obtido em DMSO- d_6



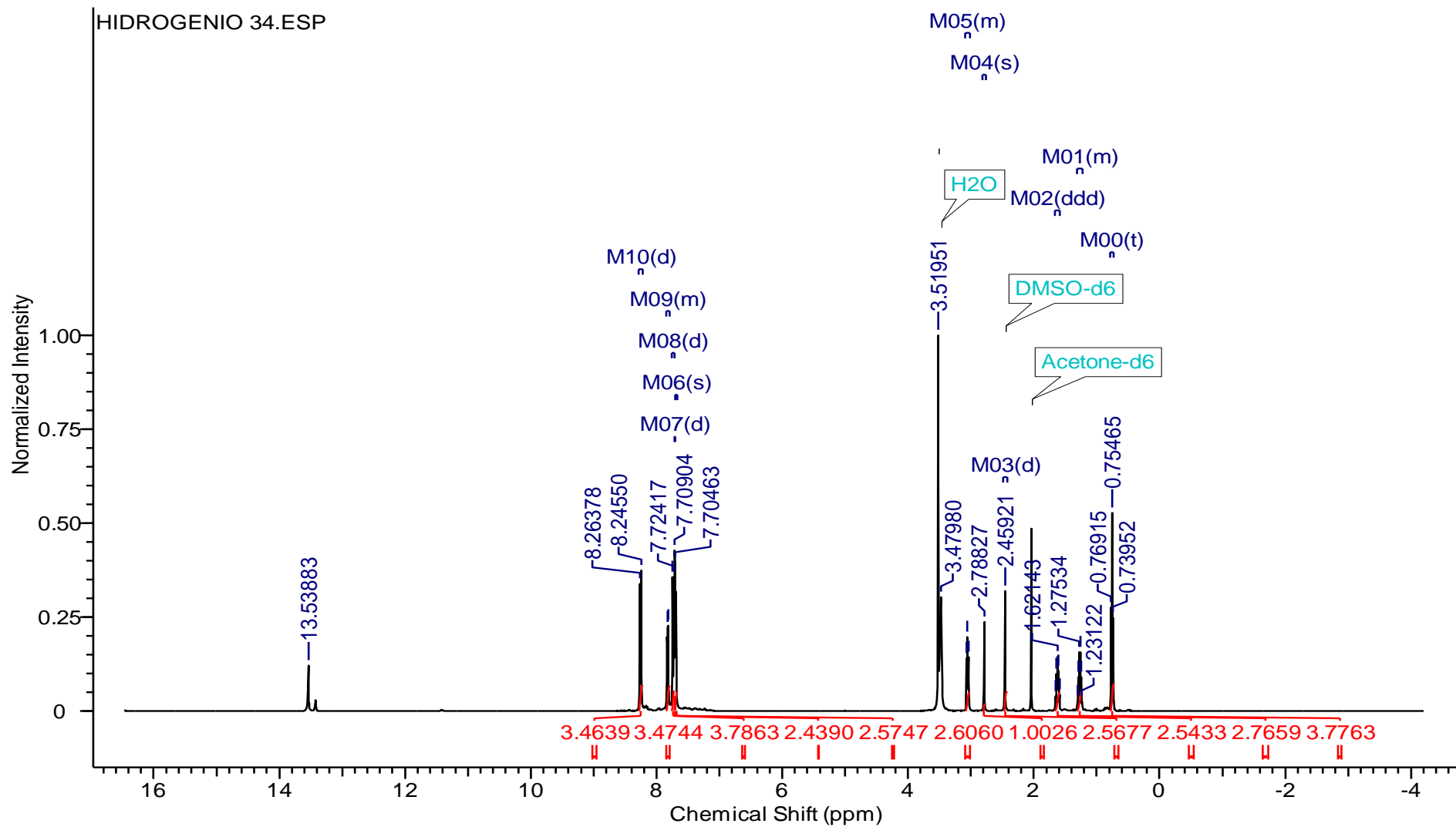
v. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (33) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



