



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN SIMÉTRICOS
DERIVADOS DE ISATINA COM ATIVIDADE ANTICÂNCER E LEISHMANICIDA**

Maísa Cavalcanti Coelho

João Pessoa – PB – Brasil

Julho / 2023



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

TESE DE DOUTORADO

**SÍNTESE DE ADUTOS DE MORITA-BAYLIS-HILLMAN SIMÉTRICOS
DERIVADOS DE ISATINA COM ATIVIDADE ANTICÂNCER E LEISHMANICIDA**

Maísa Cavalcanti Coelho*

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

Orientador: Claudio Gabriel Lima Junior

***Bolsista (CAPES)**

João Pessoa – PB – Brasil

Julho/ 2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C672s Coelho, Maísa Cavalcanti.

Síntese de adutos de Morita-Baylis-Hillman
simétricos derivados de isatina com atividade
anticâncer e leishmanicida / Maísa Cavalcanti Coelho. -
João Pessoa, 2023.
111 f. : il.

Orientação: Claudio Gabriel Lima Junior.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCEN.

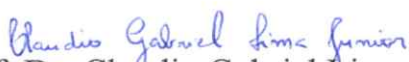
1. Química. 2. Adutos de Morita-Baylis-Hillman. 3.
Atividade antiproliferativa. 4. Atividade
antiparasitária. 5. Aceptor de Michael. 6. Simetria
molecular. I. Lima Junior, Claudio Gabriel. II. Título.

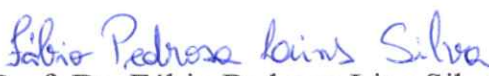
UFPB/BC

CDU 54(043)

Síntese de adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos derivados de isatina com atividade anticâncer e leishmanicida.

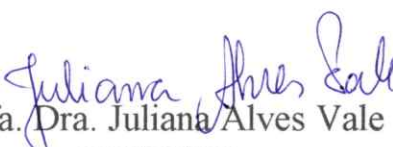
Tese de Doutorado apresentada pela aluna Maísa Cavalcanti Coelho e aprovada pela banca examinadora em 28 de julho de 2023.


Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior
DQ/UFPB
Orientador/Presidente


Prof. Dr. Fábio Pedrosa Lins Silva
UNINEves-JPA
Examinador


Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura
UEPB/CG-PB
Examinador


Profa. Dra. Dayse das Neves Moreira
DQ/UFPB
Examinadora


Profa. Dra. Juliana Alves Vale
DQ/UFPB
Examinadora

Assinaturas da Banca realizadas em modo presencial em 28/07/2023, digitalizada e certificada pelo Prof. Dr. Claudio Gabriel Lima Junior (SIAPE) 1937438

À Nossa Senhora, mãe de Jesus e minha.
A todos os que já foram, são ou serão afligidos pela leishmaniose ou pelo câncer.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus da vida, por ter me dado a oportunidade de viver, de estar cercada por pessoas queridas e por me sustentar em cada segundo da minha existência. À Nossa Senhora, minha mãe que em tudo me abraça.

À CAPES, pela bolsa concedida a mim, e pelos recursos direcionados à UFPB e aos professores do LASOM-PB. Aos demais órgãos de fomento, CNPQ que também beneficiaram o LASOM-PB e a UFPB, de modo a possibilitar a aquisição de equipamentos e reagentes ao longo do tempo, os quais possibilitaram a execução deste trabalho. À UFPB e ao PPGQ, essenciais para que este trabalho e a minha formação fosse possível.

À minha família, por ter me estimulado desde criança a estudar, especialmente no exemplo de meus pais professores, Zenildo e Geuza; meus irmãos Maíra e Victor; e minha madrinha Geida. Mas sobretudo, agradeço por terem me proporcionado o apoio emocional, afetivo, prático, financeiro e todo o necessário para que eu pudesse cursar o mestrado e o doutorado longe deles fisicamente. À minha família inteira, avós, tios, primos e cunhados, por terem vibrado comigo em cada conquista, e me animado nas dificuldades. Pela presença marcante mesmo tão distantes geograficamente.

Ao meu querido orientador, professor Claudio. Jamais poderia ter pedido a Deus orientadores melhores do que eu tenho e tive. Agradeço por ser um orientador que me impulsiona, eleva, orienta e compreende. Por toda paciência que teve comigo, os inúmeros ensinamentos e a convivência alegre.

Ao meu orientador emérito, professor Mário Vasconcellos, por ter me acolhido no LASOM desde o mestrado com muita confiança e carinho. Por todos os ensinamentos que me deu, pela amizade e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao ensino.

Aos meu amados colegas do LASOM, porque se tornaram amigos e alegraram cada dia de pesquisa e estudo. Aleff, Tayná, Rhuan, Anderson, Sandro, Isadora, Emily, Rita, Lidiane, Ashley, Jayne, João Paulo, Renan, Chico, Pedro, por compartilhar comigo nossas

angústias, aprendizados e vitórias, e pela disposição em colaborar no que precisasse no laboratório. De modo especial a Aleff, que além de amigo e companheiro de bancada, ouvir e ajudar em meus perrengues, foi essencial na escrita do primeiro artigo oriundo da tese. E a Tayná, cuja ideia inspirada em um projeto anterior do grupo, fez nascer a semente desta tese.

Ao professor Edilson, minha imensa gratidão por ter me apresentado ao mundo da pesquisa pela Iniciação Científica. Por todo o incentivo, ensinamentos e amizade que perduram até hoje.

À minha professora Ana Soares, porque ao me ensinar a dançar me ensinou também a ter mais disciplina e confiança em mim mesma. Por ter me ajudado a abstrair todos os problemas dançando, principalmente no auge da pandemia. Agradeço também pelo exemplo de professora que inspira e entende os estudantes. Às minhas parceiras de dança, pela companhia, aprendizados e risadas.

Aos meus amigos da Legião de Maria, por serem acolhida certa em todas as necessidades. Por serem pessoas maravilhosas que me inspiram e impulsionam a agir e a viver com Deus e Nossa Senhora. Por todo o carinho que me trazem e porque além de tudo me ajudaram a me sentir em casa. A dona Licor, Socorro Fernandes, Do Carmo, José Antônio, Lourdes, Nilza, Socorro Mourão, Gilvete, Marta, Odinete, Atamildes, agradeço.

Aos meus amigos e amigas que estiveram comigo, mesmo de longe, torcendo por mim e me apoiando nesta jornada, especialmente Núbia, Helena, Thaís, Natália, Maysa, Palloma, Fernanda, Letícia, Rafael, Gabriela e Iandra.

A todos os colaboradores da UFPB, especialmente os do departamento de Química, aos professores e ao secretário do PPPGQ, por terem sido parte da minha jornada de aprendizados no doutorado, seja nos ambientes do campus, em aula, em bancas, em colaborações no laboratório, seja administrando o programa.

Por fim, e não menos importante, à Mel, Zara, King e Dora, cujo amor são um bálsamo de alegria na minha vida.

*“O mar ensina
A maré de sorte só chega pra quem um dia
Entendeu que os ventos sempre mudam de direção
E não deixou de remar
Porque ninguém aprende a nadar na areia
O mar ensina, mas é preciso remar”
(Allan Dias Castro)*

RESUMO

Duas questões importantes na saúde humana, o câncer e a leishmaniose têm tratamentos usuais que incluem medicamentos injetáveis com muitos efeitos adversos, caros e por vezes ineficazes. No contexto necessário de desenvolvimento de novos fármacos, o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol está presente em moléculas sintéticas com propriedades antiproliferativa e leishmanicida. Para sintetizar este núcleo, a reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH) pode ser utilizada, sendo alguns adutos também já relatados como anti-leishmania e antitumorais. A fim de potencializar esta atividade, utilizamos a abordagem de dimerização molecular no desenho das moléculas inéditas. O objetivo do trabalho foi obter novos adutos diméricos com potencial atividades antiproliferativa e antiparasitária, contendo o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol formado a partir da reação de Morita-Baylis-Hillman usando a isatina como substrato. A rota sintética envolveu a síntese de 10 derivados de isatinas, o diacrilato de etilenoglicol e a RMBH formando os adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) diméricos. Variáveis como solvente, temperatura, catalisadores diferentes e proporções crescentes de DABCO (25 a 100%) foram testadas na otimização sintética dos AMBH. Os dímeros inéditos foram caracterizados por espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C . O uso de temperatura ambiente, DABCO 100% mol e DMF foram eleitos como as melhores condições de reação, com 43% de rendimento no caso do dímero usado no estudo de otimização (**1a**, *N*-metilado). O tempo reacional variou de entre 15 minutos e 11 dias, e rendimentos de 24 a 67%. Os 10 dímeros inéditos foram avaliados biologicamente nas linhagens de células cancerígenas K-569, HL-60 e A-549, e também em promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*. Dentre os adutos enviados para avaliação de atividade antiproliferativa, apresentaram forte atividade **1h**, um dímero *N*-benzilado e diclorado (CI_{50} 0,72 a 2,24 μM e IS 0,6 a 1,87), e **1f**, um dímero *N*-metilado e diclorado (CI_{50} 1,18 a 3,83 μM e IS 1,8 a 5,84), contra todas as cepas, sendo considerados promissores. Os dímeros deste trabalho foram mais ativos (CI_{50} 1,18 a 7,94 μM) que os monômeros correspondentes existentes (CI_{50} 4,2 a 16,08 μM) reportados na literatura, atestando a eficácia da dimerização para este caso. Nos testes *in vitro* em *Leishmania infantum*, **1h** e **1f** também se mostraram os mais ativos, com CI_{50} de 5,48 e 5,7 μM , respectivamente, na forma amastigota do parasito.

Palavras-chave: adutos de Morita-Baylis-Hillman, acceptor de Michael, simetria molecular, atividade antiproliferativa, atividade antiparasitária, 3-hidróxi-2-oxindol.

ABSTRACT

Two important questions in human health, cancer and leishmaniasis have usual treatments that include injectable medicine with a lot of adverse effects, high cost and sometimes ineffective. In the context of need of new drugs development, the 3-hydroxy-2-oxindol scaffold is present in synthetic molecules with antiproliferative and leishmanicidal properties. In order to synthesize this nucleus, the Morita-Baylis-Hillman reaction (MBHR) can be used, and some adducts are already reported as anti-leishmania and antitumor. With the purpose of enhancing this activity, we used a molecular dimerization approach in the design of the novel molecules. The aim of this work was to obtain new dimmeric Morita-Baylis-Hillman adducts with potential antiproliferative and antiparasitic activity, containing the 3-hydroxy-2-oxindol nucleus formed by Morita-Baylis-Hillman reaction, using isatin as substrate. The synthetic route involved the synthesis of 10 isatin derivatives, the ethyleneglycol acrylate and the MBHR synthesis, forming the dimmeric Morita-Baylis-Hillman Adducts (MBHA). Variables as solvent, temperature, different catalysts and increasing proportions of DABCO (25 to 100%) were tested in the MBHA synthetic optimization. The novel dimmers were characterized by mass spectrometry, Fourier transform infrared (FTIR), ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR). Room temperature, DABCO 100 mol% and DMF were chosen as the best reaction conditions, with 43% yield in the case of the dimer used in the optimization study (**1a**, *N*-metilado). The reaction time varied between 15 minutes to 11 days, and yields between 24 and 67%. 10 original dimmers were biologically evaluated in the cancer cell lines K-569, HL-60 e A-549 and also in promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum*. Among the adducts sent to antiproliferative evaluation, **1h**, a *N*-benzilated and dichlorated dimmer, presented strong activity against all the strains (IC_{50} 0,72 to 2,24 μM and SI 0,6 to 1,87), as well **1f**, a *N*-metilated and dichlorated dimmer (IC_{50} 1,18 to 3,83 μM and SI 1,8 a 5,84), being both considered promising. The dimmers of this work (IC_{50} 1,18 to 7,94 μM) were more active than the existing correspondent monomers (IC_{50} 4,2 to 16,08 μM) reported in the literature, evidencing the efficacy of dimerization approach in this case. The *in vitro* tests in *Leishmania infantum* showed **1h** and **1f** as the most active too, with IC_{50} of 5,48 and 5,7 μM , respectively, in the amastigote form of the parasite.

Keywords: Morita-Baylis-Hillman adducts, Michael acceptor, molecular symmetry, antiproliferative activity, antiparasitic activity, 3-hidroxy-2-oxindol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química geral dos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos sintetizados neste trabalho.

Figura 2 – Representação das estruturas químicas do núcleo 3-hidróxi-2-oxindol (1), paratunamida A (2), maremicina B (3) e convolutamidina A (4) (Elsbay, Tanaka & Miyamoto, 2019).

Figura 3 – Representação da estrutura química da série 5a-5h por Zhang *et al.* (2015) e das moléculas 6a-6x sintetizadas por Prathima *et al.* (2017).

Figura 4 – Representação da estrutura química das duas moléculas mais ativas da série sintetizada por Moghaddam *et al.* (2018), 7a e 7b, e da antocolorina H (8) isolada por Elsbay, Tanaka & Miyamoto (2019).

Figura 5 – Representação das estruturas químicas das bases de Mannich 29a, 29b e 29c sintetizadas por Wendel *et al.* (2009) e que demonstraram atividade contra *T. brucei*.

Figura 6 – Produto natural com atividade *in vitro* em *Trypanosoma cruzi* por Cotinguiba *et al.* (2009), 30a; um dos compostos sintetizados por Carvalho *et al.* (2014) com atividade leishmanicida *in vitro* em *Leishmania donovani*, 30b.

Figura 7 - Um dos híbridos de triclosano e chalcona sintetizado por Otero *et al.* (2014).

Figura 8 - Moléculas isoladas de *Scleria striatinux* De Wild com atividade moderada antiparasitária (Nyongbela *et al.*, 2017).

Figura 9 - Representação da estrutura química dos produtos naturais: ácido elágico (33), dicumarina (34) e tuberazina A (35).

Figura 10 – Esquema simplista representando um homodímero sem espaçador (A), um homodímero com espaçador (B), um heterodímero com espaçador (C) e um heterodímero de modo sobreposto.

Figura 11 – Estrutura química do dímero de hidantoína (36) e do dímero (37) baseado na curcumina (38)

Figura 12 – Representação da estrutura química do dímero 39 sintetizado por Chen *et al.* (2021) e respectivo monômero 40.

Figura 13 – Representação das estruturas químicas da testosterona 41, seu derivado 42 e dímero 43 sintetizados por Paquin *et al.* (2023).

Figura 14 – Alguns dos dímeros de adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados por Silva (2016).

Figura 15 – Estrutura química do produto 2-hidróxi-etil-2-(3-hidróxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il)acrilato (50) formado nas reações utilizando DES.

Figura 16 – Espectro de RMN ^1H de 1d.

Figura 17 – Espectro de RMN ^{13}C de 1d.

Figura 18 – Espectro de Infravermelho (IV) em KBr de 1d.

Figura 19 – Gráfico comparando os CI_{50} dos compostos, por linhagem de célula cancerígena.

Figura 20 – Gráfico gerado pelo ADME Swiss representando espaço de valores relacionados a propriedades físico-químicas adequadas à biodisponibilidade oral de 1f. Lipo = lipofilicidade; Size = tamanho/massa molecular; Polar = polaridade; insol = insolubilidade; insatu = insaturações; flex = flexibilidade

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema da reação de síntese dos híbridos 9a-9h sintetizados por Fernandes *et al.* (2020), contendo a porção 3-hidróxi-2-oxindol.

Esquema 2 – Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman.

Esquema 3 – Mecanismos propostos por McQuade e Aggarwal para a RMBH representadas num único esquema feito por Lima-Júnior e Vasconcellos (2012).

Esquema 4: Representação da reação de MBH entre um acrilato com núcleo tetraidropirano e aldeído aromático, realizada por Sousa *et al.* (2017).

Esquema 5 – Esquema reacional de um dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados por Vieira *et al.* (2022). Os outros adutos foram sintetizados partindo de outros aldeídos.

Esquema 6 – Esquema da RMBH e posterior inserção do grupo TBS realizada por Khon *et al.* (2006).

Esquema 7 – Esquema reacional das sínteses realizadas por Mohan *et al.* (2006).

Esquema 8 – Esquema reacional das RMBH realizadas por Lima-Junior *et al.* (2016), usando isatina e isatina metilada.

Esquema 9 – Esquema reacional da RMBH realizada por Oliveira *et al.* (2021).

Esquema 10 - Rota sintética convergente para a síntese dos AMBH simétricos de isatina.

Esquema 11 - Rota sintética das isatinas substituídas necessárias para a síntese dos dímeros-alvo.

Esquema 12 – Reação de Morita-Baylis-Hillman usando isatinas substituídas (**48a-48i**, **45a-45c**), DABCO (**50**) e o acceptor de Michael diacrilato **46** para sintetizar os AMBH simétricos inéditos.

Esquema 13 – Esquema reacional da síntese de diacrilato de etilenoglicol **46** a partir de reação de esterificação e resultados de rendimento e tempo reacional desta síntese.

Esquema 14 – Representação da RMBH realizada por Malini *et al.* (2015) usando N-metilisatina e o 1,6-hexanodiol, levando à síntese de um dímero (**52**) e um monômero (**53**).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições reacionais, tempo e rendimento da síntese das isatinas *N*-alquiladas **45a-45c**.

Tabela 2 – Esquema reacional e resultados da síntese das isatinas substituídas a partir de reações de substituição eletrofílica aromática, gerando os derivados 5-nitroisatina, 5-cloroisatina e 5,7-dicloroisatina.

Tabela 3 – Esquema reacional da *N*-alquilação das isatinas substituídas em C-3 e C5, formando **48a-48i**, seguido dos resultados de rendimento e tempos destas sínteses.

Tabela 4 – Otimização das condições reacionais e rendimentos dos experimentos realizados para a reação de Morita-Baylis-Hillman. O composto de interesse produzido em todas foi o dímero **1a**.

Tabela 5 – Esquema reacional da reação de Morita-Baylis-Hillman para a síntese dos AMBH simétricos, usando o diacrilato de etilenoglicol (**46**) como aceptor de Michael e as isatinas substituídas como sítio eletrofílico. O catalisador usado foi o DABCO (**12**).

Tabela 6 – Percentuais de inibição dos dímeros AMBH nas linhagens tumorais A549 (carcinoma de pulmão de células pequenas), HL60 (leucemia promielocítica) e K562 (leucemia mielóide crônica).

Tabela 7 – Concentração Inibitória 50% e Índice de Seletividade dos AMBHs frente às linhagens tumorais A-549 (carcinoma de pulmão de células pequenas), HL-60 (leucemia promielocítica) e K-562 (leucemia mielóide crônica). A linhagem MRC-5 é de células não-tumorigênicas e foi usada para calcular a seletividade dos compostos estudados.

Tabela 8 – Comparação dos resultados de Concentração Inibitória 50% dos monômeros (Brito *et al.*, 2020) e dímeros correspondentes no presente trabalho, frente a células HL-60.

Tabela 9 – *Screening* dos compostos frente a forma promastigota de *Leishmania infantum*.

Tabela 10 – Avaliação dos compostos na forma promastigota de *Leishmania infantum*. O tratamento estatístico utilizou o método do N estatístico.

Tabela 11 – Avaliação dos compostos na forma amastigota de *Leishmania infantum*. O tratamento estatístico utilizou o método do N estatístico.

Tabela 12 – Valores de parâmetros de Lipinski, refratibilidade molar e área superficial polar topológica preditos pela ferramenta ADME Swiss.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME – Absorção, distribuição, metabolização e excreção

AMBH – Aduto de Morita-Baylis-Hillman

ASPT – Área Superficial Polar Topológica

Bmim [BF₄] - 1-Butil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato

CCDA – Cromatografia em Camada Delgada Analítica

CI₅₀ – Concentração Inibitória 50%

DABCO – 1,8-diazabicyclo [2.2.2]octano

DBU - 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno

DES – Deep eutectic solvent (solvente eutético profundo)

DTN – Doença Tropical Negligenciada

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IS -Índice de seletividade

MBH - Morita-Baylis-Hillman

RMBH – Reação de Morita-Baylis-Hillman

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

THF - Tetrahidrofurano

WHO -World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1 O câncer e a leishmaniose persistem como doenças carentes de novos tratamentos.....	20
3.2 A porção 3-hidróxi-2-oxindol em moléculas ativas em <i>Leishmania</i> e câncer.....	22
3.3 Adutos de Morita-Baylis-Hillman: aspectos sintéticos e farmacológicos em leishmaniose e câncer.....	25
3.4 Aceptores de Michael e sua importância no planejamento de novos candidatos a fármacos antiparasitários.....	31
3.5 A simetria na natureza e o emprego de dimerização molecular como estratégia no planejamento de novos fármacos.....	34
4. ESTRATÉGIA.....	39
4.1 Planejamento e síntese das substâncias inéditas.....	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Síntese dos intermediários sintéticos dos AMBH simétricos: diacrilato (46) e isatinas substituídas (45a-45c, 47a-47c e 48a-48i).....	42
5.2 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos de isatina (1a-1j).....	46
5.3 Avaliação de atividade antiproliferativa dos AMBH diméricos.....	57
5.4 Avaliação de atividade dos AMBH diméricos <i>in vitro</i> em <i>Leishmania infantum</i>	63
5.5 Avaliação <i>in silico</i> das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolização e estabilidade).....	65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	68
7. EXPERIMENTAL.....	69
7.1 Material e métodos.....	69

7.2 Síntese do diacrilato 46.....	70
7.3 Síntese das isatinas monossubstituídas (5-cloro-isatina, 5,7-diclorosatina, 5-nitro-isatina, <i>N</i> -alil-isatina, <i>N</i> -benzil-isatina, <i>N</i> -metil-isatina) 45a-45c, 47a-47c.....	70
7.4 Síntese das isatinas dissbstituídas 48a-48i (<i>N</i> -metilação, <i>N</i> -alilação e <i>N</i> -benzilação das isatinas monossubstituídas 47a-47c).....	71
7.5 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos usando as isatinas mono ou dissbstituídas.....	72
7.6 Dados espectroscópicos das moléculas inéditas.....	72
REFERÊNCIAS.....	79
ESPECTROS.....	88
ANEXO – Artigo oriundo da tese.....	112

1. INTRODUÇÃO

Dentre os principais desafios da humanidade, a relação saúde-doença sempre teve destaque, devido à complexidade das questões envolvidas e as consequências que podem surgir a partir das doenças. A descoberta e acesso a tratamentos ocorre de maneira desigual, privilegiando lugares e pessoas com maior poder aquisitivo, aprofundando o cenário de desigualdade social observado no mundo (Oliveira, 2018).

Um exemplo disso é a existência das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), que designa enfermidades que acometem principalmente habitantes de regiões tropicais, em situações inadequadas de saneamento, alimentação e moradia. Para tais doenças há menos interesse da iniciativa privada de buscar novos e melhores tratamentos (Who, 2020).

Uma das alternativas é que a iniciativa pública cumpra este papel de busca por novas substâncias ativas, mais eficazes, seguras e baratas que poderiam aumentar a acessibilidade e reduzir custos em diferentes tratamentos. Porém, estima-se que a cada medicamento que chega ao mercado farmacêutico, mais de 10.000 entidades químicas foram testadas no processo de pesquisa e desenvolvimento, em um processo científico-tecnológico custoso e demorado (Sun *et al.*, 2022).

Em contrapartida, doenças como o câncer --- que não respeitam limites geográficos, etários, econômicos e sociais --- mobilizam esforços em escala global. E na busca de tratamentos eficazes para essa doença, já foram observados potencial uso de quimioterápicos e resultados promissores em doenças negligenciadas tal como a miltefosina, que foi pensada para tratamento do câncer e se mostrou efetiva e adotada no tratamento da leishmaniose (Brasil, 2020).

Em diferentes partes do Brasil, equipes e laboratórios se esforçam na busca por novas alternativas terapêuticas. Destacamos o Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba – LASOM–PB, que há 15 anos se dedica em identificar e testar novas substâncias, já apresentando bons resultados em linhagens de células cancerígenas e espécies de *Leishmania* (Barbosa *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2021). E dentre os esqueletos moleculares que são foco de estudo atual está a porção 3-hidróxi-2-oxindol.

Esta porção está presente em inúmeras moléculas relatadas na literatura com atividade anticâncer (Zhang *et al.*, 2015; Prathima *et al.*, 2017; Moghaddam *et al.*, 2018), tendo emergido mais recentemente como núcleo de destaque em algumas moléculas com propriedade leishmanicida (Fernandes *et al.*, 2020).

Uma das maneiras de obter a porção 3-hidróxi-2-oxindol sinteticamente é pela reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH), usando a isatina como substrato. Além disso, adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) já demonstraram atividade em *Leishmania* sp. (Sousa *et al.*, 2017; Vieira *et al.* 2017) e em câncer (Mohan *et al.*, 2006; Lima-Júnior *et al.*, 2016).

No intuito de melhorar a eficácia das moléculas em estudo, diferentes técnicas podem ser utilizadas, sendo uma delas a dimerização molecular. Nessa abordagem, duas porções de atividade conhecida são unidas em uma única molécula, podendo apresentar um espaçador entre elas ou não (Barreira & Fraga, 2015). O intuito é que o dímero gerado tenha propriedades melhores que os monômeros isolados e já foi alcançado com sucesso em muitos casos (Slavova-Kazakova *et al.*, 2015; Furutachi *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2021).

Partindo deste contexto, o presente trabalho explora o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol na proposição de novos compostos antitumorais e antiparasitários. Tendo conhecido as potencialidades desta porção e as possíveis benesses da dimerização molecular, espera-se que os dímeros simétricos oriundos da reação de Morita-Baylis-Hillman, possam contribuir na pesquisa de novas moléculas ativas contra células tumorais e parasitos que acometem a humanidade.

2. OBJETIVOS

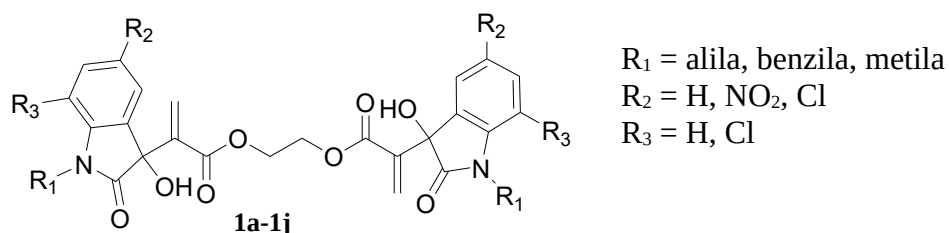
2.1 Objetivo Geral

Planejar novos adutos diméricos de Morita-Baylis-Hillman com potencial atividade antiproliferativa e antiparasitária, usando derivados de isatina como substrato, como potenciais candidatos a fármacos.

2.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar os derivados *N*-alquilados da isatina.
- Sintetizar 5-nitro-isatina, 5-cloro-isatina, 5,7-dicloro-isatina e seus respectivos derivados *N*-alquilados.
- Sintetizar e caracterizar os adutos de Morita-Baylis-Hillman (Figura 1) a partir da reação entre o diacrilato de etilenoglicol e os derivados de isatina.

Figura 1 – Estrutura química geral dos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos sintetizados neste trabalho.



- Avaliar a atividade biológica *in vitro* das substâncias obtidas nas linhagens de células humanas cancerígenas A-549 (carcinoma de pulmão de células pequenas) K-562 (leucemia mielóide crônica) e HL-60 (leucemia promielocítica).
- Avaliar a atividade biológica *in vitro* dos compostos sintetizados em células de *Leishmania infantum*.
- Relacionar a estrutura química às atividades biológicas observadas.
- Realizar estudos *in silico* das moléculas sintetizadas frente às propriedades ADME.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nos próximos tópicos serão abordados sobre as doenças câncer e leishmaniose; as propriedades das moléculas com a porção 3-hidróxi-2-oxindol e formas de obtê-las sinteticamente; a reação de Morita-Baylis-Hillman e seus adutos; e a dimerização molecular.

3.1 O câncer e a leishmaniose persistem como doenças carentes de novos tratamentos

Um dos maiores problemas de saúde no mundo atual é o câncer, que mata quase 1 pessoa a cada 6 acometidas pela doença. Em 2020, 10 milhões de pessoas no globo morreram em decorrência desta enfermidade, que pode acontecer em praticamente qualquer local do corpo. Para cada local, há um tipo de câncer, denominação que engloba mais de 100 doenças, sendo os tipos mais comuns os de mama, pulmão, cólon, reto e próstata (Who, 2022).

No Brasil, o câncer de pulmão tem a 3ª maior incidência entre os tipos de câncer entre os homens, atingindo uma estimativa de 18.020 pessoas em 2023, mas é o que apresenta a maior mortalidade entre eles (13,6%). Entre as mulheres, estes tipos de câncer representam a 4ª maior incidência, acometendo 14.440 pessoas, e a 2ª maior mortalidade (11,6%) entre os cânceres que as atingem (Inca, 2020).

Para o triênio 2023 a 2025, foi estimado que novos 704 mil casos de câncer ocorrerão no Brasil, a cada ano. Destes, 34 mil por ano serão no pulmão. Já a leucemia, o 10º tipo de câncer mais frequente no Brasil, terá 11.540 novos casos anuais neste triênio (Inca, 2022).

Em relação ao tratamento, as várias opções de quimioterápicos antitumorais trazem a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelas células cancerígenas, por diferentes mecanismos (Huang, 2017). Há muitos genes e moléculas envolvidos e interconectados na sensibilidade ou resistência intrínseca e desenvolvida aos antitumorais. Para driblar esta possível resistência das células cancerígenas, novas terapias com máximo efeito que viabilize a eliminação das células tumorais com o menor efeito tóxico possível aos tecidos normais devem ser desenvolvidas (Nikolaou, 2018).

Além disso, o recomendado é usar uma combinação de fármacos no tratamento de câncer, a fim de aumentar a chance de remissão e diminuir a de recorrência. Com isso, o

desafio de lidar com a toxicidade torna-se ainda maior, objetivando o sucesso do tratamento sem comprometer demais a qualidade de vida do paciente (Zugazagoitia, 2016). Assim, é preciso não só de novos fármacos para aumentar o arsenal terapêutico contra o câncer, mas também que eles sejam o menos tóxico possível.

Enquanto o câncer consiste em uma série de doenças, a leishmaniose apresenta alguns tipos mais limitados, a saber, a leishmaniose visceral, a cutânea e a mucocutânea. A doença pode se desenvolver após a infecção de parasitos do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada do mosquito palha infectado. Atualmente, a leishmaniose ainda é considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DNT) pela Organização Mundial de Saúde e acomete entre 700 mil e 1 milhão de pessoas no mundo a cada ano (Who, 2023).

Mais da metade das chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DNTs) são parasitárias e afetam, juntas, mais de 1,7 bilhão de pessoas no mundo. A denotação de doenças negligenciadas se refere a enfermidades de diferentes causas, seja bacteriana, parasitária, fúngica, viral e mesmo algumas não infecciosas. O que elas apresentam em comum é que afetam a qualidade de vida das pessoas atingidas, atrapalhando seu trabalho e seus estudos e acentuando ainda mais sua condição social já desfavorecida, pois as DNTs acometem principalmente pessoas com baixo acesso a saneamento básico, água potável, saúde e educação (Who, 2020).

Como bem colocado por Oliveira (2018), o termo “negligência” denuncia não apenas a negligência das doenças, mas de pessoas. As DNTs acabam sendo uma barreira para o desenvolvimento socioeconômico e a redução da pobreza. Apesar dos esforços mais significativos nos últimos 10 anos, ainda há muito o que ser feito para combater estas doenças e as desigualdades agravadas por elas (Who, 2020). Neste contexto, a universidade pública apresenta um papel crucial, posto que deve ter como prioridade assuntos de interesse da população, como é o caso destas enfermidades e suas consequências.

No Brasil, os novos casos de leishmaniose visceral — a forma mais fatal, quando não tratada — diminuíram para menos de 2000 casos em 2021, entretanto, a taxa de letalidade aumentou para 10,5% em 2021. Essa taxa era 3,2% em 2000 e 6,9% em 2010 (BRASIL, 2020). Entre os fatores responsáveis por esse aumento de letalidade figuram o diagnóstico tardio, a falha terapêutica e o abandono do tratamento pelo paciente (Cavalcante *et al.*, 2022).

Em adição, outros fatores como a incidência de leishmaniose visceral, tamanho da população vulnerável e da população municipal, além da incidência de SIDA, também foram encontrados como fatores importantes no aumento da letalidade de leishmaniose visceral no Brasil (Donato *et al.*, 2020).

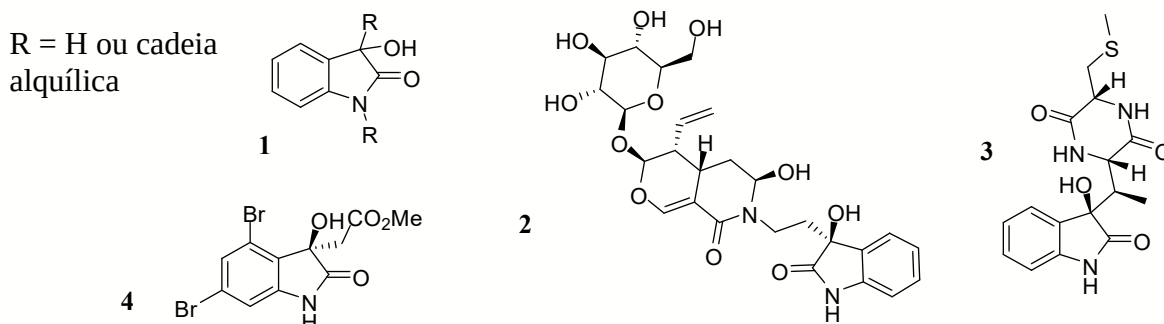
O abandono do tratamento pelos pacientes representa uma ameaça, visto que aumenta a chance de resistência parasitária. Na investigação de Bamorovat e *et al.* (2023), alguns fatores associados ao abandono do tratamento de leishmaniose (cutânea) foram a complexidade e a duração do regime de tratamento, além dos seus efeitos adversos. Esse resultado reforça a necessidade não só de buscar alternativas para aumentar a adesão dos pacientes, mas também tratamentos melhores, mais fáceis de administrar e com menos efeitos adversos.

Esses efeitos adversos incluem dores nas articulações, fadiga, dor no local da aplicação, problemas renais e o mais grave, problemas cardiovasculares. A função renal e o coração devem ser monitorados durante o tratamento, a fim de garantir a segurança do paciente e trocar o medicamento em caso de toxicidade (Brasil, 2014).

3.2 A porção 3-hidróxi-2-oxindol em moléculas ativas em Leishmania e câncer

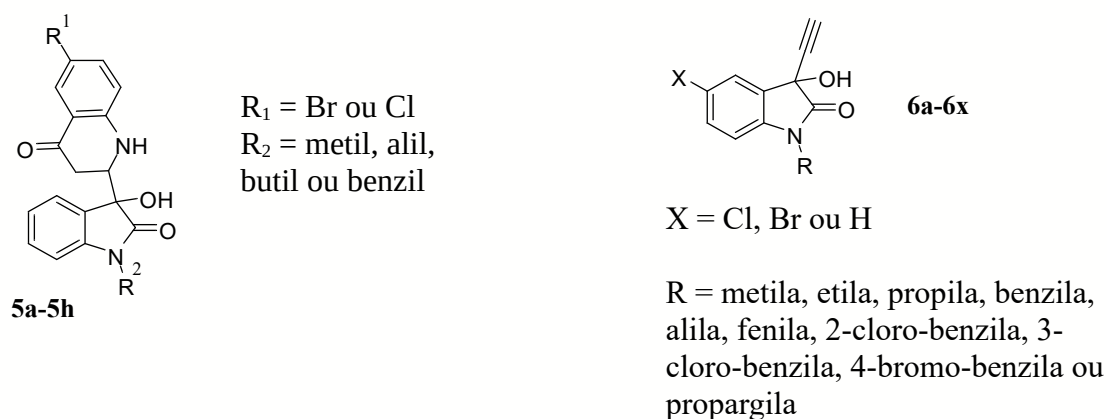
No sentido de encontrar novas substâncias potencialmente úteis no enfrentamento destas doenças, destacamos o núcleo oxindol, especificamente o 3-hidróxi-2-oxindol, representado na Figura 2. A natureza produz moléculas contendo esta porção, a exemplo das paratunamidas A-D (Figura 2), usadas pelo ser humano para problemas estomacais e que são citotóxicas em carcinoma de células KB (Kagata *et al.*, 2006, Pedibblota, 2009). Outros exemplos incluem as maremicinas A-D, ativas contra a linhagem de leucemia K-562, e as convolutamidina A-E, ativas contra a linhagem HL-60 (Pedibblota, 2009).

Figura 2 – Representação das estruturas químicas do núcleo 3-hidróxi-2-oxindol (1), paratunamida A (2), maremicina B (3) e convolutamidina A (4) (Elsbay, Tanaka & Miyamoto, 2019).



Os núcleos 3-hidróxi-2-oxindol e o 2,3-dihidroquinolina foram conjugados em uma série de moléculas sintetizadas por Zhang e *et al.* (2015). As moléculas **5a-5h** (Figura 3) mostraram resultados positivos de atividade antiproliferativa não só *in vitro*, em células das linhagens Hela (câncer cervical) e A-549 (câncer de pulmão), como *in vivo*, em camundongos.

Figura 3 – Representação da estrutura química da série **5a-5h** por Zhang e *et al.* (2015) e das moléculas **6a-6x** sintetizadas por Prathima e *et al.* (2017).



Continuando entre as moléculas sintéticas, uma série de pequenas moléculas **6a-6x** com o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol apresentou atividade em linhagens de células tumorais de mama, de próstata, colorretal e cervical, sendo a mais ativa com CI_{50} entre 4,9 e 6,1 μM ($X = \text{Cl}$ e $R = \text{propargila}$). A estrutura delas está representada na Figura 3 (Prathima *et al.*, 2017).

Moghaddam *et al.* (2018) sintetizaram moléculas com o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol e observaram que duas delas demonstraram atividade antitumoral diante da linhagem DU145 (câncer de próstata). É digno de nota que ambas as substâncias, representadas na Figura 4, apresentam um halogênio como grupo substituinte no anel aromático do núcleo 3-hidróxi-2-oxindol, uma o cloro e a outra o bromo. Nas investigações, foi notado que **7a**, cujo CI_{50} foi 110 μM , induzia as células cancerosas à apoptose. Outro ponto observado foi que as novas entidades químicas sintetizadas sem substituição no nitrogênio não apresentaram atividade, mas sim aquelas substituídas com o grupo etila.

Figura 4 – Representação da estrutura química das duas moléculas mais ativas da série sintetizada por Moghaddam *et al.* (2018), **7a** e **7b**, e da antocolorina H (**8**) isolada por Elsbay, Tanaka & Miyamoto (2019).

X = Br (**7a**) ou Cl (**7b**)

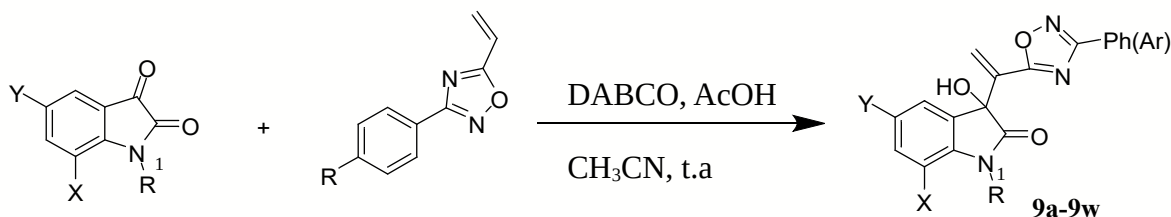


A antocolorina H (**8**, Figura 4), um dos produtos extraídos a partir da fermentação de arroz por *Aspergillus versicolor*, apresenta efeito citotóxico frente a células Hela. O par enantiomérico dela, antocolorina G, não foi ativa, e as demais substâncias isoladas que não tinham a porção 3-hidróxi-2-oxindol demonstraram menos atividade ou nenhuma (Elsbay, Tanaka & Miyamoto, 2019).

