

Isatina: “Bloco de Construção” Promissor no Desenvolvimento de Novos Fármacos

> Carolina S. Marques*
Anthony J. Burke

Isatin: Promising Building Block for Drug Design. *Isatin (or 1H-indole-2,3-dione) is a highly desirable heterocyclic compound in the fields of medicinal and synthetic chemistry due to its particularly adaptable structure, allowing it to be derivatized and thus used for many applications. In recent years, it has been extensively modified, functionalized and used for obtaining several interesting potential drug candidates. In this article, we highlight our work on the design and synthesis of new families of oxindole-type compounds and show their potential application in two important troubling diseases, Alzheimer’s disease, and cancer.*

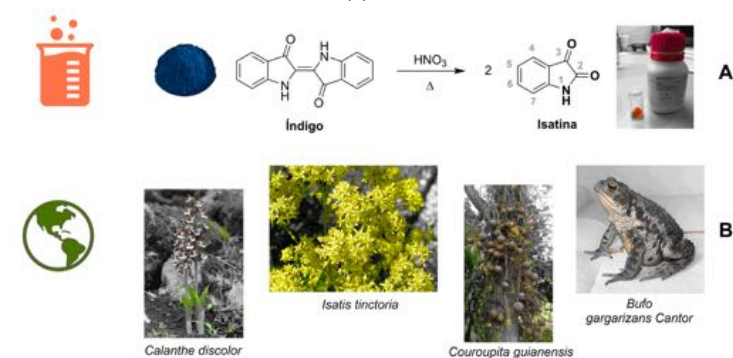
A isatina (ou 1H-indole-2,3-diona) é um composto heterocíclico muito cobiçado nas áreas da química medicinal e sintética devido à sua estrutura particularmente versátil no que diz respeito à possibilidade de modificação estrutural e no leque imenso de aplicações que possui. Nos últimos anos tem sido vastamente modificada de forma a provar o seu interesse como potencial fármaco. Neste artigo pretende-se mostrar o trabalho realizado por nós no âmbito do design e síntese de novas famílias de compostos do tipo oxindole, e de mostrar a sua potencial aplicação em duas doenças preocupantes da atualidade, a doença de Alzheimer e o cancro.

1. Isatina: importância e aplicações

Em 1840, Erdmann e Laurent isolaram, pela primeira vez, um sólido cristalino de cor vermelho-alaranjado a partir dos seus estudos de oxidação do corante índigo (de cor azul) e chamaram-lhe isatina (Figura 1A). Num recipiente de porcelana com aquecimento à chama, verificaram que a adição lenta de ácido nítrico a uma mistura de índigo e água até ao total desaparecimento da coloração azul e formação de um líquido de cor amarela originou, após diluição em água quente, cristais de cor vermelha. Observou-se também que a isatina era facilmente recristalizada em etanol ou ácido acético, apresentando um ponto de fusão na ordem dos 200 °C [1,2]. A isatina começou por ser considerada apenas um composto sintetizado em laboratório, mas rapidamente foi isolada (tal como alguns dos seus derivados) a partir de várias fontes naturais. Foi descoberta em plantas abundantes na China com importância crucial em terapêutica caseira (*Couroupita guianensis*, *Isatis tinctoria* e *Calanthe discolor*), na secreção da glândula parótida de sapos do género *Bufo* (*bufo gargarizans* Cantor), em fungos e moluscos

marinhos, no cérebro, tecidos e fluidos humanos (pois é um derivado metabólico da adrenalina), e em muitas outras fontes naturais (Figura 1B) [3-6].

Figura 1 - Reação de oxidação do índigo por Erdmann e Laurent (A) e fontes naturais onde a isatina e derivados foram detetados (B).

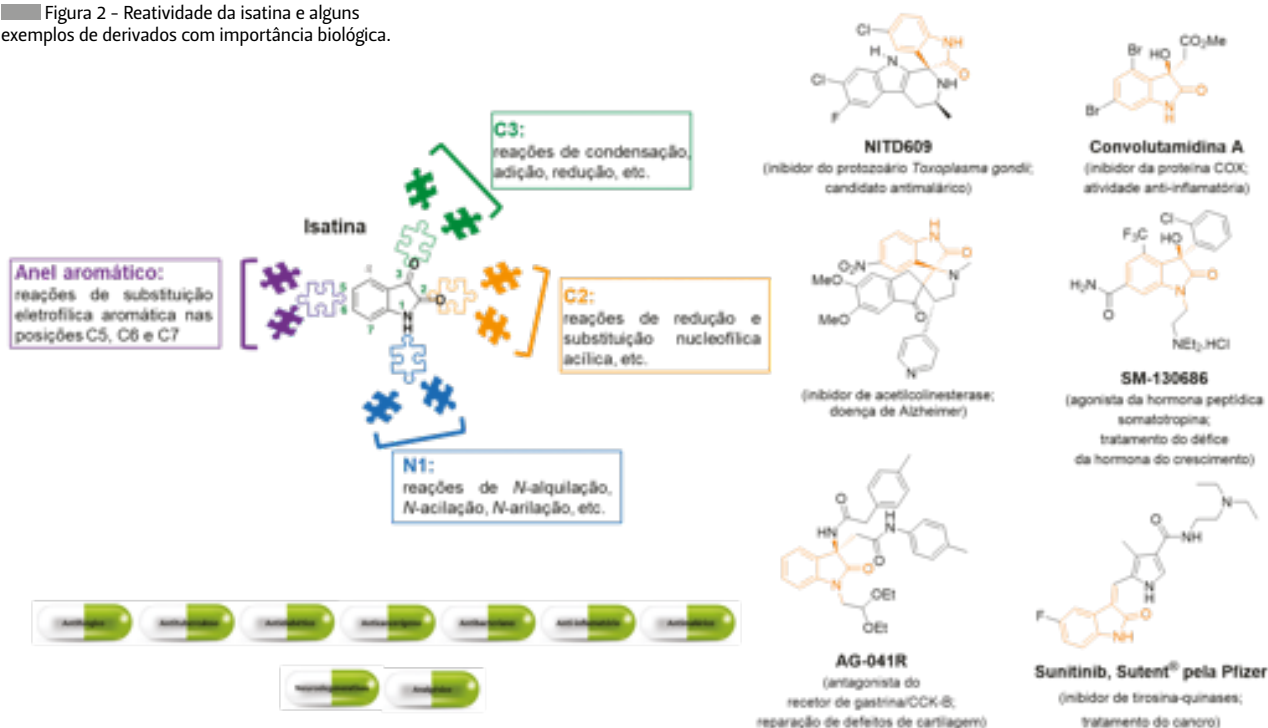


Pequenos compostos heterocíclicos como a isatina (1H-indole-2,3-diona, ou indenediona ou indole quinona) e seus derivados são uma importante

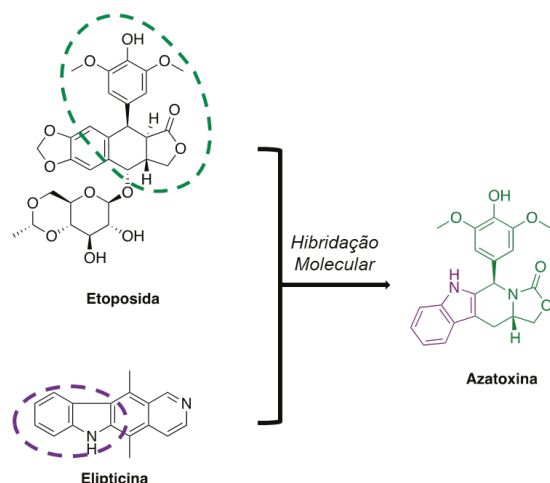
classe de compostos orgânicos bastante explorados devido à sua reatividade interessante e às suas propriedades bioativas, farmacológicas e medicinais [5-10]. A sua estrutura faz da isatina um composto de extremo interesse para ser investigado do ponto de vista sintético, pois possui um largo número de grupos funcionalizáveis: um átomo de nitrogênio na posição 1 e dois grupos carbonilo nas posições 2 e 3; é ainda constituída por um anel aromático de seis membros e um anel antiarômático (sistema conjugado de elétrons π que possui maior energia devido à presença de $4n$ elétrons π , aumentando a sua instabilidade/reactividade) de cinco membros, fundidos, sendo ambos planares (Figura 2). Prova disso, é o elevado número de publicações reportadas nos últimos anos [11] identificando novas famílias de compostos derivados da isatina com diversas propriedades biológicas, em particular anticancerígena [12], antibacteriana [13], antifúngica [14], antidiabética [15], anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana [16], antidepressiva e ansiolítica [17], antituberculosa [18], antimalárica [19], entre outras. A isatina e seus derivados possuem também algumas aplicações industriais, utilizados, nomeadamente, como inibidores de corrosão [20], como sensores fluorescentes [21] e como pigmentos [22]. Na Figura 2 encontram-se alguns exemplos de derivados da isatina com propriedades farmacológicas de interesse, incluindo um fármaco comercializado pela Pfizer e prescrito para o tratamento do cancro (Sutent®).

