

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

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
ISATINA-ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS

GABRIELA XAVIER ROCHA

Seropédica, RJ

2021

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

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
ISATINA-ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS

GABRIELA XAVIER ROCHA

Sob a orientação da professora

Dra. Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

Co-orientação das professoras

Dra. Andressa Esteves de Souza dos Santos e Dra. Águida Aparecida de Oliveira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química.

Seropédica, RJ

2021

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

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

R672s Rocha, Gabriela Xavier, 1986-
SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
ISATINA-ARIL-TIOSSEMICARBAZONAS / Gabriela Xavier
Rocha. - Rio de Janeiro, 2021.
128 f.: il.

Orientadora: Aurea Echevarria Aznar Neves Lima.
Coorientadora: Andressa Esteves de Souza dos
Santos.
Coorientadora: Águida Aparecida de Oliveira .
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Química, 2021.

1. Síntese Orgânica. 2. Tiossemicarbazonas. 3.
Antifúngicos. 4. Química Medicinal e Biológica. I.
Lima, Aurea Echevarria Aznar Neves, 1950-, orient.
II. Santos, Andressa Esteves de Souza dos , 1975-,
coorient. III. Oliveira , Águida Aparecida de, 1984-,
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Química. V. Título.

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

GABRIELA XAVIER ROCHA

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/12/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento (s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima
(Dr^a.) UFRRJ (Orientadora)

Maria Aparecida Medeiros Maciel
(Dr^a.) UFRN

Marco Edilson Freire de Lima
(Dr.) UFFRJ



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
SISTEMA INTEGRADO DE PATRIMÔNIO, ADMINISTRAÇÃO E
CONTRATOS

FOLHA DE ASSINATURAS

Emitido em 2021

TERMO Nº 1371/2021 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 30/12/2021 09:34)
AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matricula: 387189

(Assinado digitalmente em 30/12/2021 09:07)
MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matricula: 1058758

(Assinado digitalmente em 03/01/2022 11:43)
MARIA APARECIDA MEDEIROS MACIEL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 373.201.654-49

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número:
1371, ano: **2021**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **30/12/2021** e o código de verificação: **53e7239553**

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me amparou, me deu ânimo, perseverança e me permitiu chegar até aqui, vencendo e ultrapassando cada obstáculo. Para que eu pudesse adquirir conhecimento e me aprimorar como pessoa e profissional.

Aos meus pais, Marcia e Edson, que estiveram ao meu lado, apoiando e torcendo pelo sucesso de mais um ciclo que eu optei por iniciar.

A UFRRJ, instituição em que trabalho, que me possibilitou desenvolver a pós-graduação concomitantemente com meu exercício.

Aos professores desta Instituição, principalmente aos alocados no Departamento de Química Orgânica, que além de fazerem parte do quadro docente deste Programa, também são meus colegas de trabalho, e compreenderam cada vez que necessitei utilizar meu horário para realizar alguma atividade do Mestrado, além de sanarem minhas dúvidas referentes às disciplinas.

Gostaria de agradecer aos alunos pertencentes ao laboratório do meu grupo de pesquisa, que contribuíram enriquecendo meu aprendizado.

Em especial agradecer aos meus amigos Igor e Victor que fiz na pós-graduação, os quais estiveram ao meu lado me dando forças, e ajudando em cada dúvida que eu tinha. E a minha amiga e companheira de trabalho e estudos Érica que trilhou todo o caminho comigo.

Às minhas orientadoras, Aurea, que sempre me apoiou, me escolheu e acreditou em mim, entendendo cada dificuldade e o tempo limitado de dedicação que eu tive, ela esteve ao meu lado me dando todo suporte e me mostrando que eu era capaz. À Andressa que me deu suporte em toda minha jornada, me incentivando e apoiando. E Águida que me deu toda ajuda quando precisei e acreditou em mim, me possibilitando ter um aprendizado ainda maior.

Enfim, a todos que de alguma forma direta ou não contribuíram para que eu pudesse chegar até o encerramento de mais um ciclo na vida. Muito obrigada!

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

Lista de Tabelas

Tabela 1: Pontos de fusão, rendimentos e aparência física das tiossemicarbazonas 4-substituídas...	47
Tabela 2: Pontos de fusão, rendimentos e aparência física das tiossemicarbazonas 3-substituídas...	49
Tabela 3: Principais bandas de absorção (cm^{-1}) observadas nos espectros de infravermelho para as tiossemicarbazonas 4-substituídas sintetizadas.	51
Tabela 4: Principais bandas de absorção (cm^{-1}) observadas nos espectros de infravermelho para as tiossemicarbazonas <i>m</i> -substituídas sintetizadas.	52
Tabela 5: Rendimentos, pontos de fusão e aparência física das isatina- <i>p</i> -tiossemicarbazonas (ISATIO-X) sintetizadas.	53
Tabela 6: Rendimentos, pontos de fusão e aparência física das isatina- <i>m</i> -X-tiossemicarbazonas (ISATIO-X) sintetizadas.	55
Tabela 7: Principais bandas de absorção, em cm^{-1} , observados nos espectros de Infravermelho para as isatina- <i>p</i> -X-tiossemicarbazonas (ISATIO-4-X).....	57
Tabela 8: Principais bandas de absorção, em cm^{-1} , observados nos espectros de Infravermelho para as isatina- <i>aril</i> - <i>m</i> -X-tiossemicarbazonas (ISATIO-3-X).	58
Tabela 9: Deslocamentos químicos (δ) para os principais hidrogênios, em ppm, das isatina- <i>aril</i> -4-X-tiossemicarbazonas (ISATIO-4-X).	59
Tabela 10: Deslocamentos químicos (δ) para os principais hidrogênios, em ppm, das isatina- <i>aril</i> -3-X-tiossemicarbazonas (ISATIO-3-X).	60
Tabela 11: Deslocamentos químicos (δ) para os principais carbonos, em ppm, das isatina- <i>aril</i> -4-X-tiossemicarbazonas (ISATIO-4-X).	61
Tabela 12: Deslocamentos químicos (δ) para os principais carbonos, em ppm, das isatina- <i>aril</i> -3-X-tiossemicarbazonas (ISATIO-3-X).	62
Tabela 13: Valores obtidos do diâmetro de crescimento do halo do <i>A. parasiticus</i> no tratamento nas concentrações de 62,5 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ nos ensaios das isatina-tiossemicarbazonas.	65
Tabela 14: Valores do percentual de Inibição do Crescimento do halo do <i>A. parasiticus</i> nas concentrações testadas.	67
Tabela 15: Valores da Concentração Mínima Inibitória (MIC) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente ao <i>S. spp.</i> para as isatina-tiossemicarbazonas.	74

Lista de Figuras

Figura 1: Amplo espectro de atividades biológicas apresentadas por derivados de aril-tiossemicarbazonas e isatina (FERNANDES, 2017; MAIA et al., 2010; JARAPULA et al., 2016)	15
Figura 2: Formação e estrutura geral de tiossemicarbazonas (TENÓRIO, 2005).	17
Figura 3: Formas tautoméricas da tiossemicarbazona (BITTENCOURT, 2016).	17
Figura 4: Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas (TENÓRIO; GÓES, 2005).....	18
Figura 5: Retrossíntese da obtenção de tiossemicarbazonas a partir de hidrazinas e reagentes eletrofílicos (TENÓRIO; GÓES, 2005).....	19
Figura 6: Estrutura química da isatina e possibilidades sintéticas. (MARTINEZ; FERREIRA, 2017)	20
Figura 7: Obtenção da Isatina pela oxidação do índigo (PHOGAT; SINGH, 2015).....	21
Figura 8: Obtenção da isatina pelo método de Sandmeyer (PHOGAT; SINGH, 2015).....	21
Figura 9: Obtenção da Isatina pelo método de Stolle (STOLLE, 1914; LOLOIU <i>et al.</i> , 1997)	21
Figura 10: Obtenção da Isatina pelo método de Martinet (TAYLOR, 1980).....	22
Figura 11: Tipos de hibridização molecular (ARAUJO <i>et al.</i> ,2015)	23
Figura 12: Possibilidades de hibridização molecular (MASS, 2017)	24
Figura 13: Colônias de espécies do gênero <i>Aspergillus</i> (Al-Hmoud <i>et al.</i> , 2012).	26
Figura 14: Colônia da espécie <i>Sporothrix schenkii</i> (Tomazi, 2018).....	27
Figura 15: Estrutura química dos fungicidas: equinocandinas, polienos e triazol, respectivamente ...	28
Figura 16: Estrutura química dos fungistáticos: griseofulvinas e flucitosinas, respectivamente	28
Figura 17: a) Adição dos produtos ao meio de cultura; b) Soluções prontas vertidas nas placas; c) Placas no primeiro dia de análise; d) Crescimento radial do halo; e) Placas de um dos produtos no último dia de análise. Fonte: acervo pessoal.	42
Figura 18: a) Preparação das placas 96 poços; b) Placas com o meio RPMI adicionado em cada poço; c) Placa com os produtos; agentes antifúngicos e inóculo adicionado; d) Placa depois de 48h. Fonte: acervo pessoal.	44
Figura 19: Espectro de UV/Vis do EDTA ($1,60 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹) e com EDTA Fe ⁺² ($1,60 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹).....	45

Figura 20: Rota sintética empregada na obtenção das isatina-tiossemicarbazonas	46
Figura 21: Imagem do aspecto físico de algumas tiossemicarbazonas p-substituídas obtidas: 4-trifluor (a); 4-hidroxi (b); 4-fluor (c); 4-dimetilamino (d); não substituído (e); 4-metil (f); 4-nitro (g). Fonte: acervo pessoal.	48
Figura 22: Imagem do aspecto físico de algumas tiossemicarbazonas m-substituídas obtidas: 3-bromo (a); 3-cloro (b); 3-fluor (c); 3- hidroxi (d); 3-metóxi (e). Fonte: acervo pessoal.	49
Figura 23: Mecanismo de formação da tiossemicarbazona em meio ácido (adaptado TENÓRIO; GOES, 2005).....	50
Figura 24: Imagem das isatina-p-X-tiossemicarbazonas formadas: 4-bromo (a); 4-cloro (b); 4-metóxi (c); 4-trifluor (d); 4-hidroxi (e); 4-fluor (f); 4-dimetilamino (g); não-substituída (h); 4-metil (i); 4-nitro (j). Fonte: acervo pessoal.	54
Figura 25: Imagem das isatina-m-X-tiossemicarbazonas formadas: 3-nitro (a); 3-bromo (b); 3-cloro (c); 3-fluor (d); 3- hidroxi (e); 3-metóxi (f); 3-trifluormetil (g); 3-metil (h). Fonte: acervo pessoal.	55
Figura 26: Mecanismo sugerido para a formação do híbrido isatina-tiossemicarbazona em meio de ácido acético.....	56
Figura 27: Imagem da lâmina preparada do <i>Aspergillus parasiticus</i> utilizado no ensaio. Fonte: acervo pessoal.....	64
Figura 28: Controle negativo do ensaio de crescimento radial em temperatura média de 29°C. Fonte: acervo pessoal.	64
Figura 29: Gráfico da comparação percentual do crescimento dos halos na concentração de 250µg.mL ⁻¹ das isatina-tiossemicarbazonas 4-substituídas com o controle negativo frente ao <i>A. parasiticus</i>	68
Figura 30: Gráfico da comparação percentual do crescimento dos halos na concentração de 250µg.mL ⁻¹ das isatina-tiossemicarbazonas 3-substituídas com o controle negativo frente ao <i>A. parasiticus</i>	68
Figura 31: Representação do resultado dos produtos: ISATIO-4-Cl (a); ISATIO-4-CH ₃ (b); ISATIO-4-CF ₃ (c). Fonte: acervo pessoal.	69
Figura 32: Representação do resultado dos produtos: ISATIO-3-Cl (d); ISATIO-3-CF ₃ (e). Fonte: acervo pessoal.	69
Figura 33: Gráficos do ensaio do Crescimento Radial dos produtos: ISATIO-H; ISATIO-N(CH ₃) ₂ , ISATIO-CH ₃ , ISATIO-OH respectivamente	70
Figura 34: Gráficos do ensaio do Crescimento Radial dos produtos: ISATIO-F; ISATIO-Cl, ISATIO-Br respectivamente.....	71
Figura 35: Gráficos do ensaio do Crescimento Radial dos produtos: ISATIO-CH ₃ ; ISATIO-NO ₂ , ISATIO-CF ₃ respectivamente	72

- Figura 36: Imagem da lâmina preparada do *Sporothrix spp* utilizado no ensaio. Fonte: acervo pessoal. 73
- Figura 37: Imagem de uma parte da placa utilizada para realizar o MIC, onde os primeiros poços não foram visualizados o desenvolvimento *Sporothrix* diferente dos demais que apresentam turvação. Fonte: acervo pessoal. 74
- Figura 38: Representação das placas de 96 poços de um dos ensaios do MIC. Fonte: acervo pessoal. 75
- Figura 39: Gráfico que representa o percentual de inibição do crescimento do halo para as isatina-tiossemicarbazonas com substituintes nas posições para e meta na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 76
- Figura 40: Gráfico que representa o percentual de inibição do crescimento do para as isatina-tiossemicarbazonas com substituintes nas posições para e meta na concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 77
- Figura 41: Gráfico do MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) x substituintes nas posições 3 e 4 das isatina-tiossemicarbazonas frente ao *Sporothrix spp* 77
- Figura 42: Sobreposição ISATIO-4-Cl ($4,15 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-Cl ($4,15 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($4,15 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$). 78
- Figura 43: Sobreposição ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$); sobreposição ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($4,00 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$). 79
- Figura 44: Sobreposição ISATIO-3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$); sobreposição ISATIO-3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO 3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($4,53 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$). 79
- Figura 45: Sobreposição ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$); sobreposição ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($1,23 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$). 80

Lista de abreviaturas

MIC: Concentração Mínima Inibitória.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

Linker: sítio de interação entre os fármacos.

Sporothrix spp.: espécies do complexo do gênero *Sporothrix*.

S. schenckii: *Sporothrix schenckii*.

A. parasiticus: *Aspergillus parasiticus*.

TIO-X: intermediários sintetizados – tiossemicarbazonas.

ISATIO-X: produtos sintetizados – híbridos isatina-tiossemicarbazona.

MEA: Ágar extrato de malte.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute – meio de cultura produzido neste Instituto.

RPMI-1640: meio de cultura composto por Glicose, vermelho de fenol, NaCl, NaHCO₃, Na₂PO₄, KCl, MgSO₄, Ca(NO₃)₂.

RESUMO

Compostos híbridos como isatina-tiossemicarbazonas, encontram-se na literatura, como substâncias com grande potencial biológico; tais como antibacteriana, antitumoral, antifúngica, entre outras. No entanto, diversos são os procedimentos pelos quais a isatina e as tiossemicarbazonas são combinadas para sintetizar os produtos híbridos desejados. Neste trabalho, foram sintetizados 18 (dezoito) precursores 4-X-fenil-tiossemicarbazonas e 3-X-fenil-tiossemicarbazonas com diferentes substituintes no anel aromático, onde X =H, Cl, Br, F, OCH₃, N(CH₃)₂, OH, CF₃, CH₃, NO₂. Posteriormente, 18 (dezoito) derivados híbridos inéditos foram obtidos através da reação destas tiossemicarbazonas com a isatina. Todos os compostos foram devidamente caracterizados através de técnicas espectroscópicas de rotina, as tiossemicarbazonas somente com IV, pois suas estruturas estão descritas na literatura, e os produtos finais inéditos através das técnicas de IV, RMN ¹H e ¹³C. As isatina-tiossemicarbazonas foram ensaiadas frente à atividade antifúngica, através das técnicas do Crescimento Radial com *Aspergillus parasiticus* e de Crescimento Mínimo Inibitório (MIC) com *Sporothrix schenkii*, mostrando resultados bastante satisfatórios. A investigação da correlação estrutura-atividade foi realizada utilizando dados dos efeitos eletrônicos e hidrofóbicos das moléculas sintetizadas. Por fim, os produtos finais foram investigados quanto ao seu efeito quelante junto aos íons de ferro (II).

Palavras-chave: Isatina, atividade antifúngica, efeitos eletrônicos.

ABSTRACT

Hybrid compounds such as isatin-thiosemicarbazones are found in the literature as substances with great biological potential, such as antibacterial, antitumor, antifungal, among others. However, there are several procedures by which isatin and thiosemicarbazones are combined to synthesize the desired hybrid products. In this work, 18 (eighteen) precursors 4-X-phenyl-thiosemicarbazones and 3-X-phenyl-thiosemicarbazones with different substituents on the aromatic ring were synthesized, where X =H, Cl, Br, F, OCH₃, N(CH₃)₂, OH, CF₃, CH₃, NO₂. Subsequently, 18 (eighteen) new hybrid derivatives were obtained through the reaction of these thiosemicarbazones with isatin. All compounds were properly characterized through routine spectroscopic techniques, the thiosemicarbazones only with IR, as their structures are described in the literature, and the final products were unpublished through the techniques of IR, ¹H and ¹³C NMR. Isatin-thiosemicarbazones were tested for antifungal activity, using the Radial Growth techniques with *Aspergillus parasiticus* and Minimum Inhibitory Growth (MIC) with *Sporothrix schenkii*, showing very satisfactory results. The investigation of the structure-activity correlation was carried out using data from the electronic and hydrophobic effects of the synthesized molecules. Finally, the final products were investigated for their chelating effect with iron (II) ions.

Keywords: Isatin, antifungal activity, electronic effects.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	13
2 Revisão de Literatura	17
2.1 Tiossemicarbazona	17
2.2 Isatina	19
2.3 Hibridização Molecular	23
2.4 Fungos: crescimento e inibição.	25
2.4.1. O gênero <i>Aspergillus</i>	26
2.4.2. O gênero <i>Sporothrix</i>	26
2.4.3. Resistência aos agentes antifúngicos.	27
3 Objetivos.....	30
3.1 Objetivo Geral.	30
3.2 Objetivo Específico	30
4 Materiais e Métodos.	31
4.1 Equipamentos e Materiais.	31
4.1.1 Equipamentos utilizados na caracterização dos compostos.....	31
4.1.2 Equipamentos utilizados na síntese dos compostos.....	31
4.1.3 Reagentes, solventes e materiais utilizados na síntese e análise	31
4.2 Procedimentos de síntese	32
4.2.1 Síntese das aril-tiossemicarbazonas.	32
4.2.1.1 Caracterização dos intermediários aril-tiossemicarbazonas <i>p</i> -substituídas	32
4.2.1.2 Caracterização dos intermediários aril-tiossemicarbazonas <i>m</i> -substituídas	34
4.2.2 Síntese dos híbridos isatina-aril-tiossemicarbazonas.	36
4.2.2.1 Caracterização das isatina-aril- <i>p</i> -tiossemicarbazonas.	36
4.2.2.2 Caracterização das isatina-aril- <i>m</i> -tiossemicarbazonas.	39
4.3 Procedimentos para análise de Atividade Antifúngica	41
4.3.1 Inibição do Crescimento radial em placa de Petri.	41
4.3.2 Concentração Inibitória Mínima através do ensaio de microdiluição.	42

4.4 Estudo das correlações entre a Estrutura Química X Atividade Antifúngica	44
4.5 Determinação da Atividade Quelante	44
5. Resultados e Discussão.	46
5.1 Obtenção e caracterização das aril-tiossemicarbazonas.	47
5.2 Obtenção e caracterização dos híbridos isatina-tiossemicarbazonas.	52
5.3 Caracterização dos ensaios de Atividade Antifúngica	64
5.3.1 Resultados dos ensaios de inibição do crescimento radial em placa de Petri frente ao <i>Aspergillus parasiticus</i>	64
5.3.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC) frente ao fungo <i>Sporothrix schenkii</i> através da microdiluição	73
5.4 Correlações entre a estrutura química das isatina-tiossemicarbazonas contra os efeitos antifúngicos.....	75
5.5 Avaliação da Atividade Quelante	78
6 Conclusões	81
7 Referências Bibliográficas.	82

1 INTRODUÇÃO

A busca por moléculas que possuem alguma propriedade biológica tem cada vez mais importância, e tem sido muito realizada a partir de compostos que apresentam atividade biológica já conhecida e descrita na literatura.

Estas moléculas, consideradas por parte dos pesquisadores como estruturas moleculares privilegiadas, seriam, esqueletos moleculares com propriedades versáteis de ligação, de tal modo que um único grupamento é capaz de proporcionar ligantes potentes e seletivos para uma gama de diferentes alvos biológicos através das suas modificações.

Como definida por DeSimone e colaboradores, essas estruturas são andaimes moleculares com propriedades de ligação versáteis, de modo que um único andaime é capaz de fornecer ligantes potentes e seletivos para uma variedade de diferentes alvos biológicos através da modificação de grupos funcionais. Além disso, normalmente exibem boas propriedades semelhantes a moléculas ativas, o que, por sua vez, leva a mais bibliotecas e *leads* de compostos semelhantes a essas moléculas. O resultado líquido é a produção de *leads* de alta qualidade que fornecem uma base sólida para um maior desenvolvimento. A identificação de estruturas privilegiadas é discutida, enfatizando a importância de compreender as relações estrutura-alvo que conferem status “privilegiado”. Esse entendimento permite que bibliotecas baseadas em estrutura privilegiada sejam direcionadas a famílias alvo distintas (por exemplo, GPCRs, LGIC, enzimas/quinasas) (DESIMONE *et al.*, 2004).

Muitos fármacos contêm estruturas privilegiadas, como relatado por Duarte e colaboradores, que as define como estruturas moleculares capazes de fornecer ligantes úteis para mais de um tipo de receptor ou enzima alvo por meio de modificações estruturais criteriosas (DUARTE *et al.*, 2007).

Com isso, tornam-se necessárias novas pesquisas para explorar a atividade de substâncias com provável potencial biológico, que podem se tornar protótipos para novos fármacos visando tratamentos mais eficazes para as doenças causadas por microrganismos.

Considerando as enfermidades causadas; o aparecimento de novas doenças devido a novas cepas de fungos, bactérias e vírus; além de novas linhagens tumorais, e com a resistência aos medicamentos já existentes, encontram-se assim, motivos para que haja necessidade de síntese de novas substâncias como alternativa para o tratamento dessas doenças. E assim, melhorar a qualidade de vida da população e contribuir com a diminuição dos grandes distúrbios ambientais provocados pelo uso de substâncias nocivas (OLIVEIRA, 2010).

As tiossemicarbazonas são exemplos de alvos importantes nas pesquisas de geração de novos fármacos, devido ao seu largo espectro de ação biológica. Muitos autores atribuem esta característica

à alta afinidade com a enzima ribonucleotídeo redutase, fundamental na síntese do DNA e na divisão celular; suas propriedades biológicas também são atribuídas à capacidade de formar complexos com cátions metálicos (TENÓRIO; GÓES, 2005; SANTOS, 2017).

As tiossemicarbazonas apresentam vários átomos doadores de elétrons e diferentes modos de coordenação, dependendo dos reagentes de partida e das condições de reação para sua obtenção. Os derivados de tiossemicarbazonas são ótimos ligantes frente a metais de transição devido ao comportamento ácido do grupo NH imínico, quando em meio ácido, que uma vez desprotonado, provoca a deslocalização de carga ao longo da cadeia originando um ligante aniônico (TENÓRIO; GÓES, 2005; SANTOS, 2017).

Citando algumas propriedades farmacológicas das tiossemicarbazonas, temos as atividades antituberculostática (frente a *Mycobacterium tuberculosis*) e citotóxica (frente a linhagem celular MDA-MB-231 de câncer de mama) de tiossemicarbazonas e seus complexos de paládio (II) que foram avaliados em 2010. Os compostos testados 2-acetilpiridina-tiossemicarbazona, 2-acetilpiridina-N(4)-metil-tiossemicarbazona e 2-acetilpiridina-N(4)-fenil-tiossemicarbazona e seus respectivos complexos apresentaram moderada atividade antituberculostática em comparação com o fármaco isoniazida, porém, excelente atividade citotóxica (MAIA *et al.*, 2010).

Em 2014, Xie e colaboradores sintetizaram uma série inédita de tiossemicarbazonas e avaliaram *in vitro* a atividade citotóxica frente às linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama), HCT-116 (câncer de cólon) e BEL-7402 (câncer de fígado). A maioria dos compostos apresentaram atividade citotóxica, com destaque para o composto (Z)-5,6-di(p-cloroanilino)-piridina-2,3-diona-3-tiossemicarbazona.

Em relação às propriedades da isatina, esta molécula possui uma gama de ações, como inibição do SNC-MAO, atividades anticonvulsivantes e ansiogênicas. Seu efeito como uma monoaminoxidase (MAO) inibidor é a ação *in vitro* mais potente registrada até o momento. É um inibidor seletivo da MAO B com concentração inibitória (IC₅₀) de cerca de 3 µg.mL⁻¹ (PANDEYA *et al.*, 2005).

Recentemente, uma série de novas bases de Schiff derivadas da isatina contendo o grupo hidroxibenzidrazida apresentaram atividade anti-inflamatória. Os resultados mostraram que tais compostos possuem significativa seletividade frente a Ciclo-oxigenases 2 (COX 2). O estudo de docking molecular, comparou tais bases de Schiff com os fármacos de referência seletivos a COX 2 e mostrou a relação estrutura- seletividade COX 1 e 2. Nestes estudos, utilizou-se bases de Schiff híbridas, que contém um grupo farmacofórico derivado da isatina e outro derivado da benzidrazida

hidroxilada no anel aromático. Dentre as descobertas, destacou-se aquelas em que as moléculas bromadas e cloradas apresentaram maior atividade anti-inflamatória (JARAPULA et al., 2016).

Nesta perspectiva, compostos híbridos isatinas-tiossemicarbazonas têm sido sintetizados e apresentados na literatura como potencializadores das atividades antiviral, anticâncer, anti-inflamatória, de inibição enzimática, entre outras, associadas ao núcleo isatina (FERNANDES, 2017; SONG et al., 2020; MAIA *et al.*, 2010; JARAPULA et al., 2016).

Esse amplo espectro de atividades biológicas (Figura 1) tem sido facilitado pela versatilidade sintética da isatina, e da tiossemicarbazona que permitiram a obtenção de muitos derivados estruturalmente diversos. A isatina interage de maneira reversível com muitos alvos biológicos conhecidos, entre eles, várias proteínas vitais para a sobrevivência celular. Esta característica pode influenciar o modo de interação das proteínas de ligação com as estruturas citoesqueléticas (FERNANDES, 2017). E as tiossemicarbazonas com afinidade à ribonucleotídeo redutase e capacidade de formar complexos, também é um potencial biológico (SANTOS, 2017).

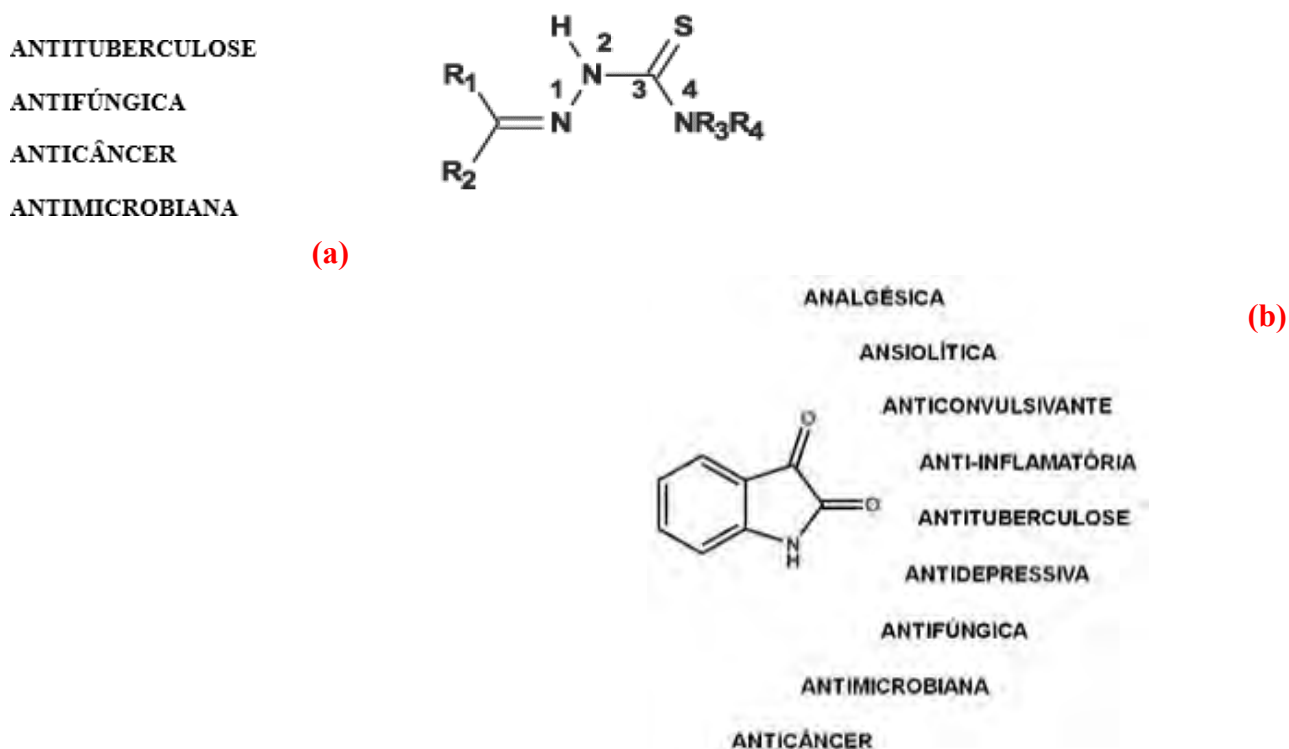


Figura 1: Amplo espectro de atividades biológicas apresentadas por derivados de aril-tiossemicarbazonas (a) e isatina (b) (FERNANDES, 2017; MAIA et al., 2010; JARAPULA et al., 2016)

Considerando que a literatura reporta que algumas tiossemicarbazonas, isatinas e compostos com estruturas análogas têm aplicação na síntese de fármacos e ou intermediários destes, com potencial atividade biológica, o estudo de novas rotas de obtenção destes compostos apresentam grande relevância no preparo de fármacos.

Frente a esses aspectos, este trabalho teve como objetivo sintetizar novos compostos, através da técnica de hibridação molecular, associando as tiossemicarbazonas e a isatina, considerando os efeitos biológicos já conhecidos, resultantes desses grupos farmacofóricos, visando atividade antifúngica para as novas moléculas híbridas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tiossemicarbazonas

São compostos derivados da reação de condensação quimiosseletiva da tiossemicarbazida com aldeídos e cetonas (Figura 2), cuja classe de moléculas ocupa lugar importante entre os ligantes orgânicos, por apresentar átomos doadores de elétrons e diferentes modos de coordenação, a depender dos reagentes utilizados para sua síntese (SANTOS *et al.*, 2017).

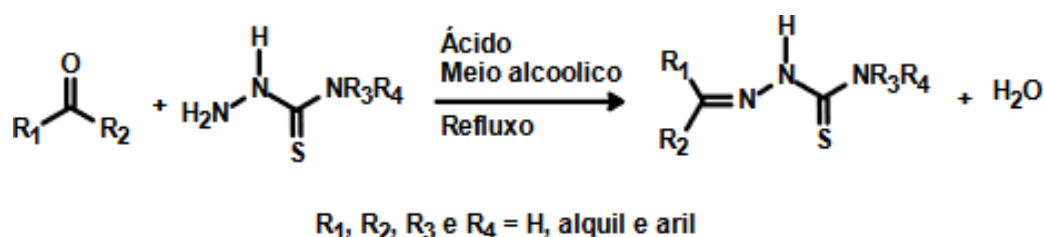


Figura 2: Formação e estrutura geral de tiossemicarbazonas (TENÓRIO, 2005).

Observando-se a Figura 2, quando o R_3 e R_4 se apresentam como hidrogênio, ou seja, não há substituinte ligado ao N-4, a tiossemicarbazona se caracteriza como uma estrutura planar, com o átomo de enxofre que está ligado ao C-3 em posição *anti* em relação ao nitrogênio imínico. Este fato possibilita a formação de ligação de hidrogênio entre o N-4 e os hidrogênios da tioamida. Porém, a presença de substituintes no lugar de R_3 ou R_4 favorece a conformação *sin*, entre o enxofre e o nitrogênio imínico (TENÓRIO; GÓES, 2005).

No estado sólido, as tiossemicarbazonas podem existir na forma tiona, enquanto no estado líquido na forma tiol. Em solução, desprotonadas, as tiossemicarbazonas apresentam extensa deslocalização eletrônica e, por conta disso, essas moléculas podem coexistir na forma tiona ou tiol, em equilíbrio tautomérico, conforme observado na Figura 3 (BITTENCOURT, 2016).

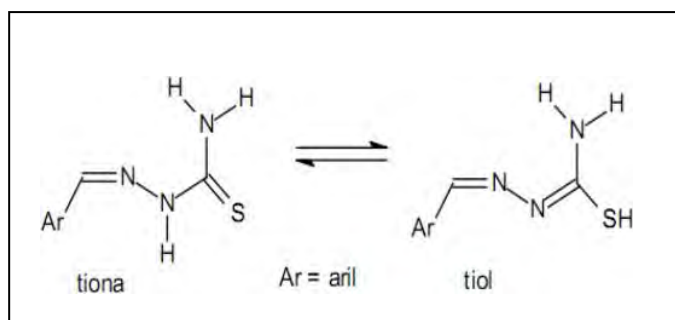


Figura 3: Formas tautoméricas da tiossemicarbazona (BITTENCOURT, 2016).

Na obtenção da tiossemicarbazona a partir do aldeído e a tiossemicarbazida em presença de meio ácido, o mecanismo, proposto por Tenório e Góes (Figura 4), ocorre com a protonação do oxigênio da carbonila do aldeído para formar o intermediário íon oxônio, seguida de ataque nucleofílico do nitrogênio N-1 da tiossemicarbazida para formação do intermediário hemiaminal protonado, que perde uma molécula de água, ocorrendo a formação da ligação imina, formando a tiossemicarbazona. Nesta metodologia utiliza-se como solvente o etanol e quantidades catalíticas de ácido mineral (TENÓRIO; GOES, 2005).

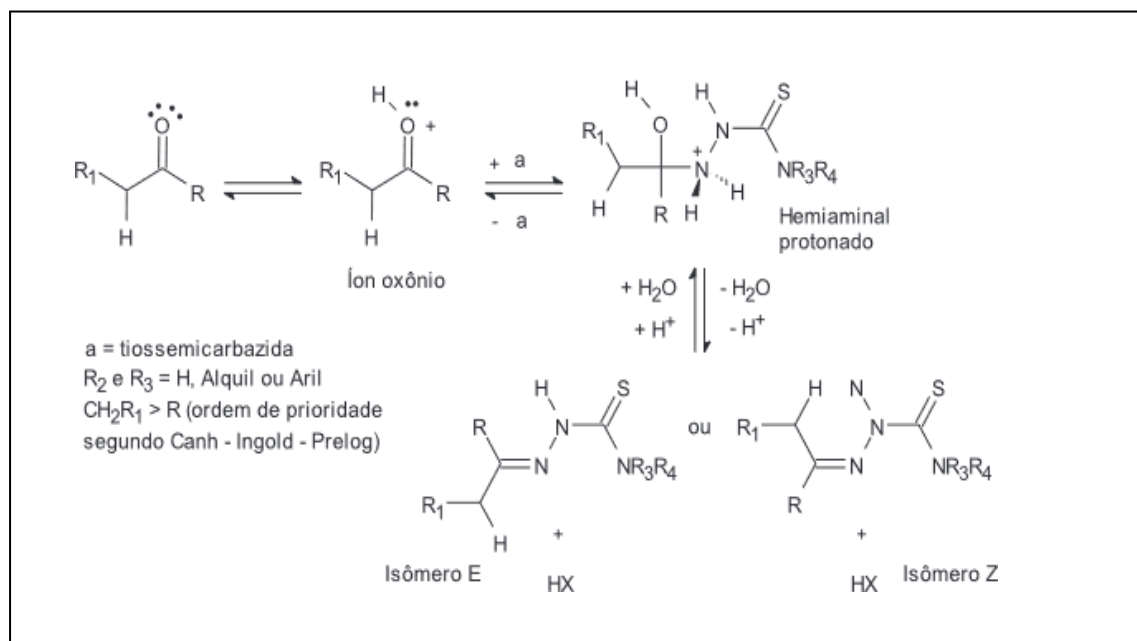


Figura 4: Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas (TENÓRIO; GÓES, 2005).

Quando em solução, as tiossemicarbazonas apresentam isomerização da configuração *Z* para *E*, pois, esta tem maior estabilidade termodinâmica. Além disso, com a utilização de aldeídos para sua obtenção, o isômero *E* possui maior proporção, já no caso de cetonas, vai depender dos substituintes ligados a carbonila, principalmente devido ao efeito estérico.

Outras rotas sintéticas podem ser utilizadas para a obtenção das tiossemicarbazonas, como por exemplo, partindo da hidrazina, gerando tiossemicarbazida como intermediário e, posteriormente, reagindo com um derivado carbonílico como aldeídos e cetonas. No exemplo da Figura 5, ocorre uma etapa preliminar que envolve a reação entre hidrazina (NH₂-NH₂) e diferentes reagentes eletrofílicos (ácido tiocarbamoiltioglicólico, ditiocarbamatos, isotiocianatos), para posteriormente ocorrer a reação de condensação do derivado formado com aldeídos ou cetonas (TENÓRIO; GÓES, 2005).

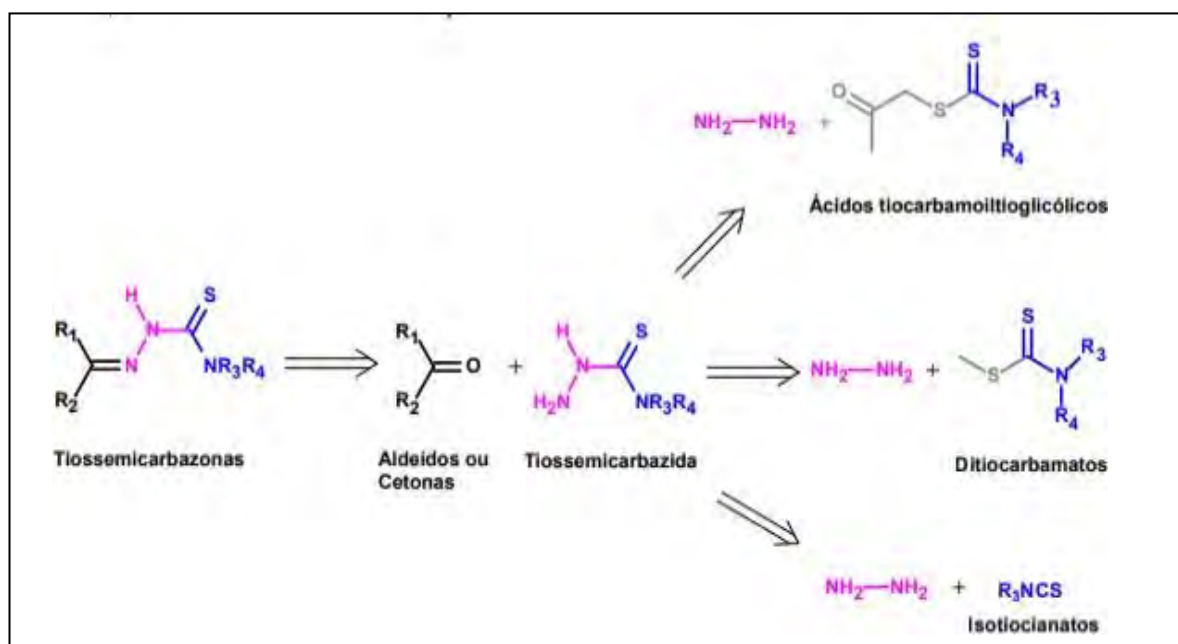


Figura 5: Retrossíntese da obtenção de tiossemicarbazonas a partir de hidrazinas e reagentes eletrofílicos (TENÓRIO; GÓES, 2005).

As tiossemicarbazonas são muito relatadas na literatura visando a obtenção de novos fármacos, devido seu largo espectro de ação biológica. Muitos autores atribuem esta característica à alta afinidade com a enzima ribonucleotídeo redutase, fundamental na síntese do DNA e na divisão celular, conforme já citado na Introdução. Dentre as atividades biológicas conhecidas das tiossemicarbazonas pode-se citar ações antituberculose, antifúngica, antiviral, antitumoral e antiprotozoária, conforme inúmeros relatos da literatura (SOARES, *et al.*, 2017).

Pesquisas associam que a atuação biológica dependerá da natureza dos grupos substituintes ligados ao fragmento tiossemicarbazona, e também da possibilidade da presença de um centro metálico coordenado. Sendo assim, as modificações estruturais nas tiossemicarbazonas poderão ser correlacionadas entre a atividade biológica e as propriedades eletrônicas e de lipofilicidade das moléculas (CHAVES *et al.*, 2019).

2.2 Isatinas

A isatina (1H-indol-2,3-diona), foi obtida pela primeira vez por Erdman e Laurent em 1841, a partir de uma reação com ácido nítrico e ácidos crômicos, como um produto da oxidação do corante índigo (PHOGAT; SINGH, 2015).

A isatina possui uma estrutura química com diversificada reatividade, visto que possui um núcleo indólico, carbonilas cetônica (3) e amídica (2), como representado na Figura 6. Esses grupos funcionais apresentam reatividades diferentes, permitindo reações como condensação e redução para as carbonilas e, o grupo N-H é passível de sofrer reações de N-alquilação e N-acilação. Além disso, apresenta um anel aromático, onde reações de substituição eletrofílica aromática poderão ocorrer (DIVAR *et al.*, 2017).

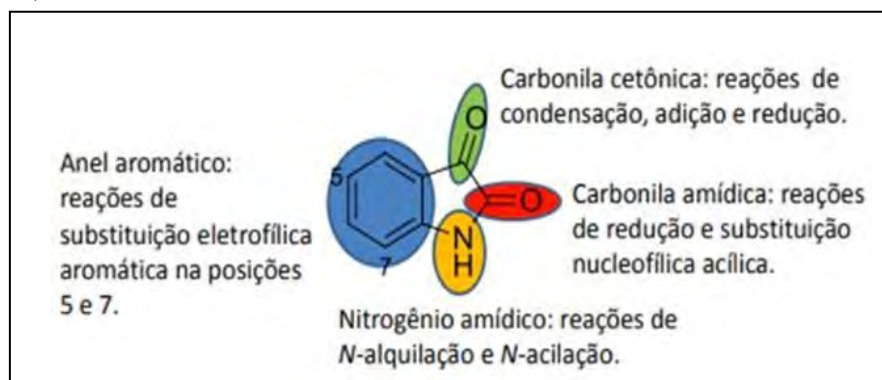


Figura 6: Estrutura química da isatina e possibilidades sintéticas. (MARTINEZ; FERREIRA, 2017).

A molécula da isatina, conforme citado, possui vários centros reativos, o que faz com que tanto a isatina como os seus derivados participem de um elevado número de reações no contexto da síntese orgânica, incluindo substituições eletrofílicas aromáticas nas posições C5, C6 e C7, reações de alquilação e acilação no nitrogênio, adições nucleofílicas no grupo carbonila no C3, oxidações e reduções quimiosseletivas, reações de Mannich e Michael, entre outras (BOGDANOV *et al.*, 2019).

A introdução de átomos de flúor em um composto é uma estratégia frequentemente utilizada para desenvolver novos fármacos, porque este átomo pode modificar propriedades biológicas de uma molécula. Os substratos de isatina foram transformados em compostos difluoro correspondentes através de uma reação com trifluoreto de dietilaminoxofre (DAST) seguido de tratamento com excesso de “borano” em THF. N-acil-3,3-difluoro-2-oxindoles (21) foram mostrados por Boechat *et al.*, para ser extremamente versátil na partida materiais para a síntese de uma variedade de compostos porque sofrem abertura do anel heterocíclico em a presença de nucleófilos, como água, álcoois, amina e tiossemicarbazidas (SILVA, 2013).

Derivados de carbamato de isatina exibem intensa atividade vasodilatadora; esses compostos têm demonstrado aumentar o endotélio níveis de NO, que ativa a produção de enzimas responsável pelo relaxamento vascular, ou seja, guanósina Monofosfato 3',5'-cíclico (cGMP) e guanilato ciclase (GC). Portanto, os derivados de carbamato podem representar um tratamento alternativo para hipertensão (SILVA, 2013).

A isatina está presente nas espécies vegetais do gênero *Isatis*, em *Calanthe discolor* e em *Couroupita guianensis*, e também foi encontrada como um constituinte da secreção da glândula parótida de sapos *Bufo* e em humanos, pois é um derivado metabólico da adrenalina (PHOGAT; SINGH, 2015).

Apresenta-se com forte coloração alaranjada e como um corante azul, se for misturado com ácido sulfúrico e com o benzeno, na formação da indofenina, como representado na Figura 7.

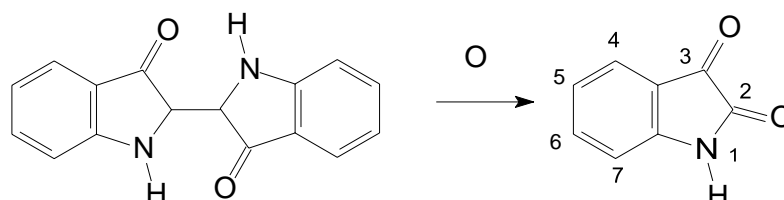


Figura 7: Obtenção da Isatina pela oxidação do índigo (PHOGAT; SINGH, 2015).

Sandmeyer, desenvolveu uma metodologia para sintetizar a isatina, representada na Figura 8, a partir de reação da anilina com ou sem substituinte com hidrato de cloral e um sal de hidroxilamina, na presença de uma solução saturada de sulfato de sódio, para formar *iso*-nitrosoacetanilidas. Posteriormente, o procedimento foi otimizado com a modificação do solvente de reação e utilização de líquidos iônicos na etapa de ciclização (PHOGAT; SINGH, 2015).

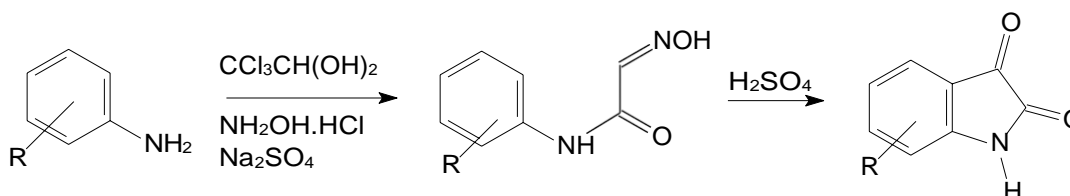


Figura 8: Obtenção da isatina pelo método de Sandmeyer (PHOGAT; SINGH, 2015).

No método desenvolvido por Stolle, Figura 9, a anilina reage com cloreto de oxalila formando o intermediário, que é então ciclizado em presença de ácido de Lewis. É uma das metodologias mais empregadas, depois do método de Sandmeyer (STOLLE, 1914; LOLOIU *et al.*, 1997).

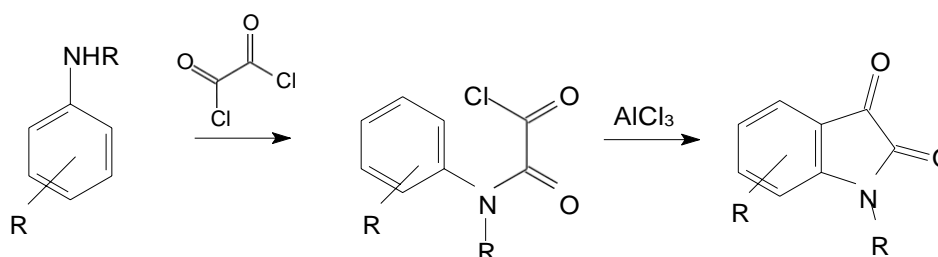


Figura 9: Obtenção da Isatina pelo método de Stolle (STOLLE, 1914; LOLOIU *et al.*, 1997).

Um outro método de preparação e a chamada síntese de Martinet, onde o cloreto de oxalila é substituído por oxomalonato de etila, gerando o dioxoindol, representado como intermediário na reação da Figura 10, que após descarboxilação oxidativa, fornece a respectiva isatina. (TAYLOR, 1980).

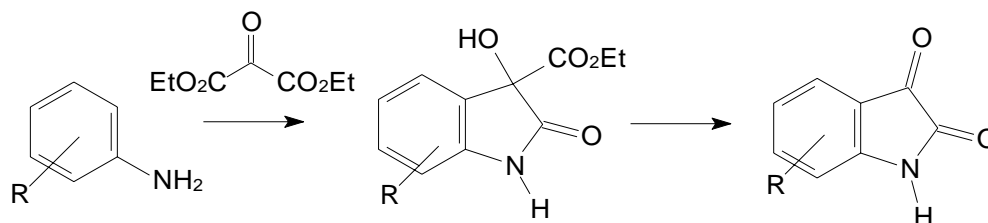


Figura 10: Obtenção da Isatina pelo método de Martinet (TAYLOR, 1980).

As isatinas são materiais de partida versáteis para a preparação de outras classes de compostos, devido a diferença na reatividade de suas carbonilas. A carbonila cetônica pode ser utilizada para a obtenção de oxindóis, através da sua redução, que pode ocorrer em meio ácido, empregando Zn e HCl (redução de Clemmensen) ou hidrogenação catalítica (H₂, Pd/C, HCl/HOAc). A redução também pode ocorrer em meio básico, com hidrazina, etilenoglicol e uma base inorgânica, como NaOH ou KOH (redução de Wolff-Kishner). Em pH neutro, ocorre a transformação da carbonila em um tiocetal, através da reação com um ditiol e ácido de Lewis como catalisador, seguida de uma redução com níquel de Raney (MARTINEZ; FERREIRA, 2017).

Devido a sua estrutura e reatividade, a isatina possui uma gama de propriedades biológicas, que lhe concede versatilidade nas aplicações. Dentre essas, a de ser matéria-prima para a obtenção de Sunitinibe, fármaco utilizado no tratamento de carcinomas (SILVA *et al.*, 2010). Relatos na literatura indicam sua utilização para o desenvolvimento de compostos que atuam como agentes anticonvulsivos e ansiolíticos, além de possuírem atividades contra doenças degenerativas, entre outras (SONG *et al.*, 2020).

A isatina também apresenta aplicações em detecções colorimétricas, como na determinação do aminoácido prolina, em pólenes e outros materiais vegetais. Ademais, é bastante utilizada na análise de esteroides, na determinação da atividade enzimática da cetopantoil-lactona redutase e outras carbonil redutases fúngicas e, como substrato na biossíntese de violaceína, um agente tripanocida (SILVA *et al.*, 2001).

2.3. Hibridação Molecular

A hibridação molecular é uma estratégia de construção de protótipos baseado no reconhecimento de unidades farmacofóricas na estrutura molecular de dois ou mais compostos bioativos. Farmacóforos são definidos como um conjunto de características estéricas e eletrônicas que garantem a interação supramolecular com um alvo biológico específico (MASS, 2017).

A hibridação molecular apresenta dois tipos de estratégias (Figura 11). Alguns autores descrevem como hibridização droga-droga, onde dois fármacos inteiros são ligados covalentemente, de forma direta ou via utilização de um *linker*; e o outro tipo, como hibridização farmacofórica, onde somente os farmacóforos dos respectivos fármacos são ligados diretamente ou também, através de *linkers* (ARAUJO *et al.*, 2015).

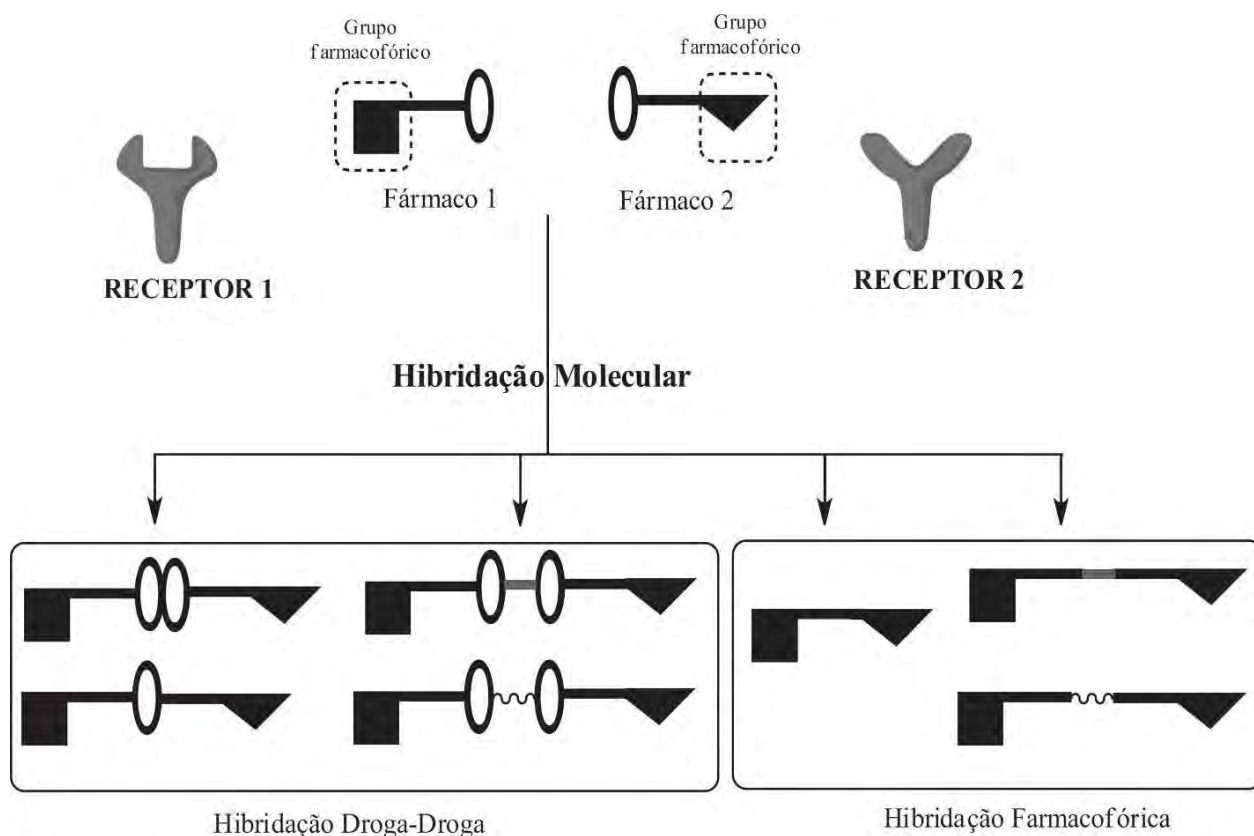


Figura 11: Tipos de hibridização molecular (ARAUJO *et al.*, 2015).

Outros autores, optam por classificar as moléculas híbridas como conjugados, nos quais as estruturas moleculares que contêm os farmacóforos para cada alvo são separados por um grupo vinculador distinto, o qual não foi encontrado em qualquer um dos medicamentos individuais. Como moléculas híbridas fundidas, com tamanho do ligante diminuído, de modo a obter estrutura dos

farmacóforos farmacêuticos essencialmente conexos. E, também, como híbridos mesclados que possuem suas estruturas mescladas aproveitando as semelhanças estruturais dos compostos de partida, que dão origem a menores e moléculas simples, conforme a Figura 12 (MUREGI; ISHIIH, 2009).



Essas moléculas são de grande importância para a postulação de uma concepção de fármacos com múltiplas atividades biológicas associadas e tem trazido resultados promissores ao potencial terapêutico. Essa multifuncionalidade surge da interação de substâncias químicas polifuncionalizadas com alvos ou receptores moleculares variados (MASS, 2017).

Nesse contexto, como exemplo temos o trabalho de Santos e colaboradores, que propõe a síntese e a caracterização de um composto híbrido, de ação sinérgica para tratamento potencial de infecções dermatológicas, como dermatite seborreica e acne. A síntese do híbrido foi realizada através de uma reação de diazotização, utilizando como precursores o ácido salicílico, que possui atividades queratolítica antimicrobiana conhecidas, e a sulfacetamida, composto antimicrobiano SANTOS *et al.*, 2019).

Encontra-se também na literatura, no grupo de pesquisa de Heng Zhang, 2016 no Laboratory de Chemical Biology da School of Pharmaceutical Sciences, na Universidade de Shandong, um trabalho relacionado à síntese de 24 novos compostos híbridos derivados diarilpirimidínicos contendo grupamento uracila capazes de inibir a enzima transcriptase reversa do vírus HIV. A pesquisa se baseou na hibridação molecular de dois compostos: o fármaco antiviral etravirina e um composto protótipo JLJ506, um catecol dieter inibidor da transcriptase reversa. A hibridação foi feita, juntando o grupamento uracil do JLJ506 com o farmacóforo arilpirimidínico da etravirina (FEIJÓ *et al.*, 2019).

Com o escopo de associar os efeitos anti-inflamatórios inibidores das Ciclo-oxigenases (COX) e inibidores das 5- lipo-oxigenase (LOX) e obter fármacos mais ativos e com menos efeitos colaterais, foi desenvolvida um composto sintético (LQFM-091) através da técnica de hibridação molecular que liga covalentemente a nimesulida (N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida) com um precursor de butilhidroxitolueno, o derivado 2,6-di-terc-butil-1-hidroxibenzeno (BF-389), inibidores de COX e

LOX, respectivamente. Este novo composto que inibe COX e LOX e assim disponibiliza mais ácido araquidônico (AA) para seguir a via da epoxigenase deverá, então, contribuir também com a regulação de respostas celulares específicos importantes tanto na inflamação quanto da imunidade (LEITE, 2015).

2.4. Fungos: crescimento e inibição

Os fungos são um vasto grupo de organismos heterotróficos classificados dentro do Reino Fungi; são capazes de utilizar uma grande variedade de substratos para obter carbono orgânico e se adaptam a diversas condições de vida. Por isso, colonizam inúmeros habitats (águas doces e salgadas, terra, madeira, estrume, resíduos queimados, entre outros) e desempenham funções relevantes nos ecossistemas, como decompositores ou parasitas, também denominados patogênicos, que podem ser de plantas ou de animais; por exemplo (OLIVEIRA, 2010).

