

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMACIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Planejamento, síntese e avaliação da atividade antitumoral em linhagem MCF-7 de derivados benzisoxazois

FERNANDA NUNES VILANOVA

PORTO ALEGRE, 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMACIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Planejamento, síntese e avaliação da atividade antitumoral em linhagem MCF-7 de derivados benzisoxazóis

Dissertação apresentada por **Fernanda Nunes Vilanova**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Porto Alegre, 2021

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em nível de Mestrado Acadêmico, e aprovada em 16 de novembro de 2021 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Dione Silva Correa
Universidade Luterana do Brasil

Profa. Dra. Marcela Silva Lopes
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Vera Lucia Eifler Lima
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Vilanova, Fernanda Nunes
Planejamento, síntese e avaliação da atividade
antitumoral em linhagem MCF-7 de derivados
benzissoxazóis / Fernanda Nunes Vilanova. -- 2021.
121 f.
Orientadora: Simone Cristina Baggio Gnoatto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2021.

1. 1,2-Benzisoxazol. 2. Receptor de estrogênio. 3.
Reação de Barbier-Grignard. I. Gnoatto, Simone
Cristina Baggio, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica (LaFiS), com colaboração do Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC). Ambos são localizados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na cidade de Porto Alegre. O apoio financeiro foi realizado através de bolsa de estudos concedida pela CAPES entre os meses de abril de 2019 e julho de 2021.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto pela orientação, disponibilidade, conhecimentos compartilhados, paciência, conversas e amizade. Obrigada por me receber em seu grupo de pesquisa e pela confiança. Eterna admiração pela sua competência, forma de viver e observar a vida.

Aos grandes amigos científicos Samuel Santos, Jéssica Gotardi, Thais Helena M. Fernandes e Debora Renz por todo apoio, conhecimentos compartilhados, risadas, ensinamentos e longas conversas durante todo esse desafio. Para tentar expressar todo meu carinho e sentimento por vocês, mencionarei um grande cientista: “Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com vocês” (C. Sagan). Obrigada por tudo.

Às minhas amigas Renata Colatto, Elisa Pereira, Mariah Assis Brasil, Carolyne Mercedes, Lina Crespo e Marília Bento, por estarem comigo em todos os momentos, sempre ressignificando o sentido da vida. *You make me happy when skies are gray*. Amo vocês.

Ao Diego Defferrari pelo auxílio no projeto, ideias e conhecimentos compartilhados e amizade.

Aos colegas do LaFis pela parceria e por tornar a nossa exaustiva rotina de um laboratório de síntese muito mais leve.

Ao professor Dr. Diogo André Pilger e Camila Mariot pelos ensaios biológicos e seminários pandêmicos por vídeo chamada.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS e a CAPES.

À minha mãe Fatima Nunes, meu irmão Fabricio Vilanova, minha tia Fabiani Vilanova e meu pai (*in memoriam*), grata por sempre me incentivarem a lutar pelos meus objetivos.

Aos cientistas brasileiros que são fontes de resiliência e inspiração diária.

RESUMO

O carcinoma mamário é a doença com maior mortalidade entre mulheres no mundo. A necessidade de tratamentos mais eficazes com menos efeitos colaterais tem incentivado a pesquisa de fármacos mais potentes e seletivos. O planejamento lógico de fármacos implica na criação e alteração de compostos visando alcançar resultados farmacologicamente relevantes. Essa abordagem envolve a identificação de substratos e substituintes com base na estrutura do alvo molecular, com foco em compostos heterocíclicos, como o núcleo 1,2-benzisoxazol, que desempenham um papel essencial no desenvolvimento de novos medicamentos e na melhoria das propriedades farmacêuticas. Este núcleo é valorizado por sua versatilidade estrutural e tem sido estudado em relação à atividade antitumoral, agindo como agonista de RE β com efeito antiproliferativo. Dessa forma, o presente estudo identificou, através de testes *in silico*, possível ação em receptores de estrogênio (alvo importante utilizado em terapias hormônio dependente). A rota sintética utilizada para a ciclização desse núcleo foi uma reação do tipo Barbier-Grignard. Os perfis de predição farmacocinético e de alvo biológico de 19 estruturas foram consideradas satisfatórias quanto aos parâmetros *druglikeness* e farmacocinéticos, entre elas 12 estruturas foram filtradas por *docking* para as quais foi estabelecido protocolo de síntese. Todos os intermediários de reação foram sintetizados e otimizados. A ciclização, etapa final, via reação tipo Barbier-Grignard se mostrou eficiente para obtenção de estruturas simples como 3-fenil-1,2-benzisoxazol (81 % de rendimento) e não demonstrou o desempenho esperado quando o meio reacional possui reagentes com substituintes mais complexos, sendo eles importantes para buscar aumento de interação do composto planejado com receptores fisiológicos, via acepção/doação de ligação de hidrogênio. Portanto, o trabalho apresenta uma promissora síntese convergente de ciclos 1,2-Benzisoxazol. Contudo, ainda se faz necessária a otimização das condições reacionais deste protocolo, visto que estruturas mais complexas acabam inviabilizando a ciclização do núcleo em compostos com maior grau de substituição. Para o 1,2-benzisoxazol avaliado quanto a viabilidade celular em MCF-7, não houve citotoxicidade até 100 μ M.

Palavras-chaves: 1,2-Benzisoxazol; Receptor de estrogênio; Reação de Barbier-Grignard.

ABSTRACT

Breast cancer has highest mortality rate disease in women all over the world. The mortality's high rate and side effects associated with treatment generate a great effort on search for new molecules, with a more potent profile, selective, and security, aiming for treatment improvement. In this scenario, the drug's rational design is an essential tool to develop, identify, and plan chemical modifications to obtain more potent compounds. Once a biological target is defined, it is possible to screen a vast diversity of substrates and ligands through similarity drug design, based on approved treatments and proposing structure modifications, aiming for better interaction with the receptor. Heterocyclic compounds are the most frequently observed fragments in approved drugs; thus, they can participate in several biochemical reactions through intermolecular interactions, being essential in the development of new drugs and/or to the refinement of druglikeness and pharmacokinetics properties. The 1,2-benzisoxazol scaffold is a privileged structure, due to its versatile sites to structural modifications and it is present in antitumoral activity with antiproliferative via RE β agonist studies. Thus, the present study identified, through in silico tests, possible action in estrogen receptors (an important target used in hormone-dependent therapies). The synthetic route used for cyclization of this scaffold was a Barbier-Grignard like reaction. Pharmacokinetics profile prediction and biological target of 19 structures were considered satisfactory in druglikeness and pharmacokinetics parameters, between them, 12 structures were filtered by docking and established synthesis protocol. All reaction intermediaries were synthesized and optimized. The cyclization via Barbier-Grignard-like reaction show efficacy for simple structures (81% yield) and do not have the expected performance when the reaction media has more complex fragments, being them important to seek for an increase of interaction between the compound and physiological receptors, by acceptor/donor of hydrogen bonds. Therefore, this research presents a promising convergent synthesis of 1,2-benzisoxazole cycles. However, the optimization of the reaction conditions in this protocol remains necessary, given that more complex structures ultimately hinder the cyclization of the core into compounds with a higher degree of substitution. For the 1,2-benzisoxazole assessed for cellular viability in MCF-7, no cytotoxicity was observed up to 100 μ M.

Keywords: 1,2-Benzisoxazole; Estrogen Receptor; Barbier-Grignard-type reaction

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de 1,2-benzisoxazol.....	24
Figura 2. Estrutura do 17 β -estradiol.....	28
Figura 3. Estrutura dos princípios ativos de fármacos utilizados na hormonioterapia: Tamoxifeno (3), Raloxifeno (4), Fulvestranto (5), Letrozol (6) e Anastrozol (7).....	30
Figura 4. Estrutura de 3-(4-(4-fenoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzo[d]isoxazol (8).	32
Figura 5. Estruturas derivadas de 6-fluor-3-(4-piperidinil)-1,2-benzisoxazol (9) e os melhores substituintes determinados a partir dos resultados no estudo de REA.....	33
Figura 6. Scaffold de um benzisoxazol difenólico (10); Genesteína (11); (IV), (V) e (VI) Derivados benzisoxazol difenólico (12); Prinaberel (13).	34
Figura 7. Fragmentos para planejamento de fármacos anticâncer de mama.	42
Figura 8. Identificação das estruturas utilizadas como controle positivo.	44
Figura 9. Modelo esquemático das estratégias utilizadas para o planejamento de fármacos.....	55
Figura 10. Estrutura genérica para o esqueleto 1,2-benzisoxazol com as posições de substituição avaliadas no estudo de predição molecular.	56
Figura 11. Resultado de SwissTargetPrediction para probabilidade de interação com alvos fisiológicos.	56
Figura 12. Estruturas aprovadas na triagem por predição que serão utilizadas no estudo de docking.	58
Figura 13. Ranking de interação com a proteína cristalografada de RE α - 5FQP.....	59
Figura 14. Interações de SERMs no RE α (17 β -estradiol 2 em amarelo). (A) Sobreposição de 41 em 2; (B) Sobreposição de 40 e 4 em 2; (C) Sobreposição de 3 em 10; (D) Sobreposição de 39 em 10.....	61
Figura 15. Interações de 1,2-Benzisoxazois no RE α (17 β -estradiol 2 em amarelo. (A) Sobreposição de 63a em 2; (B) Sobreposição de 63e e 2; (C) Sobreposição de 62e e 2; (D) Sobreposição de 62e e 2.....	63
Figura 16. Ranking de interação com a proteína cristalografada de Re β – 2JJ3.....	64
Figura 17. Interações de 1,2-Benzisoxazois no RE β (17 β -estradiol 2 em amarelo). (A) Sobreposição de 37 em 2; (B) Sobreposição de 62f e 2; (C) Sobreposição de 63e e 2; (D) Sobreposição de 41 e 2.....	66

Figura 18. Interações de agonistas seletivos e derivados 1,2-Benzisoxazois em Estradiol (amarelo) no RE β . (A) Sobreposição de 44 em 2; (B) Sobreposição de 13 em 2; (C) Sobreposição de 62c em 2; (D) Sobreposição de 64b em 2.....	67
Figura 19. Espectro de RMN ^1H de 2-hidroxibenzaldeído (46). Região ampliada de 6 a 12 ppm do salicilaldeído.	71
Figura 21. Sobreposição dos espectros ampliados de RMN ^1H na faixa de 5 a 12 ppm do 2-hidroxibenzaldeído (vermelho) e da 2-hidroxibenzonitrila (azul).....	73
Figura 22. Espectro ampliado de ^{13}C da 2-hidroxibenzonitrila.	73
Figura 23. Sobreposição dos espectros de RMN ^1H do salicilaldeído (vermelho) e do produto obtido após a desproteção seletiva (azul).	76
Figura 24. Espectro da 2-cloro- <i>N,N</i> -di-isopropilacetamida.	78
Figura 25. Espectro da FV014 em CDCl_3 (Bruker, 400 MHz).	79
Figura 26. Sobreposição dos espectros da amida (vermelho) e da respectiva amina (azul), após a reação de redução.	81
Figura 27. Espectros de ^1H (preto) e ^{13}C (azul) do fenilbenzisoxazol e de ^{13}C da salicilnitrila (marrom).....	83
Figura 28. Espectro de ^1H do produto isolado na reação de Grignard.	86
Figura 29. Espectro de massas do produto majoritário isolado.	87
Figura 30. Dímero proposto como produto da reação.	87
Figura 31. Contagem de células de MCF-7, após 48 h do tratamento com 37.....	88

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Principais rotas sintéticas para obtenção de 1,2-Benzisoxazol.....	34
Esquema 2. Obtenção de 1,2-benzisoxazois através da ciclização de aldeídos ou cetonas.....	35
Esquema 3. Fatores estéricos e eletrônicos em óxidos de fenilnitrila.	36
Esquema 4. Obtenção de 1,2-benzisoxazois via adição intramolecular [4 + 1].....	37
Esquema 5. Proposta de mecanismo utilizando reação de Grignard-Barbier para obtenção de 1,2-benzisoxazois.	38
Esquema 6. Retrossíntese da obtenção de Benzisoxazol via reação tipo Barbier-Grignard.	45
Esquema 7. Análise retrossintética generalizada para a obtenção dos compostos de interesse.....	70
Esquema 8. Obtenção de salicilonitrilas a partir de aldeídos salicílicos. Via formação de iminas (Superior) e via formação de oximas (Inferior).....	72
Esquema 9. Estratégias de proteção das hidroxilas do 2,3,4-tri-hidroxibenzaldeído utilizadas.	74
Esquema 10. Proposta de mecanismo para desproteção seletiva.	75
Esquema 11. Esquema de obtenção das amidas N,N-dissubstituídas e os respectivos rendimentos observados.	77
Esquema 12. Reação de Williamson para síntese dos 4-bromofenóis alquilados. ...	78
Esquema 13. Esquema genérico de obtenção das amidas por rota <i>one-pot</i>	80
Esquema 14. Aminas obtidas através da reação de redução com LiAlH ₄	81
Esquema 15. Reação de obtenção do benzisoxazol.....	82
Esquema 16. Reação de Grignard em derivados 4-bromofenóxi com acetamidas...84	
Esquema 17. Reação de Grignard em derivados 4-bromofenóxi com aminas.	85
Esquema 18. Reagente de grignard em reação 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina..	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila.
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDI	1,1'-carbonildiimidazol
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
ACN	Acetonitrila
TBAF	Fluoreto de tetra-n-butilamônio
CYP450	Citocromo P450
Dppf	1,1'-Bis(diphenylphosphino)ferrocene
E2	7β-estradiol
Et ₂ O	Éter etílico
Hex	Hexano
LBD	Sítio de ligação – em inglês: <i>Ligand Binding Domain</i>
PA	Padrão Analítico
S _N 2	Substituição Nucleofílica Bimolecular.
SERMs	Modulador seletivo do receptor de estrogênio, do inglês <i>selective estrogen receptor modulator</i> .
t-AmOH	t-amil álcool
TBHP	hidroperóxido de terc-butila
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
REA	Relação Estrutura-Atividade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. REFERENCIAL TEÓRICO	27
3.1. Carcinoma mamário	27
3.2. Receptores de estrogênio	27
3.2.1. O Receptor de Estrogênio α	28
3.2.2. O receptor de estrogênio β	29
3.3. Tratamentos com alvo em RE	30
3.4. Compostos heterocíclicos e 1,2-benzisoxazois.....	30
3.5. Compostos 1,2-Benzisoxazolicos e atividades biológicas.....	31
3.5.1. Compostos 1,2-Benzisoxazolicos e atividade antitumoral	31
3.6. Métodos de obtenção do núcleo 1,2-benzisoxazol	34
3.7. Planejamento de fármacos.....	38
4. PARTE EXPERIMENTAL	41
4.1. Materiais e métodos	41
4.2. Planejamento de potenciais antitumorais para o tratamento de cânceres dependentes de estrogênio	41
4.2.1. Abordagem via scaffold endógeno e fragmentos.....	41
4.2.2. Planejamento in silico e viabilidade sintética	42
4.2.3. Docking molecular	44
4.2.4. Viabilidade sintética	45
4.3. Síntese de potenciais antitumorais dependentes de estrogênio	45
4.3.1. Síntese do salicilaldeído (46).....	45

4.3.2.	Síntese da 2-hidroxibenzonitrila (33).....	46
4.3.3.	Síntese dos intermediários para estrutura final 62a e 63a	46
4.3.3.1.	Síntese da 2-cloro-1-morfolinoetan-1-ona (48a)	46
4.3.3.2.	Síntese da 2-(4-bromofenoxi)-1-morfolinaetanona (51a)	47
4.3.3.3.	Síntese da 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina (53a)	47
4.3.4.	Síntese dos intermediários para as estruturas finais 62c e 63c	47
4.3.4.1.	Síntese da 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etan-1-ona (48b)	47
4.3.4.2.	Síntese da 2-(4-bromofenoxi)-1-(pirrolidin-1-il)etan-1-ona (51b).....	48
4.3.4.3.	Síntese da 1-(2-(4-bromofenoxi)etil)pirrolidina (53b)	48
4.3.5.	Síntese dos intermediários para as estruturas finais 62e e 63e	49
4.3.5.1.	Síntese da 2-cloro-1-(4-metilpiperazin-1-il)eta-1-ona (48c)	49
4.3.5.2.	Síntese da 2-(4-bromofenoxi)-1-(4-metilpiperazin-1-il)etan-1-ona (51c)	49
4.3.5.3.	Síntese da 1-(2-(4-bromofenoxi)etil)-4metilpiperazina (53c).....	49
4.3.5.4.	Síntese da 2-cloro-N,N-diisopropilacetamida (48d)	50
4.3.5.5.	Síntese da N,N-diisopropil-2-fenoxiacetamida (51d).....	50
4.3.5.6.	Síntese da N-(2-(4-bromofenoxi)etil)-N-isopropilpropan-2-amina (53d)	50
4.3.5.7.	Obtenção de 51a : Otimização via one-pot	51
4.3.6.	Síntese dos intermediários para as estruturas finais 61 , 64a e 64b	51
4.3.6.1.	Síntese do 3,4-bis(benziloxi)-2-hidroxibenzaldeído (54)	51
4.3.6.2.	Síntese do 3-fenil-1,2-benzisoxazol (37) e derivados	52
4.3.6.3.	Avaliação biológica do 3-fenil-1,2-benzisoxazol e derivados	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	Resultados do planejamento de fármacos.....	55
5.2.	Planejamento sintético para elaboração das estruturas	70
5.2.1.	Obtenção do aldeído salicílico (46)	70
5.2.2.	Obtenção da 2-hidroxibenzonitrila (33)	71
5.2.3.	Proteção e desproteção seletiva do 2,3,4-tri-hidroxibenzaldeído (55) .	74

5.2.4.	Síntese dos haletos precursores da reação tipo Barbier-Grignard.	76
5.2.4.1.	Síntese das 2-cloroacetamidas-N,N-dissubstituídas.	77
5.2.4.2.	Reações de substituição entre 4-bromofenol com as 2-cloroacetamidas-N,N-dissubstituídas.	78
5.2.4.3.	Reação one-pot para obtenção das 4-bromofenoxiacetamidas-N,N-dissubstituídas.	80
5.2.4.4.	Reações redução para a formação de aminas terciárias.....	80
5.2.5.	Reações de adição e ciclização (Grignard-Barbier) para a formação dos benzisoxazóis.....	82
5.2.6.	Tentativa de obtenção dos compostos benzisoxazóis finais.	84
5.3.	Resultados da avaliação de viabilidade celular.....	88
6.	CONCLUSÕES GERAIS	89
7.	PERSPECTIVAS	91
8.	REFERÊNCIAS	93
9.	ANEXO	101

1. INTRODUÇÃO

Por ser a doença que incide no maior número de mortes entre as mulheres, o câncer de mama causa um forte movimento de pesquisa e desenvolvimento de fármacos na busca de tratamentos mais eficazes, visando o aumento de potência/seletividade, diminuição da resistência e efeitos colaterais. Partindo desse pressuposto, novas estruturas com potencial ação em Receptores de Estrogênio (RE) são necessárias, pois 70% dos casos de câncer de mama são do tipo que expressam nesse receptor, logo a modulação do 17 β -estradiol, em efeitos estrogênicos e antiestrogênicos, mostra-se uma via de tratamento fundamental e em constante melhoria (CHEN, S., 2011; SUNG *et al.*, 2021).

Os moduladores de receptor de estrogênio (SERMs - *selective estrogen receptor modulator*), idealmente, apresentam um efeito antagonista em receptores nas glândulas mamárias e endométrio, mas também um efeito agonista nos sistemas que se beneficiam dos efeitos do estrogênio (FERREIRA ALMEIDA *et al.*, 2020).

Uma maneira de abordar tal idealidade é explorar as duas isoformas deste receptor, pois apesar de semelhantes, possuem propriedades e papéis distintos. O RE α é o maior alvo das terapias de SERMs, através de ação antagonista ao receptor, por ser mais expresso em células tumorais hormônio-dependentes (LIU; MA; YAO, 2020). O RE β , também é expresso em tecidos uterinos e mamários, mas não é o receptor de estrogênio dominante, tornando-o um interessante alvo de terapias endócrinas. A isoforma RE β possui um papel inibidor nas glândulas mamárias e endométrio (efeito antagonista), com o efeito protetivo no sistema cardiovascular, imune e sistema nervoso central (efeito agonista) e efeito antiproliferativo, na sua expressão basal, em algumas linhagens de tumorais (BHARATHKUMAR *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2006).

Os tratamentos via SERMs também apresentam efeitos colaterais, pois o efeito antagonista que não estimula o crescimento de células do carcinoma, também bloqueia a síntese e as sinalizações mediadas por esse esteroide, sendo algumas delas importantes na prevenção de osteoporose, doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade. Além disso, em alguns casos, o uso é limitado por resistências e aumento de casos de câncer no endométrio (FERREIRA ALMEIDA *et al.*, 2020). Os

efeitos colaterais devem ser minimizados sempre que possível, pois impactam na adesão ao tratamento e qualidade de vida do paciente.

À vista disso, é evidente a importância do planejamento racional de fármacos na descoberta de novas estruturas, pois a partir da enfermidade, detecta o alvo biológico e sua cascata de sinalização, assim projeta a melhor forma de interação com o sítio alvo, a partir de diversas ferramentas e estratégias, sendo essas estratégias fluídas em relação a proposta de estrutura, análise de desempenho e refino das estruturas propostas (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009).

Entendendo a necessidade de estratégias multidisciplinares na busca de novas entidades químicas para tratamento do câncer de mama RE+(estrogênio-dependente), nosso trabalho visa contribuir com novas estruturas para potencial ação nos REs. Para isso utilizamos como esqueleto-base a classe química 1,2-benzisoxazol com derivados substituídos na posição 3 (**1**), observado na Figura 1, considerado um promissor *scaffold* na busca de novas moléculas.

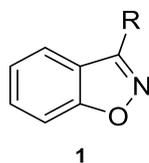


Figura 1. Estrutura de 1,2-benzisoxazol.

Em análise prévia por programas de predição de alvo biológico, foi constatado a probabilidade de interação com RE α e RE β . Os fragmentos propostos na modificação estrutural desse esqueleto foram baseados nas estruturas de ligantes SERMs conhecidos e aprovados ou em aprovação pelo FDA. As estruturas propostas foram triadas via ferramenta de predição de propriedades farmacocinéticas, viabilidade sintética e, finalmente uso de *docking* molecular para verificar a interação com duas isoformas de receptores de estrogênio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Planejar, sintetizar via reação tipo Barbier-Grignard e avaliar a atividade antitumoral em células MCF-7 de derivados 1,2-bem/zisoxazólicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Planejar as estruturas utilizando estratégias de planejamento racional de fármacos e ferramentas de predição;
- Refinar a quantidade de compostos a serem sintetizados via *docking* molecular em receptores de estrogênio;
- Padronizar protocolos de obtenção de 2-hidroxibenzonitrila;
- Sintetizar e otimizar a obtenção de intermediários reacionais;
- Viabilizar o protocolo de obtenção de derivados 1,2-benzisoxazol via reação de Barbier-Grignard;
- Avaliar a interferência na viabilidade celular de células MCF-7 dos 1,2-benzisoxazóis obtidos.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Carcinoma mamário

O câncer, uma designação abrangente para uma série de enfermidades associadas a células mutadas do organismo, é um crescente problema de saúde pública mundial. No ano de 2020, a escala dos novos casos de câncer globalmente atingiu aproximadamente 19,3 milhões, com um destaque notável: o câncer de mama ultrapassou o câncer de pulmão em diagnósticos, registrando 2,3 milhões de novas ocorrências (11,7%) (SUNG *et al.*, 2021).

O carcinoma mamário é a doença que incide no maior número de morte entre as mulheres (684.996 mortes, 6,9%) (SUNG *et al.*, 2021). Os carcinomas de mamas podem ser categorizados em variados subtipos, incluindo aqueles com receptor de progesterona positivo (PR), câncer de mama receptor do fator de crescimento epitelial humano positivo (HER2 – *human epidermal growth factor receptor 2*) e os que têm superexpressão de receptor de estrogênio (RE+), como luminal A, luminal B, HER2+ e basal-símile. Apesar da diversidade desses subtipos, a predominância dos carcinomas mamaros se concentra naqueles que expressam receptores de estrogênio, sendo esses responsáveis por cerca de 70% dos casos (CHEN, S., 2011).

3.2. Receptores de estrogênio

O Receptor de Estrogênio (RE), quando influenciado pelo 17 β -estradiol (Figura 2), no câncer de mama e em algumas doenças como tromboembolismo e câncer endometrial, sendo um alvo de terapia em células tumorais muito utilizado.

Antagonistas de RE diminuem o desenvolvimento dessas doenças, pois podem reduzir o tamanho do tumor antes de intervenção cirúrgica ou, alternativamente, podem ser usados após a cirurgia para mitigar o risco de reincidência. Entretanto, é importante reconhecer que certos tecidos se beneficiam da presença de estrogênio, como o sistema cardiovascular, musculatura esquelética e sistema nervoso central (SNC). A ausência de estrogênio pode acarretar em efeitos nocivos, como efeitos na coagulação sanguínea, nas lipoproteínas plasmáticas, sintomas associados à menopausa, como incidência de ondas de calor e aumento da reabsorção óssea com desenvolvimento de osteoporose, entre outras implicações (ASCENZI; BOCEDI; MARINO, 2006).

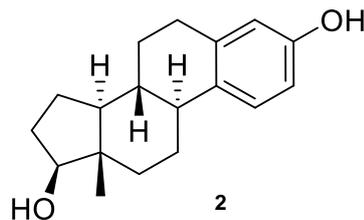


Figura 2. Estrutura do 17 β -estradiol.

Os receptores de estrogênio pertencem à família dos receptores nucleares (RN) de fatores de transcrição e possuem duas isoformas: RE α e RE β , que apresentam alto grau de homologia de sequência e afinidades ao 17 β -estradiol.

Embora similares, essas isoformas não são idênticas possuindo tamanhos e propriedades distintas, conseqüentemente, a interação no LBD (sítio de ligação – em inglês: *Ligand Binding Domain*) e seus papéis são diferentes dentro das terapias hormonais, conforme observado na Tabela 1.

Tabela 1. Diferença entre as isoformas de receptores de estrogênio.

Isoforma	Principais aminoácidos que interagem no LBD	Maior expressão
RE α	Ala350, Asp351, Glu353, Trp383, Leu384, Arg 394, Phe404, Met421, His524 e Leu525	Glândula mamária, ossos, útero, hipófise, tecido adiposo, preservação do músculo esquelético, regulação de metabolismo.
RE β	Glu305, Met336, Arg346, Phe356, Ile373, Phe377, His475 e Leu476.	Sistema nervoso e imunológico rins, glândula mamária, bexiga, ovário, cérebro, ossos, pulmão, coração, próstata, mucosa intestinal e cólon.

3.2.1. O Receptor de Estrogênio α

O Receptor de Estrogênio α (RE α), inicialmente isolado em 1985 da linhagem celular MCF-7, é codificado pelo gene *ESR1*. Com peso molecular de 66kDa, sua sequência abrange 595 aminoácidos, ocupando um volume total de 310 Å³. Os aminoácidos mais importantes para interação com 17 β -estradiol são Leu384 e Met421 (GREEN *et al.*, 1986). Esta isoforma detém sua maior expressão em células tumorais de câncer hormônio dependente, como câncer de mama, endométrio e

ovários, onde aumenta a progressão da doença através de sinalizações como regulação de PI3k/AKT. Além disso, RE α também contribui na progressão do câncer de próstata, por sua superexpressão, atua como oncogene ao induzir transição epitélio-mesenquimal e ativação de metaloproteínas(LIU; MA; YAO, 2020).

Entretanto, RE α também possui papel significativo na prevenção da osteoporose, obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes. Também mantém o fenótipo luminal, assim o tratamento segue sensível à terapia hormonal (HASSON *et al.*, 2014). Portanto, é notório que a regulação do RE α é uma complexa interação, dado seu papel bifacetado (FERREIRA ALMEIDA *et al.*, 2020; LIU; MA; YAO, 2020).

3.2.2. O receptor de estrogênio β

O Receptor de Estrogênio β (RE β), cujo primeiro clone foi obtido em 1996 através da linhagem de próstata de rato, é codificado pelo gene *ESR2*. Com peso molecular de 59KDa, sua sequência contém 530 aminoácidos, ocupando um volume total de 264 Å³. Os aminoácidos mais importantes para interação de E2 são Met336 e Ile373. A expressão predominante ocorre nos tecidos prostáticos (epitélio), bexiga, ovário (células granulosas), cólon, tecido adiposo e sistema imunológico (CHANG *et al.*, 2006; PATERNI *et al.*, 2014).

No caso de carcinomas mamários RE+, é comum que a ativação seja mediada pelo RE α , responsável pelo aumento da proliferação celular. No entanto, essa ativação é neutralizada pela ação de RE β , que desempenha um efeito antiproliferativo. A expressão de RE β tem a capacidade de modular genes relacionados com a progressão de ciclo celular, como já observado por Wang e colaboradores (WANG *et al.*, 2006), onde a simples expressão dos RE β reduziu a taxa basal de crescimento de células MCF-7 independentemente da ligação do estrogênio (CHANG *et al.*, 2006).

Isso ressalta a promissora perspectiva de agonistas seletivos RE β , pois o fato de RE β não ser o receptor de estrogênio dominante, mas ser expresso em tecidos uterinos e mamários, induz a concluir que esta isoforma é um alvo interessante para interação com novos fármacos (MALAMAS *et al.*, 2004). O RE β desempenha um papel inibidor nas glândulas mamárias e no endométrio (representando um efeito antagonista indireto ao RE α), ao mesmo tempo em que oferece proteção nos sistemas cardiovascular, imunológico e nervoso central (operando como um agonista do RE β) (BHARATHKUMAR *et al.*, 2015).

3.3. Tratamentos com alvo em RE

A hormonioterapia é amplamente utilizada através do uso do tratamento por SERMs, como Tamoxifeno (3) e Raloxifeno (4), antagonistas do receptor de estrogênio (SERDs – *selective estrogen receptor down-regulators*), como Fluvestranto (5) e inibidores da aromatase (IA), como Letrozol (6) e Anastrozol (7), observados na Figura 3. Os diferentes fármacos utilizados nessa terapia também podem ser associados entre si, tal como o uso dos IAs analogamente ao tratamento com SERMs, assim minimizando a quantidade de estrogênio remanescente. Assim, observa-se uma constante busca por moléculas ativas e seletivas, para a obtenção de medicamentos mais eficazes com minimização de efeitos colaterais (FERREIRA ALMEIDA *et al.*, 2020). Desta forma, busca-se que um fármaco SERMs, idealmente, tenha um efeito antagonista em receptores nas glândulas mamárias e endométrio e um efeito agonista nos sistemas que se beneficiam dos efeitos do estrogênio (FERREIRA ALMEIDA *et al.*, 2020; PATERNI *et al.*, 2014).

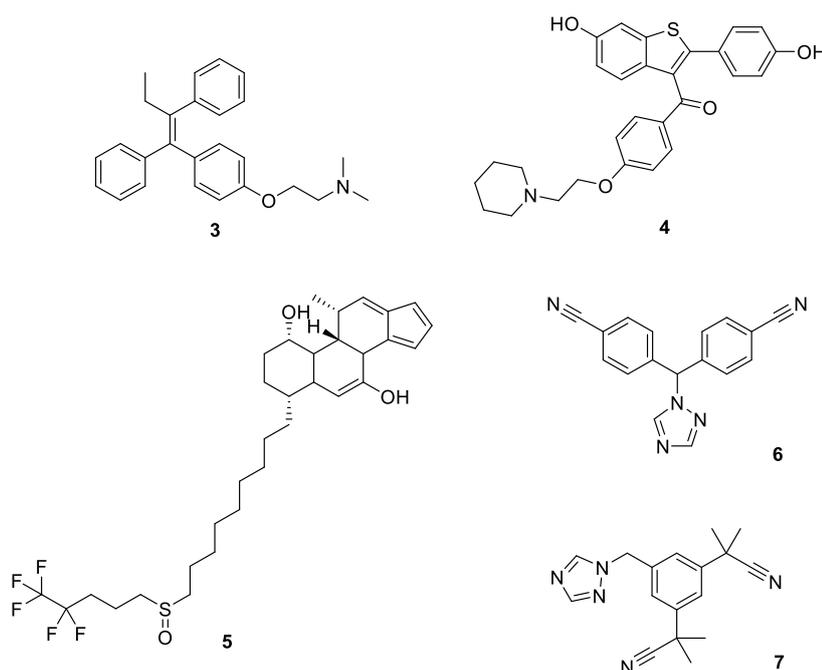


Figura 3. Estrutura dos princípios ativos de fármacos utilizados na hormonioterapia: Tamoxifeno (3), Raloxifeno (4), Fulvestranto (5), Letrozol (6) e Anastrozol (7).

3.4. Compostos heterocíclicos e 1,2-benzisoxazóis

Dentre a gama de fármacos utilizados como moduladores/reguladores de RE, os compostos heterocíclicos se destacam por desempenharem funções importantes na química medicinal, visto que são a classe química mais observada nas estruturas

de moléculas bioativas e por servirem como modelo para desenvolvimento de agentes terapêuticos com propriedades únicas (NEWSOME *et al.*, 2013; SHASTRI, 2016).

Neste contexto, os benzisoxazóis são uma das peças mais importantes na descoberta de novos fármacos devido à variedade de resultados positivos nos *screenings* de atividades biológicas, quando comparados aos demais heterocíclicos (UTO, 2016).

3.5. Compostos 1,2-Benzisoxazólicos e atividades biológicas

Eles possuem uma estrutura molecular com propriedades de ligações versáteis, providas de ligantes seletivos e potentes para uma gama de alvos biológicos (RAKESH *et al.*, 2017). Esse núcleo, muito usado como bioisómero de outros heterociclos, tem papel importante tanto em fármacos já aprovados (FDA) e usados na clínica, como é um promissor *scaffold* na busca de novos fármacos (LALUT *et al.*, 2020; MEGENS; KENNIS, 1996; RAKESH *et al.*, 2017).

Um exemplo importante de fármaco pertencente a essa classe de compostos é a Risperidona (Risperdal; Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ). Fármaco que foi desenvolvido através de planejamento racional pela substituição de uma porção benzoíla na estrutura inicial por uma porção benzisoxazol, aumentando a seletividade da atividade antagonista de 5HT₂ e diminuindo a toxicidade, comparativamente aos análogos obtidos inicialmente (MEGENS; KENNIS, 1996). Além do antagonismo no SNC, são observados estudos utilizando benzisoxazóis como antitumorais (KARANDIKAR *et al.*, 2018; RAJASHEKAR REDDY *et al.*, 2016), antimicrobianos (BHARATHKUMAR *et al.*, 2015; KUMBHARE; INGLE, 2009; LAMANI *et al.*, 2009; PRIYA *et al.*, 2005; PUNATKAR; WANARE; JUGADE, 2016; SHASTRI; VARUDKAR, 2009), anticonvulsivantes (Zonisamide) (LEPPIK, 2004; UNO *et al.*, 1979), antioxidantes (KUMARA; CHANNE GOWDA, 2017), entre outros (NUHRICH *et al.*, 1996; RANGAPPA; BASAPPA, 2005; UTO, 2016).

