



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SÍNTESE ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS DE NOVOS ESPIROS 1,3,4-  
TIADIAZÓIS DERIVADOS DA ISATINA COM POTENCIAL ATIVIDADE  
BIOLÓGICA**

**DANIEL PEREIRA DA COSTA**



**João Pessoa – PB – Brasil**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**SÍNTESE ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS DE NOVOS ESPIROS 1,3,4-  
TIADIAZÓIS DERIVADOS DA ISATINA COM POTENCIAL ATIVIDADE  
BIOLÓGICA**

**Daniel Pereira da Costa\***

Dissertação de Mestrado  
apresentada como requisito para  
obtenção do título de Mestre em  
Química pela Universidade Federal  
da Paraíba.

**Orientador: Dr. Claudio Gabriel Lima Junior**

**\*Bolsista CAPES**

**João Pessoa – PB – Brasil**

**2020**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

C837s Costa, Daniel Pereira da.

Síntese assistida por micro-ondas de novos espiros  
1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina com potencial  
atividade biológica / Daniel Pereira da Costa. - João  
Pessoa, 2020.

119 f.

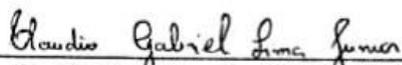
Orientação: Claudio Gabriel Lima Junior.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Derivados de isatina. 2. Espiro-compostos. 3.  
Micro-ondas. 4. Atividade biológica. I. Lima Junior,  
Claudio Gabriel. II. Título.

UFPB/BC

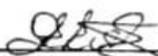
# Síntese assistida por micro-ondas de novos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina com potencial atividade biológica.

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Daniel Pereira da Costa e aprovada pela banca examinadora em 28 de fevereiro de 2020.



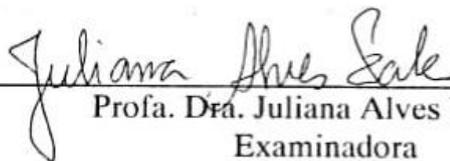
---

Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior  
Orientador/Presidente



---

Profa. Dra. Gabriela Fehn Fiss  
Examinadora



---

Profa. Dra. Juliana Alves Vale  
Examinadora

*Dedico este trabalho aos meus pais, Walmir e Roseane, pelo apoio incondicional e por terem sido grandes incentivadores nos momentos mais difíceis que enfrentei nesta jornada.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado força e saúde para superar todas adversidades encontradas nesse árduo caminho.

Aos meus pais, Walmir e Roseane, que me acolheram e me incentivaram a seguir em frente e nunca desistir, mesmo com tantas dificuldades enfrentadas.

A minha namorada, Taiza Rafaela, por toda paciência em todos os meus momentos de estresse.

Ao meu professor orientador, Dr. Claudio Gabriel, pela orientação, confiança e conselhos em toda minha formação acadêmica.

Ao professor Dr. Mario Vasconcellos pelo acolhimento.

Aos meus amigos de laboratório que conquistei nesta jornada, pela contribuição, conversas, divertimento, paciência e principalmente pela amizade: Aleff, Everton, Gerlande, Girlyanderson, Jayne, João Paulo, Julyanna, Maísa, Pedro, Renan, Rhuan, Tayná.

Ao Dr. Fábio Pedrosa pela contribuição na reta final.

A professora Dra. Gabriela Fehn, por todo apoio e conversas durante toda essa jornada.

Aos técnicos do Laboratório de Multiusuário de Caracterização e Análises da UFPB pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

A CAPES e UFPB pela bolsa concedida.

E a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

**Título:** Síntese assistida por micro-ondas de novos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina com potencial atividade biológica.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de sintetizar, utilizando irradiação de micro-ondas como fonte de aquecimento para o meio reacional, 12 espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina (**3a-3l**), sendo 9 inéditos e investigar a atividade antimicrobiana e antitumoral. Derivados da isatina clorados e *N*-alquilados, previamente sintetizados, foram utilizados como substratos para a obtenção das tiossemicarbazonas (**2a-2l**) sob condições de irradiação de micro-ondas. Estes intermediários foram obtidos em curtos tempos reacionais e em rendimentos que variaram de **53-88%**. A etapa sintética final consistiu na ciclização das tiossemicarbazonas (**2a-2l**) utilizando anidrido acético sob condições também de irradiação de micro-ondas. Os espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados de isatina (**3a-3l**) foram obtidos em tempos reacionais que variam de 6 a 18 minutos, apresentando rendimentos que variaram de **25-90%**. Todos os compostos foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Foi realizada avaliação da atividade antimicrobiana e anticâncer destes compostos. Dentre os 10 compostos avaliados, cinco deles apresentaram atividade antimicrobiana, com destaque para os compostos **3d** (diclorado e *N*-alilado) e **3g** (*N*-alilado), que apresentaram os menores valores de Concentração Inibitória Mínima (137,5 µg/mL) para todos os micro-organismos testados, exceto *P. aureuginosa* ATCC – 9027, que apresentou sensibilidade para a molécula *N*-alilada **3g** na concentração de 550 µg/mL. Realizou-se também a avaliação preliminar da atividade citotóxica em 3 linhagens de células tumorais (HT-29, K562 e HL60), onde apenas o espiro-composto diclorado e *N*-benzilado **3e** apresentou atividade, obtendo  $CI_{50} = 6,8 \mu M$ . Investigação *in silico* foi realizada, onde pode-se observar que ambos os espiro-compostos **3d**, **3e** e **3g** são potenciais candidatos a fármacos com satisfatória biodisponibilidade oral.

**Palavras-chave:** derivados de isatina; espiro-compostos; micro-ondas; atividade biológica.

## ABSTRACT

**Title:** Microwave-assisted synthesis of new spiro-1,3,4-thiadiazoles with potential biological activity.

This work was executed aiming the synthesis of 12 spiro-1,3,4-thiadiazoles derived from isatin (**3a-3l**), including 9 novel ones, using microwave as heating source and investigating the antimicrobial and antitumoral activities. Chlorinated and N-alkylated isatin derivatives were synthesized and used as substrates to the obtainment of thiosemicarbazones (**2a-2l**) under microwave irradiation. These intermediates were obtained in short reaction times and yields of between **53-88%**. The final reaction step consisted on the thiosemicarbazones cyclization (**2a-2l**) using acetic anhydride and microwave irradiation. The spiro-1,3,4-thiadiazoles (**3a-3l**) derived from isatin were produced in reaction times between 6 to 18 minutes, presenting yields around **25-90%**. All the compounds were characterized by spectroscopic techniques of NMR <sup>13</sup>C and NMR <sup>1</sup>H. The antimicrobial and anticancer activities of these compounds were evaluated. 5 from 10 evaluated compounds showed antimicrobial activity, highlighting **3d** (dichlorinated and N-allylated) and **3g** (N-allylated) that presented the minor values of Minimum Inhibitory Concentration (137.5 µg / mL) to all the tested microorganisms, except for *P. aureuginosa* ATCC – 9027 that was sensitive to the N-allylated **3g** at 550 µg/mL. A preliminary assessment of cytotoxic activity in 3 tumour cell lines (HT-29, K562 e HL60) showed only the dichlorinated and N-benzylated spiro-compound **3e** as active, obtaining IC<sub>50</sub> = 6,8 µM. An in silico investigation demonstrated that the spiro-compounds **3d**, **3e** and **3g** are potential drug candidates with satisfactory oral bioavailability calculated.

**Keywords:** isatin derivatives; spiro-compounds; microwave; biological activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Compostos heterocíclicos comumente distribuídos na natureza.....	19
<b>Figura 2</b> – Número crescente de publicações associadas a síntese de heterocíclicos nos últimos vinte anos.....	20
<b>Figura 3</b> – Recentes drogas farmacologicamente ativas contendo fragmentos de heterocíclico.....	21
<b>Figura 4</b> – Medicamentos mais comercializados nos EUA e que possuem heterocíclicos em sua estrutura.....	21
<b>Figura 5</b> – Representação estrutural de um carbono espiro.....	22
<b>Figura 6</b> – Estrutura da Isatina (1H-indol-2,3-diona).....	24
<b>Figura 7</b> – Estrutura do NITD609.....	26
<b>Figura 8</b> – Estrutura dos medicamentos antimaláricos atuais.....	26
<b>Figura 9</b> – Espiro-composto derivado da isatina com atividade antibacteriana e antifúngica.....	28
<b>Figura 10</b> – Espiro-compostos derivados da isatina com propriedades farmacológicas.....	29
<b>Figura 11</b> – Isômeros do heterocíclico tiadiazol.....	30
<b>Figura 12</b> – Compostos heterocíclicos contendo o esqueleto 1,3,4-tiadiazol.....	30
<b>Figura 13</b> – Fármacos comercializados contendo o esqueleto 1,3,4-tiadiazol.....	31
<b>Figura 14</b> – Estratégias de preparação dos derivados de 1,3,4-tiadiazóis.....	32
<b>Figura 15</b> – Espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina propostos nesse trabalho.....	38
<b>Figura 16</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de <b>2c</b> .....	48
<b>Figura 17</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C–APT (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de <b>2c</b> .....	49
<b>Figura 18</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de <b>3c</b> .....	55
<b>Figura 19</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C – APT (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de <b>3c</b> .....	56
<b>Figura 20</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) referente a molécula <b>3b</b> .....	58
<b>Figura 21</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C – APT (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de <b>3b</b> .....	59
<b>Figura 22</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 400 MHz) de <b>3d</b> .....	60
<b>Figura 23</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C – APT (DMSO-d <sub>6</sub> , 100 MHz) de <b>3d</b> .....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Representação estrutural, ocorrência e propriedade farmacológica dos espiro-compostos de ocorrência natural.....	23
<b>Tabela 2</b> – Dados de tempo e rendimento de obtenção dos derivados de 1,3,4-tiadiazol com técnicas de irradiação de micro-ondas e aquecimento tradicional .....	35
<b>Tabela 3</b> – Rendimentos isolados para a obtenção dos derivados de isatina <i>N</i> -alquilado .....	44
<b>Tabela 4</b> – Rendimentos e tempos reacionais para obtenção de <b>2a - 2l</b> .....	46
<b>Tabela 5</b> – Investigação do parâmetro temperatura para a síntese de <b>3a</b> .....	51
<b>Tabela 6</b> – Dados experimentais obtidos na obtenção dos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina ( <b>3a-3l</b> ) .....	52
<b>Tabela 7</b> – Predição das propriedades físico-químicas dos compostos.....	62
<b>Tabela 8</b> – Toxicidade teórica dos espiros 1,3,4-tiadiazóis .....	64
<b>Tabela 9</b> – Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) das amostras contra cepas bacterianas e fúngicas.....	66
<b>Tabela 10</b> – Percentual de inibição em concentração única ( $25 \mu\text{g/mL}$ ) do crescimento celular das amostras em três linhagens tumorais .....	68

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> – Rota racêmica para obtenção das espiroindolonas.....	27
<b>Esquema 2</b> – Rota sintética e rendimentos obtidos para obtenção do Composto (20) .....	28
<b>Esquema 3</b> – Esquema reacional para a obtenção dos espiros derivados da isatina .....	35
<b>Esquema 4</b> – Esquema reacional para a síntese dos derivados da isatina <b>1a-1l</b> .....	40
<b>Esquema 5</b> – Esquema reacional para a síntese das tiossemicarbazonas.....	40
<b>Esquema 6</b> – Esquema reacional para a síntese dos espiros 1,3,4-tiadiazóis.....	41
<b>Esquema 7</b> – Mecanismo de síntese da 5,7-dicloroisatina.....	43
<b>Esquema 8</b> – Mecanismo para obtenção das tiossemicarbazonas em solução neutra .....	47
<b>Esquema 9</b> – Mecanismo proposto para a obtenção dos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina .....	54

## LISTA DE ESPECTROS

ESPECTRO 1 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2a</b> .....	96
ESPECTRO 2 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2a</b> .....	96
ESPECTRO 3 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2b</b> .....	97
ESPECTRO 4 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2b</b> .....	97
ESPECTRO 5 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2c</b> .....	98
ESPECTRO 6 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2c</b> .....	98
ESPECTRO 7 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2d</b> .....	99
ESPECTRO 8 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2d</b> .....	99
ESPECTRO 9 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2e</b> .....	100
ESPECTRO 10 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2e</b> .....	100
ESPECTRO 11 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2f</b> .....	101
ESPECTRO 12 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2f</b> .....	101
ESPECTRO 13 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2g</b> .....	102
ESPECTRO 14 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2g</b> .....	102
ESPECTRO 15 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2h</b> .....	103
ESPECTRO 16 – RMN $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2h</b> .....	103
ESPECTRO 17 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2i</b> .....	104
ESPECTRO 18 – RMN $^{13}\text{C}$ 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2i</b> .....	104
ESPECTRO 19 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2j</b> .....	105
ESPECTRO 20 – RMN $^{13}\text{C}$ 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2j</b> .....	105
ESPECTRO 21 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2k</b> .....	106
ESPECTRO 22 – RMN $^{13}\text{C}$ 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2k</b> .....	106
ESPECTRO 23 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2i</b> .....	107
ESPECTRO 24 – RMN $^{13}\text{C}$ 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>2i</b> .....	107
ESPECTRO 25 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de <b>3a</b> .....	108
ESPECTRO 26 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3b</b> .....	109
ESPECTRO 27 – RMN $^{13}\text{C}$ 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3b</b> .....	109
ESPECTRO 28 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3c</b> .....	110
ESPECTRO 29 – RMN $^{13}\text{C}$ 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3c</b> .....	110
ESPECTRO 30 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3d</b> .....	111
ESPECTRO 31 – RMN $^{13}\text{C}$ 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3d</b> .....	111
ESPECTRO 32 – RMN $^1\text{H}$ 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3e</b> .....	112

<b>ESPECTRO 33</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3e</b> .....	112
<b>ESPECTRO 34</b> – RMN <sup>1</sup> H 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3f</b> .....	113
<b>ESPECTRO 35</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3f</b> .....	113
<b>ESPECTRO 36</b> – RMN <sup>1</sup> H 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3g</b> .....	114
<b>ESPECTRO 37</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3g</b> .....	114
<b>ESPECTRO 38</b> – RMN <sup>1</sup> H 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3h</b> .....	115
<b>ESPECTRO 39</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3h</b> .....	115
<b>ESPECTRO 40</b> – RMN <sup>1</sup> H 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3i</b> .....	116
<b>ESPECTRO 41</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3i</b> .....	116
<b>ESPECTRO 42</b> – RMN <sup>1</sup> H 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3j</b> .....	117
<b>ESPECTRO 43</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3j</b> .....	117
<b>ESPECTRO 44</b> – RMN <sup>1</sup> H 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3k</b> .....	118
<b>ESPECTRO 45</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3k</b> .....	118
<b>ESPECTRO 46</b> – RMN <sup>1</sup> H 400 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3l</b> .....	119
<b>ESPECTRO 47</b> – RMN <sup>13</sup> C 100 MHz (DMSO- <i>d</i> 6) de <b>3l</b> .....	119

## LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

**ADMET** – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção e Toxicidade.

**ATCI** – Ácido tricloroisocianúrico

**CCD** – Cromatografia de Camada Delgada

**CI<sub>50</sub>** – concentração que inibe 50% do crescimento de uma população

**CIM** – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

**DMF** – Dimetilformamida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**HSAB** – *hard and soft acid and bases*

**HSQC** – *Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*

**Hz** – Hertz

**J** – Constante de acoplamento

**K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – Carbonato de potássio

**MHz** – Mega Hertz

**P&D** – PESQUISA E DESENVOLVIMENTO

**ppm** – Partes por milhão

**REA** – Relação Estrutura Atividade

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**SAR** – *structure-activity relationships*

**S<sub>n</sub>2** – Substituição Nucleofílica Bimolecular

**THF** – Tetraidrofurano

**δ** – Deslocamento Químico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	19
<b>2.1. Compostos heterocíclicos</b> .....	19
2.1.1. Espiro-compostos.....	22
2.1.1.1. Espiro-compostos derivados da isatina .....	24
2.1.2. Tiadiazol .....	29
2.1.2. Uso da irradiação de micro-ondas em síntese orgânica.....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
3.1. <b>Objetivos Gerais</b> .....	37
3.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	37
<b>4. ESTRATÉGIA</b> .....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1. <b>Síntese dos derivados da isatina (1b - 1h; 1j - 1l)</b> .....	43
5.2. <b>Síntese das tiossemicarbazonas derivadas da isatina (2a - 2l)</b> .....	45
5.3. <b>Síntese dos novos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina (3a - 3l)</b> ...50	
5.4. <b>Estudos biológicos</b> .....	61
5.4.1. Estudos <i>in silico</i> .....	61
5.4.2. Estudos antimicrobianos .....	65
5.4.3. Estudo da citotoxicidade em 3 linhagens de células tumorais.....	67
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	69
6.1. <b>Conclusões</b> .....	69
6.2. <b>Perspectivas</b> .....	69
<b>7. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	71
7.1. <b>Materiais e métodos</b> .....	71
7.2. <b>Procedimento de síntese dos derivados da isatina (1b - 1h; 1j - 1l)</b> .....	72
7.2.1. Procedimento de síntese da 5,7 dicloroisatina ( <b>1b</b> ).....	72
7.2.2. Procedimento de síntese dos derivados metilados ( <b>1c; 1f; 1j</b> ).....	72
7.2.2. Procedimento de síntese dos derivados alilados ( <b>1d; 1g; 1k</b> ).....	73
7.2.3. Procedimento de síntese dos derivados benzilados ( <b>1e; 1h; 1l</b> ) .....	73
7.3. <b>Procedimento geral de síntese das tiossemicarbazonas derivadas da isatina (2a - 2l)</b> .....	74

<b>7.3. Procedimento geral de síntese dos espiro 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina (3a – 3l).....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>ESPECTROS .....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é um processo bastante complexo, duradouro e de alto custo, fundamentando-se na integração de vários campos estratégicos, como inovação, conhecimento, tecnologia, gerenciamento e investimento em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008; GUIDO). Os constantes avanços da ciência, possibilitam um melhor entendimento de mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos que contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de doenças. Com isso, viabilizam a descoberta de novos fármacos capazes de representar notáveis inovações terapêuticas, revolucionando o modo e a qualidade de vida das diversas populações no mundo

A Química Medicinal possui um papel importantíssimo no processo P&D de fármacos, possuindo como característica seu caráter multidisciplinar que permite não só a invenção, descoberta e planejamento de fármacos, mas também a interpretação dos mecanismos de ação molecular dos compostos biologicamente ativos, estudo do metabolismo, relações entre a estrutura química e atividade (do inglês, *SAR, structure-activity relationships*), entre outros (GUIDO; ANDRICOPULO, 2008). Complementar a isto, novos métodos sintéticos vêm sendo desenvolvidos, baseando-se em rotas sintéticas mais eficientes, processos que reduzem ou eliminam o uso e geração de substâncias nocivas à saúde e ao meio ambiente, abrindo a possibilidade de expandir a biblioteca de moléculas bioativas, impulsionando a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.

Neste cenário de desenvolvimento e descoberta de novos candidatos a fármacos, os compostos heterocíclicos detêm uma importante representatividade, uma vez que, devido aos heteroátomos e ao tamanho do anel, juntamente com os seus respectivos substituintes, agregam propriedades físico-químicas únicas para esses compostos (MUSTAFA, 2018). Com isso, estes compostos são de suma importância para pesquisas em Química Medicinal, apresentando um alto potencial farmacológico.

A isatina é um heterociclo bastante utilizado como bloco de construção (em inglês, *building block*) na síntese e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Isso se dá pela grande versatilidade sintética associado ao seu baixo custo comercial, fornecendo derivados com um grande espectro de atividades.

Uma das aplicações mais promissoras e fascinantes da isatina na síntese orgânica é, sem dúvidas, ocasionada pela alta reatividade da carbonila cetônica (C-3), permitindo a síntese de novos derivados espirocíclicos com carbono assimétrico unindo dois anéis (SINGH; DESTA, 2012). Esta característica é recorrente em muitos produtos naturais, e derivados sintéticos vêm apresentando promissores tipos de bioatividade, como agente neuroprotetor (CHOU *et al.*, 2009), antimalárico (YEUNG *et al.*, 2010), antimicrobiano (SAKHUJA *et al.*, 2011), anti-inflamatório e analgésico (RAJANARENDAR *et al.*, 2013), anticâncer (ARUN *et al.*, 2014), anti-histamínico (ARYA *et al.*, 2012), entre outros. Estes compostos despertam um enorme interesse dos pesquisadores da área de química orgânica sintética e Química Medicinal em todo o mundo. Entretanto, a síntese de compostos espirocíclicos, em geral, sempre foi um ponto desafiador para os químicos orgânicos, que devido à sua exigência estrutural, necessita de estratégias sintéticas específicas (SINGH; DESTA, 2012).

Entre as recentes metodologias para a síntese destes compostos, as reações assistidas por micro-ondas ganharam considerável atenção devido ao seu melhor gerenciamento térmico acompanhadas de menores tempos reacionais, onde vem se tornando uma ferramenta indispensável para a síntese de novos espiro-compostos (KONOVALOVA; MASLIVETS, 2019).

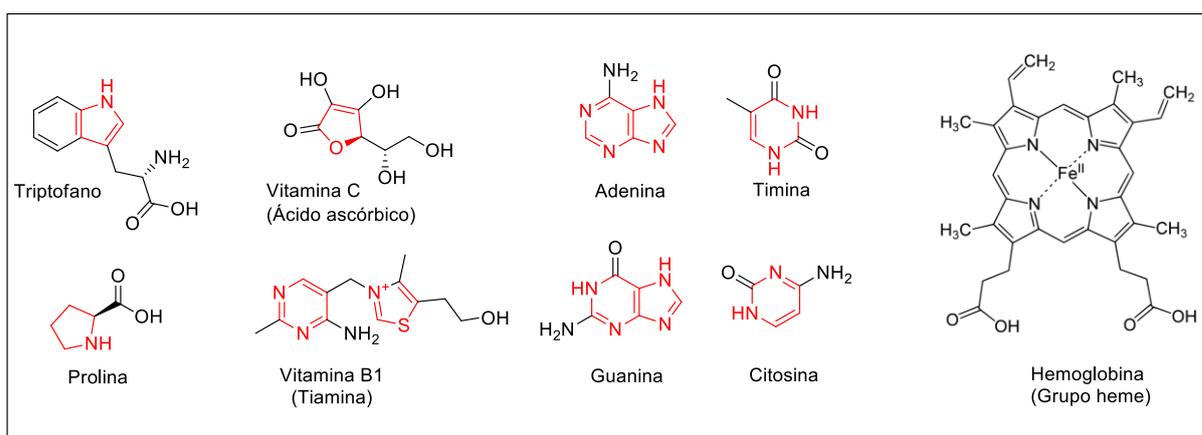
Com base no exposto, apresentamos neste trabalho a síntese assistida por micro-ondas de 12 espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina, dos quais 9 são inéditos, e a investigação de suas atividades biológicas.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Compostos heterocíclicos

Os compostos heterocíclicos são definidos como compostos orgânicos cíclicos contendo átomos de carbono e pelo menos um outro átomo em sua estrutura, os quais podem ser comumente nitrogênio, oxigênio e enxofre. Esses compostos são amplamente distribuídos na natureza e essenciais para células vivas. Alguns deles, como aminoácidos, proteínas, vitaminas, bases nitrogenadas, hemoglobina (grupo heme), etc. (Figura 1), desempenham um papel vital no metabolismo de todos os seres vivos e são utilizados em quase todas as fases dos muitos processos bioquímicos necessários para a manutenção da vida.

**Figura 1** – Compostos heterocíclicos comumente distribuídos na natureza

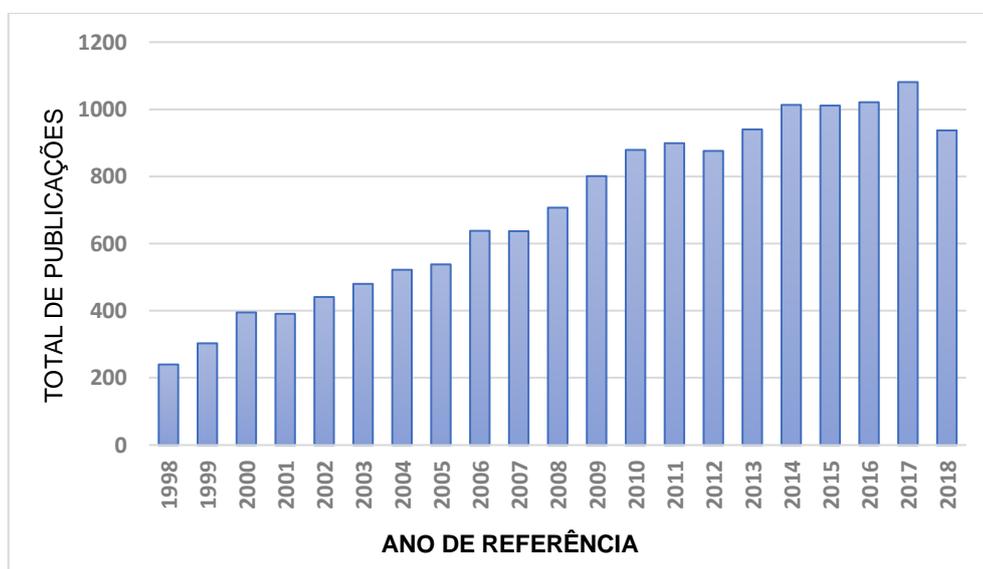


Fonte: Elaborado pelo autor

As amplas atividades biológicas que esses compostos podem apresentar estão parcialmente atribuídas aos seus heteroátomos, nos quais podem atuar como ácidos e bases, dependendo do pH do ambiente. Além disso, a diversidade de interações intermoleculares que esses compostos podem se envolver, tais como ligação de hidrogênio, ligação coordenada, interações de van der Waals, interações hidrofóbicas, além da ampla variedade dos tamanhos dos anéis que permitem uma interação mais abrangente com receptores ou enzimas, atribuem uma maior atividade farmacológica ou especificidade aos compostos heterocíclicos (MARTINEZ; GIL, 2016).

Sendo assim, esses compostos possuem uma extrema importância para os químicos medicinais, pois, associado aos avanços nas metodologias sintéticas, é possível expandir a biblioteca de moléculas e impulsionar a descoberta de novos candidatos a fármacos. A relevância que esses compostos demonstram no cenário atual da Química Medicinal, em especial, no desenvolvimento de novos compostos com potencial atividade biológica, é refletido no crescimento expressivo no número de publicações referentes aos últimos vinte anos, mediante a pesquisa na base de dados *Web of Science* associando o termo “*Heterocyclic*” ao termo “*Synthesis*”. (Figura 2).

**Figura 2** – Número crescente de publicações associadas a síntese de heterocíclicos nos últimos vinte anos



Fonte: elaborado pelo autor. Acesso em 22 de novembro de 2019.

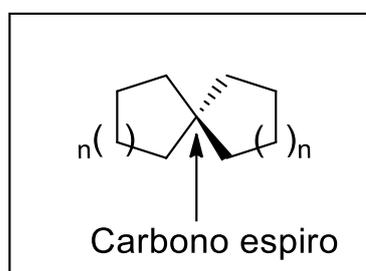
Esse crescente interesse pela síntese de compostos heterocíclicos vem sendo associado as suas diversas aplicações clínicas, onde vem desempenhando um papel importantíssimo no desenvolvimento de novas drogas antibacterianas (CONSTANTIN *et al.*, 2019), antitumorais (NAM *et al.*, 2014), anti-inflamatórios (WEI *et al.*, 2018), antivirais (KANG *et al.*, 2015), antifúngicos (DELONG *et al.*, 2017), entre outras, nos últimos anos (Figura 3).



### 2.1.1. Espiro-compostos

O primeiro composto espiro foi sintetizado em 1900, por Baeyer, descrito na época como um hidrocarboneto bicíclico (BAEYER, 1900). Desde então, o termo espiro cíclico ou espiro composto é utilizado para descrever essa família de compostos que possui como principal característica um átomo de carbono com hibridização  $sp^3$  fazendo parte simultaneamente de dois ciclos, conforme demonstra a Figura 5. Devido à natureza tetraédrica do carbono espiro, os planos dos anéis são quase perpendiculares entre si (PRADHAN *et al.*, 2006).

**Figura 5** – Representação estrutural de um carbono espiro

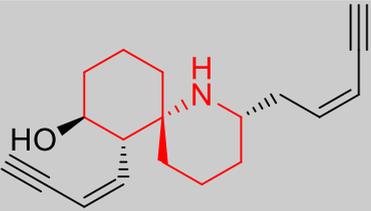
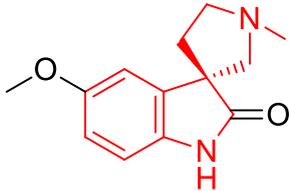
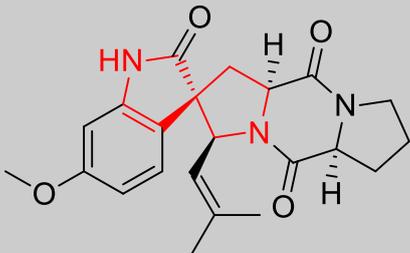
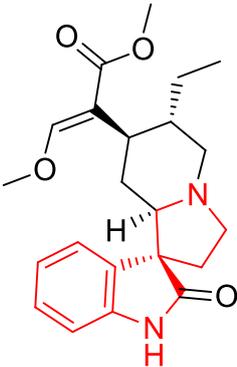


Fonte: Elaborado pelo autor

Esses compostos são de recente interesse devido às suas interessantes características conformacionais e suas possíveis implicações estruturais para os sistemas biológicos. A característica assimétrica ocasionada pelo carbono espiro (centro assimétrico), vêm sendo relatado como um dos critérios importantes das atividades biológicas. A retenção de propriedades neurotóxicas da *Perhydrohistrionicotoxin*, um análogo de um produto natural (-)-*Histrionicotoxin*, é uma evidência clara do papel do carbono espiro na orientação da atividade biológica (TAKAHASHI; WITKOP; BROSSI, 1982).

Os compostos espiro representam uma classe importante de substâncias de ocorrência natural e que são caracterizados por suas propriedades biológicas altamente pronunciadas. Sabe-se há muito tempo que a característica espirocíclica está presente em diversos fitoquímicos, tanto em alcalóides, lactonas ou terpenóides. Exemplos desses fitoquímicos com suas respectivas propriedades farmacológicas estão expostos na Tabela 1 a seguir.

**Tabela 1** – Representação estrutural, ocorrência e propriedade farmacológica dos espiro-compostos de ocorrência natural

COMPOSTO	OCORRÊNCIA	PROPRIEDADE FARMACOLÓGICA
 <p><i>Histrionicotoxin</i></p>	<p>Pele de sapos da família <i>Dendrobatidae</i>, principalmente do <i>Dendrobates histrionicus</i>, (DALY <i>et al.</i>, 1977).</p>	<p>Potente receptor nicotínico</p>
 <p><i>Horsfiline</i></p>	<p>Raízes da <i>Horsfieldia superba</i> (árvore nativa da Malásia) (PAVLOVSKA <i>et al.</i> 2016).</p>	<p>Analgésico</p>
 <p><i>Spirotryptostatin A</i></p>	<p>Fungos <i>Aspergillus fumigatus</i>, pertencente à família <i>Trichocomacceae</i> (STEVENS <i>et al.</i>, 2005).</p>	<p>Anticâncer</p>
 <p><i>Rhynchophylline</i></p>	<p>Ervas das espécies <i>Uncaria</i>, principalmente em <i>Uncaria rhynchophylla</i> (CHOU <i>et al.</i>, 2009).</p>	<p>Agente neuroprotetor</p>

Nas últimas três décadas, os espiro-compostos receberam uma atenção considerável devido às suas diversas propriedades farmacológicas e terapêuticas. Muitos deles, apresentam um grande espectro de atividades biológicas e têm sido empregados como moduladores de progesterona (FENSOME *et al.*, 2008), anti-HIV (KUMARI *et al.*, 2011), anticâncer (DING *et al.*, 2005), antituberculose (VINTONYAK *et al.*, 2010), antimalárico (YEUNG *et al.*, 2010), entre outros. Além dos seus usos

clínicos, alguns compostos possuem aplicabilidade em outros campos, podendo ser utilizados nos campos agrícola e industrial, como pesticidas, agentes antifúngico, dispositivos eletroluminescentes e corantes (KONOVALOVA; MASLIVETS, 2019; SARASWAT *et al.*, 2016).

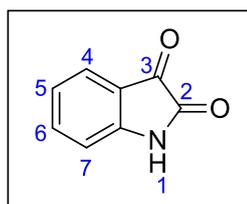
Em uma pesquisa realizada por Carreira e Fessard (2014) sobre o número de artigos relacionados a temática dos espiro-compostos (1964 – 2013), constatou-se o crescimento exponencial de publicações e uma relação direta desses compostos com agentes bioativos. Neste estudo, foram também analisados dados referentes a depósitos de patentes de espiro-compostos, no qual foi observado que a maioria estão relacionados à indústria farmacêutica, agroquímica ou a áreas relacionadas a doenças, como oncologia, distúrbios metabólicos e anti-infecciosos.

No entanto, a formação de um composto espirocíclico é um grande desafio enfrentado pelos químicos orgânicos sintéticos. Isso se dá pelo requisito estrutural característico desses compostos, um carbono  $sp^3$  fazendo parte simultaneamente de dois anéis. Esta dificuldade, aos poucos, vem sendo eliminada pelos químicos diante da variedade de novas metodologias sintéticas que têm sido reportadas em recentes revisões (KHANNA *et al.*, 2017; KONOVALOVA; MASLIVETS, 2019; ZIARANI; MORADI; LASHGARI, 2016), onde muitas evidenciam que a aplicação da irradiação de micro-ondas vem se tornando uma ferramenta indispensável para a síntese de novos espiro-compostos.

#### 2.1.1.1. Espiro-compostos derivados da isatina

A isatina (1H-indol-2,3-diona) (**1a**) (Figura 6) é um composto que foi isolado pela primeira vez por Erdmann e Laurent, em 1840, como um produto de oxidação do índigo, usando ácido nítrico e crômico (ERDMANN, 1841; LAURENT, 1840).

**Figura 6** – Estrutura da isatina (1H-indol-2,3-diona)



Fonte: Elaborado pelo autor

Na natureza, pode ser encontrada em folhas e raízes da *Strobilanthes cusia* (Nees), onde, em 1840, foi isolada pela primeira vez a partir de plantas das espécies *Isatis tinctoria*, *Calanthe discolor* e *Couroupita guianensis*. Essas plantas são abundantes no Norte e no centro da China, e possuem importância étnica na terapêutica tradicional (CHEN *et al.*, 2012; KHAN; MAALIK, 2015). A isatina é também encontrada em fungos, moluscos marinhos e em um dos componentes da secreção da glândula parótida de sapos do gênero *Bufo* (MATHUR; NAIN, 2014). Em humanos, é um composto endógeno metabólito derivado da adrenalina, amplamente distribuído em diversos tecidos e fluidos biológicos (GLOVER *et al.*, 1988).

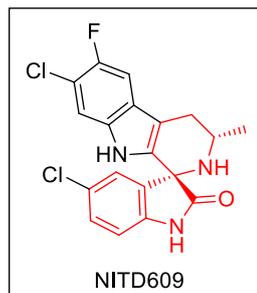
A utilização da isatina como matéria prima para a síntese e descobrimento de novos fármacos tem se tornado bastante promissor nos últimos. Além do seu baixo custo comercial, sua estrutura é passível de grandes modificações químicas, onde é possível encontrar duas carbonilas (cetônica e amídica) com reatividades distintas, um anel aromático que está sujeito a reações de substituição eletrofílica aromática, principalmente nas posições 5 e 7, e um nitrogênio amídico susceptível a reações de *N*-alquilação ou *N*-alcilação. Diante disso, seus derivados vêm apresentando uma ampla ação em vários alvos biológicos, atribuindo um interessante espectro de atividades para estes novos compostos (GABRIEL *et al.*, 2011).

No cenário atual, a isatina constitui, talvez, a única classe de compostos heterocíclicos que tem sido empregada de maneira tão extensiva no projeto e síntese de estruturas espirocíclicas. Esta aplicação está diretamente associada à sua carbonila cetônica (C-3) altamente reativa, que também é um centro proquiral. Estes espiro-compostos derivados da isatina vêm despertando um enorme interesse dos pesquisadores na área de química orgânica em todo mundo, isto porque, além da ocorrência em muitos produtos naturais, seus derivados sintéticos vêm apresentando interessantes atividades biológicas (SINGH; DESTA, 2012).

Em recentes esforços para a descoberta de novas drogas com atividade biológica, uma parceria público-privada identificou um novo espiro-composto promissor derivado da isatina, onde é potencialmente eficaz contra uma gama de espécies de *Plasmodium* (parasita causador da malária) e que possui as propriedades farmacocinéticas necessárias para se tornar um medicamento viável. Denominado de NITD609 (Figura 7), foi otimizado entre uma série de espiroindolonas e apresenta

valores de concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) de 0.5–1.4 nM contra cepas de *Plasmodium falciparum* (protozoário causador da malária em humanos), além disso, os exames de toxicidade padrão indicaram um risco mínimo de citotoxicidade, cardiotoxicidade e genotoxicidade (TSE, 2010; YEUNG *et al.*, 2010).

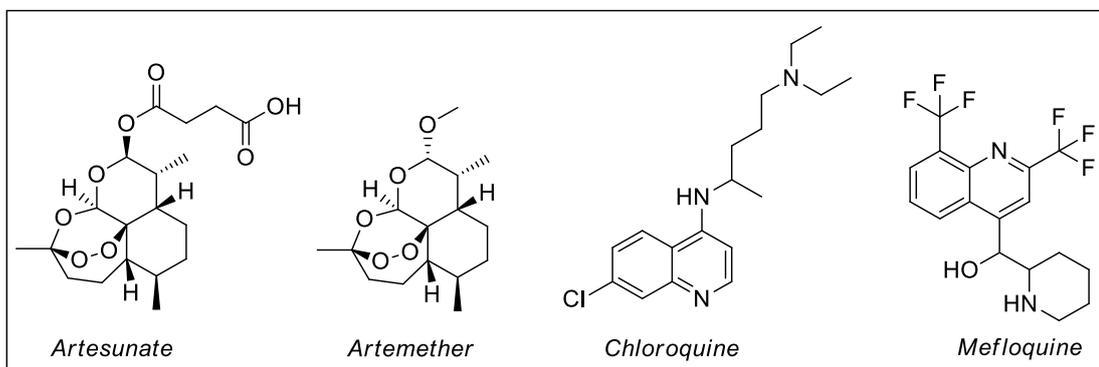
**Figura 7** – Estrutura do NITD609



Fonte: adaptado de Yeung e colaboradores, 2010

Quando administrado em camundongos infectados por *Plasmodium berghei* (protozoário causador da malária em roedores), em dose única de 100 mg/kg, os roedores foram completamente curados. Fato esse que não foi observado com doses semelhantes dos medicamentos antimaláricos atuais (*Artesunate*, *Artemether*, *Chloroquine* ou *Mefloquine*), os quais podem ser observados na Figura 8 (TSE, 2010; YEUNG *et al.*, 2010).

**Figura 8** – Estrutura dos medicamentos antimaláricos atuais

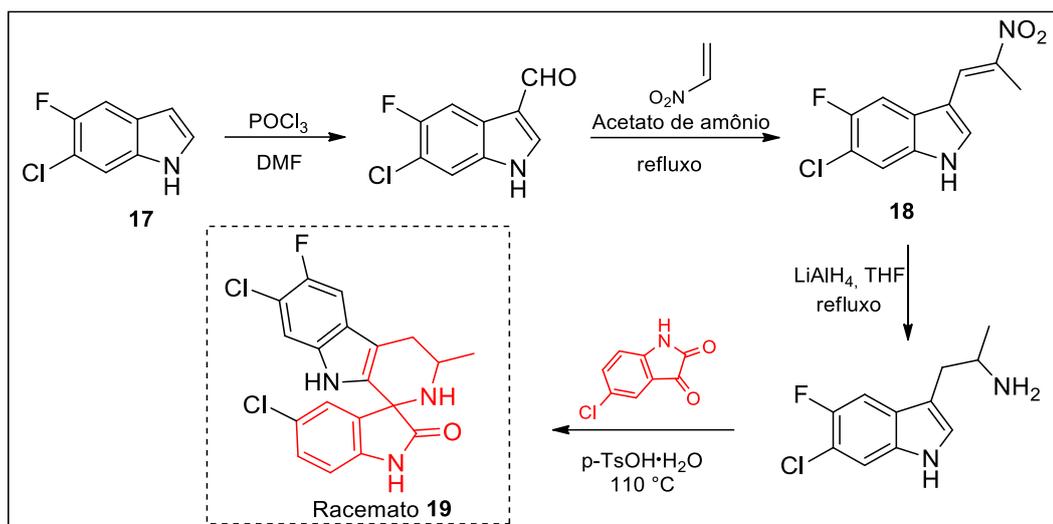


Fonte: Elaborado pelo autor

Em termos sintéticos, a mistura racêmica que deu origem ao NITD609 foi preparada a partir do indol substituído **17**, o qual reagiu através de uma reação de

Vilsmeier-Haack seguida de condensação com o nitroeteno, fornecendo o nitroalceno **18**. Em seguida, a redução do nitroalceno com hidreto de alumínio e lítio, seguido da condensação com 5-cloroisatina, proporcionou o racemato **19**. Os enantiômeros foram separados por cromatografia quiral e diferenciados por rotação óptica. Os reagentes e as condições empregadas estão expostas no Esquema 1 (YEUNG *et al.*, 2010).

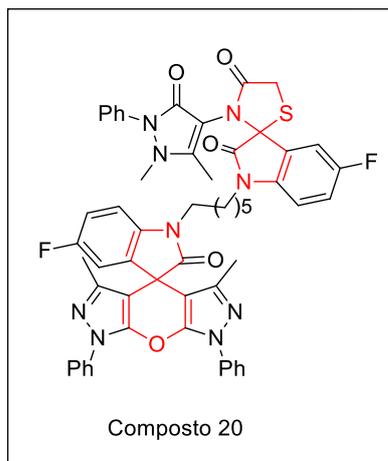
**Esquema 1** – Rota racêmica para obtenção das espiroindolonas



Fonte: adaptado de Yeung e colaboradores, 2010

Em um outro estudo, dessa vez realizado por Sakhuja e colaboradores (2011), relataram uma nova série de novos mono/bis espiro-compostos derivados da isatina (espiro[indol-tiazolidina]espiro[indol-piran]) que foram sintetizados a partir de derivados alquilados da isatina (N-(6-bromohexyl)indol-2,3-dione). Todos os compostos sintetizados foram avaliados quanto às suas atividades antimicrobiana *in vitro* contra três bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermis*), quatro bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* e *Klebsiella pneumonia*), bem como quatro fungos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Candida albicans*). Os bis-espiro-indóis exibiram maior eficiência antibacteriana e antifúngica do que seus correspondentes mono-espiro-indóis. Entre todos os compostos sintetizados, o Composto **20** (Figura 9) se destacou por apresentar maior inibição do crescimento de todas as linhagens bacterianas e duas linhagens de fungos (*A. niger* e *C. albicans*).