Também chamados de bolores ou mofos, os fungos filamentosos, podem, pela sua ação direta, ocasionar vários problemas aos produtos agrícolas armazenados. Desenvolvendo-se sobre sementes, podem causar perda do poder germinativo da planta; afetar a qualidade por descoloração do arroz e da manteiga de cacau; produzir aromas desagradáveis, como no caso do café, além de alterar as condições físicas por desidratação dos produtos onde crescem. Podem ocasionar também a diminuição do valor nutritivo das proteínas na maioria dos produtos, como dos óleos e gorduras, do amendoim e da soja, além de prejudicar seriamente o aspecto externo dos alimentos (PAIVA, 2013).

Entretanto, o potencial biotecnológico destes organismos também deve ser considerado; pois o número de espécies fúngicas com importância química, farmacológica, ambiental, ecológica, agrícola e alimentícia é extraordinário (TAKAHASHI *et al.*, 2017).

Em linhas gerais, os fungos possuem parede celular composta por glucanas e quitina. A reprodução pode ser sexual, por cariogamia e meiose; parassexual, cariogamia seguida de aneuploidia; e/ou assexual, por divisão nuclear mitótica (GOW *et al.*, 2018).

Como características das colônias filamentosas, podem ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas. São constituídas fundamentalmente por elementos multicelulares em forma de tubo - as hifas. Ao conjunto, dá-se o nome de micélio, o qual se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes.

Neste trabalho de Dissertação foram avaliados fungos das espécies *Aspergillus* e *Sporothrix*. Assim, a seguir serão apresentadas algumas informações sobre essas espécies.

2.4.1. O gênero *Aspergillus*

As substâncias denominadas aflatoxinas são produzidas por espécies de fungos, essencialmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Figura 13). O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos Hyphomycetos que se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com formas e arquitetura variáveis. A contaminação e a deterioração dos alimentos causadas por fungos são mais comuns que as originadas por qualquer outro grupo de microrganismos. A contaminação por fungos é importante não apenas sob o ponto de vista sensorial, mas também, pelo perigo que a produção de micotoxinas, como as aflatoxinas, representa para o consumidor, pois são causadoras do câncer de fígado, principalmente (PEREIRA *et al.*, 2002). Algumas espécies do gênero são patógenas oportunistas de humanos e animais, causando desde infecções de pele, unhas, a micose pulmonar e micetomas.



Figura 13: Colônias de espécies do gênero *Aspergillus* (AL-HMOUD *et al.*, 2012).

2.4.2. O gênero *Sporothrix*

As micoses subcutâneas ocorrem em um grau de risco maior que as dermatomicoses e afetam o tecido subcutâneo, causando destruição do tecido. A infecção ocorre por inoculação no tecido subcutâneo ou na derme, ocasionada por lesão na pele. Os fungos responsáveis por esta micose estão presentes no solo, madeira e plantas em decomposição, com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais úmidas. A esporotricose é causada pela espécie *Sporothrix schenckii* (Figura 14) e envolve o tecido subcutâneo no ponto de inoculação traumática. A infecção geralmente se espalha ao longo dos canais linfáticos cutâneos da extremidade envolvida (ARAÚJO, 2018). Através do sequenciamento de genes demonstrou-se que a espécie *S. schenckii* pertence a um grupo complexo que é composto das seguintes espécies críticas: *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* e *S. schenckii*. Com o aumento do número

de espécies patogênicas, modificam-se os procedimentos da rotina diagnóstica da esporotricose com a inclusão de novos aspectos relacionados à morfologia, fisiologia e nutrição (CRUZ, 2013).



Figura 14: Colônia da espécie *Sporothrix schenckii* (TOMAZI, 2018).

A esporotricose é uma micose subcutânea endêmica, emergente e negligenciada no Brasil e está intimamente associada a um caráter zoonótico. Na última década, a casuística da doença e sua expansão geográfica no território brasileiro vem sendo reportada, ocasionando graves problemas de saúde pública em diversas regiões. Em 2020, a esporotricose humana passou a ser de notificação compulsória no Brasil (MUNHOZ *et al.*, 2021).

2.4.3. Resistência aos agentes antifúngicos

Os mecanismos de ação dos antifúngicos podem estar ligados diretamente a síntese do ergosterol, constituinte da membrana celular e a ação dos antifúngicos é prejudicada pela automedicação. As classes dos principais agentes antifúngicos são indicadas, caracterizando seu sítio de ação fúngica. Os polienos, equinocandinas e triazóis atuam direta e indiretamente nas camadas do envoltório celular ocasionando sua ruptura, atuando como fungicida levando a célula a morte. As griseofulvinas e flucitosinas atuam no interior das células fúngicas, inibindo o crescimento e atuam como fungistáticos. Portanto, a combinação de antifúngicos fungicida e fungistático aumentam a eficácia do controle a infecções fúngicas (ARAÚJO, 2018).

Nas figuras 15 e 16 exemplifica-se então as estruturas químicas destes compostos de inibição fúngica.

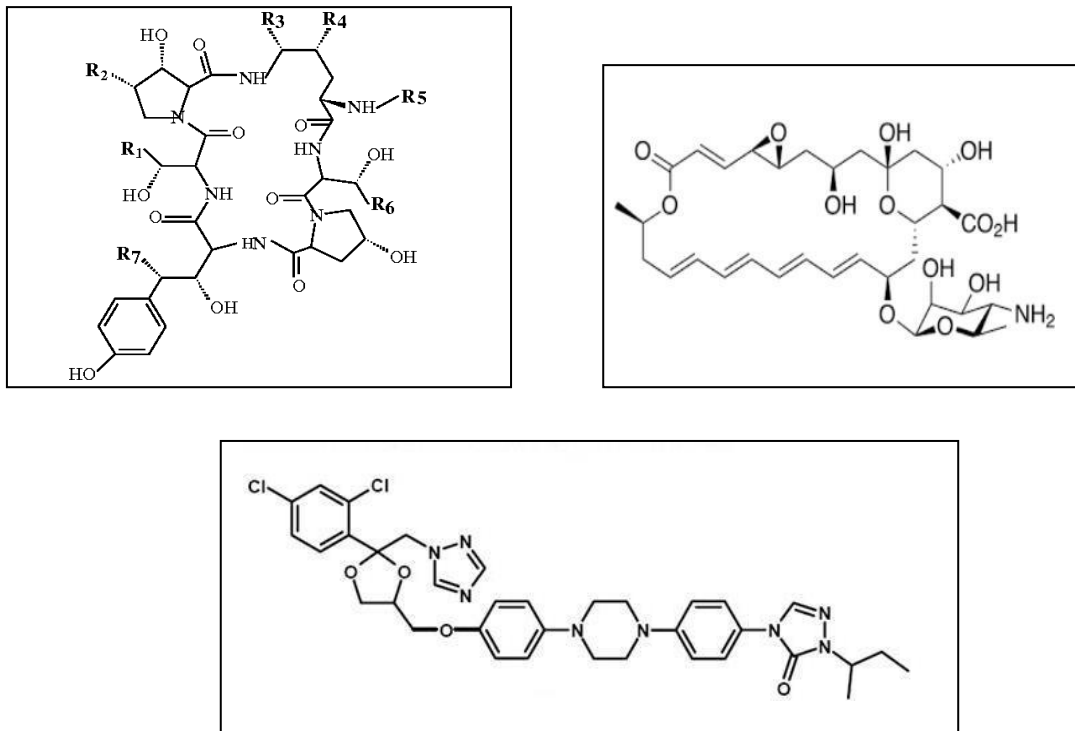


Figura 15: Estrutura química dos fungicidas das classes: equinocandinas, polienos e triazol, respectivamente.

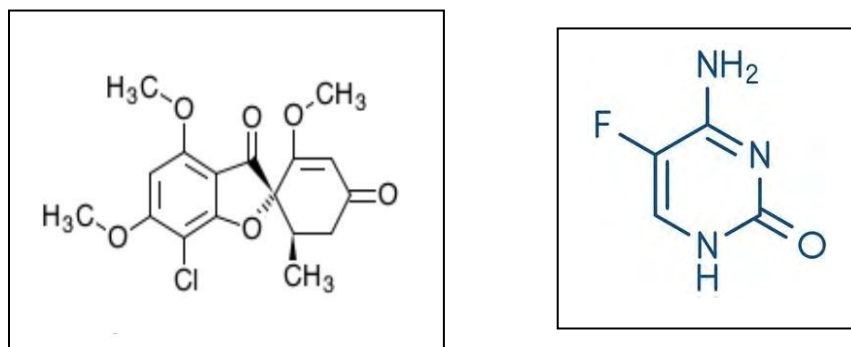


Figura 16: Estrutura química dos fungistáticos: griseofulvina e flucitosina, respectivamente.

Os mecanismos de resistência aos agentes antifúngicos podem estar envolvidos em patógenos fúngicos clinicamente relevantes em diferentes condições quando expostos a substâncias antifúngicas. Vários estudos estão explorando, além de possíveis vias alternativas de resistência, o papel da formação de biofilme por várias espécies de fungos no desenvolvimento da resistência a vários antifúngicos, incluindo os azólicos (SANGLARD, 2002).

Contudo, as buscas de moléculas que sejam ativas contra as diversas espécies de fungos têm conseguido cada vez mais espaço na pesquisa. Já que são espécies com sensibilidades e resistências diferentes entre si, o que se torna necessária a síntese de novos compostos para desenvolverem ação fungicida e fungistática.

Assim, a isatina, quando associada a grupos do tipo hidrazonas, semicarbazonas, tiosemicarbazonas e aminoguanidinas, compostos pertencentes a classe das iminas, têm sido extensivamente estudadas, por suas características químico-estruturais que lhe atribuem diversificadas ações biológicas, entre elas, pode-se citar a atividade antimicrobiana, analgésica, anticonvulsante, antifúngica e antitumoral (BERTO *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar e caracterizar uma nova série de moléculas híbridas isatina-tiossemicarbazonas com potencial atividade biológica e verificar as correlações entre os efeitos eletrônicos das estruturas e a atividade antifúngica.

3.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar uma série de aril-tiossemicarbazonas contendo grupos substituintes doadores e retiradores de elétrons na posição *para* e *meta*.
2. Preparar utilizando a técnica de hibridação molecular uma série de isatina-tiossemicarbazonas.
3. Caracterizar por técnicas espectroscópicas de rotina (IV e RMN de ^1H e ^{13}C) a série de isatina-tiossemicarbazonas.
4. Investigar a atividade antifúngica das isatina-tiossemicarbazonas frente aos fungos *Aspergillus parasiticus* e *Sporothrix spp.*
5. Analisar a relação entre a estrutura das isatina-tiossemicarbazonas e os efeitos eletrônicos através dos deslocamentos químicos obtidos por RMN, e a lipofilicidade de suas estruturas com a atividade antifúngica.
6. Analisar o efeito quelante dos compostos sintetizados que obtiveram os melhores resultados para atividade antifúngica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e Materiais

4.1.1 Equipamentos utilizados na caracterização dos compostos

As tiossemicarbazonas e os híbridos isatina-tiossemicarbazonas, tiveram determinados seus pontos de fusão em um aparelho da marca Mel-Temp II Melting Point Apparatus. Os espectros de infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Brüker, modelo FT-IR Vertex 70, pela técnica de ATR na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} . Os experimentos de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (500 MHz ou 400 MHz) e carbono-13 (125 MHz ou 100 MHz) foram realizados com um espectrômetro Bruker Ultrashield Plus em DMSO- d_6 contendo tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

4.1.2 Equipamentos utilizados na síntese dos compostos

Os reagentes e produtos formados tiveram na aferição das suas massas, a utilização da Balança Semi-Analítica 0,001g/430g Marte e da balança analítica ATX-224 da marca Shimadzu. Para realizar as recristalizações, e sintetizar as tiossemicarbazonas foram utilizadas placas de aquecimento com agitador magnético, capacidade de 6 L, diâmetro 14 cm, 100 - 1800 RPM e 220 V da Fisatom. Para realizar a síntese da 2ª etapa, onde faz-se o refluxo da solução, utilizou-se as mantas de aquecimento Luca-50 capacidade do balão: 50 mL, voltagem: 110 ou 220 V.

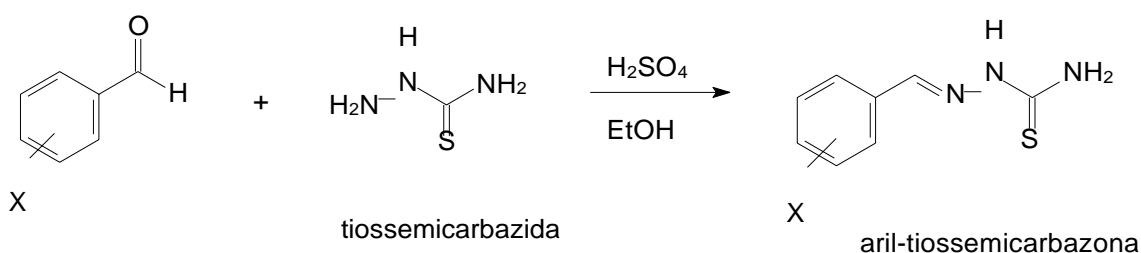
4.1.3. Reagentes, solventes e materiais utilizados nas sínteses e análises

As análises de cromatografia de camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F254 (Merck) e reveladas com lâmpada UV (254nm), para acompanhar o tempo de reação, e verificar a pureza intermediários e produtos finais. Os solventes empregados nas sínteses, etapas de purificação, CCD e análises instrumentais eram de grau P.A. dentre os quais foram: etanol (Neon), acetato de etila e hexano (Vetec), dimetilsulfóxido hexadeuterado (Sigma-Aldrich) e água destilada (IQ-UFRRJ). E, os demais reagentes: ácido acético glacial (Vetec), ácido sulfúrico (Dinâmica), benzaldeído (Vetec), *p*-nitrobenzaldeído, *p*-bromobenzaldeído, *p*-fluorbenzaldeído, *p*-metoxibenzaldeído, *p*-clorobenzaldeído, *p*-dimetilaminobenzaldeído, *p*-tolualdeído, *p*-

trifluormetilbenzaldeído e *p*-hidroxibenzaldeído, *m*-nitrobenzaldeído, *m*-bromobenzaldeído, *m*-fluorbenzaldeído, *m*-metoxibenzaldeído, *m*-clorobenzaldeído, *m*-tolualdeído, *m*-trifluormetilbenzaldeído *em*-hidroxibenzaldeído (Sigma-Aldrich).

4.2 Procedimentos de Síntese

4.2.1 Síntese das aril-tiossemicarbazonas



X nas posições <i>para</i> ou <i>meta</i>									
H	Br	F	OCH ₃	Cl	N(CH ₃) ₂	CH ₃	CF ₃	OH	NO ₂

Em Erlenmeyer colocou-se 0,01 mol do 4-X-benzaldeído ou 3-X-benzaldeído, 50 mL de etanol e depois da solubilização, adicionou-se 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado e 0,91 g de tiossemicarbazida. A mistura reacional foi aquecida sob agitação magnética por no mínimo 2 h e, depois foi deixada em repouso a temperatura ambiente, observando-se a precipitação do produto, que foi após filtrado a vácuo, recristalizado em etanol.

4.2.1.1 Caracterização dos intermediários aril-tiossemicarbazonas *p*-substituídas.

TIO-4-H (C₈H₉N₃S, 179 g.mol⁻¹): Tempo de reação 3h, produto: agulhas esbranquiçadas. A massa obtida = 1,524g, rendimento 85%; P.F. = 158°C. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3419 (ν_{N-H} primária associada), 3251 (ν_{N-H} secundária associada), 3025 (ν_{C-H} aromático), 1589 (ν_{C=S}), 1540 (ν_{C=N}+ ν_{N-N}), 1105 e 1085 (ν_{N-N}), 761 e 694 (padrão de substituição de anel aromático: monosubstituído).

TIO-4-Br (C₈H₈N₃SBr, 258 g.mol⁻¹): Tempo de reação 3h, produto: sólido amorfo esbranquiçado. A massa obtida = 1,158g; rendimento 46%; P.F. = 228°C. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3434 (ν_{N-H} primária associada), 3284 (ν_{N-H} secundária associada), 3184 (ν_{C-H} aromático), 1596 (ν_{C=S}),

1519 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1101 e 1087 (ν_{N-N}), 810 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 609 (ν_{C-Br}).

TIO-4-F ($C_8H_8N_3SF$, 197 $g \cdot mol^{-1}$): Tempo de reação 3h, produto: sólido esbranquiçado brilhante. A massa obtida = 1,845g; rendimento 78%; P.F. = 200°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3390 (ν_{N-H} primária associada), 3232 (ν_{N-H} secundária associada), 3049 (ν_{C-H} aromático), 1600 ($\nu_{C=S}$), 1531 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1105 e 1089 (ν_{N-N}), 833 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 1226 (ν_{C-F}).

TIO-4-OCH₃ ($C_9H_{11}ON_3S$ 193 $g \cdot mol^{-1}$): Tempo de reação 2,5h, produto: sólido amorfo amarelado. A massa obtida = 1,105g; rendimento 52%; P.F. = 180°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3402 (ν_{N-H} primária associada), 3286 (ν_{N-H} secundária associada), 3058 (ν_{C-H} aromático), 1596 ($\nu_{C=S}$), 1533 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1085 e 1056 (ν_{N-N}), 833 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 1232 e 1186 (ν_{C-O}).

TIO-4-Cl ($C_8H_8N_3SCl$, 213,5 $g \cdot mol^{-1}$): Tempo de reação 2,5h, produto: sólido amorfo esbranquiçado. A massa obtida = 1,148g; rendimento 54%; P.F. = 226°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3436 (ν_{N-H} primária associada), 3278 (ν_{N-H} secundária associada), 3058 (ν_{C-H} aromático), 1598 ($\nu_{C=S}$), 1523 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1105 e 1089 (ν_{N-N}), 813 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 611 (ν_{C-Cl}).

TIO-4-N(CH₃)₂ ($C_{10}H_{14}N_4S$, 222 $g \cdot mol^{-1}$): Tempo de reação durou 3h, produto: sólido vermelho brilhante. A massa obtida = 1,800g; rendimento 81%; P.F. = 202°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3348 (ν_{N-H} primária associada), 3255 (ν_{N-H} secundária associada), 2900 (ν_{C-H} aromático), 1581 ($\nu_{C=S}$), 1517 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1076 (ν_{N-N}), 819 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 1361 (ν_{C-N}).

TIO-4-CH₃ ($C_9H_{11}N_3S$, 177 $g \cdot mol^{-1}$): Tempo de reação 3h, produto: sólido amorfo branco. A massa obtida = 1,732g; rendimento 88%; P.F. = 176°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3400 (ν_{N-H} primária associada), 3234 (ν_{N-H} secundária associada), 3000 (ν_{C-H} aromático), 1594 ($\nu_{C=S}$), 1537 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1095 e 1062 (ν_{N-N}), 811 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 1365 (ν_{CH_3}).

TIO-4-CF₃ ($C_9H_8N_3SF_3$, 231 $g \cdot mol^{-1}$): Tempo de reação 3h, produto: sólido amorfo esbranquiçado. A massa obtida = 0,683g; rendimento 47%; P.F. = 212°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} :

¹: 3430 ($\nu_{\text{N-H}}$ primária associada), 3261 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3058 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1596 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1533 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1164 e 1134 ($\nu_{\text{N-N}}$), 732 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 1324 ($\nu_{\text{C-F}}$).

TIO-4-OH ($\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_3\text{OS}$, 196 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Tempo de reação 3h, produto: sólido amorfo amarelo. A massa obtida = 1,244g; rendimento 64%; P.F. = 224°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3471 ($\nu_{\text{N-H}}$ primária associada), 3359 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 2800 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1577 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1552 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1097 ($\nu_{\text{N-N}}$), 823 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 3186 - 3016 (ν_{OH}).

TIO-4-NO₂ ($\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$, 225 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Tempo de reação 3 h, produto: sólido opaco amarelo intenso. A massa obtida = 1,799g; rendimento 79%; P.F. = 228°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3490 ($\nu_{\text{N-H}}$ primária associada), 3363 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3143 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1525 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1450 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1093 e 1051 ($\nu_{\text{N-N}}$), 817 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 1575 e 1336 ($\nu_{\text{C-NO}_2}$).

4.2.1.2 Caracterização dos intermediários aril-tiossemicarbazonas *m*-substituídas.

TIO-3-Br ($\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_3\text{SBr}$, 258 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Tempo de reação 3 h, produto: sólido amorfo esbranquiçado. A massa obtida = 1,990 g; rendimento 73%; P.F. = 208°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3390 ($\nu_{\text{N-H}}$ primária associada), 3232 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3153 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1602 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1531 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1105 e 1066 ($\nu_{\text{N-N}}$), 939, 783 e 678 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 541 ($\nu_{\text{C-Br}}$).

TIO-3-F ($\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_3\text{SF}$, 197 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Tempo de reação 3 h, produto: sólido esbranquiçado brilhante. A massa obtida = 1,535 g; rendimento 76%; P.F. = 194°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3390 ($\nu_{\text{N-H}}$ primária associada), 3236 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3159 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1602 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1529 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1095 e 1049 ($\nu_{\text{N-N}}$), 883, 752 e 678 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1180 ($\nu_{\text{C-F}}$).

TIO-3-OCH₃ ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{ON}_3\text{S}$ 193 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$): Tempo de reação 3 h, produto: sólido amorfo amarelado. A massa obtida = 2,144 g; rendimento 95%; P.F. = 193°C. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3396 ($\nu_{\text{N-H}}$ primária associada), 3276 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3153 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1591 ($\nu_{\text{C=S}}$),

1533 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1093 e 1041 (ν_{N-N}), 833, 783 e 686 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1267 e 1157 (ν_{C-O}).

TIO-3-Cl ($C_8H_8N_3SCl$, 213,5 g.mol⁻¹): Tempo de reação 3 h, produto: sólido amorfo esbranquiçado. A massa obtida = 2,012 g; rendimento 90%; P.F. = 198°C. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3388 (ν_{N-H} primária associada), 3228 (ν_{N-H} secundária associada), 3149 (ν_{C-H} aromático), 1602 ($\nu_{C=S}$), 1523 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1099 e 1074 (ν_{N-N}), 850, 779 e 678 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 621 (ν_{C-Cl}).

TIO-3-CH₃ ($C_9H_{11}N_3S$, 177 g.mol⁻¹): Tempo de reação 3 h, produto: sólido amorfo esbranquiçado. A massa obtida = 1,895 g; rendimento 93%; P.F. = 198°C. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3382 (ν_{N-H} primária associada), 3240 (ν_{N-H} secundária associada), 2989 (ν_{C-H} aromático), 1596 ($\nu_{C=S}$), 1537 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1097 e 1058 (ν_{N-N}), 831, 781 e 686 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1361 (ν_{CH_3}).

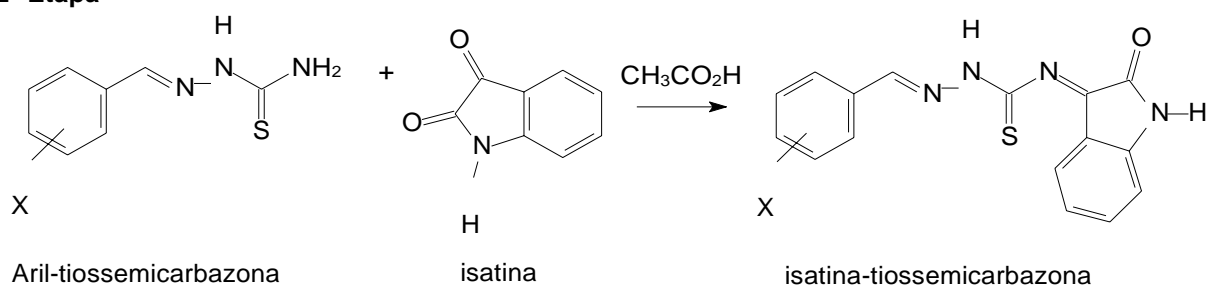
TIO-3-CF₃ ($C_9H_8N_3SF_3$, 231 g.mol⁻¹): Tempo de reação 3 h, produto: sólido brilhoso levemente amarelado. A massa obtida = 2,346 g; rendimento 98%; P.F. = 212 °C. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3400 (ν_{N-H} primária associada), 3234 (ν_{N-H} secundária associada), 3155 (ν_{C-H} aromático), 1596 ($\nu_{C=S}$), 1533 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1124 e 1068 (ν_{N-N}), 833, 800 e 692 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1324 (ν_{C-F}).

TIO-3-OH ($C_8H_{10}N_3OS$, 196 g.mol⁻¹): Tempo de reação 3 h, produto: sólido amorfo amarelo. A massa obtida = 1,050 g; rendimento 52%; P.F. = 226°C. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3334 (ν_{N-H} primária associada), 3186 (ν_{N-H} secundária associada), 2981 (ν_{C-H} aromático), 1581 ($\nu_{C=S}$), 1540 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1153 e 1099 (ν_{N-N}), 935, 781 e 684 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 3186–3159 (ν_{OH}).

TIO-3-NO₂ ($C_8H_9N_4O_2S$, 225g.mol⁻¹): Tempo de reação 3 h, produto: sólido amarronzado. A massa obtida = 1,371g; rendimento 60%; P.F. = 238°C. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3394 (ν_{N-H} primária associada), 3236 (ν_{N-H} secundária associada), 3153 (ν_{C-H} aromático), 1523 ($\nu_{C=S}$), 1471 ($\nu_{C=N} + \nu_{N-N}$), 1105 e 1066 (ν_{N-N}), 817, 736 e 702 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1602 e 1346 (ν_{C-NO_2}).

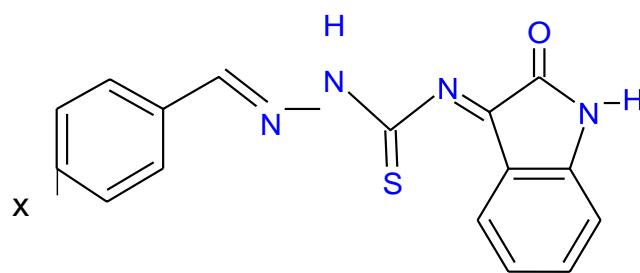
4.2.2 Síntese dos compostos híbridos isatina-aril-tiossemicarbazonas

2ª Etapa



X nas posições <i>para</i> ou <i>meta</i>									
H	Br	F	OCH ₃	Cl	N(CH ₃) ₂	CH ₃	CF ₃	OH	NO ₂

Em balão de fundo redondo acoplado a um condensador de bolas, foram adicionadas a aril-tiossemicarbazona e a isatina em quantidades equimolares, 50mL de etanol e 0,50 mL de ácido acético glacial. A mistura da reação foi aquecida a refluxo durante pelo menos 4h e, depois a solução foi resfriada e o produto precipitado recristalizado em etanol: água (1: 2).

4.2.2.1 Caracterização das isatina-aril-*p*-tiossemicarbazonas.

ISATIO-4-X

ISATIO-H

Produto: sólido vermelho intenso; P.F. = 216°C, rendimento 54%. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3211 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3000 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1618 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1604 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1697 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C=O}}$), 3176 ($\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$), 1726 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1122 ($\nu_{\text{N-N}}$), 734 e 630 (padrão de substituição de anel aromático: monosubstituído). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7a 11,22 (s, 1H, CH), H-20 9,06 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 184,86 (C10), 179,12 (C15), 163,10 (C14), 142,82 (C1), 138,82 (C7).

ISATIO-4-Br

Produto: sólido amarelo alaranjado; P.F. = 222°C, rendimento de 58%. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3280 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3056 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1598 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1521 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1668 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C=O}}$), 3164 ($\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$), 1685 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1103 e 1087 ($\nu_{\text{N-N}}$), 811 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 611 ($\nu_{\text{C-Br}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7 11,51 (s, 1H, CH), H-20 8,01 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 179,13 (C10), 178,51 (C15), 163,10 (C14), 142,82 (C6), 141,37 (C7), 134,00 (C1).

ISATIO-4-F

Produto: sólido avermelhado; P.F. = 188°C; rendimento 56%. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : aprox. 3300 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 2981 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), aprox. 1510 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1458 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1614 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C=O}}$), aprox. 3100 ($\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$), 1724 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1093 ($\nu_{\text{N-N}}$), 765 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 1330 ($\nu_{\text{C-F}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): H-13 11,44 (s, 1H, CH), H-7 11,04 (s, 1H, NH), H-20 8,21 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 184,86 (C10), 178,46 (C15), 159,83 (C14), 151,18 (C6), 141,49 (C7).

ISATIO-4-OCH₃

Produto: sólido alaranjado; P.F. = 218°C; rendimento de 50%. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3288 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3114 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1540 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1508 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1685 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C=O}}$), 3184 ($\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$), 1726 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1087 e 1062 ($\nu_{\text{N-N}}$), 765 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 1247 e 1201 ($\nu_{\text{C-O}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7 11,33 (s, 1H, CH), H-20 8,70 (s, 1H, NH), H-6a 3,79 (s, 3H, CH₃). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 179,14 (C10), 178,05 (C15), 163,10 (C14), 161,14 (C6), 142,67 (C7), 132,49 (C1), 55,24 (C6a).

ISATIO-4-Cl

Produto: sólido vermelho amarronzado; P.F. = 208°C; rendimento de 50%. Infravermelho (ATR) cm^{-1} : aprox. 3160 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), aprox. 3050 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1600 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1459 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1612 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C=O}}$), 2981 ($\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$), 1724 ($\nu_{\text{C=O}}$), aprox. 1090 e 1050 ($\nu_{\text{N-N}}$), aprox. 871 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 659 ($\nu_{\text{C-Cl}}$). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): H-13 12,44 (s, 1H, NH), H-7 11,50 (s, 1H, CH), H-20 8,26 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 179,12 (C10), 178,51 (C15), 163,18 (C14), 151,13 (C6), 141,26 (C7), 134,67 (C1).

ISATIO-4-N(CH₃)₂

Produto: sólido amarronzado com aparência pastosa e amorfa; P.F. = 188°C; rendimento 70%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3249 (ν_{N-H} secundária associada), 2995 (ν_{C-H} aromático), 1521 (ν_{C=S}), 1456 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1589 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3149 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1724 (ν_{C=O}), 1056 (ν_{N-N}), 813 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 1357 (ν_{C-N}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,47 (s, 1H, NH), H-7 11,20 (s, 1H, CH), H-20 9,06 (s, 1H, NH), H-6a 2,96 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,86 (C10), 177,35 (C15), 159,84 (C14), 151,17 (C6), 143,74 (C7), 40,25 (C6a).

ISATIO-4-CH₃

Produto: sólido vermelho-amarronzado brilhoso; P.F. = 184°C; rendimento 79%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: aprox. 3200 (ν_{N-H} secundária associada), aprox. 3000 (ν_{C-H} aromático), 1537 (ν_{C=S}), 1461 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1598 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3159 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1726 (ν_{C=O}), 1093 (ν_{N-N}), 811 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 1330 (ν_{CH₃}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,47 (s, 1H, NH), H-7 11,39 (s, 1H, CH), H-20 9,06 (s, 1H, NH), H-6a 2,33 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,86 (C10), 178,24 (C15), 163,10 (C14), 142,79 (C7), 140,08 (C1), 131,93 (C6), 21,50 (C6a).

ISATIO-4-CF₃

Produto: sólido vermelho alaranjado; P.F. = 182°C; rendimento 88%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3209 (ν_{N-H} secundária associada), aprox. 3050 (ν_{C-H} aromático), 1616 (ν_{C=S}), 1585 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1695 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3176 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1724 (ν_{C=O}), 1124 e 1058 (ν_{N-N}), aprox. 730 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 1319 (ν_{C-F}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7 11,22 (s, 1H, CH), H-20 9,06 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 179,14 (C10), 166,68 (C15), 159,84 (C14), 151,17 (C6), 138,83 (C7), 135,04 (C1).

ISATIO-4-OH

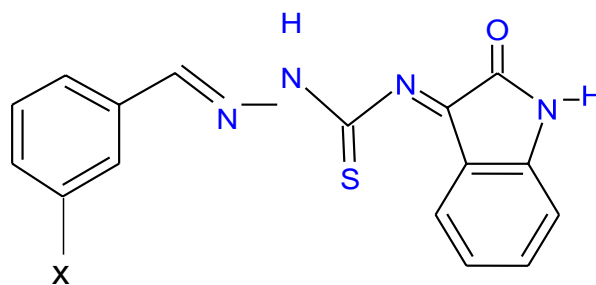
Produto: sólido vermelho amarronzado; P.F. = 236°C; rendimento 60%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3430 (ν_{N-H} secundária associada), 3058 (ν_{C-H} aromático), 1594 (ν_{C=S}), 1459 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1614 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3361 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1731 (ν_{C=O}), 1141 e 1095 (ν_{N-N}), 829 (padrão de substituição de anel aromático: p-substituído), 3182 (ν_{OH}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7 11,27 (s, 1H, CH), H-6a 11,22 (s, 1H, OH), H-20 9,06 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (125

MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,86 (C10), 177,85 (C15), 159,87 (C14), 159,70 (C6), 151,16 (C1), 143,11 (C7).

ISATIO-4-NO₂

Produto: sólido alaranjado; P.F.= 201°C; rendimento 69% Infravermelho (ATR) cm⁻¹:3415 (v_{N-H} secundária associada), 3097 (v_{C-H} aromático), 1606 (v_{C=S}), 1459 (v_{C=N} + v_{N-N}), 1701 (v_{C=N} + v_{C=O}), 3211 (v_{N-H} + v_{C=O}), 1724 (v_{C=O}), 1122 e 1095 (v_{N-N}), 844 (padrão de substituição de anel aromático: *p*-substituído), 3176 (v_{NO₂}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,47 (s, 1H, NH), H-7 11,05 (s, 1H, CH), H-20 8,24 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,76 (C10), 179,21 (C15), 163,07 (C14), 159,75 (C6), 151,18 (C1), 140,00 (C7).

4.2.2.2 Caracterização das isatina-aryl-*m*-tiossemicarbazonas



ISATIO-3-X

ISATIO-3-Br

Produto: sólido alaranjado; P.F. = 188 °C, rendimento de 70%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3392 (v_{N-H} secundária associada), 3027 (v_{C-H} aromático), 1602 (v_{C=S}), 1531 (v_{C=N} + v_{N-N}), 1697 (v_{C=N} + v_{C=O}), 3155 (v_{N-H} + v_{C=O}), 1728 (v_{C=O}), 1105 e 1066 (v_{N-N}), 827, 784 e 678 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 622 (v_{C-Br}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 11,52 (s, 1H, NH), H-7 11,05 (s, 1H, CH), H-20 8,20 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,86 (C10), 177,85 (C15), 159,87 (C14), 159,70 (C4), 143,11 (C7), 151,16 (C1).

ISATIO-3-F

Produto: sólido alaranjado; P.F. = 174°C; rendimento 76%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: aprox. 3365 (v_{N-H} secundária associada), 2894 (v_{C-H} aromático), aprox. 1614 (v_{C=S}), 1531 (v_{C=N} + v_{N-N}), 1685 (v_{C=N} + v_{C=O}), aprox. 3230 (v_{N-H} + v_{C=O}), 1724 (v_{C=O}), 1143 e 1093 (v_{N-N}), 761, 676 e 657 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1267 (v_{C-F}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7 11,05 (s, 1H, CH), H-20 8,28 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,85 (C10), 178,68 (C15), 163,96 (C14), 162,03 (C4), 141,14 (C7).

ISATIO-3-OCH₃

Produto: sólido vermelho alaranjado; P.F. = 194°C; rendimento de 46%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3384 (ν_{N-H} secundária associada), 2981 (ν_{C-H} aromático), 1596 (ν_{C=S}), 1535 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1612 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3162 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1726 (ν_{C=O}), 1095 e 1039 (ν_{N-N}), 769, 734 e 684 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1288 e 1269 (ν_{C-O}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,47 (s, 1H, NH), H-7 11,44 (s, 1H, CH), H-20 8,24 (s, 1H, NH), H-4a 3,80 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,85 (C10), 178,41 (C15), 163,13 (C14), 159,83 (C4), 142,79 (C7), 142,62 (C1), 55,67 (C4a).

ISATIO-3-Cl

Produto: sólido vermelho alaranjado; P.F = 195°C; rendimento de 88%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3386 (ν_{N-H} secundária associada), aprox. 3197 (ν_{C-H} aromático), 1527 (ν_{C=S}), 1459 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1612 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3216 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1726 (ν_{C=O}), 1188 e 1095 (ν_{N-N}), 829, 767 e 676 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 622 (ν_{C-Cl}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 11,53 (s, 1H, NH), H-7 11,05 (s, 1H, CH), H-20 8,28 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,90 (C10), 178,59 (C15), 159,83 (C14), 151,23 (C4), 141,67 (C7).

ISATIO-3-CH₃

Produto: sólido vermelho-amarronzado brilhoso; P.F. = 182 °C; rendimento 64%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3437 (ν_{N-H} secundária associada), 3076 (ν_{C-H} aromático), 1645 (ν_{C=S}), 1550 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1708 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3342 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1782 (ν_{C=O}), 1093 (ν_{N-N}), 800, 781 e 717 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1351 (ν_{CH₃}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7 11,73 (s, 1H, CH), H-20 9,06 (s, 1H, NH), H-4a 2,33 (s, 3H, CH₃). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,85 (C10), 178,42 (C15), 159,83 (C14), 142,85 (C7), 138,33 (C1), 134,57 (C4), 21,30 (C4a).

ISATIO-3-CF₃

Produto: sólido avermelhado; P.F. = 198 °C; rendimento 91%. Infravermelho (ATR) cm⁻¹: 3432 (ν_{N-H} secundária associada), 3159 (ν_{C-H} aromático), 1606 (ν_{C=S}), 1537 (ν_{C=N} + ν_{N-N}), 1674 (ν_{C=N} + ν_{C=O}), 3265 (ν_{N-H} + ν_{C=O}), 1726 (ν_{C=O}), 1122 e 1066 (ν_{N-N}), 800, 692 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 1319 (ν_{C-F}). RMN de ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): H-13 12,48 (s, 1H, NH), H-7 11,04 (s, 1H, CH), H-20 8,68 (s, 1H, NH). RMN de ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 184,86 (C10), 179,22 (C15), 163,10 (C14), 159,83 (C4), 140,97 (C7), 151,19 (C1), 142,83 (C4a).

ISATIO-3-OH

Produto: sólido amarronzado; P.F. = 192°C; rendimento 85% Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3332 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3058 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1542 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1459 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1616 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C=O}}$), 3261 ($\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$), 1728 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1095 ($\nu_{\text{N-N}}$), 765, 682 e 657 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), aprox. 3190 (ν_{OH}). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): H-13 12,47 (s, 1H, NH), H-7 11,05 (s, 1H, CH), H-4a 11,39 (s, 1H, OH), H-20 8,20 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 184,76 (C10), 178,39 (C15), 159,83 (C14), 151,11 (C4), 142,82 (C1), 143,09 (C7).

ISATIO-3-NO₂

Produto: pó fino alaranjado; P.F. = 186°C; rendimento 40% Infravermelho (ATR) cm^{-1} : 3396 ($\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada), 3058 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático), 1523 ($\nu_{\text{C=S}}$), 1459 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{N-N}}$), 1614 ($\nu_{\text{C=N}} + \nu_{\text{C=O}}$), 3238 ($\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$), 1726 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1095 e 1068 ($\nu_{\text{N-N}}$), 767, 734 e 673 (padrão de substituição de anel aromático: *m*-substituído), 3160 (ν_{NO_2}). RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): H-13 11,04 (s, 1H, NH), H-7 11,64 (s, 1H, CH), H-20 8,15 (s, 1H, NH). RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 184,86 (C10), 178,79 (C15), 159,84 (C14), 151,17 (C4), 136,66 (C1), 140,36 (C7).

4.3. Procedimentos para Avaliação da Atividade Antifúngica

4.3.1. Inibição do crescimento radial em placa de Petri

Foram realizados ensaios com os produtos sintetizados, com a finalidade de observar se havia inibição do crescimento fúngico através da medida do halo diariamente, durante o espaço de tempo de 1 semana. Nos experimentos foi avaliado se havia atividade antifúngica dos produtos ISATIO-*p*-substituídos e ISATIO-*m*-substituídos frente a uma cepa padrão NRRL 2999 de *Aspergillus parasiticus*. Como também, a observação de desenvolvimento dos conídios.

Os testes foram executados em triplicata, utilizando placas de Petri de poliestireno, nas dimensões 90 x 15 mm. E, o meio de cultura usado para o crescimento do microrganismo, Ágar Extrato de Malte (MEA), foi preparado com 8 g de Extrato de Malte, 0,4 g de Peptona, 8 g de Glicose, 8 g de Ágar Bacteriológico, em 400 mL de água destilada. Este meio, depois de fundido, foi separado em frações de 20 mL, e assim autoclavados (OLIVEIRA, 2010).

Após o meio esterilizado, ele foi homogeneizado com as alíquotas dos produtos a serem testados, com o auxílio de Vortex, de acordo com as concentrações: 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 250

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$; assim, vertidos para as placas, juntamente com o controle negativo, onde se encontrava somente o meio.

A cultura dos fungos que já se encontrava desenvolvida em uma placa, foi utilizada para compor uma solução ágar-ágar 0,2% em água destilada e, desta retirado inóculo e inserido, por meio de uma picada central em cada uma das placas preparadas, vedando-as com Parafilm®, e observando o crescimento do halo diariamente durante 7 dias.

A Figura 17 ilustra o procedimento resumido realizado para avaliar o crescimento fúngico de *Aspergillus parasiticus* e as placas de Petri com o ensaio de um dos compostos avaliados.

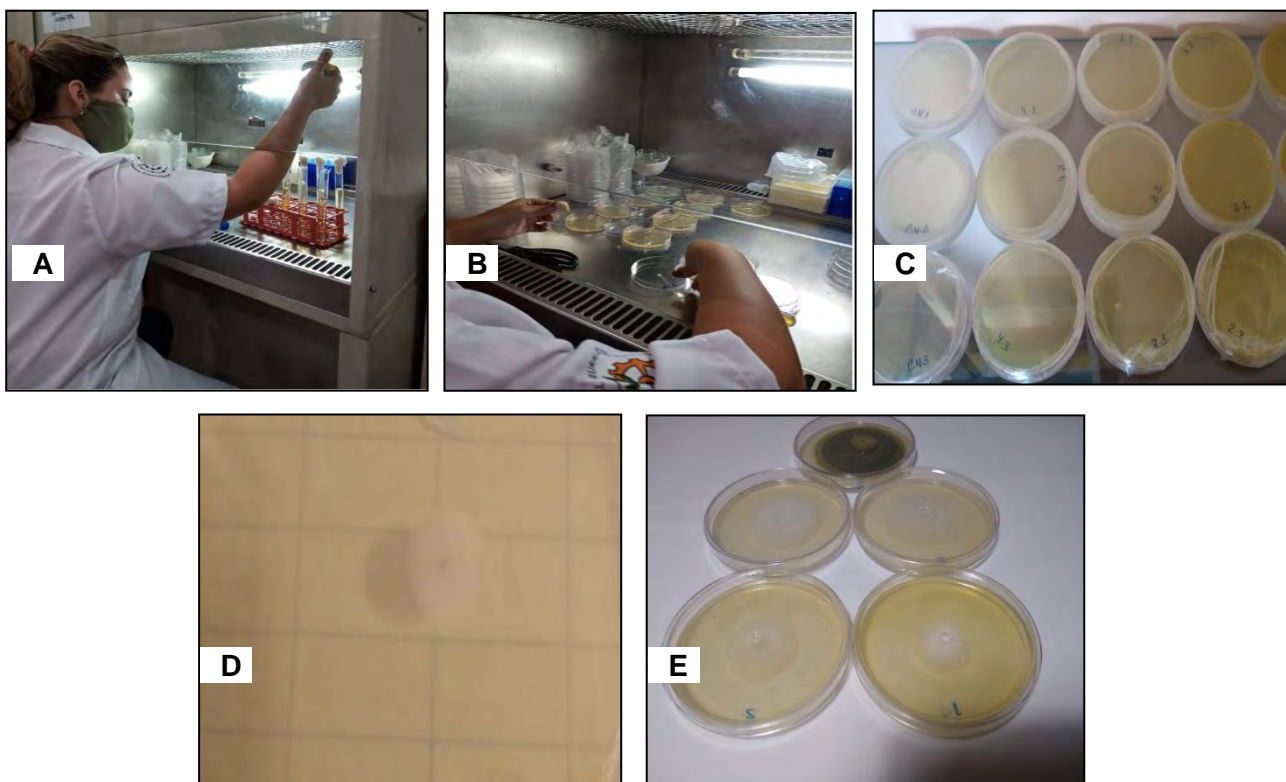


Figura 17: a) Adição dos produtos ao meio de cultura; b) Soluções prontas vertidas nas placas; c) Placas no primeiro dia de análise; d) Crescimento radial do halo; e) Placas de um dos produtos no último dia de análise. Fonte: acervo pessoal.

4.3.2. Concentração Inibitória Mínima através do ensaio da microdiluição

O procedimento para determinar o MIC (Concentração Inibitória Mínima) dos produtos ISATIO-*p*-substituídos e ISATIO-*m*-substituídos foi realizado segundo ao CLSI, em microplacas de 96 poços de fundo em “U” incubadas a $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$; onde em cada linha da placa tinha um tratamento. As soluções dos produtos foram feitas a partir de soluções estoques de 25 mg.mL^{-1} preparadas em DMSO, onde a alíquota retirada foi homogeneizada com o meio RPMI e adicionada nos poços. A

Nistatina e o Itraconazol, antifúngicos utilizados como controle positivo, foram homogêneos com o meio e adicionada ao poço.

Na linha A o agente antifúngico Nistatina, em seu primeiro poço, 200 µL dessa solução e nas colunas seguintes 100 µL do meio e 100 µL do poço anterior; sendo por fim adicionando em cada um dos poços 100 µL de inóculo de microrganismo. Na linha B o agente antifúngico Itraconazol, repetindo o mesmo procedimento citado anteriormente. E em todas as linhas subsequentes, os produtos foram testados, executando o mesmo procedimento realizado com o antifúngico. Uma coluna de poços foi utilizada como controle de crescimento, adicionando 100 µL do inóculo a 100 µL do meio de cultura, e outro como controle de esterilidade do meio de cultura, adicionando-se apenas 100 µL do meio de cultura RPMI-1640 com 2% de glicose e 100 µL de água estéril.

A solução padrão de pré-inóculo foi obtida coletando colônias da cepa clínica identificada como pertencente ao complexo *Sporothrix spp*, que possui uma maior probabilidade de ser *S.brasiliensis*, contudo não houve uma identificação molecular; sendo ela oriunda de lesão grave de felino, que para fins de organização denominou-se SC 541536. A densidade da suspensão foi ajustada até obter turbidez equivalente ao de uma solução padrão de sulfato de bário McFarland 0,5 (0,5 mL de BaCl₂ 0,048 M, 99,5 mL de H₂SO₄ 0,18 M).

Foram realizadas triplicatas de cada uma das soluções testadas e verificado o resultado em 48 h após incubação em estufa a temperatura de 27 °C. A Figura 18 ilustra o procedimento resumido para avaliação do MIC frente ao fungo *Sporothrix spp*.

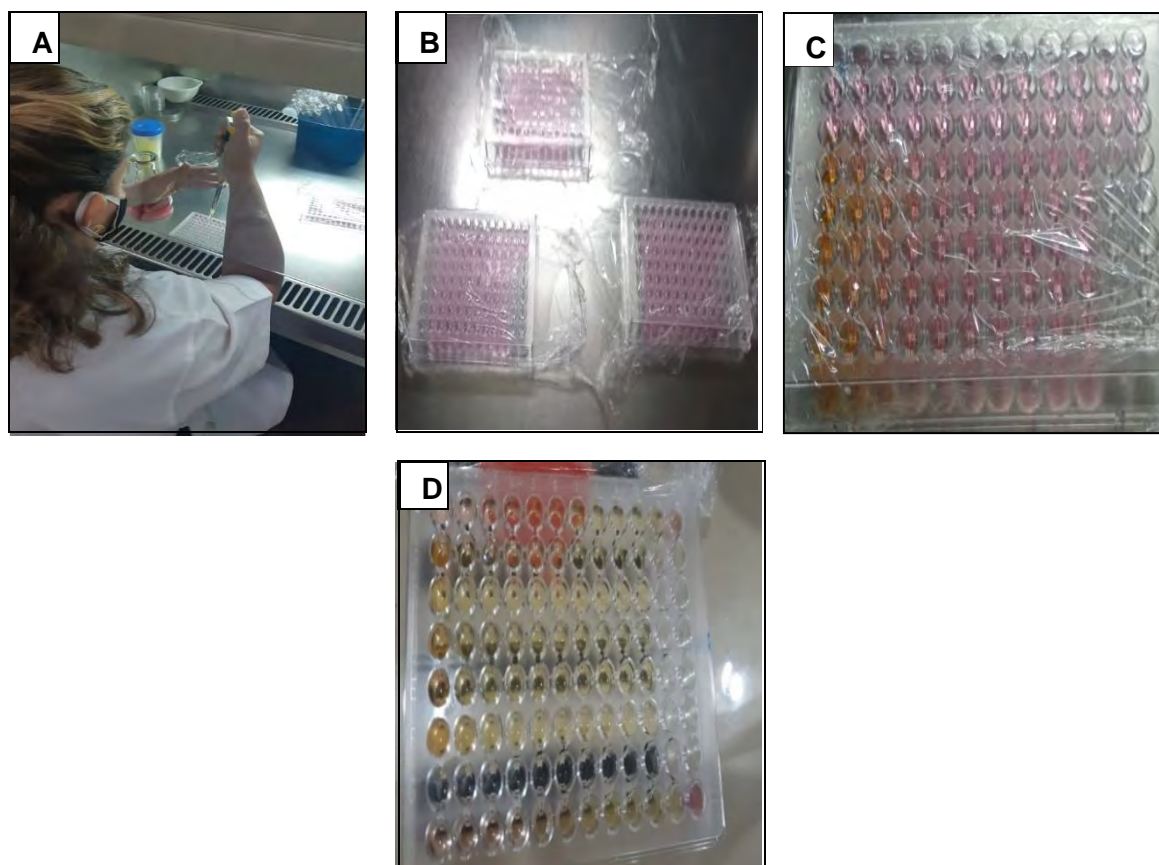


Figura 18: a) Preparação das placas 96 poços; b) Placas com o meio RPMI adicionado em cada poço; c) Placa com os produtos; agentes antifúngicos e inóculo adicionado; d) Placa depois de 48h. Fonte: acervo pessoal.

4.4. Estudo das Correlações entre a Estrutura Química X Deslocamentos Químicos de RMN e Atividade Antifúngica

As correlações e gráficos realizados entre os valores de parâmetros físico-químicos, (eletrônicos e lipofílicos) e os resultados biológicos foram realizadas utilizando o programa Origin versão 6.0 em computador pessoal.

4.5. Determinação da Atividade Quelante

A análise foi realizada no espectrofotômetro JASCO J-815 CD Spectrometer e para obtenção dos espectros foram utilizadas soluções estoque dos produtos com melhores resultados na atividade antifúngica: ISATIO-4-Cl ($10,42 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), ISATIO-4-CH₃ ($11,12 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), ISATIO-4-CF₃ ($9,52 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), ISATIO-4-F ($10,98 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), ISATIO-3-Cl ($10,42 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e ISATIO-

3-F ($10,98 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) em DMSO, utilizou-se também as soluções aquosas de FeSO_4 ($1,60 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e de EDTA ($1,60 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) como padrão de quelação com o Ferro.

Os espectros foram obtidos em cubeta de quartzo (1,5 mL) e a sobreposição dos espectros de UV/Vis obtidos foi realizada utilizando-se o programa Origin 8.0. A Figura 19 ilustra o gráfico da curva padrão obtida neste experimento.

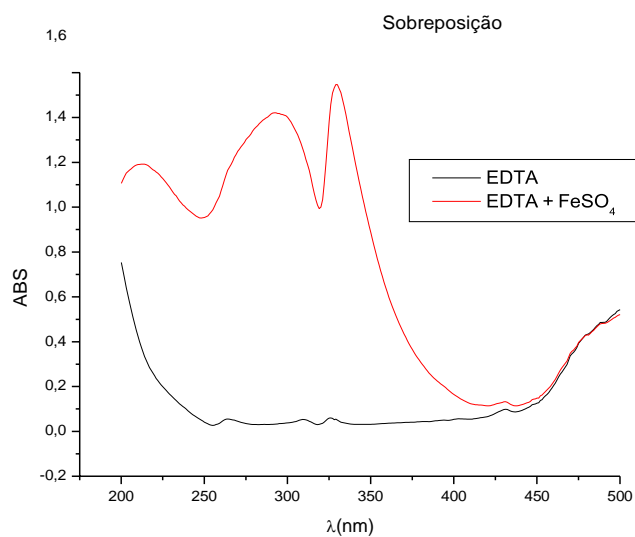


Figura 19: Espectro de UV/Vis do EDTA ($1,60 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e com EDTA Fe^{+2} ($1,60 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho de dissertação foi sintetizada uma série de novos compostos utilizando a técnica de hibridação molecular entre aril-tiossemicarbazonas e a isatina visando uma possível ação biológica, devido às propriedades, já conhecidas, das isatina, bem como das tiossemicarbazonas. Foi realizada a síntese e caracterização de 18 (dezoito) aril-tiossemicarbazonas (**TIO**) já conhecidas na literatura, e 18 (dezoito) isatina-tiossemicarbazonas (**ISATIO**) inéditas que, posteriormente, foram avaliadas quanto a atividade frente aos fungos *Aspergillus parasiticus* e *Sporothrix spp.*

Inicialmente, foram preparadas as aril-tiossemicarbazonas pelo método convencional, que consiste na reação em quantidades equimolares entre os benzaldeídos *p*-substituídos e *m*-substituídos, onde os substituintes na posição *para* foram: H, Br, Cl, F, CF₃, CH₃, OCH₃, N(CH₃)₂, NO₂ e OH, e os substituintes na posição *meta*: Br, Cl, F, CF₃, CH₃, OCH₃, NO₂ e OH com a tiossemicarbazida em meio de etanol como solvente, sob agitação e aquecimento, contendo quantidades catalíticas de ácido sulfúrico concentrado.

Posteriormente, os produtos obtidos, as aril-tiossemicarbazonas, foram colocados em refluxo com a isatina, usando etanol como solvente, contendo quantidades catalíticas de ácido acético glacial.

A Figura 18 representa a rota sintética empregada para a preparação dos compostos que posteriormente foram alvo de estudos em relação a atividade antifúngica.

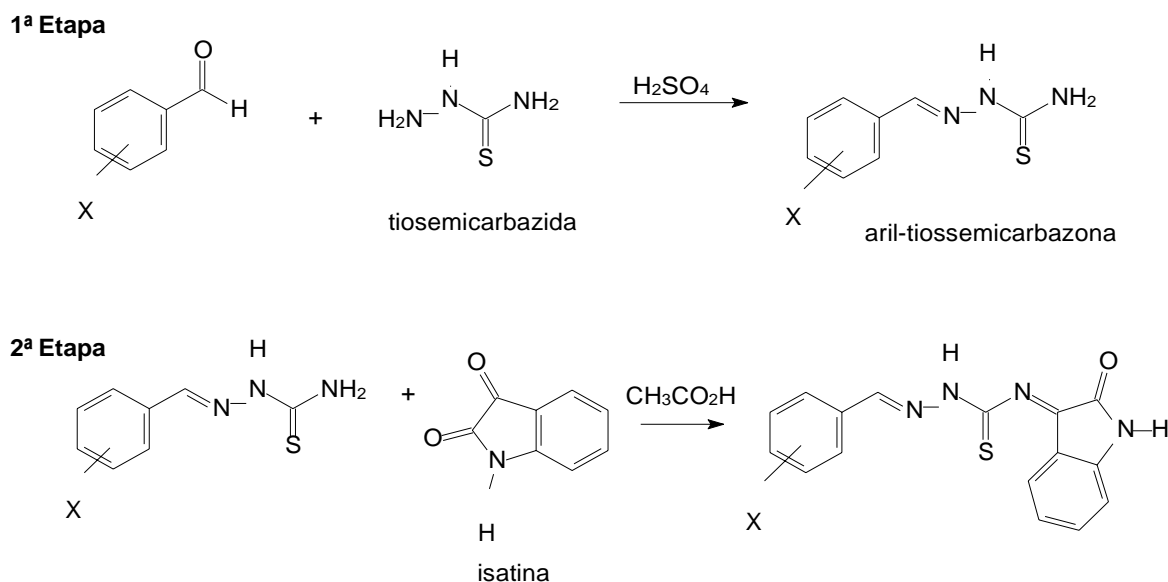


Figura 20: Rota sintética empregada na obtenção das isatina-tiossemicarbazonas.

As isatina-tiossemicarbazonas foram caracterizados por IV, RMN de ¹H e ¹³C. As seções a seguir mostram os resultados detalhados para a síntese dos intermediários e isatina-tiossemicarbazonas.

5.1 Obtenção e caracterização das aril-tiossemicarbazonas

As aril-tiossemicarbazonas foram obtidas a partir do benzaldeído e dos benzaldeídos substituídos e a tiossemicarbazida sob aquecimento e agitação magnética na presença de gotas de ácido sulfúrico como catalisador em etanol como solvente. Os produtos obtidos mostraram colorações variadas e aparências distintas, tais como formato de agulhas, pó fino, sólido brilhante ou amorfo. Seus pontos de fusão também foram diferentes entre si.

Além disso, alguns mostraram dificuldade na cristalização, embora o período de 3 h tivesse sido suficiente para a formação do produto. As reações que utilizaram o *p*-dimetilaminobenzaldeído, *p*-tolualdeído, *p*-trifluorometilbenzaldeído, *p*-hidroxibenzaldeído, e o benzaldeído precisaram ficar mais tempo em repouso depois da reação finalizada, aproximadamente 5 dias, de maneira diferente dos demais que com 2 dias de repouso à temperatura ambiente, já apresentavam seus cristais formados. Os rendimentos obtidos ficaram na faixa de 88% a 43%. A Tabela 01 indica os rendimentos, aparência física e pontos de fusão obtidos para todas as *p*-tiossemicarbazonas preparadas. A Figura 21 mostra a aparência física de alguns produtos obtidos.

Tabela 01. Pontos de fusão, rendimentos e aparência física das tiossemicarbazonas 4-substituídas.

