



Dissertação de Mestrado

DERIVADOS DE QUINAZOLINAS
NA INIBIÇÃO DA ADENOSINA
QUINASE

Aluno: Fábio Henrique dos Santos Rodrigues

Orientadora: Prof^a Dr^a Ljubica Tasic

Campinas, 2011.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

R618d Rodrigues, Fábio Henrique dos Santos (1986-).
Derivados de quinazolinas na inibição da adenosina
quinase / Fábio Henrique dos Santos Rodrigues. –
Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ljubica Tasic.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. 4-anilinoquinazolinas. 2. Adenosina quinase.
3. Inibição enzimática. 4. Interação enzima/ligante.
I. Tasic, Ljubica. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Quinazoline derivatives in adenosine kinase inhibition

Palavras-chave em inglês:

4-anilinoquinazolines

Adenosine kinase

Enzymatic inhibition

Enzyme/ligand interaction

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora:

Ljubica Tasic [Orientador]

Nelson Eduardo Durán Caballero

Silvana Aparecida Rocco

Data de defesa: 14/10/2011

Programa de pós-graduação: Química

Invictus William Ernest Henley

*Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.*

*In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.*

*Beyond this place of wrath and tears
Looms but the Horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.*

*It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.*

*Sob o manto da noite que me cobre,
Negro como as profundezas de um pólo a outro,
Eu agradeço a todos os deuses,
Por minha alma invencível.*

*Nas garras ferozes das circunstâncias
Não me encolhi nem derramei meu pranto.
Golpeado pelo destino
Minha cabeça sangra, mas não se curva.*

*Longe deste lugar de ira e lágrimas
Só assoma o Horror das sombras,
Ainda assim, a ameaça dos anos
Me encontra, e me encontrará sempre destemido.*

*Pouco importa quão estreita seja a porta
Quão profusa em punições seja a lista,
Sou o senhor do meu destino:
Sou o capitão da minha alma.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por permitir que este sonho se concretizasse.

Agradeço a meus pais, por todo amor, incentivo e apoio durante toda minha vida, sem eles não teria chegado a lugar algum.

A toda minha família, avós, tios, primos, sogros, cunhados, etc, por sempre estarem a meu lado me apoiando.

A Izabella, pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos, bons e ruins. Te amo!

A Buba, por todos estes anos de orientação e amizade, e por ter sido minha porta de entrada na vida científica.

Aos meus colegas de LQB; Juliana, Alessandra, Dani Pott, Almas, Junko, Adriana, Iza, Leandro, Dosil, Camila, Jéssica, Diana, Willians, todos os demais que já deixaram o grupo, muito obrigado pelas inúmeras conversas, sugestões, convívio, etc, vocês são parte fundamental de todo este trabalho.

Ao pessoal do laboratório I-250, Prof. Nelson Durán, Ana Paula, Pryscila, Dani, Elias, Larissa, Stéphaney, Chico, Marcela, e todos os demais alunos.

Ao grupo do Prof. Kléber Franchini (Silvana, João, Renata, Raphael), pelo apoio na execução do projeto.

A Dr^a Silvana Rocco, por toda a ajuda em todos os aspectos do projeto, especialmente na síntese dos compostos.

A todos os meus amigos, sem vocês não teria caminhado até aqui.

Aos técnicos dos laboratórios do IQ-UNICAMP (Sônia, Paula, Anderson – RMN; Márcia – IV; Rita – MS; Cláudia – Fluorescência; Daniel – MEV).

Ao Instituto de Química da UNICAMP pela infra-estrutura oferecida para a realização do projeto.

A Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

A CNPq pelo auxílio financeiro.

Curriculum Vitae

Fábio Henrique dos Santos Rodrigues

Brasileiro, Solteiro, Data de Nascimento: 28/08/1986

Avenida Luiz Gonzaga Martins Guimarães, nº 01, apto. 133

Jardim Campos Elísios – 13.209-770 - Jundiaí – SP

E-mail: rodriguesfhs@gmail.com

Formação

Bacharelado em Química

Bacharelado pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2009.

Iniciação Científica: Iniciação científica sob orientação da Profª Drª Ljubica Tasic, do IQ-UNICAMP e co-orientação do Prof. Dr. Peter R. Seidl, da EQ-UFRJ. – Título do Projeto: Aplicação de RMN no estudo de asfaltenos.

Bolsa: Fundação José Bonifácio – RJ.

Mestrado em Química Orgânica

Mestrado pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2011.

Projeto sob orientação da Profª Drª Ljubica Tasic, do IQ-UNICAMP, intitulado “Derivados de Quinazolininas da Inibição da Adenosina Quinase”.

Bolsa: CNPq.

Formação Complementar

Curso Complementar de “Introdução a Determinação Estrutural por Ressonância Magnética Nuclear, (Carga Horária: 40 horas), AUREMN, Rio de Janeiro (2009).

Idiomas

- Inglês (fluente)
- Espanhol (básico)
- Francês (básico)

Sociedades

Membro da AUREMN – Associação dos Usuários de Ressonância Magnética Nuclear

Publicações

Fattori, J.; Prando, A.; Martins, A.M.; Rodrigues, F.H.S.; Tasic, L. Bacterial Secretion Chaperones, *Prot. Pept. Lett.*, **2011**, 18, 158.

Azevedo, M.B.; Tasic, L.; Fattori, J.; Rodrigues, F.H.S.; Cantos, F.C.; Ribeiro, L.P.; Paula, V.; Ianzer, D.; Santos, R.A. New Formulations of an old drug in hypertension treatment: the sustained release of captopril from cyclodextrin nanoparticles; *Int. J. Nanomedicine*, **2011**, 6, 1005.

Oliveira, C.Z.; Santos-Filho, N.A.; Menaldo, D.L.; Boldrini-França, J.; Giglio, J.R.; Calderon, L.A.; Stábeli, R.G.; Rodrigues, F.H.S.; Tasic, L.; Silva, S.L.; Soares, A.M. Structural and Functional Characterization of a γ -Type Phospholipase A(2) Inhibitor from *Bothrops jararacussu* Snake Plasma, *Curr. Top. Med. Chem.*, **2011** (no prelo). (PubMed)

Informações Adicionais

Currículo Lattes:

<http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.jsp?id=K4463141P6>

Resumo

DERIVADOS DE QUINAZOLINAS NA INIBIÇÃO DA ADENOSINA QUINASE

A Adenosina Quinase (ADK) é uma enzima importante (EC 2.7.1.20), cuja ação pode estar relacionada a diversas doenças, tais como inflamações, derrame, infarto, entre outras. Desse modo, a inibição de sua atividade é de grande importância, e desperta interesse científico. Na tentativa de inibir a ação da ADK, houve busca por compostos orgânicos cuja capacidade inibitória seja superior comparando-se com inibidores da ADK existentes. Desse modo, derivados de 4-anilinoquinazolinas mostraram-se alvos interessantes. Foi sintetizada uma série de 22 derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas, substituídas nas posições 3' e 4' do anel anilínico. Os compostos sintetizados foram caracterizados e testados frente à ADK, de forma a verificar seu potencial inibitório, principalmente através da técnica de fluorescência de emissão. Da série de compostos, seis apresentaram-se promissores na inibição da ADK. Ensaios *in silico* também foram realizados, buscando-se uma melhor compreensão do mecanismo de inibição do sistema compostos/ADK.

Palavras Chave: 4-anilinoquinazolinas, Adenosina Quinase (ADK); Inibição Enzimática; Interações Enzima/Ligante; Fluorescência de Emissão.

Abstract

QUINAZOLINES DERIVATIVES IN ADENOSINE KINASE INHIBITION

The Adenosine Kinase (ADK) is an important enzyme (EC 2.7.1.20) that might be related to several diseases, such as inflammation, stroke and infarct, and many others. Therefore, its activity inhibition is of great importance, arising significant scientific interest. Aiming ADKs inhibition, a search for suitable organic species was realized, in such way that 4-anilinoquinazoline derivatives showed themselves interesting targets. A serie of 22 8-methoxy-4-anilinequinazoline derivatives, substituted on the aniline ring at 3' and 4' positions, was synthesized. The compounds were characterized and tested in *in vitro* ADKs inhibition, in order to verify their inhibitory potentials, mainly applying emission fluorescence technique. Six compounds of this serie presented promising properties in ADKs inhibition. *In silico* assays were also conducted, in order to better explain the inhibitory mechanism of the system compounds/ADK.

Keywords: 4-anilinoquinazolines, Adenosine Kinase (ADK); Enzymatic Inhibition; Enzyme/Ligand Interactions; Emission Fluorescence.

Lista de Abreviaturas

a.s.e.	Área de Sobreposição Espectral
ADK	Adenosina Quinase
ADO	Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina, do inglês <i>Adenosine Diphosphate</i>
AMP	Monofosfato de Adenosina, do inglês <i>Adenosine Monophosphate</i>
ATP	Trifosfato de Adenosina, do inglês <i>Adenosine Triphosphate</i>
CMC	Banco de Dados Compreensivo de Química Medicinal, do inglês <i>Comprehensive Medicinal Chemistry Database</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Classificação de Enzima, do inglês <i>Enzyme Commission</i>
E_{grid}	Energia de <i>Grid</i>
GTP	Trifosfato de Guanosina, do inglês <i>Guanosine Triphosphate</i>
HSQC	Coerência Heteronuclear de Quanto Único, do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
I.V.	Infravermelho
J	Constante de acoplamento, em hertz
<i>J</i>	Integral de Sobreposição Espectral
K_a	Constante de Associação
KBr	Brometo de Potássio
K_d	Constante de Dissociação
K_M	Constante de Michaelis-Menten
logP	Coeficiente de Partição Octanol/Água

M.M.	Massa molar, em g mol ⁻¹
m/z	Razão massa/carga
P.F.	Ponto de Fusão
p.p.m.	Partes por milhão
PDB	Banco de Dados de Proteínas, do inglês <i>Protein Data Bank</i>
<i>psa</i>	Área Superficial Polar, do inglês <i>Polar Surface Area</i>
<i>R5L</i>	Regra de Cinco de Lipinski
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rnlmq	Regressão Não Linear de Mínimos Quadrados
TMS	Tetrametilsilano
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
δ	Deslocamento químico
$\vec{\mu}$	Momento Dipolar

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 – Valores de E_{grid} para os compostos da série 8-metóxi-4anilinoquinazolinas.....	53
Tabela 2 – Parâmetros de Druglikeness (R5L) da série 8-metóxi-4anilinoquinazolinas.....	58
Tabela 3. Parâmetros de Druglikeness (CMC combinado a psa) da série sintetizada.....	59
Tabela 4 – Área de Sobreposição Espectral (a.s.e) para os compostos sintetizados.....	64
Tabela 5 – Distâncias entre compostos sintetizados e os resíduos Trp ₇₅ e Trp ₁₅₆	66
Tabela 6 – de κ^2 para os compostos sintetizados e os resíduos Trp ₇₅ e Trp ₁₅₆	66
Tabela 7 – Valores de K_d calculados para os compostos da série 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas.....	68
Tabela A – Dados físico-químicos e morfológicos dos compostos sintetizados.	89

Lista de Figuras e Esquemas

Figuras

	Página
Figura 1 – (A) Representação gráfica da estrutura tridimensional da ADK (PDB: 1BX4) com seus domínios (domínio maior $\alpha 8/\beta 9$ em verde; domínio menor $\alpha 2/\beta 2$ em azul; substrato ADO em esferas amarelas, Asp ₃₀₀ em laranja e triptofanos em vermelho). (B) Assinalamento da estrutura secundária da ADK (PDB: 1BX4), com indicações de α -hélices e folhas- β	7
Figura 2 – Mecanismo reacional da ADK, ilustrando o ataque nucleofílico do grupo γ -fosfato do ATP pela adenosina (ADO), levando a formação de ADP e AMP. A presença do cátion Mg^{2+} é fundamental para a atividade enzimática, uma vez que estabiliza as cargas negativas do grupamento fosfato, facilitando o ataque nucleofílico; resíduo de aspartato ilustrado em laranja.	8
Figura 3 – Sítio de Ligação do íon Mg_{360} (esfera verde) indicando a rede de ligações de hidrogênio (tracejados amarelos) envolvida na ligação entre os substratos naturais e o íon de magnésio, através de moléculas de água (esferas vermelhas). Vale ressaltar o posicionamento	

do Asp₃₀₀ (em laranja), resíduo catalítico próximo ao Mg₃₆₀. Figura preparada utilizando o programa The PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.2r1, DeLano Scientific, LLC. 9

Figura 4 – Íons de Mg²⁺ (em verde) presentes na estrutura cristalina da ADK. Observa-se geometria octaédrica, tendo como ligantes moléculas de água (esferas vermelhas) e resíduos de aminoácidos. 10

Figura 5 – Representação gráfica da estrutura molecular da adenosina (ADO)..... 11

Figura 6 – (A) Representação gráfica da estrutura molecular de 4-anilinoquinazolina, com numeração de seus átomos. (B) Representação gráfica da estrutura molecular do PD153035. 13

Figura 7 – Diagrama de Jablonski simplificado, representando os fenômenos de fluorescência e fosforescência. Estados eletrônicos representados por: estado singlete fundamental, “S₀”; primeiro estado singlete excitado, “S₁”; segundo estado singlete excitado, “S₂”; primeiro estado triplete excitado, “T₁”; segundo estado triplete excitado, “T₂”. 15

Figura 8 – Representação espectral do processo de supressão de fluorescência com deslocamento de λ_{max} (A) para o azul (blueshift); (B) com ausência de deslocamento; (C) para o vermelho (redshift). 17

Figura 9 – (A) Gráfico de Stern-Volmer típico de sistema com um único fluoróforo, e (B) desvio negativo de gráfico de Stern-Volmer para múltiplos fluoróforos. 18

Figura 10 – Representação do equilíbrio ADK+L $\rightleftharpoons$ ADK'L. 19

Figura 11 – Sobreposições espectrais (áreas hachuradas) possíveis (A) uma intersecção, (B) duas intersecções, para a emissão do doador (Trp), linha verde, e absorção do acceptor, linha azul. 20

Figura 12 – Representação dos ângulos e vetores utilizados na determinação de κ^2 21

Figura 13 – Ilustração da orientação dos vetores dos momentos dipolares e de separação, e seus respectivos valores de κ^2 . (A) $\kappa^2=0$; (B) $\kappa^2=1$ e (C) $\kappa^2=4$ 22

Figura 14 – Gel SDS-PAGE (12%) da ADK por cromatografia de exclusão utilizando-se coluna Superdex 200. A fração antes de purificação por Superdex é identificada por PC; enquanto as frações puras recolhidas após a purificação são apresentadas por F1, F2, F3 e F4. Foi utilizado marcado de massa molar GE..... 35

Figura 15 – Alinhamento entre as estruturas da ADK humana (PDB 1BX4, em verde) e a estrutura prevista pelo servidor I-TASSER, baseado na estrutura primária da ADK de Mus musculus (em azul). Substratos naturais representados por esferas amarelas. 36

- Figura 16** – Representação dos potenciais sítios de ligação da ADK (esferas laranja) e do substrato natural ADO (em amarelo). Átomos de magnésio são representados por esferas verdes, moléculas de água representadas por esferas vermelhas. Figura preparada utilizando-se o software UCSF Chimera, versão 1.5.2 (build 32411), Regents of the University of California. 51
- Figura 17** – Representação dos resultados de “docking” para os compostos sintetizados, com indicação da posição dos compostos (estruturas coloridas) no sítio preferencial e sítio alternativo, e sítios de ligação previstos (esferas laranja), além de substratos naturais ATP e ADO (em amarelo). 52
- Figura 18** – Mapa de interações bidimensional e estruturas dos compostos (A) 8MEO-3Br; (B) 8MEO-4I; (C) 8MEO-4ACET, em que interações de van der Waals são apresentadas por linhas pontilhadas verdes, e ligações de hidrogênio por linhas tracejadas azuis. Números representam o número de identificação dos átomos das estruturas segundo notação utilizadas pelos métodos bioinformáticos. Dados obtidos utilizando-se os softwares ArgusLab 4.0.1, RCSB PDB Ligand Explorer 3.9 e ChemBio Draw Ultra, versão 11.0.1, CambridgeSoft. 55
- Figura 19** – Resultados de “docking” para os sistemas (A) ADK/8MEO-3Br (bege); (B) ADK/8MEO-4I (roxo) e (C) ADK/8MEO-4ACET (verde); apresentando os compostos bloqueando a entrada do ATP no correspondente sítio. ATP e ADO representados em amarelo; ligações de hidrogênio são representadas por pontilhados amarelos, e moléculas de água representadas por esferas vermelhas. Figura preparada utilizando o software The PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.2r1, DeLano Scientific, LLC. 56
- Figura 20** – Estrutura do resíduo de aminoácido triptofano, em que é possível observar seu grupamento indol. 61
- Figura 21** – (A) Espectro de excitação de solução de ADK ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$, em solução tampão Tris 50 mmol L^{-1} , pH 8,0). (B) espectro de emissão de solução de ADK ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$, contida em solução tampão Tris 50 mmol L^{-1} , pH 8,0). $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$; fendas de 5 nm 61
- Figura 22** – Espectros de fluorescência de emissão referente à titulação da ADK com (A) 8MEO-3Br, (B) 8MEO-4I e (C) 8MEO-4ACET. Acréscimo de ligantes à solução de ADK leva a aumento na supressão de fluorescência. Dados apresentam-se normalizados. 62
- Figura 23** – Espectros de Ret da ADK (A_1) 8MEO-3Br; (B_1) 8MEO-4I e (C_1) 8MEO-4ACET, com a área hachurada em verde indica sobreposição espectral; distâncias (em Å) entre os compostos e os resíduos de triptofano (Trp₇₅ e Trp₁₅₆, em vermelho), (A_2) 8MEO-3Br; (B_2) 8MEO-4I e (C_2) 8MEO-4ACET. 65
- Figura 24** – Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3Br; (B) 8MEO-4I e (C) 8MEO-4ACET. 68

Figura 25 – Momentos Dipolares dos compostos da série investigada.....	70
Figura 26 – Efeito da posição do substituinte (3' e 4') nos momentos dipolares dos compostos da série 8-Metóxi-4-anilinoquinazolinas.	70
Figura 27 – Efeito da posição do substituinte (3' e 4') nos momentos dipolares dos compostos (A) 8MEO-3NO₂ e (B) 8MEO-4NO₂.	71
Figura 28 – Comparação entre Momento Dipolar e logP para a série 8-Metóxi-4-anilinoquinazolinas.	71
Figura A.1.1 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3F.	93
Figura A.1.2 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4F.	94
Figura A.1.3 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3Cl.	95
Figura A.1.4 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4Cl.	96
Figura A.1.5 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3Br.	97
Figura A.1.6 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4Br.	98
Figura A.1.7 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3I.	99
Figura A.1.8 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4I.	100
Figura A.1.9 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3BZL.	101
Figura A.1.10 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4BZL.	102
Figura A.1.11 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3NO₂.	103
Figura A.1.12 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4NO₂.	104
Figura A.1.13 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3ACET.	105
Figura A.1.14 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4ACET.	106
Figura A.1.15 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3CH₃.	107
Figura A.1.16 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4CH₃.	108

Figura A.1.17 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-3METX.	109
Figura A.1.18 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-4METX.	110
Figura A.1.19 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-ANL.	111
Figura A.1.20 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-CF_3.	112
Figura A.1.21 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-TRI.	113
Figura A.1.22 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-DMEA.	114
Figura A.2.1 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3F.	117
Figura A.2.2 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4F.	118
Figura A.2.3 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3Cl.	119
Figura A.2.4 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4Cl.	120
Figura A.2.5 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3Br.	121
Figura A.2.6 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4Br.	122
Figura A.2.7 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3I.	123
Figura A.2.8 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4I.	124
Figura A.2.9 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3BZL.	125
Figura A.2.10 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4BZL.	126
Figura A.2.11 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3NO_2.	127
Figura A.2.12 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4NO_2.	128
Figura A.2.13 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3ACET.	129
Figura A.2.14 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4ACET.	130
Figura A.2.15 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3CH_3.	131

Figura A.2.16 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4CH ₃	132
Figura A.2.17 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3METX.	133
Figura A.2.18 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4METX.	134
Figura A.2.19 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-ANL.	135
Figura A.2.20 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-CF ₃	136
Figura A.2.21 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-TRI.	137
Figura A.2.22 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-DMEA.	138
Figura A.3.1 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3F.	141
Figura A.3.2 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4F.	141
Figura A.3.3 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3Cl.	141
Figura A.3.4 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4Cl.	142
Figura A.3.5 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3Br.	142
Figura A.3.6 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4Br.	142
Figura A.3.7 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3I.	143
Figura A.3.8 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4I.	143
Figura A.3.9 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3BZL.	143
Figura A.2.10 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4BZL.	144
Figura A.3.11 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3NO ₂	144
Figura A.3.12 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4NO ₂	144
Figura A.3.13 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3ACET.	145
Figura A.3.14 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4ACET.	145
Figura A.3.15 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3CH ₃	145

Figura A.3.16 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4CH ₃	146
Figura A.3.17 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3METX.	146
Figura A.3.18 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4METX.	146
Figura A.3.19 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-ANL.	147
Figura A.3.20 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-CF ₃	147
Figura A.3.21 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-TRI.	147
Figura A.3.22 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-DMEA.	148
Figura A.4.1 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3F.	151
Figura A.4.2 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4F.	151
Figura A.4.3 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3Cl.	152
Figura A.4.4 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4Cl.	152
Figura A.4.5 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3Br.	153
Figura A.4.6 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4Br.	153
Figura A.4.7 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3I.	154
Figura A.4.8 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4I.	154
Figura A.4.9 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3BZL.	155
Figura A.4.10 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4BZL.	155
Figura A.4.11 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3NO ₂	156
Figura A.4.12 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4NO ₂	156
Figura A.4.13 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3ACET.	157
Figura A.4.14 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4ACET.	157
Figura A.4.15 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3CH ₃	158
Figura A.4.16 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4CH ₃	158

Figura A.4.17 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3METX.	159
Figura A.4.18 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4METX.	159
Figura A.4.19 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-ANL.	160
Figura A.4.20 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-CF ₃	160
Figura A.4.21 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-TRI.	161
Figura A.4.22 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-DMEA.	161
Figura A.5.1 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.	165
Figura A.5.2 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.	165
Figura A.5.3 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.	166
Figura A.5.4 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.	166
Figura A.5.5 - Mapas de Interação Bidimensionais para 8MEO-3BZL.	167
Figura A.5.6 - Mapas de Interação Bidimensionais para 8MEO-3BZL.	167
Figura A.5.7 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3NO ₂ e (B) 8MEO-4NO ₂	168
Figura A.5.8 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.	168
Figura A.5.9 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3CH ₃ e (B) 8MEO-4CH ₃	169
Figura A.5.10 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-METX e (B) 8MEO-4METX.	169
Figura A.5.11 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF ₃	170
Figura A.5.12 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.	170
Figura A.6.1 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.	173

Figura A.6.2 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.	173
Figura A.6.3 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.	173
Figura A.6.4 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.	174
Figura A.6.5 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.	174
Figura A.6.6 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3NO ₂ e (B) 8MEO-4NO ₂	174
Figura A.6.7 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.	175
Figura A.6.8 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3CH ₃ e (B) 8MEO-4CH ₃	175
Figura A.6.9 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.	175
Figura A.6.10 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF ₃	176
Figura A.6.11 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.	176
Figura A.7.1 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3F.	179
Figura A.7.2 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4F.	179
Figura A.7.3 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3Cl.	180
Figura A.7.4 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4Cl.	180
Figura A.7.5 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3Br.	181
Figura A.7.6 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4Br.	181
Figura A.7.7 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3I.	182
Figura A.7.8 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4I.	182
Figura A.7.9 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3BZL.	183
Figura A.7.10 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4BZL.	183
Figura A.7.11 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3NO ₂	184
Figura A.7.12 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4NO ₂	184
Figura A.7.13 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3ACET.	185

Figura A.7.14 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4ACET.	185
Figura A.7.15 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3CH ₃	186
Figura A.7.16 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4CH ₃	186
Figura A.7.17 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3METX.	187
Figura A.7.18 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4METX.	187
Figura A.7.19 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-ANL.	188
Figura A.7.20 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-CF ₃	188
Figura A.7.21 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-TRI.	189
Figura A.7.22 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-DMEA.	189
Figura A.8.1 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.	193
Figura A.8.2 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.	193
Figura A.8.3 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.	193
Figura A.8.4 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.	194
Figura A.8.5 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.	194
Figura A.8.6 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3NO ₂ e (B) 8MEO-4NO ₂	194
Figura A.8.7 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.	195
Figura A.8.8 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3CH ₃ e (B) 8MEO-4CH ₃	195
Figura A.8.9 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.	195
Figura A.8.10 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF ₃	196
Figura A.8.11 - Espectros de Ret dos compostos (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.	196
Figura A.9.1 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.	199

Figura A.9.2 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.	199
Figura A.9.3 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.	199
Figura A.9.4 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.	200
Figura A.9.5 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.	200
Figura A.9.6 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3NO ₂ e (B) 8MEO-4NO ₂ .	200
Figura A.9.7 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.	201
Figura A.9.8 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3CH ₃ e (B) 8MEO-4CH ₃ .	201
Figura A.9.9 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.	201
Figura A.9.10 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-CF ₃ e (B) 8MEO-TRI.	202
Figura A.9.11 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos 8MEO-DMEA.	202
Figura A.10.1 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.	205
Figura A.10.2 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.	205
Figura A.10.3 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.	205
Figura A.10.4 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.	206
Figura A.10.5 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.	206

Figura A.10.6 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3NO ₂ e (B) 8MEO-4NO ₂	206
Figura A.10.7 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.	207
Figura A.10.8 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3CH ₃ e (B) 8MEO-4CH ₃	207
Figura A.10.9 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.	207
Figura A.10.10 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF ₃	208
Figura A.10.11 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.	208

Esquemas

	Página
Esquema 1 – Requisitos da Regra de Cinco de Lipinski (R5L).	24
Esquema 2 – Estrutura primária da ADK proveniente de <i>Mus musculus</i> ; triptofanos indicados em vermelho.	35
Esquema 3. Série 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas.	36
Esquema 4. Compostos adicionais sintetizados da série 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas	37
Esquema 5 – Rota sintética para preparo dos derivados de 4-anilinoquinazolinas. (A) Etapa de Ciclização; (B) Etapa de Cloração e (C) Etapa de Adição de Derivado Anilínico. (1) Ácido 2-Amino-3-Metóxi Benzóico; (2) Quinazolinona; (3) 4-Cloroquinazolina e (4) derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas.....	37
Esquema 6 – Rota sintética para a preparação da quinazolinona.....	38

Esquema 7 – (A) Rota sintética para a preparação da 4-cloroquinazolina. (B) Ilustração do sistema reacional utilizado.....**38**

Esquema 8 – (A) Rota sintética para a preparação das 4-anilinoquinazolininas.(B) Ilustração do sistema reacional utilizado.....**39**

Índice

1- MOTIVAÇÃO	3
2- REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1- Adenosina Quinase (ADK)	7
2.2- Adenosina (ADO).....	11
2.3- Quinazolinás.....	13
2.4- Fluorescência de Emissão, Gráficos de Stern-Volmer, Constantes de Dissociação (K_d) e Transferência de Energia de Ressonância (RET)	14
2.5- Ensaios <i>in silico</i>	22
2.6- Potencial Farmacológico (<i>Druglikeness</i>)	23
3- OBJETIVOS	29
3.1-Objetivo Geral	29
3.2- Objetivos Específicos.....	29
4- PARTE EXPERIMENTAL	33
4.1- Instrumentação geral, reagentes e solventes.....	33
4.2- Ensaios <i>in silico</i> conduzidos neste estudo	33
4.2.1- Previsão sítios.....	34
4.2.2- <i>Docking</i>	34
4.2.3- Predição do potencial farmacológico (<i>Druglikeness</i>)	34
4.3- Clonagem, expressão e purificação da ADK	34
4.4- Síntese e caracterização dos compostos.....	35
4.5- Ensaios de Fluorescência de Emissão	48
4.6- Cálculos Constantes de Dissociação (K_d)	48
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1- Resultados das análises <i>in silico</i>	51
5.1.1- Previsão sítios.....	51
5.1.2- <i>Docking</i>	52
5.1.3- Mapas de Interação Bidimensionais	54
5.1.4- Hipótese de Inibição	56
5.1.5- Avaliação dos resultados de potencial farmacológico - (<i>Druglikeness</i>)	57

5.2- Resultados obtidos de clonagem, expressão e purificação da ADK	60
5.3- Resultados obtidos na síntese e caracterização dos compostos.....	60
5.4- Ensaio de fluorescência de emissão.....	60
5.4.1- Supressão de fluorescência (<i>quenching</i>).....	61
5.4.2- Transferência de Energia de Ressonância (RET)	63
5.5- Constantes de Dissociação (K_d) obtidas para os sistemas estudados.....	67
5.6- Outras considerações	69
5.6.1- Momentos Dipolares (μ) e logP	69
6- CONCLUSÕES.....	75
7- BIBLIOGRAFIA.....	79
ANEXOS	87
ANEXO 1 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H	91
ANEXO 2 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C	115
ANEXO 3 – ESPECTROS DE MS DE ALTA RESOLUÇÃO	139
ANEXO 4 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO	149
ANEXO 5 – MAPAS BIDIMENSIONAIS DE INTERAÇÃO	163
ANEXO 6 – HIPÓTESE DE INIBIÇÃO	171
ANEXO 7 – ESPECTROS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA	177
ANEXO 8 – ESPECTROS DE RET	191
ANEXO 9 – GRÁFICOS DE STERN-VOLMER	197
ANEXO 10 – MOMENTOS DIPOLARES	203

1- MOTIVAÇÃO

É crescente na atualidade a busca de novas abordagens terapêuticas para o tratamento das mais diversas doenças. Dentre estas abordagens, a busca por novas moléculas, que apresentem pronunciada atividade biológica tem sido uma das mais exploradas estratégias no combate a doenças. Muitos destes compostos podem atuar como ligantes, ativando e desativando proteínas, de forma que podem ser aplicados no tratamento de doenças que estejam relacionadas à atividade enzimática.

Nesse contexto, uma importante enzima, a qual pode estar relacionada à múltiplas doenças humanas é a Adenosina Quinase (ADK) ¹; enzima da classe das transferases (EC 2.7.1.20), responsável pela fosforilação de adenosina (ADO) ², e desse modo, regulando as concentrações de ADO no organismo. A adenosina é um importante nucleosídeo, cuja concentração propicia diversas respostas biológicas, atuando em importantes receptores ³, tais como os receptores ⁴ acoplados à proteína G (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃). Estes receptores ⁵ atuam em um grande número de processos biológicos, que vão desde a sinalizar o início ou interrupção de um processo inflamatório ⁶, até a processos angiogênicos ⁷ e vasodilatadores ⁸.

Dada a importante ação da ADK nestes processos biológicos, fica evidente que o aumento das concentrações de ADO, através da inibição da atividade da ADK, pode ser uma interessante abordagem terapêutica para o tratamento destas doenças. Desse modo, há um grande interesse no desenvolvimento de compostos orgânicos capazes de inibir a atividade da ADK, particularmente no desenvolvimento de inibidores não nucleosídicos, com potencial farmacológico.

Um grande número de classes de compostos orgânicos foi explorado no desenvolvimento de novos fármacos, atividade que envolveu extensos trabalhos científicos. Diversos compostos potencialmente inibidores da ADK foram sintetizados, sendo que um dos mais conhecidos é a 5-iodotubercidina ⁹ e seus análogos. Contudo, dentre as classes estudadas, os derivados de quinazolininas, particularmente os derivados de 4-anilinoquinazolininas ¹⁰ mostraram-se muito promissores na inibição da ADK. As 4-anilinoquinazolininas são espécies orgânicas compostas por duas porções

principais, uma composta por um núcleo quinazolínico, no qual está ligada a segunda porção principal, composta por um anel anilínico, na posição 4 do núcleo quinazolínico.

A investigação do potencial inibitório dos derivados de quinazolininas pode ser realizada por uma grande gama de técnicas. Contudo uma eficiente, simples e sensível técnica capaz de monitorar a interação compostos/ADK é a fluorescência de emissão. Para tal, são realizados ensaios baseados na fluorescência intrínseca de triptofano ¹¹ (presente na estrutura primária da ADK), de forma a verificar-se a supressão de fluorescência da ADK com o crescente aumento da concentração dos compostos. Os dados obtidos pelos experimentos de fluorescência de emissão, associados a gráficos de Stern-Volmer, permitem o cálculo de constantes de dissociação (K_d) para cada um dos sistemas compostos/ADK estudados.

Além da determinação dos parâmetros relacionados ao potencial inibitório dos compostos, é importante também se propor uma hipótese que justifique tal comportamento. A fim de conduzirem-se tais proposições, ensaios *in silico* são poderosas ferramentas que podem complementar dados obtidos *in vitro*. Experimentos de previsão de sítios de ligação potenciais, associados a ensaios de *docking*, permitem a avaliação dos mecanismos envolvidos no processo de ligação dos compostos alvo a um sítio enzimático da ADK, prevendo posições de ligação e calculando energias de cada interação.

Isto posto, a síntese de derivados de 4-anilinoquinazolininas, aliada a ensaios espectroscópicos e ensaios bioinformáticos, pode levar ao desenvolvimento de novas moléculas com potencial farmacológico capazes de inibir a ADK e serem utilizados no tratamento de doenças e distúrbios metabólicos.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Adenosina Quinase (ADK)

A Adenosina Quinase (ADK) é uma enzima da classe das Transferases (adenosina 5'-fosfotransferase, EC 2.7.1.20) que catalisa a reação entre trifosfato de adenosina (ATP) e adenosina (ADO), convertendo-os em difosfato de adenosina (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP), respectivamente¹². É a enzima chave na regulação da concentração de adenosina, e sua inibição pode resultar em uma ampla gama de benefícios à saúde. A ADK tem sua estrutura tridimensional resolvida por cristalografia, em resolução de 1,5 Å, e é composta por um grande domínio α/β , semelhante ao de Rossmann^{13, 14} com nove folhas- β e oito α -hélices, responsável pelo sítio de ligação de ATP (Figura 1A, domínio em verde); e um domínio menor misto, α/β , composto por cinco folhas- β e duas α -hélices¹ (Figura 1A, azul), que em conjunto com o domínio maior, forma o sítio de ligação de adenosina (Figura 1A, esferas amarelas). A ADK possui 345 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária (sendo dois deles triptofanos), e massa molar de 38,7 kDa. Seus dois sítios de ligação estão bastante próximos, sugerindo-se que o resíduo Asp₃₀₀ seja um importante resíduo catalítico na função da ADK.

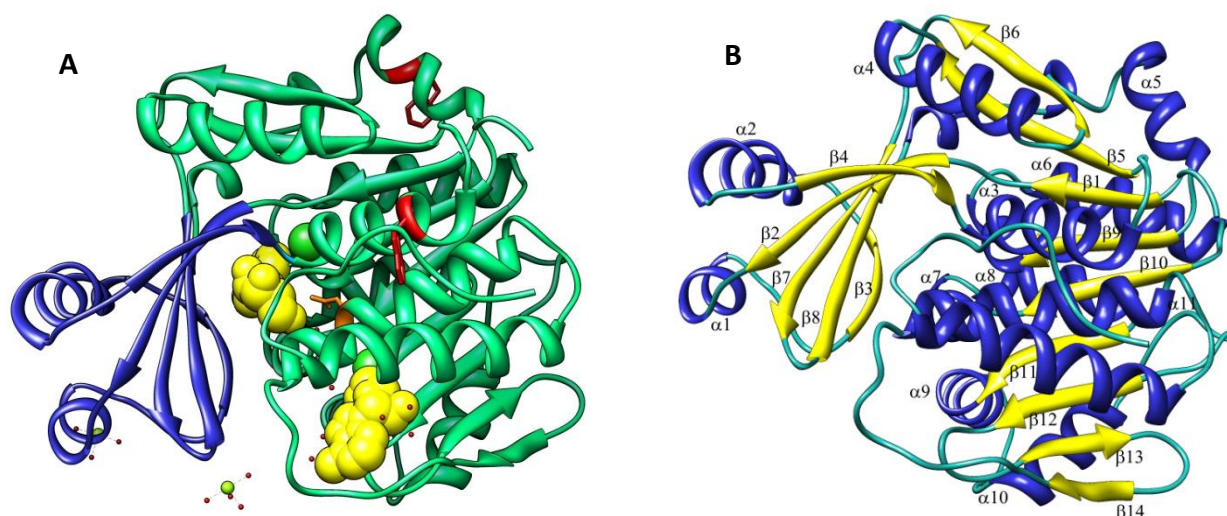


Figura 1. (A) Representação gráfica da estrutura tridimensional da ADK (PDB: 1BX4) com seus domínios (domínio maior $\alpha 8/\beta 9$ em verde; domínio menor $\alpha 2/\beta 2$ em azul; substrato ADO em esferas amarelas, Asp₃₀₀ em laranja e triptofanos em vermelho). (B) Assinalamento da estrutura secundária da ADK (PDB: 1BX4), com indicações de α -hélices e folhas- β .

A Adenosina Quinase é a mais abundante quinase de nucleosídeos em tecidos de mamíferos, incluindo humanos. Seus dois sítios de ligação possuem diferentes afinidades por adenosina; o primeiro sítio, maior, possui afinidade inferior por ADO (e dessa maneira maior tendência em ligação com ATP), e um sítio menor com maior afinidade por ADO. A ADK catalisa a conversão de ATP e ADO em ADP e AMP, respectivamente, através da seguinte reação:



O mecanismo reacional da ADK envolve a transferência de γ -fosfato do ATP para o grupo 5'-hidróxi da adenosina, formando AMP, com Asp₃₀₀ agindo como base catalítica na desprotonação deste grupo ¹⁵. A transferência do fosfato do ATP ocorre segundo mecanismo do tipo S_N2 ¹⁶, conforme dados cristalográficos ¹⁷. O cátion magnésio possui papel importante na reação, estabilizando as cargas negativas do grupo fosfato, de modo a facilitar o ataque nucleofílico (Figura 2).

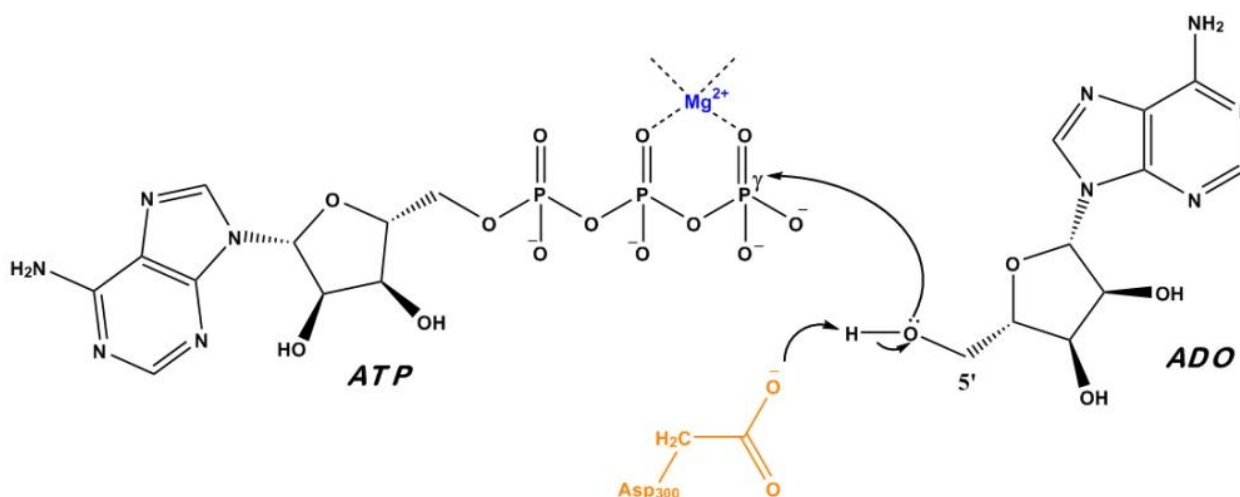


Figura 2. Mecanismo reacional da ADK, ilustrando o ataque nucleofílico do grupo γ -fosfato do ATP pela adenosina (ADO), levando à formação de ADP e AMP. A presença do cátion Mg^{2+} é fundamental para a atividade enzimática, uma vez que estabiliza as cargas negativas do grupamento fosfato, facilitando o ataque nucleofílico¹; resíduo de aspartato ilustrado em laranja.

Estruturalmente, é possível observar a função destes íons presentes na estrutura cristalina da ADK. A literatura ¹ mostra que há três íons de magnésio presentes na estrutura da ADK, sendo denominados Mg₃₆₀, Mg₃₆₅ e Mg₃₇₅. O íon Mg₃₆₀ é o que desempenha ação mais importante, por estar relacionado à atividade catalítica da ADK.

Para tal, este se posiciona em um local entre os substratos naturais (ADO e ATP), conectando-os através de uma rede de ligações de hidrogênio através de diversas moléculas de água. Estas moléculas de água interagem com os substratos naturais, assim como com resíduos de aminoácidos presentes nas vizinhanças (Glu₂₂₆ e Gln₃₈). A Figura 3 detalha este processo.

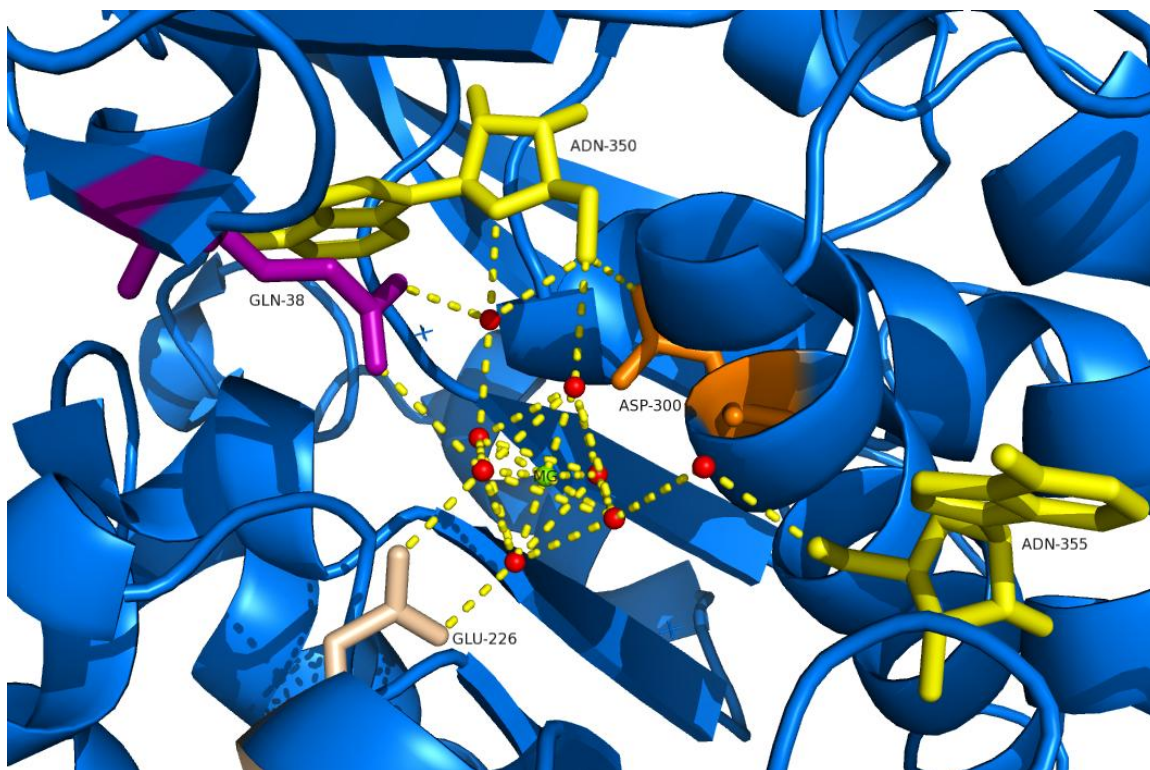


Figura 3. Sítio de Ligação do íon Mg_{360} (esfera verde) indicando a rede de ligações de hidrogênio (tracejados amarelos) envolvida na ligação entre os substratos naturais e o íon de magnésio, através de moléculas de água (esferas vermelhas). Vale ressaltar o posicionamento do Asp₃₀₀ (em laranja), resíduo catalítico próximo ao Mg_{360} . Figura preparada utilizando o programa The PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.2r1, DeLano Scientific, LLC.

Os íons de Mg^{2+} presentes na proteína apresentam geometria octaédrica (Número de Coordenação = 6), tendo como ligantes tanto moléculas de água quanto resíduos de aminoácidos. A importância desses íons é variada, indo desde interações simples com resíduos de aminoácidos (no caso, Mg_{365}) e funções de interação com resíduos de aminoácidos e ações superficiais que envolvem o empacotamento cristalino da ADK. A Figura 4 ilustra as coordenações envolvidas para cada íon de Mg^{2+} .

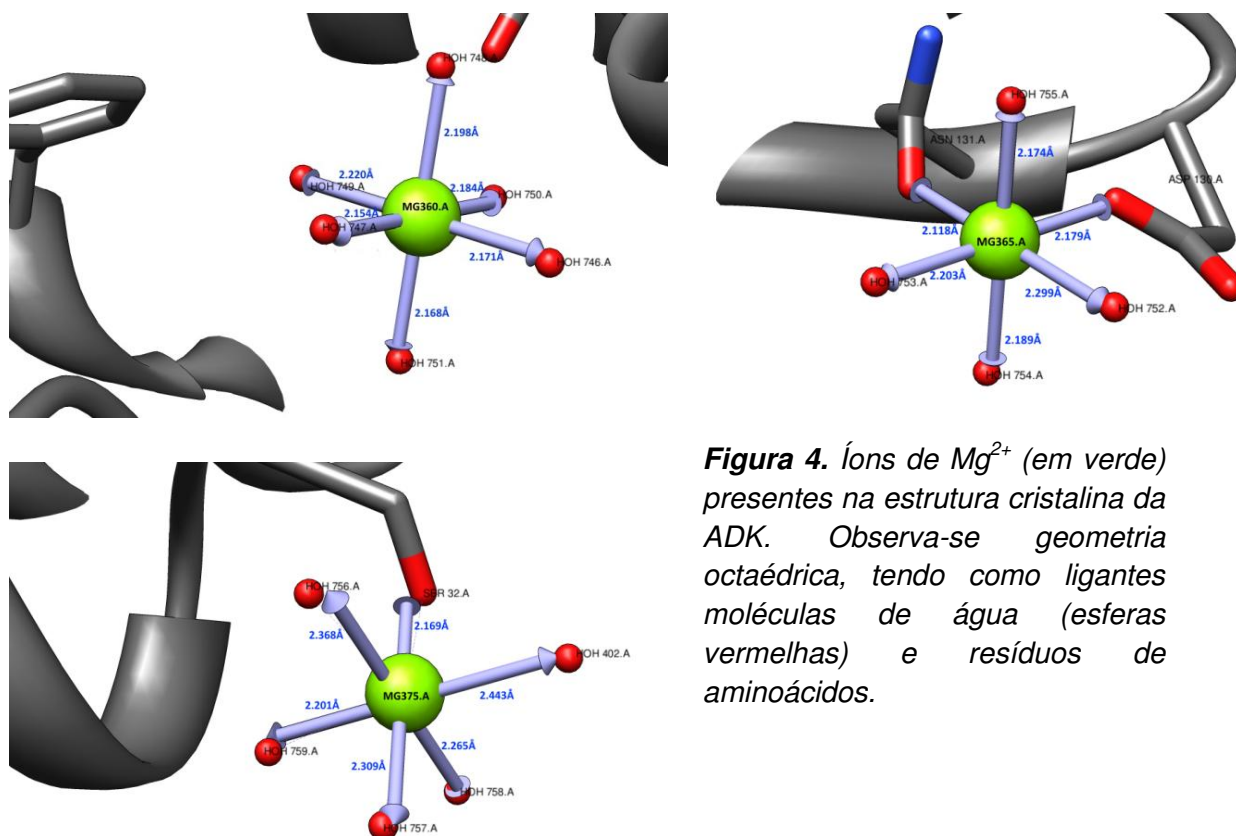


Figura 4. Íons de Mg^{2+} (em verde) presentes na estrutura cristalina da ADK. Observa-se geometria octaédrica, tendo como ligantes moléculas de água (esferas vermelhas) e resíduos de aminoácidos.

Complementarmente, temos que a ADK e a enzima Adenosina Deaminase (ADA) apresentam-se como enzimas muito importante na regulação de diversos aspectos do metabolismo, devido a suas capacidades de variar a concentração de adenosina no organismo. Contudo, baseado do baixo valor de K_m ($0,7 \mu\text{mol L}^{-1}$) da ADK ¹⁸, esta deve ser a rota primária de metabolização de adenosina. Esta propriedade faz da ADK um alvo importante no tratamento de doenças como epilepsia e derrame cerebral, uma vez que estudos mostram que a inibição farmacológica da ADK suprime crises epiléticas e deprimem a atividade neuronal. Além disso, fibroblastos deficientes em ADK liberam 2,3 vezes mais ADO do que fibroblastos deficientes em ADA, o que reforça o interesse na inibição da ADK ¹⁹. Estudos ²⁰ mostram que a inibição da ADA mostra-se uma tarefa mais difícil, uma vez que esta enzima apresenta papel crucial em muitas funções fisiológicas, principalmente envolvendo o sistema imune.

2.2- Adenosina (ADO)

A ADK é uma enzima tão importante devido a sua capacidade de metabolizar adenosina no organismo através da conversão de ADO intracelular em AMP, uma vez que é um importante regulador dos níveis de ADO extracelulares. Níveis altos de ADO protagonizam importantes papéis, e cuja concentração regula a liberação de purinas cardíacas¹⁸, atividades antiinflamatórias²¹, funções citoprotetoras, entre outras.

Os efeitos fisiológicos de ADO agem através de suas interações com os quatro receptores acoplados a proteínas G (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), os quais são expressos em muitos tipos celulares, incluindo neutrófilos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais^{22, 23}. Contudo, o tempo de vida fisiológico da adenosina (ordem de segundos) restringe sua ação protetora em tecidos e sítios celulares²⁴; e por esse motivo, uma alternativa no incremento da concentração de ADO endógena e potencializar sua ação terapêutica²⁵ poderia ser a inibição de enzimas de metabolização de ADO^{26, 27}. Conforme afirmado anteriormente, estudos mostram que ADK pode estar relacionada a diversas doenças, tais como inflamações²⁸, derrame²⁹ e infarto³⁰, entre outras^{31, 32}.

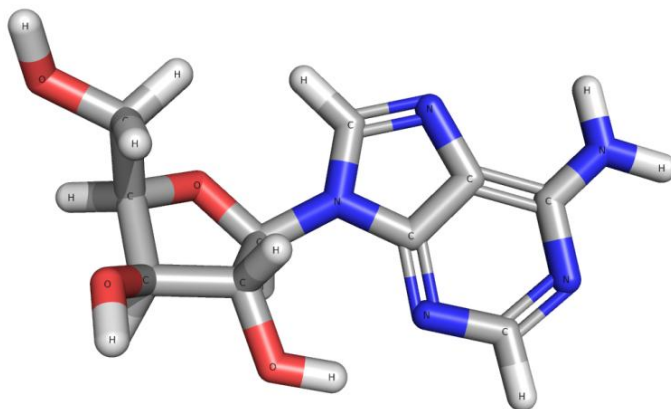


Figura 5. Representação gráfica da estrutura molecular da adenosina (ADO).

Estudos mostram que inibidores seletivos da ADK aumentam a concentração de ADO extracelular, suprimindo a inflamação em diversos modelos³³. A adenosina é um imunomodulador, de modo que em um primeiro momento, esta é liberada na vizinhança de células imune presente em tecidos submetidos a estímulos nocivos, incluindo isquemia e inflamação. Os efeitos antiinflamatórios da ADO agem através de seus receptores, principalmente os receptores A_1 (imunoestimulador) e A_{2A} (imunossupressor).

A adenosina regula a função dos neutrófilos através de sua ligação aos seus receptores supracitados, de forma contra-regulatória. Este efeito aumenta a resposta inflamatória em locais em que a concentração de ADO esteja reduzida (por exemplo, no caso de infecções bacterianas, em que o consumo metabólico de ADO é aumentado). É possível que este processo ocorra de forma autócrina, uma vez que ocorre a liberação de adenosina pelos neutrófilos. Contudo, uma vez que os neutrófilos atingem o local de acentuado dano tecidual, (em que há altas concentrações de ADO gerada pelos tecidos ou células danificadas) há um efeito de *feedback*, de forma a sinalizar a inibição das funções antiinflamatórias dos neutrófilos.

A Adenosina também se apresenta com atividade neuroprotetora, uma vez que é uma moduladora homeostática de atividade celular, agindo como um anticonvulsivo exógeno e agente neuroprotetor ³⁴. Em casos de isquemia cerebral ou hipóxia, a liberação de ADO limita a estimulação excitatória de forma que os neurônios podem sobreviver ao diminuído suprimento energético. Além disso, há fortes evidências de que ADO, além de controlar a disponibilidade de oxigênio de forma aguda através da regulação do tônus vascular, serve como potencializador de longo termo de crescimento vascular em áreas de tensão de oxigênio reduzida ³⁵.

Outro aspecto importante quanto às propriedades da adenosina é sua capacidade de produzir vasodilatação, a fim de aumentar a disponibilização de oxigênio para o coração hipóxico. Vasos sanguíneos em outros tecidos são menos sensíveis aos efeitos dilatadores de ADO do que artérias coronárias, mas também dilatam como resposta a ADO, através de uma combinação de efeitos entre os receptores A_{2A} e A_{2B}.

Além de seu papel histo-protetor, a adenosina também age como estimuladora de angiogênese, a qual é necessária no processo de regeneração tecidual. Este processo também ocorre através do estímulo de receptores de adenosina, sendo que a ativação do receptor A₁ estimula de forma muito acentuada a angiogênese *in vivo* ²².

No entanto, apesar de todos os benefícios da ADO, sua administração sistêmica não é uma abordagem executável, dado que devido a sua natureza não seletiva e a expressão de receptores de ADO em todos os tipos celulares implica em efeitos colaterais não aceitáveis, prevenindo que esta seja uma modalidade terapêutica efetiva.

Contudo, agentes capazes de elevar as concentrações de ADO no organismo localmente poderiam ser utilizados com potencial sucesso no tratamento de doenças inflamatórias, auto-imunes, isquêmicas e vasculares³⁶.

2.3- Quinazolininas

Dado o interesse farmacológico relacionado à ADK, muitos compostos heterocíclicos têm sido estudados por vários anos, e um grande número destes apresentaram propriedades farmacológicas importantes, sendo utilizados como drogas^{37, 38}. Entre estes compostos, os derivados de quinazolininas, como as 4-anilinoquinazolininas (Figura 6A), apresentam propriedades promissoras na inibição de diversas enzimas, o que pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Muitos derivados de quinazolininas possuem conhecidas propriedades biológicas³⁹, sendo que seu mais conhecido inibidor é o PD153035⁴⁰ (Figura 6B). Os derivados de quinazolininas⁴¹ são reportados na literatura como potentes e seletivos inibidores de tirosina quinases de receptores da família EGF^{42, 43, 44, 45, 46}.

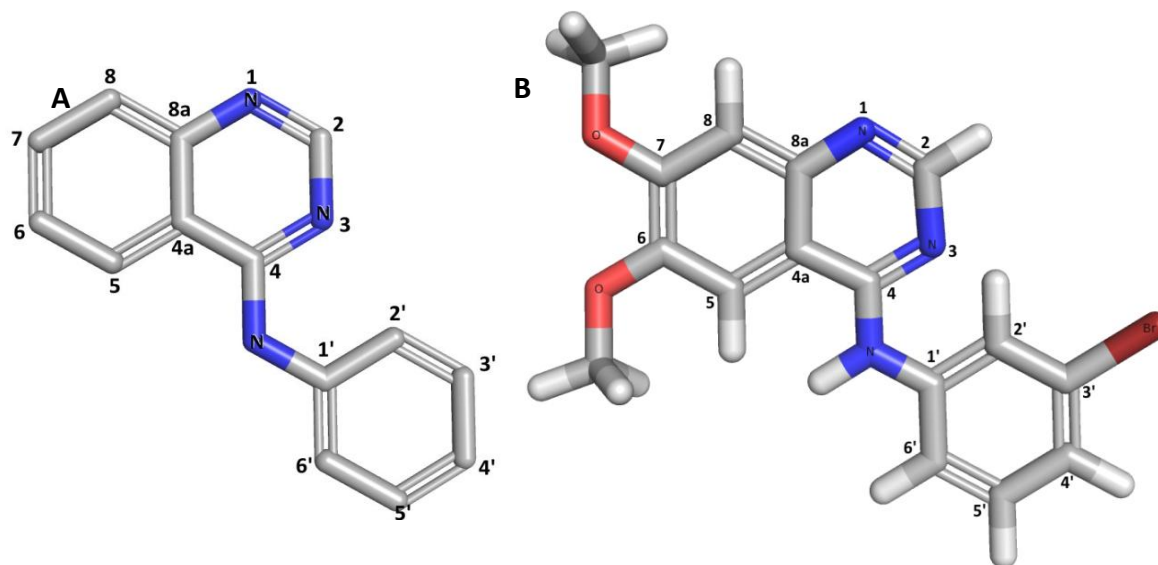


Figura 6. (A) Representação gráfica da estrutura molecular de 4-anilinoquinazolina, com numeração de seus átomos. (B) Representação gráfica da estrutura molecular do PD153035.

Embora alguns inibidores de ADK sejam conhecidos e já utilizados no tratamento de diversas doenças, o desenvolvimento de novos compostos capazes de inibir a ADK ainda são alvos de grande interesse medicinal, e a investigação das interações entre estes compostos e a enzima é de grande importância. Um dos mais conhecidos

inibidores da ADK é a 5-iodotubercidina^{9, 47}, e seus análogos, os quais se mostraram altamente potentes. Contudo, apesar dos resultados inicialmente positivos, a aplicação farmacológica destes compostos é muito comprometida devido a sua baixa biodisponibilidade, pequeno tempo de meia-vida plasmático, baixa seletividade, aliada a toxicidade, fatos que levaram então a busca por novas classes de compostos capazes de inibir a ADK. Dentre estas novas classes, figuram os derivados de quinazolinas.

Derivados de quinazolinas, como as 4-anilinoquinazolinas, podem ser obtidos através de rotas sintéticas razoavelmente simples, partindo por exemplo, de derivados de ácido antranílico e formamidas, modificando-se ligeiramente a clássica reação estabelecida por Niementowski⁴⁸, obtendo-se como produto uma quinazolinona.

Outra etapa importante envolve a cloração da quinazolinona, aplicando dimetilformamida (DMF) como catalisador e cloreto de tionila (SOCl_2), valendo-se da formação do também clássico reagente de Vilsmeier⁴⁹. A etapa final pode ser realizada utilizando-se derivado de anilina, formando os produtos finais, derivados de 4-anilinoquinazolinas.

O preparo de derivados de quinazolinas permite um grande número de variações e modificações, fato que permite que tal grupo possa ser explorado em uma vasta gama de aplicações, tornando-os interessantes alvos na busca de novos fármacos.

2.4- Fluorescência de Emissão, Gráficos de Stern-Volmer, Constantes de Dissociação (K_d) e Transferência de Energia de Ressonância (*Ret*)

A fluorescência pertence ao fenômeno denominado luminescência, o qual por sua vez pode ser definido como a emissão de luz a partir de qualquer substância⁵⁰. Na fluorescência, ocorre a excitação de um elétron proveniente de um estado eletrônico fundamental para ou estado excitado singlete, de forma que o retorno deste elétron para o estado fundamental é permitido por spin e ocorre rapidamente através da emissão de um fóton. Uma forma muito eficaz de ilustrar tal fenômeno envolve a utilização do Diagrama de Jablonski⁵¹ (Figura 7).

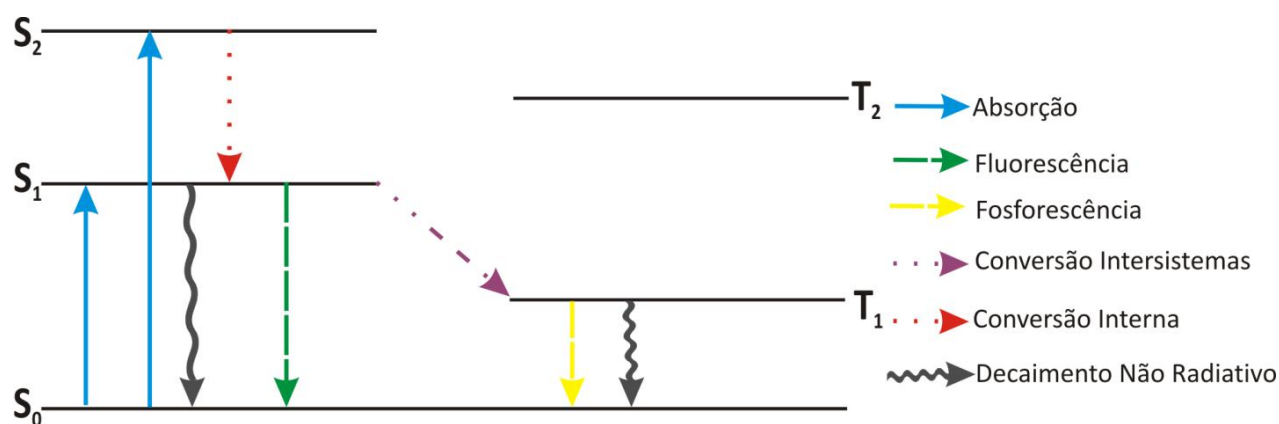


Figura 7. Diagrama de Jablonski simplificado⁵¹, representando os fenômenos de fluorescência e fosforescência. Estados eletrônicos representados por: estado singlete fundamental, " S_0 "; primeiro estado singlete excitado, " S_1 "; segundo estado singlete excitado, " S_2 "; primeiro estado triplete excitado, " T_1 "; segundo estado triplete excitado, " T_2 ".

O diagrama de Jablonski (desenvolvido pelo físico polonês Alexander Jablonski) ilustra muito claramente o processo de fluorescência, assim como o de fosforescência. É comumente observado que os máximos de emissão de espectros de fluorescência encontram-se localizados em comprimentos de ondas superiores aos máximos de excitação, ou seja, localizam-se em regiões de energia inferiores às energias dos máximos de excitação.

Este fenômeno pode ser explicado através do diagrama de Jablonski, uma vez que o elétron proveniente do nível S_0 pode ser excitado para o nível S_2 , decair de forma não radiativa para o nível S_1 (de energia inferior a S_2). Em seguida, o elétron então decai de forma radiativa (fluorescência) saindo do nível S_1 e retornando ao nível inicial, S_0 .

O fenômeno de fosforescência comporta-se de forma similar aos processos de fluorescência, mas envolve a excitação de um elétron proveniente do nível S_0 para o nível S_2 , o qual sofre conversão interna para o nível S_1 . Em seguida, ocorre uma conversão intersistemas, de forma que o elétron excitado passa a ocupar então um nível eletrônico excitado T_1 . Finalmente, o elétron excitado retorna, de forma radiativa, para o nível S_0 , completando assim todo o processo envolvido no fenômeno de fosforescência.

Existe uma diferença de energia entre as transições $S_0 \rightarrow S_2$ e $S_1 \rightarrow S_0$, de modo que o retorno ao nível fundamental é menos energético do que a excitação para os níveis excitados (essa diferença provém do decaimento não radiativo de $S_2 \rightarrow S_1$). Este fenômeno é então denominado deslocamento de Stokes, sendo amplamente observados em ensaios de fluorescência.

A ADK possui ao menos dois triptofanos (Trp_{56} e Trp_{156}) em sua estrutura primária¹, e devido às suas propriedades fluorescentes (provenientes de suas características estruturais), permite estudos de suas interações tanto com ligantes naturais quanto com potenciais inibidores por ensaios de supressão de fluorescência de emissão⁵⁰.

Durante o processo de supressão de fluorescência, os máximos de emissão podem ser deslocados para comprimentos de onda menores, também conhecidos como *blueshifts* (Figura 8A), maiores, ou *redshifts* (Figura 8C) ou ficarem inalterados (Figura 8B). Os deslocamentos dos máximos de fluorescência de emissão podem ser indicativos, no caso de sistemas biológicos como proteínas, de mudanças conformacionais decorrentes de algum processo.

Comumente, tal variação ocorre devido a variações no pH, ou através da adição de ligantes, os quais podem perturbar a estrutura protéica. Todos estes fatores, associados à alta sensibilidade, fazem da fluorescência de emissão uma potente técnica, de forma que é possível obter uma grande gama de informações acerca do sistema estudado. No caso de sistemas protéicos, tais ensaios permitem a verificação de mudanças conformacionais, além da própria investigação, por exemplo, de como ligantes interagem com uma dada proteína.

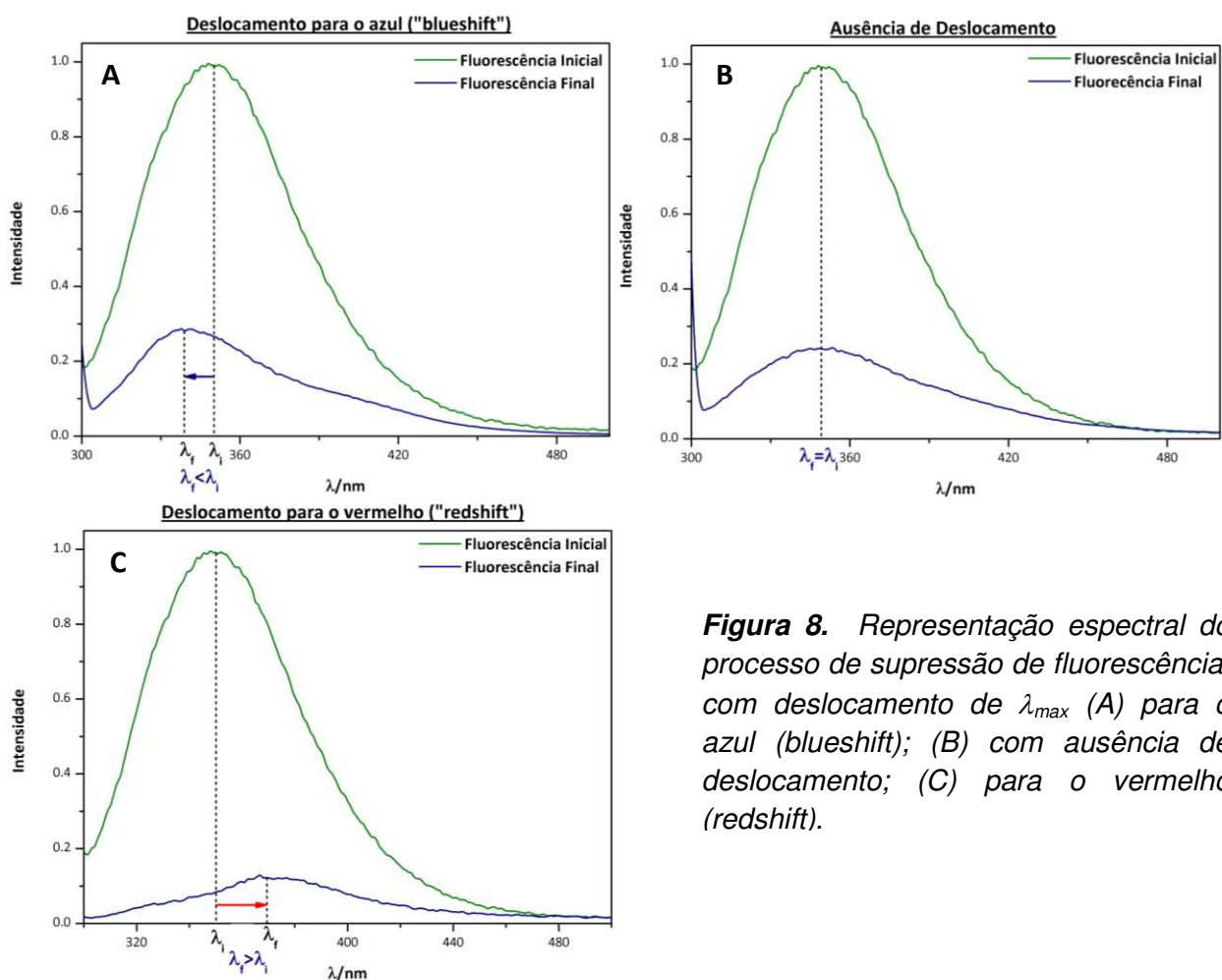


Figura 8. Representação espectral do processo de supressão de fluorescência. com deslocamento de λ_{max} (A) para o azul (blueshift); (B) com ausência de deslocamento; (C) para o vermelho (redshift).

As técnicas de fluorescência podem ser utilizadas para investigar⁵² o sítio de ligação enzimático⁵³, permitindo a verificação de mudanças no ambiente dos triptofanos quando da ligação dos ligantes à ADK. Tais ensaios também permitem a determinação da constante de dissociação (K_d)⁵³ de um dado composto, através de gráficos de Stern-Volmer⁵⁴ e de Regressão Não Linear de Mínimos Quadrados (nlnmq)⁵⁵. Gráficos de Stern-Volmer comuns são muito úteis em cálculos de K_d , uma vez que valores de constantes de dissociação podem ser obtidos pelo coeficiente angular da equação proveniente de uma regressão linear. Na situação de um sistema fluorofórico simples (por exemplo, uma proteína com apenas um triptofano em sua estrutura primária) os gráficos de Stern-Volmer^{56, 57} apresentam um comportamento linear (Figura 9A). Se dois ou mais fluoróforos estão presentes, desvios da linearidade são comumente observados (Figura 9B)⁵⁸, uma vez que diferentes fluoróforos podem se comportar de forma distinta, apresentando assim diferentes acessibilidades aos supressores de

fluorescência, também chamados de “quenchers” (neste caso, os compostos sintetizados).

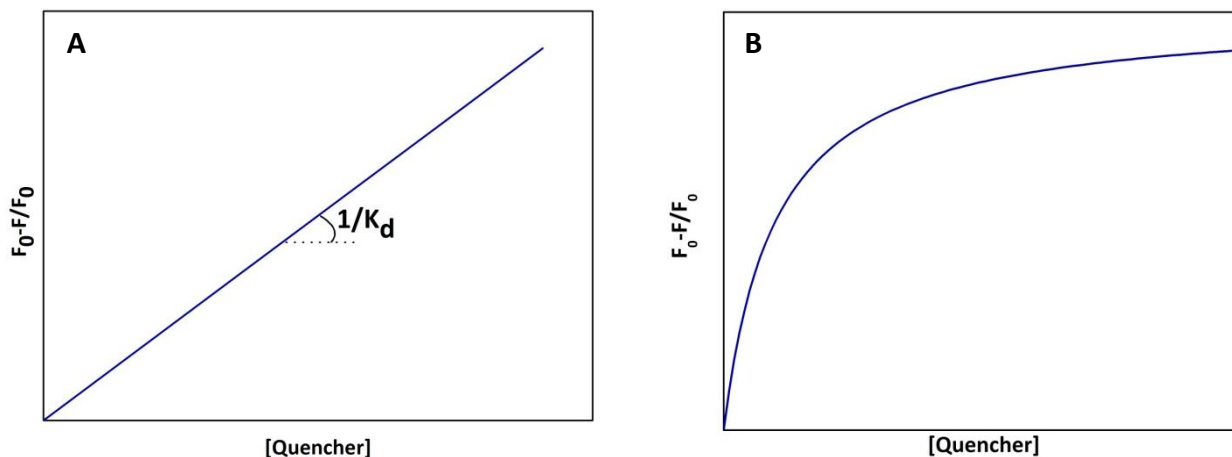


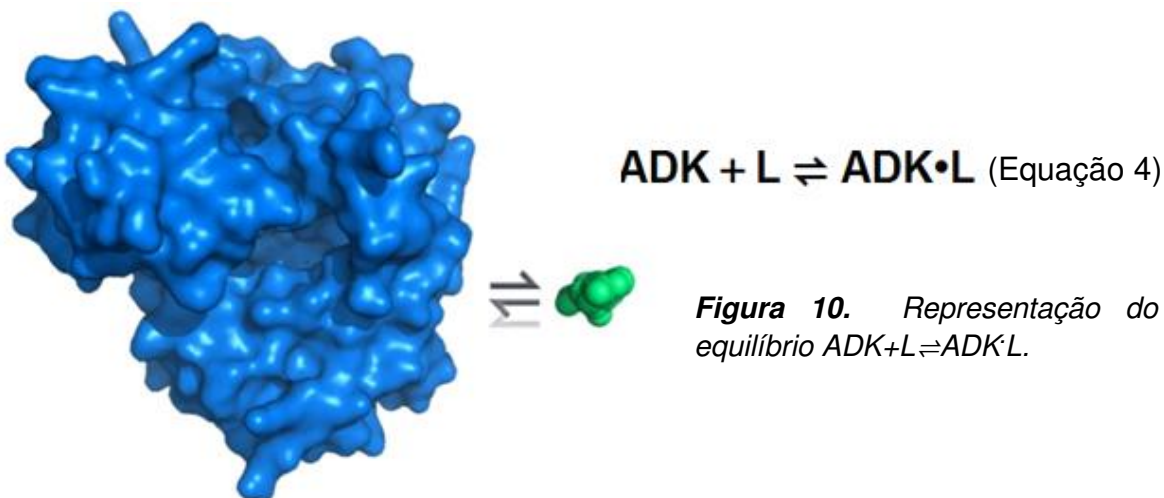
Figura 9. (A) Gráfico de Stern-Volmer típico de sistema com um único fluoróforo, e (B) desvio negativo de gráfico de Stern-Volmer para múltiplos fluoróforos.

No sistema da ADK, dois triptofanos estão presentes, e como supracitado, desvios de linearidade são observados. A fim de calcular o K_d , uma regressão não linear de mínimos quadrados se faz necessária, e é executada através do ajuste (regressão) de uma das seguintes equações⁵⁶:

$$Q = \frac{Q_{\max} k_a C}{1 + k_a C} \quad \text{ou} \quad Q = \frac{Q_{\max} C}{k_d + C}$$

Equação 2 Equação 3

Sendo “Q” a supressão de fluorescência observada (“quenching”), “Q_{max}” a máxima supressão de fluorescência observada, “K_a” a constante de associação, “K_d” a constante de dissociação e “C” a concentração de composto inibidor (“quencher”). O cálculo de K_d é muito importante na avaliação do potencial de interação entre um dado composto e seu alvo biológico. Em sistemas proteína/ligante, em uma situação de único sítio, o seguinte equilíbrio é observado⁵⁶, como ilustrado pela Figura 10.



Logo, as Equações 5 e 6 podem ser aplicadas.

$$K_a = \frac{[ADK \cdot L]}{[ADK][L]} \quad (\text{Equação 5})$$

$$K_d = \frac{[ADK][L]}{[ADK \cdot L]} \quad (\text{Equação 6})$$

,em que K_a é a constante de associação, K_d a constante de dissociação, ADK a Adenosina Quinase livre, L o ligante livre (compostos) e ADK.L o complexo Adenosina Quinase/Ligante (compostos). Embora ambas as constantes, K_a e K_d , levem às mesmas conclusões, a utilização de K_d para expressar tais valores é mais usual. Desse modo, K_d mede a tendência de um ligante dissociar-se de seu hospedeiro, sendo que quanto menor o valor da constante de dissociação, menor é a tendência em desligar-se de seu sítio de ligação, indicando uma interação mais efetiva (maior afinidade). Isto posto, a determinação de K_d pode ser utilizada como parâmetro de comparação com substratos naturais, principalmente ATP. Uma proposta para a explicação do fenômeno de supressão de fluorescência envolve a ocorrência de um fenômeno denominado Transferência de Energia de Ressonância (*Ret*; *Resonance Energy Transfer*)⁵⁰. O fenômeno de *Ret* ocorre quando um fluoróforo, denominado doador, transfere energia para outra espécie, denominada aceptor; sendo que esta transferência implica em uma diminuição na intensidade de fluorescência emitida (supressão) do doador. Um fator muito importante a ser salientado é que durante a ocorrência de *Ret* não há emissão de fluorescência, uma vez que o processo não envolve a absorção de um fóton emitido

pelo doador por parte do acceptor. Por este motivo, a denominação *Ret* é preferida em relação à antiga denominação, *FRET* (Transferência de Energia de Ressonância de Fluorescência, do inglês *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Para que haja *Ret* em um dado sistema, é necessário que sejam satisfeitas algumas condições; sobreposição do espectro de emissão do doador e do espectro de absorção do acceptor⁵⁹ (Figura 11); o doador e o acceptor, tipicamente, devem estar a uma distância entre 10-100 Å⁶⁰; e deve haver alinhamento entre os momentos dipolares do doador e do acceptor⁶¹.

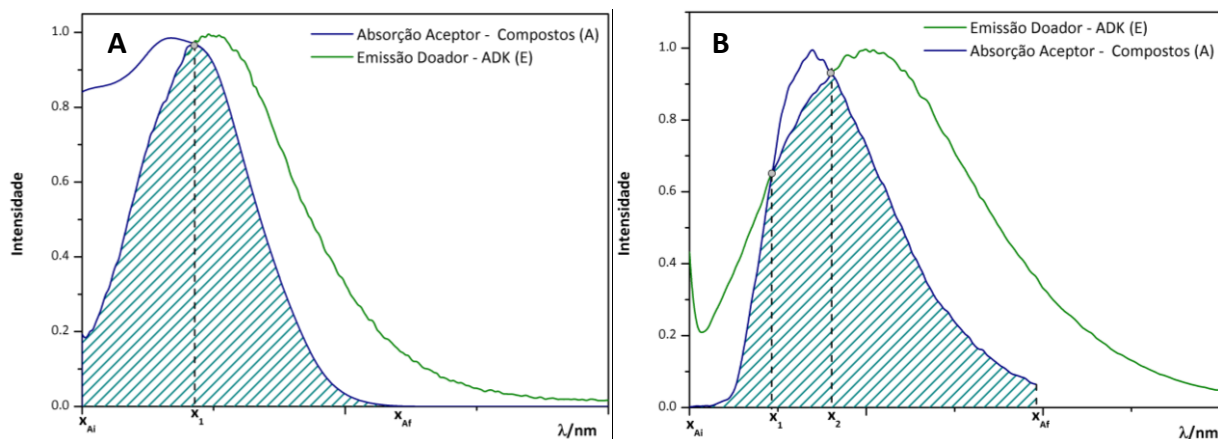


Figura 11. Sobreposições espectrais (áreas hachuradas) possíveis (A) uma intersecção, (B) duas intersecções, para a emissão do doador (Trp), linha verde, e absorção do acceptor, linha azul.

A sobreposição entre os espectros de emissão e absorção pode ser avaliada através de um Integral de Sobreposição Espectral, J , a qual é dada por $J = \int_{\lambda} I_{\lambda}^D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$, em que I_{λ}^D é intensidade espectral radiante normalizada, ϵ_A o coeficiente de absorção molar do acceptor e λ o comprimento de onda. Graficamente, é possível determinar a área de sobreposição entre os espectros integrando-se a área de intersecção entre os espectros, utilizando a Equação 7 para o caso da Figura 11A e Equação 8 para o caso da Figura 11B.

$$A = \int_{x_{Ai}}^{x_1} f(E) dx + \int_{x_1}^{x_{Af}} f(A) dx$$

(Equação 7)

$$A = \int_{x_{Ai}}^{x_1} f(A) dx + \int_{x_2}^{x_{Af}} f(A) dx + \int_{x_1}^{x_2} f(E) dx$$

(Equação 8)

em que $f(E)$ corresponde ao espectro de emissão e $f(A)$ o espectro de absorção.

O alinhamento dos momentos dipolares da espécie doadora e do acceptor é um aspecto muito importante a ser considerado, uma vez que determina a eficiência com que a transferência de energia será realizada. A fim de avaliar-se tal alinhamento, lança-se mão de um parâmetro denominado Fator de Orientação⁶², κ^2 . O κ^2 é calculado através dos ângulos entre os vetores que definem o momento dipolar do doador (D), o momento dipolar do acceptor (A) e o vetor de separação (R), conforme ilustrado pela Figura 12.

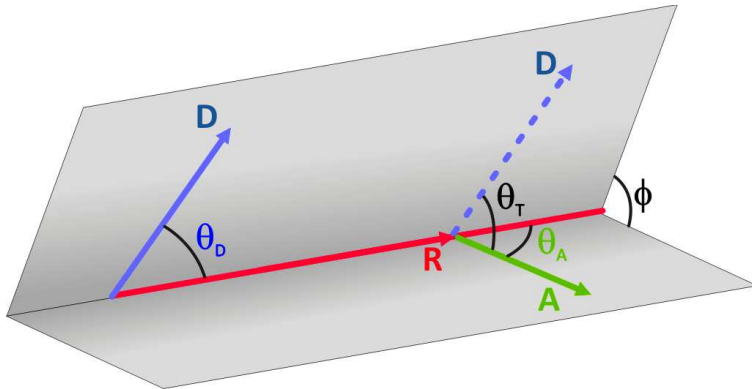


Figura 12. Representação dos ângulos e vetores utilizados na determinação de κ^2 , em Ret.

O fator de orientação pode ser calculado através das seguintes relações:

$$\cos \theta_T = \sin \theta_D \sin \theta_A \cos \phi + \cos \theta_D \cos \theta_A \quad (\text{Equação 9})$$

$$\kappa^2 = (\cos \theta_T - 3 \cos \theta_D \cos \theta_A)^2 \quad (\text{Equação 10})$$

em que θ_D , θ_A são os ângulos de separação entre os vetores $\vec{R}$, e os vetores $\vec{D}$ e $\vec{A}$, respectivamente; e ϕ o ângulo diedro (azimute) entre os planos $(\vec{D}, \vec{R})$ e $(\vec{A}, \vec{R})$.

A utilização de κ^2 permite rápida avaliação do alinhamento entre os momentos dipolares, uma vez que, em princípio, κ^2 pode assumir valores que variam de 0 (momentos perpendiculares) a 4 (momentos colineares). Em uma situação em que os momentos são paralelos entre si, e perpendiculares ao vetor de separação (R), temos que $\kappa^2=1$, conforme ilustrado pela Figura 13.