Esta porção também está presente em moléculas com propriedades antileishmaniose. Moléculas híbridas com núcleo 3-hidróxi-2-oxindol apresentaram atividade em *Leishmania infantum* e algumas delas também em *Trypanosoma cruzi*. Os valores de CI_{50} foram comparáveis aos de benzonidazol e miltefosina, o que exemplifica a potencialidade deste núcleo para a síntese de novos agentes leishmanicidas. As moléculas foram sintetizadas

servindo-se da reação de Morita-Baylis-Hillman (Esquema 1), com derivados de isatina e um aceptor de Michael contendo núcleo oxadiazol (Fernandes *et al.*, 2020).

Esquema 1 – esquema da reação de síntese dos híbridos **9a-9h** sintetizados por Fernandes *et al.* (2020), contendo a porção 3-hidróxi-2-oxindol.



R¹ = Me, Et, Ph ou Bn

X = Br, Cl ou H

Y = Cl, Br, F, OCF₃, NO₂, OMe, Me, H

R = H, OMe, NO₂ ou Cl

Outros relatos de substâncias contendo este núcleo específico e que apresentassem atividade em espécies de *Leishmania* sp. não puderam ser encontrados, entretanto, o núcleo oxindol em geral é reconhecido na literatura em muitos compostos com esta propriedade biológica (Kapil, Singh & Silakari, 2018). Moléculas contendo esta porção na estrutura também aparecem na literatura com atividade antiviral (Wei *et al.*, 2023).

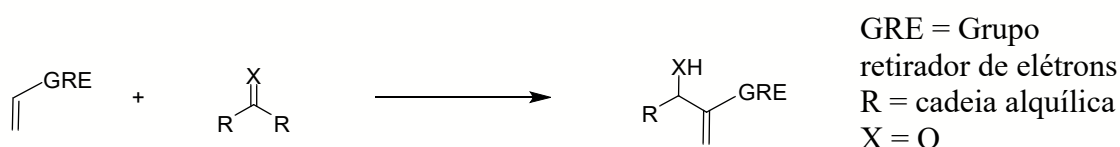
A fim de obter o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol, há uma lista de reações que podem ser utilizadas, tais como a reação de Barbier (Karpe & Mondal, 2022), reação catalisada por iodo (Vuppalapati & Lee, 2012), reação de Henry (Meshram *et al.*, 2013), reação aldólica (Wei *et al.*, 2023) e funcionalização de C (sp³)-H (Hao *et al.*, 2015), todas a partir de isatina. Além destas, temos também a reação de Morita-Baylis-Hillman (Garden & Skakle, 2002).

3.3 Adutos de Morita-Baylis-Hillman: aspectos sintéticos e farmacológicos em leishmaniose e câncer

A reação de Morita-Baylis-Hillman se destaca por suas peculiaridades como a formação de ligação C-C com economia de átomos, *one-pot* (único meio reacional), e por possibilitar, por vezes, o uso de solventes verdes como a água (Biswas, 2015). A reação se dá entre um alceno ativado, um acrilato, por exemplo, e uma entidade que apresente um centro eletrofílico, como uma carbonila (Esquema 2). O catalisador usado quando Morita *et al.*

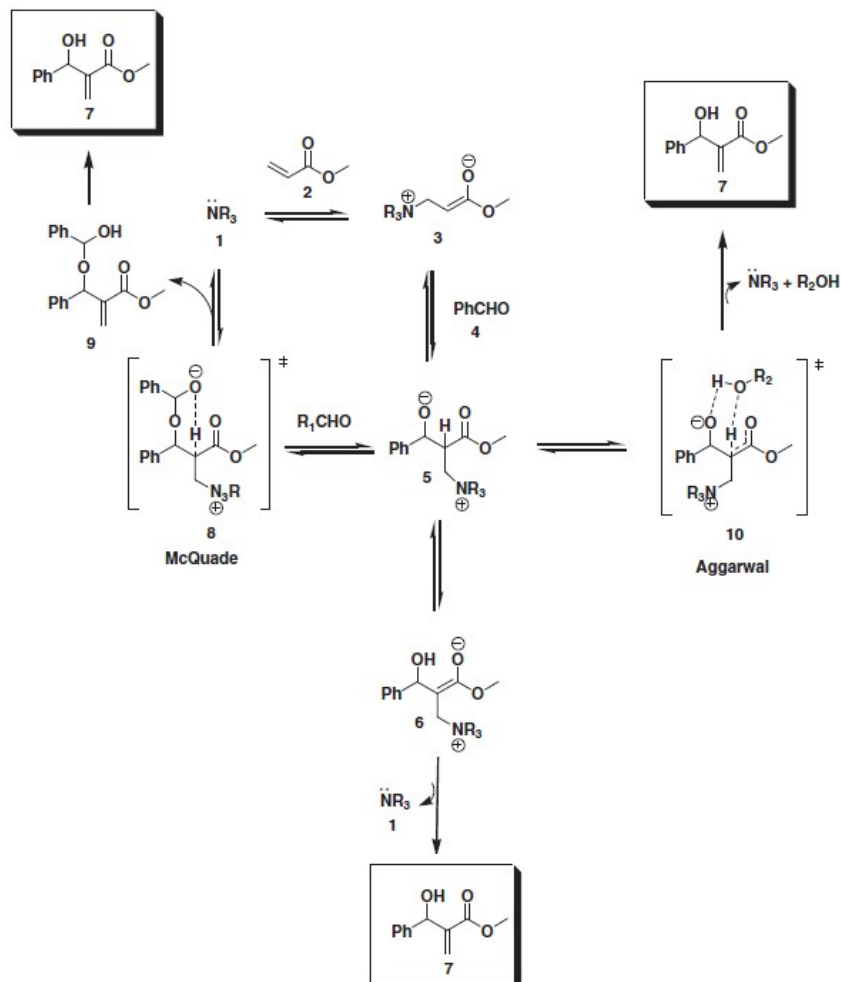
(1968) desenvolveram a reação era uma fosfina e depois, Baylis e Hillman melhoraram a reação usando aminas terciárias como catalisadores (Lima-Júnior & Vasconcellos, 2012). Os produtos formados, os adutos de Morita-Baylis-Hillman, vem se consolidando na literatura por suas atividades biológicas, incluindo em linhagens cancerígenas e em espécies de *Leishmania* (Santos *et al.*, 2015).

Esquema 2 – Esquema geral da reação de Morita-Baylis-Hillman.



Quanto ao mecanismo da reação, as propostas envolvem o catalisador como promotor da reação. O Esquema 3 ilustra as principais propostas num só esquema, mostrando que elas podem ocorrer simultaneamente, dependendo das condições reacionais. Na proposta de McQuade, duas moléculas de aldeído reagem com uma do aceptor de Michael. Só então o catalisador reage com o intermediário para formar um complexo. A diferença mais marcante da proposta de Aggarwal e McQuade é que o primeiro considera o uso de um solvente prótico, enquanto o segundo utiliza um solvente aprótico.

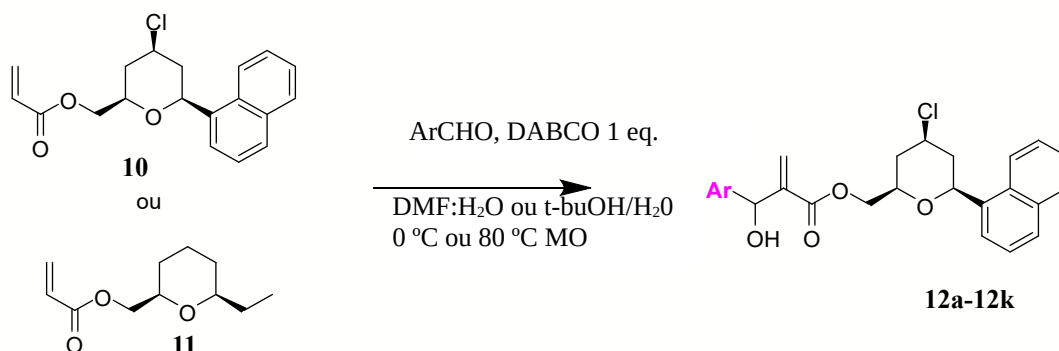
Esquema 3 – Mecanismos propostos por McQuade e Aggarwal para a RMBH representadas num único esquema feito por Lima-Júnior e Vasconcellos (2012).



Uma série de AMBH com núcleo tetraidropirano apresentou resultados de inibição de *Leishmania donovani* na forma promastigota. As moléculas foram sintetizadas utilizando um acrilato com núcleo tetraidropirano, DABCO como catalisador e variando o aldeído. A depender do eletrófilo, o solvente usado era DMF:H₂O ou PhOH, na temperatura 0 °C, ou t-buOH/H₂O, com aquecimento em micro-ondas a 80 °C (Esquema 4). Os rendimentos variaram de 45 a 96%, com tempos de reação entre 18 minutos e 240 horas. Na avaliação em *Leishmania donovani*, o melhor CI₅₀ foi do aduto com substituinte *p*-bromofenil: 5,81 µM. Apesar do CI₅₀ da anfotericina B (fármaco de referência) ser melhor (0,38 µM), o aduto

apresentou índice de seletividade maior que 180,19, indicando uma menor toxicidade que o fármaco de referência, com IS 33,05 (Sousa *et al.* 2017).

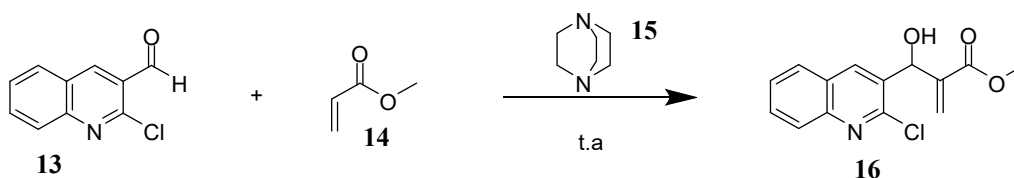
Esquema 4: Representação da reação de MBH entre um acrilato com núcleo tetraidropirano e aldeído aromático, realizada por Sousa *et al.* (2017).



Ar: *o*-nitrofenil, *m*-nitrofenil, *p*-nitrofenil, 2-piridinil, 3-piridinil, 4-piridinil, α -naftil, *p*-bromofenil

Em outro trabalho envolvendo avaliação de AMBH em *Leishmania*, Vieira *et al.* (2022) sintetizaram uma série de AMBH, reagindo sete diferentes aldeídos com acrilato de metila na presença de DABCO, em temperatura ambiente (Esquema 5). Em seguida, parte dos produtos foi submetido a modificações como acetilação da hidroxila ou hidrólise do grupo éster em ácido carboxílico. Todas as moléculas foram testadas em *Leishmania chagasi* e duas delas, que eram AMBH sem modificações, tiveram CI_{50} igual a 0,6 μ M, menor que da pentamidina e glucantime (CI_{50} = 2 μ M). Ambos os adutos tinham um grupo cloro.

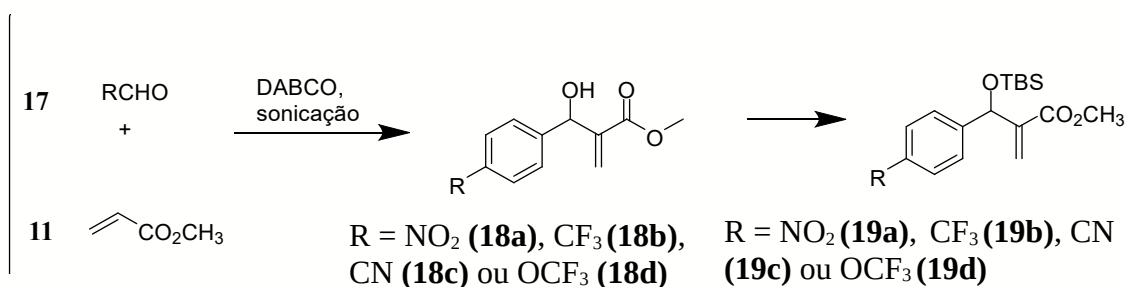
Esquema 5 – Esquema reacional de um dos adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados por Vieira *et al.* (2022). Os outros adutos foram sintetizados partindo de outros aldeídos.



Em relação à atividade antiproliferativa, um dos primeiros trabalhos que relata esta propriedade em AMBH data de 2006 e mostrou que os adutos aromáticos que contém grupos substituintes de natureza retiradora de elétrons foram os mais ativos. Os adutos foram

sintetizados empregando acrilato de metila e aldeídos sob sonicação, tendo DABCO como catalisador (Esquema 6). Os rendimentos variaram de 40 a 90%, enquanto os tempos reacionais não foram informados. Posteriormente, foram sintetizados outros dois grupos de moléculas, um a partir da inserção do grupo TBS na hidroxila e outro a partir da hidrogenação da ligação dupla dos adutos (Kohn *et al.*, 2006).

Esquema 6: Esquema da RMBH e posterior inserção do grupo TBS realizadas por Kohn *et al.* (2006).



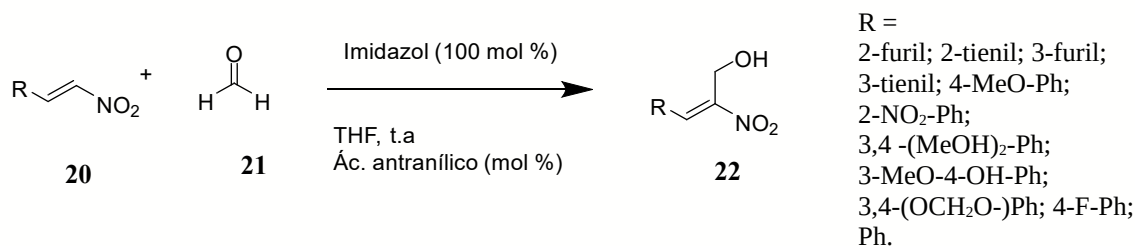
Nos testes antiproliferativos *in vitro*, as linhagens cancerígenas testadas foram UACC62 (melanoma), MCF7 (mama), NCI460 (células não-pequenas de pulmão), OVCAR, (ovário), PC03 (próstata), HT29 (cólon) e 786-0 (rins). As substâncias que mais se destacaram, com atividade em todas as linhagens, foram adutos de Morita-Baylis-Hillman sem modificações ou apenas com o grupo TBS inserido. Aliás, o grupo TBS não ofereceu ganhos significativos de atividade, ficando na mesma faixa que os adutos correspondentes (Kohn *et al.*, 2006).

Outro trabalho pioneiro relatou evidências da inibição da proliferação de células cancerígenas por AMBH. As pequenas moléculas foram sintetizadas a partir de nitroalcenos e formaldeído, na presença de imidazol e ácido antranílico, em THF e temperatura ambiente (Esquema 7). As mesmas reações foram realizadas com e sem ácido antranílico, sendo que para mais da metade dos substratos houve um aumento no rendimento quando o ácido estava presente, por exemplo, de 48 para 71% (Mohan *et al.*, 2006).

A faixa de rendimento com o ácido variou entre 25 e 71%, com tempos de reação entre 15 e 120 h, enquanto sem o ácido os rendimentos foram entre 19 a 57%, e os tempos reacionais de 15 a 148 h. As moléculas foram testadas em células HeLa (câncer cervical) e

testes complementares apontaram um possível mecanismo de ação via inibição dos microtúbulos (Mohan *et al.*, 2006).

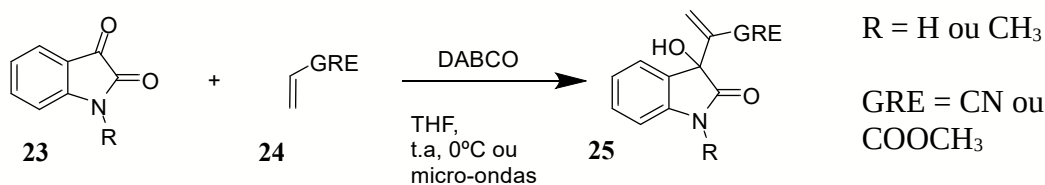
Esquema 7 – Esquema reacional das sínteses realizadas por Mohan *et al.* (2006).



Da série de 32 AMBH sintetizados por Lima-Júnior *et al.* (2016), os dois mais ativos foram justamente aqueles com o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol. As moléculas haviam sido formadas pela RMBH (Esquema 8), reagindo isatinas com alcenos ativados (acrilato de metila ou acrilonitrila) em meio dissolvido por THF e usando DABCO como catalisador. O uso destas condições somadas ao aquecimento a 80 °C por micro-ondas, temperatura ambiente ou banho de gelo a 0 °C foram comparadas. Os melhores tempos e rendimentos de reação se deram com o aquecimento por micro-ondas, sendo entre 20 e 120 minutos e 73% a rendimento quantitativo.

As novas entidades foram testadas nas linhagens de células cancerígenas HL-60 e K-562 (leucemia aguda e crônica, respectivamente), apresentando atividade inclusive por indução à apoptose, no caso de HL-60.

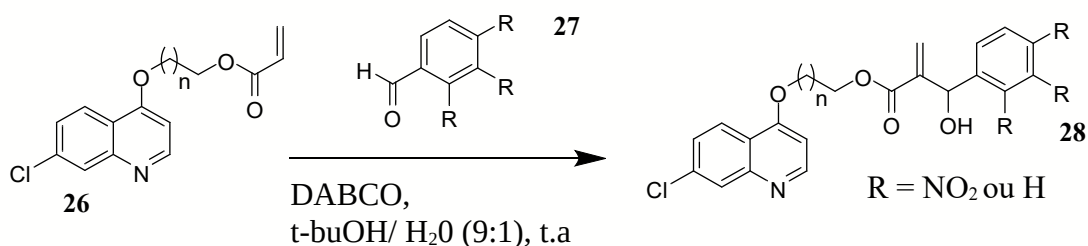
Esquema 8 – Esquema reacional das RMBH realizadas por Lima-Junior *et al.* (2016), usando isatina e isatina metilada.



Os adutos de MBH formados pela união do núcleo 7-cloroquinolína e uma molécula de atividade conhecida em HL-60 levaram a uma série de híbridos também ativos em células cancerígenas. A síntese dos híbridos (Esquema 9) envolveu a RMBH na etapa final, entre um

acrilato derivado de uma 7-cloroquinolina e um aldeído, tendo o DABCO como catalisador e t-buOH/H₂O (9:1) como solvente, em temperatura ambiente. Os rendimentos foram em torno de 33 e 74% e as reações demoraram de 24 a 168 h. Alguns adutos conseguiram inibir a proliferação de células das linhagens MCG-7, HL-60, HCT-116 e NCIH292, mantendo um índice de seletividade maior que 1 (Oliveira *et al.*, 2021).

Esquema 9 – Esquema reacional da RMBH realizada por Oliveira *et al.* (2021).



3.4 Aceptores de Michael e sua importância no planejamento de novos candidatos a fármacos antiparasitários

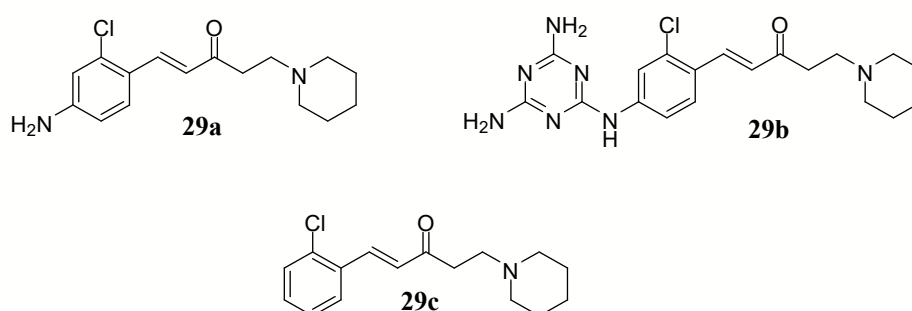
A reação de Morita-Baylis-Hillman proporciona a formação de uma porção aceptora de Michael, associada à ação antiparasitária (Zhu *et al.*, 2002). A atuação dos aceptores de Michael como antiparasitários pode ser explicada, em vários casos, pela inibição de cisteínas de proteases deles. As cisteínas proteases são enzimas do tipo hidrolases presentes nos organismos eucariontes, desempenhando funções que envolvem a degradação de proteínas. Nos protozoários parasitos causadores de doenças em humanos, estas enzimas atuam degradando proteínas para a nutrição deles. Inclusive, estas proteínas podem ser as do hospedeiro humano, como é o caso da hemoglobina, degradada por proteases de cisteína do *Plasmodium falciparum* para lhes fornecer aminoácidos (SANTOS & MOREIRA, 2007; BUTTLE & MORT, 2013).

Por outro lado, a presença do aceptor de Michael requer atenção, pois pode tornar a molécula mais propensa a causar sensibilização na pele (Kalberg *et al.*, 2008) mutagenicidade (Benigni, 2005) e ecotoxicidade (Von Der Ohe *et al.*, 2005).

Relataremos aqui alguns exemplos de moléculas com uma porção aceptora de Michael e atividade antiparasitária. O primeiro é uma série de bases de Mannich contendo aceptor de

Michael, da qual 3 (Figura 5) foram descobertos como ativos contra *T. brucei* (Wenzel *et al.*, 2009). A atividade das substâncias inéditas (CI_{50} de 0,19 a 0,29 μM) foi menor que a do fármaco de referência, melarsoprol ($CI_{50} = 0,007 \mu M$), mas ainda assim elas são consideradas moléculas *lead* ($CI_{50} < 1 \mu M$).

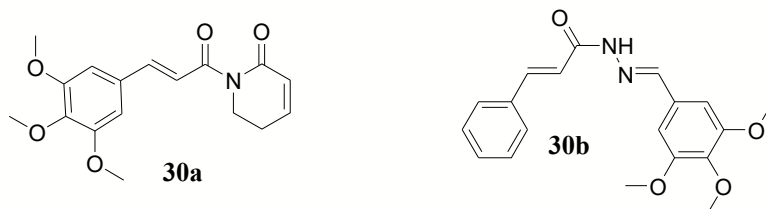
Figura 5 - Representação das estruturas químicas das bases de Mannich **29a**, **29b** e **29c** sintetizadas por Wendel *et al.* (2009) e que demonstraram atividade contra *T. brucei*.



Cotinguiba *et al.* (2009) isolaram piperamidas de *Piper tuberculatum*, modificaram-nas estruturalmente e testaram todos eles *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*. As modificações incluíram a redução das duplas conjugadas, extinguindo o grupo aceptor de Michael, ou realizando a hidrólise dos compostos. As moléculas modificadas não apresentaram atividade, enquanto 3 dos produtos naturais, com o aceptor de Michael presente, tiveram atividade melhor (CI_{50} entre 10,5-30 μM) que o padrão benzonidazol ($CI_{50} = 42,7 \mu M$). Uma dessas moléculas (**30a**) pode ser vista na Figura 6.

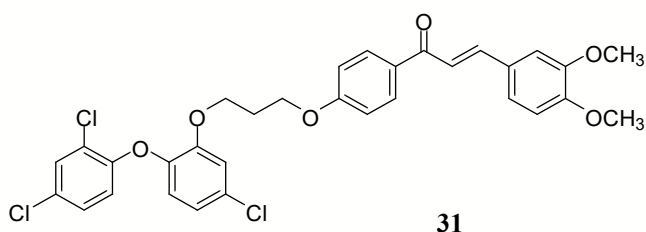
Um outro exemplo de aceptor de Michael que apresentou atividade antiparasitária, no caso leishmanicida, é o **30b**, mostrado na Figura 6, um derivado do ácido *trans*-cinâmico. Segundo os autores, a porção da carbonila alfa-beta insaturada, característica de aceptor de Michael, é considerada importante para a atividade das moléculas (Carvalho *et al.*, 2014).

Figura 6 – Produto natural com atividade *in vitro* em *Trypanosoma cruzi* por Cotinguiba *et al.* (2009), **30a**; um dos compostos sintetizados por Carvalho *et al.* (2014) com atividade leishmanicida *in vitro* em *Leishmania donovani*, **30b**.



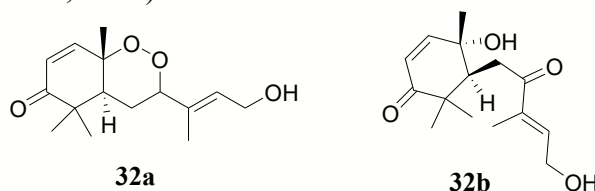
A união do triclosano com chalcona, cumarina ou cromona resultou em uma série de híbridos contendo o grupo aceptor de Michael. Os heterodímeros de triclosano-chalcona (Figura 7) e triclosano-cromona foram ativos contra *Leishmania panamensis*, com destaque para os de 3 carbonos no espaçador, que tiveram melhores índices de seletividade, e exceção para aqueles com 8 carbonos no espaçador, que não foram ativos (Otero *et al.*, 2014).

Figura 7 - Um dos híbridos de triclosano e chalcona sintetizado por Otero *et al.* (2014).



Retomando o rol de produtos naturais com porção aceptor de Michael e com atividade antiparasitária, temos as moléculas **32a** e **32b** mostradas na Figura 8. Elas e outras quatro foram isoladas de *Scleria striatinux* De Wild, uma planta utilizada como condimento e como antipirético. Os extratos e os isolados foram caracterizados e testados *in vitro* em *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* e *Trypanosoma brucei rhodensiense*. Embora não tenham apresentado atividade melhor que os padrões empregados (cloroquina, quinina e artesunato), mas uma atividade moderada, estas moléculas podem ser utilizadas como protótipo para o desenho de novas moléculas antiparasitárias (Nyongbela *et al.*, 2017).

Figura 8 – moléculas isoladas de *Scleria striatinux* De Wild com atividade moderada antiparasitária (Nyongbela *et al.*, 2017).

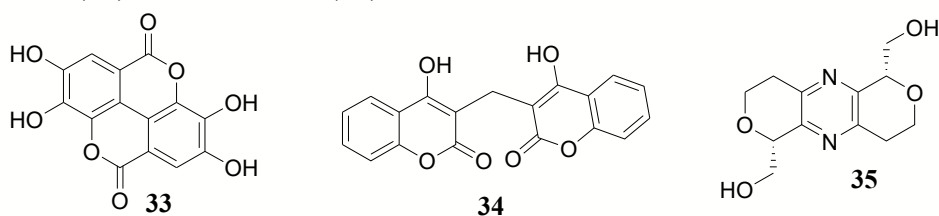


3.5 A simetria na natureza e o emprego de dimerização molecular como estratégia no planejamento de novos fármacos

Tal como aceptores de Michael são encontrados em produtos naturais, as moléculas diméricas são encontradas na natureza há décadas, desde a elucidação estrutural de moléculas isoladas de fontes naturais. Em termos químicos, um dímero seria uma molécula com dois lados idênticos e sem perda de átomos. Em um conceito menos restrito, poderíamos considerar como diméricas moléculas não exatamente iguais dos dois lados, sem necessariamente um espaçador, sendo possível citar o ácido elágico, um agente citotóxico, e a dicumarina, um anticoagulante (Schwartz, 1976).

Também podemos citar a tuberazina A, um composto extraído de um animal marinho e que apresenta atividade anti-linfagiogênica (Chen *et al.*, 2018). Estes três compostos podem ser vistos na Figura 9. A partir destes e outros exemplos existentes, percebe-se a diversidade de atividades farmacológicas dos dímeros (Schwartz, 1976)

Figura 9 - Representação da estrutura química dos produtos naturais: ácido elágico (33), dicumarina (34) e tuberazina A (35).



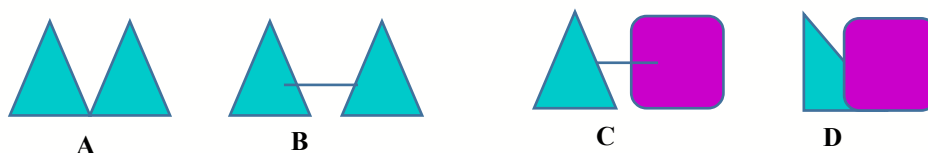
Fonte: adaptado de Schwartz (1976)

Numa pesquisa abrangendo 3000 artigos envolvendo produtos naturais isolados, foi encontrada uma porcentagem de 7% de moléculas com simetria bilateral. Essa porcentagem instigou cálculos teóricos na tentativa de compreender o porquê de a natureza produzir

dímeros. Os cálculos mostraram um maior favorecimento energético teórico da dimerização em relação à formação de hipotéticos trímeros ou tetrâmeros de alguns compostos naturais, que teriam um alto custo energético de síntese. Isso pode indicar por que trímeros e tetrâmeros não aparecem nos extratos de produtos naturais, mas razões por que a dimerização pode ser favorável para a natureza continuam a ser investigadas (Voloshchuk, 2004).

No tocante ao planejamento de novos fármacos, a dimerização molecular é uma estratégia de desenho de novos fármacos que gera um dímero, que pode ser um homodímero ou um heterodímero. O homodímero é formado por duas entidades farmacofóricas idênticas, que podem ser compostos ativos ou *leads*, enquanto o heterodímero é constituído por duas entidades farmacológicas diferentes. Estas entidades, idênticas ou não, podem estar unidas com ou sem espaçador, ou mesmo de modo sobreposto, como representado na Figura 10 (Wermuth, 2008).

Figura 10 – Esquema simplista representando um homodímero sem espaçador (A), um homodímero com espaçador (B), um heterodímero com espaçador (C) e um heterodímero de modo sobreposto.



Fonte: autoria própria, baseado em Wermuth (2008)

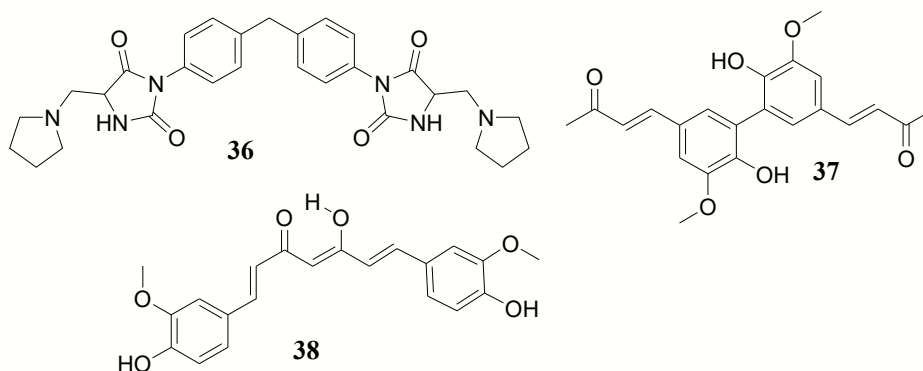
A técnica de dimerização ou hibridação molecular pode ser feita em conjunto com outras, até que o protótipo tenha a atividade desejada somada às propriedades farmacocinéticas interessantes. A construção de uma molécula inédita passa por várias etapas de desenho, testes biológicos, aprimoramentos do desenho a partir da análise da relação estrutura-atividade, reteste, e assim sucessivamente (Barreiro & Fraga, 2015).

Esta técnica tem sido utilizada tanto pela Indústria Farmacêutica como por pesquisadores acadêmicos, formando híbridos a partir de fragmentos de fármacos consagrados e/ou protótipos com atividade biológica, tendo como fim uma atividade dual ou simbiótica.

Os dímeros podem apresentar maior afinidade pelo mesmo receptor que o monômero, como também pode atuar em um receptor diferente ou com outra consequência, de agonista ou antagonista (Wermuth, 2008; Barreiro & Fraga, 2015).

Um exemplo de dimerização molecular é o dímero de hidantoína (**36**) mostrado na Figura 11, cuja atividade antitumoral em células de glioma e de carcinoma humano foi melhor que a da cisplatina (Furutachi *et al.*, 2019). Inspirado no dímero natural curcumina (**38**), o dímero **37** foi sintetizado e apresentou atividade antioxidante mais alta que seu monômero (Slavova-Kazakova *et al.*, 2015).

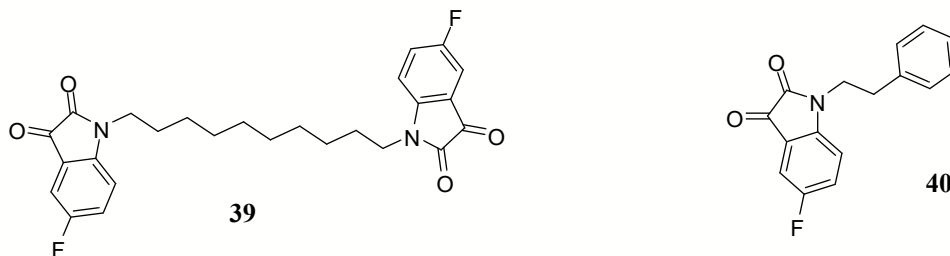
Figura 11 - Estrutura química do dímero de hidantoína (**36**) e do dímero (**37**) baseado na curcumina (**38**).



Fonte: adaptado de Furutachi *et al.* (2019) e Slavova-Kazakova *et al.* (2015)

Uma série de homodímeros de isatina foi planejada e sintetizada com base em uma molécula ativa (**40**) (Figura 12) em teste enzimático usando proteína DJ-1. Esta proteína é dimérica e tem relação com doenças neurodegenerativas e também com o câncer, sendo inibida por **40**. Os dímeros eram semelhantes a **39** mas com tamanhos diferentes de espaçador (2 a 12 carbonos), e todos conseguiram inibir DJ-1 ou no mesmo patamar ou mais que o monômero, com exceção daquele com 2 carbonos no espaçador. O dímero de destaque tinha 10 carbonos no espaçador e está representado na Figura 12 (Chen *et al.*, 2021).

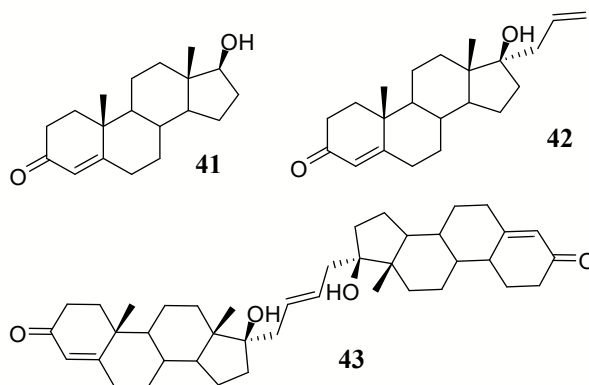
Figura 12 – Representação da estrutura química do dímero **39** sintetizado por Chen *et al.* (2021) e respectivo monômero **40**.



Testes posteriores com **39** mostraram que ele conseguia se ligar covalentemente à DJ-1, e que em células de linhagens cancerígenas (H1299, carcinoma de pulmão de células não pequenas, PC9, HCC1937, de câncer de mama, BEL7402, células de câncer hepatocelular, HepG2, RCC4, 786-O, células de carcinoma renal) esta molécula era capaz de inibir a proliferação delas. Além disso, em modelo *in vivo*, **39** também conseguiu reduzir o crescimento de tumor de células H1299.

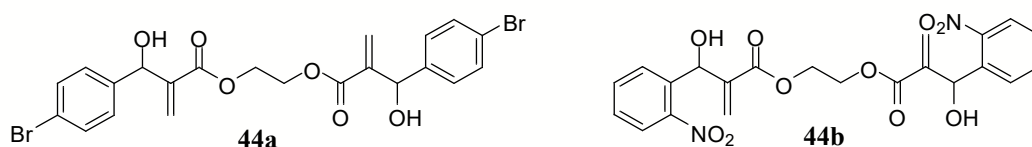
Um derivado de testosterona (**42**, Figura 13) apresentou atividade em duas linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humana, uma sensível a androgênicos (LNCaP) e outra não sensível (PC3). O inédito dímero da testosterona (**43**, Figura 13), testado nas mesmas condições, mostrou uma atividade ainda maior, com CI_{50} menor (11,7 μ M em LNCaP e 43,4 μ M em PC3) que o padrão acetato de citoproterona (40,7 μ M em LNCaP e 84,3 μ M em PC3) (Paquin *et al.*, 2023).

Figura 13 – Representação das estruturas químicas da testosterona **41**, seu derivado **42** e dímero **43** sintetizados por Paquin *et al.* (2023).



O trabalho de Silva (2016) é um exemplo de sucesso na estratégia de dimerização molecular, pois os dímeros sintetizados mostraram maior atividade leishmanicida *in vitro* em *Leishmania donovani* que os monômeros correspondentes. As moléculas produzidas são adutos de Morita-Baylis-Hillman (AMBH) diméricos, sendo alguns representantes mostrados na Figura 14. O composto com substituição para-bromo (**44a**) se destacou com Concentração Inibitória (CI₅₀) igual a 0,5 µM, menor que a Anfotericina B, fármaco de referência para a leishmaniose, cujo CI₅₀ é igual a 0,62 µM.

Figura 14 – Alguns dos dímeros de adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados por Silva (2016).



Além disso, este aduto dimérico em destaque apresentou um alto índice de seletividade (IS > 400), o que significa que ele prejudica as células do parasito numa proporção muito maior do que as células humanas, algo bastante vantajoso em relação a anfotericina B, cujo IS é mais baixo, 18,73, e para ser administrado o paciente deve estar hospitalizado ou em observação médica rigorosa (Korolkovas, 2014).

Dois dos adutos diméricos do trabalho de Silva (2016) foram testados nas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, e também foram capazes de matar os parasitos. Embora com valores de IC₅₀ maiores, os índices de seletividade foram pelo menos duas vezes melhores que o da anfotericina B (Rocha *et al.*, 2019).

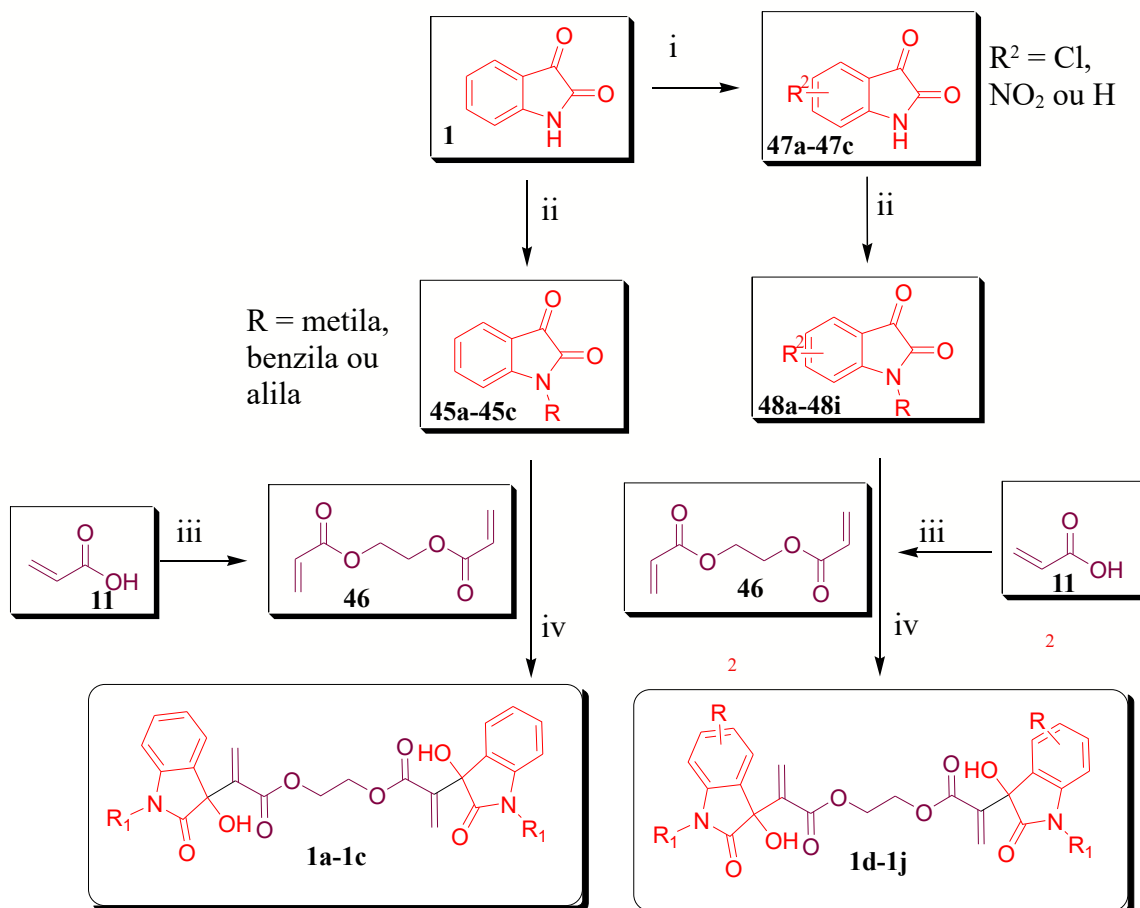
Inspirado nestes AMBH, o presente trabalho propõe dímeros utilizando o mesmo espaçador diacrilato de etilenoglicol e a reação de Morita-Baylis-Hillman. Porém, em vez de utilizar aldeídos, propomos o emprego de isatinas substituídas, que formarão o núcleo 3-hidróxi-2-oxindol, o qual, como explanado anteriormente, vem demonstrando alto valor farmacológico e sintético.

