

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**PAULO SÉRGIO GONÇALVES NUNES**

**Síntese de novas quinazolininas para tratamento de tumores sob hipóxia e nitroimidazol para diagnóstico por PET**

Ribeirão Preto  
2018

**PAULO SÉRGIO GONÇALVES NUNES**

**Síntese de novas quinazolininas para tratamento de tumores sob hipóxia e nitroimidazol para diagnóstico por PET**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

**Orientadora:** Profa. Dra. Ivone Carvalho

Versão Corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 16/10/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto  
2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Nunes, Paulo Sérgio Gonçalves

Síntese de novas quinazolininas para tratamento de tumores sob hipóxia e nitroimidazol para diagnóstico por PET. Ribeirão Preto, 2018.

187 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Carvalho, Ivone.

1. Hipóxia tumoral. 2. Tomografia de Emissão de Póstron. 3. Síntese Orgânica. 4. AMBF<sub>3</sub>. 5. Quinazolininas. 6. 2-nitroimidazol

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Paulo Sérgio Gonçalves Nunes

Título: Síntese de novas quinazolininas para tratamento de tumores sob hipóxia e nitroimidazol para diagnóstico por PET

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

# ***Dedicatória***

*Aos meus pais José Donizete N. Machado e Creusa S. G. Nunes, pelo apoio e conselhos dados durante toda minha trajetória em busca da realização dos meus sonhos.*

*Aos meus irmãos Célia Márcia e Wilhan, que mesmo distantes torcem para que alcance aquilo que me deixa feliz.*

*A minha namorada Karen C. Rangel, por estar comigo me apoiando e me ajudando a passar pelos momentos difíceis durante essa trajetória.*

# **Agradecimentos**

*À Profa. Dra. Ivone Carvalho, pela orientação e apoio durante a realização do trabalho.*

*À Universidade de São Paulo e Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP – pela infraestrutura e oportunidade de realização deste projeto.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFRP, pela oportunidade, e aos funcionários da seção de pós-graduação, Eleni Angeli Passos, Rafael Braga Poggi, Rosana Florêncio e Rosemary Ioshimine Gerolineto pela atenção e serviços prestados.*

*Aos amigos do laboratório por compartilhar momentos de discussões e descontração.*

*Aos técnicos Marcelo Rodrigues de Carvalho, Luís Otávio Bunhotto Zamoner, José Carlos Tomaz e Vinícius Palaretti.*

*Aos membros da banca do meu exame de qualificação Prof. Dr. Giuliano Cesar Clososki, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos e Prof. (a) Dr. Niede Araçari Jacometti Cardoso Furtado pelas correções e sugestões que contribuíram para a continuidade deste trabalho.*

*A toda a equipe da BC Cancer Research Centre e UBC e em especial ao Dr. Kuo-Shyan Lin pelo apoio na realização do estágio no exterior e auxílios na realização da pesquisa.*

*A Doutoranda Martha Sahylí Ortega Pijeira e a Pós-Doutoranda Sofia do Nascimento do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão das bolsas de doutorado no país e no exterior (Processo FAPESP n.º 2013/27186-7 e 2017/04599-5) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Código de Financiamento 001) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo financiamento de projetos em nosso laboratório.*

*Enfim, a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, Muito Obrigado!*

## RESUMO

NUNES, P. S. G. **Síntese de novas quinazolininas para tratamento de tumores sob hipóxia e nitroimidazol para diagnóstico por PET.** 2018. 187 f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O tumor sob hipóxia apresenta resistência a terapia antitumoral convencional por diferentes mecanismos. O uso de métodos diagnósticos moleculares não invasivos, como imagem por PET, permite a identificação de tumores sob hipóxia e auxilia no delineamento da estratégia terapêutica mais adequada. Atualmente, diversas pesquisas têm demonstrado alternativas ao tratamento de tumores sob hipóxia, explorando características como, potencial redutor do tumor e inibição de mecanismos de adaptação celular para a sobrevivência sob essa condição. Assim, neste trabalho foi realizada a síntese e avaliação *in vivo* de novo derivado 2-nitroimidazol, contendo o grupo hidrofílico zwitteriônico amôniometil-trifluoroborato (AMBF<sub>3</sub>), **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, com potencial para geração de imagens de tumores sob hipóxia. O composto **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** foi facilmente preparado em 4 etapas sintéticas. A marcação com <sup>18</sup>F foi realizada via reação de troca isotópica <sup>18</sup>F-<sup>19</sup>F e **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** foi obtido em 14,8 ± 0,4% de rendimento radioquímico (*n* = 3) com decaimento corrigido, 24,5 ± 5,2 GBq/μmol de atividade específica e >99% de pureza radioquímica. Estudos de imagem e biodistribuição *ex vivo* em camundongos, portando tumores HT-29, demonstraram que **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** possui rápido *clearance* do sangue, com excreção pelas vias hepatobiliar e renal. No entanto, o tumor não foi visualizado em imagens de PET até 3 h pós-injeção devido à baixa captação tumoral (0,54 ± 0,13 e 0,19 ± 0,04% AI/g em 1 e 3 h pós-injeção, respectivamente), devido à não difusão de **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** através da membrana celular. Adicionalmente, compostos quinazolinicos com potencial aplicação em diagnóstico foram também sintetizados contendo unidades biorredutíveis, nitro-benzil e nitro-imidazol, além de grupo fluoroetil, inicialmente contendo <sup>19</sup>F (frio), como padrão analítico para a síntese do radiotraçador. Entretanto, devido a formação de produtos voláteis durante a radiosíntese da unidade 2-[<sup>18</sup>F]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***), para incorporação no anel quinazolinico, a obtenção do radiotraçador e os correspondentes estudos de biodistribuição e imagem não foram realizados. Em paralelo ao trabalho anterior, foi realizada a síntese de um conjunto de 12 compostos aminotriazolil-quinazolinicos com potencial atividade antitumoral, via reação de cicloadição CuAAC. Inicialmente todos derivados quinazolinicos obtidos no trabalho para aplicação no diagnóstico foram testados em uma série de linhagens de células tumorais sob condições de normóxia e hipóxia (MDA-MB-231, SKBR3, BT474, PC3, MKN45, U251, U87, MIA PaCa-2, Skmel37, e A549, na concentração de 10 μM), empregando cisplatina como referência. Neste estudo, apenas os derivados contendo grupo nitro-benzil-triazólico **61** e **63**, apresentaram cerca de 50% de inibição de células MKN45 em normóxia e 40% em células SKBR3 sob hipóxia, respectivamente. Na sequência, os 12 derivados aminotriazolil-quinazolinicos foram submetidos a avaliação da citotoxicidade *in vitro* sob as linhagens de células tumorais de mama (MDA-MB-231, SKBR3, BT474, na concentração de 30 μM), empregado os controles positivos Erlotinib e

Lapatinib. Apenas o derivado contendo a função ftalimida **9**, não substituído nas posições C-6 e C-7 do anel quinazolinico, apresentou cerca de 60% de inibição de células SKBR3 em hipóxia. Paralelamente, os derivados aminotriazolil-quinazolinicos foram submetidos à avaliação de triagem da atividade inibitória frente as quinases HER2, EGFR e PERK, na concentração de 10  $\mu$ M. Todavia, não houve inibição significativa nas enzimas avaliadas na concentração testada. Novos ensaios estão em andamento a fim de determinar a capacidade dos compostos atuarem como inibidores do crescimento de outras linhagens de células tumorais.

Palavras-chave: 1. Hipóxia tumoral, 2. Tomografia de Emissão de Póstron, 3. Síntese Orgânica, 4. AMBF<sub>3</sub>, 5. Quinazolininas, 6. 2-nitroimidazol.



## ABSTRACT

NUNES, P. S. G. **Synthesis of novel quinazolines for the treatment of tumors under hypoxia and nitroimidazole for diagnosis by PET.** 2018. 187 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Tumor hypoxia is resistant to conventional antitumor therapy by different mechanisms. The use of non-invasive molecular diagnostic methods, such as PET imaging, allows the identification of tumors under hypoxia and assists in designing the most appropriate therapeutic strategy. Currently, several researches have provided alternative treatments for tumors under hypoxia, exploring some specific properties, such as tumor reducing potential and inhibition of adaptive mechanisms required for cell survival under hypoxia. Thus in this work, it was performed the synthesis and *in vivo* evaluation of new 2-nitroimidazole derivative, containing the zwitterionic hydrophilic group, ammonium methyl-trifluoroborate (AMBF<sub>3</sub>), **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, with potential for tumor imaging in hypoxia. The compound **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** was easily prepared in four steps. <sup>18</sup>F labeling was conducted via <sup>18</sup>F-<sup>19</sup>F isotope exchange reaction, and **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** was obtained in 14.8 ± 0.4% (n = 3) decay-corrected radiochemical yield with 24.5 ± 5.2 GBq/μmol specific activity and > 99% radiochemical purity. Imaging and biodistribution *ex vivo* studies in HT-29 tumor-bearing mice showed that **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** cleared quickly from blood, and was excreted via the hepatobiliary and renal pathways. However, tumor PET images were not visualized until 3 h post-injection due to low tumor uptake (0.54 ± 0.13 and 0.19 ± 0.04%ID/g at 1 h and 3 h post-injection, respectively) due to non-diffusion of **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** through the cell membrane. Additionally, quinazolinic compounds with potential diagnostic application were also synthesized containing biorreductive units, nitrobenzyl and nitroimidazole, as well as a fluoroethyl group, initially containing <sup>19</sup>F (cold), as an analytical standard for the synthesis of the radiotracer. However, due to the formation of volatile products during the radiosynthesis of the 2-[<sup>18</sup>F] fluoroethyl 4-methylbenzenesulfonate (**34\***) unit, for incorporation into the quinazoline ring, the radiotracer preparation and its corresponding biodistribution and imaging studies were not performed. Concomitantly to the previous work, the synthesis of a set of 12 aminotriazolyl-quinazoline compounds with potential antitumor activity was performed, via the CuAAC cycloaddition reaction. Initially, all quinazolinic derivatives obtained in the work for application in the diagnosis were tested in a range of tumor cell lines under normoxia and hypoxia conditions (MDA-MB-231, SKBR3, BT474, PC3, MKN45, U251, U87, MIA PaCa-2, Skmel37, and A549, at 10 μM), using cisplatin as a reference. In this study, only the derivatives bearing the nitrobenzyltriazole group **61** and **63** showed about 50% inhibition of MKN45 cells in normoxia and 40% in SKBR3 cells under hypoxia, respectively. In the sequence, the 12 aminotriazolyl-quinazoline derivatives were submitted to *in vitro* cytotoxicity evaluation using breast tumor cell lines (MDA-MB-231, SKBR3, BT474, at 30 μM), in the presence of the reference drugs Erlotinib and Lapatinib. Only the derivative containing the phthalimide function **9**, unsubstituted at C-6 and C-7 positions of the quinazoline ring, displayed about 60% inhibition on SKBR3 cells under hypoxia. Concomitantly, the inhibitory

activity of these aminotriazolyl-quinazoline derivatives were also subjected to a screening evaluation against the HER2, EGFR and PERK kinases, 10  $\mu$ M. However, there was no significant inhibition of these enzymes at the tested concentration. New assays are ongoing to determine the inhibitory activity under other tumor cell lines.

Keywords: Tumor hypoxia, 2. Positron Emission Tomography, 3. Organic synthesis, 4.  $\text{AMBF}_3$ , 5. Quinazolines, 6. 2-nitroimidazole.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplo de biomarcadores sanguíneos de tumores.....	3
<b>Figura 2.</b> Pró-fármacos biorredutores estudados para seletividade em tumores sob hipóxia.....	7
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de ativação biorredutiva do inibidor de tirosina quinase EGFR TH-4000.....	8
<b>Figura 4.</b> Respostas da via HIF-1 sob condições de hipóxia e normóxia....	9
<b>Figura 5.</b> Esquema simplificado da participação das vias de adaptação da célula tumoral a hipóxia. ....	9
<b>Figura 6.</b> Compostos que atuam sobre a via HIF-1.....	10
<b>Figura 7.</b> Inibidor proteossomal Bortezomibe e Inibidores da mTOR rapamicina e WYE125132.....	11
<b>Figura 8.</b> Exemplo de reação de fosforilação promovida por uma proteína quinase em um resíduo de serina. ADP: adenosina difosfato.....	12
<b>Figura 9.</b> Características de Inibidores de quinases.....	13
<b>Figura 10.</b> Mecanismo do inibidor de CHK1 CH-01 ativado por hipóxia....	14
<b>Figura 11.</b> Pró-fármacos ativados sob hipóxia para a inibição da EGFR e CHK1.....	15
<b>Figura 12.</b> Alguns exemplos de fármacos inibidores de tirosina quinase (EGFR) marcados com radionuclídeos emissores de pósitron $^{11}\text{C}$ e $^{18}\text{F}$ .....	16
<b>Figura 13.</b> Radiofármacos utilizados para geração de imagens hipóxia tumoral com PET.....	17
<b>Figura 14.</b> Mecanismos de retenção do derivado [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO em células em hipóxia.....	18
<b>Figura 15.</b> Derivado de $\text{AmBF}_3$ de 2-nitroimidazol proposto $^{18}\text{F}\text{-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ .....	19
<b>Figura 16.</b> Estrutura geral da cadeia de quinazolína com substituintes em C-4, C-6 e C-7, contendo o grupo biorredutor 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina em C-4 e fluoroetil em C-6.....	19
<b>Figura 17.</b> Série de novos derivados 4-aminoquinazolina sintetizados.....	20
<b>Figura 18.</b> Cromatogramas de controle de qualidade (CQ) obtidos por co-injeção do padrão não radioativo $\text{AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ com o $^{18}\text{F}\text{-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ .....	68
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas de Radio-CLAE do $^{18}\text{F}\text{-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ após ser incubado com plasma de camundongo a $37^\circ\text{C}$ .....	70
<b>Figura 20.</b> Imagens estáticas representativas de $^{18}\text{F}\text{-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ em camundongo NOD- <i>scid</i> IL2R $\gamma^{\text{null}}$ portando xenoenxerto de câncer de colón humano HT-29.....	71
<b>Figura 21.</b> Curvas de atividade-tempo de $^{18}\text{F}\text{-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ .....	73
<b>Figura 22.</b> Etapas do trabalho. ....	77
<b>Figura 23.</b> Estrutura geral dos derivados quinazolínicos planejados para o diagnóstico.....	77
<b>Figura 24.</b> NOE- <i>Diff</i> realizado para o composto <b>25</b> .....	84
<b>Figura 25.</b> Unidades biorredutíveis obtidas.....	89
<b>Figura 26A.</b> Análise por CLAE do composto marcado 2- $^{18}\text{F}$ fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato ( <b>34*</b> ) ( $t_{\text{R}} = 9,859$ min).Perfil correspondente ao detector de radioatividade.....	101
<b>Figura 26B.</b> Análise por CLAE do composto padrão 2-fluoroetil 4-	101

metilbenzenosulfonato ( <b>34</b> ) ( $t_R = 9,988$ min). Perfil correspondente ao detector UV 256 nm.....	
<b>Figura 27.</b> Série de novos derivados 4-aminoquinazolina sintetizados.....	105
<b>Figura 28.</b> Compostos avaliados sobre o ensaio de viabilidade celular.....	106
<b>Figura 29.</b> Dados da atividade biológica dos produtos quinazolínicos contendo grupos nitro <b>52-54, 65, 61, 63</b> .....	108
<b>Figura 30.</b> Inibidores de tirosina quinase HER2 e EGFR. Lapatinib.....	109
inibidor dual HER2/EGFR e Erlotinib, inibidor da tirosina quinase EGFR....	
<b>Figura 31.</b> Dados da atividade biológica sob linhagens tumorais de Mama - MDA-MB-231, SKBR3, BT474.....	112
<b>Figura 32.</b> Estrutura inibidores duais da tirosina quinase HER2 e EGRF.	113
<b>Figura 33.</b> Inibidores empregados como controle positivo no ensaio de inibição realizado pela empresa Reaction Biology .....	114
<b>Figura 34.</b> Curvas de $IC_{50}$ dos controles positivos staurosporina e GSK-2606414 obtidos pela Reaction Biology.....	114

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Etapas para a síntese de <b>AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI</b> .....	66
<b>Esquema 2.</b> Radiossíntese do análogo de <b><sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI</b> pela reação de troca isotópica <sup>19</sup> F- <sup>18</sup> F.....	67
<b>Esquema 3.</b> Estratégias sintéticas realizadas.....	78
<b>Esquema 4.</b> Método geralmente empregado para obtenção de quinazolinonas.....	79
<b>Esquema 5.</b> Estratégia sintética para a obtenção da quinazolinona <b>17</b> .....	79
<b>Esquema 6.</b> Mecanismo proposto para de-O-metilação empregando MSA e L-MET.....	80
<b>Esquema 7.</b> Reação de proteção da hidroxila fenólica, pelo tratamento com piridina em anidrido acético.....	81
<b>Esquema 8.</b> Nova abordagem para a obtenção do intermediário <b>17</b> .....	82
<b>Esquema 9.</b> Rota sintética para a obtenção do derivado ácido antranílico <b>22</b> .....	82
<b>Esquema 10.</b> Rota sintética para a obtenção do derivado ácido antranílico <b>23</b> .....	82
<b>Esquema 11.</b> Primeira etapa para a obtenção dos derivados do ácido antranílico.....	83
<b>Esquema 12.</b> Redução do grupo nitro (WEBER et al., 2005).....	84
<b>Esquema 13.</b> Proposta inicial para a obtenção da quinazolinona <b>17</b> .....	85
<b>Esquema 14.</b> Reação de proteção do grupo hidroxila em C-6 com acetil da quinazolinona <b>17</b> .....	85
<b>Esquema 15.</b> Novo planejamento para síntese de derivados quinazolínicos.....	86
<b>Esquema 16.</b> Estratégia para a obtenção das quinazolinonas <b>32</b> e <b>33</b> .....	86
<b>Esquema 17.</b> Etapas de avaliação da reação ciclização redutiva empregando cloreto de índio (InCl <sub>3</sub> ).....	87
<b>Esquema 18.</b> Mecanismo proposto da reação de ciclização redutiva na presença de cloreto de índio.....	88
<b>Esquema 19.</b> Estratégia sintética para a obtenção das 4-aminoquinazolininas, contendo flúor frio.....	88
<b>Esquema 20.</b> Métodos empregados para a obtenção 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato ( <b>34</b> ).....	89
<b>Esquema 21.</b> Estratégia de síntese da unidade biorredutível 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina ( <b>37</b> ).....	90
<b>Esquema 22.</b> Proposta de síntese do intermediário <b>42</b> .....	90
<b>Esquema 23.</b> Nova proposta sintética para a obtenção do 2-([4-nitrobenzil]oxi) etanamina ( <b>37</b> ).....	91
<b>Esquema 24.</b> Síntese do éter nitro-aromático <b>45</b> .....	92
<b>Esquema 25.</b> Desproteção do intermediário <b>45</b> .....	92
<b>Esquema 26.</b> Rota sintética para a obtenção de <b>38</b> .....	93
<b>Esquema 27.</b> Rota sintética empregada para a síntese da unidade biorredutível <b>39</b> .....	94
<b>Esquema 28.</b> Estratégia sintética otimizada para a síntese obtenção de 4-aminoquinazolininas, exemplificando a síntese do derivado <b>54</b> com a unidade biorredutível 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina e o grupo <sup>18</sup> F-etílico.	95
<b>Esquema 29.</b> Mecanismo de substituição nucleofílica aromática ativada	95

por fosfônio (WAN et al., 2006).....	96
<b>Esquema 30.</b> Avaliação da reação de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio.....	96
<b>Esquema 31.</b> Avaliação de diferentes bases para obtenção do intermediário modelo <b>60</b> .....	96
<b>Esquema 32.</b> Emprego da DIPEA como base para a obtenção de <b>52</b> .....	97
<b>Esquema 33.</b> Emprego da reação de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio para a obtenção do intermediário <b>52</b> .....	97
<b>Esquema 34.</b> Etapas finais para obtenção do produto desejado <b>53</b> para posterior marcação com o grupo $^{18}\text{F}$ -etílico.....	99
<b>Esquema 35.</b> Rota sintética para radiossíntese de derivados 4-aminoquinazolínicos contendo o anel triazólico.....	99
<b>Esquema 36.</b> Síntese do 2- $^{18}\text{F}$ fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato ( <b>34*</b> )....	100
<b>Esquema 37.</b> Etapa final necessária para a obtenção de 4-aminoquinazolinas desejadas.....	102
<b>Esquema 38.</b> Derivados de quinazolínicos obtidos a partir da condensação da quinazolinona <b>18</b> com as unidades biorredutíveis <b>37</b> ou <b>38</b> .....	103
<b>Esquema 39.</b> Estratégia empregada para obtenção dos 12 novos derivados de 4-aminoquinazolina obtidos.....	104

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Mecanismos de resistência dos fármacos antitumorais devido à presença de hipóxia.....	6
<b>Tabela 2.</b> Dados de biodistribuição (média ± SD % AI/g) de <sup>18</sup> F-AmBF <sub>3</sub> -bu-2NI em 1 e 3 h após injeção em NOD- <i>scid</i> IL2Rgamma <sup>null</sup> camundongo portando xenoenxerto tumoral HT-29.....	74
<b>Tabela 3.</b> Resultados do ensaio de inibição dos compostos <b>65, 1-9</b> sobre as enzimas tirosinas quinases EGFR e HER2 e quinase PERK na concentração de 10 µM.....	115

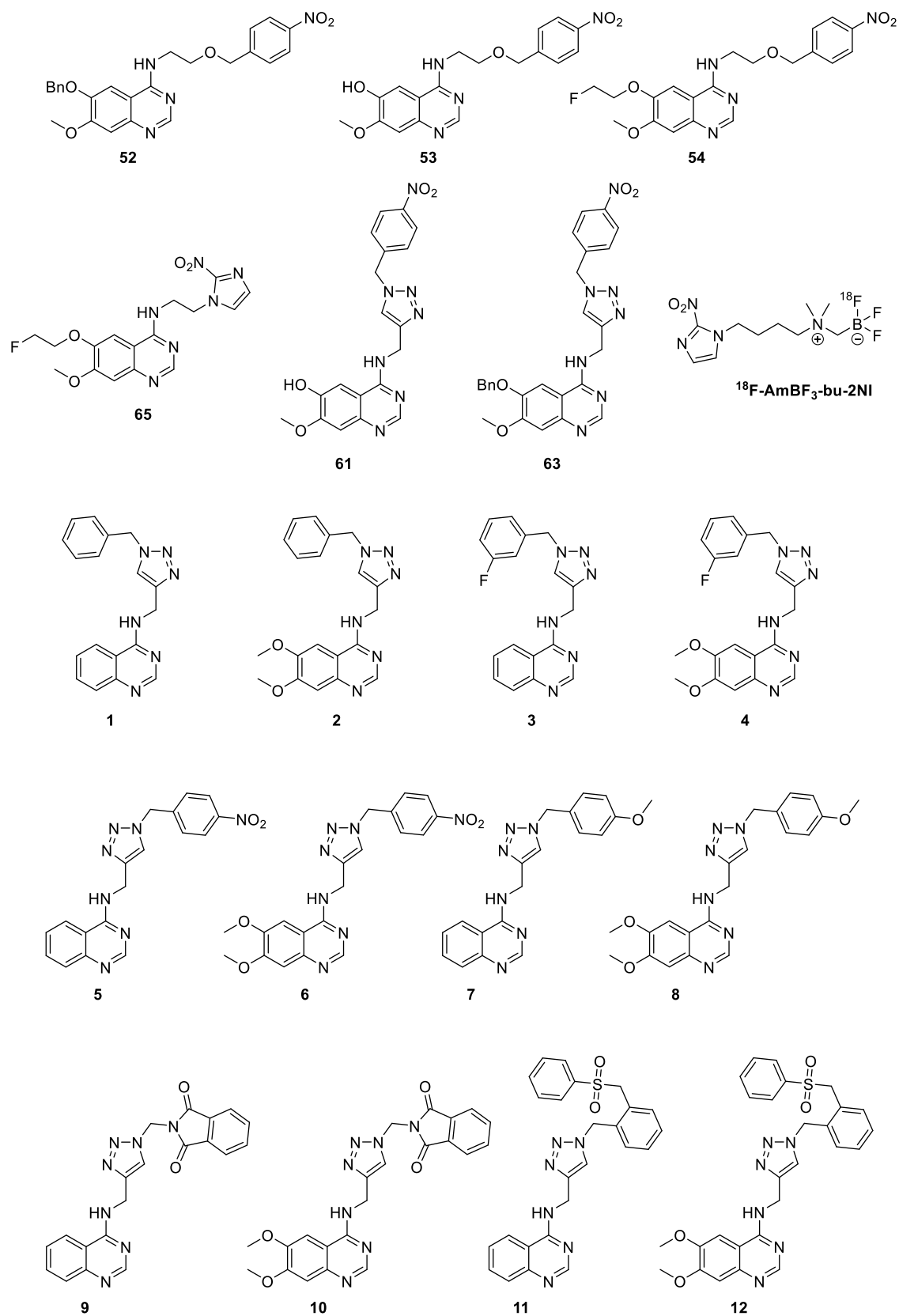
## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>% AI/g</b>	Porcentagem de atividade injetada por grama de tecido
<b>AMBF<sub>3</sub></b>	amônio metil-trifluoroborato
<b>ABL</b>	Abelson proto-oncogene
<b>ATM</b>	Ataxia-Telangiectasia Mutada
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BOLD</b>	<i>Blood oxygen dependent level</i>
<b>CCC</b>	Cromatografia em Coluna Clássica
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CQ</b>	Controle de Qualidade
<b>cpm</b>	<i>counts per minute</i>
<b>CT</b>	<i>Computed Tomography</i>
<b>CuAAC</b>	Cicloadição Azido/Alcino Catalisadas por Cobre(I)
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>EGFR</b>	<i>Epidermal Grow Factor Receptor</i>
<b>ESI</b>	<i>Electron spray ionization</i>
<b>GBq/μmol</b>	Gigabecquerel por micromol
<b>HIF-1</b>	<i>Hypoxia Inducible Factor 1</i>
<b>HREs</b>	<i>Hypoxia Response Elements</i>
<b>HRMS</b>	<i>High resolution mass spectra</i>
<b>IPEN</b>	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
<b>MBq</b>	Megabecquerel
<b>mCi</b>	Millicurie
<b>MMR</b>	<i>DNA mismatch repair</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>mTORC1</b>	Quinase mTOR do complexo 1
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end joining</i>
<b>NOE-diff</b>	<i>Nuclear Overhauser Effect Difference Spectroscopy</i>
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PET</b>	<i>Positron Emission Tomography</i>
<b>PHD</b>	prolil hidroxilases
<b>RE</b>	retículo endoplasmático



<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>SPECT</b>	<i>Single Photon Emission Computed Tomograph</i>
<b>UPR</b>	<i>Unfolded Protein Response</i>
<b>VEGFA</b>	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
<b>VHL</b>	E3-ubiquitina ligase von Hippel-Lindau

## LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS SINTETIZADOS</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 Câncer: Características gerais .....	2
1.2 Hipóxia e Câncer.....	4
1.3 Mecanismos de resposta celular a hipóxia .....	8
1.4 Quinases e relevância na hipóxia .....	11
1.5 Diagnóstico da hipóxia tumoral .....	15
<b>1.5.1 Identificação da hipóxia tumoral por PET</b> .....	<b>16</b>
1.6 Justificativa .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 Objetivo Geral .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 MATERIAIS.....	25
3.1.1. Aparelhagem Analítica.....	25
3.1.2 Aparelhagem Laboratorial.....	26
3.1.3 Purificação/Isolamento.....	26
3.1.4 Solventes, reagentes e outros materiais.....	27
3.2 MÉTODOS.....	28
3.2.1 Síntese.....	28
3.2.2 Radiossíntese de <sup>18</sup> F-AmBF <sub>3</sub> -bu-2NI .....	58
3.2.3 Avaliação do Coeficiente de Partição (LogP).....	59
3.2.4 Ensaios biológicos .....	59
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>

4.1 Novo traçador $^{18}\text{F}$ -AmBF <sub>3</sub> -bu-2NI para estudos de biodistribuição e imagem por PET/CT e captação celular .....	66
4.1.1 Síntese do precursor AmBF <sub>3</sub> -bu-2NI .....	66
4.1.2 Radiossíntese de $^{18}\text{F}$ -AmBF <sub>3</sub> -bu-2NI .....	67
4.1.3 Avaliação do Coeficiente de Partição (LogP).....	68
4.1.4 Avaliação da estabilidade em plasma.....	69
4.1.5 Estudos de imagem e biodistribuição ex-vivo por PET/CT .....	70
4.2 Síntese e avaliação de compostos quinazolínicos para diagnóstico e tratamento de tumores sob hipóxia por PET.....	76
4.2.1 Planejamento e síntese de quinazolininas e quinazolinonas.....	78
4.2.2 Síntese de unidades biorredutíveis.....	89
4.2.3 Síntese de quinazolininas - Avaliação da Rota A de obtenção do composto marcado com $^{18}\text{F}$ .....	94
4.2.4 Síntese de derivados 4-aminoquinazolínicos frios.....	102
4.2.5 Derivados 4-aminoquinazolínicos para o tratamento de tumores sob hipóxia .....	103
4.2.6 Ensaios de atividade biológica.....	105
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>117</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>120</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>135</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

---

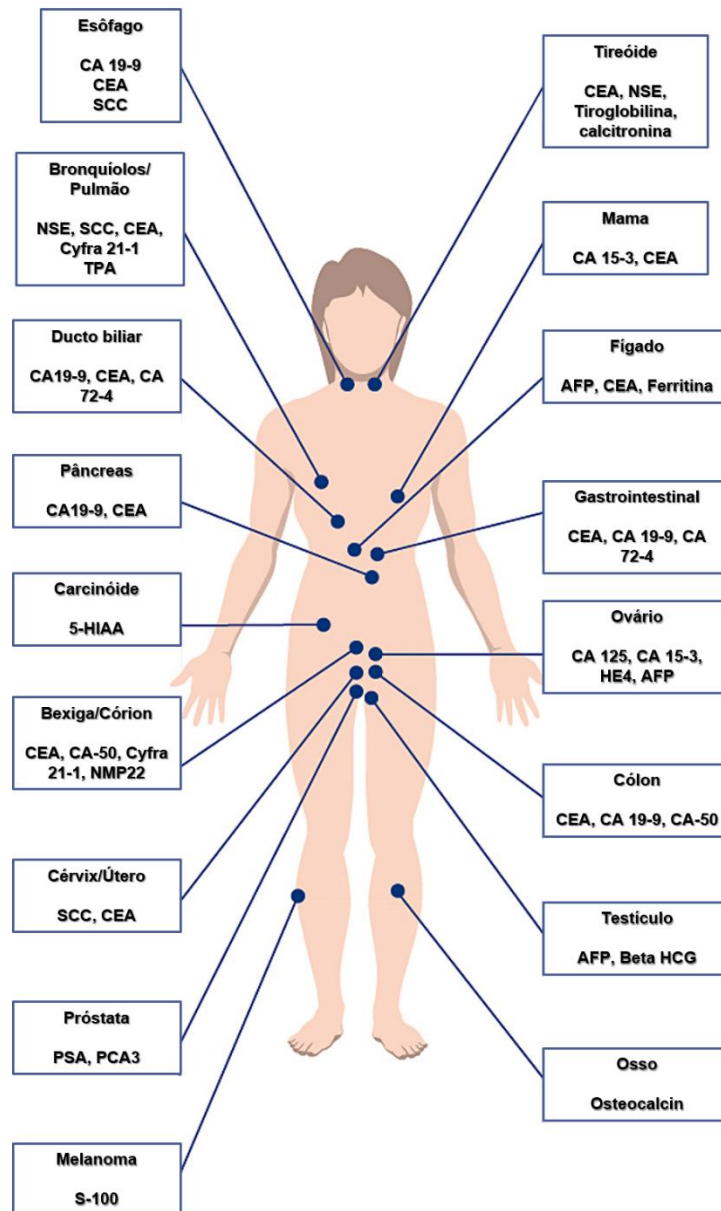
## 1.1 Câncer: Características gerais

Câncer é um termo utilizado para denominar um conjunto de mais de 100 doenças, no qual células anormais ou que sofreram mutações apresentam uma capacidade de replicação intermitente (NCI, 2018). As alterações celulares levam ao comprometimento de tecidos adjacentes e também podem atingir outros tecidos, através da circulação sanguínea e/ou sistema linfático pelo processo de metástase (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

O câncer origina-se de alterações genéticas ou epigenéticas resultantes de fatores externos ou internos. Os fatores externos são classificados em fatores físicos, químicos e biológicos tal como exposição à radiação ionizante, gases tóxicos e infecções virais, enquanto os internos referem-se a mutações herdadas (NCI, 2018; FLAVAHAN; GASKELL e BERNSTEIN, 2017). As mutações mais relevantes na progressão do câncer tendem a afetar três tipos principais de genes: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA (NCI, 2018).

As principais características comuns à maioria dos cânceres, descritas em maiores detalhes por Douglas Hanahan e Robert A. Weinberg (2011), correspondem a: resistência a morte celular, indução de angiogênese, ativação de invasão e metástase, imortalidade replicativa, evasão da resposta imune, evasão de supressores tumorais, sinal de proliferação contínua e desregulação energética celular.

O método diagnóstico padrão-ouro de neoplasias sólidas é a biópsia, que é realizada por meio de análise histológica guiada por imuno-histoquímica com a avaliação de características morfológicas e da capacidade de invasão. Porém outras técnicas menos invasivas têm demonstrado alta relevância no auxílio do diagnóstico, tais como dosagem de biomarcadores sanguíneos (**Figura 1**) e exames de imagem. O uso dessas técnicas torna possível o acompanhamento da progressão dos tumores e a identificação de marcadores moleculares para direcionar o tratamento mais adequado (WEBER; HABERKORN e MIER, 2015).



**Figura 1.** Exemplo de biomarcadores sanguíneos de tumores. Figura adaptada de [https://tdlpathology.com/media/15854/tdl\\_tumourmarkers.jpg](https://tdlpathology.com/media/15854/tdl_tumourmarkers.jpg)

Os exames de imagem por ultrassonografia, ressonância magnética nuclear (RMN), tomografia computadorizada (CT, do inglês: *Computed Tomography*) e tomografia de emissão de pósitron (PET, do inglês: *Positron Emission Tomography*), permitem a obtenção de informações anatômicas e funcionais auxiliando na realização da biópsia e no monitoramento do tratamento oncológico. Assim, estas ferramentas atuam de forma complementar ao diagnóstico e permitem a obtenção de dados que auxiliam nas abordagens terapêuticas (WEISSLEDER e PITTET, 2008).

Devido às próprias características do câncer, como instabilidade genômica, o mesmo tipo de tumor pode apresentar características diversificadas dentre elas mutações ou microambientes hipóxicos, os quais resultam em respostas diferentes a um determinado tratamento. Por exemplo, as mutações ativadoras do gene KRAS resultam em ativação constitutiva de KRAS, portanto independente da regulação normal pelo receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR, do inglês: *epidermal grow factor receptor*). Os cânceres de cólon com esta mutação tornam-se resistentes a fármacos que inibem sua progressão via mecanismos *anti-EGFR* (MISALE et al., 2012).

Desta forma, a obtenção de métodos diagnósticos moleculares que permitam a identificação de características tumorais, como estágio, origem tecidual e mutações presentes, auxilia no delineamento da estratégia terapêutica com a escolha de uma abordagem farmacológica mais adequada. Sendo assim, o desenvolvimento de ferramentas para a diferenciação/estratificação tumoral se torna tão importante quanto a obtenção de novos fármacos para o tratamento.

## 1.2 Hipóxia e Câncer

A hipóxia ou tensão baixa de oxigênio, abaixo do valor basal do órgão ou tecido, é uma condição causada pela diminuição do aporte sanguíneo para a uma determinada região do organismo (MUZ et al., 2015). Essa condição pode surgir em tumores sólidos em resposta a alta proliferação celular, juntamente com a presença de uma vascularização ineficiente (EALES; HOLLINSHEAD e TENNANT, 2016).

Mesmo na presença de oxigênio, a célula cancerígena não o utiliza para obtenção de energia. Apesar de ser energeticamente desfavorável, o ATP é obtido preferencialmente por meio da glicólise aeróbica, fenômeno este definido como efeito Warburg (WARBURG, 1956). No entanto, a hipóxia tumoral é responsável por diferentes alterações na biologia do tumor, que contribuem tanto com a sobrevivência quanto com a agressividade do câncer (WILSON e HAY, 2011).

No tumor, a hipóxia seleciona células que expressem genes capazes de favorecer: sobrevivência após hipóxia seguida de reoxigenação, como



mutações TP53, (GRAEBER et al.,1996); mudanças na expressão gênica que suprimem a apoptose (ERLER et al., 2004) e permitem suportar a autofagia (ROUSCHOP et al., 2010); e alterações anabólicas no metabolismo central (CAIRNS et al., 2011).

Além disso, a hipóxia colabora com a metástase tumoral estimulando a angiogênese tumoral e promovendo a invasão celular, ainda suprimindo a resposta imunológica e aumenta a sinalização mediada por receptores de tirosina quinase (SEMENZA, 2000; YOTNDA et al., 2010; CHANG et al., 2011; PENNACCHIETTI et al., 2003; WANG e OHH, 2010; WILSON e HAY, 2011). Adicionalmente, o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (GUZY et al., 2005) e a *downregulation* das vias de reparo de DNA (BRISTOW et al., 2008), presentes nas células em hipóxia, contribuem para a perda da estabilidade genômica.

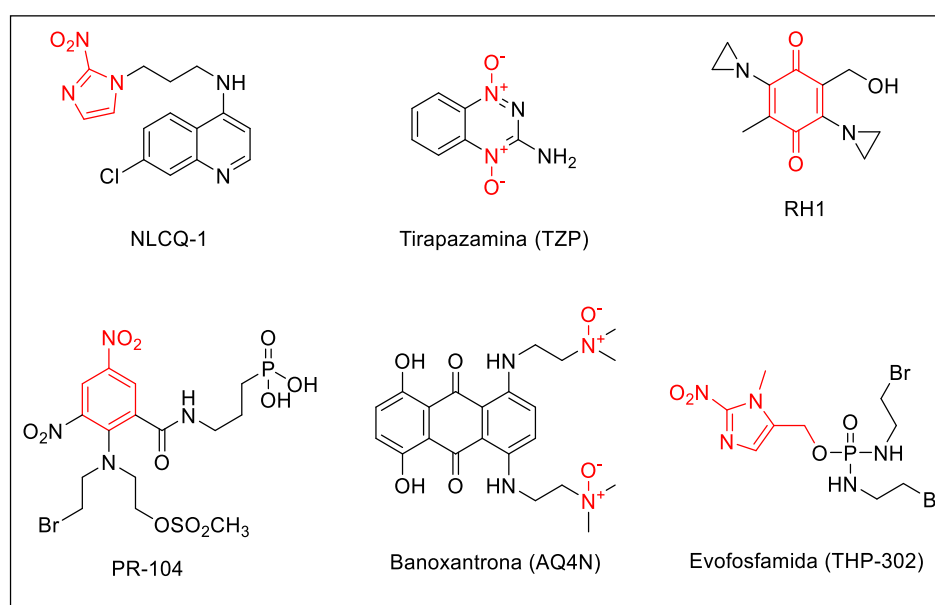
As alterações causadas pela hipóxia conferem resistência a várias abordagens terapêuticas empregadas na terapia antitumoral convencional do câncer, como a radioterapia e antitumorais, por diferentes mecanismos (**Tabela 1**) (WILSON e HAY, 2011). Devido a estas características, a hipóxia está correlacionada com um mau prognóstico em tumores sólidos tais como relatado no carcinoma de colo do útero, sarcomas e cânceres de cabeça e pescoço (FYLES et al., 2002; BRIZEL et al., 1997; NORDSMARK et al., 2005; NORDSMARK et al., 2001; LIN e MAITY, 2015).

**Tabela 1.** Mecanismos de resistência dos fármacos antitumorais devido à presença de hipóxia.

Efeito da hipóxia	Mecanismo	Agentes afetados	Exemplo	Referência
<b>Falta de oxidação do DNA por radicais livres por O<sub>2</sub></b>	Falha na indução de quebras no DNA	Radiação Ionizante	Requer um aumento de 2-3-vezes na dose de radiação para morte celular equivalente.	(GRAY et al., 1953)
		Antibióticos que quebram DNA	Bleomicina	(TEICHER et al., 1981)
<b>Parada do ciclo celular na fase G1 ou G2</b>	Reparar antes da progressão para a fase S ou M	Fármacos quimioterápicos ciclo-seletivos	5-fluorouracila	(CHAN et al., 2010)
<b>Distância da vasculatura (indireta)</b>	Exposição ao fármaco comprometida	Fármacos que se ligam extensivamente em células tumorais	Taxanas	(KYLE et al., 2007)
<b>Acidificação extracelular (indireta)</b>	Menor absorção	Fármacos básicos	Doxorubicina	(GERWECK et al., 1999)
<b>Resistência à apoptose</b>	Seleção genética de mutantes TP53	Vários	--	(GRAEBER et al., 1996)
<b>Instabilidade genômica</b>	Mutagêneses (BINDRA et al., 2005)	Vários	Metotrexato	(RICE et al., 1986)
<b>Supressão de reparo ao DNA</b>	<i>Downregulation</i> da MMR*	Agentes que metilam o DNA	--	(BINDRA et al., 2007)
<b>Estabilização do HIF-1</b>	Expressão de transportadores ABC	Substratos de transportadores ABC	Doxorubicina	(COMERFORD et al., 2002)
	<i>Downregulation</i> de NHEJ**	Agentes de quebra de fita dupla de DNA	Etoposida	(WIRTHNER et al., 2008)

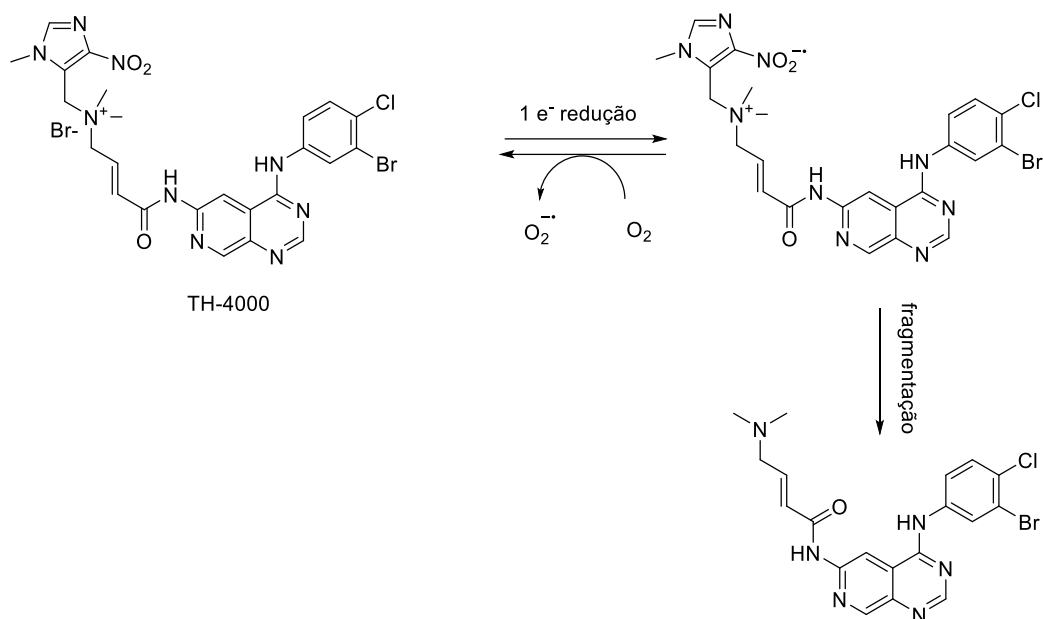
\*MMR, reparo de incompatibilidade de DNA (MMR, do inglês: *DNA mismatch repair*); \*\* NHEJ, união de extremidade não-homóloga (NHEJ, do inglês: *Non-homologous end joining*). Fonte: Adaptado de WILSON e HAY, 2011.

As abordagens terapêuticas que exploram características presentes em tumores sob hipóxia estão sobre intenso desenvolvimento com vários compostos atualmente em ensaios clínicos (GUISE et al., 2014). Entre as estratégias mais estudadas, está o desenvolvimento de pró-fármacos biorredutíveis, que explora o ambiente redutor que surge durante a hipóxia. Nesta abordagem são utilizados compostos contendo funções nitro-aromáticos, hidroquinonas, *N*-óxidos heteroaromáticos e *N*-óxidos alifáticos e metais de transição, como cobalto e cobre (**Figura 2**), os quais são alvos de diferentes redutases intracelulares (CHEN e HU, 2009).



**Figura 2.** Pró-fármacos biorredutores estudados para seletividade em tumores sob hipóxia (Adaptado de WILSON e HAY, 2003).

Nas células em condições de normóxia esses compostos são reduzidos a intermediários, geralmente por redução monoelétrica, que são prontamente reoxidados pelo oxigênio molecular. Por outro lado, em células sob hipóxia após os compostos sofrerem redução, normalmente não há re-oxidação efetiva devido à baixa concentração de oxigênio. Assim, a redução prossegue até a geração de espécies citotóxicas ou liberação de compostos ativos (**Figura 3**) (ABRANTES et al., 2009; FAILES e HAMBLEY, 2006).

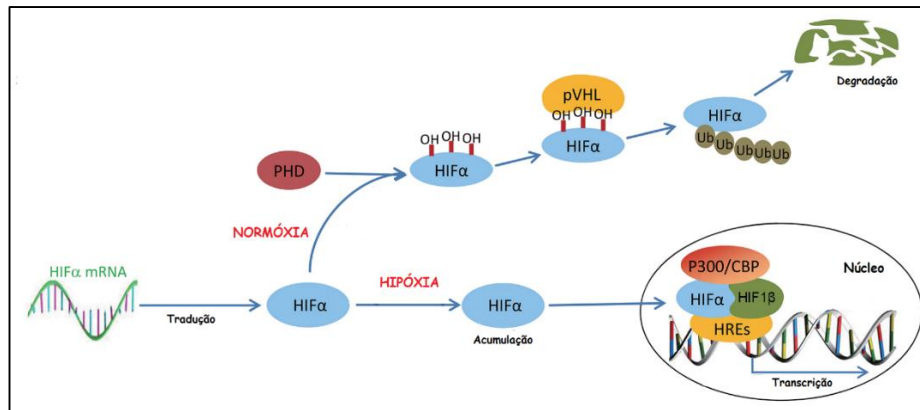


**Figura 3.** Mecanismo de ativação biorredutiva do inibidor de tirosina quinase EGFR TH-4000. Adaptado de Phillips, 2016.

Outras estratégias exploram mecanismos de resposta a hipóxia: inibição da via do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1, do inglês: *hypoxia-inducible factor 1*), resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês: *unfolded protein response*) e da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês: *mammalian target of rapamycin*) (WILSON e HAY, 2003).

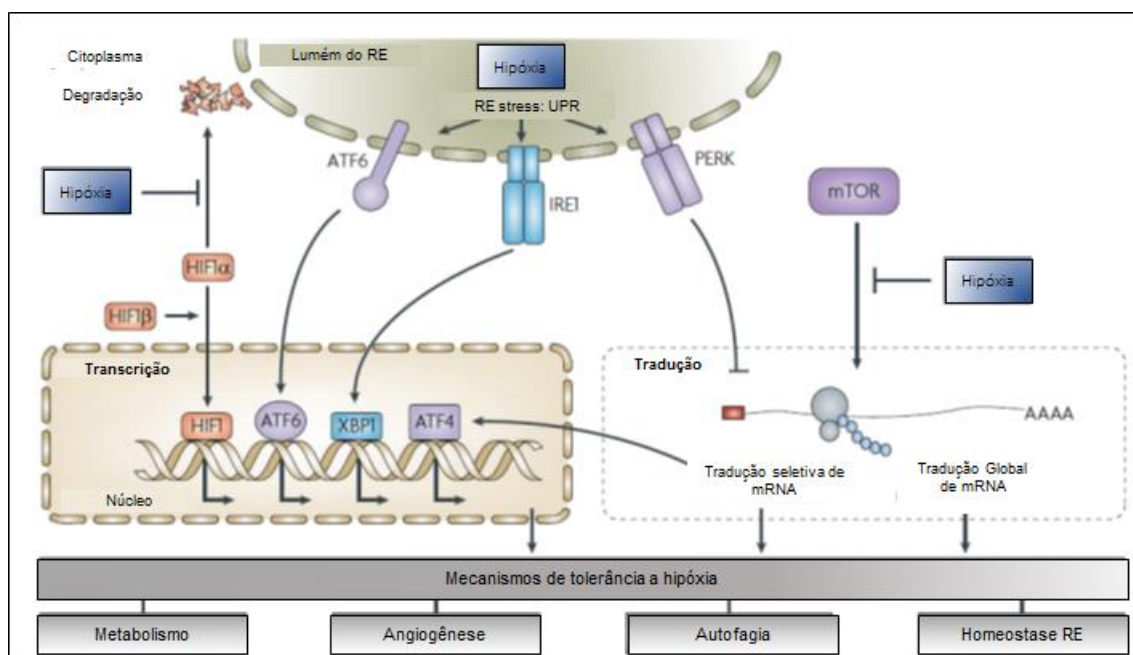
### 1.3 Mecanismos de resposta celular a hipóxia

Na ausência de oxigênio a principal via responsável pela sobrevivência da célula tumoral é a via HIF-1. O HIF-1 é uma proteína heterodimérica constituída por duas subunidades o HIF-1 $\alpha$ , regulada por oxigênio, e uma subunidade de HIF-1 $\beta$ , constitutivamente expressa, presentes no citoplasma e núcleo, respectivamente. Sob condições de normóxia, a subunidade HIF-1 $\alpha$  sofre degradação proteossomal após hidroxilação por prolil hidroxilases (PHD), que requerem oxigênio como cofator, e ligação ao complexo E3-ubiquitina ligase von Hippel-Lindau (VHL) (SEMENZA, 2011) (**Figuras 4 e 5**).



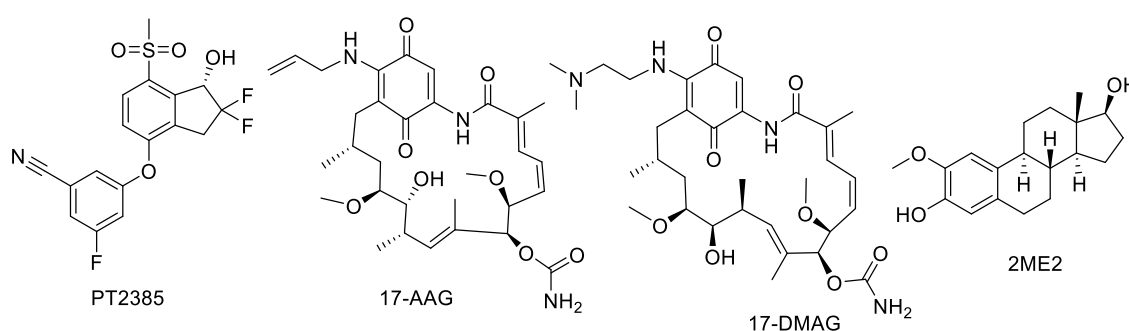
**Figura 4.** Respostas da via HIF-1 sob condições de hipóxia e normóxia. Elementos de resposta a hipóxia (HREs, do inglês: *Hypoxia Response Elements*). P300/CBP: fatores de transcrição.

