



Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Ana Carolina Carbonaro Souza

**Síntese de Hidrazonas, Semicarbazonas e Tiossemicarbazonas de
Indirubinas 5-substituídas**

Juiz de Fora

2017

Ana Carolina Carbonaro Souza

**Síntese de Hidrazonas, Semicarbazonas e Tiossemicarbazonas de
Indirubinas 5-substituídas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química.
Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Richard Michael Grazul.

Juiz de Fora

2017

Dedico este trabalho ao meu esposo Túlio, meu melhor conselheiro e incentivador.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio e suporte fornecidos para que este trabalho fosse possível. Foi pelo cuidado de vocês que cheguei até aqui.

Ao meu esposo Túlio, por todo amor e paciência durante esta jornada. Ao Sérgio e a Lelena, maiores incentivadores da educação que eu conheço, por todo apoio.

À minha irmã Anna Clara e a Dayane, por me receberem muito bem na “Ksa” e fazerem minha estadia em Juiz de Fora muito especial. Obrigada pelas risadas noturnas. Aprendi muito com vocês.

Ao professor Marcelo, pelos primeiros ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de conhecer esse mundo fascinante que é a ciência.

Ao professor Richard, pela confiança em me receber em seu laboratório. Obrigada pela paciência e por compartilhar um pouco do seu conhecimento.

À professora Mara, pela recepção na UFJF e por toda ajuda.

Ao Pedro e Hugo, que sempre se prontificaram a me ajudar com dúvidas rotineiras e compartilharam de suas experiências.

Ao Danilo, que primeiro se aventurou pelo mundo das indrubinas e que gentilmente me cedeu algumas observações.

A Raíssa, Isa e Ju pela amizade. Obrigada pelas risadas, por escutarem minhas histórias mirabolantes durante o almoço e por compartilharem comigo o dia mais feliz da minha vida. Obrigada, especialmente, Ju, por cuidar de mim quando estava sozinha e pelos bolos de cenoura.

Às amigas de Barroso, Fabiana, Grazi, Virgínia e Vanessa, por se fazerem sempre presentes.

Aos amigos do NUPEQ e demais laboratórios pela ajuda. Ao Departamento de Física, em especial ao Jefferson, e ao Departamento de Farmácia pelas análises realizadas.

A todos os professores que fizeram e fazem parte da minha vida acadêmica e que me inspiram.

A UFJF, CAPES E FAPEMIG pelo suporte e bolsa concedidos.

“Há mais pessoas que desistem do que pessoas que fracassam.”

(Henry Ford)

RESUMO

A presente dissertação, intitulada “Síntese de Hidrazonas, Semicarbazonas e Tiossemicarbazonas de Indirubinas 5-substituídas”, descreve a preparação e caracterização de indirubinas associadas a unidades semicarbazonas e tiossemicarbazonas. Duas rotas sintéticas foram examinadas para a obtenção dos compostos-alvo propostos: 1) via reação de adição nucleofílica de indirubinas-3'-hidrazonas a fenilisocianatos e fenilisotiocianatos e 2) pela condensação entre indirubinas-5-substituídas e semicarbazidas e tiossemicarbazidas *N-4* substituídas. Os compostos obtidos foram caracterizados pela faixa de fusão, espectroscopia na região do ultravioleta visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C .

Palavras-chave: Indirubina, Índigo, Semicarbazonas, Tiossemicarbazonas, Antineoplásicos.

ABSTRACT

The present dissertation, entitled "Synthesis of Hydrazones, Semicarbazones and Thiosemicarbazones of 5-substituted Indirubines," describes the preparation and characterization of indirubins 3' hydrazones, semicarbazones and thiosemicarbazones. Two synthetic routes were examined to obtain the proposed target compounds: 1) via the nucleophilic addition reaction of indirubins-3'-hydrazones to phenylisocyanates and phenylisothiocyanates and 2) by the condensation between 5-substituted indirubins and *N4*-semicarbazides and thiosemicarbazides. The compounds obtained were characterized by their melting, ultraviolet-visible and infrared spectroscopies, and ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance.

Keywords: Indirubin, Índigo, Semicarbazones, Thiosemicarbazones, Antineoplastic.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Formação da indirubina e índigo a partir do indoxil.	18
Esquema 2: Reação de Grignard para obtenção de um álcool terciário em C3'	23
Esquema 3: Rota de preparação para semicarbazonas e tiossemicarbazonas	27
Esquema 4: Análise retrossintética para os compostos-alvo	32
Esquema 5: Síntese 5-nitroisatina (1)	33
Esquema 6: Síntese 5-aminoisatina (2)	33
Esquema 7: Síntese das indirubinas 5-substituídas (3a) e (3b)	34
Esquema 8: Síntese das indirubinas-3'-hidrazona 5-substituídas (4a) e (4b)	34
Esquema 9: Síntese das semicarbazidas e tiossemicarbazidas N-4 substituídas (5a-b), (6a-b) e (7a-b)	35
Esquema 10: Rota sintética utilizada como referência para síntese dos compostos-alvo	36
Esquema 11: Síntese da 5-nitroisatina (1)	37
Esquema 12: Tentativa de redução da 5-nitroisatina (1) e formação do composto (14)	37
Esquema 13: Rota sintética de (K. JNANESHWAR; H. DESHPANDE, 1999) para síntese da convolutamidina A	38
Esquema 14: Rota sintética para 5-aminoisatina (2) baseada em (MAGIATIS, et al., 2010)..	41
Esquema 15: Hidrólise da isatina (1a) em meio básico.	42
Esquema 16: Rota sintética para 5-acetamidaisatina (20)	45
Esquema 17: Síntese das indirubinas 5-substituídas (3a), (3b) e (3c)	45
Esquema 18: Mecanismo de formação do indoxil.....	46
Esquema 19: Mecanismo de formação das indirubinas em meio alcalino	46
Esquema 20: Síntese das indirubinas-3'-hidrazona 5-substituídas (4a), (4b) e (4c)	53
Esquema 21: Tentativa de síntese das hidrazonas (4b) e (4c)	65
Esquema 22: Síntese das semicarbazidas e tiossemicarbazidas N4-substituídas	70
Esquema 23: Síntese dos compostos-alvo pela rota a.	72
Esquema 24: Síntese dos compostos-alvo pela rota b	75
Esquema 25: Representação do padrão de fragmentação para o composto (9b)	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de I) Indirubina e II) Índigo.....	17
Figura 2: Estrutura dos primeiros derivados naturais isolados.....	17
Figura 3: Estrutura dos compostos com atividade relevante no trabalho de (BEUCHAR, <i>et al.</i> , 2006).....	20
Figura 4: Estrutura dos compostos com atividade relevante no trabalho de (MOON, <i>et al.</i> , 2006).....	20
Figura 5: Estrutura dos compostos com considerável solubilidade e atividade antiproliferativa (CHENG, <i>et al.</i> , 2010).....	21
Figura 6: Estrutura dos compostos sintetizados por (GINZINGER, <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figura 7: Indirubinas 5-sulfonamidas sintetizadas por (JAUTELAT, <i>et al.</i> , 2005).....	23
Figura 8: Estrutura dos compostos sintetizados por (JAUTELAT, <i>et al.</i> , 2005).....	24
Figura 9: Compostos com boa atividade celular sintetizados por (TANAKA, <i>et al.</i> , 2006)....	25
Figura 10: Composto com melhor atividade inibitória para DRAK 2 (JUNG, <i>et al.</i> , 2016) ...	25
Figura 11: Protótipos à potencias agentes antileishmaniais.	26
Figura 12: Estrutura geral das hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas	26
Figura 13: Potenciais agentes antineoplásicos sintetizados por (JUNJIE, <i>et al.</i> , 2015).....	28
Figura 14: Estrutura geral dos compostos propostos neste trabalho.	31
Figura 15: Compostos-alvo propostos	35
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H para o composto (14) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	39
Figura 17: Expansão do espectro de RMN de ¹ H para o composto (14) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	39
Figura 18: Espectro de RMN de ¹³ C para o composto (14) (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	40
Figura 19: Estrutura do composto (18).....	43
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H para o composto vermelho (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	43
Figura 21: Espectro de RMN de ¹³ C para o composto vermelho (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	44
Figura 22: Espectro na região do UV-Vis da 5-nitroindirubina (3a)	47
Figura 23: Espectro na região do infravermelho da 5-nitroindirubina (3a)	48
Figura 24: Espectro de RMN de ¹ H da 5-nitroindirubina (3a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	49
Figura 25: Espectro de RMN de ¹³ C da 5-nitroindirubina (3a) (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	50
Figura 26: Mapa de contorno HSQC para (3a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	50
Figura 27: Expansão do mapa de contornos HSQC para (3a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	51
Figura 28: Mapa de contorno HMBC para (3a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	51
Figura 29: Expansão mapa de contornos HMBC para (3a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	52
Figura 30: Espectro na região do UV-Vis para (-----) 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a) e (____) 5-nitroindirubina (3a).....	53
Figura 31: Espectro na região do UV-Vis para 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a) em (____) solução metanólica neutra e (----) solução ácida.....	54
Figura 32: Espectro na região do infravermelho para 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a).....	54
Figura 33: Espectro de RMN de ¹ H da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	55
Figura 34: Espectro de RMN de ¹³ C da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a) (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	56
Figura 35: Espectro na região do UV-Vis para (____) composto amarelo-esverdeado e (-----) 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a)	57
Figura 36: Espectro na região do infravermelho para o composto amarelo-esverdeado.....	57

Figura 37: Espectro de RMN de ^1H do composto amarelo-esverdeado (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	58
Figura 38: Espectro de RMN de ^1H do composto amarelo-esverdeado com D ₂ O (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	59
Figura 39: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto amarelo-esverdeado (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	60
Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C do composto amarelo-esverdeado (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	60
Figura 41: Estruturas do composto descrito por (BERGMAN; EKLUND, 1982).	61
Figura 42: Atribuições para o espectro de RMN de ^1H do composto (21a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	62
Figura 43: Atribuições para o espectro de RMN de ^{13}C do composto (21a) (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	63
Figura 44: Mapa de contornos HMBC do composto (21a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	63
Figura 45: Mapa de contornos COSY do composto (21a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	64
Figura 46: Mapa de contornos HSQC do composto (21a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	64
Figura 47: Espectro na região do infravermelho para (21c).	66
Figura 48: Espectro de RMN de ^1H para o composto (21c) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	67
Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto (21c) (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	67
Figura 50: Espectro de RMN de ^1H para o composto (21c) - 24h de reação (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	68
Figura 51: Comparativo espectro de RMN de ^1H para (21a), (21c) e (21c) - 48 horas de reação (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	69
Figura 52: Comparação dos espectros de RMN de ^1H da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a) e do bruto reacional (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	74
Figura 53: Espectros de RMN de ^1H do composto (9b) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	76
Figura 54: Espectros de RMN de ^{13}C do composto (9b) (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	77
Figura 55: Espectro na região do infravermelho para o composto (9b).	77
Figura 56: Espectro de massas ES/TOF para o composto (9b).	78
Figura 57: Expansão do espectro de massas ES/TOF para o composto (9b).	79
Figura 58: Espectro de massas ES/TOF para (25b).	81
Figura 59: Espectro de massas ES/TOF para (9a).	82
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H do composto (25a) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	83
Figura 61: Espectro de massas ES/TOF para o composto (25a).	84
Figura 62: Produtos laterais das reações com semicarbazida e tiossemicarbazidas.	84
Figura 63: Comparação dos espectros de RMN de ^1H da feniltiossemicarbazida (5b) e do composto (28b) (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	86
Figura 64: Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C da feniltiossemicarbazida (5b) e do composto (28b) (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	86
Figura 65: Espectro na região do infravermelho para o composto (28b).	87
Figura 66: Estrutura dos compostos-alvo propostos inicialmente.	89
Figura 67: Estrutura dos compostos 5-acetamida substituídos.	90
Figura 68: Compostos inéditos sintetizados neste trabalho.	91

LISTA DE TABELAS

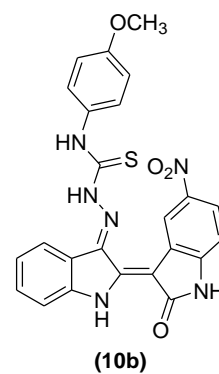
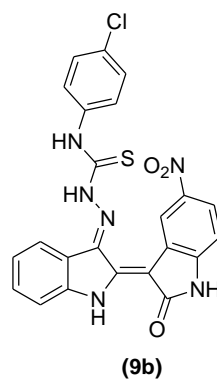
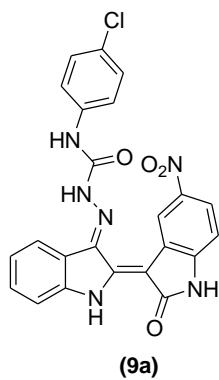
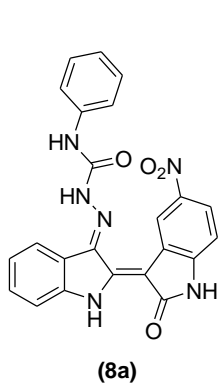
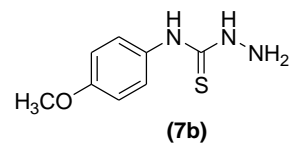
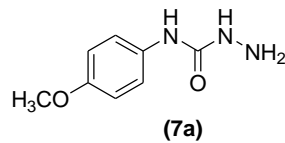
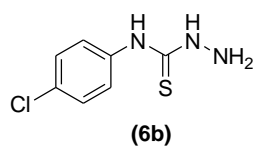
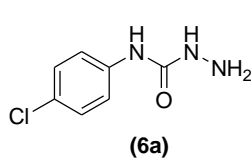
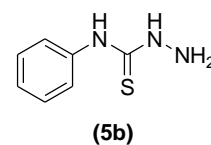
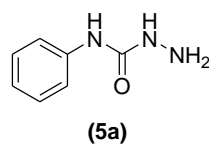
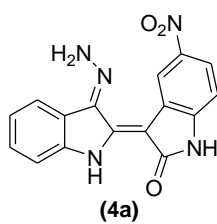
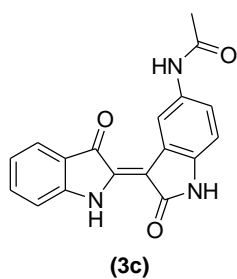
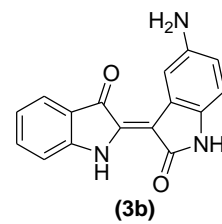
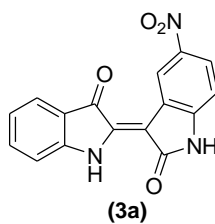
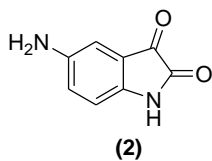
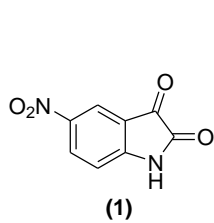
Tabela 1: Ponto de fusão e rendimento para as indirubinas 5-substituídas	46
Tabela 2: Dados espectroscópicos obtidos para as indirubinas (3a) , (3b) e (3c)	47
Tabela 3: Hidrogênios das indirubinas (3a) , (3b) e (3c) atribuídos neste trabalho ^a e por Beuchard ^b (BEAUCHARD et al., 2006)	52
Tabela 4: Dados obtidos para reação de síntese dos compostos (21b) e (21c)	65
Tabela 5: Características físicas da semicarbazidas e tiossemicarbazidas sintetizadas.....	70
Tabela 6: Dados espectroscópicos obtidos para semicarbazidas e tiossemicarbazidas sintetizadas	71
Tabela 7: Resumo das condições testadas para síntese dos compostos-alvo pela rota a.....	73
Tabela 8: Sistemas de solventes empregados	73
Tabela 9: Resumo dos dados espectroscópicos para os compostos-alvo sintetizados	80

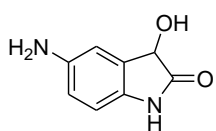
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOH	ácido acético
CCD	cromatografia em camada delgada
CDKs	cyclin-dependent kinases
CI ₅₀	concentração que inibe 50% do crescimento de uma população
d	duplete
dd	duplete de duplete
ddd	duplete de duplete de duplete
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido deuterado
EtOH	etanol
F. M.	fórmula molecular
GSK-3	glycogen synthase kinase-3
Hex	hexano
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
I. V.	Infravermelho
Lit.	literatura
m	multipleto
MeOH	metanol
MHz	megaHertz
P. F.	ponto de fusão
PMA	ácido fosfomolíbico
ppm	partes por milhão
R _f	fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	simpleto
t. a.	temperatura ambiente

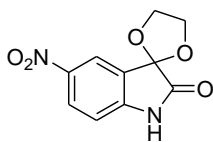
t	triplete
td	triplete de duplete
THF	tetrahidrofurano
U.V-Vis	ultravioleta-visível
°C	graus Celsius
δ	deslocamento químico
μM	micromolar
<i>J</i>	constante de acoplamento
ν	número de onda

LISTA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NESTE TRABALHO

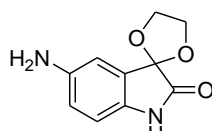




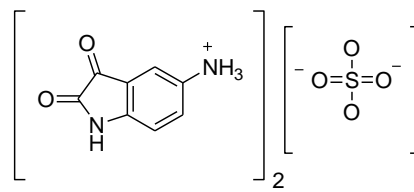
(14)



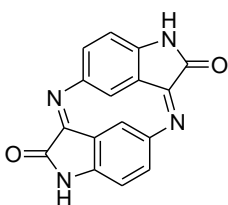
(15)



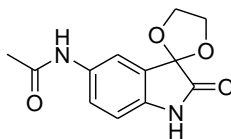
(16)



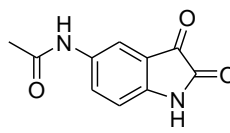
(17)



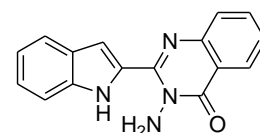
(18)



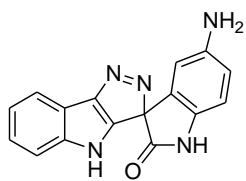
(19)



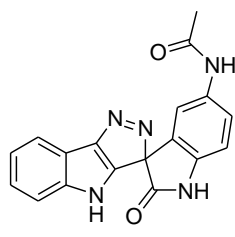
(20)



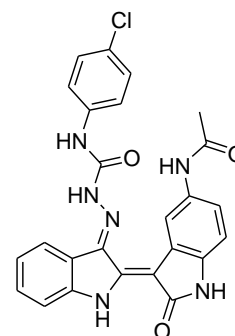
(21a)



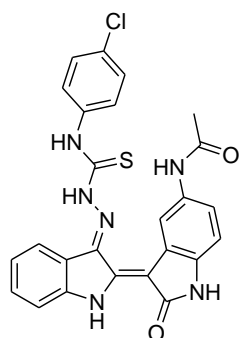
(21b)



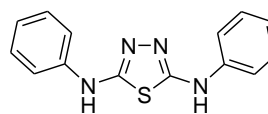
(21c)



(25a)



(25b)



(28b)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 INDIRUBINAS	17
1.2 CDKs e GSKs	18
1.3 REVISÃO DA LITERATURA	19
1.3.1 Quinases como alvo de inibição	19
1.3.2 Solubilidade.....	20
1.3.3 Outros alvos de inibição	24
1.4 HIDRAZONAS, SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS	26
1.5 QUÍMICA MEDICINAL	28
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	31
4 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA	29
5 METODOLOGIA	33
5.1 SÍNTESE DA 5-NITROISATINA (1)	33
5.2 SÍNTESE DA 5-AMINOISATINA (2)	33
5.3 SÍNTESE DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (3a) e (3b)	33
5.4 SÍNTESE DAS INDIRUBINAS-3'-HIDRAZONA 5-SUBSTITUÍDAS (4a) e (4b)....	34
5.5 SÍNTESE DAS FENILSEMICARBAZIDAS E FENILTIOSSEMICARBAZIDAS N-4 SUBSTITUÍDAS (5a-b), (6a-b) e (7a-b).....	34
5.6 SÍNTESE DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (8a-b), (9a-b), (10a-b), (11a-b), (12a-b) e (13a-b)..	35
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1 SÍNTESE DA 5-NITROISATINA (1)	37
6.2 SÍNTESE DA 5-AMINOISATINA (2)	37
6.2.1 Síntese da 5-acetamida isatina (20)	44
6.3 SÍNTESE DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (3a), (3b) e (3c)	45
6.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS INDIRUBINAS-3'-HIDRAZONA 5- SUBSTITUÍDAS (4a), (4b) e (4c).	52
6.4.1 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a).....	53
6.4.2 5-aminoindirubina-3'-hidrazona (4b) e 5-acetamidaindirubina-3'-hidrazona (4c)	65
6.5 SÍNTESE DAS FENILSEMICARBAZIDAS E FENILTIOSSEMICARBAZIDAS N-4 SUBSTITUÍDAS (5a-b), (6a-b) e (7a-b).....	69

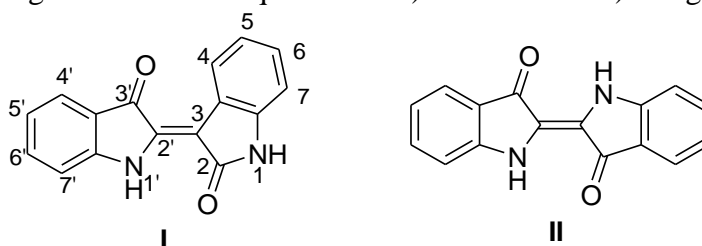
6.6 SÍNTESE DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (8a-b), (9a-b), (10a-b), (24a-b), (25a-b) e (26a-b) PELA ROTA A.....	71
6.7 SÍNTESE DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (8a-b), (9a-b), (10a-b), (24a-b), (25a-b) e (26a-b) PELA ROTA B.....	74
7 CONCLUSÕES.....	89
PARTE EXPERIMENTAL.....	93
1 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	93
2 PREPARAÇÃO.....	93
2.1 Síntese da 5-nitroisatina (1).....	93
2.2 Síntese da 5-aminoisatina (2).....	94
2.3 Síntese das indirubinas 5-substituídas (3a), (3b) e (3c).....	99
2.4 Síntese das indirubinas-3'-hidrazona (4a), (4b) e (4c).....	101
2.5 Síntese das N-4-fenilsemicarbazidas e N-4-feniltiossemicarbazidas (5a-b), (6a-b) e (7a-b).....	104
2.6 Síntese dos derivados indirubínicos propostos	104
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS.....	110

1 INTRODUÇÃO

1.1 INDIRUBINAS

As indirubinas são compostos bis-indólicos de ocorrência natural encontrados em diferentes espécies de plantas, como a *Isatis spp*, *Indigofera tinctoria* e *Baphicacanthus cusia*, organismos marinhos e urina humana (ADACHI *et al.*, 2001; JAUTELAT *et al.*, 2005; EFSTATHIOU *et al.*, 2014). Isômero vermelho do famoso corante *Indigo Blue* (Figura 1), sua primeira aplicação, datada do século 13 a.C, foi no tingimento de fibras na região do Mediterrâneo (MEIJER, *et al.*, 2006).

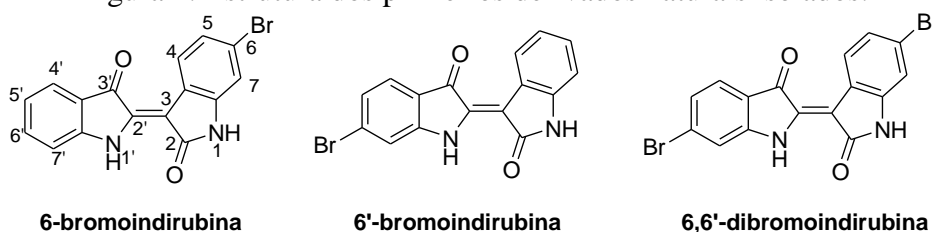
Figura 1: Estrutura química de I) Indirubina e II) Índigo



Fonte: Elaborado pela própria autora

O isolamento da indirubina, a partir da planta *Isatis tinctoria*, e caracterização ocorreram apenas em 1855, pelo químico Henry Edward Schunck, responsável também por demonstrar, em 1856, que este composto é isomérico ao índigo, dando-lhe o nome de indirubina. Os primeiros derivados naturais identificados foram a 6-bromoindirubina, 6'-bromoindirubina e a 6,6'-dibromoindirubina (Figura 2), isolados em 1992 como componentes minoritários do pigmento púrpura excretado por moluscos das famílias *Muricidae* e *Thaisidae*. Este pigmento, conhecido como Royal Purple, foi utilizado como corante desde a idade do Ferro (MEIJER, *et al.*, 2006).

Figura 2: Estrutura dos primeiros derivados naturais isolados.

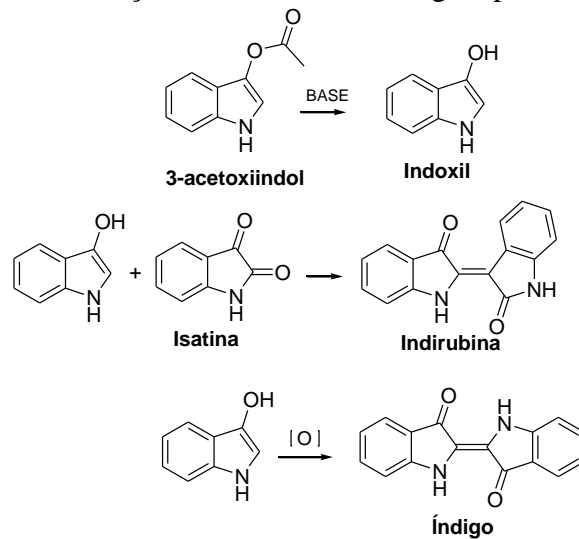


Fonte: Elaborado pela própria autora

Sinteticamente, a indirubina foi obtida em 1870 pelo químico alemão Adolf von Bayer (JAUTELAT, *et al.* 2005; MEIJER, *et al.*, 2006). Tal composto é produzido pela condensação do indoxil - gerado pela hidrólise em meio básico do 3-acetoxiindol - com isatina, como mostra

o Esquema 1. O indoxil sofre oxidação em contato com o ar e dimeriza-se, por isso, a formação da indirubina e seus derivados vem sempre acompanhada de uma pequena quantidade de índigo.

Esquema 1: Formação da indirubina e índigo a partir do indoxil.



Fonte: Elaborado pela própria autora

As propriedades medicinais da indirubina foram relatadas primeiramente em 1966, no Instituto de Ciências Médicas da China, quando este composto foi isolado da mistura de ervas conhecida como *Danggui Longhui Wan*, utilizada há milênios no tratamento da leucemia mieloide crônica (HOESSEL *et al.*, 1999; POLYCHRONOPOULOS *et al.*, 2004; BEAUCHARD *et al.*, 2006).

Os primeiros relatos sobre a forma como as indirubinas atuam no organismo surgiram em 1999, em trabalho publicado por Hoessel e colaboradores (HOESSEL, *et al.*, 1999). Durante as investigações sobre agentes antineoplásicos presentes em plantas empregadas na Medicina Chinesa, este grupo demonstrou que as indirubinas e seus análogos inibem as proteínas quinases, especificamente as CDKs (cyclin-dependent kinases) e GSK-3 (glycogen synthase kinase-3), pela competição pelo sítio catalítico da ATP (JAUTELAT, *et al.* 2005).

1.2 CDKs e GSKs

As proteínas quinases são a maior família de proteínas em eucariotos, totalizando aproximadamente 500 tipos diferentes. A fosforilação é um dos principais mecanismos de regulação do ciclo celular e aquelas proteínas catalisam este processo utilizando moléculas de ATP e, em alguns casos, GTP como doadores de fosfato. Elas estão relacionadas ao desenvolvimento de inúmeras doenças, como câncer, diabetes e Alzheimer (POLYCHRONOPOULOS, *et al.*, 2004; MOON, *et al.*, 2006). Desta forma, a inibição de uma quinase pode desencadear uma mudança na resposta celular e, conseqüentemente, uma

modificação na evolução de tais doenças (GARCÍA-ECHEVERRÍA; TRAXLER; EVANS, 2000).

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

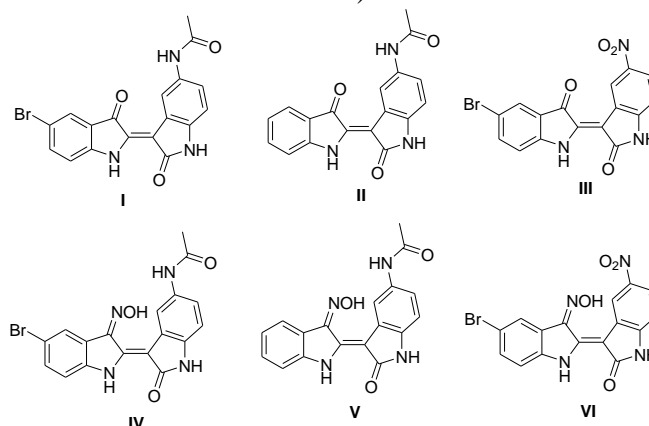
1.3.1 Quinases como alvo de inibição

Durante os últimos 20 anos, muitos pesquisadores estiveram interessados nas indirubinas e seus análogos como potenciais inibidores das proteínas quinases. Os diversos estudos de relação estrutura-atividade publicados ao longo deste período, demonstram que a introdução de determinados substituintes nas posições 5, 3', 4' e 5' do esqueleto indirubínico (Figura 1-I) contribui positivamente para o poder de inibição, enquanto nas demais posições leva à uma redução se comparado à indirubina.

Beauchard e colaboradores (BEUCHARD, *et al.*, 2006) sintetizaram derivados 5-nitro, 5-amino, 5-acetilamino e 5-halogeno 3'-substituídos. A propriedade inibitória foi testada para as quinases CDK1, CDK5 e GSK-3. Os derivados 5-halogenados, especialmente aqueles substituídos por bromo, e também os 5-nitro substituídos, apresentaram poder de inibição significativo para todas as quinases, com valores de IC_{50} da ordem de 10 μ M, enquanto a indirubina apresenta valor de IC_{50} de 10^3 μ M para as mesmas quinases. Os derivados 5-amino e 5-acetilamino apresentaram, em geral, valores de IC_{50} até 10 vezes menores que os derivados citados acima (valores próximos à 0,1 μ M), entretanto, inibem mais efetivamente a GSK-3 que CDK1 e CDK5, sendo, portanto, seletivos para GSK-3.

O estudo apontou, ainda, assim como trabalho prévio de Polychronopoulos (POLYCHRONOPOULOS, *et al.*, 2004), que a substituição em 3' por um grupo oxima (Figura 3-IV, V e VI) acarreta um aumento da atividade inibitória até 20 vezes maior quando comparado aos análogos oxigenados. Na Figura 3, encontra-se alguns dos compostos que apresentaram atividade relevante.

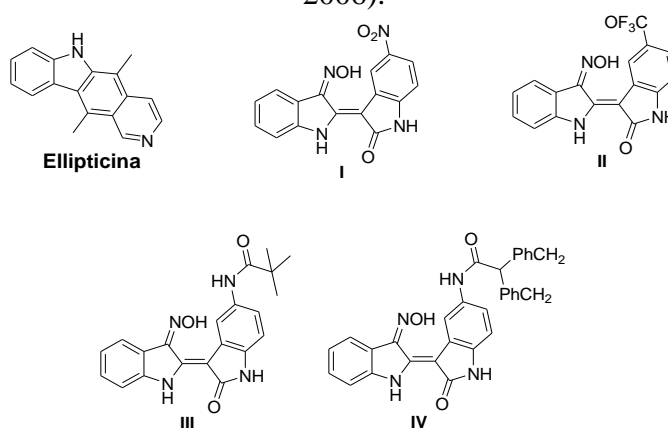
Figura 3: Estrutura dos compostos com atividade relevante no trabalho de (BEUCHAR, *et al.*, 2006).



Fonte: Elaborado pela própria autora

O grupo de Moon (MOON *et al.*, 2006) também investigou as propriedades biológicas de derivados 5 e 3' substituídos. Os compostos sintetizados foram testados em diferentes linhagens de células cancerígenas, como de estômago (SNU638), leucemia (HL-60), mama (HT1080), cólon (Col2) e pulmão (A549), além da proteína quinase CDK2. Na Figura 4, pode-se observar os compostos I e II que se mostraram potentes inibidores da CDK2. Os valores de IC_{50} são comparáveis a Ellipticina, um agente antineoplásico muito conhecido. Os compostos III e IV, apesar de demonstrarem boa atividade antiproliferativa para todas as linhagens, não mostraram efeito de inibição substancial para CDK2. Este fato sugere que os derivados indirubínicos possuem mais de um mecanismo de ação, embora ainda não elucidados.

Figura 4: Estrutura dos compostos com atividade relevante no trabalho de (MOON, *et al.*, 2006).



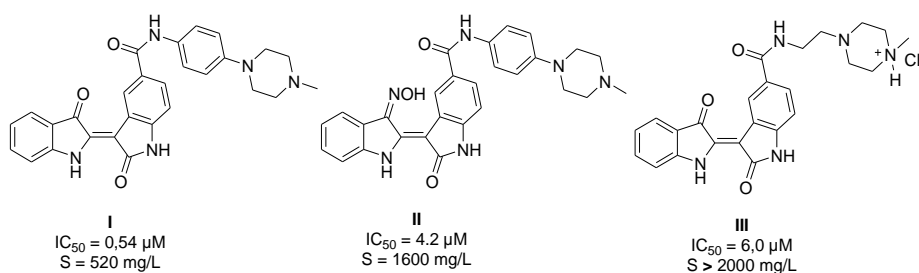
Fonte: Elaborado pela própria autora

1.3.2. Solubilidade

Um desafio no desenvolvimento de novos derivados indirubínicos com atividade antineoplásica pronunciada é a baixa solubilidade em água e baixa biodisponibilidade em fluidos biológicos, isto devido à planaridade e rigidez do núcleo indirubínico (EFSTATHIOU, *et al.*, 2014; HESHMATI, *et al.*, 2014; JAUTELAT, *et al.* 2005). Devido a isso, muitos pesquisadores têm buscado introduzir grupos polares e volumosos, principalmente nas posições 5 e 3', como uma tentativa de otimizar esta propriedade. Entretanto, a escolha dos substituintes deve ser cuidadosa, já que grupos hidrofílicos aumentam a solubilidade, mas, são grupos lipofílicos os responsáveis pela biodisponibilidade e, conseqüentemente, pela maior atividade biológica (GINZINGER, *et al.*, 2014).

Neste sentido, Cheng (CHENG, *et al.*, 2010), por exemplo, estudou a solubilidade de indirubina-5-carboxamidas, bem como o efeito antiproliferativo sobre uma linhagem de células de câncer pulmonar (LXFL529L). A indirubina-5-carboxamida, derivada da (*p*-(4-metil-piperazín)-anilina (Figura 5 - I) mostrou excelente resultado, com valor de IC₅₀ de 0,54 µM e solubilidade de 520 mg.L⁻¹, considerando-se uma boa solubilidade em água valores superiores a 40 mg.L⁻¹ (JAUTELAT, *et al.* 2005). A transformação deste composto na correspondente 3'-oxima levou a um aumento da solubilidade em mais de 50%, sem prejuízo na atividade (Figura 5 – II). Um aumento na solubilidade ainda maior foi observado para o cloridrato de I (Figura 5 – III), também com preservação da atividade.

Figura 5: Estrutura dos compostos com considerável solubilidade e atividade antiproliferativa (CHENG, *et al.*, 2010)

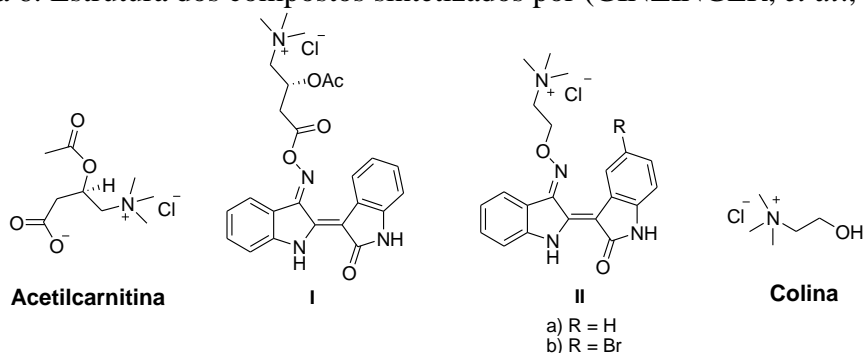


Fonte: Elaborado pela própria autora

Ginzinger avaliou indirubinas incorporando sais de amônio quaternários ligados à porção oxima, na posição 3'. Para o primeiro derivado preparado, foi empregado a acetilcarnitina (Figura 6 – I), um fármaco utilizado como ativador neural. Embora tenha apresentado boa solubilidade, este composto mostrou-se sensível a temperaturas superiores a 40°C, além de taxa

de hidrólise que excede o valor requerido para aplicação intravenosa (GINZINGER, *et al.*, 2012).

Figura 6: Estrutura dos compostos sintetizados por (GINZINGER, *et al.*, 2012).



