



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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**TRIAGEM VIRTUAL E SÍNTESE DE DÍMEROS DE LAPACHOL E ISATINA COM  
POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL**



**Maísa Cavalcanti Coelho**

**João Pessoa – PB – Brasil**

**Fevereiro / 2019**



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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**TRIAGEM VIRTUAL E SÍNTESE DE DÍMEROS DE LAPACHOL E ISATINA COM  
POTENCIAL ATIVIDADE ANTITUMORAL**

**Maísa Cavalcanti Coelho\***

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

**SAPIENTIA ÆDIFICAT**

**Orientador: Mário Luiz de Almeida Araujo Vasconcellos**

**2º Orientador: Edilson Beserra de Alencar Filho**

**\*Bolsista (CAPES)**

**João Pessoa – PB – Brasil**

**Fevereiro / 2019**

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

C672t Coelho, Máisa Cavalcanti.

Triagem virtual e síntese de dímeros de lapachol e isatina com potencial atividade antitumoral / Máisa Cavalcanti Coelho. - João Pessoa, 2019.

74 f.

Orientação: Mário Luiz de Almeida Araujo Vasconcellos, Edilson Beserra de Alencar Filho.

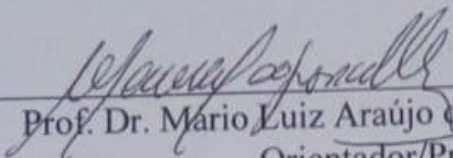
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

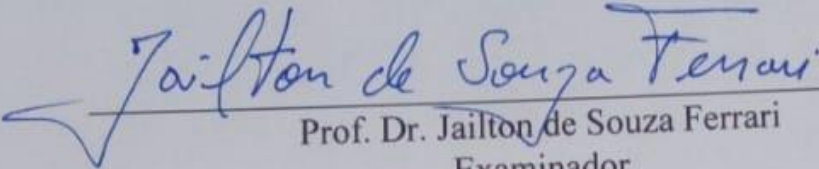
1. Hibridização molecular. 2. "Docking" molecular. 3. Atividade anticâncer. I. Vasconcellos, Mário Luiz de Almeida Araujo. II. Filho, Edilson Beserra de Alencar. III. Título.

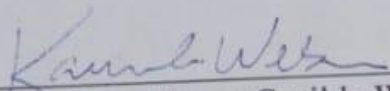
UFPB/CCEN

# Triagem virtual e síntese de dímeros de Lapachol e Isatina com potencial atividade antitumoral.

Dissertação de Mestrado apresentada pela aluna Máisa Cavalcanti Coelho e aprovada pela banca examinadora em 19 de fevereiro de 2019.

  
Prof. Dr. Mario Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos  
Orientador/Presidente

  
Prof. Dr. Jailton de Souza Ferrari  
Examinador

  
Profa. Dra. Karen Cacilda Weber  
Examinadora

*À Maria Santíssima.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, e por ter me permitido viver a experiência do Mestrado; pela força ao longo do caminho, e por todas as pessoas ao meu redor que transmitiram seu Amor.

Aos meus pais Zenildo e Geuza, que me incentivaram e deram todo o suporte pela realização do sonho de seguir a carreira acadêmica; por acreditarem em mim e estarem sempre ao meu lado.

Aos meus irmãos Victor e Maíra e toda a família, cujo apoio, torcida e carinho sempre foram essenciais para mim. À minha madrinha Geida, pela inspiração, presença e incentivo.

Ao meu querido Marcus Vinícius, por ouvir pacientemente todos os desabafos sobre os experimentos, mesmo sem compreender. Pelo apoio, estímulo e, principalmente, pela espera.

Ao meu Orientador, prof. Mário, por ter me acolhido tão bem desde o princípio e confiado no meu potencial; pelos inúmeros ensinamentos ao longo desde tempo, pelo carinho, cuidado e inspiração.

Ao meu Segundo Orientador, prof. Edilson, pela parceria que sempre me ensina tanto; por ter me incentivado a seguir pela busca de conhecimento; pela disponibilidade de se fazer presente mesmo geograficamente longe, sanando todas as dúvidas pelos meios possíveis; enfim, pela orientação e amizade maravilhosas de sempre.

Ao prof. Claudio, pelo suporte indispensável; por todos os conhecimentos transmitidos, provocações, incentivos, e tantas orientações; por importar-se com a formação de todos no LASOM; e por todo o cuidado conosco como pessoas.

Aos amigos da Legião de Maria, especialmente os novos, por serem meu suporte e minha segunda família em João Pessoa. Por todo amor, cuidado e compreensão.

Aos amigos do LASOM, pelo companheirismo e pela troca tão importante de experiências e conhecimentos; e principalmente pela alegria e amizade de todos os dias, que torna tudo mais leve.

Aos colegas dos demais laboratórios, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário; pelo companheirismo e pelas trocas de conhecimento.

A todos os funcionários e professores da UFPB, por constituírem esta instituição e trabalharem por ela e seus estudantes.

À CAPES, pelo financiamento da bolsa, que viabilizou minha vinda e permanência no programa de pós-graduação.

## RESUMO

Uma das doenças com impacto considerável na humanidade é o câncer, que provavelmente terá atingido 18,1 milhões de pessoas no mundo em 2018. Os tratamentos antitumorais existentes, em geral, apresentam alta toxicidade e reduzem qualidade de vida do paciente, tornando indispensável a busca por novos compostos antitumorais. Nesta investigação, uma estratégia da química medicinal promissora é a hibridização molecular, que reúne duas entidades farmacológicas e pode trazer grandes benefícios à sua bioatividade e toxicidade. Aliado à esta estratégia, as ferramentas da química computacional, como o *docking* molecular, se bem utilizadas, podem otimizar este processo. No *docking* molecular, é calculada a afinidade de um ligante em uma macromolécula, prevendo a tendência de *docking* dele neste alvo. O presente estudo objetivou a avaliação *in silico* de uma biblioteca de híbridos e seus intermediários com estruturas baseadas na isatina e no lapachol, bem como sintetizar os compostos mais promissores. A proteína NADP(H) oxidoreductase (NQO1) foi escolhida como proteína alvo, por ser altamente expressa em células tumorais. O programa AutoDock4 foi utilizado na triagem virtual por *docking* molecular. A validação do sistema foi feita através do *redocking* do ligante nativo E6A, sendo o RMSD obtido igual a 0,51. Em geral, todos os dímeros testados apresentaram ótimo potencial antitumoral frente à NQO1, com energias de ligação (EL) entre -10 e -9 kcal/mol, mesma faixa que o dicumarol (**36**), sendo **31a-31c** e **35a-35c** os mais promissores, com EL na faixa de -11 kcal/mol, tal qual o ligante nativo E6A (**28**). Para a produção dos dímeros, o lapachol foi extraído por Soxhlet e extração ácido-básica. Os intermediários foram sintetizados de acordo com protocolos da literatura, mas também foi testado o uso de micro-ondas. O lapachol foi obtido puro com melhor rendimento na extração por Soxhlet (0,76%) em relação à ácido-base (0,14%). A síntese dos dímeros de lapachol **31a-31c**, **35a-35c** e **33a-33c** não levou aos produtos finais, apenas aos intermediários **29** (67,2% de rendimento), **30a** (rendimento quantitativo), e **32a-32c** (11,69%, 27,23% e 31,6% de rendimento). Em contrapartida, os dímeros de isatina **23a-23c** e **26a-26c** foram sintetizados com rendimentos de 41, 29 e 20% para **23a-23c** e de 29,5%, 26% e 17%, respectivamente, para **26a-26c**. Os intermediários **22a-22c** foram produzidos com rendimento na faixa de 50%. A perspectiva é que estes homo e heterodímeros de isatina **23a-23c** e **26a-26c**, assim como os intermediários potencialmente ativos **32a-32c** e **29** tenham suas sínteses otimizadas e sejam enviados para testes *in vitro* de atividade antitumoral, a fim de confirmar seu potencial e relacionar os dados obtidos *in silico* e *in vitro*.

**Palavras-chave:** hibridização molecular; *docking* molecular; atividade anticâncer

## ABSTRACT

The cancer is a disease with a considerable impact on humanity. It is estimated that by 2018 it may have affected approximately 18.1 million people worldwide. In general, existing antitumor treatments presents high toxicity and reduce patient's quality of life, making it indispensable to search for new antitumor compounds. In this research, a promising medicinal chemistry strategy is molecular hybridization, which brings together two pharmacological entities and can bring great benefits to their bioactivity and toxicity. Combined with this strategy, computational chemistry tools, such as molecular docking, if well used, can optimize this process. In molecular docking, the affinity of a linker in a macromolecule is calculated, predicting its docking tendency in this target. The present study aimed the *in silico* evaluation of a library of hybrids and their intermediates with structures based on isatin and lapachol, as well as to synthesize the most promising compounds. The protein NADPH quinone oxidoreductase (NQO1) was chosen as the target protein because it is highly expressed in tumor cells. The AutoDock4 program was used in virtual screening by molecular docking. System validation was done by redocking the native ligand, and the RMSD was equal to 0.51. In general, all the dimers tested had an excellent antitumor potential against NQO1, with binding energies (EL) between -10 and -9 kcal/mol, same range as dicumarol (**36**), being **31a-31c** and **35a-35c** more promising, with EL in the range of -11 kcal/mol, just like the native E6A ligand (**28**). For the production of dimers, lapachol was extracted by Soxhlet and acid-base extraction. Intermediates were synthesized according to literature protocols, but the use of microwaves was also tested. Lapachol was obtained pure with a better yield in Soxhlet extraction (0.76%) than the acid-base one (0.14%). The synthesis of lapachol dimers **31a-31c**, **35a-35c** and **33a-33c** did not lead to the final products, only to intermediates **29** (67.2% yield), **30a** (quantitative yield), and **32a-32c** (11.69 %, 27.23% and 31.6% yield). In contrast, the isatin dimers **23a-23c** and **26a-26c** were synthesized in yields of 41, 29 and 20% for **23a-23c** and 29.5%, 26% and 17%, respectively, for **26a-26c**. Intermediates **22a-22c** were produced in 50% yield. The perspective is that these isatin homo and heterodimers **23a-23c** and **26a-26c** as well as the potentially active intermediates **32a-32c** and **29** have their syntheses optimized and sent for *in vitro* tests of antitumor activity in order to confirm their potential and to relate the data obtained *in silico* and *in vitro*.

**Keywords:** molecular hybridization; molecular docking; antitumor activity.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** estrutura da ifosfamida (1), metotrexato (2), mitomicina C (3), anastrozol (4) e sutinib (5) como representantes de algumas classes de antitumorais.

**Figura 2:** esquema mostrando a atuação de alguns fármacos antitumorais, considerando as diferentes fases do ciclo celular.

**Figura 3:** em I, esquema exemplificando a capacidade oxidante do  $\text{NADP}^+$  e redutora de NADPH. Em II, as estruturas do  $\text{NADP}^+$ , o estado oxidado, e NAPH, o estado reduzido.

**Figura 4:** Exemplos de homo e heterodímeros: homodímero derivado da bis-tacrina (6); homodímero de um aduto de Morita-Bayllis-Hillman (7); Heterodímero de ácido acetilsalicílico e paracetamol (8); dímero de isatina e ciprofloxacino (9).

**Figura 5:** Dímero assimétrico 10 com atividade antitumoral sintetizado por Ibacache e colaboradores (2018).

**Figura 6:** estrutura química do lapachol (11) e doxorrubicina (12).

**Figura 7:** árvore de *Tabebuia impetiginosa*, correspondente botânica de *Tabebuia avellaneda*, fonte de lapachol.

**Figura 8:** Estrutura da naftoquinona (13) análoga ao lapachol com atividade antitumoral *in vitro* em células leucêmicas humanas e derivado de lapachol com atividade antitumoral (14) frente a glioblastoma.

**Figura 9:** estrutura química da isatina (15).

**Figura 10:** Árvore e detalhe das flores de *Couroupita guianensis*.

**Figura 11:** Heterodímeros de isatina com núcleo quinolina (20) e DHEA (21), que demonstraram atividade antitumoral.

**Figura 12:** Proteína 5EAI editada, destacando as cadeias em cores diferentes, sendo a E em laranja.

**Figura 13:** estrutura de E6A (28), ligante nativo de NQO1(cód. 5EAI).

**Figura 14:** representação da caixa de grade utilizada, com as dimensões citadas.

**Figura 15:** Representação das moléculas utilizadas neste estudo. Destas, 12 são inéditas (homodímeros de lapachol e heterodímeros lapachol-isatina).

**Figura 16:** à esquerda, sobreposição do ligante nativo E6A (28), em roxo, e do mesmo após *redocking* (azul claro). À direita, cluster gerado pelo Autodock4 durante o estudo de *redocking* molecular, sendo a nativa em roxo.

**Figura 17:** sobreposição do ligante nativo (E6A, em roxo) e reacoplado, em azul, e interações com a proteína 5EAI, com destaque para a interação tipo p-stacking com o FAD, em salmão.

**Figura 18:** figura retirada do trabalho de Pidugu e colaboradores (2016), destacando o posicionamento e interação p-stacking da naftoquinona dimérica E6A em relação ao FAD.

**Figura 19:** Pose de E6A (roxo) e **31a** (azul esverdeado) no sítio de interação de NQO1 (5EAI).

**Figura 20:** Pose de E6A (roxo) e **31b** (verde) no sítio de interação de NQO1 (5EAI).

**Figura 21:** Pose de E6A (roxo) e **35a** (laranja) no sítio de interação de NQO1 (5EAI).

**Figura 22:** foto de amostras de **26a** (IIB-2), **26b** (IIB-3) e **26c** (IIB-4).

**Figura 23:** À esquerda, imagem da serragem fina de *Tabebuia avellanedae* usada neste trabalho; à direita, sistema de extração de Soxhlet.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** resultados dos *redocking* nos modos *short*, *medium* e *long*.

**Tabela 2:** resultados dos *dockings* com os dímeros de lapachol propostos e seus respectivos monômeros, em destaque, em comparação com o ligante nativo (E6A).

**Tabela 3:** resultados dos *dockings* com os dímeros de isatina propostos e seus respectivos monômeros, em destaque, em comparação com o ligante nativo (E6A).

**Tabela 4:** tempo de reação e rendimentos da síntese de **22a-22c** mostrando também o rendimento da formação concomitante de **23a-23c**.

## LISTA DE ESQUEMAS

**Esquema 1:** Algumas possibilidades de reações de formação de derivados de isatina.

**Esquema 2:** esquema reacional e dímeros produzidos por Singh et al. (2017).

**Esquema 3:** rota sintética idealizada para os homodímeros de lapachol **31a-31c**.

**Esquema 4:** rota sintética planejada para os homodímeros de lapachol **33a-33c**.

**Esquema 5:** esquema reacional para a produção dos heterodímeros de lapachol e isatina **35a-35c**.

**Esquema 6:** rota sintética idealizada para os homo e heterodímeros de isatina **23a-23c** e **26a-26c**, respectivamente.

**Esquema 7:** reação de lapachol (**11**) para formar 2-metóxi-lapachol (**29**)

**Esquema 8:** reação de lapachol metilado (**29**) para formação de **30a**, usando o aminoálcool correspondente (n=1).

**Esquema 9:** reação de tosilção de **30a** para formar **37a** (n=1) e finalmente **31a** (n=1).

**Esquema 10:** reação de cloração de **30a** usando cloreto de tionila para gerar **40a** e posteriormente **31a**.

**Esquema 11:** esquema reacional montado para obtenção dos homodímeros de lapachol **33a-33c** (n=1, 2 ou 3, respectivamente).

**Esquema 12:** produção de **32a-32c** a partir de lapachol (**11**).

**Esquema 13:** síntese dos intermediários **22a-22c** e homodímeros **23a-23c** a partir da isatina (**15**) e dos dibromoalcanos correspondentes, sendo n=1 para a, n=2 para b e n=3 para c.

**Esquema 14:** rota sintética para obtenção dos heterodímeros de isatina **26a-26c**

**Esquema 15:** rota sintética para obtenção dos heterodímeros **35a-35c** a partir das isatinas alquiladas **22a-22c** e lapachonato de potássio (**38**).

**Esquema 16:** rota sintética para obtenção dos dímeros **35a-35c** a partir do lapachol alquilado correspondente **32a-32c** e o sal potássico de isatina (**41**).

## LISTA DE ESPECTROS

- Espectro 1:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **22a**.
- Espectro 2:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **22a**.
- Espectro 3:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de lapachol (**11**).
- Espectro 4:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  tipo APT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de lapachol (**11**).
- Espectro 5:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **29**.
- Espectro 6:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **29**.
- Espectro 7:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **30a**.
- Espectro 8:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **30a**.
- Espectro 9:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **32b**.
- Espectro 10:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  tipo APT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **32b**.
- Espectro 11:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **32c**.
- Espectro 12:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  tipo APT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **32c**.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**AIA** – artrite induzida por antígeno

**ATP** - trifosfato de adenosina

**CIA** – artrite induzida por colágeno

**CCDA** – cromatografia em cada delgada analítica

**DHEA** – dehidroepiandrosterona

**EL** – energia de ligação

**FAD** – flavina adeninda dinucleotídeo

**KI** – constante de inibição

**LAFEPE** – Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes

**MD** – Dinâmica molecular

**MDR1** – proteína de resistência à múltiplas drogas

**NADP<sup>+</sup>** – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NAD(P)H** – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

**NQO1** –NAD(P)H:quinona oxidorreductase

**PDB** – *Protein Data Bank*

**QSAR** – relação quantitativa estrutura-atividade

**RMSD** – *root main square deviation*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1 Câncer.....	19
3.2 Planejamento de fármacos auxiliado por computador .....	21
3.3 <i>Docking</i> Molecular .....	22
3.4 A proteína NQO1 como alvo para atividade antitumoral .....	23
3.5 Estratégias de planejamento de novos fármacos: hibridização molecular ( <i>Twin drugs</i> ) .....	25
3.6 Lapachol .....	27
3.7 Isatina e seus derivados: potencialidades sintéticas e farmacológicas.....	29
4. ESTRATÉGIA.....	33
4.1 Estudo de <i>docking</i> molecular .....	33
4.1.1 <i>Redocking</i> molecular.....	34
4.1.2 <i>Docking</i> molecular da biblioteca de moléculas .....	34
4.2 Rota sintética para preparação de homo e heterodímeros de lapachol .....	36
4.3 Rota sintética para obtenção dos homo e heterodímeros de isatina .....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
5.1 Estudo de <i>docking</i> molecular da biblioteca de compostos.....	39
5.1.1 <i>Redocking</i> molecular.....	39
5.1.2 Estudo de <i>docking</i> molecular das moléculas da biblioteca construída .....	41
5.2 Síntese de homo e heterodímeros de lapachol .....	46
5.2.1 Extração de lapachol .....	46
5.2.2 Síntese do intermediário 29 para obtenção final de 31a-31c.....	47

5.2.3 Síntese do intermediário 30a a partir de 29.....	48
5.2.4 Formação do dímero 31a a partir da tosilção de 30a .....	49
5.2.5 Síntese do dímero 31a a partir do derivado clorado de 30a .....	49
5.3 Síntese dos homodímeros de lapachol 33a-33c .....	50
5.4 Síntese dos homo e heterodímeros de isatina 23a-23c e 26a-26c.....	52
5.5 Produção dos heterodímeros de lapachol-isatina 35a-35c .....	55
5.5.1 Produção dos heterodímeros de lapachol-isatina 35a-35c a partir de 22a-22c....	55
5.5.2 Produção dos heterodímeros de lapachol-isatina 35a-35c a partir de 32a-32c....	56
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	58
7. EXPERIMENTAL .....	59
7.1 Triagem virtual por <i>Docking</i> molecular .....	59
7.1.1 <i>Redocking</i> molecular para validação do sistema .....	59
7.2 Síntese dos dímeros de lapachol e isatina e seus intermediários.....	59
7.2.1 Extração de lapachol .....	59
7.2.2 Síntese 2-metoxi-lapachol (29) .....	60
7.2.3 Síntese de 2(2-hidróxi-etilamina) lapachol (30a).....	61
7.2.4 Tosilação de 30a para produção de 2-(3-methylbut-2-enyl)-3-(2-tosylethylamino)naphthalene-1,4-dione (37a) .....	61
7.2.5 Cloração de 30a para produzir 2-(2-cloroetilamina)-3-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona) 40a .....	61
7.2.6 Síntese do dímero de lapachol (31a).....	62
7.2.7 Síntese das isatinas alquiladas (22a-22c) .....	62
7.2.8 Síntese de lapachol alquilado (32a-32c) .....	62
7.2.9 Síntese dos heterodímeros de lapachol e isatina (35a-35c).....	63
7.2.10 Síntese dos dímeros de isatina (26a-26c).....	63
REFERÊNCIAS .....	64
ESPECTROS .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer afeta milhões de pessoas todos os anos, em todo o mundo. Em 2015, 8,8 milhões de pessoas morreram devido a esta doença. A própria enfermidade, somada ao tratamento com muitos efeitos colaterais, tornam o paciente debilitado e pode, muitas vezes, levar à perda da qualidade de vida e também à morte. O necessário desenvolvimento de novos fármacos pode alongar-se por até dez anos (DASTMALCHI, 2016) e é preciso lançar mão de estratégias para otimizar o tempo e os custos deste processo.

No presente trabalho, busca-se planejar e sintetizar moléculas com potencial para atuar como antitumorais com alguma especificidade, de modo a minimizar efeitos colaterais na terapia antineoplásica e avaliar este potencial usando a química computacional.

Neste sentido, construímos uma biblioteca de moléculas a partir do lapachol e da isatina, dois produtos naturais que apresentam, sozinhas, atividade antitumoral. Acreditamos que as modificações nestas moléculas podem trazer benefícios para a eficácia e toxicidade delas. Como nem todas poderiam ser sintetizadas, empregamos a química computacional, como ferramenta na escolha dos compostos a serem produzidos.

Destarte, esta pesquisa objetiva obter híbridos com potencial atividade antitumoral a partir de isatina e lapachol que serão avaliados e selecionados por uma triagem virtual via *docking* molecular. Além de construir a biblioteca de moléculas com estes híbridos, objetivamos realizar o *docking* molecular tendo como macromolécula a proteína NQO1; analisar os resultados deste estudo teórico através das energias de ligação calculadas e as interações intermoleculares entre os compostos e o alvo NQO1; extrair e purificar lapachol a partir da planta *Tabebuia avellanedae*; e sintetizar e caracterizar os híbridos com maior tendência de afinidade pela NQO1, sendo potenciais compostos antitumorais.

A síntese de novas moléculas construídas de forma racional possibilita o aumento na chance de encontrar substâncias mais ativas e menos tóxicas biologicamente, como é urgente ser feito no caso do câncer, tendo em vista a alta toxicidade e custo dos tratamentos atuais. Além disso, a produção de moléculas semelhantes viabiliza outros estudos posteriores para a melhor compreensão da relação estrutura-atividade de uma determinada classe.

A hibridização molecular foi a estratégia da química farmacêutica utilizada na construção da biblioteca de moléculas, consistindo na união de moléculas farmacologicamente ativas, isto é, que já apresentam alguma atividade biológica sozinhas. Como será melhor demonstrado adiante, esta técnica tem possibilitado o desenvolvimento de moléculas com

atividade biológica melhores que seus monômeros. Como ferramenta gratuita de triagem virtual, o *docking* molecular foi escolhido para prever o potencial antitumoral dos compostos frente à enzima NADPH quinona oxidoreductase (NQO1), e guiar a síntese das substâncias mais promissoras.

Esta dissertação está dividida em seis seções: (i) Objetivos, que trata dos objetivos gerais e específicos do trabalho; (ii) Estratégia, a qual mostra as estratégias envolvidas em vistas do cumprimento dos objetivos propostos, com detalhes da realização da triagem virtual e as rotas sintéticas planejadas para a síntese dos dímeros; (iii) Resultados e discussão, que mostra e discute todos os resultados obtidos na triagem virtual e nas sínteses, lançando mão de figuras e tabelas para melhor exposição dos mesmos; (iv) Considerações finais e perspectivas; (v) Experimental, com todos os pormenores da realização do *docking* molecular, bem como dos experimentos sintéticos; e (vi) Espectros, que expõe os espectros enumerados de todas as moléculas obtidas com êxito.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Obter dímeros de isatina e lapachol com potencial atividade antitumoral avaliado por uma triagem virtual, realizada por *docking* molecular.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Compor uma biblioteca de moléculas derivadas de lapachol e isatina com potencial atividade antineoplásica, planejadas pela estratégia de dimerização molecular.

- Realizar a triagem virtual da biblioteca de moléculas constituída por híbridos de lapachol e isatina, através da ferramenta de *docking* molecular, usando a proteína NQO1 como macromolécula-alvo.

- Selecionar as moléculas mais promissoras de acordo a triagem virtual, considerando a energia de ligação e as interações intermoleculares com o sítio de interação da macromolécula NQO1, comparando com o ligante nativo da mesma e o dicumarol.

- Extrair e purificar lapachol a partir de *Tabebuia avellanedae* para empregar na síntese dos dímeros desta naftquinona usando métodos descritos na literatura.

- Sintetizar e caracterizar as moléculas com maior potencial anticâncer, com base nos estudos teóricos, assim como seus intermediários sintéticos.

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Câncer

O câncer é uma doença em que as células se proliferam de modo desregrado, após terem sofrido mutações sucessivas que alteraram o controle sobre a própria reprodução. Frequentemente, as células cancerígenas invadem áreas que deveriam estar ocupadas por outras células, prejudicando tecidos adjacentes e todo o organismo.

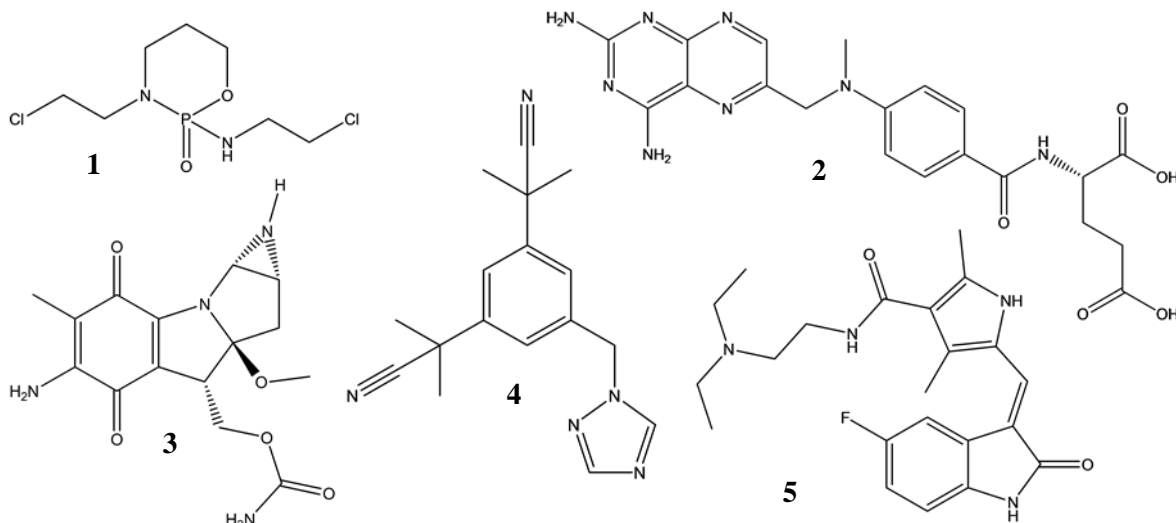
Dentre os cerca de cem tipos de câncer, há as seguintes características comuns: sinalização proliferativa sustentável; resistência à morte celular; escape à destruição imune; evasão de supressores de crescimento; ativação da imortalidade replicativa; instabilidade genômica; inflamação indutora de tumores; ativação de invasão e metástase; indução à angiogênese; e desregulação da energética celular (ALBERTS, 2017; KUMAR, ABBAS & ASTER, 2016).