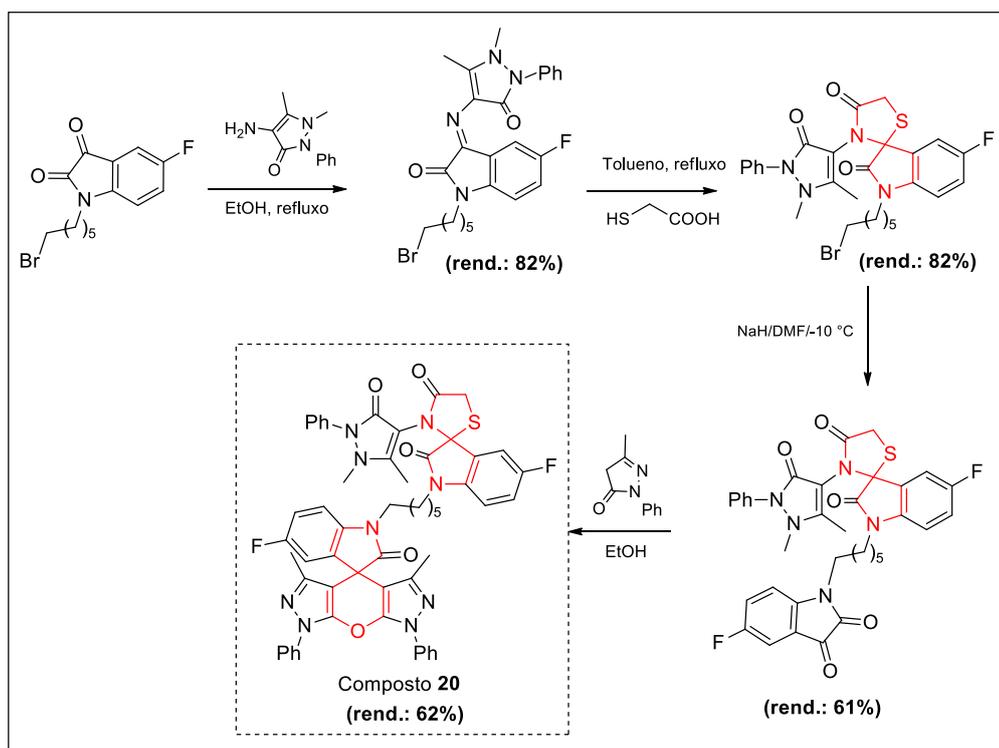
**Figura 9** – Espiro-composto derivado da isatina com atividade antibacteriana e antifúngica



Fonte: adaptado de Sakhuja e colaboradores, 2011

A metodologia sintética empregada para a obtenção do composto **20**, observada no Esquema 2, é caracterizada pelo autor como limpa e eficiente, tomando como base as poucas etapas sintéticas acompanhadas de bons a excelentes rendimentos, podendo ser utilizada como metodologia para síntese de outros espiros de grande importância biológica (SAKHUJA *et al.*, 2011).

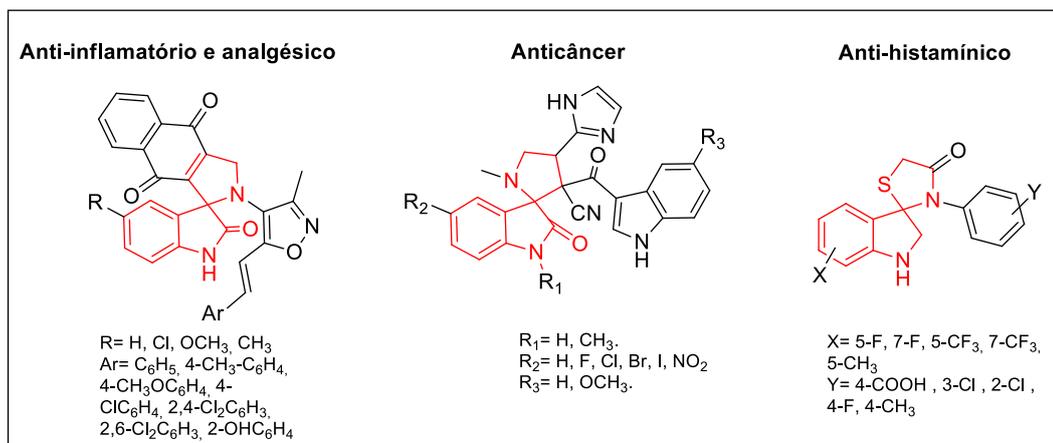
**Esquema 2** – Rota sintética e rendimentos obtidos para obtenção do Composto (**20**)



Fonte: adaptado de Sakhuja e colaboradores (2011)

Além das atividades mencionadas anteriormente, a presença da estrutura espirocíclica em derivados da isatina vem se apresentando com enunciadas atividades biológicas (Figura 10), tais como anti-inflamatória e analgésica (RAJANARENDAR *et al.*, 2013), anticâncer (ARUN *et al.*, 2014) e anti-histamínico (ARYA *et al.*, 2012).

**Figura 10** – Espiro-compostos derivados da isatina com propriedades farmacológicas



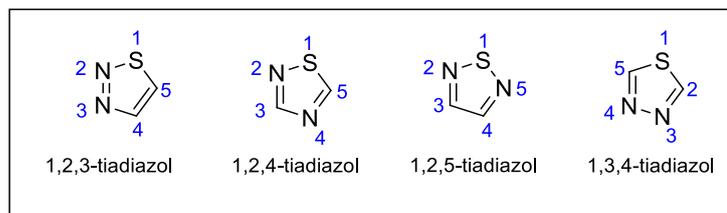
Fonte: elaborado pelo autor

Tendo em vista o grande espectro de atividade biológica que os espiro-compostos derivados da isatina vêm abrangendo, desde os alcaloides de origem animal/vegetal até os novos compostos sintetizados em trabalhos recentes, a busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas mais enunciadas, que possam ser obtidas em rotas sintéticas mais simples, continuam sendo objetivos da pesquisa na área de Química Medicinal.

### 2.1.2. Tiadiazol

O tiadiazol é um composto heterocíclico que apresenta dois átomos de nitrogênio e um átomo de enxofre como parte do anel aromático de cinco membros, podendo ser encontrado em quatro formas isoméricas 1,2,3-tiadiazol, 1,2,4-tiadiazol, 1,2,5-tiadiazol e 1,3,4-tiadiazol (Figura 11) (SERBAN, 2019).

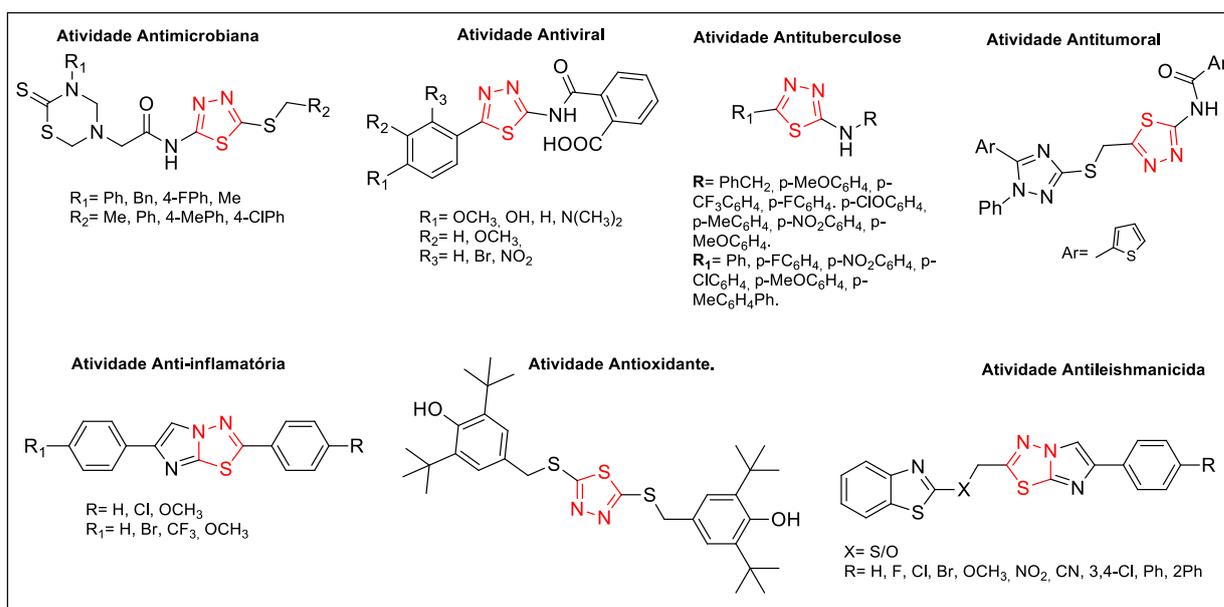
**Figura 11 – Isômeros do heterociclo tiadiazol**



Fonte: adaptado de Serban, 2019

Dentre os quatros isômeros, os derivados do 1,3,4-tiadiazol se destacam devido ao seu amplo espectro de atividade farmacológica (Figura 12), incluindo antimicrobiana (YAN *et al.*, 2019), anti-inflamatória (CRISTINA *et al.*, 2018), antitumoral (NASSAR; ATT-ALLAH; HEMDAN, 2018), antioxidante (AHMAD *et al.*, 2019), antituberculose (SEKHAR *et al.*, 2019), antiviral (BRAI *et al.*, 2018), antileishmanicida (ER *et al.*, 2019), entre outras. A natureza mesoiônica destes heterociclos, permitem que estes compostos tenham fortes interações com biomoléculas (DNA, proteínas). Apesar de suas cargas internas, os compostos mesoiônicos possuem carga líquida neutra, fazendo com que cruzem as membranas celulares com uma maior facilidade e interajam com alvos biológicos com propriedades distintas, fato este que ocasiona uma boa permeabilidade celular dos derivados do 1,3,4-tiadiazol (LI *et al.*, 2013).

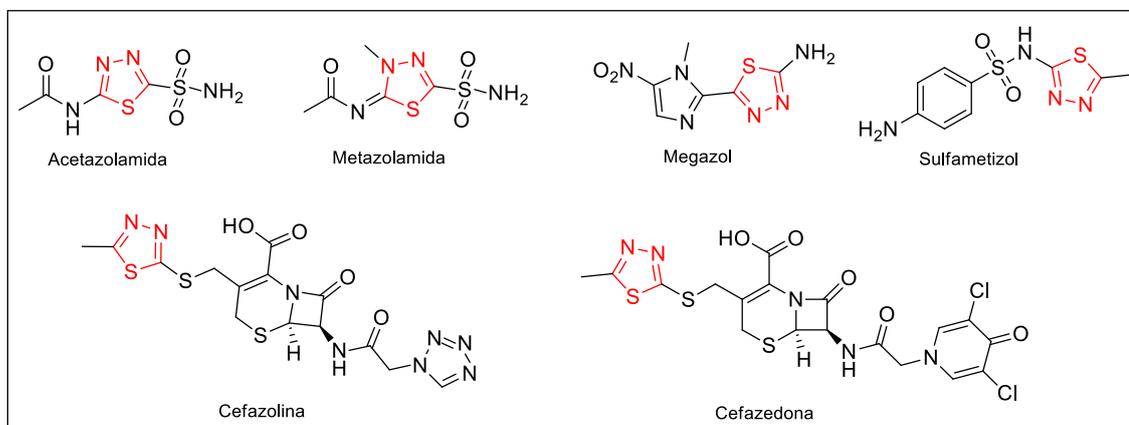
**Figura 12 – Compostos heterocíclicos contendo o esqueleto 1,3,4-tiadiazol**



Fonte: elaborado pelo autor

Atualmente, é possível encontrar entre os medicamentos comercializados alguns que contêm em sua estrutura o esqueleto do 1,3,4-tiadiazol. A Acetazolamida e Metazolamida são potentes inibidores da anidrase carbônica (utilizados no tratamento do glaucoma), o Megazol é um agente anti-tripanosossoma utilizado no tratamento da doença de Chagas e o Sulfametizol possui atividade antimicrobiana. Cefazolina e Cefazedona pertencem à primeira geração da família das cefalosporinas, agentes antimicrobianos (Figura 13).

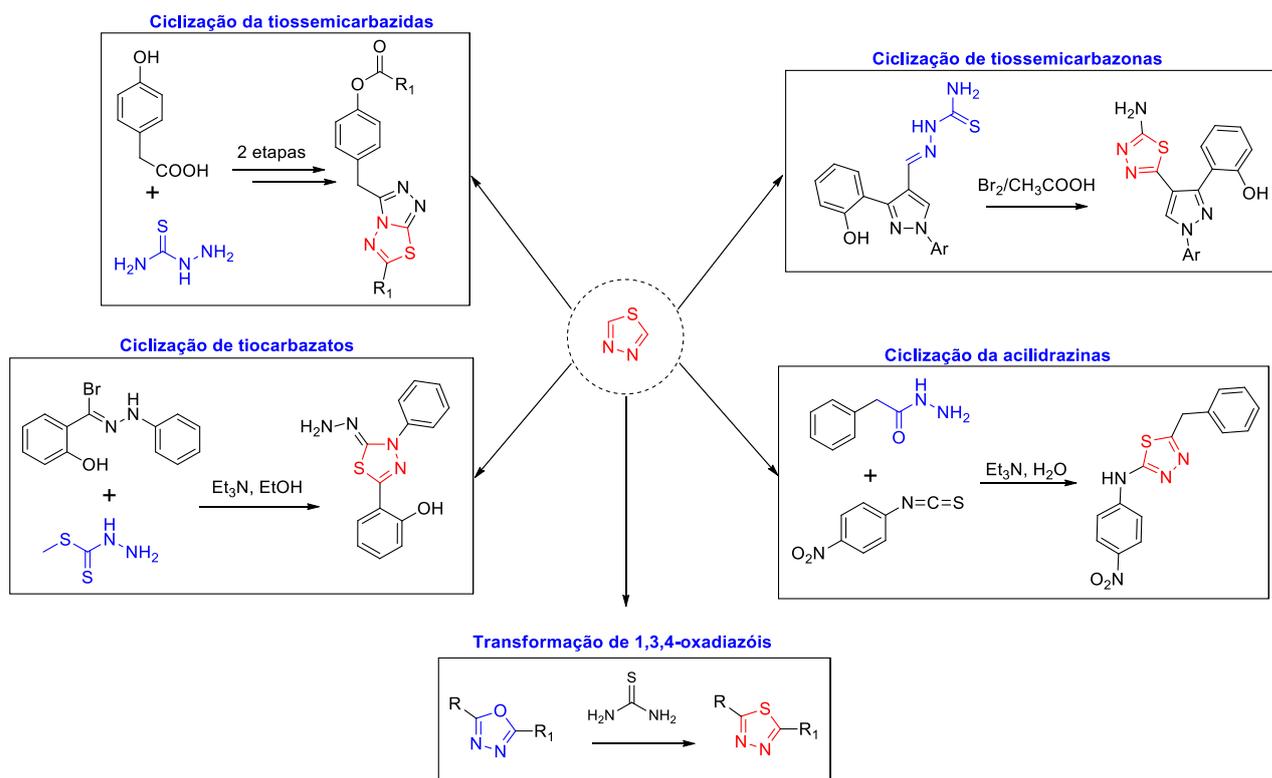
**Figura 13** – Fármacos comercializados contendo o esqueleto 1,3,4-tiadiazol



Fonte: Elaborado pelo autor

Várias estratégias de síntese vêm sendo desenvolvidas visando a construção dos derivados de 1,3,4-tiadiazóis. Geralmente, esses derivados são obtidos em rotas simples através da ciclização de acilidrazinas (ARYANASAB; HALIMEHJANI; SAIDI, 2010), ditiocarbazatos (AL-OMAIR; SAYED; YOUSSEF, 2015), tiossemicarbazidas (YUAN *et al.*, 2018), tiossemicarbazonas (GURUNANJAPPA; KARIYAPPA, 2016) ou transformação de 1,3,4-oxadiazóis (LINGANNA; RAI, 1998) (Figura 14).

**Figura 14** – Estratégias de preparação dos derivados de 1,3,4-tiadiazóis



Fonte: Elaborado pelo autor

A grande versatilidade sintética para obtenção de derivados de 1,3,4-tiadiazóis, associada aos mais variados tipos de atividade biológica que esses compostos apresentam, vem estabelecendo esse heterociclo como promissor na descoberta de novas drogas com potencial atividade biológica (KAUR, 2017).

### 2.1.2. Uso da irradiação de micro-ondas em síntese orgânica

A ideia de que a irradiação de micro-ondas poderia ser utilizada como método de aquecimento foi descoberta acidentalmente em 1956, por Spencer, ao perceber que uma barra de chocolate que estava em seu bolso estava derretida após a exposição à radiação de micro-ondas. Logo, Spencer desenvolveu rapidamente a ideia e, no ano seguinte (1957), projetou o primeiro forno de micro-ondas para uso doméstico (OSEPCHUK, 2009).

Quatro décadas mais tarde, começaram os primeiros ensaios de síntese química assistida por radiação de micro-ondas. Em 1986, Gedye e Guiguerre utilizaram um micro-ondas doméstico para realizar as primeiras reações de síntese,

sem qualquer controle de temperatura ou pressão, onde descobriram que certas reações poderiam funcionar mil vezes mais rápido quando a radiação de micro-ondas substituía a fonte de aquecimento convencional (GEDYE *et al.*, 1986; GIGUERRE *et al.*, 1986).

Já na década de 90, começaram a surgir os primeiros reatores de micro-ondas com uso específico de laboratório, onde o controle de todos os parâmetros reacionais, tais como pressão, temperatura e potência, permitiram uma maior reprodutibilidade e segurança nos experimentos realizados (SOUZA; MIRANDA, 2011).

Geralmente, as reações químicas que são aquecidas através de uma fonte externa de calor (banho de óleo ou manta de aquecimento), são dependentes de processos de convecção e condução do calor e da condutividade térmica de diferentes materiais por onde o calor tem de penetrar, tornando o processo de aquecimento lento, onde muitas vezes a temperatura do vaso reacional é superior à da mistura reacional.

Já a utilização de micro-ondas proporciona um aquecimento mais eficiente, na qual as moléculas polares na mistura reacional absorvem diretamente essa radiação convertendo-a em calor através de dois mecanismos principais: polarização dipolar e condução iônica. No primeiro caso, está relacionado com o alinhamento das moléculas com o campo elétrico aplicado. Após a remoção desse campo, as moléculas voltam a um estado desordenado e a energia que foi absorvida é dissipada em forma de calor (LIDSTRÖM *et al.*, 2001). No campo elétrico com frequência de 2,45 GHz há uma oscilação de cerca de  $4,9 \times 10^9$  vezes por segundo, ocorrendo um pronto aquecimento das moléculas (SANSEVERINO, 2002).

No segundo caso, os íons presentes no meio reacional se movem dentro da solução com base na orientação do campo elétrico aplicado, ocasionando um aumento da temperatura do meio devido ao movimento de fricção e colisão das espécies envolvidas (PERREUX; LOUPY, 2001).

Geralmente, moléculas polares absorvem bem a energia de micro-ondas (água, acetonitrila, etanol), no entanto, moléculas menos polares (hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos) ou moléculas com momento de dipolo nulo ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ) absorvem micro-ondas mais fracamente.

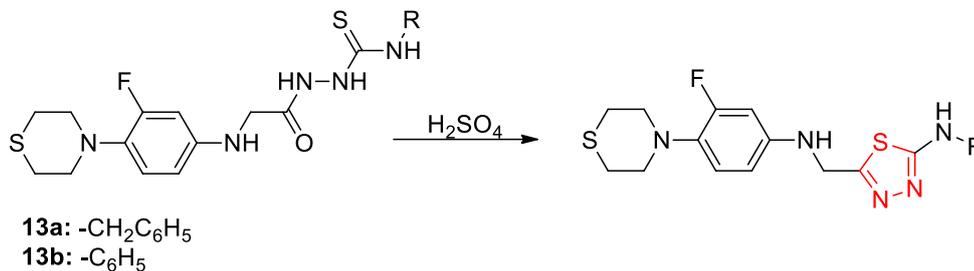
Esta tecnologia vem demonstrando muitas vantagens em várias áreas da química, desde o desenvolvimento de novas metodologias sintéticas até a aplicação

em processos industriais (LA HOZ; DÍAZ-ORTIZ; PRIETO, 2015). Dentre as principais vantagens, podemos destacar:

- ✓ Temperaturas reacionais mais elevadas mediante a combinação da radiação de micro-ondas com a utilização de vasos fechados;
- ✓ Tempo reacional reduzido, rendimentos elevados, diminuição de co-produtos, facilitando os processos de purificação;
- ✓ Utilização de solventes de baixo ponto de ebulição em vasos fechados sobre pressão e temperaturas elevadas (acima do ponto de ebulição do solvente);
- ✓ Possibilidade da utilização de catalisadores que absorvem fortemente a radiação;
- ✓ Possibilidade da não utilização de solventes;
- ✓ Monitoramento *on-line* da temperatura e pressão, permitindo uma maior reprodutibilidade;

Comprovadamente, além das inúmeras diferentes possibilidades de reações, há diversos relatos na literatura científica da utilização da irradiação de micro-ondas em síntese orgânica, com considerável diminuição do tempo reacional e melhorias nos rendimentos, comparados às metodologias que empregam reações à temperatura ambiente ou aquecimento convencional. Demirci e colaboradores (2017) prepararam novos 1,3,4-tiadiazóis (**15a-b**) com tempos reacionais de 120 minutos em aquecimento convencional. Sob irradiação de micro-ondas a 70 °C e empregando os mesmos substratos, foi possível obter os produtos com rendimentos melhorados em apenas 8 minutos de reação (Tabela 2).

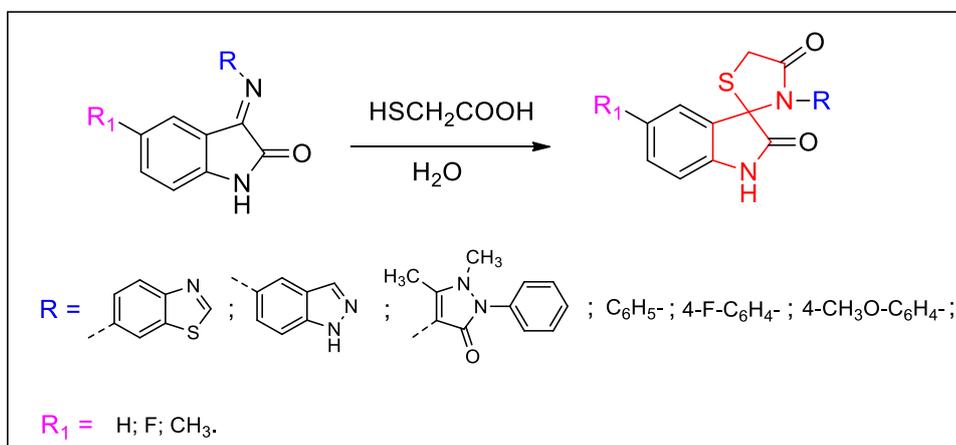
**Tabela 2** – Dados de tempo e rendimento de obtenção dos derivados de 1,3,4-tiadiazol com técnicas de irradiação de micro-ondas e aquecimento tradicional



Composto	Método	Temp. (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)
13a	Refluxo	70	120	78
13a	Micro-ondas	70	8	97
13b	Refluxo	70	120	67
13b	Micro-ondas	70	8	97

Em 2012, Panda e Jain adotaram uma metodologia rápida, eficiente e ecologicamente correta para obtenção de novos espiros derivados da isatina, utilizando água como solvente. As vantagens abordadas pelo autor são várias, dentre elas podemos destacar a não exigência de um catalisador ou reagente adicional, meio reacional não inflamável, alto rendimento, facilidade no isolamento e baixa ou nenhuma geração de resíduos. As reações que foram realizadas utilizando aquecimento convencional tiveram seus tempos reacionais de 4 a 5 horas de duração. Ao utilizar a irradiação de micro-ondas com os mesmos substratos, esse tempo foi reduzido para 5 minutos (PANDA; JAIN, 2012) (Esquema 3).

**Esquema 3** – Esquema reacional para a obtenção dos espiros derivados da isatina



Fonte: adaptado de Panda e Jain (2012)

Com base no exposto, observa-se o crescente interesse em moléculas que possuam em sua estrutura fragmentos de heterociclos os quais fazem parte da maioria das moléculas biologicamente ativas, inclusive em medicamentos já comercializados. Observa-se também que a utilização da tecnologia de micro-ondas vem se tornando essencial para obtenção destes compostos, diminuindo não somente os tempos reacionais, como também contribuindo para redução no tempo de desenvolvimento de uma droga, sendo de grande benefício na construção de novas bibliotecas de compostos para posterior avaliação em alvos biológicos e estudos da relação estrutura-atividade (REA).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Este trabalho teve como objetivo a síntese assistida por micro-ondas de novos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina, investigação *in silico* das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas e investigação preliminar *in vitro* das atividades antimicrobiana e anticâncer.

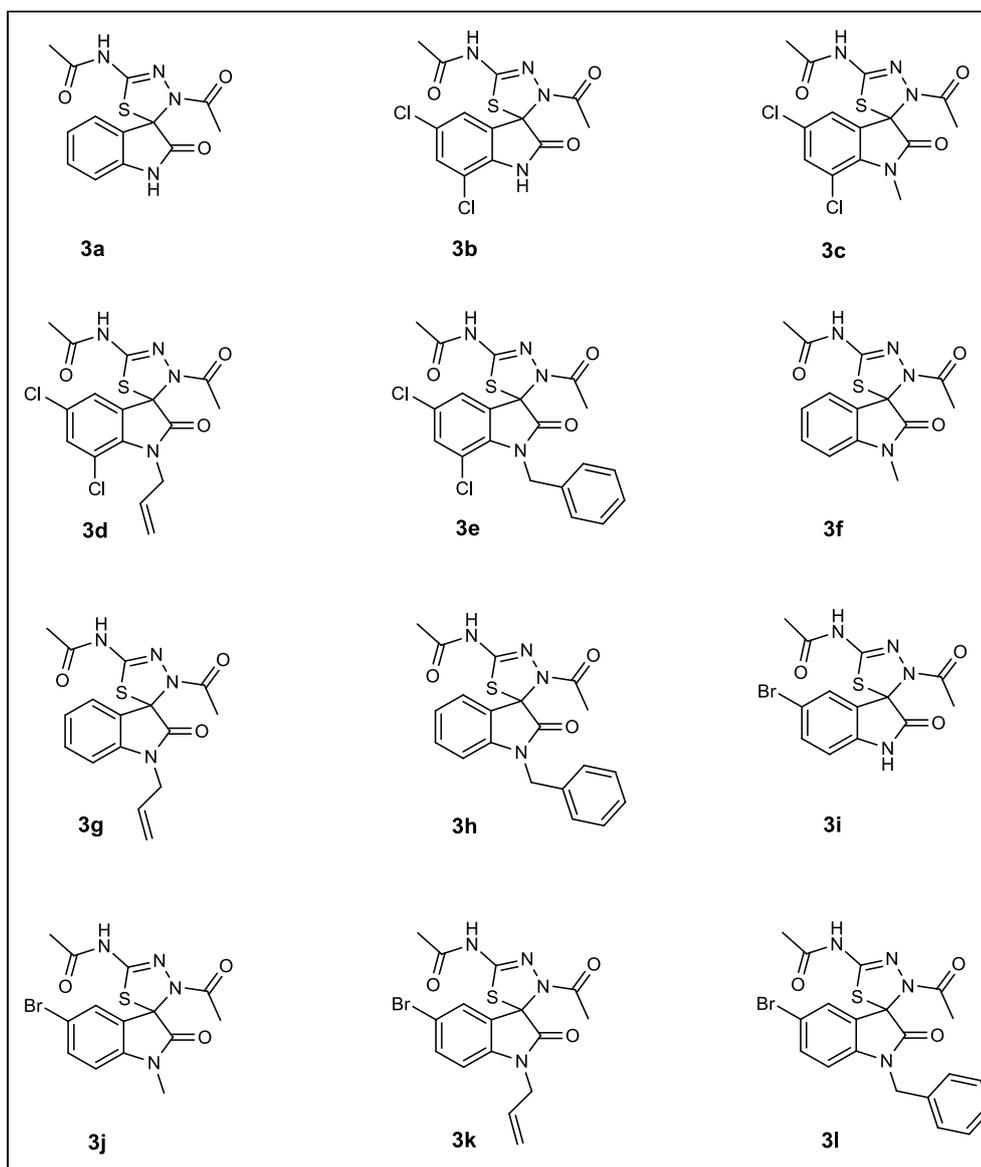
#### 3.2. Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar derivados da isatina clorados e *N*-alquilados (**1b – 1h; 1j – 1l**) a partir de reações de substituição eletrofílica aromática e substituição nucleofílica em carbono saturado, respectivamente;
- Sintetizar e caracterizar 12 tiossemicarbazonas (**2a – 2l**), sendo 4 delas inéditas, a partir da reação de condensação entre a isatina e derivados (**1a – 1l**) e a tiossemicarbazida, utilizando irradiação de micro-ondas;
- Sintetizar e caracterizar 12 espiros 1,3,4-tiadiazóis (**3a – 3l**), sendo 9 deles inéditos, a partir de reação de ciclização da tiossemicarbazona derivada da isatina, utilizando irradiação de micro-ondas;
- Avaliar o potencial teórico das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos espiros 1,3,4-tiadiazóis (**3a – 3l**) através de estudo *in silico*;
- Avaliar os espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina (**3a – 3l**) frente às atividades antimicrobiana e anticâncer (*in vitro*).

## 4. ESTRATÉGIA

A obtenção de moléculas funcionais com potenciais bioatividades através de curtas rotas sintéticas é uma tarefa importante na química orgânica sintética e medicinal. Tendo em vista o importante papel que os compostos heterocíclicos desempenham na Química Medicinal, com destaque para a isatina que vem servindo como bloco de construção (em inglês, *building block*) para descoberta de novas moléculas com potencial atividade biológica, a estratégia de trabalho inicial consiste na preparação de 12 espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina, mostrados na Figura 15, usando reator de micro-ondas como fonte de aquecimento.

**Figura 15** – Espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina propostos nesse trabalho

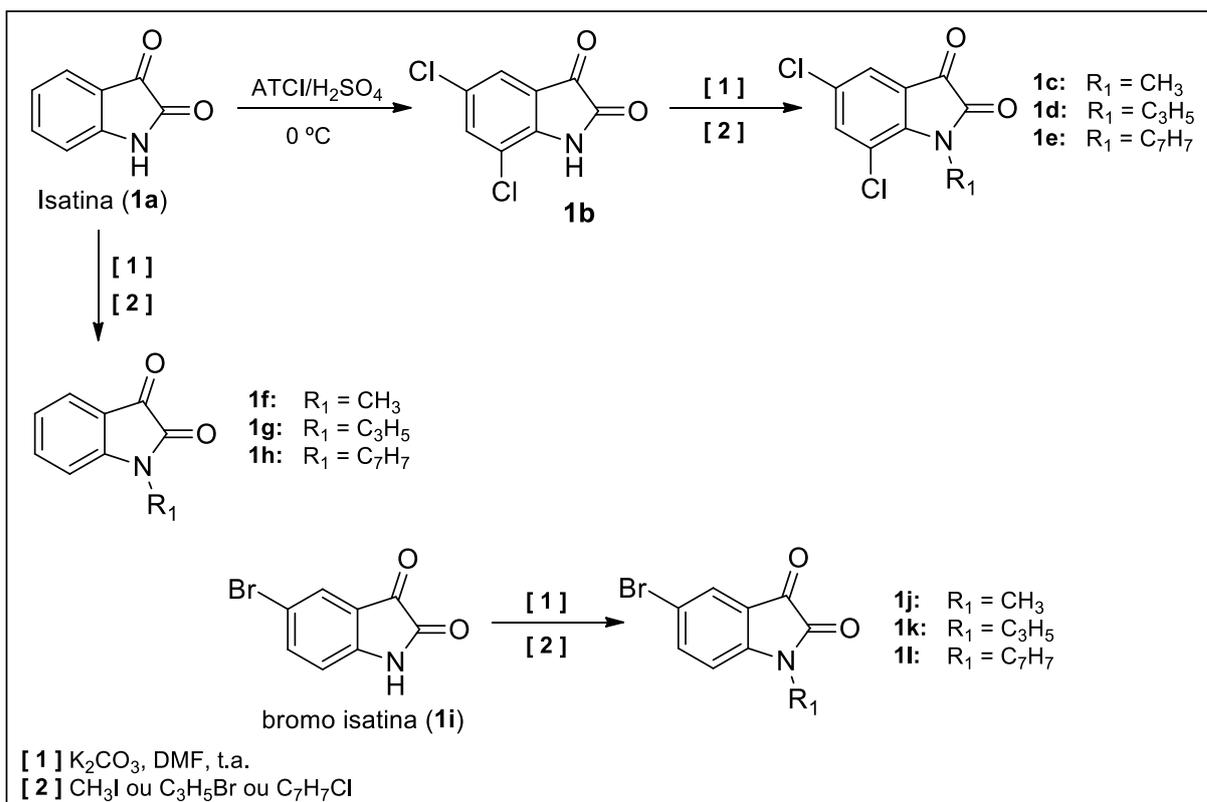


O planejamento sintético consiste inicialmente em utilizar a isatina **1a** como material de partida para a síntese de seu derivado diclorado **1b**. Para isto, inicialmente será realizada reação de substituição eletrofílica aromática de cloração na isatina **1a**, empregando ácido tricloroisocianúrico (ATCI) em meio de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Esquema 4), seguindo protocolo estabelecido na literatura (DA SILVA, 2010). A inserção de halogênios na porção aromática possui como objetivo a formação de um análogo com melhores características de absorção em membranas lipídicas, por tornar a estrutura mais lipofílica e menos hidrossolúvel, aumentando assim a sua atividade biológica (CHIMENTO *et al.*, 2019). Na literatura, facilmente é possível encontrar recentes trabalhos no qual derivados halogenados possuem propriedades farmacológicas superiores aos mesmos compostos não halogenados (AHMED *et al.*, 2019; VAMISSETTI *et al.*, 2019).

Em seguida, a isatina **1a** e bromo isatina **1i** (obtidos comercialmente), juntamente com o derivado diclorado **1b** (obtido anteriormente), serão submetidos a reações de *N*-alquilação utilizando iodeto de metila, brometo de alila e cloreto de benzila, para obtenção dos compostos (**1c–1h**; **1j–1l**), seguindo protocolos estabelecidos na literatura (MARTINEZ; FERREIRA, 2017; GARDEN; TORRES; PINTO, 2000). O principal objetivo desta etapa consiste investigar a influência da lipofilicidade nos resultados biológicos. Sabe-se que um alto valor deste parâmetro, resulta em uma baixa solubilidade, podendo ocasionar uma maior probabilidade do composto apresentar toxicidade *in vivo* e também uma desordenada interação *in vitro* da droga-receptor. Por outro lado, valores baixos de lipofilicidade implicará em propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) ruins (VOET; VOET, 2013; TESTA *et al.*, 2000).

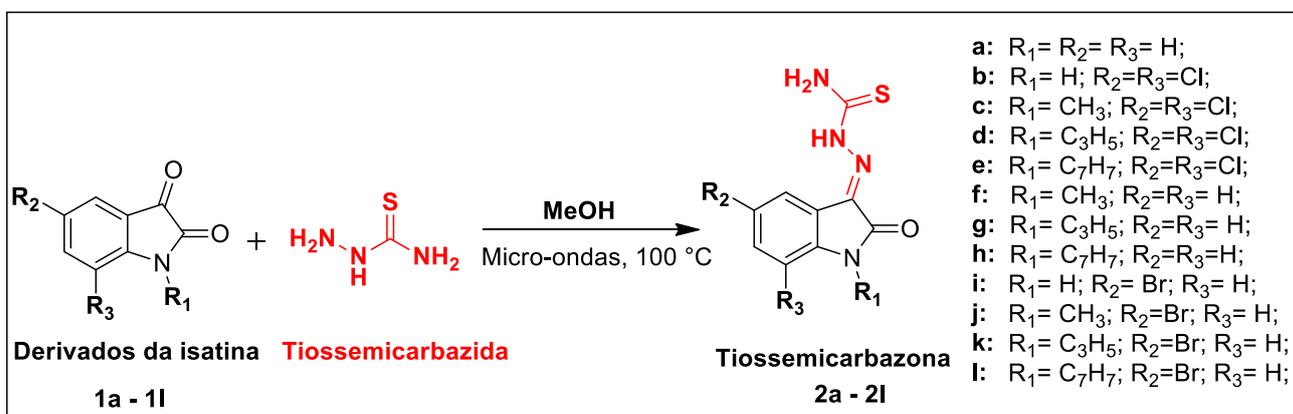
O Esquema 4 apresenta o caminho sintético adotado como estratégia para a obtenção dos derivados da isatina.

**Esquema 4 – Esquema reacional para a síntese dos derivados da isatina 1a-1l**



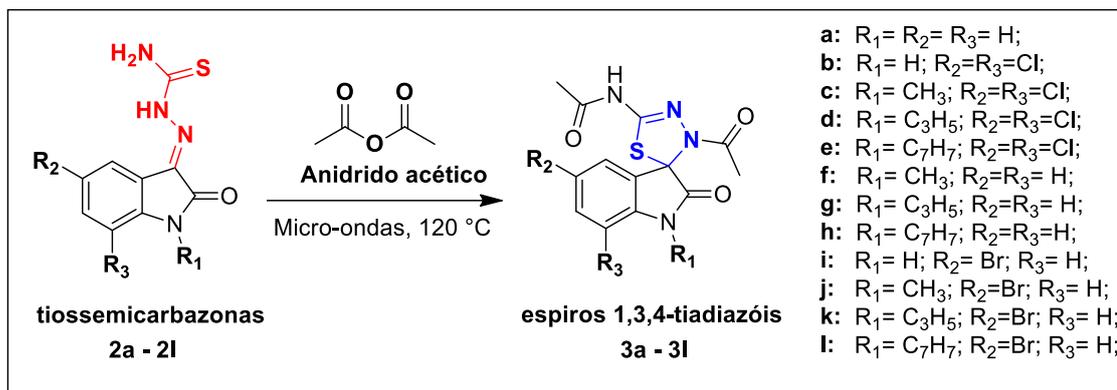
Na sequência, os derivados da isatina, incluindo a própria isatina **1a**, serão utilizados como materiais de partida, juntamente com a tiossemicarbazida, para a síntese das tiossemicarbazonas (**2a – 2l**). Esses compostos serão obtidos via condensação equimolar em meio alcoólico sob condições de radiação de micro-ondas, conforme esquema 5 (SILVA, 2018).

**Esquema 5 – Esquema reacional para a síntese das tiossemicarbazonas**



A etapa sintética final envolve a obtenção de novos espiros 1,3,4-tiadiazóis (**3a – 3l**), sob presença de anidrido acético e radiação micro-ondas como fonte de aquecimento (Esquema 6). A reação ocorre através da acetilação seguida da ciclização das tiossemicarbazonas sintetizadas (**2a – 2l**), com protocolo inicialmente adaptado de Somogyi (1993), Vahedi e colaboradores (2012), Mamun e colaboradores (2010).

**Esquema 6** – Esquema reacional para a síntese dos espiros 1,3,4-tiadiazóis



Todos os compostos sintetizados serão caracterizados por meio das técnicas espectroscópicas de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, sendo realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização Analítica da Universidade Federal da Paraíba.

Os compostos finais também passarão por um estudo (*in silico*), utilizando o programa SwissADME (disponível gratuitamente em <http://www.swissadme.ch/>) e seguindo os requisitos da Regra dos Cinco de Lipinski que avalia a probabilidade de uma substância ser um bom candidato a fármaco por via oral. Neste estudo, são avaliados parâmetros de massa molecular, número de aceptores de hidrogênio, número de doadores de hidrogênio, logP, refratividade molar.

Também reportamos o uso do programa *Osiris Property Explorer* (disponível gratuitamente em <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>) que permite desenhar as estruturas químicas e prever (*in silico*) a toxicidade do composto sintetizado, obtendo resultados a partir de comparações da molécula em estudo com um banco de dados de fragmentos estruturais presentes em fármacos de uso clínico.

A avaliação preliminar da atividade antimicrobiana e anticâncer (*in vitro*) dos compostos será realizada em colaboração com a professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima (Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB) e a professora

Dra. Gardenia Carmen Gadelha Militão (Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE), respectivamente.

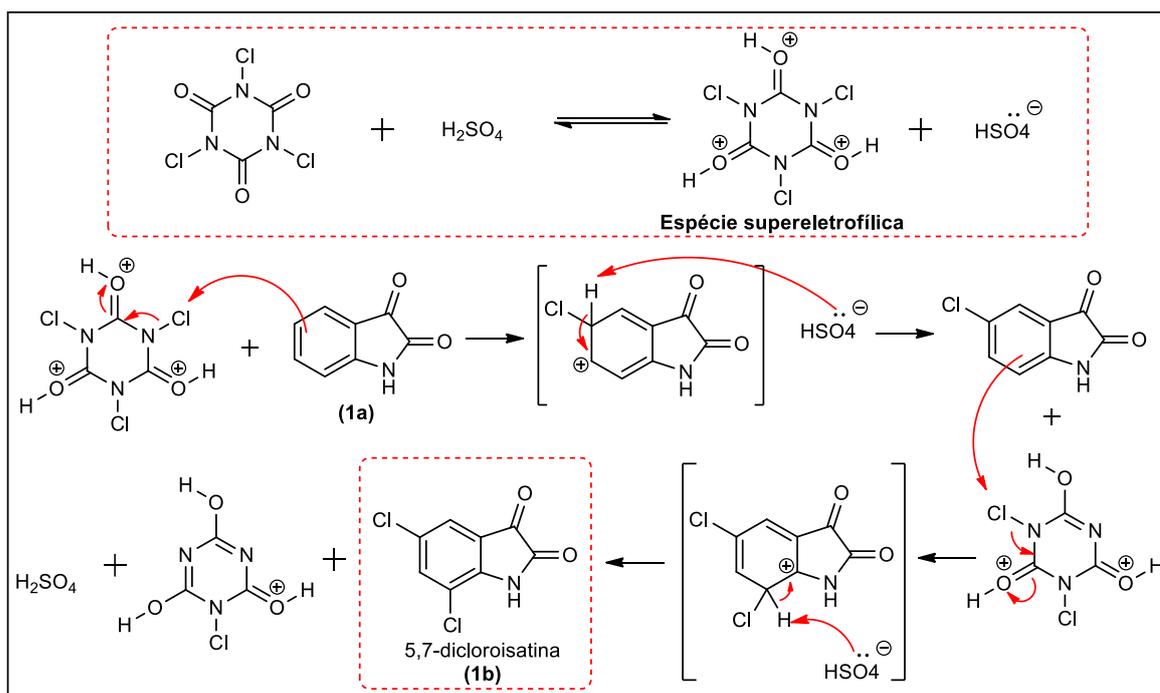
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Síntese dos derivados da isatina (1b - 1h; 1j - 1l)

A primeira etapa do trabalho consistiu na síntese da 5,7-dicloroisatina. Partindo da isatina comercial (**1a**), utilizou-se o ácido tricloroisocianúrico (ATCI) juntamente com o ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), afim de realizar uma reação de substituição eletrofílica no anel aromático presente na isatina (Esquema 4). A formação do produto foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), na qual foi possível verificar o consumo total da isatina após 30 minutos de reação. O produto desta síntese consistiu em um sólido amarelado e apresentou rendimento de 89%, levemente superior ao obtido por Da Silva e colaboradores (2010).

O mecanismo da reação é descrito no Esquema 7 e propõe-se a formação de uma espécie supereletrofílica, onde o ATCI aparece poliprotonado, promovendo a transferência de "Cl<sup>+</sup>" para o núcleo aromático da isatina de forma mais eficiente devido ao alívio da repulsão carga-carga (MENDONÇA *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2010). No caso da isatina, as posições do C-5 e C-7, orto e para em relação ao nitrogênio do heterociclo, são as mais favorecidas neste tipo de reação.

**Esquema 7** – Mecanismo de síntese da 5,7-dicloroisatina



Fonte: adaptado de MENDONÇA *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2010

Posteriormente, a isatina (**1a**), 5,7-dicloroisatina (**1b**) e a bromo isatina (**1i**), foram submetidas à reação de *N*-alquilação via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), seguindo a metodologia já citada anteriormente (MARTINEZ; FERREIRA, 2017; GARDEN; TORRES; PINTO, 2000). Utilizou-se como agentes alquilantes o iodeto de metila, brometo de alila e cloreto de benzila, juntamente com um solvente polar aprótico (DMF) e uma base fraca ( $K_2CO_3$ ) (Esquema 4). As reações foram realizadas em temperatura ambiente e foi possível observar através de CCD, o consumo total dos substratos (**1a**; **1b**; **1i**) e a formação dos produtos desejados após 120 minutos de reação.

