

Artigo

Avaliação das Atividades Antiproliferativa e Antileishmania de 2-amino-5-aryl-1,3,4-tiadiazóis Derivados do R-(+)-limoneno

Vandresen, F.;* Souza, M. R. P.; Britta, E.; Silva E. L.; Carvalho J. E.; Ruiz, A. L. T. G.; Nakamura, C. V.; Silva, C. C.

Rev. Virtual Quim., 2017, 9 (3), no prelo. Data de publicação na Web: 6 de abril de 2017

<http://rvq.s bq.org.br>

Evaluation of Antiproliferative and Antileishmanial Activities of R-(+)-limonene-derived 2-Amino-5-aryl-1,3,4-thiadiazoles

Abstract: Natural products are great prototypes for the development of new compounds with pharmacologic properties. In this work, the monoterpene R-(+)-limonene was used to obtain a series of 1,3,4-thiadiazoles and their antitumor and antileishmania activities against *Leishmania amazonenses* were investigated. The analogous 4-methyl (**4b**) was potentially active against melanoma tumor cells (UACC-62), while the derivative 4-methoxy (**4c**) and 4-dimethylamino (**4d**) were the most active against *L. amazonensis*.

Keywords: R-(+)-limonene; 1,3,4-thiadiazoles; thiosemicarbazones; antitumor activity; *Leishmania amazonensis*.

Resumo

Produtos naturais são muitas vezes utilizados como protótipos de síntese para o desenvolvimento de novas substâncias com potencial farmacológico. Neste trabalho, utilizou-se o monoterpene R-(+)-limoneno para obtenção de uma série de 1,3,4-tiadiazóis e suas atividades antitumoral e antileishmania frente à *Leishmania amazonenses* foram investigadas. O derivado 4-metil (**4b**) mostrou-se potencialmente ativo frente à células tumorais de melanoma (UACC-62), enquanto os derivados 4-metóxi (**4c**) e 4-dimetilamino (**4d**) foram os mais ativos contra *L. amazonensis*.

Palavras-chave: R-(+)-limoneno; 1,3,4-tiadiazóis; tiossemicarbazonas; atividade antitumoral; *Leishmania amazonensis*.

* Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Química, Av. dos Pioneiros 3131, CEP 86036-370, Londrina-PR, Brasil.

✉ fabiovandresen@utfpr.edu.br

DOI:

Avaliação das Atividades Antiproliferativa e Antileishmania de 2-amino-5-aryl-1,3,4-tiadiazóis Derivados do R-(+)-limoneno

Fábio Vandresen,^a Mariana R. Passos de Souza,^b Elizandra Britta,^c Expedito L. Silva,^d João E. de Carvalho,^{e,f} Ana Lúcia T. G. Ruiz,^e Celso V. Nakamura,^c Cleuza Conceição da Silva^d

^a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Química, CEP 86036-370, Londrina-PR, Brasil.

^b Universidade Estadual do Centro-Oeste, Departamento de Química, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil.

^c Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Ciências Básicas da Saúde, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

^d Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

^e Universidade Estadual de Campinas, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), CEP 13083-970, Campinas-SP, Brasil.

^f Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, CEP 13083-871, Campinas-SP, Brasil.

* fabiovandresen@utfpr.edu.br

Recebido em 4 de março de 2017. Aceito para publicação em 4 de abril de 2017

1. Introdução

2. Parte experimental

2.1. Síntese dos derivados 1,3,4-tiadiazóis

2.2. Avaliação da atividade antiproliferativa

2.3. Atividade antileishmania

3. Resultados e discussão

3.1. Obtenção dos 1,3,4-tiadiazóis

3.2. Avaliação da atividade antiproliferativa

3.3. Atividade antileishmania

4. Conclusão

1. Introdução

Produtos naturais são fontes interessantes de compostos que podem levar ao desenvolvimento de moléculas candidatas a novos fármacos. Cerca de 40% das moléculas aprovadas para utilização nos últimos anos estão diretamente relacionadas aos produtos naturais.^{1,2} Dentre as diferentes classes de produtos naturais, os terpenos, compostos encontrados em plantas e comumente associados com óleos essenciais destacam-se por apresentarem diferenciadas propriedades farmacológicas. Muitos desses possuem propriedades analgésicas,³ anti-inflamatórias,⁴ antibacterianas,⁵ antifúngicas,⁶ antiprotozoárias,⁷⁻⁹ antioxidante¹⁰ além de relevante atividade antitumoral.¹¹⁻¹² Entre os terpenos que desempenham ação antitumoral destaca-se o *R*-(+)-limoneno, em que ensaios *in vivo* mostraram que este monoterpene inibe a formação e o desenvolvimento de diferentes tipos de tumores, tais como carcinomas mamários, neoplasias pulmonares, tumores pancreáticos, câncer de fígado, adenomas pulmonares e tumores de estômago.¹³⁻¹⁶ Compostos que possam desempenhar atividade antitumoral são alvo de diversas pesquisas já há muitos anos e a incidência da doença vem aumentando ano a ano. Só em 2008 foram mais de 7,6 milhões de mortes decorrentes principalmente de tumores de pulmão, estômago, fígado, colo e mama.¹⁷ Para o ano de 2012 o Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontou que mais de 500.000 novos casos ocorreram no Brasil, sendo tumores de melanoma, próstata, pulmão e estômago os mais comuns entre indivíduos do sexo masculino e mama e útero para o sexo feminino.¹⁸ Além de despertar o interesse pelas atividades antitumorais, o limoneno também é descrito como um potencial agente antileishmania. Estudos confirmaram a ação antiprotozoária do limoneno frente a formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonenses*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* e *L. major*.¹⁹

Além de terpenos e outros produtos

naturais, os compostos heterocíclicos estão amplamente associados a uma gama variada de atividades farmacológicas. Derivados heterocíclicos contendo o núcleo 1,3,4-tiadiazol, suas formas isoméricas e biossostéricas, já tiveram seu potencial terapêutico investigado apresentando resultados satisfatórios, destacando-se pelas potenciais atividades antifúngica,²⁰ antibacteriana,²¹ antileishmania, antitripanossoma²²⁻²⁴ e antitumoral²⁵.

Geralmente, as estratégias de síntese para a obtenção do núcleo 1,3,4-tiadiazol envolvem a ciclodesidratação de aciltiossemicarbazidas em meio ácido ou ciclizações oxidativas de tiossemicarbazonas utilizando íons Fe³⁺.²⁶ Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisas mantém-se focado na obtenção de novos compostos farmacologicamente ativos usando diferentes terpenos como bloco de construção sintética. Diversos isotiocianatos, tiossemicarbazidas, tiouréias e tiossemicarbazonas foram anteriormente obtidas com significativas atividades antifúngica, antitumoral, antileishmania e antitripanossoma. Recentemente, apresentamos uma série de tiossemicarbazonas possuindo a unidade monoterpênica *R*-(+)-limoneno, onde alguns análogos desempenharam potente atividade contra células tumorais de próstata PC-3.²⁷

Como alguns núcleos heterocíclicos, entre eles o 1,3,4-tiadiazol, podem ser obtidos diretamente a partir de tiossemicarbazonas, optamos por dar continuidade ao estudo de síntese e avaliação de atividades farmacológicas de novos produtos preparados a partir de terpenos naturais. Recentemente, reportamos a síntese e avaliação da atividade antitripanossoma dos derivados *R*-(+)-limoneno-1,3,4-tiadiazóis, sendo que o derivado 4-metil-fenil apresentou-se como o mais ativo²⁶. Com base nos resultados obtidos, continuamos avaliando outras potenciais atividades farmacológicas desempenhadas por estes análogos. Neste trabalho apresentamos a avaliação da atividade antiproliferativa frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas, bem como a avaliação da atividade

antileishmania dos mesmos frente à forma promastigota de *L. amazonensis*.

2. Parte experimental

2.1. Síntese dos derivados 1,3,4-tiadiazóis

Síntese dos 1,3,4-tiadiazóis 4a-4j

1,3,4-tiadiazóis contendo a unidade monoterpênica *R*-(+)-limoneno foram sintetizados de acordo com metodologia descrita na literatura²⁶ (Figura 1). As precursoras tiossemicarbazonas (3a-3j) foram obtidas através da condensação de quantidades equimolares de tiossemicarbazida (3) com diferentes derivados de benzaldeído²⁷. Em seguida, a ciclização oxidativa destas tiossemicarbazonas (0,22 mmol) foi realizada na presença de excesso de cloreto férrico (1,10 mmol) em refluxo (2-20 horas) utilizando uma mistura de etanol:água (3:1) levando a obtenção dos *R*-(+)-limoneno-1,3,4-tiadiazóis (4a-4j) (Esquema 1). O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCD e os produtos obtidos foram recristalizados em metanol ou acetona resultando em rendimentos razoáveis a satisfatórios (35-85%). Todos os compostos foram caracterizados com base em seus dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C, IV, massas e % C,H,N.

