



Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

**A química das indirubinas: síntese e caracterização de
novos derivados hidrossolúveis**

Mestrando: Danilo de Souza Costa

Juiz de Fora

2019

Danilo de Souza Costa

A química das indirubinas: síntese e caracterização de novos derivados hidrossolúveis

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

Orientador: Prof. Dr. Richard Michael Grazul

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida

Juiz de Fora

2019

Danilo de Souza Costa

A química das indirubinas: síntese e caracterização de novos derivados hidrossolúveis

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

Aprovada em 25 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Richard Michael Grazul - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Professor Doutor Mauro Vieira de Almeida - Coorientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Professora Doutora Mara Rúbia Couri

Universidade Federal de Juiz de Fora

Doutor Rafael Carvalhaes Machado

Medquímica

Dedico este trabalho à minha namorada Rafaela e a minha família, meus incentivadores e alicerces.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, ao Bruno e a Priscilla, irmão e cunhada, pelo apoio, suporte e compressão pela escolha que tomei, para que este trabalho fosse possível.

À minha namorada Rafaela, por todo amor, paciência e apoio durante esta jornada.

Ao Professor Richard por me receber mais uma vez em seu grupo de pesquisa, apoio amizade e força.

Ao professor Ângelo (póstumo) e a professora Barbara da UFRJ, pelos primeiros ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de conhecer esse mundo fascinante que é a ciência e química orgânica.

Ao professor Mauro, obrigado pela paciência e por compartilhar um pouco do seu conhecimento.

À Ana Carolina, que continuou meu trabalho interrompido e engrandeceu com sua dissertação de mestrado, deixando um grande suporte para continuação da pesquisa.

Ao professor Adilson pela enorme ajuda e ensinamentos, e seu grupo de pesquisa Raíssa, Nicolas, Giovana Isabela e Pedro pela amizade.

À professora Mara por sempre me ajudar e ensinamentos, pela motivação de me fazer voltar a pós-graduação na UFJF.

Aos amigos-irmãos da vida toda da M1: Bruno, Cláudio, Guilherme, Hugo, Ivo, Leonardo, Raphael Ricardo e famílias. Pelo grande amor e amizade, companheirismo, por se fazerem sempre presentes, pelas risadas e brincadeiras, e sermos essa família maravilhosa.

Aos amigos Filipe Teixeira, Gustavo Senra e Lucas Duarte pela amizade, bate papos e trocas de conhecimento.

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

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

A UFJF, CAPES, CNPQ e FAPEMG pelo suporte e bolsa concedidos.

RESUMO

A presente dissertação, intitulada “A química das indirubinas: síntese e caracterização de novos derivados hidrossolúveis”, trata da preparação e caracterização de compostos derivados de indirubina com solubilidade melhorada em água e etanol, e determinação experimental do $\text{Log}P$.

Neste trabalho foram obtidos 8 compostos inéditos. Todos foram caracterizados por suas faixas de fusão, espectroscopia na região do UV-Vis e IV e RMN de ^1H e de ^{13}C , além das técnicas em duas dimensões e espectrometria de massas (HRMS-LDI-TOF). Dados experimentais obtidos para os compostos anteriormente descritos são condizentes com os dados da literatura.

Diferentes rotas sintéticas foram examinadas para a obtenção dos compostos-alvo propostos: indirubina-3'-hidrazonas 5-substituídas (**10**), indirubina-3'-azino-fenil-hidrazonas 5-substituídas (**14**) e *N*-1-hidroximetil-indirubina 5-substituídas (**16 e 17**).

Várias reações previstas no projeto inicial não conduziram aos compostos almejados mas resultaram na obtenção de oito novos compostos (**10c, 17a-f e 19**) cujas estruturas não possuem precedentes na literatura. A partir da análise minuciosa dos dados espectrais foi possível propor suas estruturas.

A indirubina-3'-hidrazonas (**10**), previamente reportada na literatura, foi preparada com dificuldades, conduzindo a várias misturas complexas, com indícios de competição nucleofílica entre a hidrazina e o íon hidróxido formado no meio reacional.

As Bases de Mannich de indirubinas (**16**) propostas não foram obtidas, sendo formado compostos *N*-1-hidroximetil-indirubinas (**17a-f e 19**), que se mostraram promissores diante do objetivo deste trabalho.

Os compostos obtidos tiveram sua solubilidade e $\text{Log}P$ determinados por cálculos e experimentalmente. Todos tiveram solubilidade em água e etanol aumentadas em relação aos seus análogos de indirubinas 5-substituídas, porém os derivados 3'-hidrazonas se mostraram muito hidrossolúveis, fornecendo valores de $\text{Log}P$ fora ou próximo do limite da regra de Lipinski.

Estratégias para trabalho futuro são traçadas para testar biologicamente os novos compostos, superar as dificuldades encontradas e sugerir caminhos alternativos para a síntese de indirubinas com possíveis atividades biológicas.

Palavras chaves: indirubina, indol, isatina, hidrossolubilidade, logP.

ABSTRACT

The present dissertation, entitled "The chemistry of indirubins: synthesis and characterization of new water-soluble derivatives", deals with the preparation and characterization of compounds derived from indirubin with improved solubility in water and ethanol, and the experimental determination of $\text{Log}P$ values.

Eight previously undescribed compounds were prepared. All were characterized by their melting ranges, UV-Vis, IR, ^1H , ^{13}C and two-dimensional NMR spectroscopies and mass spectrometry (HRMS-LDI-TOF). Experimental data obtained for the previously described compounds are consistent with the literature data.

Four synthetic routes were examined for the proposed target compounds: 5-substituted indirubin-3'-hydrazones (**10**), 5-substituted indirubin-3'-azino-phenylhydrazones (**14**), *N*-1-hydroxymethyl-5-substituted indirubins (**16** and **17**).

A number of unexpected results were encountered during the course of this project, which resulted in the syntheses of eight novel compounds (**10c**, **17a-f** and **19**) whose structures are unprecedented in the literature. From the detailed analysis of the spectral data, it was possible to propose its structures.

The preparation of indirubin-3'-hydrazones (**10**), previously reported in the literature, was executed with difficulty, forming several complex mixtures, with evidence of nucleophilic competition between hydrazine and hydroxide ion formed in the reaction medium.

The Mannich Bases of indirubins (**16**) were not obtained and *N*-1-hydroxymethyl-indirubins (**17a-f** and **19**) were formed, which were promising for the purpose of this work.

The solubility and $\text{Log}P$ values were determined experimentally for the compounds obtained and compared with calculated values. All compounds showed increased solubility in water and ethanol when compared to their 5-substituted indirubin analogues, while the 3'-hydrazone derivatives proved to be very water soluble, providing $\text{Log}P$ values beyond or near the limit (1-5) proposed by Lipinski.

Strategies for future work are proposed to biologically test the new compounds, overcome the difficulties encountered and suggest alternative routes for the synthesis of indirubins with possible biological activities.

Key words: indirubin, indole, isatin, water solubility, logP.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Esquema retrossintético de indirubina e indirubinas 5-substituídas	26
Esquema 2: Esquema retrossintético de derivados 3'-azínicos de indirubina	27
Esquema 3: Esquema retrossintético de indirubinas <i>N</i> -1-substituídas	28
Esquema 4: Preparação dos compostos 2 e 3	29
Esquema 5: Preparação do composto 5	29
Esquema 6: Preparação do composto 6	30
Esquema 7: Preparação dos compostos 7 e 8	30
Esquema 8: Método 1 de preparação de indirubinas	31
Esquema 9: : Preparação dos compostos 9d e 9e	31
Esquema 10: Método 2 de preparação de indirubinas	32
Esquema 11: Preparação de derivados de indirubinas-3'-hidrazonas (10).....	33
Esquema 12: Preparação de indirubina-3'-oxima (12).....	33
Esquema 13: Preparação de derivados fenil-hidrazonas.....	34
Esquema 14: Preparação de derivados azínicos pela Rota A.....	34
Esquema 15: Preparação de derivados azínicos pela Rota B.....	35
Esquema 16: Preparação de Base de Mannich de isatinas 15	35
Esquema 17: Preparação de Base de Mannich 16 pela rota C	36
Esquema 18: Preparação de Base de Mannich 16 pela rota D.....	36
Esquema 19: Preparação dos compostos 2 e 3	39
Esquema 20: Preparação do composto 5	42
Esquema 21: Rota 3 para preparação de 9a	43
Esquema 22: Preparação dos derivados 10a , 10b e 10c	46
Esquema 23: Preparação dos derivados 10a , 10b e 10c	49
Esquema 24: Experimento de hidrólise de 9a	52
Esquema 25: Experimento de hidrólise de 9b	55
Esquema 26: Preparação de 12	57

Esquema 27: Preparação dos compostos 13a e 13b	60
Esquema 28: Tentativa de formação de derivados azínicos pela rota A	60
Esquema 29: Tentativa de formação de derivados azínicos pela rota B	61
Esquema 30: Preparação de base de Mannich 15	63
Esquema 31: Formação de base de Mannich 16 pela rota C	65
Esquema 32: Tentativa de formação de base de Mannich 16 pela rota D	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da indirubina e estrutura de seus isômeros índigo isoindigo	20
Figura 2: Estrutura de compostos sintetizados por Ginzinger e colaboradores	21
Figura 3: Composto 6ha , sintetizado por Cheng e colaboradores	22
Figura 4: 5-nitro-5'-hidroxi-indirubina-3'-oxima - AGM 130	22
Figura 5: 6-bromo-indirubina-3'-oxima – 6BIO	23
Figura 6: Estrutura das moléculas alvo.....	25
Figura 7: Diluições em série para curva de calibração	37
Figura 8: Metodologia para a determinação da concentração em EtOH	37
Figura 9: Metodologia para determinação da concentração em H ₂ O.....	37
Figura 10: Metodologia para determinação das concentrações em fase orgânica e aquosa.....	38
Figura 11: Comparação de espectros de infravermelho (ATR) 2 e 3	40
Figura 12: Comparação de espectros de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 2 e 3 com expansão da região aromática	41
Figura 13: Comparação de RMN de ¹³ C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 2 e 3	42
Figura 14: Espectros de UV-Vis (em EtOH) de 9a	44
Figura 15: Espectros de infravermelho (em ATR) de 9a	44
Figura 16: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) com expansão da região aromática de 9a	45
Figura 17: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 9a	46
Figura 18: Espectros de UV-Vis (em EtOH) 10a	49
Figura 19: Espectros de infravermelho (em ATR) 10a	50
Figura 20: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) com expansão da região aromática de 10a	51
Figura 21: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 10a	52
Figura 22: Comparação de espectros de IV e UV-Vis (em EtOH) 9a e 11	53
Figura 23: Comparação de espectros de IV (ATR) 9a e 11	53

Figura 24: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) com expansão da região aromática de 11	54
Figura 25: Mapa de correlação COSY de 11	54
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6), da hidrólise com 9b	55
Figura 27: Mapa de correlação HSQC de 11b	56
Figura 28: Mapa de correlação HMBC $\text{H}^1 \times \text{C}^{13}$ de 11b	56
Figura 29: Mapa de correlação HMBC $\text{H}^1 \times \text{N}^{15}$ de 11b	57
Figura 30: Espectros de UV-Vis (em EtOH) de 12	58
Figura 31: Espectros de infravermelho (em ATR) de 12	58
Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) com expansão da região aromática de 12	59
Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) de 12	59
Figura 34: Espectro UV-Vis (em EtOH) de 16	64
Figura 35: Espectro de infravermelho (ATR) de 1	64
Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) do produto da rota C , mistura de 16 e 9a	65
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) e DEPT 135 do produto da rota C , mistura de 9a e 16	66
Figura 38: Espectro UV-Vis (em EtOH) de 17a	68
Figura 39: Espectro IV (ATR) de 17a	69
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) de 17a	69
Figura 41: Mapas de correlação HSQC (500 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) e NOESY (500 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) de 17a	70
Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; em DMSO- <i>d</i> 6) e DEPT 135 de 17a .	70
Figura 43: Espectro UV-Vis (em EtOH) de 19	71
Figura 44: Espectro de IV (ATR) de 19	72
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; DMSO- <i>d</i> 6) de 19	72

Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; em DMSO- <i>d</i> 6) e DEPT 135 de 19 ...	73
Figura 47: Espectro de massas LDI-TOF de 19	73
Figura 48: Compostos cuja solubilidade e $\log P$ foram avaliados	74

LISTA DE TABELAS

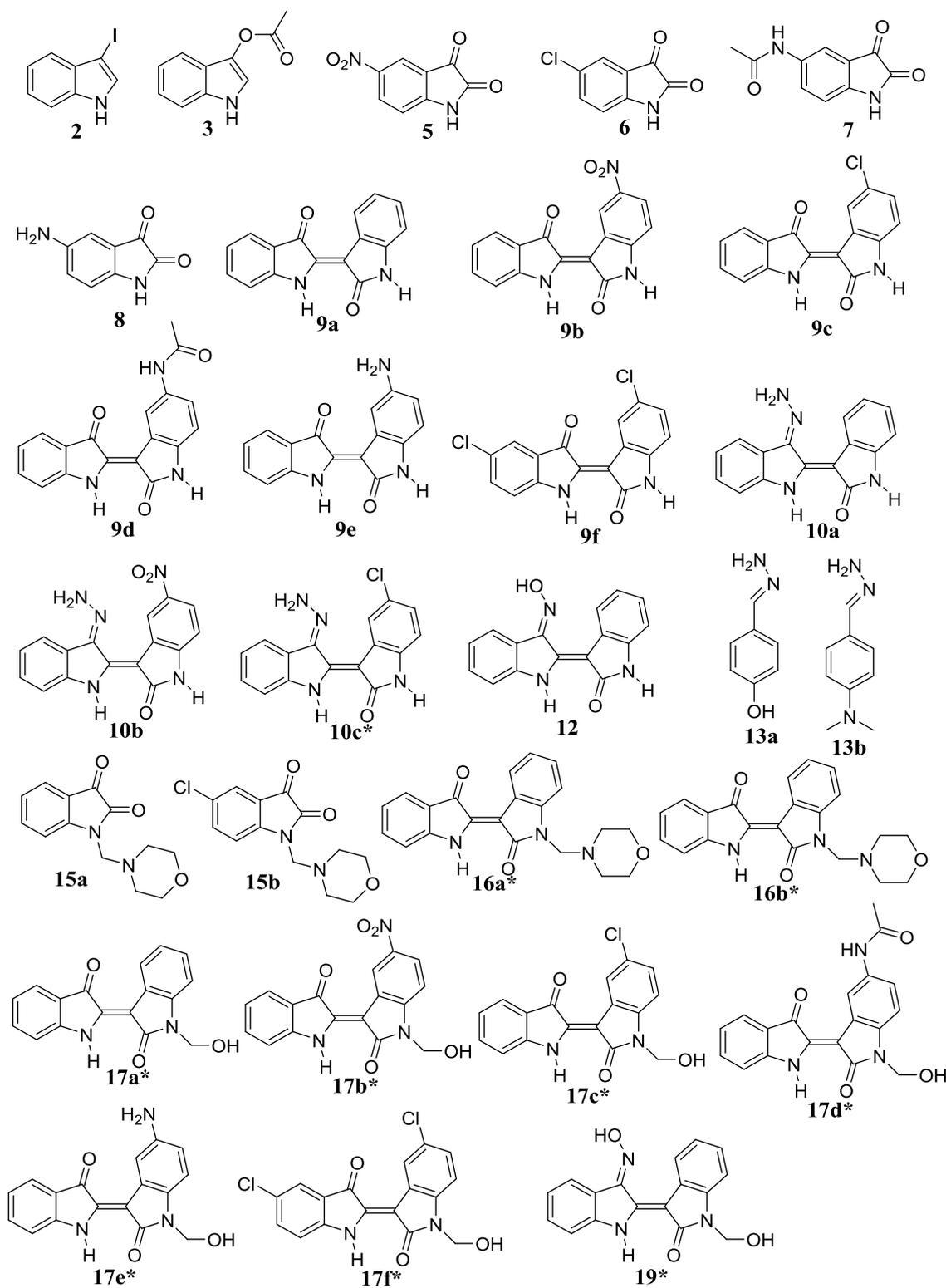
Tabela 1: Experimentos utilizando hidrazina hidratada 65%	37
Tabela 2: Experimentos utilizando dicloridrato de hidrazina	38
Tabela 3: Experimentos utilizando sulfato de hidrazinas	38
Tabela 4: Comparação dos experimentos para preparação de derivados azínicos pela rota B	62
Tabela 5: Testes para reação de Mannich com indirubinas	67
Tabela 6: Comparação de resultados de solubilidades e $\log P$	76

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	acetona
AcOAg	acetato de prata
AcOH	ácido acético
CCD	cromatografia em camada delgada
CDKs	cyclin-dependent kinases
CI ₅₀	concentração que inibe 50% do crescimento de uma população
d	duplete
dd	duplete de duplete
ddd	duplete de duplete de duplete
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO- <i>d6</i>	dimetilsulfóxido deuterado
EtOH	etanol
F. M.	formula molecular
GSK-3	glycogen synthase kinase-3
Hex	hexano
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
I. V.	Infravermelho
KNO ₃	nitrato de potássio
KOH	hidróxido de potássio
LDI-TOF	Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
Lit.	literatura
log <i>P</i>	coeficiente de partição ou lipofilicidade
m	multiplete
MeOH	metanol
MHz	mega-hertz
NaBH ₄	boro hidreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaHSO ₃	bissulfito de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
NH ₄ OH	hidróxido de amônio
P. F.	ponto de fusão

PMA	ácido fosfomolíbico
ppm	partes por milhão
Rf	fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	simpleto
t. a.	temperatura ambiente
t	triplete
td	triplete de duplete
THF	tetrahidrofurano
U.V-Vis	ultravioleta-visível
°C	graus Celsius
δ	deslocamento químico
μM	micromolar
<i>J</i>	constante de acoplamento
ν	número de onda

LISTA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NESTE TRABALHO



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

*Compostos inéditos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 JUSTIFICATIVA	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos gerais	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA	26
4.1 Preparação de indirubina e indirubinas 5-substituídas.....	26
4.2 Preparação de derivados azínicos de indirubinas	27
4.3 Preparação de indirubinas N-1-substituídas	28
5 METODOLOGIA.....	29
5.1 Síntese dos análogos de indol 3-substituído	29
5.2 Síntese de isatinas 5-substituídas	29
5.2.1 Síntese de 5-nitro-isatina	29
5.2.2 Síntese da 5-cloro-isatina.....	30
5.2.3 Síntese da 5-acetamido-isatina e 5-amino-isatina.....	30
5.3 Síntese da indirubina e seus derivados 5-substituídos.....	30
5.3.1 – Método 1	31
5.3.2 – Preparação de 5-acetamido-indirubina e 5-amino-indirubina	31
5.3.3 – Método 2	32
5.4 Síntese de indirubinas-3'-hidrazonas.....	32
5.5 Síntese de indirubina-3'-oxima	33
5.6 Síntese de derivados de fenil-hidrazonas	33
5.7 Preparação de azinas de indirubina.....	34
5.7.1 Preparação de azinas de indirubina pela rota A	34
5.7.2 Preparação de azinas de indirubina pela rota B	34

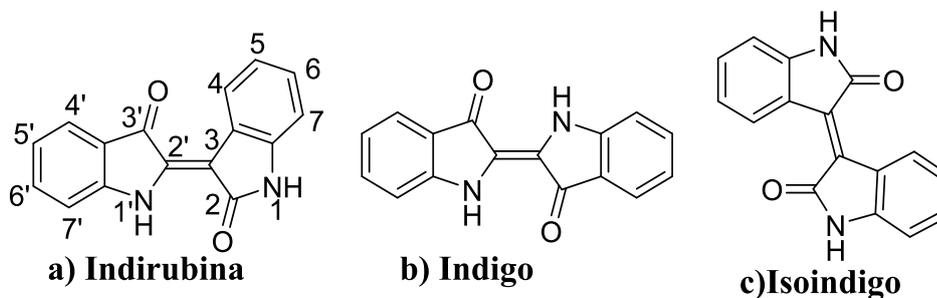
5.8 Síntese de indirubinas <i>N</i> -1-substituídas.....	35
5.8.1 Síntese de base de Mannich de isatina.....	35
5.8.2 Síntese de bases de Mannich de indirubinas	35
<hr/>	
5.9 Estudos de solubilidade	36
5.9.1 Estudo de solubilidade em etanol	37
5.9.2 Estudo de solubilidade em água	37
<hr/>	
5.10 Determinação do log <i>P</i>	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1- Síntese e caracterização de 3-iodo-indol e 3-acetoxi-indol.....	39
6.2- Síntese e caracterização de isatinas 5-substituídas	42
6.3 Síntese e caracterização de indirubinas	43
6.4 Síntese e caracterização de indirubinas 3'-hidrazona.....	46
6.4.1 Metodologias testadas.....	46
6.4.2 Caracterização de indirubinas-3'-hidrazona.....	49
<hr/>	
6.5 Hidrólise de indirubinas em meio básico	52
6.6 Síntese e caracterização de indirubina-3'-oxima.....	57
6.7 Síntese de derivados de fenil-hidrazonas	60
6.8 Preparação de azinas de indirubina.....	60
6.8.1 Preparação de azinas de indirubina pela rota A	60
6.8.2 Preparação de azinas de indirubina pela rota B	61
<hr/>	
6.9 Bases de Mannich de isatinas	62
6.10 Bases de Mannich de indirubinas	63
6.10.1 Rota C.....	63
6.10.2 Rota D.....	66
<hr/>	

6.11 Caracterização de <i>N</i> -1-hidroximetil-indirubinas	68
6.12 Caracterização de <i>N</i> -1-hidroximetil-indirubina-3'-oxima	71
6.13 Estudos de solubilidade e $\log P$	74
7 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

A indirubina é o isômero de cor vermelha do famoso corante *Índigo Blue* (Figura 1) e está presente em plantas como *Indigofera tinctoria* e *Isatis tinctoria* e em animais como em moluscos da família *Muricidae*. É um componente ativo do *Danggui Longhui Wan*, mistura de onze ervas utilizada pelos chineses no tratamento da leucemia mielóide crônica (JUNG *et al*, 2016). Seus derivados constituem uma classe de compostos amplamente estudados por sua capacidade de inibição das enzimas CDKs (quinases dependentes de ciclina) e GSK (quinases glicogênio sintase), processos inflamatórios, paralisação do ciclo celular e apoptose, doenças neurodegenerativas, leishmaniose, entre outras ações farmacológicas (WANG *et al*, 2017) (JÄHNE *et al*, 2016).

Figura 1: Estrutura da indirubina e de seus isômeros índigo e isoindigo.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Sele e colaboradores descreveram a obtenção de vários heterociclos com atividades biológicas promissoras empregando reações em cascata a partir da indirubina. (SELE, M. A. *et al*, 2015).

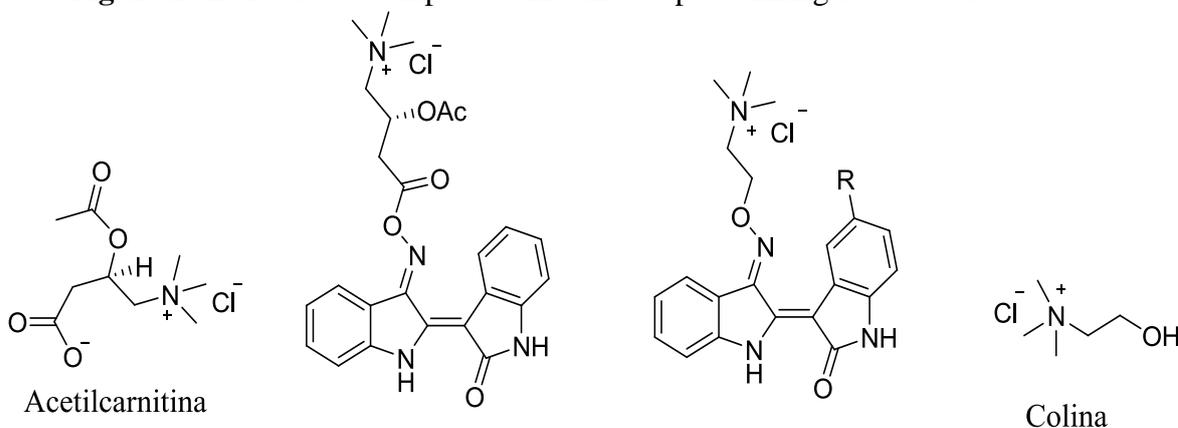
Entretanto, as indirubinas possuem solubilidade extremamente baixa em fluidos biológicos e escassa biodisponibilidade. Tentativas para superar este problema são adições de grupos polares aos anéis aromáticos e alterações na carbonila C3' com diferentes nucleófilos (GINZINGER *et al*, 2012). Embora disponíveis na literatura diversos estudos sobre as propriedades biológicas de indirubinas, os derivados descritos são em sua maioria substituídos nas posições 5 e/ou 6 por halogênios ou grupo nitro, e na posição 3' por oxima. O número de derivados substituídos em 3' por grupos volumosos é restrito e sabe-se que esta modificação distorce a coplanaridade da molécula, podendo aumentar a hidrossolubilidade (EFSTATHIOU *et al*, 2014).

Moléculas bioativas devem mesclar características lipossolúveis para conseguirem a permeação através de barreiras lipídicas do organismo, e características hidrossolúveis

para serem absorvidas e distribuídas nos compartimentos biológicos até seu alvo de ação. O coeficiente de partição ou lipofilicidade ($\log P$) é o logaritmo decimal da razão entre a concentração da molécula bioativa na fase orgânica pela concentração na fase aquosa, onde o valor de $\log P$ tem correspondência com a atividade biológica, sendo que valores entre 1 a 5 são valores aceitáveis para moléculas bioativas, valores entre 1 a 3 correspondem a faixa ótima entre distribuição e absorção e valores acima de 5 tem baixa biodisponibilidade devido a hidrossolubilidade reduzida (BARREIRO e FRAGA, 2015).

Ginzinger e colaboradores propuseram sintetizar derivados catiônicos (Figura 2) através da introdução de um grupo amônio quaternários em éteres de colina em indirubinas-3'-oxima substituídas, porém estes compostos se mostraram instáveis, com taxa de hidrólise alta. Como alternativa esses pesquisadores prepararam ésteres de indirubina-3'-oxima com acetilcarnitina projetados de acordo com o conceito de pró-fármaco, liberando no meio biológico a indirubina-3'-oxima, cujas propriedades bioativas importantes, citadas anteriormente para indirubinas, estão bem estabelecidas na literatura (GINZINGER *et al*, 2012).

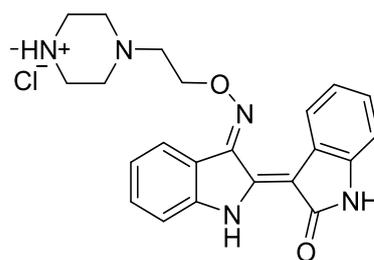
Figura 2: Estrutura de compostos sintetizados por Ginzinger e colaboradores.



Fonte: Adaptada de (GINZINGER *et al*, 2012).

Cheng e colaboradores realizaram a conversão de derivados de indirubina 3' em sais cloridratos estáveis e solúveis em água. O composto chamado pelos autores de **6ha** (Figura 3), produziu uma inibição potente do IGF-1R (fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1) surpreendentemente eficaz, sem inibir CDKs e GSK num painel de 22 proteínas quinases. Análises posteriores identificaram que este composto induziu apoptose e parada na divisão celular em células tumorais (CHENG *et al*, 2017).

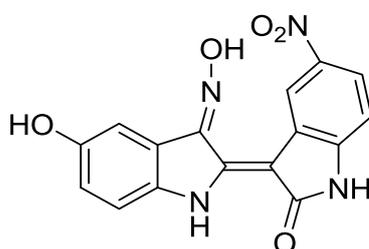
Figura 3: Composto **6ha**, sintetizado por Cheng e colaboradores.



Fonte: Adaptada de (CHENG *et al*, 2017).

Ahn e colaboradores sintetizaram uma nova série de derivados de indirubina-3'-oxima com substituições combinadas nas posições 5 e 5' para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade desta classe de compostos na terapia do câncer. Estudo anterior demonstrou que a 5-nitro-5'-hidroxi-indirubina-3'-oxima, denominada pelos autores de **AGM130** (Figura 4), induziu apoptose em células de leucemia mielóide crônica resistentes à fármacos. No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular da ação da **AGM130** em células tumorais (ANH *et al*, 2015).

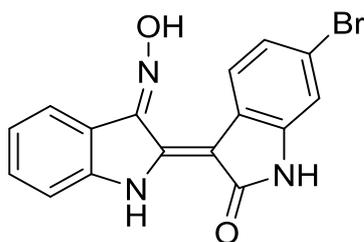
Figura 4: 5-nitro-5'-hidroxi-indirubina-3'-oxima – **AGM130**.



Fonte: Adaptada de (AHN *et al*, 2015).

Através de uma análise racional das principais interações das indirubinas no sítio de ligação ao ATP da quinase glicogênio sintase (GSK-3) e a síntese e avaliação biológica de vários de seus derivados, Vougiannopoulou e colaboradores estabeleceram novas interações locais, oferecendo estabilização adicional aos complexos inibidores de GSK-3. Os novos análogos de indirubina preparados por esses autores foram menos citotóxicos do que o composto **6BIO** parental e demonstraram uma inibição potente da GSK-3 em dois modelos celulares. Esses resultados abrem novas diretrizes para o desenho de indirubinas farmacologicamente bioativas, com potencial de desenvolvimento de novos fármacos contra diferentes doenças como a de Alzheimer, diabetes ou hipertrofia cardíaca (VOUGOGIANNOPOULOU *et al*, 2008).

Figura 5: 6-bromo-indirubina-3'-oxima – **6BIO**.



Fonte: Adaptada de (VOUGOGIANNOPOULOU *et al*, 2008).

A absorção de indirubina é relatada como ocorrendo por difusão passiva. O transporte de indirubina através da membrana do intestino de rato não foi influenciado pela glicoproteína-P ou pela proteína associada à resistência a múltiplas drogas. Do ponto de vista da concentração da droga, independentemente de outras questões, como o tamanho da molécula da droga e a área de superfície de absorção, quanto maior a concentração de fármaco no local de absorção, maior a fração de droga absorvida transportada por difusão passiva. A solubilidade melhorada e uma taxa de dissolução mais alta para fármacos fracamente solúveis em água são fatores-chave para aumentar a absorção do fármaco (CHEN *et al*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A formação de hidrazonas e oximas é uma reação versátil para química e bioquímica, permitindo a ligação de porções funcionais a biomoléculas. Para reações envolvendo biomoléculas que apresentam uma abordagem tridimensional, grupos hidrazona e oxima possuem versátil conjugação química, com resultados melhores que funções aldeído e cetona (KOOL, 2013). A presença de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e a lipofilicidade relativa ($\log P$) são características relevantes no *design* de fármacos (LIPINSKI *et al.*, 1997).

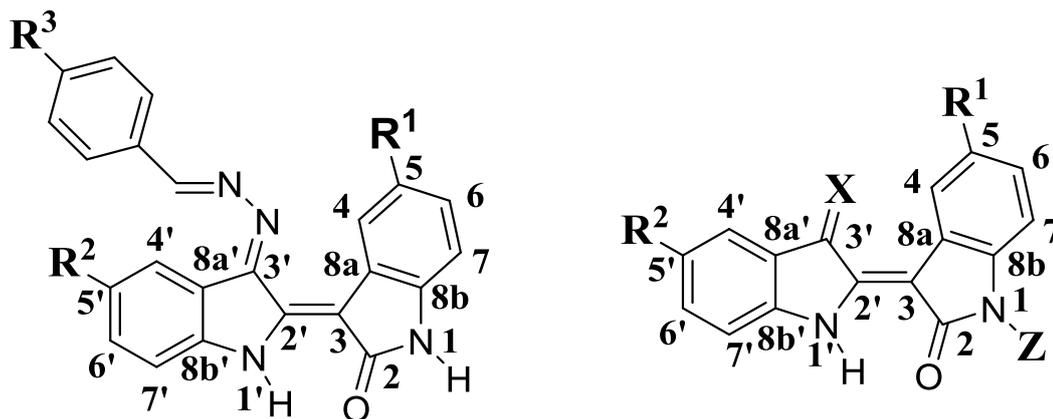
Este trabalho tem como objetivo novas propostas para atenuar o problema de hidrossolubilidade de derivados indirubínicos, pela síntese e caracterização de derivados que sejam quimicamente estáveis, determinando suas propriedades físico-químicas, pouco descritas na literatura. Estes novos derivados de indirubinas devem possuir melhores solubilidades em água e particionamento óleo/água que as indirubinas correspondentes. Espera-se que tais derivados apresentem atividades biológicas promissoras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais:

O presente trabalho tem por objetivo a síntese, isolamento e caracterização de derivados indirubínicos hidrossolúveis substituídos nas posições 5, 3' e *N*-1 (Figura 6), além da determinação de suas solubilidades e lipofilicidade ($\log P$).

Figura 6: Estrutura das moléculas alvo.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

3.2 Objetivos específicos:

- Preparação e caracterização de derivados de indirubinas na posição 5 com $R^1 = H$, NO_2 , Cl , $NHAc$ e NH_2 , e 5' com $R^2 = H$ e Cl .
- Preparação e caracterização de derivados hidrazonas na posição 3' com $X = O$; $N-NH_2$; $N-OH$; e *p*-fenil-hidrazonas com $R^3 = OH$ e $N(CH_3)_2$.
- Preparação e caracterização de derivados de indirubinas na posição *N*-1 com $Z =$ morfolinilmetila e hidroximetila;
- Determinação de suas solubilidades em água e de seus valores de coeficiente de partição ou lipofilicidade ($\log P$).

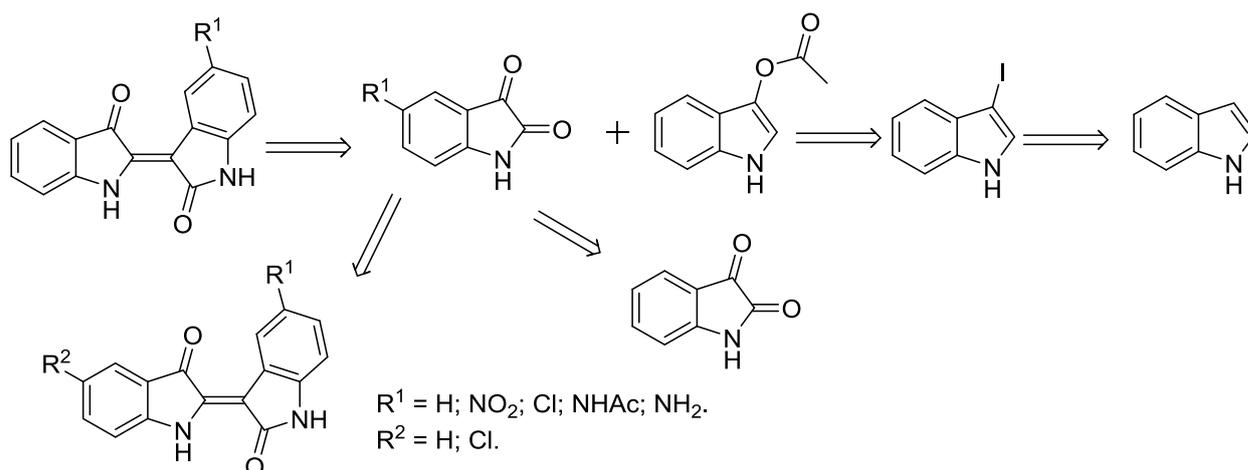
4 ANÁLISE RETROSSINTÉTICA

O estudo retrossintético deste trabalho, para um melhor entendimento, foi subdividido em 3 partes apresentados nos Esquemas 1, 2 e 3 a seguir. O Esquema 1 mostra o planejamento para obtenção de indirubina e indirubinas 5-substituídas. O Esquema 2 apresenta a preparação de compostos 3'-azínicos de indirubinas e o esquema 3 indirubinas substituídas na posição *N*-1.

4.1 Preparação de indirubina e indirubinas 5-substituídas

A indirubina e indirubinas 5-substituídas podem ser obtidas através da reação em meio metanólico básico entre o 3-acetoxi-indol com isatina ou isatinas 5-substituídas. O 3-acetoxi-indol seria obtido pela reação de substituição nucleofílica aromática do 3-iodo-indol com acetato de prata e o 3-iodo-indol pela reação substituição eletrofílica do indol com iodo. A isatina pode ser obtida comercialmente, a 5-nitro-isatina e a 5-cloro-isatina são preparadas por substituição eletrofílica aromática, a 5-acetamida-isatina preparada pela redução do grupo nitro em amino com zinco metálico em ácido acético seguido pela acetilação com anidrido acético e a 5-amino-isatina, na forma de seu sal sulfato, pela hidrólise da 5-acetamido-isatina em solução de ácido sulfúrico (Esquema1).

Esquema 1: Esquema retrossintético de indirubina e indirubinas 5-substituídas.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.2 Preparação de derivados azínicos de indirubinas (Esquema 2)

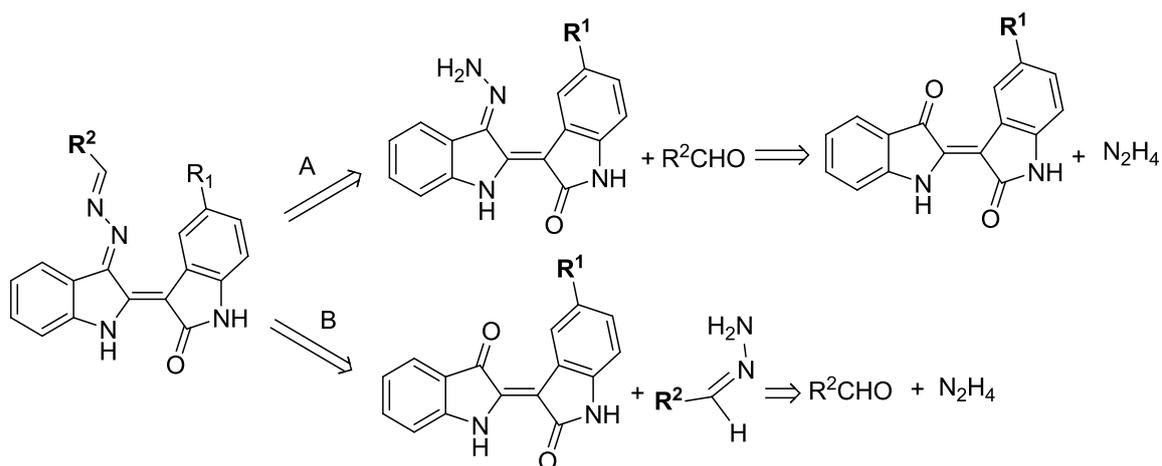
Rota A:

O primeiro grupo de compostos-alvo poderia ser preparado pelo tratamento das indirubinas com hidrazina hidratada, com subsequente adição nucleofílica e eliminação de água aos benzaldeídos.

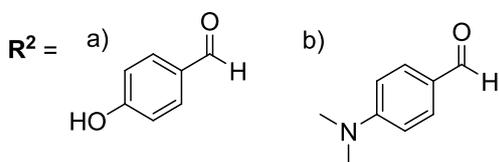
Rota B:

A segunda possibilidade envolveria a formação de fenil hidrazonas substituídas pelo tratamento dos benzaldeídos, citados anteriormente, com hidrazina hidratada, seguida de adição nucleofílica das hidrazonas formadas à carbonila C3' da indirubina.

Esquema 2: Esquema retrossintético para preparação de derivados 3'-azínicos de indirubina.



$R^1 =$ a) H ; b) NO_2 ; c) Cl; d) NH_2 ; e) $NHAc$.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

4.3 Preparação de indirubinas *N*-1-substituídas (Esquema 3)

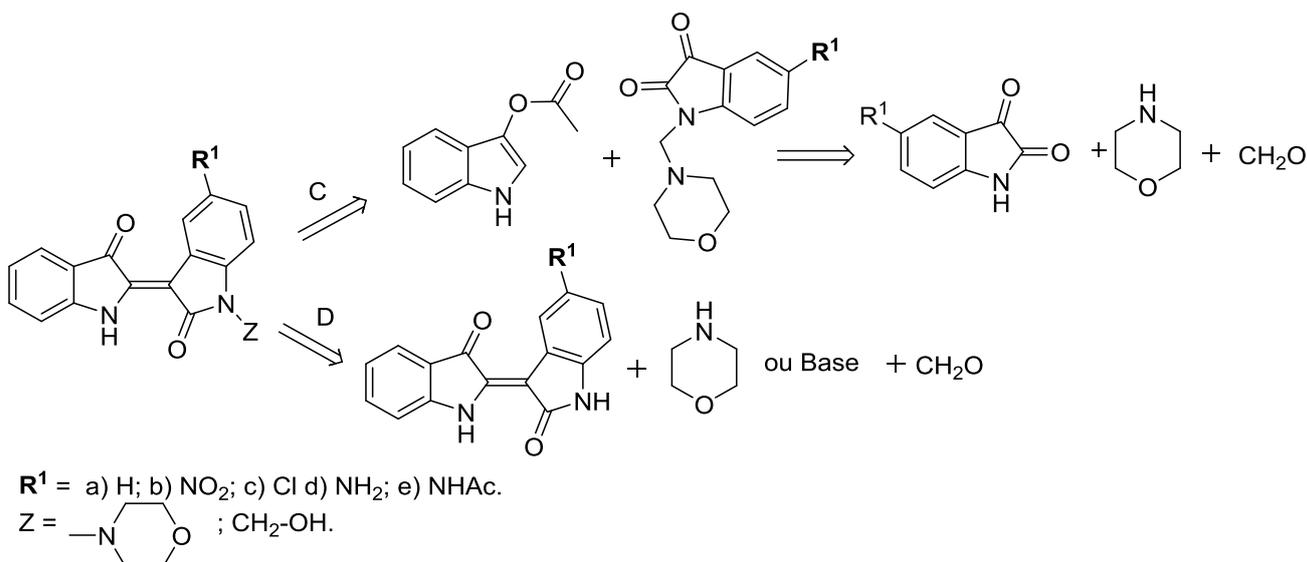
Rota C:

O segundo grupo de compostos-alvo foi planejado pela reação do 3-acetoxi-indol com os derivados *N*-1-metil-morfolinil-isatina substituída, os quais poderiam ser obtidos por reação de Mannich entre isatina e morfolina em presença de solução de formaldeído 37%

Rota D:

Uma alternativa para o segundo grupo de compostos é a reação de Mannich entre indirubina e morfolina na presença de solução de formaldeído, ou tratamento de indirubinas com formaldeído em meio básico, descritos no esquema 4.