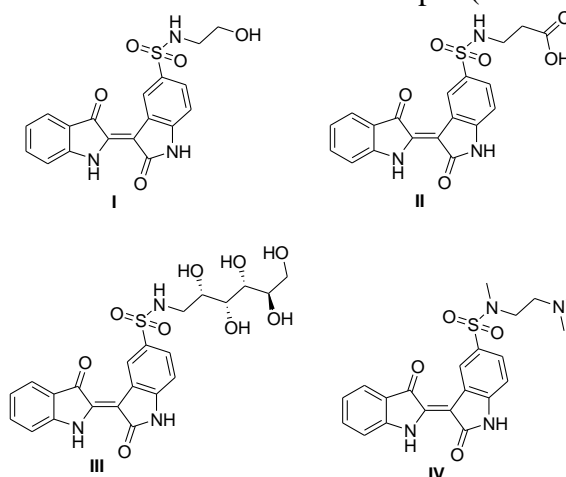
Fonte: Elaborado pela própria autora

Como alternativa para um éter oxima mais estável, foi utilizado a colina, um cátion orgânico integrante do complexo B de vitaminas (Figura 6 – II a e b). Neste caso, o composto apresentou boa solubilidade e estabilidade. Quanto à atividade biológica, demonstrou impacto sobre a proliferação celular, no entanto, não foi observado efeito de inibição para proteínas quinases. (GINZINGER, *et al.*, 2012).

O grupo de JAUTELAT explorou três diferentes vertentes na tentativa de obter derivados mais solúveis e ativos. A primeira série de compostos foi preparada pela introdução de grupos sulfonamidas na posição 5. Compostos como I e II (Figura 7) não levaram a um aumento substancial de solubilidade. O composto III, além de não contribuir para hidrofiliabilidade, levou a uma redução na potência de inibição para CDK2. De um total de oito compostos, apenas o composto IV apresentou poder de inibição significativo para CDK2 ($IC_{50} = 0,01 \mu M$), boa solubilidade e excelente atividade antiproliferativa.

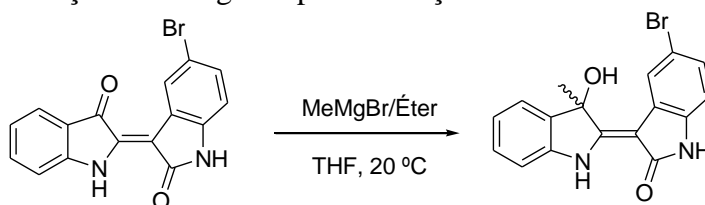
A segunda estratégia utilizada foi a tentativa de distorção da planaridade pela introdução de um centro quiral em 3'. A carbonila C3' da 5-bromoindirubina foi transformada em um álcool terciário pela reação de Grignard (Esquema 2), fornecendo um produto amarelo, como consequência direta da modificação do sistema π do núcleo indirubínico. Este produto, apesar de possuir valores de log P (coeficiente de partição no sistema de solvente octanol/ H_2O) similares, mostrou-se mais hidrossolúvel que o material de partida. Quanto à atividade inibitória, não sofreu grande prejuízo, obtendo-se um valor de IC_{50} de $3 \mu M$ para o novo composto, contra $1 \mu M$ do material de partida.

Figura 7: Indirubinas 5-sulfonamidas sintetizadas por (JAUTELAT, *et al.*, 2005)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Esquema 2: Reação de Grignard para obtenção de um álcool terciário em C3'

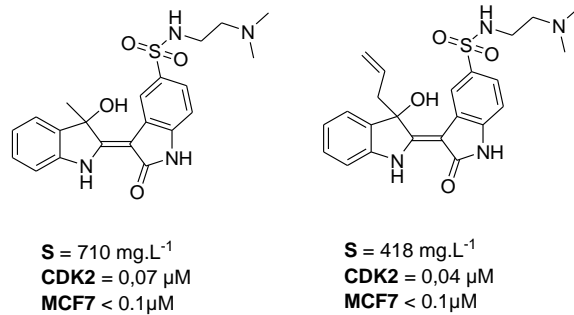


Fonte: Elaborado pela própria autora

De posse deste resultado, foram combinadas as duas estratégias, que levou à introdução de um centro quiral no carbono 3' e à introdução de uma sulfonamida na posição 5. Estes compostos, apresentados na figura abaixo (Figura 8), apresentaram solubilidade acima do valor mínimo estabelecido (40 mg.L^{-1}), além de pronunciada atividade inibitória para CDK2 e antiproliferativa para uma linhagem de células de câncer cerebral (MCF7). Em todos os casos, o enantiômero positivo se mostrou mais ativo por um fator de 10 a 50.

Outra opção para superar este desafio é o emprego de meios emulsificantes (SEDDS – *Self Emulsifying Drug Delivery Systems*). Os veículos lipídicos associados à surfactantes, por exemplo, são muito usados em formulações farmacêuticas para aumentar a biodisponibilidade de drogas lipofílicas com baixa solubilidade em água. Heshmati e grupo investigaram a solubilidade da indirubina-3'-oxima-2,3-diidroxipropileter em quatro diferentes sistemas de auto-emulsificação. Cada formulação possuía uma quantidade específica de mono e diglicerídeos de cadeia longa e curta, um tipo de surfactante hidrofílico, polietilenoglicol como co-surfactante e etanol como co-solvente. Tanto para testes *in vitro* quanto *in vivo* (realizado em camundongos), as quatro formulações aumentaram a partição na fase aquosa cerca de 30 vezes. (HESHMATI, *et.al.*, 2014).

Figura 8: Estrutura dos compostos sintetizados por (JAUTELAT, *et al.*, 2005)



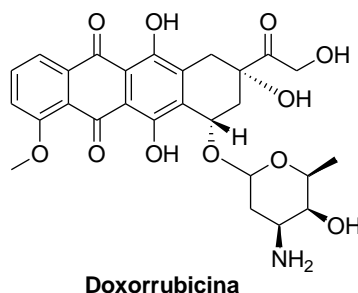
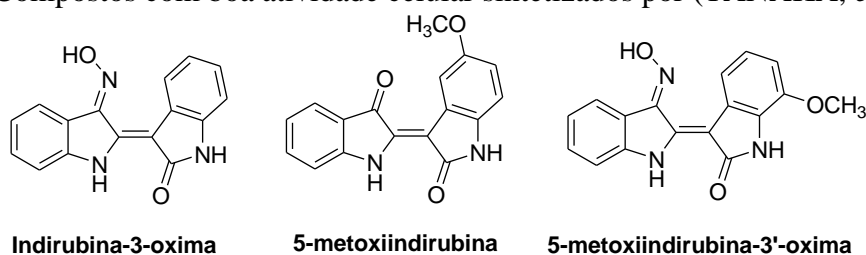
Fonte: Elaborado pela própria autora

1.3.3 Outros alvos de inibição

Muitos derivados indirubínicos possuem atividade antitumoral pela inibição de diferentes quinases, como CDK1, CDK2, CDK5 e GSK-3. Entretanto, podem-se encontrar também pesquisas sobre a interação destes com outros receptores ou alvos de inibição.

Recentemente, Tanaka e colaboradores estudaram a capacidade de três novas séries indirubínicas para inibição do gene MDR1. Este gene está envolvido no aparecimento de resistência a múltiplas drogas, configurando um obstáculo para agentes antitumorais e outros fármacos. Três indirubinas demonstraram resultado interessante (Figura 9). Estes compostos mostraram-se capazes de aumentar a sensibilidade da Doxorubicina – um antitumoral já comercializado no mercado – possibilitando a administração de doses menores, que pode diminuir os efeitos colaterais causados nos pacientes e proporcionar uma melhor qualidade de vida. O estudo sugere, ainda, que estes compostos atuam principalmente mudando a conformação do sítio catalítico de NF-Y, um complexo proteico importante no processo de transcrição do DNA (TANAKA, *et al.*, 2014).

Figura 9: Compostos com boa atividade celular sintetizados por (TANAKA, *et al.*, 2006)

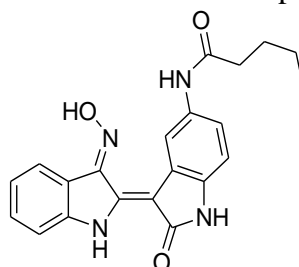


Fonte: Elaborado pela própria autora

Utilizando técnicas de *Screening*, Jung e demais autores, identificaram indirubinas 3'-monooximas como uma nova classe de inibidores da DRAK2. Esta enzima é uma quinase serina-treonina que induz apoptose (morte celular programada) em vários tipos de células, além de estar relacionada ao desenvolvimento de processos autoimune. Tem sido relatado, ainda, que a DRAK2 desempenha importante papel como imunossupressor (JUNG *et al.*, 2016).

Dos vários compostos preparados, o composto apresentado na figura abaixo (Figura 10) apresentou o melhor desempenho, com valor de $IC_{50} = 0,003 \mu M$ apenas. Estudos de *docking* molecular sugerem uma boa afinidade de ligação com ATP, podendo, também, ser um potencial inibidor da CDKs e GSKs (JUNG, *et al.*, 2016).

Figura 10: Composto com melhor atividade inibitória para DRAK 2 (JUNG, *et al.*, 2016)



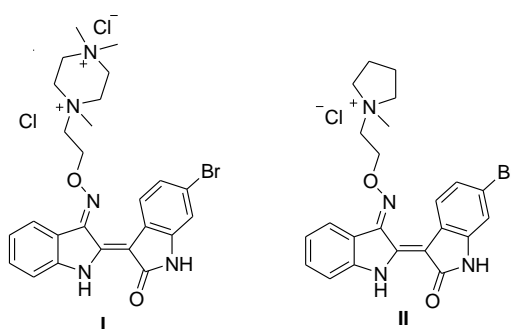
Fonte: Elaborado pela própria autora

Xingi e grupo testou a atividade inibitória de indirubinas 6-substituídas, especialmente derivados 6-bromo-substituídos, para LGSK-3 e LCRQ3, quinases essenciais à sobrevivência do protozoário leishmania, causador da leishmaniose, doença tropical negligenciada que acomete mamíferos (XINGI, *et al.*, 2009; EFSTATHIOU, *et al.*, 2014). Estes derivados apresentaram inibição considerável e, em geral, mostraram-se mais seletivos para a LCRK3.

Entretanto, relatos na literatura apontam que o fato de um composto ser um inibidor seletivo para LCRK3 não garante uma boa atividade antiparasitária, indicando que a LGSK-3 desempenha papel crucial no desenvolvimento do protozoário.

Desta forma, em artigo recente, este mesmo grupo testou novos derivados 3'-substituídos por grupos amino volumosos. Foram identificados dois compostos (Figura 11), com anéis piperazina (I) e pirrolidina (II) seletivos para LGSK-3 e com excelente atividade antiparasitária, com valores de $IC_{50} < 0,70 \mu M$. Assim sendo, estes compostos são considerados blocos iniciais no desenvolvimento de potentes agentes antileishmaniais (EFSTATHIOU, *et al.*, 2014).

Figura 11: Protótipos à potencias agentes antileishmaniais.

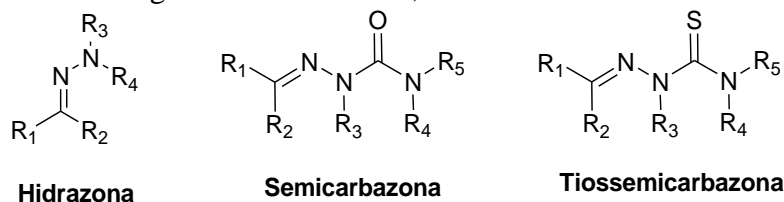


Fonte: Elaborado pela própria autora

1.4 HIDRAZONAS, SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS

Hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas são classes de compostos caracterizadas pelo grupo funcional $RRC=NNRR$ (Figura 12) e apresentam um vasto perfil farmacológico, já muito explorado na literatura. Dentre as principais propriedades biológicas, destacam-se a antiviral, anticonvulsivante, antiparasitária, antibacteriana, antimalárica e antineoplásica (BERALDO, 2004; HALL *et al.*, 2009; KARKI *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013).

Figura 12: Estrutura geral das hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas

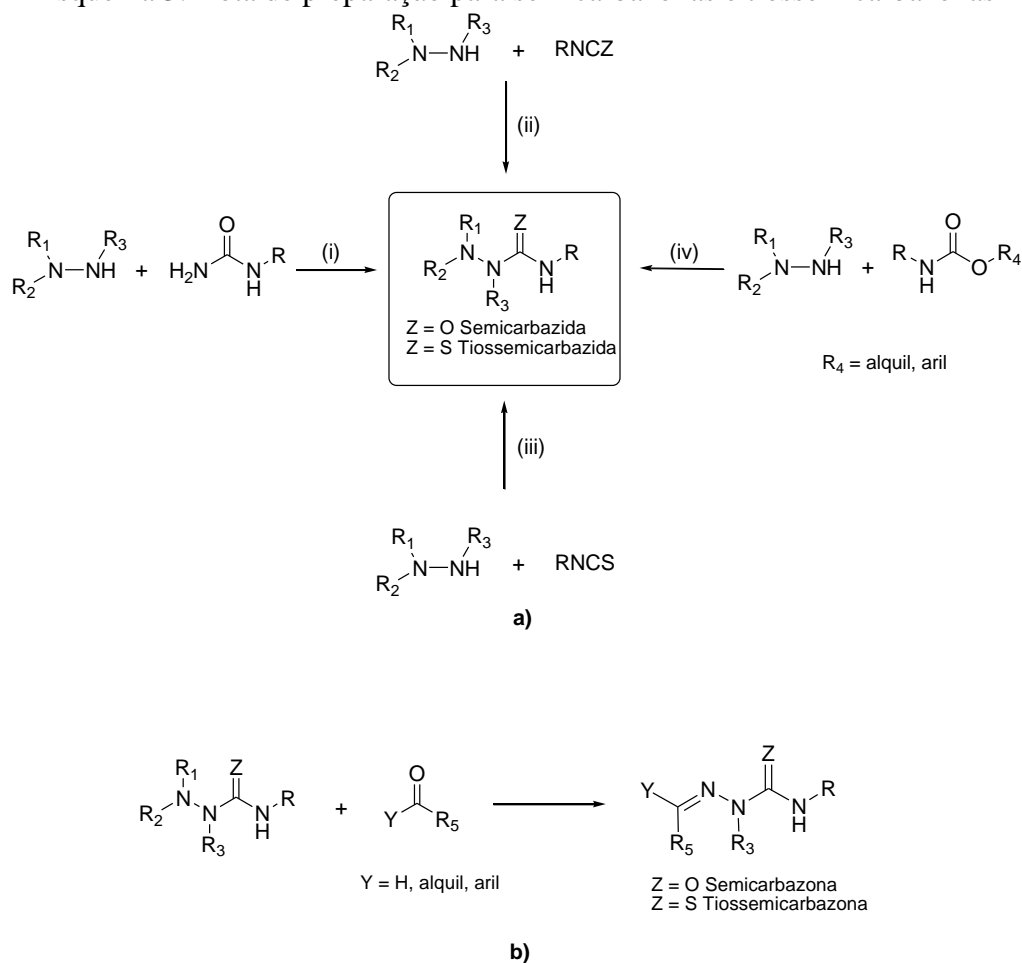


Fonte: Elaborado pela própria autora

São preparadas pela adição nucleofílica de uma hidrazina, semicarbazida e tiossemicarbazida a um aldeído ou cetona (Esquema 3-b). As semicarbazidas e tiossemicarbazidas podem ser preparadas pela reação de hidrazinas e derivados com ureias (i),

isocianatos e isotiocianatos (ii e iii) ou carbamatos (iv) como mostra o Esquema 3-a (BEUKERS *et al.*, 2003; CAPPOEN *et al.*, 2014; GAN *et al.*, 2014).

Esquema 3: Rota de preparação para semicarbazonas e tiossemicarbazonas



Fonte: Elaborado pela própria autora

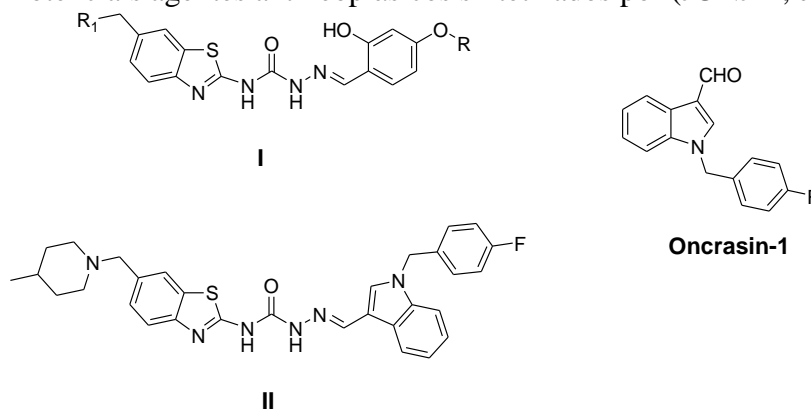
Pesquisas recentes sobre as propriedades antineoplásicas com estes grupos envolvem o trabalho de Gan e colaboradores, que demonstraram, por exemplo, que estes compostos acoplados a diferentes esteroides apresentam potencial atividade contra câncer gástrico e de fígado, com valores de IC₅₀ melhores até mesmo que dá cisplatina, um agente quimioterápico altamente eficaz e já estabelecido no mercado (GAN, *et al.*, 2014).

Já Abdelazem e demais autores, otimizaram as propriedades antineoplásicas de derivados de hidroquinonas pela introdução de diferentes séries de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas. Os novos compostos foram testados em três linhagens de células cancerosas, sendo, pulmão (A549), cérebro (MCF-7) e adenocarcinoma (HT29). Em geral, os derivados apresentaram maior atividade antineoplásica que as hidroquinonas de origem, com valores de IC₅₀ da ordem de 10 μM, exceto para adenocarcinoma, cujos valores de IC₅₀ foram superiores a 20 μM (ABDELAZEEM *et al.*, 2016).

O grupo de Junjie (MA JUNJIE, 2015) produziu novos derivados benzotiazóis-*o*-carbamoilhidrazonas (Figura 13-I) pela substituição do grupo terminal *o*-hidroxi por um grupo fenil ou benzil-*1H*-indol, a fim de melhorar a potência antineoplásica. Os compostos sintetizados foram testados para quatro linhagens de células cancerosas, sendo dois tipos de adenocarcinoma (HT29 e H460), um de pulmão (A549) e um de cérebro (MDA-MB-231).

Todos os quinze compostos produzidos mostraram atividade antineoplásica de moderada a excelente para todas as linhagens celulares, com destaque para o composto mostrado abaixo (Figura 13-II) que apresentou valores de IC₅₀ de 0,015 μM, 0,28 μM, 1,53 μM e 0,68 μM para cada linhagem, respectivamente (JUNJIE, *et al.*, 2015). Os valores encontrados são de 2 a 168 vezes melhores que os do padrão de referência Oncrasin-1, para as quatro linhagens.

Figura 13: Potenciais agentes antineoplásicos sintetizados por (JUNJIE, *et al.*, 2015).



Fonte: Elaborado pela própria autora.

1.5 QUÍMICA MEDICINAL

Química medicinal é um ramo da química baseado principalmente na química orgânica e que tem por objetivo o planejamento racional, preparação e identificação de novos compostos bioativos, denominados protótipos (BARREIRO; FRAGA, 2008). Outras atribuições incluem: avaliação da farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo, eliminação e toxicologia), elucidação do mecanismo de ação e estudos de relação estrutura-atividade (AMARAL; MONTANARI, 2002; LIMA, 2007).

Dentre as diversas técnicas empregadas no planejamento de novos protótipos, pode-se citar o bioisosterismo e a simplificação molecular, que têm por objetivo otimizar as propriedades farmacológicas e reduzir a toxicidade de um farmacóforo já existente (SHERIDAN, 2002; LIMA, 2007). Destaca-se, ainda, a hibridação molecular baseada na conjugação de estruturas bioativas distintas em uma única molécula, podendo o novo composto-híbrido apresentar as características biológicas de ambas substâncias de origem ou somente de uma. Esta estratégia é especialmente útil quando se deseja, por exemplo, inibir duas enzimas

diferentes envolvidas em uma única patologia (AMARAL; MONTANARI, 2002; MEUNIER, 2008; SOLOMON; HU; LEE, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

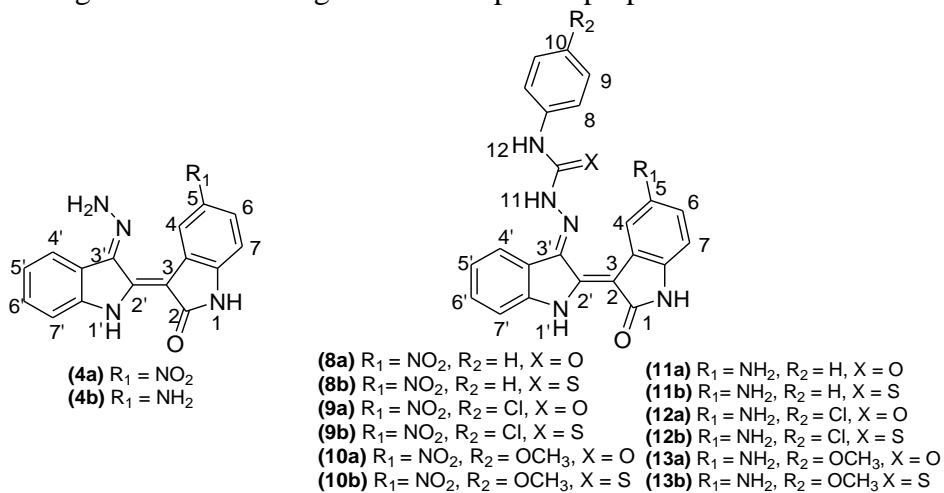
A indirubina vem sendo usada na medicina chinesa há pelo menos quatro milênios. Desde o primeiro relato sobre suas atividades farmacológicas, diversos autores têm investigado seu mecanismo de ação e modificações estruturais que possam levar a compostos mais potentes, sendo a baixa solubilidade uma limitação neste processo (HOESSEL *et al.*, 1999).

A revisão da literatura aponta que a introdução de diferentes grupos nas posições 5 e/ou 3' do núcleo indirubínico é estratégia chave na otimização da solubilidade e bioatividade desta classe de compostos. Estudos de modelagem molecular em combinação com difração de Raios-X têm mostrado que a substituição na posição 3' das indirubinas aumenta a solubilidade sem prejuízo das propriedades farmacológicas (CHENG, *et al.*, 2010; JAUTELAT, *et al.*, 2005). Além disso, os diversos compostos bioativos que possuem em suas estruturas unidades semicarbazonas e tiossemicarbazonas, estes já descritos na literatura, justificam a pretensão de preparar novos derivados indirubínicos substituídos em 3' pelas referidas unidades.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo a síntese, empregando a técnica de hibridação molecular, e a caracterização de hidrazonas, semicarbazonas e tiossemicarbazonas de indirubinas 5-susbtituídas. A Figura 14 mostra a estrutura geral dos compostos propostos.

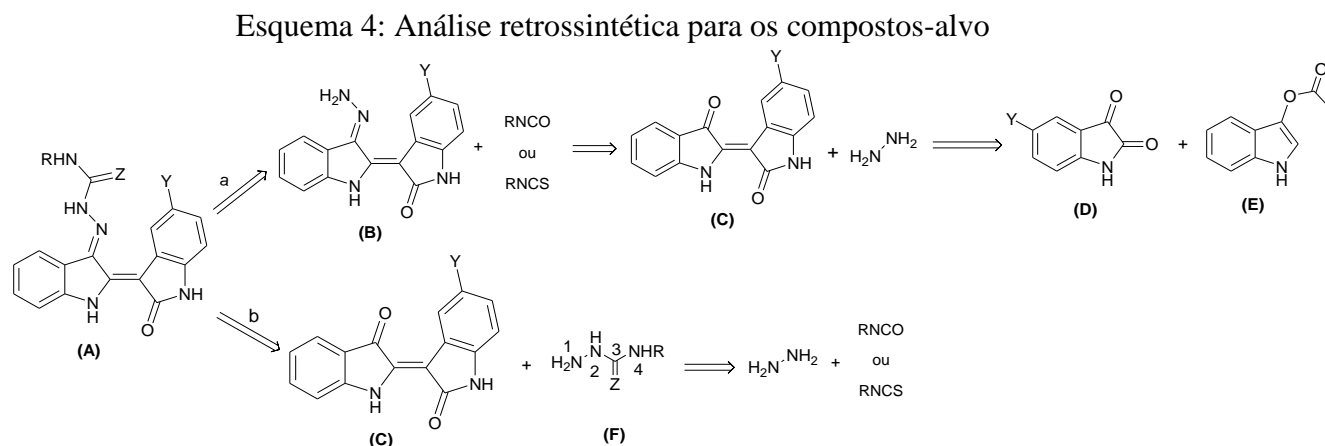
Figura 14: Estrutura geral dos compostos propostos neste trabalho.



Fonte: Elaborado pela própria autora

4 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA

Foram identificadas pelo estudo retróssintético duas rotas distintas para a preparação dos compostos-alvo propostos neste trabalho, como mostrado no Esquema 4.



Rota a:

Acredita-se que os compostos-alvo propostos neste trabalho (A) podem ser preparados através da reação de adição nucleofílica das hidrazonas indirubínicas (B) aos isocianatos ou isotiocianatos disponíveis comercialmente. As hidrazonas indirubínicas podem ser preparadas pelo tratamento das indirubinas (C) com hidrazina hidratada. As indirubinas, por sua vez, são sintetizadas pela reação entre isatinas (D) e 3-acetoxindol (E).

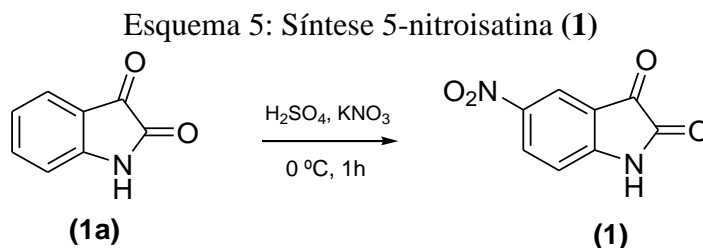
Rota b:

Outra possibilidade é a reação de adição nucleofílica das indirubinas (C) com as tiossemicarbazidas e semicarbazidas *N*-4-substituídas (F). Estas são obtidas também por reação de adição nucleofílica da hidrazina hidratada aos isocianatos e isotiocianatos.

5 METODOLOGIA

5.1 – SÍNTESE DA 5-NITROISATINA (1)

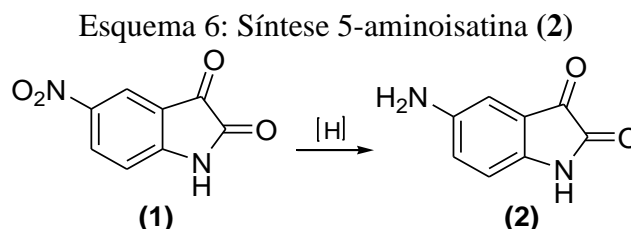
A 5-nitroisatina (**1**) pode ser obtida pela nitração da isatina (**1a**) com ácido sulfúrico e nitrato de potássio em banho de gelo, como já descrito na literatura (VINE, *et al.*, 2007) e apresentado no Esquema 5.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.2 - SÍNTESE DA 5-AMINOISATINA (2)

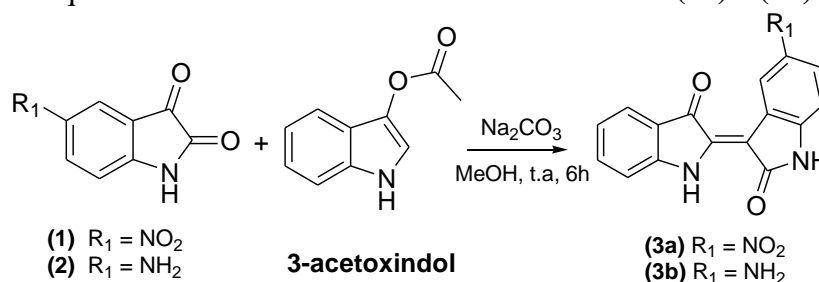
O principal procedimento descrito na literatura para obtenção da 5-aminoisatina (BEAUCHARD *et al.*, 2006; VINE *et al.*, 2007) é a partir da redução da 5-nitroisatina empregando Fe^0 em meio ácido. Entretanto, sabe-se que para redução de grupo nitro a amino, utiliza-se também hidrogenação catalítica (MARCH, 2007). O Esquema 6 mostra uma equação geral para esta reação.



Fonte: Elaborado pela própria autora

5.3 – SÍNTESE DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (3a) e (3b)

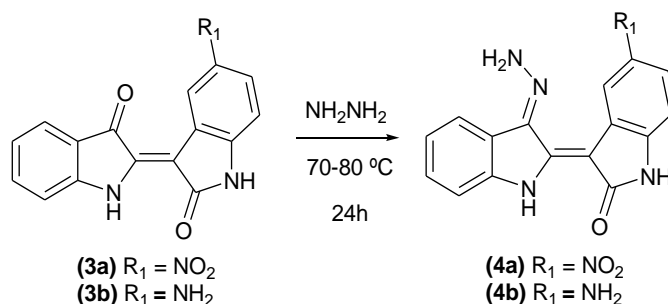
As indirubinas 5-substituídas são sintetizadas pelo acoplamento das isatinas (**1** e **2**) com 3-acetoxy-indol em metanol, na presença de carbonato de sódio, como descrito por Beauchard (BEAUCHARD *et al.*, 2006) e exposto no Esquema 7.

Esquema 7: Síntese das indirubinas 5-substituídas (**3a**) e (**3b**)

Fonte: Elaborado pela própria autora

5.4 SÍNTESE DAS INDIRUBINAS-3'-HIDRAZONA 5-SUBSTITUÍDAS (**4a**) e (**4b**)

A síntese das indirubinas-3'-hidrazona 5-substituídas (Esquema 8) pode ser realizada seguindo metodologia descrita por Moon (MOON, *et al.*, 2006) para a preparação da indirubina-3'-hidrazona, através da reação direta das indirubinas 5-substituídas com hidrazina monohidratada a 70-80°C por 24h.

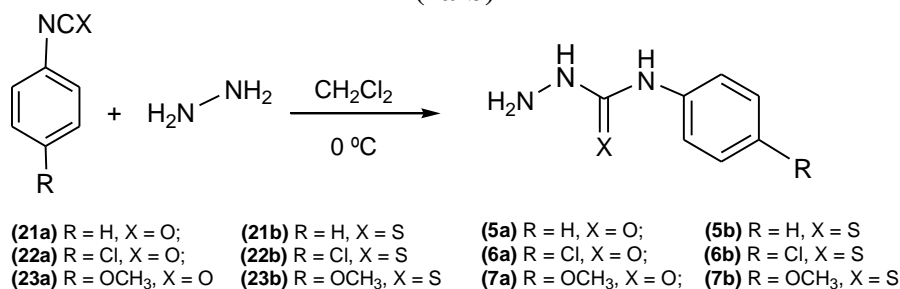
Esquema 8: Síntese das indirubinas-3'-hidrazona 5-substituídas (**4a**) e (**4b**)

Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.5 - SÍNTESE DAS FENILSEMICARBAZIDAS E FENILTIOSSEMICARBAZIDAS N-4 SUBSTITUÍDAS (**5a-b**), (**6a-b**) e (**7a-b**)

As semicarbazidas e tiossemicarbazidas N-4 substituídas são obtidas pela reação dos isocianatos e isotiocianatos com hidrazina monohidratada em diclorometano sob banho de gelo, como mostrado no Esquema 9, e vêm sendo preparadas pelo nosso grupo de pesquisa rotineiramente (BEUKERS, *et al.*, 2003).

Esquema 9: Síntese das semicarbazidas e tiossemicarbazidas *N*-4 substituídas (**5a-b**), (**6a-b**) e (**7a-b**)

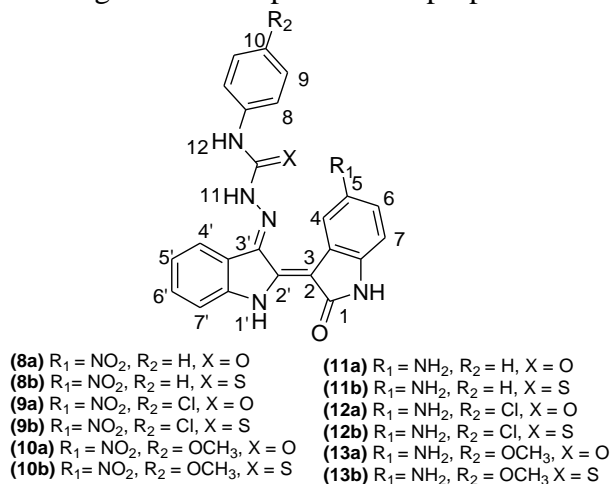


Fonte: Elaborado pela própria autora.

5.6 SÍNTESE DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (**8a-b**), (**9a-b**), (**10a-b**), (**11a-b**), (**12a-b**) e (**13a-b**)

Para a síntese dos compostos-alvo planejados neste trabalho, foram investigadas duas rotas distintas, assim como exposto no Esquema 4, na Seção 4.

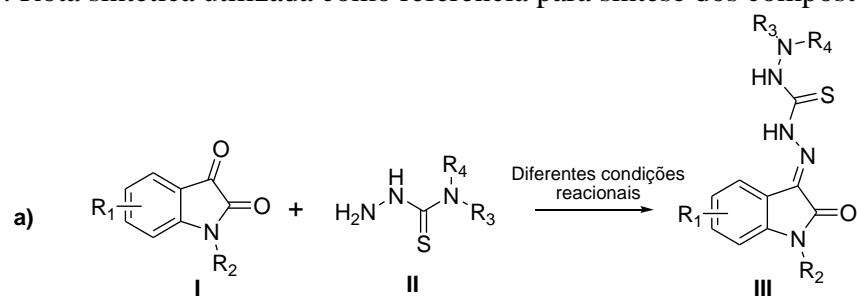
Figura 15: Compostos-alvo propostos



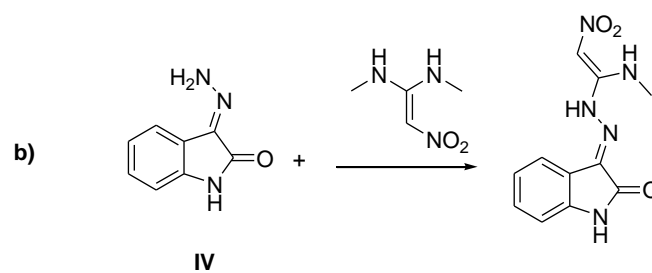
Fonte: Elaborado pela própria autora.

Tais rotas foram propostas com base na química de isatinas, amplamente descrita na literatura. Kang e grupo (KANG *et al.*, 2011), por exemplo, descreve a síntese de tiossemicarbazonas de isatinas (III) pela reação de adição nucleofílica de isatinas (I) e tiossemicarbazidas (II) (Esquema 10a). Já Silva e demais autores abordam a reação entre isatina-3-hidrazona (IV) e diferentes eletrófilos, como mostra o exemplo do Esquema 10b (SILVA; GARDEN; PINTO, 2001).

Esquema 10: Rota sintética utilizada como referência para síntese dos compostos-alvo



$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4 = \text{aril, fenil}$

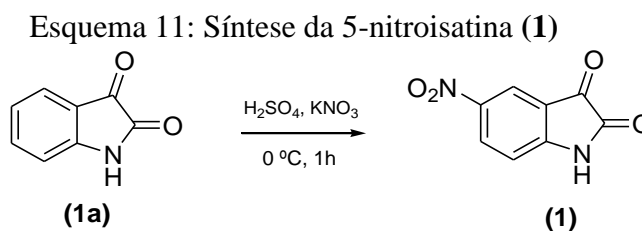


Fonte: Elaborado pela própria autora

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - SÍNTESE DA 5-NITROISATINA (1)

A 5-nitroisatina (**1**) foi obtida pela reação da isatina em H_2SO_4 com uma solução de KNO_3 em H_2SO_4 (Esquema 11). Após 1h de reação, o bruto foi vertido em gelo picado, resultando em uma suspensão de um sólido amarelo que foi isolado por filtração, lavado com água e recristalizado em metanol/água 1:1. O rendimento foi de 90%. A caracterização foi realizada por P.F, RMN de ^1H e ^{13}C , cujos resultados concordam com os dados da literatura.

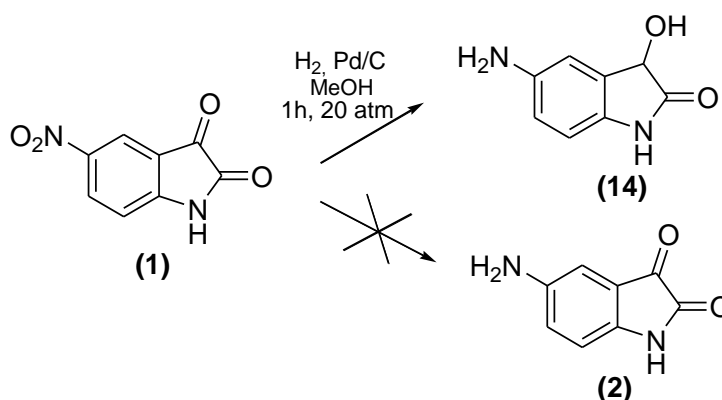


Fonte: Elaborado pela própria autora

6.2 SÍNTESE DA 5-AMINOISATINA (2)

A primeira metodologia empregada para redução da 5-nitroisatina foi a hidrogenação catalisada por Pd/C em metanol, conforme Esquema 12. Após uma hora no aparelho de Parr com pressão 20 atm, observou-se a formação de um único produto, com Rf inferior ao do material de partida. Ao isolar-se, obteve-se um produto puro, com rendimento de 58%.