2.1.1. *N*-{1-Metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-il]etil}-5-fenil-1,3,4-tiadiazol-2-amina (4a). Sólido branco recristalizado com MeOH; rendimento 46 %; pf. 169–171 °C; [α]_D²⁰: +36 (CHCl₃); IV (KBr) vmax: 3226, 1551, 1095 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.80 (2H, m, H-2'', H-6''), 7.39 (3H, m, H-3'', H-4'', H-5''), 5.75 (1H, s, NH), 5.36 (1H, m, H-3'), 2.16 (1H, m, H-1'), 2.01 (2H, m, H-5'), 1.99 (2H, m, H-2'), 1.86 (2H, m, H-6'), 1.64 (3H, s, H-10'), 1.41 (3H, s, H-9'), 1.38 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 166.9 (C, C-2), 158.1 (C, C-5), 134.3 (CH, C-

4'), 131.2 (C, C-1''), 129.9 (CH, C-4''), 129.1 (CH, C-3'', C-5''), 127.0 (CH, C-2'', C-6''), 120.5 (CH, C-3'), 58.3 (C, C-7'), 41.4 (CH, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.5 (CH₃, C-10'), 24.2 (CH₃, C-8); EI-MS *m/z* 313 (M+•); 123. Análise elementar: calculado. para C₁₈H₂₃N₃S: C, 68.97 %; H, 7.40 %; N, 13.41 %. Encontrado: C, 69.16 %; H, 7.49 %; N, 13.86 %.

2.1.2. *N*-{1-Metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-5-(4-metilfenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (4b). Sólido branco recristalizado em MeOH; rendimento 60 %; . 173–175 °C; [α]_D²⁰: +34 (CHCl₃); IR (KBr) vmax: 3211, 1510, 1102 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.68 (2H, d, *J* 7.9 Hz, H-2'', H-6''), 7.23 (2H, d, *J* 7.9 Hz, H-3'', H-5''), 6.22 (1H, bs, NH), 5.37 (1H, m, H-3'), 2.39 (3H, s, 4-CH₃), 2.16 (1H, m, H-1'), 2.12 (2H, m, H-5'), 2.00 (2H, m, H-2'), 1.86 (2H, m, H-6'), 1.64 (3H, s, H-10'), 1.41 (3H, s, H-9'), 1.38 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 166.4 (C, C-2), 157.4 (C, C-5), 140.9 (C, C-4''), 134.4 (C, C-4'), 129.1 (2 CH, C-3'', C-5''), 127.6 (C, C-1''), 127.0 (2 CH, C-2'', C-6''), 120.3 (CH, C-3'), 59.1 (C, C-7'), 41.6 (CH, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.9 (CH₃, C-8'), 23.5 (CH₃, C-10'), 21.7 (CH₃); EI-MS *m/z* 327 (M⁺); Análise elementar: Calculado para C₁₉H₂₅N₃S: C, 69.68%; H, 7.69%; N, 12.83%. Encontrado: C, 69.36%; H, 7.39%; N, 13.04%.

2.1.3. 5-(4-metóxfenil)-*N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-amina (4c). Sólido branco; rendimento 65%; pf. 173-175 °C; [α]_D²⁰: +48 (CDCl₃); IV (KBr) vmax: 3183, 1611, 1096 cm⁻¹; RMN de ¹H (CHCl₃, 300 MHz): δ = 7.73 (2H, d, *J* 8.2 Hz, H-2'', H-6''); 6.93 (2H, d, *J* 8.2 Hz, H-3'', H-5''), 5.45 (1H, bs, NH), 5.37 (1H, m, H-3'), 3.84 (3H, s, OCH₃), 2.16 (1H, m, H-1'), 2.01 (2H, m, H-5'), 1.99 (2H, m, H-2'), 1.86 (2H, m, H-6'), 1.64 (3H, s, H-10'), 1.41 (3H, s, H-9'), 1.37 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 166.3 (C, C-2), 161.0 (C, C-4''), 158.2 (C, C-5), 134.4 (C, C-4'), 128.4 (2 CH, C-2'', C-6''),

124.0 (C, C-1''), 120.5 (CH, C-3'), 114.5 (2 CH, C-3'', C-5''), 58.3 (OCH₃), 55.6 (C, C-7'), 41.4 (C, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.9 (CH₃, C-8'), 23.5 (CH₃, C-10'); EI-MS *m/z* 343 (M⁺); Análise elementar calculado para C₁₉H₂₅N₃OS: C, 66.44%; H, 7.34%; N, 12.23%. Encontrado: C, 66.65%; H, 7.28%; N, 12.44%.

2.1.4. 5-[4-(dimetilamino)fenil]-*N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**4d**). Sólido alaranjado; rendimento 35%; pf. 154 °C; [α]_D²⁰: +36 (CDCl₃); IV (KBr) *v*max: 3199, 1579, 1101 cm⁻¹; RMN de ¹H (CHCl₃, 300 MHz): δ = 7.66 (2H, d, *J* 8.6 Hz, H-2'', H-6''), 6.70 (2H, d, *J* 8.6 Hz, H-3'', H-5''), 1.36 (3H, s, H-8'), 5.36 (1H, m, H-3'), 5.21 (1H, bs, NH), 3.01 (6H, s, N(CH₃)₂), 2.14 (1H, m, H-1'), 2.02 (2H, m, H-5'), 2.00 (2H, m, H-2'), 1.85 (2H, m, H-6'), 1.64 (3H, s, H-10'), 1.39 (3H, s, H-9'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 165.5 (C, C-2), 156.0 (C, C-5), 151.6 (C, C-4''), 134.4 (C, C-4'), 128.4 (2 CH, C-2'', C-6''), 120.5 (CH, C-3'), 119.0 (C, C-1''), 112.1 (2 CH, C-3'', C-5''), 58.2 (C, C-7'), 41.3 (CH, C-1'), 40.4 (N(CH₃)₂), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.9 (CH₃, C-8'), 23.5 (CH₃, C-10'); EI-MS *m/z* 356 (M⁺); Análise elementar: calculado para C₂₀H₂₈N₄S: C, 67.38%; H, 7.92%; N, 15.71%. Encontrado: C, 67.25%; H, 7.75%; N, 15.46%.

2.1.5. 5-(2-clorofenil)-*N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**4e**). Sólido branco recristalizado em acetona; rendimento 75%; pf. 166-169 °C; [α]_D²⁰: +23 (CDCl₃); IV (KBr) *v*max: 3174, 1549, 1104 cm⁻¹; RMN de ¹H (CHCl₃, 300 MHz): δ = 8.16 (1H, m, H-3''), 7.44 (1H, m, H-6''), 7.33 (2H, m, H-4'', H-5''), 6.36 (1H, bs, NH), 5.36 (1H, m, H-3'), 2.19 (1H, m, H-1'), 2.02 (2H, m, H-5'), 1.98 (2H, m, H-2'), 1.87 (2H, m, H-6'), 1.65 (3H, s, H-10'), 1.44 (3H, s, H-9'), 1.41 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 168.8 (C, C-2), 153.0 (C, C-5), 134.1 (C, C-4'), 131.5 (C, C-2''), 130.5 (CH, C-4''), 130.4 (2 CH, C-5'', C-6''), 129.1 (C, C-1''), 127.2 (CH, C-3''), 120.4 (CH, C-3'), 58.2 (C, C-7'), 41.4 (CH, C-1'), 31.1 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂,

C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.9 (CH₃, C-8'), 23.3 (CH₃, C-10'); EI-MS *m/z* 347 (M⁺); Análise elementar: Calculado para C₁₈H₂₂ClN₃S: C, 62.14%; H, 6.37%; N, 12.08%. Encontrado: C, 62.23%; H, 6.66%; N, 11.94%.