4. ESTRATÉGIA

4.1 Planejamento e síntese das substâncias inéditas

Este trabalho trata da síntese de moléculas inéditas com vistas à atividade antiparasitária e antiproliferativa. O desenho destes compostos se baseou no núcleo 3-hidróxi-2-oxindol a partir da isatina, aplicando a abordagem de dimerização molecular. O intuito é que a dimerização potencialize o efeito antiparasitário e antiproliferativo do grupo oxindol, cujos derivados vêm demonstrando tais atividades, conforme descrito na fundamentação teórica. Para a síntese, novas ligações C-C serão formadas por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman, a qual transformará a isatina em oxindol, além de inserir um grupo aceptor de Michael, que ficará no espaçador entre as duas porções 3-hidróxi-2-oxindol. A rota sintética convergente está esquematizada no Esquema 10.

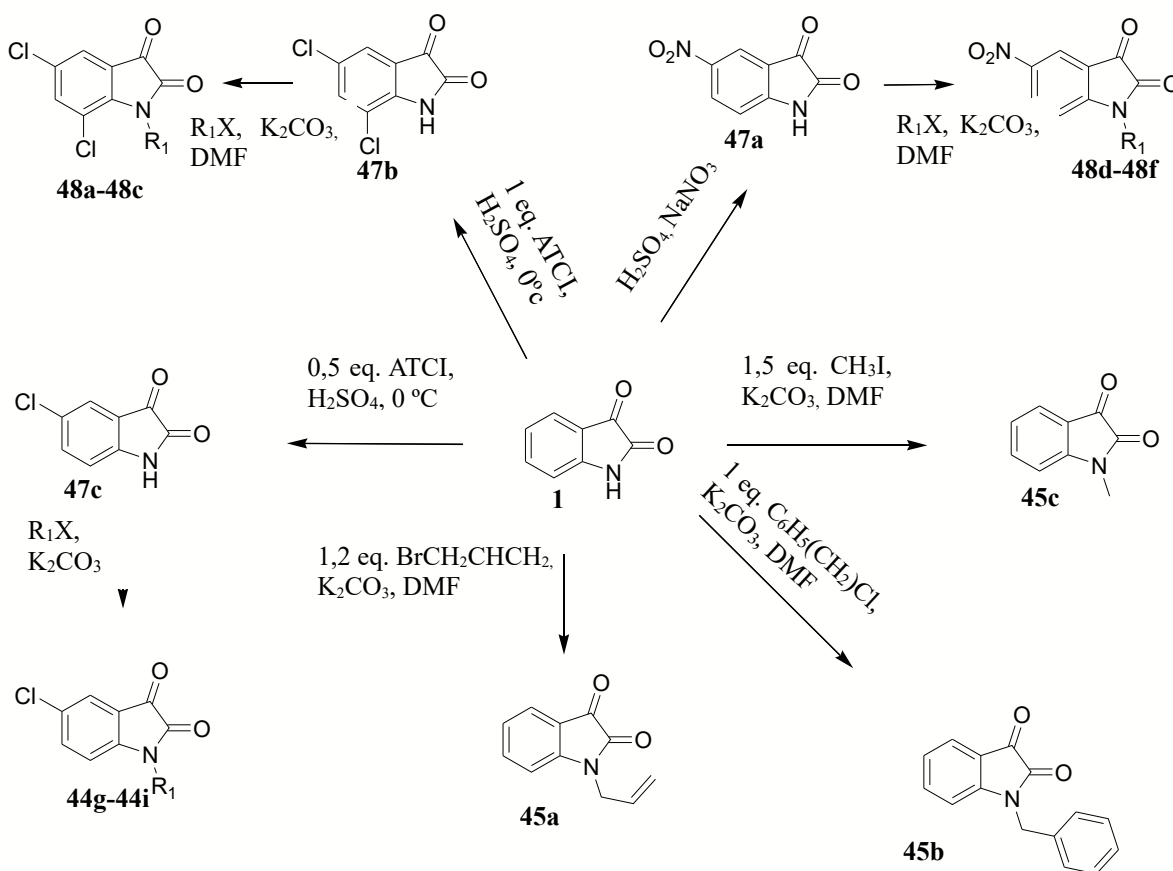
Esquema 10 - Rota sintética convergente para a síntese dos AMBH simétricos de isatina.



i = ATCl ou $\text{NaNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, 0 °C; ii = K_2CO_3 , agente alquilante, DMF, atmosfera inerte de argônio; iii = hidroquinona, etilenoglicol, ciclohexano, 100 °C; iv = DABCO, DMF seco, t.a.

Os primeiros produtos obtidos são isatinas substituídas já relatadas na literatura cujos reagentes são de fácil aquisição e cujas sínteses estão esquematizadas no Esquema 11 (Ribeiro *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011, Brito *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2020). Estão inclusas a 5-nitro-isatina, 5,7-dicloroisatina e 5-cloro-isatina (**47a-47c**), obtidas pelas reações de nitração e cloração da isatina; e os derivados *N*-alil-isatina, *N*-benzil-isatina e *N*-metil-isatina (**45a-45c**), obtidas pelas reações de *N*-alquilação. As isatinas **47a-47c** também serão alquiladas pelo mesmo método, formando as isatinas dissubstituídas **48a-48i**.

Esquema 11 - Rota sintética das isatinas substituídas necessárias para a síntese dos dímeros-alvo.

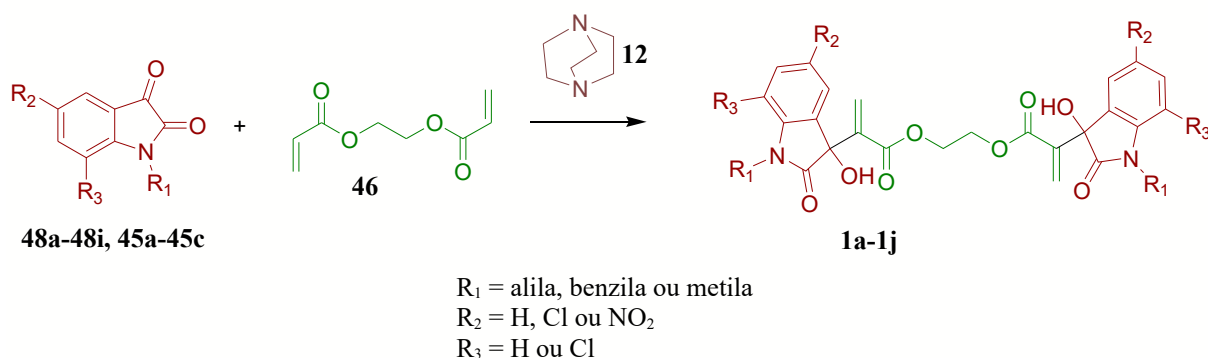


Fonte: autoria própria

Estas isatinas atuarão como o componente eletrofílico da reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH), na etapa seguinte, formando os respectivos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos de isatina **1a-1c** e **1d-1j**, como mostra o Esquema 12. A RMBH será empregada para gerar novas ligações carbono-carbono e assim formar os dímeros desejados com economia de átomos, em condições reacionais que foram investigados ao longo do trabalho.

O outro componente para a síntese dos produtos finais **1a-1j** é o aceptor de Michael, o diacrilato de etilenoglicol **46**, que foi usado na reação de Morita-Baylis-Hillman (RMBH). A síntese deste diacrilato, que também funcionará como espaçador dos dímeros simétricos, é descrita por Silva (2016) e ocorre via esterificação catalisada por ácido *p*-toluenossulfônico.

Esquema 12 – Reação de Morita-Baylis-Hillman usando isatinas substituídas (**48a-48i**, **45a-45c**), DABCO (**50**) e o aceptor de Michael diacrilato **46** para sintetizar os AMBH simétricos inéditos.



A avaliação antiproliferativa dos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos foi realizada em parceria com a professora Gardênia Carmen Gadelha Militão, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco. As linhagens celulares utilizadas no estudo foram A-549, HL-60 e K-562, sendo o método usado o do MTT. Já o estudo da atividade leishmanicida foi feito em parceria com a professora Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, do Departamento de biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba. Foram empregadas as formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania infantum* no estudo de viabilidade celular.

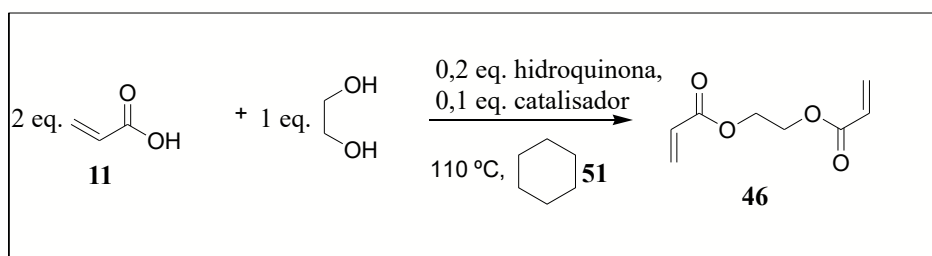
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos intermediários sintéticos dos AMBH simétricos: diacrilato (46) e isatinas substituídas (45a-45c, 47a-47c e 48a-48i)

Utilizando a estratégia apresentada, foram obtidos os intermediários sintéticos para posterior síntese dos compostos inéditos. Começando com o intermediário correspondente ao aceptor de Michael, o diacrilato de etilenoglicol **46**, foi empregado um sistema de refluxo tipo Dean-Stark. Para esta síntese, ilustrada no Esquema 13, foi utilizado inicialmente o protocolo conhecido na literatura (SILVA, 2016), empregando ácido para-toluenossulfônico como catalisador nesta reação de esterificação entre o ácido acrílico e o etilenoglicol. A hidroquinona fez o papel de evitar a polimerização, e sua ausência resultou num meio reacional gelatinoso.

A reação durou 6h e foi obtido um óleo amarelo, condizente com o encontrado por Silva (2016), com 80% de rendimento. O produto foi analisado por CCDA, sendo seu fator de retenção (r. f) idêntico ao do padrão previamente caracterizado disponível no laboratório.

Esquema 13 – Esquema reacional da síntese de diacrilato de etilenoglicol **46** a partir de reação de esterificação e resultados de rendimento e tempo reacional desta síntese.



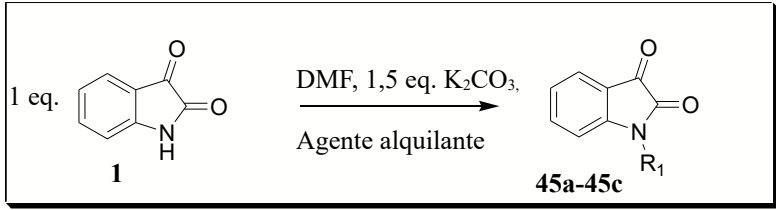
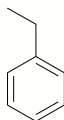
Catalisador: Ácido para-toluenossulfônico ou Montmorilonita K10.

Buscando condições reacionais mais verdes, foi realizada uma tentativa usando Montmorilonita K10 no lugar de ácido para-toluenossulfônico, baseado em relatos de que seria possível promover esterificação com catálise heterogênea (YADAV & BHAGAT, 2005). Ao contrário do dito ácido, este catalisador não solubiliza em água e possibilita sua reutilização por filtração após o fim da reação. As demais condições de reação foram mantidas, entretanto, após 9h horas de reação não foi observada formação de produto.

Em relação à síntese dos derivados de isatina, os produtos da alquilação no nitrogênio (**45a-45c**) foram obtidos reagindo a isatina em meio básico com um agente alquilante – iodeto de metila, cloreto de benzila ou brometo de alila. Esta *N*-alquilação está representada na Tabela 1. Os tempos de reação variaram entre 4 e 5,5 h e rendimentos entre 81 e 99%. É notável o rendimento superior do produto metilado **45c** em relação ao alilado **45a** e benzilado **45b**, no que importa ressaltar os diferentes grupos abandonadores dos agentes alquilantes utilizados. No iodeto de metila, temos o iodo, um grupo abandonador melhor que o bromo e o cloro, o que pode justificar o maior rendimento da *N*-metilação (Bento & Bickelhaupt, 2008).

Em adição, o tamanho menor do iodeto de metila facilita o ataque pelo nitrogênio quando comparado ao tamanho do cloreto de benzila de brometo de alila. Quanto ao mecanismo, a *N*-metilação segue por um mecanismo via SN2, em etapa concertada, porque não há possibilidade de formação de um carbocátion estável, pois seria primário. Já a *N*-alilação e a *N*-benzilação podem seguir tanto por um mecanismo via SN2 como SN1, pois os carbocátions que se formariam são estabilizados por ressonância. Não menos importante, a maior proporção do agente alquilante na *N*-metilação em relação às outras *N*-alquilações também deve ter contribuído, proporções estas presentes nos protocolos sintéticos utilizados. Entretanto, testes para padronizar tais proporções serão válidos.

Tabela 1 – Condições reacionais, tempo e rendimento da síntese das isatinas *N*-alquiladas. **45a-45c**.

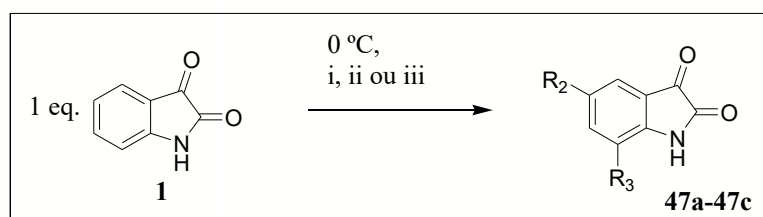
						
Entrada	Produto	R ₁	Agente alquilante	Tempo de reação		Rendimento
1	45a		i) 1,2 eq. brometo de alila	5,5 h		81%
2	45b		ii) 1 eq. cloreto de benzila	4h		85%

3	45c		iii) 1,5 eq. iodeto de metila	4h	99%
---	------------	---	-------------------------------	----	-----

Para a síntese da 5-nitro-isatina, 5-cloro-isatina e 5,7-dicloro-isatina, foram empregadas reações via substituição eletrofílica aromática. Para a nitração, foram utilizados ácido sulfúrico e nitrato de sódio, enquanto para a cloração foram usados ácido sulfúrico mais ácido triclorocianúrico, seguindo os protocolos da literatura (Silva *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2005). O esquema da reação com as respectivas condições e rendimentos estão dispostos na Tabela 2.

Os rendimentos e tempos reacionais, em geral, foram semelhantes ao da literatura. Na nitração, o produto **47a** foi obtido com 61% de rendimento, idêntico ao conseguido por da Silva *et al.* (2010). Na 5-cloração, o rendimento foi 83%, um pouco menor que o obtido por Ribeiro *et al.* (2005), que conseguiu 97%. É válido mencionar que esta reação era interrompida aos 20 minutos, no máximo, pois após este tempo já era observada a formação simultânea do produto diclorado. No caso da 5,7-dicloração, apesar do tempo reacional maior (1h30) em relação ao observado por Ribeiro *et al.* (2005), que foi de meia hora, o rendimento do produto obtido no presente trabalho foi quantitativo (99%).

Tabela 2 – Esquema reacional e resultados da síntese das isatinas substituídas a partir de reações de substituição eletrofílica aromática, gerando os derivados 5-nitroisatina, 5-cloroisatina e 5,7-dicloroisatina.



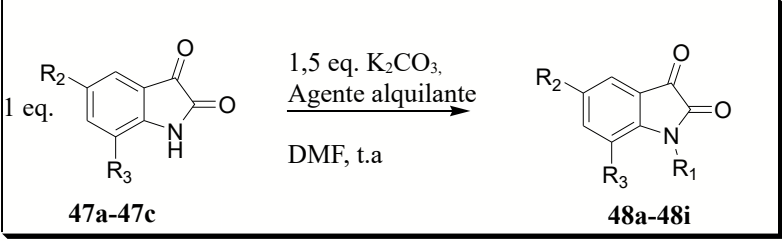
Entrada	Produto	R ₂	R ₃	Condições	Tempo de reação	Rendimento
1	47a	NO ₂	H	i) H ₂ SO ₄ , 0,95 eq. NaNO ₃	1,5 h	61%
2	47b	Cl	Cl	ii) 1. eq. de ATCl, H ₂ SO ₄	1,5 h	99%
3	47c	Cl	H	iii) 0,5 eq. ATCl, H ₂ SO ₄	20 min	83%

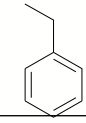
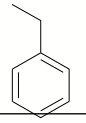
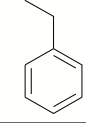
Para a síntese das isatinas dissustituídas **48a-48i**, produtos da *N*-alquilação dos derivados **47a-47c**, foi usado o mesmo protocolo que para a *N*-alquilação da isatina sem substituição, tal como pode ser visualizado na Tabela 3. Assim, a reação ocorreu entre a 5-nitro-isatina, 5-cloro-isatina ou 5,7-dicloro-isatina, em meio básico, e um agente alquilante – iodeto de metila, brometo de alila ou cloreto de benzila. Podemos inferir que os rendimentos das *N*-alquilações das isatinas substituídas no anel aromático (**47a-47c**) são menores comparativamente às alquilações feitas na isatina sem substituição (**1**), o que também foi observado por Brito *et al.* (2020).

Isso pode ter ocorrido porque, nesta reação, o nitrogênio da isatina (ou derivado) ataca o carbono ligado ao halogênio do agente alquilante. Na 5,7-dicloro-isatina, por exemplo, os grupos cloro deslocam densidade eletrônica para si, tornando o nitrogênio um pouco menos denso eletronicamente, ou seja, menos nucleofílico. O mesmo ocorrerá com a 5-cloro-isatina e 5-nitro-isatina, pois também apresentam grupos retiradores de elétrons, principalmente este último, que apresenta um efeito retirador de elétrons mais forte. Outro fator importante é que houve a formação de subprodutos nestas reações, e os produtos passaram por purificação em coluna cromatográfica *flash*, o que pode ter colaborado para perda de produto.

Pelo que podemos perceber em relação aos rendimentos, o agente alquilante iodeto de metila funcionou melhor, dando rendimentos melhores (43-73%) que a alilação (11-54%) e benzilação (10-62%), pelos mesmos motivos que nas *N*-alquilações da isatina.

Tabela 3 – Esquema reacional da *N*-alquilação das isatinas substituídas em C-3 e C-5, formando **48a-48i**, seguido dos resultados de rendimento e tempos destas sínteses.

							
Entrada	Molécula	R ₁	R ₂	R ₃	Agente alquilante	Tempo reacional	Rendimento
1	48a		Cl	Cl	i) 1,2 eq. brometo de alila	3h40min	28%

2	48b		Cl	Cl	ii) 1 eq. cloreto de benzila	4h30min	41%
3	48c		Cl	Cl	iii) 1,5 eq. iodeto de metila	5h	73%
4	48d		NO ₂	H	i) 1,2 eq. brometo de alila	2h	11%
5	48e		NO ₂	H	ii) 1 eq. cloreto de benzila	5h	10%
6	48f		NO ₂	H	iii) 1,5 eq. iodeto de metila	4h	43%
7	48g		Cl	H	i) 1,2 eq. brometo de alila	4h	54%
8	48h		Cl	H	ii) 1 eq. cloreto de benzila	21h	62%
9	48i		Cl	H	iii) 1,5 eq. iodeto de metila	4h	65%

Todos os derivados de isatina foram analisados por CCDA, sendo os fatores de retenção (r.f) comparados com padrões previamente sintetizados pelo grupo de pesquisa, confirmando a obtenção deles.

5.2 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos de isatina (1a-1j)

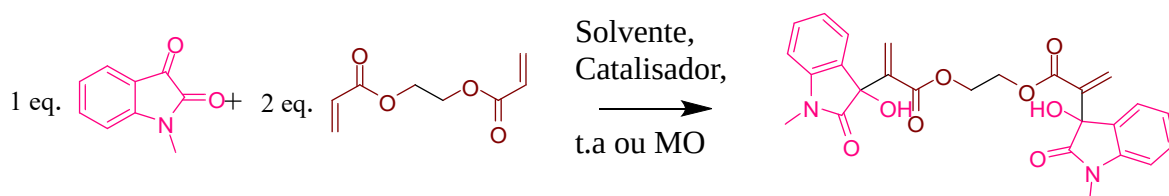
Tendo obtido os intermediários sintéticos, foram feitas as sínteses dos produtos simétricos de isatina **1a-1j**, por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman. Inicialmente, foram realizados testes para determinar as melhores condições sintéticas, utilizando como substrato a *N*-metil-isatina, no papel de eletrófilo, e o diacrilato de etilenoglicol como acceptor de Michael.

Numa primeira entrada, registrada na Tabela 4, empregamos DMF seco como solvente e DABCO na proporção de 100 % mol, além de temperatura ambiente, condições que haviam sido relatadas por Silva (2016). A reação durou 11 dias, com um rendimento de 43%, enquanto as reações daquele autor duraram entre 24h e 20 dias, com rendimentos entre 35 e

94%, tendo usado como substratos aldeídos aromáticos como eletrófilos e não derivados de isatina. Um ponto a ser destacado é que não houve consumo completo dos reagentes, pois a análise de CCDA permitia visualizar a presença de material de partida até o final do experimento. O produto foi isolado após verificar a falta de progressão da reação.

Partimos então para o estudo de otimização da síntese, modificando fatores diferentes, como temperatura, catalisador e solvente. Na Tabela 4 podemos visualizar os parâmetros que foram modificados e seus respectivos resultados. Percebemos que a utilização de aquecimento em micro-ondas não foi útil para este sistema, pois foram formados apenas traços de produto. Ao aquecer a 120 °C, foi detectada a formação de traços de produto e também vários co-produtos, que foram visualizados após análise por CCDA e que nas outras condições reacionais não ocorriam. Assim, elegemos a temperatura ambiente como a melhor para este sistema.

Tabela 4 – Otimização das condições reacionais e rendimentos dos experimentos realizados para a reação de Morita-Baylis-Hillman. O composto de interesse produzido em todas foi o dímero **1a**.



Entrada	Catalisador	Temperatura	Solvente	Tempo	Rendimento
1	DABCO 100% eq.	t.a	DMF	11 dias	43%
2	DABCO 100% eq.	t.a	DMF	8 dias	28%
3	DABCO 100% eq.	t.a	DMF	3 dias	21,24%
4	DABCO 50% eq.	MO 80 °C	DMF	1h	Traços
5	DABCO 50% eq.	MO 100 °C	DMF	1h	Traços

6	DABCO 50% eq.	MO 120 °C	DMF	1h	Traços + subprodutos
7	DABCO 50% eq.	t.a	DMF	5 dias	34%
8	DABCO 50% eq. + polímero de coordenação 50% Cu/IDA	t.a	DMF	3 dias	20%
9	DABCO 50% eq.	t.a	Bmim [BF ₄]	5 dias	24%
10	DBU 100%	t.a	DMF	3 dias	27%
11	DBU 50%	t.a	DMF	3 dias	30%

Um dos catalisadores testados nesta reação foi o Cu/Mn-IDA. Notamos que a inserção de polímero de coordenação 50% Cu/Mn-IDA (ácido de Lewis) junto ao DABCO 50% (base de Lewis) equivalente não beneficiou a reação, pois ela parou de progredir após 3 dias, mas o rendimento foi inferior ao da entrada empregando apenas DABCO 50%. Pimentel *et al.* (2022) também não viram melhorias no tempo e rendimento das reações quando aldeídos não ativados foram utilizados como substratos.

O que havia motivado a experimentação deste catalisador foi o trabalho de Andrade *et al.* (2021), que haviam sintetizado Cu/Mn-IDA e aplicado pela primeira vez em RMBH, conseguindo melhores resultados de tempo e rendimento ao usá-lo junto ao DABCO. Sem a presença do DABCO, o Cu/Mn-IDA sozinho não foi capaz de promover a reação, o que pode ser explicado pelo mecanismo proposto, em que o DABCO inicialmente ataca o acrilato (aceptor de Michael). O intermediário zwitteriônico formado é complexado com o catalisador Cu-Mn/IDA. O intermediário complexado ataca o aldeído formando um novo complexo, que após a saída do DABCO e do Cu-Mn/IDA forma o AMBH.

Outro catalisador testado foi o Bmim [BF₄], um líquido iônico que fez o papel de solvente no lugar do DMF e pode agir como co-catalizador junto ao DABCO. Igualmente ao experimento usando Cu-Mn/IDA, o uso de Bmim [BF₄] o trouxe resultados desanimadores. A reação que usou apenas DABCO 50% teve o mesmo tempo de reação (5 dias) e um

rendimento melhor que com o Bmim [BF₄] (Entradas 5 e 7 da Tabela 4). Um dos trabalhos que motivou o teste com este líquido iônico foi o de Souza *et al.* (2008), que perceberam uma diminuição do tempo em mais de 50% ao usar Bmim [BF₄] em água numa RMBH, embora aquecendo em micro-ondas. Segundo a proposta de Santos *et al.* (2006), o Bmim [BF₄] atua provavelmente por duas vias: uma é a ativação do aldeído e a outra é a estabilização dos intermediários da reação que são espécies zwitteriônicas, pela coordenação supramolecular.

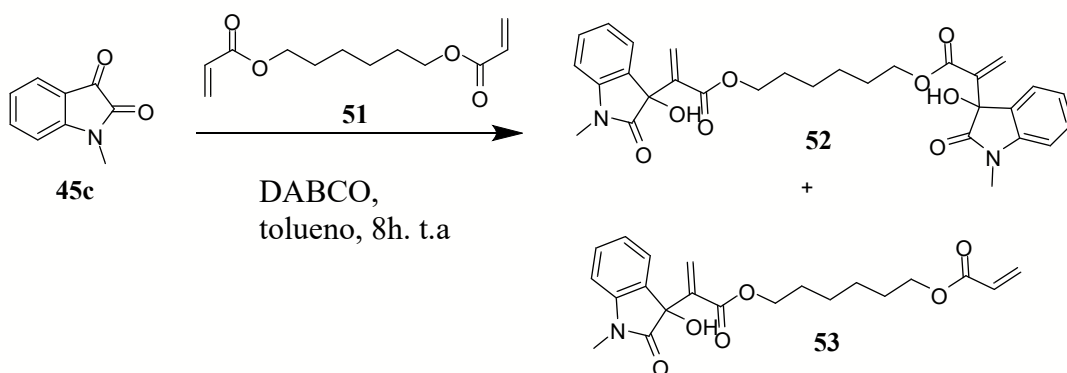
Já o experimento com DBU, uma amina terciária cuja ação se assemelha à do DABCO, apresentou um resultado interessante. Tanto na proporção de 100% como 50% equivalente, no mesmo tempo de reação de 3 dias, o rendimento foi praticamente o mesmo, na faixa de 30% (entradas 10 e 11, Tabela 4), tal qual na entrada em que o DABCO é usado na proporção de 50% equivalente (34% de rendimento). Vale notar que o DABCO é uma base mais forte que o DBU, tendo pK_b maior que o pK_b do DBU (NCBI, 2023; Kaupmees, Trummal & Leito, 2014). Há relatos, porém, em que o DBU teve ação melhor que o DABCO como catalisador da RMBH (Shi *et al.*, 2002; Pareek & Kalek, 2022). Sendo assim, o melhor rendimento foi conseguido utilizando DABCO na proporção de 100%, com DMF seco e temperatura ambiente (43%), sendo estas as condições elegidas para as demais reações de dimerização por meio da reação de Morita-Baylis-Hillman.

Malini *et al.* (2015) também haviam obtido adutos de Morita-Baylis-Hillman semelhantes, a maioria provenientes de aldeídos piridínicos, mas um era um dímero formado a partir da *N*-metil-isatina e um diacrilato de 6 carbonos no espaçador. Os rendimentos obtidos inicialmente foram oriundos da reação com um aldeído de piridina (7% para o produto monomérico e 35% para o produto dimérico).

No estudo de otimização das condições de reação, feito com aldeído de piridina e o diacrilato de 1,6-hexanodiol, Malini *et al.* (2015) testaram solventes diferentes, entre polares próticos como metanol e apróticos como THF, acetonitrila, além de solventes de baixa polaridade como 1,4-dioxano e tolueno. Os melhores resultados de tempo e rendimento foram obtidos com tolueno (8h e 20 e 65% de rendimento para o produto monomérico e dimérico), porém o DMF não foi testado. Assim como no presente trabalho, eles também observaram aumento de tempo de reação (36h) ao utilizar uma quantidade menor de DABCO, no caso deles de 0,4 eq para 0,1 eq., embora sem uma perda significativa no rendimento.

Após eleger as melhores condições reacionais como temperatura ambiente, tolueno como solvente, DABCO 0,4 eq, como catalisador e definir 8h de reação, o rendimento obtido por Malini *et al.* (2015) na reação com *N*-metil-isatina e o diacrilato de 1,6-hexanodiol foi 46% para o produto monomérico (**53**, no Esquema 14) e 55% para o dímero (**52**, no Esquema 14). Possivelmente, a maior lipofilicidade do diacrilato de 1,6-hexanodiol tenha contribuído para um melhor isolamento.

Esquema 14 – Representação da RMBH realizada por Malini *et al.* (2015) usando *N*-metilisatina e o 1,6-hexanodiol, levando à síntese de um dímero (**52**) e um monômero (**53**).



Posteriormente, Silva (2016) realizou um estudo mais extenso em relação ao uso dos solventes num sistema de RMBH entre aldeídos e diacrilato de etilenoglicol, chegando ao DMF, que não tinha sido testado por Malini *et al.* Assim, preferimos manter o DMF como solvente escolhido em todas as reações, a não ser naquela em que empregamos o Bmim [BF₄].

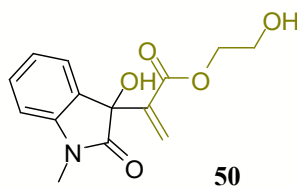
Visando melhorar as sínteses em termos de impacto ambiental e também reduzir o tempo de reação, empregamos os DES (*Deep euthetic solvent*, em português Solvente eutético profundo) de colina:etilenoglicol 1:2 nas reações de MBH, baseado no realizado por Zhao *et al.* (2016). O DES foi utilizado no lugar do DMF, sendo um solvente mais amigável ecologicamente. Além disso, testamos concentrações de DABCO de 25 a 100 mol% aliado ao uso do DES de colina:etilenoglicol 1:2.

Com o uso de 25% mol de DABCO houve a formação de apenas traços de produto, com 24h de reação. Quando utilizamos outras proporções de DABCO (75, 100 e 50 mol% de

DABCO), as análises das placas de CCDA evidenciaram a formação de muitos co-produtos, de modo que impossibilitou o isolamento do produto desejado. Além disso, foi detectada a produção de uma grande quantidade um co-produto mais polar que o dímero já caracterizado.

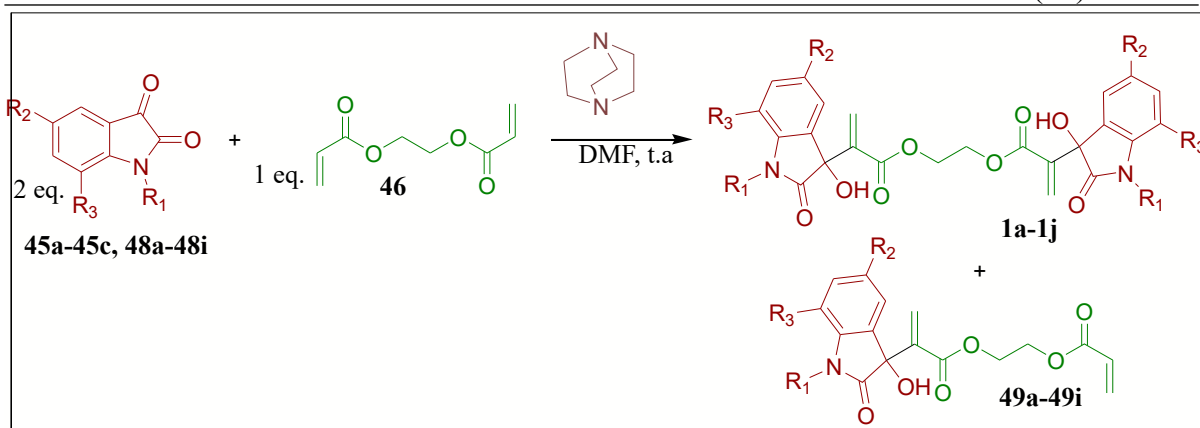
Verificou-se que se tratava de um co-produto cujo padrão estava de posse do laboratório e que já havia sido relatado e caracterizado na literatura por Andrade *et al.* (2023), do nosso grupo de pesquisa. Este co-produto ocorre devido a uma transesterificação a partir do ataque do etilenoglicol presente no DES (*Deep euthetic solvent*) ao complexo DABCO-*N*-metil-isatina. Em seguida, acontece a RMBH e está formado o co-produto, cuja estrutura está representada na Figura 15.

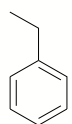
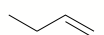
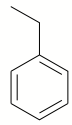
Figura 15 – Estrutura química do produto 2-hidróxi-etil-2-(3-hidróxi-1-metil-2-oxoindolin-3-il)acrilato (**50**) formado nas reações utilizando DES.



Deste modo, notou-se preferível utilizar o DMF e não o DES de colina:etilenoglicol 1:2 nesta reação. Tendo determinado as melhores condições reacionais a partir dos testes efetuados, foram realizadas as reações com os derivados de isatina preparados anteriormente. Os substratos empregados foram o diacrilato de etilenoglicol **46**, com o papel de nucleófilo/aceptor de Michael, e os derivados de isatina **47a-47c** e **48a-48i**, com a função de eletrófilo. Além disso, empregamos o DABCO como a amina terciária para catalisar a reação e temperatura ambiente, condições que foram as observadas como as melhores entre as estudadas neste trabalho e considerando os anteriores. O esquema reacional e respectivos resultados estão na Tabela 5.

Tabela 5 – Esquema reacional da reação de Morita-Baylis-Hillman para a síntese dos AMBH simétricos, usando o diacrilato de etilenoglicol (**46**) como acceptor de Michael e as isatinas substituídas como sítio eletrofílico. O catalisador usado foi o DABCO (**12**).



Entrada	Molécula	R ₁	R ₂	R ₃	Tempo de reação	Rendimento (dímero)
1	1a		H	H	11 dias	43%
2	1b		H	H	3 dias	30%
3	1c		H	H	4 dias	40%
4	1d		Cl	H	3,5 h	52%
5	1e		Cl	H	3h	49%
6	1f		Cl	Cl	20 min	63%
7	1g		Cl	Cl	1h	25%
8	1h		Cl	Cl	30 min	24%
9	1i		NO ₂	H	23h	58%
10	1j		NO ₂	H	1h	56%

No caso do aduto dimérico sem nenhuma substituição na isatina ($R_1=R_2=R_3=H$), após 17h de reação foram isolados dois produtos. Porém, os espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C de ambos não se mostraram conclusivos para as estruturas esperadas. Possivelmente, um dos produtos formados foi originado de um ataque do nitrogênio da isatina ao diacrilato de etilenoglicol, gerando um produto que não era o desejado neste trabalho. Este tipo de produto foi identificado por Chen *et al.* (2011).

Observando a Tabela 5, nota-se que os tempos reacionais foram maiores (3 a 11 dias) para os dímeros de isatina substituída apenas no nitrogênio (**1a-1c**). Já a síntese dos dímeros com substituição no anel aromático da isatina teve tempos reacionais menores, entre 15 minutos e 23h. Algo semelhante foi observado por Silva (2016), que obteve tempos reacionais de 24h para os dímeros partindo de aldeídos nitrados, enquanto os demais tiveram tempos de reação de 20 dias.

Isto pode ter ocorrido porque os substituintes cloro e nitro são retiradores de elétrons e, ao deslocar a densidade eletrônica para si, tornam a porção aromática mais pobre em elétrons, atingindo também o carbono carbonílico mais próximo ao anel aromático e que é o sítio reativo da reação de Morita-Baylis-Hillman. Assim, com o carbono carbonílico mais deficiente em elétrons, consequentemente mais susceptível à reação, tornando-a mais rápida.

Como ser visto no esquema na Tabela 5, a reação de Morita-Baylis-Hillman formou dois produtos: o aduto dimérico (**1a-1j**) e o que chamamos de monomérico (**49a-49i**), os quais foram isolados após purificação por coluna cromatográfica *flash*. Embora não tenhamos obtido todos os monoméricos puros em quantidade suficiente para caracterização, Silva (2016) obteve e caracterizou os dois tipos de produto.

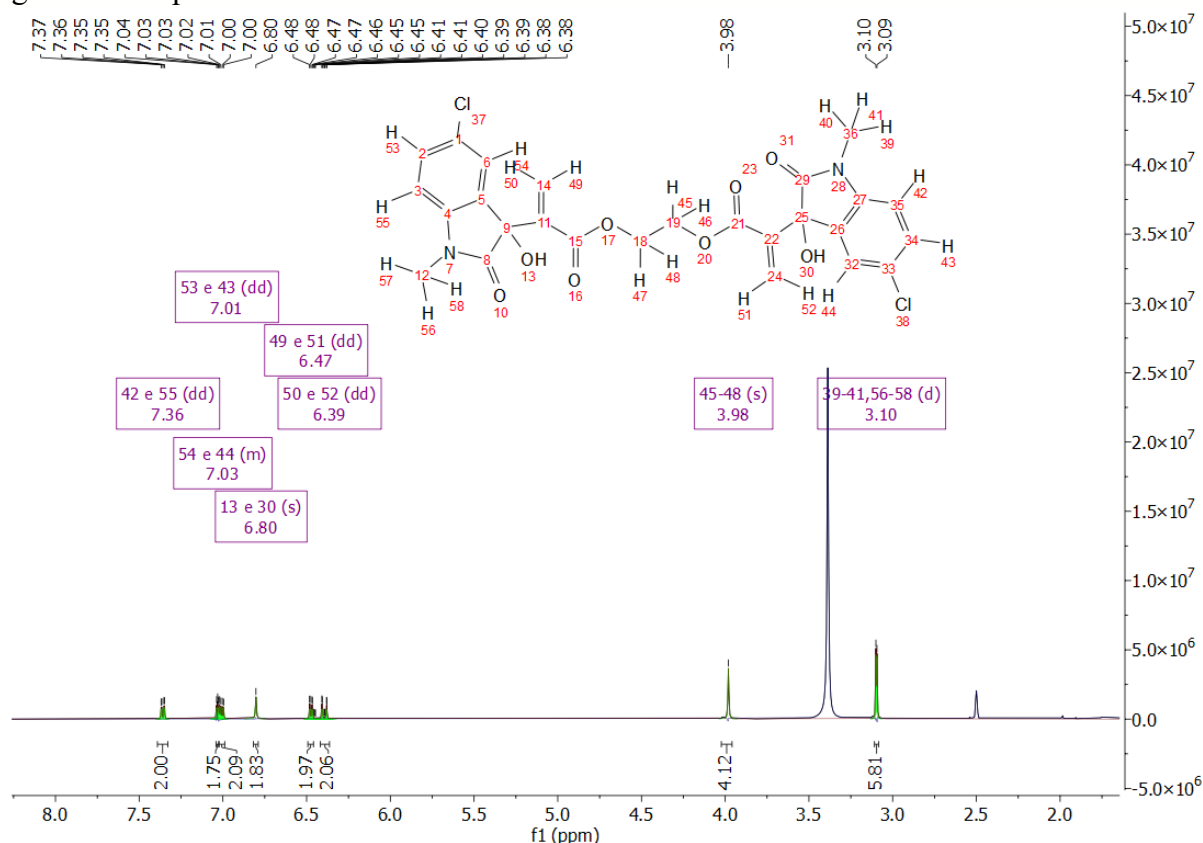
Neste trabalho, conseguimos isolar **49e** e obter espectros de RMN ^{13}C e RMN 1H de **49e** coerentes com a estrutura deste produto monomérico. Os espectros desta substância estão nas seções Experimental e Espectros. Os rendimentos conseguidos foram, em sua maioria, na faixa de 50% (mostrados na Tabela 5), justamente pela formação destes dois produtos principais, observada nas placas de CCDA de acompanhamento das reações.