Em condição de hipóxia, a hidroxilação do HIF-1 $\alpha$  é reduzida resultando em acúmulo e dimerização com o HIF-1 $\beta$ , que leva a formação do HIF-1. O heterodímero HIF-1 liga-se ao DNA, recruta proteínas coativadoras e ativa a transcrição de mais de 30 genes, que codificam proteínas envolvidas na sobrevivência celular, angiogênese, reprogramação metabólica, imortalização, resistência a radiação e quimioterapia, invasão e metástase (**Figuras 4 e 5**) (VAUPEL e HARRISON, 2004). Embora alterações na via HIF-1 também tenham sido relatadas de forma independente da hipóxia, essa via é considerada uma das mais importantes na adaptação da célula tumoral à hipóxia (SEMENZA, 2011).



**Figura 5.** Esquema simplificado da participação das vias de adaptação da célula tumoral a hipóxia. Adaptado de WOUTERS e KORITZINSKY, 2008.

A via HIF-1 tem sido explorada para o desenvolvimento de novos compostos para o tratamento do câncer através de diferentes mecanismos: *i*) PT2385 inibe a dimerização HIF-1 $\alpha$ , atualmente em fase clínica I (NCT02293980); *ii*) os análogos da geldamicina 17-AAG (tanespimicina) e 17-DMAG (alvespimicina) promovem a degradação da HIF1 $\alpha$  independente da VHL ao inibirem a chaperona Hsp90 (do inglês: *Heat shock protein 90*); e *iii*) 2ME2 inibe a síntese do HIF-1 $\alpha$ , suprimindo a sua atividade de transcrição (**Figura 6**) (YU e TANG, 2017).



**Figura 6.** Compostos que atuam sobre a via HIF-1.

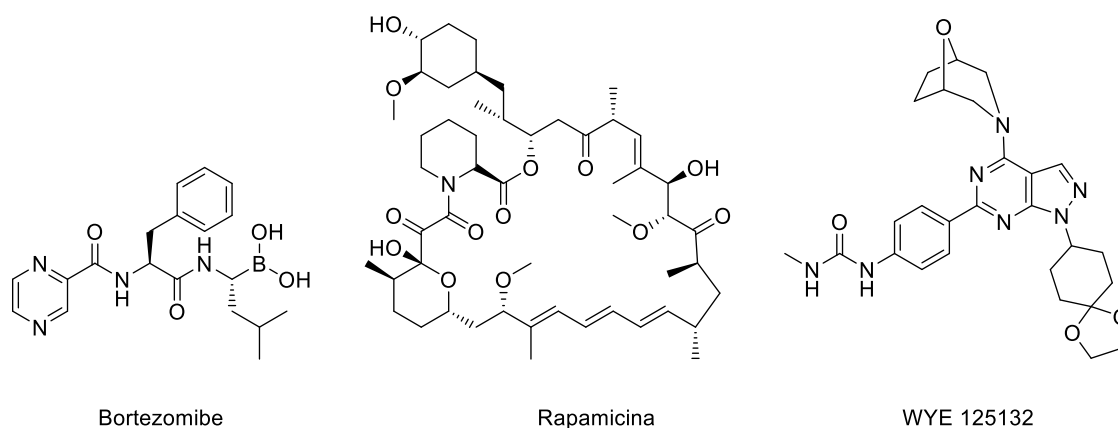
A hipóxia severa leva ao aumento dos níveis de proteínas desdobradas no retículo endoplasmático ativando a via UPR, que é responsável por coordenar a capacidade de uma célula de responder ao estresse do retículo endoplasmático (RE). O oxigênio atua como aceptor de elétrons terminal preferencial no processo de enovelamento de proteínas no RE, assim a falta de oxigênio é uma das causas da elevação de proteínas desenoveladas. De forma geral, a via UPR atua após o estresse do RE ativar os sensores de stress ATF6, IRE1 e PERK, que resultam na produção dos fatores de transcrição ATF6 (N), XBP1 e ATF4, respectivamente. Estes fatores são responsáveis pela ativação de genes para restabelecer a homeostase pela supressão da síntese ou estimulação da degradação de proteínas no RE, e ativação da apoptose e autofagia (WALTER e RON, 2011) (**Figura 5**).

O uso de inibidores de ATF6, IRE1, PERK e proteossomais levam ao aumento do estresse no RE, por exemplo, o bortezomibe (**Figura 7**), e podem ser empregados no tratamento dos tumores sob hipóxia, por meio da inibição

da via da UPR impedindo que as células tumorais se adaptem neste processo de hipóxia (**Figura 5**) (WILSON e HAY, 2003).

Outra via de crescente relevância corresponde a via mTOR, que atua como reguladora da energia celular e do status nutricional. Na hipóxia, a atividade da quinase mTOR do complexo 1 (mTORC1) é restrita por múltiplos mecanismos, resultando na supressão da síntese proteica em uma extensão que depende da severidade e duração da hipóxia. A restrição da mTORC1 leva a tradução seletiva de um subconjunto específico de mRNA, o qual está incluído o mRNA que traduz HIF1 $\alpha$  e o fator de crescimento endotelial e vascular A (VEGFA, do inglês: *Vascular Endothelial Growth Factor A*) (**Figura 5**) (WOUTERS e KORITZINSKY, 2008).

A modulação da mTORC1 devido a presença da hipóxia leva a inibição do crescimento do tumor, que pode ser uma resposta adaptativa frente às limitações energéticas favorecendo a sobrevivência de células hipóxicas e dificultando prever as consequências de sua inibição. No entanto, pesquisas realizadas com a rapamicina, um inibidor de mTORC1, e WYE 125132, inibidor da quinase de mTOR, (**Figura 7**) apresentaram bons resultados em células sob hipóxia ao exercerem efeitos antiproliferativos seletivos e bloquearem o acúmulo de HIF1 $\alpha$ , respectivamente (YU et al., 2010; PENCREACH et al., 2009).

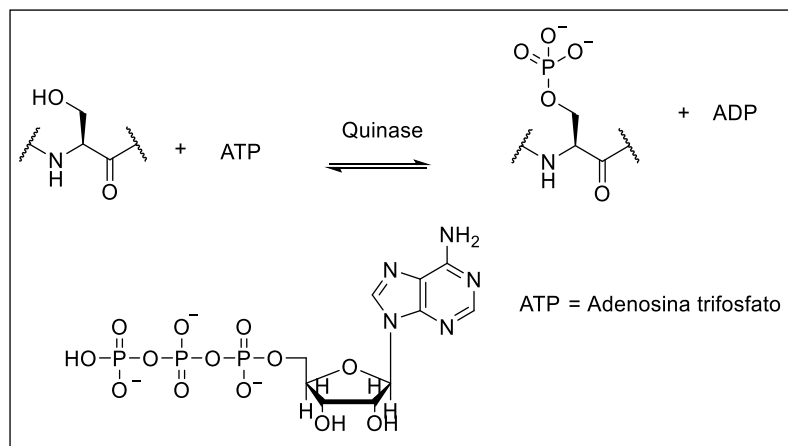


**Figura 7.** Inibidor proteossomal Bortezomibe e Inibidores da mTOR rapamicina e WYE125132.

#### 1.4 Quinases e relevância na hipóxia

As quinases são enzimas que transferem grupos fosfato de moléculas de ATP para substratos específicos, por meio de uma reação de fosforilação

(**Figura 8**). Os alvos mais conhecidos de quinases são os álcoois de resíduos de serina e treonina, e o grupo fenol de resíduos de tirosina, presentes em proteínas. A fosforilação destes resíduos de aminoácidos por quinases promove uma alteração significativa na proteína alvo, devido a inserção de um grupo volumoso contendo oxigênios carregados negativamente, em pH fisiológico. Portanto, as quinases ativam ou desativam enzimas após promover mudanças em sua estrutura terciária, que irão causar a exposição ou fechamento do sítio ativo da enzima.



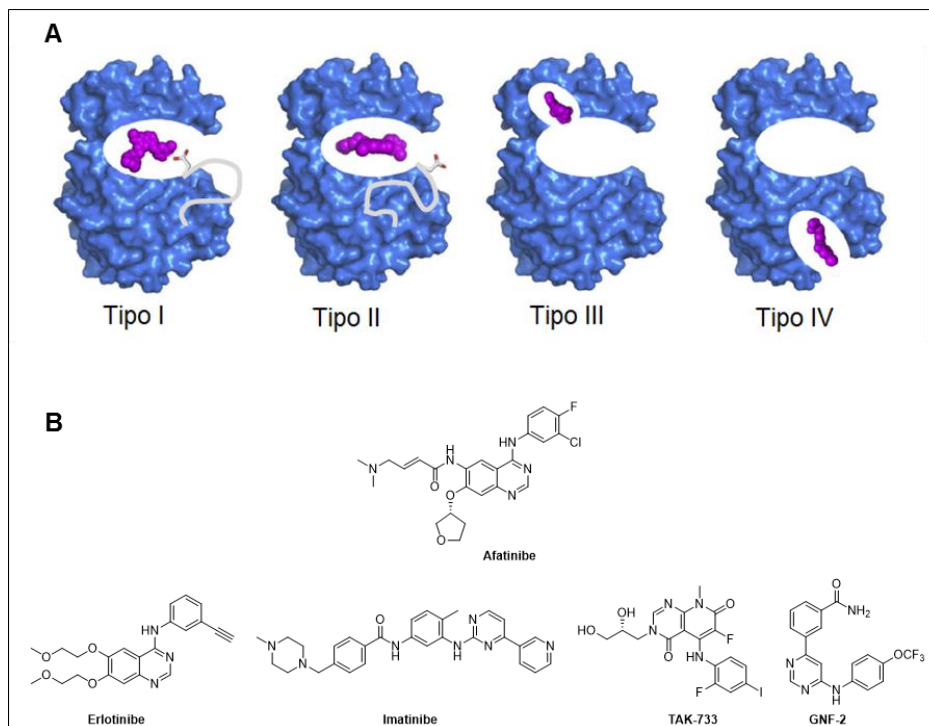
**Figura 8.** Exemplo de reação de fosforilação promovida por uma proteína quinase em um resíduo de serina. ADP: adenosina difosfato.

Em geral, os inibidores de quinases atuam no sítio de ligação do ATP. De acordo com o modo de ligação os inibidores são divididos em reversível ou irreversível. Os inibidores irreversíveis ligam-se covalentemente aos resíduos de cisteína próximos ao sítio de ligação do ATP. Enquanto os inibidores reversíveis têm diferentes modos de ligação sendo classificados em quatro tipos I-IV, de acordo com a conformação da cavidade de ligação e de uma sequência de aminoácidos denominada DFG (Aspartato (D), Fenilalanina (F) e Glicina (G)), que controla o acesso do sítio ativo.

Os inibidores do tipo I ligam-se a forma ativa das quinases, e competem com o ATP pelo sítio ativo. Os inibidores do tipo II ligam-se à forma inativa das quinases, assim atuam em cavidades específicas adjacentes ao sítio de ligação do ATP. Os inibidores do tipo III ligam-se às cavidades alostéricas próximas ao sítio de ATP, porém sem possuir nenhuma interação com o sítio de ligação do ATP. Por fim, os inibidores do tipo IV atuam em sítios alostéricos localizados



distante da cavidade de ligação do ATP (WU, NIELSEN e CLAUSEN, 2015) (Figura 9).

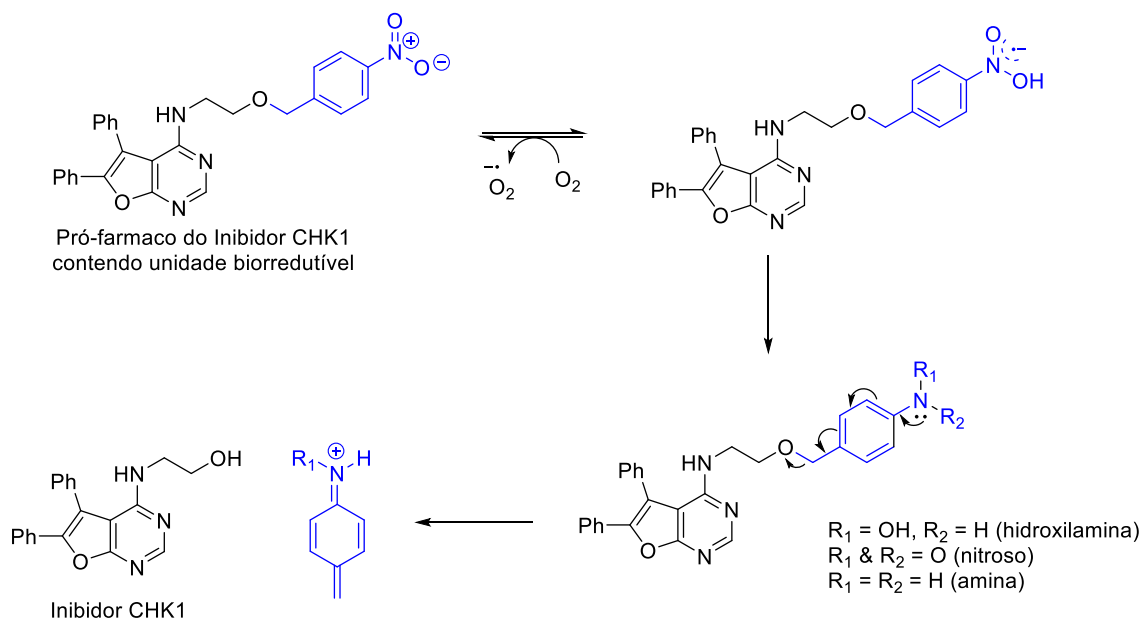


**Figura 9.** Características de Inibidores de quinases. **A.** Representação dos tipos de inibidores de quinases. **B.** Exemplos de inibidores de quinases, afatinibe, inibidor irreversível de da quinase EGFR; erlotinibe, inibidor do tipo I da proteína quinase EGFR; imatinibe, inibidor do tipo II da tirosina quinase ABL (Abelson proto-oncogene); TAK-733, inibidor do tipo III da proteína quinase MEK (Proteíno-quinases ativadas por mitógenos); e GNF-2, inibidor do tipo IV o qual estabiliza a Bcr-Abl. Adaptado de WU, NIELSEN e CLAUSEN, 2015.

As quinases estão envolvidas em diferentes estágios de adaptação celular do câncer a ambientes de baixa oxigenação e participam de eventos chaves durante a hipóxia, sendo assim, é evidente que sua regulação promova relevantes resultados no tratamento antitumoral. Na literatura, existem relatos de que inibidores das quinases mTORC1, EGFR, PIM (do inglês: *Proviral Integration site for Moloney murine leukemia vírus*), ataxia-telangiectasia mutada (ATM) e *Checkpoint 1* (CHK1), promovem a morte de células tumorais sob hipóxia por diferentes mecanismos (MIN et al., 2016; PORE et al., 2006, KARNTHALER-BENBAKKA et al., 2016; KARNTHALER-BENBAKKA et al., 2014; HASVOLD et al., 2013; WARFEL et al., 2016; CAZARES-KORNER et al., 2013; PHILLIPS, 2016).

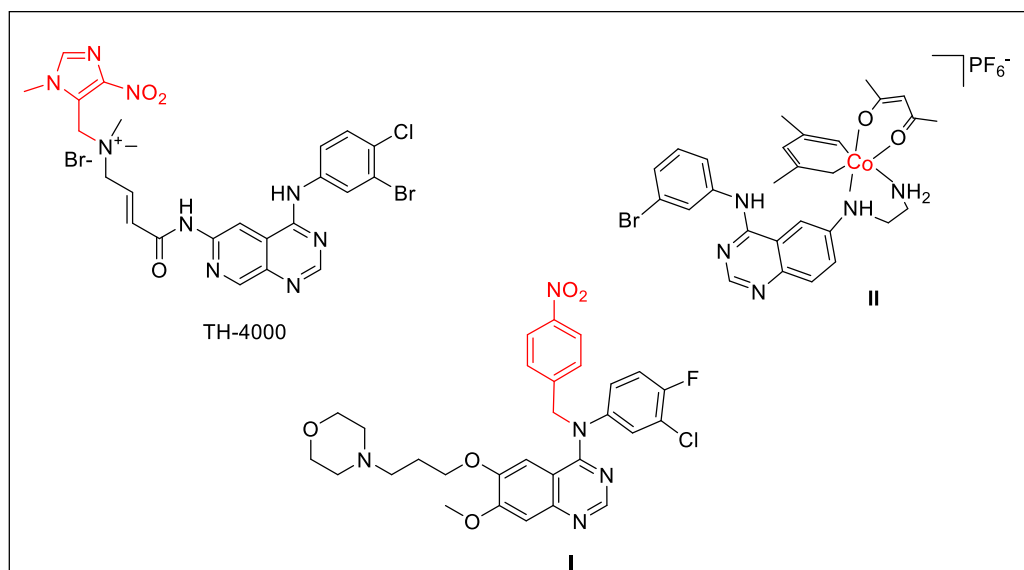
Embora a inibição da quinase CHK1 tenha sido identificada como uma terapia promissora para tumores sob hipóxia a inibição de CHK1 tem potencial

de induzir instabilidade genômica e contribui para a tumorigênese por afetar a replicação normal e causar danos no DNA. Desta forma o grupo de pesquisa de Stuart J. Conway (CAZARES-KORNER et al., 2013) obteve um pró-fármaco biorredutível, que após ativação sob hipóxia libera seletivamente um inibidor das quinases CHK1/Aurora A, via uma reação espontânea de eliminação 1,6, protegendo o tecido normal da instabilidade genômica induzida pela terapia (Figura 10).



**Figura 10.** Mecanismo do inibidor de CHK1 CH-01 ativado por hipóxia.

Inibidores da tirosina quinase EGRF que atuam na hipóxia ao induzir a síntese de fatores de crescimento (EGF e VEGF), dependente e independente da via HIF1 (PORE et al., 2006), tem sido latenciados para ativação após biorredução em tumores sob hipóxia levando a obtenção do composto TH4000 atualmente em estudos clínicos (Figura 3) e outros derivados como I e II (Figura 11) (PHILLIPS, 2016).



**Figura 11.** Pró-fármacos ativados sob hipóxia para a inibição da EGFR e CHK1.

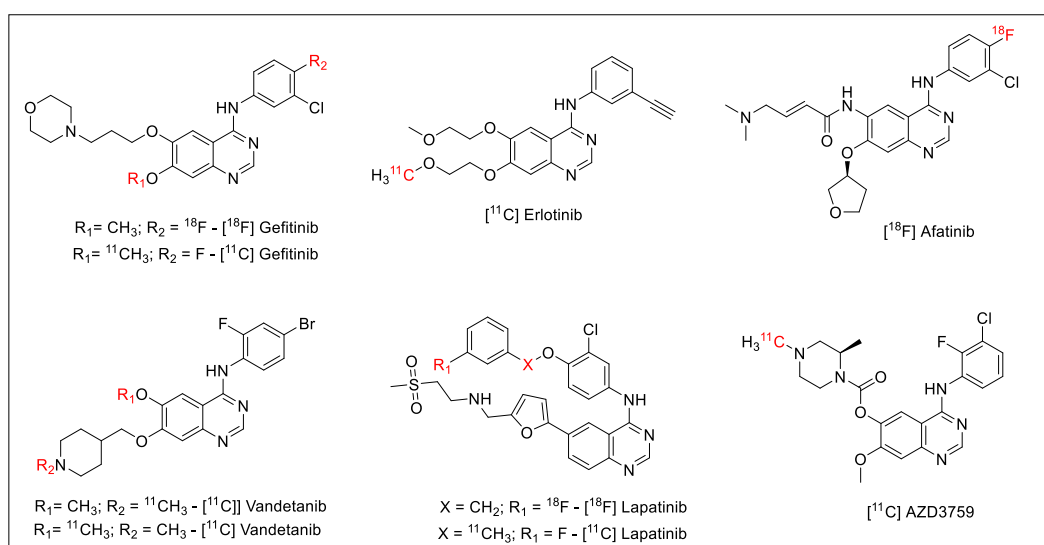
### 1.5 Diagnóstico da hipóxia tumoral

Atualmente, existem diversas técnicas disponíveis para obter um valor absoluto ou relativo do estado de oxigenação dos tumores. Em uma revisão recentemente, publicada por Amarnath Challapalli, Laurence Carroll e Eric O. Aboagye (2017), são apresentadas as vantagens e desvantagens de cada técnica questionando diferentes aspectos do microambiente hipóxico e fornecendo informações sobre a hipóxia em diferentes locais. Os eletrodos de oxigênio (*Eppendorf probes*), considerados atualmente como padrão ouro, e amostragem por *OxyLite* (técnica que emprega fibra ótica) medem predominantemente a hipóxia intersticial. Os marcadores extrínsecos, como PET e SPECT (do inglês: *Single Photon Emission Computed Tomograph*), caracterizam a hipóxia intracelular, sendo que estes dois últimos permitem a quantificação e obtenção de dados em escala macroscópica em regiões tumorais. As técnicas de imagem por ressonância magnética, BOLD (do inglês: *Blood oxygen dependent level*) e fração *Oxy-R*, permitem a avaliação da oxigenação sanguínea, enquanto os métodos indiretos de adaptações moleculares induzidos por hipóxia, expressão de GLUT1 e CA9, também têm sido utilizados como marcadores de oxigenação tumoral (CHALLAPALLI; CARROLL e ABOAGYE, 2017).

### 1.5.1 Identificação da hipóxia tumoral por PET

PET é uma ferramenta que possibilita a visualização e quantificação de processos celulares e moleculares de forma não invasiva com a obtenção de imagens, a partir de radiofármacos/radiotraçadores contendo radionuclídeos emissores de pósitrons, utilizados em concentrações picomolar. De maneira geral, esses radionuclídeos ao decair emitem partículas de pósitrons ( $\beta^+$ ), antieletrón, os quais, após encontrarem com um elétron próximo, sofrem uma reação de aniquilação e emitem radiação gama, que por sua vez é captada e traduzida em imagem, demonstrando a localização do radiotraçador após biodistribuição *in vivo* (WEISSLEDER et al., 2010).

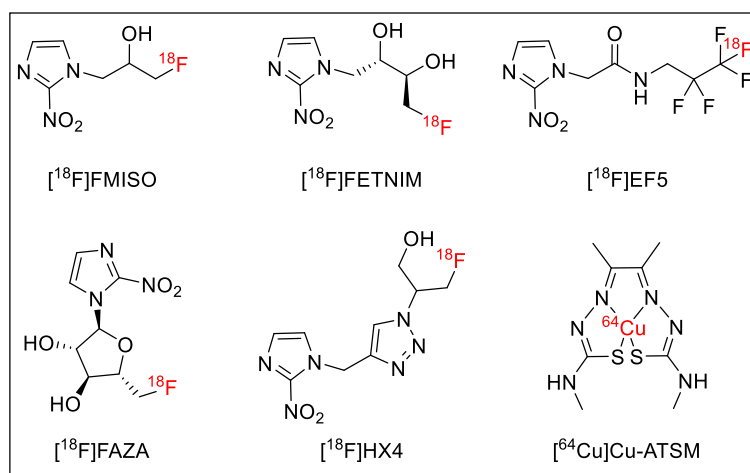
Devido à possibilidade de rastrear a localização da molécula marcada e avaliar sua cinética *in vivo*, PET tem demonstrado ampla aplicação na prática clínica, pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. A técnica PET usando fármacos antitumorais marcados (**Figura 12**), possibilita a realização de tratamentos personalizados com indicação da presença e expressão de determinado alvo, sua possível interação com o fármaco e a cinética da ligação do composto *in vivo*. Por outro lado, quando aplicado na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, PET permite obtenção de informações sobre toxicidade, capacidade de transpor a barreira hematoencefálica e indicar a presença de mecanismos de resistência, por meio da observação das imagens de captação do composto *in vivo* (SLOBBE et al., 2012).



**Figura 12.** Alguns exemplos de fármacos inibidores de tirosina quinase (EGFR) marcados com radionuclídeos emissores de pósitron  ${}^{11}\text{C}$  e  ${}^{18}\text{F}$  (SLOBBE et al., 2012).

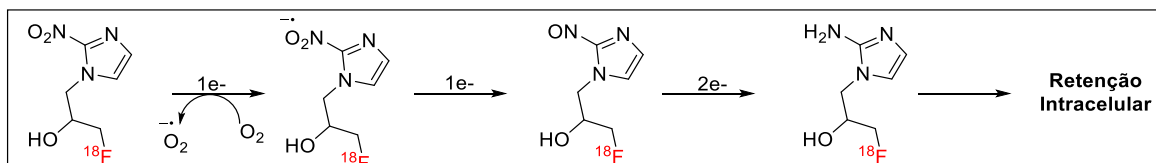
Apesar de existir uma vasta lista de radionuclídeos emissores de pósitron (WEISSLEDER et al., 2010), as características intrínsecas de tumores sob hipóxia requerem que radionuclídeos empregados para marcação da hipóxia tumoral apresentem tempo de meia-vida que permitam longos períodos de avaliação/biodistribuição, geralmente até de 4 h. Assim, atualmente têm sido explorados os radionuclídeos  $^{18}\text{F}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{124}\text{I}$ , os quais possuem 109,7 min, 12,7 h, 68 min, 4,176 dias de tempo de meia vida, respectivamente (WUEST e WUEST, 2013).

De forma semelhante ao tratamento, os marcadores exógenos contendo  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{18}\text{F}$ , empregados para a identificação da hipóxia por PET, exploram o potencial redutor de ambientes hipóxicos. Alguns exemplos são o  $^{64}\text{Cu}$ -ATSM, contendo o radionuclídeo  $^{64}\text{Cu}$ , e derivados nitroimidazólicos  $^{18}\text{F}$ FMISO,  $^{18}\text{F}$ HX4,  $^{18}\text{F}$ EF5,  $^{18}\text{F}$ FAZA e  $^{18}\text{F}$ FETNIM (Figura 13). Desta forma, sob condições de hipóxia os radiofármacos, contendo o grupo 2-nitroimidazol biorredutível, acumula-se no ambiente intracelular devido a ocorrência sequencial da redução do grupo nitro, presente no anel, a grupos nitroso, hidroxiamina e amina por enzimas nitroredutases (Figura 14), levando a formação de espécies reativas que são covalentemente ligadas a proteínas intracelulares. Em contrapartida, na presença de oxigênio, o radical anion do grupo nitro é re-oxidado e permite sua saída da célula para posterior excreção (LOPCI et al., 2014).



**Figura 13.** Radiofármacos utilizados para geração de imagens hipóxia tumoral com PET. Abreviações: [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO:  $^{18}\text{F}$ -fluoromisonidazol; [ $^{18}\text{F}$ ]EF5:  $^{18}\text{F}$ -2-2-(nitro-1 [H]-imidazol-1-il)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropilo)-acetamida; [ $^{18}\text{F}$ ]FAZA:  $^{18}\text{F}$ -Fluoroazomicinarabinofuranosideo; [ $^{18}\text{F}$ ]FETNIM: [ $^{18}\text{F}$ ]fluoroeritronitroimidazol;

[<sup>18</sup>F]HX4: <sup>18</sup>F-3-fluoro-2-(4-((2-nitro-1H-imidazol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)propan-1-ol; [<sup>64</sup>Cu]Cu-ATSM: Cobre (Cu)-diacetil-bis (N4-metiltiosemicarbazona) (WUEST e WUEST, 2013).



**Figura 14.** Mecanismos de retenção do derivado [<sup>18</sup>F]FMISO em células em hipoxia. Adaptada de WUEST e WUEST (2013).

Primeiramente relatado pelo grupo de Welch em 1986, o derivado de 2-nitroimidazol [<sup>18</sup>F]FMISO (**Figura 13**) ainda é considerado o traçador padrão-ouro para imagens de hipoxia empregando PET (JERABEK et al., 1986).

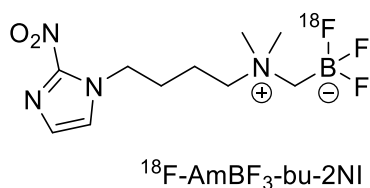
No entanto, o [<sup>18</sup>F]FMISO é excretado lentamente do sangue e tecidos normais e, portanto, as imagens são normalmente adquiridas em até 4 h após a injeção (ABOLMAALI et al., 2011). O *clearance* lento do [<sup>18</sup>F]FMISO dos tecidos também leva a um menor contraste de fundo para o tumor.

Conseqüentemente, uma baixa razão tumor-para-fundo (1,2-1,4) é usada como corte para identificar a presença de hipoxia (RASEY et al., 1996.; LEE et al., 2008). A otimização farmacocinética levou à descoberta de novos traçadores, incluindo FAZA e HX4 marcados com <sup>18</sup>F (**Figura 13**) (PIERT et al., 2005; DUBOIS et al., 2011). Esses novos traçadores foram projetados para obtenção de uma depuração/*clearance* mais rápida dos tecidos de fundo, melhorar o contraste entre tumor e o fundo e possibilitar a geração de imagens com menor tempo de aquisição.

## 1.6 Justificativa

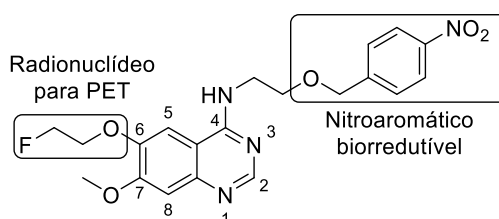
A preparação de derivado biorredutor de 2-nitroimidazol, para o diagnóstico da hipoxia tumoral por PET, deve explorar novo radiotraçador que apresente menor tempo para a aquisição de imagem e maior facilidade sintética. Assim, a recente descrição do método de marcação por meio de reação de troca isotópica de <sup>18</sup>F-<sup>19</sup>F em 1 etapa (LIU et al., 2015; LIU et al., 2014), empregando um derivado contendo função trifluorborato, tornou-se atrativa, considerando que o precursor trifluorborato, necessário para geração

do produto marcado, também atua como padrão não radioativo para os devidos fins analíticos. Adicionalmente, a função  $\text{AmBF}_3$  é um zwitterion e a incorporação da porção zwitterion num marcador aumentaria a hidrofiliicidade total da molécula resultante e poderia facilitar sua eliminação do sangue e dos tecidos de fundo. Portanto, neste estudo, foi investigado o derivado de  $\text{AmBF}_3$  de 2-nitroimidazol (**Figura 15**) que poderia ser marcado com  $^{18}\text{F}$  em 1 etapa, via reação de troca isotópica  $^{18}\text{F}$ - $^{19}\text{F}$ .



**Figura 15.** Derivado de  $\text{AmBF}_3$  de 2-nitroimidazol proposto  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI.

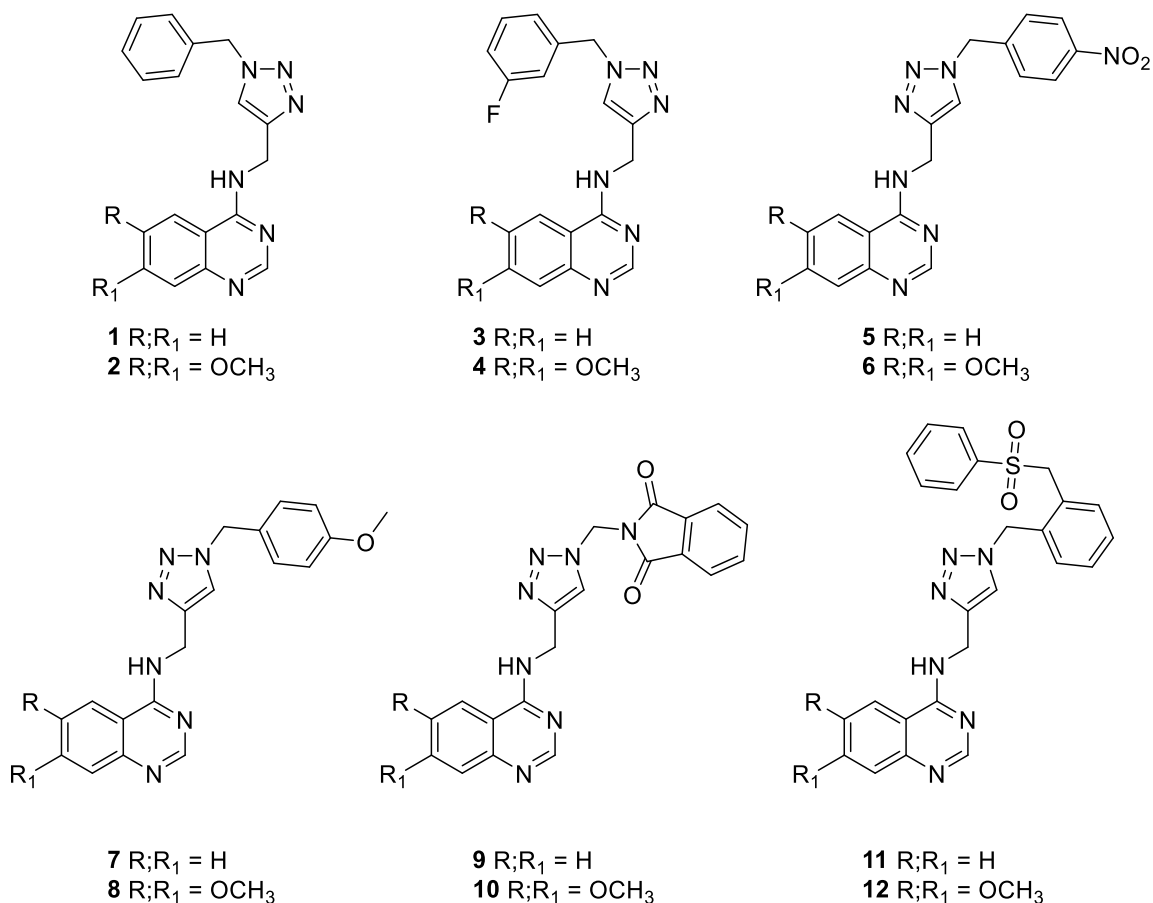
Com base na importância da marcação de moléculas com  $^{18}\text{F}$  para obtenção de compostos com finalidade diagnóstica por PET e na utilização de unidades biorredutíveis para direcionamento e retenção de radiomarcadores em tumores em hipóxia, no presente trabalho foi explorando a inclusão do flúor, via inserção da unidade etileno flúor e a avaliação de diferentes unidades biorredutíveis introduzidas em um esqueleto comum de quinazolina. As unidades biorredutíveis, como: (i) derivado *p*-nitro-benzílico, com decomposição via eliminação 1,6 ou (ii) nitroimidazol, degradado a subprodutos polares e reativos, atuariam promovendo a liberação e retenção de quinazolina marcada no interior da célula tumoral sob hipóxia (BOLTON e MCCLELLAND, 1989; KIZAKA-KONDOH e KONSE-NAGASAWA, 2009; HALL e WILKINSON, 2012) (**Figura 16**).



**Figura 16.** Estrutura geral da cadeia de quinazolina com substituintes em C-4, C-6 e C-7, contendo o grupo biorredutor 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina em C-4 e fluoroetil em C-6.

Desta forma, a evidente contribuição das quinazolininas como estrutura base de compostos com propriedades antitumorais, observados em inibidores de quinases, nos levou não apenas ao desenvolvimento de novos compostos para o diagnóstico da hipóxia tumoral por imagem por PET, mas também à preparação de derivados quinazolinínicos com potencial atividade antitumoral.

Neste contexto, um novo perfil estrutural para inibição de quinases, relevantes no tratamento da hipóxia tumoral foi explorado substituindo o grupo anilina, presente na posição C-4 do anel quinazolina dos fármacos inibidores de quinases, por grupo 4-aminometileno-1,2,3-triazólico, como possível bioisómero (**Figura 17**). A ausência de um padrão estrutural estabelecido para a inibição da quinase PERK e a versatilidade da reação de cicloadição catalisada por cobre (I) (CuAAC, do inglês: *Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*), conhecida como estratégia de “Click Chemistry”, para obtenção de anéis triazólicos 1,4-dissubstituídos, podem justificar as modificações propostas na **Figura 17**.



**Figura 17.** Série de novos derivados 4-aminoquinazolinina sintetizados.



Nestes estudos, a identificação de compostos quinazolínicos capazes de promover a morte de células tumorais sob hipóxia, via inibição da quinase PERK e a marcação destes compostos com radionuclídeos emissores de pósitron poderão fornecer uma ferramenta para a diferenciação/estratificação tumoral por PET e identificação da hipóxia tumoral de forma indireta.

## **2. OBJETIVOS**

---

## 2.1 Objetivo Geral

Obtenção de um novo radiotraçador derivado de 2-nitroimidazol, contendo um grupo  $\text{AMBF}_3$  para otimizar a depuração e contraste tumoral para o diagnóstico de tumores sob hipóxia por PET. Avaliação de compostos quinazolínicos contendo unidades biorredutíveis para o diagnóstico da hipóxia por PET e substituintes 4-aminometileno-1,2,3-triazólicos possam ser empregados no tratamento de tumores sob hipóxia.

## 2.2 Objetivos específicos

- a) Síntese do precursor **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** e radiosíntese do **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, via reação de troca isotópica <sup>19</sup>F-<sup>18</sup>F;
- b) Caracterização das propriedades do novo traçador **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** em relação ao coeficiente de partição (Log P), estabilidade em plasma seguida da realização de estudos de biodistribuição e imagem por PET/CT, bem como captação celular.
- c) Desenvolvimento de estratégia sintética e preparação de biblioteca de compostos 4-aminoquinazolínicos contendo flúor (<sup>18</sup>F e <sup>19</sup>F) e unidades biorredutíveis ou triazólicas, com potencial uso no diagnóstico por PET e possível tratamento de tumores sob hipóxia;
- d) Estudos de citotoxicidade dos compostos quinazolínicos em células tumorais sob condição de hipóxia (1% de O<sub>2</sub>) e normóxia (20% de O<sub>2</sub>);
- e) Estudo dos mecanismos de ação e identificação do alvo dos compostos 4-aminoquinazolínicos ativos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 3.1 MATERIAIS

### 3.1.1. Aparelhagem Analítica

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), unidimensionais e bidimensionais dos núcleos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{19}\text{F}$  foram adquiridas com espectrômetros Bruker Avance (EUA) modelo DPX-300 MHz, DRX-400 MHz e DRX-500 MHz e espectrômetro Bruker UltraShield 300 FT-NMR. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) estão descritos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS) ou traço residual do solvente empregado; a multiplicidade dos sinais está representada entre parênteses (s = simpleto, sl = simpleto largo, d = duplete, t = tripleto, q = quaduplete, quint = quintuplete, dd = duplo duplete, ddd = duplo duplo duplete, tt = triplo tripleto, m = multiplete); a constante de acoplamento ( $J$ ), descrita em Hertz (Hz); e o número de hidrogênios deduzido a partir da integral relativa.

Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos em Espectrômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier, IRTracer-100 (Shimadzu), na região espectral de  $4500$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ , em celas ou em pastilhas de KBr, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP).

Os dados de espectroscopia de massas de alta resolução (HRMS, do inglês: *High Resolution Mass Spectrometry*) foram obtidos em espectrômetro de massas Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-Q II - ESI-Qq-TOF e 4000 QTRAP AB SCIEX no modo de detecção positivo.

O  $^{18}\text{F}$ -Fluor foi produzido através da reação  $^{18}\text{O} (p, n) ^{18}\text{F}$  usando um ciclotron TR19 Advanced Cyclotron Systems Inc. (Richmond, BC, Canadá). A radioatividade foi medida usando um calibrador de dose CRC<sup>®</sup> - 25R / W da Capintec (Ramsey, NJ, EUA), e a radioatividade de tecidos de camundongos coletados de estudos de biodistribuição *ex-vivo* foi contada usando um contador gama automático Wizard2 2480, Perkin Elmer (Waltham, MA, EUA).

### 3.1.2 Aparelhagem Laboratorial

- a) Evaporadores rotatórios: Büchi RE-121 e Büchi R-215;
- b) Balanças: Mettler PE 400/Sartorius BP 121S e Mettler Toledo Excellence;
- c) Bomba de alto vácuo: Precision Model D 150;
- d) Luz ultravioleta: Spectroline CM-10;
- e) Reator para irradiação de micro-ondas CEM® Discover;
- f) Centrífuga Eppendorf Modelo 5702;
- g) Agitadores magnéticos IKA RCT Basic e Corning PC-320;
- h) Estufa de esterilização e secagem FANEM;
- i) Refrigerador Multifunções para Laboratório Büchi;
- j) Freezer ThermoFisher -25°C;
- k) Capelas de exaustão moduladas Braslab;
- l) Cartuchos <sup>18</sup>F Trap & Release (8 mg) foram comprados do ORTG Inc (Oakdale, TN).

### 3.1.3 Purificação/Isolamento

As purificações por cromatografia *flash* foram realizadas por Cromatografia em Coluna Clássica (CCC) empregando coluna de sílica gel (40-63 µm) MERCK®, ou nos sistemas de purificação Biotage SP1-B2C e Biotage Isolera One, empregando cartuchos de fase normal.

As purificações realizadas por CLAE foram feitas em um i) cromatógrafo Shimadzu (SCL-10AVP), acoplado a um detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD), detector UV-DAD (SDP-M10A), injetor automático (SIL-10AF) e controlados por *software* CLASS-VP 5.0, empregando coluna de fase reversa (C-18) semi-preparativa (250 x 10 mm, 10 µm, Macherey-Nagel Nucleodur®) e/ou ii) cromatógrafo Agilent usando o *software* Agilent ChemStation empregando coluna semi-preparativa Phenomenex (Torrance, CA) (Luna C18, 5 µ, 250x10 mm) e coluna analítica Phenomenex (Luna C18, 5 µ, 150x4,6 mm).

A purificação e controle de qualidade do derivado trifluorborato e seu análogo marcado com <sup>18</sup>F foram realizados em sistemas CLAE Agilent (Santa Clara, CA, EUA) equipados com uma bomba quaternária modelo 1200, um

detector de absorvância UV modelo 1200 e um detector de cintilação NaI Bioscan (Washington DC, EUA). O detector de radiação foi conectado a um sistema Flow-Count Bioscan B-FC-1000 e a saída do sistema Bioscan Flow Count foi alimentada em uma interface Agilent 35900E, que converteu o sinal analógico em sinal digital.

#### **3.1.4 Solventes, reagentes e outros materiais**

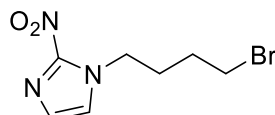
- a) Os solventes e reagentes comerciais, quando necessário, foram purificados conforme métodos padronizados na literatura (ARMAREGO; CHAI, 2009);
- b) As análises de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram realizadas utilizando placas de sílica-gel 60 GF254 da MERCK®;

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Síntese

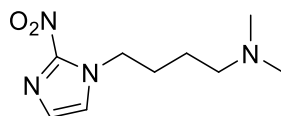
#### 3.2.1.1 Síntese do derivado de 2-nitroimidazol $\text{AmBF}_3\text{-bu-2NI}$

##### 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (**14**)



Foi adicionado 1,4-dibromobutano (1,58 mL; 13,3 mmol; 3 eq.), 2-nitroimidazol (**13**) (0,50 g; 4,4 mmol; 1 eq.) e carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (0,30 g; 2,21 mmol; 0,5 eq.) em DMF (3 mL) e agitado à temperatura ambiente durante 72 h. A mistura foi diluída com em DCM e extraída com solução de NaCl saturado. A camada de DCM foi seca com sulfato de magnésio anidro ( $\text{MgSO}_4$ ), concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel *flash* (Hexano/AcOEt 1:1) para obter o 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (**14**) como um óleo amarelo em 42% de rendimento (0,46 g; 1,87 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,15 (1H; s); 7,11 (1H; s); 4,46 (3H; t;  $J$  7,2 Hz); 3,42 (2H; t;  $J$  6,3 Hz); 2,10-1,98 (3H; m); 2,00-1,84 (2H; m). **MS (ESI $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{BrN}_3\text{O}_2^+$ : 248,0; encontrado: 248,0. Dados de acordo com a literatura (CHENG et al., 2014).

##### 1-(4-N,N-dimetilaminobutil)-2-nitroimidazol (**15**)

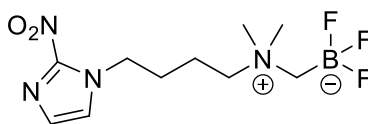


Uma solução de dimetilamina a  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  em etanol (9,35 mL; 10,5 eq.) foi adicionada ao composto **14** (0,44 g; 1,79 mmol; 1 eq.) em THF (15 mL) e agitada durante 48 h. Após o consumo do material de partida (monitorado por CCD, DCM/MeOH 9: 1,  $R_f = 0,19$ ), a mistura reacional foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em DCM (30 mL) e extraído com solução aquosa de NaOH (0,5 M; 30 mL). A camada orgânica foi seca com



MgSO<sub>4</sub> anidro e concentrada sob pressão reduzida para obtenção do composto **15** como um óleo amarelo em 85% de rendimento (0,32 g; 1,51 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,13 (1H; s); 7,10 (s; 1H); 4,44 (2H; t; *J* 7,4 Hz); 2,29 (2H; t; *J* 7,1 Hz); 2,20 (6H; s); 1,89 (2H; q; *J* 7,5 Hz); 1,52 (2H; q; *J* 7,3 Hz). **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 128,3; 125,9; 58,7; 5,1; 45,3; 28,4; 24,4. **MS (ESI<sup>+</sup>)**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 213,1; encontrado: 213,1.

**1-(4-(*N*-trifluoroborilmetil-*N,N*-dimetilammonio)butil)-2-nitroimidazol (AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI)**



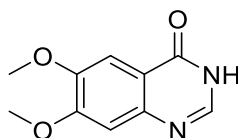
Foi adicionado, gota a gota, de 2-(iodometil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano (0,42 g; 1,59 mmol; 1,1 eq) dissolvido em éter etílico anidro (Et<sub>2</sub>O) (1 mL) numa solução de **15** (0,31 g; 1,45 mmol; 1 eq) em Et<sub>2</sub>O anidro (2 mL). A solução resultante foi agitada durante 1 h à temperatura ambiente. O precipitado amarelado formado foi centrifugado, descartado o sobrenadante, lavado com Et<sub>2</sub>O (15 mL x 2) e seco sob alto vácuo para se obter o intermediário, um sal iodeto de amônio quaternário **16**, como um sólido branco (417 mg). Este intermediário foi utilizado no passo seguinte sem qualquer purificação adicional.

Uma solução aquosa de fluoreto de hidrogênio e potássio (KHF<sub>2</sub>) (3 M, 300 μL, 0,9 mmol, 4 eq) e HCl (4 M, 300 μl) foi adicionada a uma solução do intermediário sal de amônio quaternário **16** (77 mg; 0,22 mmol; 1 eq.) em DMF (600 μL) e água deionizada (200 μl), e a mistura reacional resultante foi agitada a 45 °C por 2 h. A reação foi cessada pela adição de solução aquosa de hidróxido de amônio (28%, 10 uL) e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi diluído com CH<sub>3</sub>CN (10 mL) e filtrado através de uma coluna de sílica gel. A solução foi concentrada sob pressão reduzida e purificado por CLAE (coluna semi-preparativa Luna C18, 4,5 mL / min, 2,5 - 20% CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O em 20 min, *t<sub>R</sub>* = 20,7 min). As frações do eluato contendo o produto desejado

foram recolhidas e concentradas sob pressão reduzida para proporcionar **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** como um sólido branco em 90% de rendimento (58 mg; 0,20 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,65 (1H; s); 7,16 (1H; s); 4,53 (2H; t; *J* 6,8 Hz); 3,40-3,26 (2H; m); 3,05 (6H; s); 2,42 (2H; d; *J* 4,6 Hz); 1,99-1,76 (4H, m). **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ<sub>C</sub> (ppm): 129,1; 128,3; 66,9; 54,2; 50,4; 27,9; 21,0. **RMN de <sup>19</sup>F** (282 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>F</sub> (ppm): -141,20. **MS (ESI<sup>+</sup>)**: *m/z* [M-F]<sup>+</sup> calculado para C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>BF<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 275,1; encontrado: 275,1.

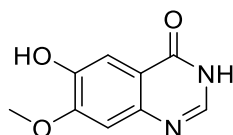
### 3.2.1.2 Síntese das quinazolinonas

#### 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3H)-ona (**20**)



Uma mistura do ácido 2-amino-4,5-dimetoxibenzóico (**19**) (200 mg; 1,01 mmol) em formamida (201 μL; 5,07 mmol) foi irradiada a 60 W, 150 °C, por 40 min. Após alcançar a temperatura ambiente a mistura reacional foi diluída com acetato de etila (AcOEt) 20 mL e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel empregando o cromatógrafo Biotage SP1-B2C<sup>®</sup> [AcOEt: MeOH 0-10% (v/v), fluxo: 10 mL/min] para a obtenção do composto 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3H)-ona (**20**) como um sólido marrom claro em 67% de rendimento (141 mg; 0,68 mmol; 67%). **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 12,10 (1H; s); 7,99 (1H; s); 7,43 (1H; s); 7,13 (1H; s); 3,90 (3H; s); 3,86 (3H, s). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 160,1; 154,5; 148,6; 144,9; 143,9; 115,6; 108,0; 104,9; 56,0; 55,7. Dados de acordo com a literatura (FORCELLINI et al. 2018).

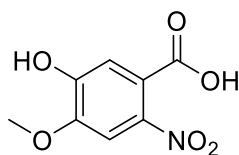
*6-hidroxi-7-metoxi-quinazolin-4(3H)-ona (17)*



*Procedimento I* - A uma solução do composto 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3H)-ona (**20**) (200 mg; 0,97 mmol) em ácido metanossulfônico (1,2 mL) foi adicionado L-metionina (239 mg; 1,60 mmol). A mistura reacional foi aquecida a 120 °C e agitada por 25-30 h. A reação foi resfriada à temperatura ambiente, logo após resfriada em banho de gelo e o pH ajustado para ~ 9 com solução aquosa de NaOH 40%. A suspensão obtida foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel [AcOEt: MeOH (9,5:0,5)], fornecendo **17** em uma mistura de regioisômeros, em rendimento quantitativo, na proporção 1: 0,3.

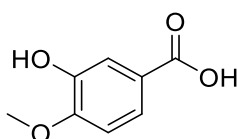
*Procedimento II* - Uma mistura do ácido 2-amino-5-hidroxi-4-metoxibenzóico (**31**) (28 mg; 0,15 mmol) em formamida (30 µL; 0,76 mmol) com AcOH (9 µL; 0,15 mmol) foi irradiada a 60 W, 150 °C, por 20 min. Após alcançar a temperatura ambiente a mistura reacional foi diluída com AcOEt (10 mL) e concentrada sob vácuo. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [AcOEt: MeOH (9,5:0,5)] fornecendo o composto 6-hidroxi-7-metoxi-quinazolin-4(3H)-ona (**17**) como um sólido marrom em 74% de rendimento (22 mg; 0,11 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 11,95 (1H; s); 9,83 (1H; s); 7,91 (1H; s); 7,37 (1H; s); 7,09 (1H; s); 3,89 (3H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 160,0; 153,9; 146,6; 143,8; 143,0; 116,0; 108,7; 108,2; 55,8. **HRMS (ES<sup>+</sup>)**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup>: 193,0613; encontrado: 193,0605. Dados de acordo com a literatura (LÜTH e LÖWE, 2008).

*Ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzóico (25)*



Uma mistura de ácido 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzóico (**24**) (2,00 g; 9,39 mmol) em solução aquosa de NaOH 6 mol.L<sup>-1</sup> (8 mL) foi aquecida à 100 °C por 3 h, resfriada à temperatura ambiente e vertida em uma mistura de ácido clorídrico concentrado (HCl 36%) e gelo (pH <2). A mistura foi extraída com AcOEt, lavada com solução saturada de cloreto de sódio (NaCl), seca com sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), filtrada, e concentrada sob vácuo fornecendo o ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzóico (**25**) como um sólido amarelo em 91% de rendimento (1,72 g; 8,07 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,55 (1H; s); 7,05 (1H; s); 3,96 (3H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub> (ppm): 169,1; 152,3; 150,3; 141,5; 124,1; 116,1; 108,6; 57,0. **HRMS (ES<sup>+</sup>)**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>6</sub><sup>+</sup>: 214,0352; encontrado: 214,0343; *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calculado de C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>6</sub>Na<sup>+</sup>: 263,0171; encontrado: 236,0164. Dados de acordo com a literatura (HELAL et al., 2011).