TIO-4-X	Fórmula Molecular	Aparência Física do Produto	P.F. (°C)	P.F (°C) literatura	Rendimento (%)
TIO -H	C ₈ H ₉ N ₃ S	Sólido esbranquiçado em formato de agulhas	158	155 ^a	85
TIO -F	C ₈ H ₉ N ₃ SF	Sólido esbranquiçado brilhante	200	-	78
TIO -Cl	C ₈ H ₉ N ₃ SCl	Sólido esbranquiçado	226	218 ^a	54
TIO -Br	C ₈ H ₉ N ₃ SBr	Sólido esbranquiçado	228	220 ^a	46
TIO -CH ₃	C ₉ H ₁₁ N ₃ S	Sólido branco	176	185 ^a	88
TIO -CF ₃	C ₉ H ₈ N ₃ SF ₃	Sólido esbranquiçado	212	-	47
TIO -OH	C ₈ H ₁₀ N ₃ OS	Sólido amarelo	224	227 ^b	64
TIO -OCH ₃	C ₉ H ₁₁ N ₃ OS	Sólido amarelado	180	179 ^b	52
TIO-N(CH ₃) ₂	C ₁₀ H ₁₄ N ₄ S	Sólido vermelho brilhante	202	199 ^a	81
TIO -NO ₂	C ₈ H ₉ N ₄ O ₂ S	Sólido amarelo intenso opaco	228	222 ^c	79

^aGOULART, 2010; ^bALBUQUERQUE, 2013.

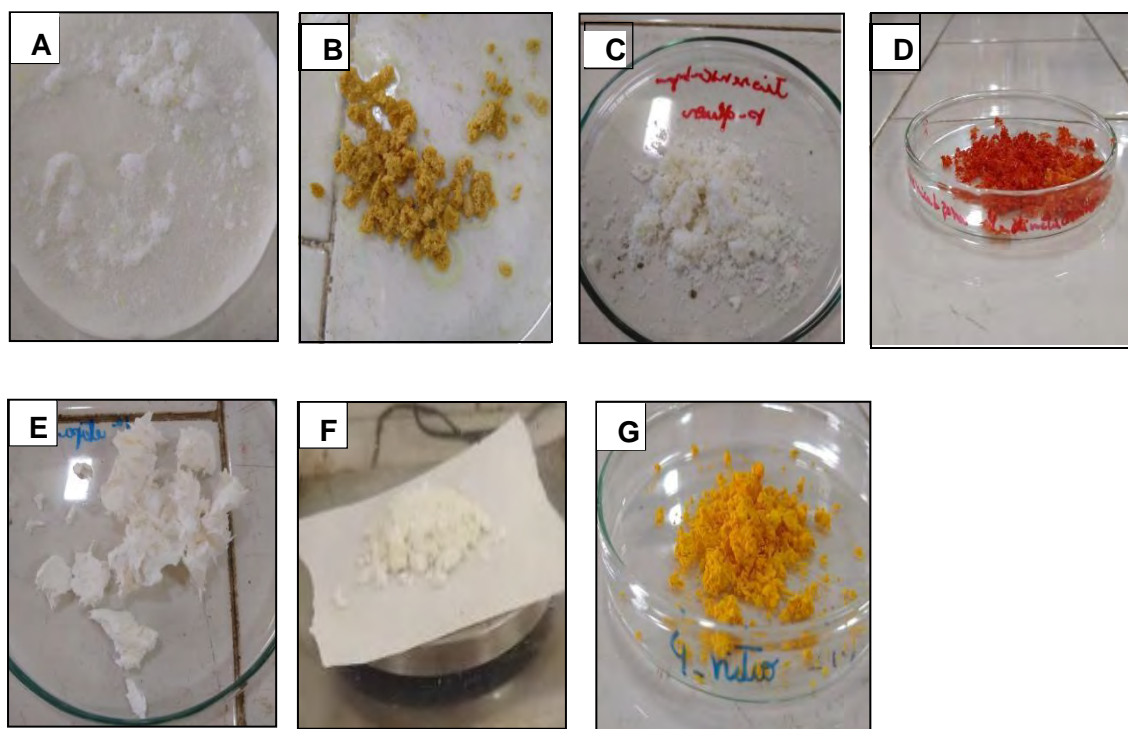


Figura 21: Imagem do aspecto físico de algumas tiossemicarbazonas *p*-substituídas obtidas: 4-trifluor (a); 4-hidroxi (b); 4-fluor (c); 4-dimetilamino (d); não substituído (e); 4-metil (f); 4-nitro (g). Fonte: acervo pessoal.

Além disso, algumas tiossemicarbazonas mostraram dificuldade na cristalização, embora 3 h tivesse sido suficiente para a formação do produto, as reações que utilizaram o *m*-tolualdeído e o *m*-trifluormetilbenzaldeído precisaram ficar mais tempo em repouso depois da reação finalizada, aproximadamente 5 dias, para que seus cristais fossem formados. Os rendimentos obtidos ficaram na faixa de 98% a 52%. A Tabela 02 indica os rendimentos, aparência física e pontos de fusão obtidos para as *m*-tiossemicarbazonas preparadas. A Figura 22 mostra a aparência física de alguns produtos obtidos.

Tabela 02. Pontos de fusão, rendimentos e aparência física das tiossemicarbazonas 3-substituídas.

TIO-3-X	Fórmula Molecular	Aparência Física do Produto	P.F. (°C)	P.F (°C) literatura	Rendimento (%)
TIO -F	C ₈ H ₉ N ₃ SF	Sólido esbranquiçado	194	190 ^b	76
TIO -Cl	C ₈ H ₉ N ₃ SCl	Sólido amorfo esbranquiçado	198	195 ^c	90
TIO -Br	C ₈ H ₉ N ₃ SBr	Sólido amorfo esbranquiçado	208	208 ^d	73
TIO -CH ₃	C ₉ H ₁₁ N ₃ S	Sólido amorfo esbranquiçado	198	-	93
TIO -CF ₃	C ₉ H ₈ N ₃ SF ₃	Sólido brilhoso levemente amarelado	212	220 ^a	98
TIO -OH	C ₈ H ₁₀ N ₃ OS	Sólido amorfo amarelo	226	-	52
TIO -OCH ₃	C ₉ H ₁₁ N ₃ OS	Sólido amorfo amarelo	193	192 ^c	95
TIO -NO ₂	C ₈ H ₉ N ₄ O ₂ S	Sólido amarronzado	238	238 ^c	60

^aDU *et al*, 2002; ^bÇAKIR *et al*, 2015; ^cRAGHAV & KAUR, 2014; ^dASHRY *et al*, 2014.

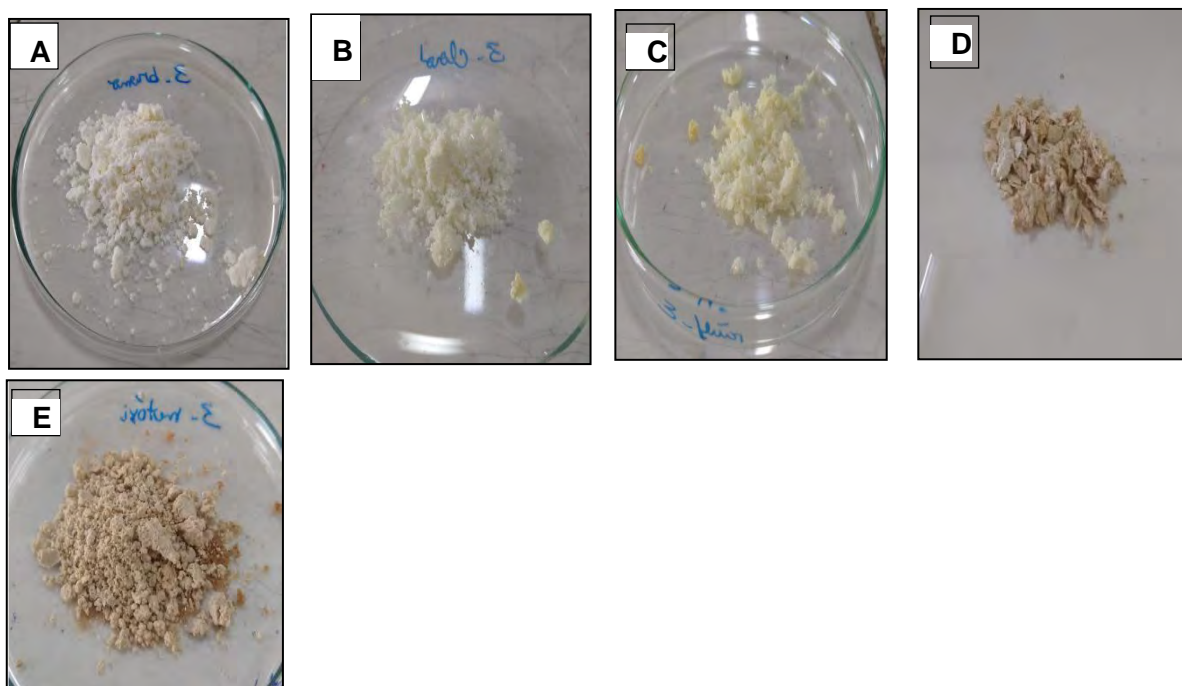


Figura 22: Imagem do aspecto físico de algumas tiossemicarbazonas *m*-substituídas obtidas: 3-bromo (a); 3-cloro (b); 3-fluor (c); 3- hidroxi (d); 3-metóxi (e). Fonte: acervo pessoal.

A obtenção das tiossemicarbazonas ocorreu pela reação de condensação quimiosseletiva da tiossemicarbazida com aldeídos, neste caso benzaldeídos substituídos. Inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila para formar o intermediário íon oxônio, seguido de ataque nucleofílico do nitrogênio da tiossemicarbazida levando ao intermediário hemiaminal protonado. Este último perde uma molécula de água e após neutralização e captura dos hidrogênios ligados ao nitrogênio, forma-se a tiossemicarbazona. A Figura 23 mostra o mecanismo de formação do intermediário da síntese.

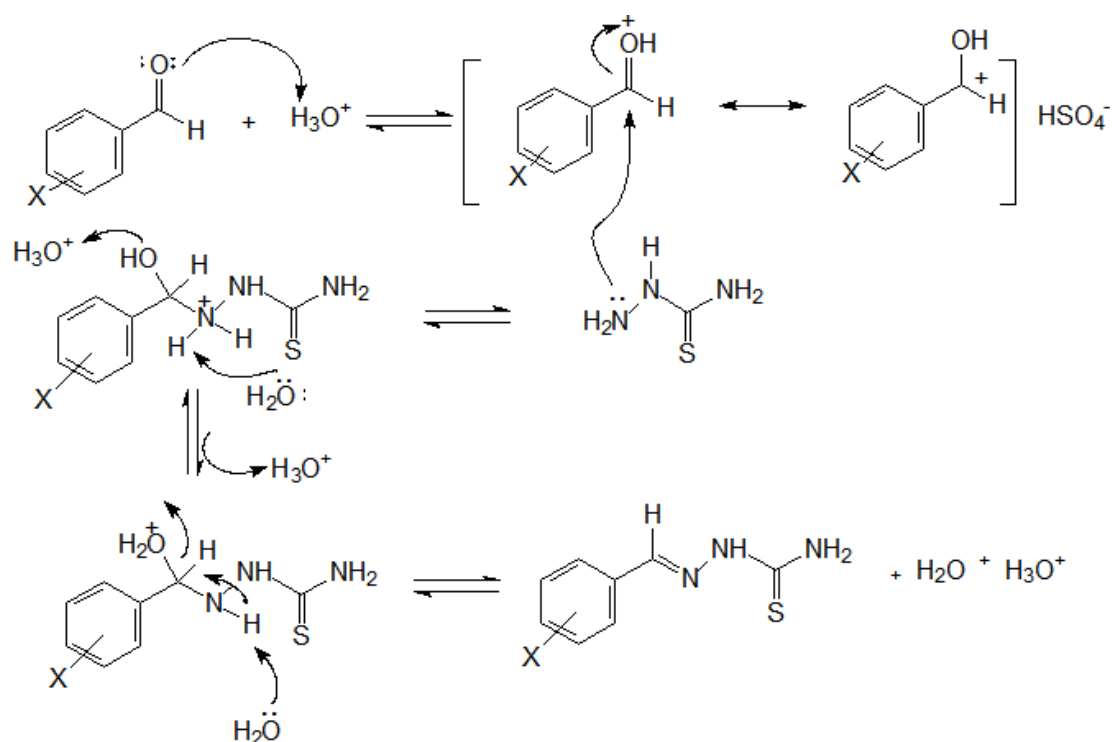


Figura 23: Mecanismo de formação da tiossemicarbazona em meio ácido (adaptado TENÓRIO; GÓES, 2005).

A caracterização das aril-tiossemicarbazonas foi realizada por comparação com os dados da literatura utilizando a técnica de infravermelho e o ponto de fusão.

Os espectros de infravermelho de todos os compostos apresentaram bandas de absorção características dos modos vibracionais esperados, conforme resumido nas Tabelas 3 e 4. De forma geral, a presença de bandas de absorção atribuídas ao VN-H(primária associada), VN-H(secundária associada), VC-H Ar, VC=S, VC=N + VN-N, VN-N, indicaram a formação das tiossemicarbazonas. Também foram observadas bandas de absorção intensas referentes ao padrão de substituição do anel aromático de cada composto.

Tabela 3. Principais bandas de absorção (cm^{-1}) observadas nos espectros de infravermelho para as tiossemicarbazonas 4-substituídas sintetizadas.

TIO-4-X	V_{N-H} primária associada	V_{N-H} secundária associada	V_{C-H} Ar	V_{C=S}	V_{C=N} + V_{N-N}	V_{N-N}	Padrão de substituição de anel aromático	V_{C-X}
TIO-H	3419	3251	3025	1589	1540	1105 e 1085	761 e 694	-
TIO-F	3390	3232	3049	1600	1531	1105 e 1089	833	1226
TIO-Cl	3436	3278	3058	1598	1523	1105 e 1089	813	611
TIO-Br	3434	3284	3184	1596	1519	1105 e 1087	810	609
TIO-CH₃	3400	3234	3000	1594	1537	1095 e 1062	811	1365
TIO-CF₃	3430	3261	3058	1596	1533	1164 e 1134	732	1324
TIO-OH	3471	3359	2800	1577	1552	1097	823	3186-3016
TIO-OCH₃	3402	3286	3058	1596	1533	1085 e 1056	833	1232 e 1186
TIO-N(CH₃)₂	3348	3255	2900	1581	1517	1076	819	1361
TIO -NO₂	3490	3363	3143	1525	1450	1093 e 1051	817	1575 e 1336

Todos os compostos obtidos nesta tabela e na seguinte apresentaram as principais bandas de absorção conforme o esperado e, de acordo com a natureza dos substituintes considerando os efeitos retiradores ou doadores de elétrons e, também, à sua posição na substituição no anel.

Tabela 04. Principais bandas de absorção (cm^{-1}) observadas nos espectros de infravermelho para as tiossemicarbazonas 3-substituídas sintetizadas.

TIO-3-X	VN-H primária associada	VN-H secundária associada	VC-H Ar	VC=S	VC=N + VN-N	VN-N	Padrão de substituição de anelaromático	VC-X
TIO-F	3390	3236	3159	1602	1529	1095 e 1049	883, 752 e 678	1180
TIO-Cl	3388	3228	3149	1602	1523	1099 e 1074	850, 779 e 678	621
TIO-Br	3390	3232	3153	1602	1531	1105 e 1066	939, 783 e 678	541
TIO-CH₃	3382	3240	2989	1596	1537	1097 e 1058	831, 781 e 686	1361
TIO-CF₃	3400	3234	3155	1596	1533	1124 e 1068	833, 800 e 692	1324
TIO-OH	3334	3186	2981	1581	1540	1153 e 1099	935, 781 e 684	3186 – 3159
TIO-OCH₃	3396	3276	3153	1591	1533	1093 e 1041	833, 783 e 686	1267 e 1157
TIO –NO₂	3394	3236	3153	1523	1471	1105 e 1066	817, 736 e 702	1602 e 1346

5.2 Obtenção e caracterização dos híbridos isatina-tiossemicarbazonas

As isatina-tiossemicarbazonas foram preparadas a partir das aril-tiossemicarbazonas, como intermediários obtidos na etapa anterior, e a isatina em quantidades equimolares em etanol como solvente e com quantidade catalítica de ácido acético glacial. A reação ocorreu sob refluxo em tempos variados.

Os compostos obtidos apresentaram características físicas diferentes, tanto na aparência física, quanto na coloração, embora todos eles tivessem tonalidades na cor vermelha, destacando que a isatina tem a coloração bem intensa avermelhada. Seus pontos de fusão também foram diferentes entre si.

Além disso, alguns compostos necessitaram maiores tempos de reação sob refluxo e foram cristalizados com dificuldade. A isatina-tiossemicarbazona obtida a partir da fenil-tiossemicarbazona

precisou de 7 h no refluxo, ao invés das 4 h para os demais compostos. Os produtos provenientes da *p*-cloro-fenil-tiossemicarbazona e *p*-trifluormetil-fenil-tiossemicarbazona, necessitaram de mais de uma recristalização, pois ainda se encontravam com impurezas.

A precipitação das isatina-tiossemicarbazonas a partir das aril-tiossemicarbazonas *p*-dimetilamino, *p*-metil, *p*-trifluormetil, *p*-hidroxi e a não substituída ocorreu após 5 dias da finalização do aquecimento da mistura de reação, diferentemente dos demais cuja precipitação dos cristais ocorreu após com 2 dias de repouso à temperatura ambiente. Os rendimentos foram obtidos na faixa de 88% a 21%. A Tabela 5 mostra os rendimentos, pontos de fusão e aparência física dos compostos obtidos e a Figura 24 as imagens com a aparência física.

Tabela 05: Rendimentos, pontos de fusão e aparência física das isatina-*p*-tiossemicarbazonas (ISATIO-X) sintetizadas.

ISATIO-4-X	Fórmula Molecular	Aparência Física do Produto	P.F. (°C)	Rendimento (%)
ISATIO-H	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ SO	Sólido vermelho intenso em forma de agulhas	216	54
ISATIO-F	C ₁₆ H ₁₁ N ₄ SOF	Sólido avermelhado	188	56
ISATIO-Cl	C ₁₆ H ₁₁ N ₄ SOCl	Pó fino amarronzado	208	50
ISATIO-Br	C ₁₆ H ₁₁ N ₄ SOBr	Sólido amarelo alaranjado	222	58
ISATIO-CH ₃	C ₁₇ H ₁₄ N ₄ SO	Sólido vermelho amarronzado brilhoso	184	69
ISATIO-CF ₃	C ₁₇ H ₁₁ N ₄ SOF ₃	Sólido vermelho alaranjado em forma de agulhas	182	88
ISATIO-OH	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ SO ₂	Sólido vermelho amarronzado em forma de agulhas	236	60
ISATIO-OCH ₃	C ₁₇ H ₁₄ N ₄ SO ₂	Pó fino avermelhado	218	50
ISATIO-N(CH ₃) ₂	C ₁₈ H ₁₇ N ₅ SO	Sólido marrom amorfo	188	70
ISATIO-NO ₂	C ₁₆ H ₁₁ N ₅ SO ₃	Sólido alaranjado	201	69

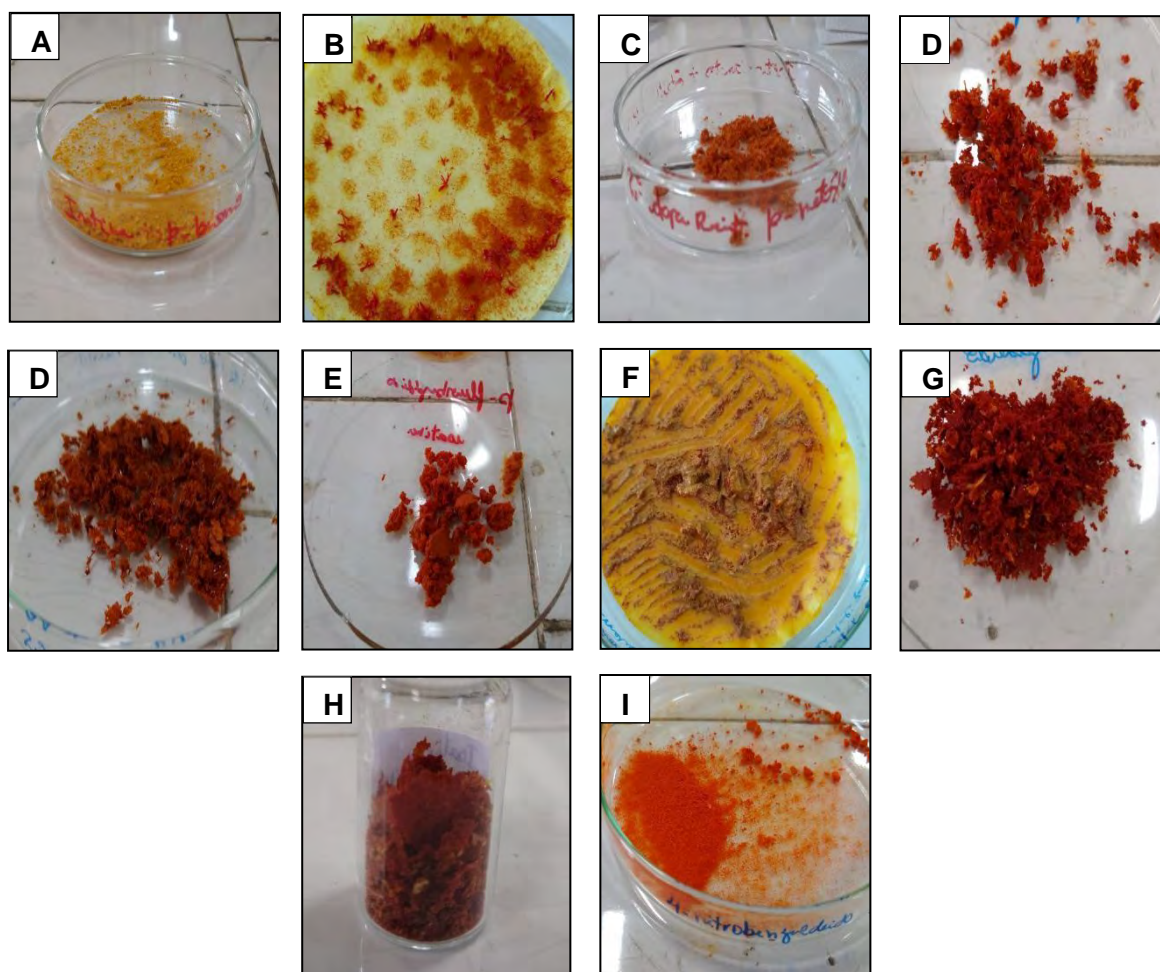


Figura 24: Imagem das isatina-*p*-X-tiossemicarbazonas formadas: 4-bromo (a); 4-cloro (b); 4-metóxi (c); 4-trifluor (d); 4-hidroxi (e); 4-fluor (f); 4-dimetilamino (g); não-substituída (h); 4-metil (i); 4-nitro (j). Fonte: acervo pessoal.

A precipitação das isatina-tiossemicarbazonas a partir das tiossemicarbazonas *p*-trifluormetil e *p*-hidroxi, ocorreu após aproximadamente 5 dias após o final da reação, diferentemente dos demais cuja precipitação dos cristais ocorreu com 2 dias de repouso à temperatura ambiente. Os rendimentos foram obtidos na faixa de 91% a 40%. A Tabela 6 mostra os rendimentos, pontos de fusão e aparência física dos compostos obtidos e a Figura 25 as imagens da aparência física.

Tabela 6: Rendimentos, pontos de fusão e aparência física das isatina-*m*-X-tiossemicarbazonas (ISATIO-X) sintetizadas.

ISATIO-3-X	Fórmula Molecular	Aparência Física do Produto	P.F. (°C)	Rendimento (%)
ISATIO-F	C ₁₆ H ₁₁ N ₄ SOF	Sólido alaranjado	174	86
ISATIO-Cl	C ₁₆ H ₁₁ N ₄ SOCl	Sólido vermelho alaranjado	195	88
ISATIO-Br	C ₁₆ H ₁₁ N ₄ SOBr	Sólido alaranjado	188	70
ISATIO-CH ₃	C ₁₇ H ₁₄ N ₄ SO	Sólido alaranjado	182	64
ISATIO-CF ₃	C ₁₇ H ₁₁ N ₄ SOF ₃	Sólido avermelhado	198	91
ISATIO-OH	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ SO ₂	Sólido amarronzado	192	85
ISATIO-OCH ₃	C ₁₇ H ₁₄ N ₄ SO ₂	Sólido vermelho alaranjado	194	46
ISATIO-NO ₂	C ₁₆ H ₁₁ N ₅ SO ₃	Pó fino alaranjado	186	40

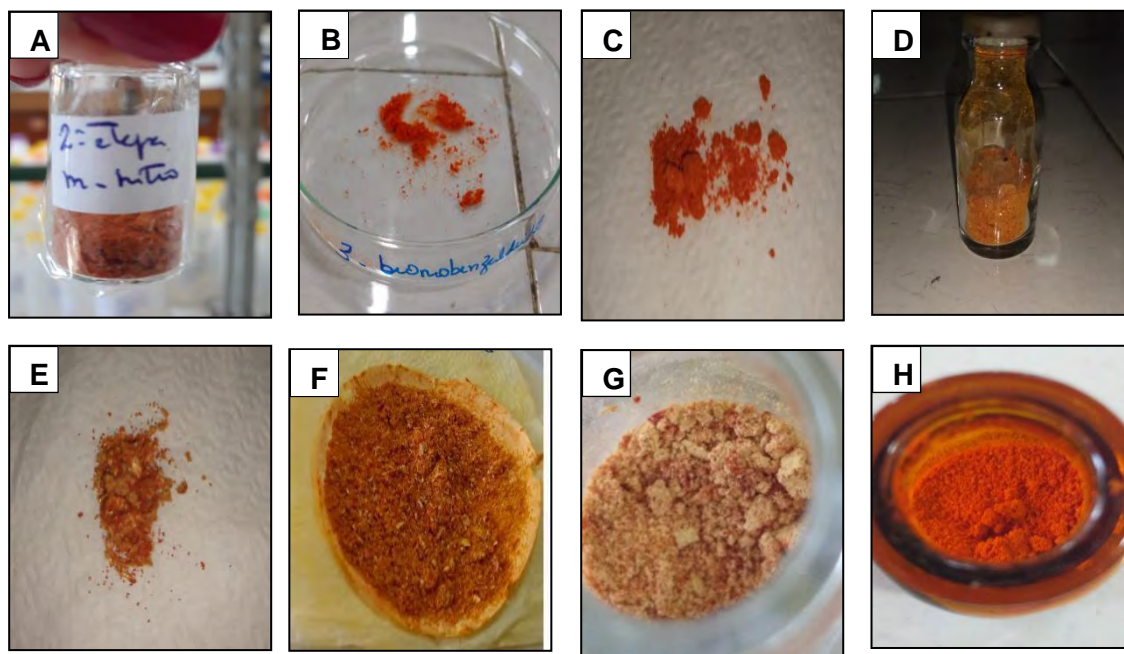


Figura 25: Imagem das isatina-*m*-X-tiossemicarbazonas formadas: 3-nitro (a); 3-bromo (b); 3-cloro (c); 3-fluor (d); 3- hidróxi (e); 3-metóxi (f); 3-trifluormetil (g); 3-metil (h). Fonte: acervo pessoal.

O mecanismo sugerido para a reação inicia-se com a protonação do oxigênio da carbonila cetônica da isatina, através do ácido acético, para formar o intermediário íon oxônio, seguido de ataque nucleofílico do nitrogênio da tiossemicarbazona ao carbono, para gerar o intermediário tetraédrico. Esse intermediário perde uma molécula de água e os hidrogênios ligados ao nitrogênio, são capturados pela água ou pela base acetato, formando-se, assim, o híbrido isatina-tiossemicarbazona. A Figura 26 mostra o mecanismo sugerido para a reação de formação da imina no híbrido isatina-tiossemicarbazona.

Além disso, os híbridos isatina-tiossemicarbazonas, obtidos neste trabalho, não foram encontrados nos bancos de dados da literatura. Ademais, têm sido reportados muitos artigos onde observa-se a reação da carbonila cetônica da isatina com a tiossemicarbazida pelo seu átomo de nitrogênio mais nucleofílico, ou seja, o NH_2 terminal mais distante da tiocarbonila.

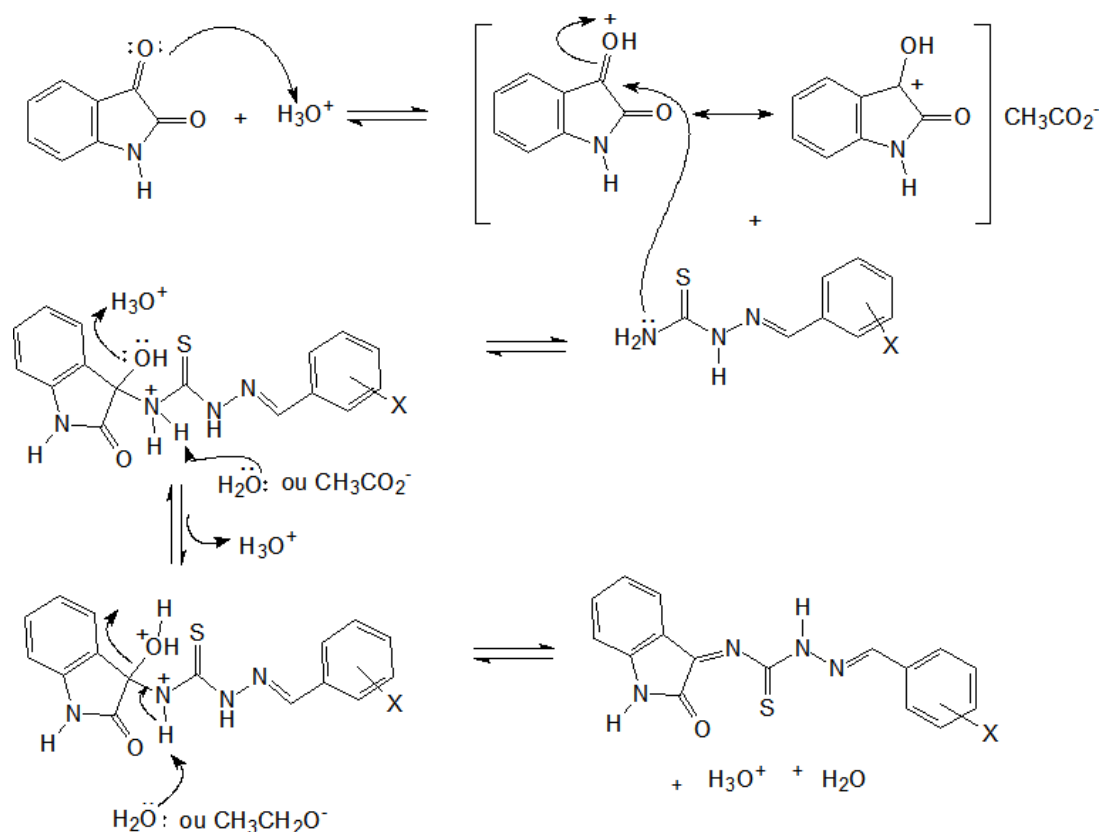


Figura 26. Mecanismo sugerido para a formação do híbrido isatina-aril-tiossemicarbazona em meio de ácido acético.

A caracterização dos compostos obtidos foi realizada por infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . Os espectros de infravermelho de todos os compostos apresentaram bandas de absorção características dos modos vibracionais esperados, conforme resumido nas Tabela 07 e 08. De forma

geral, a presença de bandas de absorção atribuídas a $\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada, $\nu_{\text{C-H Ar}}$, $\nu_{\text{C=S}}$, $\nu_{\text{C=N}^+}$, $\nu_{\text{N-N}}$, $\nu_{\text{C=N}}$ + $\nu_{\text{C=O}}$, $\nu_{\text{N-H}} + \nu_{\text{C=O}}$, $\nu_{\text{C=O}}$, indicaram a ocorrência da reação entre a isatina e as aril-tiossemicarbazonas. O desaparecimento da banda referente à carbonila cetônica da isatina e o aparecimento da banda C=N da imina indicaram fortemente a obtenção dos híbridos isatina-tiossemicarbazonas. Também foram observadas bandas de absorção intensas referentes ao padrão de substituição do anel aromático de cada composto.

Tabela 7: Principais bandas de absorção, em cm^{-1} , observados nos espectros de Infravermelho para as isatina-*p*-X-tiossemicarbazonas (**ISATIO-4-X**).

ISATIO-4-X	$\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada	$\nu_{\text{C-H Ar}}$	$\nu_{\text{C=S}}$	$\nu_{\text{C=N}} +$ $\nu_{\text{N-N}}$	$\nu_{\text{C=N}} +$ $\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{N-H}} +$ $\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{C=O}}$	Padrão de substituição de anel aromático	$\nu_{\text{C-X}}$
ISATIO-H	3211	3000	1618	1604	1697	3176	1726	734 e 630	-
ISATIO-F	3300	2981	1510	1458	1614	3100	1724	765	1330
ISATIO-Cl	3160	3050	1600	1459	1612	2981	1724	871	659
ISATIO-Br	3280	3056	1598	1521	1668	3164	1685	811	611
ISATIO-CH₃	3200	3000	1537	1461	1598	3159	1726	811	1330
ISATIO-CF₃	3209	3050	1616	1585	1695	3176	1724	730	1319
ISATIO-OH	3430	3058	1594	1459	1614	3361	1731	829	3182
ISATIO-OCH₃	3288	3114	1540	1508	1685	3184	1726	765	1247 e 1201
ISATIO-N(CH₃)₂	3249	2995	1521	1456	1589	3149	1724	813	1357
ISATIO-NO₂	3415	3097	1606	1459	1701	3211	1724	844	3173

Observando-se os resultados das absorções nas Tabelas 07 e 08, pôde se verificar os valores das bandas de absorção características para esses produtos formados, conforme o esperado em função dos efeitos eletrônicos dos substituintes.

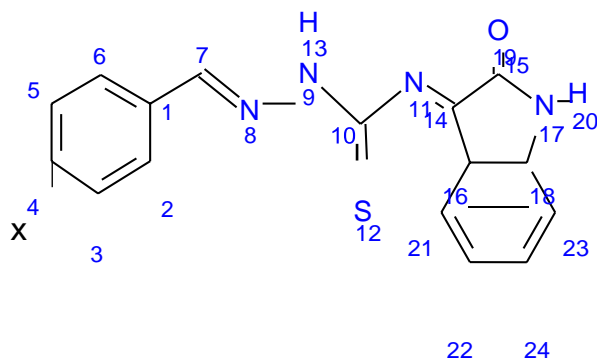
Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos obtidos corroboraram a caracterização das isatina-tiossemicarbazonas conforme as estruturas propostas.

Tabela 08: Principais bandas de absorção, em cm^{-1} , observados nos espectros de Infravermelho para as isatina-aril-*m*-X-tiossemicarbazonas (**ISATIO-3-X**).

ISATIO-3-X	$\nu_{\text{N-H}}$ secundária associada	$\nu_{\text{C-H Ar}}$	$\nu_{\text{C=S}}$	$\nu_{\text{C=N +}}$ $\nu_{\text{N-N}}$	$\nu_{\text{C=N +}}$ $\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{N-H +}}$ $\nu_{\text{C=O}}$	$\nu_{\text{C=O}}$	Padrão de substituição de anel aromático	$\nu_{\text{C-X}}$
ISATIO-F	3365	2894	1614	1531	1685	3230	1724	761, 676 e 657	1267
ISATIO-Cl	3386	3197	1527	1459	1612	3216	1786	829, 767 e 676	622
ISATIO-Br	3392	3027	1602	1531	1697	3155	1728	827, 784 e 678	622
ISATIO-CH₃	3437	3076	1645	1550	1708	3342	1782	800, 781, 717	1351
ISATIO-CF₃	3432	3159	1606	1537	1674	3265	1726	800, 692	1319
ISATIO-OH	3332	3058	1542	1459	1616	3261	1728	765, 682 e 657	3190
ISATIO-OCH₃	3384	2981	1596	1535	1612	3162	1726	769, 734 e 684	1288 e 1269
ISATIO-NO₂	3396	3058	1523	1459	1614	3238	1726	767, 734 e 673	3160

As Tabelas 09 e 10 mostram os deslocamentos químicos para os principais hidrogênios e as Tabelas 11 e 12 os deslocamentos químicos para os principais carbonos nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , respectivamente, para as isatina-tiossemicarbazonas sintetizadas. Os referidos espectros encontram-se em anexo.

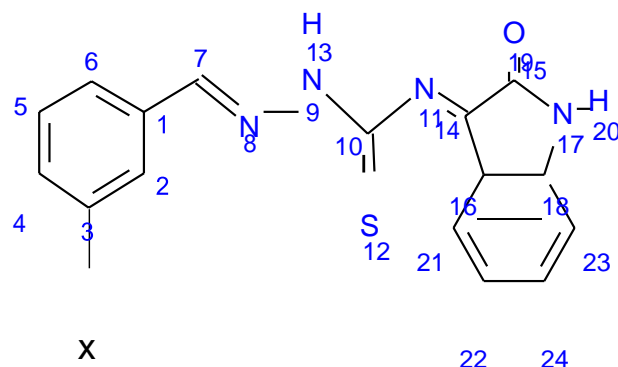
Tabela 09: Deslocamentos químicos (δ) para os principais hidrogênios, em ppm, das isatina-aryl-4-X-tiossemicarbazonas (**ISATIO-4-X**).



4-X	δ H-9 (N-H)	δ H-7 (C-H)	δ H-17 (N-H)	δ (X-H)
H	12,48	11,22	9,06	-
F	11,04	11,44	8,21	-
Cl	12,44	11,50	8,26	-
Br	12,48	11,51	8,01	-
CH₃	12,47	11,39	9,06	2,33
CF₃	12,48	11,22	9,06	-
OH	12,48	11,27	9,06	11,22
OCH₃	12,48	11,33	8,70	3,79
N(CH₃)₂	12,47	11,20	9,06	2,96
NO₂	12,47	11,05	8,24	-

Verifica-se na Tabela 9, nos deslocamentos químicos dos hidrogênios de N-H na posição 9, o menor valor atribuído a estrutura com o substituinte flúor na posição *para* do anel aromático (11,04 ppm) comparando-se com os demais compostos que apresentaram valores praticamente iguais (δ 12,47-12,48) e, para os *meta*-substituídos, observa-se na Tabela 10, que os menores valores foram para os grupos fortemente retiradores por efeito indutivo (Cl, Br e NO₂, 11,53, 11,52 e 11,04 ppm, respectivamente). No entanto, é importante destacar que o hidrogênio-9 (N-H) vizinho à ligação imina, encontra-se fora do plano em relação ao grupo aril-substituído dificultando a transmissão dos efeitos eletrônicos esperados. Investigando-se as possíveis correlações entre as constantes dos substituintes, considerando-se os efeitos indutivos e de ressonância (σ_p , σ_m , σ_I e σ_R) contra os deslocamentos químicos para o H-9, não foram observadas correlações significativas devido ao posicionamento desse hidrogênio no espaço com relação aos substituintes.

Tabela 10: Deslocamentos químicos (δ) para os principais hidrogênios, em ppm, das isatina-aryl-3-X-tiossemicarbazonas (**ISATIO-3-X**).

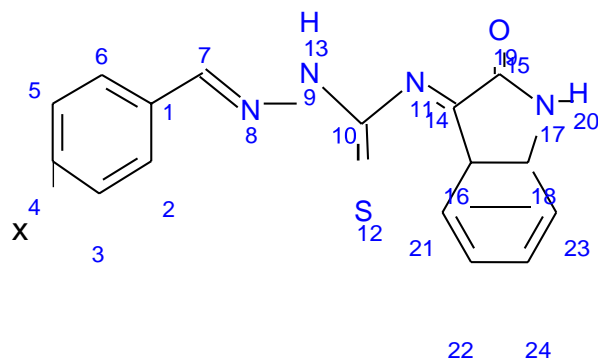


3-X	δ H-9 (N-H)	δ H-7 (C-H)	δ H-17 (N-H)	δ (X-H)
F	12,48	11,05	8,28	-
Cl	11,53	11,05	8,28	-
Br	11,52	11,05	8,20	-
CH ₃	12,48	11,43	9,06	2,33
CF ₃	12,48	11,04	8,68	-
OH	12,47	11,05	8,20	11,39
OCH ₃	12,47	11,44	8,24	3,80
NO ₂	11,04	11,64	8,15	-

Este fato foi observado, também, para os valores dos deslocamentos químicos do hidrogênio de N-H na posição H-17 e para os hidrogênios da ligação imínica (N=C-H 7), não tendo sido observadas correlações significativas com as constantes dos substituintes devido a estarem for do plano em relação ao grupo aril-substituído. No caso dos hidrogênios na posição 7, a diferença entre os deslocamentos químicos para os compostos *para*-substituídos foi de $\Delta\delta=0,45$ e para os *meta*-substituídos $\Delta\delta=0,40$, com exceção do *meta*-NO₂ que apresentou deslocamento químico de 11,64 ppm devido ao maior efeito indutivo ($\sigma_I=0,65$) transmitido através das ligações sigma.

A seguir as Tabelas 11 e 12 mostram os principais valores de deslocamento químico obtidos nos espectros de RMN de carbono-13 para as isatina-tiossemicarbazonas em DMSO-d₆.

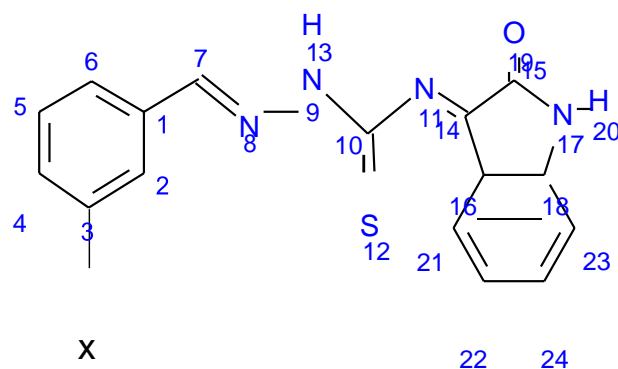
Tabela 11: Deslocamentos químicos (δ) para os principais carbonos, em ppm, das isatina-*aril-4-X*-tiosemicarbazonas (**ISATIO-4-X**).



4-X	δ C-10 (C=S)	δ C-15 (C=O)	δ C-14 (C=N)	δ C-4 (C-X)	δ C-7 (HC=N)	δ C-1 (C-CH)	δ C _X
H	184,86	179,12	163,10	131,72	138,82	142,82	-
F	184,86	178,46	159,83	151,18	141,49	-	-
Cl	179,12	178,51	163,18	151,13	141,26	134,67	-
Br	179,13	178,51	163,10	142,82	141,37	134,00	-
CH ₃	184,86	178,24	163,10	142,70	140,08	131,93	21,50
CF ₃	179,14	166,68	159,84	151,17	138,83	135,04	-
OH	184,86	177,85	159,87	159,70	143,11	151,16	-
OCH ₃	179,14	178,05	163,10	161,14	142,67	132,49	55,24
N(CH ₃) ₂	184,86	177,35	159,84	151,17	143,74	-	40,25
NO ₂	184,76	179,21	159,75	163,07	140,00	151,18	-

Em relação aos espectros de RMN de ^{13}C , o deslocamento químico referente ao carbono na posição 4 (carbono *ipso*), que está ligado diretamente a substituinte, observou-se uma maior desproteção nos produtos *para*-substituídos, dos grupos com o oxigênio ligado diretamente ao carbono e, também, para o grupo nitro como substituinte devido ao maior efeito indutivo retirador de elétrons. E, ocorre o contrário com o C-Br e C-CH₃, observando-se maior proteção devido a menor eletronegatividade do bromo, com menor efeito indutivo além do efeito de ressonância doar de elétrons devido aos seus pares de elétrons não-ligantes em comparação aos outros grupos, possuindo além disso, maior raio atômico. Quanto ao grupo metila, o efeito doador por hiperconjugação mostrou-se importante.

Tabela 12: Deslocamentos químicos (δ) para os principais carbonos, em ppm, das isatina-aril-3-X-tiossemicarbazonas (**ISATIO-3-X**).



3-X	δ C-10 (C=S)	δ C-15 (C=O)	δ C-14 (C=N)	δ C-3 (C-X)	δ C-7 (HC=N)	δ C-1 (C-CH)	δ C _x
F	184,85	178,68	163,96	162,03	141,14	-	-
Cl	184,90	178,59	159,83	151,23	141,67	-	-
Br	184,86	177,85	159,87	159,70	143,11	151,16	-
CH ₃	184,85	178,42	159,83	134,57	142,85	138,33	21,30
CF ₃	184,86	179,22	163,10	159,83	140,97	151,19	142,83
OH	184,76	178,39	159,83	151,11	143,09	142,82	-
OCH ₃	184,85	178,41	163,13	159,83	142,79	142,62	55,67
NO ₂	184,86	178,79	159,84	151,17	140,36	136,66	-

Já nos *meta*-substituídos, na posição equivalente, C-3 (carbono *ipso*), a maior desproteção foi observada para os grupos flúor, CF₃ e os demais halogênios além do grupo OH devido a seus intensos efeitos indutivos retiradores de elétrons.

Os deslocamentos químicos para o carbono 1 referentes aos produtos *para*-substituídos apresentam os efeitos eletrônicos esperados destacando-se a maior desblindagem para os grupos OH e NO₂ devido ao maior efeito indutivo retirador de elétrons. No caso dos compostos *meta*-substituídos.

Outro resultado que se destaca, é o deslocamento de C-15, carbono carbonílico, que possui o menor valor, no composto com o trifluormetil como substituinte na posição *para* do anel, que pode ser atribuído a possibilidade de ligação de hidrogênio intermolecular. O que não ocorre nos *meta*-substituídos, onde os valores são conforme o esperado em relação a todos os substituintes.

Investigando-se as possíveis correlações entre os deslocamentos químicos de carbono-13 observou-se correlação linear significativa para o carbono 7 nas isatina-tiossemicarbazonas *para*-substituídas como a constante de Hammett (σ_p , MARCH, 1977) com valor de coeficiente de correlação -0,9301, segundo a equação 1.

$$\delta_{C-7(para)} = (141,83 \pm 0,23) - (3,11 \pm 0,50) \sigma_p \quad (\text{equação 1})$$

$$R = -0,9301 \quad dp = 0,6434 \quad n = 8 \quad \text{fora da correlação} = H \text{ e } CH_3$$

onde R é o coeficiente de correlação linear, n é o número de compostos e dp é o desvio padrão.

A partir da equação 1 podem ser previstos menores valores de deslocamento químico para o C-7 dos compostos *para*-substituídos com grupos retiradores de elétrons.

As melhores correlações entre os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C para os compostos *meta*-substituídos foram apresentadas, também para o carbono-7 contra as constantes considerando apenas o efeito eletrônico indutivo (σ_I , ISAAC, 1995). A equação 2 mostra a correlação como valor de coeficiente de correlação de -0,9708.

$$\delta_{C-7(meta)} = (144,61 \pm 0,61) - (6,41 \pm 0,79) \sigma_I \quad (\text{equação 2})$$

$$R = -0,9708 \quad dp = 0,2880 \quad n = 6 \quad \text{fora da correlação} = Br$$

onde R é o coeficiente de correlação linear, n é o número de compostos e dp é o desvio padrão.

Da mesma forma que para os compostos *para*-substituídos, os *meta*-substituídos apresentaram os maiores valores de deslocamentos químicos para os grupos doadores de elétrons, considerando-se a equação 2.

Além disso, os compostos isatina-aril-tiossemicarbazonas possuem a possibilidade de serem obtido como uma mistura de dois isômeros, sendo as formas *E* e *Z*, devido a estereoespecificidade das constantes de blindagem em compostos acíclicos contendo o grupo $-C=N-$. Mudanças químicas 1H e ^{13}C , juntamente com o $^{13}C-^1H$, $^{13}C-^{13}C$ e $^{15}N-^1H$, constantes de acoplamento H, podem servir como uma ferramenta confiável para a atribuição configuracional desses compostos. A orientação *trans* em relação ao par isolado de nitrogênio, a ressonância ^{13}C relevante aparece em frequências mais baixas em comparação com os grupos orientados *cis*. O mesmo efeito foi descoberto para a ressonância ^{13}C do carbono vizinho ao grupo $-CH=N-$ (AFONIN *et al.*, 2012). Assim, necessita-se realizar cálculos mais específicos para confirmar esta estereosseletividade e a predominância de qual isômero.

5.3. Avaliação da Atividade Antifúngica

5.3.1. Resultados dos ensaios de inibição do crescimento radial em placa de Petri frente ao *Aspergillus parasiticus*

Os ensaios foram realizados com os compostos ISATIO-4-X e ISATIO-3-X, em concentrações na faixa de 62,5 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para avaliar a inibição do crescimento do fungo filamentososo *Aspergillus parasiticus* (Figura 27), que é um patógeno oportunista, um micotoxígeno produtor das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Os ensaios foram realizados e avaliados no período de 7 dias, conforme mostrado na Figura 28. Foi verificado, também, se as isatina-tiossemicarbazonas retardavam o desenvolvimento dos conídios.

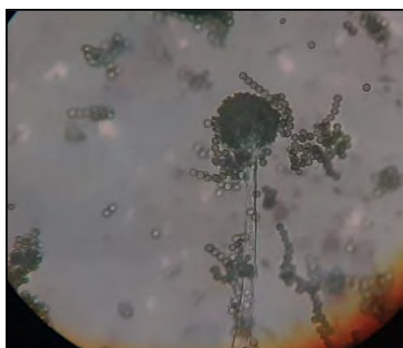


Figura 27: Imagem da lâmina preparada do *Aspergillus parasiticus* utilizado no ensaio. Fonte: acervo pessoal.

Como características macromorfológicas, o *A. parasiticus* em MEA (ágar Extrato de Malte) aos sete dias de crescimento, possui diâmetro médio 7,5 cm; são pulverulentos, de coloração verde escuro e micélio branco claro. O *A. parasiticus* um fungo filamentososo hialino; com vesícula subglobosa; uniseriado; conídios e a maioria dos conidióforos rugosos.

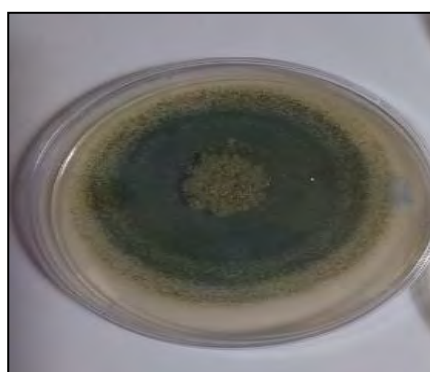


Figura 28: Controle negativo do ensaio de crescimento radial em temperatura média de 29°C. Fonte: acervo pessoal.

Conforme relatos da literatura (PAIVA, 2013), a avaliação do crescimento do fungo filamentososo *A. parasiticus* foi realizada utilizando o meio (MEA) foram adicionados as isatin-tiossemicarbazonas em diferentes concentrações (62,5 – 500 µg mL⁻¹). Obteve-se, assim, após 7 dias, com a medição sendo realizada diariamente, os resultados em centímetros dos halos, além das características observadas neste período. A Tabela 13 mostra os valores dos diâmetros obtidos para os halos de crescimento para os compostos avaliados nas concentrações de 62,5 a 500 µg mL⁻¹. Foi observado, também, que nas menores concentrações a massa fúngica apresentava em sua maioria coloração esverdeada e, à medida que a concentração aumentava sua coloração era branca. Os ensaios foram realizados na faixa de temperatura de 29 a 31 °C.

Tabela 13: Valores obtidos do diâmetro de crescimento do halo de inibição do *Aspergillus parasiticus* no tratamento nas concentrações de 62,5 a 500 µg.mL⁻¹ nos ensaios com as isatin-tiossemicarbazonas.

4-X/3-X	Halo ± dp (cm)				
	500 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	125 µg mL ⁻¹	62,5 µg mL ⁻¹	Controle Negativo*
ISATIO-H	6,20±0,00	7,10±0,17	8,50±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00
ISATIO-4-N(CH ₃) ₂	3,10±0,17	5,00±0,45	6,80±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00
ISATIO-4-F	2,50±0,00	5,70±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00	8,50±0,11
ISATIO-3-F	3,50±0,00	5,50±0,00	6,50±0,00	7,00±0,00	7,80±0,00
ISATIO-4-Cl	1,37±0,15	2,03±0,35	5,03±0,06	6,87±0,11	8,50±0,11
ISATIO-3-Cl	1,60±0,17	5,17±0,29	7,00±0,00	7,50±0,00	7,80±0,00
ISATIO-4-Br	4,33±0,29	4,67±0,29	4,67±0,29	6,80±0,00	8,50±0,11
ISATIO-3-Br	2,90±0,36	3,50±0,00	4,67±0,29	5,17±0,76	8,00±0,29
ISATIO-4-CH ₃	0,67±0,29	4,73±0,11	6,47±0,23	8,00±0,00	8,50±0,00
ISATIO-3-CH ₃	4,80±0,00	6,80±0,00	7,83±0,29	8,00±0,00	8,00±0,29
ISATIO-4-CF ₃	0,87±0,23	3,37±0,40	5,70±0,00	7,50±0,00	8,50±0,00
ISATIO-3-CF ₃	3,00±0,00	5,00±0,00	5,80±0,00	7,50±0,00	8,00±0,00
ISATIO-4-OH	6,67±0,29	8,50±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00	8,50±0,00
ISATIO-3-OH	6,00±0,00	7,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00
ISATIO-4-OCH ₃	3,00±0,00	3,27±0,11	4,87±0,11	6,17±0,29	8,50±0,00
ISATIO-3-OCH ₃	6,30±0,00	6,67±0,29	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00
ISATIO-4-NO ₂	6,00±0,00	7,00±0,00	7,70±0,00	7,77±0,40	8,50±0,29
ISATIO-3-NO ₂	5,00±0,00	7,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00

*Controle negativo: halo de crescimento na ausência da isatina-tiossemicarbazona medido em cm¹

De acordo com os resultados obtidos no período e condições indicadas pela técnica do crescimento radial, os compostos *para*-substituídos que apresentaram maior inibição do crescimento dos halos, foram com os substituintes cloro, metil e trifluormetil. E em relação aos *meta*-substituídos, os compostos com maior atividade, possuíam o cloro e o trifluormetil como substituintes no anel da tiossemicarbazona. Vale ressaltar, também, que a maioria das isatina-tiossemicarbazonas em sua menor concentração avaliada (62,50 µg.mL⁻¹) apresentaram menores halos de inibição quando comparados ao controle negativo.

Posteriormente, com os valores dos diâmetros do crescimento dos halos dos controles negativos e das placas contendo os produtos sintetizados, foram realizados os cálculos para verificar o percentual da inibição do crescimento, fazendo a comparação entre os halos de inibição dos controles negativos com os halos de inibição contendo as isatina-tiossemicarbazonas. Esses cálculos foram realizados com as placas após 7 dias do crescimento fúngico. O cálculo foi realizado segundo Bampiet *al*, (2013) utilizando a equação:

$$\text{Inibição do crescimento (\%)} = \frac{C_{\text{controle}} - C_{\text{tratamento}}}{C_{\text{crescimento controle}}} \times 100$$

Onde C controle: crescimento do halo do controle negativo, C tratamento: crescimento do halo com o tratamento da isatina-tiossemicarbazona.

Os resultados obtidos para os percentuais dos halos de inibição em comparação com o controle negativo podem ser observados na Tabela 14.

Tabela 14: Valores do percentual de Inibição do crescimento do halo do *Aspergillus parasiticus* nas concentrações testadas.

Compostos 4-X/3-X	Inibição do halo tratamento 62,5 µg/mL (%)	Inibição do halo tratamento 125 µg/mL (%)	Inibição do halo tratamento 250 µg/mL (%)	Inibição do halo tratamento 500 µg/mL (%)
ISATIO-H	0	0	16,47	27,06
ISATIO-4-N(CH ₃) ₂	0	20,00	41,18	63,53
ISATIO-4-F	0	0	32,94	70,59
ISATIO-3-F	10,26	16,67	29,49	55,13
ISATIO-4-Cl	20,00	41,18	76,47	84,70
ISATIO-3-Cl	3,85	10,26	32,05	78,20
ISATIO-4-Br	20,00	43,53	47,06	49,41
ISATIO-3-Br	37,50	43,75	56,25	56,25
ISATIO-4-CH ₃	5,88	22,35	43,53	94,12
ISATIO-3-CH ₃	0	0	15	40
ISATIO-4-CF ₃	11,76	31,76	61,18	88,23
ISATIO-3-CF ₃	6,25	27,5	37,5	62,5
ISATIO-4-OH	0	0	0	25
ISATIO-3-OH	0	0	12,5	25
ISATIO-4-OCH ₃	25,88	42,35	61,18	64,70
ISATIO-3-OCH ₃	0	0	12,5	21,25
ISATIO-4-NO ₂	5,88	9,41	17,65	41,67
ISATIO-3-NO ₂	0	0	12,5	37,5

Assim, na Tabela 14 pode ser observado que a inibição do crescimento do fungo *A. parasiticus* foi dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração maior foi o percentual de inibição em relação ao controle negativo. Os compostos com maior atividade antifúngica foram o 4-cloro, 4-trifluormetil e 4-metil com 84,70%, 88,23% e 94,12%, respectivamente, de inibição do halo de crescimento em relação ao controle negativo.

As Figuras 29 e 30 mostram os gráficos com a comparação percentual do crescimento dos halos de inibição das isatina-tiossemicarbazonas *para* e *meta* substituídas, respectivamente, e o controle negativo, respectivamente, na concentração de 250 µg.mL⁻¹ frente ao *A. parasiticus*.