Outro ponto que pode ser destacado é que os AMBH diméricos que se mostraram como líquidos viscosos foram aqueles com grupo alila e benzila no nitrogênio da isatina (**1b**, **1g**, **1h** e **1j**).

Quanto à caracterização, todos os espectros de massas, de RMN ^1H , RMN ^{13}C , além de espectros de infravermelho, foram obtidos e coerentes com os compostos inéditos esperados. Eles constam na seção Espectros. Em adição, é digno de nota que os adutos diméricos foram produzidos em condições racêmicas e, portanto, foram obtidos na forma de mistura de diastereoisômeros. A seguir, serão discutidos os espectros de **1d**.

No espectro de RMN ^1H , na Figura 16, é possível ver um dos sinais menos deslocados em 3,10 ppm, um dubleto com integral de 6 hidrogênios e que é atribuído àqueles das duas metilas da molécula. Teoricamente seria um singlete, mas ele se desdobrou em dubleto, provavelmente porque há dois diastereoisômeros na amostra, devido ao centro assimétrico na estrutura do produto. O sinal seguinte, em 3,98 ppm, é um dos que indicam mais fortemente a formação do produto desejado, pois é relativo aos 4 hidrogênios do espaçador.

Figura 16 – Espectro de RMN ^1H de **1d**.

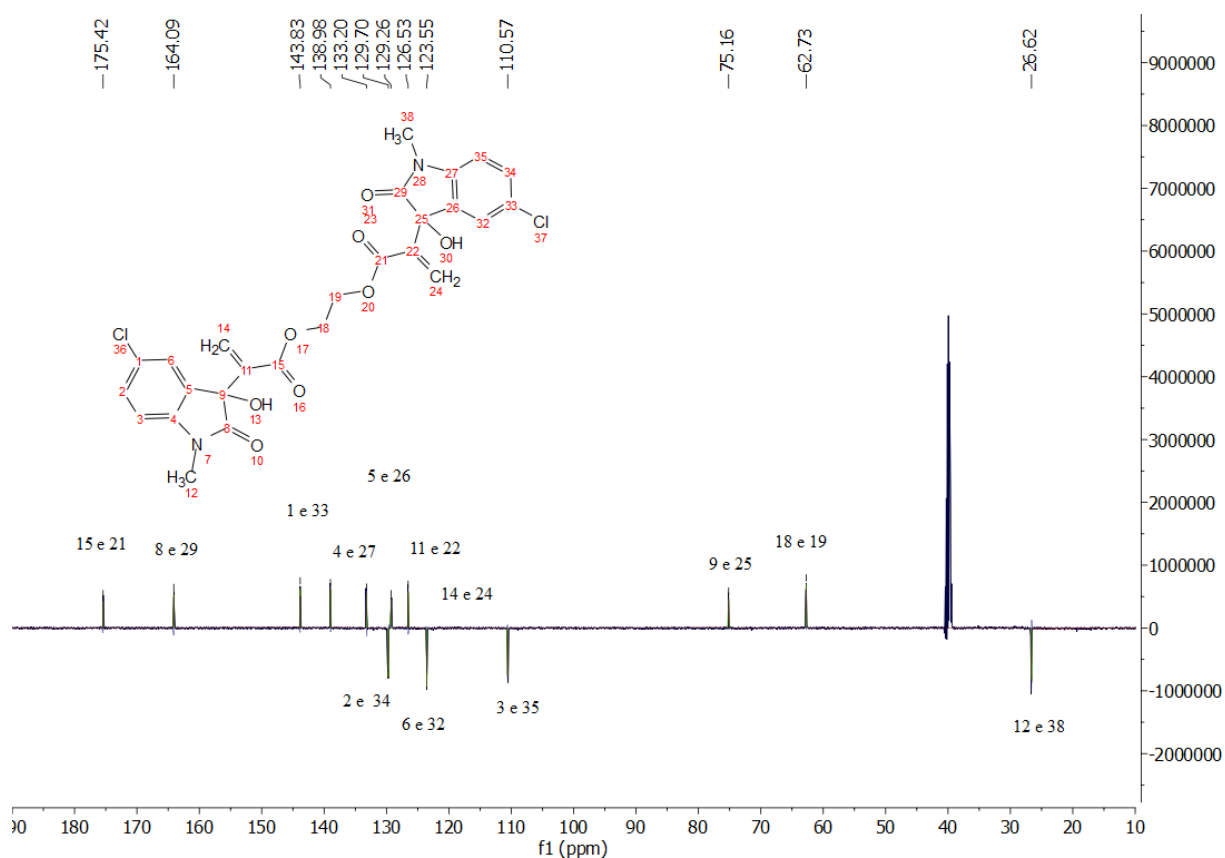


Os dois duplos dubletos com integral de 2 hidrogênios (cada um), um em 6,47 ppm e o outro em 6,37 ppm, podem ser atribuídos aos hidrogênios vinílicos. Apesar de raramente

aparecer, o sinal referente aos hidrogênios das hidroxilas está presente em 6,80 ppm como um singlete de integral de dois. Tal como observado por Brito *et al.* (2020), estes hidrogênios parecem não ter acoplado com outros, como pode ser visto no espectro HSQC (Espectro 26, na seção Espectros). Os hidrogênios do anel aromático correspondem aos sinais mais deslocados, em 7,01 ppm, 7,03 ppm e 7,37 ppm, como um duplo dubleto, multipeto e duplo dubleto, respectivamente, cada um com integral de 2 hidrogênios. Assim, todos os hidrogênios da molécula tiveram sua presença indicada pelo espectro de RMN ^1H .

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 17), por sua vez, também sugere a presença dos 13 carbonos esperados. Por se tratar de uma molécula simétrica, a quantidade de carbonos corresponde à metade da existente na molécula (26), por serem carbonos equivalentes. O sinal negativo em 26,5 ppm corresponde aos dois carbonos das metilas, enquanto os dois carbonos do espaçador estão representados pelo sinal positivo em 62,7 ppm. Cabe destacar que este sinal não seria único para os dois carbonos caso o produto fosse o monomérico (**49d**), pois este não é simétrico e os dois carbonos em questão não seriam equivalentes.

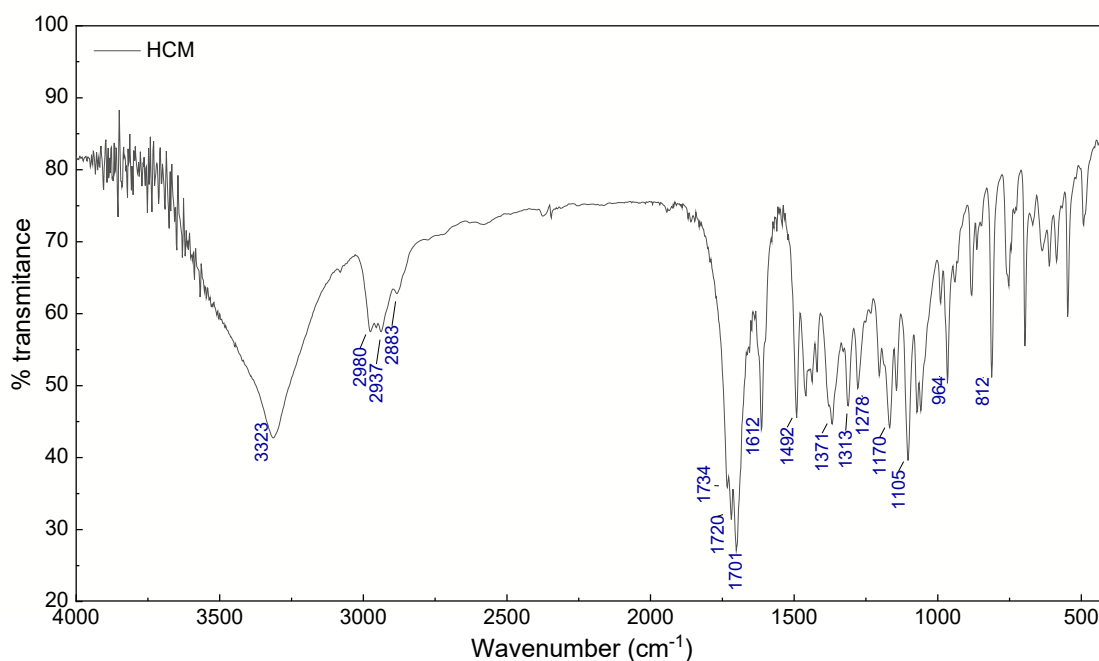
Figura 17 – Espectro de RMN ^{13}C de **1d**.



Passando para os sinais mais desprotegidos, os carbonos quaternários ligados à hidroxila podem ser relacionados ao sinal em 75,1 ppm. Os três sinais negativos em 110,5, 123,3 e 129,7 ppm são relativos aos carbonos do anel aromático que estão ligados a um hidrogênio. O sinal em 126,5 ppm pode ser o carbono quaternário vinílico, e o seguinte, em 129,26 ppm, o outro carbono vinílico, sem substituições. Os três sinais em 133,2, 138,9 e 143,8 são relativos aos carbonos quaternários do anel aromático. Já os sinais mais desprotegidos, em 175,4 ppm e 164,0 ppm possivelmente são atribuídos aos carbonos carbonílicos do éster e da amida, respectivamente. Observando a expansão deste espectro (Espectro 16, seção Espectros), é possível perceber os sinais desdobrados, confirmando a presença da mistura diastereoisomérica.

No espectro de infravermelho (Figura 18), podemos ressaltar a presença da banda em 3300 cm^{-1} , indicando a existência de hidroxila, que é um grupo funcional novo no produto em relação aos reagentes. No caso deste sistema, havia no reagente isatina uma carbonila, enquanto no produto AMBH há um carbono ligado à hidroxila e ao acceptor de Michael. No espectro em questão também podemos citar a banda indicadora de cetona de éster (1700 cm^{-1}) e as bandas relativas à presença de anel aromático (1600 , 1500 e 1400 cm^{-1}).

Figura 18 – Espectro de Infravermelho (IV) em KBr de **1d**.



5.3 Avaliação de atividade antiproliferativa dos AMBH diméricos

Inicialmente, no *screening* para avaliar as porcentagens de inibição de crescimento das linhagens de células tumorais HL-60 (leucemia promielocítica), K-562 (leucemia mielóide crônica) e A-549 (carcinoma de pulmão de células pequenas), nove dos dez compostos apresentaram percentuais de inibição próximos ou acima de 50% nas três linhagens (46,7% a 94,9%). Apenas o composto **1a** demonstrou atividade de inibição proliferativa destas linhagens abaixo de 50% (22,1% e 31,5%) em duas delas, e maior que 50% em uma única linhagem, como pode ser visto na Tabela 6. Assim, o estudo prosseguiu com os outros nove compostos, nas mesmas linhagens tumorais.

Tabela 6 - Percentuais de inibição dos dímeros AMBH nas linhagens tumorais A549 (carcinoma de pulmão de células pequenas), HL60 (leucemia promielocítica) e K562 (leucemia mielóide crônica).

Composto	% Inibição ($\pm$ DP)		
	A-549	HL-60	K-562
1a	31.5 $\pm$ 12.5	22.1 $\pm$ 11.9	59.5 $\pm$ 17.1
1b	90.1 $\pm$ 5.2	87.9 $\pm$ 3.0	89.5 $\pm$ 5.7
1c	89.6 $\pm$ 5.4	90.2 $\pm$ 4.9	91.4 $\pm$ 4.5
1d	87.1 $\pm$ 7.3	88.8 $\pm$ 3.2	86.8 $\pm$ 6.6
1e	90.9 $\pm$ 4.9	81.1 $\pm$ 8.2	87.5 $\pm$ 6.3
1f	92.5 $\pm$ 4.1	85.7 $\pm$ 7.2	89.8 $\pm$ 5.4
1g	90.9 $\pm$ 4.8	94.9 $\pm$ 2.4	91.4 $\pm$ 4.6
1h	92.2 $\pm$ 4.1	88.3 $\pm$ 7.9	92.9 $\pm$ 3.8
1i	46.7 $\pm$ 14.4	61.3 $\pm$ 13.8	87.9 $\pm$ 6.2
1j	89.5 $\pm$ 5.5	75.7 $\pm$ 4.1	87.2 $\pm$ 6.4
Doxorrubicina	46.5 $\pm$ 15.0 ^a	90.1 $\pm$ 8.9 ^b	90.8 $\pm$ 8.4 ^a

^a Doxorrubicina 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. ^b Doxorrubicina 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. DP: desvio padrão.

Os resultados do estudo seguinte trouxeram a Concentração Inibitória 50% de cada composto e estão dispostos na Tabela 7. Na mesma tabela também podemos observar o Índice de Seletividade (IS) calculado experimentalmente para cada um. A seguir, os resultados serão discutidos considerando cada linhagem de células cancerígenas em particular.

Tabela 7 - Concentração Inibitória 50% e Índice de Seletividade dos AMBHs frente às linhagens tumorais A-549 (carcinoma de pulmão de células pequenas), HL-60 (leucemia promielocítica) e K-562 (leucemia mielóide crônica). A linhagem MRC-5 é de células não-tumerogênicas e foi usada para calcular a seletividade dos compostos estudados.

Composto	MRC-5 ^b	A-549		HL-60		K-562	
	CC ₅₀ (μM)	CI ₅₀ (μM)	IS	CI ₅₀ (μM)	IS	CI ₅₀ (μM)	IS
1b	21.11 (12.77-34.71)	8.54 (7.21-10.07)	2.47	4.52 (3.57-5.69)	4.67	11.35 (8.48-15.12)	1.86
1c	8.80 (4.99-15.47)	3.75 (2.85-4.89)	2.35	3.95 (2.52-6.17)	2.23	5.27 (3.51-7.87)	1.67
1d	9.34 (5.03-17.26)	9.64 (7.60-11.99)	0.97	5.31 (3.04-9.25)	1.76	7.87 (6.35-9.70)	1.19
1e	4.48 (3.28-6.07)	8.83 (6.51-11.90)	0.51	4.39 (2.97-6.48)	1.02	10.35 (8.66-12.30)	0.43
1f	6.91 (4.74-10.03)	3.20 (2.55-4.01)	2.16	1.18 (0.96-1.46)	5.84	3.83 (3.04-4.80)	1.80
1g	NT	10.42 (8.85-12.21)	-	2.47 (1.70-3.57)	-	4.89 (3.64-6.53)	-
1h	1.35 (0.61-2.90)	2.24 (1.72-2.90)	0.60	0.72 (0.44-1.18)	1.87	1.65 (1.37-1.97)	0.82
1i	NT	- ^c	-	7.94 (5.27-11.92)	-	6.08 (3.45-10-63)	-
1j	16.31 (7.60-34.79)	7.39 (5.90-9.21)	2.21	2.24 (1.83-2.72)	7.29	7.93 (5.11-12.25)	2.06
Doxorrubici-na	6.09 (3.49-10.45)	1.24 (0.74-2.07)	4.91	0.43 (0.32-0.58)	14.16	2.71 (1.95- 3.77)	2.25

^a CI₅₀ valores obtidos por regressão não-linear; os dados representam a média de dois experimentos independentes, com cada concentração testada em duplicata. ^b Linha celular não-tumerogênica. ^c CI₅₀ > 25 μg L⁻¹. NT: não testado.

Iniciando pela linhagem A-549 (carcinoma de pulmão de células pequenas), observando a tabela e comparando as atividades das moléculas da série entre si, percebemos a seguinte relação estrutura-atividade: os compostos *N*-alilados apresentaram a mesma faixa de atividade, sendo o menor CI₅₀ dado pelo que apresenta o grupo nitro, **1j** (7,39 μM). Na sequência, a molécula monoclorada **1d**, seguida pela diclorada **1f** e, por fim, o dímero sem substituição alguma no anel aromático **1b**.

Entre as moléculas *N*-benziladas, a presença dos dois cloros em **1h** parece ter contribuído para melhorar um pouco a atividade (2,24 μM) em relação ao composto sem nenhuma substituição no anel aromático **1c** (3,75 μM). Por outro lado, os grupos halogenados

fizeram com que o índice de seletividade fosse quase 4 vezes menor (0,6) que em **1c** (2,35), denotando um aumento na toxicidade que faz **1c** ser preferível.

Observando os dímeros metilados, vale lembrar que **1a**, sem substituição no anel aromático, não obteve bons resultados na triagem inicial e seu CI_{50} não foi estudado. O dímero **1i**, com grupo nitro teve uma atividade muito baixa, com CI_{50} maior que 25 $\mu\text{g/mL}$. Por sua vez, o dímero **1d**, com um grupo cloro, apresentou atividade moderada (9,64 μM) e aquele com dois cloros, **1f**, demonstrou uma atividade melhor, classificada como boa (3,2 μM). É interessante notar que o IS de **1f**, mesmo com dois grupos cloro, foi duas vezes melhor que o de **1d**, que tem um grupo cloro.

A respeito da linhagem HL-60 (leucemia promielocítica), analisando a atividade dos compostos da série *N*-alil, **1b** (sem outra substituição) e **1e** (com um grupo cloro) apresentaram atividade semelhante (4,52 e 4,39 μM , respectivamente). A presença de um cloro parece não ter tido efeito na atividade do composto, mas a presença de dois cloros em **1g** parece ter colaborado para a melhoria da atividade (2,47 μM). Já o grupo nitro em **1j** conferiu uma atividade um pouco maior (2,24 μM) e um índice de seletividade que foi o mais alto entre toda a série (7,29).

Entre os adutos diméricos benzilados, **1b** (sem substituição no anel aromático) apresentou uma atividade moderada (3,95 μM), enquanto **1h** (com dois grupos cloro) demonstrou atividade alta (0,72 μM). Se por um lado a presença dos halogênios pode ter contribuído para um menor CI_{50} , ela também pode tê-lo feito para um índice de seletividade menor, consequentemente uma toxicidade maior, assim como ocorreu na linhagem A-549.

Analisando a série *N*-metil, **1a**, sem substituição no anel aromático, como já citado não apresentou atividade. A presença do grupo nitro em **1i** trouxe a atividade para um patamar moderado, que subiu para bom em **1d**, com um grupo cloro. A presença de dois cloros parece ter ajudado a **1f** apresentar atividade alta. Assim como foi observado na linhagem anterior, o índice de seletividade também foi melhor para o composto diclorado **1f** em relação ao clorado, dessa vez 3 vezes mais.

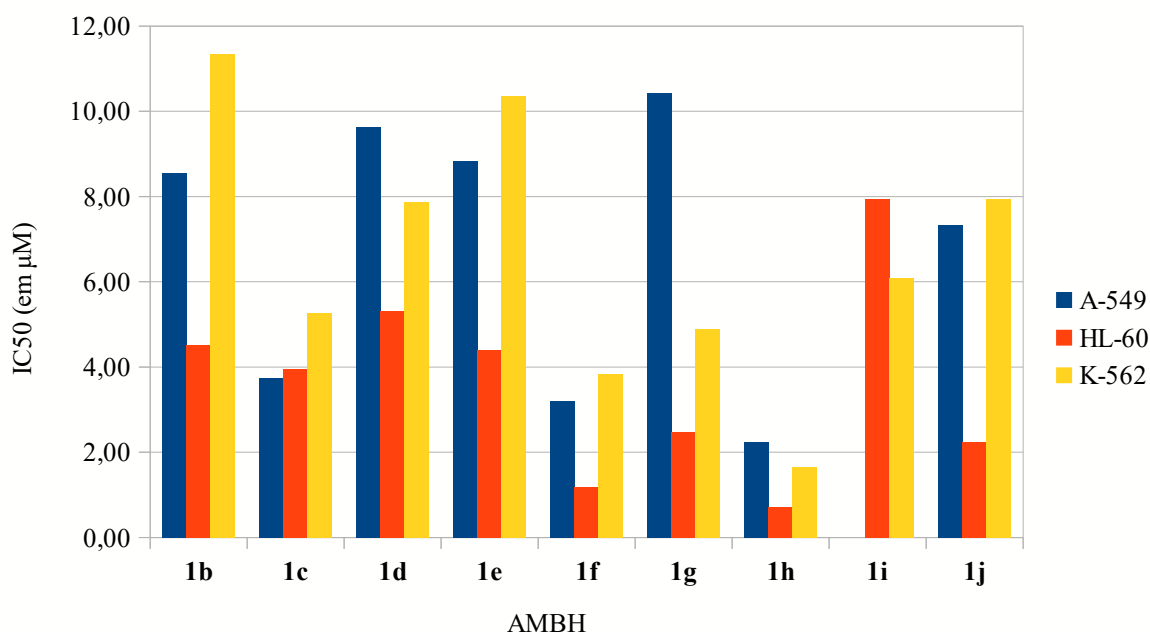
Por fim, discutindo sobre os resultados frente à linhagem de células de leucemia mieloide crônica (K-562), na série *N*-alil o composto **1b** (sem substituinte no anel aromático) apresentou a atividade mais baixa, moderada, mas com IS maior que 1. Ao colocar um grupo

cloro, a atividade melhorou levemente em **1e**, porém os IS foi abaixo de 1. Na presença do grupo nitro, o CI_{50} de **1j** deu um salto, mas a atividade continuou moderada, embora com IS maior que 2. Com dois grupos cloro, atividade passou a ser considerada boa em **1g** (4,89 μ M).

O composto *N*-benzilado **1b**, sem substituição no anel aromático, apresentou uma boa atividade frente a linhagem K-562, mas **1h**, com dois grupos cloro no anel aromático, demonstrou uma alta atividade. Ao mesmo tempo, a presença dos dois cloros diminuiu o IS de **1h**, tornando **1b** mais interessante por somar boa atividade e IS.

Comparando a atividade da série *N*-metil, começando pelo dímero metilado **1a**, sem substituições no anel aromático, não há atividade. No dímero clorado **1d** já há atividade, que é cada vez maior no sentido do dímero nitrado **1i**. Por fim, o dímero diclorado **1f** apresentou a mais alta atividade e IS da série, um conjunto que o torna bastante chamativo e o mais promissor da série inédita sintetizada neste trabalho.

Figura 19 – Gráfico comparando os CI_{50} dos compostos, por linhagem de célula cancerígena.



Agrupando as moléculas por grupo substituinte no anel aromático (Figura 19), ao compararmos **1b** (alilada) e **1c** (benzilada), sem substituição no anel, há um ganho no CI_{50} de **1c** (benzilada) em relação a **1b**. Percebemos índices de seletividade semelhantes para K-562 e A-549, sendo o de **1b** duas vezes maior em HL-60. Se por um lado o grupo benzil trouxe um

CI₅₀ menor para **1c**, o grupo alil parece ter contribuído para uma melhor seletividade de **1b**, tornando-o mais interessante.

Analisando a dupla de monoclorados **1d** e **1e**, nas três linhagens o grupo *N*-metil de **1d** lhe rendeu um IS próximo ou maior que 1, e sempre maior que o de **1e**. Já o CI₅₀ foi menor com o grupo alil, em duas das três linhagens (A-549 e HL-60). Na linhagem K-562, **1d** teve tanto melhor CI₅₀ como IS.

Entre os compostos diclorados, observamos a mesma tendência de atividade nas 3 linhagens: o benzilado **1h** apresenta o menor CI₅₀, mas um IS maior que 1 apenas em HL-60. O metilado **1f** teve um CI₅₀ um pouco maior, mas em compensação seus IS foram sempre >1. Já **1g**, alilado, mostrou os maiores valores de CI₅₀ do grupo e não teve seu IS calculado. Vale ressaltar que compostos diclorados **1h** e **1f** foram os mais ativos entre todos, frente às 3 linhagens testadas. A presença de grupos halogenados como o cloro é bastante comum entre moléculas bioativas, tanto por melhorar as propriedades ADME como por possibilitar diversas interações intermoleculares com alvos farmacológicos (Shinada, Brevern & Schmidtke, 2019).

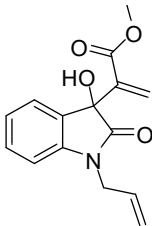
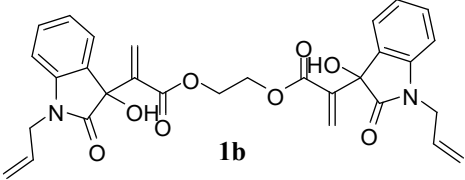
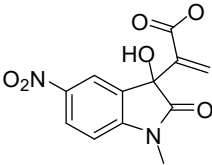
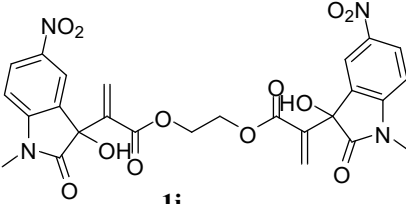
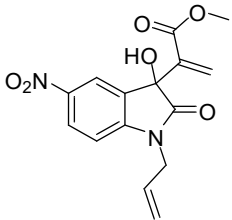
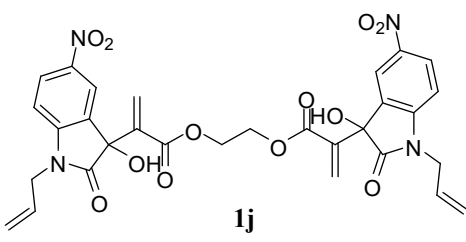
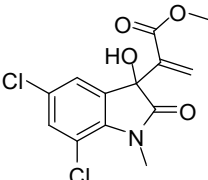
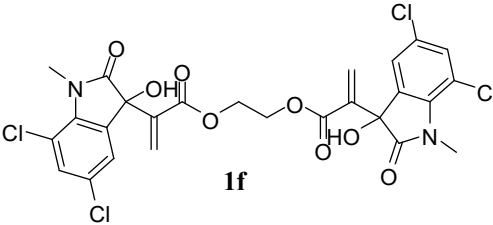
Agrupando os compostos por substituinte *N*-alquilado, os que mais chamam atenção são os *N*-benzilados **1c** e **1h**. Apesar de **1h** (diclorado) demonstrar CI₅₀ menor em todas as linhagens, **1c** tem os melhores índices de seletividade. Entre os *N*-metilados, o diclorado **1h** se destaca como o melhor, tanto em CI₅₀ como em seletividade. O dímero nitrado **1i** e o monoclorado **1d** alternam a segunda posição, a depender da linhagem analisada. Os compostos *N*-alilados foram mais ativos na linhagem HL-60, que é a mais sensível frente a todos os compostos em geral, inclusive na literatura. **1j** foi o alilado que mais se destacou, com um IS de 7,29 em HL-60.

Um resultado correlacionado foi obtido por Zhang *et al.* (2015), cujos híbridos mais ativos foram aqueles *N*-benzilados e com um grupo cloro.

Os adutos de Morita-Baylis-Hillman sintetizados por Brito *et al.* (2020) são semelhantes aos nossos dímeros, de modo que podemos considerá-los seus monômeros. Nos testes *in vitro* realizados com estas moléculas por Santos *et al.* (2022) frente à linhagem de células tumorais HL-60, os monômeros apresentaram CI₅₀ maiores que os respectivos dímeros, como pode ser visto na Tabela 8. Dos quatro pares apresentados, o dímero **1b** foi 4 vezes mais ativo que o monômero, **1j** e **1f** foram duas vezes mais ativos, e em apenas um par

(1i) o dímero apresentou uma atividade que foi um pouco menor. Isto sugere que para este caso, a dimerização contribuiu para o aumento na atividade biológica. Possivelmente os dímeros consigam interagir melhor com os alvos farmacológicos, em comparação com os monômeros correspondentes.

Tabela 8 – Comparação dos resultados de Concentração Inibitória 50% dos monômeros (Brito *et al.*, 2020) e dímeros correspondentes no presente trabalho, frente a células HL-60.

Monômero	CI ₅₀	Dímero correspondente	CI ₅₀
	16,08	 1b	4,52
	6,27	 1i	7,94
	5,42	 1j	2,24
	4,2	 1f	1,18

5.4 Avaliação de atividade dos AMBH diméricos *in vitro* em *Leishmania infantum*

Inicialmente, foi realizado um *screening* com seis dos AMBH que haviam demonstrado atividade antiproliferativa e, portanto, julgamos que teriam maior potencial de apresentar atividade leishmanicida, tendo em vista a literatura que relatam compostos que são antiproliferativos em células cancerígenas humanas e também são antiparasitários (da Silva *et al.*, 2021; Chaves *et al.*, 2017). Este teste inicial foi realizado na forma promastigota de *Leishmania infantum* e seus resultados estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 – Screening dos compostos frente a forma promastigota de *Leishmania infantum*.

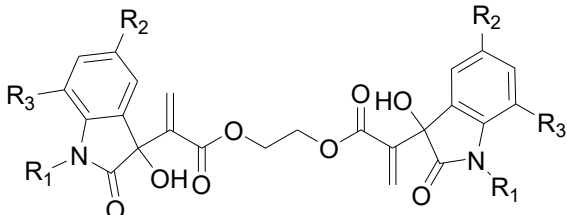
AMBH	CI ₅₀ (μM)	R ¹	R ²	R ³
1c	71,63	Benzila	H	H
1d	138,5	Metila	Cl	H
1e	15	Alila	Cl	H
1f	7,9	Metila	Cl	Cl
1h	15,5	Benzila	Cl	Cl
1j	48,7	Alila	NO ₂	H

Os resultados (Tabela 9) mostram que todos os compostos analisados apresentaram alguma atividade, sendo que entre os adutos simétricos *N*-alilados, **1e**, com um grupo cloro, apresentou CI₅₀ mais de duas vezes melhor que **1j**, com um grupo nitro. Entre os *N*-metilados, a presença de mais um grupo cloro em **1f** pode ter contribuído para uma atividade muito melhor que em **1d**, com um grupo cloro. Já entre os *N*-benzilados, a presença de dois grupos cloro em **1h** em vez de nenhum em **1c** parece ter ajudado a melhorar a propriedade

leishmanicida da substância. De maneira geral, os AMBH mais promissores foram **1e**, **1f** e **1h**, todos com presença do grupo cloro, seja um (**1e**) ou dois (**1f** e **1h**).

Na etapa seguinte, estes três compostos mais ativos **1e**, **1f** e **1h** foram analisados quanto à atividade nas formas promastigotas e amastigotas, separadamente, *in vitro*. A forma promastigota é a que ocorre no vetor, o mosquito transmissor, enquanto a forma amastigota se desenvolve no hospedeiro humano. Estes experimentos foram realizados em triplicata e seus resultados, dispostos na Tabela 10 e Tabela 11 demonstram que os três adutos de Morita-Baylis-Hillman foram ativos contra este parasito, principalmente na forma amastigota, embora não tenham sido melhores que o padrão anfotericina B.

Tabela 10 – Avaliação dos compostos na forma promastigota de *Leishmania infantum*. O tratamento estatístico utilizou o método do N estatístico.



R¹ = alila, R² = Cl, R³ = H (**1e**)
R¹ = metila, R² = Cl, R³ = Cl (**1f**)
R¹ = benzila, R² = Cl, R³ = Cl (**1h**)

AMBH	CI ₅₀ (μM) 1N	CI ₅₀ (μM) 2N	CI ₅₀ (μM) 3N	N total
1e	18,29	22,09	14,51	17,36
1f	-	9,37	9,73	9,55
1h	-	7,99	9,00	8,50
Anfotericina B	0,13			

Tabela 11 – Avaliação dos compostos na forma amastigota de *Leishmania infantum*. O tratamento estatístico utilizou o método do N estatístico.

Composto	CE ₅₀ (μM) 1N	CE ₅₀ (μM) 2N	CE ₅₀ (μM) 3N	N total
1e	11,55	19,99	3,42	8,77
1f	-	5,71	5,53	5,48

1h	-	7,47	5,13	5,70
Anfotericina B	0,15			

Isto é peculiar, porque normalmente a forma promastigota é que é mais sensível aos compostos químicos em geral. Ademais, este resultado é bastante positivo, visto que é na forma amastigota que o parasito se hospeda e se prolifera no corpo humano. Assim, se conseguimos provocar a morte destes parasitos, isso mostra que estas moléculas são promissoras na jornada de busca por novos leishmanicidas. Outro ponto interessante é que os dois compostos mais ativos frente as linhagens tumorais, **1h** e **1f**, foram exatamente os mais ativos contra *Leishmania infantum* e apresentam dois grupos cloro em cada lado da molécula simétrica, enquanto **1e**, ativo mas de menos destaque, também apresenta grupo cloro, mas apenas um

5.5 Avaliação *in silico* das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolização e estabilidade)

Considerando a importância das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolização e estabilidade) de uma molécula na efetividade de um fármaco, foi realizado um estudo teórico destas propriedades, por meio da ferramenta online ADME Swiss. Os valores encontrados, dispostos na Tabela 12, apontam que das 10 moléculas 6 apresentaram apenas uma violação dos parâmetros de Lipinski. No caso, a massa molecular, que é maior que 500 mg/mmol.

Os parâmetros de Lipinski ajudam a prever a tendência da molécula de ser um novo fármaco, baseado em faixas determinadas de massa molecular, número de aceptores de ligação de hidrogênio, número de doadores de ligação de hidrogênio e logP (Lipinski *et al.*, 2001). Como preditor, não é rigidamente necessário estar dentro de todos os parâmetros para que uma molécula seja um fármaco em potencial, embora seja uma ferramenta útil. Assim, uma única violação é bastante propício. Há diversos fármacos, inclusive quimioterápicos antitumorais e leishmanicidas, como a doxorrubicina e a anfotericina B, que não se enquadram nessa faixa de massa molecular. Assim, uma única violação é um bom indício de que a molécula tem chances de se tornar um fármaco.

Tabela 12 – Valores de parâmetros de Lipinski, refratibilidade molar e área superficial polar topológica preditos pela ferramenta ADME Swiss.

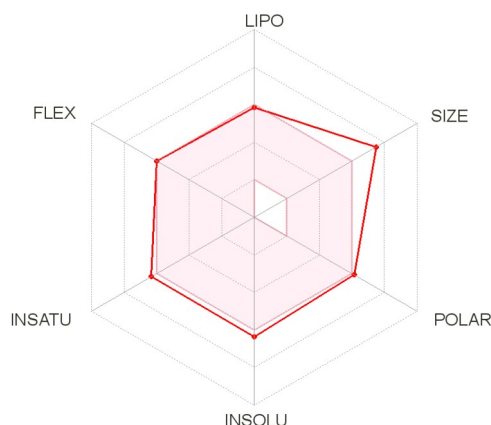
AMBH	Parâmetros de Lipinski					Refratibilidade molar	ASPT (Å)
	MM	ALH	DLH	Log P	nViol		
1a	492.48	8	2	1.78	0	133.33	133.68
1b	544.55	8	2	1.41	1	151.61	133.68
1c	644.67	8	2	2.6	1	182.30	133.68
1d	561.37	8	2	1.69	1	143.35	133.68
1e	613.44	8	2	2.32	1	161.63	133.68
1f	630.26	8	2	2.62	1	153.37	133.68
1g	682.33	8	2	3.23	1	171.65	133.68
1h	782.45	8	2	4.36	2	202.34	133.68
1i	582.47	12	2	-0.89	2	150.38	225.32
1j	634.55	12	2	-0.23	2	168.66	225.32

MM: massa molecular; ALH: acceptor de ligação de hidrogênio; DLH: doador de ligação de hidrogênio; Log p: coeficiente de partição octanol/água; nViol: número de violações; TPSA: área de superfície polar topológica.

Em relação às demais substâncias, 1 delas não apresentou nenhuma violação dos parâmetros de Lipinski, e 3 apresentaram 2 violações. Os dímeros nitrados **1i** e **1j** excederam os limites de massa molecular e a quantidade de aceptores de ligação de hidrogênio, enquanto **1h** excedeu levemente o logP e a massa molecular.

O ADME Swiss gera nas análises um gráfico visual na forma de hexágono (Figura 20) em que a área rosa representa o espaço de valores relacionados à propriedades físico-químicas adequadas à biodisponibilidade oral. De toda a série analisada, uma das moléculas que mais se enquadrou na área rosa foi **1f**, a não ser pelo seu tamanho. Apesar de sua baixa solubilidade teórica em água, ela apresentou uma alta absorção teórica pelo trato gastrointestinal, sendo um bom candidato a ser absorvido via oral. **1h**, por sua vez, apresentou baixa solubilidade em água e baixa absorção pelo trato gastrointestinal, calculadas teoricamente.

Figura 20 – Gráfico gerado pelo ADME Swiss representando espaço de valores relacionados à propriedades físico-químicas adequadas à biodisponibilidade oral de **1f**. Lipo = lipofilicidade; Size = tamanho/massa molecular; Polar = polaridade; insolu = insolubilidade; insatu = insaturações; flex = flexibilidade



1a foi a que mais se enquadrou na área rosa do radar, apresentando todos os parâmetros dentro da área, a não ser a quantidade de insaturações, levemente fora do padrão. A solubilidade foi calculada como moderadamente solúvel e a absorção pelo trato gastrointestinal, alta. Além disso, ela não violou nenhum dos parâmetros de Lipinski. Assim, seria também um bom candidato a uso via oral, teoricamente. Inclusive, por estes parâmetros, esta molécula teria o melhor perfil de *druglikeness* em relação às outras da série.

A área superficial polar topológica (ASPT) deve estar entre 20 e 130 Å e está relacionada a capacidade de atravessar membranas e, portanto, à entrada da molécula nas células, e também ajuda a prever a capacidade de acessar a barreira hematoencefálica. A maioria dos compostos apresentou um valor levemente maior, de 133,86 Å, destoando pouco do padrão estabelecido. Já as moléculas nitradas, **1i** e **1j**, tiveram sua ASPT calculada maior que 200 Å, indicando uma baixa capacidade teórica de absorção.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, os 10 adutos de Morita-Bayli-Hillman diméricos foram obtidos, sendo que 9 deles apresentaram atividade antiproliferativa e 5 leishmanicida *in vitro*. Do ponto de vista sintético, os dímeros foram sintetizados com rendimentos entre 24 e 63% e tempos reacionais entre 15 minutos e 11 dias. As melhores condições de síntese foram temperatura ambiente, DMF seco como solvente e 100% mol de DABCO. Todos os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectros de massa, além de espectros de infravermelho, foram coerentes com as estruturas planejadas.

Sobre a avaliação antiproliferativa, percebemos que, em geral, os dímeros diclorados apresentaram os menores valores de CI_{50} . O benzilado **1h** se destacou com os menores de todos, mas o metilado **1f** obteve os melhores índices de seletividade. Agrupando as moléculas *N*-alquiladas, foram os benzilados que chamaram atenção em todas as linhagens, com os menores valores de CI_{50} . Em adição, os compostos *N*-alilados são destaque com os mais altos índices de seletividade na linhagem HL-60.

Em relação à atividade leishmanicida, um dado interessante do trabalho é que os compostos que se destacaram foram os mesmos que na atividade antiproliferativa, **1h**, **1f** e **1e**.

Ao comparar os dímeros inéditos com os respectivos monômeros que tinham sido testados por outro autor em uma das mesmas linhagens que os dímeros (HL-60), estes foram mais ativos que os aqueles, demonstrando a eficácia da dimerização para a melhoria da atividade biológica estudada, atestando o sucesso da estratégia escolhida.

Dentre todos os compostos, destacamos **1f**, que apresentou uma ótima atividade tanto nas linhagens cancerígenas como em *Leishmania infantum*, além de bons índices de seletividade e parâmetros ADME calculados teoricamente. A perspectiva é de novos estudos para aprofundar o conhecimento sobre a toxicidade deste composto sejam realizados, visto ser uma molécula promissora na busca por fármacos anticâncer e leishmanicida. Além disso, novas moléculas semelhantes também deverão ser planejadas e testadas, de acordo com a premissa da Química Medicinal de que é a estrutura química que determina a atividade de uma molécula.

7. EXPERIMENTAL

7.1 Material e métodos

A isatina, o ATCI, o ácido sulfúrico, o nitrato de sódio, o carbonato de potássio, o iodeto de metila, brometo de alila, cloreto de benzila, ácido acrílico, ácido para-toluenossulfônico, hidroquinona, etilenoglicol, DABCO, DBU, Bmim [BF₄] desse trabalho foram adquiridos da SIGMA ALDRICH com elevado grau de pureza, usados sem purificação prévia.