Os químicos medicinais e sintéticos de todo o mundo continuam fascinados pelos derivados da isatina devido à sua reatividade, química simples e objetiva e, obviamente, pela possibilidade de obter uma variedade de bibliotecas de novos compostos com potencial atividade biológica. A construção de novas estruturas moleculares com vários graus de complexidade a partir de moléculas simples (como a isatina), usando tecnologias e métodos de síntese simples, baratos e sustentáveis, tem sido a grande aposta e a tendência global na química orgânica moderna e na química medicinal. Na última década, esta estratégia tem sido extensamente aplicada na preparação de novos compostos candidatos a fármacos com perfis farmacocinéticos aperfeiçoados. Também designada de *hibridação molecular*, este conceito assenta basicamente no *design* de novos compostos híbridos a partir da modulação de entidades/fragmentos chave de outros compostos de interesse. Pretende-se, com esta metodologia, aumentar e possivelmente expandir a sua bioatividade, melhorando o seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico quando se utiliza, por exemplo, um fármaco já existente para lhe dar origem [23,24]. A vantagem manifesta-se no desenvolvimento de moléculas mais eficientes e com um potencial tóxico mais reduzido. Existem muitos exemplos de fármacos sintetizados pela combinação de estruturas chave (ou farmacóforos) de dois fármacos pré-existentes. A azatoxina, um potencial agente antineoplásico com atividade inibitória contra a enzima topoisomerase II e a

Figura 2 - Reatividade da isatina e alguns exemplos de derivados com importância biológica.



polimerização da tubulina, encontrando-se na fase de testes pré-clínicos, é um composto híbrido sintetizado a partir de dois fármacos já existentes, a etoposida (inibidor da enzima topoisomerase II, utilizada em quimioterapia) [25] e a elipticina (classe de compostos com atividade tumoral) [26] (Esquema 1) [27-29].



Esquema 1 - Esquema descritivo do design da azatoxina, um composto híbrido.

Na última década, o nosso grupo tem trabalhado ativamente no *design* e síntese de novas famílias de pequenas moléculas heterocíclicas com potencial atividade biológica, em particular, mas não exclusivamente, para o combate às doenças neurodegenerativas. A pequena revisão que se segue foca-se na investigação realizada usando derivados da isatina.

2. Doença de Alzheimer: o primeiro desafio

2.1. Síntese de novas famílias de compostos derivados da isatina

A história desta investigação teve início no ano de 2013 com o projeto *INMOLFARM: Inovação Molecular e Descoberta de Fármacos - Novas estratégias para a descoberta de novos fármacos*, que tinha como objetivo o *design*, a síntese e o estudo do perfil biológico de novas moléculas com potencial interesse para o combate a doenças do foro neurodegenerativo. Contando com uma equipa multidisciplinar (químicos orgânicos, bioquímicos, químicos teóricos, alunos de doutoramento em química e bioquímica, etc.) decidiu-se iniciar o projeto pela análise dos fármacos existentes para mitigar ou protelar as condições dolorosas provocadas pela doença de Alzheimer (DA) nos pacientes.

A DA é uma doença complexa e progressiva do foro neurodegenerativo (agravando-se ao longo do tempo), multifatorial, irreversível, incurável e, em último caso, fatal. É caracterizada pela destruição da memória e pela interrupção das funções mentais normais (como o

esquecimento do nome de um familiar próximo, saber onde o carro está estacionado e, em casos mais graves, perder a capacidade de ingerir uma simples refeição). É motivo de grande preocupação em todo o mundo (a Organização Mundial de Saúde considera-a uma preocupação alarmante ao nível da saúde pública global), considerando os custos de tratamento, o impacto social e o inevitável envelhecimento da população. Não existe cura e os números são inquietantes: estima-se que em 2030 sejam diagnosticados 82 milhões de casos no mundo inteiro e que 152 milhões de casos sejam diagnosticados em 2050 [30-32].

Atualmente, apesar de extensa investigação e estudo na área, ainda não é claro o mecanismo que despoleta a DA, mas sabe-se que disfunções ao nível do neurotransmissor acetilcolina (ACh), amiloidoses do péptido amiloide β (péptido A β), hiperfosforilação da proteína Tau e o *stress* oxidativo estão envolvidas na sua origem [33]. Contudo, parece existir um consenso entre a comunidade científica de que duas destas hipóteses poderão estar envolvidas na causa desta doença: a hipótese colinérgica e a alteração do péptido A β . A hipótese colinérgica foi talvez a primeira teoria proposta para explicar a DA e, até agora, tem contribuído para o desenvolvimento dos únicos fármacos existentes no mercado para tratar sintomas moderados da DA. Esta teoria baseia-se no decréscimo dos níveis de ACh no córtex cerebral, evidente no cérebro dos pacientes com DA, e que resulta numa severa e progressiva perda de memória [34]. A ACh é hidrolisada a colina e ácido acético num processo catalisado pelas enzimas colinesterases (ChE: acetil e butirilcolinesterases, AChE e BuChE, respetivamente). A inibição destas enzimas levará a um aumento dos níveis de ACh e, consequentemente, ao restauro de défices cognitivos. A ACh é hidrolisada preferencialmente pela AChE, mas parece que a função da BuChE está diretamente associada a este mecanismo. Por exemplo, num paciente num estado avançado de DA, o nível de AChE no cérebro decresce para cerca de 55 a 67%, comparativamente a um cérebro "normal", enquanto o nível de BuChE aumenta para cerca de 120%, indicando que a BuChE tem um papel significativo na hidrólise da ACh em doentes diagnosticados com DA. Existem ainda evidências que a formação de amiloidoses do péptido A β , com a respetiva formação de placas proteicas, pode ser causada por ambas as ChE (AChE e BuChE) [35].

Os fármacos existentes no mercado para o tratamento de doentes com DA (Figura 3) pertencem à classe de inibidores de ChE, e têm o intuito de aumentar a concentração de ACh no cérebro e, eventualmente, reduzir a formação de amiloidoses do péptido A β . Contudo, estes fármacos apresentam efeitos secundários severos e não atrasam a neurodegeneração [36].