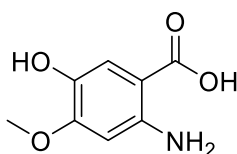
*Ácido 3-hidroxi- 4-metoxibenzóico (27)*



3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (**26**) (200 mg; 1,32 mmol) foi adicionado a uma mistura de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (30%; 0,3 mL; 2,92 mmol) e dióxido de selênio (SeO<sub>2</sub>) (12 mg; 0,11 mmol) em diclorometano (DCM) (3,5 mL) a 0 ° C. A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 24 h, logo após lavada com 4 mL de água destilada. A camada aquosa foi extraída com DCM (3 x 2 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com 4 mL de solução aquosa de tiosulfato de sódio 10% seguida de solução saturada de NaCl (2 mL). A camada orgânica foi vigorosamente agitada com solução aquosa saturada de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (10 mL) por 2 h à

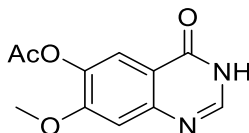
temperatura ambiente. Após separação da fase orgânica, o pH da fase aquosa foi ajustado a pH 4-5 com HCl 1 mol.L<sup>-1</sup> e extraída com AcOEt (3 x 2 mL). As fases orgânicas combinadas foram secadas com MgSO<sub>4</sub> e concentrados sob vácuo para a obtenção do composto **27** como um óleo castanho em 41% de rendimento (92 g; 0,55 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> (ppm): 6,72 (1H; d; *J* 8,6 Hz); 6,31 (1H; d; *J* 2,8 Hz); 6,21 (1H; dd; *J* 2,8 Hz; *J* 8,6 Hz); 3,76 (3H; s).

*Ácido 2-amino-5-hidroxi-4-metoxibenzóico (22)*



Uma solução do ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzóico (**25**) (404 mg; 1,90 mmol) em 5 mL de MeOH, foi tratada com de Pd-C 10% (10 mg). A mistura foi agitada e mantida sob atmosfera de gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) (50 psi) por 6 h. O catalizador foi removido por filtragem em placa sinterizada, contendo Celite®. A solução obtida foi concentrada sob vácuo para a obtenção do ácido 2-amino-5-hidroxi-4-metoxibenzóico (**22**) como sólido amorfo levemente cinza.com 88% de rendimento (304 mg; 1,66 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 8,23 (1H; s); 7,07 (1H; s); 6,27 (1H; s); 3,72 (3H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 169,2; 153,7; 147,0; 136,3; 115,9; 101,2; 99,0; 55,1. **HRMS (ES<sup>+</sup>)**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>4</sub><sup>+</sup> 184,0610; encontrado:184,0608. Dados de acordo com a literatura (WEBER et al., 2005).

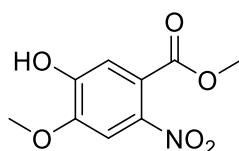
*6-Acetoxi-7-metoxiquinazolin-4(3H)-ona (21)*



A uma solução de 6-hidroxi-7-metoxi-quinazolin-4(3H)-ona (**17**) (12 mg; 0,06 mmol) e anidrido acético (Ac<sub>2</sub>O) (0,6 mL) foi adicionada piridina (0,12 mL). A

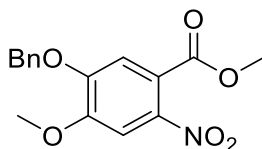
mistura reacional foi aquecida a 100 °C e agitada por 3 h. Após alcançar a temperatura ambiente, o solvente foi removido sob vácuo e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [AcOEt: MeOH (9,5:0,5)], fornecendo o composto 6-acetoxi-7-metoxiquinazolin-4(3*H*)-ona (**21**) em 60% de rendimento (9 mg; 0,04 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 12,22 (1H; s); 8,09 (1H; s); 7,75 (1H; s); 7,28 (1H; s); 3,91 (3H; s); 2,30 (3H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 168,7; 159,9; 156,1; 148,9; 145,9; 138,9; 119,1; 115,6; 109,2; 56,5; 20,4. **HRMS (ES+)**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 235,0719; encontrado: 235,0712. Dados de acordo com a literatura (LÜTH e LÖWE, 2008).

*5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzoate de metila (29)*



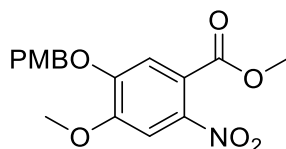
Ácido 5-hidroxi- 4-metoxi-2-nitrobenzóico (**25**) (500 mg; 2,35 mmol) em MeOH (3,5 mL) foi tratado com ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (0,330 mL). A mistura foi agitada sob refluxo por 48 h. Após resfriar à temperatura ambiente, o solvente foi removido sob pressão reduzida, e o resíduo resultante foi diluído em água e extraído com AcOEt. A fase orgânica foi lavada com água, seguida de solução saturada de NaCl, secada com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada para obtenção do composto **29** como sólido levemente amarelado em 95 % de rendimento (505 mg; 2,22 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,60 (1H; s); 7,01 (1H; s); 3,97 (3H; s); 3,85 (3H; s). Dados de acordo com a literatura (HELAL et al., 2011).

5-(benziloxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (**30**)



5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzoate de metila (**29**) (600 mg; 2,64 mmol), brometo de benzila (BnBr) (0,377 mL; 3,17 mmol), e carbonato de césio ( $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ) (1722 mg, 5,28 mmol) em *N,N*-dimetilformamida (DMF) (3 mL) foram agitados a temperatura ambiente por 24 h. A mistura reacional foi diluída em AcOEt (~5 mL), lavada com água, solução saturada de NaCl e posteriormente secada com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Hexano: AcOEt (7:3)] para a obtenção do composto **30** como um sólido levemente amarelado com 84% de rendimento (705 mg; 2,22 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,45 (1H; s); 7,44-7,34 (5H; m); 7,15 (1H; s); 5,21 (3H; s); 3,96 (3H; s); 3,89 (3H; s). Dados de acordo com a literatura (KUNDU et al., 2008).

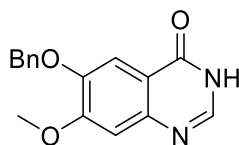
5-(*p*-metoxibenziloxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (**31**)



Uma solução de 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzoate de metila (**29**) (100 mg; 0,44 mmol) em DMF (2 mL) foi tratada com cloreto de *p*-metoxibenzila (65  $\mu\text{L}$ ; 0,48 mmol), carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (61 mg; 0,44 mmol) e iodeto de potássio (KI) (36 mg; 0,22 mmol) e mantida sob agitação a 90°C por 5h. Após resfriar lentamente a temperatura ambiente a mistura reacional foi diluída em AcOEt (10 mL), extraída com água (2x5 mL), solução saturada de NaCl, e secada com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Após concentração sob vácuo, o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Tolueno: AcOEt (9:1)] para a obtenção do composto **31** em 78 % de rendimento (119 mg, 0,34 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,44 (1H; s); 7,35

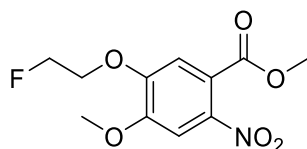
(2H; d;  $J$  8,7 Hz); 7,15 (1H; s); 6,91 (2H; d;  $J$  8,6 Hz); 5,13 (2H; s); 3,94 (3H; s); 3,89 (3H; s); 3,81 (3H; s).

*6-benziloxi-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (32)*



Uma mistura de 5-(benziloxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (**30**) (317 mg; 1,00 mmol) e formamida (1,6 mL, 40 mmol) foi tratada com cloreto de índio (III) (221 mg; 1 mmol) e aquecida a 150 °C por 4h. Em seguida foi vertida em água gelada e agitada por 30 min. O precipitado resultante foi recuperado em papel filtro, lavado com água, secado sob vácuo e filtrado em sílica gel [AcOEt-MeOH (0-20%)] para a obtenção do composto **32** como sólido marrom claro em 57% de rendimento (162 mg; 0,57 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 12,05 (1H; s); 7,95 (1H; s); 7,50 (1H; s); 7,47-7,26 (5H; m); 7,11 (1H; s); 5,16 (2H; s); 3,87 (3H; s). (KUNDU et al., 2008).

*5-(2-fluoroetoxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (35)*

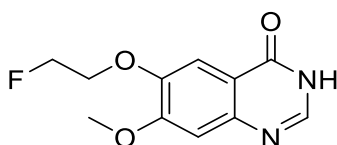


5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (**29**) (200 mg; 0,88 mmol), 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34**) (0,18 mL; 1,06 mmol), e  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (574 mg; 1,76 mmol) em DMF (3 mL) foram agitados a temperatura ambiente por 24 h. A mistura reacional foi diluída em acetato de etila (~5 mL) e lavada com água, solução de NaCl concentrado e posteriormente seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Hexano: AcOEt (7:3)] para a obtenção do composto **35** em 48% de rendimento (117 mg; 0,43 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,46 (1H; s); 7,14 (1H; s); 4,84 (2H; dt;  $^2J_{\text{H-F}}$  47,3;  $^3J_{\text{H-H}}$  4,0 Hz); 4,37 (2H; dt,  $^3J_{\text{H-F}}$  27,4;  $^3J_{\text{H-H}}$  4,0 Hz); 3,98 (3H; s); 3,92 (3H; m). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



$\delta_c$  (ppm): 166,1; 151,4; 151,2; 142,3; 121,3; 112,9; 107,6; 81,4 (d,  $^1J_{C-F}$  172,5 Hz); 68,9 (d,  $^2J_{C-F}$  20,8 Hz); 56,8; 53,4. **RMN de  $^{19}F$**  (282 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta_F$  (ppm) - 176,55 (TFA empregado como padrão interno); -222,6 (tt,  $J$  47,3; 27,3 Hz). **HRMS (ES<sup>+</sup>)**:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para  $C_{11}H_{13}FNO_6^+$ : 274,0727; encontrado: 274,0724;  $m/z$  [M+Na]<sup>+</sup> calculado para  $C_{11}H_{12}FNaNO_6^+$ : 296,0546; encontrado: 296,0545;  $m/z$  [M+K]<sup>+</sup> calculado para  $C_{11}H_{12}FKNO_6^+$ : 312,0286, encontrado: 312,0287.

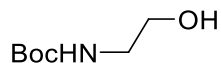
6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (**18**)



Uma mistura de 5-(2-fluoroetoxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (**35**) (103 mg; 0,43 mmol) e formamida (0,69 mL, 40 mmol) foi aquecida a 150 °C na presença de cloreto de índio (III) (96 mg; 1 mmol) por 4h. Em seguida foi vertida em água gelada e agitada por 30 min. O precipitado resultante foi filtrado, lavado com água e foi passada através de 1 cm de gel de sílica utilizando AcOEt-MeOH 0-20% para remover quaisquer partículas insolúveis não desejadas. Após purificação o composto **18** foi obtido em 75% de rendimento (78 mg, 0,33 mmol). **RMN de  $^1H$**  (300 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_H$  (ppm): 12,10 (1H; s); 8,00 (1H; s); 7,47 (1H; s); 7,15 (5H; s); 4,79 (2H; dt;  $J_{H-F}$  47,6 Hz;  $J_{H-H}$  5,8 Hz); 4,33 (2H; dt;  $J_{H-F}$  29,3 Hz;  $J_{H-H}$  5,6 Hz); 3,92 (3H; s). **RMN de  $^{13}C$**  (101 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_C$  (ppm): 160,0; 154,54; 147,3; 145,1; 144,0; 115,5; 108,2; 106,3; 82,0 (d,  $^1J_{C-F}$  167,0 Hz); 67,9 (d,  $^2J_{C-F}$  18,3 Hz); 55,9. **RMN de  $^{19}F$**  (282 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta_F$  (ppm): - 176,55 (TFA usado como padrão interno); -220,16 (tt;  $J$  47,8 Hz;  $J$  30,1 Hz). **HRMS (ES<sup>+</sup>)**:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para  $C_{11}H_{12}FN_2O_3^+$ : 239,0832, encontrado: 239,0827.

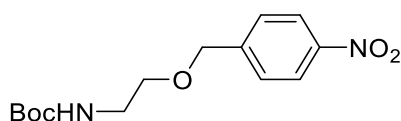
### 3.2.1.3 Síntese das unidades biorredutíveis

#### *tert*-butil *N*-(2-hidroxi)etil)carbamato (**44**)



A uma solução de 2-aminoetanol (**43**) (0,25 mL; 4,08 mmol) em tetraidrofurano (THF) (2 mL) e NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> (2,1 mL) foi adicionado gota a gota dicarbonato de di-*tert*-butila (Boc<sub>2</sub>O) (1,05 mL; 4,36 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação por 15h e logo após o solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida, a fase aquosa foi acidificada com uma solução de HCl 1 mol.L<sup>-1</sup> e extraída com AcOEt. A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e evaporada. A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna *flash* de gel de sílica [Hexano: AcOEt (1:1)], fornecendo o composto *tert*-butil *N*-(2-hidroxi)etil)carbamato (**44**) como um óleo viscoso transparente em 70% de rendimento (466 mg; 2,08 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 5,02 (1H; s); 3,69 (2H; dd; *J* 10,1 Hz; *J* 5,1 Hz); 3,28 (2H; dd; *J* 10,1 Hz; *J* 5,1 Hz); 2,70 (1H; s); 1,44 (9H; s). **HRMS (ES<sup>+</sup>)**: *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calculado para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup>: 184,0944; encontrado: 184,0950; *m/z* [M+K]<sup>+</sup> calculado para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>K<sup>+</sup>: 200,0689; encontrado: 200,0676. Dados de acordo com a literatura (GHILARDI et al., 2013).

#### *tert*-butil [2-((4-nitrobenzil)oxi)etil]carbamato (**45**)

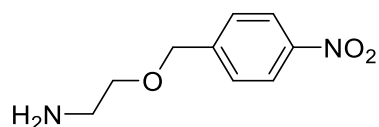


*Procedimento I*: Hidreto de sódio (19 mg; 60% em dispersão em óleo mineral, 0,48 mmol; 1,5 eq.) foi adicionado a uma solução de *tert*-butil *N*-(2-hidroxi)etil)carbamato (**44**) (50 mg; 0,31 mmol; 1,0 eq.) em THF anidro (2 mL). A mistura de reação foi agitada durante 15 min sob atmosfera de argônio à temperatura ambiente e, em seguida, brometo de 4-nitrobenzila (**41**) (100 mg; 0,47 mmol; 1,5 eq.) e TBAI (0,34 g; 0,09 mmol) foram adicionados. A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente durante 26 h, logo após foi adicionado metanol (1 mL) e os solventes foram removidos sob vácuo. O

resíduo foi dissolvido em DCM, lavado com água destilada e a camada orgânica foi seca sob  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada sob vácuo. O resíduo resultante foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Hexano: AcOEt (7:3)] fornecendo o composto **45** em 23% de rendimento (21 mg; 0,07 mmol).

*Procedimento II:* Óxido de prata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) (60,6 mg; 0,26 mmol) foi adicionado a uma solução do *tert*-butil *N*-(2-hidroxi)etilcarbamato (**44**) (42 mg; 0,26 mmol) e brometo de 4-nitrobenzila (**41**) (56 mg; 0,26 mmol) em DCM (10 mL). A mistura foi aquecida sob refluxo em atmosfera de  $\text{N}_2$ , durante 4 dias, em seguida, filtrada em Celite<sup>®</sup>, lavada com HCl (2 mol.L<sup>-1</sup>), solução de hidróxido de sódio (4 mol.L<sup>-1</sup>) e água, seca com  $\text{MgSO}_4$  e concentrada sob vácuo. O resíduo bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Hexano: AcOEt (7:3)] para obtenção do composto **45** em 23 % de rendimento (18 mg; 0,06 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,19 (2H; d; *J* 8,8 Hz); 7,49 (2H; d; *J* 8,8 Hz); 4,91 (s; 1H); 4,61 (2H; s); 3,58 (2H; t; *J* 5,1 Hz); 3,37 (2H; dd; *J* 10,4 Hz; *J* 5,1 Hz); 1,44 (9H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm):  $\delta$  156,1; 147,6; 145,8; 127,8; 123,8; 79,6; 71,9; 70,2; 40,5; 28,5. **HRMS (ES<sup>+</sup>):** *m/z* [*M*+Na]<sup>+</sup> calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{Na}^+$ : 319,1270; encontrado: 319,1284.

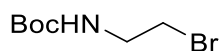
2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**)



*Procedimento I:* HCl gasoso foi borbulhado em dioxano (2 mL), até pH 1. O composto *tert*-butil [2-((4-nitrobenzil)oxi)etil]carbamato (**45**) (16 mg; 0,05 mmol) foi introduzido sob o dioxano e a solução foi agitada à temperatura ambiente por 16 h. A mistura reacional foi concentrada sob vácuo, diluída em água e extraída com DCM. A fase aquosa foi basificada até pH 10 pela adição de NaOH 1 mol.L<sup>-1</sup> e extraída com DCM. A fase orgânica foi seca com  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada sob vácuo, fornecendo o composto 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**) em 10% de rendimento (1 mg; 0,01 mmol).

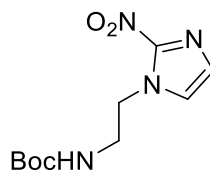
*Procedimento II* - A solução do composto *terc*-butil [2-((4-nitrobenzil)oxi)etil] carbamato (**45**) (0,16 g; 0,53 mmol) em MeOH (5 mL) foi previamente resfriada a 0 °C e tratada com HCl gasoso por 10 min. A mistura reacional foi agitada em temperatura ambiente até observação do consumo total do material de partida por CCD, em aproximadamente 1 hora. Logo após a solução foi concentrada resultando em sólido branco/amarelo claro. O sólido foi lavado com solução de Hexano: AcOEt (1:1), fornecendo o composto 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**) em 71% de rendimento (88 mg; 0,38 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> (ppm): 8,24 (1H; d; *J* 8,8 Hz); 7,65 (1H; d; *J* 8,8 Hz); 4,74 (2H; s); 3,82-3,72 (2H; m); 3,21 (2H; t, *J* 5,2 Hz). **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>C</sub> (ppm): 149,0; 146,8; 129,3; 124,5; 72,9; 67,6; 40,7. Dados de acordo com a literatura (CAZARES-KORNER et al., 2013).

*terc*-butil (2-bromoetil)carbamato (**47**)



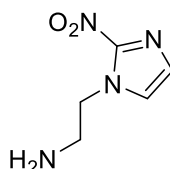
Hidrobrometo de 2-bromoetilamina (**46**) (625 mg; 3,06 mmol), seguido de trietilamina (Et<sub>3</sub>N) (571 μL; 4,09 mmol) gota a gota por 10 min, foram adicionado a um balão contendo Boc<sub>2</sub>O (600 mg; 2,75 mmol) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (13 mL) em condições anidras a 0 °C. A mistura reacional foi mantida até alcançar temperatura ambiente e agitada por 18 h. A reação foi diluída com a adição de DCM (100 mL) e lavada com solução saturada de NH<sub>4</sub>Cl (2 x 10 mL), solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2 x 10 mL) e solução saturada de NaCl (2 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas e secadas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtradas e concentradas sob vácuo para obtenção do composto **47** em 80 % de rendimento (548 mg; 2,46 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 4,94 (1H; sl); 3,61- 3,39 (4H; m); 1,45 (9H; s). Dados de acordo com a literatura (LUESCHER, VO e BODE, 2014).

*tert*-butil 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilcarbamato (**48**)



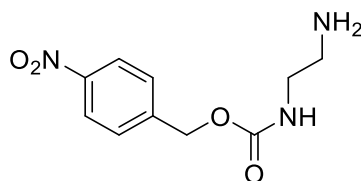
Uma mistura de 2-nitroimidazol (**13**) (52,5 mg; 0,46 mmol), *tert*-butil 2-bromoetilcarbamato (155,4 mg; 0,70 mmol), iodeto de sódio (NaI) (7 mg; 0,05 mmol) e carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (128 mg; 0,93 mmol) em 1 mL de DMF foi agitada por 48h à 60°C. Após a mistura foi diluída em 3 mL de AcOEt e lavada com água (H<sub>2</sub>O) (10 mL × 2) e solução saturada de NaCl (5 mL × 1). A fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e filtrada. O filtrado foi concentrado sob vácuo, e o resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Hexano: AcOEt (1:1)] para a obtenção de **48** em 62% de rendimento (73,5 mg; 0,29 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,14 (1H; sl); 7,07 (1H; m); 4,76 (1H; sl); 4,58 (2H; t; *J* 5,6 Hz); 3,55 (2H; q; *J* 5,9 Hz); 1,42 (9H; s). Dados de acordo com a literatura (ZHA et al., 2011).

2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il) etanamina (**38**)



Uma solução de *tert*-butil 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il)etilcarbamato (**48**) (69 mg; 0,27 mmol) em 1,3 mL de ácido trifluoroacético (TFA)/DCM (1:1) foi agitada a temperatura ambiente por 1h. A reação foi concentrada e submetida a coevaporações com metanol para a obtenção do produto **38** na forma de um sal de trifluoroacetato em 95% de rendimento (69 mg; 0,25 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,53 (1H; d; *J* 1,1 Hz); 7,22 (1H; d; *J* 1,1 Hz); 4,77 (2H; t; *J* 6,1 Hz); 3,49 (2H; t; *J* 6,1 Hz). Dados de acordo com a literatura (ZHA et al., 2011).

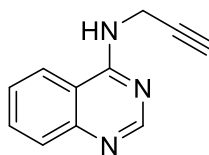
4-nitrobenzil 2-aminoetilcarbamato (**39**)



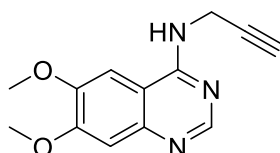
4-nitrobenzil cloroformiato (**49**) (400 mg; 1,86 mmol) dissolvido em THF (2 mL) foi adicionado em NaN<sub>3</sub> (145 mg; 2,23 mmol) dissolvido H<sub>2</sub>O (1 mL). Após 15 min a mistura foi extraída com AcOEt (2,5 mL). A fase orgânica foi lavada com água e solução de NaCl saturada, seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrada para obtenção de 4-nitrobenzil azidoformiato (**50**) como um sólido branco que foi usado sem purificação na próxima etapa. Etano-1,2-diamina (**51**) (0,9 mL; 13,37 mmol) dissolvido em CHCl<sub>3</sub> (5 mL) foi mantido a 0°C. A esta solução o azidoformiato **50** (295 mg, 1,33 mmol) dissolvido em CHCl<sub>3</sub> foi adicionado, gota a gota (2,5 mL) por 20 min. A mistura reacional foi agitada a temperatura ambiente por 1 h. A fase orgânica foi lavada com água (3 x 15 mL); solução de NaCl saturado (1 x 15 mL), seca sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrada e o sólido branco obtido foi lavado com Et<sub>2</sub>O gelado para obtenção do 4-nitrobenzil-2-aminoetilcarbamato (**39**) como um sólido branco em 44 % de rendimento (195 mg; 0,81 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 8,21 (2H; d; *J* 8,8 Hz); 7,51 (2H; d; *J* 8,7 Hz); 5,19 (2H; s); 3,26 (2H; q; *J* 5,9 Hz); 2,85 (2H; t; *J* 5,9 Hz). Dados de acordo com a literatura (HUANG et al., 2014).

### 3.2.1.3 Síntese de 4-aminoquinazolininas

Procedimento Geral A: Para uma solução do derivado quinazolin -4(3*H*)-ona (0,53 mmol) e PyBOP (0,69 mmol) foi adicionado DBU (0,79 mmol) em temperatura ambiente. A mistura reacional foi agitada por 5 min, e então foi adicionado a amina (0,79 mmol) gota a gota. A reação foi monitorada por CCD, e cessada após consumo total do material de partida. O solvente foi removido sob vácuo e a reação bruta foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel [AcOEt: MeOH] (WAN et al., 2006).

4-amino-[N-(propinil)]-quinazolina (**58**)

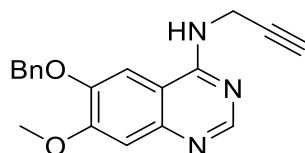
Obtido de acordo com o procedimento geral A empregando quinazolin-4(3*H*)-ona (**56**) (70 mg; 0,48 mmol), PyBOP (324 mg; 0,62 mmol); DBU (107  $\mu$ L; 0,31 mmol), propargilamina (46  $\mu$ L; 0,72 mmol) em DMF (3 mL) por 24 h. A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna de sílica comum [AcOEt: MeOH (9:1)]. O composto **58** foi obtido como um sólido branco em 80 % de rendimento (70 mg; 0,38 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,69 (1H; t; *J* 5,4 Hz); 8,54 (1H; s); 8,23 (1H; d; *J* 8,3 Hz), 7,79 (1H; ddd; *J* 8,2 Hz; *J* 6,9 Hz; *J* 1,3 Hz); 7,72 (1H; dd; *J* 8,3 Hz; *J* 1,0 Hz); 7,54 (1H; ddd; *J* 8,2 Hz; *J* 6,9 Hz; *J* 1,3 Hz); 4,34 (2H; dd; *J* 5,5 Hz; *J* 2,5 Hz); 3,12 (1H; t; *J* 2,4 Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 158,9; 154,8; 149,0; 132,7; 127,5; 125,9; 122,6; 114,8; 81,3; 72,8; 29,7. **HRMS (ES<sup>+</sup>)**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub><sup>+</sup>: 184,0875; encontrado: 184,0869.

4-amino-[N-(propinil)]-6,7-dimetoxi-quinazolina (**59**)

Obtido de acordo com o procedimento geral A empregando 6-7-dimetoxi-4(3*H*)-quinazolinona (**57**) (200 mg; 0,97 mmol), PyBOP (656 mg, 1,26 mmol), DBU (218  $\mu$ L, 1,45 mmol) propargilamina (93  $\mu$ L; 1,45 mmol) em DMF (3 mL) por 24 h. O mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel [AcOEt:MeOH (9:1)]. O composto **59** foi obtido como sólido branco em 55 % de rendimento (130 mg; 0,53 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,39 (1H; s); 8,31 (1H; t; *J* 5,3 Hz); 7,60 (3H; s); 7,11 (1H; s); 4,33 (2H; dd; *J* 5,1 Hz; *J* 2,1 Hz); 3,89 (2H; s); 3,88 (2H; s); 3,12 (2H; s). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 157,6; 153,9; 148,5; 146,1; 108,5; 107,0; 101,8; 81,7;

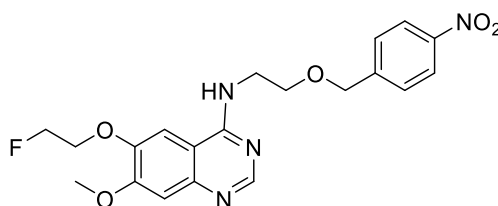
72,7; 56,0; 55,8; 55,7; 29,5. **HRMS (ES<sup>+</sup>)**:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 244,1086; encontrado: 244,1086.

*4-amino-[N-(propinil)]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (60)*



Obtido de acordo com o procedimento geral A empregando 6-benziloxi-7-metoxi-4(3*H*)-quinazolinona (**32**) (30 mg; 0,21 mmol), PyBOP (139 mg; 0,27 mmol), DBU (46  $\mu$ L; 0,31 mmol); propargilamina (20  $\mu$ L; 0,31 mmol) em DMF (3 mL) por 24 h. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [AcOEt:MeOH (9:1)]. O composto **60** foi obtido como óleo amarelo em 78 % de rendimento (52 mg; 0,16 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ <sub>H</sub> (ppm): 8,48 (1H; s); 7,68 (1H; s); 7,54-7,31 (5H; m); 7,15 (1H; s); 5,21 (2H; s); 4,45 (2H; d; *J* 2,5 Hz); 4,01 (3H; s); 2,66 (1H; t; *J* 2,5 Hz); 2,00 (1H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ <sub>c</sub> (ppm): 160,1; 157,3; 153,1; 150,3; 137,6; 129,5; 129,2; 128,9; 126,1; 105,1; 104,4; 80,7; 72,3; 72,1; 56,7; 31,4. **HRMS (ES<sup>+</sup>)**:  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 320,1399; encontrado: 320,1390.

*4-amino-[N-(2-([4-nitrofenil]metiloxi)etil)]-6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-quinazolina (54)*

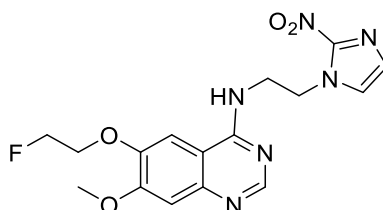


Obtido de acordo com o procedimento geral A empregando 6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-4(3*H*)-quinazolinona (**18**) (26 mg; 0,11 mmol), PyBOP (73 mg; 0,14 mmol), DBU (24  $\mu$ L; 0,16 mmol), cloridrato de 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**) diluído em DMF (0,5 mL) (38 mg; 0,16 mmol) em DMF (3 mL) por 24 h. A mistura reacional foi purificada CLAE empregando fase gradiente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O



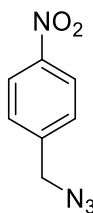
(0,02% TFA) gradiente em coluna de fase reversa (C-18) semi-preparativa (250 x 10 mm, 10  $\mu$ m, Macherey-Nagel Nucleodur®). O composto **54** foi obtido em  $t_R$  27,03 min como sólido branco em 39% de rendimento (18 mg; 0,34 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_H$  (ppm): 8,60 (1H; s); 8,06 (2H; d;  $J$  8,8 Hz); 7,72 (1H; s); 7,52 (2H; d;  $J$  8,8 Hz); 7,13 (1H; s); 4,79-4,74 (1H; m); 4,67 (2H; s); 4,49-4,43 (1H; m); 4,38-4,33 (2H; m); 4,06 (3H; s) 4,01 (2H; t;  $J$  5,2 Hz); 3,87 (2H; t;  $J$  5,2 Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_C$  (ppm): 161,4; 158,9; 151,3; 149,8; 148,6; 147,4; 136,0; 129,4; 124,3; 108,0; 105,3; 100,6; 82,7; 72,7; 70,3; 69,2; 57,2; 47,41; 43,2. **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$  [M+H] $^+$  calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{FN}_4\text{O}_5^+$ : 417,1574; encontrado: 417,1564.

*4-amino-[N-(2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)]-6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-quinazolina (65)*



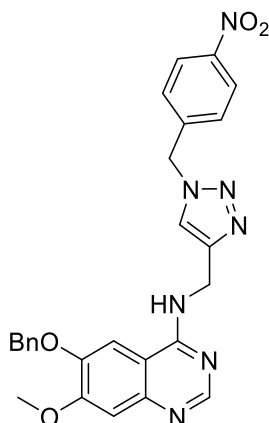
Obtido de acordo com o procedimento geral A empregando 6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (**18**) (12 mg; 0,05 mmol), PyBOP (34 mg; 0,06 mmol), DBU (11  $\mu$ L; 0,07 mmol), trifluoracetato de 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)etanoamina (**32**) diluído em DMF (0,5 mL)(20,42 mg; 0,08 mmol) em DMF (3 mL) por 24 h. A mistura reacional foi purificada por CLAE empregando fase gradiente  $\text{CH}_3\text{CN}$ :  $\text{H}_2\text{O}$  (0,02% TFA) gradiente em coluna de fase reversa (C-18) semi-preparativa (250 x 10 mm, 10  $\mu$ m, Macherey-Nagel Nucleodur®). O composto **65** foi obtido em  $t_R$  13,86 min como um sólido branco em 31% de rendimento (6 mg; 0,015 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_H$  (ppm): 8,49 (1H; s); 7,61 (1H; s); 7,37 (1H; d;  $J$  1,1 Hz); 7,16 (1H; s); 6,99 (1H; d;  $J$  1,1 Hz); 4,84 (2H; m); 4,77-4,71 (1H; m); 4,37 (2H; dt;  $^3J_{H-F}$  28,4;  $^3J_{H-H}$  3,9); 4,29 (2H; m); 4,05 (3H; s). **RMN  $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_F$  (ppm): - 176,55 (TFA usado como padrão interno); -223,51 (tt,  $J$  47,6 Hz;  $J$  28,4 Hz). **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$  [M+H] $^+$  calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{FN}_6\text{O}_4^+$ : 377,1374; encontrado: 377,1369.

1-(azidometil)-4-nitro-benzeno (**62**)



Uma solução de azida de sódio (45 mg; 0,69 mmol) em água (1 mL) foi lentamente adicionada a uma solução de brometo de *p*-nitrobenzila (**41**) (100 mg; 0,46 mmol) em acetona (10 mL) a 0° C e agitada a temperatura ambiente por 16 h. A mistura foi extraída com AcOEt, e a fase orgânica foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo em bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Hexano: AcOEt (9,5:0,5)] para obtenção de **62** em 96% rendimento (80 mg; 0,45 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 8,27 (2H; d; *J* 8,8 Hz;); 7,52 (2H; d; *J* 8,8 Hz); 4,52 (2H; s). **IV** (ν<sub>máx</sub>/cm<sup>-1</sup>) 2120 cm<sup>-1</sup>. Dados de acordo com a literatura (ROHILLA et al., 2016).

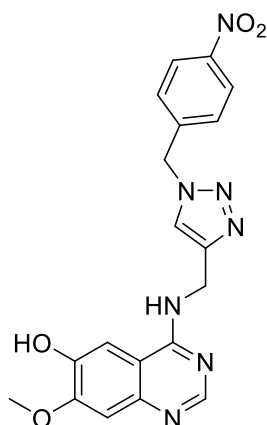
4-amino-[*N*-[1-(4-nitrofenilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il]metil]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**63**)



Uma mistura de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) (0,45 mg; 0,003 mmol; 5 mol%), 1,10-fenantrolina monohidratada (0,5 mg; 0,003 mmol; 5 mol%), e L-ascorbato de sódio (11 mg; 0,06 mmol) em EtOH-H<sub>2</sub>O [2:1 (v/v); 1 mL], foi agitada por 5 min à temperatura ambiente. Subsequentemente os compostos 4-amino-[*N*-(propinil)]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**60**) (19,7 mg; 0,06 mmol) e 1-(azidometil)-4-nitro-benzeno (**62**) (10 mg; 0,06 mmol) diluídos em EtOH-H<sub>2</sub>O

[2:1 (v/v); 1 mL] foram adicionados a mistura reacional, a qual foi agitada por 18 h à temperatura ambiente. Logo após a mistura reacional foi concentrada sob vácuo e purificada por cromatografia em coluna de sílica gel [AcOEt: MeOH (9,5:0,5)]. O composto **63** foi obtido em rendimento quantitativo (28 mg; 0,06 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,42 (1H; t;  $J$  5,5 Hz); 8,31 (1H; s); 8,14 (1H; d;  $J$  8,8 Hz); 8,07 (1H; s); 7,72 (1H; s); 7,47-7,40 (4H; m); 7,39-7,24 (2H; m); 7,05 (1H; s); 5,65 (2H; s); 5,05 (2H; s); 4,73 (2H; d;  $J$  5,5 Hz); 3,81 (3H; s). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 158,1; 154,0; 153,5; 147,4; 147,2; 146,1; 145,6; 143,6; 136,4; 129,1; 128,5; 128,3; 128,2; 123,9; 123,8; 108,5; 107,1; 103,3; 70,4; 55,8; 51,8; 35,8. **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$  [M+H] $^+$  calculado para C<sub>26</sub>H<sub>24</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub> $^+$ : 498,1890; encontrado: 498,1881.

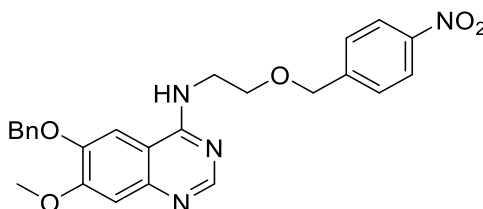
*4-amino-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-6-hidroxi-7-metoxi-quinazolina (61)*



Uma solução de 4-amino-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**63**) (10 mg; 0,02 mmol) em TFA (110  $\mu\text{L}$ ) foi refluxada por 50 min. Após resfriar à temperatura ambiente a mistura foi vertida em gelo. O solvente foi removido sob vácuo com auxílio de coevaporação com MeOH e o produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de C-18 empregando cartuchos de extração em fase sólida Discovery<sup>®</sup> DSC-18 SPE (H<sub>2</sub>O: MeOH). O composto **61** foi obtido como um sólido branco em 55 % de rendimento (4,5 mg; 0,01 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,64 (1H; s); 8,23 (2H; d;  $J$  8,8 Hz); 8,12 (1H; s); 7,59 (1H; s); 7,51 (2H; d;  $J$  8,8 Hz); 7,16 (1H; s); 5,74 (2H; s); 5,04 (2H; s); 4,08 (3H; s). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 161,2; 157,6; 150,4; 149,4; 149,3; 143,9; 134,9; 130,0; 125,

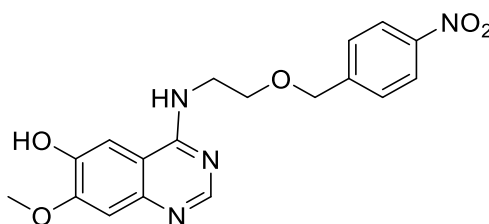
3; 125,0; 109,0; 107,3; 100,3; 57,3; 53,9; 37,9. **HRMS (ES<sup>+</sup>):**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 408,1420; encontrado: 408,1408.

*4-amino-[N-2-[(4-nitrofenil)metiloxi]etil]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (52)*



Obtido de acordo com o procedimento geral A empregando 6-benziloxi-7-metoxi-4(3*H*)-quinazolinona (**32**) (50 mg; 0,18 mmol), PyBOP (120 mg; 0,23 mmol) DBU (39  $\mu$ L; 0,31 mmol), 2-[(4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**) diluído em DMF (0,5 mL) (51 mg; 0,22 mmol), em DMF (3 mL) por 24 h. A mistura reacional foi purificada por CLAE empregando fase gradiente CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (0,02% TFA) coluna de fase reversa (C-18) semi-preparativa (250 x 10 mm, 10  $\mu$ m, Macherey-Nagel Nucleodur<sup>®</sup>). O composto **52** foi obtido em  $t_R$  de 28,52 min como um sólido branco em 10 % de rendimento (8 mg; 0,17 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_H$  (ppm): 8,58 (1H; s); 8,00 (2H; d;  $J$  8,8 Hz); 7,80 (1H; s); 7,57-7,30 (8H; m); 7,14 (1H; s); 5,25 (2H; s); 4,66 (2H; s); 4,05 (3H; s); 4,00 (2H; t;  $J$  5,2 Hz), 3,87 (2H; t;  $J$  5,2 Hz). **RMN de <sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_C$  (ppm): 161,4; 158,9; 151,3; 149,7; 148,6; 147,4; 137,2; 135,9; 129,7; 129,4; 128,9; 124,3; 108,1; 105,5; 100,7; 72,7; 72,4; 69,1; 57,3; 43,2. **HRMS (ES<sup>+</sup>):**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 461,1825; encontrado: 461,1817.

*7-metoxi-4-((2-((4-nitrobenzil)oxi)etil)amino)quinazolin-6-ol (53)*

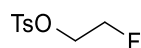


Uma solução de 4-amino-[N-2-[(4-nitrofenil)metiloxi]etil]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**52**) (45 mg; 0,10 mmol) em TFA (450  $\mu$ L) foi submetida a refluxo

por 50 min. Logo após a solução foi resfriada, a mistura foi vertida em gelo. A mistura foi concentrada com auxílio de co-evaporação com MeOH. Após concentração a reação foi purificada por CCC empregando C18 como fase estacionária e H<sub>2</sub>O e MeOH como fase móvel. O composto **53** foi obtido em 41 % de rendimento (15 mg; 0,40 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,53 (1H; s); 8,05 (2H; d; *J* 8,8 Hz); 7,56 (1H; s); 7,51 (2H; d; *J* 8,8 Hz); 7,11 (1H; s); 4,66 (2H; s); 4,08 (3H; s); 3,97 (2H; t; *J* 5,2 Hz); 3,85 (2H; t; *J* 5,2 Hz). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 161,3; 157,4; 150,2; 149,3; 148,6; 147,4; 134,8; 129,4; 124,3; 108,9; 107,3; 100,4; 72,6; 69,2; 57,2; 43,0. **HRMS (ES<sup>+</sup>)**: *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup>: 371,1355; encontrado: 371,1353.

### 3.2.1.4 Síntese da unidade contendo o átomo de flúor

#### *2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (34)*



*Procedimento I*: A uma solução de 2-fluoroetanol (**62**) (250 mg; 62,0 mmol) em piridina (1,25 mL) foi adicionado cloreto de 4-metilbenzeno-1-sulfonila (895 mg, 4,69 mmol) em cinco porções ao longo de 30 min. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 24 h e o volume foi reduzido sob vácuo. O resíduo foi diluído em HCl aquoso 1 mol.L<sup>-1</sup> (50 mL) e extraída com DCM. As fases orgânicas combinadas foram secas sob Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentradas sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt (7:3)] para a obtenção de do composto **34** em rendimento quantitativo.

*Procedimento II*: A uma solução de 2-fluoroetanol (**62**) (500 mg; 7,81 mmol) em DCM anidro (5,00 mL) e Et<sub>3</sub>N (2,2 mL; 15,62 mmol) foi adicionado cloreto de 4-metilbenzeno-1-sulfonila (1,56 g; 8,2 mmol) em cinco porções ao longo de 30 min. A mistura de reação foi agitada à temperatura ambiente durante 24 h. A mistura reacional foi concentrada e em sequência o produto bruto foi rediluído em DCM e extraído com NaHCO<sub>3</sub> e solução saturada de NaCl. A fase orgânica

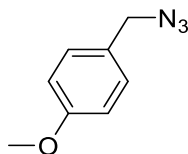
foi seca sob  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentradas sob vácuo. O produto bruto foi purificado por cromatografia de coluna de sílica gel [Hexano:AcOEt (7:3)] para a obtenção do composto **34** em rendimento quantitativo. **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 7,78 (2H; d;  $J$  8,3 Hz); 7,47 (2H; d;  $J$  8,0 Hz;  $J$  5,3 Hz); 4,56 (2H; dt;  $^2J_{\text{H-F}}$  47,6 Hz;  $^3J_{\text{H-H}}$  5,8 Hz); 4,24 (2H; dt;  $^3J_{\text{H-F}}$  29,3 Hz;  $^3J_{\text{H-H}}$  5,6 Hz); 2,40 (3H; s). Dados de acordo com a literatura (BERNARD-GAUTHIER et al., 2015).

### 3.2.1.5 Síntese da série de 4-aminoquinazolininas contendo 1,2,3 triazóis

*Procedimento Geral B:* Azida de sódio (1,3 eq.) foi adicionado a uma solução do haleto (1 eq.) em DMF e agitado à temperatura ambiente por 16-18h. A mistura reacional foi diluída em AcOEt e extraída com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca sob  $\text{MgSO}_4$ ; filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia líquida em sílica gel. Procedimento para síntese dos azidos **68** à **72**.

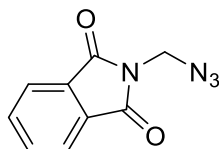
*Procedimento Geral C* - Em um tubo de micro-ondas contendo uma barra magnética foi adicionado o ascorbato de sódio (0,2 eq.) diluído com 100  $\mu\text{L}$  de DMF e adicionado sulfato de cobre  $\text{CuSO}_4$  (0,05 eq.) em solução 1  $\text{mol.L}^{-1}$ . A mistura reacional foi agitada por 5 min e logo em seguida foram adicionados o azido (1 eq.) seguido do alcino (1,1 eq.) previamente diluídos em DMF. A mistura reacional foi irradiada em micro-ondas com 100 W, 80  $^{\circ}\text{C}$  por 5 a 10 min. O material bruto foi diluído em AcOEt e extraído com solução saturada de NaCl. A fase orgânica foi seca com a adição de  $\text{MgSO}_4$ , filtrada e concentrada sob pressão reduzido. O resíduo foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel em cromatografo *flash*, empregando AcOEt/MeOH 5%.

1-(azidometil)-4-metoxibenzeno (69)



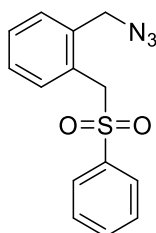
*Procedimento Geral B.* Óleo transparente obtido em rendimento quantitativo. **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,31 (1H; d; *J* 8,7 Hz); 6,88 (1H; d; *J* 8,7 Hz); 4,57 (1H; s); 3,81 (2H; s). Dados de acordo com a literatura (BAI et al., 2014).

2-(azidometil)isoindolina-1,3-diona (71)



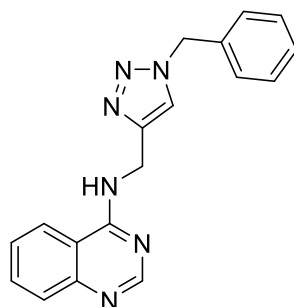
*Procedimento Geral B.* Sólido branco obtido em 28% de rendimento (36 mg; 0,18 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,97-7,89 (2H; m), 7,83-7,76 (2H; m), 5,08 (2H; s). Dados de acordo com a literatura (PYTA et al., 2014).

1-(azidometil)-2-((fenilsulfonil)metil)benzeno (72)



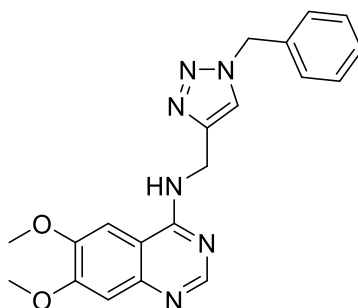
*Procedimento Geral B.* Sólido Branco obtido em 59% de rendimento (30 mg; 0,10 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 7,66-7,54 (3H; m); 7,47-7,38 (2H; m); 7,35-7,23 (2H; m); 7,22-7,13 (1H; m); 6,97 (1H; d; *J* 7,6 Hz); 4,39 (2H; s), 4.29 (2H, s). Dados de acordo com a literatura (LEE et al., 2003).

*N-((1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (1)*



*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido em 67 % de rendimento (53 mg; 0,17 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,77 (1H; t;  $J$  5,6 Hz); 8,44 (1H; s); 8,20 (1H; d;  $J$  7,8 Hz); 8,02 (1H; s); 7,79-7,60 (2H; m); 7,47 (1H; ddd;  $J$  8,2 Hz;  $J$  6,9 Hz;  $J$  1,3 Hz); 7,36-7,21 (5H; m); 5,49 (2H; s); 4,75 (2H; d;  $J$  5,7 Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 159,2; 155,0; 149,1; 145,2; 136,2; 132,7; 128,7; 128,1; 129,0; 127,5; 125,8; 123,3; 122,7; 115,0; 52,7; 39,5; 36,0. **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_6^+$ : 317,1515; encontrado: 317,1508.

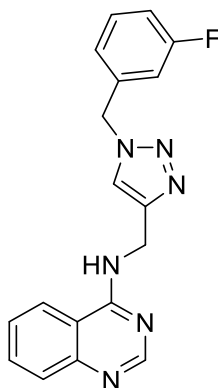
*N-((1-(3-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)quinazolin-4-amina (3)*



*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido em 72% de rendimento (51 mg; 0,13 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,53 (1H; s); 7,65 (1H; s); 7,38 (3H; dd;  $J$  5,0 Hz;  $J$  1,8 Hz); 7,28 (1H; d;  $J$  7,7 Hz); 7,15 (1H; s); 7,03 (2H; s); 5,50 (2H; s); 4,89 (2H; d;  $J$  5,4 Hz); 3,99 (3H; s); 3,79 (3H; s). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 158,1; 154,4; 153,8; 149,0; 134,5; 129,3; 129,0; 128,2; 107,5; 100,1; 77,2; 56,3; 56,2; 54,5; 36,3. **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_2^+$ : 377,1726; encontrado: 377,1719.

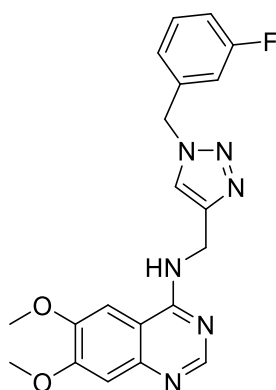
*N-((1-(3-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)quinazolin-4-amina (3)*





*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido em 30% de rendimento (10 mg; 0,03 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,82 (1H; t;  $J$  5,6 Hz); 8,49 (1H; s); 8,25 (1H; d;  $J$  7,7 Hz); 8,11 (1H; s); 7,77 (1H; ddd;  $J$  8,2 Hz;  $J$  6,9 Hz;  $J$  1,3 Hz); 7,70 (1H; dd;  $J$  8,3 Hz;  $J$  1,0 Hz); 7,51 (1H; ddd;  $J$  8,2 Hz;  $J$  6,9 Hz;  $J$  1,3 Hz); 7,44-7,36 (1H; m); 7,19-7,09 (3H; m); 5,57 (2H; s); 4,80 (2H; d;  $J$  5,7 Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 163,3; 160,9; 159,1; 154,9; 149,1; 145,2; 138,9; 138,8; 132,6; 130,8; 127,5; 125,7; 124,0; 123,4; 122,7; 115,0; 114,9; 114,8; 114,8; 114,62; 52,0; 35,9. **RMN de  $^{19}\text{F}$**  (471 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{F}}$  (ppm): -113,34 – -115,69 (1F, m). **HRMS (ES $^+$ )**  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{FN}_6^+$ : 335,1420; encontrado: 335,1422.

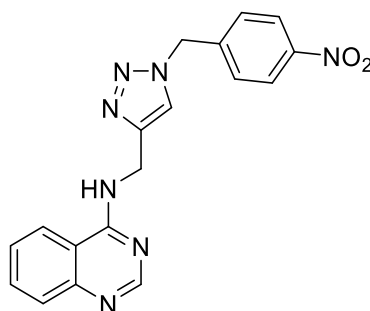
*N-((1-(3-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amina*  
(4)



*Procedimento Geral C.* Sólido branco com 38% de rendimento (26 mg; 0,03 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,47 (1H; t;  $J$  5,5 Hz); 8,37 (1H; s); 8,10 (1H; s); 7,61 (1H; s); 7,40 (1H; q;  $J$  7,7 Hz); 7,20-7,05 (4H; m); 5,57 (2H; s); 4,78 (2H; d;  $J$  5,5 Hz); 3,88 (3H; s); 3,85 (3H; s). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (126

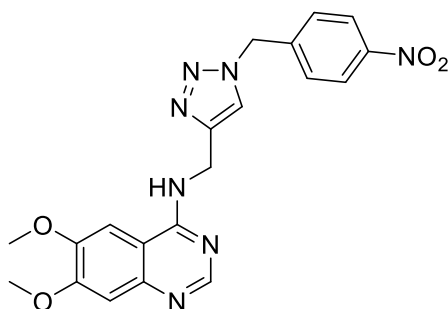
MHz, DMSO)  $\delta_c$  (ppm): 163,0; 161,1; 158,0; 153,8; 153,3; 148,4; 145,9; 145,5; 138,8; 130,8; 130,7; 124,0; 123,4; 115,0; 114,8; 114,7; 108,5; 106,9; 102,0; 56,0; 55,7; 52,0; 35,8. **RMN de  $^{19}\text{F}$**  (471 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_F$  (ppm): -113,97 – -114,04 (H, m). **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_6\text{O}_2^+$ : 395,1632; encontrado: 395,1628.