Segundo dados de previsão da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2018) haveriam surgido mais 18,1 milhões de casos e 9,6 milhões de mortes devido a este tipo de enfermidade no mundo em 2018. No Brasil, a mortalidade como consequência de neoplasias foi de 220.332 pessoas em 2017 (DATASUS, 2018). Desta forma, trata-se de uma doença de alto impacto epidemiológico e também financeiro, já que o custo anual do câncer em 2010 foi de 1,16 trilhões de dólares (WHO, 2018). Reconhecidamente, o tratamento medicamentoso apresenta toxicidade para as células saudáveis também, além de não garantir a cura, pois as células tumorais podem adquirir resistência aos medicamentos (ALBERTS, 2017).

Quanto ao tratamento, os fármacos antitumorais usados clinicamente são classificados em agentes alquilantes, antimetabólitos, produtos naturais, hormônios e antagonistas de hormônios, além de agentes diversos, e alguns representantes deles estão dispostos na Figura 1. Eles agem principalmente danificando o DNA, especialmente na sua fase de síntese, a fase S do ciclo celular. Outros, porém, agem na fase M, inibindo o fuso mitótico. Na Figura 2, há um esquema resumindo os modos de ação dos antitumorais, considerando a atuação nas fases do ciclo celular (BRUNTON, CHABNER & KNOLLMANN, 2011).

Os agentes alquilantes incluem, entre outros exemplos, mostardas nitrogenadas como a ifosfamida (**1**), e são empregados em mieloma múltiplo, neuroblastoma, câncer de mama, ovário, pulmões, testículos, entre outros. Sua ação envolve a alquilação de ácidos nucleicos e proteínas, promovendo ligações cruzadas nas fitas de DNA e inibindo a sua síntese.

**Figura 1:** estrutura da ifosfamida (1), metotrexato (2), mitomicina C (3), anastrozol (4) e sutinib (5) como representantes de algumas classes de antitumorais.



Fonte: adaptado de <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>

Entre os antimetabólitos, um dos exemplos é o metotrexato (2), um análogo do ácido fólico, útil no tratamento de câncer de bexiga, pulmões, mama, cabeça, pescoço e na leucemia linfóide. Um representante dos produtos naturais é a mitomicina C (3), uma substância que serve para o tratamento de câncer de pulmão, de estômago e anal.

Inibidores da aromatase como o anastrozol (4) fazem parte da classe dos hormônios e seus antagonistas, e são empregados no tratamento de tumores que produzem ou utilizam os mesmos. Na classe dos agentes diversos, temos a subclasse em ascensão de inibidores de tirosina quinase na qual o sutinib (5) pode ser citado como exemplo (BRUNTON, CHABNER & KNOLLMANN, 2011).

Desse modo, existe uma variedade de classes e subclasses de compostos antineoplásicos, além da combinação de fármacos no uso clínico para evitar a criação de resistência. Apesar disso, os efeitos colaterais debilitantes causados ao paciente por estes compostos podem levá-los até mesmo à morte (KOROLKOVAS, 2014).

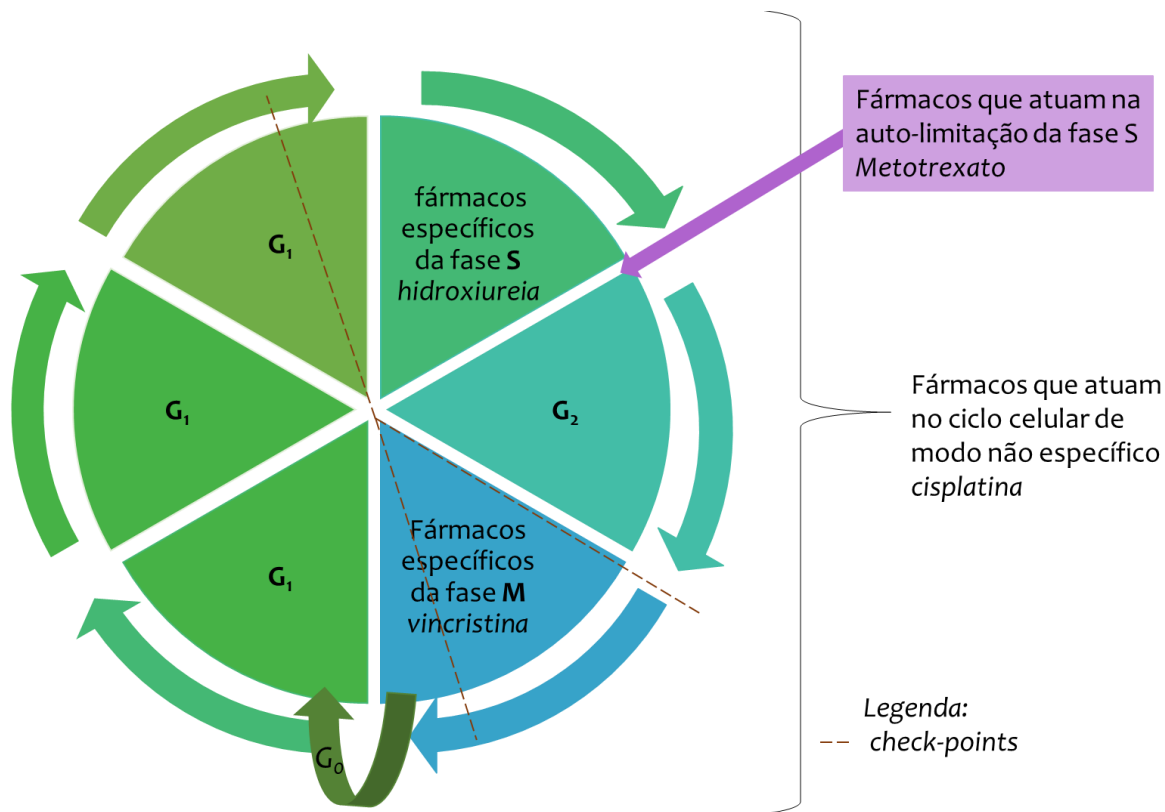
Isto ocorre porque as células cancerígenas são, via de regra, parte do organismo e, apesar de haver diferenças na bioquímica celular delas, as diferenças são muito sutis. Por isso, as substâncias usadas no tratamento atingem também as células saudáveis.

Quanto à resistência, ela pode ser suscitada por vários motivos: (i) devido à pouca irrigação sanguínea no tumor, levando à baixa absorção do (s) fármaco (s); (ii) alterações epigenéticas, que alteram o fenótipo celular; (iii) aquisição de resistência à morte mesmo após danos ao DNA; e (iv) presença de proteína de resistência à múltiplas drogas (MDR1), nas

células-tronco cancerígenas (KOROLKOVAS, 2014; KUMAR, ABBAS & ASTER, 2016).

Por conseguinte, é justificada a busca incansável por novos agentes antineoplásicos, a fim de encontrar compostos que sejam eficazes, perpassem a resistência das células tumorais e sejam menos tóxicas às células saudias.

**Figura 2:** esquema mostrando a atuação de alguns fármacos antitumorais, considerando as diferentes fases do ciclo celular.



Fonte: adaptado de Brunton, Chabner & Knollmann (2011)

### 3.2 Planejamento de fármacos auxiliado por computador

Na busca por novos compostos bioativos, há diversas ferramentas oferecidas pela química computacional que auxiliam no desenho de novas moléculas com potencial atividade biológica. Os custos e o tempo economizados através do uso de métodos computacionais tornam seu uso bastante proveitoso durante o processo de projeção, síntese e avaliação biológica de moléculas bioativas. Como exemplos, é possível encontrar na literatura os estudos da relação quantitativa estrutura-atividade (QSAR), estudo de *docking* molecular, estudo de dinâmica

molecular (MD), modelos farmacofóricos, entre outras (SLIWOSKI et al., 2014; BARREIRO & FRAGA, 2015).

Ao longo da história da química computacional, o uso destas abordagens revelou ser inviável classificar uma ou outra como superior, porém deve-se escolher qual é a mais adequada para fornecer respostas em dadas circunstâncias (SLIWOSKI et al., 2014). No presente trabalho, temos interesse na projeção de moléculas potencialmente ativas contra células cancerígenas, conhecendo a estrutura de um alvo macromolecular biológico específico, bem como um *template* de um pequeno ligante, o qual permite variações estruturais. Deste modo, o *docking* molecular foi utilizado como ferramenta no planejamento de novos compostos.

### 3.3 *Docking* Molecular

Resumidamente, o *docking* molecular é uma ferramenta computacional que calcula o posicionamento de um ligante no sítio de ligação de uma macromolécula e a energia de ligação associada ao *docking* do ligante nesta pose. Esta ferramenta é a mais utilizada e precisa em prever se uma molécula apresenta potencial para ser inibidora de uma dada proteína, sendo largamente empregada pela indústria farmacêutica. Os programas que fazem este tipo de procedimento o dividem em passos, que incluem o *docking* em si e a função *score*, para selecionar a melhor pose. Este *docking* envolve fatores conformacionais e de orientação do ligante, restritos no espaço do sítio da macromolécula. A pose que será selecionada contém informações da conformação, orientação e translação do ligante. Além disso, o programa prevê a afinidade dessas poses pelo cálculo de energia de ligação do complexo proteína-ligante (YURIEV, AGOSTINO & RAMSLAND, 2010; YOUNG, 2009).

O estudo de *docking* molecular emprega um método de busca, o qual explora o espaço conformacional que foi delimitado, e um campo de força, que avalia a energia de cada conformação gerada. No caso do programa Autodock4, um dos mais usados na literatura entre 2010-2011 (YURIEV & RAMSLAND, 2013) e que é gratuito, o campo de força empregado é semi-empírico, isto é, seu cálculo é composto de parte teórica e parte empírica, e foi devidamente calibrado com uma variedade de complexos ligante-proteína (HUEY et al., 2007).

A contribuição teórica corresponde aos termos pares que avaliam a interação entre as duas moléculas e inclui um modelo termodinâmico no processo de *docking*, considerando termos de interações intramoleculares no cálculo de energia livre. Já a contribuição empírica estima a contribuição das moléculas de água não explícitas ao redor, através de um modelo de

dessolvatação que abarca todos os tipos de átomos. Ela inclui a contribuição favorável de energia de dessolvatação de átomos de carbono tal como no caso desfavorável da dessolvatação de átomos polares e carregados (HUEY et al., 2007).

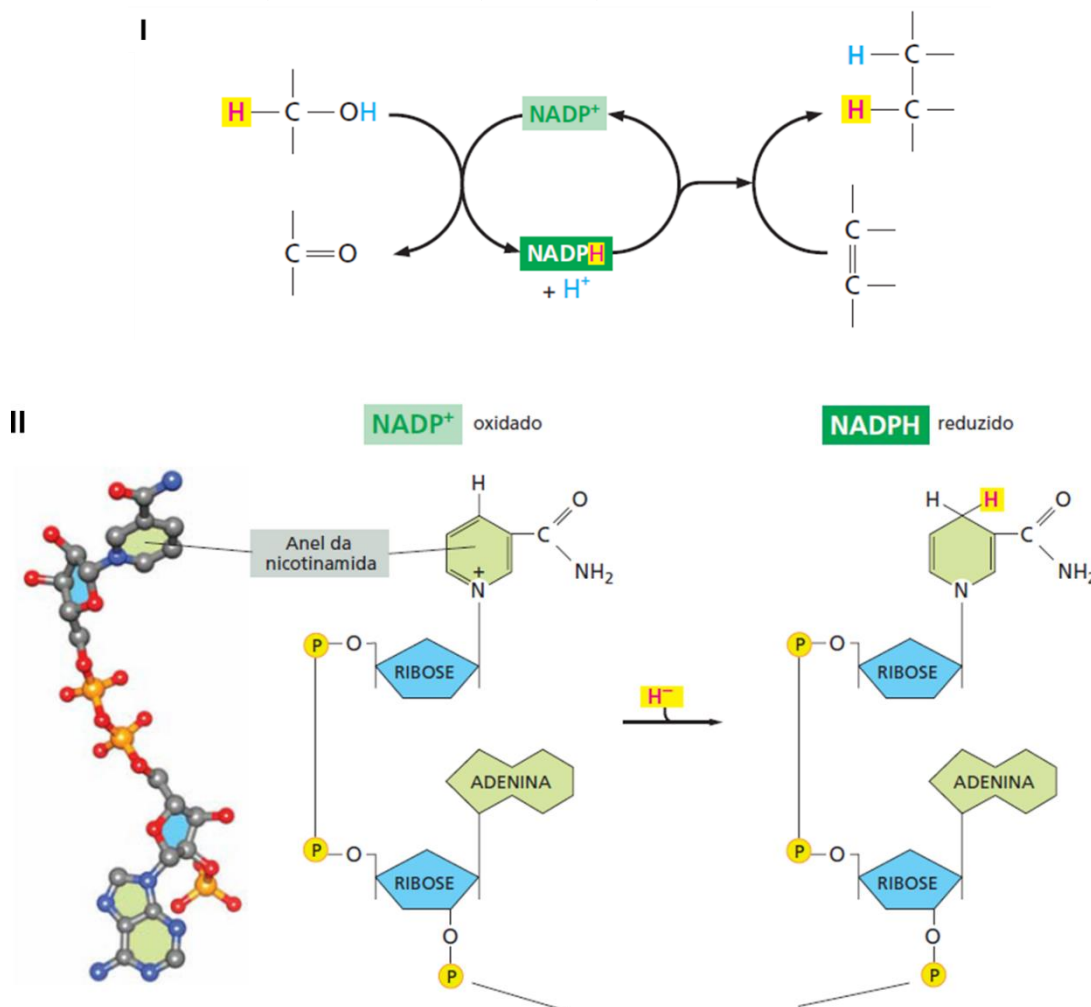
Em relação ao método de busca, o AutoDock4 dispõe de vários tipos a serem escolhidos pelo operador: algoritmo genético lamarckiano, mais indicado pelos autores do programa, além do algoritmo genético tradicional e o método de *simulated annealing*. No algoritmo genético lamarckiano, é gerada uma população inicial de conformações. Cada uma delas passa por mutações e cruzamentos, de modo semelhante ao que ocorre na natureza, concebendo uma nova geração. As novas conformações da geração são avaliadas e passam por mutações também, formando nova geração, e assim sucessivamente. O processo permite que as conformações individuais geradas sejam alocadas em local com energia mínima, e esta informação seja passada às gerações seguintes, levando à seleção de conformações de menor energia de ligação (MORRIS et al., 2009).

Há diversas finalidades para as quais o estudo de *docking* é útil, incluindo a predição da ligação de um ligante a proteínas relacionadas à farmacocinética, como a albumina (ABDELHAMEED et al., 2017). Outro exemplo é a predição da atividade biológica de moléculas em uma proteína relacionada à alguma enfermidade, como a doença de Chagas, alvo do estudo de Molfetta e colaboradores (2009), usando inclusive o AutoDock4. Ajduković e colaboradores (2013) fizeram uso de outra empregabilidade desta ferramenta: eles realizaram uma triagem virtual de suas moléculas (potencialmente antiproliferativas) através de *docking* molecular, para selecionar para síntese e avaliação biológica apenas as substâncias mais promissoras segundo os resultados do estudo *in silico*, sem perder tempo com aquelas que não mostraram resultados satisfatórios.

### **3.4 A proteína NQO1 como alvo para atividade antitumoral**

Chamada sistematicamente de NAD(P)H quinona oxidoreductase, a NQO1 é uma proteína que catalisa reações de óxido-redução envolvendo 2 elétrons, tendo como substrato preferencial quinonas de cadeia curta (NC-IUBMB, 2010). O NADPH presente nesta proteína é responsável por suas propriedades oxidoreductoras, como está demonstrado na Figura 3.

**Figura 3:** em I, esquema exemplificando a capacidade oxidante do  $\text{NADP}^+$  e redutora de  $\text{NADPH}$ . Em II, as estruturas do  $\text{NADP}^+$ , o estado oxidado, e  $\text{NADPH}$ , o estado reduzido.



Fonte: extraído e adaptado de Alberts et al. (2017)

A busca usando a palavra “NQO1” no *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), um banco de dados que engloba principalmente arquivos de coordenadas de proteínas, permitiu encontrar oito arquivos de NQO1 cristalografada. Todos os arquivos eram de proteínas oriundas de *Homo sapiens* e expressas em *Escherichia coli*. Destes oito, três arquivos eram de NQO1 acoplada com dicumarol, três com outros ligantes (incluindo derivado de cumarina, naftoquinona e *cibacron blue*, uma quinona) e dois não apresentavam ligantes.

Segundo Asher e seus colaboradores (2001), o dicumarol desestabiliza a proteína p53 por degradação proteossômica, não apenas a p53 comum como também a mutada, que suprime a apoptose, encontrada em vários tipos de câncer. Este efeito do dicumarol, como demonstrado pelo grupo, está associado à inibição da proteína NQO1 e promove o efeito antitumoral (ASHER et al., 2001).

Outra substância que consegue inibir a NQO1 é o DNQ, uma quinona natural ativada por esta proteína, levando à morte celular de modo subsequente. Por isso, esta substância é um promissor antitumoral seletivo, já que a NQO1 é expressa em maior proporção em células tumorais (PARKINSON & HERGENROTHER, 2015).

Devido à sua presença mais expressiva em células com frequente divisão celular, como as tumorais (NELSON & COX, 2011), a NQO1 se constitui como um alvo interessante na busca por compostos antitumorais. Em adição, há relatos de naftoquinonas com atividade antitumoral que agem via NQO1, em linhagens de células tumorais com diferentes proporções de expressão dela (BEGLEITER et al., 2009). Em acordo com isso, Pidugu e colaboradores (2016) cristalizaram a NQO1 complexada com uma naftoquinona dimérica, cuja atividade antitumoral contra várias linhagens apontou para um mecanismo de ação envolvendo a NQO1.

Em relação ao uso da NQO1 como alvo específico em tratamentos oncológicos, o grupo de Liao (2012) propõe duas estratégias para construir novas moléculas com este fim: uma de desenho de moléculas com alta especificidade pela NQO1 e que sejam capazes de gerar um ciclo redox fútil; e outra estratégia em que pró-fármacos atóxicos ou pouco tóxicos sejam projetados, de modo que sejam ativados apenas pela NQO1, nos locais onde ela é altamente expressa como nas células tumorais (LIAO et al., 2012).

### **3.5 Estratégias de planejamento de novos fármacos: hibridização molecular (*Twin drugs*)**

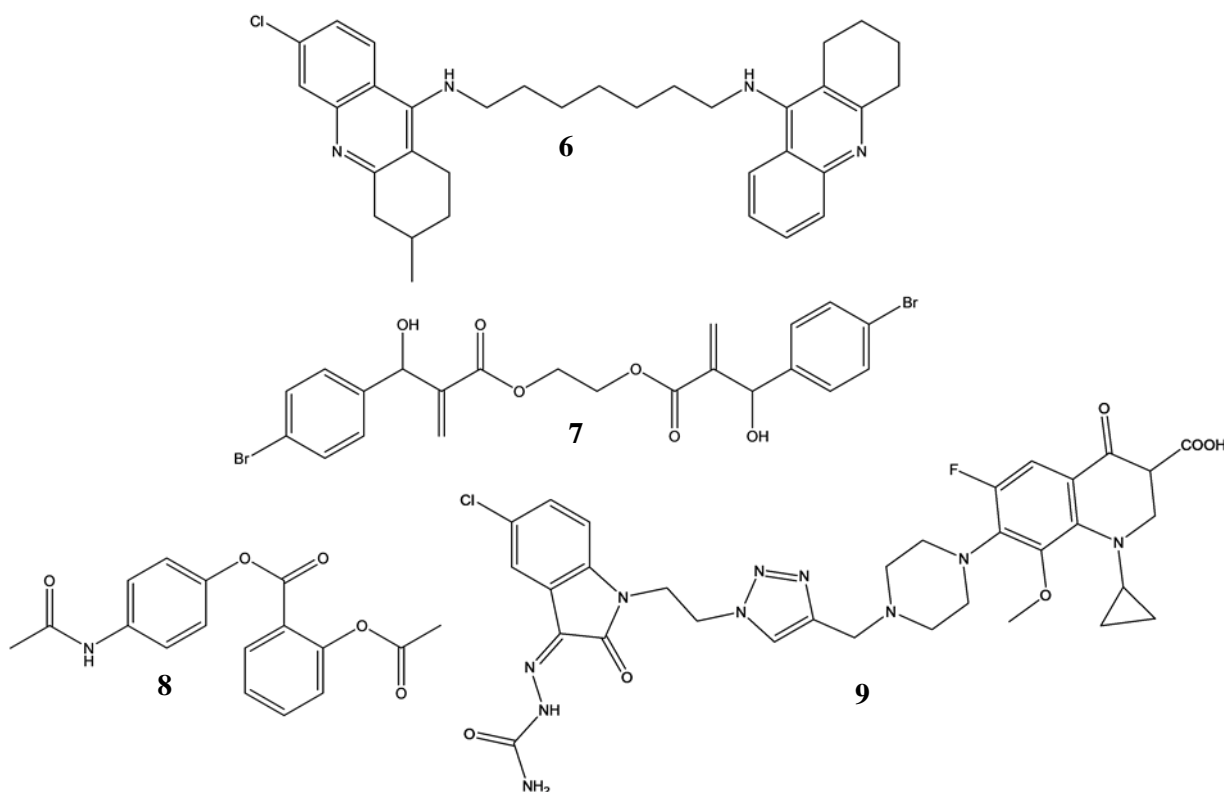
Segundo Wermuth (2008), a união de duas unidades farmacológicas por ligações covalentes gera os chamados fármacos gêmeos, também nomeados duais, diméricos, bivalentes, híbridos, mixados ou, ainda, múltiplos. Tais entidades a serem unidas podem ser iguais, formando homodímeros, ou diferentes, constituindo heterodímeros. Além disso, elas podem ser unidas com um espaçador, sem espaçador ou de forma sobreposta. A técnica propõe que o dímero criado tenha vantagens de potência e seletividade em relação ao monômero, no caso dos homodímeros, ou seja capaz de atuar em ambos alvos de cada monômero, no caso dos heterodímeros.

Alguns exemplos de dímeros estão dispostos na Figura 4, como a substância **6**, um homodímero proveniente da modificação da bis-tacrina, e que apresentou maior potência que ela (LOPES, 2014). É importante salientar que uma molécula inicialmente simétrica, constituída como homodímero, pode ser posteriormente modificada para gerar moléculas

melhores, numa otimização que pode trazer assimetrias a ela, sem que ela deixe de ser um homodímero (WERMUTH, 2008).

O composto **7**, advindo da dimerização de um aduto de Morita-Baylis-Hillman sintetizado por nosso grupo de pesquisa, apresentou atividade 1,4 vezes maior e seletividade 400 vezes maior que o respectivo monômero (SILVA, 2016). Já o composto **8** é um heterodímero, proveniente da junção do paracetamol e ácido acetilsalicílico (WERMUTH, 2008). O também heterodímero **9** foi gerado a partir da união da isatina com o ciprofloxacino, e demonstrou atividade antimicrobacteriana duas vezes maior que este monômero (XU et al., 2018).

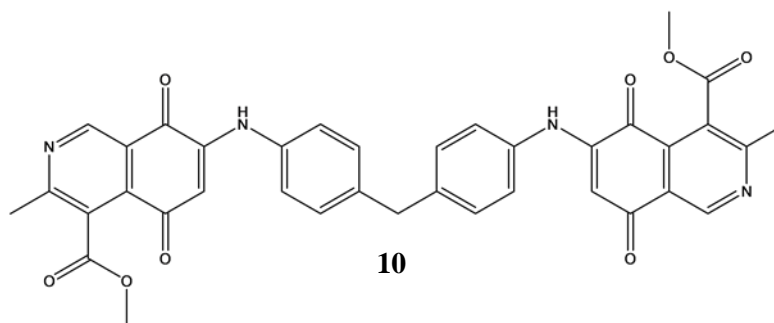
**Figura 4:** Exemplos de homo e heterodímeros: homodímero derivado da bis-tacrina (**6**); homodímero de um aduto de Morita-Bayllis-Hillman (**7**); Heterodímero de ácido acetilsalicílico e paracetamol (**8**); dímero de isatina e ciprofloxacino (**9**).



Fonte: adaptado de Lopes (2014), Silva (2016), Wermuth (2008) e Xu et a. (2018).

Outro exemplo de sucesso no planejamento de moléculas diméricas é o composto **10**, um derivado de isoquinolinequinona com atividade antitumoral, sintetizado pelo grupo de Ibacache (2018). Esta molécula, mostrada na Figura 5, apresentou um valor de IC<sub>50</sub> comparável à do taxol e uma seletividade sete vezes maior que a deste padrão ouro.

**Figura 5:** Dímero assimétrico **10** com atividade antitumoral sintetizado por Ibacache e colaboradores (2018).

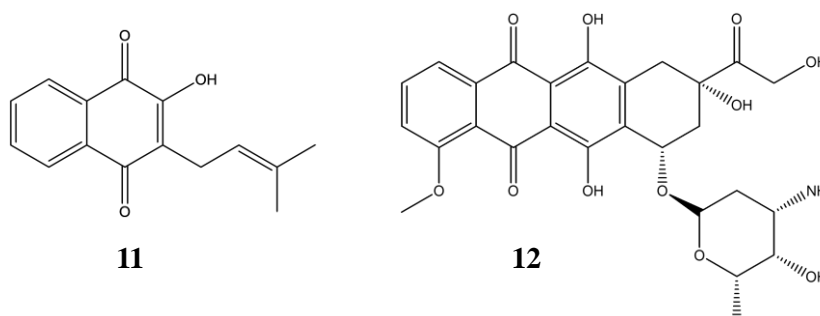


Fonte: adaptado de Ibacache et. al. (2018).