Esquema 12: Tentativa de redução da 5-nitroisatina (**1**) e formação do composto (**14**)



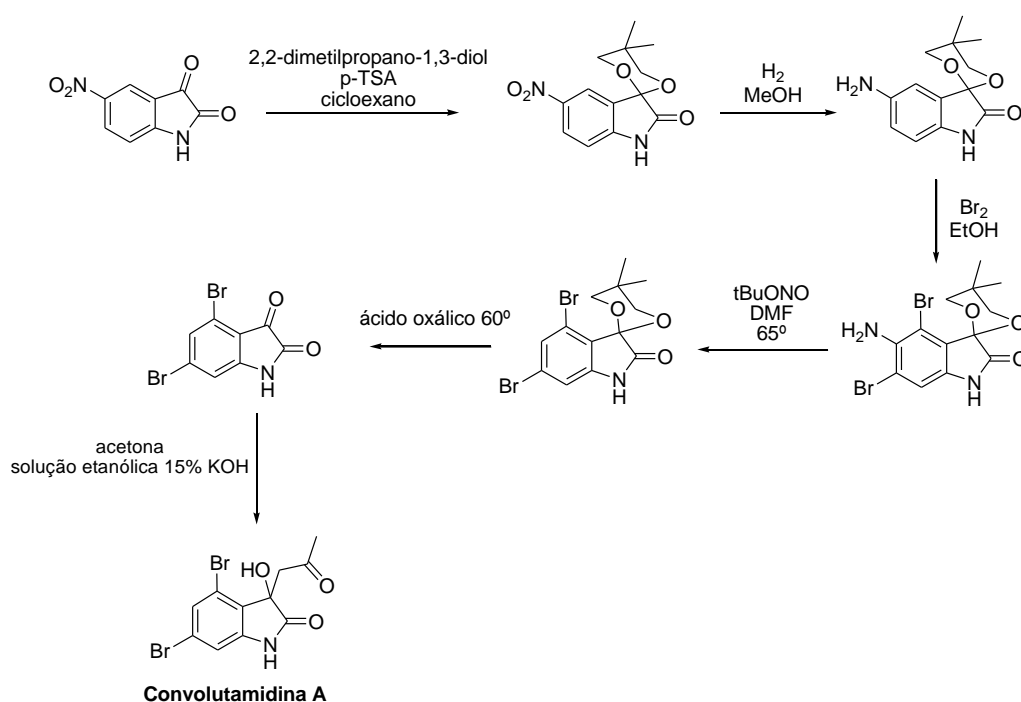
Fonte: Elaborado pela própria autora

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C sugerem que houve a redução do grupo nitro e da carbonila C3, formando, assim, um álcool (**14**) como apresentado no Esquema 12.

Sonderegger e colaboradores investigaram a redução enantiosseletiva de derivados de isatina pela hidrogenação catalisada por Pt/alumina modificada por cinchonidina, obtendo

como produto justamente derivados 3-álcool (SONDEREGGER *et al.*, 2004). Tanto Jnaneshwar e Deshpande, para a síntese da convolutamidina A, quanto Magiatis e grupo, para síntese de derivados de isatina aminoalogenados, protegeram a carbonila da posição C3 introduzindo um grupo cetal antes da redução por hidrogenação, indicando, pois, a sensibilidade deste grupo a este tipo de reação (K. JNANESHWAR; H. DESHPANDE, 1999; MAGIATIS *et al.*, 2010).

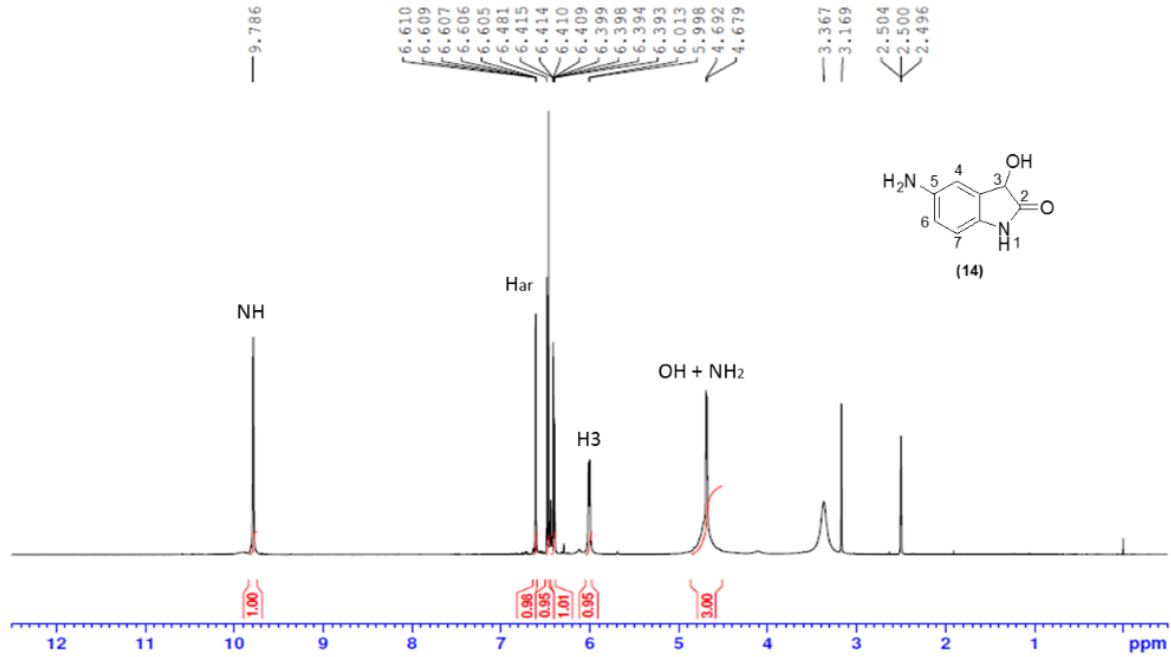
Esquema 13: Rota sintética de (K. JNANESHWAR; H. DESHPANDE, 1999) para síntese da convolutamidina A



Fonte: Elaborado pela própria autora

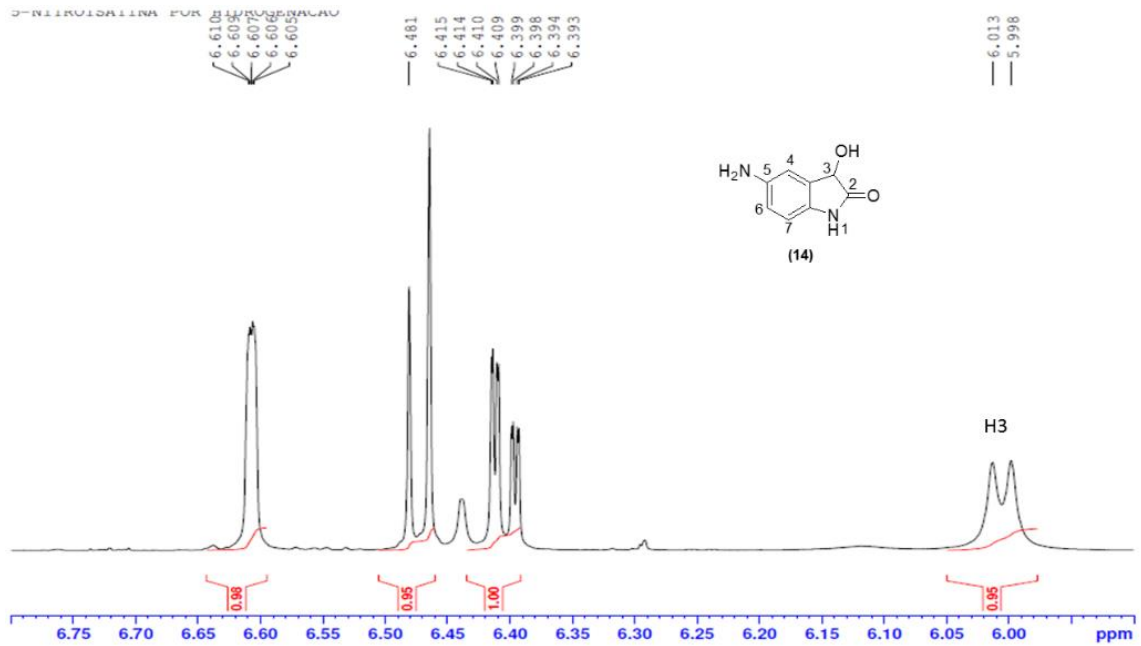
Observa-se no espectro de RMN de ¹H (Figura 16) um duplete centrado em 4,68 ppm atribuído ao hidrogênio da hidroxila. A base alargada sugere a presença do pico correspondente aos hidrogênios do grupo amino com deslocamento de acordo com o previsto na literatura (BEUCHARD *et al.*, 2006). O duplete em 6,00 ppm é referente ao hidrogênio do carbono C3, que, neste caso, encontra-se acoplado ao hidrogênio da hidroxila com constante de acoplamento de 7,0 Hz. No espectro de RMN ¹³C (Figura 18), pode-se observar o sinal em 69,8 ppm correspondente ao carbono C3.

Figura 16: Espectro de RMN de ^1H para o composto **(14)** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



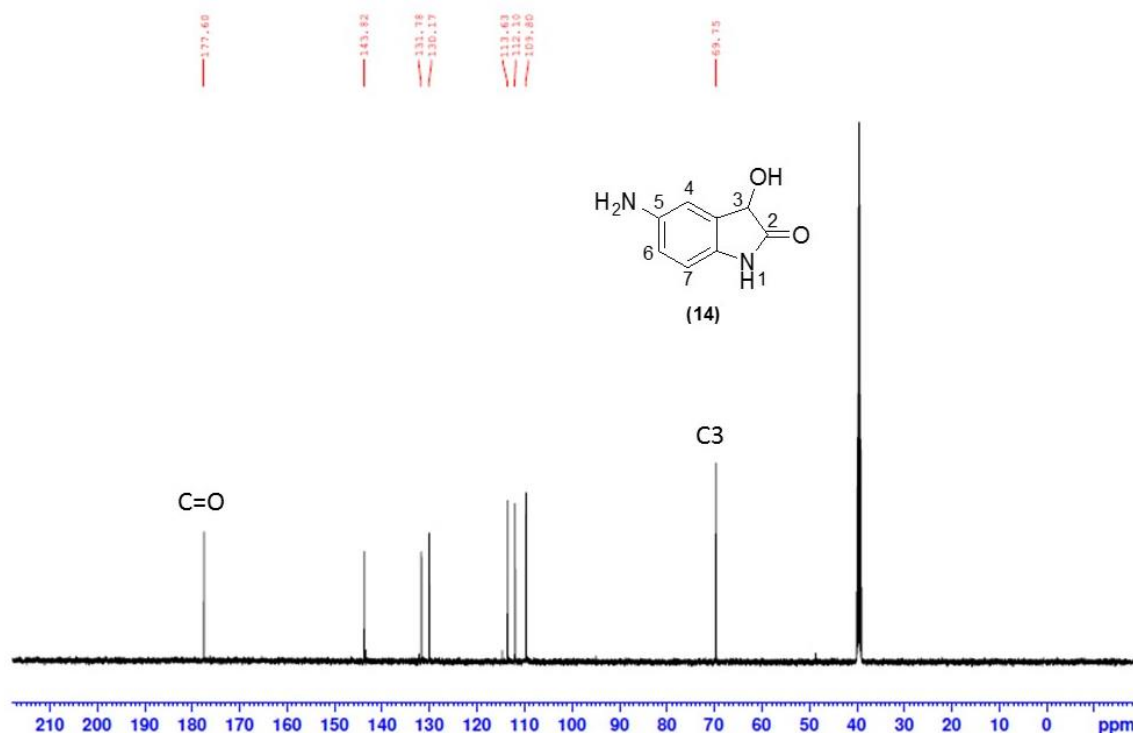
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 17: Expansão do espectro de RMN de ^1H para o composto **(14)** (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 18: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto **(14)** (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Através dos dados da literatura e da análise dos espectros adquiridos, pode-se concluir que a estrutura proposta é correta e as condições empregadas para esta reação resultam na redução da carbonila da posição 3, além do grupo nitro.

A reação foi repetida em condições mais brandas, utilizando-se H_2 à pressão atmosférica. A reação progrediu lentamente e, após cinco dias, houve formação de dois produtos, verificados por CCD: 1) a 5-aminoisatina (**2**) e 2) o produto **(14)** supracitado. Devido à presença de produto lateral e às dificuldades de purificação em rendimentos satisfatórios métodos alternativos foram investigados.

Optou-se, então, pela redução com Fe metálico em etanol, na presença de HCl concentrado e atmosfera inerte. Embora a reação seja rápida, requerendo apenas 1h para obtenção do produto desejado, nas tentativas de isolamento por extração com acetato de etila, houve a formação de emulsões intratáveis, devido à presença do hidróxido de ferro produzido após o ajuste de pH para conversão à base livre.

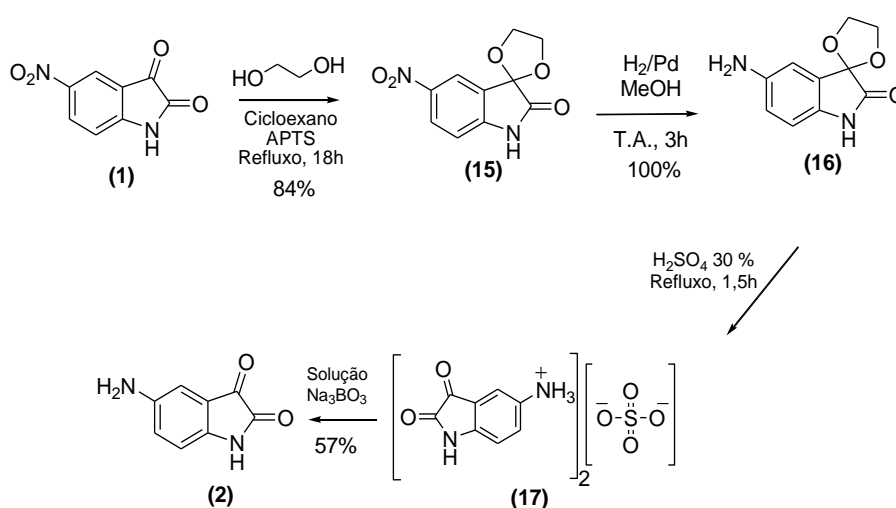
O mesmo fenômeno foi observado para redução com Zn metálico em ácido acético. Neste caso, a correção de pH, realizada com solução saturada de bicarbonato de sódio, leva à formação de acetato de sódio e carbonato de zinco, insolúvel em água e pouco solúvel em solventes orgânicos.

Alternativamente foi testada uma quarta metodologia baseada no procedimento descrito por Magiatis e colaboradores (MAGIATIS, *et al.*, 2010) para síntese de 5-amino-6-bromoisatina.

A rota adaptada para este trabalho possui um total de quatro etapas, a saber: 1) proteção da carbonila C3 de **(1)** pela transformação desta em um grupo cetal, empregando etilenoglicol **(15)**; 2) redução do grupo nitro por hidrogenação catalítica **(16)**; 3) clivagem do grupo protetor com H₂SO₄ 30% e simultânea transformação do grupo amino em sal sulfato; 4) precipitação da 5-aminoisatina **(2)** com solução aquosa quente de Na₃BO₃, conforme ilustrado no Esquema 14.

As etapas 1 e 2 foram reproduzidas sem dificuldades. As reações mostraram-se limpas, de fácil isolamento e com excelentes rendimentos (84% e 100% respectivamente). Na terceira etapa, o sulfato de 5-aminoisatina foi produzido reagindo-se a 5-aminoisatina cetal **(16)** com ácido sulfúrico 30% sob refluxo por 1,5h. O resultado foi um sólido fino, de cor laranja e brilhante, isolado por filtração a vácuo e lavado com acetona. Logo em seguida dissolveu-se este sólido em água quente e adicionou-se, lentamente, sob constante agitação, solução aquosa quente de Na₃BO₃ até pH 6,0. Com a adição, a solução passa de laranja translúcida para avermelhada e, em seguida, roxa, quando o pH desejado é atingido. Após alguns minutos em repouso, surge um precipitado azul-escuro e brilhante. O sólido foi isolado por filtração, com 57% de rendimento. A caracterização foi realizada por P.F, RMN de ¹H e ¹³C, estando os dados espectroscópicos em concordância com a literatura e disponíveis na Seção 9.2.

Esquema 14: Rota sintética para 5-aminoisatina **(2)** baseada em (MAGIATIS, *et al.*, 2010)



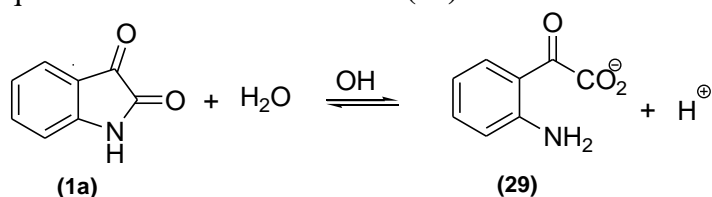
Fonte: Elaborado pela própria autora

Embora, à primeira vista, o procedimento descrito acima pareça simples, foram encontradas algumas dificuldades na execução. Anteriormente à obtenção da 5-aminoisatina **(2)**, a adição da solução de Na₃BO₃ forneceu um sólido vermelho cujo padrão na CCD e aspecto

físico não correspondem a **(2)**. A primeira hipótese para explicar o ocorrido partiu de estudos sobre as formas termodinamicamente estáveis da isatina **(1a)** (ver Esquema 15) em diferentes pH.

A revisão da literatura aponta que a isatina **(1a)** sofre hidrólise em meio básico com quebra da ligação CO-NH, formando, assim, o composto **(29)**, como mostra o Esquema 15 (CASEY, GALT, PAGE, 1993). A forma **(1a)** é termodinamicamente estável apenas em pH menores que 3. Para pH que varia de 4-6, há uma mistura equimolar das formas **(1a)** e **(29)**, enquanto para pH superiores a 6, nota-se predominância da forma **(29)**.

Esquema 15: Hidrólise da isatina **(1a)** em meio básico.



Fonte: Elaborado pela própria autora.

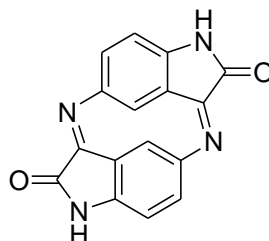
Assim, uma vez que a solução de Na₃BO₃ foi adicionada em quantidade descrita na metodologia de Magiatis (MAGIATIS *et al.*, 2010) e sem qualquer controle de pH, inferiu-se que o composto vermelho formado poderia ser a 5-aminoisatina hidrolisada, ou seja, com quebra da ligação CO-NH.

A 5-aminoisatina **(2)** pode ser obtida, então, em um segundo experimento, onde a adição de Na₃BO₃ foi realizada até pH 6,0, como já mencionado anteriormente. Entretanto, experimentos posteriores não foram reprodutíveis, obtendo-se ora o produto vermelho, ora uma mistura de 5-aminoisatina **(2)** e produto vermelho, mesmo com controle minucioso de pH. Em alguns casos, o sólido vermelho precipitou ainda em pH ácido, o que discorda da hipótese de hidrólise.

Este sólido vermelho foi isolado e caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho e RMN de ¹H e ¹³C. A análise dos dados espectrais sugere a formação do composto **(18)** representado pela estrutura mostrada na Figura 19. Com a adição gradativa de solução de Na₃BO₃, o sal sulfato de isatina **(17)** é convertido a base livre 5-aminoisatina **(2)**

que, ainda em pH ligeiramente ácido, adiciona-se nucleofilicamente ao carbono carbonílico da cetona com subsequente desidratação para formação da imina.

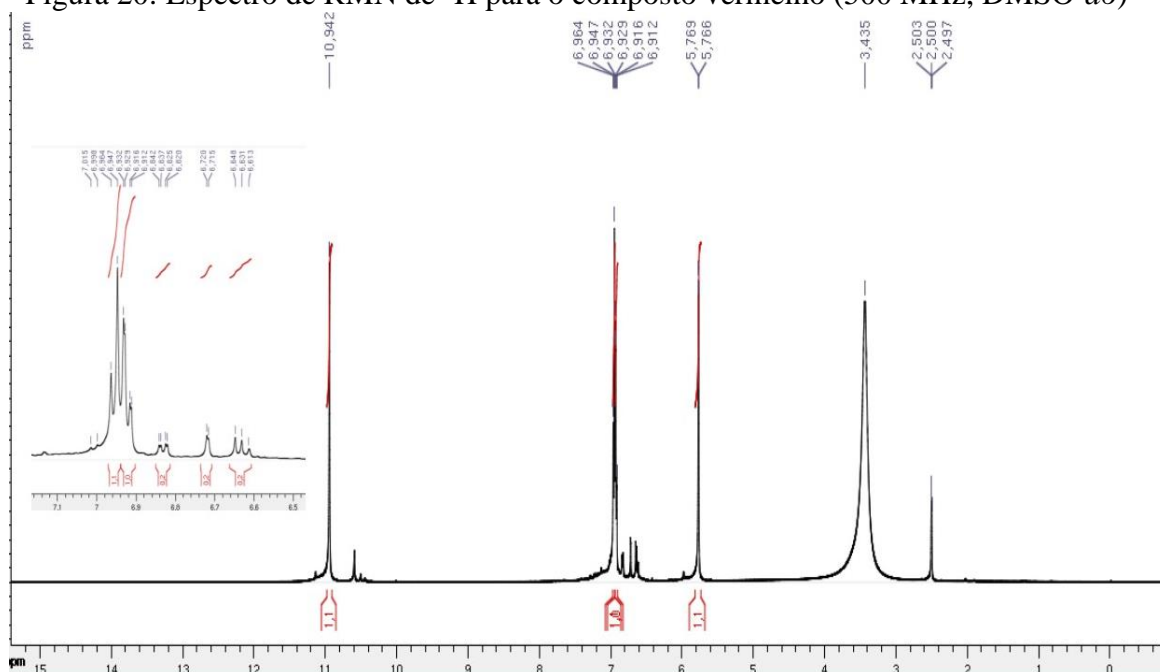
Figura 19: Estrutura proposta para o composto **(18)**



Fonte: Elaborado pela própria autora

Observa-se, no espectro de RMN de ^1H (Figura 20), a presença de três hidrogênios aromáticos, como um duplete ($J = 2,0$ Hz) em 5,76 ppm, um duplete de duplete ($J = 8,25$ Hz/ $2,0$ Hz) em 6,9 ppm e duplete ($J = 8,5$ Hz) em 6,95 ppm, e um simpleto em 10,94 ppm, característico do NH. Entretanto, a principal evidência de formação da imina é a ausência de qualquer sinal característico do grupo NH_2 .

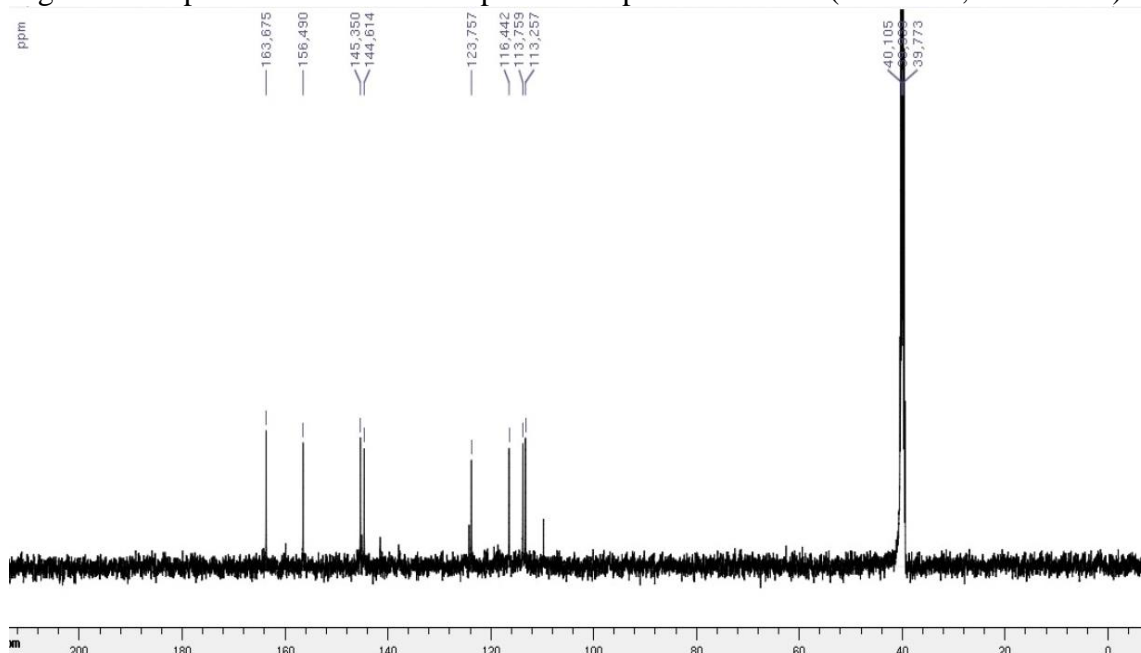
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H para o composto vermelho (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 21), observa-se o desaparecimento do carbono carbonílico da cetona próximo a 188 ppm, além do surgimento de um novo sinal em 156,5 ppm atribuído ao carbono imínico.

Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto vermelho (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Com intuito de contornar as dificuldades da preparação da 5-aminoisatina (**2**), necessária à síntese da 5-aminoindirubina (**3a**) (ver Esquema 7), a síntese de (**3a**) foi testada a partir do sal sulfato de isatina (**17**), onde, no meio alcalino, devida à presença de carbonato de sódio, a 5-aminoisatina (**2**) poderia ser produzida e reagir com 3-acetoxindol. Entretanto, foi formada uma mistura marrom complexa, não contendo o produto desejado (verificado por CCD), e por isso esta metodologia foi abandonada.

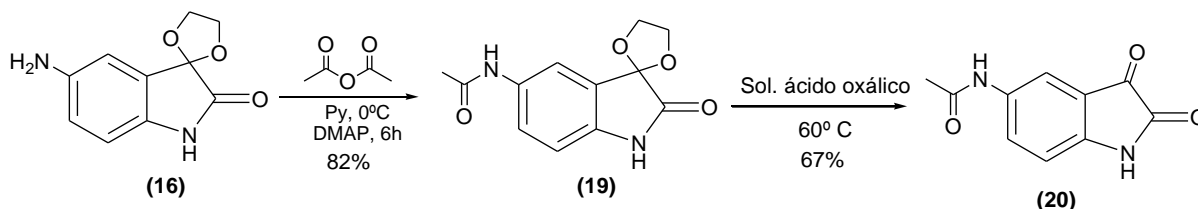
Após as exaustivas tentativas de síntese da 5-aminoisatina (**2**), decidiu-se substituí-la pela 5-acetamidaisatina (**20**), uma vez que esta pode ser obtida sem problemas semelhantes aos apresentados até aqui. Assim, o grupo acetamido pode ser hidrolisado a amino após a preparação da 5-acetamidaindirubina (**3c**) ou após obtenção dos derivados semicarbazonas e tiossemicarbazonas. Além disso, uma vez que indirubinas com grupo acetamida como substituintes na posição 5 são relatadas na literatura com atividade antiproliferativa e com inibição das proteínas quinases comparáveis aos grupos nitro e amino, seria vantajoso sintetizar, também, a série de compostos-alvo 5-acetamido substituídos.

6.2.1 Síntese da 5-acetamida isatina (**20**)

A síntese da 5-acetamida isatina foi realizada seguindo rota semelhante à empregada para a 5-aminoisatina (Esquema 15). Após a hidrogenação, a 5-aminoisatina cetal (**16**) foi reagida com anidrido acético em piridina sob banho de gelo por 6 horas. Neste estágio o controle de temperatura deve ser rigoroso. Do contrário, observa-se a formação do produto diacetilado.

Superado este obstáculo o produto **(19)** foi obtido como um sólido, de cor palha, com alto grau de pureza e rendimento de 82%. O grupo cetal foi removido agitando-se **(19)** em solução diluída de ácido oxálico a 60°C por uma noite. Houve precipitação de um sólido vermelho que após filtração e lavagem com água, mostrou-se puro e com rendimento de 67%.

Esquema 16: Rota sintética para 5-acetamidaisatina (**20**)



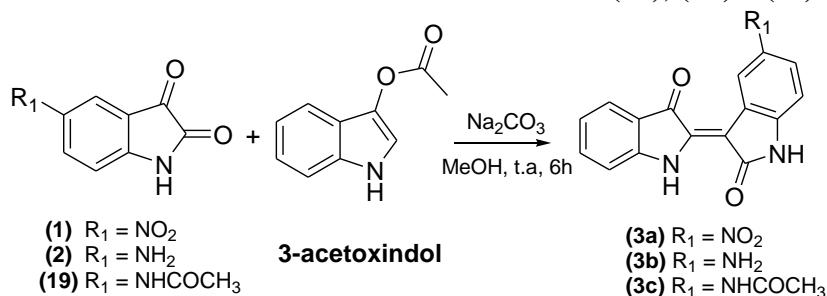
Fonte: Elaborado pela própria autora

A caracterização também foi realizada pela faixa de fusão e RMN de ^1H e ^{13}C . Os resultados concordam com o esperado e, por se tratar de um composto já descrito na literatura, a discussão dos espectros foi omitida. Os dados espectroscópicos podem ser consultados na Seção 9.2.1.

6.3 - SÍNTESE DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (**3a**), (**3b**) e (**3c**)

As indirubinas 5-substituídas foram sintetizadas empregando metodologia descrita por Beauchard e colaboradores com excelentes rendimentos, como apresentado no Esquema 17 e Tabela 1 (BEAUCHARD *et al.*, 2006). Após 6h de agitação à temperatura ambiente, o sólido formado foi filtrado, lavado com metanol gelado, exaustivamente com água e seco em estufa, não havendo necessidade de purificação.

Esquema 17: Síntese das indirubinas 5-substituídas (**3a**), (**3b**) e (**3c**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

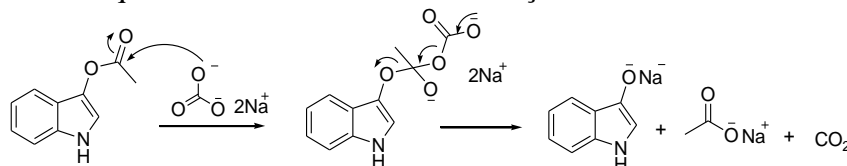
Tabela 1: Ponto de fusão e rendimento para as indirubinas 5-substituídas

Composto	R ₁	P.F (°C)	Rendimento (%)	Aspecto
3a	NO ₂	>260	90	Sólido roxo
3b	NH ₂	>260	86	Sólido azul intenso
3c	NHCOCH ₃	>260	85	Sólido azul intenso

Fonte: Elaborado pela própria autora

A formação das indirubinas ocorre pela reação entre as isatinas e o indoxil, gerado *in situ* pela hidrólise do grupo acetoxi. O processo é iniciado pelo ataque nucleofílico do íon carbonato à carbonila do 3-acetoxiindol, como exposto no Esquema 18.

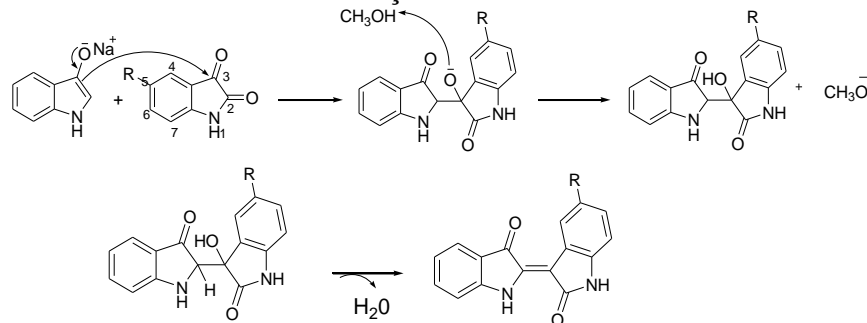
Esquema 18: Mecanismo de formação do indoxil



Fonte: Elaborado pela própria autora

Formado o indoxil, este adiciona-se nucleofilicamente à carbonila C3 da isatina. O ânion indirubínico recebe então um próton do metanol, seguido de desidratação para formação da indirubina (Esquema 19).

Esquema 19: Mecanismo de formação das indirubinas em meio alcalino



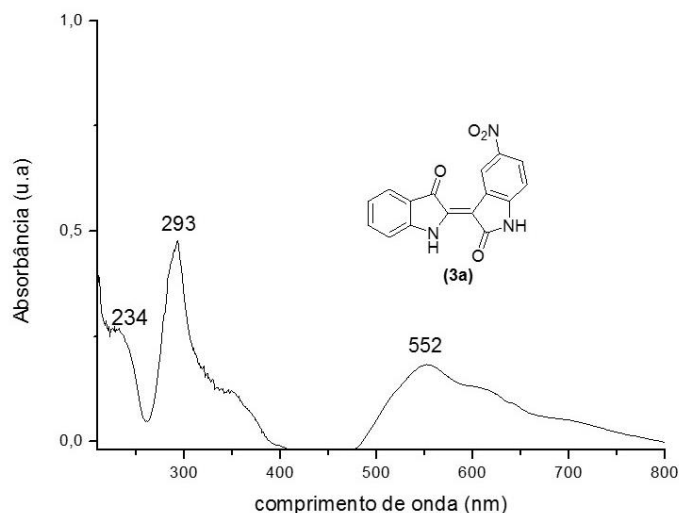
Fonte: Elaborado pela própria autora

Embora já descrita na literatura, a caracterização foi realizada pela faixa de fusão, espectroscopia na região do UV-Vis e IV e RMN de ¹H e ¹³C, com o intuito de facilitar a descrição dos compostos das etapas subsequentes. A Tabela 2 apresenta os dados espectroscópicos obtidos. Por serem similares em estrutura, a discussão detalhada dos espectros será realizada apenas para a 5-nitroindirubina (**3a**).

No espectro de UV-Vis em solução metanólica neutra (Figura 22) podem-se observar duas absorções importantes: em 293 nm, referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da carbonila, deslocada para comprimento de onda maior que o esperado devido à alta conjugação da molécula, e em

552 nm, referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ aromática. O ombro ao lado da banda em 293 nm é característico das transições $n \rightarrow \pi^*$ de menor intensidade.

Figura 22: Espectro na região do UV-Vis da 5-nitroindirubina (**3a**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

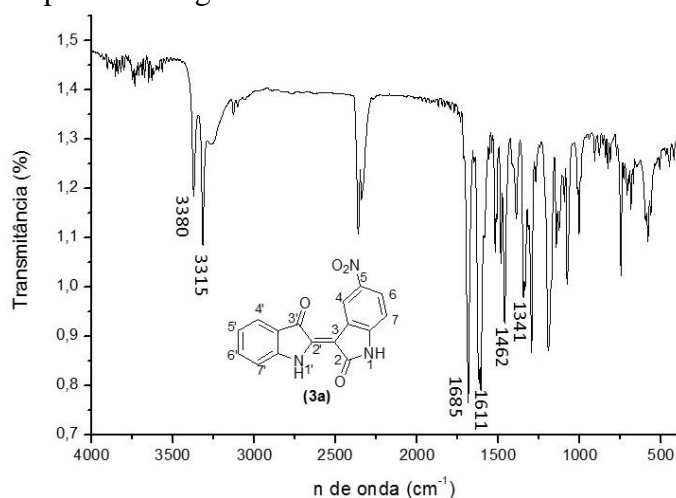
No espectro na região do infravermelho (Figura 23) observa-se, em 3380 e 3315 cm^{-1} , duas bandas finas correspondentes ao estiramento da ligação N-H da amina e da lactama. A banda fina e intensa em 1685 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento da ligação C=O em C3', enquanto a vibração de estiramento da carbonila da lactama pode ser observada em 1611 cm^{-1} . As frequências de absorção das carbonilas em C2 e C3' apresentaram valores menores que os previstos na literatura devido à conjugação com a ligação dupla C2=C3, onde a ressonância aumenta o caráter de ligação simples. As bandas finas em 1462 cm^{-1} e 1341 cm^{-1} , de média intensidade, são características da deformação axial assimétrica e simétrica de nitro compostos aromáticos.

Tabela 2: Dados espectroscópicos obtidos para as indirubinas (**3a**), (**3b**) e (**3c**)

Composto	R	NH	NH'	H4	H6	Outros hidrogênios	Carbonos
3a	NO ₂	11,49 (sl)	11,16 (sl)	9,62 (s)	8,14 (ddd)	7,66 (d, H7'); 7,58 (t, H6'); 7,41 (d, H4'); 7,05-7,02 (m, H5' e H7)	103,6; 109,4; 113,8; 118,9; 119,6; 121,7; 122,1; 124,7; 124,8; 137,5; 140,1; 141,7; 145,8; 152,5; 171,1; 188,9.
3b	NH ₂	10,44 (sl)	10,94 (sl)	8,15 (d)	6,52 (dd)	7,63 (d, H7'); 7,55 (td, H5'); 7,39 (d, H4'); 7,00 (td, H6'); 6,59 (d, H7), 4,72 (sl, NH ₂)	108,2; 109,8; 111,5; 113,3; 115,6; 119,1; 121,0; 122,0; 124,2; 132,1; 137,0; 137,8; 143,3; 152,4; 170,9; 188,4.
3c	NHCOCH ₃	10,77 (sl)	10,94 (sl)	8,84 (d)	7,50 (dd)	9,89 (s, NHact) 7,63 (d, H7'); 7,55 (t, H5'); 7,35 (d, H4'); 7,01 (t, H6'); 6,83 (d, H7), 2,03 (s, CH ₃)	23,9; 107,0; 109,6; 113,7; 117,8; 119,3; 121,6; 122,02; 124,6; 133,3; 137,2; 137,6; 138,8; 152,7; 168,6; 171,4; 188,9.

Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 23: Espectro na região do infravermelho da 5-nitroindirubina (**3a**)



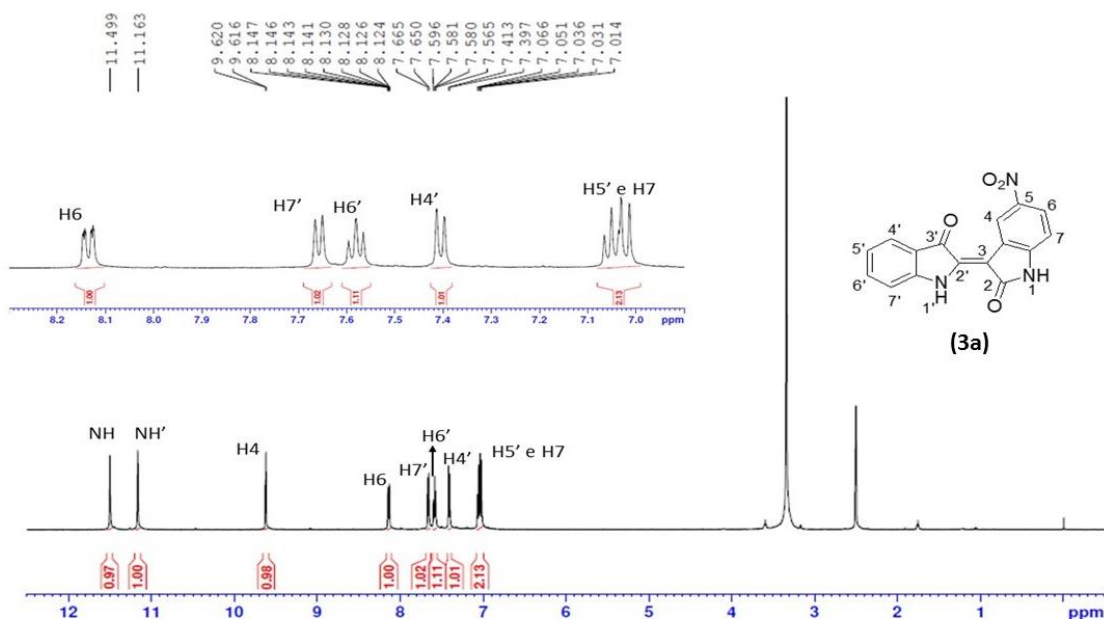
Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro de RMN de ^1H , na Figura 24, é possível observar, em 11,49 e 11,16 ppm, dois simples largos referente aos hidrogênios das ligações N-H e N-H', respectivamente. Para as indirubinas (**3b**) e (**3c**) (ver Tabela 2), estes hidrogênios aparecem invertidos. Isso pode ser explicado pelo fato de o substituinte NO_2 ser um grupo retirador de elétrons, enquanto o NH_2 e o NHCOCH_3 serem doadores de elétrons, fazendo com que NH para (**3b**) e (**3c**) fique mais blindado em relação à NH'.

Prosseguindo, nota-se, em 9,63 ppm, um simpleto atribuído ao hidrogênio H4 e, em 8,14 ppm, um duplete de duplete duplo atribuído ao hidrogênio H6, desblindados em relação aos demais hidrogênios aromáticos devido ao efeito mesomérico negativo causado pelo grupo nitro. Novamente, para (**3b**) e (**3c**) (ver Tabela 2), tanto H6 quanto H4 aparecem mais blindados devido aos grupos doadores de elétrons $-\text{NH}_2$ e $-\text{NHCOCH}_3$. Este efeito de blindagem é menos intenso em H4 devido à sua proximidade com a ligação dupla $\text{C}2=\text{C}3$ conjugada à carbonila, que retira densidade eletrônica.

Os sinais referentes aos hidrogênios H7' e H4' podem ser observados em 7,66 e 7,41 ppm, cada um como um duplete. Em 7,58 ppm, nota-se um tripleto correspondente a H6' e, por fim, um multipletto entre 7,06-7,01 ppm, onde os sinais de H-5' e H-7 aparecem sobrepostos.

Figura 24: Espectro de RMN de ^1H da 5-nitroindirubina (**3a**) (500 MHz, DMSO- d_6).

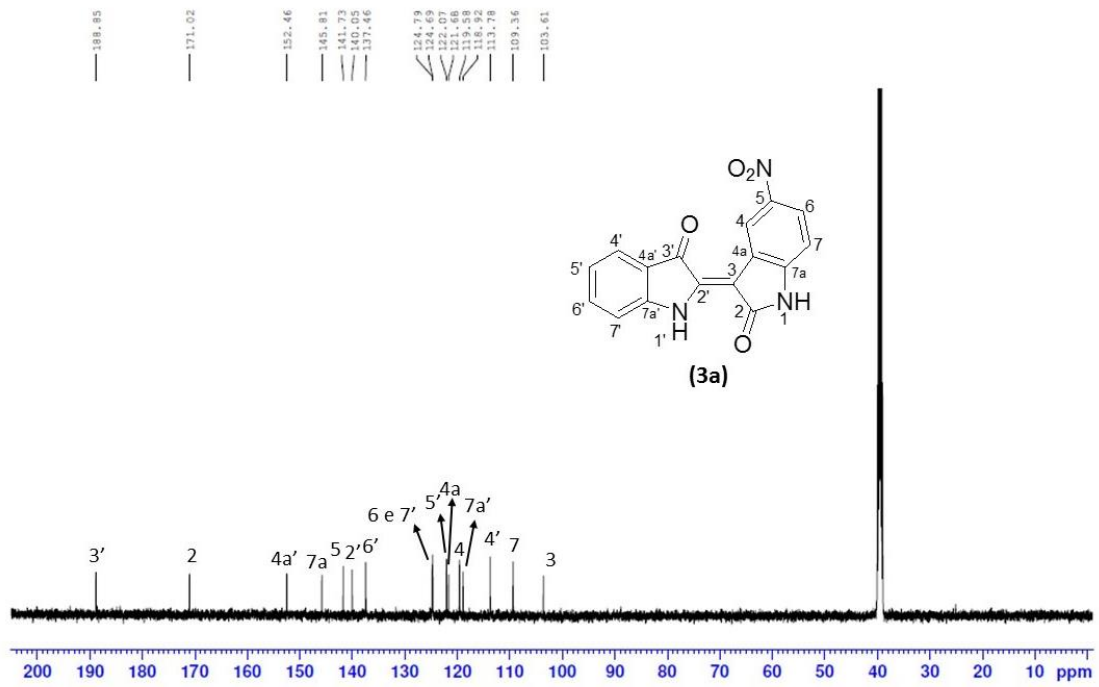


Fonte: Elaborado pela própria autora

Os deslocamentos químicos apresentados no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 25) estão de acordo com o esperado, dando destaque para os sinais em δ 188,9 e δ 171,0 ppm correspondentes aos carbonos C3' (C=O) e C2 (RNHC=O) respectivamente.

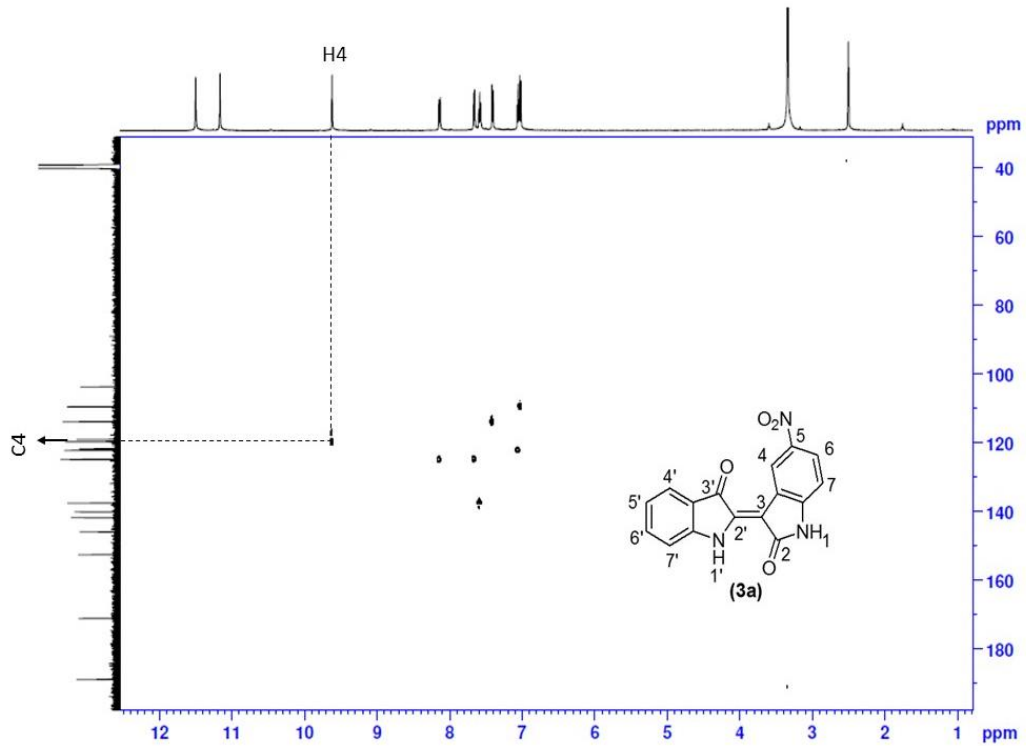
A atribuição completa dos hidrogênios e carbonos de (**3a**) foi possível com auxílio das técnicas de HSQC, que correlaciona $^1J_{\text{CH}}$ e HMBC que correlaciona $^2J_{\text{CH}}$ e $^3J_{\text{CH}}$. Os carbonos hidrogenados C4, C6, C7, C4', C5', C6' e C7' foram atribuídos com base no mapa de contornos HSQC (Figuras 26 e 27). Já os carbonos não hidrogenados C2, C3, C4a, C5, C7a, C2', C3', C4a' e C7a' foram distinguidos utilizando-se o mapa de contornos HMBC (Figuras 28 e 29). Com esta mesma ferramenta, foi possível distinguir os hidrogênios NH e NH', pelo acoplamento $^2J_{\text{CH}}$ com C2 e $^3J_{\text{CH}}$ com C3'.

Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C da 5-nitroindirubina (**3a**) (125 MHz, DMSO-*d*₆).



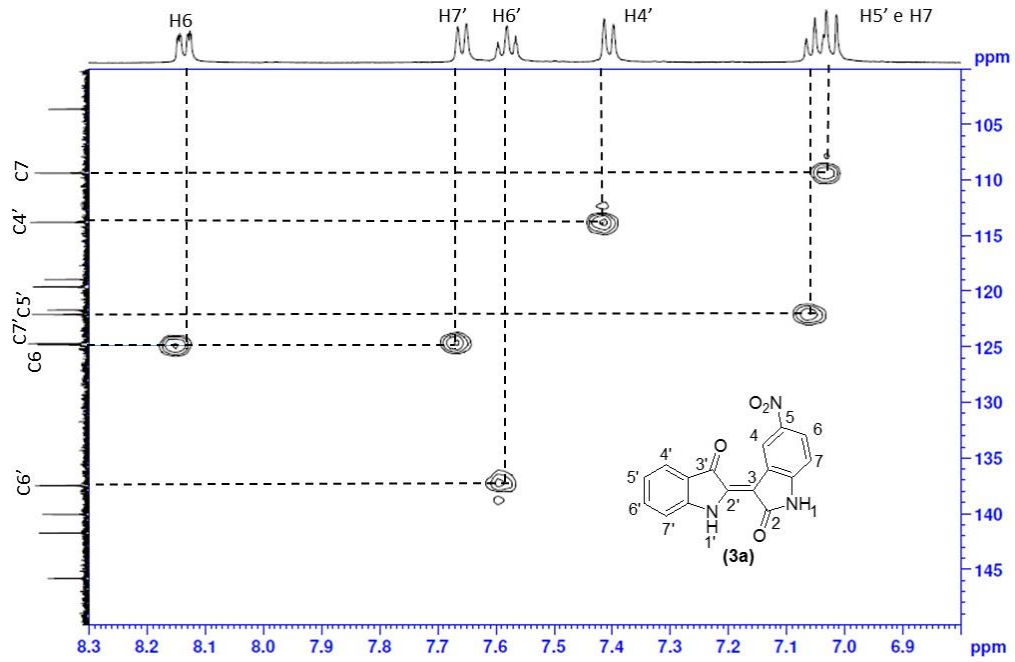
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 26: Mapa de contorno HSQC para (**3a**) (500 MHz, DMSO-*d*₆)



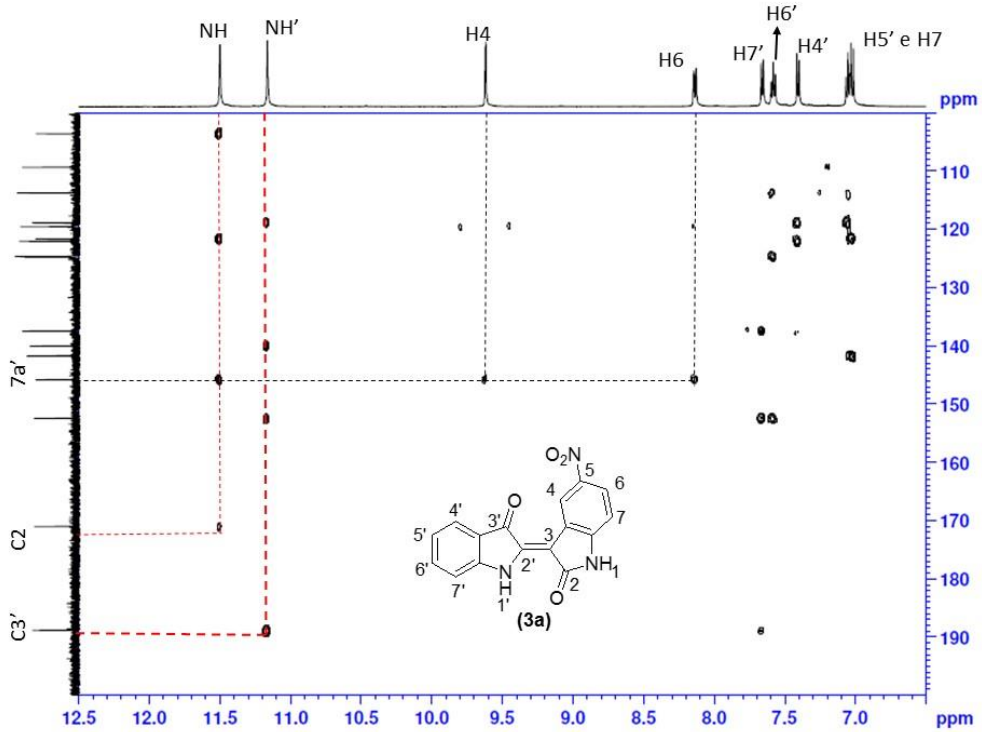
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 27: Expansão do mapa de contornos HSQC para (**3a**) (500 MHz, DMSO-*d*₆)



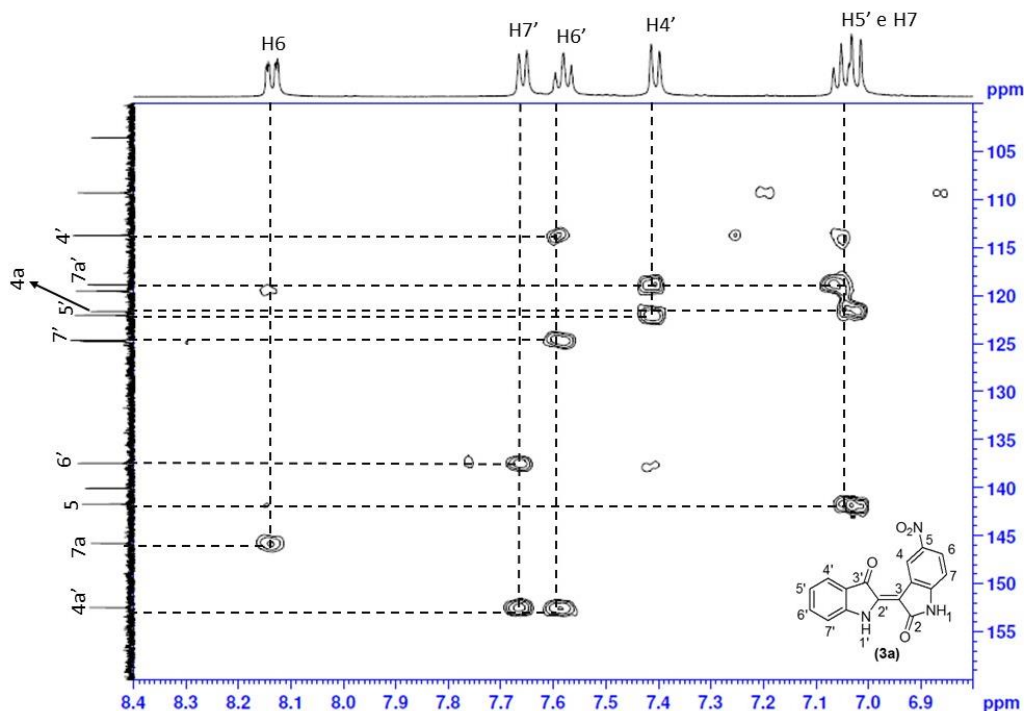
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 28: Mapa de contorno HMBC para (**3a**) (500 MHz, DMSO-*d*₆)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 29: Expansão mapa de contornos HMBC para **(3a)** (500 MHz, DMSO-*d*₆)



Fonte: Elaborado pela própria autora

A análise minuciosa baseada nos espectros de HSQC e HMBC, nas figuras 26-29, leva à conclusão de que as atribuições propostas por Beuchard para alguns hidrogênios, como NH, NH', H5' e H6' são errôneas, como mostra a Tabela 3.

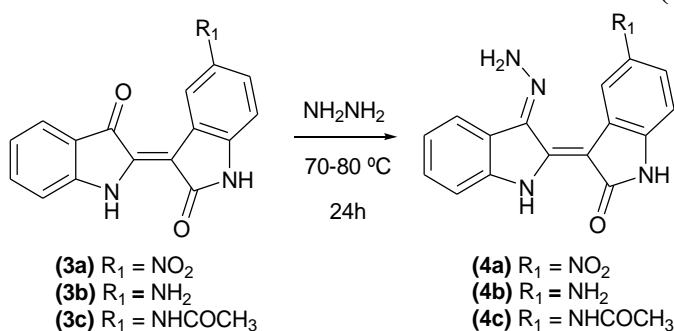
Tabela 3: Hidrogênios das indirubinas **(3a)**, **(3b)** e **(3c)** atribuídos neste trabalho^a e por Beuchard^b (BEAUCHARD et al., 2006)

Compostos	NH'	NH	H4	H6	H7	H4'	H5'	H6'	H7'
(3a)	^a 11,16	11,49	9,62	8,14	7,03	7,41	7,03	7,58	7,66
	^b 11,48	11,18	9,68	8,18	7,44	7,70	7,05	7,61	7,05
(3b)	^a 10,94	10,44	8,15	6,52	6,59	7,39	7,55	7,00	7,63
	^b 10,96	10,48	8,17	6,61	6,70	7,68	7,06	7,60	7,34
(3c)	^a 10,94	10,77	8,84	7,50	6,83	7,35	7,55	7,01	7,63
	^b 10,91	9,85	8,88	7,41	6,68	7,68	7,07	7,60	7,60

Fonte: Elaborado pela própria autora

6.4 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS INDIRUBINAS-3'-HIDRAZONA 5-SUBSTITUÍDAS **(4a)**, **(4b)** e **(4c)**.

Para a síntese das indirubinas-3'-hidrazona-5-substituídas, propôs-se, inicialmente, metodologia descrita por Moon e colaboradores (MOON, *et al*, 2006) para a síntese da indirubina-3'-hidrazona, na qual reage-se indirubina diretamente com hidrazina hidratada entre 70 e 80° por 24h, como mostra Esquema 20.

Esquema 20: Síntese das indirubinas-3'-hidrazona 5-substituídas (**4a**), (**4b**) e (**4c**)

Fonte: Elaborado pela própria autora

6.4.1 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**)

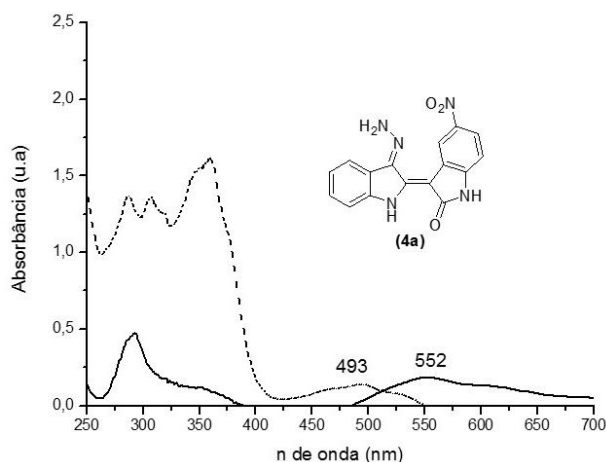
Seguindo metodologia descrita por Moon (MOON, *et al.*, 2006), obteve-se como produto um sólido vermelho, que foi filtrado, lavado com água, seco e isolado com rendimento de 43% após purificação em coluna cromatográfica, utilizando-se, como eluente, acetato de etila/hexano 1:1.

O composto obtido foi caracterizado pela sua faixa de fusão, espectroscopia na região do UV-Vis, IV e RMN de ¹H e ¹³C.

No espectro na região do UV-Vis em solução metanólica neutra (Figura 30), destaca-se a banda em 493 nm referente à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ aromática. Para a 5-nitroindirubina (**3a**), a banda correspondente a esta transição aparece em 552 nm, uma diferença de $\lambda_{\text{máx}}$ consistente com a mudança de coloração de roxo, em (**3a**), para vermelho, em (**4a**).

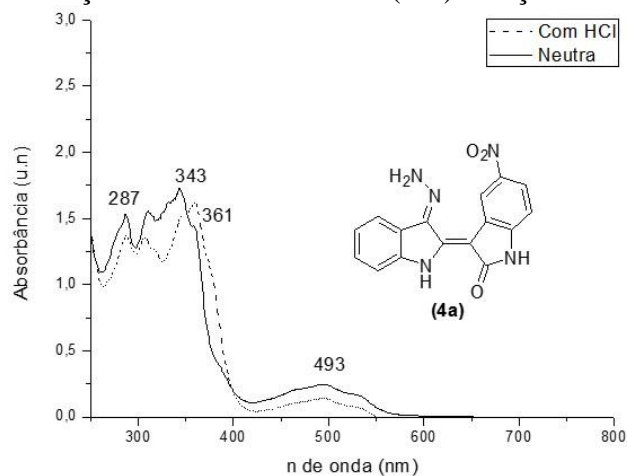
Em 361 nm, observa-se a banda correspondente à transição $n \rightarrow \pi^*$ na ligação C=N da hidrazona, que, em meio ácido, sofre um deslocamento batocrômico de 18 nm, passando de 361 para 343 nm e evidenciando a presença do grupo NH₂, como mostra Figura 31.

Figura 30: Espectro na região do UV-Vis para (-----) 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**) e (—) 5-nitroindirubina (**3a**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

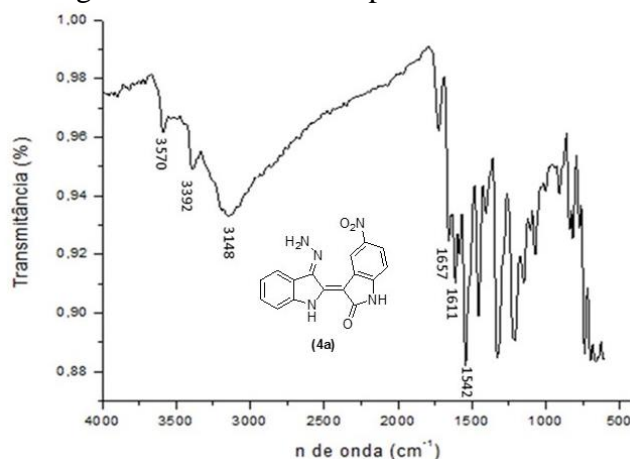
Figura 31: Espectro na região do UV-Vis para 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**) em (___) solução metanólica neutra e (----) solução ácida



Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro na região do infravermelho (Figura 32), podem-se destacar duas bandas, em 3570 e 3392 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação N-H da hidrazona, o que corrobora novamente com a presença do grupo NH_2 . Em 3148 cm^{-1} , nota-se o estiramento das ligações N-H indólicas. O desaparecimento da banda intensa em 1685 cm^{-1} , atribuído ao estiramento da ligação C=O da carbonila 3', em relação ao espectro da 5-nitroindirubina (**3a**), também indica a formação do produto esperado. Observa-se, em 1657 cm^{-1} , a banda de estiramento da ligação C=N da hidrazona e, em 1542 cm^{-1} , a banda intensa da deformação angular da ligação N-H deste mesmo grupo.

Figura 32: Espectro na região do infravermelho para 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**)



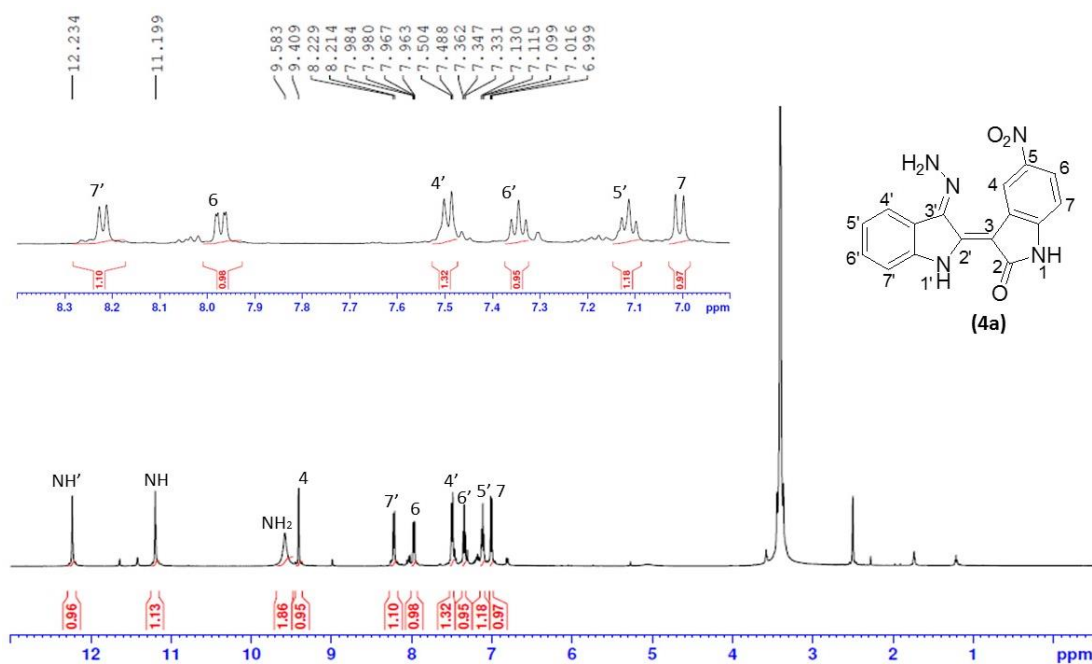
Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro de RMN de ^1H , na Figura 33, destaca-se um simpleto largo em 9,58 ppm, característico do grupo NH_2 de hidrazona. Observa-se que o hidrogênio N-H' se encontra mais desblindado em relação ao N-H da 5-nitroindirubina (**3a**) devido à influência do grupo

hidrazona, passando de 11,16 ppm para 12,23 ppm. Nota-se também que H5' apresenta-se mais desblindado, em relação ao material de partida.

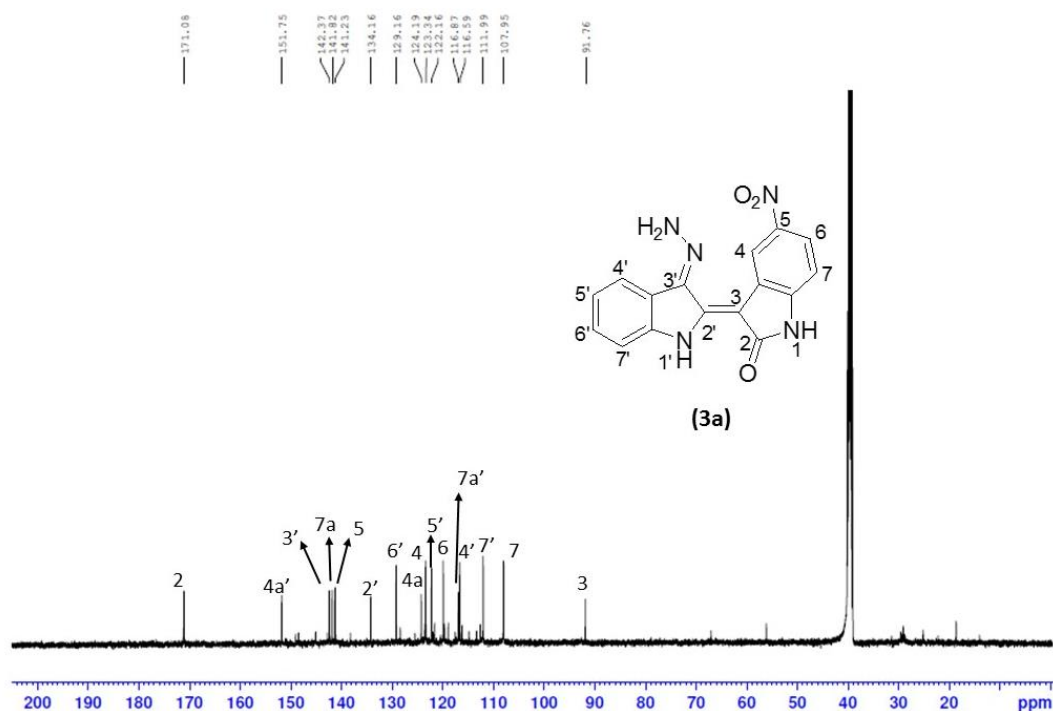
Por fim, pela análise do espectro de RMN de ^{13}C , pode-se observar o desaparecimento do sinal em 188,9 ppm correspondente à carbonila C3' na 5-nitroindirubina (**3a**) e o surgimento do sinal em 142,4 ppm, que evidencia mais uma vez a ocorrência de reação na posição C3' (Figura 34).

Figura 33: Espectro de RMN de ^1H da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**) (500 MHz, DMSO- d_6).



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**) (125 MHz, DMSO-d6).

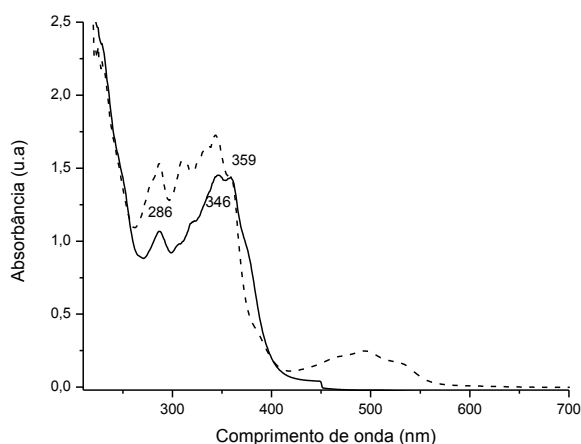


Fonte: Elaborado pela própria autora

Durante uma das sínteses da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona, observou-se um fato inusitado. Ao final da reação (Esquema 20), houve formação majoritária de um sólido amarelo-esverdeado e, no fundo do balão, uma pequena quantidade de um sólido vermelho, característico do produto esperado (**4a**). Este sólido foi purificado em coluna cromatográfica, empregando-se como eluente acetato de etila/hexano 1:1, com 41% de rendimento e caracterizado por faixa de fusão, espectroscopia na região do UV-Vis, IV, RMN de ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas (MALDI-TOF).

A Figura 35 mostra uma comparação do espectro na região do UV-Vis para a 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**) e o produto amarelo-esverdeado formado. Nota-se a ausência da banda em 552 nm, característica das transições $\pi \rightarrow \pi$ aromática altamente conjugada, sugerindo uma possível modificação do núcleo indirubínico.

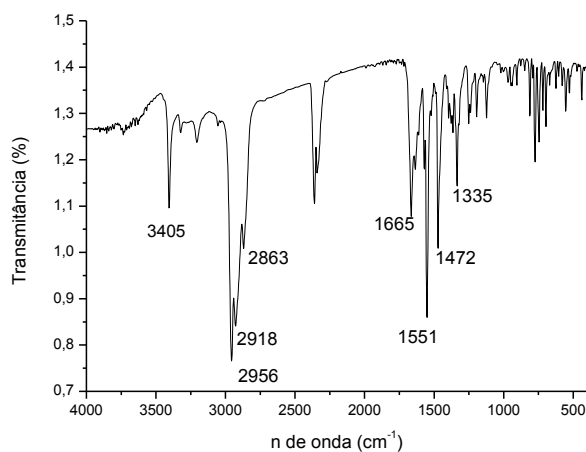
Figura 35: Espectro na região do UV-Vis para (____) composto amarelo-esverdeado e (-----) 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Já no espectro na região do IV, na Figura 36, observa-se também a ausência da banda intensa em 1542 cm^{-1} referente à deformação da ligação N-H da hidrazona, além da ausência da banda em 1611 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento da ligação C=O do núcleo indólico, o que corrobora com a hipótese de modificação do núcleo indirubínico.

Figura 36: Espectro na região do infravermelho para o composto amarelo-esverdeado

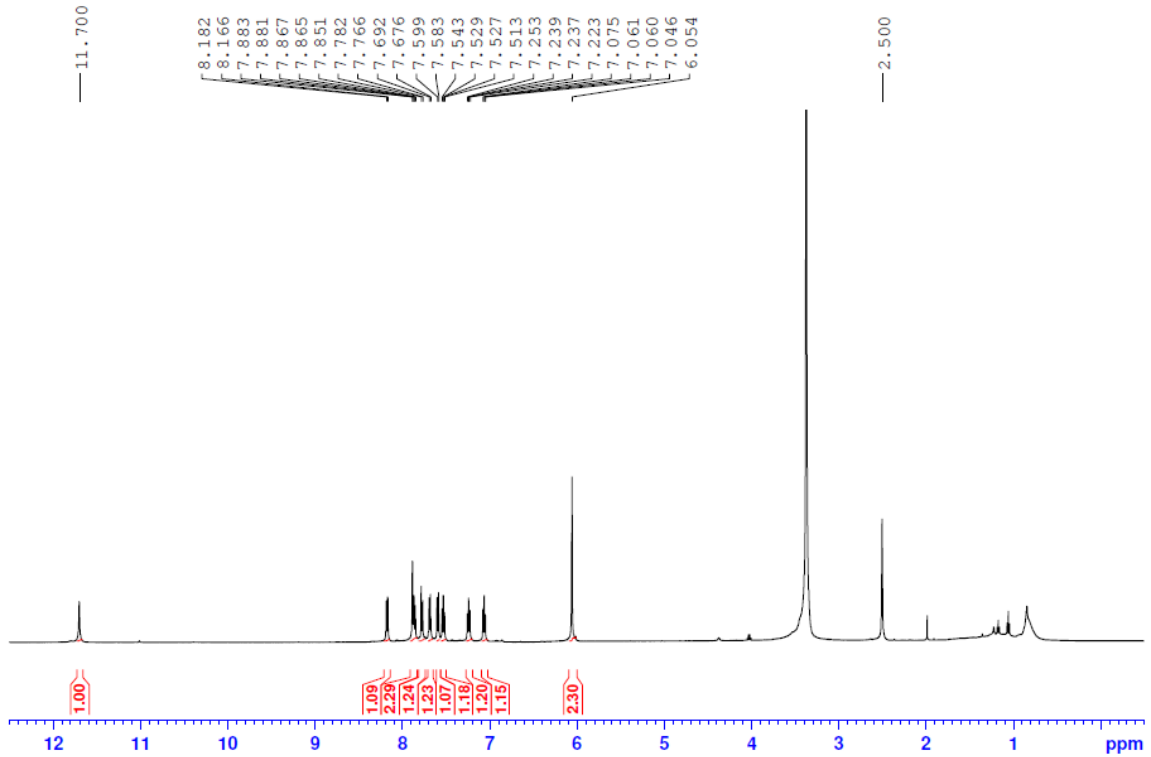


Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro de RMN de ^1H (Figura 37), a primeira evidência deste fato é a ausência de um sinal entre 11 e 12 ppm correspondente a um hidrogênio do NH' da porção indólica ou do NH da lactama, ao contrário do que se observa para indirubinas em geral. Além disso, o singlete em 6,05 ppm com integração igual à 2H indica a presença de um grupo NH_2 . A diminuição destes dois sinais no espectro de RMN de ^1H na presença de D_2O (Figura 38) confirma que se

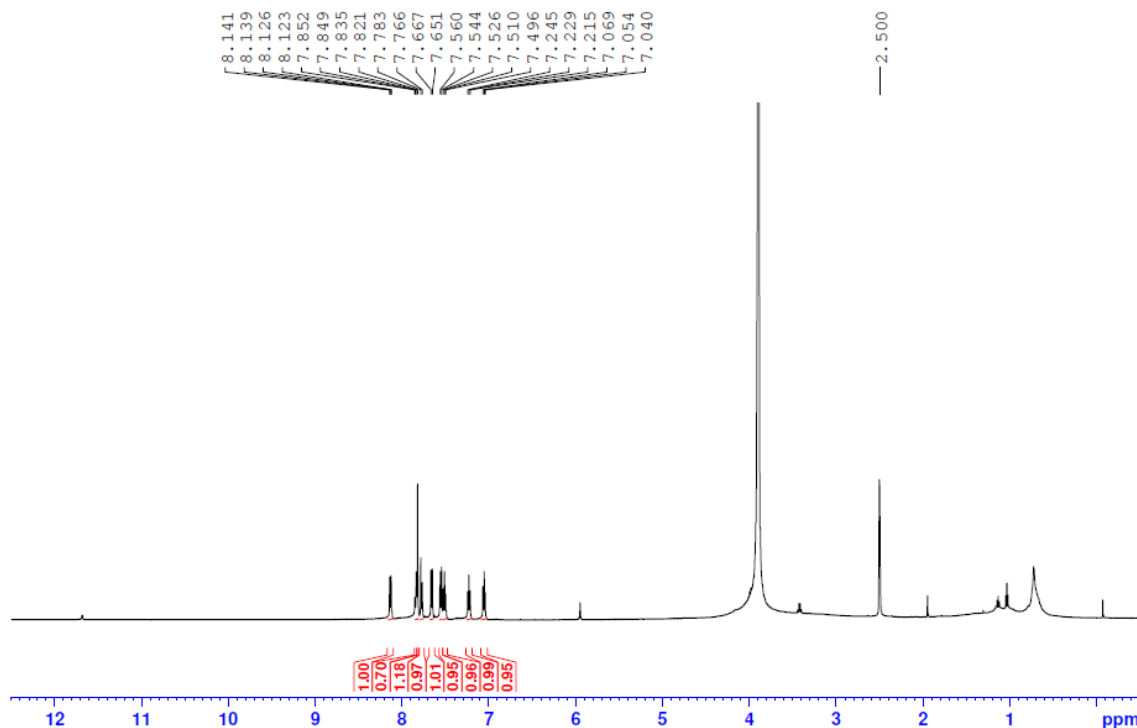
tratam de hidrogênios ligados a um átomo de N e que estes são os únicos deste tipo presente na molécula, visto que não houve redução ou desaparecimento de mais nenhum pico neste espectro. Isso acontece porque, em contato com D₂O, os hidrogênios ácidos presentes na molécula, neste caso apenas hidrogênios NH, trocam com o deutério e não há registro de sinal no espectro de RMN de ¹H.