Esquema 3: Esquema retrossintético de indirubinas *N*-1-substituídas.



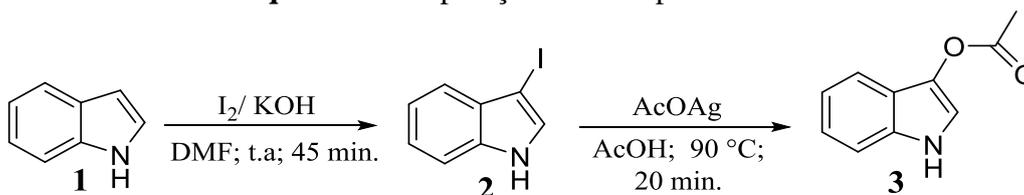
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5 METODOLOGIA

5.1 Síntese dos análogos de indol 3-substituído

Neste trabalho o 3-iodo-indol, composto **2**, foi preparado a partir da reação de substituição eletrofílica aromática em quantidades equimolares entre indol e I_2 em meio básico em DMF sob agitação e temperatura ambiente. O composto **2** foi isolado por precipitação no meio reacional seguido de filtração a vácuo (FATTALLA *et al*, 2010). O 3-acetoxi-indol, composto **3**, foi preparado a partir da reação de substituição nucleofílica aromática em proporção estequiométrica de 1 para 2 entre o composto **2** e AcOAg em AcOH, sob agitação e aquecimento. O meio reacional foi filtrado e evaporado, com o composto **3** foi isolado por cromatografia em coluna (DUNN *et al*, 2007), como descrito no esquema 5.

Esquema 4: Preparação dos compostos **2** e **3**.



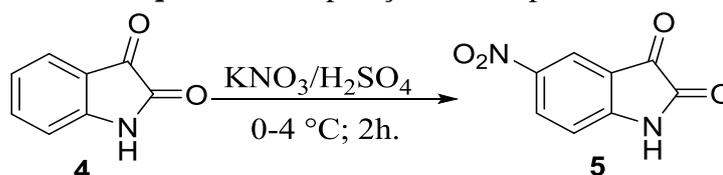
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.2 Síntese de isatinas 5-substituídas

5.2.1 Síntese de 5-nitro-isatina:

A preparação de 5-nitro-isatina, composto **5**, foi executada seguindo procedimento descrito por Souza (SOUZA, 2017). O composto **5** foi preparado pelo tratamento de isatina, composto **4**, com KNO_3 em H_2SO_4 concentrado, por substituição eletrofílica aromática, sob agitação em baixa temperatura. O isolamento foi realizado por precipitação do meio reacional em água e gelo, seguida de filtração a vácuo, como descrito no esquema 6.

Esquema 5: Preparação do composto **5**.

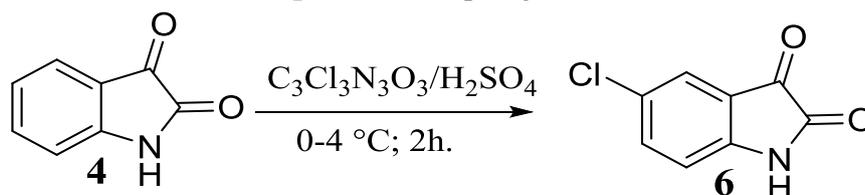


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.2.2 Síntese da 5-cloro-isatina:

A preparação de 5-cloro-isatina, composto **6**, foi executada pelo tratamento do composto **4** com ácido tricloro-isocianúrico ($C_3Cl_3N_3O_3$) em ácido sulfúrico concentrado, por substituição eletrofílica aromática, sob agitação em baixa, conforme procedimento descrito por Mendonça e colaboradores (MENDONÇA *et al*, 2005) descrito no esquema 7.

Esquema 6: Preparação de **6**.

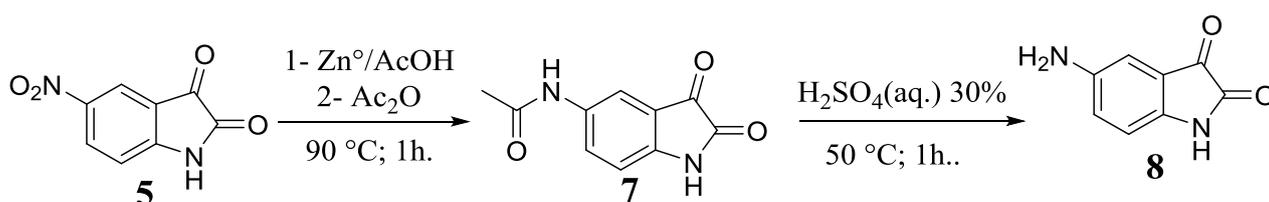


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.2.3 Síntese da 5-acetamido-isatina e 5-amino-isatina:

Para a preparação de 5-acetamido-isatina, composto **7**, foi realizada a redução do grupo nitro presente no composto **5** em presença de Zn^0 em AcOH, seguida pela acetilação com anidrido acético. O meio reacional foi filtrado e evaporado, seguido de extração. O composto **7** foi obtido após evaporação da fase orgânica. Para obtenção da 5-amino-isatina, o composto **8**, foi obtido pela hidrólise de **7** em ácido sulfúrico 30%, conforme metodologia descrita por Beauchard e colaboradores (BEAUCHARD *et al*, 2006), descritos no esquema 8.

Esquema 7: Preparação dos compostos **7** e **8**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

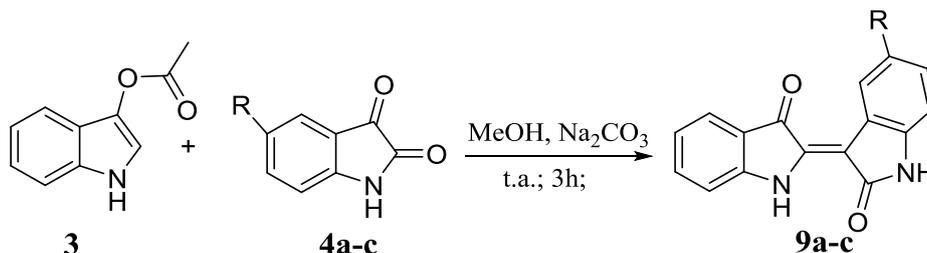
5.3 Síntese da indirubina e seus derivados 5-substituídos

Para a preparação de indirubina e indirubinas 5-substituídas foram utilizados 2 métodos de síntese, que são apresentados nos tópicos a seguir.

5.3.1 – Método 1

A indirubina composto **9a**, 5-nitro-indirubina composto **9b** e 5-cloro-indirubina composto **9c** foram preparadas empregando metodologia descrita por Souza (SOUZA, 2017), na reação do composto **3** com a respectiva isatina, compostos **4**, **5** e **6** em metanol em meio básico. Os compostos **9a**, **9b** e **9c** foram isolados por precipitação em água seguida por filtração, descritos no esquema 9.

Esquema 8: Método 1 para preparação de indirubinas.



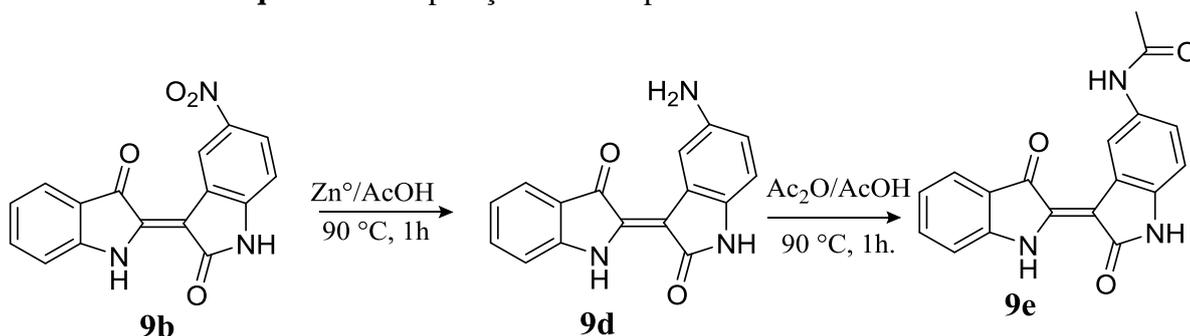
a) R = H; b) R = NO₂; c) R = Cl.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3.2 – Preparação de 5-acetamido-indirubina e 5-amino-indirubina

Alternativamente, os derivados 5-acetamido-indirubina, composto **9d** e 5-amino-indirubina **9e** foram obtidos pela redução de do composto **9b**, utilizando a metodologia de redução do grupo nitro da 5-nitro-isatina pelo tratamento com Zn⁰ em AcOH seguido de adição de anidrido acético como descrito por Bremner e colaboradores (BREMNER *et al*, 2007). Os compostos **9d** e **9e** foram obtidos após evaporação da fase orgânica, descritos no esquema 10.

Esquema 9: Preparação dos compostos **9d** e **9e**.

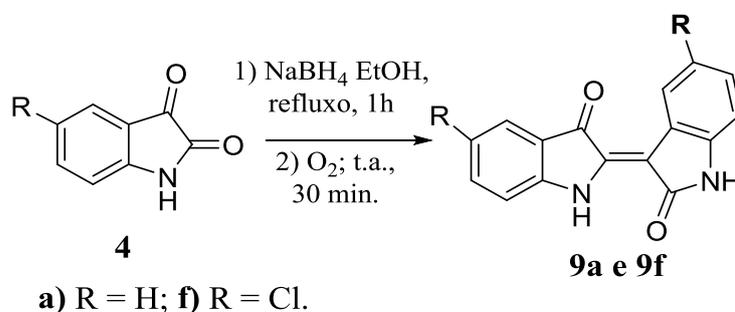


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.3.3 – Método 2

Na metodologia descrita por Wang e colaboradores para obtenção de indirubinas (WANG *et al*, 2017) não se utiliza 3-acetoxi-indol, composto **3**, ocorrendo a dimerização de isatinas em presença de vários agentes redutores, fornecendo derivados indirubínicos 5,5'-substituídos. A preparação de indirubina **9a** e 5,5-dicloro-indirubina **9f** foram realizadas pelo tratamento da isatina correspondente com NaBH₄ em EtOH, sob agitação e refluxo. Após a mudança de coloração e comparação por cromatografia em camada delgada, CCD, o meio reacional foi oxidado com O₂ do ar. Os compostos **9a** e **9f** foram isolados por precipitação em água seguida de filtração a vácuo, descritos no Esquema 11.

Esquema 10: Método 2 de preparação dos compostos **9a** e **9f**.

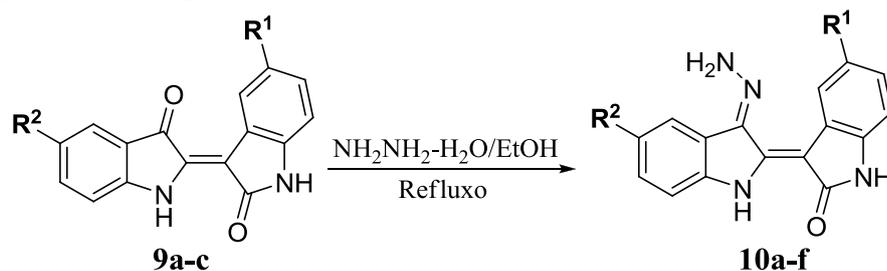


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.4 Síntese de indirubinas-3'-hidrazonas

Os derivados indirubinas-3'-hidrazona foram preparados por adaptação da metodologia de Moon e colaboradores, utilizando etanol como co-solvente da reação, não utilizando por Moon, pelo tratamento das indirubinas correspondentes com hidrazina hidratada em etanol sob refluxo e agitação (Esquema 12). Os derivados **10a-f** foram isolados por resfriamento do meio reacional e filtração sob vácuo (MOON *et al*, 2006).

Esquema 11: Preparação de derivados de indirubinas-3'-hidrazonas (**10a-f**).



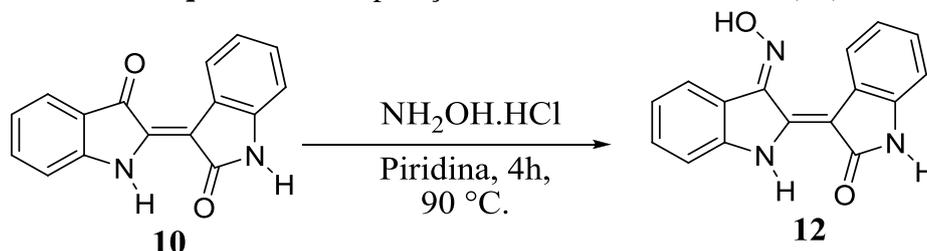
- a) $R^1 = H$, $R^2 = H$; b) $R^1 = NO_2$, $R^2 = H$, c) $R^1 = Cl$, $R^2 = H$;
d) $R^1 = NHAc$, $R^2 = H$; e) $R^1 = NH_2$, $R^2 = H$; f) $R^1 = Cl$, $R^2 = Cl$.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.5 Síntese de indirubina-3'-oxima

A indirubina-3'-oxima, composto **12**, foi preparado seguindo a metodologia de Ichimaru e colaboradores, reagindo a indirubina com cloridrato de hidroxilamina em piridina. Para isolamento de **12** o meio reacional foi neutralizado com solução de HCl, seguido de extração com AcOEt e solução de $NaHCO_3$. O composto **12** foi obtido após evaporação da fase orgânica, descritos no Esquema 13 (ICHIMARU *et al*, 2017).

Esquema 12: Preparação de indirubina-3'-oxima (**12**).

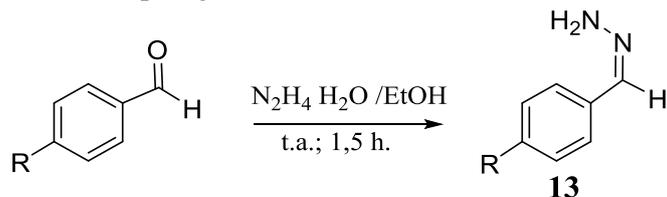


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.6 Síntese de derivados de fenil-hidrazonas

As fenil-hidrazonas **13a** e **13b** foram preparadas como descritos por Micheli e colaboradores, pelo tratamento dos benzaldeídos *p*-substituídos com hidrazina hidratada (65%) em etanol, sob agitação a temperatura ambiente. Os compostos **13a** e **13b** foram isolados pela precipitação e filtração a vácuo, descritos no Esquema 14 (MICHELI *et al*, 2016).

Esquema 13: Preparação de derivados fenil-hidrazonas **13a** e **13b**



R: a) OH; b) $N(\text{CH}_3)_2$.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

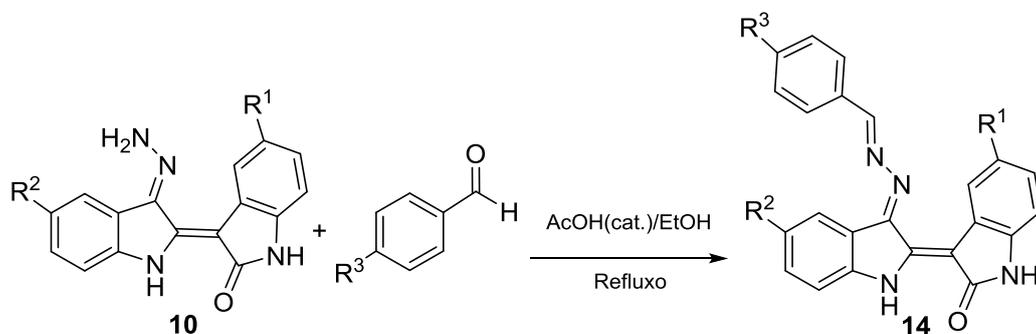
5.7 Preparação de azinas de indirubina

Na preparação dos derivados azínicos de indirubinas foi utilizado o método de Micheli e colaboradores, e foram testadas duas rotas sintéticas. A rota **A** envolve a reação dos compostos **10a-f** com os aldeídos aromáticos, catalisadas por ácido. A rota **B** emprega a reação dos compostos **9a-f** com as fenil-hidrazonas **13** catalisada por ácido (MICHELI *et al.*, 2016).

5.7.1 Preparação de azinas de indirubina pela rota A (Esquema 14)

Os compostos azínicos **14**, na posição 5 com $\text{R}^1 = \text{H}, \text{NO}_2, \text{Cl}, \text{NHAc}$ e NH_2 ; na posição 5' com $\text{R}^2 = \text{H}$ ou Cl ; e na posição para do anel aromático referente ao aldeído, $\text{R}^3 = \text{OH}$ ou $\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

Esquema 14: Preparação de derivados azínicos pela rota A.



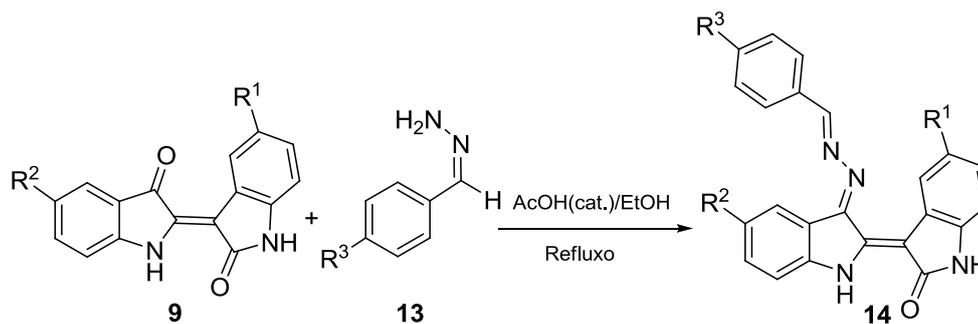
R^1 : a) H; b) NO_2 ; c) Cl; d) NH_2 ; e) NHAc . R^2 : a) H; b) Cl. R^3 : a) OH; $\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.7.2 Preparação de azinas de indirubina pela rota B (Esquema 15)

Na rota B dará origem aos mesmos compostos azínicos **14**, na posição 5 com $\text{R}^1 = \text{H}, \text{NO}_2, \text{Cl}, \text{NHAc}$ e NH_2 ; na posição 5' com $\text{R}^2 = \text{H}$ ou Cl ; e na posição para do anel aromático referente ao aldeído, $\text{R}^3 = \text{OH}$ ou $\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

Esquema 15: Preparação de derivados azínicos pela rota B.



R^1 : a) H; b) NO_2 ; c) Cl; d) NH_2 ; e) NHAc ; R^2 : a) H; b) Cl; R^3 : a) OH; b) $\text{N}(\text{CH}_3)_2$.

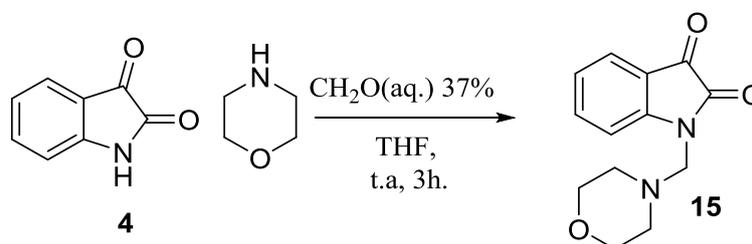
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.8 Síntese de indirubinas N-1-substituídas:

5.8.1 Síntese de base de Mannich de isatina

A base de Mannich de isatina **15** foi preparada segundo metodologia descrita por Kurkin e colaboradores, pela reação de **4** com morfolina em presença de formaldeído aquoso 37% em THF, sob agitação em temperatura ambiente. Para o isolamento de **15** o meio reacional foi aquecido até o refluxo por curto período de tempo, seguido repouso para precipitação, e posteriormente filtrado a vácuo, descrito no Esquema 17 (KURKIN *et al*, 2009).

Esquema 16: Preparação do comosto **15**.



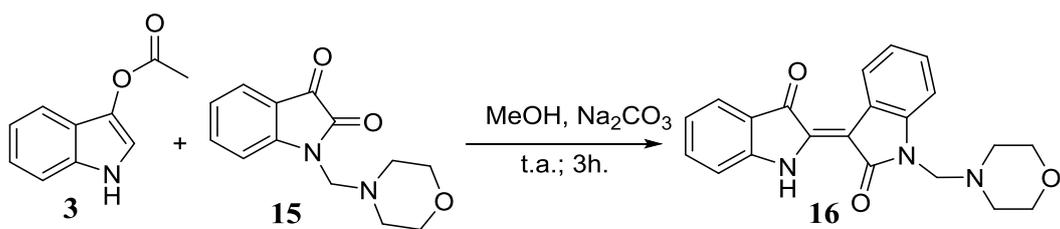
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.8.2 Síntese de bases de Mannich de indirubinas:

Rota C:

Nessa rota empregou-se metodologia descrita por Souza (SOUZA, 2017), na reação do composto **3** com o composto **15**, em metanol e meio básico, sob agitação e temperatura ambiente. A morfolinil-metil-indirubina, composto **16**, foi isolada por precipitação em água seguida de filtração a vácuo (Esquema 18).

Esquema 17: Preparação do composto **16** pela rota C.

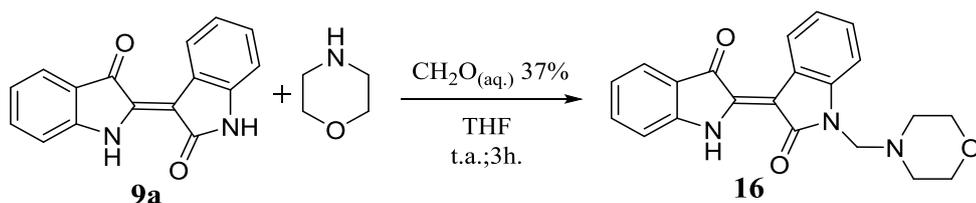


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Rota D:

A rota D é uma adaptação da metodologia de Kurkin e colaboradores para indirubinas, pela reação de do composto **9a** com morfolina em presença de formaldeído aquoso 37% em THF, sob agitação a temperatura ambiente. Para o isolamento do produto formado, o meio reacional foi aquecido até o refluxo por 15 min e deixou-se em repouso para precipitação, sendo o sólido formado filtrado a vácuo, descrito no Esquema 19 (KURKIN *et al.*, 2009).

Esquema 18: Preparação do composto **16** pela rota D.

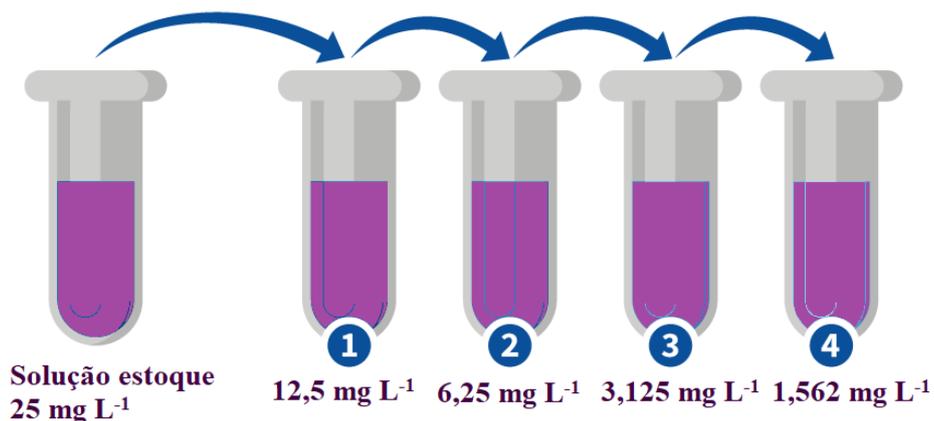


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.9 Estudos de solubilidade:

Para a determinação das concentrações dos compostos **9a-f**, **10a-c**, **12**, **17a-f** e **19** da solubilidade em etanol e água dos compostos sintetizados, foram elaboradas curvas de calibração de concentração versus absorvância em etanol, com 5 pontos nos valores de 25 mg L⁻¹, 12,5 mg L⁻¹, 6,25 mg L⁻¹, 3,125 mg L⁻¹, 1,5625 mg L⁻¹ e 0 mg L⁻¹, utilizando diluições sucessivas divididas pela metade da concentração da solução anterior, a partir da solução estoque de 25 mg L⁻¹, com R² de valor o mais próximo de 1, seguindo a lei de Beer. A equação da linha de tendência do gráfico obtido ($y = ax + b$) pode ser igualada a equação da lei de Beer onde: y igual absorvância, a igual a concentração, x igual ϵ (absortividade molar) e b é o valor da intersecção com o eixo y (CHENG *et al.* 2010).

Figura 7: Diluições em série para curva de calibração.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.9.1 Estudo de solubilidade em etanol:

A solubilidade em etanol foi realizada pela determinação da concentração de uma solução saturada dos compostos em etanol seguido de filtração, diluição e leitura de absorbância, com a determinação da concentração a partir da curva de calibração adquirida, a metodologia está representada na figura 8.

Figura 8: Metodologia para a determinação da concentração em EtOH.

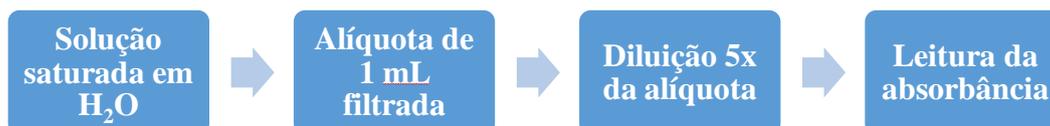


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

5.9.2 Estudo de solubilidade em água:

Para determinar a concentração em água, 2 mg dos compostos foram deixados em 10 mL de água em agitação por ultrassom e 36 °C, onde uma alíquota de 1 mL foi coletada, filtrada e diluída para 5 mL em etanol, como demonstrada na figura 9.

Figura 9: Metodologia para determinação da concentração em H₂O.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

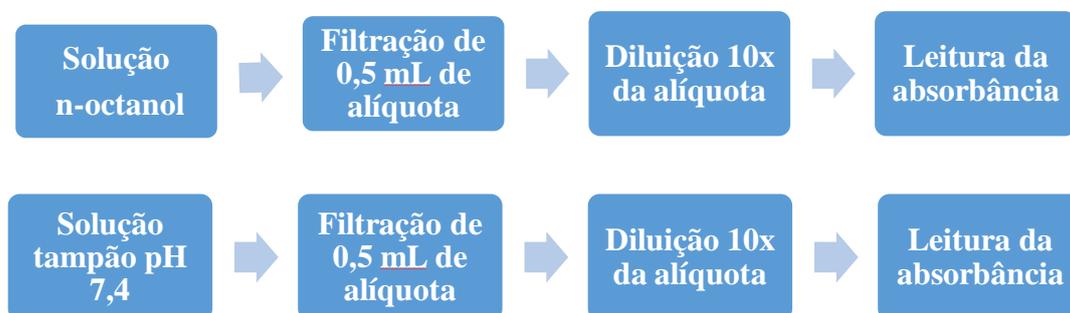
5.10 Determinação do logP:

O logP foi determinado pela partição em um sistema contendo 2 mL de tampão TRIS (tris(hidroximetil)aminoetano)-HCl em água (pH 7,4), 2 mL de *n*-octanol e 1 mg do derivado de indirubina, a temperatura controlada de 36 °C. As concentrações foram determinadas pela absorbância de uma diluição de 0,5 mL da amostra em 10 vezes o volume em etanol no comprimento de onda máximo na região do visível de cada amostra, utilizando as equações das curvas de calibração em etanol do **item 5.10**, demonstrados na figura 10 (HESHMATI *et al*, 2013).

Cálculos de logP teóricos, foram realizados nos sites: <http://www.molsoft.com/mprop/>, <http://www.vcclab.org/lab/alogps/> e <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.

Onde o logP é definido como:
$$\log P = \frac{[n\text{-octanol}]}{[\text{tampão}]}$$

Figura 10: Metodologia para determinação das concentrações em fase orgânica e aquosa.



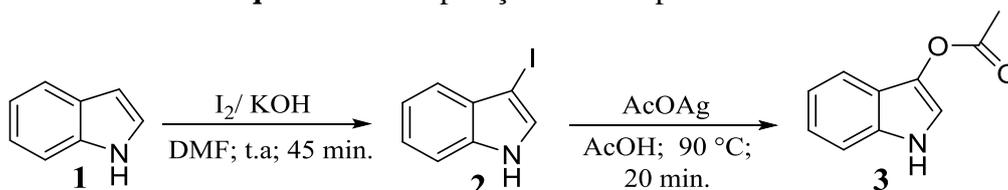
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Síntese e caracterização de 3-iodo-indol e 3-acetoxi-indol

Para o início da preparação de indirubinas e seus derivados, houve a necessidade de se obter o 3-acetoxi-indol, composto **3**, intermediário chave na síntese e de alto valor agregado.

Esquema 19: Preparação dos compostos **2** e **3**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

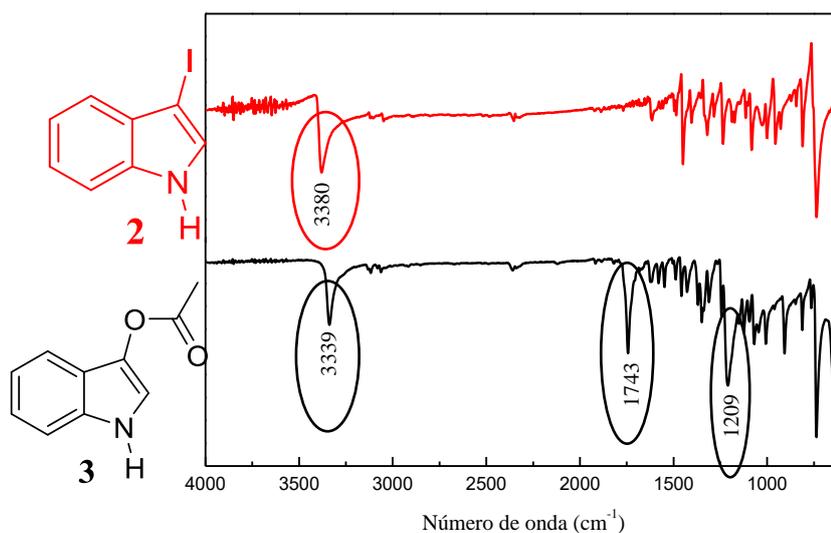
Esta síntese foi aprimorada, com a preparação do 3-iodo-indol, composto **2**, empregando metodologia adaptada de Fathalla e colaboradores, realizada em menor tempo, aproximadamente 45 minutos, e sem a necessidade de utilizar KI (FARTTHALLA *et al*, 2010).—O composto **2** foi preparado a partir da reação de substituição eletrofílica aromática em quantidades equimolares entre indol e $I_{2(s)}$ em meio básico de $KOH_{(aq)}$ em DMF sob agitação e temperatura ambiente. O composto **2** foi isolado por precipitação após adição de solução de $NaHSO_{3(aq.)}$ 0,1% e $NH_4OH_{(aq.)}$ 0,5% no meio reacional seguido de filtração a vácuo (FATTALLA *et al*, 2010). Faixa de fusão de $77\text{-}78\text{ }^\circ\text{C}$ (decomposição) segundo a literatura (OAKDALE e BUGER, 2010), com dados espectroscópicos apresentados a seguir e no item 8.1 da parte experimental, demonstram a identidade do composto **2** e sua pureza.

Para o composto **3** foi utilizada a metodologia de Dunn e colaboradores adaptada, onde o AcOH foi de gaseificado com N_2 e a reação permaneceu sob atmosfera inerte do mesmo gás, completando-se em apenas 20 minutos (DUNN *et al*, 2007). O composto **3** foi preparado a partir da reação de substituição nucleofílica aromática em proporção estequiométrica de 1 para 2 entre o composto **2** e $AcOAg_{(s)}$ em AcOH, sob agitação a $90\text{ }^\circ\text{C}$. O meio reacional foi filtrado e o ácido acético evaporado e o composto **3** foi isolado por cromatografia em coluna, apresentando faixa de fusão de $128\text{-}130\text{ }^\circ\text{C}$, de acordo com a literatura (LIU *et al*, 2010), dados espectroscópicos apresentados a seguir e no item 8.2 da parte experimental, demonstram a identidade do composto **3** e sua pureza.

As metodologias empregadas foram satisfatórias em relação ao tempo, solvente, temperatura e isolamento, obtendo-se melhores rendimentos que os descritos na literatura. A principal alteração foi a purificação através de cromatografia líquida sob vácuo, utilizando sílica gel como fase estacionária e fase móvel Hex 7:3 AcOEt, que se mostrou um método rápido de purificação fornecendo os produtos com alto teor de pureza.

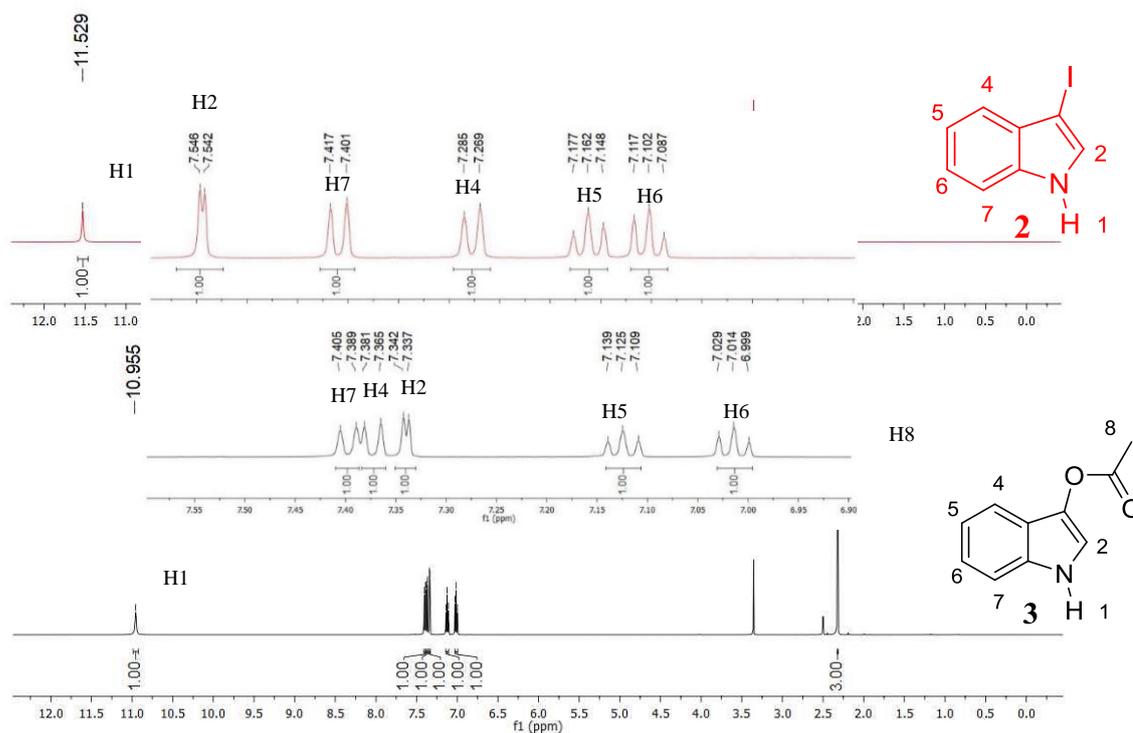
Na Figura 11 temos a comparação dos espectros de infravermelho (ATR) dos compostos **2** e **3** na qual se observa uma diferença nas bandas referentes a deformação axial da ligação N-H, com valor de 3380 cm^{-1} em **2** e 3339 cm^{-1} em **3**. Entretanto, o que melhor caracteriza a obtenção de **3** são as bandas em 1743 cm^{-1} associada a deformação axial de uma ligação C=O de éster e 1209 cm^{-1} associada a deformação angular C-O de éster.

Figura 11: Comparação de espectros de infravermelho (ATR) **2** e **3**.



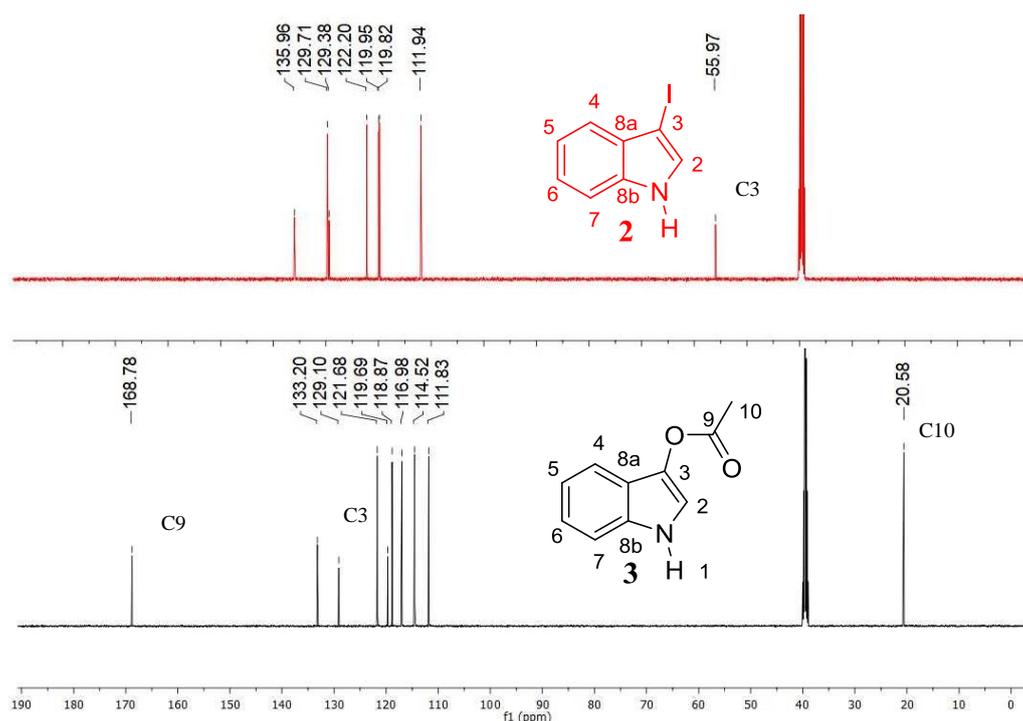
Na comparação de espectros de RMN de ^1H entre **2** e **3** (Figura 12), as diferenças marcantes é o simpleto com integração para 3 H, referentes aos hidrogênios metílicos do grupo acetoxi em 2,32 ppm e algumas alterações nas posições dos sinais dos hidrogênios aromáticos devido a troca na posição 3 pelo grupo acetoxila.

Figura 12: Comparação de espectros de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **2** e **3** com expansão da região aromática.



Na comparação de espectros de RMN de ^{13}C entre os compostos **2** e **3**, mostrados na Figura 13, as diferenças marcantes no espectro de **3** são os sinais em 20,58 ppm, referente ao carbono metílico C10 e em 168,78 ppm referente a carbonila C9 do grupo acetoxila, e a mudança considerável de deslocamento químico do sinal do carbono C3 em 133,2 ppm, que era 55,9 ppm no espectro de **2**.

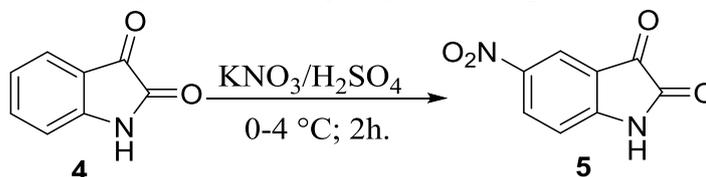
Figura 13: Comparação de espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) de **2** e **3**.



6.2- Síntese e caracterização de isatinas 5-substituídas

A preparação do composto **5** foi executada seguindo procedimento descrito por Souza (SOUZA, 2017). O composto **5** foi preparado pelo tratamento de **4** com $\text{KNO}_3(\text{s})$ em $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{aq.})$ concentrado, reagindo por substituição eletrofílica aromática, sob agitação a temperatura de 0-4 °C (utilização de banho de gelo). O isolamento foi realizado por precipitação do meio reacional em água e gelo, seguida de filtração a vácuo, com rendimento de 75%, faixa de fusão de 253-255, próximo ao descrito na literatura de 254-255°C (VINE *et al.*, 2007), seus dados espectroscópicos apresentados no item **2.3** da parte experimental confirmam sua identidade e pureza (Esquema 25).