3.5.1. Compostos 1,2-Benzisoxazólicos e atividade antitumoral

Embora os benzisoxazóis sejam uma classe interessante e promissora para diversas atividades biológicas, ainda não existem fármacos antitumorais desta classe. No entanto, já existem estudos conforme apresentados a seguir:

Nanjundaswamy Ashwini *et al.* (2015) desenvolveram uma série de 1,2-benzisoxazol 3-substituído com derivados 1,2,3-triazol com potencial antitumoral

contra Leucemia Mieloide Aguda (LMA). Dentro dessa série de compostos, destaca-se o 3-(4-(4-fenoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzo[d]isoxazol (**8**), como ilustrado na Figura 4, que exibiu uma proeminente atividade antiproliferativa em três tipos de linhagens celulares de LMA: MOLM13, MOLM14 e MV4-11, apresentando IC₅₀ de 1 µM, 2 µM e 2,5 µM, respectivamente, após 96h de tratamento, por ensaio de MTT. Além disso, a via de morte celular por apoptose foi confirmada por meio de ensaio com anexina combinado com iodeto de propídio. Apesar de apresentar citotoxicidade em linhagens de LMA, **8** mostrou-se relativamente seletivo quando testado em células C57BL/6 (controle de células saudáveis da medula óssea), pois não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 5 µM e 10 µM (ASHWINI *et al.*, 2015).

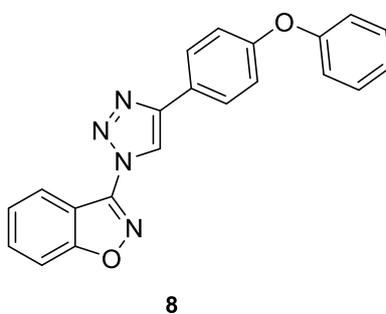


Figura 4. Estrutura de 3-(4-(4-fenoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzo[d]isoxazol (**8**).

Benaka Prasad *et al.* (2009) desenvolveram estudo de relação estrutura-atividade (REA) em derivados 6-fluor-3-(4-piperidinil)-1,2-benzisoxazol (**9**) com intuito de avaliar o efeito antiproliferativo em linhagens de fibroblastos humanos e células de carcinomas, como câncer cervical (HeLa), câncer de cólon (HT-29), câncer de mama (MCF-7) e câncer de fígado (HepG-2), através do ensaio de MTT, na concentração de 100 µM (Figura 4). Neste estudo, foi observado a importância do anel aromático e da porção heterocíclica para o manter a atividade antitumoral. Ficou evidente também a importância das substituições no anel aromático com átomos retiradores de elétrons por efeito indutivo, tais como flúor, cloro e bromo, os quais apresentaram maior percentual de atividade, crescendo proporcionalmente à eletronegatividade do átomo. A introdução de substituintes R na posição 3 do anel heterocíclico, como pirrolidina (**9-I**), morfolina (**9-II**) e *O*-difluorfenil (**9-III**) resultou em inibições da viabilidade celular de 37 %, 39 % e 42 %, respectivamente. Para a pirrolidina e morfolina o aumento é atribuído a basicidade dos anéis e o *O*-difluorfenil é atribuído a sua posição não

convencional, pois com a mudança da posição de um dos átomos, a atividade cai drasticamente (BENAKA PRASAD *et al.*, 2009).

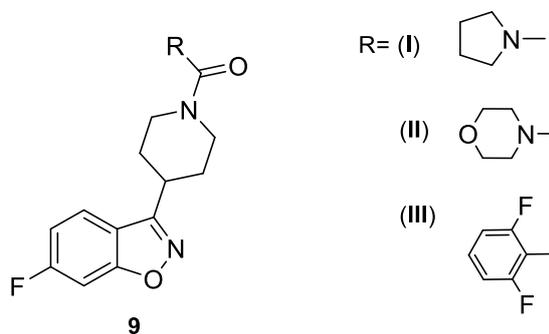


Figura 5. Estruturas derivadas de 6-fluor-3-(4-piperidinil)-1,2-benzisoxazol (**9**) e os melhores substituintes determinados a partir dos resultados no estudo de REA.

Michael S. Malamas *et al.* (2004) também empregaram a abordagem de estudo de REA para planejar e sintetizar uma série de azoldifenólicos como potenciais agonistas seletivos para RE β . Este estudo utilizou como *scaffold* um benzisoxazol difenólico (**10**) de alta potência e baixa seletividade, em comparação com o flavonoide genesteína (**11**), o controle positivo. As estruturas foram planejadas a partir de estruturas obtidas por difração de raio X de RE β co-cristalizado com ligantes e utilizaram modelagem molecular para agilizar a descoberta dos ligantes. Dentre as estruturas avaliadas, **12-I**, **12-II** e **12-III** apresentaram IC₅₀ de 1,8, 2 e 5 nM, respectivamente, que foi menor que o ligante endógeno 17 β -estradiol (usada de *scaffold*) e **11**. Apesar do menor IC₅₀ encontrado nos derivados benzisoxazol difenólicos, a seletividade em relação a isoforma RE α diminuiu cerca de 3x quando comparado com a seletividade **11**, bem como a seletividade para RE β quando comparado com **13**, usado como controle positivo pela alta seletividade em RE β (MALAMAS *et al.*, 2004).

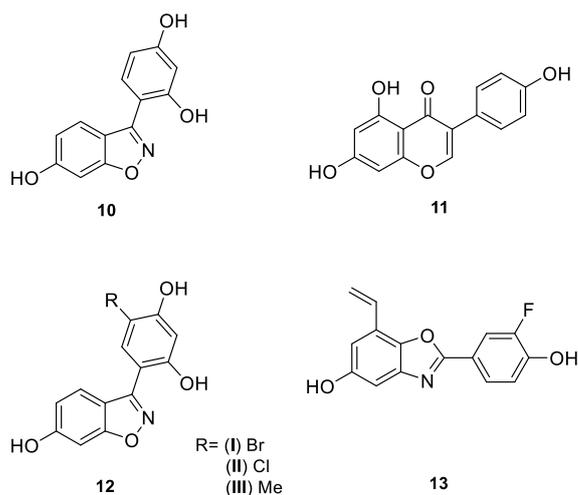
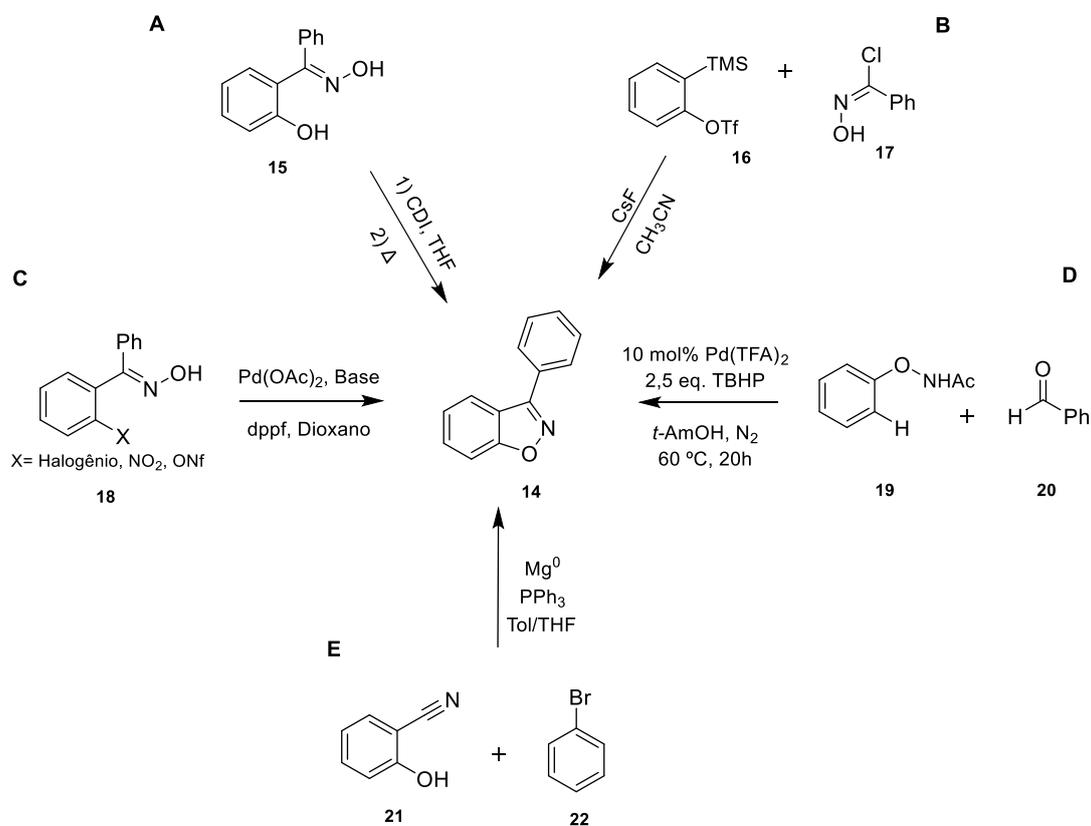


Figura 6. Scaffold de um benzisoxazol difenólico (**10**); Genesteína (**11**); (IV), (V) e (VI) Derivados benzisoxazol difenólico (**12**); Prinaberel (**13**).

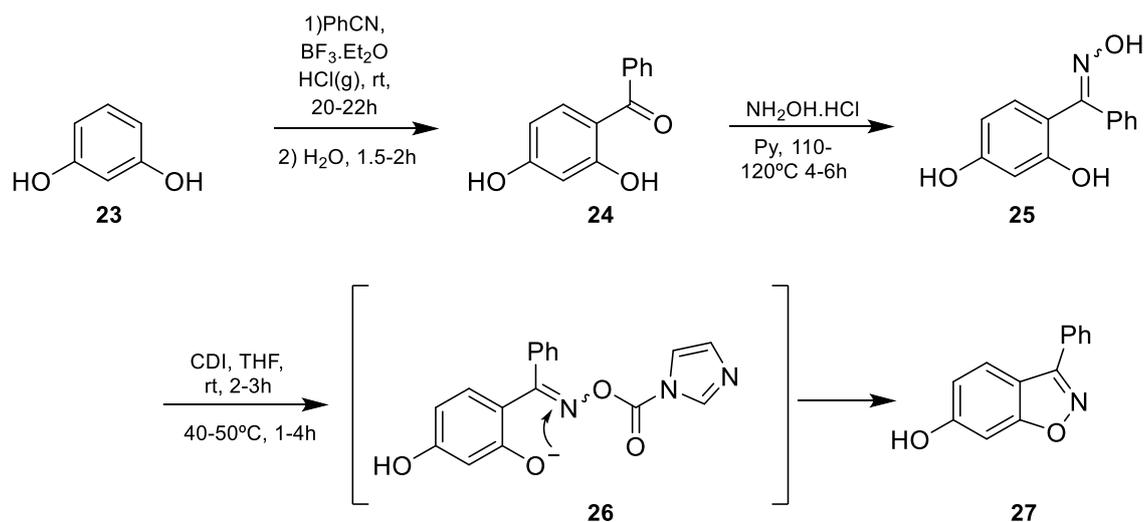
3.6. Métodos de obtenção do núcleo 1,2-benzisoxazol

Do ponto de vista de obtenção, as principais rotas de sintéticas do núcleo 1,2-benzisoxazol são observadas no Esquema 1.



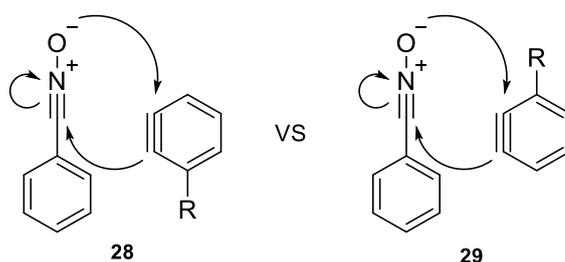
Esquema 1. Principais rotas sintéticas para obtenção de 1,2-Benzisoxazol.

O método mais utilizado para obter os 1,2-benzisoxazois é através da ciclização de aldeídos ou cetonas em derivados oxima com fragmento 2-hidroxifenil. Na maioria dos casos acontece um Rearranjo de Beckmann, levando a mistura de 1,3-benzazol, sendo necessária a introdução de duas etapas adicionais para impedir a formação de mistura: formação de derivados acíclicos de oximas, seguido de substituição intramolecular do grupo oxima por fenol, em meio alcalino (POISSONNET, 1997). Essa metodologia foi empregada na abordagem de Frasinyuk, M. S. (2015), conforme ilustrado no Esquema 2. Neste contexto, o resorcinol é submetido a uma substituição eletrofílica aromática com benzonitrila, seguido pela hidrólise da respectiva imina, resultando na formação de 2,4-dihidroxibenzofenona. O derivado cetona é convertido em oxima, por hidroxilamina e meio alcalino, seguido de substituição intramolecular no átomo de nitrogênio na presença do agente desidratante 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), assim fechando o núcleo 1,2-benzisoxazol. O CDI é frequentemente usado para fechamento deste núcleo, devido à sua capacidade de contornar a etapa de proteção do grupo hidroxil fenólico, evitando a formação de subproduto de rearranjo (FRASINYUK, 2015). Entretanto, algumas desvantagens são consideradas ao utilizar esse método, tais como o baixo rendimento, desvios na rota para evitar misturas indesejadas (CHEN, G. *et al.*, 2017; FRASINYUK, 2015), exigência de 3-4 passos para preparação dos materiais de partida, síntese linear, longo tempo reacional e algumas condições severas de reação (DUBROVSKIY *et al.*, 2013).



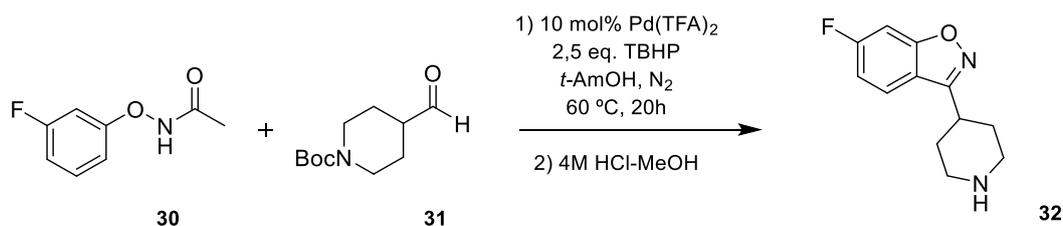
Esquema 2. Obtenção de 1,2-benzisoxazois através da ciclização de aldeídos ou cetonas.

A literatura apresenta outro método de síntese de 1,2-benzisoxazois através da cicloadição [3+2] de benzino e óxido de nitrila. O intermediário benzino é formado a partir de 2-(trimetilsilil)aryl triflatos em condições que envolvem uma fonte de íons fluoreto (CsF, KF ou TBAF), um solvente polar aprótico e temperatura ambiente (GALLO; REZENDE; MUZZI, 2009). A elevada reatividade dos arinos, devida à baixa energia dos orbitais LUMOs, os torna suscetíveis a ataques mesmo por espécies pouco nucleofílicas. Neste contexto, os óxidos de nitrila produzem, *in situ*, espécies zwitteriônicas, sendo essa abordagem promissora para inserção de ligações sigma. Entretanto, essa abordagem também apresenta limitações, como os fatores eletrônicos e estéricos, no qual o volume do substituinte R que afeta a regioselectividade, conforme representado no Esquema 3 (DUBROVSKIY; LAROCK, 2010), baixo rendimento para moléculas mais complexas (DUBROVSKIY *et al.*, 2013), além do uso de reagentes de partida mais dispendiosos ou de maior complexidade sintética (DUBROVSKIY; LAROCK, 2010; FRASINYUK, 2015).



Esquema 3. Fatores estéricos e eletrônicos em óxidos de fenilnitrila.

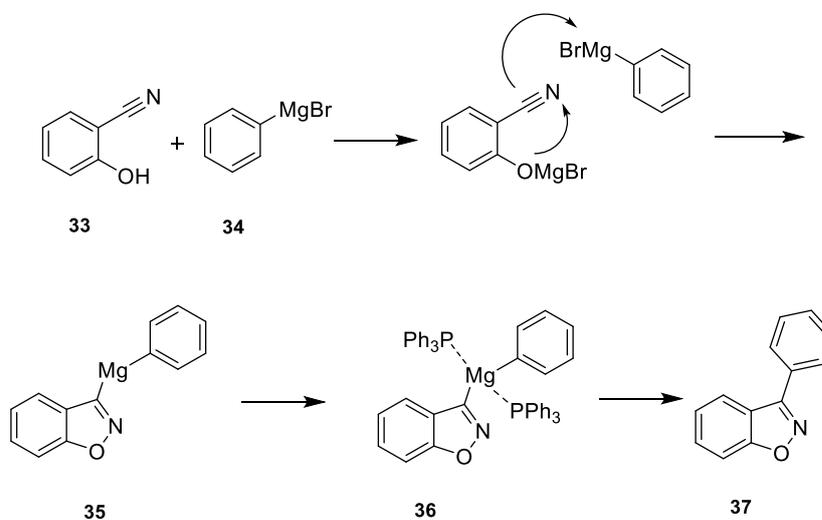
Pingping Duan *et al.* (2014), sintetizaram o núcleo 1,2-Benzisoxazol, partindo de *N*-fenóxiacetamidas com aldeídos via anelação intramolecular [4 + 1] catalisada por paládio. Essa estratégia foi otimizada visando a preparação de fármacos como Risperidona, Paliperidona e Iloperidona, no qual o principal precursor (6-fluoro-3-(piperidin-4-yl)benzo[d]isoxazole **III**) para esses três fármacos é obtido reagindo *N*-(3-fluorofenóxi)acetamida (**I**) e terc-butil 4-formilpiperidina-1-carboxilato (**II**), nas condições descritas no Esquema 4, obtendo rendimento de aproximadamente 40%. Em estruturas mais simples, como partir de um 4-Metilbenzaldeído, os rendimentos, determinados via cromatografia gasosa, foram de até 88% (DUAN *et al.*, 2014).



Esquema 4. Obtenção de 1,2-benzisoxazóis via adição intramolecular [4 + 1].

Embora a metodologia seja interessante, apresenta desvantagens em alguns pontos, como por exemplo o uso de solventes pouco convencionais e mais dispendiosos, tais como *t*-AmOH e TBHP. Quando há a substituição de solventes mais usuais, como THF e 1,4-dioxano, leva a uma queda drástica no rendimento da reação. O mesmo ocorre com a utilização de reagentes oxidantes convencionais, como sais de prata ou $K_2S_2O_8$, além de catalisadores à base de paládio, os quais são substancialmente caros.

GuiFang Chen *et al.* (2017) desenvolveram um método de síntese de obtenção de 1,2-benzisoxazol 3-substituído, em apenas uma etapa, através de 2-hidroxibenzonitrilas e bromobenzeno (Esquema 1-E), utilizando reação de Grignard-Barbier para construir ligações C-C. Conforme o Esquema 5, o mecanismo de reação proposto inicia-se através da remoção do próton e a formação de intermediário. O alcóxido ataca o nitrogênio do grupo ciano para romper a ligação π , fornecendo um carbânion que, posteriormente, interage com Mg e sofre uma eliminação redutiva para fornecer o produto 3-fenilbenzo[*d*]isoxazol (CHEN, G. *et al.*, 2017).



Esquema 5. Proposta de mecanismo utilizando reação de Grignard-Barbier para obtenção de 1,2-benzisoxazóis.

Além da escolha de uma rota de síntese viável e menos dispendiosa, o uso de estratégias de otimização de busca de moléculas bioativas, conhecido como planejamento racional de fármacos, é largamente utilizado pela pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos.

3.7. Planejamento de fármacos

O planejamento de fármacos é uma área da química medicinal responsável por planejar, desenvolver e identificar novas entidades químicas, derivadas de moléculas já ativas ou mesmo de moléculas que inicialmente possuem baixa afinidade com seus respectivos alvos. Essa abordagem visa otimizar aspectos como a potência, seletividade, propriedades farmacocinéticas, entre outros. Para isso, são utilizadas algumas estratégias e ferramentas como relação estrutura-atividade (REA), simplificação molecular, hibridação, homologação, bioisosterismo, triagens biológicas automatizadas em larga escala (HTS, do inglês, *high-throughput screening*), predição de propriedades farmacocinéticas, probabilidade de pequenas moléculas atingirem alvos fisiológicos (baseado na estrutura do receptor ou estrutura do ligante) e *docking* molecular (ANDRICOPULO; SALUM; ABRAHAM, 2009; GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008).

O estudo realizado por Hay *et al.* (2014) destacou a importância de estimar precocemente os parâmetros Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção (ADME) para reduzir falhas relacionadas a parâmetros farmacocinéticos em fases posteriores de ensaios clínicos (HAY *et al.*, 2014). Dessa forma, através de métodos *in silico*, que visam prever parâmetros ADME de estruturas moleculares por meio de ferramentas computacionais, podem acelerar os processos de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, minimizando assim gastos de tempo e recursos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

O SwissADME é uma ferramenta online produzida pelo *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB) para a predição de propriedades físico-químicas e parâmetros ADME, tais como absorção gastrointestinal, permeabilidade da barreira hematoencefálica, avaliação de substratos de glicoproteína P, permeação cutânea e inibição de CYP450. Além disso, a ferramenta calcula parâmetros relacionados à adequação do composto para uso como fármaco (*drug-likeness*) (ELDEHNA *et al.*,

2019; FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, 2019). O SwissADME demonstra robustez nas predições, com significância estatística e poder preditivo (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Outra ferramenta do SIB é o SwissTargetPrediction, que estima a probabilidade de pequenas moléculas interagirem com alvos fisiológicos baseado no princípio da similaridade quantificado a partir de estruturas experimentalmente ativas. Esta ferramenta abrange um banco de dados com 376.342 compostos e 3.068 macromoléculas fisiológicas que são possíveis alvos de pequenas moléculas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2019). A previsão de alvos através do *target fishing* pode ser baseada na estrutura tridimensional da proteína ou baseada em ligantes (DING *et al.*, 2013).

O *docking* molecular é uma estratégia que se encontra dentro da Triagem Virtual para predição de afinidade do ligante com os complexos de biomacromoléculas. A predição do comportamento de uma molécula pequena em uma proteína ou ácido nucleico é crucial para prever as interações e minimizar a chance de falha que podem ser previstas antes de fase clínica ou até mesmo da fase sintética dos compostos (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008; MENG *et al.*, 2012). As interações são avaliadas considerando a conformação mais estável no sítio ativo do receptor e a energia livre de Gibbs é utilizada para classificação por meio de uma pontuação aproximada, visto que as características entrópicas não são totalmente previstas (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008). O *docking molecular* é uma abordagem constantemente aperfeiçoada e fornece resultados confiáveis para guiar o planejamento de novos fármacos a partir de refino dos fragmentos.

Entendendo a necessidade de estratégias multidisciplinares na busca de novas entidades químicas para tratamento do câncer de mama hormônio dependente, neste trabalho utilizamos ferramentas de predição para escolha do alvo a partir de uma classe química, estratégias de hibridação molecular para construção de novas estruturas, triagem utilizando predição de propriedades farmacocinéticas e viabilidade sintética e, finalmente uso de *docking molecular* para verificar a interação com duas isoformas de receptores de estrogênio.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais e métodos

Os reagentes e solventes utilizados nos procedimentos experimentais foram adquiridos comercialmente em grau Padrão Analítico (PA), sem tratamento prévio, exceto hexano e acetato de etila que foram destilados, solventes e reagentes utilizados em reações em condições anidras, como redução com LiAlH_4 e reagente tipo Barbier-Grignard.

Na purificação por cromatografia líquida em coluna foi utilizado como fase estacionária silicagel Fluka na granulometria 0,063-0,2 mm.

O monitoramento reacional foi através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em lâminas de alumínio 60 Å com indicador de fluorescência a 254 nm. Como reveladores de CCD, foram utilizados Iodo, luz UV_{254} e anisaldeído sulfúrico (quando necessário).

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker 400, operando em frequência de 400 MHz para o hidrogênio e 100 MHz para carbono-13. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como referência. As multiplicidades dos sinais de hidrogênio foram abreviadas como: (s) para simpleto, (d) para duplete, (dd) para duplo duplete, (ddd) para duplo duplete de duplete, (t) para tripleto, (q) para quarteto e (m) para multiplete. As constantes de acoplamentos foram expressas em Hertz (Hz).

4.2. Planejamento de potenciais antitumorais para o tratamento de cânceres dependentes de estrogênio

4.2.1. Abordagem via scaffold endógeno e fragmentos

O planejamento das moléculas descritas neste trabalho foi baseado, inicialmente, pela probabilidade de interação fisiológica do núcleo 1,2-benzisoxazol predita a partir do banco de dados do SwissTargetPrediction e, posteriormente, baseado no ligante endógeno (17β -estradiol) dos receptores de estrogênio, bem como na utilização desse núcleo por ser um bioisómero de diversos heterocíclicos e por apresentar melhora nas propriedades farmacocinéticas e perfis de segurança (UTO, 2015).

Os substituintes selecionados levaram em consideração fragmentos estruturais como anéis aromáticos (planaridade e lipofilia), heterocíclicos, espaçamento (*linker*) de dois carbonos, aminas, aminas cíclicas, fenóis e éteres, presentes em compostos aprovados como anticâncer de mama (RE+) pelo FDA, como Tamoxifeno, Arzoxifeno, Raloxifeno e Lasofoxifeno (FERREIRA, M. C. F. *et al.*, 2011). Na busca de novas vias, também foram introduzidos catecóis, aminas impedidas (do ponto de vista espacial), dióis e amidas, conforme figura abaixo.

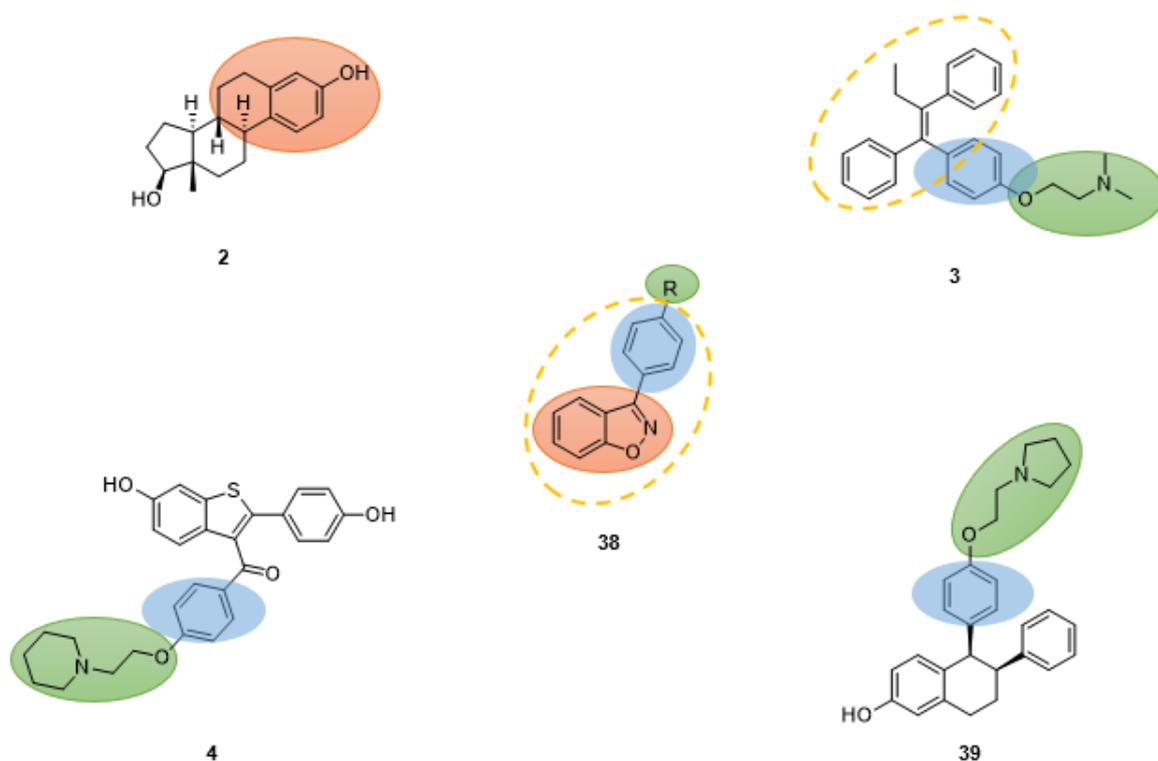


Figura 7. Fragmentos para planejamento de fármacos anticâncer de mama.

4.2.2. Planejamento *in silico* e viabilidade sintética

As estruturas desenhadas, derivadas de 1,2-benzisoxazol, passaram por triagem via predições de perfil farmacocinético empregando o software SwissADME.

Foram selecionadas as estruturas consideradas com perfil farmacocinético satisfatório, que seguiram regras *Druglikeness* (Tabela 2) e apresentaram uma predição com alta absorção gastrointestinal.

Tabela 2. Parâmetros druglikeness

	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge
Massa Molar (g/mol)	≤500	160 - 480	-	-	200-600
Rotação de ligações	-	-	≤ 10	-	≤ 15
Aceptores ligações de hidrogênio	≤ 10	-	-	-	≤ 10
Doadores ligação de hidrogênio	≤ 5	-	-	-	≤ 5
Refratividade molar(m³mol⁻¹)	-	40 - 130	-	-	-
Área de superfície polar (Å²)	-	-	≤ 140	≤ 131,6	≤ 150
Lipofilicidade (LogP)	≤ 4,15	-0,4 - 5,6	-	≤ 5,88	-2 - 5
Num. de aromáticos	-	-	-	-	≤ 7
Num. Carbonos	-	-	-	-	> 4
Num. heteroátomos	-	-	-	-	> 1
Num. de átomos	-	20 - 70	-	-	-

As estruturas foram desenhadas via *software* ChemDraw v.19.1 (PerkinElmer, EUA) e preparadas para *docking* por Chimera v.1.15 (Universidade da Califórnia, EUA) e Discovery Studio v.21.1 (Dassault Systèmes Biovia Corp, França).

Para fins de validação das predições *in silico* e *docking* molecular e, para comparação de resultados, alguns fármacos e o ligante endógeno 17β-estradiol (**2**) foram utilizados como controle positivo. Como moduladores seletivos em REα foram utilizados SERMs (aprovados pelo FDA), tais como Tamoxifeno (**3**), Arzoxifeno (**40**), Bazedoxifeno (**41**), Clomifeno (**42**) e Toremifeno (**43**). Como estruturas seletivas para REβ, foi utilizado Raloxifeno (**4**), como uma estrutura aprovada pelo FDA e os compostos Prinaberel (**13**) e LY500307 (**44**), como estruturas em fase investigacional/experimental. Todas as estruturas são apresentadas na Figura 8.

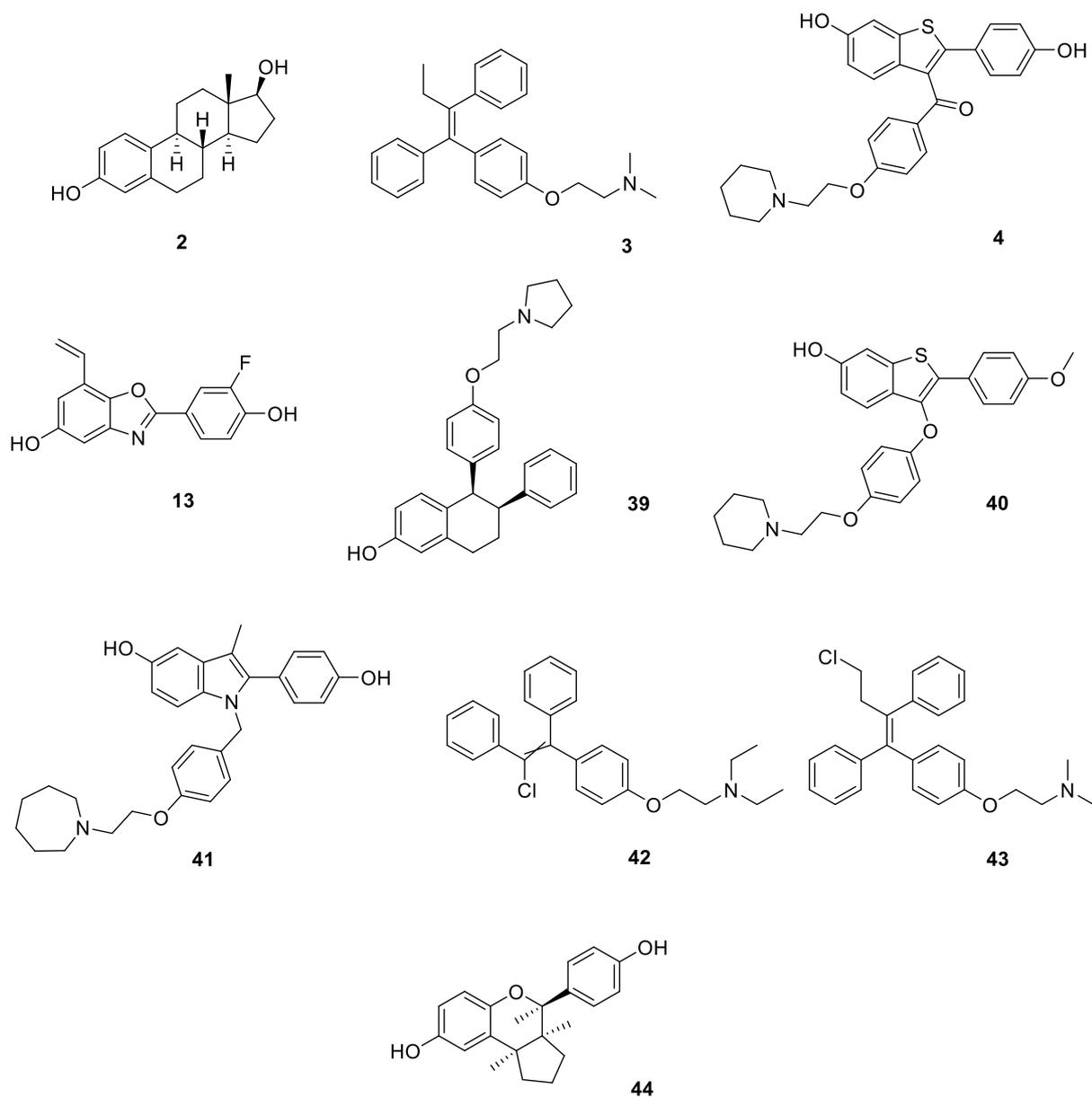


Figura 8. Identificação das estruturas utilizadas como controle positivo.

4.2.3. Docking molecular

As moléculas analisadas pelo SwissADME com perfil farmacocinético dentro dos parâmetros *druglikeness* (descritos acima), foram avaliadas em ensaio de interação com os alvos biológicos RE α e RE β , via plataforma GOLD (Cambridge Crystallographic Data Centre, EUA).