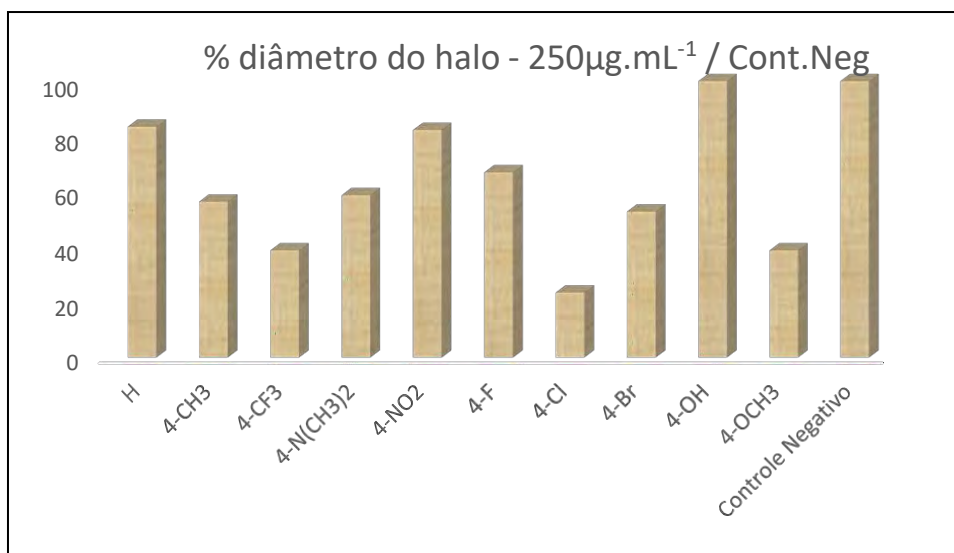


Figura 29: Gráfico da comparação percentual do crescimento dos halos na concentração de 250µg.mL⁻¹ das isatinossemicarbazonas 4-substituídas com o controle negativo frente ao *A. parasiticus*.

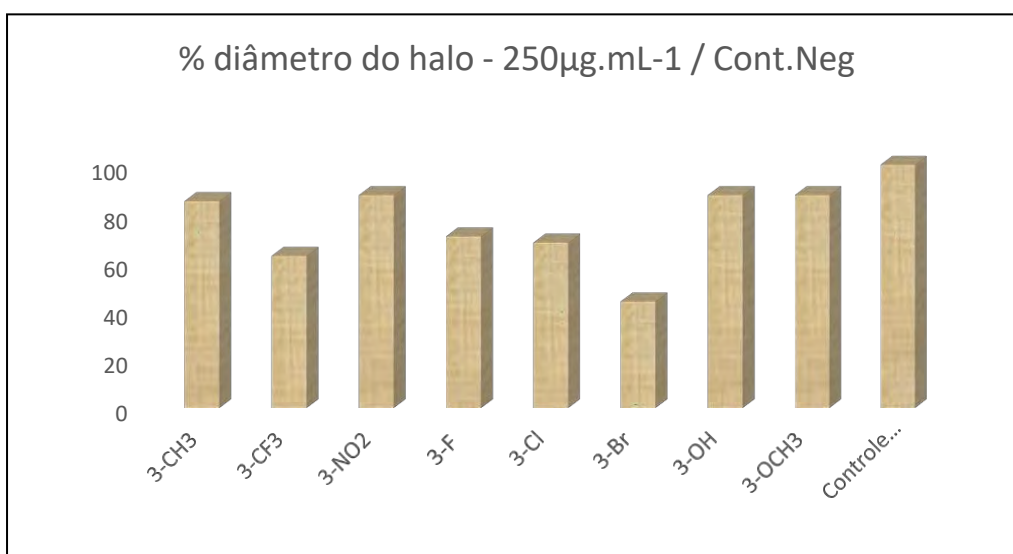


Figura 30: Gráfico da comparação percentual do crescimento dos halos na concentração de 250µg.mL⁻¹ das isatinossemicarbazonas 3-substituídas com o controle negativo frente ao *A. parasiticus*.

As Figuras 31 e 32 mostram as placas dos ensaios referentes aos compostos com os substituintes que apresentaram maior atividade de inibição frente ao *Aspergillus parasiticus*. Assim, estão apresentadas as placas para os compostos com os substituintes 4-Cl, 4-CF₃ e 4-CH₃ e 3-Cl, 3-CF₃ nas concentrações referentes a 500 µg.mL⁻¹, 250 µg.mL⁻¹, 125 µg.mL⁻¹, 62,5 µg.mL⁻¹ e controle negativo.

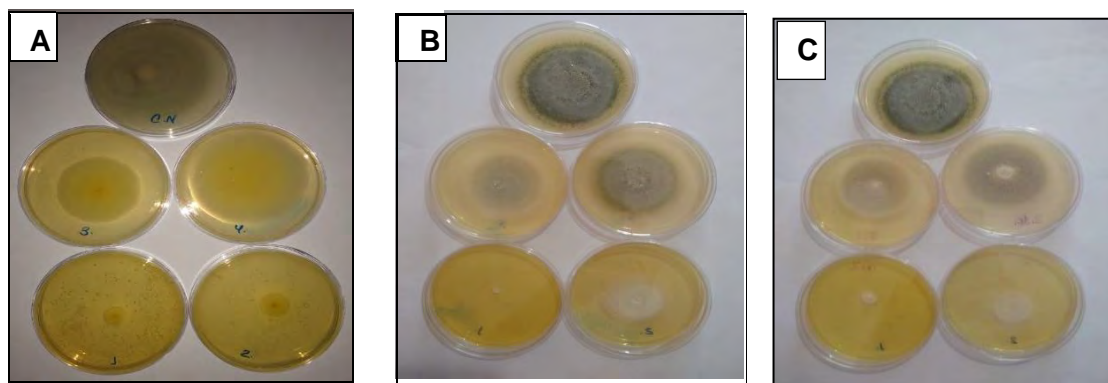


Figura 31: Representação do resultado dos produtos: ISATIO-4-Cl (a); ISATIO-4-CH₃ (b); ISATIO-4-CF₃ (c). Fonte: acervo pessoal.

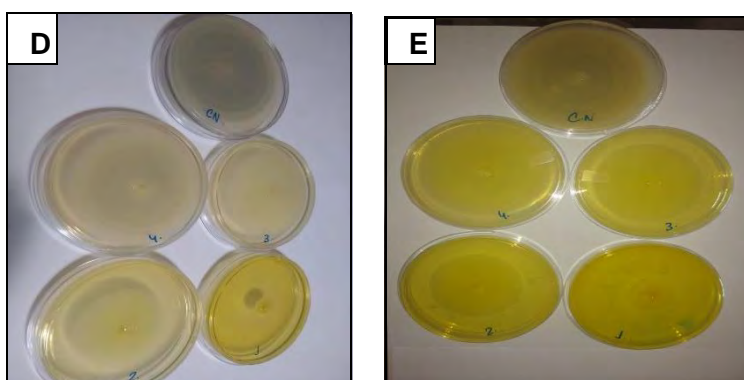


Figura 32: Representação do resultado dos produtos: ISATIO-3-Cl (d); ISATIO-3-CF₃ (e). Fonte: acervo pessoal.

Complementando a apresentação dos resultados, para estes ensaios de atividade antifúngica frente ao *A. parasiticus* dos híbridos isatina-aril-tiossemicarbazonas sintetizados, podem ser observados nas Figuras 33, 34 e 35 os gráficos tempo em dias x taxa de crescimento do halo de inibição do crescimento, no período dos experimentos (7 dias).

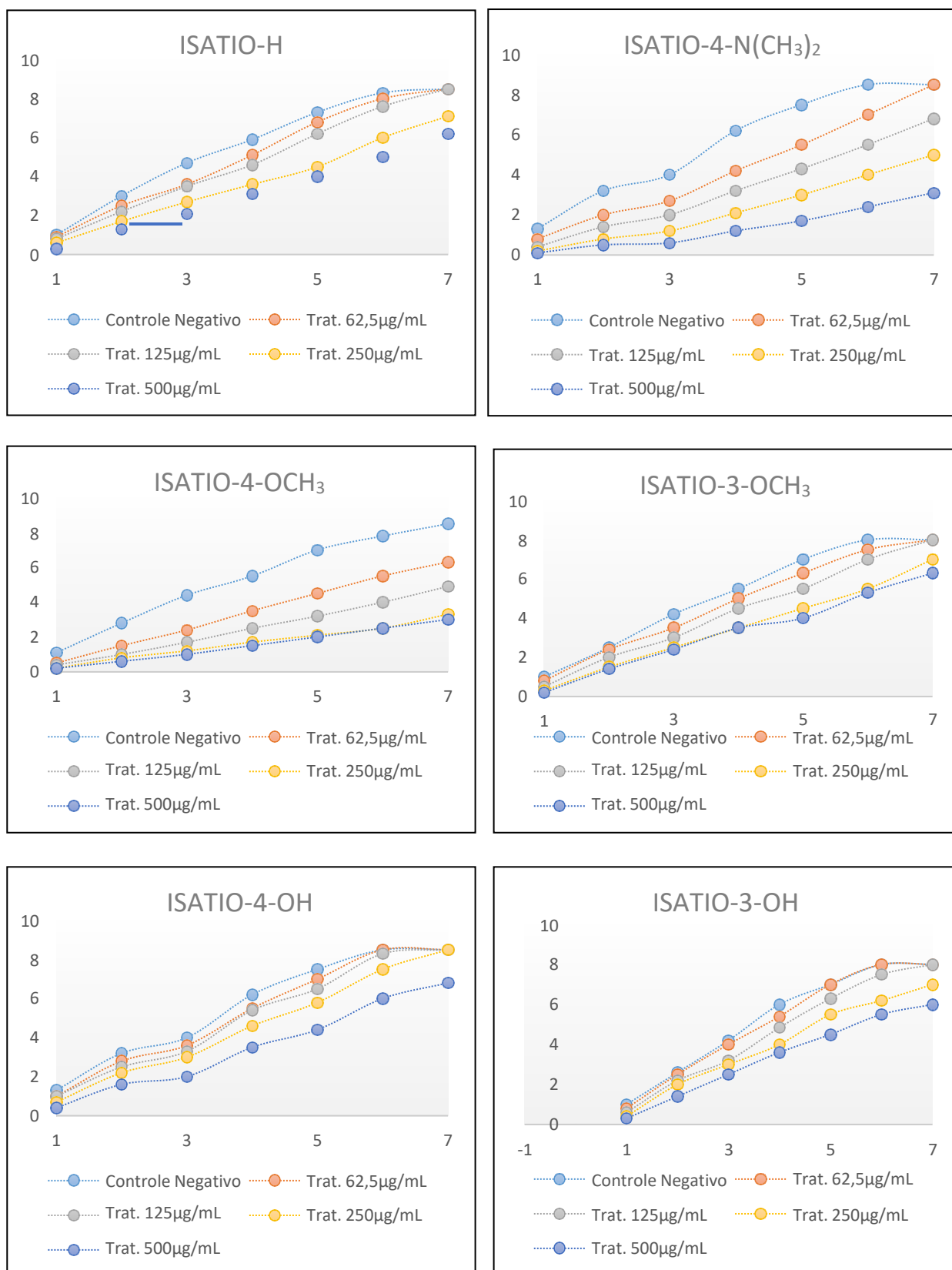


Figura 33: Gráficos do ensaio do Crescimento Radial dos produtos: ISATIO-H; ISATIO-N(CH₃)₂, ISATIO-CH₃, ISATIO-OH respectivamente.

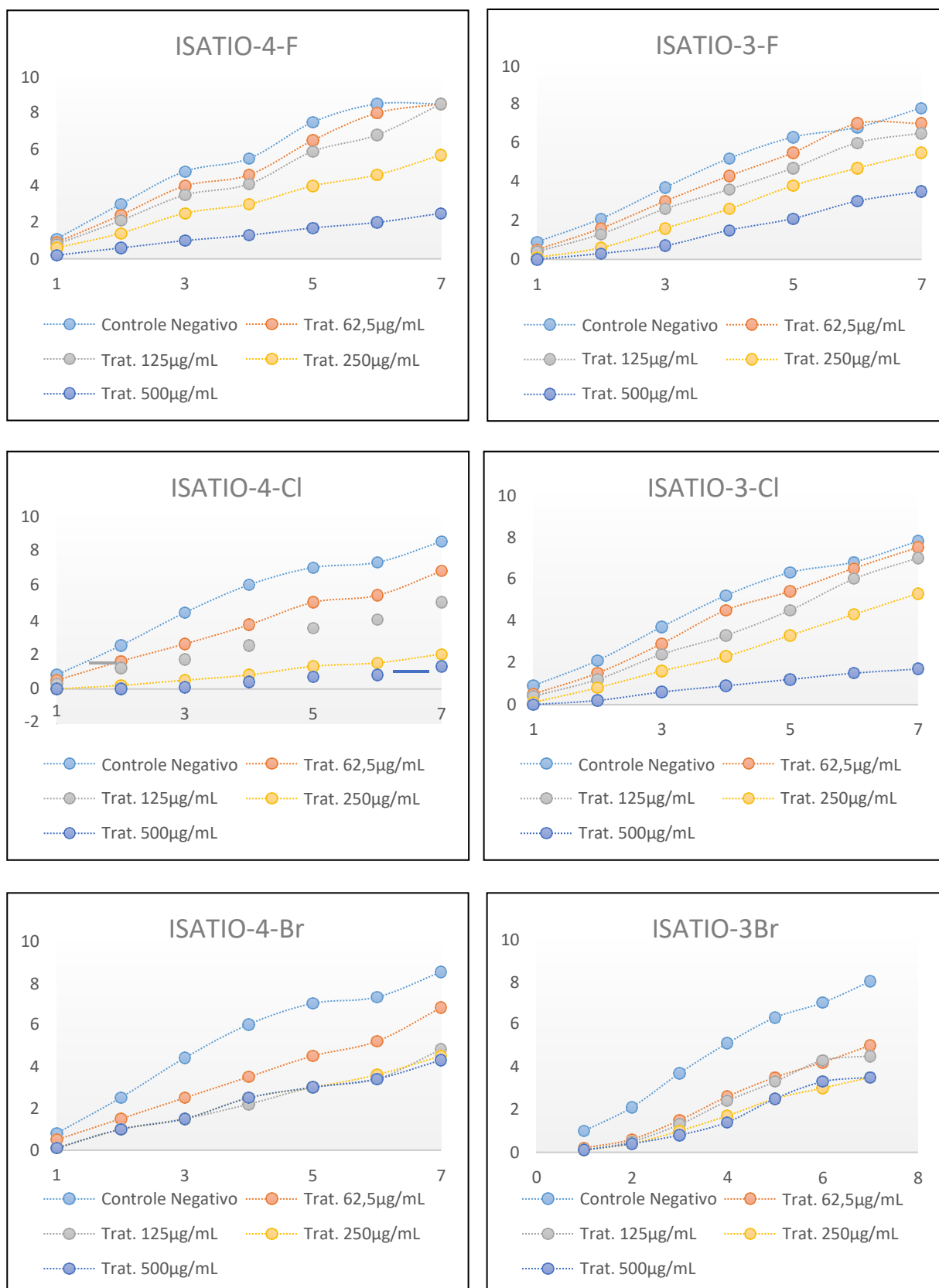


Figura 34: Gráficos do ensaio do Crescimento Radial dos produtos: ISATIO-F; ISATIO-Cl, ISATIO-Br respectivamente.

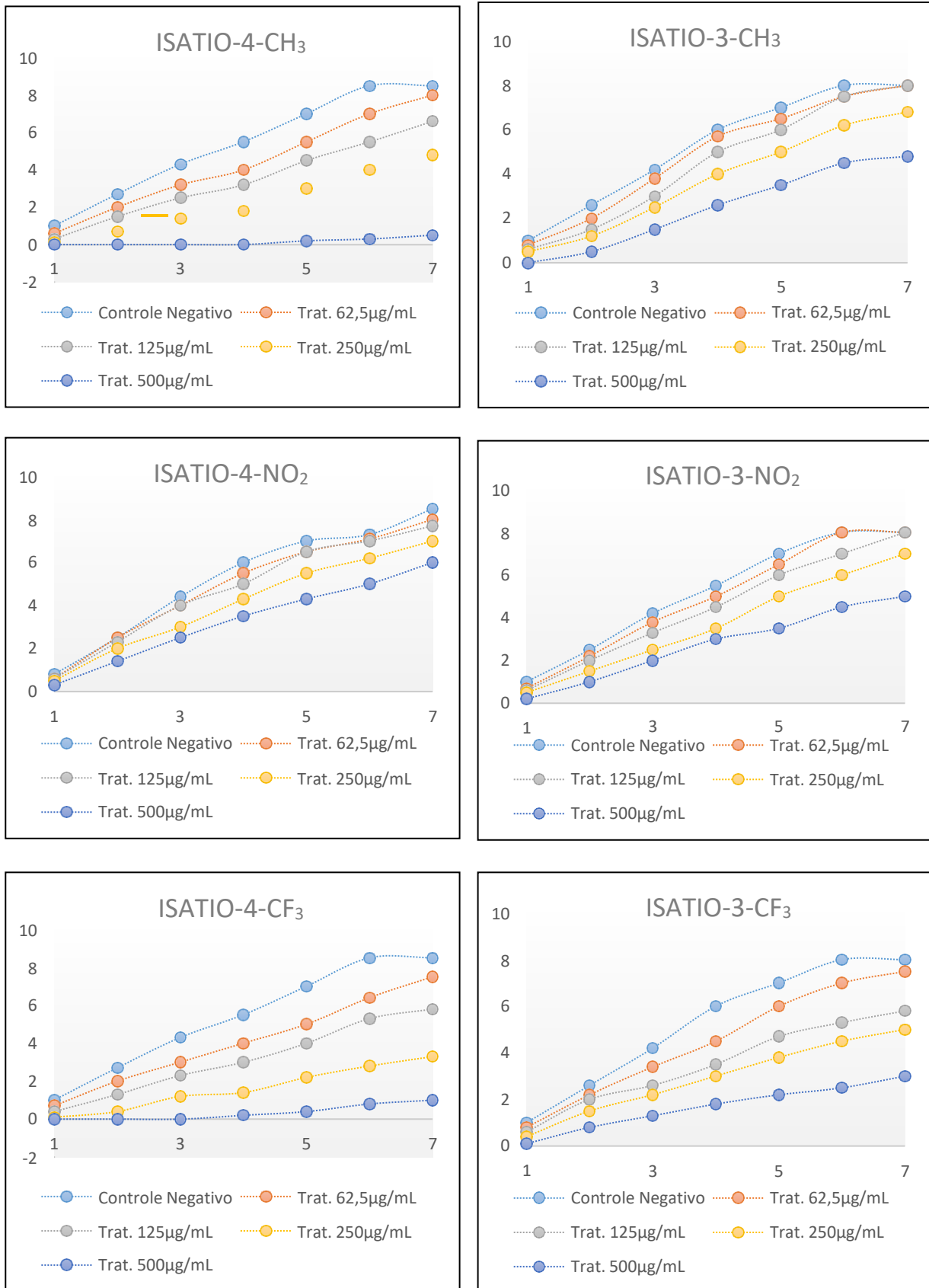


Figura 35: Gráficos do ensaio do Crescimento Radial dos produtos: ISATIO-CH₃; ISATIO-NO₂, ISATIO-CF₃ respectivamente.

Contudo, através de todos os resultados apresentados, os híbridos ISATIO-4-Cl; ISATIO-4-CH₃; ISATIO-4-CF₃ e ISATIO-3-Cl; ISATIO-3-CF₃ foram os que mostraram maior atividade frente a inibição do *Aspergillus parasiticus*, mas, no entanto, não foi possível estabelecer nenhuma correlação com os parâmetros estruturais.

Quanto ao mecanismo de ação, pode ser sugerido que essas substâncias podem atuar através da inibição da enzima 1,4- α -desmetilase que converte o lanosterol em ergosterol, essencial para a sobrevivência do fungo. Essa hipótese foi sugerida a partir da estrutura química das isatina-tiossemicarbazonas e suas interações de acordo com os agentes antifúngicos descritos na literatura (MACHADO *et al*, 2019).

5.3.2. Concentração Mínima Inibitória (MIC) frente ao fungo *Sporothrix schenckii* através da microdiluição

Os ensaios foram realizados para determinar qual a concentração mínima inibitória das isatina-tiossemicarbazonas sintetizadas (ISATIO-4-X e ISATIO-3-X) frente ao fungo termodimórfico *Sporothrix spp* (Figura 36), que é o patógeno causador da esporotricose.



Figura 36: Imagem da lâmina preparada do *Sporothrix spp* utilizado no ensaio. Fonte: acervo pessoal.

Como características macromorfológicas, o *Sporothrix spp* apresenta colônias filamentosas a 25°C, crescendo com superfície enrugada e pigmentação de branco a creme. Em sua micromorfologia é um fungo hialino de hifas finas septadas; apresentando conidióforos curtos com conídios no ápice em forma de “margarida”, mas também podem se apresentar sésseis. A Figura 37 mostra a imagem contendo o *S. spp* em meio RPMI 1640 nos poços na placa utilizada para a realização do ensaio, e na Tabela 15 os valores do MIC em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ressaltando que foram utilizados como controles positivos os antifúngicos Nistatina (solução da TEUTO) e Itraconazol de origem comercial. De acordo com os resultados obtidos nas condições indicadas pela técnica referenciada pelo manual do BrCAST -

EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 9.3.1 de janeiro 2017, foram obtidos os valores de MIC: 2 mg.L⁻¹ para a Nistatina e 1 mg.L⁻¹ para o Itraconazol.

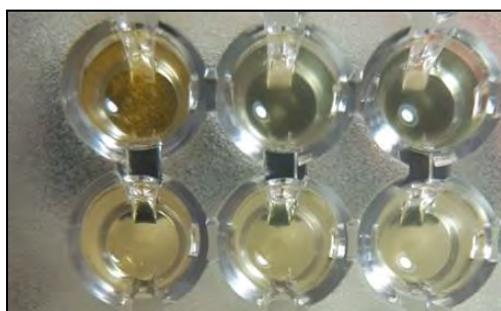


Figura 37: Imagem de uma parte da placa utilizada para realizar o MIC, onde os primeiros poços não foram visualizados o desenvolvimento *Sporothrix* diferente dos demais que apresentam turvação. Fonte: acervo pessoal.

Tabela 15: Valores da Concentração Mínima Inibitória (MIC) em µg.mL⁻¹ frente ao *S. spp.* para as isatina-tiossemicarbazonas.

Compostos 4-X/ 3-X	MIC µg.mL ⁻¹
ISATIO-H	Sem atividade
ISATIO-4-N(CH ₃) ₂	500
ISATIO-4-F	250
ISATIO-3-F	125
ISATIO-4-Cl	250
ISATIO-3-Cl	125
ISATIO-4-Br	500
ISATIO-3-Br	Houve formação de precipitado
ISATIO-4-CH ₃	125
ISATIO-3-CH ₃	500
ISATIO-4-CF ₃	250
ISATIO-3-CF ₃	500
ISATIO-4-OH	Houve formação de precipitado
ISATIO-3-OH	500
ISATIO-4-OCH ₃	Houve formação de precipitado
ISATIO-3-OCH ₃	Houve formação de precipitado
ISATIO-4-NO ₂	500
ISATIO-3-NO ₂	500
Nistatina ^a	2
Itraconazol ^b	1

^{a,b} controle positivo em mg.L⁻¹

Os compostos *para*-substituídos que apresentaram melhor atividade, verificada pelos valores do MIC foram o ISATIO-4-CH₃ com a concentração mínima inibitória de 125 µg.mL⁻¹e, posteriormente, os derivados ISATIO-4-Cl, ISATIO-4-F ISATIO-4-CF₃ com a concentração de 250 µg mL⁻¹. E em relação aos derivados *meta*-substituídos, a maior atividade foi observada para ISATIO-3-Cl e ISATIO-3-F, com a concentração mínima inibitória de 125 µg.mL⁻¹.

Algumas substâncias não permitiram a observação de seus resultados nos ensaios para a determinação dos valores do MIC, pois houve formação de precipitado em suas soluções, inviabilizando a observação com clareza da turvação apresentada pelo desenvolvimento do fungo (Figura 38).



Figura 38: Representação das placas de 96 poços de um dos ensaios do MIC. Fonte: acervo pessoal.

Contudo, os melhores resultados obtidos, nas placas de 96 poços, foram para os produtos ISATIO-4-CH₃; ISATIO-3-Cl; ISATIO-3-F que apresentaram maior atividade frente a inibição do *Sporothrix spp.* Sugere-se que a provável ação desses compostos pode ocorrer devido a inibição da biossíntese do ergosterol ou outros esteróis, danificando as membranas celulares do fungo, alterando também sua permeabilidade, tendo como resultado a perda de seus elementos intracelulares e, pode ser que ocasione, também, a inibição da biossíntese dos triglicérides e fosfolipídios do fungo. Esta sugestão foi indicada através de pesquisas na literatura sobre a ação de agentes antifúngicos com estruturas químicas relacionadas às isatina-tiossemicarbazonas (PEREIRA, 2017).

5.4. Correlações entre a estrutura química das isatina-tiossemicarbazonas contra os efeitos antifúngicos.

Os compostos sintetizados, obtidos da hibridação molecular entre as tiossemicarbazonas substituídas e a isatina, foram relacionados com alguns parâmetros eletrônicos como as constantes de Hammett, parâmetros hidrofóbicos como log P frente aos efeitos biológicos, obtendo-se correlações significativas apenas para os derivados *meta*-substituídos frente ao *A. parasiticus*.

As equações a seguir apresentam as relações lineares obtidas para os derivados *meta*-substituídos considerando o percentual da inibição do crescimento radial para as concentrações de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, separadamente, contra a constante de Hammett (σ_{meta} , MARCH, 1977).

Para as isatina-tiossemicarbazonas *meta*-substituídas em 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

$$\% \text{crescimento} = (21,80 \pm 3,61) + (90,21 \pm 12,84) \sigma_m$$

$$R = 0,9618 \quad n = 6 \quad \text{desvio padrão} = 5,70 \quad p = 0,002$$

Grupos fora da correlação: 3-NO₂ e 3-Cl

Para as isatina-tiossemicarbazonas *meta*-substituídas em 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

$$\% \text{crescimento} = (21,80 \pm 3,61) + (90,21 \pm 12,84) \sigma_m$$

$$R = 0,9618 \quad n = 6 \quad \text{desvio padrão} = 5,70 \quad p = 0,002$$

onde R é o coeficiente de correlação, n é o número de compostos, e p a probabilidade

Grupos fora da correlação: 3-NO₂ e 3-Cl

A variação dos grupos substituintes, que se diversificam em doadores e retiradores de elétrons, mostram que os efeitos indutivos e de ressonância promovidos por esses substituintes, podem sim interferir nos efeitos biológicos observados, sendo o efeito indutivo mais relevante, conforme observados nas equações de correlação com os derivados *meta*-substituídos. Assim, foram confeccionados dois gráficos para melhor visualização dos efeitos considerando a substituição nas posições *meta* e *para* nos compostos avaliados (Figura 39 e 40, para 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente).

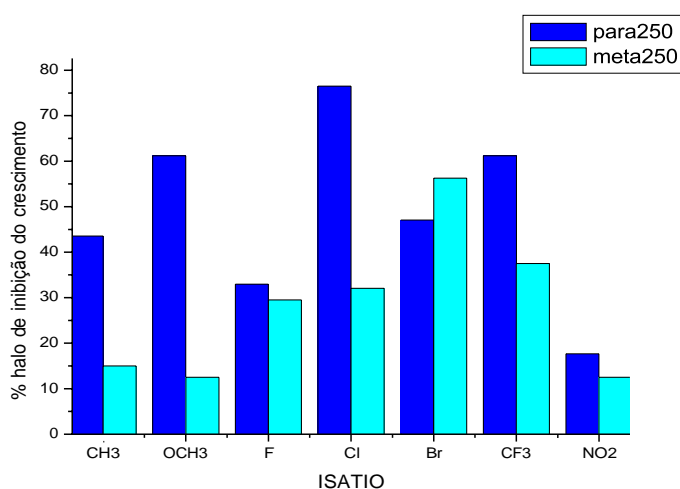


Figura 39: Gráfico que representa o percentual de inibição do crescimento do halo para as isatina-tiossemicarbazonas com substituintes nas posições *para* e *meta* na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

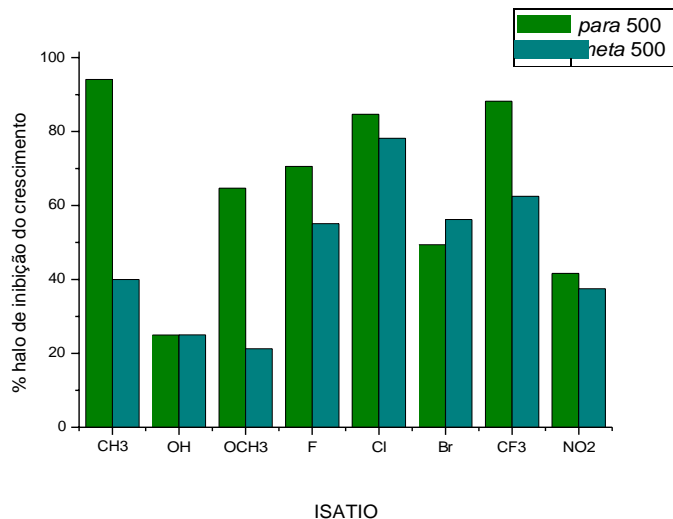


Figura 40: Gráfico que representa o percentual de inibição do crescimento do para as isatina-tiossemicarbazonas com substituintes nas posições *para* e *meta* na concentração de 500 µg.mL⁻¹.

Conforme pode ser observado para os derivados *para*-substituídos ocorre uma distribuição aleatória considerando os efeitos eletrônicos e para os *meta*-substituídos observa-se um maior percentual de inibição do crescimento, de maneira geral, para os compostos substituídos por halogênios.

Com relação à atividade das ISATIO *para* e *meta* substituídas frente ao *Sporothrix spp* não foram observadas correlações significativas com os parâmetros eletrônicos ou hidrofóbico e os valores obtidos para os MICs. A Figura 43 mostra o gráfico com a comparação das isatina-tiossemicarbazonas *meta* e *para*-substituídas que tiveram seus valores de MIC obtidos. Observa-se, assim, que os substituintes flúor e o cloro nos derivados *meta*-substituídos foram os mais ativos com menores valores de MIC.

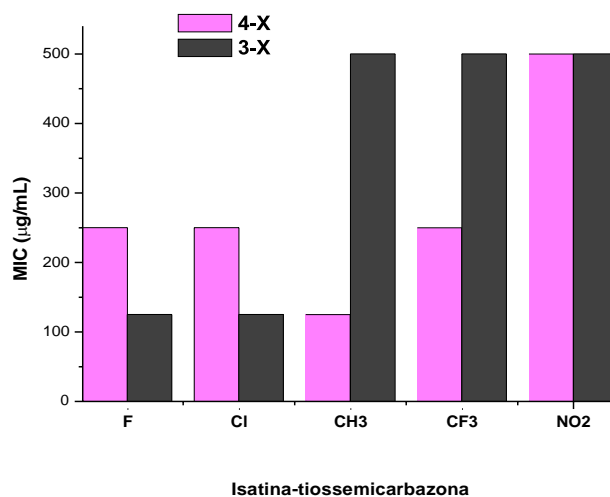


Figura 41: Gráfico do MIC (µg.mL⁻¹) x substituintes nas posições 3 e 4 das isatina-tiossemicarbazonas frente ao *Sporothrix spp*.

5.5. Avaliação da Atividade Quelante.

Na tentativa de avaliar se as isatina-tiossemicarbazonas mais ativas frente aos fungos investigados possuíam atividade quelante com o Fe^{+2} , foi analisada a capacidade de complexação, através da espectroscopia UV/Vis, dos derivados sintetizados que apresentaram melhores resultados frente a inibição do crescimento das espécies *A. parasiticus* e *S. spp.* Essa avaliação foi realizada porque os fungos investigados possuem a enzima Ribonucleosídeo Difosfato Redutase (RDR) que é ferro-dependente (BERALDO, 2004) e, poderia se sugerir sua inibição como causa da atividade dessas substâncias.

Os espectros foram obtidos nas estequiometrias de 1:1 e 1:2 da isatina-tiossemicarbazona e Fe^{2+} , respectivamente. Após análise das melhores concentrações a serem usadas, os espectros de absorção foram obtidos na faixa de 500-200 nm. Posteriormente, foi avaliado se haveria formação de complexo com as soluções contendo os as isatina-tiossemicarbazonas escolhidas e o Fe^{+2} .

A análise da sobreposição dos espectros das isatina-tiossemicarbazonas na ausência e presença dos íons de Fe^{2+} nas Figuras 44 a 47, nos possibilita verificar se as substâncias estudadas mostravam indicativo ou não de apresentar efeito quelante frente aos íons Fe^{+2} .

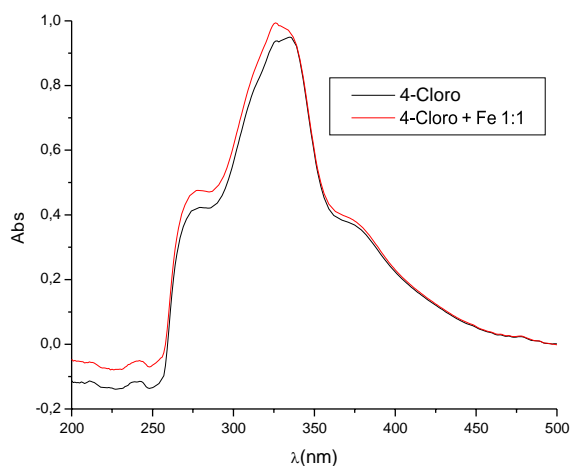


Figura 42: Sobreposição ISATIO-4-Cl ($4,15 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-Cl ($4,15 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($4,15 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$).

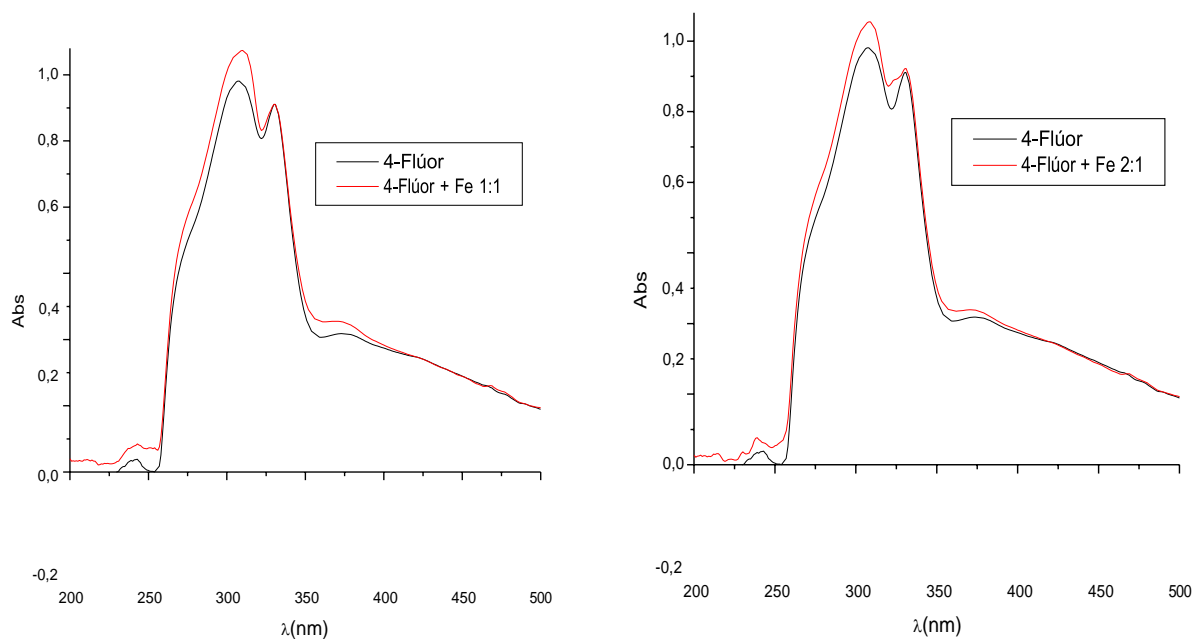


Figura 45: Sobreposição ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$); sobreposição ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-F ($7,99 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($4,00 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$).

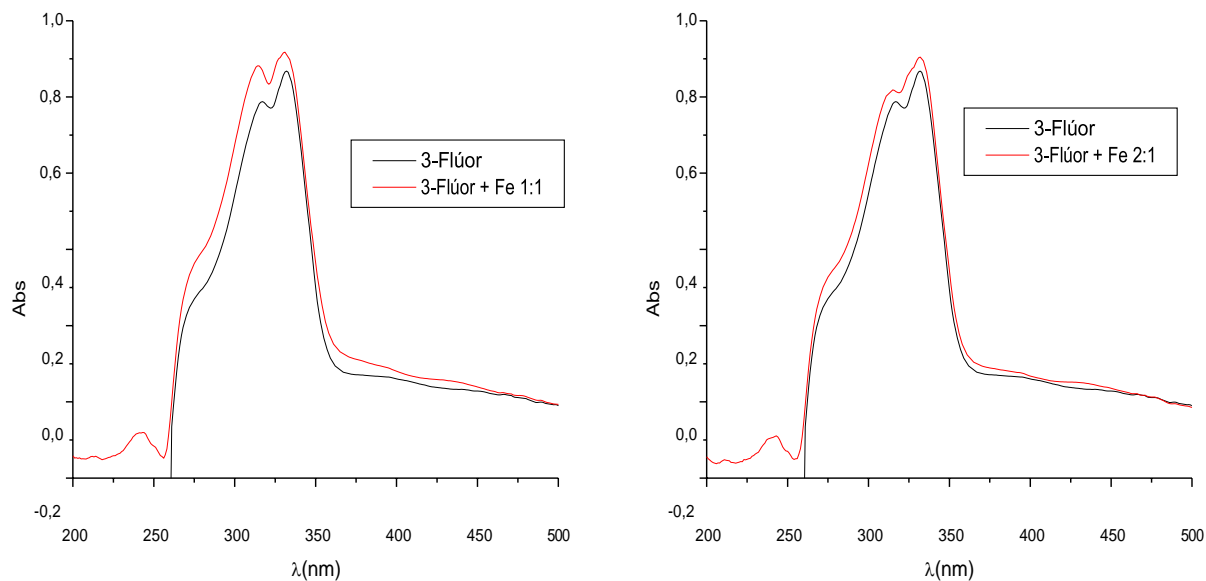


Figura 46: Sobreposição ISATIO-3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$); sobreposição ISATIO-3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-3-F ($9,07 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe^{+2} ($4,53 \cdot 10^{-5} \text{mol.L}^{-1}$).

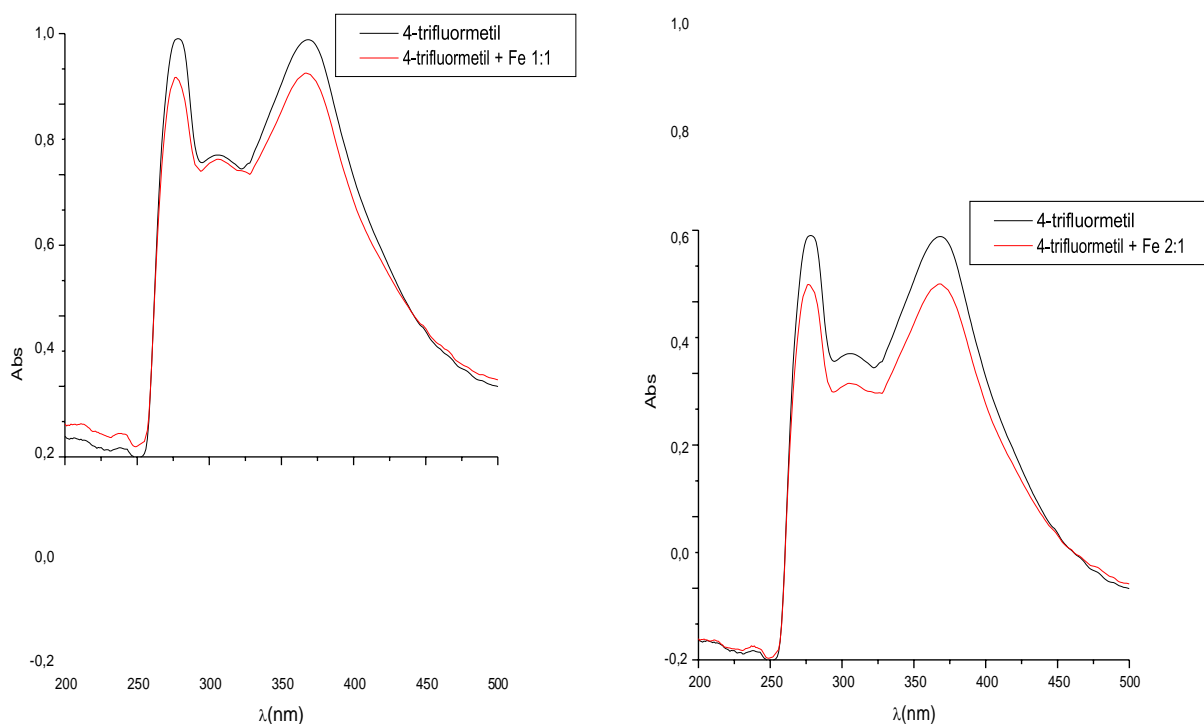


Figura 47: Sobreposição ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe⁺² ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$); sobreposição ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) e ISATIO-4-CF₃ ($2,47 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$) + Fe⁺² ($1,23 \cdot 10^{-4} \text{mol.L}^{-1}$).

As ISATIO com substituintes 4-Cl, 4-F e 3-F mostraram um deslocamento hiperacrômico nos espectros na proporção 1:1 e 2:1 entre as espécies de magnitude similar (Figuras 44-47). No caso do substituinte 4-CF₃, foi observado um efeito hipocrômico, ainda mais acentuado na proporção de 2:1, indicando a formação do complexo.

Esses deslocamentos que ocorreram quando foram analisadas a sobreposições, mostraram que houve uma mudança nos níveis de energia dos produtos envolvidos, o que sugere a ocorrência da complexação dos produtos com os íons de Fe⁺².

O efeito hiperacrômico na absorção em 325 nm dos substituintes 4-Cl, 4-F e 3-F, indica que houve formação de complexo sendo o efeito calculado em 5,26%, 6,25% e 6,41%, respectivamente. E o efeito hipocrômico na absorção em 290 nm e 325 nm do derivado com substituinte 4-CF₃ ocorreu na proporção de 1:1 em 3,39% e na proporção 2:1 em 18,18%, de acordo com a equação a seguir (ALMEIDA *et al.*, 2013).

$$\text{Efeito quelante (\%)} = -[1 - (A \text{ amostra}/A \text{ controle})] \times 100\%$$

Os valores para os percentuais na sobreposição dos espectros corroboraram com os resultados obtidos na ação antifúngica, principalmente, frente ao *A. parasiticus* sugerindo uma possível inibição da enzima ferro-dependente.

6 CONCLUSÕES

As isatina-tiossemicarbazonas, bem como seus intermediários, foram obtidos em condições brandas de síntese com a confirmação das estruturas propostas através das técnicas espectroscópicas, características físicas, e com rendimentos satisfatórios. Foi possível realizar a formação dos híbridos isatina-tiossemicarbazonas, através de rota de síntese diferente da utilizada na literatura para compostos análogos.

Os deslocamentos de RMN ^1H e ^{13}C de cada composto, com a presença dos substituintes na posição 3 e 4 do anel aromático, corroboraram com o esperado para cada composto, atendendo às diferenças relacionadas à grupos mais eletronegativos, com maior raio atômico, mais volumosos, e com possibilidade de interação intermoleculares. As bandas de absorção do IV também atenderam às características de compostos com àqueles grupos funcionais.

Além disso, foram obtidos com êxito, 36 compostos, com uma rota sintética, sem muitas variantes e especificações; podendo ser reproduzida e embora menos explorada por outros pesquisadores, com rendimentos em média satisfatórios.

Os ensaios para investigar a atividade biológica frente aos fungos *A. parasiticus* e *S. spp*, foram exitosos. Através do ensaio de inibição de Crescimento Radial e do ensaio de obtenção da Concentração Inibitória Mínima (MIC), verificou-se que grande parte dos das isatina-tiossemicarbazonas sintetizadas inibiram o crescimento dos fungos, ou mesmo retardaram o desenvolvimento dos conídios, deixando mais lento o metabolismo dessas espécies, diminuindo ou até inviabilizando a liberação de micotoxinas, possivelmente. Com destaque para o composto ISATIO-4- CH_3 .

O estudo dos efeitos eletrônicos e hidrofóbicos mostraram correlações significativas apenas para os compostos *meta*-substituídos envolvendo os resultados da atividade frente ao *A. parasiticus* e a constante de Hammett indicando o efeito indutivo mais significativo.

A formação de complexos com Fe^{+2} sugerida para os compostos com a maior atividade antifúngica, pode ser o motivo ou um deles para explicar o efeito antifúngico observado através da interação com a enzima RDR que é ferro-dependente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONIN, A. V; PAVLOV, D. V; USHAKOV, I. A; KEIKO, N. A. Stereospecificity of ^1H , ^{13}C and ^{15}N shielding constants in the isomers of methylglyoxal bisdimethylhydrazone: problem with configurational assignment based on ^1H chemical shifts. *Magnetic Resonance in Chemistry*. v. 50. p. 202-510. 2012.

ALBUQUERQUE, M. A. de. Avaliação da atividade anticorrosiva das formulações com tiossemicarbazonas e extrato das folhas de *Talinum triangulare*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Ciências Exatas Programa de Pós-Graduação em Química. 2013.

ALBUQUERQUE, M. A de.; OLIVEIRA, M. C.C.; ECHEVARRIA, A. Avaliação da atividade anticorrosiva de formulações de 4-hidroxibenzaldeído tiossemicarbazona e extrato vegetal de *Talinum triangulare*. INTERCORR 2014.

ALBUQUERQUE, M. A.; OLIVEIRA, M. C. C.; ECHEVARRIA, A. Avaliação da atividade anticorrosiva de formulações com extrato vegetal por técnicas eletroquímicas e gravimétrica. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 5, p. 1841-1853, 2015.

AL-HMOUD, N.; IBRAHIM, M. A.; AL-ROUSAN, H.; ALSEYAH, A. The prevalence of aflatoxinogenic *Aspergillus parasiticus* in Jordan. *International Journal of Microbiology*, v. 2012, p. 675361, 2012.

ARAÚJO, L.F. Plantas Medicinais no Controle de Fungos Patogênicos Humanos. Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Biotecnologia. Curso de Graduação em Biotecnologia. Minas Gerais. 2018.

ARAÚJO, C. R. M.; FILHO, C. A. L.; SANTOS, V. L. A.; MAIA, G. L. A.; GONSALVES, A. A. Desenvolvimento de fármacos por hibridação molecular: uma aula prática de química medicinal usando comprimidos de paracetamol e sulfadiazina e a ferramenta virtual SciFinder®. *Química Nova*, v. 38, n. 6, p, 868-873, 2015.

ARENDRUP, M. C.; MELETIADIS, J.; MOUTON, J. W.; LAGROU, K.; EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 9.3.1 – BrCAST / janeiro, 2017.

ASHRYA, E. S. H. E.; YOUSUF, S.; HASSANA, H. H.; ZAHRAN, M. K.; HEBISHY, A. S. Synthesis and single-crystal X-ray diffraction studies of an arylidene-thiosemicarbazone and hydrazonyl-phenylthiazole. *Letters in Organic Chemistry*, v. 11, p. 101-108, 2014.

Atlas de Micologia Médica Veterinária. FEPMVZ Editora. ISSN 1676 – 6024. Dezembro – 2019.

BAMPI, D.; CASA, R. T.; WORDELL FILHO, J. A.; BLUM, M. M. C.; CAMARGO, M. P. de. Sensibilidade de *Stenocarpella macrospora* fungicidas. *Bioscience Journal*, v. 29, p. 787-795, 2013.

BARBOSA, F. A. R. Planejamento, Síntese e Avaliação Biológica de Híbridos Moleculares Derivados de Diidropirimidinonas. Universidade Federal De Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. Florianópolis, 2019.

BASTOS, M. D. M.; SANTOS, V. L. dos A.; GONSALVES, A. de A.; ARAÚJO, C. R. M. Avaliação da atividade de aldeídos aromáticos e suas oximas frente à enzima acetilcolinesterase eritrocitária humana. *Acta Brasiliensis*, v. 1, n. 3, p. 22-27, 2017.

BERALDO, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*, v. 27, n. 3, p. 461-471, 2004.

BERTO, C.; WIRTH, F.; BARTH, N.; HERMES, D. M. Bases da resistência antifúngica: uma revisão comentada. *Revista Uningá*, v. 55, n. 3, p. 52-71, 2018.

BITTENCOURT, V. C. D. de. Síntese e caracterização estrutural de ligantes isatinas-mono-halogenados derivados de tiosemicarbazonas e hidrazonas e complexos de Níquel (II) e Zinco (II). Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental. Rio Grande, 2016.

BOGDANOV, A. V.; ZARIPOVA, I. F.; VOLOSHINA, A. D.; SAPUNOVA, A. S.; KULIK, N. V.; BUKHAROV, S. V.; VORONINA, J. K.; VANDYUKOV, A. E.; MIRONOV, V. F. Synthesis and biological evaluation of new isatin-based QACs with high antimicrobial potency. *Chemistry Select*, v. 4, p. 6162–6166, 2019.

BRITTO, K. B. Derivados Triazólicos de Isatina como Potenciais Agentes Herbicidas. Universidade Federal Do Espírito Santo. Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas. 2019.

CHAVES, O. A.; CASTRO, I. S. de.; GOULART, C. M.; BELLIENY, M. S. S.; NETTO-FERREIRA, J. C.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; ECHEVARRIA, A. In vitro and in vivo cytotoxic activity and human serum albumininteraction for a methoxy-styryl-thiosemicarbazone. *Investigational New Drugs*, v. 37, n. 5, p. 994-1005, 2019.

CRUZ, C. H. DA. *Micologia Veterinária*. Editora Thieme Revinter. 2º Edição.

CRUZ, L. C. H. da. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. *Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 20, 2013.

CUNHA, S.; SANTANA, L. L. B. de. Condensação de Knoevenagel de aldeídos aromáticos com o ácido de Meldrum em água: uma aula experimental de química orgânica verde. *Química Nova*, v. 35, p. 642-647, 2012.

ÇAKIR, G.; KUÇUKGÜZEL, I.; GUHAMAZUMDER, R.; TATAR, E.; MANVAR, D.; BASU, A.; PATEL, B. A.; ZIA, J.; TALELE, T. T.; KAUSHIK-BASU, N. Novel 4-thiazolidinones as non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Archiv der Pharmazie-Chemistry in Life Sciences*, n. 348, p. 10–22, 2015.

DESIMONE, R. W.; CURRIE, K. S; MITCHELL, S. A; DARROW, J. W; PIPPIN, D. A. Estruturas Privilegiadas: Aplicações na Descoberta de Medicamentos. *Química Combinatória e Triagem de Alto Rendimento*. v. 7. N°. 5. p. 473-493(21). 2004.

DUARTE, C. D; BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. Estruturas Privilegiadas: Um Conceito Útil para o Projeto Racional de Novos Candidatos a Drogas Chumbo. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. v. 7, N°. 11. p. 1108-1119(12). 2007.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio

semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n.13, p. 2695-2707, 2002.

DIVAR, M.; KHALAFI-NEZHAD, A.; ZOMORODIAN, K.; SABET, R.; FAGHIH, Z.; JAMALI, M.; POURNAGHZ, H.; KHABNADIDEH, S. Synthesis of some novel semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives of isatin as possible biologically active agents. *Journal of Pharmaceutical Research International*, v. 17, n. 6, p. 1-13, 2017.

FEIJÓ, R. M; LÓCIO, L. L; BINO, S. L; DANTAS, R. S; MOURA, R. O. de. Aplicação da hibridação molecular como ferramenta de planejamento de novos fármacos. II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde. 2019.

FERNANDES, I. P. G. Mecanismos Eletroquímicos de Derivados da Isatina e de Proteínas Membranares Calmodulina e Caveolinas. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade de Coimbra. 2017.

FINKIELSZTEIN, L. M.; CASTRO, E. F.; FABIAN, L. E.; MOLTRASIO, G. Y.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. V.; MOGLIONI, A. G. New 1-indanone thiosemicarbazone derivatives active against BVDV. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, p. 1767-1773, 2008.

GOULART, C. M. Síntese e avaliação da atividade anticorrosiva de tiossemicarbazonas, chalconas tiocarbamoil e 1-tiocarbamoil-4,5-diidro-1H-pirazóis. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Instituto de Ciências Exatas Programa de Pós-Graduação em Química. 2015.

GOMES, P. A. T. M. Planejamento estrutural, síntese e avaliação das propriedades farmacológicas de inéditas tiazolil-hidrazonas derivadas da ftalimida e da isatina. Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. 2016.

GOW, N.A.R.; AMIN, T.; MCARDLE, K.; BROWN, A.J.P.; BROWN, G.D.; WARRIS, A. Strategic research funding: a success story for medical mycology. *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 10, p. 811-813, 2018.

HE, Z.; QIAO, H.; YANG, F.; ZHOU, W.; GONG, Y.; ZHANG, X.; WANG, H.; ZHAO, B.; MA, L.; LIU, H.; ZHAO, W. Novel thiosemicarbazone derivatives containing indole fragment as potent and selective anticancer agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 184, p. 111764, 2019.

ISAACS, N. *Physical Organic Chemistry*. Second Edition. Longman Scientific & Technical. 1995.

LANZMASTER, M. Estudo da Influência de Grupos Retiradores de Elétrons Em Novos Complexos de Vanádio (Iii) e (Iv) Como Modelos para as Vanádio-Trasferrinas. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Departamento de Química. Curso de Pós-Graduação em Química. 2010;

LEITE, K. C. S. Caracterização eletroquímica do composto LQFM-091, obtido por hibridação molecular a partir dos protótipos nimesulida e BF-389. Universidade Federal de Goiás. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Goiânia. 2015.

LEITE, T. O. C. Benzaldeído (CAS 100-52-7). *Revista Virtual Química*, v. 12, p. 183-195, 2020.

LOLOIU, G; MAIOR, O. Isatin chemistry. Synthesis of N-methyl-2,3-dioxo-2,3-dihydropyrrolo[2,3-b]phenoxatiin. *Revue Roumaine de Chimie*, v. 42, p. 67, 1997.

MACHADO, O. V. O; PATROCÍNIO, M. C. A; MEDEIROS, M. S; BANDEIRA, T. J. P. G. Antimicrobianos revisão geral para graduandos e generalistas. Ed Unichristus: Editora do Centro Universitário Christus. Fortaleza. 2019

MARTINEZ, S. T.; FERREIRA, V. F. As Isatinas do Professor Angelo. *Revista Virtual Química*, v. 9, p. 1154-1183, 2017.

MARCH, J. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure*. Tokyo, McGraw-Hill, 1977.

MASS, E. B. Hibridização Molecular: Reação de Huisgen Aplicada na Síntese de Chalconas-Dihidropirimidinonas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. Porto Alegre. 2017.

MATHEW, B; BAEK, S. C; PARAMBI, D. G. T; LEE, J. P; JOY, M; RILDA, P. R. A; RANDEV, R. V; NITHYMOL, P; VIJAYAN, V; INASU, S. T; MATHEW, G. E; LIHIDAKSHAN, K. K; KRISHNAN, G. K; KIM, H. Selected aryl thiosemicarbazones as new class of multi-targeted monoamine oxidase inhibitors. *MedChemComm*, v.9, n. 11, p. 1871-1881, 2018.

MITCHELL, T. C. de. C. C. Efetividade do óleo essencial de orégano (*origanum vulgare* L., lamiaceae) na inibição do crescimento de espécies de *aspergillus* potencialmente toxigênicas. Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Nutrição Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife-PE. 2008;

MOURA, E. C. M. de; SOUZA, A. D. N.; ROSSI, C, G. F. T.; SILVA, D. R. da.; MACIEL, M. A. M. Avaliação do potencial anticorrosivo de tiossemicarbazonas solubilizadas em microemulsão. *Química Nova*, v. 36, p. 59-62, 2013.

MUNHOZ, L. S.; POESTER, V. R.; BENELLI, J. L.; KLAFKE, G.; BASSO, R. P.; XAVIER, M. O. Casuística da esporotricose no município do Rio Grande - RS: 2017 a 2019. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 25 (S1), p. 101078, 2021.

MUREGI, F. W; ISHIIH, A. Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design. *Drug Development Research*, v. 71, p.20–32, 2010.

OLIVEIRA, A. A. de.; Óleos Essenciais e Extratos Vegetais de Plantas Cultivadas no Brasil: Impacto no Crescimento de *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus carbonarius*. Instituto de Veterinária. UFRRJ. 2010.

PAIVA, R. de. O.; Avaliação das Atividades Antifúngicas de Substâncias Sintéticas Frente a Fungos Micotoxigênicos de Interesse Agropecuário. Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação Em Agropecuária. UFRRJ. 2013.

PEREIRA, D. S.; GOULART, C. M.; REIS, C. M. dos; Echevarria, A. Síntese e avaliação da atividade anticorrosiva de tiossemicarbazida e tiossemicarbazona 4-N-(p-metóxfenil) substituídas. *Revista Virtual de Química*, v. 5, p. 770-785, 2013.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P. de; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v. 20, p. 141-156, 2002.

PEREIRA, V. S. Drogas leishmanicidas: atividade antimicrobiana da pentamidina sobre o complexo *sporothrix schenckii* e antagonismo do antimoniato de meglumina com antifúngicos clássicos. Universidade Federal do Ceará Faculdade de Medicina Departamento de Patologia e Medicina Legal. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica. 2017.

PITUCHA, M; KORGA-PLEWKO, A; CZYLKOWSKA, A; ROGALEWICZ, B; DROZD, M; IWAN, M; KUBIK, J; HUMENIUK, E; ADAMCZUK, G; KARZMARZYK, Z; FORMAL, E; WYSOCKI, W; BARTNIK, P. Influence of complexation of thiosemicarbazone derivatives with Cu (II) ions on their antitumor activity against melanoma cells. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, p. 3104, 2021.

PHOGAT, P.; SINGH, P. A mini review on central nervous system potential of isatin derivatives. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, v. 15, p. 28-31, 2015.

QUEIROZ, C; SOUSA, A. C. B. de. Produção de enzimas hidrolíticas por fungos filamentosos em diferentes substratos sólidos. Brazilian Journal of Development, v. 6, p. 51849-51860, 2020.

RAGHAV, N.; KAUR, R. Synthesis and evaluation of some semicarbazone and thiosemicarbazone-based cathepsin B inhibitors. Medicinal Chemistry Research, v. 23, p. 4669–4679, 2014.