Esquema 20: Preparação do composto **5**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

O composto **6**, foi preparado segundo metodologia descrita por Mendonça e colaboradores (MENDONÇA *et al.*, 2005). Em um frasco Erlenmeyer foi solubilizado **4** isatina em H_2SO_4 concentrado, e deixado sob agitação, reagindo por substituição eletrofílica aromática, sob agitação a temperatura de 0-4 °C (utilização de banho de

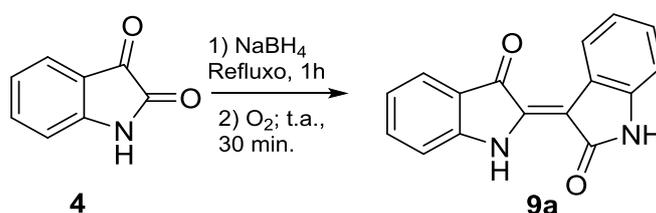
gelo). Em seguida foi adicionado ácido tricloro-isocianúrico lentamente. O meio reacional foi deixado sob-agitação magnética e banho de gelo e sal por aproximadamente 2 horas. O isolamento foi realizado por precipitação do meio reacional em água e gelo, seguida de filtração a vácuo, com rendimento de 70%, faixa de fusão de 244-246 °C, sendo descrito na literatura 245-249 °C (SINGH *et al*, 2007). Dados espectroscópicos apresentados no item 2.4 da parte experimental confirmam a identidade e pureza do composto **6** (MENDONÇA *et al*, 2005).

A 5-amino-indirubina, composto **8**, foi obtido por redução da 5-nitro-indirubina **5**, obtendo a 5-acetamida-isatina, composto **7**, seguida por hidrólise em meio ácido de ácido sulfúrico 30%, como os rendimentos foram abaixo de 30%, e estes compostos são apenas intermediários para se obter indirubinas 5-substituídas, 5-acetamido-indirubina, composto **9d**, e a 5-amino-indirubina, composto **9e**, esta foi descontinuada, obtendo-se os compostos **9d** e **9e**, como descrito no item 5.2.3 da metodologia e itens 2.9 e 2.10 da parte experimental respectivamente, onde se encontra a metodologia detalha, dados físico-químicos e dados espectroscópicos que demonstram a identidade dos compostos **9d** e **9e**.

6.3 Síntese e caracterização de indirubinas (9a)

Foram utilizados para preparar **9a** os métodos 1 (BREMNER *et al*, 2007) e 2 (WANG *et al*, 2017), obtendo o mesmo resultado e rendimentos próximos. Optou-se por utilizar o método 2 por ser mais econômico, por não utilizar o 3-acetoxi-indol (**2**), que aumentaria custos na pesquisa (Esquema 26).

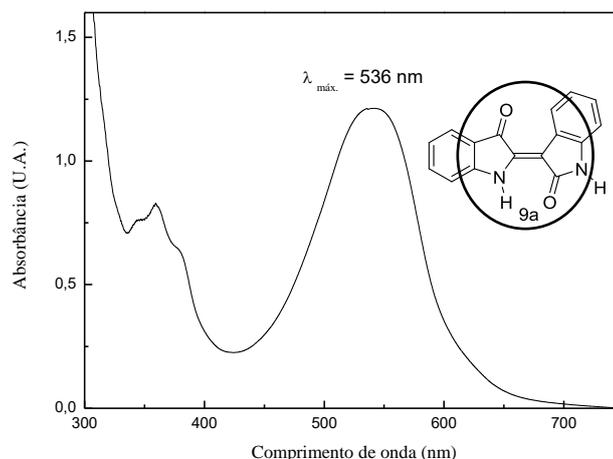
Esquema 21: Rota 3 para preparação de **9a**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

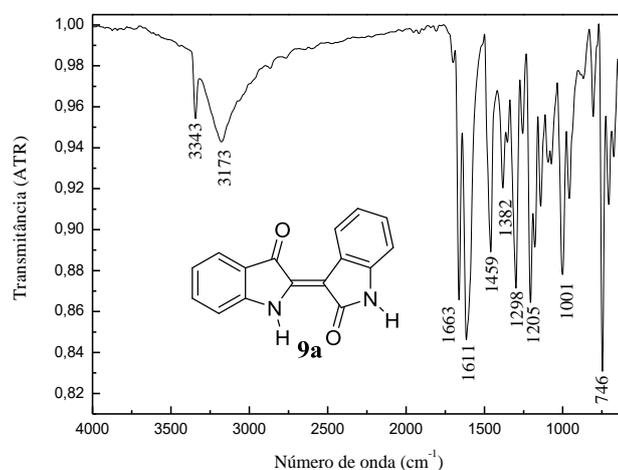
No espectro de ultravioleta-visível em etanol (Figura 14) do composto **9a**, temos o valor do $\lambda_{\text{Máx}}$ de 536 nm na região do visível, valor característico e descrito na literatura para a indirubina, ocorrendo transições $n-\pi^*$ no cromóforo em destaque.

Figura 14: Espectros de UV-Vis (em EtOH) de **9a**.



No espectro de infravermelho em ATR de **9a** (Figura 15), observa-se a banda dos estiramentos das ligações N-H da indirubina em 3376 cm^{-1} e 3173 cm^{-1} , valor alterado devido a ligação de hidrogênio intramolecular entre o H e O, as bandas dos estiramentos das carbonilas, cetônica em 1663 cm^{-1} e da lactâmica em 1611 cm^{-1} .

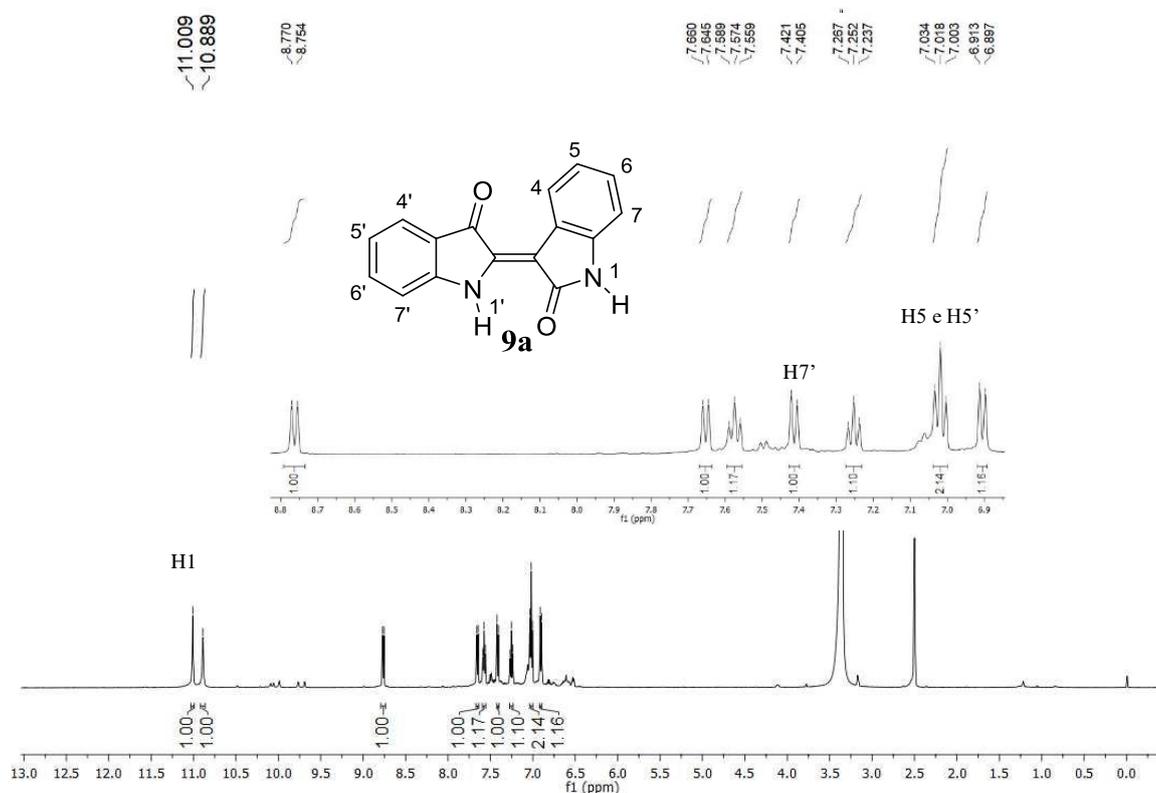
Figura 15: Espectros de infravermelho (em ATR) de **9a**.



Na Figura 16, observa-se no espectro de RMN de ^1H do composto **9a** sinais referentes a oito hidrogênios, sendo seis hidrogênios aromáticos, com destaque para o sinal de H4, um duplete com J de 8 Hz em 8,76 ppm mais desblindado em relação aos outros hidrogênios aromáticos por estar próximo espacialmente do oxigênio da carbonila cetônica, sendo bem característico em todas as indirubinas e análogos. Os outros dois hidrogênios são ligados aos nitrogênios, estando como sinais em regiões mais desblindadas em relação ao TMS, sendo H1 o hidrogênio da lactama um simpleto em 11,01 ppm e H1' um simpleto em 10,89 ppm. Esses valores estão de acordo com os

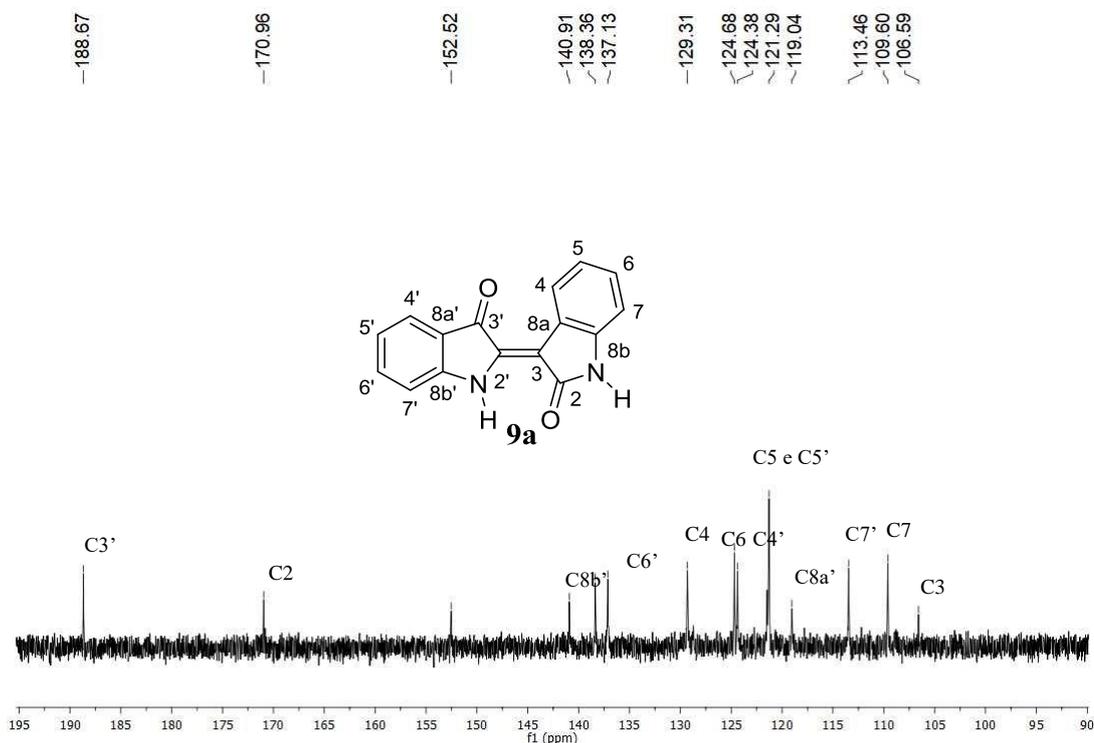
descritos por Cuong e colaboradores para derivados indirubínicos (CUONG *et al*, 2010).

Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆) com expansão da região aromática de **9a**.



Na Figura 17, observa-se no espectro de RMN de ^{13}C do composto **9a**, 15 sinais referentes aos 16 carbonos, C5 e C5' possuem sinais muito próximos. Vale destacar o sinal da carbonila C3' em 188,67 ppm. Esses valores de deslocamento estão de acordo com os descritos por Cuong e colaboradores para derivados indirubínicos (CUONG *et al*, 2010).

Figura 17: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆) de **9a**.

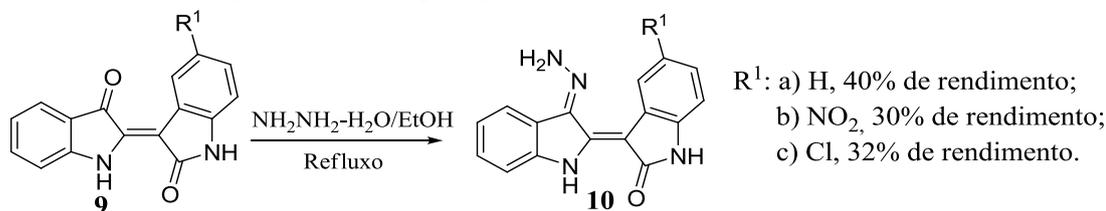


6.4 Síntese e caracterização de indirubinas 3'-hidrazona (**10**)

6.4.1 Metodologias testadas

A reação dos derivados indirubínicos com hidrazina para formação das correspondentes hidrazonas **10a-c**, como descrito por Moon e colaboradores (MOON *et al*, 2006), utilizando indirubina em hidrazina hidratada (64%) à 80 °C por 24h, foi de difícil reprodução, apresentando subprodutos de difícil purificação e degradação do material de partida, fornecendo os produtos em rendimentos inferiores a 10% após purificação em coluna cromatográfica. Metodologia descrita no esquema 27.

Esquema 22: Preparação dos derivados **10a**, **10b** e **10c**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor

Dessa forma, optou-se por testar outras condições reacionais como mudança na temperatura: temperatura ambiente, 50 °C e refluxo; utilização de solventes como: etanol, metanol, ACN, piridina; catálise com ácido acético catalítico; e diferentes fontes

de hidrazina: hidrazina hidratada, sulfato de hidrazina e dicloridrato de hidrazina, destacadas nas Tabelas 1 a 3 a seguir, sendo **10a** o produto desejado:

Tabela 1: Experimentos utilizando hidrazina hidratada 65%.

Hidrazina hidratada (64%)							
Solvente	Temperatura	AcOH	30 min.	2 horas	4 horas	24 horas	48 horas
EtOH	t.a.	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
EtOH	50 °C	Sim	Não reativo	Mis. c/ 10a	Mistura	Degradação	Degradação
EtOH	Refluxo	Sim	Mis. c/ 10a	Mistura	Não reativo	Mistura	Degradação
EtOH	t.a.	Não	Não reativo	Não reativo	Degradação	Mistura	Degradação
EtOH	50 °C	Não	Não reativo	Não reativo	Mis. c/ 10a	Mis. c/ 10a	Degradação
EtOH	Refluxo	Não	Não reativo	Não reativo	Mis. c/ 10a	Mistura	Degradação
MeOH	t.a.	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
MeOH	50 °C	Sim	Não reativo	Mistura	Não reativo	Mistura	Degradação
MeOH	Refluxo	Sim	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação
MeOH	t.a.	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
MeOH	50 °C	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
MeOH	Refluxo	Não	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação
ACN	t.a.	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
ACN	50 °C	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
ACN	Refluxo	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
ACN	t.a.	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
ACN	50 °C	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
ACN	Refluxo	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
Piridina	t.a.	Não	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação
Piridina	50 °C	Não	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação
Piridina	Refluxo	Não	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação

Os resultados da tabela 1 apresentam que o excesso de tempo reacional, acima de 2 horas, leva a degradação do material de partida e do produto **10a** desejado. Em solventes apróticos não foi reativo, sendo a melhor condição a utilização de etanol como co-solvente, catalise utilizando ácido acético e refluxo por 30 minutos, obtendo uma mistura onde for possível o isolamento do produto desejado por cromatografia em coluna.

Tabela 2: Experimentos utilizando dicloridrato de hidrazina.

Dicloridrato de hidrazina							
Solvente	Temperatura	AcOH	30 min.	2 horas	4 horas	24 horas	48 horas
EtOH	t.a.	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
EtOH	50 °C	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
EtOH	Refluxo	Sim	Não reativo	Não reativo	Mistura	Mistura	Degradação
EtOH	t.a.	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
EtOH	50 °C	Não	Não reativo	Não reativo	Mistura	Mistura	Degradação
EtOH	Refluxo	Não	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação
Piridina	t.a.	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
Piridina	50 °C	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
Piridina	Refluxo	Não	Não reativo	Não reativo	Mistura	Mistura	Degradação

Para os experimentos relatados na tabela 2, foram utilizados apenas etanol, melhor solvente nos experimentos da tabela 1, e piridina, utilizada na reação de preparação de indirubina-3'-oxima com cloridrato de hidroxilamina, como solventes. Os resultados da tabela dos demonstram que não ocorre a reação com o dicloridrato de hidrazina.

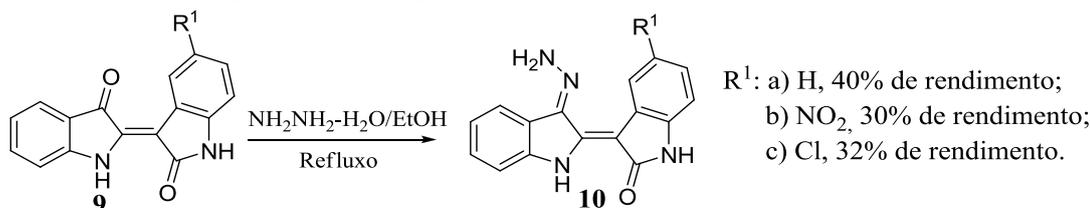
Tabela 3: Experimentos utilizando sulfato de hidrazina.

Sulfato de hidrazina							
Solvente	Temperatura	AcOH	30 min.	2 horas	4 horas	24 horas	48 horas
EtOH	t.a.	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Não reativo
EtOH	50 °C	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
EtOH	Refluxo	Sim	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
EtOH	t.a.	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura
EtOH	50 °C	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura
EtOH	Refluxo	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Mistura	Degradação
Piridina	t.a.	Não	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Não reativo	Degradação
Piridina	50 °C	Não	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação
Piridina	Refluxo	Não	Não reativo	Mistura	Mistura	Mistura	Degradação

Para os experimentos relatados na tabela 3, também foram utilizados apenas etanol, melhor solvente nos experimentos da tabela 1, e piridina, utilizada na reação de preparação de indirubina-3'-oxima com cloridrato de hidroxilamina, como solventes. Os resultados da tabela dos demonstram que não ocorre a reação com o sulfato de hidrazina.

O emprego de hidrazina hidratada em etanol sob refluxo (Esquema 25) forneceu as hidrazonas **10a**, **10b** e **10c** em rendimentos de 15-18%, em menor tempo, aproximadamente 30 min, e os produtos foram purificados por cromatografia. A mesma metodologia aplicada para preparação da 5-amino-indirubina-3'-hidrazona e 5-acetamido-indirubina-3'-hidrazona conduziu a formação de uma mistura complexa de produtos.

Esquema 23: Preparação dos derivados **10a**, **10b** e **10c**.

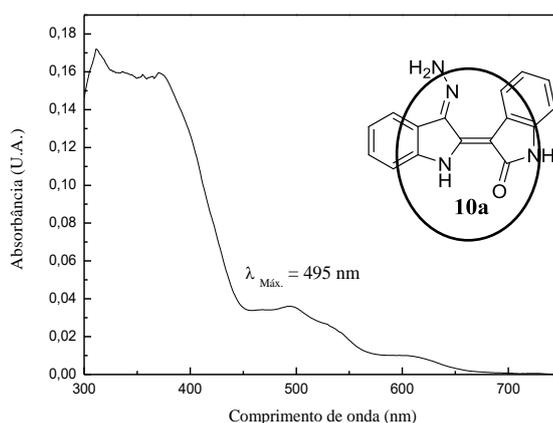


Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6.4.2 Caracterização de indirubinas-3'-hidrazona

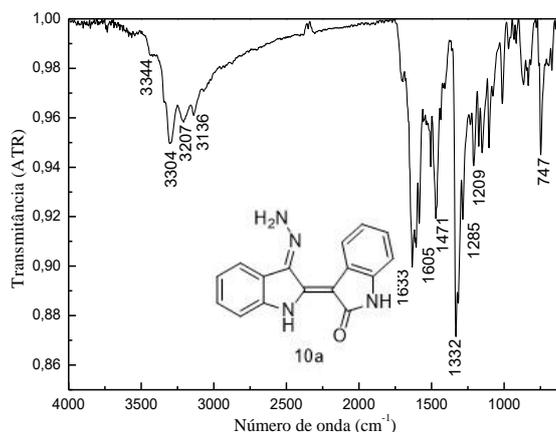
No espectro de ultravioleta-visível em etanol do composto **10a** (Figura 18) destaca-se o λ_{Max} na região do visível em 495 nm, mudança de valor em relação a indirubina, pela alteração em seu cromóforo pela mudança de função cetona para hidrazona, ocorrendo um deslocamento batocrômico $n-\pi^*$.

Figura 18: Espectros de UV-Vis (em EtOH) **10a**.



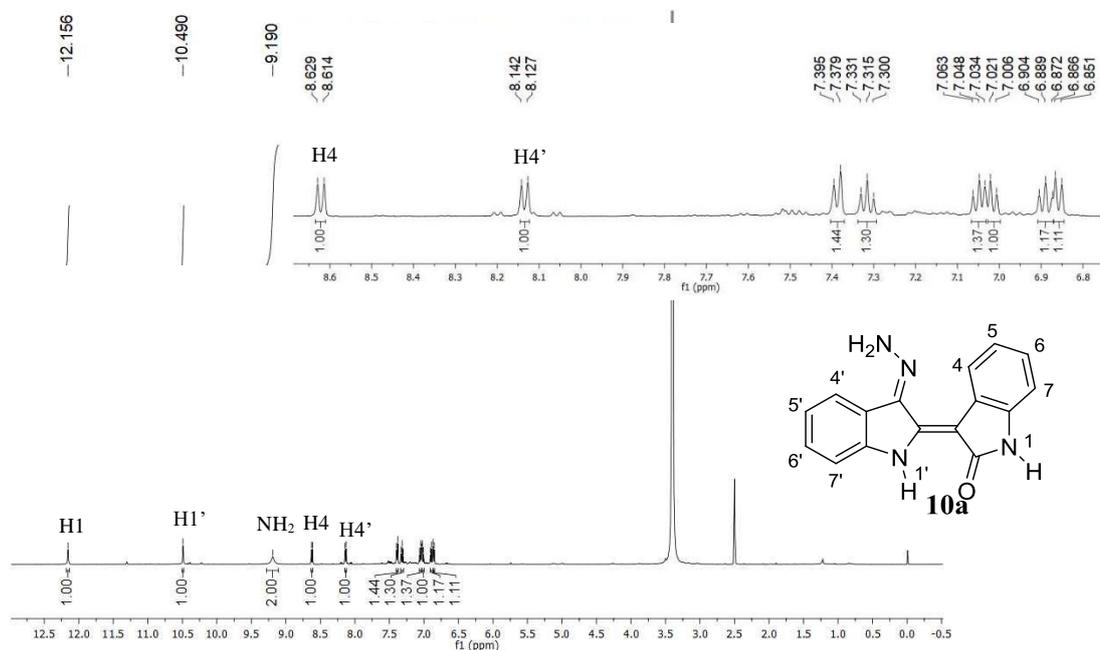
No espectro de infravermelho (ATR) de **10a** (Figura 19) observa-se as bandas referentes aos estiramentos das ligações N-H do grupo NH₂ da hidrazona em 3304 cm⁻¹ e 3207 cm⁻¹ e a banda do estiramento da ligação C=N em 1633 cm⁻¹ que diferem da indirubina, evidenciando a formação da hidrazona desejada.

Figura 19: Espectros de infravermelho (em ATR) **10a**.



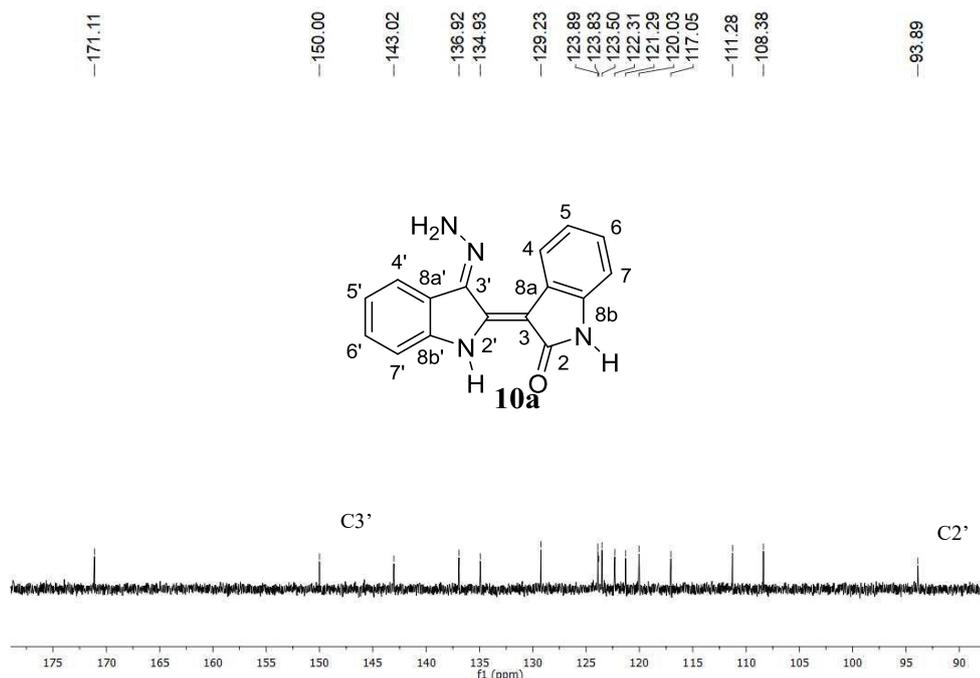
No espectro de RMN de ¹H do composto **10a** (Figura 20) observa-se a modificação do ambiente eletrônico devido à troca da carbonila cetônica por um grupo hidrazona, gerando várias alterações de deslocamentos de sinais de hidrogênios no espectro. O hidrogênio NH1 passa a ficar mais desblindado com deslocamento em 12,16 ppm e NH1' passa a ficar mais blindado com deslocamento em 10,49 ppm. Destaque para o simpleto largo em 9,19 ppm com integração para 2 hidrogênios, característico de NH₂ das hidrazonas. O hidrogênio H4 passa a um campo mais baixo em 8,65 ppm e H4' passa a ser mais blindado em 8,134 ppm, possivelmente pela presença do grupo NH₂ da hidrazona nas proximidades. Os demais hidrogênios também presentes no material de partida não sofrem alterações significativas em seus deslocamentos químicos.

Figura 20: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆) com expansão da região aromática de **10a**.



No espectro de RMN de ^{13}C do composto **10a** (Figura 21) verifica-se o desaparecimento do sinal da carbonila C3', anteriormente em 188,67 ppm, e o aparecimento de um sinal em 150,00 ppm referente ao carbono C3' ligado ao nitrogênio da hidrazona. Vale ressaltar que todos os sinais dos demais carbonos aparecem com valores menores em ppm, com destaque para C2' em 93,89 ppm.

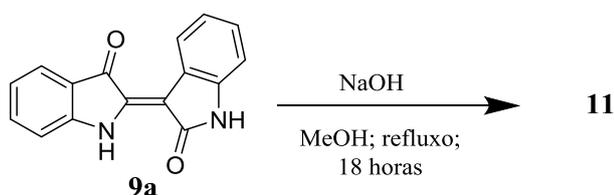
Figura 21: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6) de **10a**.



6.5 Hidrólise de indirubinas em meio básico

Mesmo com a diminuição na formação de subprodutos, os rendimentos se mantiveram baixos. Observou-se que quanto maior o tempo de reação maior era a formação de subprodutos, sugerindo a degradação da hidrazona e ou a competição dos nucleófilos presentes na solução de hidrazina hidratada 64%. Para verificar essa hipótese, foi realizado um experimento pelo tratamento de **9a** com hidróxido de sódio sob-refluxo de metanol. Após 18 horas foi observado a degradação total da indirubina por CCD (CH_2Cl_2 98:2 CH_3OH), isolando em maior quantidade um produto, de cor amarela, chamado de **11**, que possui características espectroscópicas diferentes da indirubina.

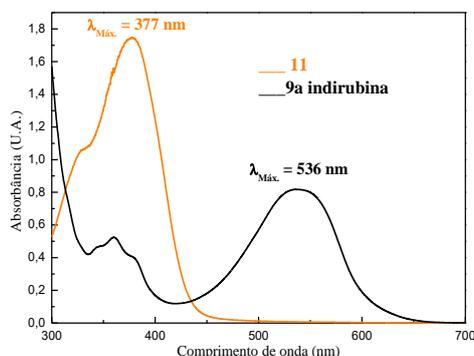
Esquema 24: Experimento de hidrólise de **9a**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

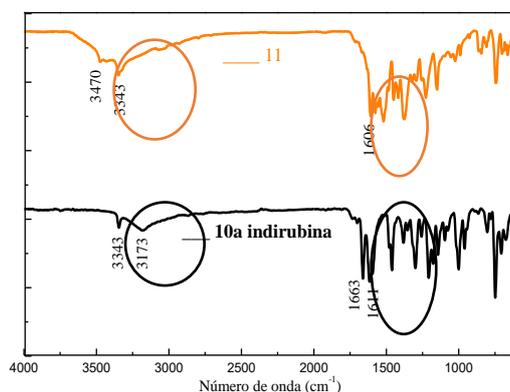
No espectro UV-Vis comparativo entre **9a** e **11** (Figura 22) observa-se a nítida mudança do valor do $\lambda_{\text{Máx.}}$ de 536 nm da indirubina para 377 nm em **11**, indicando a alteração do cromóforo.

Figura 22: Comparação de espectros de IV e UV-Vis (em EtOH) **9a** e **11**.



No espectro comparativo de IV entre a **9a** e o produto **11** (Figura 23) observa-se uma banda em 3470 cm^{-1} característica de estiramento O-H, a manutenção da banda em 3343 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H e o desaparecimento da banda em 3173 cm^{-1} do estiramento da outra ligação N-H onde há uma ligação de hidrogênio intramolecular. Outras diferenças são o desaparecimento da banda em 1663 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C=O cetônica, porém com a manutenção da banda em 1611 cm^{-1} do estiramento da ligação C=O da lactâmica.

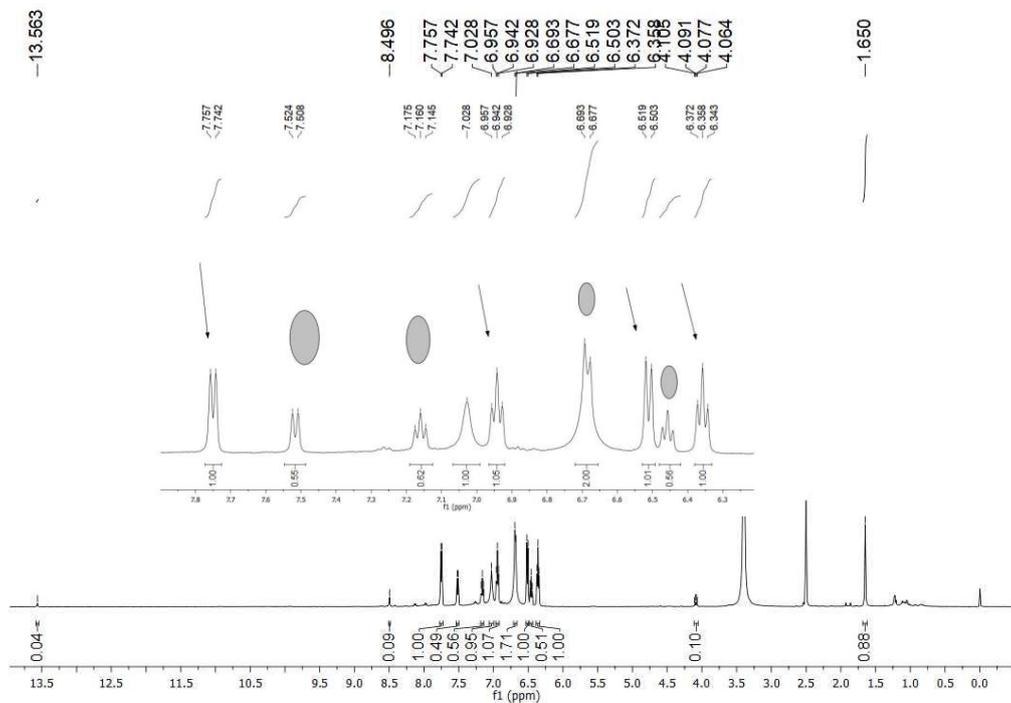
Figura 23: Comparação de espectros de IV (ATR) **9a** e **11**.



No espectro de RMN de ^1H do produto **11**, com expansão aromática (Figura 24), foram observados dois grupos de hidrogênios aromáticos, marcados com setas e

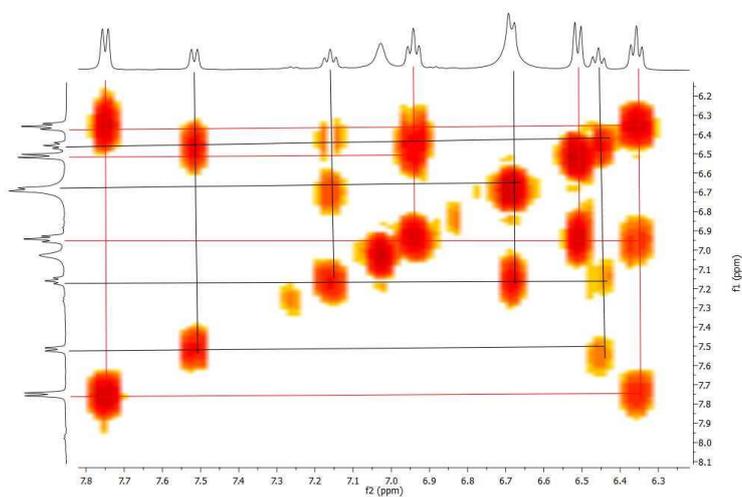
círculos, cada grupo apresenta integrações distintas e multiplicidades que mostram a correlação distinta em cada grupo.

Figura 24: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) com expansão da região aromática de **11**.



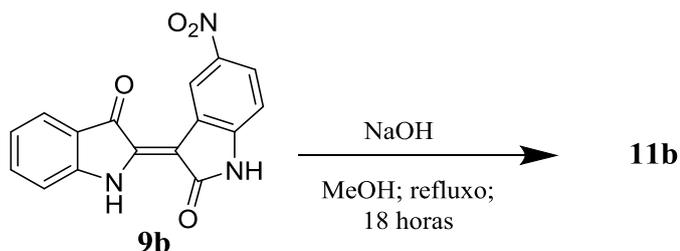
Na figura 25, o mapa de correlação COSY do produto **11**, as correlações entre os dois grupos de hidrogênios fica evidente, concluindo que se trata de uma mistura de compostos, e que cada grupo de hidrogênios aromáticos é derivado do núcleo indólico e o outro do núcleo isatiníco.

Figura 25: Mapa de correlação COSY de **11**.



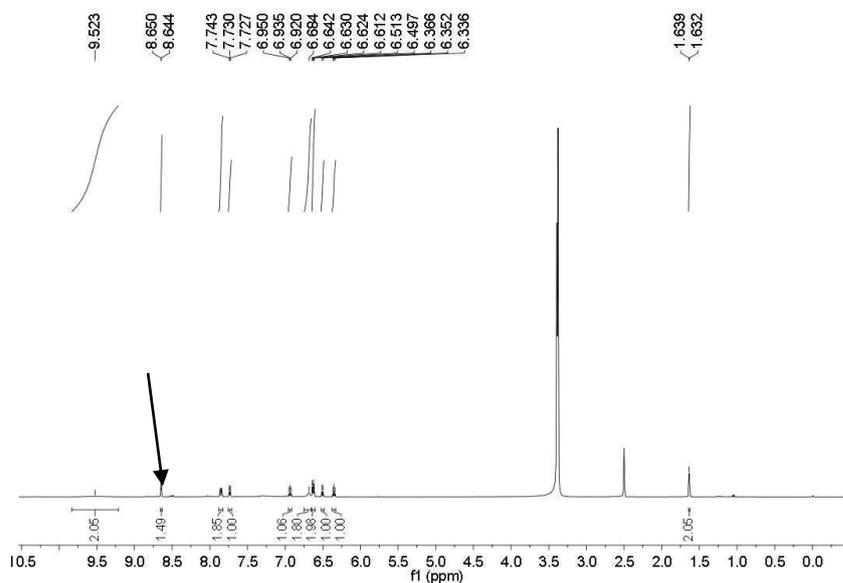
Foi realizado o mesmo experimento com o composto **9b**, 5-nitro-indirubina, por apresentar uma variação de deslocamento químico em H4, e a ausência de H5. Na figura 26 observamos o mesmo padrão de deslocamento químico e integração, porém podemos identificar que os hidrogênios referentes ao núcleo isatiníco é o que apresenta a maior integração, pela identificação do H4 do composto **9b**, destacado com uma seta.

Esquema 25: Experimento de hidrólise de **9b**.



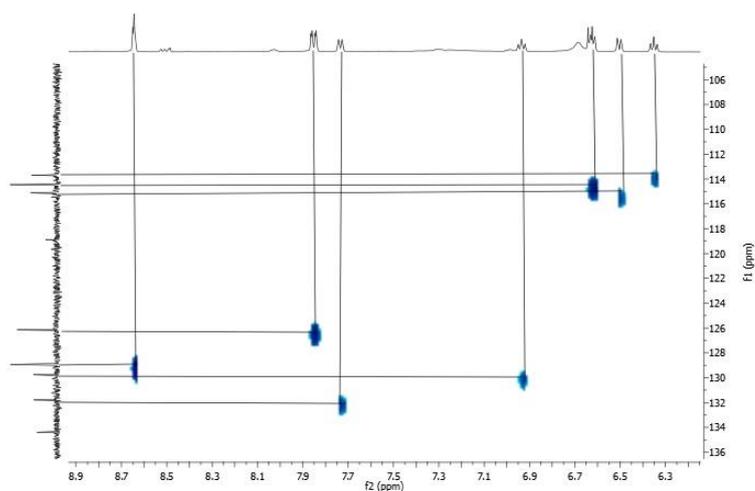
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), da hidrólise com **9b**.



Para demonstrar que os produtos dos experimentos **11** e **11b** são uma mistura de compostos, com origem na ruptura da ligação dupla que une os núcleos indólico e o isatiníco das indirubinas, originando dois compostos referentes a cada núcleo, foi realizado experimentos de RMN de C^{13} e mapas de correlação entre $\text{H}^1 \times \text{C}^{13}$, HSQC (figura 27) e HMBC (figura 28) e mapa de correlação entre $\text{H}^1 \times \text{N}^{15}$ HMBC (figura 29).

Figura 27: Mapa de correlação HSQC de **11b**.



No mapa de correlação HSQC $\text{H}^1 \times \text{C}^{13}$ (figura 27) do produto **11b**, analisamos correlações a curta distância. No mapa de correlação HMBC $\text{H}^1 \times \text{C}^{13}$ (figura 28) identificamos o ambiente químico de cada hidrogênio através de correlações a longa distância, e no HMB $\text{H}^1 \times \text{N}^{15}$ observamos as correlações a longa distância entre hidrogênios e nitrogênio.

Figura 28: Mapa de correlação HMBC $\text{H}^1 \times \text{C}^{13}$ de **11b**.

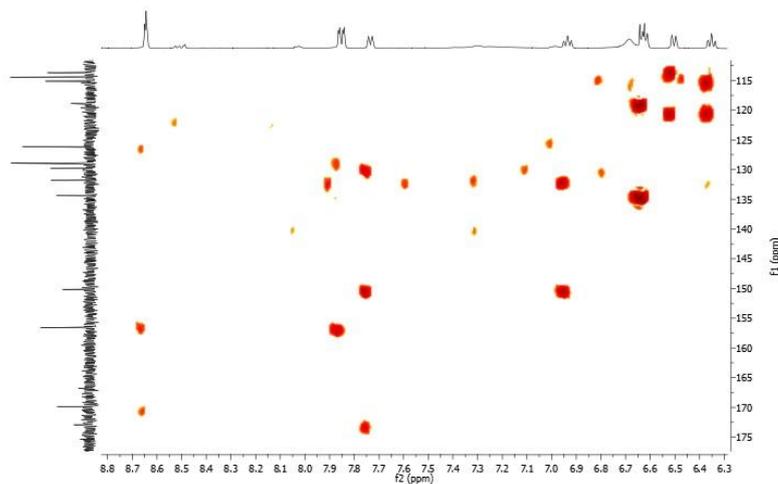
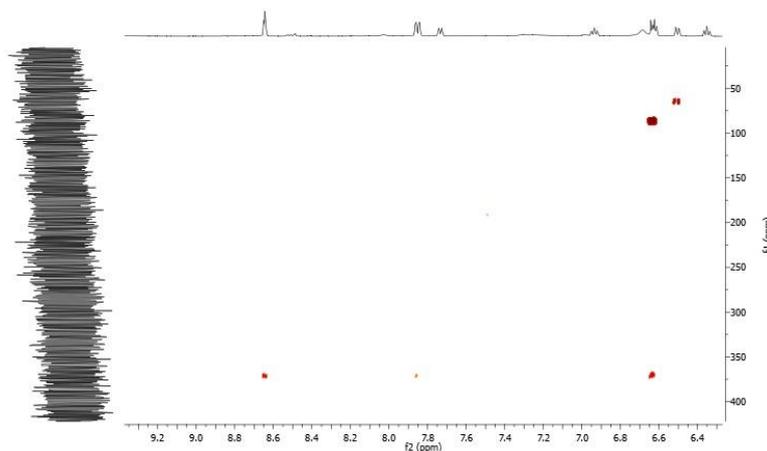


Figura 29: Mapa de correlação HMBC $H^1 \times N^{15}$ de **11b**.