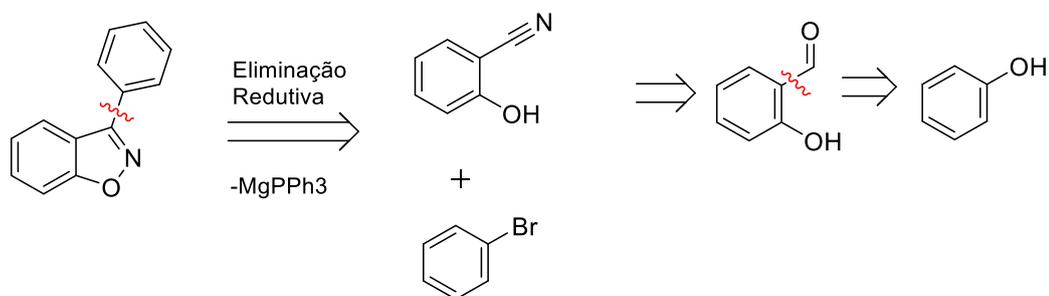
As estruturas cristalográficas foram extraídas no banco de dados do *Protein Data Bank* (PDB), escolhidas de acordo com trabalhos recentes da literatura que comparam terapias antitumorais *multi-target*. O RE α foi cristalografado com Tetrahydroisoquinolina (Id. PDB: 5FQP) (SCOTT *et al.*, 2016) conhecido por ser um

SERDs de ação antagonista nessa isoforma. A estrutura complexada com RE β foi um agonista da família dos benzopiranos (Id. PDB: 2JJ3)(NORMAN *et al.*, 2007). Todas as estruturas co-cristalizadas com os receptores são extraídas previamente ao processo de docking para liberar o bolsão de interesse.

Os resultados foram expressos em escala de pontuação (*score*) por *Chemscore*, o *rescore* (usado como validação interna do ensaio *in silico*) por *Chemplp* e avaliados pela interação das estruturas com os resíduos de aminoácidos do sítio alvo. Para esta avaliação, foram escolhidas as posições das moléculas com maior *score* (maior interação).

4.2.4. Viabilidade sintética

O parâmetro viabilidade sintética levou em consideração fatores como viabilidade de reprodução em escala industrial partindo de estruturas químicas simples e de baixo custo, assim como purificação por recristalização e, finalmente, reagentes e recursos disponíveis no LaFis. Optou-se, então, pelo uso de fenol e salicilaldeído empregando a metodologia descrita por GuiFeng Chen (2017), guiados pela retrosíntese apresentada no Esquema 6.



Esquema 6. Retrossíntese da obtenção de Benzisoxazol via reação tipo Barbier-Grignard.

4.3. Síntese de potenciais antitumorais dependentes de estrogênio

4.3.1. Síntese do salicilaldeído (**46**)

O protocolo de obtenção de salicilaldeído foi adaptado de Vogel (VOGEL, 1989). Foram solubilizados 1,2 mol de NaOH em 48 mL de água (2,66 mol), analogamente foram solubilizados 0,16 mol de fenol (**47**) em 15 mL de água (0,83

mol). As duas soluções foram misturadas e o sistema reacional foi aquecido até 60 °C, sob agitação, onde com o auxílio de um funil de adição, foi adicionado por gotejamento, durante 20 min, 0,31 mol de CHCl₃. O tempo reacional foi de 1,5 h. Após o término do tempo reacional, a mistura foi acidificada com HCl concentrado e destilada por arraste à vapor. O volume coletado foi extraído com CH₂Cl₂ e evaporado. O resíduo de salicilaldeído e fenol foi separado pela formação de aduto de bissulfito (solução saturada de bissulfito de sódio), por 45 min e agitação vigorosa a temperatura ambiente. O sólido branco foi filtrado, lavado com álcool e, posteriormente, com éter etílico. A decomposição do aduto de bissulfito foi efetuada com adição de 50 mL de H₂SO₄ (3 mol. L⁻¹) a 100 °C até formação de fase oleosa (salicilaldeído). O produto foi extraído três vezes com CH₂Cl₂ (30 mL) e evaporado. O rendimento foi de 27 %.

4.3.2. Síntese da 2-hidroxibenzonitrila (**33**)

Seguindo a metodologia de Ingale *et al.* (2017) (INGALE; PATIL; SHINDE, 2017), 3 mmol de 2-hidroxibenzaldeído (**46**) foram solubilizados em 15 mL de glicerol, seguido de adição de 3,3 mmol de cloridrato de hidroxilamina. A mistura reacional foi aquecida a 90 °C por 7 h. Após o tempo reacional, a mistura foi resfriada a temperatura ambiente e extraída 3 vezes com solução de ciclohexano (CyH) e acetato de etila (AcOEt) na proporção 95:5 (20 mL). A fase do glicerol foi separada para reutilização e a fase orgânica foi evaporada e concentrada. A purificação foi efetuada por cromatografia em coluna (CC), com eluente CyH:AcOEt (9:1) isocrático. O rendimento foi de 82 %.

4.3.3. Síntese dos intermediários para estrutura final **62a** e **63a**.

4.3.3.1. Síntese da 2-cloro-1-morfolinoetan-1-ona (**48a**)

Conforme protocolos da literatura (LEE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2011), 20 mmol de morfolina (**49**) e 40 mmol de K₂CO₃ foram adicionados em 50 mL de THF, em banho de gelo (0 °C). Após, foram adicionados 24 mmol de cloreto de cloroacetila (**50**), previamente diluídos em THF. Esse processo foi executado lentamente com auxílio de seringa, com purga de nitrogênio. A mistura foi mantida sob agitação por 4 h, a temperatura ambiente, até total conversão de **49** (processo monitorado por CCD, eluído com AcOEt 10 % de MeOH). Após o término do tempo reacional, foram

adicionados 20 mL de CH₂Cl₂ e transferido para um funil de decantação. A mistura foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL), solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄, filtrada e evaporada. A purificação, quando necessária, é efetuada em CC com eluição de AcOEt com 10 % de MeOH. O rendimento foi de 70 %.

4.3.3.2. Síntese da 2-(4-bromofenoxi)-1-morfolinaetanona (**51a**)

A mistura de 3 mmol de 4-bromofenol (**52**), 4 mmol de K₂CO₃ e 0,2 mmol de KI em DMF (3 mL) foi agitada, a temperatura ambiente, por 10 min. Com auxílio de seringa, foram adicionados 2 mmol de **48a**. A mistura ficou sob agitação e aquecimento (70 °C) por 16h. A mistura reacional foi extraída três vezes com AcOEt (30 mL), lavado com água e com solução saturada de NaCl (30 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄ e evaporada. A purificação foi por CC com eluição de CyH/AcOEt (7:3) isocrático ou recristalização com AcOEt. O rendimento foi de 31 %.

4.3.3.3. Síntese da 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina (**53a**)

Conforme protocolo adaptado da literatura (COLABUFO *et al.*, 2008; FUJIMORI *et al.*, 2015; VAN DRIESSCHE *et al.*, 2006), a uma suspensão de LiAlH₄ (2 mmol, 2 eq.) em Et₂O (5 mL) foi adicionado AlCl₃ (0,66 mmol, 0,33 eq.) e a mistura foi agitada a 0 °C por 30 min. À mistura foi adicionada, gota a gota, uma solução de **51a** (1 mmol, 1 eq.) e submetida a agitação, a 0 °C, por 15 min, após, aqueceu-se até temperatura ambiente permanecendo por 1,5 h, sendo o processo monitorado por CCD, eluído com CyH/AcOEt (7:3). A mistura reacional foi vertida em gelo e filtrada em Celite. O filtrado foi diluído em água e extraído três vezes com AcOEt (20 mL), lavado com salmoura (20 mL), seco em Na₂SO₄ e concentrado sob pressão reduzida. O rendimento foi de 29 %.

4.3.4. Síntese dos intermediários para as estruturas finais **62c** e **63c**.

4.3.4.1. Síntese da 2-cloro-1-(pirrolidin-1-il)etan-1-ona (**48b**)

Conforme protocolos da literatura (LEE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2011), 20 mmol de pirrolidina e 40 mmol de K₂CO₃ foram adicionados em 50 mL de THF, em banho

de gelo (0°C). Em seguida, foram adicionados 24 mmol de **50**, previamente diluídos em THF. Esse processo foi executado lentamente com auxílio de seringa de adição, com purga de nitrogênio. A mistura reagiu por 4 h, a temperatura ambiente, até total conversão da pirrolidina (processo monitorado por CCD. Eluente: AcOEt). Após o término do tempo reacional, foram adicionados 20 mL de CH₂Cl₂ e a mistura foi transferida para um funil de decantação. A mistura foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL), solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄, filtrada e evaporada. A purificação foi efetuada por CC com eluição de AcOEt 100 % isocrático. O rendimento foi de 66 %.

4.3.4.2. Síntese da 2-(4-bromofenoxi)-1-(pirrolidin-1-il)etan-1-ona (**51b**)

A mistura de 3 mmol de **52**, 4 mmol de K₂CO₃ e 0,2 mmol de KI em DMF (3 mL) foi agitada, a temperatura ambiente, por 10 min. Com auxílio de seringa foram adicionados 2 mmol de **48b**. A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento (70 °C) por 16 h. Após, mistura reacional foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL), lavada com água (1 x 20 mL) e com solução saturada de NaCl (1 x 20 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄ e evaporada a pressão reduzida. Purificação foi executada via CC com CyH/AcOEt(1:1) ou recristalização com CyH/AcOEt (1:1). O rendimento foi de 50 %.

4.3.4.3. Síntese da 1-(2-(4-bromofenoxi)etil)pirrolidina (**53b**)

Conforme protocolo adaptado da literatura (COLABUFO *et al.*, 2008; FUJIMORI *et al.*, 2015; VAN DRIESSCHE *et al.*, 2006), a uma suspensão de LiAlH₄ (2 mmol, 2 eq.) em Et₂O (5 mL) foi adicionado AlCl₃ (0,66 mmol, 0,33 eq.) e a mistura foi submetida a agitação por 30 min a 0 °C. À mistura foi adicionado, gota a gota, uma solução de **51b** (1 mmol, 1 eq.). Após esse processo, a mistura foi mantida sob agitação, a 0 °C, por 15 min, seguindo-se de aquecimento até temperatura ambiente, onde permaneceu por 1,5h, monitorada por CCD (Eluente: CyH/AcOEt, (1:1). A mistura reacional foi vertida em gelo e filtrada em Celite. O filtrado foi diluído em água (10 mL) e extraído com AcOEt (3 x 15 mL), lavado com salmoura (1 x 10 mL), seco em Na₂SO₄ e evaporado sob pressão reduzida. O rendimento foi de 36 %.

4.3.5. Síntese dos intermediários para as estruturas finais **62e** e **63e**.

4.3.5.1. Síntese da 2-cloro-1-(4-metilpiperazin-1-il)eta-1-ona (**48c**)

Conforme protocolos da literatura (LEE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2011), 20 mmol de 1-metilpiperazina e 40 mmol de K₂CO₃ foram adicionados em 50 mL de THF, em banho de gelo (0 °C). Após, foram adicionados 24 mmol de **50**, previamente diluídos em THF. Esse processo foi executado lentamente com auxílio de seringa de adição, com purga de nitrogênio. A mistura foi mantida sob agitação por 4 h, a temperatura ambiente, até total conversão da 1-metilpiperazina (processo monitorado por CCD. Eluente: AcOEt com 20 % de MeOH). Após o término do tempo reacional, foram adicionados 20 mL de CH₂Cl₂ e a mistura transferida para um funil de decantação. A mistura foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL) e solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄, filtrada e evaporada. A purificação, quando necessária, foi efetuada por CC com eluição de AcOEt com 20 % de MeOH de maneira isocrática. O rendimento foi de 36 %.

4.3.5.2. Síntese da 2-(4-bromofenoxi)-1-(4-metilpiperazin-1-il)etan-1-ona (**51c**)

A mistura de 3 mmol de 4-bromofenol, 4 mmol de K₂CO₃ e 0,2 mmol de KI em DMF (3 mL) foi agitada, a temperatura ambiente, por 10 min. Com auxílio de seringa foram adicionados 2 mmol de **48c**. A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento (70 °C) por 16h. Após, mistura reacional foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL), lavada com água (1 x 20 mL) e com solução saturada de NaCl (1 x 20 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄ e evaporada a pressão reduzida. Purificação foi executada via CC com AcOEt com 10 % de MeOH. O rendimento foi de 48 %.

4.3.5.3. Síntese da 1-(2-(4-bromofenoxi)etil)-4metilpiperazina (**53c**)

Conforme protocolo adaptado da literatura (COLABUFO *et al.*, 2008; FUJIMORI *et al.*, 2015; VAN DRIESSCHE *et al.*, 2006), a uma suspensão de LiAlH₄ (2 mmol, 2 eq.) em Et₂O (5 mL) foi adicionado AlCl₃ (0,66 mmol, 0,33 eq.) e a mistura foi submetida a agitação por 30 min a 0 °C. À mistura foi adicionado, gota a gota, uma solução de **51c** (1 mmol, 1 eq.). Após esse processo, a mistura foi mantida sob agitação, a 0 °C, por 15 min, seguindo-se de aquecimento até temperatura ambiente, onde permaneceu por 1,5 h, monitorada por CCD (Eluente: AcOEt com 10 % de

MeOH). A mistura reacional foi vertida em gelo e filtrada em Celite. O filtrado foi diluído em água (10 mL) e extraído com AcOEt (3 x 15 mL), lavado com salmoura (1 x 10 mL), seco em Na₂SO₄ e evaporado sob pressão reduzida. O rendimento foi de 30 %.

4.3.5.4. Síntese da 2-cloro-N,N-diisopropilacetamida (**48d**)

Conforme protocolos da literatura (LEE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2011), 20 mmol de di-isopropilamina e 40 mmol de K₂CO₃ foram adicionados em 50 mL de THF, em banho de gelo (0 °C). Após, foram adicionados 24 mmol de **50**, previamente diluído em THF. Esse processo foi executado lentamente com auxílio de seringa de adição, com purga de nitrogênio. A mistura foi mantida sob agitação por 4 h, a temperatura ambiente, até total conversão da di-isopropilamina, processo monitorado por CCD CyH/AcOEt (4:1). Após o término do tempo reacional, foram adicionados 20 mL de CH₂Cl₂ e a mistura foi transferida para um funil de decantação. A mistura foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ (2 x 30 mL), solução saturada de NaCl (2 x 30 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄, filtrada e evaporada sob pressão reduzida. A purificação foi efetuada por CC com gradiente de hexano (100 %) e CyH/AcOEt (4:1). O rendimento foi de 59 %.

4.3.5.5. Síntese da N,N-diisopropil-2-fenoxiacetamida (**51d**)

A mistura de 3 mmol de 4-bromofenol, 4 mmol de K₂CO₃ e 0,2 mmol de KI em DMF (3 mL) foi agitada, a temperatura ambiente, por 10 min. Com auxílio de seringa foram adicionados 2 mmol de **48d**. A mistura foi mantida sob agitação e aquecimento (70 °C) por 16 h. Após, mistura reacional foi extraída com AcOEt (3 x 20 mL), lavada com água (1 x 20 mL) e com solução saturada de NaCl (1 x 20 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄ e evaporada a pressão reduzida. Purificação foi executada via CC com CyHAcOEt (4:1). O rendimento foi de 59 %.

4.3.5.6. Síntese da N-(2-(4-bromofenoxi)etil)-N-isopropilpropan-2-amina (**53d**)

Conforme protocolo adaptado da literatura (COLABUFO *et al.*, 2008; FUJIMORI *et al.*, 2015; VAN DRIESSCHE *et al.*, 2006), a uma suspensão de LiAlH₄ (2 mmol, 2 eq.) em Et₂O (5 mL) foi adicionado AlCl₃ (0,66 mmol, 0,33 eq.) e a mistura foi submetida a agitação por 30 min a 0 °C. À mistura foi adicionado, gota a gota, uma solução de **51d** (1 mmol, 1 eq.). Após esse processo, a mistura foi mantida sob

agitação, a 0 °C, por 15 min, seguindo-se de aquecimento até temperatura ambiente, onde permaneceu por 1,5 h, monitorada por CCD (Eluente: CyH:AcOEt, 1:1). A mistura reacional foi vertida em gelo e filtrada em Celite. O filtrado foi diluído em água (10 mL) e extraído com AcOEt (3 x 15 mL), lavado com salmoura (1 x 10 mL), seco em Na₂SO₄ e evaporado sob pressão reduzida. O rendimento foi de 31 %.

4.3.5.7. Obtenção de **51a**: Otimização via *one-pot*

Conforme protocolos da literatura (LEE *et al.*, 2015; SUN *et al.*, 2011), 20 mmol de **49** e 40 mmol de K₂CO₃ foram adicionados em 50 mL de THF, em banho de gelo (0 °C). Após, foram adicionados 24 mmol de **50**, previamente diluído em THF. Esse processo foi executado lentamente com auxílio de seringa de adição, com purga de nitrogênio. A mistura foi mantida sob agitação por 4 h, a temperatura ambiente. Após total conversão da amida (**48a**), foram adicionados 1 equivalente (20 mmol) de K₂CO₃ (pH 10) e 1,2 equivalentes de **52**. A mistura ficou sob agitação e aquecimento (70 °C) por 16 h. Finalmente, a mistura reacional foi extraída com AcOEt (3 x 30 mL), lavada com água (1 x 20 mL) e com solução saturada de NaCl (1 x 20 mL). A fração orgânica foi seca em Na₂SO₄ e evaporada sob pressão reduzida. A purificação foi por CC com eluição de CyH/AcOEt (1:1) isocrático ou por recristalização com AcOEt. O rendimento foi de 38 %.

Para aumento de escala das estruturas **51b**, **51c** e **51d** foi utilizado a via *one-pot* e a purificação foi realizada de acordo com os protocolos originais.

4.3.6. Síntese dos intermediários para as estruturas finais **61**, **64a** e **64b**.

4.3.6.1. Síntese do 3,4-bis(benziloxi)-2-hidroxibenzaldeído (**54**)

A mistura de 2,3,4-trihidroxibenzaldeído (**55**) (1 mmol), K₂CO₃ (5 eq.), KI (0,1 eq.) e DMF (5 mL) foi resfriada a 0 °C e foram adicionados, gota a gota, 5 eq. de BnBr (**56**). A mistura foi mantida a 0 °C durante 10 min e após, foi aquecida até a temperatura ambiente e mantida a essa temperatura por 24 h, sendo monitorada por CCD (Eluente: CyH/AcOEt, 4:1) até completo consumo do material de partida. A reação foi encerrada com a adição de HCl 1 mol.L⁻¹ (15 mL) e extraída três vezes com AcOEt (20 mL), lavado com água (1 x 20 mL) e salmoura (1 x 20 mL), sendo seca com

Na₂SO₄. A purificação se deu por CC, utilizando gradiente 10:1 e 4:1 (CyH/AcOEt) para obtenção do 2,3,4-tris(benziloxi)benzaldeído(**57**).

À mistura de **57** (1 mmol) em éter etílico (15 mL) foram adicionados 1,1 eq. de MgBr₂.Et₂O (**58**), em temperatura ambiente e a mistura foi monitorado por CCD (Eluente: CyH/AcOEt, 4:1) durante 10 h. Ao final da reação, a temperatura foi diminuída até 0 °C e adicionou-se HCl 1 mol.L⁻¹ (8 mL). A fase aquosa foi extraída com éter (3 x 20 mL), lavada com água (1 x 20 mL) e salmoura (1x 20 mL), seca em Na₂SO₄, purificada por CC utilizando como eluente gradiente 10:1 e 4:1 (CyH /AcOEt). O rendimento foi de 46 %.

4.3.6.2. Síntese do 3-fenil-1,2-benzisoxazol (**37**) e derivados

Para todas as reações de Grignard, foi empregado um sistema anidro, onde todos os solventes utilizados foram secos em duas etapas: A primeira foi uma pré-secagem (*overnight*) com KOH e a segunda um refluxo com sódio metálico, utilizando benzofenona como indicador de ausência de água/oxigênio e a coleta do destilado em recipiente com peneira molecular 3 Å ativada(ARMAREGO; CHAI, 2009). Todas as vidrarias foram secas em estufa a 105 °C por 1 h, resfriadas em dessecador com septo de borracha em todas as saídas e, posteriormente, o sistema é purgado com nitrogênio.

O procedimento padrão do grupo de GuiFang Chan (CHEN, G. *et al.*, 2017) foi reproduzido para avaliar a viabilidade do método. Em um balão de 3 bocas acoplado a um sistema anidro, com purga de nitrogênio, foram adicionados 10 mmol de magnésio em aparas ativado em 10 mL de tolueno seco, seguido de adição de solução com 10 mmol de bromobenzeno (**45**) em 7,5 mL de tolueno seco. Com auxílio de seringa, foram adicionados 5 mmol de 2-hidroxibenzonitrila (**33**) solubilizados em 7,5 mL de THF seco, seguido de adição de 0,75 mmol de trifenilfosfina (**59**). A mistura reacional foi mantida sob agitação, a 90 °C por 6 h, monitorando o processo por CCD com eluentes CyH/AcOEt (5:1). Após a reação finalizada, a mistura reacional foi resfriada até temperatura ambiente, lavada com etanol (2 x 15 mL), lavada com água (1 x 15 mL) e extraída com AcOEt (3 x 15 mL). A purificação foi efetuada por CC, em sistema isocrático de CyH/AcOEt (5:1). O rendimento foi de 81 %.

4.3.6.3. Avaliação biológica do 3-fenil-1,2-benzisoxazol e derivados

Para realização do ensaio de avaliação da atividade citotóxica dos compostos sintetizados em linhagem celular de câncer de mama RE+ células MCF-7 (*American Type Culture Collection*, EUA), foram semeadas em placas de 96 poços, na concentração de 5×10^3 células por poço. Essas foram cultivadas em meio de cultura *low-glucose* DMEM (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Life Technologies, EUA), 0,5 % de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA) e 1 % de anfotericina B (Sigma-Aldrich, EUA), e mantidas em atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.

Os compostos foram individualmente solubilizados em dimetilsulfóxido para obtenção de soluções estoque na concentração de 10 mM. A partir dessas, as concentrações experimentais que compuseram as curvas de concentrações avaliadas foram preparadas em meio de cultura *low-glucose* DMEM e adicionadas às células. Após 48 horas de tratamento, as células foram transferidas para eppendorfs e o efeito da exposição aos compostos foi avaliado por contagem celular em citômetro de fluxo FACSVerse™ (BD Biosciences, EUA). Os resultados foram expressos como percentual em relação ao controle, composto de células MCF-7 não tratadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para uma melhor organização desta sessão, os resultados serão divididos em dois subtítulos, primeiro apresentaremos a avaliação de triagem das estruturas e, posteriormente, mostraremos a apresentação da estratégia sintética utilizada para produção dos compostos mais efetivos segundo os estudos preliminares *in silico*.

5.1. Resultados do planejamento de fármacos

A partir do amplo conhecimento que nosso grupo de pesquisa (LaFis) possui com derivados 1,3-benzazólicos, foram pesquisados potenciais alvos biológicos, com base em isômeros constitucionais dessa classe de compostos, os derivados 1,2-benzisoxazólicos, conhecidos por serem núcleos usados como bioisósteros com a finalidade de melhorar o perfil farmacocinético, potência e seletividade das estruturas.

Após levantamento dos recursos e reagentes disponíveis, o planejamento de fármacos foi iniciado.

A triagem foi realizada com 52 estruturas, propostas com base em hibridação molecular e utilizando bioisósteros de fragmentos frequentemente observados em SERMs e SERDs (Figura 5, item 4.2), posteriormente, o refino foi realizado com base na predição de perfil farmacocinético e por *docking* molecular. A Figura 9 apresenta o esquema utilizado para o refino das estruturas.

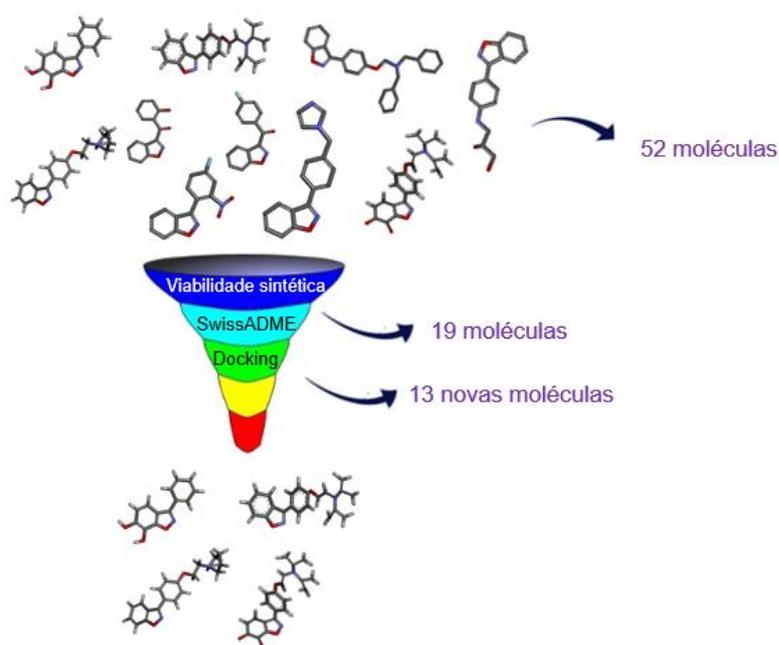


Figura 9. Modelo esquemático das estratégias utilizadas para o planejamento de fármacos.

As modificações estruturais propostas para o esqueleto 1,2-benzisoxazólico foram realizadas nas posições 6 e 7 (R^1 e R^2) com diversos grupos como hidroxilas, metóxilas e halogênios. As substituições na fenila foram nas posições *orto*, *meta* e *para* (R^3 , R^4 e R^5) utilizando fragmentos estruturais de hibridação, espaçamento de dois carbonos e grupos retiradores de elétrons por ressonância e/ou efeito indutivo (Figura 10).

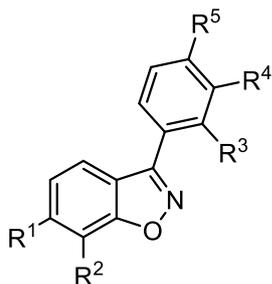


Figura 10. Estrutura genérica para o esqueleto 1,2-benzisoxazol com as posições de substituição avaliadas no estudo de predição molecular.

Para prever possíveis alvos fisiológicos a partir do esqueleto base 1,2-benzisoxazol proposto, a ferramenta *in silico*, *SwissTargetPrediction*, foi utilizada. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para uma das estruturas avaliadas.

Target	Common name	Uniprot ID	ChEMBL ID	Probability*	# sim. cmpds (3D / 2D)	Target Class
Estrogen receptor	ESR1	P03372	CHEMBL206		0 / 29	Transcription Factor
Estrogen receptor beta	ESR2	Q92731	CHEMBL242		0 / 29	Transcription Factor
Receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3	FLT3	P36888	CHEMBL1974		0 / 17	Tyr Kinase
Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	P07900	CHEMBL3880		0 / 5	Cytosolic other
Heat shock protein HSP 90-beta (<i>by homology</i>)	HSP90AB1	P08238	CHEMBL4303		0 / 5	Cytosolic other
Endoplasmic (<i>by homology</i>)	HSP90B1	P14625	CHEMBL1075323		0 / 5	Unclassified
Lanosterol synthase	LSS	P48449	CHEMBL3593		0 / 2	Enzyme
Carbonic anhydrase 1	CA1	P00915	CHEMBL261		0 / 1	Enzyme
Carbonic anhydrase 2	CA2	P00918	CHEMBL205		0 / 1	Enzyme
Carbonic anhydrase 4	CA4	P22748	CHEMBL3729		0 / 1	Enzyme
Carbonic anhydrase 6	CA6	P23280	CHEMBL3025		0 / 1	Enzyme
Amine oxidase [flavin-containing] B	MAOB	P27338	CHEMBL2039		0 / 1	Enzyme
Lipid-phosphate phosphatase	EPHX2	P34913	CHEMBL2409		0 / 10	Serine Protease
Carbonic anhydrase 5A, mitochondrial	CA5A	P35218	CHEMBL4789		0 / 1	Enzyme
Carbonic anhydrase 7	CA7	P43166	CHEMBL2326		0 / 1	Enzyme

Figura 11. Resultado de SwissTargetPrediction para probabilidade de interação com alvos fisiológicos.

Inicialmente, foi observado uma baixa probabilidade de interação. No entanto, a estrutura apresentou interação com ambas as isoformas de receptor de estrogênio.

Esses resultados preliminares sugeriram que modificações estruturais poderiam potencializar a eficácia do composto para atingir o alvo desejado

Assim, um total de 52 estruturas passaram por triagem utilizando o *SwissADME*. Dessas estruturas, aquelas que não atenderam aos critérios *druglikeness* estabelecido por Lipinski e Muegg foram excluídas, resultando em um grupo de 19 estruturas com perfil promissor para a próxima fase de avaliação por *docking molecular*. Na Figura 12, é possível visualizar as estruturas candidatas selecionadas para avaliação por *docking molecular*.

Para uma análise mais robusta dos resultados, foram utilizadas propriedades farmacocinéticas de estruturas que já atingem esse alvo foram utilizadas como parâmetro de comparação. A análise foi realizada considerando apenas as propriedades farmacocinéticas quanto às características *druglikeness* de um candidato à fármaco, uma vez que essas foram desenvolvidas e frequentemente são usadas por grandes indústrias farmacêuticas. Para os estudos de predição *in silico* dos parâmetros ADME foram selecionados dois SERMs (**41** e **3**, Figura 8) e dois agonistas de RE- β , (**13** e **44**, Figura 8). Essas estruturas serão discutidas em relação à sua interação com o receptor.

No *docking molecular*, os resultados são expressos em pontuação e classificados com base na conformação que melhor interage no sítio alvo. O fator decisivo é a intensidade e quantidade de interações com resíduos do bolsão de ligação. Para a discussão, apenas as estruturas que superaram o desempenho do 17 β -estradiol foram consideradas. A Tabela 3 documenta os valores de pontuação resultantes dos estudos de *docking*.

Para facilitar a compreensão dos dados obtidos e apresentados na Tabela 4, a Figura 13 apresenta um gráfico que compara as pontuações obtidas pelas estruturas em análise com as de controle positivo, bem como o ligante endógeno encontrado na proteína 5FQP.

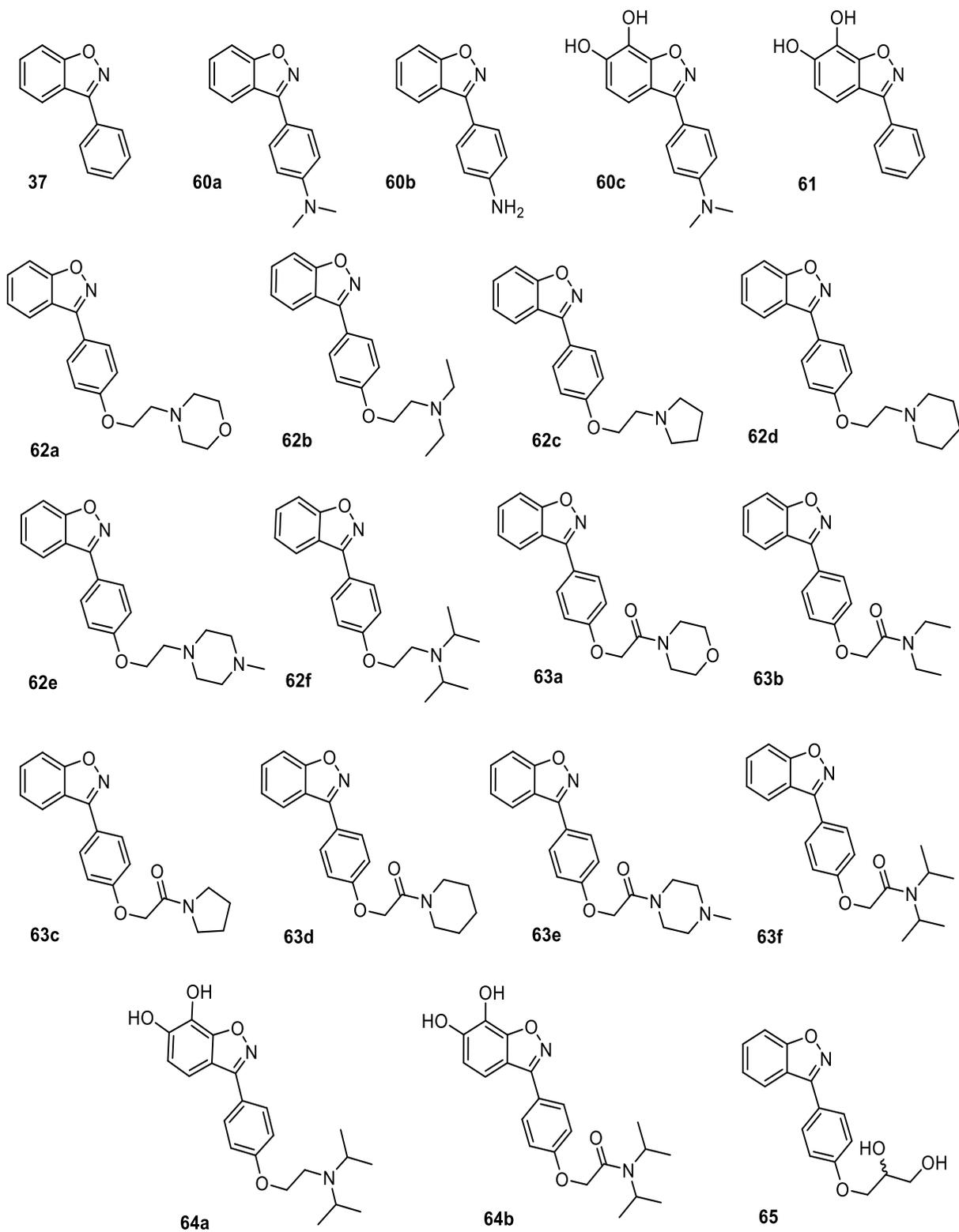


Figura 12. Estruturas aprovadas na triagem por predição que serão utilizadas no estudo de docking.