*N-((1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (5)*



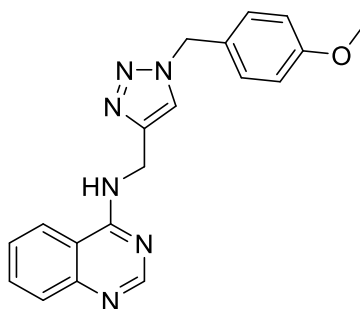
*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido com 42 % de rendimento (38 mg; 0,10 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_H$  (ppm): 8,84 (1H; s); 8,50 (1H; s); 8,25 (1H; d;  $J$  8,3 Hz); 8,21 (2H; d;  $J$  8,7 Hz); 8,15 (1H; s); 7,77 (1H; t;  $J$  7,6 Hz); 7,70 (1H; d;  $J$  8,3 Hz); 7,54 – 7,48 (3H; m); 5,73 (2H; s); 4,82 (4H; d;  $J$  5,6 Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta_c$  (ppm): 159,1; 154,9; 149,0; 147,2; 145,3; 143,4; 132,5; 128,9; 127,4; 125,6; 123,7; 122,6; 114,9; 5,7; 35,9. **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_7\text{O}_2^+$ : 362,1365; encontrado: 362,1360.

6,7-dimetoxi-*N*-((1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina  
(6)



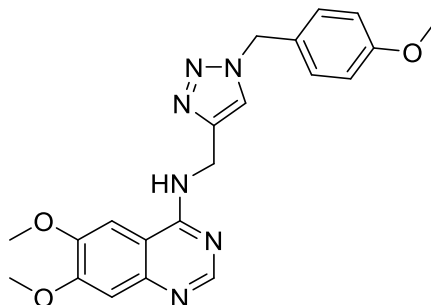
*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido em 45 % de rendimento (36 mg; 0,08 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 8,49 (1H; t; *J* 5,4 Hz); 8,22 (2H; d; *J* 8,5 Hz); 8,14 (1H; s); 7,63 (1H; s); 7,51 (2H; d; *J* 8,6 Hz); 7,12 (1H, s); 5,73 (2H; s); 4,79 (2H; d; *J* 5,4 Hz); 3,89 (3H; s); 3,86 (3H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 157,9; 153,8; 153,2; 148,3; 147,2; 145,6; 143,4; 129,0; 123,7; 123,6; 107,0; 102,0; 55,9; 55,6; 51,7; 35,7. **HRMS (ES<sup>+</sup>):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 422,1577; encontrado: 422,1574.

*N*-((1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (7)



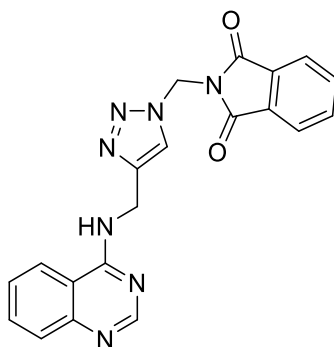
*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido com 53% de rendimento (17 mg, 0,049 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 8,65 (1H; s); 7,86-7,76 (2H; m); 7,72 (1H; t; *J* 8,3 Hz); 7,55 (1H; s); 7,43 (1H; t; *J* 8,2 Hz); 7,27-7,21 (2H; m); 6,97 (1H; s); 6,91-6,87 (2H; m); 5,45 (2H; s); 4,90 (2H; d; *J* 5,0 Hz); 3,80 (3H; s). **RMN de <sup>13</sup>C** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ<sub>C</sub> (ppm): 160,2; 159,3; 155,0; 149,1; 144,9; 132,9; 129,8; 128,3; 126,4; 122,3; 121,1; 115,1; 114,7; 76,8; 55,5; 54,0; 36,6. **HRMS (ES<sup>+</sup>):** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>6</sub>O<sup>+</sup>: 347,1620; encontrado: 347,1616.

6,7-dimetoxi-N-((1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**8**)



*Procedimento Geral C.* Sólido branco com 55 % de rendimento (42 mg; 0,10 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 9,93 (1H; t;  $J$  4,4 Hz); 8,59 (1H; s); 7,88 (1H; s); 7,60 (1H; s); 7,03 (2H; d;  $J$  8,6 Hz); 6,97 (1H; s); 6,65 (2H; d;  $J$  8,6 Hz); 5,22 (2H; s); 4,69 (2H; d;  $J$  5,4 Hz); 3,70 (3H; s); 3,64 (3H; s); 3,46 (3H; s). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 159,2; 156,1; 150,1; 149,1; 143,3; 134,3; 129,8; 127,9; 123,4; 114,2; 106,6; 103,3; 99,6; 56,5; 55,2; 52,5. **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_3^+$ : 407,1832; encontrado: 407,1825.

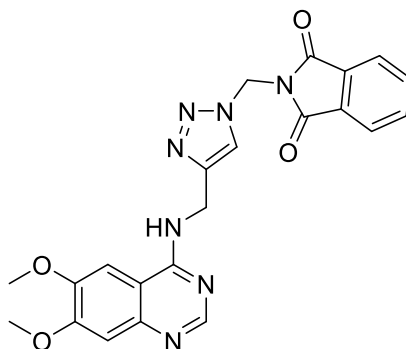
2-((4-((quinazolin-4-ilamino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoindolina-1,3-diona (**9**)



*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido em 22% de rendimento (8 mg; 0,021 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  ( $\delta_{\text{H}}$ (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{H}}$  (ppm): 8,81 (1H; t;  $J$  5,7 Hz); 8,50 (1H; s); 8,23 (1H; d;  $J$  8,3 Hz); 8,12 (1H; s); 7,96-7,91 (2H; m); 7,90-7,86 (2H; m); 7,77 (1H; t;  $J$  8,2 Hz); 7,69 (1H; d;  $J$  8,2 Hz); 7,51 (1H; t;  $J$  8,1 Hz); 6,11 (2H; s); 4,79 (2H; d;  $J$  5,6 Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_{\text{C}}$  (ppm): 166,6; 159,1; 154,9; 149,0; 145,2; 135,1; 132,6; 131,1; 127,5; 125,7;

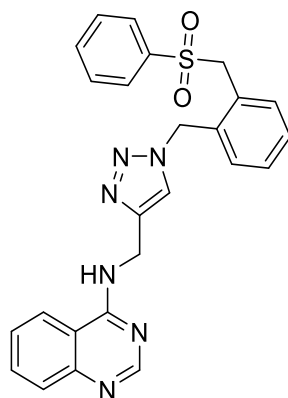
123,7; 122,7; 114,9; 49,9; 35,7. **HRMS (ES<sup>+</sup>):**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>7</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: 386,1365; encontrado: 386,1358.

2-((4-(((6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoindolina-1,3-diona (**10**)



*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido em 20% de rendimento (5 mg; 0,01 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): δ<sub>H</sub> (ppm): 8,48 (1H; t; *J* 5,4 Hz); 8,37 (1H; s); 8,10 (1H; s); 7,96-7,92 (3H; m); 7,91-7,86 (3H; m); 7,59 (5H; s); 7,09 (3H; s); 6,11 (8H; s); 4,76 (2H; d; *J* 5,5 Hz); 3,88 (3H; s); 3,84 (3H; s). **HRMS (ES<sup>+</sup>):**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup>: 446,1577; encontrado: 446,1574.

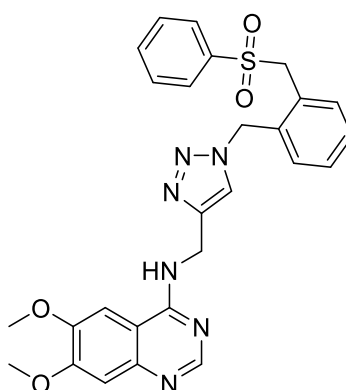
*N*-((1-(2-((fenilsulfonil)metil)benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**11**)



*Procedimento Geral C.* Sólido branco obtido em 65% de rendimento (16 mg; 0,034 mmol). **RMN de <sup>1</sup>H** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub> (ppm): 8,81 (1H; t; *J* 5,6 Hz); 8,47 (1H; s); 8,22 (1H; d; *J* 8,2 Hz); 8,00 (1H; s); 7,82-7,71 (4H; m); 7,69 (1H; d;

$J$  8,3 Hz); 7,62 (2H; t;  $J$  7,8 Hz); 7,50 (1H; t;  $J$  7,6 Hz); 7,31 (1H; t;  $J$  7,5 Hz); 7,23 (2H; d;  $J$  7,6 Hz); 7,08 (2H; t;  $J$  7,3 Hz); 5,60 (2H; s); 4,91 (2H; s); 4,78 (2H; d;  $J$  5,6 Hz). **RMN de  $^{13}\text{C}$**  (126 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_c$  (ppm): 159,1; 154,9; 149,0; 145,3; 138,4; 136,5; 134,1; 133,0; 132,6; 129,3; 128,8; 128,1; 128,0; 127,4; 126,6; 125,7; 123,4; 122,7; 114,9; 57,8; 49,9; 35,9. **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}^+$ : 471,1603; encontrado: 471,1599.

6,7-dimetoxi-*N*-((1-(2-((fenilsulfonil)metil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**12**)



**Procedimento Geral C.** Sólido branco obtido em 62% de rendimento (62 mg; 0,12 mmol). **RMN de  $^1\text{H}$**  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta_H$  (ppm): 8,43 (1H; t;  $J$  5,6 Hz); 8,34 (1H; s); 7,98 (1H; s); 7,82-7,78 (2H; m); 7,77-7,73 (1H; m); 7,65-7,61 (2H; m); 7,59 (1H; s); 7,31 (1H; t;  $J$  7,5 Hz); 7,23 (1H; t;  $J$  7,5 Hz); 7,10-7,07 (3H; m); 5,60 (2H; s); 4,92 (2H; s); 4,76 (2H; d;  $J$  5,6 Hz); 3,88 (3H; s); 3,84 (3H; s). **HRMS (ES $^+$ )**:  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}^+$ : 531,1814; encontrado: 531,1811.

### 3.2.2 Radiossíntese de $^{18}\text{F}$ -AmBF $_3$ -bu-2NI

$\text{H}_2^{18}\text{O}$  (3 mL) contendo  $^{18}\text{F}$ -fluor foi passada através de um cartucho  $^{18}\text{F}$  *Trap & Release*. O  $^{18}\text{F}$ -fluor retido no cartucho foi eluído com 0,1 mL de HCl 0,1 M em um tubo falcon de 6 mL pré-preenchido com o **AmBF $_3$ -bu-2NI** (1000 nmol) e  $\text{KHF}_2$  (100 nmol) em DMF (15  $\mu\text{L}$ ). A mistura reacional foi mantida a 80  $^\circ\text{C}$  por 5 min e depois por mais 15 min sob vácuo. A reação foi cessada com a adição de tampão fosfato salina (PBS, do inglês: *phosphate buffered saline*) 10 mM

$\text{PO}_4^{3-}$ , 137 mM NaCl e 2,7 mM KCl, pH 7,4 1 mL. A mistura resultante foi purificada por CLAE semi-preparativa utilizando EtOH a 6% em PBS com fluxo de 4,5 mL/min. A  $t_R$  do radiotraçador foi de 15,0 min. O radiotraçador coletado foi posteriormente diluído com PBS para concentração apropriada para estudos em animais. O controle de qualidade (CQ) do  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  foi realizado em coluna analítica Phenomenex (Luna C18, 5  $\mu$ , 150x4,6 mm) utilizando  $\text{CH}_3\text{CN:H}_2\text{O}$  10% com fluxo de 2 mL/min o  $t_R$  obtido foi 10,0 min.

### 3.2.3 Avaliação do Coeficiente de Partição (LogP)

Uma alíquota (20  $\mu\text{Ci}$ ) do radiotraçador  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  foi adicionada em um tubo falcon de 15 mL contendo uma mistura octanol: PBS (1:1) de 6 mL. A mistura resultante foi submetida a agitação por 30 segundos e depois centrifugada a 1057 x g durante 20 min. Um mililitro da fase de octanol e 0,1 mL da fase aquosa (PBS) foram recolhidos e contados em um contador gama. O valor de Log P foi calculado usando a equação:

$$\text{LogP} = \text{Log} \left( \frac{\text{cpm da fase de octanol}}{\text{cpm da fase aquosa}} \right)$$

### 3.2.4 Ensaios biológicos

#### 3.2.4.1 Avaliação da estabilidade em plasma

Alíquotas do radiotraçador  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  (100  $\mu\text{L}$ , ~ 300  $\mu\text{Ci}$ ) foram misturadas com 400  $\mu\text{L}$  de plasma de camundongo BALB/c, comercialmente disponível (Innovative Research), e incubadas a 37°C por 5, 15, 30 e 60 min. No final de cada período de incubação, as proteínas foram precipitadas pela adição de 0,5 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ . As amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes foram passados através de um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . Amostras filtradas foram analisadas por CLAE, utilizando uma coluna analítica para verificar a presença de metabólitos usando as condições descritas para o CQ do radiotraçador.

### 3.2.4.2 Estudos de Biodistribuição *ex-vivo* e imagem por PET/CT

Esses estudos foram conduzidos de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Canadense de Cuidados com Animais e aprovados pelo Comitê de Ética Animal da University of British Columbia. Camundongos machos NOD-*scid* IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> imunodeficiente foram adquiridos no *Animal Research Center, BC Cancer Research Center*, Vancouver, Canadá. Após anestesia com isoflurano (2% de isoflurano em oxigênio), os camundongos foram injetados com  $5 \times 10^6$  células de HT-29 (em 100  $\mu$ L PBS e matrigel na proporção de 1: 1) por via subcutânea sob o flanco dorsal direito. As imagens de PET/CT e os estudos de biodistribuição *ex-vivo* foram realizados 3 semanas após a inoculação do tumor.

Para o estudo de biodistribuição *ex-vivo*, camundongos foram anestesiados por inalação de 2% de isoflurano em oxigênio e injetados com ~ 3-4 MBq do composto marcado. Após períodos de captação pré-determinados (1 e 3 h), os camundongos foram anestesiados novamente por inalação de isoflurano, seguido por asfixia com dióxido de carbono. O sangue foi retirado, e órgãos/tecidos de interesse foram removidos, lavados com soro fisiológico, secos e pesados. A radioatividade dos tecidos coletados foi contada em um contador gama automático Wizard2 2480, com correção da radiação de fundo e decaimento radioativo, e expressa como porcentagem de atividade injetada por grama de tecido (% AI/g).

Os experimentos de imagem PET/CT foram realizadas utilizando um aparelho microPET/CT Inveon da Siemens (Knoxville, TN, USA) e camundongos portadores de tumores HT-29, como descrito acima. Para estudo dinâmico de imagem, os camundongos foram sedados por inalação de isoflurano 2% em oxigênio e posicionados no microPET/CT. Uma análise de tomografia computadorizada (CT) foi obtida para correção de atenuação e localização antes da injeção do radiotraçador <sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI, usando raios-X de 60 kV a 500 mA, 3 posições de leito sequenciais com 33% de sobreposição e rotação contínua de 220 graus. Os camundongos foram mantidos aquecidos por uma almofada de aquecimento durante a aquisição. A aquisição dinâmica de 60 min foi iniciada no momento da injeção intravenosa



com ~ 7 MBq do radiotraçador  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ . Os dados de *list mode* foram reinseridos em intervalos de tempo (12 x 10, 6 x 30, 5 x 60, 6 x 300 e 2 x 600 segundos) para obter as curvas de tempo-atividade do tecido. As imagens foram reconstruídas usando OSEM3D, 2 iterações, (do inglês: 3-dimensional ordered subsets expectation maximization) seguidas por um algoritmo *a priori* (FastMAP: 18 iterações). Os camundongos foram sacrificados no final da aquisição das imagens e os tecidos foram coletados, contados e analisados como descrito anteriormente.

Para o estudo de imagens estáticas, os camundongos foram brevemente sedados para injeção intravenosa do radiotraçador (~ 7 MBq) e, em seguida, puderam se recuperar e vagar livremente em suas gaiolas. Em períodos de captação pré-determinados (1 e 3 h), os camundongos foram sedados com inalação de 2% de isoflurano em oxigênio, colocados no aparelho microPET/CT, e uma análise de CT de correção de atenuação foi obtida como descrito anteriormente. Uma única varredura de emissão estática foi adquirida por 10 min. As imagens foram reconstruídas em 1 *frame* usando os parâmetros de reconstrução descritos anteriormente. Os camundongos foram sacrificados e os órgãos/tecidos foram coletados para os estudos de biodistribuição, como descrito anteriormente.

### 3.2.4.3 Ensaio de captação celular

As células HT-29 foram coletadas por tampão de dissociação celular (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e ressuspensas em PBS a uma concentração final de  $1,5 \times 10^6$  células/mL. As células (2,5 mL de células suspensas) foram incubadas com uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ) do radiotraçador (concentração final:  $2,0 \times 10^5$  célula/mL) a 27 °C. Em períodos selecionados (5, 15, 30, 60, 120 e 180 min), uma alíquota (0,3 mL) de células suspensas foi removida e centrifugada (2 min a 400 x g) para isolamento do *pellet*. Os sedimentos de células foram lavados duas vezes com PBS, antes de serem ressuspensos em citrato de sódio 0,01 M, tampão NaCl 0,14 M (pH = 2,05) durante 2 min à temperatura ambiente (20 °C) e depois centrifugados (2 min a 400 x g). A radioatividade no sobrenadante após a lavagem com ácido representou a superfície celular associada ao radiotraçador  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ ,

enquanto a quantidade do radiotraçador internalizada foi calculada por medição do sedimento celular. As amostras foram contadas num contador gama e o ensaio foi realizado em triplicata.

#### **3.2.4.5 Ensaio antitumoral - Triagem por uma dose**

As linhagens de células tumorais humanas de Mama - MDA-MB-231, SKBR3, BT474, Próstata - PC3, Gástrico - MKN45; Glioblastoma – U251, U87, Pâncreas - MIA PaCa-2, Melanoma - Skmel37, Pulmão - A549 foram crescidas em meio RPMI 1640 ou DMEM contendo 5% de soro fetal bovino e 2 mM de L-glutamina e inoculadas em placas de 96 poços de microtitulação em 100 µL a densidades de plaqueamento de 2000 células/poço. Após a inoculação das células, as placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de ar e 100% de humidade relativa durante 24 h antes da adição de compostos experimentais. Para ensaio na condição de hipóxia as células foram cultivadas sob atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 1% O<sub>2</sub> (Hipóxia) por 24h em câmara de Whitley H35.

Após 24 h, uma placa de cada uma das linhagens celulares (em hipóxia e em normóxia) foi fixada *in situ* com ácido tricloroacético (TCA), para representar a medição da população celular para cada linhagem celular no momento da adição do composto a ser testado (Tz). Os compostos testados foram diluídos no meio de cultura nas concentrações avaliadas de 10 µM ou 30 µM.

O ensaio foi finalizado com adição de TCA frio. As células foram fixadas *in situ* com 50 µL de TCA frio a 50% (m/v) (concentração final, 10% de TCA) e incubadas durante 60 min a 4 °C. O sobrenadante foi rejeitado, e as placas foram lavadas cinco vezes com água e secas ao ar. A solução de sulforrodamina B (SRB) (100 µL) a 0,4% (m/v) em ácido acético a 1% foi adicionada a cada poço e as placas foram incubadas durante 10 min à temperatura ambiente. Após coloração, o corante não ligado foi removido por lavagem cinco vezes com ácido acético (1%) e as placas foram secas ao ar. A coloração ligada foi subseqüentemente solubilizada com 10 mM de base de trizma, e a absorvância foi lida em leitor de placas automatizado a um comprimento de onda de 515 nm. Utilizando as medidas de absorvância [tempo

zero, ( $T_z$ ), crescimento de controle, (C) e crescimento de teste na presença do composto ( $T_i$ ), calculou-se a porcentagem de crescimento. A inibição da porcentagem de crescimento foi calculada como:

Para concentrações para as quais  $T_i > T_z$ :

$$\left[ \frac{(T_i - T_z)}{(C - T_z)} \right] \times 100$$

Para concentrações para as quais  $T_i < T_z$ :

$$\left[ \frac{(T_i - T_z)}{(T_z)} \right] \times 100$$

### 3.2.4.5.1 Interpretação dos dados do ensaio

Os dados do ensaio são relatados como um gráfico médio da porcentagem de crescimento das células tratadas empregando o software GraphPad 4.0. O número indicado para o ensaio corresponde ao crescimento relativo ao controle sem o composto testado, e relativo ao tempo zero de células. Isto permite detectar tanto a inibição do crescimento (valores entre 0 e 100) quanto a letalidade (valores inferiores a 0).

### 3.2.4.6 Ensaio enzimático

O ensaio para determinação da atividade inibitória dos compostos foi realizado pela Reaction Biology Corporation (Malvern, PA) empregando o método radiométrico *filter binding assay*. Inicialmente foi diluído o substrato indicado (substrato peptídico, poli[Glu:Tyr] (4:1), 0,2 mg/ml, para o EGFR e HER2 e MBP (do inglês: Myelin Basic Protein) para PERK, 10  $\mu$ M) no tampão base de reação. Em sequência, foi adicionado os cofatores necessários à solução do substrato utilizado, seguida da enzima quinase (EGFR, HER2 ou PERK) na solução do substrato e misturado suavemente. Os compostos teste diluídos em DMSO foram então adicionados à mistura reacional de quinase por *Acoustic technology* (Echo550; nanoliter range) e incubados por 20 min a temperatura ambiente. Logo após, foi administrado 10  $\mu$ M de  $^{33}\text{P}$ -ATP na

mistura reacional e a reação foi incubada por mais 2 h a temperatura ambiente para finalmente ser cessada em papel de troca iônica P81 e ter a atividade de quinase determinada pelo método de *filter binding assay*, pela contagem da radiação do substrato retido no papel das amostras testadas em comparação com amostra controle de DMSO.

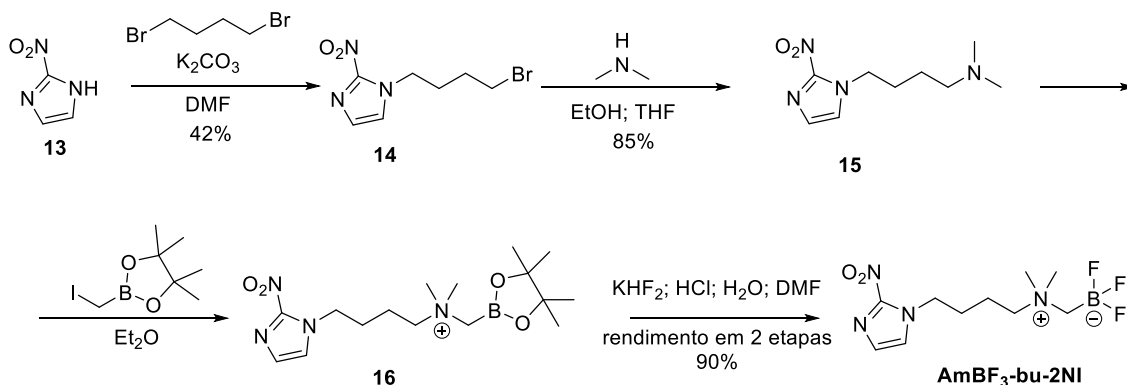
## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 4.1 Novo traçador $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI para estudos de biodistribuição e imagem por PET/CT e captação celular

### 4.1.1 Síntese do precursor AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI

A obtenção do radiotraçador derivado de 2-nitroimidazol contendo o grupo trifluorborato  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI, para o diagnóstico da hipóxia tumoral por PET, foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa do Dr. Kuo-Shyan Lin da BC Cancer Agency, University of British Columbia, Canadá, durante o estágio FAPESP-BEPE. O derivado 2-nitroimidazólico  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI foi sintetizado utilizando uma rota de quatro etapas descrita no **Esquema 1**.



**Esquema 1.** Etapas para a síntese de AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI.

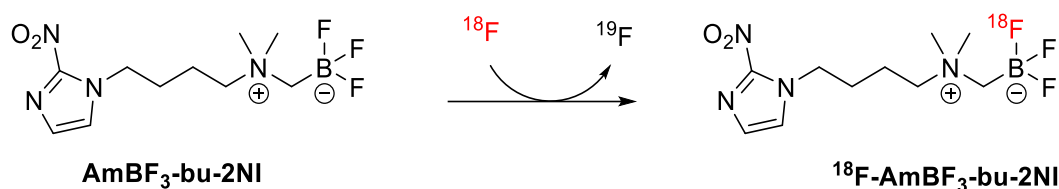
Inicialmente foi sintetizado o intermediário 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1*H*-imidazol (**14**) pelo tratamento de 2-nitroimidazol (**13**), comercialmente disponível, com 1,4-dibromobutano na presença de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em DMF, com 42% de rendimento (CHENG W, et al., 2014). A etapa sequencial de funcionalização com dimetilamina foi realizada a partir da reação de substituição empregando excesso de dimetilamina em uma mistura de etanol e THF, para obtenção do intermediário **15** com 85 % de rendimento. O tratamento de **15** com 2-(iodometil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano em éter etílico, levou a obtenção do sal de amônio quaternário **16**, o qual foi precipitado, isolado por filtração e utilizado na próxima etapa sem realização de purificação adicional.

A última etapa foi realizada empregando o método descrito por LIU e colaboradores (2015). O sal quaternário **16** foi tratado com KHF<sub>2</sub> e HCl em mistura de água e DMF e o produto foi obtido por purificação em CLAE,

empregando uma coluna semi-preparativa Phenomenex (Luna C18, 5  $\mu$ , 250x10 mm) com gradiente 2,5-20% H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN em 25 min. O derivado de 2-nitroimidazol desejado **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** foi obtido como um sólido branco em 54% de rendimento, em duas etapas com t<sub>R</sub> 20,8 min.

#### 4.1.2 Radiossíntese de <sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI

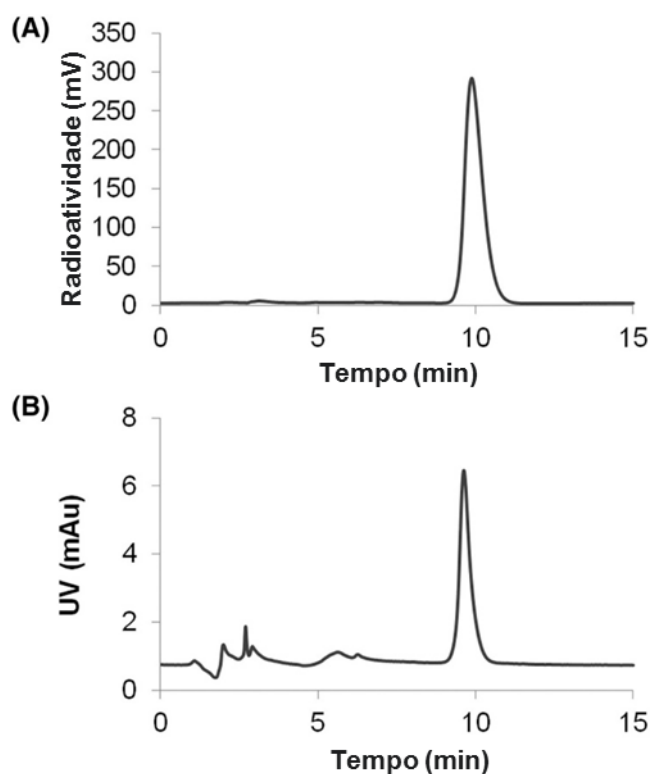
A radiossíntese do derivado de 2-nitromidazol <sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI foi avaliada com o uso das condições de reação de troca isotópica <sup>19</sup>F-<sup>18</sup>F descritas em trabalhos desenvolvidos pelo grupo do Dr. Kuo-Shyan Lin (LIU et al., 2015; LIU et al., 2014) com algumas adaptações (**Esquema 2**). Para essa reação o isótopo radioativo <sup>18</sup>F, obtido em água enriquecida com <sup>18</sup>O (H<sub>2</sub><sup>18</sup>O) após bombardeamento com prótons 18 MeV em ciclotron, foi retido em cartucho de troca aniônica ( $\mu$ -QMA). Logo após, foi realizada a eluição do <sup>18</sup>F com HCl 0,1 M para uma solução contendo 100 a 200 nmol do precursor **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** na presença de KHF<sub>2</sub> e DMF, submetida ao aquecimento de 80°C por 5 min e mantida sob vácuo por mais 15 min.



**Esquema 2.** Radiossíntese do análogo de <sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI pela reação de troca isotópica <sup>19</sup>F-<sup>18</sup>F.

No entanto, as tentativas iniciais com o uso de 100-200 nmol do precursor **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, como reportado nos trabalhos anteriores do grupo do Dr. Kuo-Shyan Lin, resultaram em rendimento radioquímico muito baixo. Afim de otimizar o rendimento da reação de troca isotópica, foi empregado 1000 nmol do precursor **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, o qual resultou na obtenção de <sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI com 14,8±0,4 % de rendimento radioquímico ( $n = 3$ ), após correção de decaimento, 24,5±5,2 GBq/ $\mu$ mol de atividade específica e >99% pureza radioquímica. A confirmação da obtenção do composto desejado foi obtida por

análise de CLAE após a realização da co-eluição com o padrão frio precursor, ou seja, **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** (não radioativo, **Esquema 1**) (**Figura 28**).



**Figura 18.** Cromatogramas de controle de qualidade (CQ) obtidos por co-injeção do padrão não radioativo **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** com o **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** (A) Detector de Radiação e (B) Detector UV.

#### 4.1.3 Avaliação do Coeficiente de Partição (LogP)

O Coeficiente de Partição (LogP) do derivado 2-nitroimidazol foi obtido pelo método de *shake-flask* empregando o derivado marcado **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**. Neste método uma alíquota do radiotraçador é solubilizada em uma solução de octanol:água na proporção 1:1, logo após a mistura é agitada para posterior obtenção da razão de distribuição do radiotraçador entre as fases octanol:água. Alíquotas de ambas as fases são avaliadas por contador de radiação gama e o valor do coeficiente é obtido por meio da equação:

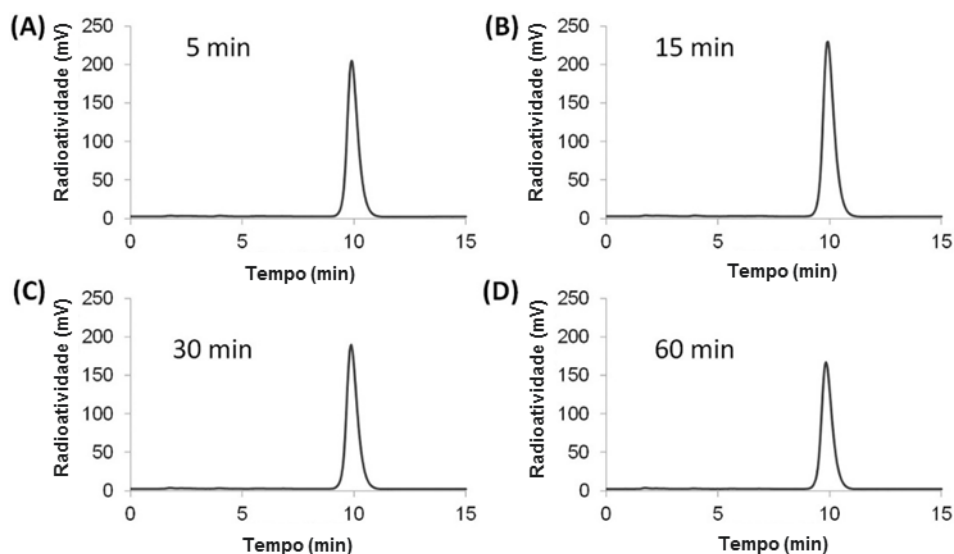
$$\text{LogP} = \text{Log} \left( \frac{\text{cpm da fase de octanol}}{\text{cpm da fase aquosa}} \right)$$



Após a avaliação do composto **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, foi obtido o valor de  $\text{Log } P = -1,52 \pm 0,02$  ( $n = 3$ ). A inclusão da unidade AmBF<sub>3</sub> promoveu o aumento da hidrofiliçidade, tornando este composto mais hidrofílico entre os derivados de 2-nitroimidazois descritos até o momento os quais apresentam valores de 0,40, 0,04, e -0,69, para FMISO, FAZA, e HX4 respectivamente (DUBOIS et al., 2011; ZHANG et al., 2016; GRUNBAUM et al., 1987).

#### 4.1.4 Avaliação da estabilidade em plasma

A avaliação da estabilidade de novos radiotraçadores, via ensaios de estabilidade em plasma *in vitro*, é comumente empregada para fornecer estimativas da estabilidade metabólica desses compostos *in vivo*. Para determinação da estabilidade plasmática do novo radiotraçador **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, foi realizada sua incubação a 37°C por períodos de 5, 15, 30 e 60 min em plasma de camundongo BALB/c, comercialmente disponível (Innovative Research). Após tratamento para remoção de proteínas, com a precipitação em CH<sub>3</sub>CN e filtragem, as amostras foram avaliadas por CLAE. Como demonstrado na **Figura 19**, nenhum metabólito significativo foi observado após o período de incubação de **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** por 1h. Estes dados estão de acordo com resultados obtidos em outros trabalhos que exploraram a marcação de moléculas com <sup>18</sup>F via reação de troca isotópica com a inclusão da unidade **AmBF<sub>3</sub>** (LIU et al., 2015; LAU et al., 2015; POURGHASIAN et al., 2015).



**Figura 19.** Cromatogramas de Radio-CLAE do  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  após ser incubado com plasma de camundongo a  $37^\circ\text{C}$  por (A) 5, (B) 15, (C) 30 e (D) 60 minutos.

#### 4.1.5 Estudos de imagem e biodistribuição *ex-vivo* por PET/CT

Para a determinação da captação do radiotraçador  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  foi empregado duas técnicas: biodistribuição *ex-vivo* e estudo de imagem. Devido o estudo de imagem ser relativamente novo em investigações com novos radiotraçadores conduzidos em animais, essas técnicas geralmente são realizadas paralelamente em caráter de comparação (KAGADIS et al., 2016).

Os estudos foram conduzidos em camundongos machos imunodeficientes NOD-*scid*/IL2Rgamma<sup>null</sup>, portando xenoenxertos de câncer de cólon humano HT-29 seguindo procedimentos reportados por ZHANG, et al., 2016, após 3 semanas após a inoculação do tumor

Os experimentos de imagem PET/CT foram realizados utilizando um aparelho microPET/CT. Para aquisição dos dados de imagem, os camundongos foram sedados e posicionados no microPET/CT após injeção do radiotraçador para aquisição de imagens estáticas e dinâmicas.

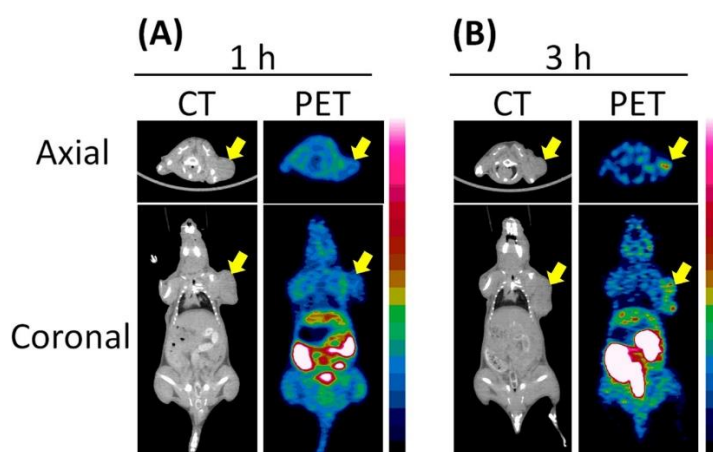
Para o estudo de biodistribuição *ex-vivo*, os animais foram injetados com ~ 3-4 MBq do  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$ . Após períodos de captação pré-determinados (1 e 3 h), os camundongos foram sacrificados e dessecados. O sangue e órgãos/tecidos de interesse foram coletados, pesados e a radioatividade emitida foi avaliada em um contador de radioatividade gama, e

expressa como porcentagem de atividade injetada por grama de tecido (% AI/g), empregando a equação descrita abaixo:

$$\%AI/g = \frac{cpm \text{ \acute{o}rg\~{a}o}}{\text{peso \acute{o}rg\~{a}o (g)} \times cpm \text{ padr\~{a}o}} \times 100$$

As imagens PET/CT foram obtidas com períodos de tempo de 1h e 3h após a injeção do radiotraçador. O período de captação de 3h foi escolhido afim de permitir a comparação direta dos dados obtidos deste novo radiotraçador com os dados de avaliação do [<sup>18</sup>F]FMISO, previamente reportados pelo grupo neste modelo tumoral (ZHANG, et al., 2016). Por outro lado, para investigar se tumores poderiam ser visualizados em um momento anterior a 3h, também foi realizado o estudo de imagem PET/CT 1 hora após a injeção, uma vez que este período de captação é geralmente explorado para a avaliação de traçadores com farmacocinética rápida.

Na **Figura 20** são mostradas imagens PET/CT adquiridas após 1 e 3 h da injeção do radiotraçador. Em 1 hora após injeção, pequena captação foi observada no músculo e coração, indicando rápido *clearance* do radiotraçador. Além disso, uma alta taxa captação foi observada em ambos sistemas renal e hepatobiliar incluindo fígado, rins, intestinos e bexiga urinária com maiores valores de porcentagem de atividade na bexiga urinária (>200 % AI/g). Porém, uma taxa muito pequena de captação pode ser observada no tumor, sem contraste, devido a captação tumoral ter apresentado valores inferiores aos tecidos circundantes.



**Figura 20.** Imagens estáticas representativas de <sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI em camundongo NOD-*scid* IL2Rgamma<sup>null</sup> portando xenoenxerto de câncer de colón humano HT-29 adquirido em (A), 1 hora e (B), 3 horas após injeção. As escalas da barra de cores são 0-2,0 %AI/g e 0-0,75 % AI/g para 1 e 3 horas após injeção, respectivamente. Xenoenxertos tumorais estão indicados por setas amarelas.

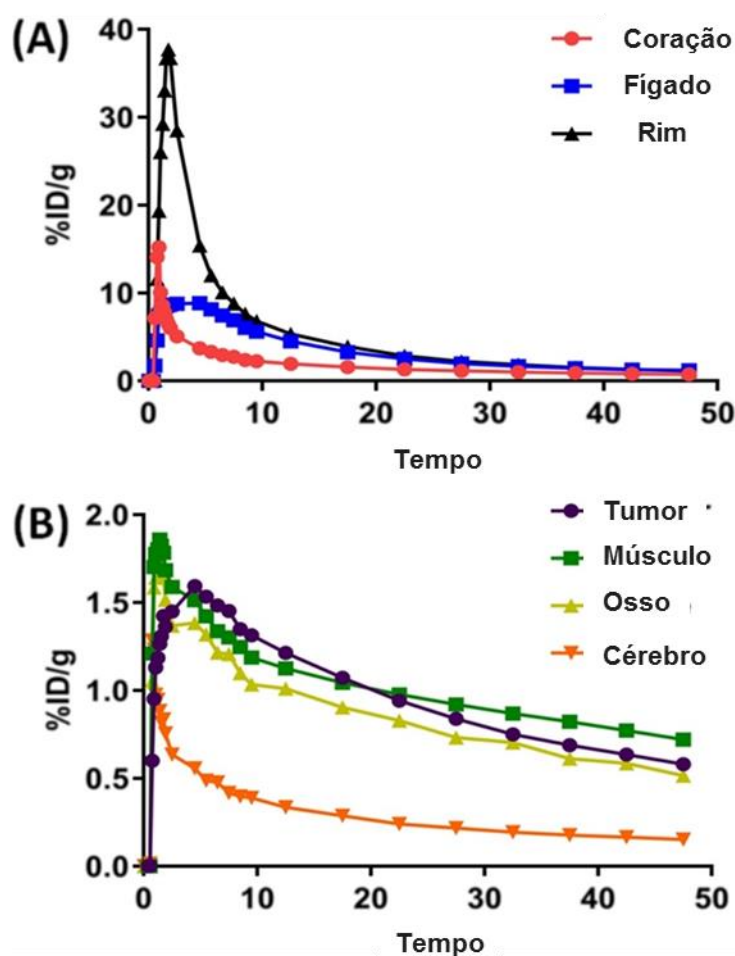
As imagens de PET mostraram que houve uma redução pronunciada de captação de 1 a 3 h após a injeção do radiotraçador, com a observação de um decréscimo na radiação de fundo, representada pela captação muscular, bem como da captação no fígado e rim. Os estudos de captação realizados após 3 h de injeção do radiotraçador, demonstraram um maior acúmulo do radiotraçador no intestino grosso e bexiga urinária. Apesar de ter ocorrido uma redução na captação após 1 a 3 h da injeção, decorridos 3 h foi possível a visualização do tumor por PET devido a uma ligeira melhora no contraste, provavelmente devido ao *clearance* dos tecidos próximos ao tumor (**Figura 20B**).

Com a realização de um estudo dinâmico por imagem de PET foram obtidas as curvas de atividade-tempo do  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  dos principais órgãos, ou seja, coração, fígado, rim, músculo, osso e cérebro, demonstradas na **Figura 21**, as quais indicaram um rápido *clearance* destes órgãos.

A captação no coração atingiu o pico no primeiro minuto a 15,2 % AI/g e caiu rapidamente para <1% AI/g em 1 hora após a injeção. A maior captação renal atingiu 37,7 % AI/g decorridos 3-4 min, e a captação do fígado atingiu o pico de 8,79 % AI/g após 2,5 min da injeção do radiotraçador (**Figura 21A**). A eliminação do radiotraçador de ambos os órgãos, rim e fígado, ocorreu rapidamente com a observação do decréscimo da captação do radiotraçador para aproximadamente 1 % AI/g no final do estudo dinâmico de imagem. Como mostrado na **Figura 21B**, os valores de captação no músculo, tumor e ossos foram muito semelhantes em todos os momentos do estudo dinâmico, atingindo valores de pico (1,44-1,85 % AI/g) nos primeiros min após a injeção e caindo para <1% AI/g ao final do estudo.

O tumor não foi observado no final da seção de imagem dinâmica devido a presença de um contraste insuficiente entre a radiação de fundo, provenientes do sangue e músculo, e do tumor. A redução contínua da absorção óssea ao longo do tempo após o pico em 1,25 min indicou que não houve desfluoração significativa de  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  *in vivo*. Os menores valores de captação foram observados no cérebro (**Figura 21B**) o que é consistente com a observação nas imagens PET estáticas (**Figura 20**) e

sugere que uma quantidade limitada de  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  cruzou a barreira hematoencefálica.



**Figura 21.** Curvas de atividade-tempo de  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  (A), coração, fígado e rim e (B), tumor, músculo, osso e cérebro.

Os dados de biodistribuição *ex-vivo* de  $^{18}\text{F-AmBF}_3\text{-bu-2NI}$  em 1 e 3 h pós-injeção em camundongos portando xenoenxerto tumoral HT-29 estão listados na **Tabela 2**. Para comparação, dados de biodistribuição reportados do  $[^{18}\text{F}]$ FMISO em 3 h após injeção obtidos do mesmo modelo tumoral são também fornecidos.

Consistente com as observações obtidas após a realização do estudo de imagens PET, realizados em aparelho microPET, foi observado baixos níveis de captação de fundo na maioria dos órgãos e tecidos, mesmo após 1 hora de injeção do radiotraçador. A avaliação da captação do radioisótopo após 1 hora de biodistribuição indicou valores de porcentagem de atividade menores que 1 % AI/g para maioria dos órgãos/tecidos, exceto rins ( $1,01 \pm 0,29$  % AI/g),

músculo ( $1,32 \pm 0,76$ ), intestino delgado ( $5,54 \pm 2,22$  % AI/g), e intestino grosso ( $3,57 \pm 1,50$  %AI/g). A captação pelo tumor foi de apenas de  $0,54 \pm 0,13$  % AI/g, resultando em baixas taxas de contraste de tumor-musculo e tumor-sangue ( $0,51 \pm 0,25$  e  $0,99 \pm 0,32$ , respectivamente). Valores muito baixos de captação do radiotraçador foram observados no cérebro  $0,03 \pm 0,01$  % AI/g.

**Tabela 2.** Dados de biodistribuição (média  $\pm$  SD % AI/g) de  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI em 1 e 3 h após injeção em NOD-*scid*/IL2Rgamma<sup>null</sup> camundongo portando xenoinxerto tumoral HT-29.

Tecido/Orgão	$^{18}\text{F}$ -AmBF <sub>3</sub> -bu-2NI		$^{18}\text{F}$ FMISO
	1 h (n = 5)	3 h (n = 6)	3 h (n = 6)
Sangue	$0,59 \pm 0,19$	$0,10 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,10$
Tecido Adiposo	$0,10 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,04$
Testículos	$0,12 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,01$	$0,47 \pm 0,15$
Estomago	$0,18 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,07$
Baço	$0,38 \pm 0,09$	$0,05 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,12$
Fígado	$0,87 \pm 0,16$	$0,37 \pm 0,08$	$1,47 \pm 0,43$
Pancreas	$0,61 \pm 0,19$	$0,09 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,14$
Adrenal	$0,16 \pm 0,06$	$0,04 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,13$
Rim	$1,01 \pm 0,29$	$0,28 \pm 0,10$	$1,16 \pm 0,40$
Pulmão	$0,47 \pm 0,12$	$0,14 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,21$
Coração	$0,55 \pm 0,12$	$0,25 \pm 0,07$	$0,54 \pm 0,15$
Tumor	$0,54 \pm 0,13$	$0,19 \pm 0,04$	$1,84 \pm 0,52$
Músculo	$1,32 \pm 0,76$	$0,20 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,14$
Ossos	$0,24 \pm 0,07$	$0,08 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,08$
Cérebro	$0,03 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,00$	$0,35 \pm 0,13$
Intestino delgado	$5,40 \pm 2,22$	$1,07 \pm 0,55$	N/D
Intestino grosso	$3,57 \pm 1,50$	$11,6 \pm 2,41$	N/D
Razão tumor-músculo	$0,51 \pm 0,25$	$0,92 \pm 0,08$	$4,52 \pm 1,36$
Razão tumor-sangue	$0,99 \pm 0,32$	$2,62 \pm 1,02$	$5,05 \pm 0,50$

Dados reportados de  $^{18}\text{F}$ FMISO no mesmo modelo tumoral são também listados para comparação (ZHANG et al., 2016). N/D: não disponível.

Os dados de biodistribuição de 3 h mostraram valores de captação de 2 a 8 vezes mais baixos na maioria dos órgãos/tecidos do que os tomados 1 hora após a injeção. A única exceção foi a captação no intestino grosso que aumentou de  $3,57 \pm 1,50$  para  $11,6 \pm 2,41$  % AI/g. Isto foi provavelmente devido aos movimentos peristálticos normais do intestino. Apesar da redução na captação do tumor às 3 h pós-injeção ( $0,19 \pm 0,04$  % AI/g), as razões de contraste tumor-músculo e tumor-sangue aumentaram para  $0,92 \pm 0,08$  e  $2,62 \pm 1,02$ , respectivamente, o que permitiu uma ligeira visualização do tumor às 3 h pós-injeção, apesar do contraste limitado.

Em comparação com dados de biodistribuição do [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO (**Tabela 2**), o  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI mostrou uma captação de 2 a 9 vezes menor na maioria dos órgãos/tecidos 3 h após a injeção. Isto confirmou que a incorporação da unidade AmBF<sub>3</sub> baseado em zwitterion hidrofílico poderia levar a um *clearance* mais rápido de  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI dos demais tecidos. No entanto, tal substituição também levou a uma redução significativa na lipofilicidade total (valor de Log P: [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO, 0,40;  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI, -1,52) (GRUNBAUM et al., 1987) e a incapacidade de  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI de atravessar livremente a barreira hematoencefálica (captação cerebral após 3 hrs pós-injeção: [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO,  $0,35 \pm 0,13$  % AI/g;  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI,  $0,01 \pm 0,00$  % AI/g). Esses valores mais baixos de Log P e de captação cerebral também poderiam explicar uma captação tumoral 10 vezes menor do  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI em comparação ao [ $^{18}\text{F}$ ]FMISO ( $0,19 \pm 0,04$  % AI/g vs  $1,84 \pm 0,52$  % AI/g), o que levou o radiotraçador  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI apresentar taxas inferiores de contraste entre o tumor e radiação de fundo, ou seja, sangue e músculo (**Tabela 2**). Assim, foi observado que a inclusão da unidade AMBF<sub>3</sub> e uma cadeia de 4 carbonos leva a formação de um composto com valor de Log P sub-ótimo o qual necessitaria de outros mecanismos para penetração em células tumorais sob hipóxia devido, possivelmente, o mesmo não ser capaz de se difundir livremente através da membrana celular e ser trapeado após redução por nitro-redutase intracelulares.

Para confirmar a incapacidade do radiotraçador  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI permear membranas, foi realizado um estudo de captação celular (YANG ET AL., 2017). As células HT-29 foram incubadas na presença de  $^{18}\text{F}$ -AmBF<sub>3</sub>-bu-

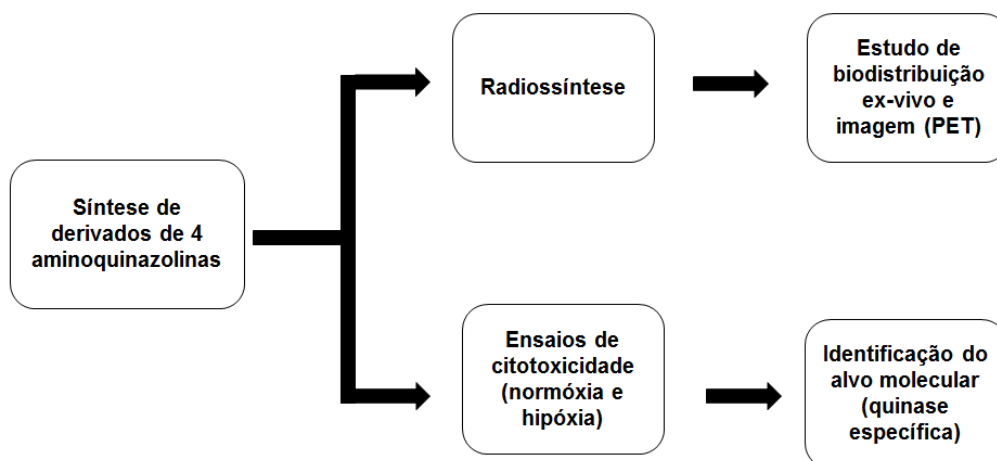
**2NI** por até 3 h. Em períodos pré-determinados, uma suspensão de células foi alíquotada, centrifugada e o sedimento celular, após lavagem com solução ácida para remoção da radioatividade ligada à membrana, foi contada. Para todos as alíquotas avaliadas em 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos, não foi encontrado nenhuma radioatividade detectável (<40 cpm, indistinguível da radioatividade de fundo) em amostras obtidas da lavagem ácida e sedimento celular. Isso confirma que não houve ligação de **<sup>18</sup>F-AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** à membrana celular ou difusão através da membrana celular.

#### **4.2 Síntese e avaliação de compostos quinazolínicos para diagnóstico e tratamento de tumores sob hipóxia por PET.**

As etapas para obtenção de compostos quinazolínicos com potencial para diagnóstico ou tratamento de tumores sob hipóxia, explorando derivados contendo flúor e unidades biorredutíveis ou triazólicas, respectivamente, são descritas nos tópicos a seguir.

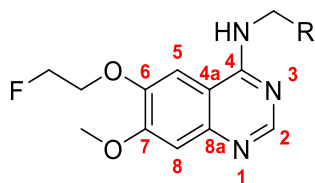
O trabalho foi planejado de acordo com o fluxograma demonstrado na **Figura 22**. Para o diagnóstico, derivados 4-aminoquinazolinicos, contendo <sup>19</sup>F (frio), e unidades biorredutíveis, foram obtidos e as etapas de radiosíntese, com inclusão do <sup>18</sup>F para estudos de biodistribuição e imagem por PET estão sob investigação. Por outro lado, a síntese de derivados 4-aminoquinazolínicos, contendo o anel triazólico, para possível aplicação no tratamento de tumores em hipóxia, foi explorada para seleção de compostos mais promissores via ensaios *in vitro* de citotoxicidade em células tumorais cultivadas sob condições de normóxia (20% de O<sub>2</sub>) e hipóxia (1% de O<sub>2</sub>) e identificação de alvos moleculares relacionados a quinases.