### 3.6 Lapachol

Entre as naftoquinonas, o lapachol é uma substância de destaque, tendo sido descoberto por Paternò em 1882 e alvo de estudos até os dias atuais. Segundo Fonseca, Braga e Santana (2003), a descoberta do lapachol foi uma das mais importantes do século XX, na área da fitoquímica. A estrutura do lapachol (**11**) pode ser vista na Figura 6, onde se observa o grupo quinona, também presente em alguns fármacos antitumorais como a mitomicina (3, Figura 1) e doxorubicina (**12**, figura 6).

**Figura 6:** estrutura química do lapachol (**11**) e doxorubicina (**12**).



Fonte: adaptado de <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>

Esta substância pode ser extraída de plantas da família Bignoniaceae, como *Tabebuia avellaneadae* (BRASIL, 2015) cuja imagem está na Figura 7. Ela apresenta atividade antitumoral (FIORITO et al., 2014) e chegou a ser produzida e distribuída no Brasil em forma de cápsulas de 250 mg pelo LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco Governador Miguel Arraes) por mais de 20 anos (ARAÚJO, ALENCAR & ROLIM-NETO, 2002).

O lapachol também foi alvo de estudos clínicos pelo National Cancer Institute dos Estados Unidos, mas devido à toxicidade acarretada pelas altas doses necessárias, eles foram interrompidos (SIMÕES et al., 2007). Além disso, o lapachol apresenta atividade antifúngica (GUIRALD et al., 1994), moluscicida (SANTOS et al., 2001), anti-helmíntica (MATA-SANTOS, 2015), leishmanicida (LIMA et al., 2004) e fotoprotetora (ARAÚJO et al., 2014).

Em adição à esta gama de atividades do lapachol, há evidências de que ele diminua a progressão de artrite induzida por colágeno (CIA) e artrite induzida por antígeno (AIA), com efeitos anti-inflamatórios e de redução nos danos do tecido articular. A atuação do lapachol em artrite experimental também envolve seu efeito anti-proliferativo em relação aos linfócitos, fazendo com que ele também seja um potencial imunossupressor (PERES et al., 2017).

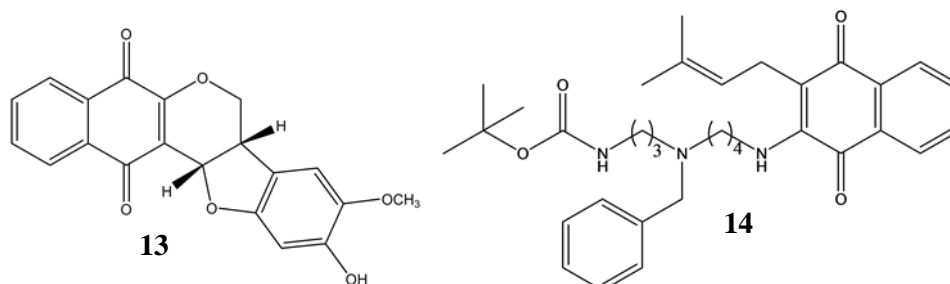
**Figura 7:** árvore de *Tabebuia impetiginosa*, correspondente botânica de *Tabebuia avellanedae*, fonte de lapachol.



Fonte: <<https://www.flickr.com/photos/flaviocb/7451592342/in/photostream/>>

Derivados desta substância têm sido desenvolvidos com o intuito de promover uma melhor atividade antitumoral com menor toxicidade. O composto **13** (Figura 8), por exemplo, foi um dos avaliados pelo grupo de Salustiano (2010) que apresentou atividade contra células tumorais leucêmicas humanas comparável à mitomicina C (3, Figura 1), com menor toxicidade às células sanguíneas monocleares. O composto **14** (Figura 8), um derivado de lapachol conjugado com poliamina, também apresentou atividade antitumoral frente a células de glioblastoma. A ação deste composto inclui a diminuição da invasibilidade das células tumorais, com melhores resultados que o lapachol (ROMÃO et al., 2018).

**Figura 8:** Estrutura da naftoquinona (**13**) análoga ao lapachol com atividade antitumoral *in vitro* em células leucêmicas humanas e derivado de lapachol com atividade antitumoral (**14**) frente a glioblastoma.

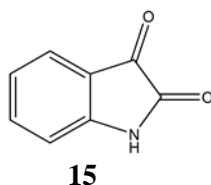


Fonte: adaptado de Salustiano et al. (2010).

### 3.7 Isatina e seus derivados: potencialidades sintéticas e farmacológicas

A isatina (**15**) é uma pequena molécula, como visto na Figura 9, cuja estrutura tem servido de base para inúmeros compostos biologicamente ativos, com atividade antitumoral (VINE et al., 2009; SINGH et al., 2011), antioxidante (PREMANATHA et al., 2012), anti-inflamatória (SHARMA et al., 2016), inibidora da formação de biofilme (em *P. Aeruginosa*) (ROSAY et al., 2015), entre outras. Além disso, a isatina por si já demonstrou atividade antitumoral e anti-angiogênese em células de neuroblastoma, por exemplo, sendo capaz de induzir a apoptose delas *in vitro* e *in vivo* (HOU et al., 2008; SONG et al., 2013).

**Figura 9:** estrutura química da isatina (**15**).



Esta substância pode ser encontrada em plantas como em *Couropita guianensis* (TRIPATHI & SONAWANE, 2013), mostrada na Figura 10; em animais como os moluscos marinhos do gênero Mouricidae (BENKENDORFF et al., 2015); e alguns análogos dela foram encontrados como resultado do metabolismo da adrenalina, em estudos mimetizando o organismo humano (PALUMBO et al., 1989; d'ISCHIA, PALUMBO & PROTA, 1988).

**Figura 10:** Árvore e detalhe das flores de *Couroupita guianensis*.



Fonte: <<https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/22172199935/in/photostream/>>

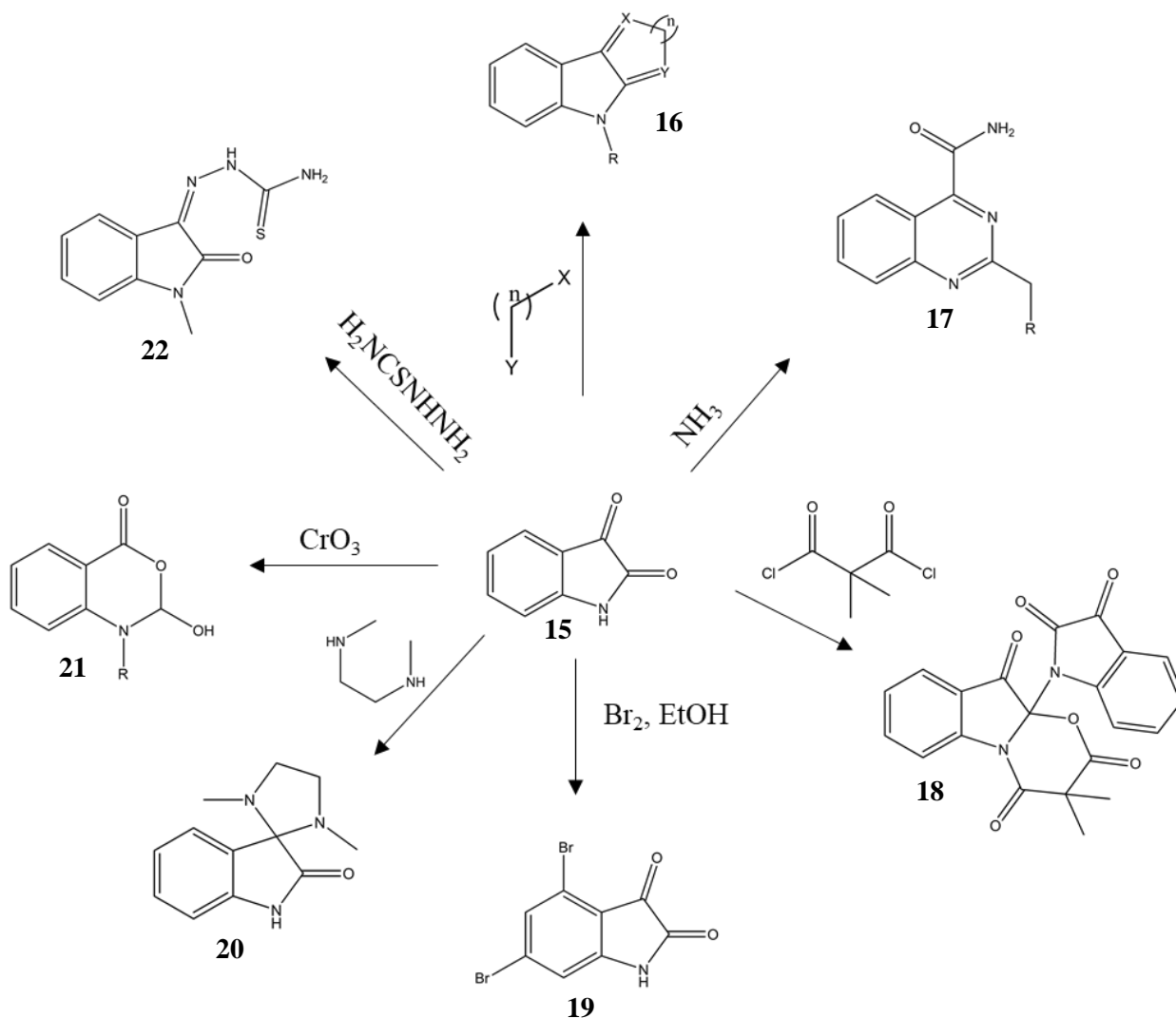
A revisão de Sumpter (1944) mostra que a isatina é sintetizada desde 1840, por Erdmann e Laurent, e desde então foram estudados diversos modos de obtenção dela e seus derivados. No Brasil, Pinto e colaboradores contribuíram para aprimorar a síntese da isatina, esclarecer seu mecanismo de reação e amplificar os seus derivados, sendo muitos inéditos (MARTINEZ & FERREIRA, 2017).

A isatina é bastante versátil e pode gerar uma gama de derivados, por participar de vários tipos diferentes de reações, tal como alquilação, arilação, acilação, sulfonação, substituição eletrofílica aromática, redução, oxidação, adição e substituição nucleofílica. Exemplos de algumas reações que podem ser feitas com a isatina estão dispostos no Esquema 1 (SILVA, GARDEN & PINTO, 2001).

Assim, muitos compostos derivados de isatina têm sido desenvolvidos em várias partes do mundo, inclusive empregando a hibridização molecular e gerando moléculas antitumorais (PARTHASARATHYHY et al., 2013; YU et al., 2016; ATTIA et al., 2017; FARES et al., 2015).

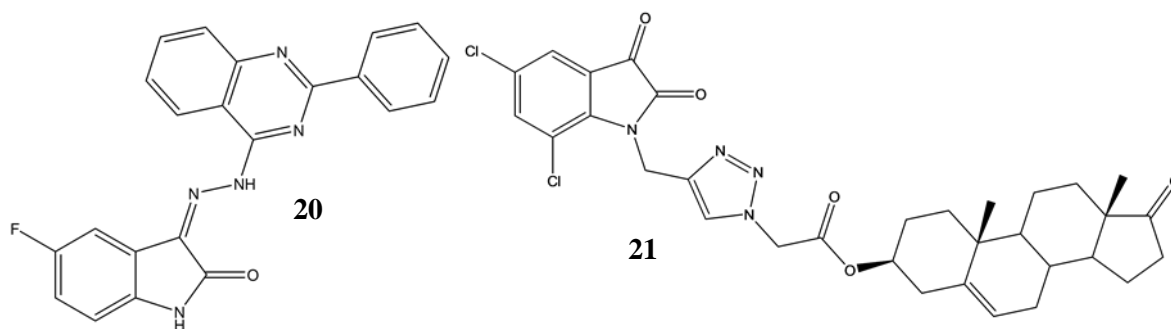
No trabalho de Fares e colaboradores (2015), por exemplo, foi empregada a técnica de hibridização molecular, gerando híbridos de isatina e quinolina que se mostraram ativos contra algumas linhagens de células tumorais (de câncer de mama, fígado e cólon). A molécula **20**, uma das mais ativas do trabalho, está representada na Figura 11. A molécula **21**, na mesma figura, foi projetada pelo grupo de pesquisa de Yu (2016) usando a isatina diclorada e DHEA (deidroepiandrosterona), juntamente com outros híbridos de DHEA com outros arcabouços estruturais. Porém, as melhores atividades antiproliferativas foram atribuídas àqueles com isatina.

**Esquema 1:** Algumas possibilidades de reações de formação de derivados de isatina.



Fonte: adaptado de Silva, Garden & Pinto (2001).

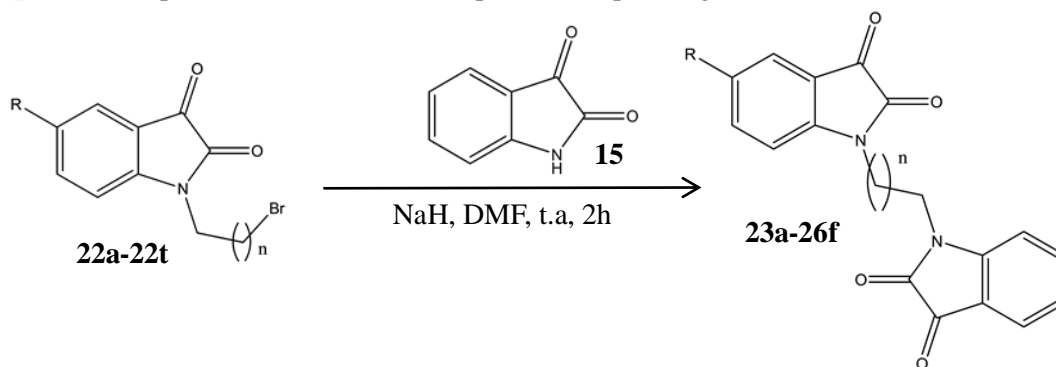
**Figura 11:** Heterodímeros de isatina com núcleo quinolina (20) e DHEA (21), que demonstraram atividade antitumoral.



Fonte: adaptado de Fares et al. (2015) e Yu et al. (2016)

Ainda na abordagem de dimerização molecular, Singh e colaboradores (2017) sintetizaram uma série de moléculas diméricas de isatina, variando o espaçador e os substituintes do anel aromático de um dos lados da molécula, formando homo e heterodímeros, mostrados no Esquema 2.

**Esquema 2:** esquema reacional e dímeros produzidos por Singh et al. (2017).



<b>23a:</b> R = H; n = 1	<b>24a:</b> R = Cl; n = 1	<b>25a:</b> R = F; n = 1	<b>26a:</b> R = Br; n = 1
<b>23b:</b> R = H; n = 2	<b>24b:</b> R = Cl; n = 2	<b>25b:</b> R = F; n = 2	<b>26b:</b> R = Br; n = 2
<b>23c:</b> R = H; n = 3	<b>24c:</b> R = Cl; n = 3	<b>25c:</b> R = F; n = 3	<b>26c:</b> R = Br; n = 3
<b>23d:</b> R = H; n = 4	<b>24d:</b> R = Cl; n = 4	<b>25d:</b> R = F; n = 4	<b>26d:</b> R = Br; n = 4
<b>23e:</b> R = H; n = 5	<b>24e:</b> R = Cl; n = 5	<b>25e:</b> R = F; n = 5	<b>26e:</b> R = Br; n = 5
<b>23f:</b> R = H; n = 7	<b>24f:</b> R = Cl; n = 7	<b>25f:</b> R = F; n = 7	<b>26f:</b> R = Br; n = 7

Fonte: adaptado de Singh et al. (2017)

Os compostos foram testados *in vitro* e mostraram atividade antiparasitária e fungistática, especialmente **26b**, um heterodímero de isatina substituída na posição 5 com bromo, cujo  $CI_{50}$  foi  $3,72 \mu M$  para *Tricomonas vaginalis*. Além disso, foi realizado um teste que mostrou que estas moléculas provavelmente não interferem na flora normal do intestino humano, algo importante para minimizar possíveis efeitos gastrintestinais. Apesar de terem mencionado que tais substâncias também apresentam potencial atividade anticâncer, os autores não realizaram experimentos para comprová-la. Tendo em vista estes dados, o presente trabalho incluiu o estudo de alguns destes dímeros via *docking* molecular, a fim de prever a tendência de atividade antitumoral delas.

## 4. ESTRATÉGIA

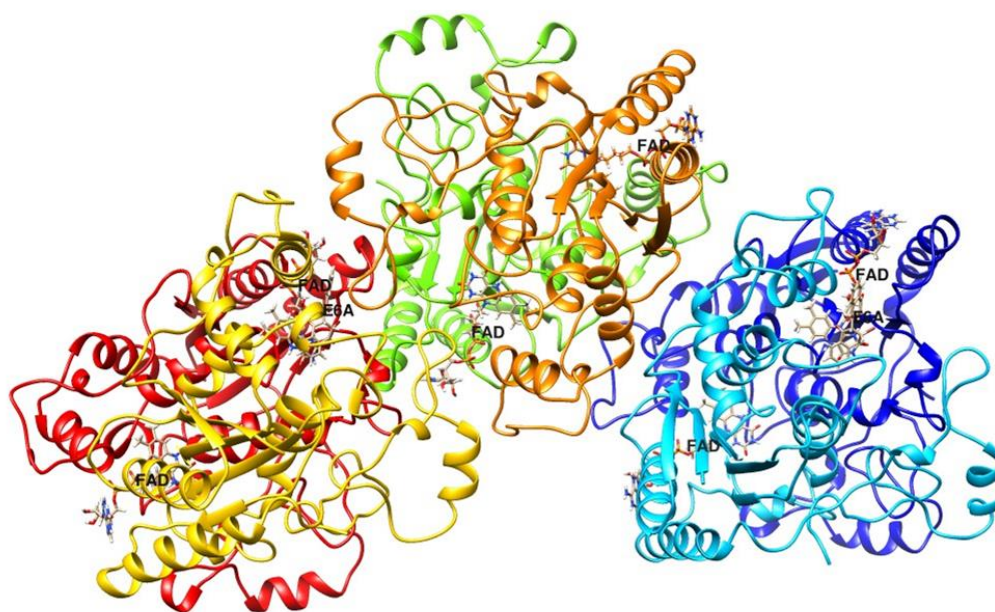
A estratégia deste trabalho consiste no planejamento de híbridos de lapachol e isatina, que passarão por uma triagem virtual através de docking molecular. Nesta triagem, será analisado o potencial teórico de afinidade delas pela proteína NQO1, alvo relacionado ao câncer, e assim selecionar as moléculas mais interessantes para ser sintetizadas posteriormente.

### 4.1 Estudo de *docking* molecular

Para a triagem virtual via *docking* molecular foi escolhido o programa Autodock 4 (MORRIS et al., 2009). As coordenadas da proteína quinona oxidoreductase (NQO1) foram adquiridas sob o código 5EAI (PIDUGU et al., 2016) no *Protein Data Bank*. Este arquivo de coordenadas de NQO1 foi o selecionado por apresentar como ligante uma naftoquinona dimérica, cuja estrutura é semelhante às estudadas no presente trabalho, possibilitando uma melhor comparação dos dados a ser coletados no estudo. Na Figura 12, é possível ver a representação desta proteína após as edições necessárias.

Os demais detalhes deste procedimento estão descritos na seção Experimental (7.1).

**Figura 12:** Proteína 5EAI editada, destacando as cadeias em cores diferentes, sendo a E em laranja.



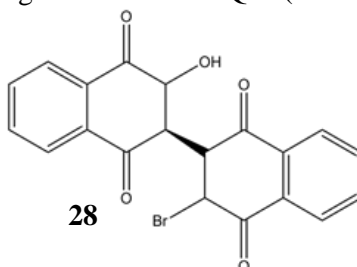
Fonte: figura gerada pela autora usando as coordenadas do arquivo pdb de NQO1, no programa Chimera.

#### 4.1.1 Redocking molecular

Para a validação do estudo, foi realizado o procedimento de *redocking*, em que o ligante nativo (E6A, **28**) é retirado e o programa calcula o *docking* desta mesma estrutura. Ao final do processo, o programa calcula o desvio das poses geradas em relação à original. Na Figura 13, está representada a estrutura de **28** e na Figura 14 pode ser vista representação da caixa de grade no sítio de ligação, cujos detalhes se encontram na seção Experimental.

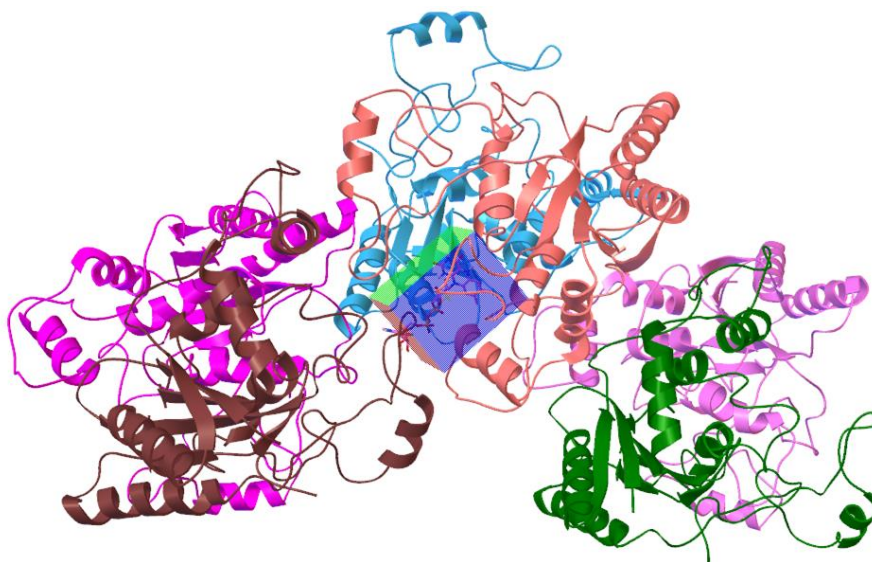
Quanto ao modo de cálculo, todos os modos (*short*, *medium* e *long*) foram testados no *redocking*, a fim de definir o mais conveniente para o sistema em estudo.

**Figura 13:** estrutura de E6A (**28**), ligante nativo de NQO1(cód. 5EAI).



Fonte: adaptado de Pidugu et al. (2016)

**Figura 14:** representação da caixa de grade utilizada, com as dimensões citadas.



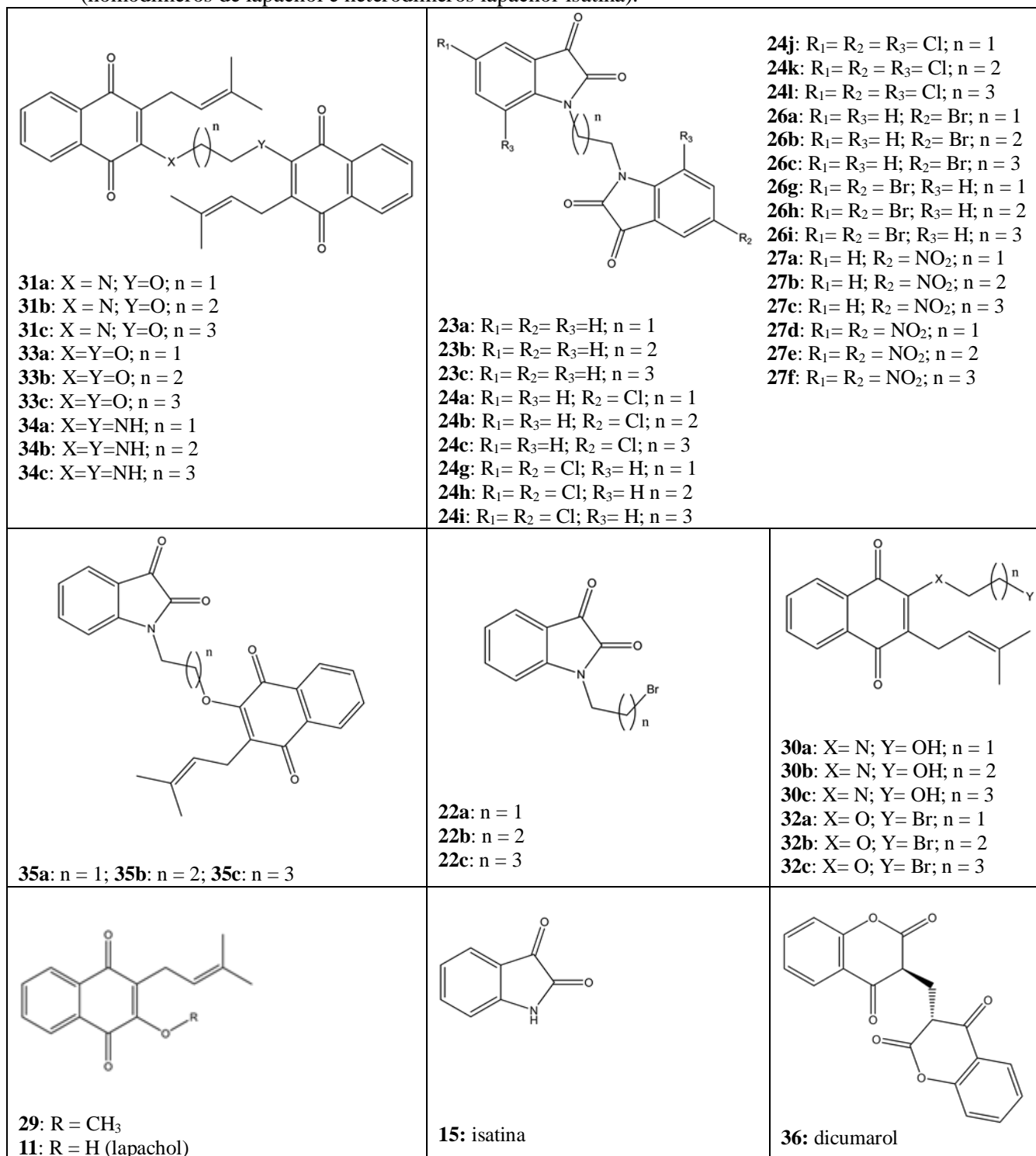
Fonte: figura gerada pela autora usando as coordenadas do arquivo pdb de NQO1, no programa AutodockTools

#### 4.1.2 Docking molecular da biblioteca de moléculas

Os mesmos parâmetros usados no estudo de *redocking* foram empregados no estudo das moléculas da biblioteca montada e seus intermediários de síntese, além do dicumarol (**36**), uma substância conhecida inibidora da NQO1 (NC-IUBMB, 2010). Tendo em vista os

resultados do *redocking*, foi escolhido o modo *short* de cálculo para o *docking* das moléculas a serem analisadas. Foram estudadas quarenta e nove (49) moléculas, incluindo dímeros e seus intermediários, sendo doze (12) dímeros inéditos (**31a-31c**, **33a-33c**, **34a-34c** e **35a-35b**), além de seus respectivos monômeros e o padrão dicumarol (**36**), mostrados na figura 15.

**Figura 15:** Representação das moléculas utilizadas neste estudo. Destas, 12 são inéditas (homodímeros de lapachol e heterodímeros lapachol-isatina).