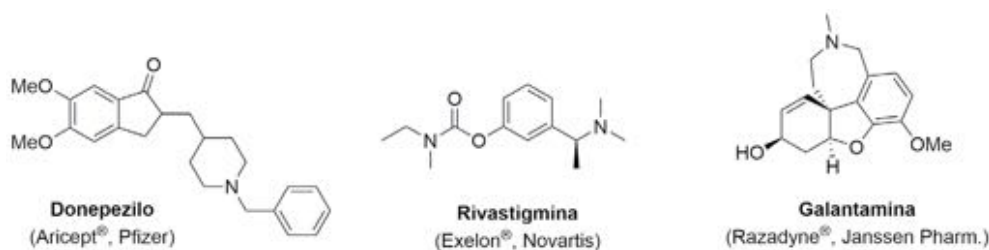
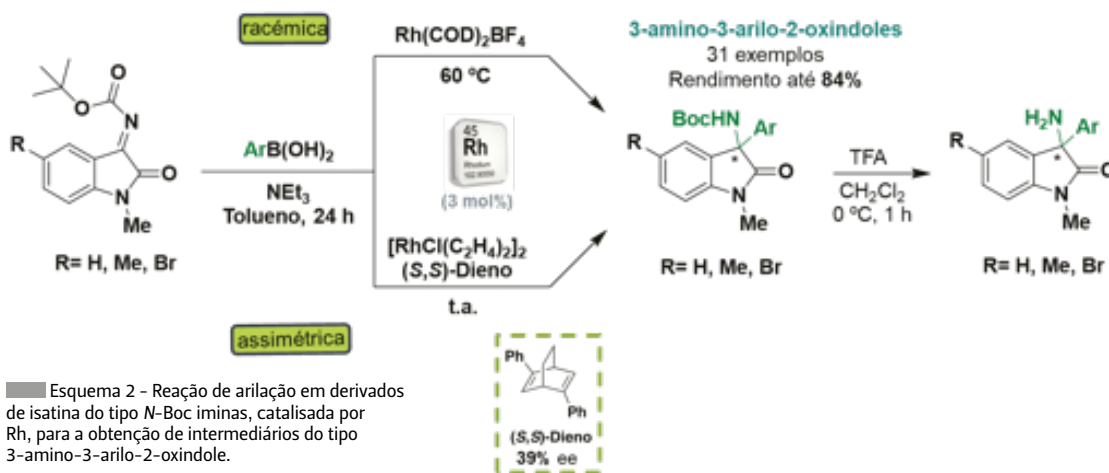


Figura 3 - Fármacos existentes no mercado para a DA.



Esquema 2 - Reação de arilação em derivados de isatina do tipo *N*-Boc iminas, catalisada por Rh, para a obtenção de intermediários do tipo 3-amino-3-arilo-2-oxindole.

Pelo número diminuto de fármacos existentes no mercado e pela gravidade da doença, o nosso grupo decidiu contribuir para este desafio na procura de novos fármacos que pudessem, se não curar, pelo menos tornar a vida de um paciente com DA menos dolorosa e com mais qualidade. Explorando o potencial supracitado da isatina e derivados, foi desenvolvida a síntese de algumas famílias de compostos com o objetivo de testar o seu potencial inibitório nas ChE. A abordagem inicial, com o objetivo de encontrar o *composto líder* (*hit*), consistiu em realizar diversas modificações nas posições N1, C3, C5 e C6 da isatina, adicionando diversidade estrutural.

Devido ao conhecimento anteriormente adquirido no que diz respeito a reações catalíticas de arilação [37], desenvolveu-se um método eficiente e pioneiro para a obtenção de derivados de 3-amino-3-aryl-oxindoles utilizando ródio como catalisador e ácidos borônicos comercialmente disponíveis como fonte de arilo [38]. Pela importância do farmacóforo possuir grupos do tipo amina, decidiu-se introduzir esta unidade na posição C3 da estrutura central da isatina. Foram sintetizadas as respectivas iminas possuindo um grupo protetor do tipo Boc (*tert*-butiloxicarbonilo), facilmente removível em meio ácido, como substrato para esta transformação química. Depois de otimizadas as condições reacionais,

o uso de $\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4$ (3 mol%), trietilamina como base (2 equivalentes) e tolueno como solvente, a 60 °C durante 24 h, permitiu obter uma família diversificada de derivados do tipo 3-amino-3-aryl-2-oxindole com rendimentos satisfatórios e em condições reacionais suaves (Esquema 2). Foi também conseguida uma versão assimétrica desta reação usando o pré-catalisador $[\text{RhCl}(\text{C}_2\text{H}_4)_2]_2$ e ligando quiral do tipo dieno (*S,S*-Dieno) (ambos comercialmente disponíveis), em condições reacionais suaves (temperatura ambiente). A utilização de ácido trifluoroacético (TFA) em diclorometano permitiu a rápida desproteção do grupo protetor Boc e a consequente formação da amina primária substituída na posição C3 (Esquema 2).

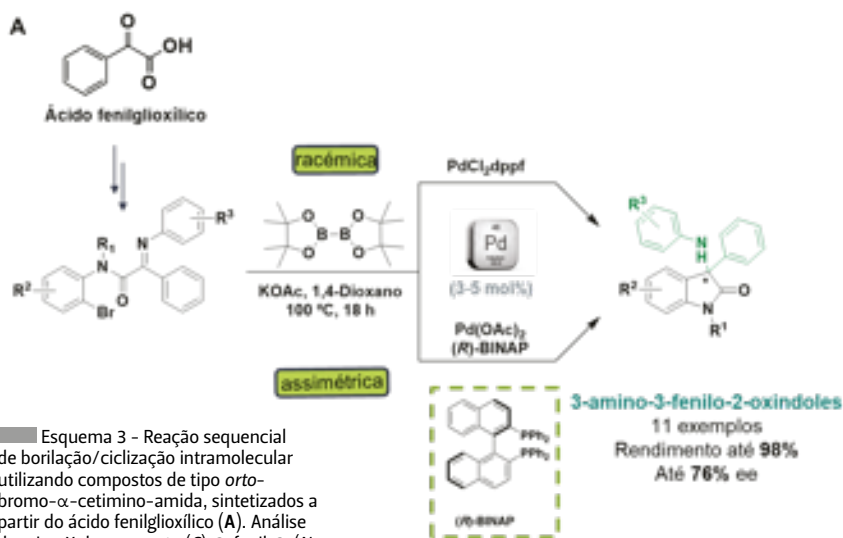
No mesmo âmbito, e enfatizando a importância deste tipo de moléculas, foi ainda desenvolvida e estudada uma outra abordagem sintética para a obtenção deste tipo de intermediários 3-amino-2-oxindole utilizando compostos do tipo *orto*-bromo- α -cetiminó-amida, sintetizados a partir do ácido fenilgloxílico, comercialmente disponível [39]. Utilizando paládio como catalisador, foi possível adicionar um grupo contendo boro a este tipo de intermediário e formar, em dois passos subsequentes e no mesmo balão reacional, derivados de 3-amino-3-fenilo-oxindole numa abordagem sintética do tipo intramolecular

(Esquema 3A). Aparentemente, o catalisador de Pd utilizado consegue promover a introdução de um grupo contendo boro na posição ocupada pelo haleto (bromo, neste caso) de arilo no substrato (reação conhecida por borilação de Miyaura [40]) e promover a consequente reação de ciclização na unidade imina da molécula. A reação funciona muito bem utilizando o catalisador comercial Pd(dppf)Cl₂ (3 mol%), acetato de potássio como base (3 equivalentes) e 1,4-dioxano como solvente, a 100 °C.

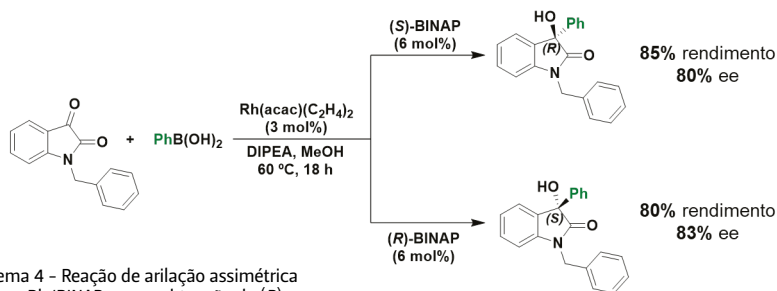
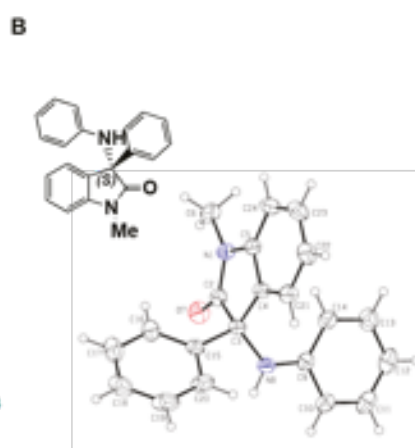
A maioria dos fármacos comercializados atualmente são estereoisômeros (enantiômeros ou diastereoisômeros), pois desde que ocorreu o desastre da talidomida nos anos 60 [41] foi priorizada a importância da quiralidade dos fármacos e das suas propriedades estereoquímicas. Por esta razão, desenvolveu-se uma versão assimétrica desta reação intramolecular. Após otimização, testando vários pré-catalisadores de paládio, vários ligandos quirais, bases e condições reacionais, concluiu-se que a reação funciona bastante bem, com grande tolerância a grupos funcionais eletrodoadores e eletroaceitadores, utilizando o sistema catalítico Pd(OAc)₂ e o ligando quiral (*R*)-BINAP ((*R*)-(+)-2,2'-Bis(difenilfosfina)-1,1'-binaftaleno), nas mesmas condições reacionais que as utilizadas para a