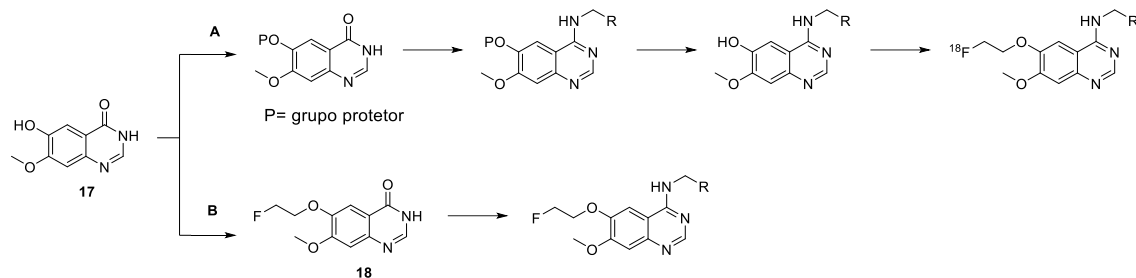
**Figura 22.** Etapas do trabalho.

Para a obtenção de derivados quinazolínicos com potencial no diagnóstico de tumores sob hipóxia foi planejado a síntese de derivados de 4-aminoquinazolinias contendo os substituintes fluoroetil e metoxi nas posições C-6 e C-7, respectivamente (**Figura 23**).



**Figura 23.** Estrutura geral dos derivados quinazolínicos planejados para o diagnóstico. R = grupos biorredutores.

Para facilitar a obtenção de derivados 4-aminoquinazolínicos bem como tornar possível a síntese de radiotraçadores, contendo o radionuclídeo  $^{18}\text{F}$ , foram desenvolvidas duas estratégias sintéticas distintas. Ambas estratégias foram inspiradas na rota para obtenção do fármaco Gefitinibe, envolvendo a síntese inicial de um intermediário de quinazolinona para posterior funcionalização com aminas em C-4 (Método A) (GIBSON, 1996). Neste caso, a rota sintética dos compostos frios, contendo o isótopo  $^{19}\text{F}$  (Método B), possuiria um menor número de etapas, devido não necessitar de reações de proteção/desproteção para inclusão do radionuclídeo nas etapas finais da sequência sintética (**Esquema 3**).

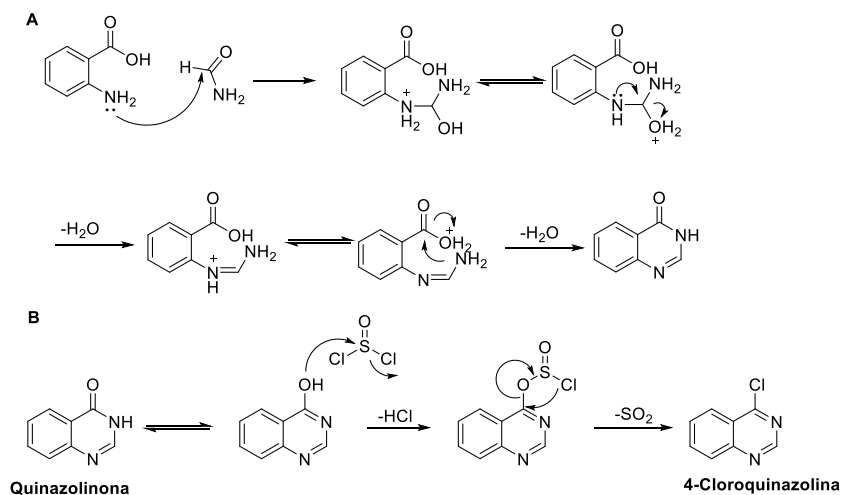


**Esquema 3.** Estratégias sintéticas realizadas. **A** – Estratégia sintética para a obtenção de radiotraçadores. **B** – Estratégia sintética para a obtenção de derivados 4-aminoquinazolínicos contendo flúor frio (<sup>19</sup>F).

Inicialmente, as sínteses relacionadas aos métodos A e B foram planejadas a partir do intermediário de quinazolinona **17**, o qual contém um grupo fenólico em C-6 para inclusão da unidade fluoretileno. Assim, os tópicos a seguir serão divididos em: *i*) síntese da quinazolinona **17**, intermediário empregado nas rotas sintéticas A e B (**Esquema 3**); *ii*) síntese de unidades biorredutíveis, potenciais para trapear os derivados quinazolínicos na célula sob hipóxia; *iii*) avaliação da estratégia A (**Esquema 3**), para síntese de derivados radiotraçadores; e *iv*) síntese de derivados 4-aminoquinazolínicos frios como padrões analíticos do correspondente radiotraçador, rota sintética B.

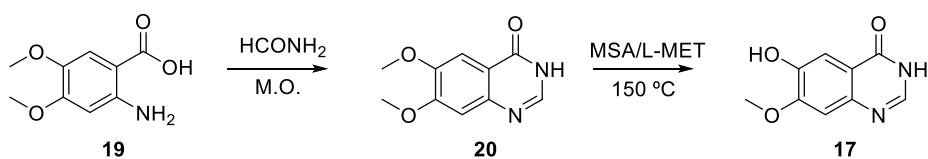
#### 4.2.1 Planejamento e síntese de quinazolininas e quinazolinonas

Quinazolininas são compostos heterocíclicos formados pela junção de um anel de pirimidina com um anel benzílico. Devido ao crescente interesse em derivados de 4-aminoquinazolininas, são descritos diversos métodos para síntese de compostos contendo este anel (CONNOLLY et al. 2005; KHAN et al., 2014; HAMEED et al., 2018). A síntese de 4-aminoquinazolininas a partir de 4-cloroquinazolininas é um dos métodos reportados mais utilizados, que consiste inicialmente na cloração de quinazolinonas geralmente sintetizadas por meio da reação de ciclocondensação de Niementowski utilizando derivados do ácido antranílico com formamidas (JIN, DAN e RAO, 2018) (**Esquema 4**).



**Esquema 4.** Método geralmente empregado para obtenção de quinazolinonas. **A** – Síntese do anel de quinazolinona. **B** - Exemplo de reação de cloração, empregando cloreto de tionila como reagente.

Para a obtenção do anel de quinazolinona **17** foi planejada a estratégia sintética demonstrada no **Esquema 5**.



**Esquema 5.** Estratégia sintética para a obtenção da quinazolinona **17**.

As tentativas iniciais de emprego de micro-ondas para a síntese do intermediário quinazolinona **20**, a partir do ácido antranílico **19**, foram conduzidas de acordo com o método descrito por Alexandre e colaboradores (2002), utilizando formamida como reagente e solvente (5 eq.) e irradiação de micro-ondas a  $150\text{ }^\circ\text{C}$  por 40 min. Apesar de Alexandre e colaboradores (2002) terem obtido um rendimento de 70% para o mesmo intermediário **20**, não havia indicação do método de purificação empregado, então diferentes métodos precisaram ser avaliados.

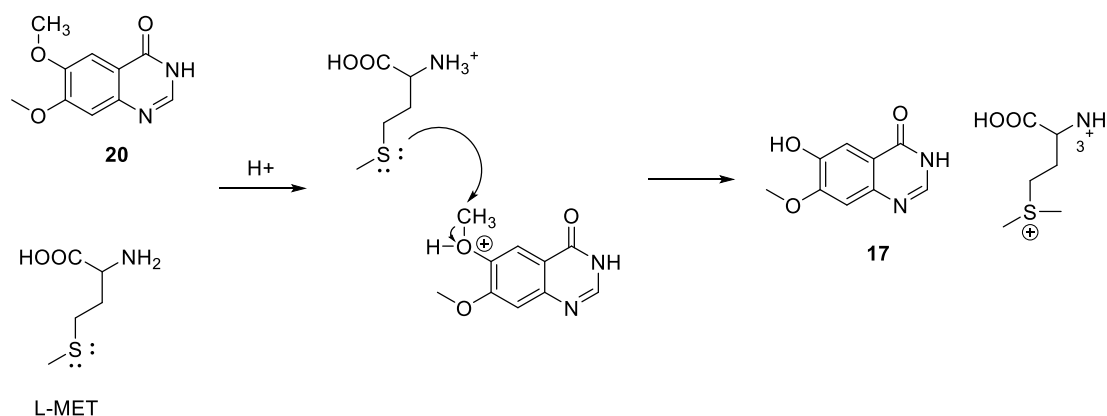
Os métodos de recristalização ou cristalização permitiram a formação de um sólido a partir do produto bruto, no entanto o tamanho reduzido dos cristais, impossibilitou a sua separação de forma eficiente, devido transporem o papel de filtro durante o processo de filtragem. A avaliação da centrifugação para

posterior remoção do sobrenadante acarretou problemas semelhantes por causa da ressuspensão do precipitado e presença de impurezas no produto obtido. Assim, o melhor método de purificação foi por cromatografia em gel de sílica flash, fase móvel AcOEt:MeOH (9,5:0,5), que resultou na obtenção do produto com 65 % de rendimento.

Embora os rendimentos do núcleo de quinazolinona **20** tenham sido interessantes e moderados ainda havia a necessidade da obtenção de maiores quantidades deste precursor, assim foi adquirida comercialmente disponível 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3*H*)-ona (**20**).

Dando continuidade a rota (**Esquema 5**), a reação de desmetilação seletiva da 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3*H*)-ona (**20**), para a obtenção do derivado fenólico **17**, foi realizada pelo tratamento com metionina (L-MET) em ácido metanossulfônico (MSA), empregando o método clássico descrito para síntese do fármaco Gefitinib® (GIBSON, 1996).

Nessa reação, a metionina atua como um aceptor do grupo metila em um mecanismo semelhante ao apresentado no **Esquema 6**, ou seja, pela protonação do oxigênio metoxílico pelo ácido, seguido do ataque do par de elétrons do enxofre ao grupo metila, o qual promove a clivagem da ligação carbono-oxigênio para estabilização da carga presente no oxigênio (IRIE et al., 1976).

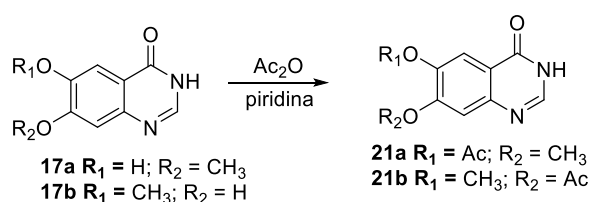


**Esquema 6.** Mecanismo proposto para de-O-metilação empregando MSA e L-MET.

Após a purificação da mistura reacional foi constatado que não houve remoção seletiva da metila na posição 6, como descrito na literatura. Na verdade, apesar do rendimento quantitativo, houve formação de uma mistura

de regioisômeros na proporção 1:0,3 da quinazolinona desejada **17** mesmo após tentativas de modificação das condições reacionais. O uso de condições reacionais alternativas para a desmetilação seletiva é discutida por Kumar e colaboradores (2014), o qual utilizou o cloreto de lítio sob aquecimento convencional (BERNARD et al., 1989), tioanisol e ácido tríflico (KISO et al., 1979) e tricloreto de boro em DCM a  $-20^{\circ}\text{C}$  (NAGAOKA et al., 1981), mas não se obteve a desmetilação seletiva esperada. O uso de cloreto de lítio e irradiação por micro-ondas foi também realizado, porém também não se obteve sucesso (FANG et al., 2007).

As dificuldades de isolamento do regioisômero desejado **17a** conduziu a realização da etapa seguinte de proteção da hidroxila fenólica, pelo tratamento com piridina em anidrido acético (**Esquema 7**). Assim, a mistura de regioisômeros **17** (hidroxilas livres nas posições 6 e 7) foi submetida a essas condições para posterior purificação. No entanto, a utilização desta estratégia também não foi eficaz para separação dos dois isômeros devido aos fatores de retenção ( $R_f$ ) muito próximos.

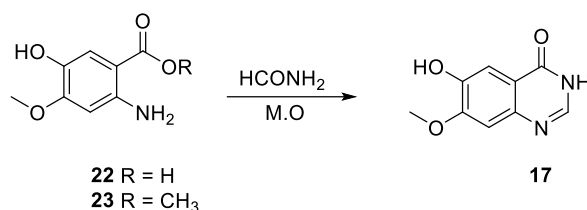


**Esquema 7.** Reação de proteção da hidroxila fenólica, pelo tratamento com piridina em anidrido acético.

As dificuldades enfrentadas para a desmetilação específica da posição C-6, conduziram a reformulação da rota sintética descrita no tópico a seguir.

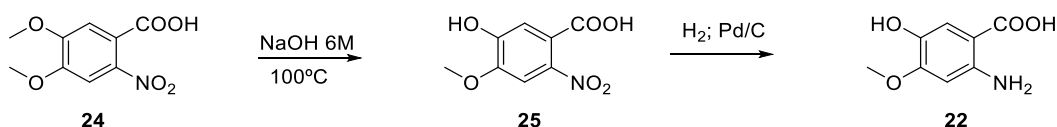
#### 4.2.1.1 Nova rota para síntese do núcleo de quinazolinona **17**

A nova rota sintética para obtenção do núcleo de quinazolinona foi planejada tendo como base o emprego de derivados do ácido antranílico já contendo a hidroxila livre em C-6, compostos **22** ou **23** (**Esquema 8**) para a obtenção do intermediário **17**, desejado. Dessa forma, evitou-se a necessidade da desmetilação específica da quinazolinona **4**.

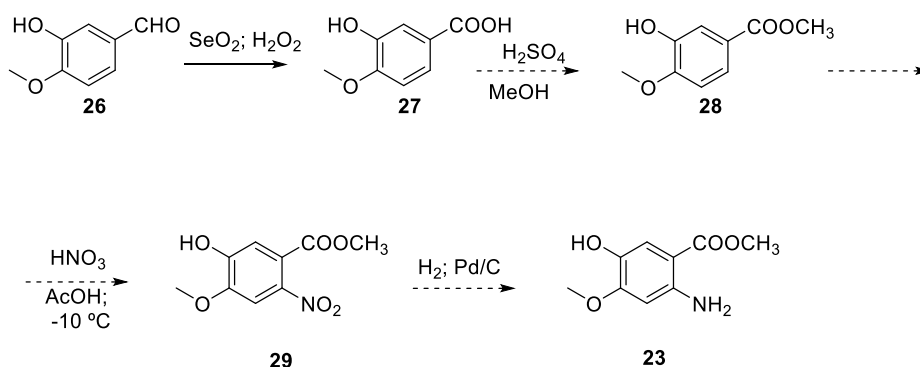


**Esquema 8.** Nova abordagem para a obtenção do intermediário 1.

A obtenção do derivado de ácido antranílico (**22** ou **23**) foi proposta por meio de duas rotas sintéticas diferentes (**Esquemas 9** e **10**), planejadas de acordo com a disponibilidade de precursores no laboratório e métodos descritos na literatura (HELAL et al., 2011; CARDWELL e ROBINSON, 1915; JOSHI, DESAI e PELLETIER, 1986). A primeira proposta (**Esquema 9**), estratégia 1, emprega o ácido 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzóico (**24**) como precursor envolvendo duas etapas, sendo uma delas a desmetilação regioseletiva para a obtenção da hidroxila fenólica (**Esquema 9**). Por outro lado, a segunda proposta é iniciada a partir da isovanilina (**26**), a qual já contém a hidroxila fenólica, porém possui um número maior de etapas (**Esquema 10**).



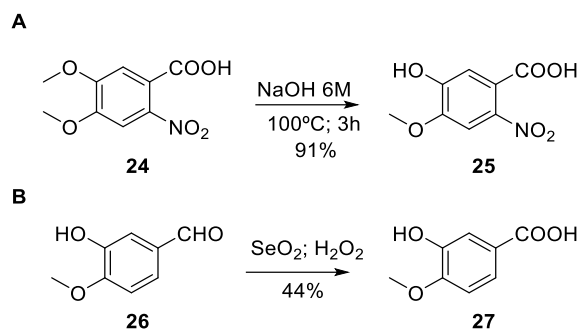
**Esquema 9.** Rota sintética para a obtenção do derivado ácido antranílico **22**.



**Esquema 10.** Rota sintética para a obtenção do derivado ácido antranílico **23**.

As etapas iniciais das reações de desmetilação do ácido 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzóico (**24**) (**Esquema 11A**), estratégia 1, e oxidação do aldeído da

isovanilina (**26**) (SHINKARUK et al., 2008) (**Esquema 11B**), estratégia 2, foram realizadas paralelamente e conduziram a formação dos produtos esperados **25** e **27** em 91% e 44% de rendimentos, respectivamente.

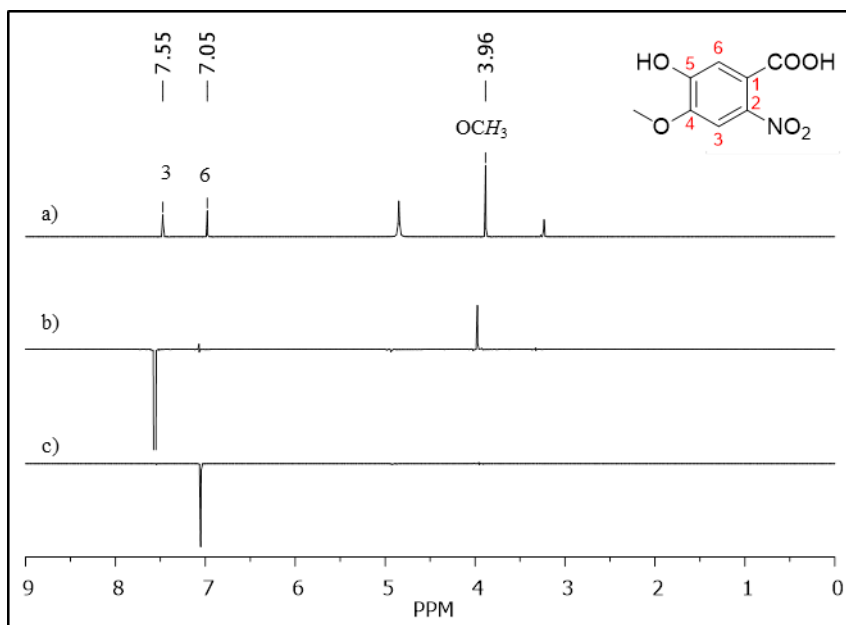


**Esquema 11.** Primeira etapa para a obtenção dos derivados do ácido antranílico. **A** - Estratégia 1, **B** - Estratégia 2.

Portanto, a estratégia 1 (**Esquema 9**) foi priorizada para a obtenção do derivado ácido antranílico desejado **22** tendo em vista suas vantagens como a realização de menor número de etapas, uso de precursores de menor custo e em maior rendimento.

Embora a remoção do grupo metila do ácido 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzóico (**24**) tenha sido evidenciada por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e HRMS-ESI, a confirmação da regioseletividade da desmetilação da metoxila em C-5 só foi possível após experimento de NOE-diff (do inglês: *Nuclear Overhauser Effect Difference Spectroscopy*). Nesse experimento, os hidrogênios que estão espacialmente próximos ao irradiado sofrem aumento da intensidade do sinal pelo efeito *Overhauser* podendo ser identificados e analisados após subtração de espectros, no qual o hidrogênio irradiado é apresentado na fase inversa em relação ao hidrogênio que sofre NOE.

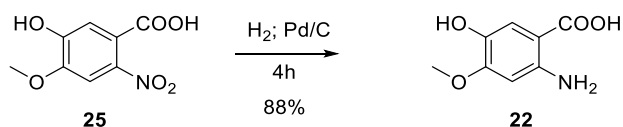
Desta forma, foram irradiados os hidrogênios H-3, *orto* ao grupo nitro, presente em 7,55 ppm, e em seguida o hidrogênio H-6, *orto* ao grupo carboxila, em 7,05 ppm do produto **25**, para observação de quais hidrogênios encontravam-se espacialmente próximos ao grupo metoxila em 3,96 ppm, presente na molécula (**Figura 24**). A presença de NOE entre H-3 e a metoxila (**Figura 24b**), bem como a ausência de NOE com H-6 (**Figura 24c**), indicou que houve a remoção seletiva da metila localizada na posição C-5.



**Figura 24.** NOE-Diff realizado para o composto **25**: (a) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) como referência; (b) irradiação em H-3; (c) irradiação em H-6.

Segundo Cardwell e Robinson (1915) a remoção seletiva da metila em C-5, localizada *para* ao grupo nitro de **24**, ocorre devido ao efeito retirador de elétrons do grupo nitro, o qual enfraquece a ligação Ar-OMe tornando-a mais susceptível ao ataque de nucleófilos ( $\text{OH}^-$ ), em um mecanismo semelhante a  $\text{S}_{\text{N}}2\text{Ar}$ .

Dando continuidade à síntese do derivado do ácido antranílico, o intermediário fenólico **25**, foi submetido a uma reação de hidrogenação catalítica empregando  $\text{H}_2$  e Pd/C 10%, sob atmosfera de 50 psi, para redução do grupo nitro a amina e obtenção do derivado ácido antranílico **6** com 88 % de rendimento (**Esquema 12**). O produto foi confirmado por análises de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , e HRMS-ESI (WEBER et al., 2005).

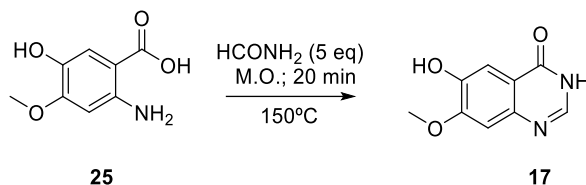


**Esquema 12.** Redução do grupo nitro (WEBER et al., 2005).

A reação de ciclização do intermediário **6**, para obtenção da quinazolinona **1**, foi avaliada inicialmente com a irradiação por micro-ondas a  $150^\circ\text{C}$  por 20 min (300W), empregando formamida como solvente e catálise

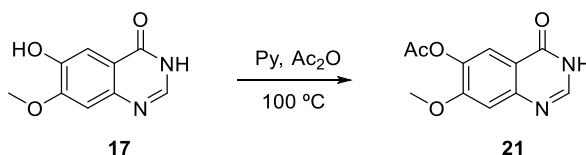


com AcOH (LI et al., 2007). A obtenção do produto **17** em baixo rendimento (21%) conduziu a modificações do método, como a diminuição da potência de irradiação para 60W. Assim, esta variação permitiu que o produto fosse obtido adequadamente com 74% de rendimento (**Esquema 13**), em uma escala reacional de 28 mg.



**Esquema 13.** Proposta inicial para a obtenção da quinazolinona **17**.

Após a obtenção da quinazolinona **17** foi realizada a proteção da hidroxila fenólica, em C-6, em escala reduzida de 12 mg, pelo tratamento com piridina e anidrido acético sob aquecimento de 100 °C (**Esquema 14**), a fim de avaliar o emprego deste intermediário para a radiosíntese dos derivados quinazolínicos (CHANDREGOWDA; KUSH; CHANDRASEKARA, 2009). O composto acetilado **21** foi obtido com 60 % de rendimento, após purificação e caracterização por análises de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HRMS-ESI.

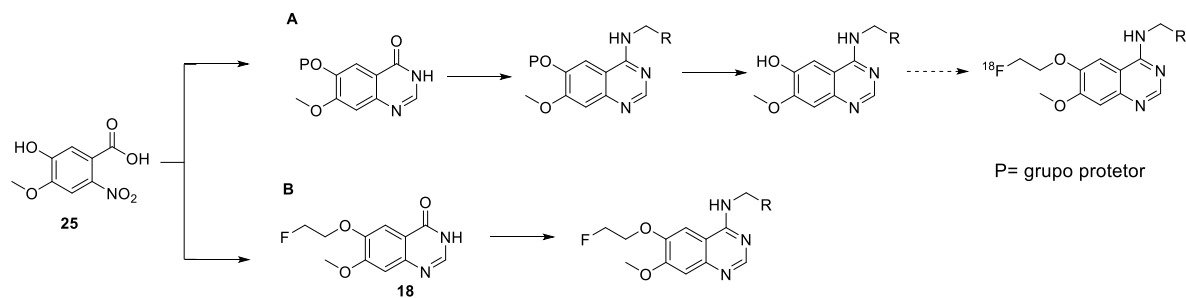


**Esquema 14.** Reação de proteção do grupo hidroxila em C-6 com acetil da quinazolinona **17**.

A reação de proteção da quinazolinona **17**, permitiu a obtenção da quinazolinona contendo o grupo acetil em C-6 **21** com rendimento aceitável, mas o escalonamento da reação, para a obtenção da quinazolinona **17** acarretou em considerável redução no rendimento, o qual pode estar relacionado a instabilidade da hidroxila fenólica às condições da reação de ciclização.

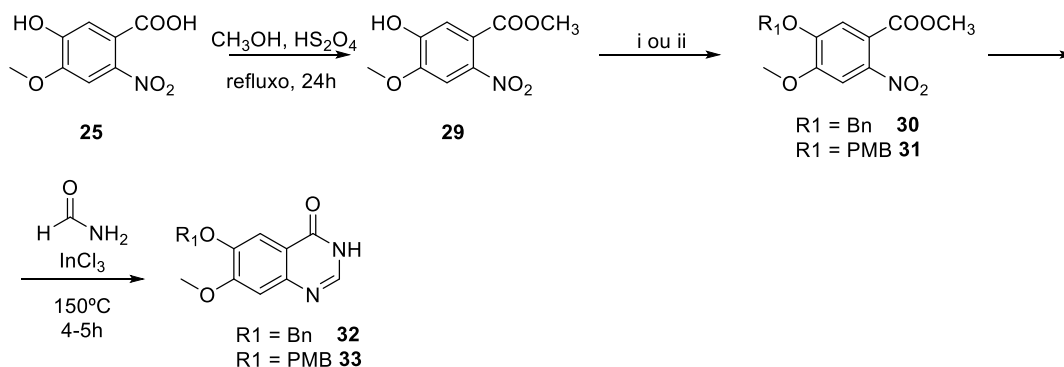
Desta forma, foi abandonada a proposta inicial de síntese do bloco de quinazolinona **17** para as estratégias sintéticas A (estratégia sintética para a obtenção de radiotraçadores) e B (estratégia sintética para a obtenção de derivados 4-aminoquinazolínicos contendo flúor frio ( $^{19}\text{F}$ )) (**Esquema 4**).

Em contrapartida, uma nova abordagem foi planejada com a proteção da hidroxila fenólica do intermediário **25**, anteriormente a reação de ciclização para síntese da quinazolinona **17**. Para a rota sintética A, ou seja, para síntese de radiotraçadores, foi proposta a proteção com grupos benzil ou *p*-metoxibenzil (PMB) e para a rota sintética B, contendo o flúor frio, foi avaliado a inclusão do grupo fluoretileno (**Esquema 15**). As quais serão discutidas separadamente a seguir.



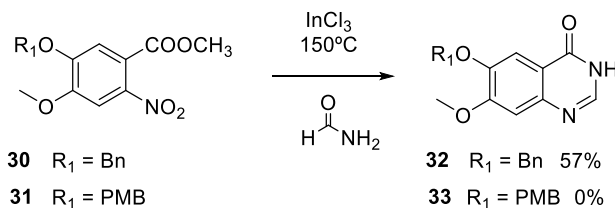
**Esquema 15.** Novo planejamento para síntese de derivados quinazolínicos. **A** – Estratégia sintética para a obtenção de radiotraçadores. **B** – Estratégia sintética para a obtenção de derivados 4-aminoquinazolínicos contendo flúor frio (<sup>19</sup>F).

A obtenção das quinazolinonas da rota A, foi proposta de acordo com a estratégia sintética descrita no **Esquema 16**, com inicial síntese dos respectivos nitroderivados **14** e **15**, seguida de uma etapa de ciclização redutiva. Além de evitar a etapa de ciclização com um intermediário fenólico, realizada na estratégia anterior, essa abordagem permite a obtenção das quinazolinonas desejadas sem o acréscimo de etapas sintéticas.



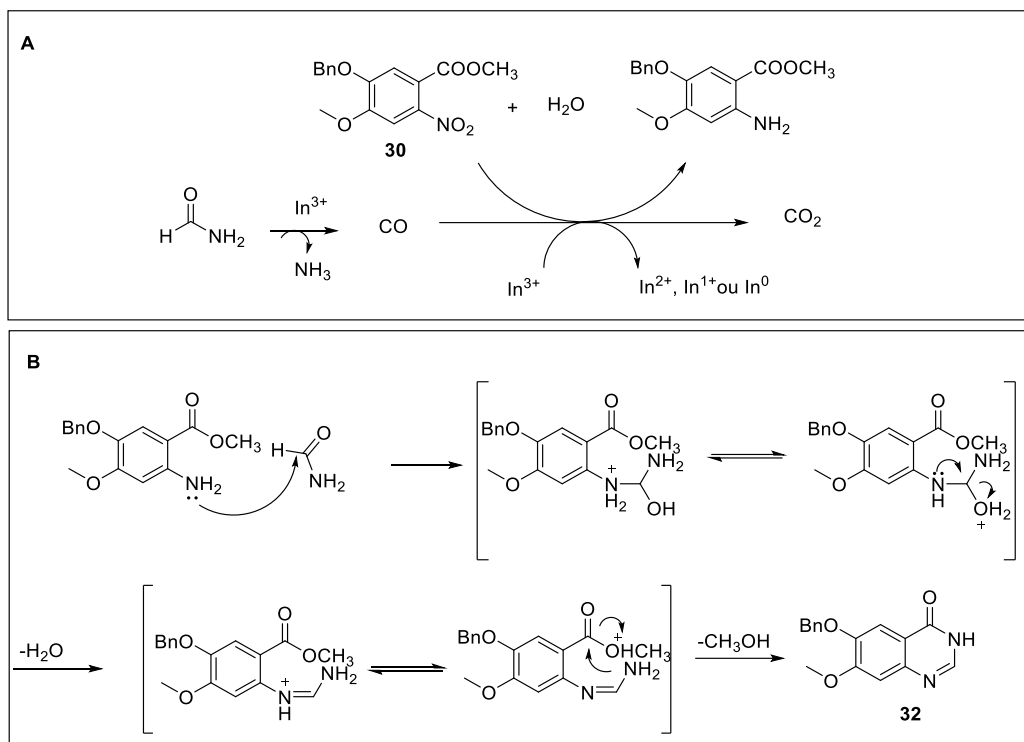
**Esquema 16.** Estratégia para a obtenção das quinazolinonas **32** e **33**. i) BnBr, DMF, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 84%, ii) PMBCl, DMF, KI, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 90°C, 78%.

Ambas as etapas de formação do éster **29** e subsequente proteção com benzil ou PMB permitiram a preparação dos intermediários **30** e **31** em alto rendimento. A reação de ciclização reductiva, na presença de cloreto de índio, no entanto, levou à formação da quinazolinona **32**, quando empregado o material de partida benzilado **30** e a formação de subprodutos não desejados quando empregado o intermediário **31**, contendo o grupo PMB (**Esquema 17**). Assim a síntese foi seguida a partir do intermediário **32**.



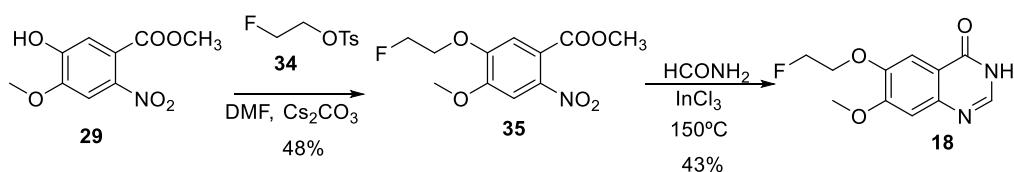
**Esquema 17.** Etapas de avaliação da reação ciclização reductiva empregando cloreto de índio (InCl<sub>3</sub>).

Kundu e colaboradores (2008) sugerem que a reação de ciclização reductiva com cloreto de índio ocorre pela redução do grupo nitro seguido de ciclocondensação de Niementowski, em um mecanismo semelhante ao proposto no **Esquema 18**. Nesse processo, ocorre inicialmente a degradação da formamida catalisada pelo In<sup>3+</sup>, com a liberação de monóxido de carbono (CO) e amônia. Em seguida, o grupo nitro do precursor **30** é reduzido à amina catalisado por CO (**Esquema 18A**). A amina formada realiza um ataque a formamida, presente em excesso na reação e, em seguida, ocorre a ciclocondensação de Niementowski (**Esquema 18B**).



**Esquema 18.** Mecanismo proposto da reação de ciclização redutiva na presença de cloreto de índio. Adaptada de Kundu e colaboradores (2008).

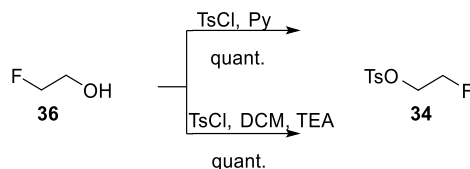
A obtenção da quinazolinona **18**, contendo flúor frio, necessária para a rota B (**Esquema 15**), foi proposta de acordo com as etapas demonstradas no **Esquema 19**, empregando reações semelhantes as utilizadas na síntese da quinazolinona **17**.



**Esquema 19.** Estratégia sintética para a obtenção das 4-aminoquinazolinonas, contendo flúor frio.

Para a realização da primeira etapa da síntese da quinazolinona **18** foi inicialmente sintetizado o 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**18**). Na literatura são disponíveis diversos métodos para síntese de **18** (KNISS et al., 2015). Assim sua obtenção foi avaliada por dois métodos (**Esquema 20**): *i*) tratamento do 2-fluoretanol (**36**), comercialmente disponível, com cloreto de tosilato utilizando piridina como solvente (BERNARD-GAUTHIER et al., 2015) e *ii*)

tratamento do 2-fluoretanol (**36**) com Et<sub>3</sub>N e cloreto de tosila em DCM. Ambos os métodos resultaram na obtenção quantitativa do produto **34**, no entanto devido a facilidade do *workup* o segundo método foi escolhido.

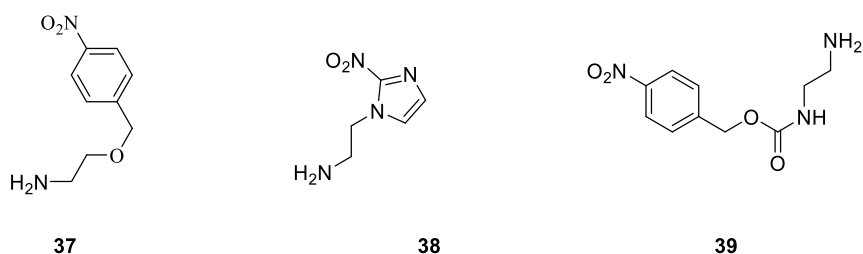


**Esquema 20.** Métodos empregados para a obtenção 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**18**).

A funcionalização do intermediário **29** com o grupo etilenoflúor, foi realizada pelo seu tratamento com carbonato de céσιο (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34**) em DMF por 24 h o qual resultou na sua obtenção do intermediário éter **35** com 48% de rendimento. O aquecimento da reação a 70°C, foi avaliado como alternativa para aumentar o rendimento desta etapa, porém houve apenas a formação de impurezas, sem acréscimo no rendimento total. Na sequência, a ciclização redutiva do intermediário **35**, na presença de InCl<sub>3</sub> para conversão à quinazolinona **18**, ocorreu após 5 h de reação, sendo o produto **18** obtido com 43% de rendimento (**Esquema 17**).

#### 4.2.2 Síntese de unidades biorredutíveis

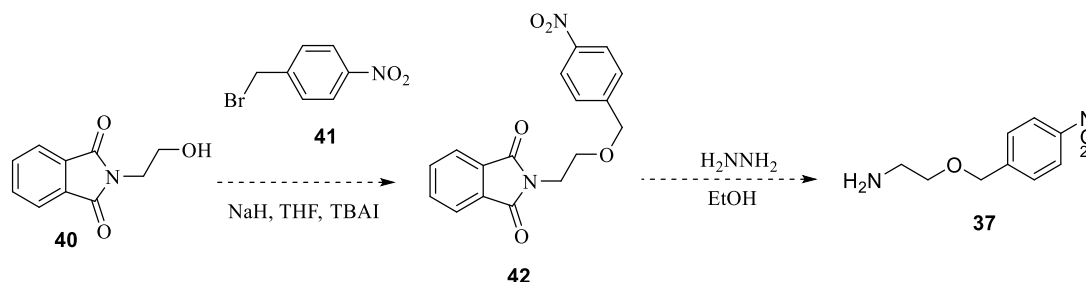
As unidades biorredutíveis sintetizadas para posterior inclusão no anel de quinazolina foram as: 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**); 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il) etanamina (**38**); e 4-nitrobenzil 2-aminoetilcarbamato (**39**) (**Figura 25**), empregando diferentes rotas sintéticas.



**Figura 25.** Unidades biorredutíveis obtidas.

A síntese da 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**) foi proposta via formação da função éter entre o álcool *N*-(2-hidroxietil)fitalimida (**38**) e o

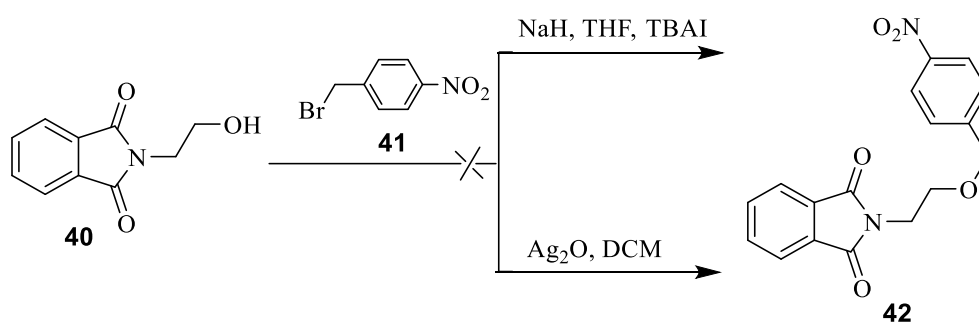
brometo de 4-nitrobenzila (**39**), disponíveis comercialmente, e sequencial remoção do grupo protetor ftalimida, empregando o método descrito por CAZARES-KORNER e colaboradores (2013) (**Esquema 21**).



**Esquema 21.** Estratégia de síntese da da unidade biorredutível 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**).

As tentativas de síntese do éter **42**, empregando o protocolo descrito, ou seja, NaH, TBAI em THF (**Esquema 20**), resultaram apenas na obtenção de produtos indesejados, mesmo após modificações do tempo reacional e alterações tanto na ordem de adição quanto na proporção dos reagentes.

A fim de evitar a formação de subprodutos oriundos de possível degradação dos precursores **40** e **41**, foi empregado uma condição mais branda com o uso de  $\text{Ag}_2\text{O}$  em DCM (PITTS, HARRISON e MOODY, 2001), porém não houve formação do produto **42**, mesmo após prolongamento do tempo reacional (**Esquema 22**).

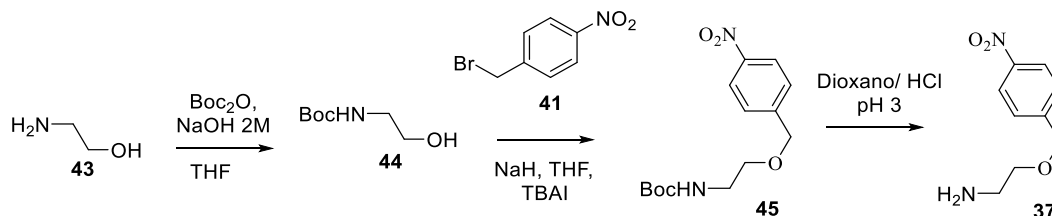


**Esquema 22.** Proposta de síntese do intermediário **42**.

Uma vez que não foi possível a síntese do éter **42** a partir dos precursores **40** e **41**, a estratégia para síntese da unidade biorredutível **37** foi reformulada tendo como base a substituição do grupo protetor presente na amina de ftalimida para NHBoc (**Esquema 23**). O emprego desse grupo protetor não apenas torna possível a realização de reações em condições básicas, tais como as empregadas inicialmente, quanto permite o

acompanhamento da formação do produto por CCD empregando solução de ninidrina como revelador.

Desse modo, a síntese do composto **37**, foi proposta de acordo com o **Esquema 23**.

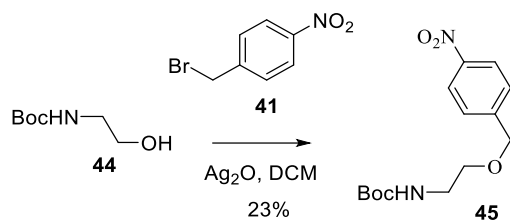


**Esquema 23.** Nova proposta sintética para a obtenção do 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**).

A etapa inicial correspondeu a proteção do grupo amina de 2-aminoetanol (**37**) com di-*tert*-butil dicarbonato em NaOH 2 mol.L<sup>-1</sup> e THF, para a obtenção do intermediário **44** (GHILARDI et al., 2013). O produto **44** foi obtido como um óleo transparente com 70% de rendimento e caracterizado por análise de HRMS-ESI, a qual demonstrou o pico referente ao íon [M+Na]<sup>+</sup> de 184,0944 (calculado para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 184,0950), e análise de RMN de <sup>1</sup>H que indicaram a presença de um singlete em 1,45 ppm com integral 9, referente aos hidrogênios metílicos do grupo *tert*-butil e um par de duplos dupletos em 3,70 ppm, 3,29 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilênicos.

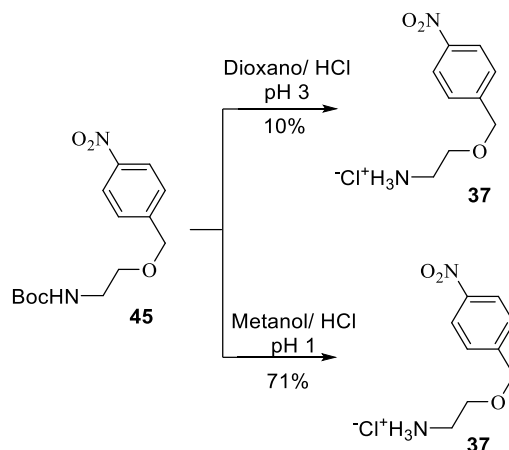
A obtenção do éter **45** foi realizada mediante o tratamento de **44** com NaH e TBAI, seguida da adição de brometo de 4-nitrobenzila (**41**). O composto **45** foi isolado com 23% de rendimento e caracterizado por RMN de <sup>1</sup>H o qual indicou a presença dos sinais de hidrogênio aromáticos com padrão de substituição *para* em 8,21 e 7,50 ppm, bem como um singlete referente ao grupo *tert*-butil em 1,45 ppm, com integrais de 2, 2 e 9, respectivamente.

A otimização da formação da porção biorredutora empregando os precursores **44** e o haleto **41**, sob condições mais brandas com o uso de Ag<sub>2</sub>O em DCM (PITTS, HARRISON e MOODY, 2001) (**Esquema 24**) resultou na obtenção do produto desejado com rendimento semelhante ao obtido empregando NaH em THF, ou seja, de 23%. Embora o rendimento dessa etapa tenha sido relativamente baixo foi semelhante aos reportados na literatura (CAZARES-KORNER et al., 2013).



**Esquema 24.** Síntese do éter nitro-aromático **45**.

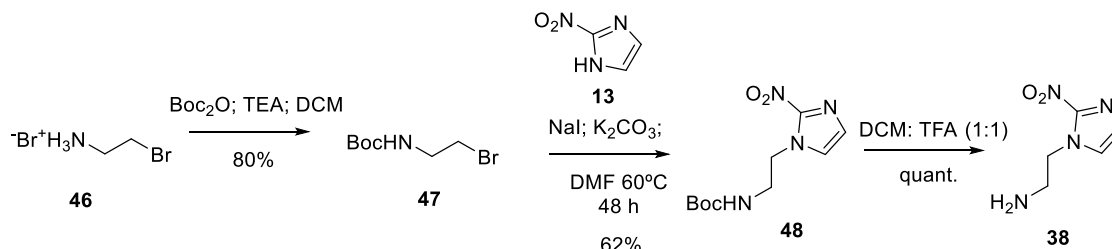
A desproteção do intermediário **45** para a obtenção de 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**) foi inicialmente realizada na presença de solução HCl em dioxano, produzida pelo borbulhamento de HCl gasoso em dioxano até pH 1 (**Esquema 25**). Após 16 h de reação, foi verificado a formação de precipitado branco e consumo total do material de partida por CCD. No entanto a purificação empregando extração ácido-base permitiu a obtenção do produto com apenas 10 % de rendimento. Afim de otimizar a etapa de desproteção, foi avaliada a obtenção do cloridrato do composto **37**, ao invés de sua base livre (HUGHES et al., 2005). Esse processo facilitou a purificação e aumentou a estabilidade desta unidade biorredutível **37**. Assim, a solução de dioxano/HCl foi substituída por metanol/HCl em pH = 1 e após o consumo total do material de partida em 1 h, a mistura reacional foi concentrada e purificada por meio da lavagem com Hexano:AcOEt (1:1). Esta alteração permitiu a obtenção do produto **37** com 71% de rendimento (**Esquema 25**), confirmado por experimentos de RMN de  $^1\text{H}$ , a qual indicou a presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos em 8,24 ppm e 7,51 ppm, hidrogênios metilênicos do grupo etilenoamina em 4,64 ppm e 3,57 – 3,49 ppm, e ausência dos hidrogênios referente ao grupo *terc*-butil em 1,45 ppm.



**Esquema 25.** Desproteção do intermediário (**45**)



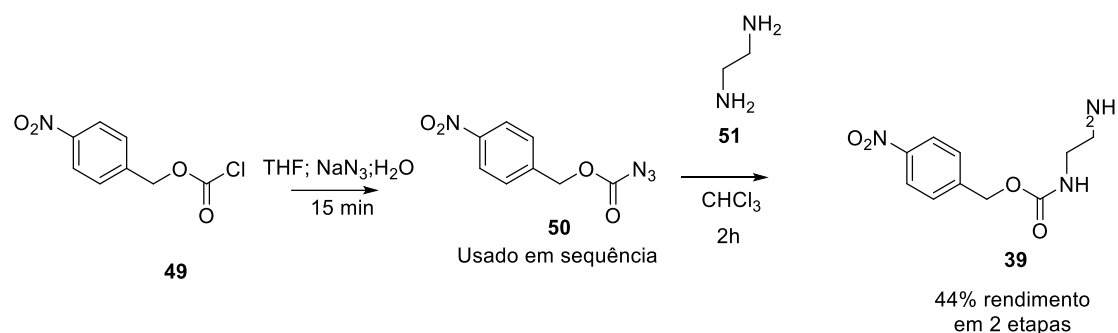
A obtenção da unidade biorredutível de 2-nitroimidazol **38** foi realizada empregando a estratégia descrita por Zha e colaboradores (2011) e Luescher e colaboradores (2014) demonstrada no **Esquema 26**.



**Esquema 26.** Rota sintética para a obtenção de **38**.

Inicialmente foi realizada a proteção da amina do brometo de 2-bromoetanolamina (**46**) pelo tratamento com  $\text{Boc}_2\text{O}$  para a obtenção do intermediário **47**, com 80% de rendimento. Na sequência, o intermediário **31** foi tratado com 2-nitroimidazol (**13**) na presença de iodeto de sódio e carbonato de potássio em condições anidras a  $60^\circ\text{C}$  por 48h para a obtenção do intermediário **33**, com 62% de rendimento. Finalmente, o composto **48** foi tratado com DCM e TFA para remoção do grupo protetor e obtenção do sal de TFA da unidade biorredutível **38** de forma quantitativa (ZHA et al., 2011; LUESCHER, VO e BODE, 2014).

A unidade biorredutível **39** foi sintetizada de acordo com o método descrito por HUANG e colaboradores (2014) (**Esquema 27**). O 4-Nitrobenzil cloroformiato (**49**), disponível comercialmente, foi convertido ao derivado azidoformiado **50**, o qual foi tratado com etano-1,2-diamina (**51**), e mantido por aproximadamente 2 h para a obtenção de **39** com 44% de rendimento. Essa abordagem permitiu a obtenção do composto **39** de forma rápida e sem a necessidade de métodos cromatográficos de purificação.

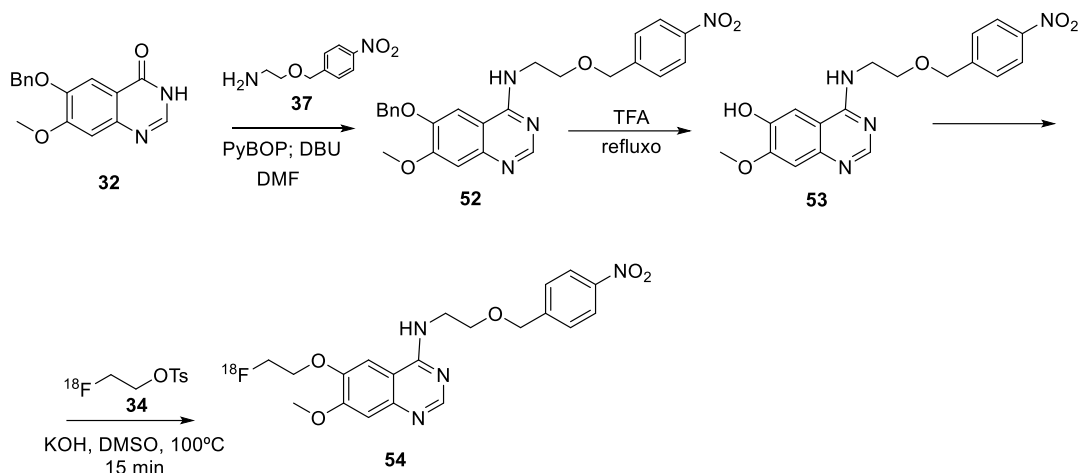


**Esquema 27.** Rota sintética empregada para a síntese da unidade biorredutível **39**.

#### 4.2.3 Síntese de quinazolinas - Avaliação da Rota A de obtenção do composto marcado com $^{18}\text{F}$

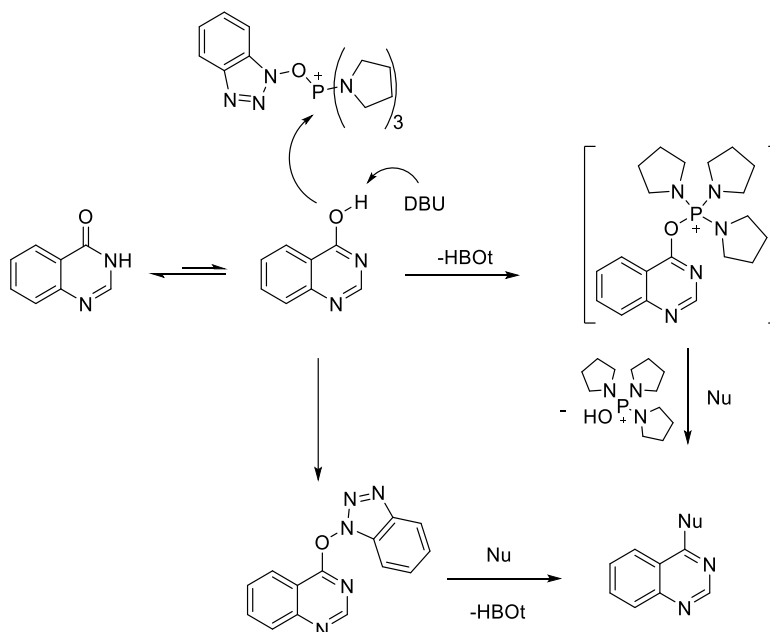
A síntese de 4-aminoquinazolinas a partir de quinazolinonas, geralmente ocorre com a inicial conversão da quinazolinona em 4-cloroquinazolina para posterior funcionalização com aminas. Devido a fatores como relatos da instabilidade do intermediário 4-cloroquinazolina (KUMAR et al., 2014) e o aumento do número de etapas de síntese os quais comprometeriam o rendimento global de síntese avaliamos uma nova abordagem descrita por WAN e colaboradores (2006), que é amplamente empregada para a obtenção de derivados de amidas e uréias heterocíclicas (SLOBBE et al., 2014; BAE e LAKSHMAN, 2007; ASHTON e SCAMMELLS, 2008; LOCKMAN et al., 2012; WAN et al., 2007).