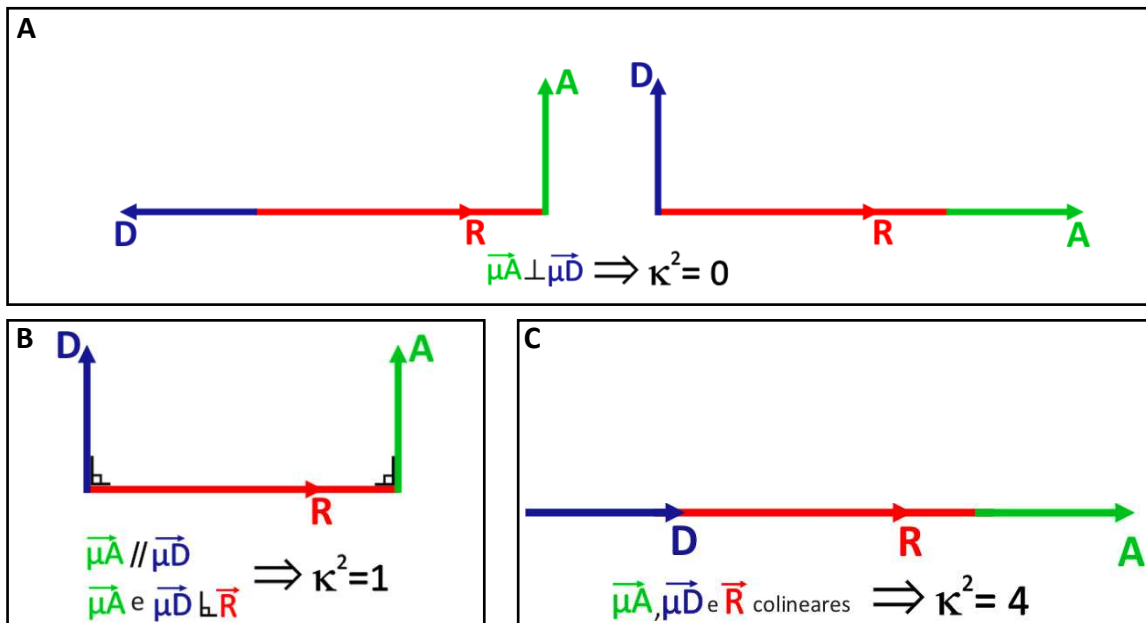


Figura 13. Ilustração da orientação dos vetores dos momentos dipolares e de separação, e seus respectivos valores de κ^2 . (A) $\kappa^2=0$; (B) $\kappa^2=1$ e (C) $\kappa^2=4$.

O *Ret* é uma ferramenta muito utilizada na investigação de interações inter e intramoleculares devido a suas características, uma vez que implica em supressão de fluorescência estática, indicando um processo em que ocorre interação específica entre uma espécie doadora e uma espécie aceptora.

2.5- Ensaios *in silico*

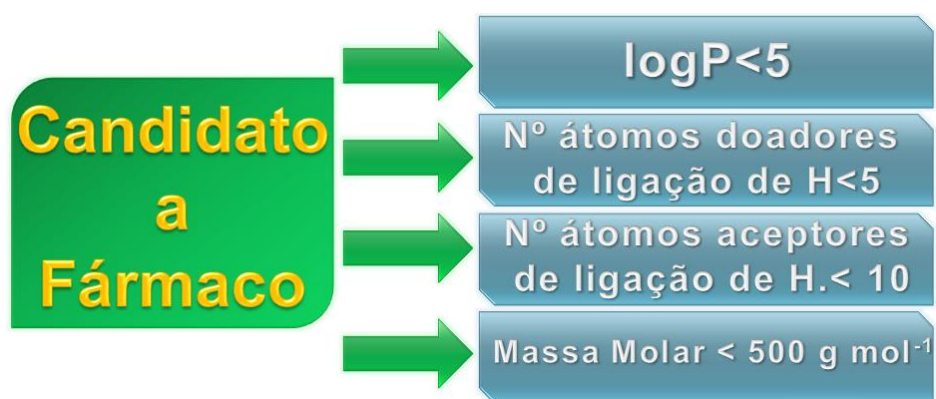
Buscando uma melhor compreensão do processo de interação de um sistema proteína/ligante, é necessária a utilização de outras ferramentas que permitam tais investigações, de modo que abordagens utilizando bioinformática, ou seja, ensaios *in silico*, são amplamente explorados. Ensaios *in silico* são ferramentas muito importantes no estudo e na avaliação de novos fármacos, uma vez que podem prever o comportamento de interações do tipo proteína/ligantes, através de, por exemplo, ensaios de *docking*^{63, 64}. Neste tipo de experimento, simula-se a interação entre um provável sítio de ligação e um dado composto. O software utilizado então busca a posição e conformação energeticamente mais estável para o sistema escolhido, de modo a apresentar uma grandeza denominada Energia de *Grid* (E_{grid})⁶⁵, que indica o valor de energia para a conformação mais estável (menor valor de E_{grid} $\therefore$ mais intensa interação). Dessa maneira, a integração dos resultados obtidos a partir de todas as

técnicas abordadas permite a proposição de hipótese acerca das interações entre os derivados que quinazolininas e ADK, de forma a avaliar o potencial inibitório desta classe de moléculas.

2.6- Potencial Farmacológico (*Druglikeness*)

De um modo geral, *druglikeness* é um parâmetro que avalia quão similar um dado composto é em relação aos fármacos já conhecidos. Desse modo, durante o desenvolvimento de um novo fármaco busca-se por compostos que possuam um perfil farmacológico específico, cujas características sejam desejáveis para abordar o alvo terapêutico escolhido ⁶⁶. Porém, comumente observa-se que muitos compostos previamente candidatos a fármacos falham; sendo que isto muitas vezes se dá por fatores ou variáveis imprevisíveis, tal como a toxicidade dos compostos ⁶⁷. O parâmetro *druglikeness* muitas vezes alerta quanto a características nocivas de um composto, e é amplamente utilizado como um “filtro” em bibliotecas de desenvolvimentos de fármacos. Sua utilização avalia quais compostos possuem problemas em potencial (como alta massa molecular ou baixa solubilidade), de forma a evitar o gasto de recursos na síntese de tais compostos.

Há diversas maneiras de avaliar-se o potencial farmacológico de um composto, sendo que uma eficaz forma de avaliação pode ser conduzida através de uma regra denominada Regra de Cinco de Lipinski (*R5L*) ⁶⁸. A *R5L* prevê que para que um dado composto tenha potencial farmacológico, é necessário que este apresente certas características, como coeficiente de partição octanol/água ($\log P$) ⁶⁹ inferior a 5, não mais do que 5 átomos doadores de ligação de hidrogênio (átomos de N ou O com hidrogênios ligados), não mais do que 10 átomos aceptores de ligação de hidrogênio (átomos de N e O) e massa molar inferior a 500 g mol⁻¹. O Esquema 1 ilustra tais condições.



Esquema 1. Requisitos da Regra de Cinco de Lipinski (R5L).

Além da *R5L*, existem outras formas de avaliação, utilizando outras regras estipuladas, como a *CMC* ⁷⁰ (*Comprehensive Medicinal Chemistry Database* ⁷¹), a qual pode ser complementada, conforme estudos ^{72, 73}, por dados de Área Superficial Polar, *psa* (*Polar Surface Área*) ⁷⁴. A *CMC* pode ser considerada como um refinamento a *R5L*, postulando que compostos, a fim de possuírem potencial farmacológico, devem ter massa molecular entre 160-480 g mol⁻¹; $\log P$ na faixa -0,4 e 5,6; refratividade molar de 40-130 m³ mol⁻¹; e número total de átomos entre 20 e 70. Quanto a *psa*, foi verificado que valores entre 140-150 Å² são os mais adequados para condições ótimas para absorção oral do fármaco.

As propriedades previstas pela *R5L* e pela *CMC* em combinação com *psa* são bons indicativos das propriedades farmacológicas de um dado composto. Contudo, a definição consensual indica que um potencial fármaco deve ter uma combinação de diversos dos seguintes grupos funcionais; anel benzênico, anel heterocíclico (aromático ou não), amina alifática (preferencialmente terciária), grupo carboxamida, grupo hidroxila alcoólico, carboxi éster e grupo ceto.

Um aspecto muito importante a ser avaliado envolve a exclusão de grupos funcionais cuja presença na estrutura de compostos orgânicos é conhecida por causar problemas. Tais problemas envolvem toxicidade, carcinogenicidade ou ainda propriedades que os tornam metabolicamente instáveis, sendo comumente hidrolisados em condições fisiológicas; ou pelo fato de serem espécies reativas, que irão formar ligações covalentes com proteínas, por exemplo. De modo geral, os seguintes grupos funcionais devem ser evitados por sua reatividade ⁷⁵; haletos de sulfonila, acila, e alquila;

anidridos; halopirimidinas; aldeídos; iminas; epóxidos, peróxidos, entre outros. Além disso, alguns dos grupos funcionais conhecidos por apresentarem propriedades carcinogênicas são os grupos arilamina, sulfonatos de alquila; grupos arilnitro; grupos azo; aldeídos alifáticos; aziridinas, entre outros. Contudo, é muito importante salientar que nem todas as espécies orgânicas que possuem tais grupos são necessariamente carcinogênicas ou excessivamente reativas. Por este motivo, tal lista deve ser tomada como uma tendência geral, e não como regra absoluta, de modo que casos particulares devem ser analisados mais detidamente.

Finalmente, a avaliação do potencial farmacológico ou *druglikeness* de uma biblioteca de compostos é uma etapa fundamental e amplamente explorada no desenvolvimento de novos fármacos e em sua otimização.

3- OBJETIVOS

3.1-Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho consiste em estudar a capacidade inibitória de uma série de 22 derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas frente à enzima Adenosina Quinase (ADK).

3.2- Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Realizar ensaios *in silico* para a avaliação das interações intermoleculares envolvidas no sistema compostos/ADK e potenciais farmacológicos;
- Clonar, expressar e purificar a enzima ADK;
- Preparar dos 22 derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas e sua caracterização;
- Testar de inibição através de ensaios de fluorescência de emissão;
- Calcular as constantes de dissociação (K_d) para a avaliação da afinidade e interação entre a ADK e os compostos alvo;

Verificar outras propriedades complementares pertinentes ao estudo.

4- PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Instrumentação geral, reagentes e solventes

- Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro Varian Inova – 500 MHz ou espectrômetro Bruker DPX 250 MHz.
- Espectros de massas de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Waters, modelo Xevo Q-tof, em modo de infusão direta, capilar 3 kV, cone 30 V.
- Espectros de infravermelho foram obtidos em espectrômetro FT-IR Bomem MN-Series, modelo B-100, resolução de 4 cm^{-1} , varreduras de 16 *scans* e velocidade de varredura de 2 *scans*/min. Amostras foram preparadas em pastilhas de KBr, faixa espectral de $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.
- Espectros de fluorescência obtidos em espectrofluorímetro Varian, modelo Cary Eclipse, janela de 300-500 nm, fendas de 5 mm, velocidade de varredura de 120 nm/min. Utilizou-se cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm.
- Pontos de fusão obtidos utilizando equipamento Marconi Modelo MA-381.
- Todos os reagentes utilizados na síntese dos compostos apresentaram-se da marca Aldrich ou Acros. Todos os solventes utilizados foram de qualidade técnica ou analítica. Solventes deuterados utilizados (DMSO-d₆) da marca Cambridge Isotope Labs.

4.2- Ensaios *in silico* conduzidos neste estudo

Todos os ensaios *in silico* foram conduzidos em um laptop Toshiba, Processador Intel Centrino 2 Core Duo, de 2,0 GHz e 4,0 GB de memória RAM. Sistema operacional Windows Vista 32 Bits.

- Figuras preparadas utilizando-se os *softwares* *The PyMOL Molecular Graphics System*, versão 1.2r1, DeLano Scientific, LLC ⁷⁶; e *UCSF Chimera*, versão 1.5.2 (build 32411), Regents of the University of California ⁷⁷.

4.2.1- Previsão sítios

A previsão dos sítios de ligação potenciais da ADK foi realizada utilizando-se o servidor *on-line FindSite*, do *CSSB System Biology*, Prof Skolnick *group*, Universidade de Yale (<http://cssb.biology.gatech.edu/findsite>).

4.2.2- Docking

- Construção das estruturas e preparação das moléculas para os ensaios de *docking* realizada utilizando-se os *softwares ChemBio Draw Ultra*, versão 11.0.1, CambridgeSoft⁷⁸; e *ChemBio 3D*, versão 11.0.1, CambridgeSoft⁷⁹.
- Ensaios de *docking* foram realizados utilizando o *software ArgusLab*, versão 4.0.1, Mark Thompson e Planaria Software⁸⁰, tomando-se como base estrutura protéica da ADK depositada no *Protein Data Bank*, PDB: 1BX4¹.
- Avaliação das interações de hidrogênio e hidrofóbicas para construção de mapas de interação bidimensionais realizada utilizando o *software RCSB Ligand Explorer*, versão 3.9, RCSB Protein Data Bank (PDB)⁸¹.

4.2.3- Predição do potencial farmacológico (*Druglikeness*)

A predição do potencial farmacológico dos compostos alvos foi realizada utilizando-se o *software MedChem Designer*, versão 1.0.1.15, Simulations Plus, Inc⁸².

4.3- Clonagem, expressão e purificação da ADK

A ADK, proveniente de *Mus musculus*, foi cedida pelo grupo do Prof. Kleber G. Franchini, da FCM-UNICAMP e do LNBio, tendo sido clonada e introduzida em *E. coli*, utilizando vetor pET28a-SUMO. Essa proteína foi expressa em meio LB e purificada por cromatografia de afinidade, utilizando-se coluna de níquel (HisTag HP 5mL, GE). Uma segunda etapa de purificação foi realizada, utilizando-se coluna Superdex 200 (GE)⁸³. Finalmente, a ADF foi armazenada em tampão Tris (50 mmol L⁻¹, pH 8,0). A Figura 14 apresenta um gel de purificação da ADK após aplicação em coluna Superdex:

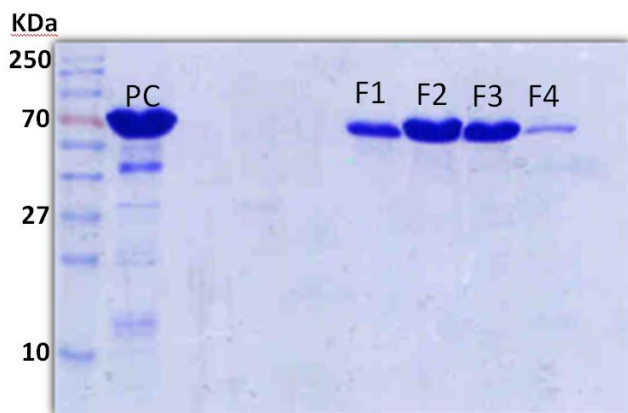


Figura 14. Gel SDS-PAGE (12%) da ADK por cromatografia de exclusão utilizando-se coluna Superdex 200. A fração antes de purificação por Superdex é identificada por PC; enquanto as frações puras recolhidas após a purificação são apresentadas por F1, F2, F3 e F4. Foi utilizado marcador de massa molar GE.

A utilização da ADK de *Mus musculus* nos ensaios realizados foi possível dada sua similaridade estrutura com a ADK humana. O Esquema 2 apresenta a estrutura primária da ADK utilizada:

```
MAAADEPKPKKLKVEAPQALSENVLFMGNPLLDISAVVDKDFLDKYSLKPNDQILAED
KHKELFDELVKKFKVEYHAGGSTQNSMKVAQWLIQEPHKAATFFGCIGIDKFGEILKRK
AADAHVDAHYYEQNEQPTGTCAACITGGNRSLVANLAAANCYKKEKHLDLERNWVLV
EKARVYYIAGFFLTVSPESVLKVARYAAENNRVFTLNLSAPFISQFFKEALMDVMPYVDI
LFGNETEAATFAREQGFETKDIKEIAKKAQALPKVNSKRQRTVIFTQGRDDTIVA AENDV
TAFPVLDQNQEEIIDTNGAGDAFVGGFLSQLVSDKPLTECIRAGHYAASVIIRRTGCTFP
EKPDPF
```

Esquema 2. Estrutura primária da ADK proveniente de *Mus musculus*; triptofanos indicados em vermelho.

A realização de um alinhamento entre a estrutura da ADK humana, cuja estrutura cristalográfica é conhecida ¹, (PDB 1BX4) com a estrutura prevista baseada na estrutura primária da ADK de *Mus musculus*, utilizando-se o servidor I-TASSER ^{84, 85}, permite a visualização da similaridade entre as estruturas (Figura 15).

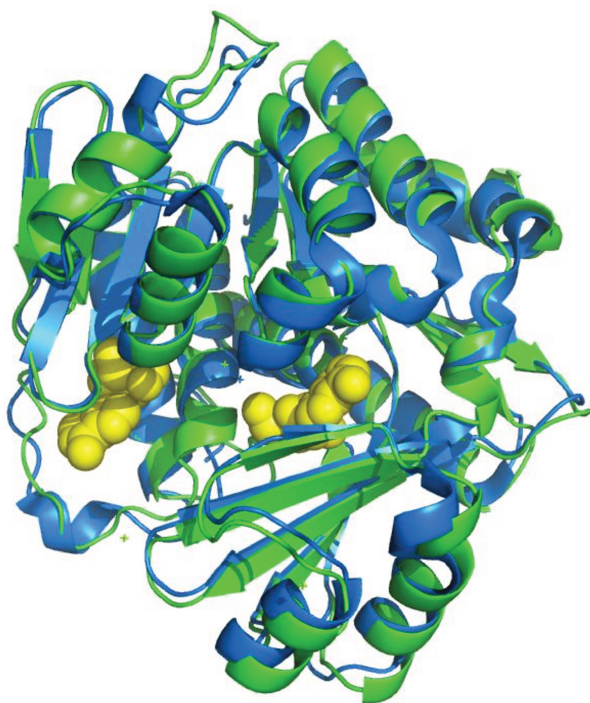
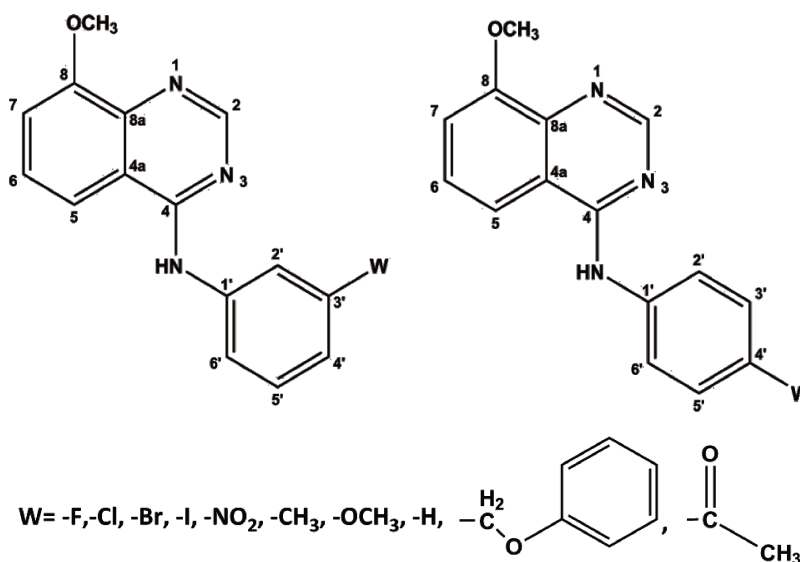


Figura 15. Alinhamento entre as estruturas da ADK humana (PDB 1BX4, em verde) e a estrutura prevista pelo servidor I-TASSER, baseado na estrutura primária da ADK de *Mus musculus* (em azul). Substratos naturais representados por esferas amarelas.

Há necessidade de simular a estrutura da ADK de *Mus musculus*, uma vez que sua estrutura não foi determinada. Vale ressaltar a notável similaridade entre as estruturas, importante fator na utilização desta enzima em todos os ensaios *in vitro* realizados.

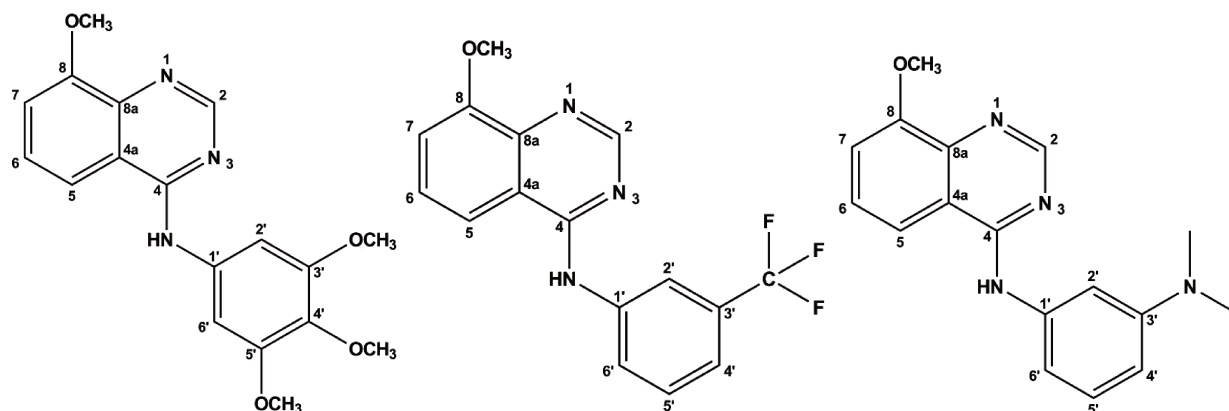
4.4- Síntese e caracterização dos compostos

Foi preparada uma série de 22 derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolininas substituídos, utilizando metodologia pertinente⁸⁶, conforme indicado no Esquema 3:



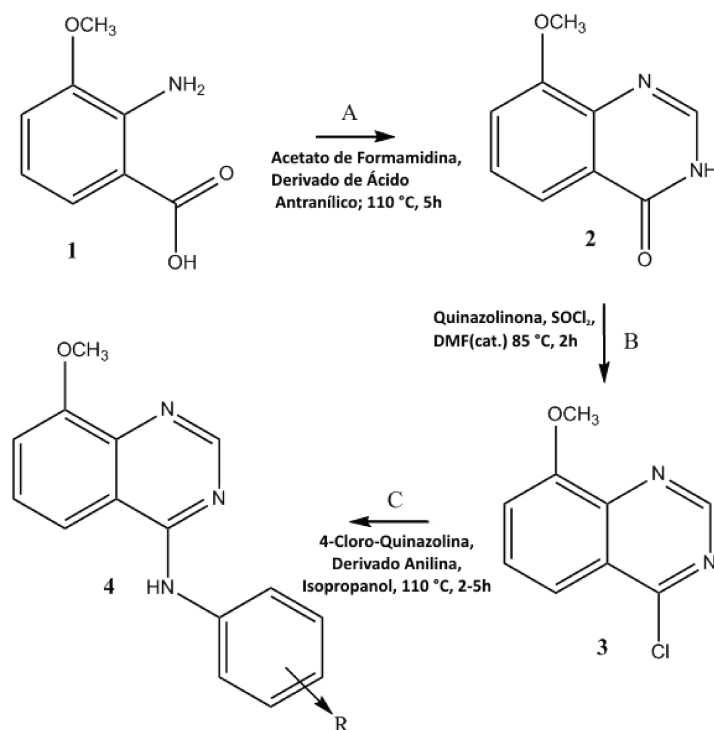
Esquema 3. Série 8-metóxi-4-anilinoquinazolininas.

Complementarmente a série indicado, três compostos adicionais também foram sintetizados, os quais são apresentados no esquema 4:



Esquema 4. Compostos adicionais sintetizados da série 8-metóxi-4-anilinoquinazolininas.

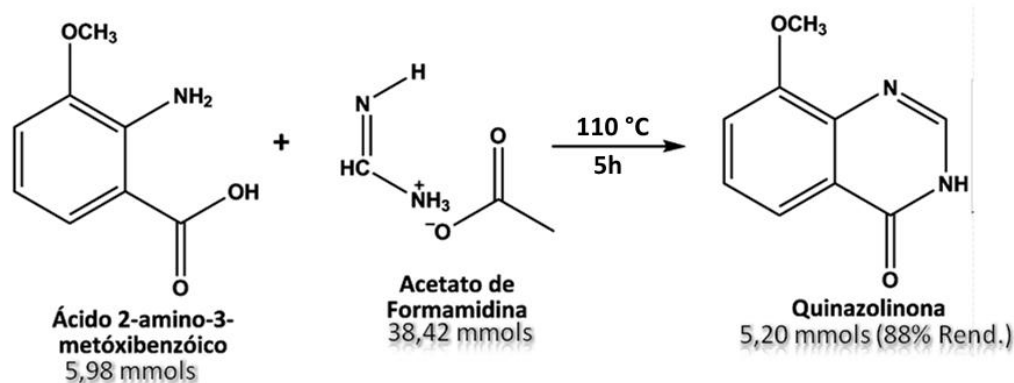
A síntese de todos os compostos foi conduzida utilizando-se a mesma estratégia sintética, conforme ilustrado pelo Esquema 5:



Esquema 5. Rota sintética para preparo dos derivados de 4-anilinoquinazolininas. (A) Etapa de Ciclização; (B) Etapa de Cloração e (C) Etapa de Adição de Derivado Anilínico. (1) Ácido 2-Amino-3-Metóxi Benzóico; (2) Quinazolinona; (3) 4-Cloroquinazolinona e (4) derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolininas.

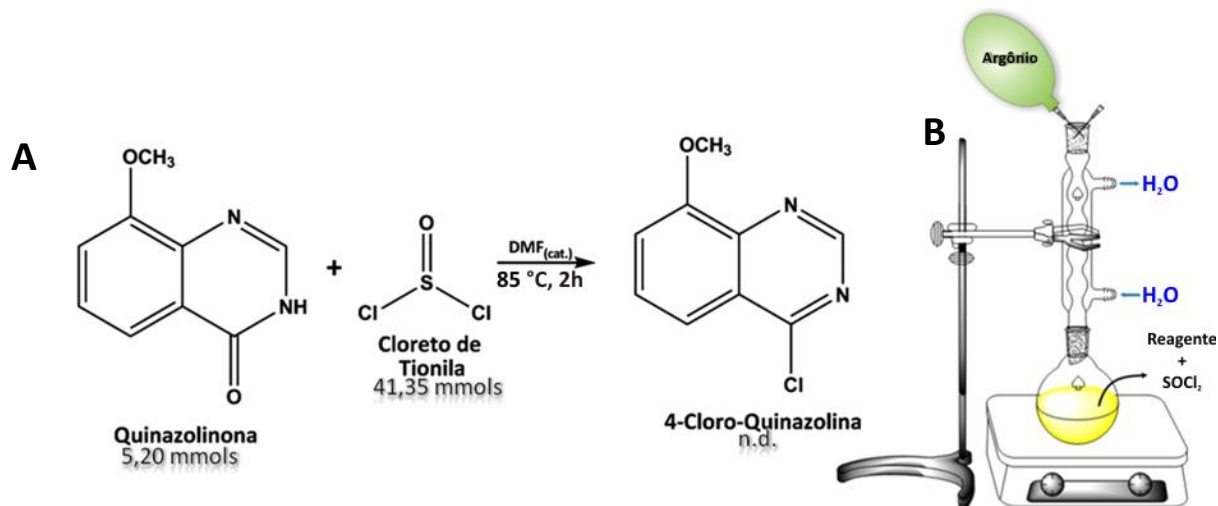
Na rota sintética, 1,0 g (5,98 mmols) de ácido 2-amino-3-metóxi benzóico foi reagido com 4,0 g (38,42 mmols) de acetato de formamidina. A mistura foi aquecida a 110°C

por 5 horas, e o produto filtrado a vácuo, lavado com água e então seco, com rendimento de superior a 88% (930 mg – 5,20 mmol).



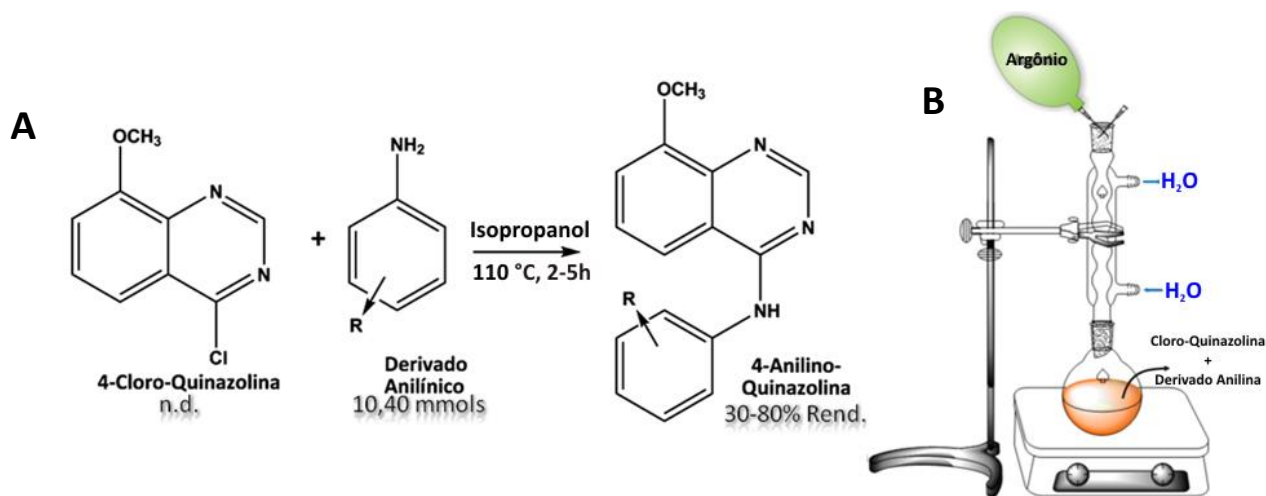
Esquema 6. Rota sintética para a preparação da quinazolinona.

A quinazolinona obtida foi então clorada utilizando-se 3,0 mL de cloreto de tionila (SOCl_2) e 30 μL de dimetilformamida (DMF) como catalisador, sendo a mistura aquecida a 85 $^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. A fim de evitar-se umidade, a qual era prejudicial à reação, esta foi conduzida em atmosfera inerte (argônio).



Esquema 7. (A) Rota sintética para a preparação da 4-cloroquinazolinona. (B) Ilustração do sistema reacional utilizado.

O SOCl_2 foi então removido, e adicionou-se 3,5 mL de isopropanol e derivado anilínico em excesso molar (proporção de 2:1) em relação à 4-cloroquinazolinona. A mistura foi aquecida a 110 $^{\circ}\text{C}$ por 2-5 horas, dependendo do composto em questão, e os derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolinona (produtos finais) foram então filtrados a vácuo e secos, com rendimentos de 20-99%.



Esquema 8. (A) Rota sintética para a preparação das 4-anilinoquinazolin-8-metóxios. (B) Ilustração do sistema reacional utilizado.

Após seu preparo, os compostos foram caracterizados principalmente por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução, de modo a confirmar o sucesso de seu preparo.

***N*-(3'-fluorofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-3F):** rendimento de 45,5%. P.F.: 162-164 °C. RMN de ^1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 11,96 (1H, s, NH); 8,83 (1H, s, H2); 8,63 (1H, d, $^3J=5,0\text{ Hz}$, H5); 7,78 (1H, q, $^3J=10,0\text{ Hz}$, H4'); 7,75 (1H, dd, $^3J=5,0\text{ Hz}$, $^3J=15,0\text{ Hz}$, H6); 7,69 (1H, d, $^3J=10,0\text{ Hz}$, H7); 7,65 (1H, ddd, $^3J=8,5\text{ Hz}$, $^4J=2,0\text{ Hz}$, $^5J=1,0\text{ Hz}$, H2'); 7,52 (1H, m, $^3J=10,0\text{ Hz}$, $^4J=5,0\text{ Hz}$, H6'); 7,18 (1H, tdd, $^3J=8,5\text{ Hz}$, $^4J=3,0\text{ Hz}$, $^5J=1,0\text{ Hz}$, H5'); 4,08 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 162,70 (C3'); 159,79 (C4); 150,69 (C2); 149,05 (C8); 138,35 (C1'); 130,33 (C8a); 130,25 (C5'); 129,92 (C2'); 128,93 (C6); 115,63 (C7); 115,19 (C5); 114,19 (C4a); 112,05 (C6'); 111,85 (C4'); 56,83 (-OCH₃). MS (EI), m/z (%) 270,10 [MH]⁺ (100); 271,12 [MH+1]⁺ (6). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3356 (N-H); 3079-2933 (C-H Aromático) 2016-1870 (overtone Aromático); 1610 (C-N Aromático); 1570 (C-C Aromático); 1275 (C-O-C); 1138 (C-F); 874 (C-H Aromático), 772 (C-H). Fórmula Química: C₁₅H₁₂FN₃O. Análise Elementar (teórica)/%: C (66,91); H (4,49); F (7,06); N (15,60); O (5,94).

***N*-(4'-fluorofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-4F):** rendimento 76,4%. P.F.: 193-196 °C. RMN de ^1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 12,04 (1H, s, -NH); 8,72 (1H, s, H2); 7,72 (1H, dd, $^3J=7,8\text{ Hz}$, $^4J=1,2\text{ Hz}$, H5); 7,61 (1H, t, $^3J=8,0\text{ Hz}$, H6); 7,56 (1H, dd,

$^3J=8,0$ Hz, $^4J=1,2$ Hz, H7); 7,36 (2H, m, H2'); 7,34 (2H, m, H3'); 3,99 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 162,11 (C4'); 160,17 (C4); 151,16 (C2); 147,10 (C8); 131,92 (C8a); 128,61 (C6); 127,96 (C1'); 122,24 (C2'); 117,21 (C3'); 116,51 (C5); 116,49 (C7); 116,12 (C4a); 56,46 (OCH₃). MS (EI), m/z (%) 270,10 [MH]⁺ (100); 271,10 [MH+1]⁺ (19). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3449 (N-H); 3065-2845 (C-H Aromático); 2126 (*overtone* Aromático); 1627 (C-N Aromático); 1561 (C-C Aromático); 1253 (C-O-C); 1032 (C-F); 820 (C-H Aromático); 750 (C-H). Fórmula Química: C₁₅H₁₂FN₃O. Análise Elementar (teórica)/%: C (66,91); H (4,49); F (7,06); N (15,60); O (5,94).

N-(3'-clorofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-3Cl): rendimento de 49,3%. P.F.: 196-198 °C. RMN de ^1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 11,33 (1H, s, NH); 8,73 (1H, s, H2); 8,44 (1H, d, $^3J=7,5$ Hz, H5); 7,85 (1H, t, $^3J=3,0$ Hz, H2'); 7,83 (1H, t, $^3J=2,0$ Hz, H6'); 7,73 (1H, t, $^3J=8,5$ Hz, H6); 7,60 (1H, d, $^3J=7,5$ Hz, H7); 7,53 (1H, t, $^3J=2,5$ Hz, H4'); 7,519 (1H, t, $^3J=3,5$ Hz, H5'); 4,04 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 158,96 (C4); 151,23 (C2); 150,45 (C8); 142,09 (C1'); 136,29 (C4'); 132,89 (C8a); 129,60 (C5'); 128,44 (C6); 128,10 (C3'); 127,44 (C2'); 125,72 (C6'); 125,02 (C7); 115,15 (C5); 114,52 (C4a); 56,43 (-OCH₃). MS (EI), m/z (%) 286,07 [MH]⁺ (100); 288,07 [MH+2]⁺ (22). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3440 (N-H); 3176-2836 (C-H Aromático); 2038-1861 (*overtone* Aromático); 1627 (C-N Aromático); 1562 (C-C Aromático); 1282 (C-O-C); 816 (C-H Aromático); 750 (C-H). Fórmula Química: C₁₅H₁₂ClN₃O. Análise Elementar (teórica)/%: C (63,05); H (4,23); Cl (12,41); N (14,71); O (5,60).

N-(4'-clorofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-4Cl): rendimento de 20,2%. P.F.: 172-176 °C. RMN de ^1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 8,58 (1H, s, H2); 7,71 (1H, dd, $^4J=1,5$ Hz, $^3J=7,5$ Hz, H5); 7,61-7,54 (2H, m, H6 e H7); 7,53-7,49 (2H, m, H2' e H6'); 7,44-7,38 (2H, m, H3' e H5'); 3,97 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 159,62 (C4); 150,45 (C2); 148,41 (C8); 138,17 (C1'); 130,35 (C8a); 130,29 (C3'); 128,79 (C6); 128,41 (C4'); 123,13 (C2'); 115,60 (C7); 115,35 (C5); 114,16 (C4a); 56,67 (-OCH₃). MS (EI), m/z (%) 286,07 [MH]⁺ (100); 287,07 [MH+1]⁺ (18); 288,07 [MH+2]⁺ (32). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3414 (N-H); 3118-2836 (C-H Aromático); 1998-1773 (*overtone* Aromático); 1627 (C-N Aromático); 1557 (C-C Aromático); 1292 (C-O-C); 816 (C-H

Aromático); 729 (C-H). Fórmula Química: $C_{15}H_{12}ClN_3O$. Análise Elementar (teórica)/%: C (63,05); H (4,23); Cl (12,41); N (14,71); O (5,60).

N-(3'-bromofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-3Br): rendimento de 61,1%. P.F.: 175-178 °C. RMN de 1H [500 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 11,66 (1H, s, NH); 8,87 (1H, s, H2); 8,36 (1H, d, $^3J=8,0$ Hz, H5); 8,04 (1H, t, $^3J=2,5$ Hz, H2'); 7,84 (1H, t, $^3J=8,5$ Hz, H6); 7,75 (1H, ddd, $^4J=1,0$ Hz, $^4J=2,0$ Hz, $^3J=8,0$ Hz, H6'); 7,72 (1H, d, $^3J=7,5$ Hz); 7,56 (1H, ddd, $^4J=1,0$ Hz, $^4J=2,0$ Hz, $^3J=8,0$ Hz, H4'); 7,48 (1H, t, $^3J=8,0$ Hz, H5'); 4,10 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [125 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 159,79 (C4); 150,65 (C2); 148,89 (C8); 138,04 (C1'); 130,80 (C8a); 130,66 (C5'); 129,40 (C4'); 129,06 (C6); 127,34 (C2'); 123,70 (C6'); 121,14 (C3'); 115,65 (C7); 115,19 (C5); 113,99 (C4a); 56,87 (-OCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 330,02 [MH]⁺ (100); 331,02 [MH+1]⁺ (18). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3378 (N-H); 3197-2919 (C-H Aromático); 1989-1822 (*overtone* Aromático); 1601 (C-N Aromático); 1533 (C-C Aromático); 1275 (C-O-C); 856 (C-H Aromático); 767 (C-H). Fórmula Química: $C_{15}H_{12}BrN_3O$. Análise Elementar (teórica)/%: C (54,56); H (3,66); Br (24,20); N (12,73); O (4,85).

N-(4'-bromofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-4Br): rendimento de 57,0%. P.F.: 206-209 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 8,70 (1H, s, H2); 7,72 (1H, m, $^4J=1,9$ Hz, H5); 7,68 (2H, m, $^3J=8,5$ Hz, H3'); 7,60 (1H, t, $^3J=7,9$ Hz, H6); 7,55 (1H, dd, $^3J=7,9$ Hz, $^4J=1,9$ Hz, H7); 7,38 (2H, d, $^3J=8,8$ Hz, H2'); 3,99 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 159,30 (C4); 151,10 (C2); 147,12 (C8); 132,40 (C1'); 131,86 (C8a); 128,62 (C6); 126,62 (C3'); 125,23 (C2'); 122,21 (C4'); 120,25 (C7); 117,21 (C5); 116,13 (C4a); 56,46 (-OCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 330,02 [MH]⁺ (100); 331,02 [MH+1]⁺ (19). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3425 (N-H); 3043-2668 (C-H Aromático); 2042-1897 (*overtone* Aromático); 1715 (C-N Aromático); 1570 (C-C Aromático); 1279 (C-O-C); 821 (C-H Aromático); 755 (C-H). Fórmula Química: $C_{15}H_{12}BrN_3O$. Análise Elementar (teórica)/%: C (54,56); H (3,66); Br (24,20); N (12,73); O (4,85).

N-(3'-iodofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-3I): rendimento de 45,0%. P.F.: 186-190 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 11,65 (1H, s, -NH); 8,85 (1H, s, H2); 8,38 (1H, d, $^3J=8,2$ Hz, H5); 8,15 (1H, m, H2'); 7,83 (1H, t, $^3J=8,2$ Hz, H6); 7,77-7,65 (2H, m, H4' e H6'); 7,76 (1H, m, H7); 4,09 (3H, s, OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz,

TMS, *ppm*]. δ : 159,77 (C4); 150,56 (C2); 148,73 (C8); 137,76 (C1'); 135,30 (C5'); 133,04 (C4'); 130,63 (C8a); 129,05 (C6); 124,22 (C2'); 115,66 (C7); 115,23 (C5); 113,92 (C4a); 104,17 (C6'); 95,06 (C3'); 56,78 (-OCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 378,01 [MH]⁺ (100); 379,03 [MH+1]⁺ (7). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3444 (N-H); 3250-2783 (C-H Aromático); 1596 (C-N Aromático); 1561 (C-C Aromático); 1226 (C-O-C); 878 (C-H Aromático); 758 (C-H). Fórmula Química: C₁₅H₁₂IN₃O. Análise Elementar (teórica)/%: C (47,77); H (3,21); I (33,65); N (11,14); O (4,24).

N-(4'-iodofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-4I): rendimento de 64,7%. P.F.: 211-214 °C. RMN de ¹H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 11,83 (1H, s, NH); 8,79 (1H, s, H2); 8,52 (1H, dd, ³J=8,3 Hz, ⁴J=0,49 Hz, H5); 7,81 (1H, t, ³J=8,3 Hz, H6); 7,69 (1H, dd, ³J=7,8 Hz, ⁴J=0,5 Hz, H7); 4,08 (3H, s, H9); 7,86 (2H, d, ³J=8,7 Hz, H2'); 7,58 (2H, d, ³J=8,7 Hz, H3'); 4,08 (3H, s, -OCH₃). RMN de ¹³C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 159,52 (C4); 150,46 (C2); 148,86 (C8); 137,36 (C1'); 136,38 (C8a); 129,58 (C2'); 128,83 (C6); 126,86 (C4'); 115,50 (C7); 114,08 (C4a); 104,18 (C5); 91,74 (C3'); 56,80 (-OCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 378,01 [MH]⁺ (100); 379,01 [MH+1]⁺ (20); 380,01 [MH+2]⁺ (3). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3378 (N-H); 3127-2845 (C-H Aromático); 1610 (C-N Aromático); 1557 (C-C Aromático); 1217 (C-O-C); 834 (C-H Aromático); 764 (C-H). Fórmula Química: C₁₅H₁₂IN₃O. Análise Elementar (teórica)/%: C (47,77); H (3,21); I (33,65); N (11,14); O (4,24).

N-(3'-(benzolóxi)fenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-3BZL): rendimento de 48,3%. P.F.: 175-177 °C. RMN de ¹H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 8,70 (1H, s, H2); 7,72 (1H, dd, ³J=7,6 Hz, ⁴J=1,9 Hz, H5); 7,60 (1H, t, ³J=8,2 Hz, H6); 7,54 (1H, dd, ³J=8,2 Hz, ⁴J=1,9 Hz, H7); 7,50-7,33 (5H, m, H2'', H3'' e H4''); 7,11-6,98 (4H, m, H2', H4', H5' e H6'); 5,12 (2H, s, -CH₂); 3,99 (3H, s, -OCH₃). RMN de ¹³C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 159,33 (C4); 158,80 (C3'); 151,17 (C2); 147,14 (C8); 136,41 (C1'); 132,87 (C1''); 131,88 (C8a); 130,56 (C5'); 128,64 (C6); 128,40 (C3''); 127,90 (C4''); 127,70 (C2''); 122,26 (C6'); 117,24 (C4'); 116,15 (C7); 115,57 (C5); 114,02 (C4a); 110,25 (C2'); 69,42 (-CH₂); 56,47 (-OCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 358,15 [MH]⁺ (100); 359,15 [MH+1]⁺ (25); 360,16 [MH+2]⁺ (6). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3422 (N-H); 2937-2550 (C-H Aromático); 2029-1778 (*overtone* Aromático); 1716 (C-N Aromático); 1584 (C-C Aromático); 1296,1275 (C-O-

C); 843 (C-H Aromático); 764 (C-H). Fórmula Química: $C_{22}H_{19}IN_3O_2$. Análise Elementar (teórica)/%: C (73,93); H (5,36); N (11,76); O (8,95).

N-(4'-(benzilóxi)fenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-4BZL): rendimento de 64,7%. P.F.: 177-179 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 8,63 (1H, s, H2); 7,31 (1H, dd, $^3J=7,6$ Hz, $^4J=1,6$ Hz, H5); 7,58 (1H, t, $^3J=8,2$ Hz, H6); 7,53 (1H, dd, $^3J=8,2$ Hz, $^4J=1,9$ Hz, H7); 7,48-7,32 (4H, m, H2', H2'', H3'' e H4''); 7,11 (2H, d, $^3J=8,8$ Hz, H3'); 5,12 (2H, s, -CH₂); 3,98 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 159,50 (C4); 157,69 (C4'); 151,58 (C2); 146,73 (C8); 136,62 (C1'); 132,84 (C8a); 129,89 (C6); 128,37 (C1''); 127,82 (C4''); 127,61 (C3''); 124,46 (C2''); 124,25 (C2'); 122,44 (C3'); 117,18 (C7); 115,98 (C5); 115,60 (C4a); 69,42 (-CH₂); 56,41 (-OCH₃). MS (EI), m/z (%) 358,15 [MH]⁺ (100); 359,15 [MH+1]⁺ (27); 360,16 [MH+2]⁺ (5). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3435 (N-H); 3021-2677 (C-H Aromático); 1720 (C-N Aromático); 1512 (C-C Aromático); 1284,1244 (C-O-C); 825 (C-H Aromático); 746 (C-H). Fórmula Química: $C_{22}H_{19}IN_3O_2$. Análise Elementar (teórica)/%: C (73,93); H (5,36); N (11,76); O (8,95).

N-(3'-nitrofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-3NO₂): rendimento de 59,1%. P.F.: 230-233 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 12,39 (1H, s, -NH); 8,90 (1H, s, H2); 8,74 (1H, m, H5); 8,31 (1H, ddd, $^3J=8,2$ Hz, $^4J=1,9$ Hz; $^4J=0,6$ Hz, H6'); 8,18 (1H, ddd, $^3J=8,2$ Hz, $^4J=1,9$ Hz, $^4J=0,6$ Hz, H4'); 7,84 (1H, t, $^3J=8,2$ Hz, H6); 7,81 (1H, d, $^3J=8,2$ Hz, H7); 7,61 (1H, t, $^4J=1,9$ Hz, H2'); 7,39 (1H, t, $^3J=7,9$ Hz, H5'); 4,10 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 160,06 (C4); 150,64 (C2); 148,67 (C8); 147,61 (C3'); 137,77 (C1'); 131,11 (C5'); 130,11 (C8a); 129,09 (C6); 122,33 (C6'); 121,06 (C7); 119,46 (C5); 114,13 (C4a); 112,76 (C4'); 109,65 (C2'); 56,81 (-OCH₃). MS (EI), m/z (%) 297,10 [MH]⁺ (100); 298,11 [MH+1]⁺ (15). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3418 (N-H); 3197-2818 (C-H Aromático); 1641 (C-N Aromático); 1566 (C-C Aromático); 1530 (N-O_{Ass}); 1350 (N-O_{Sim}); 1274 (C-O-C); 798 (C-H Aromático); 759 (C-H). Fórmula Química: $C_{15}H_{12}N_4O_3$. Análise Elementar (teórica)/%: C (60,81); H (4,08); N (18,91); O (16,20).

N-(4'-nitrofenil)-8-metóxiquinazolin-4-amina (8MEO-4NO₂): rendimento de 64,8%. P.F.: 245-248 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 12,09 (1H, s, NH); 8,91 (1H, s, H2); 8,76 (1H, d, $^3J=10,0$ Hz, H5); 8,34 (1H, d, $^3J=9,1$ Hz, H3'); 8,18 (1H, d, $^3J=9,1$ Hz, H2'); 7,83 (1H, t, $^3J=8,2$ Hz, H6); 7,71 (1H, d, $^3J=7,9$ Hz, H7); 4,09 (3H, s, -OCH₃). RMN

de ^{13}C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 159,64 (C4); 150,70 (C2); 149,41 (C8); 144,26 (C1'); 143,15 (C4'); 130,95 (C8a); 128,90 (C6); 124,43 (C3'); 124,14 (C2'); 115,48 (C5); 114,54 (C4a); 56,70 (-OCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 297,07 [MH]⁺ (100); 298,10 [MH+1]⁺ (22). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3342 (N-H); 3109-2840 (C-H Aromático); 2148-1914 (*overtone* Aromático); 1624 (C-N Aromático); 1562 (C-C Aromático); 1517 (N-O_{Ass}); 1341 (N-O_{Sim}); 1275 (C-O-C); 856 (C-H Aromático); 772 (C-H). Fórmula Química: C₁₅H₁₂N₄O₃. Análise Elementar (teórica)/%: C (60,81); H (4,08); N (18,91); O (16,20).

1-(3'-(8-metóxiquinazolin-4-ilamino)fenil)etanona (8MEO-3ACET): rendimento de 99,0%. P.F.: 170-173 °C. RMN de ^1H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 12,04 (1H, s, NH); 8,82 (1H, s, H2); 8,59 (1H, d, $^3J=5,0$ Hz, H5); 8,32 (1H, s, H2'); 8,05 (1H, d, $^3J=10,0$ Hz, H4'); 7,94 (1H, d, $^3J=10,0$ Hz, H6'); 7,82 (1H, t, $^3J=10,0$ Hz, H6); 7,71 (1H, d, $^3J=10,0$ Hz, H7); 7,66 (1H, t, $^3J=5,0$ Hz, H5'); 4,09 (3H, s, -OCH₃); 2,62 (3H, s, COCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 197,40 (C=O); 159,90 (C4); 150,69 (C2); 148,97 (C8); 137,29 (C1'); 137,13 (C3'); 129,74 (C8a); 129,51 (C5'); 129,18 (C6'); 128,96 (C2'); 126,54 (C6); 124,35 (C4'); 115,72 (C5); 115,62 (C7); 114,13 (C4a); 56,83 (-OCH₃); 26,85 (COCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 294,12 [MH]⁺ (100); 295,12 [MH+1]⁺ (21). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3378 (N-H); 3074-2884 (C-H Aromático); 2038-1892 (*overtone* Aromático); 1676 (C-N Aromático); 1560 (C=O); 1495 (C-C Aromático); 1275 (C-O-C); 856 (C-H Aromático); 729 (C-H). Fórmula Química: C₁₇H₁₅N₃O₂. Análise Elementar (teórica)/%: C (69,61); H (5,15); N (14,33); O (10,91).

1-(4'-(8-metóxiquinazolin-4-ilamino)fenil)etanona (8MEO-4ACET): rendimento de 20,1%. P.F.: 235-237 °C. RMN de ^1H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 12,16 (1H, s, -NH); 8,85 (1H, s, H2); 8,72 (1H, dd, $^3J=8,3$ Hz, $^4J=0,5$ Hz, H5); 8,05 (1H, d, $^3J=9,0$ Hz, H3'); 7,99 (1H, d, $^3J=8,8$ Hz, H2'); 7,81 (1H, t, $^3J=8,3$ Hz, H6); 7,71 (1H, d, $^3J=7,6$ Hz, H7); 4,09 (3H, s, -OCH₃); 2,61 (3H, s, COCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 196,85 (C=O); 159,73 (C4); 150,47 (C2); 148,78 (C8); 140,88 (C1'); 134,32 (C4'); 129,59 (C8a); 128,90 (C6); 128,65 (C3'); 124,34 (C2'); 115,90 (C7); 115,62 (C5); 114,20 (C4a); 56,74 (-OCH₃); 26,63 (COCH₃). MS (EI), *m/z* (%) 294,12 [MH]⁺ (100); 295,12 [MH+1]⁺ (20). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3440 (N-H); 2897 (C-H Aromático); 1658 (C-N Aromático); 1596 (C=O); 1504 (C-C Aromático); 1294 (C-O-C); 953 (C-H Aromático); 812 (C-H). Fórmula

Química: $C_{17}H_{15}N_3O_2$. Análise Elementar (teórica)/%: C (69,61); H (5,15); N (14,33); O (10,91).

8-metóxi-N-(3'-metilfenil)quinazolin-4-amina (8MEO-3CH₃): rendimento de 97,8%. P.F.: 194-196 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 8,66 (1H, s, H2); 7,71 (1H, d, $^3J=7,3$ Hz, H5); 7,59 (1H, t, $^3J=7,9$ Hz, H6); 7,54 (1H, m, H7); 7,40-7,34 (2H, m, H2' e H6'); 7,27-7,19 (2H, m, H4' e H5'); 3,98 (3H, s, -OCH₃), 2,34 (3H, s, -CH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 159,40 (C4); 151,37 (C2); 146,86 (C8); 139,23 (C1); 132,41 (C8a); 131,51 (C3'); 129,38 (C5'); 128,62 (C6); 128,49 (C2'); 123,54 (C4'); 122,32 (C6'); 120,29 (C7); 117,16 (C5); 116,03 (C4a); 56,43 (-OCH₃); 20,72 (-CH₃). MS (EI), *m/z* (%) 266,12 [MH]⁺ (100); 267,13 [MH+1]⁺ (19). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3436 (N-H); 3026-2353 (C-H Aromático); 2038-1840 (*overtone* Aromático); 1716 (C-N Aromático); 1566 (C-C Aromático); 1288 (C-O-C); 856 (C-H Aromático); 755 (C-H). Fórmula Química: $C_{16}H_{15}N_3O$. Análise Elementar (teórica)/%: C (72,43); H (5,70); N (15,84); O (6,03).

8-metóxi-N-(4'-metilfenil)quinazolin-4-amina (8MEO-4CH₃): rendimento de 57,9%. P.F.: 203-206 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 8,14 (1H, s, H2); 7,64 (1H, dd, $^3J=7,6$ Hz, $^4J=1,6$ Hz, H5); 7,47 (1H, t, $^3J=7,9$ Hz, H6); 7,38 (1H, dd, $^3J=7,9$ Hz, $^4J=1,3$ Hz, H7); 7,32 (2H, m, H2'); 7,25 (2H, m, H3'); 3,90 (3H, s, -OCH₃); 2,31 (3H, s, -CH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 158,78 (C4); 149,46 (C2); 145,31 (C8); 137,30 (C1'); 132,50 (C8a); 130,13 (C3'); 129,93 (C4'); 129,15 (C6); 122,91 (C2'); 116,77 (C7); 115,01 (C5); 112,85 (C4a); 55,96 (-OCH₃); 25,37 (-CH₃). MS (EI), *m/z* (%) 266,12 [MH]⁺ (100); 267,13 [MH+1]⁺ (18). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3435 (N-H); 3047-3646 (C-H Aromático); 2161-1870 (*overtone* Aromático); 1566 (C-N Aromático); 1513 (C-C Aromático); 1204 (C-O-C); 816 (C-H). Fórmula Química: $C_{16}H_{15}N_3O$. Análise Elementar (teórica)/%: C (72,43); H (5,70); N (15,84); O (6,03).

8-metóxi-N-(3'-metóxfenil)quinazolin-4-amina (8MEO-3METX): rendimento de 32,4%. P.F.: 174-176 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 8,62 (1H, s, H2); 7,71 (1H, dd, $^3J=7,6$ Hz, $^4J=1,9$ Hz, H5); 7,58 (1H, t, $^3J=8,2$ Hz, H6); 7,53 (1H, dd, $^3J=7,9$ Hz, $^4J=1,6$ Hz, H7); 7,43 (1H, t, $^4J=1,3$ Hz, H2'); 7,41-7,37 (2H, m, H5' e H6'); 7,00 (1H, m, H4'); 3,98 (3H, s, -OCH₃); 3,78 (3H, s, -OCH₃ (3')). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, *ppm*]. δ : 159,75 (C4); 159,47 (C3'); 151,53 (C2); 146,74 (C8); 132,86 (C1'); 130,53 (C6); 128,40

(C8a); 122,46 (C5'); 117,15 (C7); 115,97 (C5); 115,23 (C4a); 113,22 (C4'); 109,26 (C6); 104,18 (C2'); 56,38 (-OCH₃); 55,33 (-OCH₃ 3'). MS (EI), m/z (%) 282,12 [MH]⁺ (100); 283,12 [MH+1]⁺ (20); 284,12 [MH+2]⁺ (3). IV [KBr/cm⁻¹] v: 3422 (N-H); 2937-2566 (C-H Aromático); 2037-1812 (*overtone* Aromático); 1712 (C-N Aromático); 1563 (C-C Aromático); 1281,1264 (C-O-C); 855 (C-H Aromático); 754 (C-H). Fórmula Química: C₁₆H₁₅N₃O₂. Análise Elementar (teórica)/%: C (68,31); H (5,37); N (14,94); O (11,37).

8-metóxi-N-(4'-metóxifenil)quinazolin-4-amina (8MEO-4METX): rendimento de 26,7%. P.F.: 193-196 °C. RMN de ¹H [250 MHz, TMS, ppm]. δ: 8,06 (1H, s, H2); 7,62 (1H, dd, ³J=7,9 Hz, ⁴J=1,6 Hz, H5); 7,45 (1H, t, ³J=7,9 Hz, H6); 7,38 (1H, m, H7); 7,32 (2H, d, ³J=8,8 Hz, H2'); 7,03 (2H, d, ³J=8,8 Hz, H3'); 3,90 (3H, s, -OCH₃); 3,77 (3H, s, -OCH₃ (4')). RMN de ¹³C [75 MHz, TMS, ppm]. δ: 160,52 (C4); 158,55 (C4'); 150,64 (C2); 144,11 (C8); 138,63 (C1'); 130,87 (C8a); 126,99 (C6); 124,22 (C2'); 123,46 (C3'); 116,72 (C7); 114,88 (C5); 114,72 (C4a); 55,90 (-OCH₃); 55,34 (-OCH₃ 4'). MS (EI), m/z (%) 282,12 [MH]⁺ (100); 283,12 [MH+1]⁺ (21). IV [KBr/cm⁻¹] v: 3431 (N-H); 3061-2655 (C-H Aromático); 2156-1852 (*overtone* Aromático); 1698 (C-N Aromático); 1513 (C-C Aromático); 1279,1261 (C-O-C); 829 (C-H Aromático); 754 (C-H). Fórmula Química: C₁₆H₁₅N₃O₂. Análise Elementar (teórica)/%: C (68,31); H (5,37); N (14,94); O (11,37).

8-metóxi-N-fenilquinazolin-4-amina (8MEO-ANL): rendimento de 38,7%. P.F.: 154-156 °C. RMN de ¹H [250 MHz, TMS, ppm]. δ: 8,77 (1H, s, H2); 8,65 (1H, d, ³J=7,9 Hz, H5); 7,79 (1H, t, ³J=8,2 Hz, H6); 7,57 (1H, m, H7); 7,56-7,32 (5H, m, H2', H3' e H4'); 4,09 (3H, s, -OCH₃). RMN de ¹³C [75 MHz, TMS, ppm]. δ: 159,81 (C4); 150,46 (C2); 148,65 (C8); 136,49 (C1'); 232,93 (C8a); 129,65 (C3'); 128,71 (C6); 123,31 (C4'); 117,08 (C2'); 115,91 (C7); 115,68 (C5); 113,98 (C4a); 56,87 (-OCH₃). MS (EI), m/z (%) 252,11 [MH]⁺ (100); 253,11 [MH+1]⁺ (19). IV [KBr/cm⁻¹] v: 3303 (N-H); 3065-2611 (C-H Aromático); 2192-1940 (*overtone* Aromático); 1715 (C-N Aromático); 1557 (C-C Aromático); 1279 (C-O-C); 864 (C-H Aromático); 758 (C-H). Fórmula Química: C₁₅H₁₃N₃O. Análise Elementar (teórica)/%: C (71,70); H (5,21); N (16,72); O (6,37).

8-metóxi-N-(3'-(trifluorometil)fenil)quinazolin-4-amina (8MEO-CF₃): rendimento de 64,7%. P.F.: 185-188 °C. RMN de ¹H [250 MHz, TMS, ppm]. δ: 12,27 (1H, s, -NH); 8,85 (1H, s, H2); 8,72 (1H, d, ³J=7,8 Hz, H5); 8,23 (1H, s, H2'); 8,14 (1H, dt, ³J=7,8 Hz,

$^4J=1,8$ Hz, H6''); 7,81 (1H, t, $^3J=8,3$ Hz, H6); 7,75 (1H, d, $^3J=8,0$ Hz, H7); 7,72-7,66 (2H, m, H4' e H5'); 4,09 (3H, s, -OCH₃). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 159,94 (C4); 150,62 (C2); 148,83 (C8); 137,49 (C1'); 134,36 (C8a); 129,80 (C3'); 129,63 (C5'); 128,90 (C6); 126,00 (C6'); 122,88 (CF₃); 121,68 (C4'); 121,39 (C2'); 115,92 (C7); 115,63 (C5); 114,11 (C4a); 56,73 (-OCH₃). MS (EI), m/z (%) 320,10 [MH]⁺ (100); 321,10 [MH+1]⁺ (20). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3413 (N-H); 3210-2946 (C-H Aromático); 2007-1817 (*overtone* Aromático); 1575 (C-N Aromático); 1460 (C-C Aromático); 1328 (C-O-C); 1116 (C-F); 886 (C-H Aromático); 755 (C-H). Fórmula Química: C₁₆H₁₂F₃N₃O. Análise Elementar (teórica)/%: C (60,19); H (3,79); F (17,85); N (13,16); O (5,01).

8-metóxi-N-(3',4',5'-trimetóxiifenil)quinazolin-4-amina (8MEO-TRI): rendimento de 31,0%. P.F.: 193-194 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 8,58 (1H, s, H2); 7,71 (1H, dd, $^3J=7,5$ Hz, $^4J=1,5$ Hz, H5); 7,58 (1H, t, $^3J=7,8$ Hz, H6); 7,52 (1H, dd, $^3J=8,0$ Hz, $^4J=1,5$ Hz, H7); 3,97 (3H, s, -OCH₃); 3,78 (6H, s, -OCH₃^{3' e 5'}); 3,67 (3H, s, -OCH₃^{4'}). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 159,57 (C4); 153,19 (C3'); 151,73 (C2); 146,64 (C8); 136,76 (C1'); 133,20 (C8a); 128,31 (C4'); 127,36 (C6); 122,47 (C4a); 117,12 (C7); 115,89 (C5); 100,87 (C2'); 60,04 (-OCH₃ 4'); 56,35 (-OCH₃); 56,02 (-OCH₃ 3'). MS (EI), m/z (%) 342,14 [MH]⁺ (100); 343,14 [MH+1]⁺ (23); 344,15 [MH+2]⁺ (3). IV [KBr/cm⁻¹] ν : 3426 (N-H); 2994-2721 (C-H Aromático); 2104-1879 (*overtone* Aromático); 1724 (C-N Aromático); 1508 (C-C Aromático); 1288,1248,1129 (C-O-C); 820 (C-H Aromático); 763 (C-H). Fórmula Química: C₁₈H₁₉N₃O₄. Análise Elementar (teórica)/%: C (63,33); H (5,61); N (12,31); O (18,75).

N¹-(8-metóxiquinazolin-4-il)-N³,N³-dimetilbenzeno-1,3-diamina (8MEO-DMEA): rendimento de 98,1%. P.F.: 185-189 °C. RMN de 1H [250 MHz, TMS, ppm]. δ : 8,81 (1H, s, H2); 7,72 (1H, dd, $^3J=3,8$ Hz, $^4J=0,8$ Hz, H5); 7,63 (1H, t, $^3J=4,0$ Hz, H6); 7,59 (1H, dd, $^3J=4,0$ Hz, $^4J=0,8$ Hz, H7); 7,38 (1H, t, $^3J=4,0$ Hz, H5'); 7,08 (2H, m, H2' e H6'); 6,91 (1H, dd, $^3J=3,8$ Hz, $^4J=0,3$ Hz, H4'); 4,00 (3H, s, -OCH₃); 2,98 (6H, s, -N(CH₃)₂). RMN de ^{13}C [75 MHz, TMS, ppm]. δ : 159,11 (C4); 150,65 (C2); 148,39 (C3'); 147,57 (C8); 133,94 (C1'); 130,79 (C8a); 130,35 (C5'); 128,87 (C6); 122,04 (C5); 117,29 (C7); 116,33 (C4a); 113,78 (C6'); 109,17 (C4'); 104,06 (C2'); 56,55 (-OCH₃); 41,81 (-N(CH₃)₂). MS (EI), m/z (%) 295,16 [MH]⁺ (100); 296,16 [MH+1]⁺ (19); 297,16 [MH+2]⁺ (10). IV [KBr/cm⁻¹]

¹] ν : 3422 (N-H); 3043-2443 (C-H Aromático); 2051-1857 (*overtone* Aromático); 1720 (C-N Aromático); 1578 (C-C Aromático); 1279 (C-O-C); 846 (C-H Aromático); 750 (C-H). Fórmula Química: C₁₇H₁₈N₄O. Análise Elementar (teórica)/%: C (69,37); H (6,16); N (19,03); O (5,44).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (¹H e ¹³C), Espectrometria de Massas, e Infravermelho encontram-se respectivamente nos Anexos 1, 2, 3 e 4.

4.5- Ensaios de Fluorescência de Emissão

Os ensaios de fluorescência foram conduzidos utilizando-se soluções dos compostos em DMSO, na concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Uma solução de ADK na concentração 2,0 μ mol L⁻¹ foi então titulada, até saturação (até variação nula na intensidade de fluorescência emitida).

4.6- Cálculos Constantes de Dissociação (K_d)

O cálculo das constantes de dissociação (K_d) para os compostos foi realizada através de Regressão Não Linear de Mínimos Quadrados, utilizando o software *Mathematica*, versão 6.0.0, Wolfram Research, Inc ⁸⁷, através do pacote *NonlinearRegression*, de modo que foi utilizada uma planilha contendo a concentração de composto após adição à solução de ADK, e a respectiva supressão de fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no trabalho, assim como sua discussão, apresentam-se como segue.

5.1- Resultados das análises *in silico*

Os ensaios *in silico* realizados foram conduzidos a fim de complementarem-se as investigações empíricas realizadas e concordantes com os obtidos *in vitro*. Estes ensaios foram bastante importantes devido ao seu potencial de predição de propriedades, tendo-se como base a estrutura da ADK depositada em bancos de dados (PDB 1BX4) e as estruturas do 22 compostos alvo, utilizando-se os programas indicados na Parte Experimental^{80, 78, 79, 76, 81, 77}.

5.1.1- Previsão sítios

A previsão dos potenciais sítios de ligação na ADK foi a primeira e importante etapa na elaboração de uma hipótese de inibição e dos próprios ensaios de *docking*. Esta etapa foi realizada com dois propósitos principais; o primeiro envolveu a validação do método de *docking*, e a prever as posições em potencial de ligação dos compostos na ADK.

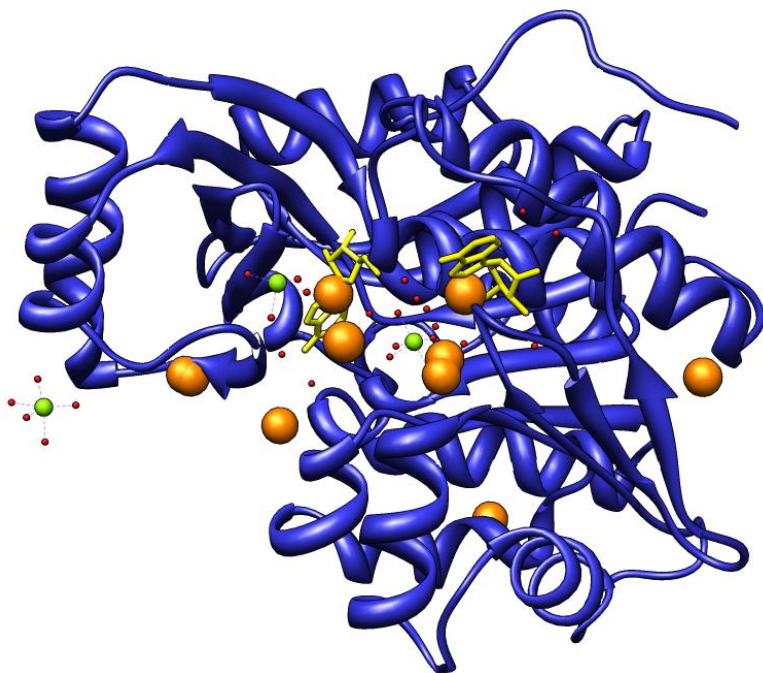


Figura 16. Representação dos potenciais sítios de ligação da ADK (esferas laranja) e do substrato natural ADO (em amarelo). Átomos de magnésio são representados por esferas verdes, moléculas de água representadas por esferas vermelhas. Figura preparada utilizando-se o software UCSF Chimera, versão 1.5.2 (build 32411), Regents of the University of California.

A Figura 16 ilustra o resultado do ensaio de previsão de potenciais sítios de ligação, os quais são apresentados pelas esferas laranja. Como se pode observar foram previstos

10 potenciais sítios de ligação para a ADK, sendo que dois destes sítios coincidem exatamente com as posições dos substratos naturais. Este resultado é muito importante, uma vez que a correta previsão dos sítios que de fato existem valida o método utilizado para se avaliar potenciais sítios de ligação dos compostos analisados. De posse destas previsões, foi possível então realizar os ensaios de *docking*, e utilizar ambos os dados na investigação do processo de ligação entre os compostos e a ADK, além de auxiliar na elaboração de uma hipótese de inibição.

5.1.2- Docking

Os ensaios de *docking* foram realizados a fim de fazer-se uma varredura inicial de quais compostos apresentavam maior potencial em inibir a ADK, e também na investigação do mecanismo de inibição. Na Figura 17, de forma geral, são resumidos resultados obtidos nestes experimentos. Foi possível observar que os compostos dividiram-se em dois grupos; um no qual a maioria dos compostos posicionou-se em uma posição denominada “Sítio Preferencial”, e outro sítio ocupado pelos demais compostos (compostos 8MEO-4F, 8MEO-4CL, 8MEO-3ACET, 8MEO-4CH3 e 8MEO-ANL) que se ligaram em um “Sítio Alternativo”.

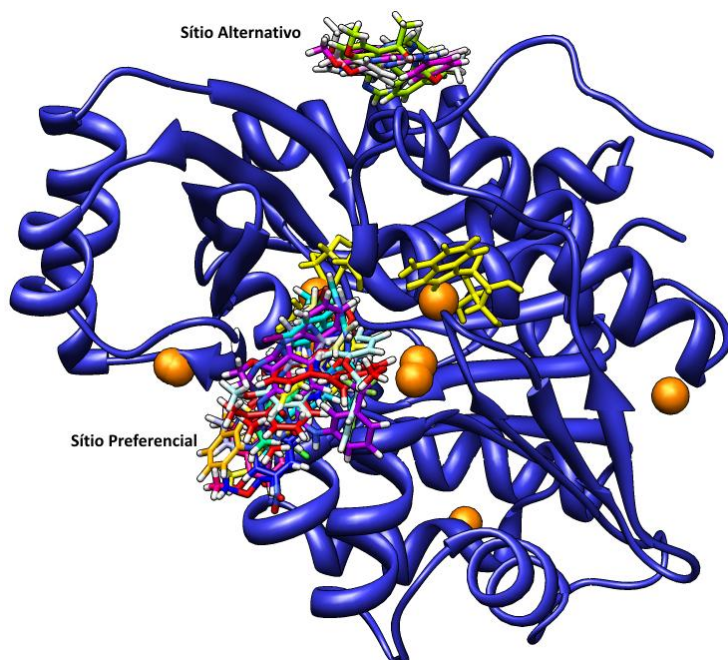


Figura 17. Representação dos resultados de “docking” para os compostos sintetizados, com indicação da posição dos compostos (estruturas coloridas) no sítio preferencial e sítio alternativo, e sítios de ligação previstos (esferas laranja), além de substratos naturais ATP e ADO (em amarelo).

Uma observação muito interessante foi que o Sítio Preferencial localizou-se em uma posição que se sobrepõe a um dos sítios de ligação previstos anteriormente. Este fato

foi um bom indicativo quanto ao método utilizado na realização dos experimentos de *docking*.

Os ensaios de *docking* permitem também uma avaliação quantitativa da afinidade dos compostos em ligar-se a ADK. Para tal, utilizam-se valores de E_{grid} determinados nos ensaios de *docking*, de modo que quanto menor este valor, maior é afinidade do composto pela enzima. A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 1. Valores de E_{grid} para os compostos da série 8-metóxi-4anilinoquinazolininas

N	Composto	$E_{grid}/\text{kcal mol}^{-1}$	N	Composto	$E_{grid}/\text{kcal mol}^{-1}$
1	8MEO-3F	-5,95	12	8MEO4-NO ₂	-5,58
2	8MEO-4F	-5,61	13	8MEO-3ACET	-6,23
3	8MEO-3Cl	-5,98	14	8MEO-4ACET	-5,88
4	8MEO-4Cl	-5,92	15	8MEO-3CH ₃	-5,54
5	8MEO-3Br	-5,95	16	8MEO-4CH ₃	-5,87
6	8MEO-4Br	-5,90	17	8MEO-3METX	-6,15
7	8MEO-3I	-6,03	18	8MEO-4METX	-5,64
8	8MEO-4I	-6,00	19	8MEOANL	-6,13
9	8MEO-3BZL	-6,16	20	8MEO-CF ₃	-5,62
10	8MEO-4BZL	-5,84	21	8MEO-TRI	-5,35
11	8MEO-3NO ₂	-5,58	22	8MEO-DMEA	-5,49

Foi realizado também um ensaio de *re-docking*, em que é realizado *docking* do próprio substrato natural, a fim de ter o valor de E_{grid} obtido como parâmetro de referência na avaliação de E_{grid} dos compostos-alvos, de modo que foi obtido para adenosina um valor de $E_{grid} = -5,64 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Foi observado que 14 dos 22 compostos apresentaram valores de E_{grid} inferiores ao de adenosina, resultados que os tornam candidatos a potenciais inibidores da ADK. Os valores de E_{grid} são um bom parâmetro na avaliação de candidatos a inibidores, mas seu valor absoluto não é o suficiente em tais avaliações. Cálculos de E_{grid} levam em conta todos os tipos de interações em que os compostos estão envolvidos, mesmo aquelas que não são relevantes, e dessa forma, torna-se necessária a avaliação das interações efetivas envolvidas, através de Mapas de Interação Bidimensionais.

5.1.3- Mapas de Interação Bidimensionais

Mapas de Interação Bidimensionais⁸⁸ são uma eficiente e amplamente aplicada representação gráfica, utilizada na representação de interações proteína/ligante, aplicada nos estudos virtuais dos 22 compostos sintetizados e suas interações com a ADK. O método baseia-se na decomposição em coordenadas cartesianas do vetor referente à interação entre a proteína e o ligante, de forma a apresentar bidimensionalmente as interações presentes em um espaço tridimensional. Isto torna a visualização de tais interações mais claras, facilitando seu estudo e investigação.

A utilização de mapas de interação bidimensionais também foi muito importante na avaliação das E_{grid} obtidas nos experimentos de *docking*, uma vez que permitiu visualizar quais interações dos compostos são efetivamente relevantes. Foram consideradas como interações relevantes aquelas que envolvem os compostos sintetizados e resíduos de aminoácidos da ADK, entre elas ligações de hidrogênio ou de van der Waals; enquanto ligações presentes entre os compostos e moléculas de água, por exemplo, não foram consideradas relevantes, uma vez que não auxiliam no ancoramento do composto em seu sítio de ligação.

O resultado desta avaliação não apenas complementou os dados de E_{grid} , como também serviu como filtro, uma vez que o cálculo de E_{grid} não distinguiu entre interações relevantes e não relevantes, levando ambas em consideração para seu cálculo. Os mapas obtidos para todos os compostos da série sintetizada encontram-se no Anexo 5, e os mapas para os três compostos com maior afinidade pela ADK (compostos 5, 8 e 14) são apresentados na Figura 18.

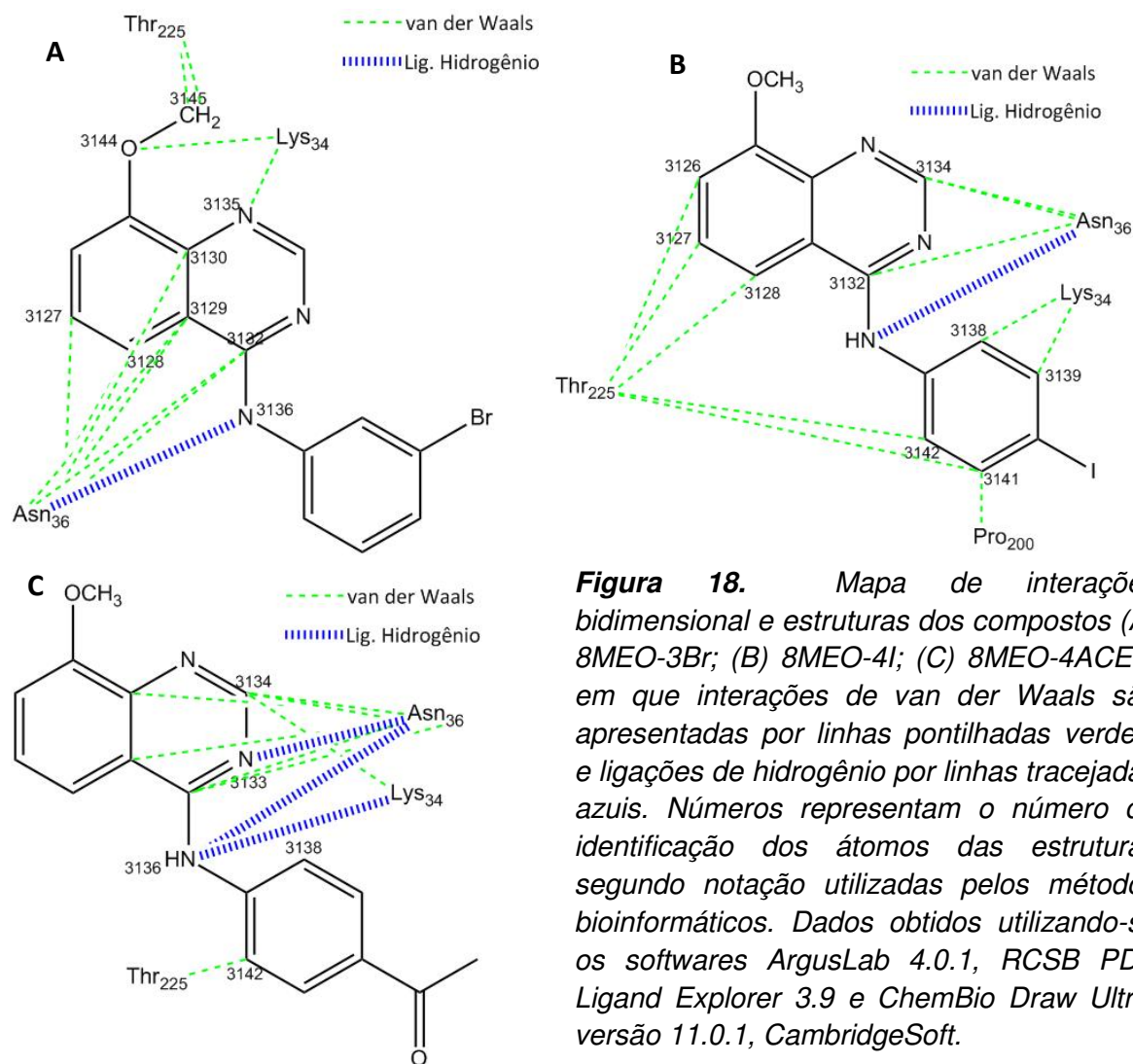


Figura 18. Mapa de interações bidimensional e estruturas dos compostos (A) 8MEO-3Br; (B) 8MEO-4I; (C) 8MEO-4ACET, em que interações de van der Waals são apresentadas por linhas pontilhadas verdes, e ligações de hidrogênio por linhas tracejadas azuis. Números representam o número de identificação dos átomos das estruturas segundo notação utilizadas pelos métodos bioinformáticos. Dados obtidos utilizando-se os softwares ArgusLab 4.0.1, RCSB PDB Ligand Explorer 3.9 e ChemBio Draw Ultra, versão 11.0.1, CambridgeSoft.

Observa-se nos mapas obtidos para os compostos 8MEO-3Br, 8MEO-4I e 8MEO-4ACET que os mesmos resíduos de aminoácidos da ADK estão envolvidos em suas interações com os compostos. Os resíduos Lys₃₄, Asn₃₆ e Thr₂₂₅ (além de Pro₂₀₀ para o composto 8MEO-4I) estão presentes nas interações entre os compostos e a ADK, de modo que todos apresentaram interações de van der Waals com os compostos, e o resíduo Asn₃₆ apresentando ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio proveniente do resíduo anilínico (para o composto 8MEO-4ACET, o resíduo Asn₃₆ também realizou ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de posição número 3 do anel quinazolinico, enquanto o resíduo Lys₃₄ também realizou ligação de hidrogênio com átomo de nitrogênio proveniente do resíduo anilínico). A associação dos dados

obtidos pelos ensaios de docking, complementados pelos mapas de interação bidimensionais, permitiram então a elaboração de uma hipótese de inibição.

5.1.4- Hipótese de Inibição

A obtenção dos dados *in silico* permitiu então que uma hipótese de inibição seja elaborada, buscando uma racionalização do processo no qual os compostos sintetizados estejam envolvidos, de forma a inibir a atividade da ADK.

Analisando-se detidamente os resultados obtidos nos ensaios de *docking*, é possível observar, conforme ilustrado na Figura 19, o posicionamento dos compostos no sítio da ADK. Os compostos localizados, em sua maioria, posicionaram-se em uma região que corresponde à entrada do sítio de ligação do substrato, não se sobrepondo ao ATP.