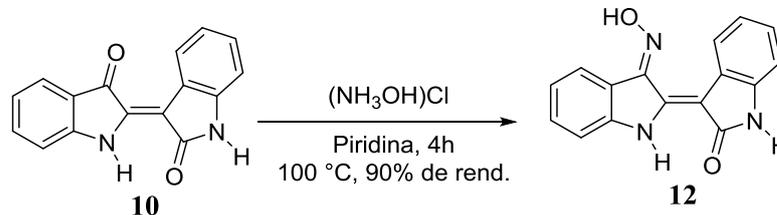


De acordo com dados espectroscópicos disponíveis na literatura (REGULSKA *et al.* 2009) os produtos **11** trata-se de uma mistura do ácido 2-amino-benzóico e seu sal sódico e **11b** se trata do ácido 5-nitro-2-amino benzoico. Concluiu-se que este produto de hidrólise é um dos subprodutos da reação da indirubina com hidrazina hidratada, havendo a competição de nucleófilos, no caso o íon hidróxido presente na solução.

6.6 Síntese e caracterização de indirubina-3'-oxima (**12**)

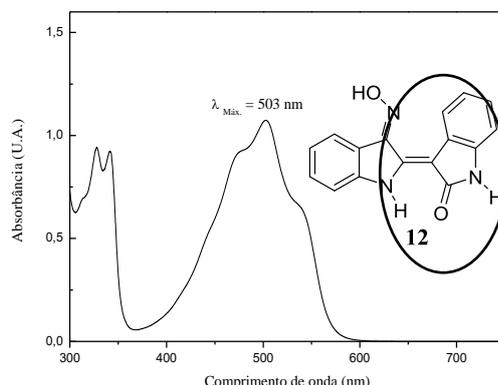
A indirubina-3'-oxima, composto **12**, e seus derivados, são as indirubinas mais relatadas na literatura em relação à mudança estrutural e melhoria na solubilidade. Decidiu-se preparar este análogo como modelo de comparação em relação às indirubinas-3'-hidrazonas. O composto **12** foi preparado reagindo a indirubina com cloridrato de hidroxilamina (Esquema 28), segundo a metodologia descrita por Ichimaru e colaboradores (ICHIMARU *et al.*, 2017).

Esquema 26: Preparação de **12**.



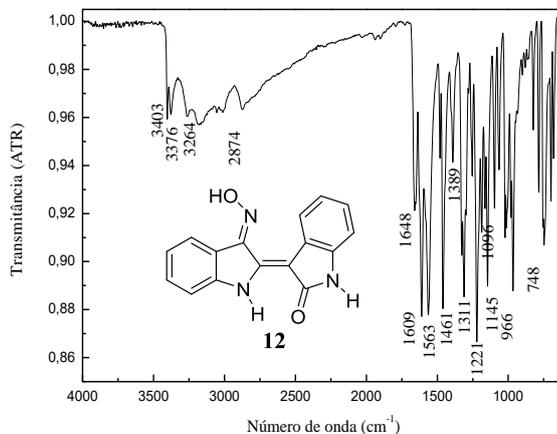
No espectro de ultravioleta-visível em etanol de **12** (Figura 30) temos o valor do $\lambda_{\text{Máx.}}$ de 503 nm na região do visível, pela alteração do cromóforo da indirubina pela adição do grupo oxima, ocorrendo um deslocamento batocrômico $n-\pi^*$.

Figura 30: Espectros de UV-Vis (em EtOH) de **12**.



No espectro de infravermelho em ATR de **12** (Figura 31) observa-se uma banda em 3403 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H do grupo oxima, as bandas referentes aos estiramentos das ligações N-H da indirubina em 3376 cm^{-1} e 3264 cm^{-1} e a banda do estiramento da ligação C=N em 1652 cm^{-1} que difere da indirubina, evidenciando a formação da hidrazona desejada.

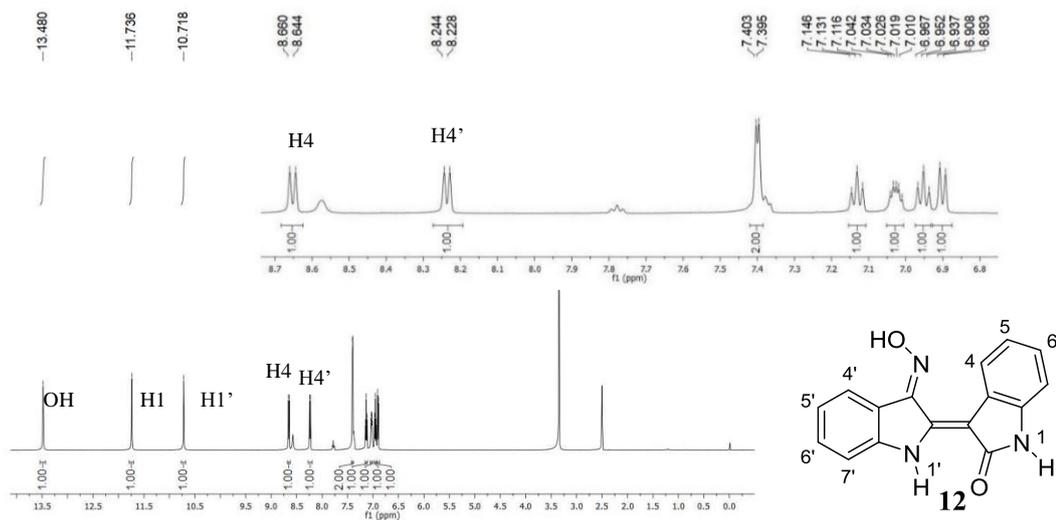
Figura 31: Espectros de infravermelho (em ATR) de **12**.



No espectro de RMN de ^1H do composto **12** (Figura 32) observa-se a modificação do ambiente eletrônico devido à troca da carbonila cetônica pelo grupo oxima, gerando várias alterações de deslocamentos de sinais de hidrogênios no espectro. Com deslocamento químico de $13,48 \text{ ppm}$ e integração de 1 observa-se o sinal do hidrogênio da hidroxila referente ao grupo oxima. O hidrogênio NH1 passa a ficar mais desblindado com deslocamento em $11,73 \text{ ppm}$ e NH1' passa a ficar mais blindado com deslocamento em $10,72 \text{ ppm}$. O hidrogênio H4 passa a um campo mais baixo em $8,65 \text{ ppm}$ e H4' passa a ser mais blindado em $8,33 \text{ ppm}$, possivelmente pela presença do

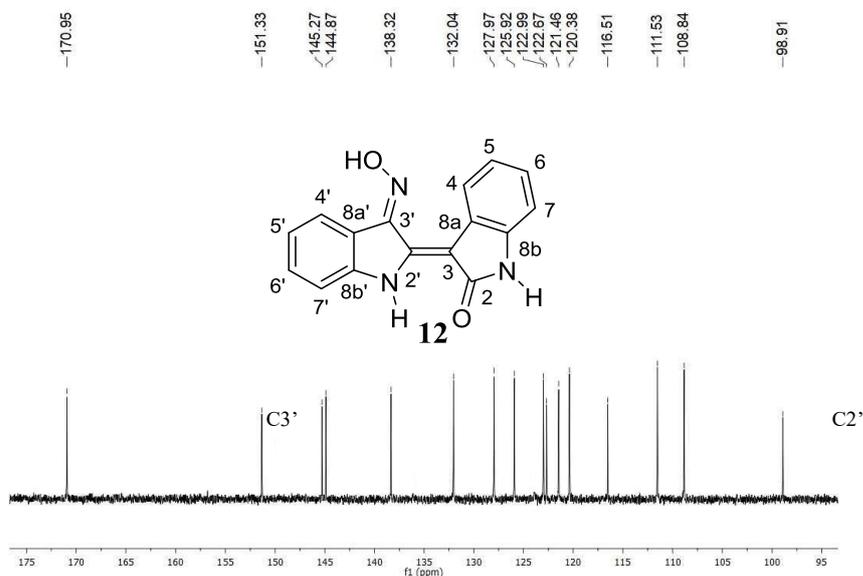
grupo OH da oxima nas proximidades. Os demais hidrogênios também presentes no material de partida não sofrem alterações significativas em seus deslocamentos químicos.

Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆) com expansão da região aromática de **12**.



No espectro de RMN ^{13}C do composto **12** (Figura 33) verifica-se o desaparecimento do sinal da carbonila C3' anteriormente em 189,1 ppm, e o aparecimento de um sinal em 151,33 ppm referente ao carbono C3' ligado ao nitrogênio da oxima. Vale ressaltar que todos os sinais dos demais carbonos aparecem com valores menores em ppm, com destaque para C2' em 98,91 ppm.

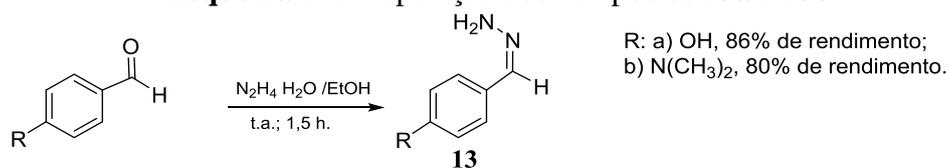
Figura 33: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆) de **12**.



6.7 Síntese de derivados de fenil-hidrazonas (13)

Para obter os derivados azínicos pela rota B, foi necessário preparar previamente os compostos 4-hidroxi-fenil-hidrazona, composto **13a** e 4-dimetilamino-fenil-hidrazona, composto **13b**, obtidos como descritos por Micheli (MICHELI, 2016), em excelentes rendimentos (86 e 80%, respectivamente) (Esquema 31). Os valores de pontos de fusão e os dados espectroscópicos estão em acordo com o disposto na literatura, apresentados na parte experimental nos itens 2.16 e 2.17.

Esquema 27: Preparação dos compostos **13a** e **13b**.



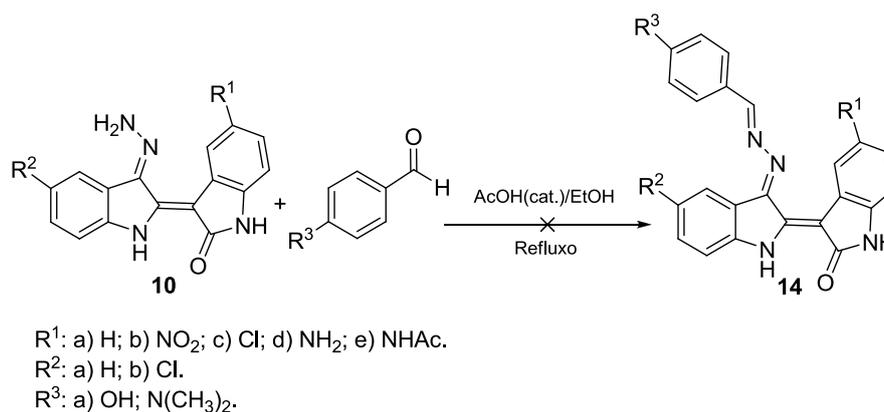
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6.8 Preparação de azinas de indirubina:

A preparação dos derivados azínicos de indirubinas foi realizada por duas rotas. A **rota A** envolve a reação de **10** com benzaldeídos 4-substituídos e catálise ácida (Esquema 32). A **rota B** emprega a reação do composto **9** com as fenil-hidrazonas **13a** e **13b** catalisada por ácido (Esquema 33).

6.8.1 Preparação de azinas de indirubina pela rota A (Esquema 32)

Esquema 28: Tentativa de formação de derivados azínicos pela **rota A**.



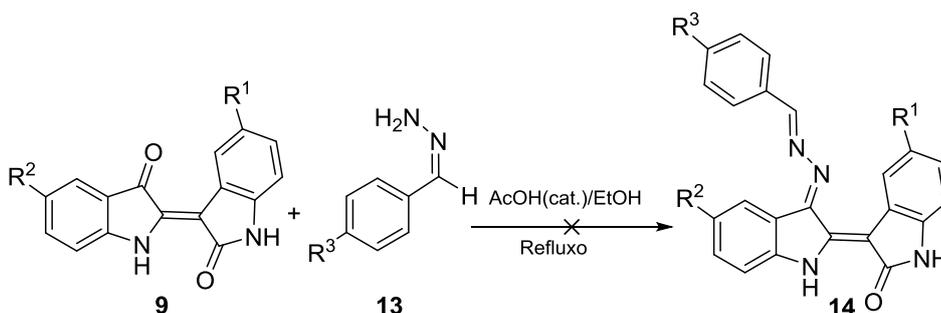
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Não se obteve sucesso empregando a **rota A** devido à necessidade de se obter derivados indirubínicos-3'-hidrazona em quantidade e pureza satisfatórias. Alguns testes com o composto **10c** com **13a** foram realizados com a indicação em CCD e RMN de

C¹³, da formação do derivado azínico **14c** (5-cloro-indirubina-3'-hidrazona) desejado, em uma mistura complexa de difícil separação. É necessária a realização de mais experimentos partindo de indirubinas-3'-hidrazonas puras para comprovar a eficácia dessa metodologia.

6.8.2 Preparação de azinas de indirubina pela rota B (Esquema 33)

Esquema 29: Tentativa de formação de derivados azínicos de indirubinas pela **rota B**.



R¹: a) H; b) NO₂; c) Cl; d) NH₂; e) NHAc;

R²: a) H; b) Cl;

R³: a) OH; b) N(CH₃)₂.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Diversas tentativas foram realizadas para a formação de derivados azínicos, pela reação entre **9** e **13**.

A primeira tentativa foi a reação de **9b** com a hidrazona **13b** em refluxo de etanol, catalisada por ácido acético. O meio reacional permaneceu sob essas condições durante 7 dias, sem observação de formação de novos produtos. Verificou-se por CCD apenas a presença dos materiais de partida.

A mesma reação foi repetida em temperatura ambiente ou refluxo, empregando **9b** ou **9e**, com **13a** ou **13b**, usando outros ácidos como catalisadores, a saber: ácido clorídrico, ácido canforssulfônico (CSA), e resina Amberlite[®]CG-50 ácida. Não foi observada a formação do produto esperado, nem o consumo dos materiais de partida. Os experimentos estão resumidos na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4: Comparação dos experimentos para preparação de derivados azínicos pela rota B.

5-nitro-indirubina				5-cloro-indirubina			
Benzaldeído	Catalisador	Temp.	Resultado	Benzaldeído	Catalisador	Temp.	Resultado
4-OH	AcOH	t.a.	Não reativo	4-OH	AcOH	t.a.	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	AcOH	t.a.	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	AcOH	t.a.	Não reativo
4-OH	AcOH	Refluxo	Não reativo	4-OH	AcOH	Refluxo	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	AcOH	Refluxo	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	AcOH	Refluxo	Não reativo
4-OH	HCl	t.a.	Não reativo	4-OH	HCl	t.a.	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	HCl	t.a.	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	HCl	t.a.	Não reativo
4-OH	HCl	Refluxo	Não reativo	4-OH	HCl	Refluxo	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	HCl	Refluxo	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	HCl	Refluxo	Não reativo
4-OH	Amberlite	t.a.	Não reativo	4-OH	Amberlite	t.a.	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	Amberlite	t.a.	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	Amberlite	t.a.	Não reativo
4-OH	Amberlite	Refluxo	Não reativo	4-OH	Amberlite	Refluxo	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	Amberlite	Refluxo	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	Amberlite	Refluxo	Não reativo
4-OH	CSA	t.a.	Não reativo	4-OH	CSA	t.a.	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	CSA	t.a.	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	CSA	t.a.	Não reativo
4-OH	CSA	Refluxo	Não reativo	4-OH	CSA	Refluxo	Não reativo
4-N(CH ₃) ₂	CSA	Refluxo	Não reativo	4-N(CH ₃) ₂	CSA	Refluxo	Não reativo

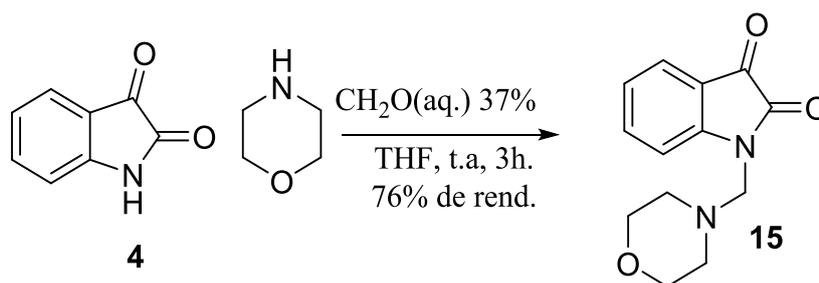
Os resultados da tabela 4 demonstram que as variações na indirubina substituída, no *p*-benzaldeído, no catalisador ácido e na temperatura reacional, não foi obtido sucesso na reação.

Para criar novas expectativas de indirubinas mais hidrossolúveis, decidiu-se realizar modificações no nitrogênio na posição *N*-1, através de formação de bases de Mannich com indirubinas, demonstrados nos itens a seguir.

6.9 Bases de Mannich de isatinas

A Base de Mannich **15** foi obtida segundo metodologia de Kurkin e colaboradores, com ponto de fusão e dados espectroscópicos, apresentados no item 2.17 na parte experimental, em acordo com os dispostos na literatura (Esquema 30).

Esquema 30: Preparação de base de Mannich **15**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

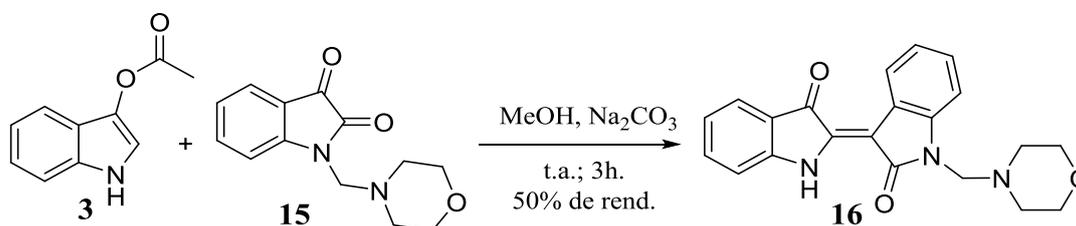
6.10 Bases de Mannich de indirubinas

Com os problemas na obtenção de derivados **10**, como baixos rendimentos e formação de subprodutos, optou-se por produzir bases de Mannich derivadas de indirubinas, reações realizadas com sucesso com derivados de isatinas (intermediário na produção de indirubinas e com reatividade química parecida) em nosso grupo de pesquisa. As bases de Mannich possuem um grupo amino terciário básico, que poderia conduzir a um aumento da hidrossolubilidade. Não foi encontrada na literatura nenhuma base de Mannich de indirubina.

Planejou-se a obtenção de bases de Mannich de derivados de indirubinas por duas rotas. A **rota C** (Esquema 35) envolve a reação de **3** com a base de Mannich da isatina correspondente **15**, enquanto a **rota D** (Esquema 36) envolve a reação de Mannich com os derivados **9**.

6.10.1 Rota C:

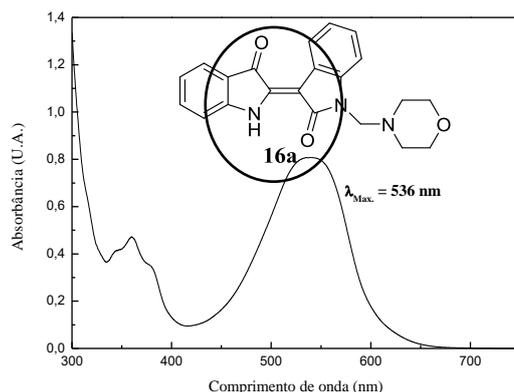
Esquema 31: Formação de base de Mannich **16** pela **rota C**.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

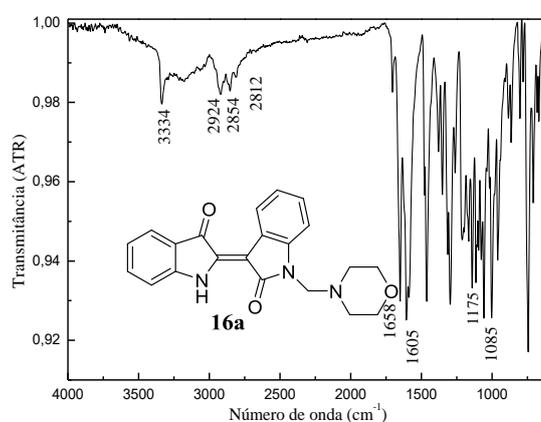
No espectro de UV-Vis de **16** (Figura 34) observa-se que com a inserção do grupo morfolinilmetila na posição *N*-1 não temos alteração no cromóforo da molécula.

Figura 34: Espectro UV-Vis (em EtOH) de **16**.



No espectro de infravermelho de **16** (Figura 35) observa-se bandas referentes a estiramentos axiais das ligações carbono-hidrogênio alifáticas da unidade de morfolinilmetila entre 2924, 2854 e 2812 cm^{-1} , além das bandas em 1175 cm^{-1} referente a ligação C-N e 1085 cm^{-1} referente a ligação C-O, evidenciando a presença do grupo morfolinilmetila.

Figura 35: Espectro de infravermelho (ATR) de **1**

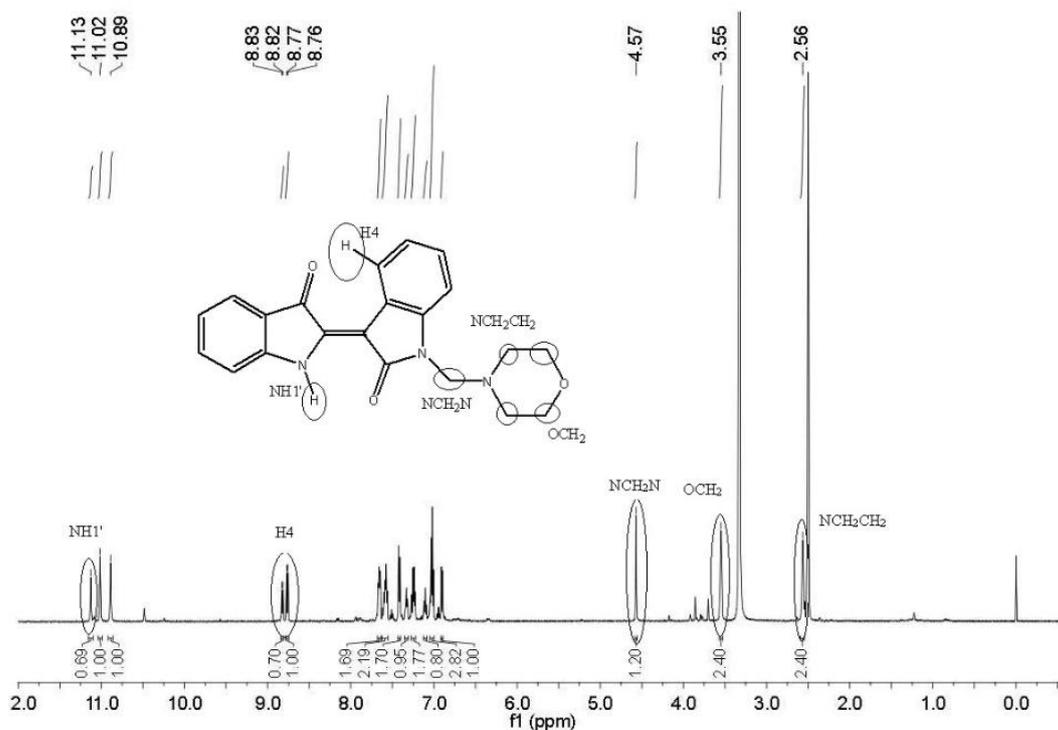


Empregando esta rota, após a análise dos espectros de RMN, observa-se algo inesperado, uma mistura do produto desejado **16** com **9a**.

No espectro de RMN de ^1H dessa mistura de **9a** e **16** (Figura 36), com destaque para os sinais do composto **16**, observa-se a presença de dois tripletos em 2,56 ppm e 3,56 ppm, e um simpleto em 4,57 ppm que são referentes a unidade morfolinilmetila da base de Mannich. Todos os sinais na região aromática estão dobrados com pequenos deslocamentos e mesma multiplicidade. Na região mais distante do TMS observa-se 3 sinais referentes a hidrogênios ligados aos nitrogênios.

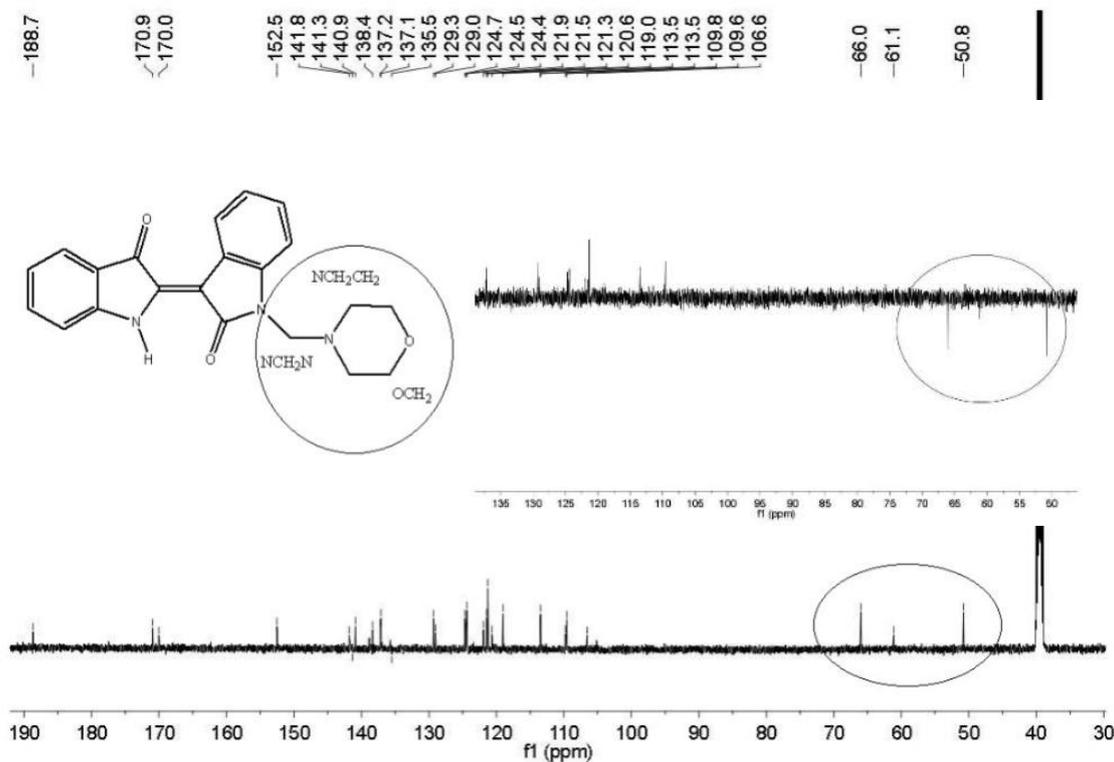
Comparando as integrações dos sinais, evidencia-se uma mistura de, aproximadamente, 60% de **9a** e 40% da base de Mannich desejada **16**.

Figura 36: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) do produto da rota C, mistura de **16** e **9a**.



No espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37) dessa mistura observa-se três sinais em 50,8 ppm, 61,1 ppm e 66,0 ppm, característicos do fragmento morfolinilmetila evidenciados como carbonos metilênicos por DEPT 135.

Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) e DEPT 135 do produto da rota C, mistura de **9a** e **16**.

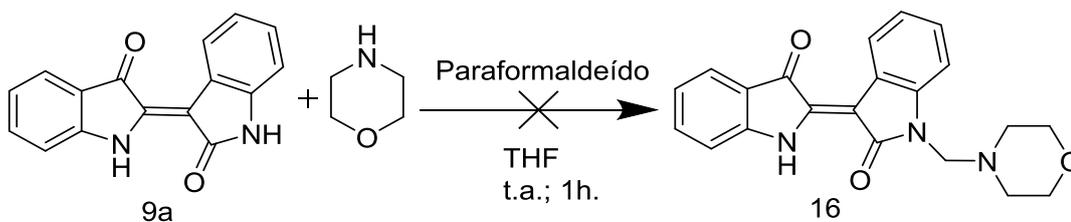


Tentativas com a *N*-1-metilmorfolinil-isatina e *N*-1-metilmorfolinil-5-cloroisatina, empregando condições mais brandas e solventes apróticos, como THF, conduziu aos mesmos resultados. Acreditava-se que as condições reacionais, usando metanol como solvente em meio levemente básico a temperatura ambiente, poderia estar levando a quebra da base de Mannich regenerando a indirubina correspondente.

6.10.2 Rota D:

Esta rota também levou a resultados inesperados. Mesmo utilizando excesso da amina, não ocorreu a formação da base de Mannich almejada **16**, e sim o derivado *N*-1-hidroximetila **17a** (Esquema 36).

Esquema 32: Tentativa de formação de base de Mannich **16** pela rota D.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Está rota também levou a resultados inesperados, mesmo utilizando excesso da amina não ocorreu a formação da base de Mannich **16**, e sim o derivado *N*-1-hidroximetila **17a**, cuja formação foi bem-sucedida pela repetição do processo empregando apenas paraformaldeído como reagente (Tabela 5). Observou-se que **17a** é mais solúvel que a indirubina em etanol, o que levou a ser considerado para esse projeto a preparação de outros análogos de **17a**, visando obter indirubinas mais hidrossolúveis.

Os resultados da tabela 5 a seguir em que foram realizado diversos experimentos com condições reacionais diferentes, variando: o solvente entre THF, EtOH e ACN; temperatura entre temperatura ambiente e refluxo; tipo de catálise entre ácida, básica ou sem catálise; fonte de formaldeído entre paraformaldeído ou solução aquosa 37% de formaldeído; e o tempo de reação entre 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 4 horas. As melhores condições observadas foram solventes EtOH e THF, temperatura de refluxo, catálise básica, ambas as fontes de formaldeído e tempo de 1 hora.

Tabela 5: Testes para reação de Mannich com indirubinas.

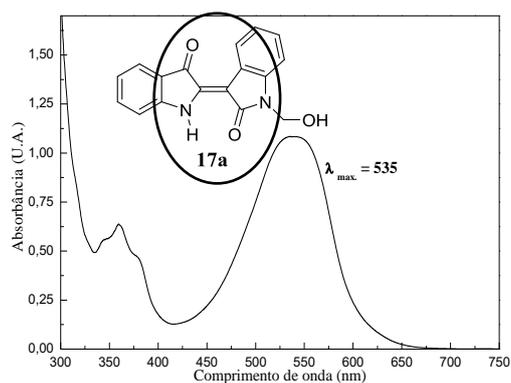
Solvente	Temp.	Catálise	Fonte de CH ₂ O	30 min.	1 hora	2 horas	4 horas
THF	t.a.	sem	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	mistura	17a
THF	Refluxo	sem	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
THF	t.a.	sem	Paraformaldeído	mistura	mistura	mistura	17a
THF	Refluxo	sem	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
THF	t.a.	básica	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
THF	Refluxo	básica	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	17a	17a	17a
THF	t.a.	básica	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
THF	Refluxo	básica	Paraformaldeído	mistura	17a	17a	17a
THF	t.a.	ácida	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	mistura	17a
THF	Refluxo	ácida	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
THF	t.a.	ácida	Paraformaldeído	mistura	mistura	mistura	17
THF	Refluxo	ácida	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
EtOH	t.a.	sem	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	mistura	17
EtOH	Refluxo	sem	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
EtOH	t.a.	sem	Paraformaldeído	mistura	mistura	mistura	17
EtOH	Refluxo	sem	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
EtOH	t.a.	básica	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
EtOH	Refluxo	básica	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	17a	17a	17a
EtOH	t.a.	básica	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
EtOH	Refluxo	básica	Paraformaldeído	mistura	17a	17a	17a
EtOH	t.a.	ácida	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	mistura	17a
EtOH	Refluxo	ácida	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a

Solvente	Temp.	Catálise	Fonte de CH ₂ O	30 min.	1 hora	2 horas	4 horas
EtOH	t.a.	ácida	Paraformaldeído	mistura	mistura	mistura	17
EtOH	Refluxo	ácida	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
ACN	t.a.	sem	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	mistura	17
ACN	Refluxo	sem	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
ACN	t.a.	sem	Paraformaldeído	mistura	mistura	mistura	17a
ACN	Refluxo	sem	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
ACN	t.a.	básica	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
ACN	Refluxo	básica	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	17a	17a	17a
ACN	t.a.	básica	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a
ACN	Refluxo	básica	Paraformaldeído	mistura	17a	17a	17a
ACN	t.a.	ácida	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	mistura	17a
ACN	Refluxo	ácida	CH ₂ O _(aq.) 37%	mistura	mistura	17a	17a
ACN	t.a.	ácida	Paraformaldeído	mistura	mistura	mistura	17a
ACN	Refluxo	ácida	Paraformaldeído	mistura	mistura	17a	17a

6.11 Caracterização de *N*-1-hidroximetil-indirubinas **17a**

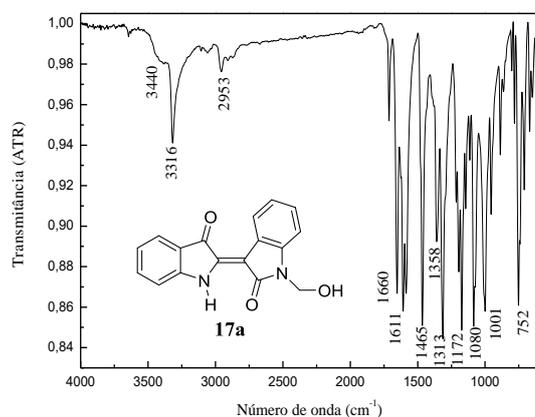
No espectro de UV-Vis de **17a** (Figura 38) observa-se que com a inserção do grupo hidroximetila na posição *N*-1 não temos alteração no cromóforo da molécula.

Figura 38: Espectro UV-Vis (em EtOH) de **17a**.



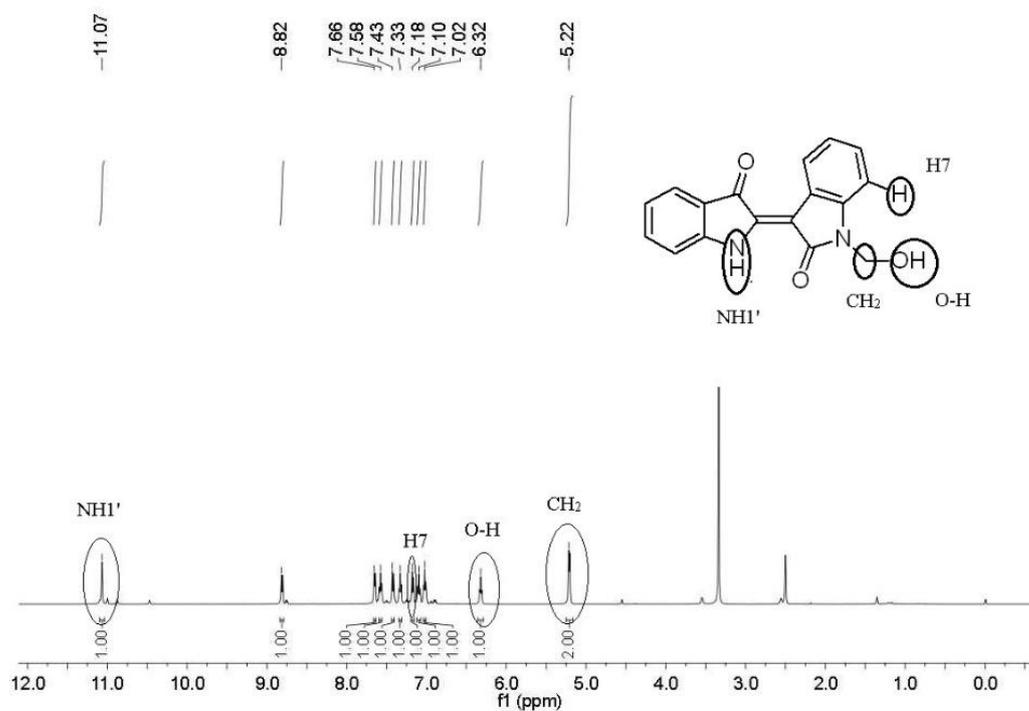
No espectro de IV de **17a** (Figura 39) temos duas bandas acima de 3300 cm⁻¹, 3346 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação O-H e 3319 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação N-H, uma banda em 2953 referente às ligações C-H e uma banda referente a ligação C-O de álcool primário em 1080 cm⁻¹.

Figura 39: Espectro IV (ATR) de **17a**.



No espectro de ^1H de **17a** (Figura 40) observa-se o desaparecimento do sinal próximo a 10,9 ppm referente a um dos hidrogênios ligados a nitrogênio, e o aparecimento de dois sinais, um tripleto em 6,32 ppm com integração para 1 hidrogênio e um duplete em 5,21 ppm com integração para dois hidrogênios, ambos com constante de acoplamento de 6,5 Hz.

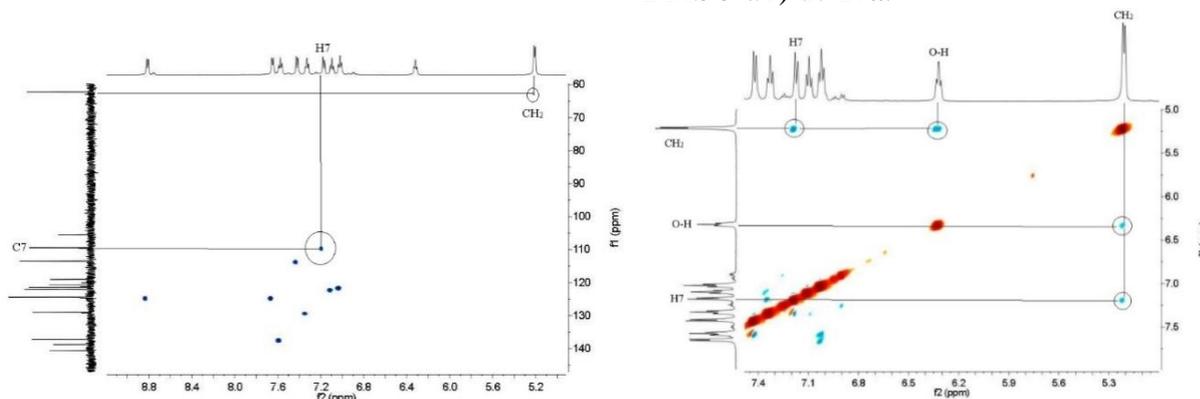
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; DMSO-*d*₆) de **17a**.



No lado esquerdo da Figura 41, o RMN de correlação 2D HSQC e no lado direito o espectro de correlação de RMN 2D NOESY estão de acordo com as atribuições de hidrogênios e carbonos descritos por Cuong e colaboradores para

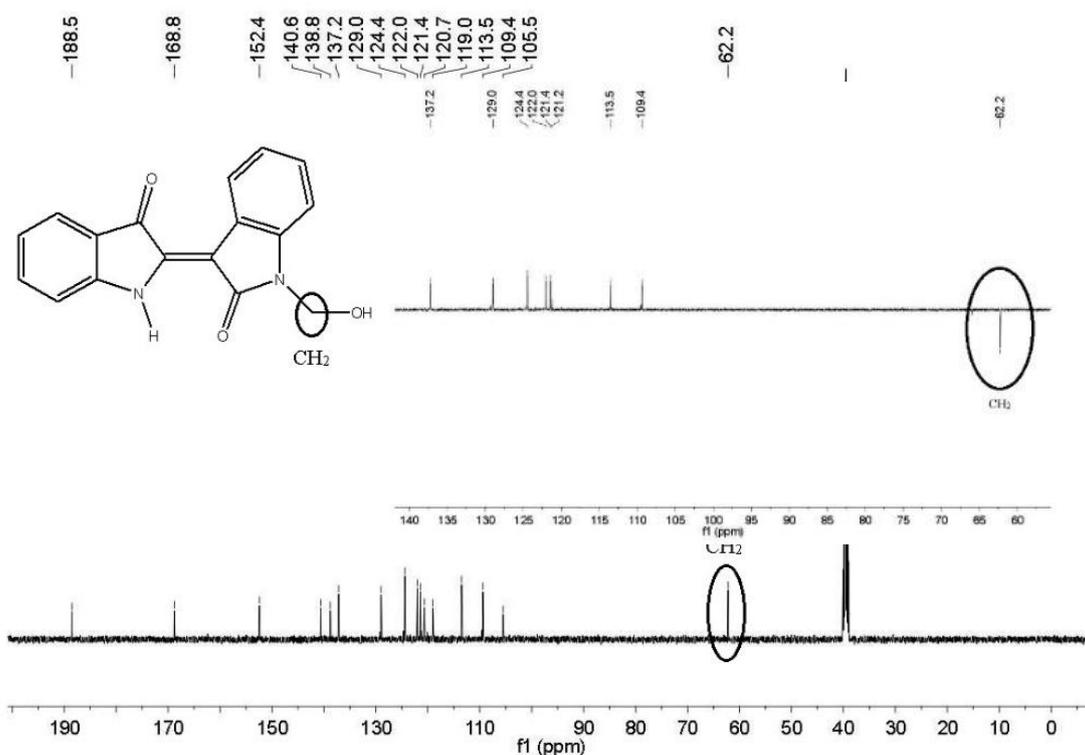
derivados indirubínicos *N*-1-substituídos (CUONG *et al*, 2010). Observa-se no composto **17a** o acoplamento do hidrogênio H-7 com os 2 hidrogênios metilênicos e com o hidrogênio da hidroxila do grupo hidroximetila, evidenciando a inserção do grupo hidroximetila na posição *N*-1.