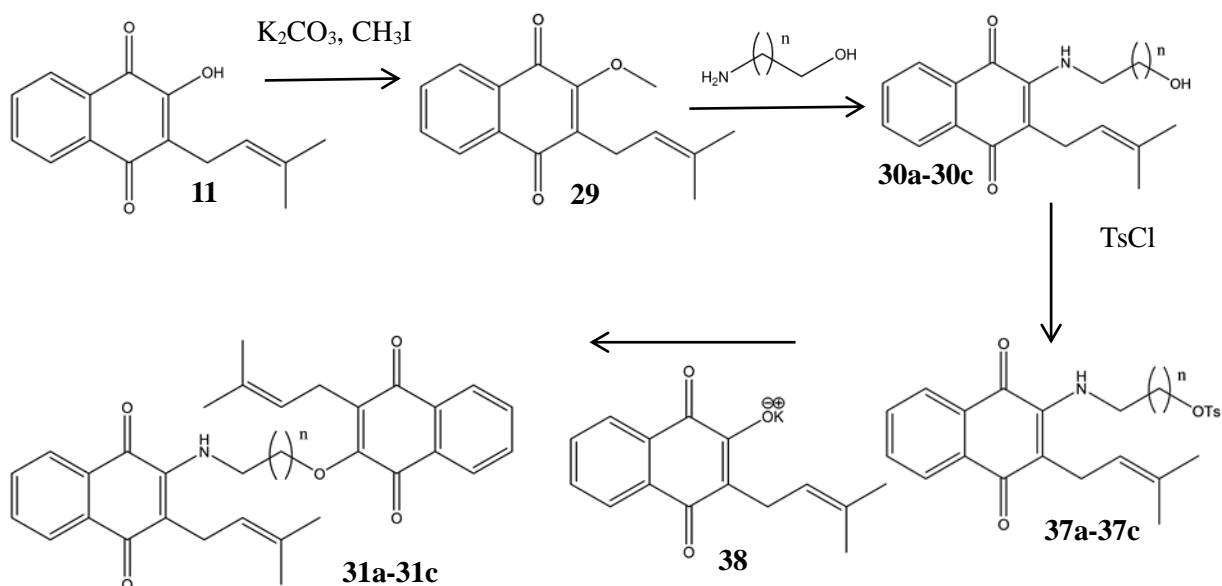


## 4.2 Rota sintética para preparação de homo e heterodímeros de lapachol

Para produzir os derivados de lapachol (**11**), esta substância será extraída a partir da serragem fina de *Tabebuia avellanedae*, fornecida pelo prof. Alexandre Góes (UFPE). Dois métodos serão empregados: um através de sistema de Soxhlet (e outro por extração ácido-básica, empregando o método de Barbosa e Diniz-Neto (2013)).

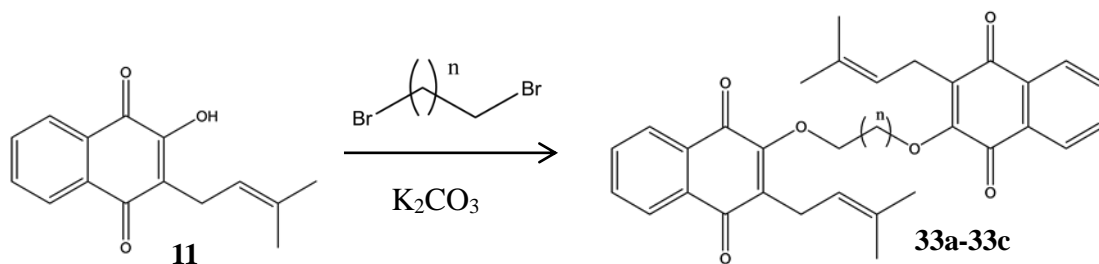
De acordo com o Esquema 3, o lapachol (**11**) será inicialmente metilado, adicionando iodeto de metila e carbonato de potássio anidro, gerando (**29**), empregando as condições descritas anteriormente por Eyong e colaboradores (2013). Em seguida, (**29**) será utilizado numa reação com o aminoálcool correspondente, para gerar os intermediários **30a-30c**, usando o método de Oliveira e colaboradores (2017). Na etapa seguinte, **30a-30c** serão submetidos a uma reação de tosilção, dependendo cloreto de tosil, a fim de gerar os intermediários **37a-37c**, com o método da mesma autora. Por fim, **37a-37c** reagiriam com lapachonato de potássio (**38**), gerado *in situ* após a adição de lapachol e  $K_2CO_3$ , produzindo os dímeros **31a-31c**.

**Esquema 3:** rota sintética idealizada para os homodímeros de lapachol **31a-31c**.



Para realizar a síntese dos homodímeros de lapachol **33a-33c**, o lapachol (**11**) formaria o sal potássico de lapachol (**38**) a partir da reação ácido-básica com  $K_2CO_3$ , permitindo a reação com o dibromoalcano correspondente e gerando os dímeros **33a-33c**, como é mostrado no Esquema 4.

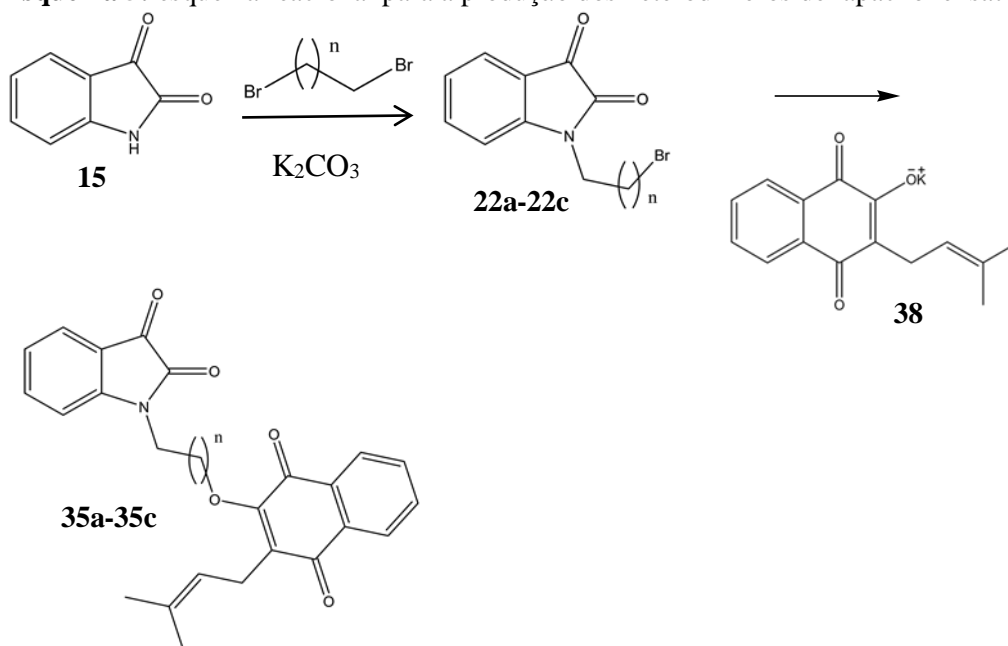
**Esquema 4:** rota sintética planejada para os homodímeros de lapachol **33a-33c**.



### 4.3 Rota sintética para obtenção dos homo e heterodímeros de isatina

Para produção dos heterodímeros **35a-35c**, mostrada no Esquema 5, a isatina (**15**) reagiria com o dibromoalcano correspondente para gerar **22a-22c**. Em seguida, **22a-22c** reagiria com o lapachonato de potássio (**38**) para formar **35a-35c**.

**Esquema 5:** esquema reacional para a produção dos heterodímeros de lapachol e isatina **35a-35c**.

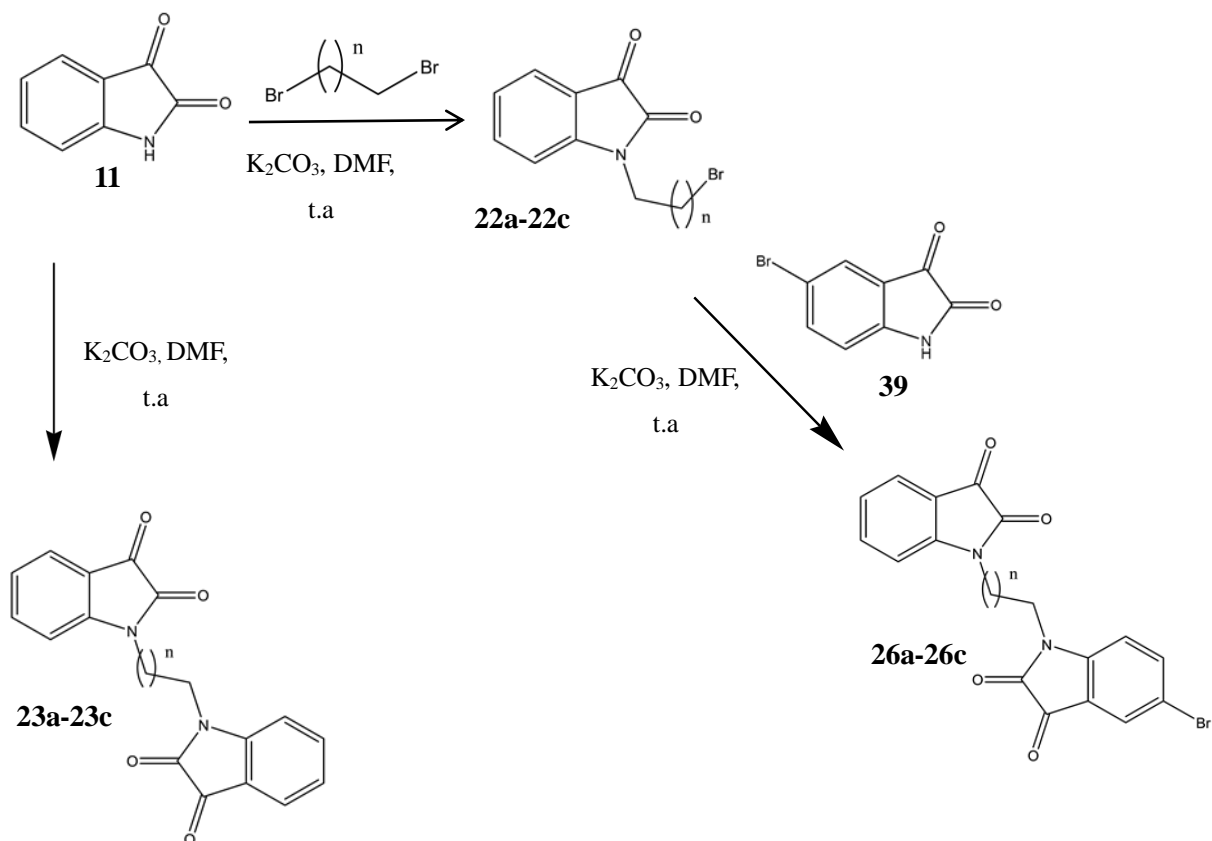


Tendo em vista a ampliação da série de moléculas sintetizadas, foi planejada a síntese dos homodímeros de isatina **23a-23c** e dos heterodímeros de isatina **26a-26c**, mostrada no Esquema 6. A fim de produzir os homodímeros **23a-23c**, a isatina (**11**) reagiria com o dibromoalcano correspondente em meio com  $K_2CO_3$  e DMF, em temperatura ambiente.

Na produção dos intermediários **22a-22c**, as mesmas condições de síntese de **23a-23c** seriam empregadas, partindo também de isatina (**11**) e os dibromoalcanos correspondentes, mas com a adequação da estequiometria.

Para sintetizar os heterodímeros **26-26c**, os intermediários **22a-22c** reagiriam com a isatina bromada (**39**) em meio reacional com DMF e  $K_2CO_3$ , usando temperatura ambiente.

**Esquema 6:** rota sintética idealizada para os homo e heterodímeros de isatina **23a-23c** e **26a-26c**, respectivamente.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo de *docking* molecular da biblioteca de compostos

#### 5.1.1 *Redocking* molecular

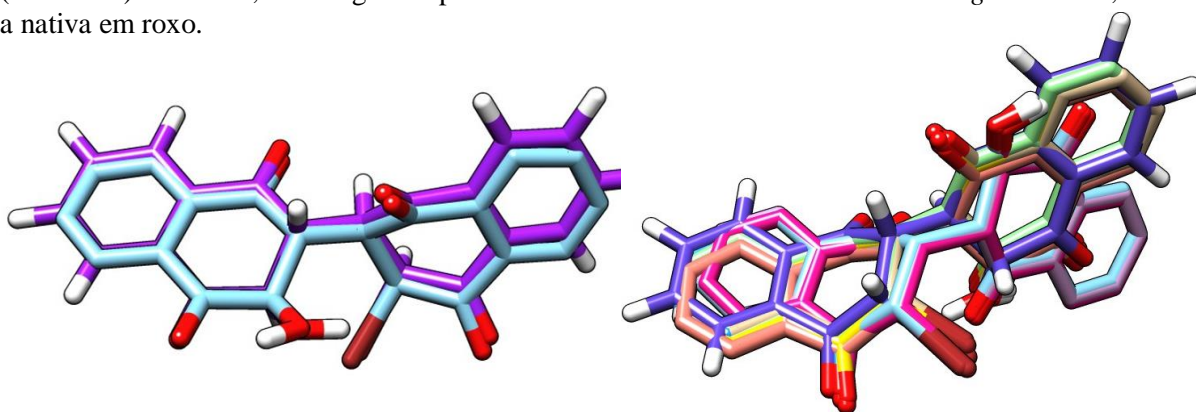
No estudo de *redocking*, todos os modos de cálculo levaram à validação da metodologia, pois o RMS obtido foi 0,5 para os três modos, como visto na Tabela 1. Como valores abaixo de 2,0 são considerados válidos, o sistema foi validado com sucesso, e o modo *short* foi escolhido por ser o mais veloz entre os demais. Na figura 16, é possível ver que, de fato, a pose de maior *score* em que o programa posicionou o ligante é praticamente idêntica à do ligante nativo. Em adição, as 10 conformações geradas durante o cálculo de *redocking* foram semelhantes, como visto na mesma figura, o que se configura como mais um fator de confirmação da validação da metodologia. Ambas as imagens foram feitas com os arquivos gerados no modo *short*.

Segundo o artigo de Pidugu e colaboradores (2016), a principal interação para o *docking* do ligante nativo são as interações de  $\pi$ -stacking com o FAD (flavina adenina dinucleotídeo), somada à algumas interações lipofílicas e algumas ligações de hidrogênio, como observado nas Figuras 17 e 18.

**Tabela 1:** resultados dos *redocking* nos modos *short*, *medium* e *long*.

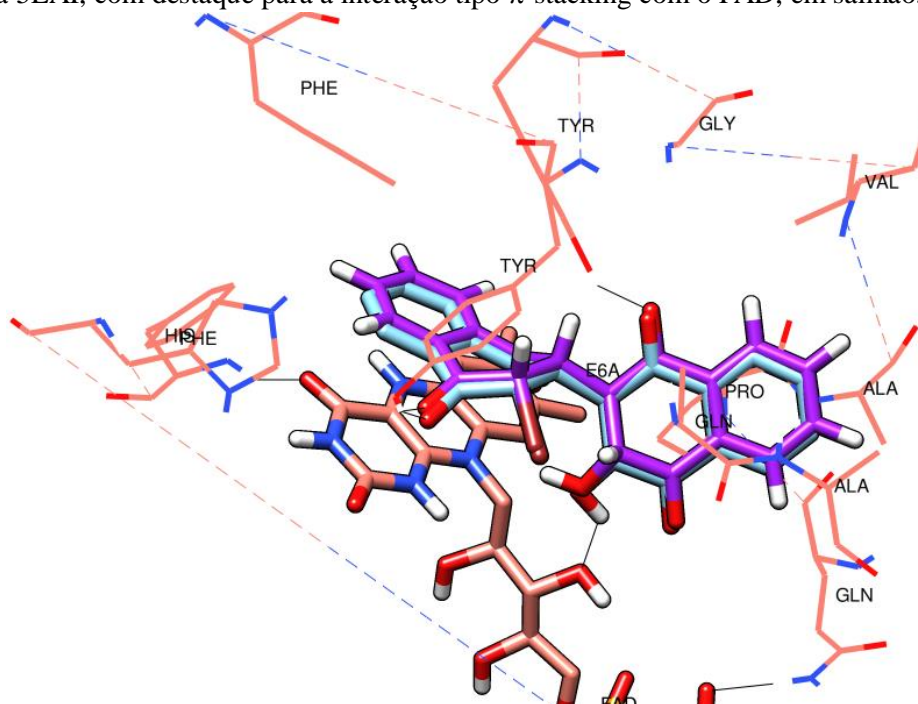
Modo	RMS	Energia de ligação (kcal/mol)	KI (nM)	Nº de clusteres
<i>Short</i>	0,51	-11,65	2,9	2
<i>Medium</i>	0,5	-11,62	3,05	1
<i>Long</i>	0,5	-11,61	3,07	1

**Figura 16:** à esquerda, sobreposição do ligante nativo E6A (**28**), em roxo, e do mesmo após *redocking* (azul claro). À direita, cluster gerado pelo Autodock4 durante o estudo de *redocking* molecular, sendo a nativa em roxo.



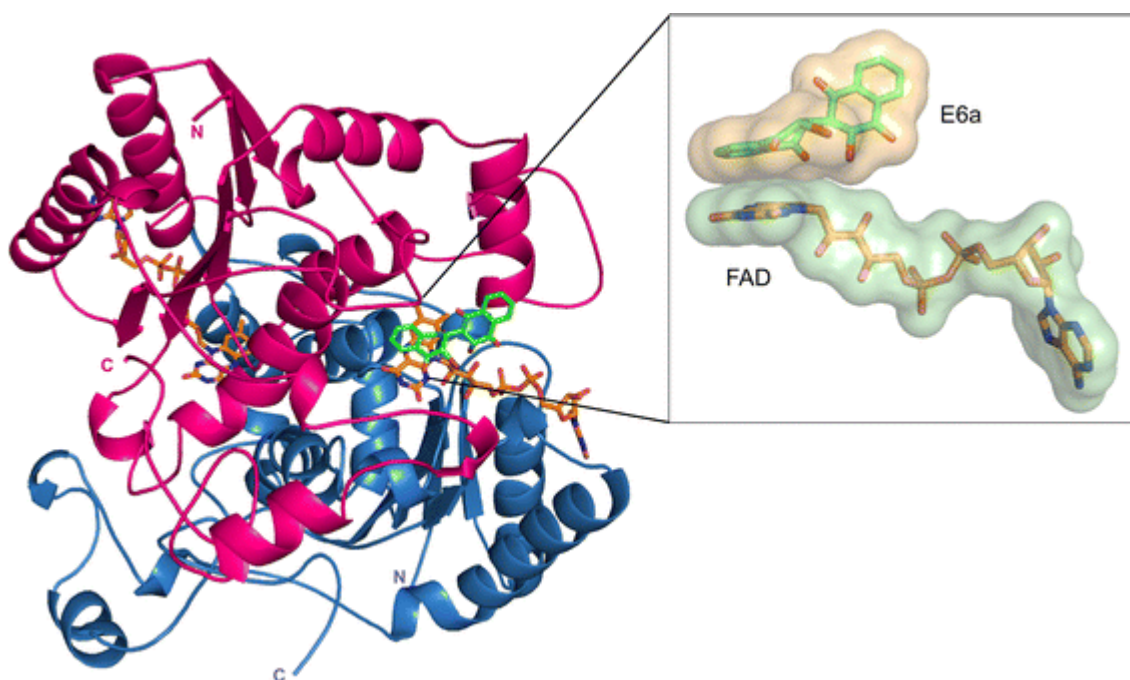
Fonte: figuras geradas pela autora no programa Chimera, utilizando as coordenadas dos arquivos pdb fornecidos após os cálculos de *redocking*.

**Figura 17:** sobreposição do ligante nativo (E6A, em roxo) e reacoplado, em azul, e interações com a proteína 5EAI, com destaque para a interação tipo  $\pi$ -stacking com o FAD, em salmão.



Fonte: figura produzida pela autora no Chimera, usando as coordenadas dos arquivos pdb fornecidos após os cálculos de *redocking*, além do sítio de interação de NQO1 mostrado pelo Autodock.

**Figura 18:** figura retirada do trabalho de Pidugu e colaboradores (2016), destacando o posicionamento e interação  $\pi$ -stacking da naftoquinona dimérica E6A em relação ao FAD.



Fonte: Pidugu e colaboradores (2016)

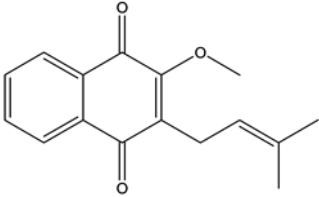
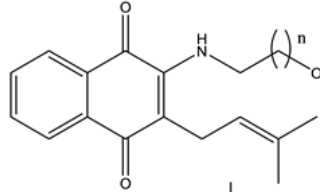
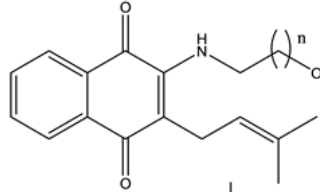
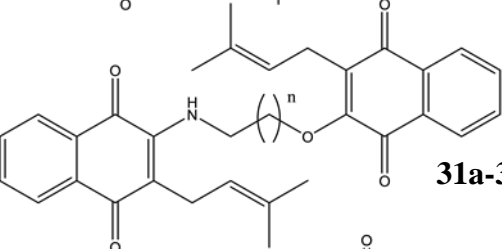
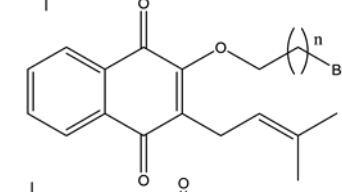
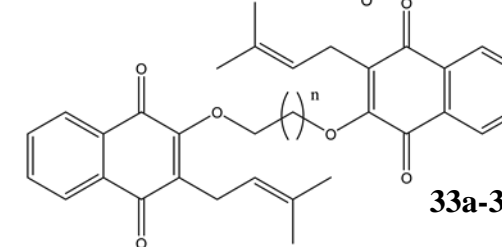
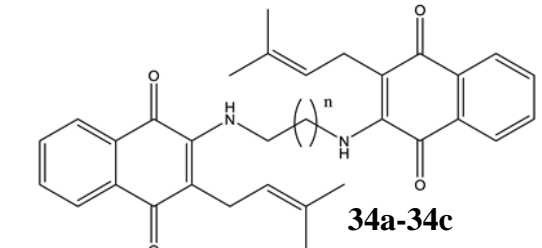
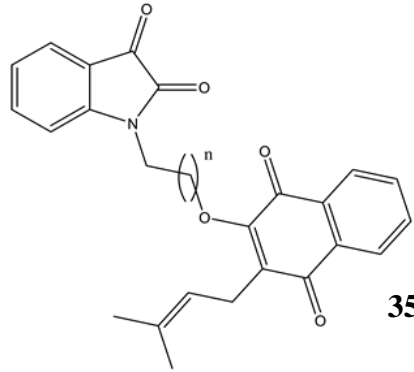
### 5.1.2 Estudo de *docking* molecular das moléculas da biblioteca construída

Um dos fatores que permite a comparação das moléculas estudadas com o ligante da proteína escolhida é o fato de que este ligante, o E6A (**28**), é uma naftoquinona dimérica cuja estrutura guarda semelhança às propostas neste trabalho, principalmente com os derivados de lapachol, igualmente uma naftoquinona. Ademais, todas são dímeros e apresentam planaridade em parte delas, além de duas carbonilas, espaçadas por dois carbonos (para as naftoquinonas) ou adjacentes uma à outra (no caso dos derivados de isatina). Uma diferença proeminente é que os derivados de isatina possuem um nitrogênio em sua estrutura, o que possibilitou algumas interações moleculares adicionais com a proteína-alvo. Além disso, as moléculas propostas no estudo também guardam semelhança com o dicumarol (**36**), sabidamente inibidor da proteína NQO1.

Nas Tabelas 2 e 3, estão explicitadas as energias de ligação (EL) e constantes de inibição (KI) calculados pelo programa para cada molécula. A partir desses dados, e da análise das interações moleculares, é possível inferir que os dímeros testados apresentam, em geral, a mesma tendência de *docking* à proteína NQO1. Destacaram-se os dímeros de lapachol **31a**, **31b** e **34a**, além do híbrido lapachol-isatina **35a**, com energias de ligação menores que  $-11,00 \text{ kcal mol}^{-1}$ , semelhante ao ligante nativo **28**.

Na Figura 19 é possível visualizar o posicionamento de **31a** e E6A (**28**) em relação ao FAD e aos demais aminoácidos do sítio de interação. Da mesma forma, nas Figuras 20 e 21 é possível observar o posicionamento e as interações de **31b** e **35a**, respectivamente. A afinidade dos demais dímeros (**23a-23c**, **24a-24c**, **24g-24i**, **26a-26c**, **26g-26i**, **27a-27e**, **31c**, **33a**, **33c**, **34c** e **35b-35c**) com o alvo é aparentemente menor (EL na faixa de  $-10$  a  $-9 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), em comparação com o ligante nativo E6A ( $-11,65 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Porém, comparando com o dicumarol (EL =  $-9,58 \text{ kcal mol}^{-1}$ ), é praticamente a mesma, mostrando que estas moléculas são potencialmente ativas considerando o alvo escolhido.

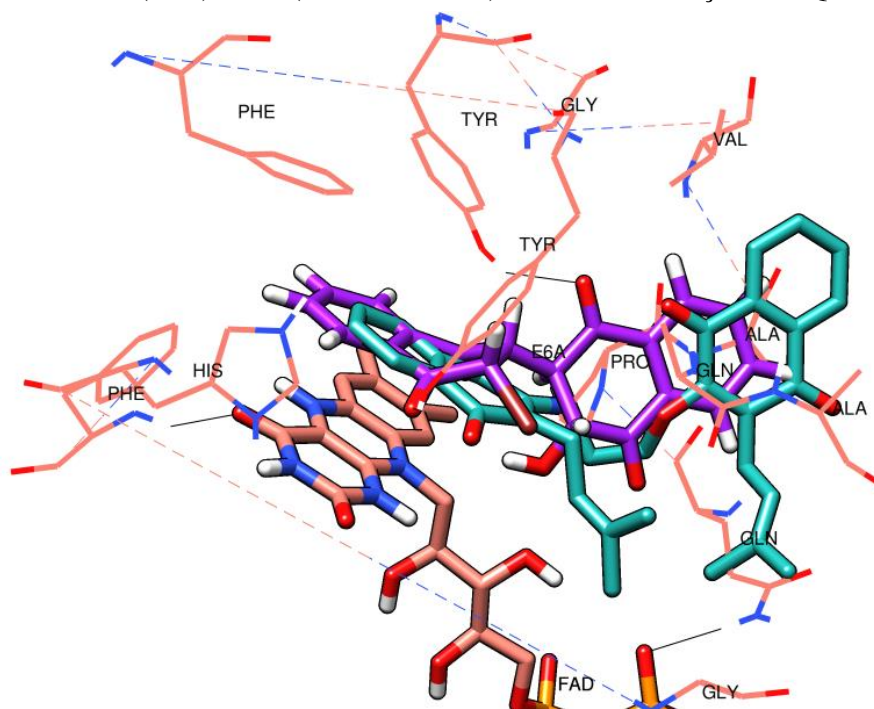
**Tabela 2:** resultados dos *dockings* com os dímeros de lapachol propostos e seus respectivos monômeros, em destaque, em comparação com o ligante nativo (E6A).