2.1.6. 5-(3-clorofenil)-*N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**4f**). Sólido branco; rendimento 70%; pf. 139-140 °C; [α]_D²⁰: +34 (CHCl₃); IV (KBr) *v*max: 3253, 1502, 1078 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.80 (1H, s, H-2''), 7.69 (1H, m, H-6''), 7.35 (2H, m, H-4'', H-5''), 5.64 (1H, bs, NH), 5.37 (1H, m, H-3'), 2.16 (1H, m, H-1'), 2.02 (2H, m, H-5'), 2.00 (2H, m, H-2'), 1.85 (2H, m, H-6'), 1.64 (3H, s, H-10'), 1.42 (3H, s, H-9'), 1.38 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 167.1 (C, C-2), 156.6 (C, C-5), 135.1 (C, C-3''), 134.4 (C, C-4'), 132.9 (C, C-1''), 130.3 (CH, C-4''), 129.8 (CH, C-5''), 126.9 (CH, C-2''), 125.0 (CH, C-6''), 120.4 (CH, C-3'), 58.5 (C, C-7'), 41.4 (CH, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 24.2 (CH₃, C-8'), 23.5 (CH₃, C-10'); EI-MS *m/z* 347 (M⁺); Análise Elementar: Calculado para C₁₈H₂₂ClN₃S: C, 62.14%; H, 6.37%; N, 12.08%. Encontrado: C, 62.23%; H, 6.66%; N, 11.94%.

2.1.7. 5-(4-clorofenil)-*N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**4g**). Sólido branco; rendimento 65%; pf. 172-174 °C; [α]_D²⁰: +46 (CHCl₃); IV (KBr) *v*max: 3179, 1552, 1088 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.72 (2H, d, *J* 8.1 Hz, H-2'', H-6''), 7.38 (2H, d, *J* 8.4 Hz, H-3'', H-5''), 6.18 (1H, bs, NH), 5.37 (1H, m, H-3'), 2.16 (1H, m, H-1'), 2.12 (2H, m, H-5'), 1.99 (2H, m, H-2'), 1.87 (2H, m, H-6'), 1.63 (3H, s, H-10'), 1.44 (3H, s, H-9'), 1.38 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 167.1 (C, C-2), 156.6 (C, C-5), 135.6 (C, C-4''), 134.4 (C, C-4'), 129.7 (C, C-1''), 129.3 (2 CH, C-3'', C-5''), 128.3 (2 CH, C-2'', C-6''), 120.5 (CH, C-3'), 58.4 (C, C-7'), 41.3 (CH, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.9 (CH₃, C-8'), 23.5 (CH₃, C-10'); EI-MS *m/z* 347 (M⁺); Análise elementar: calculado para C₁₈H₂₂ClN₃S: C, 62.14%; H, 6.37%; N,

12.08%. Encontrado C, 62.23%; H, 6.66%; N, 11.94%.

2.1.8. *N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-5-(2-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**4h**). Sólido amarelo; rendimento 75%; pf. >250 °C; $[\alpha]_D^{20}$: +56 (CHCl₃); IV (KBr) ν_{\max} : 3184, 1557, 1100, 1530, 1359 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7,88 (1H, dd, *J* 7,6 and 1,5 Hz, H-4''), 7,76 (1H, dd, *J* 7,6 and 1,5 Hz, H-3''), 7,65 (1H, m, H-5''), 7,57 (1H, m, H-6''), 6,55 (1H, bs, NH), 5,36 (1H, m, H-3'), 2,11 (1H, m, H-1'), 2,07 (2H, m, H-5'), 2,00 (2H, m, H-2'), 1,87 (2H, m, H-6'), 1,64 (3H, s, H-10'), 1,42 (3H, s, H-9'), 1,39 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 168.3 (C, C-2), 153.5 (C, C-5), 148.4 (C, C-2''), 134.1 (C, C-4'), 132.8 (CH, C-5''), 131.9 (CH, C-4''), 130.6 (CH, C-6''), 124.8 (C, C-1''), 124.6 (CH, C-3''), 120.5 (C, C-3'), 58.6 (C, C-7'), 41.4 (CH, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.9 (CH₃, C-8'), 23.5 (CH₃, C-10'); and EI-MS *m/z* 358 (M⁺); Análise elementar: calculado para C₁₈H₂₂N₄O₂S: C, 60.31%; H, 6.19%; N, 15.63%. Encontrado C, 60.45%; H, 6.06%; N, 15.89%.

2.1.9. *N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-5-(3-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**4i**). Sólido amarelo; rendimento 68%; pf. 198-200 °C; $[\alpha]_D^{20}$: +48 (CHCl₃); IV (KBr) ν_{\max} : 3171, 1557, 1102, 1530 cm⁻¹, 1348; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8,58 (1H, d, *J* 1,5 Hz, H-2''), 7,22 (2H, dd, *J* 7,9 and 1,5 Hz, H-4'', H-6''), 7,61 (1H, t, *J* 7,9 Hz, H-5''), 6,49 (1H, bs, NH), 5,36 (1H, m, H-3'), 2,20 (1H, m, H-1'), 2,00 (2H, m, H-5'), 2,00 (2H, m, H-2'), 1,88 (2H, m, H-6'), 1,64 (3H, s, H-10'), 1,46 (3H, s, H-9'), 1,42 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 167.7 (C, C-2), 154.8 (C, C-5), 134.3 (C, C-4'), 148.7 (C, C-3''), 133.0 (C, C-1''), 132.2 (CH, C-6''), 130.2 (CH, C-5''), 124.1 (CH, C-4''), 121.6 (CH, C-2''), 120.4 (CH, C-3'), 58.6 (C, C-7'), 41.2 (CH, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 24.1 (CH₃, C-8'), 23.4 (CH₃, C-10'), and EI-MS *m/z* 358 (M⁺); Análise elementar: Calculado para C₁₈H₂₂N₄O₂S: C,

60.31%; H, 6.19%; N, 15.63%. Encontrado: C, 60.45%; H, 6.06%; N, 15.89%.

2.1.10. *N*-{1-metil-1-[(1*R*)-4-metilciclohex-3-en-1-il]etil}-5-(4-nitrofenil)-1,3,4-tiadiazol-2-amina (**4j**). Sólido amarelo recristalizado com MeOH; rendimento 85%; pf. 234-238 °C; $[\alpha]_D^{20}$: +63 (CHCl₃); IV (KBr) ν_{\max} : 3176, 1557, 1102, 1517, 1341 cm⁻¹; RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 8,28 (2H, d, *J* 8,4 Hz, H-3'', H-5''); 7,97 (2H, d, *J* 8,4 Hz, H-2'', H-6''), 5,67 (1H, bs, NH), 5,37 (1H, m, H-3'), 2,15 (1H, m, H-1'), 2,06 (2H, m, H-5'), 2,01 (2H, m, H-2'), 1,87 (2H, m, H-6'), 1,65 (3H, s, H-10'), 1,44 (3H, s, H-9'), 1,36 (3H, s, H-8'); RMN de ¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 167.8 (C, C-2), 155.4 (C, C-5), 148.2 (C, C-4''), 137.1 (C, C-1''), 134.4 (C, C-4'), 127.4 (2 CH, C-2'' C-6''), 124.4 (2 CH, C-3'', C-5''), 120.5 (CH, C-3'), 58.9 (C, C-7'), 41.4 (CH, C-1'), 31.2 (CH₂, C-5'), 26.9 (CH₂, C-2'), 24.5 (CH₃, C-9'), 24.3 (CH₂, C-6'), 23.9 (CH₃, C-8'), 23.5 (CH₃, C-10'); EI-MS *m/z* 358 (M⁺); Análise elementar: Calculado para C₁₈H₂₂N₄O₂S: C, 60.31%; H, 6.19%; N, 15.63%. Encontrado C, 60.45%; H, 6.06%; N, 15.89%.