Figura 41: Mapas de correlação HSQC (500 MHz; DMSO-*d*6) e NOESY (500 MHz; DMSO-*d*6) de **17a**.



No espectro de RMN de ¹³C do composto **17a** (Figura 42) observa-se um sinal em 62,2 ppm referente a um carbono metilênico, evidenciando a formação de uma molécula inédita, não descrita na literatura.

Figura 42: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz; em DMSO-*d*6) e DEPT 135 de **17a**.

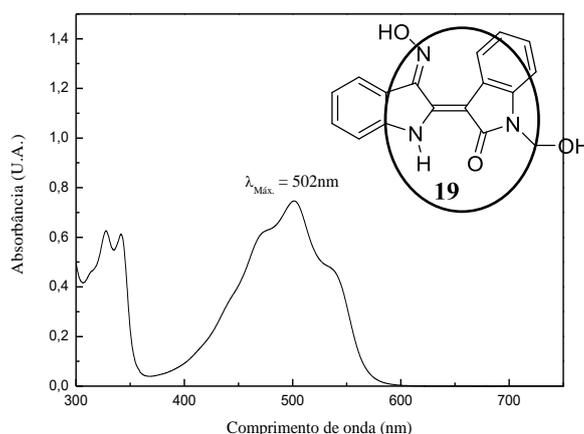


Seguindo a mesma metodologia que forneceu **17a**, foram obtidos os derivados *N*-1-hidroximetil-5-nitro-indirubina (**17b**), *N*-1-hidroximetil-5-cloro-indirubina (**17c**), *N*-1-hidroximetil-5-acetamido-indirubina (**17d**), *N*-1-hidroximetil-5-amino-indirubina (**17e**) e *N*-1-hidroximetil-5,5'-dicloro-indirubina (**17f**) com rendimentos de valores próximos. O produto **18** *N*-1-hidroximetil-indirubina-3'-hidrazona não foi obtido, alternativamente foi preparado o derivado 3'-oxima **19**, cuja caracterização está descrita a seguir.

6.12 Caracterização de *N*-1-hidroximetil-indirubina-3'-oxima (**19**)

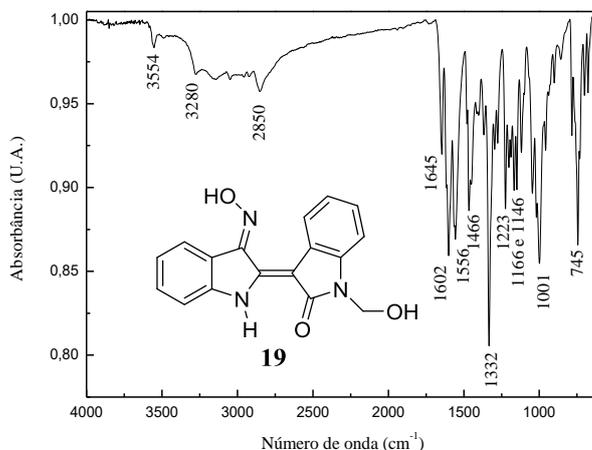
Observa-se no espectro UV-Vis (em EtOH) de **19** (Figura 43) o valor do $\lambda_{\text{Máx}}$ de 502 nm na região do visível, muito próximo do valor encontrado para o composto **12** que possui o $\lambda_{\text{Máx}}$ de 503 nm, pois não ocorreu alteração significativa do grupo cromóforo.

Figura 43: Espectro UV-Vis (em EtOH) de **19**.



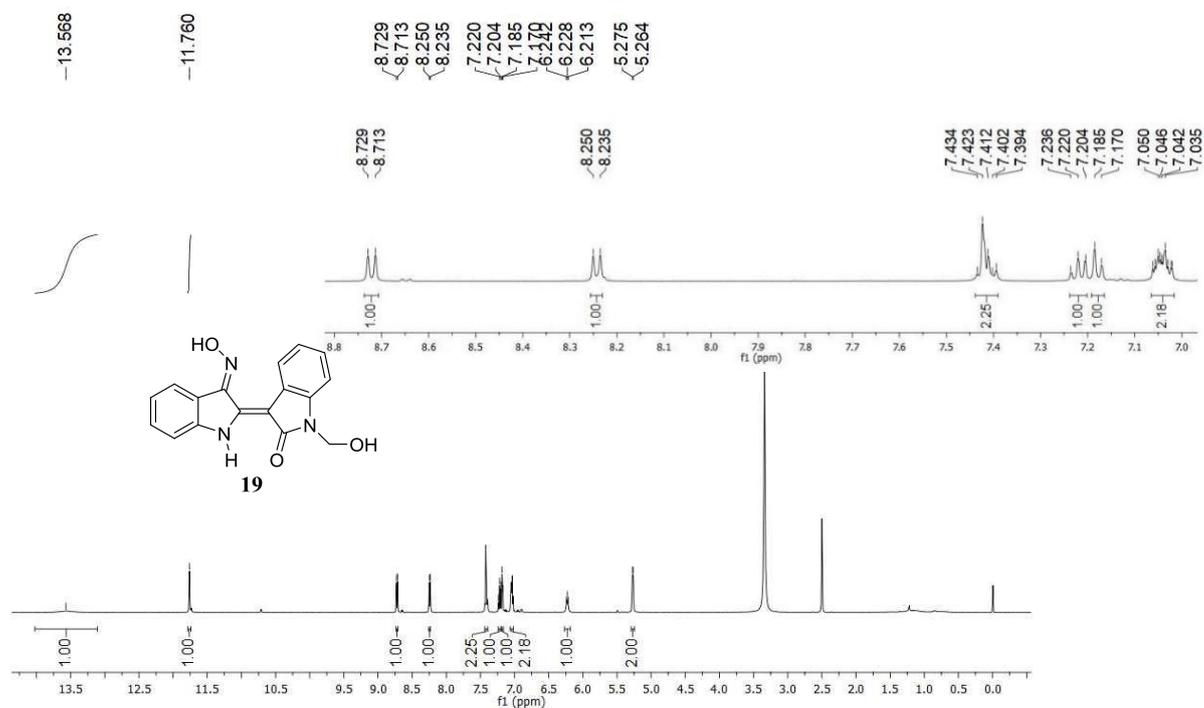
No espectro de IV de **19** (Figura 44) temos duas bandas acima de 3300 cm^{-1} , 3346 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H e 3319 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H, uma banda em 2953 referente as ligações C-H e uma banda referente a ligação C-O de álcool primário em 1080 cm^{-1} .

Figura 44: Espectro de IV (ATR) de **19**.



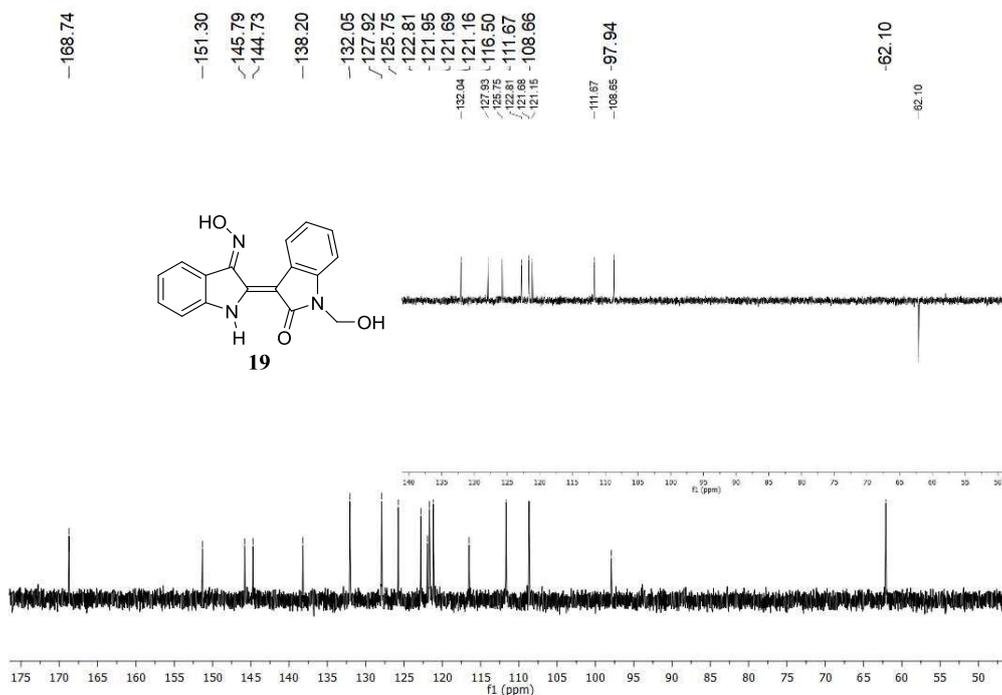
Os espectros de RMN de ¹H (Figura 45) apresenta a evidencia da formação produto desejado com os sinais dos hidrogênios do fragmento hidroximetila com o duplete em 5.26 ppm com integração de 2 hidrogênios e o tripleto em 6,22 ppm com integração de 1 hidrogênio, e o simpleto largo em 13,56 ppm referente ao hidrogênio do grupo oxima.

Figura 45: Espectro de RMN de ¹H (500 MHz; DMSO-*d*₆) de **19**.



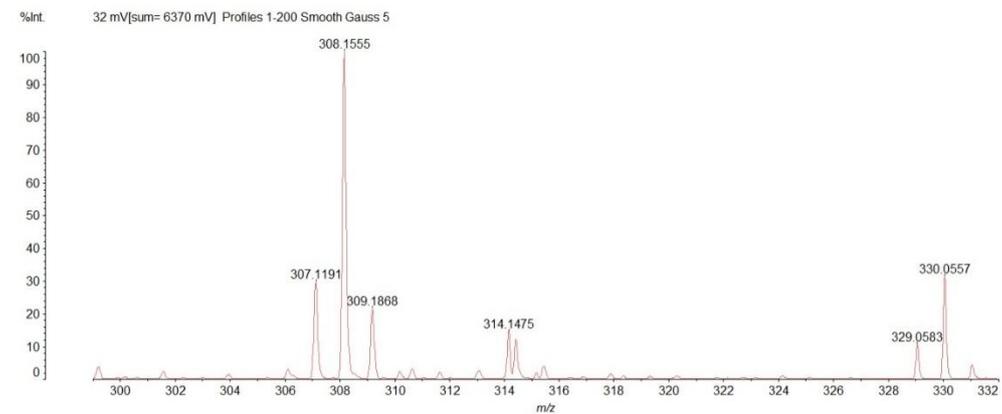
No RMN de ^{13}C (Figura 46) de **19** observamos o sinal do carbono metilênico do fragmento hidroximetila em 62,1 ppm e C3' que passa a ter deslocamento químico em 168,74 ppm, referente ao carbono ligado ao grupo oxima.

Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; em DMSO-*d*6) e DEPT 135 de **19**.



No espectro de massas de **19** (Figura 47) observa os íons M/z em unidade de massa: $[M]^+$ 307,1191; $[M+H]^+$ 308,1555 e $[M+Na]^+$ 330,0557. Comprovando a identidade do composto **19**.

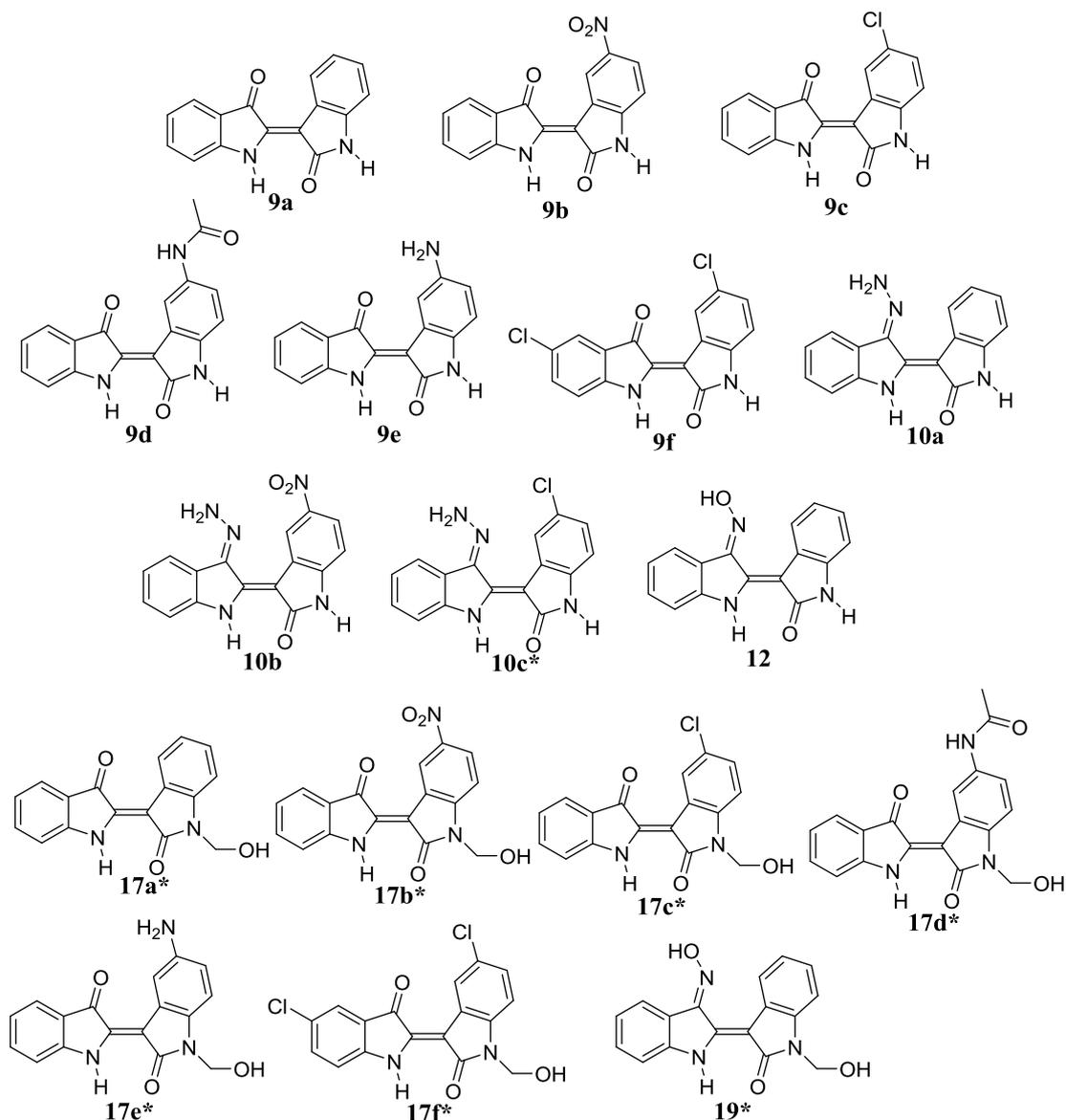
Figura 47: Espectro de massas LDI-TOF de **19**.



6.13 Estudos de solubilidade e log*P*

Para estudar a solubilidade e log*P* dos novos derivados de indirubina sintetizados, foi necessário também fazer os mesmos experimentos para as respectivas indirubinas das quais deu origem a esses. A Figura 41 mostra a estrutura dos compostos analisados.

Figura 48: Compostos cuja solubilidade e log*P* foram avaliados.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (* = compostos inéditos).

A determinação da solubilidade em etanol e água e as concentrações em *n*-octanol e no tampão TRIS-HCl foram realizadas empregando a curva de calibração utilizando a região de maior absorvância na região da luz visível em etanol para cada

composto. As medições foram realizadas em triplicata para validar o método. Os valores encontrado foram um pouco acima dos calculados pelas plataformas disponíveis, nos sites :1 <http://www.molsoft.com/mprop/> , 2 <http://www.vcclab.org/lab/alogps/> e 3 <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties/> levando em consideração que os softwares dos sites também não concordam entre si.

As indirubinas-3'-hidrazona **10a**, **10b** e **10c** se mostraram mais solúveis que as respectivas indirubinas, **9a**, **9b** e **9c**, na ordem de 20 vezes em etanol e 50 vezes maior em água, pela a inserção de um grupo NH₂ (da hidrazona) capaz de realizar ligações de hidrogênio com os solventes, etanol e água. Porém o log*P* ficou muito próximo de 1, sendo próximo da faixa aceitável para moléculas bioativas descritas na literatura. A dificuldade para obtê-las em bons rendimentos e a formação de misturas de difícil separação as tornam inviáveis até o presente momento.

Os derivados *N*-1-hidroximetil-indirubina **17a-f** e a *N*-1-hidroximetil-indirubina-3'-oxima **19**, forneceram aumento na solubilidade sendo 8 vezes maior em etanol e 7 vezes maior em água, devido a inserção de um grupo hidroxila capaz de fazer ligações de hidrogênio com os solventes, sendo que o log*P* ficou dentro da faixa esperada de 1-3.

Foi observado que a presença de substituintes na posição 5 seguem uma tendência, onde o grupo nitro, retirador de densidade eletrônica, diminui a solubilidade, grupo cloro aumenta pouco a solubilidade, e os grupos NHAc e NH₂, doadores de densidade eletrônica, fornecem um aumento na solubilidade. A adição de um grupo Cl na posição 5' diminui a solubilidade. Os dados obtidos estão resumidos na Tabela 6 a seguir.

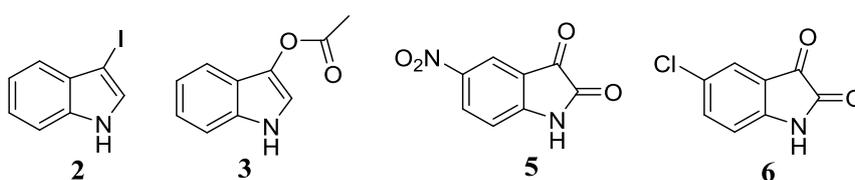
Tabela 6: Comparação de resultados de solubilidades e $\log P$.

Molécula	Solubilidade em etanol	Solubilidade em água	$\log P$ exp.	$\log P$ calc. 1	$\log P$ calc. 2	$\log P$ calc. 3
9a	34,76 mg L ⁻¹	6,73 mg L ⁻¹	4,21	2,87	3,05	2,90
9b	18,44 mg L ⁻¹	2,98 mg L ⁻¹	4,03	2,60	3,02	2,83
9c	37,82 mg L ⁻¹	7,38 mg L ⁻¹	4,45	3,58	3,61	3,55
9d	50,21 mg L ⁻¹	10,46 mg L ⁻¹	3,73	2,41	2,62	2,09
9e	49,63 mg L ⁻¹	8,91 mg L ⁻¹	3,91	2,43	2,37	1,95
9f	36,55 mg L ⁻¹	6,97 mg L ⁻¹	4,52	4,30	4,41	4,21
10a	683,8 mg L ⁻¹	329,77 mg L ⁻¹	1,14	3,29	2,22	3,00
10b	520,25 mg L ⁻¹	142,04 mg L ⁻¹	0,97	3,02	2,37	2,93
10c	701,19mg L ⁻¹	330,23 mg L ⁻¹	1,26	4,01	2,93	3,65
12	117,3 mg L ⁻¹	15,14 mg L ⁻¹	2,1	3,46	2,70	3,29
17a	286,6 mg L ⁻¹	49,6 mgL ⁻¹	1,74	2,60	1,80	2,32
17b	152,76 mg L ⁻¹	17,43 mg L ⁻¹	1,66	2,33	1,56	2,26
17c	305,04 mg L ⁻¹	43,17 mg L ⁻¹	2,1	3,32	2,39	2,98
17d	411,72 mg L ⁻¹	55,34 mg L ⁻¹	1,1	2,14	1,50	1,52
17e	406,97 mg L ⁻¹	52,01 mg L ⁻¹	1,2	2,16	1,43	1,37
17f	299,71 mg L ⁻¹	40,77 mg L ⁻¹	2,4	4,03	3,01	3,63
19	961,86 mg L ⁻¹	92,4 mg L ⁻¹	1,18	3,19	1,28	2,72

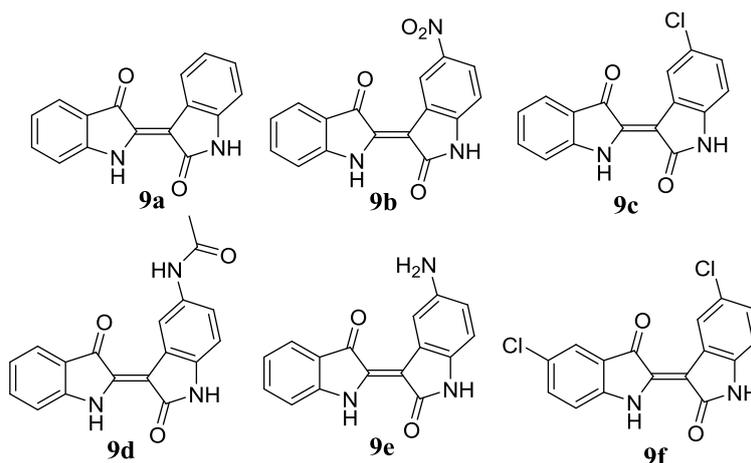
7 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo sintetizar, caracterizar novos derivados de indirubinas hidrossolúveis, e realizar com estes testes de solubilidade e $\log P$.

No seguimento deste trabalho foram preparados 3-iodo-indol e 3-acetoxi-indol, compostos **2** e **3**, como intermediários para a síntese de indirubinas, com resultados de rendimento e pureza melhores que os descritos na literatura. Também foram preparados 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina, os compostos **5** e **6**, como intermediários na síntese de indirubinas.

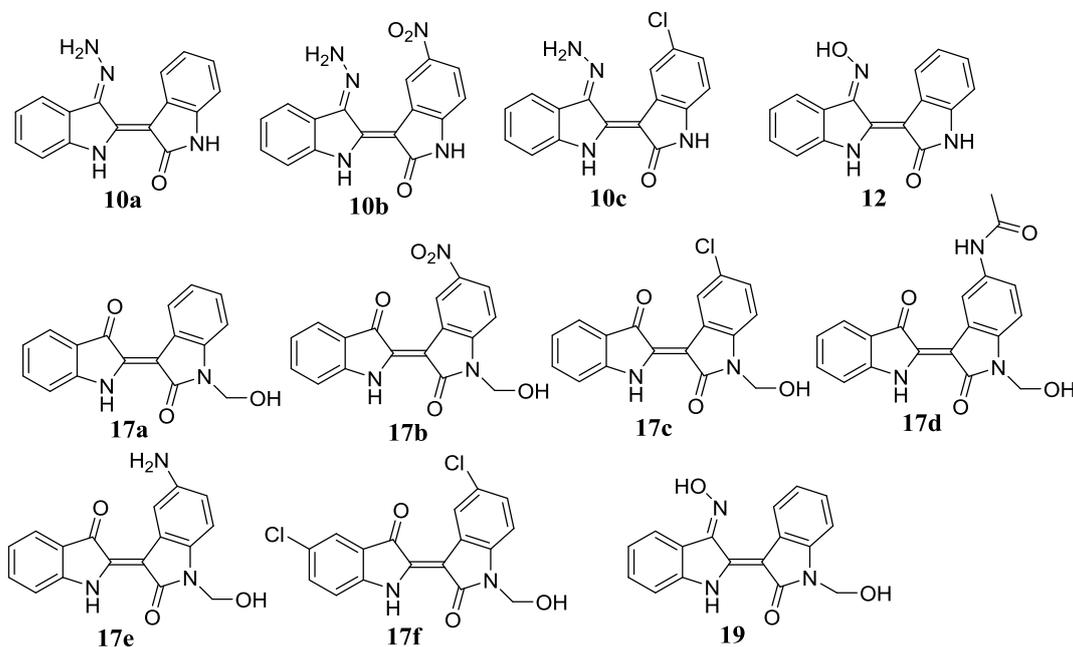


A indirubina e seus derivados 5-substituídos foram obtidos através da reação entre o composto **3** e as isatinas 5-substituídas, obtendo **9a**, **9b** e **9c** com bons rendimentos por (BREMNER *et al*, 2007). Para obter as indirubinas **9d** e **9e** foi realizada a redução do grupo nitro de **9b** utilizando Zn em AcOH, seguido de acetilação com Ac₂O no caso de **9d**. Alternativamente a indirubina **9a** e a **9f** foram obtidas por dimerização da isatina ou da isatina **6** (WANG *et al*, 2017).



Os compostos **10a-c**, **12**, **17a-f** e **19** são mais solúveis que a indirubina em etanol e água, como esperado pela inserção de grupos funcionais com a capacidade de realizar ligações de hidrogênio intermolecular. A solubilidade dos compostos de **10a-c** em etanol em média foi 19 vezes maior e em água em média foi 50 vezes maior. Para o

derivado **17a-f e 19** em média foram 8 vezes mais solúveis em EtOH e 7 vezes maior em H₂O.



Os resultados obtidos de Log*P* experimental mostra que o grupo hidrazona não é uma boa opção por ficar muito próximo de 1, sendo muito hidrossolúvel. Já os compostos *N*-1-hidroximetil substituídos ficaram na faixa ótima de Log*P* com ganho considerável na solubilidade.

As hidrazonas de indirubinas se mostraram muito instáveis no meio reacional e de difícil obtenção e isolamento, dificultando a formação de compostos azínicos com benzaldeídos. Já a indirubinas se mostraram não reativas com fenil hidrazonas.

Bases de Mannich foram hidrolisadas as suas respectivas indirubinas, não sendo um caminho viável, porém tornou possível a obtenção dos derivados hidroximetil. Os quais se mostram inovadores de acordo com o objetivo do trabalho.

Trabalho foi concluído com 8 compostos inéditos e testes de solubilidade e Log*P* que não estavam descritos na literatura ou haviam poucas informações.

REFERÊNCIAS:

AFSAH, E. M. *et al.* Synthesis of some new mixed azines, Schiff and Mannich bases of pharmaceutical interest related to isatin. **A Journal of Chemical Sciences**, v. 70 (6), p. 393-402. 2015. Disponível em: <[https://doi-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/10.1515/znb-2014-0262](https://doi.org/ez25.periodicos.capes.gov.br/10.1515/znb-2014-0262)>.

AHN, M. Y, *et al.* 5-nitro-5-hydroxy-indirubin-3-oxime (AGM130), indirubin-3'-oxime derivative, inhibits tumor growth by inducing apoptosis against non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, p. 122–131. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.08.015>>.

BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos Alberto Manssour. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BEAUCHARD, A. *et al.* Synthesis of novel 5-substituted indirubins as protein kinases inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6434-6443, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.05.036>>.

BLASEVIC, T. *et al.* Indirubin and indirubin derivatives for counteracting proliferative diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-12, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2015/654098>>.

CHEN, Z. Q. *et al.* Improved oral bioavailability of poorly water-soluble indirubin by a supersaturatable self-microemulsifying drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1115-1125, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/IJN.S28761>>.

CHENG, X. *et al.* Synthesis and cytotoxicity of novel indirubin-5-carboxamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p. 4509–4515, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.066>>.

CHENG, X. *et al.* 7,7'-Diazaindirubin - A small molecule inhibitor of casein kinase 2 in vitro and in cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.22, p. 247–255, 2014.

Disponível em: <<https://doi-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.bmc.2013.11.031>>.

CHENG, X., *et al.* Identification of a water-soluble indirubin derivative as potent inhibitor of insulin-like growth factor 1 receptor through structural modification of the parent natural molecule. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 60, p. 4949–4962, 2017. Disponível em: <<https://pubs-acso.org.ez25.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.7b00324>>.

CUONG, M. N. *et al.* Studies on the acetylation and NMR reassignment of indirubin derivatives. **Natural Product Research**, v. 24, n. 2, p. 99–105, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786410802300469>>.

DUNN, R. *et al.* Preparation of heterocyclic compounds having 5-HT₆ receptor affinity for treating CNS, gastrointestinal, and polyglutamine-repeat disorders. **PCT Int. Appl.**, 2007098418, 30 Aug 2007.

EFSTATHIOU, A. *et al.* An inhibitor-driven study for enhancing the selectivity of indirubin derivatives towards leishmanial Glycogen Synthase Kinase-3 over leishmanial cdc2-related protein kinase 3. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 234-234, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4039064/>>.

FATTHALLA, M. I., Pedersen, E. B. Unexpected Hydration of a Triple Bond During DNA Synthesis: Conjugating 3-(Pyren-1-ylethynyl)indole to DNA for Triplex Studies. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 21, p. 3528–3535, 2016. Disponível em: <<https://doi-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ejoc.201600287>>.

GINZINGER, W. *et al.* Water-soluble cationic derivatives of indirubin, the active anticancer component from indigo naturalis. **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, p. 2175-2185, 2012. Disponível em: <<https://doi-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/10.1002/cbdv.201200147>>.

JUNG, M. *et al.* Discovery of indirubin derivatives as new class of DRAK2 inhibitors from high throughput screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 2719-2723, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.03.111>>.

HESHMATI, N. *et al.* Physicochemical characterization and in vitro permeation of an indirubin derivative. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 467-475, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.021>>.

JÄHNE, E. A., *et al.* Development and full validation of an UPLC-MS/MS method for the quantification of the plant-derived alkaloid indirubin in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 247-252, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.018>>.

KOOL, T. E. and CRISALLI, P. Water-soluble organocatalysts for hydrazone and oxime formation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 78, p. 1184–1189, 2013. Disponível em: <<https://pubs-acsc-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/jo302746p>>.

KURKIN, A.V.*et al.* Synthesis of isatins with a chiral substituent at the nitrogen atom. **Tetrahedron: Asymmetry**. v 20, n. 13, p. 1500-1505, 2009. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez25.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0957416609004194>>.

LAI, j., *et al.* Indirubin inhibits LPS-induced inflammation via TLR4 abrogation mediated by the NF-kB and MAPK signaling pathways. **Inflammation**, v. 40, n. 1, p. 1-12. 1 2017. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez25.periodicos.capes.gov.br/content/pdf/10.1007%2Fs10753-016-0447-7.pdf>>.

LIPINSKI, C. A., *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p.3-25, 1997. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)>.

LIU, K., et al. A Novel and efficient method for the synthesis of 1*H*-indol-3-yl acetates. **Synthesis**, v. 21, p. 3623-3626, 2010. Disponível em: <<https://www-thieme-connect-com.ez25.periodicos.capes.gov.br/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0030-1258240>>.

MICHELI, F. *et al.* 1,2,4-Triazolyl 5-azaspiro[2.4]heptanes: lead identification and early lead optimization of a new series of potent and selective dopamine D3 receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, p. 8549–8576, 2016. Disponível em: <<https://pubs-acso-rg.ez25.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/acs.jmedchem.6b00972>>.

MOON, M. J. *et al.* Synthesis and structure–activity relationships of novel indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with CDK2 inhibitory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 237-246, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.08.008>>.

OAKDALE, J. S. and BOGER, D. L. Total synthesis of lycogarubin C and lycogalicacid. **Organic Letters**, v. 12 (5), p. 1132-1134, 2010. Disponível em: <<https://pubs-acso-rg.ez25.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/ol100146b>>.

REGULSKA, E., *et al.* Theoretical and experimental study of alkali metal o-, m- and p-aminobenzoates in comparison with nitrobenzoates. **Journal of Molecular Structure**. v. 936, p. 162–170, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2009.07.033>>

SCHMITT, E. *et al.* A general approach towards NH-pyrazoles that bear diverse fluoroalkyl groups by means of fluorinated iminium salts. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 27, p. 6052-6060, 2015. Disponível em: <<https://doi-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ejoc.201500920>>.

SELE, A. M. *et al.* A cascade synthetic route to new bioactive spiroindolinepyrido [1,2- α] indole-diones from indirubin. **Tetrahedron**, v. 71, p. 8357-8367, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tet.2015.08.012>>.

SOUZA, Ana Carolina Carbonaro. **Síntese, caracterização e avaliação biológica de derivados de Indirubinas como potenciais agentes antineoplásicos.** Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Programa de pós-graduação em química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/4231>>.

SZMANT, H. H. The Mechanism of the Wolff-Kishner reduction, elimination, and isomerization reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 7, n. 2, p. 120-128, 1968. Disponível em: <<https://doi-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/10.1002/anie.196801201>>.

VINE, K. L. *et al.* In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, V. 15, n. 2, p. 931-938, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.10.035>>.

VOUGOGIANNOPOULOU, K. *et al.* Soluble 3',6-substituted indirubins with enhanced selectivity toward glycogen synthase kinase-3 alter circadian period. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 6421-6431, 2008. Disponível em: <<https://pubs-acsc-org.ez25.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1021/jm800648y>>.

WANG, C. *et al.* One step synthesis of indirubins by reductive coupling of isatins with KBH₄. **Tetrahedron**, v. xxx, p. 1-6, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tet.2017.03.077>>.

ANEXOS

PARTE EXPERIMENTAL

1 MATERIAIS

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

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

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro BRUKER-AVANCE DRX500 (500MHz) no Departamento de Química, UFJF, a calibração foi realizada pelo sinal do TMS em 0 ppm.

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

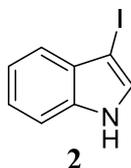
Para cromatografia em coluna de sílica utilizou-se sílica-gel 60G 0,063-0,200mm (70-230 mesh ASTM) MERK. Para cromatografia em camada delgada utilizou-se cromatofolhas com sílica gel suportada em placa de alumínio contendo indicador de fluorescência F₂₅₄, SilicycleTLA-R10011B-323. Nos procedimentos de purificação, por extração ou coluna cromatográfica, foram utilizados solventes P.A. VETEC, SYNTH E CROMOLINE.

Para as análises de solubilidade e curva de calibração no espectrômetro UV-Vis SHIMADZU 03237, etanol 99,8% P.A. NEON e água destilado do departamento de química da UFJF.

2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

2.1– Preparação e caracterização do composto 2: 3-iodo-indol

Em um frasco Erlenmeyer, dissolveu-se 4,0 g de indol (34,2 mmol) e 5,64 g de pastilhas trituradas de hidróxido de potássio (85,6 mmol) em 70 mL de DMF, agitação a temperatura ambiente. Uma segunda solução contendo 8,820 g de I₂ (34,72 mmol) em 70 mL de DMF foi adicionado gota a gota a primeira. A mistura reacional foi agitada durante 45 minutos a temperatura ambiente. A reação foi monitorada por CCD (Hex 8:2 AcOEt) até a observação do consumo total de indol e formação de 3-iodo-indol. Ao final da reação foi adicionado ao meio reacional, em pequenas quantidades até completar 150 mL, uma solução aquosa gelada com NH₄OH 0,5% (v/v) e NaHS₃ 0,1% (m/v), formando uma mistura turva com um precipitado amarelo. O precipitado amarelo foi isolado por filtração sob pressão reduzida em funil de porcelana e papel de filtro, lavado água fria. Obteve-se 7,895 g de 3-iodo-indol (95% de rendimento) sem purificação adicional como um sólido amarelo. Armazenado sob refrigeração e atmosfera de N₂, ficou preto na exposição à luz e ar.



F. M.: C₈H₆IN; **M.M.:** 243 g mol⁻¹; **Características físicas:** cristais amarelos; **R_f:** 0,45 (Hex/AcOEt 8:2); **Revelador:** lâmpada de UV, iodo; **Faixa de Fusão:** exp.: 75-77 °C (decomposição), **lit.:** 77-78 °C (decomposição) (OAKDALE e BUGER, 2010); **Rendimento:** 95%.

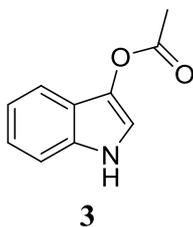
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3380, 3106, 3047, 1615, 1451, 1318, 1081, 736.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,10 (1H, t, *J* = 8,0 Hz); 7,16 (1 H, t, *J* = 8,0 Hz); 7,28 (1 H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,41 (1 H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,54 (1 H, d, *J* = 8,0 Hz); 11,53 (1 H, s).

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 55,9; 111,8; 119,7; 119,9; 122,1; 129,3; 129,6; 135,9.

2.2 - Preparação e caracterização do composto 3: 3-acetoxi-indol

Em um frasco Erlenmeyer 120 mL de ácido acético (AcOH) foi aquecido sob agitação até 90 °C e borbulhado com N₂ por 10 minutos. Em seguida foi adicionado 10,31 g de acetato de prata (61,72 mmol), formando uma suspensão cinza. Após a homogeneização da suspensão foi adicionado 7,5 g de 3-iodo-indol (30,86 mmol) (2). Reação foi monitorada por CCD (Hex 8:2 AcOEt) até o consumo total de 3-iodo-indol. Após o fim da reação o solvente foi evaporado em pressão reduzida em um rotaevaporador, o sólido resultante foi purificado por cromatografia à vácuo em sílica gel (Hex 8:2 AcOEt). O volume das frações contendo 3-acetoxi-indol foi reduzido até o início de precipitação, sendo deixado a temperatura ambiente. O precipitado transparente foi isolado por filtração sob pressão reduzida em funil de porcelana e papel de filtro, lavado com hexano frio. Obteve-se o 4,86g de 3-acetoxi-indol (90% de rendimento) após a purificação na forma de cristais transparentes em formato de agulhas. Armazenado sob-refrigeração e atmosfera de N₂, ficou vermelho na exposição à luz e ar.



F. M.: C₁₀H₉NO₂; **M.M.:** 175 g mol⁻¹; **Características físicas:** cristal incolor em agulhas; **R_f:** 0,35 (Hex/AcOEt 8:2); **Revelador:** lâmpada de UV, iodo; **Faixa de Fusão:** exp.: 128-130 °C.**lit.:**128-130 °C (LIU *et al.*, 2010); **Rendimento:** 90%.

IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3339, 3117, 3063, 1743, 1211, 736.

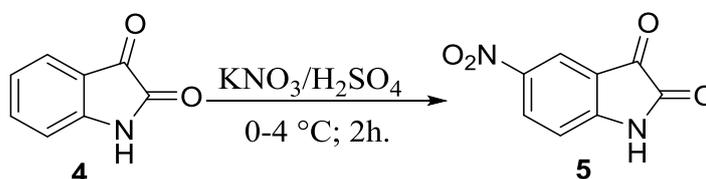
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm):2,32 (3 H, s); 7,01 (1 H, t, *J*= 8,0 Hz); 7,12 (1 H, t, *J*= 8,0 Hz); 7,34 (1 H, d, *J*= 2,5 Hz);7,37 (1H, d, *J*= 8,0Hz); 7,39 (1H, d, *J*= 8,0 Hz); 10,95 (1 H, s).

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 20,6; 111,8; 116,9; 118,9; 121,7; 129,1;133,2; 168,8.

2.3 – Preparação e caracterização do composto 5: 5-nitro-isatina

A preparação de **5** foi executada seguindo procedimento descrito por Souza (SOUZA, 2017). O composto **5** foi preparado pelo tratamento de **4** com $\text{KNO}_3(\text{s})$ em $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{aq.})$ concentrado, por substituição eletrofílica aromática, sob agitação a temperatura de 0-4 °C (utilização de banho de gelo). O isolamento foi realizado por precipitação do meio reacional em água e gelo, seguida de filtração a vácuo, como descrito no esquema 5 (SOUZA, 2017).

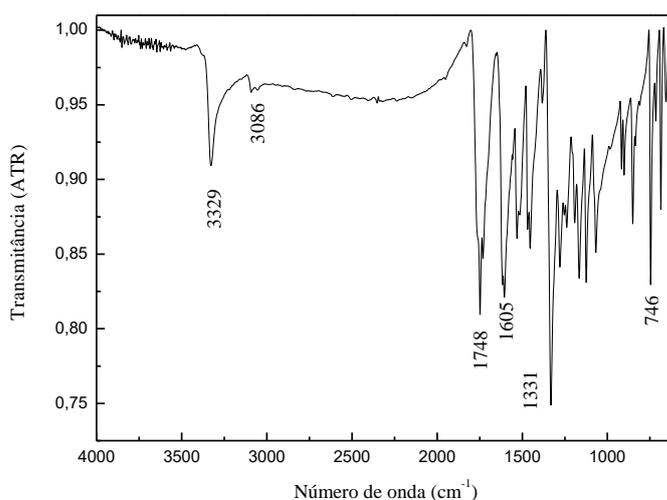
Esquema 5: Preparação do composto **5**.