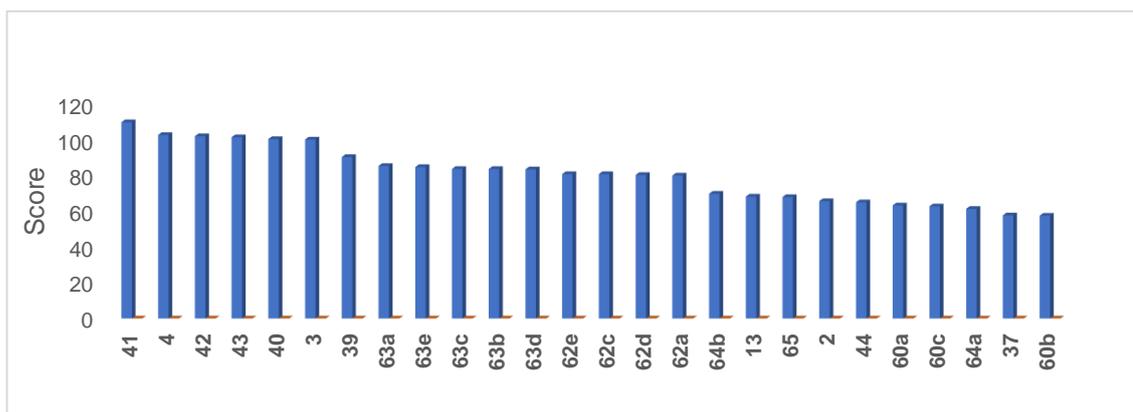


Figura 13. Ranking de interação com a proteína cristalografada de RE α - 5FQP.

Entre as estruturas analisadas, o Basidoxifeno (**41**) demonstrou uma interação mais significativa com o receptor alvo. Para fins de comparação de interação no bolsão e ligação, o 17 β -estradiol (**2**, representado em amarelo) foi utilizado como referência na análise e o receptor 5FQP foi oculto para melhor visualização da sobreposição. Na Figura 14 (entrada A) é possível observar a sobreposição de **41** e **2** (em amarelo) em suas conformações mais estáveis. Nessa sobreposição, a porção indol é sobreposta no tetrahidronaftaleno e a hidroxila substituinte de **41** é também sobreposta a de **2**, mimetizando assim o substituinte endógeno. As principais interações com aminoácidos do receptor RE α são detalhadas na Tabela 4. Foi observado que além das interações tradicionais com os aminoácidos (conforme apresentadas na Tabela 1), existem fortes interações do tipo ligação de hidrogênio com Asp351, Leu387 e Gly521, o que justifica a pontuação mais elevada em relação às demais estruturas.

Os SERMs Arzoxifeno (**40**) e Raloxifeno (**4**) apresentam estruturas notavelmente semelhantes e diferem apenas no conector entre o benzotiofeno e fenóxietil piperidina, sendo um éter para **40** e uma cetona para **4**. Além disso, diferem na posição 4 do anel aromático, com o **40** possuindo um grupo metóxi e o **4** uma hidroxila. Como esperado, ambas estruturas demonstram interações semelhantes no bolsão de ligação. No entanto, **4** possui uma interação adicional, do tipo ligação de hidrogênio, com Gly521, o que resulta em um aumento na sua pontuação. Outras interações notadas são interações π stacking (π - π) com Phe404, π - enxofre com Met343 e Met421 e a já relatada interação do tipo ligação de hidrogênio fornecida pela Asp351 que estabilizam antagonistas(FERREIRA ALMEIDA *et al.*, 2020).

Tabela 3. Predição das propriedades físico-químicas e scores de docking molecular.

Propriedades	Compostos																								
	2	3	37	41	44	60a	60b	60c	61	62a	62b	62c	62d	62e	62f	63a	63b	63c	63d	63e	63f	64a	64b	65	
Físico-químicas																									
Massa molar (g/mol)	271.2	371.	195.2	470.	282.	238.	210.	270.	227.	324.	310.3	308.3	322.4	337.4	338.4	338.3	324.3	322.3	336.3	351.4	352.4	370.4	384.4	285.2	
Rotação de ligações	4	5	2	6	3	3	2	3	2	4	9	7	0	2	4	6	7	6	8	0	3	4	3	9	
Aceptores ligações de hidrogênio	2	8	1	7	1	2	1	2	1	5	7	5	5	5	7	5	7	5	5	5	7	7	7	5	
Doadores ligação de hidrogênio	5	2	2	4	3	2	2	4	4	5	4	4	4	5	4	5	4	4	4	5	4	6	6	5	
Refratividade molar (m³mol⁻¹)	2	0	0	2	2	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	
Área de superfície polar (Å²)	73.5	119	59.5	147	81.4	73.7	63.9	77.7	63.5	95.8	92.9	94.7	99.5	106	102	96	93.1	94.9	99.7	106	103	107	107	78	
Lipofilicidade (LogP)	66.5	12.5	26	57.9	49.7	29.3	52.1	69.7	66.5	47.7	38.5	38.5	38.5	41.8	38.5	64.8	55.6	55.6	55.6	58.8	55.6	79	96	75.7	
Solubilidade	3.24	5.77	3.10	5.07	3.26	3.09	2.53	2.20	2.31	2.98	3.82	3.55	3.80	2.91	4.34	2.48	3.30	3.06	3.37	2.45	3.87	3.53	3.10	2.20	
Druglikeness (Lipinsky)	M	P	S	P	M	M	S	S	S	S	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	S	M	M	
Druglikeness (Muegge)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Absorção gastrointestinal	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Permeação da barreira hematoencefálica	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
Substrato de P-gp	S	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	S	
CYP1A2¹	N	S	N	S	S	N	S	S	N	S	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
CYP2C19¹	S	N	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	
CYP2C9¹	S	S	S	S	S	S	S	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
CYP2D6¹	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	N	
CYP3A4¹	N	S	N	S	S	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
Score REα	N	N	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	N	
Score REβ	65.5	100	55.7	111	65	63.2	57.4	62.3	58.4	79.9	73.2	80.7	80.3	80.7	70.5	85.3	83.6	83.6	83.4	84.6	78.1	61.3	69.7	67.9	
	61	55.6	54.4	58.9	65.1	63	57.8	62.7	58.1	78.8	73.2	79.7	84.3	80.7	70.8	85.6	83.5	83.9	83.9	84.9	78.1	61.4	68.3	67.9	

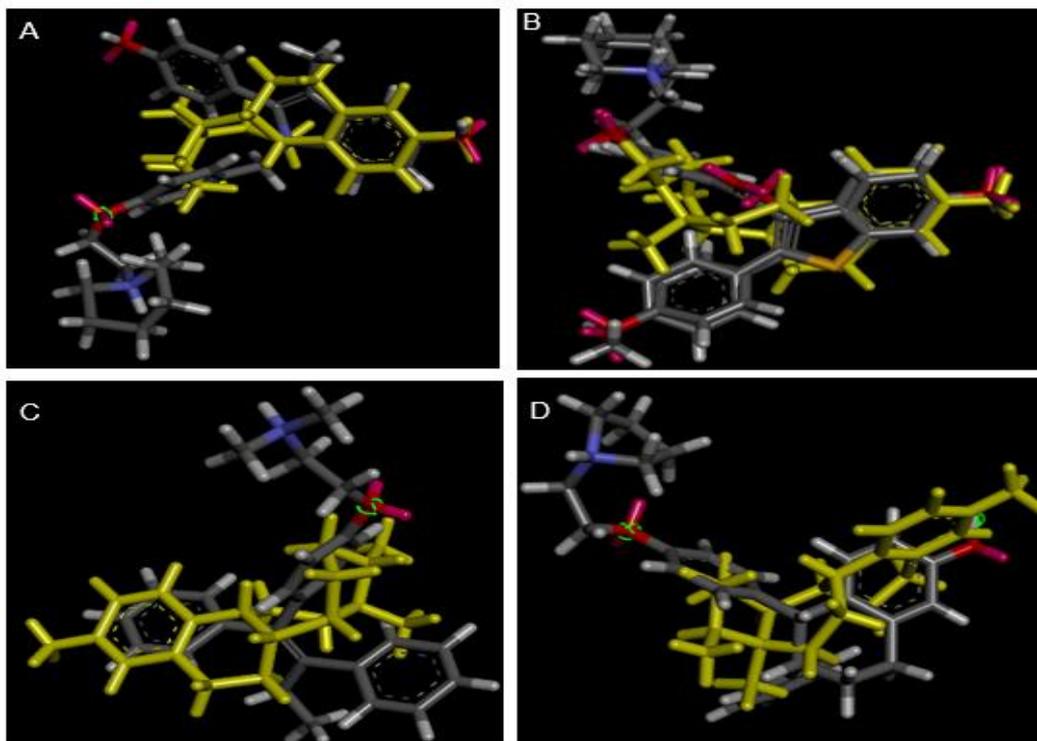


Figura 14. Interações de SERMs no RE α (17 β -estradiol **2** em amarelo). (A) Sobreposição de **41** em **2**; (B) Sobreposição de **40** e **4** em **2**; (C) Sobreposição de **3** em **10**; (D) Sobreposição de **39** em **10**.

Os demais resíduos de interação, de ambas as estruturas, podem ser encontrados na Tabela 4. A porção benzotiofeno de **40** e **4** interage de forma semelhante ao tetrahidronaftaleno de **2** com o receptor (Figura 14, entrada B). Portanto, benzotiofeno, indol e tatrahidronaftaleno ocupam o mesmo bolsão de ligação, pois interagem com os mesmos aminoácidos.

Para os fármacos derivados de Tamoxifeno (**3**), como Clomifeno (**42**) e Toremifeno (**43**), é observado o mesmo comportamento que os SERMs anteriores e diferem em alguns tipos de ligação e resíduos (Figura 14, entrada C).

Na análise do comportamento conformacional dos SERMs no sítio de ligação de RE α é possível associar que planaridade conferida por sistemas aromáticos e insaturações desempenha um papel de grande importância para interações na mesma região ocupada pelo 17 β -estradiol. No entanto, essa planaridade para a potência de forma que a competição seja em vantagem do fármaco antagonista. A hidroxila presente na porção indol, benzotiazol e difeniletano sobrepõem a hidroxila de 17 β -estradiol responsável por interações do tipo ligação de hidrogênio. Além disso, essas características estruturais, tanto dos esqueletos quanto dos grupos substituintes, mimetizam o 17 β -estradiol, resultando em um aumento de potência devido à

amplificação das interações com outros aminoácidos próximos ao sítio de ligação endógeno. Essas características estruturais classificam os SERMs como antagonistas do RE α altamente eficazes

O Lasofoxifeno (**39**) se diferencia dos demais fármacos devido à sua falta de planaridade, visto que apresenta um anel aromático condensado a um anel de cinco membros que não está conjugado (Figura 14, entrada D). Essa característica resulta em diminuição no *score*, já que algumas interações clássicas não acontecem com esse fármaco. Além disso, a hidroxila do **4** não sobrepõe a de **2**, assim como os demais SERMs. Possui interações mais fortes como ligação de hidrogênio com Asp351, π -Enxofre com Met 343 e Met421, mas majoritariamente π -Alquil, conforme detalhado na Tabela 4.

Os derivados 1,2-benzisoxazóis da série, apesar de serem considerados bioisómeros do indol (LAMANI *et al.*, 2009), não apresentaram uma sobreposição do núcleo na posição tetrahidronaftaleno (Figura 15). Conseqüentemente, o *score* destes compostos é semelhante ao do Lasofoxifeno que também não exibe essa sobreposição. Os substituintes dos derivados benzisoxazóis com anel tensionado (anéis de 5/6 membros) e/ou travados pela ligação amida sobrepõem a porção tetrahidronaftaleno de **2**, provavelmente por ser os que mais se assemelham a uma estrutura planar (Figura 14). As interações mais importantes de **63a** são π -stacking com Phe404, π -enxofre com Met343, π -sigma com Pro535 e majoritariamente π -Alquil, conforme visto na Tabela 4.

São observadas interações importantes para os demais derivados, como **63e** que interage π -stacking com Leu346, π -enxofre com Met343 (uma interação clássica de SERMs) e ligação carbono-hidrogênio com Glu353. O aminoácido Glu353 é notório por desempenhar um papel fundamental na afinidade com RE α (FERREIRA ALMEIDA *et al.*, 2020). Já o **62e** foi o derivado em que o núcleo benzisoxazol apresentou uma sobreposição semelhante à dos SERMs antagonistas, conforme ilustrado na Figura 15, entrada C. No entanto, as interações observadas são do tipo π -Alquil e π -stacking (Tabela 4). Considerando uma perspectiva de refinamento estrutural através do uso da ferramenta de *docking*, é possível conceber que uma estrutura que possua uma hidroxila na posição 4 do anel aromático para interagir com Leu384, em uma provável ligação de hidrogênio, o que potencialmente aumentaria a interação com o sítio de ligação.

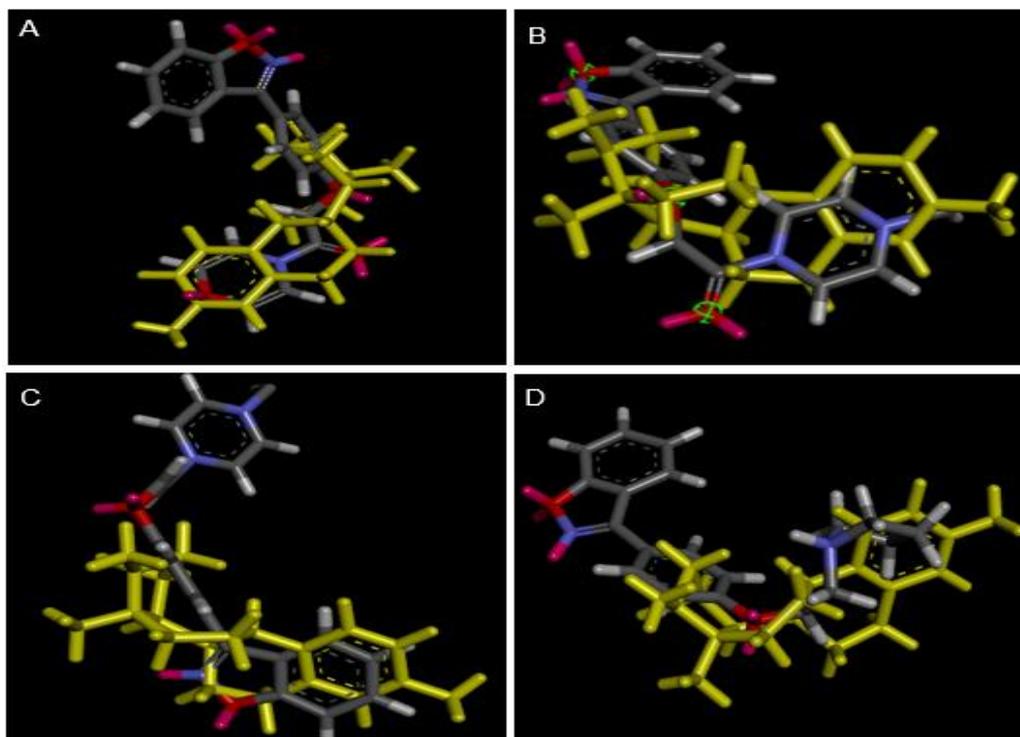


Figura 15. Interações de 1,2-Benzisoxazois no RE α (17 β -estradiol **2** em amarelo. (A) Sobreposição de **63a** em **2**; (B) Sobreposição de **63e** e **2**; (C) Sobreposição de **62e** e **2**; (D) Sobreposição de **62e** e **2**.

Da mesma forma que foi realizado para a isoforma RE α , procedemos o *docking* molecular em 19 estruturas contendo o núcleo 1,2-benzisoxazol, desta vez direcionando a análise para a isoforma RE β . Posteriormente, as estruturas foram classificadas com base em score, como ilustrado na Figura 16. Durante a análise das interações com os resíduos de aminoácidos, concentramos nossa atenção nas estruturas que apresentaram pontuação mais elevada ou próximos aos do 17 β -estradiol.

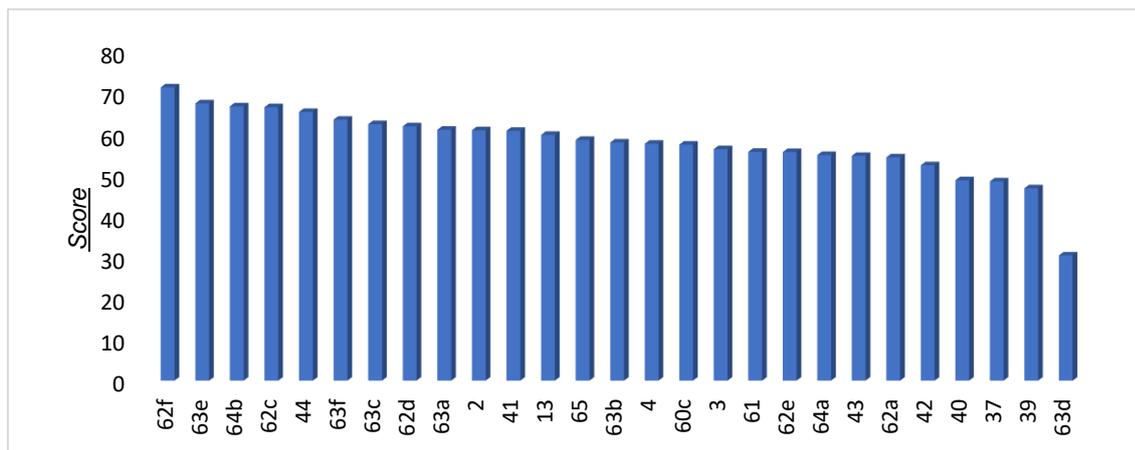


Figura 16. Ranking de interação com a proteína cristalografada de Re β – 2JJ3

Para fins de comparação de interação no sítio de ligação e a afinidade, utilizaremos o 17 β -estradiol (**2**, representado em amarelo) como nossa referência na análise. O receptor 2JJ3 foi ocultado para facilitar a visualização da sobreposição. A Figura 17 (entrada A), ilustra a interação do composto **37** com o bolsão de ligação de RE β , em posição semelhante ao ligante endógeno, sendo a base 1,2-benzisoxazol sobreposta a porção tetrahidronaftaleno do **2**. Esse resultado respalda as predições propostas inicialmente via SwissTargetPrediction, embora seja importante notar que o **37** apresenta uma interação ligeiramente inferior de acordo com a pontuação de classificação.

Ao introduzir os grupamentos propostos via hibridação molecular no esqueleto de **37**, foi observado um aumento significativo na interação com o receptor, superando até mesmo a interação com o composto **2**. As principais interações do ligante endógeno com receptor envolvem as ligações de hidrogênio em Leu339 e Gly472, interações π - π (π stacking) em Phe356 e π -Alquil em Leu298, Ala302, Leu434, Ile373, His375 e Ile376. Na Figura 17 (entrada B) foi observado que a sobreposição de **62f** com **2** é semelhante àquela observada com o composto **37**. No entanto, a estrutura 62f obteve uma pontuação de interação no sítio de ligação 23 pontos superior, enfatizando a importância dos substituintes nesse esqueleto base. Nas interações de **62f** foram observadas ligações de hidrogênio em Thr299, π stacking em Phe356, π -Alquil em Leu298, Leu301, Ala302, Leu339, Met340, Leu434, 376Ile e Leu476. O mesmo tipo de sobreposição foi observado na entrada C (Figura 17), onde o *score* mais elevado de **63e** foi referente a interação π -stacking com os resíduos em Phe356, π -Enxofre em Met366, além das interações π -Alquil nos mesmos aminoácidos que **2**.

Tabela 4. Interação de SERMs e 1,2-Benzisoxazois com resíduos de aminoácidos em REα.

	2	3	4	39	40	41	42	43	62a	62c	62d	62e	62f	63a	63b	63c	63d	63e	65
343Met	×	□	□	□	□	□	□		□	□				□			□	□	
346Leu	×	◇	×	×	×	◇	×		†	◇				†		†		◇	†
347Thr		†								○									
350Ala	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
351Asp		○	○	○	○	○	○	○											
353Glu									†					†					†
354Leu			×	×	×	×	×		×					×		×		×	
383Trp			×	×	×	×	×						◇						
384Leu	×					×		×											
387Leu	○	×	○	×	○	○	×	×		×	×	×						×	×
388Met	×					×							×	×		×		×	
391Leu	×	×	×	×	×	×	×	×			×	×		×		×	×	×	
394Arg																			
404Phe	◇	◇	◇		◇	◇	◇	◇			◇	◇		◇	◇	◇	◇	◇	◇
421Met	×	□	□	□	□		□						×						
424Ile		×	×	×	×	×	×	×		×			×						
428Leu		×													×				
521Gly			○			○													
524His										×			×						
525Leu	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
535Pro			×	×	×	×	×		+	+	+	×	+	+	+	+	+	+	×
539Leu							×												

◇ π stacking ○ Ligação de Hidrogênio □ π-Enxofre + π-Sigma † Ligação Carbono-Hidrogênio × π-Alquil ● Interação Proibida

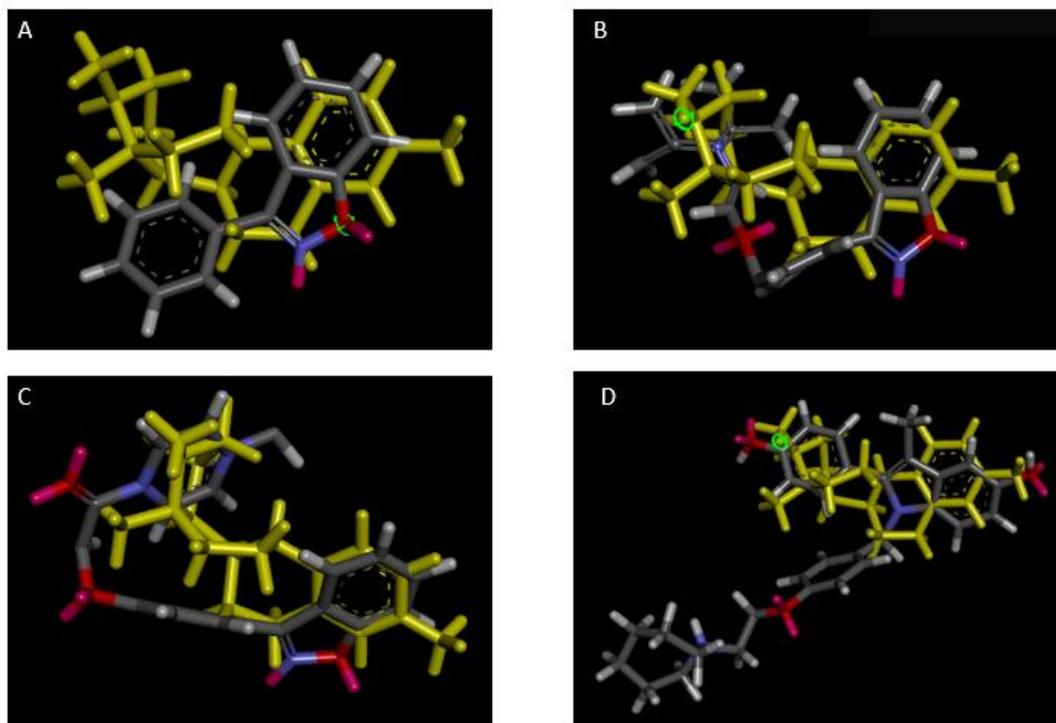


Figura 17. Interações de 1,2-Benzisoxazois no RE β (17 β -estradiol **2** em amarelo). (A) Sobreposição de **37** em **2**; (B) Sobreposição de **62f** e **2**; (C) Sobreposição de **63e** e **2**; (D) Sobreposição de **41** e **2**.

Ao contrário do que ocorre com o RE α , o *score* dos SERMs é menor que o do ligante endógeno. No entanto, a sobreposição da porção tetrahidronaftaleno (representada pela estrutura **2**) com a porção indol do **41** (Figura 17, na entrada D) também acontece para RE β . É importante notar que o 1,2-benzisoxazol apresenta interações semelhantes às dos fármacos SERMs no sítio de ligação do RE β . O bioisosterismo entre esses dois núcleos, o 1,2-benzisoxazois e indol, é de grade relevância, uma vez que o indol é frequentemente presente em fármacos antitumorais aprovados pelo FDA. A interação do composto **41** com o receptor RE β é predominantemente caracterizada por ligação de hidrogênio com os aminoácidos em Leu339 e Gly472, π stacking com Phe356, π -Alquil com Leu301, Ala302, Met340, Leu434, Ile376, Leu380 e Val487.

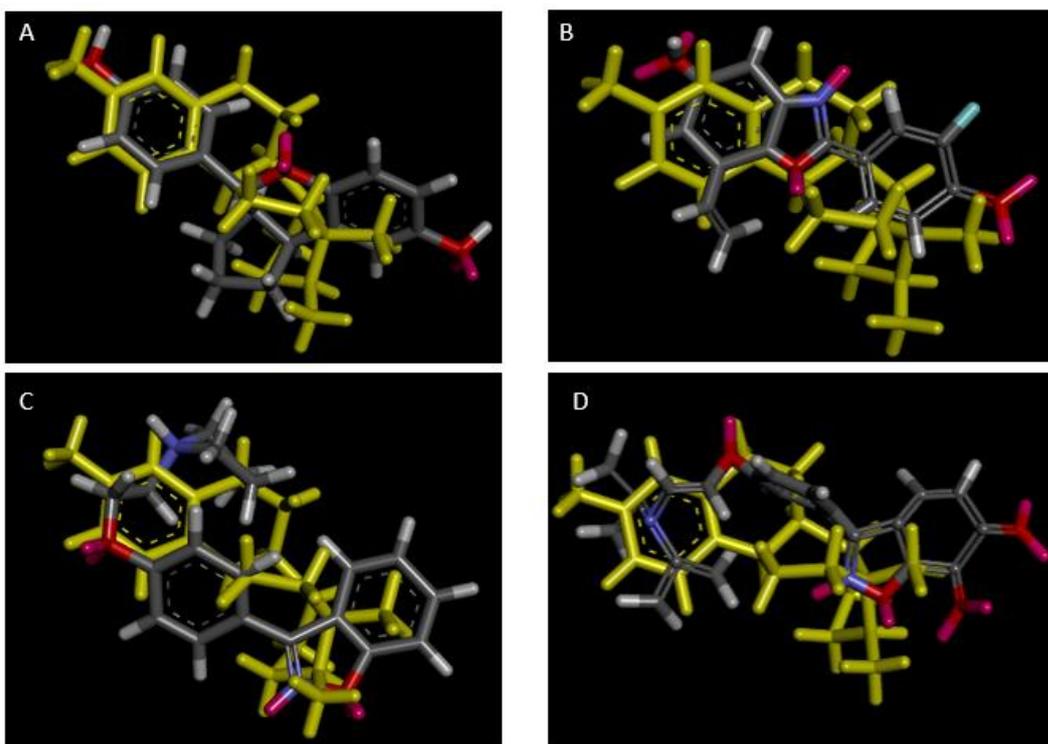


Figura 18. Interações de agonistas seletivos e derivados 1,2-Benzisoxazois em Estradiol (amarelo) no RE β . (A) Sobreposição de **44** em **2**; (B) Sobreposição de **13** em **2**; (C) Sobreposição de **62c** em **2**; (D) Sobreposição de **64b** em **2**.

O comportamento conformacional de agonistas seletivos de RE β apresenta sobreposições distintas, sendo que o composto **13** possui a porção 1,3-benzazol sobreposta a porção tetrahidronaftaleno de **2** (Figura 18). Além disso, esses agonistas interagem com os mesmos resíduos do ligante endógeno e estabelecem uma interação com a carboxila do resíduo Glu305, por meio de ligação de hidrogênio. Esse aminoácido é considerado um importante resíduo para interação no receptor, assim como observado anteriormente em RE α . Adicionalmente, a interação com Phe356 é via π -stacking nas porções etileno, anel aromático e interação como acceptora de elétrons na hidroxila, mostrando a relevância de grupos doadores de elétrons (acceptores de ligação de hidrogênio) nesta posição.

Em contraste com as expectativas usuais em relação aos SERDs, a porção benzopirona do composto **44** não se sobrepôs à porção tetrahidronaftaleno do composto **2**. Em vez disso, o grupo aceptor de ligação de hidrogênio, representado pela hidroxila fenólica mais acessível, estabeleceu uma interação com a carboxila de Glu305 (Figura 18). Além dessa importante ligação, foi observada interação do tipo π -Stacking com Phe356 e outras interações do tipo π -Alquil, conforme descrito na Tabela 5. Aparentemente, a conformação mais relevante é aquela em que a posição

da hidroxila nas estruturas dos fármacos coincide com a posição da hidroxila no ligante endógeno. Essa conformação parece ser reforçada pela π -stacking devido a hidroxila fenólica. Assim, esses resultados sugerem que fragmentos doadores de elétrons são bem aceitos e exibem uma interação significativa nessas posições.

Essa mesma conformação de não sobreposição também foi observada nos derivados **62c** e **64b**. Em **62c**, foi observada uma ligação de hidrogênio entre a carboxila do resíduo de Glu305 e o nitrogênio da porção pirrolidina. Seguindo nessa mesma linha, era esperado que a estrutura de **64b** também estabelecesse interações com o nitrogênio de diisopropil. No entanto, isso provavelmente não ocorreu devido ao impedimento estérico causado pelos grupos propil. Aparentemente, o volume desse grupamento foi ajustado no bolsão de ligação, pois mesmo na ausência de uma ligação de hidrogênio, foi observada uma pontuação significativa atribuída às interações π -Alquil.

Dessa forma, a presente sessão apresentou algumas correlações entre a presença de heteroátomos, grupos doadores de elétrons e/ou aceptores de hidrogênio e as posições em que estão distribuídos na estrutura. Notavelmente, as extremidades da molécula parecem ser as regiões mais propensas para as interações desses grupamentos, quando comparadas às posições internas da estrutura. No entanto, ao utilizar o *docking* como uma forma de interação, é preciso considerar que átomos como o oxigênio, que possuem dois pares de elétrons livres podem não ser reconhecidos no ensaio *in silico*, sendo categorizados como “*dummy atoms*” (átomos substituintes). A presença desses *dummy atoms* para “reconhecimento computacional” não afeta o resultado dos outros átomos da simulação, porém os *dummy atoms* não são reconhecidos como doadores ou aceptores de ligações, o que pode impactar negativamente a pontuação da simulação de interação com o bolsão de ligação. Isso ocorre devido ao fato de que as estruturas em análise contêm diversos átomos de oxigênio, que normalmente são reconhecidos por serem bons doadores/receptores de ligações. Na nossa abordagem comparativa com estruturas de atividade conhecida não há uma diferença substancial, porque este “erro” também é aplicado as estruturas de controle positivo, sendo essa uma limitação da técnica *in silico* aplicada em todas as estruturas testadas e estas podem ser validadas via *rescore* durante o ensaio.

Tabela 5. Interação de SERMs e 1,2-Benzisoxazois com resíduos de aminoácidos em RE β .

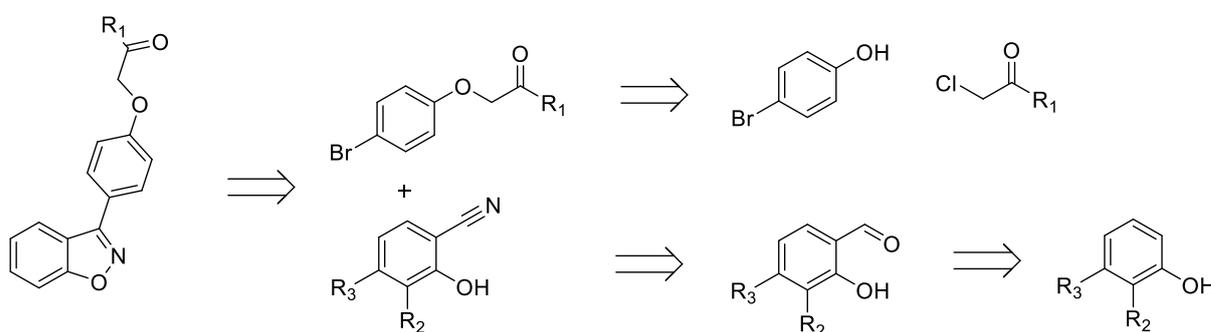
Composto	2	3	13	37	41	44	62b	62c	62d	62f	63a	63c	63e	63f	64b
295Met						x	x	x							
298Leu	x		x	x		x			x	†	x		x	x	
299Thr		●	†							○					
301Leu			x		x	x	x	x		x				x	x
302Ala	x			x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
305Glu			○					○						○	
336Met					x		x	x			□		□		□
339Leu	○		x	x	○	x	x	x	x	x	x	x	x		
340Met			x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x
343Leu	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
346Arg															
356Phe	◇	●	◇	◇	◇	◇	x	○	◇	x	◇	◇	◇	◇	x
373Ile	x								●			x	x		
375His	x														
376Ile	x					x		x	x	x		x	x		
377Phe									x						
380Leu			x		x										
472Gly	○				○				†						
475His						x									
476Leu		x				x	x			x	x			x	
479Met		□				x	□								
487Val					◇										

◇ π stacking ○ Ligação de Hidrogênio □ π -Enxofre + π -Sigma x π -Alquil † Ligação Carbono-Hidrogênio ● Interação Proibida

5.2. Planejamento sintético para elaboração das estruturas

Após a realização dos ensaios com docking molecular foram selecionados 13 compostos para síntese, a saber: **62a**, **62c**, **62d**, **62d**, **62f**, **63a**, **63b**, **63c**, **63d**, **63e**, **63f**, **64b** e **65**.

Ao analisar uma série de protocolos já utilizados para a obtenção de estruturas análogas às aquelas de interesse, foi escolhida a metodologia de GuiFang Chen (CHEN, G. *et al.*, 2017). Essa abordagem emprega o clássico reagente de Grignard em uma síntese convergente, tendendo à melhores resultados de rendimento global. O Esquema 7 ilustra a retrosíntese escolhida para a síntese dos compostos.



Esquema 7. Análise retrosintética generalizada para a obtenção dos compostos de interesse.

5.2.1. Obtenção do aldeído salicílico (**46**)

Com o objetivo de desenvolver uma metodologia para obtenção do 2-hidroxibenzaldeído a partir de fenóis, foi realizada uma avaliação.

A obtenção do 2-hidroxibenzaldeído (**46**) via formilação de Reimer-Tiemann, descrita por Vogel (BRIAN S. FURNISS, ANTONY J. HANNAFORD, PETER W. G. SMITH, 1989), é um método clássico e efetivo para obtenção dos derivados salicílicos. Entretanto, essa reação apresentou baixos rendimentos (27 %), devido à incidência de subprodutos de formilação na posição *para*, gerando 4-hidroxibenzaldeído. Além disso, ocorreram subprodutos de polimerização, que causavam uma difícil extração e reaproveitamento.

A Figura 19 apresenta o espectro de RMN ¹H do **46** obtido através da metodologia de formilação.