Síntese dos derivados 1,3,4-tiadiazóis **5a-5j**

Os derivados 1,3,4-tiadiazóis (**5a-j**) foram preparados de acordo com procedimento descrito anteriormente²⁸ e as estruturas foram estabelecidas através da comparação com dados existentes na literatura.^{29,30}

2.2. Avaliação da atividade antiproliferativa

Para a realização da triagem *in vitro* foram utilizadas as linhagens de células tumorais humanas U251 (glioma, SNC), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplas drogas), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT29 (côlon) e K562 (leucemia), além da

linhagem VERO (célula epitelial, rim de macaco verde) utilizada para o delineamento da toxicidade dos derivados testados. Essas linhagens foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI/EUA) e foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 5% de soro fetal bovino inativado (SFB), em atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C e ambiente úmido. Uma mistura de penicilina e estreptomicina (1 µg mL⁻¹:1 UI mL⁻¹) foi adicionada às culturas experimentais. As células (100 µL de suspensão celular por compartimento, densidade de inoculação entre 3 x 10⁴ e 6,5 x 10⁴ cel mL⁻¹) foram expostas a diferentes concentrações das amostras dissolvidas em DMSO/RPMI/SFB 5% (0,25; 2,5; 25 e 250 µg mL⁻¹) e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂, em ambiente úmido, por 48 h. A concentração final de DMSO 1% não afetou a viabilidade celular. Utilizou-se doxorrubicina como controle positivo nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg mL⁻¹. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Após o período de incubação de 48 h, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 50% e a proliferação celular foi determinada através da quantificação espectrofotométrica (540 nm) do conteúdo proteico celular, usando-se o teste de sulforrodamina B³¹. A partir da curva de proliferação celular em função da concentração de amostra os parâmetros GI₅₀ (concentração que produz 50% de inibição do crescimento), TGI (concentração que produz inibição total do crescimento ou efeito citostático) foram determinados através de regressão não linear usando o software ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation)³².

2.3. Atividade Antileishmania

Os ensaios microbiológicos foram realizados com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA), cultivadas em meio Warren (infusão de cérebro e coração “Difco®” + hemina + ácido fólico) pH 7,0 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB – Gibco®) e incubadas a 25°C.

Nos experimentos foram utilizadas culturas em fase logarítmica de crescimento, ou seja, após 48 horas de incubação depois do subcultivo. Para os ensaios, foram feitas soluções estoque de 1000 µg/mL dos compostos sintetizados incluindo a tiossemicarbazida, o isotiocianato e o R-(+)-limoneno, solubilizadas com DMSO (dimetilsulfóxido – Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA®) a 1%. Para os testes, um inóculo inicial de 1x10⁶ células/mL em meio Warren de formas promastigotas de *L. amazonensis* com cultivo de 48 h foram colocadas em placa de 24 poços estéreis na presença e na ausência da substância solubilizada em DMSO a 1%. Os tratamentos foram realizados nas concentrações finais de 1, 5, 10, 50 e 100 µg/mL. O crescimento foi avaliado através da contagem em câmara hematocitométrica de Neubauer, em um microscópio óptico, após 72 h de incubação à 25 °C. Os experimentos foram realizados em duplicata e a atividade antileishmania foi expressa através do percentual de inibição de crescimento em relação ao controle³³.

A avaliação da atividade citotóxica dos compostos sintetizados foi realizada sobre macrófagos da linhagem J774G8. Este método baseia-se na afinidade do corante sulforrodamina B pelas proteínas celulares propiciando uma avaliação colorimétrica diretamente proporcional ao número de células viáveis. Uma suspensão de macrófagos J774G8 em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina foi distribuída em microplaca de 96 poços na concentração de 5,0 x 10⁵ células/mL. As células foram incubadas por 24 h em estufa úmida a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ até a formação de uma monocamada. Posteriormente, o meio foi retirado e 100 µL de diferentes concentrações dos compostos (160, 320, 640 e 1.280 µg/mL) foram adicionados à monocamada de macrófagos. Controle de células (sem adição dos compostos sintetizados) foi realizado. A microplaca foi incubada por 48 h após a adição das concentrações dos compostos. Após esse período de incubação, o meio dos poços foi removido, e fixado com ácido tricloroacético

à 10% no volume de 50 µL/poço por 1 h sob refrigeração e ao abrigo de luz. A placa foi lavada 4 vezes em água corrente e mantida em temperatura ambiente até secagem. Em cada poço adicionou-se 50 µL de uma solução 4% de sulforrodamina B, para coloração, e a microplaca foi incubada por 30 min sob refrigeração e ao abrigo da luz. Em seguida a microplaca foi lavada com ácido acético 1% 4 vezes para a remoção do corante. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µL de solução Tris-base 10 mM. A absorbância foi determinada em por espectrofotômetro com leitor de microplacas em 530 nm. A citotoxicidade foi determinada pela destruição celular propiciada pelo composto, a fim de determinar o CC_{50} (dose tóxica a 50% das células).^{33,34}

3. Resultados e discussão

3.1. Obtenção dos 1,3,4-tiadiazóis

A série dos heterocíclicos 1,3,4-tiadiazóis (Figura 1) foi obtida a partir de um protocolo sintético já estabelecido por nosso grupo de pesquisas, em que o precursor terpênico insaturado *R*(+)-limoneno é convertido no seu respectivo isotiocianomonoterpeno **1** a partir da adição quimio- e regioseletiva de ácido isotiocianico (HSCN) à dupla ligação³⁵. Esta metodologia garante a manutenção e a integridade do centro estereogênico do monoterpeno. O isotiocianato terpênico obtido é submetido a uma reação de condensação com hidrazina que leva a formação da tiossemicarbazida monoterpênica **2**.²⁷ As tiossemicarbazonas **3a-3j** são obtidas pela condensação mediante catálise ácida da tiossemicarbazida **2** com

benzaldeído e derivados substituídos.²⁷ Por fim, os derivados 1,3,4-tiadiazólicos **4a-4j** foram preparados a partir da ciclização oxidativa das benzaldeidotiossemicarbazonas **3a-3j** com cloreto férrico mediante refluxo em meio hidro-etanólico. Os tiadiazóis foram obtidos com rendimentos satisfatórios entre 35-85% com tempos reacionais variando de 2 a 20 horas.

Os derivados 1,3,4-tiadiazóis foram caracterizados estruturalmente através das técnicas espectroscópicas de IV, EM e RMN de ¹H e de ¹³C, uni- e bidimensionais. Nos espectros de absorção no infravermelho destacam-se a presença das bandas em 1095-1102 cm⁻¹ característica de vibrações da porção N=C-S-C=N do anel tiadiazólico, além de banda em 3211-3226 cm⁻¹ referente à estiramento da ligação N-H. Para os nitro-derivados **4h**, **4i** e **4j** destacam-se também os sinais referentes ao estiramento do grupo –NO₂ em 1517 e 1341 cm⁻¹. A formação do núcleo 1,3,4-tiadiazol foi confirmado por sinais nos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C. No espectro de RMN de ¹H, observa-se a ausência de sinais de hidrogênios imínicos característicos das benzaldeidotiossemicarbazonas precursoras dos 1,3,4-tiadiazóis, a presença de um singleto em δ_H 5,21-6,55 (NH-6), além de sinais característicos da unidade *R*(+)-limoneno e hidrogênios do sistema aromático provenientes do benzaldeído, enquanto que no espectro de RMN de ¹³C/DEPT verifica-se a presença de dois sinais de carbonos não ligados a hidrogênio em δ_C 165,5-168,8 (C-2) e 153,0-158,2 (C-5) típicos do sistema heterocíclico e também as ausências de sinal de carbono imínico e tiocarbonílico. Os dados espectrais das substâncias sintetizadas foram reportadas anteriormente²⁶.