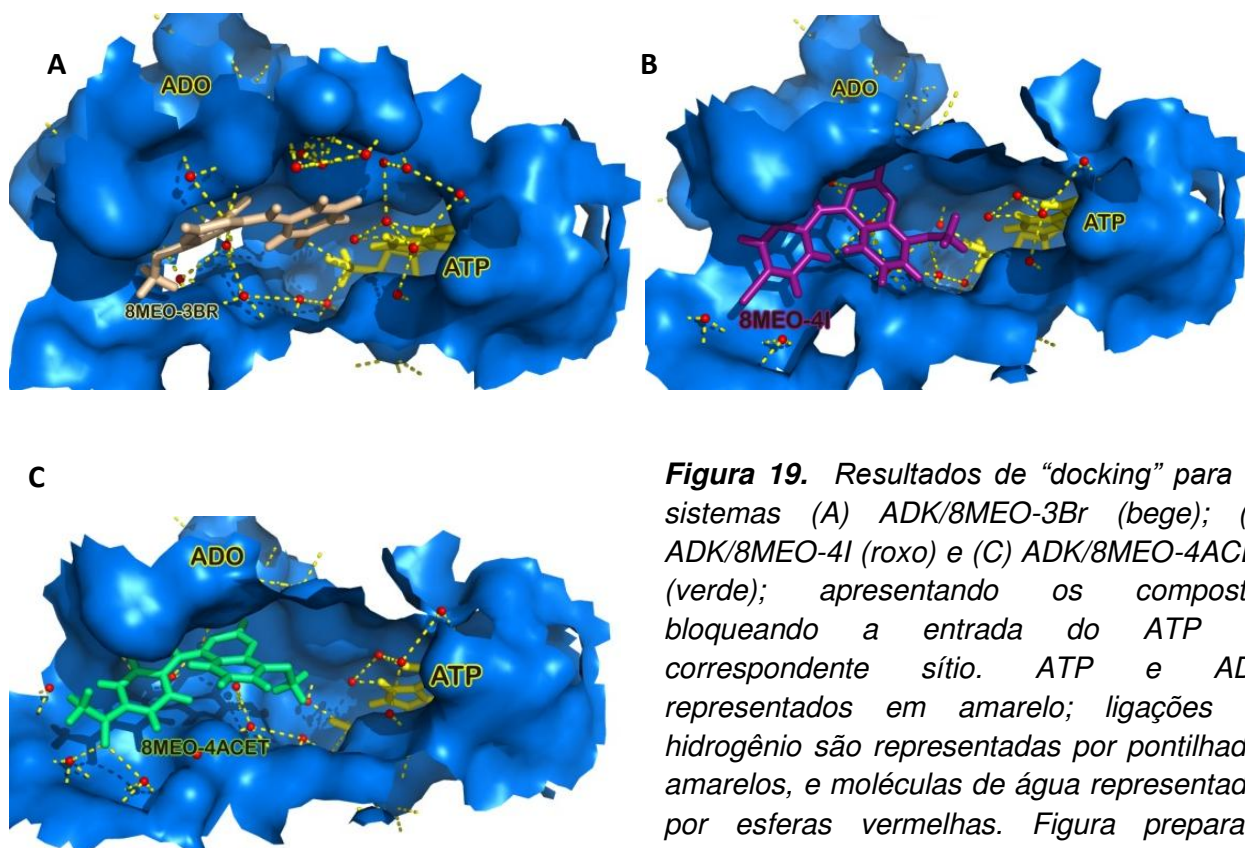


Figura 19. Resultados de “docking” para os sistemas (A) ADK/8MEO-3Br (bege); (B) ADK/8MEO-4I (roxo) e (C) ADK/8MEO-4ACET (verde); apresentando os compostos bloqueando a entrada do ATP no correspondente sítio. ATP e ADO representados em amarelo; ligações de hidrogênio são representadas por pontilhados amarelos, e moléculas de água representadas por esferas vermelhas. Figura preparada utilizando o software The PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.2r1, DeLano Scientific, LLC

Embora os compostos não se liguem exatamente nas posições dos substratos naturais, (e logo nos sítios de ligação naturais), conferindo-lhes características de inibidores competitivos, estes se mostraram potencialmente eficazes, uma vez que se posicionaram na entrada do maior sítio de ligação (sítio de ATP), de forma a bloqueá-lo. Este bloqueio impediu a entrada de ATP em seu sítio enzimático, interrompendo a atividade catalítica da ADK.

Os compostos que se ligam na posição alternativa muito provavelmente afetam também a ligação de ADO a seu sítio, ou devem provocar mudanças conformacionais protéicas significativas na ADK, afetando seu funcionamento. Contudo, tais hipóteses necessitam de aprofundamentos experimentais em suas investigações, como por exemplo, ensaios de $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$ -HSQC ou mesmo ensaios de co-cristalização e investigação da estrutura por métodos cristalográficos.

As figuras com a representação da proposta de inibição para todos os compostos sintetizados encontram-se no Anexo 6.

5.1.5- Avaliação dos resultados de potencial farmacológico - (*Druglikeness*)

A avaliação do potencial farmacológico (*druglikeness*) foi uma das etapas fundamentais no desenvolvimento de fármacos, uma vez que possibilitou estimar importantes propriedades, como solubilidade, toxicidade, entre outras.

Conforme discutido na seção 3.6, existem diversas regras que permitem avaliar o potencial farmacológico de um dado composto, como a *R5L*, *CMC* e a *psa*, entre diversas outras. Estas regras, obtidas de forma empírica, são amplamente utilizadas, permitindo uma varredura preliminar na determinação de quais potenciais moléculas devem ser tratados com maior ou menor prioridade.

A *R5L* foi aplicada a toda a série sintetizada, e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros de Druglikeness (*R5L*) da série 8-metóxi-4-anilinoquinazolinás

N	Composto	logP		M.M./ g mol ⁻¹		Doad. L.Hid.		Acep. L.Hid.		N	Composto	logP		M.M./ g mol ⁻¹		Doad. L.Hid.		Acep. L.Hid.	
1	8MEO-3F	3,673	✓	269,28	✓	1	✓	4	✓	12	8MEO-4NO ₂	3,141	✓	296,28	✓	1	✓	7	✓
2	8MEO-4F	3,762	✓	269,28	✓	1	✓	4	✓	13	8MEO-3ACET	2,862	✓	293,32	✓	1	✓	5	✓
3	8MEO-3Cl	4,126	✓	285,73	✓	1	✓	4	✓	14	8MEO-4ACET	3,141	✓	293,32	✓	1	✓	5	✓
4	8MEO-4Cl	4,152	✓	285,73	✓	1	✓	4	✓	15	8MEO-3CH ₃	3,778	✓	265,31	✓	1	✓	4	✓
5	8MEO-3Br	4,234	✓	330,19	✓	1	✓	4	✓	16	8MEO-4CH ₃	3,890	✓	265,31	✓	1	✓	4	✓
6	8MEO-4Br	4,266	✓	330,19	✓	1	✓	4	✓	17	8MEO-3METX	3,545	✓	281,31	✓	1	✓	5	✓
7	8MEO-3I	4,462	✓	377,18	✓	1	✓	4	✓	18	8MEO-4METX	3,631	✓	281,31	✓	1	✓	5	✓
8	8MEO-4I	4,541	✓	377,18	✓	1	✓	4	✓	19	8MEO-ANL	3,431	✓	251,29	✓	1	✓	4	✓
9	8MEO-3BZL	4,910	✓	357,41	✓	1	✓	5	✓	20	8MEO-CF ₃	4,388	✓	319,28	✓	1	✓	4	✓
10	8MEO-4BZL	4,977	✓	357,41	✓	1	✓	5	✓	21	8MEO-TRI	3,182	✓	341,36	✓	1	✓	7	✓
11	8MEO-3NO ₂	3,126	✓	296,28	✓	1	✓	7	✓	22	8MEO-DMEA	3,874	✓	294,35	✓	1	✓	5	✓

Legenda - ✓: resultado positivo no parâmetro da *R5L* avaliado.

✗: resultado negativo no parâmetro da *R5L* avaliado.

Foi possível observar que todos os compostos atenderam a todos os requisitos estabelecidos pela *R5L*, resultado muito importante na potencial utilização destes compostos sintetizados como fármacos. A fim de complementar os estudos de potencial farmacológico da *R5L*, foi realizado um novo estudo, tomando como referência outra base de dados ou regra, a *CMC* combinada a *psa*. A utilização de outra regra é importante, pois leva em consideração parâmetros que não são abordados na *R5L*, diminuindo assim a possibilidade de falhas na avaliação do potencial farmacológico dos compostos da série 8-metóxi-4-anilinoquinazolinás. Dados de *psa* complementam a *CMC*, pois fornecem valiosas informações no que diz respeito à capacidade de absorção oral destes compostos. Os resultados obtidos em estudos de *CMC* combinado a *psa* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de Druglikeness (CMC combinado a psa) da série sintetizada.

N	Composto	M.M./ g mol ⁻¹		LogP		Nº At.Tot.		PSA/Å ²		N	Composto	M.M./ g mol ⁻¹		LogP		Nº At.Tot.		PSA/Å ²	
1	8MEO-3F	269,27	✓	3,673	✓	32	✓	47,04	✓	12	8MEO-4NO ₂	296,28	✓	3,141	✓	34	✓	92,86	✓
2	8MEO-4F	269,27	✓	3,762	✓	32	✓	47,04	✓	13	8MEO-3ACET	293,31	✓	2,862	✓	37	✓	64,11	✓
3	8MEO-3CL	285,72	✓	4,126	✓	32	✓	47,04	✓	14	8MEO-4ACET	293,31	✓	3,141	✓	37	✓	64,11	✓
4	8MEO-4CL	285,72	✓	4,152	✓	32	✓	47,04	✓	15	8MEO-3CH ₃	265,30	✓	3,778	✓	35	✓	47,04	✓
5	8MEO-3BR	330,17	✓	4,234	✓	32	✓	47,04	✓	16	8MEO-4CH ₃	265,30	✓	3,890	✓	35	✓	47,04	✓
6	8MEO-4BR	330,17	✓	4,266	✓	32	✓	47,04	✓	17	8MEO-3METX	281,30	✓	3,545	✓	36	✓	56,27	✓
7	8MEO-3I	377,17	✓	4,462	✓	32	✓	47,04	✓	18	8MEO-4METX	281,30	✓	3,631	✓	36	✓	56,27	✓
8	8MEO-4I	377,17	✓	4,451	✓	32	✓	47,04	✓	19	8MEO-ANL	251,28	✓	3,431	✓	32	✓	47,04	✓
9	8MEO-3BZL	357,40	✓	4,910	✓	46	✓	56,27	✓	20	8MEO-CF ₃	319,28	✓	4,388	✓	35	✓	47,04	✓
10	8MEO-4BZL	357,40	✓	4,977	✓	46	✓	56,27	✓	21	8MEO-TRI	341,36	✓	3,182	✓	44	✓	74,73	✓
11	8MEO-3NO ₂	296,28	✓	3,126	✓	34	✓	92,86	✓	22	8MEO-DMEA	294,35	✓	3,874	✓	40	✓	50,28	✓

Legenda - ✓: resultado positivo no parâmetro da CMC combinado a psa avaliado.

✗: resultado negativo no parâmetro da CMC combinado a psa avaliado.

5.2- Resultados obtidos de clonagem, expressão e purificação da ADK

A clonagem, expressão e purificação da ADK permitiram que esta fosse obtida de forma pura e bastante estável, fato muito importante para que houvesse sucesso nos ensaios executados *in vitro* de interação (fluorescência) com os compostos sintetizados. Contudo, vale ressaltar que esta parte do projeto foi essencialmente realizada pelo grupo do Prof. Dr. Kleber Franchini, do LNBio e FCM-UNICAMP.

5.3- Resultados obtidos na síntese e caracterização dos compostos

A síntese dos compostos foi realizada seguindo metodologia bem descrita na literatura, de modo que foram necessárias apenas algumas modificações e adaptações, como a utilização de atmosfera inerte, a fim de reduzir a reversão da reação de cloração. Os tempos reacionais também requereram otimização, e conforme descrito na Parte Experimental, principalmente na última etapa racional. Apesar de toda a otimização realizada, muitos dos compostos apresentaram baixos rendimentos, mas suficientes para a realização dos testes desejados. Houve também grande dificuldade na purificação dos compostos, sendo que diversas abordagens distintas foram utilizadas (recristalizações, cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada preparativa, entre outras), mas sem que houvesse completo sucesso nestas tentativas. A caracterização dos compostos foi realizada através de métodos espectroscópicos, espectrométricos e físicos, tendo sido realizados ensaios de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , RMN HMQC- $\{^1\text{H}-^{13}\text{C}\}$, infravermelho, espectrometria de massa de alta resolução (sem fragmentação), além da determinação de pontos de fusão.

5.4- Ensaios de fluorescência de emissão

A principal técnica utilizada nos estudos de interação executada *in vitro* entre os compostos sintetizados e ADK foi a de fluorescência de emissão. A técnica foi escolhida devido a sua sensibilidade, simplicidade de execução e facilidade no preparo das amostras, além do fato da enzima alvo ser um bom fluoróforo. A ADK possui dois triptofanos (Figura 1) em sua estrutura primária, e uma vez que triptofano contém um grupo indol em sua estrutura (Figura 20), é capaz de fluorescer, e logo, ser estudado por ensaios de fluorescência.

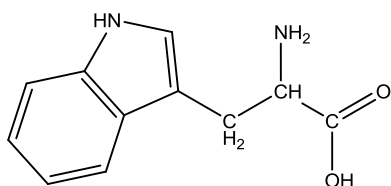


Figura 20. Estrutura do resíduo de aminoácido triptofano, em que é possível observar seu grupamento indol.

O espectro de excitação da ADK (Figura 21A) exibe máximo em 292 nm (λ_{em} = 400 nm), sendo utilizado então na obtenção do espectro de emissão. Este foi obtido (Figura 21B) utilizando-se λ_{ex} = 290 nm, sendo observado máximo de emissão em 350 nm.

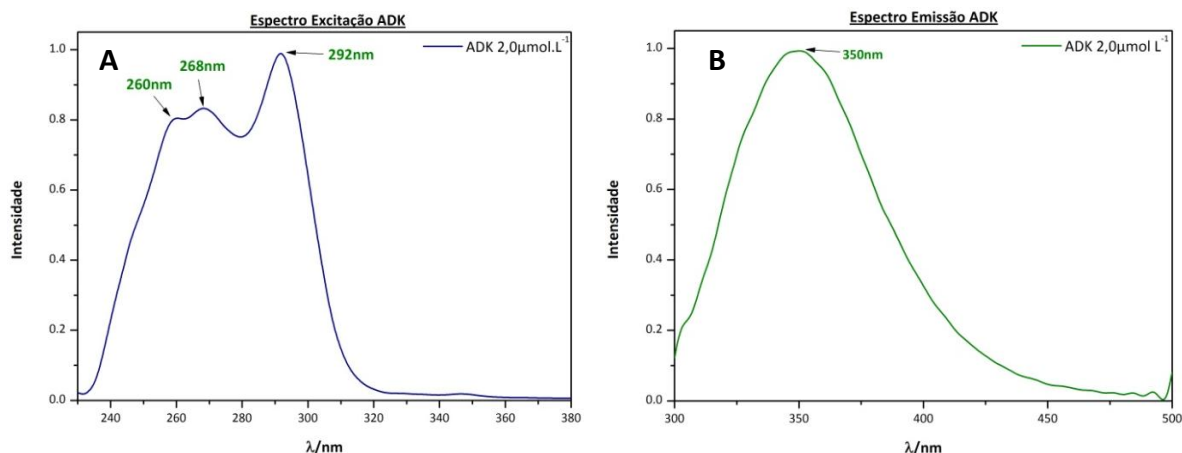


Figura 21. (A) Espectro de excitação de solução de ADK (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em solução tampão Tris 50 mmol L^{-1} , pH 8,0). (B) espectro de emissão de solução de ADK (2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, contida em solução tampão Tris 50 mmol L^{-1} , pH 8,0). λ_{em} = 400 nm, λ_{ex} = 290 nm; fendas de 5 nm.

A determinação de condições ideais para a realização dos ensaios de fluorescência é fundamental para os posteriores experimentos de supressão de fluorescência, os quais serão utilizados na avaliação da afinidade entre os compostos sintetizados e a ADK.

5.4.1- Supressão de fluorescência (*quenching*)

Nos ensaios de supressão de fluorescência, as soluções de ADK foram tituladas utilizando soluções dos compostos em dimetilsulfóxido (DMSO), em pequenos incrementos, até que não fosse mais observada supressão de fluorescência (*quenching*). Foi realizada também uma análise em branco, titulando-se a ADK somente com DMSO, até concentração de DMSO idêntica a utilizada nas titulações. Não foram observadas quaisquer alterações no espectro de emissão da ADK, validando a análise. Os compostos foram titulados, e os espectros obtidos para os três melhores compostos estão apresentados na Figura 22.

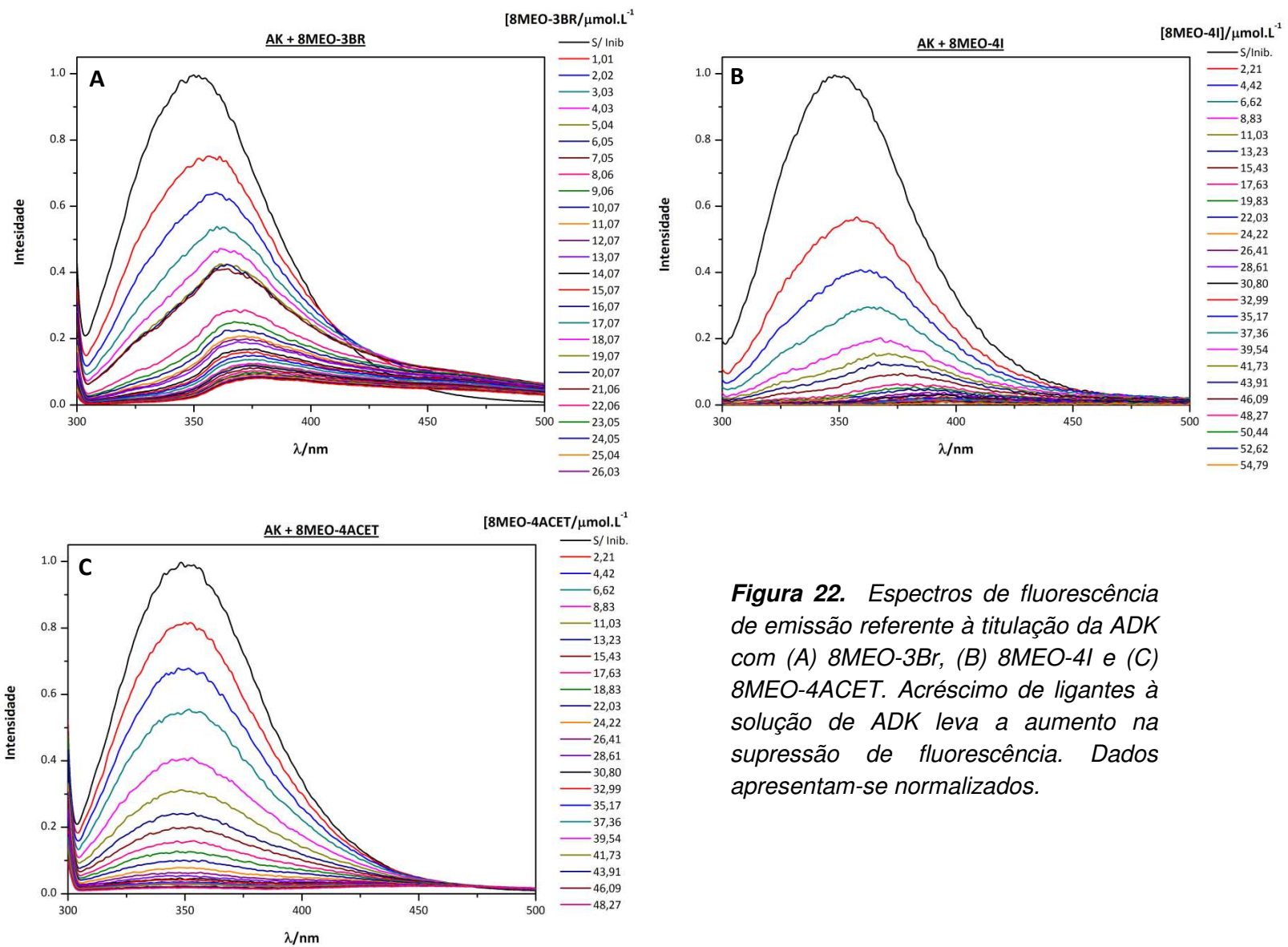


Figura 22. Espectros de fluorescência de emissão referente à titulação da ADK com (A) 8MEO-3Br, (B) 8MEO-4I e (C) 8MEO-4ACET. Acréscimo de ligantes à solução de ADK leva a aumento na supressão de fluorescência. Dados apresentam-se normalizados.

fluorescência para os três compostos. Estes atingiram saturação em concentrações inferiores às observadas para os demais compostos, de modo que essa acentuada supressão de fluorescência sugere uma interação composto/ADK bastante efetiva. A ocorrência de supressão de fluorescência para praticamente todos os compostos é um forte indicativo que, por exemplo, no caso dos compostos derivados de iodo, de que o *quenching* observado não é decorrente do efeito de átomo pesado. Outro fator importante a ser indicado é o deslocamento dos máximos de fluorescência durante a titulação.

Foram observados deslocamentos ($\Delta\lambda_{\max}$) que variaram até 40 nm, sendo que para 21 dos 22 compostos este deslocamento deu-se para comprimentos de onda maiores (deslocamento para o vermelho). Os deslocamentos⁸⁹ de $\lambda_{\max}$ fornecem informações importantes acerca de mudanças conformacionais protéicas, sendo que deslocamentos para o vermelho indicam alterações estruturais tais que levam a maior exposição dos resíduos de triptofano para o solvente.

Os dados fluorimétricos permitiram o cálculo de constantes de dissociação, um importante fator na avaliação destas interações. Conforme discutido anteriormente, a presença de dois triptofanos na estrutura primária da ADK faz com que esta não apresente comportamento fluorescente homogêneo, de modo a observar-se desvio negativo de linearidade, apresentando então um comportamento hiperbólico em gráficos de Stern-Volmer, utilizados na determinação de K_d .

Os gráficos de supressão de fluorescência de todos os compostos encontram-se no Anexo 7.

5.4.2- Transferência de Energia de Ressonância (*Ret*)

A supressão de fluorescência observada para o sistema ADK compostos pode ter ocorrido através de fenômenos de *Ret*. Conforme descrito na seção 3.4, para que haja a ocorrência de *Ret*, é necessária sobreposição espectral entre a emissão de um doador, no caso, os resíduos de triptofano; e a absorção de um aceptor, nesse estudo, os derivados de 4-anilinoquinazolinás. A área de sobreposição espectral determinada para cada um dos compostos encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4. Área de Sobreposição Espectral (*a.s.e.*) para os compostos sintetizados.

	Composto	<i>a.s.e.</i>		Composto	<i>a.s.e.</i>
1	8MEO-3F	45,00	12	8MEO-4NO ₂	52,16
2	8MEO-4F	14,93	13	8MEO-3ACET	23,44
3	8MEO-3Cl	23,92	14	8MEO-4ACET	69,51
4	8MEO-4Cl	21,42	15	8MEO-3CH ₃	13,23
5	8MEO-3Br	46,17	16	8MEO-4CH ₃	12,89
6	8MEO-4Br	14,86	17	8MEO-3METX	15,01
7	8MEO-3I	43,88	18	8MEO-4METX	18,71
8	8MEO-4I	46,15	19	8MEO-ANL	49,10
9	8MEO-3BZL	15,04	20	8MEO-CF ₃	49,09
10	8MEO-4BZL	14,72	21	8MEO-TRI	13,98
11	8MEO-3NO ₂	41,20	22	8MEO-DMEA	17,49

É possível observar que para nenhum dos 22 compostos sintetizados foi observado valor nulo de *a.s.e.*, de modo que este importante requisito para que haja a ocorrência de *Ret* foi satisfeito.

Os espectros de *Ret* dos três compostos com mais pronunciada afinidade pela ADK, 8MEO-4I, 8MEO-3Br e 8MEO-4ACET, estão apresentados na Figura 23A₁, 23B₁ e 23C₁. A área hachurada em verde indica a região em que houve sobreposição entre os espectros de emissão (ADK, linha verde) e absorção (compostos, linha azul).

As distâncias entre os compostos e os resíduos de triptofano (em vermelho) também foram determinadas e apresentadas nas Figuras 23A₂, 23B₂ e 23C₂. Analisando os resultados obtidos, foi possível observar que as distâncias calculadas (indicada por tracejado amarelo) encontraram-se em uma faixa adequada, atendendo ao intervalo espacial típico para a ocorrência de *Ret* (10-100 Å).

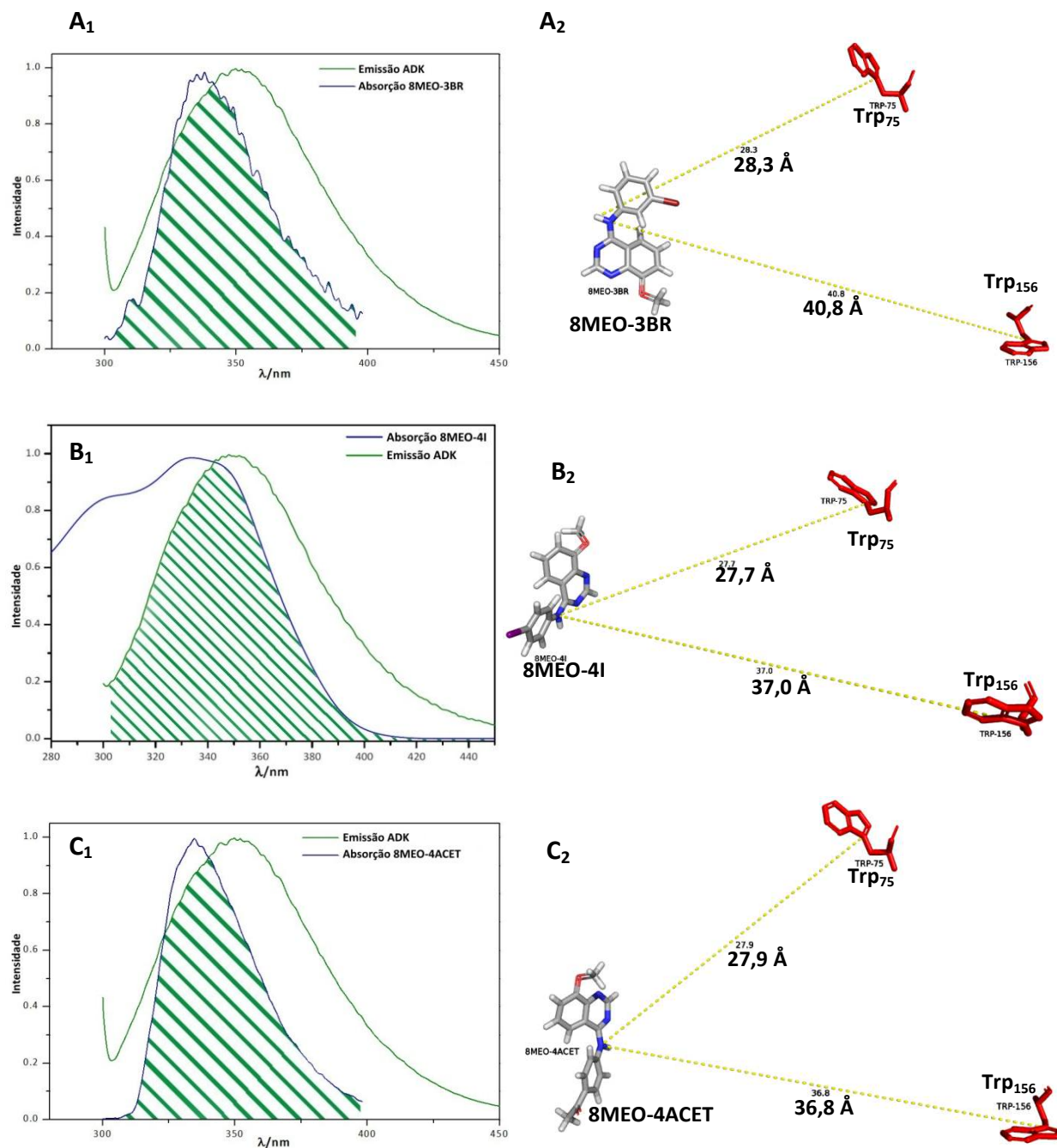


Figura 23. Espectros de Ret da ADK (A₁) 8MEO-3BR; (B₁) 8MEO-4I e (C₁) 8MEO-4ACET, com a área hachurada em verde indica sobreposição espectral; distâncias (em Å) entre os compostos e os resíduos de triptofano (Trp₇₅ e Trp₁₅₆, em vermelho), (A₂) 8MEO-3BR; (B₂) 8MEO-4I e (C₂) 8MEO-4ACET

A Tabela 5 compila os valores das distâncias compostos/Trp para todos os compostos da série sintetizada.

Tabela 5. Distâncias entre compostos sintetizados e os resíduos Trp₇₅ e Trp₁₅₆

	Composto	Dist.Trp ₇₅ /Å	Dist.Trp ₁₅₆ /Å		Composto	Dist.Trp ₇₅ /Å	Dist.Trp ₁₅₆ /Å
1	8MEO-3F	9,6	33,2	12	8MEO-4NO ₂	29,5	37,8
2	8MEO-4F	25,1	39,4	13	8MEO-3ACET	13,9	33,7
3	8MEO-3Cl	27,8	36,7	14	8MEO-4ACET	27,9	36,8
4	8MEO-4Cl	10,1	33,8	15	8MEO-3CH ₃	32,7	39,2
5	8MEO-3Br	28,3	40,8	16	8MEO-4CH ₃	12,7	31,4
6	8MEO-4Br	25,0	37,0	17	8MEO-3METX	26,9	38,8
7	8MEO-3I	25,2	37,2	18	8MEO-4METX	26,1	38,0
8	8MEO-4I	27,7	37,0	19	8MEO-ANL	10,4	32,9
9	8MEO-3BZL	24,7	37,3	20	8MEO-CF ₃	29,7	39,3
10	8MEO-4BZL	28,2	39,2	21	8MEO-TRI	28,1	35,9
11	8MEO-3NO ₂	28,8	37,1	22	8MEO-DMEA	26,2	36,8

Foi observado que as distâncias entre os compostos e os resíduos de Trp da ADK possuíam dimensões que se apresentavam dentro do intervalo típico de 10-100 Å, satisfazendo assim mais um dos requisitos necessários para efetiva ocorrência de *Ret*.

Posteriormente, foram avaliados então os resultados obtidos para κ^2 , para cada um dos compostos e para os resíduos de Trp, como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de κ^2 para os compostos sintetizados e os resíduos Trp₇₅ e Trp₁₅₆

N	Composto	κ^2 /Trp75	κ^2 /Trp156	N	Composto	κ^2 /Trp75	κ^2 /Trp156
1	8MEO-3F	1,768	2,553	12	8MEO-4NO ₂	0,355	1,060
2	8MEO-4F	0,902	0,004	13	8MEO-3ACET	0,927	0,175
3	8MEO-3Cl	0,450	0,879	14	8MEO-4ACET	0,339	1,138
4	8MEO-4Cl	0,032	3,073	15	8MEO-3CH ₃	0,060	0,760
5	8MEO-3Br	0,061	1,201	16	8MEO-4CH ₃	2,039	0,176
6	8MEO-4Br	0,407	0,528	17	8MEO-3METX	0,007	1,729
7	8MEO-3I	0,187	0,000	18	8MEO-4METX	0,184	1,025
8	8MEO-4I	0,001	1,695	19	8MEO-ANL	0,982	1,123
9	8MEO-3BZL	0,004	1,557	20	8MEO-CF ₃	0,058	0,389
10	8MEO-4BZL	0,734	0,155	21	8MEO-TRI	0,311	0,012
11	8MEO-3NO ₂	0,123	0,715	22	8MEO-DMEA	0,111	1,416

Os dados obtidos de fatores de orientação complementam a avaliação dos resultados de *Ret*. É possível observar que de modo geral, os compostos que apresentaram os menores valores de a.s.e também apresentaram valores de κ^2 próximos a zero.

Estes resultados são concordantes, uma vez que valores de κ^2 próximos a zero indicam uma eficiência reduzida no processo de transferência de energia, implicando em uma menor intensidade no fenômeno de *Ret*.

A baixa a.s.e também leva a menor eficiência de *Ret*, pois indica que a transferência de energia entre os orbitais das espécies doadoras (Trp) eceptoras (compostos) não apresentam extensa compatibilidade.

Os gráficos de *Ret* de todos os compostos, assim como a representação gráfica das distâncias entre os compostos e os resíduos de triptofano, encontram-se no Anexo 8.

5.5- Constantes de Dissociação (K_d) obtidas para os sistemas estudados

A determinação das constantes de dissociação (K_d) exige a realização de regressões não lineares de mínimos quadrados, através do ajuste dos dados já normalizados de supressão de fluorescência (*quenching*) em função da concentração do composto. Os compostos, de modo geral, apresentaram perfil hiperbólico nos gráficos de Stern-Volmer, permitindo então que fosse determinado seus respectivos valores de K_d .

As constantes de dissociação foram calculadas, conforme mencionado anteriormente, através de *nlm*. Isto é necessário devido à falta de linearidade dos gráficos de Stern-Volmer, a qual provém da presença de duas espécies fluorofóricas (Trp), as quais apresentam propriedades distintas

A Figura 23 apresenta os gráficos de Stern-Volmer para os três compostos com maior afinidade pela ADK, 8MEO-4I, 8MEO-3Br e 8MEO-4ACET, enquanto os K_d obtidos encontram-se sumarizados na Tabela 7.

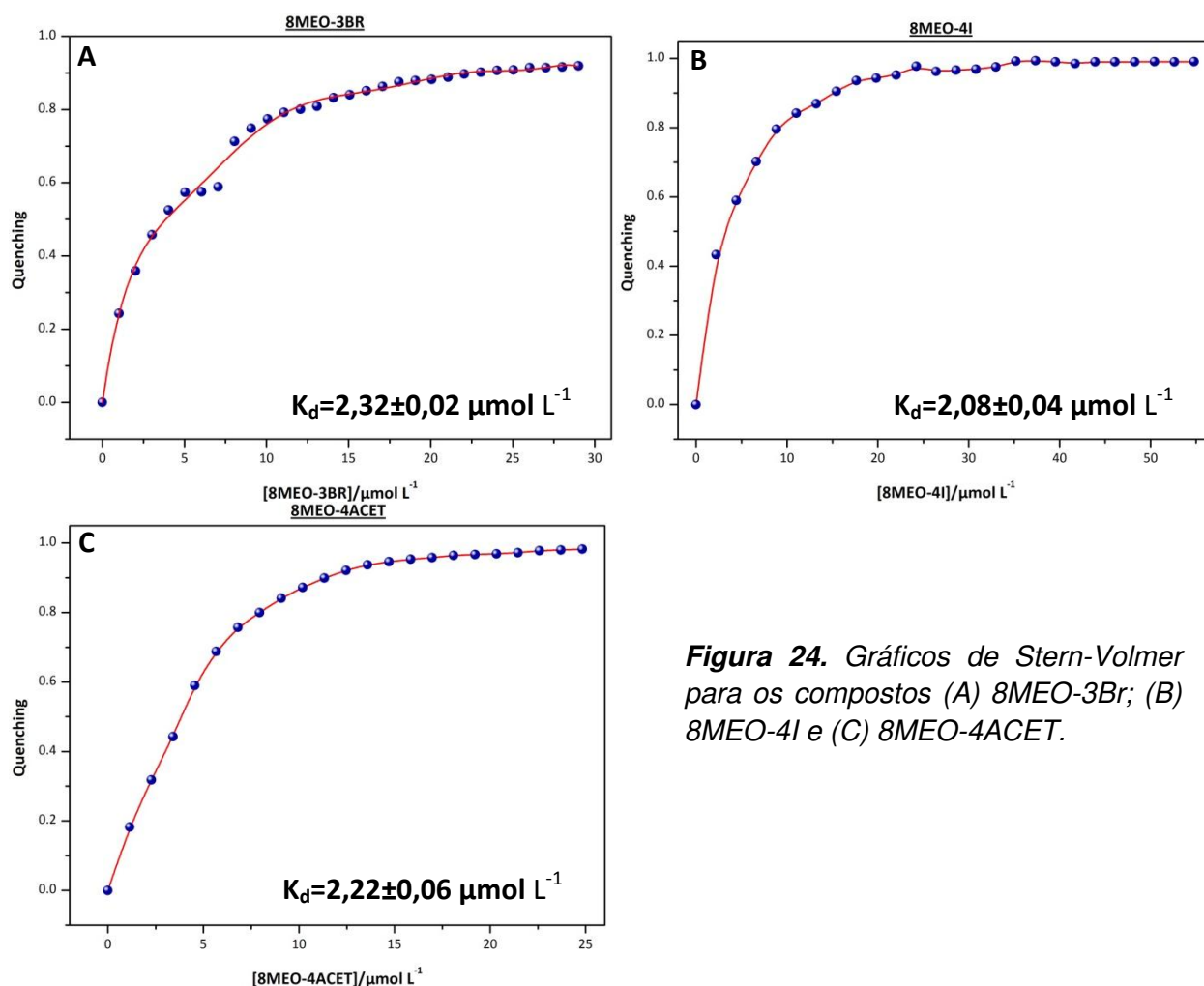


Figura 24. Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3Br; (B) 8MEO-4I e (C) 8MEO-4ACET.

Tabela 7. Valores de K_d calculados para os compostos da série 8-metóxi-4-anilinoquinazolinas

Nº	Composto	$K_d/\mu\text{mol L}^{-1}$	Nº	Composto	$K_d/\mu\text{mol L}^{-1}$
1	8MEO-3F	$10,471 \pm 0,006$	12	8MEO-4NO ₂	$2,63 \pm 0,02$
2	8MEO-4F	$90,09 \pm 0,03$	13	8MEO-3ACET	$3,44 \pm 0,05$
3	8MEO-3Cl	$5,26 \pm 0,02$	14	8MEO-4ACET	$2,22 \pm 0,06$
4	8MEO-4Cl	$7,14 \pm 0,03$	15	8MEO-3CH ₃	$5,55 \pm 0,04$
5	8MEO-3Br	$2,32 \pm 0,02$	16	8MEO-4CH ₃	$2,5 \pm 0,1$
6	8MEO-4Br	$4,54 \pm 0,05$	17	8MEO-3METX	$4,34 \pm 0,04$
7	8MEO-3I	$7,518 \pm 0,008$	18	8MEO-4METX	$10,00 \pm 0,01$
8	8MEO-4I	$2,08 \pm 0,04$	19	8MEO-ANL	n.d.
9	8MEO-3BZL	$38,461 \pm 0,005$	20	8MEO-CF ₃	$15,384 \pm 0,007$
10	8MEO-4BZL	$66,666 \pm 0,009$	21	8MEO-TRI	$62,500 \pm 0,006$
11	8MEO3-NO ₂	$9,09 \pm 0,01$	22	8MEO-DMEA	$62,500 \pm 0,003$

Os valores de K_d obtidos para 16 dos compostos sintetizados apresentam-se inferiores aos estipulados pela literatura para o ATP ($38,0 \mu\text{mol L}^{-1}$)⁵³. Além disso, três deles

(8MEO-4I, 8MEO-3Br e 8MEO-4ACET) apresentaram valores muito inferiores, ao redor de $2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

As constantes de dissociação determinadas indicam que há grande afinidade entre os compostos sintetizados, particularmente aqueles com os mais baixos valores de K_d , e a ADK. Isto torna estes três compostos candidatos mais promissores na inibição da ADK, de modo que o aprofundamento futuro de seu estudo, através de ensaios *in vivo* (toxicidade, absorção, atividade, entre outros) é necessário a fim de avaliar seu potencial farmacológico.

Os gráficos Stern-Volmer de todos os compostos encontram-se sumarizados no Anexo 9.

5.6- Outras considerações

Além de todos os dados abordados e seus resultados, outros aspectos relevantes acerca de propriedades químicas e padrões observados serão brevemente abordados nesta seção.

5.6.1- Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) e logP

Foram calculados os valores de Momento Dipolar para os 22 compostos sintetizados, de modo que os valores de $|\vec{\mu}|$ estão apresentados na Figura 25. Foram observadas algumas tendências no comportamento de $|\vec{\mu}|$, de modo que foi possível inferir algumas relações, por exemplo, entre $|\vec{\mu}|$ e o coeficiente de partição octanol/água (logP).

Imagens das moléculas com a indicação de seus respectivos $\vec{\mu}$ encontram-se apresentadas no Anexo 10.

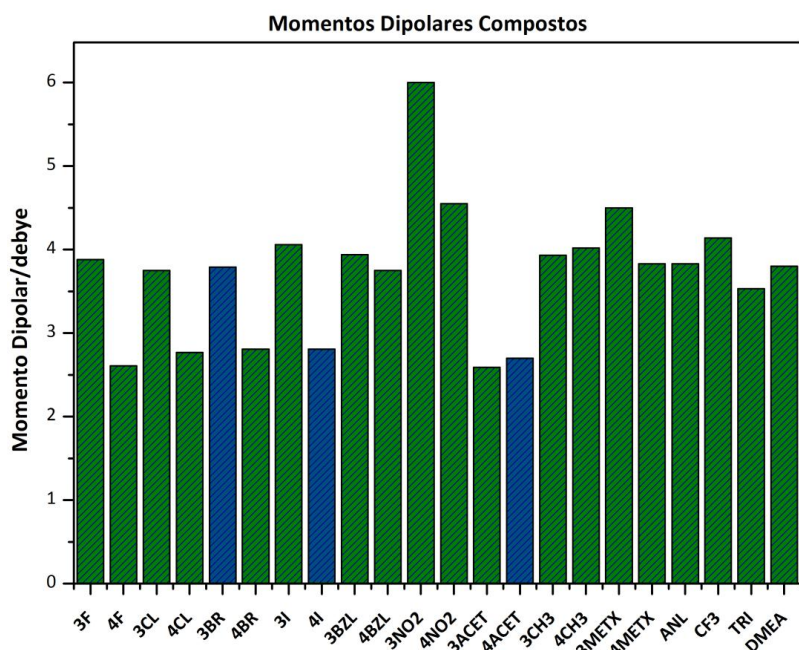


Figura 25. Momentos Dipolares dos compostos da série investigada.

Tendo em posse $|\vec{\mu}|$, verificou-se então o efeito da posição dos substituintes (3' e 4') no momento dipolar, conforme indicado na Figura 26.

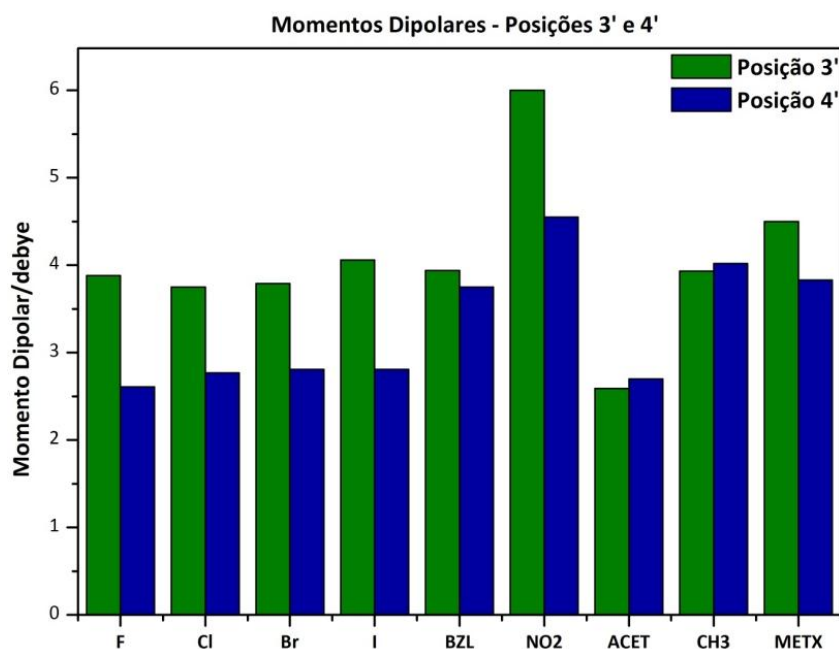


Figura 26. Efeito da posição do substituinte (3' e 4') nos momentos dipolares dos compostos da série 8-Metóxi-4-anilinoquinazolininas.

É possível observar que há uma clara relação entre a posição do substituinte e o momento dipolar, ficando evidente que a substituição na posição 3' do anel anilínico implica em um maior valor de $\vec{\mu}$, para um mesmo grupo. A Figura 27 ilustra esta observação para os derivados de grupo nitro.

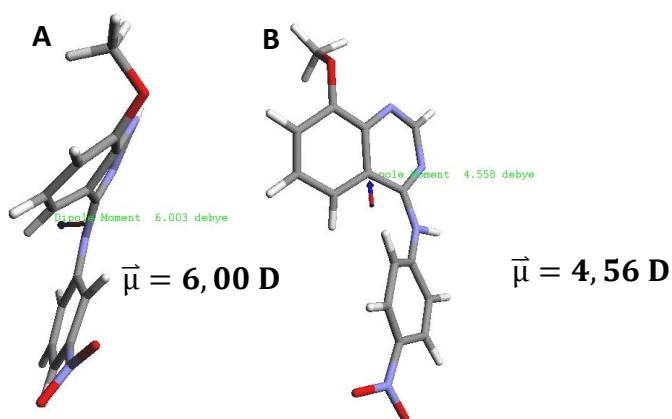


Figura 27. Efeito da posição do substituinte (3' e 4') nos momentos dipolares dos compostos (A) 8MEO-3NO₂ e (B) 8MEO-4NO₂.

A obtenção das propriedades dipolares dos compostos faz que sejam associadas também características de polaridade à série. Desse modo, pode-se então relacionar o momento dipolar com logP, uma vez que este último mede lipofilicidade (ou hidrofobicidade) de um dado composto. Assumindo isto, espera-se que com a diminuição do momento dipolar ao irmos da posição 3' para a 4' haja um correspondente aumento de logP, uma vez que a molécula torna-se mais apolar, e logo, mais lipofílica. A análise gráfica de tais propriedades permite a verificação de tal hipótese, conforme ilustrado pela Figura 28.

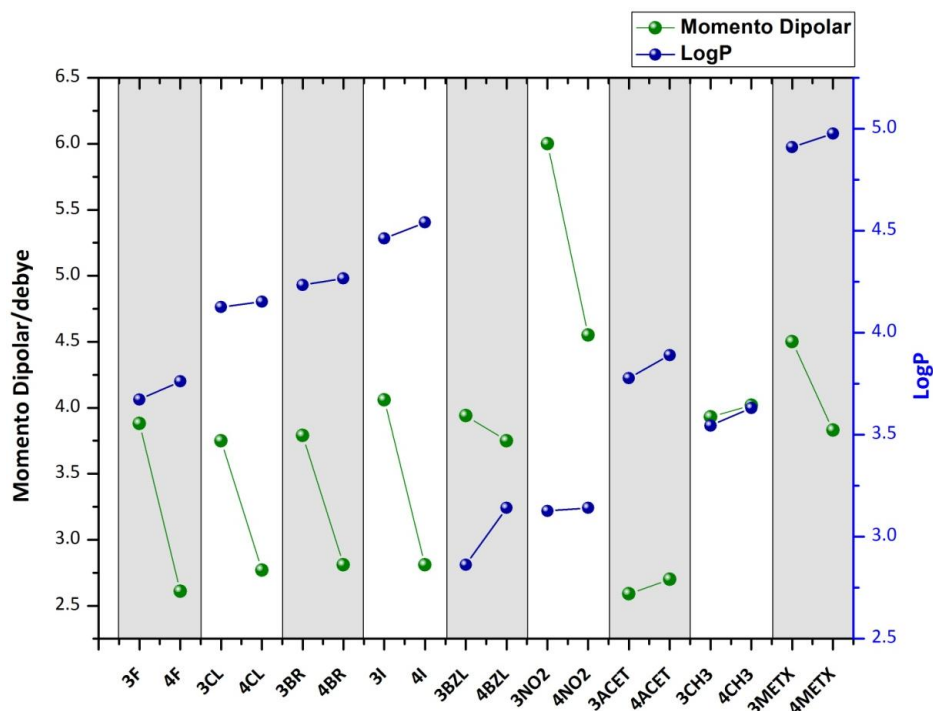


Figura 28. Comparação entre Momento Dipolar e logP para a série 8-Metóxi-4-anilinoquinazolinás.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

Os 22 compostos derivados de 8-metóxi-4-anilinoquinazolininas foram explorados frente a estudos de interação e inibição da ADK. Primeiramente aplicados, os ensaios *in silico* permitiram uma avaliação das interações moleculares entre os compostos e a Adenosina Quinase, concluindo-se que estes potencialmente a inibem através do bloqueio da entrada do substrato no sítio da ADK com menor afinidade frente a ADO.

Os mapas de interação bidimensionais e ensaios de *docking* permitiram o mapeamento das interações intermoleculares nos sistemas compostos/ADK, determinando-se ligações de hidrogênio, contatos polares e interações de van der Waals atuando entre eles. Os ensaios de fluorescência de emissão mostraram-se fundamentais na avaliação do potencial inibitório *in vitro* dos compostos sintetizados e ADK, através de gráficos de Stern-Volmer, os quais permitiram a determinação dos valores de constantes de dissociação, apresentando-se concordantes com os valores de E_{grid} obtidos nos ensaios de *docking*.

Os valores de E_{grid} para os compostos 8MEO-4I, 8MEO-4ACET e 8MEO-3Br apresentaram-se inferiores aos obtidos para os substratos naturais. Os estudos acerca de *Druglikeness*, através de parâmetros estabelecidos por Lipinski, permitiram também avaliações do potencial farmacológico de toda a série 8MEO, sendo que estes também se mostraram de acordo com os demais dados determinados.

Os estudos de *Ret* e seus parâmetros (*a.s.e.*, distâncias, κ^2) forneceram valiosas informações que auxiliam no entendimento do processo de supressão de fluorescência, além de ser um indicativo complementar da especificidade da interação compostos/ADK.

Finalmente, é possível concluir que os compostos 8MEO-4I, 8MEO-4ACET e 8MEO-3Br mostram-se promissores na inibição da ADK, sendo candidatos a posteriores estudos, tendo K_d inferiores em comparação com ATP e ADO.

BIBLIOGRAFIA

7- BIBLIOGRAFIA

1. Mathews, I. I.; Erion, M. D.; Ealick, S. E. Structure of Human Adenosine Kinase at 1.5 Å Resolution. *Biochem.* **1998**, *37*, 15607.
2. Fredholm, B. B. Adenosine – A Physiological Regulator and a Distress Signal. *Neurosci. J.* **2010**, *4*, 53.
3. Haas, H. L.; Selbach, O. Functions of Neuronal Adenosine Receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 375.
4. Ralevic, V.; Burnstock, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **1998**, *50*, 413.
5. Sands, W. A.; Palmer, T. M. Adenosine Receptors and the Control of Endothelial Cell Function in Inflammatory Disease. *Immunol. Lett.* **2005**, *101*, 1.
6. Haskó, G.; Linden, J.; Cronstein, B.; Pacher, P. Adenosine Receptors: Therapeutic Aspects for Inflammatory and Immune Diseases. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 759.
7. Headrick, J. P.; Peart, J. N.; Reichelt, M. E.; Haseler, L. J. Adenosine and its Receptors in the Heart: Regulation, Retaliation and Adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 1413.
8. Tabrizchi, R.; Bedi, S. Pharmacology of Adenosine Receptors in the Vasculature. *Pharm. Ther.* **2001**, *91*, 133.
9. Jarvis, M. F.; Yu, H.; Kohlhaas, K.; Alexander, K.; Lee, C. H.; Jiang, M.; Bhagwat, S. S.; Williams, M.; Kowaluk, E. A. ABT-702 (4-amino-5-(3-bromophenyl)-7-(6-morpholinopyridin-3-yl)pyrido[2, 3-d]pyrimidine), a Novel Orally Effective Adenosine Kinase Inhibitor with Analgesic and Antiinflammatory Properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *295*, 1156.
10. Sielecki, T. M.; Johnson, T. L.; J, L.; Seitz, S. P. Quinazolines as Cyclin Dependent Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1157.
11. Chattopadhyay, A.; Raghuraman, H. Application of fluorescence spectroscopy to membrane protein structure and dynamics. *Curr. Sci.* **2004**, *87*, 175.
12. Gomtsyan, A.; S, D.; C-H, L.; Stewart, A. O.; Bhagwat, S. S.; Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F. Synthesis and Biological Evaluation of Pteridine and Pyrazolopyrimidine Based Adenosine Kinase Inhibitors. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4165.

13. Rao, S. T.; Rossmann, M. G. Comparison of Super-Secondary Structures in Proteins. *J. Mol. Biol.* **1973**, *76*, 241.
14. Argos, P.; Rossmann, M. G. The Taxonomy of Binding Sites in Proteins. *Mol. Cell Biochem.* **1978**, *21*, 161.
15. Muchmore, S. W.; Smith, R. A.; Stewart, A. O.; Cowart, M. D.; Gomtsyan, A.; Matulenko, M. A.; Yu, H.; Severin, J. M.; Bhagwat, S. S.; Lee, C.-H.; Elizabeth, A.; Kowaluk, E. A.; Jarvis, M. F.; Clarissa, L.; Jakob, C. L. Crystal Structures of Human Adenosine Kinase Inhibitor Complexes Reveal Two Distinct Binding Modes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6726.
16. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*; Oxford University Press: New York, 2000; p Cap. 17.
17. Maj, M.; Singh, B.; Gupta, R. S. Structure-Activity Studies on Mammalian Adenosine Kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *275*, 386.
18. Decking, U. K. M.; Schrader, J. Role of Adenosine Kinase and AMP Deaminase in the Regulation of Cardiac Purine Release. *Drug Dev. Res.* **1998**, *45*, 295.
19. Boison, D. Adenosine Kinase, Epilepsy and Stroke: Mechanisms and Therapies. *TRENDS Pharm. Sci.* **2007**, *27*, 652-658.
20. Ujjinamatada, R. K.; Phatak, P.; Burger, A. M.; Hosmane, R. S. Inhibition of Adenosine Deaminase by Analogues of Adenosine and Inosine, Incorporating a Common Heterocyclic Base, 4(7)-Amino-6(5)H-imidazo[4,5-d]pyridazin-7(4)one. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 694.
21. Firestein, G. S. Anti-inflammatory Effects of Adenosine Kinase Inhibitors in Acute and Chronic Inflammation. *Drug Dev. Res.* **1996**, *39*, 371.
22. Linden, J. Adenosine in Tissue Protection and Tissue Regeneration. *J. Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1385.
23. Montesinos, M. C.; Desai, A.; Delano, D.; Chen, J. F.; Fink, J. S.; Jacobson, M. A.; Cronstein, B. N. Adenosine A2A or A3 Receptors are Required for Inhibition of Inflammation by Methotrexate and its Analog MX-68. *Arthritis Rheum.* **2003**, *48*, 240.
24. Moser, G. H.; Schrader, J.; Duessen, A. Turnover of Adenosine in Plasma of Human and Dog Blood. *Am. J. Physiol.* **1989**, *25*, C799.

25. Jacobson, K. A.; Kim, S.-K.; Costanzi, S.; Gao, Z.-G. Purine Receptors: GPCR Structure and Agonist Design. *Mol. Interv.* **2004**, 4, 337.
26. Williams, M.; Jarvis, M. Purinergic and Pyrimidinergic Receptors as Potential Drug Targets. *M. Biochem. Pharmacol.* **2000**, 59, 1173.
27. Linden, J. Molecular Approach to Adenosine Receptors: Receptor Mediated Mechanisms of Tissue Protection. *J. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2001**, 41, 775.
28. Suzuki, R.; Stanfa, L. C.; Kowaluk, E. A.; Williams, M.; Jarvis, M. F.; Dickenson, A. H. The effect of ABT-702, a Novel Adenosine Kinase Inhibitor, on the Responses of Spinal Neurones Following Carrageenan Inflammation and Peripheral Nerve Injury. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 132, 1615.
29. Shen, H. I.; Lusardi, T. A.; Williams-Karnesky, R. L.; Lan, J. Q.; Poulsen, D. J.; Boison, D. Adenosine Kinase Determines the Degree of Brain Injury After Ischemic Stroke in Mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2011**, 31, 1648.
30. Peart, J. N.; Gross, G. J. Cardioprotection Following Adenosine Kinase Inhibition in Rat Hearts. *Basic. Res. Cardiol.* **2005**, 100, 328.
31. Pawelczyk, T.; Podgórska, M.; Sakowicz, M. The Effect of Insulin on Expression Level of Nucleoside Transporters in Diabetic Rats. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 63, 81.
32. McGaraughty, S.; Cowart, M.; Jarvis, M. M.; Berman, R. F. Anticonvulsant and Antinociceptive Actions of Novel Adenosine Kinase. *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, 5, 43.
33. Cronstein, B. N. Adenosine and Inflammation. *Immun. Endoc. Metab. Agents Med. Chem.* **2007**, 7, 280.
34. Perner, R. J.; Gu, Y.-G.; Lee, C.-H.; Bayburt, E. K.; McKie, J.; Alexander, K. M.; Kohlhaas, K. L.; Wismer, C. T.; Mikusa, J.; Jarvis, M. F.; Kowaluk, E. A.; Bhagwat, S. S. 5,6,7-Trisubstituted 4-Aminopyrido[2,3-d]pyrimidines as Novel Inhibitors of Adenosine Kinase. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 5249.
35. Fredholm, B. B. Adenosine, an Endogenous Distress Signal, Modulates Tissue Damage and Repair. *Cell Death Differ.* **2007**, 14, 1315.
36. Haskó, G.; Cronstein, B. N. Adenosine: an Endogenous Regulator of Innate Immunity. *Trends Immunol.* **2004**, 25, 33.

37. Broxterman, H. J.; Georgopapadakou, N. H. Anticancer Therapeutics: a Durge of New Developments Increasingly Target Tumor and Stroma. *Drug. Resist. Updat* **2007**, *10*, 182.
38. Paez, J. G.; Janne, P. A.; Johnson, B. E.; Meyerson, M. EGFR Mutations in Lung Cancer:Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497.
39. Rewcastle, G. W.; Denny, W. A.; Showalter, H. D. H. Synthesis of 4-(Phenylamino)pyrimidine Derivatives as ATP-Competitive Protein Kinase Inhibitors with Potential for Cancer Chemotherapy. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 679.
40. Bos, M.; Mendelsohn, J.; Kim, Y. M. PD153035, a Tyrosine Kinase Inhibitor, Prevents Epidermal Growth Factor Receptor Activation and Inhibits Growth of Cancer Cells in a Receptor Number-dependent Manner. *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 2099.
41. Hennequin, L. F.; Allen, J.; Breed, J.; Curwen, J.; Costello, G. N-(5-Chloro-1,3-benzodioxol-4-yl)-7-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-5-(tetrahydro-2H-pyran-4-yloxy)quinazolin-4-amine, a Novel, Highly Selective,Orally Available, Dual-Specific c-Src/Abl Kinase Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6465.
42. Fry, D. W.; Kraker, A. J.; McMichael, A.; Ambroso, L. A.; Nelson, J. M.; Leopold, W. R. A Specific Inhibitor of the Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *Sci.* **1994**, *265*, 1093.
43. Levitzki, A. Protein Tyrosine Kinase Inhibitors as Novel Therapeutic Agents. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 231.
44. Fry, D. W. Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor Family of Tyrosine Kinases as an Approach to Cancer Chemotherapy: Progression from Reversible to Irreversible Inhibitors. *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 207.
45. Gomtsyan, A.; Lee, C.-H. Nonnucleoside Inhibitors of Adenosine Kinase. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 1093.
46. Tracy, S.; Greulich, H.; Gabriel, S.; Herman, P. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497.
47. Park, J.; Gupta, R. S. Adenosine Kinase and Ribokinase – the RK Family of Proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 2875.

48. Niementowski, S. Synthesen von Chinazolinverbindungen. *J. Prakt. Chem.* **1895**, 51, 564.
49. Vilsmeier, A. Über die Einwirkung von Halogenphosphor auf Alkyl-formanilide. Eine neue Methode zur Darstellung sekundärer und tertiärer p-Alkylamino-benzaldehyde. *Chem. Ber.* **1927**, 60, 119.
50. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science: New York, 2006.
51. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH, 2001.
52. Bodenreider, C.; Beer, D.; Keller, T. H.; Lim, S. P. A Fluorescence Quenching Assay to Discriminate Between Real and Non-specific Inhibitors of Dengue Virus Protease. *Anal. Biochem.* **2009**, 395, 195.
53. Pelicano, H.; Maury, G.; Elalaoui, A.; Shafiee, M.; Imbach, J.-L.; Goody, R. S. Study of the Substrate-Binding Properties of Bovine Liver Adenosine Kinase and Inhibition by Fluorescent Nucleoside Analogues. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 248, 930.
54. Lehrer, S. S. Solute Perturbation of Protein Fluorescence. Quenching of the Tryptophyl Fluorescence of Model Compounds and of Lysozyme by Iodide Ion. *Biochem.* **1971**, 10, 3254.
55. Kelley, C. T. *Iterative Methods for Optimization*; Society for Industrial and Applied Mathematics: Raleigh, 1999.
56. Eftink, M. R.; Ghiron, C. A. Fluorescence Quenching Studies with Proteins. *Anal. Biochem.* **1981**, 114, 199.
57. Elalaoui, A.; Divita, G.; Maury, G.; Imbach, J.-L.; Goody, R. S. Intrinsic Tryptophan Fluorescence of Bovine Liver Adenosine Kinase, Characterization of Ligand Binding Sites and Conformational Changes. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 221, 839.
58. Lin, M.; Nielsen, K. Binding of the Brucella abortus Lipopolysaccharide O-chain Fragment to a Monoclonal Antibody: Quantitative Analysis by Fluorescence Quenching and Polarization. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 2821.
59. Piston, D. W.; Kremers, G.-J. Fluorescence Protein FRET: the Good, the Bad and the Ugly. *TRENDS Biochem. Sci.* **2007**, 32, 407.
60. Hillisch, A.; Lorenz, M.; Diekmann, S. Recent Advances in FRET: Distance

- Determination in Protein-DNA Complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, 11, 201.
61. Vogel, S. S.; Thaler, C.; Koushik, S. V. Fanciful FRET. *Sci. Signal.* **2006**, re2, 1.
 62. Dale, R. E.; Eisinger, J.; Blumberg, W. E. The Orientational Freedom of Molecular Probes - The Orientation Factor in Intramolecular Energy Transfer. *Biophys. J.* **1979**, 26, 161.
 63. Joy, S.; Nair, P. S.; Hariharan, R.; Pillai, M. R. Detailed Comparison of the Protein-Ligand Docking Efficiencies of GOLD, a Commercial package and ArgusLab, a Licensable Freeware. *In Silico Biol.* **2006**, 6, 53.
 64. Feller, D.; Thompson, M. A.; Kendall, R. A. A Theoretical Case Study of Substituent Effects and Microsolvation on the Binding Specificity of Crown Ethers. *J. Phys. Chem. A* **1997**, 101, 7292.
 65. Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 3rd ed.; Oxford University Press: New York, 2005.
 66. Long, M. C.; Shaddix, S. C.; Moukha-Chafiq, O.; Maddry, J. A.; Nagy, L.; Parker, W. B. Structure–Activity Relationship for Adenosine Kinase from Mycobacterium tuberculosis: II. Modifications to the Ribofuranosyl Moiety. *Biochem. Pharm.* **2008**, 75, 1588.
 67. Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; Elsevier Academic Press: San Diego, 2006.
 68. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3.
 69. Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. Partition Coefficients and Their Uses. *Chem. Rev.* **1971**, 71, 525.
 70. Systems, M. I. *Comprehensive Medicinal Chemistry Database*; San Leandro, CA.
 71. MDL Information Systems - Comprehensive Medicinal Chemistry Database.
 72. Palm, K.; Stenberg, P.; Luthman, K.; Artursson, P. Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans. *Pharm. Res* **1997**, 14, 568.

73. Clark, D. E. Rapid Calculation of Polar Molecular Surface Area and its Application to the Prediction of Transport Phenomena. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 807.
74. Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment Based Contributions and its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714.
75. King, F. D. *Medicinal Chemistry*, 2nd ed.; RSC: Cambridge, 2005.
76. The PyMOL Molecular Graphics System, versão 1.2r1, DeLano Scientific, LLC.
77. UCSF Chimera, versão 1.5.2 (build 32411), Regents of the University of California.
78. ChemBio Draw Ultra, versão 11.0.1, CambridgeSoft.
79. ChemBio 3D, versão 11.0.1, CambridgeSoft.
80. ArgusLab, versão 4.0.1, Mark Thompson e Planaria Software.
81. RCSB Ligand Explorer, versão 3.9, RCSB Protein Data Bank (PDB).
82. MedChem Designer, versão 1.0.1.15, Simulations Plus, Inc.
83. Barth, H. G.; Boyes, B. E.; Jackson, C. Size Exclusion Chromatography and Related Separation Techniques. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 251R.
84. I-TASSER, Protein Structure & Function Prediction.
<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> (accessed Setembro 22, 2011).
85. Roy, A.; Kucukural, A.; Zhang, Y. I-TASSER: a Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction. *Nat. Prot.* **2010**, *5*, 725.
86. Rocco, S. A.; Barbarini, J. E.; Rittner, R. Syntheses of Some 4-Anilinoquinazoline Derivatives. *Synth.* **2004**, *3*, 429.
87. Mathematica, versão 6.0.0, Wolfram Research, Inc.
88. Clark, A. M. 2D Structure Depiction in MOE.
<http://www.chemcomp.com/journal/depictor.htm> (accessed Setembro 04, 2011).
89. Calhoun, D. B.; Vanderkoo, J. M.; Holtorn, G. R.; Englander, S. W. Protein Fluorescence Quenching by Small Molecules: Protein Penetration Versus Solvent

Exposure. *Prot. Struc. Func. Gen.* **1986**, 1, 109.

Dados Compostos

Tabela A – Dados físico-químicos e morfológicos dos compostos sintetizados.

N	Composto	P.F./°C	Aspecto Físico	M.M./g mol ⁻¹	N	Composto	P.F./°C	Aspecto Físico	M.M./g mol ⁻¹
1	8MEO-3F	162-164	Sólido Amarelo	269,27	12	8MEO-4NO ₂	245-248	Sólido Amarelo	296,28
2	8MEO-4F	193-196	Sólido Branco	269,27	13	8MEO-3ACET	170-173	Sólido Amarelo	293,31
3	8MEO-3Cl	196-198	Sólido Amarelo	285,72	14	8MEO-4ACET	235-237	Sólido Alaranjado	293,31
4	8MEO-4Cl	172-176	Sólido Branco	285,72	15	8MEO-3CH ₃	194-196	Sólido Bege	265,30
5	8MEO-3Br	175-178	Sólido Bege	330,17	16	8MEO-4CH ₃	203-206	Sólido Bege	265,30
6	8MEO-4Br	206-209	Sólido Bege	330,17	17	8MEO-3METX	174-176	Sólido Bege	281,30
7	8MEO-3I	186-190	Sólido Amarelo	377,17	18	8MEO-4METX	193-196	Sólido Bege	281,30
8	8MEO-4I	211-214	Sólido Amarelo	377,17	19	8MEO-ANL	154-156	Sólido Marrom claro	251,28
9	8MEO-3BZL	175-177	Sólido Bege	357,40	20	8MEO-CF ₃	185-188	Sólido Amarelo	319,28
10	8MEO-4BZL	177-179	Sólido Bege	357,40	21	8MEO-TRI	193-194	Sólido Amarelo	341,36
11	8MEO-3NO ₂	230-233	Sólido Amarelo	296,28	22	8MEO-DMEA	185-189	Sólido Amarelo	294,35

ANEXO 1 – ESPECTROS DE RMN DE ^1H

fabio 3-F dmsO/bbsw ago20ljuH2
ago20ljuH2

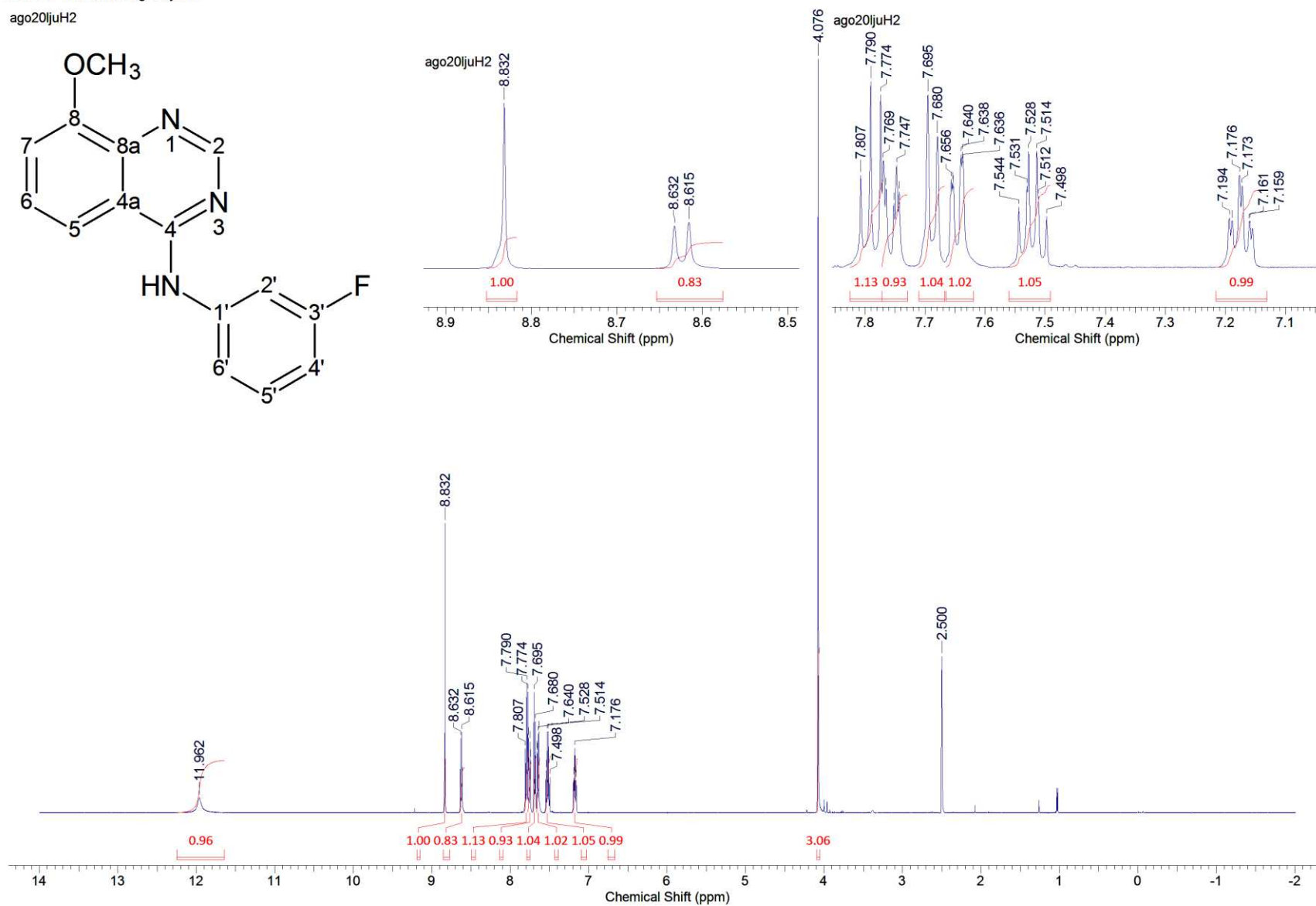
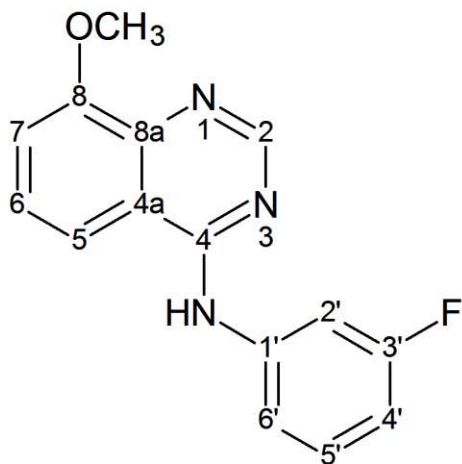


Figura A.1.1 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-3F.

Fabio "8MeO-4F" dmsO/bbsw ago10fhsH2

ago10fhsH2

ago10fhsH2

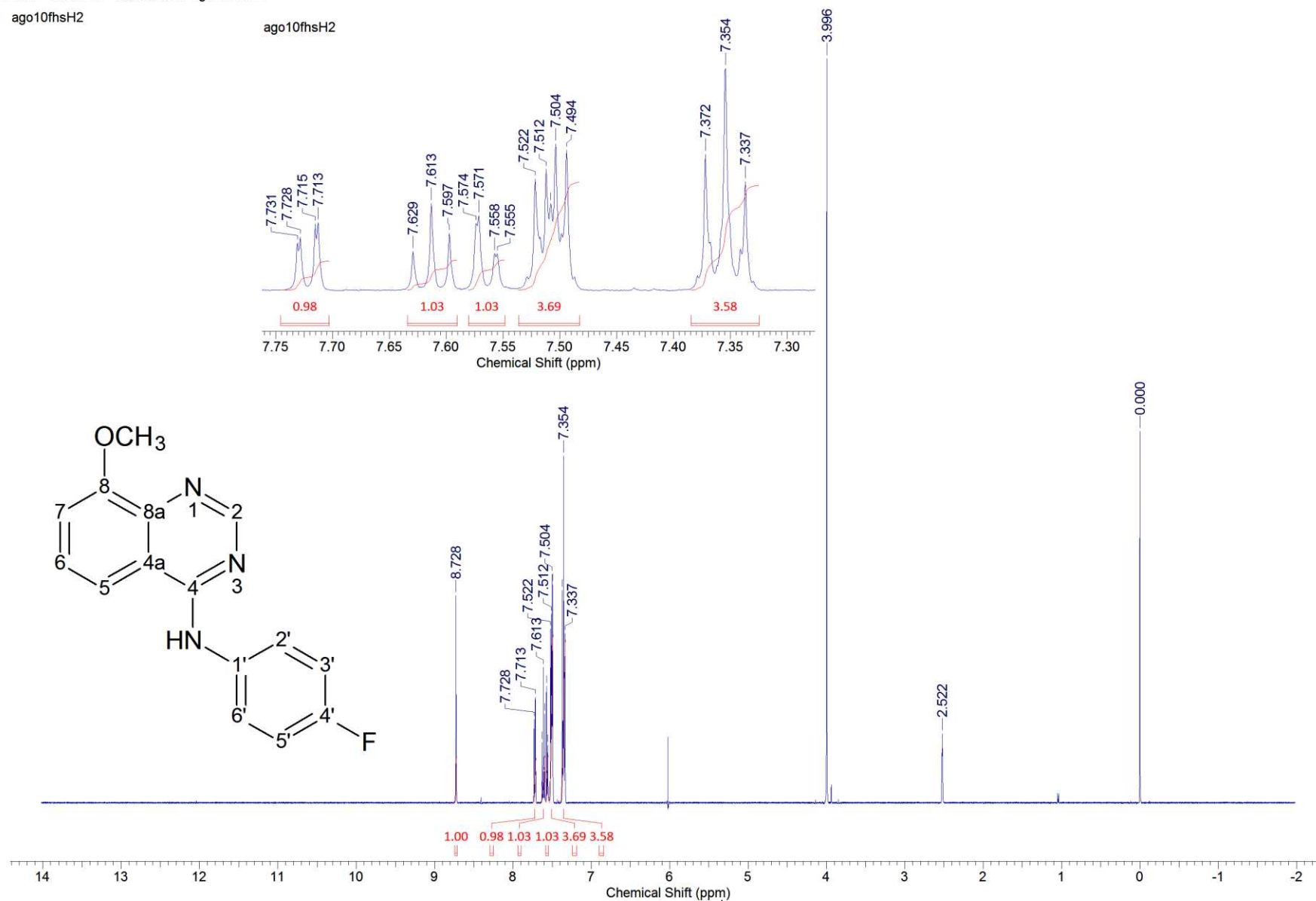
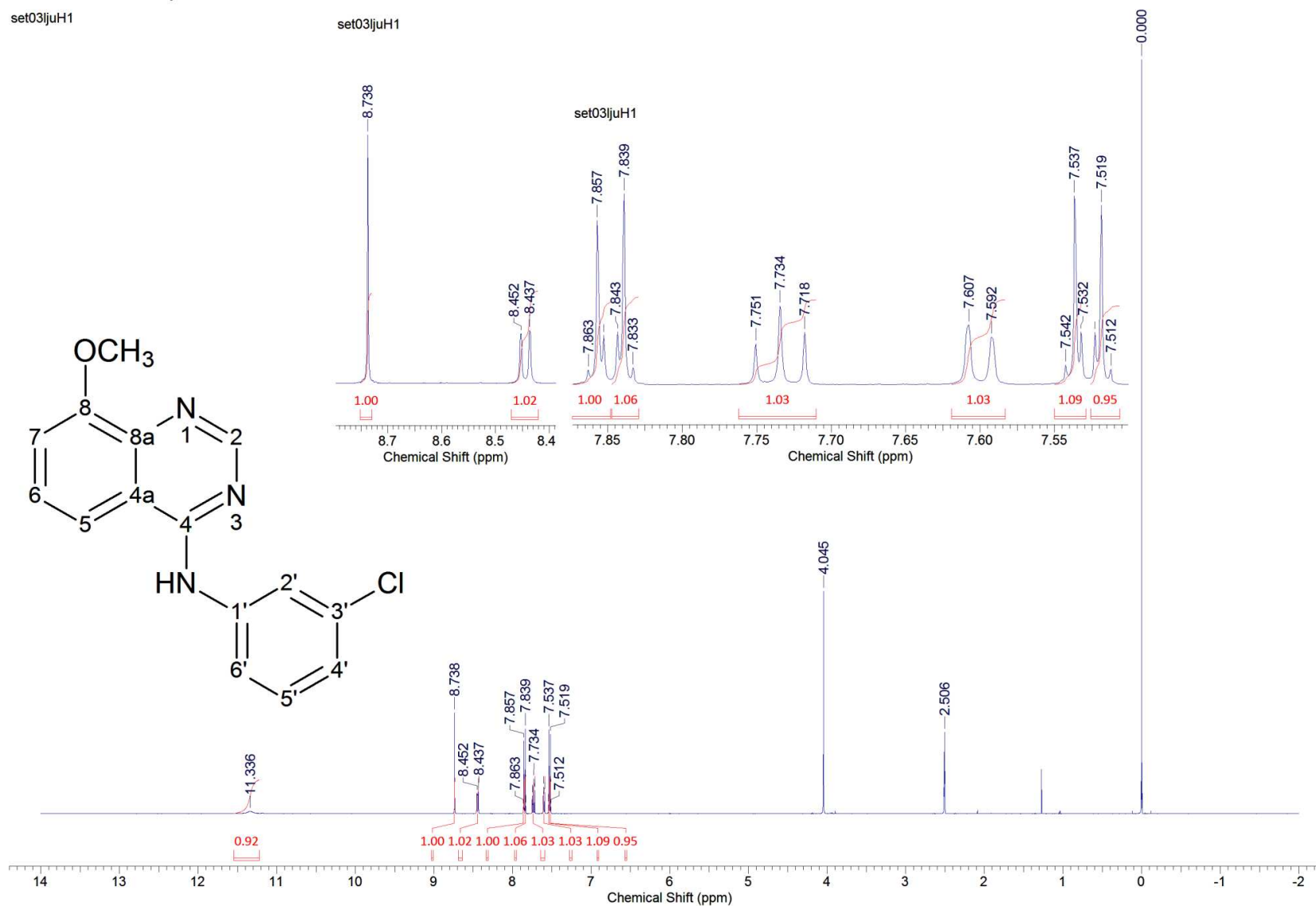


Figura A.1.2 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4F.

fabio 3-Cl dms0/bbsw set03juH1

set03juH1

Figura A.1.3 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3Cl.

fabio 4-Cl dms0/bbsw set03ljuH2
4CLset03ljuH2.esp 4CLset03ljuH2.esp

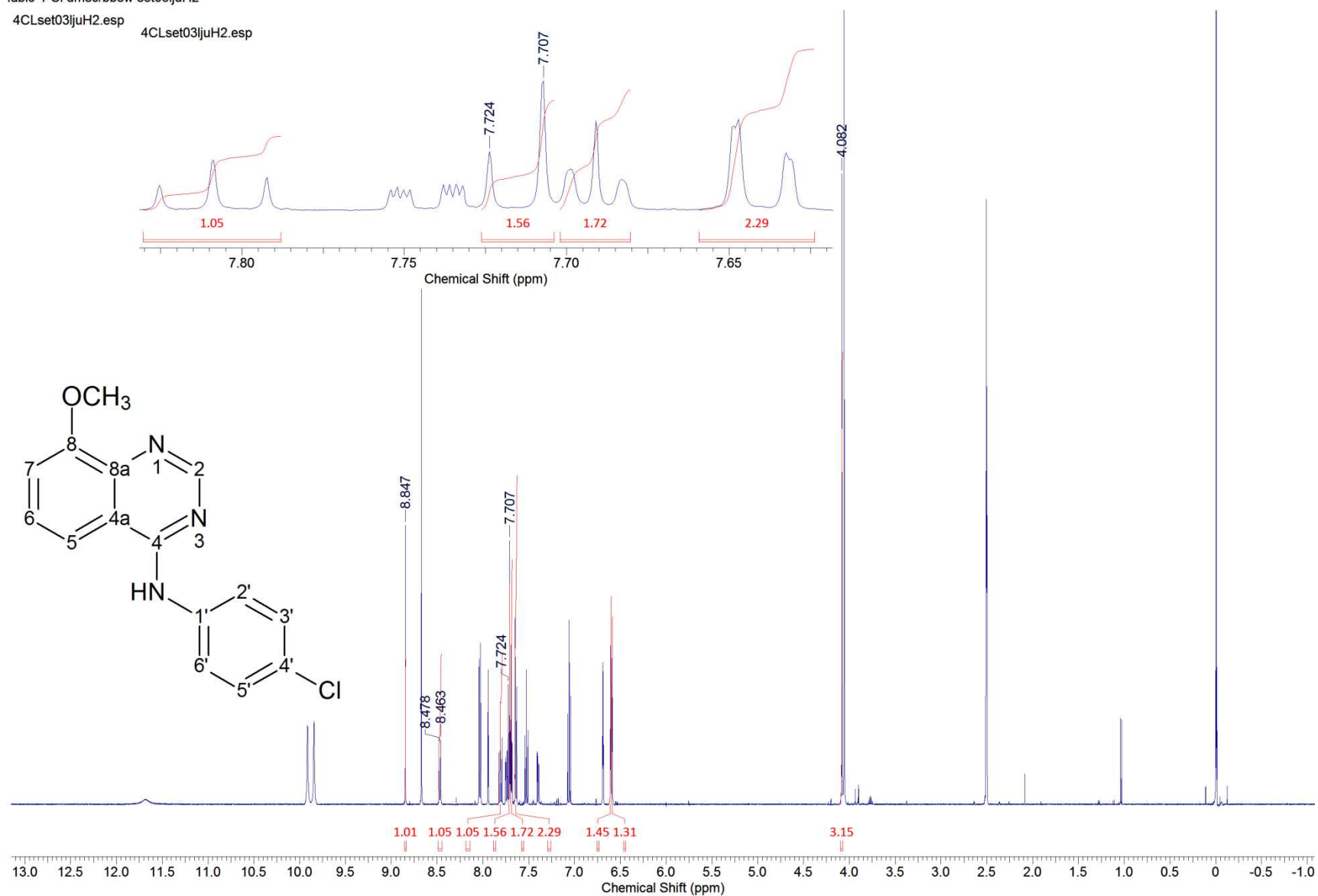


Figura A.1.4 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-4Cl.