Molécula	EL (kcal mol <sup>-1</sup> )	KI	
<b>E6A (28)</b>	-11,65	2,9 nM	
<i>Dicumarol 36</i>	-9,58	94,67 nM	<b>29</b>
<i>Lapachol 11</i>	-8,58	514,98 nM	
<b>29</b>	-9,24	169,05 nM	<b>30a-30c</b>
<b>30a</b>	-8,67	422,12 nM	
<b>30b</b>	-8,25	901,36 nM	
<b>30c</b>	-8,56	528,16 nM	
<b>31a</b>	-11,47	3,92 nM	
<b>31b</b>	-12,86	374,16 pM	<b>31a-31c</b>
<b>31c</b>	-9,36	137,1 nM	
<b>32a</b>	-9,0	251,19 nM	
<b>32b</b>	-9,46	116,36 nM	<b>32a-32c</b>
<b>32c</b>	-9,92	53,57 nM	
<b>33a</b>	-9,69	78,25 nM	
<b>33b</b>	-8,78	364,0 nM	
<b>33c</b>	-9,59	93,55 nM	<b>33a-33c</b>
<b>34a</b>	-11,07	7,66 nM	
<b>34b</b>	-8,77	369,94 nM	
<b>34c</b>	9,40	128,34 nM	
<b>35a</b>	-11,6	3,26 nM	
<b>35b</b>	-10,53	19,19 nM	<b>34a-34c</b>
<b>35c</b>	-10,81	11,94 nM	
			

**Tabela 3:** resultados dos *dockings* com os dímeros de isatina propostos e seus respectivos monômeros, em destaque, em comparação com o ligante nativo (E6A).

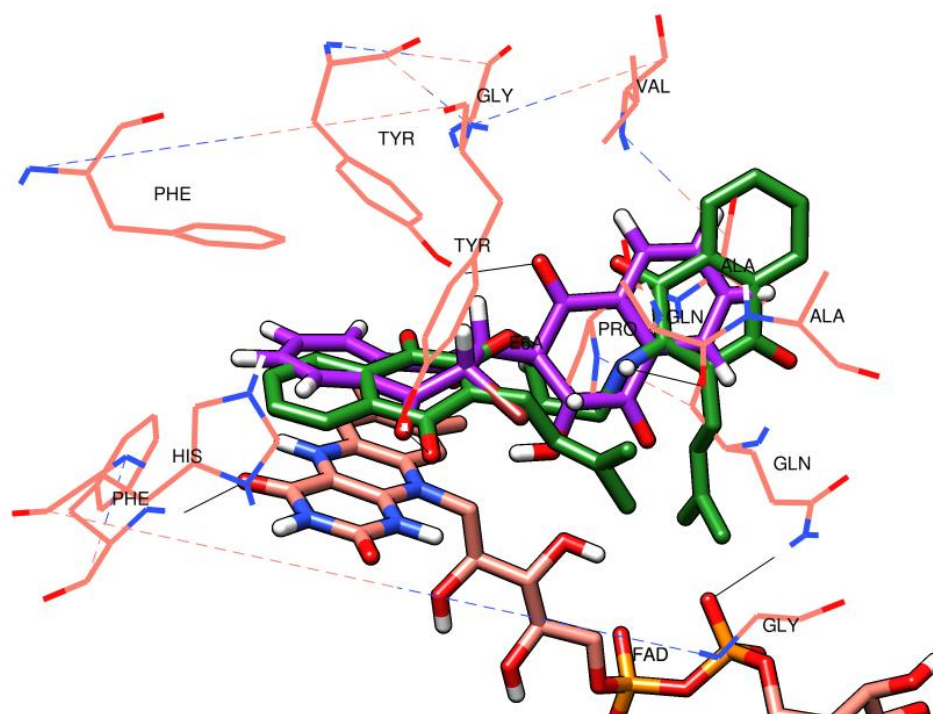
Molécula	EL (kcal mol <sup>-1</sup> )	KI		
<i>Isatina</i> <b>15</b>	-6,24	26,81 uM		
<b>22a</b>	-7,37	3,93 uM		
<b>22b</b>	-7,53	3,02 uM		
<b>22c</b>	-7,55	2,92 uM		
<b>23a</b>	-9,54	108,48 nM		
<b>23b</b>	-9,94	51,54 nM		
<b>23c</b>	-10,11	36,68 nM		
<b>24a</b>	-9,89	56,3 nM		
<b>24b</b>	-9,98	48,49 nM		
<b>24c</b>	-9,88	57,05 nM		
<b>24g</b>	-10,24	31,31 nM		
<b>24h</b>	-9,95	50,65 nM		
<b>24i</b>	-9,75	71,64 nM		
<b>24j</b>	-10,41	23,38 nM		
<b>24k</b>	-10,14	36,76 nM		
<b>24l</b>	-9,77	69,5 nM		
<b>26a</b>	-10,24	31,13 nM		
<b>26b</b>	-9,88	57,43 nM		
<b>26c</b>	-9,89	56,23 nM		
<b>26g</b>	-10,49	20,42 nM		
<b>26h</b>	-10,5	20,08 nM		
<b>26i</b>	-9,73	73,74 nM		
<b>27a</b>	-9,45	118,35 nM		
<b>27b</b>	-9,17	188,98 nM		
<b>27c</b>	-9,63	86,81 nM		
<b>27d</b>	-9,01	248,87 nM		
<b>27e</b>	-9,84	61,08 nM		
<b>27f</b>	-8,61	490,19 nM		

**Figura 19:** Pose de E6A (roxo) e **31a** (azul esverdeado) no sítio de interação de NQO1 (5EAI).



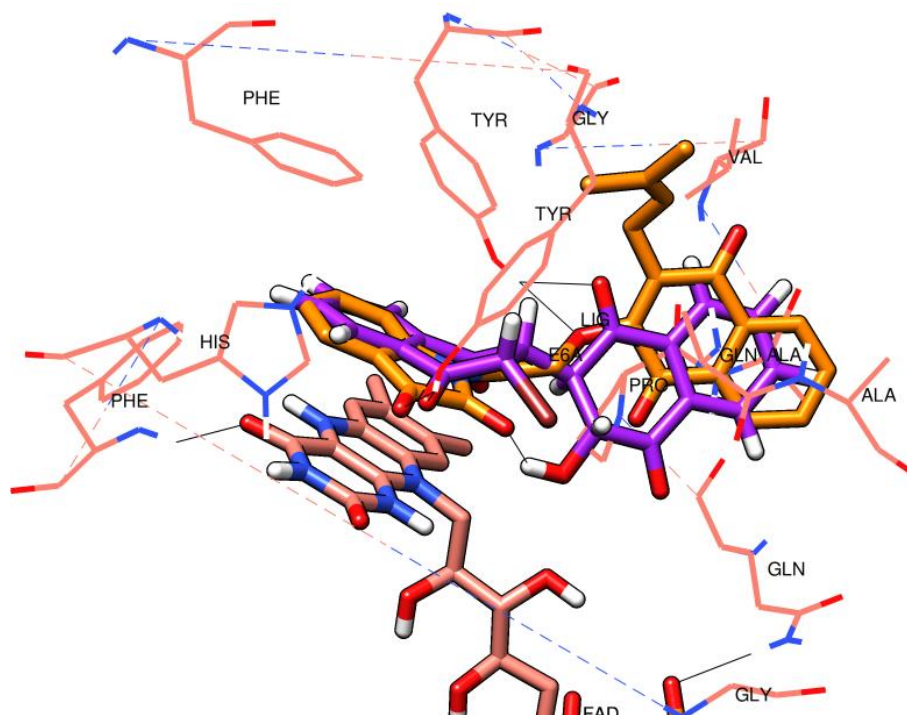
Fonte: figura produzida pela autora no Chimera, usando as coordenadas dos arquivos pdb fornecidos após os cálculos de *docking*, além do sítio de interação de NQO1 mostrado pelo Autodock.

**Figura 20:** Pose de E6A (roxo) e **31b** (verde) no sítio de interação de NQO1 (5EAI).



Fonte: figura produzida pela autora no Chimera, usando as coordenadas dos arquivos pdb fornecidos após os cálculos de *docking*, além do sítio de interação de NQO1 mostrado pelo Autodock.

**Figura 21:** Pose de E6A (roxo) e **35a** (laranja) no sítio de interação de NQO1 (5EAI).



Fonte: figura produzida pela autora no Chimera, usando as coordenadas dos arquivos pdb fornecidos após os cálculos de *docking*, além do sítio de interação de NQO1 mostrado pelo Autodock.

Outro dado interessante é que os intermediários **22a-22c**, bem como o monômero isatina (**45**), apresentaram energias de ligação na faixa de  $-7,55$  a  $-6,24$  kcal mol<sup>-1</sup>, mais altas que as dos seus respectivos dímeros **23a-23c**, **24a-24c**, **24g-24i**, **26a-26c**, **26g-26i**, **27a-27f** e **35a-35c** ( $-11,6$  a  $-8,61$  kcal mol<sup>-1</sup>). Do mesmo modo, os intermediários **30a-30c** e o próprio lapachol isolado (**11**) também mostraram EL maiores ( $-8,67$  a  $-8,25$  kcal mol<sup>-1</sup>) que os dímeros correspondentes **31a-31c** ( $-12,86$  a  $-9,36$  kcal mol<sup>-1</sup>). Isso mostra que a dimerização realmente favoreceu o *docking* com a proteína-alvo, em comparação com os monômeros.

A exceção é o grupo de intermediários **32a-32c**, que se mostraram potencialmente ativos tal qual seus dímeros correspondentes **33a-33c**. Similarmente, o lapachol metilado (**29**) apresentou um valor de energia de ligação próximo ao do dicumarol ( $-9,29$  kcal mol<sup>-1</sup>) e, portanto, estes também devem ser testados após a síntese.

Comparando os grupos de dímeros entre si, é perceptível uma mesma tendência de *docking*, com exceção do homodímero de isatina com 4 carbonos no espaçador e substituída com grupo nitro (**27f**), e dos homodímeros de lapachol com 3 carbonos no espaçador **33b** e **34b**, cujas energias de ligação foram maiores que  $-9$  kcal mol<sup>-1</sup>. Todos os demais dímeros ficaram abaixo dessa faixa, similarmente ao dicumarol (**36**), não apresentando grandes diferenças entre as energias de ligação e interações intermoleculares.

Considerando os resultados de *docking* para a biblioteca de moléculas estudadas neste trabalho, praticamente quaisquer grupos de dímeros poderiam ser escolhidos para serem sintetizados e bioavaliados, com uma preferência clara por **31a-31c** e **35a-35c**, seguido aos demais. Por isso, nos estudos sintéticos foi dada prioridade aos compostos que atenderam aos critérios de afinidade demonstrado pelo *docking* aliado à sua exequibilidade experimental, como os compostos **31a-31c** e **35a-35c**. Apesar disso, outros dímeros também foram escolhidos para serem produzidos, observando também a viabilidade sintética de execução.

## **5.2 Síntese de homo e heterodímeros de lapachol**

As primeiras moléculas produzidas foram as derivadas de lapachol e a extração desta substância foi necessária, seguida pelas reações posteriores de modificação da molécula, até a obtenção dos dímeros planejados.

### **5.2.1 Extração de lapachol**

A extração por Soxhlet apresentou rendimento médio de 6,26% (m/m). O solvente da extração (isopropanol) foi recuperado durante a concentração do extrato em rotaevaporador, na proporção máxima de 68,33%, para reutilização nas extrações subsequentes. Levando em consideração a preservação do meio ambiente e os critérios de sustentabilidade da química verde, o reaproveitamento de recursos desta natureza é de grande valia. Na etapa de purificação, foi conseguido um rendimento médio de 0,8% de lapachol, obtido como um sólido amarelo, coerentemente ao relatado na literatura (VIANA et al., 2003). A mistura de acetato de etila e hexano usada nas colunas cromatográficas também foi recolhida em rotaevaporador, para recuperação através de destilação. De modo geral, o rendimento de substâncias extraídas a partir de fontes naturais é baixo, por conta disso o rendimento aqui descrito pode ser considerado satisfatório (XIAU et al., 2013).

Na extração ácido-base a partir do material vegetal, foi obtido um extrato bruto com 2,4g, correspondente a um rendimento de 1,20% (m/m). A purificação cromatográfica deste extrato mostrou-se bastante trabalhosa devido à presença de outras substâncias de polaridade semelhante ao lapachol presentes no extrato obtido. Em função disso, em nossas mãos, o rendimento obtido de lapachol isolado foi 0,14% (m/m), valor este abaixo do esperado para o protocolo empregado (Barbosa & Neto, 2013).

Desta forma, a extração com Soxhlet demonstrou maior eficiência e custo-benefício, pois seu rendimento foi cinco vezes mais alto, possibilitando a obtenção de maior quantidade de lapachol puro.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  registrados do lapachol podem ser vistos nos anexos, vide Espectros 3 e 4 (página 69), e confirmam a obtenção desta substância pura. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 3), os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos 3 e 6 aparecem como dubletos distorcidos em 8,10 e 8,05 ppm. Já os hidrogênios também aromáticos 1 e 2 aparecem como tripletos distorcidos em 7,74 e 7,67 ppm, como esperado para este tipo de hidrogênio. O hidrogênio da hidroxila também aparece no espectro, como um singlete em 7,32 ppm. O triplete em 5,20 ppm refere-se ao hidrogênio 15, da cadeia lateral do lapachol, e o duplete em 3,3 ppm corresponde aos hidrogênios 14 e 14'. Por fim, os dois singletos correspondentes a 3 hidrogênios cada um, com deslocamento em 1,79 e 1,68 ppm, são referentes aos hidrogênios das duas metilas, 17 e 18.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  tipo APT (Espectro 4), os dois carbonos carbonílicos 10 e 7 são os sinais mais desblindados, em 184,87 e 181,80 ppm. Em seguida aparecem os carbonos quaternários 9, em 152,58 ppm, e 8, 5, 4 e 16, entre 134,21 e 123,61 ppm, com sinais para cima. Na mesma faixa, com sinais para baixo, aparecem os carbonos CH aromáticos 6, 3, 1 e 2. O C15, também CH, aparece para baixo em 119,97 ppm. Os sinais menos desprotegidos, para baixo, estão em 25,37 e 18,09 ppm e se referem aos  $\text{CH}_3$  17 e 18, e o que está para cima corresponde ao  $\text{CH}_2$  14, com deslocamento de 22,86 ppm.

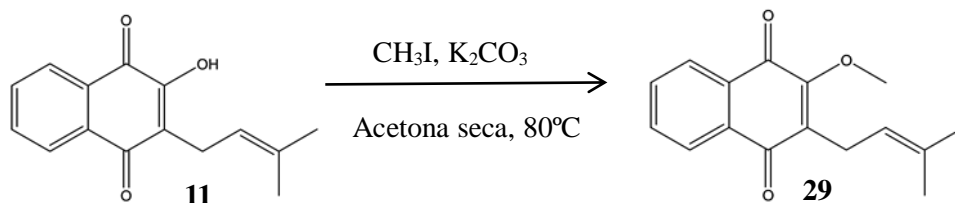
### 5.2.2 Síntese do intermediário 29 para obtenção final de 31a-31c

Tendo obtido o lapachol puro, foram realizadas reações de metilação dele (Esquema 7), obtendo **29**, com rendimento máximo de 67%, coerente com o encontrado na literatura (EYONG et al., 2013). O tempo de reação foi otimizado via micro-ondas a 80 °C e a reação ocorreu em apenas 10 minutos, em contraste às 3h de reação usando aquecimento em banho de óleo. Na formação deste produto, foi observada mudança de coloração do meio reacional de roxo para amarelado ou amarronzado, e foi gerado um sólido amarelo após a purificação.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  de **29** estão expostos nos Espectros 5 e 6 (página 70), e neles podem ser vistos sinais muito semelhantes aos do lapachol, diferenciando-se principalmente pela ausência do sinal referente à hidroxila e aparecimento de um sinal relativo à metila adicionada, em 4,11 ppm no RMN  $^1\text{H}$ . No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , por sua vez, aparece

um sinal a mais em relação ao lapachol, totalizando 16 sinais, com a metila a mais aparecendo em 61,49 ppm. Assim, foi confirmada a obtenção deste produto.

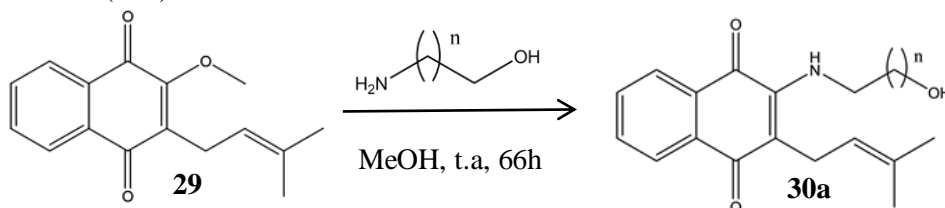
**Esquema 7:** reação de lapachol (**11**) para formar 2-metóxi-lapachol (**29**).



### 5.2.3 Síntese do intermediário **30a** a partir de **29**

Após a metilação, a etapa seguinte foi a inserção do espaçador no intermediário **29**, formando **30a** (Esquema 8). A síntese de **30a** ( $n=1$ ) levou a um líquido viscoso vermelho, com rendimento quantitativo após 66h de reação em temperatura ambiente. Apesar de o tempo de reação ter sido maior em relação ao observado por Oliveira e colaboradores (2017), que foi 24h, o rendimento também foi melhor, pois os autores obtiveram pouco menos de 90% de rendimento. A polaridade do produto mostrou-se menor que a de **29**, e os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  comprovaram a obtenção dele, conforme mostrado nos Espectros 7 e 8, respectivamente (página 71).

**Esquema 8:** reação de lapachol metilado (**29**) para formação de **30a**, usando o aminoálcool correspondente ( $n=1$ ).



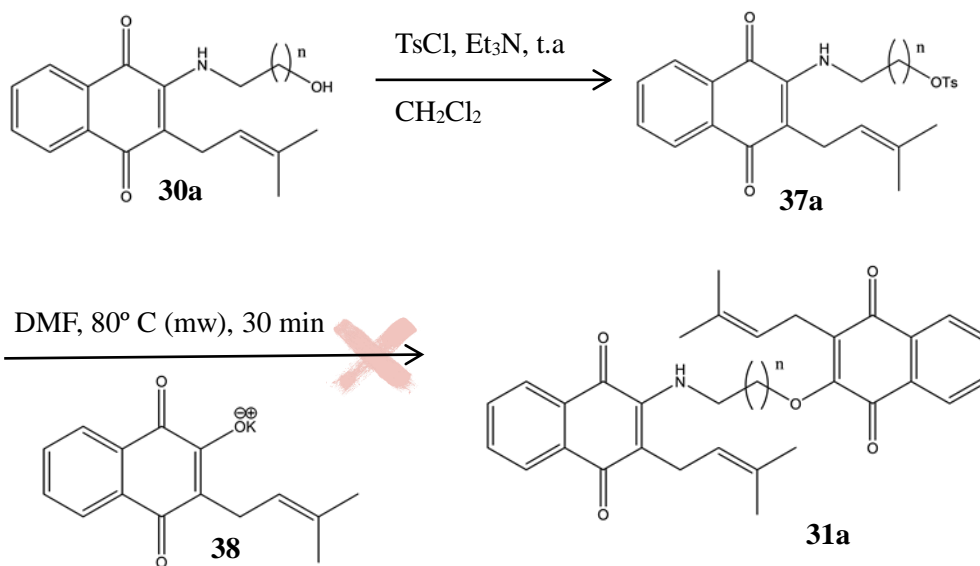
Os espectros obtidos foram semelhantes aos descritos por Oliveira e colaboradores (2017), apresentando todos os sinais referentes aos átomos inseridos depois desta reação: o multipletto referente a 2H em 3,70 ppm e o tripleto correspondente a 2H em 3,84 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , por exemplo, correspondem aos hidrogênios 16 e 17, respectivamente. No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , os carbonos 16 e 17 aparecem em 46,92 e 61,48 ppm, respectivamente.

### 5.2.4 Formação do dímero 31a a partir da tosilatação de 30a

Após a obtenção de **30a**, foram testados meios para trocar o grupo hidroxila por um bom grupo abandonador e gerar em seguida o dímero **31a**. O primeiro teste envolveu a inserção do grupo tosil, usando o cloreto de tosil sob atmosfera inerte de argônio, a fim de produzir **37a** (Esquema 9). A reação transcorreu a temperatura ambiente ao longo de 9h30min e o produto obtido apresentou polaridade menor em relação ao reagente na análise por placa de CCDA (cromatografia em camada delgada analítica).

Logo em seguida à purificação cromatográfica, o sólido laranja isolado foi misturado ao sal potássico de lapachol usando DMF como solvente. Mesmo após 30 minutos de reação sob irradiação em micro-ondas, a 80°C, o produto de interesse não foi detectado. Essa observação, até esse momento, tem sido creditada a provável degradação do tosilato naquelas condições. Desta forma, partimos para outra rota alternativa para a produção de **31a**, passando por outro intermediário sintético, discutido na próxima seção.

**Esquema 9:** reação de tosilatação de **30a** para formar **37a** (n=1) e finalmente **31a** (n=1).

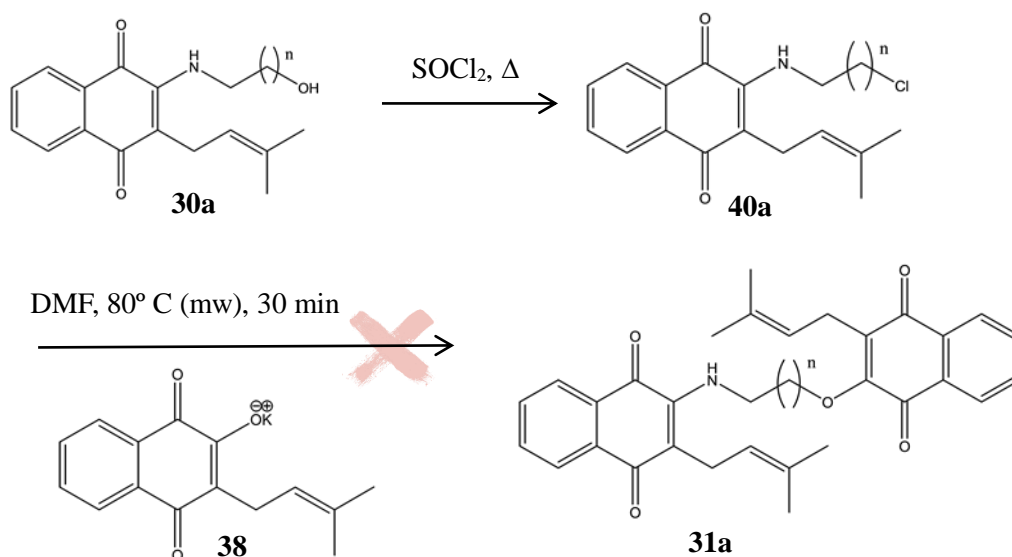


### 5.2.5 Síntese do dímero 31a a partir do derivado clorado de 30a

Tendo em vista o insucesso na produção de **31a** a partir de **37a**, foi usada como alternativa a cloração de **30a** (Esquema 10), já que o cloro é um bom grupo abandonador. O produto **40a** foi obtido com rendimento quantitativo como um sólido marrom após a extração, apresentando polaridade menor que o reagente **30a** sob avaliação em CCDA.

Na etapa subsequente, foi adicionado lapachonato de potássio, produzido *in situ* com  $K_2CO_3$  em DMF, e a reação foi aquecida por irradiação de micro-ondas a 80°C. Foi observado aparecimento de uma mancha na placa de CCDA de maior polaridade que **40a**, a qual foi creditada ao dímero **31a**. Após o isolamento, o produto apresentou-se como um sólido amarelo. Infelizmente, a análise dos espectros de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  obtidos após a purificação demonstrou que o material se tratava puramente de lapachol. Em função disto e por conta da exiguidade do tempo para contornar este problema, decidiu-se imprimir esforços na execução da síntese de outros dímeros de interesse.

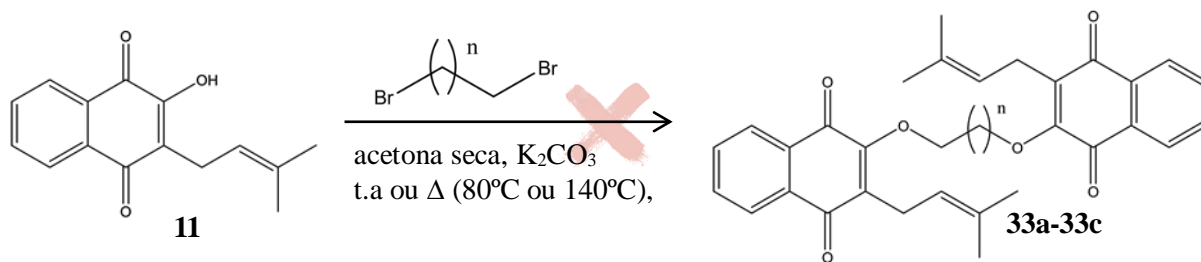
**Esquema 10:** reação de cloração de **30a** usando cloreto de tionila para gerar **40a** e posteriormente **31a**.



### 5.3 Síntese dos homodímeros de lapachol **33a-33c**

Para prosseguir na síntese de homodímeros de lapachol, testamos produzir **33a-33c** ( $n=1$  para **33a**,  $n=2$  para **33b** e  $n=3$  para **33c**) conforme o Esquema 11, com diversas condições reacionais diferentes, a saber: aquecimento em micro-ondas (80 e 140 °C), aquecimento em banho de óleo (80 °C) e a temperatura ambiente, além da adição de iodeto de potássio como agente de dimerização. Em todas as reações, o aquecimento convencional e em micro-ondas não foram capazes de gerar produtos passíveis de purificação, formando uma mistura complexa de difícil purificação.

**Esquema 11:** esquema reacional montado para obtenção dos homodímeros de lapachol **33a-33c** (n=1, 2 ou 3, respectivamente).