reação racêmica (Esquema 3A). Foi obtida uma nova família de compostos do tipo 3-amino-3-fenil-oxindole (no total de 11 novos compostos) com rendimentos excelentes e bons valores de enantiosseletividade (até 76% ee). Foi realizada uma análise por raio-X de um destes derivados mostrando a configuração absoluta do mesmo como sendo (*S*) (Esquema 3B).

O interesse em colocar variedade estrutural na posição C3 e N1 da isatina levou a considerar-se a introdução de grupos hidroxilo (-OH), éteres (-OR) ou do tipo acetal no carbonilo da posição C3 e também mostrar a versatilidade do nitrogênio da amida na posição N1. Começou por usar-se a 1-benzilindolina-2,3-diona (sintetizada facilmente a partir da isatina por meio de uma reação de alquilação com brometo de benzilo e uma base) numa reação de arilação assimétrica utilizando Rh como catalisador e *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) como base em condições reacionais suaves (Esquema 4). Utilizando o ligando BINAP (aplicado com sucesso em reações semelhantes - ver Esquema 3) foi possível obter o respetivo produto, 1-benzil-3-fenil-3-hidroxi-indolin-2-ona, com muito bom rendimento e enantiosseletividade [42]. Como este composto mostrou potencial atividade em enzimas do tipo ChE (os pormenores serão discutidos *a posteriori*),



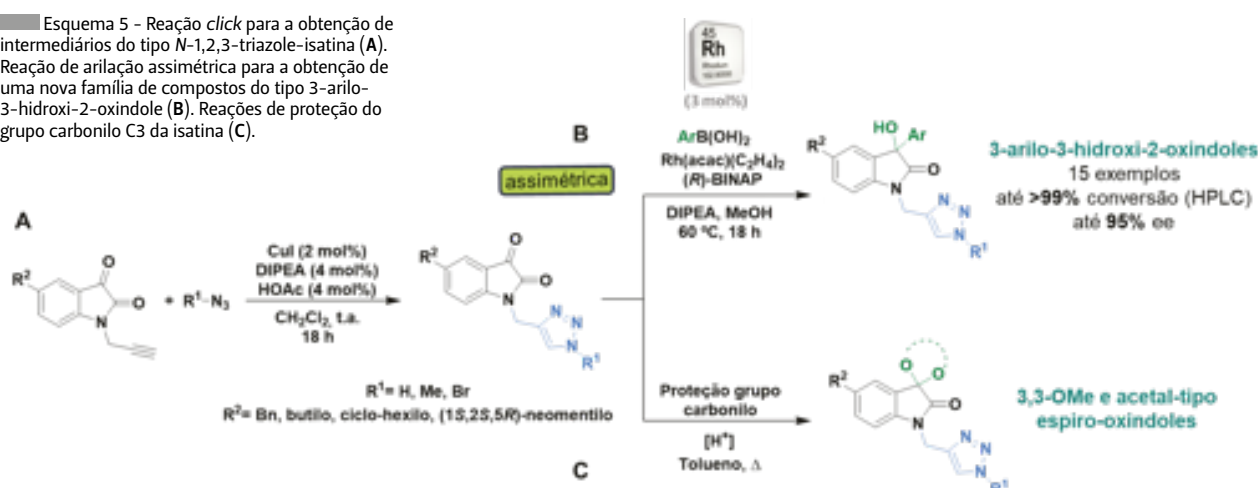
Esquema 3 - Reação sequencial de borilação/ciclização intramolecular utilizando compostos de tipo orto-bromo- α -cetimino-amida, sintetizados a partir do ácido fenilgloxílico (A). Análise de raios-X do composto (*S*)-3-fenil-3-(*N*-fenilamino)-1-metilindolin-2-ona (B).



Esquema 4 - Reação de arilação assimétrica catalisada por Rh/BINAP para a obtenção de (*R*)- e (*S*)-1-benzil-3-fenil-3-hidroxi-indolin-2-ona.

1-benzil-3-fenil-3-hidroxi-indolin-2-ona

Esquema 5 - Reação click para a obtenção de intermediários do tipo *N*-1,2,3-triazole-isatina (A). Reação de arilação assimétrica para a obtenção de uma nova família de compostos do tipo 3-arilo-3-hidroxi-2-oxindole (B). Reações de proteção do grupo carbonilo C3 da isatina (C).



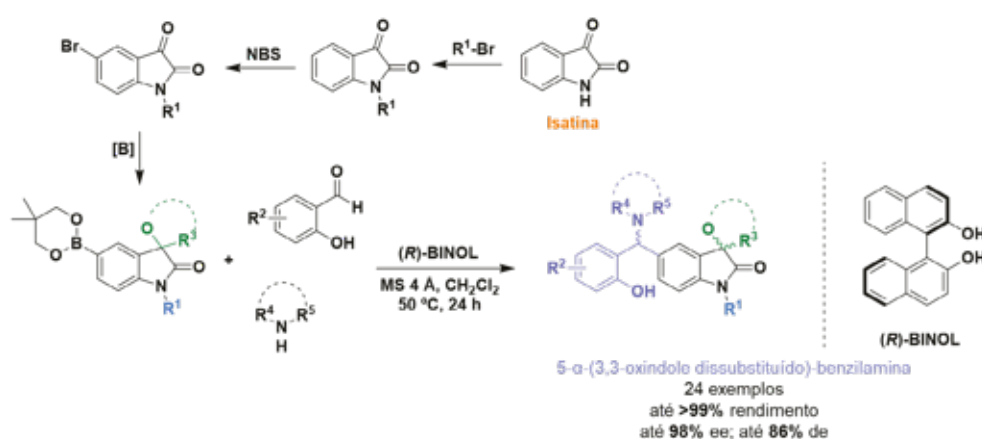
denominada por reação de Petasis borono-Mannich e tem sido vastamente modificada e explorada nos últimos 30 anos, dando acesso a uma diversidade de moléculas com as mais variadas potenciais aplicações [58,59]. Procedeu-se à borilação da isatina a partir do derivado bromado na posição C5 para ter acesso a intermediários do tipo 5-arilboronato-3-oxindole com o grupo carbonilo na posição C3 protegido (Esquema 6) [52]. Após otimização das condições reacionais, foi possível obter uma nova família de compostos do tipo 5- α -(3,3-oxindole dissustituído)-benzilamina a partir dos intermediários do tipo boronato, derivados de *o*-hidroxi-benzaldeído (ou salicilaldeído) e aminas secundárias, com excelentes rendimentos, apenas utilizando tolueno como solvente, a 90 °C. Uma versão assimétrica desta RP foi também realizada com sucesso utilizando o organocatalisador (*R*)-BINOL (bifenilnaftol ou 1,1'-bi-2-naftol), diclorometano como solvente, em condições reacionais mais suaves (50 °C) (Esquema 6). Este processo permitiu o acesso a uma variedade estrutural na posição C5 do anel aromático da isatina e à criação de uma nova família de compos-

tos, com elevada enantio- ou diastereosseletividade. Esta RMC de Petasis foi também aplicada com sucesso a compostos da família da triptantina (obtida através da isatina), outro alvo molecular muito interessante do ponto de vista biológico [60].