Os solventes orgânicos foram da Synth, Tedia, Quimiz, Neon, Vetec, todos comerciais, e com excelente grau de pureza, conforme as especificações dos fabricantes foram utilizados sem purificação prévia. O cloreto de colina e o etilenoglicol foram colocados em sistema com bomba de vácuo para retirar ao máximo a água presente, em um rotaevaporador, logo antes do procedimento experimental.

As reações foram acompanhadas pela técnica de cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), usando cromatofolhas de alumínio suportadas em Gel de Sílica 60 da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha) e uma mistura de acetato de etila (Neon) e hexano (Synth) sendo utilizada como fase móvel. As análises eram feitas numa câmara de ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm.

Para a evaporação dos solventes sob pressão reduzida e temperatura controlada, foi empregado um rotaevaporador IKA, modelo RV 10 digital e, para a purificação dos produtos, foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna do tipo *flash*, por meio de colunas de vidro utilizando gel de sílica como fase estacionária com granulação 0,040 – 0,0063 mm da ACROS e misturas de acetato de etila/hexano, como fase móvel, com a utilização de um pressurizador utilizado em nebulizadores comuns.

Os espectros de Infravermelho foram realizados em um espectrofotômetro FTIR modelo IRPrestige-21 da Shimadzu em pastilhas de Kbr, e as frequências foram expressas em cm⁻¹.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram registrados usando DMSO- d_6 ou CDCl_3 (Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, USA) com um espectrômetro Bruker Avance II (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) (500 or 400 MHz para ^1H ; 126 ou 100 MHz para ^{13}C). Os valores dos deslocamentos químicos (δ) nos espectros de RMN ^1H foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo o tetrametilsilano (TMS; δ 0.00 ppm) como padrão interno, e constantes de acoplamento J em hertz. Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^{13}C foram registrados em escala relativa a CDCl_3 e DMSO- d_6 .

As análises de espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) foram realizadas em colaboração na Universidade Federal de Goiás, em um espectrômetro de massa microTOF III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As amostras foram preparadas em metanol ($1\ \mu\text{L}^{-1}$) e infundidas na fonte ESI a $1\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$. A fonte eletrospray foi operada em modo positivo, e nitrogênio de alta pureza ($> 98\%$) foi usado como dissolutor ($200\ ^\circ\text{C}$; $4\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$) e gás de colisão. A pressão foi mantida a 4 bar, o gás seco a $9\ \text{L}\ \text{min}^{-1}$ e a tensão capilar a 4500 V. Os espectros de massa foram adquiridos e processados usando o Bruker Compass DataAnalysis Software (Bruker Daltonik GmbH).

7.2 Síntese do diacrilato 46

Em um balão de 50 mL, foram colocados 15 mmol de etilenoglicol em 10 mL de ciclohexano. Em seguida, foram adicionados 30 mmol de ácido acrílico em presença de 0,1 eq. de ácido paratoluenossulfônico (3 mmol) e 0,3 eq. de hidroquinona (9 mmol). O balão foi conectado a um aparelho de Dean-Stark e um condensador, mantendo o sistema sob aquecimento (110°C) e agitação magnética por 6h. A reação foi acompanhada por CCDA empregando acetato de etila: hexano 2:8 como eluente. Findada a reação, o pH foi ajustado para 7 com uma solução aquosa de NaOH 1M e solução saturada de NaCl. O produto foi extraído com diclorometano e purificado por cromatografia em coluna *flash*, usando acetato de etila: hexano 1:9 como eluente.

7.3 Síntese das isatinas monossubstituídas (5-cloro-isatina, 5,7-diclorosatina, 5-nitro-isatina, N-alil-isatina, N-benzil-isatina, N-metil-isatina) 45a-45c, 47a-47c

7.3.1 *N*-alil-isatina (**45a**), *N*-benzil-isatina (**45b**) e *N*-metil-isatina (**45c**)

Em um balão de 50 mL, foram adicionados 5 mmol de isatina, 4 mL de DMF seco e 1,5 eq. de K₂CO₃. O sistema foi mantido em temperatura ambiente, agitação magnética e atmosfera inerte de argônio, sendo adicionado o agente alquilante (1,2 eq. de brometo de alila ou 1 eq. de cloreto de benzila ou 1,5 eq. de iodeto de metila) em seguida. A reação acompanhada por CCDA. Após o consumo de reagentes, foi realizada extração líquido-líquido com acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi reunida, seca com cloreto de cálcio anidro e concentrada em rotaevaporador, sob pressão reduzida. O produto foi purificado por coluna cromatográfica *flash*.

7.3.2 5-nitro-isatina (**47a**)

Em um erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 10 mmol de isatina, 20 mL de ácido sulfúrico concentrado e uma solução de 9,5 mmol nitrato de sódio em 2 mL de ácido sulfúrico, estando o sistema em banho de gelo. A reação foi acompanhada por CCDA e após o consumo de isatina, foi colocado gelo picado no meio reacional. O precipitado formado foi filtrado em funil de Buchner.

7.3.3 5-cloro-isatina (**47c**) e 5,7-dicloro-isatina (**47b**)

Em um erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 10 mmol de isatina e ATCI (ácido triclorocianúrico) macerado (1 eq., para a 5,7-dicloroisatina, e 0,5 eq. para 5-cloro-isatina). Em seguida, com o sistema mantido em banho de gelo, foi gotejado 6 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação ficou sob agitação magnética e foi acompanhada por CCDA. Findada a reação, foi adicionado gelo picado no meio reacional e o precipitado foi coletado por filtração em funil de Buchner, lavando com água destilada gelada.

7.4 Síntese das isatinas dissustituídas 48a-48i (*N*-metilação, *N*-alilação e *N*-benzilação das isatinas monosustituídas 47a-47c)

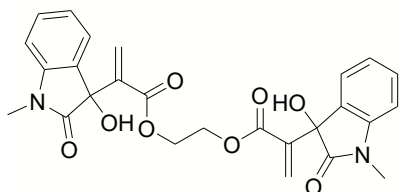
Foram empregados os mesmos métodos de alquilação de isatina, diferindo apenas no reagente de partida, que foram as isatinas já sustituídas no anel aromático (5-nitro-isatina, 5-cloro-isatina e 5,7-dicloro-isatina), além da eventual necessidade de purificação por coluna cromatográfica.

7.5 Síntese dos adutos de Morita-Baylis-Hillman simétricos usando as isatinas mono ou dissustituídas

Em um balão de 25 mL, foi adicionado 0,5 mmol de diacrilato (**46**), 1 mmol da isatina substituída desejada, 0,5 mmol de DABCO e 1 mL de DMF. O balão foi deixado sob agitação magnética e temperatura ambiente até o consumo do reagente limitante ou até a estabilização da reação. A reação foi acompanhada por CCDA com acetato de etila:hexano 6:4 ou outra proporção mais adequada, a depender da polaridade dos reagentes e produtos, a fim de obter uma melhor análise cromatográfica. Em seguida, foi feita a extração líquido-líquido com acetato de etila e água destilada. A fase orgânica foi reunida, seca com cloreto de cálcio anidro e concentrada em rotaevaporador. A purificação foi realizada por coluna cromatográfica *flash*, usando como eluente uma mistura de acetato de etila e hexano na proporção mais conveniente, estudada antes do início da coluna.

7.6 Dados espectroscópicos das moléculas inéditas

7.6.1 Aduto simétrico **1a**

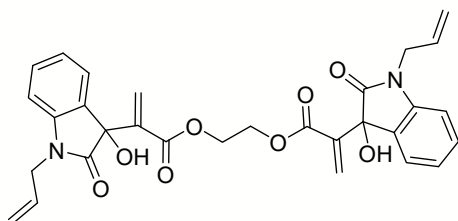


Aspecto físico: sólido amarelado

Rendimento: 43%

RMN ^1H (400 MHz, DMSO): δ 7.30 – 7.26 (m, 2H), 7.03 – 6.93 (m, 6H), 6.60 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 6.45 (s, 2H), 6.37 (d, J = 1.3 Hz, 2H), 3.91 (s, 4H), 3.09 (d, J = 2.3 Hz, 6H). RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO): δ 175.75, 164.16, 144.91, 139.74, 131.25, 129.97, 128.53, 123.39, 122.53, 108.9, 75.31, 62.61, 26.50. HRMS (FTMS + pESI) m/z , calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8$: 492.1533; encontrado: 493.1611 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.6.2 Aduto simétrico **1b**

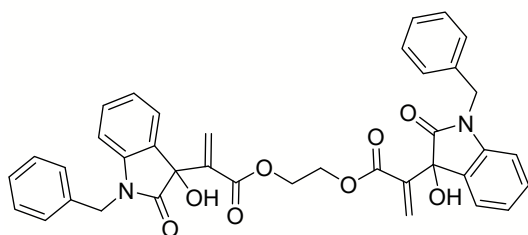


Aspecto físico: líquido viscoso amarelo

Rendimento: 30%

RMN ¹H (500 MHz, DMSO) δ 7.34 – 7.21 (m, 1H), 7.03 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.98 – 6.93 (m, 1H), 6.89 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 2.3 Hz, 2H), 6.47 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 6.39 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 5.83 (ddd, J = 17.4, 10.3, 5.3 Hz, 1H), 5.41 – 5.32 (m, 0H), 5.18 (d, J = 10.4 Hz, 0H), 4.26 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 4.07 – 3.88 (m, 1H), 3.42 (s, 36H), 2.51 (s, 1H). **RMN ¹³C (126 MHz, DMSO)** δ 175.61, 164.18, 144.09, 139.56, 132.39, 131.21, 129.88, 123.50, 122.56, 117.48, 109.62, 75.32, 62.56, 42.07. **HRMS (FTMS + pESI)** m/z , calcd. para C₃₀H₂₈N₂O₈: 544.1846; encontrado: 545.1918 [M+H]⁺.

7.6.3 Aduto simétrico **1c**



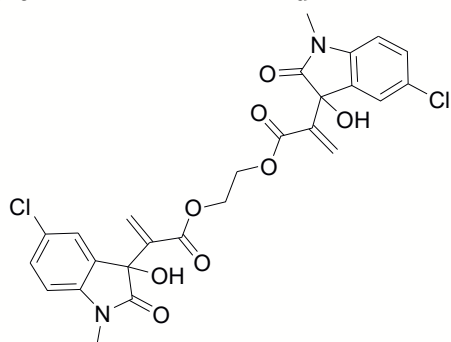
Aspecto físico: sólido branco-perolado

Rendimento: 40%

RMN ¹H (250 MHz, DMSO): δ 7.43 (dd, J = 8.2, 1.6 Hz, 4H), 7.41 – 7.22 (m, 6H), 7.18 (td, J = 7.6, 1.5 Hz, 2H), 7.02 (dd, J = 7.3, 1.5 Hz, 2H), 6.93 (td, J = 7.4, 1.0 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 6.75 (s, 2H), 6.50 (d, J = 1.3 Hz, 2H), 6.42 (d, J = 1.3 Hz, 2H), 4.86 (q, J = 15.9 Hz, 4H), 3.89 (dt, J = 15.2, 10.4 Hz, 4H). **RMN ¹³C (126 MHz, DMSO):** δ 175.98, 164.22,

143.99, 139.62, 136.78, 131.29, 129.88, 128.94, 127.83, 123.60, 122.66, 109.56, 75.38, 62.54, 43.32. **HRMS (FTMS + pESI) m/z** , calculada para $C_{38}H_{32}N_2O_8$: 644.2159; encontrada: 645.2235 $[M+H]^+$.

7.6.4 Aduto simétrico **1d**

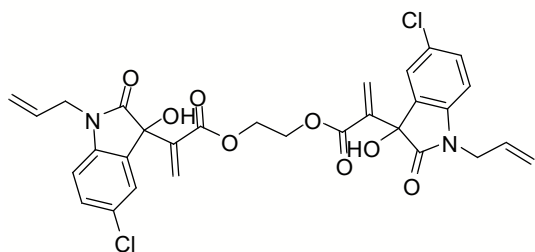


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 52%

RMN 1H (500 MHz, DMSO) δ 7.36 (dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 2H), 7.04 – 7.02 (m, 2H), 7.01 (dd, J = 8.3, 3.8 Hz, 2H), 6.80 (s, 2H), 6.47 (dd, J = 7.2, 1.2 Hz, 2H), 6.39 (dd, J = 13.9, 1.2 Hz, 2H), 3.98 (s, 4H), 3.10 (d, J = 3.0 Hz, 6H). RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO) δ 243.83, 175.42, 164.09, 138.98, 133.2, 129.7, 126.53, 123.55, 123.5, 110.57, 62.73, 26.62.

7.6.5 Aduto simétrico **1e**

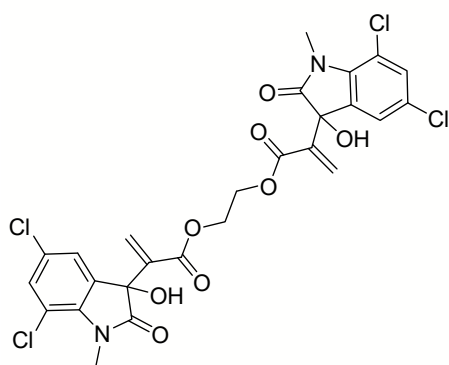


Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 37%

RMN ^1H (250 MHz, DMSO) δ 7.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.05 (s, 2H), 6.93 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.84 (s, 2H), 6.49 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H), 6.40 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.90 – 5.72 (m, 2H), 5.35 (d, $J = 17.2$ Hz, 2H), 5.18 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 4.27 (s, 4H), 4.04 (s, 4H). **RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO)** δ 174.73, 163.65, 142.47, 138.50, 132.81, 131.52, 129.44, 128.84, 126.08, 123.14, 117.17, 110.75, 74.70, 62.32, 41.72. **HRMS (FTMS + pESI)** m/z , calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_8$: 612.1066; encontrada 613.1141 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.6.6 Aduto simétrico **1f**

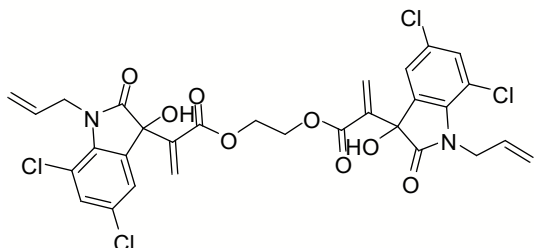


Aspecto físico: líquido viscoso branco

Rendimento: 63%

RMN ^1H (400 MHz, DMSO) δ 7.49 – 7.43 (m, 2H), 7.03 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 2H), 6.98 (s, 2H), 6.50 (t, $J = 1.2$ Hz, 2H), 6.42 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 2H), 4.08 – 4.02 (m, 4H), 3.42 (s, 6H). **RMN ^{13}C (101 MHz, CDCl_3)** δ 164.0, 139.3, 138.2, 133.3, 132.0, 129.6, 129.5, 128.7, 123.2, 116.6, 62.5, 33.2, 30.0. **HRMS (FTMS + pESI)** m/z , calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_8$: 627.9974; encontrada: 629.0051 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.6.7 Aduto simétrico **1g**

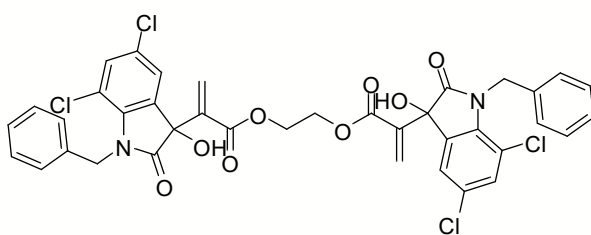


Aspecto físico: líquido viscoso amarelo

Rendimento: 25%

RMN ^1H (250 MHz, DMSO) δ 7.47 (t, $J = 2.2$ Hz, 2H), 7.06 (dd, $J = 3.7, 2.1$ Hz, 2H), 7.03 (s, 2H), 6.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 6.45 (s, 2H), 6.04 – 5.86 (m, 2H), 5.27 (d, $J = 17.3$ Hz, 2H), 5.16 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 4.56 (s, 4H), 4.09 (s, 4H). **RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO)** δ 175.29, 163.60, 138.57, 137.88, 135.49, 133.35, 130.74, 129.48, 126.82, 122.42, 115.88, 114.68, 74.13, 62.51, 43.06. **HRMS (FTMS + pESI)** m/z , calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}_8$: 680.0287; encontrado: 681.0329 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.6.8 Aduto simétrico **1h**



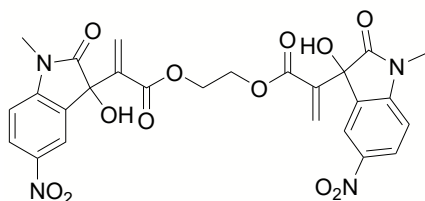
Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 24%

RMN ^1H (500 MHz, DMSO) δ 7.41 (t, $J = 2.3$ Hz, 2H), 7.35 – 7.31 (m, 8H), 7.29 – 7.22 (m, 2H), 7.15 (d, $J = 1.4$ Hz, 2H), 7.11 (dd, $J = 11.0, 2.1$ Hz, 2H), 6.56 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 6.50 (s, 2H), 5.22 – 5.17 (m, 4H), 4.12 (s, 4H). **RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO)** δ 175.9, 163.7, 138.6, 137.9, 137.6, 135.6, 135.5, 130.8, 130.7, 129.6, 128.4, 127.1, 127.0, 127.0, 126.1,

122.6, 122.5, 114.8, 74.2, 62.5, 44.4. **HRMS (FTMS + pESI)** m/z , calcd. para $C_{38}H_{28}Cl_4N_2O_8$: 780.0600; encontrado: 781.0666 $[M+H]^+$.

7.6.9 Aduto simétrico **1i**

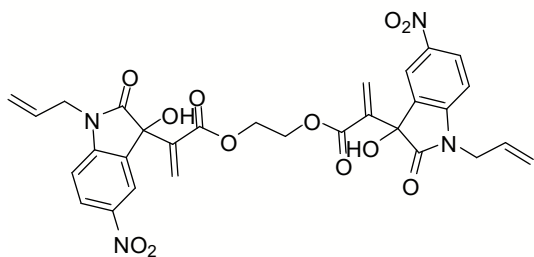


Aspecto físico: sólido amarelo

Rendimento: 58,6%

RMN 1H (400 MHz, DMSO) δ 8.29 (dt, J = 8.8, 2.3 Hz, 2H), 7.85 – 7.78 (m, 2H), 7.23 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 1.7 Hz, 2H), 6.51 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 6.43 (d, J = 15.4 Hz, 2H), 3.97 (s, 4H), 3.19 (d, J = 3.9 Hz, 6H). **RMN ^{13}C (101 MHz, DMSO)** δ 175.81, 163.54, 150.59, 142.31, 137.99, 131.68, 129.35, 126.72, 118.06, 108.73, 74.24, 62.28, 26.42.

7.6.10 Aduto simétrico **1j**



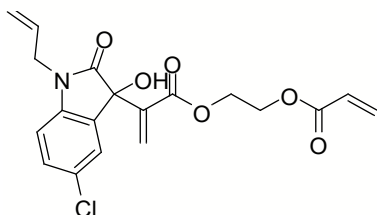
Aspecto físico: líquido viscoso amarelo

Rendimento: 56%

RMN 1H 250 MHz, DMSO) δ 8.35 – 8.23 (m, 2H), 7.85 (t, J = 2.6 Hz, 2H), 7.17 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 2H), 7.11 (s, 2H), 6.54 (d, J = 4.2 Hz, 2H), 6.46 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 5.96 – 5.74 (m, 2H), 5.44 – 5.30 (m, 2H), 5.28 – 5.15 (m, 2H), 4.38 (s, 4H), 4.04 (s, 4H). **RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO)** δ 175.44, 163.67, 149.68, 142.51, 137.99, 131.93, 131.07, 129.54, 126.89,

118.41, 117.51, 109.61, 74.20, 62.47, 42.03. **HRMS (FTMS + pESI)** m/z , calcd. para $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_{12}$: 634.1547; encontrada: 635.1626 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7.6.11 Aduto monomérico 49e



Aspecto físico: sólido branco

Rendimento: 29,12%

RMN ¹H (500 MHz, DMSO) δ 7.33 (dd, *J* = 8.3, 2.2 Hz, 1H), 7.05 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.56 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.53 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.26 (dd, *J* = 17.2, 1.5 Hz, 1H), 6.08 (dd, *J* = 17.3, 10.4 Hz, 1H), 5.94 (dd, *J* = 10.4, 1.5 Hz, 1H), 5.82 (ddt, *J* = 17.3, 10.2, 5.0 Hz, 1H), 5.36 (dq, *J* = 17.2, 1.7 Hz, 1H), 5.19 (dq, *J* = 10.4, 1.6 Hz, 1H), 4.28 (s, 1H), 4.27 – 4.09 (m, 4H). **RMN ¹³C (126 MHz, DMSO) δ** 175.16, 165.65, 164.19, 142.92, 139.12, 133.30, 132.37, 132.02, 129.64, 129.33, 128.29, 126.58, 123.64, 117.72, 111.16, 75.18, 62.83, 62.39, 42.18.

REFERÊNCIAS

- DE ANDRADE, J. C. D.; SILVA, L. A. T.; LIMA-JÚNIOR, C. G.; CHOJNACKI, J.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; DA SILVA, R. B.; JÚNIOR, S. A.; DA SILVA, F. F. Copper and copper-manganese 1D coordination polymers: Synthesis optimization, crystal structure and preliminary studies as catalysts for Baylis–Hillman reactions. **Inorganica Chimica Acta**, v. 514, p. 119985, 2021.
- DE ANDRADE, S. D.; ANDRADE, I. M. G.; CASTRO, A.; MONTENEGRO, Y. M. R.; MOREIRA, D. N.; MAIA, R. A.; MARTINS, F. T.; VAZ, B. G.; DOS SANTOS, G. F.; LIMA, E. O.; OLIVEIRA, N. R.; FARIAS, B. K. S.; LIMA-JÚNIOR, C. G. Deep eutectic solvent co-catalyzed synthesis and antimicrobial activity of Morita-Baylis-Hillman adducts from isatin derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1273, p. 134323, 2023.
- BAMOROVAT, M.; SHARIF, I.; AFSHARI, S. A. K.; KARAMOOZIAN, A.; TAHMOURESI, A.; HESHMATKHAH, A.; SALARKIA, E.; KHOSRAVI, A.; PARIZI, M. H.; BARGHI, M. Poor adherence is a major barrier to the proper treatment of cutaneous leishmaniasis: A case-control field assessment in Iran. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 21, p. 21–27, 2023.
- BARBOSA, T. C.; LIMA-JUNIOR, C. G. ; SILVA, F. P. L.; LOPES, H. M.; FIGUEIREDO, L. R. F.; SOUZA, S. C. O.; BATISTA, G. N.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Improved Synthesis of seven aromatic Baylis-Hillman adducts (BHA): evaluation against *Artemia salina* Leach. and *Leishmania chagasi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 1726-1730, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 590 p.
- BENIGNI, A. Structure-Activity Relationship Studies of Chemical Mutagens and Carcinogens: Mechanistic Investigations and Prediction Approaches. **Chem. Rev.**, v. 105, n. 5, p. 1767–1800, 2005.
- BISWAS, S.; DAGAR, A.; SRIVASTAVA, A.; SAMANTA, S. Access to Substituted Carbazoles in Water by a One-Pot Sequential Reaction of α,β -Substituted Nitro Olefins with 2-(3-Formyl-1*H*-indol-2-yl)acetates. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2015, n. 20, p. 4493–4503.
- BRASIL. **Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020**. Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022/lv-casos.pdf>. Acesso em 28 mar 2023.

BRASIL. **LV – gráficos e mapas**. Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/atualizacao-21-10-2022/lv-graficos-e-mapas.pdf>. Acesso em 28 mar 2023.

BRASIL. **Óbitos de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020**. Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-obitos.pdf>. Acesso em 28 mar 2023.

BRASIL. **Taxa de Letalidade de leishmaniose visceral - Brasil, grandes Regiões e Unidades Federativas – 2000 a 2020**. Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/arquivos/lv-letalidade.pdf>. Acesso em 28 mar 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Nota Informativa N° 13/2020-CGZV/DEIDT/SVS/MS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BRITO, V. B. M.; SANTOS, G. F.; SILVA, T. D. S.; SOUZA, J. L. C.; MILITÃO, G. C. G.; MARTINS, F. T.; SILVA, F. P. L.; OLIVEIRA, B. G.; ARAÚJO, E. C. C.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LIMA-JÚNIOR, C. G.; ALENCAR-FILHO, E. B. Synthesis, anti-proliferative activity, theoretical and ¹H NMR experimental studies of Morita–Baylis–Hillman adducts from isatin derivatives. **Molecular Diversity**, v. 24, n. 1, p. 265-281, 2020.

BUTTLE, D. J.; MORT, J. S. Cystein proteases. *In*: LENNARZ, W. J.; LANE, M. D. (org.). **Encyclopedia of Biological Chemistry**. Burlington: Elsevier, 2013. p. 589-592.

CARVALHO, S. A.; KAISER, M.; BRUN, R.; DA SILVA, E. F.; FRAGA, C. A. M. Antiprotozoal Activity of (E)-Cinnamic N-Acylhydrazones Derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20374–20381, dez. 2014.

CAVALCANTE, K. K. S.; ALMEIDA, C. P.; BOIGNY, R. N.; CAVALCANTE, F. R. A.; CORREIA, G. S.; FLORÊNCIO, C. G. D.; ALENCAR, C. H. Epidemiological and clinical factors associated with lethality from Human Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil, 2007 to 2018. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 64, e52, p. 1-9, 2022.

CHAVES, J. D. S.; TUNES, L. G.; FRANCO, C. H. J. *et al.* Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 127, n. 15, p. 727-739, 2017.

CHEN, S.; WANG, S.; SU, C.; HU, H.; YANG, Y.; HSIEH, C.; PENG, C.; CHANG, F.; CHENG, Y. Anti-Lymphangiogenesis components from *Zhoanthid Palythoa tuberculosa*. **Marine drugs**, v. 16, n. 47, p. 1-10, jan. 2018.

CHEN, G.; TANG, Y.; ZHANG, J.; WU, Y.; HAO, X.; MU, S. Michael addition between isatin and acrylate derivatives. **Letters in Organic Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 614-617, ago. 2011.

CHEN, X.; Bis-isatin derivatives: design, synthesis, and biological activity evaluation as potent dimeric DJ-1 inhibitors. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 42, n. 7, p. 1160-1170, 2021.

COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; BOLZANI, V. S.; DEBONSI, H. M.; PASSERINE, G. D.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Med. Chem. Res.*, v. 18, n. 9, p. 703-711, dez. 2009.

DONATO, L. E.; DE FREITAS, L. R. S.; DUARTE, E. C.; ROMERO, G. A. S. Visceral leishmaniasis lethality in Brazil: an exploratory analysis of associated demographic and socioeconomic factors. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 53, e20200007, 2020.

ELSBAEY, M.; TANAKA, C.; MIYAMOTO, T. New secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. **Phytochemistry Letters**, v. 32, p. 70–76, ago. 2019.

FERNANDES, F. S.; SANTOS, H.; LIMA, S. R.; CONTI, C.; RODRIGUES-JÚNIOR, M. T.; ZEOLY, L. A.; FERREIRA, L. L. G.; KROGH, R.; ANDRICOPULO, A. D.; COELHO, F. Discovery of highly potent and selective antiparasitic new oxadiazole and hydroxy-oxindole small molecule hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 201, 112418, p. 1-14, 2020.

FURUTACHI, M.; GONDO, T.; IKEDA, R.; YOSHIKAWA, N.; YOKOTA, T.; TAKEDA, Y.; YOKOMIZO, K.; ZHOU, J. R.; KASHIGE, N.; MIAKE, F.; SUMOTO, K. Anti-proliferative Activities towards Human Brain Glioma U251 Cells and Human Carcinoma Cells (KB3-1) of Some Twin-Drug Type Bivalent C2-Symmetrical Phenylboronic Acid Derivatives. **Biol Pharm Bull.**, v. 42, n. 5, p. 833-836, 2019.

GARDEN, S. J.; SKAKLE, J. M. S. Isatin derivatives are reactive electrophilic components for the Baylis–Hillman reaction. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 11, p. 1969-1972, 2002.

HAO, S.; ZHANG, X.; DONG, D.; WANG, Z. Alumina-supported heteropoly acid: An efficient catalyst for the synthesis of azaarene substituted 3-hydroxy-2-oxindole derivatives via C(sp³)H bond functionalization. **Chinese Chemical Letters**, v. 26, n. 5, p. 599–602, 2015.

HUANG, C.; JU, D.; CHANG, C.; REDDY, P. M.; VELMURUGAN, B. K. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non–small cell lung cancer. **BioMedicine**, v. 7, n. 4, p. 12-23, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, INCA, 2022.

KAGATA, T.; SAITO, S.; SHIGEMORI, H.; OHSAKI, A.; ISHIYAMA, A.; KUBOTA, T.; KOBAYASHI, J. Paratunamides A-D, Oxindole Alkaloids from *Cinnamodendron axillare*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 10, p. 1517-1521, 2006.

KALBERG, A. T.; BERGSTRÖM, M. A.; BÖRJE, A.; LUTHMAN, K.; NILSSON, J. L. G. Allergic Contact Dermatitis — Formation, Structural Requirements, and Reactivity of Skin Sensitizers. **Chemical research in toxicology**, v.21, n. 1, p.53-69, 2008.

KAPIL, S.; SINGH, P. K.; SILAKARI, O. An update on small molecule strategies targeting leishmaniasis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 157, p. 339-367, 2018.

KARPE, S. A.; MONDAL, D. Synthesis of 3-Hydroxy-2-oxindole and 2,5-Diketopiperazine Cores as Privileged Scaffolds of Indole Alkaloids. **ChemistrySelect**, v. 7, n. 36, e202202516, 2022.

KAUPMEES, K.; TRUMMAL, A.; LEITO, I. Basicities of strong bases in water: a computational study. **Croat. Chem. Acta**, v. 87, n. 4, p. 385–395, 2014.

KOHN, L. K.; PAVAM, C. H.; VERONESE, D.; COELHO, F.; DE CARVALHO, J. E.; ALMEIDA, W. P. Antiproliferative effect of Baylis–Hillman adducts and a new phthalide derivative on human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 738–744, 2006.

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

LIMA-JÚNIOR, C. G.; FAHEINA-MARTINS, G. V.; BOMFIM, C. C. B.; DANTAS, B. B.; SILVA, E. P.; ARAÚJO, D. A. M.; FILHO, E. B. A.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. Synthesis, Cytotoxic Activity on Leukemia Cell Lines and Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts. **Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 602-612, 2016.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v 46, n. 3, v. 46, p. 3-26, 2001.

LIU, Y.-T.; XIA, Y.; CUI, S.-H.; JI, Y.-G.; WU, L. Palladium-Catalyzed Cascade Hydrosilylation and Amino-Methylation of Isatin Derivatives. **Adv. Synth. Catal.**, v. 362, n. 14, p. 2632-2636, 2020.

MALINI, K.; PERIYARAJA, S.; SHANMUGAM, P. Morita–Baylis–Hillman reaction of pyridine-2, 3, and 4-carboxaldehydes and N-methyl isatin with mono and diacrylates: synthesis of highly functionalized pyridine ligands and isatin derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 36, p. 5123–5127, 2015.

MESHRAM, H. M.; THAKUR, P. B.; BEJJAM, M. B.; BANGADE, V. M. DMF mediated Henry reaction of isatins: an efficient synthesis of 3-hydroxy-2-oxindole. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 6, n. 1, p.19-43, 2013.

MOGHADDAM, M. N.; JALAL, R.; ZERAATKAR, Z. Synthesis and antiproliferative and apoptosis-inducing activity of novel 3-substituted-3-hydroxy-2-oxindole compounds. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 54, n. 1, p. 61-70, 2018.

MOHAN, R.; RASTOGI, N.; NAMBOOTHIRI, I. N. N.; MOBIN, S. M.; PANDA, D. Synthesis and evaluation of α -hydroxymethylated conjugated nitroalkenes for their anticancer activity: Inhibition of cell proliferation by targeting microtubules. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 23, p. 8073–8085, 2006.

MORITA, K.; SUZUKI, Z.; HIROSE, H. A tertiary phosphine-catalyzed reaction of acrylic compounds with aldehydes. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 41, n.11, p. 2815, 1968.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). PubChem **Compound Summary for CID 9237, 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane**. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_4-Diazabicyclo_2.2.2_octane. Acesso em 6 junho 2023.

NIKOLAOU, M.; PAVLOPOULOU, A.; GEORGAKILAS, A. G.; KYRODIMOS, E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 35, n. 4, p. 309–318, 2018.

NYONGBELA, K. D.; NTIE-KANG, F.; HOYE, T. R.; EFANGE, S. M. N. Antiparasitic Sesquiterpenes from the Cameroonian Spice *Scleria striatinux* and Preliminary *In Vitro* and *In Silico* DMPK Assessment. **Nat. Prod. Bioprospect.**, v. 7, n. 3, p. 235–247, jun. 2017.

OLIVEIRA, J. P. G.; CALEFF, G. S.; SILVA, E. P.; COELHO, M. C.; CASTRO, A. C.; MENDES, R. K. S.; OLEGÁRIO, T. R.; LIMA-JÚNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; SOUZA, J. L. C.; SOUZA, S. M.; MILITÃO, G. C. G.; VAZ, B. G.; RAMALHO, R. R. F. Morita-Baylis-Hillman Reaction with 7-Chloroquinoline Derivatives-New Compounds with Potential Anticancer Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 32, n. 2, p. 347-354, 2021.

OLIVEIRA, R.G. Sentidos das doenças negligenciadas na agenda da Saúde Global: o lugar de populações e territórios. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, n. 7, p. 2291-2302, 2018.

OTERO, E.; VERGARA, S.; ROBLEDO, S. M.; CARDONA, W.; CARDA, M.; VÉLEZ, I. D.; ROJAS, C.; OTÁLVARO, F. Synthesis, Leishmanicidal and Cytotoxic Activity of Triclosan-Chalcone, Triclosan-Chromone and Triclosan-Coumarin Hybrids. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13251-13266, 2014.

PAQUIN, A.; FORTIN, L.; GIROUARD, J.; REYES-MORENO, C.; SEVRIUKOVA, I. F.; BERUBÉ, G.; Investigating a new C2-symmetric testosterone dimer and its

dihydrotestosterone analog: Synthesis, antiproliferative activity on prostate cancer cell lines and interaction with CYP3A4. **European journal of medicinal chemistry**, v. 250, p.115222-115222, 2023.

PAREEK, A.; KALEK, M. Regioselective Dearomatization of N-Alkylquinolinium and Pyridinium Salts under Morita-Baylis-Hillman Conditions. **Adv. Synth. Catal.**, v. 364, n. 16, p. 2673-2388, 2022.

PEDDIBHOTLA, S. 3-Substituted-3-hydroxy-2-oxindole, an Emerging New Scaffold for Drug Discovery with Potential Anti-Cancer and other Biological Activities. **Current Bioactive Compounds**, v. 5, n. 1, p. 20-38, 2009.

PIMENTEL, R. L. G.; DA SILVA, R. B.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; LIMA-JÚNIOR, C. G.; DA SILVA, F. F. Mixed-Metal Cu-Mn iminodiacetate coordination polymer as heterogeneous catalyst for Morita-Baylis-Hillman reactions. **Journal of Molecular Structure**, v. 1263, p. 133133, 2022.

PRATHIMA, P. S.; BIKSHAPATHI, R.; POORNACHANDRA, Y.; HIMABINDU, V.; KUMAR, G. JAGADEESH; JAGADEESH, N.; KUMAR, C. GANESH; RAO, V. JAYATHIRTHA. Synthesis and Bioevaluation of Quaternary Centered 3-hydroxy-3 (alkynyl)indolin-2-one Derivatives as Potential Cytotoxic Agents and Akt Kinase Inhibitors. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 14, p. 1963-1970, 2017.

RADUL, O. M.; ZHUNGIETU, G. I.; REKHTER, M. A.; BUKHANYUK, S. M. Simple method for the preparation of 1-substituted isatins. **Chem Heterocycl Compd**, v. 19, p. 286–288, mar. 1983.

RIBEIRO, N. M.; DA SILVA, B. V.; VIOLANTE, F. A.; REZENDE, C. M.; PINTO, A. C. 5-Chloro- and 5,7-dichloroisatin by chlorination of isatin with trichloroisocyanuric acid. **Org. Prep. Proced. Int.**, v. 37, n. 3 p. 265-267, 2005.

ROCHA, J. C.; RODRIGUES, K. A. F.; NÉRIS, P. L. N. *et al.* Biological activity of Morita-Baylis-Hillman adduct homodimers in *L. infantum* and *L. amazonensis*: anti-Leishmania activity and cytotoxicity. **Parasitol Res**, v. 118, n.10, p. 3067–307, 2019.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P. G.; CRUZ-LOPEZ, O.; PRETI, D.; BERMEJO, J.; ESTÉVEZ, F. α -Bromoacrylamido N-Substituted Isatin Derivatives as Potent Inducers of Apoptosis in Human Myeloid Leukemia Cells. **ChemMedChem**, v. 4, n. 10, p. 1668-1676, set. 2009.

SANTOS, L. S.; NETO, B. A. S.; CONSORTI, C. S.; PAVAM, C. H.; ALMEIDA, W. P.; COELHO, F.; DUPONT, J.; EBERLIN, M. N.; The role of ionic liquids in co-catalysis of Baylis-Hillman reaction: Interception of supramolecular species via electrospray ionization mass spectrometry. **J. Phys. Org. Chem.**, v 19, n. 11, p. 731–736, 2006.

SANTOS, M. M. M.; MOREIRA, R. Michael Acceptors as Cysteine Protease Inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n.10, p. 1040-1050, 2007.

SANTOS, M. S.; COELHO, F.; LIMA-JUNIOR, C. G.; VASCONCELLOS, M. L. A. A. **Current Organic Synthesis**, v. 12, n. 6, p.830-852, 2015.

dos SANTOS, G. F.; MILITÃO, G. C. G.; SILVA, T. D. S.; SOUZA, J. L. C.; BRITO, V. B. M.; MOURÃO, E. D. S.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; ALENCAR-FILHO, E. B.; LIMA-JÚNIOR, C. G. Antiproliferative Activity, Preliminary QSAR Analysis and in silico ADME Studies of Morita-Baylis-Hillman Adducts from Isatin Derivatives in Four Cancer Cell Lines. **Rev. Virtual Quim.**, v. 15, n. 1, p. 3-11, 2023.

SCHWARTING, A. E. Dimeric natural compounds with pharmacological activity. *In*: WAGNER, H.; WOLFF, P. (ed.) **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**. Berlin: Springer-Verlag, 1976. 287 p.

SHI, M.; XU, Y.; ZHAO, G.; WU, X. Lewis Base Effects in the Baylis–Hillman Reaction of Arenecarbaldehydes and N-Arylidene-4-methylbenzenesulfonamides with α,β -Unsaturated Cyclic Ketones. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2002, n. 21, p. 3666-3679, 2002.

SHINADA, N. K.; BREVERN, A. G.; SCHMIDTKE, P. Halogens in Protein–Ligand Binding Mechanism: A Structural Perspective. **J. Med. Chem.**, v. 62, n. 21, p.9341–9356, 2019.

SILVA, B. V.; ESTEVES, P. M.; PINTO, A. C. Chlorination of isatins with trichloroisocyanuric acid. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 257-263, fev. 2011.

da SILVA, B. N. M.; BASTOS, R. S.; SILVA, B. V.; PINTO, A. C. Síntese de 5-nitro-isatina e 5-cloro-isatina a partir da isonitrosoacetanilida. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, p. 2279-2282, 2010.

da SILVA, S. V. S.; BARBOZA, O. M.; SOUZA, J. T. *et al.* Structural Design, Synthesis and Antioxidant, Antileishmania, Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of a Novel Quercetin Acetylated Derivative. **Molecules**, v. 26, n. 22, 6923, 2021.

da SILVA, W. A. V. **Uso da estratégia drogas gêmeas para a síntese de novos homodímeros de adutos de Morita-Baylis-Hilman potenciais candidatos a fármacos antiparasitários**. 2016. Tese (Doutorado em Química) -- Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2016.