Figura 37: Espectro de RMN de ¹H do composto amarelo-esverdeado (500 MHz, DMSO-*d*₆).



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 38: Espectro de RMN de ^1H do composto amarelo-esverdeado com D_2O (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

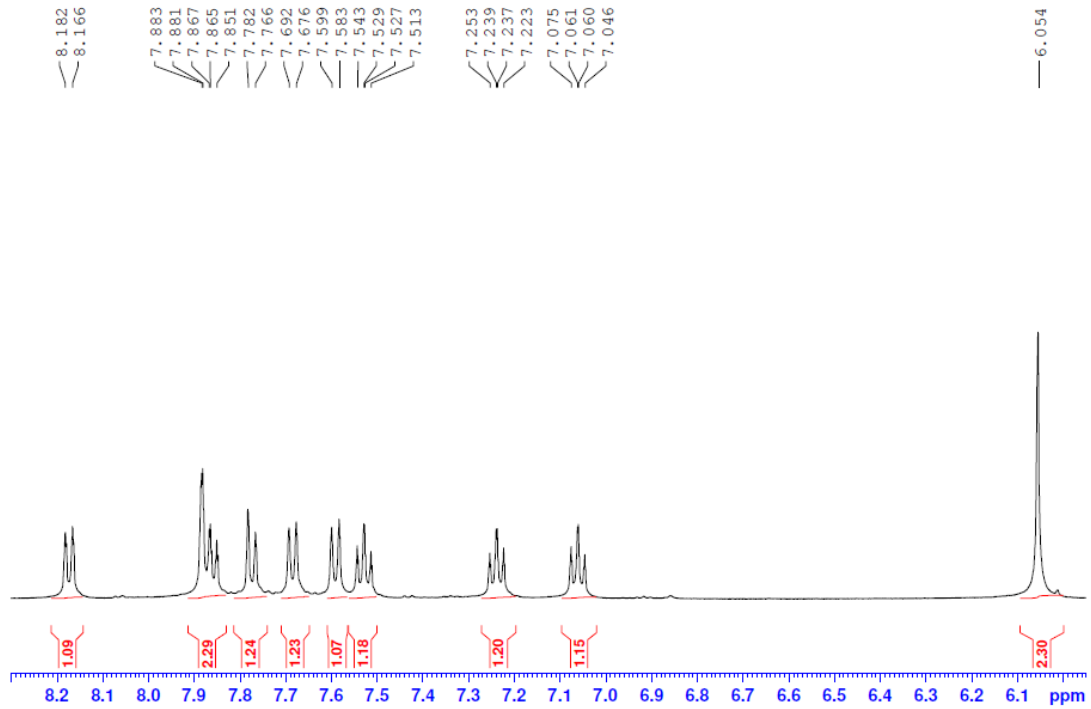


Fonte: Elaborado pela própria autora

Outro fato que despertou atenção foi o surgimento de um terceiro tripleto centrado em 7,55 ppm, como mostra a Figura 39. Tanto para a 5-nitroindirubina (**3a**) (material de partida) quanto para 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**) (produto esperado) somente dois hidrogênios podem apresentar essa multiplicidade, sendo $\text{H5}'$ e $\text{H6}'$. Um terceiro tripleto só seria possível com a ausência do grupo nitro, onde o novo hidrogênio H5 (ver estrutura na Figura 33) apareceria como um tripleto de duplete ou um tripleto aparente. Neste caso, H6 apresentaria a mesma multiplicidade, totalizando quatro tripletos. Uma inspeção na Figura 39 leva a crer que o multipletto centrado em 7,87 ppm contenha um tripleto sobreposto a um simpleto, completando, assim, quatro tripletos neste espectro.

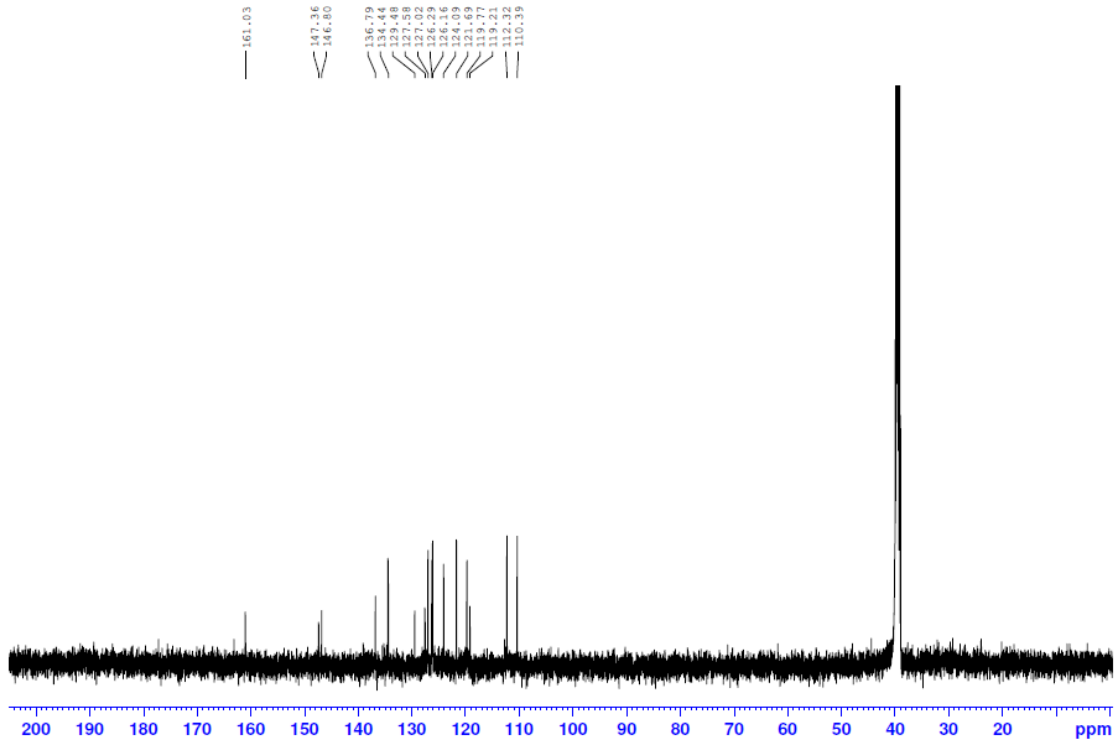
No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 40), não se observam sinais entre 170 e 190 ppm, característicos dos carbonos $\text{C3}'=\text{O}$ e $\text{C2}=\text{O}$ para as indirubinas.

Figura 39: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto amarelo-esverdeado (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

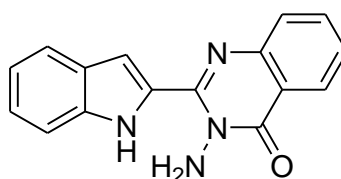
Figura 40: Espectro de RMN de ^{13}C do composto amarelo-esverdeado (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

Pesquisas intensas na literatura levaram ao trabalho de Bergman (BERGMAN; EKLUND, 1982) que descreve reações de índigo (Figura 1b) com hidrazina sob diferentes condições. Segundo os autores, a reação de índigo com hidrazina anidra em temperaturas próximas a 100°C fornece um composto, cuja estrutura é apresentada na Figura 41, confirmada por difração de Raio-X pelos autores e que é condizente com os dados de ponto de fusão, RMN de ^1H e ^{13}C e massas obtidos neste trabalho.

Figura 41: Estruturas do composto descrito por (BERGMAN; EKLUND, 1982)



(21a)

Fonte: Elaborado pela própria autora

Este composto poderia ser formado caso houvesse uma quantidade de índigo no lote de 5-nitroindirubina (**3a**) utilizado, maior que a observada comumente, uma vez que o composto amarelo-esverdeado foi o produto majoritário da reação. Como mencionado anteriormente, a síntese das indirubinas sempre vem acompanhada de índigo, devido à dimerização do 3-acetoxindol em contato com oxigênio (ver Esquema 1). Entretanto, este mesmo produto amarelo-esverdeado foi observado em outras reações, com diferentes lotes da 5-nitroindirubina. Uma vez que o referido produto não possui o substituinte NO_2 , verificado no RMN de ^1H , impele-se que pode ocorrer uma conversão da 5-nitroindirubina ao índigo.

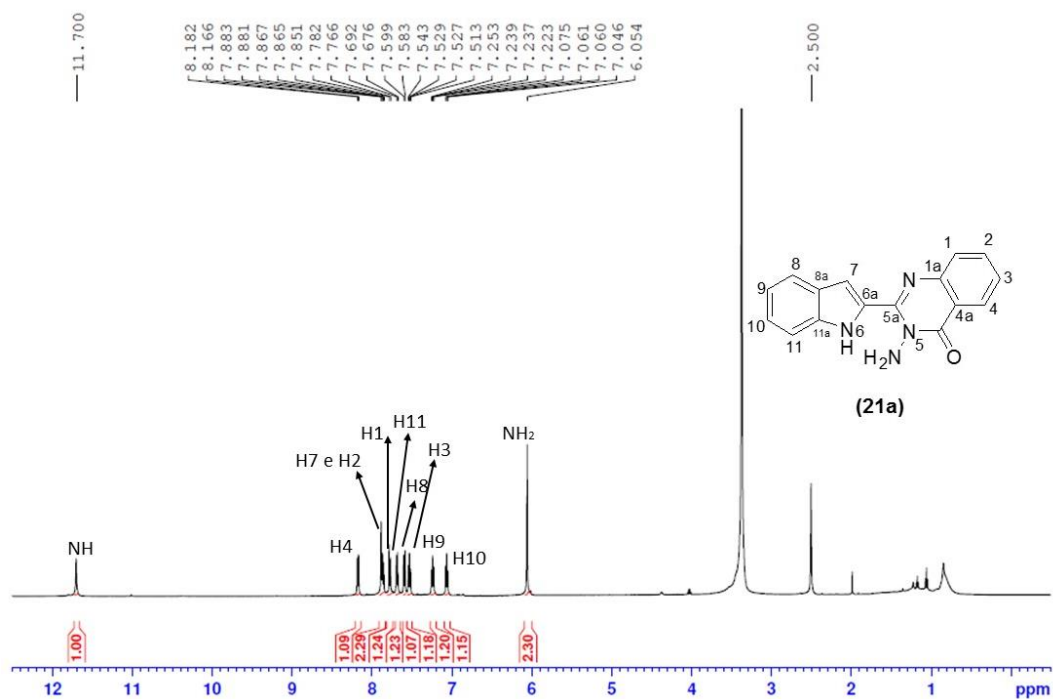
Meijer (MEIJER, *et al.*, 2006) relata que na antiguidade as indirubinas não possuíam uma boa aplicabilidade como corantes devido à tendência em convertessem-se ao índigo, contudo, não explicita em que condições de temperatura e/ou pH isso ocorre. Para verificar este fato, foi realizado um teste qualitativo, onde a indirubina foi dissolvida em THF e agitada à uma temperatura de 70°C na presença de uma gota de NaOH 1,0 mol.L $^{-1}$ e uma pequena quantidade de hidrossulfito de sódio como agente redutor. Foi verificado por CCD que a 5-nitroindirubina é gradativamente convertida ao índigo.

Uma vez que a hidrazina também é uma base, fornecendo um meio alcalino, e um forte agente redutor, a indirubina pode ser convertida ao índigo que gera o produto (**21a**) apresentado na Figura 41.

Passando a atribuição detalhada dos espectros, esta foi possível com auxílio dos mapas de contorno de COSY, que relaciona $^1J_{\text{HH}}$, NOESY, que correlaciona hidrogênios acoplados espacialmente, HSQC e HMBC.

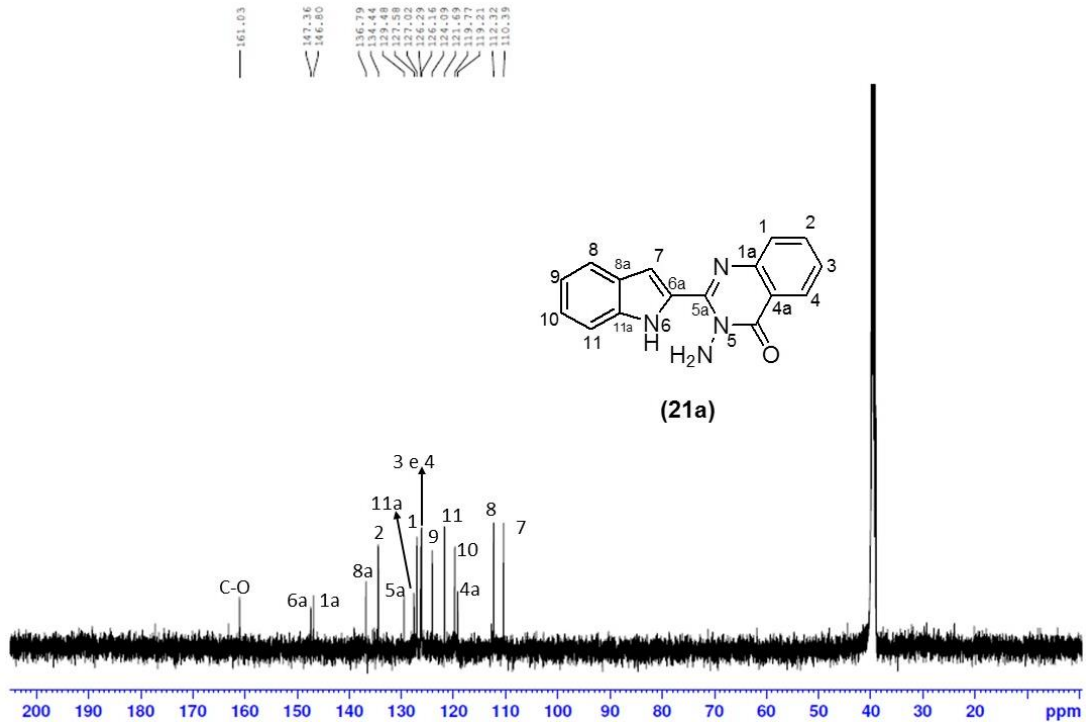
A atribuição dos hidrogênios foi iniciada por H4, que mostra um acoplamento 3J com o carbono carbonílico, e por H8, que mostra um acoplamento 3J com o carbono C7, como observado no mapa de contornos HMBC (Figura 44). Esta estratégia foi adotada pela facilidade de identificar os referidos carbonos, que são o de maior e menor deslocamento, respectivamente. A partir disso, os demais hidrogênios foram atribuídos com ajuda do mapa de contornos COSY (Figura 45).

Figura 42: Atribuições para o espectro de RMN de ^1H do composto **(21a)** (500 MHz, DMSO- d_6).



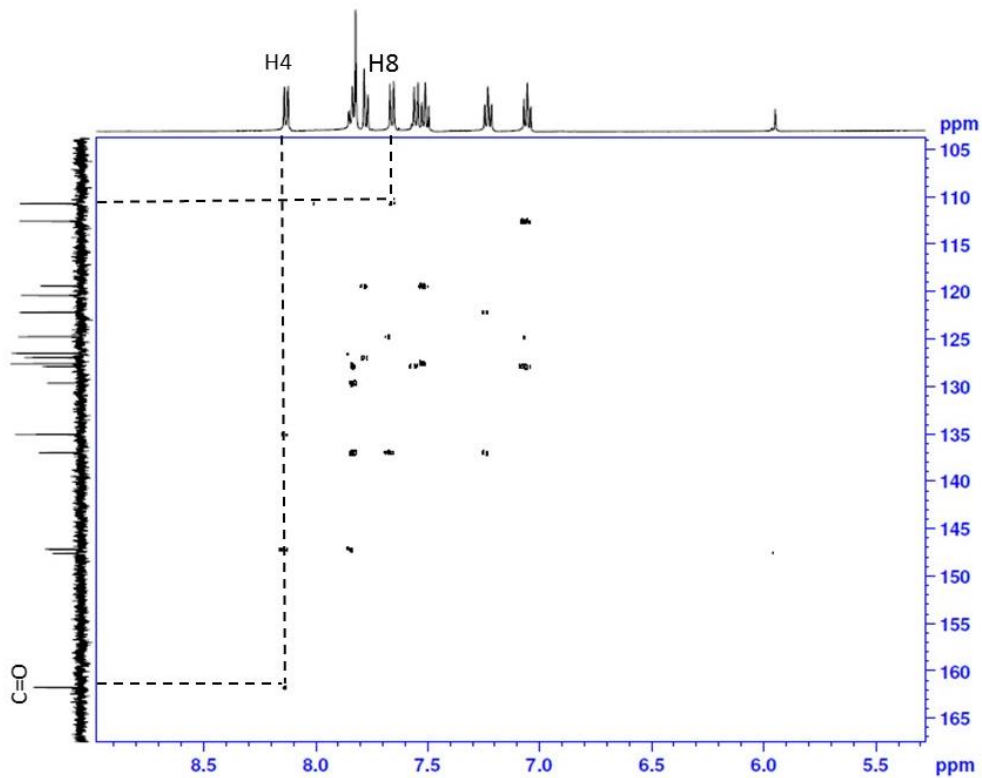
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 43: Atribuições para o espectro de RMN de ^{13}C do composto (**21a**) (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



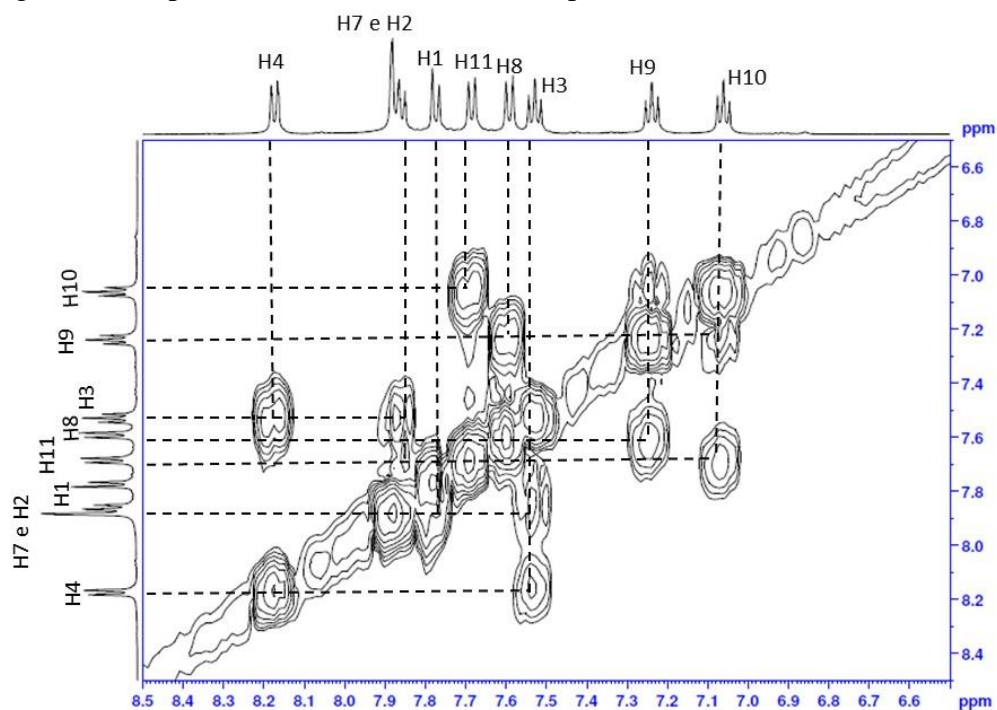
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 44: Mapa de contornos HMBC do composto (**21a**) (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)



Fonte: Elaborado pela própria autora

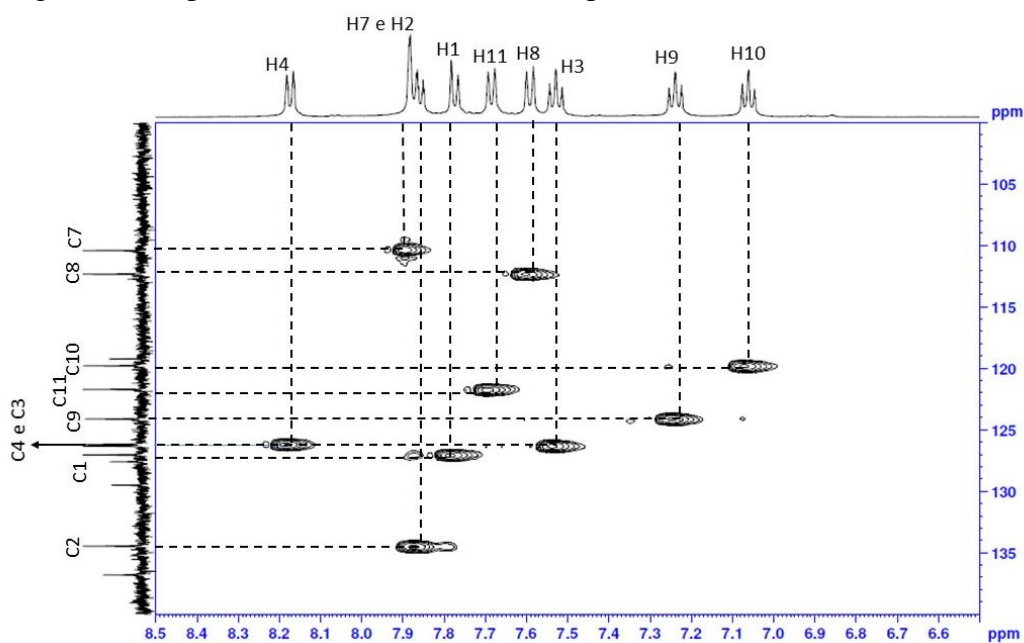
Figura 45: Mapa de contornos COSY do composto (**21a**) (500 MHz, DMSO-*d*₆)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Definidos os hidrogênios, os carbonos C1, C2, C3, C4, C7, C8, C9, C10 e C11 foram atribuídos utilizando-se o mapa de contornos HSQC (Figura 46), enquanto os demais, o HBMBC (Figura 44).

Figura 46: Mapa de contornos HSQC do composto (**21a**) (500 MHz, DMSO-*d*₆)

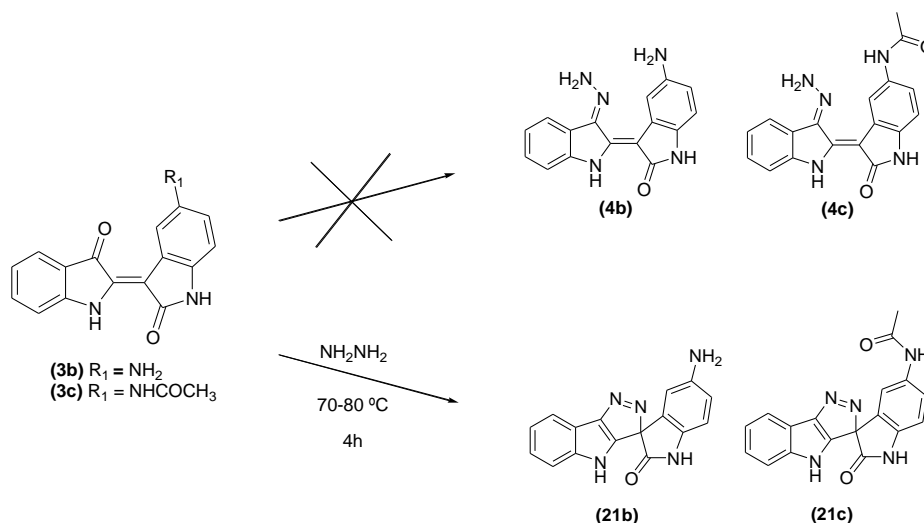


Fonte: Elaborado pela própria autora

6.4.2 5-aminoindirubina-3'-hidrazona (**4b**) e 5-acetamidaindirubina-3'-hidrazona (**4c**)

Para a reação de síntese das hidrazonas (**4b**) e (**4c**), observou-se consumo completo das indirubinas de partida com 4h de reação. As primeiras mudanças ocorreram com cerca de 30 minutos, quando o bruto reacional passa de azul-escuro para azul-esverdeado em ambas.

Esquema 21: Tentativa de síntese das hidrazonas (**4b**) e (**4c**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Ao final da reação, acompanhada por CCD, o bruto reacional foi resfriado, filtrado e lavado com água para remoção do excesso de hidrazina. Não foi necessária qualquer purificação. A Tabela 4 resume os dados obtidos.

Tabela 4: Dados obtidos para reação de síntese dos compostos (**21b**) e (**21c**)

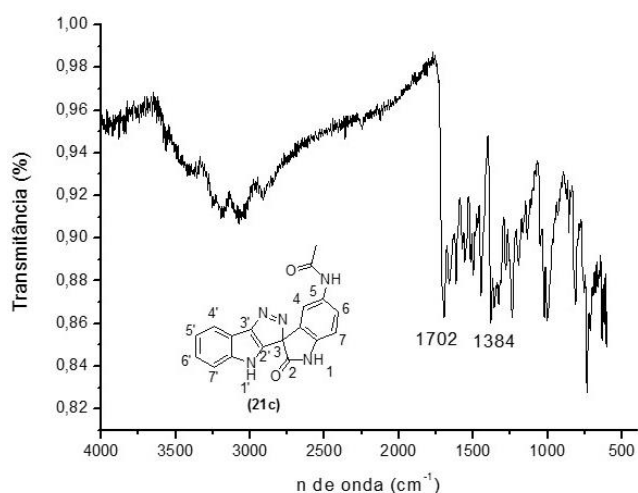
COMPOSTO	RENDIMENTO	P.F	ASPECTO
(21b)	61%	212°C	Sólido azul-pálido
(21c)	58%	208°C	Sólido azul-pálido

Fonte: Elaborado pela própria autora

A caracterização foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho, UV-Vis, RMN de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de massas (MALD-TOF). Para surpresa, tanto para reação com 5-aminoindirubina (**3b**) quanto para 5-acetamidaindirubina (**3c**), o produto isolado foi o intermediário diazeno (**21b**) e (**21c**) (Esquema 21). Na verdade, o primeiro indício da não formação das correspondentes hidrazonas foi a fluorescência azul observada na CCD e pela solução de cada produto. Por serem similares em estrutura, será apresentado aqui apenas a caracterização para o composto (**21c**).

No espectro na região do infravermelho (Figura 47), pode ser destacado a banda em 1702 cm^{-1} , atribuída ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$ da lactama, visto que amidas cíclicas absorvem em frequências maiores que amidas acíclicas devido à tensão no anel. Observa-se que, tanto para as indirubinas quanto para 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**), estes valores são menores (por volta de 1610 cm^{-1}) devido à conjugação com a ligação dupla $\text{C}2'=\text{C}3$, característica que foi perdida para estes compostos diazeno. Em 1384 cm^{-1} , nota-se a banda, possivelmente, do estiramento assimétrico da ligação $\text{N}=\text{N}$. Neste caso, esta banda é pouco intensa devido à natureza não polar da ligação.

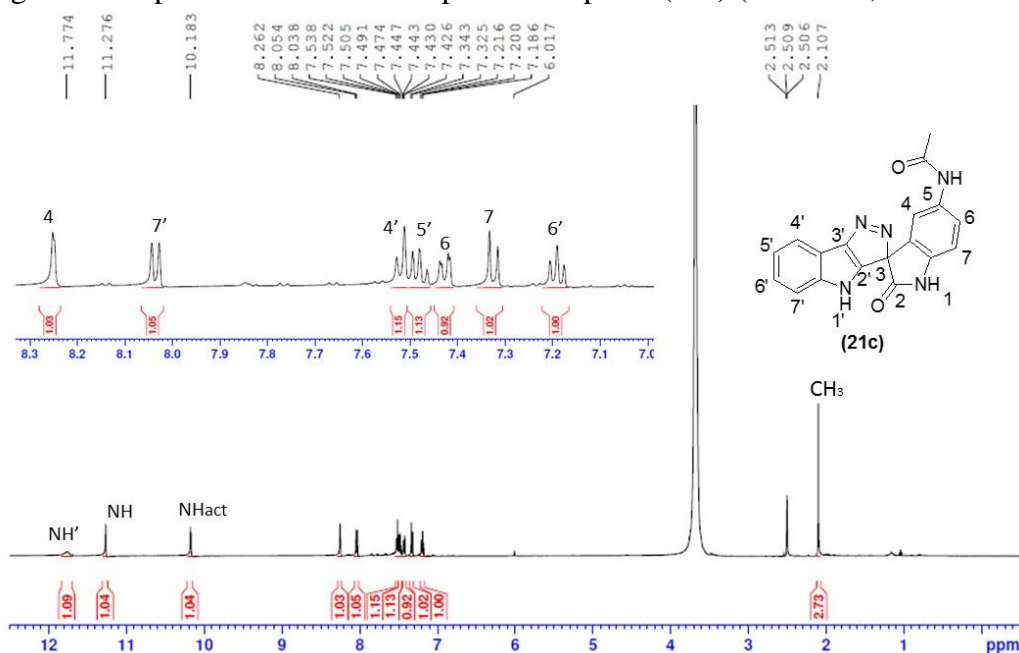
Figura 47: Espectro na região do infravermelho para (**21c**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Aspectos importantes no espectro de RMN de ^1H (Figura 48) que sugerem a formação do intermediário diazeno são a ausência do sinal próximo a 9,0 ppm, onde se esperaria observar o grupo NH_2 da hidrazona, e a ausência do sinal próximo a 6,0 ppm, onde se observa o substituinte NH_2 do composto (**21a**). Além disso, o sinal para NH' se mostra mais largo e menos intenso se comparado ao espectro de (**4a**), sugerindo uma maior proximidade com o átomo de oxigênio da lactama, fato que concorda com a ligeira mudança de conformação para (**21c**). Os demais hidrogênios apresentam deslocamentos e multiplicidades que concordam com o esperado para molécula proposta.

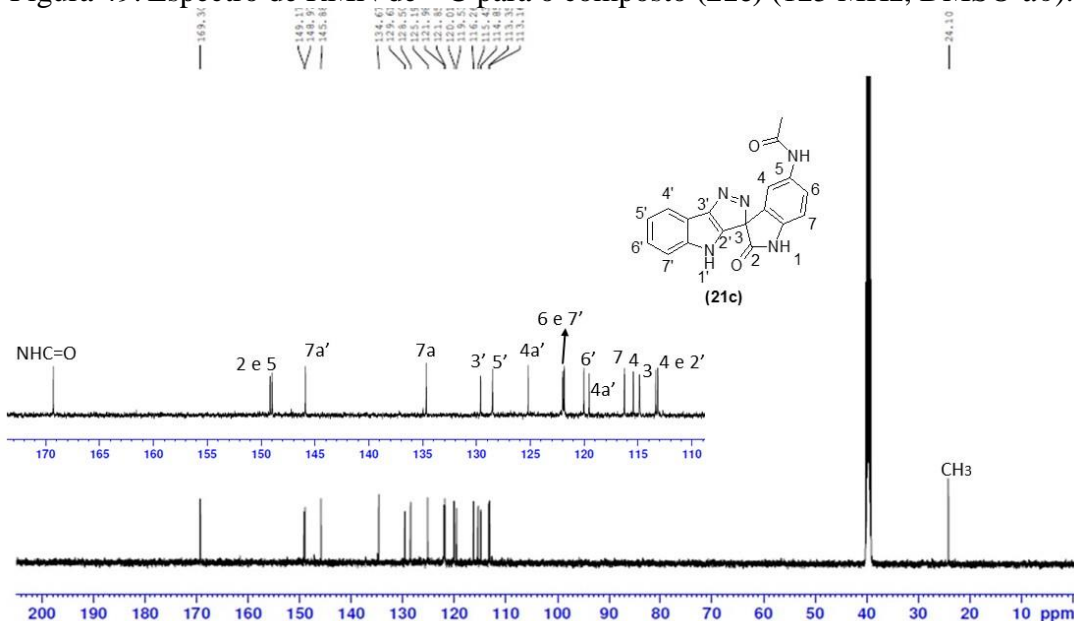
Figura 48: Espectro de RMN de ^1H para o composto (**21c**) (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro de RMN de ^{13}C , destaca-se a ausência do sinal próximo a 189 ppm, característico da ligação $\text{C}=\text{O}$ da 5-acemidindirubina (**3c**), o que evidencia a reação ocorrida neste ponto, além da diferença de deslocamento da carbonila da lactama, que sai de 171,1 ppm em (**3c**) para 149,2 ppm em (**21c**). Este carbono se encontra um pouco mais blindado devido à ausência da ligação dupla $\text{C}2'=\text{C}3$ que retira densidade eletrônica, como pode ser observado na Figura 49.

Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C para o composto (**21c**) (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



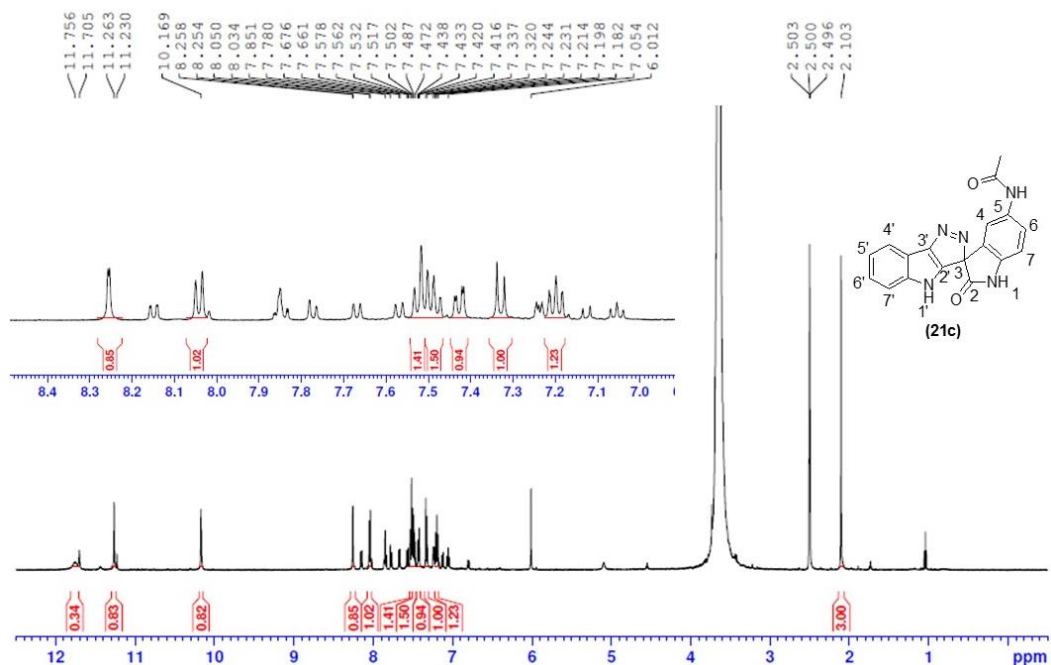
Fonte: Elaborado pela própria autora

A fim de investigar a possível conversão de **(21c)** ao análogo do composto **(21a)**, este procedimento foi realizado novamente para 24h e 48h. Ao longo da reação, o bruto reacional passou de azul-pálido para amarelado, indicando alguma reação. Após estes períodos, foram isoladas alíquotas por filtração e lavagem com água somente, e estas foram analisadas por RMN de ^1H e ^{13}C .

Como se pode observar no espectro de RMN de ^1H , apresentado na Figura 50, após 24 h de reação o composto diazeno **(21c)** permanece em grande parte intacto. Destaca-se o surgimento de um sinal em 6,01 ppm, provavelmente devido à formação do produto mesoiônico ainda em pequena quantidade, cerca de 20%. Na Figura 51, é mostrado o espectro de RMN de ^1H para o período de 48h. Neste caso, pode-se observar que a conversão de **(21c)** ao análogo mesoiônico agora é de aproximadamente 40%. Este fato demonstra que o grupo acetamida proporciona uma maior estabilidade para o produto diazeno que o grupo nitro, visto que mesmo para um tempo de reação até duas vezes maior, a conversão ainda não é completa.