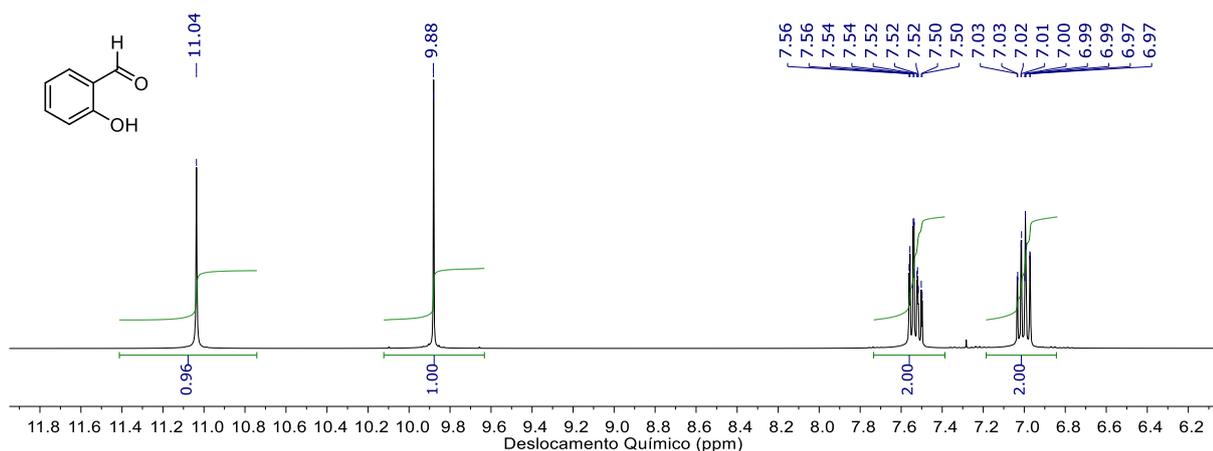


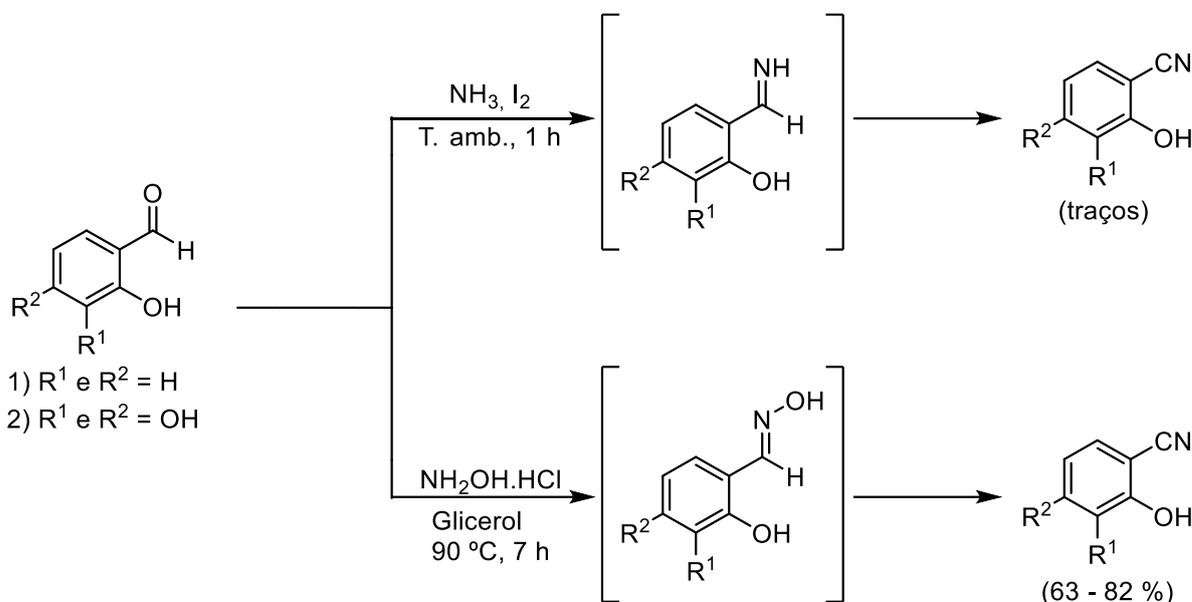
Figura 19. Espectro de RMN ^1H de 2-hidroxibenzaldeído (**46**). Região ampliada de 6 a 12 ppm do salicilaldeído.

Com a adição de um substituinte ao fenol na posição *orto*, os quatro hidrogênios aromáticos se separam como dois sinais de multiplete, aparecendo na faixa entre 7,56 e 6,97 ppm. Além disso, foi identificado o surgimento do hidrogênio ligado à carbonila, presente em 9,88 ppm, característico de hidrogênio presente em aldeídos. O sinal do OH, que antes apresentava deslocamentos típicos de OH fenólico, agora aparece em 11,0 ppm, devido à formação de uma ligação de hidrogênio com a carbonila resultante.

A utilização da formilação de fenóis foi interrompida devido à baixa viabilidade experimental, devido ao baixo rendimento observado, assim, as próximas etapas foram realizadas com aldeídos salicílicos comerciais.

5.2.2. Obtenção da 2-hidroxibenzonitrila (**33**)

Na obtenção da 2-hidroxibenzonitrila (**33**) foram utilizadas duas metodologias já descritas, uma empregando o uso de amônia (SHIE *et al.*, 2003) e outra com a utilização de cloreto de hidroxilamina, via oxima (INGALE; PATIL; SHINDE, 2017). O Esquema 8 apresenta as condições utilizadas para a essa etapa.



Esquema 8. Obtenção de salicilonitrilas a partir de aldeídos salicílicos. Via formação de iminas (Superior) e via formação de oximas (Inferior)

A primeira abordagem empregando amônia, embora previamente documentada, não produziu os resultados esperados, apresentando apenas traços do produto.

Por outro lado, a metodologia que envolveu um intermediário oxima, levou à rendimentos na faixa de 63 % a 82 %, em escalas de 3 mmol, 10 mmol e 50 mmol. Os menores valores de rendimento foram observados em maiores escalas de trabalho, o que é pouco comum já que erros de pesagem e perdas são menos impactantes. Uma justificativa para explicar isso pode estar relacionada à dificuldade de desidratação da oxima em grandes volumes. Embora tenha ocorrido uma conversão completa do salicilaldeído em oxima, a conversão subsequente da oxima em nitrila não era completa.

Outro fator relevante é a dificuldade na extração do glicerol em volumes maiores devido à alta viscosidade que ele apresenta. Tentativas de substituir o glicerol por solventes menos viscosos, como metanol e etanol, foram descartadas, uma vez que suas temperaturas de ebulição são inferiores à temperatura necessária para a desidratação.

Dessa forma, fica evidente a importância do glicerol na reação, tanto para facilitar a desidratação devido ao seu alto ponto de ebulição, quanto no papel ambiental, sendo um solvente biodegradável e com capacidade de reutilização até três vezes neste sistema reacional.

A caracterização do produto foi realizada por RMN de ^1H e ^{13}C . A Figura 20 apresenta os espectros.

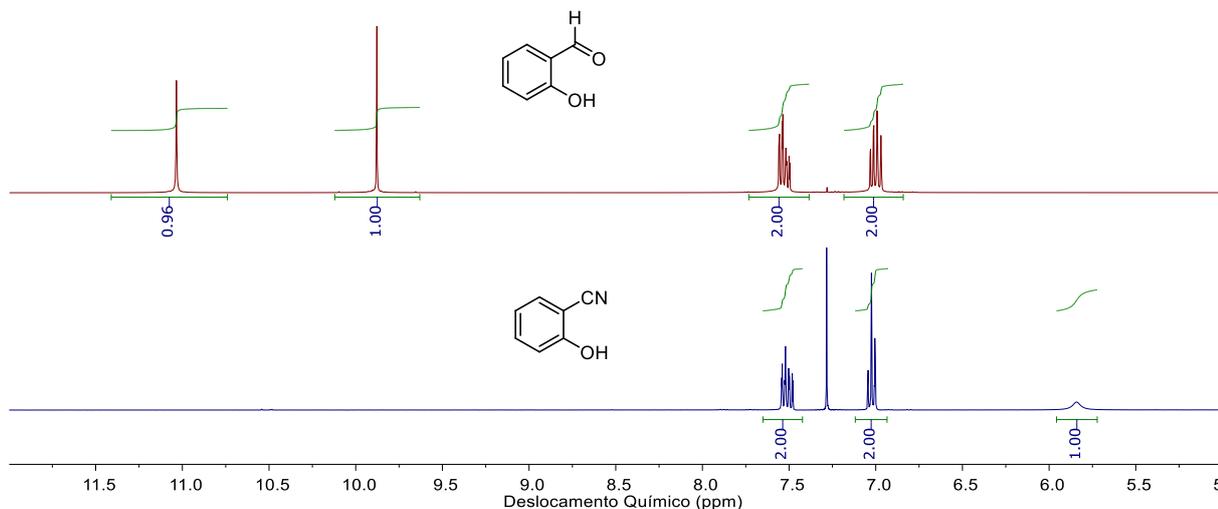


Figura 20. Sobreposição dos espectros ampliados de RMN ^1H na faixa de 5 a 12 ppm do 2-hidroxibenzaldeído (vermelho) e da 2-hidroxibenzonitrila (azul)

A principal evidência da formação da nitrila de interesse no espectro de RMN de ^1H é a ausência do sinal de hidrogênio de aldeído, que, no aldeído salicílico, está localizado em 9,88 ppm. Além disso, o sinal da hidroxila, que anteriormente se encontrava em 11,0 ppm, se desloca para a região mais blindada, em 5,84 ppm. Esse deslocamento ocorre devido à incapacidade da hidroxila de estabelecer uma ligação de hidrogênio intramolecular, retornando ao deslocamento químico típico para OH fenólico.

O espectro de RMN ^{13}C também foi utilizado para confirmação da estrutura. A Figura 21 apresenta a região ampliada de 30 a 160 ppm do espectro.

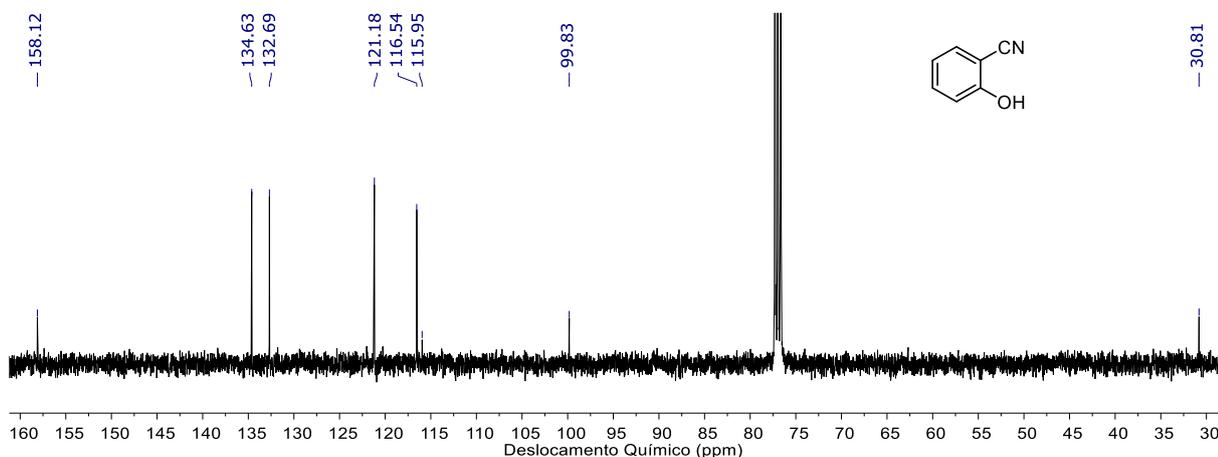


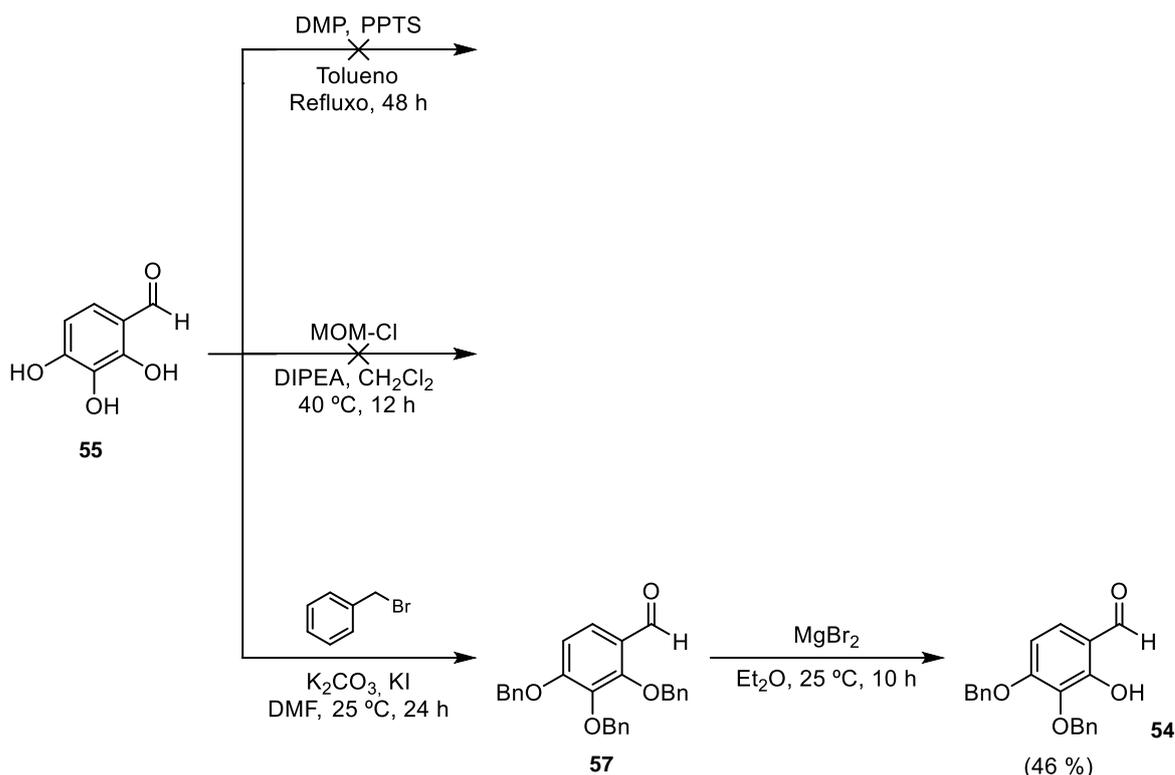
Figura 21. Espectro ampliado de ^{13}C da 2-hidroxibenzonitrila.

A confirmação mais significativa da estrutura é a alteração de deslocamento químico do sinal, que anteriormente pertencia a um carbono carbonílico, localizado próximo a 200 ppm, e agora pertence a um grupo nitrila, com deslocamento em 99,8 ppm. Isso coloca o sinal em uma região mais blindada pelo efeito anisotrópico da ligação tripla.

5.2.3. Proteção e desproteção seletiva do 2,3,4-tri-hidroxibenzaldeído (**55**).

Para a síntese dos benzisoxazois derivados do pirogalol (**60c**, **61**, **64a**, **64b**), foi necessário realizar etapas de proteção das hidroxilas 3 e 4 do 2,3,4-tri-hidroxibenzaldeído, a fim de evitar formação do produto ácido-base ocasionado pela reação entre os hidrogênios ácidos das hidroxilas com reagente de Grignard.

Para realizar a proteção, foram utilizadas três metodologias. O Esquema 9 apresenta as metodologias avaliadas.



Esquema 9. Estratégias de proteção das hidroxilas do 2,3,4-tri-hidroxibenzaldeído utilizadas.

Embora o DMP seja um clássico grupo protetor de catecois, não demonstrou eficácia na proteção das hidroxilas. Com a inserção de PPTS para ativar o DMP, ocorreu a formação de um precipitado, aparentemente polimerizado, cuja

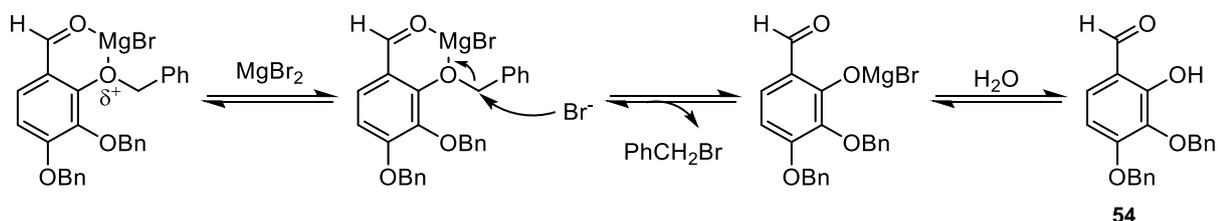
concentração aumentou à medida que o tempo de reação avançou e os reagentes foram consumidos (monitorados por CCD). Foi realizado um segundo ensaio seguindo este mesmo protocolo, mas desta vez com a incorporação de um sistema de Dean-Stark para promover o deslocamento do equilíbrio reacional no sentido dos produtos. No entanto, observou-se a formação de um produto polimerizado e o consumo dos reagentes de partida (FUJIWARA *et al.*, 2012).

Uma nova abordagem proteção individual das hidroxilas empregando MOMCI foi avaliada. No entanto, a falta de seletividade em relação à reatividade subsequente das três hidroxilas resultou na formação de diversos subprodutos, possivelmente devido à proteção em posições distintas (XU *et al.*, 2014).

Finalmente, o protocolo que se mostrou mais promissor para a proteção desejada foi a benzilação total, seguida de uma desproteção seletiva, alcançando um rendimento de 46%. Esse rendimento está associado à necessidade de realizar duas etapas reacionais.

A metodologia de proteção envolve uma S_N2 entre o fenol do aldeído e brometo de benzila. Entretanto, há na literatura uma etapa de desproteção seletiva para a hidroxila em posição *orto* à carbonila do aldeído utilizando $MgBr_2$ (NICOLAOU; SASMAL; XU, 2004).

A seletividade da desproteção na presença de $MgBr_2$ pode ser atribuída à forte afinidade do oxigênio pelo magnésio. O Esquema 10 ilustra o mecanismo de desproteção proposto, baseado em dados da literatura (HARALDSSON; BALDWIN, 1997).



Esquema 10. Proposta de mecanismo para desproteção seletiva.

A seletividade da desproteção ocorre devido a uma nova reação S_N2 , que resulta na formação de um intermediário de seis membros. Isso provoca a ativação da posição *orto*, aumentando a eletrofilicidade do carbono benzílico e formando um bom grupo de saída. A seletividade pôde ser comprovada por técnica de RMN de 1H .

A Figura 22 apresenta a comparação dos espectros que comprovam a desproteção apenas na posição 2.

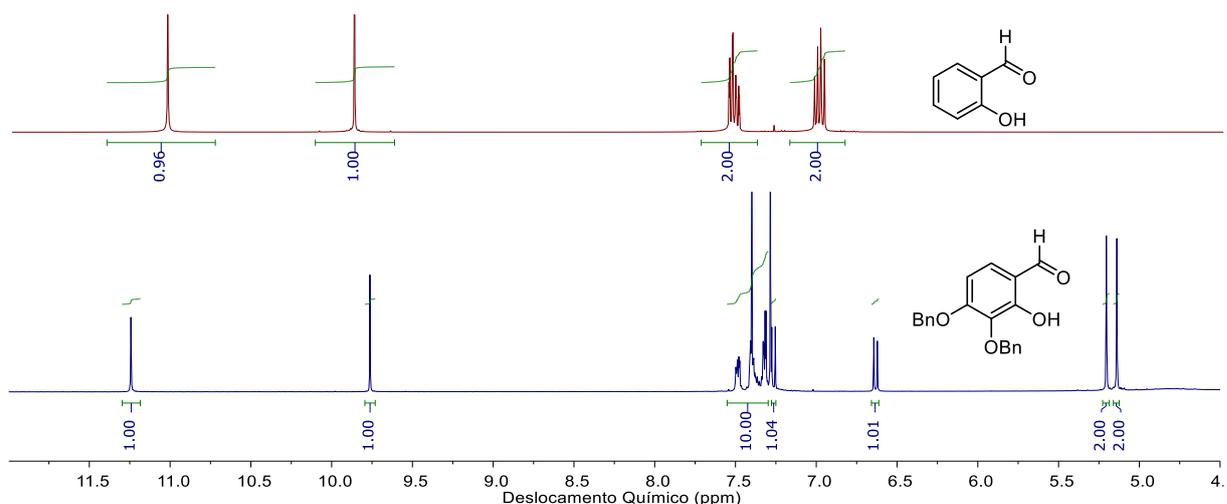


Figura 22. Sobreposição dos espectros de RMN ^1H do salicilaldeído (vermelho) e do produto obtido após a desproteção seletiva (azul).

Observando o espectro inferior, na região onde aparecem os hidrogênios aromáticos (6,5 a 8,0 ppm), podem ser observados sinais de um multipeto com integral para 10 H, referente às fenilas que permaneceram na estrutura, dois dupletos, referente aos hidrogênios aromáticos, ambos os sinais com integral para 1 H cada. Os metilenos da benzila são mais blindados e saem como simpletos, entre 5,0 e 5,5 ppm e o hidrogênio ligado diretamente ao carbono carbonílico sai na região esperada para aldeídos, em aproximadamente 9,7 ppm.

Sinais de OH em anéis aromáticos, normalmente encontrados na faixa entre 6,0 e 8,0 ppm, podem manifestar deslocamentos quando estão realizando ligações de hidrogênio intramolecular com carbonilas, como observado no caso do salicilaldeído (mostrado no espectro superior). Portanto, a evidência da desproteção na posição *orto*, em relação a carbonila é explicada pelo deslocamento químico que o OH que foi desprotegido apresenta, similar ao que acontece no do OH do salicilaldeído.

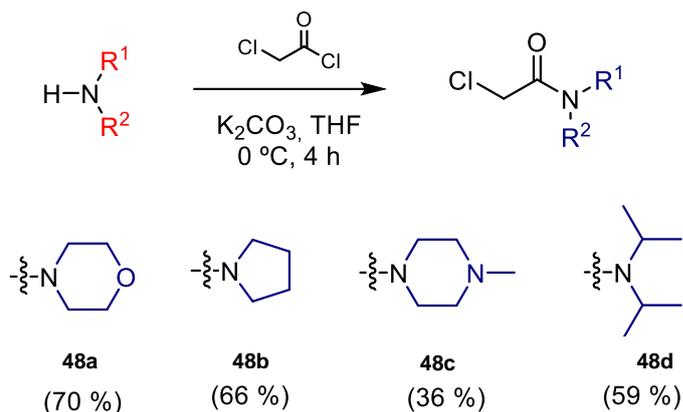
5.2.4. Síntese dos haletos precursores da reação tipo Barbier-Grignard.

Para a elaboração dos haletos precursores para a reação de Grignard, foram realizadas três etapas, a primeira foi a síntese das 2-cloroacetamidas-*N,N*-substituídas, posteriormente as amidas foram reduzidas às suas aminas

correspondentes e por fim, foram realizadas as reações de alquilação dos 4-bromofenóis.

5.2.4.1. Síntese das 2-cloroacetamidas-*N,N*-dissubstituídas.

A síntese das 2-cloroacetamidas-*N,N*-dissubstituídas foram realizadas a partir do cloreto de cloroacetila com a amina secundária correspondente, seguindo o protocolo descrito em 4.3. O Esquema 11 apresenta as condições e amidas preparadas.



Esquema 11. Esquema de obtenção das amidas *N,N*-dissubstituídas e os respectivos rendimentos observados.

A faixa de rendimentos observada para a reação no tempo de 4 h, foi de 36 a 70 %.

A utilização de uma base, neste caso, K_2CO_3 é necessária porque após o início de formação das amidas, HCl é liberado no meio, podendo causar uma protonação na amina e, conseqüentemente, interromper a reação.

Após a total conversão das aminas, o bruto reacional extraído com CH_2Cl_2 , e os produtos exigiram purificação por cromatografia em coluna, os eluentes necessários estão descritos na sessão experimental.

A confirmação das estruturas foi realizada por RMN de ^1H . A Figura 23, a seguir, apresenta o espectro do composto derivado da di-isopropilamina (**48d**).

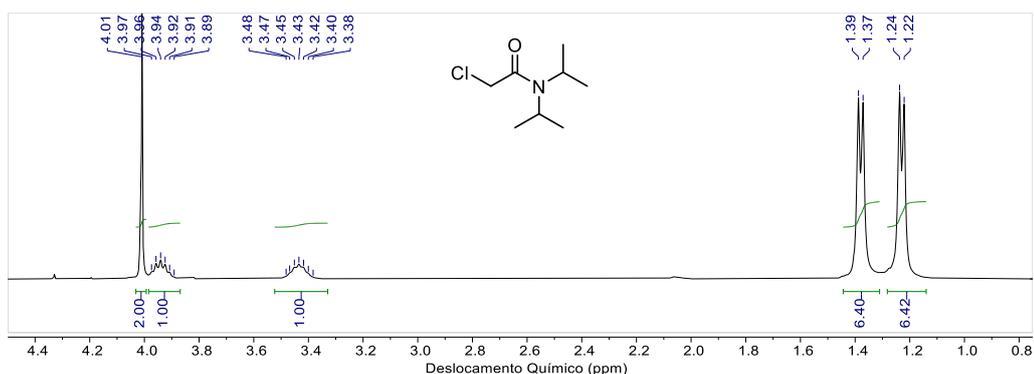
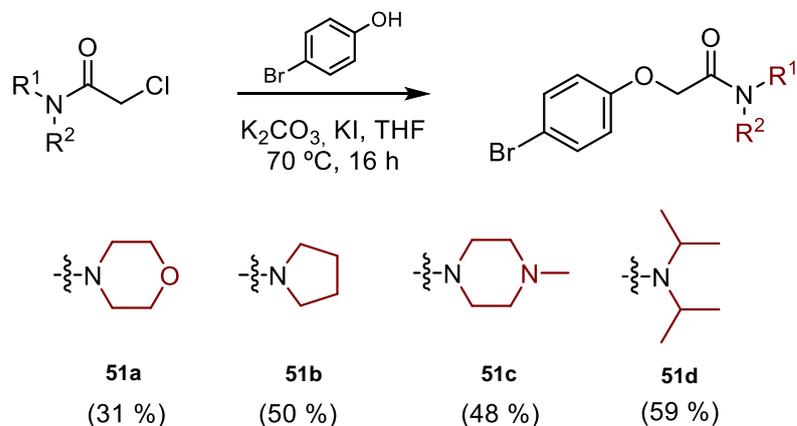


Figura 23. Espectro da 2-cloro-*N,N*-di-isopropilacetamida.

O espectro de RMN de ^1H apresenta os 5 sinais esperados. O simpleto mais desblindado é referente ao metileno entre o cloro e a carbonila. Já os demais hidrogênios, ligados ao nitrogênio, são quimicamente equivalentes, entretanto, no espectro saem em sinais separados pelo diferente ambiente químico que estão localizados. A forte conjugação que o nitrogênio tem com a carbonila resulta na distinção desses hidrogênios pela forte rigidez que causa na ligação C-N, diferenciando hidrogênios axiais e hidrogênios equatoriais. Esse efeito também se estende para os dupletos das isopropilaminas.

5.2.4.2. Reações de substituição entre 4-bromofenol com as 2-cloroacetamidas-*N,N*-dissubstituídas.

Após a síntese das amidas, o próximo passo foi a alquilação do 4-bromofenol, via clássica $\text{S}_{\text{N}}2$ entre haletos e fenóis. O Esquema 12 apresenta as condições utilizadas para a síntese dos 4-bromofenóis alquilados.



Esquema 12. Reação de Williamson para síntese dos 4-bromofenóis alquilados.

A reação de Williamson é conduzida em meio básico para a ativação dos fenóis por meio da remoção de um próton, aumentando a nucleofilicidade. No entanto, mesmo após a ativação, ainda é necessário aplicar temperaturas mais elevadas e longos tempos de reação. Para melhorar o desempenho da reação, o KI é empregado para melhorar o grupo de saída. O iodeto, sendo um nucleófilo mais eficaz, reage rapidamente com a 2-cloroacetamida e forma o 2-iodoacetamida, aumentando a reatividade no meio reacional. Apesar dessa estratégia, os tempos de reação foram próximos a 16 h. Os rendimentos obtidos para as alquilações ficaram entre 31 e 59 %.

Os compostos foram utilizados na próxima etapa sem a necessidade de prévia purificação. A Figura 24, apresenta a caracterização de **51d**, para representar a família dos 4-bromofenoxiacetamidas.

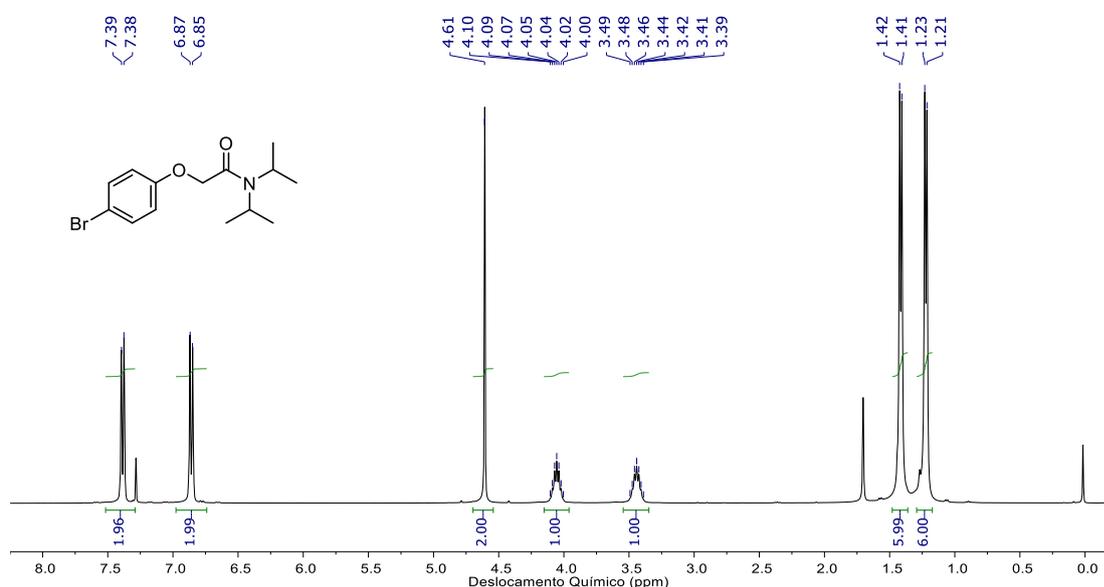


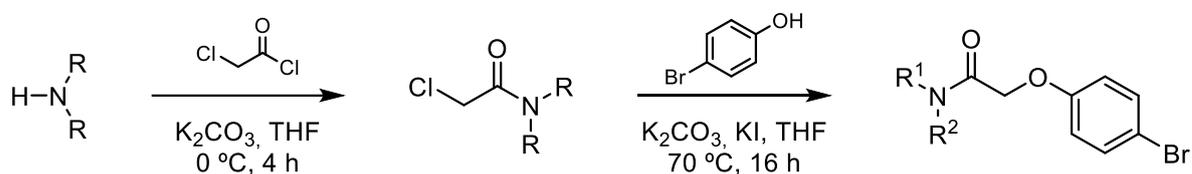
Figura 24. Espectro da FV014 em CDCl_3 (Bruker, 400 MHz).

O espectro de RMN de ^1H exibe todos os sinais previstos. Na faixa de 6,5 a 7,5 ppm os sinais do sistema *para* dissubstituído, mais ao centro, entre 3,5 e 5,0 ppm os sinais de hidrogênios vizinhos a heteroátomos. Podemos observar que o simpleto do metileno é o sinal mais desblindado dessa região central, isso por dois principais motivos, além de estar ligado a um oxigênio que é um grupo mais eletronegativo, esse oxigênio também apresenta uma carga parcial positiva pela sua conjugação com o sistema aromático, intensificando ainda mais o seu efeito de desblindar. Os demais hidrogênios ligados ao nitrogênio seguem o padrão de

duplicidade observado, indicando que ainda há uma forte conjugação entre o nitrogênio e a carbonila.

5.2.4.3. Reação *one-pot* para obtenção das 4-bromofenoxiacetamidas-*N,N*-dissubstituídas.

Com o objetivo de otimizar o processo de obtenção das amidas previamente sintetizadas, uma adaptação para uma reação *one-pot* foi realizada. As reações *one-pot* são mais eficientes, levando a rendimentos reacionais superiores, uma vez que não é necessário isolar os intermediários. As condições foram mantidas como a metodologia original e a estratégia está apresentada no Esquema 13, a seguir.



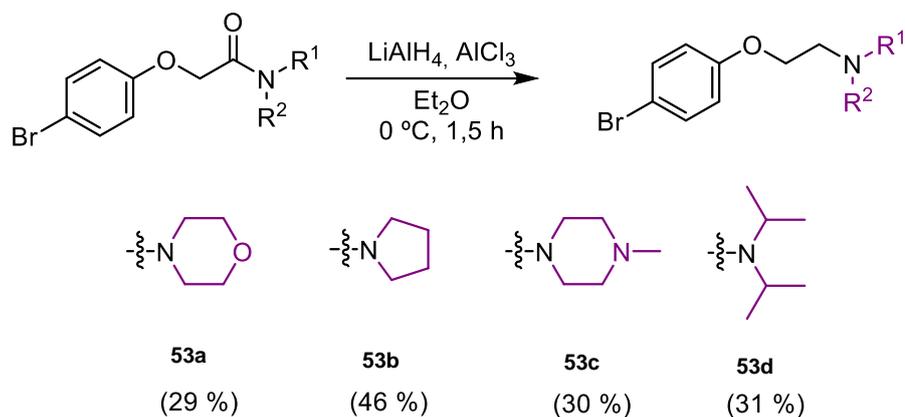
Esquema 13. Esquema genérico de obtenção das amidas por rota *one-pot*.

Na primeira etapa reacional, a presença do carbonato tem o propósito de neutralizar o HCl que vai sendo formado durante a S_N acílica. No entanto, a quantidade adicionada no início não é suficiente para promover a posterior a formação do fenóxido. Portanto, ao monitorar a reação por CCD e verificar do consumo completo da amina, o pH é ajustado para 10 com a adição de mais K_2CO_3 . Após o pH ajustado, a temperatura é aumentada para favorecer a S_N2 .

Os rendimentos obtidos para os compostos, após o desenvolvimento da metodologia *one-pot*, aumentaram cerca de 15-20%, o que já era esperado, uma vez que a etapa de isolamento dos produtos é dispensada.

5.2.4.4. Reações redução para a formação de aminas terciárias.

O próximo passo foi a redução do grupo amida, através de metodologias adaptadas, utilizando um forte agente redutor como o $LiAlH_4$. O Esquema 14 apresenta as condições utilizadas e os rendimentos observados.



Esquema 14. Aminas obtidas através da reação de redução com LiAlH₄.

Os rendimentos observados para a reação de redução ficaram na faixa de 46 a 30 %.

A reação de redução de amidas para aminas se destaca devido à notável nucleofilicidade do hidreto, que é capaz de até mesmo a carbonila de uma amida que tem baixa eletrofilicidade. Nesse contexto, o íon hidroxila (OH⁻) é o melhor grupo de saída presente no meio e a reação resulta na formação rápida das aminas terciárias correspondentes. No monitoramento da reação notou-se ausência de outros subprodutos na CCD e permitiu que a caracterização dos compostos fosse realizada sem a necessidade de prévias purificações. A Figura 25 apresenta a comparação do material de partida (amida) e do produto obtido após a redução (amina).