Estudos apontam que, a escolha do sistema  $K_2CO_3$ -DMF em reações de *N*-alquilação da isatina, vem apresentando rendimentos superiores quando comparado a outros sistemas base-solvente. Isso pode ser atribuído a dois fatores: devido à maior polaridade do solvente que permite uma solvatação mais efetiva do cátion presente no meio reacional e também a força da base utilizada (fraca), visto que a utilização de bases muito mais fortes levarão à reação de substituição entre o agente alquilante e o íon hidroxido (CHEN *et al.*, 2011). A Tabela 3 apresenta os derivados da isatina alquilados sintetizados com os seus respectivos rendimentos.

**Tabela 3** – Rendimentos isolados para a obtenção dos derivados de isatina *N*-alquilados

Produto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Rendimento (%)
<b>1c</b>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	81
<b>1d</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Cl	Cl	62
<b>1e</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Cl	Cl	78
<b>1f</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	93
<b>1g</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	79
<b>1h</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	H	H	87
<b>1j</b>	CH <sub>3</sub>	Br	H	87
<b>1k</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Br	H	71
<b>1l</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Br	H	82

Todos os derivados obtidos após as alquilações apresentaram moderados a bons rendimentos, com destaque para os derivados metilados (**1c**, **1f** e **1j**), onde foram obtidos os melhores rendimentos reacionais (81%, 93% e 87%). Mesmo com a total conversão dos substratos utilizados, a não obtenção de melhores rendimentos está

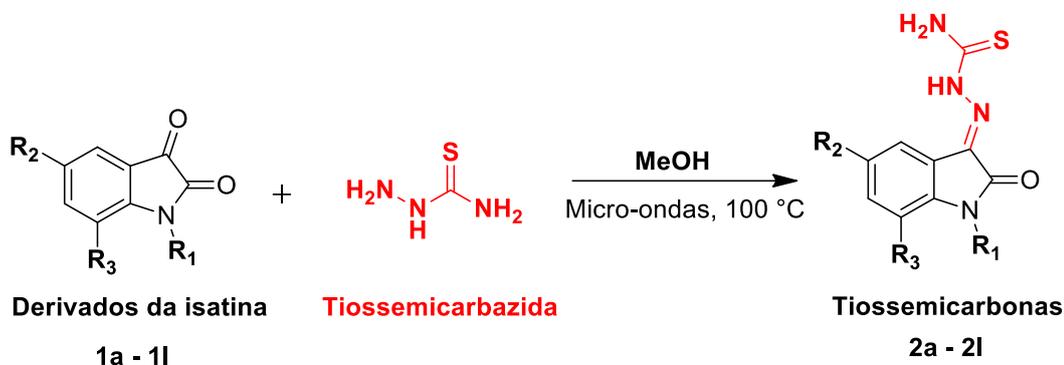
diretamente associado à escolha do solvente (DMF). Sua alta polaridade associado ao seu alto ponto de ebulição, se torna um empecilho na hora de purificação dos produtos. Vale salientar que outros solventes polares apróticos também foram testados (THF, acetonitrila) com objetivo de contornar este problema, mas não se observou a conversão total do material de partida mesmo após dois dias de reação.

## 5.2. Síntese das tiossemicarbazonas derivadas da isatina (2a - 2l)

Para a síntese das tiossemicarbazonas (**2a - 2l**), foi realizada uma reação de condensação envolvendo uma amina primária (tiossemicarbazida) e a carbonila cetônica presente nos derivados da isatina, promovendo a formação de uma imina e liberação de água.

As reações foram realizadas em meio neutro, utilizando apenas metanol como solvente e irradiação de micro-ondas na temperatura de 100 °C, em que os parâmetros reacionais utilizados foram previamente otimizados por Silva (2018). O consumo total dos derivados da isatina e da própria isatina, foi acompanhado por CCD em ciclos de 15 minutos. Após o término das reações, verificou-se a conversão total do material de partida e a formação de precipitados de coloração amarela, indicando a formação das tiossemicarbazonas. Os produtos foram filtrados à pressão reduzida, em funil de Büchner, e lavados com metanol gelado. Não se fez a utilização de catálise ácida para a obtenção dos produtos, tendo em vista que alguns autores afirmam que a utilização do ácido não seria uma condição indispensável para a obtenção dessas moléculas (AFRASIABI *et al.*, 2003; CHIYANZU *et al.*, 2003; SHAIENDRA *et al.*, 2003). As condições reacionais e os rendimentos para a obtenção das tiossemicarbazonas podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4** – Rendimentos e tempos reacionais para obtenção de **2a - 2l**



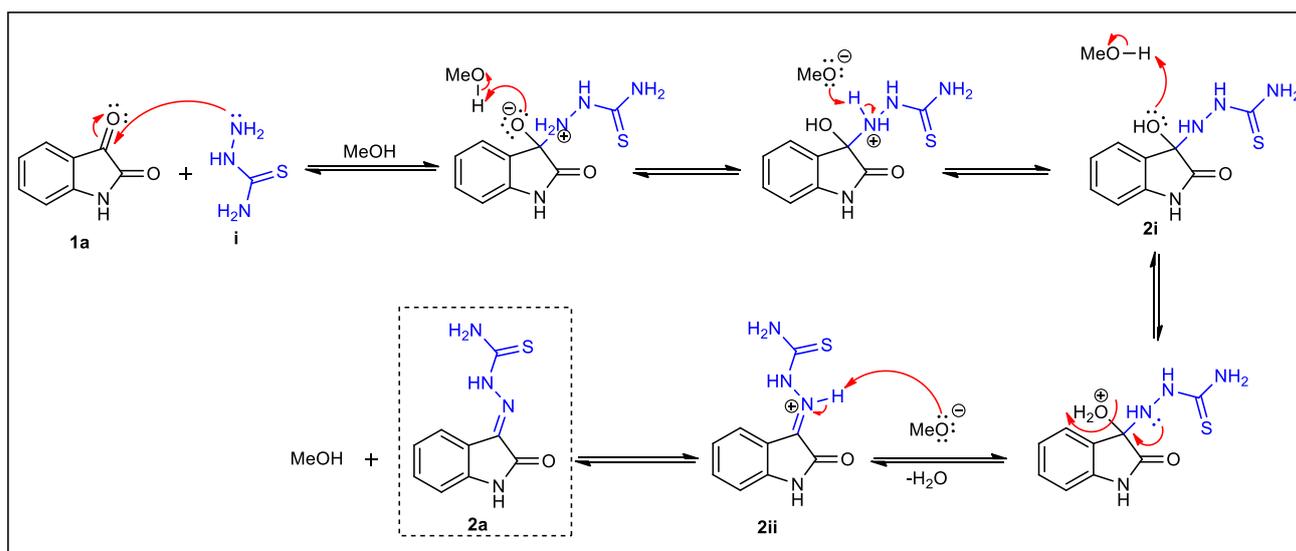
Entrada	Produto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Tempo (min)	Rendimento (%)
1	<b>2a</b>	H	H	H	<b>45</b>	<b>67</b>
2	<b>2b</b>	H	Cl	Cl	<b>45</b>	<b>51</b>
3	<b>2c</b>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	<b>30</b>	<b>63</b>
4	<b>2d</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Cl	Cl	<b>30</b>	<b>53</b>
5	<b>2e</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Cl	Cl	<b>30</b>	<b>57</b>
6	<b>2f</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	<b>30</b>	<b>75</b>
7	<b>2g</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	<b>30</b>	<b>64</b>
8	<b>2h</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	H	H	<b>30</b>	<b>87</b>
9	<b>2i</b>	H	Br	H	<b>30</b>	<b>77</b>
10	<b>2j</b>	CH <sub>3</sub>	Br	H	<b>45</b>	<b>88</b>
11	<b>2k</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Br	H	<b>45</b>	<b>73</b>
12	<b>2l</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Br	H	<b>45</b>	<b>81</b>

Pode-se observar que os parâmetros empregados para obtenção das tiossemicarbazonas se mostraram satisfatórios, formando produtos em tempos reacionais que variaram de 30 a 45 minutos e rendimentos moderados (51 - 88%), não havendo formação de co-produtos. Uma provável explicação para a não obtenção de melhores rendimentos está na escolha do solvente. A alta polaridade do metanol, utilizado no processo de obtenção dos produtos, faz com que o rendimento obtido após a filtragem do precipitado seja menor do que o esperado, tendo em vista que o

metanol solubiliza uma parte do produto. Uma saída simples é tentar investigar a reação utilizando um álcool menos polar.

Utilizando a isatina **1a** como padrão para o melhor esclarecimento da formação das tiossemicarbazonas, no Esquema 8 está detalhado o mecanismo proposto. Na primeira etapa do mecanismo para formação da tiossemicarbazona (**2a**) (imina), a carbonila presente na isatina (**1a**) sofre um ataque nucleofílico da amina presente na tiossemicarbazida (**i**). Logo em sequência, ocorrem duas transferências de prótons até a formação de uma carbinolamina (**2i**). Posteriormente, ocorre a protonação da hidroxila convertendo-se assim em um excelente grupo de saída (**H<sub>2</sub>O**). Logo, ocorre a perda do grupo de saída para a formação da ligação C=N. Por fim, o intermediário (**2ii**) é desprotonado gerando uma imina (**2a**).

**Esquema 8** – Mecanismo para obtenção das tiossemicarbazonas em solução neutra

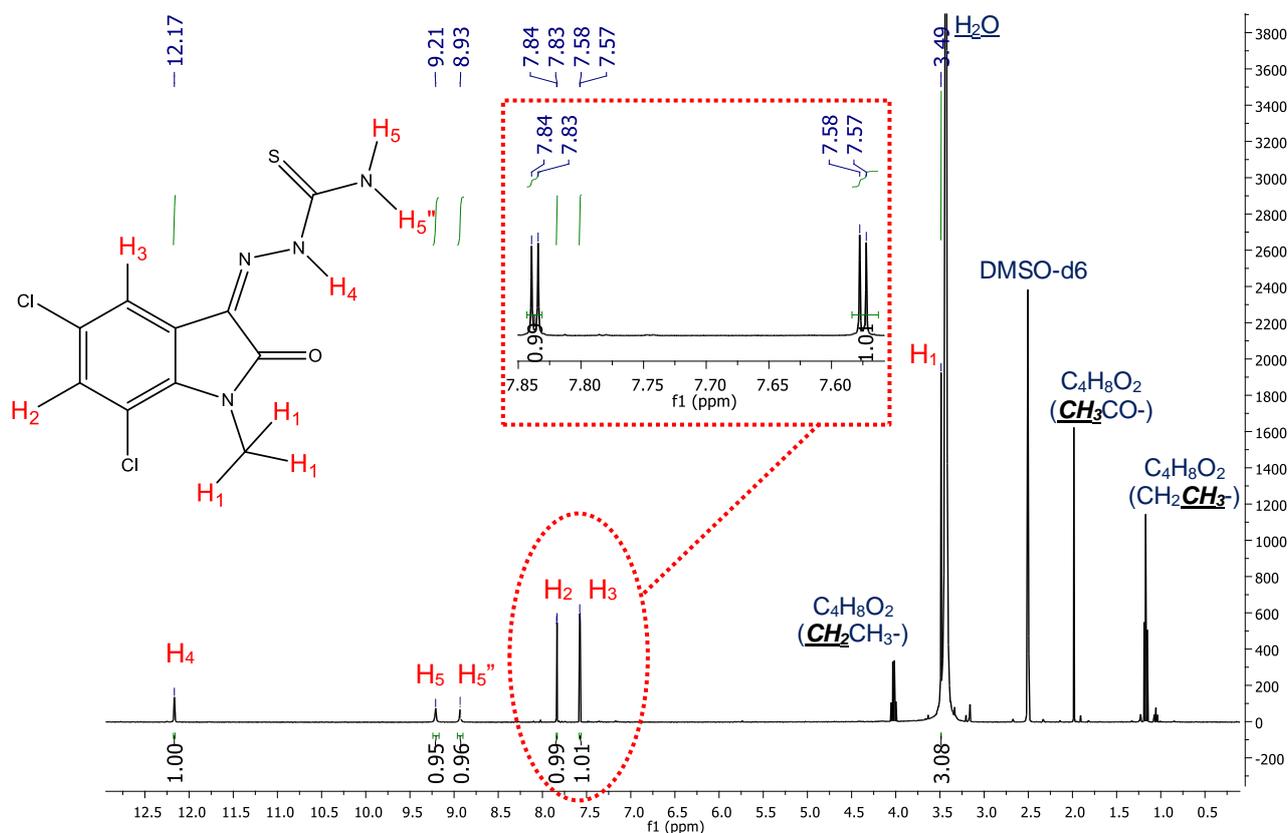


Fonte: adaptado de Bruice, 2006.

Todas as tiossemicarbazonas sintetizadas no presente trabalho foram caracterizadas por técnicas espectroscópicas (RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e seus dados espectroscópicos foram confirmados na literatura, isto com a finalidade de serem utilizadas posteriormente na síntese dos espiro-compostos.

Levando em consideração a semelhança das tiossemicarbazonas sintetizadas e a manutenção dos sinais nos espectros de RMN (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C), será apresentada uma análise de RMN <sup>1</sup>H da tiossemicarbazona inédita (**2c**), cujo o espectro é apresentado na Figura 16.

Figura 16 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) de **2c**

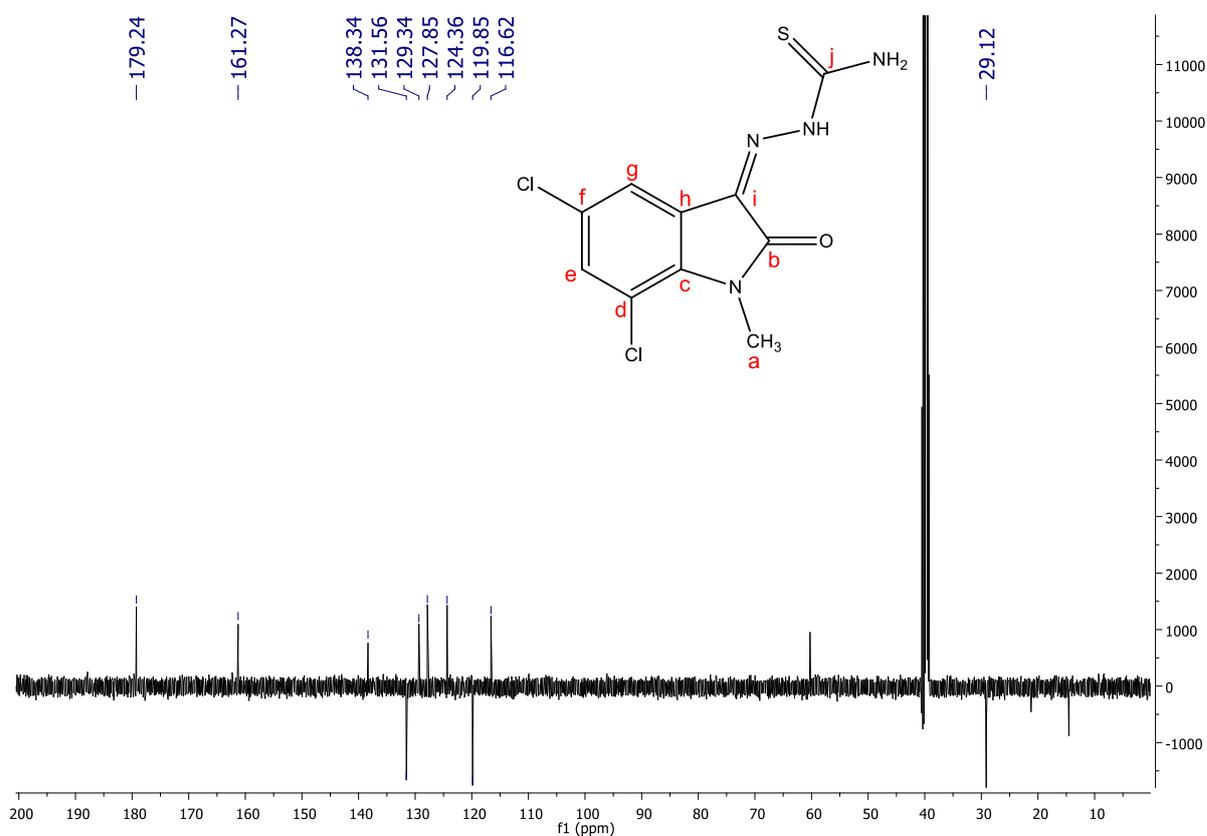


Ao analisar o espectro de RMN  $^1\text{H}$ , é possível constatar a formação do produto desejado, devido ao aparecimento dos três sinais característicos da tiossemicarbazona (**2c**), além da quantidade exata de hidrogênios presentes na molécula. A presença de um singlete em 12,17 ppm correspondente ao hidrogênio tioamídico (H<sub>4</sub>) que, por apresentar átomos eletronegativos ao seu redor, tem sua densidade eletrônica reduzida, tornando-o mais desblindado (PAVIA *et al.*, 2012). Esse efeito é menos pronunciado no caso dos hidrogênios H<sub>5</sub> e H<sub>5</sub>'', onde aparecem como dois sinais não equivalentes em 9,21 e 8,93 ppm. Isso é ocasionado devido a ressonância entre o par de elétrons não compartilhados no nitrogênio e o enxofre, deixando a rotação da ligação C-NH<sub>2</sub> restrita, tornando os hidrogênios diastereotópicos (PAVIA *et al.*, 2012; TENÓRIO *et al.*, 2005).

Os hidrogênios da região aromática (H<sub>2</sub> e H<sub>3</sub>) apresentaram dois dubletos entre 7,84 e 7,57 ppm, e ambos com constante de acoplamento de  $J = 2,1$  Hz, correspondente ao acoplamento *meta* que ocorre entre eles. O singlete em 3,39 ppm corresponde aos hidrogênios metílicos (H<sub>1</sub>), mais desblindados por estarem mais próximos do nitrogênio amídico e quase se sobrepondo ao sinal da água presente no

DMSO-*d*<sub>6</sub>. Nota-se a presença de água (singlete em 3,43 ppm) e acetato de etila residuais (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>- triplete em 1,17 ppm, CH<sub>3</sub>CO- singlete em 1,99 ppm e CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>- quarteto em 4,03 ppm), oriundos do processo de purificação, onde os respectivos deslocamentos químicos foram confirmados por Fulmer e colaboradores (2010).

**Figura 17** – Espectro de RMN <sup>13</sup>C–APT (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) de **2c**



A Figura 17 apresenta o espectro de RMN <sup>13</sup>C – APT obtido para a mesma tiossemicarbazona (**2c**). Uma análise mais detalhada do espectro permite verificar a presença do carbono tioamídico C=S (**j**) em 179,24 ppm e o carbono amídico C=O (**b**) em 161,27 ppm na região mais desblindada do espectro, devido ao ambiente químico mais rico em átomos eletronegativos, em comparação aos demais carbonos. Contemplando os valores de deslocamentos químicos de carbonos do anel aromático que variam de 110 a 175 ppm (PAVIA *et al.*, 2012), pode-se observar dois sinais voltados para baixo no espectro, em 119,85 e 131,59 ppm, estando correlacionados aos únicos carbonos hidrogenados (**e**) e (**g**).

Os deslocamentos químicos revelados na faixa de 138,34 a 116,62 ppm são correspondentes aos carbonos não hidrogenados do anel aromático (h, c, d, f) e também ao carbono imínico (i), onde ambos estão de acordo com tabelas de correlação (PAVIA *et al.*, 2012). Para uma maior precisão na caracterização dos carbonos quaternários, é necessário um experimento de correlação heteronuclear indireta HSBC.

Verifica-se também a presença de acetato de etila residual e os sinais referentes a este contaminante não foram destacados na figura. A presença deste solvente foi confirmada utilizando como base os valores de deslocamento químico reportados por Fulmer e colaboradores (2010).

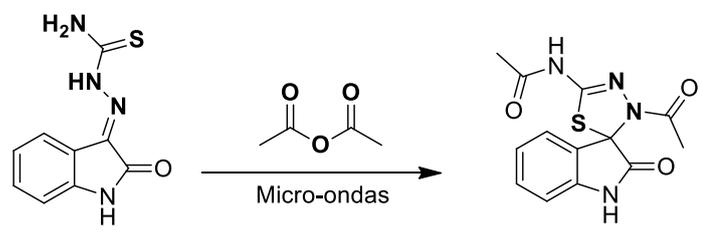
As demais tiossemicarbazonas também foram caracterizadas por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a confirmação da estrutura, seus dados espectroscópicos podem ser observados na Seção 7, referente à Parte Experimental e seus espectros encontram-se na seção de Espectros ao final do trabalho.

### **5.3. Síntese dos novos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina (3a - 3l)**

Poucos protocolos sintéticos são descritos na literatura para a obtenção de espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina. Comumente é uma reação que utiliza a tiossemicarbazona derivada da isatina e excesso de anidrido acético. Os tempos reacionais variam de 1,25 a 4 horas em aquecimento convencional (SOMOGYI, 1993; KAUR *et al.*, 2010; VAHEDI *et al.*, 2012) e de 3 a 4 minutos utilizando um forno de micro-ondas doméstico adaptado (MAMUN *et al.*, 2010).

Ciente disso, submetemos as três primeiras reações de preparação do espiro 1,3,4-tiadiazol (**3a**) sob condições de irradiação de micro-ondas (Tabela 5), variando apenas a temperatura e avaliando por CCD (em ciclos de 6 minutos), o tempo mínimo requerido para que houvesse o consumo total da tiossemicarbazona (**2a**). Como todos os protocolos sintéticos descritos na literatura, até presente momento, utilizam um excesso de anidrido acético, utilizou-se em todas as entradas 3,5 mL do mesmo.

**Tabela 5** – Investigação do parâmetro temperatura para a síntese de **3a**



The reaction scheme shows the conversion of thiosemicarbazone (2a) to spiro 1,3,4-thiadiazol (3a). The starting material (2a) is a benzimidazole derivative with a thiosemicarbazone group. It reacts with acetic anhydride in the presence of microwave irradiation to form the spiro product (3a), which is a benzimidazole with a spiro-fused 1,3,4-thiadiazole ring system.

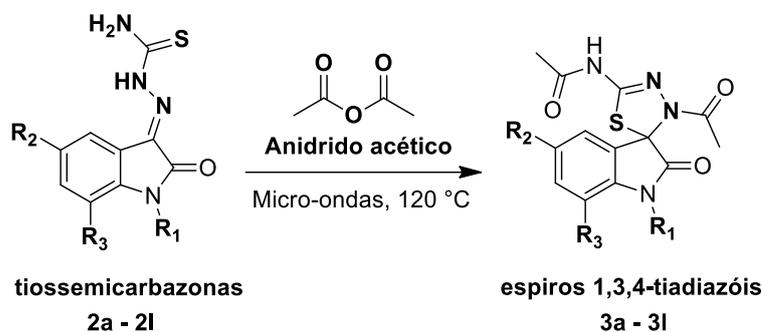
Entrada <sup>a</sup>	Temperatura (°C)	Tempo (min) <sup>b</sup>	Rendimento (%) <sup>c</sup>
1	80	18	85
2	100	12	87
3	120	6	82

<sup>a</sup> Reações usando 0,5 mmol da tiossemicarbazona (**2a**) e 3,5 mL de anidrido acético; <sup>b</sup> ciclos de 6 minutos acompanhado por CCD; <sup>c</sup> rendimento isolado.

Com base nos resultados obtidos na preparação do espiro 1,3,4-tiadiazol (**3a**), podemos observar que o aumento da temperatura no reator de micro-ondas diminuiu gradativamente o tempo reacional. Observou-se também a conversão total do material de partida e a formação dos mesmos produtos, independente da temperatura utilizada, apresentando os mesmos valores de  $R_F$  correspondentes à placa de CCD.

Levando-se em consideração que os artigos utilizados como referência não detalham aspectos sintéticos como, por exemplo, a possível formação de co-produtos e aspectos relacionados à purificação dos produtos desejados, procedemos a síntese dos demais espiros utilizando irradiação de micro-ondas a 120 °C. Após a purificação dos produtos, os resultados dos procedimentos reacionais foram apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Dados experimentais obtidos na obtenção dos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina (**3a-3l**)



Entrada <sup>a</sup>	Produto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Tempo (min) <sup>b</sup>	Rendimento (%) <sup>c</sup>
1	<b>3a</b>	H	H	H	6	82
2	<b>3b</b>	H	Cl	Cl	6	36
3	<b>3c</b>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	6	88
4	<b>3d</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Cl	Cl	6	81
5	<b>3e</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Cl	Cl	6	65
6	<b>3f</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	6	62
7	<b>3g</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	6	70
8	<b>3h</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	H	H	6	90
9	<b>3i</b>	H	Br	H	6	25
10	<b>3j</b>	CH <sub>3</sub>	Br	H	18	57
11	<b>3k</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Br	H	18	61
12	<b>3l</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Br	H	18	65

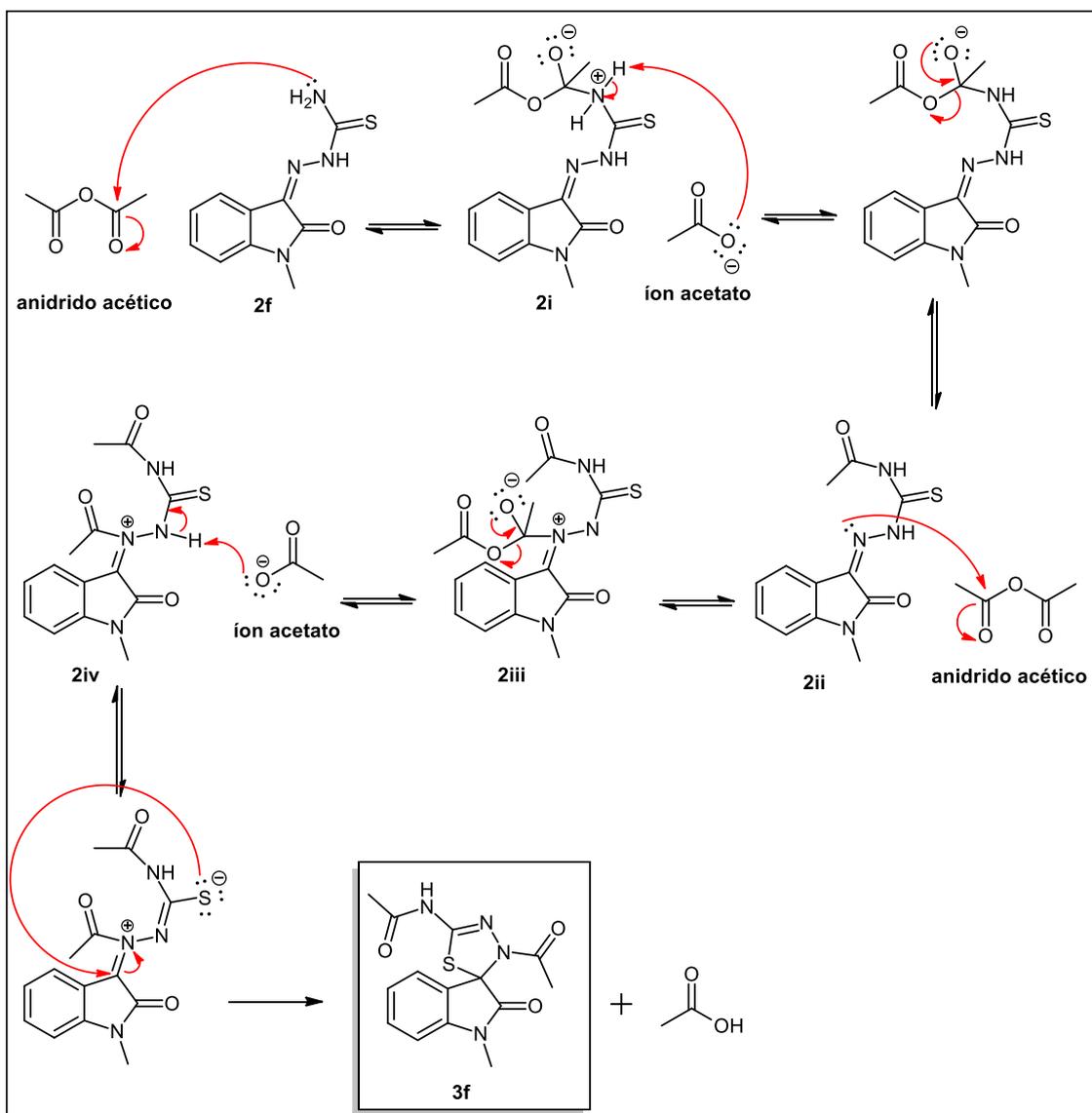
<sup>a</sup> Reações usando 0,5 mmol da tiossemicarbazona (**2a**) e 3,5 mL de anidrido acético; <sup>b</sup> ciclos de 6 minutos acompanhado por CCD; <sup>c</sup> rendimento isolado.

Analisando a série dos espiros 1,3,4-tiadiazóis não *N*-substituídos (**3a**, **3b**, **3i**), pôde-se observar, com exceção da molécula **3a**, que todas apresentaram um rendimento baixo frente às outras moléculas (**3b**, 36%; **3i**, 25%). Um fator considerável para a explicação desse baixo rendimento consiste na presença de halogênios na porção aromática da isatina que pode facilitar a acetilação do nitrogênio amídico levando a uma maior quantidade de co-produtos no meio reacional. Este empecilho ocasiona uma maior dificuldade na separação dos componentes presentes na mistura

por coluna cromatográfica. Já com as moléculas *N*-substituídas, os rendimentos foram satisfatórios, obtendo um rendimento máximo de 90% para o espiro 1,3,4-tiadiazol **3h**.

O Esquema 9 mostra a proposta mecanística para obtenção do espiro 1,3,4-tiadiazol derivado da isatina (**3f**) adaptado de Kubota e colaboradores, 1980. A primeira etapa envolve o ataque nucleofílico da amina primária presente na tiossemicarbazona metilada (**2f**) ao carbono da carbonila do anidrido acético, formando um intermediário tetraédrico (**2i**). Em seguida, o íon acetato que se encontra presente em equilíbrio reacional, abstrai um hidrogênio do cátion amônio presente em **2i**. Na sequência, a carbonila é restaurada devido a perda do grupo de saída, o íon acetato, formando **2ii**. Outro ataque nucleofílico acontece, desta vez, envolvendo o par de elétrons presente no nitrogênio da imina do composto **2ii**, formando um intermediário tetraédrico (**2iii**). Novamente a carbonila é restaurada por perda de um grupo de saída, o íon acetato, dando origem ao composto **2iv**. Por fim, na etapa final, ocorre uma abstração de hidrogênio presente no átomo de nitrogênio pelo íon acetato, ocorrendo um rearranjo que favorece a ciclização e a formação do espiro 1,3,4-tiadiazol. O mecanismo de formação do produto pode ser explicado com base na teoria de Pearson (*HSAB*, acrônimo do inglês *hard and soft acid and bases*), onde as acilações ocorrem nos átomos de nitrogênio mais duros presentes na tiossemicarbazona, ao invés do átomo de enxofre, que, por sua vez, é mole (KUBOTA *et al.*, 1980).

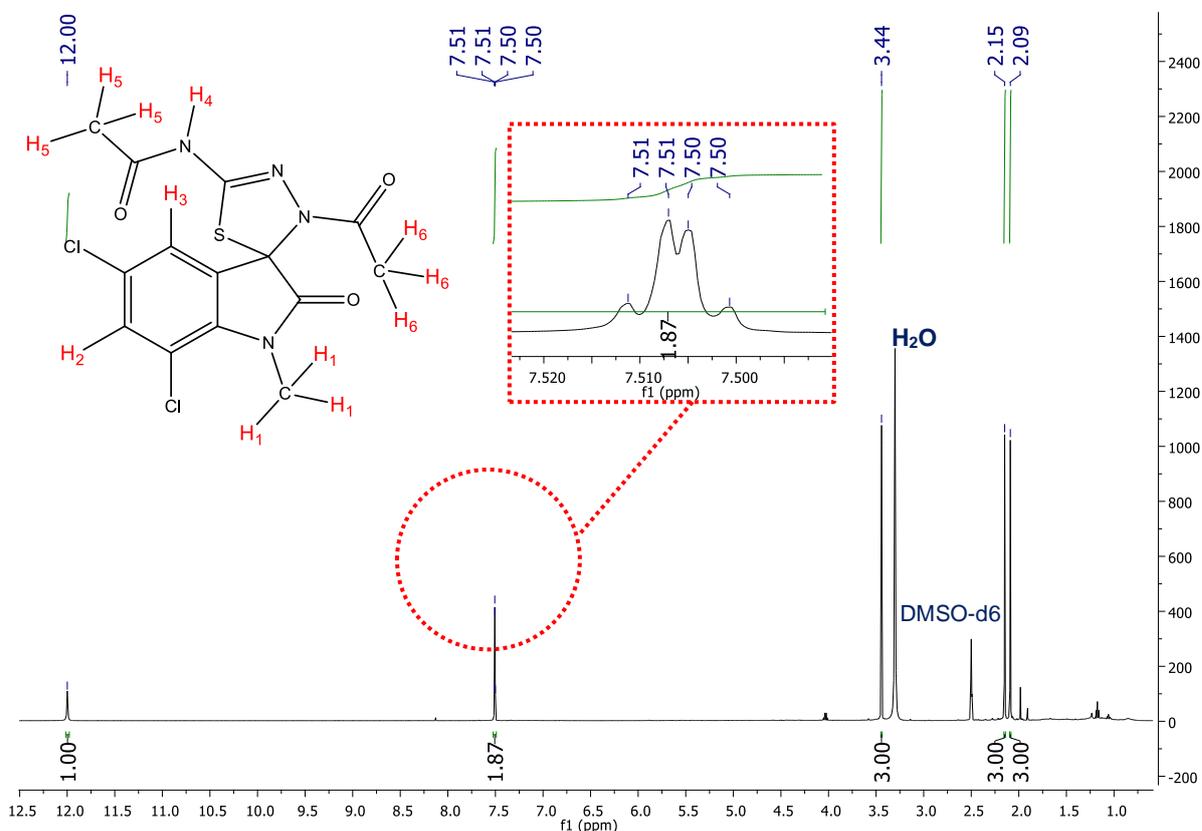
**Esquema 9** – Mecanismo proposto para a obtenção dos espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina



**Fonte:** adaptado de Kubota *et al.* (1980)

A identificação destes 12 espiros 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina foi realizada através da avaliação dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Os compostos **3c**, **3b** e **3d** foram escolhidos para apresentar a caracterização dos espiros, mostrados nos espectros das Figuras 18 – 23.

Figura 18 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **3c**

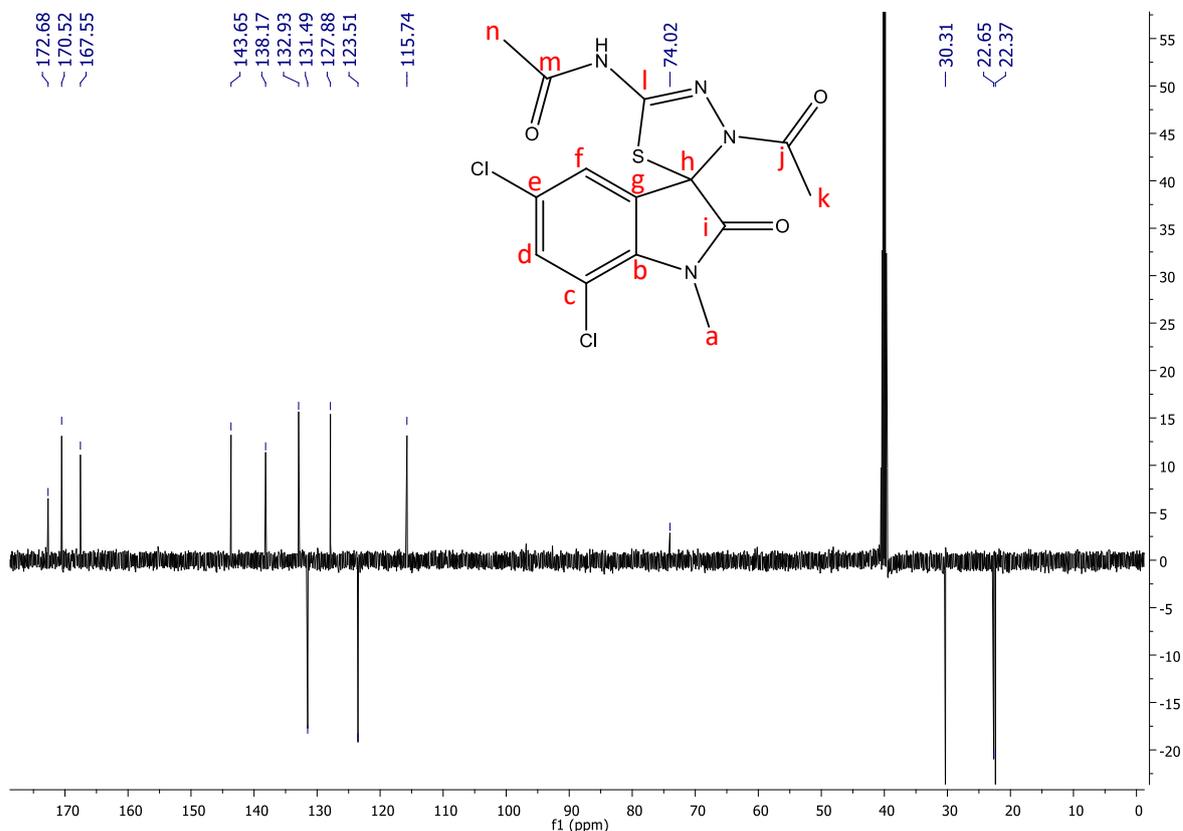


A caracterização por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  para a molécula **3c** demonstrou o sucesso na formação do espiro 1,3,4-tiadiazol. Podemos observar na Figura 18 o desaparecimento dos sinais característicos dos hidrogênios da tiossemicarbazona (**2c**), como por exemplo os singletos do grupo  $-\text{NH}_2$  em 9,21 e 8,93 ppm. Associado a isso, nota-se o aparecimento de dois singletos em 2,15 e 2,09 ppm que estão relacionados aos hidrogênios  $\alpha$  amídicos (H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub>) (PAVIA *et al.*, 2012) oriundos da acetilação da tiossemicarbazona, que são condizentes aos dados da literatura para compostos similares (SOMOGYI, 1993; MANUN *et al.*, 2010).

Os dois hidrogênios aromáticos (H<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>) apresentaram um dubleto entre 7,51 a 7,50 ppm, possuindo uma constante de acoplamento de  $J = 2,1$  Hz. Esta constante indica a ocorrência de um acoplamento *meta* entre eles, mas desta vez, é possível verificar a sobreposição entre esses dois sinais quando comparado ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  da tiossemicarbazona (**2c**) apresentado na Figura 16, onde ocorre a mesma

constante de acoplamento. O singleto localizado na região mais desblindada do espectro, em 12 ppm, corresponde ao hidrogênio ligado ao nitrogênio amídico ( $H_4$ ).

**Figura 19** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – APT (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) de **3c**



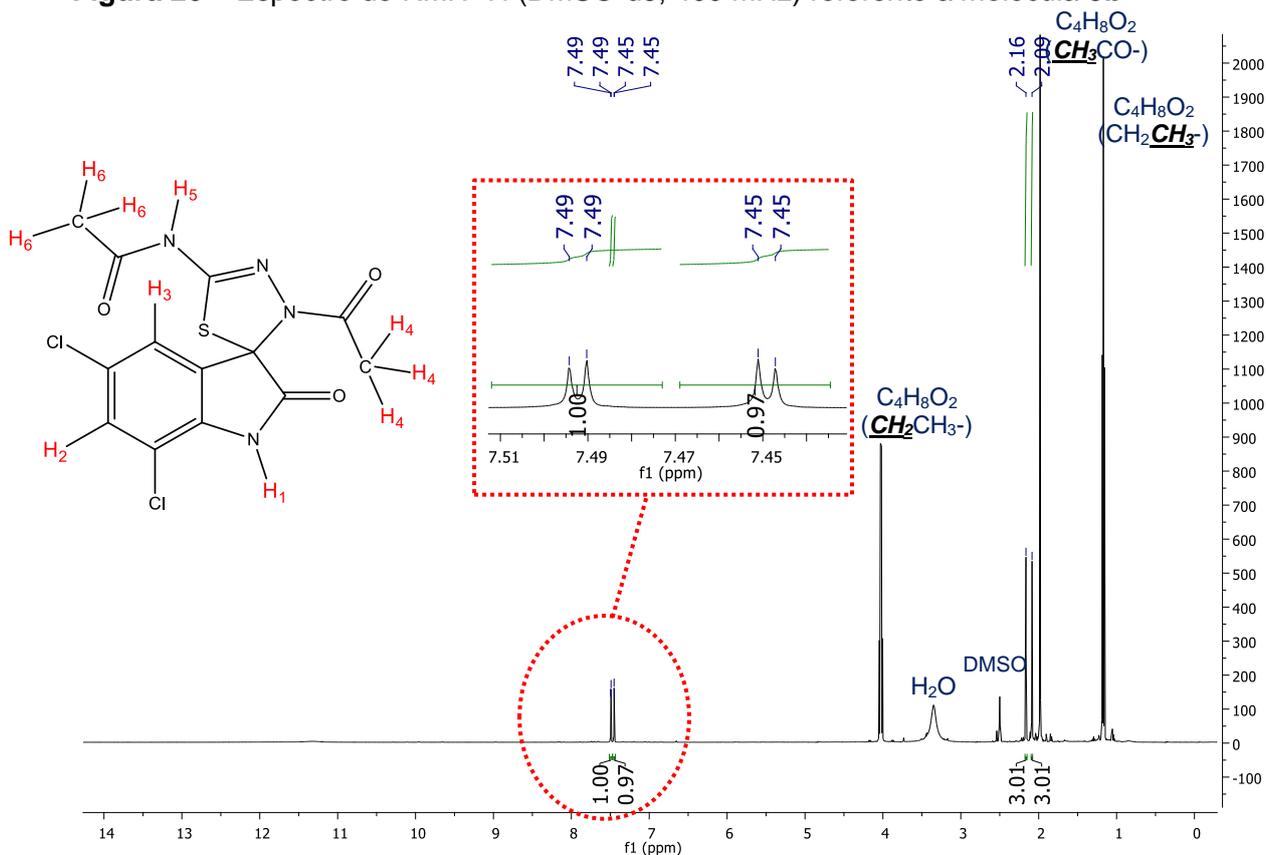
A Figura 19 apresenta o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – APT obtido para o mesmo espiro 1,3,4-tiadiazol (**3c**). Ao compararmos com o espectro RMN  $^{13}\text{C}$  – APT da molécula antecessora, **2c** (Figura 17), percebemos o aumento no número de carbonos e o aparecimento de dois sinais de carbonos metílicos (**k**, **n**) em  $\delta$  22,65 e 22,37 ppm, que foram originados a partir da acetilação da tiossemicarbazona, além do carbono

O deslocamento químico em 74,02 ppm é atribuído ao carbono espiro (**h**), apontando a formação do composto desejável e o seu valor está de acordo aos encontrados na literatura para compostos similares sendo  $\delta$  74,44 ppm (SOMOGYI, 1993) e  $\delta$  74,88 ppm (MANUN *et al.*, 2010). Observa-se também o desaparecimento do sinal do carbono tioamídico pronunciado em  $\delta$  179,24 ppm e permanência do sinal do carbono amídico da isatina (**i**) em  $\delta$  167,55 ppm. Os sinais dos átomos de carbono das carbonilas oriundas da acetilação da tiossemicarbazona (**j**, **m**) (**2c**) aparecem na região mais desblindada do espectro de APT, sendo os deslocamentos em 172,68 e

170,52 ppm. É possível também constatar a presença dos dois carbonos hidrogenados (**f**, **d**) (voltados para baixo) presentes no anel aromático em 131,49 e 123,51 ppm. Por fim, os deslocamentos químicos em 138,17 a 115,74 ppm correspondem aos carbonos não hidrogenados presentes no anel aromático (**b**, **c**, **e**, **g**) e do carbono imínico (**l**). Essa região é condizente com os sinais esperados para os carbonos aromáticos que, de acordo com Pavia e colaboradores (2012), fica em torno de  $\delta$  175 a 110 ppm.