Fabio 8MEO-3BR dmsd/bbsw ago25fhsH
ago25fhsH

ago25fhsH

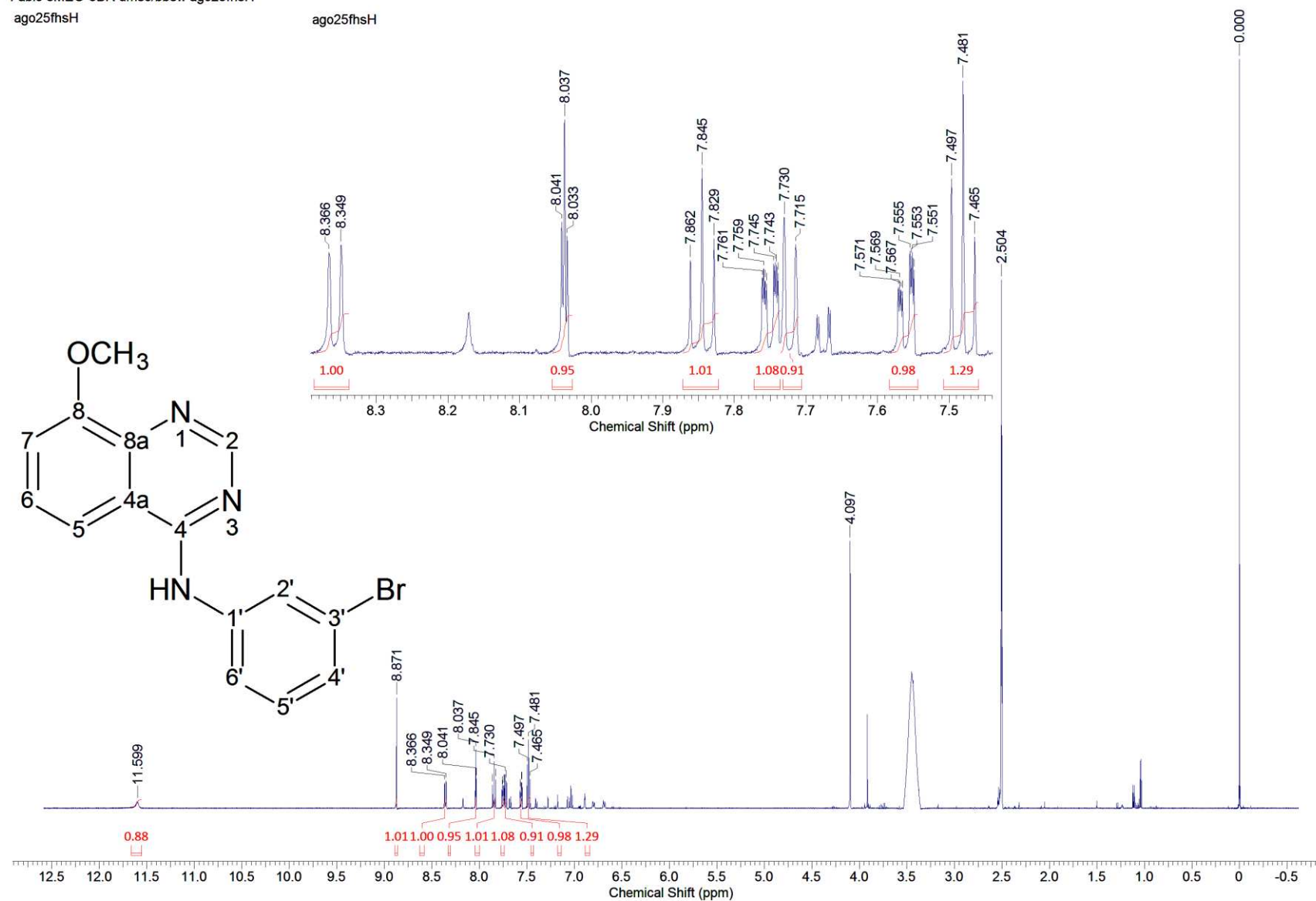


Figura A.1.5 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3Br.

Fabio "8MeO-4Br" dmso/250mhz ago08fhsH1

ago08fhsH1.001.esp

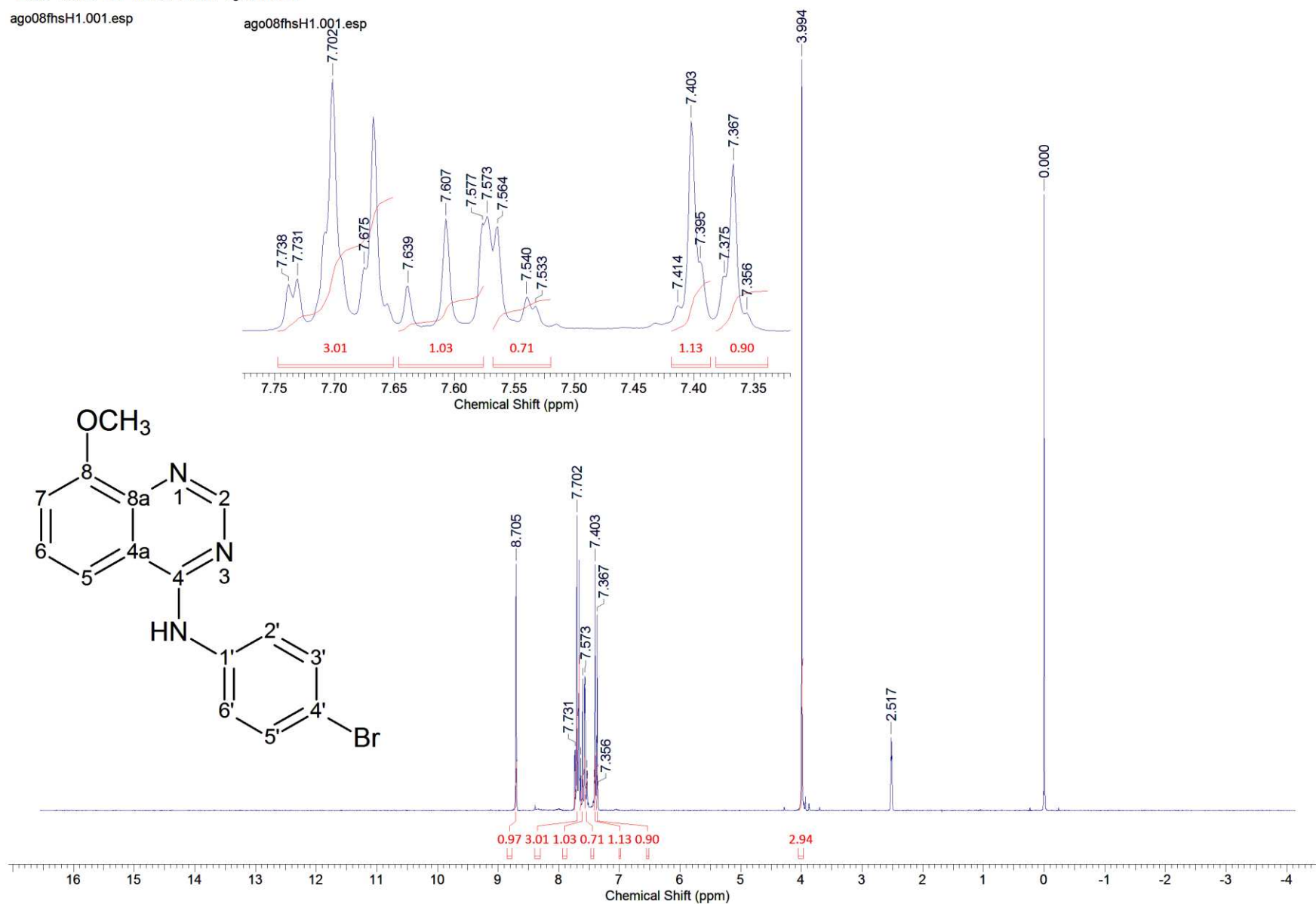


Figura A.1.6 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-4Br.

Fabio "8MeO-3i" dms0/250mhz ago08fhsH3

ago08fhsH3.001.esp

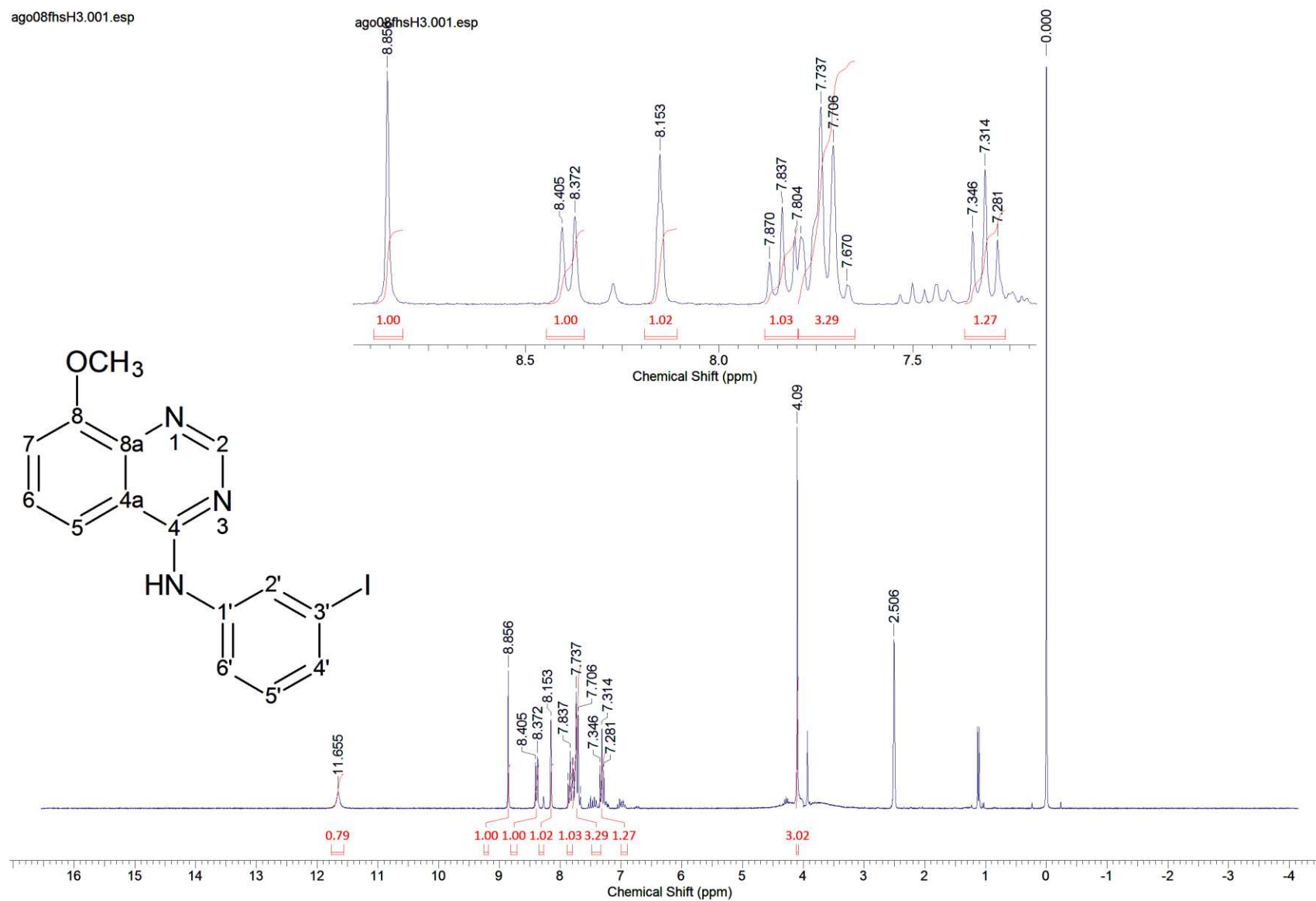


Figura A.1.7 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-3I.

fabio 8ome4l dmsol/bbsw set17ljuH1
set17ljuH1

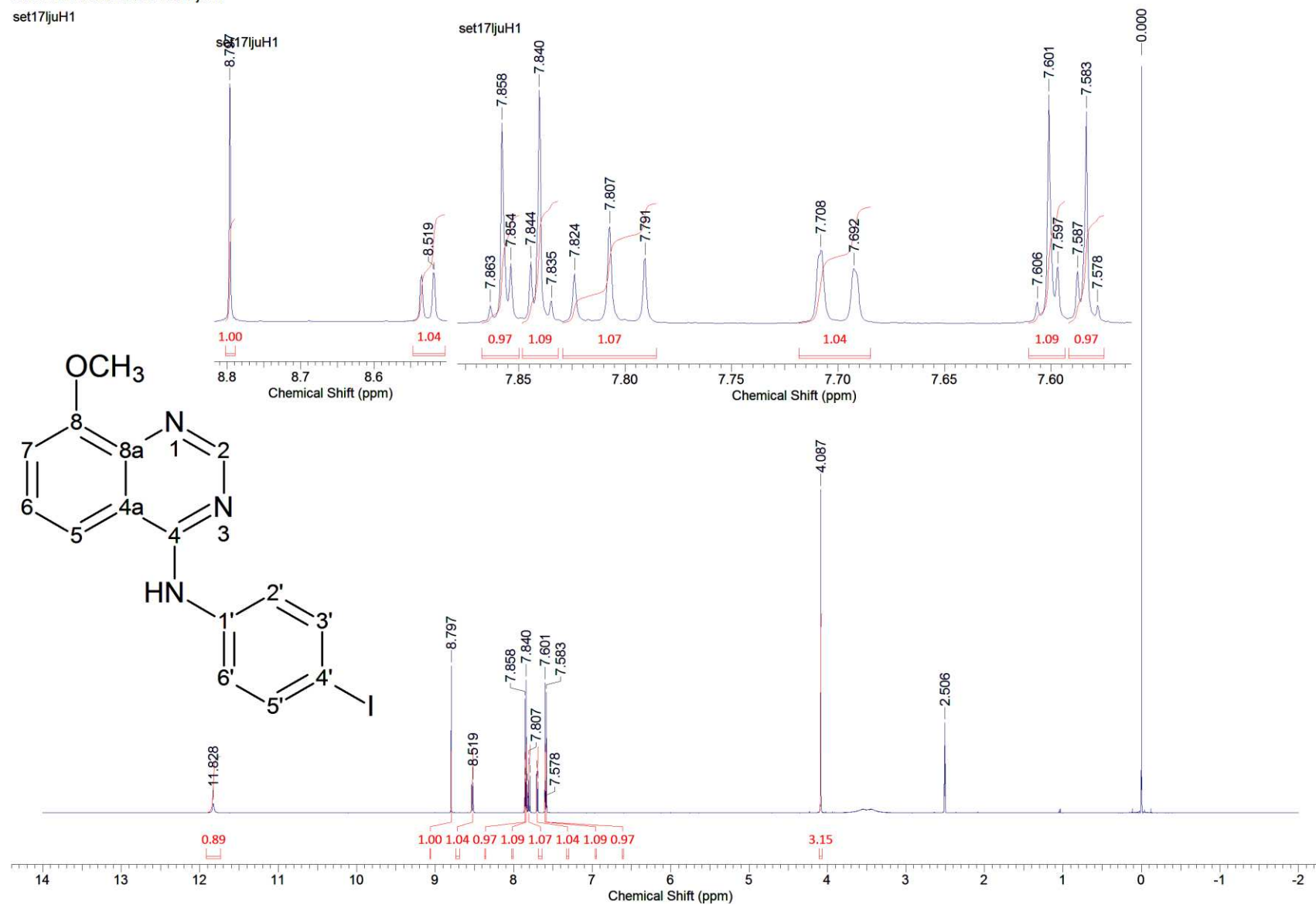
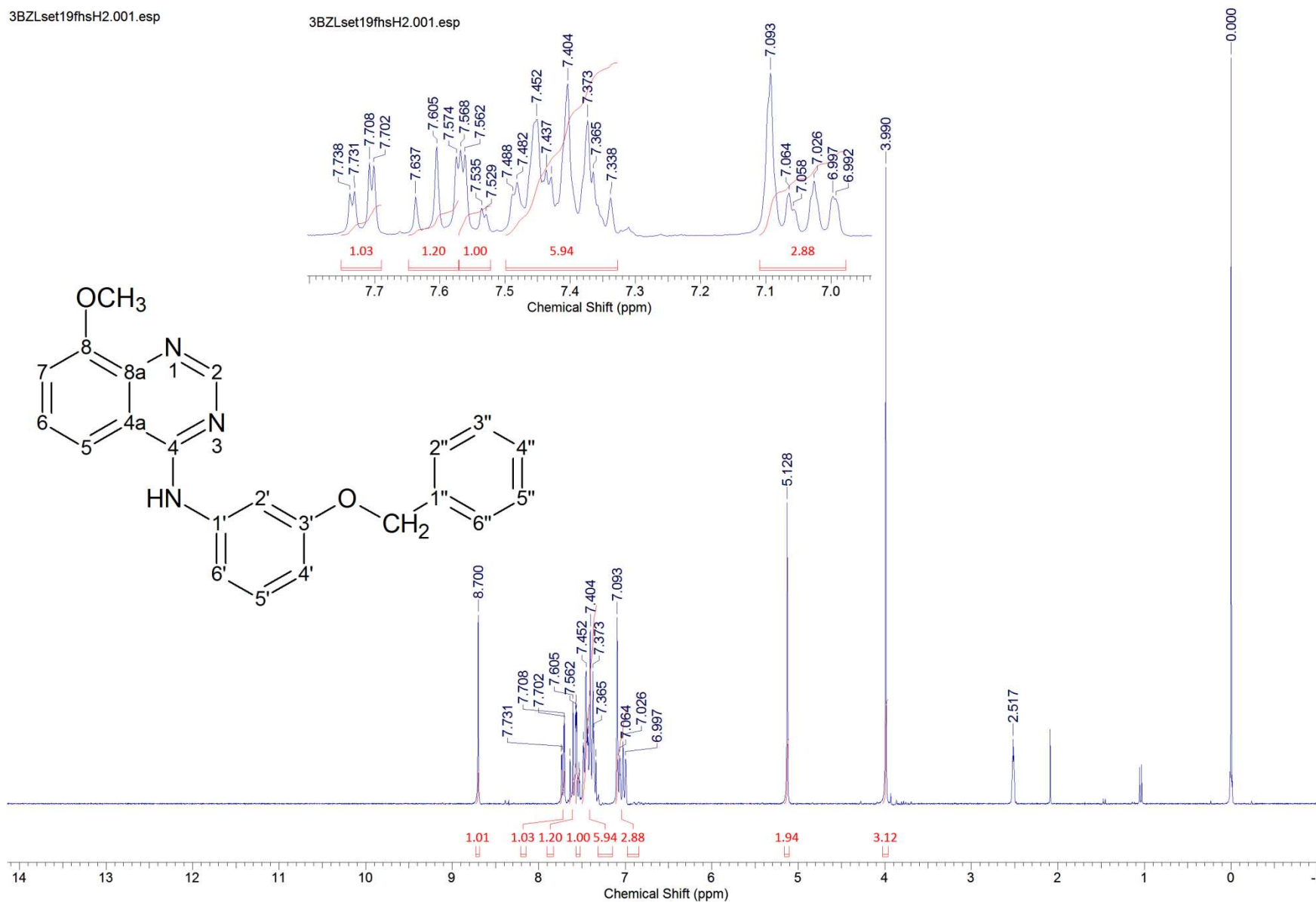


Figura A.1.8 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-4I.

Fabio "8MeO-3BZL" dmso/250mhz set19fhsH2

3BZLset19fhsH2.001.esp

3BZLset19fhsH2.001.esp

Figura A.1.9 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-3BZL.

Fabio "8MeO-4BZL" dmsol/250mhz set19fhsH1

4BZLset19fhsH1.001.esp

4BZLset19fhsH1.001.esp

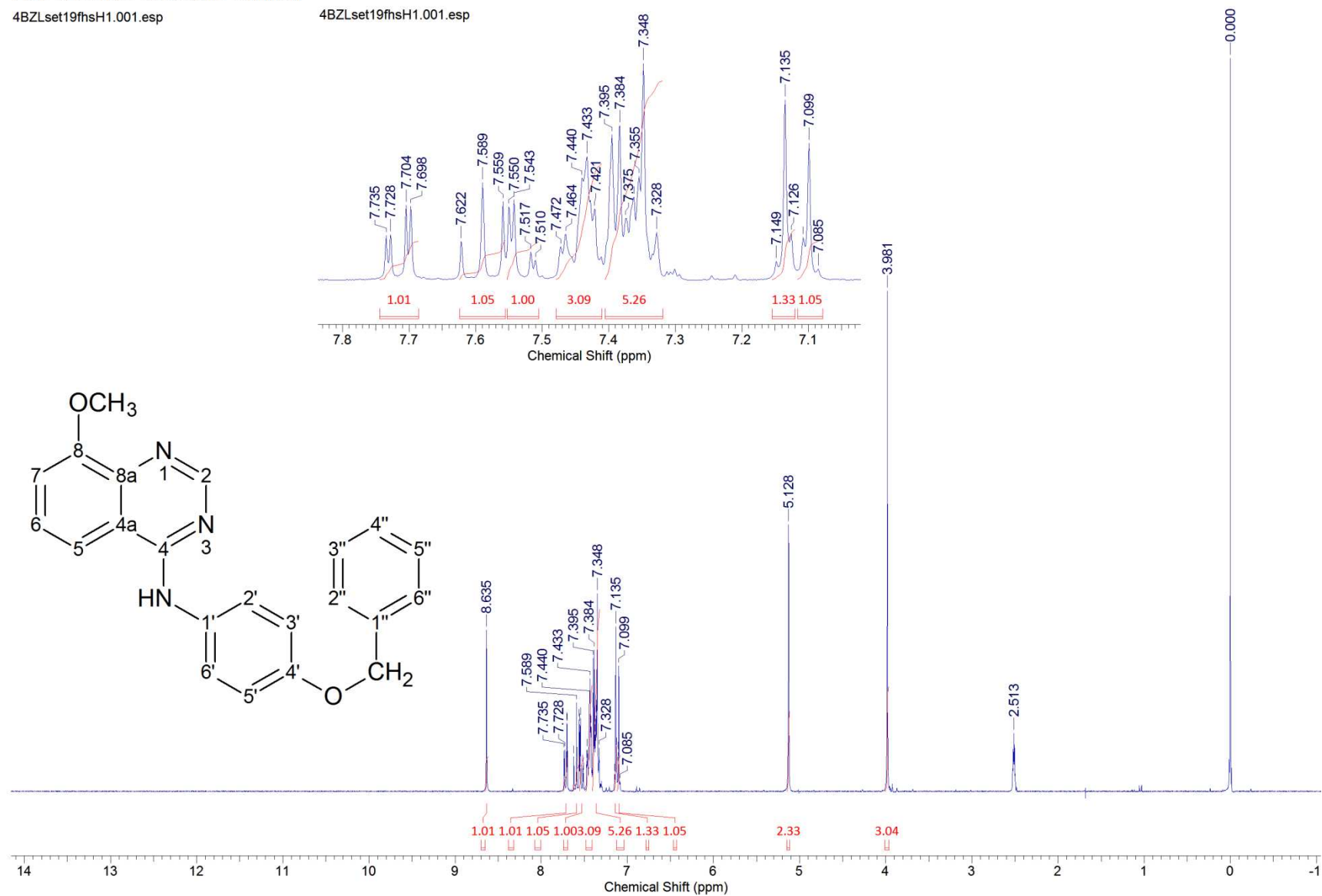


Figura A.1.10 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-4BZL.

Fabio "8MeO-3NO₂" dmsd/250mhz ago30fhsH2
ago30fhsH2.001.esp ago30fhsH2.001.esp

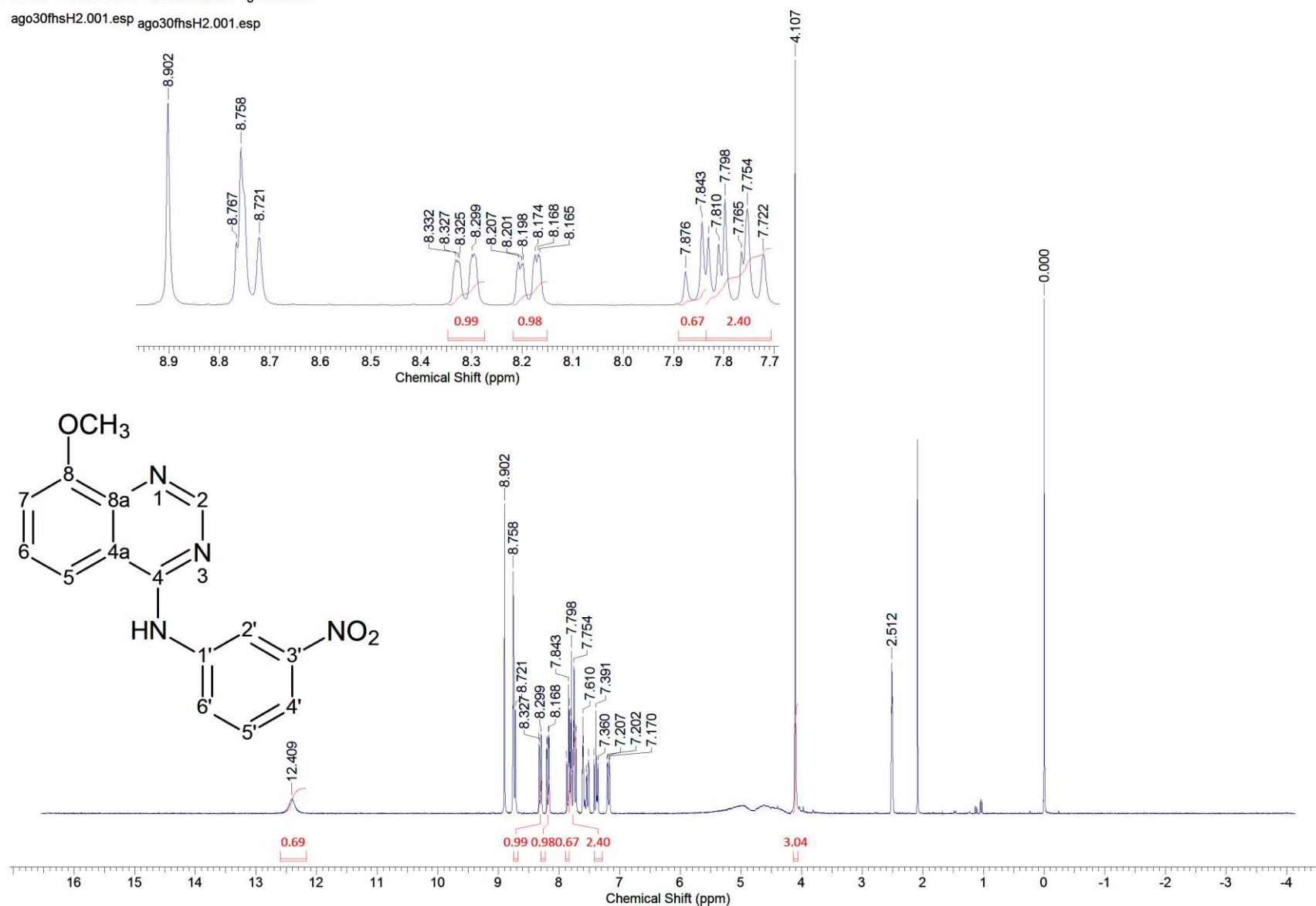


Figura A.1.11 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3NO₂.

Fabio "8MeO-4NO2" dmsd/250mhz jul21juH2

jul21juH2.001.esp jul21juH2.001.esp

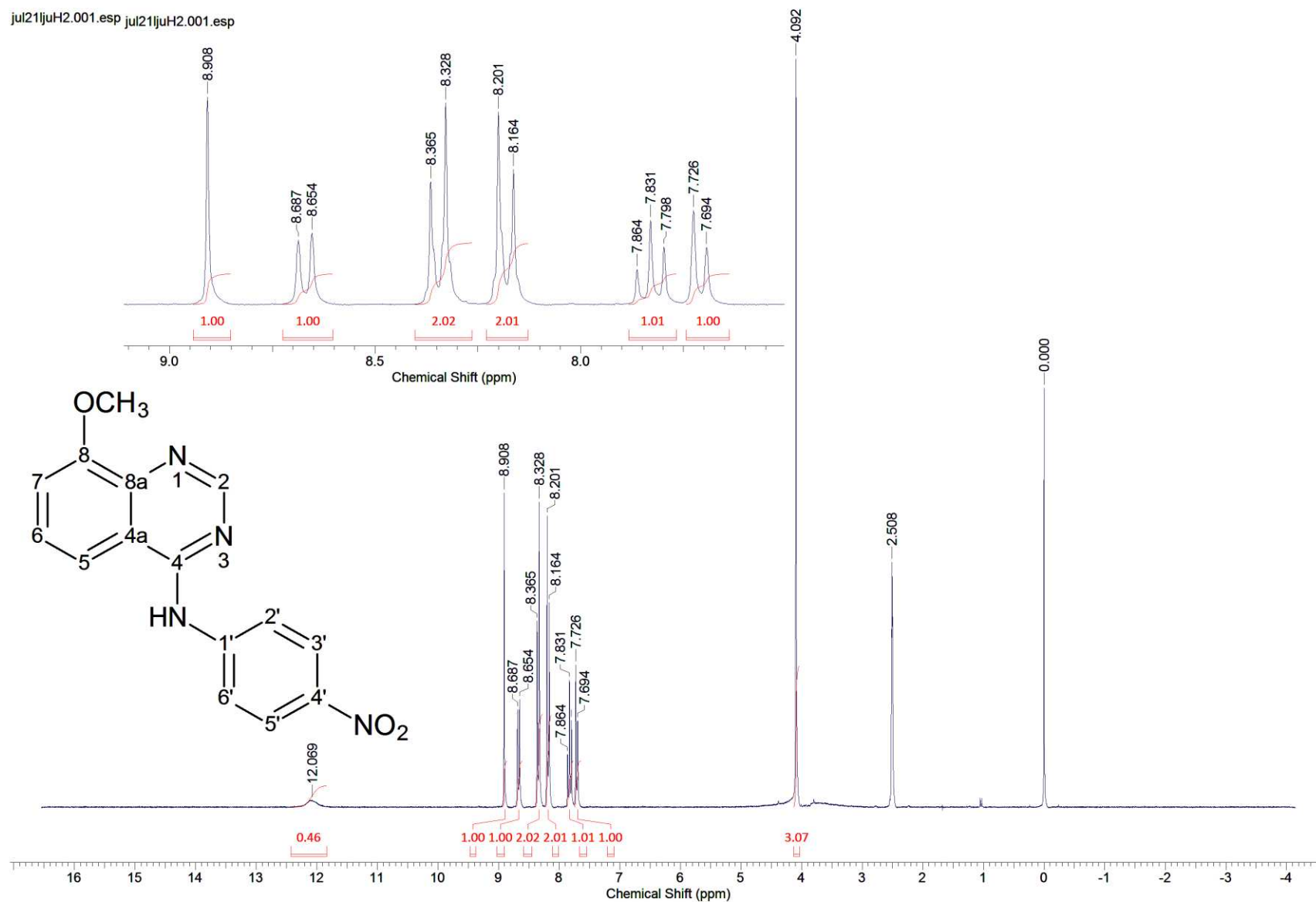


Figura A.1.12 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-4NO₂.

fabio 3-acet dmsd/tri_res ago20ljuH1
ago20ljuH1

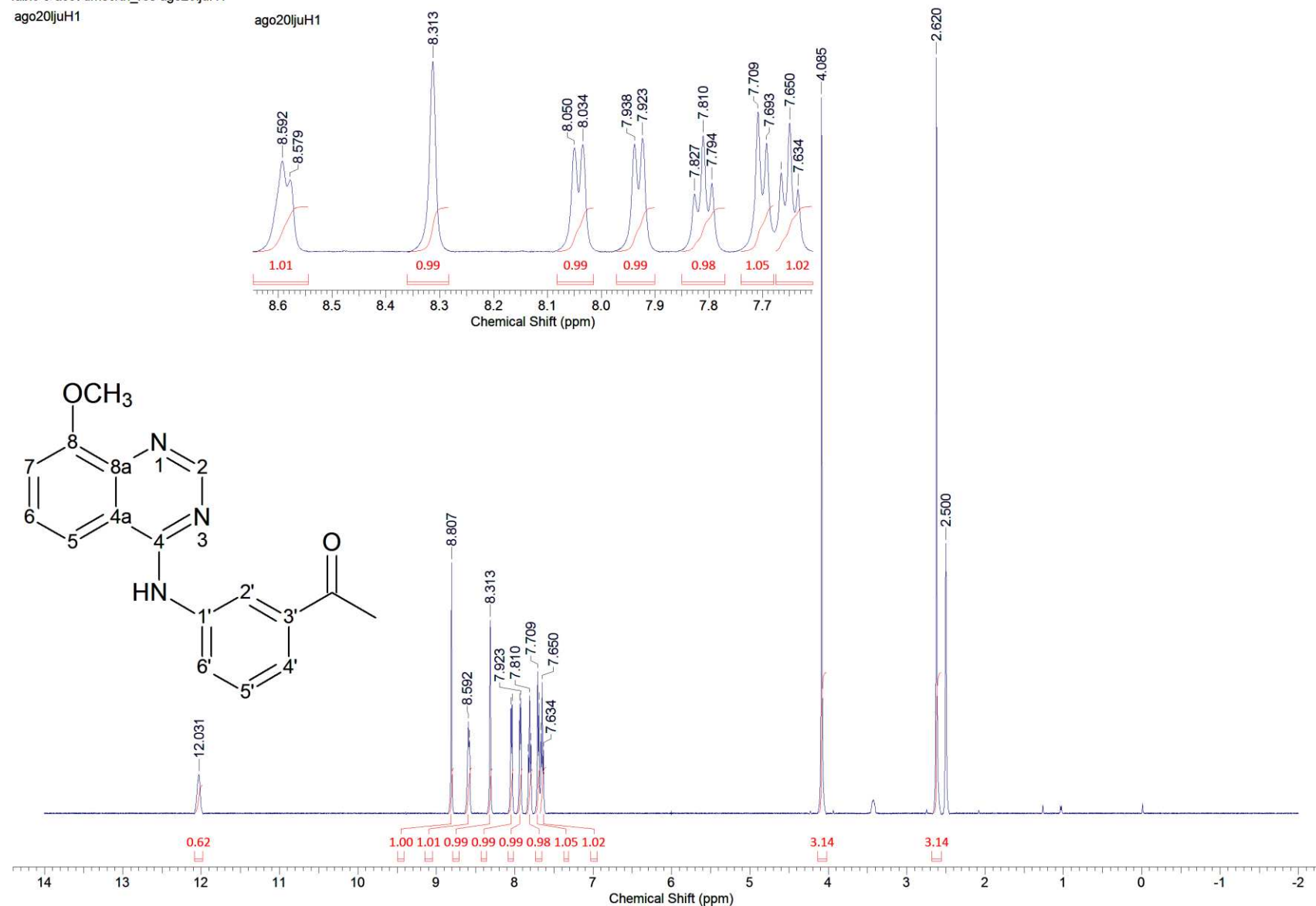


Figura A.1.13 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MEO-3ACET.

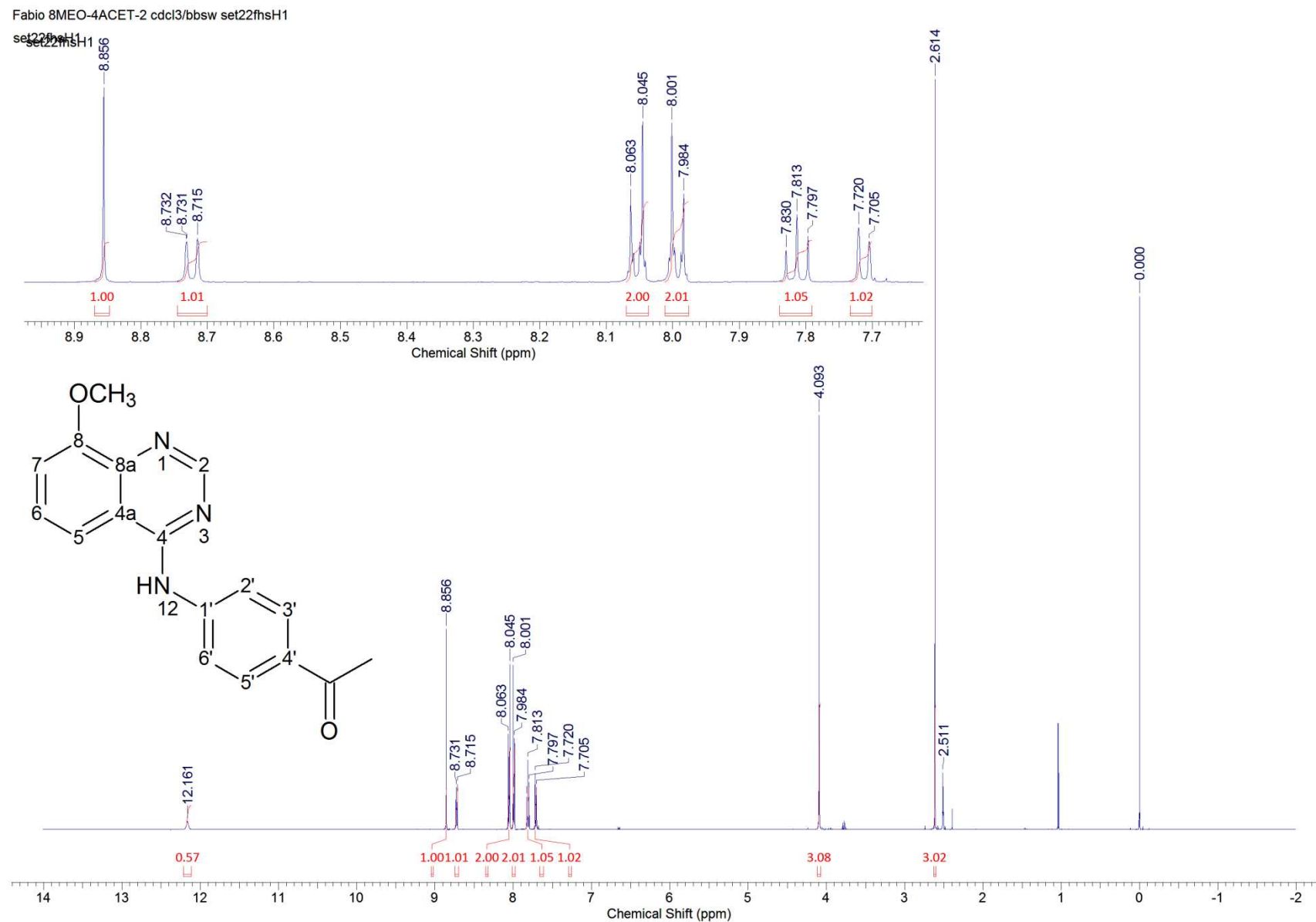


Figura A.1.14- Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-4ACET.

Fabio "8MeO-3CH3" dmsd/250mhz ago30fhsH1

3CH3ago30fhsH1.001.esp
3CH3ago30fhsH1.001.esp

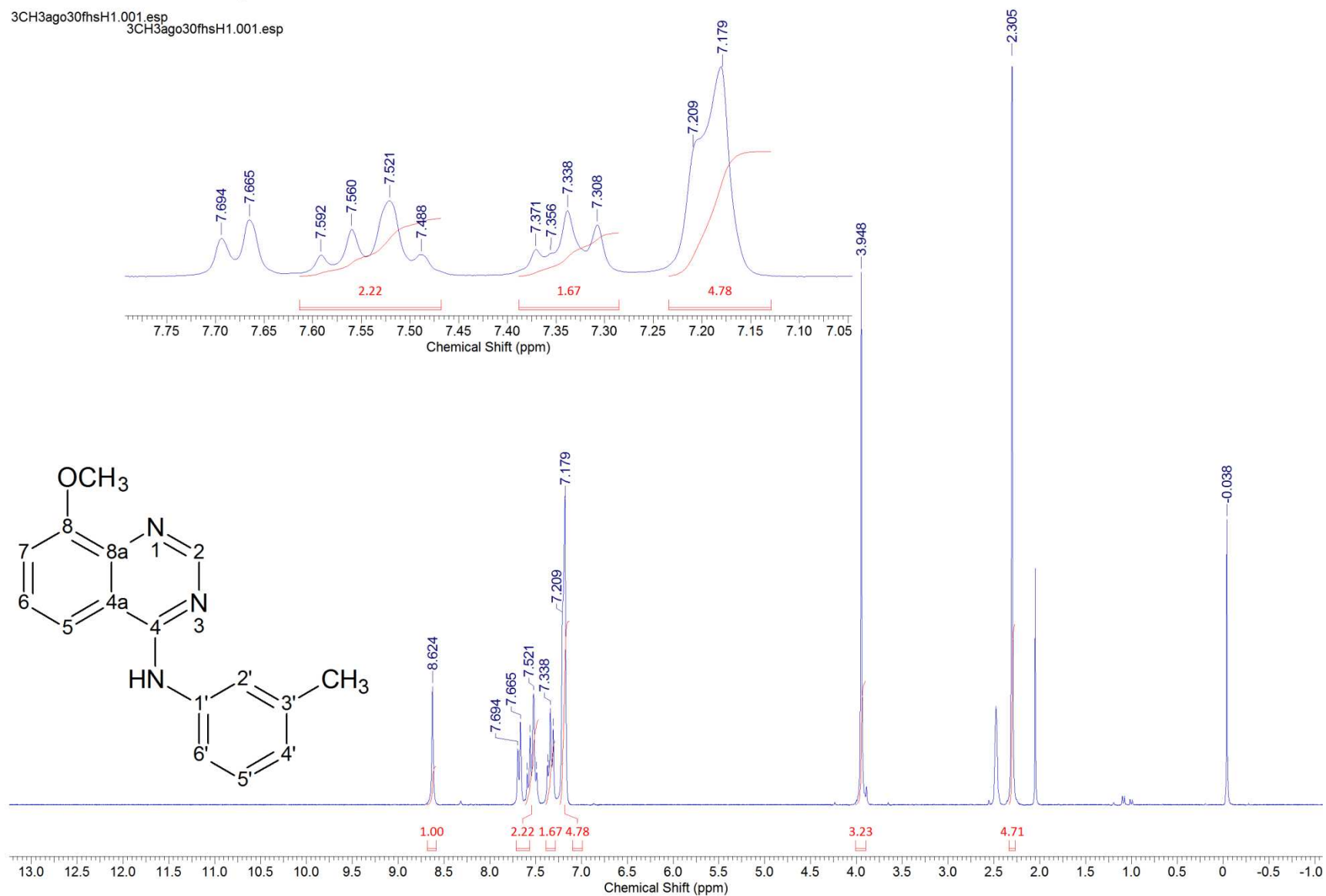


Figura A.1.15 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-3CH₃.

Fabio "8MeO-4CH3" dmsd/250mhz set08fhsH3
4CH3set08fhsH3.001.esp

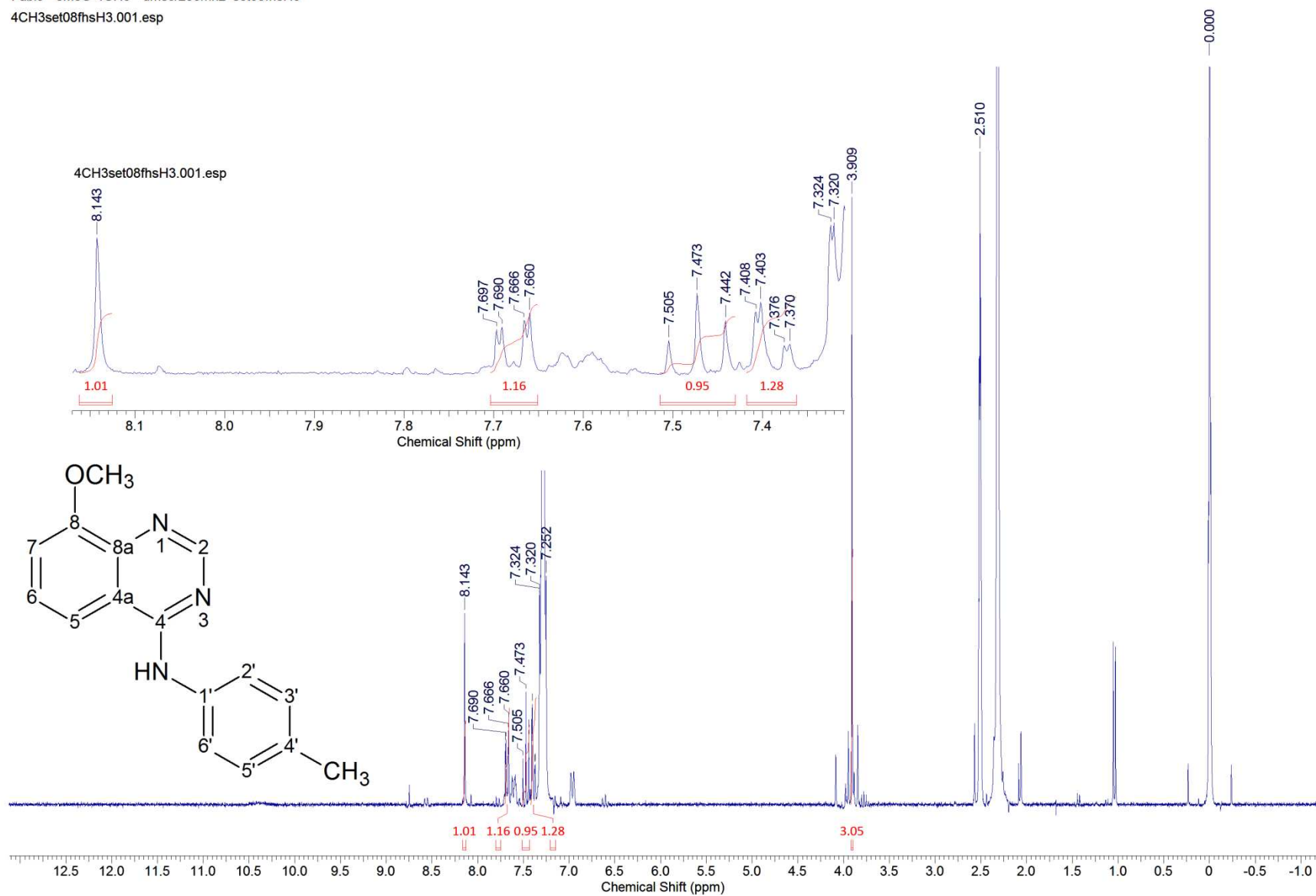


Figura A.1.16 - Espectro de RMN de ¹H do composto 8MeO-4CH₃.

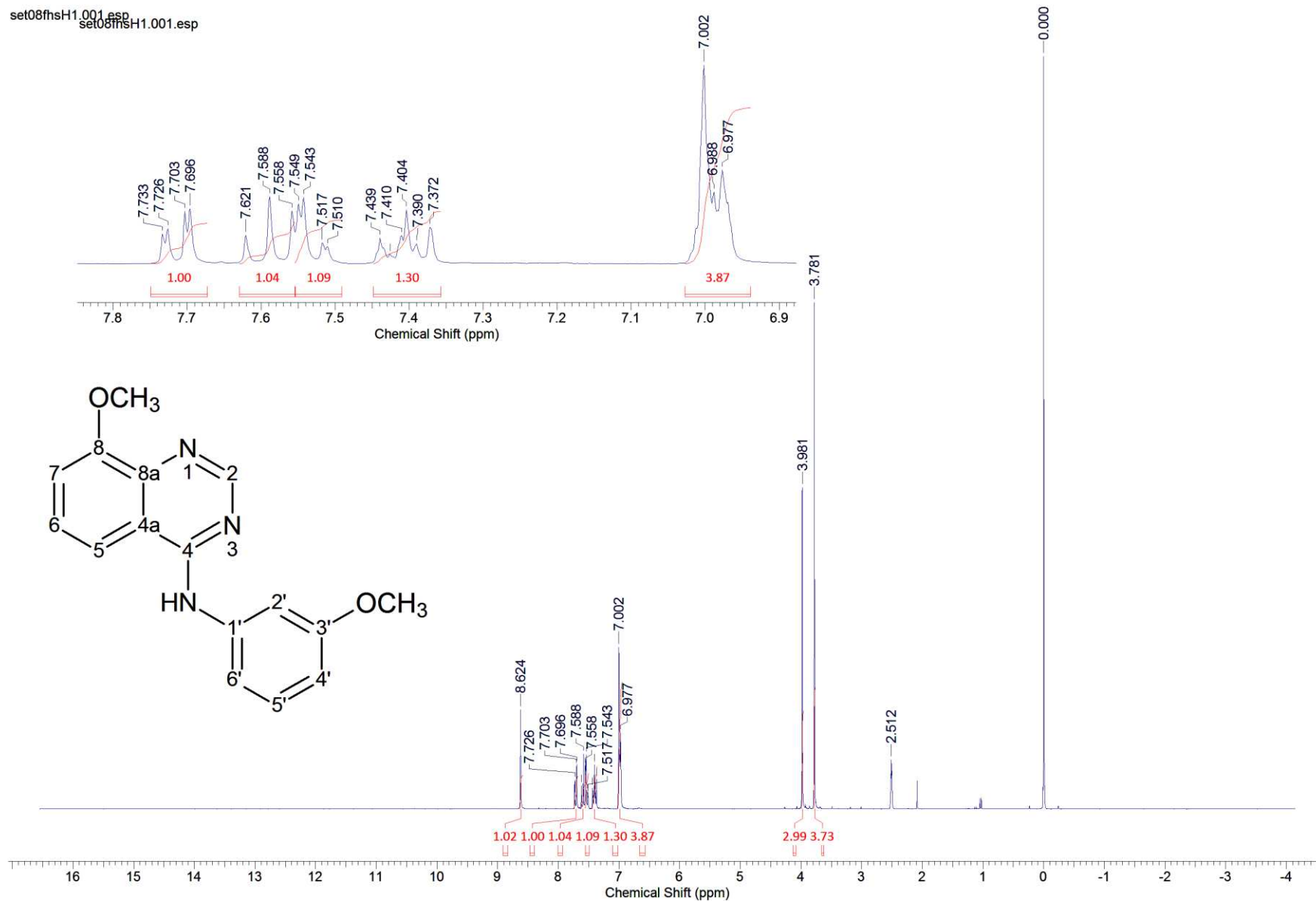


Figura A.1.17 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-3METX.

Fabio "8MeO-4MetX" dmsd/250mhz set08fhsH2
set08fhsH2.001.esp

set08fhsH2.001.esp

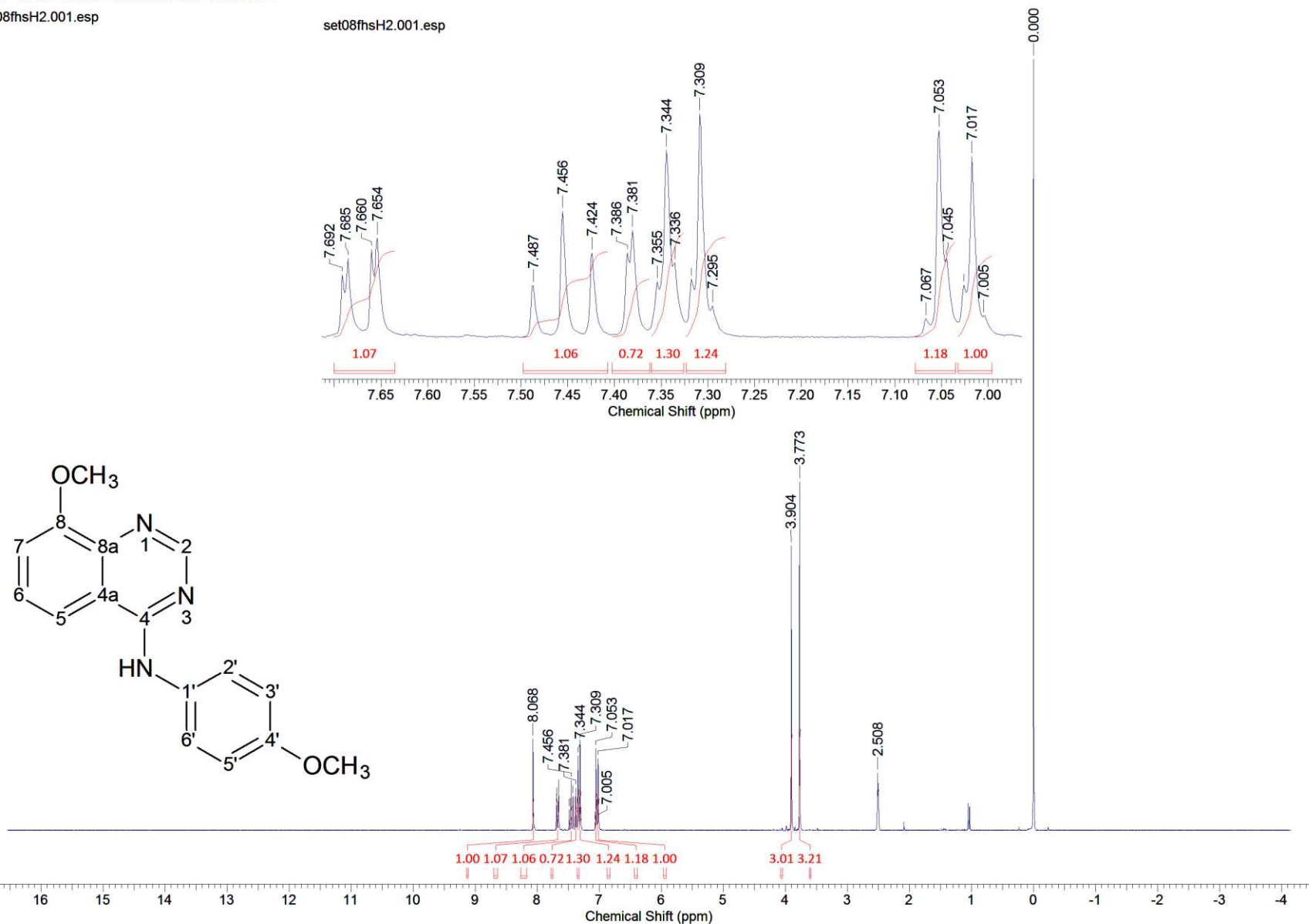


Figura A.1.18 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-4METX.

Fabio "8MeO-ANL" dmsd/250mhz ago04fhsH1
ago04fhsH1.001.esp ago04fhsH1.001.esp

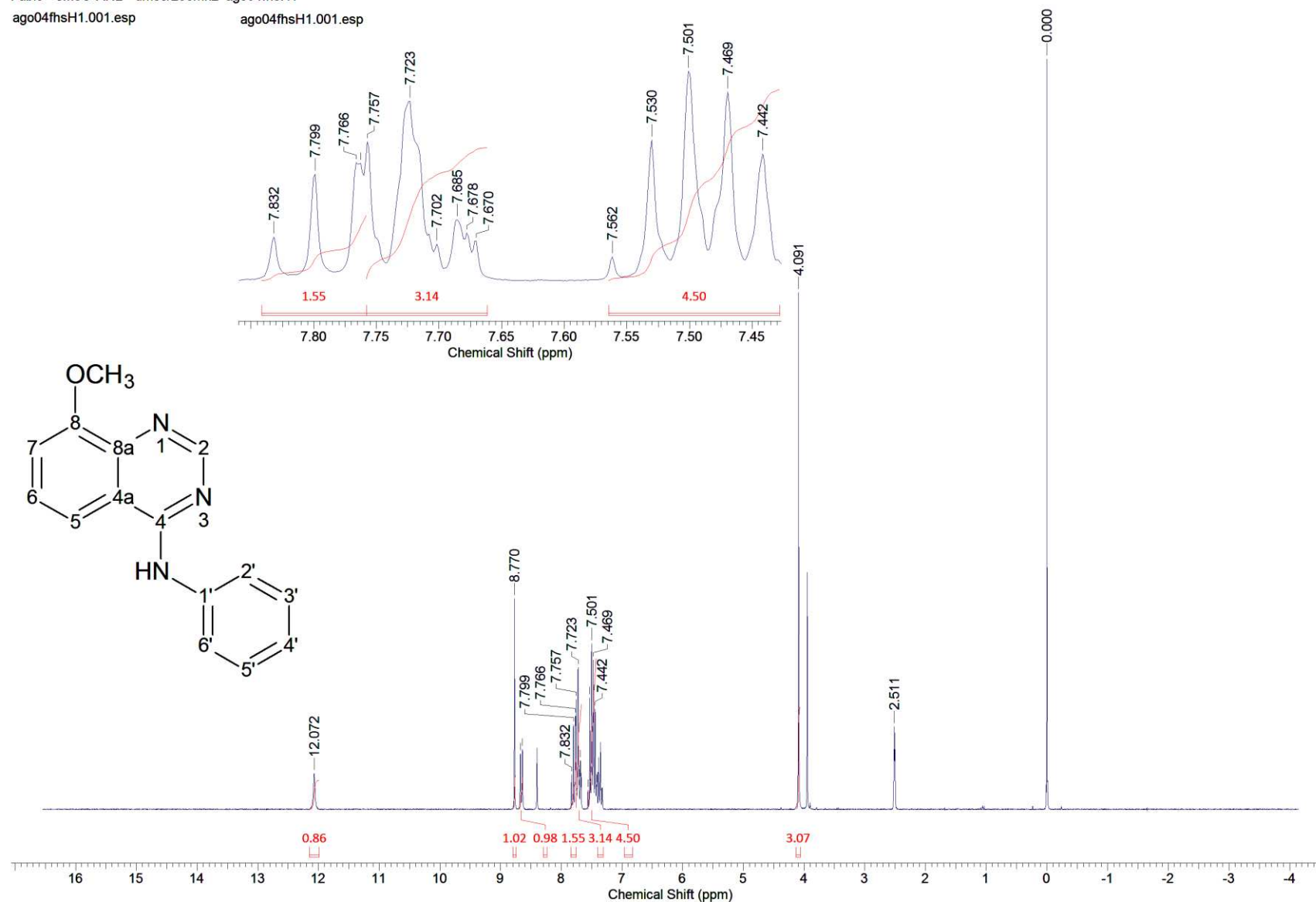


Figura A.1.19 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-ANL.

Fabio "8MeO-CF3" dmsd/250mhz ago04fhsH2

ago04fhsH2.001.esp

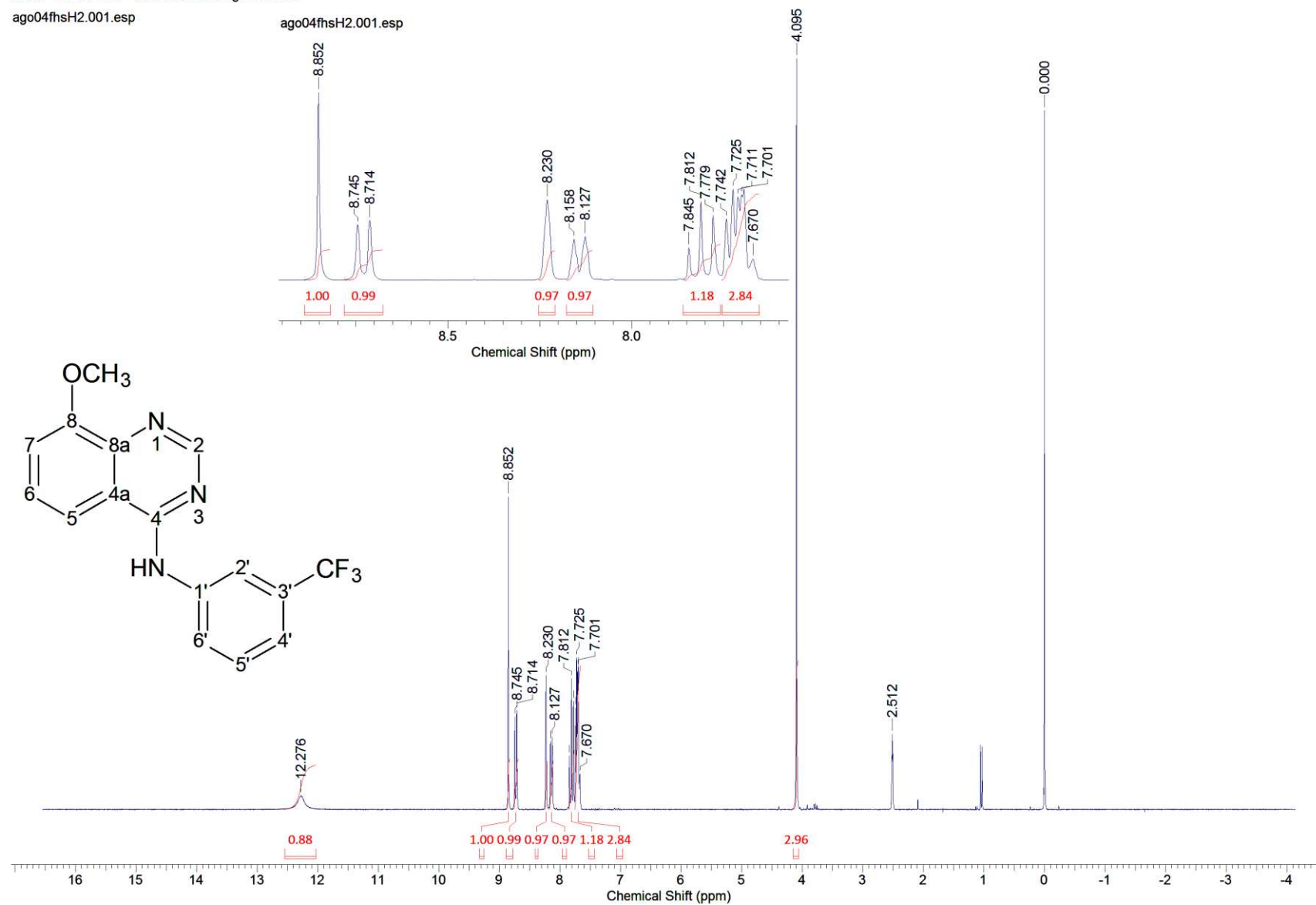


Figura A.1.20 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO- CF_3 .

Fabio "8MeO-TRI" dmsd/250mhz ago25fhsH1
ago25fhsH1.001.esp

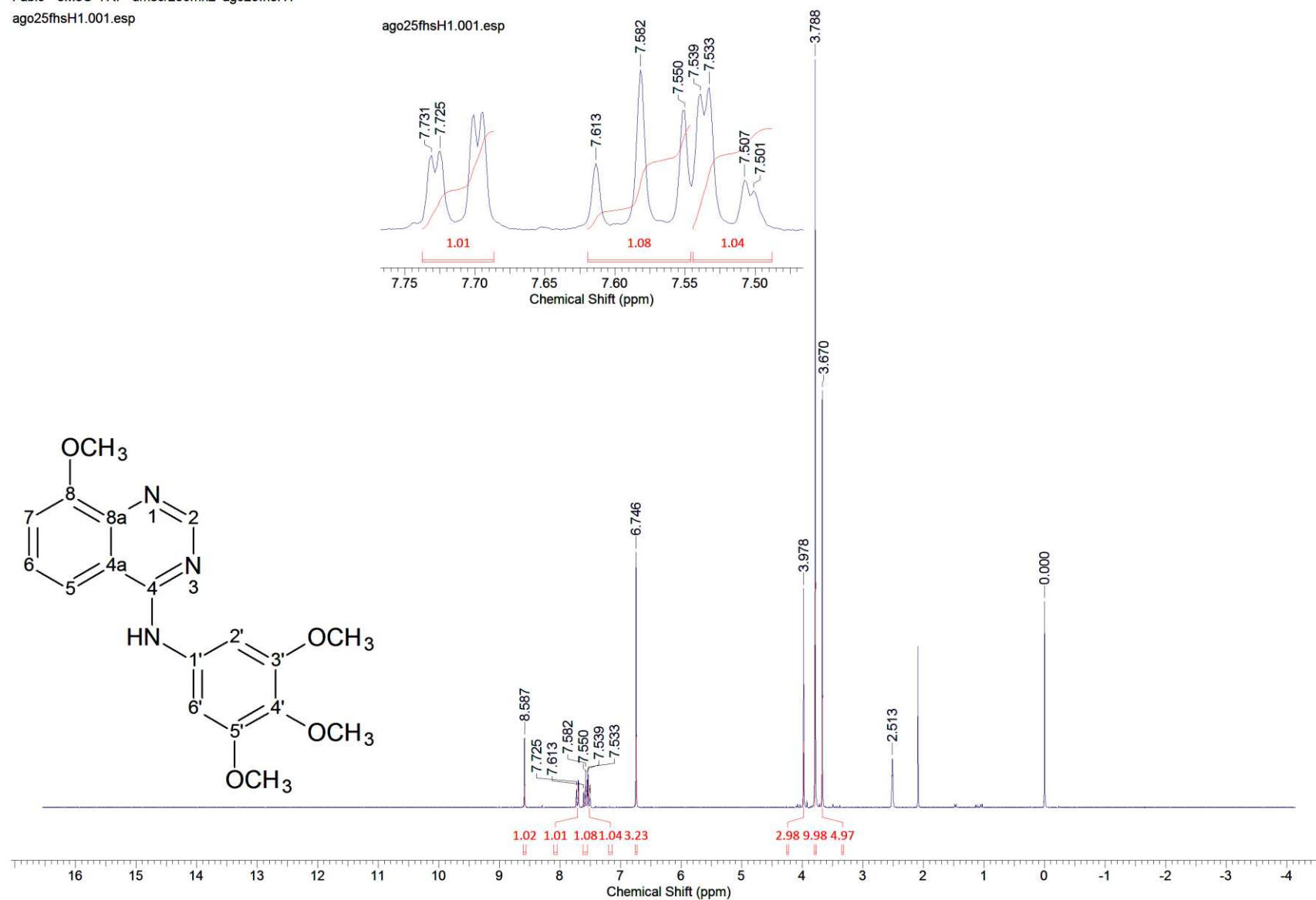


Figura A.1.21 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-TRI.

Fabio "8MEO-DMEA" dmsobbsw ago03fhsH
ago03fhsH

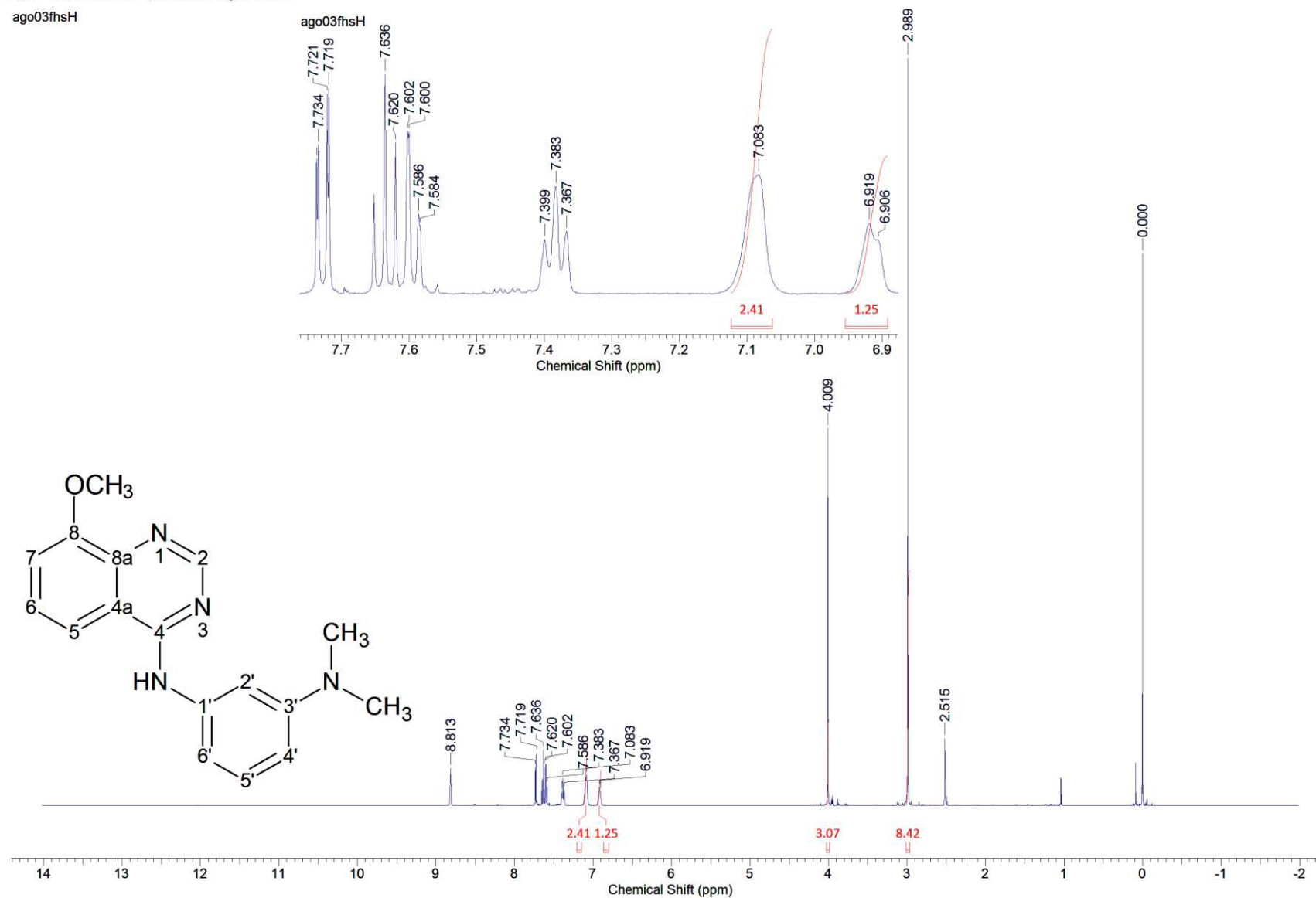


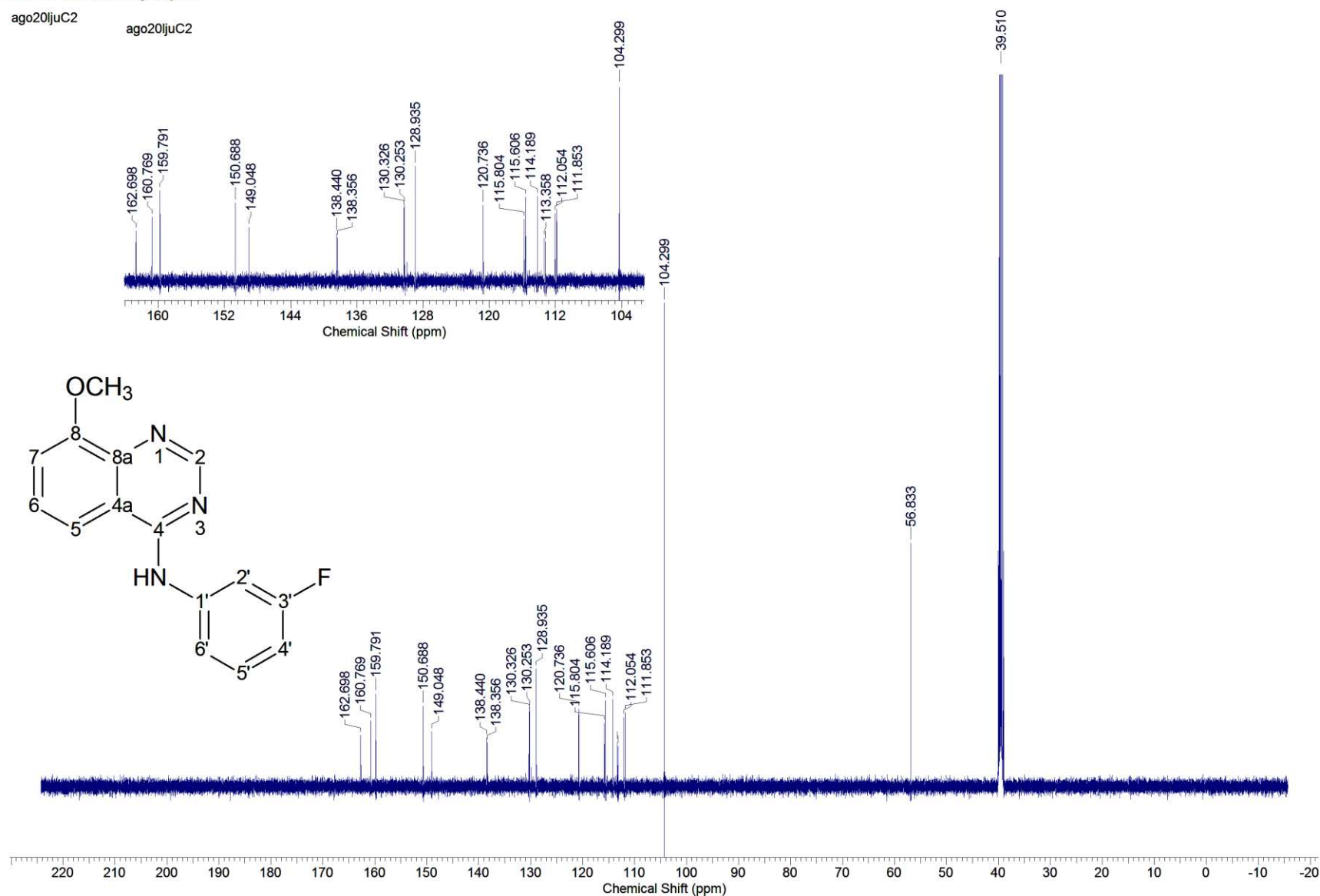
Figura A.1.22 - Espectro de RMN de ^1H do composto 8MEO-DMEA.

ANEXO 2 – ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C

fabio 3-F dmsol/bbsw ago20ljuC2

ago20ljuC2

ago20ljuC2

Figura A.2.1 - Espectro de RMN de ¹³C do composto 8MEO-3F.

Fabio "8MeO-4F" dmsol/bbsw ago10fhsC2

ago10fhsC2

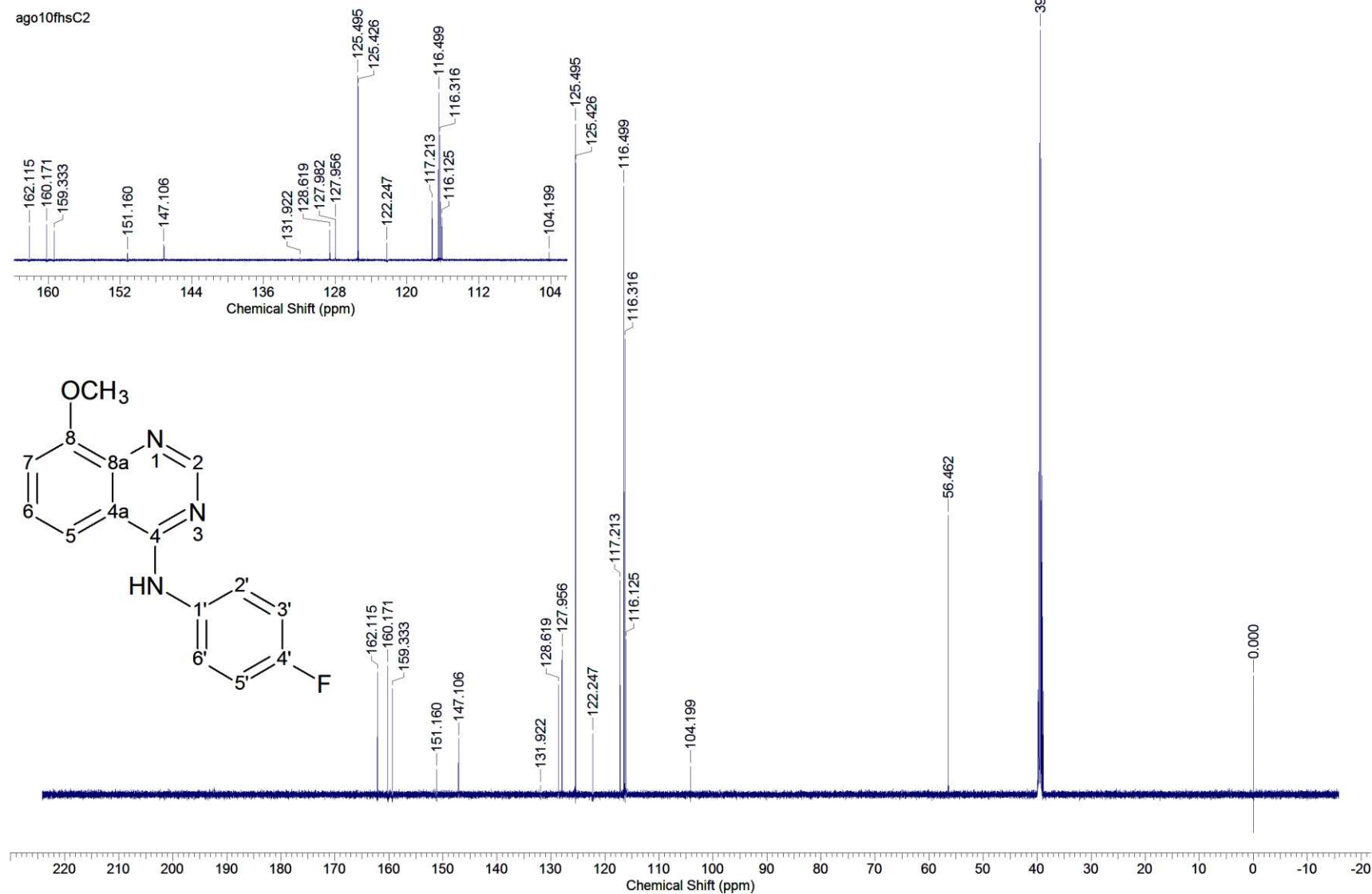


Figura A.2.2 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4F.

Fabio 3-Cl dmsobbsw set04ljuC
set04ljuC

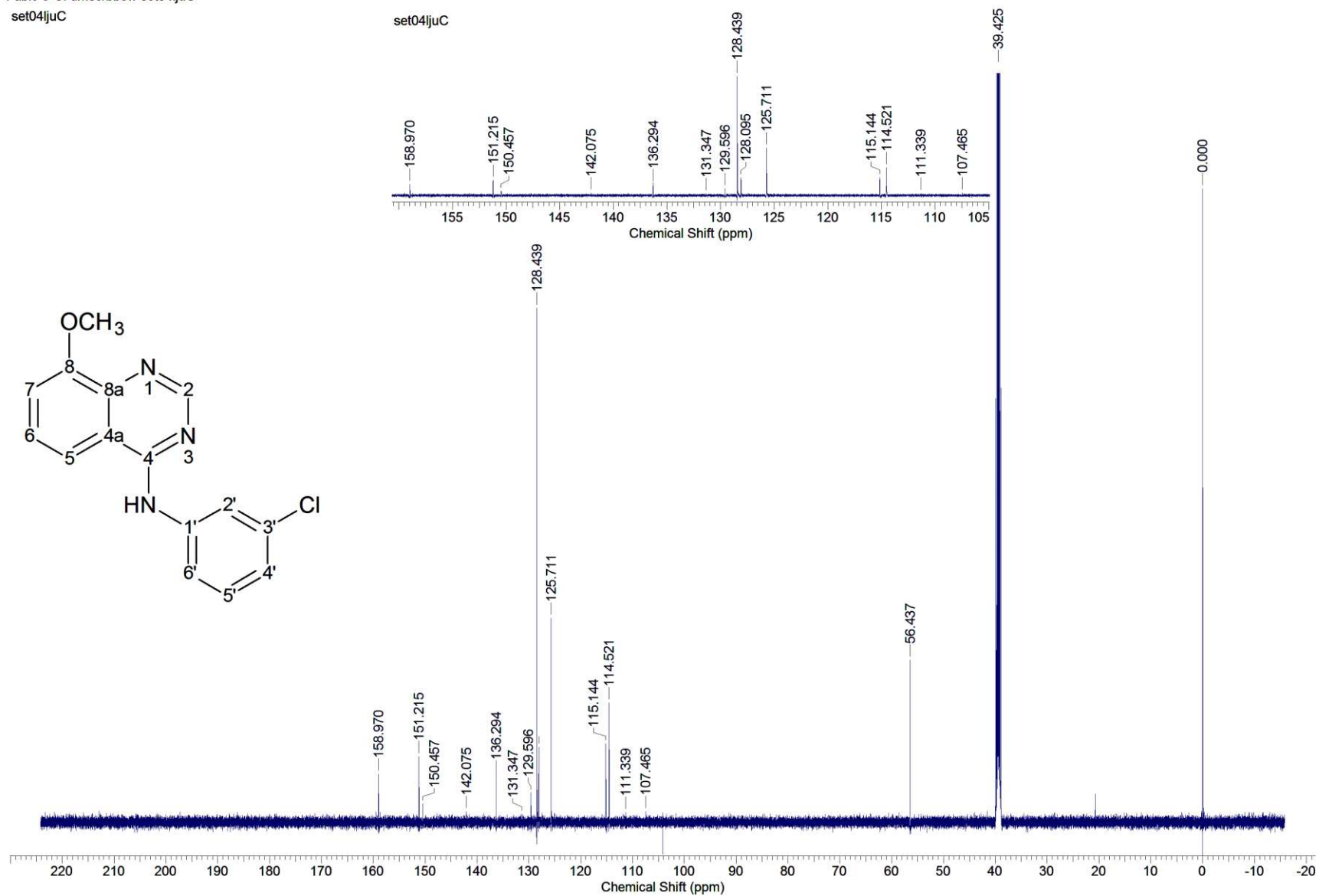
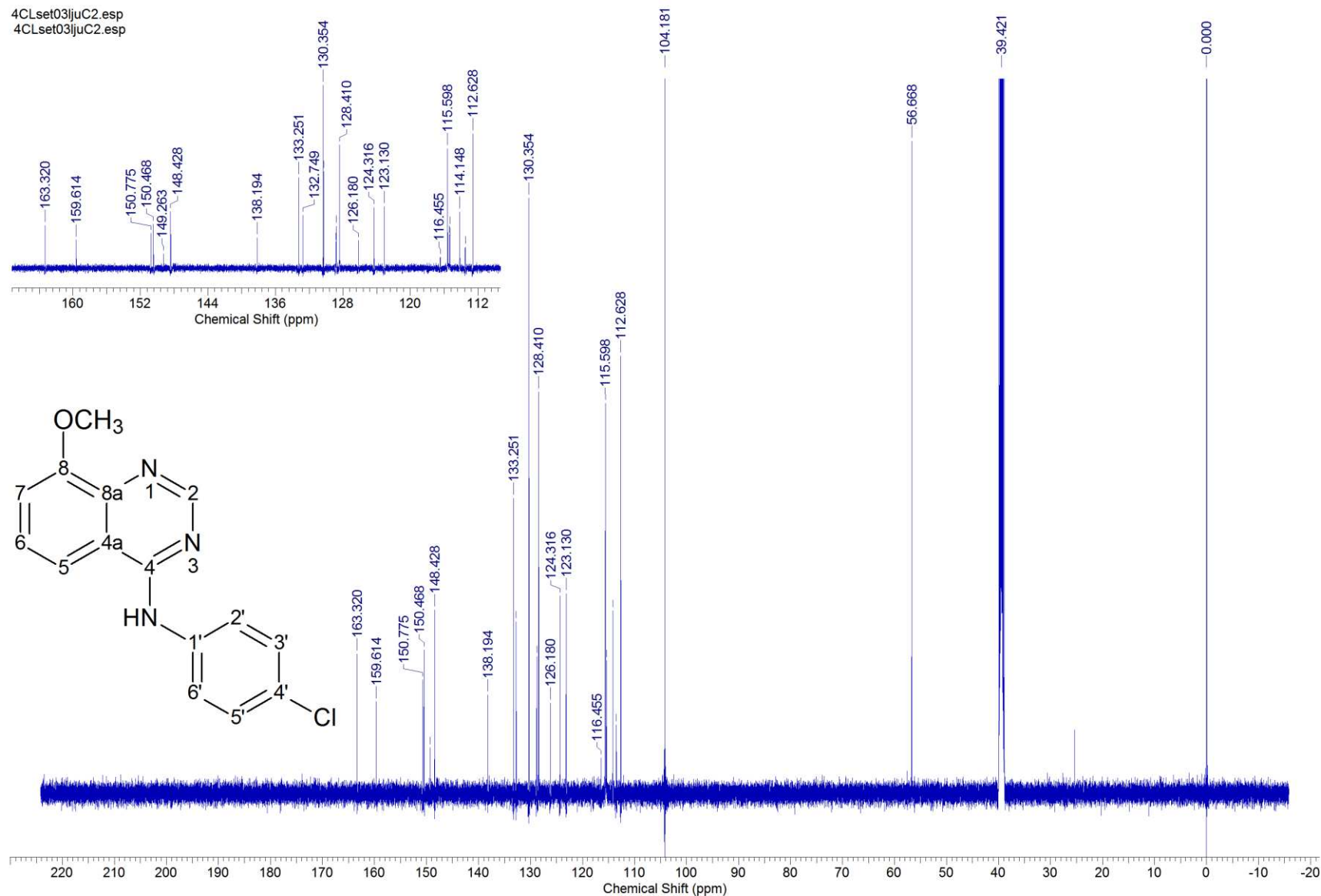


Figura A.2.3 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3Cl.

fabio 4-Cl dmsol/bbsw set03ljuC2

4CLset03ljuC2.esp

4CLset03ljuC2.esp

Figura A.2.4 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4Cl.