Além de diminuir o número de etapas para a obtenção de 4-aminoquinazolinas essa abordagem corresponde a um método mais brando que a estratégia geralmente empregada de cloração, para posterior substituição por aminas. Como demonstrado no **Esquema 28**, para a obtenção das 4-aminoquinazolinas, o intermediário **32**, poderia ser tratado com PyBOP, DBU e a unidade biorredutora, com a obtenção do derivado desejado, representado pelo composto **52**.



**Esquema 28.** Estratégia sintética otimizada para a síntese obtenção de 4-aminoquinazolinonas, exemplificando a síntese do derivado **54** com a unidade biorredutível 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina e o grupo <sup>18</sup>F-etílico.

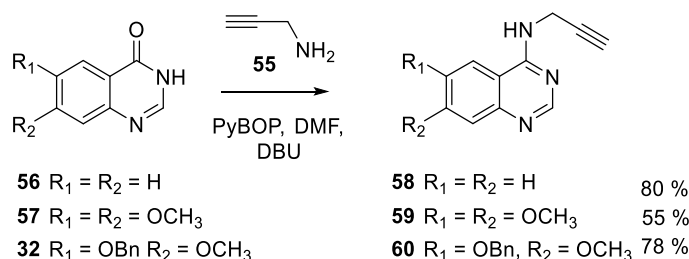
O método descrito por WAN e colaboradores (2006) explora o equilíbrio tautomérico de amidas cíclicas como a quinazolinona **32** por um mecanismo de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio, por exemplo BOP, PyBOP, etc, de acordo com o **Esquema 29**.



**Esquema 29.** Mecanismo de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio (WAN et al., 2006).

Para avaliação da reação de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio, foi empregada, inicialmente, a propargilamina (**55**) como nucleófilo.

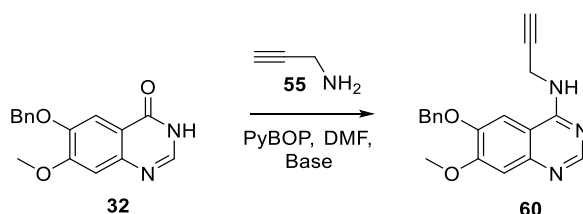
Os anéis de quinazolinonas comerciais **56** e **57**, bem como o intermediário **32** foram explorados empregando PyBOP e DBU, como reagente de acoplamento e base, respectivamente (**Esquema 30**). Todas as reações avaliadas resultaram na obtenção de derivados 4-aminoquinazolina, compostos **58**, **59** e **60**, com bons rendimentos (**Esquema 30**).



**Esquema 30.** Avaliação da reação de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio.

O método permitiu a obtenção de 4-aminoquinazolinonas, mas foi observado por análises de RMN de <sup>1</sup>H da fração isolada do composto **60** que também havia presença de impurezas, com sinais na região de 0,5 a 3,5 ppm, não detectadas em análises por CCD, mesmo após a variação da fase móvel e emprego de diferentes reveladores, como: iodo, ninidrina e etanol/ácido sulfúrico 5%.

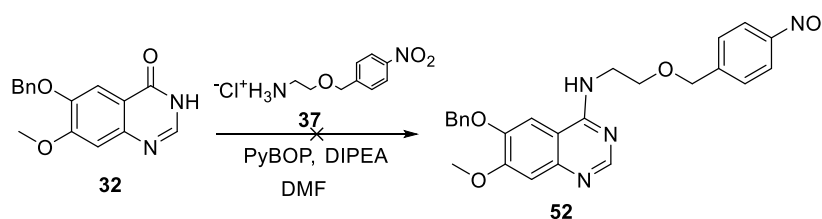
Devido a versatilidade dessa reação demonstrada por Wan e colaboradores (2006), a qual permite a mudança da base empregada, bem como o reagente de acoplamento, observada em diversos trabalhos que empregam esse método (BAE e LAKSHMAN, 2007; ASHTON e SCAMMELLS, 2008; LOCKMAN et al., 2012; WAN et al., 2007), novas condições reacionais foram avaliadas. Assim, para obtenção de 4-aminoquinazolinona puras sem necessidade de purificação por CLAE (**Esquema 31**) foi avaliada a substituição da base empregada na reação por Et<sub>3</sub>N, DIPEA, ou Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para a síntese do produto **60**.



**Esquema 31.** Avaliação de diferentes bases para obtenção do intermediário modelo **45**.

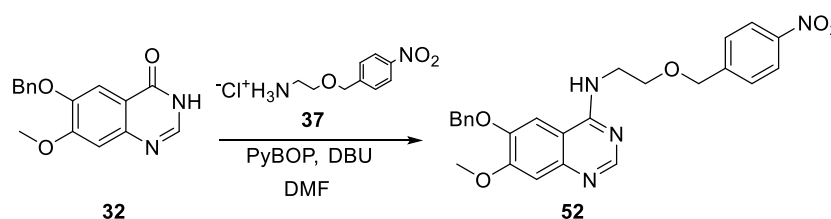
Entre as bases avaliadas foi observado que apenas DIPEA permitiu a conversão total do intermediário **32** no produto desejado **60**, após 24 h de reação. A purificação por cromatografia em coluna de sílica gel flash com fase móvel AcOEt:MeOH (9,5:0,5) forneceu o produto com 72% de rendimento, semelhante ao obtido anteriormente, mas sem presença de contaminantes.

Apesar do uso de DIPEA como base ter possibilitado a obtenção do produto **60** em pureza aceitável, a tentativa de funcionalização da quinazolinona **32** com a unidade biorredutível **37**, empregando essas condições, não permitiu a síntese do intermediário **52** (**Esquema 32**).



**Esquema 32.** Emprego da DIPEA como base para a obtenção de **52**.

Assim, optou-se pelo uso do DBU novamente e após tentativa de purificação, por cromatografia em coluna de sílica gel flash e fase móvel gradiente de AcOEt:MeOH (**Esquema 33**), foi obtido uma fração contendo a 4-aminoquinazolinona **52**. Após análises de RMN de  $^1\text{H}$  dessa fração foi observado o mesmo padrão de impureza encontrado anteriormente. Assim, para a confirmação e caracterização do composto **52**, essa fração foi repurificada por CLAE.



**Esquema 33.** Emprego da reação de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio para a obtenção do intermediário **52**.

Para a purificação de **52**, foi inicialmente utilizado a coluna analítica de fase reversa, fase móvel  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  0,02% (TFA), com fluxo de 1 mL/min. Após algumas tentativas, o gradiente linear de 10-40%  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  0,02%

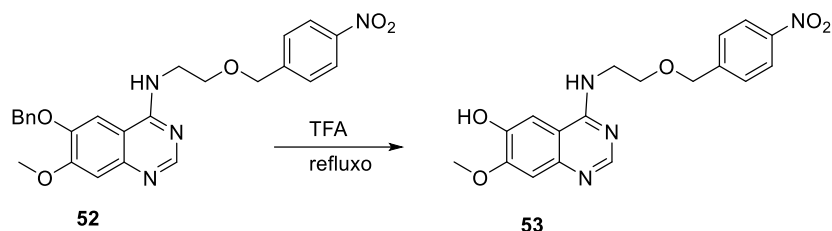
(TFA) foi o mais apropriado para isolamento do produto puro. Assim, a purificação do composto foi realizada em coluna semi-preparativa de fase reversa, com fluxo de 4,7 mL/min, com  $t_R$  de 28,5 min (216 nm) e forneceu **52** com 10% de rendimento.

As análises de HRMS-ESI, e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  confirmaram a obtenção e pureza do produto **52**, com o pico do íon molecular da  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  de 461,1817. Os sinais de RMN  $^1\text{H}$  em 5,25 ppm e 4,66 ppm com integral relativa 2, referentes aos hidrogênios metilênicos presentes no grupo benzil da unidade de quinazolina e o grupo *p*-nitrobenzil da unidade biorredutível, respectivamente, e RMN de  $^{13}\text{C}$  em 72,4 ppm e 72,7 ppm referentes aos carbonos das mesmas unidades da molécula, evidenciaram a formação do produto.

Com o objetivo de facilitar a purificação das 4-aminoquinazolininas, tais como a **52**, e obter os compostos desejados, foi avaliada a remoção do DBU remanescente da fração obtida após purificação em CCC pela sua lavagem com água. Essa abordagem permitiu a remoção de considerável quantidade de impurezas, observadas após análise de RMN de  $^1\text{H}$ .

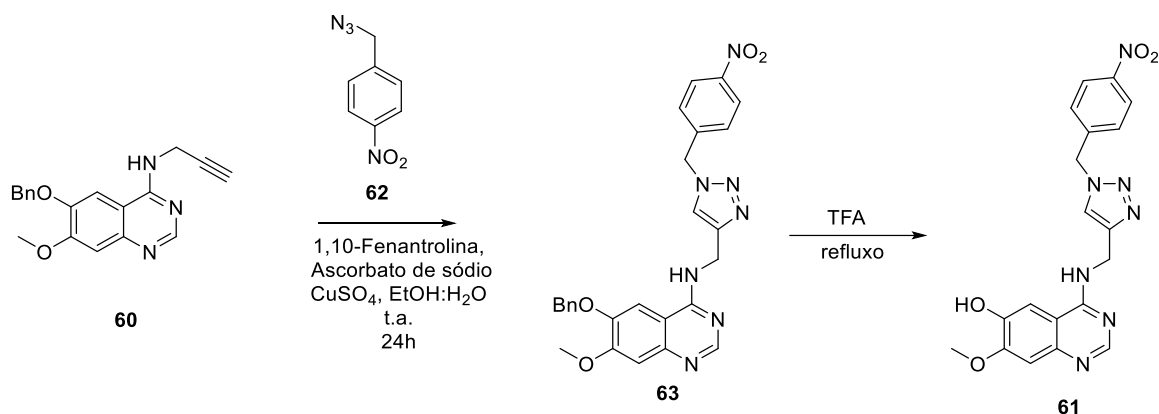
Ambas as amostras do composto **52**, obtida por CCC com DBU remanescente, purificado por CLAE e obtida após lavagem com água foram avaliadas frente à reação de desbenzilação do grupo OBn em C-6, para averiguar a necessidade da purificação imediata desse intermediário e permitir a síntese do produto mesmo na presença de pequenas impurezas (**Esquema 34**).

Desta forma, para síntese do composto **53** para posterior marcação com o grupo  $^{18}\text{F}$ -etilico, foi realizado o tratamento do intermediário **52** com ácido trifluoroacético (TFA) sob refluxo, **Esquema 34**. A desproteção da hidroxila fenólica foi confirmada por análises de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , que indicaram a ausência dos hidrogênios metilênicos e aromáticos anteriormente presentes em 5,21 e 7,27 a 7,44 do grupo benzil do precursor **52**; empregando tanto o precursor **52**, contendo impurezas residuais, quanto o precursor purificado por CLAE, indicando a possibilidade de purificação por CLAE nesta etapa, o composto **53** foi obtido com 41 % de rendimento.



**Esquema 34.** Etapas finais para obtenção do produto desejado **53** para posterior marcação com o grupo  $^{18}\text{F}$ -etílico.

A obtenção do composto modelo **60**, usado para a padronização da reação de substituição aromática ativada por fosfônio, abriu a possibilidade de obtenção do precursor **61**, para posterior estudo de inclusão de unidade contendo o radionuclídeo  $^{18}\text{F}$ , em C-6. Assim, foi realizada a estratégia sintética demonstrada no **Esquema 35**.



**Esquema 35.** Rota sintética para radiossíntese de derivados 4-aminoquinazolinicos contendo o anel triazólico.

Esse novo precursor foi facilmente obtido com o uso da reação de CuAAC, empregando o derivado alcino **60**, e o azido **62**, obtido de forma quantitativa após tratar cloreto de *p*-nitrobenzila, com azida de sódio (ROHILLA et al., 2016), seguido da desproteção do grupo OBn com TFA sob refluxo.

Para a realização da reação de CuAAC foi escolhido o método descrito por CRUZ-GONZALES e colaboradores (2014) que emprega sulfato de cobre, ascorbato de sódio e 1,10-fenantrolina a temperatura ambiente. Neste caso, a fenantrolina é complexada ao cobre durante a redução do sulfato de cobre a Cu(I) pelo ascorbato de sódio, evitando a possível complexação do cobre com aminas presentes na quinazolina **60**, que promoveria a diminuição da eficiência da reação. A 4-Aminoquinazolina **63** foi obtida com rendimento quantitativo.

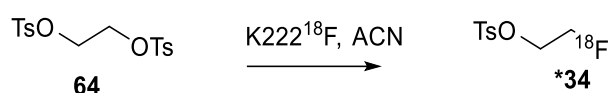
Após isolamento, o produto foi submetido a análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  as quais confirmaram a obtenção do produto com os sinais de hidrogênio e carbono da posição 5 do anel 1,2,3-triazólico 1-4 dissustituído em 8,07 e 123,8 ppm, respectivamente.

A desbenzilação com o emprego de TFA sobre refluxo permitiu a obtenção do composto **61** com 55 % de rendimento, após purificação por cromatografia em sílica gel de fase reversa C-18 (HENNEQUIN et al., 1999; SCHWAN et al., 2014; RICE e MARKBY, 2012; HIMMELSBACH et al., 2000).

#### 4.2.3.1 Preparação de 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34**)

A síntese desta unidade de 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***), foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa do jovem pesquisador Emerson Soares Bernardes e a doutoranda Martha Sahylí Ortega Pijeira no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

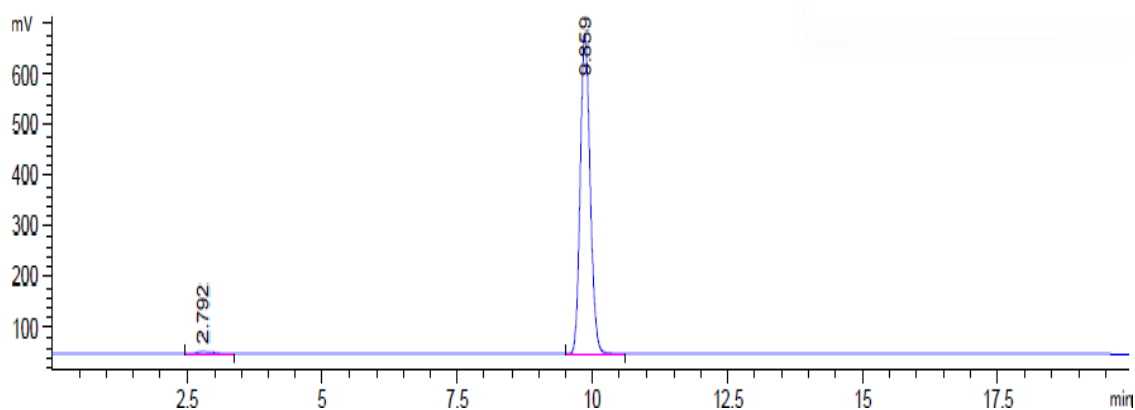
Para a radiosíntese do 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***) foi empregado métodos descritos por Schirmacher e colaboradores (2002) e Schoultz e colaboradores (2013), com adaptações, utilizando  $^{18}\text{F}$  obtido após bombardeamento de água enriquecida ( $\text{H}_2\text{O}^{18}$ ) em ciclotron, usando etilenoglicol 1,2-ditosilado (**64**) como precursor (**Esquema 36**).



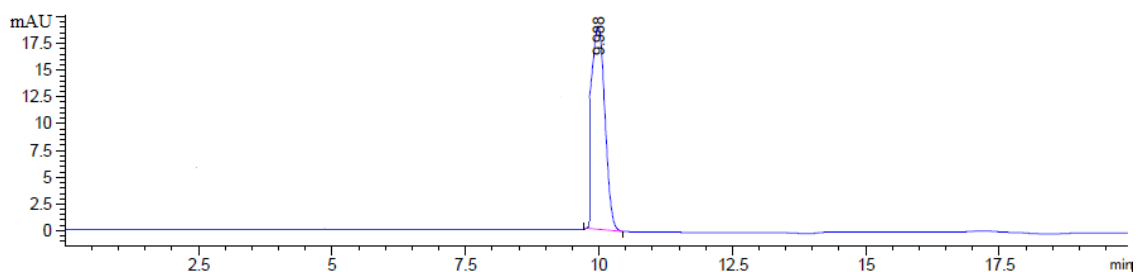
**Esquema 36.** Síntese do 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***)

A obtenção do composto 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***) foi confirmada após análise de CLAE (**Figura 26A**) e comparação com o tempo de retenção do padrão, 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato frio (**34**), (**Figura 26B**) empregando coluna analítica de fase reversa C-18 (4,6 mm x 250 mm (5  $\mu\text{m}$ ) ZORBAX Eclipse Plus), fase móvel  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (45:55 %) 0,1 % TFA, com fluxo de 1 mL/min. O composto marcado **34\*** foi obtido com 15-26 % (n=10) de rendimento e pureza radioquímica > 99%.





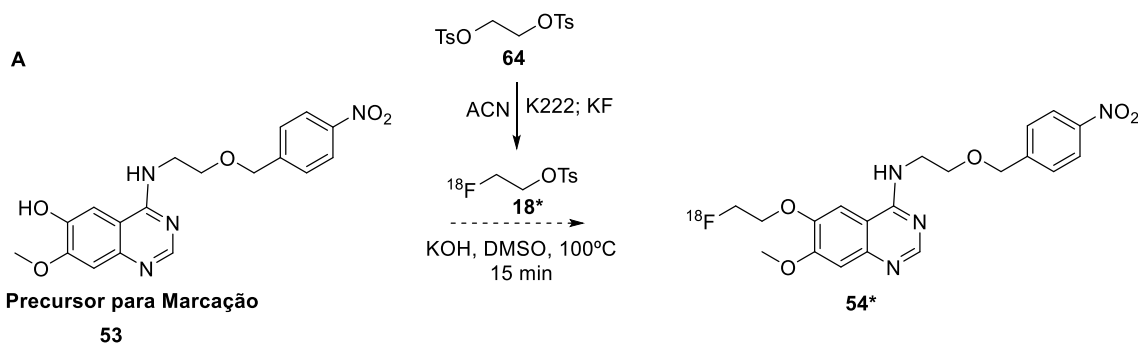
**Figura 26A.** Análise por CLAE do composto marcado 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***) ( $t_{\text{R}} = 9,859$  min). Perfil correspondente ao detector de radioatividade.



**Figura 26B.** Análise por CLAE do composto padrão 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34**) ( $t_{\text{R}} = 9,988$  min). Perfil correspondente ao detector UV 256 nm.

Embora tenha sido possível a obtenção do 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***), durante a sua síntese houve a formação de subprodutos voláteis contendo o radionuclídeo  $^{18}\text{F}$ , não identificado, possivelmente relacionado a degradação e formação de alceno, HF ou derivado dissustituído (KNISS et al., 2015). Desta forma, adaptações no método de síntese do 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato, com a utilização de *HotCell* ou mesmo modificações da estratégia de inclusão desta unidade no anel de quinazolina afim de evitar a formação de subprodutos dessa natureza estão sendo avaliadas (KNISS et al., 2015). A otimização das condições de radiosíntese desta unidade está sendo realizada pelo grupo de pesquisa do jovem pesquisador Emerson Soares Bernardes e a doutoranda Martha Sahylí Ortega Pijeira, no IPEN.

É importante destacar também que, apesar da estratégia de radiossíntese descrita no **Esquema 37** ter apresentado desafios devido a problemas na radiossíntese da unidade de 2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***), a obtenção do composto **54**, e/ou de um dos derivados mais promissores poderá ser realizada por diferentes abordagens, a partir de métodos descritos na literatura para a inclusão desta unidade (KNISS et al., 2015).

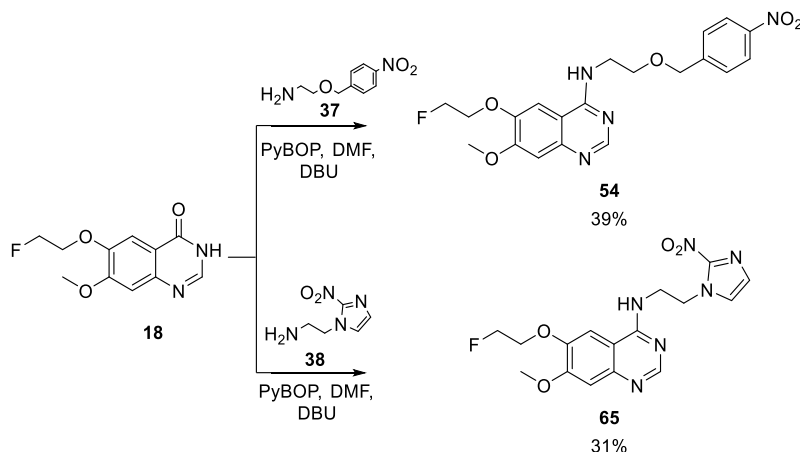


**Esquema 37.** Etapa final necessária para a obtenção de 4-aminoquinazolinonas desejadas.

#### 4.2.4 Síntese de derivados 4-aminoquinazolinônicos frios

Os compostos 4-aminoquinazolinônicos **54** e **65** (**Esquema 38**) foram obtidos a partir da quinazolinona **18**, anteriormente preparada,, via reação de substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio, pelo tratamento da quinazolinona **18** com DBU, PyBOP e cloridrato de 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**) ou 2-(2-nitro-1*H*-imidazol-1-il) etanoamina (**38**) em DMF, respectivamente, aplicando o mesmo método estabelecido na síntese do intermediário **52**, utilizado para marcação com  $^{18}\text{F}$  (**Esquema 33**). Apesar de anteriormente ter sido realizada a preparação de uma terceira unidade biorredutível **39** (**Esquema 27**), decidimos não realizar a sua condensação com a quinazolinona **18**, neste momento, para aguardar inicial padronização das etapas de radiossíntese. Os produtos nitroderivados frios **54** e **52** foram purificados, inicialmente, por CCC, empregando *sílica flash* e AcOEt:MeOH 9:1 em fase gradiente. A fração principal contendo o produto foi purificada por CLAE, de forma semelhante ao método empregado para o intermediário **52**. O

método mais adequado foi gradiente linear de 20-40% CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 0,02% (TFA), em coluna semi-preparativa de fase reversa, fluxo de 4,7 mL/min (216 nm). O produto **54** e **65** foram obtidos em *t<sub>R</sub>* 27,0 min com 39% de rendimento e *t<sub>R</sub>* 13,9 min com 31% de rendimento, respectivamente.



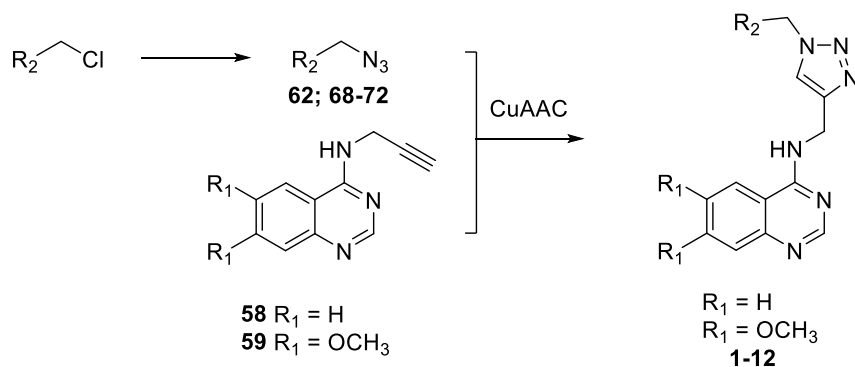
**Esquema 38.** Derivados de quinazolínicos obtidos a partir da condensação da quinazolinona **18** com as unidades biorredutíveis **37** ou **38**.

#### 4.2.5 Derivados 4-aminoquinazolínicos para o tratamento de tumores sob hipóxia

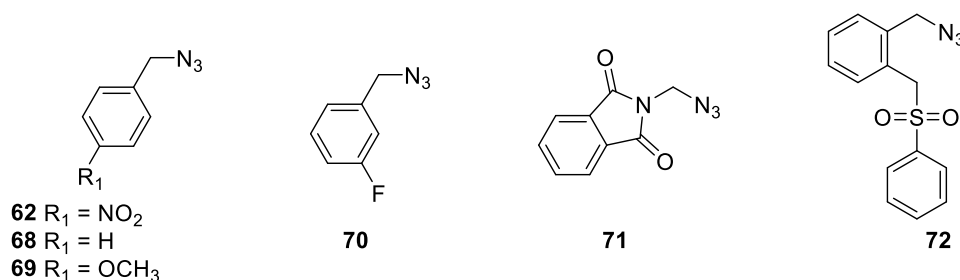
Para obtenção de compostos quinazolínicos com atividade antitumoral, uma série de novos derivados aminotriazolil-quinazolínicos (**Figura 27**) foi planejada com o objetivo de se obter derivados 4-aminoquinazolínicos de forma mais prática e rápida, empregando a reação de cicloadição catalisada por cobre (I) (CuAAC, do inglês: *Copper(I)-catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition* (CuAAC), amplamente utilizada em trabalhos desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa.

A síntese da série de 12 compostos aminotriazolil-quinazolínicos **1-12** (**Esquema 39, Figura 27**) foi realizada por CuAAC, utilizando os alcinos **58** e **59**, previamente obtidos no trabalho (**Esquema 39A**), e derivados azido **62** e **68** à **73** (**Esquema 39B**) facilmente sintetizados a partir de haletos e azida de sódio em DMF (**Esquema 39**).

A)

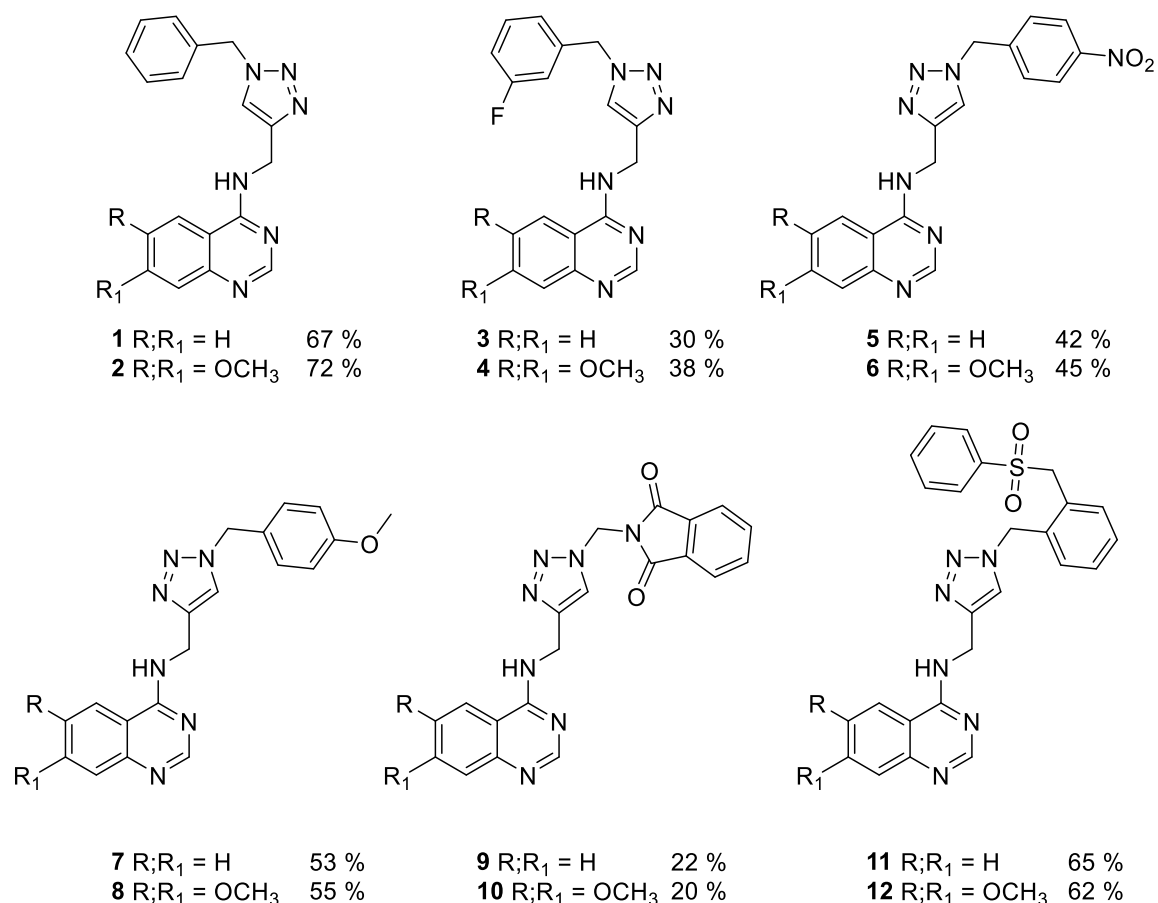


B)



**Esquema 39.** Estratégia empregada para obtenção dos 12 novos derivados de 4-aminoquinazolina obtidos. **A** – Etapas de síntese dos derivados aminotriazolilquinazolínicos **1-12**. **B** – Derivados de azidos (**62**, **68-72**), empregados na reação CuAAC com os alcinos **58** e **59**. Ambos derivados **68** e **70** foram utilizados em solução sem a purificação.

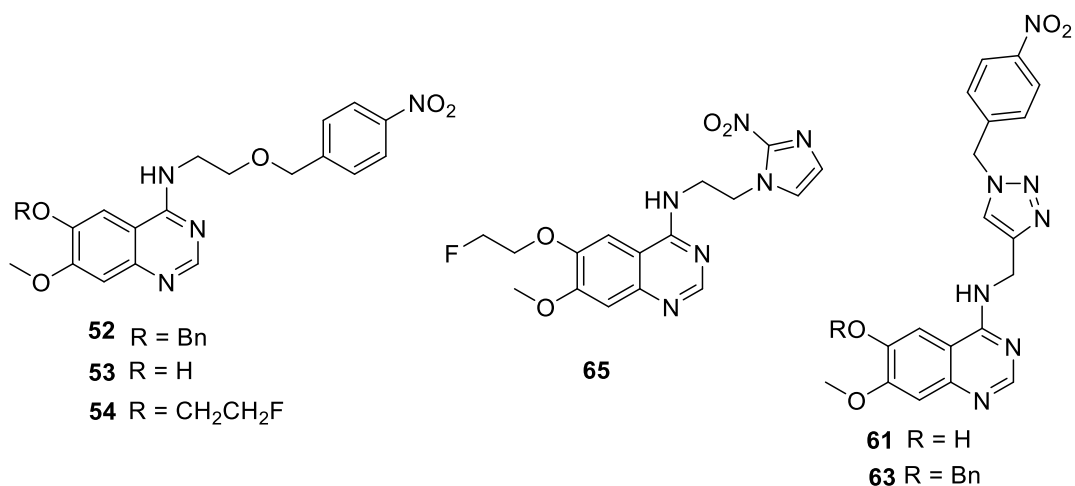
Essa nova série foi preparada com o intuito da obtenção de uma diversidade estrutural de forma mais prática e identificação do melhor substituinte amino em C-4. As reações de CuAAC foram realizadas empregando micro-ondas a 100 W, 80 °C por 5 a 10 min com o uso dos precursores azido (1 eq.) e alcino (1,1 eq.) na presença de ascorbato de sódio (0,2 eq.) e  $CuSO_4$  (0,05 eq.) em DMF em um método mais prático, sem a utilização das condições previamente empregadas para síntese do intermediário **63**. Apesar do rendimento dos produtos aminotriazolilquinazolínicos **1-12** não terem sido elevados, essa modificação permitiu a otimização das condições reacionais (**Figura 27**).



**Figura 27.** Série de novos derivados 4-aminoquinazolina sintetizados.

#### 4.2.6 Ensaios de atividade biológica

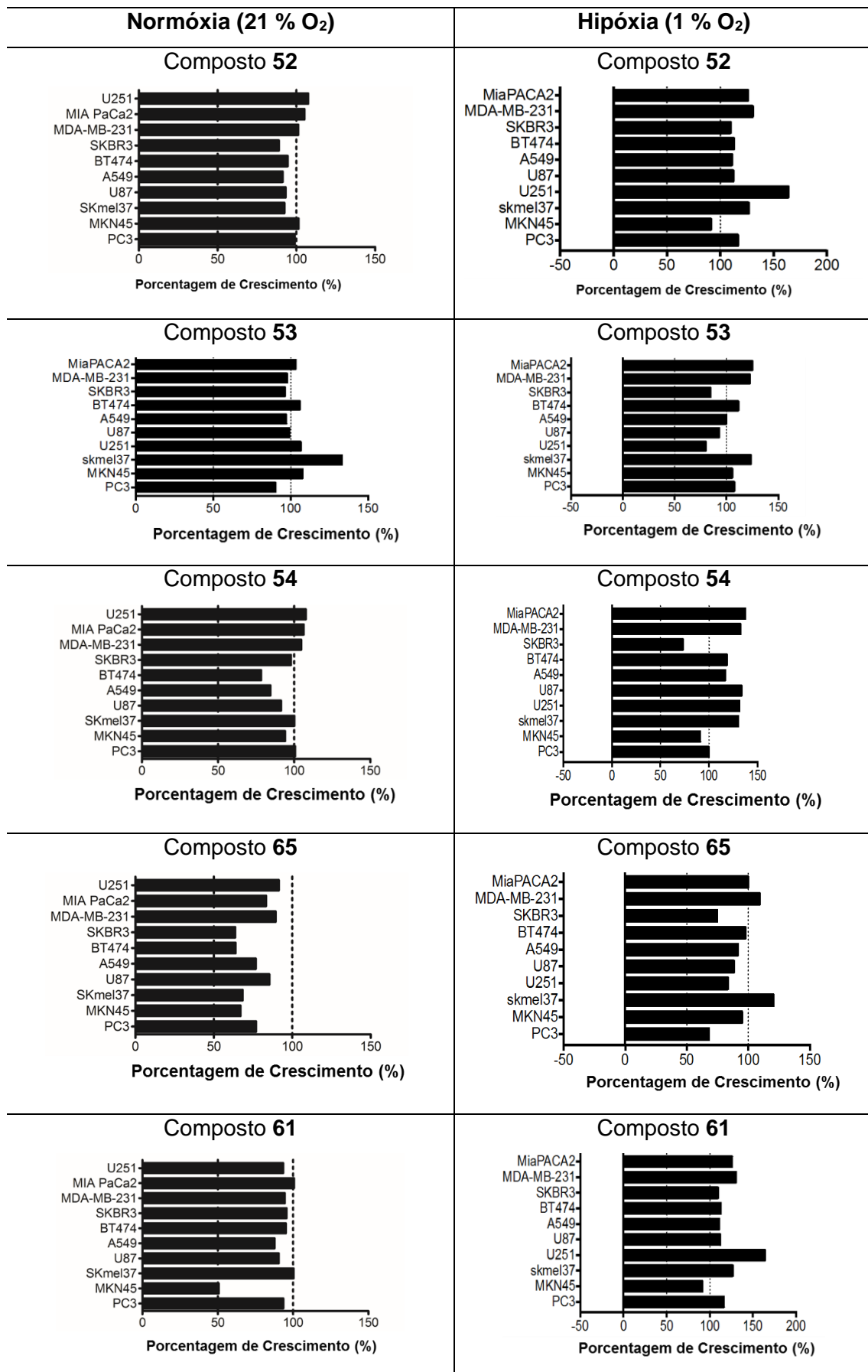
Inicialmente, foi avaliada a atividade citotóxica, em normóxia e hipóxia dos compostos nitroderivados obtidos **52**, **53**, **54**, **65**, **61** e **63**, ilustrados na **Figura 28**, empregando o ensaio de triagem com uma dose de 10  $\mu$ M, preconizada pelo *National Cancer Institute* (NCI) (BOYD e PAULI, 1995), com as linhagens tumorais de câncer de Mama - MDA-MB-231, SKBR3, BT474, Próstata - PC3, Gástrico - MKN45; Glioblastoma - U87 e U251; Pâncreas – Mia Pa2Ca2, Melanoma - Skmel37 e Pulmão - A549. Os experimentos foram conduzidos em parceria com a Pós-Doutoranda Sofia Santos do Nascimento, sobre a supervisão do Dr. Emerson Soares Bernardes do IPEN.

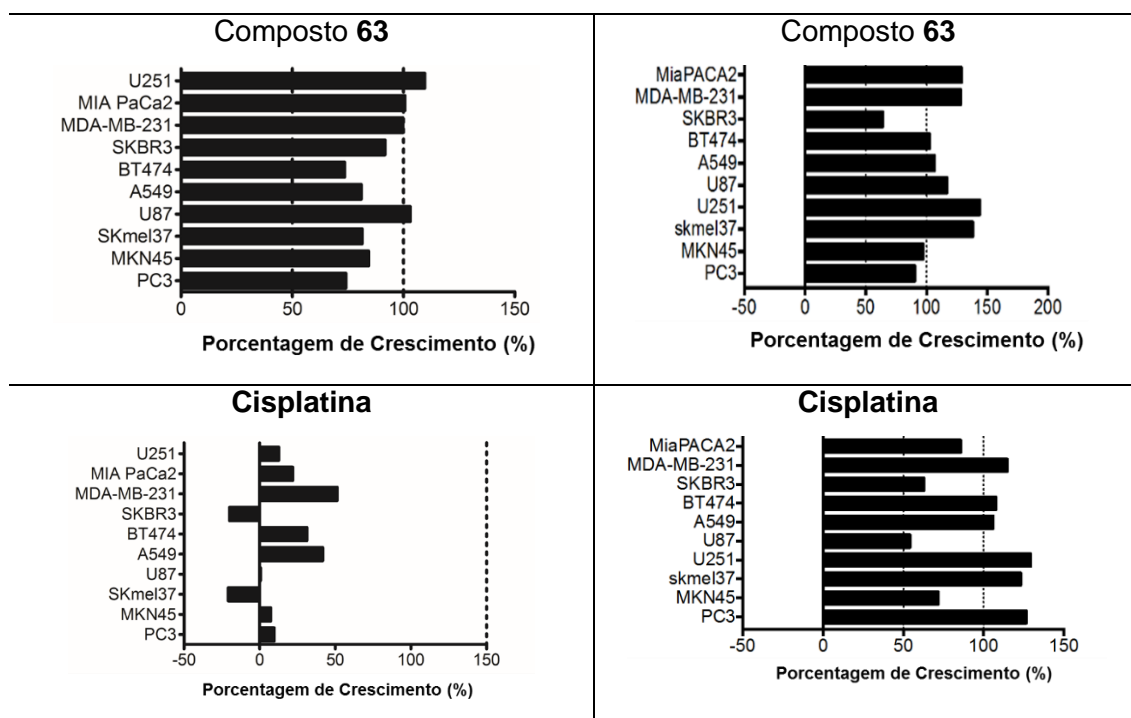


**Figura 28.** Compostos avaliados sobre o ensaio de viabilidade celular.

As células foram tratadas com os compostos e incubadas por 48h, para posterior avaliação da viabilidade celular com sulforrodamina B (SRB). Os resultados obtidos estão demonstrados nos gráficos da **Figura 29**.

O ensaio de triagem empregando SRB determina a densidade celular com indicação do teor de proteína celular. Corresponde à um método colorimétrico de baixo custo com alta sensibilidade. Após a incubação as células são fixadas com TCA e tratadas com SRB por 30 min, em seguida o excesso de corante é removido por lavagens repetidas com ácido acético 1%. O corante ligado a proteína é dissolvido em solução tampão Tris base 10 mM para determinação da densidade óptica a 510 nm (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).





**Figura 29.** Dados da atividade biológica dos produtos quinazolínicos contendo grupos nitro **52-54**, **65**, **61**, **63**. Linhagens tumorais de Mama - MDA-MB-231, SKBR3, BT474, Próstata - PC3; Gástrico - MKN45; Glioblastoma - U87, U251; Pâncreas – MIA PaCa2, Melanoma - Skmel37, Pulmão - A549.

O valor descrito nos gráficos, relacionados aos ensaios em dose única, corresponde ao crescimento celular relativo, comparado ao controle negativo e ao tempo zero do início da incubação das células. Essa abordagem permite a detecção tanto da porcentagem de inibição do crescimento (valores entre 0 e 100) quanto da letalidade (valores inferiores a 0). Assim, por exemplo, um valor de 100 significa que não há inibição de crescimento, por outro lado, um valor de 40 corresponde a 60% de inibição do crescimento. Um valor de 0 significa nenhum crescimento ao longo do experimento e, finalmente, um valor negativo tal como -40 significaria 40% de letalidade e assim por diante. Nestes experimentos, cisplatina foi empregada como fármaco de referência para o acompanhamento e avaliação dos ensaios biológicos.

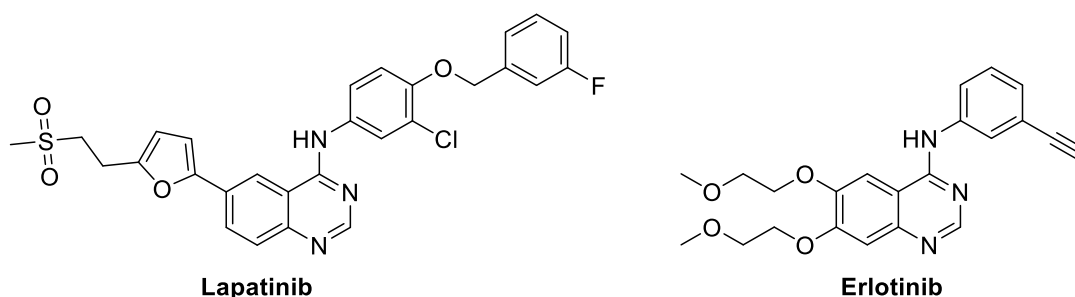
Como pode ser observado na **Figura 29**, nenhum dos compostos avaliados causaram morte celular na concentração de 10  $\mu$ M, apresentando apenas moderada inibição do crescimento. Entre os compostos testados, podem ser mencionados os derivados **61** e **63**, contendo o grupo nitro-benzílico conectado ao anel de aminoquinazolina por grupo triazólico, com cerca de 50% de inibição do crescimento de células MKN45 em normóxia, e 40% em células



SKBR3 sob hipóxia, respectivamente. Nestes estudos foram evidentes a maior atividade de cisplatina em células tumorais em normóxia, comparativamente à hipóxia. Essa atividade observada está de acordo com dados disponíveis na literatura que demonstram que altos níveis de HIF-1 $\alpha$ , presentes em células sob hipóxia, causam resistência a tratamentos com cisplatina (Al et al., 2016; FISCHER et al., 2015; WOHLKOENIG et al., 2011).

A série de derivados aminotriazolil-quinazolininas **1-12** foi avaliada sobre as linhagens tumorais de mama - MDA-MB-231, SKBR3, BT474, tendo em vista que o ensaio preliminar houve uma tendência de inibição da linhagem SKBR3 para o composto **63**, com padrão estrutural semelhante ao explorado pela série **1-12**, ou seja, uma estrutura central contendo o anel de quinazolina ligado a uma cadeia de metil 1,2,3-triazol com padrão de substituição nas posições 1,4-triazólicas.

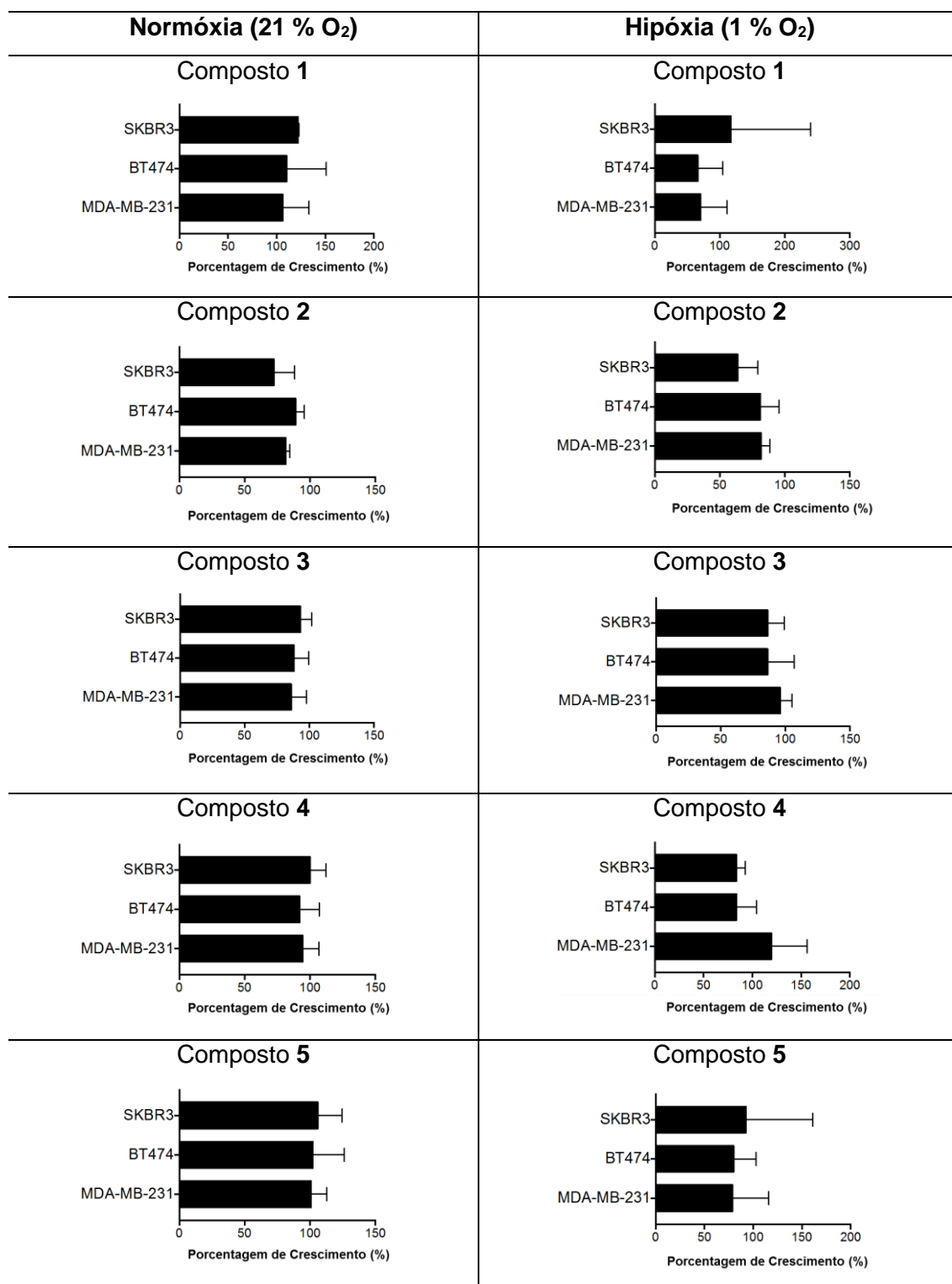
Adicionalmente, os ensaios em células de câncer de mama foram priorizados devido à atividade de derivados 4-aminoquinazolinicos já descritos na literatura em linhagem SKBR3 (ANIDO et al., 2003; YAMASAKI et al., 2007; ZHANG et al., 2008), com superexpressão do receptor de tirosina quinase HER2 (ErbB2), bem como a semelhança estrutural dos novos compostos com fármacos inibidores de tirosinas quinase HER2 e EGFR (Lapatinib). Por esta razão, os inibidores de tirosina quinase Erlotinib e Lapatinib (**Figura 30**) foram empregados como controles positivos e a avaliação desses compostos foi realizada na concentração de 30  $\mu$ M, mais próximas do valor de IC<sub>50</sub> desses fármacos nas células tumorais.

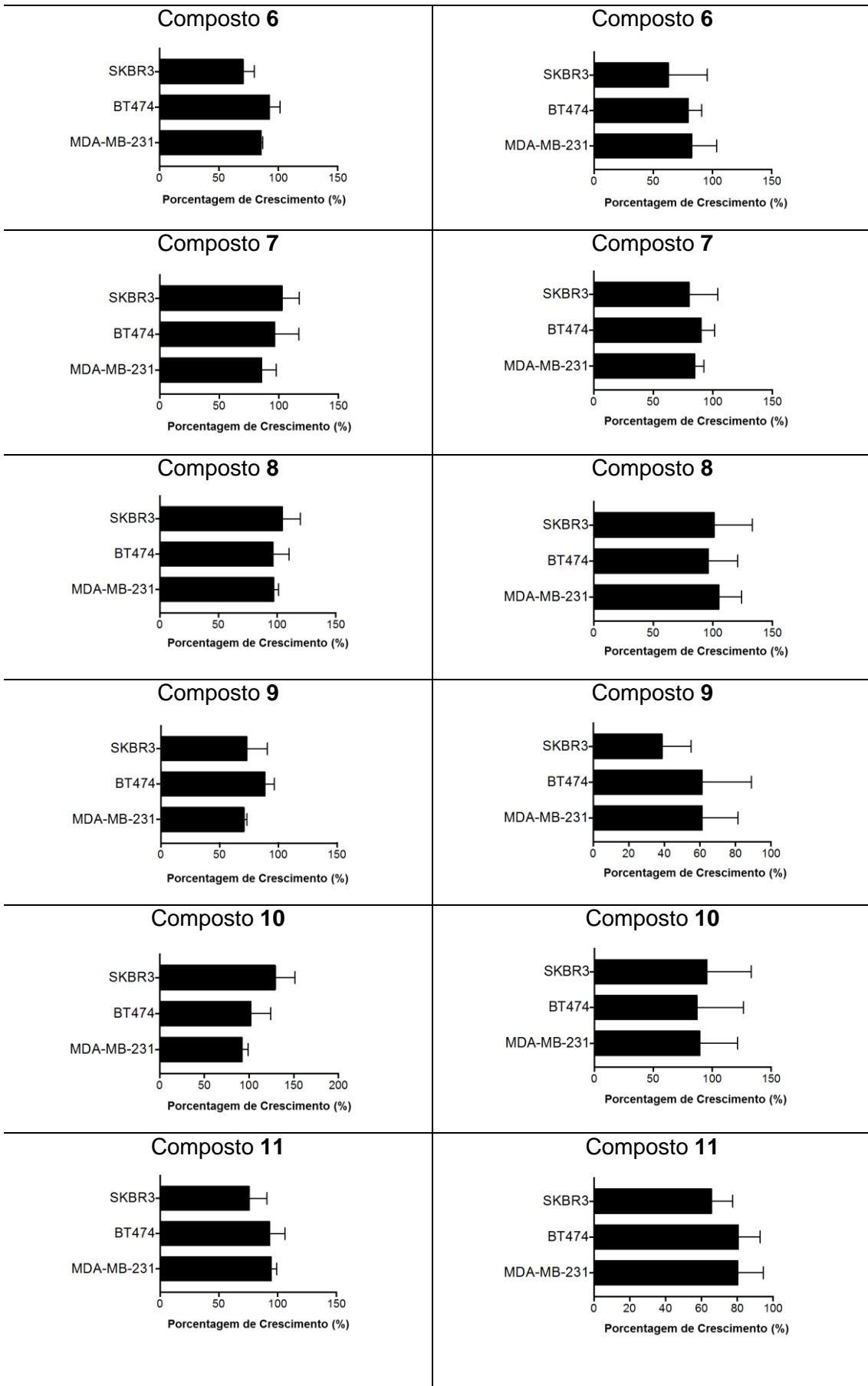


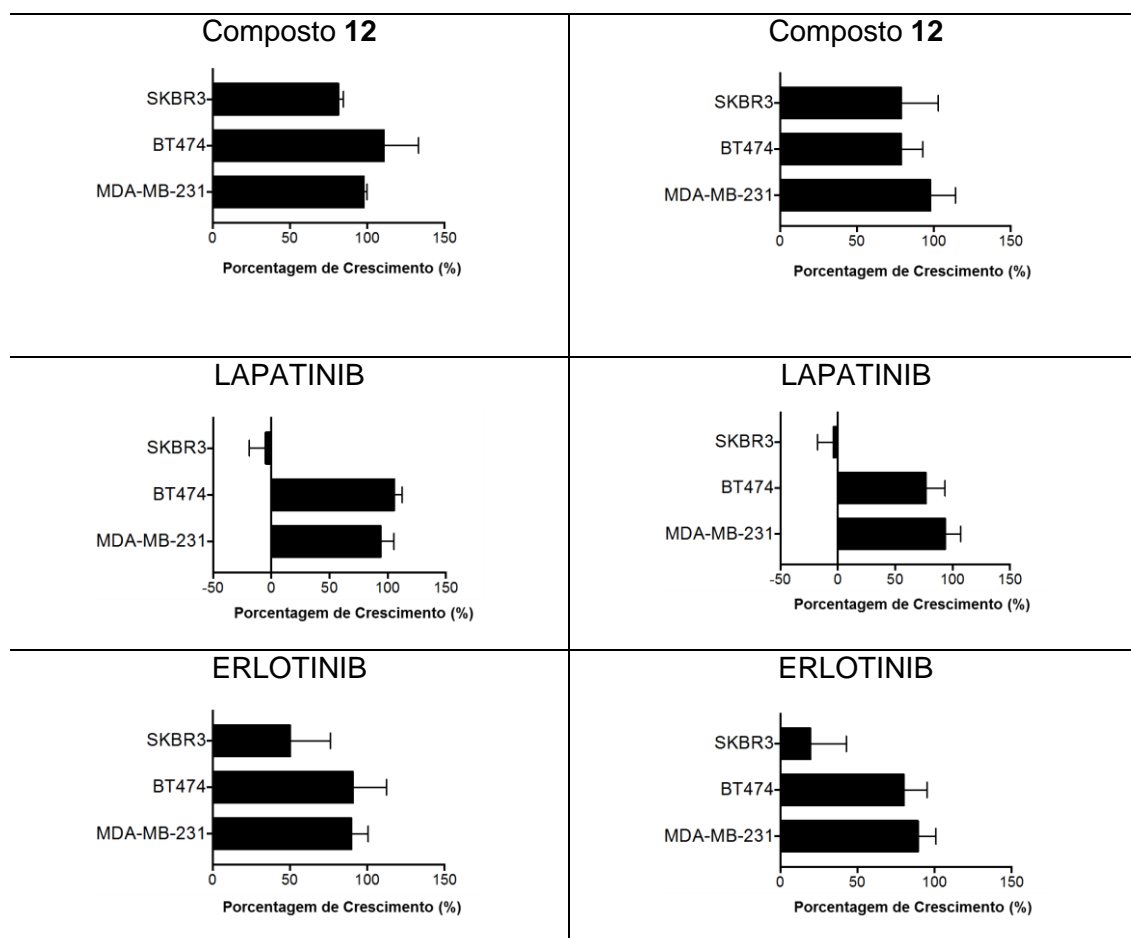
**Figura 30.** Inibidores de tirosina quinase HER2 e EGFR. Lapatinib inibidor dual HER2/EGFR e Erlotinib, inibidor da tirosina quinase EGFR.