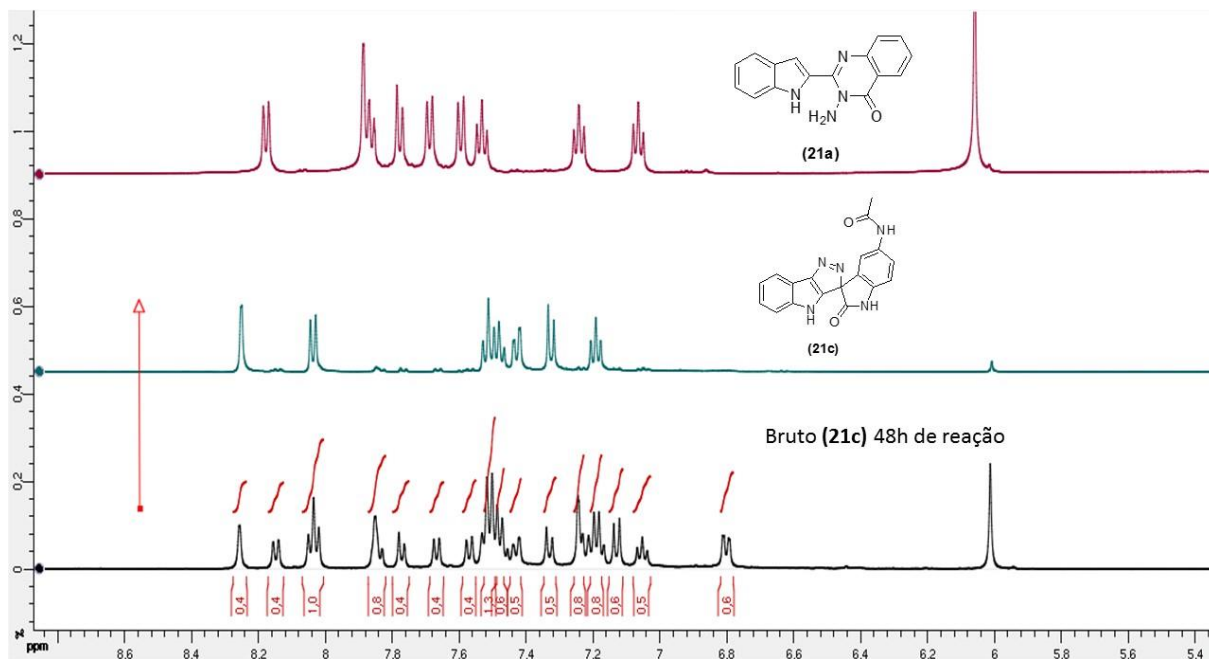
Este procedimento não foi realizado para a 5-aminoindirubina **(3b)** em razão à falta deste produto, como já discutido na Seção 6.2.

Figura 50: Espectro de RMN de ^1H para o composto **(21c)** - 24h de reação (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 51: Comparativo espectro de RMN de ^1H para **(21a)**, **(21c)** e **(21c)** - 48 horas de reação (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

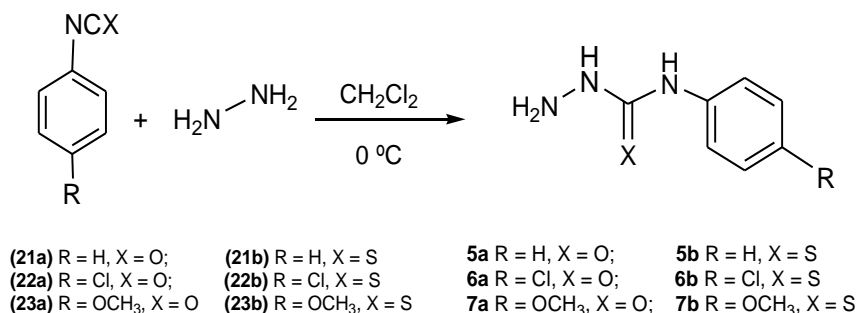


Fonte: Elaborado pela própria autora

Uma segunda metodologia foi testada na tentativa de obtenção das hidrazonas **(4a)** e **(4c)**. Foi utilizado THF como solvente e 2 equivalentes molar de $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. A reação foi monitorada por CCD por um intervalo de 24h e foi observado o mesmo comportamento para as reações diretamente em $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Para **(3a)**, forma-se a hidrazona **(4a)** com quatro horas de reação e, acima de 12h ocorre a conversão a **(21a)**. Para **(3c)**, observa-se a formação do composto diazeno também com quatro horas, não sendo possível isolar a hidrazona **(4c)**.

6.5 SÍNTESE DAS FENILSEMICARBAZIDAS E FENILTIOSSEMICARBAZIDAS *N*-4 SUBSTITUÍDAS **(5a-b)**, **(6a-b)** e **(7a-b)**

As semicarbazidas e tiossemicarbazidas foram preparadas facilmente como descrito por Beukers (BEUKERS, et al., 2003) a partir de fenilisocianatos e fenilisotiocianatos disponíveis comercialmente e hidrazina monohidratada 80%. As reações foram conduzidas em diclorometano próximas a 0°C , visto a possibilidade de formação de produtos dissustituídos em temperaturas superiores (Esquema 22).

Esquema 22: Síntese das semicarbazidas e tiossemicarbazidas *N4*-substituídas

Fonte: Elaborado pela própria autora

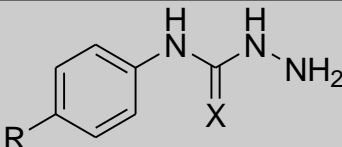
Todos os produtos precipitaram no meio reacional após intervalo de 1h, fornecendo sólidos que variaram de branco a palha, com alto grau de pureza, não sendo necessário, portanto, qualquer tipo de purificação. A caracterização foi realizada por faixa de fusão, espectroscopia na região do UV-Vis e RMN de ¹H e ¹³C. Embora algumas faixas de fusão tenham sido superiores às relatadas na literatura, os dados espectrais são condizentes com os valores esperados, como mostram as Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Características físicas da semicarbazidas e tiossemicarbazidas sintetizadas

Composto	R	X	Aspecto	Rendimento (%)	Faixa de fusão exp. (°C)	Faixa de Fusão lit.
5a	H	O	Sólido palha	77	181-182	122-123°C ^a
5b	H	S	Sólido branco	72	178	150-151°C ^b
6a	Cl	O	Sólido branco	82	199-200	190°C (dec.) ^a
6b	Cl	S	Sólido branco	81	182-183	178-180°C ^a
7a	OCH ₃	O	Sólido branco	87	158-160	132-133°C ^a
7b	OCH ₃	S	Sólido branco brilhante	75	159-160	156°C ^b

Fonte: Elaborado pela própria autora

Tabela 6: Dados espectroscópicos obtidos para semicarbazidas e tiossemicarbazidas sintetizadas

				
Composto	R	X	¹ H	¹³ C
5a	H	O	4,74 (2H, sl, NH ₂); 7,09 (1H, t, J = 7,5 Hz, HAr); 7,29 (2H, t, J = 7,5 Hz, 2x HAr); 7,61 (2H, sl, 2x HAr); 9,03 (1H, sl, N-H), 9,64 (1H, sl, N-H).	123,9; 124,5; 128,0; 139,1; 179,5.
5b	H	S	4,73 (2H, sl, NH ₂); 7,10 (1H, t, J = 7,25 Hz, HAr); 7,30 (2H, t, J = 7,9 Hz, 2x HAr); 7,63 (2H, sl, 2x HAr); 9,05 (1H, sl, N-H), 9,67 (1H, sl, N-H).	123,9; 124,6; 128,4; 139,4; 179,6.
6a	Cl	O	4,32 (2H, sl, NH ₂); 7,26 (2H, d, J = 9,0 Hz, 2x HAr); 7,42 (1H, sl, N-H); 7,52 (2H, d, J = 8,0 Hz, 2x HAr); 8,76 (1H, sl, N-H).	120,1; 125,3; 128,7; 139,1; 157,6.
6b	Cl	S	4,76 (2H, sl, NH ₂); 7,33(2H, d, J = 9,0 Hz, 2x HAr); 7,65 (2H, d, J = 8,0 Hz, 2x HAr); 9,11 (1H, sl, N-H). 9,65 (1H, sl, N-H).	125,7; 128,2; 128,4; 138,5; 179,6.
7a	OCH ₃	O	3,67 (3H, s, CH ₃); 4,28 (2H, sl, NH ₂); 6,81 (2H, d, J = 8,5 Hz, 2x HAr); 7,22 (1H, sl, N-H); 7,37 (2H, d, J = 8,5 Hz, 2x HAr); 8,44 (1H, sl, N-H).	55,4; 114,1; 120,3; 133,1; 154,5; 158,0.
7b	OCH ₃	S	3,74 (3H, s, CH ₃); 4,69 (2H, sl, NH ₂); 6,89 (2H, d, J = 9,0 Hz, 2x HAr); 7,43 (2H, d, J = 9,5 Hz, 2x HAr); 8,91 (1H, sl, N-H); 9,51 (1H, sl, N-H).	55,4; 113,5; 126,1; 132,3; 156,5; 180,1.

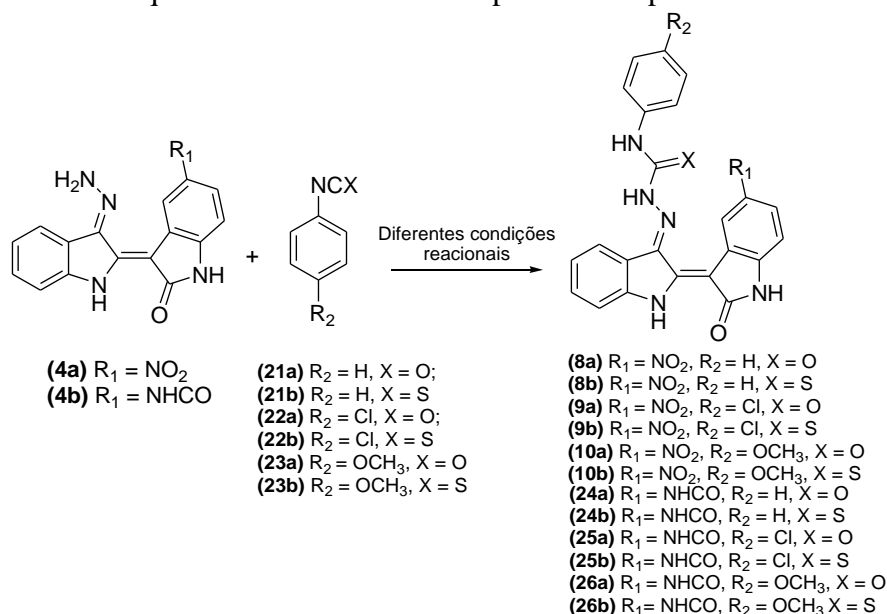
Fonte: Elaborado pela própria autora

6.6 SÍNTESE DAS SEMICARBAZONAS E TIOSSEMICARBAZONAS DAS INDIRUBINAS 5-SUBSTITUÍDAS (8a-b), (9a-b), (10a-b), (24a-b), (25a-b) e (26a-b) PELA ROTA A.

Como mencionado no item 4 deste trabalho, existem duas rotas possíveis para a síntese dos compostos de interesse. Pretendia-se, inicialmente, reagir as indirubinas-3'hidrazonas 5-

substituídas com diferentes aril isocianatos e isotiocianatos, como mostra o Esquema 23. As condições testadas estão resumidas na Tabela 7.

Esquema 23: Síntese dos compostos-alvo pela rota a.



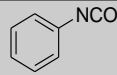
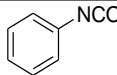
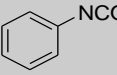
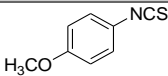
Fonte: Elaborado pela própria autora

Todas as metodologias empregaram a 3'-hidrazona-5-nitroindirubina. A primeira condição testada empregou diclorometano com fenilisocianato à temperatura ambiente. Após 48h sob agitação, nenhuma reação foi observada, sendo isolado o material de partida. Em uma segunda tentativa, o solvente foi substituído por clorofórmio e empregou-se ligeiro aquecimento. Após o mesmo intervalo, novamente nenhuma reação foi observada. A escolha por tais solventes deveu-se à alta reatividade dos isocianatos e isotiocianatos com nucleófilo, que impossibilita o uso de solventes próticos. Entretanto, não foi realizada uma secagem previa dos solventes utilizados, de forma que, a presença de água pode ter deixado o fenilisocianato indisponível para o ataque nucleofílico da hidrazona.

Na terceira metodologia, utilizou-se THF como solvente à temperatura ambiente. Após 48h de agitação, foi verificado por CCD traços de algum produto. A mistura foi colocada sob refluxo por mais 24h, não havendo consumo total dos materiais de partida. Para esta reação, os valores de R_f da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a) e do produto (8a) são muito próximos, dificultando a separação por cromatografia em coluna. Na tentativa de obter um produto com R_f diferente, na quarta metodologia, o fenilisocianato foi substituído pelo *p*-metoxifenilisotiocianato, também em THF e refluxo por 72h. Mesmo empregando um ligeiro excesso de *p*-metoxifenilisotiocianato, após este intervalo não houve consumo total da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (4a). Mais uma vez os valores de R_f permaneceram muito

próximos, independentemente do sistema de eluente utilizado (Tabela 8). Houve uma tentativa de purificação por placa preparativa, entretanto, sem êxito, devido à baixa solubilidade destes compostos na fase móvel.

Tabela 7: Resumo das condições testadas para síntese dos compostos-alvo pela rota a.

REAÇÃO	REAGENTES	CONDIÇÕES	OBSERVAÇÕES
1		CH ₂ Cl ₂ , t.a, 48h	Não houve reação
2		CHCl ₃ , Δ, 48h	Não houve reação
3		THF, t.a, 48h/refluxo 24h	Traços de produto/Mistura
4		THF, refluxo, 72h	Mistura produto e material de partida

Fonte: Elaborado pela própria autora

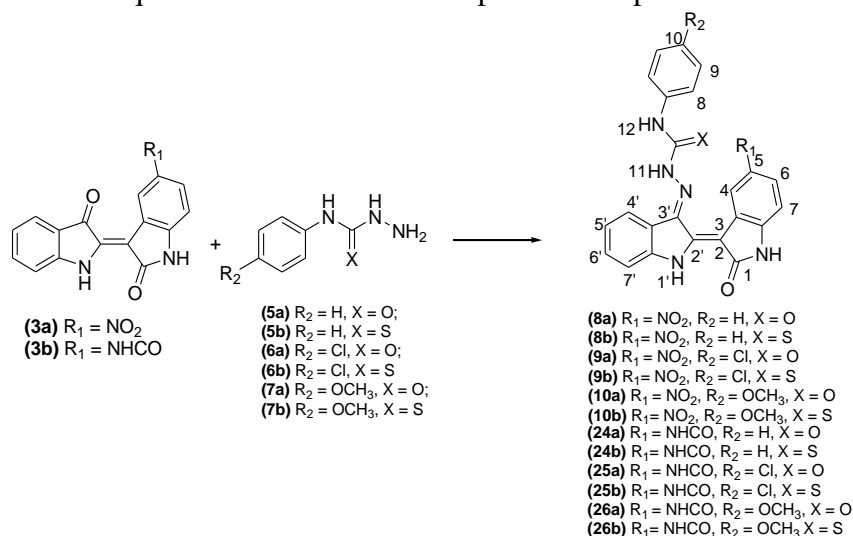
Tabela 8: Sistemas de solventes empregados

ELUENTE	PROPORÇÃO	R _f material de partida (4a)	R _f do produto (10b)
AcOEt/Hexano	1:1	0,5	0,48
AcOEt/Hexano	2:1	0,45	0,47
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	95:5	0,81	0,80
CH ₂ Cl ₂	100	0,63	0,65
Hexano/Acetona	1:1	0,39	0,39
Hexano/Dioxano	1:1	0,40	0,49
Hexano/Dioxano	2:1	0,13	0,16

Fonte: Elaborado pela própria autora

A figura abaixo mostra os espectros da 5-nitroindirubina-3'-hidrazona (**4a**) e do bruto da reação **4** (Figura 52) sobrepostos. É possível observar a diminuição na intensidade dos sinais correspondentes a NH e NH' do material de partida e o aparecimento dos sinais correspondentes a estes mesmos hidrogênios no produto. O mesmo ocorre para o sinal correspondente a NH₂, embora não se observam os sinais referentes aos NH da porção tiossemicarbazona do produto. Além disso, H₄, que no material de partida aparece com deslocamento de 9,41 ppm, aparece

Esquema 24: Síntese dos compostos-alvo pela rota b



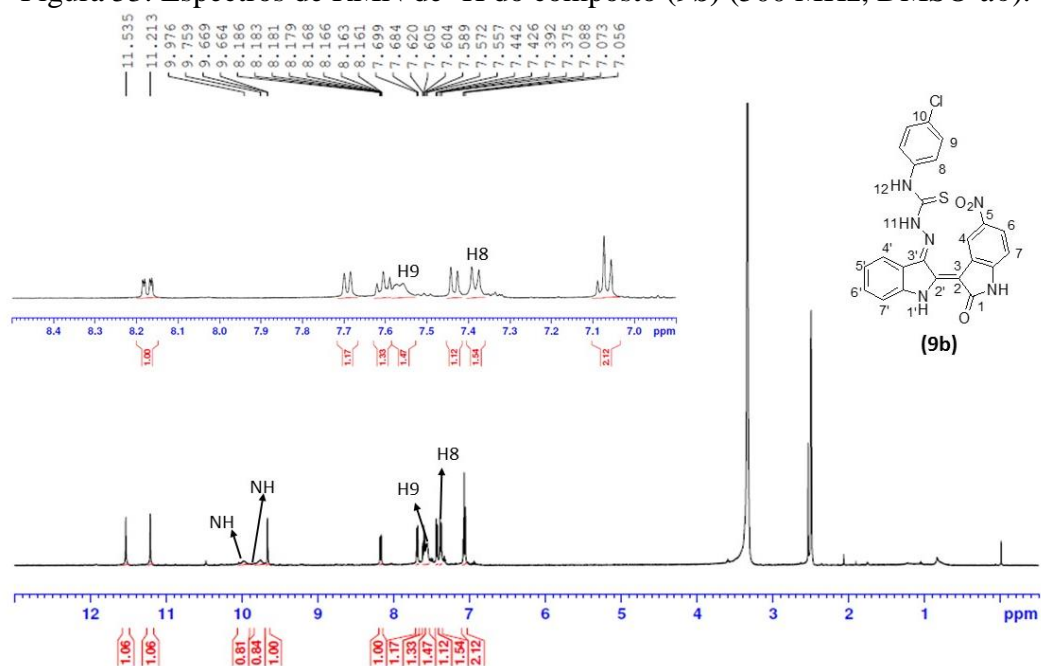
Fonte: Elaborado pela própria autora

Testou-se, inicialmente, a 5-nitroindirubina (**3a**) com *p*-clorofeniltiossemicarbazida (**6b**) em THF sob agitação à temperatura ambiente. À primeira vista, não foi observada nenhuma reação, isto porque, mesmo após longas horas, não foi observado mudança no aspecto da mistura, além de não haver consumo de (**6b**). O emprego de refluxo não favoreceu qualquer reação.

Utilizando-se catálise ácida ($\text{HCl } 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ até $\text{pH} = 5$) sob aquecimento, observou-se por CCD a formação de uma nova mancha após dois dias de reação, indicando a formação de um novo produto. Como a reação não progrediu com o passar de quatro dias, a mistura foi retirada do aquecimento e armazenada em geladeira por uma noite. No fundo do balão, havia decantado um precipitado com mesmo aspecto físico do material de partida, o qual foi separado do sobrenadante por filtração a vácuo. O sobrenadante teve o solvente evaporado e o bruto foi purificado em coluna cromatográfica, empregando como eluente acetato de etila/hexano 1:1. Entretanto, a análise de RMN de ^1H e ^{13}C das frações, que se imaginava ser o produto de interesse (**9b**), mostraram um espectro que indica a formação de um derivado da *p*-clorofeniltiossemicarbazida (**6b**) empregada, não investigado naquele momento.

Decidiu-se, então, realizar uma análise de RMN de ^1H e ^{13}C do sólido decantado, identificado inicialmente como o material de partida (**3a**), para verificar a possibilidade de uso em reações posteriores. Entretanto, ao invés de 5-nitroindirubina, a análise do espectro sugere a formação do produto de interesse (**9b**), visto o surgimento de alguns sinais característicos da porção *p*-clorofeniltiossemicarbazida, como mostram as Figuras 53 e 54.

Figura 53: Espectros de RMN de ^1H do composto (**9b**) (500 MHz, DMSO- d_6).



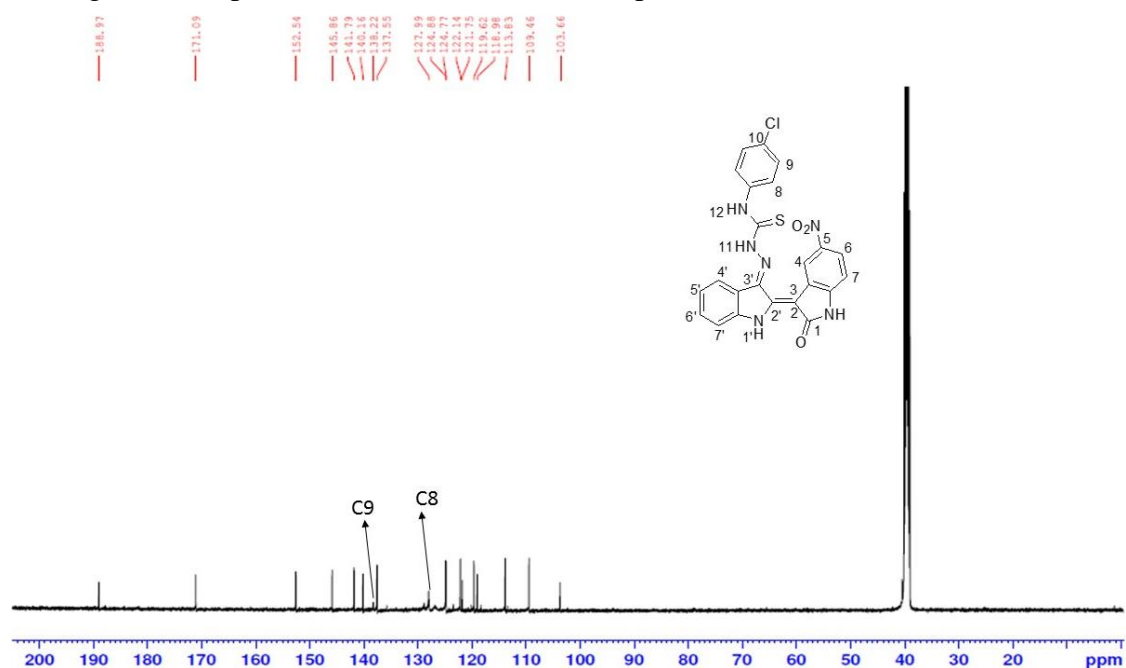
Fonte: Elaborado pela própria autora

Nota-se no espectro de RMN de ^1H (Figura 53) que os deslocamentos e multiplicidade dos hidrogênios do núcleo principal foram pouco alterados em relação ao espectro da 5-nitroindirubina (**3a**). Destaca-se o surgimento de dois simpletos alargados em 9,98 ppm e 9,76 ppm, característicos de hidrogênios N-H correspondentes a H11 e H12. Os hidrogênios equivalentes da porção tiossemicarbazona aparecem como dupletos centrados em 7,56 ppm (H9) e 7,38 ppm (H8). Os hidrogênios H9 aparecem mais desblindados devido ao efeito indutivo causado pelo átomo de cloro.

No espectro de carbono, na Figura 54, nota-se o surgimento do carbono em 127,9 ppm, atribuído a C8 e C8', e em 138,2 ppm, atribuído a C9 e C9'.

Outras técnicas de caracterização empregadas foram a espectroscopia na região do IV e espectroscopia de massas por eletro spray, além da faixa de fusão ($P.F_{\text{exp}} < 300^\circ\text{C}$).

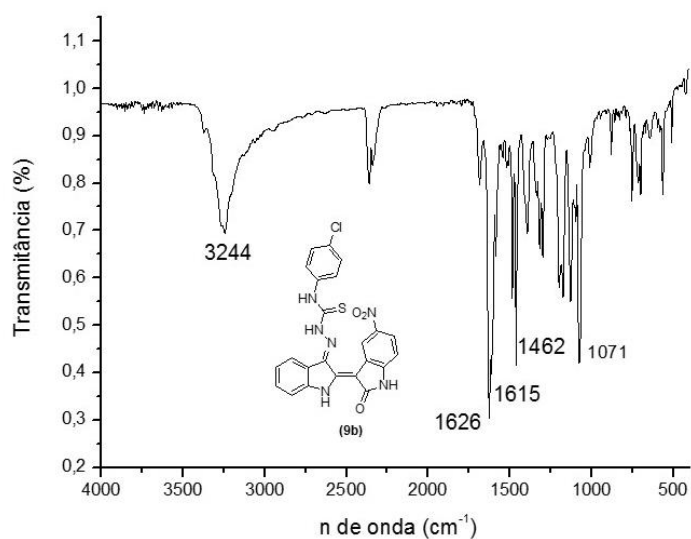
Figura 54: Espectros de RMN de ^{13}C do composto (**9b**) (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro na região do IV (Figura 55) pode-se observar em 3244 cm^{-1} uma banda com padrão característico do estiramento N-H de semicarbazonas e tiossemicarbazonas. A banda de estiramento da ligação C=N aparece em 1626 cm^{-1} , muito próxima à banda intensa referente ao estiramento da ligação C=O da lactama em 1615 cm^{-1} . Em 1462 cm^{-1} , pode-se observar a banda correspondente à deformação angular da ligação N-H. O estiramento da tiocarbonila encontra-se em 1071 cm^{-1} como uma banda fina e relativamente intensa.

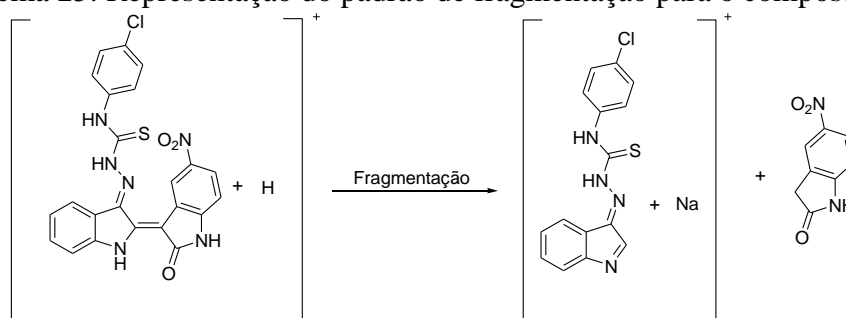
Figura 55: Espectro na região do infravermelho para o composto (**9b**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

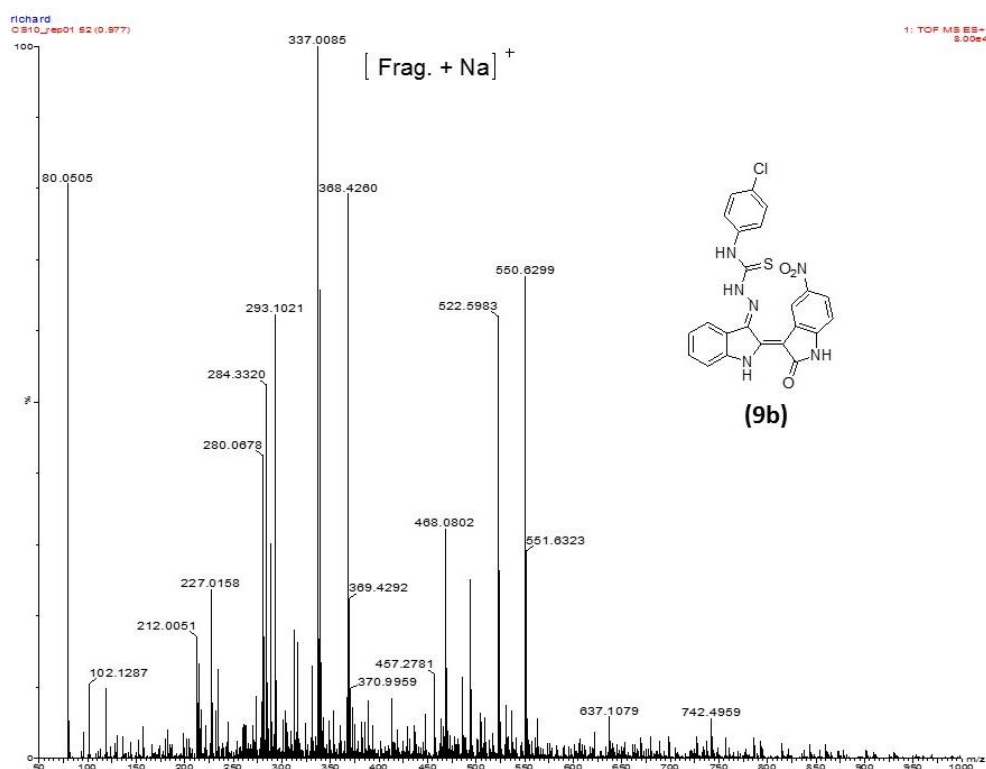
No espectro de massas (Figura 56) do composto (**9b**), não se observa o pico correspondente ao íon molecular $[M+H]^+$ (calculado $m/z = 491,0687$), entretanto, nota-se um pico correspondente à fragmentação apresentada no Esquema 26. Neste padrão, a maioria das moléculas de (**9b**) sofre quebra da ligação $C2'=C3$, gerando um íon fragmento que forma um aduto com um átomo de sódio $[Frag.+Na]^+$, com $m/z = 337,0085$ (calculado $m/z = 337,0285$). Este aduto com um átomo de sódio é o pico base por ser um íon estável devido à eliminação de um fragmento neutro.

Esquema 25: Representação do padrão de fragmentação para o composto (**9b**)



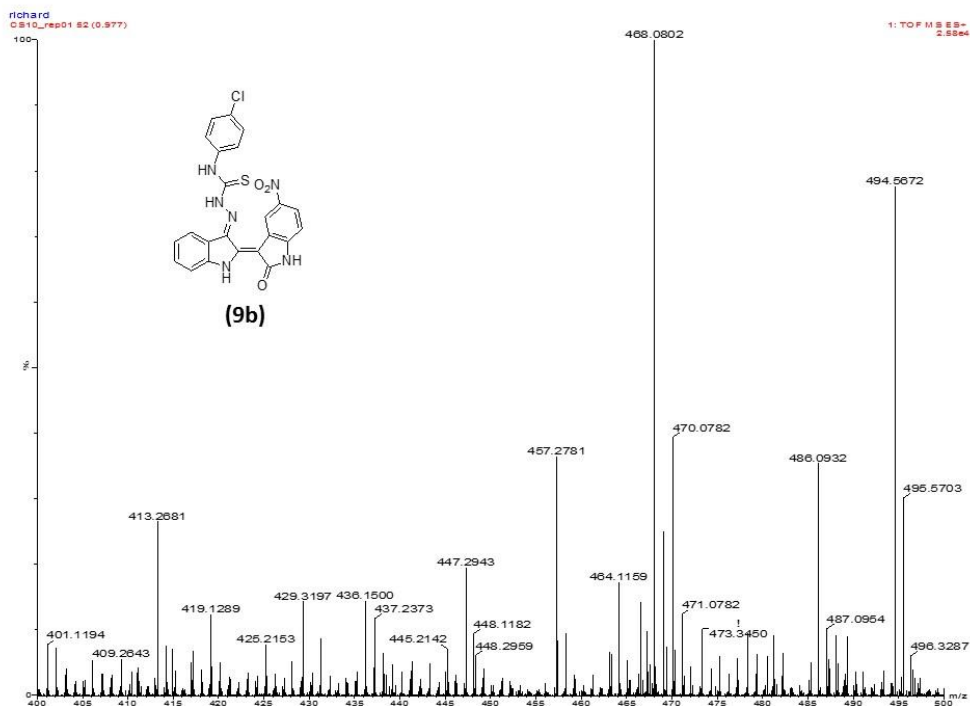
Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 56: Espectro de massas ES/TOF para o composto (**9b**)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Figura 57: Expansão do espectro de massas ES/TOF para o composto (9b)



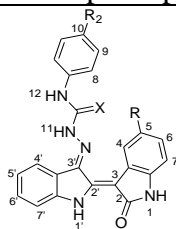
Fonte: Elaborado pela própria autora

A partir disso, estabeleceu-se como metodologia para síntese das semicarbazonas e tiossemicarbazonas das indirubinas-5-substituídas as seguintes condições: THF como solvente, HCl 0,1 mol.L⁻¹ (pH 5,0) como catalisador e agitação sob refluxo por quatro dias.

Para nenhum dos outros sete derivados testados, (8a), 8(b), (9a), (10a), (10b), (25a) e (25b), foi observada mudança de R_f. O progresso da reação fica ainda mais difícil de ser acompanhado, uma vez que não há consumo total das semi e tiossemicarbazidas.

Passados quatro dias e após resfriamento, (9a) precipitou no meio reacional, sendo filtrado e recristalizado em MeOH/H₂O 1:1. Os demais, (8a), 8(b), (10a), (10b), (25a) e (25b) tiveram o solvente evaporado e também foram recristalizados empregando o mesmo sistema de solvente, obtendo-se, assim, sólidos roxos similares às indirubinas. As análises de RMN de ¹H e ¹³C e também de infravermelho sugerem a formação dos produtos esperados (8a), (9a) e (25b), além de (9b) já descrito acima, como pode ser observado na Tabela 9, que mostra deslocamentos importantes na caracterização, como H10, H11, H8 e H9. Todos os espectros podem ser consultados no Anexo.