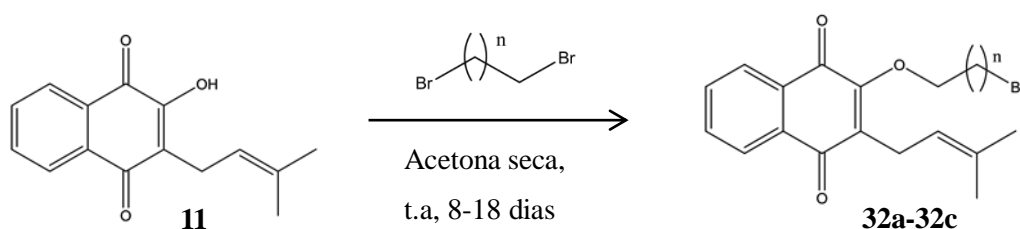


Quando a reação para geração de **33a** (n=1) foi deixada sob temperatura ambiente, com adição de iodeto de potássio, foram obtidos produtos mais polares que o lapachol, que também não puderam ser isolados. No caso do aquecimento em refluxo com adição de iodeto de potássio, testado também para **33a**, houve formação de produtos que puderam ser isolados. Entretanto, a molécula isolada não correspondeu nem ao dímero nem ao lapachol alquilado, pois o sinal de dois hidrogênios estava ausente no espectro de RMN  $^1\text{H}$  e o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  também não condizia com elas.

Nos testes a temperatura ambiente sem iodeto de potássio foram obtidos produtos mais apolares que o lapachol após 18, 8 e 11 dias de reação (**33a**, **33b** e **33c**, respectivamente) sendo que apenas 24h não foram suficientes para geração de nenhum produto. Os novos compostos isolados foram enviados para espectro, mas percebemos que não se tratavam dos dímeros desejados.

Ao invés dos dímeros **33a-33c** inicialmente planejados, foram obtidos de fato os intermediários **32a-32c** indicados no Esquema 12. Eles apresentaram rendimentos iguais a 11,69%, 27,23% e 31,6% para **32a**, **32b** e **32c**, respectivamente, e foram aproveitados na metodologia de síntese dos heterodímeros de isatina e lapachol. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  (Espectros 9-12) consolidaram estas estruturas.

**Esquema 12:** produção de **32a-32c** a partir de lapachol (**11**).



No espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **32b**, destacam-se os 2 hidrogênios 16, que correspondem ao tripleto em 4,49 ppm, mais desblindado que 17 e 18 devido à proximidade com o oxigênio.

O pico correspondente aos hidrogênios de 17 é um quinteto, já que ele se encontra entre dois CH<sub>2</sub>, com deslocamento de 2,34 ppm. O tripleto em 3,63 ppm corresponde aos 2H de 18. Os demais sinais são parecidos com os dos espectros de lapachol, com alguma diferença nos deslocamentos, naturalmente. No espectro de RMN <sup>13</sup>C, os carbonos 16, 17 e 18 correspondem aos sinais 71,08, 29,68 e 33,61 ppm respectivamente.

No espectro de RMN <sup>1</sup>H de **32c** aparecem os dois quintetos relativos aos quatro hidrogênios 17 e 18 em 2,09 e 1,95 ppm, além dos dois tripletos correspondentes aos quatro hidrogênios 16 e 22 em 4,37 e 3,5 ppm. No espectro RMN <sup>13</sup>C, o C16 aparece em 72,56 ppm enquanto 17C, 18C e 22C aparecem em 33,33, 29,70 e 29,15 ppm, corroborando a obtenção desta molécula.

Como estes intermediários apresentaram um bom potencial teórico de afinidade pela NQO1, semelhantes aos homodímeros **33a-33c**, valerá a pena realizar estudos posteriores *in vitro* com esses intermediários, com a vantagem da produção em única etapa.

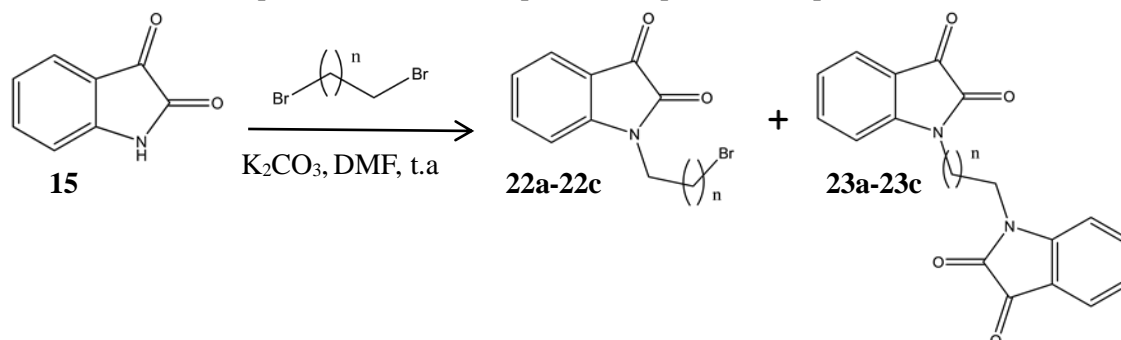
#### 5.4 Síntese dos homo e heterodímeros de isatina **23a-23c** e **26a-26c**

Para somar aos derivados de lapachol sintetizados, também foram produzidos homodímeros **23a-23c** e os heterodímeros de isatina **26a-26c**. Embora eles não tenham apresentado potencial antineoplásico nos ensaios *in silico* tão elevado quanto o dos homodímeros de lapachol e heterodímeros de lapachol-isatina, eles também mostraram ótimo potencial frente à NQO1, justificando suas sínteses.

##### 5.4.1 Síntese dos intermediários **22a-22c** e homodímeros de isatina **23a-23c**

Antes de produzir **26a-26c**, a isatina foi alquilada conforme o Esquema 13, gerando **22a-22c** e, como co-produto, **23a-23c**. No decorrer de cada reação, foi notada uma mudança no meio reacional de um tom violeta ou marrom para laranja.

**Esquema 13:** síntese dos intermediários **22a-22c** e homodímeros **23a-23c** a partir da isatina (**15**) e dos dibromoalcanos correspondentes, sendo n=1 para a, n=2 para b e n=3 para c.



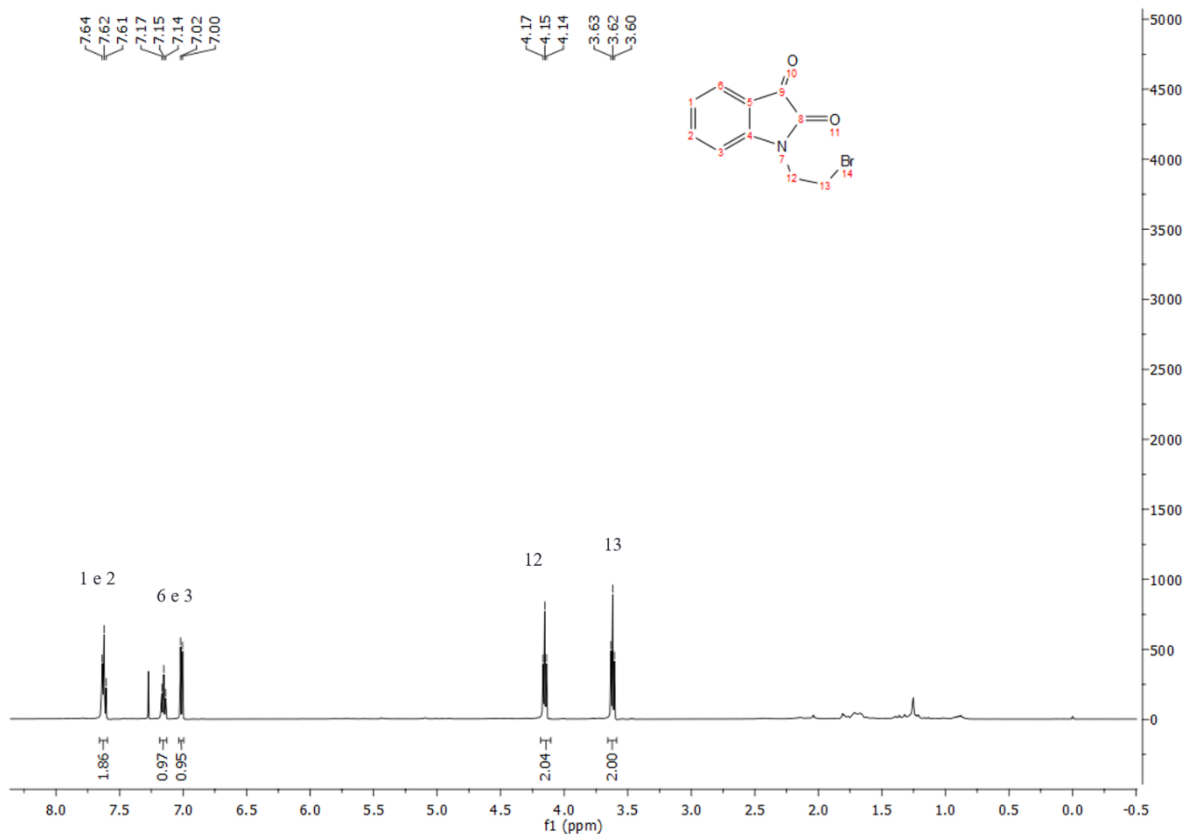
Após a extração e purificação, os produtos **22a-22c** foram obtidos na forma de cristais vermelhos, cujos rendimentos e tempos de reação estão dispostos na Tabela 4. Também foi observada a formação das bis-isatinas correspondentes **23a-23c**, cujos rendimentos se encontram na mesma tabela. Digno de nota também é o aquecimento observado ao longo da reação de preparação de **22c**, o que indicou a natureza exotérmica desta transformação, tendo ela transcorrido em apenas 30 minutos.

**Tabela 4:** tempo de reação e rendimentos da síntese de **22a-22c** mostrando também o rendimento da formação concomitante de **23a-23c**.

Produto	Rendimento	Bis-isatina	Rendimento da bis-isatina	Tempo
<b>22a</b>	54,32 %	<b>23a</b>	41,67 %	18h
<b>22b</b>	45,45 %	<b>23b</b>	29,12 %	30 min
<b>22c</b>	53,34 %	<b>23c</b>	20 %	1h

No Espectro 1 (RMN  $^1\text{H}$ ), é possível identificar os dois tripletos em 3,6 e 4,14 ppm referentes aos quatro hidrogênios do grupo etil inserido na molécula após a reação.

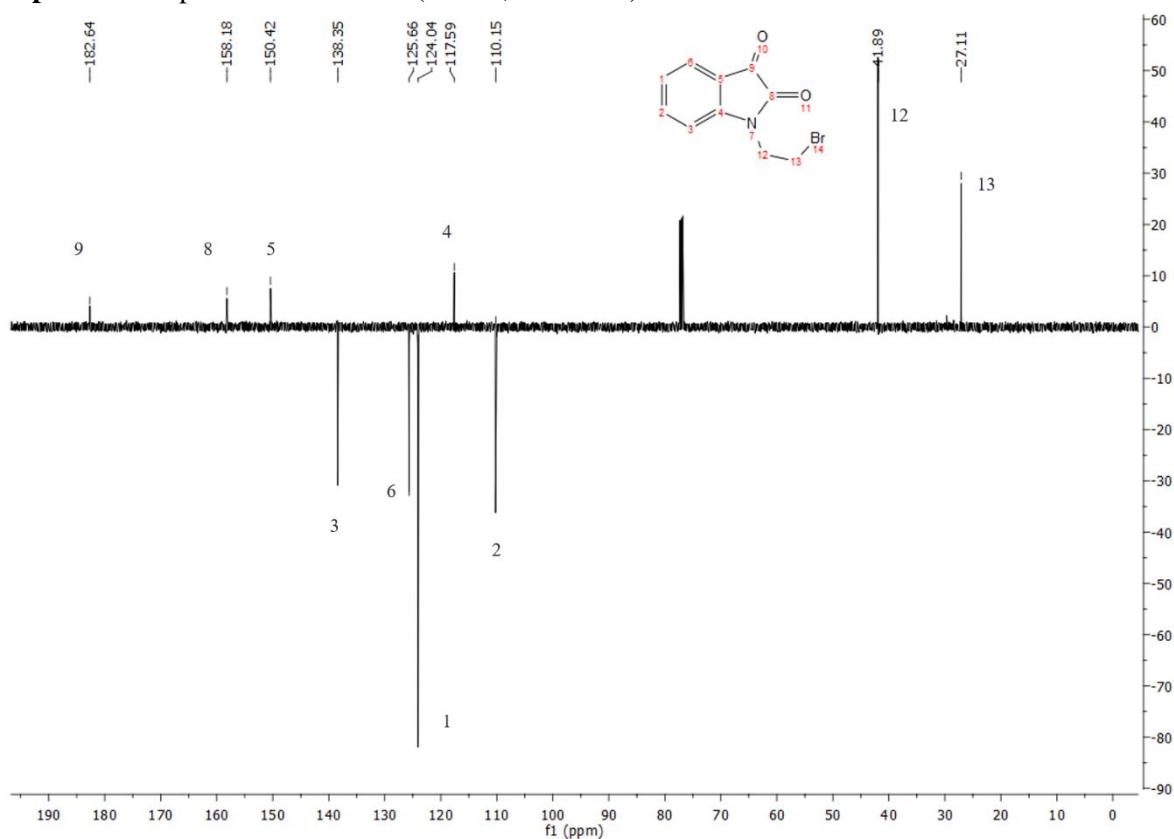
**Espectro 1:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **22a**.



Os deslocamentos químicos correspondem a hidrogênios de  $-CH_2$  próximos a N e Br, respectivamente. Os deslocamentos mais desblindados, entre 7 e 7,61 ppm referem-se aos hidrogênios do anel aromático.

No Espectro 2 (RMN  $^{13}C$ , experimento APT), foram identificados dez sinais relativos aos carbonos da molécula. Os sinais para baixo correspondem aos carbonos quaternários 8, 9, 4 e 5 da molécula. Os quatro sinais para cima mais desblindados são referentes aos  $-CH$  do anel aromático, enquanto os menos deslocados correspondem aos dois  $-CH_2$  que foram adicionados com a reação de alquilação.

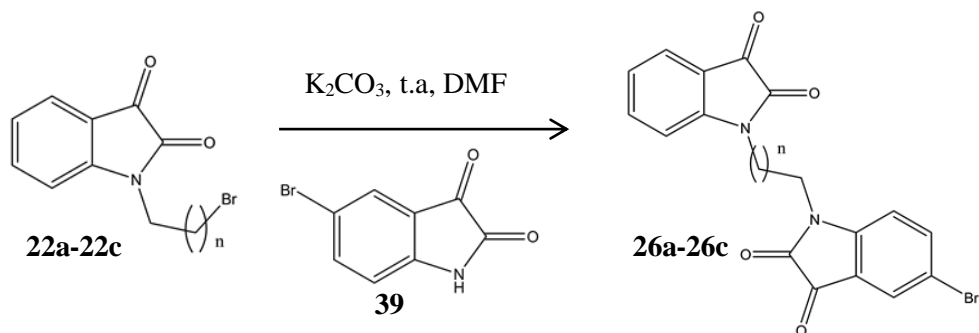
**Espectro 2:** Espectro de RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz) de **22a**.



#### 5.4.2 Síntese de **26a-26c**

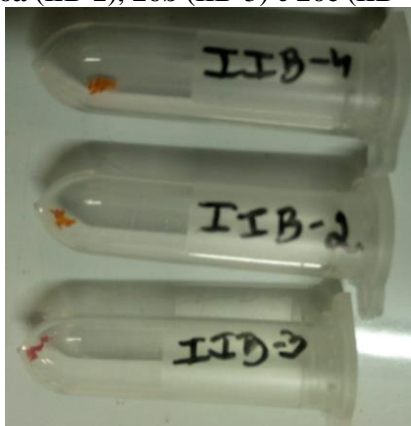
Tendo obtido os intermediários **22a-22c** isolados, eles foram empregados na síntese de **26a-26c**, de acordo com o Esquema 14. Os produtos foram obtidos na forma de cristais cor de laranja (**26a**, com  $n=1$ ), vermelhos (**26b**, com  $n=2$ ) e laranja claro (**26c**, com  $n=3$ ), após 72h, 40h e 24h de reação, respectivamente. Os r.fs foram calculados para cada produto, em eluente acetato de etila:hexano 6:4, e correspondem a 0,31, 0,25 e 0,27, na mesma ordem. Devido à formação de subprodutos mais apolares, foram obtidos rendimentos iguais a 29,48 %, 25,9 % e 16,8 %. Na Figura 22, é possível ver amostras destes 3 produtos.

**Esquema 14:** rota sintética para obtenção dos heterodímeros de isatina **26a-26c**.



Há relatos da literatura que mostram melhoria da atividade anti-inflamatória em derivados de isatina quando existe um bromo substituído na posição 5 (SHARMA et al., 2016), como é o caso das escolhidas **26a-26c**, e isso pode incrementar a possível atividade anticâncer. Os espectros destes dímeros estão em fase de registro, mas os resultados ainda não chegaram, e serão acrescentados à versão final do manuscrito. Por se tratar de moléculas não inéditas, cujo método de produção do artigo original foi criteriosamente seguido, provavelmente elas foram obtidas.

**Figura 22:** foto de amostras de **26a** (IIB-2), **26b** (IIB-3) e **26c** (IIB-4)



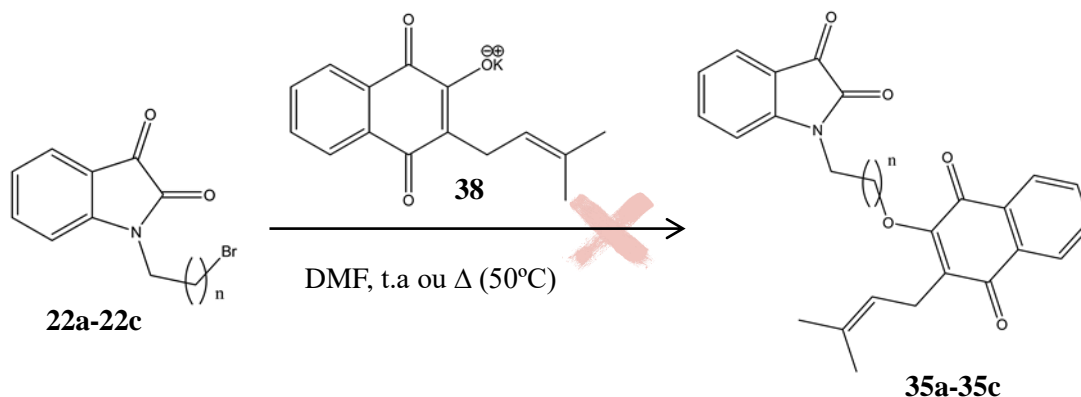
Fonte: autoria própria.

## 5.5 Produção dos heterodímeros de lapachol-isatina **35a-35c**

### 5.5.1 Produção dos heterodímeros de lapachol-isatina **35a-35c** a partir de **22a-22c**

Para produzir os heterodímeros lapachol-isatina **35a-35c**, que apresentaram um ótimo potencial farmacológico a partir dos estudos teóricos de triagem virtual, primeiro foi testada a rota sintética partindo de **22a-22c**, conforme o Esquema 15.

**Esquema 15:** rota sintética para obtenção dos heterodímeros **35a-35c** a partir das isatina alquiladas **22a-22c** e lapachonato de potássio (**38**).



Por esta rota, em que a isatina alquilada correspondente (**22a-22c**) reagiria com o lapachonato de potássio, não foi obtido sucesso. Partindo de **22a** ( $n=1$ ) e **22c** ( $n=3$ ), não foi observada a geração de produto, mesmo após 14 dias de reação, em temperatura ambiente. No sétimo dia, foi adicionado iodeto de potássio (0,005 mmol), na tentativa de induzir à dimerização, mas não houve mudança na composição do meio reacional. Isso ocorreu provavelmente porque o sal de lapachol não apresenta força nucleofílica suficiente para atacar a isatina alquilada e gerar o dímero.

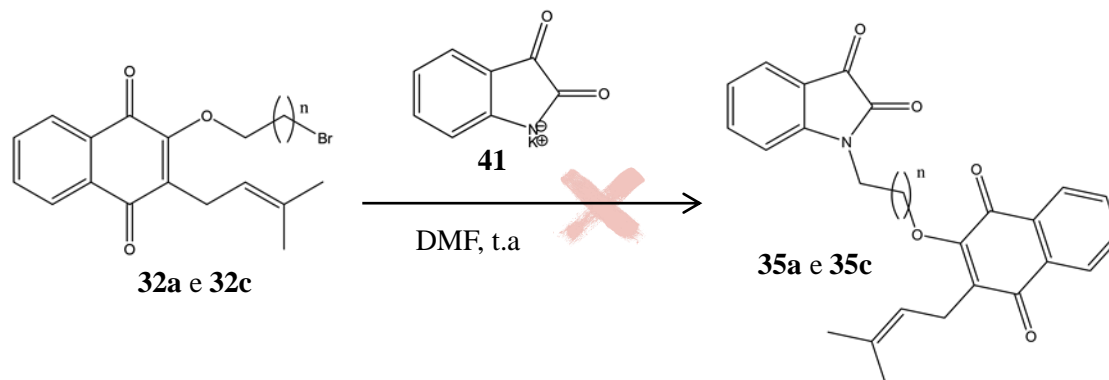
No caso da reação usando **22b** ( $n=2$ ), foram gerados dois produtos, mais polares que ambos os reagentes, após 48h de reação em aquecimento em refluxo a 50 °C. No entanto, a polaridade entre eles era muito próxima, o que inviabilizou o isolamento do produto e a continuação das reações por esta rota sintética.

### 5.5.2 Produção dos heterodímeros de lapachol-isatina **35a-35c** a partir de **32a-32c**

Sendo assim, partimos para a rota alternativa, mostrada no Esquema 16, que usa os intermediários de lapachol alquilado **32a** ( $n=1$ ) e **32c** ( $n=3$ ), produzidos anteriormente, além do sal potássico de isatina, produzido *in situ* com  $K_2CO_3$ . Houve geração de produtos que foram isolados após 24h e 6h de reação (a partir de **32a** e **32c**, respectivamente), na forma de sólidos cor de laranja.

Contudo, a análise dos espectros de RMN  $^1H$  e RMN  $^{13}C$  destes dois produtos revelou que nenhum deles eram os heterodímeros planejados, e não foi possível a identificação dos realmente produzidos, devido à existência de muitos sinais de impurezas. É possível que outro produto tenha sido formado concomitantemente, cujo r.f seja muito próximo, e por isso não foi identificado nas análises prévias por CCDA.

**Esquema 16:** rota sintética para obtenção dos dímeros **35a-35c** a partir do lapachol alquilado correspondente **32a-32c** e o sal potássico de isatina (**41**).



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foi montada uma biblioteca de 49 moléculas, planejadas pela técnica de hibridação molecular, empregando os produtos naturais isatina e lapachol para montar os dímeros. Os respectivos intermediários sintéticos e mômicos também foram incluídos neste conjunto. Uma triagem virtual destas moléculas foi realizada através de *docking* molecular e demonstrou que praticamente todos os dímeros avaliados apresentam potencial atividade antitumoral, considerando a afinidade teórica pela proteína NQO1 semelhante à do ligante nativo E6A (**28**) e do dicumarol (**36**). Além disso, as moléculas com melhores energias de ligação também apresentaram interação tipo  $\pi$ -*stacking* com o FAD, à semelhança de E6A (**28**) e dicumarol (**36**). As moléculas eleitas como mais promissoras foram **31a-31c** e **35a-35c**, seguida dos demais dímeros **23a-23c**, **24a-24c**, **24g-24i**, **26a-26c**, **26g-26i**, **27a-27c** e **33a-33c**.

O lapachol foi extraído e purificado com rendimento de 0,8% em extração por Soxhlet e utilizado nas reações de síntese dos derivados desta molécula, entre as quais os dímeros **31a-31c**, **35a-35c** e **33a-33c** não puderam ser sintetizados. Contudo, os derivados de lapachol **29** e **32a-32c**, além dos dímeros de isatina **23a-23c** e **26a-26c** e seus os intermediários **22a-22c** foram produzidos e caracterizados. Essas substâncias também representam compostos com potencial atividade antitumoral que terão suas sínteses otimizadas e serão enviadas para avaliação *in vitro* para atividade antineoplásica.

## 7. EXPERIMENTAL

### 7.1 Triagem virtual por *Docking* molecular

As 49 moléculas da biblioteca de moléculas descrita na seção Estratégia foram desenhadas no programa Avogadro (HANWELL et al., 2012) e otimizadas com o método PM6 (STEWART, 2007) no programa Gaussian 09 (FRISH et al., 2009). As coordenadas da proteína quinona oxidoreductase (NQO1) foram adquiridas sob o código 5EAI (PIDUGU et al., 2016) no *Protein Data Bank* e editada no módulo do AutodockTools (MORRIS et al., 2009), retirando as moléculas de água, tendo em vista que elas não estão presentes no sítio ativo da proteína.

Além disso, os hidrogênios foram adicionados no AutodockTools e metade das cadeias foi retirada, por se tratar de uma proteína dimérica muito extensa. As cadeias mantidas foram a A, B, E, F, K e L. A Figura 11 mostra a proteína já editada. Como todas as cadeias apresentam um sítio de interação, cada um com um ligante co-cristalizado, uma delas foi escolhida aleatoriamente para o estudo (E). Para análise das interações moleculares e geração de imagens, o programa Chimera (PETTERSEN et al., 2004) foi utilizado.

#### 7.1.1 *Redocking* molecular para validação do sistema

O ligante nativo foi retirado da cadeia E do arquivo pdb de NQO1 e as dimensões da caixa de grade utilizada para geração do arquivo .gpf foram 46x36x36, com coordenadas x=-53.949, y=-23.94 e z=-25.992. A localização foi determinada centralizando a caixa de grade no ligante nativo E6A (**28**), e as dimensões foram escolhidas de modo a comportar as moléculas inéditas do estudo.

### 7.2 Síntese dos dímeros de lapachol e isatina e seus intermediários

Todos os produtos obtidos foram purificados utilizando Cromatografia em Coluna *Flash*. Nas extrações líquido-líquido, as fases orgânicas reunidas eram sempre secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtradas antes de serem concentradas em rotaevaporador.

#### 7.2.1 Extração de lapachol

Na extração de lapachol por Soxhlet, foi empregado isobutanol como solvente extrator, numa temperatura de refluxo de 80°C. A fim de otimizar o espaço da vidraria, foram utilizados dois pedaços de algodão para impedir a passagem de serragem no balão de coleta, ao invés de cartuchos de papel. Após cerca de 4h de extração, o extrato coletado foi concentrado em

rotaevaporador, e o solvente foi recuperado. A purificação foi feita na sequência, usando como eluente acetato de etila:hexano 5%. Na figura 23 são indicados a serragem utilizada e o sistema de Soxhlet montado.

**Figura 23:** À esquerda, imagem da serragem fina de *Tabebuia avellanedae* usada neste trabalho; à direita, sistema de extração de Soxhlet.



Fonte: autoria própria.