Após realização dos ensaios foram obtidos os resultados demonstrados na **Figura 31**. Entre os derivados testados, o aminotriazolil-quinazolina **9**, contendo o grupo ftalimido e não substituído nas posições C-6 e C-7 (**Figura**

27), apresentou cerca de 60% de inibição de crescimento de células SKBR3 em hipóxia. No entanto, nenhum dos derivados obtidos demonstrou atividade citotóxica superior aos controles na concentração de 30  $\mu$ M.





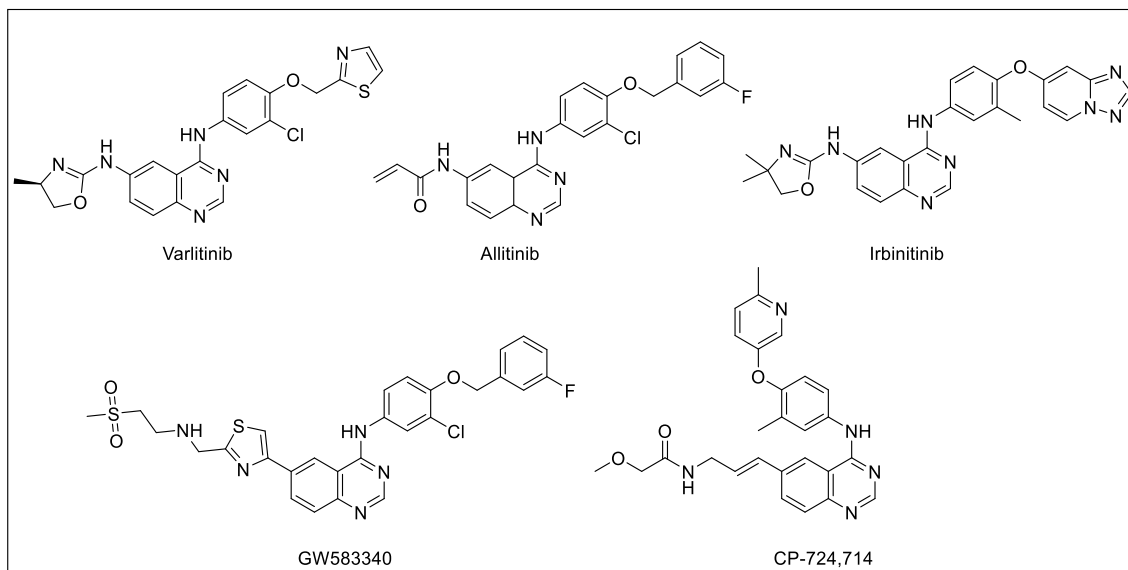


**Figura 31.** Dados da atividade biológica sob linhagens tumorais de Mama - MDA-MB-231, SKBR3, BT474.

Por outro lado, o fármaco lapatinib apresentou uma atividade expressiva em células SKBR3 em normóxia e hipóxia, inclusive causando não só a supressão do crescimento, como também pequena taxa de morte celular. Em comparação, Erlotinib também foi mais ativo nesta linhagem, mas com inibição de crescimento em apenas cerca de 50% em normóxia e cerca de 80% em hipóxia.

Paralelamente os compostos **65**, **1** ao **9** foram submetidos a avaliação da atividade inibitória frente as quinases HER2, EGFR e PERK que estão relacionadas em mecanismos de adaptação da hipóxia. As quinases HER2 e EGFR foram escolhidas devido à semelhança estrutural destes derivados de 4-aminotriazolil-quinazolina com inibidores duais destas enzimas descritos, como: Lapatinib, Irbinitinib, Varlitinib, Allitinib, CP-724,714 e GW583340 (**Figura 32**). Por outro lado, a quinase PERK foi escolhida devido a sua participação em

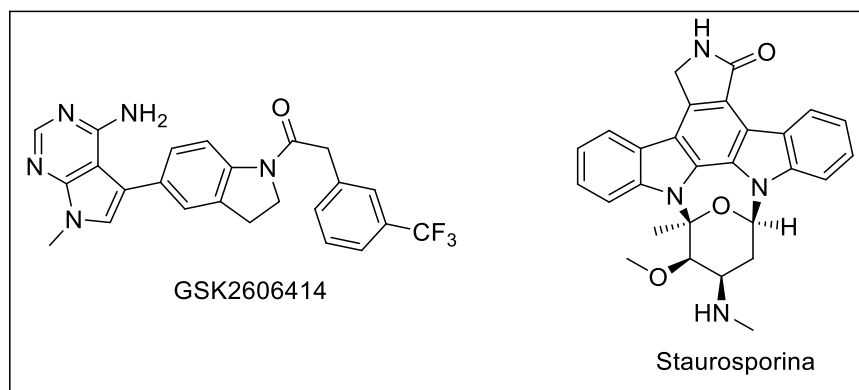
mecanismos de adaptação à hipóxia através da via de resposta ao stress no retículo endoplasmático UPR, e o reduzido número de inibidores conhecidos.



**Figura 32.** Estrutura inibidores duais da tirosina quinase HER2 e EGRF.

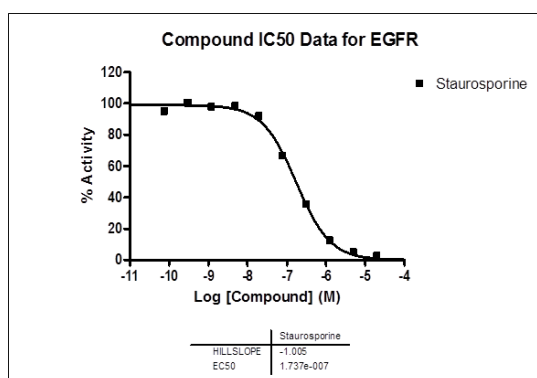
Os ensaios foram realizados pela empresa Reaction Biology, empregando o método radiométrico de *filter binding assay*. Neste ensaio os compostos a serem testados são incubados com a enzima quinase, substrato, co-fatores e ATP marcado radioisotopicamente ( $^{33}\text{P}$ - $\gamma$ -ATP). Após a incubação, a mistura da reação enzimática é filtrada, e o produto catalítico radiomarcado é avaliado em um contador de cintilografia, sendo determinado a porcentagem de atividade enzimática frente ao controle sem o inibidor.

Foram empregados dois controles positivos, staurosporina para as enzimas tirosina quinase HER2 e EGFR e o inibidor GSK-2606414 para a enzima quinase PERK (**Figura 33**), sendo os  $\text{IC}_{50}$  determinados para comparação com os dados da triagem dos compostos sintetizados (**Figura 34**). A triagem foi realizada empregando a concentração de 10  $\mu\text{M}$  e realizada em duplicata. Os dados obtidos estão representados na **Tabela 3**, expressos na forma de % de atividade enzimática.

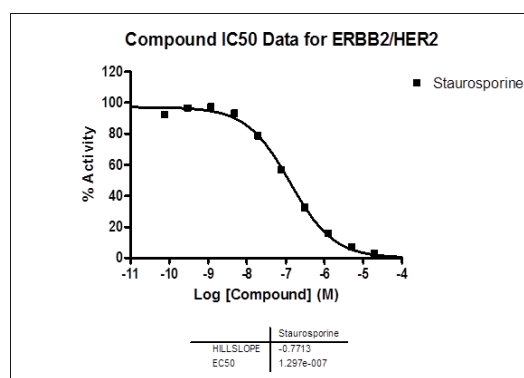


**Figura 33.** Inibidores empregados como controle positivo no ensaio de inibição realizado pela empresa Reaction Biology.

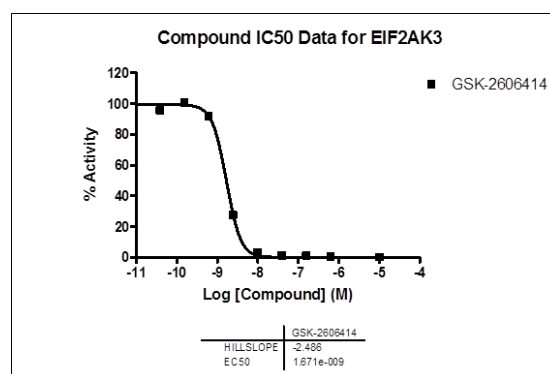
**A**



**B**



**C**



**Figura 34.** Curvas de IC<sub>50</sub> dos controles positivos staurosporina e GSK-2606414 obtidos pela Reaction Biology. **A** – Ensaio realizado com a tirosina quinase EGFR; **B** – Ensaio realizado com a quinase HER2; **C** – Ensaio realizado com a quinase PERK ou EIF2AK3.

**Tabela 3.** Resultados do ensaio de inibição dos compostos **65, 1-9** sobre as enzimas tirosinas quinases EGFR e HER2 e quinase PERK na concentração de 10  $\mu$ M.

Compostos:	% Atividade enzimática					
	PERK		ERBB2/HER2		EGFR	
	Média	SD	Média	SD	Média	SD
<b>65</b>	88,67	3,6	105,46	5,3	105,62	6,0
<b>1</b>	98,74	14,06	109,43	3,1	106,13	0,9
<b>2</b>	88,64	1,1	100,96	1,7	97,25	4,5
<b>3</b>	94,14	13,1	105,15	3,2	101,57	1,5
<b>4</b>	94,18	11,8	107,30	0,2	104,46	0,0
<b>5</b>	86,27	3,0	103,81	3,8	96,00	1,0
<b>6</b>	104,42	2,3	102,12	0,0	99,14	0,9
<b>7</b>	98,31	5,8	104,91	0,9	98,43	4,2
<b>8</b>	103,81	0,5	104,00	1,9	97,69	4,1
<b>9</b>	88,86	2,4	98,23	3,2	68,05	0,7
Staurosporina	ND		1,30E-07		1,74E-07	
GSK-2606414	1,67E-09		N/D		N/D	

SD = Desvio Padrão; N/D = não avaliado. Ensaio feito em duplicata. A porcentagem de atividade foi determinada em relação ao controle com DMSO.

Assim, como observado nos ensaios celulares, os compostos não apresentaram atividade significativa sobre nenhuma das quinases, avaliadas na concentração de 10  $\mu$ M. As variações estruturais nas posições C-4 e C-6 deverão ser exploradas a obtenção de novos compostos, consideradas as sequencias sintéticas estabelecidas neste trabalho. Uma vez que diferentes padrões estruturais de 4-anilinoquinazolina é comumente explorado para a obtenção de inibidores de tirosinas quinases, a obtenção de inibidores ATP competitivos com padrão estrutural diferente, explorando o isosterismo do anel de anilina, por exemplo, seria de grande valor para o desenvolvimento de novos fármacos. A grande diversidade de quinases conhecidas, mais de 500 incluindo serina, treonina e tirosinas quinases, torna a descoberta de novos inibidores ATP competitivos ainda mais desafiadora. Estudos de modelagem computacional serão realizados para o planejamento de novos inibidores para as quinases HER2, EGFR e PERK (HER2: código PDB 3PP0; EGFR: código

PDB 1XKK; PERK: código PDB 4G34) (AERTGEERTS et al., 2011; AXTEN et al., 2012; WOOD et al., 2004), mantendo a unidade aminotriazolil-quinazolininas como grupo central para obtenção de compostos mais potentes. A ausência de compostos com citotoxicidade significativa nas células tumorais de mama, MDA-MB-231, SKBR3, BT474, sob condições de hipóxia, na concentração de 30  $\mu\text{M}$ , inviabilizou a realização das etapas de radiosíntese e biodistribuição dos derivados quinazolínicos, contendo o anel 1,2,3-triazólico, previstas no trabalho na busca de compostos que pudessem atuar na identificação de alvos específicos no tumor sob hipóxia para o diagnóstico por PET. No entanto, novos ensaios estão em andamento a fim de determinar a capacidade dos compostos atuarem como inibidores do crescimento de outras linhagens de células tumorais.



## **5. CONCLUSÃO**

---

A síntese e avaliação de novo derivado 2-nitroimidazol, contendo o grupo hidrofílico zwitteriônico amôniometil-trifluoroborato ( $\text{AmBF}_3$ ),  $^{18}\text{F}$ -**AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**, com potencial para geração de imagens de tumores em hipóxia, assim como a obtenção de derivados quinazolínicos para o tratamento e diagnóstico por PET de tumores sob hipóxia foram adequadamente desenvolvidas no Canadá e Brasil, respectivamente.

O composto **AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** foi sintetizado com sucesso em 4 etapas de síntese como intermediário e padrão frio, a partir do reagente 2-nitroimidazol comercial, e este foi convertido no correspondente derivado radiotraçador  $^{18}\text{F}$ -**AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI** em uma etapa de radiosíntese com a reação de troca isotópica  $^{18}\text{F}$ - $^{19}\text{F}$  em bom rendimento radioquímico e atividade específica. Estudos de imagem e biodistribuição *ex vivo* demonstraram farmacocinética favorável com rápido *clearance*/depuração de órgãos/tecidos de fundo. No entanto, a captação tumoral e o contraste tumoral com a radiação de fundo foram insatisfatórios devido, possivelmente, a presença da unidade hidrofílica **AmBF<sub>3</sub>**. Desta forma, como perspectivas do trabalho, outros radiotraçadores poderão ser explorados para adequada penetração e retenção em células tumorais sob hipóxia para, de fato, alcançar os alvos intracelulares relacionados a nitro-redutases.

Visando a obtenção de compostos quinazolínicos para o diagnóstico, foram obtidos os intermediários de quinazolinonas chave, necessários para a obtenção dos padrões frios, contendo  $^{19}\text{F}$  e como precursor para a radiosíntese do radiotraçadores para tumores sob hipóxia. A síntese de cada bloco foi realizada em quatro etapas a partir do ácido 4,5-dimetoxi-2-nitrobenzóico, o qual foi submetido a desmetilação seletiva na posição C-5 e posterior funcionazilação com a cadeia de etileno flúor, para obtenção do padrão  $^{19}\text{F}$  (frio, **18**) ou grupo protetor benzil, para obtenção do radiotraçador com  $^{18}\text{F}$  (intermediário **32**), seguido de reação de ciclização redutiva na presença de cloreto de índio. A quinazolinona **18**, contendo unidade fluoretileno, foi empregada na obtenção de derivados aminoquinazolínicos **54** (contendo grupo nitro-benzílico) e **65** (contendo grupo 2-nitroimidazol), com os compostos biorredutíveis previamente sintetizados **37** (nitro-benzílico) e **38** (2-nitroimidazol), via substituição nucleofílica aromática ativada por fosfônio. A

mesma abordagem foi empregada, adequadamente, para obtenção do precursor da radiomarcagem **53**, a partir da quinazolinona **32** e a unidade biorredutível **37**. Para etapa final de obtenção do radiotraçador para diagnóstico de tumores sob hipóxia foi avaliada a obtenção do 2-[<sup>18</sup>F]fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34\***), entretanto, devido a formação de subprodutos voláteis, não foi possível, ainda, realizar a radiosíntese.

Com relação à obtenção de compostos quinazolínicos com atividade antitumoral, uma série de 12 derivados aminotriazolil-quinazolínicos **1** à **12** foi sintetizada com sucesso, usando a reação de CuAAC, via acoplamento de alcinos e derivados azidos. Desta forma, todos os compostos aminoquinazolínicos obtidos no trabalho, tanto para diagnóstico quanto tratamento, foram avaliados em relação à atividade antitumoral. Inicialmente, foram avaliados os derivados propostos para o diagnóstico **52-54**, **65**, **61** e **63** em ensaios de viabilidade de diversas células tumorais sob condição de hipóxia e normóxia (MDA-MB-231, SKBR3, BT474, PC3, MKN45, U251, U87, MIA PaCa-2, Skmel37, e A549, usando cisplatina como referência). No entanto, a atividade observada foi moderada, uma vez que apenas os derivados contendo grupo nitro-benziltriazólico **61** e **63**, apresentaram, na concentração de 10 µM, cerca de 50% de inibição de células MKN45 em normóxia e 40% em células SKBR3 sob hipóxia, respectivamente.

Em contrapartida, a série de aminotriazolil-quinazolininas proposta para o tratamento, **1-12**, foi avaliada em ensaios antitumorais contra linhagens de células tumorais de mama (MDA-MB-231, SKBR3, BT474, na concentração de 30 µM), empregado os fármacos de referência Erlotinib e Lapatinib. Desta série, apenas o derivado contendo a função ftalimida **9**, não substituído nas posições C-6 e C-7, apresentou cerca de 60% de inibição de células SKBR3 em hipóxia. Paralelamente, a estes ensaios antitumorais, os derivados aminotriazolil-quinazolínicos foram também submetidos a avaliação de triagem da atividade inibitória frente as quinases HER2, EGFR e PERK, na concentração de 10 µM. Novos ensaios serão realizados afim de avaliar a citotoxicidade dos derivados aminoquinazolínicos frente a outras linhagens de células tumorais.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ABOLMAALI, N.; HAASE, R.; KOCH, A.; ZIPS, D.; STEINBACH, J.; BAUMANN, M.; KOTZERKE, J.; ZOEPHEL, K. Two or four [<sup>18</sup>F]FMISO-PET in HNSCC. When is the contrast best? **Nuklearmedizin**, v. 50, p. 22-27, 2011.

ABRANTES, A. M.; SERRA, M. E.; MURTINHO, D.; GONSALVES, A. R.; BOTELHO, M. F. An insight into tumoral hypoxia: the radiomarkers and clinical applications. **Oncology Reviews**, v. 3, p. 3-18, 2009.

AERTGEERTS, K.; SKENE, R.; YANO, J.; SANG, B. C.; ZOU, H.; SNELL, G.; JENNINGS, A.; IWAMOTO, K.; HABUKA, N.; HIROKAWA, A.; ISHIKAWA, T.; TANAKA, T.; MIKI, H.; OHTA, Y.; SOGABE, S. Structural analysis of the mechanism of inhibition and allosteric activation of the kinase domain of HER2 protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 18756-65, 2011.

AI, Z.; LU, Y.; QIU, S.; FAN, Z. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeting HIF-1-regulated cancer metabolism. **Cancer Letters**, v. 373, p. 36-44, 2016.

ALEXANDRE, F. R.; BERECEBAR, A.; BESSON, T. Microwave-assisted Niementowski reaction. Back to the roots. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 3911-3913, 2002.

AMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. **Purification of Laboratory Chemicals**, 6th ed., Butterworth-Heinemann, Oxford, 2009.

ASHTON, T. D.; SCAMMELLS, P. J. Microwave-assisted direct amination: Rapid access to multi-functionalized N-6-substituted adenosines. **Australian Journal of Chemistry**, v. 61, p. 49-58, 2008.

AXTEN, J. M. et al. Discovery of 7-Methyl-5-(1-([3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl)-2,3-dihydro-1*H*-indol-5-yl)-7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a Potent and Selective First-in-Class Inhibitor of Protein Kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 7193-7207, 2012.

BAE, S.; LAKSHMAN, M. K. O6-(benzotriazol-1-yl)inosine derivatives: easily synthesized, reactive nucleosides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, p. 782-9, 2007.

BAI, S.; LI, S.; XU, J.; PENG, X.; SAI, K.; CHU, W.; TU, Z.; ZENG, C.; MACH, R. H. Synthesis and structure-activity relationship studies of conformationally flexible tetrahydroisoquinoliny triazole carboxamide and triazole substituted benzamide analogues as sigma2 receptor ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 4239-4251, 2014.

BERNARD, A. M.; GHIANI, M. R.; PIRAS, P. P.; RIVOLDINI, A.. Dealkylation of Activated Alkyl Aryl Ethers Using Lithium-Chloride in Dimethylformamide. **Synthesis-Stuttgart**, p. 287-289, 1989.

BERNARD-GAUTHIER, V.; ALIAGA, A.; ALIAGA, A.; BOUDJEMELINE, M.; HOPEWELL, R.; KOSTIKOV, A.; ROSA-NETO, P.; THIEL, A.; SCHIRRMACHER, R. Syntheses and Evaluation of Carbon-11- and Fluorine-18-Radiolabeled pan-Tropomyosin Receptor Kinase (Trk) Inhibitors: Exploration of the 4-Aza-2-oxindole Scaffold as Trk PET Imaging Agents. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 6, p. 260-276, 2015.

BINDRA, R. S.; GLAZER, P. M. Genetic instability and the tumor microenvironment: towards the concept of microenvironment-induced mutagenesis. **Mutation Research**, v. 569, p. 75-85, 2005.

BINDRA, R. S.; GLAZER, P. M. Co-repression of mismatch repair gene expression by hypoxia in cancer cells: role of the Myc/Max network. **Cancer Letters**, v. 252, p. 93-103, 2007.

BOLTON, J. L.; MCCLELLAND, R. A. Kinetics and mechanism of the decomposition in aqueous solutions of 2-(hydroxyamino)imidazoles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 8172-8181, 1989.

BOYD, M. R.; PAULI, K. D. Some Practical Considerations and Applications of the National-Cancer-Institute in-Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. **Drug Development Research**, v. 34, p. 91-109, 1995.

BRISTOW, R. G.; HILL, R. P. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 180-192, 2008.

BRIZEL, D. M.; SIBLEY, G. S.; PROSNITZ, L. R.; SCHER, R. L.; DEWHIRST, M. W. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. **Journal of Radiation Oncology and Biology Physics**, v. 38, 285-289, 1997.

CAIRNS, R. A.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 85-95, 2011.

CARDWELL, D.; ROBINSON, R. XXVIII.-Note on the nitroguaiacols. **Journal of the Chemical Society**, Transactions, v. 107, p. 255-259, 1915.

CAZARES-KORNER, C., PIRES, I. M., SWALLOW, I. D., GRAYER, S. C., O'CONNOR, L. J., OLCINA, M. M., CHRISTLIEB, M., CONWAY, S. J., HAMMOND, E. M. CH-01 is a Hypoxia-activated prodrug that sensitizes cells to hypoxia/reoxygenation through inhibition of Chk1 and Aurora A. **Acs Chemical Biology**, p. 1451-1459, 2013.

CHALLAPALLI, A.; CARROLL, L.; ABOAGYE, E. O. Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. **Clinical and Translational Imaging**, v. 5, p. 225-253, 2017.

CHAN, N.; PIRES, I. M.; BENCOKOVA, Z.; COACKLEY, C.; LUOTO, K. R.; BHOGAL, N.; LAKSHMAN, M.; GOTTIPATI, P.; OLIVER, F. J.; HELLEDAY, T.; HAMMOND, E. M.; BRISTOW, R. G. Contextual synthetic lethality of cancer cell

kill based on the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 70, p. 8045-8054, 2010.

CHANDREGOWDA, V.; KUSH, A. K.; CHANDRASEKARA R. G. Synthesis and in vitro antitumor activities of novel 4-anilinoquinazoline derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3046-3055, 2009.

CHANG, Q.; JURISICA, I.; DO, T.; HEDLEY, D. W. Hypoxia predicts aggressive growth and spontaneous metastasis formation from orthotopically grown primary xenografts of human pancreatic cancer. **Cancer Research**, v. 78, p. 3110-3120, 2011.

CHEN, Y.; HU, L. Design of anticancer prodrugs for reductive activation. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, p. 29-64, 2009.

CHENG, W. Y.; YUAN, Y. T.; QIU, N.; PENG, P.; SHENG, R.; HU, Y. Z. Identification of novel 4-anilinoquinazoline derivatives as potent EGFR inhibitors both under normoxia and hypoxia. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 6796-6805, 2014.

COMERFORD, K. M.; WALLACE, T. J.; KARHAUSEN, J.; LOUIS, N. A.; MONTALTO, M. C.; COLGAN, S. P. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. **Cancer Research**, v. 62, p. 3387-3394, 2002.

CONNOLLY, D. J.; CUSACK, D.; O'SULLIVAN, T. P.; GUIRY, P. J. Synthesis of quinazolinones and quinazolines. **Tetrahedron**, v. 61, p. 10153-10202, 2005.

CRUZ-GONZALEZ, D. Y.; GONZÁLEZ-OLVERA, R.; NEGRÓN-SILVA, G. E., LOMAS-ROMERO, L., GUTIÉRREZ-CARRILLO, A.; PALOMAR-PARDAVÉ, M. E.; ROMERO-ROMO, M. A.; SANTILLAN, R.; URUCHURTU, J. One-Pot Three-Component Synthesis of New Mono- and Bis-1,2,3-triazole Derivatives of 2-Benzimidazolethiol with a Promising Inhibitory Activity against Acidic Corrosion of Steel. **Synthesis**, v. 46, p. 1217-1223, 2014.

DUBOIS, L. J.; LIEUWES, N. G.; JANSSEN, M. H.; PEETERS, W. J.; WINDHORST, A. D.; WALSH, J. C.; KOLB, H. C.; OLLERS, M. C.; BUSSINK, J.; VAN DONGEN, G. A.; VAN DER KOGEL, A.; LAMBIN, P. Preclinical evaluation and validation of [<sup>18</sup>F]HX4, a promising hypoxia marker for PET imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 14620-14625, 2011.

EALLES, K. L.; HOLLINSHEAD, K. E.; TENNANT, D. A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. **Oncogenesis**, v. 5, p. e190, 2016.

ERLER, J. T.; CAWTHORNE, C. J.; WILLIAMS, K. J.; KORITZINSKY, M.; WOUTERS, B. G.; WILSON, C.; MILLER, C.; DEMONACOS, C.; STRATFORD, I. J.; DIVE, C. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms

and contributes to drug resistance. **Molecular and Cellular Biology**, v.24, p. 2875-2889, 2004.

FLAVAHAN, W. A.; GASKELL, E.; BERNSTEIN, B. E. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. **Science**, v. 357, 2017.

FAILES, T. W.; HAMBLEY, T. W. Models of hypoxia activated prodrugs: Co(iii) complexes of hydroxamic acids, **Dalton Transactions**, v. 15, p. 1895-1901, 2006.

FANG, Z., ZHOU, G. C., ZHENG, S. L., HE, G. L., LI, J. L., HE, L., BEI, D. Lithium chloride-catalyzed selective demethylation of aryl methyl ethers under microwave irradiation. **Journal of Molecular Catalysis a-Chemical**, v. 274, p. 16-23, 2007.

FISCHER, C.; LEITHNER, K.; WOHLKOENIG, C.; QUEHENBERGER, F.; BERTSCH, A.; OLSCHESKI, A.; OLSCHESKI, H.; HRZENJAK, A. Panobinostat reduces hypoxia-induced cisplatin resistance of non-small cell lung carcinoma cells via HIF-1 $\alpha$  destabilization. **Molecular Cancer**, v. 14, 2015.

FORCELLINI, E.; BOUTIN, S.; LEFEBVRE, C. A.; SHAYHIDIN, E. E.; BOULANGER, M. C.; RHÉAUME, G.; BARBEAU, X.; LAGÛE, P.; MATHIEU, P.; PAQUIN, J. F. Synthesis and biological evaluation of novel quinazoline-4-piperidinesulfamide derivatives as inhibitors of NPP1. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 130-149, 2018

FYLES, A.; MILOSEVIC, M.; HEDLEY, D.; PINTILIE, M.; LEVIN, W.; MANCHUL, L.; HILL, R. P. Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, 680–687, 2002.

GERWECK, L. E.; KOZIN, S. V.; STOCKS, S. J. The pH partition theory predicts the accumulation and toxicity of doxorubicin in normal and low-pH-adapted cells. **The British Journal of Radiology**, v. 79, p. 838-842, 1999.

GHILARDI, A.; PEZZOLI, D.; BELLUCCI, M. C.; MALLOGGI, C.; NEGRI, A.; SGANAPPA, A.; TEDESCHI, G.; CANDIANI, G.;VOLONTERIO, A. Synthesis of multifunctional PAMAM-aminoglycoside conjugates with enhanced transfection efficiency. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, p. 1928-1936, 2013.

GIBSON, H. K. PCT Int. Appl. WO 9633980, 1996.

GRAEBER, T. G.; OSMANIAN, C.; JACKS, T.; HOUSMAN, D. E.; KOCH, C. J.; LOWE, S. W.; GIACCIA, A. J. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. **Nature**, v. 379, p. 88-91, 1996.

GRAY, L. H.; CONGER, A. D.; EBERT, M.; HORNSEY, S.; SCOTT, O. C. Concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. **The British Journal of Radiology**, v. 26, p. 638-648, 1953.



GRUNBAUM, Z.; FREAUFF, S. J.; KROHN, K. A.; WILBUR, D. S.; MAGEE, S.; RASEY, J. S. Synthesis and characterization of congeners of misonidazole for imaging hypoxia. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 28, p. 68-75, 1987.

GUISE, C. P.; MOWDAY, A. M.; ASHOORZADEH, A.; YUAN, R.; LIN, W. H.; WU, D. H.; SMAILL, J. B.; PATTERSON, A. V.; DING, K. Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. **Chinese Journal of Cancer**, v. 33, p. 80-86, 2014.

GUZY, R. D.; HOYOS, B.; ROBIN, E.; CHEN, H.; LIU, L. P.; MANSFIELD, K. D.; SIMON, M. C.; HAMMERLING, U.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. **Cellular Metabolism**, v. 1, p. 401-408, 2005.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 115-123, 2012.

HAMEED, A.; AL-RASHIDA, M.; UROOS, M.; ALI, S. A.; ARSHIA; ISHTIAQ, M.; KHAN, K. M. Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011-2016). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 28, p. 281-297, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HASVOLD, G.; NAHSE-KUMPF, V.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; ROFSTAD, E. K.; SYLJUASEN, R. G. The efficacy of CHK1 inhibitors is not altered by hypoxia, but is enhanced after reoxygenation. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 12, p. 705-716, 2013.

HELAL, C. J.; KANG, Z. H.; XINJUN, P.; JAYVARDHAN, C.; THOMAS A.; HUMPHREY, J. M.; MARR, E. S.; FENNELL, K. F.; CHENARD, L. K.; FOX, C.; SCHMIDT, C. J.; WILLIAMS, R. D.; CHAPIN, D. S.; SIUCIAK, J. LEBEL, L.; MENNITI, F.; CIANFROGNA, J.; FONSECA, K. R.; NELSON, F. R., O'CONNOR, R.; MACDOUGALL, M., MCDOWELL, L.; LIRAS, S. Use of structure-based design to discover a potent, selective, in vivo active phosphodiesterase 10A inhibitor lead series for the treatment of schizophrenia. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 4536-4547, 2011.

HENNEQUIN, L. F.; THOMAS, A. P.; JOHNSTONE, C.; STOKES, E. S. E.; PLE, P. A.; LOHMANN, J. J. M.; OGILVIE, D. J.; DUKES, M.; WEDGE, S. R.; CURWEN, J. O.; KENDREW, J.; LAMBERT-VAN DER BREMPT, C. Design and Structure-Activity Relationship of a New Class of Potent VEGF Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 5369-5389, 1999.

HIMMELSBACH, F. et al. Bicyclic heterocycles, pharmaceutical compositions containing these compounds, and processes for preparing them. **WO 2000055141 A1**, 2000.

HUANG, Y. C.; CAO, C.; TAN, X. L.; LI, X.; LIU, L. Facile solid-phase synthesis of PNA-peptide conjugates using pNZ-protected PNA monomers. **Organic Chemistry Frontiers**, v. 1, p. 1050-1054, 2014.

HUGHES, R. A.; THOMPSON, S. P.; ALCARAZ, L.; MOODY, C. J. Total synthesis of the thiopeptide antibiotic amythiamicin D. **Journal of the Chemical Society**, v. 127, p. 15644-15651, 2005.

IRIE, H.; FUJII, N.; OGAWA, H.; YAJIMA, H.; FUJINO, M.; SHINAGAWA, S. Role of methionine in the facilitated cleavage of aromatic ethers by methanesulphonic acid. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 922-923, 1976.

JOSHI, B. S.; DESAI, H. K.; PELLETIER, S. W. Synthesis of Pratorimine. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 445-448, 1986.

JIN, H.; DAN, H. G.; RAO, G. W. Research progress in quinazoline derivatives as multi-target tyrosine kinase inhibitors. **Heterocyclic Communications**, v. 24, p. 1-10, 2018.

JERABEK, P. A.; PATRICK, T. B.; KILBOURN, M. R.; DISCHINO, D. D.; WELCH, M. J. Synthesis and biodistribution of <sup>18</sup>F-labeled fluoronitroimidazoles: potential in vivo markers of hypoxic tissue. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 37, p. 599-605, 1986.

KAGADIS, G.; FORD, N. L.; KARNABATIDIS, D. N.; LOUDOS, G. K. **Handbook of Small Animal Imaging: Preclinical Imaging, Therapy, and Applications**. Editors. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016.

KARNTHALER-BENBAKKA, C.; GROZA, D.; KOBLMULLER, B.; TERENCEZI, A.; HOLSTE, K.; HAIDER, M.; BAIER, D.; BERGER, W.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R.; KEPPLER, B. K. Targeting a Targeted Drug: An Approach Toward Hypoxia-Activatable Tyrosine Kinase Inhibitor Prodrugs. **ChemMedChem**, v. 11, p. 2410 –2421, 2016.

KARNTHALER-BENBAKKA, C.; GROZA, D.; KRYEZIU, K.; PICHLER, V.; ROLLER, A.; BERGER, W.; HEFFETER, P.; KOWOL, C. R. Tumor-targeting of EGFR inhibitors by hypoxia-mediated activation. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 53, p. 12930-12935, 2013.

KHAN, I.; IBRAR, A.; ABBAS, N.; SAEED, A. Recent advances in the structural library of functionalized quinazoline and quinazolinone scaffolds: synthetic approaches and multifarious applications. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 76, p. 193-244, 2014.

KISO, Y.; NAKAMURA, S.; ITO, K.; UKAWA, K.; KITAGAWA, K.; AKITA, T.; MORITOKI, H. Deprotection of *O*-methyltyrosine by a 'push-pull' mechanism using the thioanisole-trifluoromethanesulphonic acid system. Application to the convenient synthesis of a potent *N*-methylenkephalin derivative. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 971-972, 1979.

KIZAKA-KONDOH, S.; KONSE-NAGASAWA, H. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. **Cancer Science**, v. 100, p. 1366-1373, 2009.

KNISS, T.; LAUBE, M.; BRUST, P.; STEINBACH, J. 2-[<sup>18</sup>F]Fluoroethyl tosylate - a versatile tool for building <sup>18</sup>F-based radiotracers for positron emission tomography. **MedChemComm**, v. 6, p. 1714-1754, 2015.

KUMAR, P.; STYPINSKI, D.; XIA, H.; MCEWAN, A. J. B.; MACHULLA, H. J. A simple and highly efficient process for synthesis of gefitinib and its intermediate. **Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry**, v. 53B, p. 1269-1274, 2014.

KUNDU, S. K.; MAHINDARATNE, M. P. D.; QUINTERO, M. V.; BAO, A.; NEGRETE, G. R. One-pot reductive cyclization to antitumor quinazoline precursors. **Archive for Organic Chemistry**, p. 33-42, 2008.

KYLE, A. H.; HUXHAM, L. A.; YEOMAN, D. M.; MINCHINTON, A. I. Limited tissue penetration of taxanes: a mechanism for resistance in solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 13, p. 2804-2810, 2007.

LAU, J.; LIU, Z. B.; LIN, K. S.; PAN, J. H.; ZHANG, Z. X.; VULLO, D.; SUPURAN, C. T.; PERRIN, D. M.; BENARD, F. Trimeric Radiofluorinated Sulfonamide Derivatives to Achieve In Vivo Selectivity for Carbonic Anhydrase IX-Targeted PET Imaging. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 56, p. 1434-1440, 2015.

LEE, N. Y.; MECHALAKOS, J. G.; NEHMEH, S.; LIN, Z.; SQUIRE, O. D.; CAI, S.; CHAN, K.; ZANZONICO, P. B.; GRECO, C.; LING, C. C.; HUMM, J. L.; SCHODER, H. Fluorine-18-labeled fluoromisonidazole positron emission and computed tomography-guided intensity-modulated radiotherapy for head and neck cancer: a feasibility study. **International Journal of Radiation Oncology \* Biology \* Physics**, v. 70, p. 2-13, 2008.

LEE, L. V.; MITCHELL, M. L.; HUANG, S. J.; FOKIN, V. V.; SHARPLESS, K. B.; WONG, C. H. A potent and highly selective inhibitor of human alpha-1,3-fucosyltransferase via click chemistry. **Journal of American Chemical Society**, v. 125, p. 9588-9589, 2003.

LI, F.; FENG, Y.; MENG, Q.; LI, W.; LI, Z.; WANG, Q.; TAO, F. An efficient construction of quinazolin-4(3H)-ones under microwave irradiation. **Arkivoc**, p. 40-50, 2007.

LIN, A.; MAITY, A. Molecular Pathways: A Novel Approach to Targeting Hypoxia and Improving Radiotherapy Efficacy via Reduction in Oxygen Demand. **Clinical Cancer Research**, v. 21, p. 1995-2000, 2015.

LIU, Z.; AMOUROUX, G.; ZHANG, Z.; PAN, J.; HUNDAL-JABAL, N.; COLPO, N.; LAU, J.; PERRIN, D. M.; BENARD, F.; LIN, K. S. (18)F-trifluoroborate derivatives of [des-arg(10)]kallidin for imaging bradykinin b1 receptor expression with positron emission tomography. **Molecular pharmaceuticals**, v. 12, p. 974-982, 2015.

LIU, Z., LIN, K. S., BENARD, F., POURGHASIAN, M., KIESEWETTER, D. O., PERRIN, D. M. AND CHEN, X. One-step <sup>18</sup>F-labeling of biomolecules using organotrifluoroborates. **Nature Protocols**, v. 10, p. 1423-1432, 2015.

LIU, Z.; POURGHASIAN, M.; RADTKE, M.; A.; LAU, J.; PAN, J.; DIAS, G. M.; YAPP, D.; LIN, K. S.; BÉNARD, F.; PERRIN, D. M. An organotrifluoroborate for broadly applicable one-step <sup>18</sup>F-labelling. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, p. 11876-11880, 2014.

LOCKMAN, J. W.; KLIMOVA, Y.; ANDERSON, M. B.; WILLARSEN, J. A. Synthesis of Substituted Quinazolines: Application to the Synthesis of Verubulin. **Synthetic Communications**, v. 42, p. 1715-1723, 2012.

LOPCI, E., GRASSI, I., CHITI, A., NANNI, C., CICORIA, G., TOSCHI, L., FONTI, C., LODI, F., MATTIOLI, S., FANTI, S. PET radiopharmaceuticals for imaging of tumor hypoxia: a review of the evidence. **American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 4, p. 365-384, 2014.

LUESCHER, M. U.; VO, C. V. T.; BODE, J. W. SnAP reagents for the synthesis of piperazines and morpholines. **Organic Letters**, v. 16, p. 1236-1239, 2014.

LÜTH, A.; LÖWE, W. Syntheses of 4-(indole-3-yl)quinazolines – A new class of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 1478-1488, 2008.

MARZARO, G.; GUIOTTO, A.; CHILIN, A. Quinazoline derivatives as potential anticancer agents: a patent review (2007-2010). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 22, p. 223-252, 2012.

MIN, J.; GUO, K.; SURYADEVARA, P. K.; ZHU, F.; HOLBROOK, G.; CHEN, Y.; FEAU, C.; YOUNG, B. M.; LEMOFF, A.; CONNELLY, M. C.; KASTAN, M. B.; GUY, R. K. Optimization of a Novel Series of Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase Inhibitors as Potential Radiosensitizing Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 559-77, 2016.

MISALE, S. et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. **Nature**, v. 486, p. 532-536, 2012.

MUZ, B.; PUENTE, P.; AZAB, F.; AZAB, A. K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. **Hypoxia (Auckland)**, p. 83-92, 2015.

NCI - National Cancer Institute. "What Is Cancer?". Disponível em <<https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>> Acessado em 10 de Julho de 2018.

NAGAOKA, H.; SCHMID, G.; IIO, H.; KISHI, Y. A synthesis of the aromatic segment of rifamycin s. **Tetrahedron Letters**, v. 22, p. 899-902, 1981.

NORDSMARK, M.; BENTZEN, S. M.; RUDAT, V.; BRIZEL, D.; LARTIGAU, E.; STADLER, P.; BECKER, A.; ADAM, M.; MOLLS, M.; DUNST, J.; TERRIS, D. J.; OVERGAARD, J. Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. **Radiotherapy and Oncology**, v. 77, 18–24, 2005.

NORDSMARK, M.; ALSNER, J.; KELLER, J.; NIELSEN, O. S.; JENSEN, O. M.; HORSMAN, M. R.; OVERGAARD, J. Hypoxia in human soft tissue sarcomas: adverse impact on survival and no association with p53 mutations. **British Journal of Cancer**, v. 84, p. 1070–1075, 2001.

PENCREACH, E.; GUERIN, E.; NICOLET, C.; LELONG-REBEL, I.; VOEGELI, A. C.; OUDET, P.; LARSEN, A. K.; GAUB, M. P.; GUENOT, D. Marked activity of irinotecan and rapamycin combination toward colon cancer cells in vivo and in vitro is mediated through cooperative modulation of the mammalian target of rapamycin/hypoxia-inducible factor-1alpha axis. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 1297-307, 2009.

PENNACCHIETTI, S.; MICHIELI, P.; GALLUZZO, M.; MAZZONE, M.; GIORDANO, S.; COMOGLIO, P. M. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. **Cancer Cell**, v. 3, p. 347-361, 2003.

PIERT, M.; MACHULLA, H. J.; PICCHIO, M.; REISCHL, G.; ZIEGLER, S.; KUMAR, P.; WESTER, H. J.; BECK, R.; MCEWAN, A. J.; WIEBE, L. I.; SCHWAIGER, M. Hypoxia-specific tumor imaging with <sup>18</sup>F-fluoroazomycin arabinoside. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 46, p. 106-113, 2005.

PITTS, M. R.; HARRISON, J. R.; MOODY, C. J. Indium metal as a reducing agent in organic synthesis. **Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1**, p. 955-977, 2001.

PHILLIPS, R. M. Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia-activated prodrugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, p. 441-457, 2016.

PORE, N.; JIANG, Z.; GUPTA, A.; CERNIGLIA, G.; KAO, G. D.; MAITY, A. EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-

inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. **Cancer Research**, v. 66, n. 6, p. 3197-31204, 2006.

POURGHASIAN, M.; LIU, Z.; PAN, J.; ZHANG, Z.; COLPO, N.; LIN, K. S.; PERRIN, D. M. BÉNARD, F.  $^{18}\text{F}$ -AmBF3-MJ9: a novel radiofluorinated bombesin derivative for prostate cancer imaging. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, p. 1500-1506, 2015.

PYTA, K.; KLICH, K.; DOMAGALSKA, J.; PRZYBYLSKI, P. Structure and evaluation of antibacterial and antitubercular properties of new basic and heterocyclic 3-formylrifamycin SV derivatives obtained via 'click chemistry' approach. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 84, p. 651-676, 2014.

RASEY, J. S.; KOH, W. J.; EVANS, M. L.; PETERSON, L. M.; LEWELLEN, T. K.; GRAHAM, M. M.; KROHN, K. A. Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [ $^{18}\text{F}$ ]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. **International Journal of Radiation Oncology \* Biology \* Physics**, v. 36, p. 417-428, 1996.

RICE, G. C.; HOY, C.; SCHIMKE, R. T. Transient hypoxia enhances the frequency of dihydrofolate reductase gene amplification in Chinese hamster ovary cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 83, p. 5978-5982, 1986.

RICE, K.; MARKBY, D. Benzoxazepines as inhibitors of pi3k/mTOR and methods of their use and manufacture.. **WO 2012068096 A2**, 2012.

ROHILLA, S., PATEL, S. S., JAIN, N. Copper Acetate Catalyzed Regio-selective Synthesis of Substituted 1,2,3-Triazoles: A Versatile Azide-Alk-ene Cycloaddition/Oxidation Approach. **European Journal of Organic Chemistry**, p. 847-854, 2016.

ROUSCHOP, K. M. A.; BEUCKEN, T.; DUBOIS, L.; NIESSEN, H.; BUSSINK, J.; SAVELKOULS, K.; KEULERS, T.; MUJICIC, H.; LANDUYT, W.; VONCKEN, J. W.; LAMBIN, P.; KOGEL, A. J.; KORITZINSKY, M.; WOUTERS, B. G. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes *MAP1LC3B* and *ATG5*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 127-141, 2010.

SCHIRRMACHER, R.; WEBER, M.; SCHMITZ, A.; SHIUE, C.; ALAVI, A. A.; FEILEN, P.; SCHNEIDER, S.; KANN, P.; ROSCH, F. Radiosynthesis of 1-(4-(2-[ $^{18}\text{F}$ ] fluoroethoxy) benzenesulfonyl)-3-butyl urea: a potential  $\beta$ -cell imaging agent. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 45, p. 763-774, 2002.

SCHOULTZ, B. W.; REED, B. J.; MARTON, J.; WILLOCH, F.; HENRIKSEN, G. A Fully Automated radiosynthesis of [ $^{18}\text{F}$ ] fluoroethyl-diprenorphine on a single module by use of SPE cartridges for preparation of high quality 2-[ $^{18}\text{F}$ ] fluoroethyl tosylate. **Molecules**, v. 18, p. 7271-7278, 2013.

SCHWAN, G.; BARBAR ASSKAR, G.; HOFGEN, N.; KUBICOVA, L.; FUNKE, U.; EGERLAND, U.; ZAHN, M.; NIEBER, K.; SCHEUNEMANN, M.; STRATER, N.; BRUST, P.; BRIEL, D. Fluorine-containing 6,7-dialkoxybiaryl-based inhibitors for phosphodiesterase 10A: synthesis and in vitro evaluation of inhibitory potency, selectivity, and metabolism. **ChemMedChem**, v. 9, p. 1476-1487, 2014.

SEMENZA, G. L. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, p. 71-103, 2000.

SEMENZA, G. L. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 76, p. 347-353, 2011.

SHINKARUK, S.; LAMOTHE, V.; SCHMITTER, J. M.; FRUCTUS, A.; SAUVANT, P.; VERGNE, S.; DEGUEIL, M.; BABIN, P.; BENNETAU, B.; BENNETAU-PELISSERO, C. Synthesis of haptens and conjugates for ELISA of glycitein: Development and validation of an immunological test. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6809-6817, 2008.

SLOBBE, P.; WINDHORST, A. D.; WALSUM, M. S.; SCHUIT, R. C.; SMIT, E. F.; NIESSEN, H. G.; SOLCA, F.; STEHLE, G.; VAN DONGEN, G. A. M. S.; POOT, A. J. Development of [<sup>18</sup>F]afatinib as new TKI-PET tracer for EGFR positive tumors. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 41, p. 749-57, 2014.

SUN, J.; LI, D. D.; LI, J. R.; FANG, F.; DU, Q. R.; QIAN, Y.; ZHU, H. L. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling study of 4-alkoxyquinazoline derivatives as potential VEGFR2 kinase inhibitors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, p. 7676-7686, 2013.

SLOBBE, P.; POOT, A. J.; WINDHORST, A. D.; DONGEN, G. A. PET imaging with small-molecule tyrosine kinase inhibitors: TKI-PET. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 1175-87, 2012.

TEICHER, B. A.; LAZO, J. S.; SARTORELLI, A. C. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. **Cancer Research**, v. 41, p. 73-81, 1981.

VAUPEL, P.; HARRISON, L. Tumor Hypoxia: Causative Factors, Compensatory Mechanisms, and Cellular Response. **The oncologist**, v. 9, p. 4-9, 2004.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112, 2006.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, p. 1081-1086, 2011.

WAN, Z. K.; WACHARASINDHU, S.; BINNUN, E.; MANSOUR, T. An efficient direct amination of cyclic amides and cyclic ureas. **Organic Letters**, v. 8, p. 2425-2428, 2006.

WAN, Z. K.; WACHARASINDHU, S.; LEVINS, C. G.; LIN, M.; TABELI, K.; MANSOUR, T. S. The scope and mechanism of phosphonium-mediated S(N)Ar reactions in heterocyclic amides and ureas. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 10194-10210, 2007.

WANG, Y.; OHH, M. Oxygen-mediated endocytosis in cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 496-503, 2010.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v. 123, p. 309, 1956.

WARFEL, N. A.; SAINZ, A. G.; SONG, J. H.; KRAFT, A. S. PIM Kinase Inhibitors Kill Hypoxic Tumor Cells by Reducing Nrf2 Signaling and Increasing Reactive Oxygen Species. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 15, p. 1637-47, 2016.