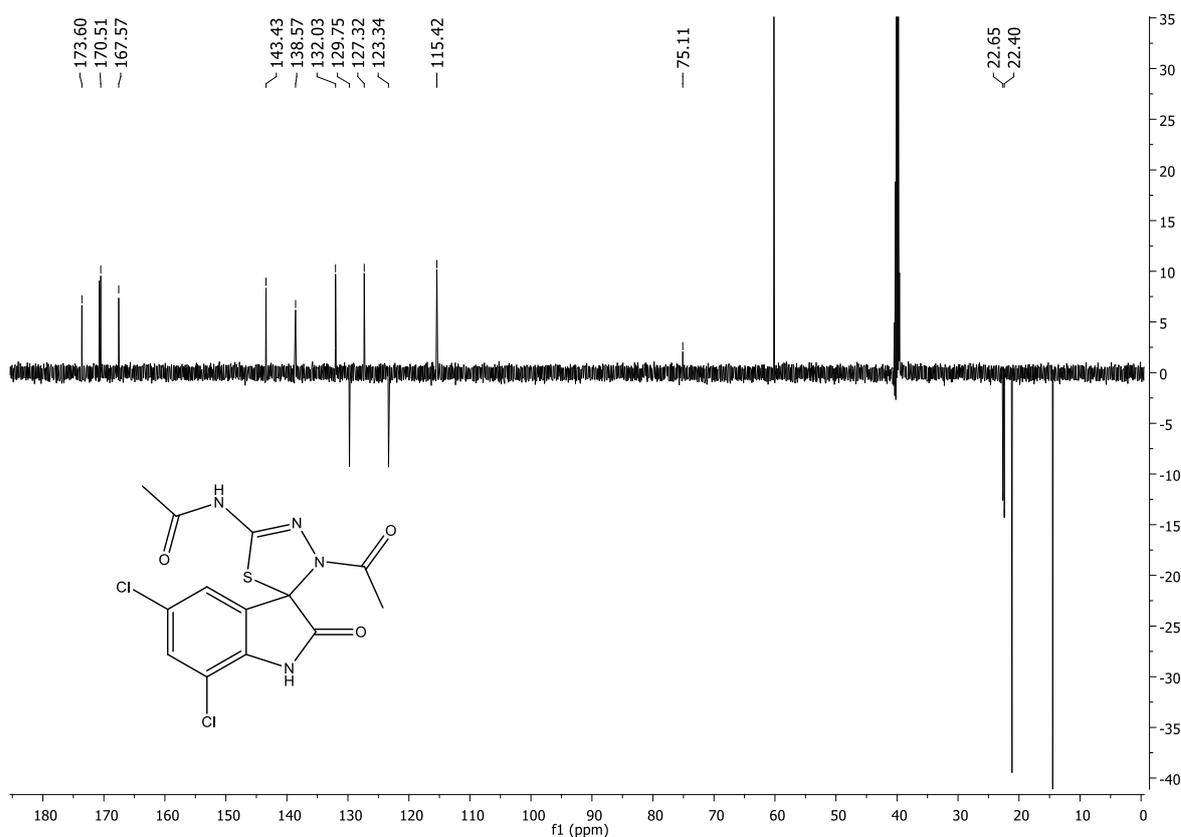
Agora, analisando o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da molécula **3b** em relação ao obtido para a molécula precursora, tiossemicarbazona **2b**, observa-se na Figura 20 a ausência de dois singletos característicos aos hidrogênios dos nitrogênios amídicos (**H<sub>1</sub>** e **H<sub>5</sub>**), explicado através do seu momento angular de spin nuclear ( $I > \frac{1}{2}$ ), ocasionando um momento de quadrupolo moderado que pode levar a um alargamento ou até mesmo à ausência do sinal do hidrogênio diretamente ligado ao nitrogênio (PAVIA *et al.*, 2012). Os hidrogênios da região aromática (**H<sub>2</sub>** e **H<sub>3</sub>**) apresentam dois dubletos entre 7,49 e 7,45 ppm, e ambos com constante de acoplamento  $J = 2,0$  Hz, correspondente ao acoplamento *meta* que ocorre entre eles. Além disso, os hidrogênios  $\alpha$  amídicos (**H<sub>4</sub>** e **H<sub>6</sub>**) continuam apresentando o mesmo padrão de deslocamento químico em 2,16 e 2,09 ppm. Também é possível encontrar a presença de acetato de etila residuais ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ - triplete em 1,17 ppm,  $\text{CH}_3\text{CO}$ - singlete em 1,99 ppm e  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ - quarteto em 4,03 ppm), oriundos do processo de purificação, onde os respectivos deslocamentos químicos foram confirmados por Fulmer e colaboradores (2010).

Figura 20 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) referente a molécula **3b**



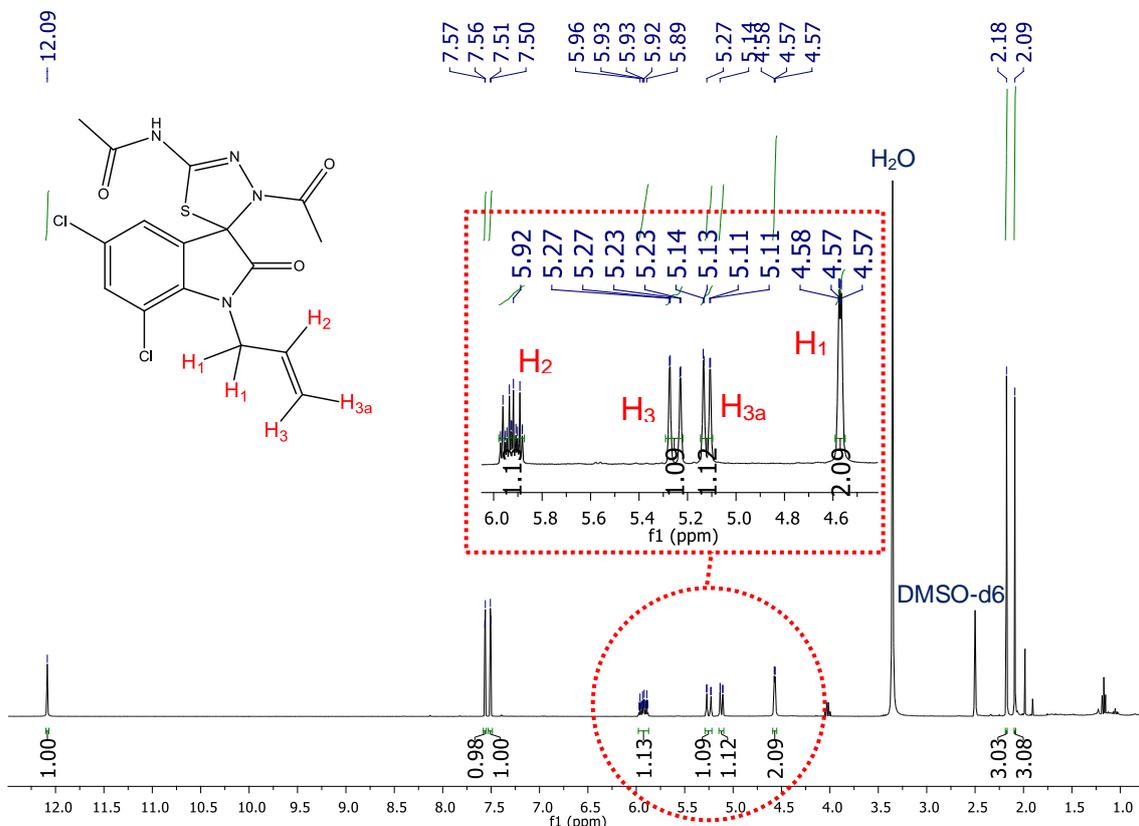
O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – APT de **3b** (Figura 21) revelou que o  $\delta$  em 75,11 ppm corresponde ao carbono espiro, em  $\delta$  173,60 e 170,51 ppm aos carbonos carbonílicos e em  $\delta$  22,65 e 22,40 ppm referentes aos carbonos metílicos, evidenciando a acetilação e a ciclização da tiossemicarbazona precursora (**2b**). Todos os valores estão de acordo com os deslocamentos químicos encontrados na literatura para compostos semelhantes (SOMOGYI, 1993; MANUN *et al.*, 2010).

**Figura 21** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – APT (DMSO- $d_6$ , 100 MHz) de **3b**



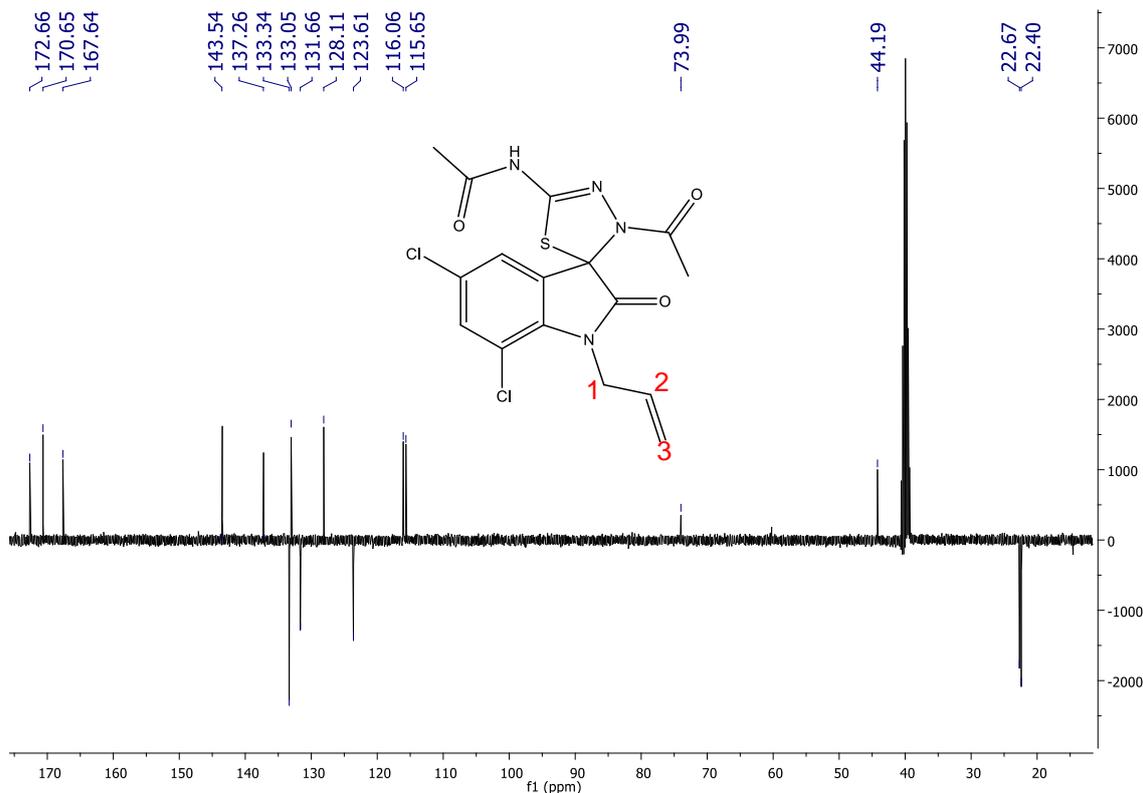
Para o espectro da molécula alilada **3d** (Figura **22**), observou-se um multiplete entre 4,58 - 4,57 ppm correspondente aos hidrogênios do carbono metileno ( $\text{H}_1$ ) que está diretamente ligado ao nitrogênio pertencente ao núcleo da isatina. O primeiro duplo dubleto entre 5,14 – 5,11 ppm com constante de acoplamento de  $J = 10,7$  Hz corresponde ao próton vinílico terminal ( $\text{H}_{3a}$ ), indicando a ocorrência de um acoplamento *cis* com o próton ( $\text{H}_2$ ). O segundo duplo dubleto entre 5,27 – 5,23 ppm com constante de acoplamento  $J = 17,4$  Hz corresponde ao próton vinílico terminal ( $\text{H}_3$ ), indicando a ocorrência de um acoplamento *trans* com o próton ( $\text{H}_2$ ). O sinal do deslocamento químico do próton vinílico ( $\text{H}_2$ ) apareceu como um multiplete em 5,97 – 5,88 ppm. Todos os outros sinais seguem o mesmo padrão de deslocamento químico dos espiros diclorados discutidos anteriormente (**3c** e **3b**).

Figura 22 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz) de **3d**



Em relação ao espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – APT de **3d** (Figura 23) revelou os deslocamentos químicos dos átomos de carbono das ligações  $\text{HC}=\text{CH}_2$  do sistema alílico (**2** e **3**) em 133,34 e 116,06 ppm respectivamente. O carbono metilênico (**1**) possui deslocamento químico em 44,19 ppm. Todos os valores dos deslocamentos químicos mencionados para o sistema alílico são condizentes aos dados reportados na literatura para compostos similares (BOUHFID, 2005).

**Figura 23** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  – APT (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz) de **3d**



## 5.4. Estudos biológicos

Os estudos biológicos realizados neste trabalho foram divididos em estudo *in silico* relacionado à farmacocinética e à toxicologia dos compostos, e estudo *in vitro*, relacionado à avaliação da potencialidade antimicrobiana e anticâncer dos compostos.

### 5.4.1. Estudos *in silico*

O estudo *in silico* vem se tornando uma excelente estratégia para auxiliar os químicos medicinais na descoberta de novos possíveis fármacos. Esse estudo se baseia em uma investigação teórica das propriedades farmacocinéticas, farmacodinâmicas e dos efeitos toxicológicos (ADMET – Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade) dos compostos com potencial atividade biológica (AGORAM; WOLTOSZ; BOLGER, 2001), possibilitando reduzir o número de compostos preparados com propriedades físico-químicas indesejáveis.

Uma das abordagens teóricas mais difundidas dos parâmetros farmacocinéticos no estudo *in silico* é a Regra dos Cinco de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1997). Esta regra é baseada em critérios físico-químicos que os compostos devem apresentar para que possam ser absorvidos e distribuídos pelo organismo humano, apresentar estabilidade frente ao metabolismo para que sejam mantidas no organismo pelo tempo necessário e cumprir sua função, não sendo apenas excretados. Para entender melhor esse tipo de comportamento nos espiros 1,3,4-tiadiazóis, foi feita a predição das propriedades físico-químicas dos compostos.

As propriedades físico-química foram previstas através do programa SwissADME, onde foram obtidos os valores de massa molecular, número de aceptores e doadores de hidrogênio, LogP e refratividade molar (Tabela 7).

**Tabela 7** – Predição das propriedades físico-químicas dos compostos

COMPOSTOS	M.M. (g/mol)	Nº ALH*	Nº DLH*	LogP	REFRATIVIDADE MOLAR	Nº DE VIOLAÇÕES DE LIPINSKI
3a	304,32	4	2	1,42	88,15	0
3b	373,21	4	2	1,95	98,17	0
3c	387,24	4	1	2,37	103,07	0
3d	413,28	4	1	2,54	112,21	0
3e	463,34	4	1	2,92	127,56	0
3f	318,35	4	1	1,90	93,05	0
3g	344,38	4	1	2,22	102,19	0
3h	394,45	4	1	2,49	117,54	0
3i	383,22	4	2	1,80	95,85	0
3j	397,25	4	1	2,28	100,75	0
3k	423,28	4	1	2,75	109,89	0
3l	473,34	4	1	2,92	125,24	0

\* ALH – aceptores de ligação de hidrogênio / DLH – doadores de ligação de hidrogênio

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostraram que os espiros 1,3,4-tiadiazóis avaliados não violam nenhum parâmetro da regra de Lipinski. Esse parâmetro propõe que a molécula deve: (i) apresentar massa molecular inferior a 500 g/mol; (ii) número de receptores de ligações de hidrogênio inferior a 5; (iii) número de doadores de ligações de hidrogênio inferior a 10; (iv) apresentar logP inferior a 5; (v) apresentar refratividade molar entre 40 e 130 m<sup>3</sup>/mol.

Todos os compostos apresentaram massa molecular abaixo de 500 g/mol, indicando que possuem uma boa solubilidade e atravessam membranas celulares sem dificuldade. O aumento do número de possibilidades de ligações de hidrogênio (nº de receptores/doadores de hidrogênio) contribui para o aumento da polaridade do composto, fazendo com que o possível candidato a fármaco tenha dificuldade na passagem da bicamada das membranas celulares, fato esse que é ocasionado pelo aumento no número de ligações de hidrogênios que precisam ser quebradas para a sua passagem do meio hidrofílico para o meio hidrofóbico (LIPINSKI *et al.*, 1997)

A lipoficidade do composto é expressa a partir do LogP e, compostos que apresentam LogP>5, são muito pouco solúveis em soluções aquosa e, portanto, incapazes de ter acesso a superfície da membrana (VOET; VOET, 2013). Em geral, para uma eficaz absorção gastrointestinal após a administração oral da droga, sabe-se que LogP deve estar na faixa de 0 a 3 para uma situação ótima (HANSCH *et al.*, 2004), fato esse que pode ser observado em todas as moléculas sintetizadas.

A refratividade molar é uma propriedade físico-química de caráter constitutivo-aditivo, sendo, portanto, extremamente dependente da estrutura química do composto. Esta propriedade está diretamente relacionada ao ajuste da molécula a seu sítio receptor. Valores positivos indicam a presença de forças dispersivas no centro ativo que auxiliam a interação ligante-bioreceptor. Já valores negativos representam a capacidade do ligante distorcer a conformação do bioreceptor, evitando o processo de interação molecular e ocasionando um impedimento estereoquímico (MONTANARI; MONTANARI; GAUDIO, 2002). Todos os compostos analisados apresentaram valores dentro do padrão de referência, indicando uma boa interação ligante-bioreceptor.

Também foram realizados estudos para uma possível previsão das propriedades toxicológicas dos compostos utilizando o programa *Osiris Property Explorer*. A Tabela 8 apresenta os resultados dos testes *in silico* de toxicidade dos espiros sintetizados.

**Tabela 8** – Toxicidade teórica dos espiros 1,3,4-tiadiazóis

Compostos	Risco Mutagênico	Risco Tumorigênico	Risco Reprodutivo	Efeito Irritante	Druglikeness	Drug-score
3a	NR	NR	NR	NR	7,04	0,81
3b	NR	NR	NR	MR	6,74	0,51
3c	NR	NR	NR	MR	7,27	0,50
3d	NR	NR	NR	MR	5,02	0,43
3e	NR	NR	NR	MR	7,96	0,34
3f	NR	NR	NR	NR	7,57	0,83
3g	NR	NR	NR	NR	5,31	0,76
3h	NR	NR	NR	NR	8,24	0,63
3i	NR	NR	NR	NR	4,91	0,71
3j	NR	NR	NR	NR	5,44	0,69
3k	NR	NR	NR	NR	3,19	0,60
3l	NR	NR	NR	NR	6,13	0,47

NR: Nenhum risco; MR: Médio risco.

Entre todos os espiros sintetizados, apenas os compostos **1b–1e** apresentaram um único grupo de risco, sendo um risco médio de causar irritação. O parâmetro *druglikeness* avalia se as moléculas possuem grupos funcionais e/ou propriedades físicas semelhantes com a maioria dos fármacos conhecidos, onde valores negativos representam semelhanças mínimas e valores positivos representam uma maior semelhança entre os possíveis candidatos a fármacos sintetizados (WALTERS; MURCKO, 2002). Já o potencial de *drug-score* combina valores de *druglikeness*, CLogP, LogS (solubilidade aquosa), massa molecular e riscos de toxicidade em um único valor numérico que é útil para julgar o potencial geral do composto para se tornar um possível fármaco (PADMINI; INBATHAMIZH, 2013). Todos os espiros sintetizados obtiveram valores positivos, indicando, predominantemente, uma semelhança substancial em subunidades farmacofóricas encontradas em fármacos.

É importante destacar que os estudos *in silico* são importantes, mas não determinantes para o andamento de uma pesquisa de novos candidatos a fármacos, servindo como orientação para o desenvolvimento dessas novas estruturas e que as atividades biológicas e toxicidades dos compostos devem ser consideradas.

#### 5.4.2. Estudos antimicrobianos

Para os ensaios da atividade antimicrobiana (*in vitro*) dos espiros sintetizados, foram utilizadas as seguintes cepas:

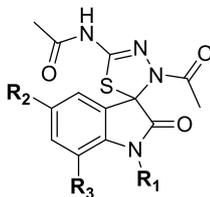
- ✓ **Bactérias:** *Staphylococcus aureus* ATCC-13150, *Escherichia coli* ATCC - 18739 e *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC – 9027.
- ✓ **Fungos:** *Candida albicans* ATCC-90028, *C. tropicalis* ATCC-13803 e *Cryptococcus neoformans* – FCF -119.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador. Com isso, a atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada através dos valores obtidos de CIM e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 µg/mL= forte atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; SARTORATTO *et al.*, 2004; HOUGHTON *et al.*, 2007).

Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (CBHI + bactérias e RPMI + leveduras), para comprovação da viabilidade das cepas, meio de cultura (RPMI/CBHI), para comprovação da esterilidade e controle negativo com antimicrobianos: gentamicina (64 µg/mL) para inibição das bactérias e anfotericina B (32 µg/mL) para inibição dos fungos.

Na Tabela 9 estão registrados os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos espiros testados.

**Tabela 9** – Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) das amostras contra cepas bacterianas e fúngicas



Amostras	Bactérias			Fungos		
	<i>S. aureus</i> ATCC-13150	<i>E. coli</i> ATCC - 18739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>C. albicans</i> ATCC - 90028	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. neoformans</i> FCF-119
<b>3b</b> ( $R_1=H$ , $R_2=R_3=Cl$ )	+	+	+	+	+	+
<b>3c</b> ( $R_1=CH_3$ , $R_2=R_3=Cl$ )	+	+	+	+	+	+
<b>3d</b> ( $R_1=C_3H_5$ , $R_2=R_3=Cl$ )	137,5	137,5	137,5	137,5	137,5	137,5
<b>3e</b> ( $R_1=C_7H_7$ , $R_2=R_3=Cl$ )	+	+	+	+	+	+
<b>3f</b> ( $R_1=CH_3$ , $R_2=R_3=H$ )	+	+	+	550,0	137,5	137,5
<b>3g</b> ( $R_1=C_3H_5$ , $R_2=R_3=H$ )	137,5	137,5	550,0	137,5	137,5	137,5
<b>3h</b> ( $R_1=C_7H_7$ , $R_2=R_3=H$ )	+	+	275,0	+	+	+
<b>3j</b> ( $R_1=CH_3$ , $R_2=Br$ ; $R_3=H$ )	+	+	+	+	+	+
<b>3k</b> ( $R_1=C_3H_5$ , $R_2=Br$ ; $R_3=H$ )	+	+	+	+	+	+
<b>3l</b> ( $R_1=C_7H_7$ , $R_2=Br$ ; $R_3=H$ )	250,0	125,0	500,0	+	+	+
<b>Controle: Meio de cultura</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Controle: Micro-organismo</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Controle: Anfotericina B</b>	x	x	x	-	-	-
<b>Controle: Gentamicina</b>	-	-	-	x	x	x

(+): Crescimento do micro-organismo; (-): Não houve crescimento microbiano; (x): Controle não usado nos ensaios.

Conforme observado na Tabela 9, dentre as dez moléculas investigadas, cinco apresentaram atividade contra ao menos um dos micro-organismos estudados. É importante observar que as moléculas **3d** e **3g**, referentes aos espiros *N*-alilados, apresentaram os menores valores de CIM (137,5  $\mu\text{g/mL}$ ) para todos os micro-

organismos testados, exceto *P. aureuginosa* ATCC – 9027, que apresentou sensibilidade a molécula **3g** na CIM de 550 µg/mL. A molécula **3i** apresentou atividade sobre cepas bacterianas (*S. aureus* ATCC-13150, *E. coli* ATCC – 18739, *P. aeruginosa* ATCC-9027), em que os valores de CIM variaram entre 125 a 500 µg/mL, enquanto que, a molécula **3f**, apresentou atividade antifúngica somente contra leveduras (*C. albicans* ATCC – 90028, *C. tropicalis* ATCC-13803, *C. neoformans* FCF-119), em que a CIM oscilou entre 137,5 a 550,0 µg/mL. Por fim, a molécula **3h** apresentou atividade apenas contra a bactéria *P. aureuginosa* ATCC – 9027, apresentando CIM de 275 µg/mL.

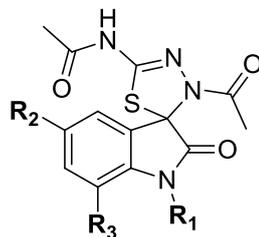
#### 5.4.3. Estudo da citotoxicidade em 3 linhagens de células tumorais

Os espiros 1,3,4 tiadiazóis sintetizados neste trabalho também foram enviados para avaliação da citotoxicidade na linhagem de HT-29 (câncer colorretal), K562 (leucemia mieloide crônica) e HL60 (leucemia promielocítica).

Para o estudo, foi utilizado o método MTT, o qual vem sendo utilizado no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (SKEHAN *et al.*, 1990). É um método rápido, sensível e barato. Este estudo permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE *et al.*, 1996).

Na Tabela 10, uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: amostras sem atividade, com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

**Tabela 10** – Percentual de inibição em concentração única (25 µg/mL) do crescimento celular das amostras em três linhagens tumorais



Compostos	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	HT-29	HL-60	K562
<b>3b</b>	H	Cl	Cl	36,6	46,5	<b>0</b>
<b>3c</b>	CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	19,7	32,2	7,2
<b>3d</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Cl	Cl	11,9	100	7,6
<b>3e</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Cl	Cl	50,4	100	78,6
<b>3f</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	23,9	45,8	<b>0</b>
<b>3g</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	H	H	20,1	14,4	<b>0</b>
<b>3h</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	H	H	27,7	43,2	<b>0</b>
<b>3j</b>	CH <sub>3</sub>	Br	H	0	21,3	<b>0</b>
<b>3k</b>	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	Br	H	<b>0</b>	49,2	<b>0</b>
<b>3l</b>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub>	Br	H	36,9	100	<b>0</b>

Como podemos observar na Tabela 10, a grande maioria dos espiros 1,3,4-tiadiazóis não apresentaram expressivas atividades de inibição contra as três linhagens de células tumorais ( HT-29, HL60 e K562), com exceção do composto **3e** (diclorado *N*-benzilado), onde o mesmo apresentou um percentual de inibição de 50,4% para HT-29, 100% para HL60 e 78,6% para K562. Com base nisso, realizou-se o cálculo da concentração necessária para inibir 50% da população (CI<sub>50</sub>), onde o composto **3e** obteve um valor bastante promissor de CI<sub>50</sub> (6,8 µM).

É importante ressaltar que, até o presente momento, não existe nenhum trabalho na literatura que tenha investigado a atividade anticâncer desta classe de compostos, o que torna este resultado promissor para o planejamento de novos derivados mais potentes frente às linhagens de câncer.

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

### 6.1. Conclusões

- ✓ Para obtenção das 12 tiossemicarbazonas (4 inéditas), o método escolhido demonstrou-se prático e eficiente, obtendo os produtos com bons rendimentos (51-88%) e em tempos reacionais que variam de 30 a 45 minutos;
- ✓ Todos os 12 espiro-compostos neste trabalho (9 inéditos) foram sintetizados sob radiação de micro-ondas, obtidos em rendimentos de moderados a bons (25-90%) e excelentes tempos reacionais (6 a 18 minutos);
- ✓ O uso do micro-ondas mostrou-se eficiente para a síntese das tiossemicarbazonas e dos espiro-compostos, reduzindo significativamente os tempos reacionais e co-produtos;
- ✓ Os resultados dos estudos *in silico* demonstraram que todos os espiro-compostos satisfizeram aos parâmetros da regra dos cinco de Lipinski e, teoricamente, possuem boa disponibilidade oral;
- ✓ Os resultados obtidos nas análises de toxicidade, *drug-likeness* e *drug-score* indicam que, teoricamente, todos os espiro-compostos têm potencial para se tornarem candidatos a fármacos;
- ✓ Na avaliação da atividade antimicrobiana, os compostos **3d**, **3f**, **3g**, **3h** e **3i** apresentaram forte atividade, com destaque para as moléculas **3d** e **3g**, referentes aos espiros *N*-alilados, onde apresentaram os menores valores de CIM (137,5 µg/mL) para todos os micro-organismos testados, exceto *P. aureuginosa* ATCC – 9027, que apresentou sensibilidade a molécula **3g** na CIM de 550 µg/mL;

### 6.2. Perspectivas

- ✓ Investigar a síntese dos compostos não aquilados (**3a**, **3b** e **3i**), os quais apresentaram menores rendimentos e maiores dificuldades na purificação, variando a quantidade de solvente e temperatura, buscando a melhoria da eficiência da reação;
- ✓ Realizar novas modificações estruturais na isatina (monocloro/nitro isatina) com o objetivo de investigar a atividade antimicrobiana;

- ✓ Submeter os espiro-compostos (**3d**, **3f**, **3g**, **3h** e **3i**) à estudos de toxicidade *in vivo*.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1. Materiais e métodos

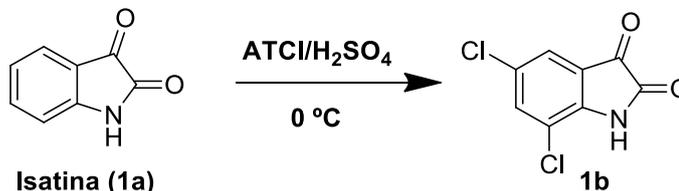
Todos os protocolos sintéticos descritos nesta pesquisa foram realizados utilizando reagentes e solventes contendo um excelente grau de pureza. O acompanhamento das reações se deu pela técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) cuja a fase estacionária foram cromatofolhas de alumínio suportadas em Gel de Sílica 60 e uma mistura de acetato de etila/hexano sendo utilizada como fase móvel, sendo irradiadas numa câmara de ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm. A purificação dos produtos foi feita utilizando a técnica de cromatografia em coluna do tipo flash utilizando também sílica como fase estacionária que apresenta granulometria de 0.035 – 0.070 mm e acetato/hexano como fase móvel. Os solventes foram todos evaporados a pressão reduzida e temperatura controlada em evaporador rotatório da marca IKA.

As reações que necessitaram de irradiação de micro-ondas foram feitas em um reator de micro-ondas CEM® modelo Discover-system benchmate com temperatura monitorada por sensor de infravermelho e potência programável 0-300 W.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) foram obtidos usando um espectrômetro Varian Mercury 500, operando a 400 MHz para RMN <sup>1</sup>H e 100 MHz para RMN <sup>13</sup>C, disponível no Laboratório Multiusuário de Caracterização Analítica da Universidade Federal da Paraíba. Os deslocamentos químicos foram relatados em relação ao padrão interno tetrametilsilano (TMS), usando CDCl<sub>3</sub> e DMSO-d<sub>6</sub> como solvente. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram medidos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Os desdobramentos químicos referentes a cada acoplamento dos hidrogênios foram expressos como singleto (s), dubleto (d), tripleto (t), duplo dubleto (dd), triplo dubleto (td), triplo tripleto (tt), duplo duplo dubleto (ddd) e multiplete (m). As multiplicidades dos sinais dos carbonos foram observadas pelo uso da técnica de APT, onde os colocados em fase “pra cima” carbonos não hidrogenados e metilenos e em fase “para baixo” carbonos de metino e metila.

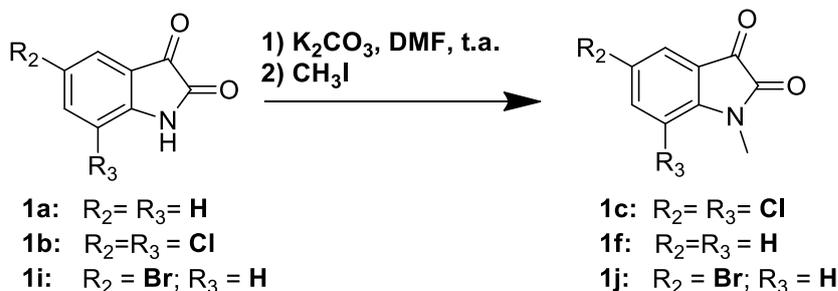
## 7.2. Procedimento de síntese dos derivados da isatina

### 7.2.1. Procedimento de síntese da 5,7 dicloroisatina (**1b**)



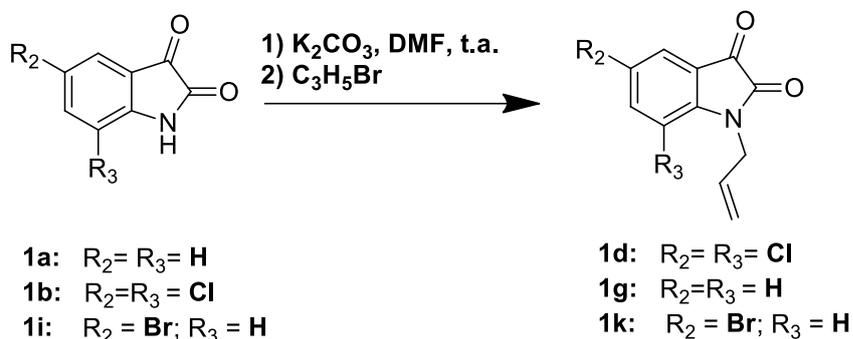
Em um erlenmeyer de 250 mL adicionou-se 2,32 g (10 mmols) de TICA em 6 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , em banho de gelo a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Em seguida adicionou-se 1,47 g (10 mmols) de isatina (**1a**) e após a adição a mistura foi submetida a agitação magnética nas condições ambiente e acompanhada por CCD. Após 30 minutos de reação a mistura foi vertida sob gelo picado e o precipitado foi filtrado a pressão reduzida em funil de Büchner e lavado com água gelada, obtendo um produto (**2b**) amarelado com rendimento de 89%.

### 7.2.2. Procedimento de síntese dos derivados metilados (**1c**; **1f**; **1j**)



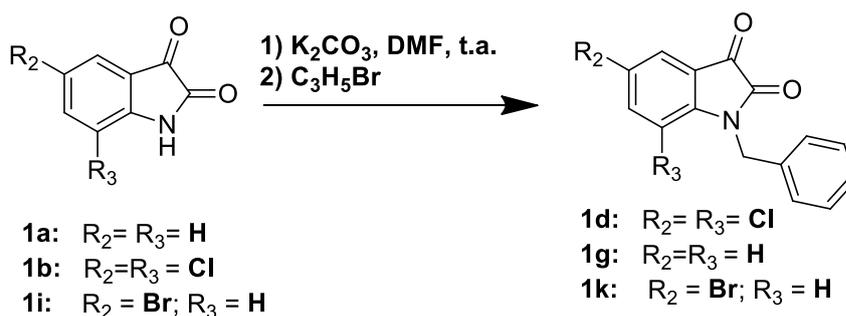
Em um balão de 50 mL foram adicionados 5 mmol da isatina (**1a**) ou seus derivados (**1b** e **1i**),  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,2 equivalentes) e 5 mL de DMF previamente seco, mantendo a mistura sob agitação magnética e temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 0,35 mL de iodeto de metila (1,2 equivalente) e a reação acompanhada via CCD. Após 2 horas de reação foi realizada extração líquido-líquido usando acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi tratada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e filtrada. Após o isolamento, foi obtido sólidos avermelhados com rendimentos de 81% (**1c**), 93% (**1f**) e 87% (**1j**).

### 7.2.2. Procedimento de síntese dos derivados alilados (**1d**; **1g**; **1k**)



Em um balão de 50 mL foram adicionados 5 mmol da isatina (**1a**) ou seus derivados (**1b** e **1i**),  $K_2CO_3$  (1,2 equivalentes) e 5 mL de DMF previamente seco, mantendo a mistura sob agitação magnética e temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 0,5 mL de brometo de alila (1,2 equivalente) e a reação acompanhada via CCD. Após 2 horas de reação foi realizada extração líquido-líquido usando acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi tratada com  $Na_2SO_4$  anidro e filtrada. Após o isolamento, foi obtido sólidos avermelhados com rendimentos de 62% (**1d**), 79% (**1g**) e 71% (**1k**).

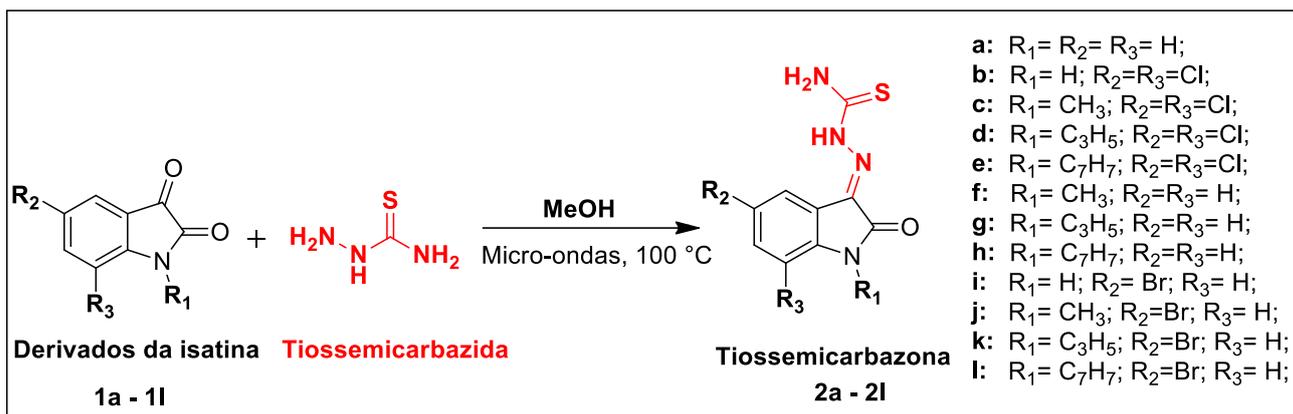
### 7.2.3. Procedimento de síntese dos derivados benzilados (**1e**; **1h**; **1l**)



Em um balão de 50 mL foram adicionados 5 mmol da isatina (**1a**) ou seus derivados (**1b** e **1i**),  $K_2CO_3$  (1,2 equivalentes) e 5 mL de DMF previamente seco, mantendo a mistura sob agitação magnética e temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 0,127 mL de cloreto de benzila (1 equivalente) e a reação acompanhada via CCD. Após 2 horas de reação foi realizada extração líquido-líquido usando acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi tratada com  $Na_2SO_4$  anidro e filtrada.

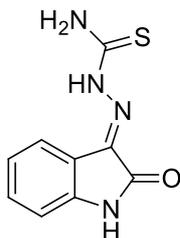
Após o isolamento, foi obtido sólidos avermelhados com rendimentos de 78% (**1e**), 87% (**1h**) e 82% (**1l**).

### 7.3. Procedimento geral de síntese das tiossemicarbazonas derivadas da isatina (**2a – 2l**)



Em um tubo de vidro de 10 mL específico para reator de micro-ondas foi adicionado 1 mmol da isatina (**1a**) ou dos seus derivados (**1b – 1l**) e 1 mmol de tiossemicarbazida. Em seguida, adicionou-se 4 mL de metanol como solvente juntamente com um agitador magnético. A reação foi realizada sob irradiação de micro-ondas à 100 °C (leitura monitorada por sensor de infravermelho) sob condições de vaso fechado e monitoradas por CCD a cada 15 minutos. Após o termino da reação, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente para a formação do precipitado no qual foi isolado por filtração à vácuo, utilizando metanol gelado para lavagem. Os rendimentos obtidos variaram de 53 a 88%.

### Composto 2a



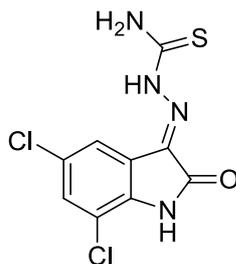
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 67%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,48 (s, 1H); 11,19 (s, 1H); 9,03 (s, 1H); 8,67 (s, 1H); 7,64 (d, 1H); 7,33 (t, 1H); 7,06 (t, 1H); 6,91 (d, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 163,10; 142,81; 132,52; 131,73; 122,84; 121,43; 120,43; 111,50.

### Composto 2b



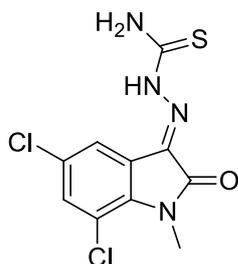
**Aspecto físico:** Sólido alaranjado

**Rendimento:** 51%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,24 (s, 1H); 11,73 (s, 1H) ; 9,15 (s, 1H) ; 8,84 (s, 1H) ; 7,70 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,51 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,24; 162,91; 138,99; 130,67; 129,88; 127,38; 123,77; 119,81; 116,28.

### Composto 2c



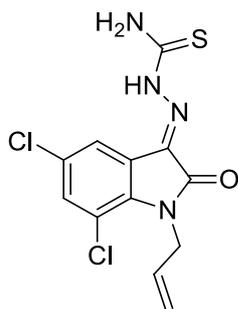
**Aspecto físico:** Sólido alaranjado

**Rendimento:** 63%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,17 (s, 1H); 9,21 (s, 1H); 8,93 (s, 1H); 7,84 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 7,57 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 3,49 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,24; 161,27; 138,34; 131,56; 129,34; 127,85; 124,36; 119,85; 116,62; 29,12.

### Composto 2d



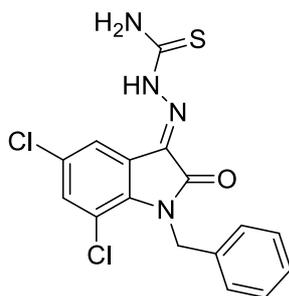
**Aspecto físico:** Sólido alaranjado

**Rendimento:** 53%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,12 (s, 1H); 9,22 (s, 1H); 8,95 (s, 1H); 7,87 (s, 1H); 7,54 (s, 1H); 6,01 – 5,92 (m, 1H); 5,14 (dd, *J* = 10,5, 1H); 5,07 (dd, *J* = 17,3, 1H); 4,63 – 4,61 (m, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,23; 161,12; 137,41; 133,37; 131,66; 129,03; 128,07; 124,59; 120,00; 116,50; 116,38; 43,11.

### Composto 2e



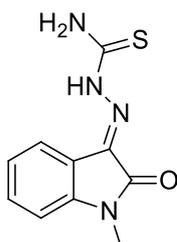
**Aspecto físico:** Sólido marrom

**Rendimento:** 57%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** 12,14 (s, 1H), 9,28 (s, 1H), 9,01 (s, 1H), 7,91 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,48 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H), 7,34 – 7,23 (m, 5H), 5,25 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,23; 161,53; 137,34; 137,31; 131,57; 129,05; 128,91; 128,24; 127,66; 126,60; 124,79; 120,03; 116,37; 44,39.

### Composto 2f



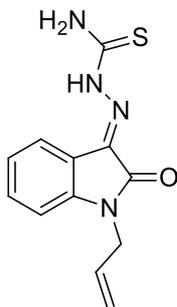
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 75%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,38 (s, 1H); 9,07 (s, 1H); 8,70 (s, 1H); 7,66 (d, *J* = 6,8 Hz, 1H); 7,42 (td, *J* = 7,7 Hz; 1,3 Hz, 1H); 7,15 – 7,09 (m, 2H); 3,36 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,16; 161,21; 144,03; 131,64; 131,60; 123,33; 121,03; 119,70; 110,23; 26,14.

### Composto 2g



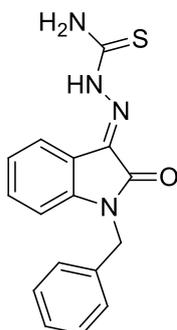
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 64%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,32 (s, 1H); 9,02 (s, 1H); 8,60 (s, 1H); 7,75 (d, 1H); 7,48 (t, 1H); 7,18 (t, 1H); 7,02 (d, 1H); 5,57 (m, 1H), 5,50 (t, 2H); 4,45 (d, 2H)

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 178,72; 160,46; 142,64; 131,42; 131,04; 130,97; 122,89; 120,73; 119,36; 117,39; 110,27; 41,32.

### Composto 2h



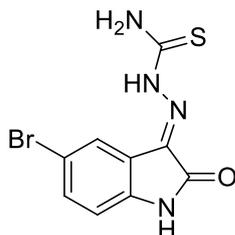
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 87%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,41 (s, 1H); 9,11 (s, 1H); 8,76 (s, 1H); 7,71 (dd, *J* = 6,8 Hz, 1H); 7,39 – 7,30 (m, 5H); 7,26 (tt, 1H); 7,12 (td, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,02 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 4,97 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,16; 161,29; 143,01; 136,20; 131,51; 131,42; 129,18; 128,08; 127,91; 123,50; 121,28; 119,97; 110,81; 42,98.