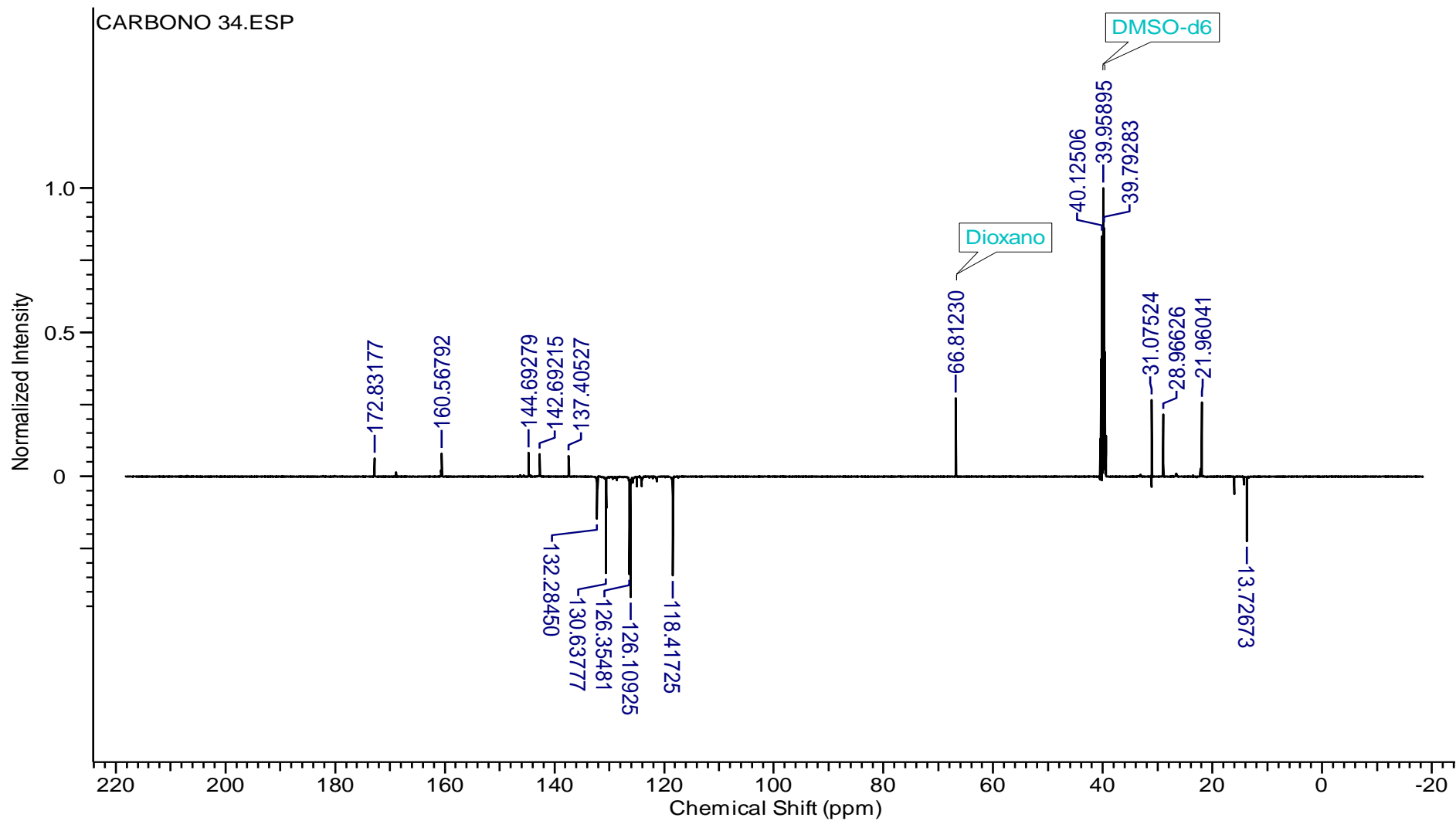
vi. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-etil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (33) obtido em DMSO-*d*₆



vii. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (34) obtido em $\text{DMSO-}d_6$