Fabio "8MEO-3Br" DMSO/BBSW jul22fhsC1
jul22fhsC1

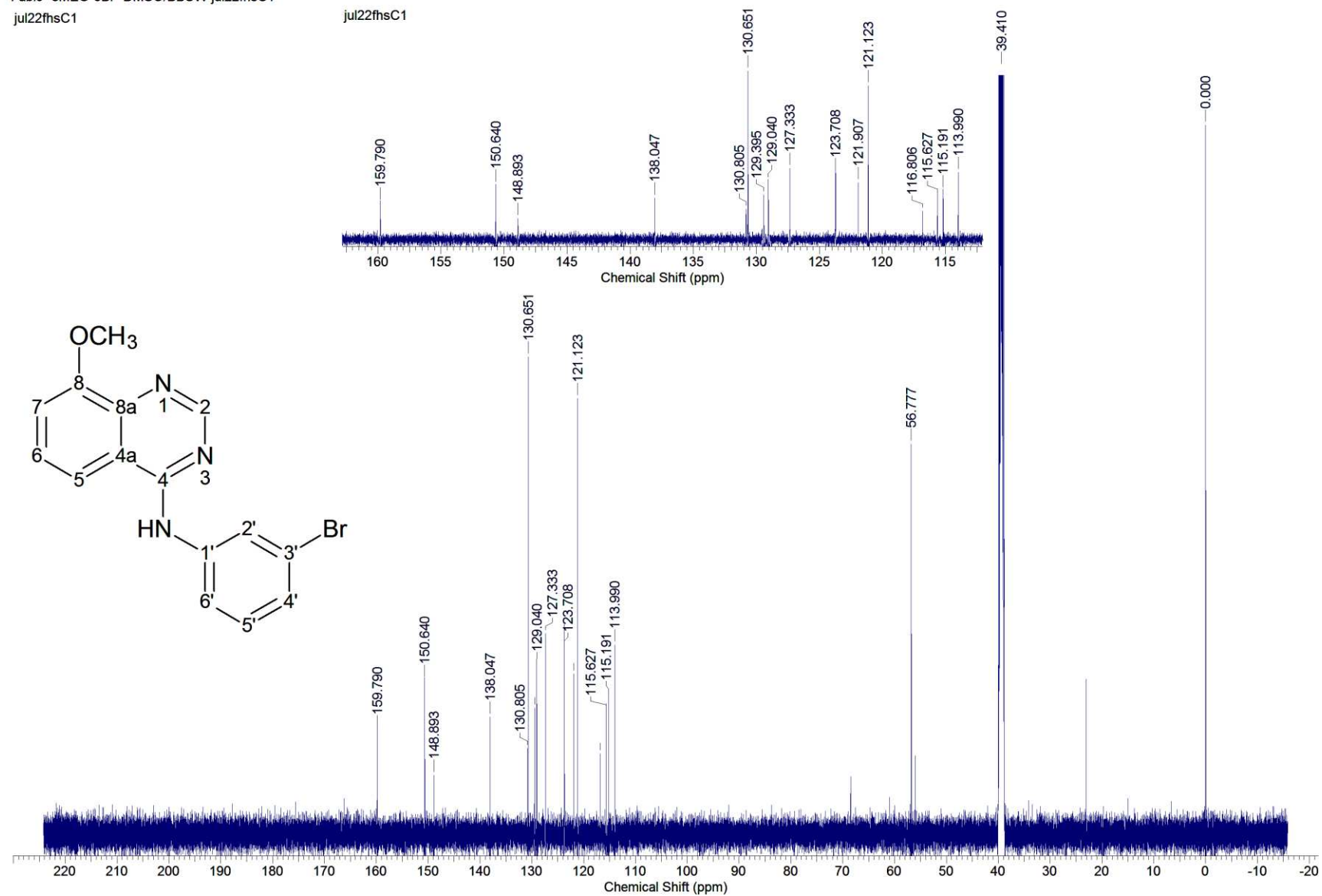


Figura A.2.5 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3Br.

Fabio 8MEO-4Br dmsd/bbsw ago11fhsC1
ago11fhsC1
ago11fhsC1

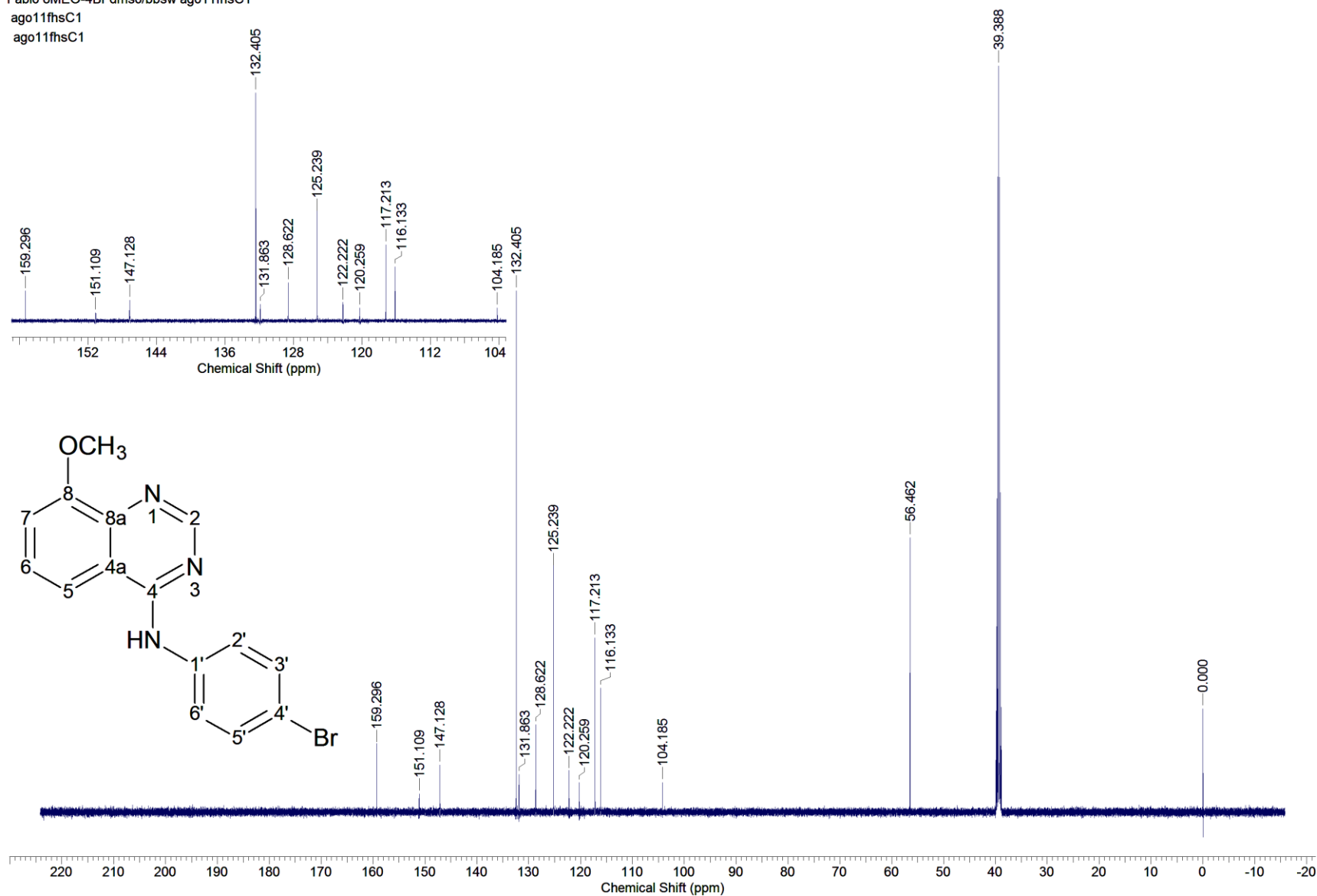


Figura A.2.6 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4Br.

Fabio "8MeO-3I" dmsO/bbsw ago10fhsC1
ago10fhsC1

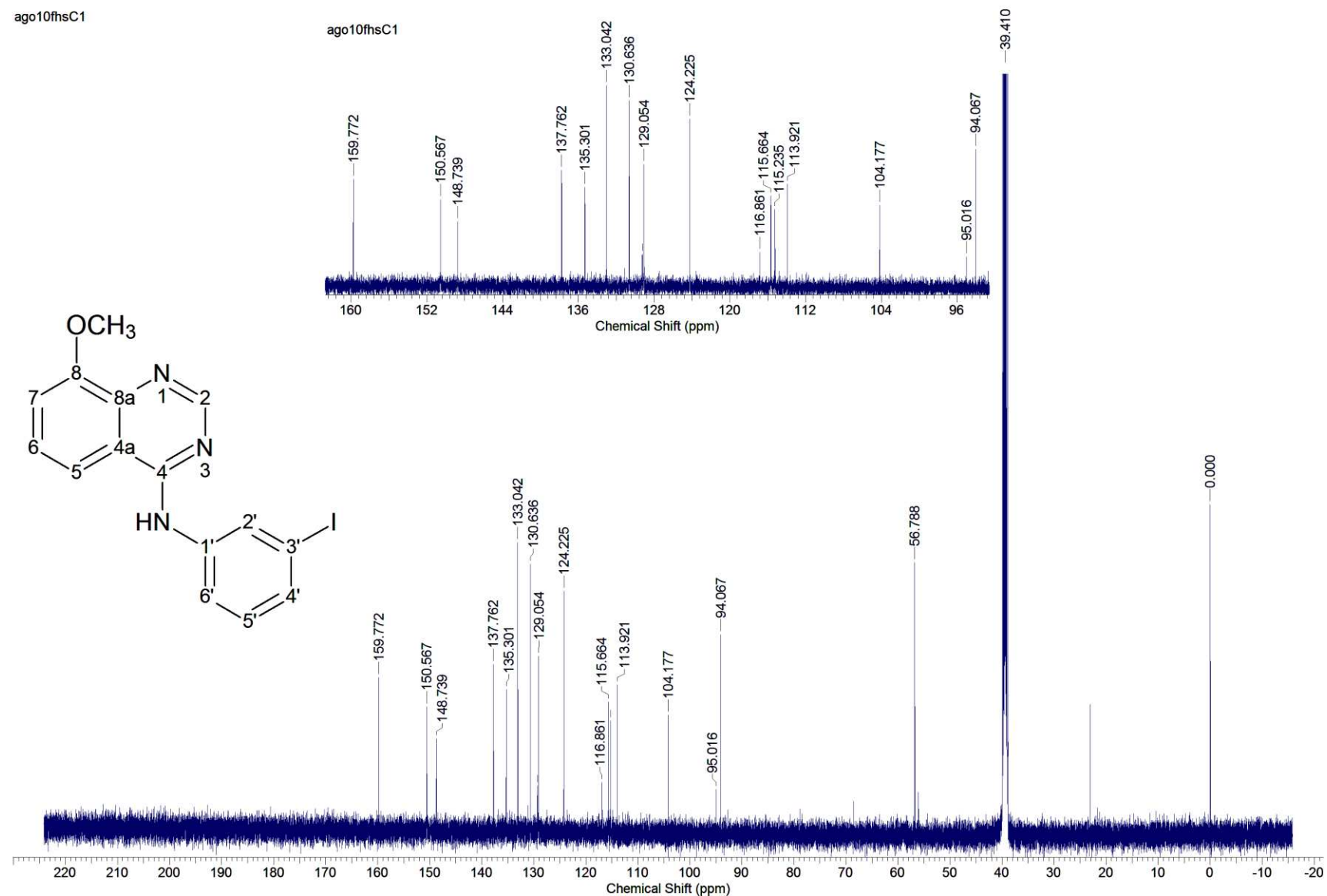


Figura A.2.7 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8-MEO-3I.

Fabio 8MEO 4I dmsd/tri-res out01ljuC
out01ljuC

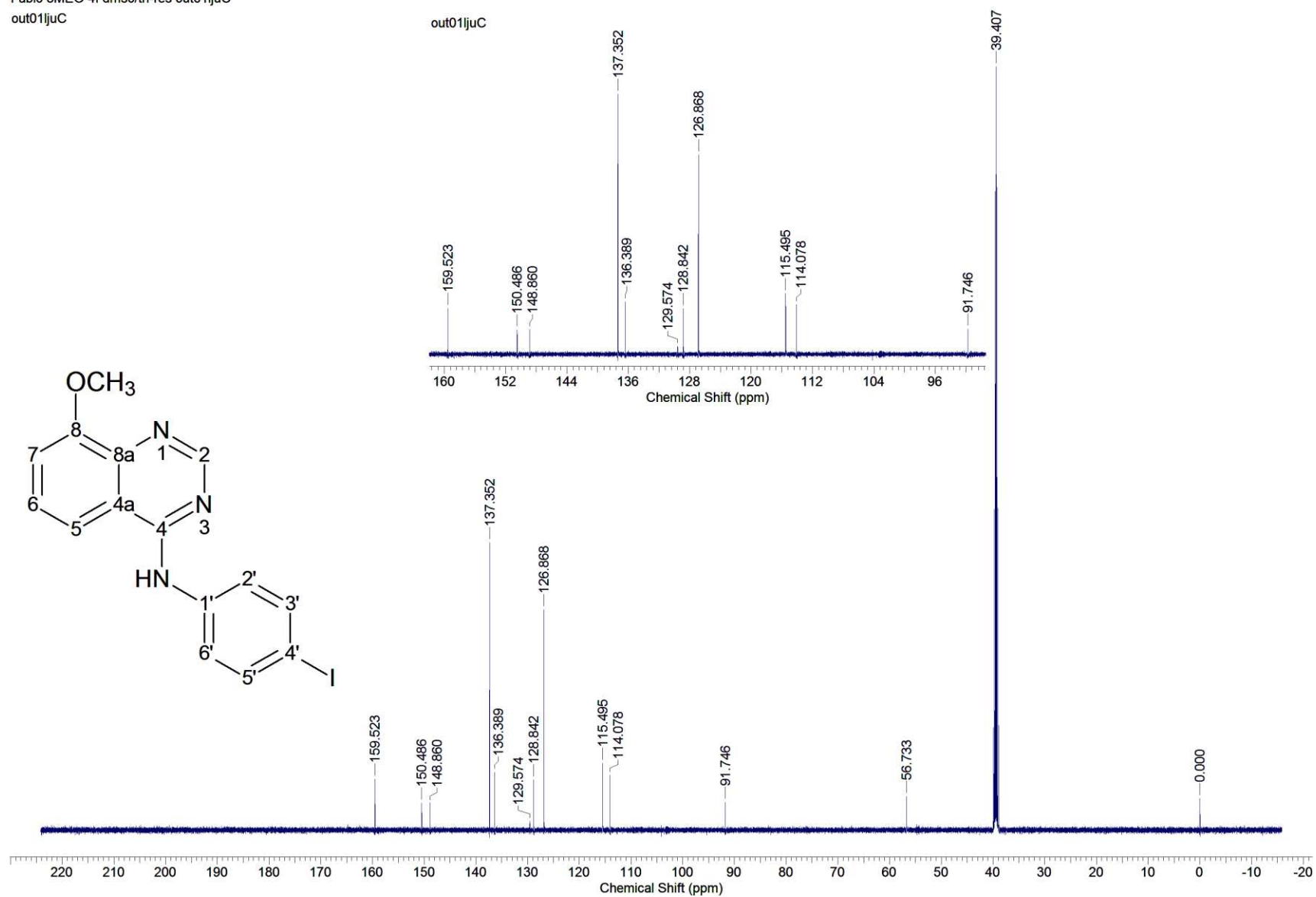


Figura A.2.8 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4I.

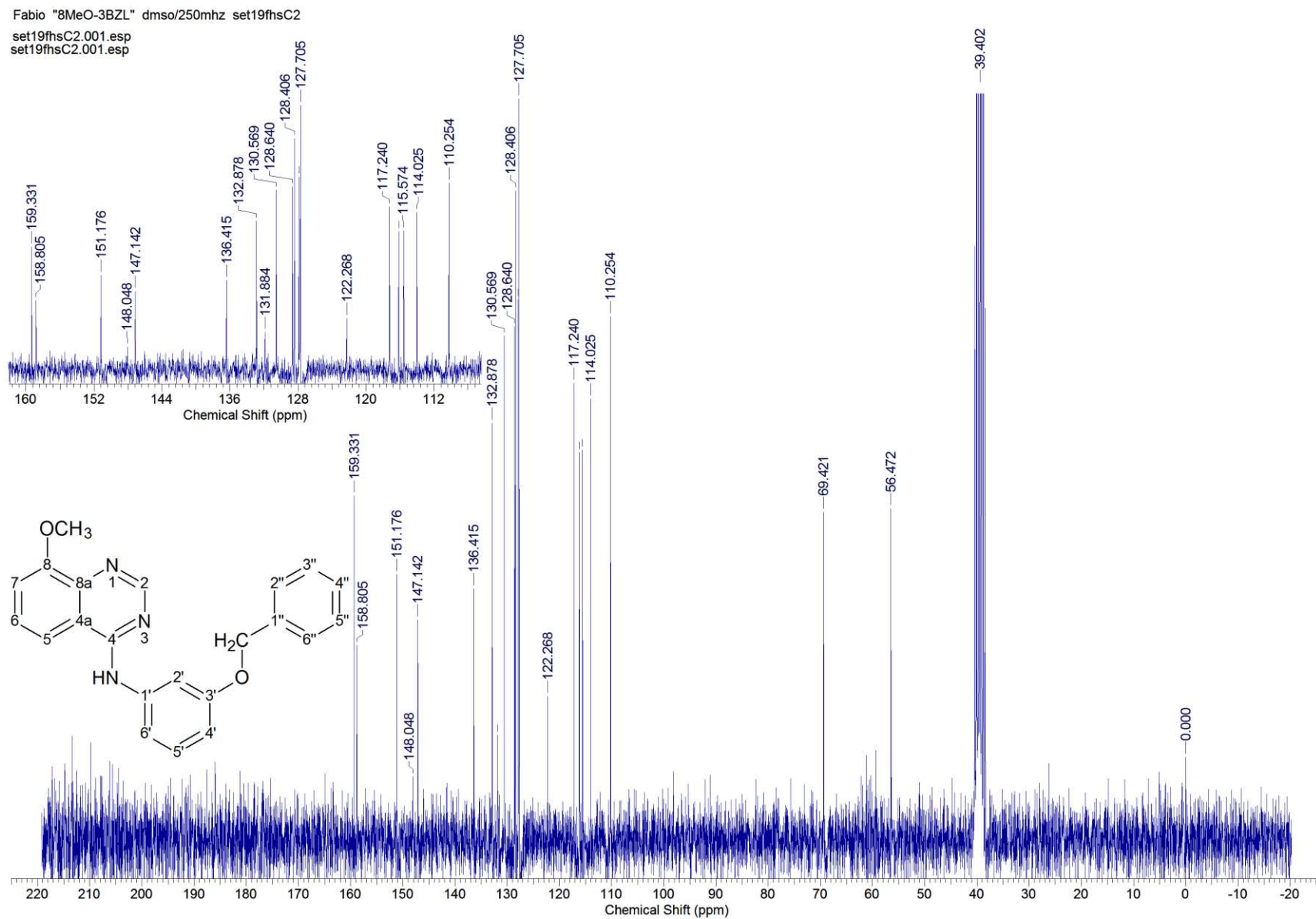


Figura A.2.9 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3BZL.

Fabio "8MeO-4BZL" dmsd/250mhz set19fhsC1
 set19fhsC1.001.esp
 set19fhsC1.001.esp

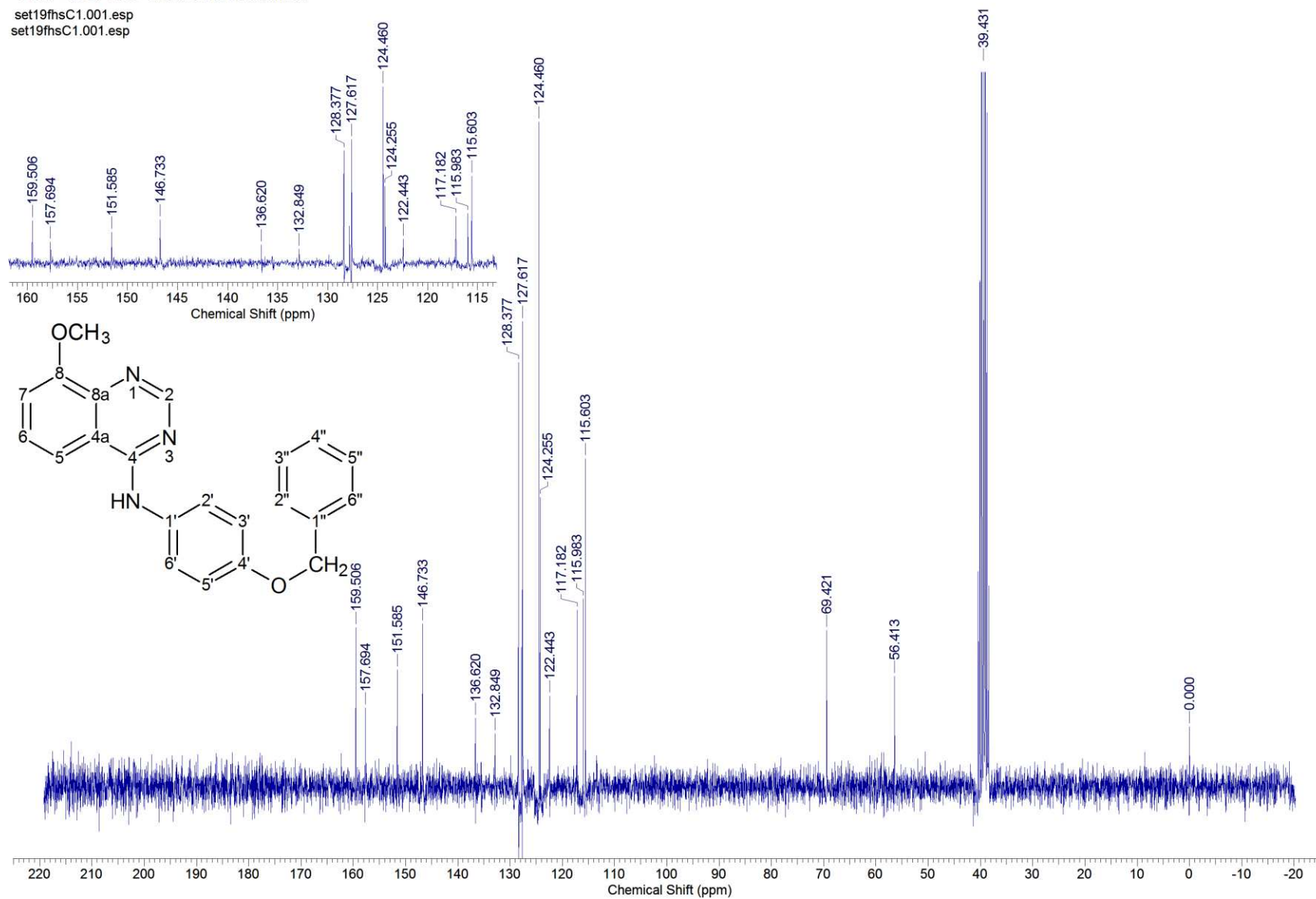
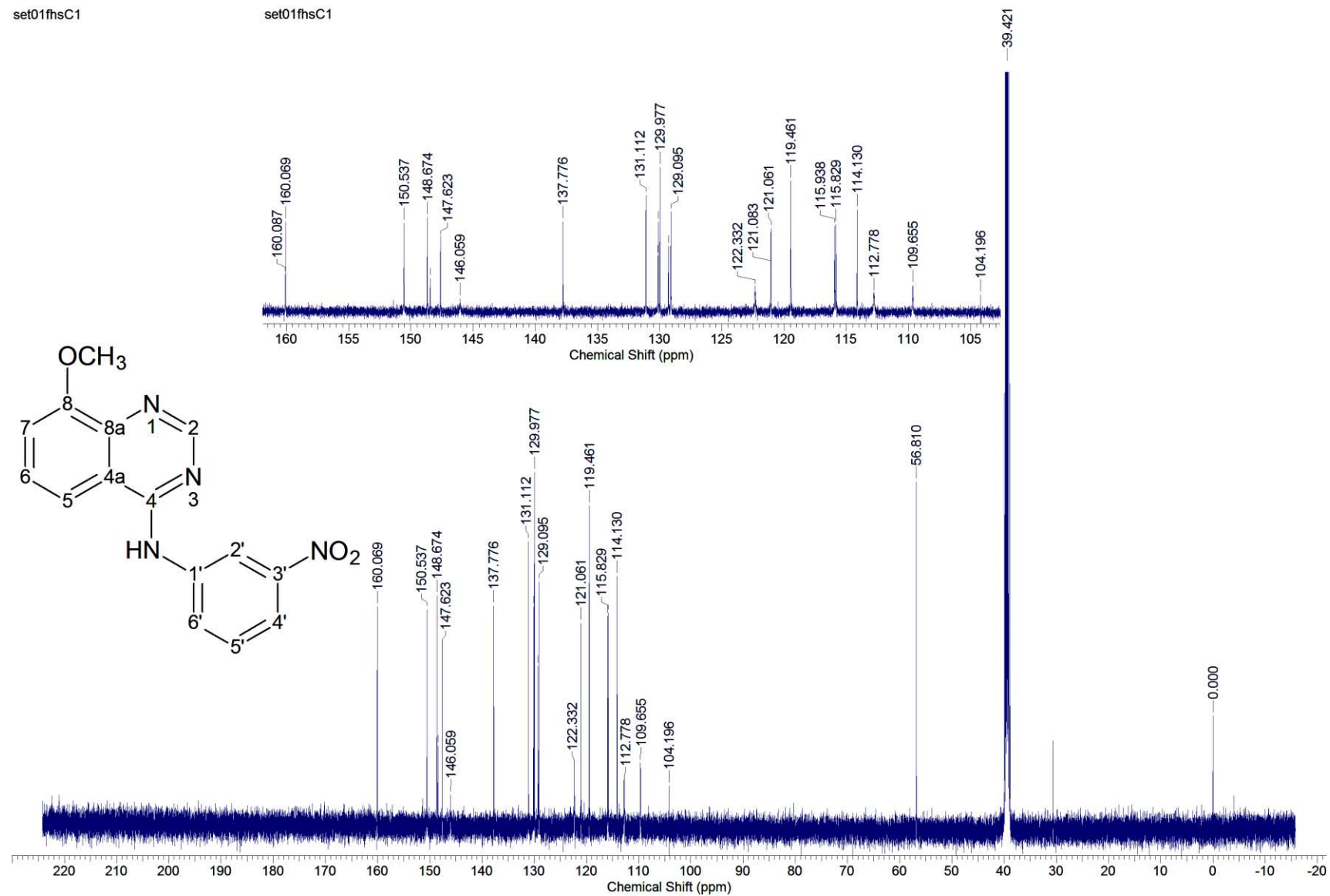


Figura A.2.10 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4BZL.

Fabio 8MEO-3NO2 dmsd/bbsw set01fhsC1

set01fhsC1

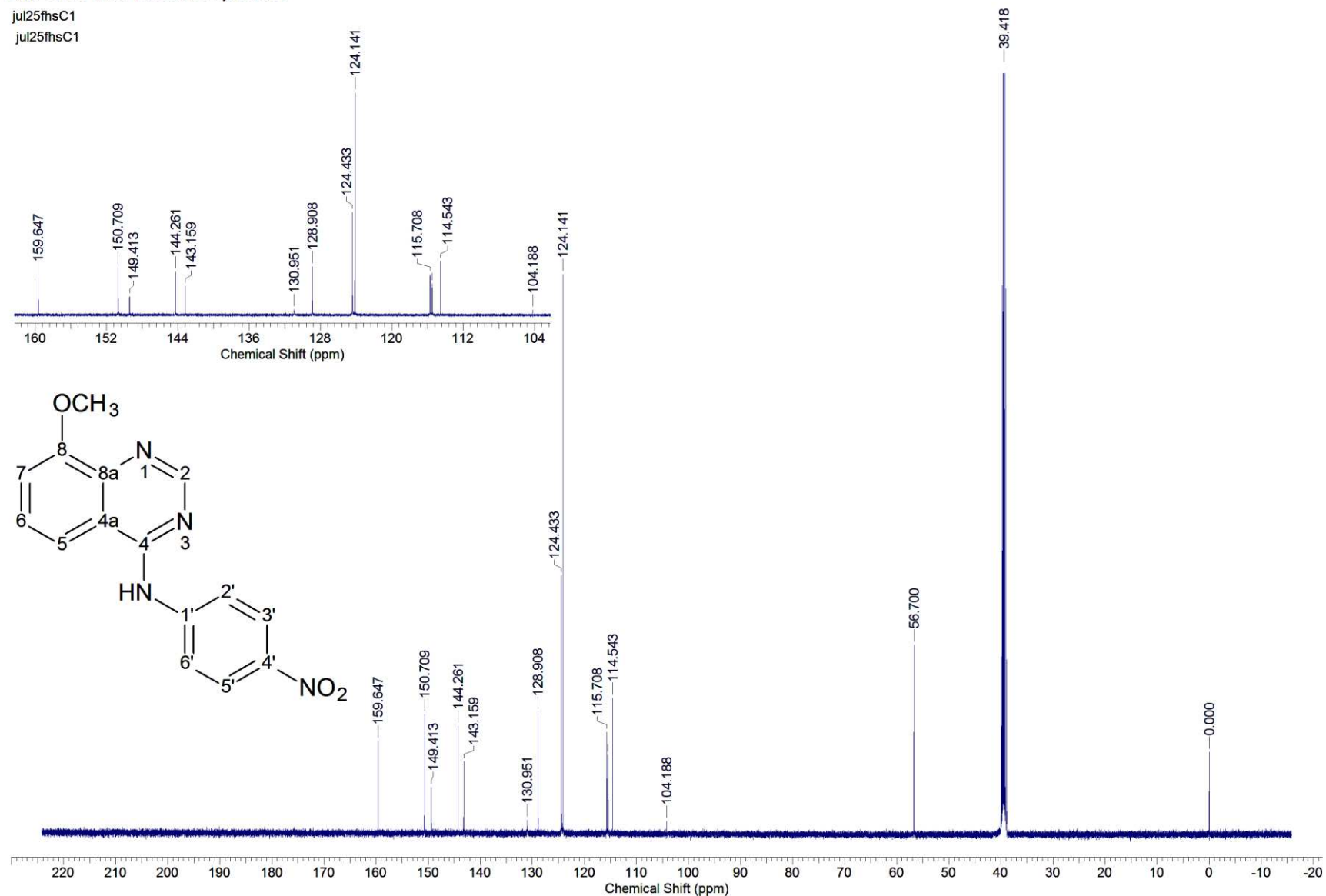
set01fhsC1

Figura A.2.11 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3NO₂.

Fabio "8MEO-4NO2" DMSO/BBSW jul25fhsC1

jul25fhsC1

jul25fhsC1

Figura A.2.12 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4NO₂.

fabio 3-Acet dmsol/bbsw ago20ljuC1
ago20ljuC1

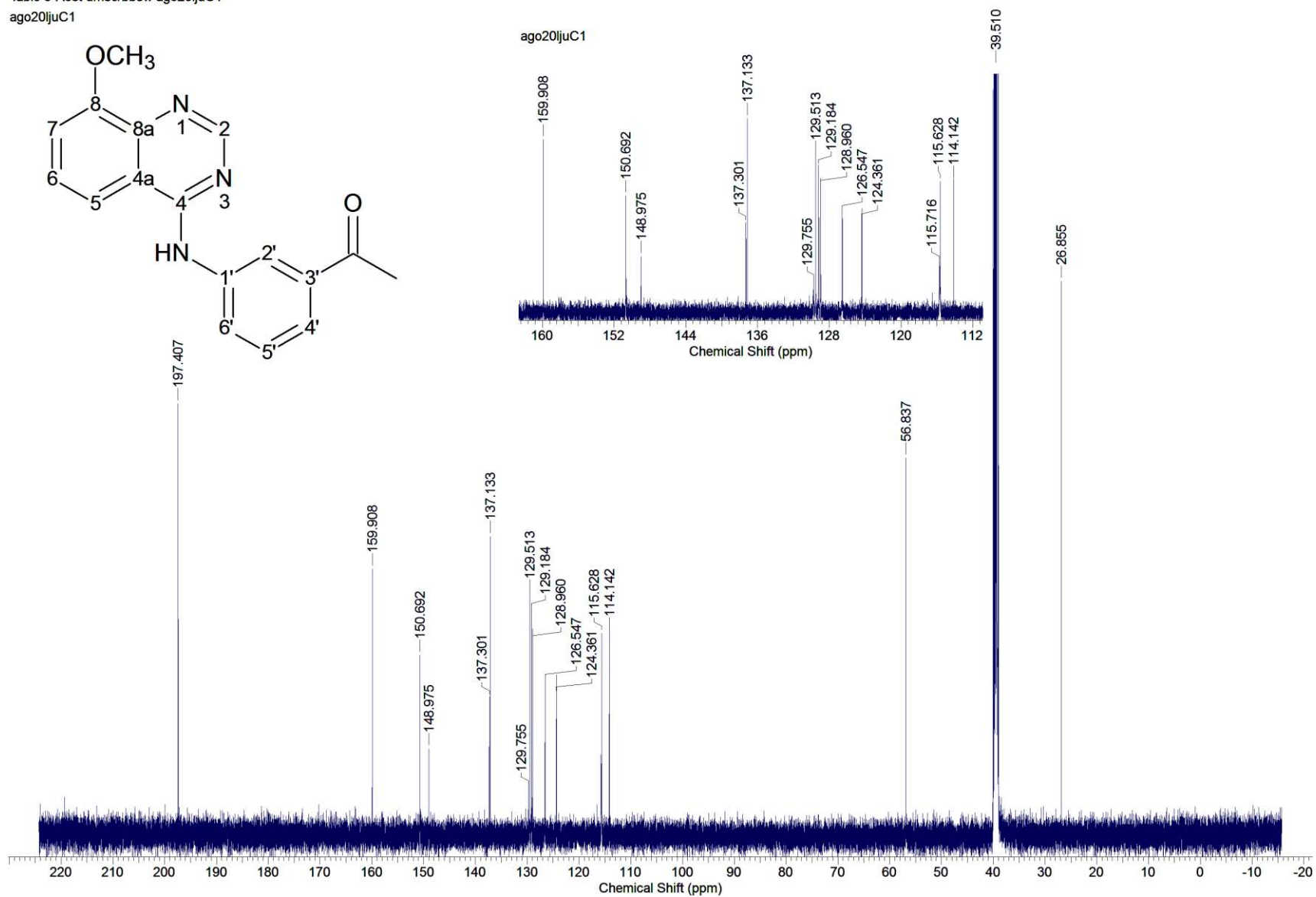


Figura A.2.13 - Espectro de RMN de ¹³C do composto 8MEO-3ACET.

Fabio 8MEO-4ACET-2 cdcl3/bbsw set22fhsC1
set22fhsC1

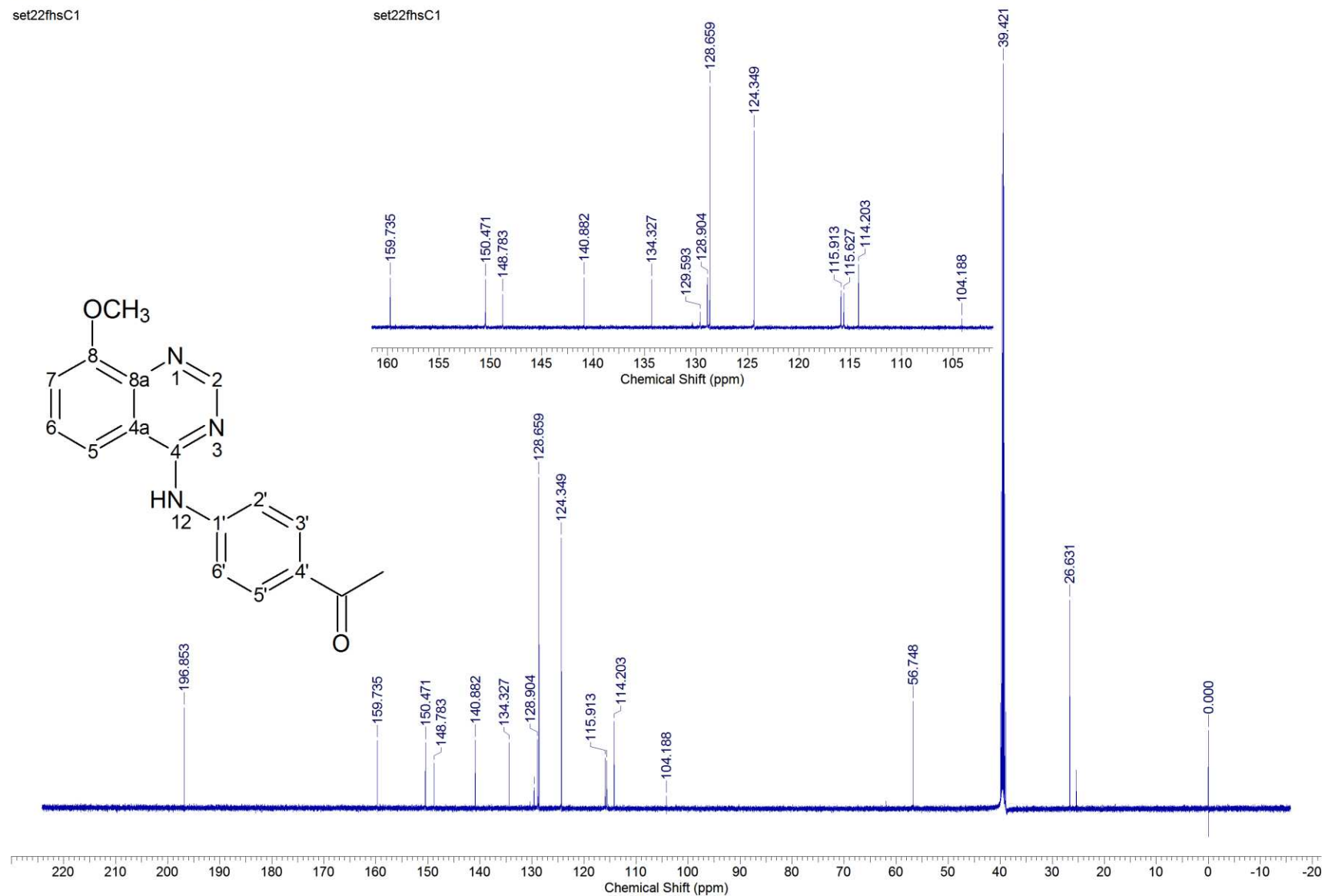


Figura A.2.14 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4ACET.

Fabio 8MEO-3CH3 dmsd/bbsw set01fhsC2
set01fhsC2

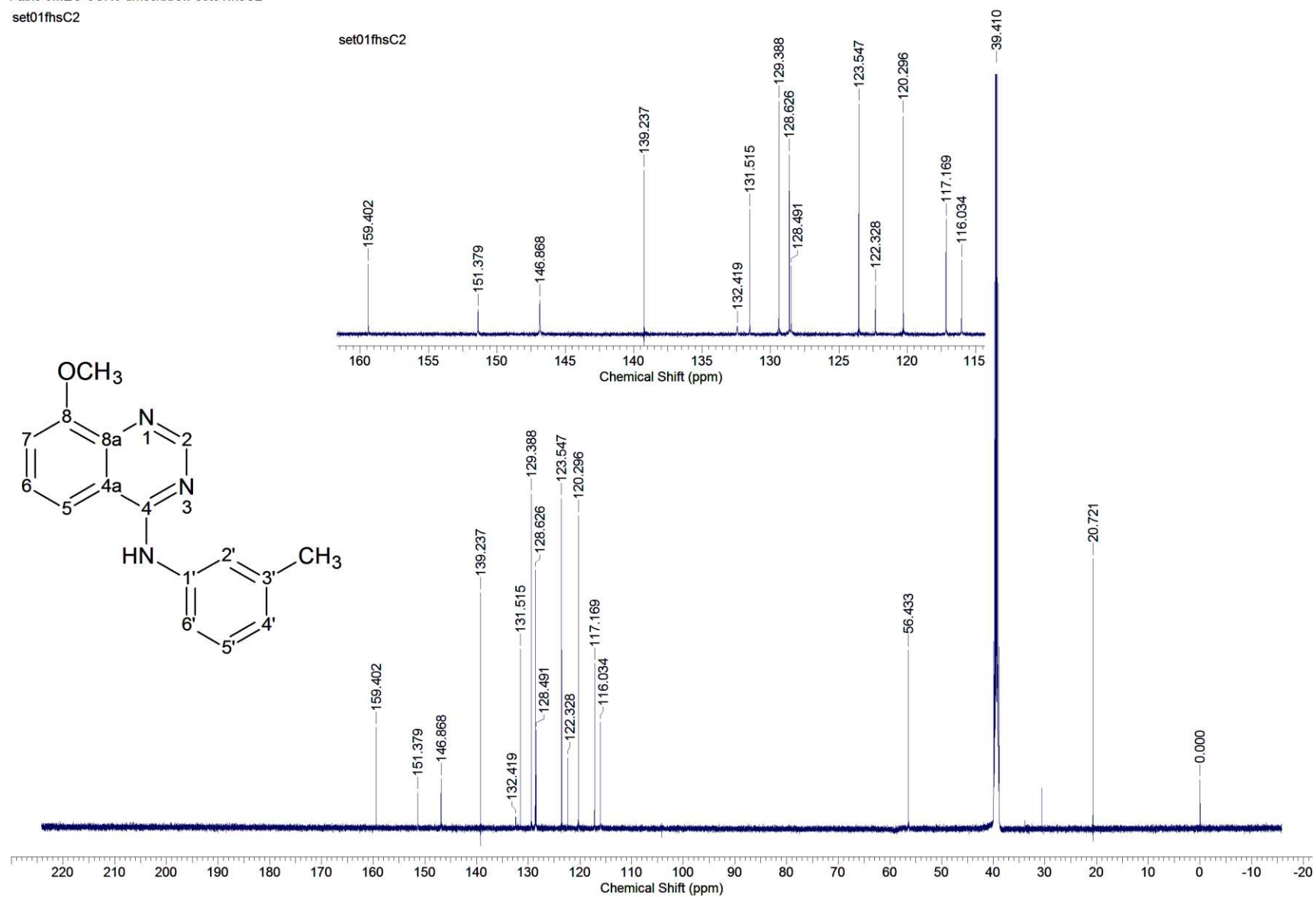


Figura A.2.15 - Espectro de RMN de ¹³C do composto 8MEO-3CH₃.

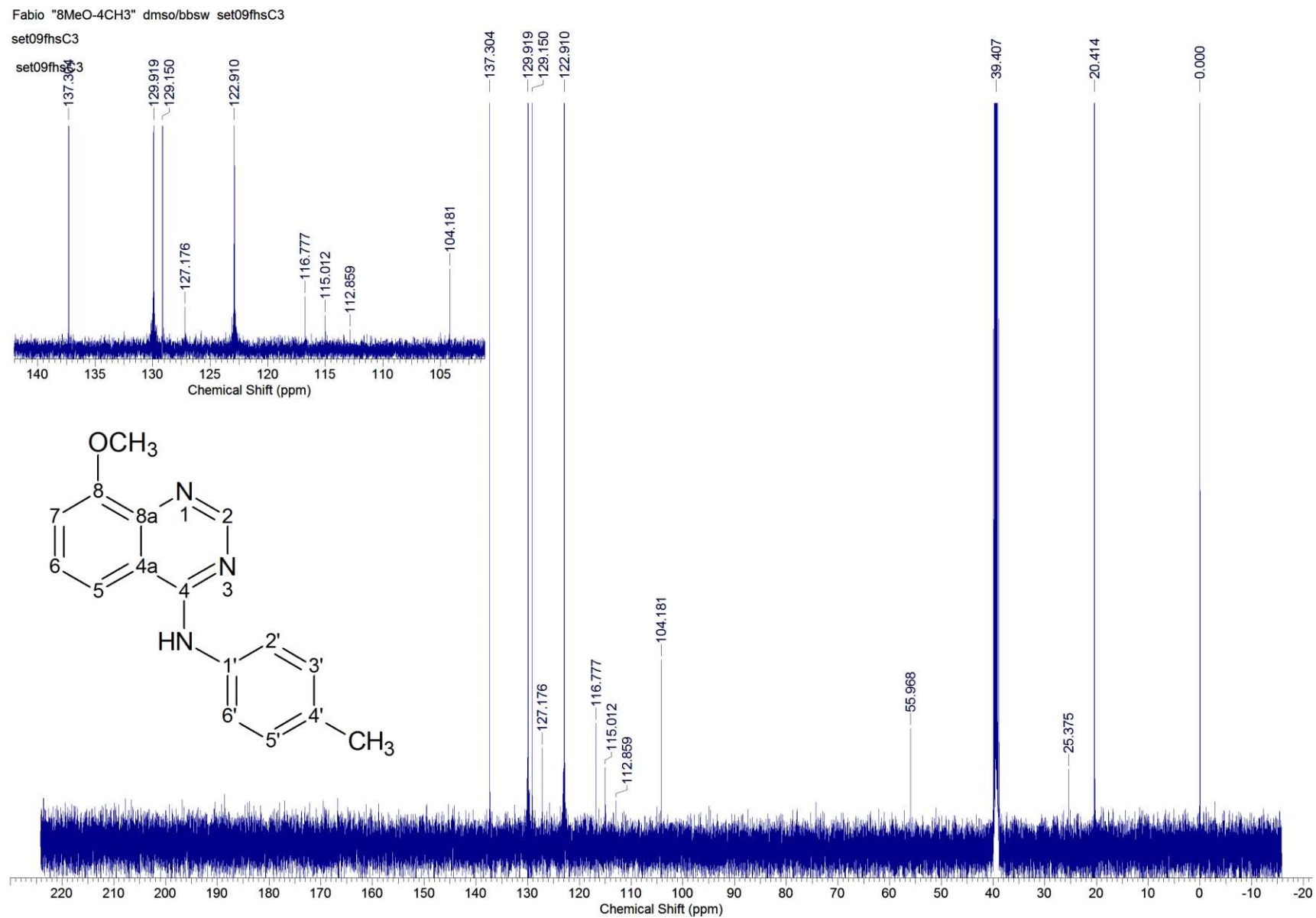
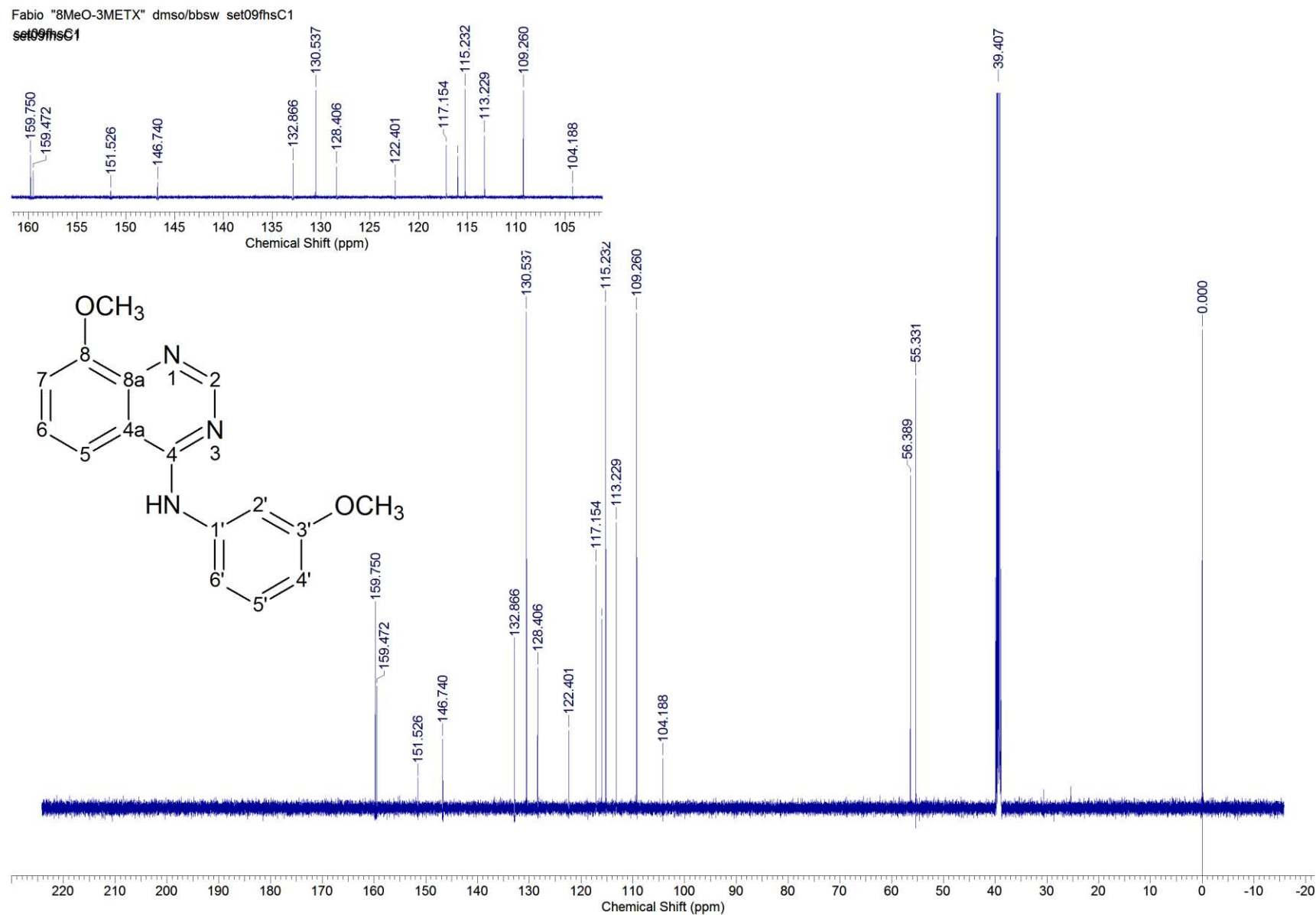


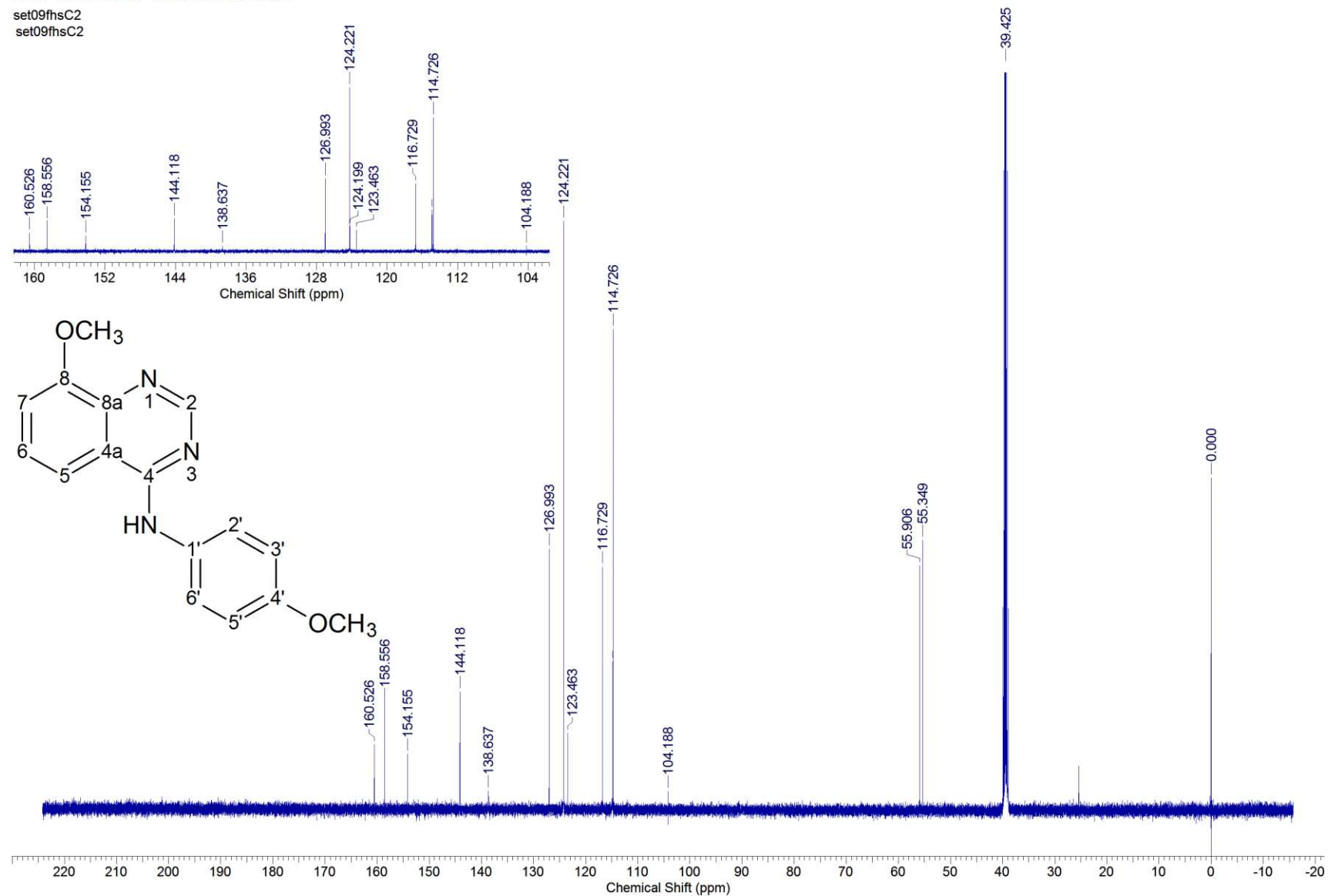
Figura A.2.16 - Espectro de RMN de ¹³C do composto 8MeO-4CH₃.

Figura A.2.17 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-3METX.

Fabio "8MeO-4METX" dmsol/bbsw set09fhsC2

set09fhsC2

set09fhsC2

Figura A.2.18 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-4METX.

Fabio "8MeO-ANL" dmsol/250mhz ago09fhsC1
ago09fhsC1.001.esp
ago09fhsC1.001.esp

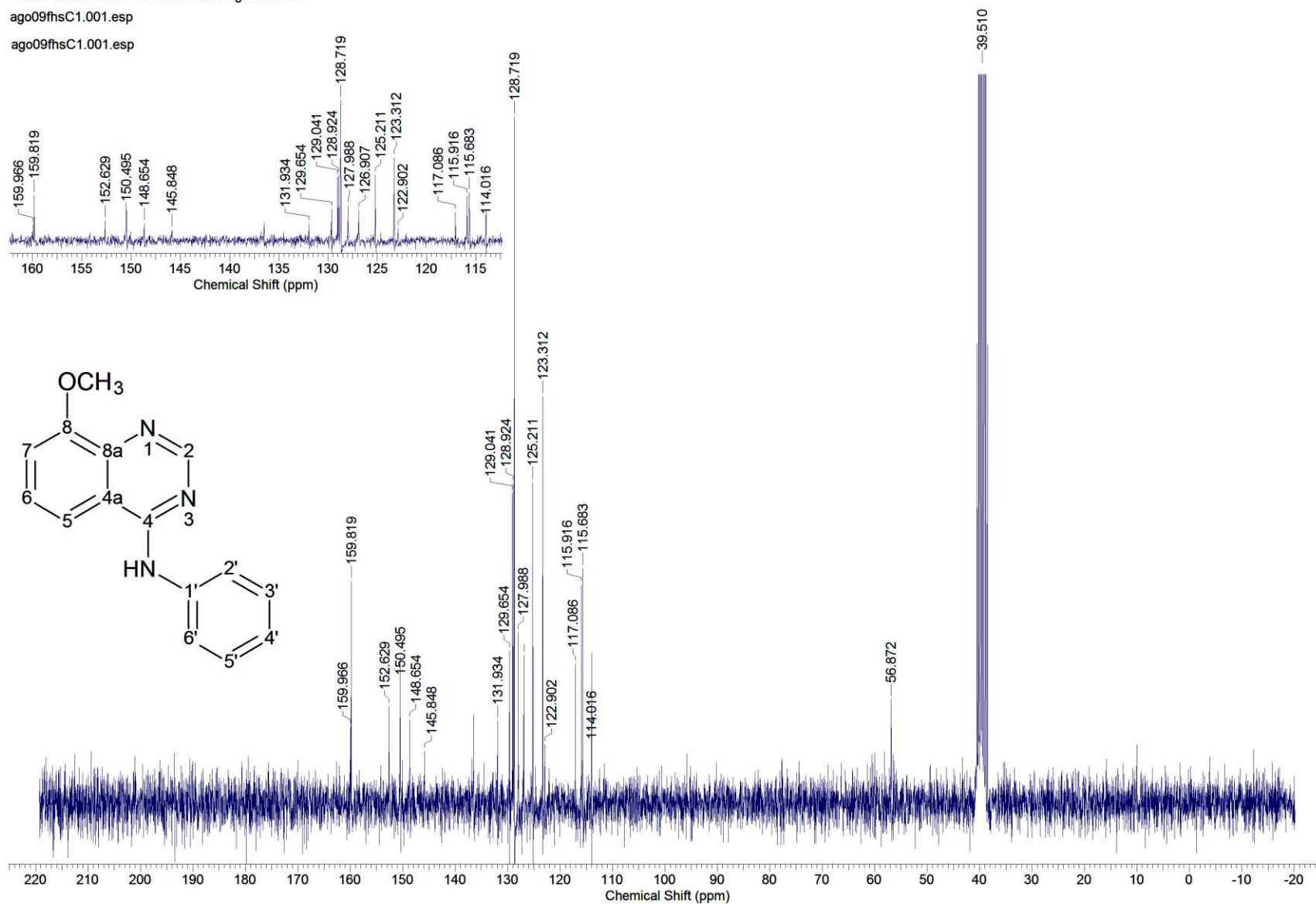


Figura A.2.19 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-ANL.

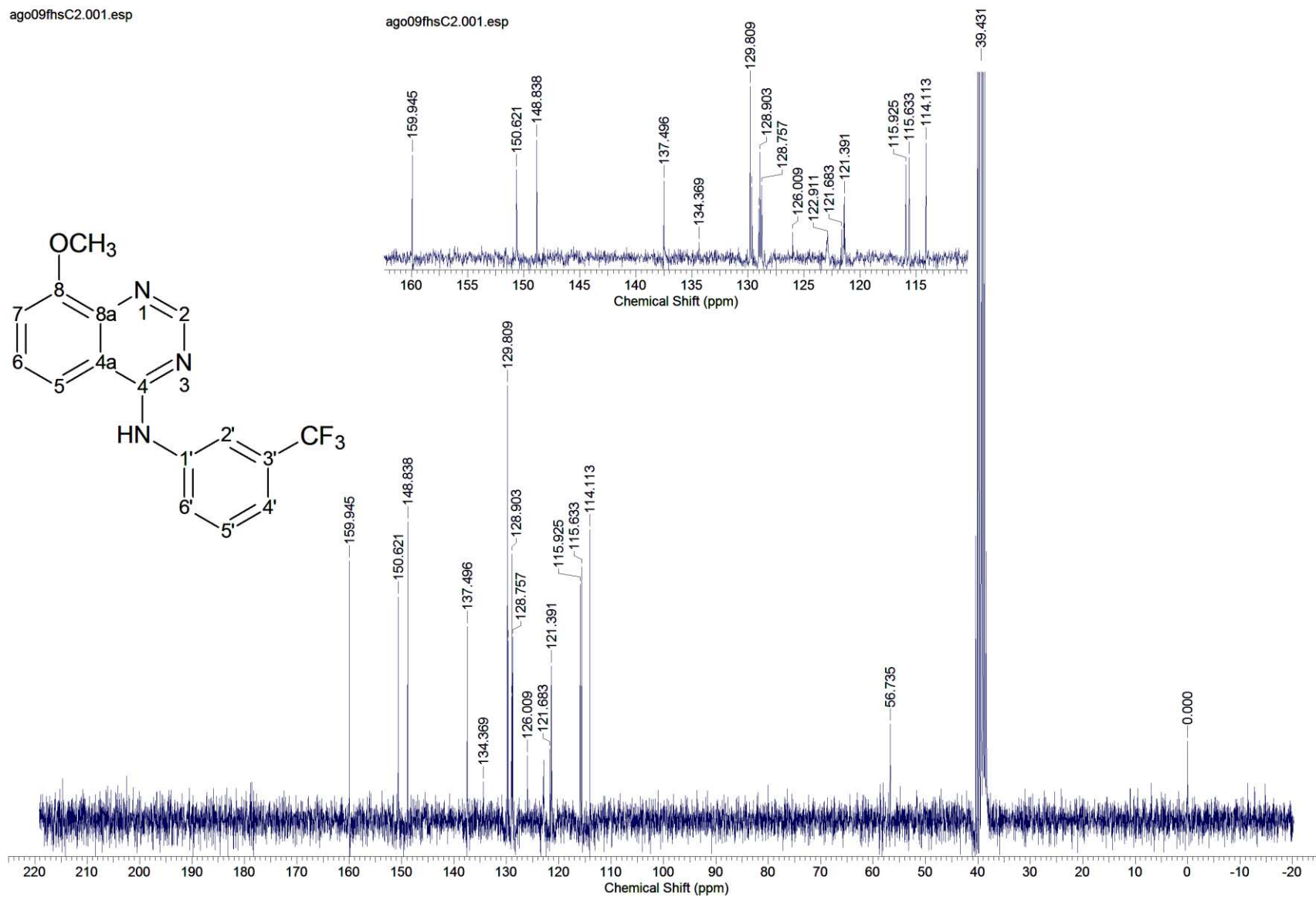


Figura A.2.20 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO- CF_3 .

Fabio 8MEO-TRI dmsolbbsw ago26fhsC1
ago26fhsC1

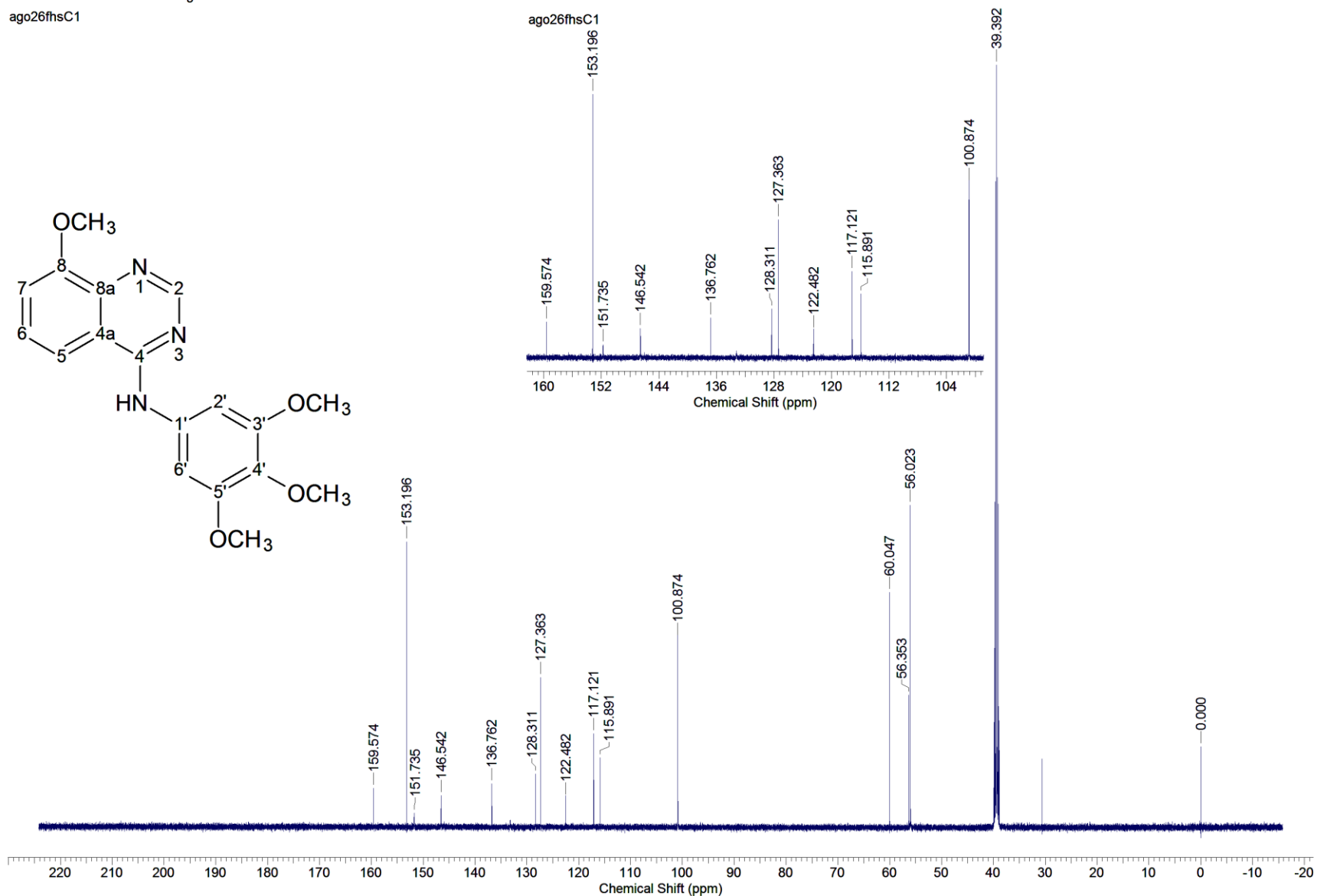


Figura A.2.21 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-TRI.

Fabio "8MEO-DMEA" dmsolbbsw ago03fhsC
ago03fhsC

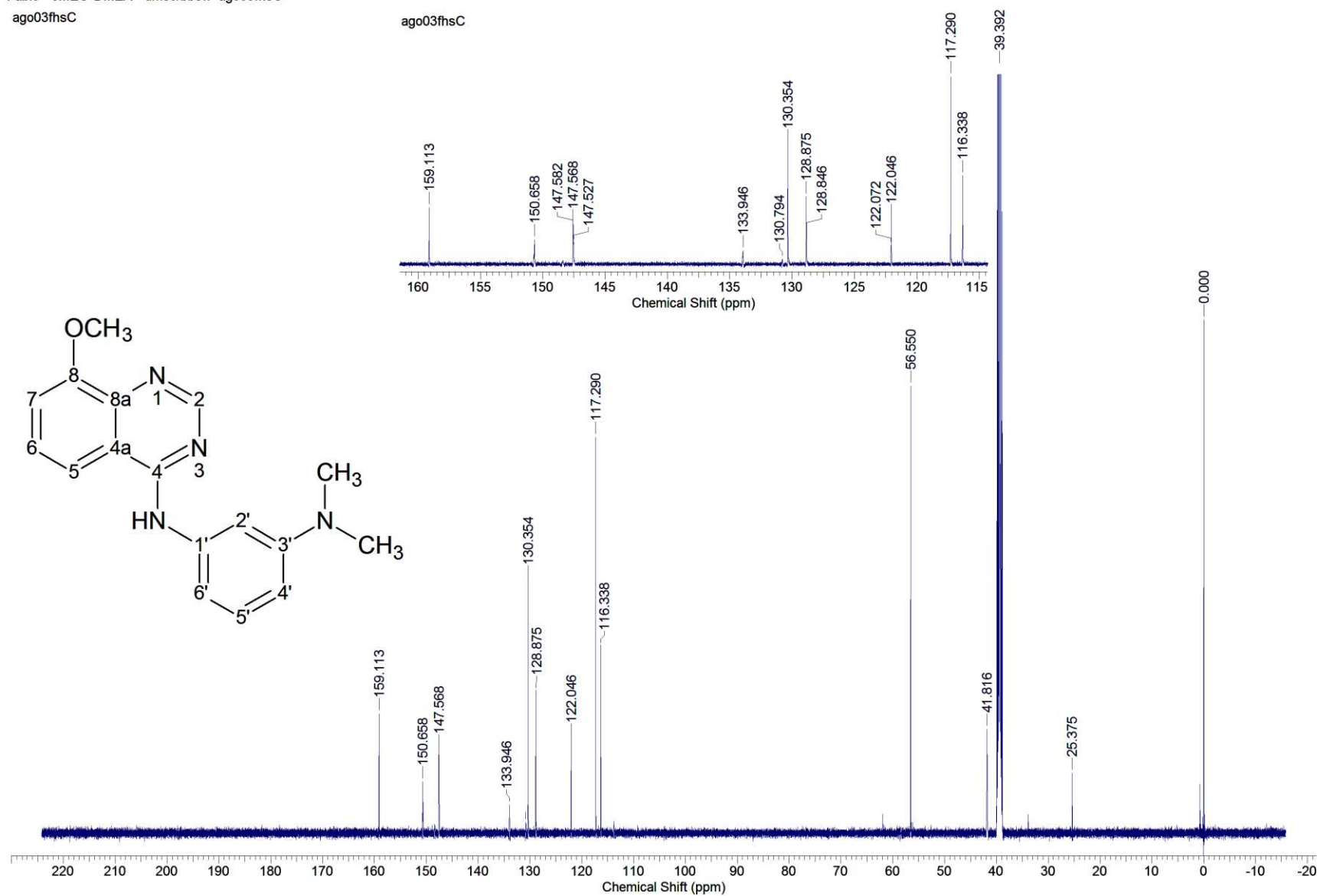


Figura A.2.22 - Espectro de RMN de ^{13}C do composto 8MEO-DMEA.

ANEXO 3 – ESPECTROS DE MS DE ALTA RESOLUÇÃO

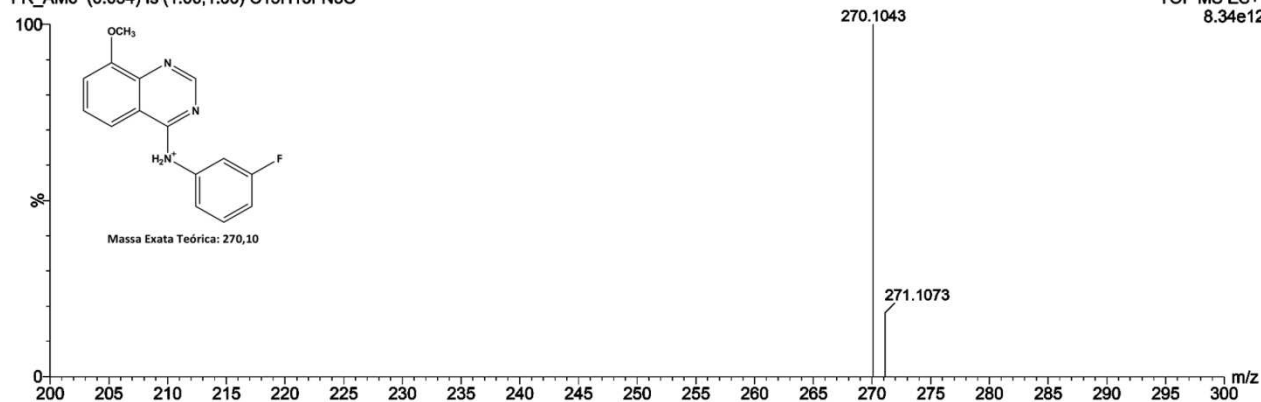
FR_AM6 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₅H₁₃FN₃OTOF MS ES+
8.34e12

Figura A.3.1 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3F.

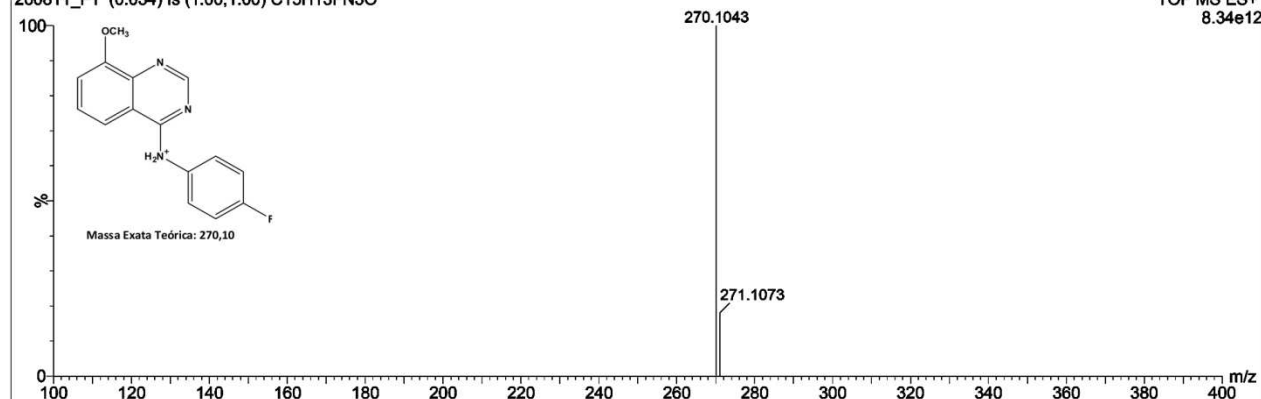
260811_F1 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₅H₁₃FN₃OTOF MS ES+
8.34e12

Figura A.3.2 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4F.

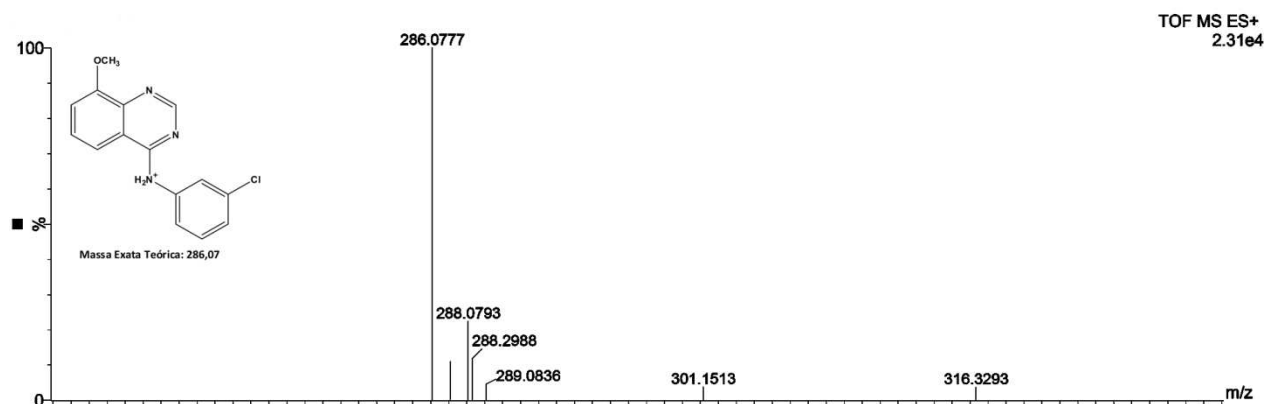


Figura A.3.3 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3Cl.

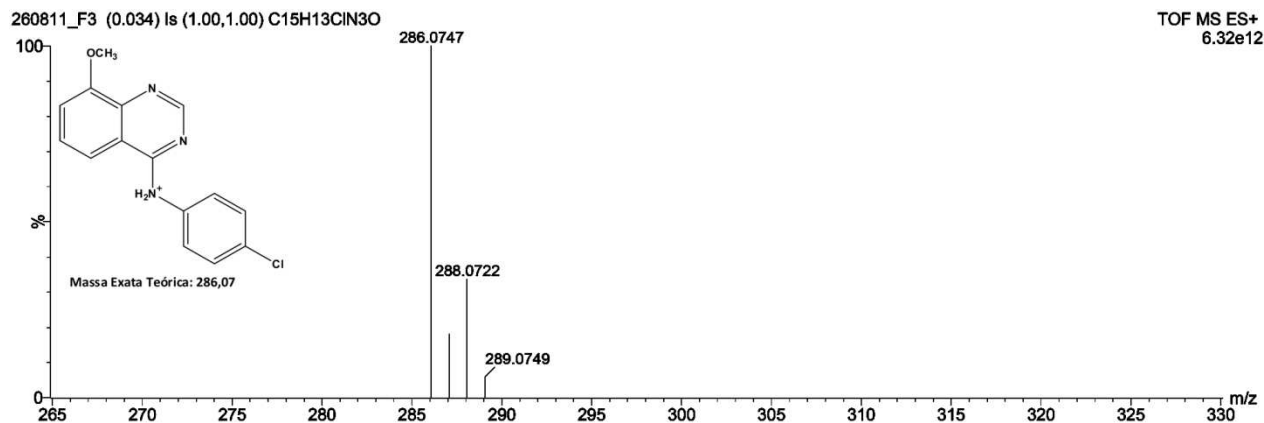


Figura A.3.4 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4Cl.

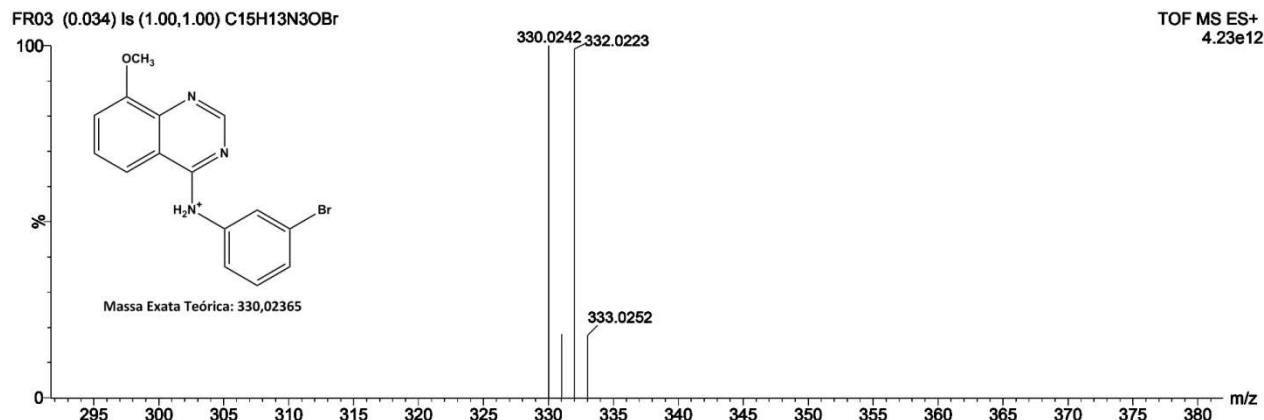


Figura A.3.5 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3Br.