2.2. Ensaio biológicos: colinesterases (ChE), monoamina oxidases (MAO) e péptido amiloide β (péptido A β)

Após a síntese de novas famílias de derivados do tipo oxindole, alguns destes compostos (Figura 5) foram testados quando à sua capacidade inibitória em algumas enzimas chave envolvidas na DA, nomeadamente as colinesterases (AChE e BuChE), as monoaminas oxidases (MAO A e B) e o péptido amiloide β (péptido A β). Os compostos selecionados foram testados nas enzimas AChE de enguia (*electrophorus electricus*, eeAChE) e BuChE de sêrum equino e humana (eqBuChE e hBuChE), tendo sido utilizada a galantamina (um dos poucos fármacos aprovados para a DA) como controle positivo. Os resultados obtidos relativamente à atividade nas ChE encontram-se reportados na Tabela 1.

Esquema 6 - RP enantiosseletiva e estereosseletiva entre compostos do tipo 5-arilboronato-3-oxindole, derivados de *o*-hidroxi-benzaldeído e aminas secundárias. NBS: *N*-bromosuccinimida. [B]: reação de borilação.



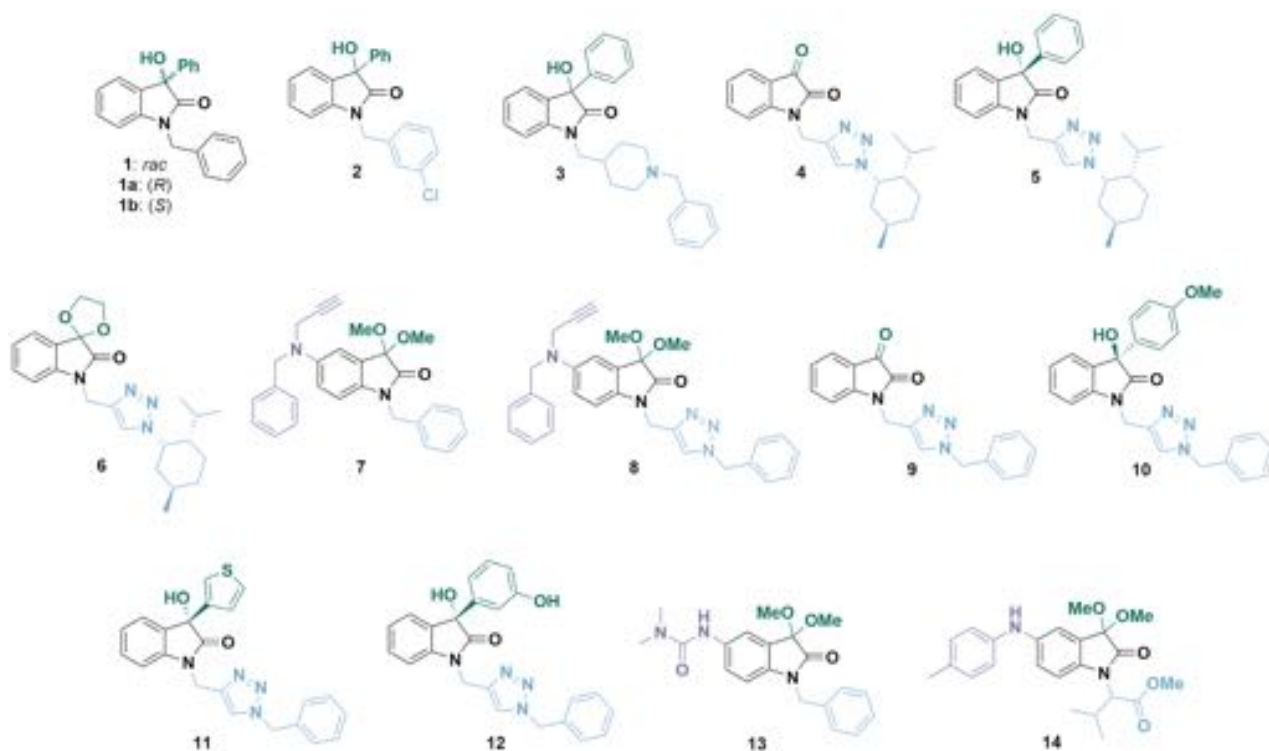


Figura 5 – Derivados do tipo oxindole selecionados para ensaios *in vitro*.

Tabela 1 – Resultados *in vitro* de IC_{50} relativos à inibição de *eeAChE*, *eqBuChE* e *hBuChE*, determinados para compostos do tipo oxindole-3-substituídos [42,51,53].

Composto	IC_{50} (μM)		
	<i>eeAChE</i>	<i>eqBuChE</i>	<i>hBuChE</i>
1	237,18 \pm 6,97	7,41 \pm 0,001	-
1a	160 ^a	54 ^a	-
1b	143,13 ^a	6,19 ^a	-
2	128,62 \pm 18,48	1,02 \pm 0,001	-
3	193,09 \pm 10,12	6,61 \pm 0,26	-
4	> 100 ^a	0,46 ^a	0,51 ^a
5	> 100 ^a	2,2 ^a	4,2 ^a
6	90,0 ^a	3,6 ^a	25,2 ^a
7	> 50 ^b	1,6 \pm 0,2 ^b	-
8	> 50 ^b	2,6 \pm 0,0 ^b	-
Galantamina	2,7 \pm 0,2 ^a	10,0 ^a	-

^a[S] = 0,452 μM . ^b[S] = 121 μM para AChE e 112 μM para BuChE.

De uma forma geral, todos os compostos testados não mostraram atividade relevante na inibição da enzima AChE. Foram obtidos resultados bastante promissores relativamente à inibição da enzima BuChE em compostos do tipo 3-hidroxi-oxindoles (compostos **1**, **2**, **3** e **5**) [42]. O enantiômero (*S*) da 1-benzil-3-fenil-3-hidroxi-indolin-2-ona (**1b**) mostrou ser mais ativo que o enantiômero (*R*), **1a**. O melhor resultado obtido até ao momento foi usando o derivado *N*-1,2,3-triazole-mentol isatina (composto **4**) que

mostrou valores de IC_{50} de 0,46 μM para a *eqBuChE* e 0,51 μM para a *hBuChE* [51]. Isto mostra a importância do grupo carbonilo livre na posição C3. Quanto à sua proteção, e ainda sublinhando a atividade nas enzimas ChE, não existem diferenças significativas no que respeita à presença de um grupo hidroxilo e arilo (**5**), espiro-acetal (**6**) ou dois grupos metoxilo (**8**). Recentemente, foram reportadas novas famílias de moléculas derivadas da isatina com diferentes unidades estruturais na posição C5 do anel aromático [53], que mostraram também bons valores de atividade na BuChE (ver Tabela 1, compostos **7** e **8**). A maioria dos compostos selecionados mostrou maior atividade que o controlo positivo, galantamina, para a enzima BuChE.

Alguns compostos foram também analisados quanto à sua atividade relativamente às enzimas monoamina oxidases (MAO A e B), cujos resultados alusivos à percentagem de inibição encontram-se reportados na Figura 6 [53]. De um modo geral, os compostos obtidos até ao momento não mostraram potencial ativo para as enzimas MAO. Salientam-se apenas os compostos **13** e **14** (ver Figura 5) com 17,3 e 14,1% de inibição para a MAO-A, respetivamente. O composto **14** revelou também ser o mais ativo na inibição da MAO-B (com 22,7% de inibição). Estes ensaios foram realizados com a utilização da clorgilina (MAO-A) e da safinamida (MAO-B) como controlo positivo em cada enzima.