Tabela 9: Resumo dos dados espectroscópicos para os compostos-alvo sintetizados

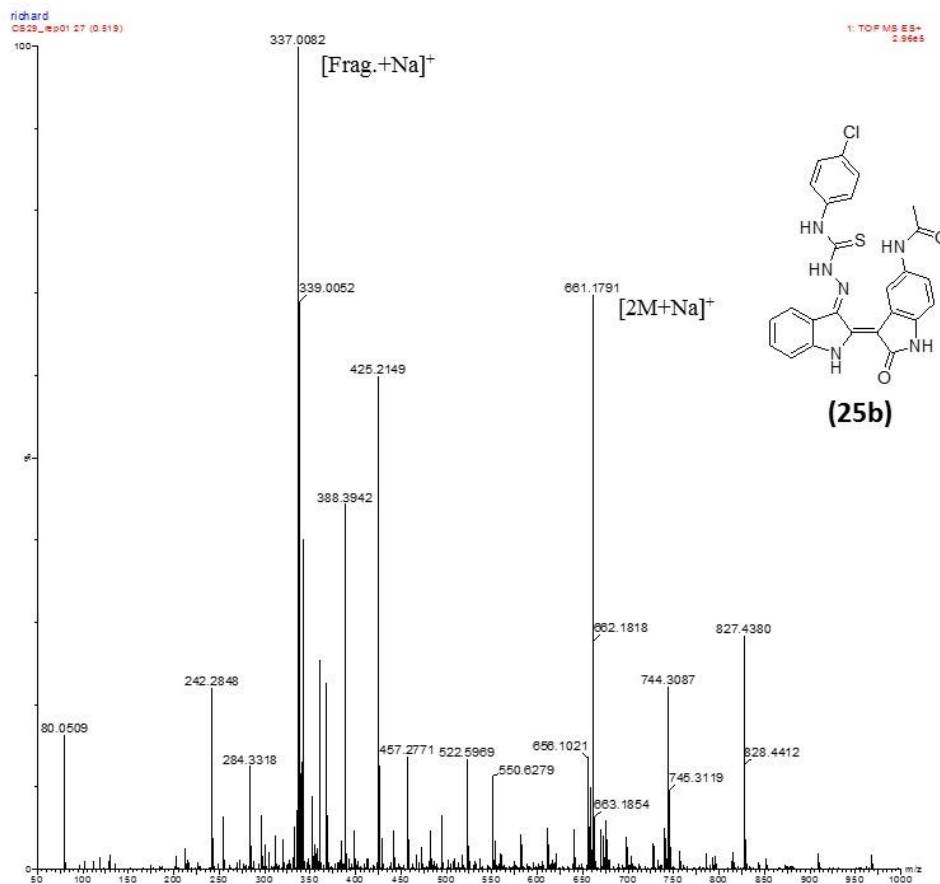


Composto	R	R ₂	X	NH ⁷	NH	H11	H12	H8	H9	H10
8a	NO ₂	H	O	11,50 (sl)	11,15 (sl)	9,60 (sl)	7,97 (sl)	7,24 (t)	7,03 (m)	7,33 (m)
9a	NO ₂	Cl	O	11,55 (sl)	11,22 (sl)	8,98 (sl)	8,08 (sl)	7,29 (d)	7,53 (d)	-
9b	NO ₂	Cl	S	11,53 (sl)	11,21 (sl)	9,97 (sl)	9,75 (sl)	7,38 (d)	7,58 (d)	-
25b	NHCO	Cl	S	10,95 (sl)	10,77 (sl)	10,05 (s)	Não visualizado	7,56 (d)	7,33 (d)	-

Fonte: Elaborado pela própria autora

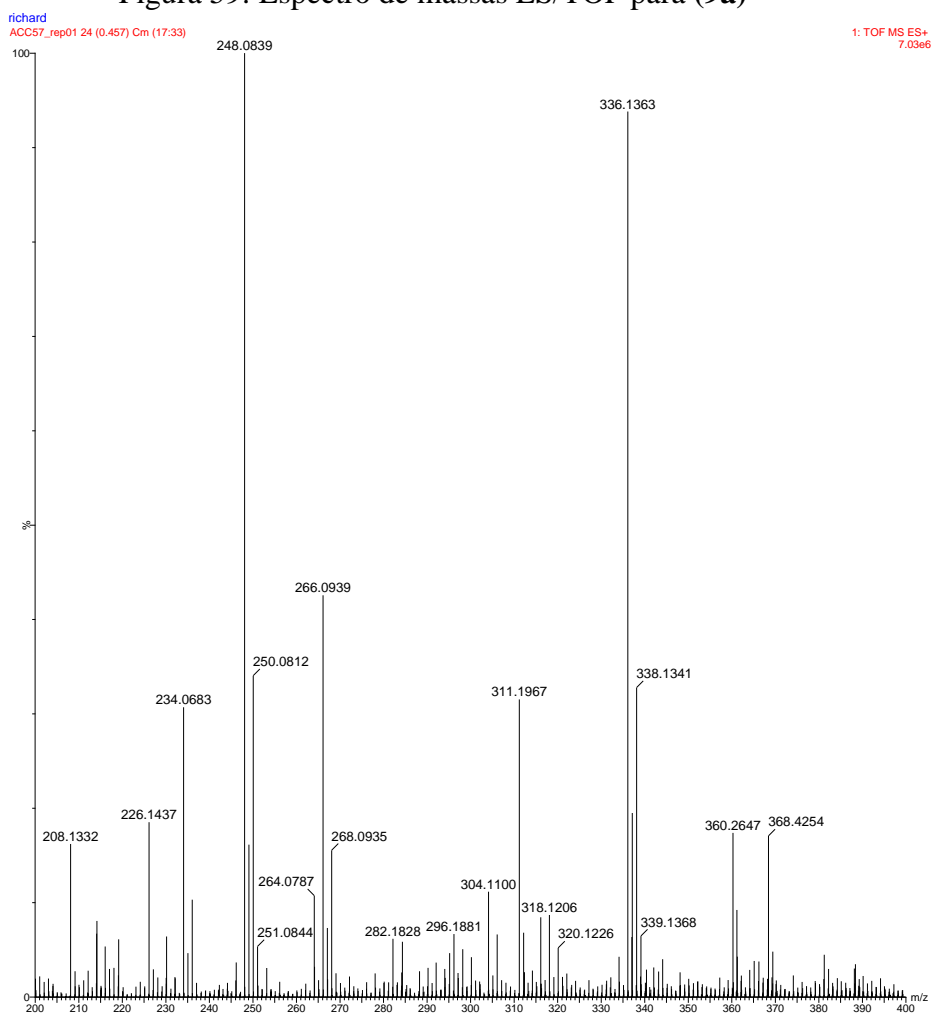
Estes compostos também foram analisados por espectrometria de massas. No espectro de massas (Figura 58) para (**25b**), é possível identificar o pico correspondente ao mesmo íon fragmento para (**9b**) no Esquema 19. Neste caso também não é possível visualizar o pico do íon molecular, o que indica que, provavelmente, o íon [Frag+Na]⁺ é mais estável que o íon molecular. Outro pico intenso que merece atenção é $m/z = 661,1791$, que também aparece no espectro do material de partida (5-acetamidaindirubina (**3c**)) atribuído a [2M+Na]⁺, cujo valor calculado é de $m/z = 661,1806$. Isso leva a crer que a reação não foi completa, havendo ainda uma pequena quantidade do material de partida (**3c**).

Figura 58: Espectro de massas ES/TOF para (25b)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Para o espectro de massas de (9a), mostrado na Figura 59, o pico base aparece acompanhado de outro pico com proporção de 1/3 e diferença de duas unidades de massa, o que indica que este fragmento contém o anel substituído por um átomo de Cl, baseado na abundância isotópica. Entretanto, não foi identificado picos atribuídos à perda de massa correspondentes às moléculas neutras ou fragmentos comumente encontrados. O íon molecular parece instável, uma vez que não é possível observá-lo no espectro de nenhum dos produtos obtidos. Observações semelhantes podem ser feitas no espectro de massas de (8a) que está disponível em anexo.

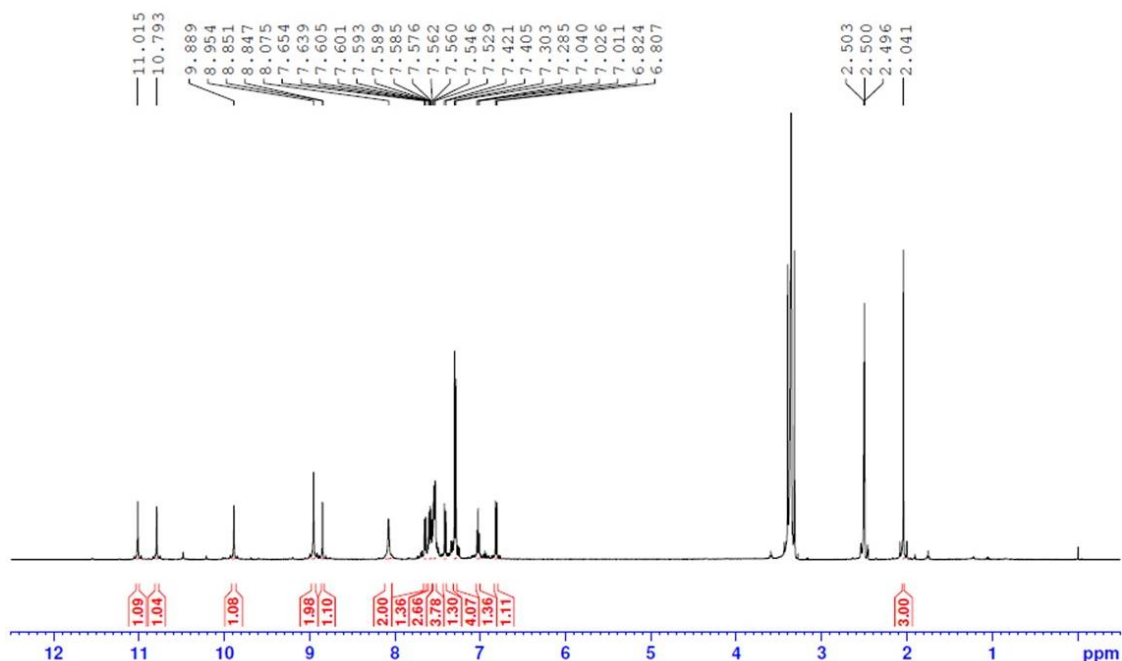
Figura 59: Espectro de massas ES/TOF para **(9a)**

Fonte: Elaborado pela própria autora

Prosseguindo, para a reação de síntese de **(10a)**, o sólido isolado apresentou RMN de ^1H e ^{13}C e IV idêntico ao de material de partida (5-nitroindirubina **(3a)**), enquanto o sobrenadante continha um derivado da semicarbazida **(7a)**. Já para **(8b)**, **(10b)** e **(25a)**, apesar de os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostrarem os sinais da porção semi e tiossemicarbazona, as integrações sugerem uma mistura de produtos. Contudo, somente com estas análises não é possível afirmar se nestas misturas estão presentes as respectivas indirubinas não consumidas ou os compostos esperados, por isso espectros de massas foram empregados como auxílio na caracterização.

Para exemplificar, na Figura 60, é mostrado o espectro de RMN de ^1H para **(25a)**. Aqui, existem duas possibilidades: 1) mistura da 5-acetamidaindirubina **(3c)** e um derivado da *p*-clorofenilsemicarbazida **(6a)**, fato observado em outras reações; ou 2) produto de substituição tanto da carbonila 3' quanto da carbonila da porção acetamida na posição 5.

Figura 60: Espectro de RMN de ^1H do composto (**25a**) (500 MHz, DMSO- d_6).



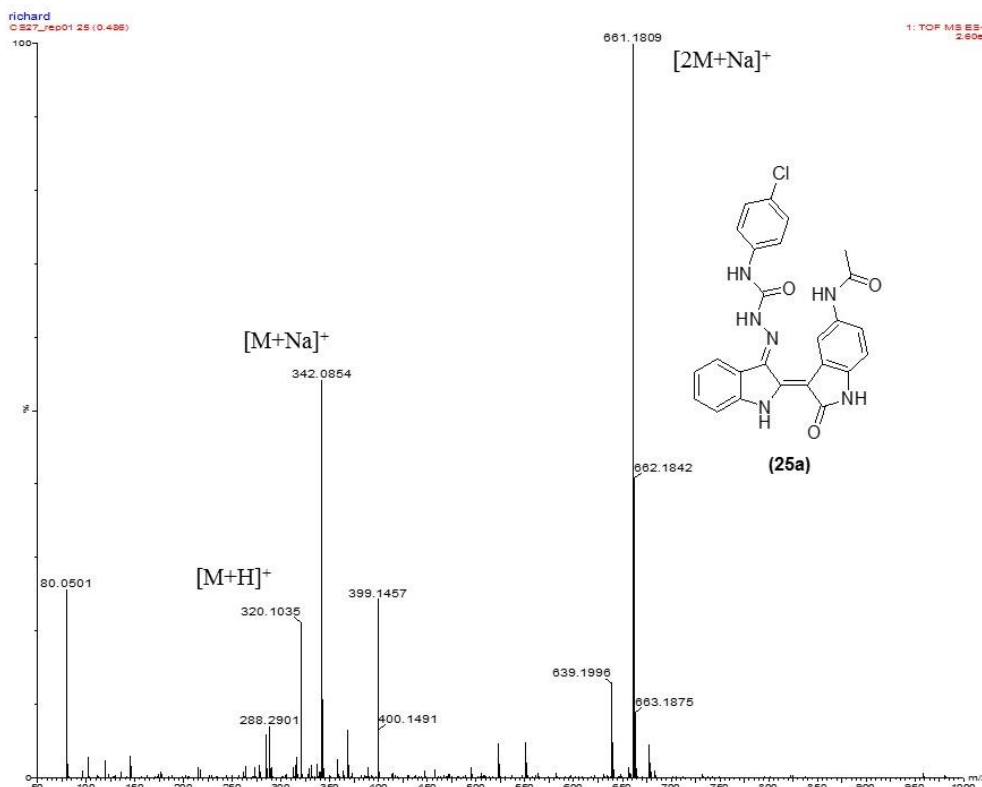
Fonte: Elaborado pela própria autora

O fato de o espectro de massas (Figura 61) para esta mistura mostrar um padrão quase idêntico ao da 5-acetamidaindirubina (**3c**) indica que não houve consumo deste material de partida, tratando-se, portanto, de uma mistura com um derivado de (**6a**) até então não identificado.

Observa-se, em $m/z = 320,1035$, o pico correspondente ao íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ para 5-acetamidaindirubina (**3c**) (calculado $m/z = 320,1029$). O pico em $m/z = 342,0854$ é devido à formação do aduto $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado $m/z = 342,0849$), enquanto $m/z = 661,1809$ é atribuído à formação de $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculado $m/z = 661,1806$).

De todas as reações testadas, apenas para (**9b**) e (**25b**), ambas partindo de (**6b**), os dados espectroscópicos fornecem evidências da formação dos produtos desejados. Para as demais, ou foi isolado a indirubina de partida pura ou uma mistura com um derivado, provavelmente de degradação, das semicarbazidas e tiossemicarbazidas utilizadas, que poderia dificultar a reação desejada.

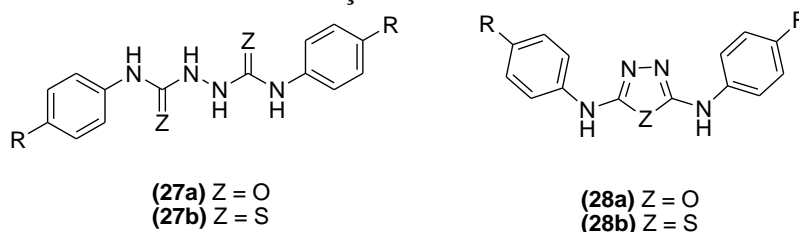
Figura 61: Espectro de massas ES/TOF para o composto (25a)



Fonte: Elaborado pela própria autora

Buscas na literatura sobre a estabilidade de *p*-fenilsemicarbazidas e *p*-feniltiossemicarbazidas levaram a publicações de Stanovnik e Tisler (B. STANOVNIK; M. TISLER, 1961) e Ranga Rão e Srinivasan (V. RANGA RÃO; V. R. SRINIVASAN, 1963). Estes autores reportam compostos 2,5-dianilino-2,3,4-tiadiazenol (28b) como produtos diretos da reação de *p*-feniltiossemicarbazidas e ácido acético, HCl concentrado, ácido sulfúrico concentrado ou a partir da ciclização do intermediário 1,6-difenilbitiouéria (27b) em aquecimento brando, solução etanólica morna ou solução diluída de ácido acético (Figura 62).

Figura 62: Produtos laterais das reações com semicarbazida e tiossemicarbazidas



Fonte: Elaborado pela própria autora

O intermediário (27b) acima citado pode ser formado pela condensação do isotiocianato correspondente com *p*-feniltiossemicarbazida não decomposta. Apesar de a ciclização ocorrer

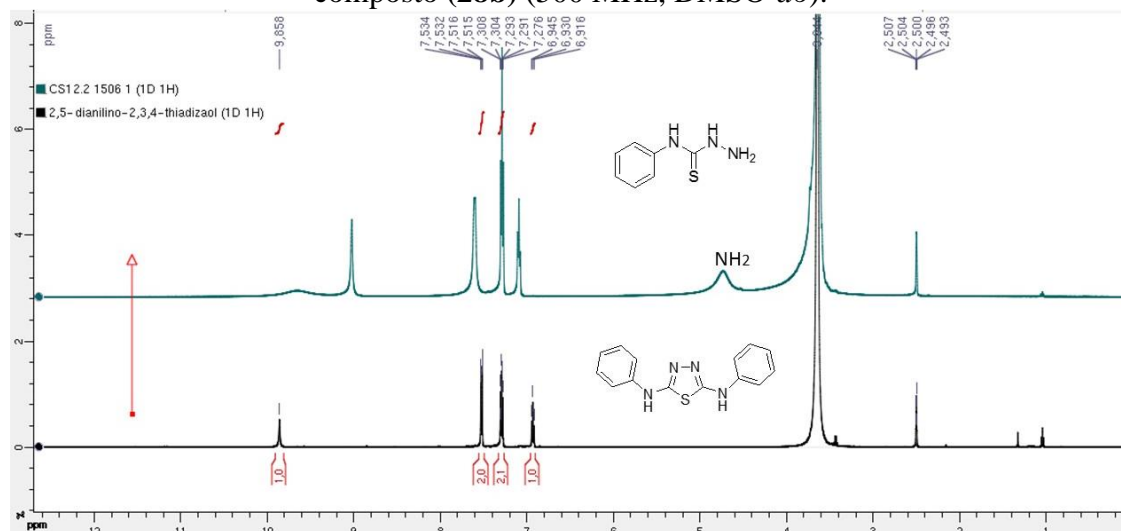
facilmente, é possível isolá-lo da mistura reacional em alguns casos (B. STANOVNIK; M. TISLER, 1961; SINGH, *et al.*, 2003).

Em qualquer hipótese, tanto a formação dos intermediários (**27a-b**) quanto de 2,5-dianilino-1,3,4-oxadiazinol (**28a**) ou 2,5-dianilino-1,3,4-tiadiazinol (**28b**) levam à perda do grupo nucleofílico (NH₂) que se adicionaria à carbonila 3' das indirubinas para formação dos compostos de interesse neste trabalho.

Para investigar a possível formação destes produtos, a *p*-feniltiossemicarbazida (**5b**) foi sujeita às mesmas condições reacionais (THF, catálise ácida e refluxo), porém na ausência de qualquer indirubina. Foi escolhido o composto (**5b**) para este estudo devido à disponibilidade de dados espectrais na literatura (YELLA *et al.*, 2011). Após o intervalo de reação e resfriamento, o sobrenadante foi separado do sólido, evaporado e recristalizado em MeOH/H₂O 1:1. Foi obtido um sólido acinzentado caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C, IV, Espectrometria de Massas e P.F. Experimentalmente, foi encontrado um ponto de decomposição de 248°C, muito próximo ao encontrado na literatura para (**28b**), P.F = 247°C (JANNIAH, S. L; YELLA, *et al.*, 2011).

Comparando os espectros de RMN de ¹H (Figura 63) para este sólido e para (**5b**), nota-se o desaparecimento do simpleto largo em 4,73 ppm equivalente ao grupo NH₂ e de outro simpleto correspondente a um dos NH presentes na estrutura de (**5b**). Já os hidrogênios aromáticos sofreram um pequeno deslocamento, sendo possível observar dois tripletos centrados em 6,93 ppm e 7,29 ppm atribuídos aos hidrogênios aromáticos H1 e H2, um duplete de duplete na faixa de 7,51-7,53 ppm correspondente a H3 e um simpleto em 9,86 ppm característico do NH, assim como os dados fornecidos por (YELLA, *et al.*, 2011) para (**28b**).

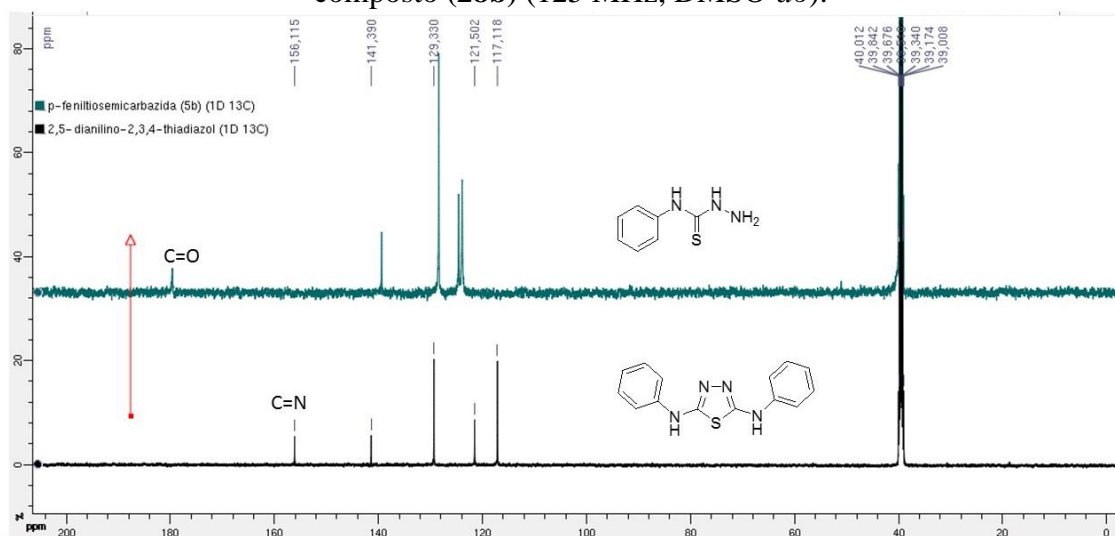
Figura 63: Comparação dos espectros de RMN de ^1H da feniltiossemicarbazida (**5b**) e do composto (**28b**) (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

Para o espectro de RMN de ^{13}C , na Figura 64, destaca-se o desaparecimento do sinal em 179,6 ppm em relação ao espectro de (**5b**), atribuído ao carbono da carbonila, e o surgimento do sinal em 156,1 ppm, atribuído ao carbono da ligação $\text{C}=\text{N}$. Estes dados também concordam com os relatados por (YELLA, *et al.*, 2011).

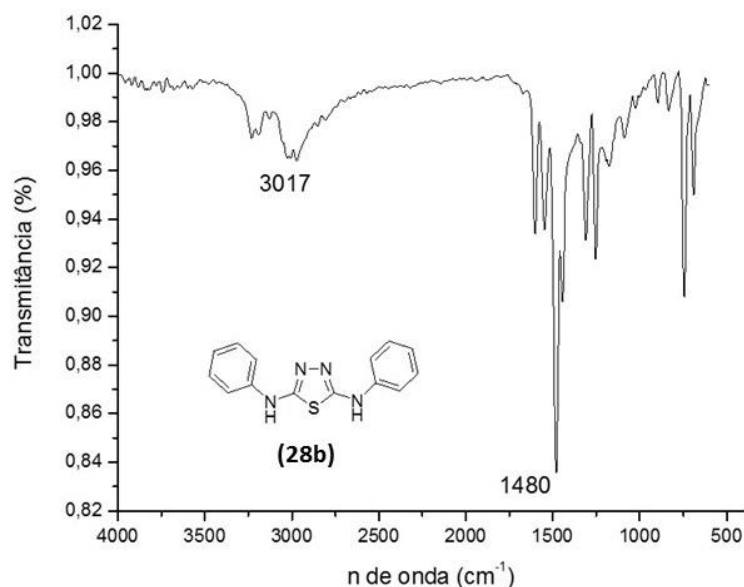
Figura 64: Comparação dos espectros de RMN de ^{13}C da feniltiossemicarbazida (**5b**) e do composto (**28b**) (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



Fonte: Elaborado pela própria autora

No espectro na região do infravermelho, destaca-se a banda alargada em 3017 cm^{-1} do estiramento da ligação N-H e a banda fina e intensa em 1480 cm^{-1} , correspondente ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{N}$ (Figura 65).

Figura 65: Espectro na região do infravermelho para o composto **(28b)**



Fonte: Elaborado pela própria autora

A análise dos dados espectrais apoia a hipótese de que as *p*-fenilsemicarbazidas e *p*-feniltiossemicarbazidas sofrem uma transformação no curso da reação, onde há perda do grupo nucleofílico NH₂, dificultando ou mesmo impossibilitando que a reação de adição nucleofílica para formação dos produtos de interesse ocorra.

Como mencionado anteriormente, esta transformação pode ocorrer diretamente das *p*-fenilsemicarbazidas e *p*-feniltiossemicarbazidas em meio ácido concentrado ou pela ciclização do intermediário **(27)** em condições brandas (B. STANOVNIK; M. TISLER, 1961; V. RANGA RÃO; V. R. SRINIVASAN, 1963). Este intermediário pode ser formado pela condensação dos *p*-isocianatos e *p*-isotiocianatos com as correspondentes *p*-fenilsemicarbazidas e *p*-feniltiossemicarbazidas não decompostas (B. STANOVNIK; M. TISLER, 1961; SINGH, *et al.*, 2003).

Outros autores relatam, ainda, a síntese de aldeídos pela oxidação de semicarbazidas, passando por intermediários do tipo **(27)**, sendo possível isolá-los a depender das condições e oxidantes usados. Ferguson (FERGUSON, 1946) obteve dibenzoilhidrazina com bom rendimento usando iodo ou óxido de mercúrio. Para as reações descritas neste trabalho, o próprio solvente (THF) pode ter fornecido os oxidantes, na forma de peróxidos, necessários para a transformação.

A velocidade de transformação de **(5a-b)**-**(7a-b)** em compostos do tipo **(28a-b)** parece variar de acordo com o substituinte (H, Cl e OCH₃). Por exemplo, para **(9b)** e **(25b)**, ambos partindo de **(6b)**, há evidências de formação dos produtos de interesse, indicando que neste caso, a transformação da *p*-clorofeniltiossemicarbazida **(6b)** em compostos do tipo **(27)** ou **(28)**

foi mais lenta que a reação principal ou ocorreu em uma proporção que não prejudicou a adição nucleofílica.

Já para **(8a)** e **(9a)**, uma vez que não foi encontrado um padrão de fragmentação pelo espectro de massas, não é possível confirmar se houve formação do produto esperado ou se o que se observa nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e IV são misturas das indirubinas com compostos do tipo **(28)** ou até mesmo do tipo **(27)**.

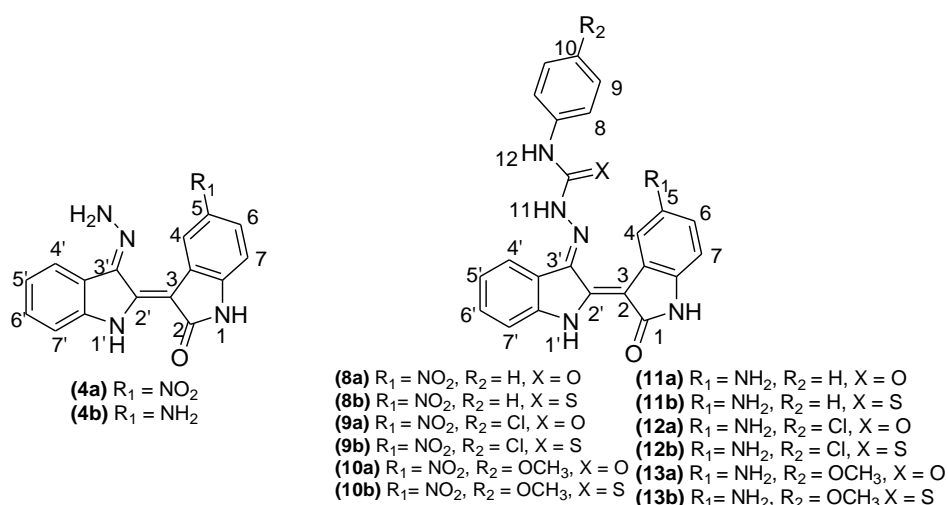
O acompanhamento das reações descritas acima é, então, dificultado por dois motivos: 1) não há diferença de Rf entre as indirubinas e os produtos de interesse – como foi o caso de **(9b)** e **(25b)** – não sendo possível, portanto, acompanhar o curso da reação por CCD. Por esta técnica, pôde-se acompanhar apenas as modificações nas *p*-fenilsemicarbazidas e *p*-feniltiossemicarbazidas; 2) os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e IV não fornecem resposta concreta do curso da reação, uma vez que não há diferença significativa de deslocamentos para misturas e o produto de interesse, sendo necessário recorrer aos espectros de massas.

Além disso, para reações testadas empregando-se EtOH como solvente, apesar de *p*-fenilsemicarbazidas e *p*-feniltiossemicarbazidas não serem convertidas aos derivados similares a **(27)** ou **(28)**, foi isolado como sólido a própria indirubina de partida, confirmado por IV e RMN de ^1H e ^{13}C . Por estes motivos, as reações de sínteses para os compostos **(24a-b)** e **(26a-b)** não foram executadas.

7 CONCLUSÕES

O trabalho aqui descrito teve por objetivo a síntese de 14 compostos inéditos, quais sejam: as hidrazonas (**4a**) e (**4b**) e as semicarbazonas e tiossemicarbazonas de indirubinas (**8a-b**), (**9a-b**), (**10a-b**), (**11a-b**), (**12a-b**) e (**13a-b**). Estes compostos foram escolhidos em razão do importante papel desenvolvido pela indirubina e seus derivados, desde seu isolamento da mistura de ervas *Danggui Longhui Wan* até os estudos de desenvolvimento como agentes farmacológicos.

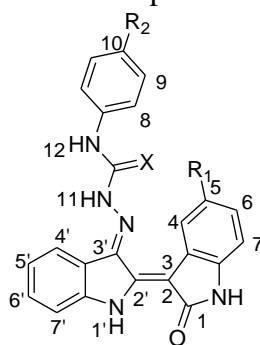
Figura 66: Estrutura dos compostos-alvo propostos inicialmente.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Devido às dificuldades de obtenção da 5-aminoisatina (**2**) em quantidade apreciável para as demais etapas de síntese, optou-se pela preparação da 5-acetamidaisatina (**20**), de mais fácil execução. Desta forma, os compostos-alvo (**11a-b**) a (**13a-b**) poderiam ser obtidos pela hidrólise do grupo acetamido a amino, após a síntese da 5-acetamidaindirubina (**4c**) ou após a preparação dos compostos (**24a-b**) a (**26a-b**) (Figura 67). Todavia, todos os esforços foram concentrados na investigação da síntese dos compostos-alvo pela rota b e, por isso, a etapa de hidrólise não foi executada.

Figura 67: Estrutura dos compostos 5-acetamida substituídos.



- (24a) $R_1 = \text{NHCOCH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $X = \text{O}$
 (24b) $R_1 = \text{NHCOCH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $X = \text{S}$
 (25a) $R_1 = \text{NHCOCH}_3$, $R_2 = \text{Cl}$, $X = \text{O}$
 (25b) $R_1 = \text{NHCOCH}_3$, $R_2 = \text{Cl}$, $X = \text{S}$
 (26a) $R_1 = \text{NHCOCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $X = \text{O}$
 (26b) $R_1 = \text{NHCOCH}_3$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $X = \text{S}$

Fonte: Elaborado pela própria autora

A metodologia empregada por Moon (MOON, *et al.*, 2006), para a síntese das 5-nitroindirubinas-3'-hidrazona, apenas permitiu o isolamento de **(4a)**. Contudo, para reação com tempo superior a 12h, a indirubina é convertida à índigo, cuja reação com hidrazina leva a formação do composto **(21a)**. Para as hidrazonas **(4b)** e **(4c)**, ficou constatado que são rapidamente convertidas nos compostos diazeno **(21b)** e **(21c)**.

Para a preparação dos compostos-alvo, propôs-se investigar duas rotas sintéticas distintas: rota a), pela reação de adição nucleofílica das hidrazonas indirubínicas **(4a)**, **(4b)** e **(4c)**, aos isocianatos e isotiocianatos; e rota b), pela condensação entre as indirubinas **(3a)**, **(3b)** e **(3c)** e as semicarbazidas e tiossemicarbazidas *N*4-substituídas **(5a-b)** a **(7a-b)**.

As metodologias testadas para rota a, empregando-se a 5-nitroindirubina-3'-hidrazona **(4a)**, forneceram reações incompletas, cuja separação do produto e material de partida foi impossibilitada em razão da similaridade de R_f , mesmo para diferentes sistemas de solvente. Ademais, uma vez que não foi possível isolar as hidrazonas **(4b)** e **(4c)**, a rota b tornou-se alvo principal das investigações.

Para a rota b, a metodologia utilizada empregou THF como solvente, sob refluxo e catálise ácida por 4 dias. Apenas para as reações de **(9b)** e **(25b)**, as caracterizações permitem afirmar a obtenção de tais produtos. Para **(8a)** e **(9a)**, apesar de os espectros de IV e RMN de ^1H e ^{13}C concordarem com as estruturas propostas, não foi possível identificar, no espectro de massas, íons fragmentos que apoiem este fato. Para os compostos **(8b)**, **(10b)** e **(25a)**, os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C mostram misturas e é difícil afirmar se houve formação dos produtos de interesse.

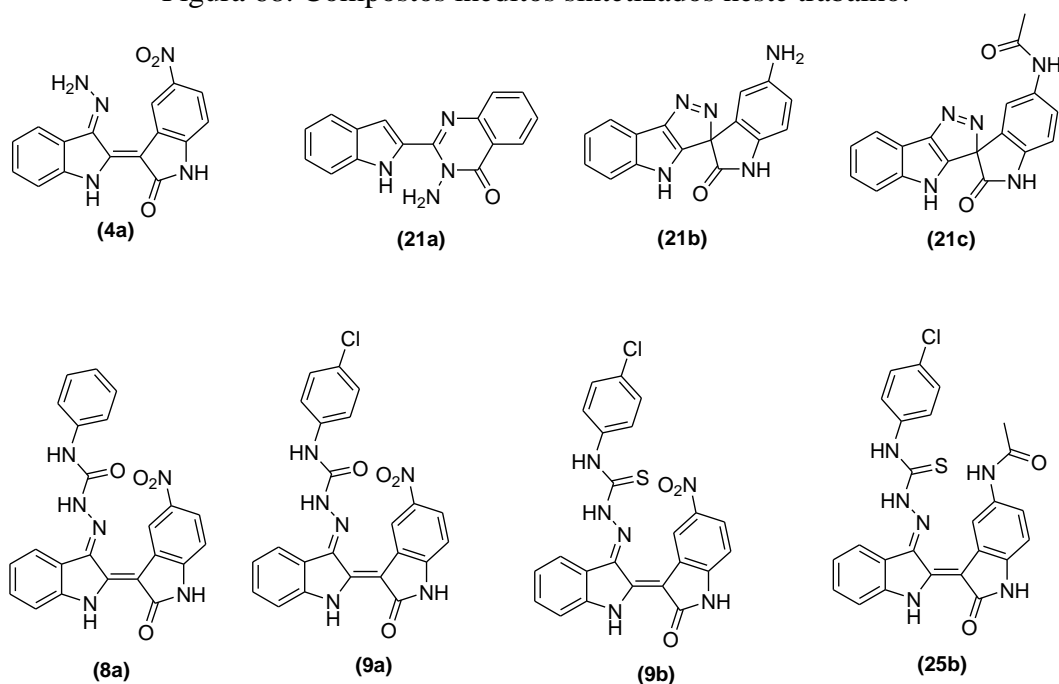
Em geral, nota-se, para todas as reações acima, a formação de um derivado das semi e tiossemicarbazidas, verificado em um ponto muito avançado deste trabalho. Nas condições aqui descritas, a revisão da literatura aponta que as semi e tiossemicarbazidas são convertidas a compostos dos tipos apresentados na Figura 62. Estes compostos perdem o grupo nucleofílico NH_2 , o que impede que a reação aconteça.

O fato de que para algumas reações observa-se o produto esperado, enquanto para outras observa-se misturas ou nenhuma reatividade, indica que a velocidade de conversão das semicarbazidas e tiossemicarbazidas (**5a-b**) a (**7a-b**) em (**27**) ou (**28**) varia de acordo com o substituinte.

Para as reações testadas em etanol sob catálise ácida, embora as semicarbazidas e tiossemicarbazidas (**5a-b**) a (**7a-b**) permaneçam intactas, não foi observada reatividade. Devido a estas dificuldades, as reações para os compostos (**24a-b**) e (**26a-b**) não foram testadas.

Em resumo, foram sintetizados e devidamente caracterizados cinco dos quatorze compostos propostos, sendo eles (**4a**), (**8a**), (**9a**), (**9b**) e (**25b**), além de três compostos não esperados, mas também inéditos, (**201a-c**).

Figura 68: Compostos inéditos sintetizados neste trabalho.



Fonte: Elaborado pela própria autora

Cabe destacar que os dados espectroscópicos para 5-nitroindirubina (**3a**) descritos na literatura estão em conflito com os adquiridos no presente trabalho, requerendo que as atribuições propostas pelo autor sejam revisadas. As atribuições para os carbonos de (**3a**) foram determinadas inequivocadamente e são reportadas pela primeira vez.

Como perspectivas futuras, propõem-se a otimização das metodologias testadas para síntese da 5-aminoisatina (**2**). Ou, ainda, investigação de metodologia para preparação da 5-aminoindirubina (**3b**) pela hidrólise da 5-acetamidaindirubina (**4c**) a amino ou pela redução do grupo nitro da 5-nitroindirubina (**3a**).

Quanto aos compostos (**21a-c**), completamente inéditos e inesperados, sugere-se realizar análises de difração de Raio-X para confirmar suas estruturas. Cabe, ainda, investigar as atividades biológicas dos compostos diazeno, uma vez que são relatados na literatura como antituberculares, antineoplásicos, antimicrobianos, anti-inflamatórios, entre outros (BHOSALE, et al., 2012; CHANDRASEKHAR, R; NANJAN, M.J., 2012), e também a aplicabilidade quanto à fluorescência apresentada por estes.

Por fim, propõe-se investigar a influência dos substituintes 5-nitro, 5-amino e 5-acetamido na estabilidade do intermediário diazeno.

PARTE EXPERIMENTAL

1 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

As medidas de faixa de fusão apresentadas nesta dissertação foram obtidas em aparelho digital Microquímica-MQAPF no Departamento de Química, UFJF.

Os espectros vibracionais na região infravermelho foram adquiridos em espectrômetro BRUKER-VERTEX no Departamento de Física e BRUKER ALPHA FT IR no Departamento de Química, UFJF.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro BRUKER-AVANCE DRX500 (500 MHz) no Departamento de Química, UFJF.

Os espectros de massas foram adquiridos SHIMADZU BIOTECH-AXIMA PERFORMANCE MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION TIME OF FLIGHT (MALDI – TOF) no Departamento de Física.

Para cromatografia em coluna de sílica utilizou-se sílica-gel 60G 0,063-0,200mm (70-230 mesh ASTM) MERK.

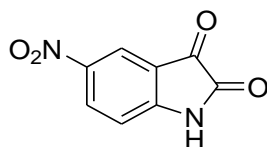
Para cromatografia em camada delgada utilizou-se placas comerciais de TLC.

Nos procedimentos de purificação, por extração ou coluna cromatográfica, foram utilizados solventes P.A. VETEC, SYNTH E CROMOLINE.

2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

2.1 Síntese da 5-nitroisatina (1)

Em um erlenmeyer, dissolveu-se 1,0g de isatina comercial (6,8 mmol) em 6,0 mL de H_2SO_4 concentrado. Adicionou-se lentamente uma solução previamente preparada e resfriada de KNO_3 (687 mg, 6,8 mmol) em H_2SO_4 concentrado (8,0 mL). A mistura foi mantida em banho de gelo (0-4°C) sob agitação magnética constante por 1h. O final da reação foi acompanhado por CCD. O meio reacional foi vertido em gelo picado, filtrado a vácuo e lavado exaustivamente com água. O produto foi recristalizado com uma mistura de MeOH/ H_2O na proporção de 1:1, fornecendo 1,04 g de um pó amarelo.