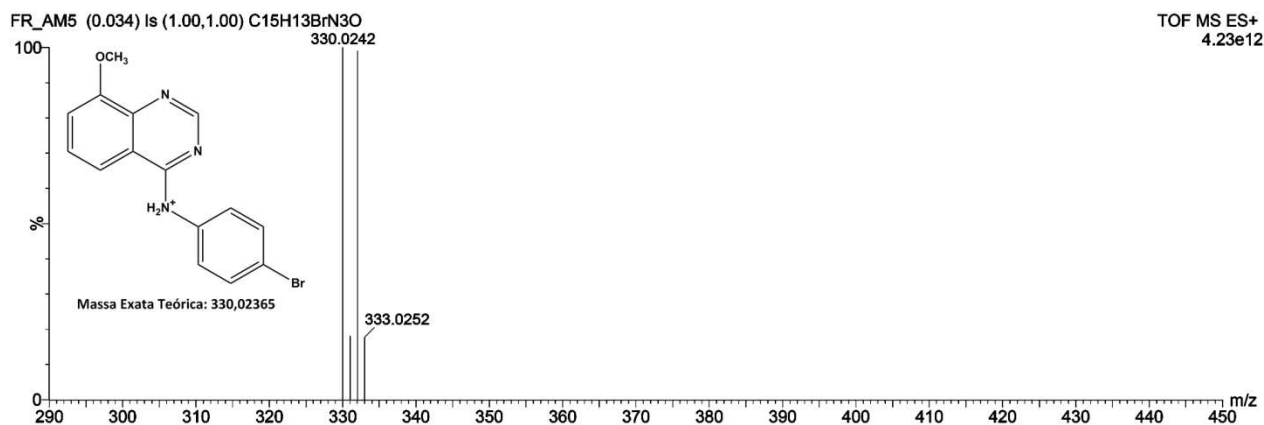


Figura A.3.6 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4Br.

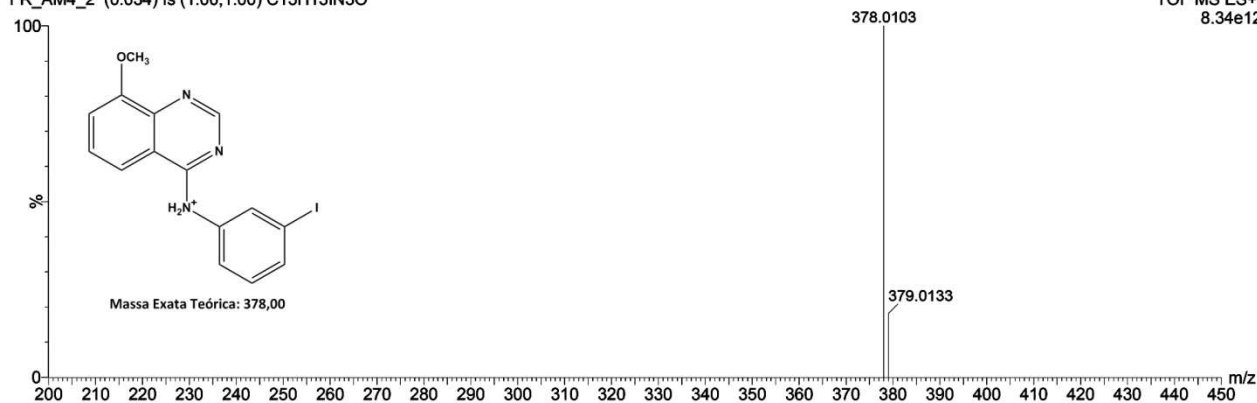
FR_AM4_2 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₅H₁₃IN₃OTOF MS ES+
8.34e12

Figura A.3.7 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3I.

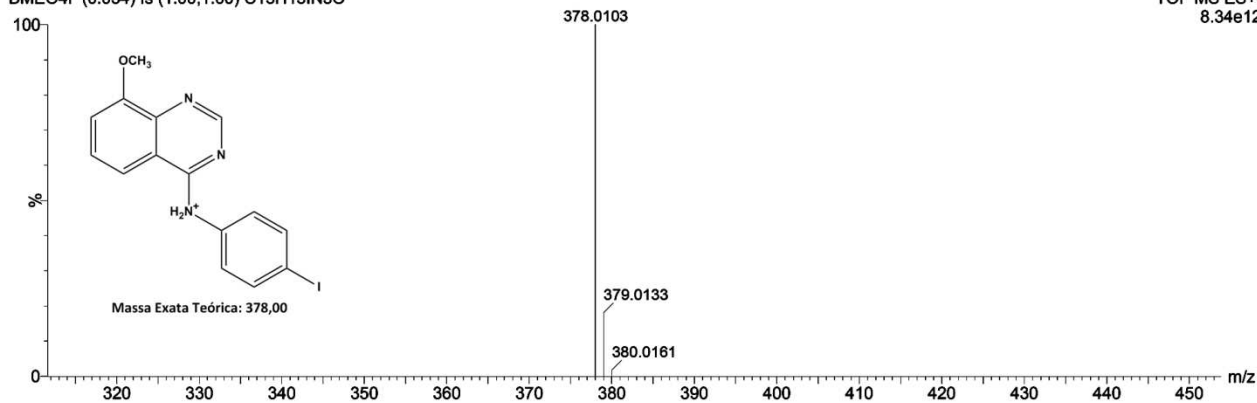
BME04I (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₅H₁₃IN₃OTOF MS ES+
8.34e12

Figura A.3.8 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4I.

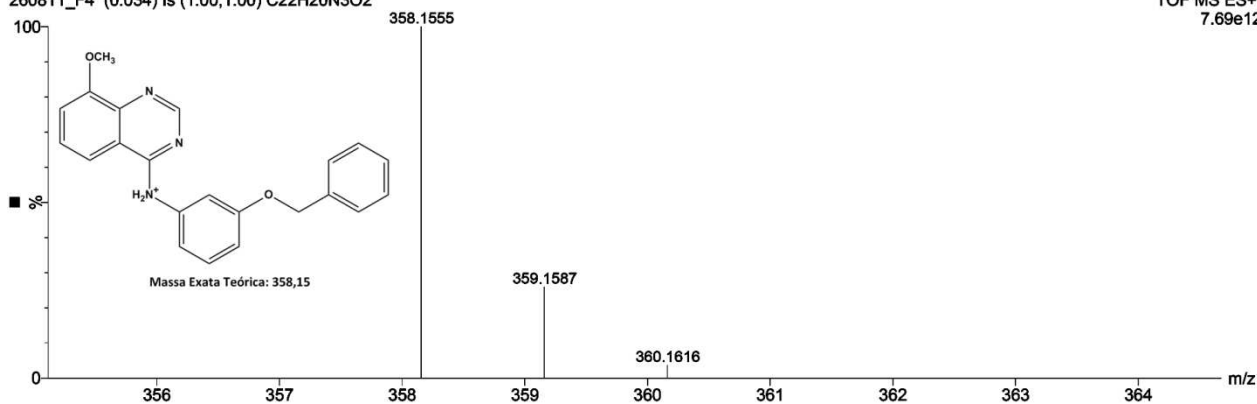
260811_F4 (0.034) Is (1.00,1.00) C₂₂H₂₀N₃O₂TOF MS ES+
7.69e12

Figura A.3.9 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3BZL.

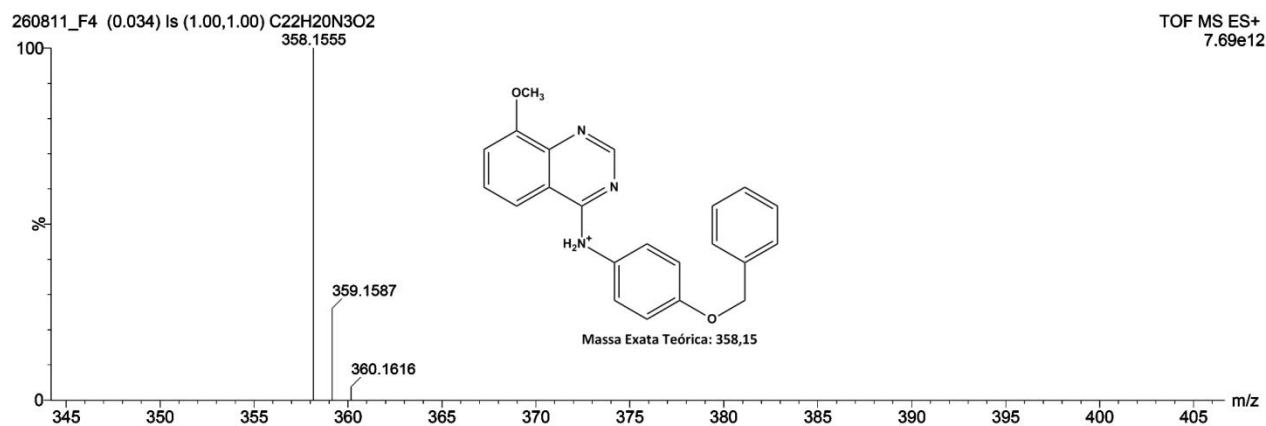


Figura A.3.10 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4BZL.

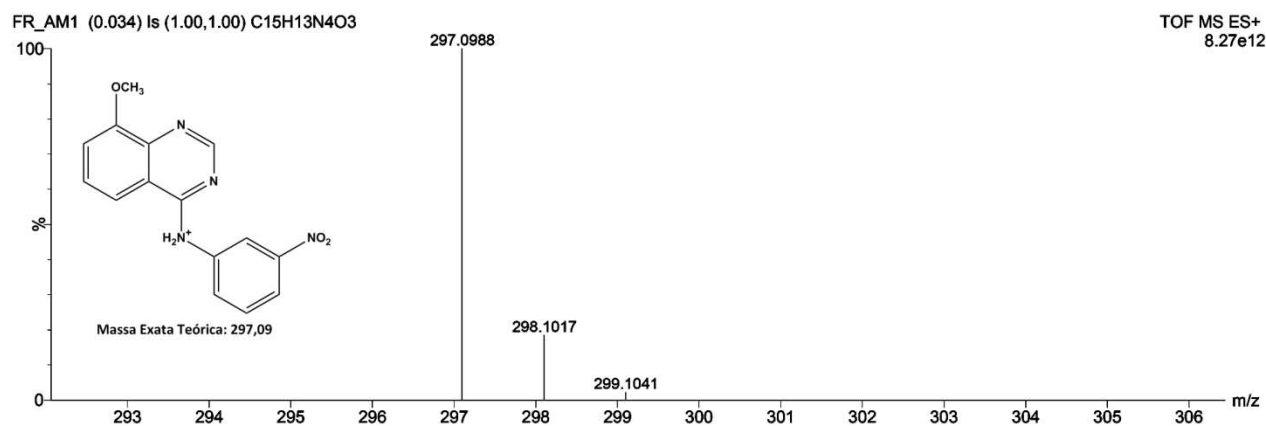


Figura A.3.11 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3NO₂.

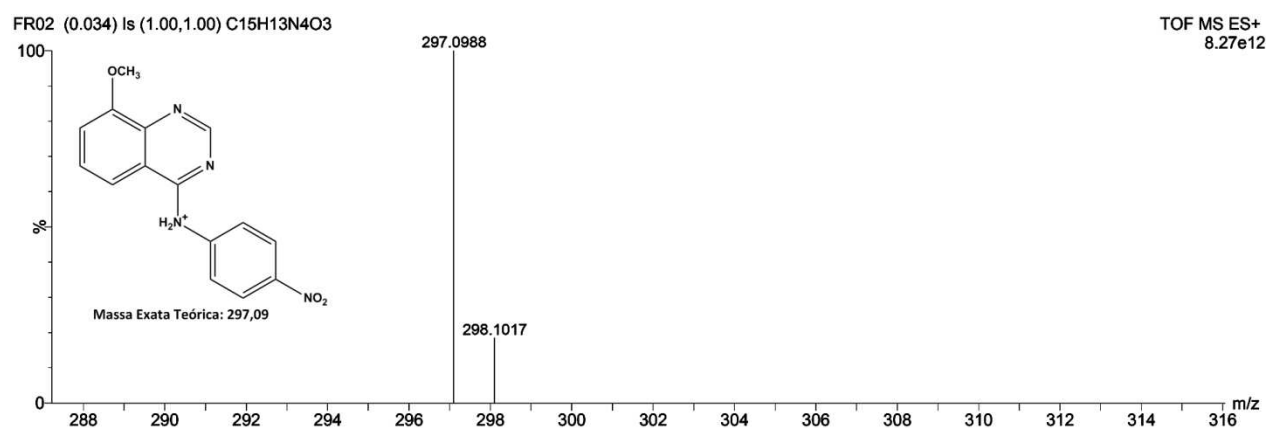


Figura A.3.12 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4NO₂.

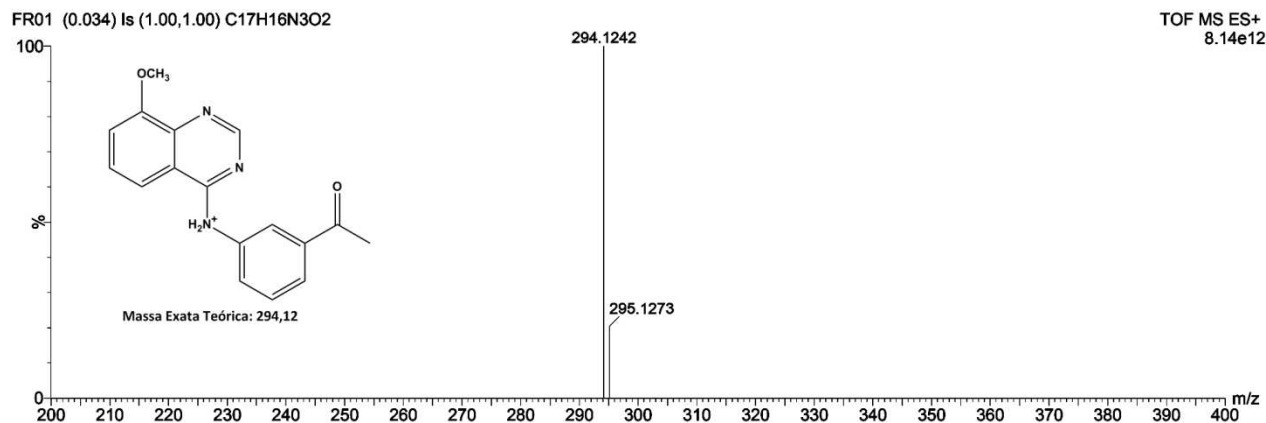


Figura A.3.13 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3ACET.

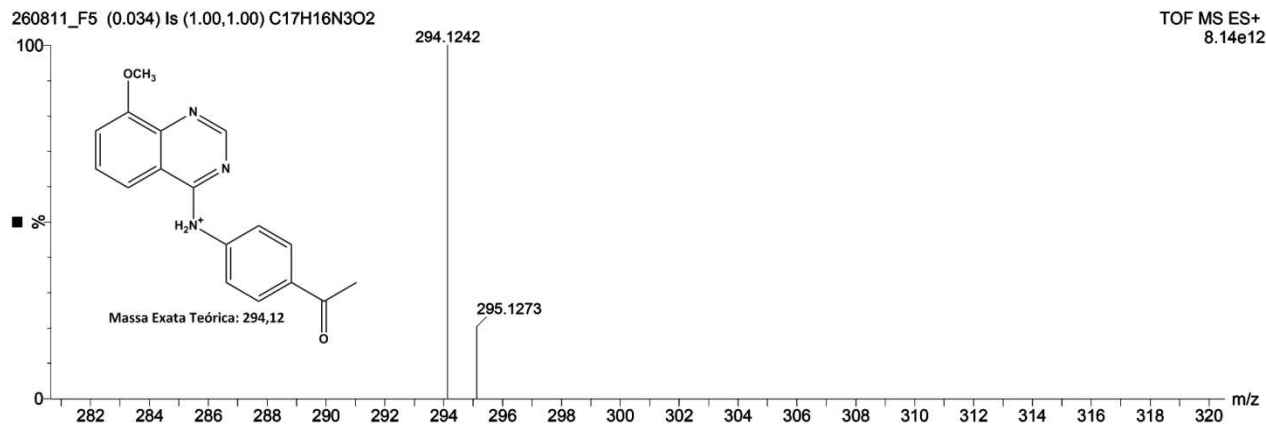


Figura A.3.14 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-4ACET.

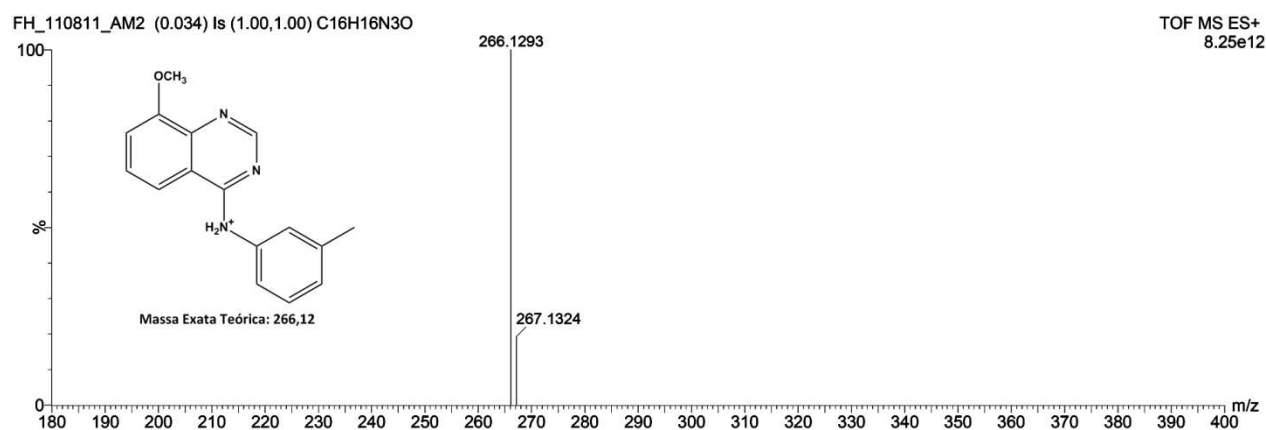
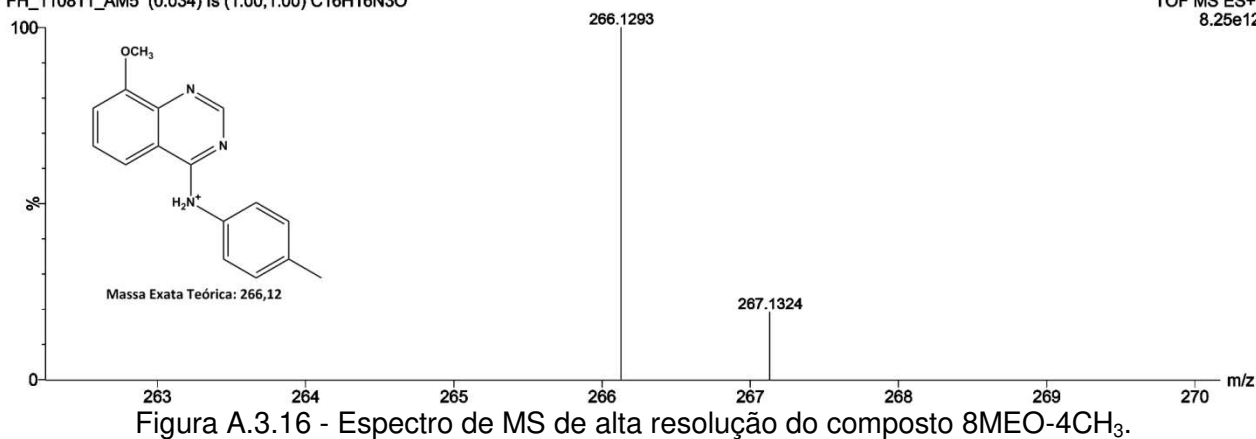
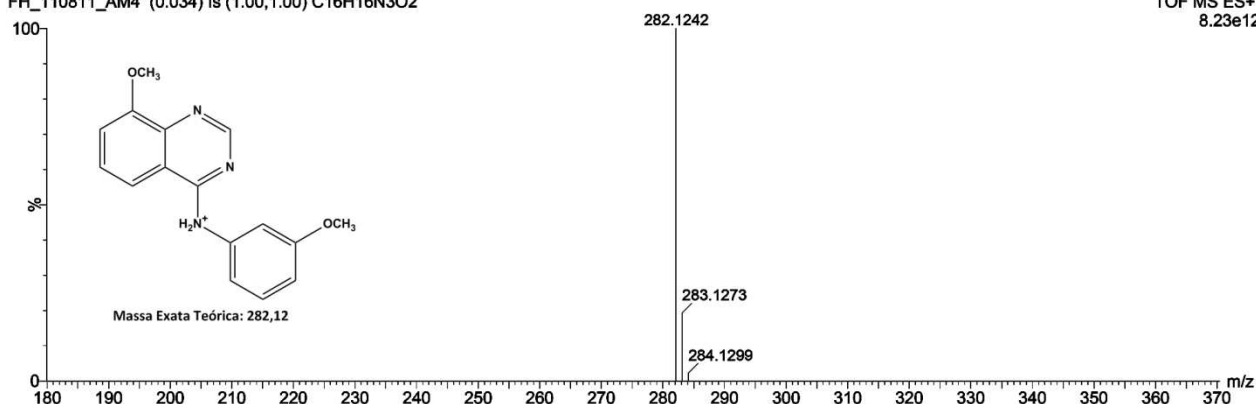
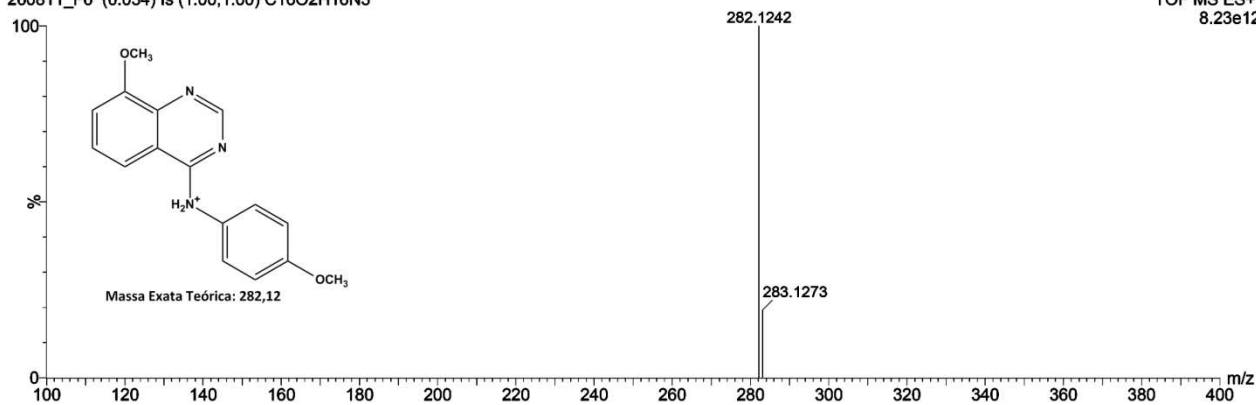


Figura A.3.15 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-3CH₃.

FH_110811_AM5 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₆H₁₆N₃OTOF MS ES+
8.25e12FH_110811_AM4 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₆H₁₆N₃O₂TOF MS ES+
8.23e12260811_F6 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₆O₂H₁₆N₃TOF MS ES+
8.23e12

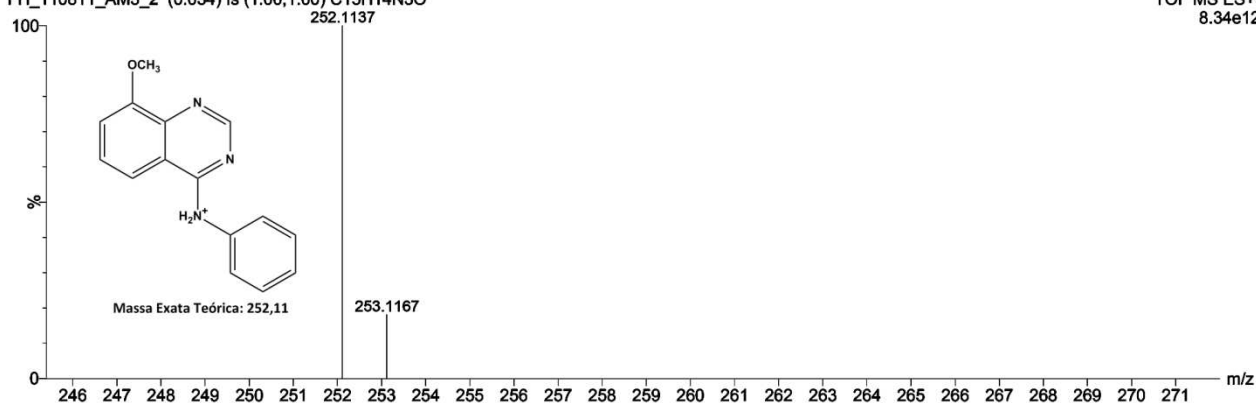
FH_110811_AM3_2 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₅H₁₄N₃OTOF MS ES+
8.34e12

Figura A.3.19 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-ANL.

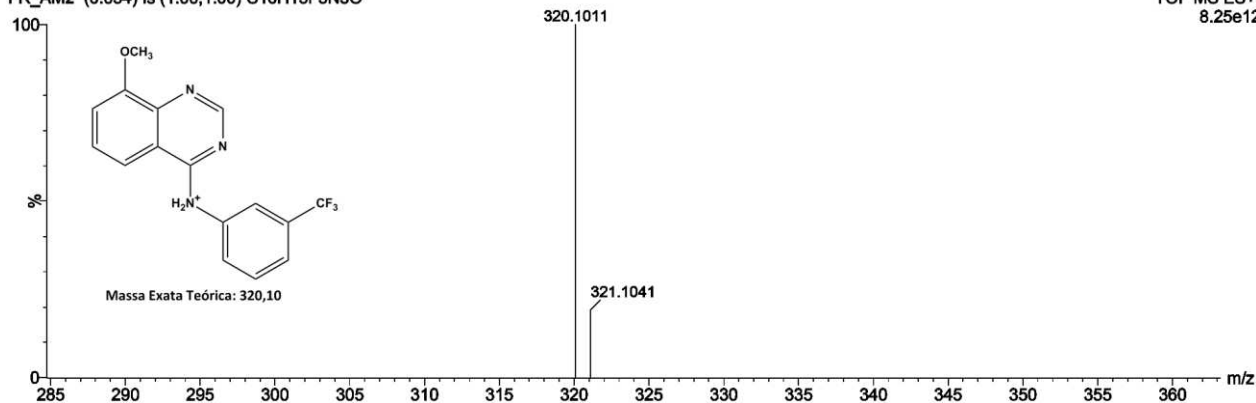
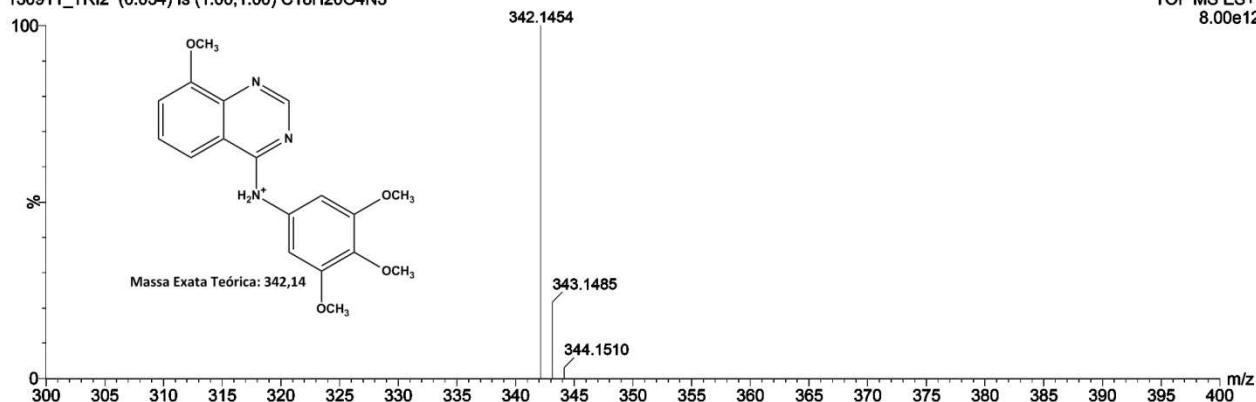
FR_AM2 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₆H₁₃F₃N₃OTOF MS ES+
8.25e12Figura A.3.20 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-CF₃.130911_TRI2 (0.034) Is (1.00,1.00) C₁₈H₂₀O₄N₃TOF MS ES+
8.00e12

Figura A.3.21 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-TRI.

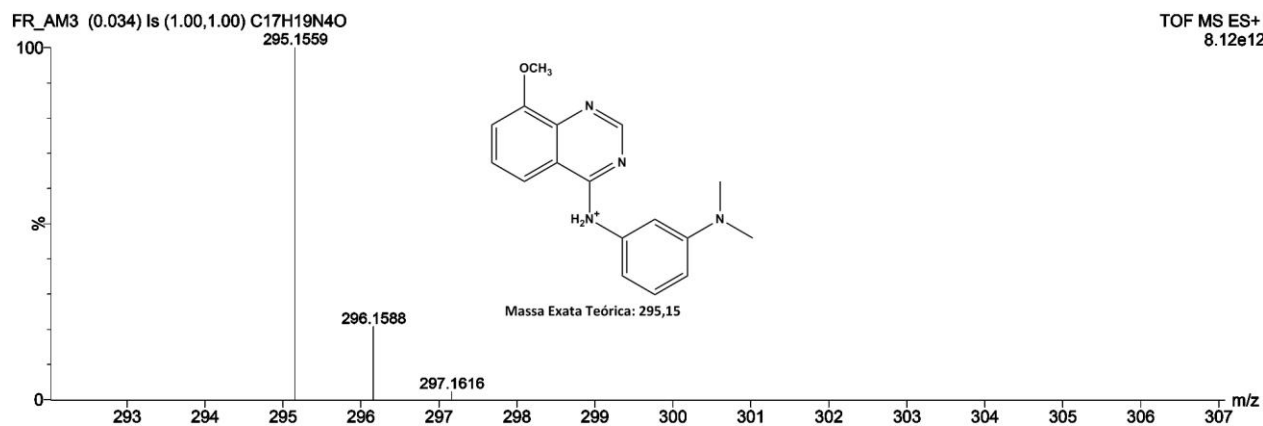


Figura A.3.22 - Espectro de MS de alta resolução do composto 8MEO-DMEA.

ANEXO 4 – ESPECTROS DE INFRAVERMELHO

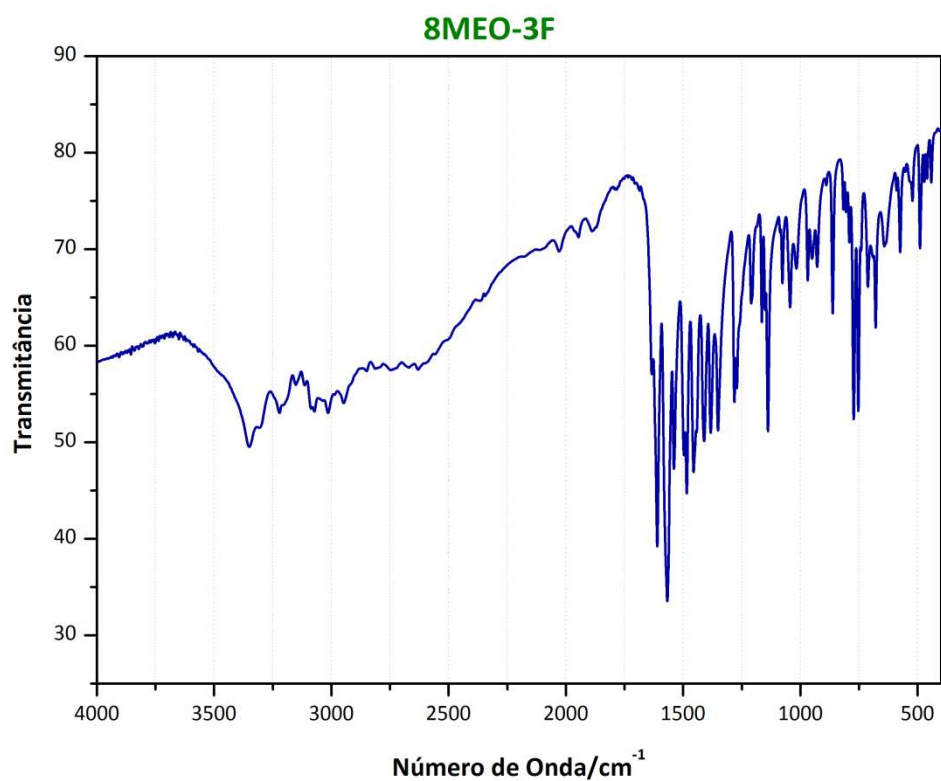


Figura A.4.1 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3F.

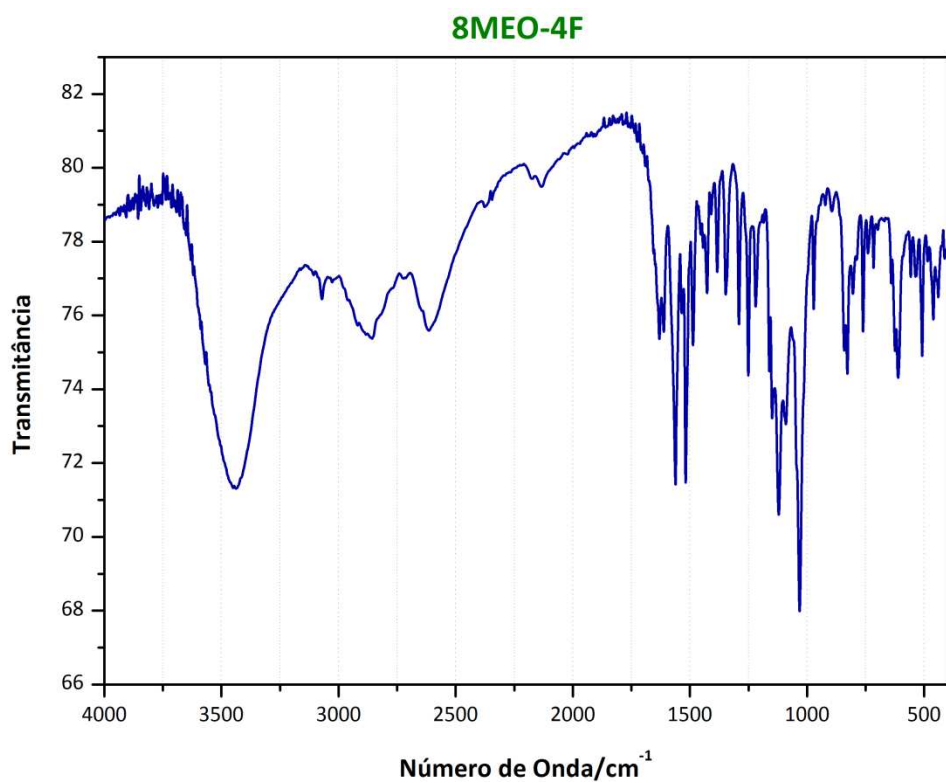


Figura A.4.2 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4F.

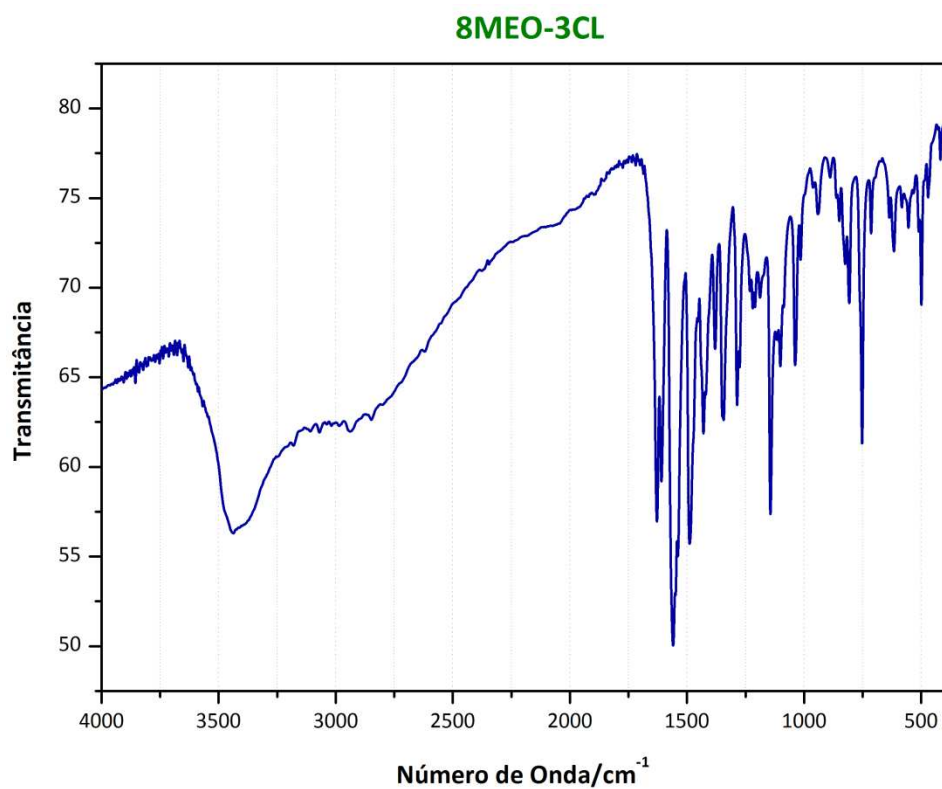


Figura A.4.3 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3Cl.

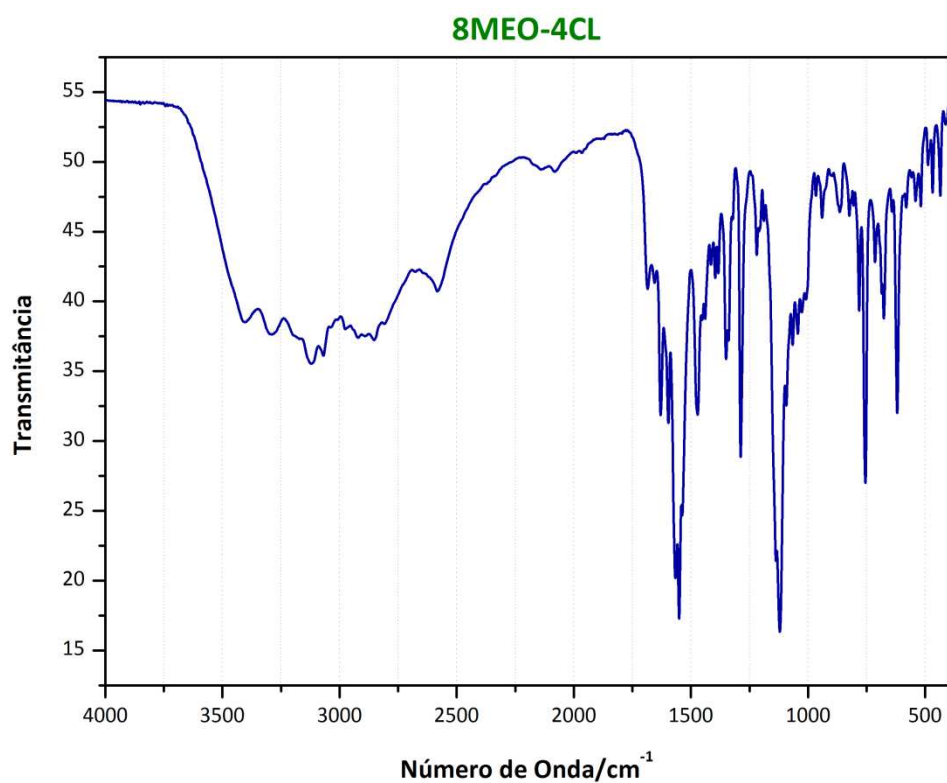


Figura A.4.4 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4Cl.

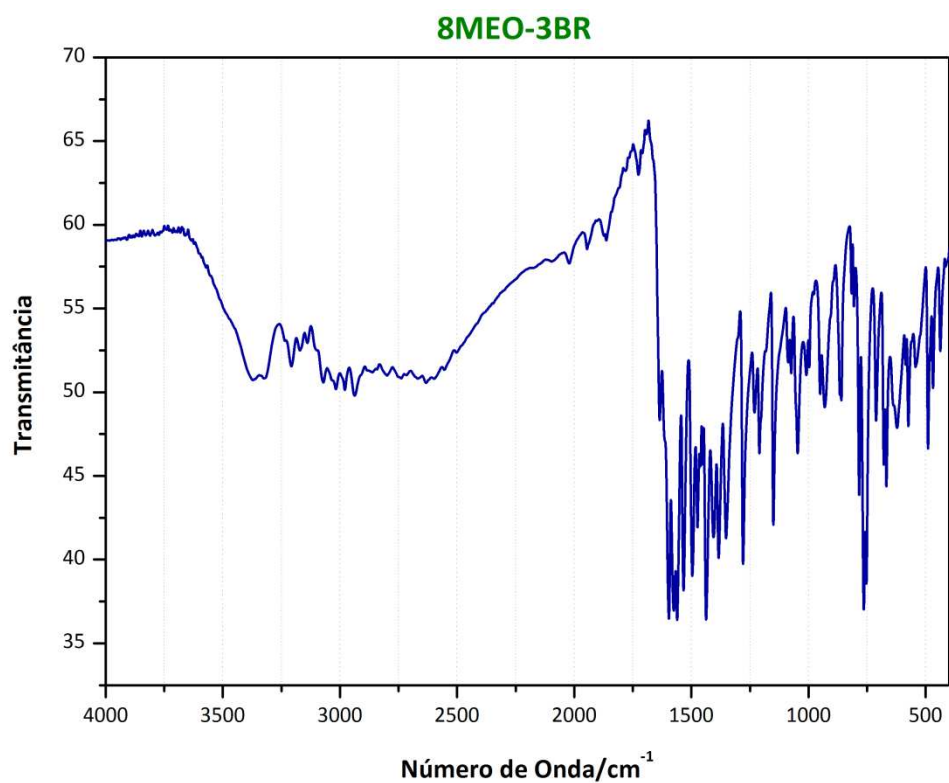


Figura A.4.5 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3Br.

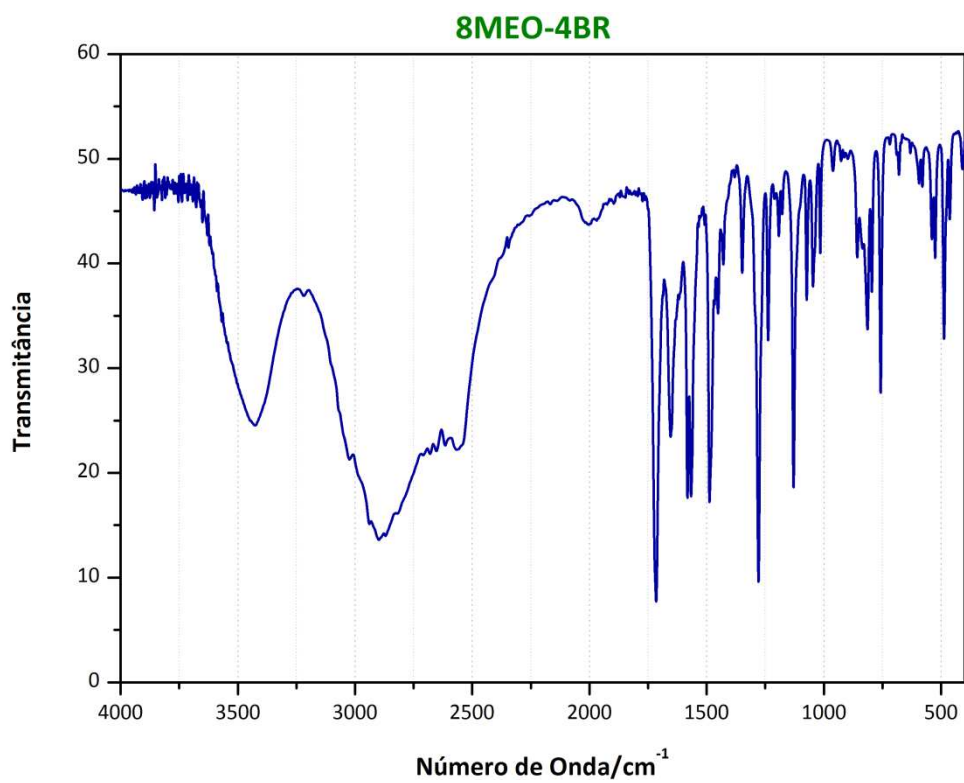


Figura A.4.6 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4Br.

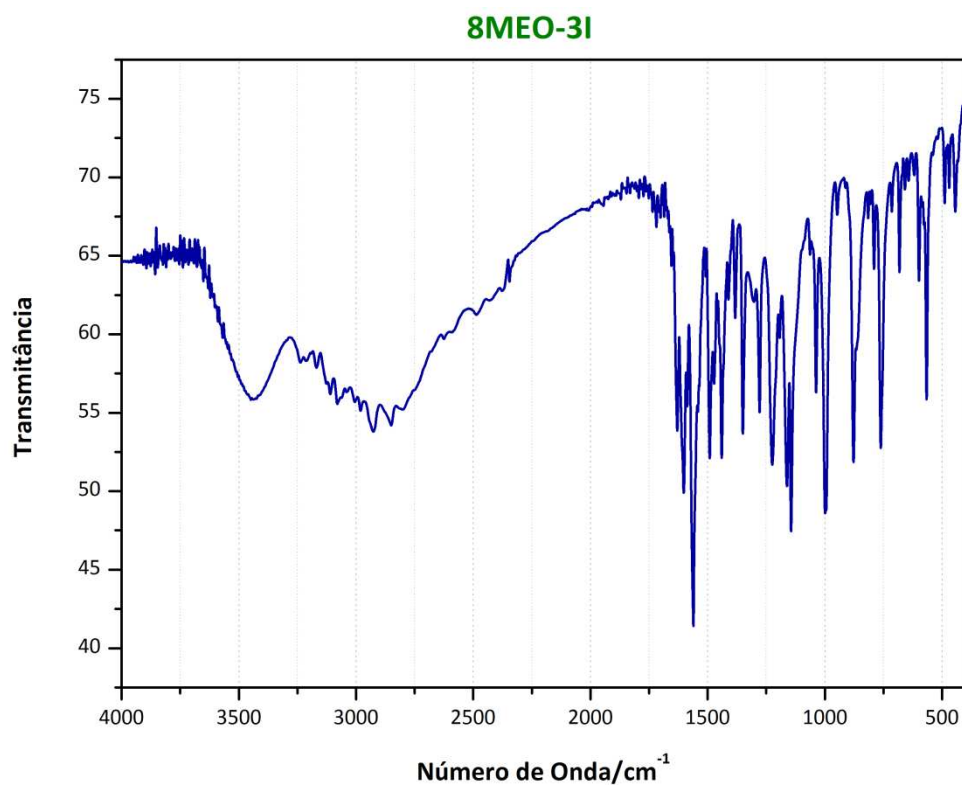


Figura A.4.7 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3I.

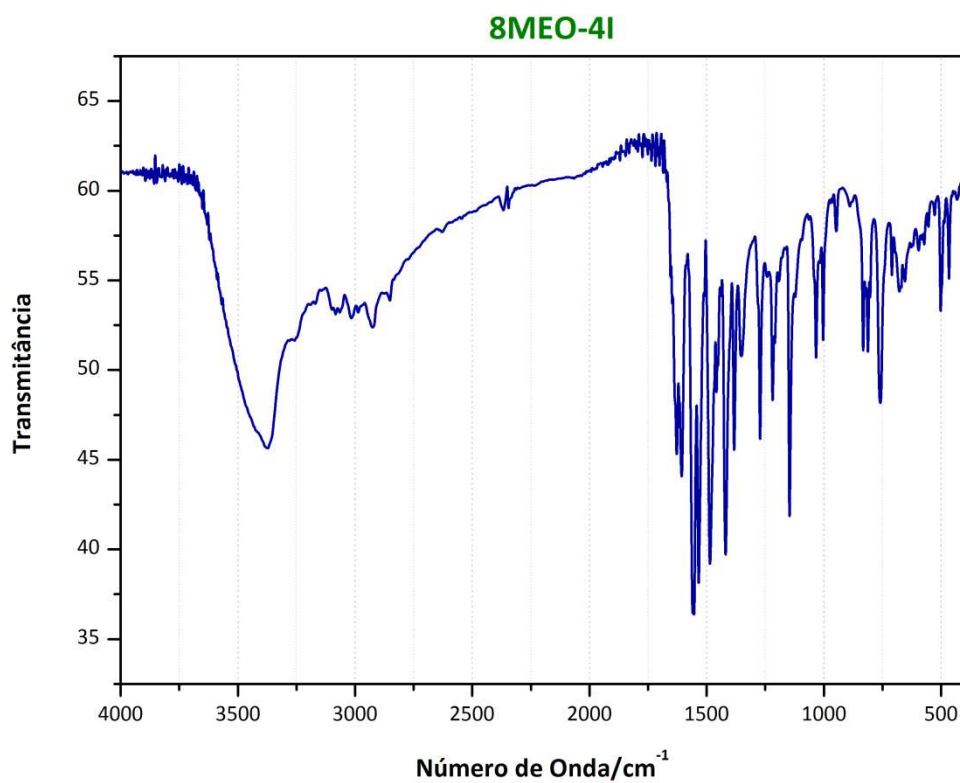


Figura A.4.8 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4I.

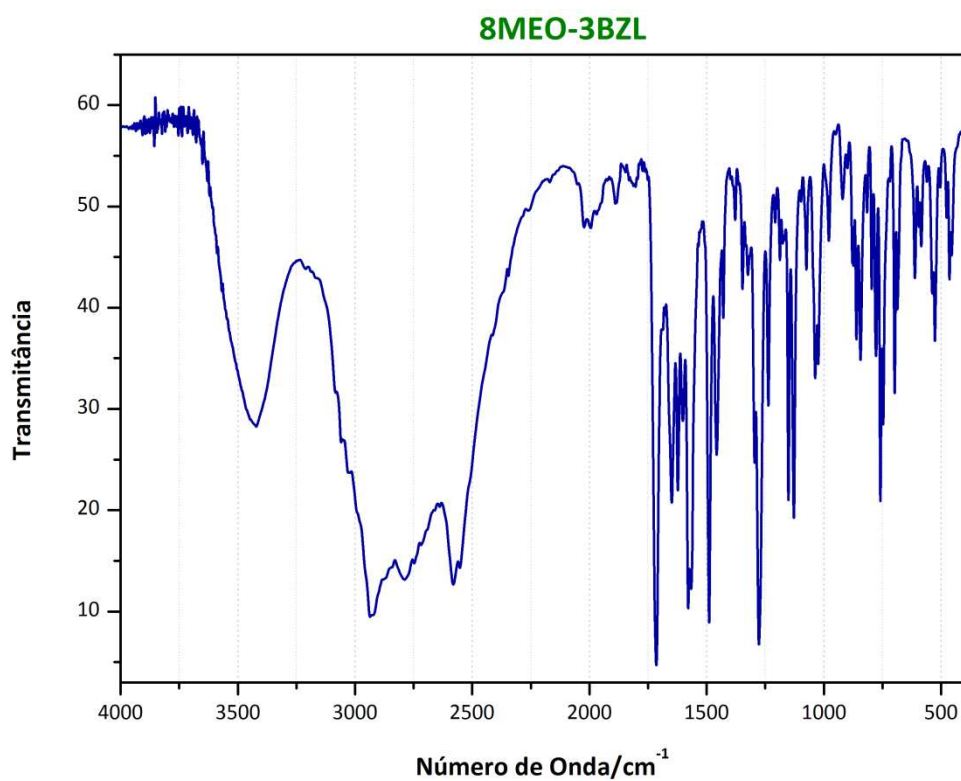


Figura A.4.9 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3BZL.

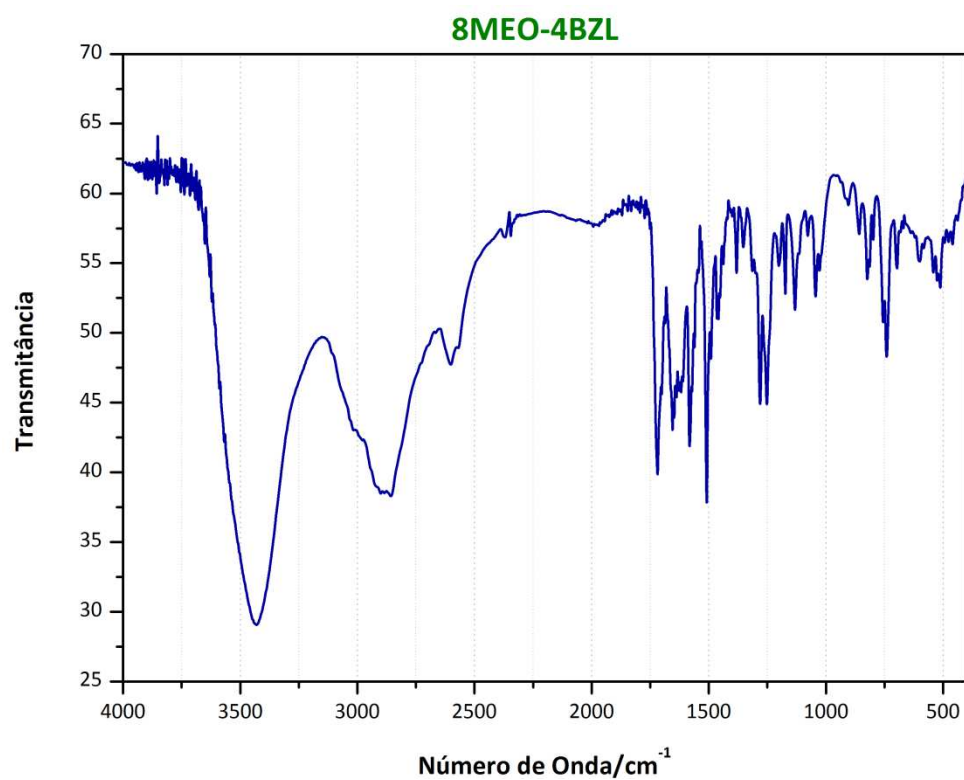
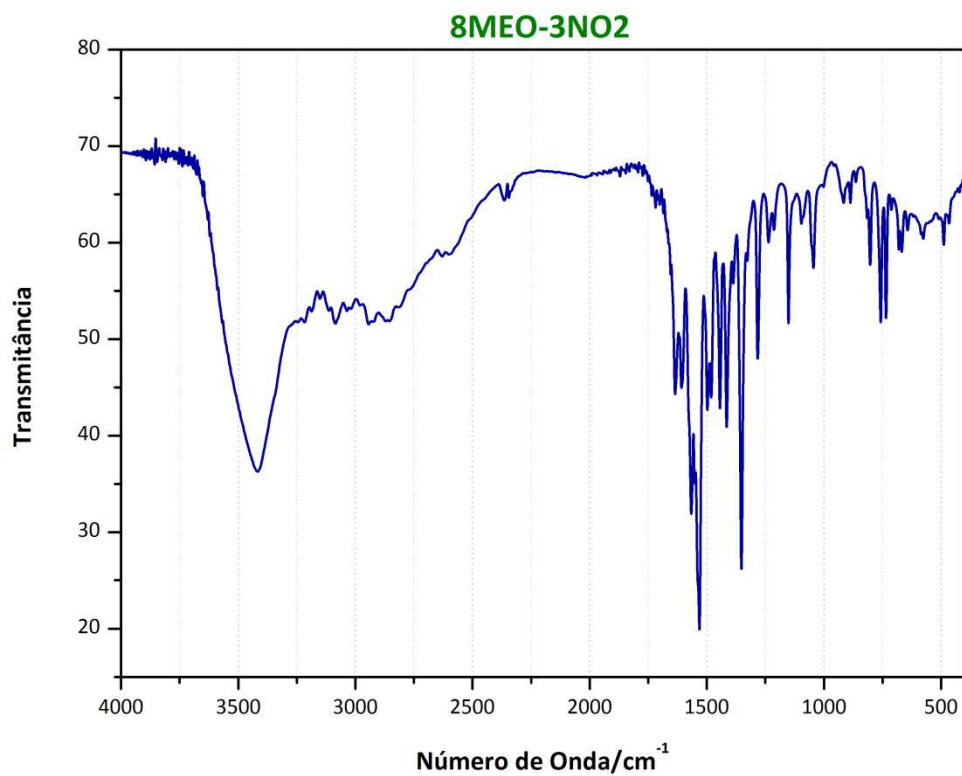
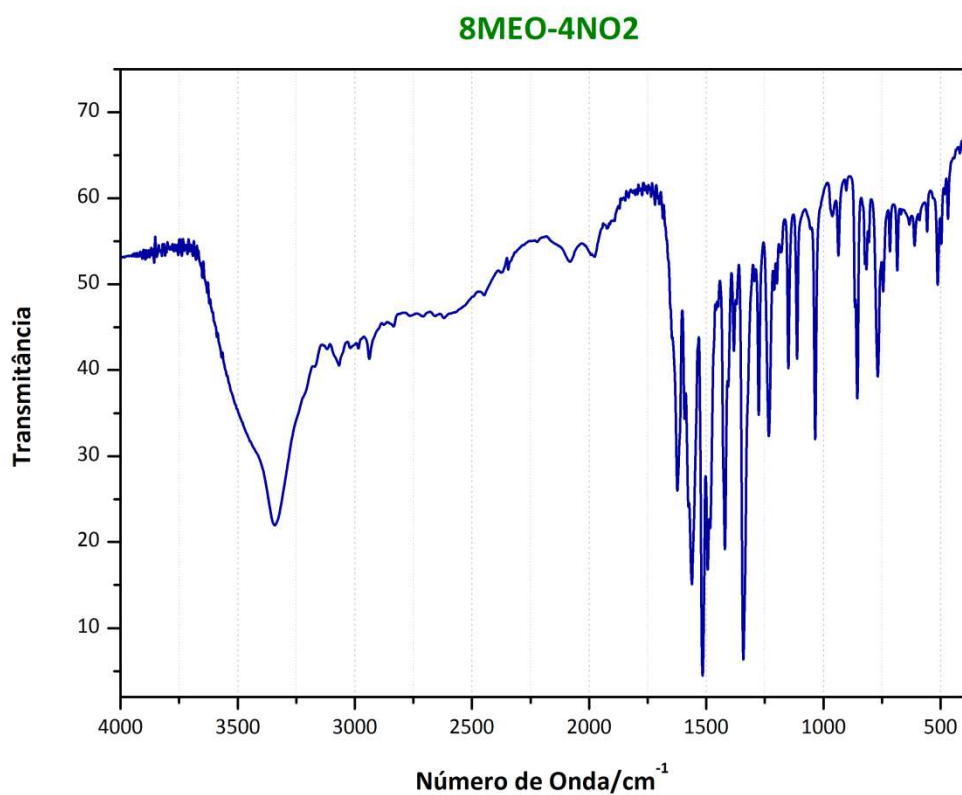


Figura A.4.10 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4BZL.

Figura A.4.11 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3NO₂.Figura A.4.12 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4NO₂.

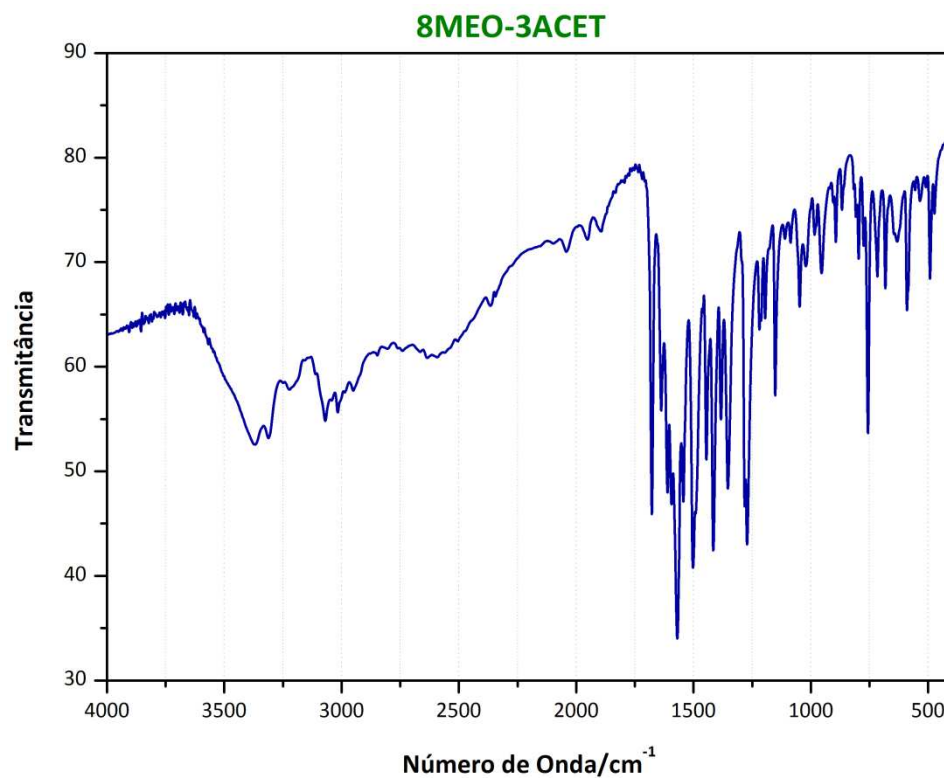


Figura A.4.13 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3ACET.

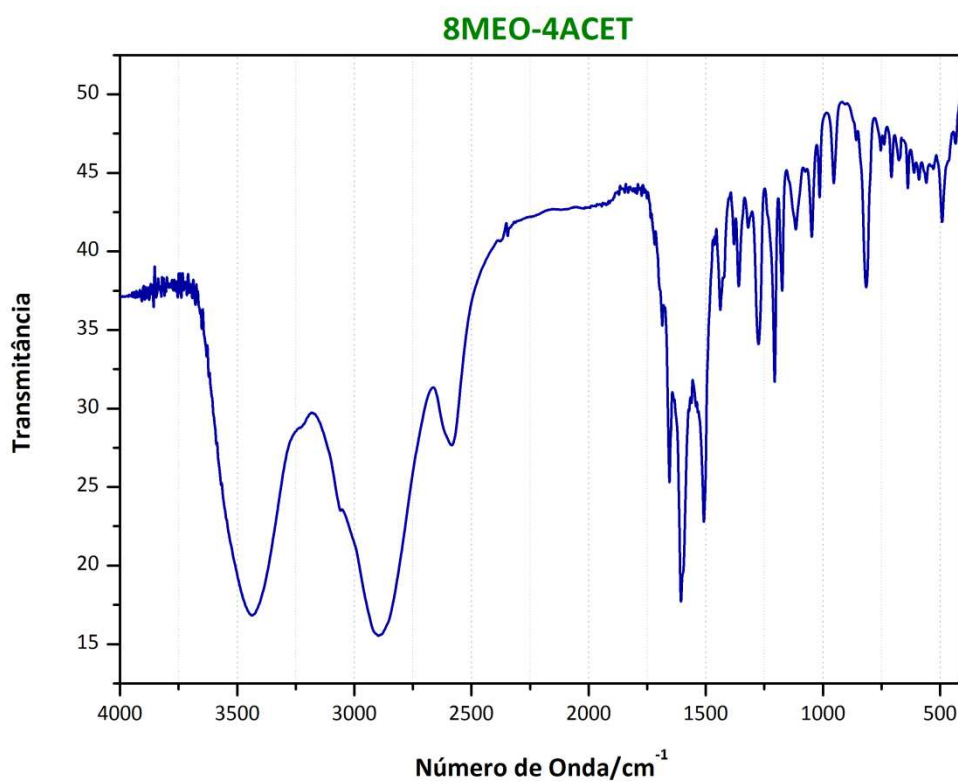


Figura A.4.14 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4ACET.

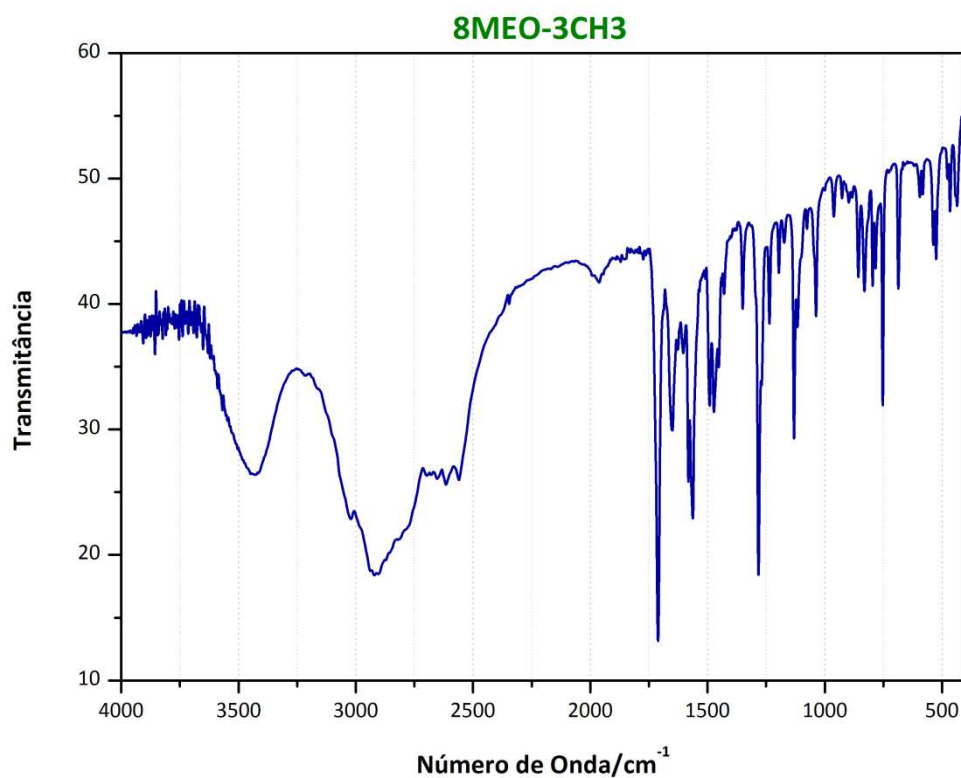


Figura A.4.15 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3CH₃.

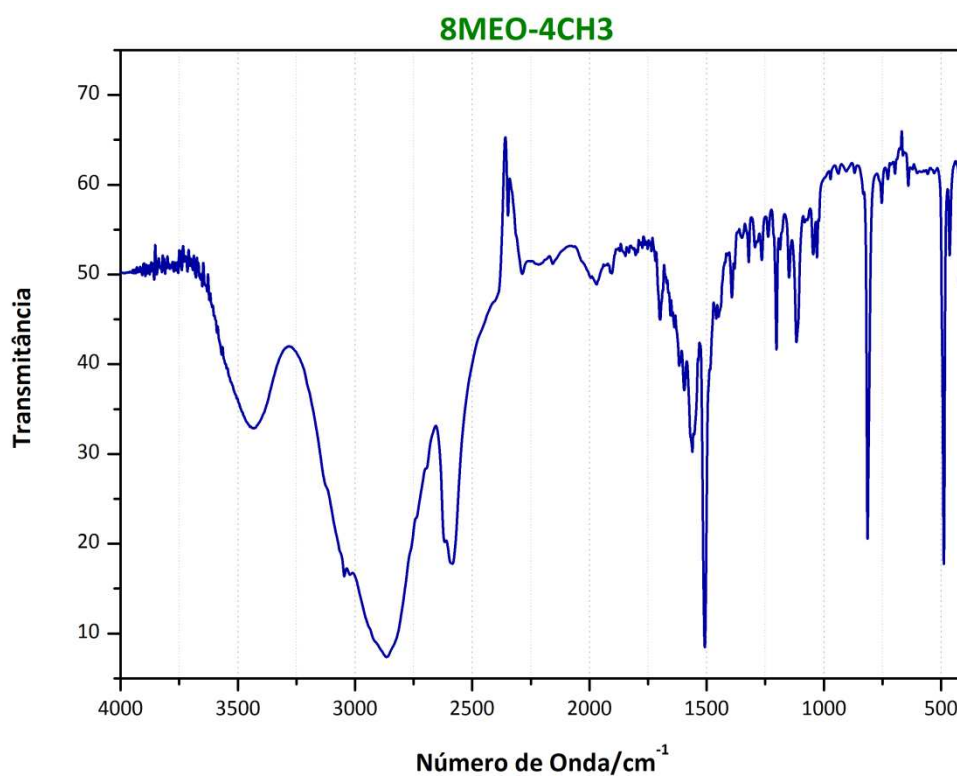


Figura A.4.16 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4CH₃.

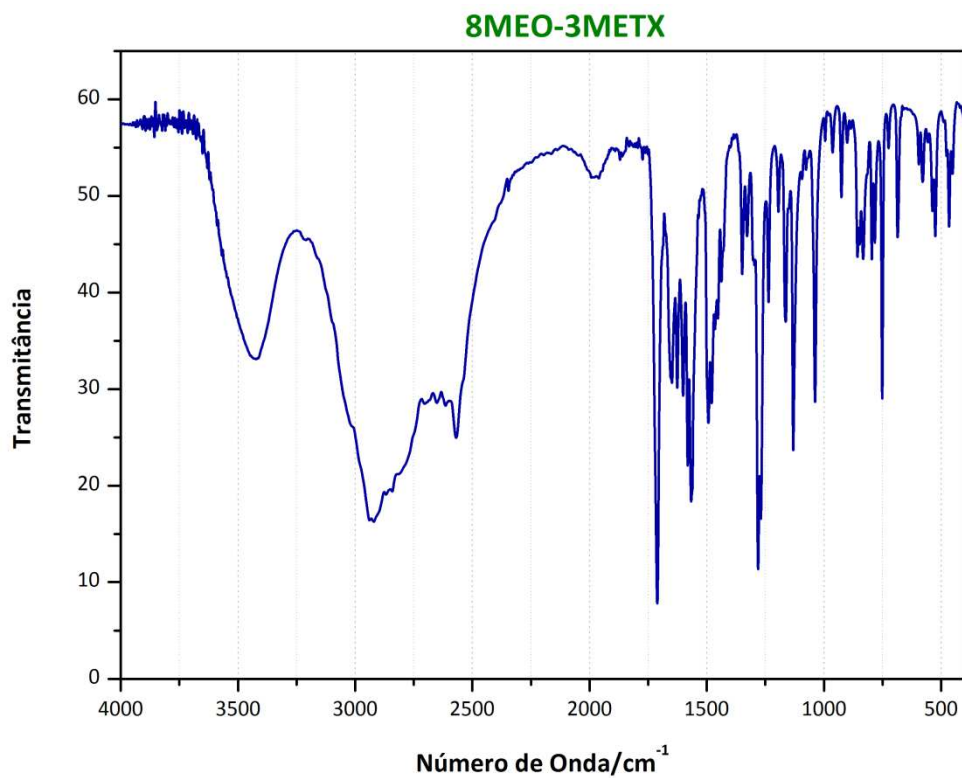


Figura A.4.17 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-3METX.

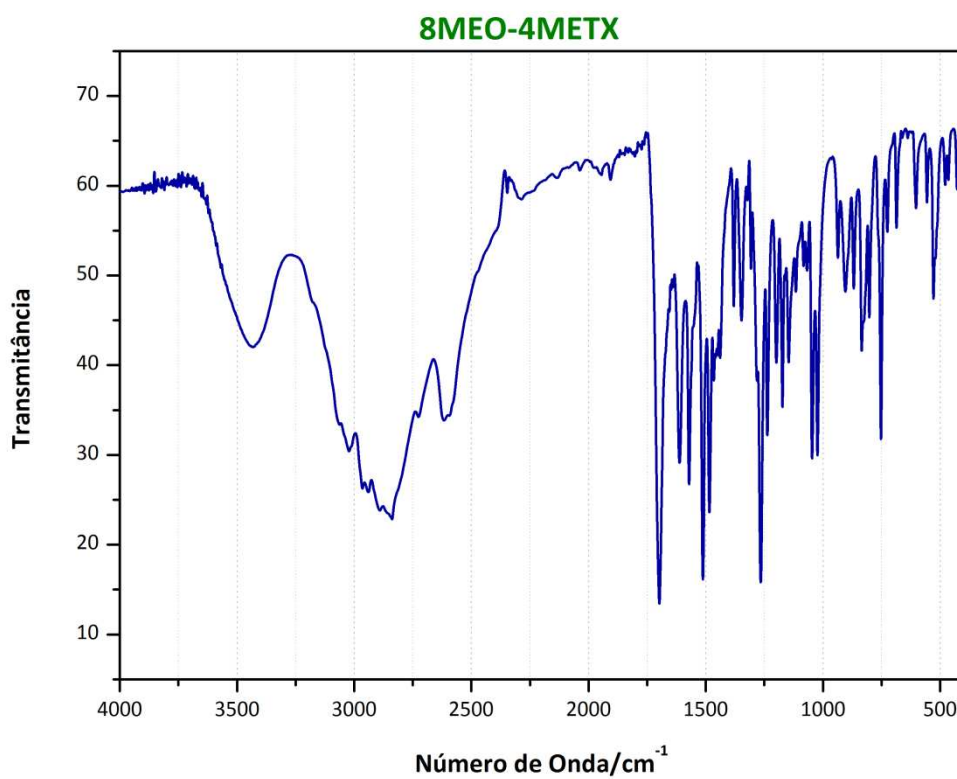


Figura A.4.18 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-4METX.

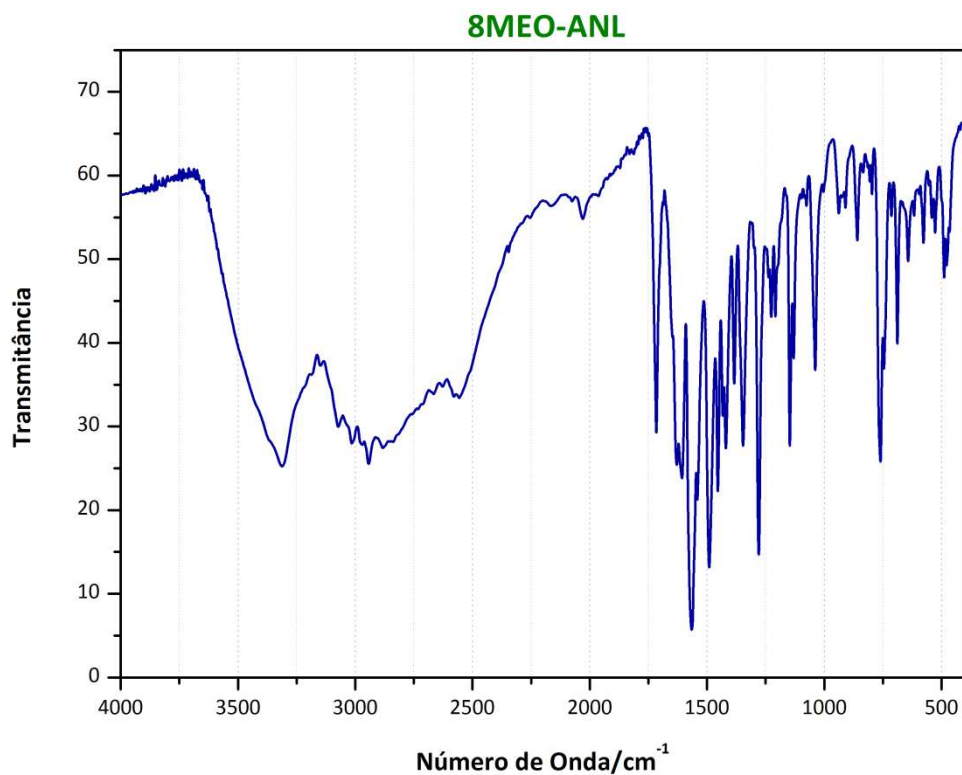
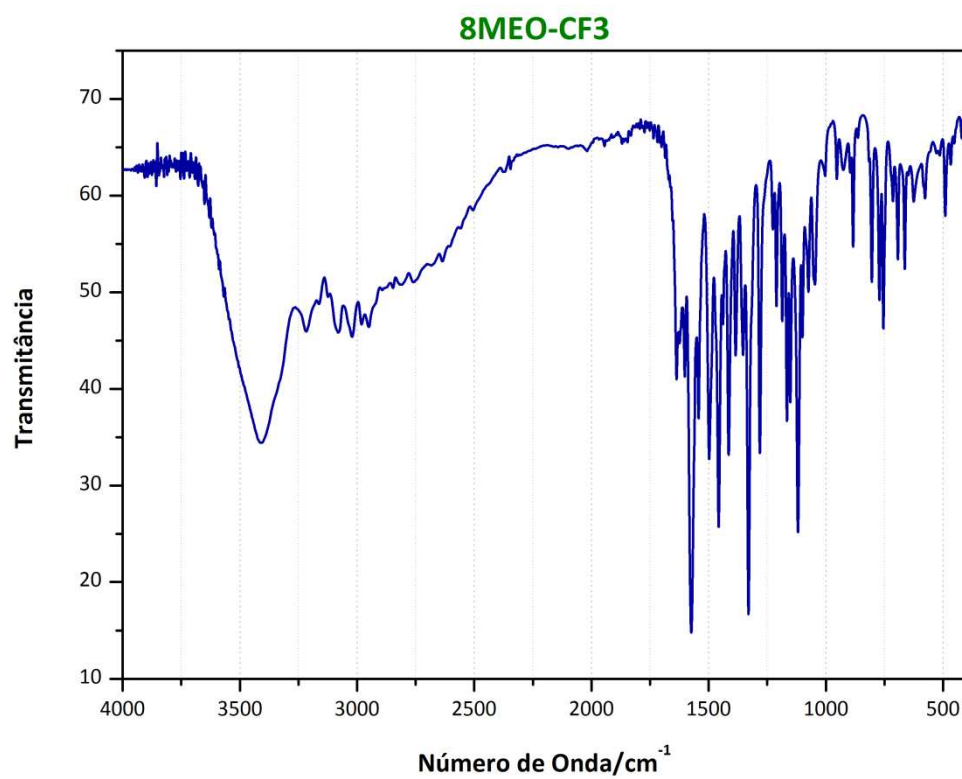


Figura A.4.19 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-ANL.

Figura A.4.20 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-CF₃.

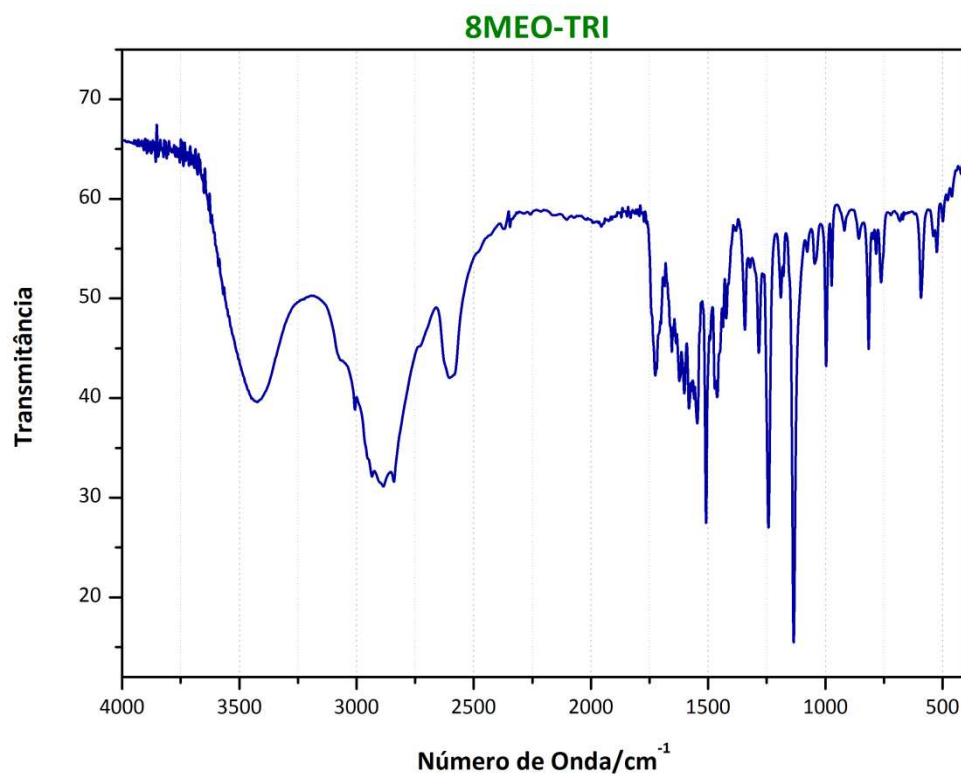


Figura A.4.21 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-TRI.

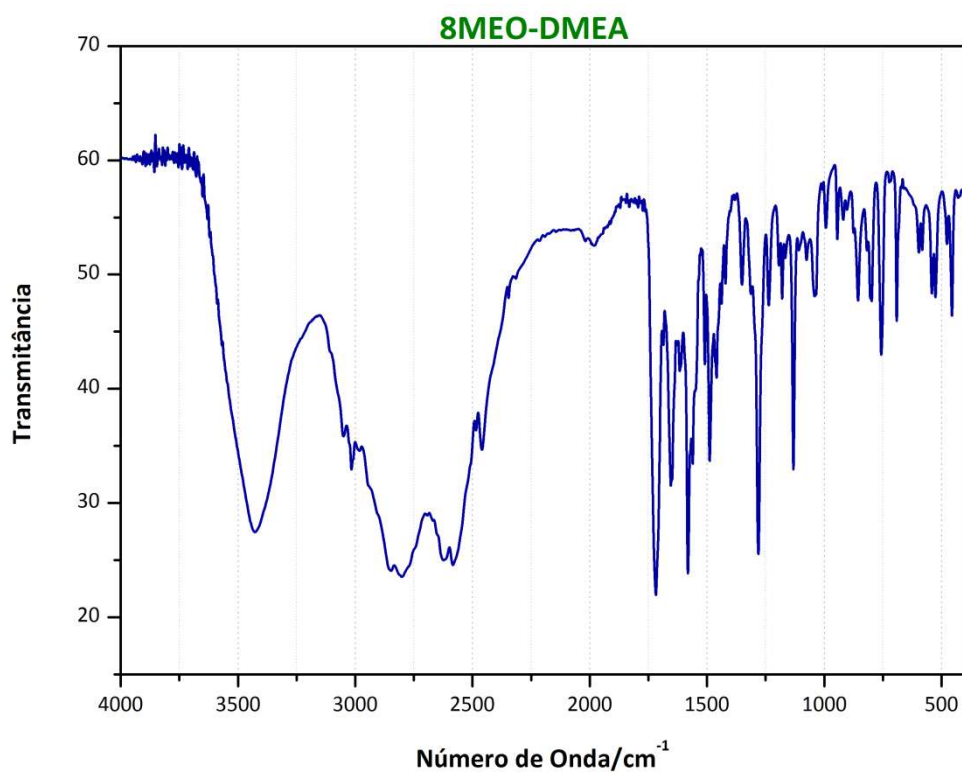


Figura A.4.22 - Espectro de Infravermelho do composto 8MEO-DMEA.