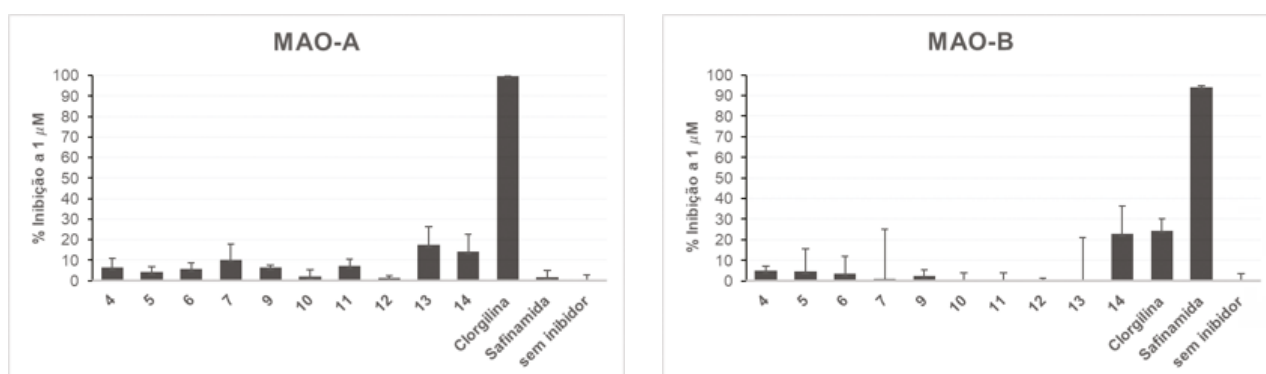


Figura 6 - Resultados da inibição das enzimas MAO para alguns compostos previamente selecionados (ver Figura 5). Clorgilina e safinamida foram utilizadas como controle positivo. Adaptada da referência [53].

Foram ainda realizados ensaios preliminares para testar alguns compostos previamente selecionados quanto à sua capacidade de inibição da agregação do péptido amiloide β (péptido A β) [51]. Uma das consequências notórias associada à DA é a formação de placas do péptido A β no cérebro, placas estas que se acumulam fora dos neurónios levando à sua morte e a uma falha grave no processo de comunicação celular. Uma das formas de conseguir reverter este mecanismo pode estar na criação de moléculas que inibam este processo. Os compostos **4**, **5**, **6** e **9** (ver Figura 5) foram testados no ensaio *in vitro* e a percentagem de inibição determinada foi bastante limitada (< 20% em todos os compostos testados, Tabela 2). A curcumina foi utilizada como controlo positivo.

Tabela 2 - Resultados *in vitro* referentes aos valores de % de inibição da agregação do péptido A β_{42} [51].

Composto	% Inibição da agregação do péptido A β_{42} ^a
4	11,5 ± 4,2
5	13,3 ± 5,0
6	8,3 ± 2,8
9	16,8 ± 2,5
Curcumina	80,4 ± 5,3

^aEnsaio feito com 50 μ M de inibidor e 50 μ M de A β_{42} .

3. Cancro: o desafio futuro

O cancro é outra doença assustadora em termos dos números de mortalidade e com elevado impacto social e económico. Estima-se que em 2020 tenham sido diagnosticados no mundo 19,3 milhões de novos casos e reportadas cerca de 10 milhões de mortes devido à doença. De entre os cancros diagnosticados, estima-se que os mais comuns sejam o cancro da mama (cerca de 2,26 milhões de casos), o cancro do pulmão (cerca de 2,21 milhões de casos) e o cancro da próstata (cerca de 1,41 milhões de casos). O cancro do pulmão foi o mais mortífero no ano de 2020 (cerca de 1,79 milhões de morte associadas) [61].

O cancro é uma doença caracterizada pela rápida e descontrolada proliferação celular. A maioria dos fármacos existentes para o tratamento dos vários tipos de cancro apresenta baixos níveis de seletividade a nível celular e provocam graves efeitos secundários nos pacientes. Na maior parte dos casos, verifica-se também o desenvolvimento de resistência ao fármaco. Apesar de existir uma massiva investigação sobre a doença e os seus modos de ação, o desenvolvimento de novos fármacos continua a ser prioritário e um grande desafio para uma quimioterapia mais eficaz e segura para o paciente, sendo uma área de investigação muito ativa e dinâmica na área da química medicinal.

De entre os compostos com potencial para cumprir este objetivo, os compostos do tipo isatina-oxindole ocupam um lugar privilegiado [62-64]. Existem atualmente dois fármacos aprovados que são derivados do tipo oxindole, o nintedanib (Ofev[®]) para o tratamento de fibrose pulmonar idiopática, e o sunitinib (Sutent[®]) para o tratamento do tumor maligno do estroma gastrointestinal, carcinoma de células renais metastático e tumores neuroendócrinos pancreáticos (Figura 7) [65,66].

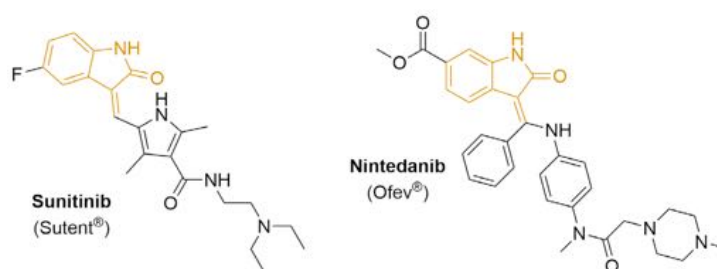


Figura 7 - Exemplos de fármacos do tipo oxindole existentes no mercado, utilizados em quimioterapia.

Os compostos isatina-oxindole sintetizados foram testados relativamente à atividade antiproliferativa em várias linhas celulares tumorais e também em linfomas. O facto de algumas famílias possuírem grupos 1,2,3-triazole ligados na posição N1 da estrutura central levou a pensar que os mesmos poderiam ter

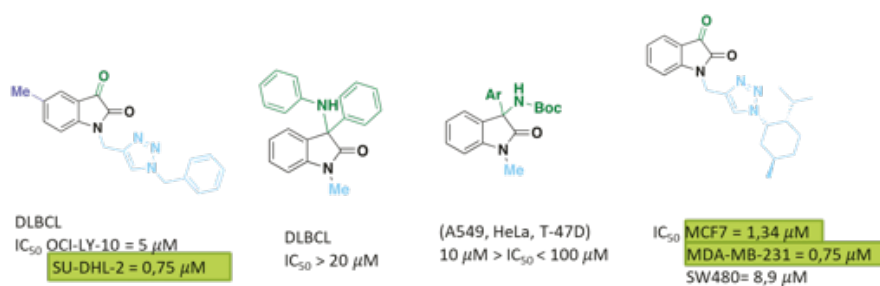


Figura 8 - Ensaios preliminares antiproliferativos em tumores líquidos (DLBCL) e sólidos (HeLa, A549, T-47D, MCF7, MDA-MB-231, SW480). DLBCL: *diffuse large B-cell lymphoma*. A549, HeLa, T-47D, MCF7, MDA-MB-231, SW480: linhas celulares.

atividade em ensaios antiproliferativos, visto que esta unidade estrutural foi já reconhecida como privilegiada na descoberta de novos fármacos anticancerígenos, muitos deles já nas últimas fases de ensaios clínicos [62,67,68]. Na Figura 8 encontram-se os resultados preliminares realizados com alguns dos compostos mais promissores, protegidos por uma patente europeia [69]. Foram realizados ensaios em algumas linhas celulares de linfoma difuso de grandes células B (DLBCL: *diffuse large B-cell lymphoma*) e os resultados foram bastante promissores com uma molécula derivada de isatina-oxindole com uma unidade 1,2,3-triazole substituída na posição N1 (ver Figura 8). O linfoma difuso de grandes células B é o tipo de linfoma (cancro que se desenvolve no sistema linfático) não Hodgkin (cancro hematológico), bastante agressivo, mais comum. Por sua vez, um derivado com estrutura semelhante mostrou boa atividade antiproliferativa em linhas celulares do cancro da mama (MCF7, MDA-MB-231) e do cólon retal (SW480). Compostos do tipo 3-amino-isatina-oxindole mostraram alguma atividade em células DLBCL e também em linhas celulares de cancro de pulmão (A549) e em linhas celulares HeLa. Face a estes resultados promissores, este tipo de compostos isatina-oxindole poderá ter potencial para ser explorado quanto à sua atividade antiproliferativa. Este é um estudo que está ainda no início e a que se pretende dar continuidade.