SLAVOVA-KAZAKOVA, A. K.; ANGELOVA, S. E.; VEPRINTSEV, T. L.; DENEV, P.; FABBRI, D.; DETTORI, M. A.; KRATCHANOVA, M.; NAUMOV, V. V.; TROFIMOV, A. V.; VASIL'EV, R. F.; DELOGU, G.; KANCHEVA, V. D. Antioxidant potential of curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies,

scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein J. Org. Chem.* v. 11, p. 1398–1411, 2015.

SOUSA, S. C.; ROCHA, J. C.; KEESEN, T. S. L.; SILVA, E. P. *et al.* Synthesis of 16 New Hybrids from Tetrahydropyrans Derivatives and Morita-Baylis-Hillman Adducts: In Vitro Screening against *Leishmania donovani*. *Molecules*, v. 22, n. 2, 207, 2017.

SOUZA, R. O. M. A.; SOUZA, A. L. F.; FERNÁNDEZ, SILVA, A. C.; PEREIRA, V. L. P.; ESTEVES, P. M.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; ANTUNES, O. A. C. Morita-Baylis-Hillman Reaction in Water/Ionic Liquids under Microwave Irradiation. *Letters in organic chemistry*, v. 5, n. 5, p.379-38, 2008.

SUN, D.; GAO, W.; HU, H.; ZHOU, S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 12, n. 7, p. 3049-3062, 2022.

VIEIRA, A. C. S.; DA SILVA SANTOS, M., LEITE, A. B. *et al.* Leishmanicidal activity of Morita-Baylis–Hillman adducts. *Parasitol Res.*, v. 121, p. 751–762, 2022.

VOLOSHCHUK, T.; FARINA, N. S.; WAUCHOPE, O. R.; KIPROWSKA, M.; HABERFIELD, P.; GREER, A. Molecular Bilateral Symmetry of Natural Products: Prediction of Selectivity of Dimeric Molecules by Density Functional Theory and Semiempirical Calculations. *J. Nat. Prod.*, v. 67, n. 7, 1141–1146, jul. 2004

VON DER OHE, P. C.; KÜHNE, R.; EBERT, R.; ALTENBURGER, R.; LIESS, M.; SCHÜÜRMAN, G. Structural Alerts - A New Classification Model to Discriminate Excess Toxicity from Narcotic Effect Levels of Organic Compounds in the Acute Daphnid Assay. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 18, n. 3, p. 536–555, 2005.

VUPPALAPATI, S. V. N.; LEE, Y. R. Iodine-catalyzed efficient synthesis of azaarene substituted 3-hydroxy-2-oxindole derivatives through sp³ C-H functionalization. *Tetrahedron*, v. 68, n. 39, p.8286-8292, 2012.

WEI, C.; YANG, X.; SHI, S.; BAI, L.; HU, D.; SONG, R.; SONG, B. 3-Hydroxy-2-oxindole Derivatives Containing Sulfonamide Motif: Synthesis, Antiviral Activity, and Modes of Action. *J. Agric. Food Chem.*, v. 71, n. 1, p. 267–275, 2023.

WENZEL, I. N.; WONG, P. E.; MAES, L.; MULLER, T. J. J.; KRAUTH-SIEGEL, R. L.; BARETT, M. P.; DAVIOUD-CHARVET, E. Unsaturated Mannich Bases Active Against Multidrug-Resistant *Trypanosoma brucei brucei* Strains. *ChemMedChem*, v. 4, n. 3, p. 339 – 351, 2009.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map*. Geneva: World Health Organization, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer: Fact sheets**. Geneva: World Health Organization, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 28 abr 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis: Fact sheets**. Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em 12 mar 2023.

YADAV, G. D.; BHAGAT, R. D. Clean esterification of mandelic acid over $\text{Cs}_{2.5}\text{H}_{0.5}\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ supported on acid treated clay. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 7, n. 4, p. 245–251, nov. 2005.

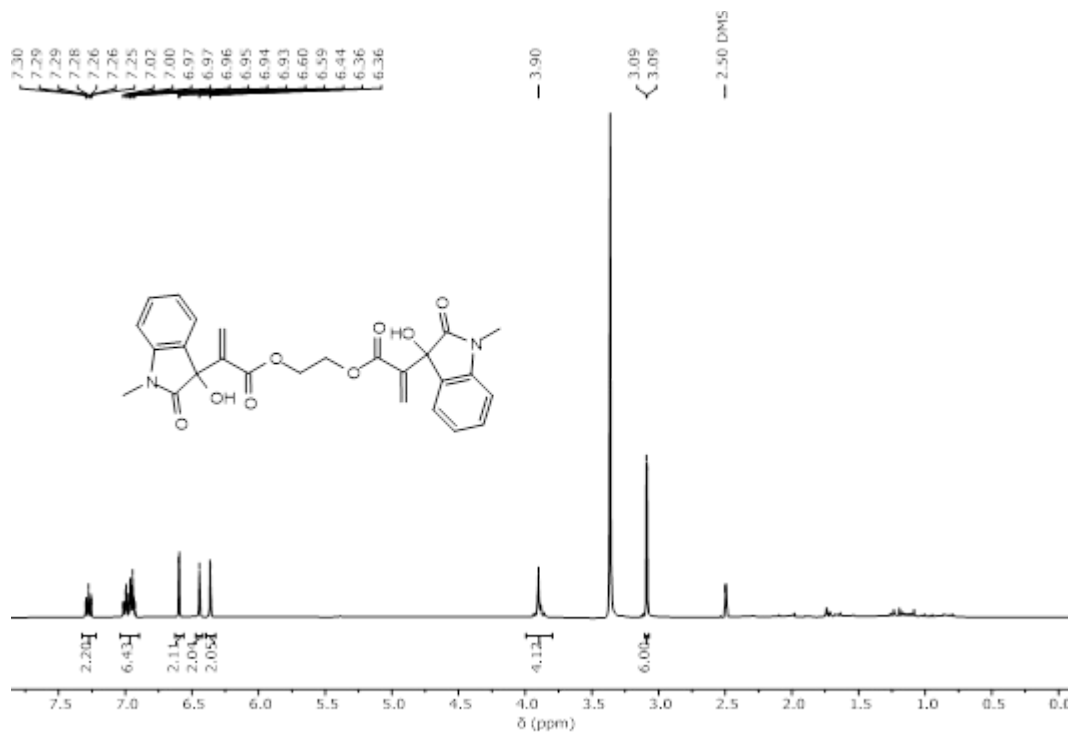
ZHANG, L.; WANG, J.; LI, W.; XIA, J.; GAO, J.; YAO, Q. Synthesis, in Vitro and in Vivo Anticancer Activity of Hybrids of 3-Hydroxy-indolin-2-one and 2,3-Dihydroquinolin-4(1H)-one. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 12, n. 2, p. 117-123, 2015.

ZHAO, S.; ZHI, H.; ZHANG, M.; YAN, Q.; FAN, J.; GUO, J. Morita–Baylis–Hillman reaction in eutectic solvent under aqueous medium. **RSC Adv.**, v. 6, n. 67, p.62778-62784, 2016.

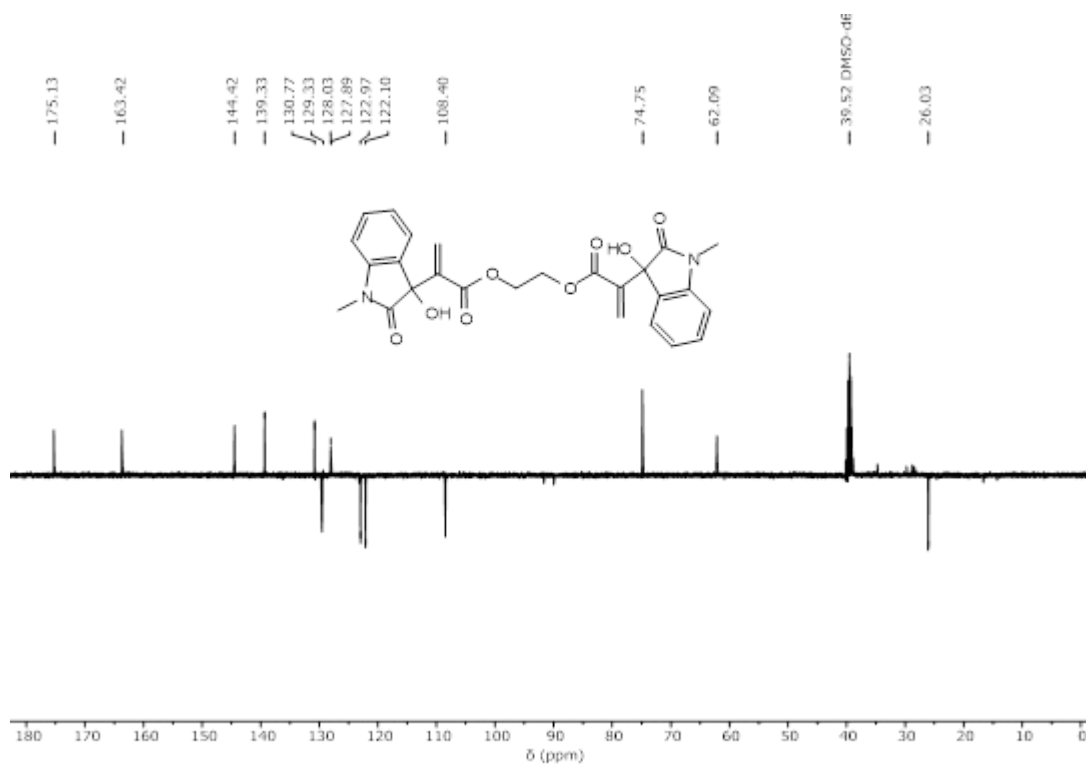
ZHU, S.; HUDSON, T. H.; KYLE, D. E.; LIN, A. J. Synthesis and In Vitro Studies of Novel Pyrimidinyl Peptidomimetics as Potential Antimalarial Therapeutic Agents. **J. Med. Chem.** v. 45, n. ‘6, p. 3491-3496, 2002.

ZUGAZAGOITIA J.; GUEDES, C.; PONCE, S.; FERRER, I.; MOLINA-PINELO, S.; PAZ-ARES, L. Current challenges in cancer treatment. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 7, 2016.

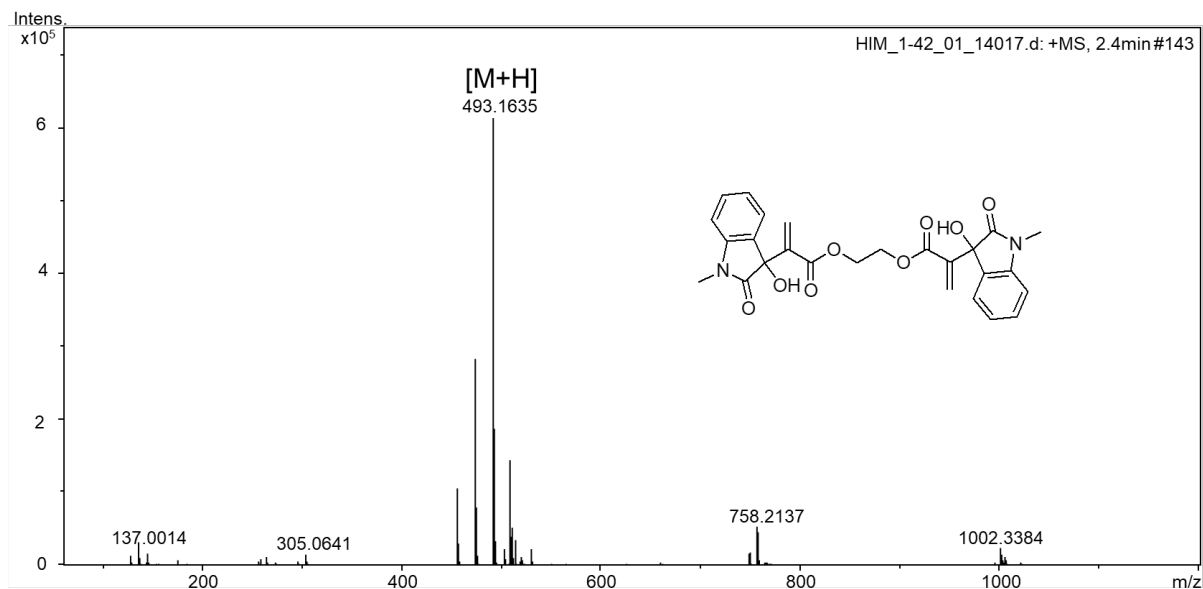
ESPECTROS



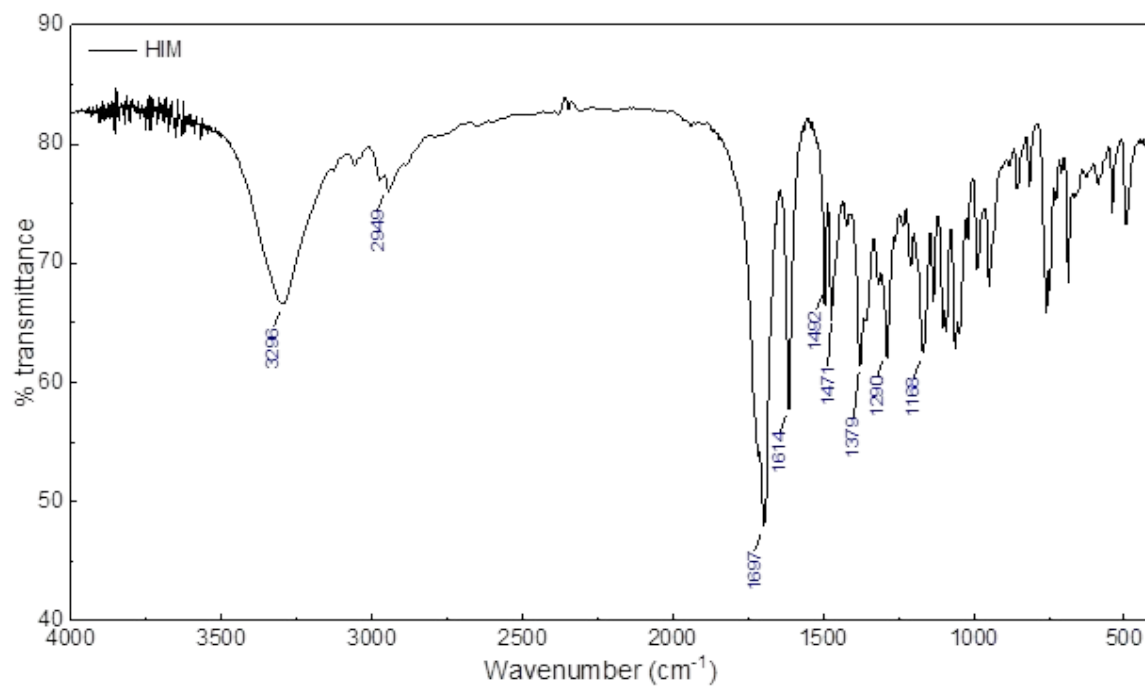
Espectro 1 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) de **1a**.



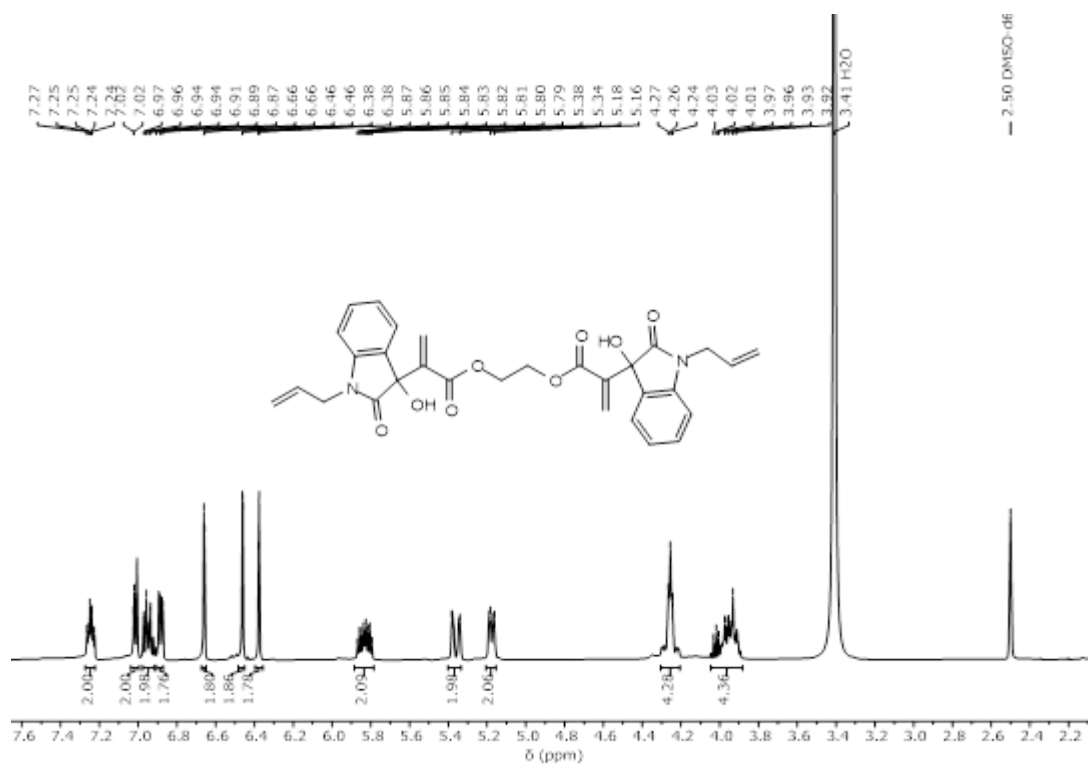
Espectro 2 - Espectro de RMN ¹³C (101 MHz, DMSO-*d*₆) de **1a**.



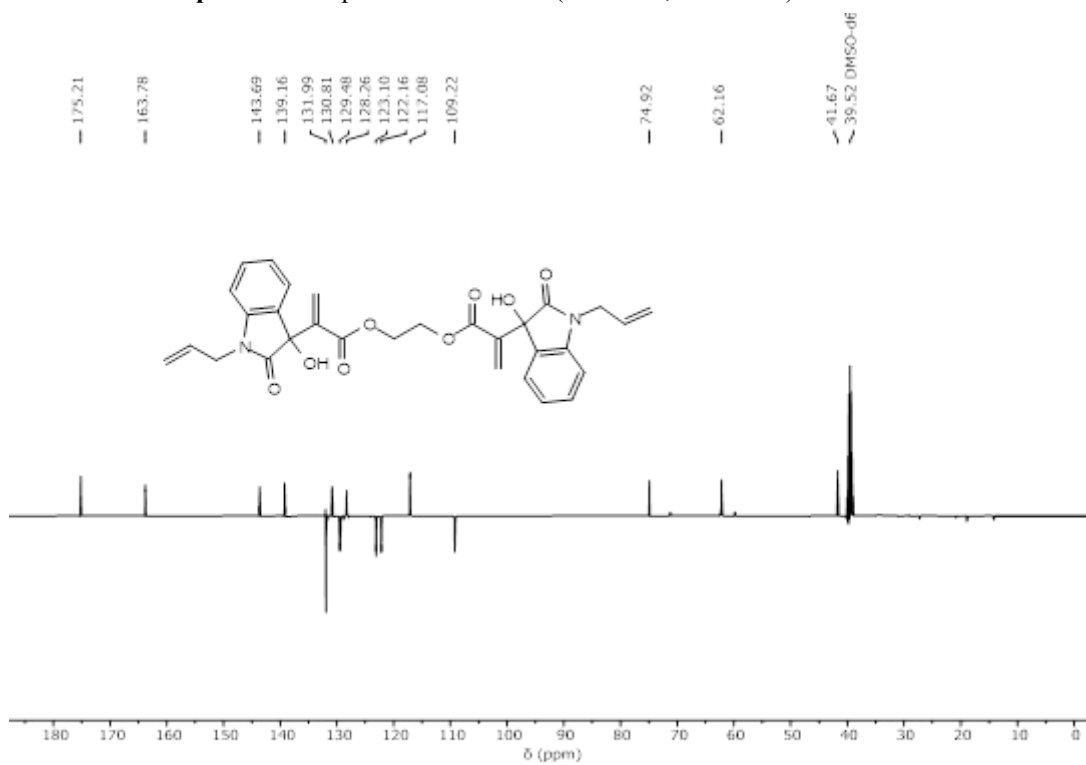
Espectro 3 - Espectro de massas de **1a**.



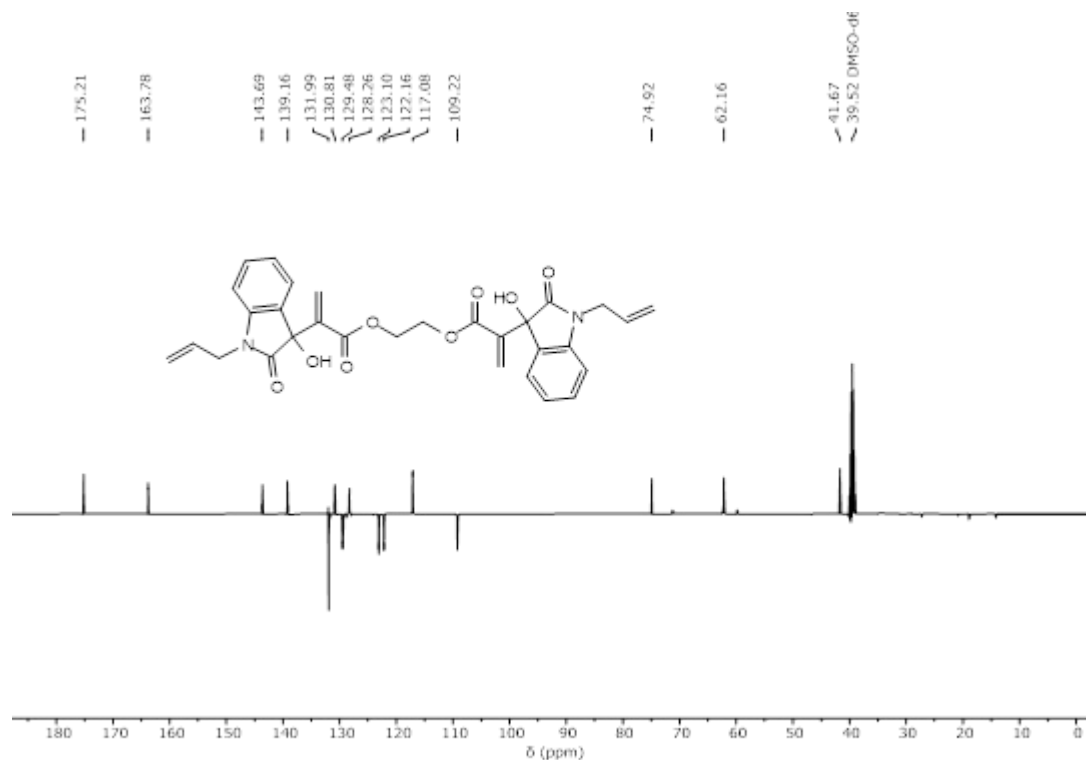
Espectro 4 - Espectro FTIR (KBr) de **1a**.



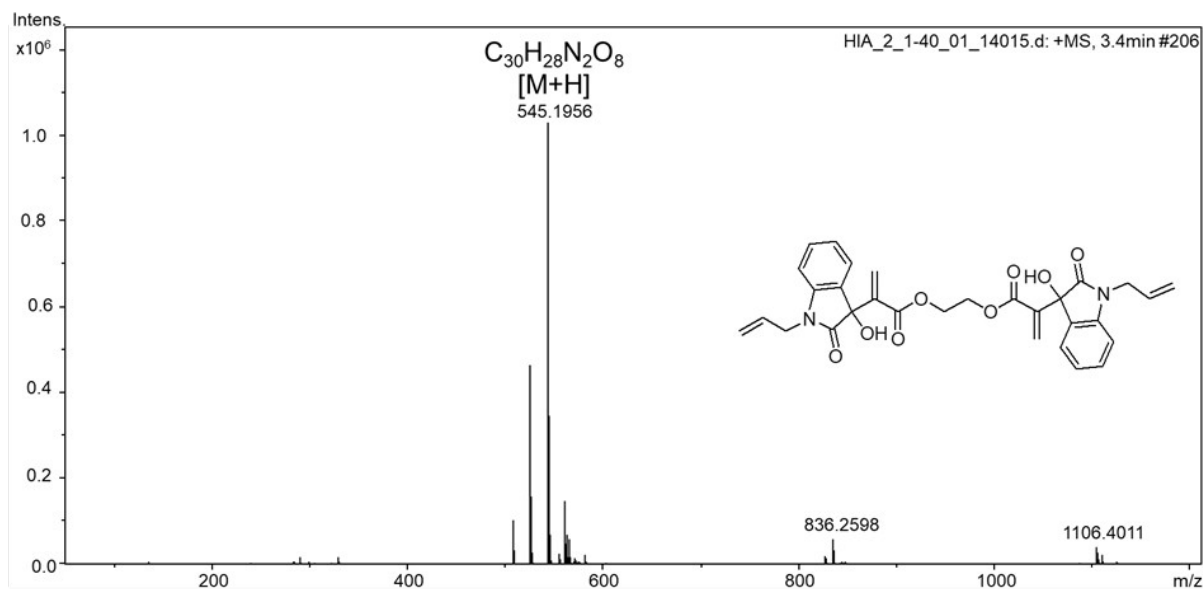
Espectro 5 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **1b**.



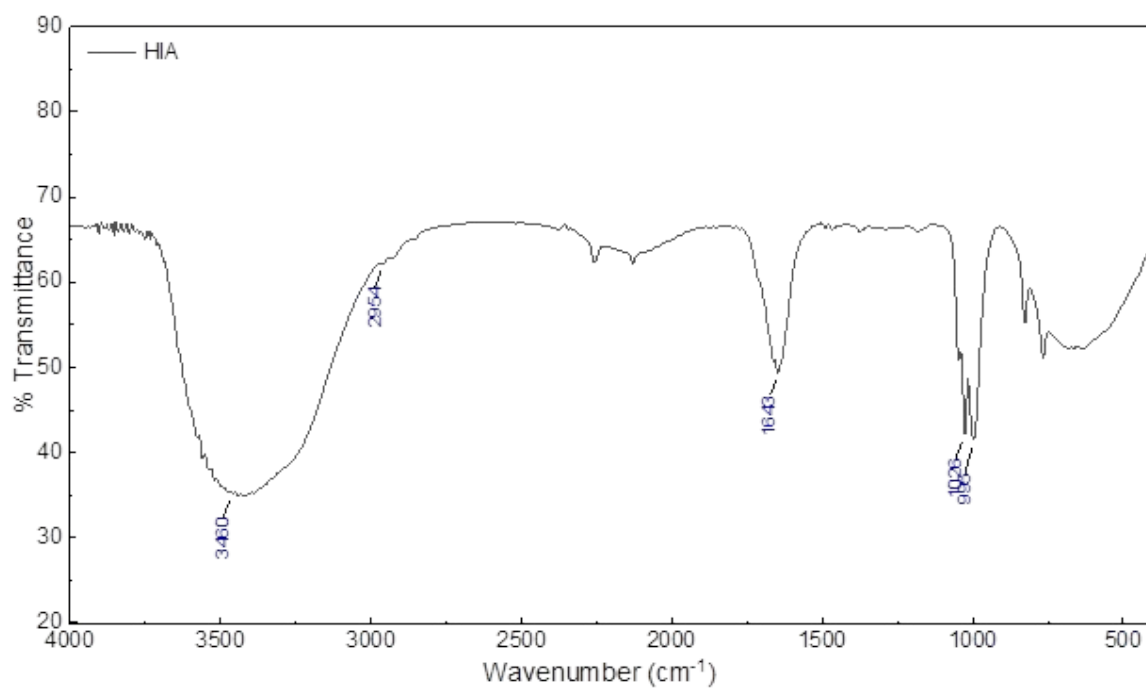
Espectro 6 - Espectro de RMN ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **1b**.



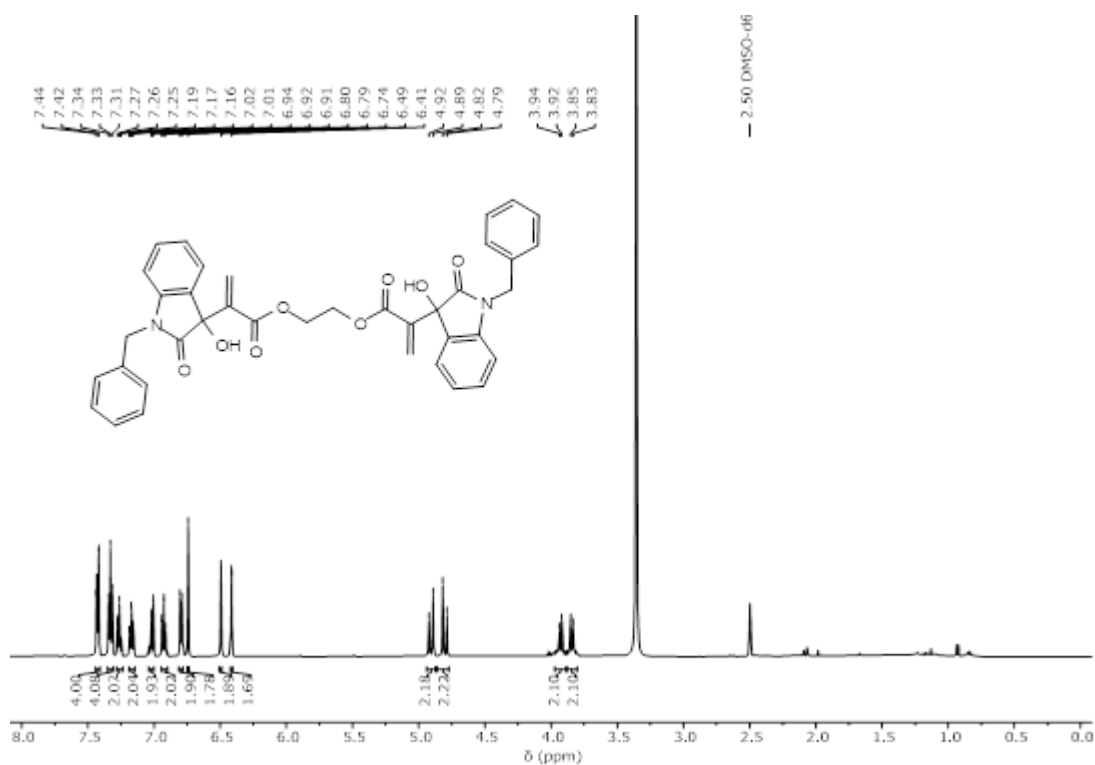
Espectro 7 - Expansão do espectro de RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) de **1b**.



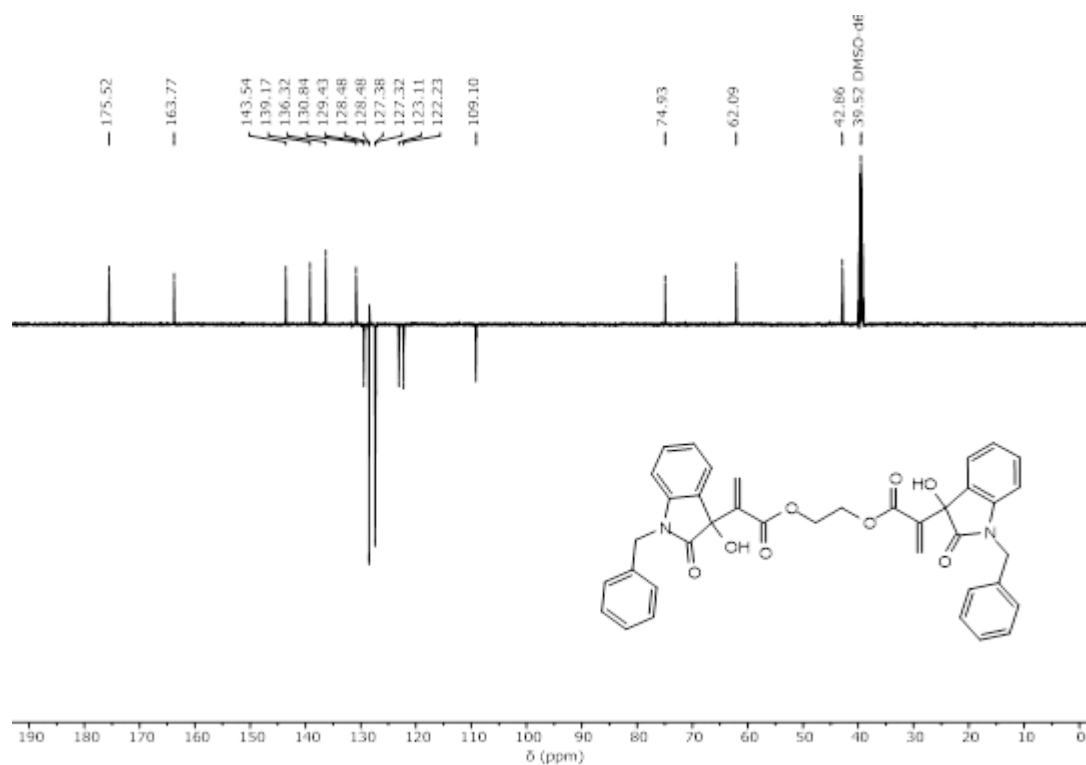
Espectro 8 - Espectro de massas de **1b**.



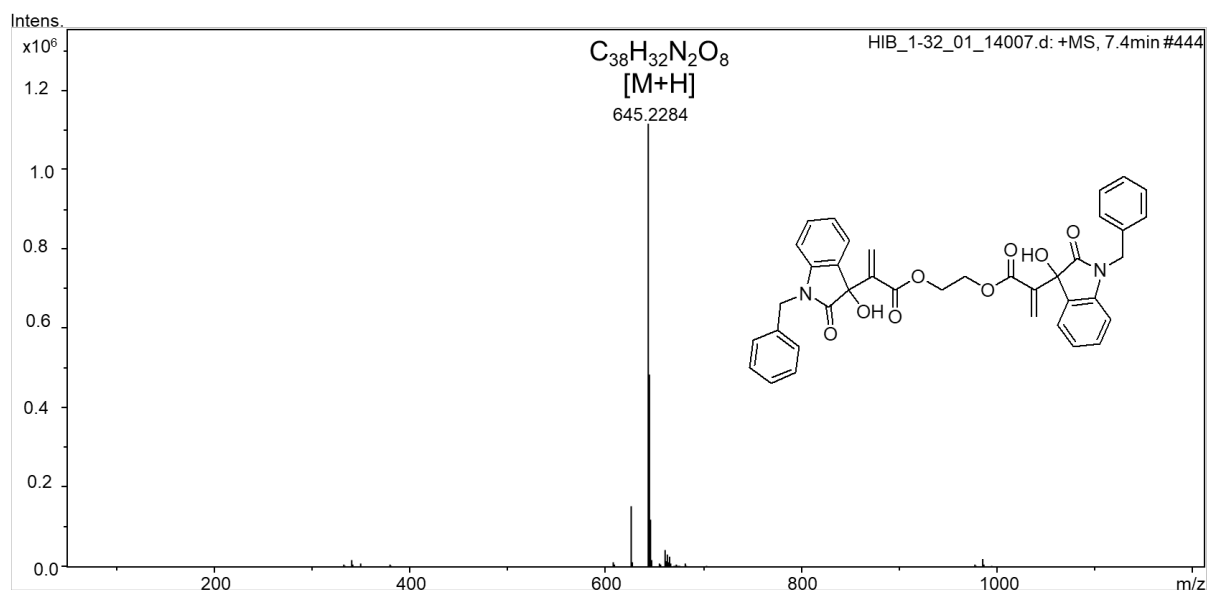
Espectro 9 - Espectro FTIR (KBr) de **1b**.



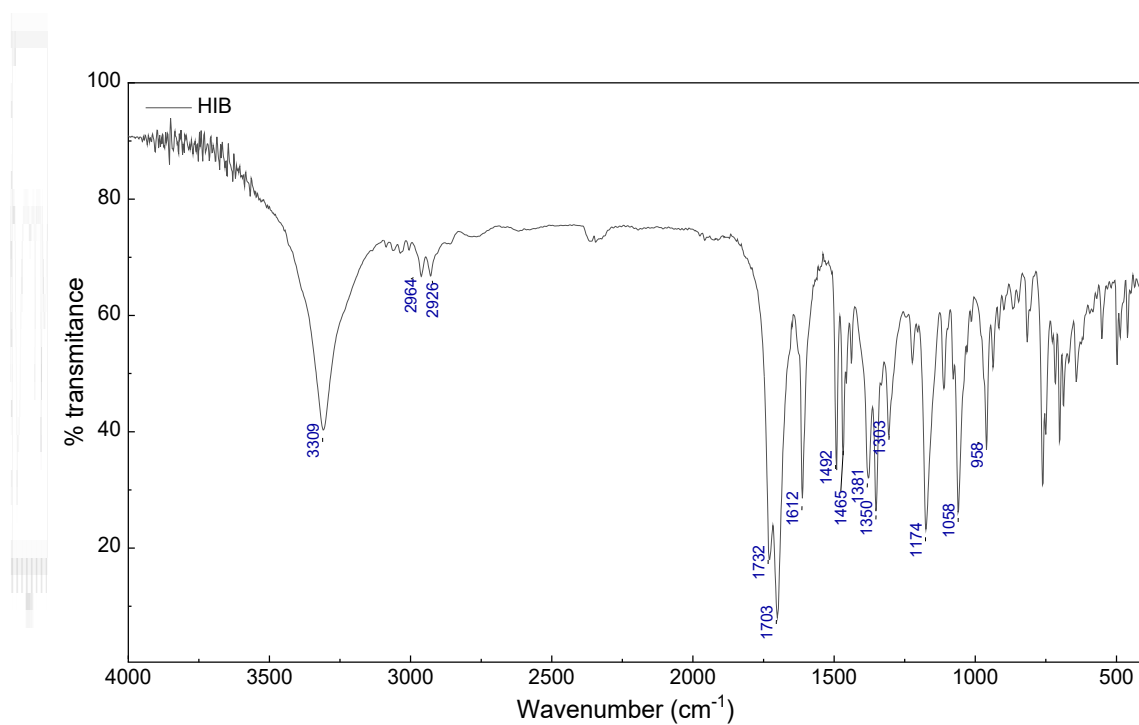
Espectro 10- Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **1c**.



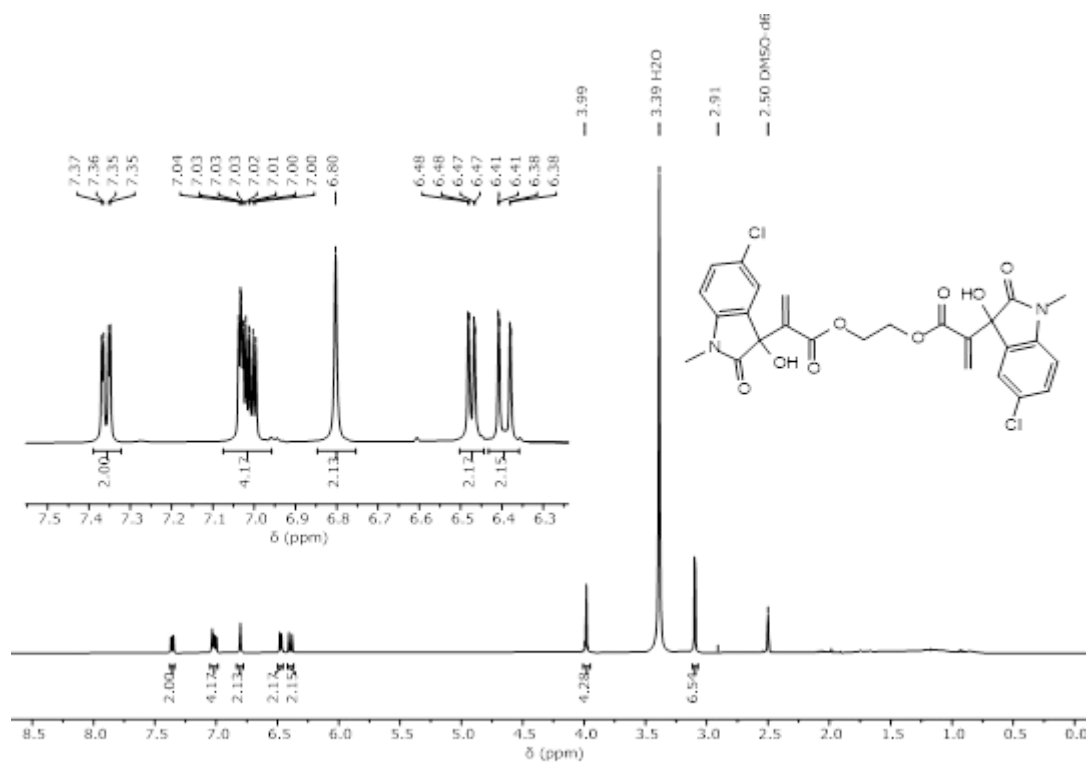
Espectro 11 - Espectro de RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) de **1c**.