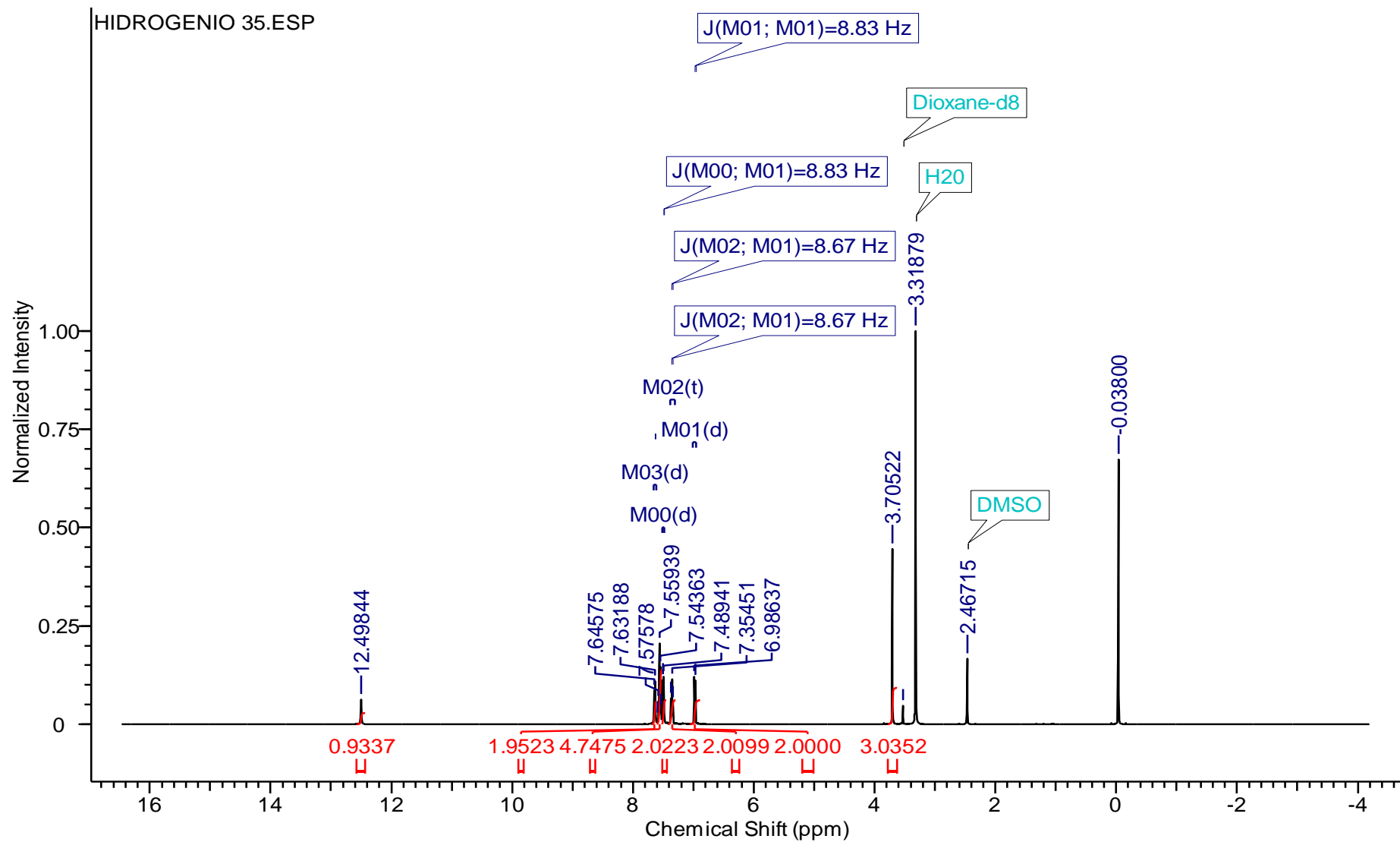


viii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-butil-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (34) obtido em DMSO-*d*₆