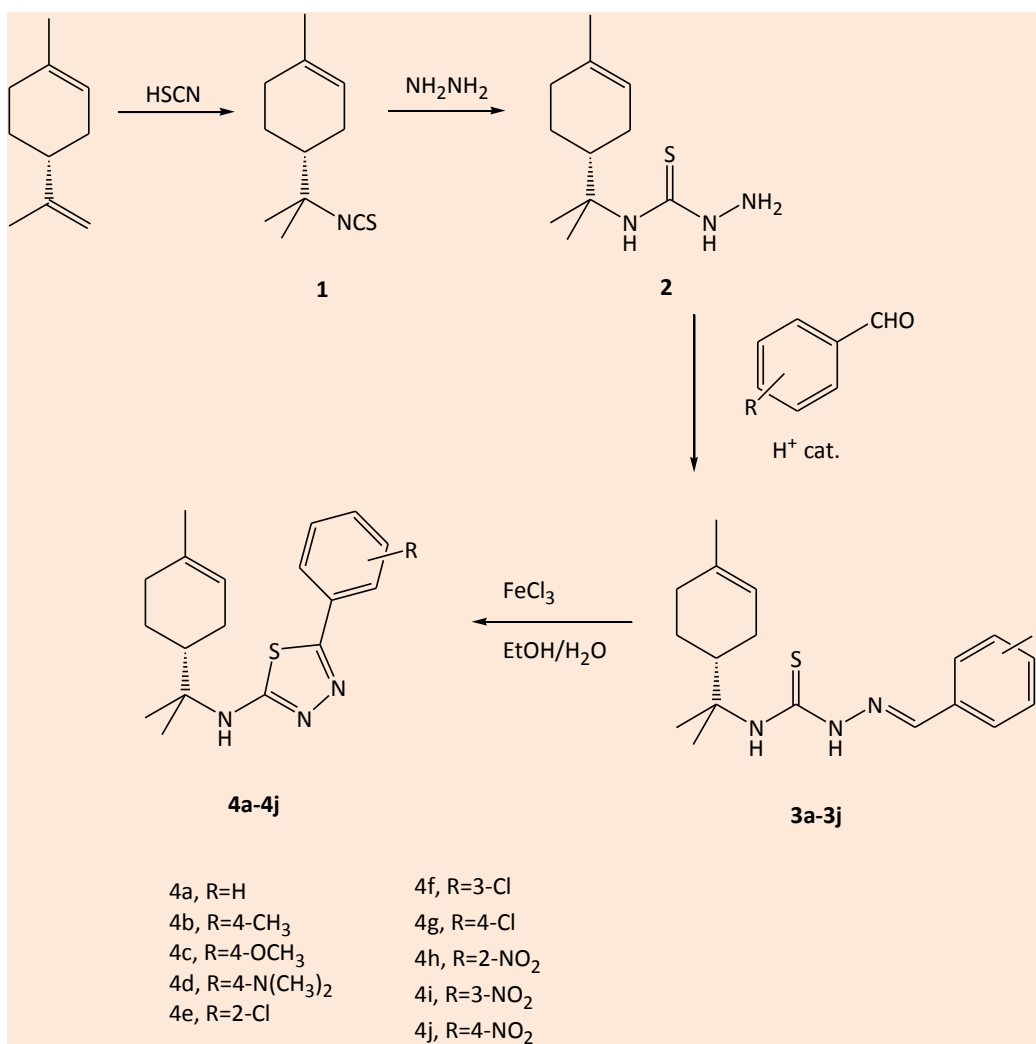


Figura 1. Rota de síntese para obtenção de 1,3,4-tiadiazóis (**4a-4j**) a partir do *R*-(+)-limoneno

3.2. Avaliação da atividade antiproliferativa

A atividade antitumoral para os 1,3,4-tiadiazóis foi avaliada *in vitro* frente a dez diferentes linhagens de células tumorais humanas: glioma (U251), melanoma (UACC-22), mama (MCF-7), ovário com fenótipo resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR/RES), rim (786-0), pulmão, tipo células não-pequenas (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), colo (HT29) e leucemia (K562). A célula epitelial renal de macaco verde (VERO) foi utilizada como parâmetro de avaliação da toxicidade dos compostos sobre célula normal. O quimioterápico doxorubicina foi utilizada como padrão de controle positivo.

Os compostos *R*-(+)-limoneno, isotiocianato **1**, tiossemicarbazida **2** e tiossemicarbazonas **3a-3h** tiveram seu potencial antitumoral anteriormente reportado,²⁷ com destaque para derivados 2-hidroxibenzaldeído e pirrol-carboxaldeído-tiossemicarbazonas como as moléculas potencialmente mais ativas, enquanto que o derivado 4-fluor-benzaldeído mostrou-se seletivo para células tumorais de próstata PC-3.

Com relação à atividade inibitória do crescimento tumoral (GI₅₀), a maioria dos 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno desempenharam atividade antiproliferativa contra as linhagens celulares tumorais avaliadas, em especial frente à células tumorais de melanoma UACC-62, em que os

derivados benzaldeído (**4a**) e 4-metil (**4b**) apresentaram melhor atividade com $GI_{50} = 1,5$ e $0,27 \mu\text{M}$, respectivamente (Tabela 1). Ainda, o derivado **4b** apresentou uma moderada seletividade frente à UACC-62 em comparação com as demais linhagens celulares tumorais avaliadas (Figura 2). Os derivados menos ativos da série foram o 4-Cl (**4g**) e 4- NO_2 (**4j**). O derivado 4-Cl mostrou-se pouco ativo apenas contra as células

tumorais de glioma U251, melanoma UACC-62 e colo HT-29, enquanto que o derivado 4- NO_2 apresentou-se mais ativo para células tumorais de melanoma UACC-62 e leucemia K-562. Para as demais linhagens de células tumorais avaliadas, estes dois derivados mostraram-se inativos. Seis análogos (**4c**, **4d**, **4e**, **4f**, **4h** e **4i**) foram moderadamente ativos frente a todas as células tumorais testadas, não apresentando seletividade significativa.

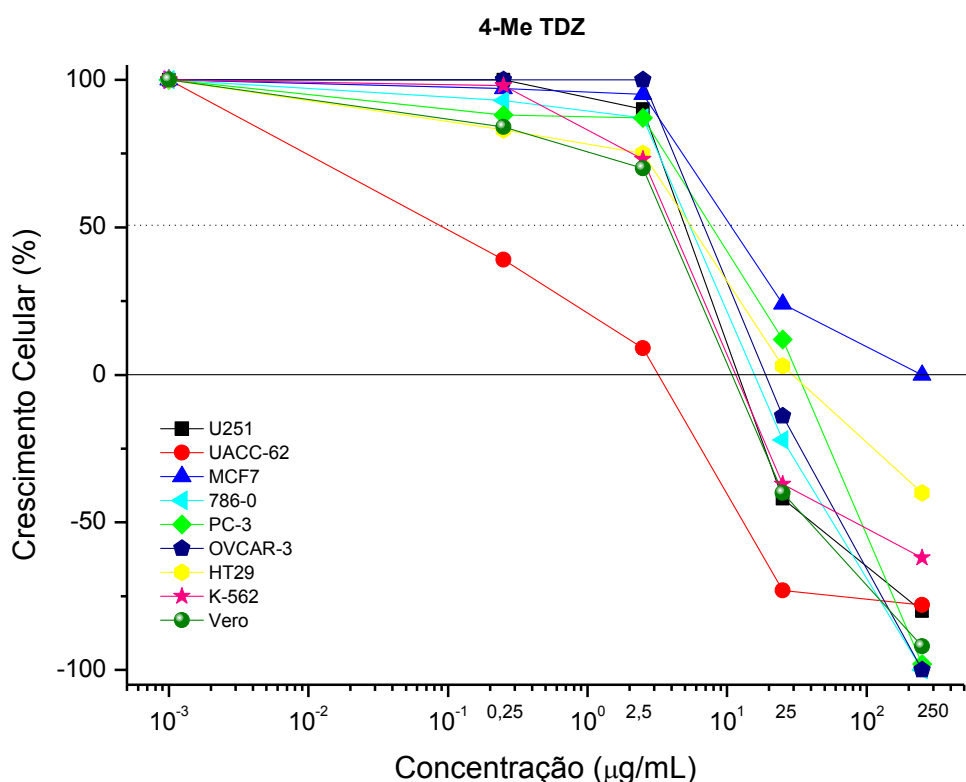


Figura 2. Gráfico de percentagem de crescimento *versus* concentração ($\mu\text{g/mL}$) para avaliação da atividade antitumoral do derivado (**4b**)

Em relação aos derivados nitro-substituídos (**4h-4j**), o mais ativo da série foi o análogo 3- NO_2 (**4i**), enquanto que o 4- NO_2 (**4j**) se mostrou o menos ativo. Porém, este análogo se mostrou moderadamente seletivo para células leucêmicas K-562 e com considerável atividade inibitória do crescimento celular ($GI_{50} = 2,4 \mu\text{M}$). Para os cloro-derivados (**4e-4g**), fracos retiradores de densidade eletrônica, também foi possível observar que o composto mais ativo foi o 3-Cl

(**4f**), enquanto que o menos ativo foi o análogo 4-Cl (**4j**).

Entre os compostos avaliados, no que se refere à atividade citostática (Tabela 2) se destacam os derivados 3-Cl (**4f**) e 3- NO_2 (**4i**), pois ambos se mostraram ativos contra todas as células tumorais avaliadas, porém com baixa seletividade. Ambos os compostos também apresentaram toxicidade contra

células normais VERO com valores de TGI de 31,3 e 31,5 μM , respectivamente.