Na extração ácido-básica, 100 g da serragem fina de *Tabebuia avellanedae* foram colocados em um béquer e com 500 mL de solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 1%. O sistema foi submetido a agitação magnética por 24h e agitações ocasionais com bastão de vidro também. Em seguida, foi realizada uma filtração simples, e o filtrado foi tratado com uma solução de HCl concentrado até que ocorresse a mudança da cor daquele, de vermelho-vinho para amarelo. Uma nova filtração foi realizada e o filtrado foi recolhido. Após a secagem em estufa, o produto foi purificado por cromatografia em coluna, da mesma forma que na extração por Soxhlet.

### 7.2.2 Síntese 2-metoxi-lapachol (29)

Em um tubo de micro-ondas, foram inseridos 0,2 mmol de lapachol, dissolvidos em 1 mL de acetona seca. Foram acrescentados 0,3 mmol de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  e mais 1 mL do solvente. O tubo foi deixado em temperatura ambiente e agitação magnética por 5 minutos, e em seguida foi adicionado 0,6 mmol de iodeto de metila (20 gotas). Na sequência, o tubo foi colocado em aparelho de micro-ondas, sob agitação magnética, aquecimento a  $80^\circ\text{C}$ , sem pressão e em

potência de 50 W. A extração foi realizada com hexano e água destilada. Foi obtido um sólido de cor amarela após a purificação.

### **7.2.3 Síntese de 2(2-hidróxi-etilamina) lapachol (30a)**

Em um balão de 50 mL, foram colocados 0,36 mmol de 2-metóxi-lapachol (**46**) e 3 mL de metanol. Foi adicionado 1 mmol (4 gotas) de etanolamina e o balão foi deixado sob temperatura ambiente, em agitação, por 66h30min. Após o consumo do lapachol metilado, o excesso de etanolamina foi retirada em rotaevaporador e a extração foi realizada com água destilada (10 mL) e 4 lavagens de 10 mL de diclorometano. Foi obtido um sólido vermelho com rendimento quantitativo.

### **7.2.4 Tosilação de 30a para produção de 2-(3-methylbut-2-enyl)-3-(2-tosylethylamino)naphthalene-1,4-dione (37a)**

Em um balão de 25 mL, foram inseridos 0,16 mmol de (4) e 1 mL de diclorometano seco para dissolver. Foram adicionados 1,5 eq. de cloreto de tosila e 1,5 eq. de trietilamina. O balão foi deixado em temperatura ambiente, com agitação magnética e atmosfera inerte de argônio. Foram adicionados mais 88,3 mg de cloreto de tosila após 4h30 min de reação. Após 6h40 min de reação, foram colocadas 6 gotas de trietilamina e, uma hora depois mais 6 gotas. Depois de 10h de reação, com o esgotamento do reagente limitante, o meio reacional foi concentrado em rotaevaporador e o produto foi purificado em coluna cromatográfica, sendo o eluente acetato de etila:pentano 1%. Foi obtido um sólido vermelho alaranjado, com rendimento de 64,46%.

### **7.2.5 Cloração de 30a para produzir 2-(2-cloroetilamina)-3-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,4-diona) 40a**

Em um balão de 25 mL, foram colocados 0,29 mmol de (4), 3 mL de diclorometano e 2,9 mmol de cloreto de tionila. O balão foi deixado sob agitação magnética e refluxo a 40 °C. Após 19h de reação, houve consumo completo do reagente, e o excesso do cloreto de tionila e solvente foram retirados em rotaevaporador. Em seguida, foi realizada uma extração com 10 mL de solução de NaHCO<sub>3</sub> a 10% e 10 mL de diclorometano. Foram feitas mais três lavagens de 10 mL de diclorometano e as fases orgânicas foram reunidas e concentradas em rotaevaporador. Foi produzido um sólido marrom-escuro, com rendimento quantitativo.

### 7.2.6 Síntese do dímero de lapachol (31a)

Em um tubo de micro-ondas, foram inseridos 0,583 mmol de lapachol e 1,23 mL de uma solução alcólica de KOH com 20 mg/mL. Com a mudança imediata da cor do meio reacional para um tom avermelhado, o etanol foi retirado em rotaevaporador. Em seguida, foi acrescentado 0,22 mmol de **37a** ou de **40a** e 2 mL de acetona seca e 1 mL de diclorometano seco. O tubo foi colocado em micro-ondas por 60 minutos, a 80 °C, com agitação magnética.

A extração foi realizada utilizando 10 mL de água destilada e 10 mL de acetato de etila, com mais cinco lavagens de 10 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada em rotaevaporador. Após purificação em coluna cromatográfica, foi obtido um sólido amarelo, com 59% de rendimento (usando **41b**).

### 7.2.7 Síntese das isatinas alquiladas (22a-22c)

Em um balão de 25 mL, foram adicionados 1 mmol de isatina (**15**) e 5 mL de DMF. Após a dissolução da isatina, foi acrescentado 1,5 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e o balão foi deixado sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida, o alquilante correspondente foi adicionado (1,74 mmol, 1,96 mmol ou 1,65 mmol de dibromoetano, dibromopropano ou dibromobutano, respectivamente). O sistema foi submetido à agitação em temperatura ambiente até o consumo do reagente limitante (isatina).

A extração foi feita com a adição de água destilada (10 mL) e lavagens com acetato de etila (3 x de 15 mL). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (4 x de 25 mL) e, verificada a ausência de produto na fase aquosa, a fase orgânica foi reunida e seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Por fim, a fase orgânica foi concentrada em rotaevaporador e purificada por Cromatografia em Coluna Flash. Foram obtidos produtos na forma de cristais vermelhos, em 18h, 30 minutos e 1h de reação, respectivamente.

### 7.2.8 Síntese de lapachol alquilado (32a-32c)

0,5 mmol de de lapachol (**11**) foi dissolvido em 5 mL de acetona seca, em um balão de 50 mL. Em seguida, foi acrescentado 0,75 mmol de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O balão foi deixado sob agitação magnética em temperatura ambiente por 5 minutos, e logo após foi adicionado 0,1 mL (1,16 mmol) do dibromoalcano correspondente. O sistema permaneceu nestas condições até ser observada a parada na progressão dela. A extração foi feita com 10 mL de água destilada e 3 lavagens de 10 mL de diclorometano. A fase orgânica foi seca em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e concentrada em rotaevaporador. Os produtos obtidos apresentaram-se como sólidos amarelos.

### 7.2.9 Síntese dos heterodímeros de lapachol e isatina (35a-35c)

Para a primeira rota, foi colocado 0,5 mmol de isatina alquilada (**22a-22c**), 0,5 mmol de lapachol (**11**) e 5 mL de DMF em um balão de 5 mL. Logo após, foi inserido 0,75 mmol de  $K_2CO_3$  e o balão foi submetido à agitação magnética sob temperatura ambiente. Nenhum produto pôde ser isolado.

Para a segunda rota, foi adicionado 0,5 mmol de lapachol alquilado (32a-32c), 0,5 mmol de isatina (**15**) e 5 mL de DMF em um balão de 50 mL. Em seguida, foi acrescentado 0,75 mmol de  $K_2CO_3$ . O balão foi deixado sob temperatura ambiente e agitação magnética. Após o consumo dos reagentes, foi feita a extração com 20 mL de água destilada, lavando 3 x com 20 mL de acetato de etila. A fase orgânica foi lavada com 30 mL de solução saturada por 3 x, e a fase aquosa foi lavada mais 4 x com 20 mL de acetato de etila. As fases orgânicas foram reunidas e foi feita a secagem com  $Na_2SO_4$  anidro e concentração do meio em rotaevaporador.

### 7.2.10 Síntese dos dímeros de isatina (26a-26c)

Em um balão de 50 mL, 0,5 mmol da isatina alquilada correspondente (**22a-22c**) foi dissolvida em 2 mL de DMF. Em seguida, foram colocados 0,5 mmol de isatina bromada e mais 1 mL DMF, para dissolução completa de ambos os reagentes. Depois foi adicionado 0,75 mmol de  $K_2CO_3$  e o sistema foi deixado sob agitação magnética e temperatura ambiente até o consumo dos reagentes. Após o consumo dos reagentes, foi adicionado ao balão 10 mL de água destilada, aos poucos, e a extração foi feita com acetato de etila (3 a 5 lavagens de 20 mL). Logo após, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de  $NaHCO_3$  (6 x 10 mL), seca com  $Na_2SO_4$  anidro e concentrada em rotaevaporador.

## REFERÊNCIAS

- ABDELHAMEED, A. S.; BAKHEIT, A. H.; MOHAMED, M. S.; ELDEHNA, W. M.; ABDEL-AZIZ, H. A.; ATTIA, M. I. Synthesis and Biophysical Insights into the Binding of a Potent Anti-Proliferative Non-symmetric Bis-isatin Derivative with Bovine Serum Albumin: Spectroscopic and Molecular Docking Approaches. **Appl. Sci.**, Switzerland, v. 7, n. 6, p. 617, jun. 2017.
- AJDUKOVIĆ, J. J.; DJURENDIĆ, E. A.; PETRI, E. T.; KLISURIĆ, O. R.; ĆELIĆ, A. S.; SAKAČ, M. N.; JAKIMOV, D. S.; GAŠI, K. M. P. 17(E)-Picolinylidene androstane derivatives as potential inhibitors of prostate cancer cell growth: Antiproliferative activity and molecular docking studies. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 21, n.23, p.7257-7266, dez. 2013.
- ALBERTS, B. (Et al). **Molecular biology of the cell**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 1464p.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GUIMARÃES, D. G.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; ALMEIDA, J. R. G. DA S.; GONSALVES, A. A. Síntese e Determinação in vitro do FPS-UVB de Oximas Derivadas do Lapachol. **Rev. Virtual Quim.**, v. 6, n. 6, p. 1702-1712, 2014.
- ARAÚJO, E.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM-NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. Bras. Farmacog.**, Maringá, v. 12, supl. 1, p. 57-59, 2002.
- ASHER, G.; LOTEM, J.; COHEN, B.; SACHS, L.; SHAUL, Y. Regulation of p53 stability and p53-dependent apoptosis by NADH quinone oxidoreductase 1. **PNAS**, v. 28, n. 3, p. 1188-1193, jan. 2001.
- ATTIA, M. I.; ELDEHNA, W. M.; AFIFI, S. A.; KEETON, A. B.; PIAZZA, G. A.; ABDEL-AZIZ, H. A. New hydrazonoindolin-2-ones: Synthesis, exploration of the possible anti-proliferative mechanism of action and encapsulation into PLGA microspheres. **PLoS ONE**, v. 12, n.7, p. 1-24, jul. 2017.
- BARBOSA, T. P.; DINIZ-NETO, H. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de química orgânica experimental. **Quim. Nova**, v. 36, n. 2, p. 331-334, fev. 2013.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 590 p.
- BEGLEITER, A.; EL-GABALAWY, N.; LANGE, L.; LEITH, M. K.; GUZIEC, L. J.; GUZIEC JR, F. S. A Model for NAD(P)H: Quinoneoxidoreductase 1 (NQO1) Targeted Individualized Cancer Chemotherapy. **Drug Target Insights**, v. 4, p.1-8, jan. 2009.
- BENKENDORFF, K.; RUDD, D.; NONGMAITHEM, B. D.; LIU, L.; YOUNG, F.; EDWARDS, V.; AVILA, C.; ABBOTT, C. A. Are the Traditional Medical Uses of Muricidae Molluscs Substantiated by Their Pharmacological Properties and Bioactive Compounds? **Mar. drugs**, Basel, v. 13, n. 8, p. 5237-5275, ago. 2015.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12 ed. New York: McGraw-Hill Education, 2011. 2084 p.

D'ISCHIA, M.; PALUMBO, A.; PROTA, G. Adrenalin oxidation revisited. New products beyond the adrenochrome stage. **Tetrahedron**, v. 44, n. 20, p. 6441-6446, 1988.

DATASUS. Disponível em  
<<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/pobt10uf.def>> Acesso em nov. 2018.

DASTMALCHI, S. (ed.). **Applied Case Studies and Solutions in Molecular Docking-Based Drug Design**. 1 ed. Hersey: IGI Global, 2016. 367 p.

EYONG, K. O.; PUPPALA, M.; KUMAR, P. S.; LAMSHOFT, M.; FOLEFOG, G. N.; SPITELLER, M.; BASKARAN, S. A mechanistic study on the Hooker oxidation: synthesis of novel indane carboxylic acid derivatives from lapachol. **Org. Biomol. Chem.**, v. 11, n. 3, 459-468, jan. 2013.

FARES, M.; ELDEHNA, W. M.; ABOU-SERI, S. M.; ABDEL-AZIZ, H. A.; ALY, M. H.; TOLBA, M. F. Design, synthesis and in vitro antiproliferative activity of novel isatin-quinazoline hybrids. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.**, v. 348, n. 2, p. 144–154, fev. 2015.

FIORITO, S.; EPIFANO, F.; BRUYÈRE, C.; MATHIEU, V.; KISS, R.; GENOVESE, S. Growth inhibitory activity for cancer cell lines of lapachol and its natural and semi-synthetic derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 2, p. 454-457, jan. 2014.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol – química, farmacologia e métodos de dosagem. **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

FRISCH, M. J. (Et Al). **GAUSSIAN 09**; Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

GUIRALD, P.; STEIMAN, R. CAMPOS-TAKAKI, G.; SEIGLE-MURANDI, F.; BUOCHBERG, M. S. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and b-lapachone. **Planta Med.**, v. 60, n. 4, p. 373—374, nov. 1994.

HANWELL, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. **AVOGADRO-1.2**; An open-source molecular builder and visualization tool, USA, 2012.

HOU, L.; JU, C.; ZHANG, J.; SONG, J.; GE, Y.; YUE, W. Antitumor effects of Isatin on human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) and the related mechanism. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 589, n. 1, p. 27–31, jul. 2008.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. A semiempirical free energy force field with charde-based desolvation. **J. Comput. Chem.**, v. 28, n. 6, p. 1145-1152, fev. 2007.

IBACACHE, J. A.; FAGUNDES, J.; MONTTOYA, M.; MEJÍAS, S.; VALDERRAMA, J. A. Preparation of Novel Homodimers Derived from Cytotoxic Isoquinolinequinones. A Twin Drug Approach. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 2, p. 439-449, fev. 2018.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 20 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 724 p.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Bases patológicas das doenças Robbins & Cotran**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 2695 p.

LIAO, K.; NIU, F.; HAO, H.; WANG, G. Advances on structure-activity relationship of NQO1-targeting antitumor quinones. **Chin. J. Nat. Med.**, v. 10, n. 3, p.170-176, maio 2012.

LIMA, N. M. F.; CORREIA, C. S.; LEON, L. L.; MACHADO, G. M. C.; MADEIRA, M. F.; SANTANA, A. E. G.; GOULART, M. O. F. Antileishmanial Activity of Lapachol Analogues. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 757-761, nov. 2004.

LOPES, J. P. B. **Síntese de dímeros quirais do tipo bis-tacrina com potencial aplicação no tratamento da doença de Alzheimer**. 2014. 127 f: Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MATA-SANTOS, T.; PINTO, N. F.; MATA-SANTOS, H. A.; DE MOURA, K. G.; CARNEIRO, P. F.; CARVALHO, T. S.; DEL RIO, K. P.; PINTO, M. C. F. R.; MARTINS, L. R.; FENALTI, J. M.; DA SILVA, P. E. A.; SCAINI, C. J. Atividade anti-helmíntica do lapachol,  $\beta$ -lapachona e derivados contra larvas de *Toxocara canis*. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 57, n.3, p. 197-204, maio/jun. 2015.

MARTINEZ, S. T.; FERREIRA, V. F. As isatinas do professor Ângelo. **Rev. Virtual Quim.**, v. 9, n. 3, p. 1154-1183, jun. 2017.

MOLFETTA, F. A.; FREITAS, R. F.; SILVA, A. B. F.; MONTANARI, C. A. Docking and molecular dynamics simulation of quinone compounds with trypanocidal activity. **J. Mol Model.**, v. 15, n.10, p. 1175–1184, mar. 2009.

MOREIRA, T. S. **Síntese e caracterização das propriedades mesomórficas e óticas de cristais líquidos fotorresponsivos derivados do azobenzeno**. 2015. 144 f: Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

MORRIS, G. M.; HUEY, R.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. (2009) Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. **J. Comput. Chem.**, v. 30, n.16, p. 2785-2791, dez. 2009.

NC-IUNMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). **The enzyme list. Class 1 – Oxidoreductases**. ExplorEnz database, set. 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1273 p.

OLIVEIRA, R. N.; SILVA, M. G.; SILVA, M. T.; MELO, V. N.; VALENÇA, W. O.; PAZ, J. A. CAMARA, C. A. New Strategies for Molecular Diversification of 2-[Aminoalkyl-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)]-1,4-naphthoquinones Using Click Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 681-688, abr. 2017.

PALUMBO, A.; D'ISCHIA, M.; MISURACA, G.; PROTA, G. A new look at the rearrangement of adrenochrome under biomimetic conditions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 990, n. 3, p. 297-302, mar. 1989.

PARKINSON, E. I.; HERGENROTHER, P. J. Deoxyxyboquinones as NQO1-Activated Cancer Therapeutics. **Acc. Chem. Res.**, Washington DC, v. 48, n. 10, p. 2715-2723, out. 2015.

PARTHASARATHY, K. PRAVEEN, C.; BALACHANDRAN, C.; KUMAR, P. S.; IGNACIMUTHU, S.; PERUMAL, P. T. Cu(OTf)<sub>2</sub> catalyzed three component reaction: Efficient synthesis of spiro[indoline-3,40-pyrano[3,2-b]pyran derivatives and their anticancer potency towards A549 human lung cancer cell lines. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, n. 9, p. 2708–2713, maio 2013.

PERES, R. S.; SANTOS, G. B.; CECILIO, N. T.; JABOR, V. A. P.; NIEHUES, M.; TORRES, B. G. S.; BUQUI, G.; SILVA, C. H. T. P.; COSTA, T. D.; LOPES, N. P.; NONATO, M. C.; RAMALHO, F. S.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; EMERY, F. S.; ALVES-FILHO, J. C. Lapachol, a compound targeting pyrimidine metabolism, ameliorates experimental autoimmune arthritis. **Arthritis Res. Ther.**, v. 19, n. 47, p. 47-59, mar. 2017.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera -- a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p.1605-1612, out. 2004.

PIDUGU, L. S. M.; MBIMBA, J. C. E.; AHMAD, M.; POZHARSKI, E.; SAUSVILLE, E. A.; EMADI, A.; TOTH, E. A direct interaction between NQO1 and a chemotherapeutic dimeric naphthoquinone. **BMC Struct. Biol.**, v. 16, n. 1, p. 1-10, jan. 2016.

PREMANATHAN, M; RADHAKRISHNAN, S.; KULANGIAPPAR, K.; SINGARAVELU, G.; THIRUMALAIARASU, V.; SIVAKUMAR, T. Antioxidant & anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione), isolated from the flowers of *Couroupita guianensis* Aubl. **Indian J. Med. Res.**, Mumbai, v. 136, n. 5, p. 822-826, nov. 2012.

ROMÃO, L.; DO CANTO, V. P.; NETZ, P. A.; MOURA-NETO, V.; PINTO, A. C.; FOLLMER, C. Conjugation with polyamines enhances the antitumor activity of naphthoquinones against human glioblastoma cells. **Anti-Cancer Drugs**, v. 29, n. 6, p. 520-529, jul. 2018.

ROSAY, T.; BAZIRE, A.; DIAZ, S.; CLAMENS, T.; BLIER, A.; MIJOUIN, L.; HOFFMANN, B.; SERGENT, J.; BOUFFARTIGUES, E.; BOIREAU, W.; VIEILLARD, J.; HULEN, C.; DUFOUR, A.; HARMER, N. J.; FEUILLOLEY, M. G. J.; LESOUHAITIERA, O. *Pseudomonas aeruginosa* Expresses a Functional Human Natriuretic Peptide Receptor Ortholog: Involvement in Biofilm Formation. **mBio**, v. 6, n. 4, p. 1-12, ago. 2015.

SALUSTIANO, E. J. S.; NETTO, C. D.; FERNANDES, R. F.; DA SILVA, A. J. M.; BACELAR, T. S.; CASTRO, C. P.; BUARQUE, C. D.; MAIA, R. C.; RUMJANEK, V. M.; COSTA, P. R. R. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol,  $\alpha$ -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. **Invest. New Drugs**, v. 28, n. 2, p. 139–144, abr. 2010.

SANTOS, A. F.; FERRAZ, P. A. L.; ABREU, F. C.; CHIARI, E.; GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal and Trypanocidal Activities of Lapachol Derivatives. **Planta Med**, New York, v. 67, n. 1, p. 92-93, mar. 2001.

SCHULTZ, R. M.; MERRIMAN, R. L.; TOTH, J. E.; ZIMMERMANN, J. E.; HERTEL, L. W.; ANDIS, S. L.; DUDLEY, D. E.; RUTHERFORD, P. G.; TANZER, L. R.; GRINDEY, G. B. **Oncol. Res.**, v. 5, n. 6, p. 223-228, jan.1993.

SHARMA, P. K.; BALWANI, S.; MATHUR, D.; MALHOTRA, S.; SINGH, B. K.; PRASAD, A. K.; LEN, C.; EYCKEN, E. V. V. der; GHOSH, B. RICHARDS, N. G. J.; PARMAR, V. S. Synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of novel triazolyl-isatin hybrids. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, London, v. 31, n. 6, p. 1520-1526, maio 2016.

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.**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 273-324, maio/jun. 2001.

SILVA, W. A. V. **Uso da estratégia de drogas gêmeas para a síntese de novos adutos de Morita-Baylis-Hillman potenciais candidatos a fármacos antiparasitários**. 2016. 126 f: Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: UFCS; Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SINGH, A.; NISHA, T. B.; HAHN, H. J.; LIU, N.; TAM, C.; CHENG, L. W.; KIM, J.; DEBNATH, A.; LAND, K. M.; KUMAR, V. Design, synthesis and preliminary antimicrobial evaluation of N-alkyl chain-tethered C-5 functionalized bis-isatins. **Med. Chem. Commun.**, Cambridge, v. 8, n. 10, p. 1982-1992, out. 2017.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE JR, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacol. Rev.**, v. 66, n. 1, p.334–395, jan. 2014.

SONG, J.; HOU, L. JU, C.; ZHANG, J.; GE, Y.; YUE, W. Isatin inhibits proliferation and induces apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro and in vivo. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 702, n. 1-3, p. 235–241, fev. 2013.

STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods. V. Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. **J. Mol. Model.**, v. 13, n.12, p. 1173-1213, set. 2007.

SUMPTER, W. S. The chemistry of isatin. **Chem. Rev.**, Washington, v. 34, n. 3, p. 393-434, jun. 1944.

TRIPATHI, R. R.; SONAWANE, R. P. An extraction of the Isatin from the *Couroupita Guianensis* (cannon ball tree) and A novel synthesis of the N,N'-(2-oxo-3'H-spiro[indoline-3,2'-[1,3,4]thiadiazole]-3',5'-diyl]diacetamide. **Int. Lett. Chem., Phys. Astron.**, Zlocieniec, v. 10, n. 2, p. 119, 2013.

VIANA, L.M. et al. Extraction of lapachol from *Tabebuia avellanedae* wood with supercritical CO<sub>2</sub>: an alternative to Soxhlet extraction? **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 317-325, set. 2003.

VINE, K. L.; MATESIC, L.; LOCKE, J. M.; RANSON, M.; SKROPETA, D. Cytotoxic and Anticancer Activities of Isatin and Its Derivatives: A Comprehensive Review from 2000-2008. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 397-414, maio 2009.

WERMUTH, C. G. **The practice of Medicinal Chemistry**. 3 ed. Amsterdan: Academic Press, 2008. 982 p.

WHO. **Health Topics – Cancer**. Disponível em < <https://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em novembro de 2018.

XIAU, W.; LEI, F.; HENGQIANG, Z.; XIAUJING, L. Isolation and Purification of Natural Products. Cap. 9. Do livro: **Natural Product Extration – Principles and Applications**. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013. 500 p.

XU, Z.; SONG, X. HU, Y.; QIANG, M.; LVA, Z. Design, Synthesis and In Vitro Antimycobacterial Activities of 8-OMe Ciprofloxacin-1H-1,2,3-triazole-isatin-(thio) Semicarbazide/Oxime Hybrids. **J. Heterocycl. Chem.**, v. 55, n. 1, p. 192-198, jan. 2018.

YOUNG, D. C. **Computational Drug Design. A Guide for Computational and Medicinal Chemists**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 307 p.

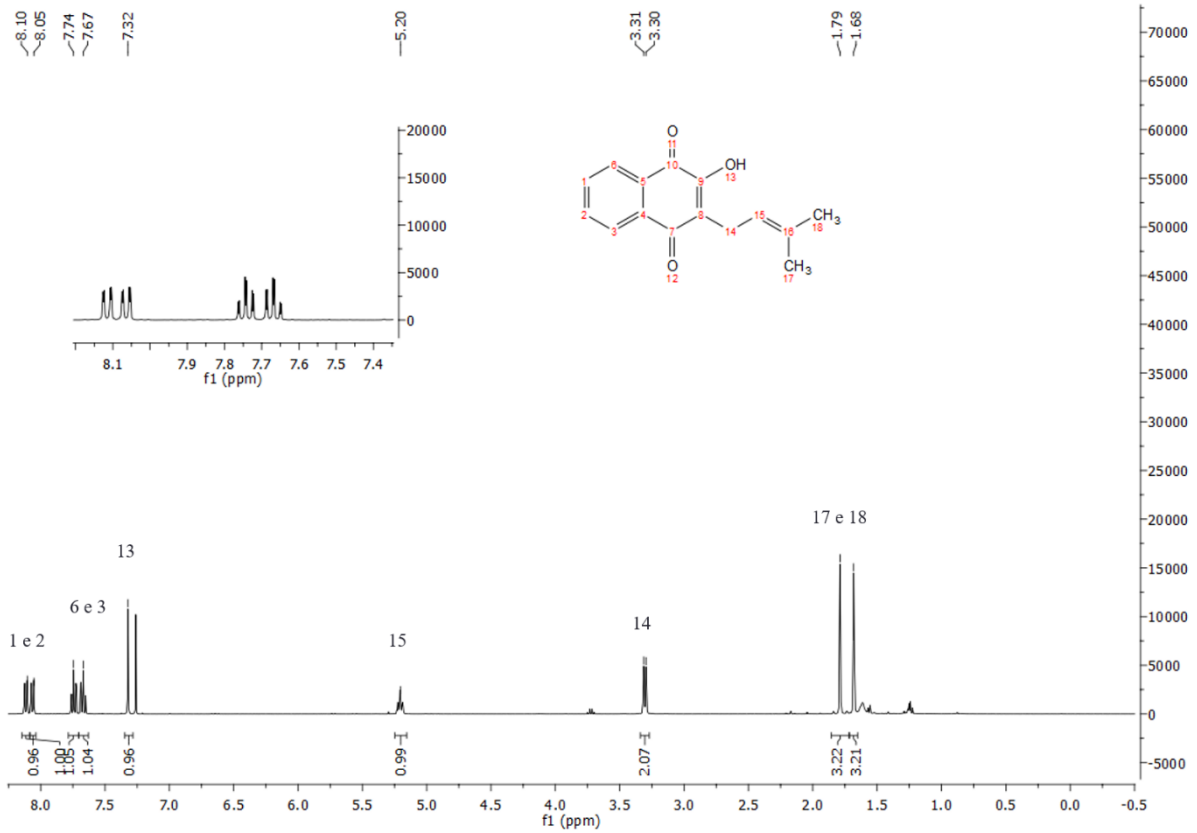
YU, B.; QI, P.; SHI X.; HUANG, R.; GUO, H.; ZHENG, Y.; YU, D.; LIU, H. Efficient synthesis of new antiproliferative steroidal hybrids using the molecular hybridization approach. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 117, p. 241-255, jul. 2016.