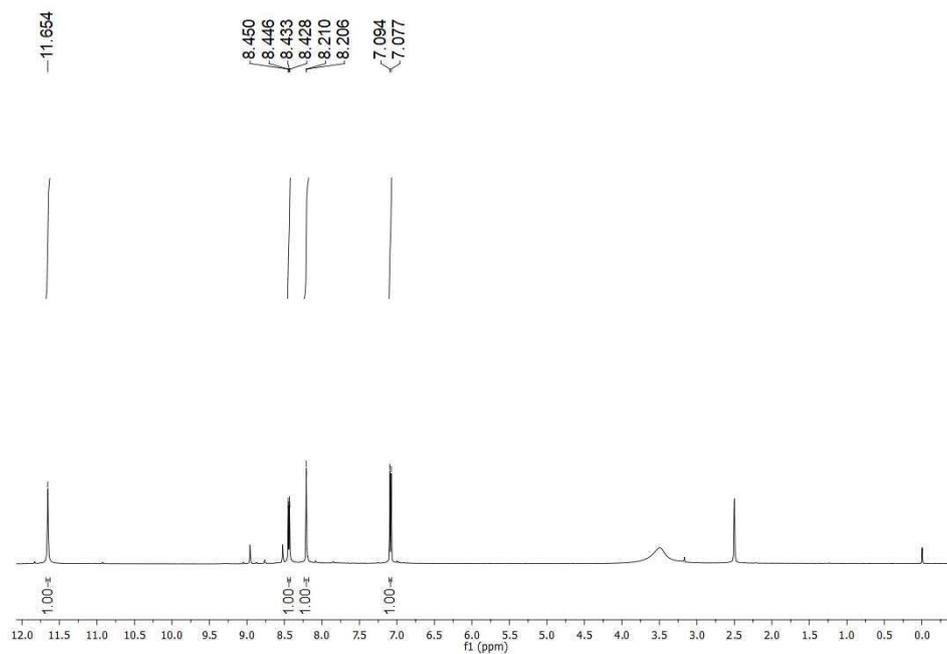
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

F. M.: $\text{C}_8\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_4$; **M.M.:** 192 g mol^{-1} ; **Características físicas:** sólido amarelo. **R_f:** 0,43; ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5); **Revelador:** lâmpada de UV e iodo; **Faixa de Fusão:** exp.: 254°C. **lit.:** 254-255°C (VINE *et al.*, 2007); **Rendimento:** 75%.

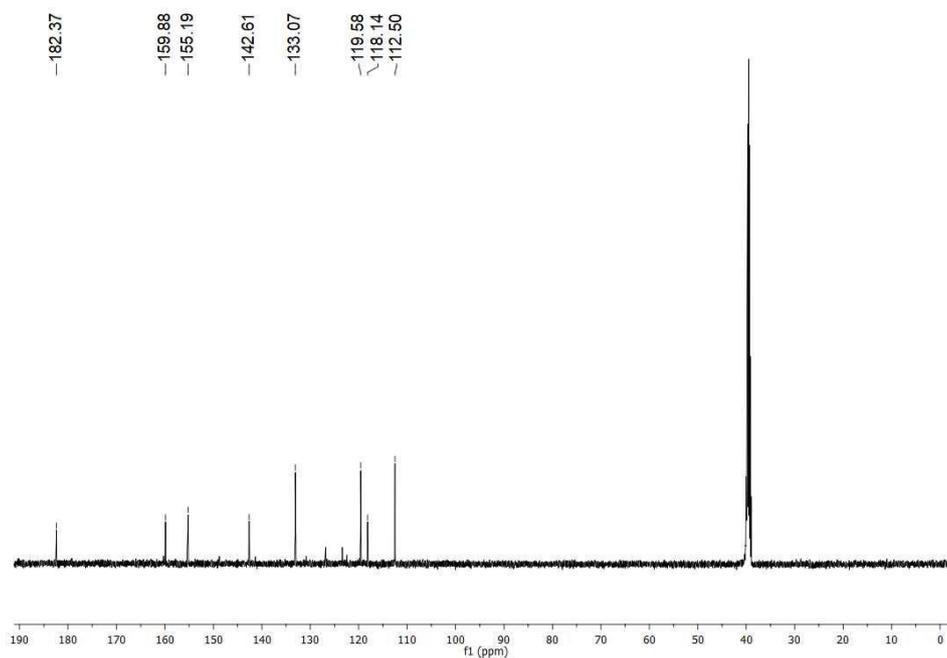
IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3329; 3086; 1748; 1605; 1331; 746.



RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 7,08 (1H, d, $J= 8,5$ Hz); 8,21 (1H, d, $J= 2,0$ Hz); 8,44 (1H, dd, $J= 8,5$ Hz/ 2,0 Hz); 11,654 (1H, s, NH).

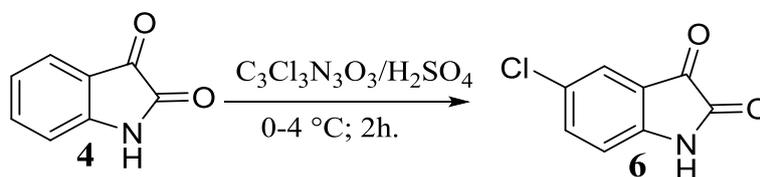


RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 112,5; 118,1; 119,6; 133,1; 142,6; 155,2; 159,9; 182,3.



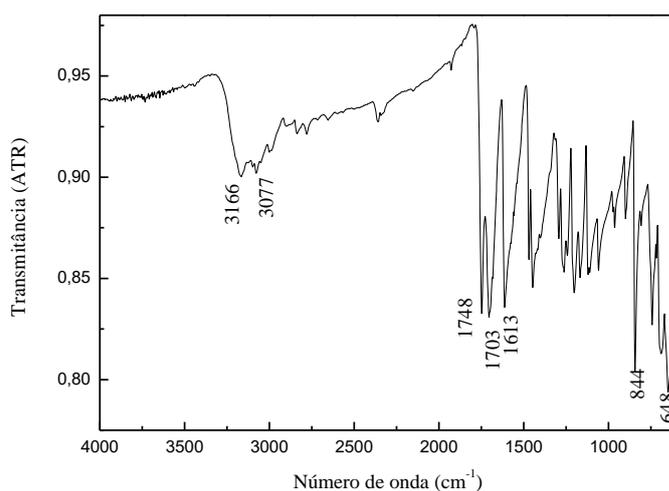
2.4 - Preparação e caracterização do composto 6: 5-cloro-isatina

Em um frasco Erlenmeyer foi solubilizado 3g de isatina (20 mmol) em 12 mL de H₂SO₄ concentrado, e deixado sob agitação magnética e banho de gelo e sal (aproximadamente 0°C). Em seguida foi adicionado à solução 2,09g de ácido tricloro-isocianúrico (9 mmol), lentamente. O meio reacional foi deixado sob agitação magnética e banho de gelo e sal por aproximadamente 2 horas. O final da reação é evidenciado por CCD entre o meio reacional e o padrão de isatina (eluente: hexano/acetato de etila 1:1 v/v). Ao final da reação o meio reacional é vertido em gelo picado, formando um precipitado laranja que foi filtrado a vácuo com auxílio de um Kitasato, funil de Buchner e filtro de papel (MENDONÇA *et al*, 2005).

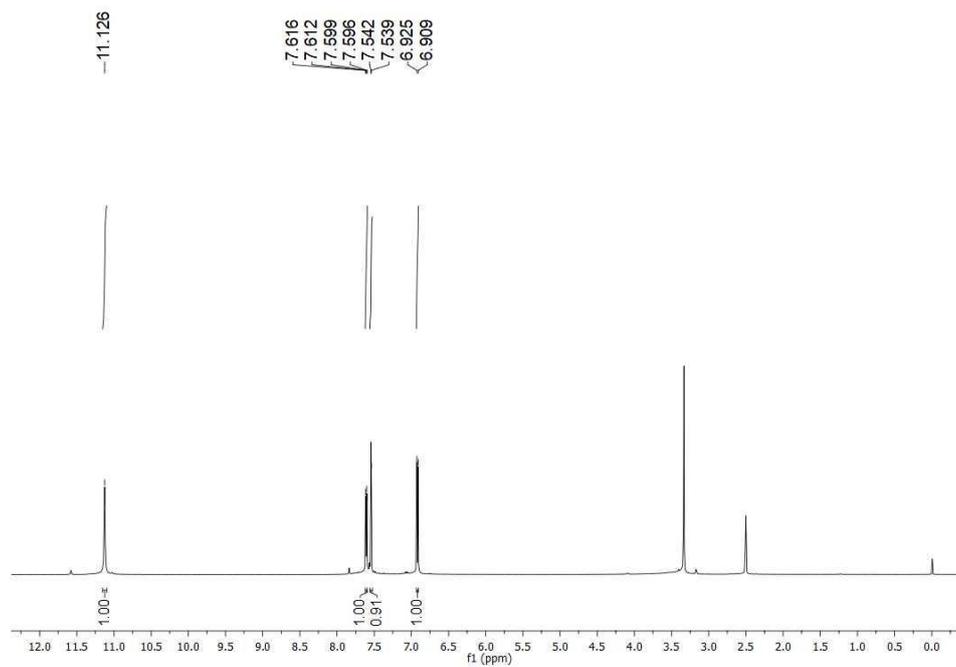


F. M.: C₈H₄N₂O₄; **M.M.:** 181 g mol⁻¹; **Características físicas:** cristais laranja; **R_f:** 0,58 (Hex/AcOEt 95:5); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** exp.: 244-246 °C, Lit. 245-249 °C (SINGH *et al*, 2007); **Rendimento:** 70%.

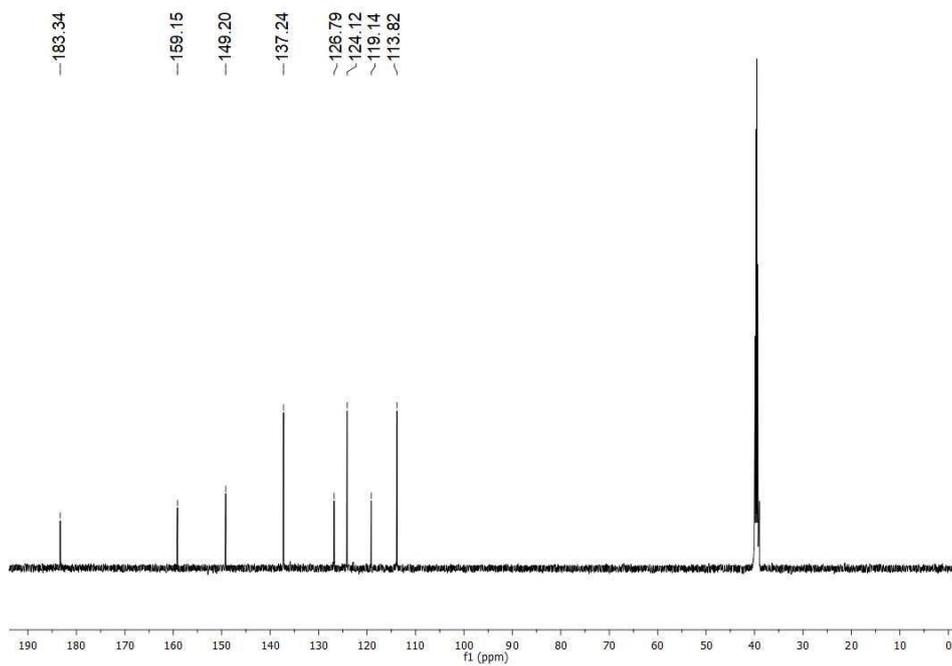
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3166; 3077; 1748; 1703, 1613, 844; 648.



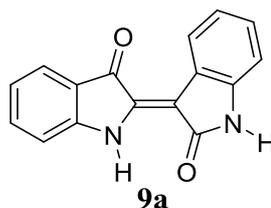
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6,92 (1H, d, *J*= 8,0 Hz); 7,54 (1H, d, *J*= 2,0 Hz); 7,60 (1H, dd, *J*=8,0 Hz/ 2,0 Hz); 11,12 (s, NH).



RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 1113,8; 119,1; 124,12; 126,8; 137,2; 149,2; 159,1; 183,3.



2.5 - Caracterização do composto 9a: indirubina



F. M.: C₁₆H₁₀N₂O₂; **M.M.:** 262 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,63 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** 205-207 °C; **Rendimento:** 85% rota 1 e 90% rota 3.

UV-Vis (EtOH), λ máx.(nm): 536.

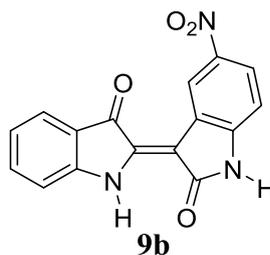
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3344; 3180; 1663; 1611; 1595; 1479; 1461; 1381; 1302; 746.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6,91 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 6,90 (2H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,26 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,42 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,58 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,66 (1H, d, *J* = 7,0 Hz); 8,77 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 10,89 (1H, s, NH); 11,02 (1H, s, NH);

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 107,0; 110,1; 113,9; 119,5; 121,8 (2 C); 121,9; 124,8; 125,2; 129,8; 137,6; 138,8; 141,4; 153,0; 171,4; 189,1.

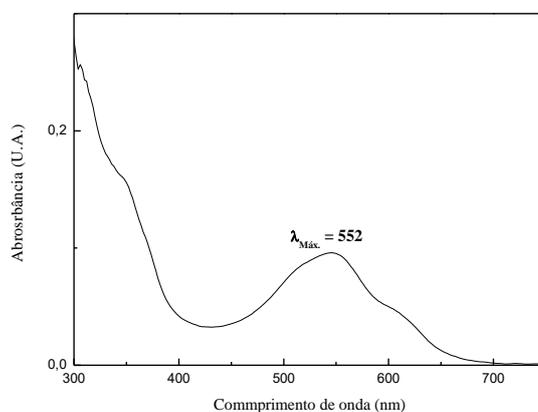
MALDI-TOF: *M/z*[*M*]⁺: calculado: 262,2633; experimental: 262,0324; [*M*+*H*]⁺: 263,0584.

2.6 - Caracterização do composto 9b: 5-nitro-indirubina

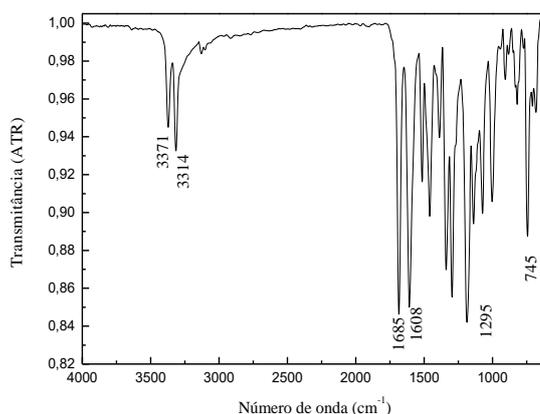


F. M.: C₁₆H₉N₃O₄; **M.M.:** 307 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:**0,45 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 85%.

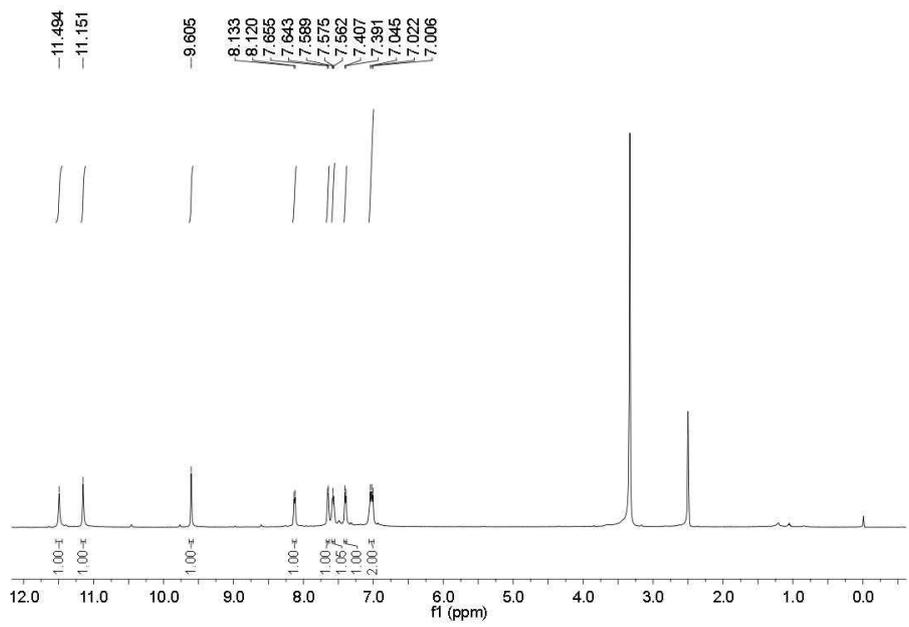
UV-Vis (EtOH), λ máx.(nm): 552.



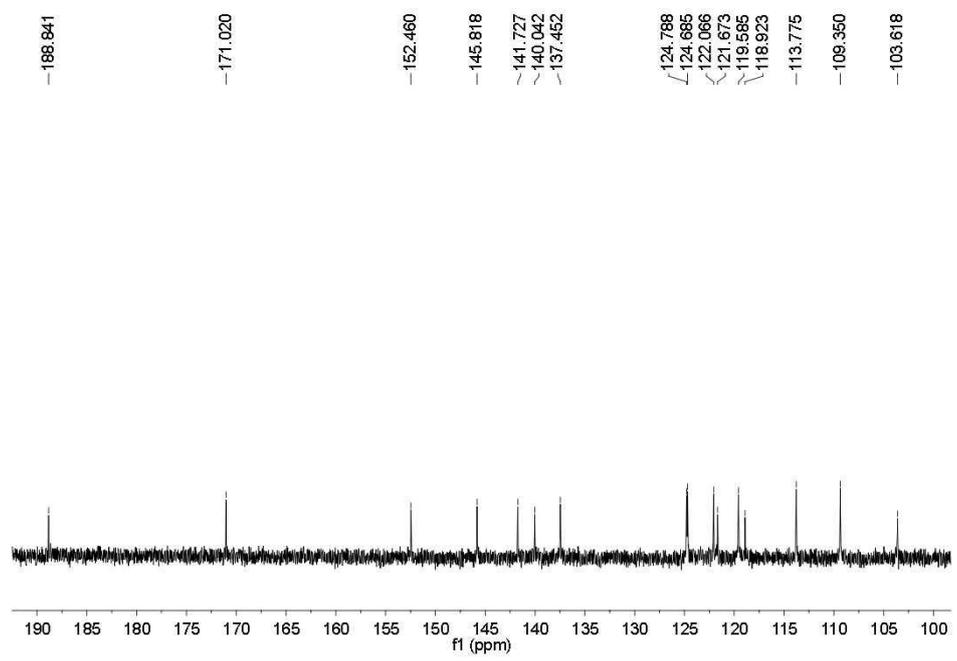
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3371; 3314; 1685; 1608; 745.



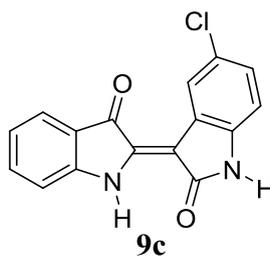
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7,02 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,05 (1H, t, *J* = 7,0 Hz); 7,40 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,58 (1H, t, *J* = 7,0 Hz); 7,65 (1H, d, *J* = 7,0 Hz); 8,13 (1H, d, *J* = 7,0 Hz); 9,61 (1H, s); 11,16 (1H, s, NH); 11,50 (1H, s, NH).



RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 103,61; 109,35; 113,77; 118,92; 119,58; 121,67; 122,07; 124,68; 124,78; 137,45; 140,04; 141,28; 145,82; 152,46; 171,02; 188,84.

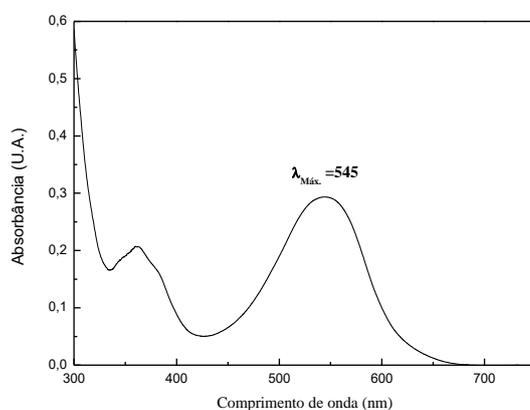


2.7 - Caracterização do composto 9c: 5-cloro-indirubina

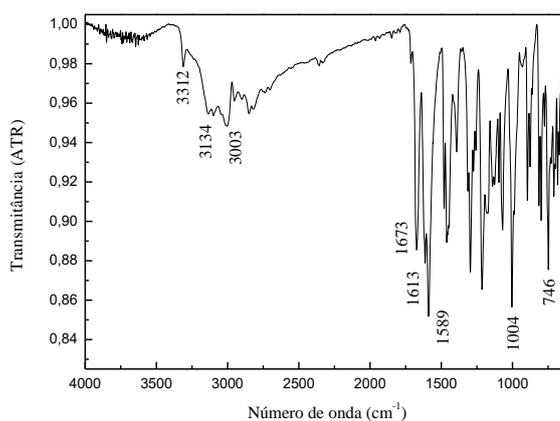


F. M.: $C_{16}H_9N_2O_2Cl$; **M.M.:** 296 g mol^{-1} ; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,55 (DCM/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV. **Faixa de Fusão:** $>250 \text{ }^\circ\text{C}$ (decomposição); **Rendimento:** 85%.

UV-Vis (EtOH), λ máx.(nm): 545.

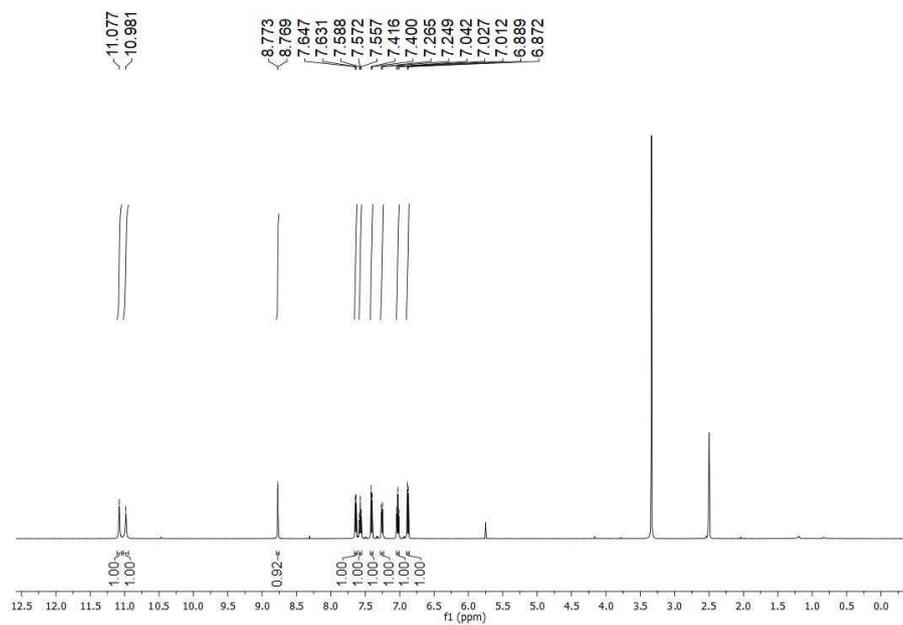


IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3312; 3134; 3003; 1673; 1613; 1589; 1004; 746.

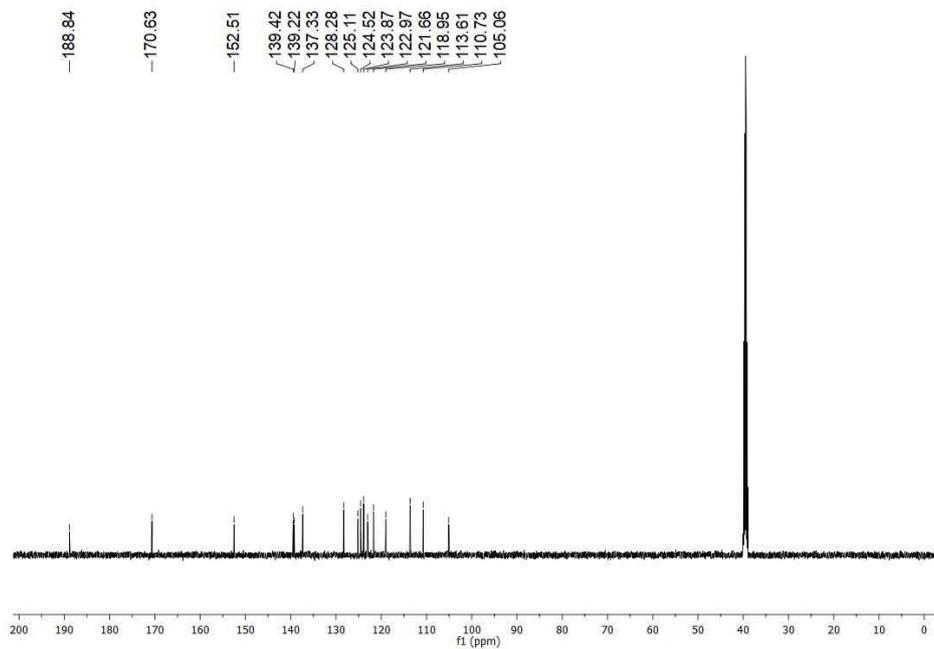


RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6,88 (1H, d, $J = 8,5 \text{ Hz}$); 7,03 (1H, t, $J = 7,5 \text{ Hz}$); 7,25 (1H, dd, $J = 7,0 \text{ Hz}$ e 2 Hz); 7,41 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$); 7,57 (1H, t, $J = 8,0$

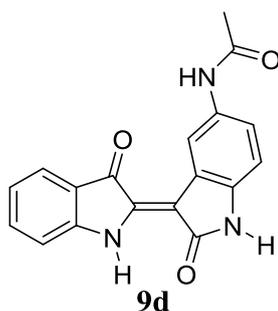
Hz); 7,64 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 8,77 (1H, d, 2 Hz); 10,981 (1H, s, NH); 11,077 (1H, s, NH).



RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 105,1; 110,1; 113,6; 118,9; 121,7; 122,9; 123,9; 124,5; 125,1; 128,3; 137,3; 139,2; 139,4; 152,5; 170,6; 188,8.

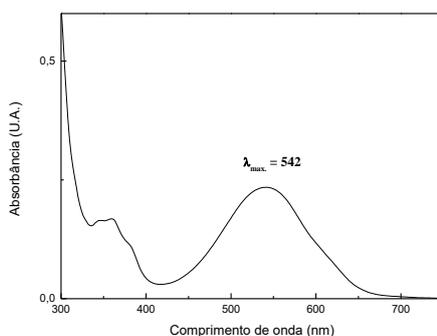


2.8 - Caracterização do composto 9d: 5-acetamida-indirubina

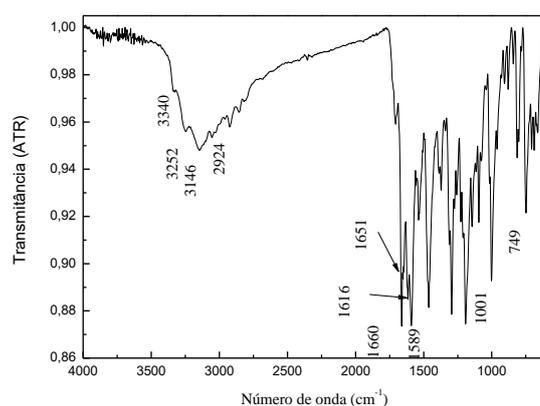


F. M.: C₁₈H₁₃N₃O₃; **M.M.:** 319 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,1 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV. **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 85%.

UV-Vis (EtOH), λ máx.(nm): 542.

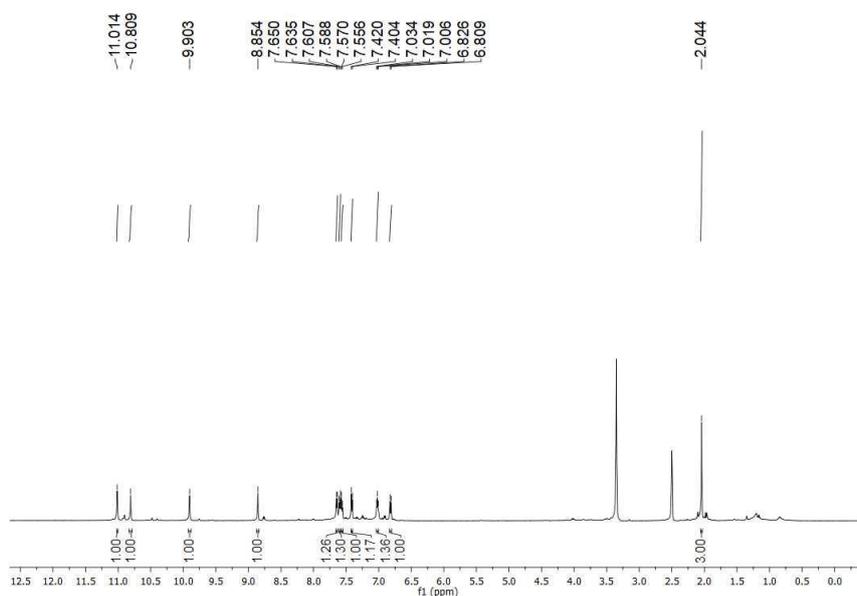


IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3340; 3252; 3152 1660; 1652; 1616; 1589; 1001; 749.

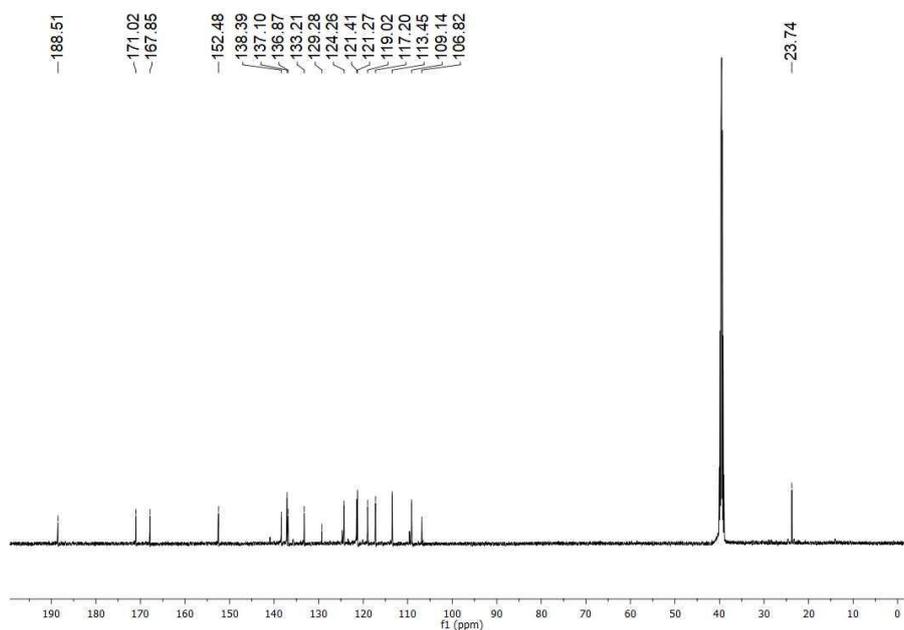


RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 2,04 (3H, s, CH₃); 6,82 (1H, d, *J* = 8,5 Hz); 7,02 (1H, t, *J* = 8,0 Hz); 7,41 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,56 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,59

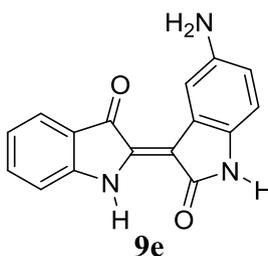
(1H, t, $J = 8,5$ Hz); 7,64 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 8,85 (1H, s); 9,90 (1H, s, NH); 10,81 (1H, s, NH); 11,01 (1H, s, NH).



RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 23,7; 106,8; 109,1; 113,4; 117,2; 119,0; 121,3; 121,4; 124,3; 124,3; 133,2; 136,9; 137,1; 138,4; 152,5; 167,8; 171,0; 188,5.

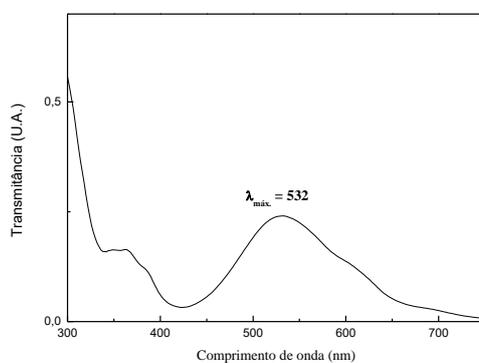


2.9 - Caracterização do composto 9e: 5-amino-indirubina

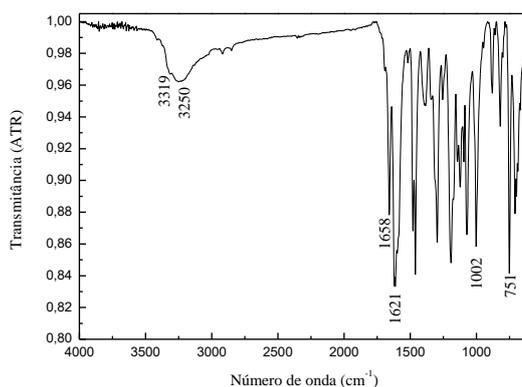


F. M.: $C_{16}H_{11}N_3O_2$; **M.M.:** 277 g mol^{-1} ; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,16 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** $>250 \text{ }^\circ\text{C}$ (decomposição); **Rendimento:** 80%.

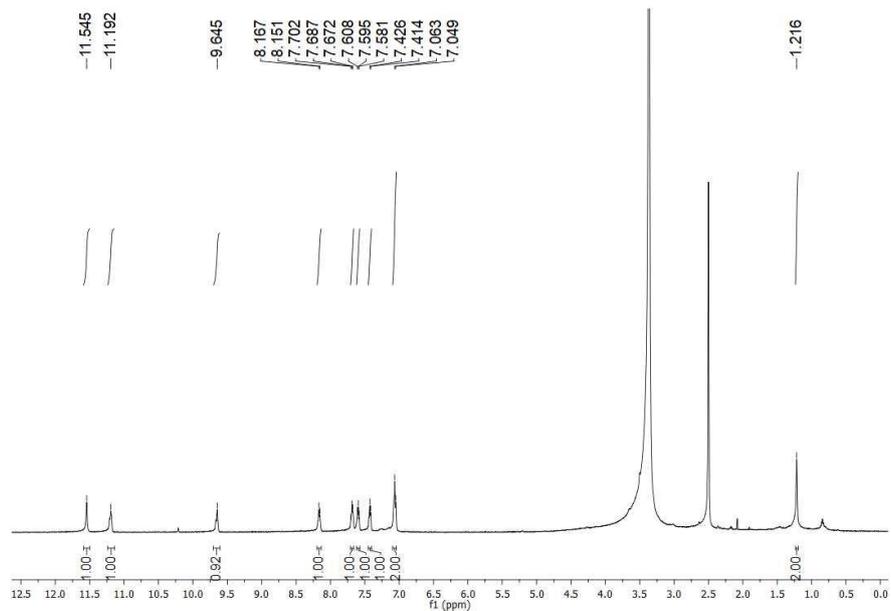
UV (EtOH), $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm): 532.



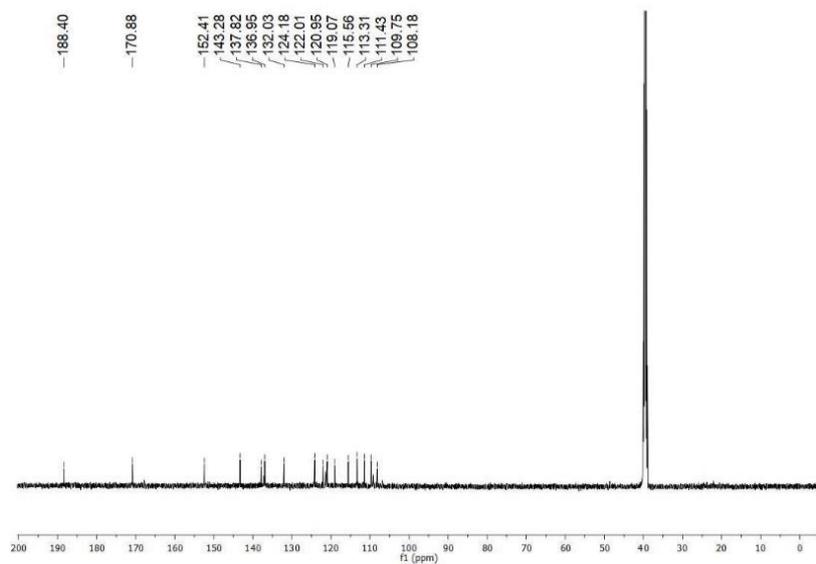
IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3319; 3250; 1658; 1621; 1002; 751.



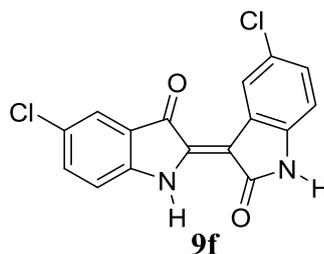
RMN de ^1H (500 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 1,216 (2H, s, NH_2); 7,05 (2H, m); 7,42 (1H, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$); 7,59 (1H, t, $J = 7,0 \text{ Hz}$); 7,68 (1H, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$); 8,16 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$); 9,645 (1H, s); 11,192 (1H, s, NH); 11,545 (1H, s, NH).



RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 108,2; 109,7; 111,4; 113,3; 115,6; 119,1; 120,9; 122,0; 124,2; 132,0; 136,9; 137,8; 143,3; 152,4; 170,9; 188,4.

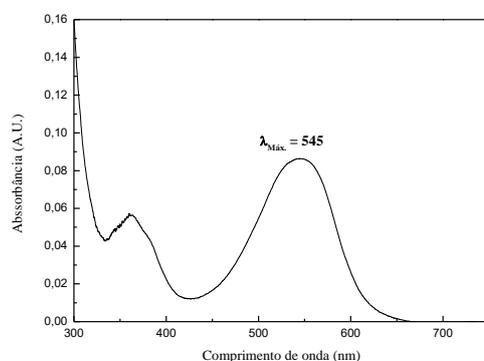


2.10 - Caracterização do composto 9f: 5,5'-dicloro-indirubina

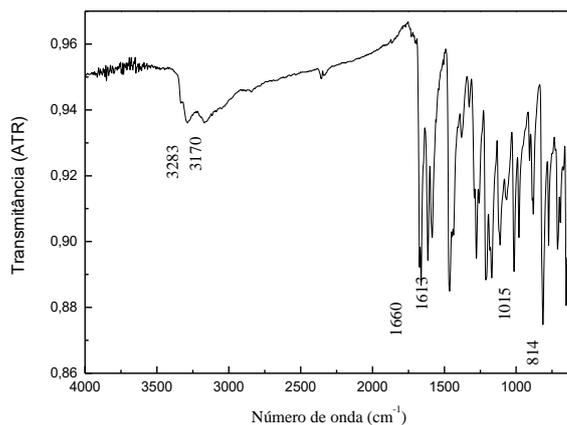


F. M.: $C_{16}H_8N_2O_2Cl_2$; **M.M.:** 330 g mol^{-1} ; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,5 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** $>250 \text{ }^\circ\text{C}$ (decomposição); **Rendimento:** 85% (rota 3).

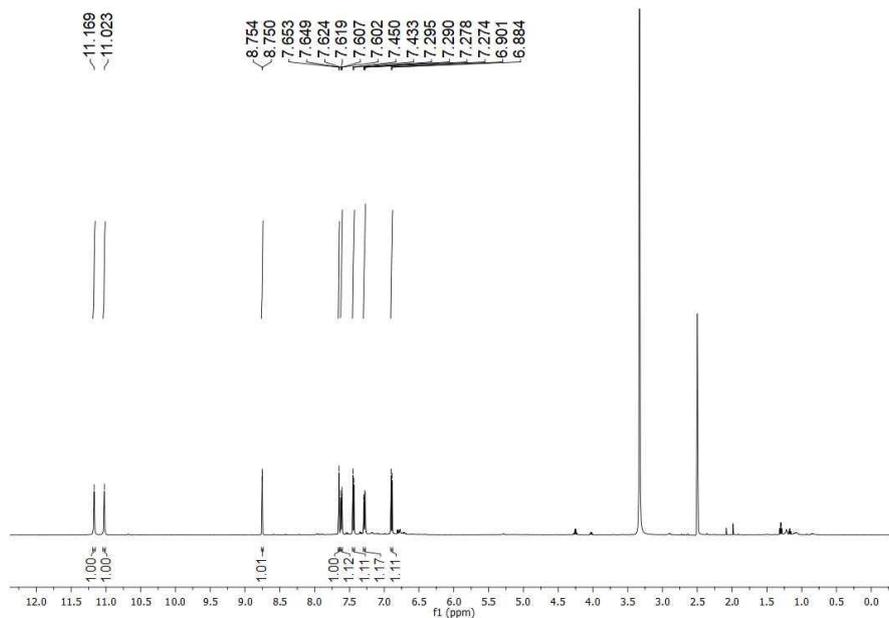
UV-Vis (EtOH), $\lambda_{\text{máx.}}$ (nm): 545



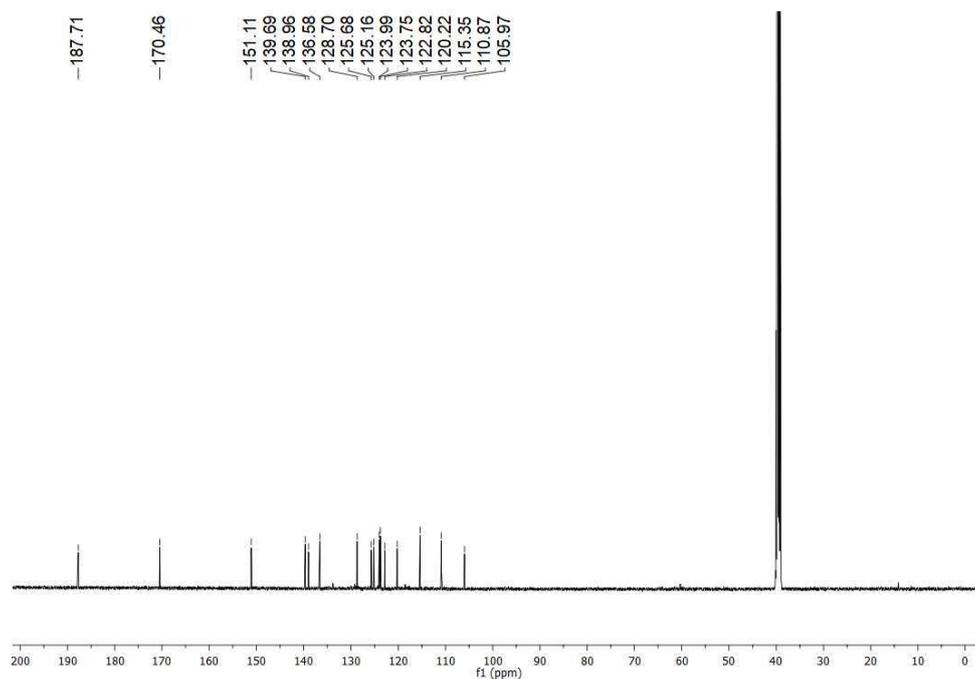
IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3283; 3170; 1660; 1613; 1591; 1015; 814.