Em relação à análise individual das células tumorais testadas, novamente o derivado 4- CH_3 (**4b**) se apresentou como o mais ativo, com TGI de 5,8 μM contra as células de melanoma UACC-62. O único composto que se apresentou inativo contra todas as linhagens celulares avaliadas foi o derivado 4-Cl (**4g**).

Quanto à atividade citotóxica dos 1,3,4-tiadiazóis, os derivados 4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ (**4d**), 4-Cl (**4g**), 2- NO_2 (**4h**) e 4- NO_2 (**4j**) se mostraram inativos contra todas as células tumorais testadas. O derivado que apresentou maior atividade citotóxica foi o 3- NO_2 (**4i**). Contudo, a maior citotoxicidade apresentada foi verificada para o derivado 3-Cl (**4f**) contra células tumorais de melanoma UACC-62, com LC_{50} de 36,6 μM .

Analisando os resultados da avaliação de atividade antitumoral realizada para os compostos sintetizados neste trabalho a partir do *R*-(+)-limoneno, pôde-se observar

que a incorporação de novos grupos à sua molécula foi proporcionando o acréscimo da atividade antitumoral dos seus derivados. Inicialmente, este monoterpene apresentou-se com atividade de inibição do crescimento tumoral apenas para células leucêmicas K-562 e com a adição do grupo isotiocianato foi possível observar que a atividade biológica já foi razoavelmente amplificada.

O potencial antitumoral dos 1,3,4-tiadiazóis sintetizados é considerada positiva, mesmo que estes compostos não tenham apresentado uma seletividade considerável. Derivados 1,3,4-tiadiazóis descritos na literatura apresentam atividade antiproliferativa com GI_{50} similares ou maiores aos análogos 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno.^{36,37} Todos os derivados apresentaram-se ativos quanto à atividade inibitória do crescimento celular e alguns análogos, como os derivados com substituintes 3-Cl (**4f**) e 3- NO_2 (**4i**) apresentaram importantes atividades citotóxicas.

Tabela 1. Valores de GI_{50} (μM) para a avaliação da atividade antitumoral de 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno (**4a-4j**)

| Composto | U251 | UACC-62 | MCF-7 | 746-0 | PC-3 | OVCAR-03 | HT29 | K-562 | VERO |
|----------|------|---------|-------|-------|------|----------|------|-------|------|
| DOX | 0,06 | 0,13 | 0,10 | 0,14 | 0,40 | 0,53 | 0,34 | 0,11 | 1,3 |
| 4a | 17,8 | 1,5 | 29,6 | 15,3 | 24,3 | 16,5 | 16,9 | 13,1 | 11,2 |
| 4b | 14,6 | 0,27 | 31,7 | 16,4 | 23,2 | 20,7 | 16,9 | 11,9 | 11,6 |
| 4c | 8,6 | 11,3 | 19,4 | 9,7 | 14,8 | 12,7 | 16,0 | 6,2 | 18,0 |
| 4d | 25,7 | 27,8 | >100 | 56,0 | 39,5 | 56,3 | 22,0 | 10,1 | 70,7 |
| 4e | 68,9 | 14,0 | 28,2 | 14,0 | 93,4 | 93,4 | 69,1 | 43,0 | 52,6 |
| 4f | 12,8 | 8,7 | 17,5 | 13,9 | 16,2 | 12,9 | 18,2 | 12,9 | 11,4 |
| 4g | 81,3 | 78,2 | >100 | >100 | >100 | >100 | 45,4 | >100 | >100 |
| 4h | 19,7 | 13,9 | 31,3 | 44,8 | 36,6 | 15,6 | 24,8 | 16,9 | 23,0 |
| 4i | 9,8 | 9,1 | 16,4 | 11,6 | 12,5 | 11,1 | 14,6 | 10,3 | 11,1 |
| 4j | >100 | 15,6 | >100 | >100 | >100 | 93,9 | >100 | 2,4 | >100 |

DOX=doxorrubicina. U251 (glioma); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); 746-0 (rim); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorretal); K562 (leucemia). VERO (célula epitelial renal de macaco verde, cel. normal).

Tabela 2. Valores de TGI(μM) para a avaliação da atividade antitumoral de 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno (**4a-4j**)

| Composto | U251 | UACC-62 | MCF-7 | 746-0 | PC-3 | OVCAR-03 | HT29 | K-562 | VERO |
|-----------|------|---------|-------|-------|------|----------|------|-------|-------|
| DOX | 1,2 | 0,55 | 4,6 | >46,0 | 5,9 | 8,5 | >46 | 0,46 | >46,0 |
| 4a | 63,1 | 14,3 | >100 | 42,4 | >100 | 49,4 | >100 | 72,7 | 50,0 |
| 4b | 43,3 | 5,8 | >100 | 54,6 | 87,6 | 74,2 | >100 | 43,3 | 35,1 |
| 4c | 21,8 | 24,2 | >100 | 20,7 | 60,3 | 34,9 | >100 | 36,4 | >100 |
| 4d | >100 | 95,0 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 4e | >100 | 73,0 | >100 | 41,7 | >100 | 84,5 | >100 | >100 | >100 |
| 4f | 55,2 | 14,4 | 61,2 | 41,7 | 55,2 | 54,6 | 82,5 | 34,8 | 31,3 |
| 4g | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 4h | 74,2 | 42,1 | >100 | 100 | 99,6 | 57,5 | >100 | >100 | >100 |
| 4i | 20,1 | 20,9 | 84,2 | 24,8 | 34,6 | 11,1 | 57,2 | 32,1 | 31,5 |
| 4j | >100 | 90,9 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

DOX=doxorubicina. U251 (glioma); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); 746-0 (rim); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorretal); K562 (leucemia). VERO (célula epitelial renal de macaco verde, cel. normal).

3.3. Atividade Antileishmania

Com relação a atividade antileishmania, foram avaliadas as atividades dos derivados *R*-(+)-limoneno-1,3,4-tiadiazóis e também os 1,3,4-tiadiazóis desprovidos da unidade monoterpênica. Os compostos sintetizados apresentaram pronunciada atividade frente à forma promastigota de *L. amazonensis* com valores de IC_{50} entre 5,4 e 22,4 μM para os derivados do *R*-(+)-limoneno e de 8,5 a 80,7 μM para os derivados não substituídos. A anfotericina B foi utilizada como fármaco referência e apresentou $\text{CI}_{50} = 0,063\mu\text{M}$.

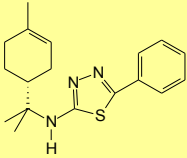
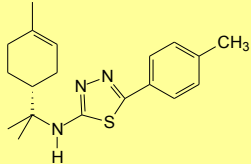
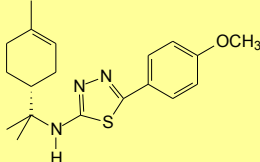
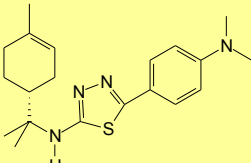
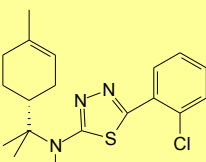
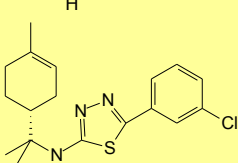
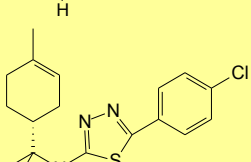
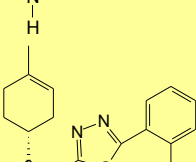
Para os derivados que possuem grupos retiradores de densidade eletrônica, os análogos contendo o grupo nitro nas posições *orto* (**4h**), *meta* (**4i**) e *para* (**4j**), verificou-se que o mais ativo foi o que apresenta o grupo nitro em *meta* (**4i**), com $\text{IC}_{50}=6,0\mu\text{M}$. Para os derivados contendo o grupo cloro também nas posições *orto* (**4e**), *meta* (**4f**) e *para* (**4g**), o composto mais ativo também foi o que apresentou o substituinte