### Composto 2i



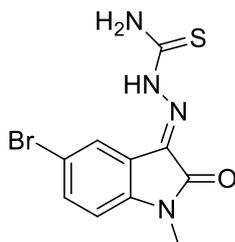
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 77%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,28 (s, 1H); 11,28 (s, 1H); 9,10 (s, 1H); 8,81 (s, 1H); 7,86 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,48 (dd, *J* = 8,3; 2,1 Hz, 1H); 6,86 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,22; 162,70; 141,80; 133,64; 131,10; 123,92; 122,77; 114,63; 113,40.

### Composto 2j



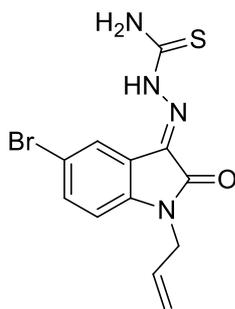
**Aspecto físico:** Sólido alaranjado

**Rendimento:** 88%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,18 (s, 1H); 9,13 (s, 1H); 8,82 (s, 1H); 7,86 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,55 (dd, *J* = 8,4; 2,1 Hz, 1H); 7,06 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 3,34 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 179,21; 160,81; 143,02; 133,46; 130,17; 123,55; 121,92; 115,24; 112,18; 26,28.

### Composto 2k



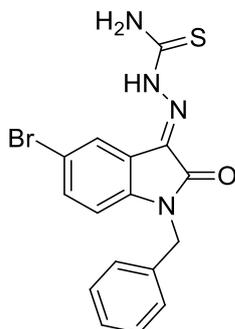
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 73%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12,18 (s, 1H); 9,15 (s, 1H); 8,86 (s, 1H); 7,92 (d,  $J$  = 2,0 Hz, 1H); 7,55 (dd,  $J$  = 8,4, 2,1 Hz, 1H), 7,01 (d,  $J$  = 8,4 Hz, 1H); 5,89 – 5,80 (m, 1H), 5,19 (ddd,  $J$  = 11,3; 9,2; 1,3 Hz, 2H), 4,36 (d, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  179,22; 160,56; 142,12; 133,43; 131,70; 130,03; 123,75; 122,15; 117,93; 115,32; 112,73; 41,86.

### Composto 2l



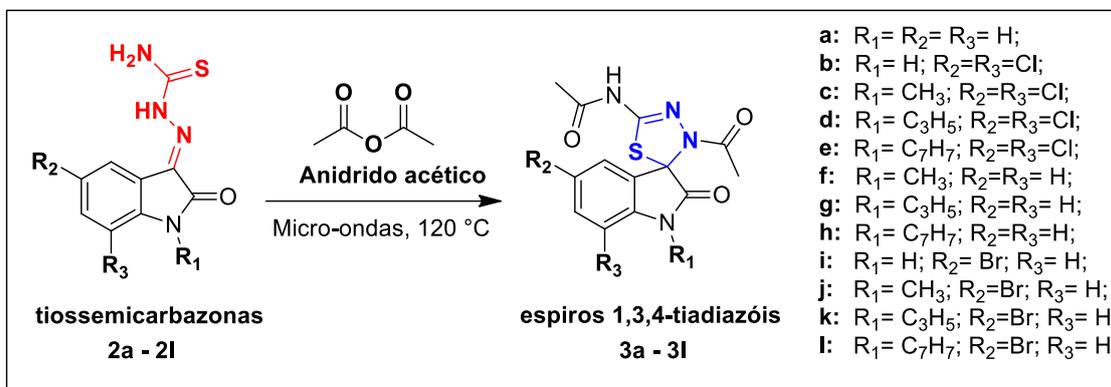
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 81%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12,22 (s, 1H); 9,18 (s, 1H); 8,89 (s, 1H); 7,94 (d,  $J$  = 2,1 Hz, 1H); 7,50 (dd,  $J$  = 8,4, 2,1 Hz, 1H); 7,37 – 7,24 (m, 5H); 6,95 (d, 1H); 4,96 (s, 2H).

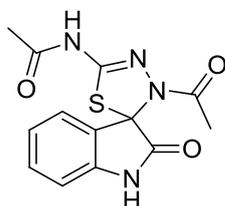
**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  179,23; 160,90; 142,00; 135,91; 133,43; 130,00; 129,18; 128,12; 127,85; 123,81; 122,28; 115,47; 112,73; 43,05.

### 7.3. Procedimento geral de síntese dos espiro 1,3,4-tiadiazóis derivados da isatina (3a – 3l)



Em um tubo de vidro de 10 mL específico para reator de micro-ondas foi adicionado 0,5 mmol das respectivas tiossemicarbazonas, 3,5 mL de anidrido acético, juntamente com um agitador magnético. A reação foi realizada sob irradiação de micro-ondas à 120 °C (leitura monitorada por sensor de infravermelho) sob condições de vaso fechado e monitoradas por CCD a cada 6 minutos. Após o termino da reação, os produtos foram diluídos em acetato de etila, permitindo assim, a lavagem da fase orgânica com uma solução saturada de bicarbonato de sódio até a total neutralização do ácido acético presente no meio reacional. Na sequência, a mistura foi concentrada sob pressão reduzida e o produto foi isolado por coluna cromatográfica usando sílica gel e uma mistura de acetato de etila/hexano como eluente.

#### Composto 3a

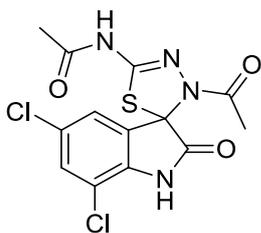


**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 82%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7.40 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.11 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.12 (s, 3H).

### Composto 3b



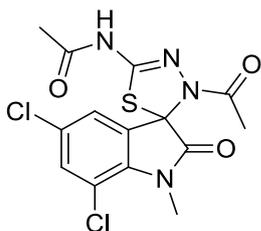
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 36%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 7,49 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,45 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 2,16 (s, 3H); 2,09 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 173,60; 170,51; 167,57; 143,43; 138,57; 132,03; 129,75; 127,32; 123,34; 115,42; 75,11; 22,65; 22,40.

### Composto 3c



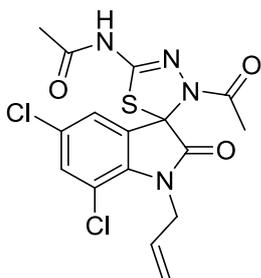
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 88%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,00 (s, 1H), 7,51 (q, *J* = 2,1 Hz, 2H); 3,44 (s, 3H); 2,15 (s, 3H); 2,09 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 172,68; 170,52; 167,55; 143,65; 138,17; 132,93; 131,49; 127,88; 123,51; 115,74; 74,02; 30,31; 22,65; 22,37.

### Composto 3d



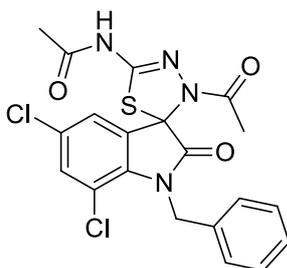
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 81%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12,09 (s, 1H); 7,56 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H); 7,51 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H); 5,97 – 5,88 (m, 1H), 5,25 (dd,  $J = 17,4$ , 1H); 5,12 (dd,  $J = 10,7$ , 1H); 4,58 – 4,57 (m, 1H); 2,18 (s, 2H); 2,09 (s, 2H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  172,66; 170,65; 167,64; 143,54; 137,26; 133,34; 133,05; 131,66; 128,11; 123,61; 116,06; 115,65; 73,99; 44,19; 22,67; 22,40.

### Composto 3e



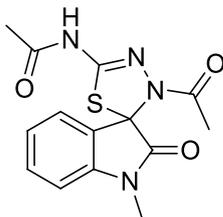
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 65%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12,07 (s, 1H); 7,59 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 7,44 (d,  $J = 2,1$  Hz, 1H); 7,34 – 7,22 (m, 5H); 5,21 (q, 2H); 2,21 (s, 3H); 2,10 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  173,11; 170,62; 167,76; 143,51; 137,75; 137,28; 133,09; 131,61; 128,87; 128,28; 127,35; 126,28; 123,59; 115,65; 74,14; 45,63; 22,65; 22,38.

### Composto 3f



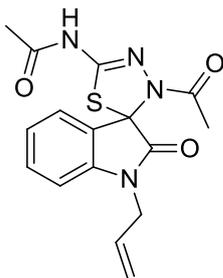
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 62%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,03 (s, 1H); 7,37 – 7,33 (m, 2H); 7,09 – 7,02 (m, 2H); 3,14 (s, 3H); 2,13 (s, 3H); 2,08 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 172,30; 170,48; 167,33; 143,37; 143,07; 130,67; 128,37; 124,01; 123,61; 109,47; 74,62; 27,10; 22,76; 22,58.

### Composto 3g



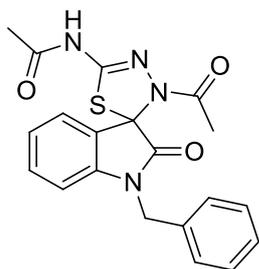
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 70%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,03 (s, 1H); 7,39 (dd, *J* = 7,5, 0,8 Hz, 1H); 7,32 (td, *J* = 7,8; 1,2 Hz, 1H); 7,07 (td, *J* = 7,6; 0,8 Hz, 1H); 6,93 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 5,87 – 5,78 (m, 1H); 5,30 (dd, *J* = 17,3, 1H); 5,14 (dd, *J* = 10,5, 1H); 4,40 – 4,22 (m, 2H); 2,15 (s, 3H); 2,09 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 172,13; 170,50; 167,39; 143,27; 142,02; 131,73; 130,53; 128,32; 124,12; 123,64; 117,18; 110,10; 74,68; 42,55; 22,76; 22,55.

### Composto 3h



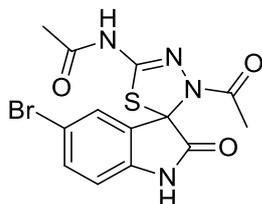
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 90%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12,06 (s, 1H); 7,40 (tt, 3H); 7,34 – 7,30 (m, 2H); 7,27 – 7,21 (m, 2H); 7,05 (td,  $J = 7,6; 0,9$  Hz, 1H); 6,78 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H); 5,02 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H); 4,83 (d,  $J = 16,2$  Hz, 1H); 2,19 (s, 3H); 2,09 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** 172,49; 170,55; 167,52; 143,31; 141,86; 136,21; 130,53; 129,03; 128,40; 127,82; 127,46; 124,17; 123,79; 110,14; 74,81; 43,85; 22,77; 22,56.

### Composto 3i



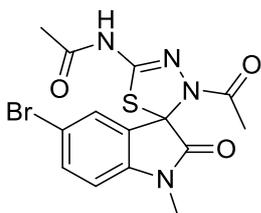
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 25%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12,01 (s, 1H); 10,86 (s, 1H); 7,52 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H); 7,43 (dd,  $J = 8,3; 2,1$  Hz, 1H); 6,80 (d,  $J = 8,3$  Hz, 1H); 2,15 (s, 1H); 2,08 (s, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  173,45; 170,50; 167,50; 143,23; 140,88; 133,24; 131,24; 127,13; 114,42; 112,61; 74,66; 22,73; 22,55.

### Composto 3j



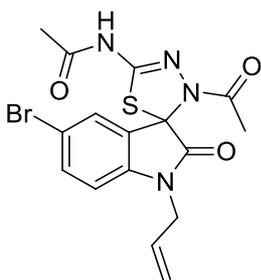
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 57%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 12,03 (s, 1H); 7,58 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,54 (dd, *J* = 8,3; 2,0 Hz, 1H); 7,02 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 3,13 (s, 3H); 2,14 (s, 3H); 2,08 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 171,98; 170,53; 167,48; 143,47; 142,47; 133,27; 130,55; 126,84; 115,11; 111,54; 74,23; 27,23; 22,73; 22,53.

### Composto 3k



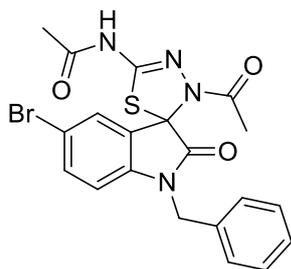
**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 61%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):** δ 7,61 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 7,51 (dd, *J* = 8,4; 2,1 Hz, 1H); 6,91 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H); 5,85 – 5,76 (m, 1H); 5,28 (dd, *J* = 17,3; 1,4 Hz, 1H); 5,14 (dd, *J* = 10,5; 1,4 Hz, 1H); 4,47 – 4,21 (m, 1H); 2,16 (s, 1H); 2,09 (s, 1H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):** δ 171,82; 170,58; 167,56; 143,35; 141,39; 133,17; 131,45; 130,53; 126,95; 117,26; 115,21; 112,16; 74,27; 42,65; 22,73; 22,50.

### Composto 3I



**Aspecto físico:** Sólido amarelado

**Rendimento:** 65%

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  12,09 (s, 1H); 7,64 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H); 7,44 (dd,  $J = 8,4; 2,1$  Hz, 1H); 7,41 – 7,21 (m, 5H); 6,74 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H); 5,04 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H); 4,80 (d,  $J = 16,3$  Hz, 1H); 2,21 (s, 3H); 2,10 (s, 3H).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO-*d*6):**  $\delta$  172,18; 170,61; 167,67; 143,38; 141,23; 135,85; 133,18; 130,61; 129,05; 127,88; 127,42; 127,02; 115,40; 112,15; 74,40; 43,94; 22,73; 22,51.

## REFERÊNCIAS

- AFRASIABI, Z. *et al.* Transition metal complexes of phenanthrenequinone thiosemicarbazone as potential anticancer agents: Synthesis, structure, spectroscopy, electrochemistry and in vitro anticancer activity against human breast cancer cell-line, T47D. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 95, n. 4, p. 306–314, 2003.
- AGORAM, B.; WOLTOSZ, W. S.; BOLGER, M. B. Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. SUPPL. 1, 2001.
- ALEX, P. Top 15 Best-Selling Drugs of 2018. **GEN: Genetic Engineering & Biotechnology News**, 2019. Disponível em: <<https://www.genengnews.com/lists/top-15-best-selling-drugs-of-2018>>. Acesso em 15 de novembro de 2019.
- AHMAD, M. H. *et al.* Design and synthesis of sulfur-containing butylated hydroxytoluene: antioxidant potency and selective anticancer agent. **Journal of Chemical Sciences**, v. 131, n. 10, 2019.
- AHMED, H. E. A. *et al.* Developing lipophilic aromatic halogenated fused systems with specific ring orientations, leading to potent anticancer analogs and targeting the c-Src Kinase enzyme. **Journal of Molecular Structure**, v. 1186, p. 212–223, 2019.
- AL-OMAIR, M. A.; SAYED, A. R.; YOUSSEF, M. M. Synthesis of novel triazoles, tetrazine, thiadiazoles and their biological activities. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2591–2610, 2015.
- ARYA, K. *et al.* Brønsted acidic ionic liquids: Green, efficient and reusable catalyst for synthesis of fluorinated spiro [indole-thiazinones/thiazolidinones] as antihistamic agents. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 137, p. 117–122, 2012.
- ARYANASAB, F.; HALIMEHJANI, A. Z.; SAIDI, M. R. Dithiocarbamate as an efficient intermediate for the synthesis of 2-amino-1,3,4-thiadiazoles in water. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 5, p. 790–792, 2010.
- ARUN, Y. *et al.* Novel spirooxindole-pyrrolidine compounds: Synthesis, anticancer and molecular docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 74, p. 50–64, 2014.
- BERRIDGE, M. V. *et al.* Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, 4: 14-19, 1996.
- BOUHFID, R. *et al.* An Efficient Synthesis Of New Spiro[Indolo-3-(1h),2'(3'h)-Oxadiazolyl] And 1-(Triazol-4-Ylmethyl)isatina Derivatives. **Heterocycles**, v. 65, n. 12, p. 413, 2005.
- BAEYER, A. Systematik und Nomenclatur bicyclischer Kohlenwasserstoffe, **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, 33, 3771-3775, 1900.

BRAI, A. *et al.* Synthesis and antiviral activity of novel spirocyclic nucleosides. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 22, p. 18363–18380, 2018.

BRUICE, P. Y. **Química orgânica**. 4 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006, 311p.

CARREIRA, E. M.; FESSARD, T. C. Four-Membered Ring-Containing Spirocycles : Synthetic Strategies and Opportunities. **Chemical Reviews**, 2014.

CHEN, G. *et al.* New bactericide derived from Isatin for treating oilfield reinjection water. **Chemistry Central Journal**, p. 1–5, 2012.

CHEN, G. *et al.* Simple isatin derivatives as free radical scavengers: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 37, 2011.

CHIMENTO, A. *et al.* Progress to improve oral bioavailability and beneficial effects of resveratrol. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, 2019.

CHIYANZU, I. *et al.* Synthesis and evaluation of isatins and thiosemicarbazone derivatives against cruzain, falcipain-2 and rhodesain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 20, p. 3527–3530, 2003.

CHOU, C. H. *et al.* Rhynchophylline from *Uncaria rhynchophylla* functionally turns delayed rectifiers into A-type K<sup>+</sup> channels. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 5, p. 830–834, 2009.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CONSTANTIN, S. M. *et al.* Formulation and characterization of new polymeric systems based on chitosan and xanthine derivatives with thiazolidin-4-one scaffold. **Materials**, v. 12, n. 2, 2019.

CRISTINA, A. *et al.* Heterocycles 48. synthesis, characterization and biological evaluation of imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives as anti-inflammatory agents. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 1–19, 2018.

DA SILVA, B. N. M. *et al.* Síntese de 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina a partir da isonitrosoacetanilida. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2279–2282, 2010.

DALY, J. W. *et al.* Gephyrotoxins, Histrionicotoxins and Pumiliotoxins from the Neotropical Frog *Dendrobates histrionicus*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 60, n. 3, p. 1128–1140, 1977

DELONG, W. *et al.* Design, synthesis and evaluation of 3-arylidene azetidín-2-ones as potential antifungal agents against *Alternaria solani* Sorauer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6661–6673, 2017.

DEMIRCI, S. *et al.* Structure-Based Hybridization, Conventional and Microwave Irradiated Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Studies of New Compounds Derived from Thiomorpholin. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 14, n. 4, p. 444–463, 2017.

DING, K. *et al.* Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 29, p. 10130–10131, 2005.

ERDMANN, O. L. Untersuchungen über den Indigo. **Journal fuer praktische Chemie**, v. 22, n. 1, p. 257-299, 1841.

ER, M. *et al.* Novel substituted benzothiazole and Imidazo[2,1-b][1,3,4]Thiadiazole derivatives: Synthesis, characterization, molecular docking study, and investigation of their in vitro antileishmanial and antibacterial activities. **Journal of Molecular Structure**, v. 1194, p. 284–296, 2019.

FENSOME, A. *et al.* Design, synthesis, and SAR of new pyrrole-oxindole progesterone receptor modulators leading to 5-(7-fluoro-3,3-dimethyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)- 1-methyl-1H-pyrrole-2-carbonitrile (WAY-255348). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 1861–1873, 2008.

GABRIEL, D. *et al.* Pharmacological Activity of Novel 2-Hydroxyacetophenone Isatin Derivatives on Cardiac and Vascular Smooth Muscles in Rats. **J. Cardiovasc Pharmacol™**, v. 590, p. 20–27, 2011.

GARDEN, S. J.; TORRES, J. C.; PINTO, A. C. An Investigation of a Palladium Catalysed Biaryl Synthesis of Pyrrolophenanthridine Derivatives. Extension of the Heck Reaction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 441–446, 2000.

GEDYE, R. *et al.* The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 3, p. 279–282, 1986.

GLOVER, V. *et al.* Isatin : Identity with the Purified Endogenous Monoamine Oxidase Inhibitor Tribulin. **Journal of Neurochemistry**, p. 656–659, 1988.

GIGUERE, R. J. *et al.* Application of commercial microwave ovens to organic synthesis. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 41, p. 4945–4948, 1986.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. **Revista Processos Químicos**, v. 2, n. 4, p. 24–36, 2008.

GURUNANJAPPA, P.; KARIYAPPA, A. K. Design, synthesis and biological evaluation of 1,3,4-oxadiazoles/thiadiazoles bearing pyrazole scaffold as antimicrobial and antioxidant candidates. **Current Chemistry Letters**, v. 5, p. 109–122, 2016.

HAFIDH, R. R. *et al.* Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The Open Microbiology Journal**, v. 5, p. 98-106, 2011.

HANSCH, C. *et al.* QSAR and ADME. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 12, p. 3391–3400, 2004.

HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

KHANNA, P. *et al.* Microwave Assisted Synthesis of Spiro Heterocyclic Systems: A Review. **Current Organic Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 67–84, 2017.

HOLETZ, F.B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

KONOVALOVA, V. V; MASLIVETS, A. N. "Synthesis of Spiro Compounds Based on 1H-Pyrrole-2,3-Diones", Mini-Reviews in Organic Chemistry. **Bentham Science Publisher**. n. 1, p. 173–192, 2019.

KANG, D. *et al.* Synthesis and Preliminary Antiviral Activities of Piperidine-substituted Purines against HIV and Influenza A/H1N1 Infections. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 568–577, 2015.

KAUR, P. 1,3,4-Thiadiazole and its derivatives: a review on biological activities. **International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences**, 246-280, 2017.

KHAN, F. A.; MAALIK, A. Advances in pharmacology of isatin and its derivatives: A review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1937–1942, 2015.

KUBOTA, S. *et al.* Synthesis of 4-Acyl-2-(acylamino)- $\Delta$ 2-1,3,4-thiadiazolines and 4-Acyl-2-amino- $\Delta$ 2-1,3,4-thiadiazolines by Acylation of Thiosemicarbazones. **Journal of Organic Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1473–1477, 1980.

KUMARI, G. *et al.* Rhodium(II) acetate-catalyzed stereoselective synthesis, SAR and anti-HIV activity of novel oxindoles bearing cyclopropane ring. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1181–1188, 2011.

LA HOZ, A. DE; DÍAZ-ORTIZ, Á.; PRIETO, P. Microwaves in green and sustainable chemistry. **Handbook of Environmental Chemistry**, v. 32, n. July, p. 405–428, 2015.

LAURENT, A. Recherches sur l'indigo. **Annales de Chimie et de Physique**, v. 3, n. 3, p. 393-434, 1840.

LI, Y. *et al.* Thiadiazole-a Promising Structure in Medicinal Chemistry. **ChemMedChem**, v. 8, n. 1, p. 27–41, 2013.

LIDSTRÖM, P. *et al.* Microwave assisted organic synthesis – A Review. **Tetrahedron**, 57, 9225-9283, 2001

LINGANNA, N.; RAI, K. M. Transformation of 1,3,4-oxadiazoles to 1,3,4-thiadiazoles using thiourea. **Synthetic Communications**, 1998.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 1997.

MAMUN, H. M. *et al.* Microwave-assisted Efficient Synthesis of Isatins and spiro-Thiadiazolines under Green Chemistry Protocol. **Journal of Scientific Research**, v. 2, n. 2, p. 322–329, 2010.

MARTINEZ, A.; GIL, C. Chapter 9 - Heterocycles Containing Nitrogen and Sulfur as Potent Biologically Active Scaffolds. In: Brase, S. Privileged Scaffolds in Medicinal Chemistry: Design, Synthesis, Evaluation. **Royal Society of Chemistry**, 2016.

MARTINEZ, S. T.; FERREIRA, V. F. The Isatins of professor angelo. **Revista Virtual de Quimica**, v. 9, n. 3, p. 1154–1183, 2017.

MATHUR G.; NAIN, S. Recent Advancement in Synthesis of Isatin as Anticonvulsant Agents: A Review. **Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 417–427, 2014.

MENDONÇA, G. F. *et al.* Trichloroisocyanuric acid in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: An efficient superelectrophilic reagent for chlorination of isatin and benzene derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 695–698, 2005.

MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A.; GAUDIO, A. C. Validação lateral em relações quantitativas entre estrutura e atividade farmacológica, QSAR. **Quimica Nova**, v. 25, n. 2, p. 231–240, 2002.

MUSTAFA, Y. F. Synthesis, characterization and antibacterial activity of novel heterocycle, coumacine, and two of its derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 6, p. 870–875, 2018.

NAM, N. H. *et al.* Synthesis, bioevaluation and docking study of 5-substitutedphenyl-1,3,4-thiadiazole-based hydroxamic acids as histone deacetylase inhibitors and antitumor agents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 5, p. 611–618, 2014.

NASSAR, I. F.; ATT-ALLAH, S. R.; HEMDAN, M. M. Utility of thiophene-2-carbonyl isothiocyanate as a precursor for the synthesis of 1,2,4-triazole, 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives with evaluation of their antitumor and antimicrobial activities. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, v. 193, n. 10, p. 630–636, 2018.

OSEPCHUK, J. M. The history of the microwave oven: A critical review. **IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest**, p. 1397–1400, 2009.

**OSIRIS PROPERTY EXPLORER**. Disponível em: <<https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>>. Acesso em 8 de setembro de 2019.

PADMINI, E.; INBATHAMIZH, L. Quinic Acid As A Potent Drug Candidate For Prostrate Cancer – A Comparative Pharmacokinetics Approach. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 4, p. 106–112, 2013.

PANDA, S. S.; JAIN, S. C. “On water” synthesis of spiro-indoles via Schiff bases. **Monatshefte fur Chemie**, v. 143, n. 8, p. 1187–1194, 2012.

Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R., ‘Introdução à Espectroscopia’ – tradução da 4ª edição norte-americana. **Ed. Cengage Learning**, São Paulo, 2012.

PERREUX, L.; LOUPY, A. A Tentative Rationalization of Microwave Effects in Organic Synthesis According to the reaction médium, and Mechanistic Considerations, **Tetrahedron**, 57, 9199-9223, 2001.

PAVLOVSKA, T. L. *et al.* Molecular diversity of spirooxindoles. Synthesis and biological activity. **Molecular Diversity**, v. 20, n. 1, p. 299–344, 2016.

PRADHAN, R. *et al.* A synthon approach to spiro compounds. **Tetrahedron**, v. 62, n. 5, p. 779–828, 2006.

RAJANARENDAR, E. *et al.* A facile synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity of isoxazolyl-2,3-dihydrospiro[benzo[f]isoindole-1,3'-indoline]-2',4, 9-triones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 13, p. 3954–3958, 2013.

SAKHUJA, R. *et al.* Design and synthesis of spiro[indole-thiazolidine]spiro[indole-pyrans] as antimicrobial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 18, p. 5465–5469, 2011.

SARASWAT, P. *et al.* Review of synthesis and various biological activities of spiro heterocyclic compounds comprising oxindole and pyrrolidine moities. **Synthetic Communications®**, v. 0, n. 0, p. 1–22, 2016.

SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SEKHAR, D. *et al.* Design and Synthesis of 1,3,4-Thiadiazole Derivatives as Novel Anticancer and Antitubercular Agents. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 770–779, 2019.

SANSEVERINO, A.M. Microondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660–667, 2002.

SERBAN, G. Future prospects in the treatment of parasitic diseases: 2-amino-1,3,4-thiadiazoles in leishmaniasis. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1–22, 2019.

STEVENS, C. V. *et al.* Synthesis of highly functionalised spiro-indoles by a halogen atom transfer radical cyclization. **Chemical Communications**, v. 8, n. 38, p. 4827–4829, 2005.

SHAILENDRA *et al.* Synthesis, spectral studies and screening for amoebicidal activity of new palladium(II) complexes derived from thiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 4, p. 689–692, 2003.

SILVA, J. F. M. DA; GARDEN, S. J.; PINTO, A. C. The Chemistry of Isatins: A Review from 1975 to 1999. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 3, p. 273–324, 2001.

SILVA, T. S. M. **Síntese Assistida Por Micro-Ondas De Tiossemicarbazonas Derivadas Da Isatina Com Potencial Atividade Biológica**. 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SINGH, G. S.; DESTA, Z. Y. Isatins as privileged molecules in design and synthesis of spiro-fused cyclic frameworks. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 11, p. 6104–6155, 2012.

SKEHAN, P. *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, 82(13): 1107-1112, 1990.

SOMOGYI, L. Synthesis of Spiro[Indoline-3,2'(3'h)-[1,3,4]Thiadiazoline]-2-Ones by Acetylation of Isatin-Beta-Thiosemicarbazones. **Liebigs Annalen Der Chemie**, n. 8, p. 931–934, 1993.

SOUZA, R. O. M. A. DE; MIRANDA, L. S. DE M. E. Irradiação de micro-ondas aplicada à síntese orgânica: uma história de sucesso no Brasil. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 497–506, 2011.

SWISSADME. **Swiss Institute of Bioinformatics**. Disponível em: <<http://www.swissadme.ch>>. Acesso em 8 de setembro de 2019.

TAKAHASHI, K.; WITKOP, B.; BROSSI, A. Total Synthesis and Electrophysiological Properties of Natural (-)-Perhydrohistrionicotoxin, its Unnatural (+)-Antipode and their 2-Depentyl Analogs. **Helvetica Chimica Acta**, v. 65, n. 23, 1982.

TENÓRIO, R. P. *et al.* Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 1030–1037, 2005.

TSE, M. T. Antimalarial drugs: Speeding to a new lead. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 11, p. 842, 2010.

VAHEDI, H. *et al.* 1,3,4-Thiadiazoles Carrying Isatin Moiety. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, n. 4, p. 1379–1382, 2012.

VAMISSETTI, G. B. *et al.* Halogen Substituents in the Isoquinoline Scaffold Switches the Selectivity of Inhibition between USP2 and USP7. **ChemBioChem**, v. 20, n. 2, p. 282–286, 2019.

VINTONYAK, V. V. *et al.* Identification of Thiazolidinones Spiro-Fused to Indolin-2-ones as Potent and Selective Inhibitors of the Mycobacterium tuberculosis Protein Tyrosine Phosphatase B. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 34, p. 5902–5905, 2010.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4 ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

WALTERS, W. P.; MURCKO, M. A. Prediction of „drug-likeness“. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 255-271, 2002.

WEI, Z. Y. *et al.* Design, synthesis, evaluation, and molecular docking of ursolic acid derivatives containing a nitrogen heterocycle as anti-inflammatory agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 10, p. 1797–1803, 2018.

YAN, J. *et al.* Design, synthesis and antimicrobial activities of novel 1,3,5-Thiadiazine-2-thione derivatives containing a 1,3,4-Thiadiazole group. **PeerJ**, v. 2019, n. 9, p. 1–18, 2019.

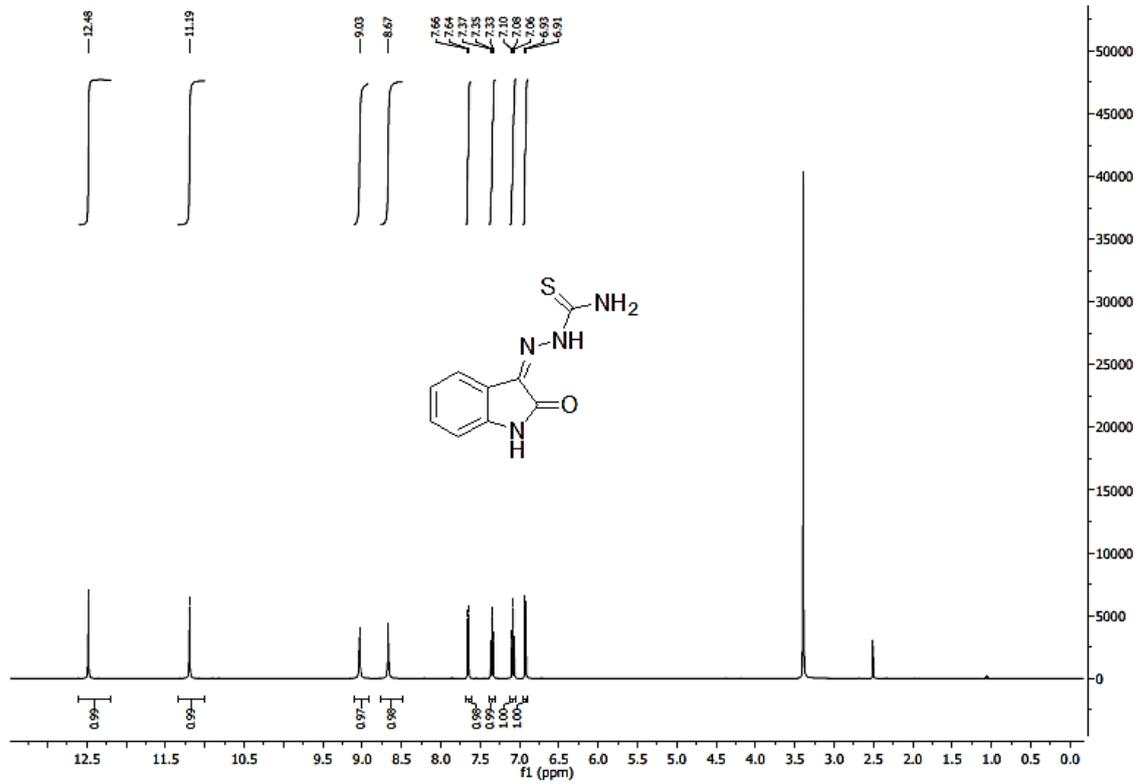
YEUNG, B. K. S. *et al.* Spirotetrahydro  $\beta$ -carbolines (spiroindolones): A new class of potent and orally efficacious compounds for the treatment of malaria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5155–5164, 2010.

YUAN, H. *et al.* Discovery, optimization and biological evaluation for novel c-Met kinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 491–502, 2018.

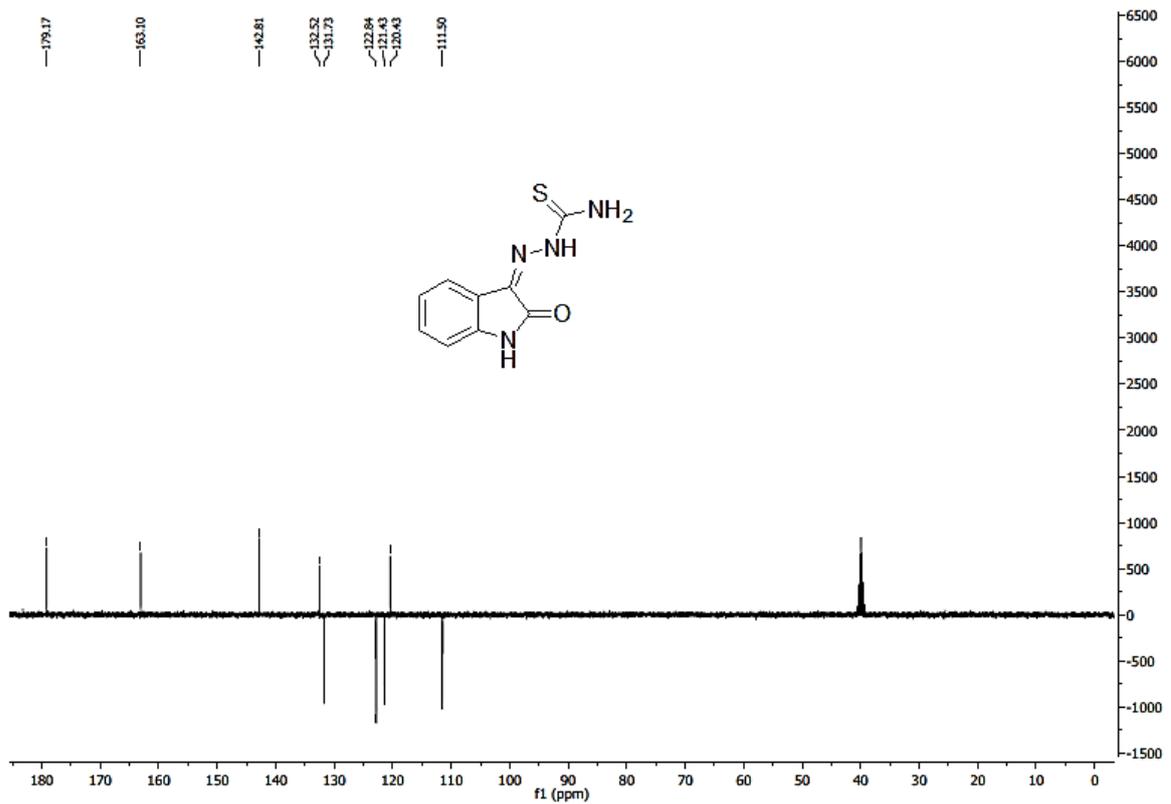
ZIARANI, G. M.; MORADI, Z.; LASHGARI, N. Synthesis of spiro-fused heterocyclic scaffolds through multicomponent reactions involving isatin. **ARQUIVOC**, p. 1-81, 2016.

# ESPECTROS

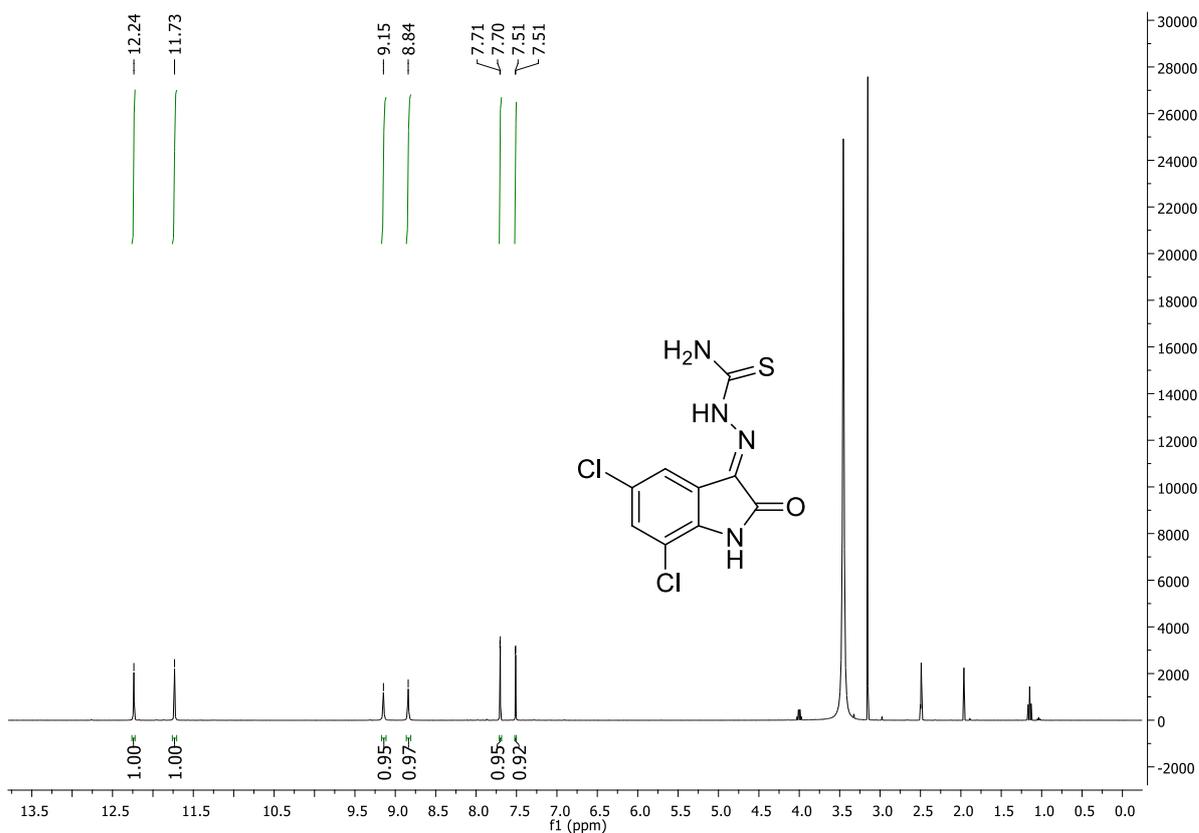
## ESPECTRO 1 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2a



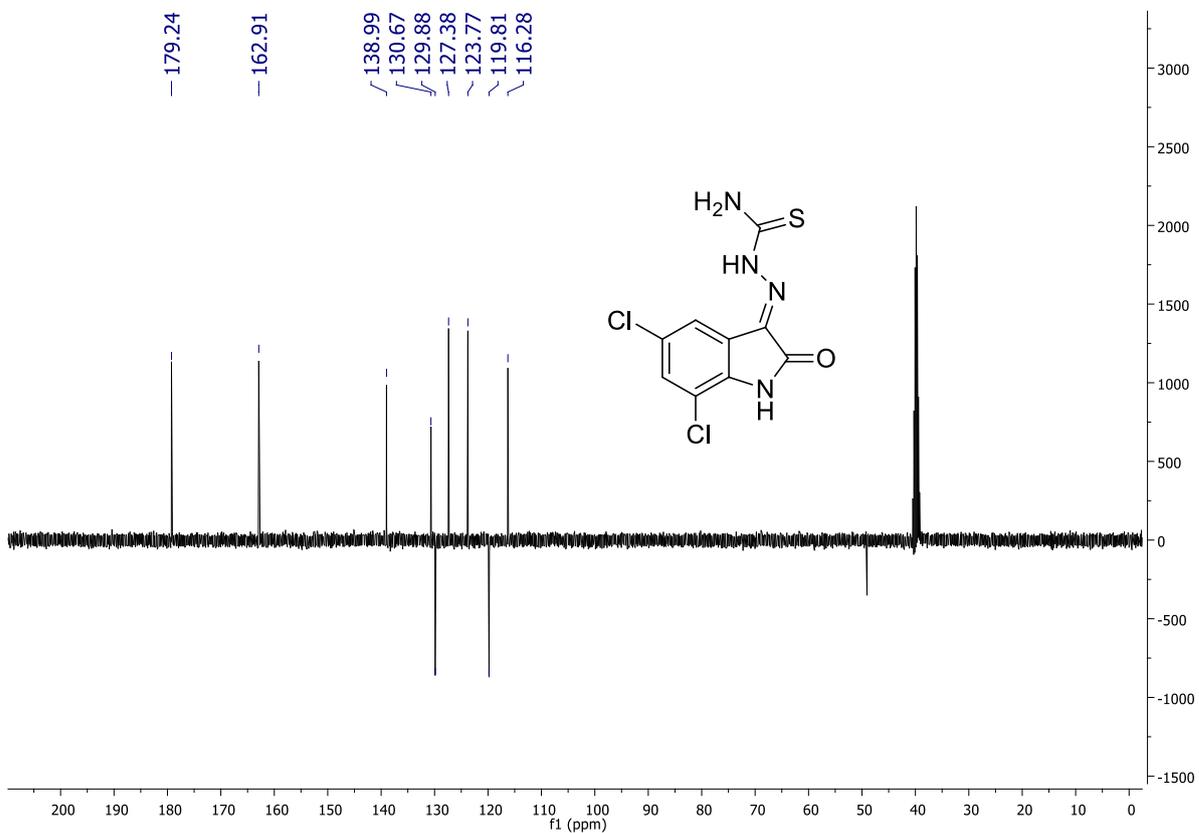
## ESPECTRO 2 – RMN <sup>13</sup>C-APT 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2a