YURIEV, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLAND, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. **J. Mol. Recognit.**, v. 24, n. 2, p. 149–164, mar./abr. 2011.

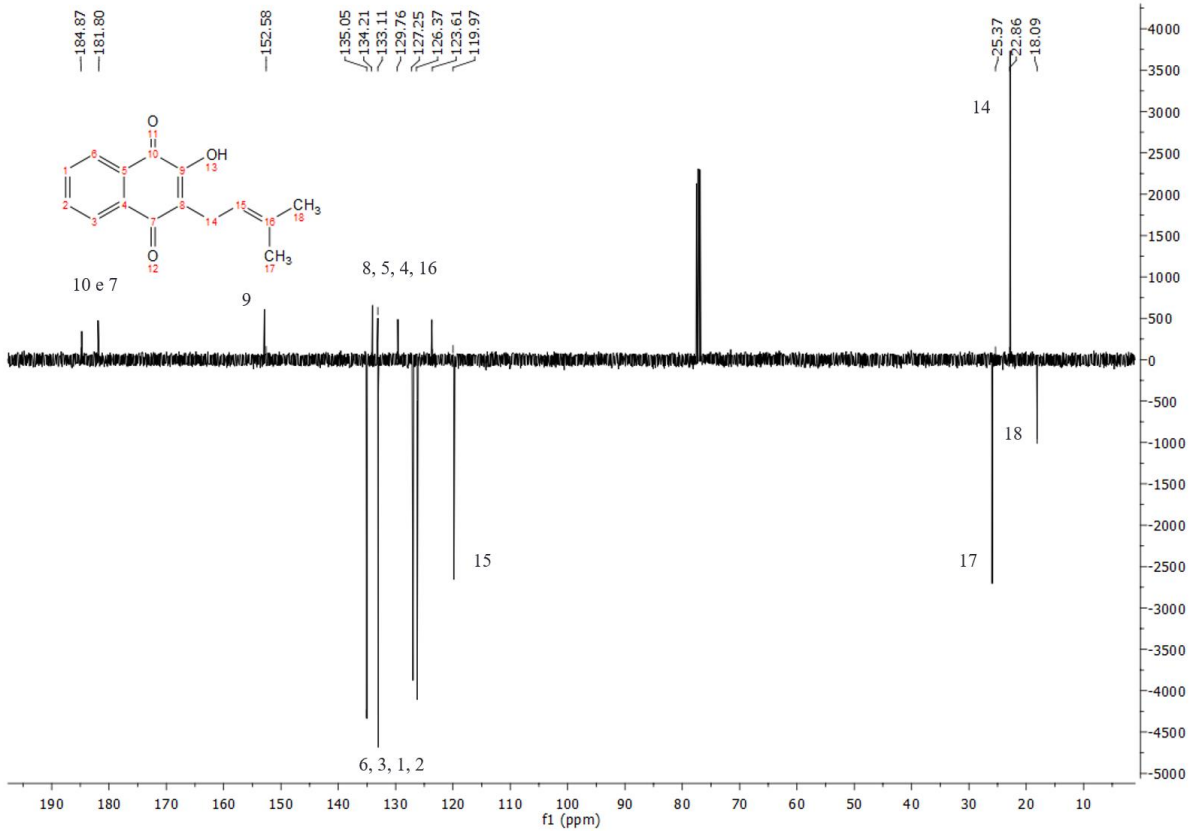
YURIEV, E.; RAMSLAND, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. **J. Mol. Recognit.**, v. 26, n. 5, p. 215–239, mar. 2013.

## ESPECTROS

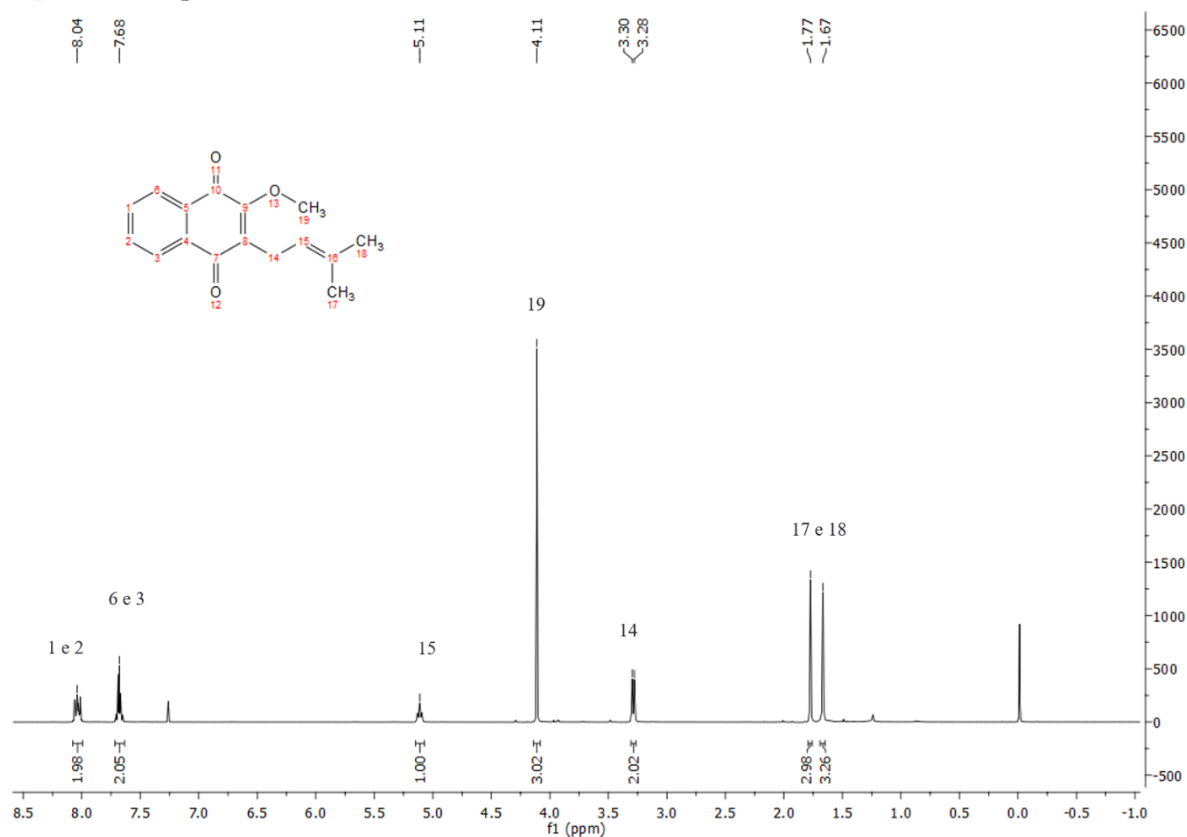
**Espectro 3:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de lapachol (**11**).



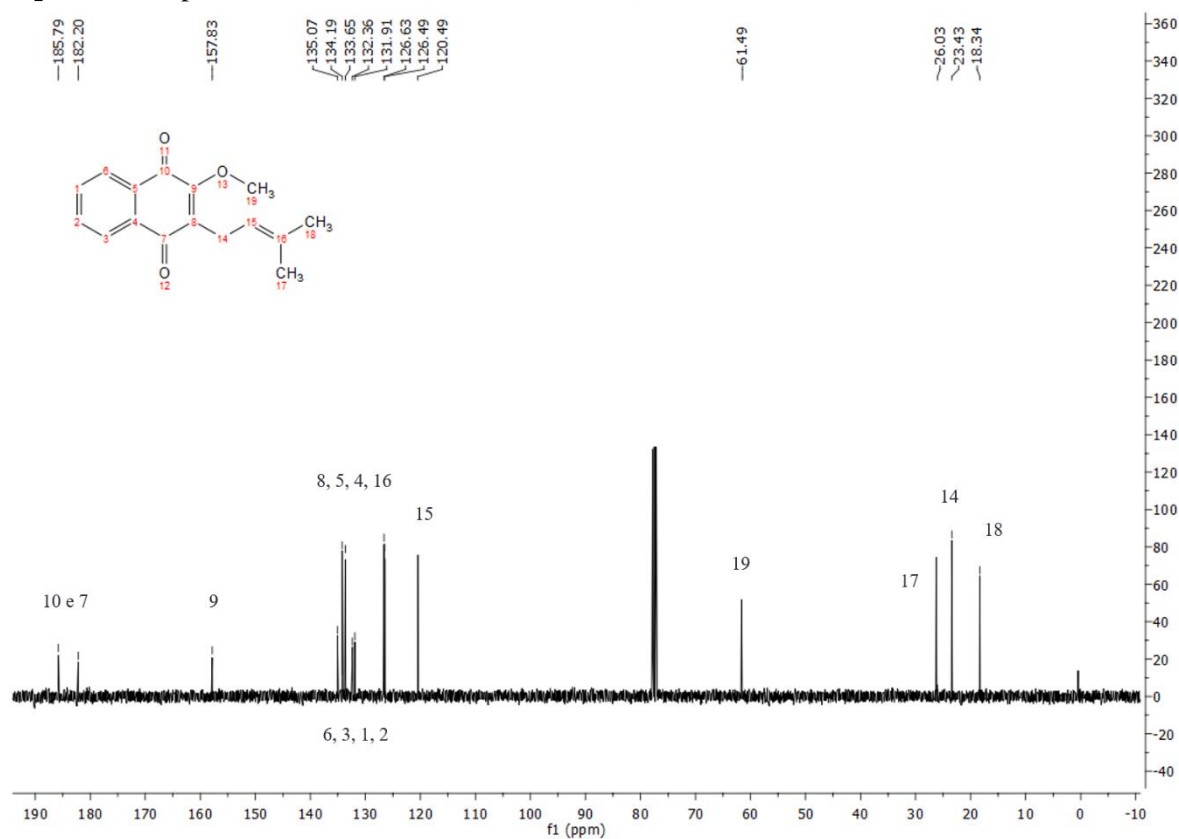
**Espectro 4:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  tipo APT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de lapachol (**11**).



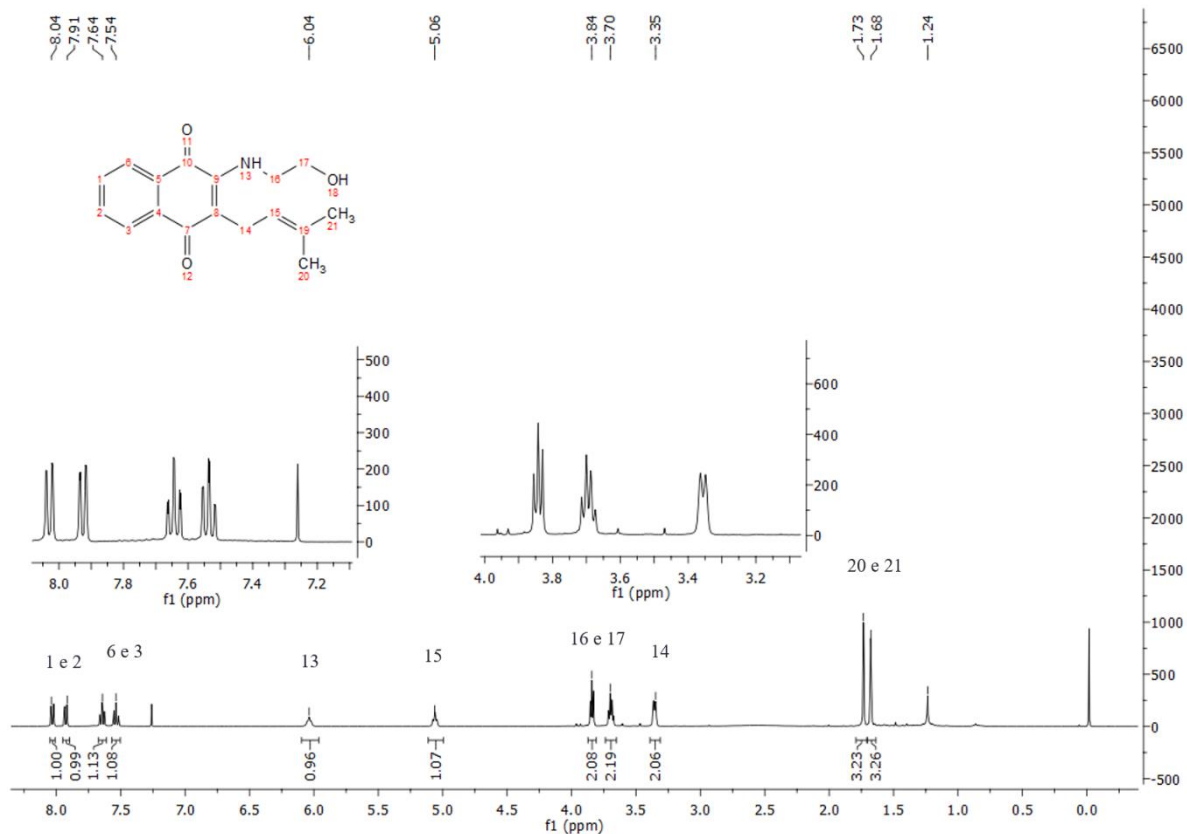
**Espectro 5:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **29**.



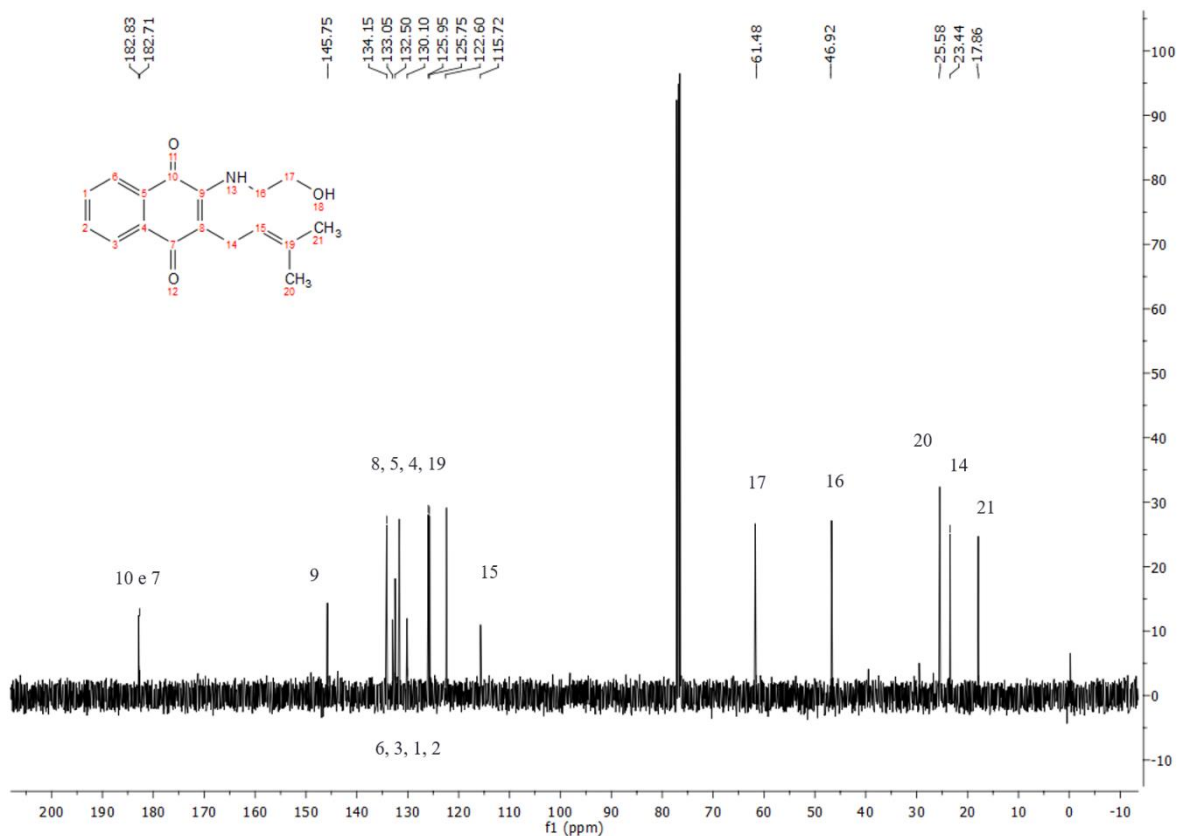
**Espectro 6:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **29**.



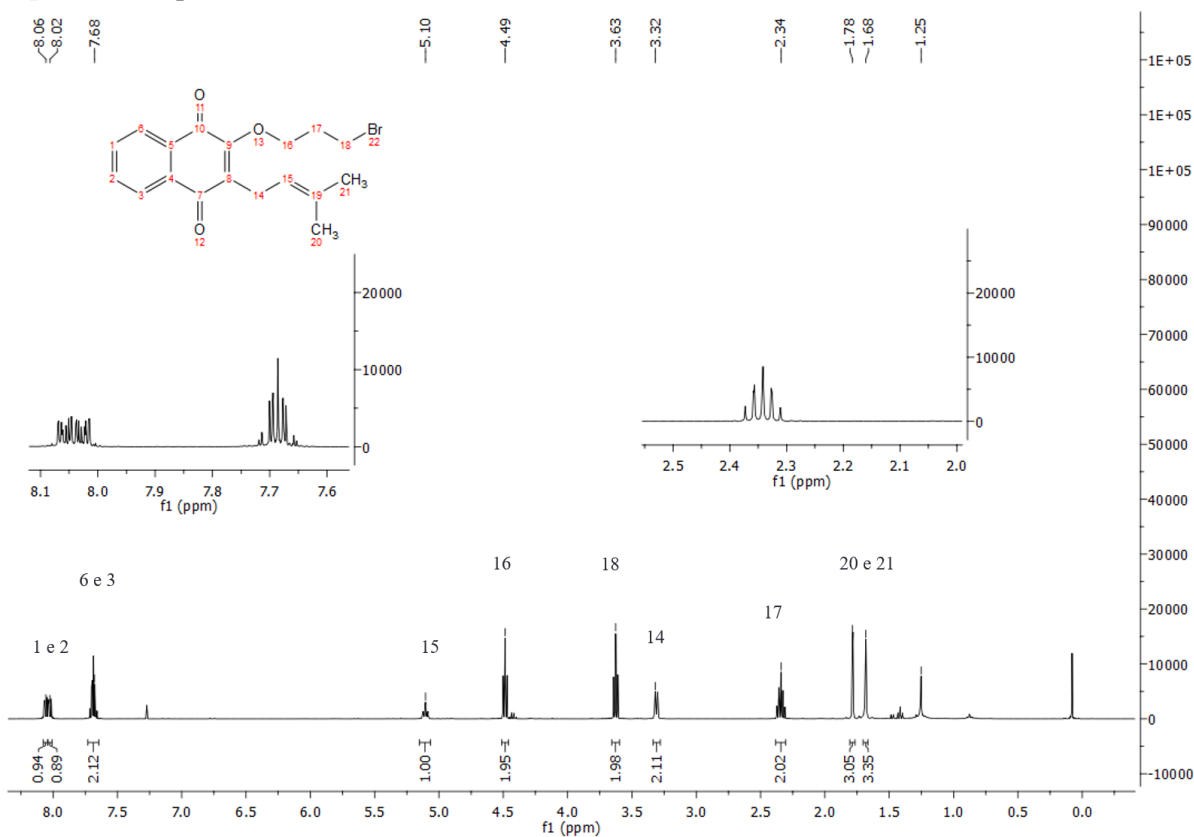
**Espectro 7:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **30a**.



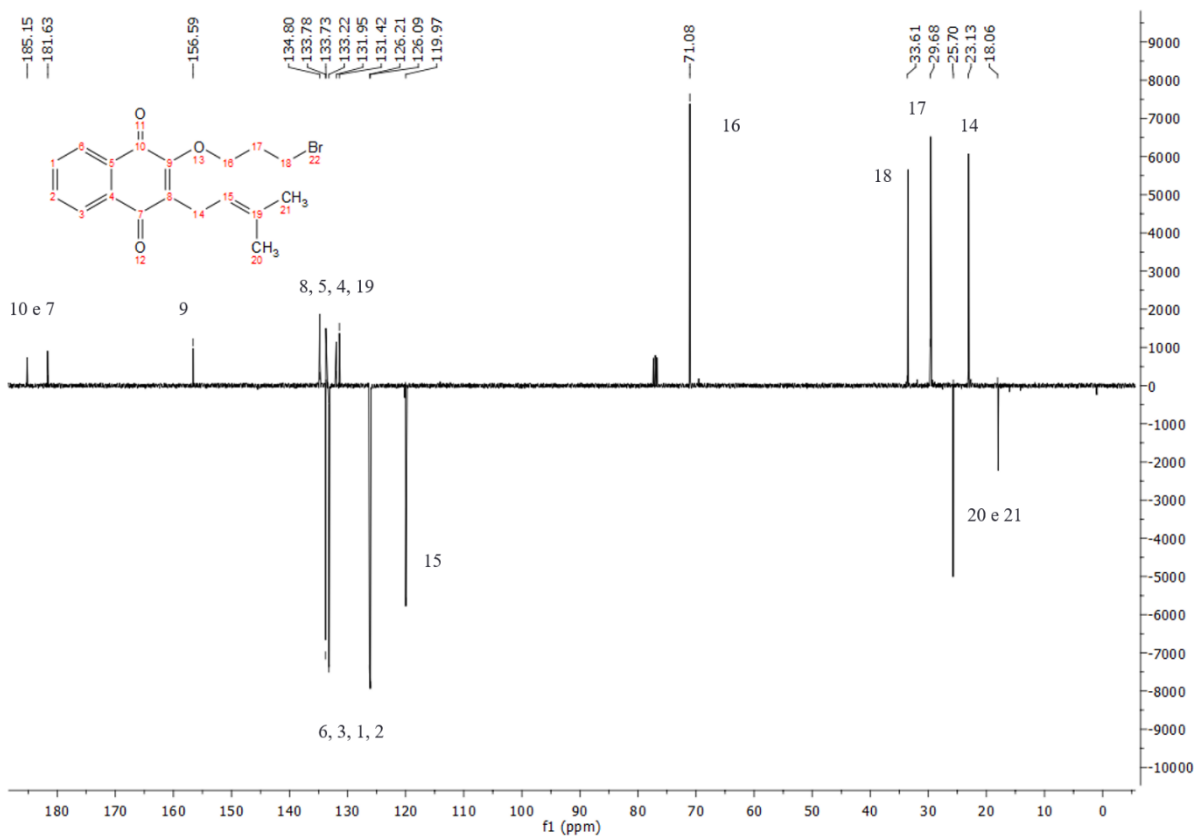
**Espectro 8:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **30a**.



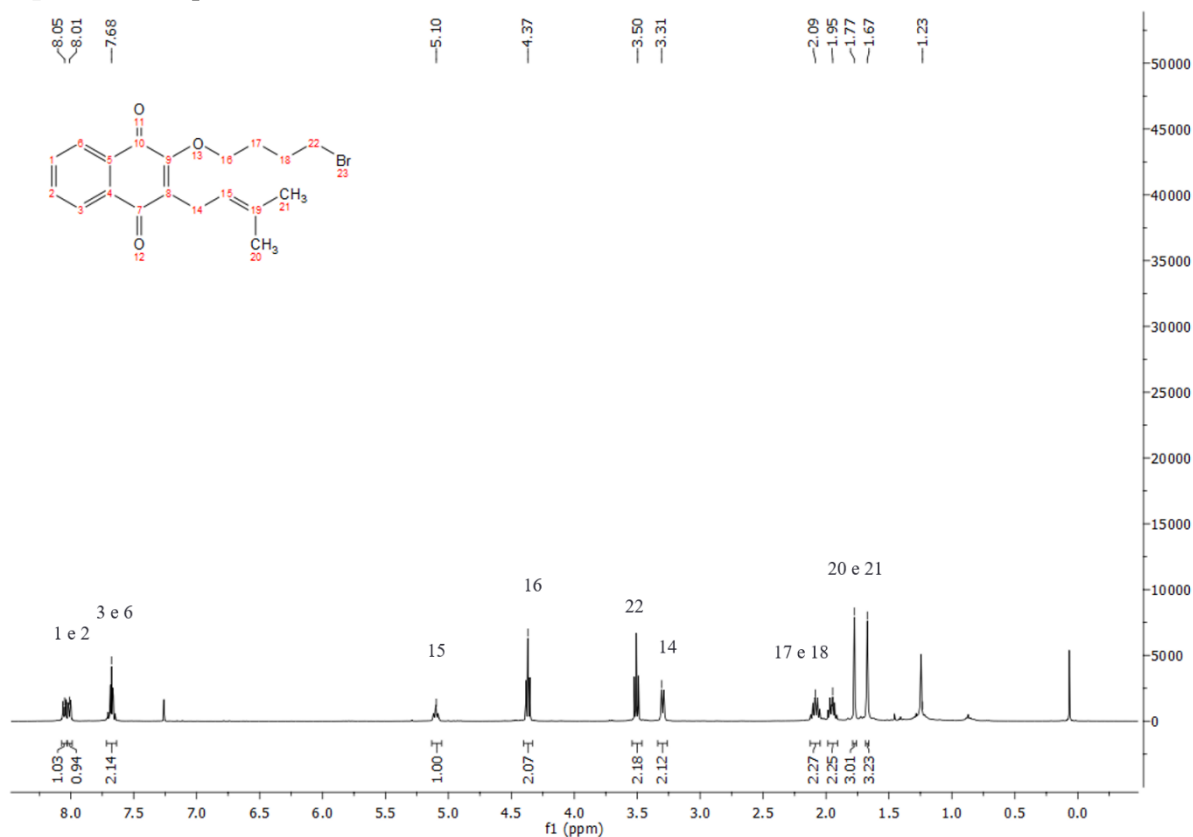
**Espectro 9:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de **32b**.



**Espectro 10:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C tipo APT (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) de **32b**.



**Espectro 11:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **32c**.



**Espectro 12:** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  tipo APT ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) de **32c**.