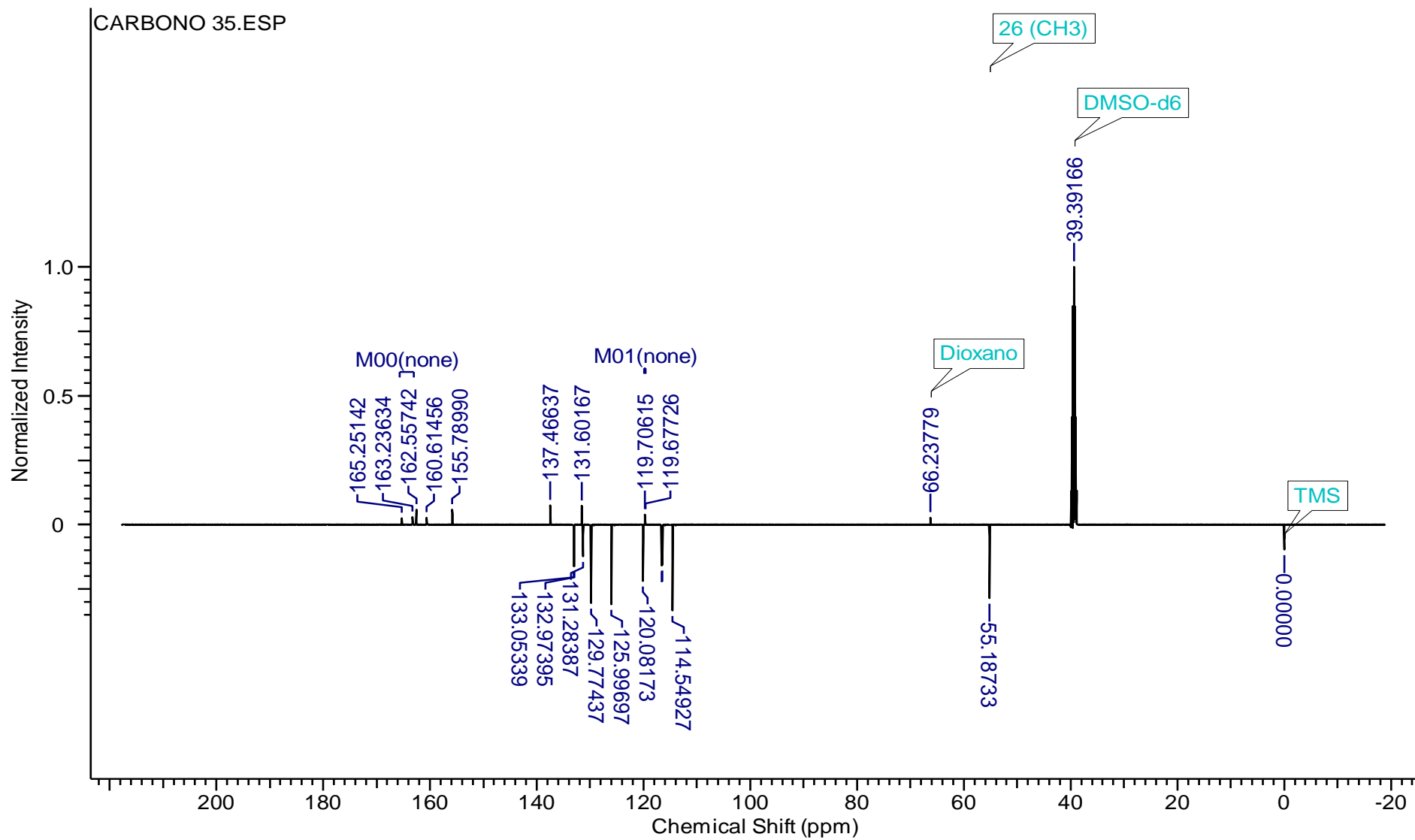


E. ESPECTRO DOS CLORIDRATOS MESOIÔNICOS DA SÉRIE III

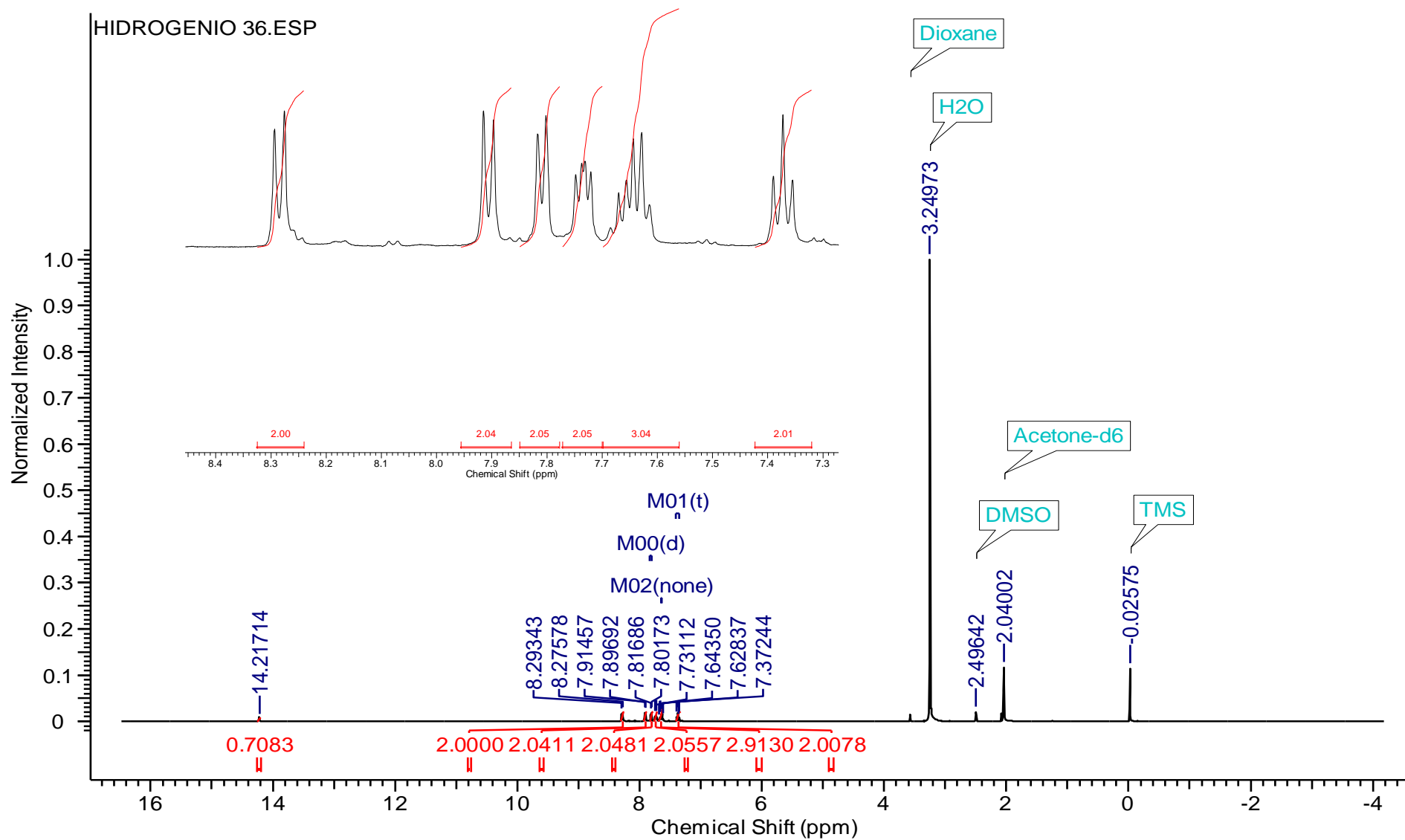
i. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (35) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