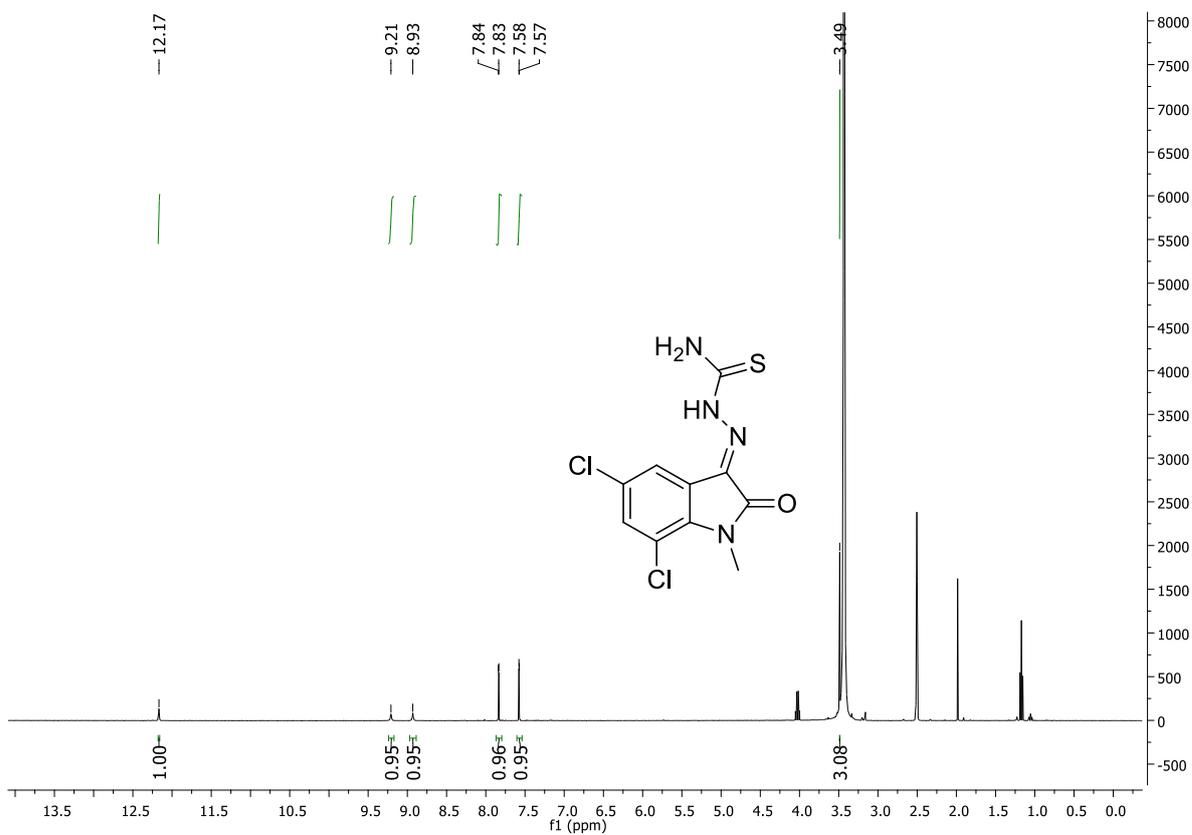
**ESPECTRO 3 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2b**



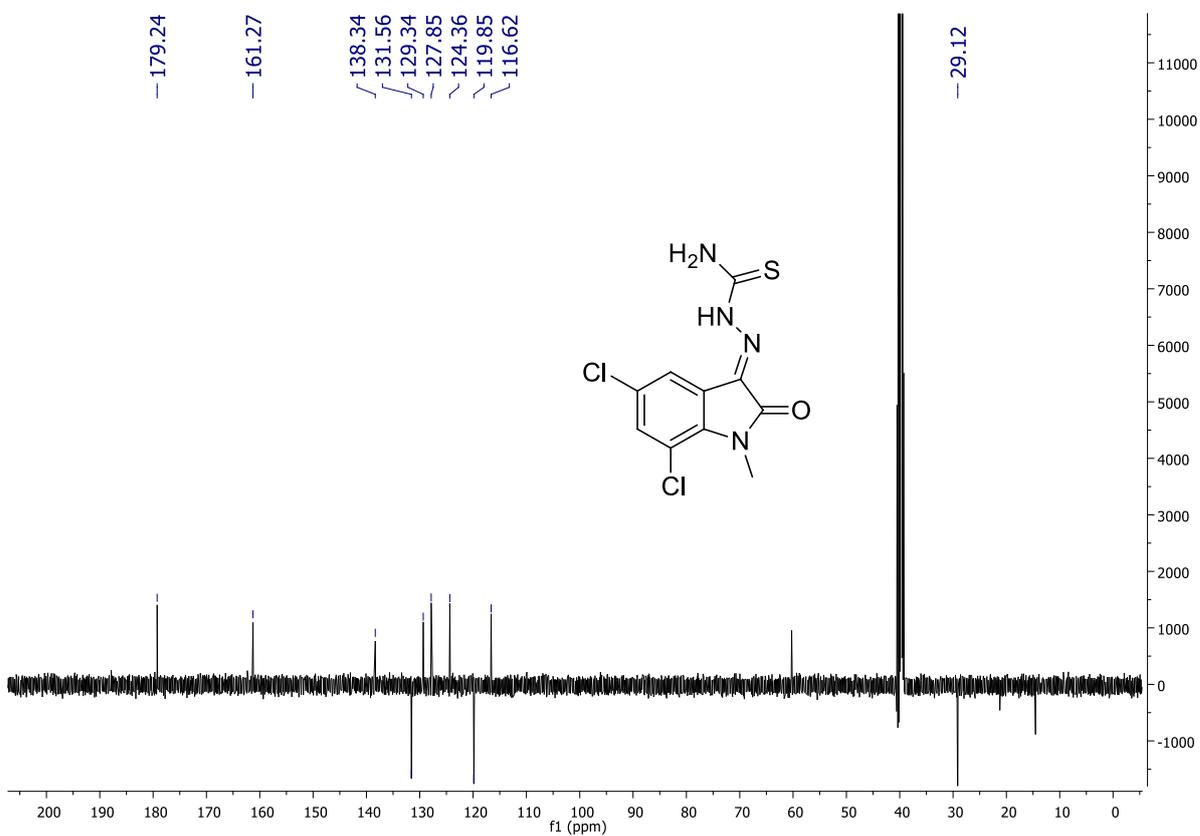
**ESPECTRO 4 – RMN <sup>13</sup>C-APT 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2b**



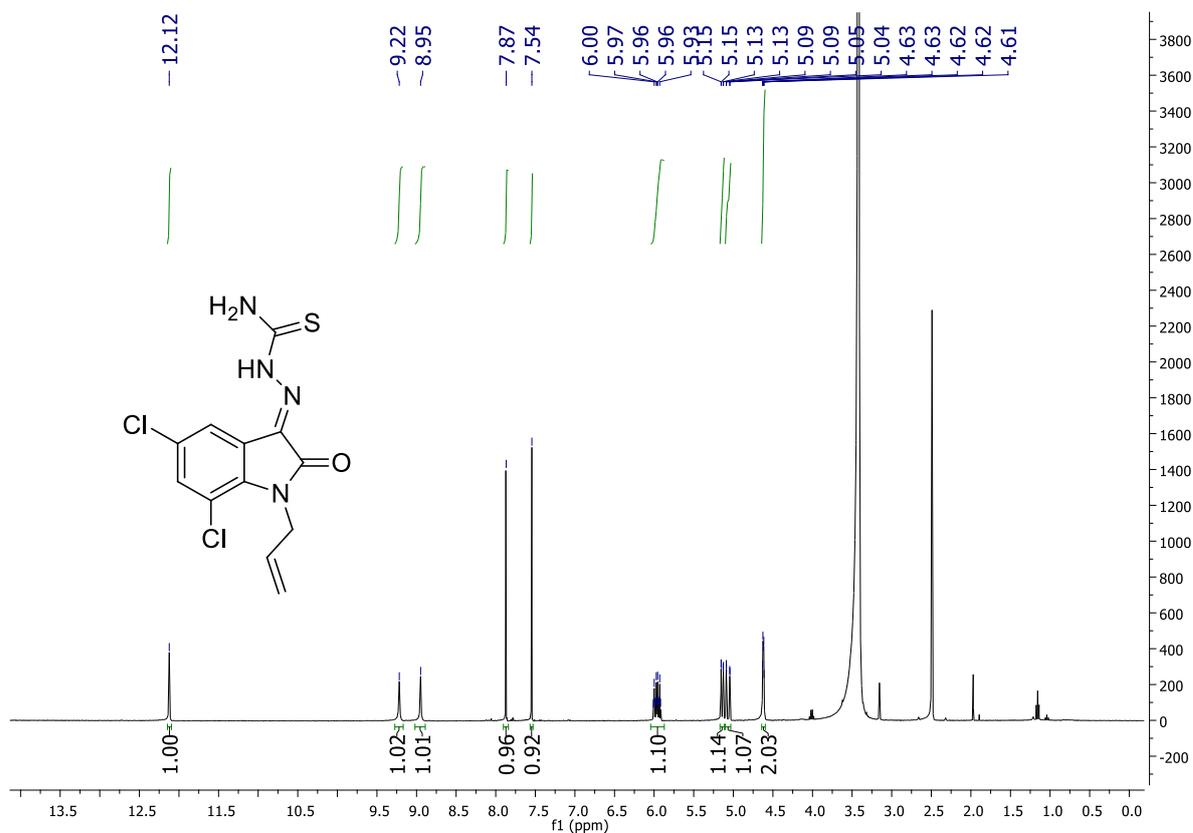
ESPECTRO 5 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **2c**



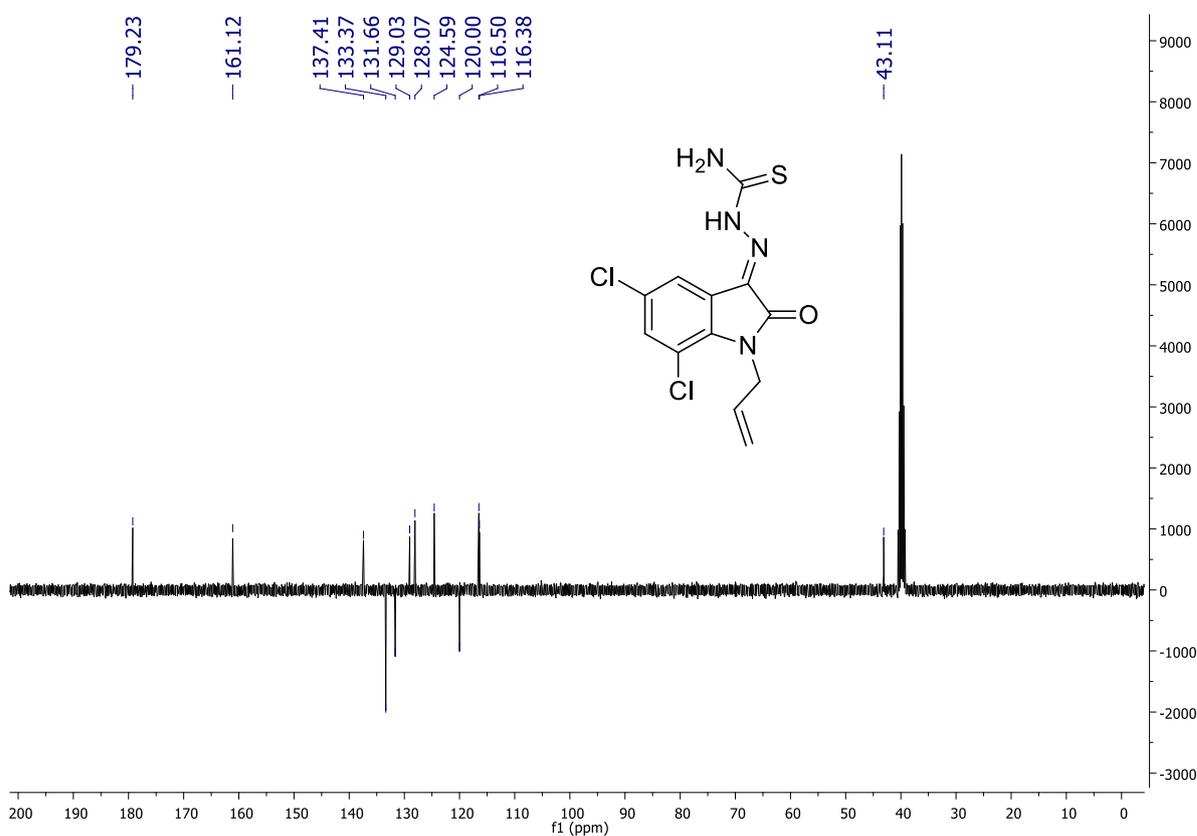
ESPECTRO 6 – RMN <sup>13</sup>C-APT 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **2c**



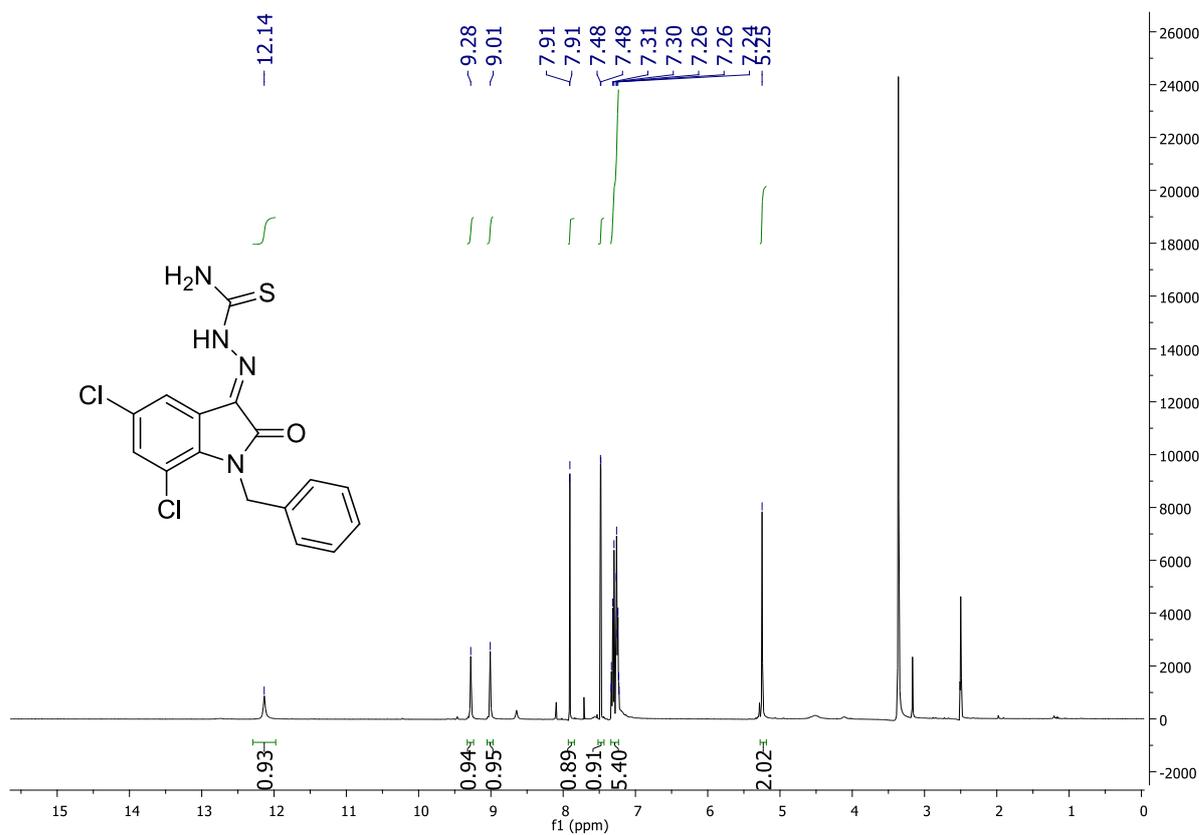
### ESPECTRO 7 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **2d**



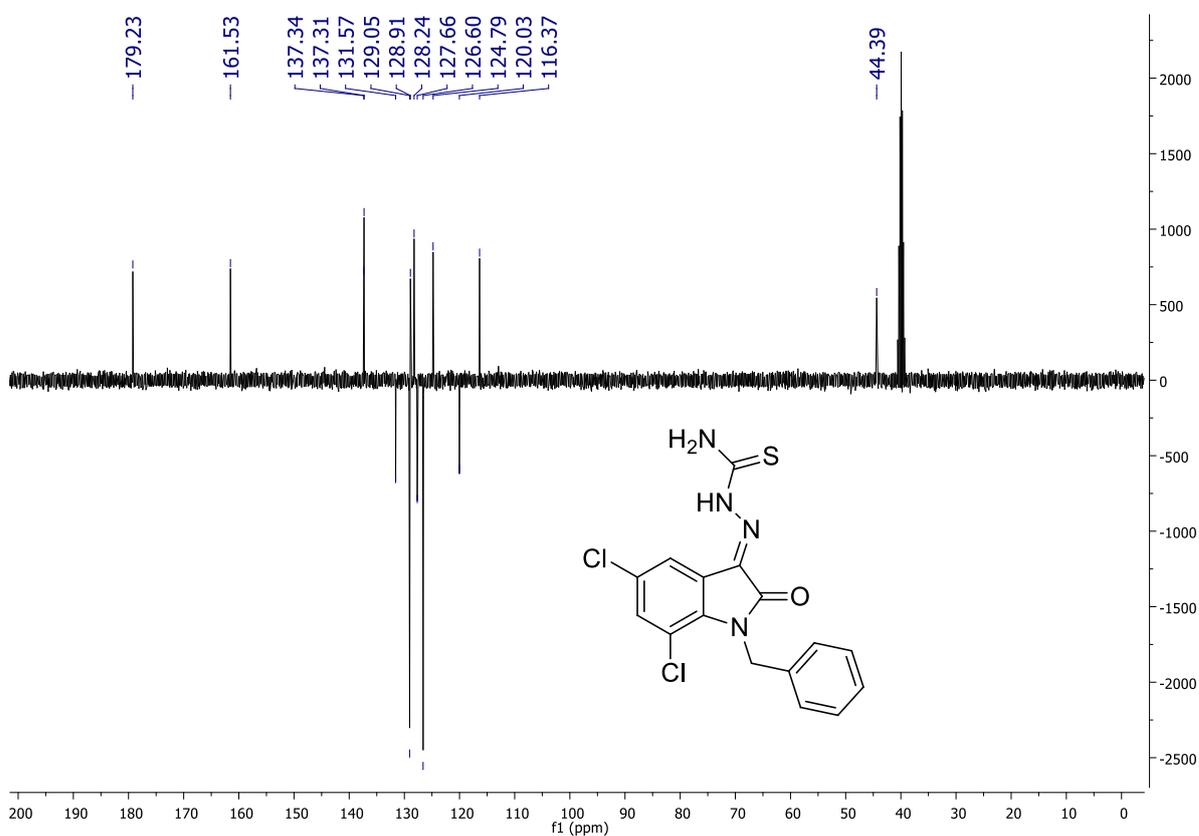
### ESPECTRO 8 – RMN <sup>13</sup>C-APT 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **2d**



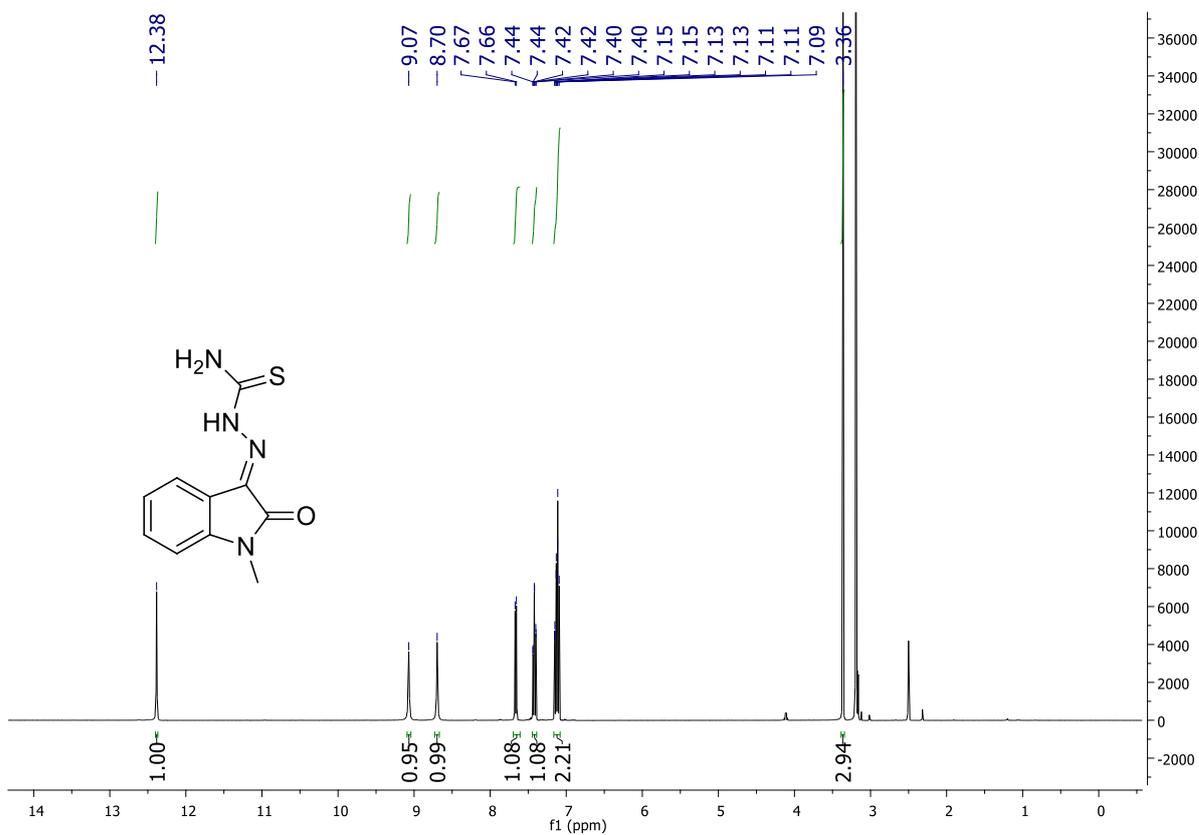
ESPECTRO 9 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-d<sub>6</sub>) de 2e



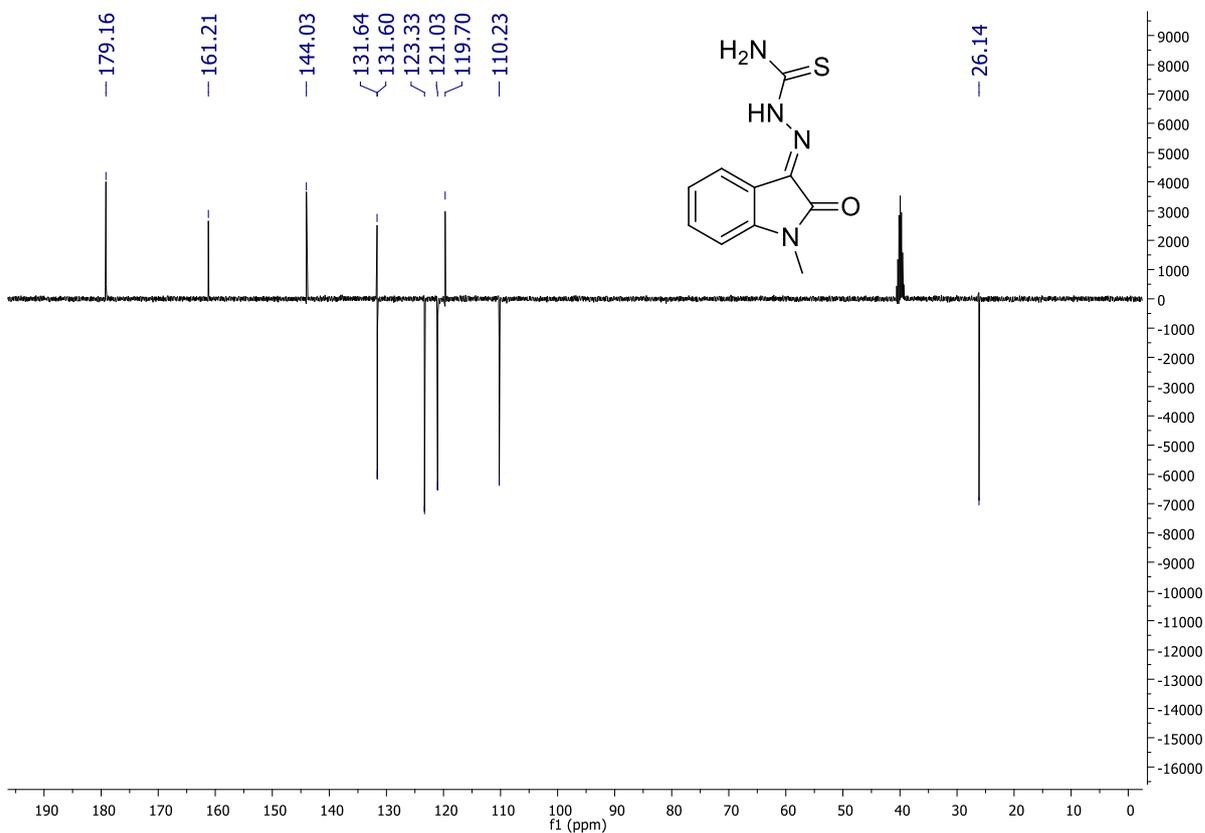
ESPECTRO 10 – RMN <sup>13</sup>C-APT 100 MHz (DMSO-d<sub>6</sub>) de 2e



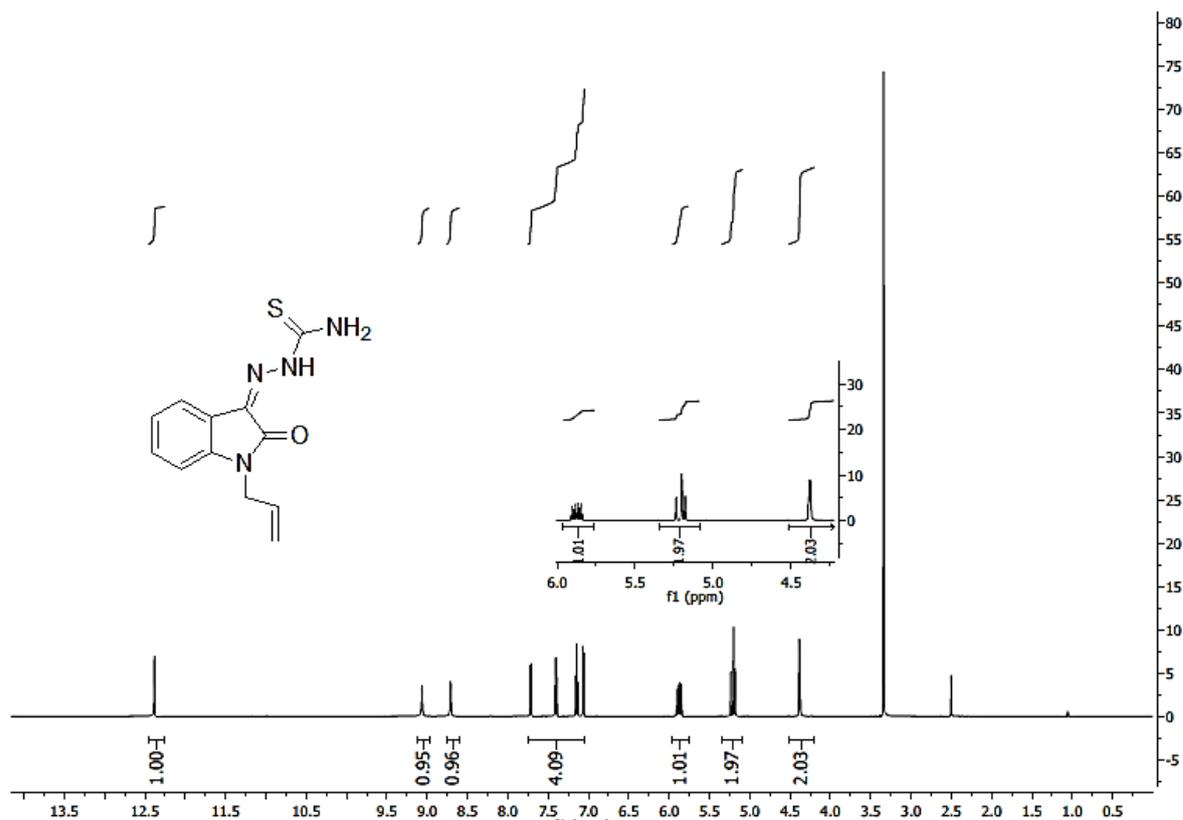
ESPECTRO 11 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2f



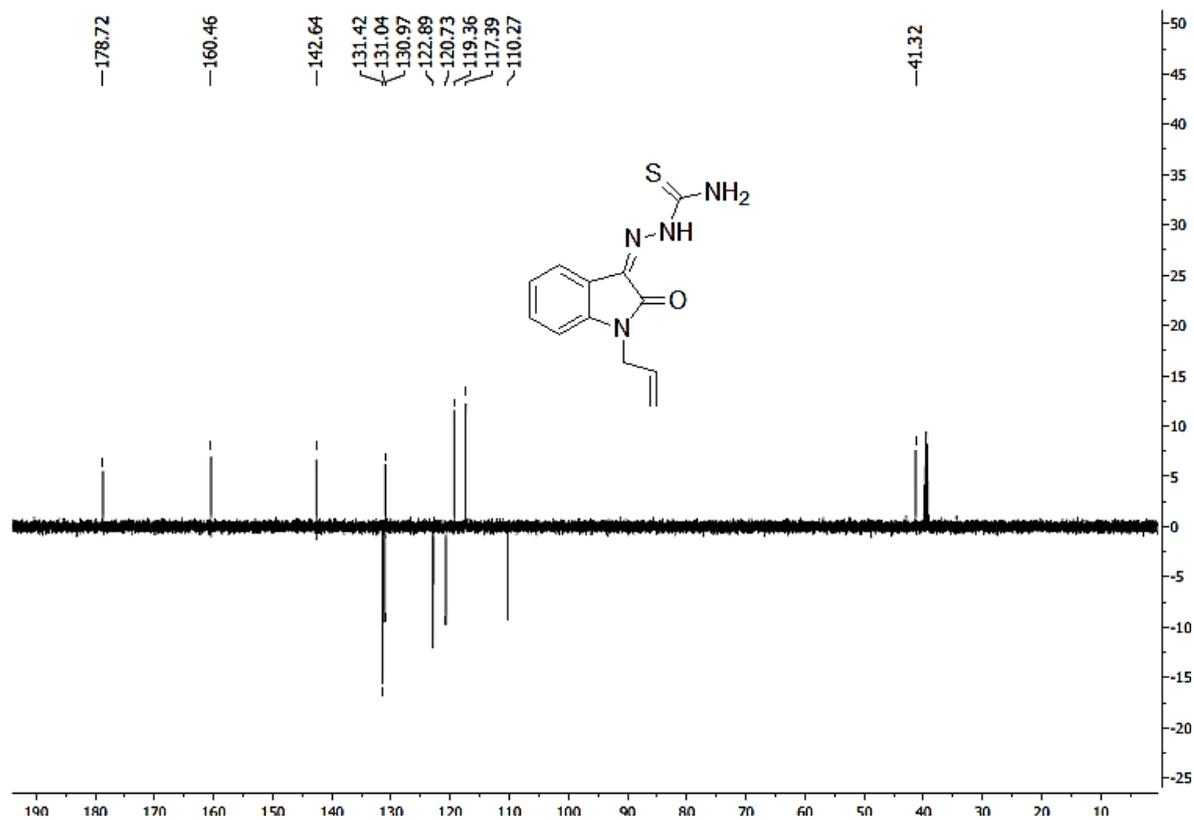
ESPECTRO 12 – RMN <sup>13</sup>C-APT 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2f



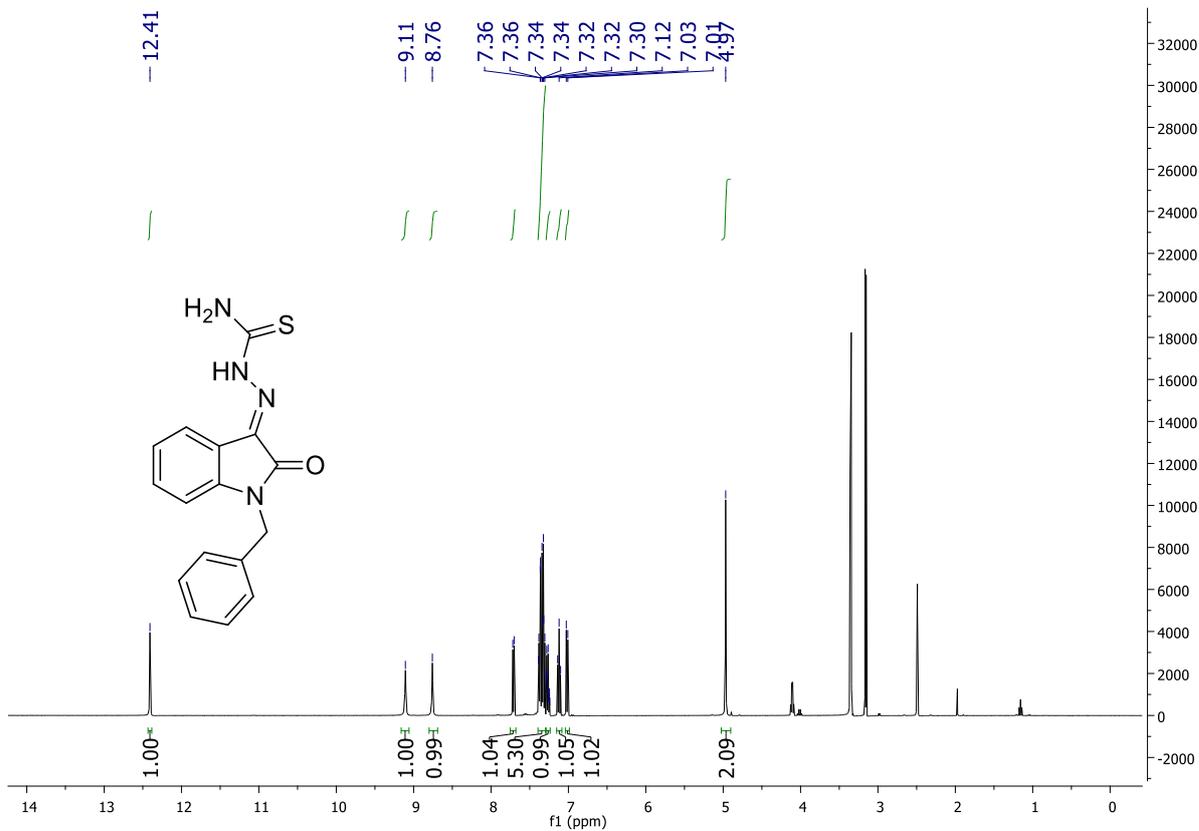
ESPECTRO 13 – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz (DMSO- $d_6$ ) de **2g**



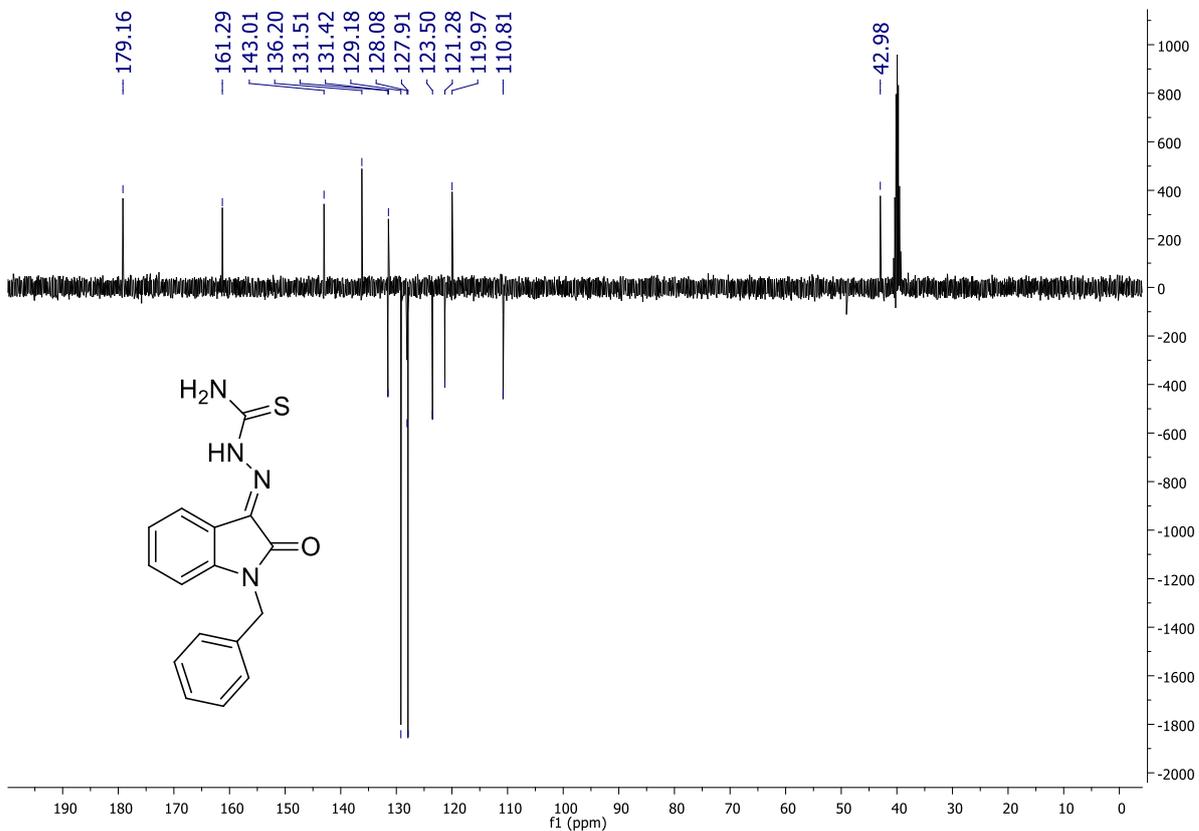
ESPECTRO 14 – RMN  $^{13}\text{C}$ -APT 100 MHz (DMSO- $d_6$ ) de **2g**



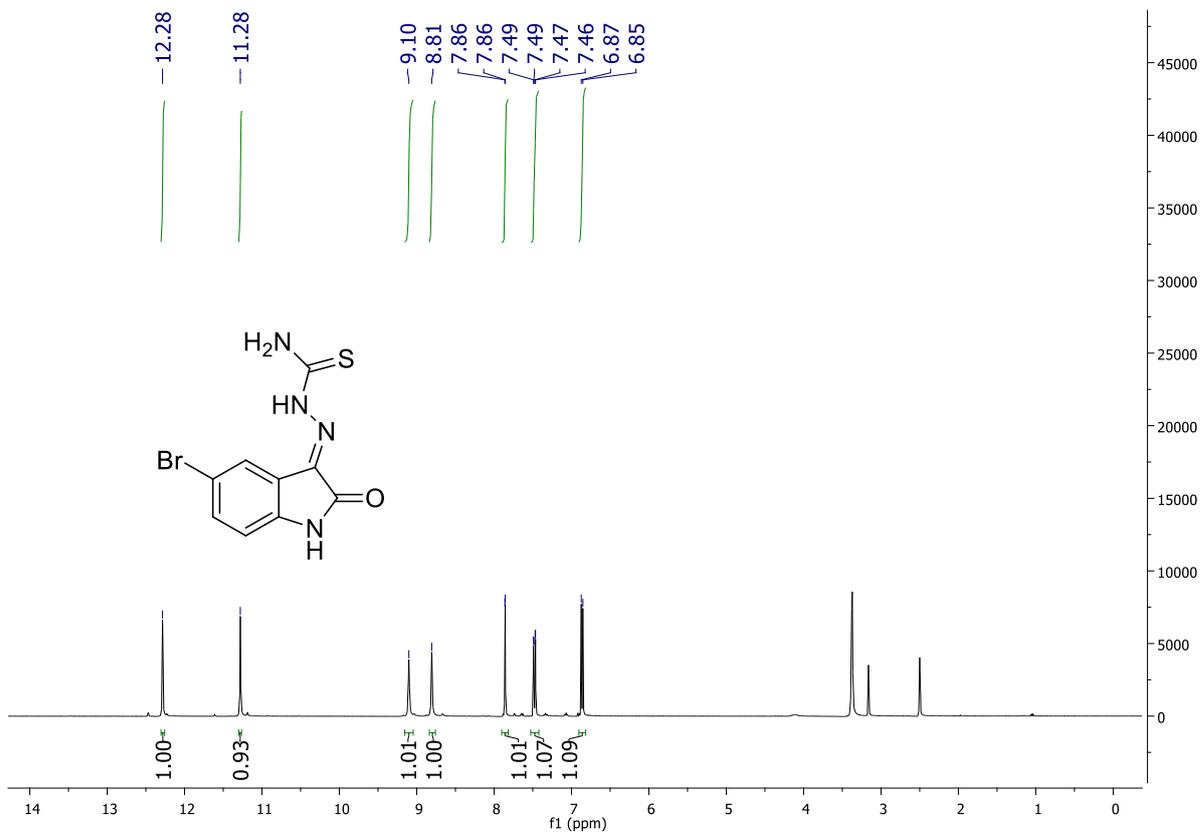
ESPECTRO 15 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2h



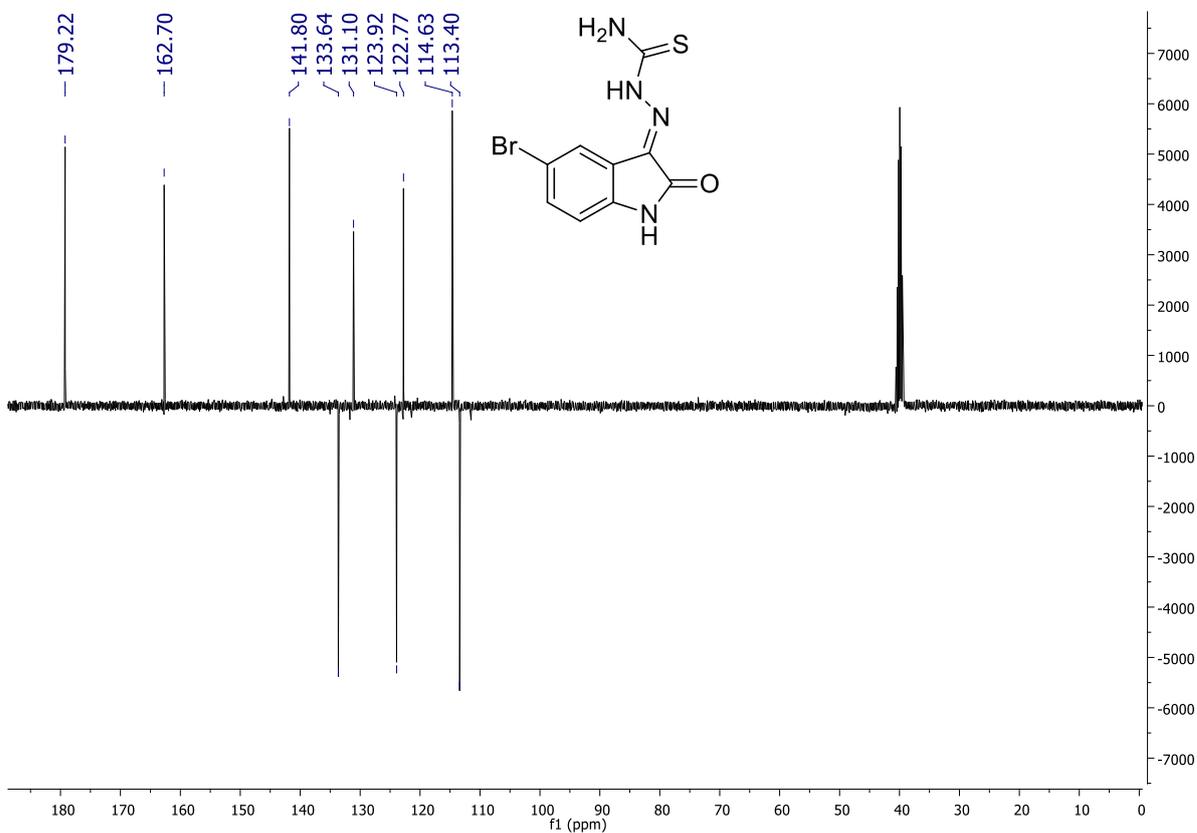
ESPECTRO 16 – RMN <sup>13</sup>C-APT 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2h