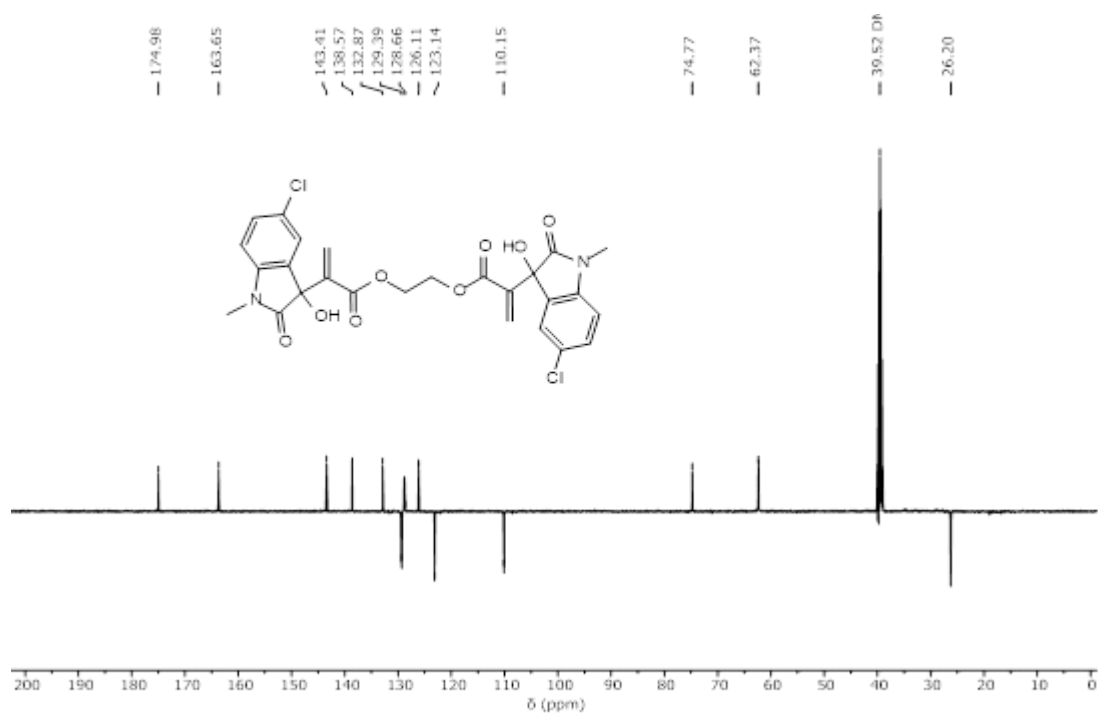
Espectro 12 - Espectro de massas de **1c**.



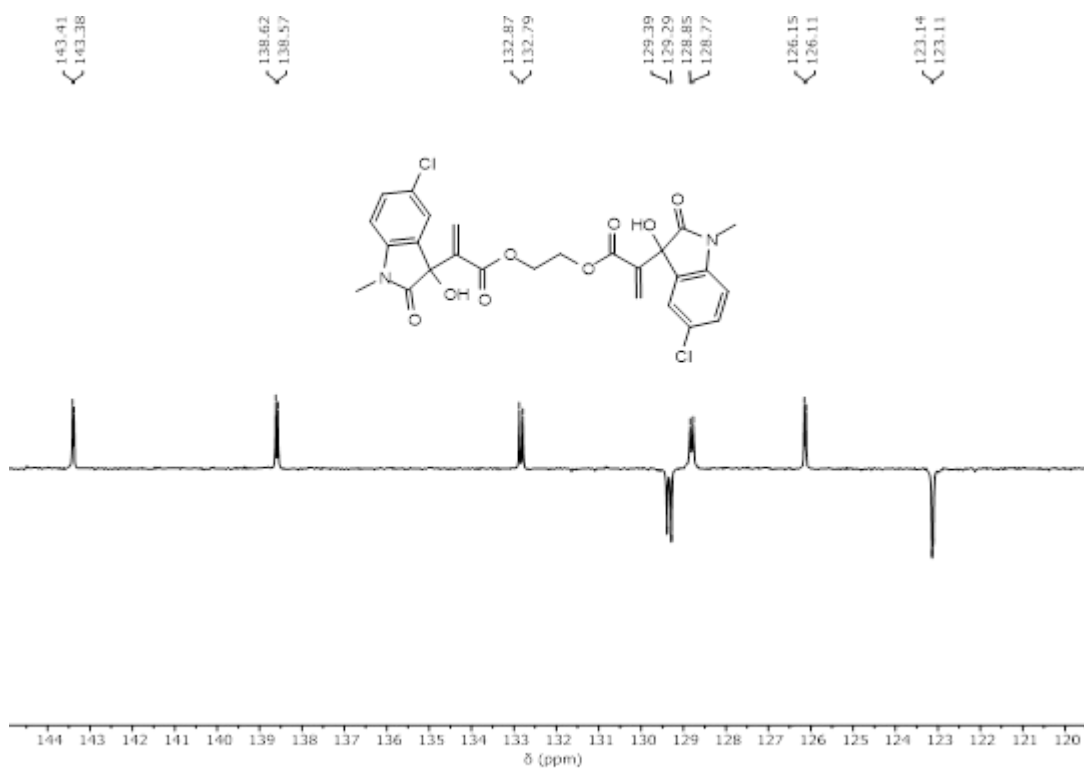
Espectro 13 - Espectro FTIR (KBr) de **1c**.



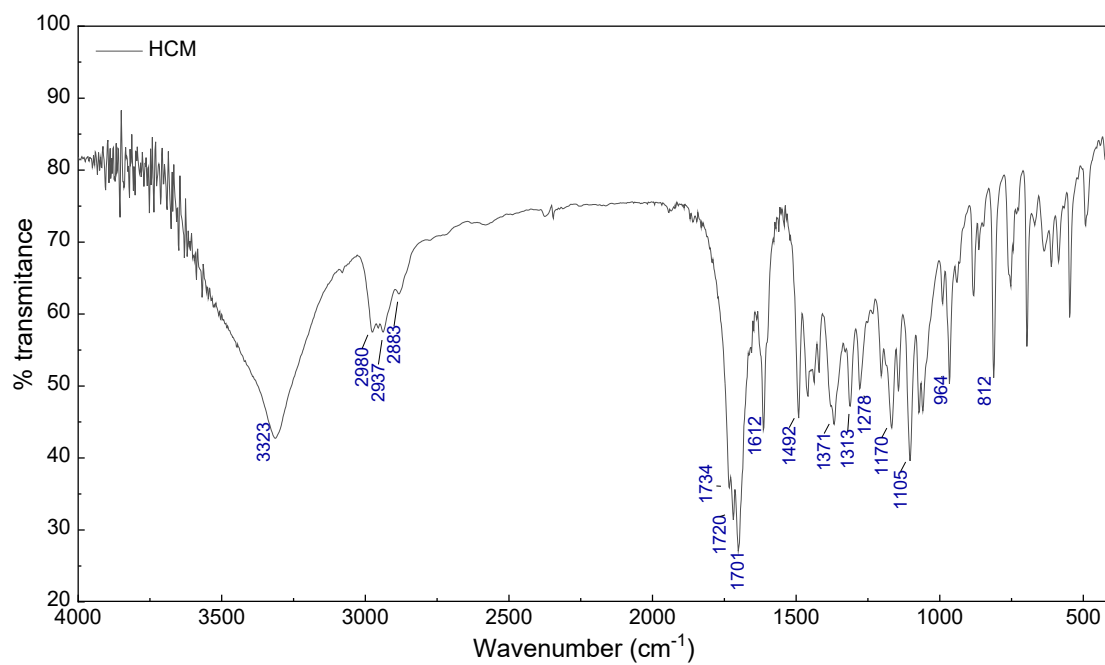
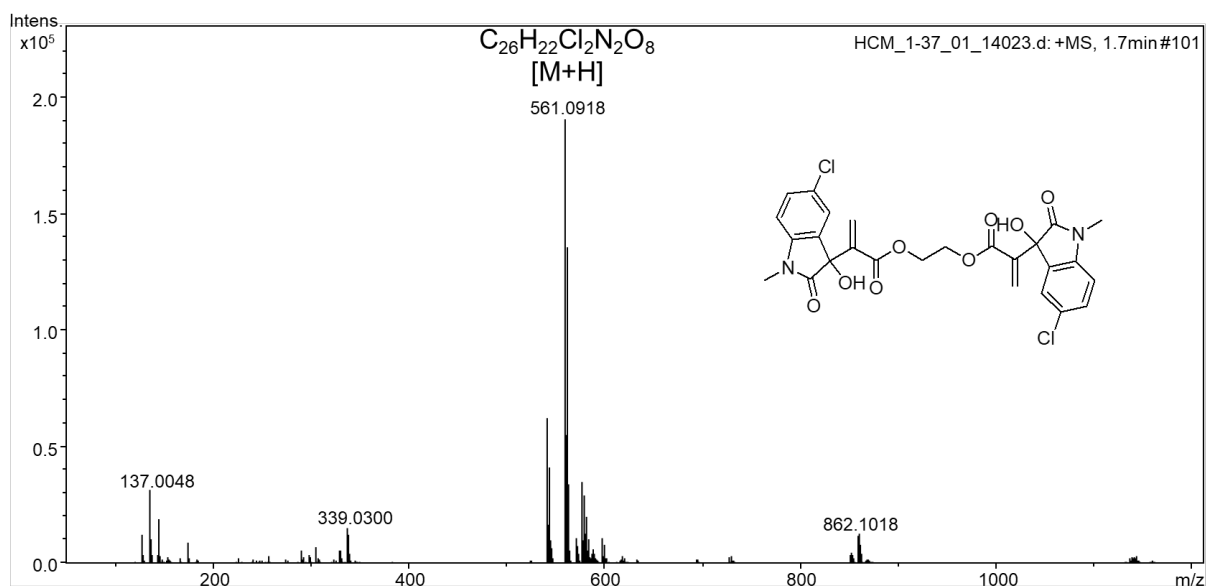
Espectro 14 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **1d**.

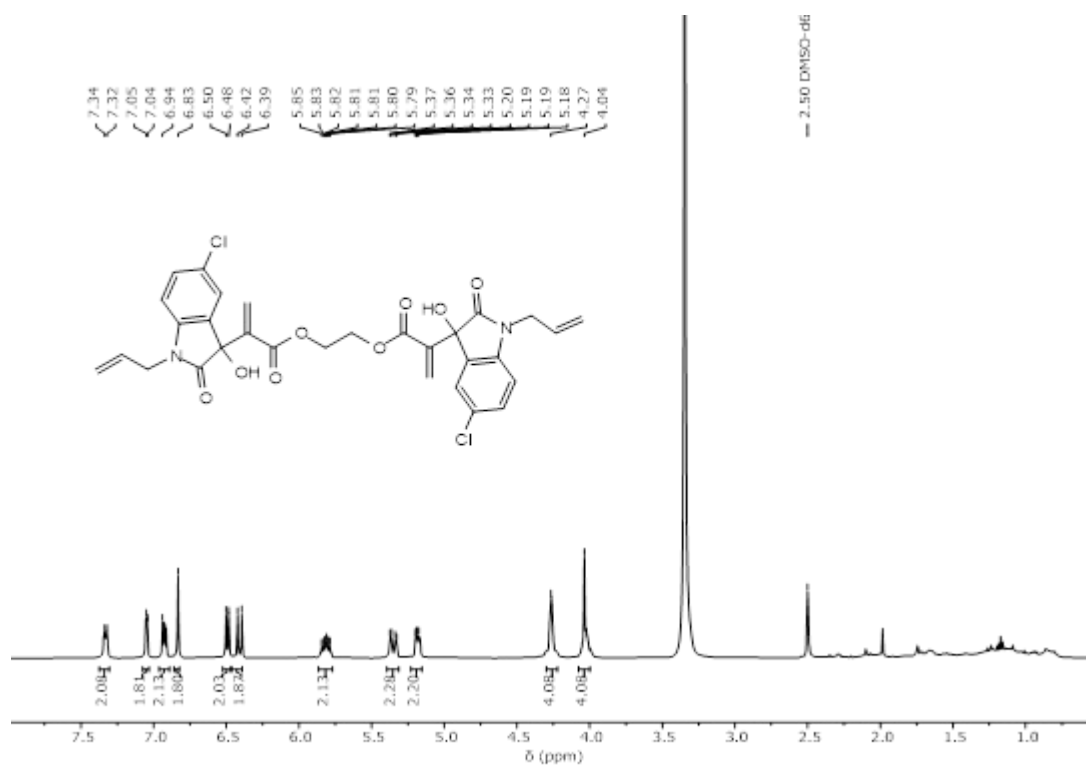


Espectro 15 - Espectro de RMN ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **1d**.

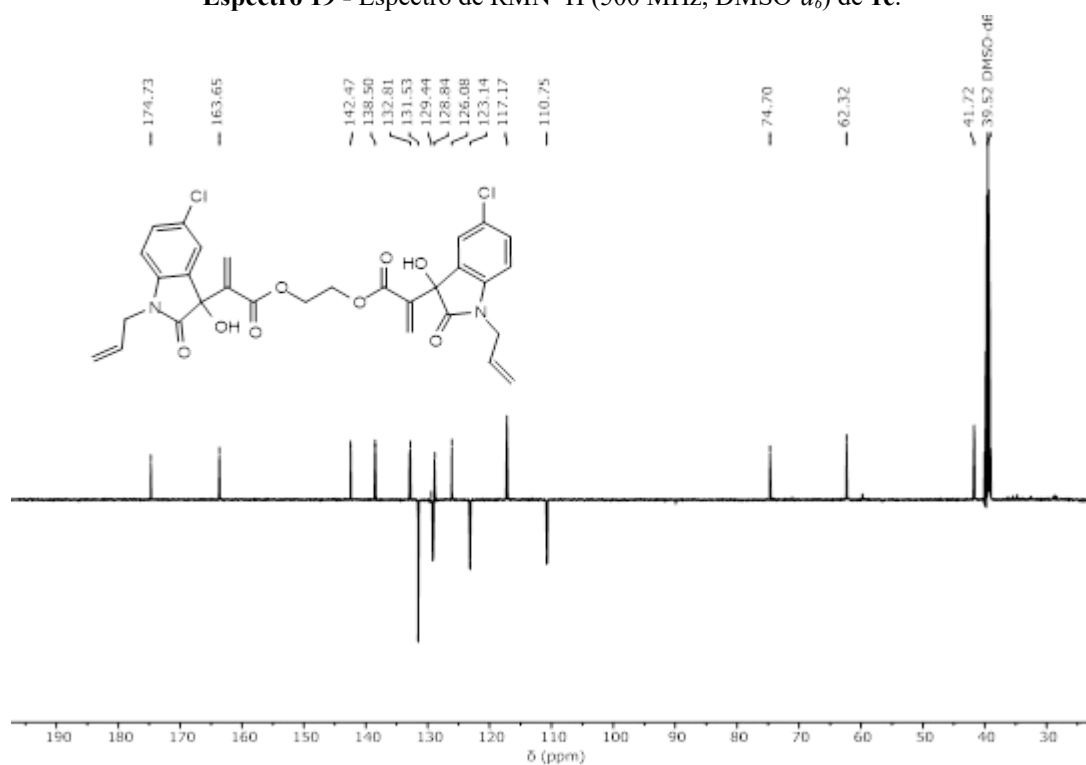


Espectro 16 - Expansão de espectro de RMN ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **1d**.

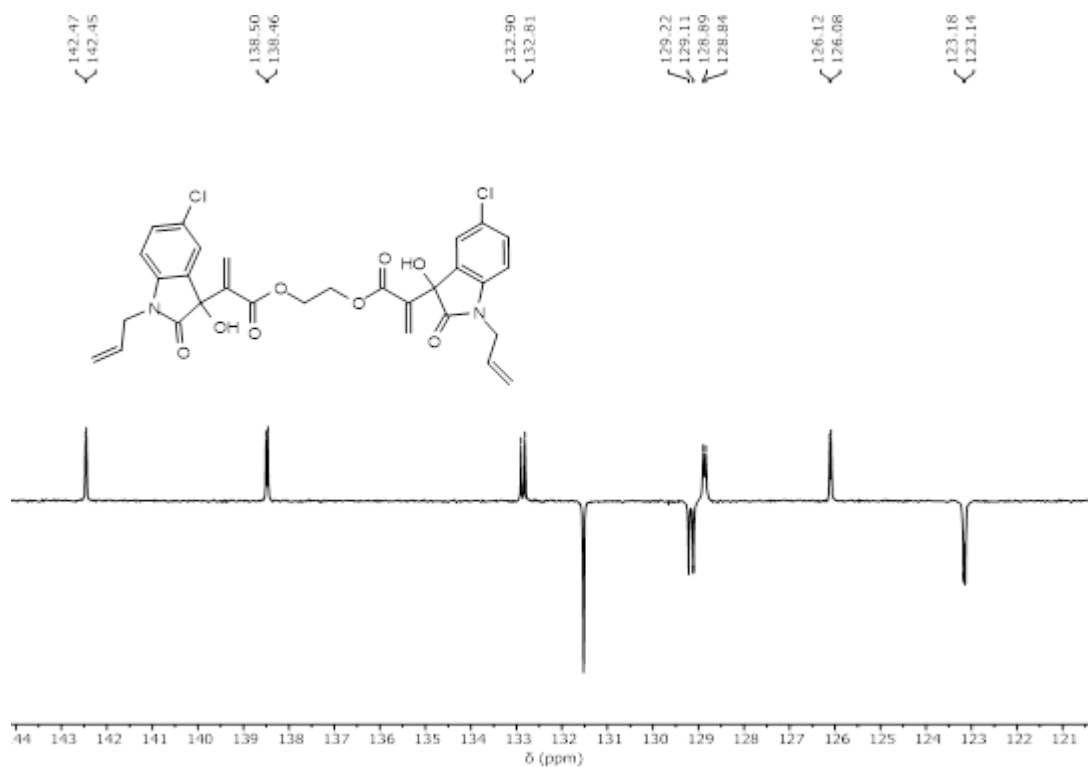




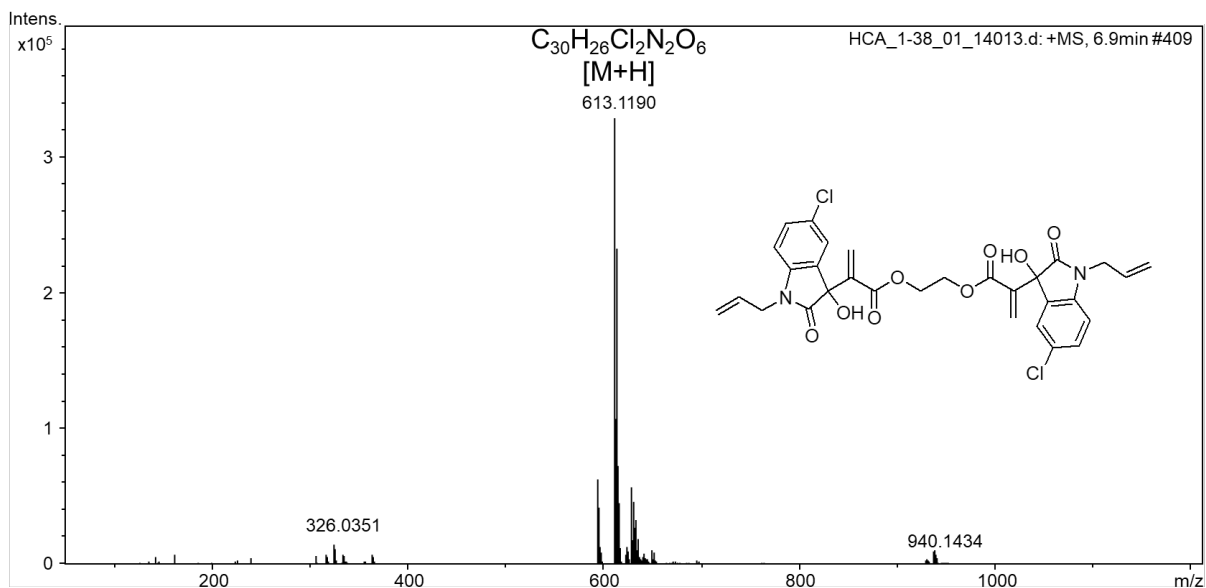
Espectro 19 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **1e**.



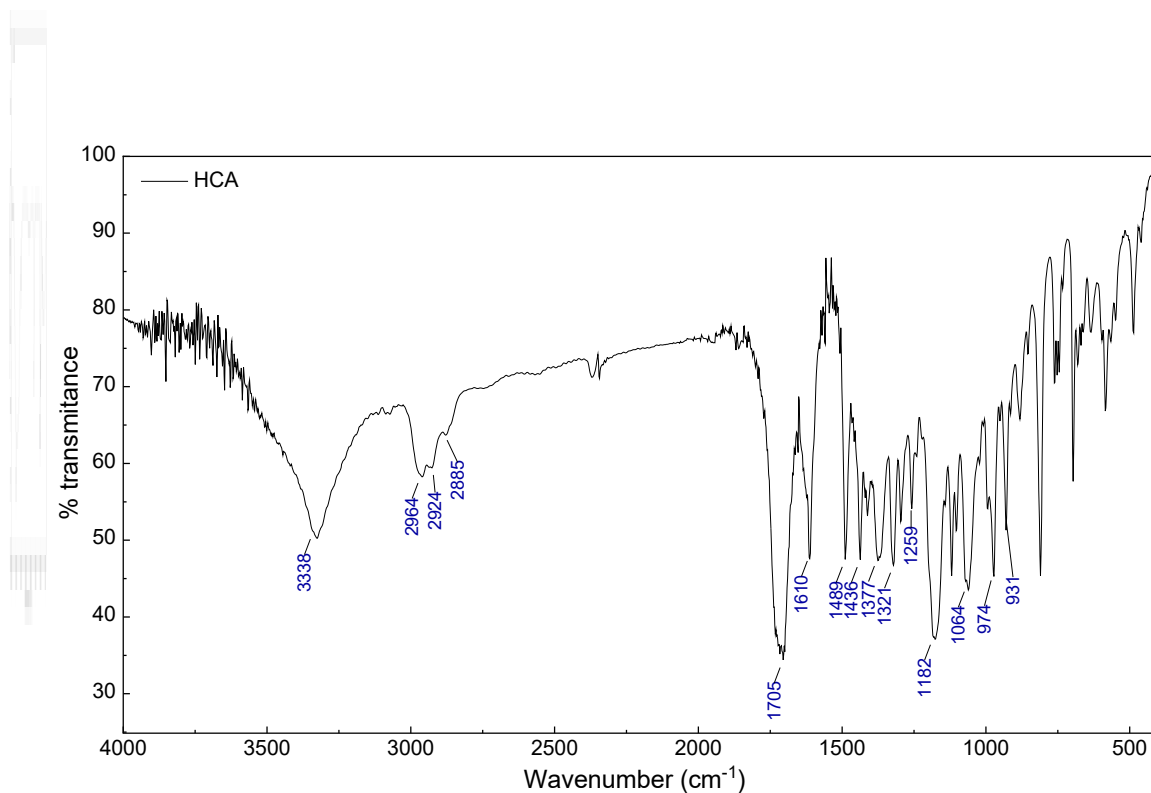
Espectro 20 - Espectro de RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) de **1e**.



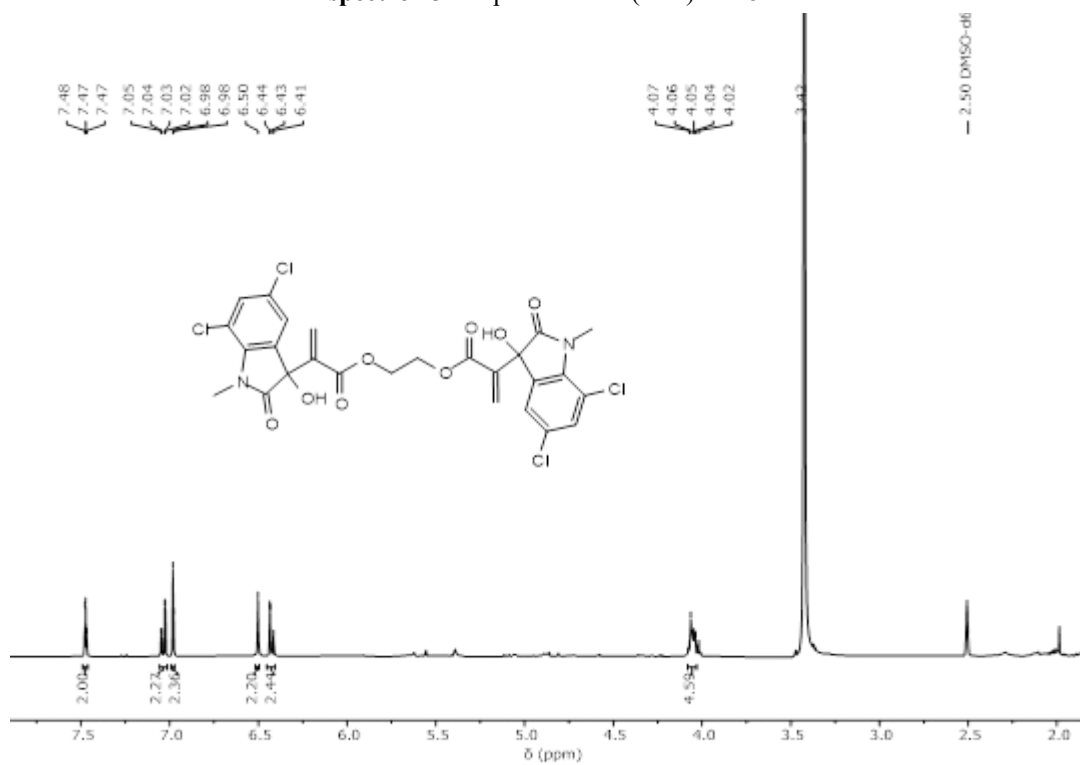
Espectro 21 - Expansão de espectro ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) de **1e**.



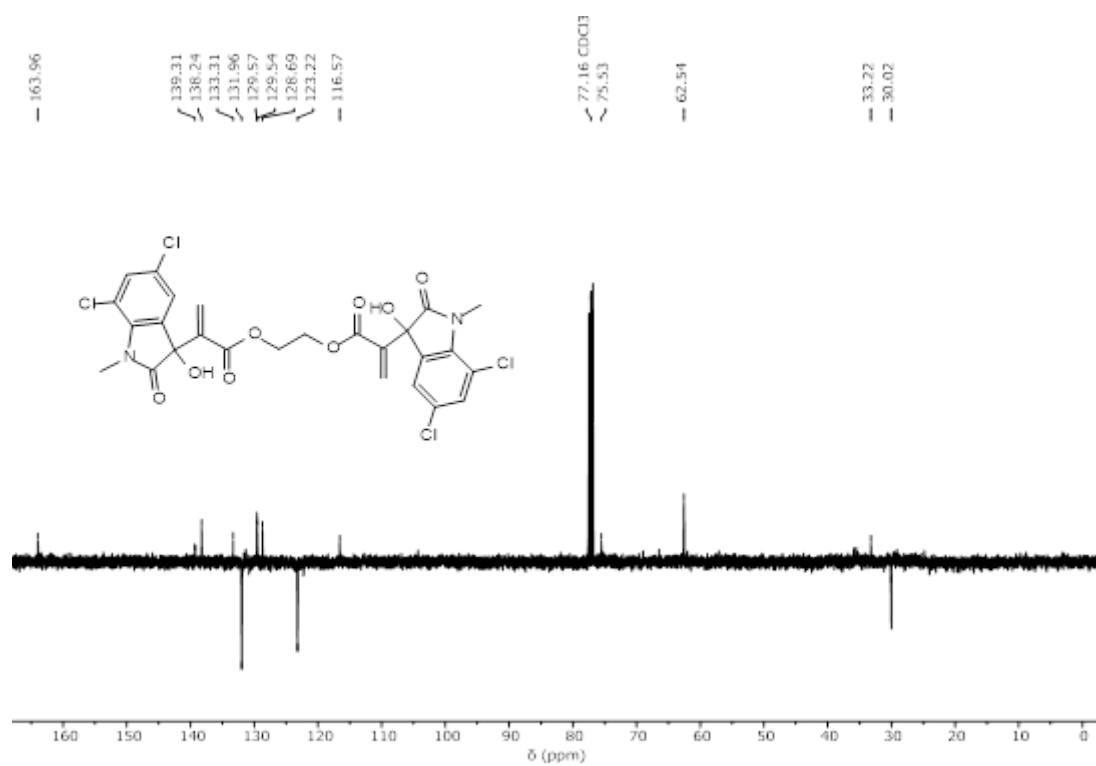
Espectro 22 - Espectro de massas de **1e**.



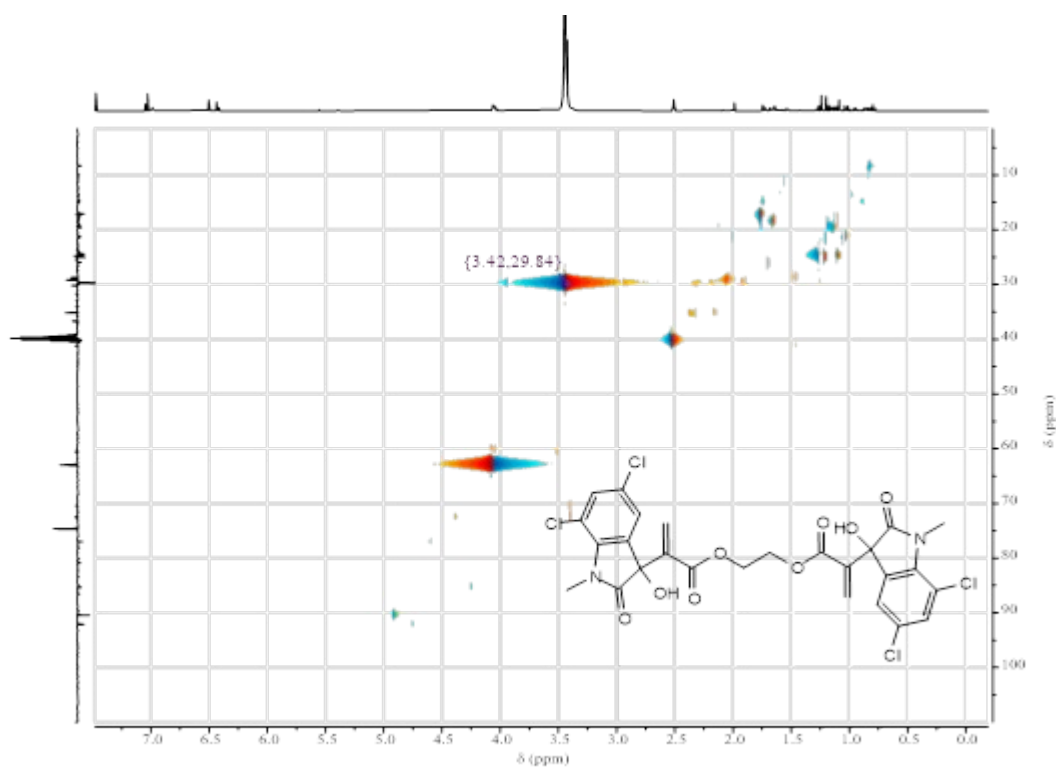
Espectro 23 - Espectro FTIR (KBr) de **1e**.



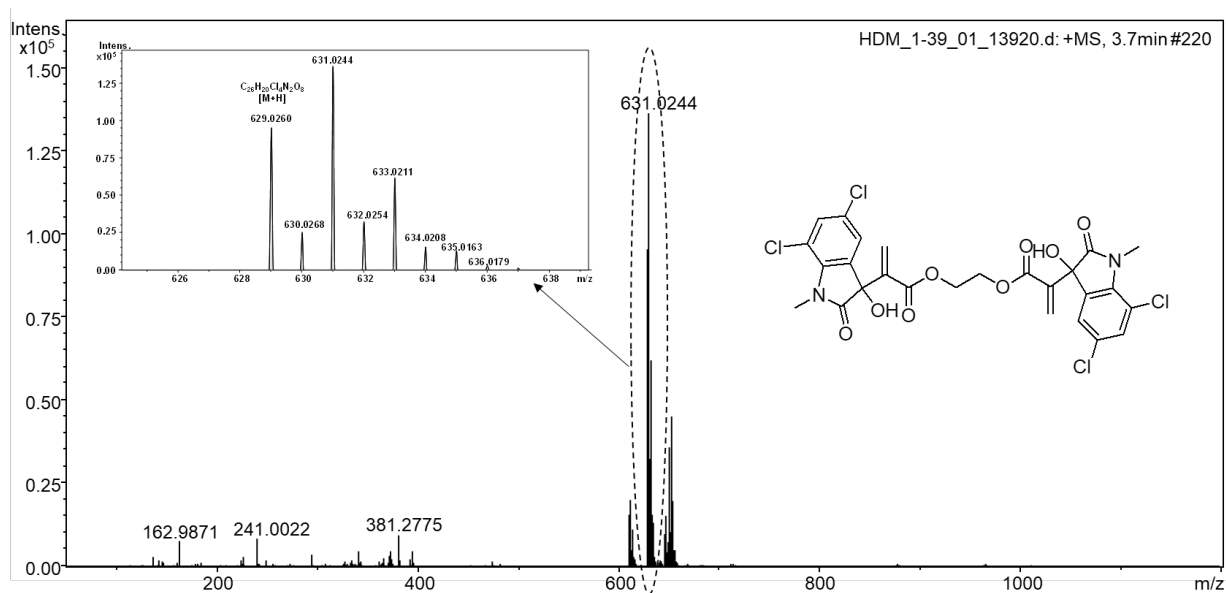
Espectro 24 - Espectro de RMN¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) de **1f**.



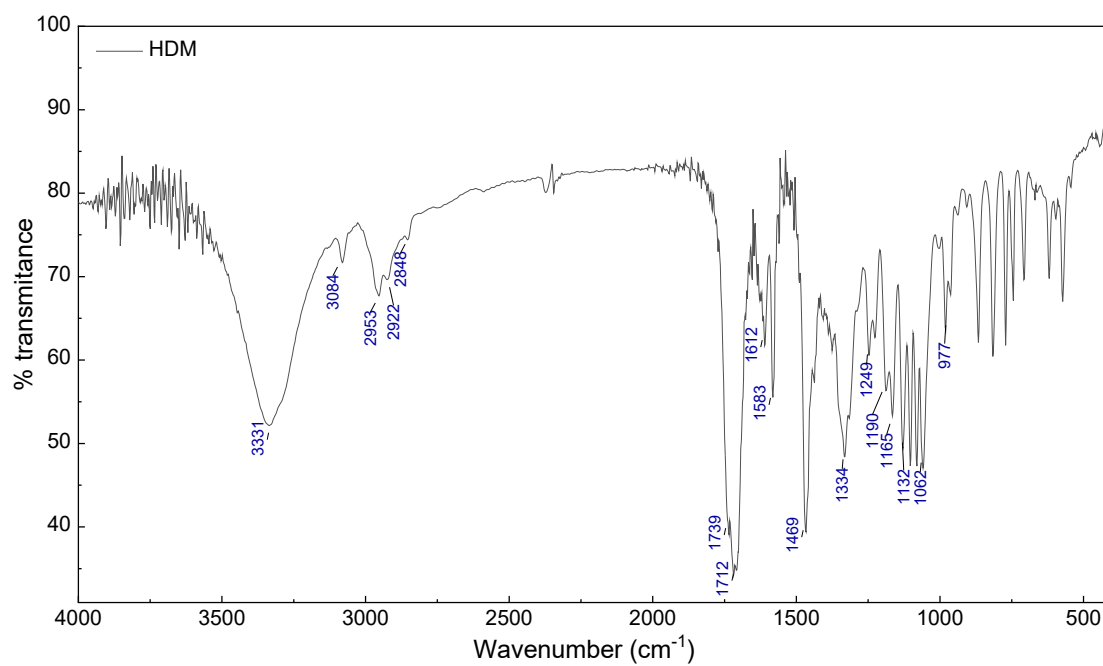
Espectro 25 - Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) de **1f**.



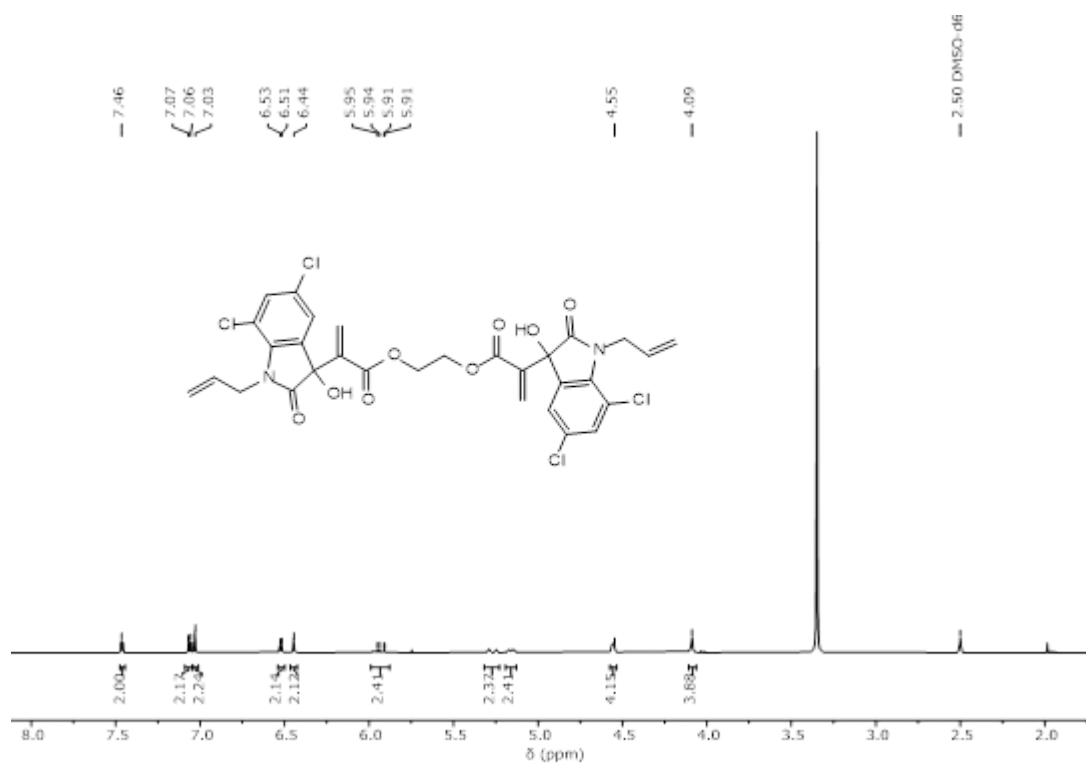
Espectro 26 - Espectro HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆) de **1f**.