4. Conclusão

Pelo que foi descrito, a investigação que tem vindo a ser realizada nos compostos descritos nos últimos anos e

que terá continuação, parece ser bastante promissora. Mostrou-se a versatilidade e potencial aplicação dos compostos derivados da isatina, um material de partida comercialmente disponível e economicamente viável, como potencial inibidor da enzima butirilcolinesterase (BuChE), uma enzima crucial no desenvolvimento de novos fármacos para tratar doenças do foro neurodegenerativo, como a doença de Alzheimer. Por outro lado, estes compostos mostraram também atividade antiproliferativa em algumas linhas celulares de cancro. Estes resultados parecem demonstrar a importância do desenvolvimento de fármacos baseados na unidade oxindole para o tratamento de diferentes patologias.

Agradecimentos

Este trabalho foi suportado pelo projeto INMOL-FARM: *Molecular Innovation and Drug Discovery* (ALENT-57-2011-20) do programa FEDER-INALENTEJO ALENT-07-0224-FEDER-001743 e pelo fundo estratégico da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) do Pest-OE/QUI/UI0619/2019 e do LAQV-REQUIMTE (UIDB/50006/2020 e UIDP/50006/2020). CSM agradece à FCT pela sua bolsa de pós-doutoramento (SFRH/BPD/92394/2013) e ao LAQV-REQUIMTE pelo contrato DL 57/2016 (UIDB/50006/2020 e UIDP/50006/2020). Os autores agradecem à ação COST 15135: *Multi-target paradigm for innovative ligand identification in the drug discovery process* (Mu-TaLig) pela fantástica colaboração entre Universidades e áreas. Agradecem ainda a todos os que estiveram envolvidos em todas as etapas deste extenso processo.

Referências

- [1] A. Laurent, *Ann. Chim. Phys.* **1840**, 3, 393-434.
- [2] O. L. Erdmann, *J. für Prakt. Chemie* **1840**, 19, 321-362.
- [3] J. Bergman, J.-O. Lindström, U. Tilstam, *Tetrahedron* **1985**, 41, 2879-2881. DOI: 10.1016/S0040-4020(01)96609-8.
- [4] S. Kiho, T. Yoshida, I. Katsuragawa, M. Sakushima, M. Usui, S. Ukai, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 17, 1460-1462. DOI: 10.1248/bpb.17.1460.
- [5] J. F. M. da Silva, S. J. Garden, A. C. Pinto, *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 273-324. DOI: 10.1590/S0103-50532001000300002.
- [6] F. A. Khan, A. Maalik, *Trop. J. Pharm. Res.* **2015**, 14, 1937-1942. DOI: 10.4314/tjpr.v14i10.28.
- [7] S. Varun, R. Kakkar, *Medchemcomm.* **2019**, 10, 351-368. DOI: 10.1039/c8md00585k.
- [8] A. S. Grewal, S. Redhu, *Int. J. Pharm. Res.* **2014**, 6, 2015-2021.
- [9] P. Pakravan, S. Kashanian, M. M. Khodaei, F. J. Harding, *Pharmacol. Reports* **2013**, 65, 313-335. DOI: 10.1016/s1734-1140(13)71007-7.
- [10] S. N. Pandeya, S. Smitha, M. Jyoti, S. K. Sridhar, *Acta Pharm.* **2005**, 55, 27-46. PMID: 15907222.
- [11] R. Nath, S. Pathania, G. Grover, M. J. Akhtar, *J. Mol. Struct.* **2020**, 1222, 128900. DOI: 10.1016/j.molstruc.2020.128900.
- [12] Z. Ding, M. Zhou, C. Zeng, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2020**, 353, 1-13. DOI: 10.1002/ardp.201900367.
- [13] H. Guo, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 164, 678-688. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.12.017.
- [14] O. A. Dar, S. A. Lone, M. A. Malik, F. M. Aqlan, M. Y. Wani, A. A. Hashmi, A. Ahmad, *Heliyon* **2019**, 5, e02055. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02055.
- [15] A. Toumi, S. Boudriga, K. Hamden, M. Sobeh, M. Cheurfa, M. Askri, M. Knorr, C. Strohmann, L. Brieger, *Bioorg. Chem.* **2021**, 106, 104507. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104507.
- [16] K. Lahari, R. Sundararajan, *J. Chem. Sci.* **2020**, 132, 94. DOI: 10.1007/s12039-020-01795-0.