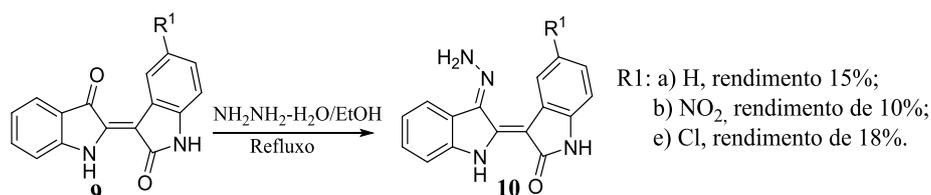
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 6,89 (1H, d, $J = 8,0 \text{ Hz}$); 7,28 (1H, dd, $J = 8,0 \text{ Hz}$ e $2,0 \text{ Hz}$); 7,44 (1H, d, $J = 8,5 \text{ Hz}$); 7,61 (1H, dd, $J = 8,5 \text{ Hz}$ e $2,5 \text{ Hz}$); 7,65 (1H, d, $J = 2,0 \text{ Hz}$); 8,75 (1H, d, $J = 2 \text{ Hz}$); 11,023 (1H, s, NH); 11,169 (1H, s, NH).



RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 105,9; 110,9; 115,3; 120,2; 122,8; 123,7; 123,9; 125,2; 125,7; 128,7; 136,6; 138,9; 139,7; 151,1; 170,5; 187,7.

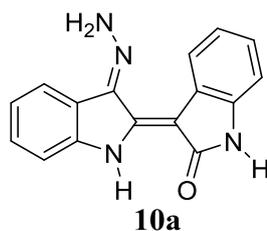


Metodologia geral escolhida para indirubinas-3'-hidrazonas:



Em um balão de fundo redondo contendo 0,2 mmol de indirubina adicionaram-se 10 mmol de hidrazina mono hidratada 64% em 12 mL de etanol. A mistura reacional permaneceu sob refluxo por 30 min. O final da reação foi marcado pela mudança de coloração, de roxo para vermelho e o consumo total do material de partida em CCD (CH₂Cl₂:MeOH 99:1). Meio reacional é evaporado em evaporador rotativo e adicionado 10 mL de água gelada. O sólido foi filtrado à vácuo, lavado com éter e água. Rendimento variando 10-18%.

2.11 - Caracterização do composto 10a: indirubina-3'-hidrazona



F. M.: C₁₆H₁₂N₄O; **M.M.:** 276 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido vermelho; **R_f:** 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 15%.

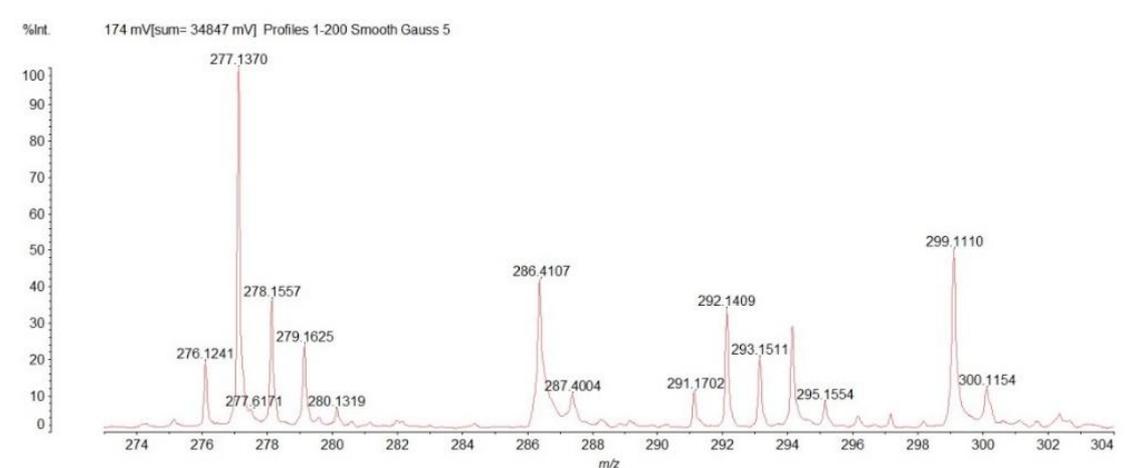
UV-Vis (EtOH), λ máx.(nm): 495;

IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3344; 3304 e 3207; 3136; 1633; 1605; 1585; 1505; 1471; 1332; 1285; 1209; 747.

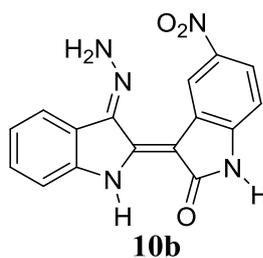
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6,87 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 6,90 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,02 (1H, 2 *J* = 7,5 Hz); 7,06 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,32 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,40 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 8,14 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 8,63 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 9,190 (2H, s, NH₂); 10,490 (1H, s, NH); 12,156 (1H, s, NH);

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 93,9; 108,4; 111,3; 117,0; 120,0; 121,3; 122,3); 123,5; 123,8; 123,9; 129,2; 134,9; 136,9; 143,0; 150,0; 171,1.

LDI-TOF: $M/z[M]^+$: Calculado: 276,2932; experimental: 276,1241; $[M+H]^+$: 277,1370.

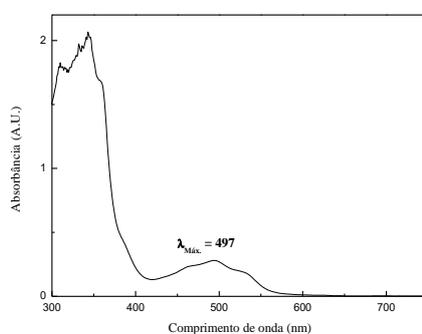


2.12 - Caracterização do composto 10b: 5-nitro-indirubina -3'-hidrazona

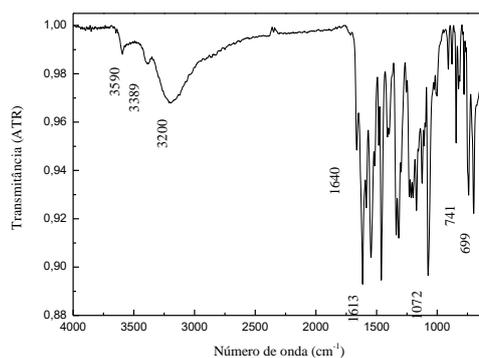


F. M.: C₁₆H₁₁N₅O₃; **M.M.:** 321,0 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido rosa; **R_f:** 0,38 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** exp.: >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 10%.

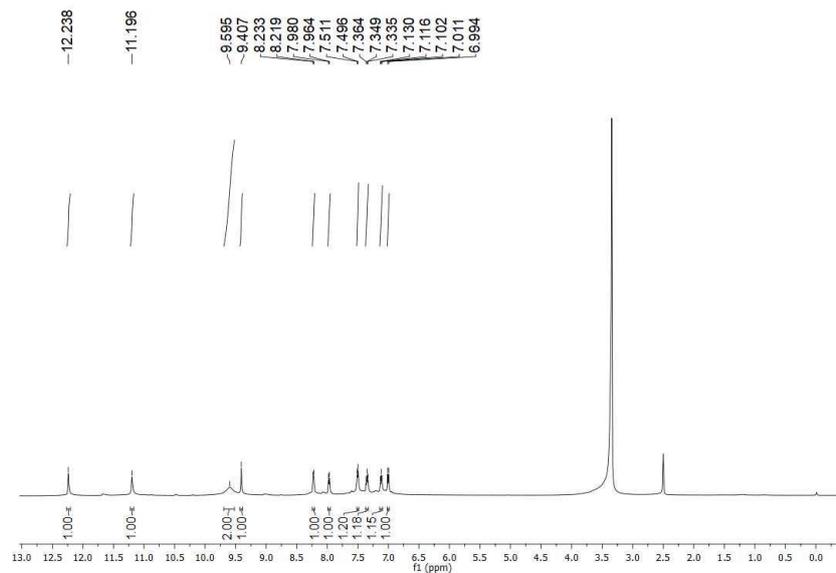
UV (EtOH), λ máx.(nm): 497.



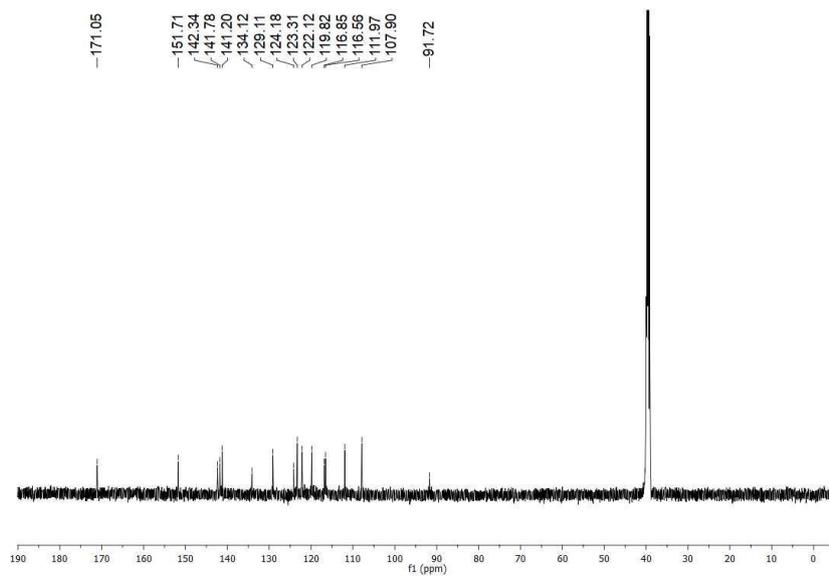
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3590; 3389; 3200; 1640; 1072; 741; 699.



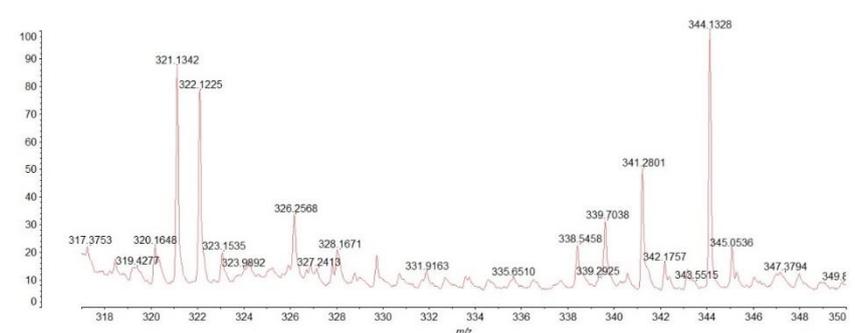
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, J(Hz): 7,01 (1H, d, J= 8,5 Hz.); 7,12 (1H, t, J= 7,5 Hz); 7,35 (1H, t, J= 7,5 Hz); 7,51 (1H, d, J= 7,5 Hz); 7,97 (1H, dd, J= 8,5 Hz e 2,0 Hz); 8,22 (1H, d, J= 8,0 Hz); 9,407 (1H, s); 9,595 (2H, s, NH₂); 11,196 (1H, s, N-H); 12,238 (1H, s, N-H).



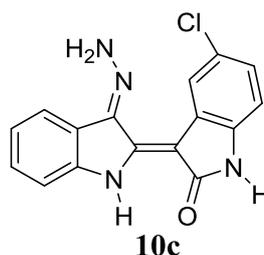
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 91,7; 107,9; 111,9; 116,5; 116,9; 119,7; 122,1; 123,3; 124,2; 129,0; 134,0; 141,2; 141,7; 142,3; 151,7; 171,0.



LDI-TOF: $M/z[M]^+$: Calculado: 321,0861; experimental: 321,3279; $[M+H]^+$: 322,3348.

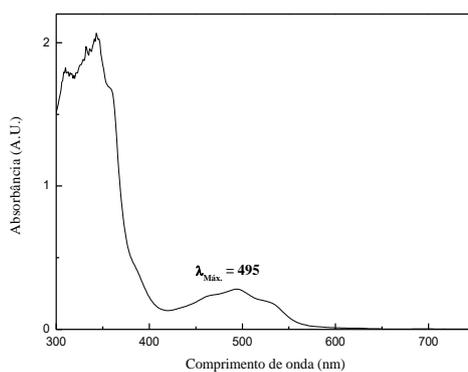


2.13 - Caracterização do composto 10c: 5-cloro-indirubina -3'-hidrazona

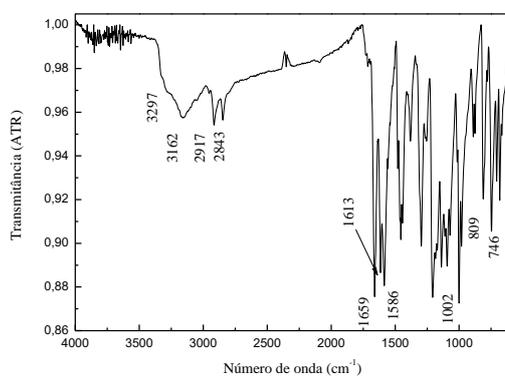


F. M.: C₁₆H₁₁ClN₄O; **M.M.:** 310 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido rosa; **R_f:** 0,45 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** exp.: >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 18%.

UV (EtOH), λ máx.(nm): 495.

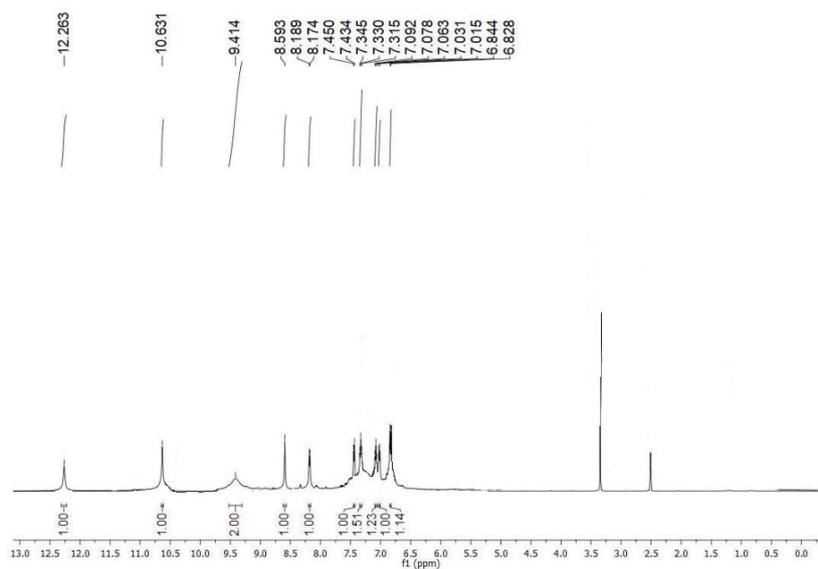


IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3297; 3162; 2917; 2843; 1659; 1613; 809; 746.

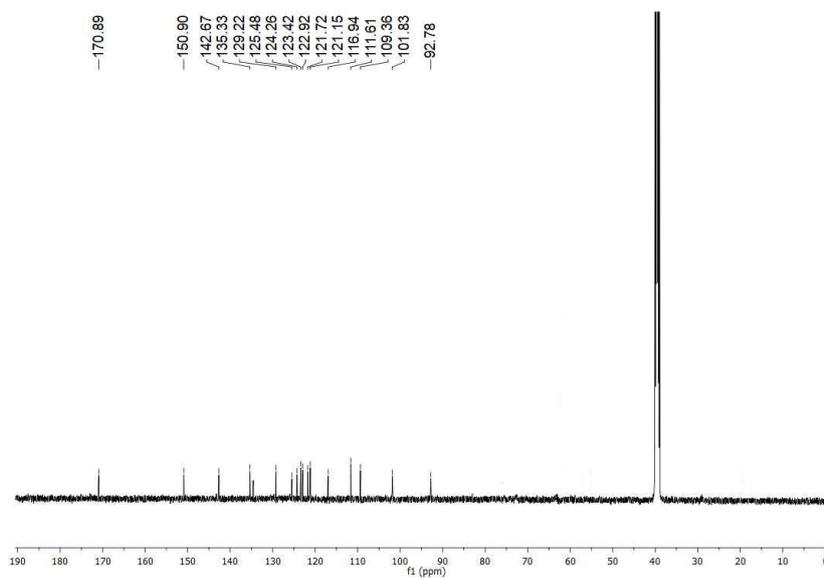


RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, J(Hz): 6,83 (1H, d, J= 8,0 Hz); 7,02 (1H, t, J= 7,5 Hz); 7,09 (1H, t, J= 7,5 Hz); 7,34 (1H, t, J= 8,0 Hz); 7,45

(1H, d, $J= 7,0$ Hz); 8,18 (1H, d, $J= 7,5$ Hz); 8,59 (1H, s, $J= 2,0$ Hz); 9,414 (2H, s, NH₂); 10,631 (1H, s, N-H); 12,263 (1H, s, N-H).

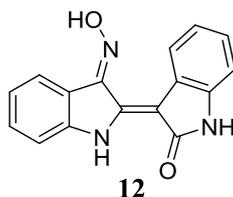


RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 92,78; 101,83; 109,36; 111,61; 116,94; 121,9; 121,72; 122,92; 123,42; 124,26; 125,48; 129,22; 135,33; 142,67; 150,90; 170,89.



LDI-TOF: $M/z[M]^+$: calculado: 310,7382; experimental:310,3408 (312,3744); $[M+H]^+$: 311,3850 - ³⁵Cl (313,5236 - ³⁷Cl).

2.14 - Caracterização do composto 12: indirubina -3'-oxima



F. M.: C₁₆H₁₂N₄O; **M.M.:** 276 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido vermelho; **R_f:** 0,55 (CH₂Cl₂/MeOH 99:1); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 80%.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 6,87 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 6,90 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,02 (1H, 2 *J* = 7,5 Hz); 7,06 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,32 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,40 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 8,14 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 8,63 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 9,20 (2H, s, NH₂); 10,50 (1H, s, NH); 12,17 (1H, s, NH);

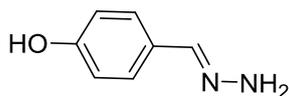
RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 93,9; 108,4; 111,3; 117,0; 120,0; 121,3; 122,3; 123,5; 123,8; 123,9; 129,2; 134,9; 136,9; 143,0; 150,0; 171,1.

IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3344 (N-H livre); 3304 e 3207; 3136; 1633; 1605; 1585 (NH₂); 1505; 1471; 1332; 1285; 1209; 747.

UV (EtOH), λ máx.(nm): 495;

LDI-TOF: M/z[M]⁺: Calculado: 276,2932; experimental: 276,3516; [M+H]⁺: 277,3600.

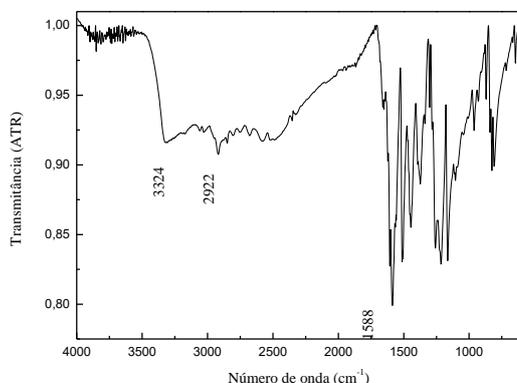
2.15 - Caracterização do composto 13a: 4-hidroxi-fenil-hidrazona



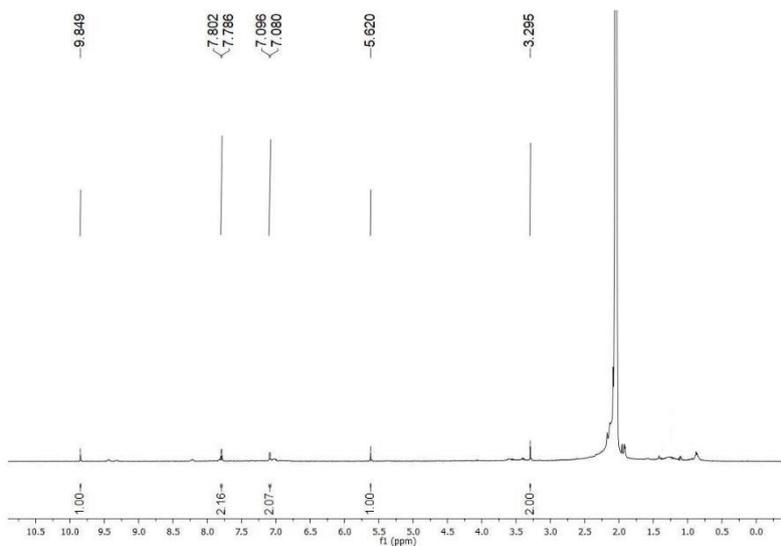
13a

F. M.: C₇H₈N₂O; **M.M.:** 136 g mol⁻¹; **Características físicas:** Sólido amarelo; **R_f:** 0,53 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** 246-248 °C; **Lit.:** 248-250 °C (MICHELI *et al*, 2006); **Rendimento:** 86%.

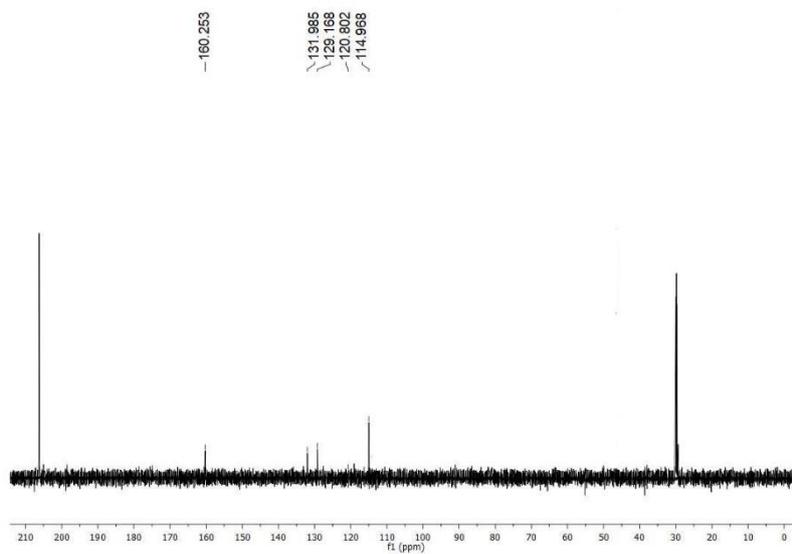
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3324; 2922; 1588.



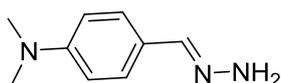
RMN de ¹H (500 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm), multiplicidade, J(Hz): 3,295 (2H, s, NH₂); 5,620 (1H, s, OH); 7,09 (2H, d, J= 8,0 Hz); 7,79 (2H, d, J= 8,0 Hz); 9,849 (1H, s, H-C=N).



RMN de ^{13}C (125 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm): 114,968; 120,802; 129,168; 131,985; 160,253.



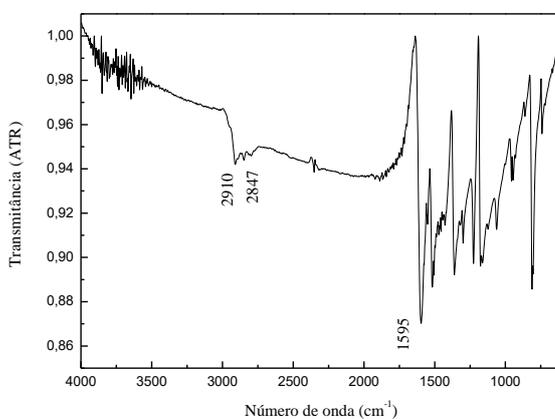
2.16 - Caracterização do composto 13b: 4-dimetilamino-fenil-hidrazona



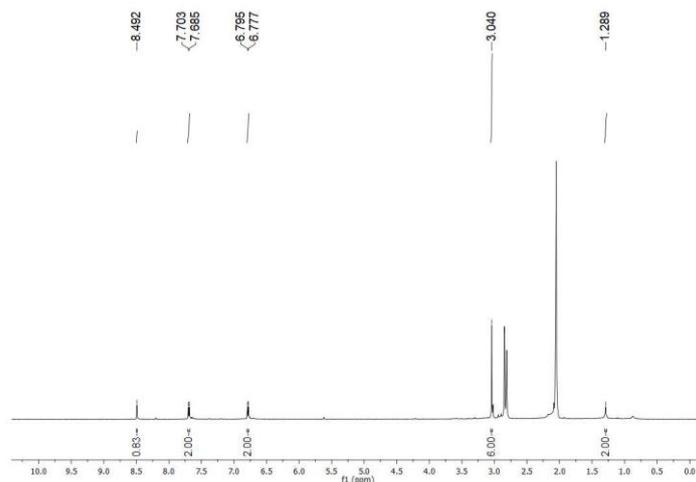
13b

F. M.: C₉H₁₃N₃; **M.M.:** 163,0 g mol⁻¹; **Características físicas:** Sólido amarelo; **R_f:** 0,2 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); **Revelador:** lâmpada de UV e Iodo; **Faixa de Fusão:** 184-185 °C; **Lit.:** 187-191 °C (Micheliet *al*, 2006); **Rendimento:** 80%.

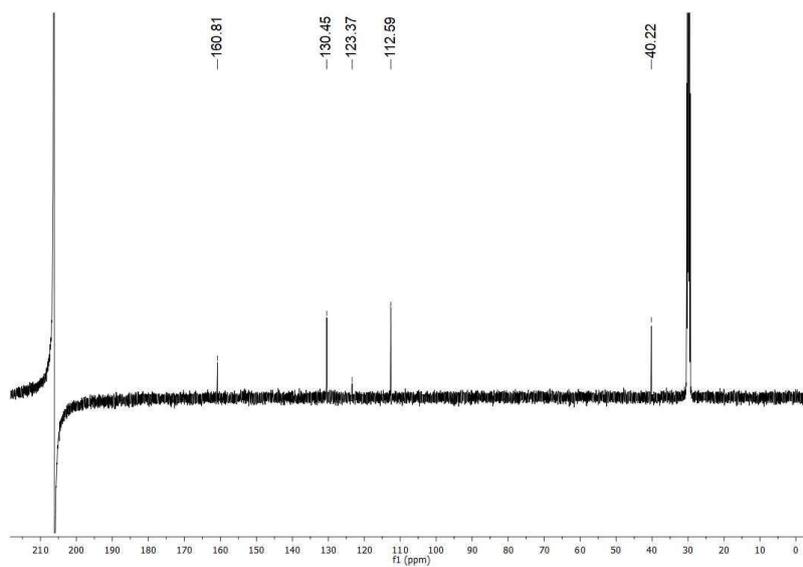
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 2910; 2847; 1595.



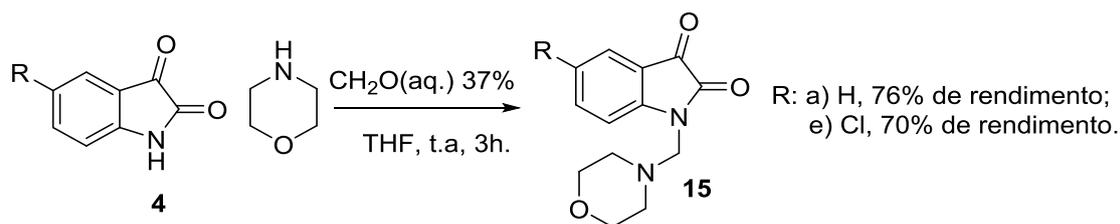
RMN de ¹H (500 MHz, Acetona-d₆), δ (ppm), multiplicidade, J(Hz): 1,29 (2H, s, NH₂); 3,04 (6H, s, N(CH₃)); 6,79 (2H, d, J= 9,0 Hz); 7,69 (2H, d, J= 9,0 Hz); 8,49 (1H, s, H-C=N).



RMN de ^{13}C (125 MHz, Acetona- d_6), δ (ppm): 40,22; 112,59; 123,37; 130,45; 160,81.



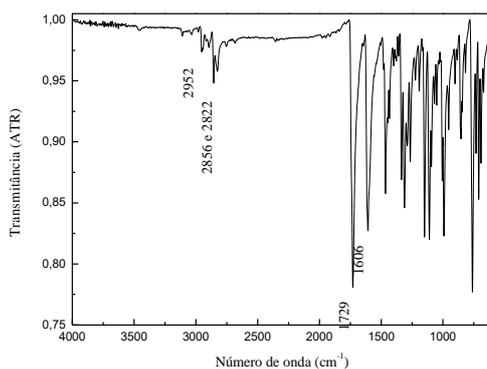
Metodologia descrita por Kurkin (KURKIN *et al*, 2009).



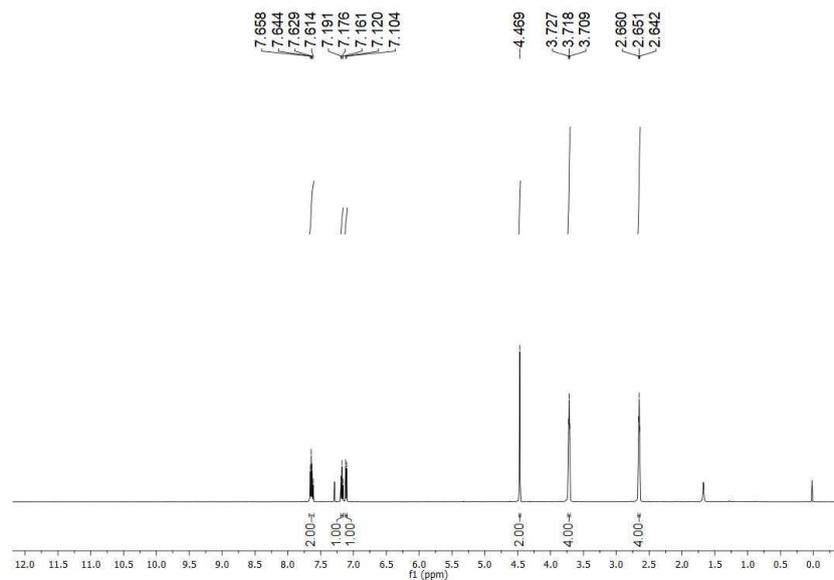
2.17 - Caracterização do composto 15a: N-1-metilmorfolinil-isatina

F. M.: C₁₃H₁₄N₂O₃; **M.M.:** 246 g mol⁻¹; **Características físicas:** cristais laranja; **R_f:** 0,43 (Hex/AcOEt 1:1); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** exp.: FF 208-210°C, Lit. 203°C (SOLOMON *et al*, 2009); **Rendimento:** 76%.

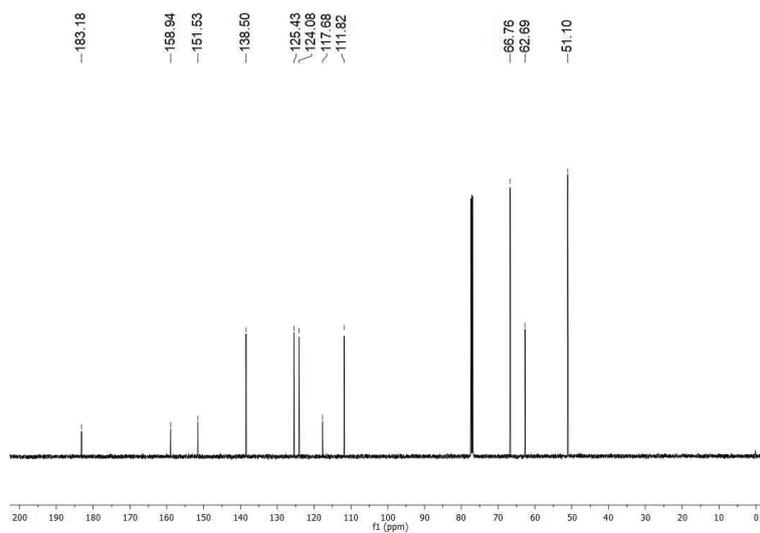
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 2952; 2856 e 2822; 1729; 1606.



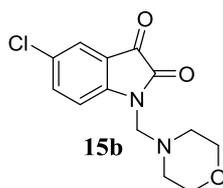
RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2,65 (4H, t, $J = 4,5$ Hz); 3,71 (4H, t, $J = 4,5$ Hz); 4,469 (2H, s); 7,12 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 7,176 (1H, t, $J = 7,5$ Hz); 7,63 (2H, m, $J = 7,5$ Hz);



RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 51,10; 62,69; 66,76; 111,82; 117,68; 124,08; 125,43; 138,50; 151,53; 158,94; 183,13.



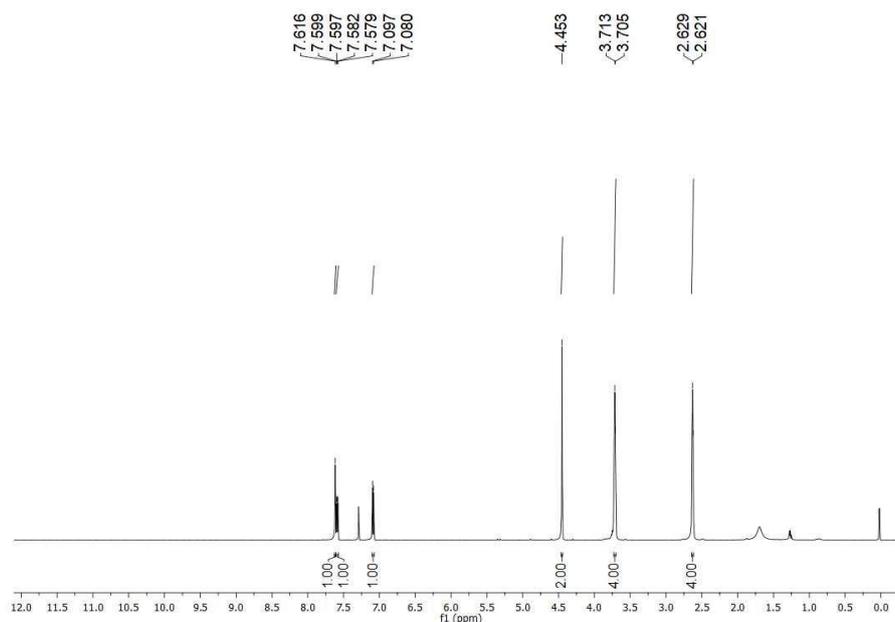
2.18 - Caracterização do composto 15b: *N*-1-morfolinilmetil-5-cloro-isatina



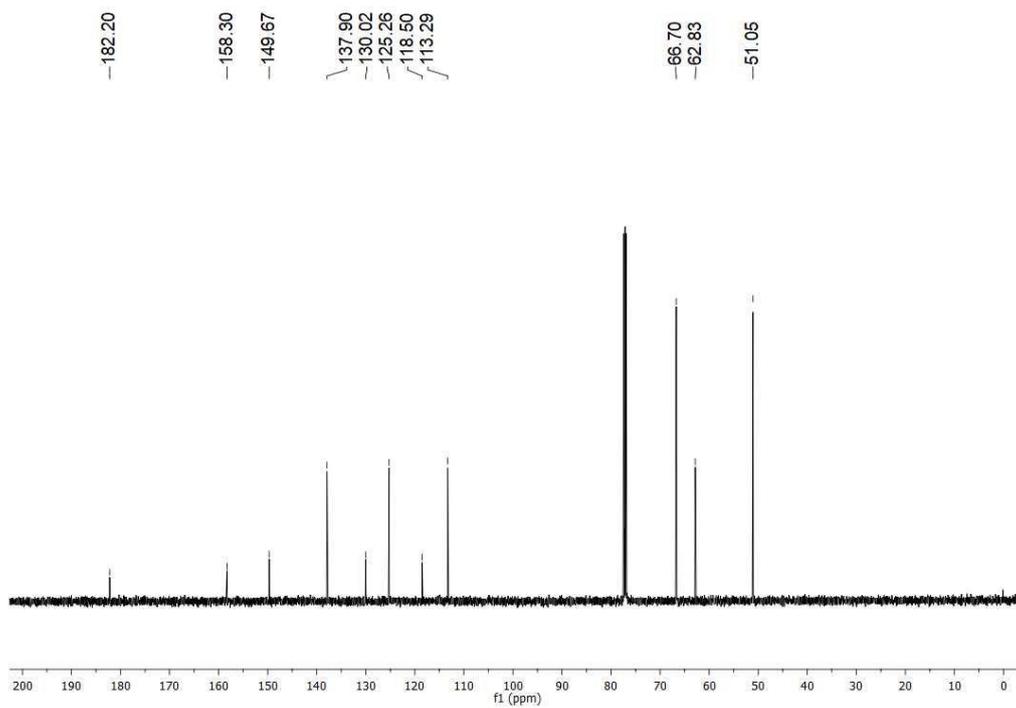
F. M.: C₁₃H₁₃ClN₂O₃; **M.M.:** 280 g mol⁻¹; **Características físicas:** cristais laranja; **R_f:** 0,43 (Hex/AcOEt 1:1); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** exp.: 244-245°C°C, Lit. 245°C (SOLOMON *et al*, 2009); **Rendimento:** 70%.

IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3080; 2884-2993; 1733; 1600; 1258; 1112; e 721.

RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 2,62 (4H, t, $J = 4,5$ Hz); 3,70 (4H, t, $J = 4,5$ Hz); 4,45 (2H, s); 7,09 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 7,58 (1H, t, $J = 7,5$ Hz); 7,60 (2H, m, $J = 7,5$ Hz).

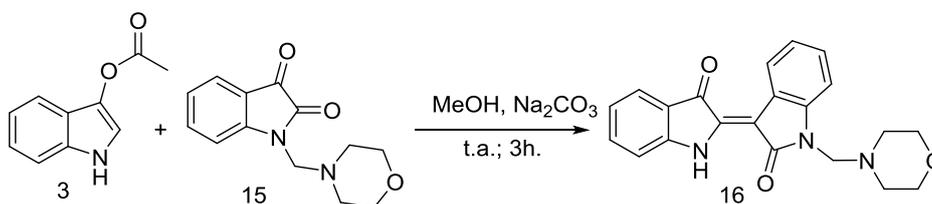


RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 51,05; 62,83; 66,70; 113,29; 118,50; 125,26; 130,02; 137,90; 149,67; 158,30; 182,20.



2.19 - Caracterização do composto 16: *N*-1-morfolinilmetil-indirubina

Metodologia descrita por Kurkin (KURKIN *et al*, 2009).



F. M.: C₂₁H₁₉N₃O₃; **M.M.:** 361 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,57 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 40 %.

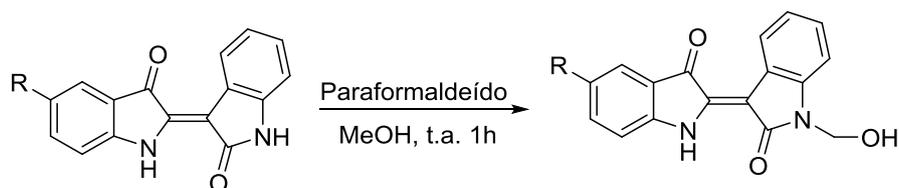
UV (EtOH), λ máx.(nm): 536.

IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3306; 2944 e 2852; 1658; 1605; 1479, 1462, 1355 e 1314; 1196 e 1175.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J*(Hz): 2,56 (4H, d, *J*= 4,5 Hz); 3,55 (4H, d, *J*= 4,5 Hz); 4,57 (2H, s); 6,91 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 7,1 (2H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,32 (2H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,61 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,65 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 8,82 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 11,13 (1H, s, NH);

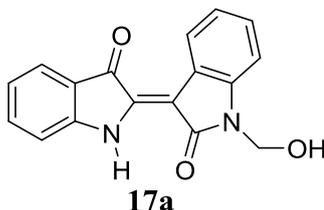
RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 50,8; 61,1; 66,0; 106,6; 109,6; 110,1; 113,5; 119,0; 120,6; 121,3; 121,9; 124,4; 124,7; 129,0; 135,5; 137,2; 140,9; 153,0; 170,0; 188,7.