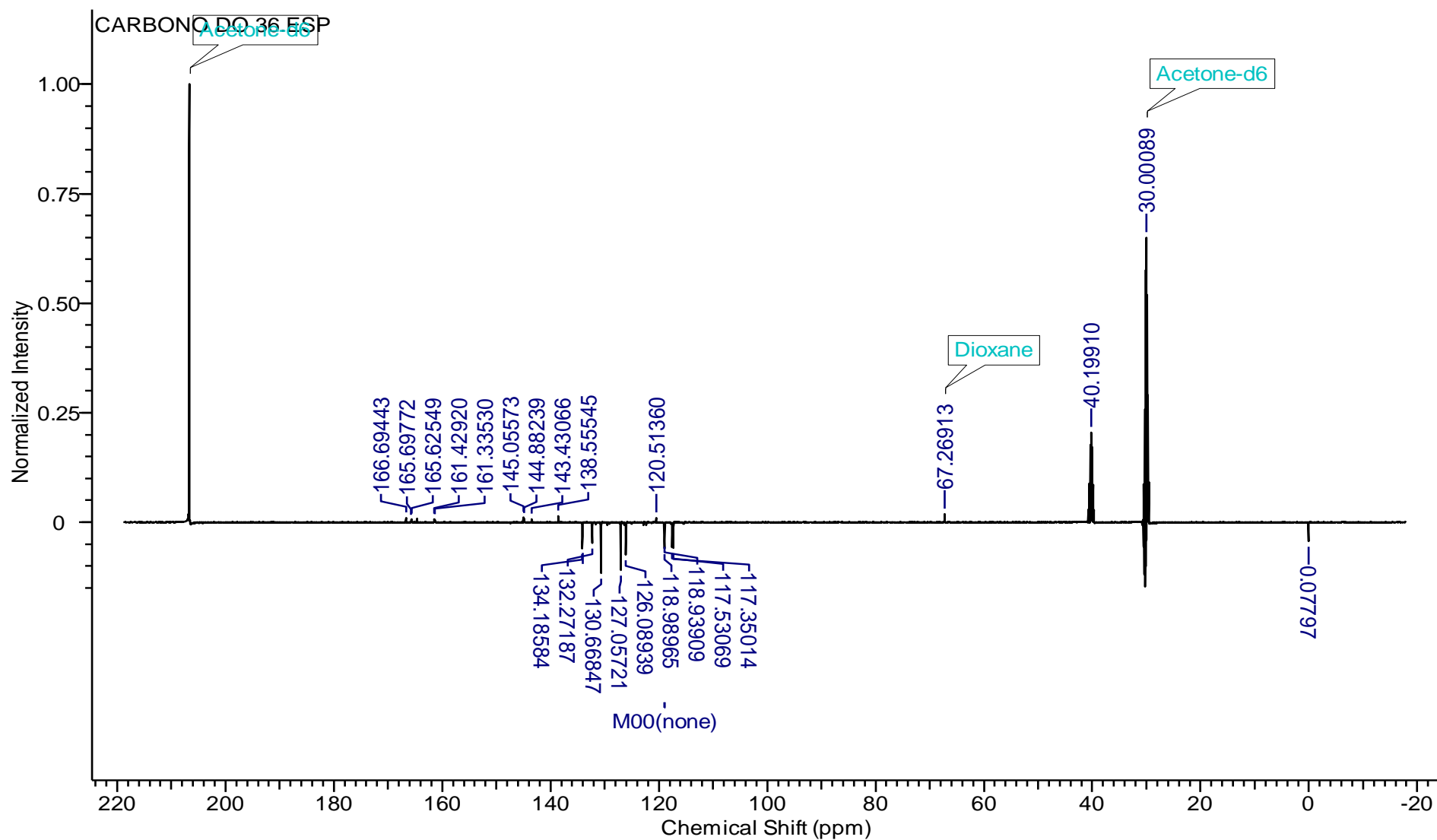
ii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (35) obtido em DMSO-*d*₆