F. M.: $\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$ **M.M.:** $192,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido amarelo.

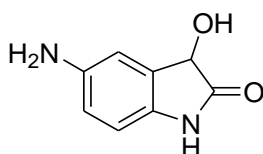
Rf: 0,43 (Eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV, iodo, PMA.

Faixa de Fusão: exp.: 254°C. **lit.:** 254-255°C (VINE *et al.*, 2007).

Rendimento: 90%.

2.2 Síntese da 5-aminoisatina (2)

Primeira tentativa: redução por hidrogenação (**14**)



Em um balão apropriado para o aparelho de Parr, dissolveu-se 1 mmol (176 mg) de 5-nitroisatina em 15 mL de acetato de etila. Adicionou-se 0,5 mmol (46 mg) de Pd/C e a mistura foi agitada por 1 hora sob pressão de 20 atm. Ao final da reação, acompanhada por CCD, a mistura foi filtrada em funil de placa sinterizada com camada de celite para remoção do Pd/C. O solvente foi evaporado em rotavapor, fornecendo 48 mg de um sólido marrom puro.

F. M.: C₈H₇N₂O₂ **M.M.:** 163 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido marrom.

Rf: 0,35 (Eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV, iodo, PMA.

Faixa de Fusão: exp.: 196°C.

Rendimento: 30%.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 4,68 (3H, d, J = 7,0 Hz, OH, NH₂); 6,00 (1H, d, J = 7,0 Hz, HCα); 6,40 (1H, dd, J = 8,0 Hz/ J = 2,0 Hz, HAr); 6,47 (1H, d, J = 8,0 Hz, HAr); 6,60 (1H, d, J = 2,0 Hz HAr); 9,79 (1H, sl, N-H).

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 69,8; 109,8; 112,1; 113,6; 130,2; 131,8; 143,8; 177,6.

IV (KBr), ν (cm⁻¹): 3408, 3173, 1701, 1673, 1483

UV (MeOH), λ máx.(nm): 292, 353, 418

Segunda e terceira tentativas: redução com Fe^o e redução com Zn^o

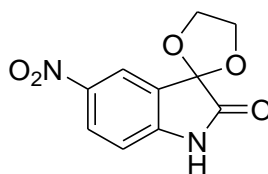
Em um balão de fundo redondo, dissolveu-se 1 mmol de 5-nitroisatina (176 mg) em etanol. Adicionaram-se 3 mmol (167mg) de Fe metálico à solução. Sob atmosfera inerte de N₂, foram adicionados 700 µL de HCl concentrado. A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 1h. O final da reação foi acompanhado por CCD. O bruto foi filtrado em funil de placa sinterizada com camada de celite para remoção de Fe residual. O solvente foi evaporado e o pH corrigido para 8,0 com solução saturada de NaHCO₃. Extraíu-se com acetato de etila. A fase orgânica foi seca com MgSO₄ e o solvente evaporado, fornecendo 28 mg (19% de rendimento) de um sólido impuro.

A redução com Zn^o foi executada de forma análoga, substituindo o etanol por ácido acético. Também forneceu uma mistura de produtos.

Quarta tentativa: redução empregando grupos protetores

Etapa 1: proteção da carbonila C3 (**15**).

Em um balão de fundo redondo, foram solubilizados 2 mmol (352mg) de 5-nitroisatina em cicloexano. Em seguida, foram adicionados 1,12 mL de etilenoglicol e 1,6 mmol de ácido p-toluenossulfônico. A mistura foi deixada sob agitação e refluxo - com um Dean-Stark acoplado para remoção de água - por 18 horas. O precipitado formado foi filtrado, lavado com solução de NaHCO₃ e água, e seco em estufa. Não houve necessidade de purificação.



F. M.: C₁₀H₈N₂O₅ **M.M.:** 236 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido palha.

Rf: 0,50 (Eluente AcOEt/Hex 1:1). **Revelador:** lâmpada de UV, iodo.

Faixa de Fusão: exp.: 216-217°C. **lit.:** 218°C (MAGIATIS, *et al.*, 2010)

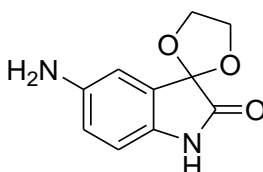
Rendimento: 84%.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 4,33 (4H, s, 2x CH₂); 7,03 (1H, d, J = 6,5 Hz, HAr); 8,14 (1H, d, J = 1,0 Hz, HAr); 8,27 (1H, dd, J = 7,0 Hz, HAr).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 66,2; 100,8; 11,3; 120,8; 125,8; 129,8; 142,9; 149,1; 174,9.

Etapa 2: redução do grupo nitro (**16**).

A 5-nitroisatina cetal (2 mmol, 472 mg) foi dissolvida em metanol em um balão apropriado para o aparelho de Parr. Adicionou-se 1 mmol de Pd/C. A reação permaneceu sob agitação com pressão de 20 atm por 3 horas. O Pd/C foi filtrado e o solvente evaporado, fornecendo a 5-aminoisatina cetal em rendimento qualitativo e pureza satisfatória.



F. M.: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ **M.M.:** 206 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido bege-escuro.

Rf: 0,28 (Eluente AcOEt/Hex 1:1). **Revelador:** lâmpada de UV, iodo.

Faixa de Fusão: exp.: 197°C. **lit.:** 195°C (MAGIATIS, *et al.*, 2009)

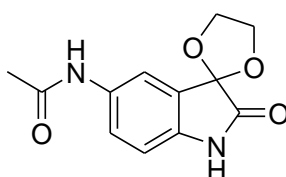
Rendimento: 100%.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 4,18 (2H, s, CH_2); 4,32 (2H, s, CH_2); 4,87 (sl, NH_2); 6,52 (2H, d, $J = 2,5$ Hz, 2x HAr); 6,59 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, 1x HAr); 9,98 (sl, NH_2).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 65,2; 102,2; 110,8, 111,5; 115,9; 125,2; 132,0; 144,4; 174,2.

Etapa 3: Proteção do grupo amino (**19**)

Em um erlenmeyer dissolveu-se 1 mmol (206 mg) da 5-aminoisatina cetal em 3,0 mL de piridina. Sob agitação em banho de gelo, foram adicionados 95 μL de anidrido acético e dois cristais de DMAP. A mistura permaneceu sob agitação por 10 horas. Após este período, a solução foi vertida em gelo picado e água. O precipitado formado foi filtrado, lavado exaustivamente com água gelada e seco em estufa. Não foi necessária a purificação.



F. M.: C₁₂H₁₂N₂O₄ **M.M.:** 248 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido bege ultrafino.

Rf: 0,30 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV, iodo.

Faixa de Fusão: exp.: 228 °C

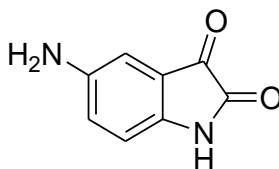
Rendimento: 82%.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 2,0 (3H, s, CH₃); 4,24 (2H, m, CH₂); 4,35 (2H, m, CH₂); 6,67 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, 1x H_{Ar}); 7,38 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz/2,0 Hz, 1x H_{Ar}); 7,66 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, 1x H_{Ar}); 9,88 (sl, NH); 10,35 (sl, NH).

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23,9; 65,5; 101,9; 110,6, 116,7; 122,3; 124,6; 134,5; 138,1; 168,2; 174,6.

Etapa 4: Clivagem dos grupos protetores – precipitação da 5-aminosatina (**2**).

Em um balão de fundo redondo, foram dissolvidos 1 mmol (248 mg) do cetal da 5-acetamidaisatina em 30 mL de solução de ácido sulfúrico 30%. A mistura foi agitada sob refluxo por 1,5 h. O precipitado formado foi filtrado e lavado com acetona, obtendo-se 200 mg (0,76 mmol) de um sólido laranja fino. Em seguida, este sólido foi dissolvido em água quente e então adicionou-se 0,025 g (0,02 mmol) de Na₃BO₃, também em solução aquosa quente, e obteve-se 0,074 g de um precipitado azul escuro e brilhante.



F. M.: C₈H₆N₂O₂ **M.M.:** 162 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido azul-escuro brilhante.

Rf: 0,20 (AcOEt/Hex 1:1). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: >260°C **lit.:** >260°C (BEAUCHARD, *et al*, 2006).

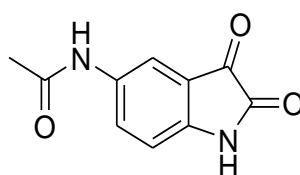
Rendimento: 57%.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 5,06 (2H, s, NH₂); 6,63 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H_{Ar}); 6,70 (1H, d, *J* = 2,5 Hz, H_{Ar}); 6,83-6,81 (1H, dd, *J* = 8,5/2,5 Hz, H_{Ar}); 10,58 (1H, s, NH).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 109,1; 112,7; 118,1; 123,6; 140,9; 144,9; 159,4; 185,4.

Clivagem do grupo cetal – precipitação da 5-acetamida isatina (**20**).

Em um balão de fundo redondo, foram solubilizados 500 mg da cetal 5-acetamidaisatina (**18**) em 20 mL de solução saturada de ácido oxálico. A mistura permaneceu sob agitação e aquecimento a 60 ° C por uma noite. Ao final desse período, a mistura foi resfriada e deixada sob repouso. Precipitou um sólido vermelho, que foi filtrado a vácuo, lavado com água e seco em estufa.



F. M.: $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ **M.M.:** 204 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

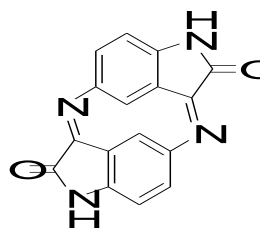
Características físicas: sólido vermelho-escuro.

Rf: 0,57 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: > 260°C **lit.:** > 260°C (BEUCHARD, *et al.*, 2006)

Rendimento: 54%

Imina (**18**)



F. M.: $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$ **M.M.:** 288 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido vermelho.

Rf: 0,10 (AcOEt/Hex 1:1). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: 248 °C

Rendimento: 65%.

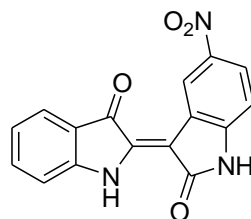
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 5,75 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H_{ar}); 6,92 (2H, dd, $J = 8,25$ Hz/2,0Hz, H_{ar}); 6,95 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H_{ar}); 10,94 (1H, s, NH).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 113,2; 113,7; 116,4; 123,7; 144,6; 145,4; 156,5; 163,7.

2.3 Síntese das indirubinas 5-substituídas (**3a**), (**3b**) e (**3c**)

Em um balão de fundo, redondo foram agitados 15 mL de MeOH sob fluxo de N_2 por 20 min. Foram solubilizados 2 mmol da isatina correspondente e 578 mg (3,3 mmol) de 3-acetoxindol seguida da adição de 530 mg (5,0 mmol) de Na_2CO_3 anidro. Observou-se mudança de coloração, de incolor para roxo. A mistura permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente por 6h. O produto foi isolado por filtração a vácuo, lavado exaustivamente com MeOH e água gelada e seco em dessecador a vácuo, sem necessidade de purificação.

5-nitroindirunina (**3a**)



F. M.: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$ **M.M.:** $307 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido roxo.

Rf: 0,67 – CH_2Cl_2 :MeOH (95:5). **Revelador:** Lâmpada de UV.

Rendimento: 90%.

Faixa de Fusão: $> 260^\circ\text{C}$; **lit.:** $> 260^\circ\text{C}$ (BEUCHARD, *et al.*, 2006).

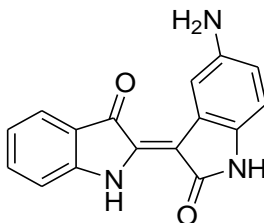
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 7,05 (2H, m, H5' e H7); 7,40 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, 1x H7'); 7,58 (1H, t, $J = 7,25 \text{ Hz}$, 1x H6'); 7,66 (1H, d, H4'); 8,14 (1H, ddd, $J = 8,5/2,0/0,5 \text{ Hz}$, H6); 9,62 (1H, s, H4); 11,18 (1H, sl, N-H'); 11,51 (1H, sl, N-H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 103,6; 109,4; 113,8; 118,96; 119,6; 121,7; 122,1; 124,7; 124,8; 137,5; 140,1; 141,8; 145,8; 152,5; 171,1; 188,9.

IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3380; 3315; 1685; 1611; 1492; 1341; 1294; 1183; 1071, 746.

UV (MeOH), λ máx.(nm): 311, 342,495.

5-aminoindirubina (**3b**)



F. M.: C₁₆H₁₁N₃O₂ **M.M.:** 277,08 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido azul-escuro.

Rf: 0,62 – CH₂Cl₂:MeOH (95:5). **Revelador:** Lâmpada de UV.

Rendimento: 87%.

Faixa de Fusão: > 260°C; **lit.:** > 260°C (BEUCHARD *et al.*, 2006).

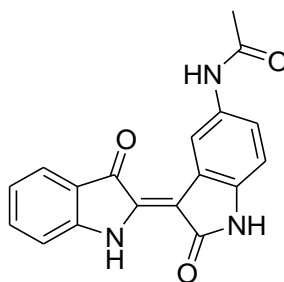
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 4,72 (2H, sl, NH₂); 6,52 (1H, dd, *J* = 8,0/2,0 Hz, H6); 7,59 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, H7); 7,00 (1H, td, *J* = 7,5/1,0 Hz, H6'); 7,39 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H4'); 7,55 (1H, td, *J* = 7,5/1,5 Hz, H5'); 7,63 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H7'); 8,15 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H4); 10,44 (1H, sl, N-H); 10,94 (1H, sl, N-H').

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 108,2; 109,8; 111,5; 113,3; 115,6; 119,1; 121,0; 122,0; 124,2; 132,1; 137,0; 137,8; 143,3; 152,4; 170,9; 188,4.

IV (KBr), ν (cm⁻¹): 3231, 1667, 1611, 1453, 1294, 1192, 736

UV (MeOH), λ máx.(nm): 283, 530

5-acetamidaindirubina (**3c**)



F. M.: C₁₈H₁₃N₃O₃ **M.M.:** 319,09 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido azul-escuro.

Rf: 0,60 (CH₂Cl₂:MeOH 95:5). **Revelador:** Lâmpada de UV.

Rendimento: 85%.

Faixa de Fusão: > 260°C; **lit.:** > 260°C (BEUCHARD *et al.*, 2006).

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 2,03 (3H, s, CH_3); 6,83 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H7); 7,01 (1H, t, $J = 7,25$ Hz, H6'); 7,35 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H4'); 7,50 (1H, dd, $J = 8,5/2,0$ Hz, H6); 7,55 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, 1x H5'); 7,63 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H7'); 8,84 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H4); 10,77 (1H, sl, N-H); 10,94 (1H, sl, N-H').

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 23,9; 107,0; 109,6; 113,7; 117,8; 119,3; 121,6; 122,02; 124,6; 133,3; 137,2; 137,6; 138,8; 152,7; 168,6; 171,4; 188,9.

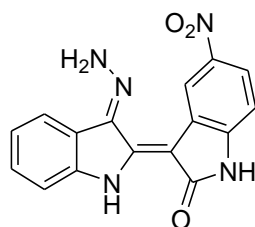
IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3259, 3082, 1723, 1602, 1481

UV (MeOH), λ máx.(nm): 289, 540

2.4 Síntese das indirubinas-3'-hidrazona (**4a**), (**4b**) e (**4c**)

Em um balão de fundo redondo contendo 100 mg da respectiva indirubina, adicionaram-se 3,0 mL de hidrazina monohidratada 80%. A mistura reacional permaneceu sob agitação a 70°C por 24h. O final da reação foi marcado pela mudança de coloração, de roxo para vermelho. O sólido foi filtrado a vácuo, lavado com éter e água e purificado por cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60G e acetato de etila/hexano 1:1 como eluente.

5-nitroindirubina-3-hidrazona (**4a**)



F. M.: $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_6\text{O}_3$ **M.M.:** $321,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido vermelho.

Rf: 0,57 (Eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV

Faixa de Fusão: exp.: >280 °C (decomposição);

Rendimento: 43%.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 7,01 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H7); 7,11 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H6'); 7,35 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H5'); 7,49 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H4'); 7,97 (1H, dd, $J = 8,5$ Hz e 2,0 Hz, H6); 8,22 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H7'); 9,41 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H4); 9,59 (1H, sl, NH_2); 11,20 (1H, sl, N-H); 12,24 (1H, sl, N-H').

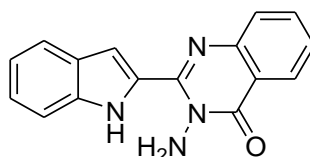
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 91,8; 107,9; 111,9; 116,6; 116,9; 119,9; 122,2; 123,3; 124,2; 129,2; 134,2; 141,2; 141,8; 142,4; 151,8; 171,1.

IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3148; 1725; 1611; 1542; 1455; 1328; 1220;

UV (MeOH), λ máx.(nm): 311, 342,495.

UV (MeOH/HCl), λ máx.(nm): 308, 346, 359, 495.

Composto (**21a**)



F. M.: $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}$ **M.M.:** $276,0 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido amarelo-esverdeado.

Rf: 0,49 (Eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5/ NH_4OH). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: 227-228°C.

Rendimento: 43%.

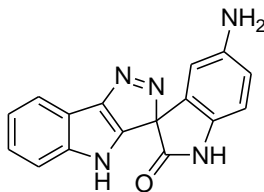
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 6,05 (1H, sl, NH_2); 7,06 (1H, t, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H10); 7,24 (1H, t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, H9); 7,53 (1H, t, $J = 7,0 \text{ Hz}$, H3); 7,58 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H8); 7,68 (1H, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H11); 7,77 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H1); 7,86 (1H, t, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H2); 7,88 (1H, d, $J = 0,5 \text{ Hz}$, H7); 8,17 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H4); 11,70 (1H, sl, N-H).

RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 110,4; 112,3; 119,2; 119,8; 121,7; 124,1; 126,2; 126,3; 127,0; 127,6; 129,5; 134,5; 136,8; 146,8; 147,4; 161,0.

IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3405, 2956, 2918, 2863, 1665, 1551, 1472, 1335.

UV (MeOH), λ máx.(nm): 286, 346, 359.

Composto (21b)



F. M.: C₁₆H₁₃N₅O **M.M.:** 291,1 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido azul pálido.

Rf: 0,47 (Eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5/NH₄OH). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: 212°C

Rendimento: 61%.

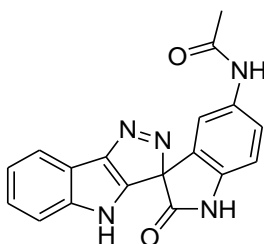
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 5,09 (2H, sl, NH₂); 6,80-6,78 (1H, dd, *J* = 8,5/2,0 Hz); 7,13 (1H, d, *J* = 8,5 Hz); 7,18 (1H, td, *J* = 7,5/1,0 Hz); 7,24 (1H, d, *J* = 2,5 Hz); 7,47 (1H, td, *J* = 7,25/1,0 Hz); 7,51 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 8,03 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 11,23 (1H, sl, NH); 11,43 (1H, sl, N-H).

RMN de ¹³C (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 106,4; 112,8; 113,8; 115,3; 116,6; 116,7; 119,7; 119,8; 121,7; 124,2; 124,8; 128,1; 144,9; 145,6; 148,5; 148,6.

IV (KBr), ν (cm⁻¹): 3173, 1692, 1610, 729

UV (MeOH), λ máx.(nm): 232, 286, 381

Composto (21c)



F. M.: C₁₈H₁₃N₅O₂ **M.M.:** 331,12 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido azul-pálido.

Rf: 0,45 (Eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5/NH₄OH). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: 208°C

Rendimento: 58%.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 2,10 (1H, s, CH_3); 6,01 (1H, t, $J = 8,0$ Hz); 7,33 (1H, d, $J = 9,0$ Hz); 7,44-7,42 (1H, dd, $J = 6,5/2,0$ Hz); 7,49 (1H, t, $J = 7,0$ Hz, H8); 7,52 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 8,05 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 8,26 (1H, s); 10,18 (1H, sl, NH); 11,27 (1H, sl, NH); 11,77 (1H, sl, N-H).

RMN de ^{13}C (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 24,1; 113,2; 113,4; 114,8; 115,4; 116,2; 119,5; 120,0; 121,8; 121,9; 125,2; 128,5; 129,6; 134,7; 145,9; 148,9; 149,1; 169,3.

IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3183, 3055, 1693, 1366, 740

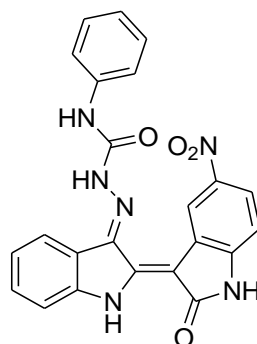
2.5 Síntese das *N*-4-fenilsemicarbazidas e *N*-4-feniltiossemicarbazidas (**5a-b**), (**6a-b**) e (**7a-b**)

Em um erlenmeyer, adicionaram-se 2,0 mmol de hidrazina monohidratada em 20 mL de CH_2Cl_2 . A mistura permaneceu sob agitação magnética em banho de gelo por alguns minutos. O resfriamento é crucial para evitar a formação de subprodutos. Em seguida, gotejou-se 1 mmol dos fenilisocianatos ou fenilistocianatos, observando a formação quase imediata de um precipitado branco. Após 1h de agitação, o sólido foi filtrado, lavado com CH_2Cl_2 e água. Não foi necessária purificação.

2.6 Síntese dos derivados indirubínicos propostos

Em um balão de fundo redondo, foi solubilizado 0,16 mmol da devida indirubina em 15 mL de THF. Adicionou-se 0,48 mmol da semicarbazida ou tiossemicarbazida correspondentes e o pH corrigido para 5 (aproximadamente 10 gotas de HCl $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$). A mistura permaneceu sob agitação e refluxo por 96h. Para as reações com a formação de precipitado, o sólido foi filtrado, lavado com água e seco. Os demais tiveram o solvente evaporado em rotavapor. Todos os produtos foram recristalizados em $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1.

5-nitroindirubina-3'-(*N*4-fenil)semicarbazona (**8a**)



F. M.: $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_4$ **M.M.:** 440 g.mol^{-1}

Características físicas: sólido roxo.

Rf: 0,53 (Eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: > 300°C

Rendimento: 72%.

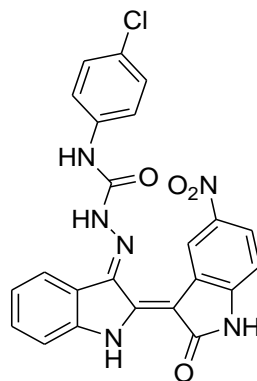
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 6,94 (1H, t, *J* = 7,0 Hz, H5'); 7,04 (2H, m, H9); 7,25 (2H, t, *J* = 8,5 Hz, H6' e H7'); 7,40 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H7); 7,48 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, H8); 7,58 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H10); 7,65 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H4'); 7,97 (1H, d, *J* = 2,0 Hz, H4); 8,12 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz/ 2,0 Hz, H6); 8,79 (1H, sl, NH); 9,60 (1H, sl, NH); 11,15 (1H, sl, N-H); 11,40 (1H, sl, N-H).

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 103,6; 105,2; 109,3; 113,7; 118,4; 118,6; 119,6; 121,6; 121,7; 122,0; 124,7; 124,8; 128,6; 137,4; 139,6; 140,0; 141,7; 145,8; 152,4; 156,0; 170,7; 171,0; 188,8.

IV (KBr), ν (cm⁻¹): 3317; 1673; 1545; 1337; 1194; 749.

UV (MeOH), λ máx.(nm): 240, 292, 542.

5-nitroindirubina-3'-[*N*-4-(4-cloro-)fenil]-semicarbazona (**9a**)



F. M.: C₂₃H₁₅N₆O₄Cl **M.M.:** 474,45 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido roxo.

Rf: 0,53 (Eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: > 300°C

Rendimento: 40%.

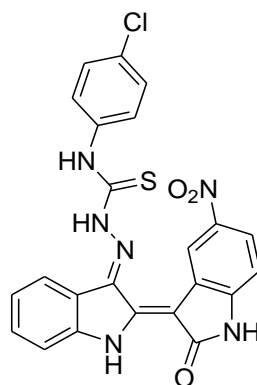
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 7,07 (2H, d, *J* = 8,0 Hz, H7 e H5'); 7,29 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H8); 7,43 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H7'); 7,53 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, H9); 7,61 (1H, t, *J* = 6,5 Hz, H6'); 7,70 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H4'); 8,08 (1H, s, H4) ; 8,18 (1H, d, *J* = 6,5 Hz, H6); 8,93 (1H, sl, NH); 9,67 (1H, sl, NH); 11,22 (1H, sl, N-H); 11,55 (1H, sl, N-H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 104,1; 109,9; 114,3; 119,5; 120,1; 120,5; 122,2; 122,6; 125,3; 125,4; 125,9; 128,9; 138,0; 139,2; 140,6; 142,3; 146,3; 153,0; 156,4; 171,6; 189,5.

IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3297; 3218; 1671; 1597; 1541; 828.

UV (MeOH), λ máx.(nm): 240, 291, 492.

5-nitroindirubina-3'-[*N*-4-(4-cloro)fenil]-tiossemicarbazona (**9b**)



F. M.: $\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{N}_6\text{O}_3\text{SCl}$ **M.M.:** $490,45 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido azul-intenso.

Rf: 0,53 (Eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: $> 300^\circ\text{C}$

Rendimento: 52%.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 7,07 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, H7 e H5'); 7,38 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H8); 7,43 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H7'); 7,56 (2H, d, *J* = 7,5 Hz, H9); 7,60 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H6'); 7,68 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H4'); 8,17 (1H, dd, *J* = 9,0 Hz/2,5 Hz, H6); 9,66 (1H, s, H4); 9,76 (1H, sl, NH); 9,98 (1H, sl, NH); 11,21 (1H, sl, N-H); 11,54 (1H, sl, N-H).

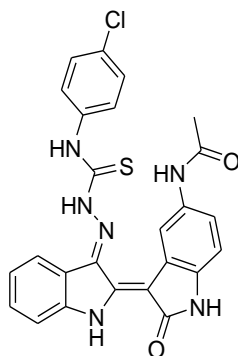
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 103,7, 109,5, 113, 8; 118,9; 119,6; 121,8; 122,14; 124,8; 124,9; 127,9; 137,6; 138,2; 140,2; 141,8; 145,9; 152,5; 171,1; 188,9.

IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3244, 1626, 1484, 1462, 1076.

UV (MeOH), λ máx.(nm): 233, 291, 546.

MS (ES/TOF) m/z : [M+Na] 337,0082 (exp). Calculado: 337,0285

5-acetamidaindirubina-3'-[N-4-(4-cloro)fenil]-tiossemicarbazona (**25b**)



F. M.: $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_3\text{SCl}$ **M.M.:** $502,10 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Características físicas: sólido azul-intenso.

Rf: 0,53 (Eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV.

Faixa de Fusão: exp.: $> 300^\circ\text{C}$

Rendimento: 64%.

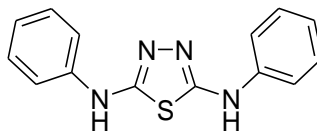
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 2,02 (3H, s, CH_3); 6,63 (1H, d, $J = 8,5 \text{ Hz}$, H7); 7,02 (1H, t, $J = 7,5$, H5'); 7,34-7,31 (2H, m, H9); 7,35 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$, H7'); 7,49-7,51 (2H, dd, $J = 8,5 \text{ Hz}/2,0 \text{ Hz}$, H6, H4'); 7,54-7,58 (3H, m, 2H8 e H6'); 7,63 (1H, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, H7'); 8,44 (1H, d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, H4); 9,90 (1H, sl, NH); 10,05 (1H, sl, NH); 10,77 (1H, sl, NH); 10,95 (1H, sl, N-H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 23, 9; 107,3; 109,6, 111, 7; 117, 7; 118,7; 119,3; 121,7; 121,8; 122,0; 124,6; 124,8; 129,1; 133,3; 137,2; 137,6; 138,7; 140,2; 152,0; 156,0; 168,6; 171,4; 188,9.

IV (KBr), ν (cm^{-1}): 3166, 1648, 1593, 1313, 1192

MS (ES/TOF) m/z : [M+Na] 337,0082 (exp). Calculado: 337,0285

Composto (28a)



F. M.: C₁₄H₁₂N₄S **M.M.:** 268,07 g.mol⁻¹

Características físicas: sólido branco-acinzentado

Rf: 0,42 (Eluente CH₂Cl₂/MeOH 95:5). **Revelador:** lâmpada de UV, PMA

Faixa de Fusão: exp.: 248°C (decomposição) Lit.: 247°C (decomposição) (YELLA, *et al.*, 2011)

Rendimento: 45%.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 6,93 (1H, t, J = 7,5); 7,27-7,30 (2H, td, J = 8,5 Hz/1,0 Hz); 7,51-7,53 (2H, dd, J = 8,5 Hz/1,0 Hz); 9,85 (1H, sl, NH).

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 117,1; 121,5; 129,3; 141,4; 156,1

IV (KBr), ν (cm⁻¹): 3017, 1480

UV (MeOH), λ máx.(nm):

MS (MALD/TOF) m/z: 269,03 (exp). Calculado: 269,08.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZEEM, A. H. et al. Novel Thymohydroquinone Derivatives as Potential Anticancer Agents: Design, Synthesis, and Biological Screening. **Australian Journal of Chemistry**, v. 69, n. 11, p. 1277-1284, 2016. Disponível em: < <http://www.publish.csiro.au/paper/CH16102> >.
- ADACHI, J. et al. Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. **J Biol Chem**, v. 276, n. 34, p. 31475-8, Aug 24 2001.
- AMARAL, A. T. D.; MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, p. 39-44, 2002. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422002000800008&nrm=iso >.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2 ed. Artmed, 2008. ISBN 978-85-363-1205-7.
- BEAUCHARD, A. et al. Synthesis of novel 5-substituted indirubins as protein kinases inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 6434-6443, 9/15/ 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096808960600410X> >.
- BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**, v. 27, p. 461-471, 2004. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422004000300017&nrm=iso >.
- BERGMAN, J.; EKLUND, N. Structure elucidation of some compounds obtained by interaction of indigo with hydrazine. **Chem. Scr.**, v. 19, n. 5, p. 193-204, // 1982.
- BEUKERS, M. W. et al. N6-Cyclopentyl-2-(3-phenylaminocarbonyltriazene-1-yl)adenosine (TCPA), a Very Selective Agonist with High Affinity for the Human Adenosine A1 Receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1492-1503, 2003/04/01 2003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jm021074j> >.
- CAPPOEN, D. et al. Biological evaluation of diazene derivatives as anti-tubercular compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 85-94, 3/3/ 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523414000191> >.
- CASEY, L. A.; GALT, R.; PAGE, M. I. The mechanisms of hydrolysis of the [gamma]-lactam isatin and its derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, n. 1, p. 23-28, 1993. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/P29930000023> >.
- EFSTATHIOU, A. et al. An inhibitor-driven study for enhancing the selectivity of indirubin derivatives towards leishmanial Glycogen Synthase Kinase-3 over leishmanial cdc2-related

protein kinase 3. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 234-234, 05/2012/09/received 05/03/accepted 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4039064/> >.

FERGUSON, L. N. The Synthesis of Aromatic Aldehydes. **Chemical Reviews**, v. 38, n. 2, p. 227-254, 1946/04/01 1946. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/cr60120a002> >.

GAN, C. et al. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. **Steroids**, v. 87, p. 99-107, 9// 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X14001391> >.

GARCÍA-ECHEVERRÍA, C.; TRAXLER, P.; EVANS, D. B. ATP site-directed competitive and irreversible inhibitors of protein kinases. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, n. 1, p. 28-57, 2000. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1128\(200001\)20:1<28::AID-MED2>3.0.CO;2-2](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-1128(200001)20:1<28::AID-MED2>3.0.CO;2-2) >.

CHENG, X. et al. Synthesis and cytotoxicity of novel indirubin-5-carboxamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 4509-4515, 6/15/ 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089610003780> >.

GINZINGER, W. et al. Water-Soluble Cationic Derivatives of Indirubin, the Active Anticancer Component from Indigo naturalis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 10, p. 2175-2185, 2012.

HALL, M. D. et al. Synthesis, Activity, and Pharmacophore Development for Isatin- β -thiosemicarbazones with Selective Activity toward Multidrug-Resistant Cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3191-3204, 2009/05/28 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jm800861c> >.

HESHMATI, N. et al. In vitro and in vivo evaluations of the performance of an indirubin derivative, formulated in four different self-emulsifying drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 11, p. 1567-1575, 2014.

HOESSEL, R. et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. **Nat Cell Biol**, v. 1, n. 1, p. 60-67, 05//print 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/9035> >.

JAUTELAT, R. et al. From the Insoluble Dye Indirubin towards Highly Active, Soluble CDK2-Inhibitors. **ChemBioChem**, v. 6, n. 3, p. 531-540, 2005. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.200400108> >.

JUNG, M. E. et al. Discovery of indirubin derivatives as new class of DRAK2 inhibitors from high throughput screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 11, p. 2719-2723, 6/1/ 2016. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X16303432> >.

K. JNANESHWAR, G.; H. DESHPANDE, V. Synthesis of Convolutamydine A from Isatin. **Journal of Chemical Research, Synopses**, n. 10, p. 632-633, 1999. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/A904205I> >.

KANG, I.-J. et al. Isatin- β -thiosemicarbazones as potent herpes simplex virus inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 7, p. 1948-1952, 4/1/ 2011. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X11002216> >.

KARKI, S. S. et al. 1-Arylmethyl-2,3-dioxo-2,3-dihydroindole thiosemicarbazones as leads for developing cytotoxins and anticonvulsants. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 537-544, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3346746/> >.

KRATKY, C.; KAPPE, T. Mesoionic six-membered heterocycles. XIV. Crystal structure of a pyrimidine belaine. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 881-883, 1981. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/jhet.5570180506> >.

LIMA, L. M. Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira. **Química Nova**, v. 30, p. 1456-1468, 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422007000600015&nrm=iso >.

MA JUNJIE, H. G., XIE LIJUN, CHEN LEI, XU BOXUAN, GONG PING. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Benzothiazole Derivatives Bearing Semicarbazone Moiety as Antitumor Agents. **CHEMICAL RESEARCH IN CHINESE UNIVERSITIES**, v. 31, n. 6, p. 958-963, 2015-11-01 2015. Disponível em: < http://www.cjcu.jlu.edu.cn/hxyj/CN/abstract/article_16162.shtml >.

MAGIATIS, P. et al. Indirubins deplete striatal monoamines in the Intact and MPTP-treated mouse brain and block kainate-induced striatal astrogliosis. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 2, p. 212-219, 3// 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0892036209002232> >. Acesso em: 2010/4//.

MEIJER, L., GUYARD, N., SKALTSOUNIS, L., EISENBRAND, G. **Indirubin, the red shade of índigo**. 2006.

MEUNIER, B. Hybrid Molecules with a Dual Mode of Action: Dream or Reality? **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 1, p. 69-77, 2008/01/01 2008. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ar7000843> >.

MOON, M. J. et al. Synthesis and structure–activity relationships of novel indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with CDK2 inhibitory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 237-246, 1/1/ 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089605007431> >.

POLYCHRONOPOULOS, P. et al. Structural Basis for the Synthesis of Indirubins as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 and Cyclin-Dependent Kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 935-946, 2004/02/01 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/jm031016d> >.

RANGA RÃO, V.; TISLER, M. Reaction of Diethyl Carbonate with 4-Substituted Thiosemicarbazides. **J. Org. Chem**, v. 26, p. 5200-5202, 1961.

ROSHINI, C.; NANJAN, M. J. Sydnones: A Brief Review. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 13, p. 1359-1365, 2012. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/node/103532/article> >.

SHERIDAN, R. P. The Most Common Chemical Replacements in Drug-Like Compounds. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 42, n. 1, p. 103-108, 2002/01/01 2002. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ci0100806> >.

SILVA, J. F. M. D.; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C. The chemistry of isatins: a review from 1975 to 1999. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 273-324, 2001. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532001000300002&nrm=iso >.

SINGH, M. M. et al. Thiosemicarbazide, phenyl isothiocyanate and their condensation product as corrosion inhibitors of copper in aqueous chloride solutions. **Materials Chemistry and Physics**, v. 80, n. 1, p. 283-293, 4/29/ 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254058402005138> >.

SOLOMON, V. R.; HU, C.; LEE, H. Design and synthesis of anti-breast cancer agents from 4-piperazinylquinoline: A hybrid pharmacophore approach. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1563-1572, 2/15/ 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089610000088> >.

SONDEREGGER, O. J. et al. Enantioselective reduction of isatin derivatives over cinchonidine modified Pt/alumina. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 217, n. 1-2, p. 93-101, 8/3/ 2004. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381116904001281> >.

SOUZA, M. A. et al. The antimicrobial activity of lapachol and its thiosemicarbazone and semicarbazone derivatives. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 342-351, 06/27/received09/19/accepted 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005582/> >.

TANAKA, T. et al. Indirubin derivatives alter DNA binding activity of the transcription factor NF-Y and inhibit MDR1 gene promoter. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 83-89, 2014.

VINE, K. L. et al. In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 931-938, 1/15/ 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089606008686> >.

XING, E. et al. 6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. **Int J Parasitol**, v. 39, n. 12, p. 1289-1303, 2009.

YELLA, R. et al. Tandem regioselective synthesis of tetrazoles and related heterocycles using iodine. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 3235-3245, 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1039/C0OB01007C> >.

ANEXOS