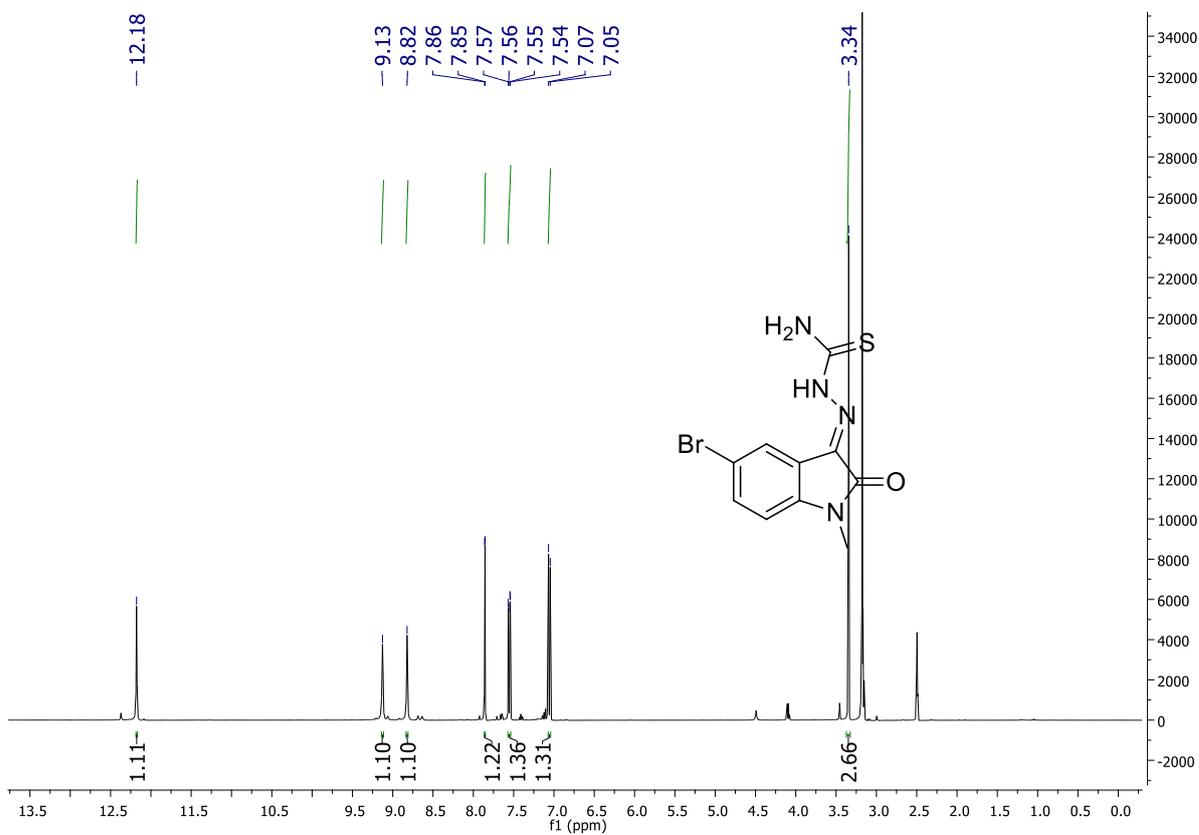
**ESPECTRO 17 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2i**



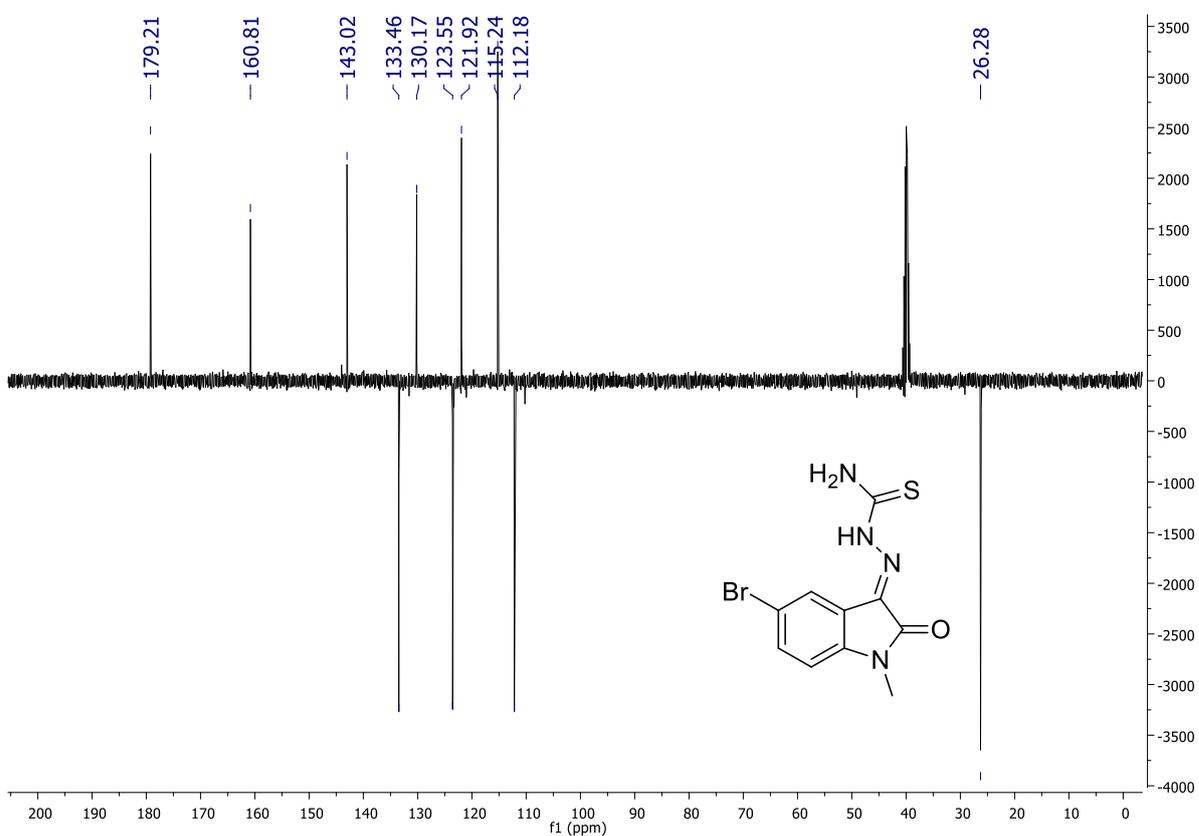
**ESPECTRO 18 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2i**



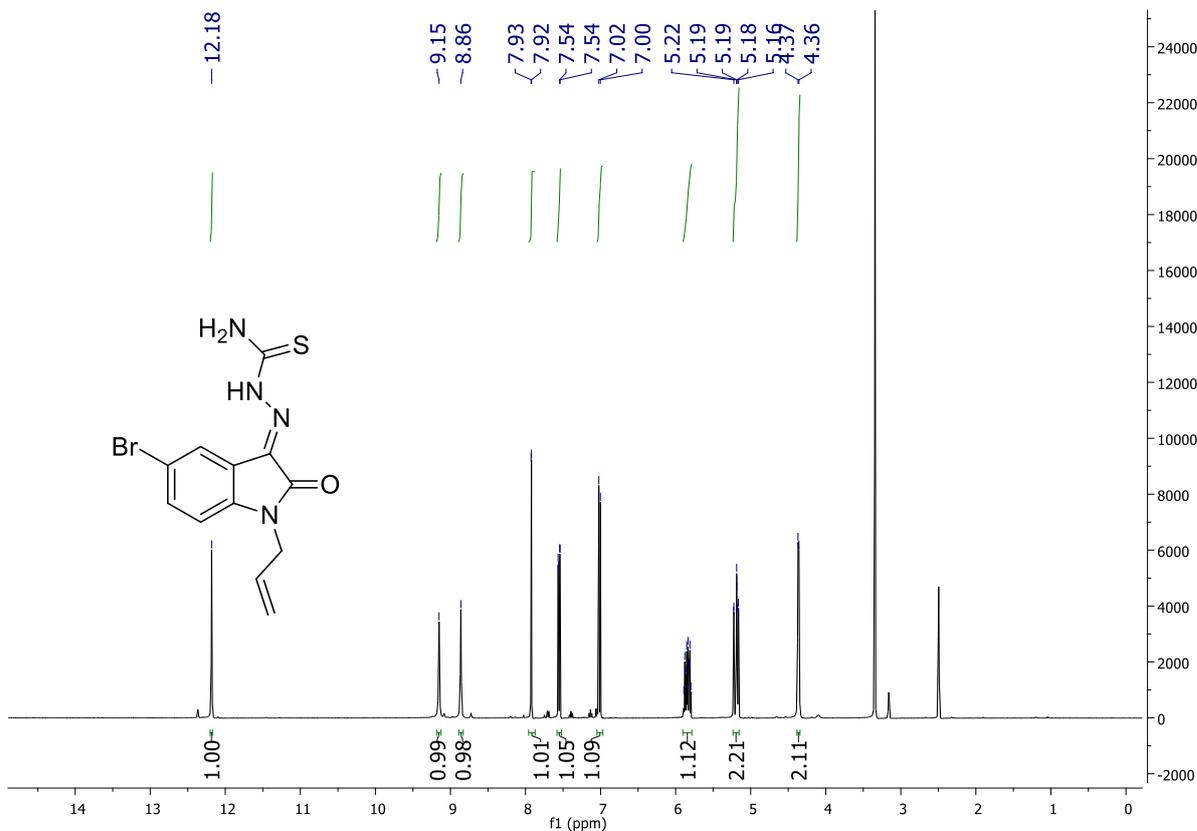
**ESPECTRO 19 – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz (DMSO- $d_6$ ) de 2j**



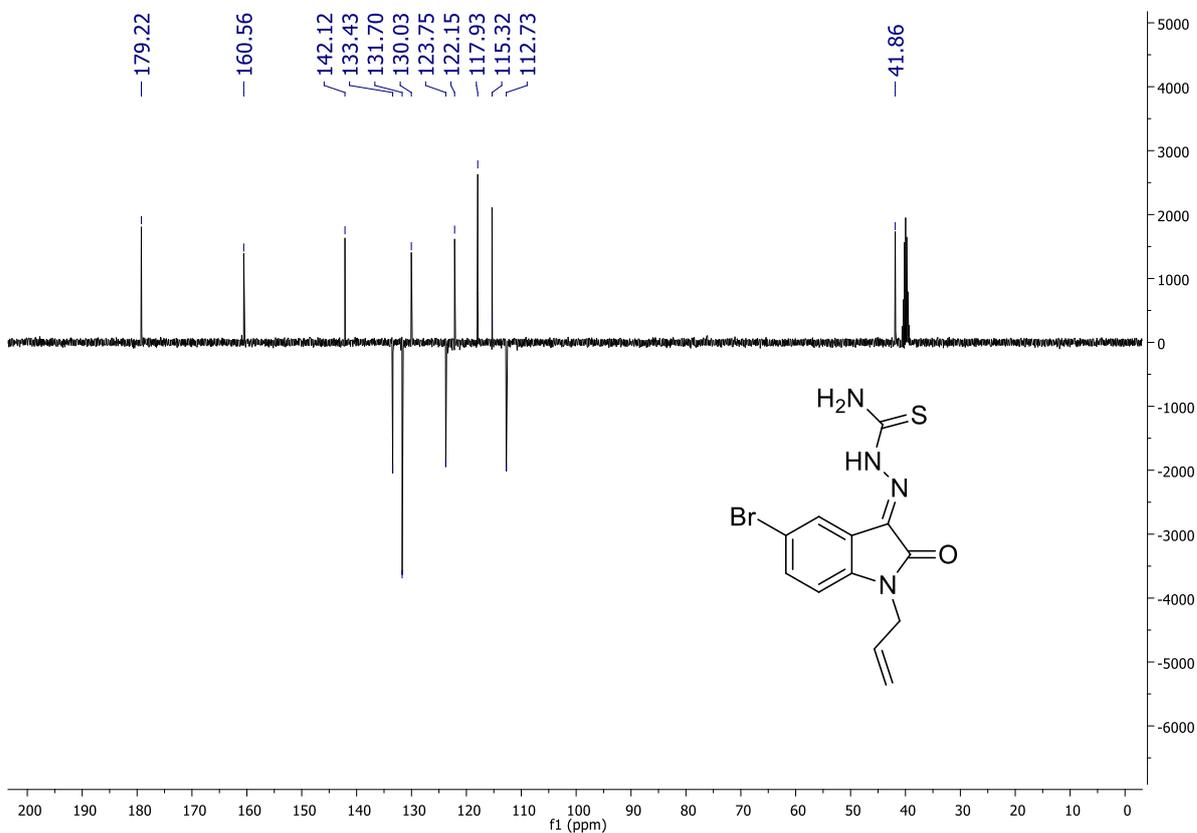
**ESPECTRO 20 – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz (DMSO- $d_6$ ) de 2j**



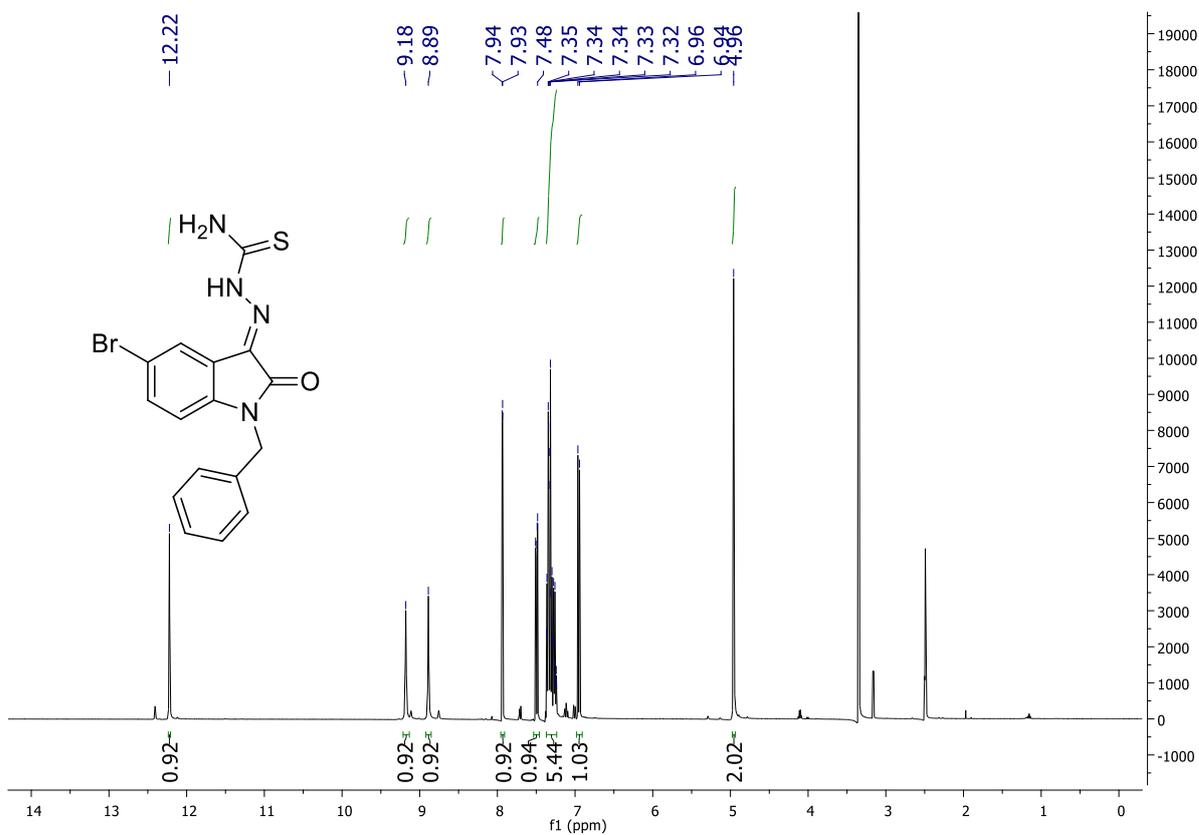
**ESPECTRO 21 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2k**



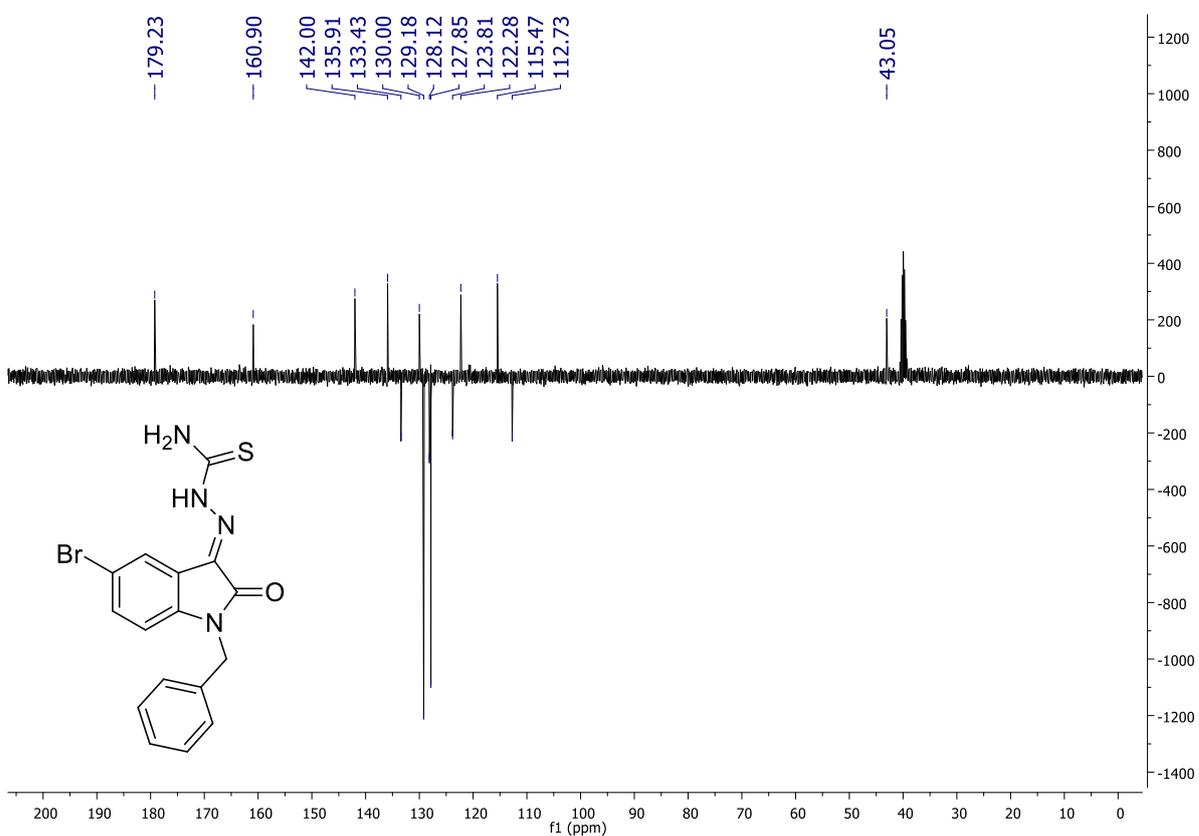
**ESPECTRO 22 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2k**



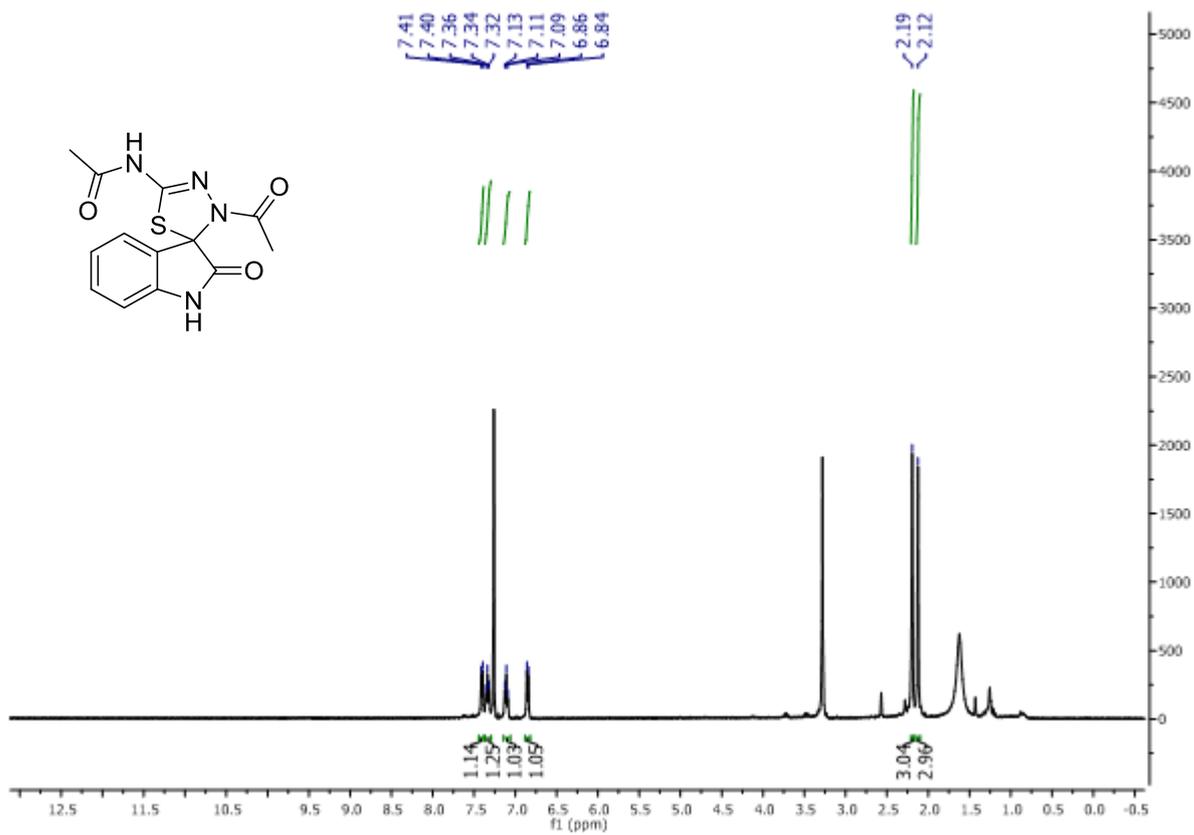
ESPECTRO 23 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2i



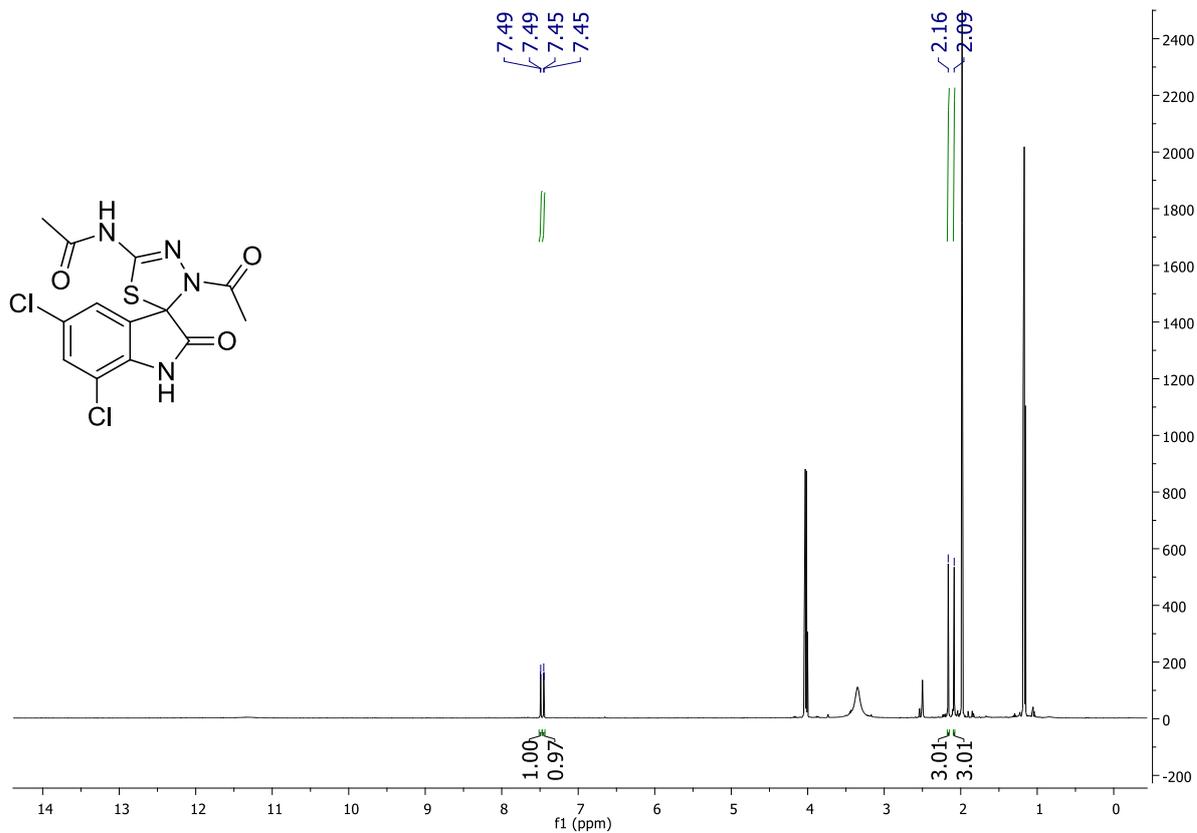
ESPECTRO 24 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 2i



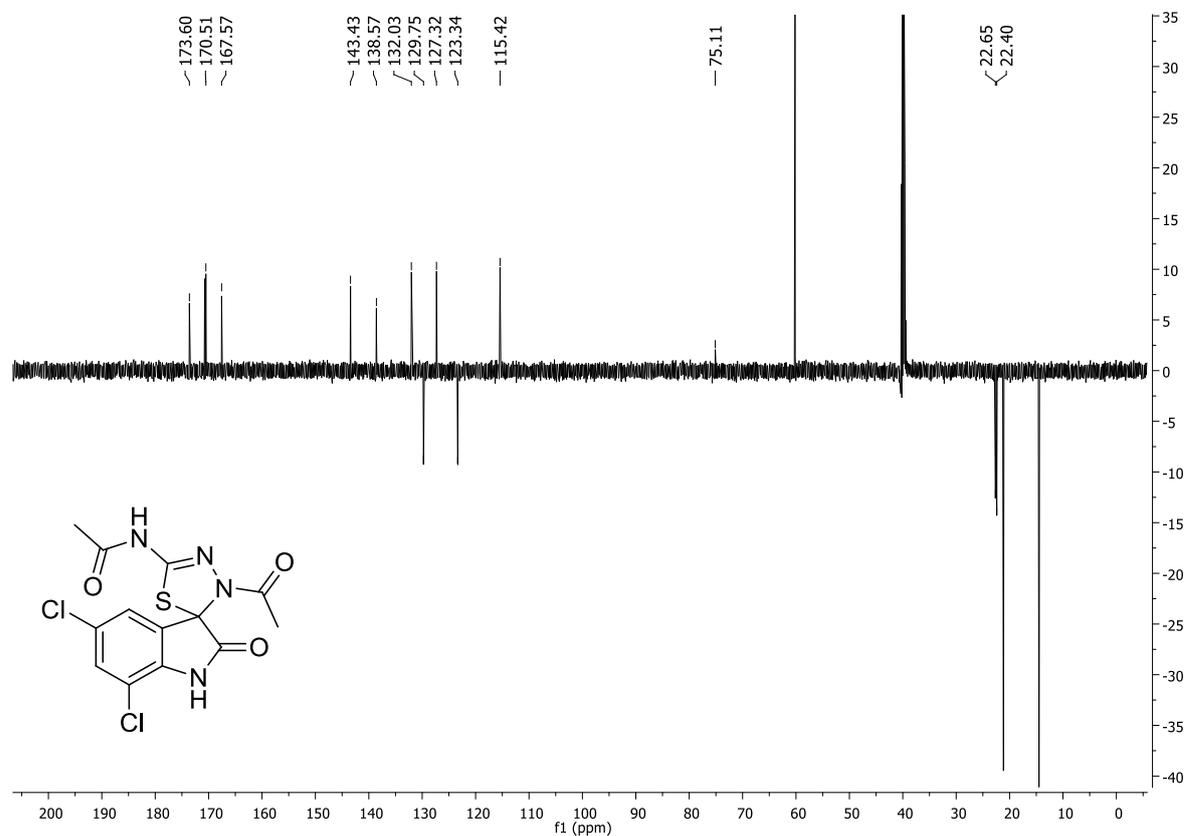
ESPECTRO 25 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>) de **3a**



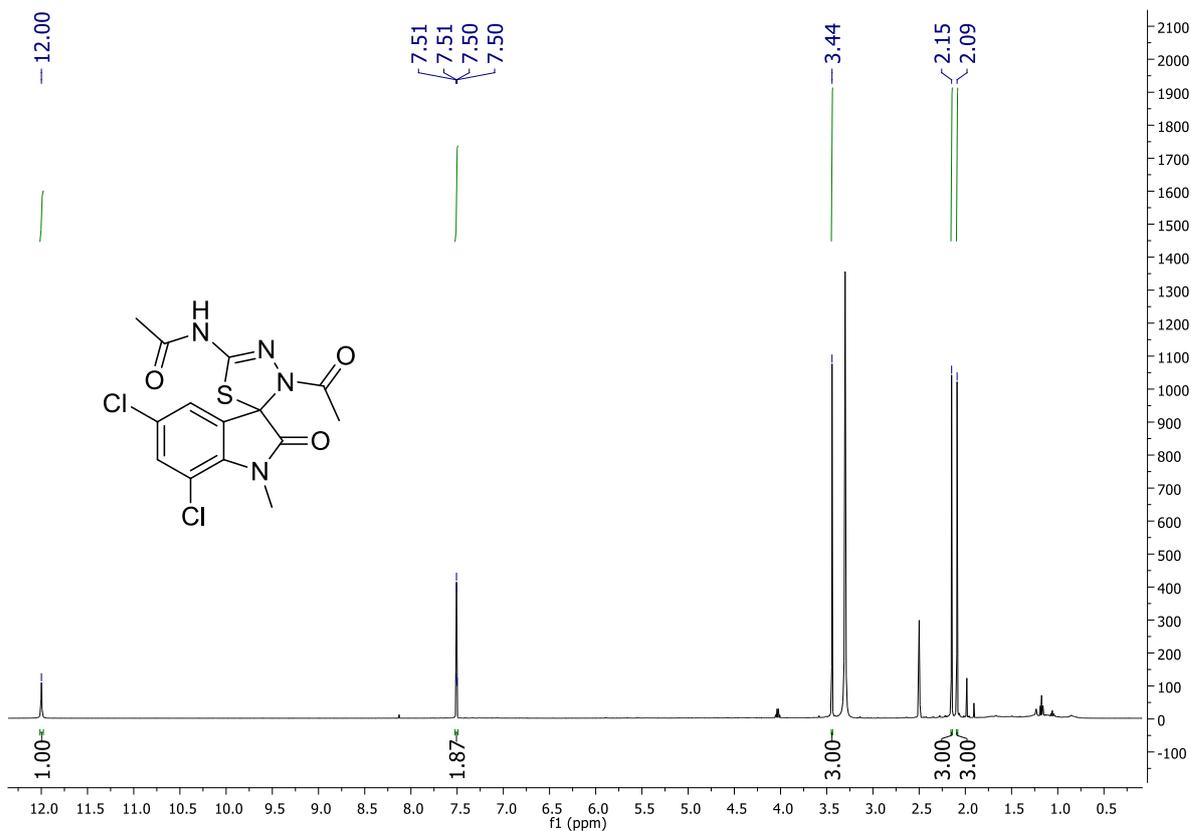
ESPECTRO 26 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3b**



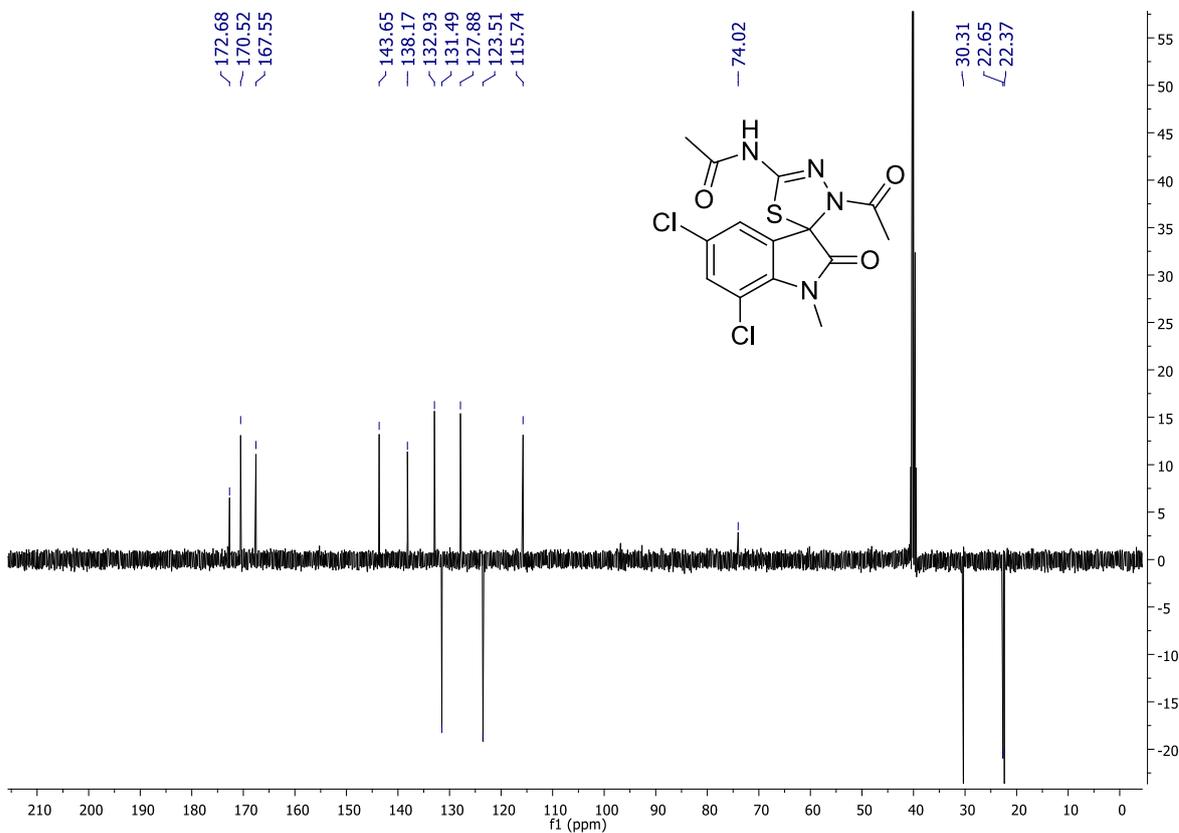
ESPECTRO 27 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3b**



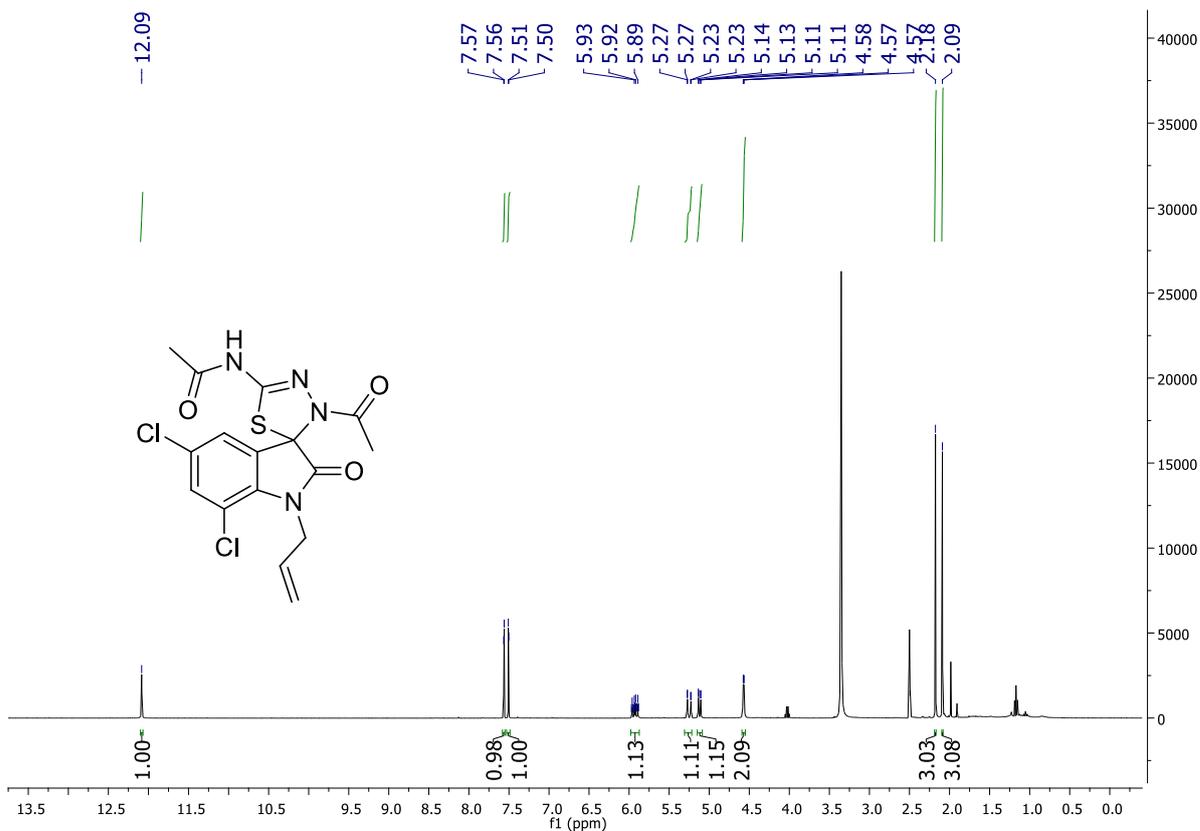
**ESPECTRO 28 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3c**



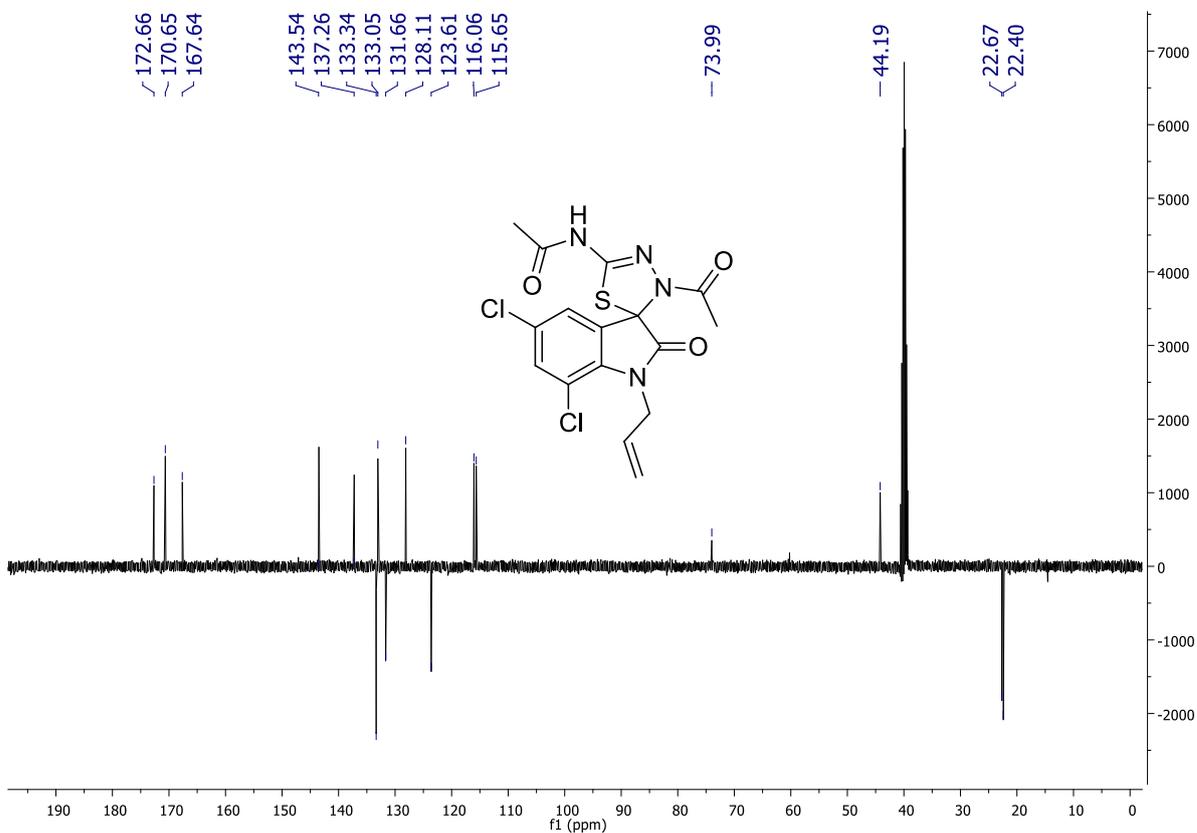
**ESPECTRO 29 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3c**



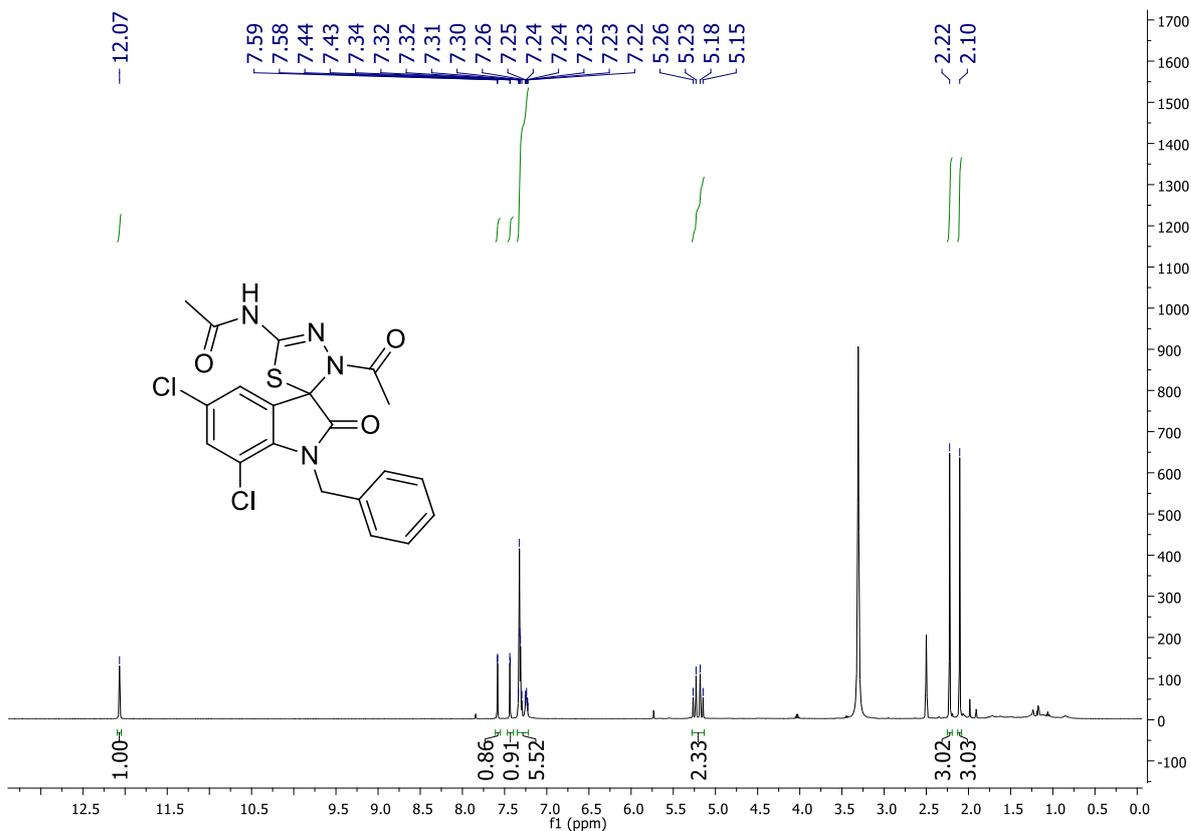
ESPECTRO 30 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3d**