Preparação dos compostos 17a-f: *N*-1-morfolinimetil-indirubina



Em um balão de fundo redondo foram adicionados 53 mg de indirubina (0,2 mmol) em 5 mL de THF, deixando a suspensão formada por alguns minutos sob agitação magnética, para a solubilização. Em seguida foi adicionado 30 mg de paraformaldeído (0,5 mmol). A mistura foi deixada por 1 hora sob agitação magnética em temperatura ambiente (t.a.), após este período, o meio reacional foi aquecido por 15 minutos, utilizado um condensador, para favorecer o refluxo. O final da reação é evidenciado por CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}98:2$) entre o meio reacional e padrão de indirubina. O meio reacional foi resfriado a t.a., sendo formado um precipitado roxo, que foi filtrado a vácuo com auxílio de Kitasato, funil de Büchner e filtro de papel, lavado exaustivamente com água gelada. Foi obtido 56 mg (3,8 mmol, 95%) de sólido roxo.

2.20- Caracterização do composto 17a: *N*-1-hidroximetil-indirubina



F. M.: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$; **M.M.:** 292 g mol^{-1} ; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,35 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} 98:2$); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** $>250 \text{ }^\circ\text{C}$ (decomposição); **Rendimento:** 95%.

UV (EtOH), λ máx.(nm): 536.

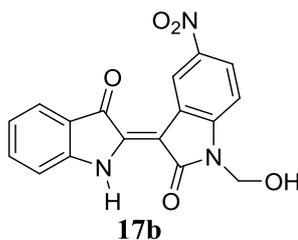
IV (ATR), ν (cm^{-1}): 3346; 3319; 1660; 1611; 1480, 1462; 1020.

RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J*(Hz): 5,21 (2H, d, *J*= 6,5 Hz); 6,32 (1H, t, *J*= 6,5 Hz); 7,00 (1H, t, *J*= 7,5 Hz); 7,09 (1H, t, *J*= 7,5 Hz); 7,17 (1H, d, *J*= 8,0 Hz); 7,33 (1H, t, *J*= 7,50 Hz); 7,42 (1H, d, *J*= 7,5 Hz); 7,58 (1H, t, *J*= 7,5 Hz); 7,65 (1H, d, *J*= 7,5 Hz); 8,81 (1H, d); 11,07 (1H, s, N-H).

RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 62,2; 105,5; 109,4; 113,5; 119,0; 120,7; 121,5; 122,0; 124,4; 129,0; 137,2; 138,8; 140,6; 152,4; 168,8; 188,5.

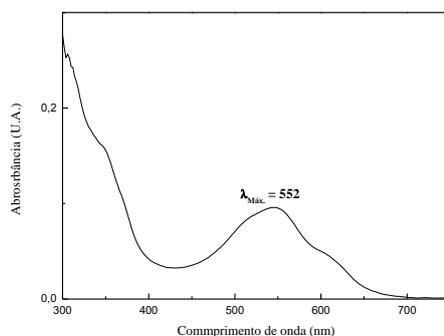
LDI-TOF: $\text{M/z}[\text{M}]^+$: calculado: 292,084793; experimental:292,0869; **$[\text{M}+\text{H}]^+$:** 293,1175; **$[\text{M}+\text{Na}]^+$** 315,0555.

2.21 - Caracterização do composto 17b: *N*-1-hidroximetil-5-nitro-indirubina

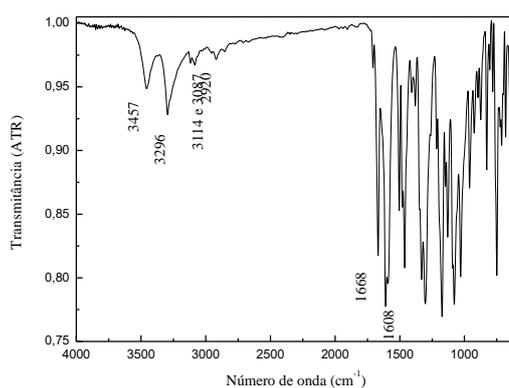


F. M.: C₁₇H₁₁N₃O₅; **M.M.:** 337 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,30 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 95%.

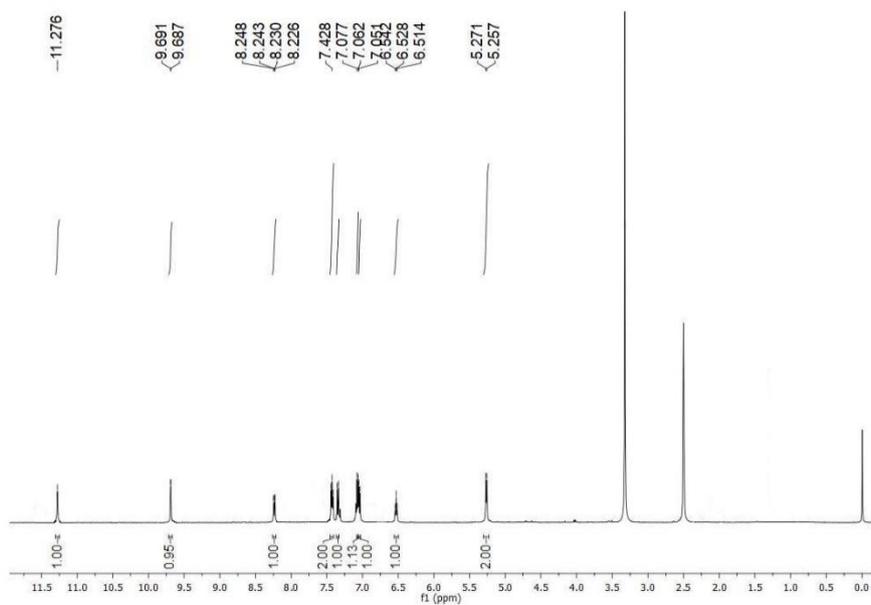
UV (EtOH), λ máx.(nm): 552.



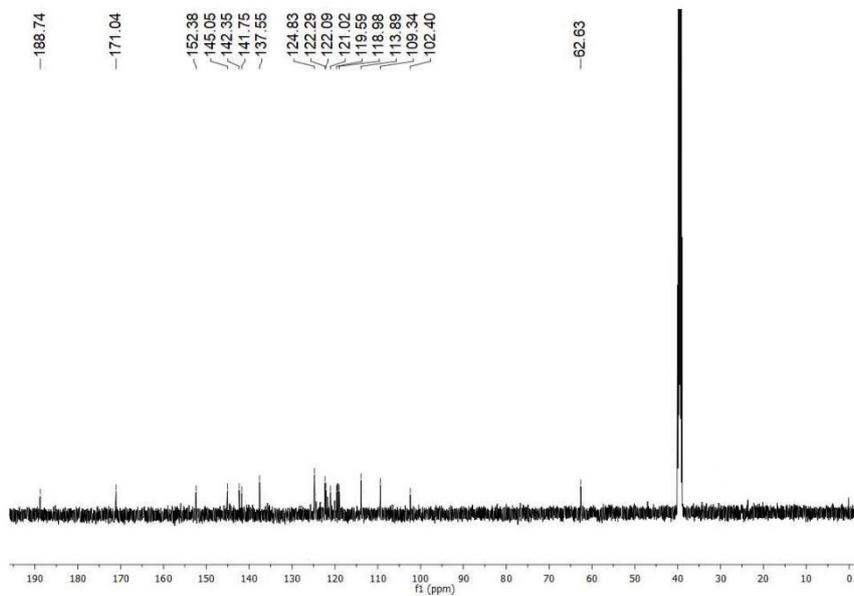
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3457; 3296; 3114 e 3087; 1668; 1608.



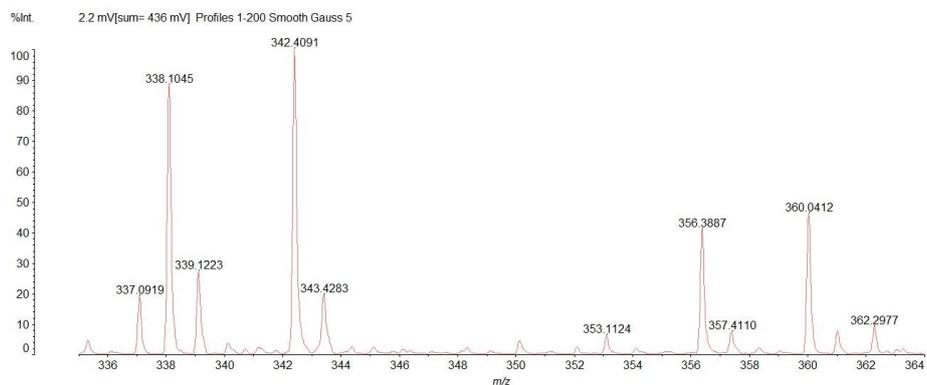
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 5,26 (2H, d, *J* = 7,0 Hz); 6,528 (1H, t, *J* = 7,0 Hz); 7,04 (1H, d, *J* = 8,5 Hz); 7,07 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 7,35 (1H, d, *J* = 9,0 Hz); 7,428 (2H, t, *J* = 7,0 Hz); 7,6 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 8,24 (1H, dd, *J* = 8,5 Hz e 2,0 Hz); 9,69 (1H, d, *J* = 2,0 Hz); 11,276 (1H, s, N-H).



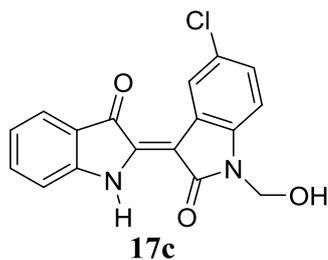
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 62,63; 102,4; 109,34; 113,89; 118,89; 119,59; 121,02; 122,09; 122,29; 124,83; 137,55; 137,55; 141,75; 142,35; 152,38; 171,04; 188,74.



LDI-TOF: $M/z[M]^+$: calculado: 337,069872; experimental: 337,0919; $[M+H]^+$: 338,1045; $[M+Na]^+$ 360,0412.

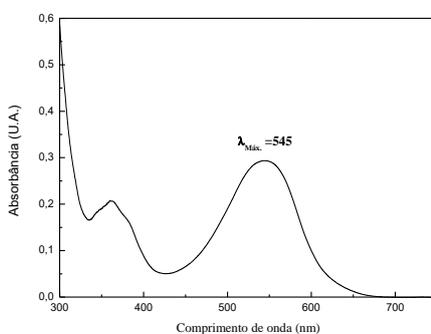


2.22 - Caracterização do composto 17c: *N*-1-hidroximetil-5-cloro-indirubina

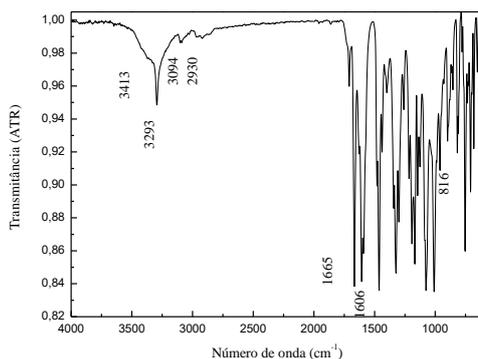


F. M.: C₁₇H₁₁ClN₂O₃; **M.M.:** 326 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,33 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 95%.

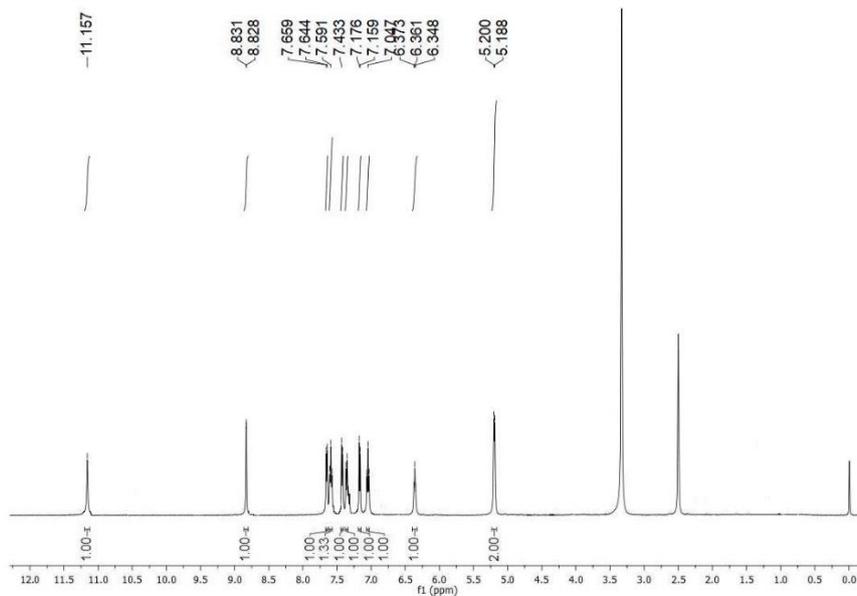
UV (EtOH), λ máx.(nm): 545.



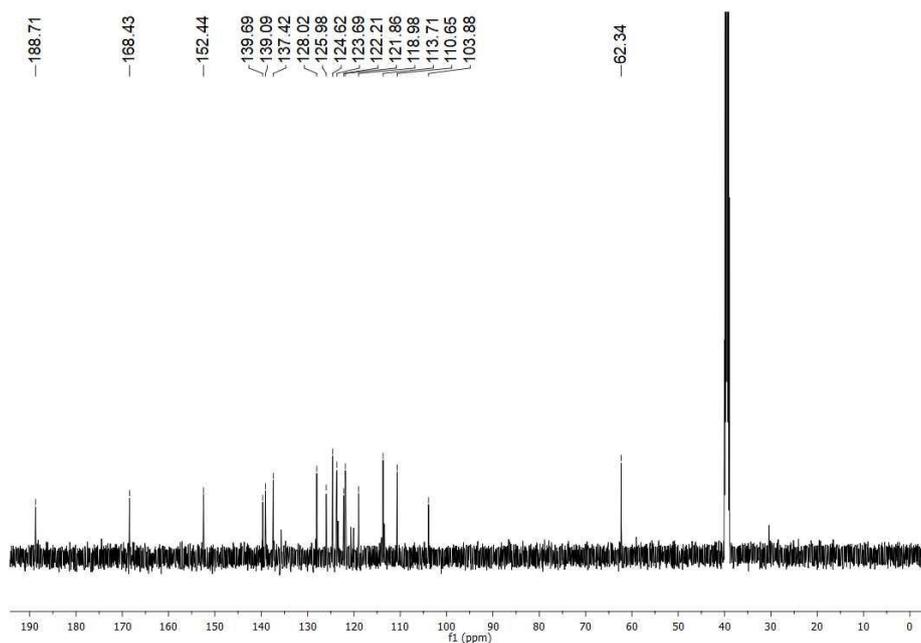
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3413; 3293; 1665; 1606; 816.



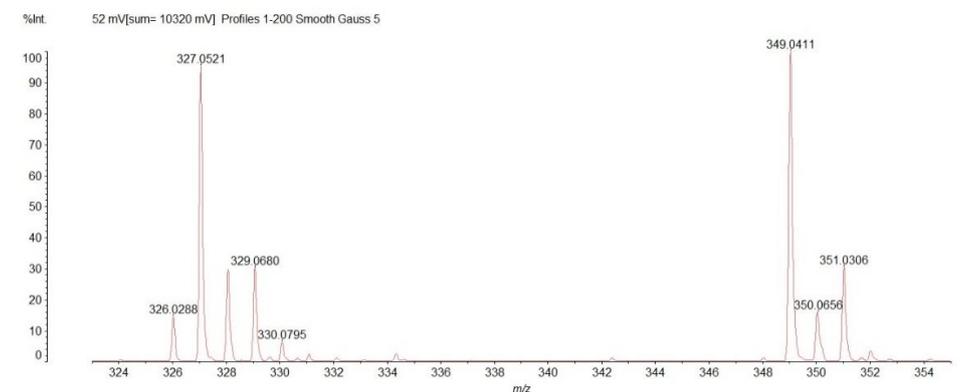
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 5,19 (2H, d, *J* = 6,0 Hz); 6,361 (1H, t, *J* = 6,0 Hz); 7,047 (1H, d, *J* = 7,5 Hz); 7,16 (1H, t, *J* = 8,5 Hz); 7,35 (1H, d, *J* = 8,5 Hz); 7,42 (1H, t, *J* = 8,0 Hz); 7,591 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,65 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 8,83 (1H, d, *J* = 2,0 Hz); 11,157 (1H, s, N-H).



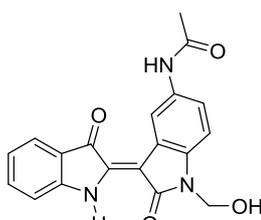
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 62,34; 103,88; 110,65; 113,71; 118,98; 121,86; 122,21; 123,69; 124,62; 125,98; 128,02; 137,42; 139,09; 139,69; 152,44; 168,43; 188,71.



LDI-TOF: $M/z[M]^+$: calculado: 326.045821; experimental: 326,0288; $[M+H]^+$: 337,0521; $[M+Na]^+$ 349,0411.

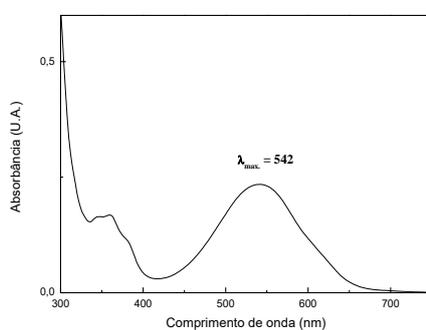


2.23 - Caracterização do composto 17d: *N*-1-hidroximetil-5-acetamido-indirubina

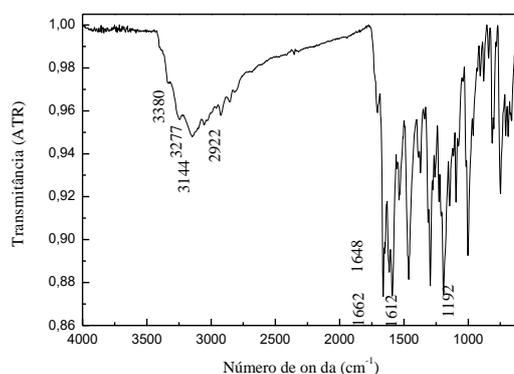


F. M.: C₁₉H₁₅N₃O₄; **M.M.:** 349 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,15 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 80%.

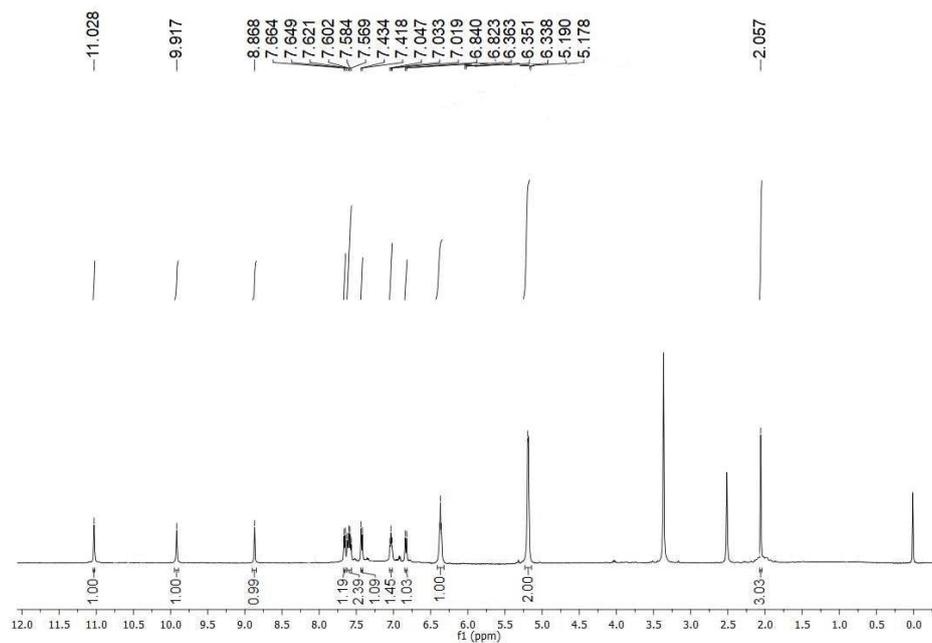
UV (EtOH), λ máx.(nm): 542.



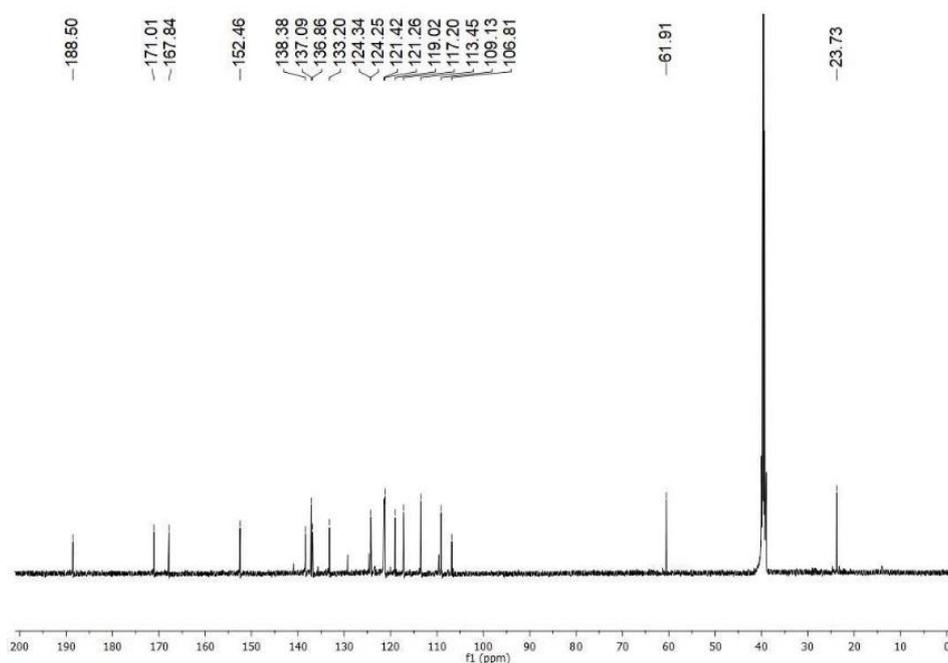
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3380; 3277; 3144; 2922; 1662; 1648; 1612; 1192.



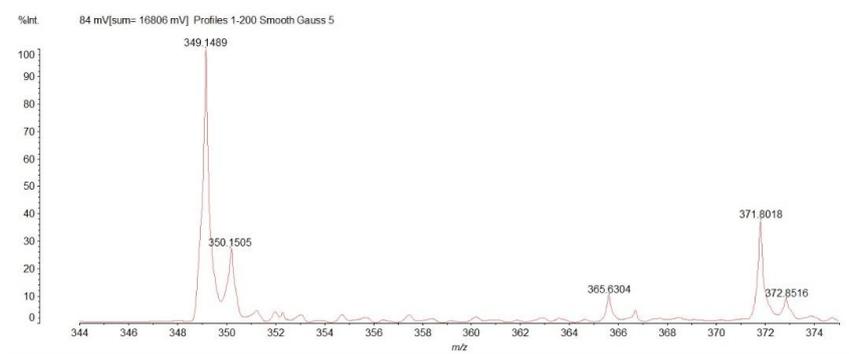
RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 2,057 (3H, s, CH₃); 5,18 (2H, d, *J* = 6,0 Hz); 6,351 (1H, t, *J* = 6,5 Hz); 6,83 (1H, d, *J* = 8,5 Hz); 7,02 (1H, t, *J* = 8,0 Hz); 7,41 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,57 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,61 (1H, t, *J* = 8,5 Hz); 7,65 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 8,868 (1H, s); 9,917 (1H, s, NH); 11,028 (1H, s, NH);



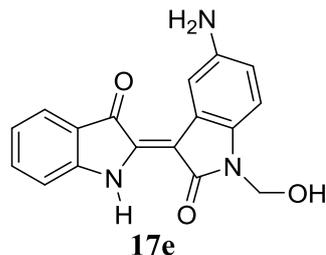
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 23,73; 61,91; 106,81; 109,13; 113,45; 117,20; 119,02; 121,26; 121,42; 124,25; 124,34; 133,20; 136,86; 137,09; 138,38; 152,46; 167,44; 171,01; 188,50.



LDI-TOF: $M/z[M]^+$: calculado: 349.106257; experimental: 349,1489; $[M+H]^+$: 350,1505; $[M+Na]^+$ 371,8018.

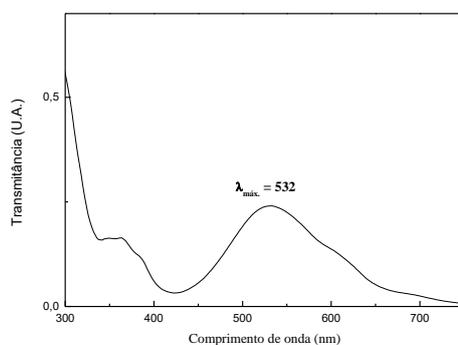


2.24 - Caracterização do composto 17e: *N*-1-hidroximetil-5-amino-indirubina

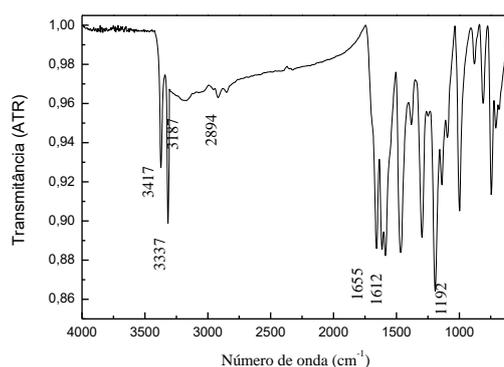


F. M.: C₁₇H₁₃N₃O₃; **M.M.:** 307 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,33 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 80%.

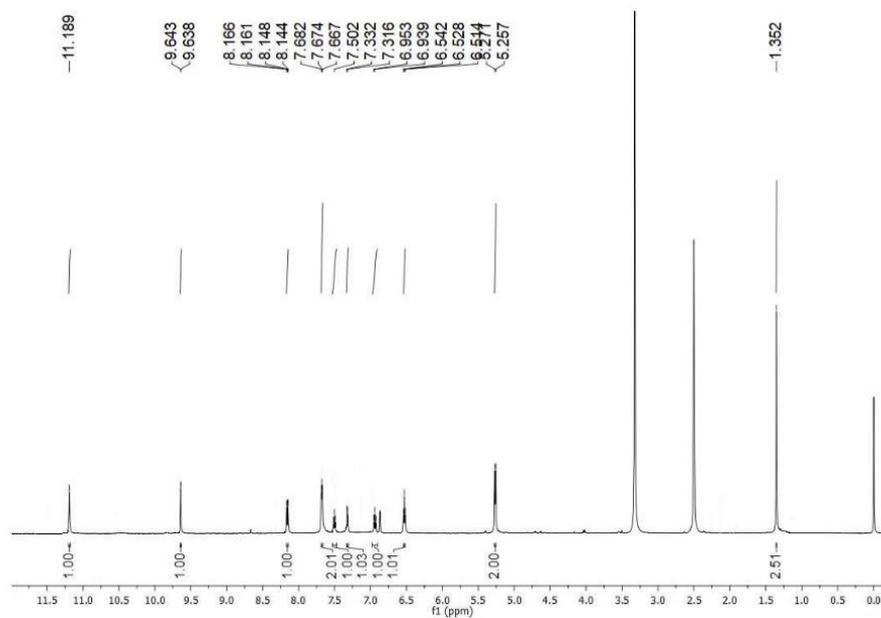
UV (EtOH), λ máx.(nm): 532.



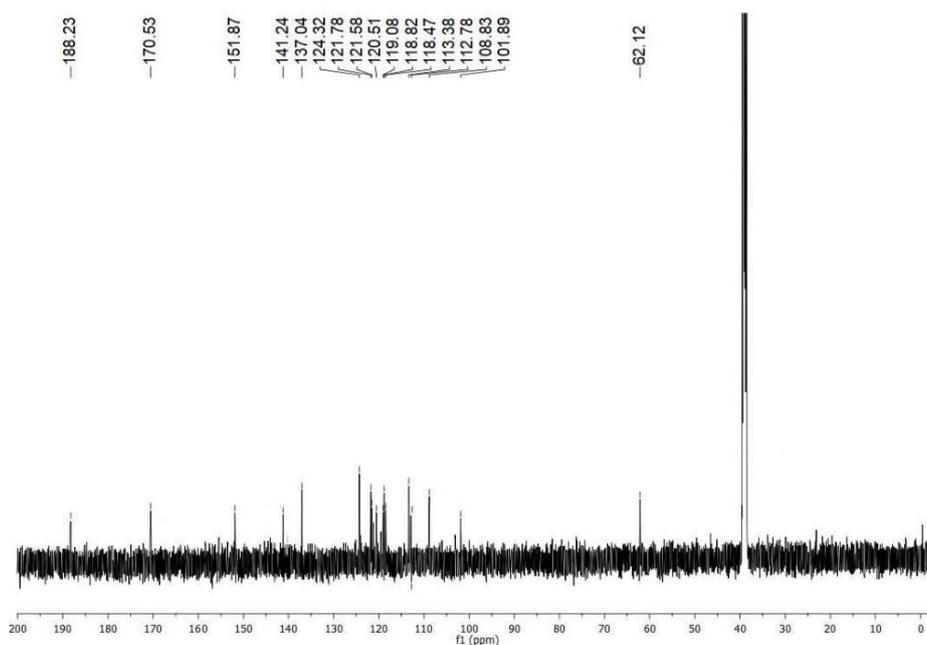
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3417; 3337; 3187; 3894; 1655; 1612; 1192.



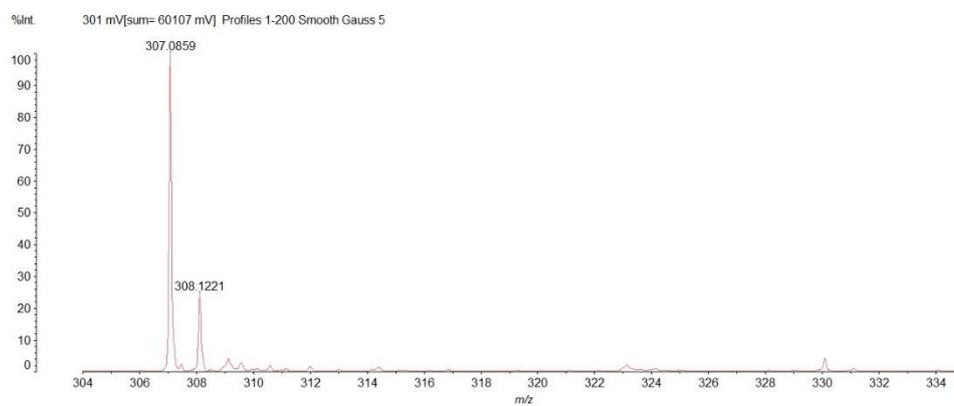
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm), multiplicidade, *J* (Hz): 5,26 (2H, d, *J* = 7,0 Hz); 6,528 (1H, t, *J* = 7,0 Hz); 6,939 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,32 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 7,502 (1H, t, *J* = 7,5 Hz); 7,674 (2H, t, *J* = 4,0 Hz); 8,15 (1H, dd, *J* = 8,0 Hz e 2,5 Hz); 9,64 (1H, d, *J* = 2,5 Hz); 11,189 (1H, s, N-H).



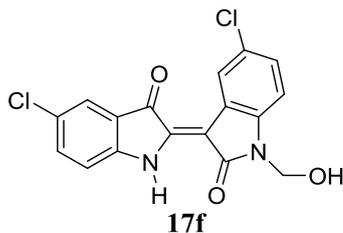
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 62,12; 101,89; 108,83; 112,78; 113,38; 118,47; 118,82; 119,08; 120,51; 121,58; 121,78; 124,32; 137,04; 141,24; 151,87; 168,53; 188,23.



LDI-TOF: $M/z[M]^+$: calculado: 307.095692; experimental: 307,0859; $[M+H]^+$: 308,1221.

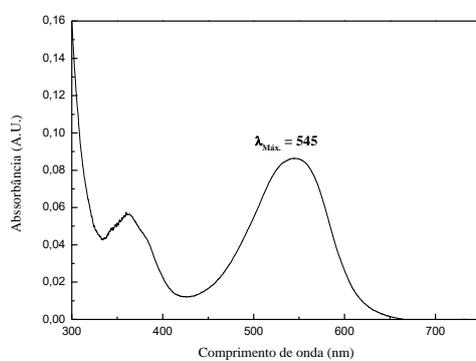


2.25 - Caracterização do composto 17f: *N*-1-hidroximetil-5,5'-dicloro-indirubina

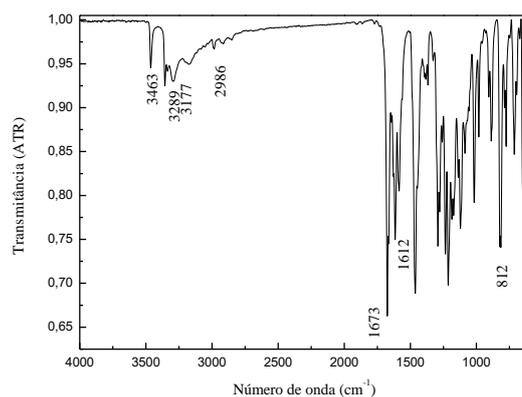


F. M.: C₁₇H₁₀Cl₂N₂O₃; **M.M.:** 360 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido roxo; **R_f:** 0,33 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 95%.

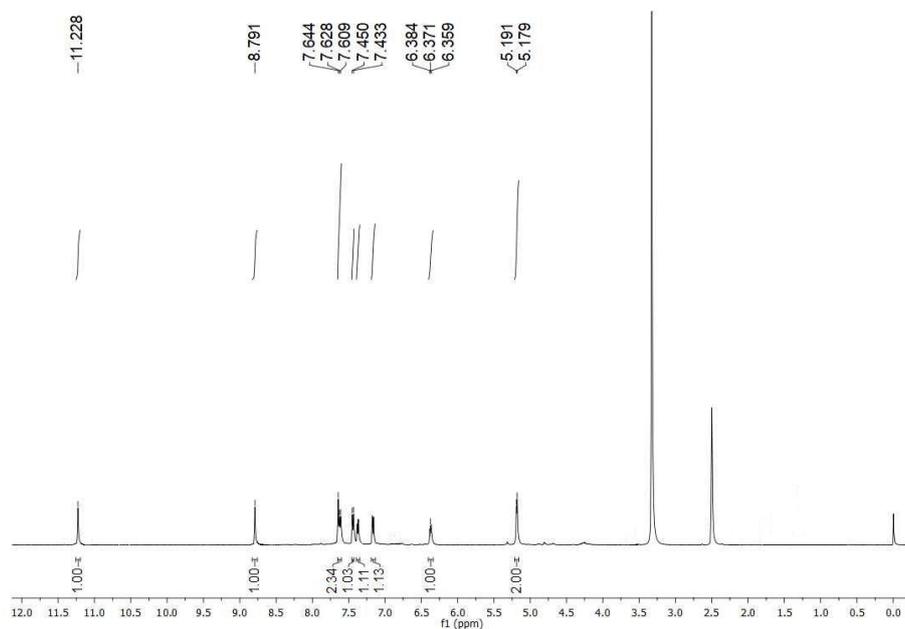
UV (EtOH), λ máx.(nm): 545.



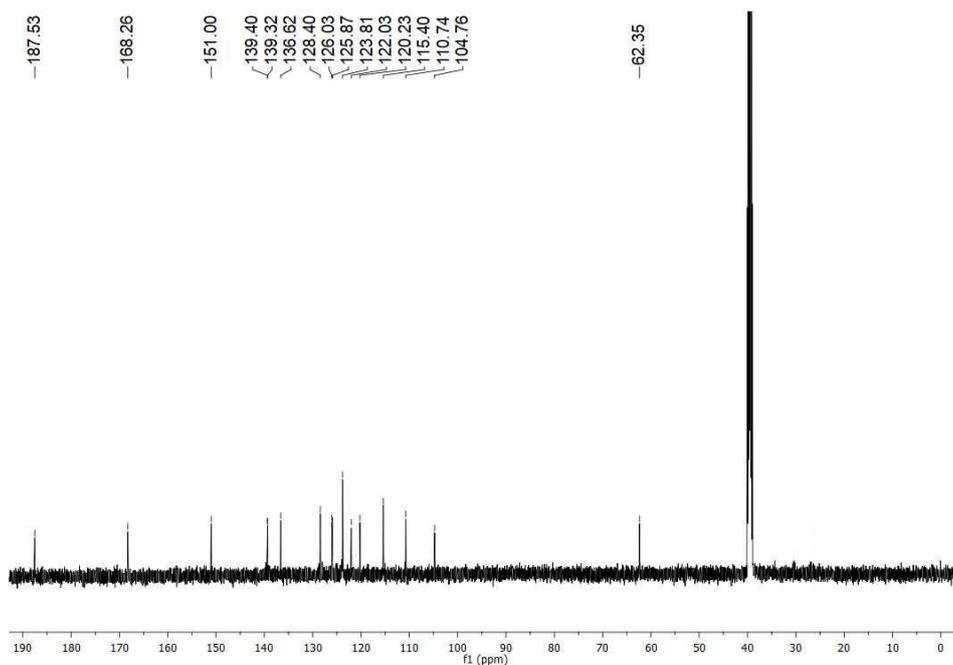
IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3463; 3289; 3177; 2986 1673; 1612; 812.



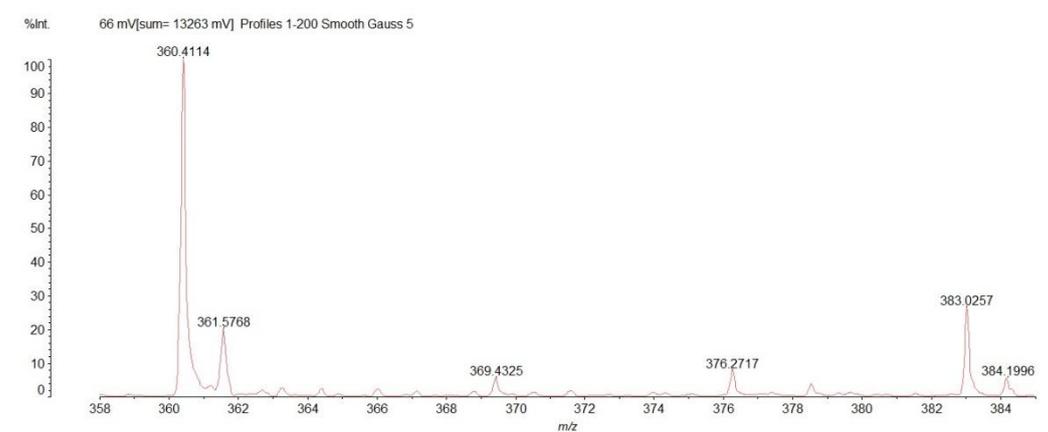
RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm), multiplicidade, J (Hz): 5,18 (2H, d, $J = 6,0$ Hz); 6,371 (1H, t, $J = 6,0$ Hz); 7,16 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 7,37 (1H, d, $J = 8,5$ Hz); 7,44 (1H, d, $J = 8,5$ Hz); 7,62 (1H, d, $J = 9,0$ Hz); 7,644 (1H, s); 8,791 (1H, s); 11,228 (1H, s, N-H).



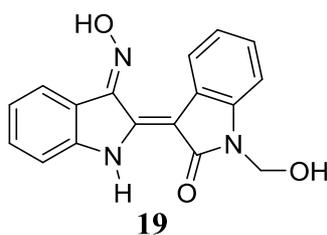
RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 62,35; 104,76; 110,74; 115,40; 120,23; 122,03; 123,81; 125,87; 126,03; 128,40; 136,62; 139,32; 139,40; 151,00; 168,26; 187,53.



LDI-TOF: $M/z[M]^+$: calculado: 360,006849; experimental: 360,4114; $[M+H]^+$: 361,5768; $[M+Na]^+$ 383,0257.



2.26 - Caracterização do composto 19: N-1-hidroximetil-indirubina-3'-oxima



F. M.: C₁₇H₁₃N₃O₃; **M.M.:** 308 g mol⁻¹; **Características físicas:** sólido vermelho; **R_f:** 0,23 (CH₂Cl₂/MeOH 98:2); **Revelador:** lâmpada de UV; **Faixa de Fusão:** >250 °C (decomposição); **Rendimento:** 90%.

UV (EtOH), λ máx.(nm): 502.

RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm), multiplicidade, J(Hz): 5,21 (2H, d, J= 6,5 Hz); 6,32 (1H, t, J= 6,5 Hz); 7,00 (1H, t, J= 7,5 Hz); 7,09 (1H, t, J= 7,5 Hz); 7,17 (1H, d, J= 8,0 Hz); 7,33 (1H, t, J= 7,50 Hz); 7,42 (1H, d, J= 7,5 Hz); 7,58 (1H, t, J= 7,5 Hz); 7,65 (1H, d, J= 7,5 Hz); 8,81 (1H, d); 11,07 (1H, s, N-H).

RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-*d*6), δ (ppm): 62,2; 105,5; 109,4; 113,5; 119,0; 120,7; 121,5; 122,0; 124,4; 129,0; 137,2; 138,8; 140,6; 152,4; 168,8; 188,5.

IV (ATR), ν (cm⁻¹): 3346; 3319; 1660; 1611; 1480, 1462; 1020.

LDI-TOF: M/z[M]⁺: calculado: 292,084793; experimental:292,1398; [M+H]⁺: 293,1521; [M+Na]⁺ 315,1169.