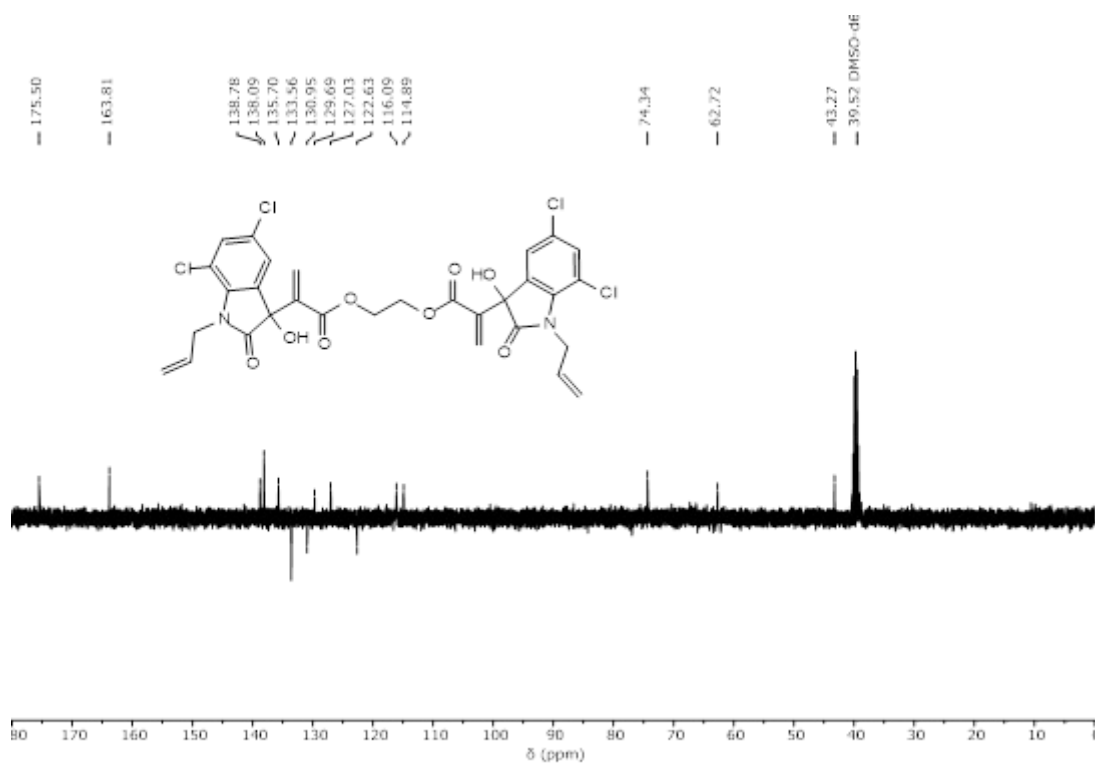
Espectro 27 - Espectro de massas de **1f**.



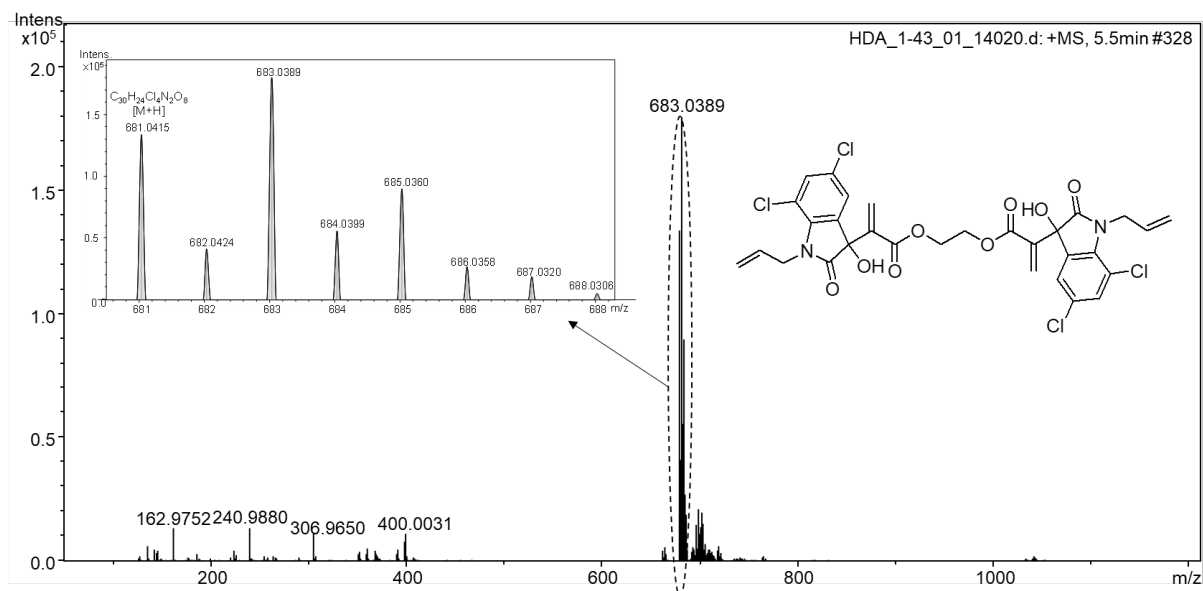
Espectro 28- Espectro FTIR (KBr) de **1f**.



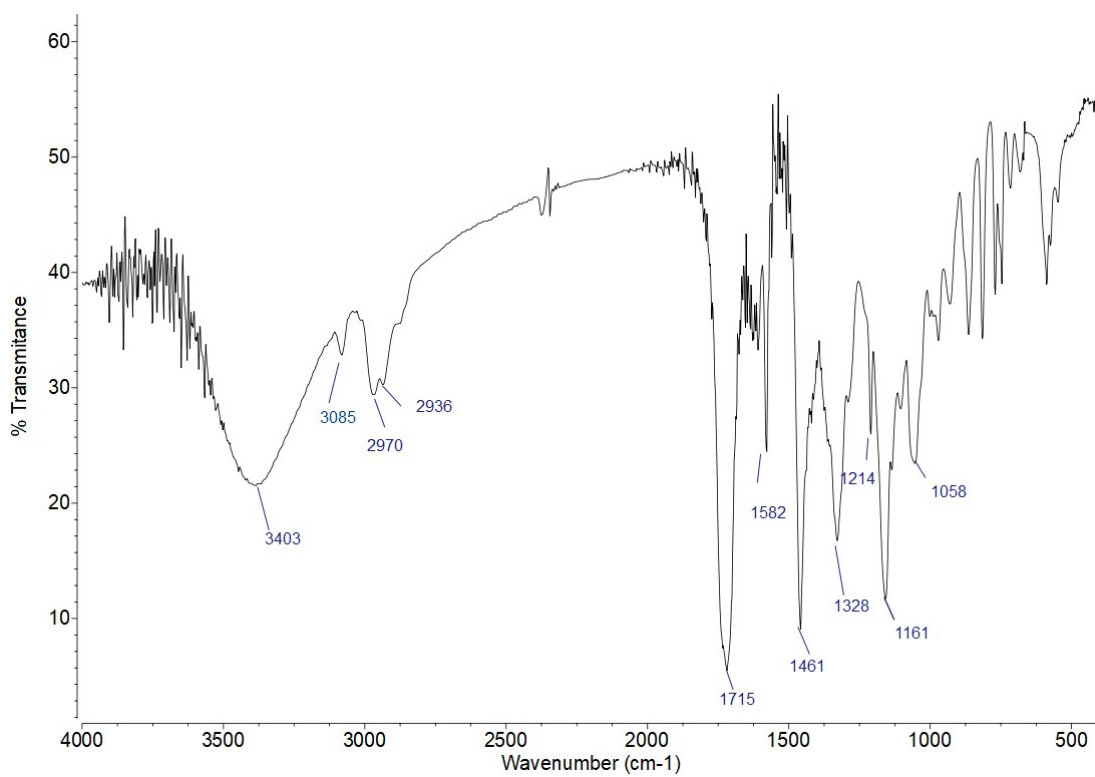
Espectro 29- Espectro de RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) de **1g**.



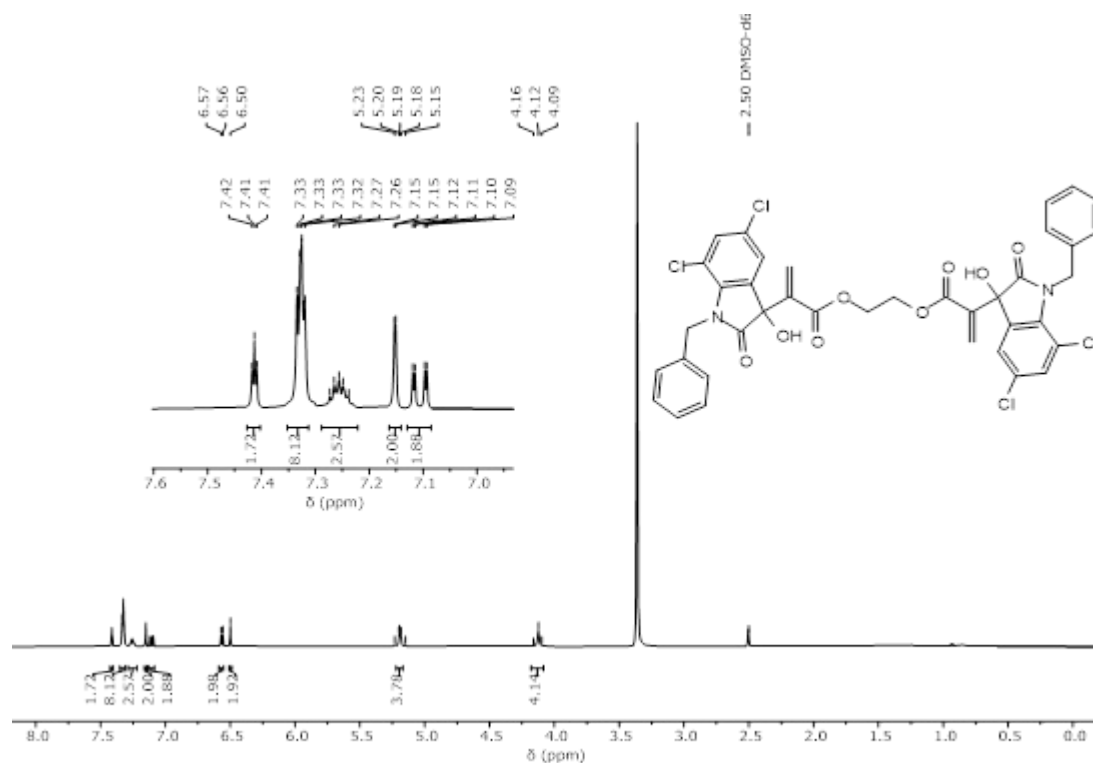
Espectro 30 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) de **1g**.



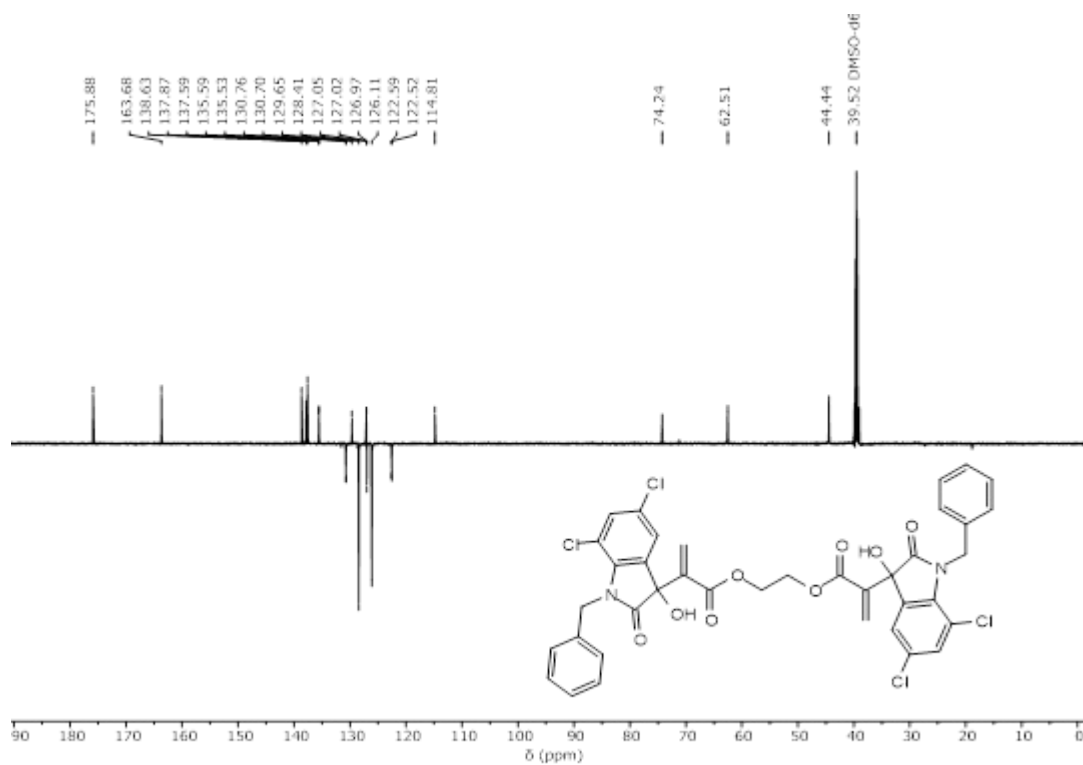
Espectro 31 - Espectro de massas de 1g.



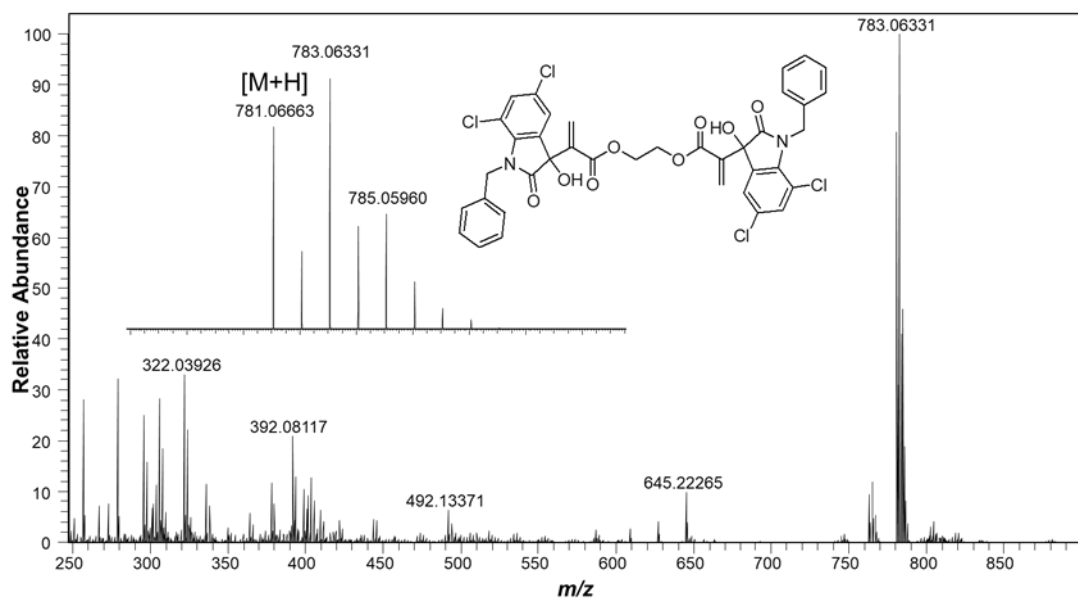
Espectro 32 - Espectro FTIR (KBr) de 1g.



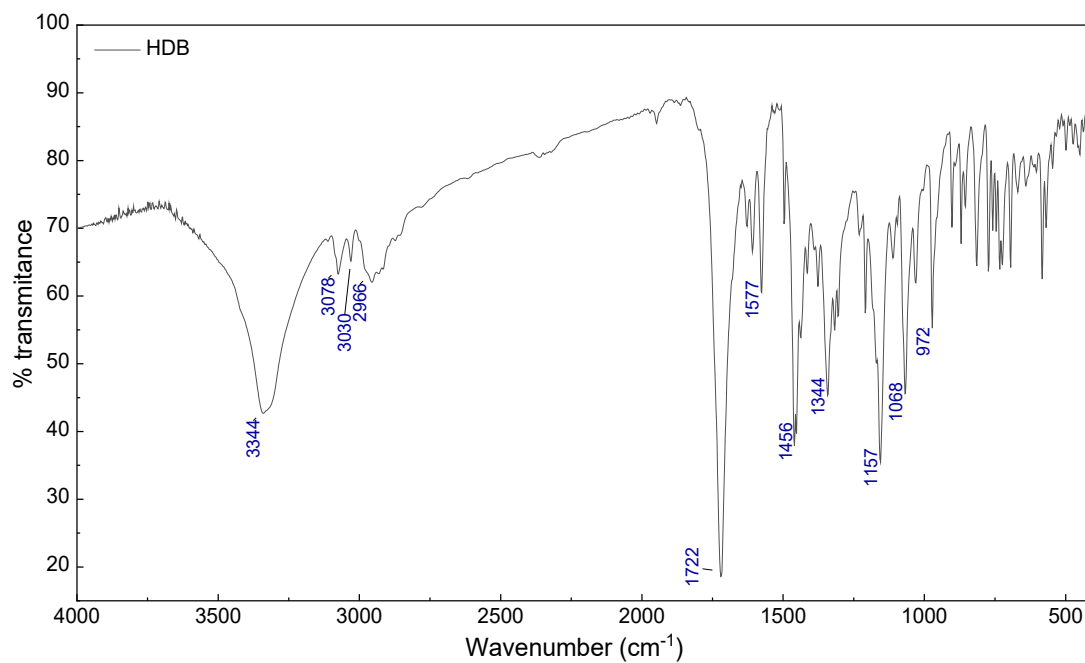
Espectro 33 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) de **1h**.



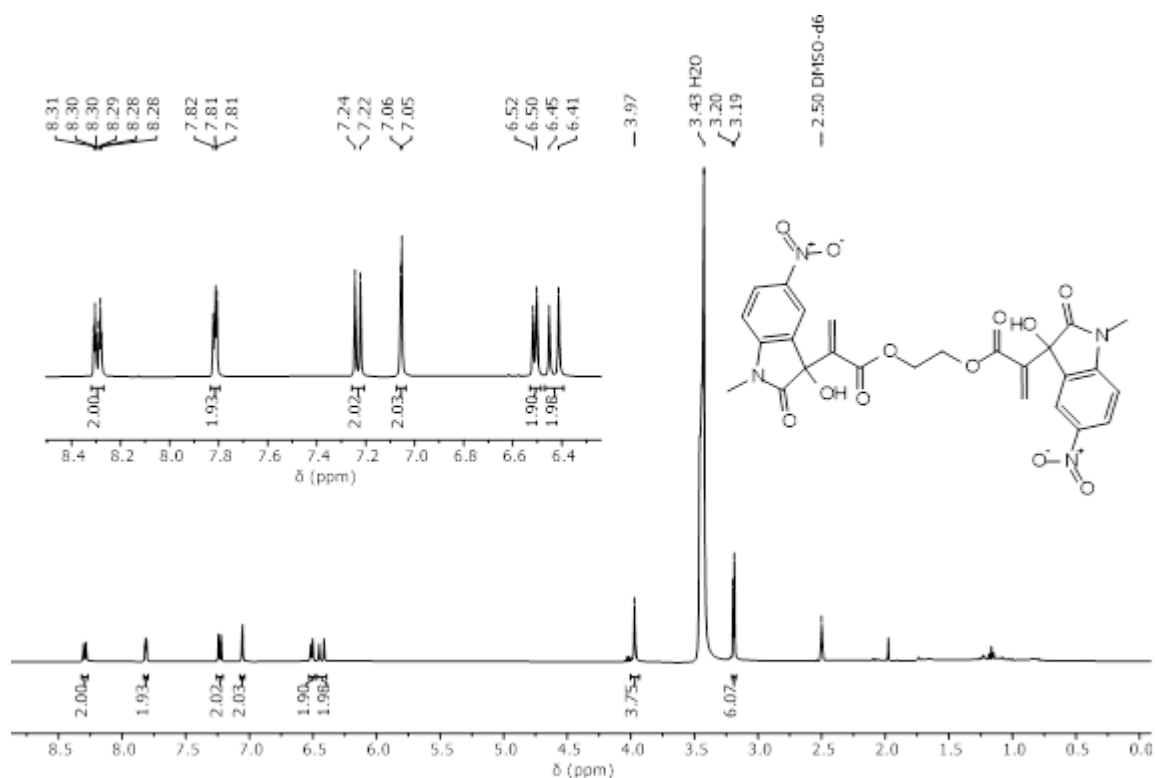
Espectro 34 - Espectro de RMN ¹³C (126 MHz, DMSO-*d*₆) de **1h**.



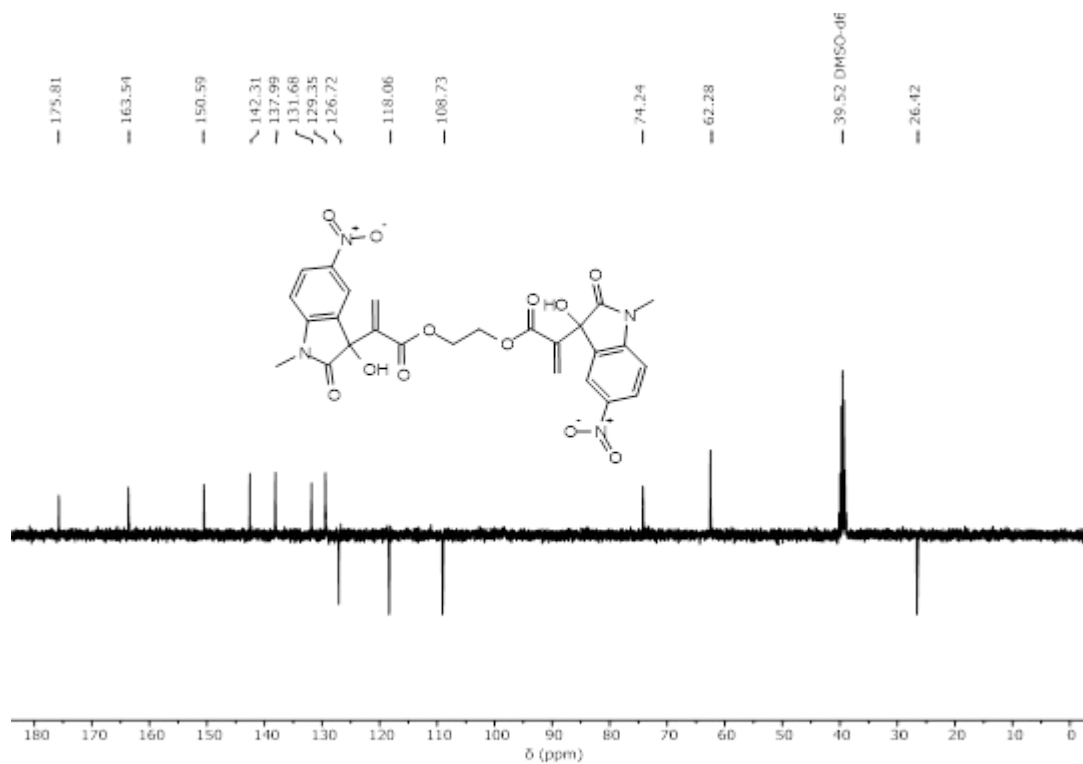
Espectro 35 - Espectro de massas de **1h**.



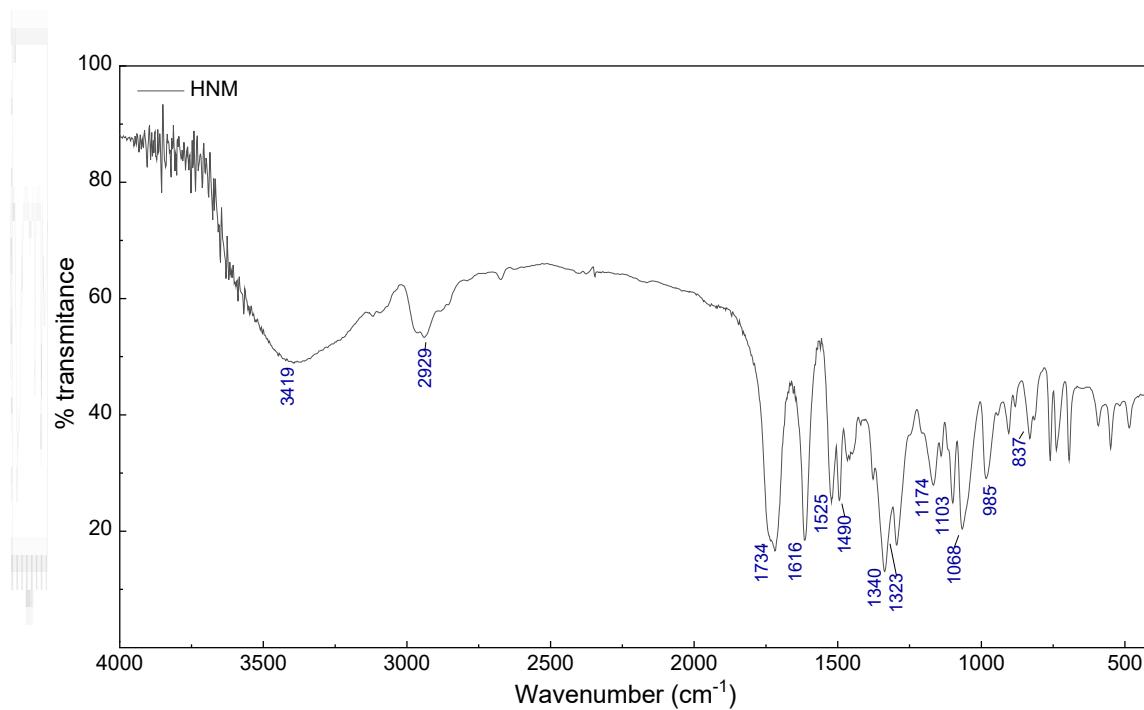
Espectro 36 – Espectro FTIR (KBr) de **1h**.



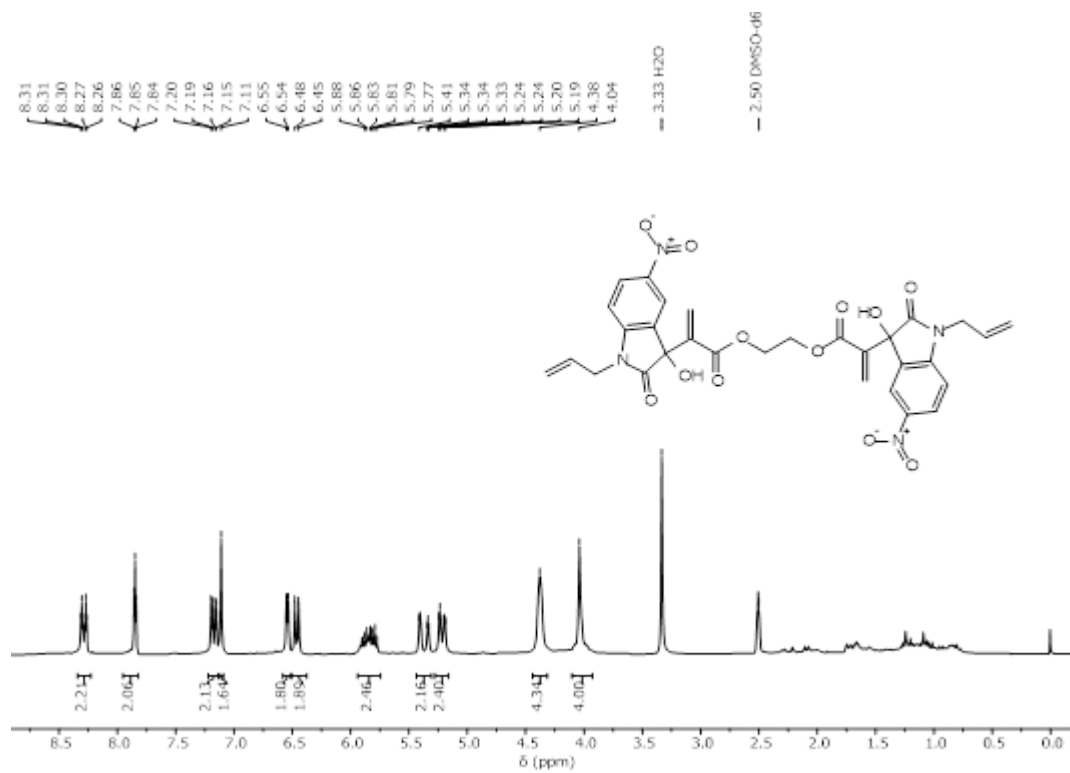
Espectro 37 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) de **1i**.



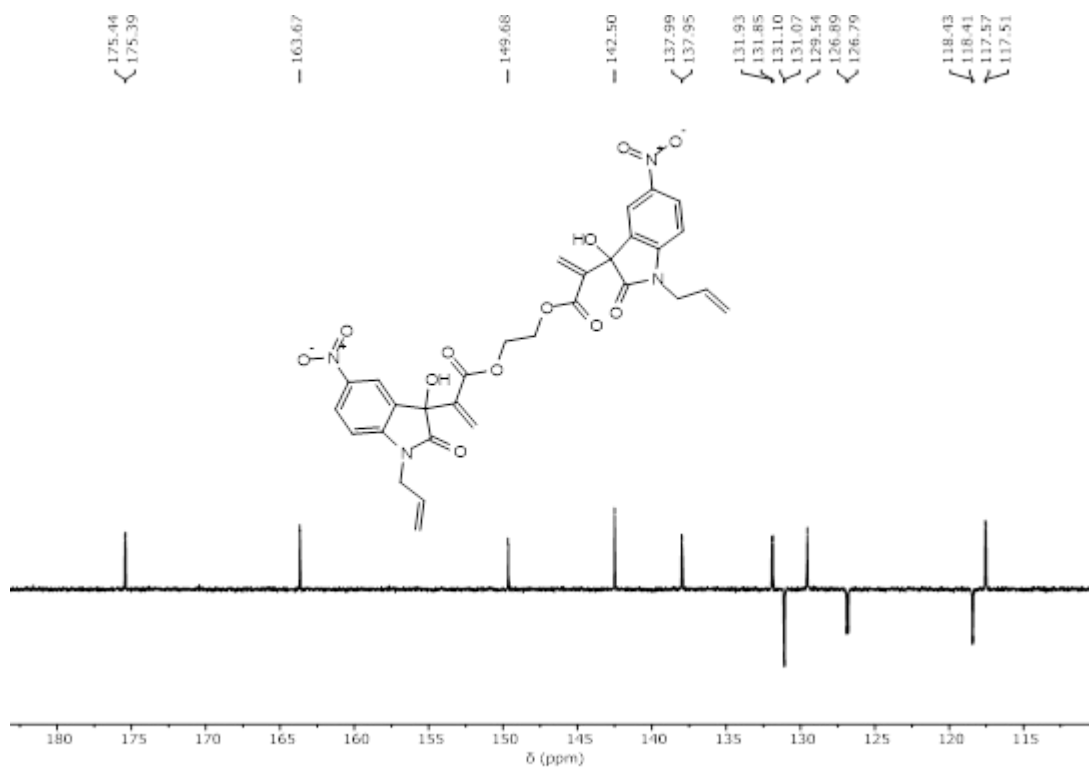
Espectro 38 - Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) de **1i**.



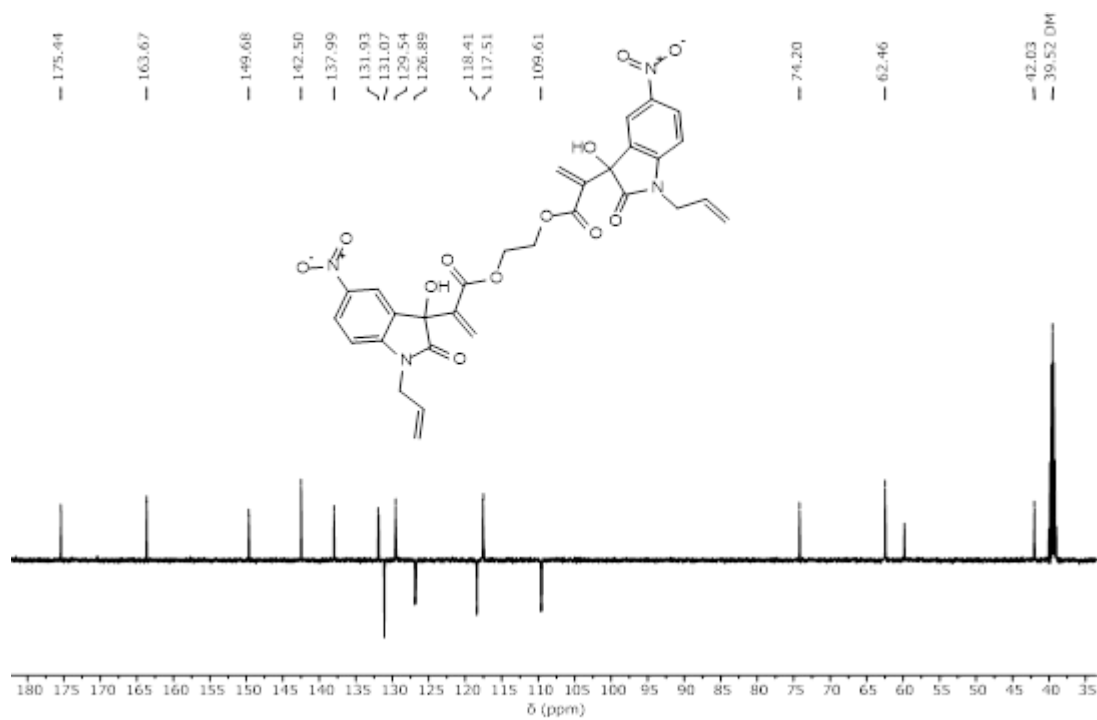
Espectro 41 – Espectro FTIR (KBr) de **1i**.



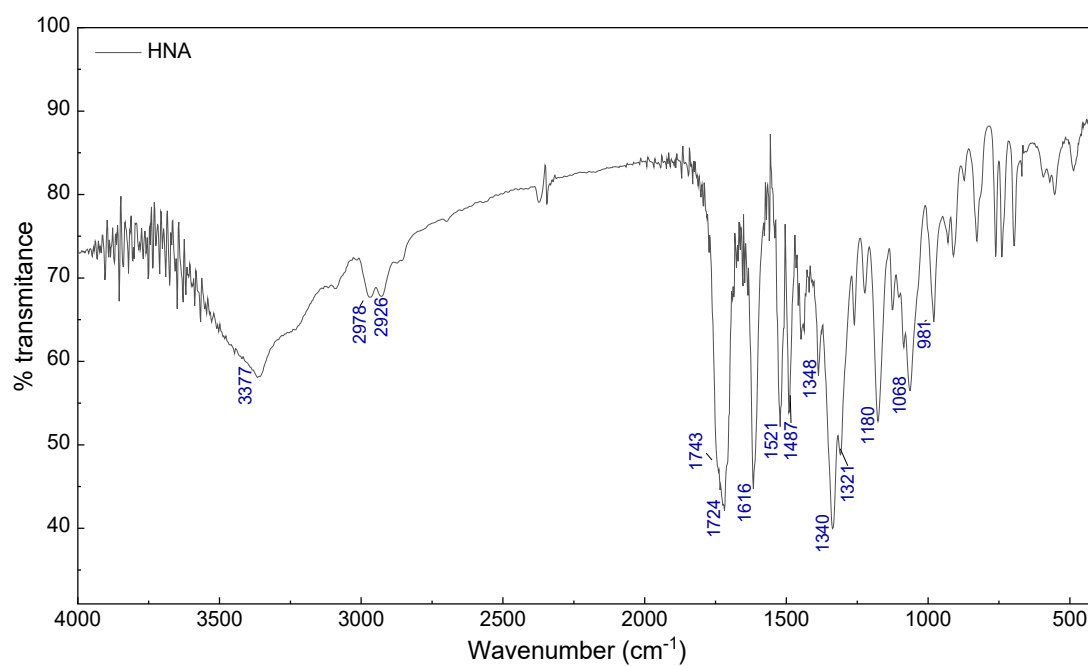
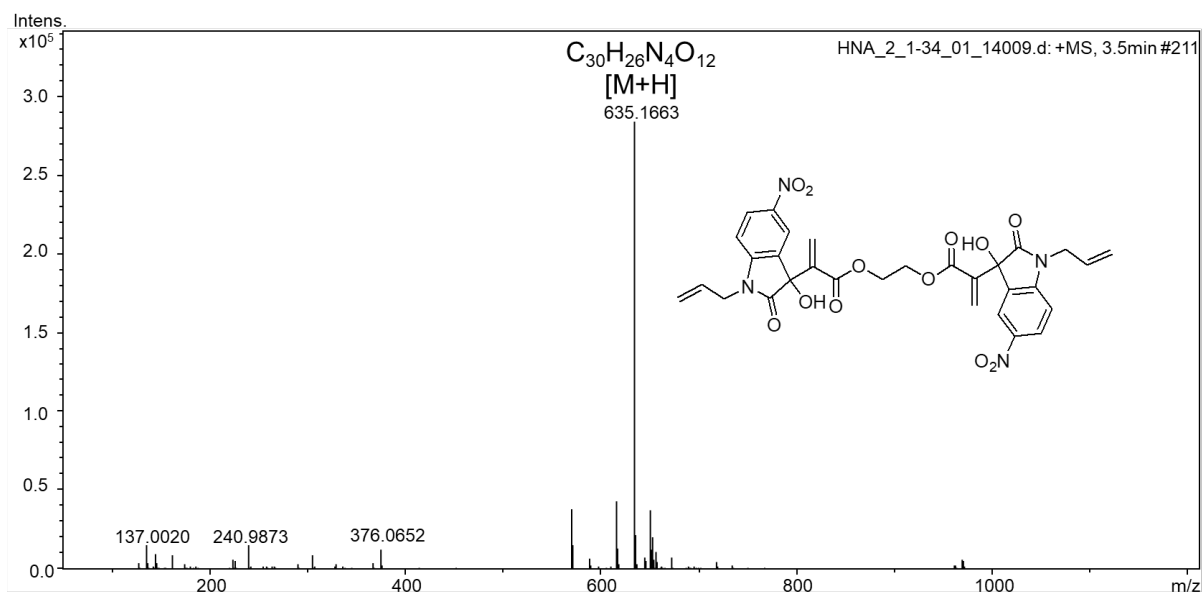
Espectro 42 - Espectro de RMN ^1H (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **1j**.

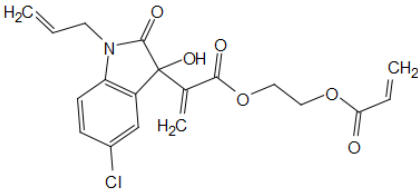


Espectro 43 - Espectro de RMN ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **1j**.

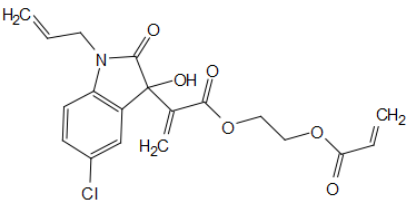


Espectro 44 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de **1j**.





Espectro 47 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da molécula **49e**.



Espectro 48 - Espectro de RMN ^{13}C (126 MHz, DMSO- d_6) da molécula **49e**.



Synthesis and Anticancer Activity of Homodimeric Morita-Baylis-Hillman Adducts Based on 3-Hydroxyindolin-2-one Core

Maísa C. Coelho,^a Aleff Castro,^a Tayná R. Olegário,^a Rodrigo Cristiano,^a
Boniek G. Vaz,^b Gabriel F. dos Santos,^b Lucas S. Machado,^b
Gardênia C. G. Militão,^c Paulo B. N. da Silva,^c Mário L. A. A. Vasconcellos^a
and Claudio G. Lima-Junior^{a,*}

^aLaboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba (LASOM-PB), Departamento de Química, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-900 João Pessoa-PB, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás (UFG), 74690-900 Goiânia-GO, Brazil

^cDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 50670-901 Recife-PE, Brazil

Cancer treatment represents one of the main scientific study targets today, mainly due to the pronounced side effects arising from chemotherapy. This study reports the synthesis, characterization, and anticancer activity of ten compounds from the Morita-Baylis-Hillman reaction. Ethylene glycol diacrylate was used as a double Michael acceptor in reactions with isatin derivatives to give homodimers of 3-hydroxyindolin-2-one core, recognized in the literature for its extensive pharmacological profile. The use of 1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane (DABCO) as a catalyst and room temperature were the optimal conditions for the study reaction. The isolated yields were up to 63%, with most reaction times inferior to 24 h, some as fast as 15 min. The anticancer potential of the synthesized dimers was evaluated *in vitro* against three cancer strains, resulting in average inhibitory concentrations up to 0.72 μ M. It was also found that the best performing homodimers are more active than their monomeric counterparts. Considering the promising selectivity indices observed, the preliminary results obtained here act as a basis for broader tests regarding the