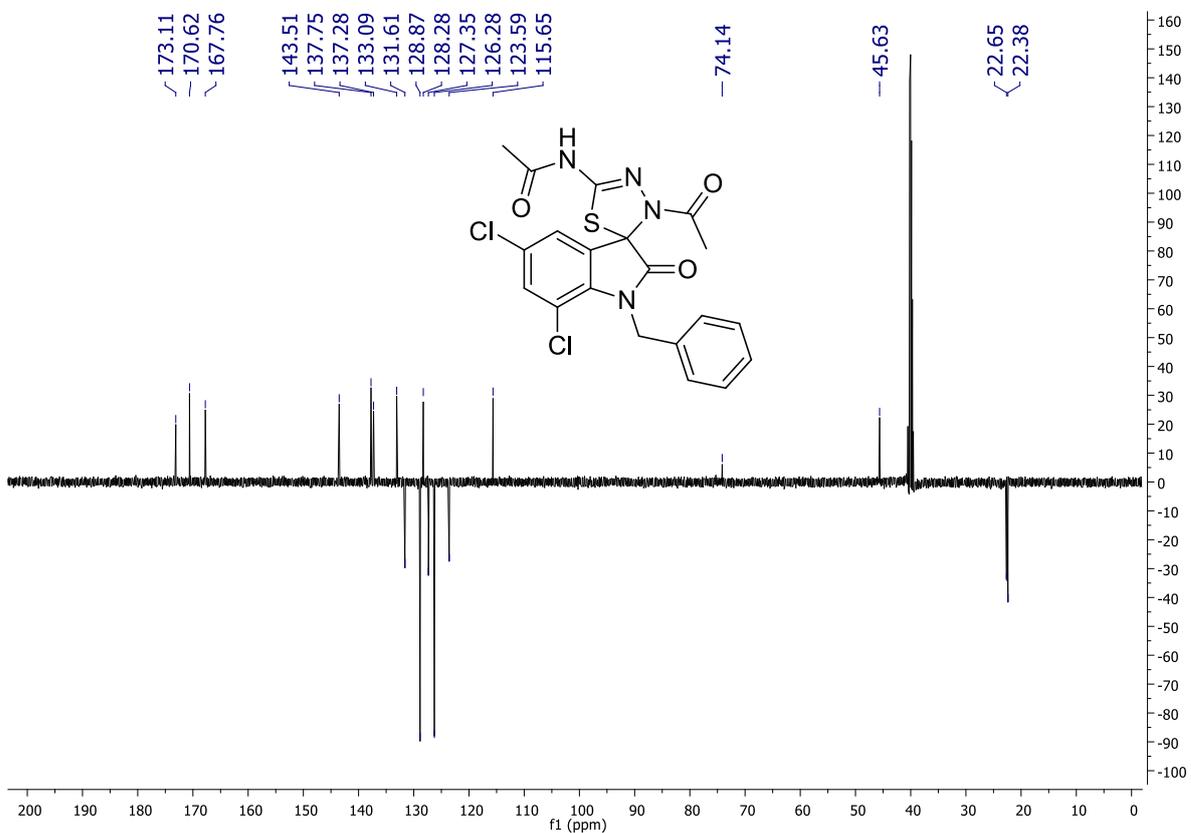
ESPECTRO 31 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3d**



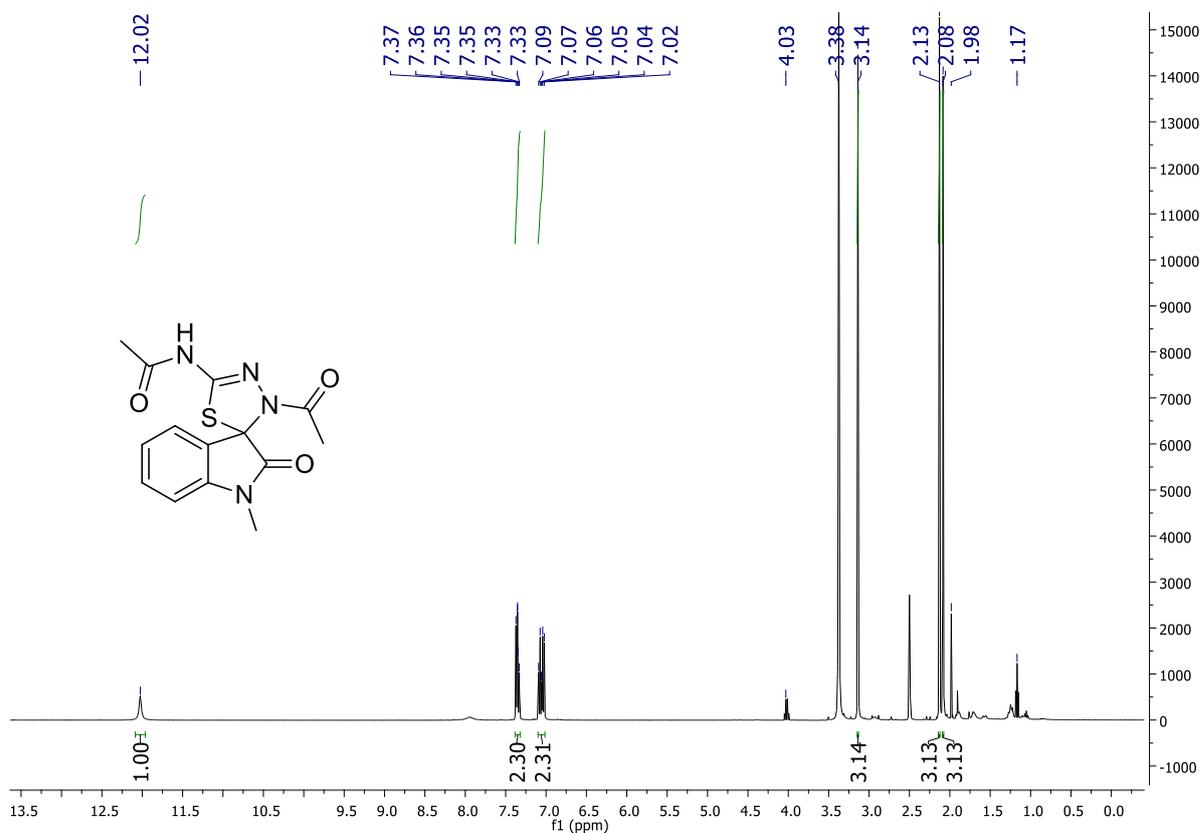
ESPECTRO 32 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3e**



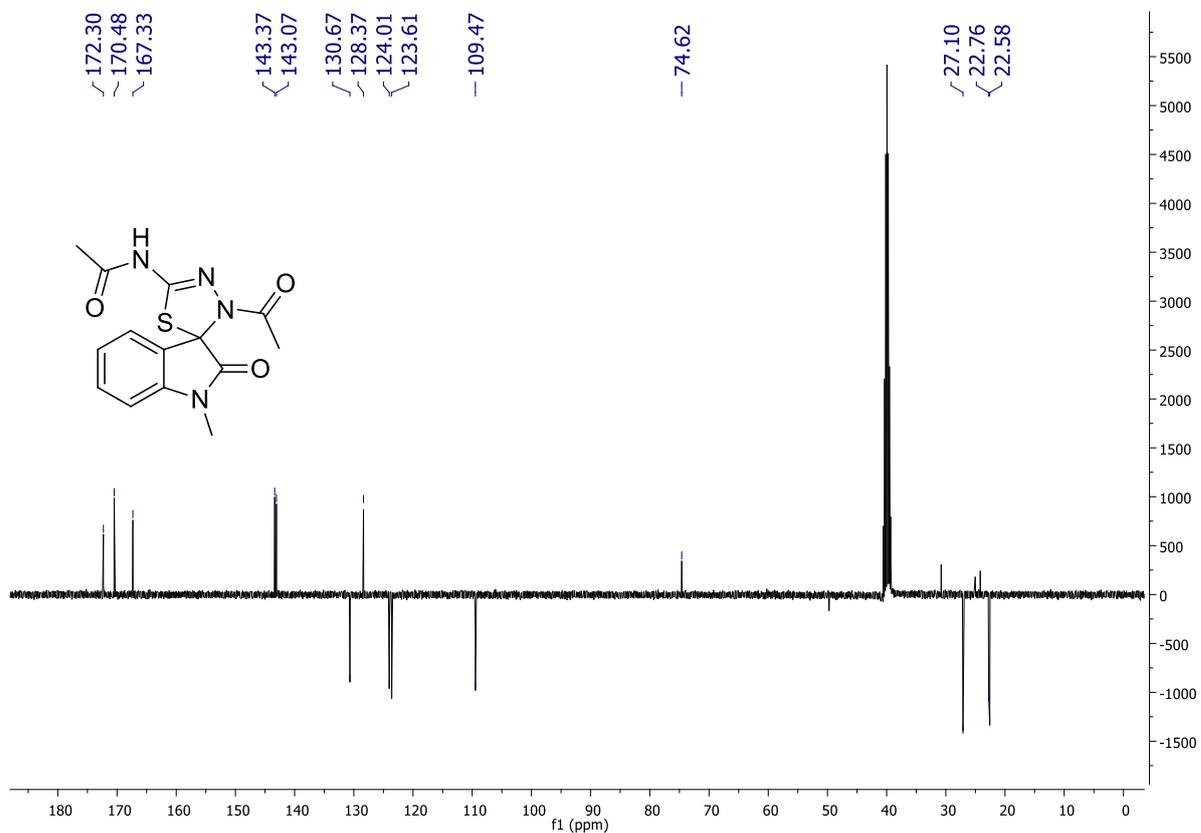
ESPECTRO 33 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3e**



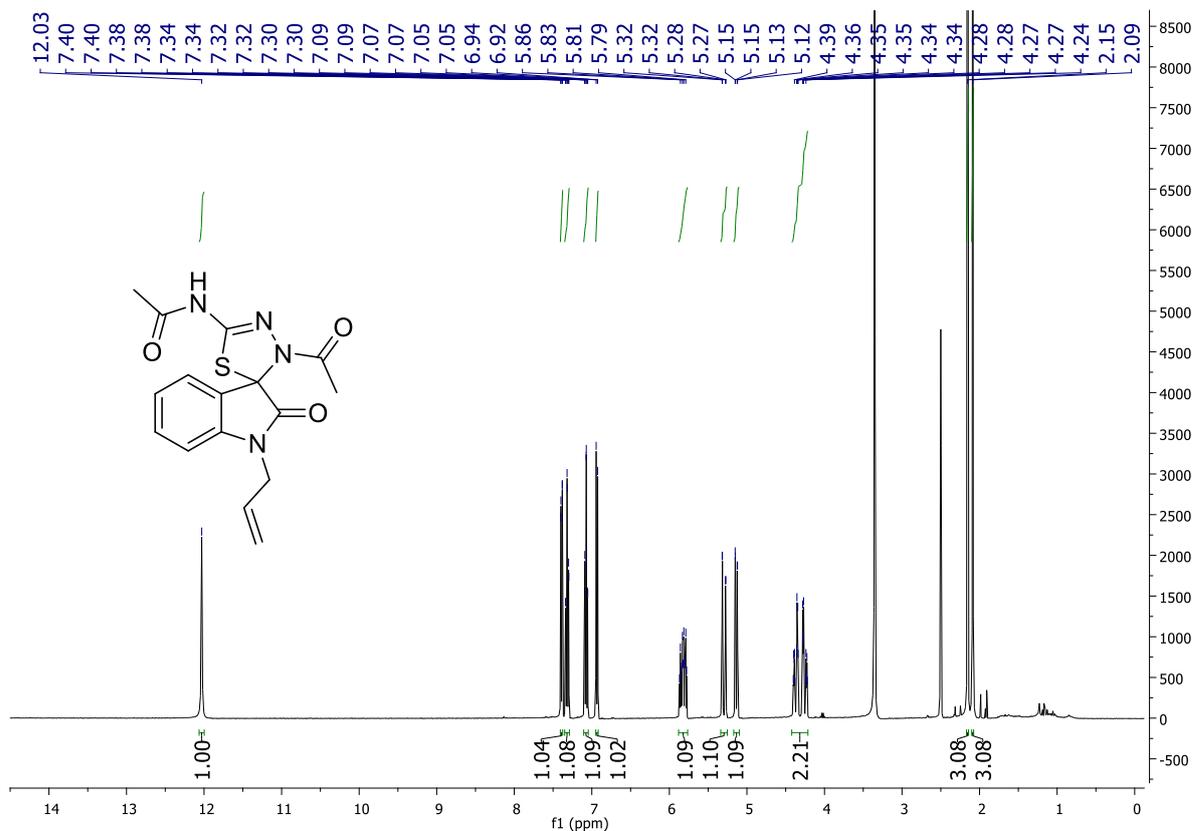
ESPECTRO 34 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3f**



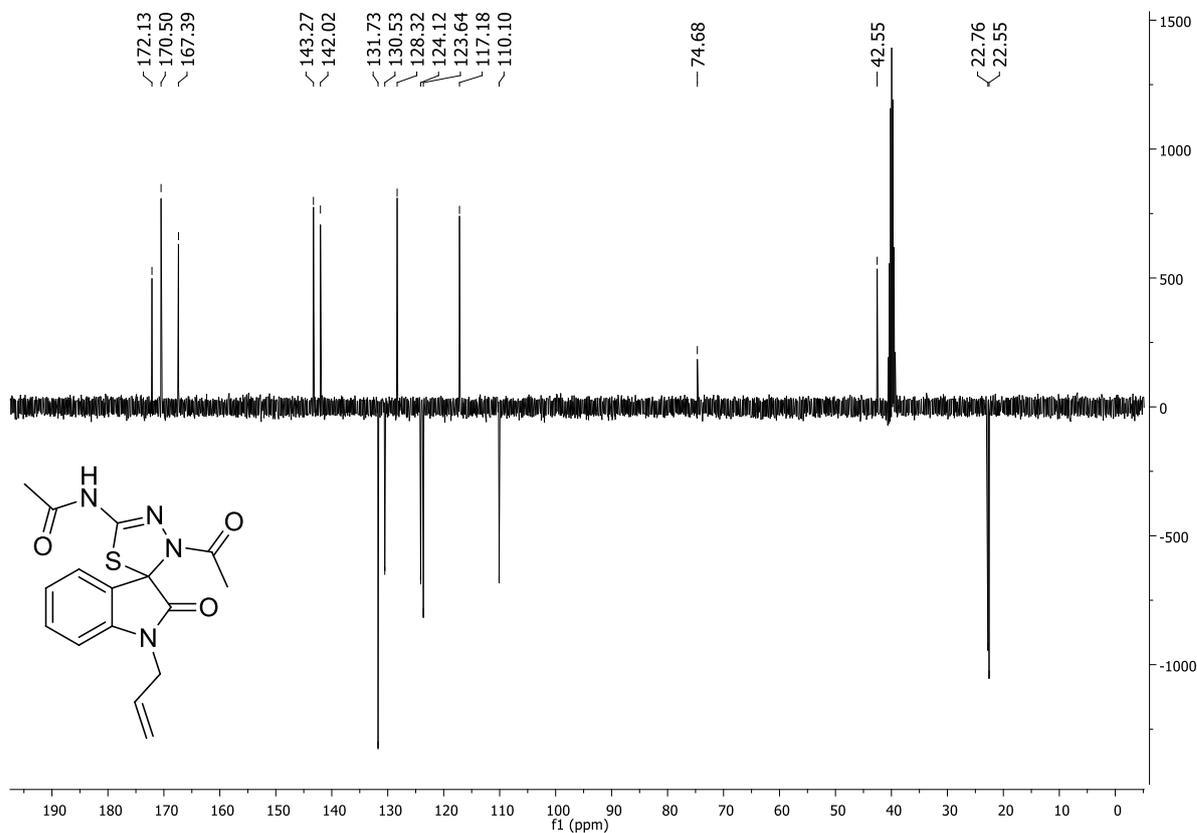
ESPECTRO 35 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3f**



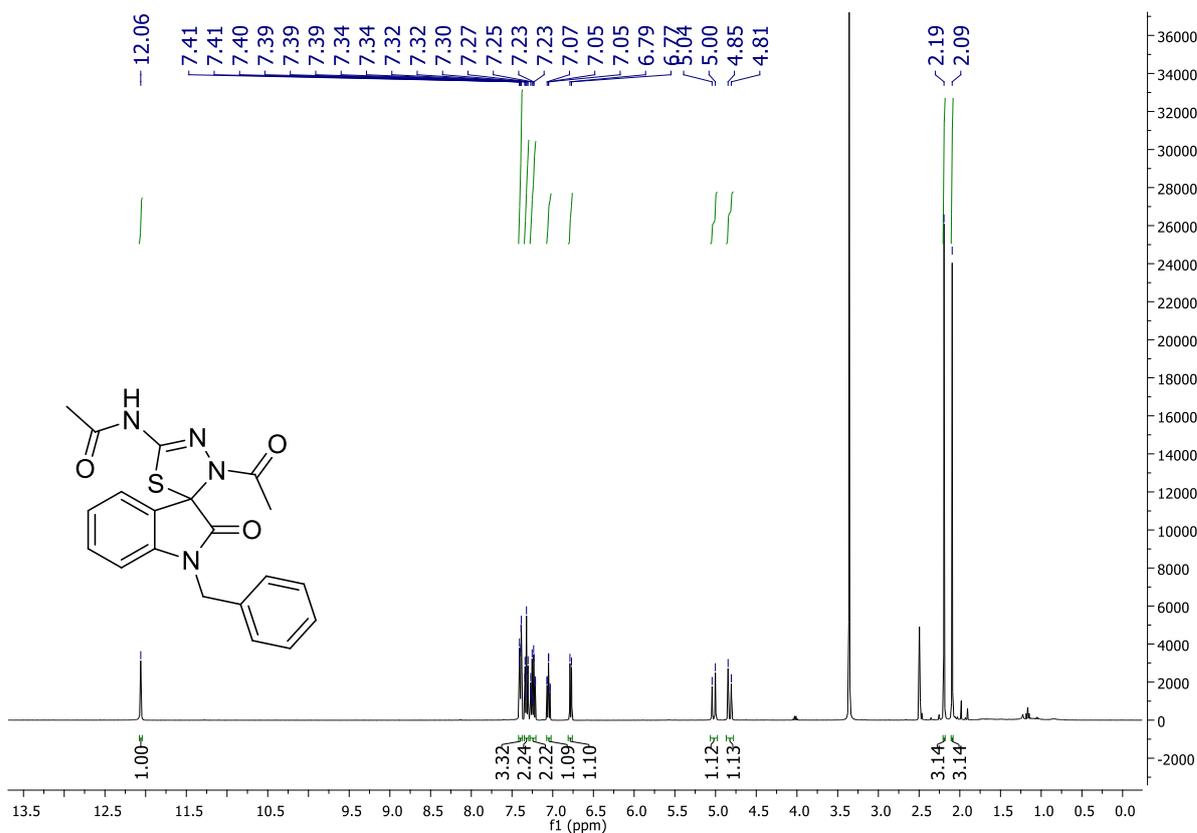
**ESPECTRO 36 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3g**



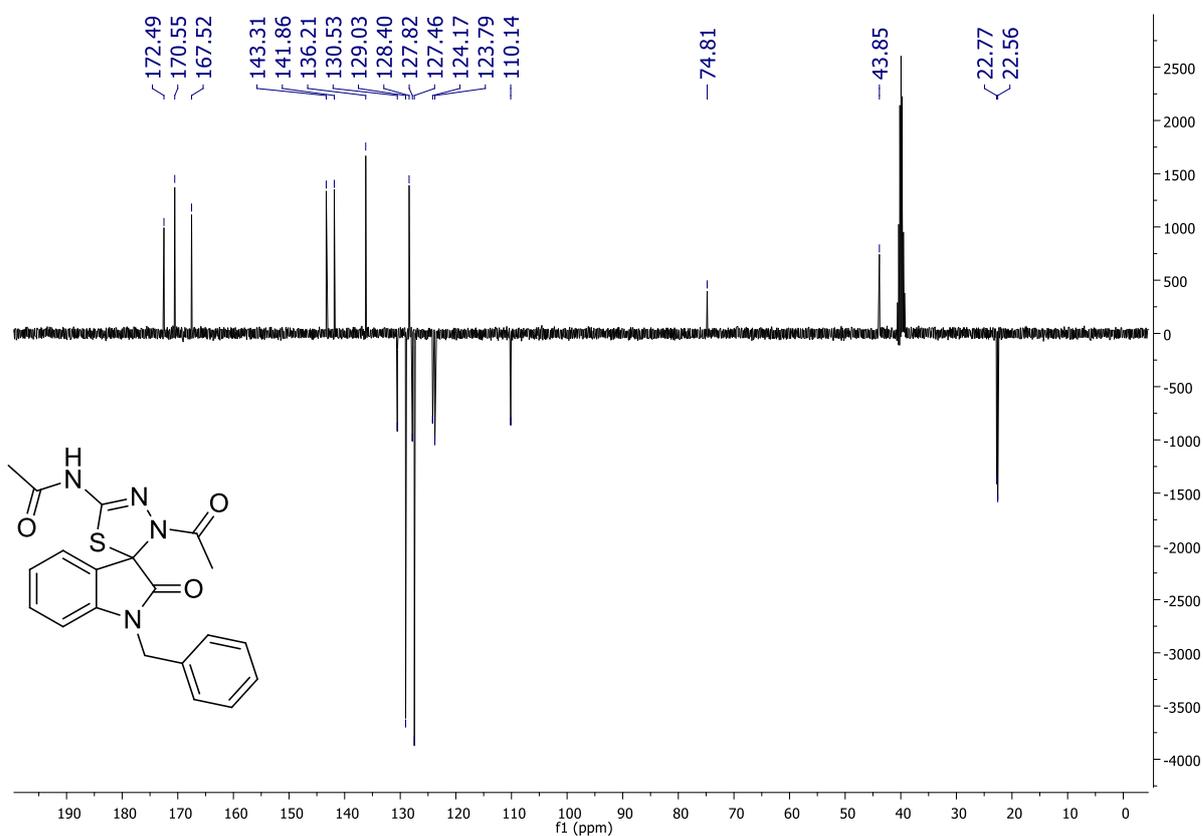
**ESPECTRO 37 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3g**



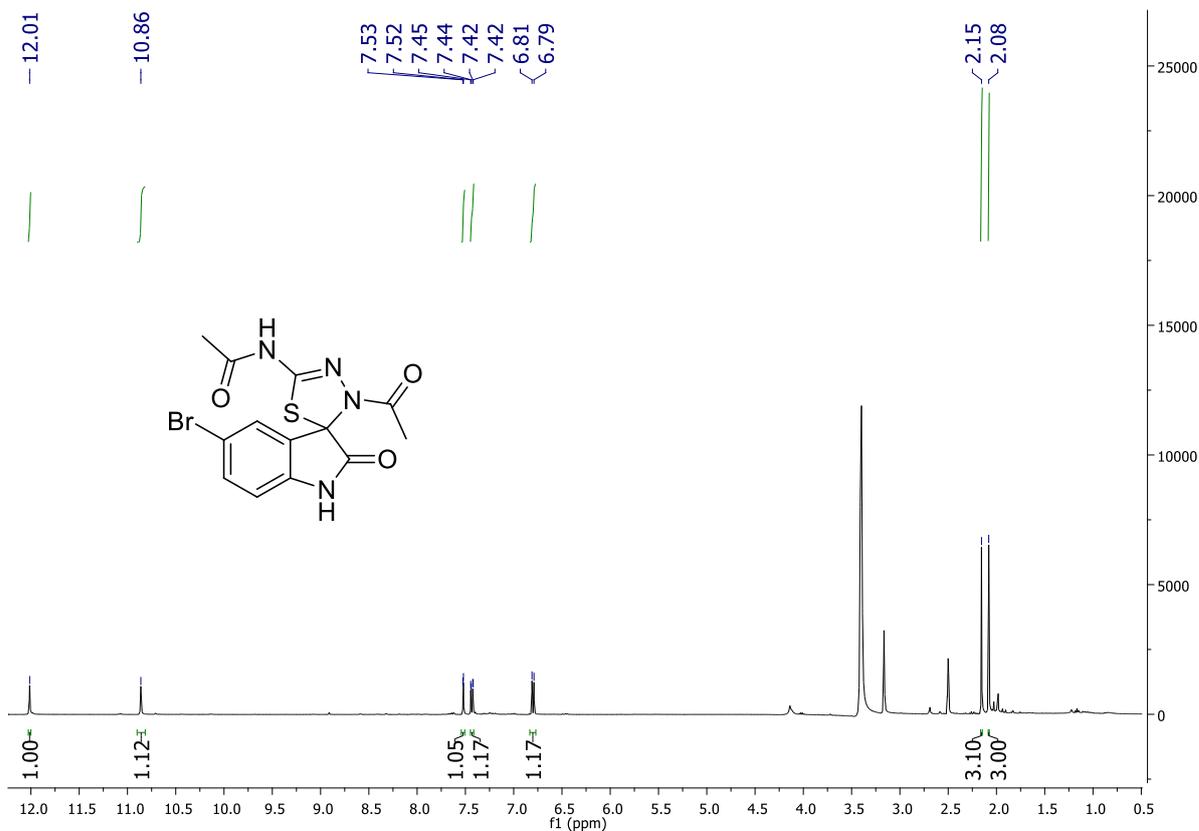
**ESPECTRO 38 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3h**



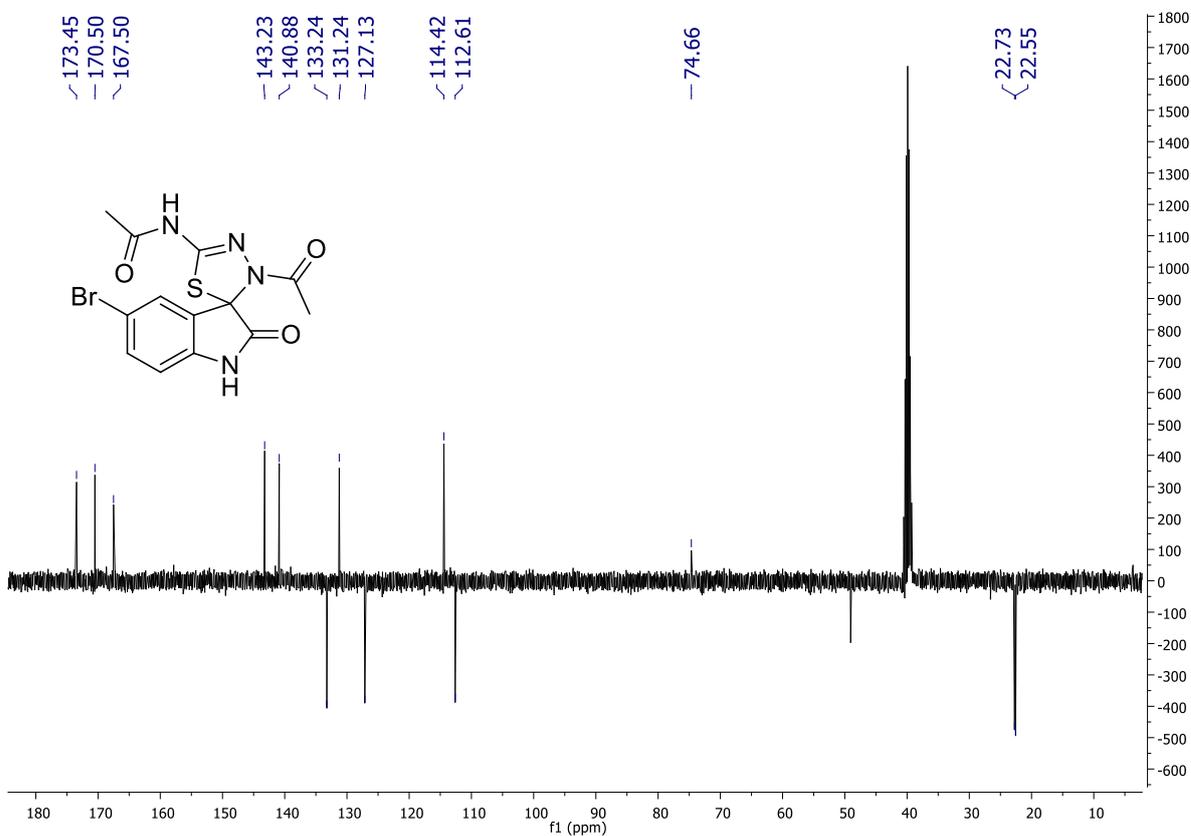
**ESPECTRO 39 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3h**



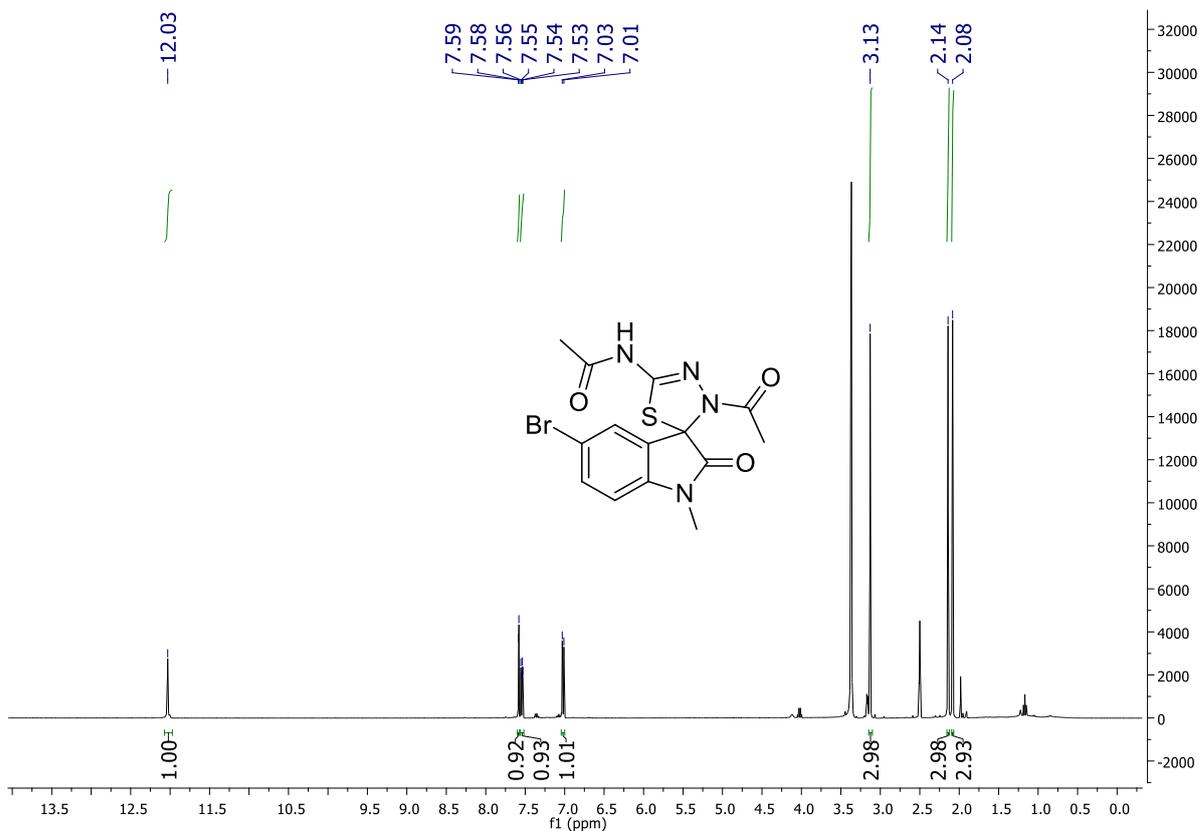
**ESPECTRO 40 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3i**



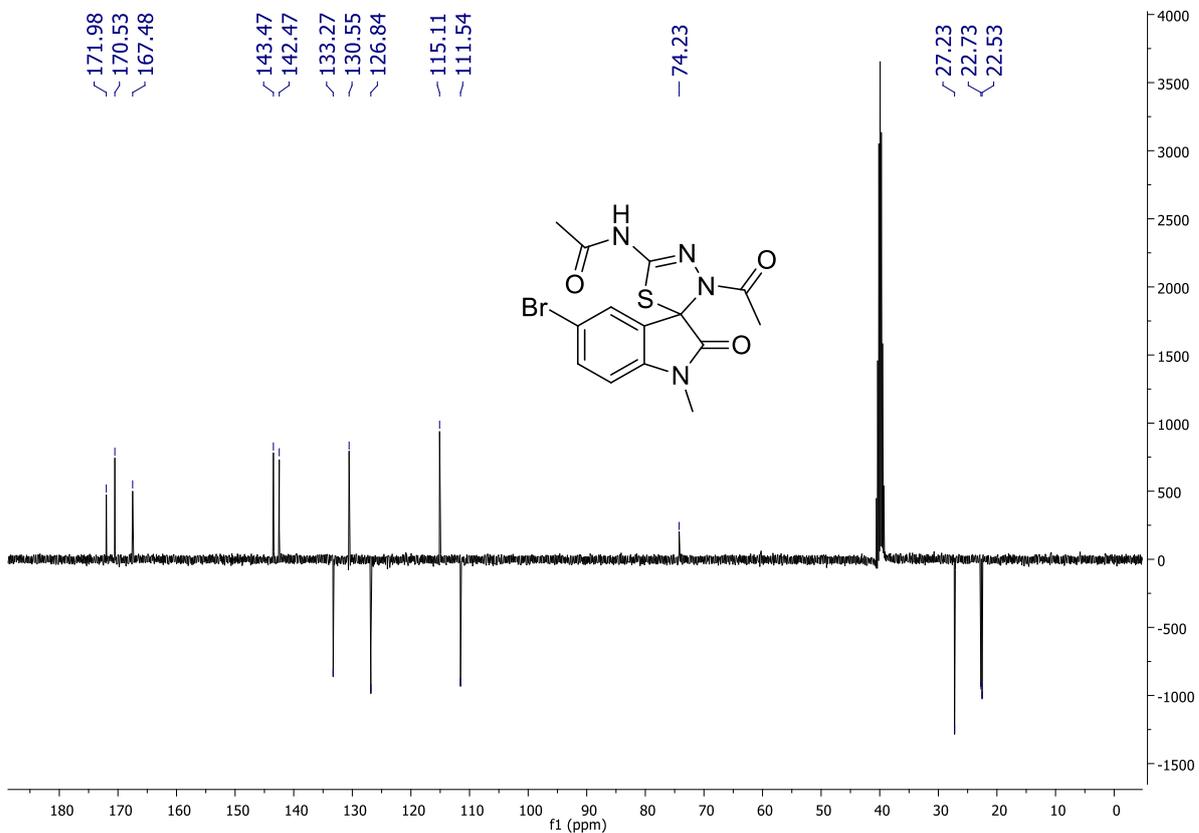
**ESPECTRO 41 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 3i**



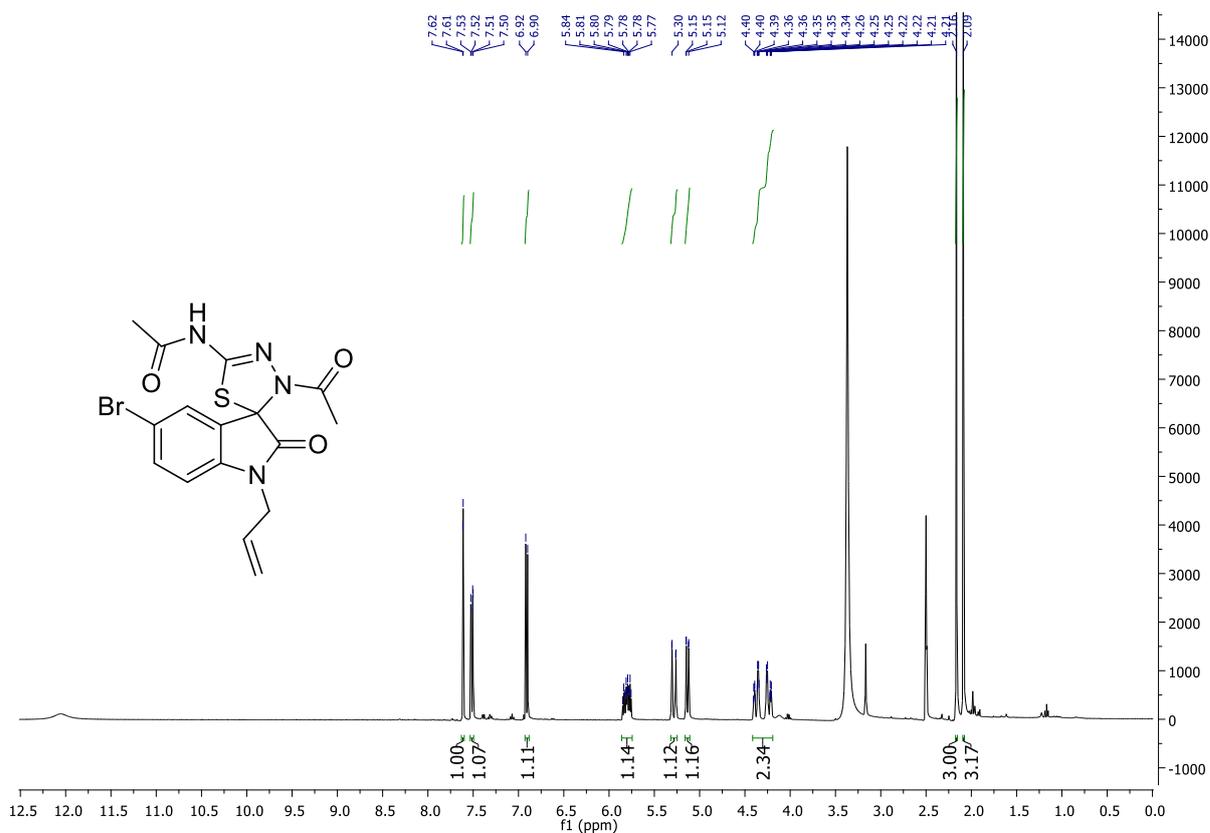
ESPECTRO 42 – RMN  $^1\text{H}$  400 MHz (DMSO- $d_6$ ) de **3j**



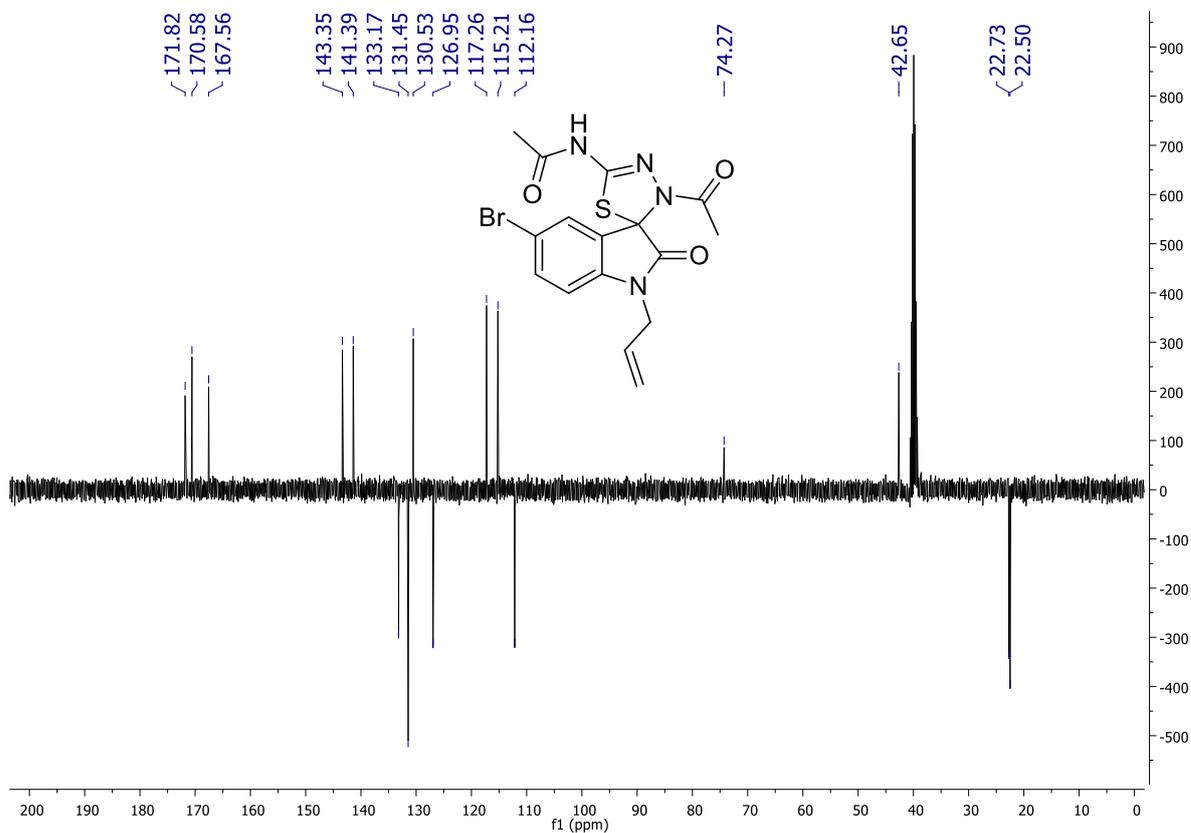
ESPECTRO 43 – RMN  $^{13}\text{C}$  100 MHz (DMSO- $d_6$ ) de **3j**



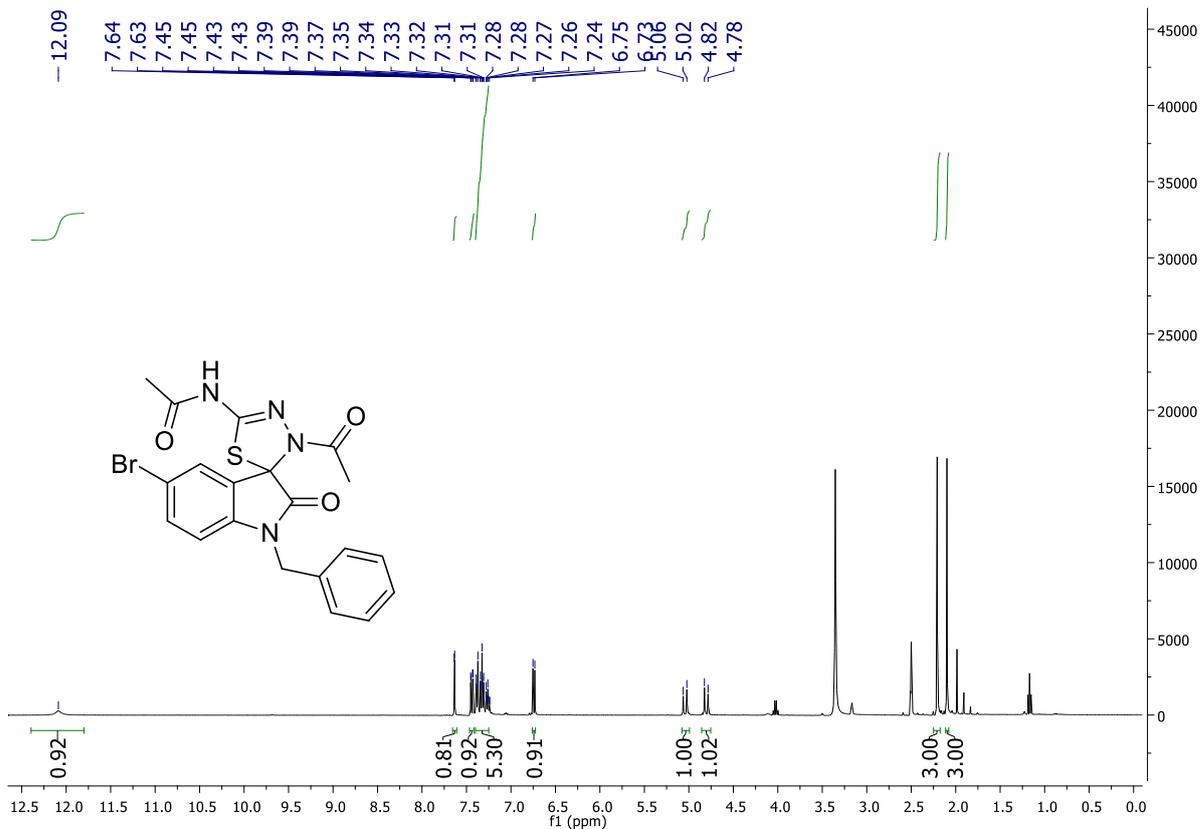
ESPECTRO 44 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3k**



ESPECTRO 45 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de **3k**



ESPECTRO 46 – RMN <sup>1</sup>H 400 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 31



ESPECTRO 47 – RMN <sup>13</sup>C 100 MHz (DMSO-*d*<sub>6</sub>) de 31