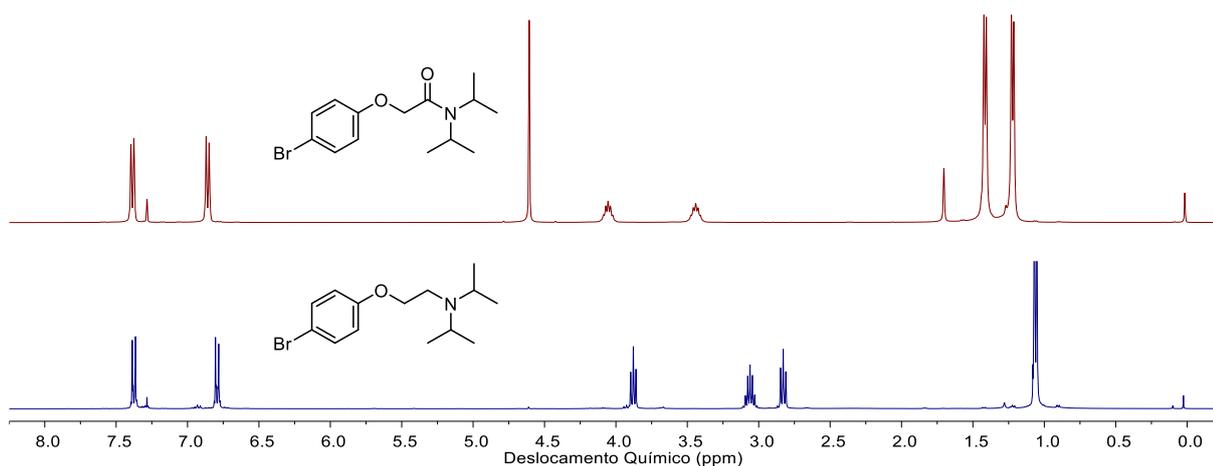
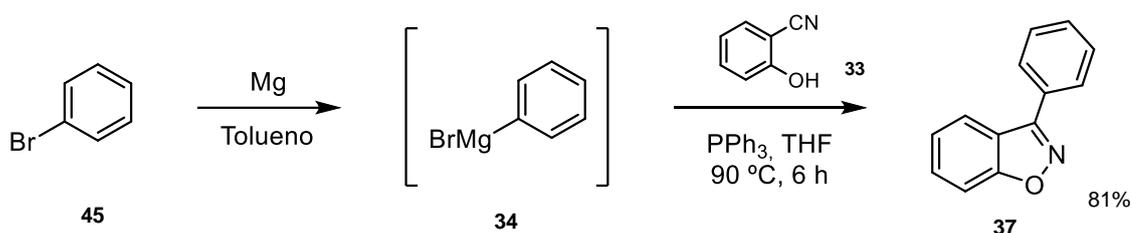


Figura 25. Sobreposição dos espectros da amida (vermelho) e da respectiva amina (azul), após a reação de redução.

Os deslocamentos químicos dos dupletos aromáticos permanecem inalterados devido à semelhança do ambiente químico. No entanto, o restante do espectro apresenta características que confirmam a ocorrência da reação. Com a redução da carbonila, ocorre uma maior liberdade rotacional devido à ausência de ressonância com o nitrogênio. Esse efeito é evidenciado através da equivalência dos septetos e dos dupletos da isopropila, que anteriormente eram distintos pela rigidez da ligação C-N. Ademais, o metileno formado, a partir da redução, acopla com o metileno vizinho e ambos aparecem no espectro como tripletos, sendo o tripleto mais desblindado referente ao metileno ligado diretamente ao oxigênio.

5.2.5. Reações de adição e ciclização (Grignard-Barbier) para a formação dos benzisoxazóis.

Para avaliar a metodologia, foi realizada uma reação conforme o protocolo de GuiFeng Chen, utilizando brometo de fenilmagnésio e salicilonitrila, como ilustrado no Esquema 15.



Esquema 15. Reação de obtenção do benzisoxazol.

Geralmente, o reagente de Grignard é preparado *in situ* no meio reacional, e em seguida, a salicilonitrila é adicionada. A reação, conforme descrita na literatura, produziu o composto desejado com um rendimento de 81%. A purificação do composto foi através de purificação em coluna. O produto da reação foi caracterizado por RMN de ¹H e ¹³C. A Figura 26 apresenta os espectros de ¹H e ¹³C do 3-fenilbenzisoxazol e o de ¹³C da 2-hidroxibenzonitrila para fins de comparação.

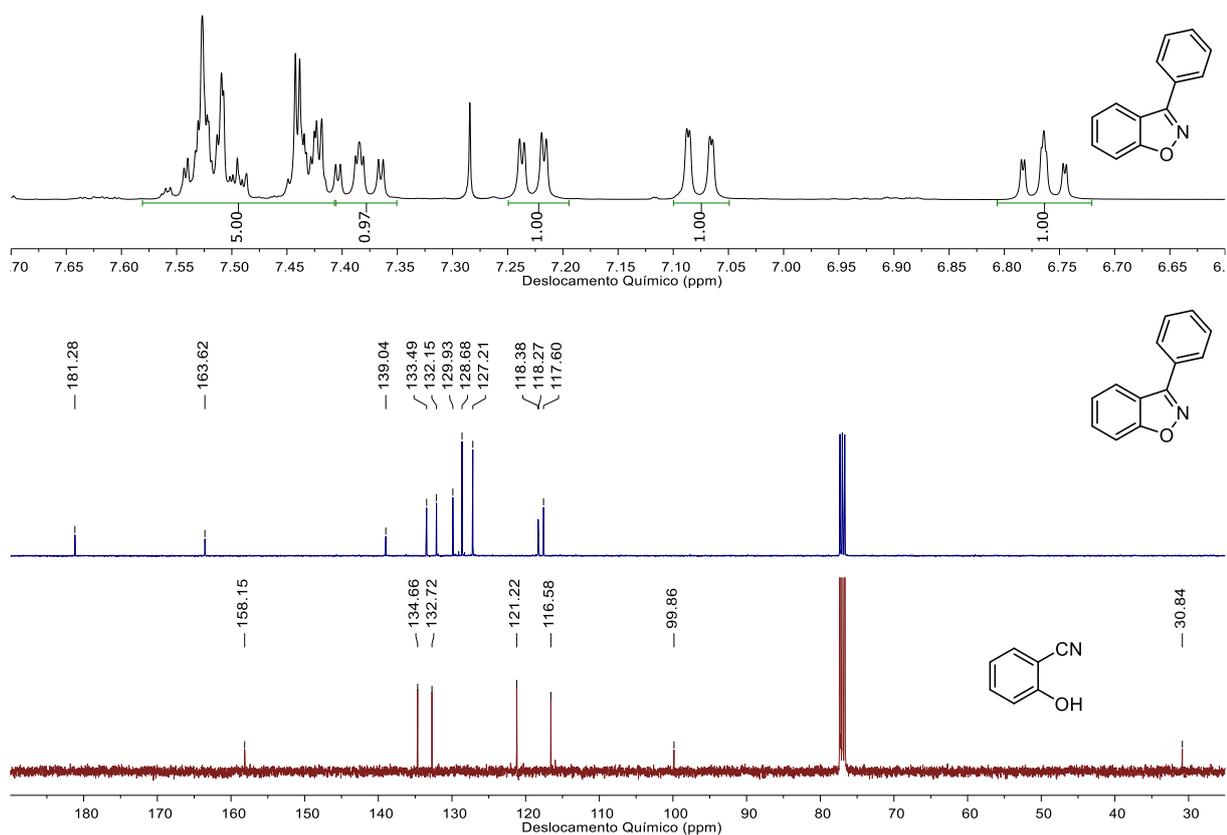


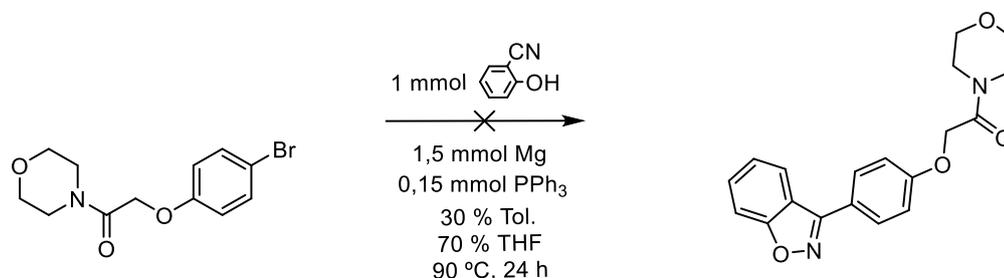
Figura 26. Espectros de ^1H (preto) e ^{13}C (azul) do fenilbenzoxazol e de ^{13}C da salicilnitrila (marrom).

No espectro de RMN de ^1H , todos os hidrogênios previstos e característicos do esqueleto 1,2-benzisoxazol foram claramente identificados após a adição seguida de ciclização. No multiplete presente na faixa de 7,56 a 7,40 ppm com integral de 5 H são encontrados os hidrogênios da fenila, logo ao lado, com aspecto de tripleto e integral para 1 H, um dos hidrogênios do sistema *orto* dissubstituído. Entre 7,25 e 6,7 ppm, estão os outros 3 hidrogênios do sistema *orto*.

No espectro de ^{13}C , novamente todos os sinais esperados para o núcleo foram identificados. O carbono da nitrila que está presente em 30,8 ppm, após a reação com o reagente de Grignard perde a blindagem por anisotropia, e agora pertence à um sistema heterocíclico, ficando como o mais desblindado do espectro, em 181,3 ppm. Os demais sinais estão presentes em δ 163,68; 139,09; 133,55; 132,21; 129,98; 128,74; 127,27; 118,43; 118,33; 117,66 e estão de acordo com os descritos na literatura.

5.2.6. Tentativa de obtenção dos compostos benzisoxazóis finais.

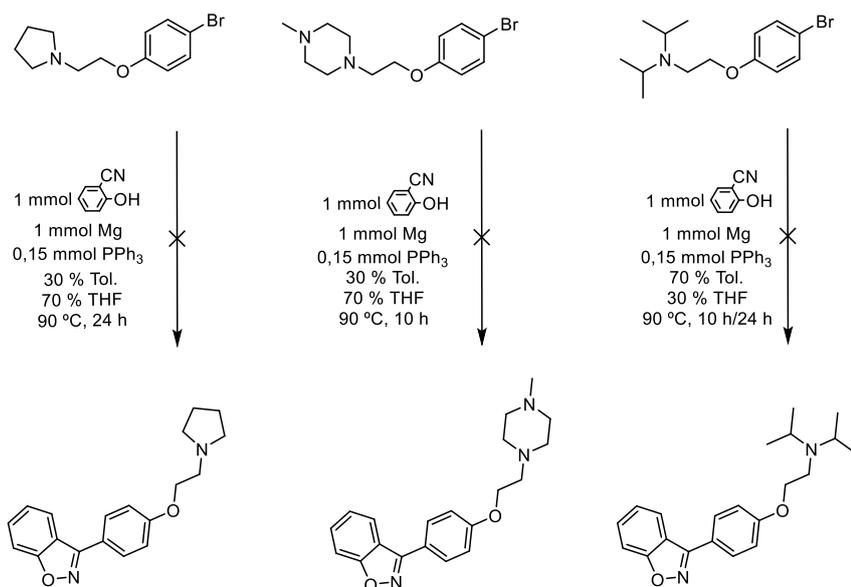
Em várias tentativas de aplicar a metodologia a derivados de 4-bromofenóxi, nenhum resultado conforme o esperado foi obtido. As primeiras foram realizadas com acetamidas, antes da redução (Esquema 16).



Esquema 16. Reação de Grignard em derivados 4-bromofenóxi com acetamidas.

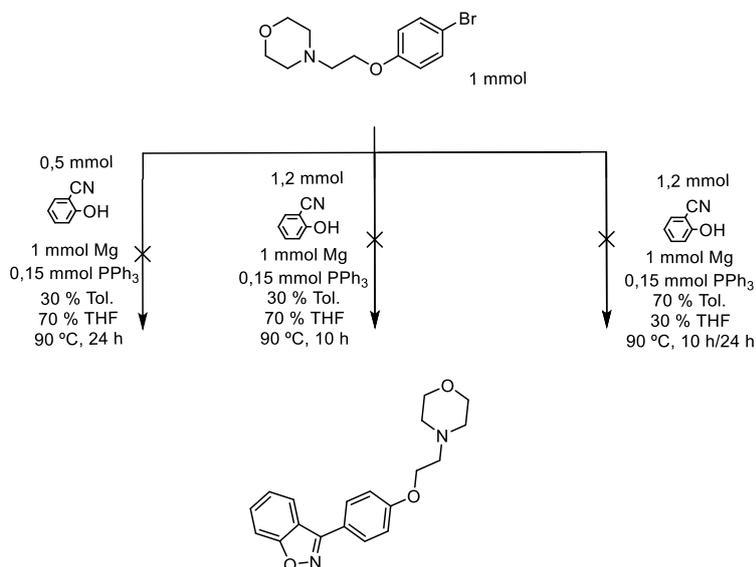
Durante o monitoramento por CCD, foram detectados vários sinais; entretanto, após o tratamento da reação, nenhum composto foi isolado majoritariamente. Dado que o reagente de Grignard é um nucleófilo potente, pode ter causado ataques na carboxila da amida, resultando na formação de subprodutos de baixo interesse e impedindo a formação do produto desejado.

Foram realizadas novas tentativas para obter os produtos desejados, desta vez utilizando as aminas correspondentes. No entanto, mais uma vez, nenhuma das reações conduziu ao resultado esperado, mesmo após várias tentativas de ajuste das proporções dos reagentes.



Esquema 17. Reação de Grignard em derivados 4-bromofenóxi com aminas.

Durante o monitoramento da reação com o derivado da morfolina para a obtenção do 62a, foram identificados sinais de maior polaridade na CCD. Após 24 h de reação, ainda eram detectados sinais do reagente limitante, o que levou ao isolamento do sinal observado para fins de caracterização. A estrutura foi analisada por RMN de ¹H e ¹³C. A Figura 27 exibe o espectro de RMN de ¹H para o composto isolado.



Esquema 18. Reagente de grignard em reação 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina.

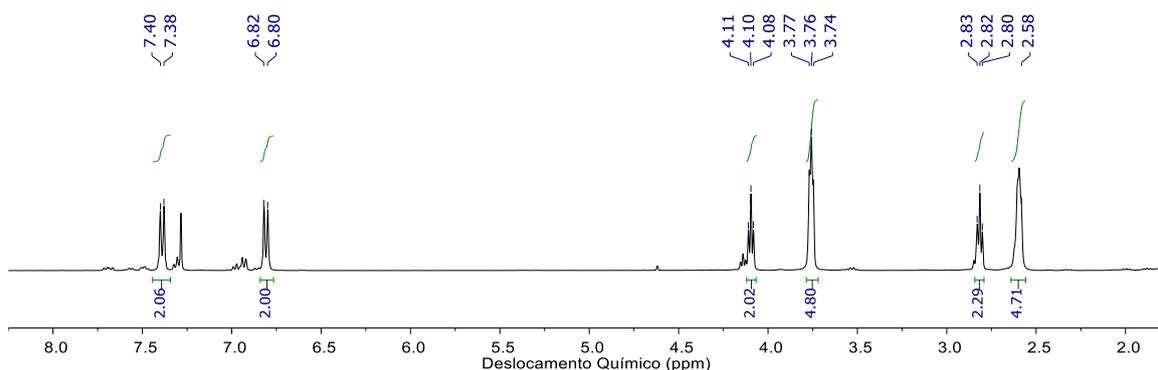


Figura 27. Espectro de ^1H do produto isolado na reação de Grignard.

O RMN ^1H apresentou sinais característicos do brometo de partida (**53a**). Já no espectro de ^{13}C (anexos), não foram observados sinais característicos do núcleo benzisoxazol, esperado em aproximadamente 180 ppm.

Embora as características dos sinais de RMN estejam relacionadas apenas ao produto inicial, a discrepância nos sinais na placa de CCD levantou dúvidas sobre essa informação. Com o objetivo de compreender o mecanismo em que a reação estava se encaminhando, foram conduzidos ensaios de espectrometria de massas. A massa molar esperada para o produto de interesse era de $324 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, enquanto uma massa molar de 62a resultou em $285 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. A Figura 28 ilustra o espectro de massas para o composto isolado.

5.3. Resultados da avaliação de viabilidade celular.

A avaliação da citotoxicidade foi conduzida por meio da contagem de células viáveis, comparando os resultados com o grupo controle. No caso do composto 37, neste experimento, foi evidente que não houve qualquer efeito citotóxico nas células MCF-7, mesmo em concentrações de até 100 μM , conforme demonstrado no gráfico da Figura 30.

Assim com o previsto na análise de *docking*, que indicaram uma interação limitada do composto 37 com ambas as isoformas do RE. Esses resultados respaldam a ausência de citotoxicidade observada para MCF-7, reforçando a importância dos substituintes para aumento da atividade antitumoral.

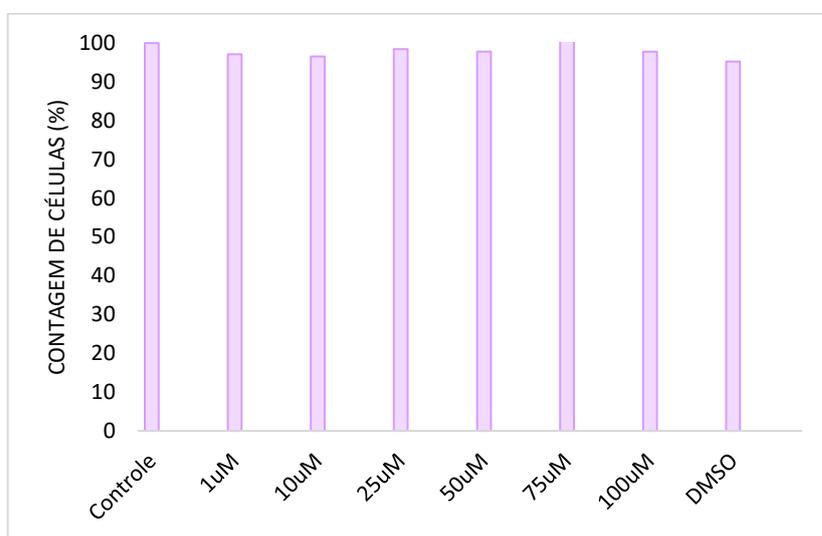


Figura 30. Contagem de células de MCF-7, após 48 h do tratamento com 37.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os procedimentos e experimentos realizados nos proporcionaram as seguintes conclusões:

- A ferramenta SwissTargetPrediction demonstrou ser eficaz na predição de possível interação com sítio alvo de RE, prevendo potenciais alvos até mesmo para uma estrutura simples como 3-fenilbenzisoxazol. A ferramenta SwissADME se mostrou uma maneira simples e com vasta gama de informações para prever fragmentos que não são interessantes no meio fisiológico, bem como comparar com outros fármacos.
- As estratégias de planejamento racional de fármacos empregadas neste trabalho se mostraram robustas para projetar estruturas baseadas em ligantes com propriedades farmacofóricas conhecidas. Uma análise mais detalhada foi possível quando relacionadas no *docking* molecular.
- O *docking* molecular se revelou uma ferramenta promissora para refinar as estruturas obtidas de predições *in silico*, estratégias de planejamento de fármacos baseado no ligante ou até mesmo de estruturas já sintetizadas e testadas, pois modela as melhores conformações dos substituintes importantes para interação com o sítio-alvo.
- Neste trabalho, o *docking* molecular foi usado de forma comparativa com outras estruturas já utilizadas na hormonioterapia, otimizando assim a seleção de compostos a serem sintetizados, resultando em economia de tempo experimental. Essa abordagem se mostrou uma ferramenta importante para conhecer as interações já descritas, tanto para o ligante endógeno quanto para o candidato a fármaco competidor.
- Na análise de *docking* no alvo RE α , 11 estruturas propostas obtiveram pontuações superiores às do ligante endógeno, sendo que 5 delas se aproximaram das pontuações do Lasofoxifeno.
- No *docking* molecular direcionado ao alvo RE β , 8 estruturas propostas obtiveram pontuações superiores às do ligante endógeno e às dos fármacos utilizados como controle positivo, sugerindo uma maior propensão à interação com essa isoforma.

- No que diz respeito à síntese, foi alcançada com sucesso a padronização do protocolo de 2-hidroxibenzonitrila, com rendimentos variando de 63 % até 82 %.
- As reações propostas na síntese dos intermediários foram adaptadas, reproduzidas e caracterizadas satisfatoriamente.
- A obtenção do núcleo 1,2-benzisoxazol por meio da reação do tipo Barbier-Grignard demonstrou ser promissora para moléculas simples, como 3-fenilbenzioxazol, com rendimento de 81%. No entanto, quando aumentamos a complexidade, variedade e quantidade de substituintes, a reação não ocorreu ou resultou em dimerizando entre os reagentes de Grignard, conforme proposta sugerida.
- O derivado **37**, avaliado nas células da linhagem MCF-7, não demonstrou citotoxicidade em concentrações de até 100µM, destacando a importância dos substituintes para aumentar da potência.

7. PERSPECTIVAS

Devido ao isolamento social consequente da pandemia de COVID-19, os acessos às dependências da Faculdade de Farmácia da UFRGS foram restritos no período de 16 de março de 2020 até 1º de fevereiro de 2021 e 20 de fevereiro de 2021 até 24 de maio de 2021. A drástica alteração no cronograma fez com que diversos experimentos não fossem executados e alterações de rotas sintéticas necessárias para as estruturas finais não tivessem tempo hábil de ser executada. Dessa forma, algumas sugestões de perspectivas são pontuadas para continuação desse trabalho:

- Otimização da síntese para moléculas mais complexas: protocolos com otimização de tempo, temperatura, solvente e auxiliares de eliminação reductiva, além dos já testados;
- Analisar possíveis rotas *one-pot* para otimização das reações;
- Se comprovada a inviabilidade da reação tipo Barbier-Grignard na obtenção das estruturas planejadas, refazer a rota sintética via ciclização de oxima, em rota linear;
- Após a finalização das estruturas, analisar a viabilidade celular em outras linhagens de células tumorais hormônio dependentes (além de MCF-7), uma vez que essa via modula e é expressa em outros tecidos.

8. REFERÊNCIAS

- ANDRICOPULO, Adriano; SALUM, Livia; ABRAHAM, Donald. Structure-Based Drug Design Strategies in Medicinal Chemistry. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 771–790, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156802609789207127>
- ARMAREGO, Wilfred L.F.; CHAI, Christina Li Lin. **Purification of Laboratory Chemicals**. sixthed. [S. l.: s. n.], 2009.
- ASCENZI, Paolo; BOCEDI, Alessio; MARINO, Maria. Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 299–402, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.07.001>
- ASHWINI, Nanjundaswamy *et al.* Synthesis of 1,2-benzisoxazole tethered 1,2,3-triazoles that exhibit anticancer activity in acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting histone deacetylases, and inducing p21 and tubulin acetylation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 18, p. 6157–6165, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.07.069>
- BENAKA PRASAD, S. B. *et al.* Synthesis of novel 6-fluoro-3-(4-piperidiny)-1,2-benzisoxazole derivatives as antiproliferative agents: A structure-activity relationship study. **Investigational New Drugs**, [s. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9205-5>
- BHARATHKUMAR, Hanumantharayappa *et al.* Microwave-assisted synthesis, characterization and cytotoxic studies of novel estrogen receptor α ligands towards human breast cancer cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1804–1807, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.01.030>
- FURNISS, Brian S., HANNAFORD, Antony J., SMITH, Peter W. G., TATCHELL, Austin R. **VOGEL's - Textbook of Practical Organic Chemistry**. [S. l.: s. n.], 1989. ISSN 0028-0836. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/284083b0>
- CHANG, Edmund C. *et al.* Impact of estrogen receptor β on gene networks regulated by estrogen receptor α in breast cancer cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 147, n. 10, p. 4831–4842, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2006-0563>
- CHEN, Guifang *et al.* A Novel PPh₃ Mediated One-Pot Method for Synthesis of 3-Aryl

or Alkyl 1,2-Benzisoxazoles. **Organic Letters**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b00563>

CHEN, Shiuan. An “omics” approach to determine the mechanisms of acquired aromatase inhibitor resistance. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 347–352, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0097>

COLABUFO, Nicola Antonio *et al.* 2-[(3-Methoxyphenylethyl)phenoxy]-based ABCB1 inhibitors: Effect of different basic side-chains on their biological properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 23, p. 7602–7613, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm800928j>

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep42717>

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. W1, p. W357–W3664, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz382>

DING, Hao *et al.* Similarity-based machine learning methods for predicting drug-target interactions: A brief review. **Briefings in Bioinformatics**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 734–747, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bib/bbt056>

DUAN, Pingping *et al.* Palladium-catalyzed benzo[d]isoxazole synthesis by C-H activation/[4 + 1] annulation. **Chemical Science**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1574–1578, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3sc53228c>

DUBROVSKIY, Anton V. *et al.* Solution-phase synthesis of a diverse library of benzisoxazoles utilizing the [3 + 2] cycloaddition of in situ-generated nitrile oxides and arynes. **ACS Combinatorial Science**, [s. l.], 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/co300159g>

DUBROVSKIY, Anton V.; LAROCK, Richard C. Synthesis of benzisoxazoles by the [3 + 2] cycloaddition of in situ generated nitrile oxides and arynes. **Organic Letters**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1180–1183, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ol902921s>

ELDEHNA, Wagdy M. *et al.* Type IIA - Type IIB protein tyrosine kinase inhibitors hybridization as an efficient approach for potent multikinase inhibitor development: Design, synthesis, anti-proliferative activity, multikinase inhibitory activity and molecular modeling of novel ind. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.],

2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.061>

FERREIRA ALMEIDA, Cristina *et al.* Estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer treatment: Are multi-target compounds the next promising approach? **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 177, n. March, p. 113989, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113989>

FERREIRA, Leonardo L.G.; ANDRICOPULO, Adriano D. **ADMET modeling approaches in drug discovery**. [S. l.: s. n.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.015>

FERREIRA, Márcia Cristina França *et al.* Moduladores seletivos do receptor estrogênico: novas moléculas e aplicações práticas. **Femina**, [s. l.], 2011.

FRASINYUK, M. S. Synthesis and Aminomethylation of 3-Substituted 6-Hydroxy-1,2-Benzisoxazoles. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, [s. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1631-z>

FUJIMORI, Ikuo *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of a novel series of peripheral-selective noradrenaline reuptake inhibitor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 15, p. 5000–5014, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.017>.

FUJIWARA, Kenshu *et al.* Total synthesis of telephantin O, vialinin A/Terrestrin A, and terrestrins B-D. **Journal of Organic Chemistry**, [s. l.], v. 77, n. 11, p. 5161–5166, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jo300565s>.

GALLO, Rafael D C; REZENDE, Hellenicy V; MUZZI, Rozanna M. O ressurgimento da química de benzino com sililaril triflatos no contexto das reações de inserção em ligações sigma. **Quimica Nova**. [s. l.], v. 32, n. 9, p. 2437–2443, 2009.

GREEN, Stephen *et al.* Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. **Journal of Steroid Biochemistry**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 77–83, 1986. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(86\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0022-4731(86)90035-X)

GUIDO, Rafeal V.C. C; OLIVA, Glaucius; ANDRICOPULO, Adriano D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 37–46, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986708783330683>.

GUIMARÃES, Ricardo L. *et al.* Aqueous Barbier allylation of aldehydes mediated by tin. **Molecules**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 2089–2105, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/12092089>

HARALDSSON, Gudmundur G.; BALDWIN, Jack E. A selective cleavage of aromatic

benzyl ethers located ortho to a carbonyl group by magnesium bromide. **Tetrahedron**, [s. l.], v. 53, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(96\)00964-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(96)00964-7)

HASSON, Rian M. *et al.* Estrogen receptor α or β loss in the colon of Min/+ mice promotes crypt expansion and impairs TGF β and HNF3 β signaling. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 96–102, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt323>

HAY, Michael *et al.* Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature Biotechnology**, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2786>

INGALE, Ajit P.; PATIL, Shripad M.; SHINDE, Sandeep V. Catalyst-free, efficient and one pot protocol for synthesis of nitriles from aldehydes using glycerol as green solvent. **Tetrahedron Letters**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.11.032>

KARANDIKAR, Shubhendu *et al.* 1,2-Benzisoxazole-3-acetamide derivatives as dual agents for DPP-IV inhibition and anticancer activity. **Synthetic Communications**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00397911.2018.1508723>

KUMARA, H. K.; CHANNE GOWDA, D. Synthesis and SAR Studies of Bisthiourea Derivatives of Dipeptides Lys/lys-Asp, Lys/lys-Trp Conjugated Benzo[d]isoxazole as Promising Antioxidants. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 259–267, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10989-016-9557-1>

KUMBHARE, Ravindra M.; INGLE, V. N. Synthesis of novel benzothiazole and benzisoxazole functionalized unsymmetrical alkanes and of there antimicrobial activity. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 996–1000, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/chin.200947101>

LALUT, Julien *et al.* Rational design of novel benzisoxazole derivatives with acetylcholinesterase inhibitory and serotonergic 5-HT₄ receptors activities for the treatment of Alzheimer's disease. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59805-7>

LAMANI, Ravi S. *et al.* Synthesis and antimicrobial studies of novel methylene bridged benzisoxazolyl imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.12.019>

LEE, Doohyun *et al.* Efficient syntheses of 1,2,3-triazoloamide derivatives using solid- and solution-phase synthetic approaches. **Molecules**, [s. l.], 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules201119673>

LEPPIK, Ilo E. Zonisamide: Chemistry, mechanism of action, and pharmacokinetics. **Seizure**, [s. l.], v. 13, n. SUPPL. 1, p. 2–6, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2004.04.016>

LIU, Yanfang; MA, Hong; YAO, Jing. ER α , a key target for cancer therapy: A review. **OncoTargets and Therapy**, [s. l.], v. 13, p. 2183–2191, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/OTT.S236532>

MALAMAS, Michael S. *et al.* Design and synthesis of aryl diphenolic azoles as potent and selective estrogen receptor- β ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 47, n. 21, p. 5021–5040, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm049719y>

MEGENS, Anton A.H.P.; KENNIS, Ludo E.J. 5 Risperidone and related 5HT₂/D₂ antagonists: A new type of antipsychotic agent? **Progress in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 33, n. C, p. 185–232, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0079-6468\(08\)70306-0](https://doi.org/10.1016/S0079-6468(08)70306-0)

MENG, Xuan-Yu *et al.* Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. **Current Computer Aided-Drug Design**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 146–157, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>

NEWSOME, Jeffery J. *et al.* Benzofuran-, benzothiophene-, indazole- and benzisoxazole-quinones: Excellent substrates for NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 2999–3009, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.071>

NICOLAOU, K. C.; SASMAL, Pradip K.; XU, Hao. Biomimetically Inspired Total Synthesis and Structure Activity Relationships of 1-O-Methylateriflorone. 6 π Electrocyclizations in Organic Synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 126, n. 17, p. 5493–5501, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja040037+>

NORMAN, Bryan H. *et al.* Benzopyrans as selective estrogen receptor β agonists (SERBAs). Part 4: Functionalization of the benzopyran A-ring. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 17, n. 18, p. 5082–5085, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.07.009>

NUHRICH, A. *et al.* Synthesis and binding affinities of a series of 1,2-benzisoxazole-3-carboxamides to dopamine and serotonin receptors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 957–964, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(97\)86174-0](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(97)86174-0)

PATERNI, Ilaria *et al.* Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-

selective ligands and clinical potential. **Steroids**, [s. l.], v. 90, p. 13–29, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.06.012>

POISSONNET, Guillaume. A simple and convenient synthesis of 1,2-benzoxazoles via intramolecular Mitsunobu reaction from salicylaldoximes and orthohydroxyarylketoximes. **Synthetic Communications**, [s. l.], v. 27, n. 22, p. 3839–3846, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00397919708005906>

PRIYA, B. S. *et al.* Synthesis and characterization of novel 6-fluoro-4-piperidinyl-1,2-benzisoxazole amides and 6-fluoro-chroman-2-carboxamides: Antimicrobial studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.01.026>

PUNATKAR, Yogesh V; WANARE, Rajendra K; JUGADE, Ravin M. Synthesis and Biological activities of 1, 2-Benzisoxazoles and their N - Glucosides. **Res. J. Chem. Sci.** [s. l.], v. 6, n. 1, p. 61–68, 2016.

RAJASHEKAR REDDY, C. B. *et al.* HDAC and NF- κ B mediated cytotoxicity induced by novel N-Chloro β -lactams and benzisoxazole derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 246, p. 69–76, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.01.010>

RAKESH, K. P. *et al.* **Benzisoxazole: A privileged scaffold for medicinal chemistry**. [S. l.: s. n.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c7md00449d>

RANGAPPA, Kanchugarakoppal S.; BASAPPA. New cholinesterase inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship studies of 1,2-benzisoxazole series and novel imidazolyl-d 2-isoxazolines. **Journal of Physical Organic Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 773–778, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/poc.936>

SCOTT, James S. *et al.* Tetrahydroisoquinoline Phenols: Selective Estrogen Receptor Downregulator Antagonists with Oral Bioavailability in Rat. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 94–99, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00413>

SHASTRI, R. A. Review on Synthesis of 3-Substituted 1,2-Benzisoxazole Derivatives. **ChemInform**, [s. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/chin.201634239>

SHASTRI, R. A.; VARUDKAR, J. S. Synthesis and antimicrobial activity of 3-propene 1,2-benzisoxazole derivatives. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 1156–1160, 2009.

SHIE, Jiun-jie *et al.* Direct Conversion of Aldehydes to Amides, Tetrazoles, and Triazines in Aqueous Media by One-Pot Tandem Reactions. **The Journal of Organic**

Chemistry, [s. l.], n. 7, p. 1158–1160, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jo026407z>

SUN, Li *et al.* Diversity oriented design of various benzophenone derivatives and their in vitro antifungal and antibacterial activities. **Molecules**, [s. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules16119739>

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

UNO, Hitoshi *et al.* Studies on 3-Substituted 1, 2-Benzisoxazole Derivatives. 6. Syntheses of 3-(Sulfamoylmethyl)-1, 2-benzisoxazole Derivatives and Their Anticonvulsant Activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 180–183, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm00188a011>

UTO, Yoshikazu. 1, 2-Benzisoxazole: A Privileged Structure with a Potential for Polypharmacology. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612822666160224142648>

UTO, Yoshikazu. 1,2-Benzisoxazole compounds: A patent review (2009-2014). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 643–662, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1027192>

VAN DRIESSE, B., VAN BRABANDT, W., *et al.* Synthesis and reactivity of trans-2-aryl-3-chloroazetidines. **Tetrahedron**, [s. l.], v. 62, n. 29, p. 6882–6892, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.04.104>

VOGEL, Arthur. **Vogel - A Text-Book Of Practical Organic Chemistry**. [S. l.: s. n.], 1989.