ANEXO 5 – MAPAS BIDIMENSIONAIS DE INTERAÇÃO

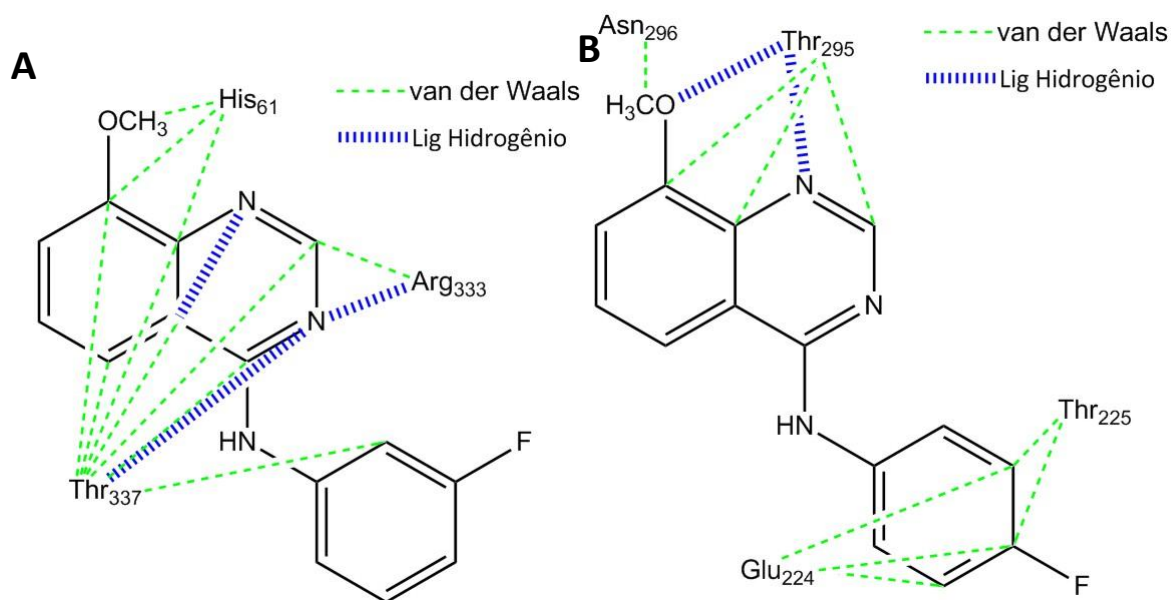


Figura A.5.1 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.

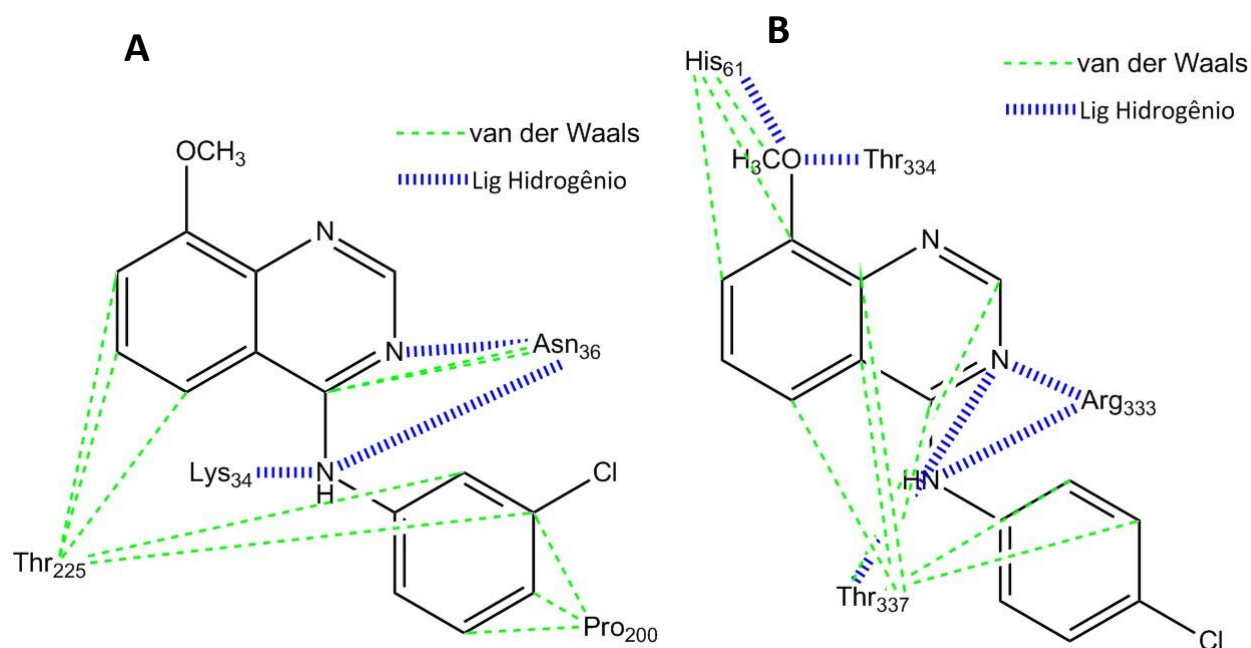


Figura A.5.2 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.

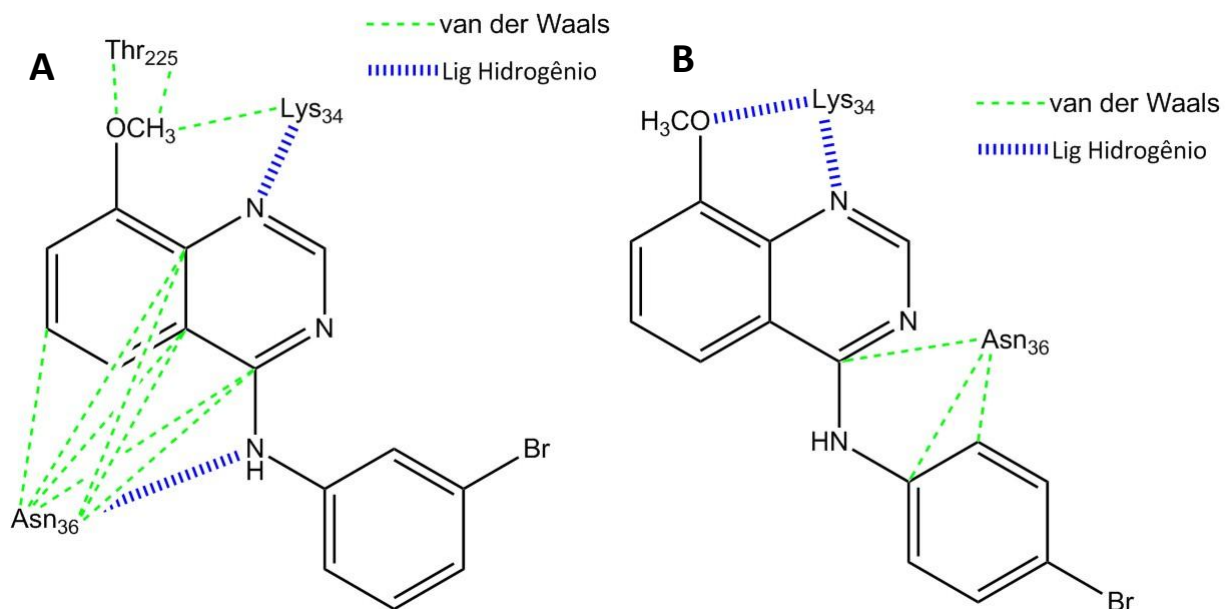


Figura A.5.3 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.

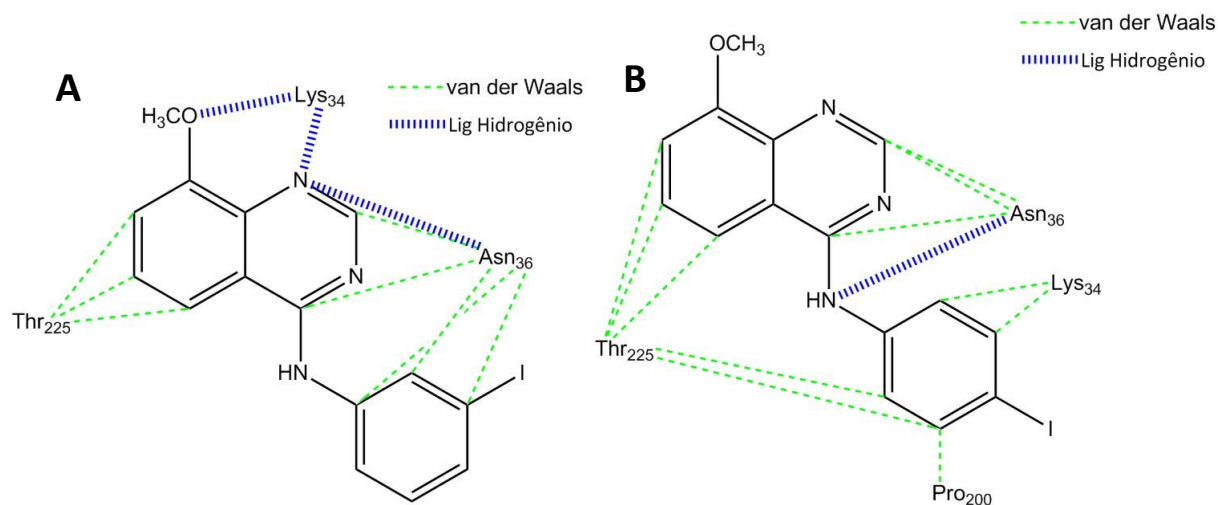


Figura A.5.4 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.

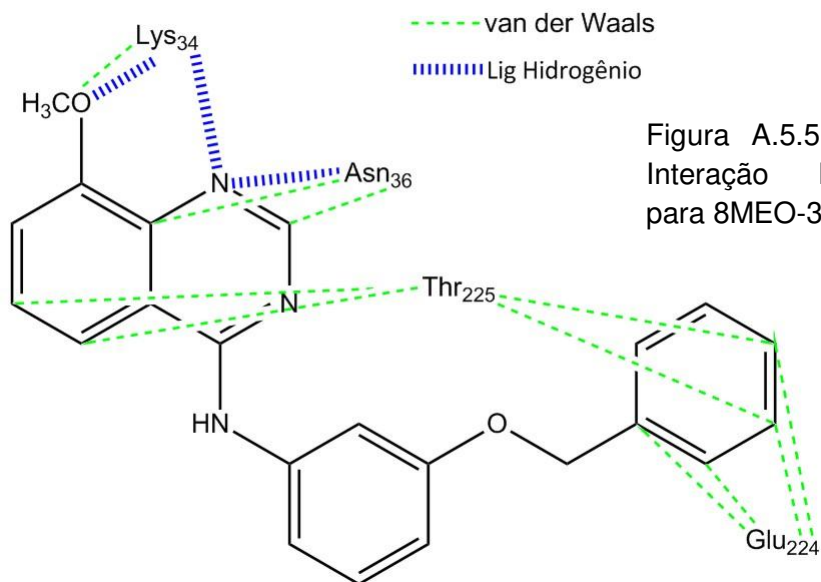


Figura A.5.5 - Mapas de Interação Bidimensionais para 8MEO-3BZL.

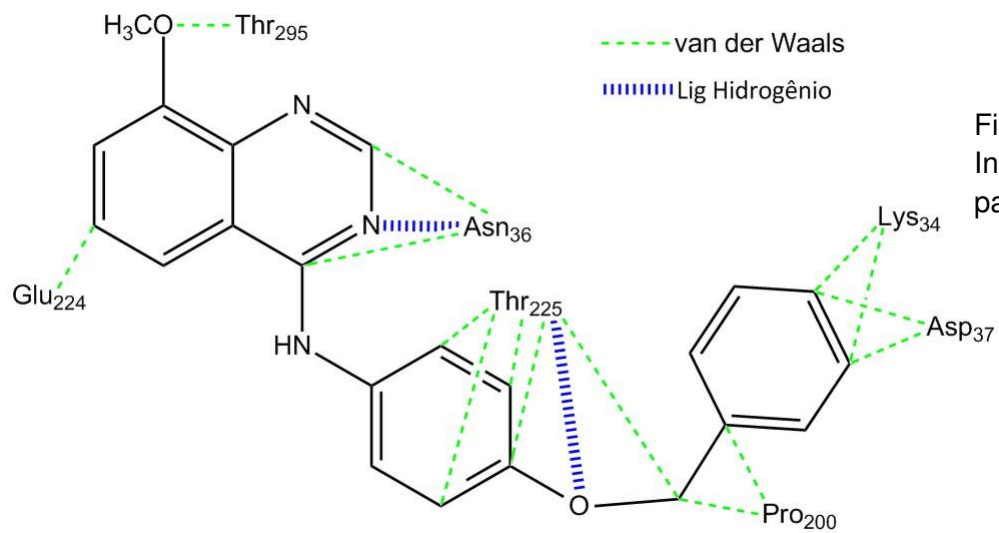


Figura A.5.6 - Mapas de Interação Bidimensionais para 8MEO-4BZL.

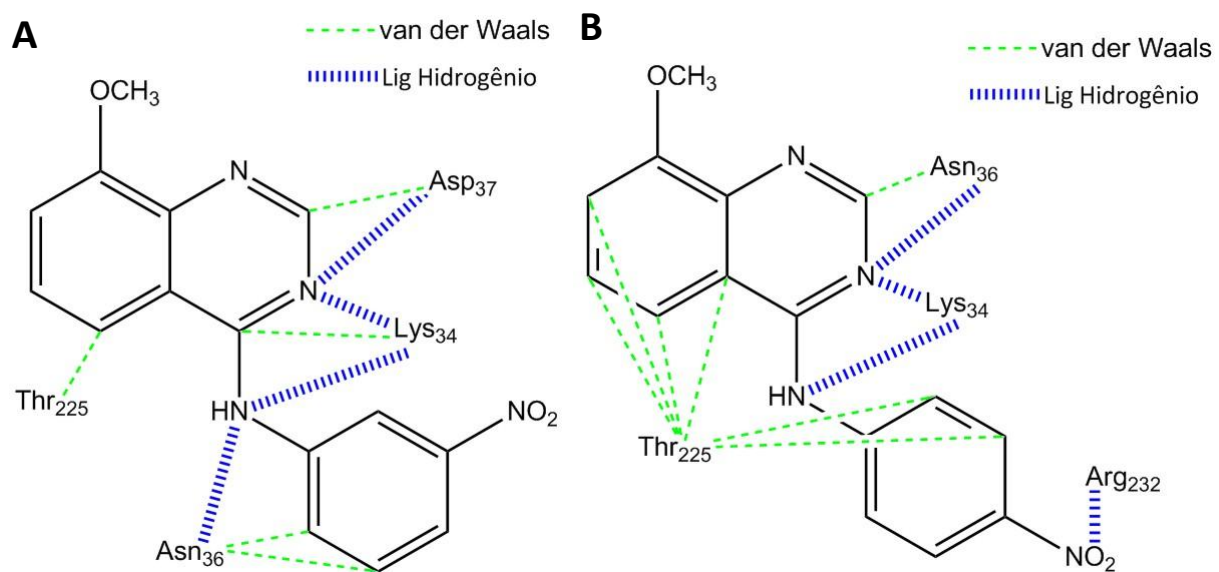


Figura A.5.7 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3NO₂ e (B) 8MEO-4NO₂.

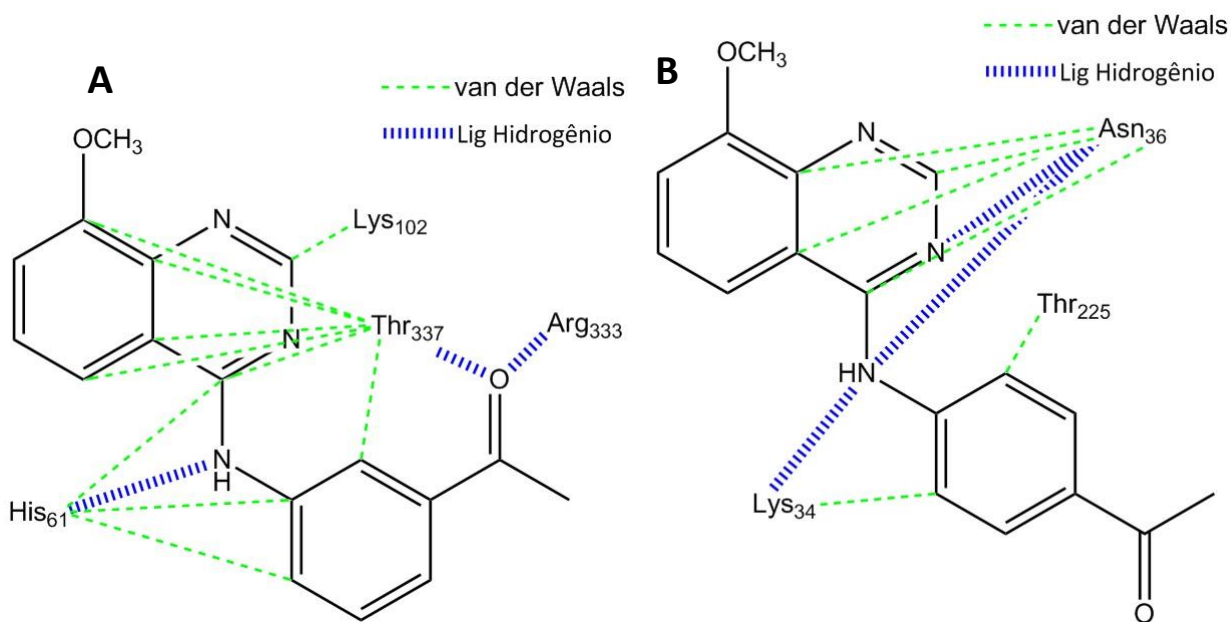


Figura A.5.8 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.

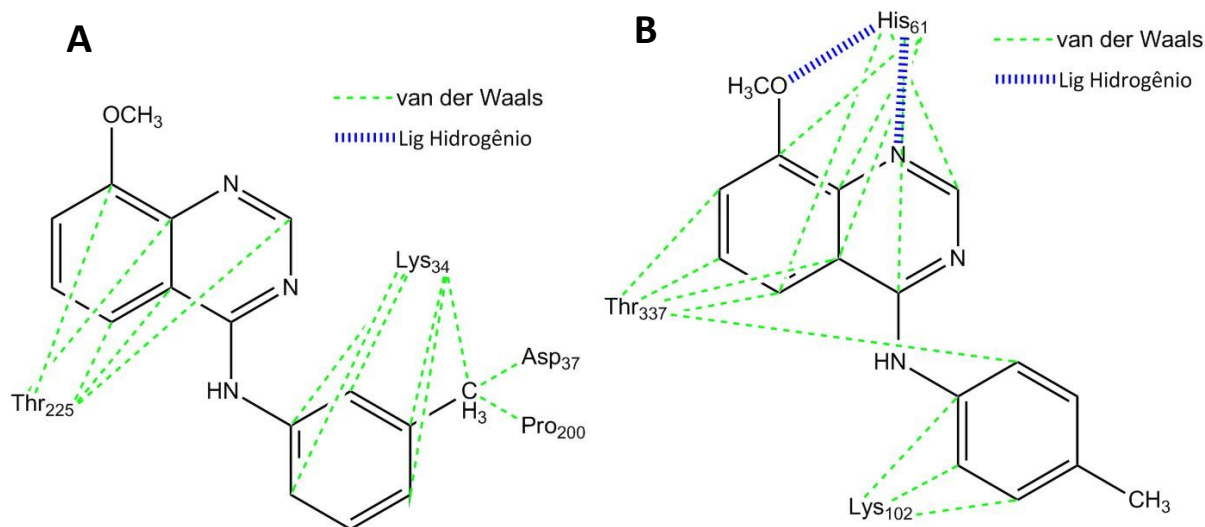


Figura A.5.9 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3CH₃ e (B) 8MEO-4CH₃.

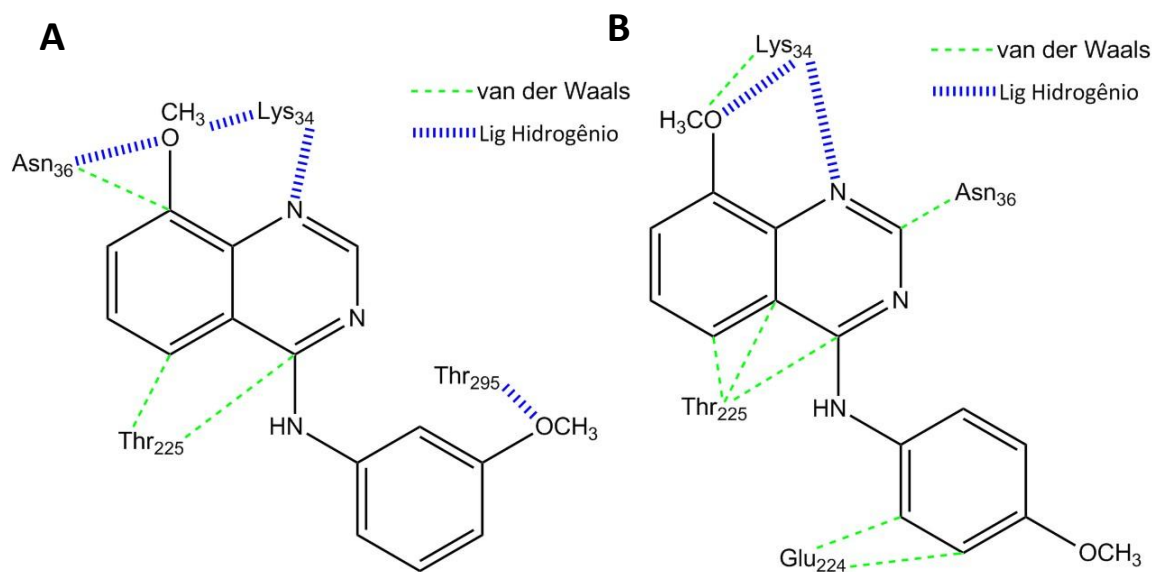


Figura A.5.10 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.

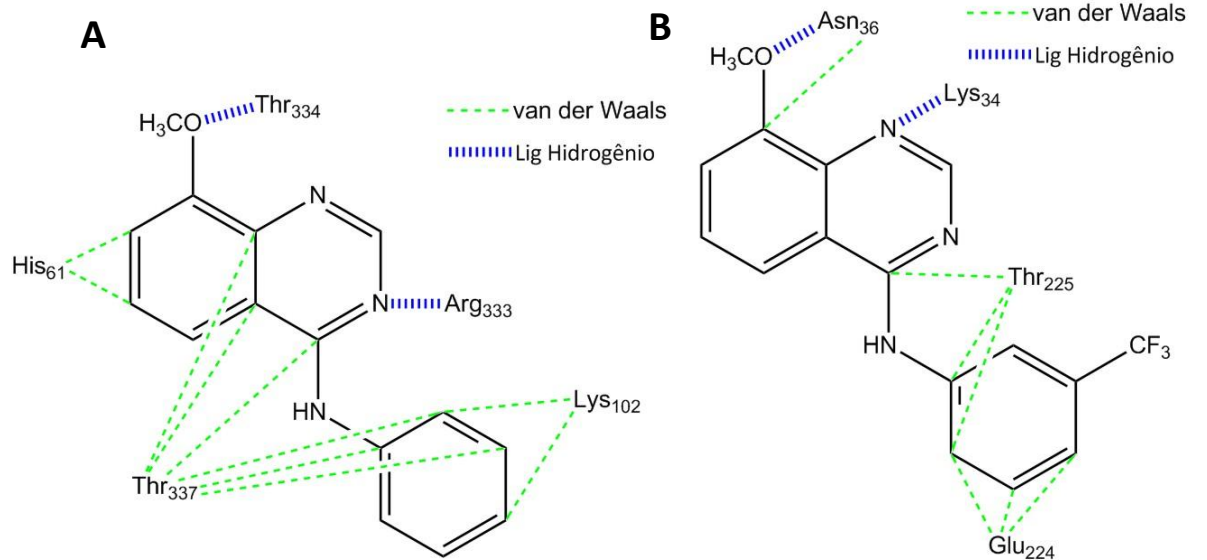


Figura A.5.11 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF₃.

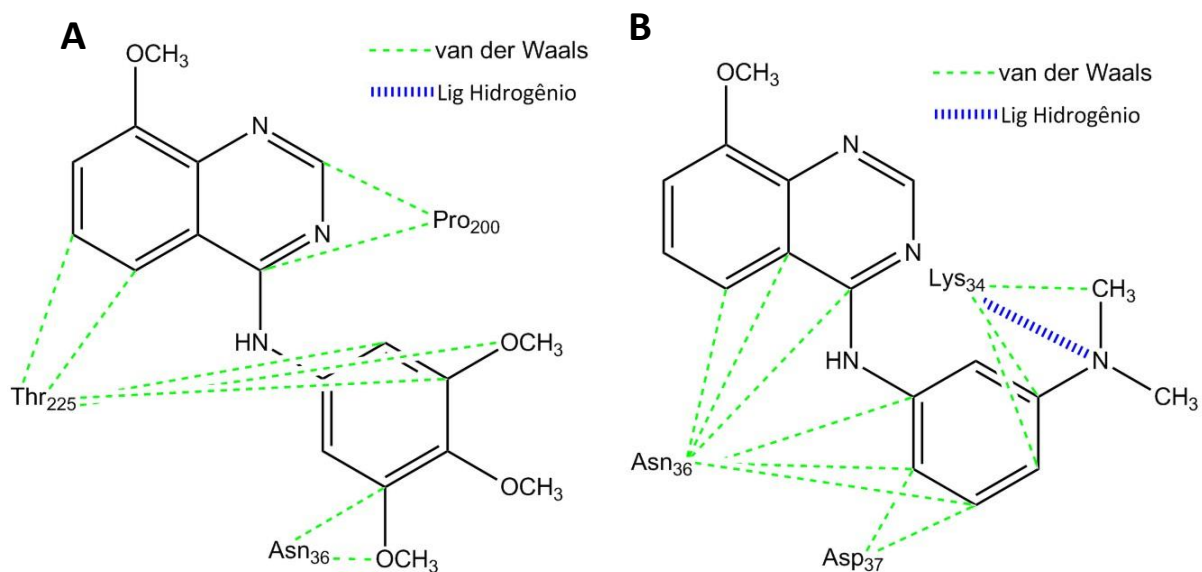


Figura A.5.12 - Mapas de Interação Bidimensionais para (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.

ANEXO 6 – HIPÓTESE DE INIBIÇÃO

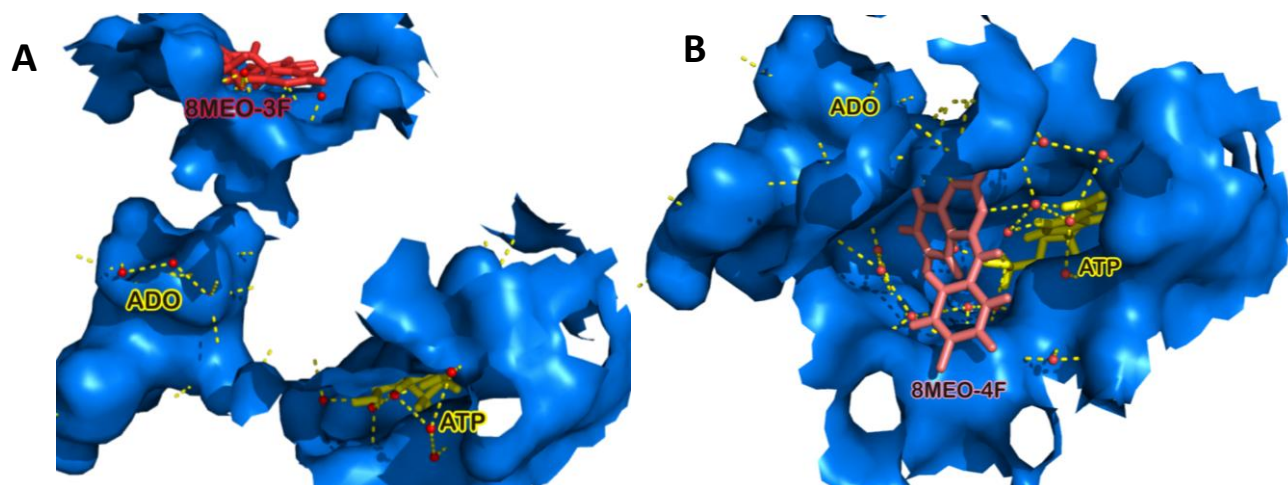


Figura A.6.1 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.

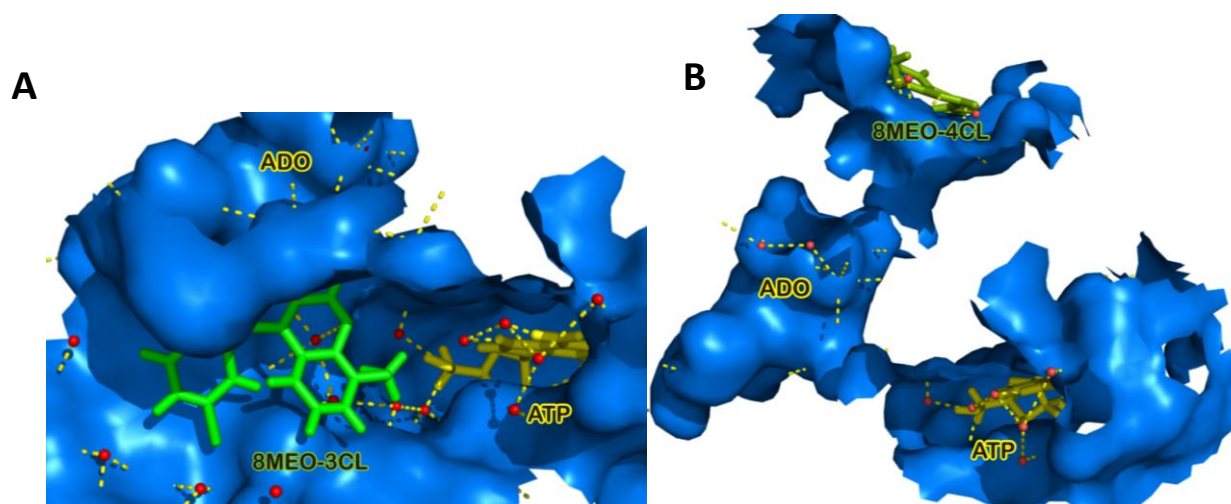


Figura A.6.2 -Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.

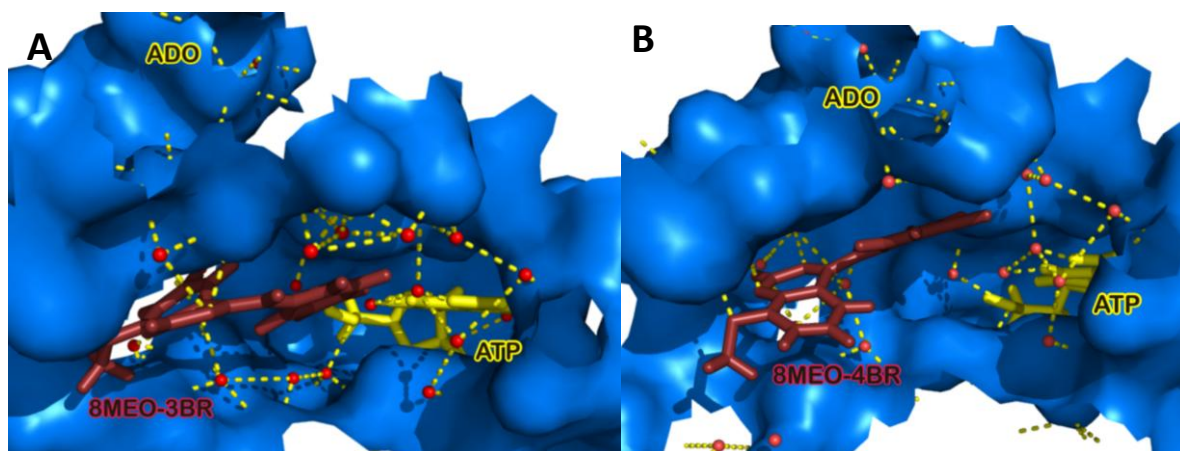


Figura A.6.3 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.

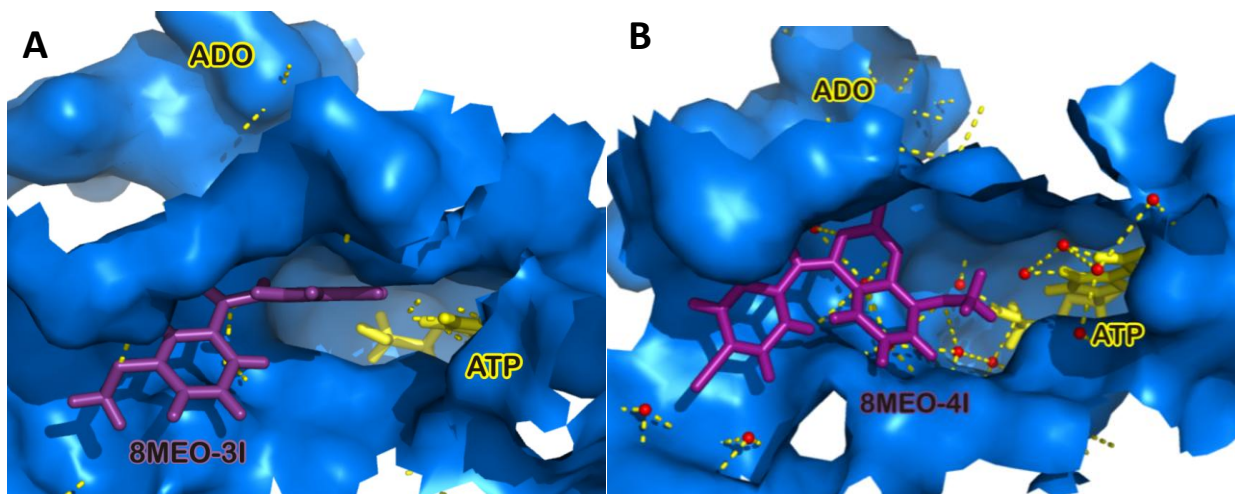


Figura A.6.4 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.

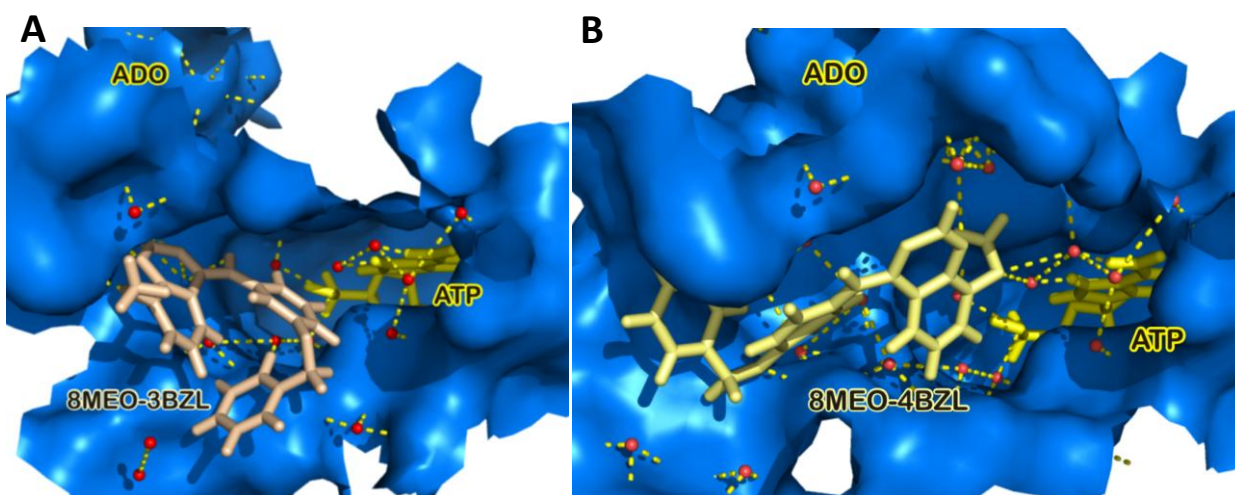


Figura A.6.5 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.

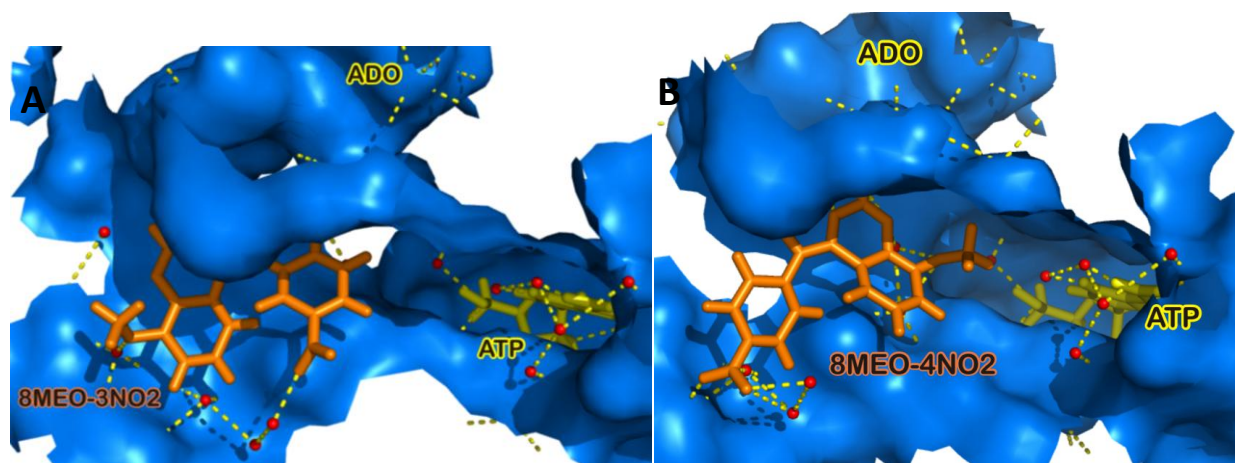


Figura A.6.6 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3NO₂ e (B) 8MEO-4NO₂.

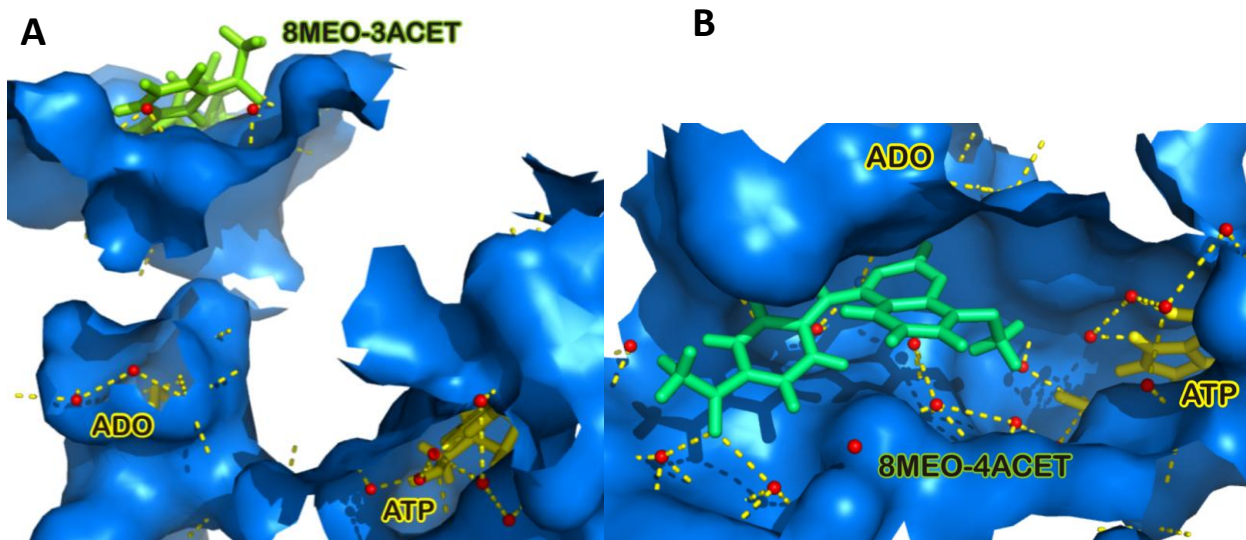


Figura A.6.7 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.

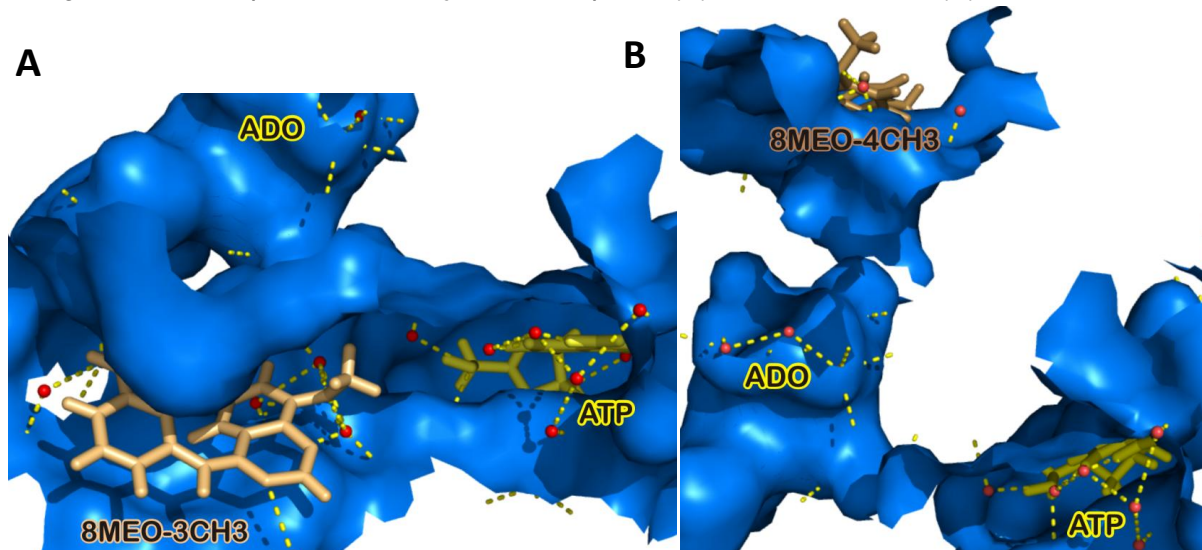


Figura A.6.8 -Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3CH₃ e (B) 8MEO-4CH₃.

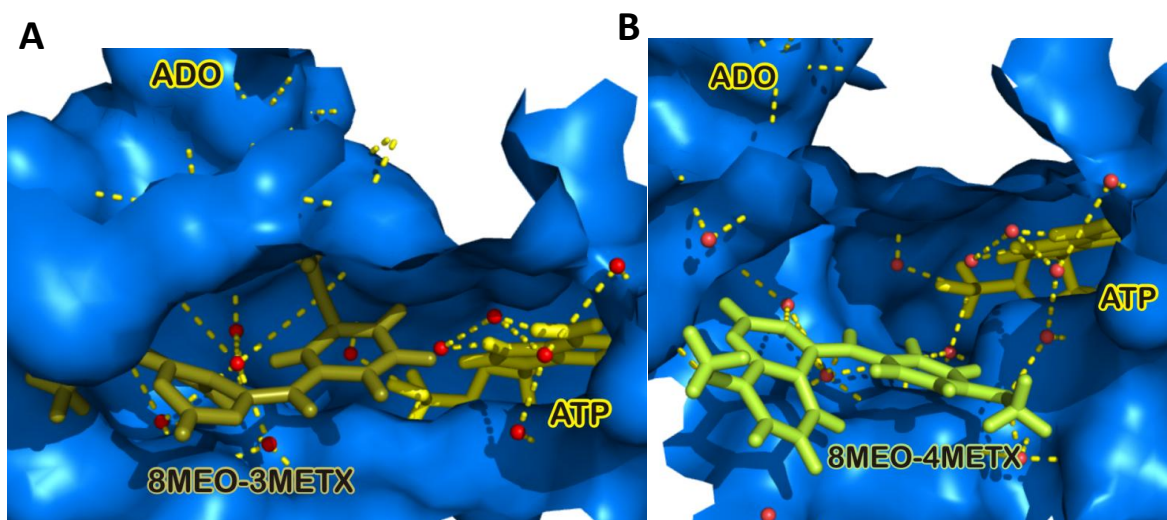


Figura A.6.9 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.

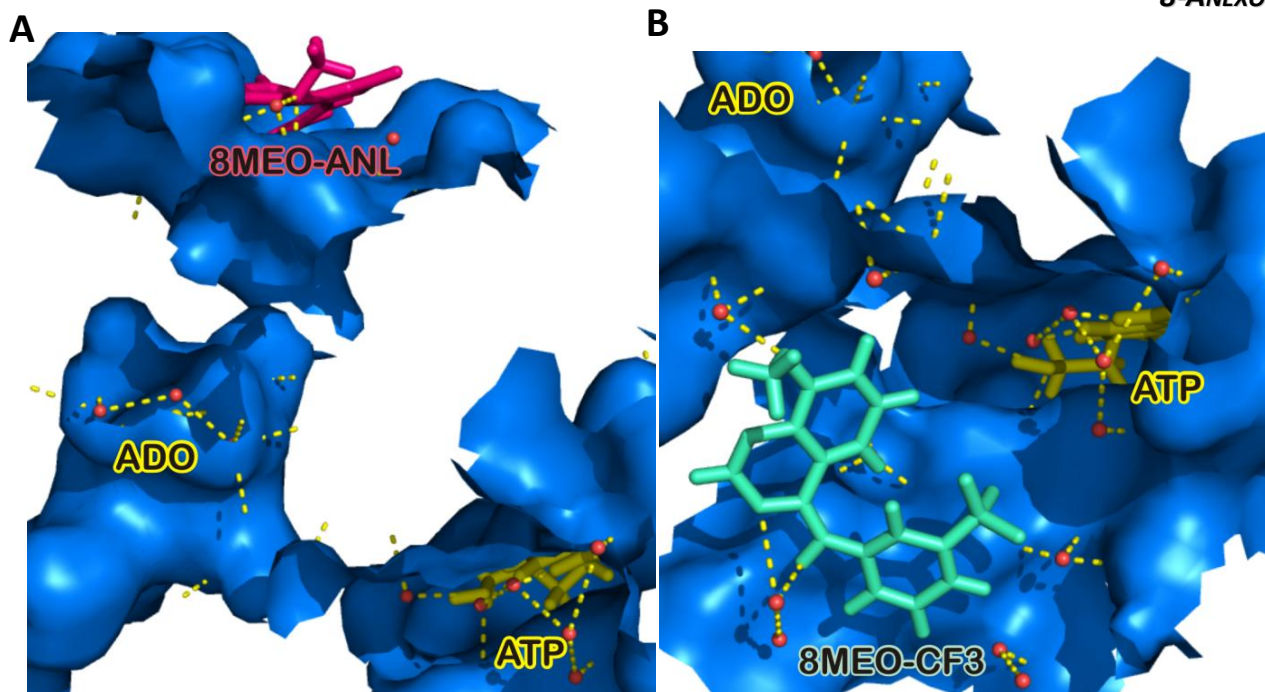


Figura A.6.10 -Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF₃.

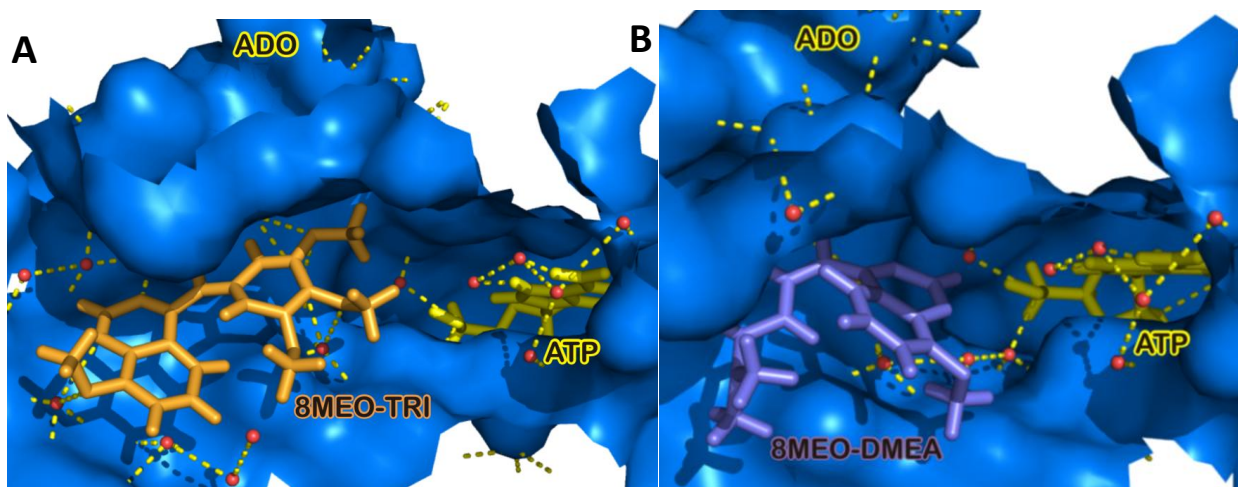


Figura A.6.11 - Hipótese de inibição do composto (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.

ANEXO 7 – ESPECTROS DE SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA

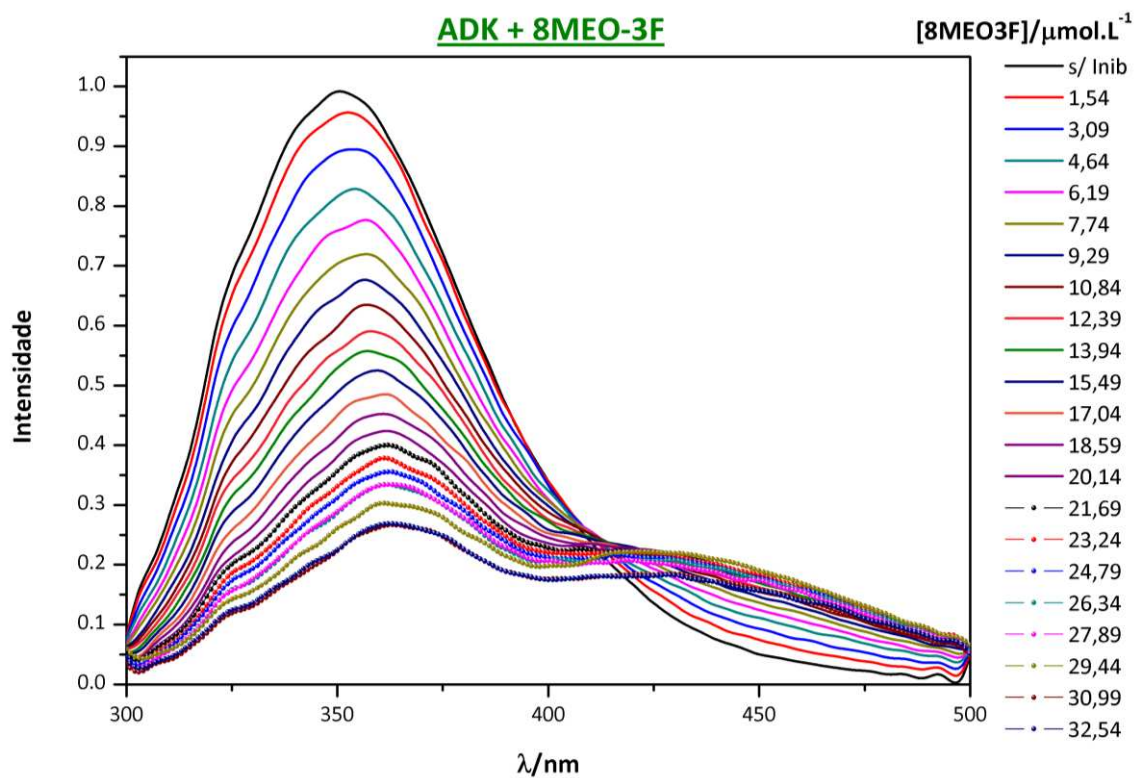


Figura A.7.1 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3F.

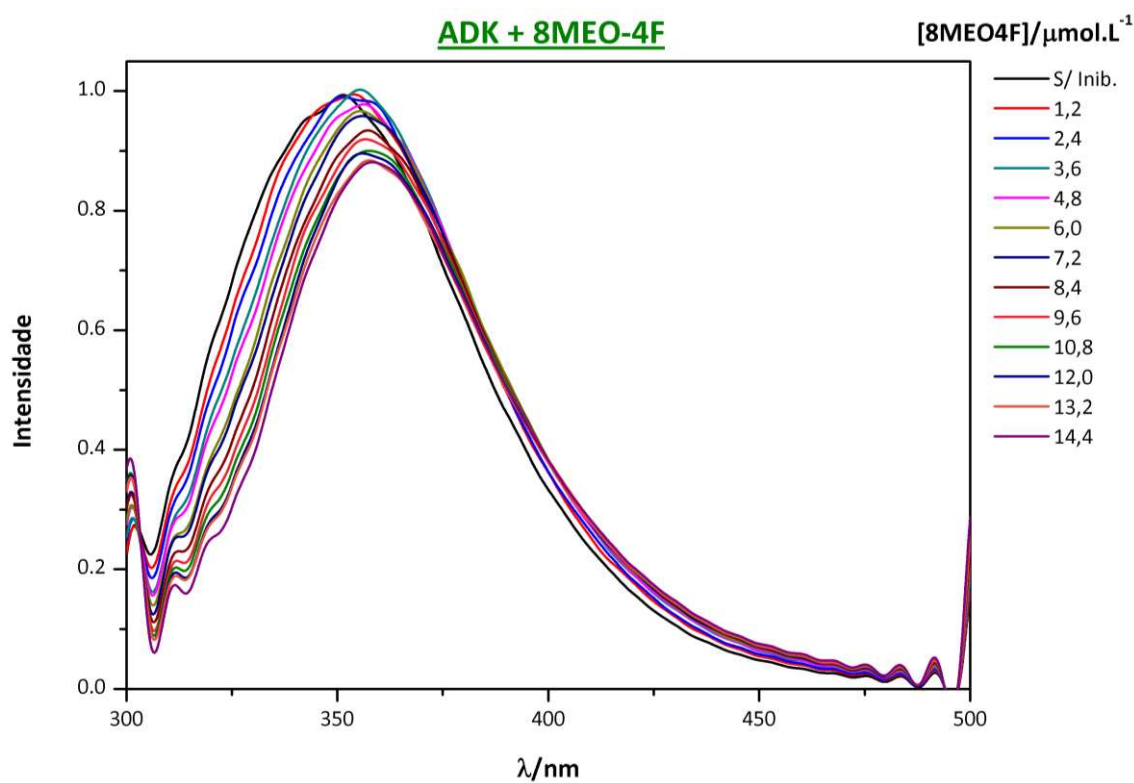


Figura A.7.2 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4F.

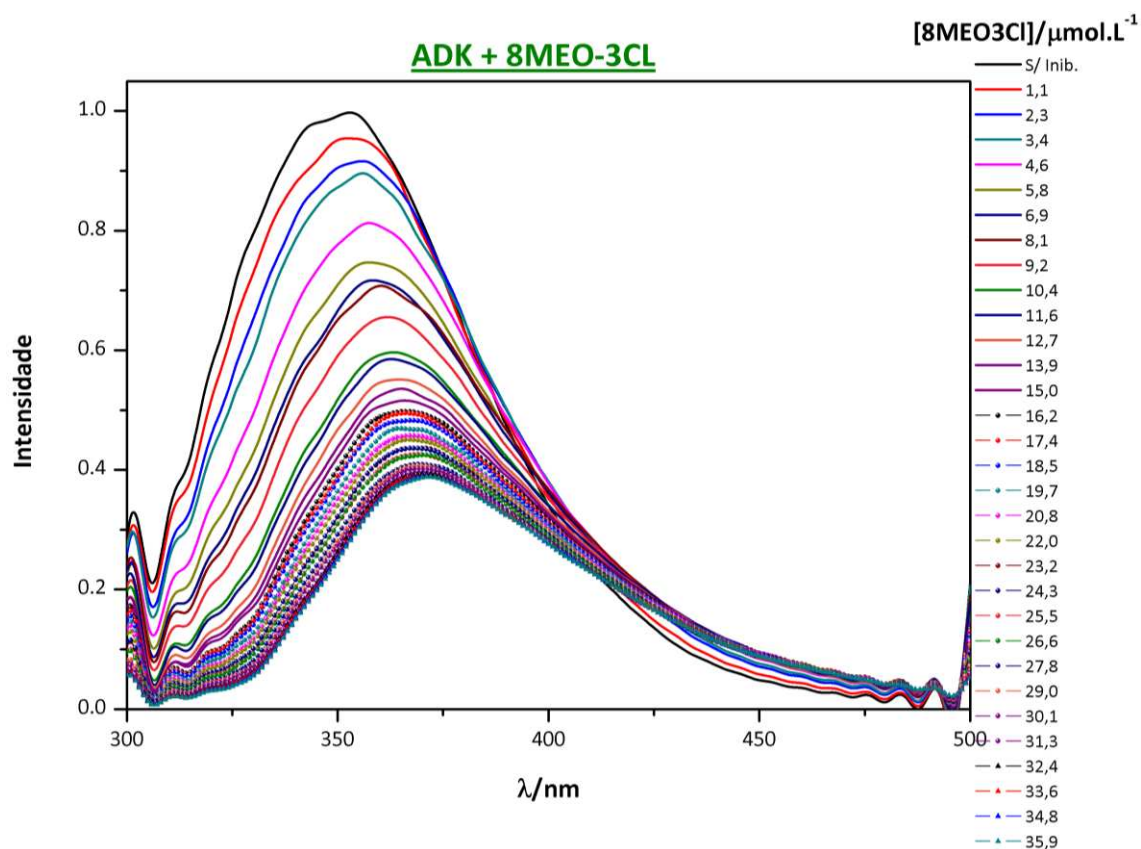


Figura A.7.3 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3Cl.

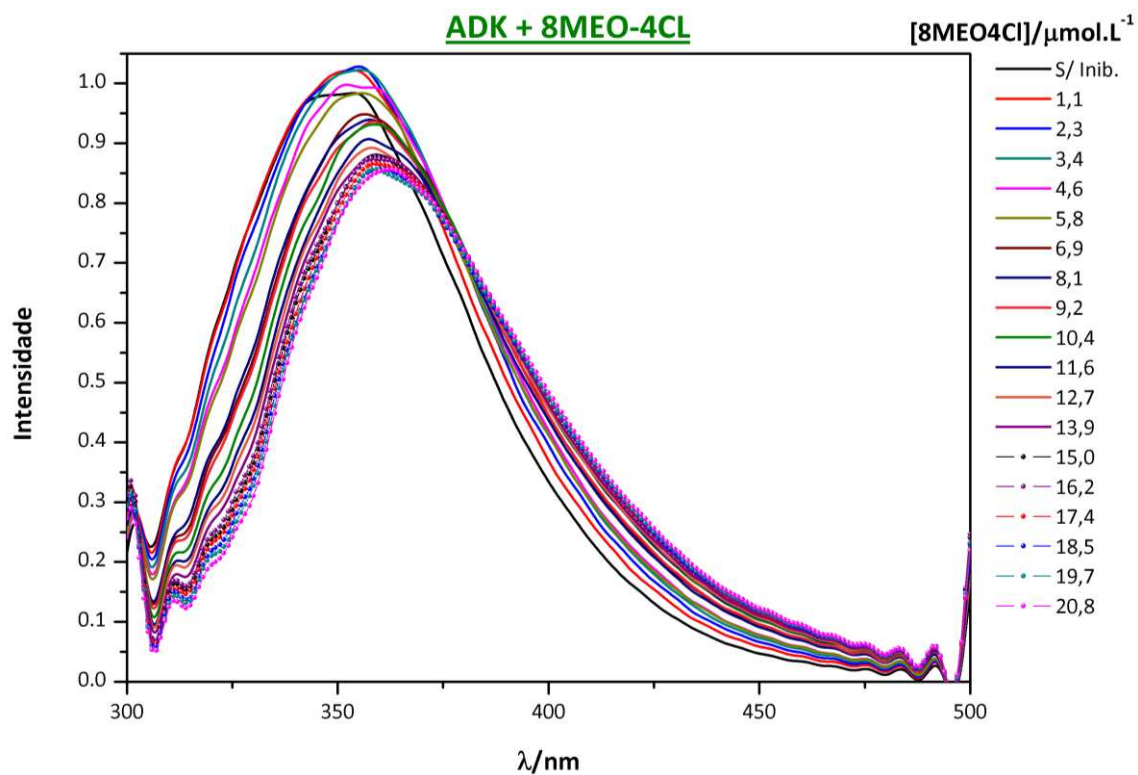


Figura A.7.4 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4Cl.

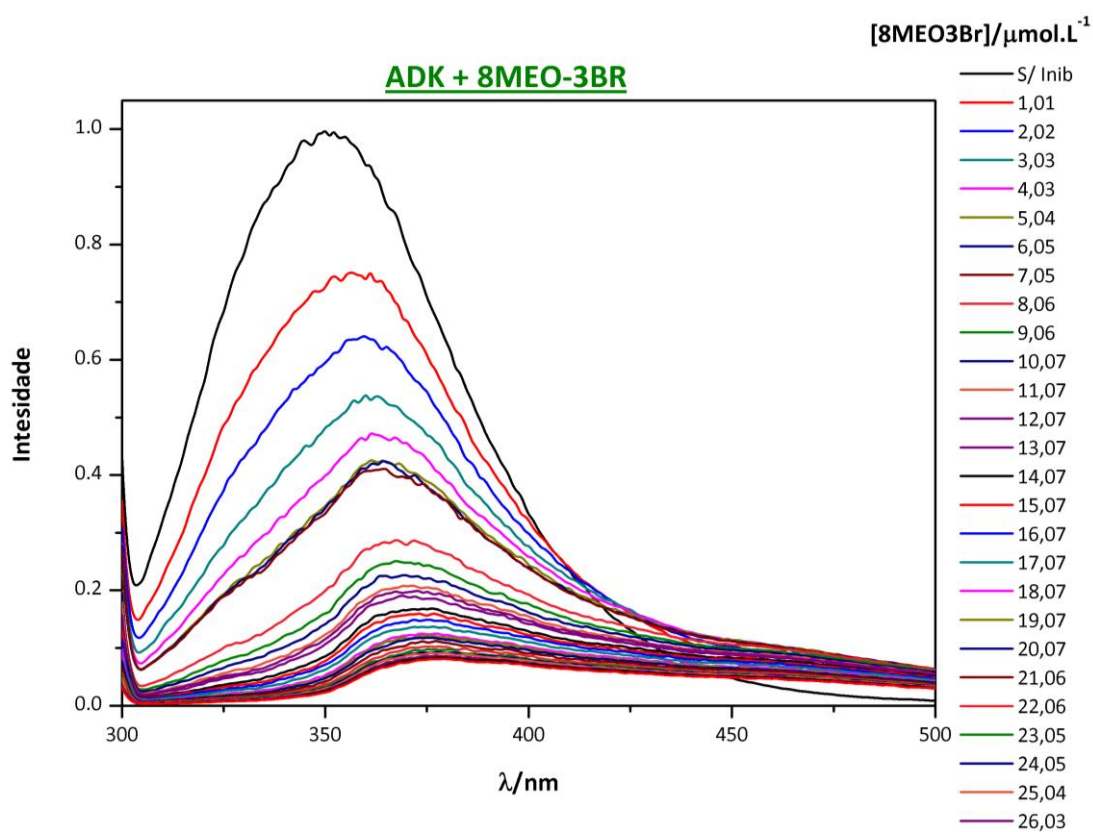


Figura A.7.5 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3Br.

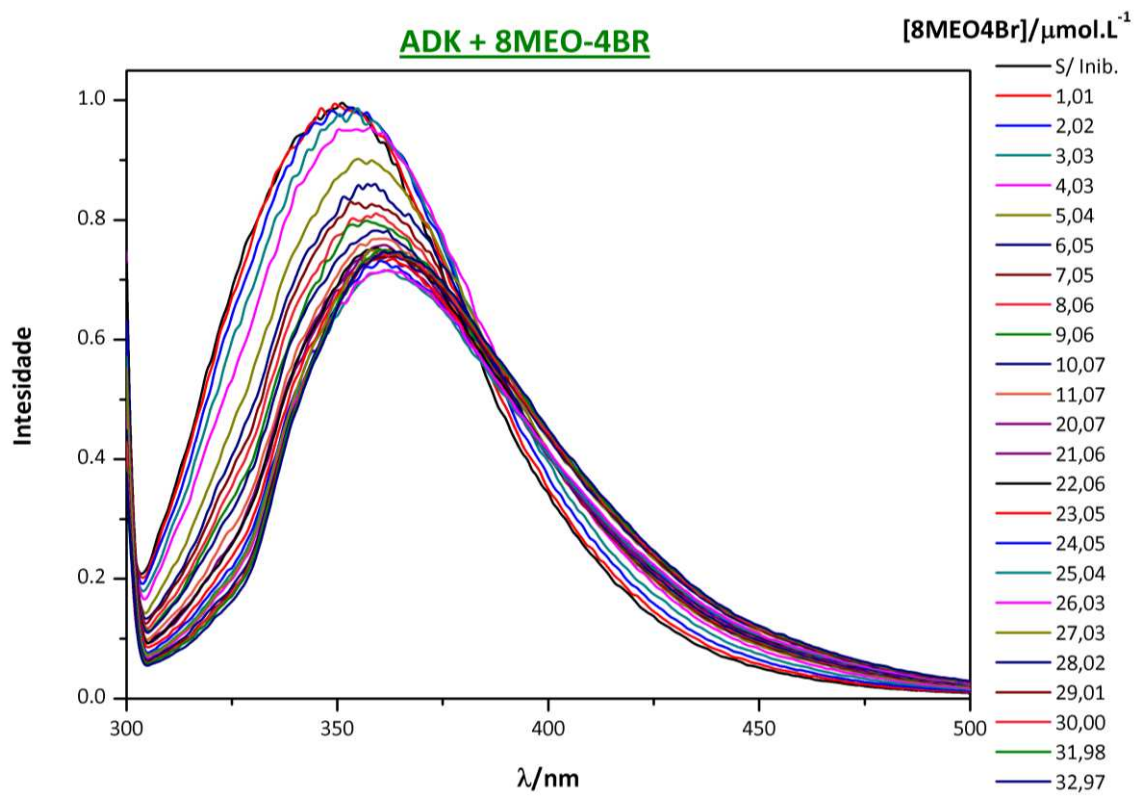


Figura A.7.6 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4Br.

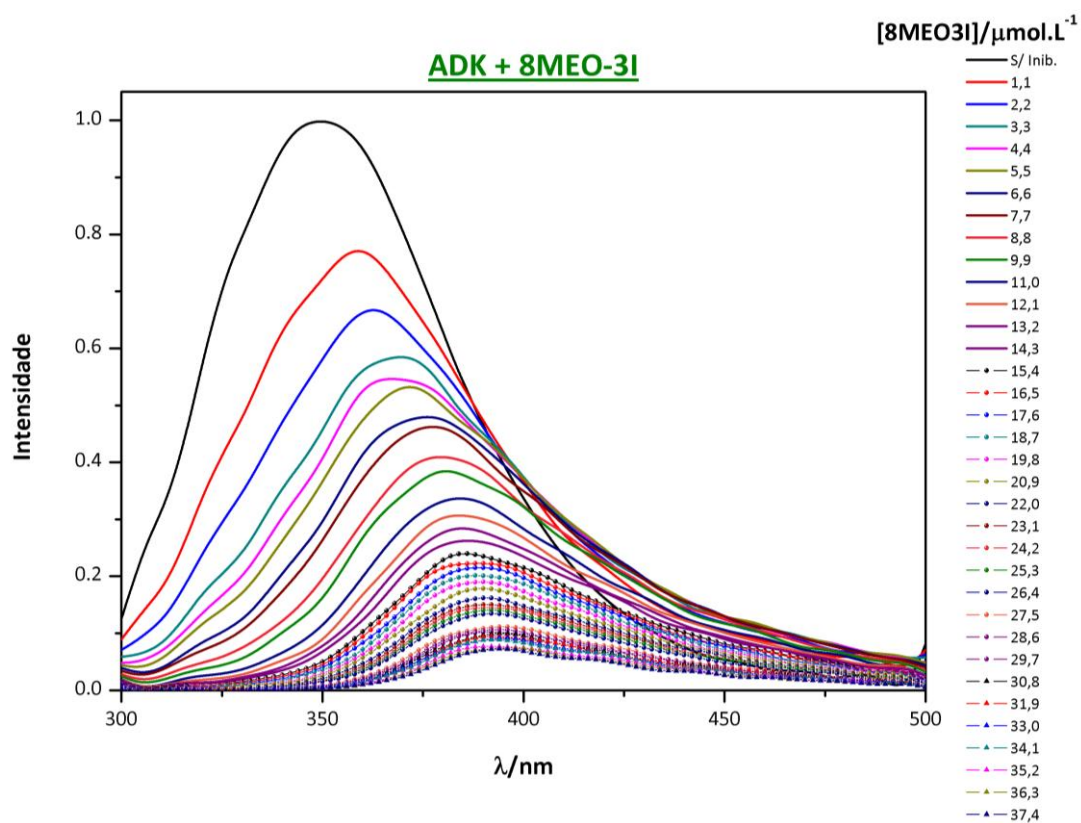


Figura A.7.7 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3I.

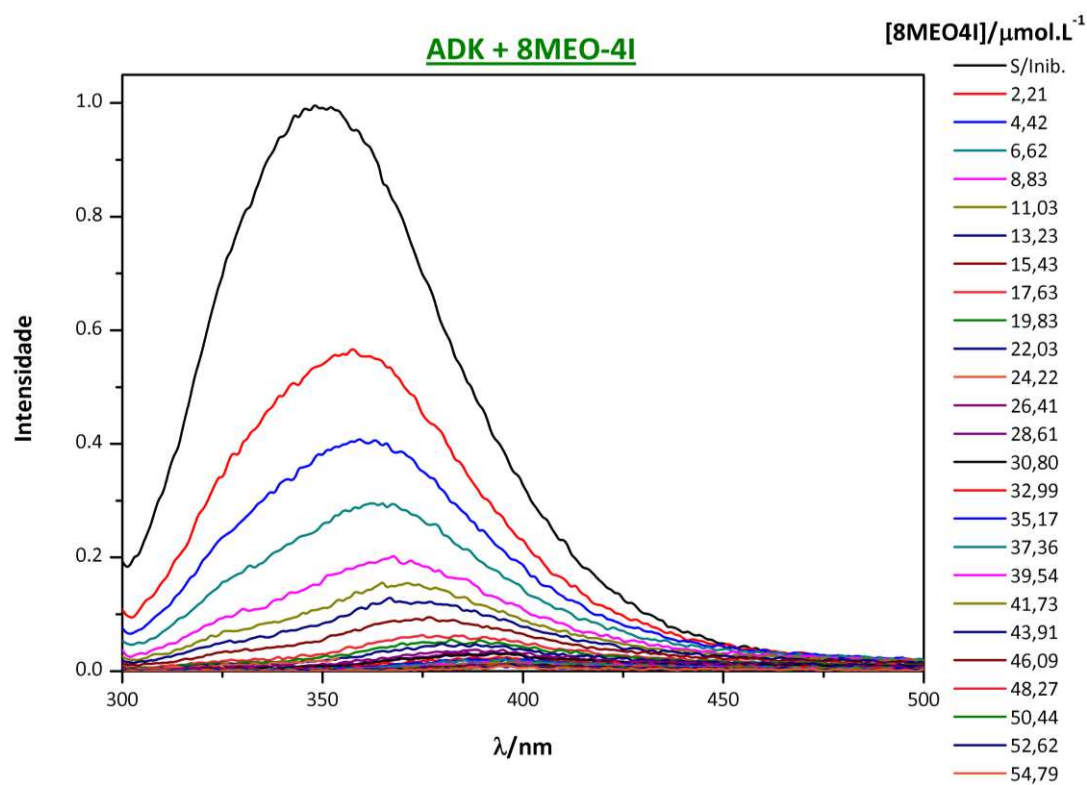


Figura A.7.8 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4I.

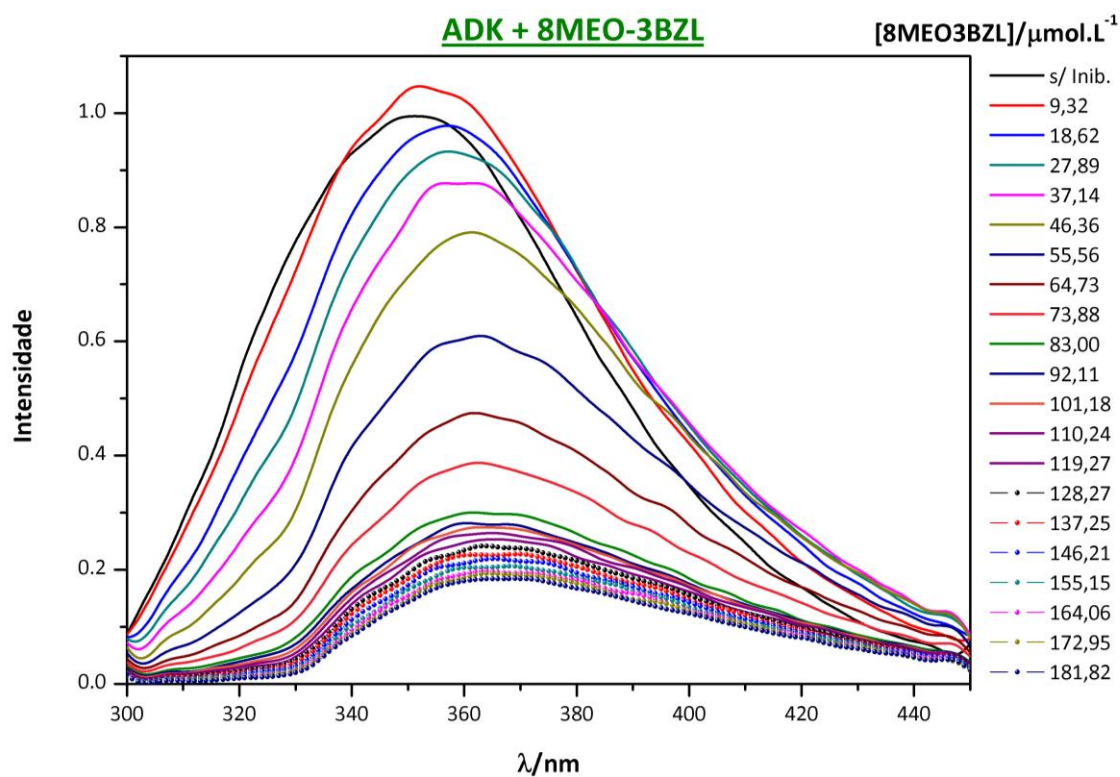


Figura A.7.9 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3BZL.

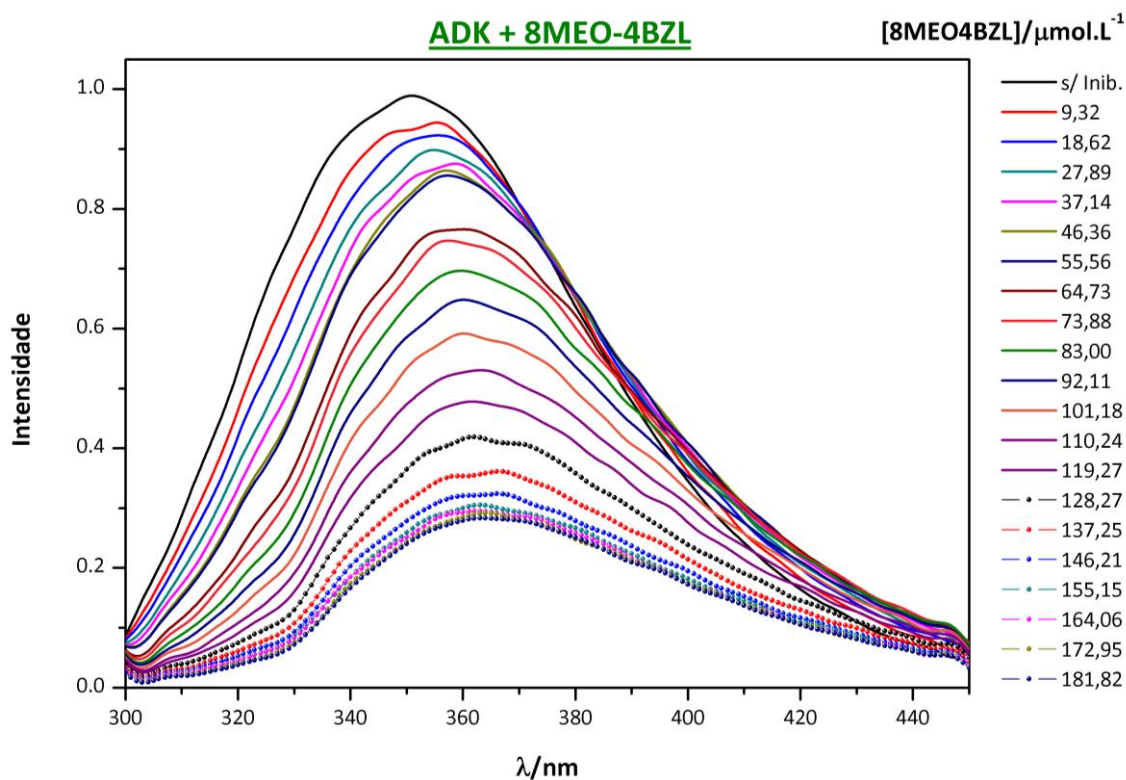


Figura A.7.10 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4BZL.

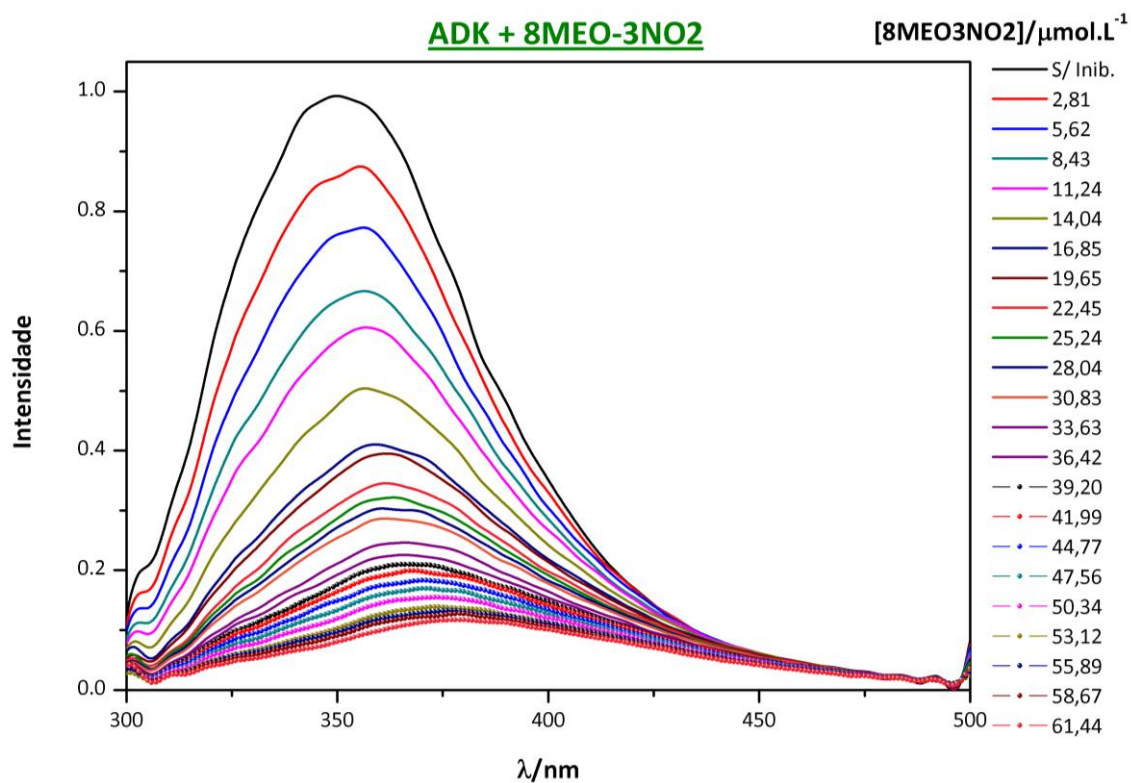


Figura A.7.11 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3NO₂.

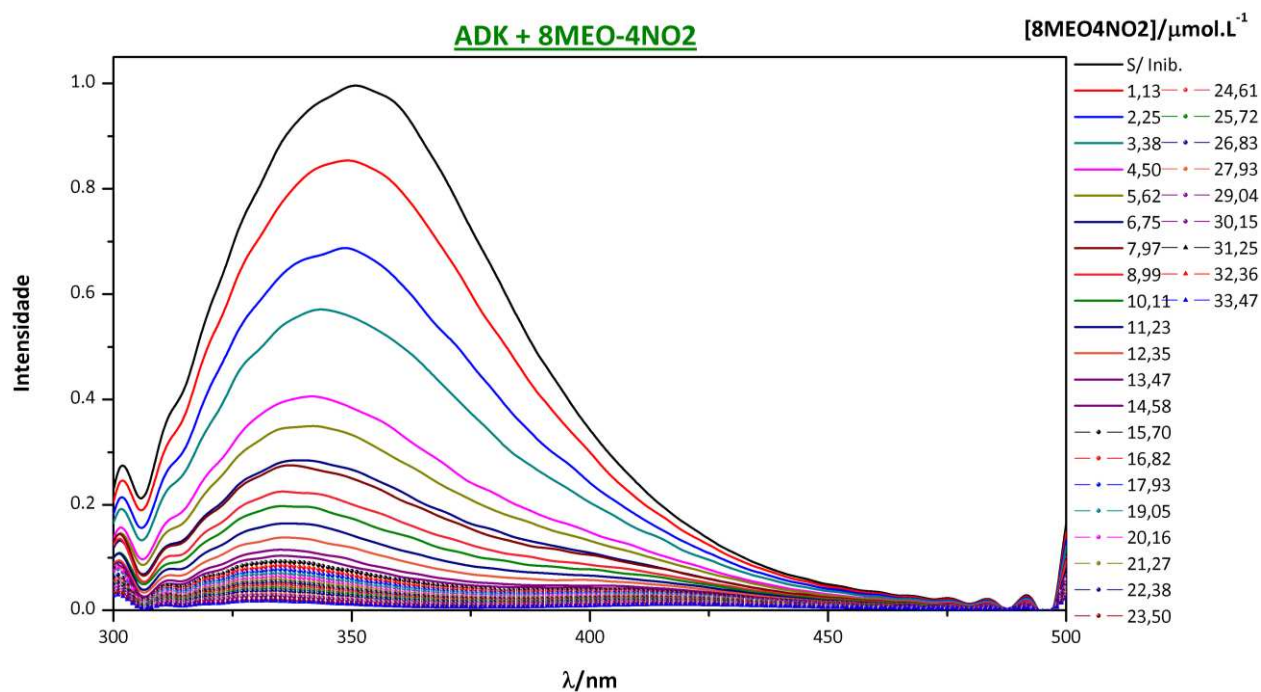


Figura A.7.12 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4NO₂.