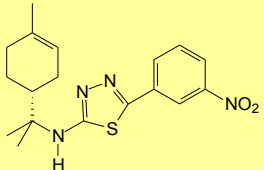
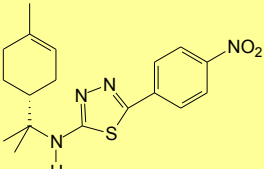
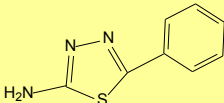
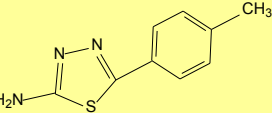
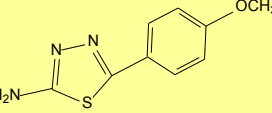
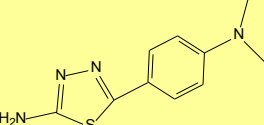
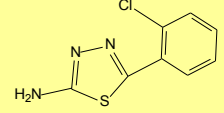
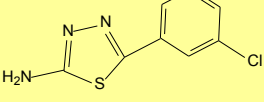
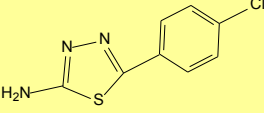
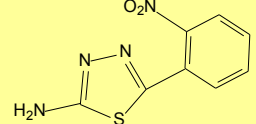
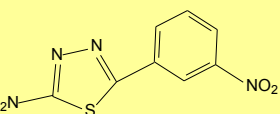
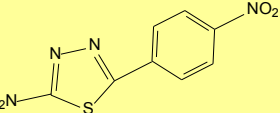
na posição *meta*, com $\text{IC}_{50}= 5,6\mu\text{M}$. Em relação aos derivados contendo grupos doadores de densidade eletrônica, as moléculas que apresentaram melhor desempenho na avaliação da atividade frente à forma promastigota de *L. amazonensis* foram as derivadas 4-OCH₃ (**4c**) e 4-N(CH₃)₂ (**4d**), ambas com $\text{IC}_{50}=5,4\mu\text{M}$ (Tabela 3).

Como pode ser observado na **Tabela 3** os derivados não substituídos de 1,3,4-tiadiazóis apresentaram atividade biológica frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* inferior aos derivados substituídos pela unidade terpênica, com exceção do derivado 4-N(CH₃)₂ (**5d**) com $\text{IC}_{50}=8,5\mu\text{M}$. Assim, a hipótese pela melhor atividade biológica apresentada pelos 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno pode ser devido à presença do grupo terpênico, conferindo maior caráter lipofílico às moléculas. Segundo Barreiro (2008) esta observação é pertinente uma vez que o aumento na lipofilicidade ou coeficiente de partição de uma molécula pode conferir a ela a tendência a ultrapassar com maior facilidade as

membranas hidrofóbicas, apresentando uma melhora no perfil farmacológico.³⁸
 melhor biodisponibilidade, resultando em

Tabela 3. Valores de CI_{50} para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, CC_{50} para células J774G8 e seus respectivos índices de seletividade (IS*)

| Composto | Estrutura | CI_{50} (μM) | CC_{50} (μM) | IS* |
|----------|---|-----------------------|-----------------------|-------|
| 4a |  | 18,0±2,9 | NT | NT |
| 4b |  | 6,9±0,6 | NT | NT |
| 4c |  | 5,4±1,0 | 1237,5 | 229,1 |
| 4d |  | 5,4±1,0 | 2828,4 | 523,8 |
| 4e |  | 22,4±4,9 | NT | NT |
| 4f |  | 5,6±0,2 | 2874,3 | 513,2 |
| 4g |  | 9,1±2,6 | NT | NT |
| 4h |  | 7,1±0,2 | NT | NT |

| | | | | |
|----|---|-----------|--------|-------|
| 4i |  | 6,0±0,6 | 199,5 | 33,3 |
| 4j |  | 7,5±0,0 | NT | NT |
| 5a |  | 80,7±17,5 | NT | NT |
| 5b |  | 16,2±0,0 | NT | NT |
| 5c |  | 16,7±6,5 | NT | NT |
| 5d |  | 8,5±0,3 | NT | NT |
| 5e |  | 34,8±1,7 | NT | NT |
| 5f |  | 17,7±11,7 | NT | NT |
| 5g |  | 15,4±5,0 | 4727,9 | 307,0 |
| 5h |  | 41,0±12,7 | NT | NT |
| 5i |  | 48,4±0,3 | NT | NT |
| 5j |  | 41,9±8,3 | NT | NT |

*IS=CC₅₀/CI₅₀; NT=Não testada

Os compostos que contém o núcleo 1,3,4-tiadiazol apresentam bons resultados de atividade frente a diferentes espécies de *Leishmania*, com valores de IC₅₀ inferiores a 10 µM. Os resultados obtidos neste trabalho são de grande relevância, pois a atividade antileishmania desempenhada pelos 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno são em alguns casos superiores às relatadas na literatura para trabalhos com compostos contendo este tipo de núcleo heterocíclico.

A avaliação da atividade citotóxica (CC₅₀) foi realizada inicialmente para os compostos que apresentaram melhores atividades. Dentre os derivados do *R*-(+)-limoneno, foi observado que os análogos 4-OCH₃ (**4c**), 4-N(CH₃)₂ (**4d**) e 3-Cl (**4f**) apresentaram os menores efeitos tóxicos às células J774G8, sendo os dois últimos com valores de CC₅₀ superiores a 2800 µM. O derivado 3-NO₂ (**4i**) apresentou efeitos tóxicos moderados com valor de CC₅₀ de 199,5 µM. Já em relação aos 1,3,4-tiadiazóis não substituídos, apenas o derivado 4-Cl (**5g**) foi avaliado e se apresentou pouco tóxico com valor de CC₅₀ de 4727,9 µM.

De acordo com os índices de seletividade (IS), foi constatado que os derivados 4-OCH₃ (**4c**), 3-Cl (**4f**) e 4-N(CH₃)₂ (**4d**) 1,3,4-tiadiazóis apresentaram-se bastante seletivos com IS = 229,1, 513,2 e 523,8, respectivamente, enquanto que o derivado 3-NO₂ (**4i**) apresentou média seletividade, com IS = 33,3. Para o derivado não-substituído analisado 4-clorobenzaldeído-1,3,4-tiadiazol (**5g**), a seletividade também foi bastante considerável com IS = 307,0.

Comparados ao fármaco referência, os 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno bem como os derivados sem unidade terpênica não apresentaram o mesmo perfil de atividade. Mas quando comparados à atividades frente à formas promastigotas de *Leishmania* de outros derivados 1,3,4-tiadiazóis da literatura, verificou-se que os compostos sintetizados apresentaram resultados muito satisfatórios, similares e em alguns casos foram mais ativos.^{39,40}

4. Conclusão

Neste trabalho, apresentamos os resultados da avaliação das atividades antitumoral e antileishmania para 1,3,4-tiadiazóis derivados do *R*-(+)-limoneno. Com relação à atividade antitumoral, o derivado 4-metil (**4b**) mostrou-se ativo frente às células tumorais de melanoma (UACC-62), enquanto que os derivados 4-metóxi (**4c**) e 4-dimetilamino (**4d**) foram os mais ativos frente à forma promastigota de *L. amazonenses*. Os resultados obtidos demonstram o potencial farmacológico dos derivados obtidos, em especial à substância (**4b**) que mostrou-se ativa e seletiva frente às células tumorais de UACC-62 levando à continuidade dos estudos para um melhor entendimento do desempenho farmacológico desta substância e a investigação à respeito do mecanismo de ação.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao CNPq e à Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- ¹ Fátima, A.; Modolo, L.V.; Conegero, L. S.; Pilli, R. A.; Ferreira, C. V.; Kohn, L. K.; Carvalho, J. E. Styryl lactones and their derivatives: biological activities, mechanisms of action and potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, *13*, 3371. [CrossRef] [PubMed]
- ² Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products* **2007**, *70*, 461. [CrossRef] [PubMed]
- ³ Sousa, D. P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. *Molecules* **2011**, *16*, 2233. [CrossRef] [PubMed]