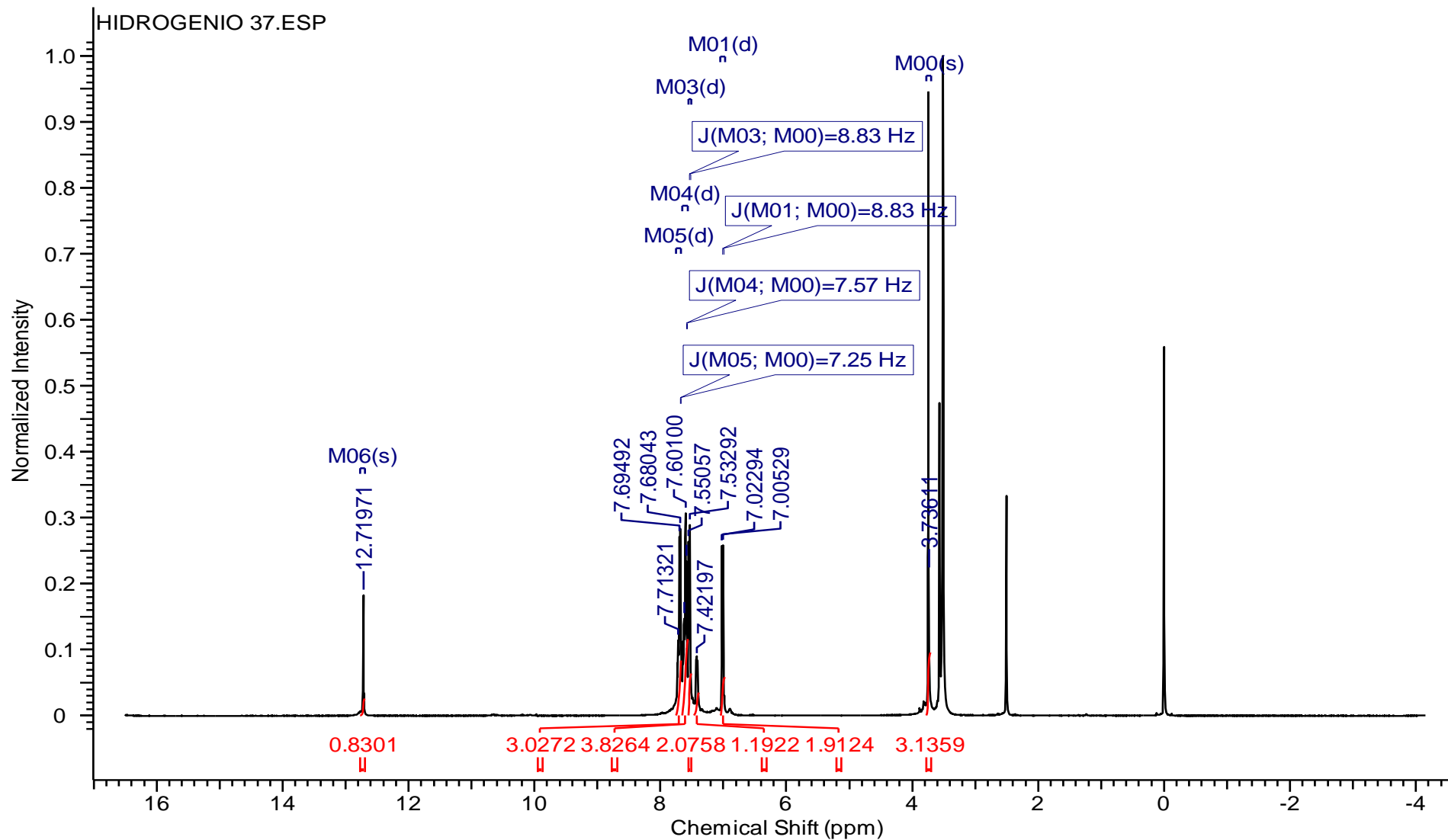
iii. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (36) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



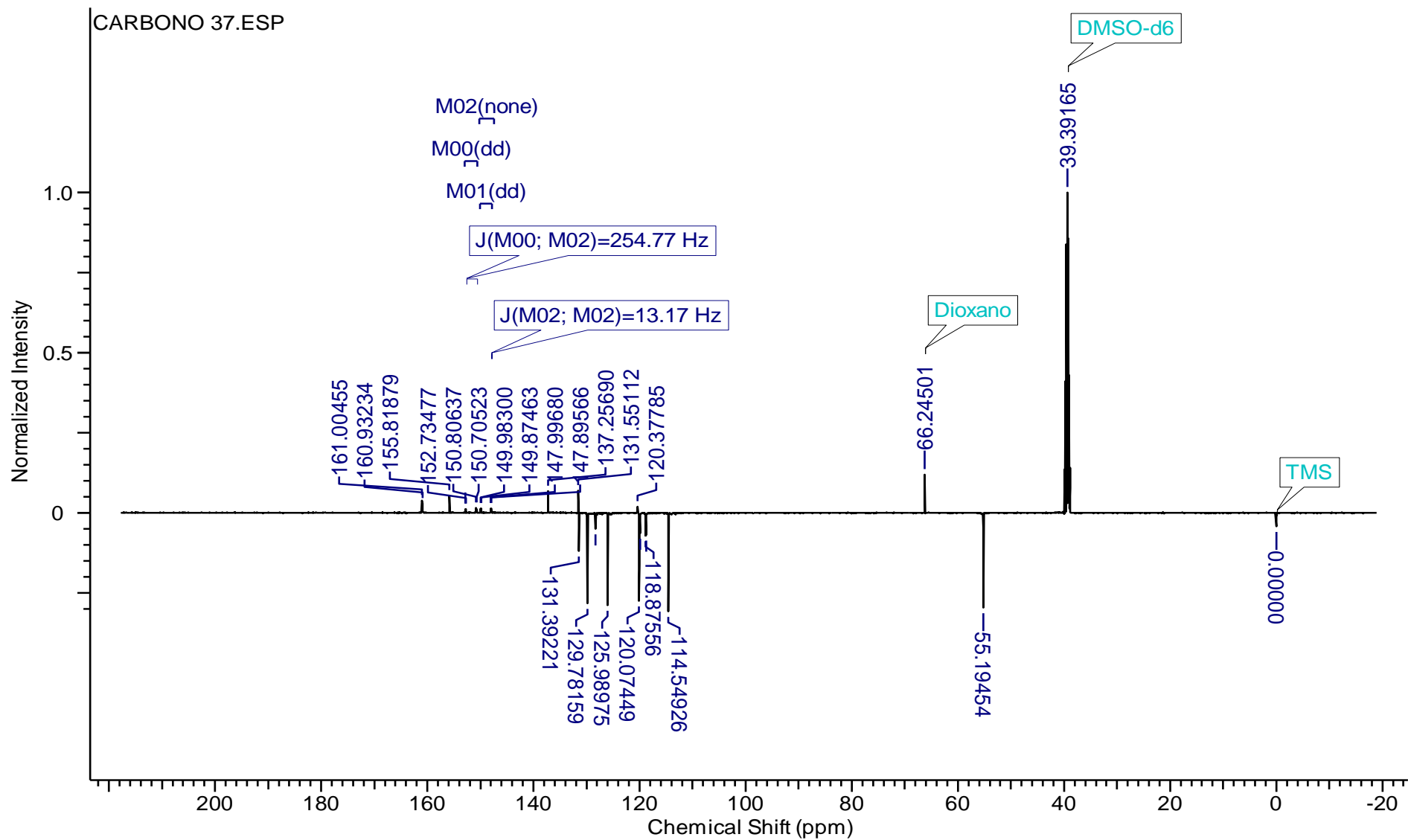
iv. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(4'-flúor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-nitro-fenil)amina (36) obtido em DMSO-*d*₆