SANSON, R. A; HOEKSTRA, E. S; FRISVAD, J. C; FILTENBORG, O. Introduction to Food and Airborne Fungi. 6^o Edição. CBS.

SANTOS, T. D. dos; CARNEIRO, J; TEIXEIRA, M. L. Síntese de candidato à fármaco por hibridação molecular. Anais do EVINCI – UniBrasil, Curitiba, v.5, n.1, p. 358-358, out. 2019.

SANTOS, J. S.; MELOS, J. R. M de.; LIMA, G. S.; LYRA, J. C.; GUEDES, G. P.; SANTOS, C. E. R. ECHEVARRIA, A. Synthesis, anti-*Trypanosoma cruzi* activity and quantitative structure relationships of some fluorinated thiosemicarbazones. Journal of Fluorine Chemistry. v. 195, p. 31-36, 2017.

SANTOS, R. C. Da S. Aril-Tiossemicarbazonas: Síntese, Caracterização Estrutural e Avaliação Esquistossomícida. Universidade Federal De Pernambuco Centro de Ciências da Saúde. Programa De Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas. 2017.

SANGLARD, D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, n. 4, p. 379-385, 2002

SILVA, B. N. M. da.; BASTOS, R. S.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C. Síntese de 5-Nitro-Isatina E 5-Cloro-Isatina a partir da Isonitrosoacetanilida. *Quim. Nova*, v. 33. p. 2279-2282. 2010.

SILVA, B. V. Isatin, a Versatile Molecule: Studies in Brazil. *Journal of Brazilian Chemistry Society*. v. 24. No. 5. 2013

SILVA, C. B da; MARTINS, J. D. C. Aflatoxina em amendoim. *Revista Engenho*. V. 9. Junho. 2014.

SILVA, C. S. Determinação da estrutura cristalina/molecular de um derivado da tiossemicarbazona com atividade farmacológica, a Tetralona-Tiossemicarbazona. Universidade Federal de Sergipe. Núcleo de pós-graduação em Química. 2013.

SILVA, J. F. M. da.; GARDEN, S J.; PINTO, A. C. The Chemistry of Isatins: A Review From 1975 To 1999. *J. Braz. Chem. Soc.*, 12; 273-324; 2001.

SILVA, T. G. de J.; LEITE, A. C. L. Síntese e Avaliação da Atividade Antitumoral de Inéditos Derivados da Isatina. XXIII CONIC. VII CONIT. IV ENIC.

SILVA, T. S. M. da. Síntese assistida por micro-ondas de tiossemicarbazonas derivadas da isatina com potencial atividade biológica. Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. 2018.

SOARES, M. A.; ALMEIDA, M. A.; MARINS-GOULART, C.; CHAVES, O. A.; ECHEVARRIA, A.; OLIVEIRA, M. C. C. de. Thiosemicarbazones as inhibitors of tyrosinase enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 27. p. 3546–3550. 2017.

SONG, S.; LI, Z.; BIAN, Y.; HUO, X.; FANG, J.; SHAO, L.; ZHOU, M. Indole/isatin-containing hybrids as potential antibacterial agents. *Arch Pharm.* 2000143. Junho, 2020.

STOLLE, R. New method for the preparation of N-substituted isatins. *Berichte Deut. Chem. Gesells.* v. 46, p. 3915, 1914.

SWATHY, S.S.; JOSEYPHUS, R. S.; Nisha, V.P.; SUBHADRAMBIKA, N.; MOHANAN, K. Synthesis, spectroscopic investigation and antimicrobial activities of some transition metal complexes of a [(2-hydroxyacetophenone)-3-isatin]-bishydrazone. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 9, S1847-S1857, 2016.

TAYLOR, A. The synthesis of the dimethoxyisatins. *Journal of Chemical Research (S)*, v. 10, p. 347, 1980.

TAKAHASHI, J. A; LIMA, G. da. S.; SANTOS, G. dos. S.; LYRA, F. H.; HUGHES, A. F. da. S.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. *Revista Virtual de Química*, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E.de. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29. p. 52-59, 2005.

TENÓRIO, R. P. & GÓES, A. J. S. Tiossemicarbazonas: Métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*, v. 28, p. 1030-1037, 2005.

TOMAZI, I. Caracterização de novas espécies de *Sporothrix*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Veterinária. Porto alegre. 2019.

WAKCHAURE, N. D.; SHEJWALL, S. S.; DESHMUKH, V. K.; CHAUDHARI, S. R. Review on common methods to synthesize substituted 1h-indole-2,3-dione (isatin) derivatives and their medicinal significance. *American Journal of PharmTech Research*, v. 2, n. 4, 2012.

WIETHAUS, G. Síntese e Caracterização de Novas Iminas com Aplicação em Óptica Não-Linear. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Departamento de Química Orgânica. 2010.

VIEIRA, R. P.; ROCHA, L. T. S.; TEIXEIRA, L. R.; SINISTERRA, R. D.; COELHO, M. M.; BERALDO, H. Benzaldeído semicarbazona: um candidato a fármaco que alia simplicidade estrutural a um amplo perfil de atividades. *Revista Virtual de Química*, v. 2, p. 2-9, 2010.

ZAMPIROLI, L. S. Dialquilfosforilidrazonas derivadas de isatinas n-substituídas com potencial atividade biológica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de pós-graduação em Química. 2009.

ZANETTE, R. A. O papel do íon ferro nas infecções por *Pythium insidiosum*. Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. 2014.

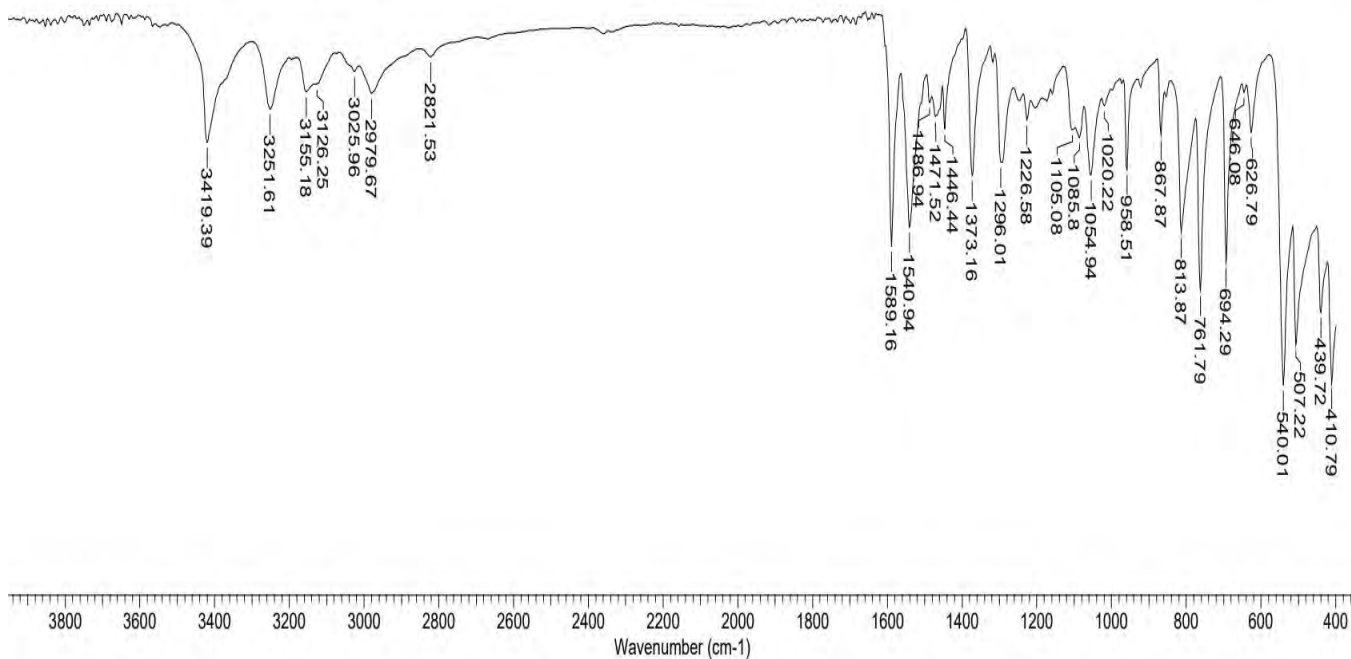
ZAREMBER, K. A; CRUZ, A. R; HUANG, C; GALLIN, J. I. Antifungal activities of natural and synthetic iron chelators alone and in combination with azole and polyene antibiotics against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 2654-2656, 2009.

ANEXOS

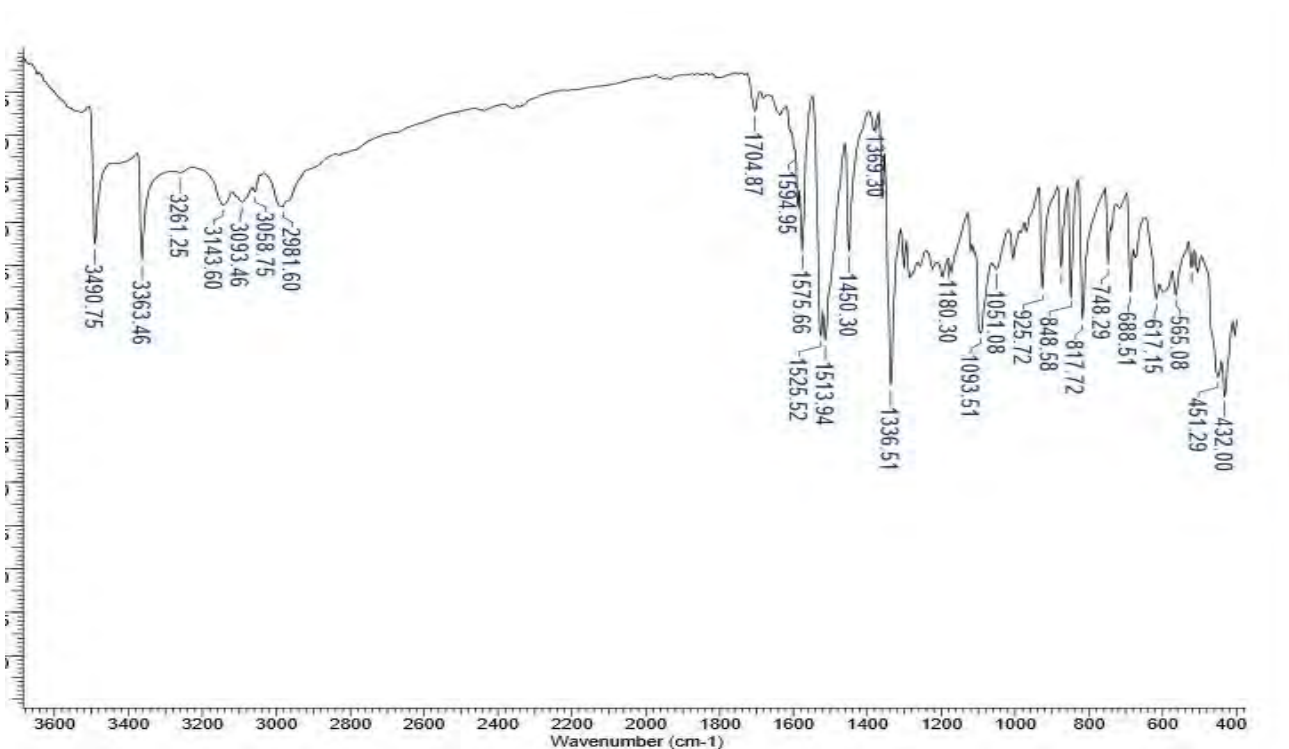
A - Espectros de infravermelho (ATR) cm^{-1} para as aril-*p*-tiossemicarbazonas sintetizadas (TIO-4-X).

Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para TIO-H

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAITIOSEMICARBAZONA BENZALDEIDO.0		
Date Stamp	11/08/2020 12:53:11.669 (GMT-3)	Date	25 Aug 2020 17:18:38	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Y Axis	Transmittance
			Data Spacing	1.9286	

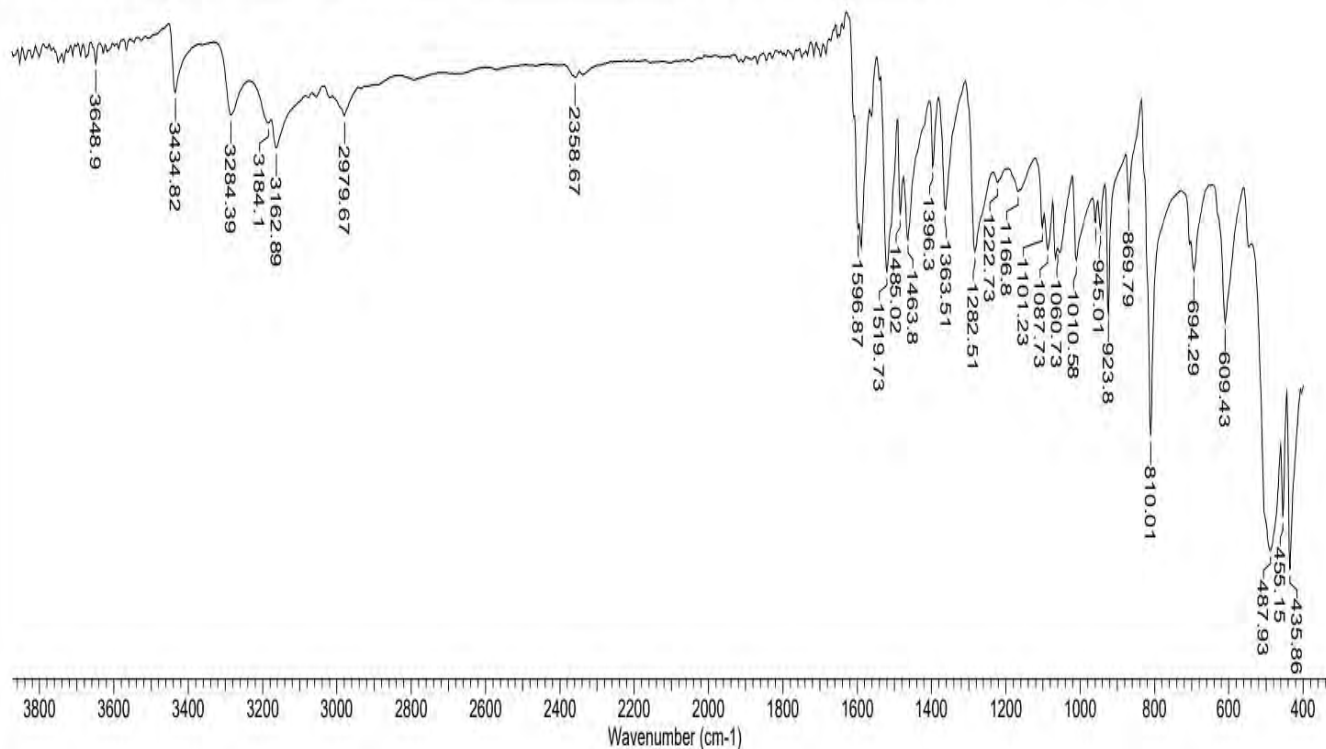


Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para TIO-4-NO₂

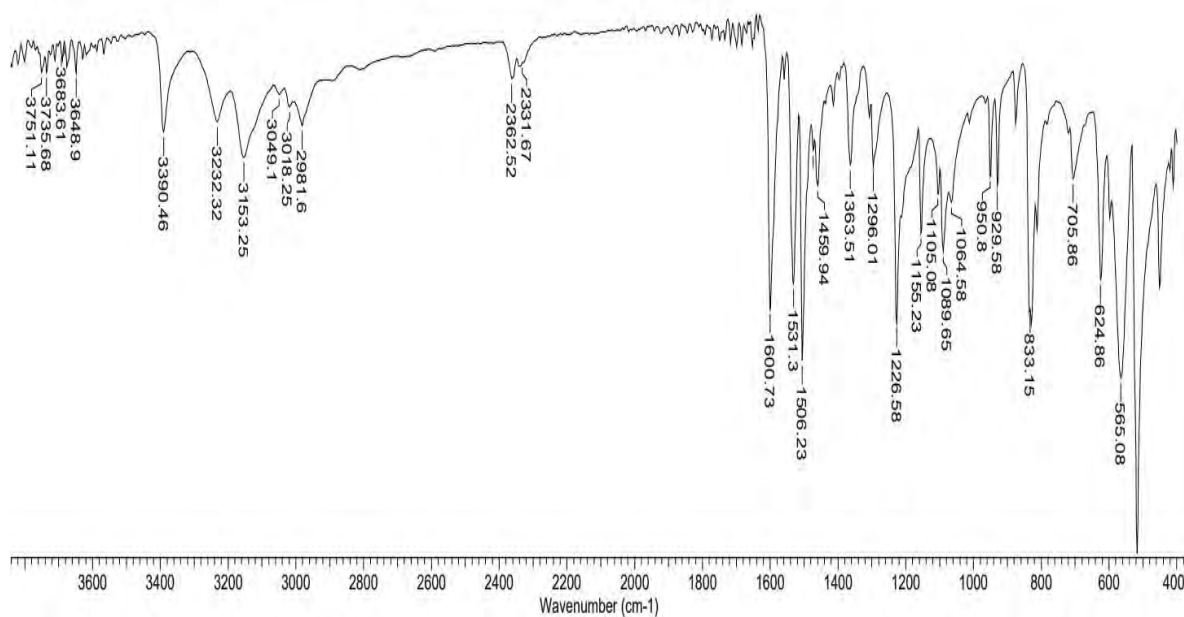


Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-Br**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAITIOSEMICARBAZONA P BROMOBENZALDEIDO.0		
Date Stamp	11/08/2020 13:02:07.551 (GMT-3)	Date	25 Aug 2020 17:18:38	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286
				Y Axis	Transmittance

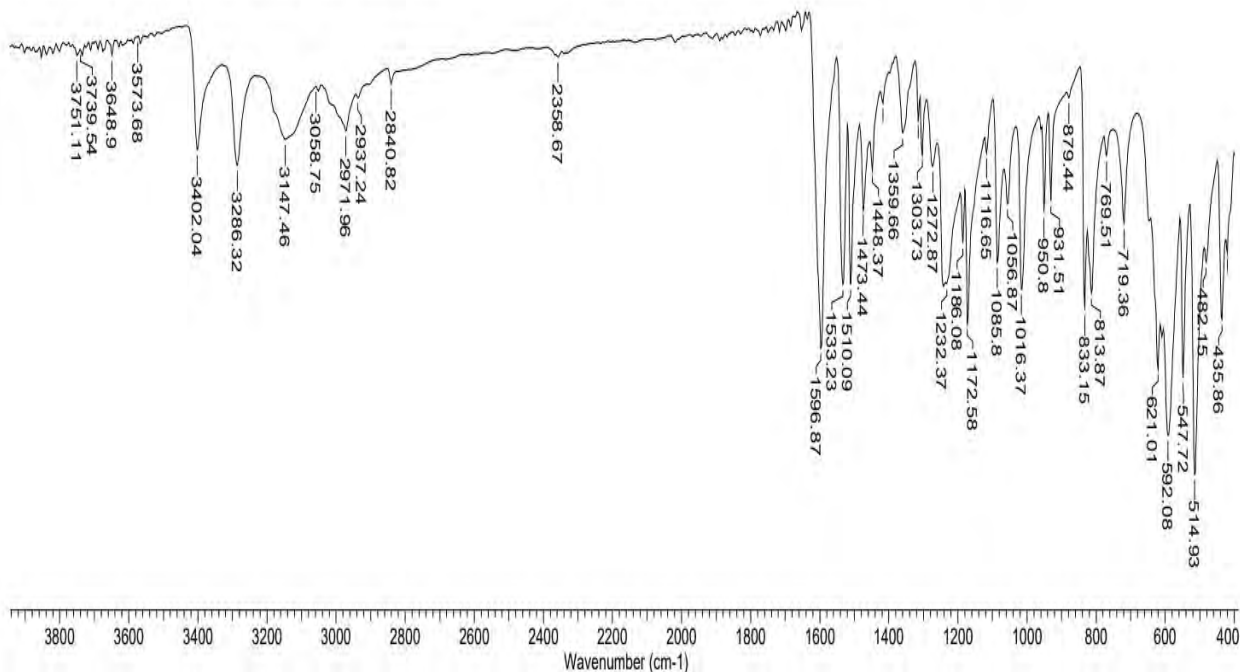
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-F**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAITIOSEMICARBAZONA P FLUORBENZALDEIDO.0		
Date Stamp	08/09/2020 14:35:52.893 (GMT-3)	Date	14 Sep 2020 16:29:54	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286
				Y Axis	Transmittance

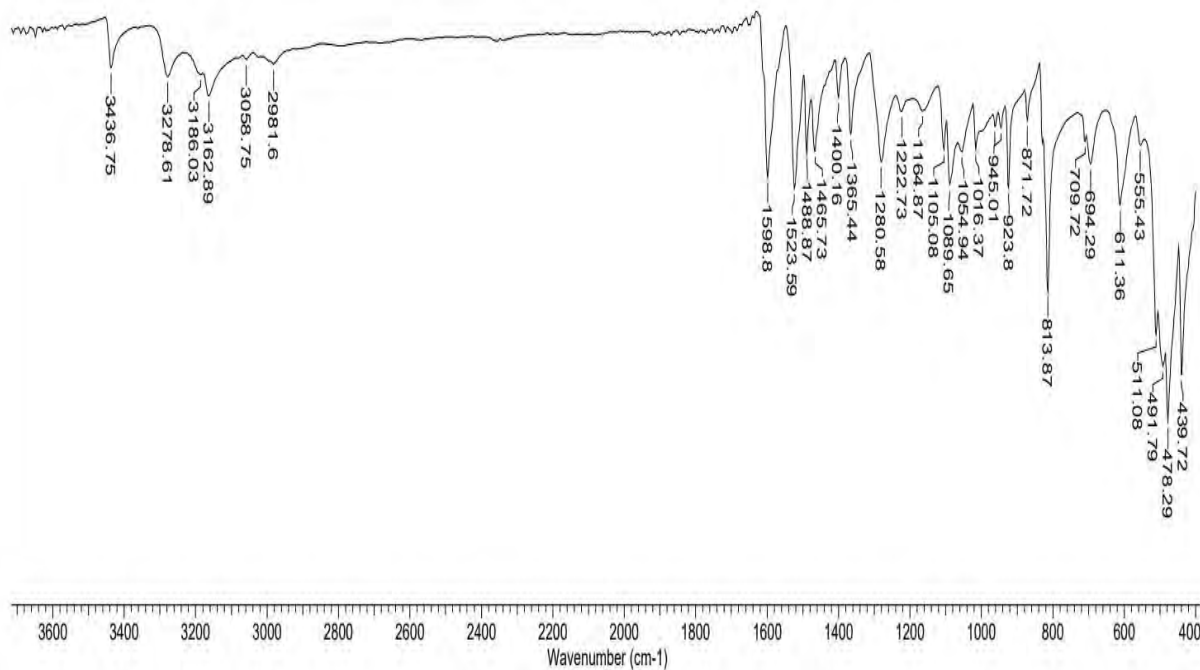


Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-OCH₃**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAI\TIOSEMICARBAZONA P METOXIBENZALDEIDO.0		
Date Stamp	11/08/2020 12:59:24.725 (GMT-3)	Date	25 Aug 2020 17:18:38	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286

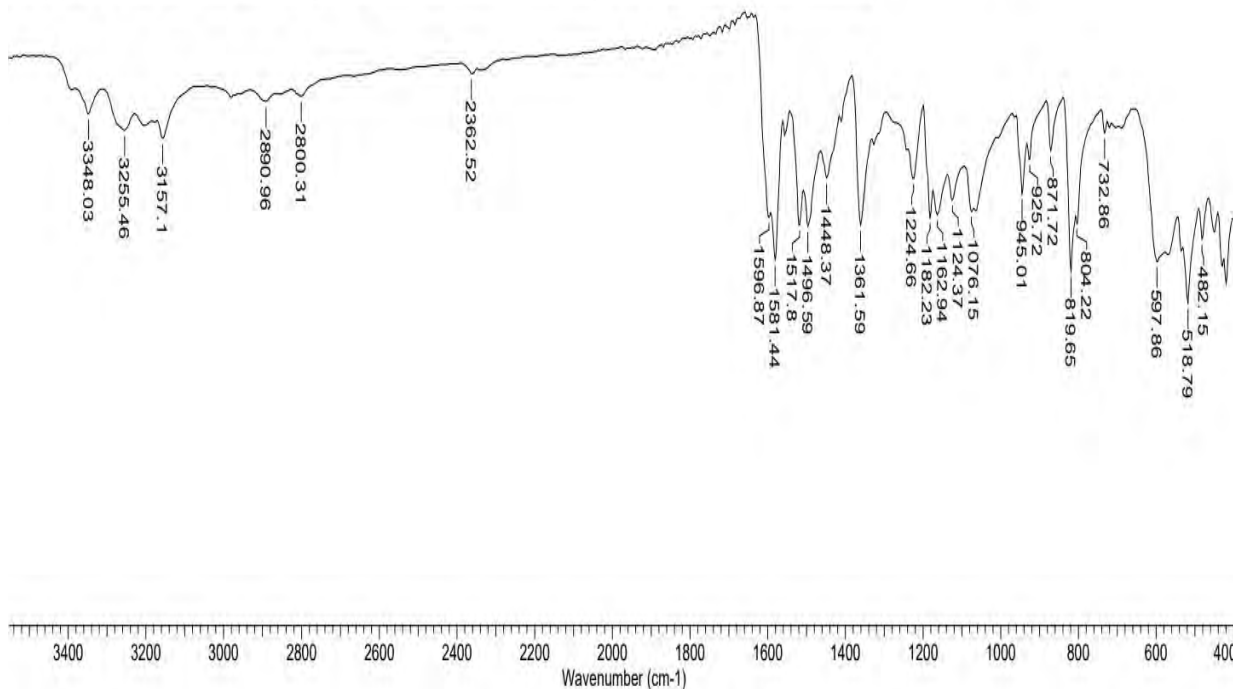
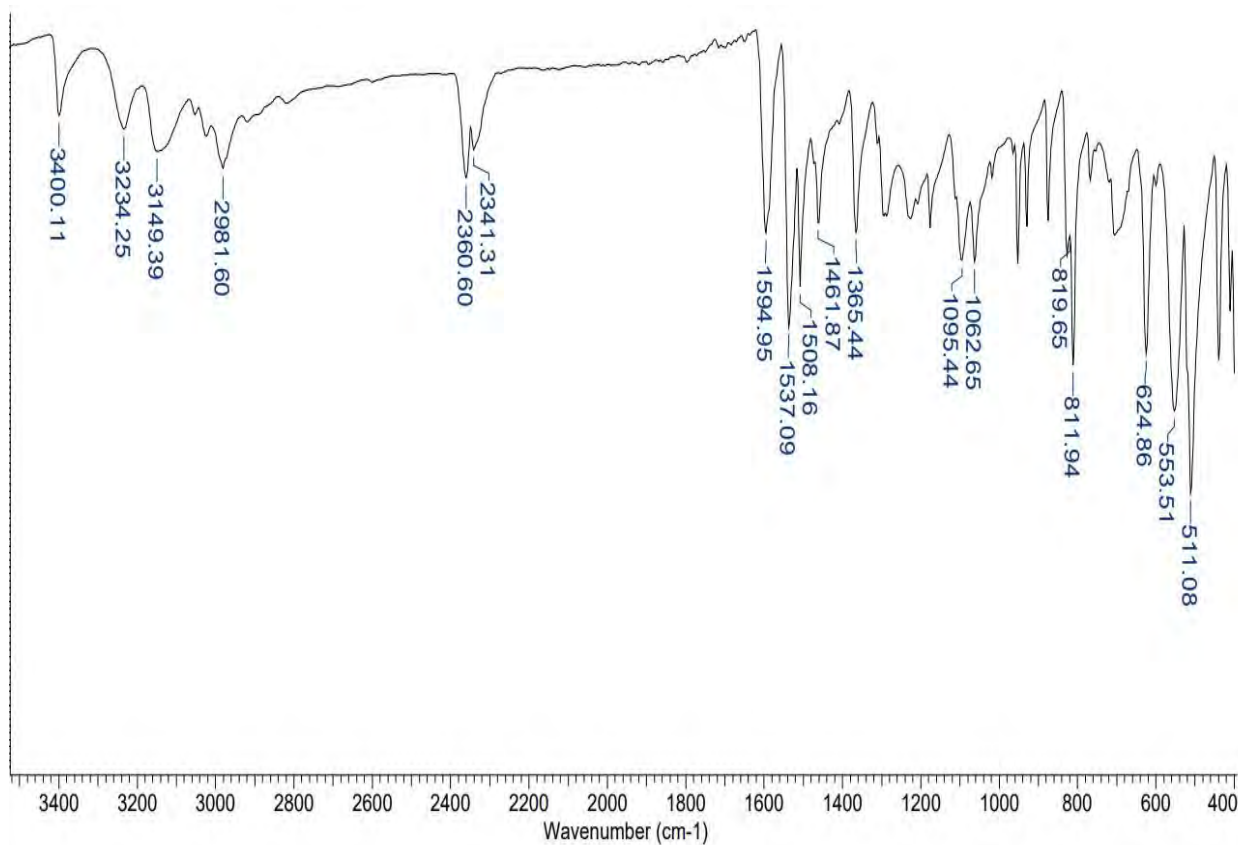
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-Cl**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAI\TIOSEMICARBAZONA P CLOROBENZALDEIDO.0		
Date Stamp	11/08/2020 12:50:28.846 (GMT-3)	Date	25 Aug 2020 17:18:38	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286



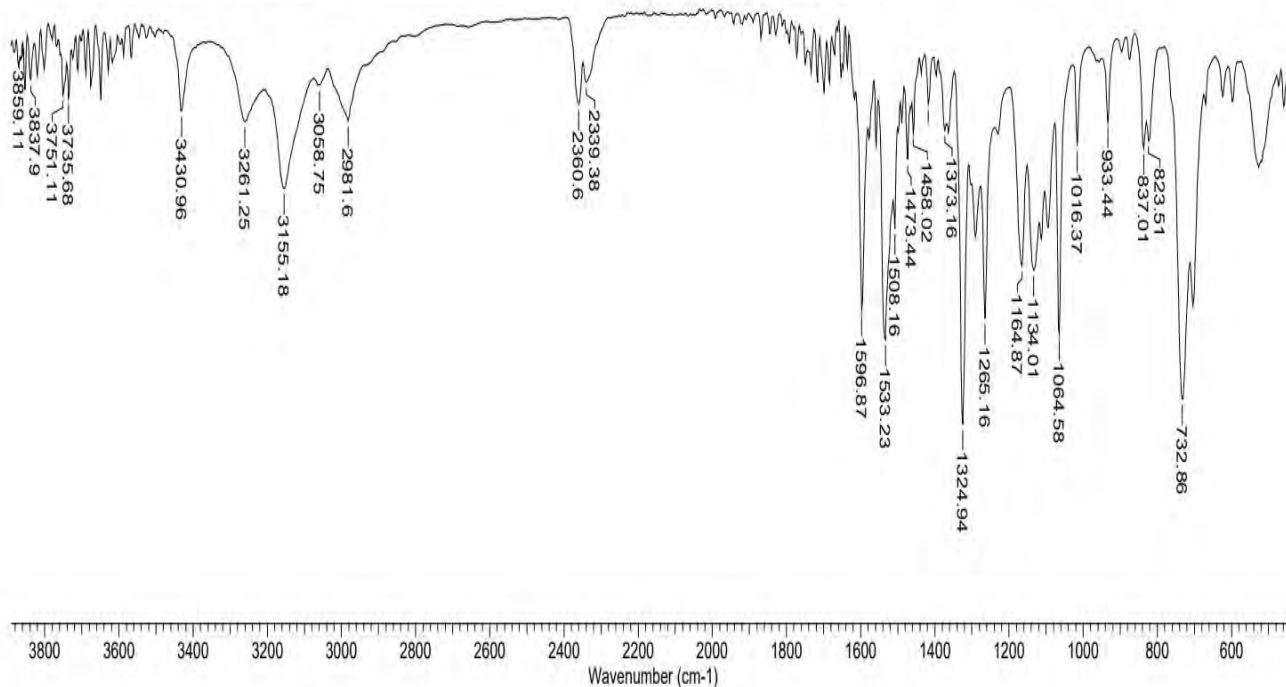
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-N(CH₃)₂**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAITIOSEMICARBAZONA P DIMETILAMINO BENZALDEIDO.0		
Date Stamp	08/09/2020 14:32:15.947 (GMT-3)	Date	14 Sep 2020 16:29:54	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286

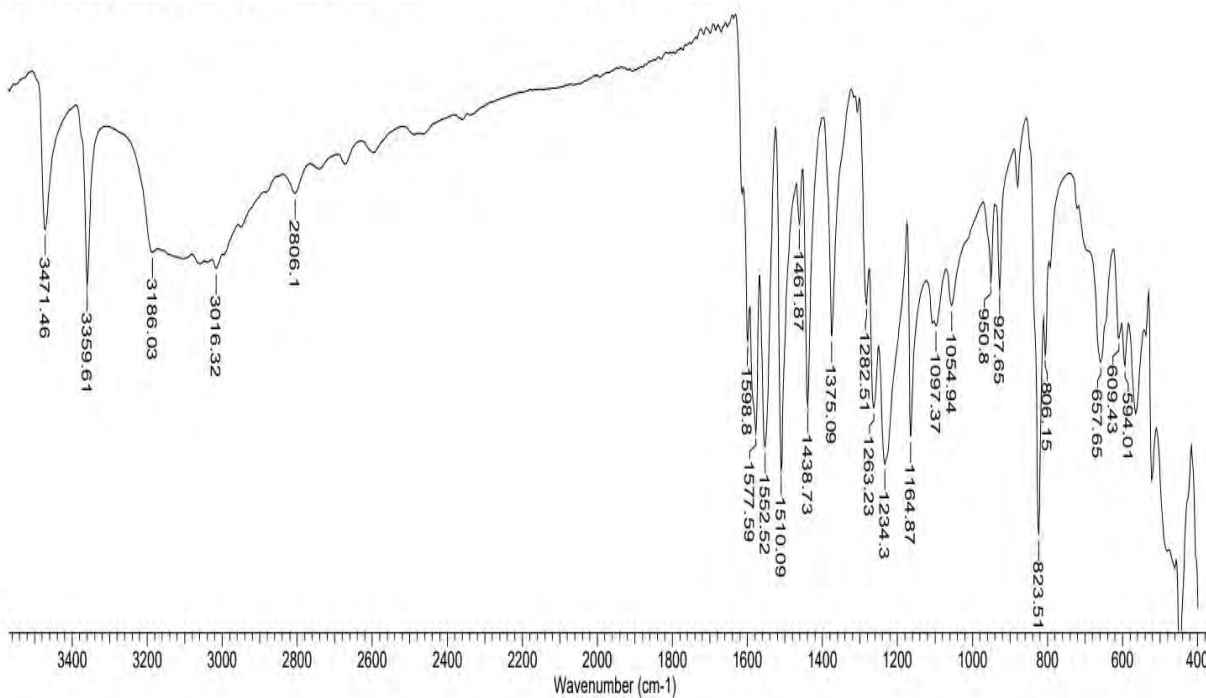
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-CH₃**

Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-CF₃**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAITIOSAMICARBAZONA P TRIFLUORMETIL.O		
Date Stamp	31/08/2020 13:31:02.568 (GMT-3)	Date	14 Sep 2020 16:32:10	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286

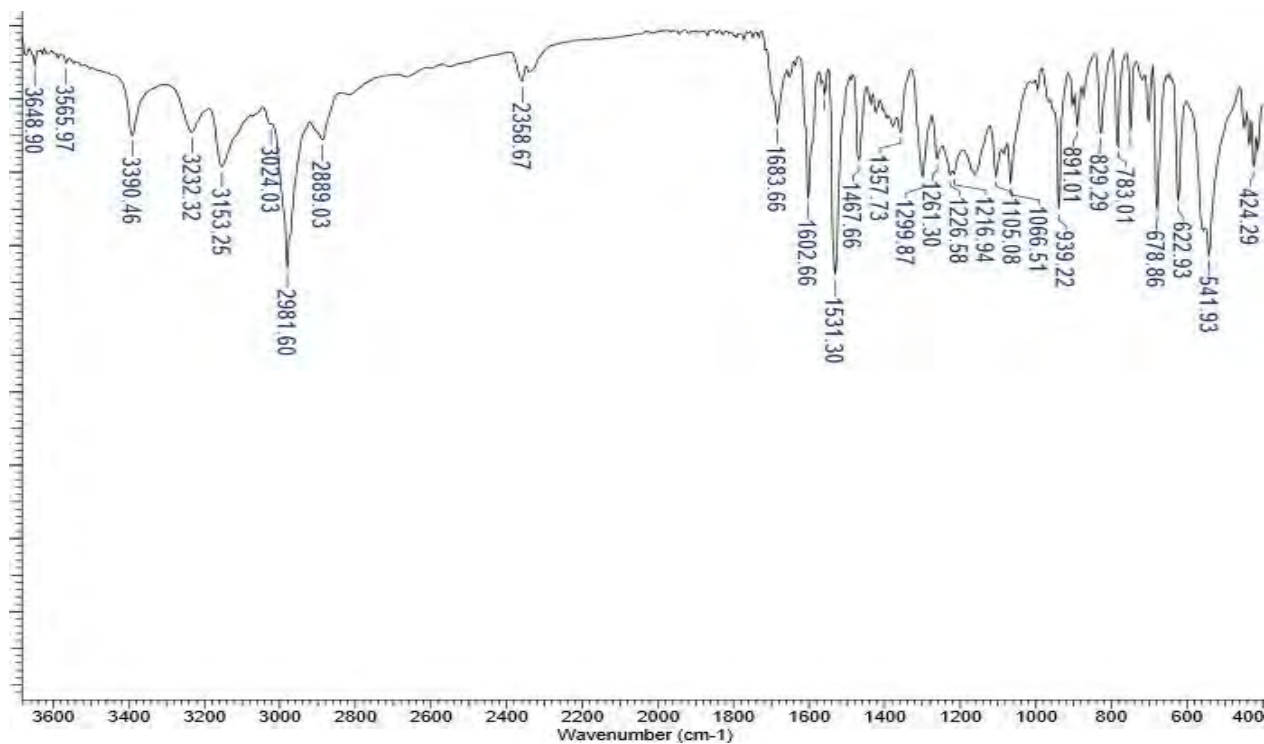
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-4-OH**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAITIOSAMICARBAZONA P HIDROXI2.O		
Date Stamp	31/08/2020 13:13:43.340 (GMT-3)	Date	14 Sep 2020 16:32:10	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286

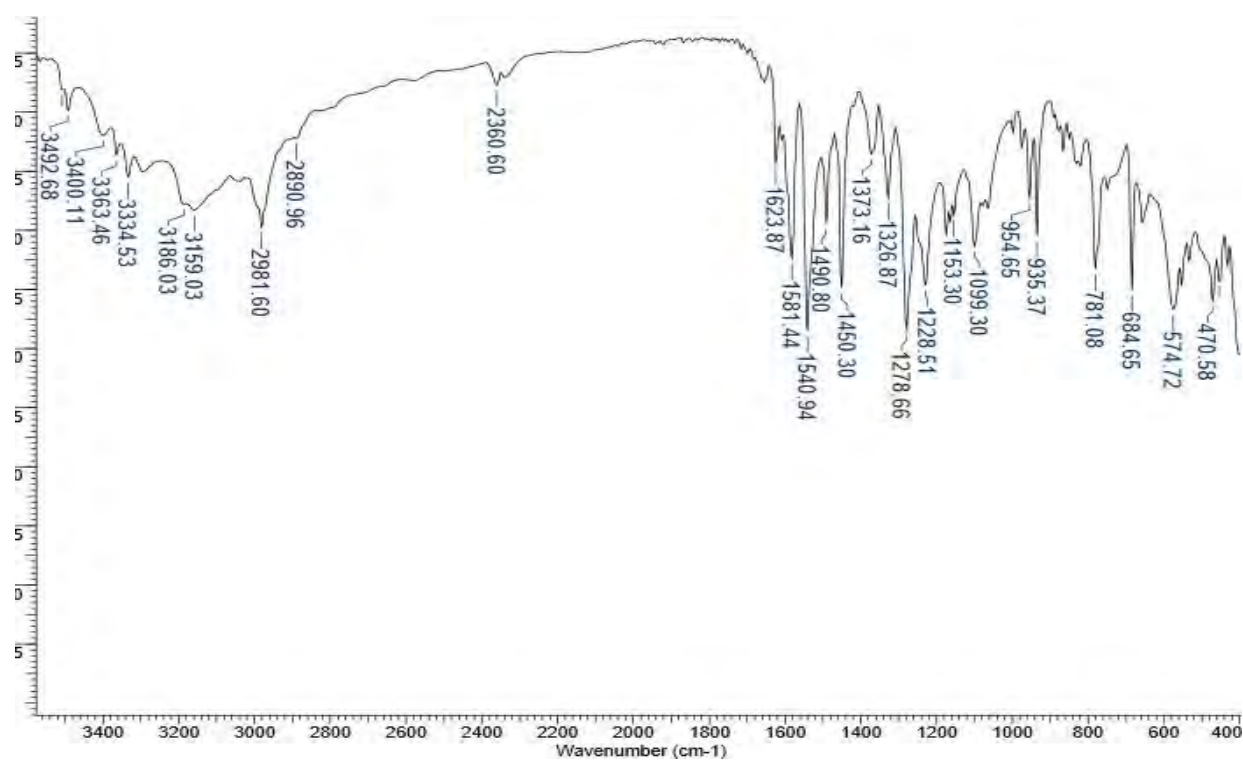


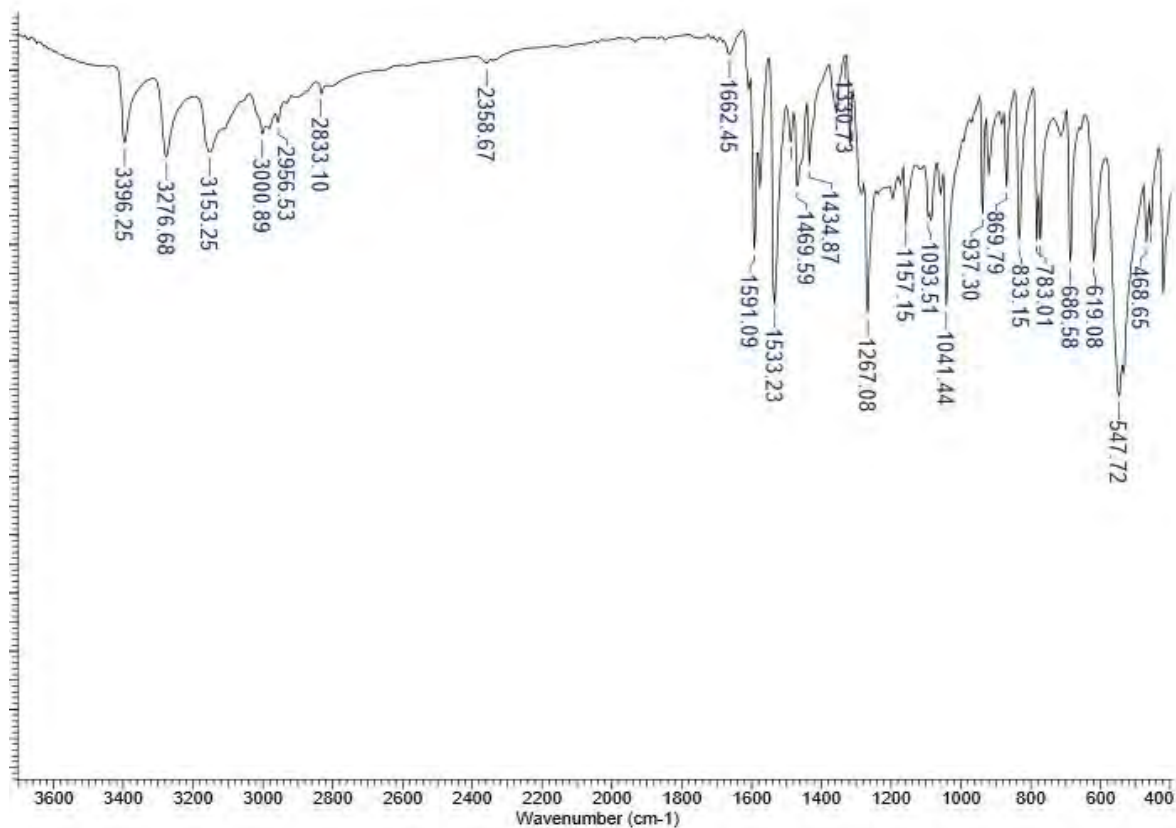
B - Espectros de infravermelho (ATR) cm^{-1} para as aril-*m*-tiossemicarbazonas sintetizadas (TIO-3-X).

Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para TIO-3-Br

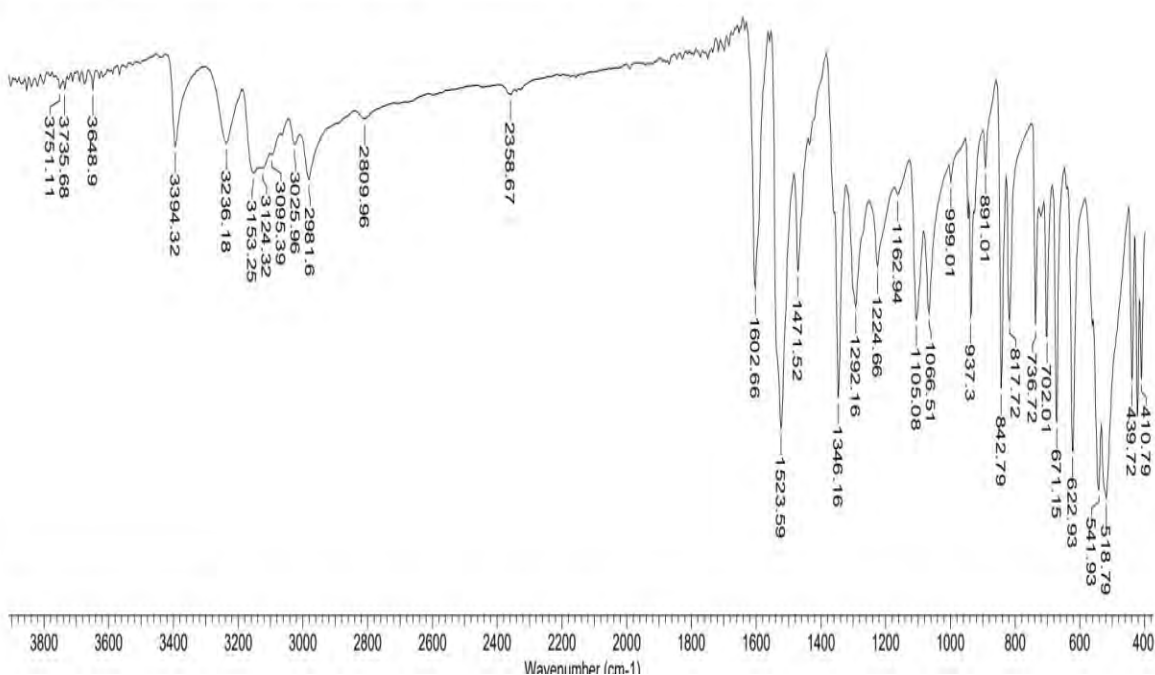


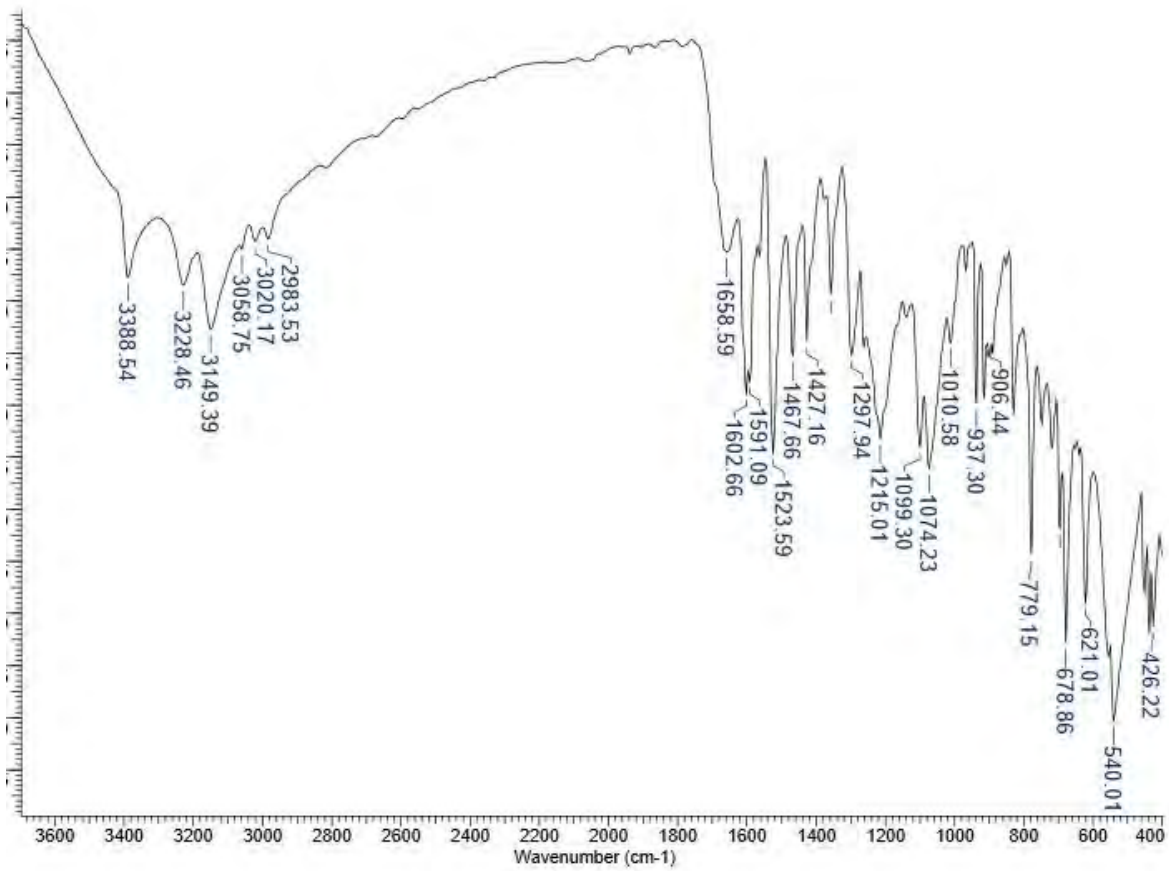
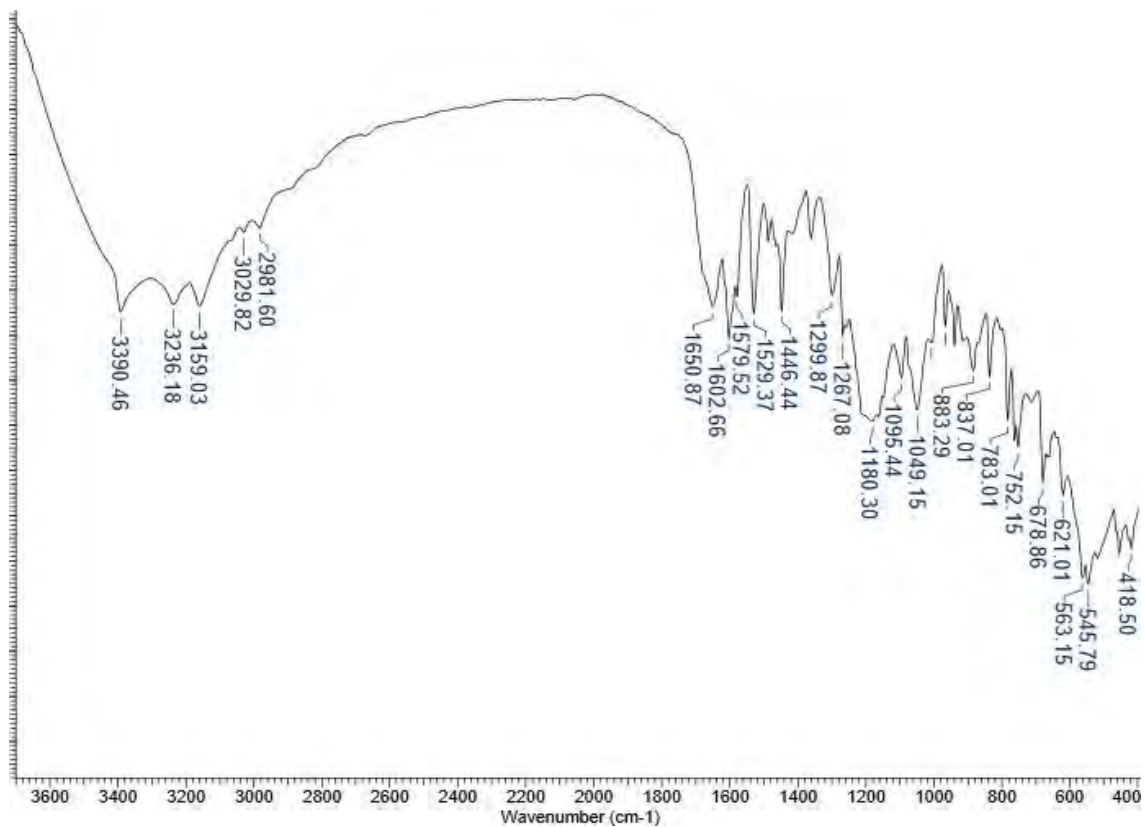
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para TIO-3-OH

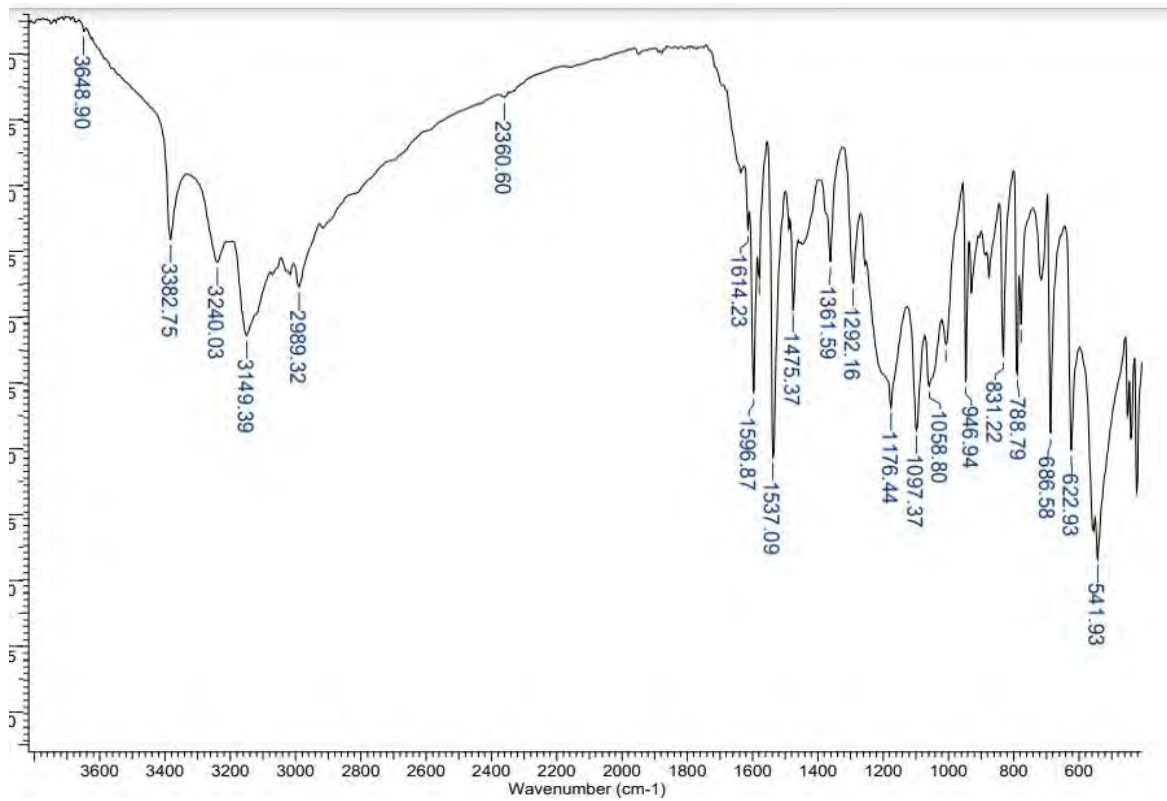
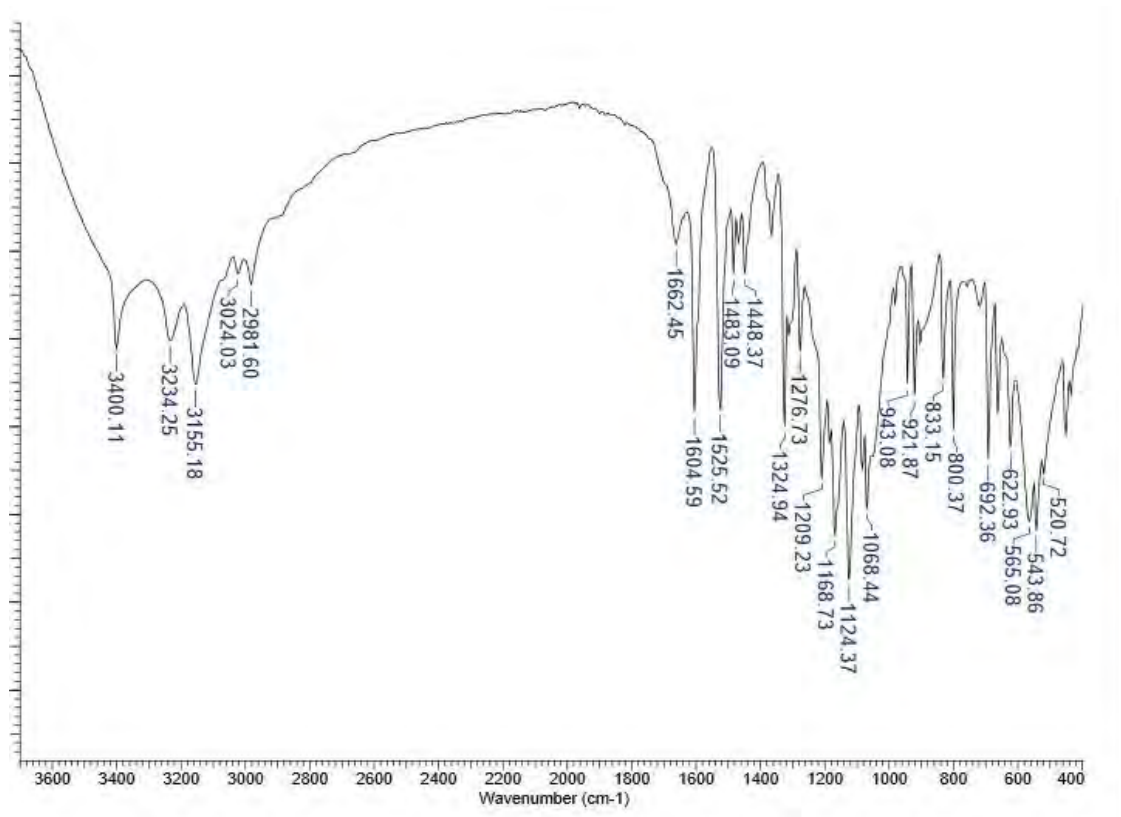


Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-3-OCH₃**Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-3-NO₂**

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAITIOSEMICARBAZONA M NITROBENZALDEIDO.0		
Date Stamp	11/08/2020 12:56:29.204 (GMT-3)	Date	25 Aug 2020 17:18:38	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Data Spacing	1.9286

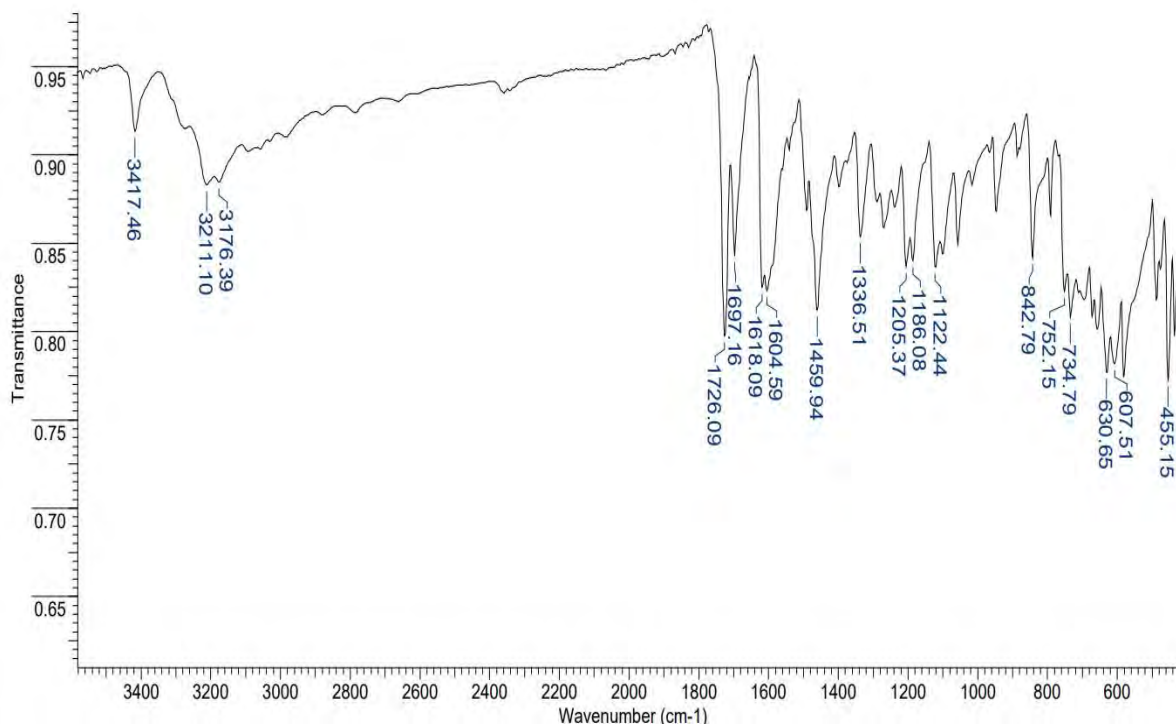


Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-3-Cl**Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-3-F**

Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-3-CH₃**Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para **TIO-3-CF₃**

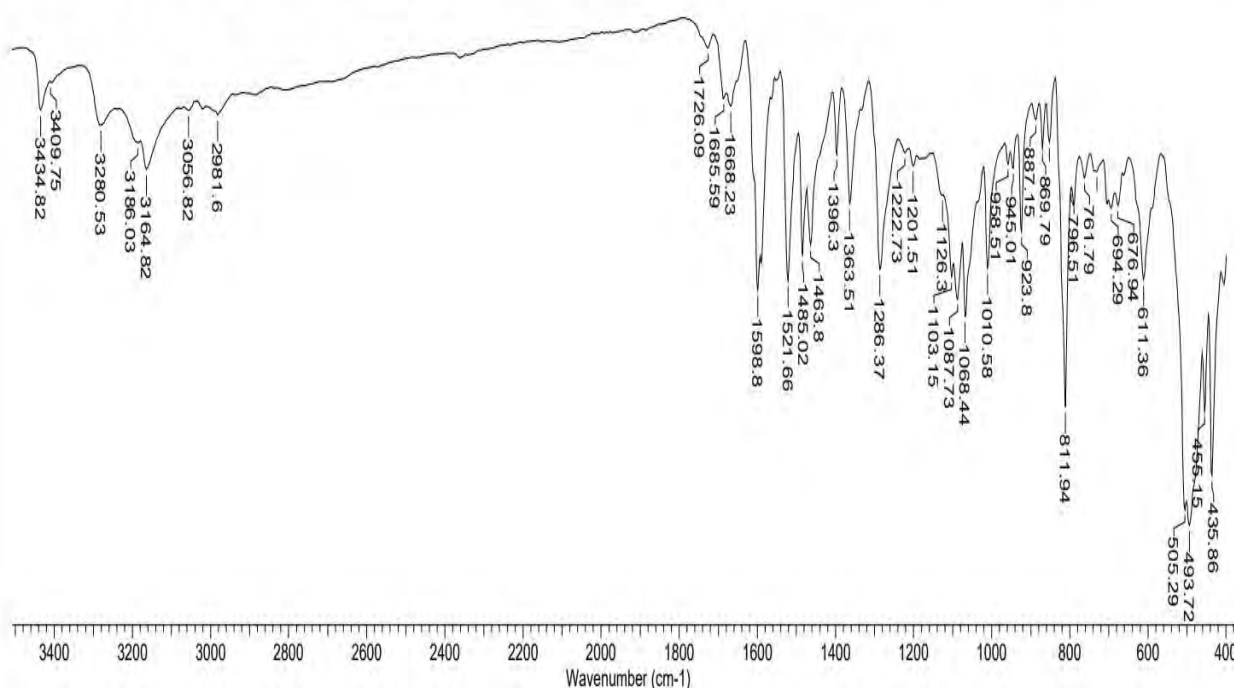
C - Espectros de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para as isatina-aril-*p*-tiossemicarbazonas (ISATIO-4-X).

Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-H



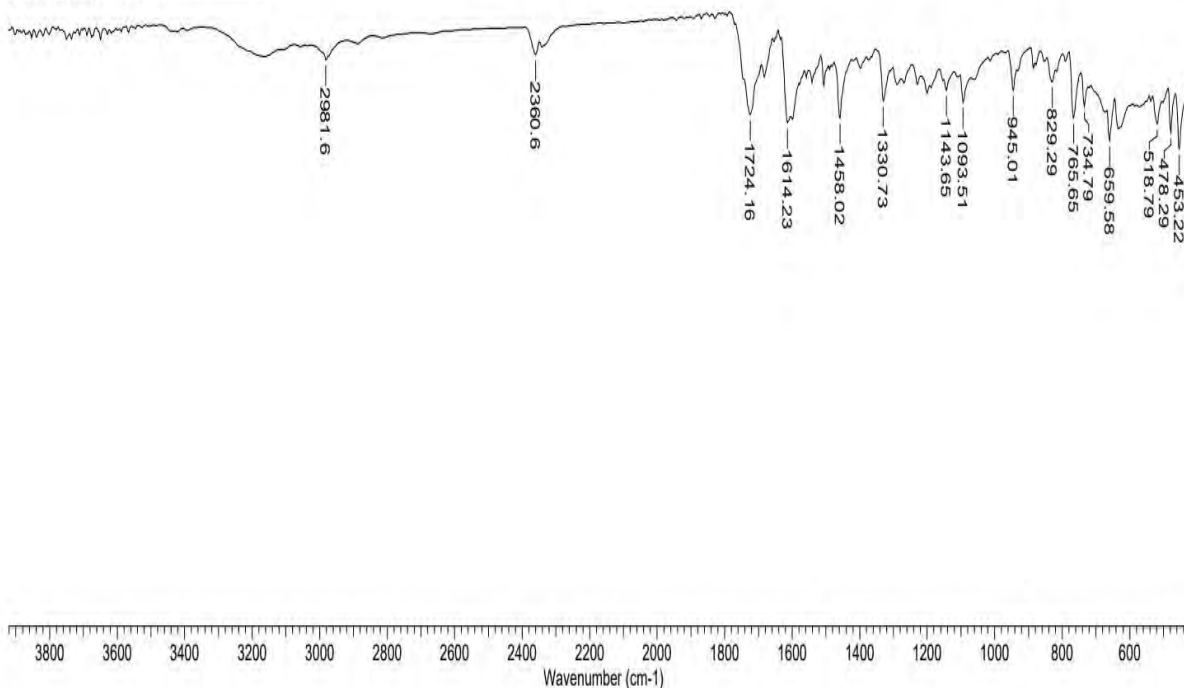
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4-Br

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELA\ISATINA P BROMOBENZALDEIDO.0		
Date Stamp	18/08/2020 14:52:04.339 (GMT-3)	Date	25 Aug 2020 17:55:44	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Y Axis	Transmittance
				Data Spacing	1.9286

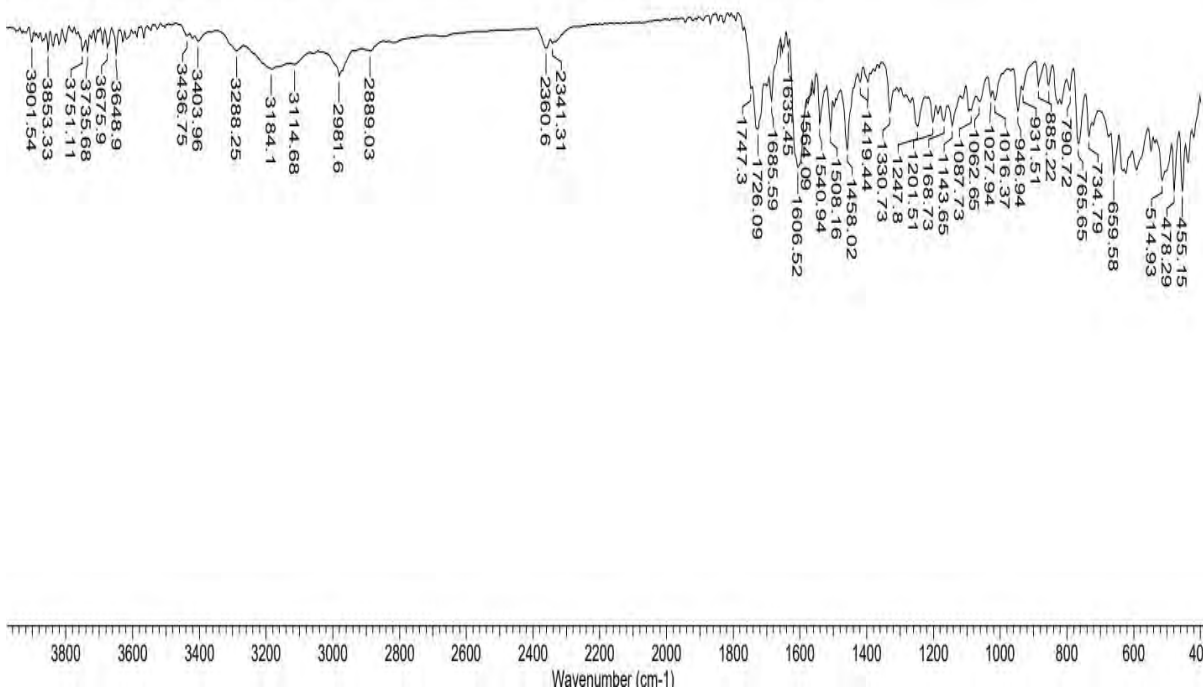


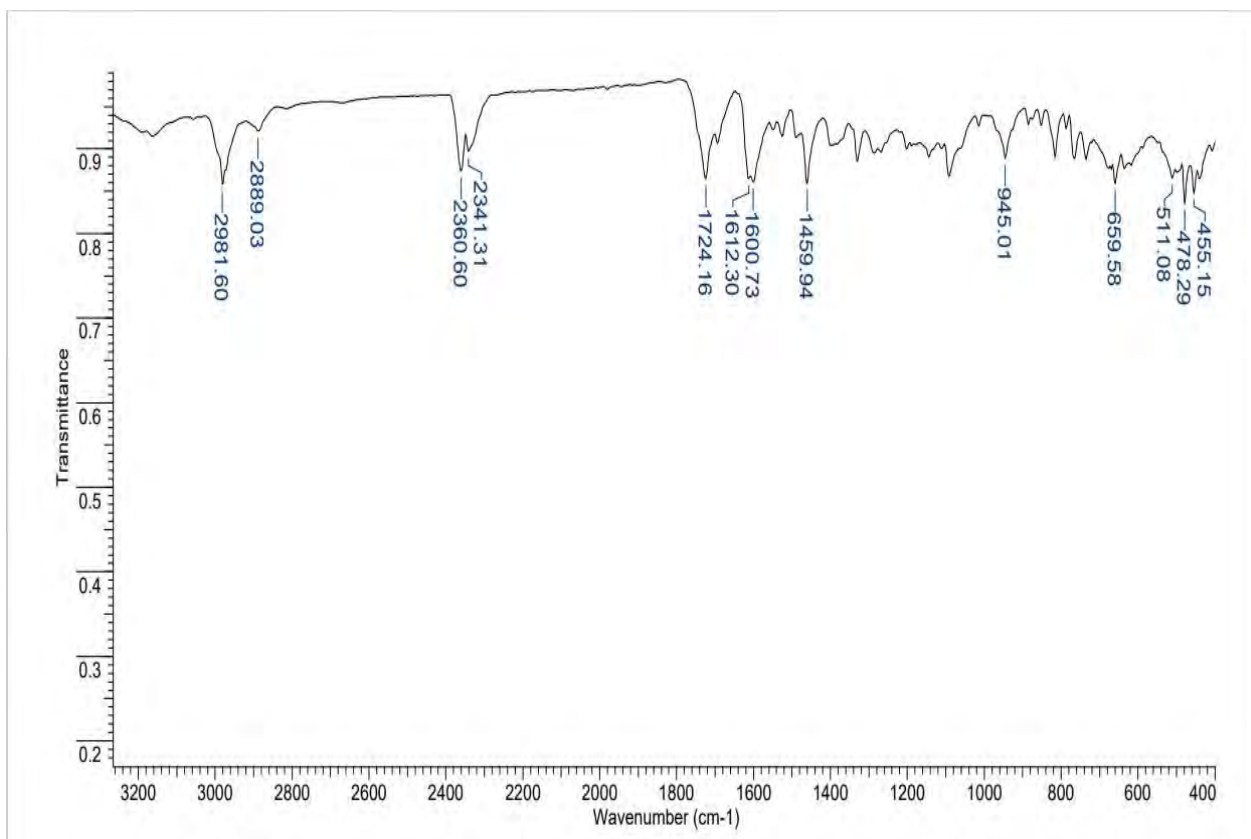
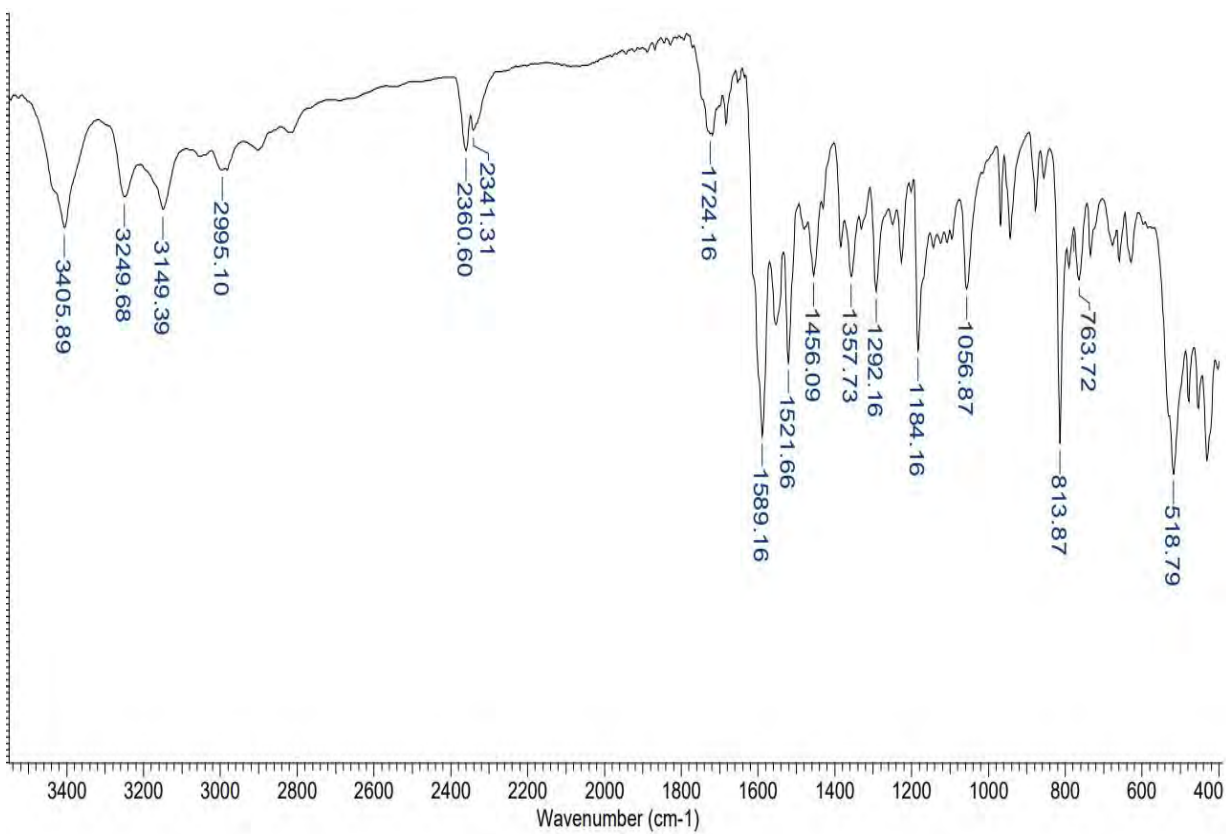
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4-F

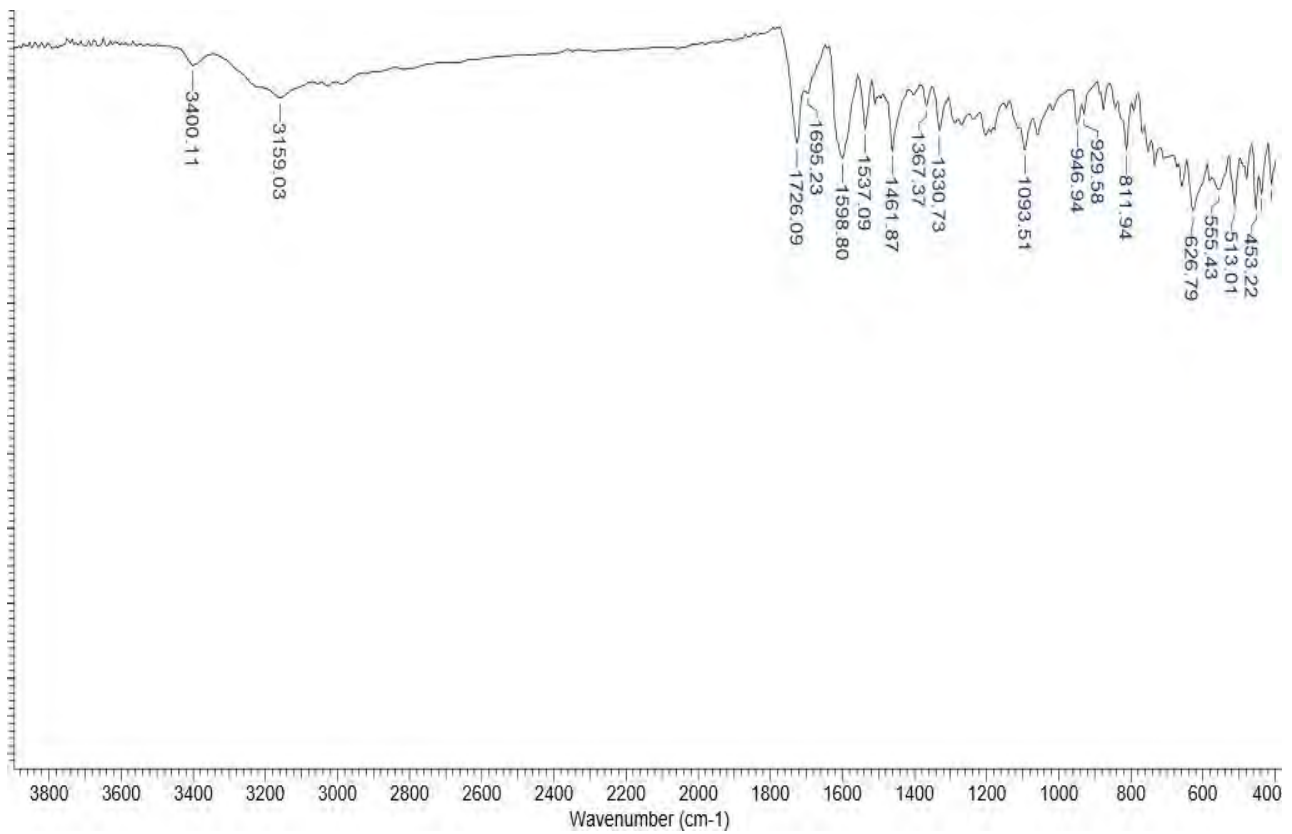
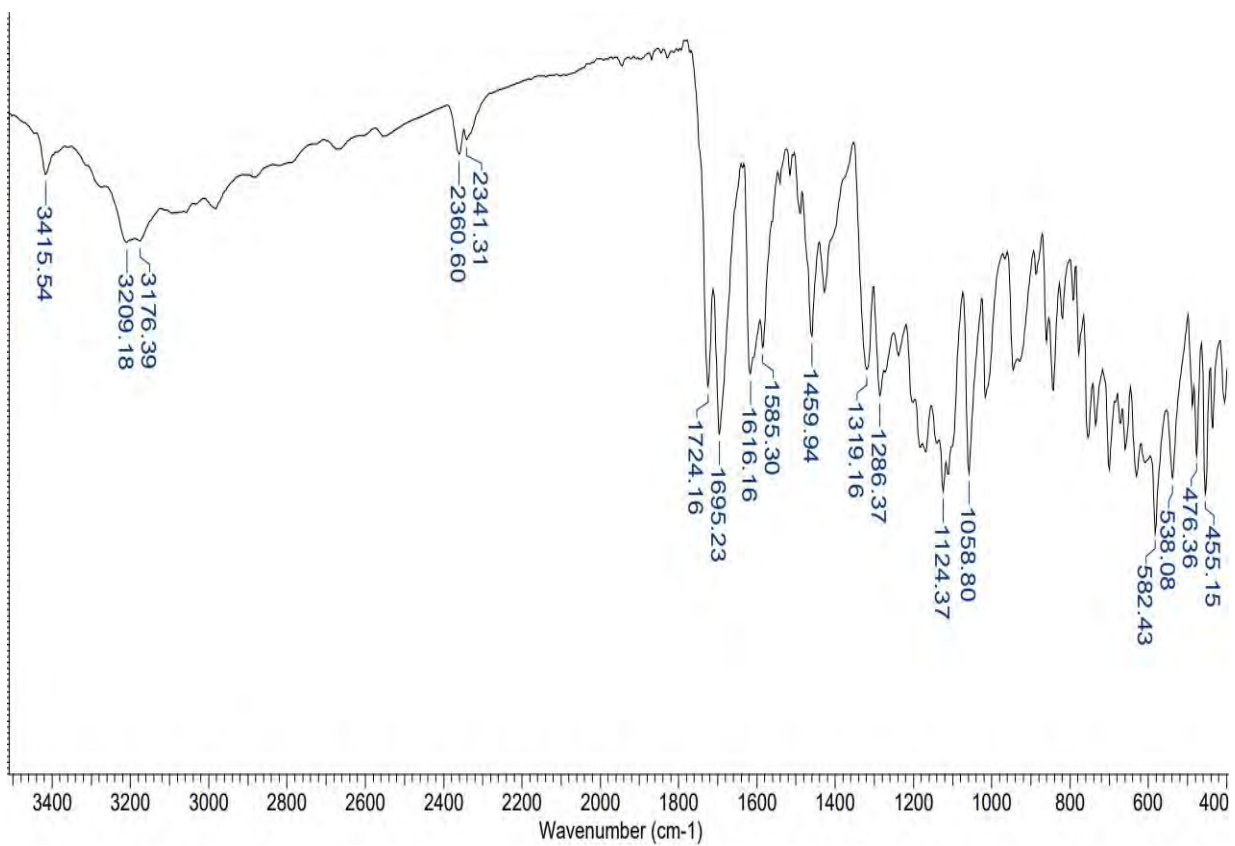
Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAI\ISATINA P FLUOR.0	Date Stamp	17/09/2020 14:56:37.799 (GMT-3)
Date	17 Sep 2020 17:51:08	Technique	Infrared	Instrument	VERTEX 70
X Axis	Wavenumber (cm-1)	Y Axis	Transmittance	Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701
Data Spacing	1.9286			Points Count	1867

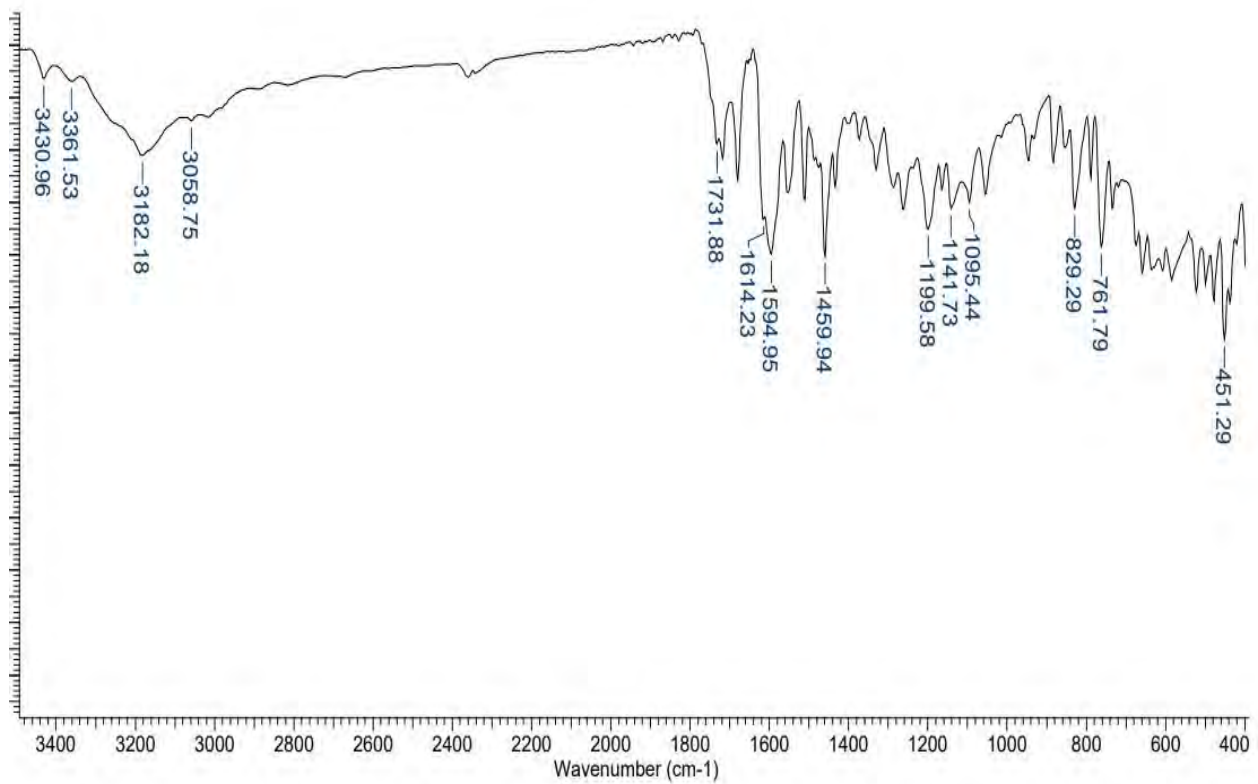
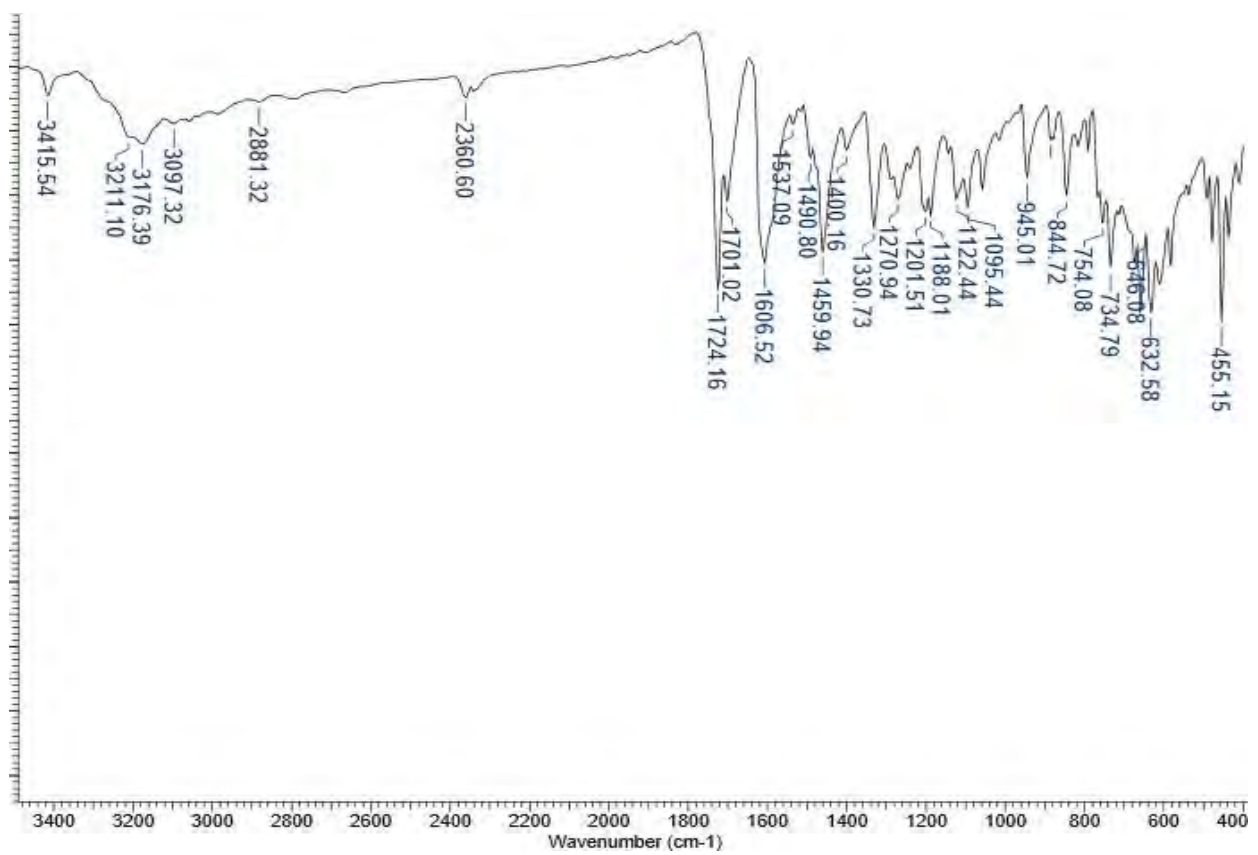
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4-OCH₃

Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELAI\ISATINA P METOXIBENZALDEIDO A.0	Date Stamp	11/08/2020 13:17:22.698 (GMT-3)
Date	11/08/2020 13:17:22.698 (GMT-3)	Technique	Infrared	Date	25 Aug 2020 17:18:38
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Y Axis	Transmittance
				Data Spacing	1.9286



Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4-ClEspectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 

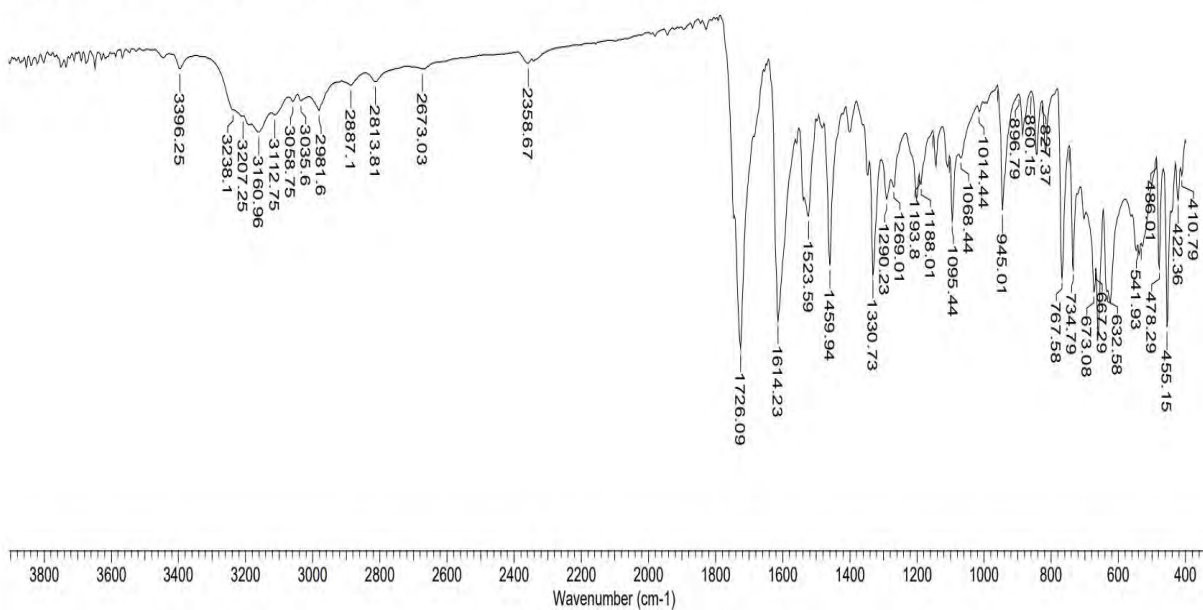
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4- CH_3 Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4- CF_3 

Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4-OHEspectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-4-NO₂

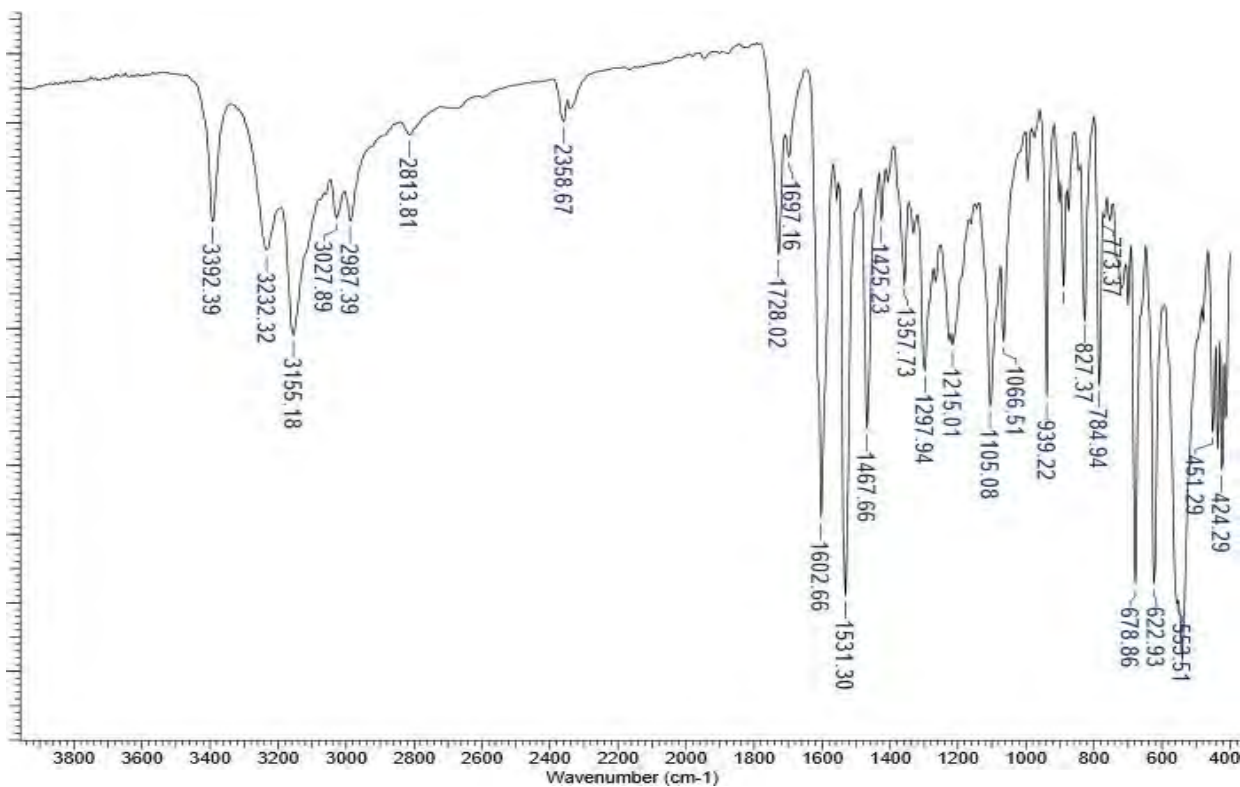
D - Espectros de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para as isatina-*aril-m*-tiossemicarbazonas (ISATIO-3-X).

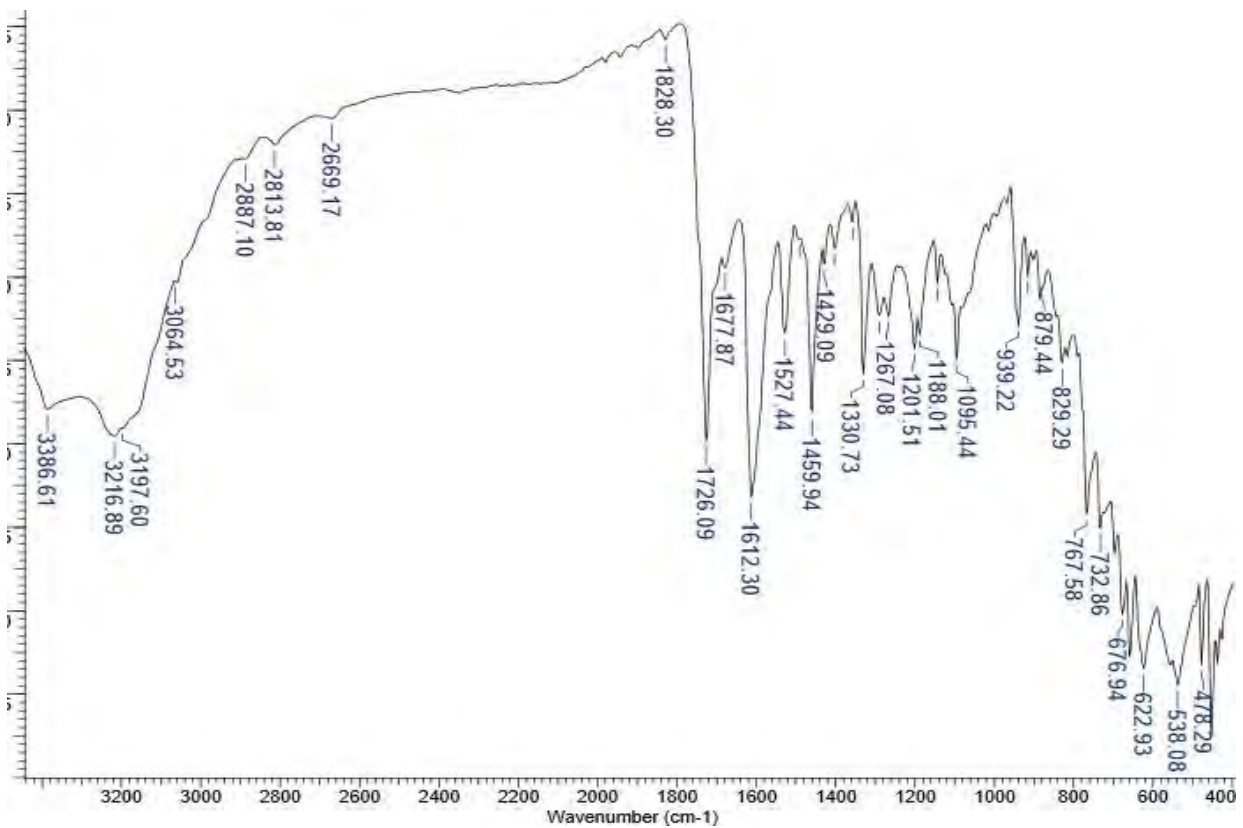
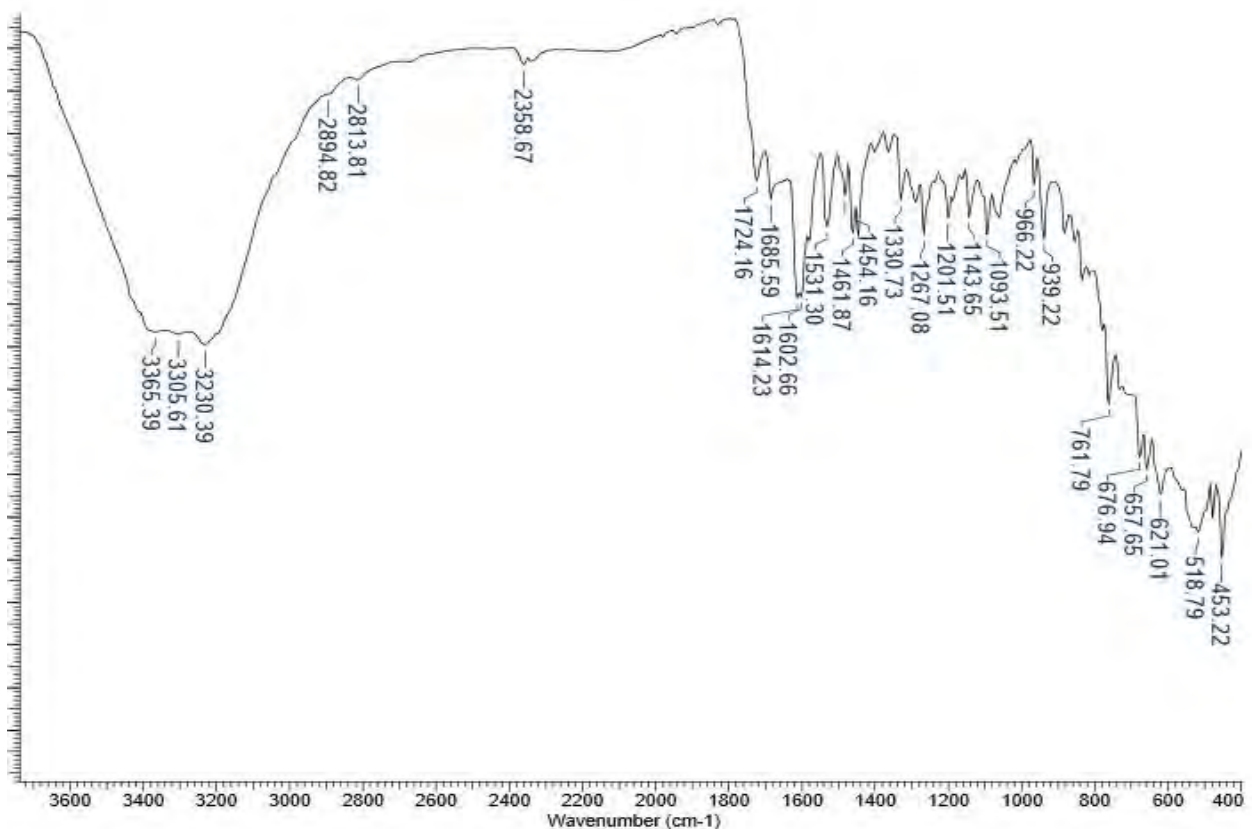
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3- NO_2

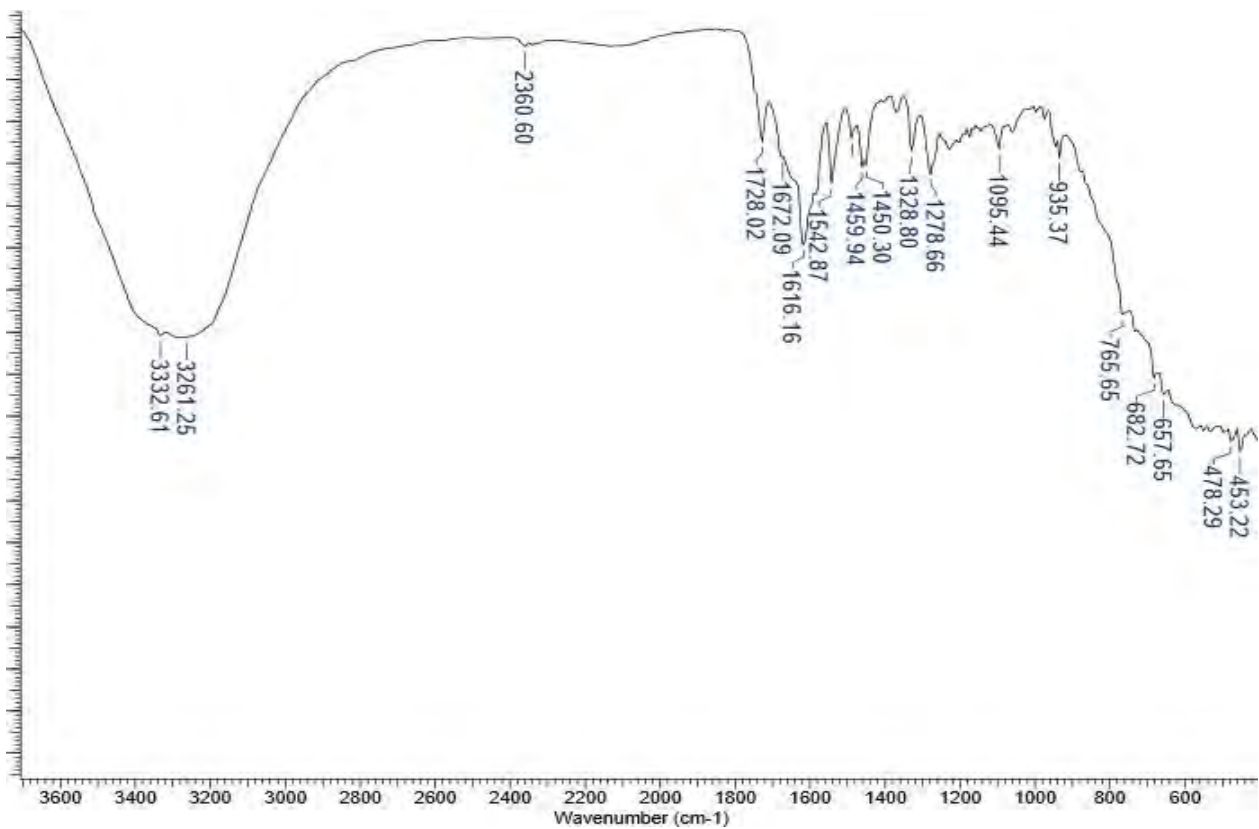
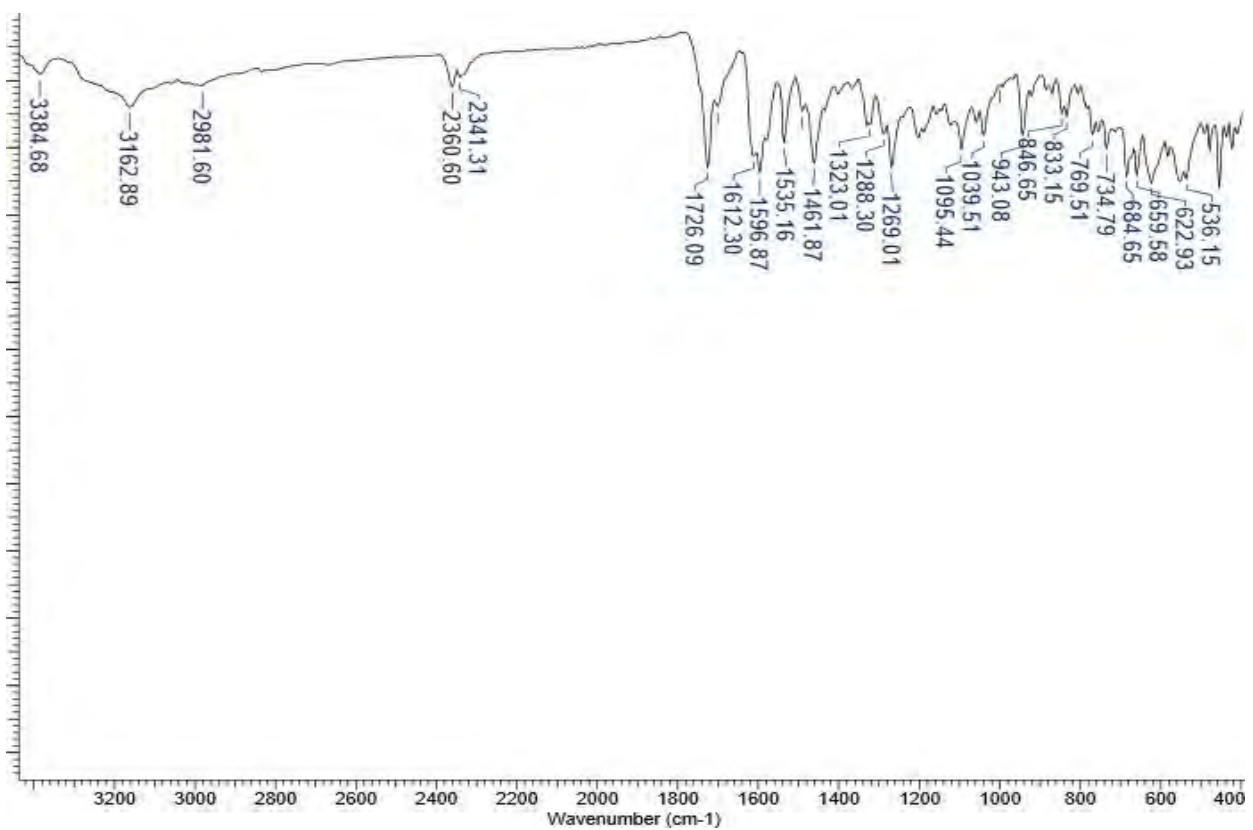
Title	MG2 CAL 500 MICRO	File Name	C:\USERS\HOME\DESKTOP\GABRIELA\ISATINA M NITROBENZALDEIDO.0		
Date Stamp	11/08/2020 13:07:20.101 (GMT-3)	Date	25 Aug 2020 17:18:38	Technique	Infrared
Instrument	VERTEX 70	Spectral Region	IR	X Axis	Wavenumber (cm-1)
Spectrum Range	399.2184 - 3997.9701	Points Count	1867	Y Axis	Transmittance
			Data Spacing	1.9286	

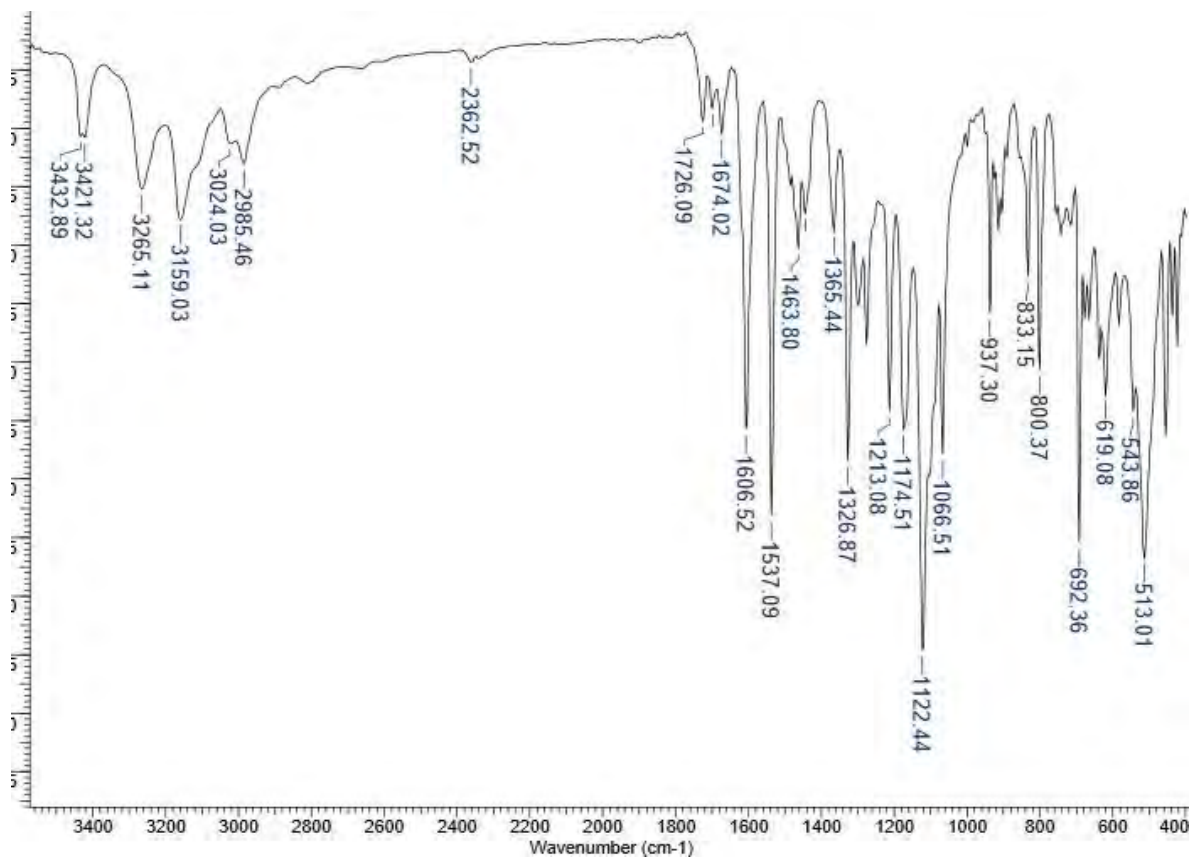
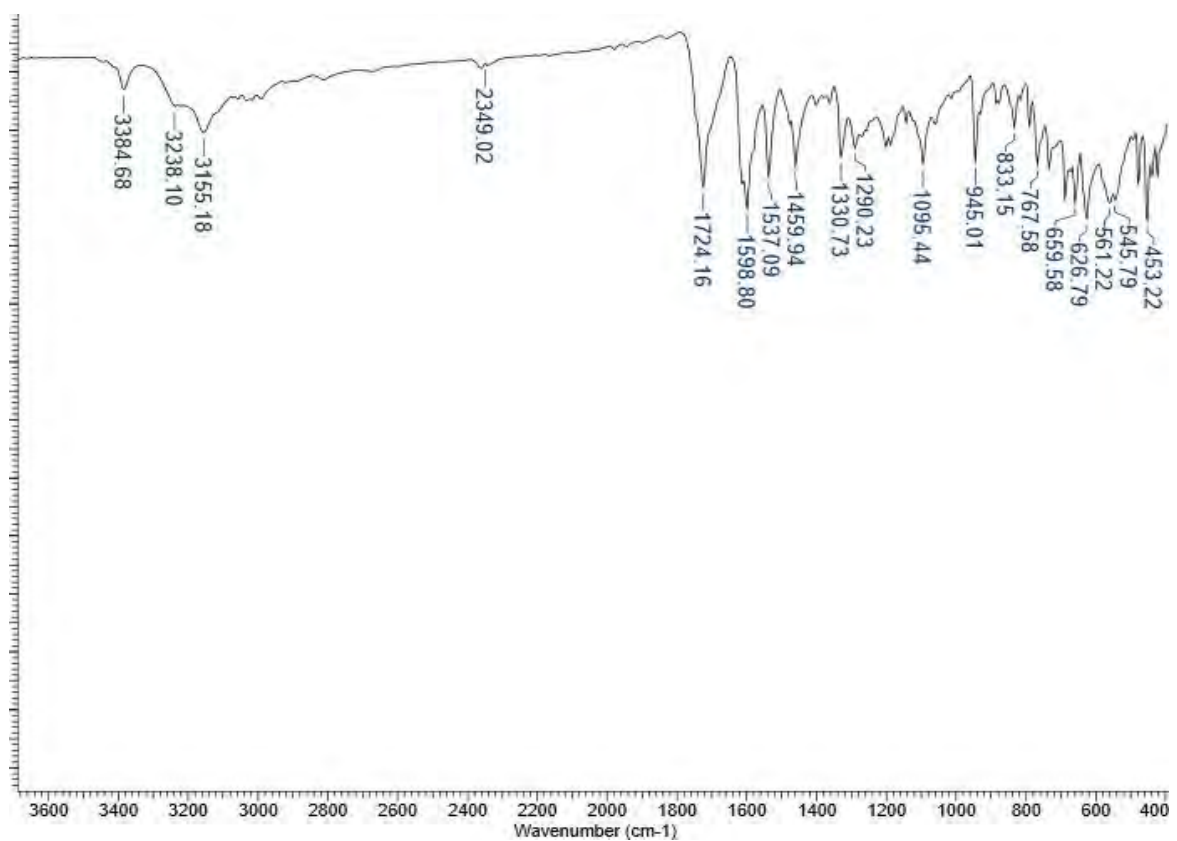


Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3-Br



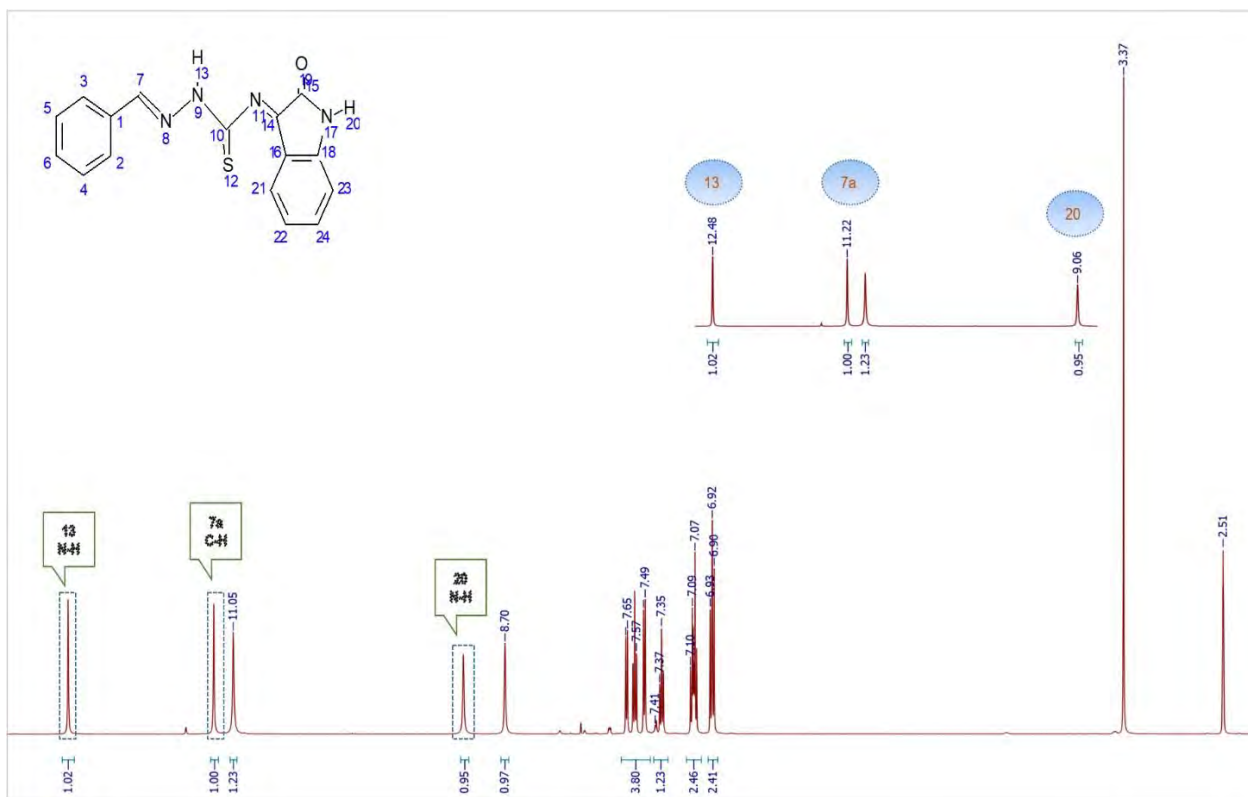
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3-CIEspectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3-F

Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3-OHEspectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3-OCH₃

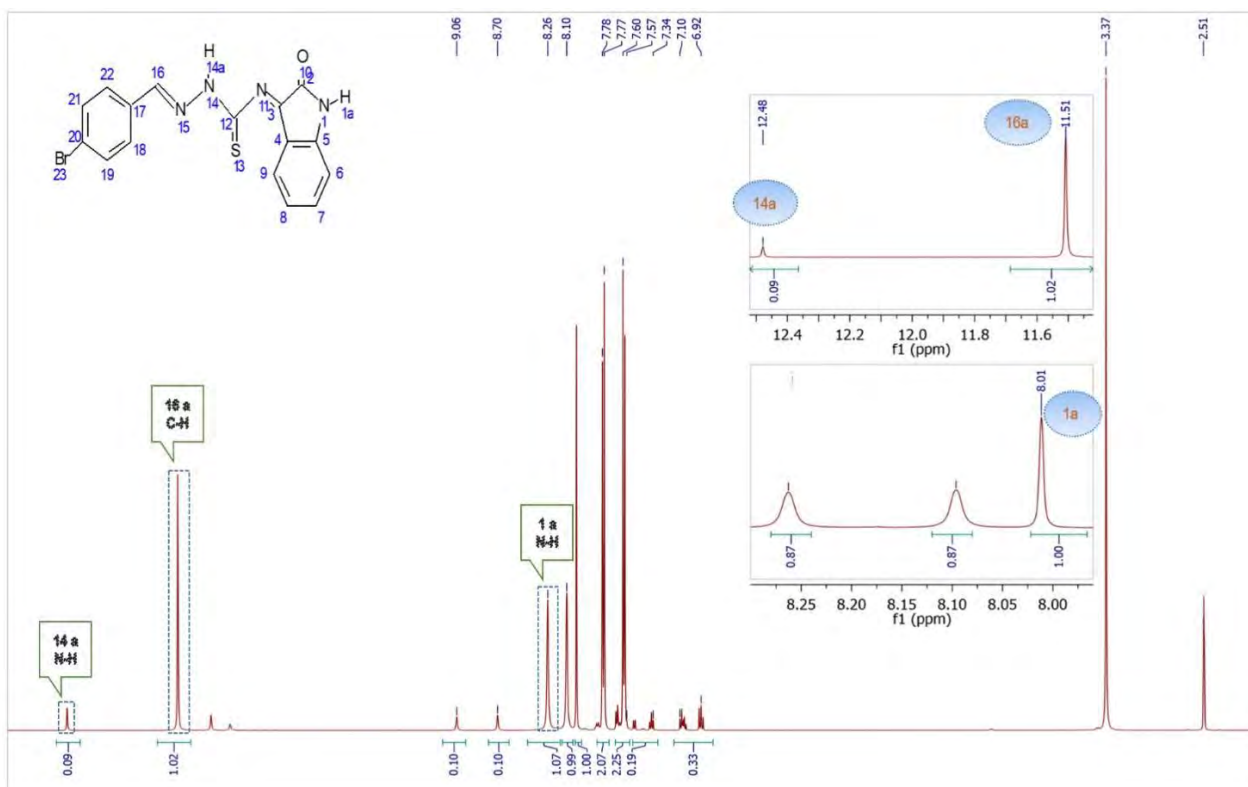
Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3- CF_3 Espectro de Infravermelho (ATR) cm^{-1} para ISATIO-3- CH_3 

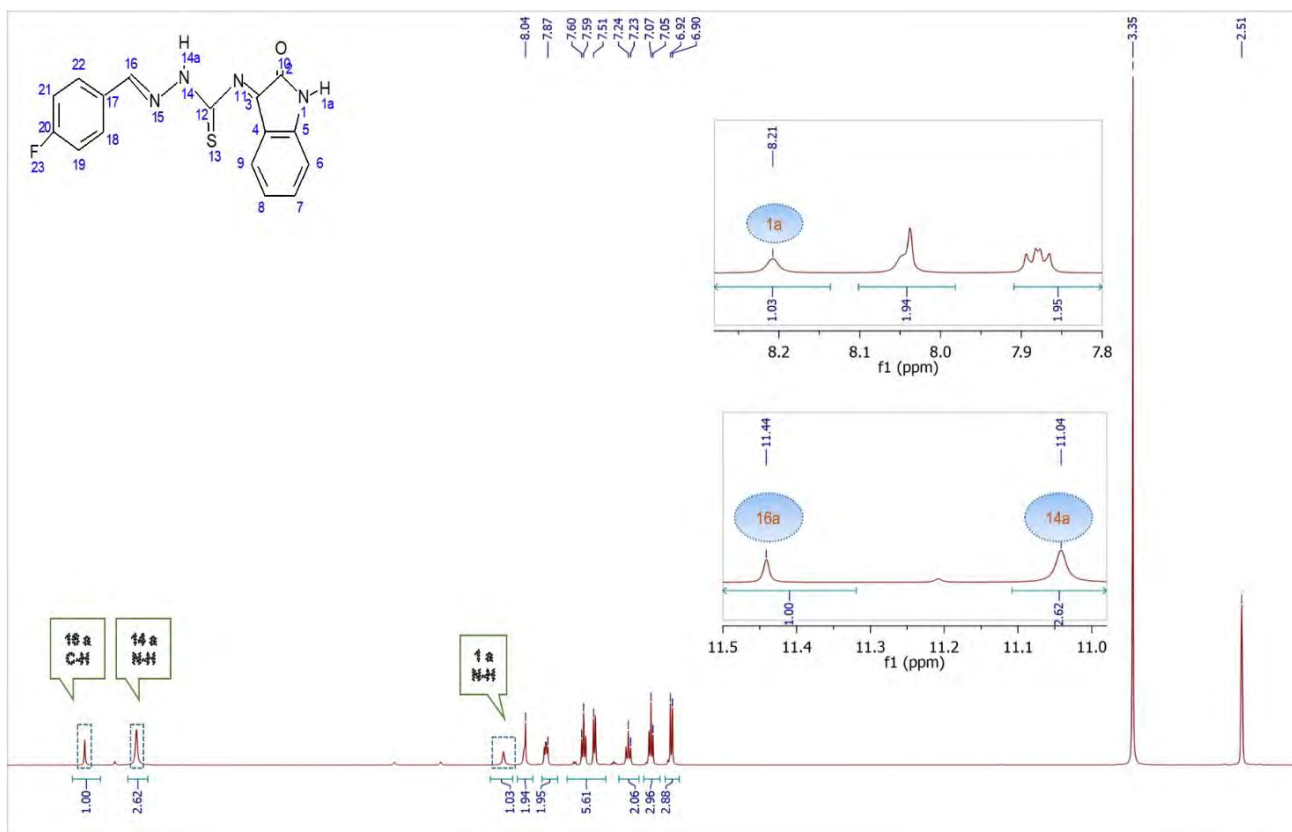
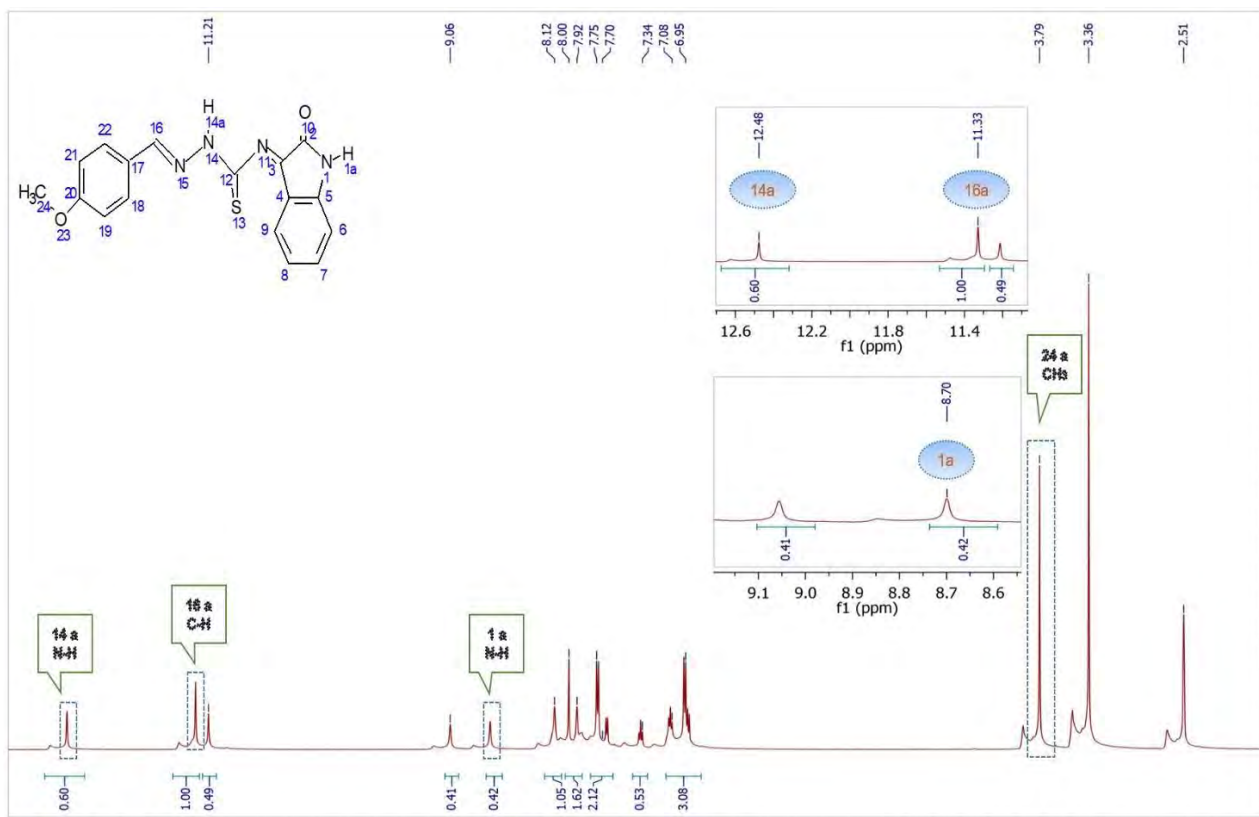
**E- Espectros de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) para as isatina-aril-*p*-
tiossemicarbazonas (ISATIO-4-X).**

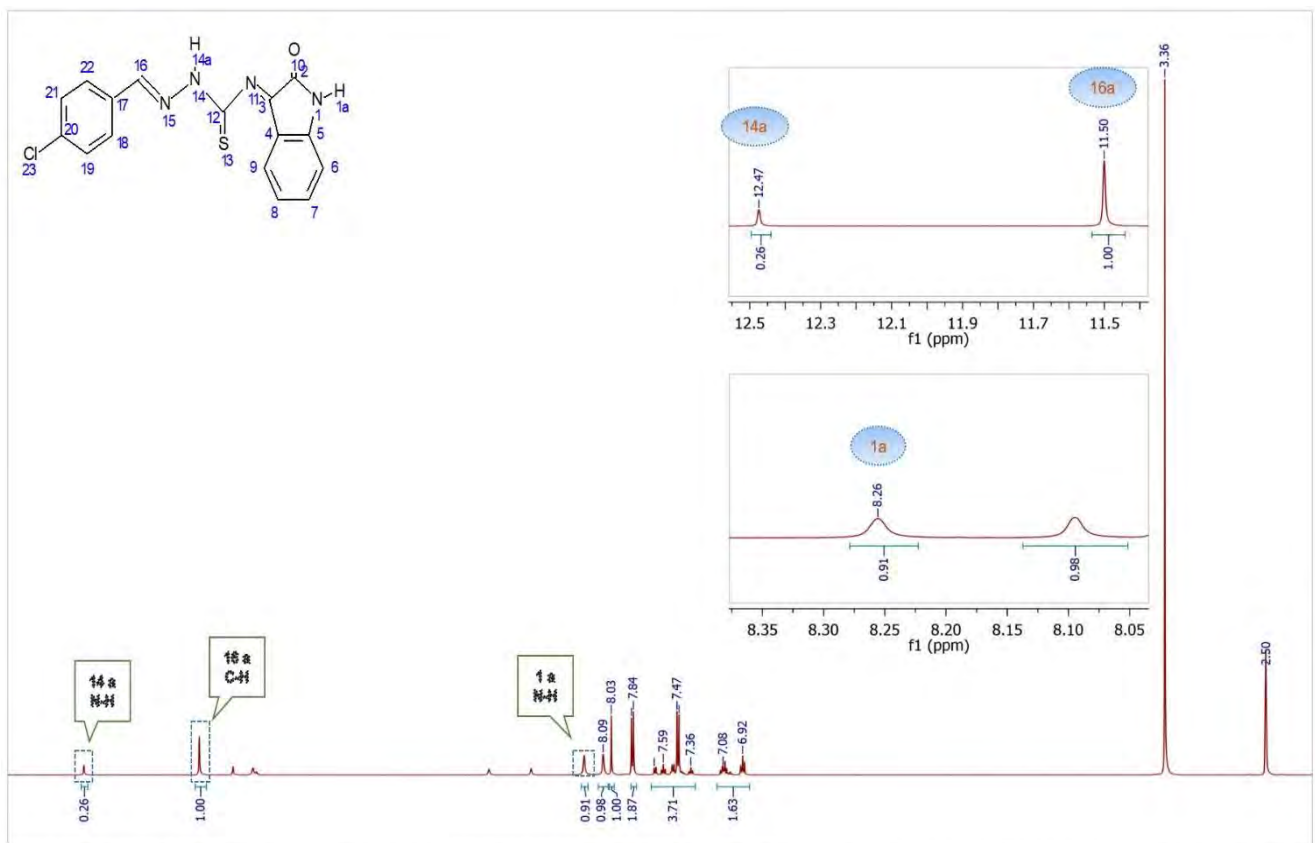
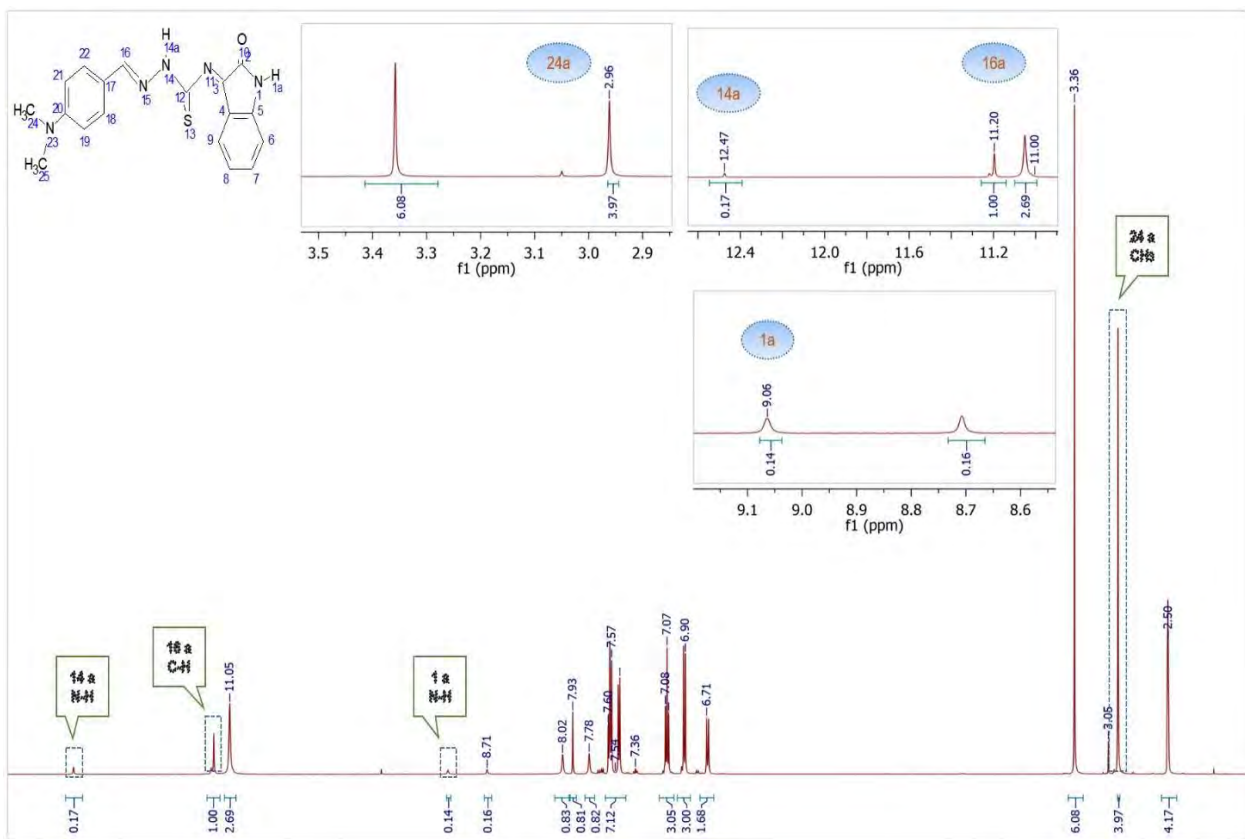
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-H

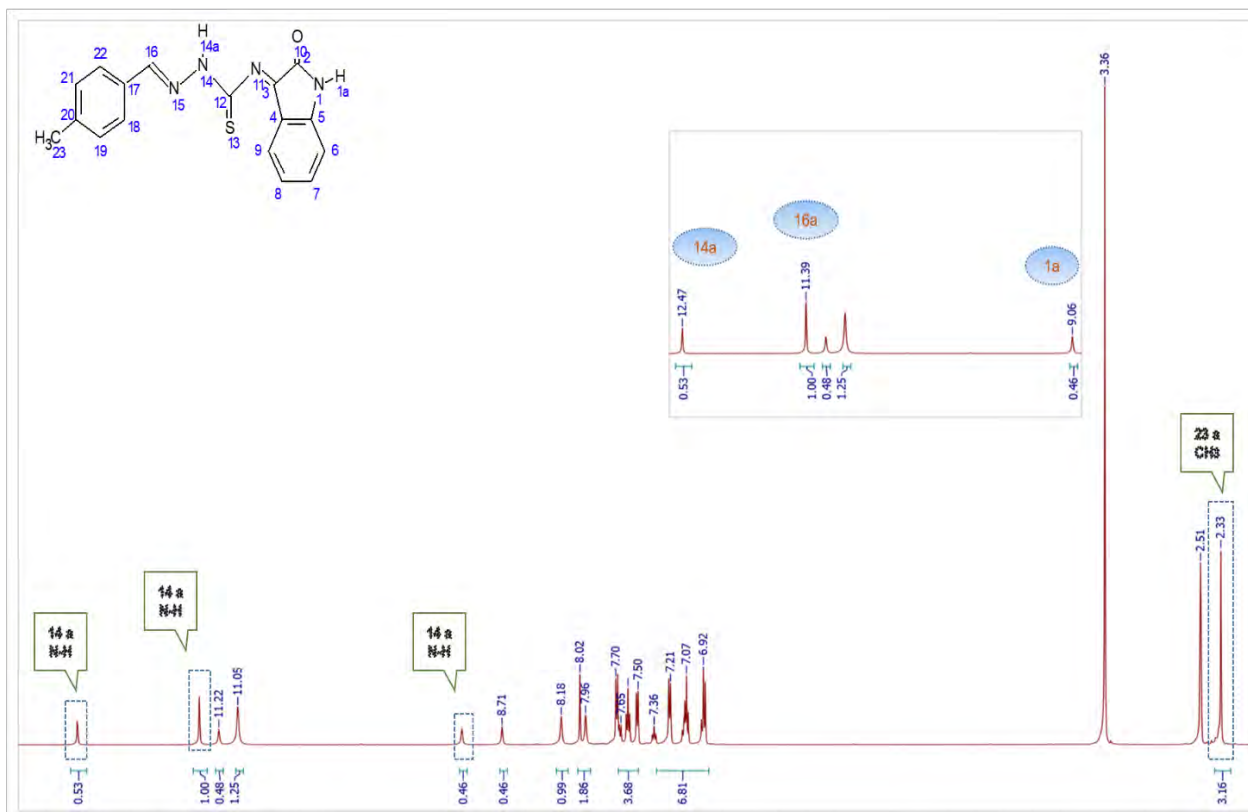
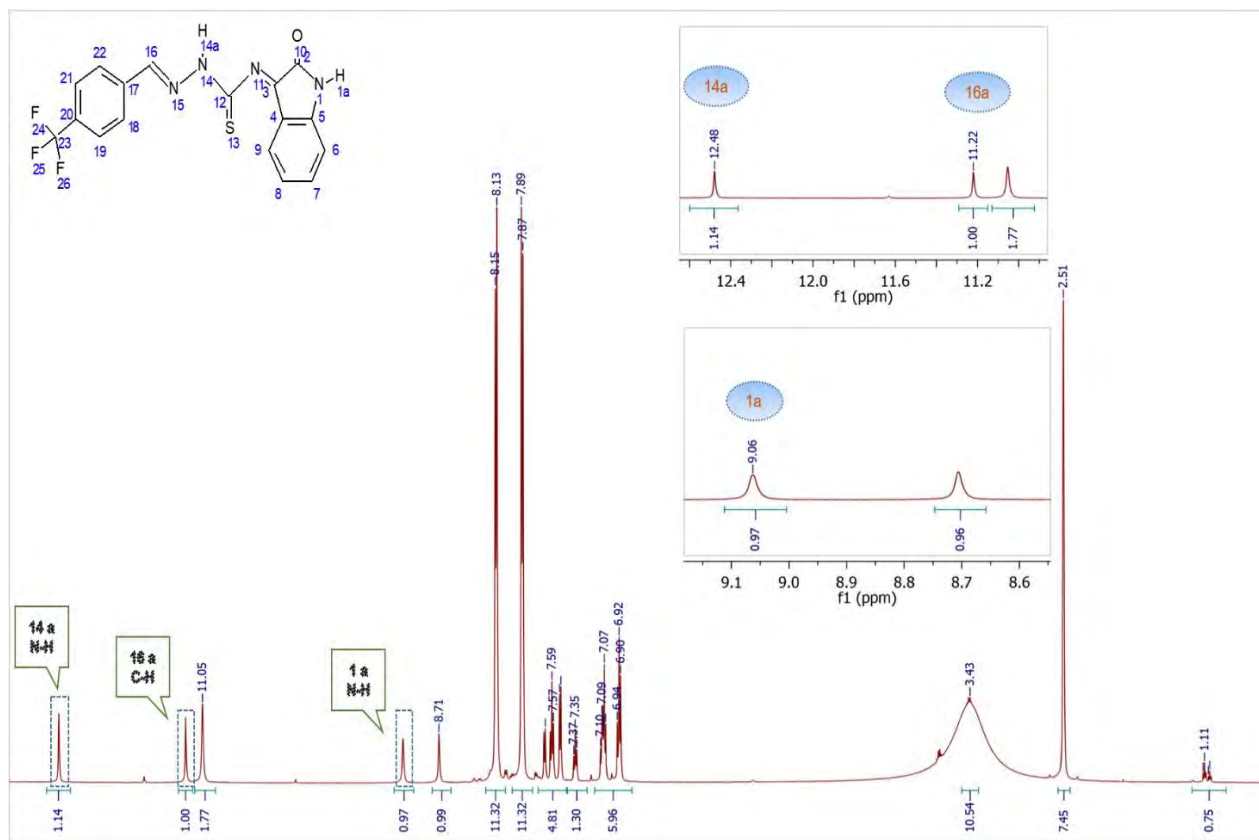


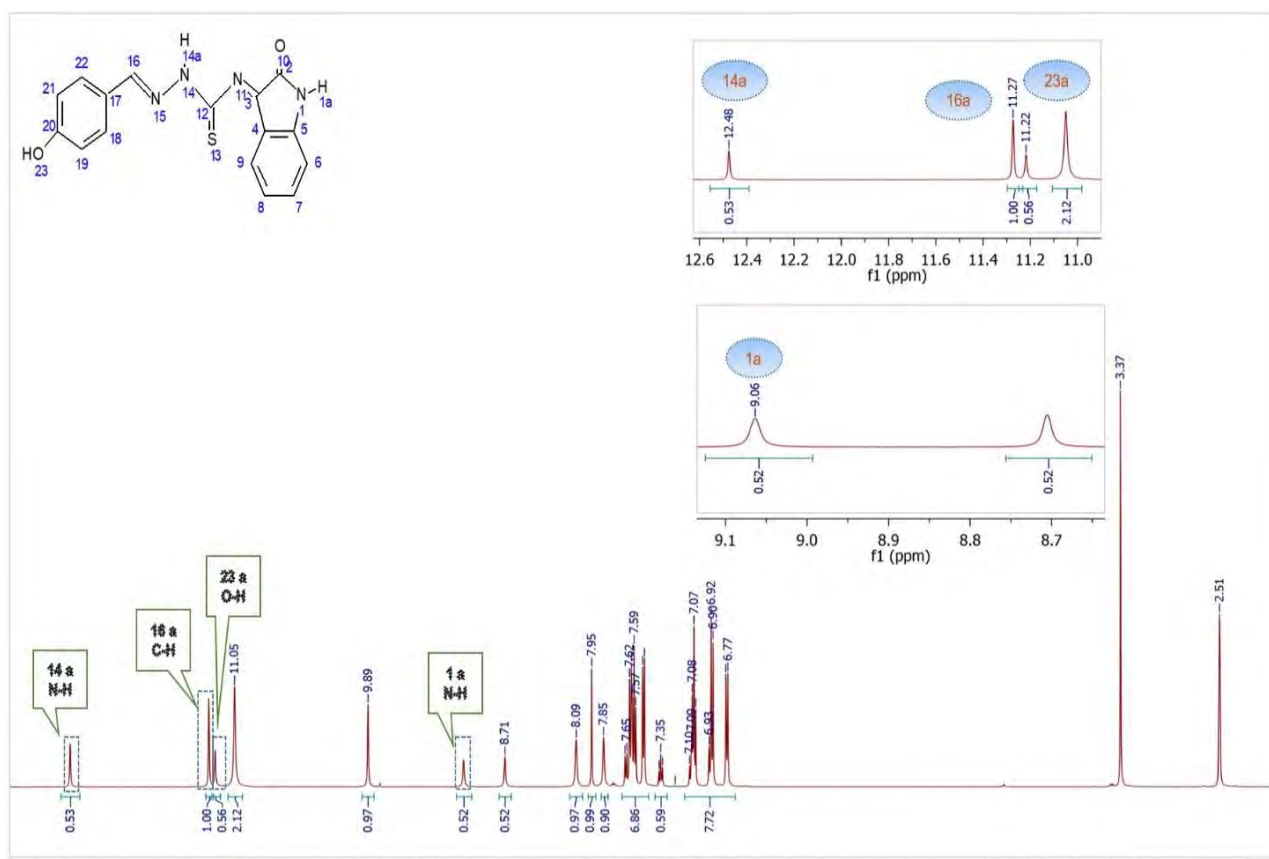
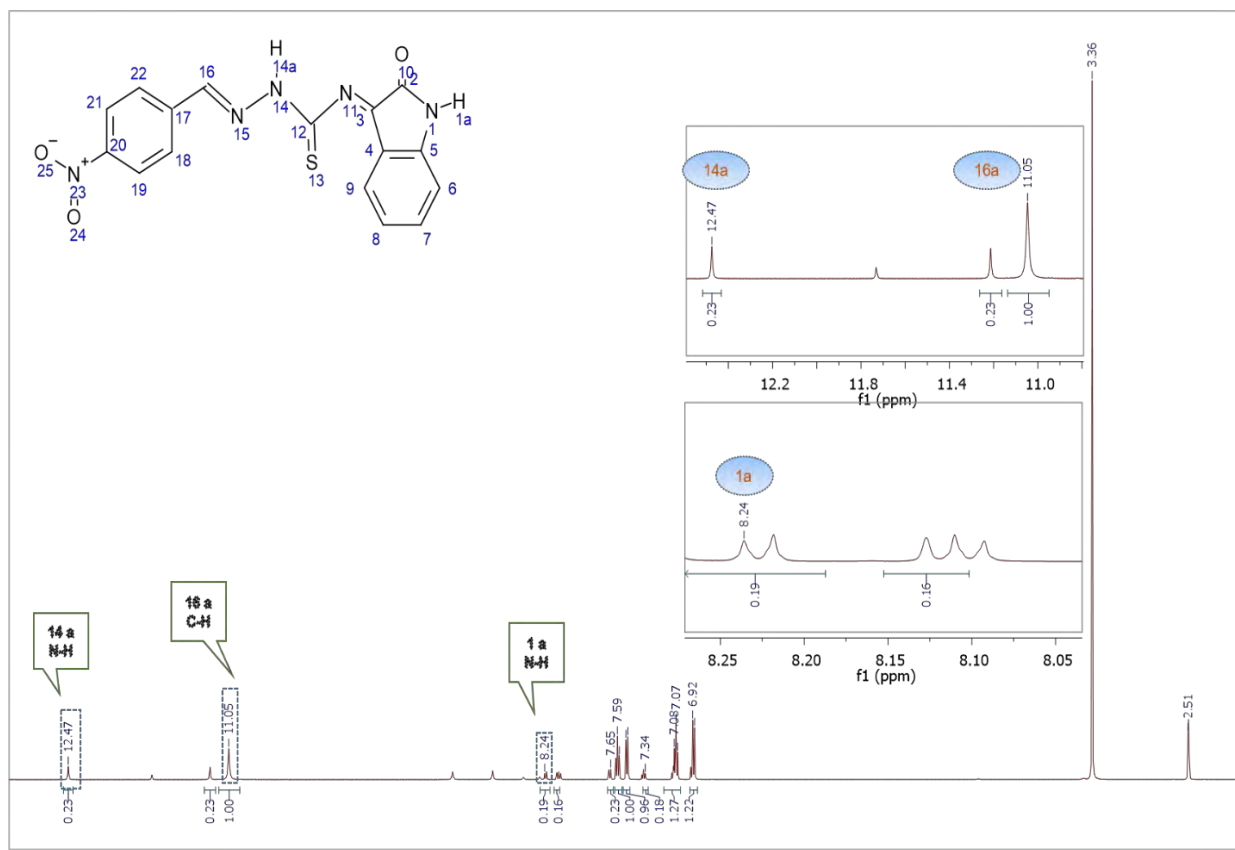
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-Br



Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-FEspectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-OCH₃

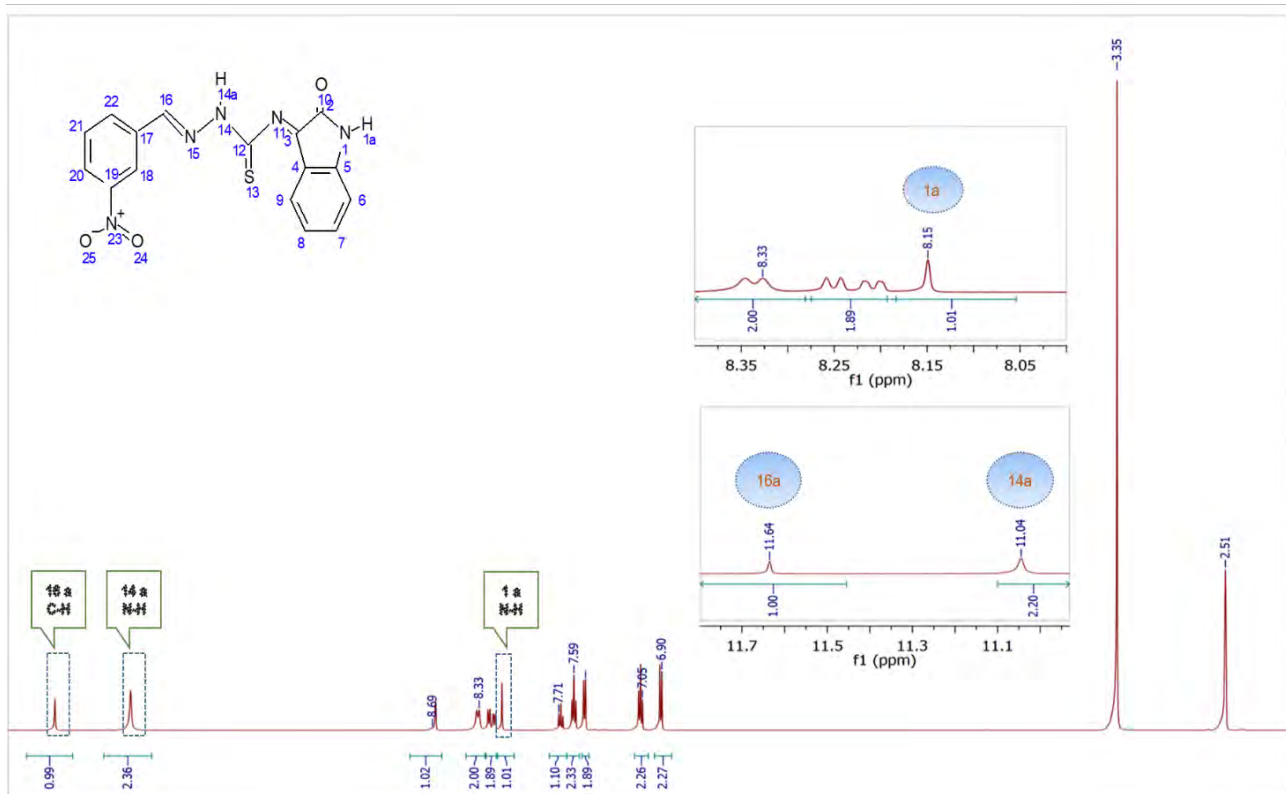
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-ClEspectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4- $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 

Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4- CH_3 Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4- CF_3 

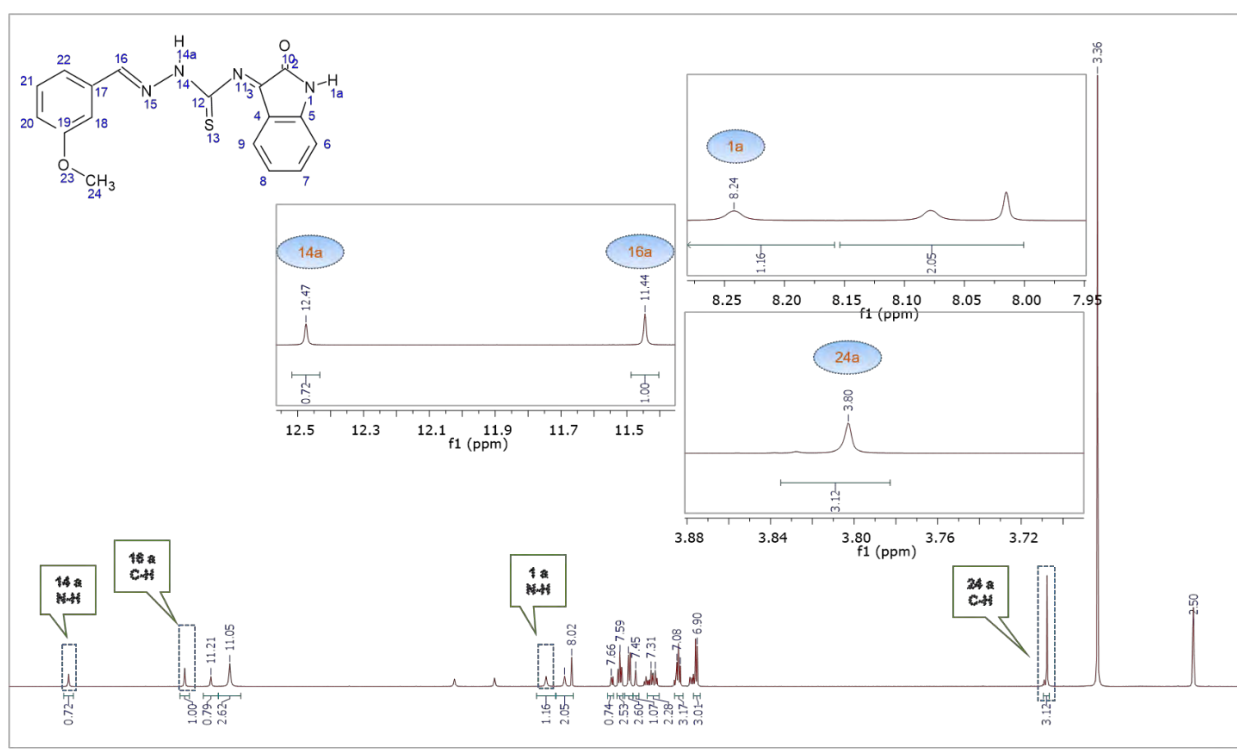
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-OHEspectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4- NO_2 

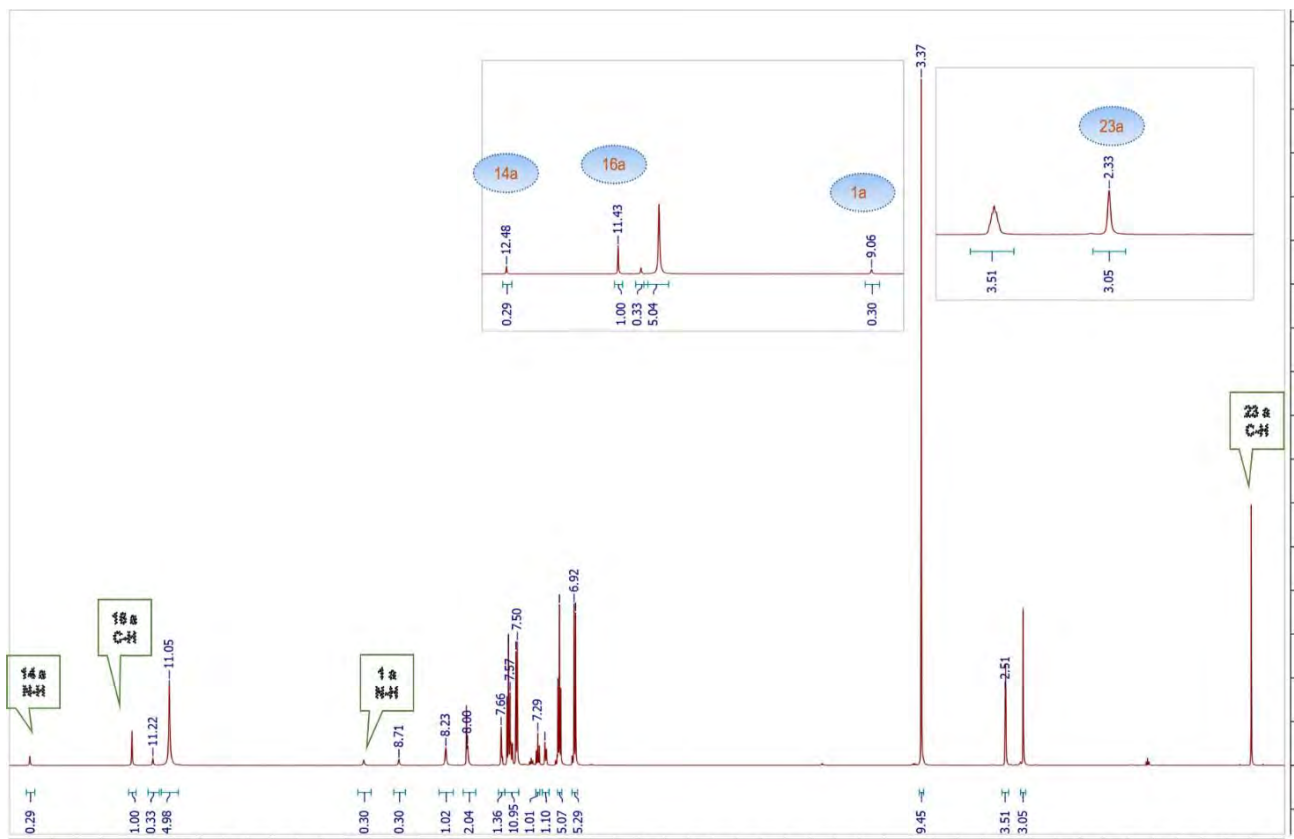
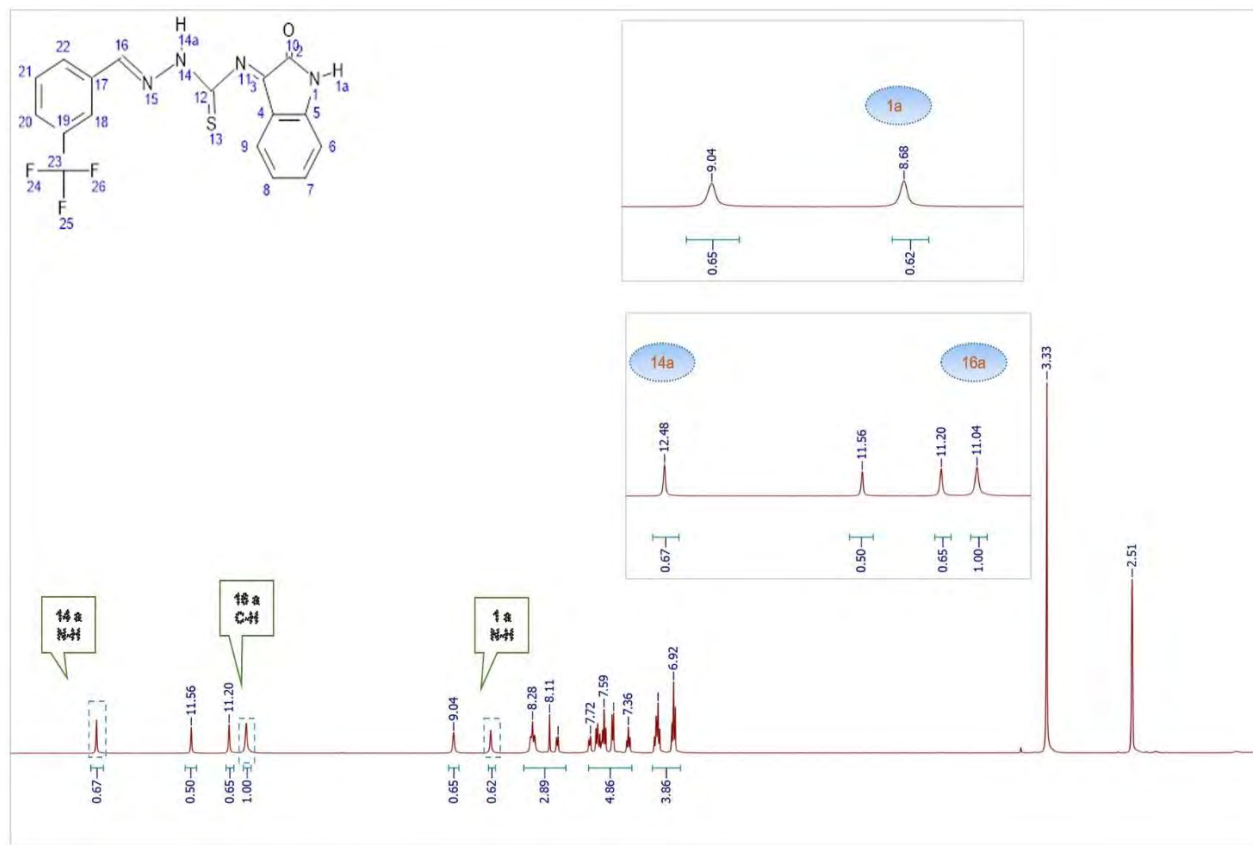
F- Espectros de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) para las isatina-aril-*m*-
 tiossemicarbazonas (ISATIO-3-X).

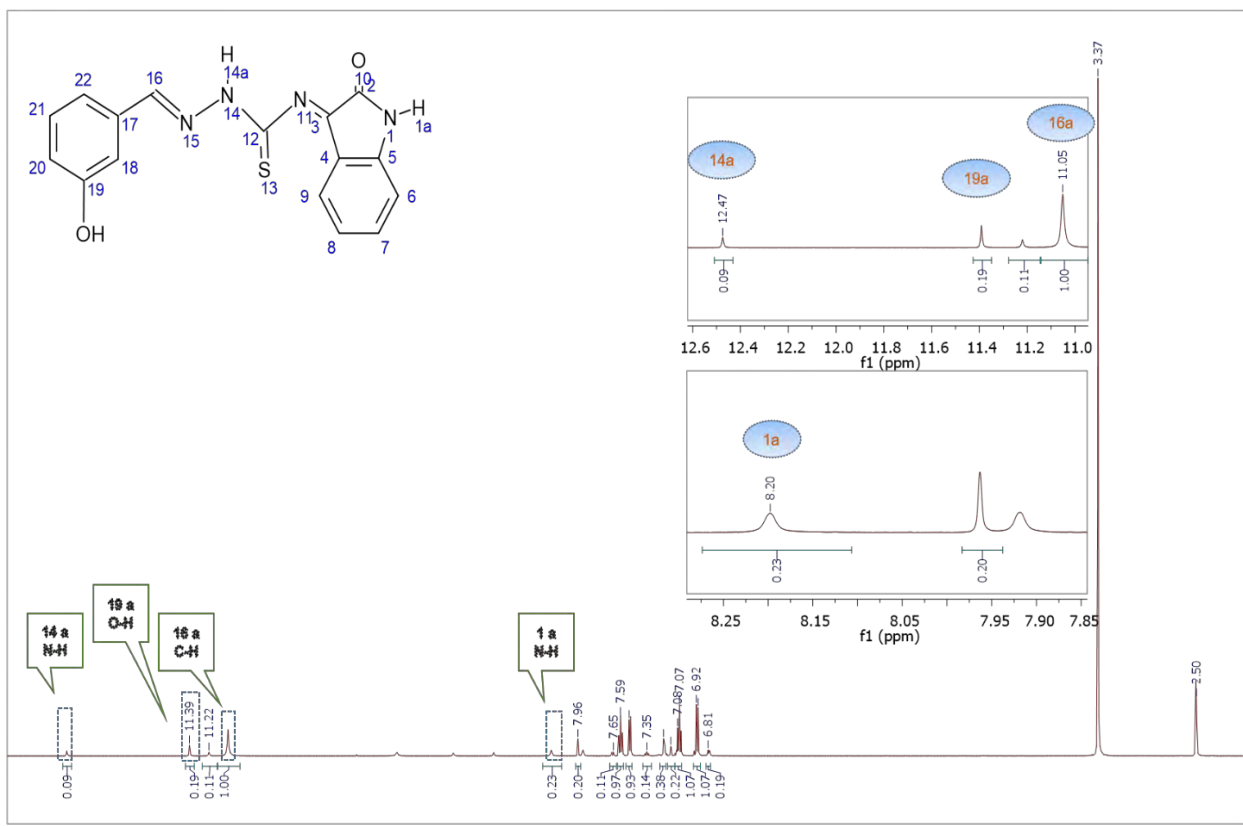
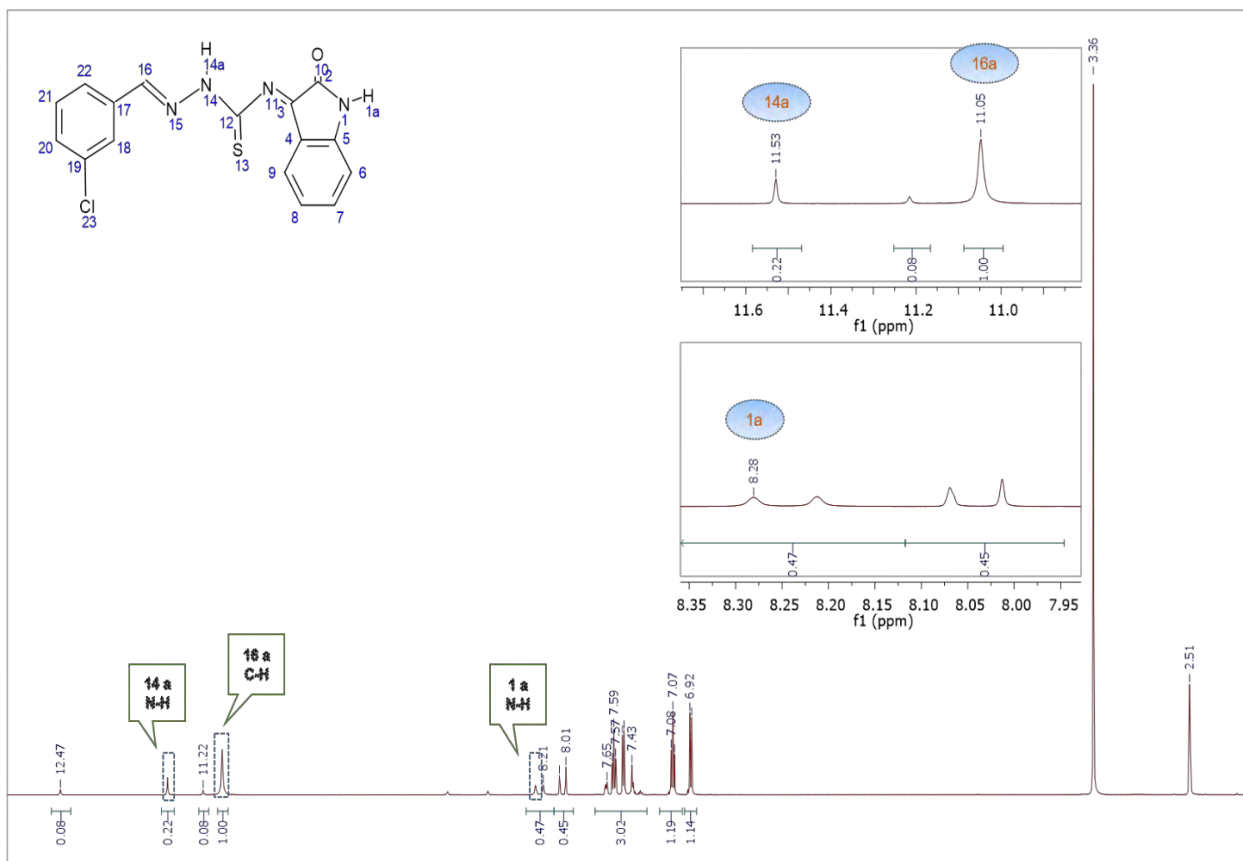
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3- NO_2

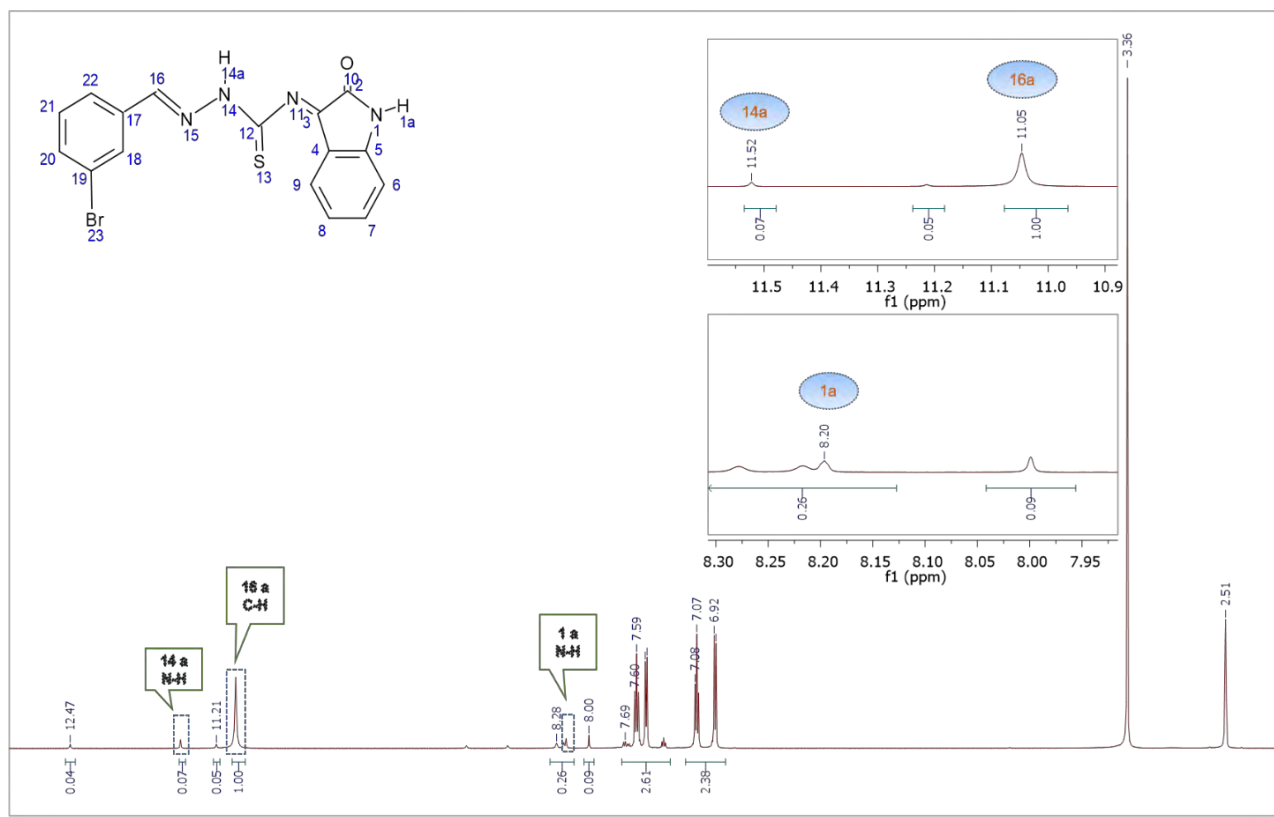
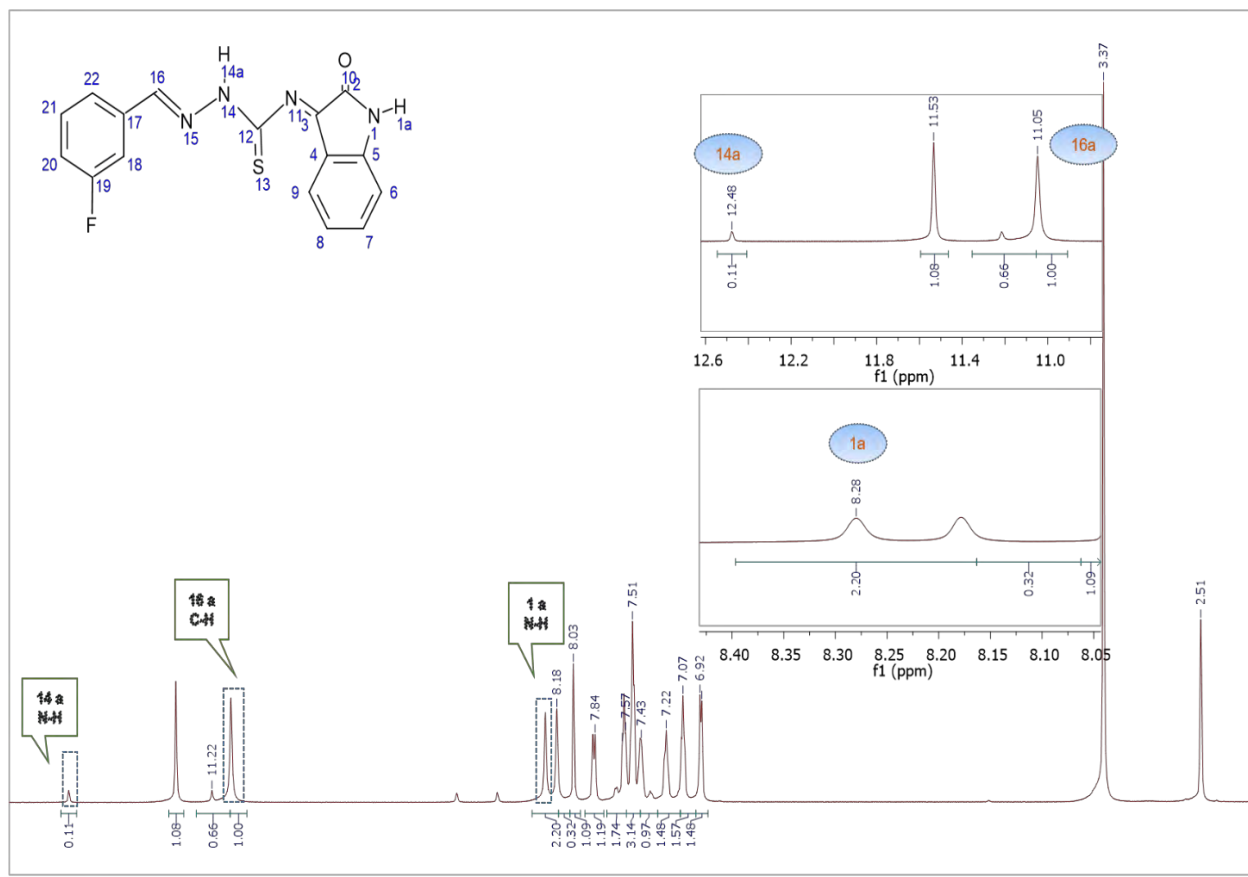


Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3- OCH_3



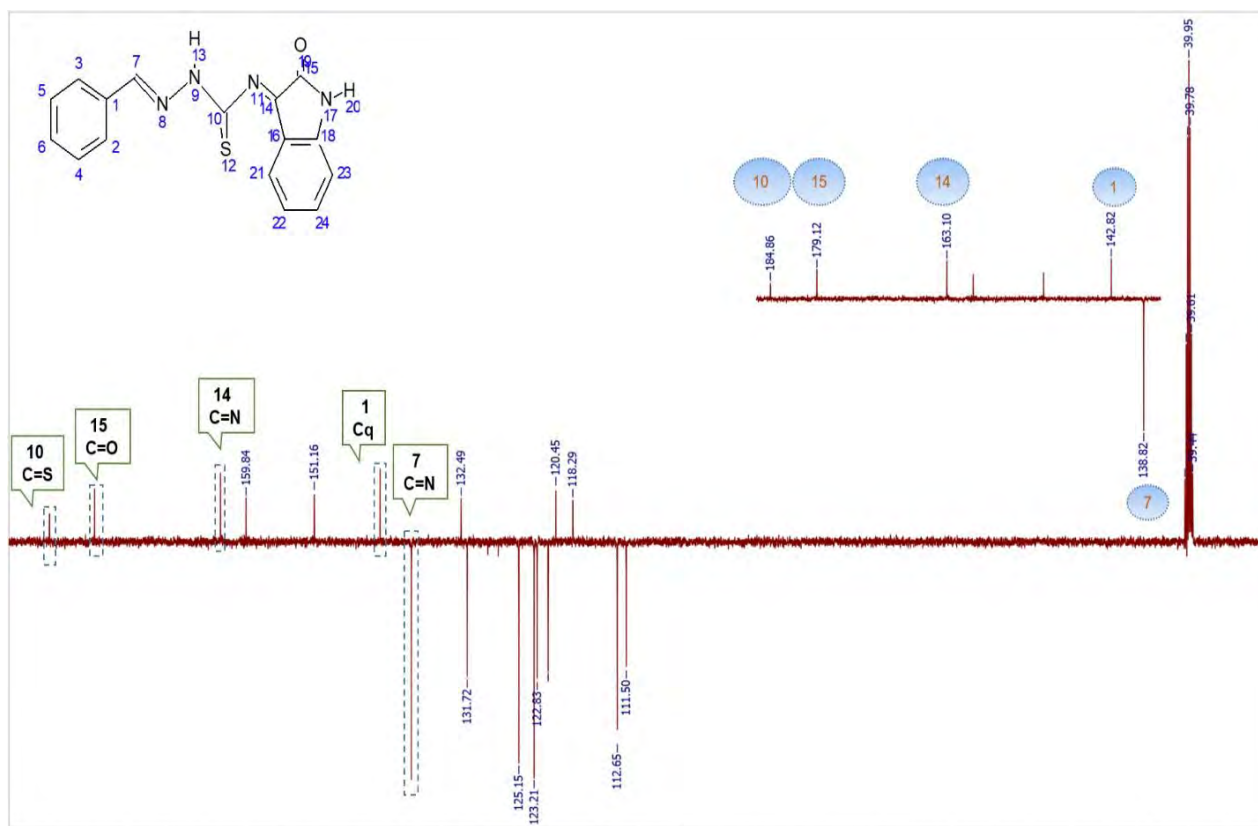
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para **ISATIO-3-CH₃**Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para **ISATIO-3-CF₃**

Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-OHEspectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-Cl

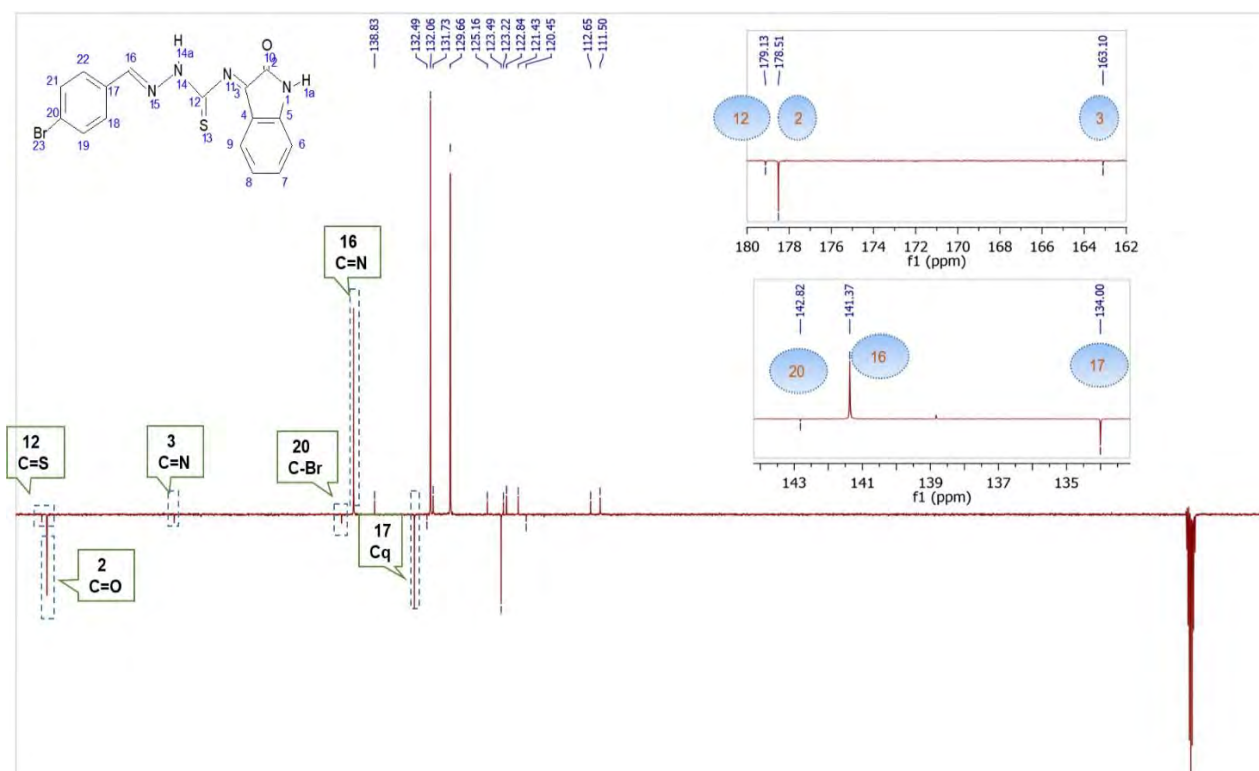
Espectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-BrEspectro de RMN de ^1H (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-F

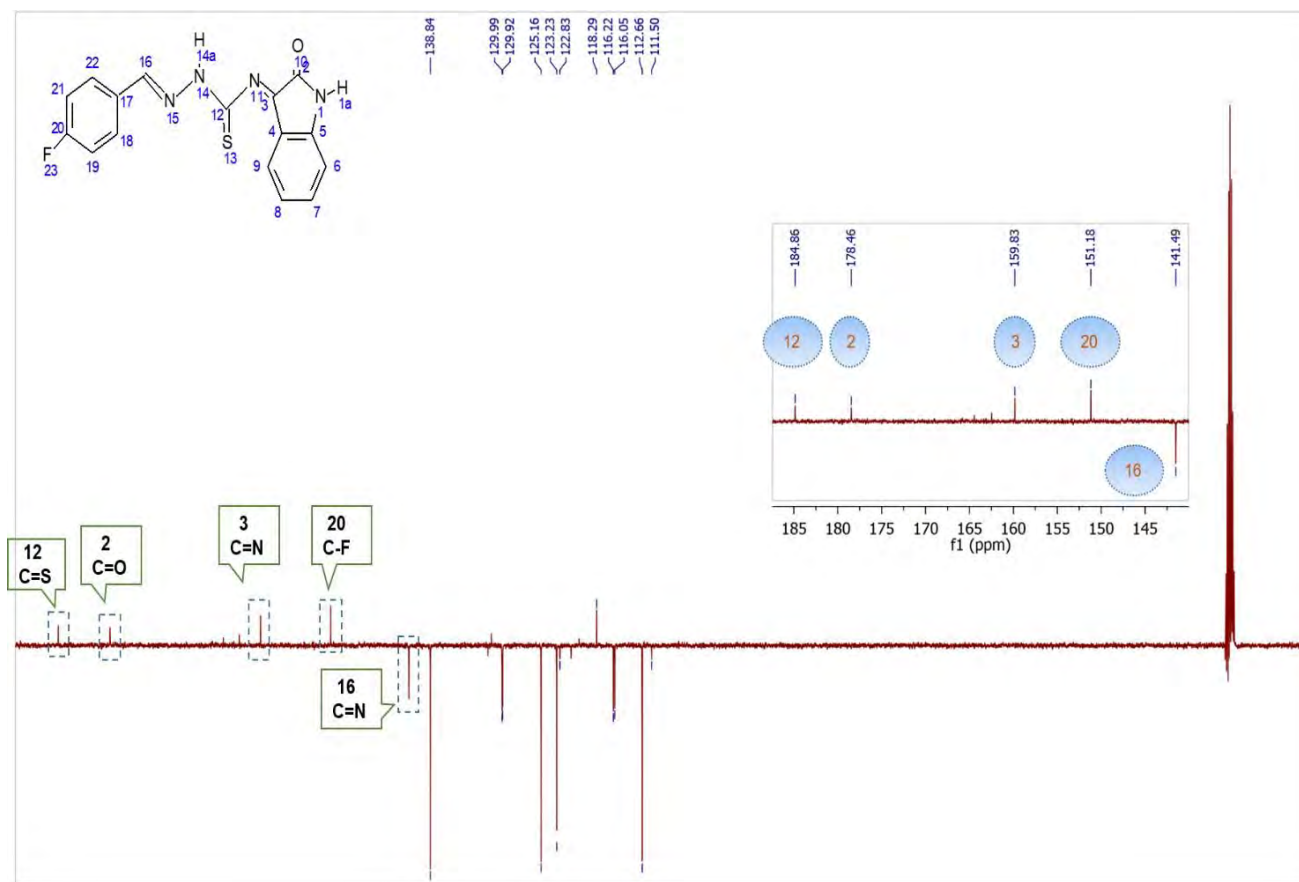
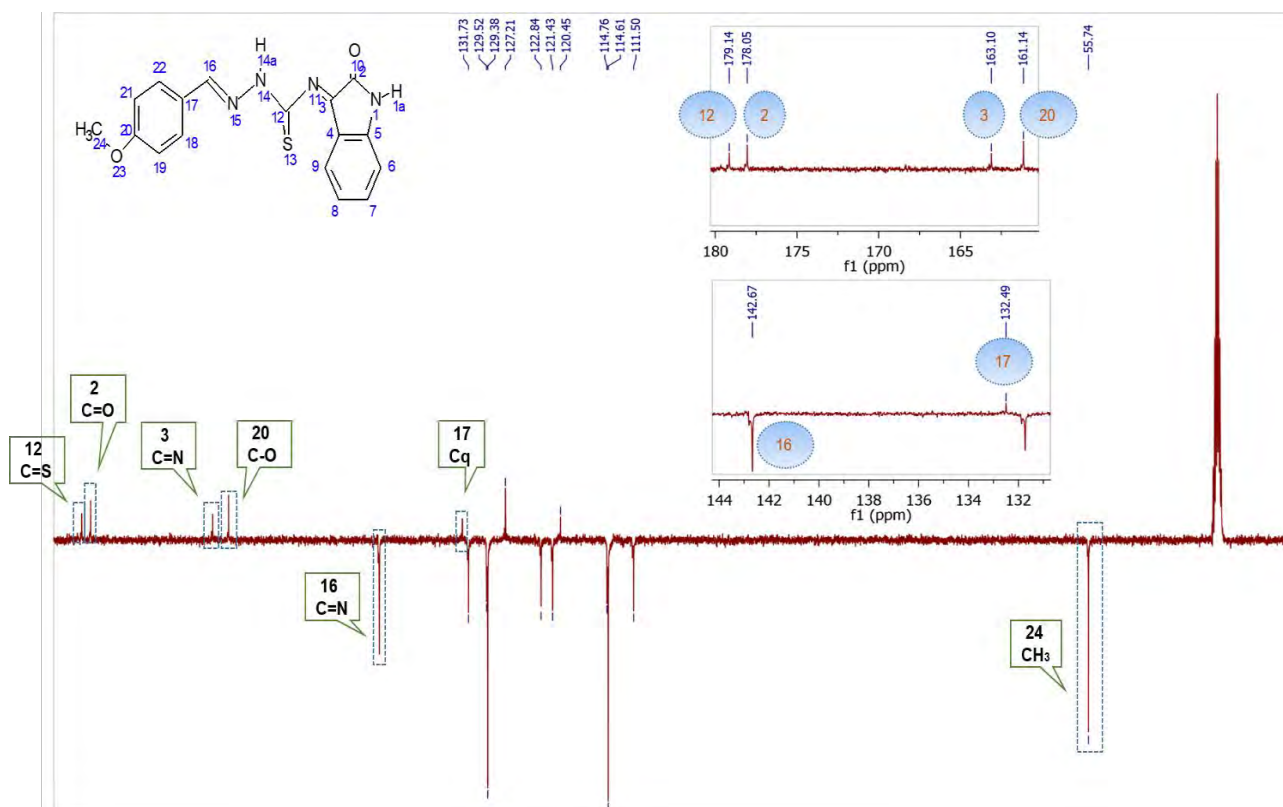
G – Espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm) para as isatina-*aril-p*-tiosemicarbazonas (ISATIO-4-X).

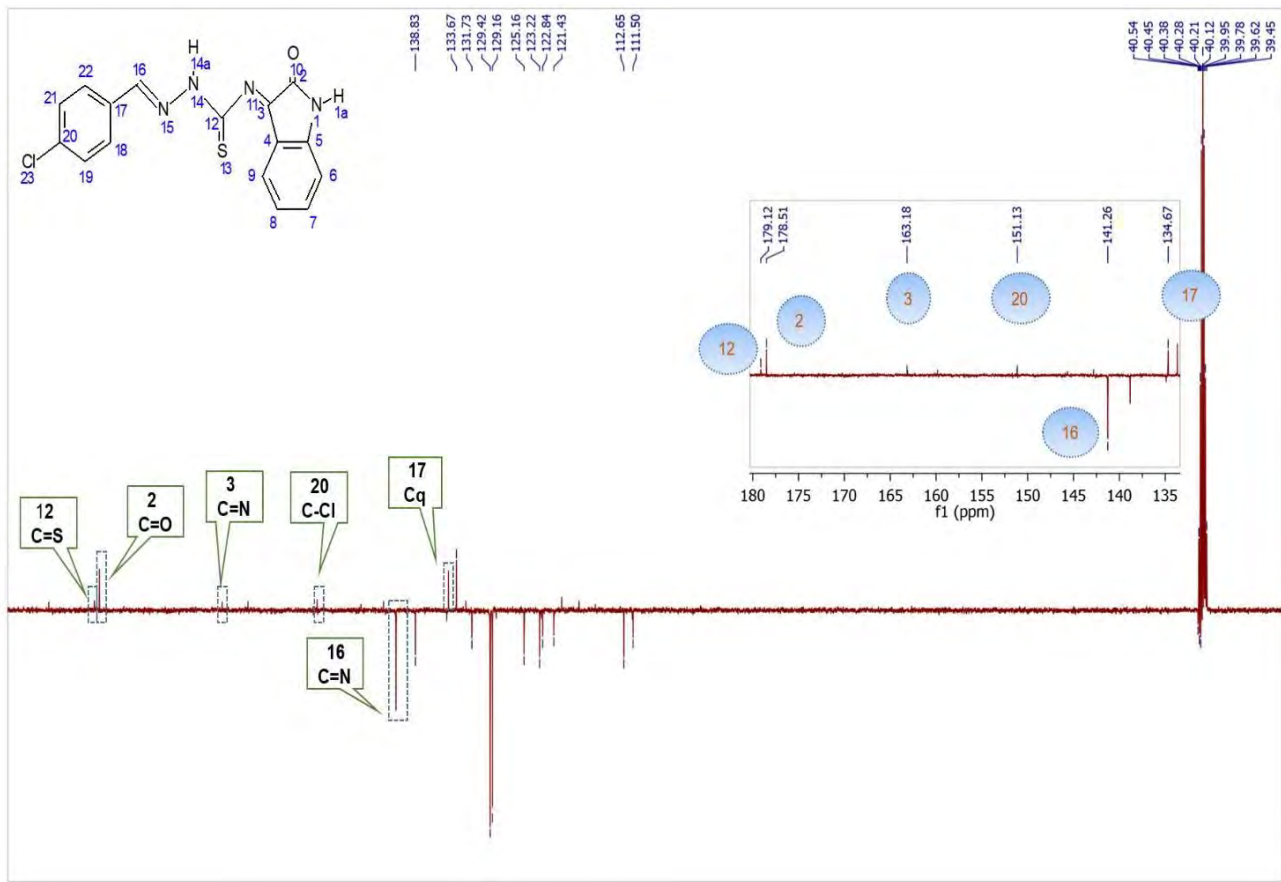
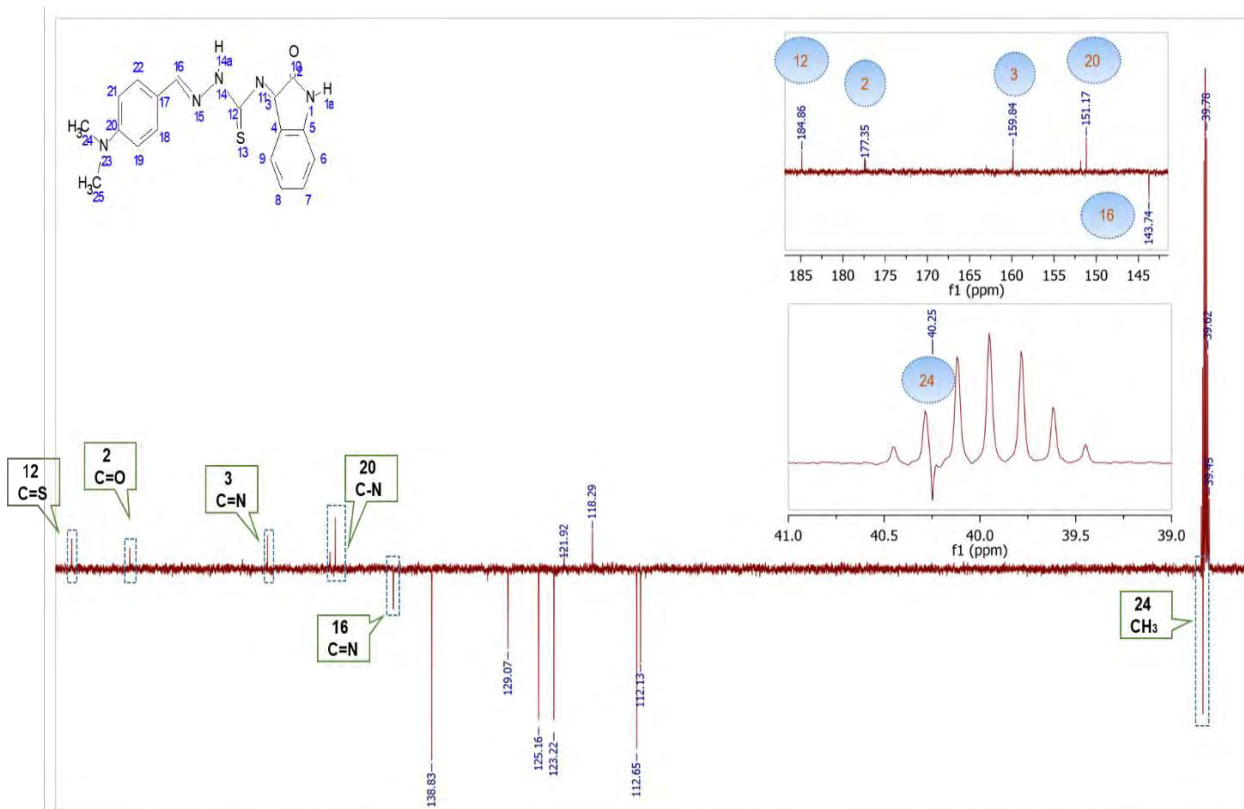
Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-H

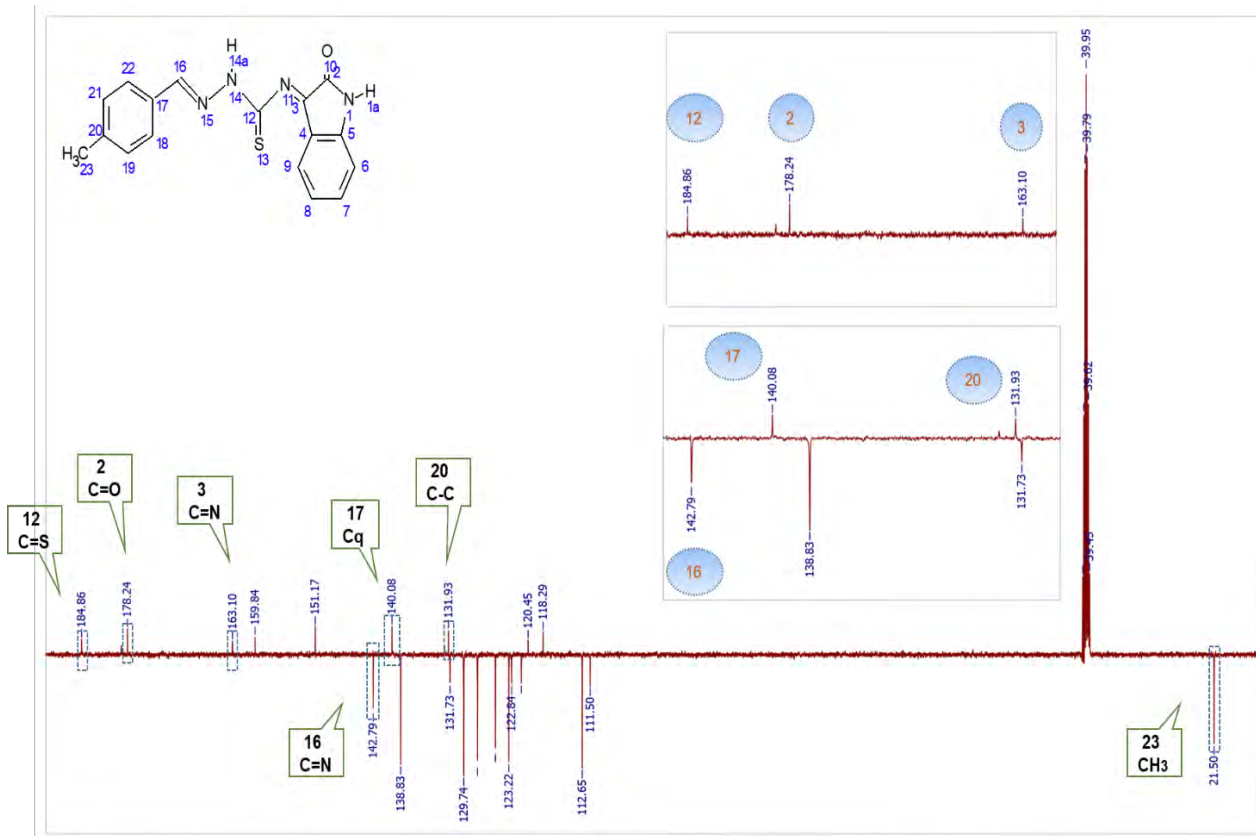
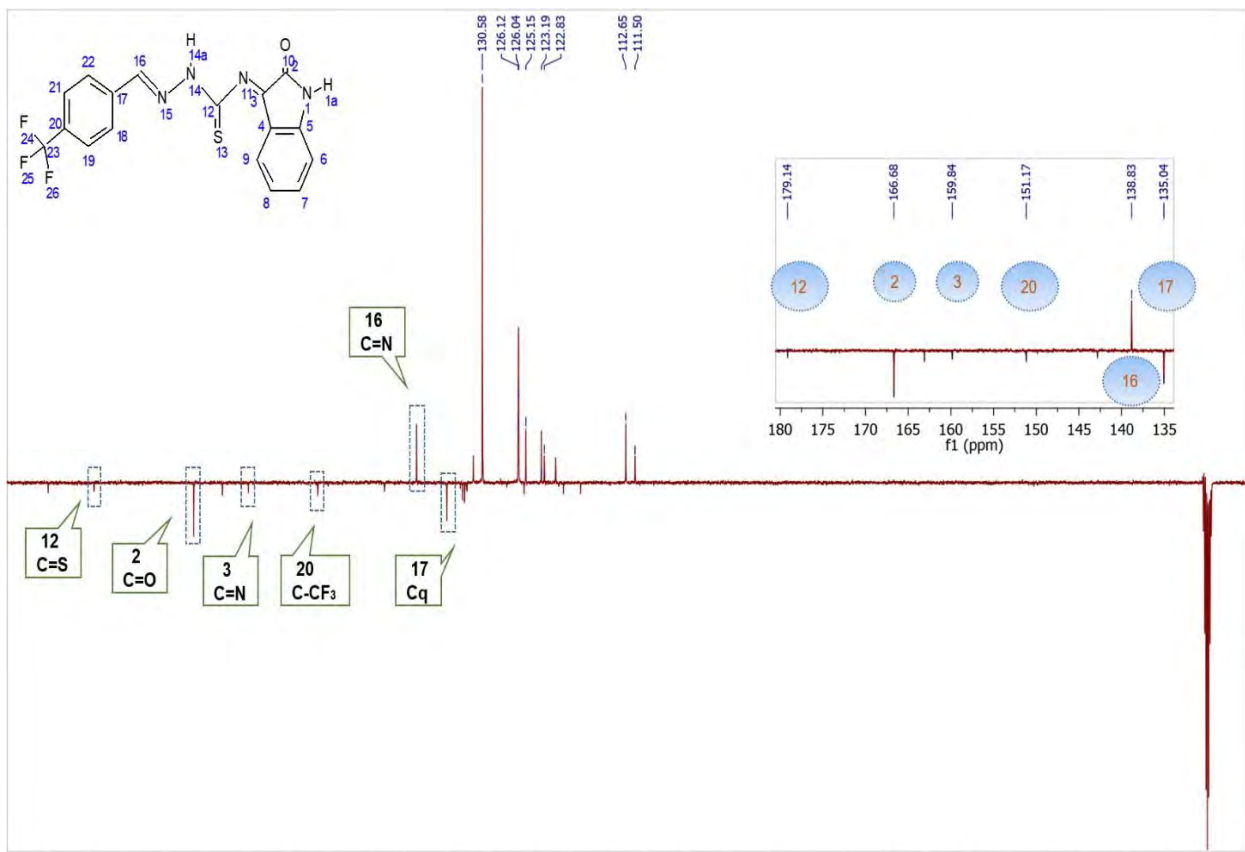


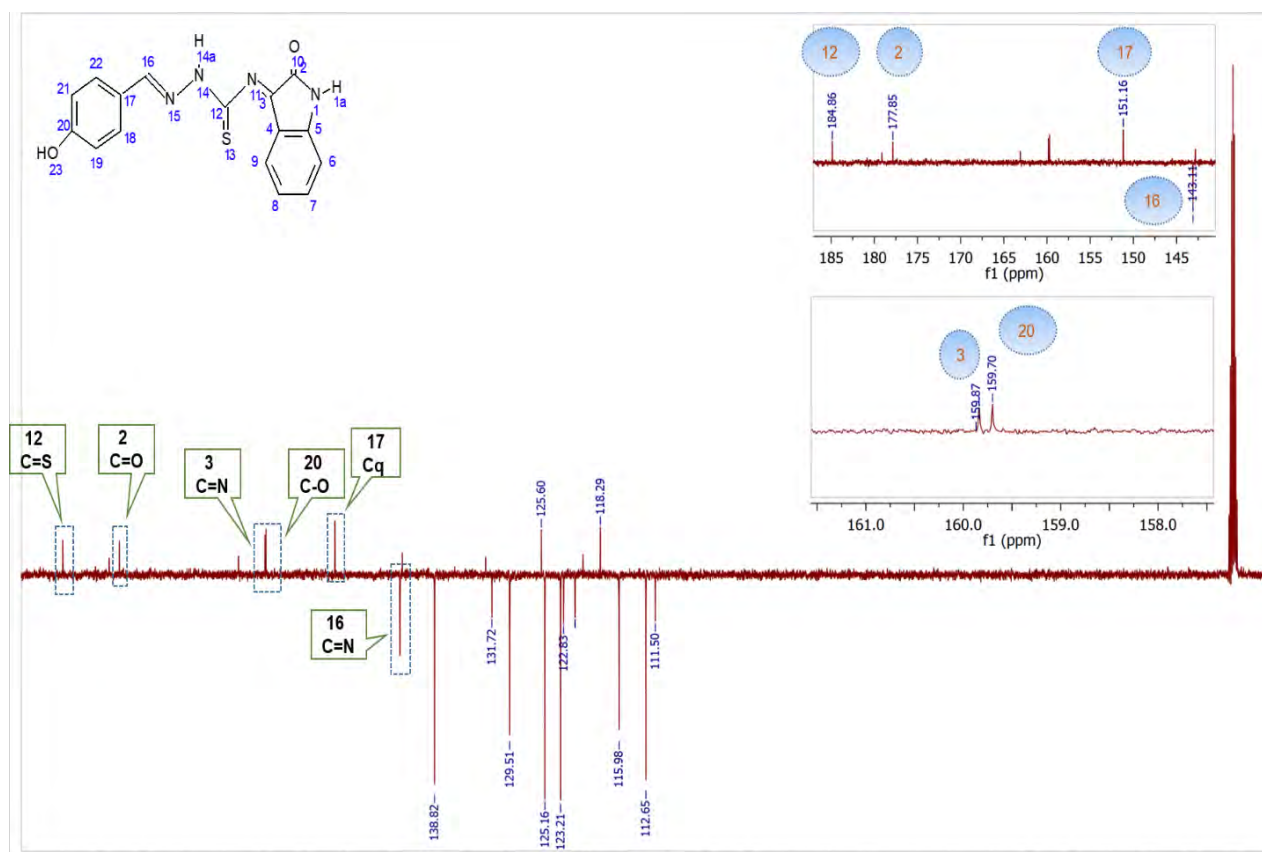
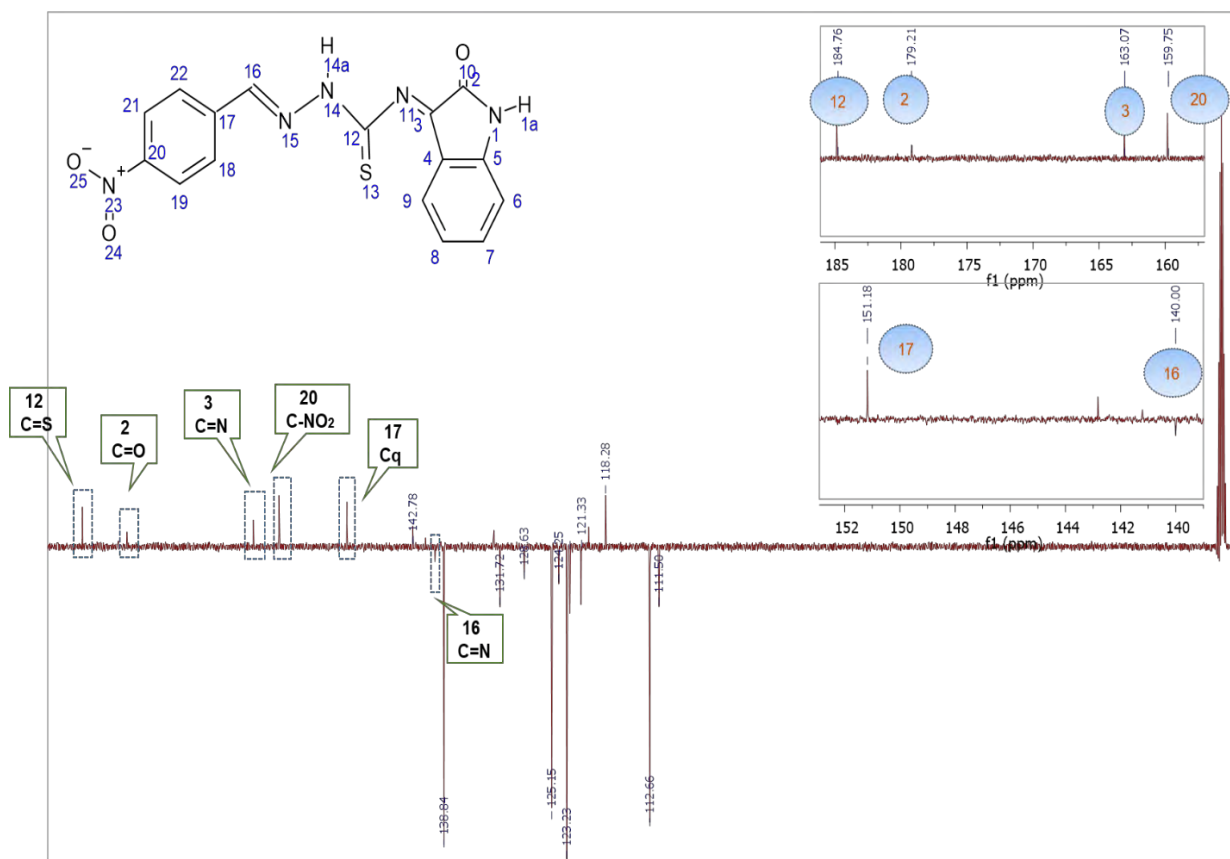
Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-Br



Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-FEspectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-OCH₃

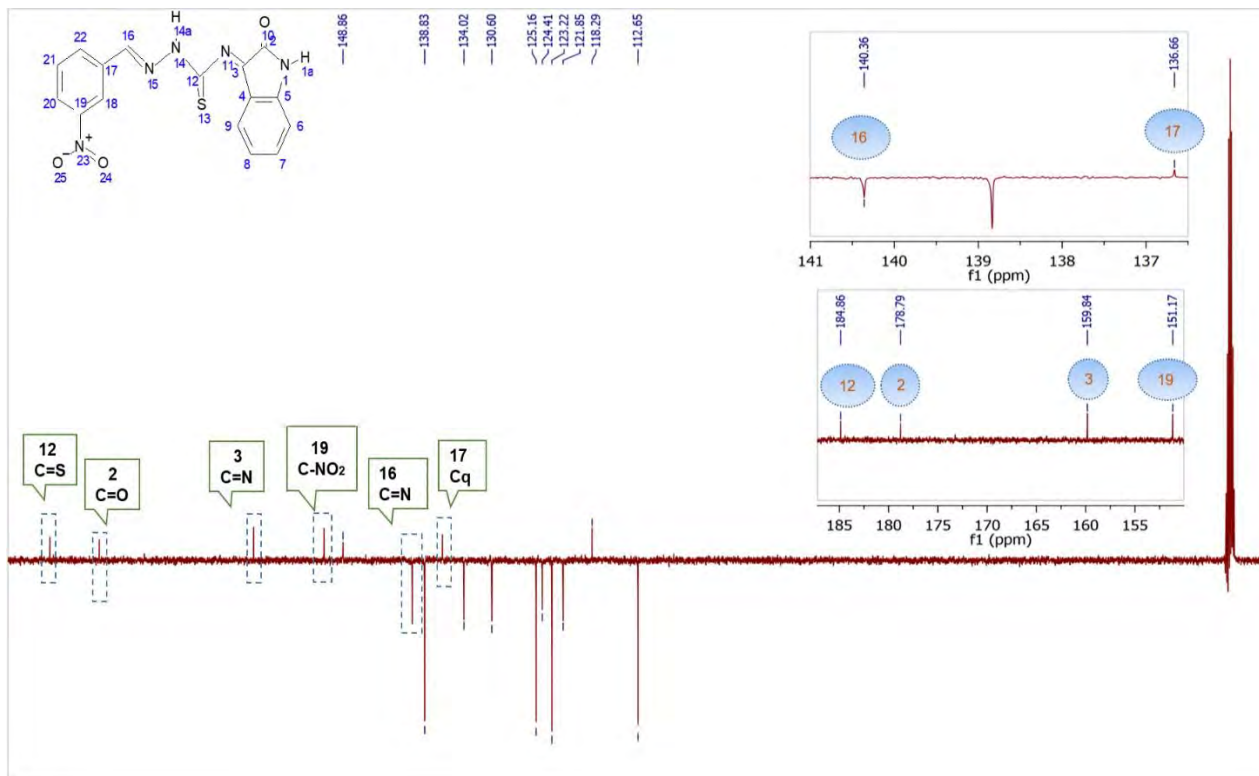
Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-ClEspectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-N(CH₃)₂

Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4- CH_3 Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4- CF_3 

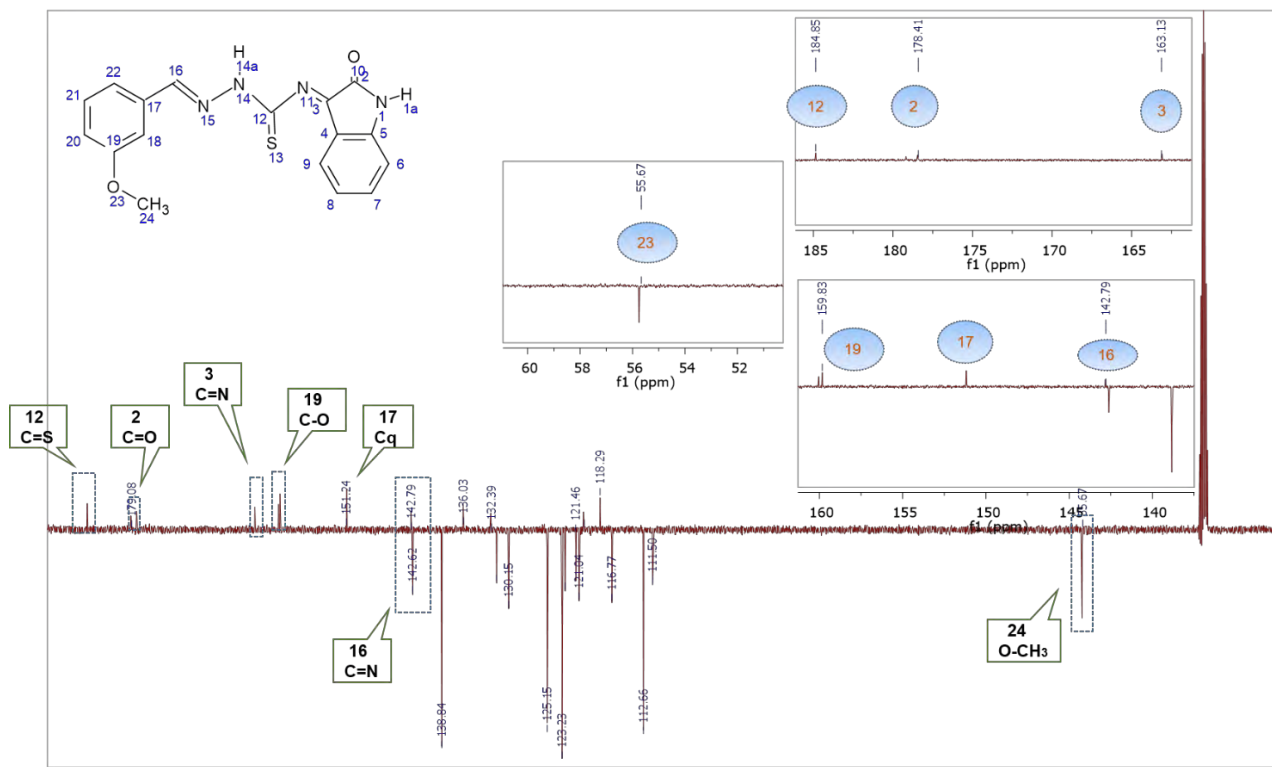
Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-OHEspectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-4-NO₂

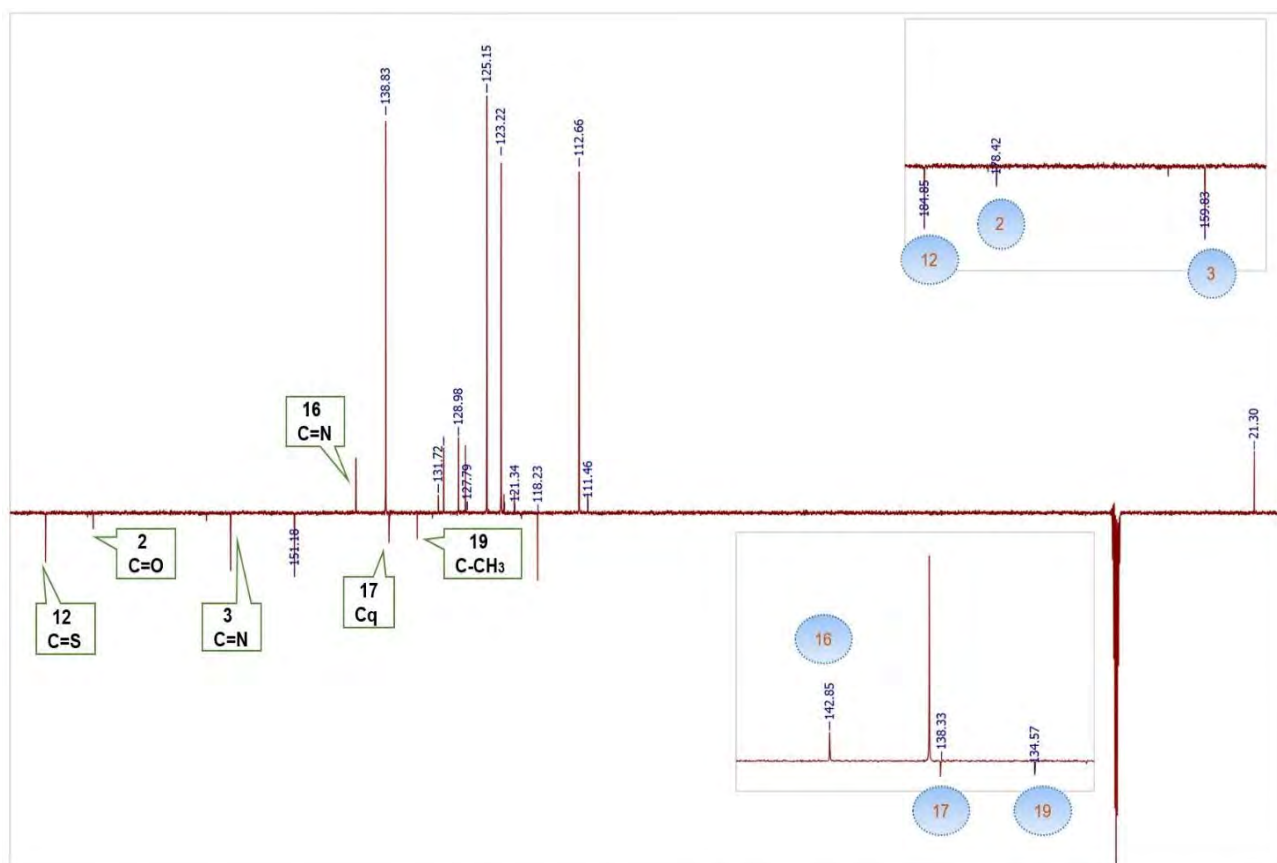
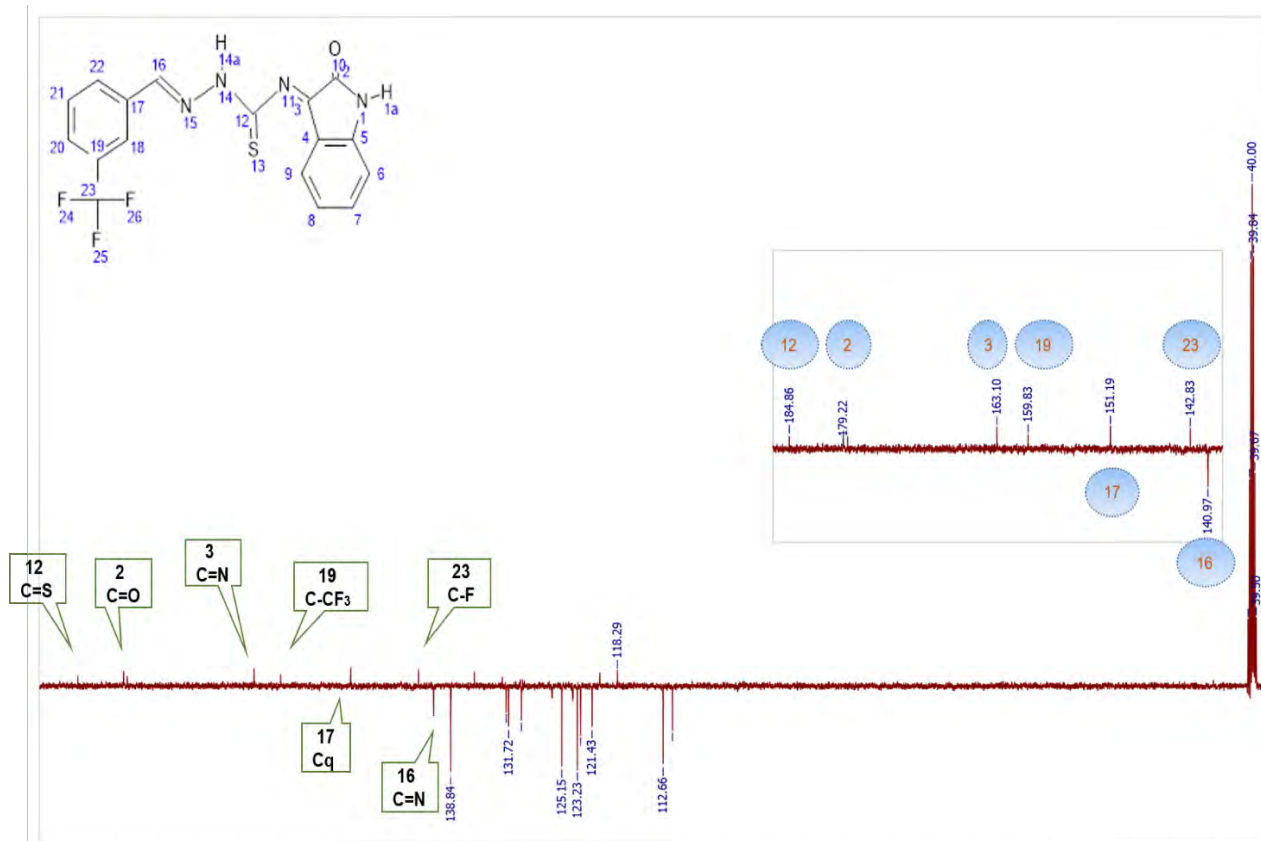
H – Espectros de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm) para as isatina-aril-*m*-tiossemicarbazonas (ISATIO-3-X).

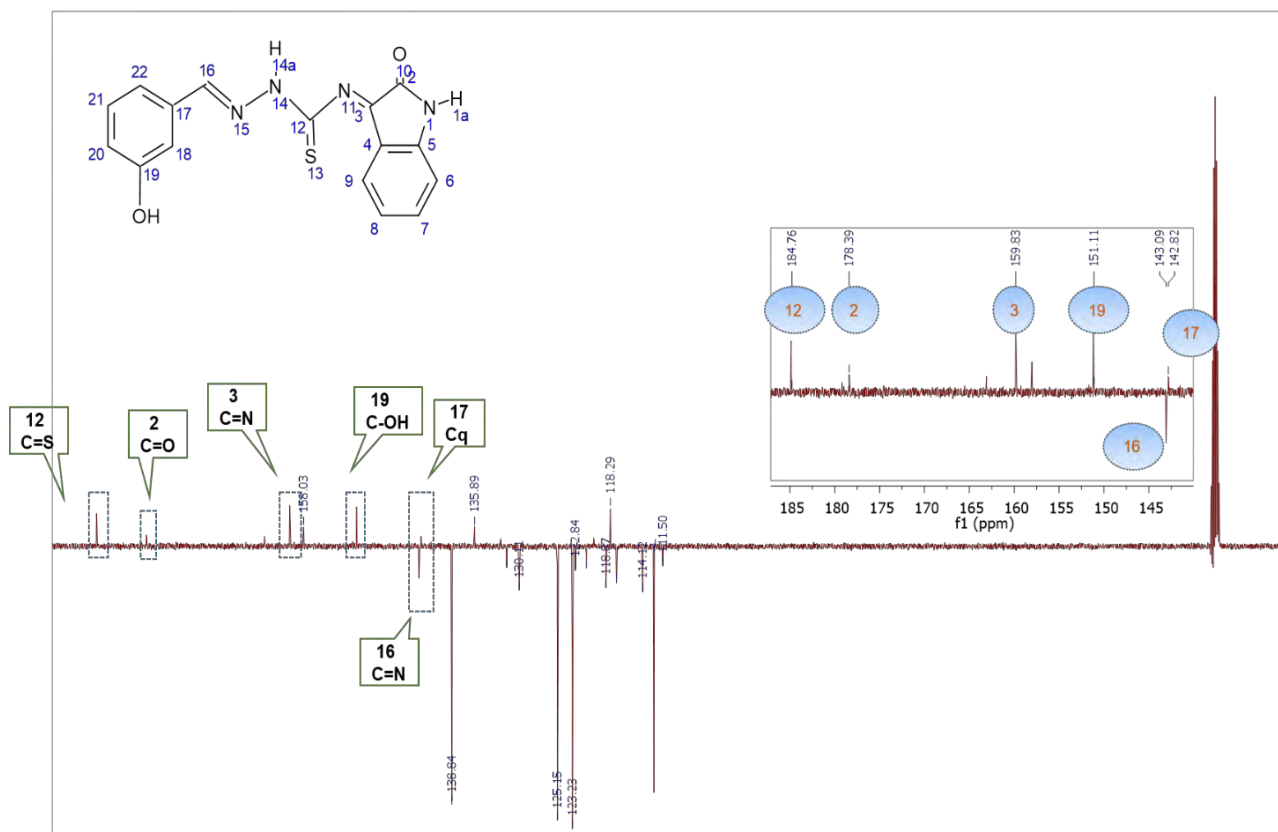
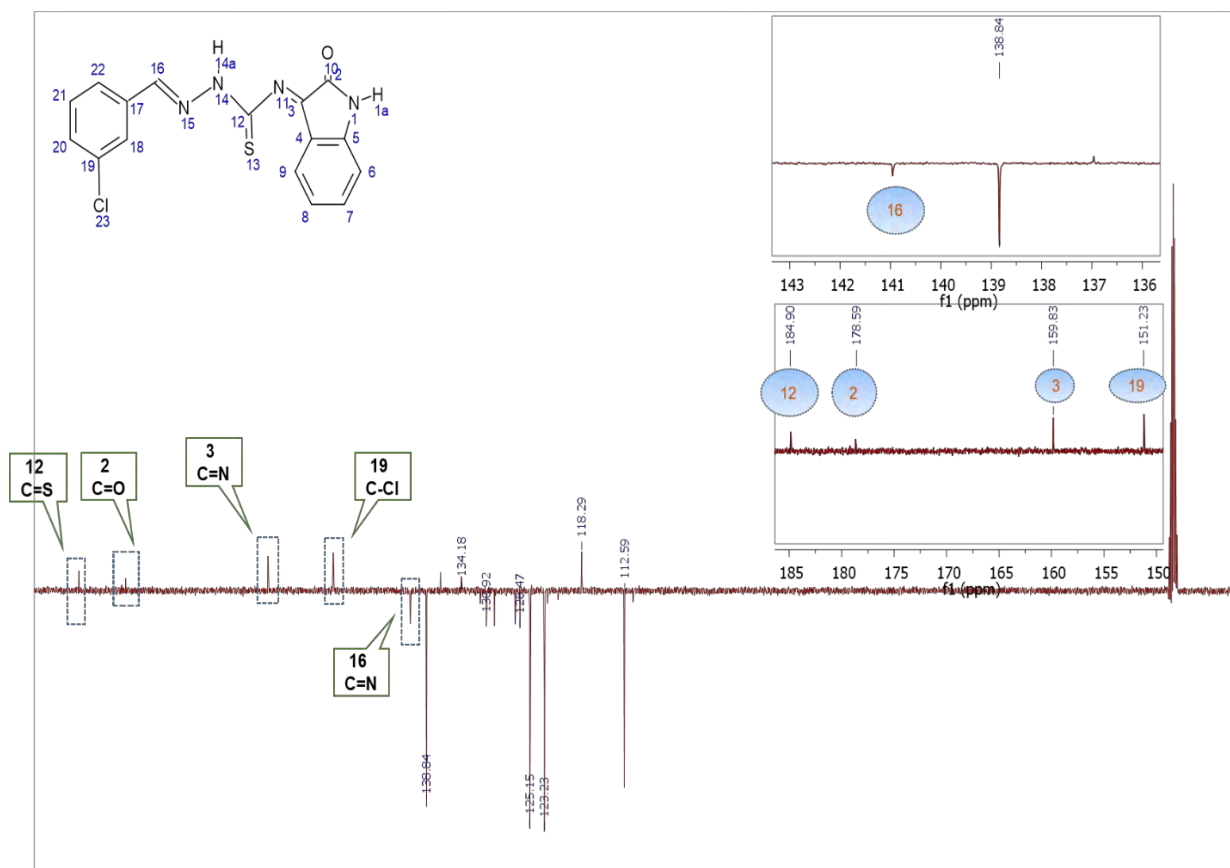
Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl₃) para ISATIO-3-NO₂

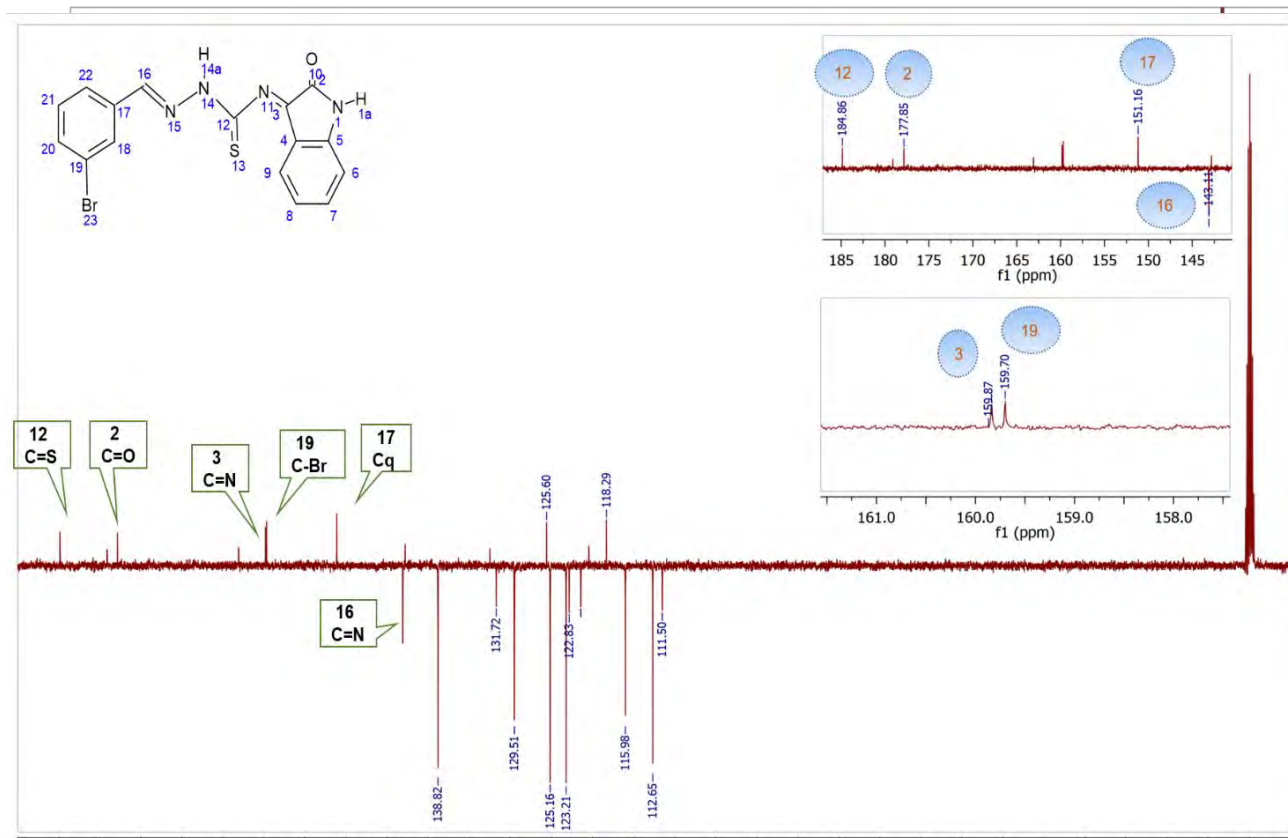


Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl₃) para ISATIO-3-OCH₃



Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3- CH_3 Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3- CF_3 

Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-OHEspectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-Cl

Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-BrEspectro de RMN de ^{13}C (500 MHz; CDCl_3) para ISATIO-3-F