- ⁴ Souza M. T.; Almeida, J. R.; Araujo, A. A.; Duarte, M. C.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C.; dos Santos, M. R.; Quintans-Júnior, L. J. Structure-activity relationship of terpenes with anti-inflammatory profile – a systematic review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2014**, *115*, 244. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Van Vuuren, S. F.; Viljoen, A. M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal* **2007**, *22*, 540. [CrossRef]
- ⁶ Marei, G. I. K.; Rasoul, M. A. A.; Abdelgalei, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2012**, *103*, 56. [CrossRef]
- ⁷ Monzote, L.; Garcia, M.; Montalvo, A. M.; Scull, R.; Miranda, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2010**, *105*, 168. [CrossRef] [PubMed]
- ⁸ Kpadonou, K. B. G.; Kpoviessi, S. D.; Yayi, L. E.; Gbaguidi, F.; Frédéricich, M.; Moudachirou, M.; Quetin-Leclercq, J.; Accrombessi, G. C.; Bero, J. *In vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activities of crude extracts and essential oils of *Ocimum gratissimum* Linn from Benin and influence of vegetative stage. *Journal of Ethnopharmacology* **2014**, *155*, 1417. [CrossRef] [PubMed]
- ⁹ Batista, R.; Silva-Júnior, A. J. S.; Oliveira, A. B. Plant-Derived Antimalarial Agents: New Leads and Efficient Phytomedicines. Part II. Non-Alkaloidal Natural Products. *Molecules* **2009**, *14*, 3037. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁰ Quiroga, P. R.; Asensio, C. M.; Nepote, V. Antioxidant effects of the monoterpenes carvacrol, thymol and sabinene hydrate on chemical and sensory stability of roasted sunflower seeds. *Journal of Science and Food Agriculture* **2015**, *95*, 471. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Sobral, M. V.; Xavier, A. L.; Lima, T. C.; Sousa, D. P. Antitumor Activity of Monoterpenes Found in Essential Oils. *The Scientific World Journal* **2014**, *ID 953451*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Jaafari, A.; Tilaoui, M.; Mouse, H. A.; M'bark, L. A.; Aboufatima, R.; Chait, A.; Lepoivre, M.; Ziad, A. Comparative study of the antitumor effect of natural monoterpenes: relationship to cell cycle analysis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2012**, *22*, 534. [CrossRef]
- ¹³ Wattenberg, L. W.; Coccia, J. B. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruitoils. *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 115. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Crowell, P. L.; Siar, A. A.; Burke, Y. D. Antitumorigenic effects of limonene and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1996** *401*, 131. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Vigushin, D. M.; Poon G. K.; Boddy, A.; English, J.; Halbert, G. W.; Pagonis, C.; Jarman, M.; Coombes, R. C. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. Cancer research campaign phase I/II clinical trials committee. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1998**, *42*, 111. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁶ Bailey, H. H.; Levy, D.; Harris, L. S.; Schink, J. C.; Foss, F.; Beatty, P.; Wadler, S. A phase II trial of daily perillyl alcohol in patients with advanced ovarian cancer: Eastern Cooperative Oncology Group Study E2E96. *Gynecologic Oncology* **2002**, *85*, 464. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ World Health Organization, World Cancer Report, 2008, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2009.
- ¹⁸ INCA (Instituto Nacional de Câncer), Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil, 2009. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> (April 2016).
- ¹⁹ Arruda, D. C.; Miguel, D. C.; Yokoyama-Yasunaka, J. K. U.; Katzin, A. M.; Uliana, S. R. B. Inhibitory activity of limonene against

- Leishmania parasites in vitro and in vivo. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2009**, *63*, 643. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Camoutsis, C.; Geronikaki, A.; Ciric, A.; Sokovic, M.; Zoumpoulakis, P.; Zervou, M. Sulfonamide-1,2,4-thiadiazole Derivatives as Antifungal and Antibacterial Agents: Synthesis, Biological Evaluation, Lipophilicity, and Conformational Studies. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2010**, *58*, 160. [CrossRef]
- ²¹ Foroumadi, A.; Mansouri, S.; Kiani, Z.; Rahmani, A. Synthesis and in vitro antibacterial evaluation of N-[5-(5-nitro-2-thienyl)-1,3,4-thiadiazole-2-yl] piperazinyl quinolones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *38*, 851. [CrossRef] [PubMed]
- ²² Karabasanagouda, T.; Adhikari, A. V.; Shetty, N. S. Synthesis and antimicrobial activities of some novel 1,2,4-triazolo [3,4b]-1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazolo[3,4b]-1,3,4-thiadiazines carrying thioalkyl and sulphonyl phenoxy moieties. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *42*, 521. [CrossRef]
- ²³ Cui, Y.; Rao, X.; Shang, S.; Song, Z.; Shen, M.; Liu, H. Synthesis, structure analysis and antibacterial activity of N-[5-dehydroabietyl-1,3,4]thiadiazol-2-yl]-aromatic amide derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society* **2014**, *1*. [CrossRef]
- ²⁴ Foroumadi, A.; Pournourmohammadi, S.; Soltani, F.; Asgharianrezaee, M.; Dabiri, S.; Kharazmi, A.; Shafiee, A. Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of 2-(5-nitro-2-furyl) and 2-(5-nitro-2-thienyl)-5-substituted-1,3,4- thiadiazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *15*, 1983. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Zhang, K.; Wang, P.; Xuan, L.; Fu, X.; Jing, F.; Li, S.; Liu, Y.; Chen, B. Synthesis and antitumor activities of novel hybrid molecules containing 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole bearing Schiff base moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 5154. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁶ Martins, S. C.; Desoti, V. C.; Lazzarin, D.; Vandresen, F.; Silva, C. C. ; Nakamura, T.; Silva, S. O.; Nakamura, C. V. Synthesis and evaluation of the trypanocidal activity of a series of 1,3,4-thiadiazoles derivatives of R-(+)-limonene benzaldehyde-thiosemicarbazones. *Medicinal Chemistry Research* **2016**, *25*, 1193. [CrossRef]
- ²⁷ Vandresen, F.; Falzirolli, H.; Almeida, B. S. A. ; Silva A. P. B. G.; Oliveira, D. N.; Catharino, R. R.; Ruiz, A. L. T. G.; Carvalho, J. E.; Foglio, M. A.; Silva, C. C. Novel R-(+)-limonene-based Thiosemicarbazones and Their Antitumor Activity Against Human Tumor Cell Lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *79*, 110. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Gireesh, T. M.; Kamble, R. R.; Taj, T. Synthesis and antimicrobial and anticancer activity of new imidazole [2, 1-b] [1,3,4] thiadiazoles. *Pharmaceutical Chemistry Journal* **2011**, *45*, 313. [CrossRef]
- ²⁹ Rajak, H.; Agarawal, A.; Parmar, P.; Thakur, B. S.; Veerasamy, R.; Sharma, P. C.; Kharya, M. D. 2,5-Disubstituted-1,3,4-oxadiazoles/thiadiazole as surface recognition moiety: Design and synthesis of novel hydroxamic acid based histone deacetylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter* **2011**, *21*, 5735. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Rao, V. R.; Srinivasan, V. R. 1,3,4-Oxa(thia)diazoles: Part V – 2-amino-5-aryl-1,3,4-thiadiazoles. *Indian Journal of Chemistry* **1970**, *8*, 509.
- ³¹ Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **1991**, *83*, 757. [CrossRef]
- ³² Shoemaker, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 813. [CrossRef]

- ³³ Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Veiga, V. F.; Nakamura, C. V. Copaiba Oil: an alternative to development of new drugs against leishmaniasis. *Evidence Based Complementary Alternative Medicine* **2012**, 898419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Veiga-Jr, V. F.; Pinto, A. C.; Nakamura, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated *in vitro* antiparasitic and synergic activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 2994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Silva, C. C.; Almagro, V.; Marsaiolli, A. J. A direct route to terpene isothiocyanates. *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, 6717. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Kumar, S.; Gopalakrishnan, V.; Hedge, M.; Rana, V.; Dhepe, S. S.; Ramareddy, S. A.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Srivastava, M. Synthesis and antiproliferative activity of imidazo[2.1-b][1,3,4-thiadiazole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24, 4682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Charitos, G.; Trafalis, D. T.; Dalezis, P.; Potamitis, C.; Sarli, V.; Zoumpoulakis, P.; Camoutsis, C. Synthesis and anticancer activity of novel 3,6-disubstituted 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4 thiadiazoles derivatives. *Arabian Journal of Chemistry* **2017**, *In press*. [[CrossRef](#)]
- ³⁸ Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M.; *Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*, Artmed: Porto Alegre, 2008. p.41.
- ³⁹ Poorrabab, F.; Ardestani, S. K.; Emami, S.; Behrouzi-Fardmoghadam, M.; Shafiee, A.; Foroumadi, A. Nitroimidazolyl-1,3,4-thiadiazole-based anti-leishmanial agents. Synthesis and *in vitro* evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 44, 1758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Silva, E. F.; Canto-Cavalheiro, M. M.; Braz, V. R.; Cysne-Finkelstein, L.; Leon L. L.; Echevarria, A. Synthesis, and biological evaluation of new 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine derivatives against *Leishmania amazonensis* promastigotes and amastigotes. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 37, 979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]