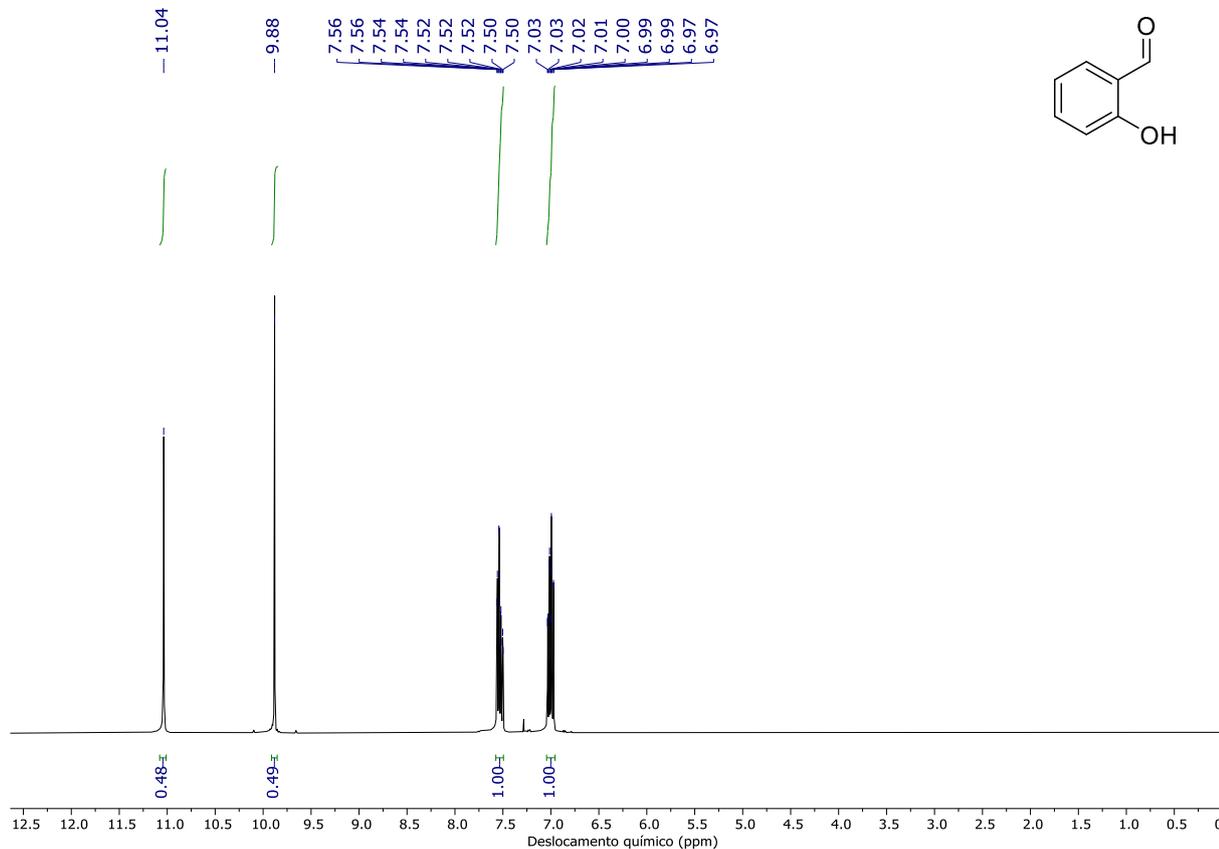
WANG, Ling *et al.* Proc . Natl . Acad . Sci . USA, [s. l.], n. 5, p. 1605–1608, 2006.

XU, J., AI, J., LIU, S., Yu, L., GENG, M., NAN, F. Design and synthesis of 3,3'-biscoumarin-based c-Met inhibitors. **Organic and Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 22, p. 3721–3734, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c4ob00364k>

9. ANEXO

- 2-hidroxibenzaldeído (**46**)

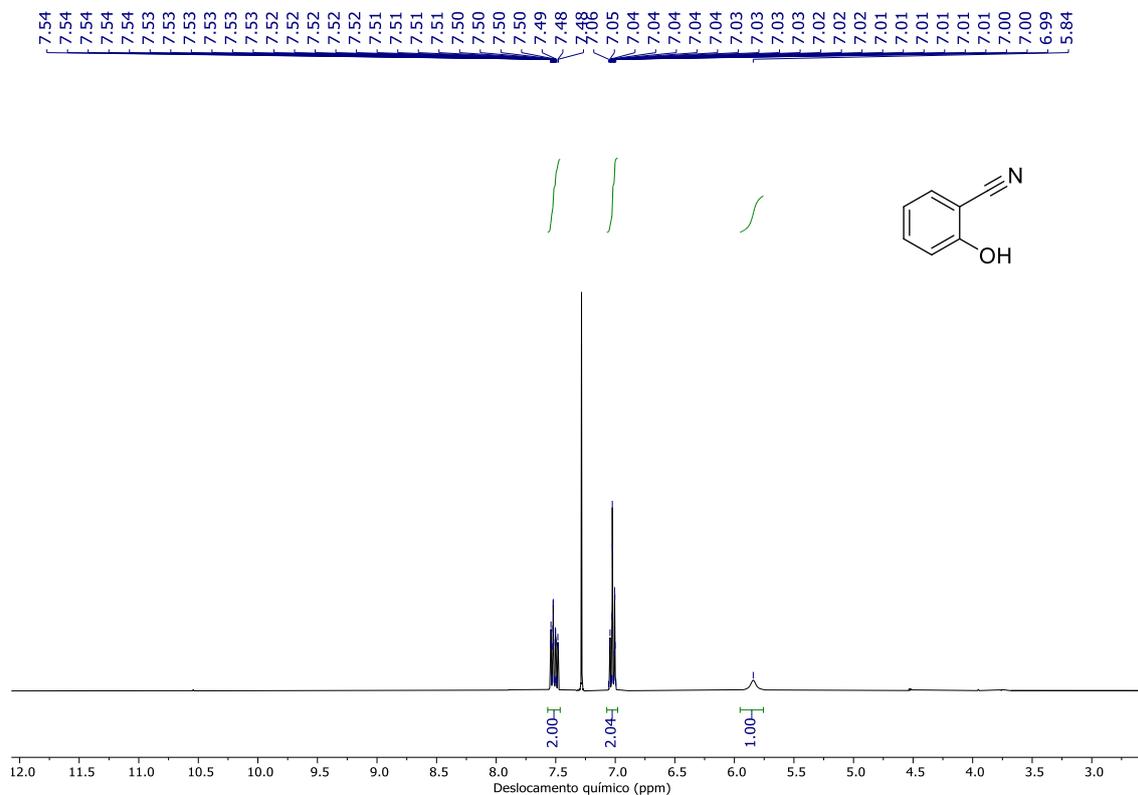
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 11.04 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 7.53 (m, 2H), 7.00 (m, 2H).



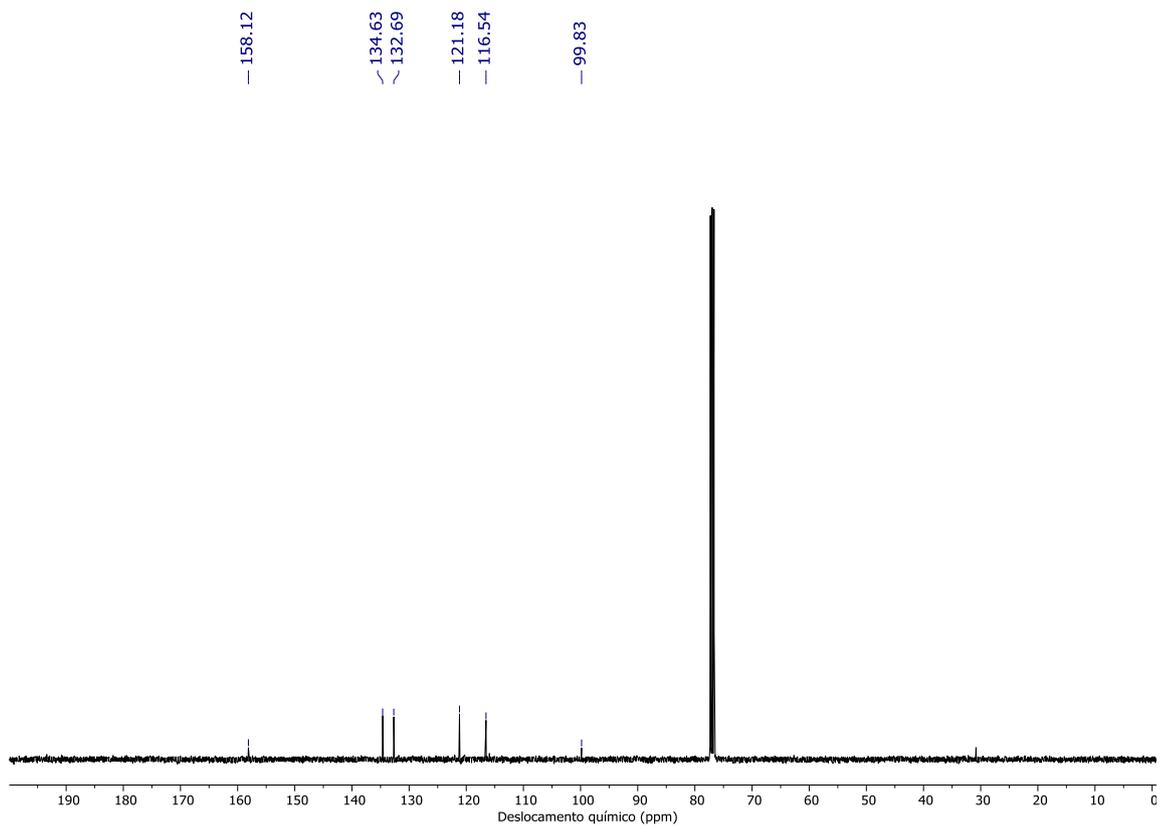
Espectro de ^1H do **46** em CDCl_3 (Bruker, 400MHz).

- 2-hidroxibenzonitrila(**33**)

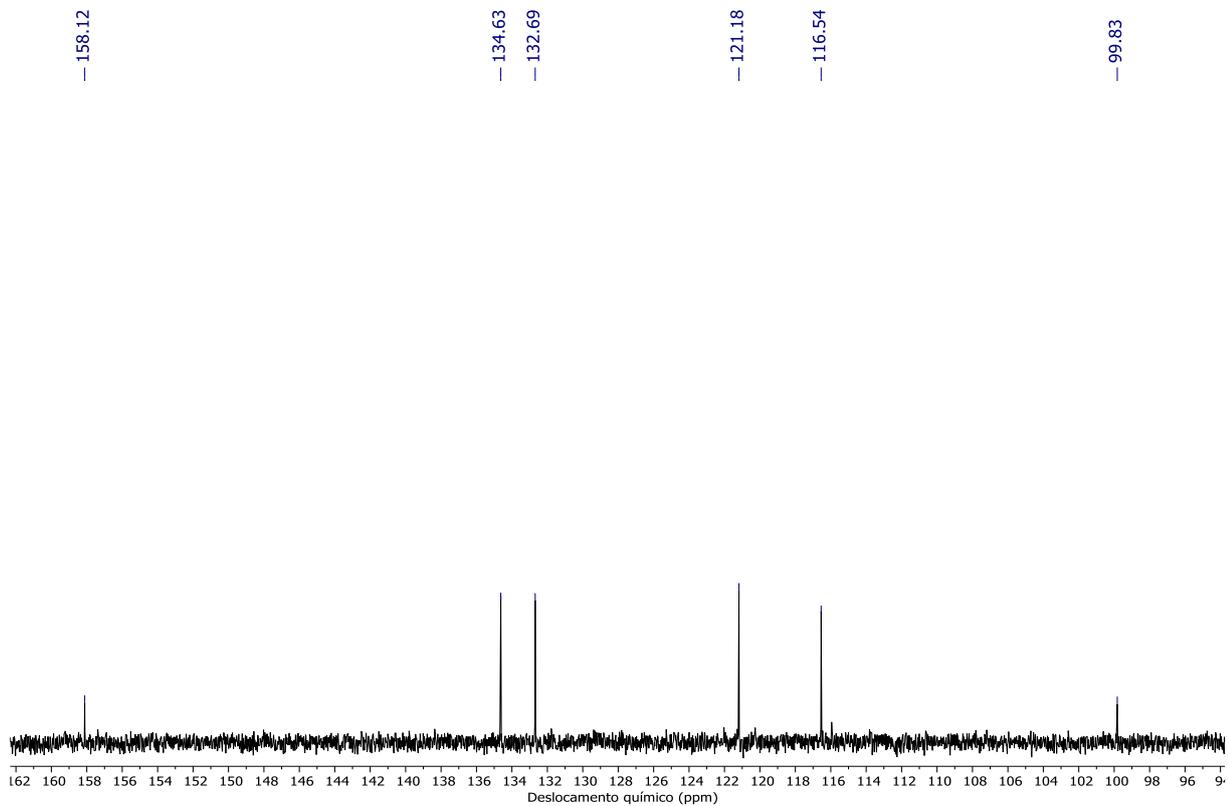
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (m, 2H), 7.02 (m, 2H), 5.84 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 158.12, 134.63, 132.69, 121.18, 116.54, 99.83.



Espectro de ^1H do **33** em CDCl_3 (Bruker, 400MHz).



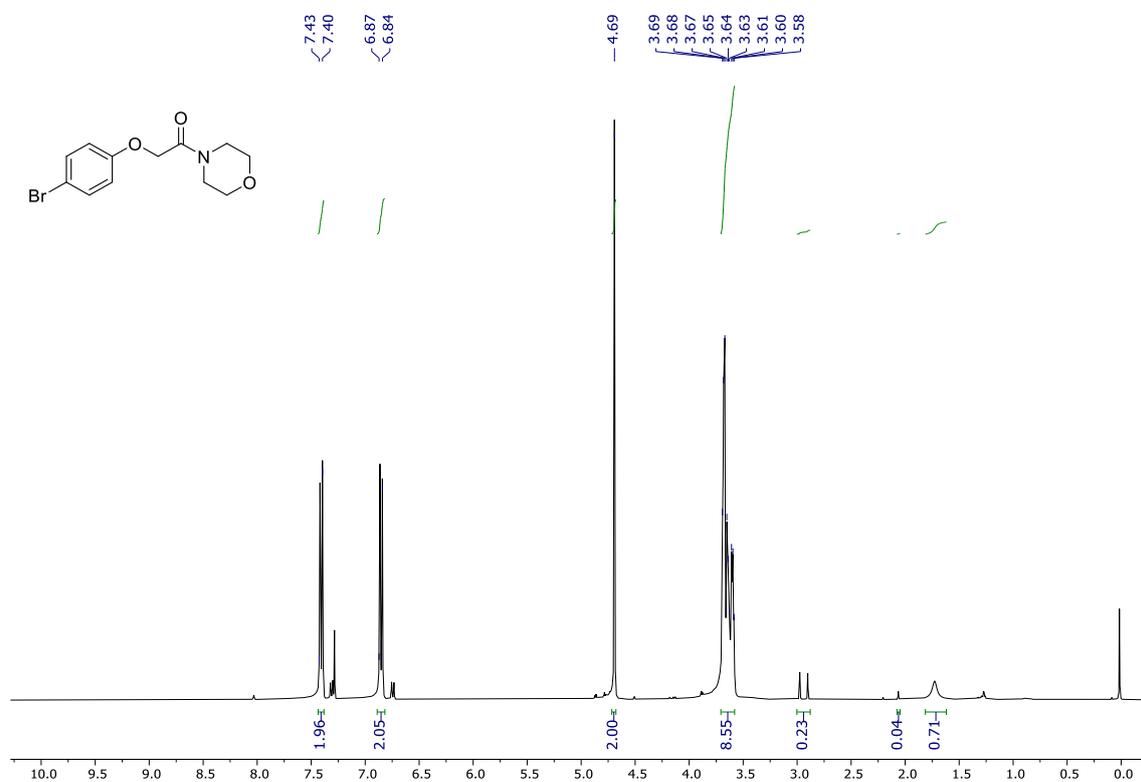
Espectro de ^{13}C do **33** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).



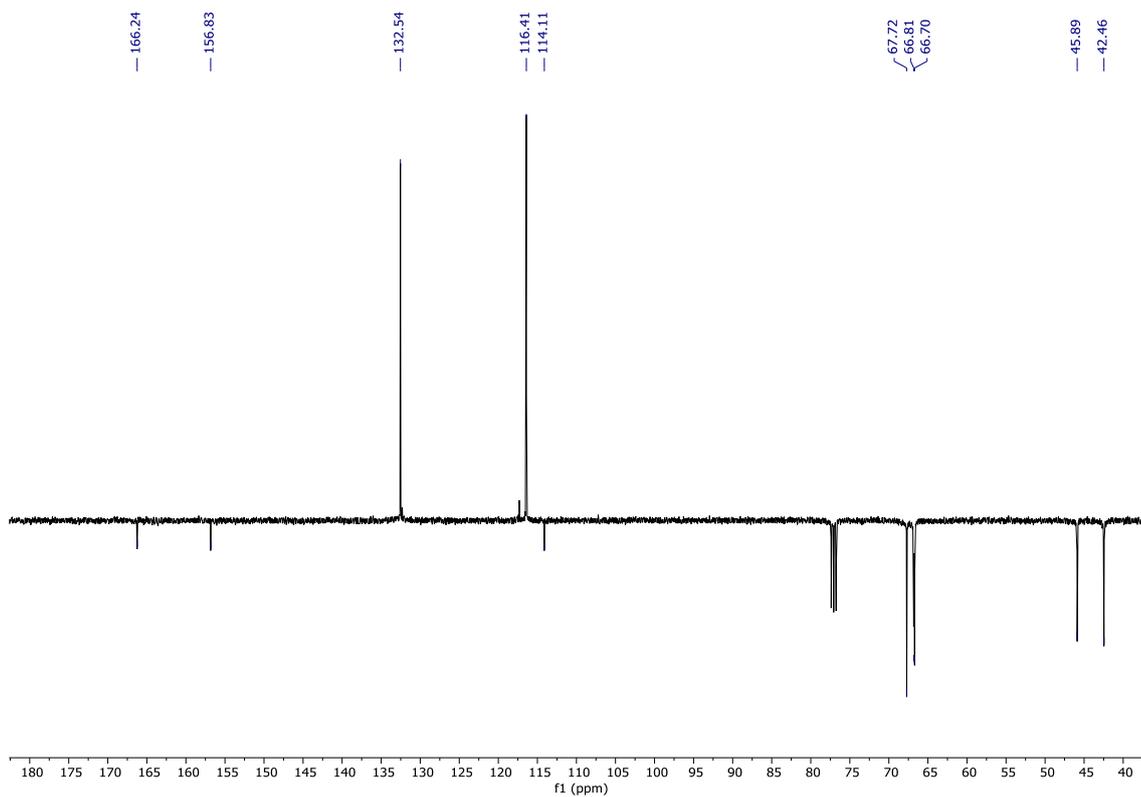
Espectro de ^{13}C do **33** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz), em ampliação de (160ppm até 95 ppm) para melhor visualização dos carbonos quaternários.

- 2-(4-bromofenoxi)-1-morfolinaetana (**51a**)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (d, *J* = 12.0, 2H), 6.86 (d, *J* = 12.0, 2H), 4.69 (s, 2H); 3.64 (m, 8H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ = 166.24, 156.83, 132.54, 116.41, 114.11, 67.22, 66.81, 66.70, 45.89, 42.46;



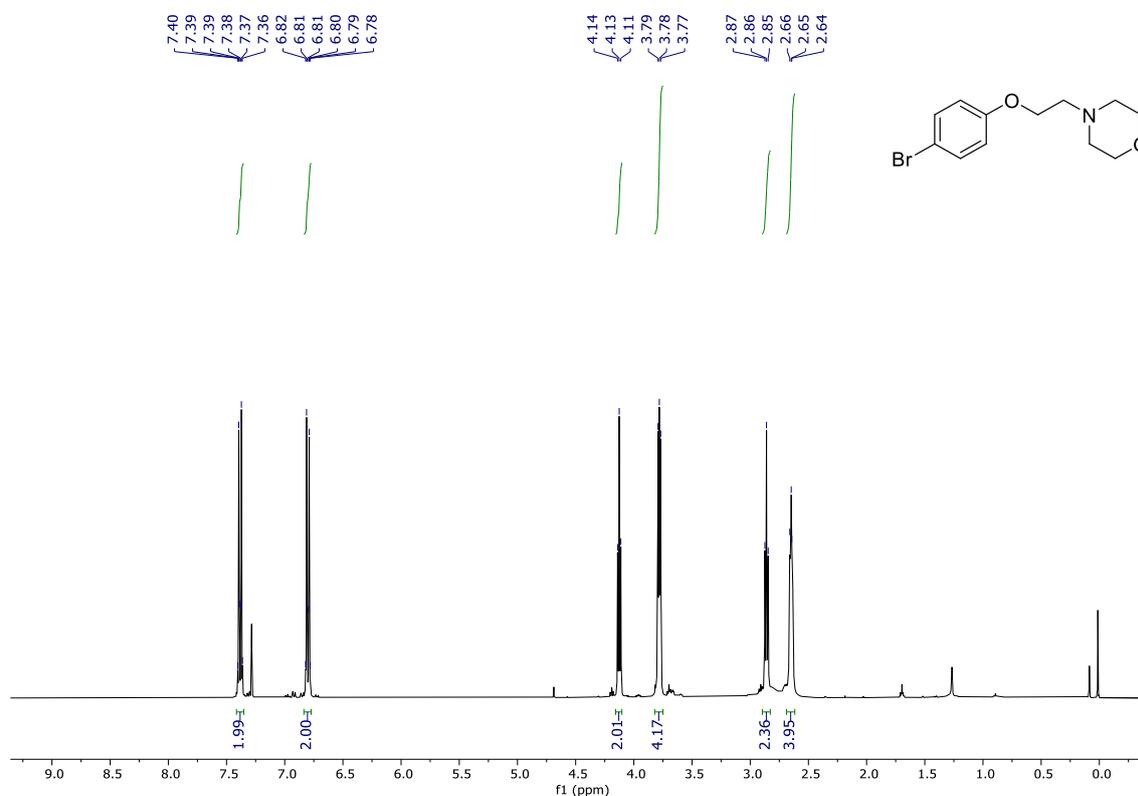
Espectro de ¹H do **51a** em CDCl₃ (Bruker, 400MHz).



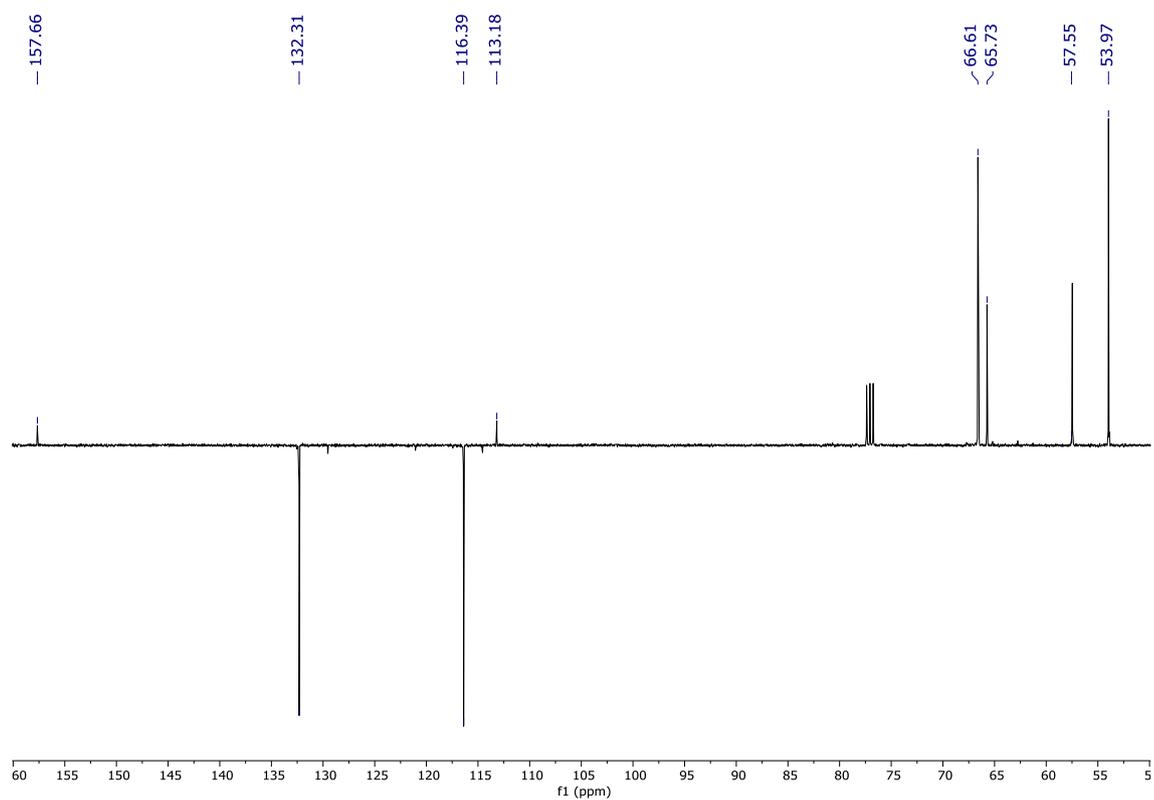
Espectro de ^{13}C do **51a** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- 4-(2-(4-bromofenoxi)etil)morfolina (**53a**)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38 (m, 2H), 6.80 (m, 2H), 4.13 (m, 2H), 3.78 (t, *J* = 4.0, 4H), 2.86 (m, 2H), 2.65 (t, *J* = 4.0, 4H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ = 157.66, 132.31, 116.39, 113.18, 66.61, 65.73, 57.55, 53.97;



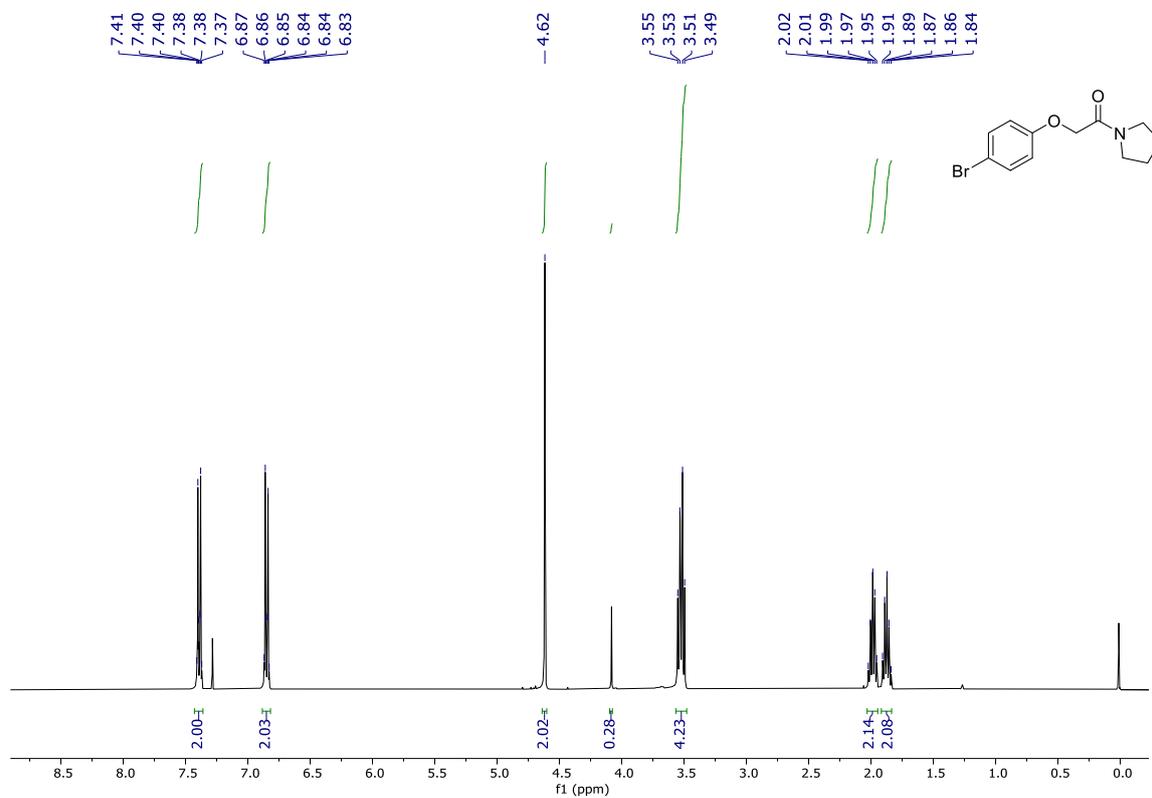
Espectro de ¹H da **53a** em CDCl₃ (Bruker, 400MHz).



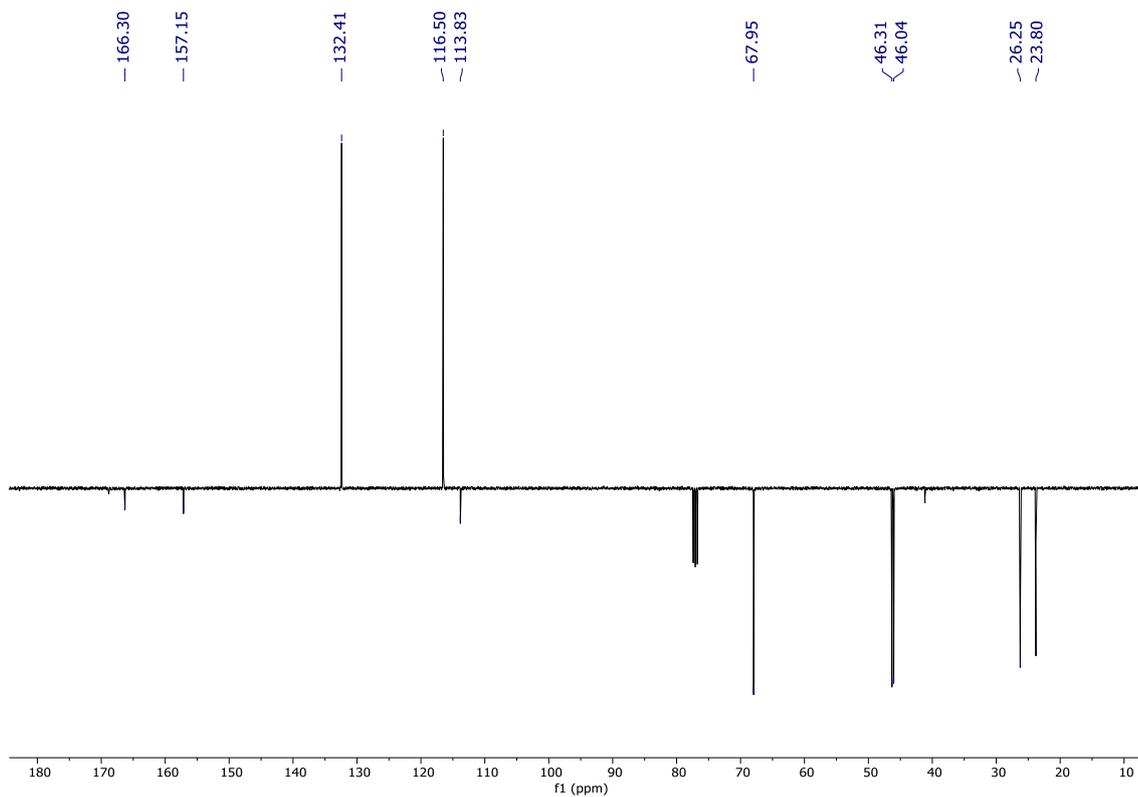
Espectro de ^{13}C do **53a** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- 2-(4-bromofenoxi)-1-(pirrolidin-1-il)etan-1-ona (**51b**)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.39 (m, 2H), 6.85 (m, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.52 (m, 4H), 1.99 (m, 2H), 1.88 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ = 166.30, 157.15, 132.41, 116.50, 113.83, 67.95, 46.31, 46.04, 26.25, 23.80;



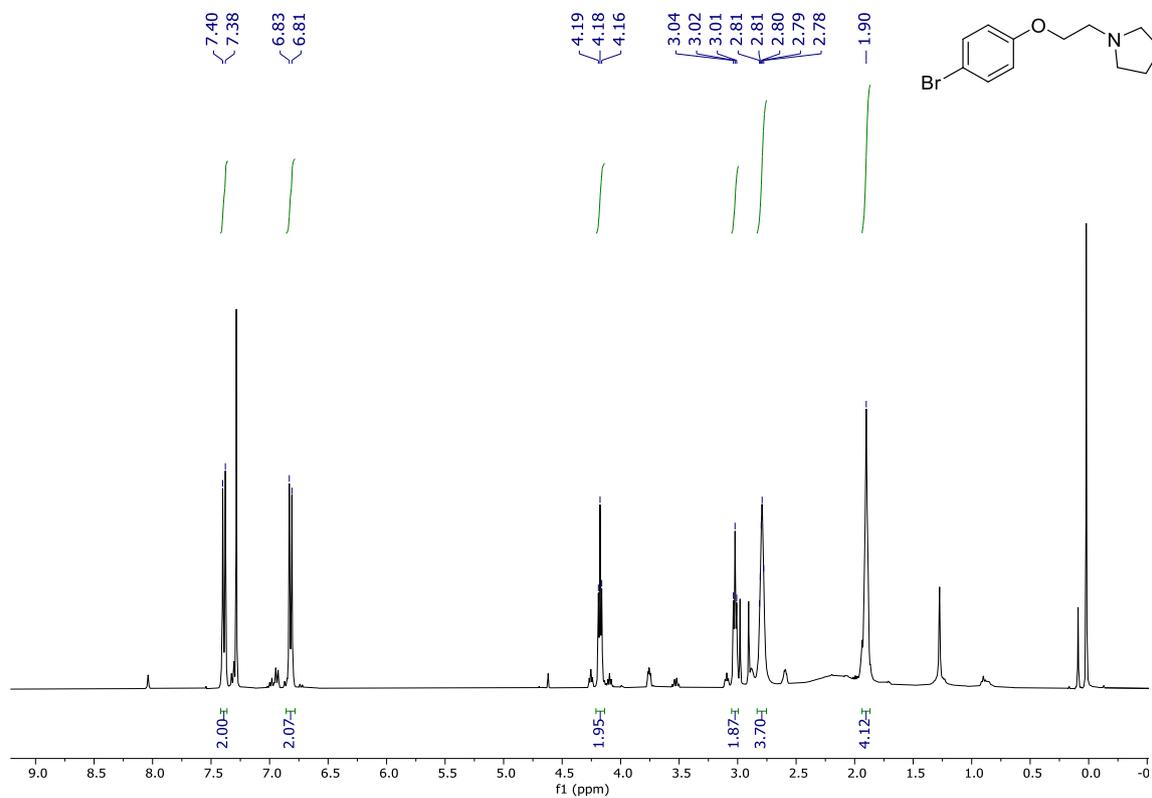
Espectro de ^1H da **51b** em CDCl_3 (Bruker, 400MHz).