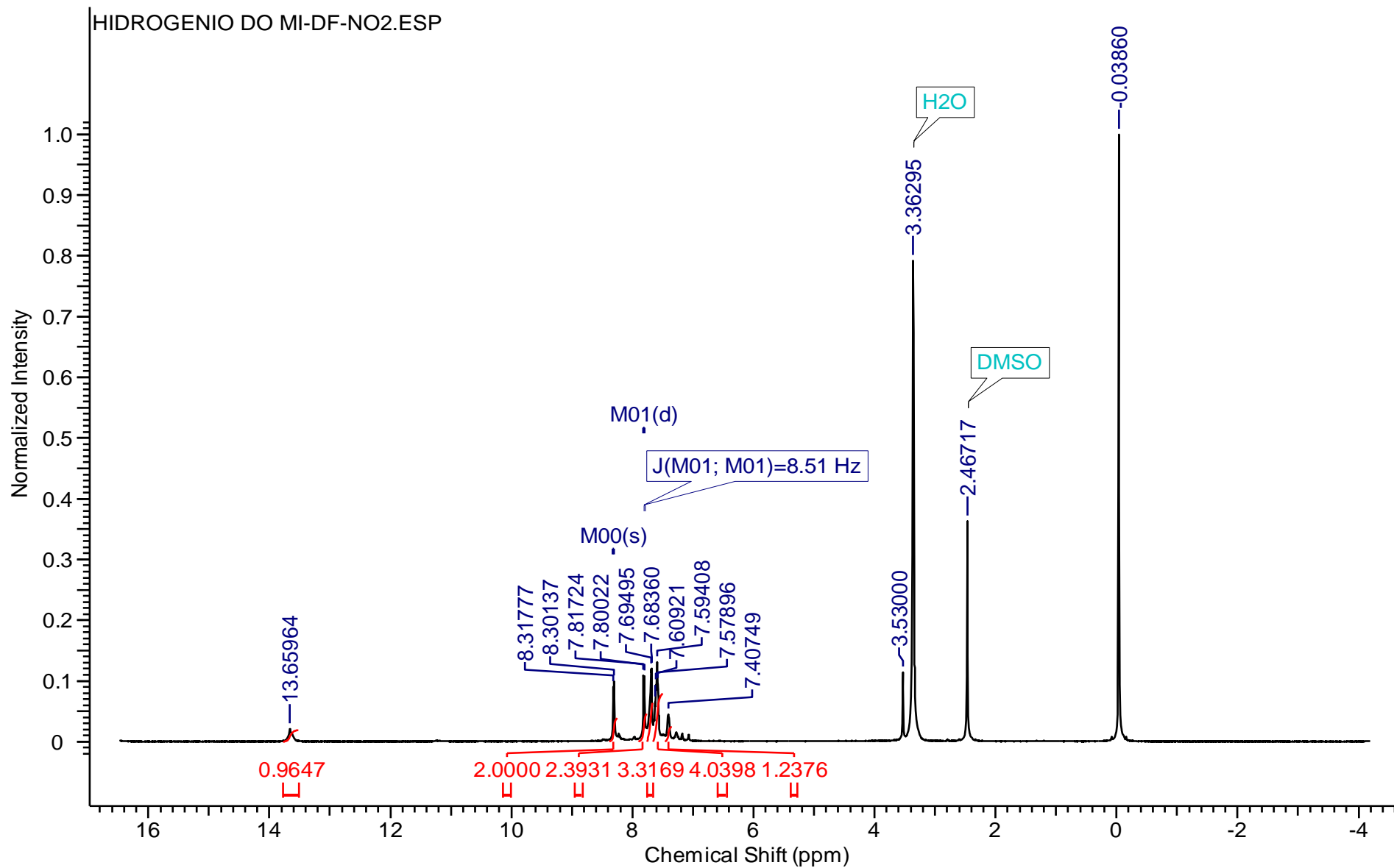
v. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-difluór-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (37) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