- [17] G. C. Montes, B. N. M. da Silva, B. Rezende, R. T. Sudo, V. F. Ferreira, F. C. da Silva, A. C. Pinto, B. V. da Silva, G. Zapata-Sudo, *Molecules* **2017**, *22*, 800. DOI: 10.3390/molecules22050800.
- [18] Z. Xu, S. Zhang, C. Gao, J. Fan, F. Zhao, Z. S. Lv, L. S. Feng, *Chinese Chem. Lett.* **2017**, *28*, 159–167. DOI: 10.1016/j.ccllet.2016.07.032.
- [19] R. K. Thakur, P. Joshi, K. Upadhyaya, K. Singh, G. Sharma, S. K. Shukla, R. Tripathi, R. P. Tripathi, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *162*, 448–454. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.008.
- [20] Y. Kharbach, F. Z. Qachchachi, A. Haoudi, M. Tourabi, A. Zarrouk, C. Jama, L. O. Olasunkanmi, E. E. Ebenso, F. Bentiss, *J. Mol. Liq.* **2017**, *246*, 302–316. DOI: 10.1016/j.molliq.2017.09.057.
- [21] M. Shakir, A. Abbasi, *Inorg. Chim. Acta* **2017**, *465*, 14–25. DOI: 10.1016/j.ica.2017.04.057.
- [22] M. El-Sedik, S. A. Elmegied, T. Aysha, S. A. Mahmoud, *Egypt. J. Chem.* **2019**, *62*, 2253–2264. DOI: 10.21608/ejchem.2019.12976.1810.
- [23] C. Viegas-Junior, A. Danuello, V. da S. Bolzani, E. J. Barreiro, C. A. M. Fraga, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 1829–1852. DOI: 10.2174/092986707781058805.
- [24] C. A. M. Fraga, *Expert Opin. Drug Discov.* **2009**, *4*, 605–609. DOI: 10.1517/17460440902956636.
- [25] M. B. Viana, K. C. C. M. S. Cunha, G. Ramos, M. Murao, *J. Pediatr. (Rio. J.)* **2003**, *79*, 489–496. DOI: 10.2223/JPED.1108.
- [26] J. J. V. Cirino, P. Belletato, S. de O. Dantas, *Quim. Nova* **2005**, *28*, 30–36. DOI: 10.1590/S0100-40422005000100006.
- [27] L. K. Gediya, V. C. Njar, *Expert Opin. Drug Discov.* **2009**, *4*, 1099–1111. DOI: 10.1517/17460440903341705.
- [28] S. D. Cline, T. L. Macdonald, N. Osheroff, *Biochemistry* **1997**, *36*, 13095–13101. DOI: 10.1021/bi971770z.
- [29] L. Gate, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* **2007**, 1–2. DOI: 10.1016/B978-0-08055232-3.61272-3.
- [30] (a) WHO, *World Health Organization*, who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia (accedido em 09/10/2021); (b) *2020 Alzheimer's disease facts and figures, Alzheimer's Association Report* **2020**, *16*, 391–460. DOI: 10.1002/alz.12068.
- [31] I. Santana, F. Farinha, S. Freitas, V. Rodrigues, Á. Carvalho, *Acta Med. Port.* **2015**, *28*, 182–188. DOI: 10.20344/amp.6025.
- [32] R. Fleming, J. Zeisel, K. Bennet, *World Alzheimer Report 2020: Design Dignity Dementia: dementia-related design and the built environment*, Volume 1, Londres, Inglaterra: Alzheimer's Association International, **2020**. alzint.org/u/WorldAlzheimerReport2020Vol1.pdf.
- [33] Z. Breijeh, R. Karaman, *Molecules* **2020**, *25*, 5789. DOI: 10.3390/molecules25245789.
- [34] L. A. Craig, N. S. Hong, R. J. McDonald, *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2011**, *35*, 1397–1409. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.03.001.
- [35] Q. Li, H. Yang, Y. Chen, H. Sun, *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *132*, 294–309. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.03.062.
- [36] A. Martorana, Z. Esposito, G. Koch, *CNS Neurosci. Ther.* **2010**, *16*, 235–245. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00175.x.
- [37] A. J. Burke, C. S. Marques, "Catalytic Arylation Methods - From the Academic Lab to Industrial Processes", 1st Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2014**, ISBN 978-3-527-67270-7.
- [38] C. S. Marques, A. J. Burke, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 806–812. DOI: 10.1002/ejoc.201501399.
- [39] C. S. Marques, S. E. Lawrence, A. J. Burke, *Synlett* **2018**, *29*, 497–502. DOI: 10.1055/s-0036-1590940.
- [40] T. Ishiyama, M. Murata, N. Miyaoura, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7508–7510. DOI: 10.1021/jo00128a024.
- [41] M. Melchert, A. List, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 1489–1499. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.01.022.
- [42] J. Totobenazara, P. Bacalhau, A. A. S. Juan, C. S. Marques, L. Fernandes, A. Goth, A. T. Caldeira, R. Martins, A. J. Burke, *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 3580–3588. DOI: 10.1002/slct.201600932.
- [43] S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2696–2718. DOI: 10.1002/asia.201100432.
- [44] J. Totobenazara, A. J. Burke, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 2853–2859. DOI: 10.1016/j.tetlet.2015.03.136.
- [45] J. Hou, X. Liu, J. Shen, G. Zhao, P. G. Wang, *Expert Opin. Drug Discov.* **2012**, *7*, 489–501. DOI: 10.1517/17460441.2012.682725.
- [46] C. S. Marques, A. J. Burke, *ChemCatChem* **2016**, *8*, 3518–3526. DOI: 10.1002/cctc.201600901.
- [47] T. L. Pavlovska, R. G. Redkin, V. V. Lipson, D. V. Atamanuk, *Mol. Divers.* **2016**, *20*, 299–344. DOI: 10.1007/s11030-015-9629-8.
- [48] A. J. Boddy, J. A. Bull, *Org. Chem. Front.* **2021**, *8*, 1026–1084. DOI: 10.1039/d0qo01085e.
- [49] P. Brandão, C. S. Marques, E. P. Carreiro, M. Pineiro, A. J. Burke, *Chem. Rec.* **2021**, *21*, 924–1037. DOI: 10.1002/tcr.202000167.
- [50] B. Yu, D. Q. Yu, H. M. Liu, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 673–698. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.06.056.
- [51] C. S. Marques, Ó. López, D. Bagetta, E. P. Carreiro, S. Petralla, M. Bartolini, M. Hoffmann, S. Alcaro, B. Monti, M. L. Bolognesi, M. Decker, J. G. Fernández-Bolaños, A. J. Burke, *Bioorg. Chem.* **2020**, *98*, 103753. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103753.
- [52] C. S. Marques, P. McArdle, A. Erxleben, A. J. Burke, *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020*, 3622–3634. DOI: 10.1002/ejoc.202000334.
- [53] C. S. Marques, Ó. López, L. Leitzbach, J. G. Fernández-Bolaños, H. Stark, A. J. Burke, *Synthesis* **2022**, *54*, 4304–4319. DOI: 10.1055/s-0041-1737343.
- [54] S. Zhi, X. Ma, W. Zhang, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 7632–7650. DOI: 10.1039/C9OB00772E.
- [55] A. Dömling, W. Wang, K. Wang, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3083–3135. DOI: 10.1021/cr100233r.
- [56] J. Zhu, Q. Wang, M. Wang (Editors), *Multicomponent Reactions in Organic Synthesis*, **2015**, Wiley-VCH. DOI: 10.1002/9783527678174.
- [57] N. A. Petasis, I. Akritopoulou, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *34*, 583–586. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)61625-8.
- [58] N. R. Candias, F. Montalbano, P. M. S. D. Cal, P. M. P. Gois, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6169–6193. DOI: 10.1021/cr100108k.
- [59] P. Wu, M. Givskov, T. E. Nielsen, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 11245–11290. DOI: 10.1021/acs.chemrev.9b00214.
- [60] P. Brandão, C. Marques, E. Pinto, M. Pineiro, A. J. Burke, *New J. Chem.* **2021**, *45*, 14633–14649. DOI: 10.1039/D1NJ02079J.
- [61] (a) WHO, *World Health Organization*, who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1 (accedido em 15/11/2021). (b) J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, D. M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, F. Bray, *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789. DOI: 10.1002/ijc.33588.
- [62] Z. Xu, S. J. Zhao, Y. Liu, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*, 111700. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111700.
- [63] P. Dhokne, A. P. Sakla, N. Shankaraiah, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *216*, 113334. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113334.
- [64] R. E. Ferraz de Paiva, E. G. Vieira, D. Rodrigues da Silva, C. A. Wegermann, A. M. Costa Ferreira, *Front. Mol. Biosci.* **2021**, *7*, 1–24. DOI: 10.3389/fmolb.2020.627272.
- [65] G. J. Roth, R. Binder, F. Colbatzky, C. Dallinger, R. Schlenker-Herceg, F. Hilberg, S. L. Wollin, R. Kaiser, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1053–1063. DOI: 10.1021/jm501562a.
- [66] L. Q. M. Chow, S. G. Eckhardt, *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 884–896. DOI: 10.1200/JCO.2006.06.3602.
- [67] M. R. Ouad, M. A. Almeahmadi, N. Rezki, F. F. Al-blewi, M. Messali, I. Ali, *J. Mol. Struct.* **2019**, *1188*, 153–164. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.04.005.
- [68] P. Singh, P. Sharma, A. Anand, P. M. S. Bedi, T. Kaur, A. K. Saxena, V. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 455–461. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.06.057.
- [69] C. S. Marques, N. Busto, E. Gaudio, F. Bertoni, A. J. Burke, "Novel N-(1,2,3-triazolmethyl)isatin and N-(1,2,3-triazolmethyl)-3-hydroxy-3-aryloxindoles with cytotoxic and anti-tumor activity", Patente Europeia EP3400938 (A1), **2018**.

>

Anthony J. Burke

Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Centro de Química de Coimbra. LAQV-REQUIMTE - Universidade de Évora. Anthony J. Burke é Professor Associado com agregação na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Possui cerca de 150 publicações/comunicações/patentes. Coordenou vários projetos e supervisionou vários alunos. Possui uma lista considerável de publicações científicas na

área da descoberta de fármacos para a doença de Alzheimer e cancro e possui forte interesse na área de processos catalíticos sustentáveis. Fundou a empresa ChiraTecnic em 2009 e é o presidente do congresso bienal ISySyCat (*International Symposium on Synthesis and Catalysis*). É editor na *Open Chemistry* (De Gruyter) e *Fellow da Chemistry Europe*.
ajburke@ff.uc.pt
ORCID.org/0000-0001-8248-1116

>

***Carolina S. Marques**

Universidade de Évora, Instituto de Investigação e Formação Avançada. LAQV-REQUIMTE - Universidade de Évora. Carolina S. Marques é investigadora contratada DL57/2017 pela Universidade de Évora e membro integrado do LAQV-REQUIMTE - Universidade de Évora. O seu foco de trabalho centra-se na química medicinal e na descoberta de novas moléculas com potencial ati-

vidade farmacológica, nomeadamente em doenças do foro neurodegenerativo e cancro. O uso de metodologias de síntese sustentáveis e novos processos eficientes é a sua prioridade.
carolsmarq@uevora.pt
ORCID.org/0000-0003-1697-7871