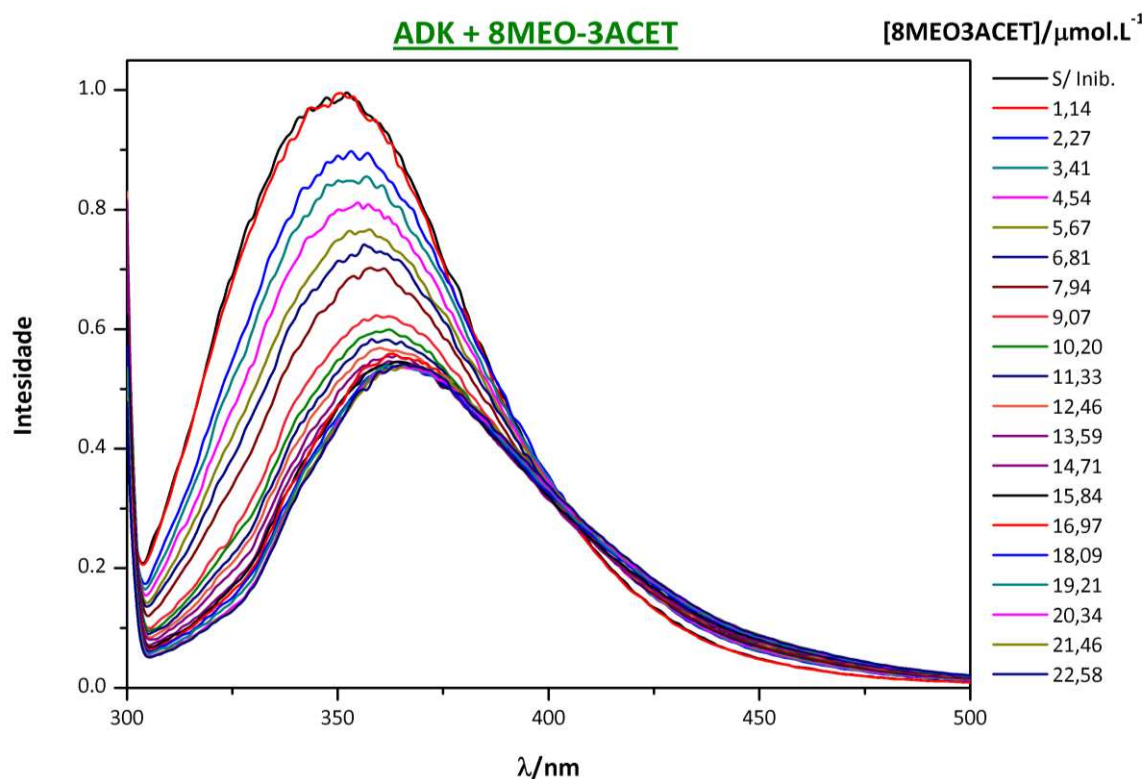


Figura A.7.13 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3ACET.

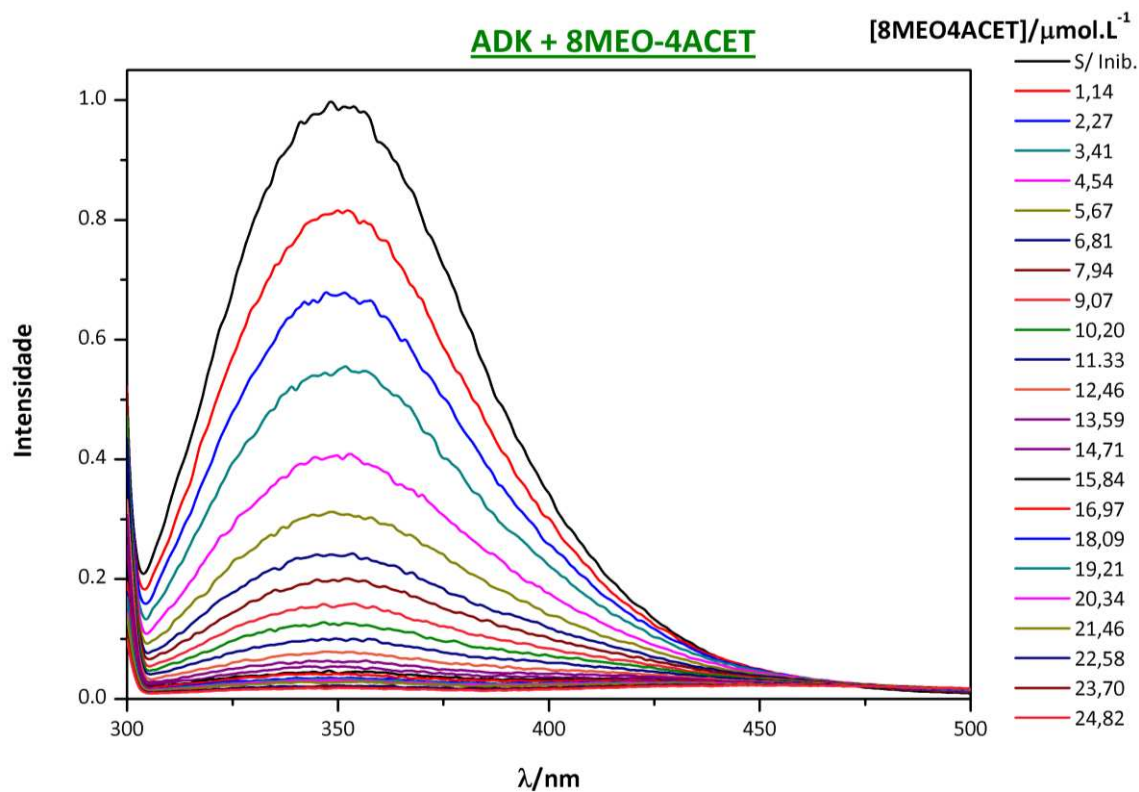
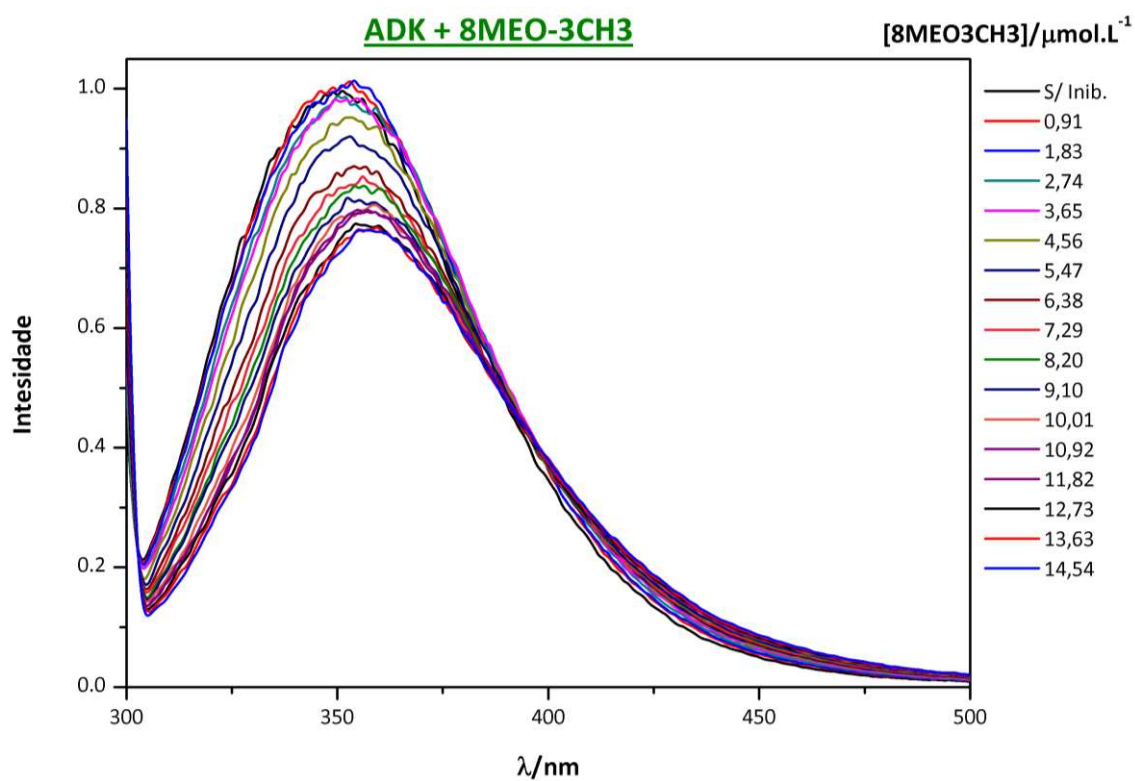
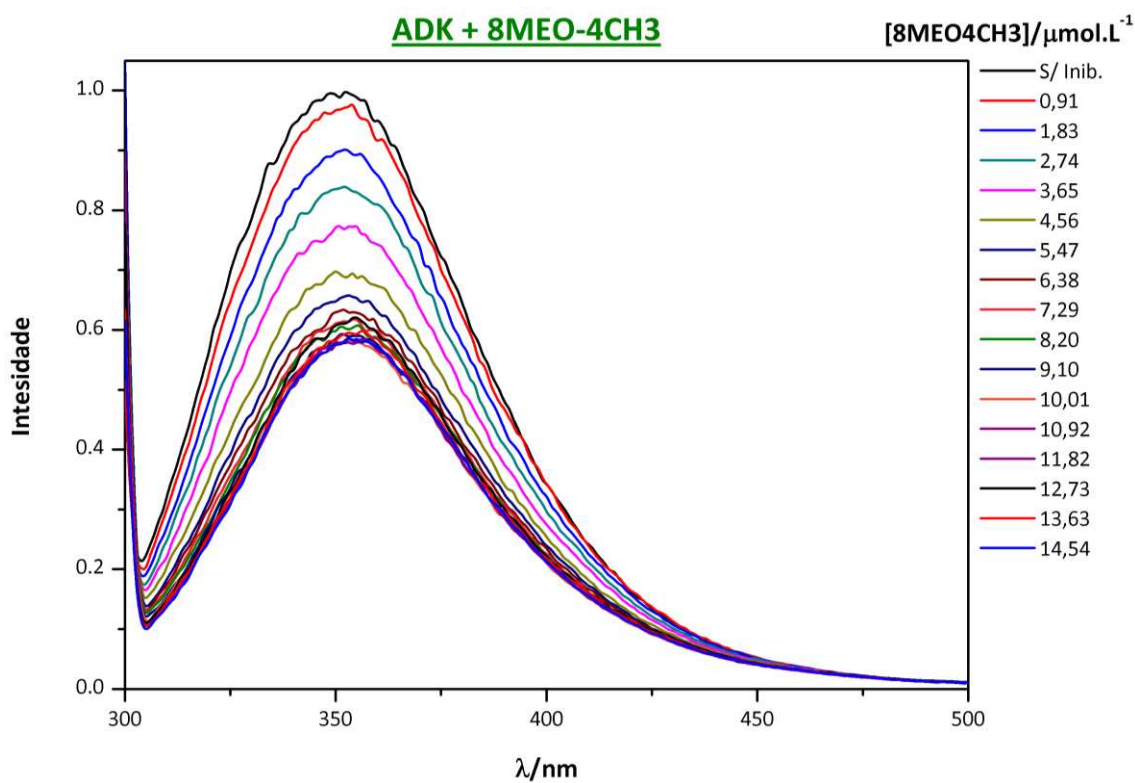


Figura A.7.14 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4ACET.

Figura A.7.15 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3CH₃.Figura A.7.16 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4CH₃.

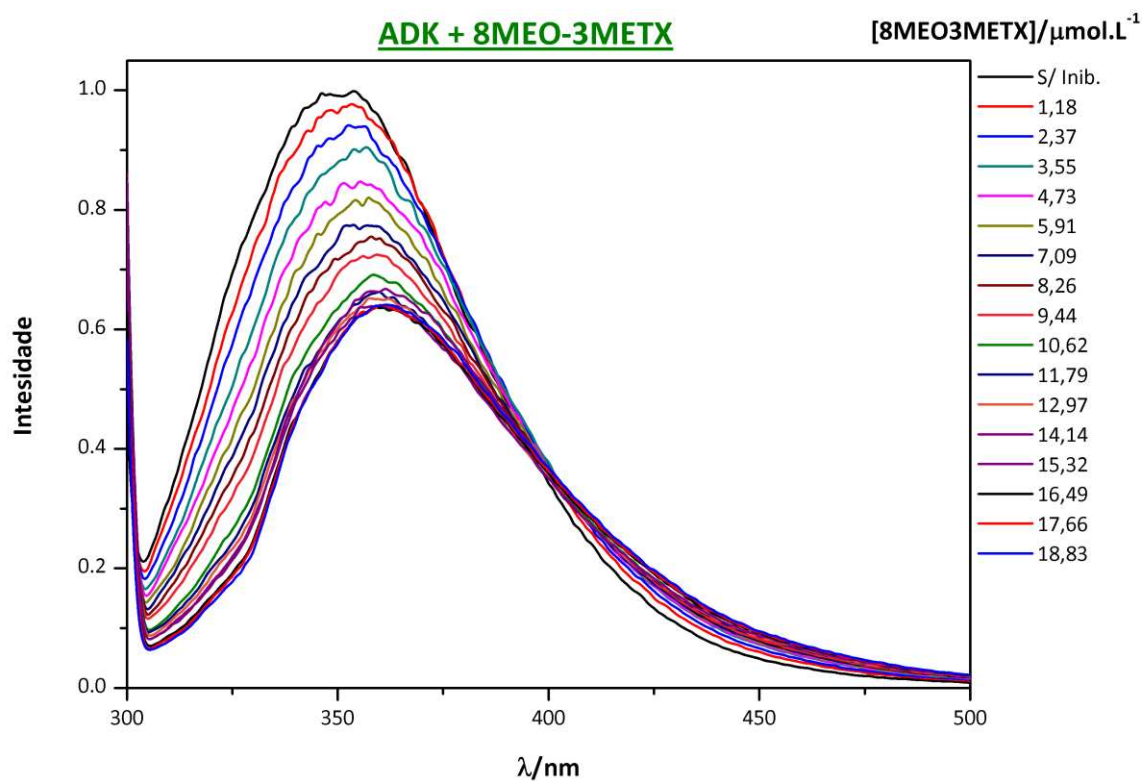


Figura A.7.17 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-3METX.

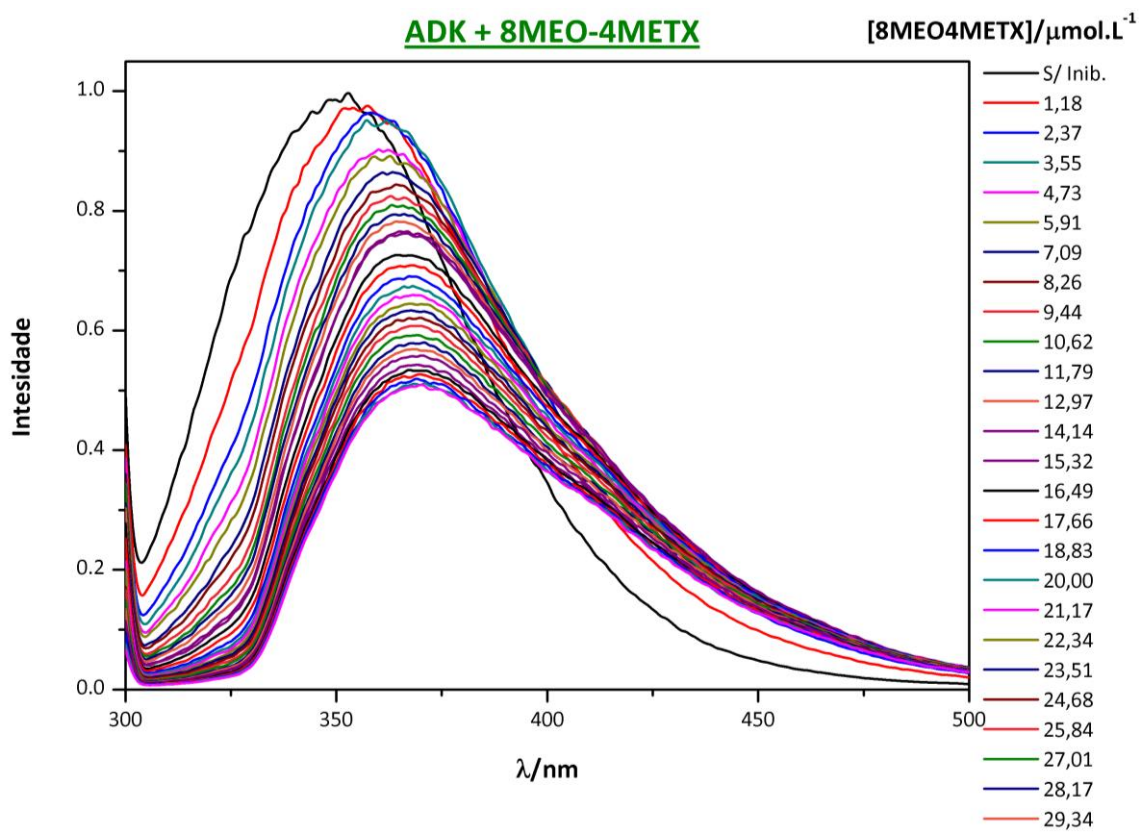


Figura A.7.18 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-4METX.

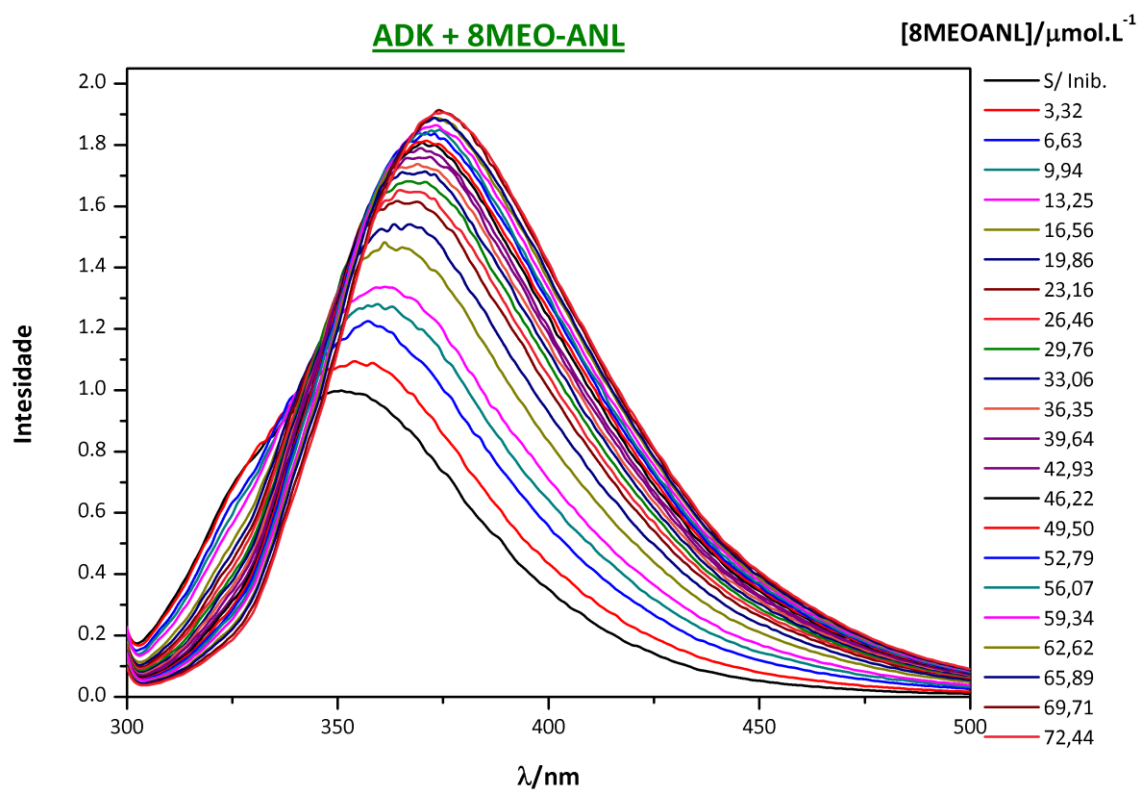


Figura A.7.19 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-ANL.

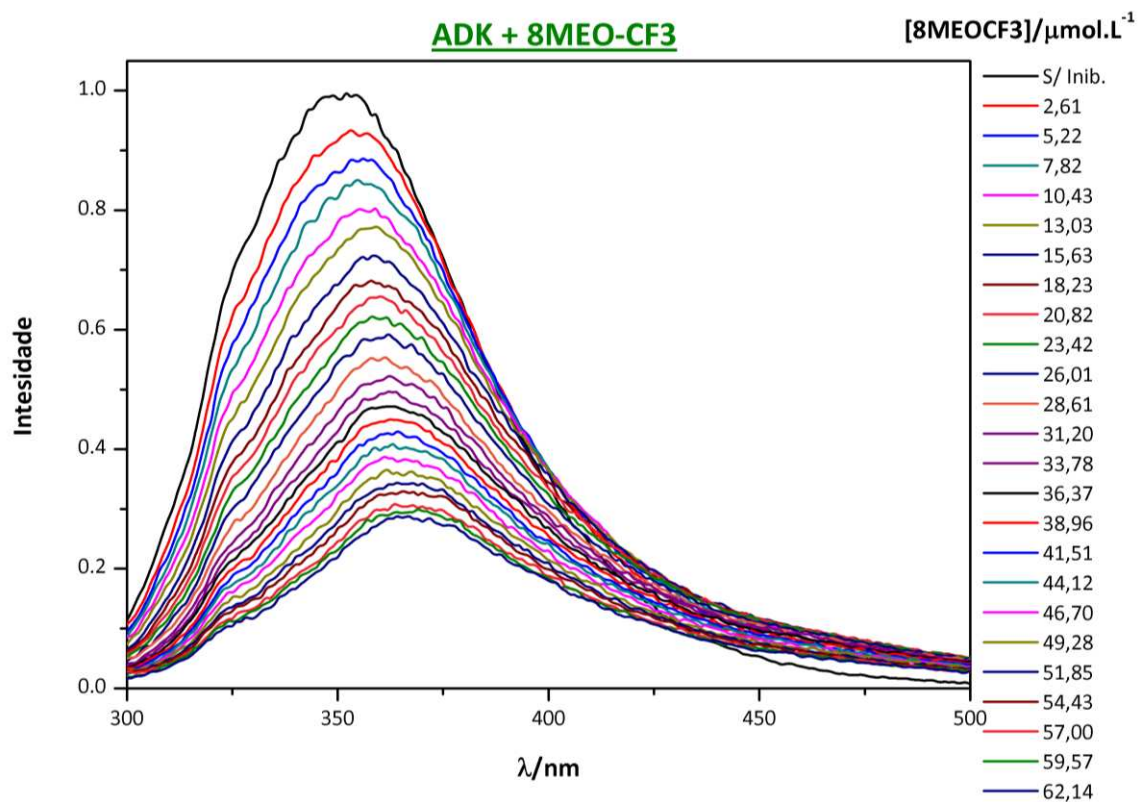


Figura A.7.20 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-CF₃.

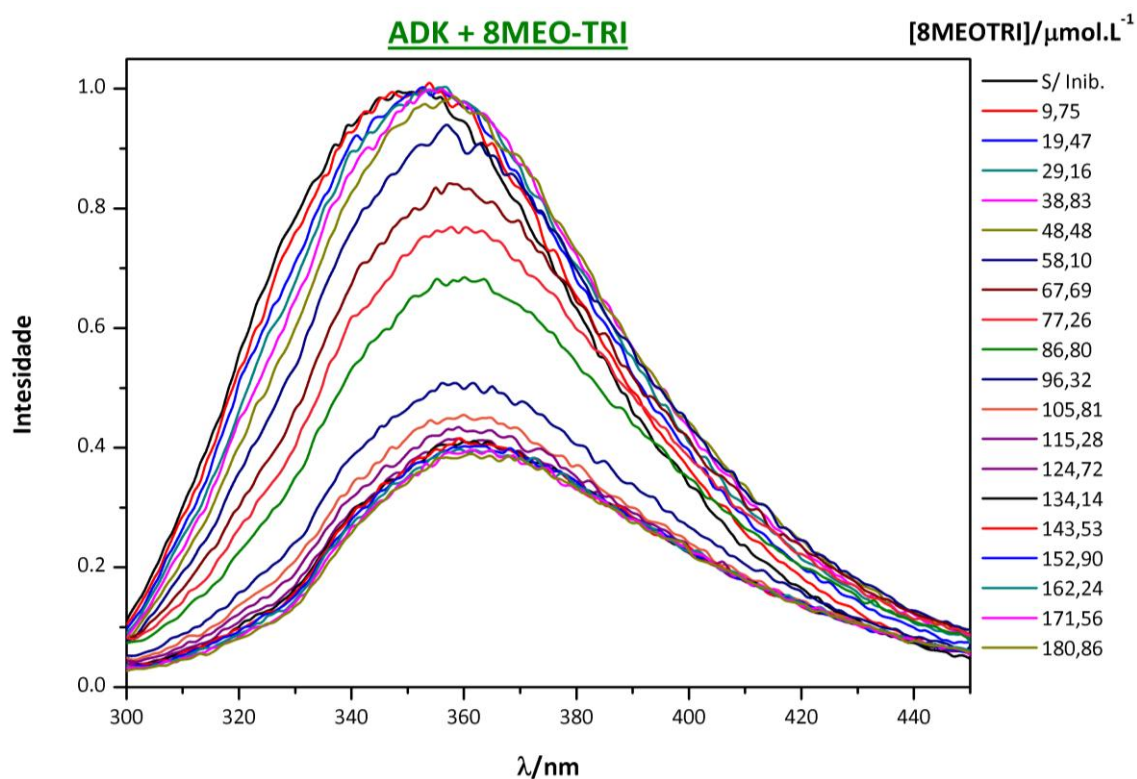


Figura A.7.21 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-TRI.

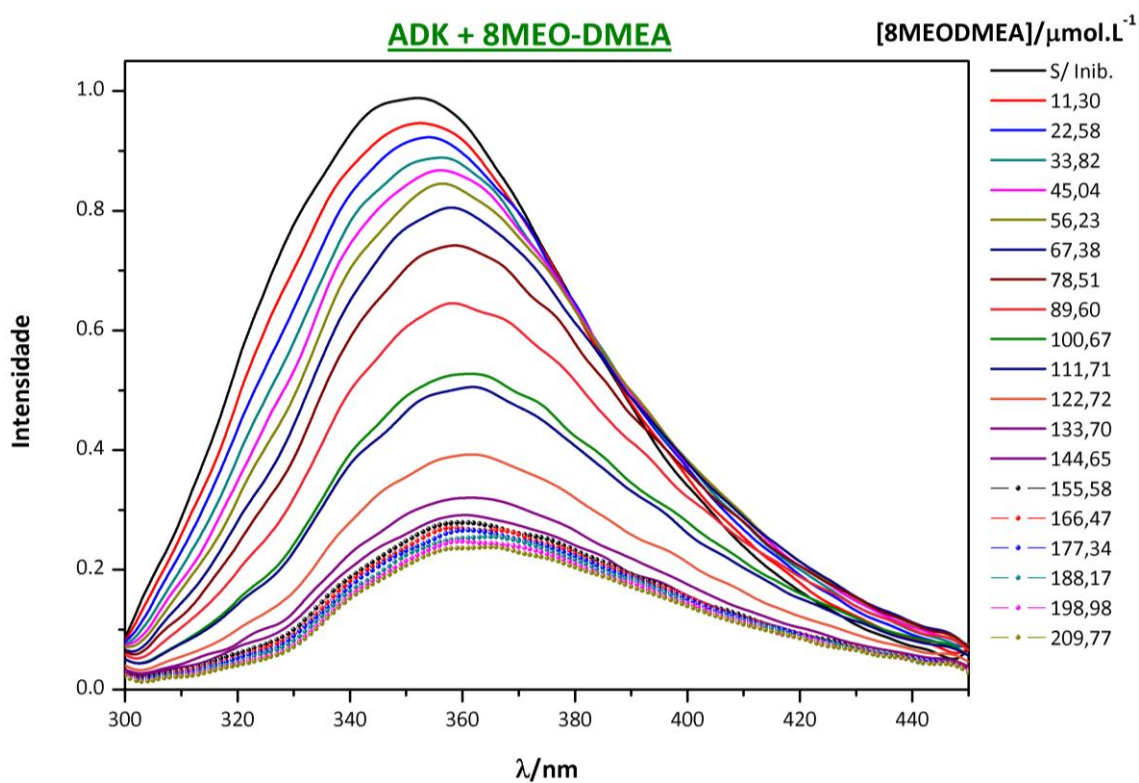


Figura A.7.22 - Espectro de supressão de fluorescência do composto 8MEO-DMEA.

ANEXO 8 – ESPECTROS DE *RET*

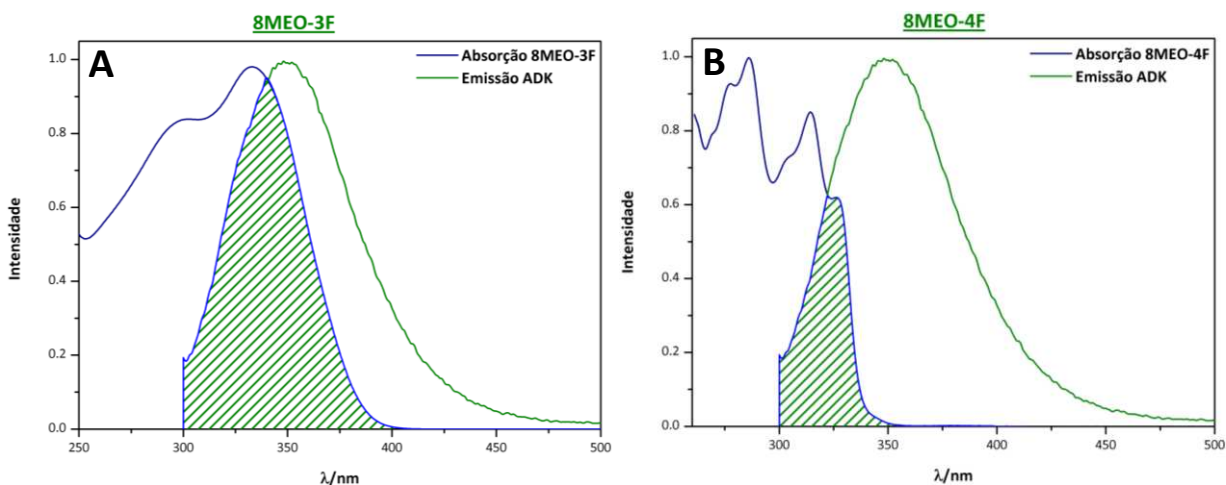


Figura A.8.1 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.

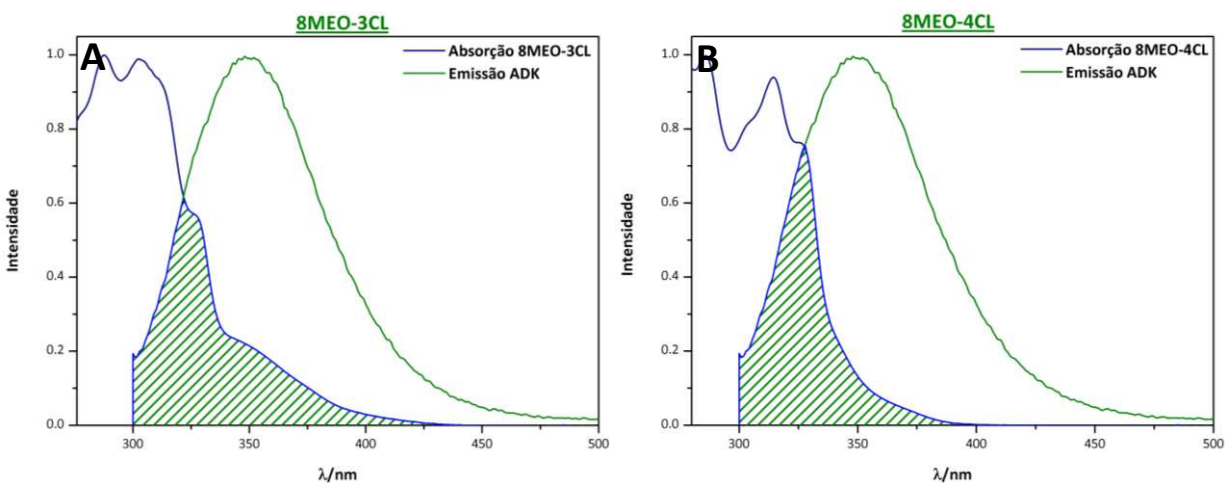


Figura A.8.2 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.

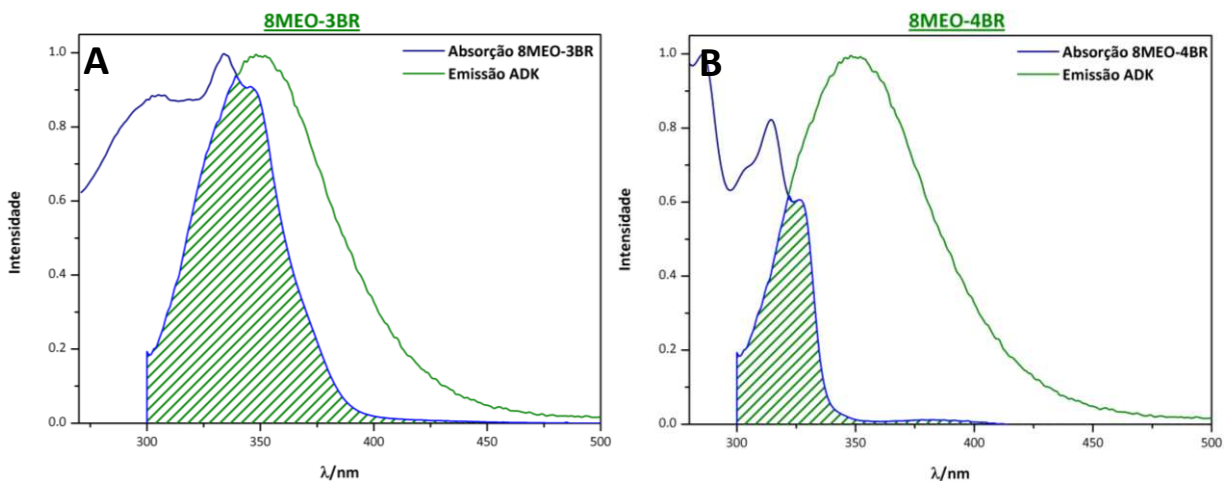


Figura A.8.3 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.

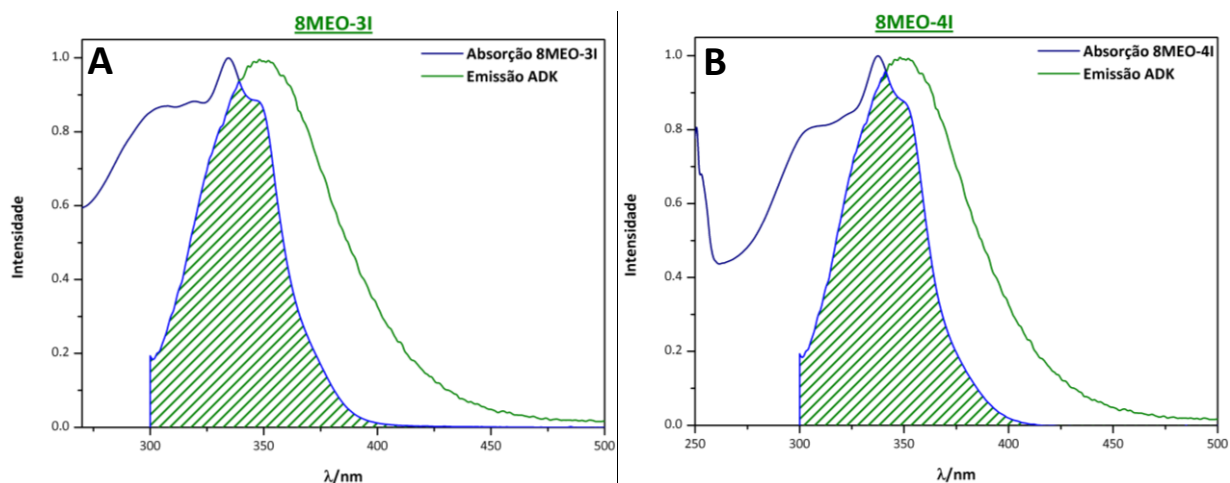


Figura A.8.4 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.

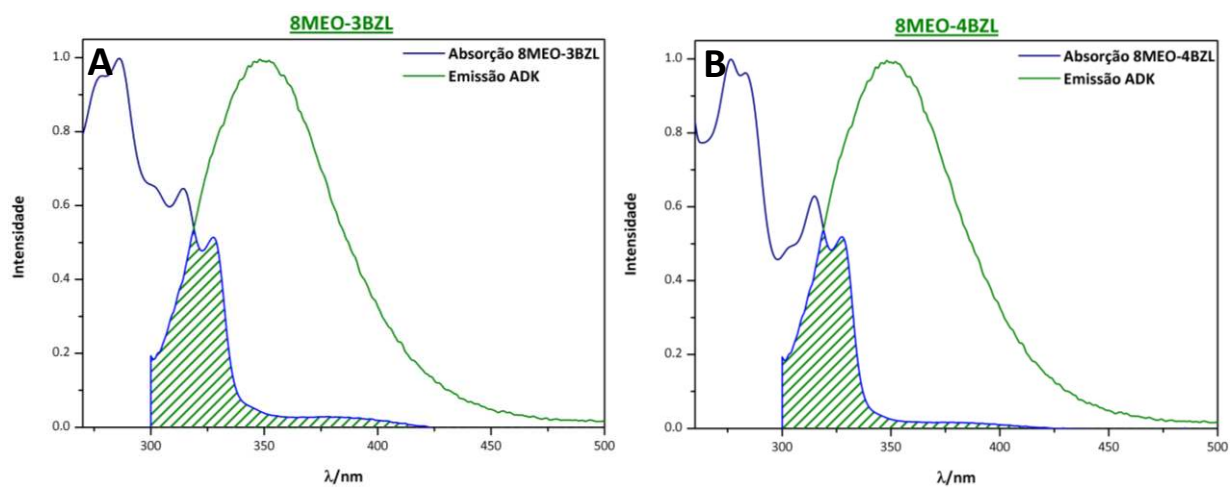


Figura A.8.5 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.

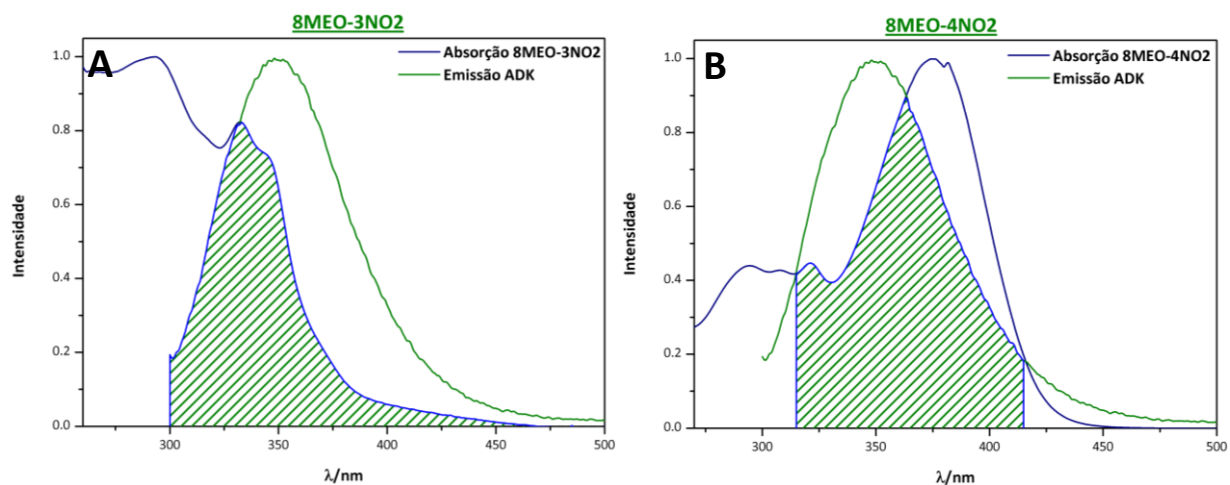


Figura A.8.6 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3NO₂ e (B) 8MEO-4NO₂.

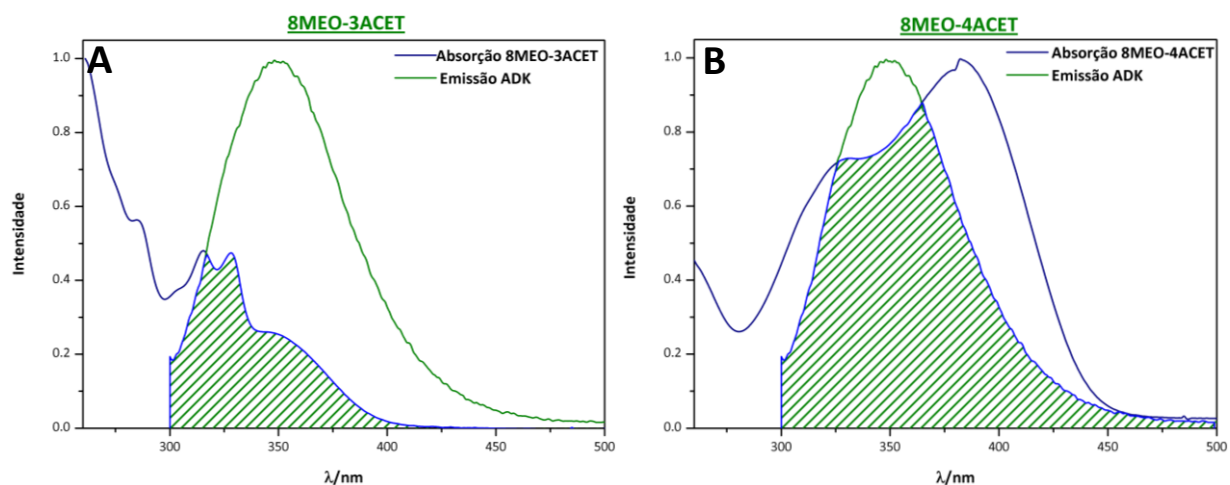


Figura A.8.7 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.

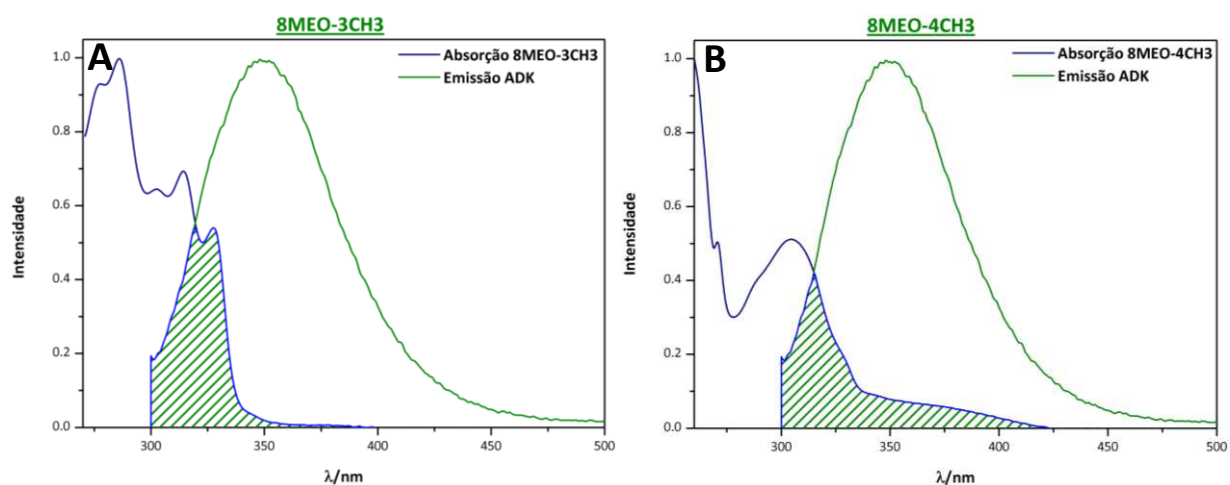


Figura A.8.8 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3CH₃ e (B) 8MEO-4CH₃.

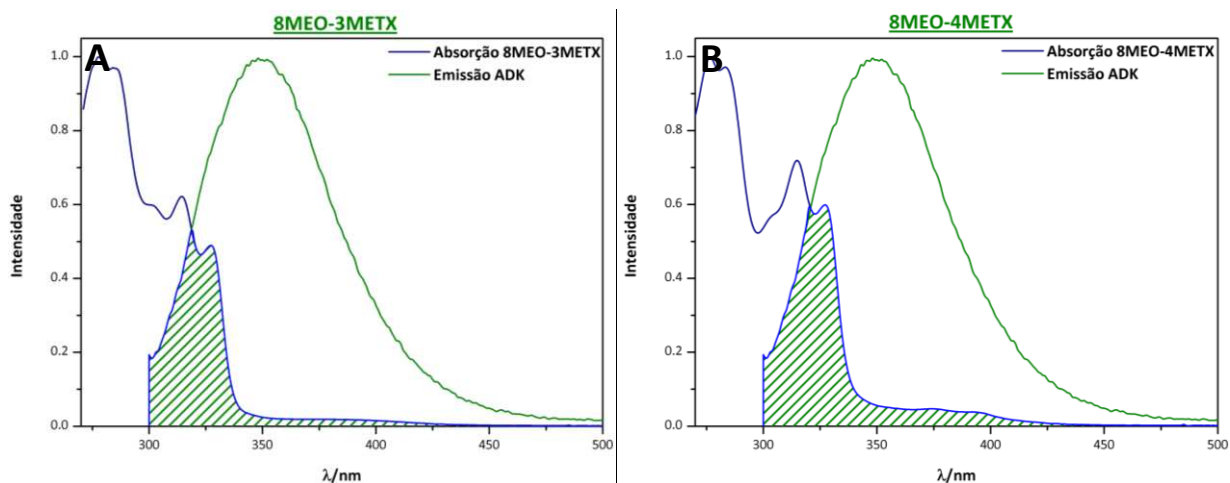


Figura A.8.9 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.

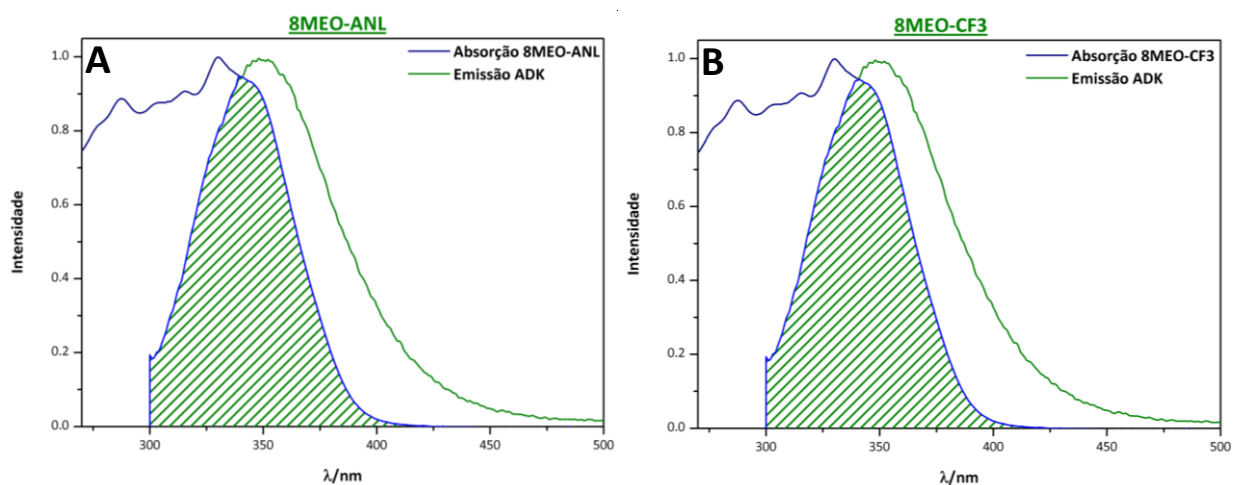


Figura A.8.10 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF₃.

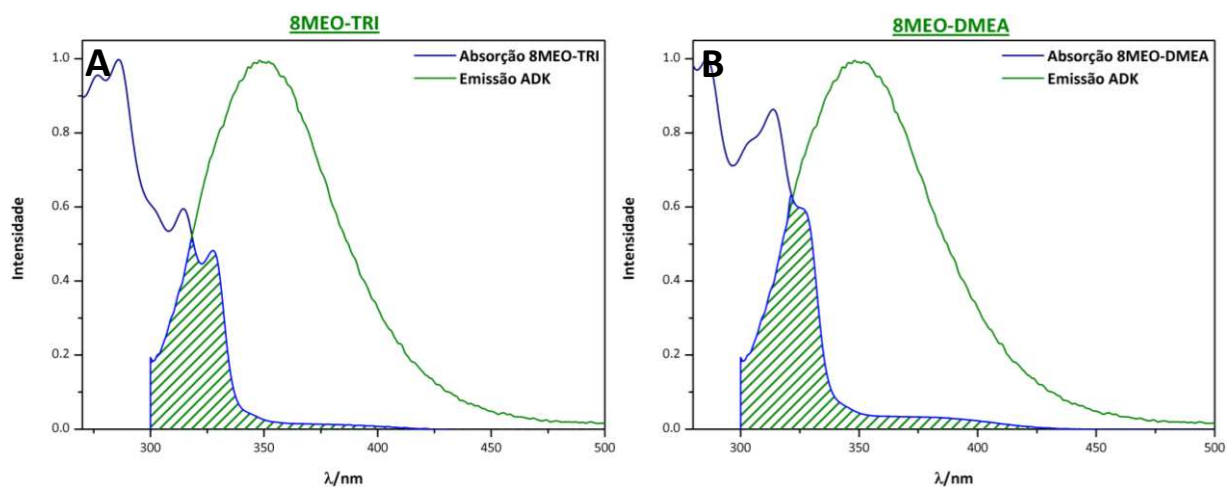


Figura A.8.11 - Espectros de *Ret* dos compostos (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.

ANEXO 9 – GRÁFICOS DE STERN-VOLMER

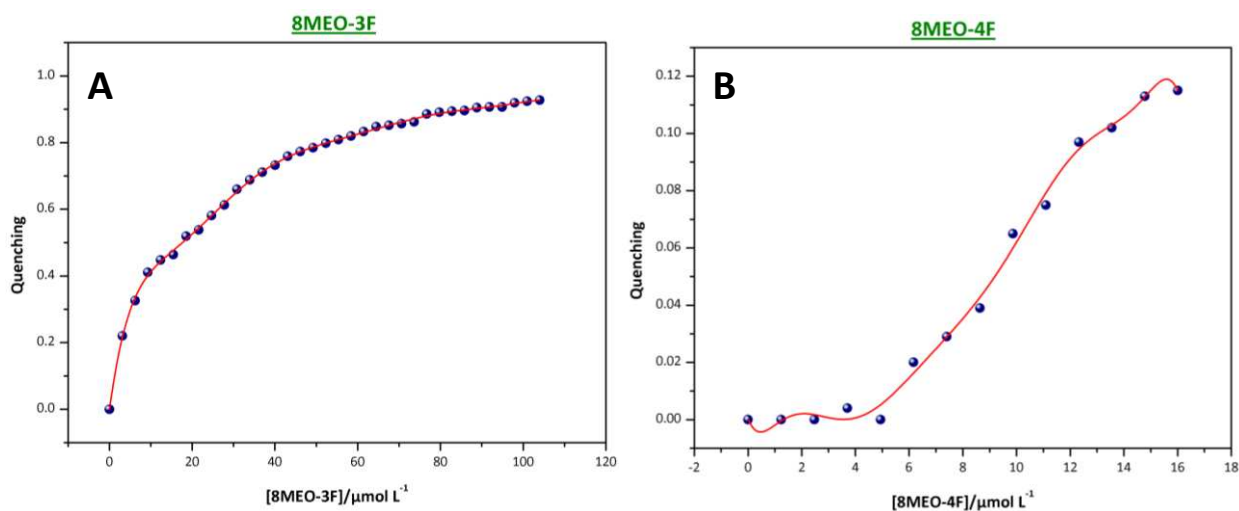


Figura A.9.1 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.

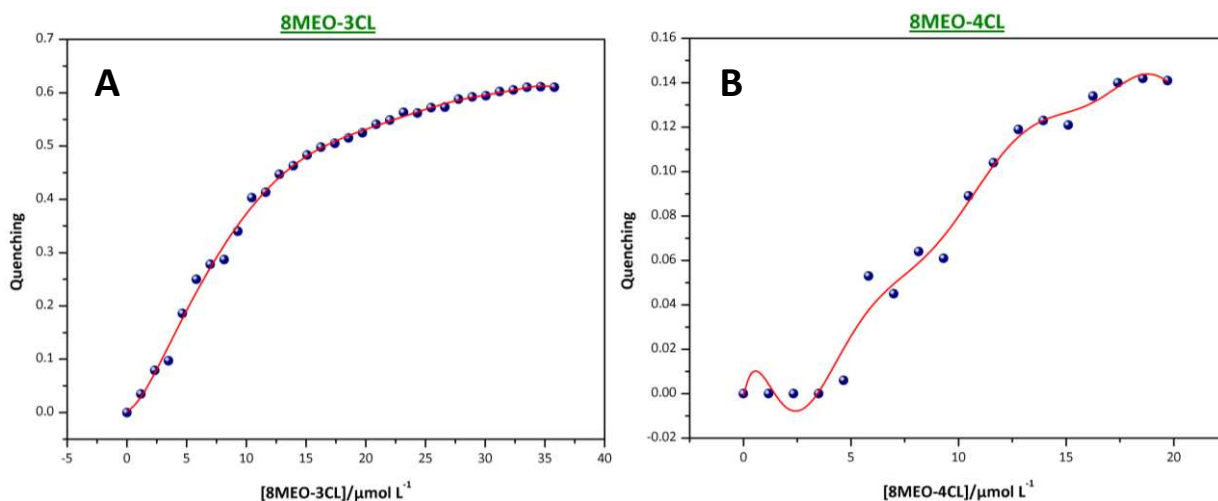


Figura A.9.2 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.

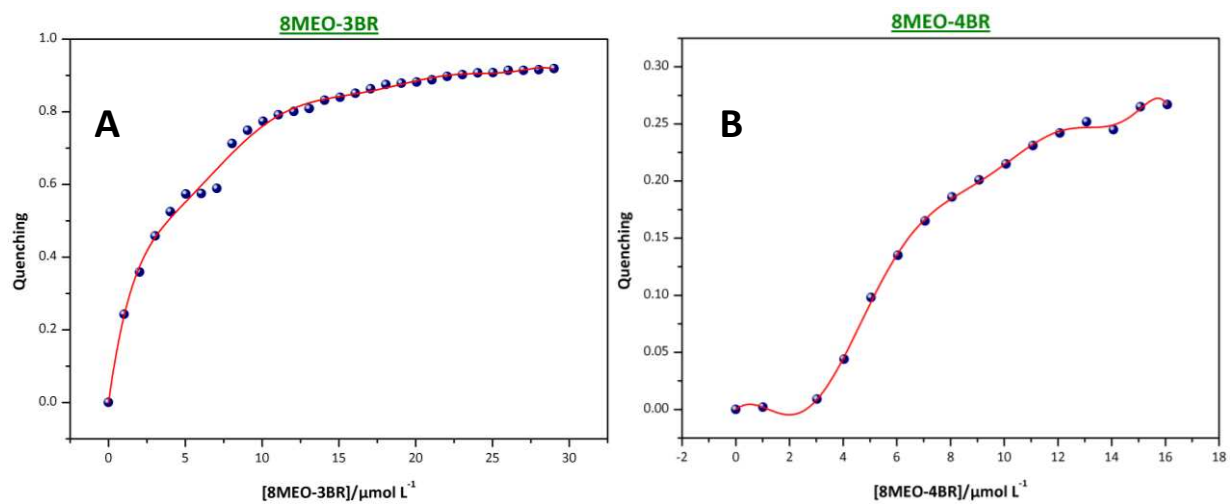


Figura A.9.3 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.

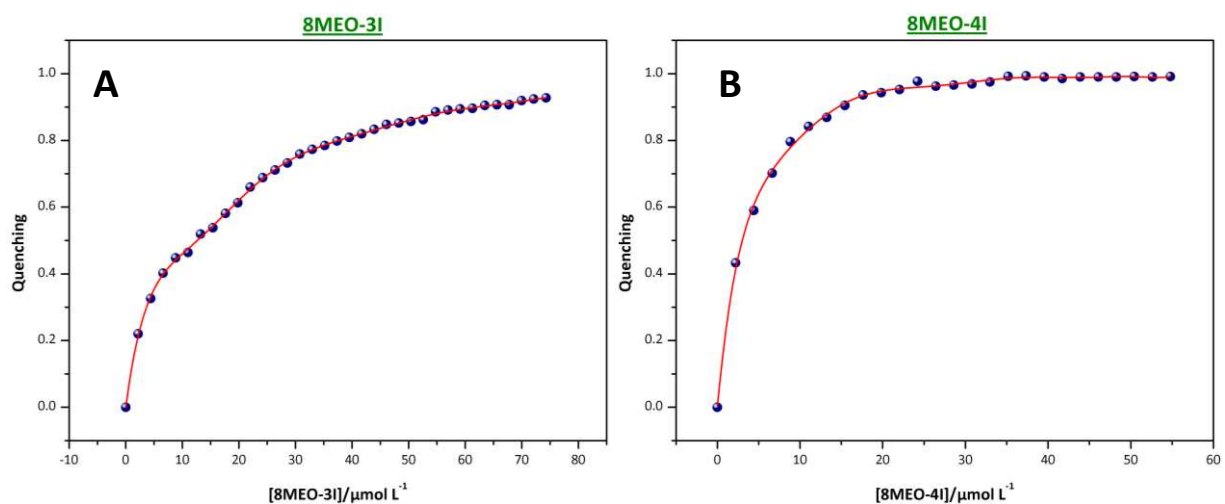


Figura A.9.4 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.

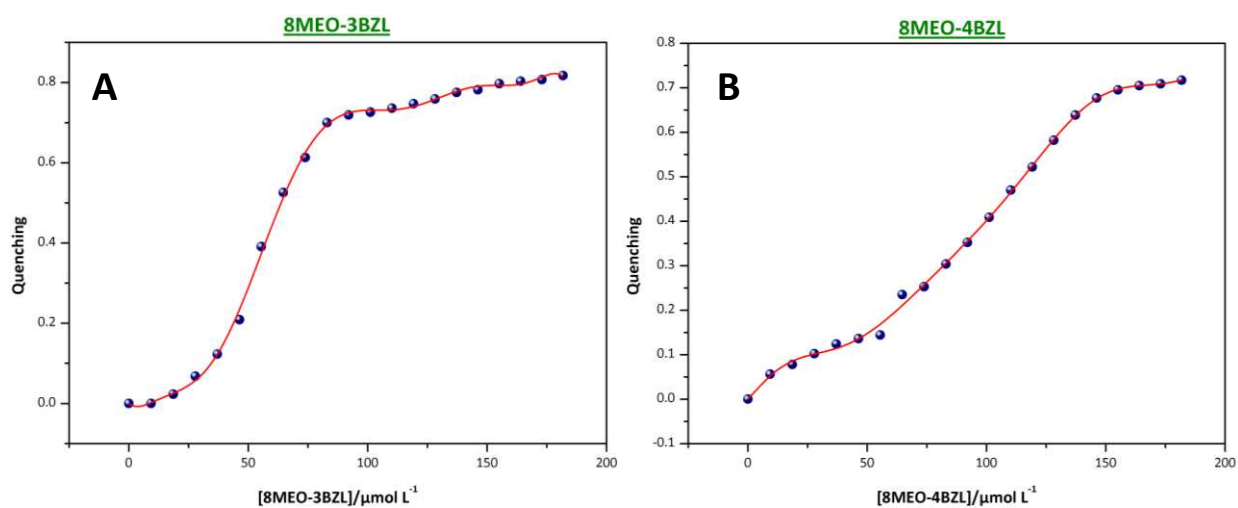


Figura A.9.5 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.

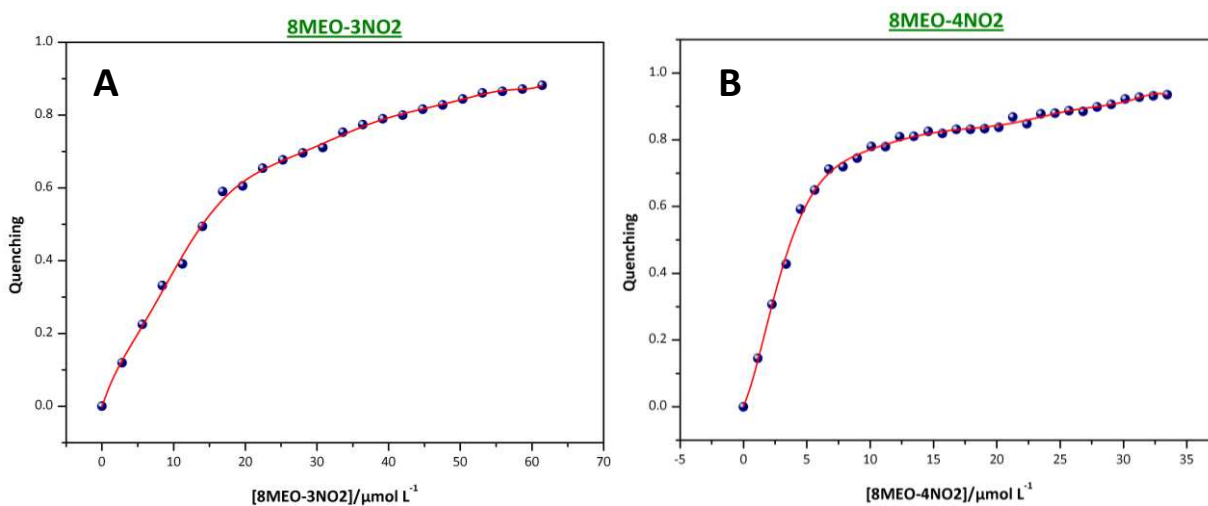


Figura A.9.6 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3NO₂ e (B) 8MEO-4NO₂.

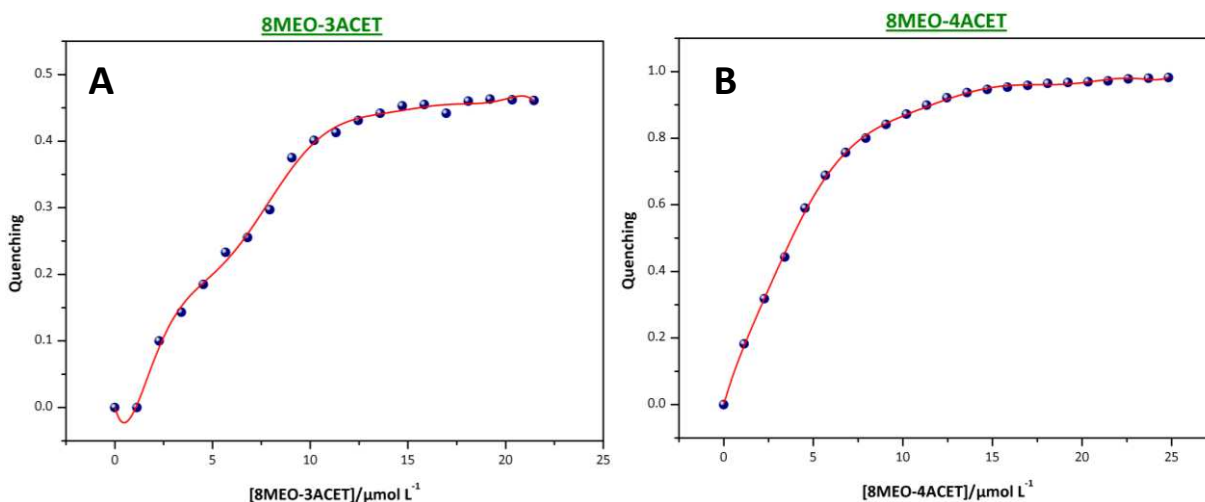


Figura A.9.7 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.

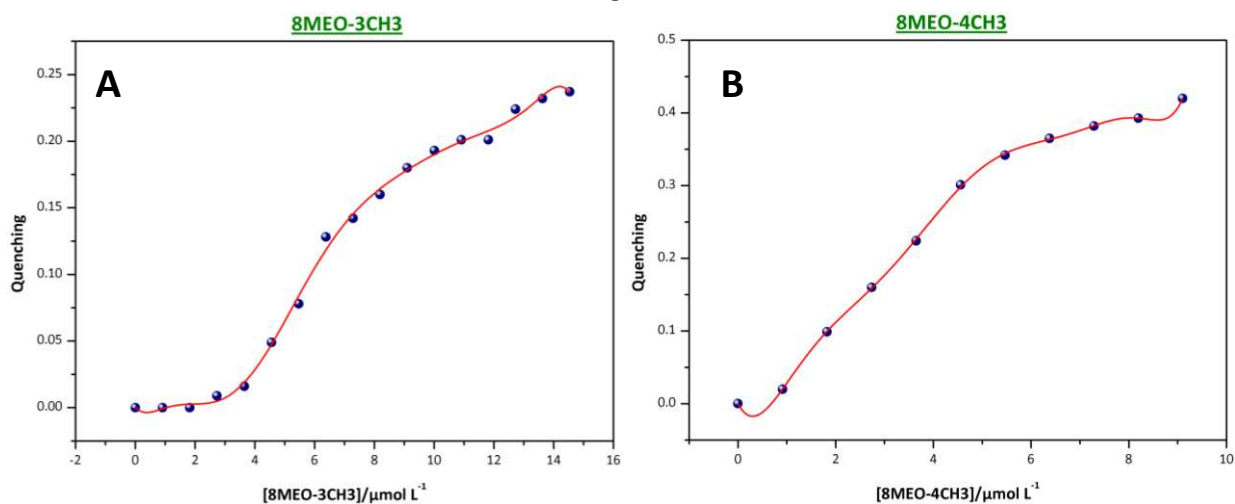


Figura A.9.8 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3CH₃ e (B) 8MEO-4CH₃.

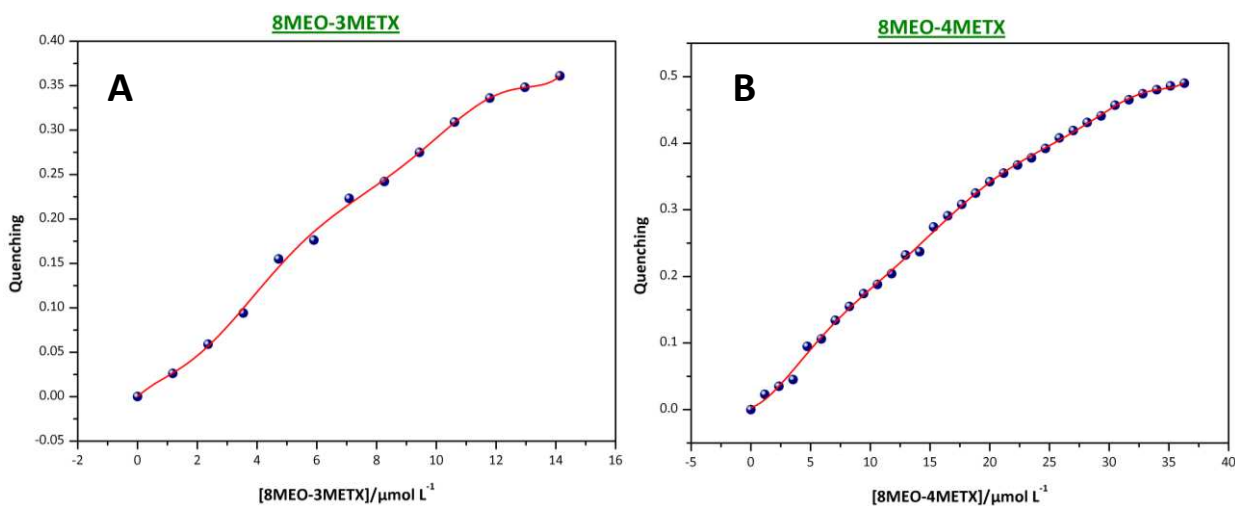


Figura A.9.9 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.

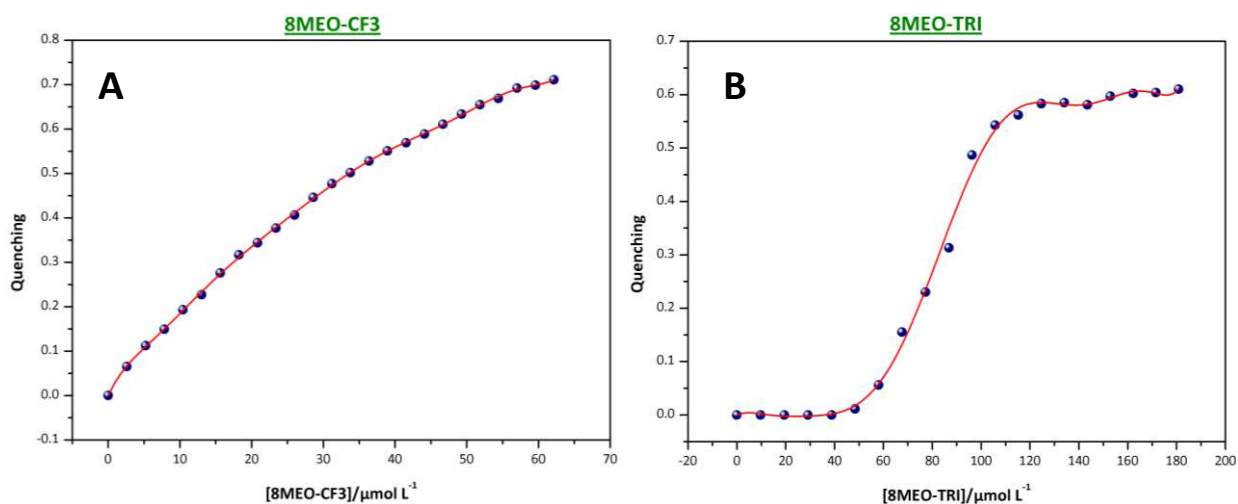


Figura A.9.10 - Gráficos de Stern-Volmer para os compostos (A) 8MEO-CF₃ e (B) 8MEO-TRI.

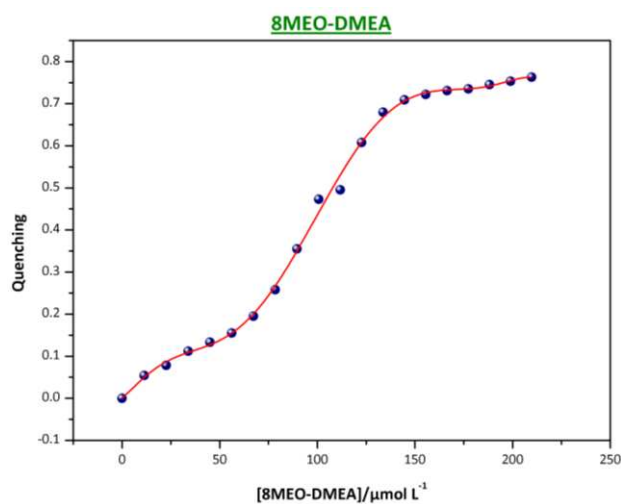


Figura A.9.11 - Gráficos de Stern-Volmer para o composto 8MEO-DMEA.

ANEXO 10 – MOMENTOS DIPOLARES

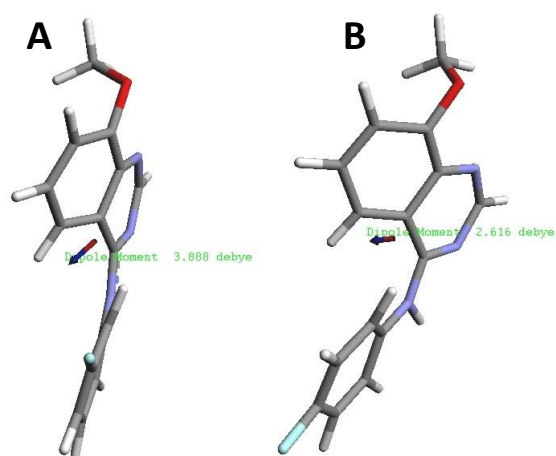


Figura A.10.1 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3F e (B) 8MEO-4F.

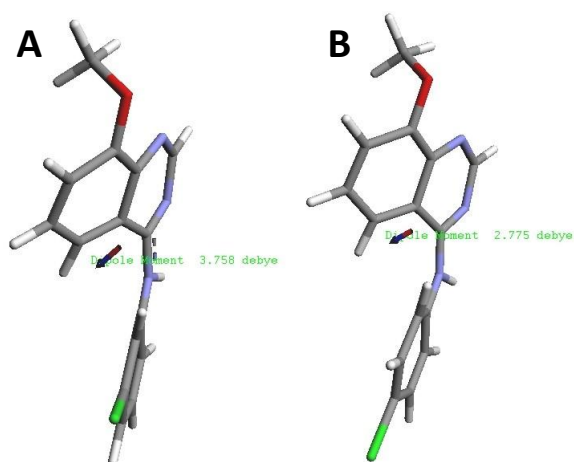


Figura A.10.2 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3Cl e (B) 8MEO-4Cl.

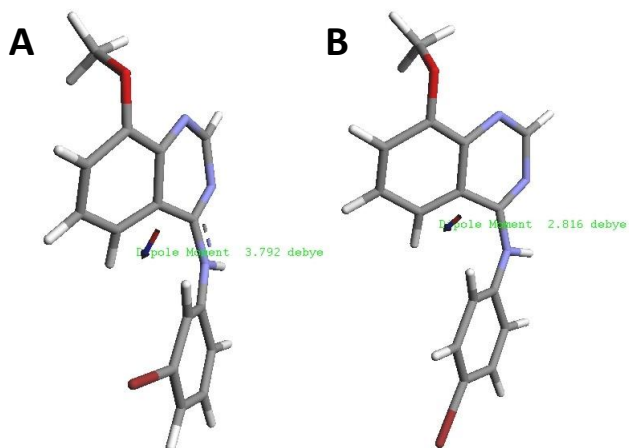


Figura A.10.3 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3Br e (B) 8MEO-4Br.

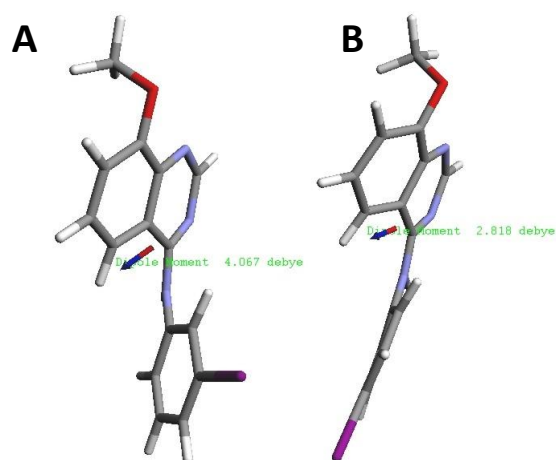


Figura A.10.4 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3I e (B) 8MEO-4I.

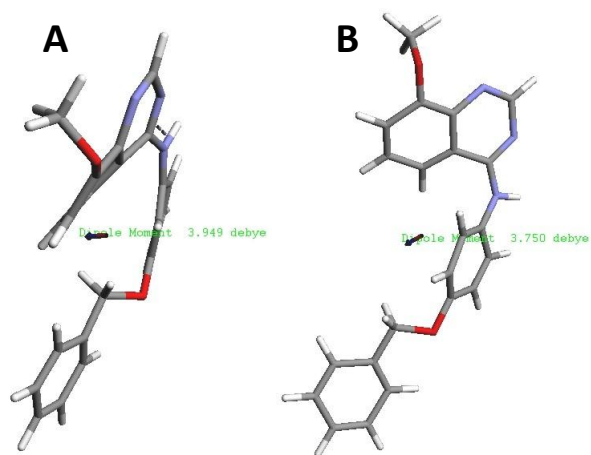


Figura A.10.5 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3BZL e (B) 8MEO-4BZL.

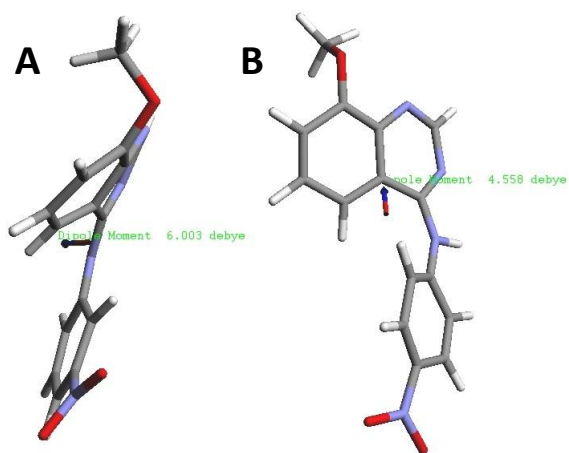


Figura A.10.6 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3NO₂ e (B) 8MEO-4NO₂.

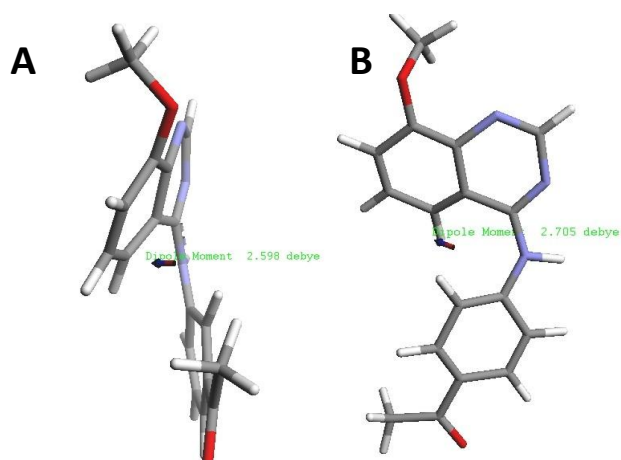


Figura A.10.7 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3ACET e (B) 8MEO-4ACET.

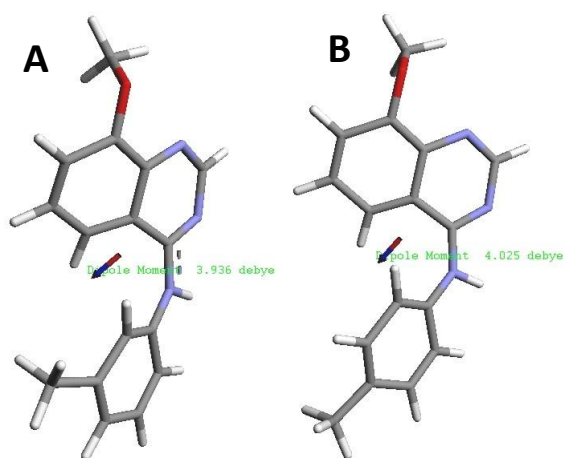


Figura A.10.8 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3CH₃ e (B) 8MEO-4CH₃.

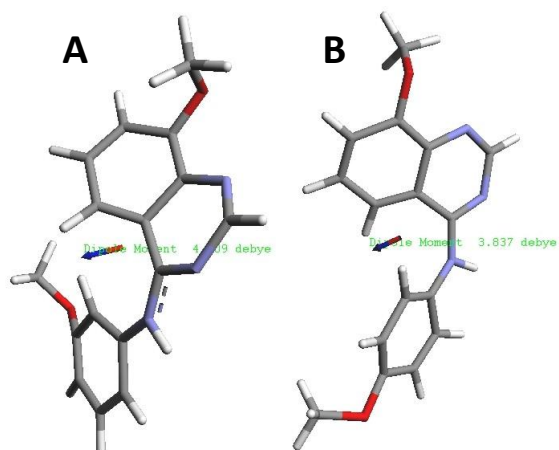


Figura A.10.9 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-3METX e (B) 8MEO-4METX.

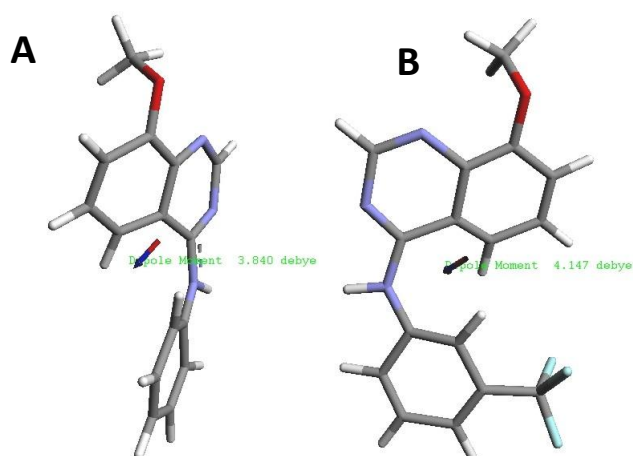


Figura A.10.10 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-ANL e (B) 8MEO-CF₃.

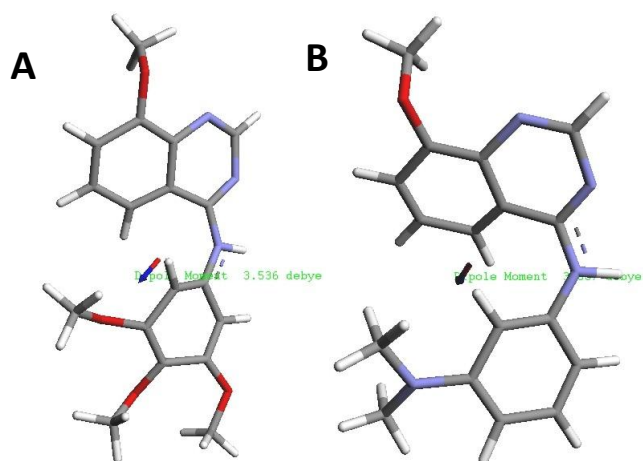


Figura A.10.11 - Momentos Dipolares ($\vec{\mu}$) para os compostos (A) 8MEO-TRI e (B) 8MEO-DMEA.