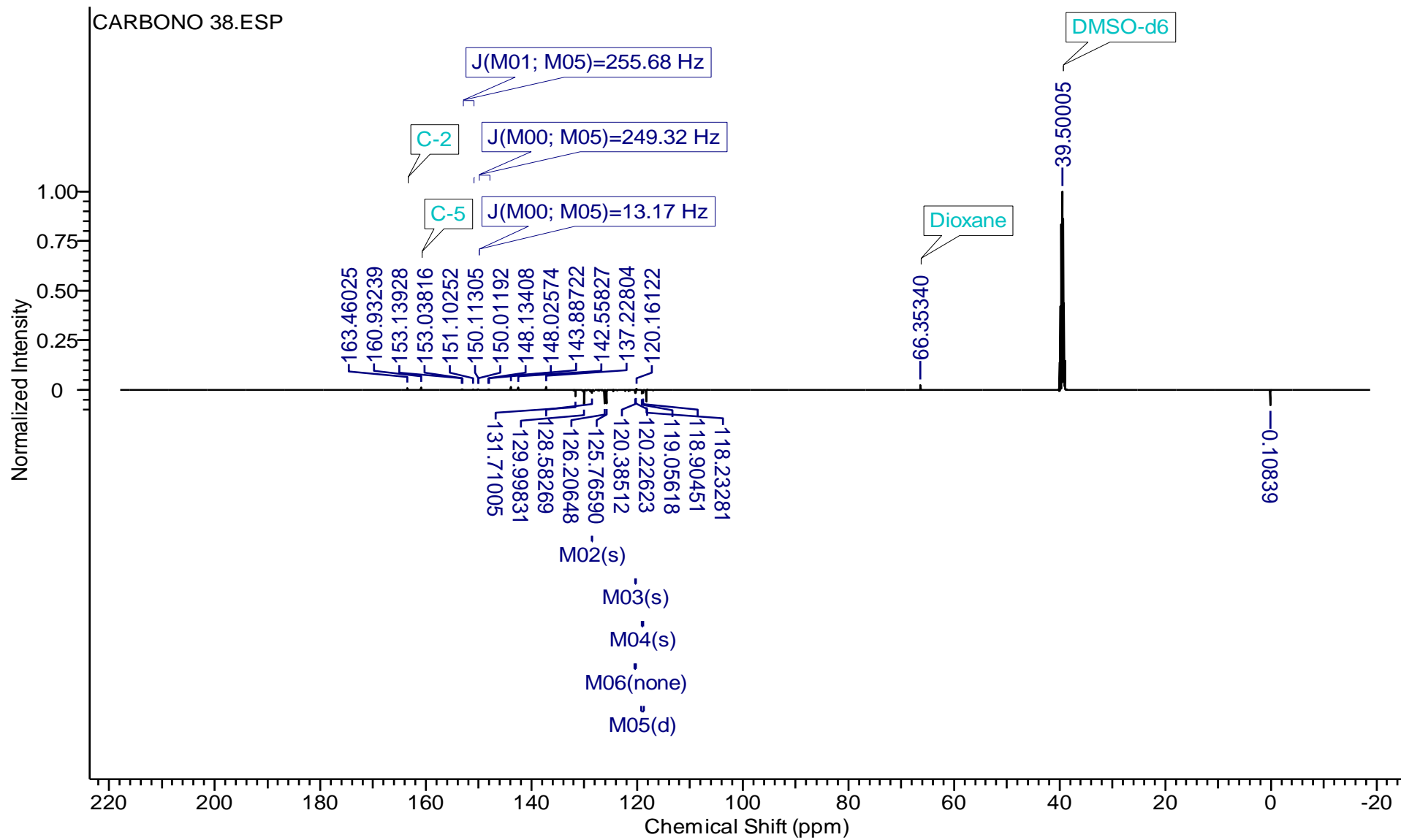
vi. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-difluor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4'''-metóxi-fenil)amina (37) obtido em DMSO-*d*₆



vii. Espectro de RMN ^1H do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-difluór-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (38) obtido em $\text{DMSO-}d_6$



viii. Espectro DEPTQ do Cloreto de 4-fenil-5-(3',4'-difluor-fenil)-1,3,4-tiadiazólio-2-(4''-nitro-fenil)amina (38) obtido em DMSO-d₆



Danilo Sousa Pereira
Doutor em Química

Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima
Orientadora

Dra. Ana Paula Pereira da Silva
Co-orientadora