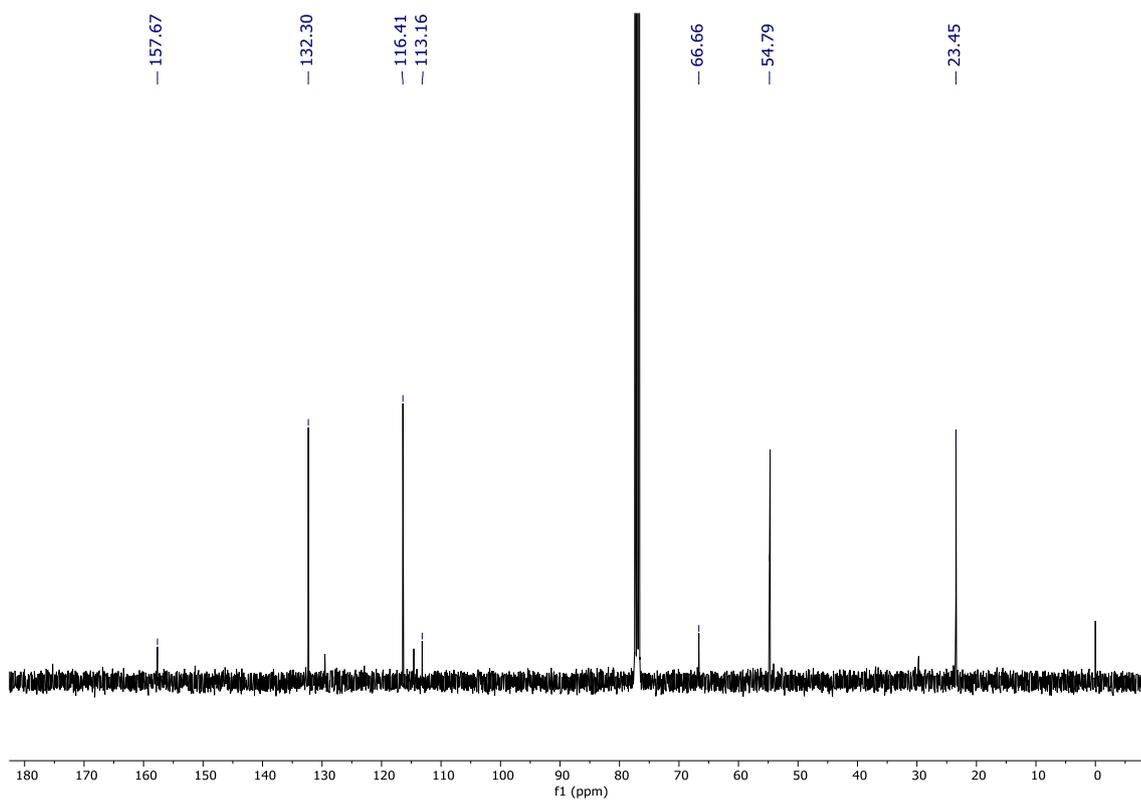
Espectro de ^{13}C do **51b** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- 1-(2-(4-bromofenoxi)etil)pirrolidina (**53b**)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.39 (d, *J* = 8.0, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.0, 2H), 4.18 (m, 2H), 3.02 (m, 2H), 1.2.80 (m, 4H), 1.90 (m, 4H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ = 157.67, 132.30, 116.41, 113.16, 66.66, 57.79, 23.45.



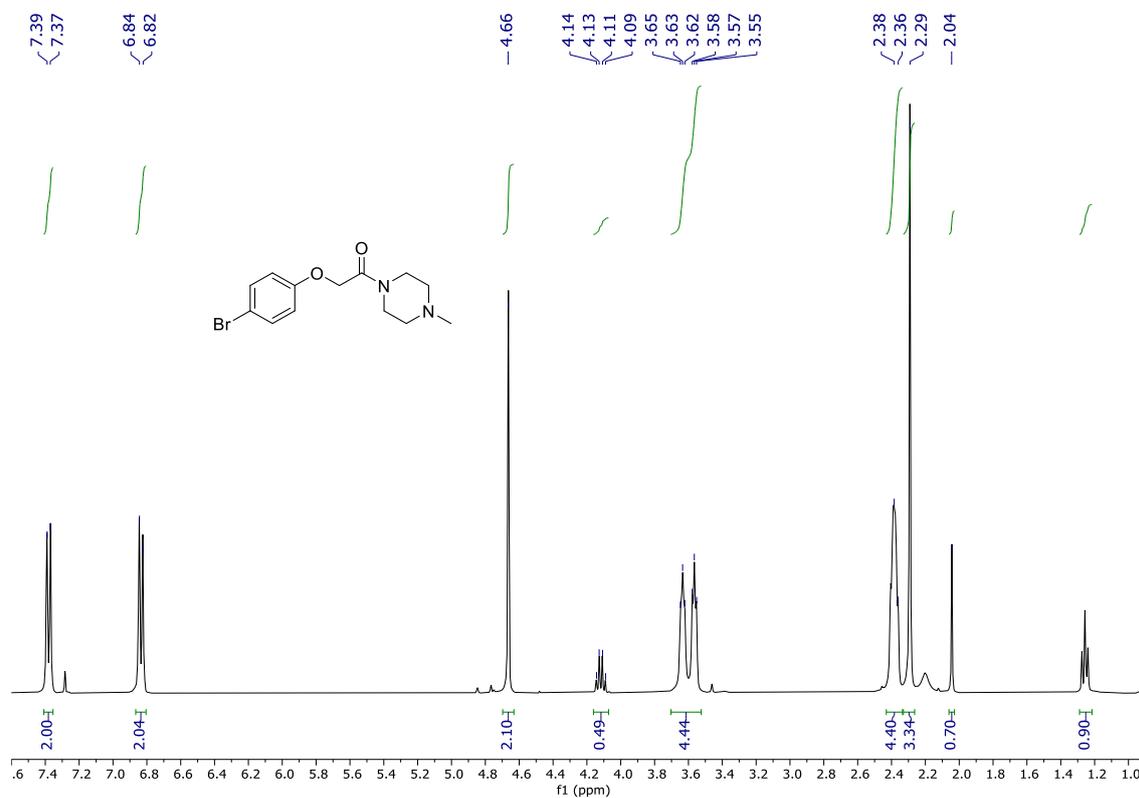
Espectro de ¹H do **53b** em CDCl₃ (Bruker, 400MHz).



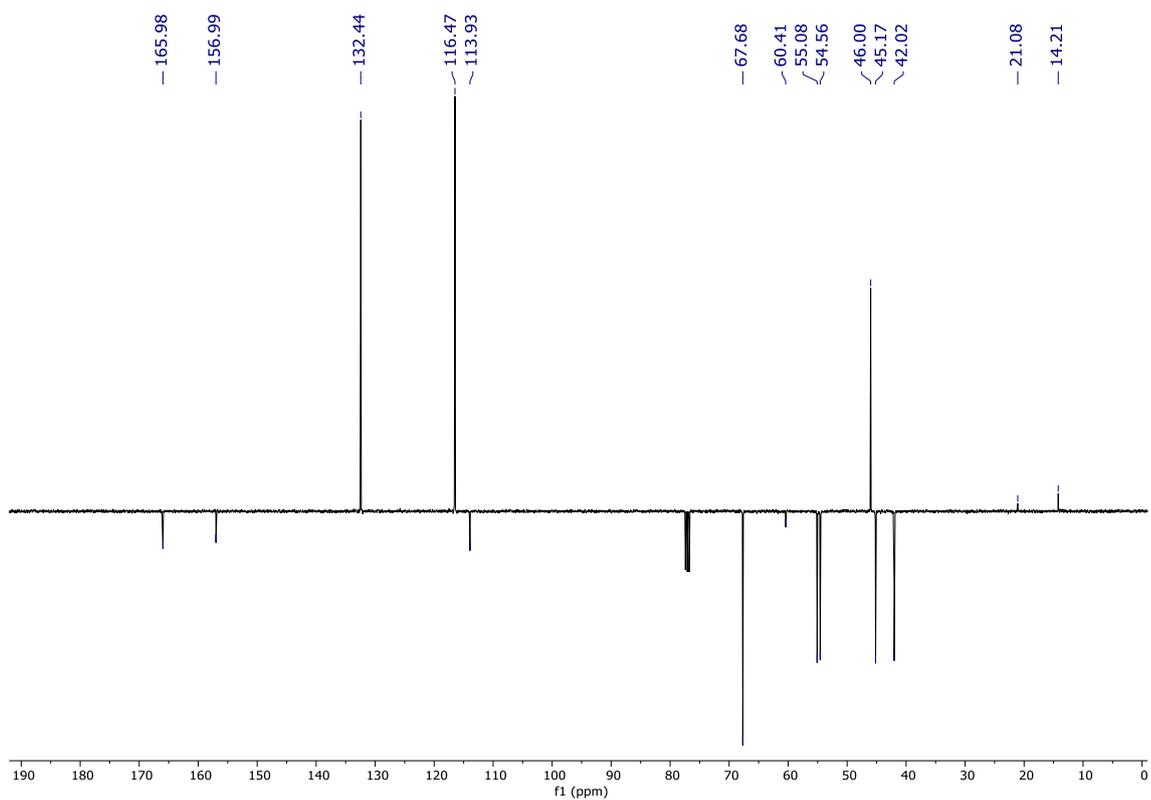
Espectro de ^{13}C do **53b** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- 2-(4-bromofenoxi)-1-(4-metilpiperazin-1-il)etan-1-ona (**51c**)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (d, $J = 8.0$, 2H), 6.83 (d, $J = 8.0$, 2H), 4.66 (s, 2H); 3.60 (m, 4H), 2.37 (m, 4H), 2.29 (s, 3H), 1.22 (d, $J = 8.0$, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 165.98, 156.99, 132.44, 116.47, 113.93, 67.68, 60.41, 55.08, 54.56, 46.00, 45.17, 42.02, 21.08, 14.21$.



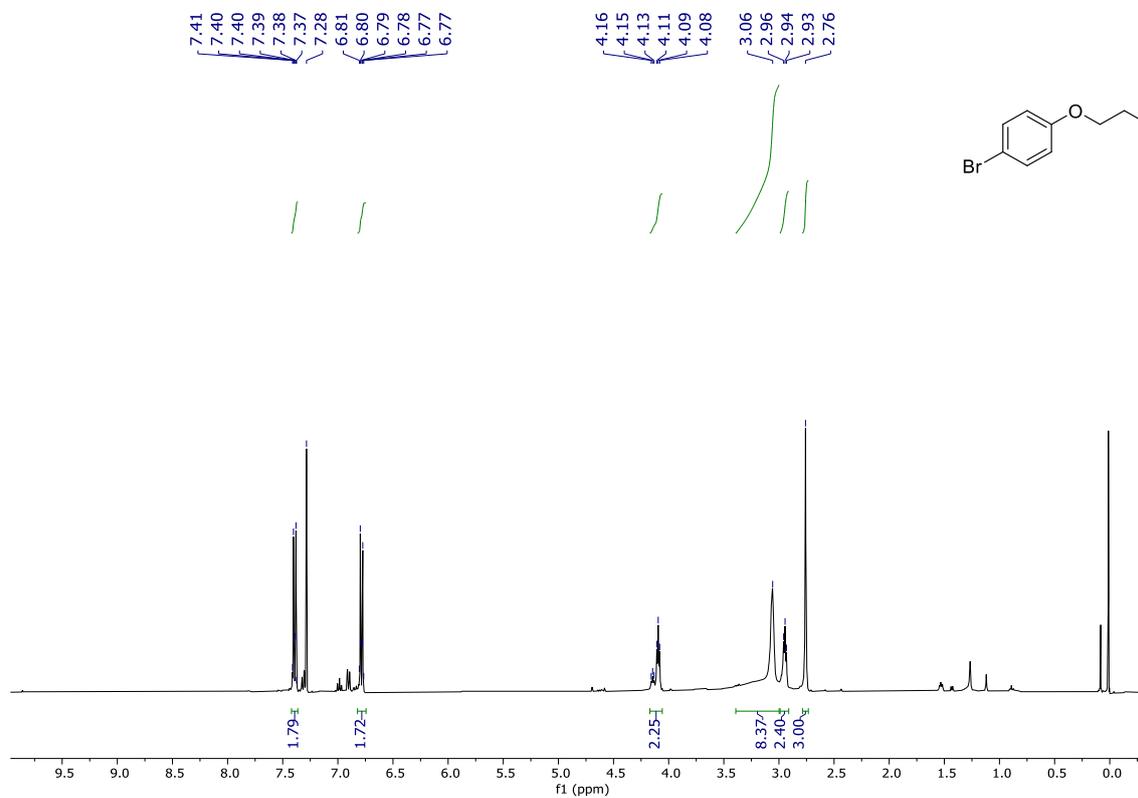
Espectro de ^1H do **51c** em CDCl_3 (Bruker, 400MHz).



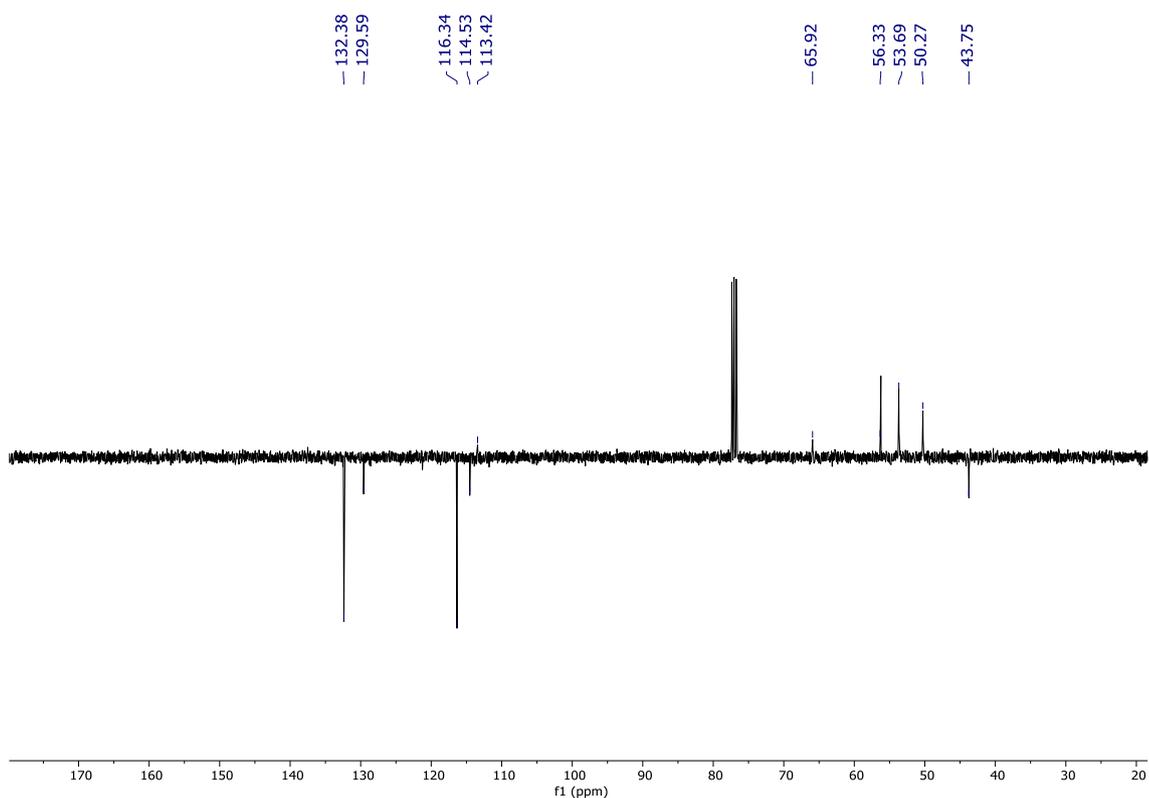
Espectro de ^{13}C do **51c** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- 1-(2-(4-bromofenoxi)etil)-4metilpiperazina (**53c**)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.39 (m, 2H), 6.79 (m, 2H), 4.12 (m, 2H); 3.06 (m, 2H), 2.83 (t, $J = 8.0$, 2H), 1.06 (d, $J = 8.0$, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 132.38$, 129.59, 116.34, 114.53, 113.42, 65.92, 56.33, 53.69, 50.27, 43.75.



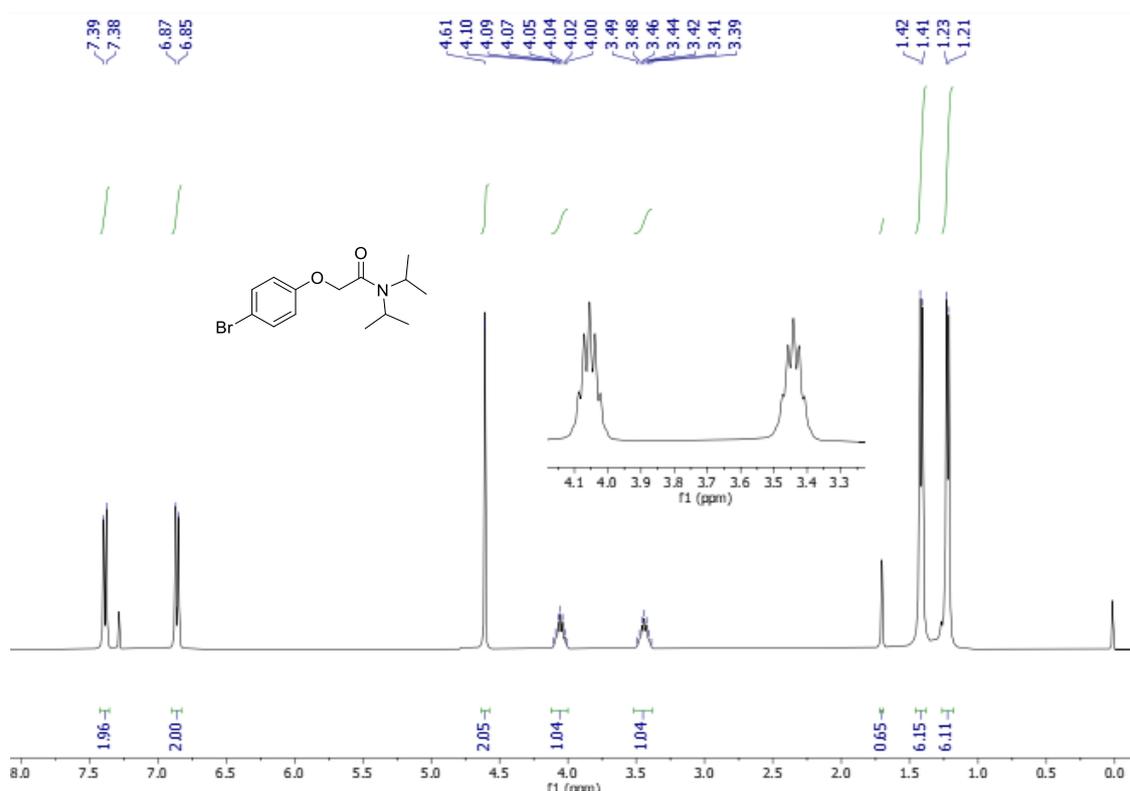
Espectro de ^1H do **53c** em CDCl_3 (Bruker, 400MHz).



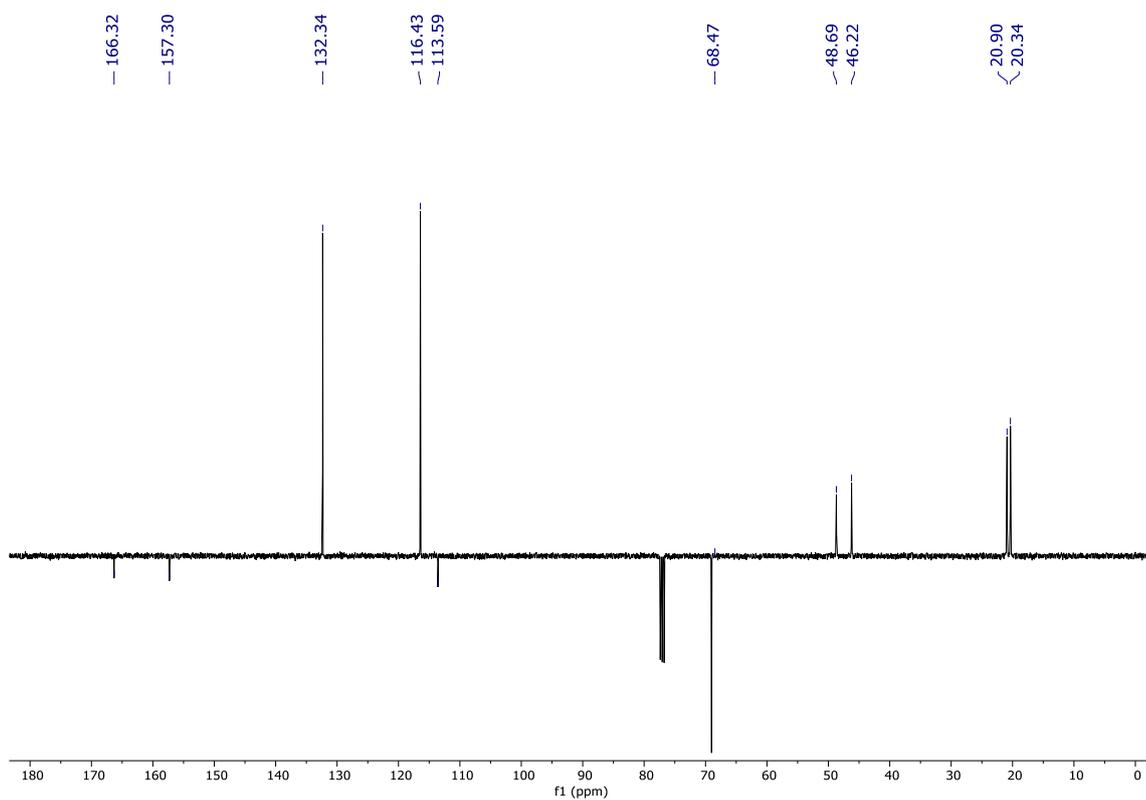
Espectro de ^{13}C do **53c** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- *N,N*-diisopropil-2-fenoxiacetamida (**51d**)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38 (d, $J = 8.0$, 2H), 6.86 (d, $J = 8.0$, 2H), 4.61 (s, 2H); 4.05 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 1.42 (d, $J = 4.0$, 6H), 1.22 (d, $J = 8.0$, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 166.32, 157.30, 132.34, 116.43, 113.59, 68.47, 48.69, 46.22, 20.90, 20.34$;



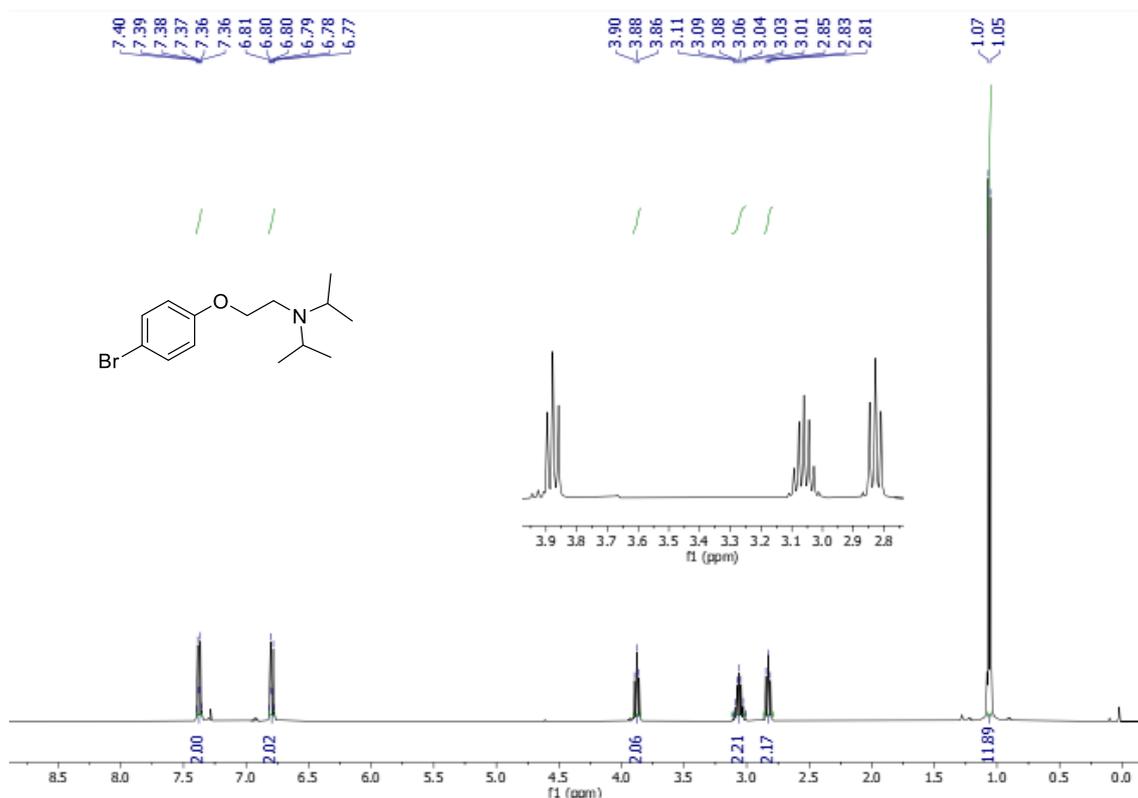
Espectro de ^1H do **51d** em CDCl_3 (Bruker, 400MHz).



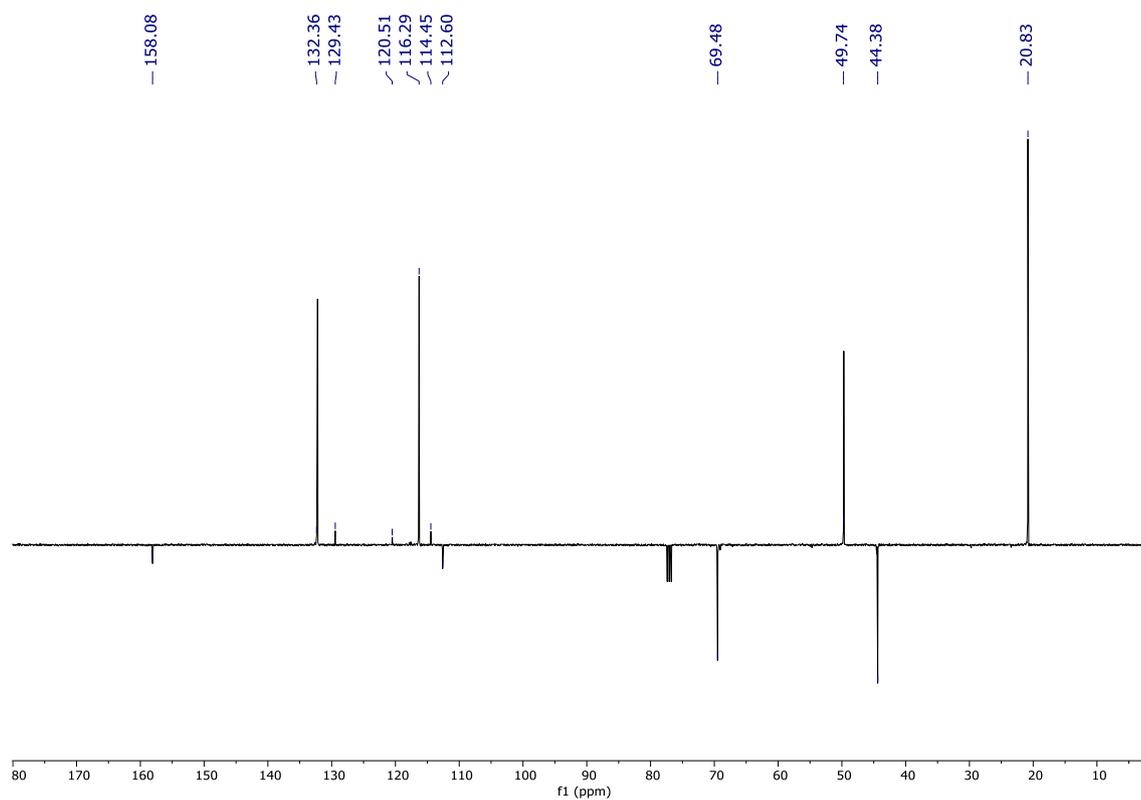
Espectro de ^{13}C do **51d** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- *N*-(2-(4-bromofenoxi)etil)-*N*-isopropilpropan-2-amina (**53d**)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38 (m, 2H), 6.89 (m, 2H), 3.88 (t, *J* = 8.0, 2H); 3.06 (m, 8H), 2.94 (m, 2H), 2.76 (s, 3H); **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃) δ = 158.08, 132.36, 116.29, 112.60, 69.48, 49.74, 44.38, 20.83;



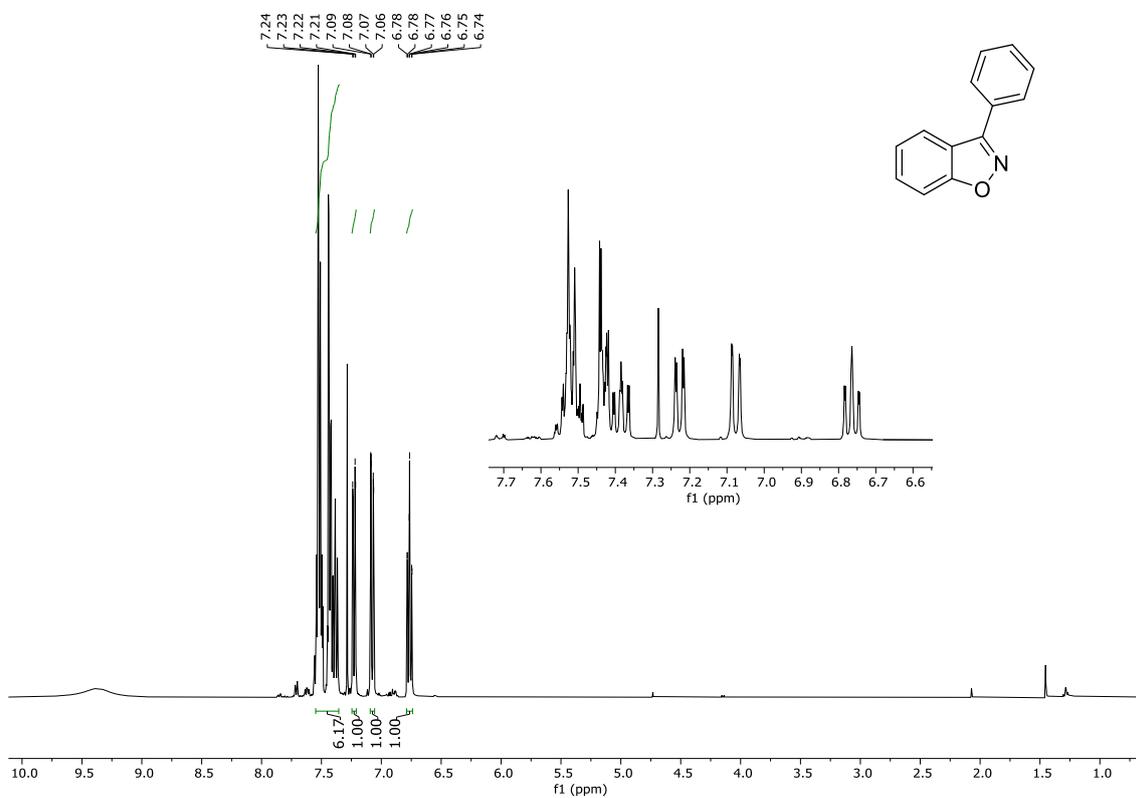
Espectro de ¹H do **53d** em CDCl₃ (Bruker, 400MHz).



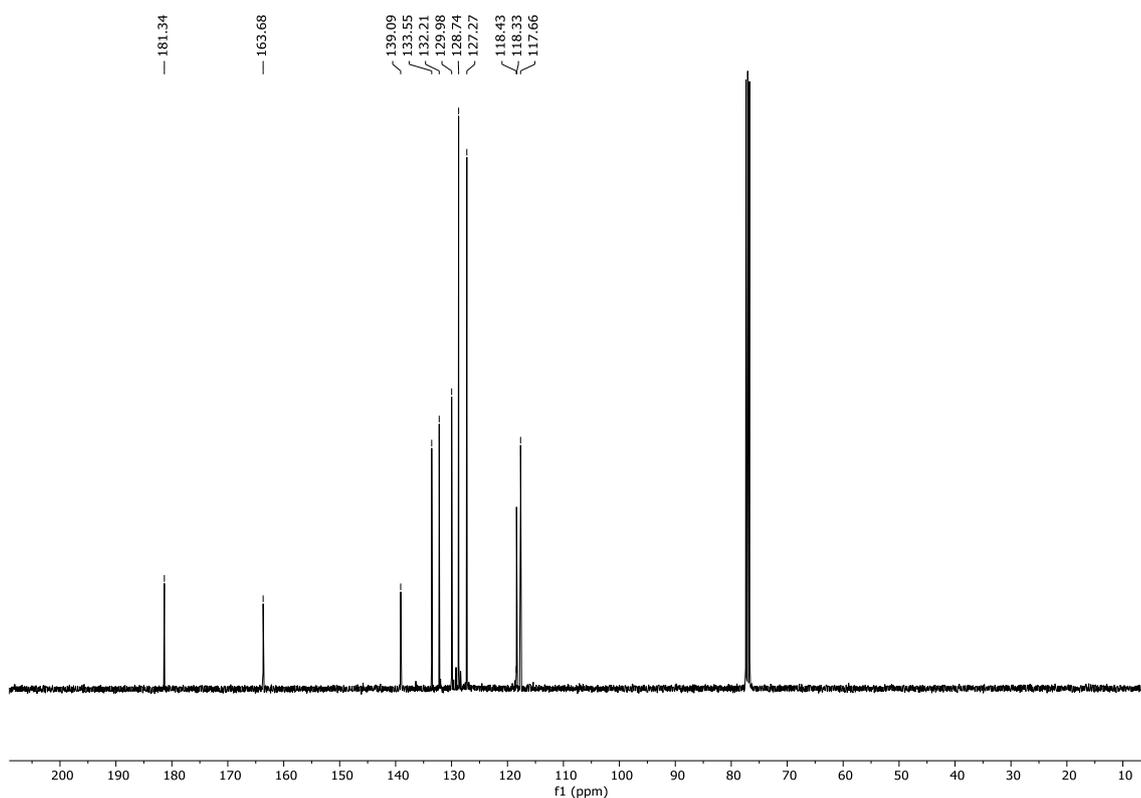
Espectro de ^{13}C do **53d** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).

- 3-phenylbenzo[d]isoxazole (**37**)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45 (m, 6H), 7.22 (dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J = 12.0, 4.0$ Hz, 1H), 6.76 (td, $J = 8.0, 4.0$, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) $\delta = 181.34, 163.68, 139.09, 133.55, 132.21, 129.98, 128.74, 127.27, 118.43, 118.33, 117.66$.



Espectro de ^1H do **37** em CDCl_3 (Bruker, 400MHz).



Espectro de ^{13}C do **37** em CDCl_3 (Bruker, 100MHz).