WEBER, C.; BIELIK, A.; DEMETER, A.; BORZA, I.; SZENDREI, G. I.; KESERU, G. M.; GREINER, I. Solid-phase synthesis of 6-hydroxy-2,4-diaminoquinazolines. **Tetrahedron**, v. 61, p. 9375-9380, 2005.

WEBER, J.; HABERKORN, U.; MIER, W. Cancer stratification by molecular imaging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 4918-4946, 2015.

WEISSLEDER, R.; PITTET, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. **Nature**, v. 452, p. 580-589, 2008.

WEISSLEDER, R.; ROSS, B. D.; REHEMTULLA, A.; GAMBHIR, S. S. **Molecular Imaging: Principles and Practice**, ed. 1, 2010.

WILSON, W. R.; HAY, M. P. Targeting hypoxia in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 393-410, 2011.

WIRTHNER, R.; WRANN, S.; BALAMURUGAN, K.; WENGER, R. H.; STIEHL, D. P. Impaired DNA double-strand break repair contributes to chemoresistance in HIF-1 alpha-deficient mouse embryonic fibroblasts. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 2306-2316, 2008.

WOHLKOENIG, C.; LEITHNER, K.; DEUTSCH, A.; HRZENJAK, A.; OLSCHIEWSKI, A.; OLSCHIEWSKI, H. Hypoxia-induced cisplatin resistance is reversible and growth rate independent in lung cancer cells. **Cancer Letters**, v. 308, p. 134-143, 2011.

WOOD, E. R.; TRUESDALE, A. T.; MCDONALD, O. B.; YUAN, D.; HASSELL, A.; DICKERSON, S. H.; ELLIS, B.; PENNISI, C.; HORNE, E.; LACKEY, K.; ALLIGOOD, K. J.; RUSNAK, D. W.; GILMER, T. M.; SHEWCHUK, L. A Unique Structure for Epidermal Growth Factor Receptor Bound to GW572016



(Lapatinib). Relationships among Protein Conformation, Inhibitor Off-Rate, and Receptor Activity in Tumor Cells. **Cancer Research**, v. 64, p. 6652-6659, 2004.

WOUTERS, B. G.; KORITZINSKY, M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, p. 851-864, 2008.

WUEST, M.; WUEST, F. Positron emission tomography radiotracers for imaging hypoxia. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, v. 56, p. 244-50, 2013.

WU, P.; NIELSEN, T. E.; CLAUSEN, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, p. 422-39, 2015.

YAMASAKI, F.; ZHANG, D.; BARTHOLOMEUSZ, C.; SUDO, T.; HORTOBAGYI, G. N.; KURISU, K.; UENO, N. T. Sensitivity of breast cancer cells to erlotinib depends on cyclin-dependent kinase 2 activity. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 6, p. 2168-2177, 2007.

YANG, D.; COMEAU, A.; BOWEN, W. D.; MACH, R. H.; ROSS, B. D.; HONG, H.; VAN DORT, M. E. Design and investigation of a [<sup>18</sup>F]-labeled benzamide derivative as a high affinity dual sigma receptor subtype radioligand for prostate tumor imaging. **Molecular pharmaceuticals**, v. 14, p. 770-780, 2017.

YOTNDA, P.; WU, D.; SWANSON, A. M. Hypoxic tumours and their effect on immune cells and cancer therapy. **Methods in Molecular Biology**, v. 651, p.1-29, 2010.

YU, K.; SHI, C.; TORAL-BARZA, L.; LUCAS, J.; SHOR, B.; KIM, J. E.; ZHANG, W. G.; MAHONEY, R.; GAYDOS, C.; TARDIO, L.; KIM, S. K.; CONANT, R.; CURRAN, K.; KAPLAN, J.; VERHEIJEN, J.; AYRAL-KALOUSTIAN, S.; MANSOUR, T. S.; ABRAHAM, R. T.; ZASK, A.; GIBBONS, J. J. Beyond Rapalog Therapy: Preclinical Pharmacology and Antitumor Activity of WYE-125132, an ATP-Competitive and Specific Inhibitor of mTORC1 and mTORC2. **Cancer Research**, v. 70, p. 621-631, 2010.

YU, T.; TANG, B.; SUN, X. Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. **Yonsei Medical Journal**, v. 58, n. 3, p. 489-496, 2017.

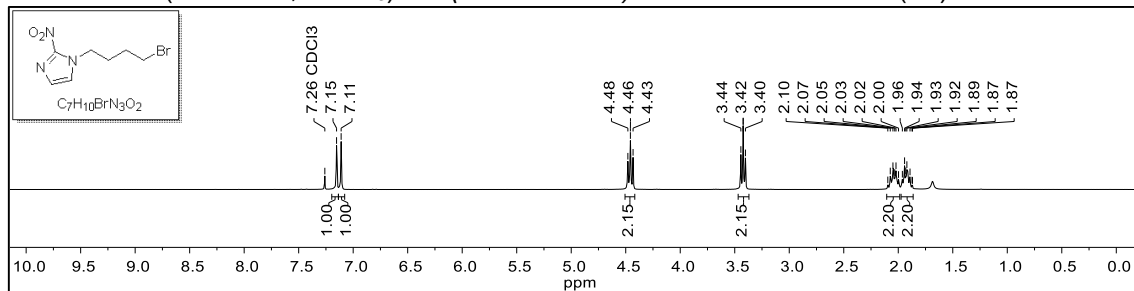
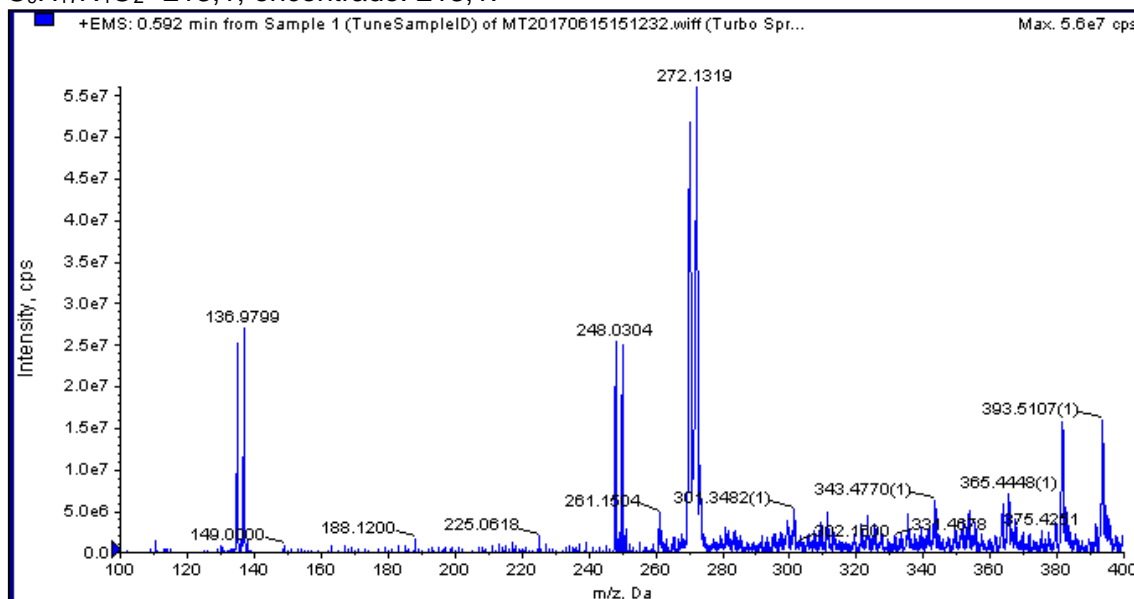
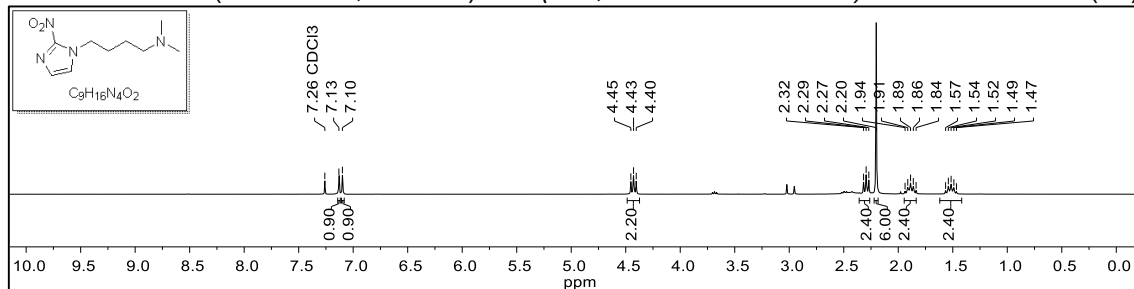
ZHANG, D. W.; PAL, A.; BORNMANN, W. G.; YAMASAKI, F.; ESTEVA, F. J.; HORTOBAGYI, G. N.; BARTHOLOMEUSZ, C. UENO, N. T. Activity of lapatinib is independent of EGFR expression level in HER2-overexpressing breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p. 1846-1850, 2008.

ZHA, Z.; ZHU, L.; LIU, Y.; DU, F.; GAN, H.; QIAO, J.; KUNG, H. F. Synthesis and evaluation of two novel 2-nitroimidazole derivatives as potential PET radioligands for tumor imaging. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 38, p. 501-508, 2011.

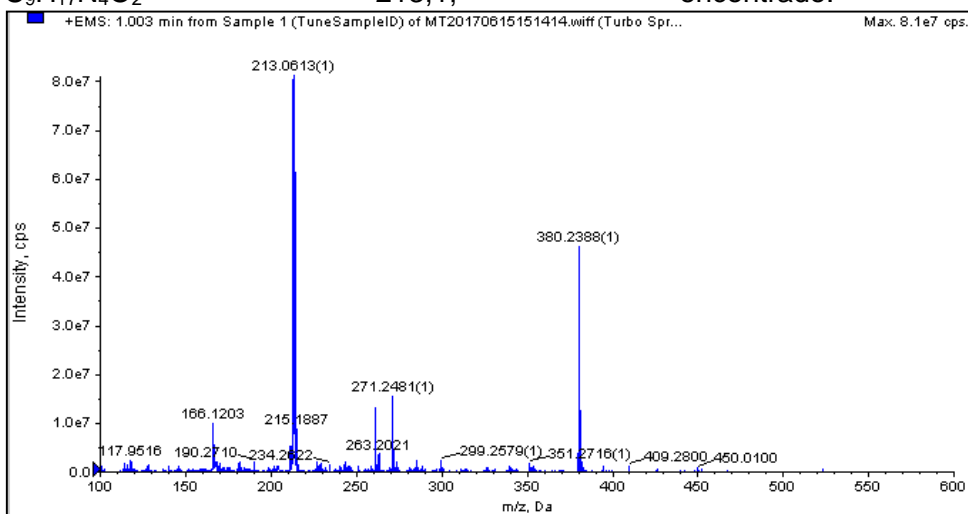
ZHANG, Z.; LAU, J.; KUO, H. T.; ZHANG, C.; HUNDAL-JABAL, N.; COLPO, N.; BÉNARD, F.; LIN, K. S. Synthesis and evaluation of  $^{18}\text{F}$ -labeled 4-nitrobenzyl derivatives for imaging tumor hypoxia with positron emission tomography: comparison of 2- $^{18}\text{F}$ fluoroethyl carbonate and 2- $^{18}\text{F}$ fluoroethyl carbamate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, p. 584-588, 2016.

## **7. ANEXOS**

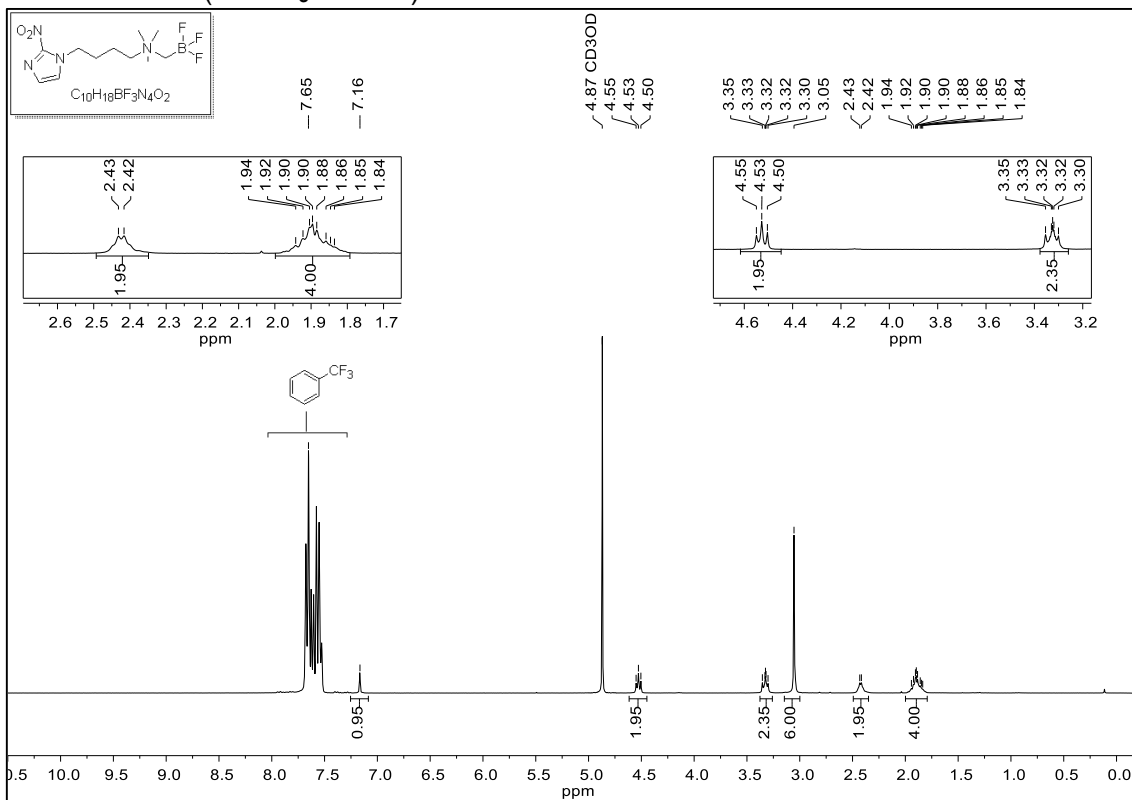
---

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (14)**

**MS (ESI) - 1-(4-bromobutil)-2-nitro-1H-imidazol (14).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$  213,1; encontrado: 213,1.**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 1-(4-N,N-dimetilaminobutil)-2-nitroimidazol (15)**


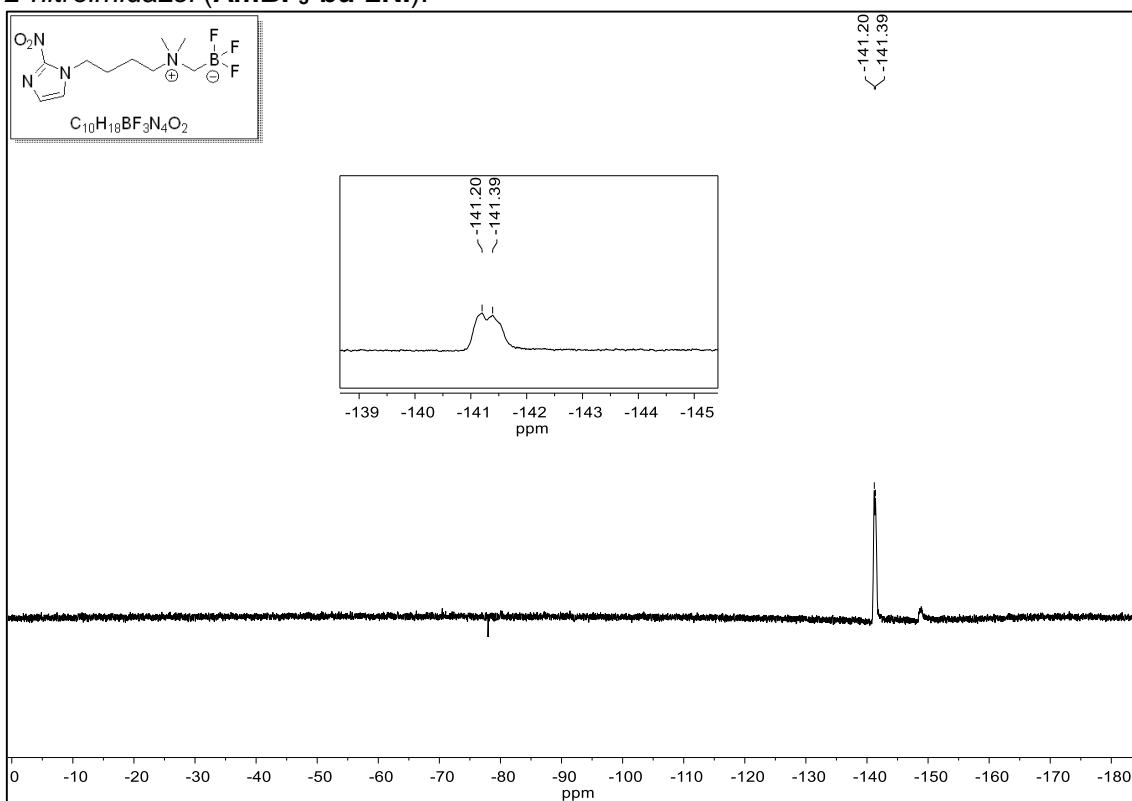
**MS (ESI) - 1-(4-N,N-dimetilaminobutil)-2-nitroimidazol (15).**  $m/z$   $[M+H]^+$  calculado para  $C_9H_{17}N_4O_2^+$  213,1; encontrado: 213,1.



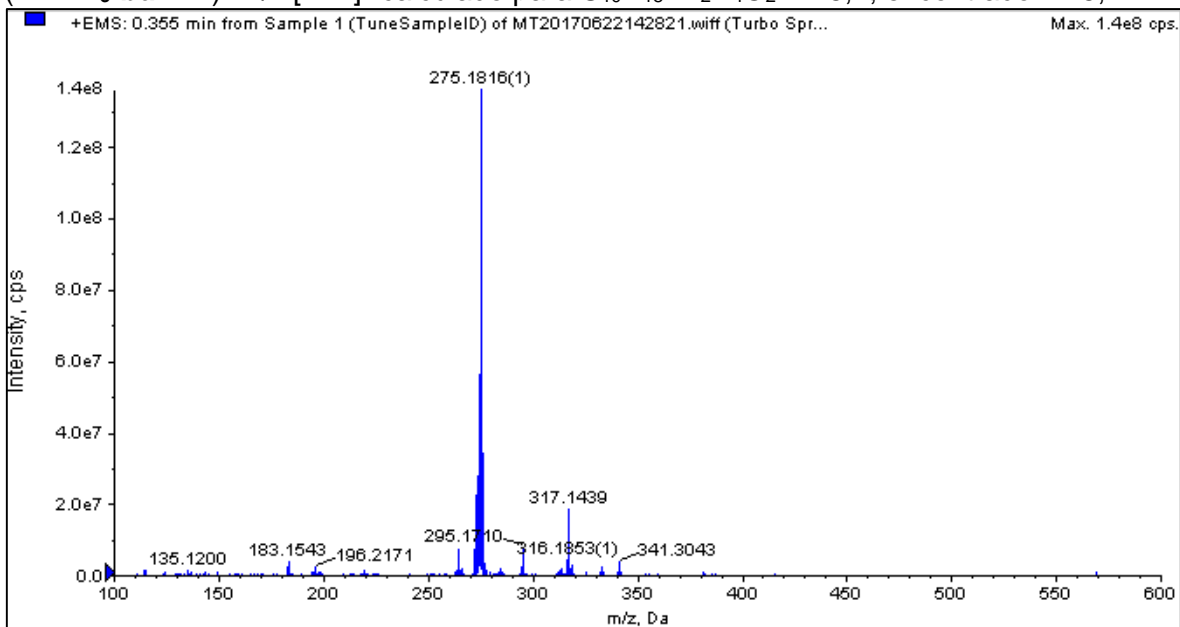
**RMN de  $^1H$  (300 MHz,  $CD_3OD$ ) - 1-(4-(N-trifluoroborilmetil-N,N-dimetilammonio)butil)-2-nitroimidazol (AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI)**

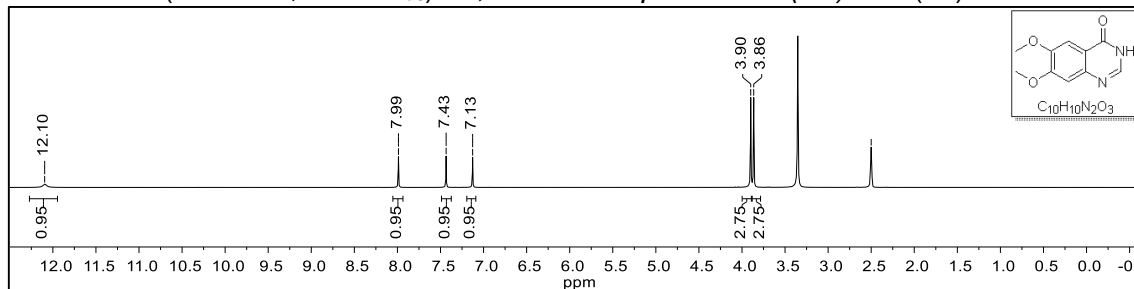
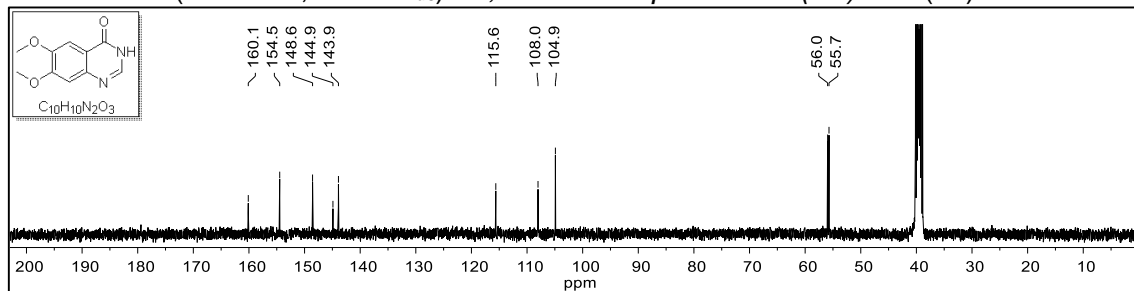
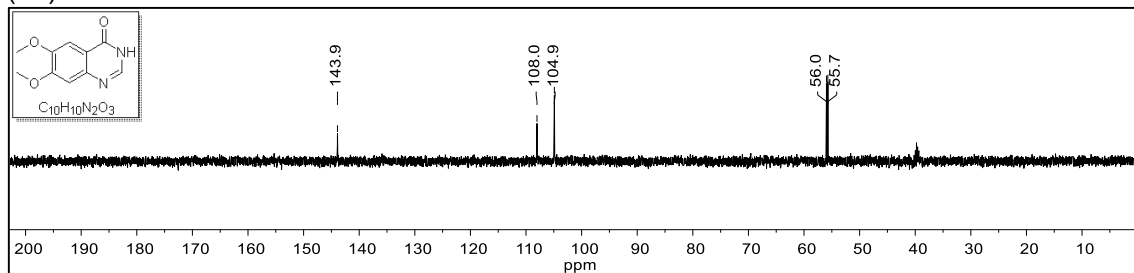
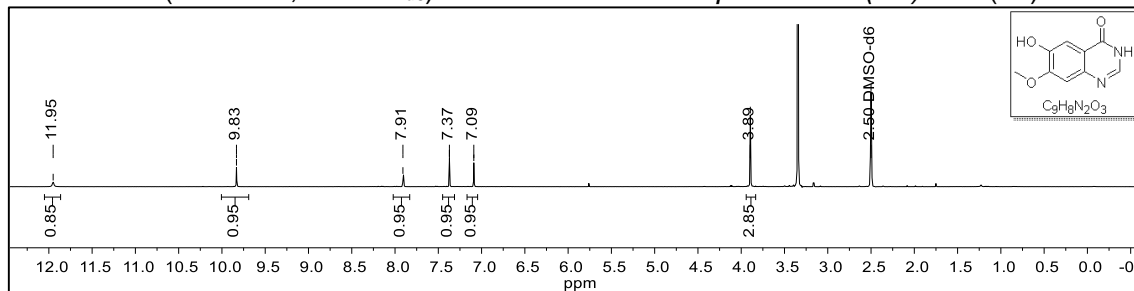
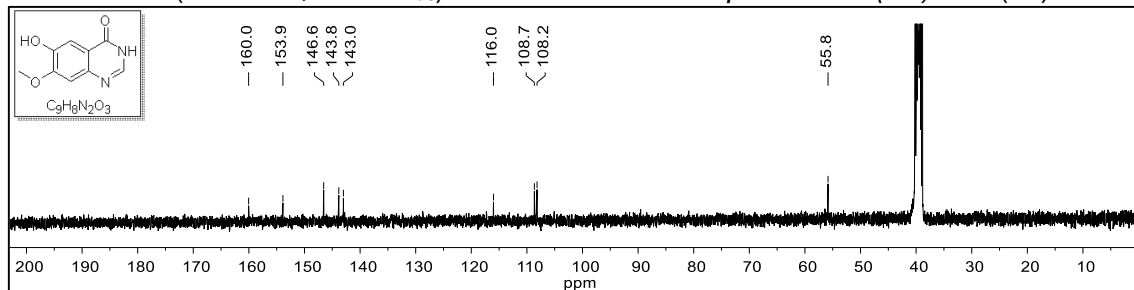


**RMN de  $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 1-(4-(*N*-trifluoroborilmetil-*N,N*-dimetilammonio)butil)-2-nitroimidazol (**AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**).

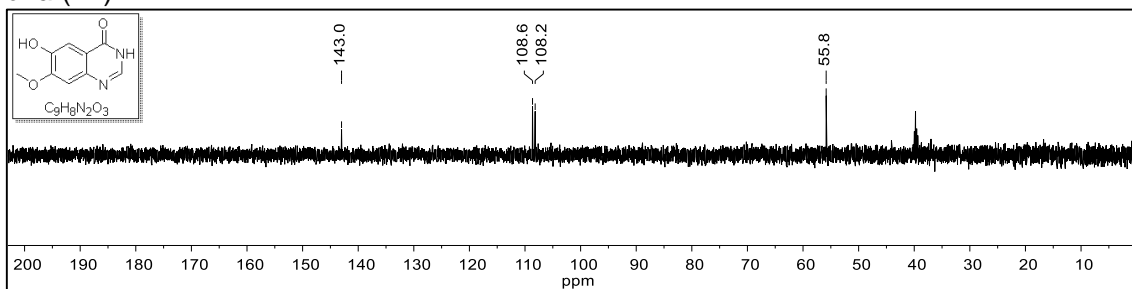


**MS (ESI)** - 1-(4-(*N*-trifluoroborilmetil-*N,N*-dimetilammonio)butil)-2-nitroimidazol (**AmBF<sub>3</sub>-bu-2NI**).  $m/z$   $[\text{M}-\text{F}]^+$  calculado para  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{BF}_2\text{N}_4\text{O}_2^+$  275,1; encontrado: 275,1.

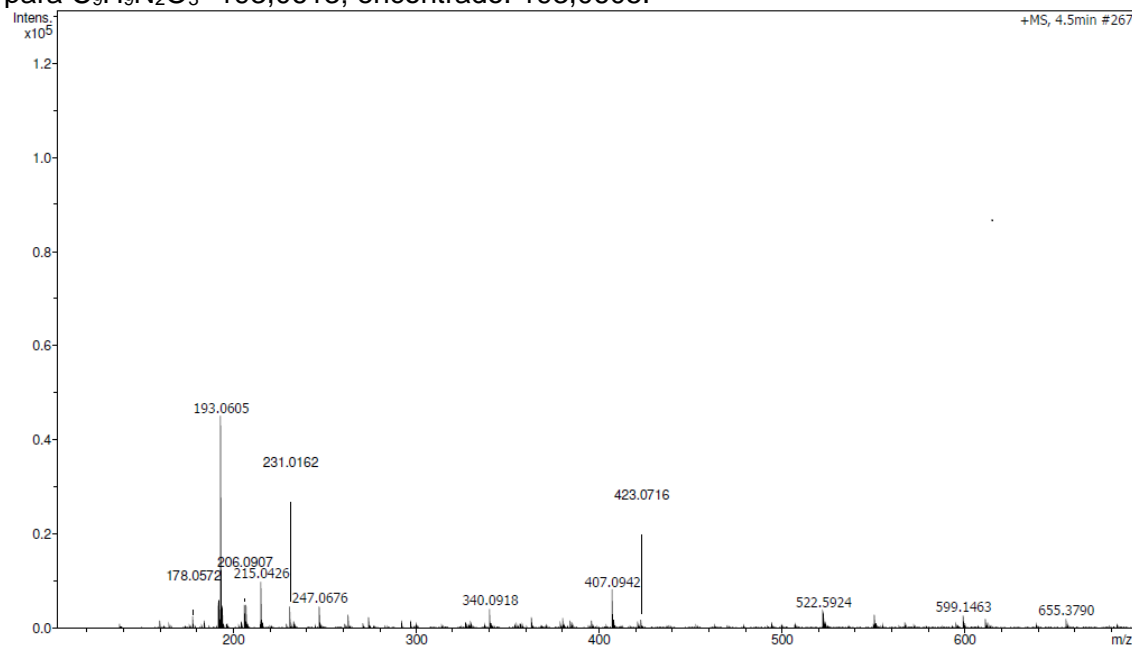


**RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3H)-ona (20)**

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3H)-ona (20)**

**RMN de  $^{13}\text{C}$  {DEPT-135} (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6,7-dimetoxi-quinazolin-4(3H)-ona (20)**

**RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-hidroxi-7-metoxi-quinazolin-4(3H)-ona (17)**

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-hidroxi-7-metoxi-quinazolin-4(3H)-ona (17)**


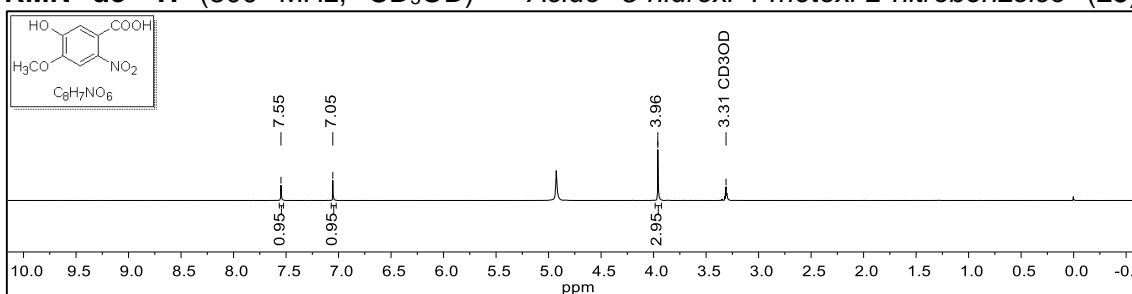
**RMN de  $^{13}\text{C}$  {DEPT-135}** (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-hidroxi-7-metoxi-quinazolin-4(3H)-ona (17).



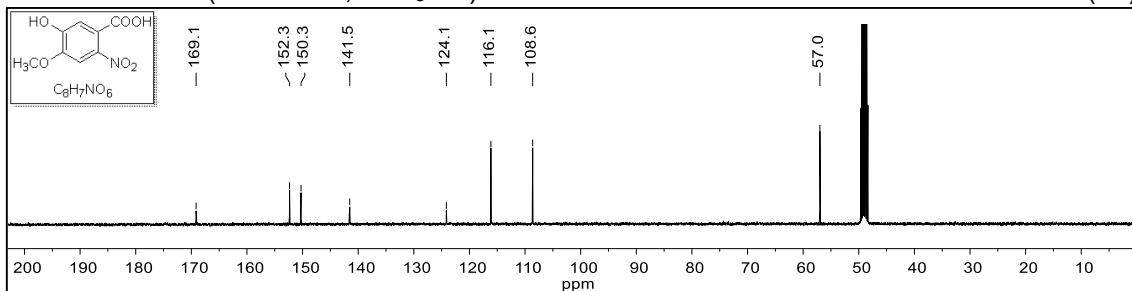
**HRMS (ES+):** - 7-hidroxi-6-metoxi-quinazolin-4(3H)-ona (17).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3^+$  193,0613; encontrado: 193,0605.



**RMN de  $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - Ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzóico (25)

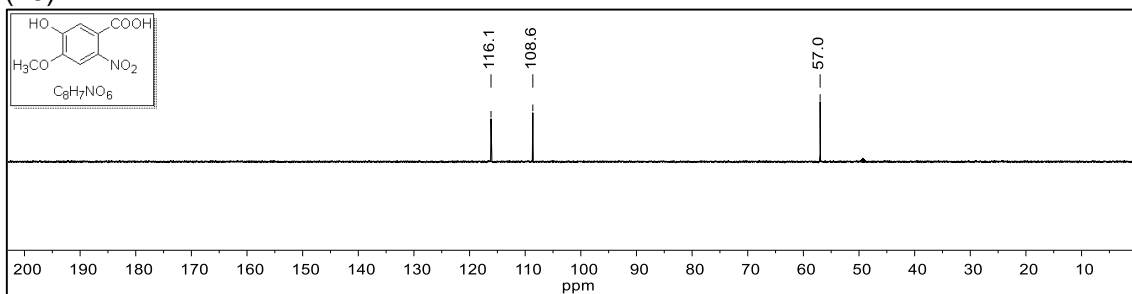


**RMN de  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - Ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzóico (25)

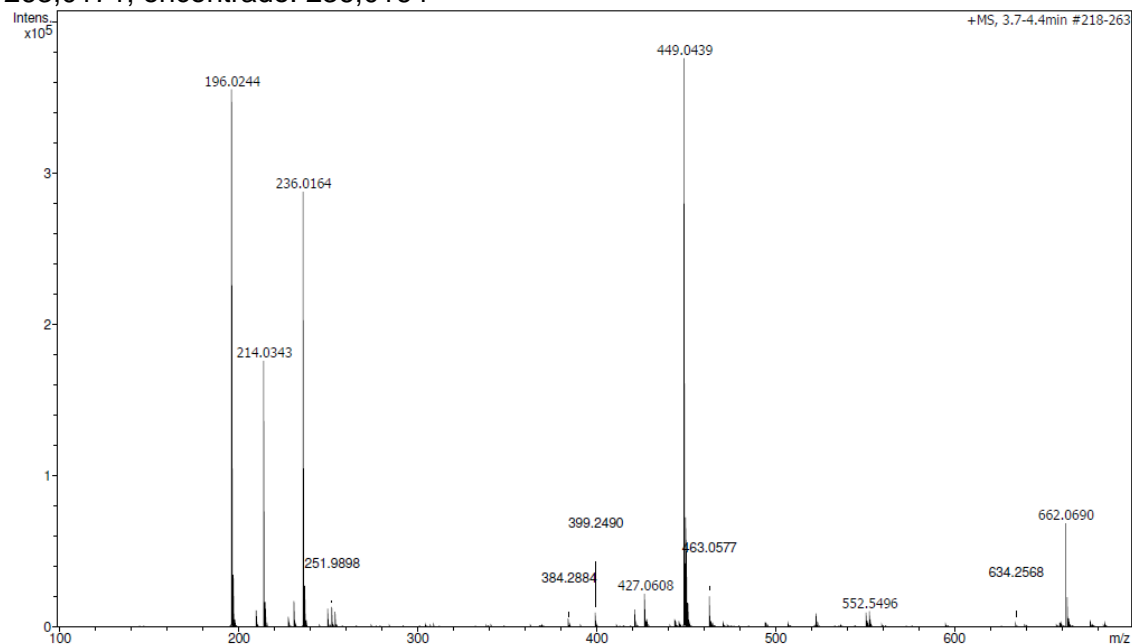




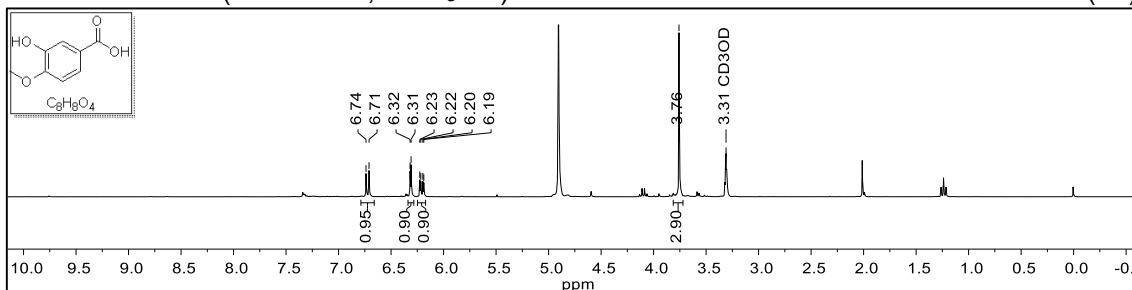
RMN de  $^{13}\text{C}$  {DEPT-135}(101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - *Ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzóico* (25)

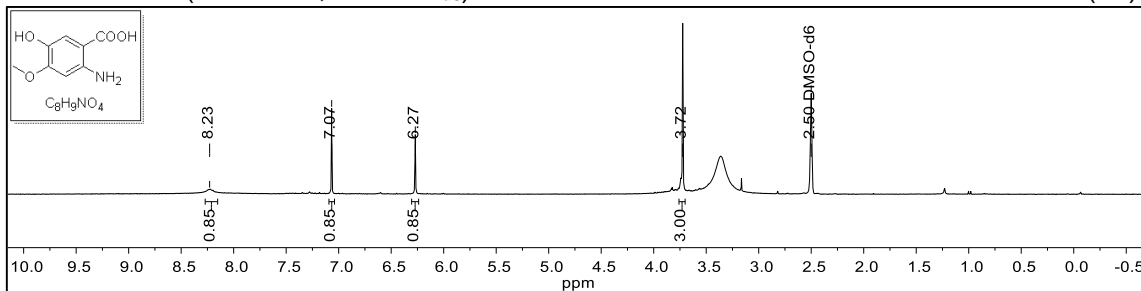
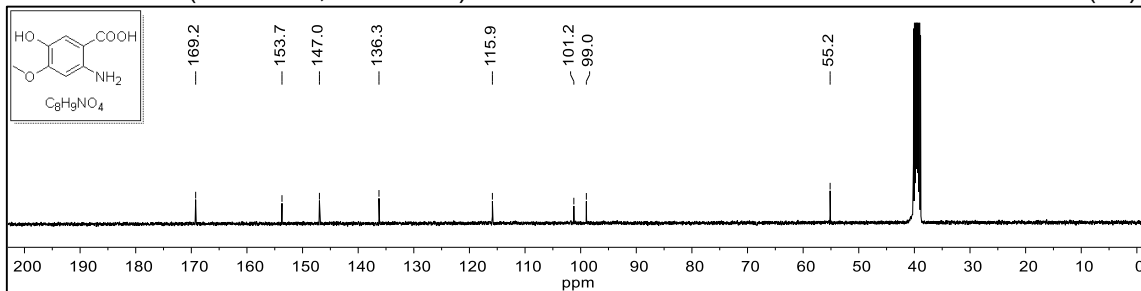
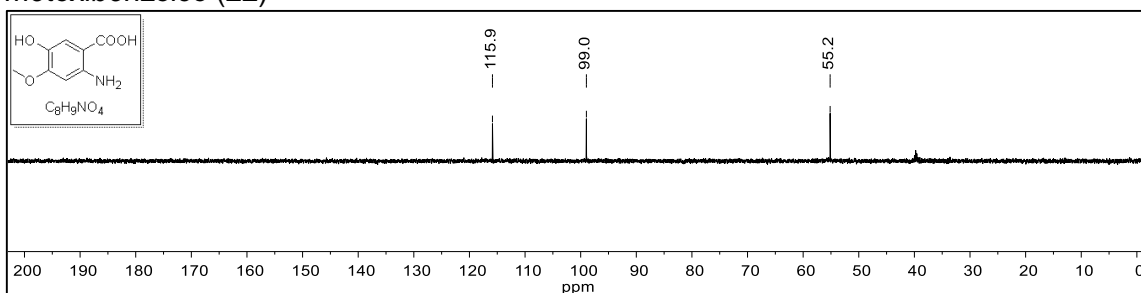
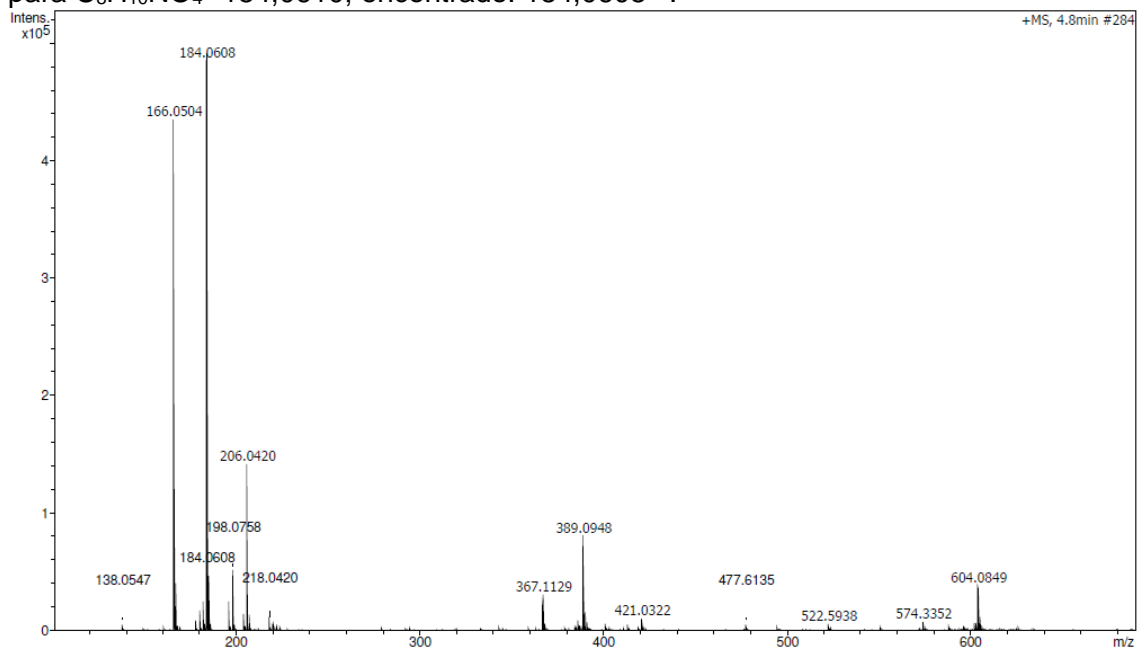


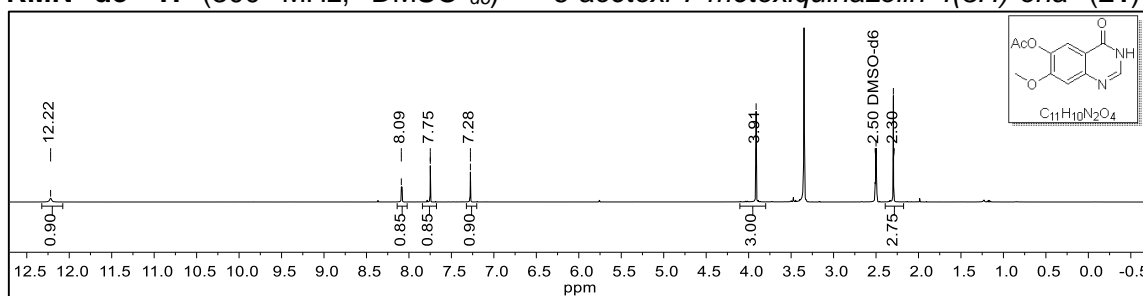
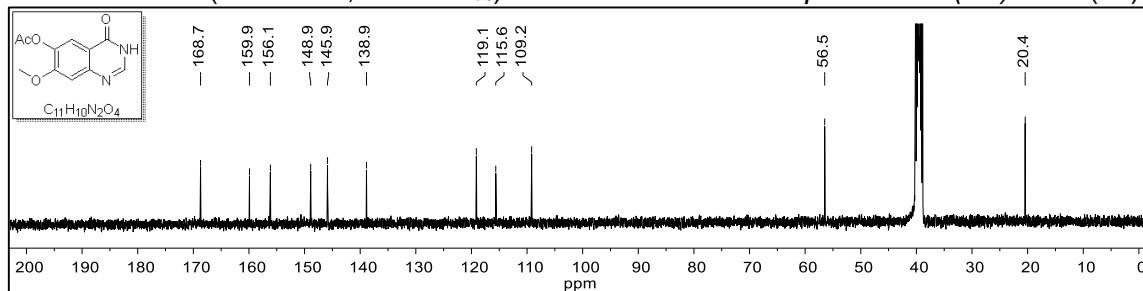
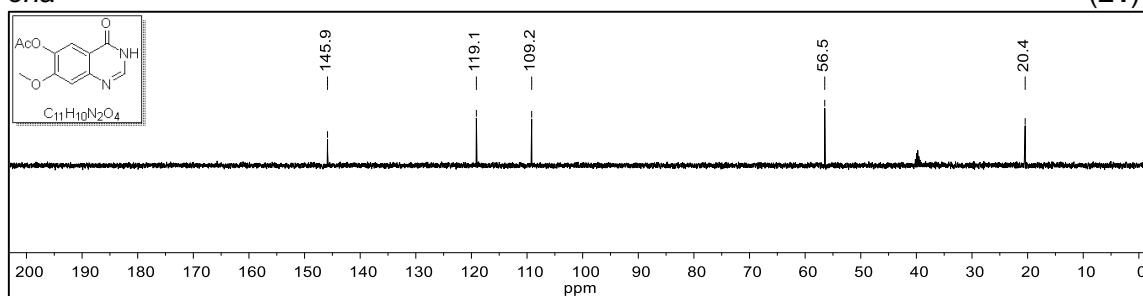
HRMS (ES<sup>+</sup>): - *Ácido 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzóico* (25).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_6$  214,0352; encontrado 214,0343;  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculado de  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_6\text{Na}^+$  263,0171; encontrado: 236,0164



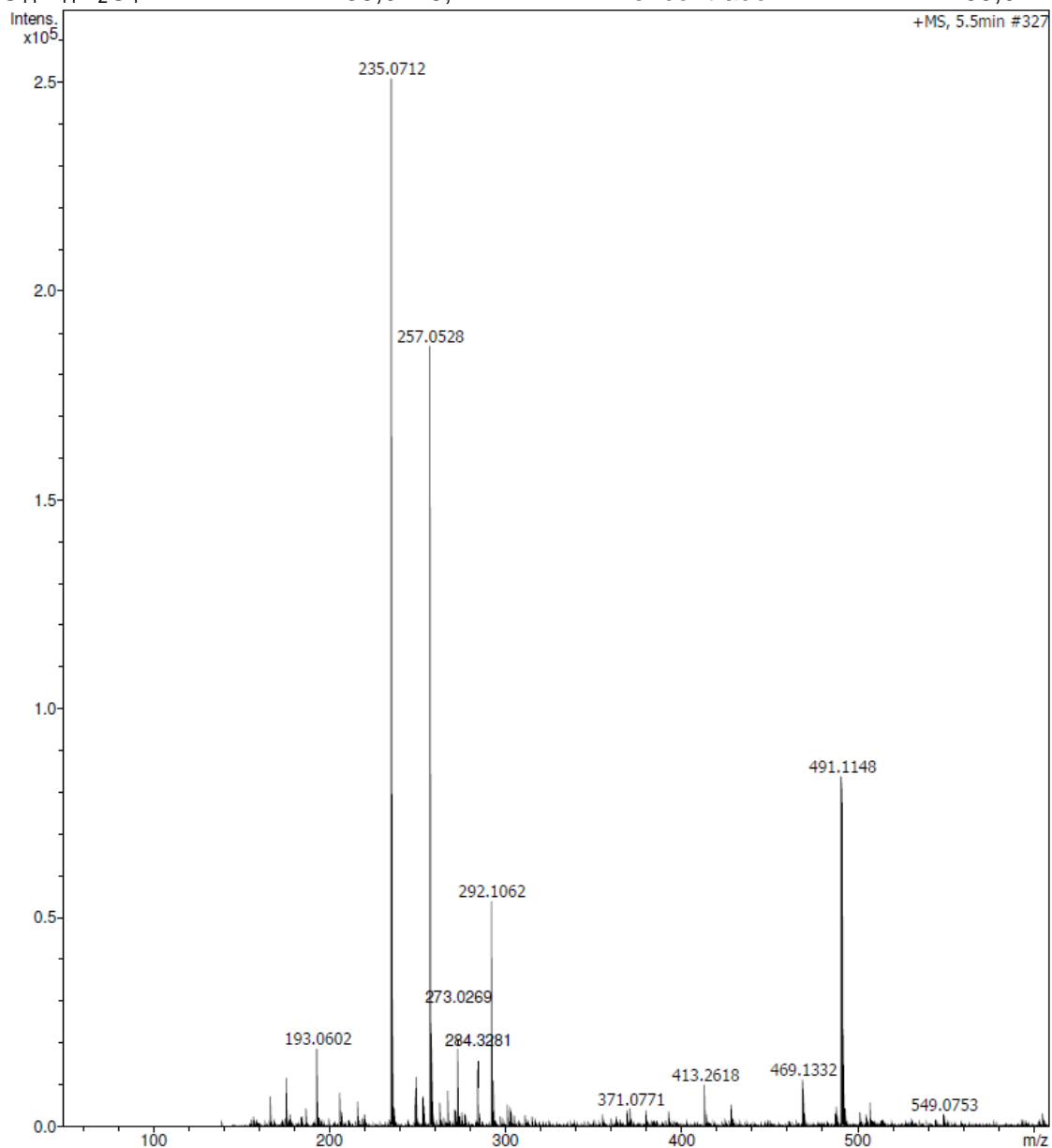
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - *Ácido 3-hidroxi-4-metoxibenzóico* (27)



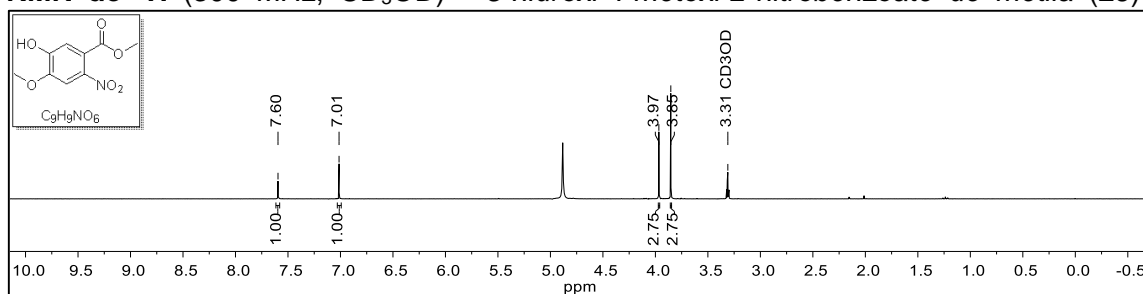
**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - Ácido 2-amino-5-hidroxi-4-metoxibenzóico (22)**

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - Ácido 2-amino-5-hidroxi-4-metoxibenzóico (22)**

**RMN de  $^{13}\text{C}$  {DEPT-135} (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - Ácido 2-amino-5-hidroxi-4-metoxibenzóico (22)**

**HRMS (ES+) - Ácido 2-amino-5-hidroxi-4-metoxibenzóico (22).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_4^+$  184,0610; encontrado: 184,0608 .**


RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-acetoxi-7-metoxiquinazolin-4(3H)-ona (21)RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-acetoxi-7-metoxiquinazolin-4(3H)-ona (21)RMN de  $^{13}\text{C}$  {DEPT-135} (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-acetoxi-7-metoxiquinazolin-4(3H)-ona (21)

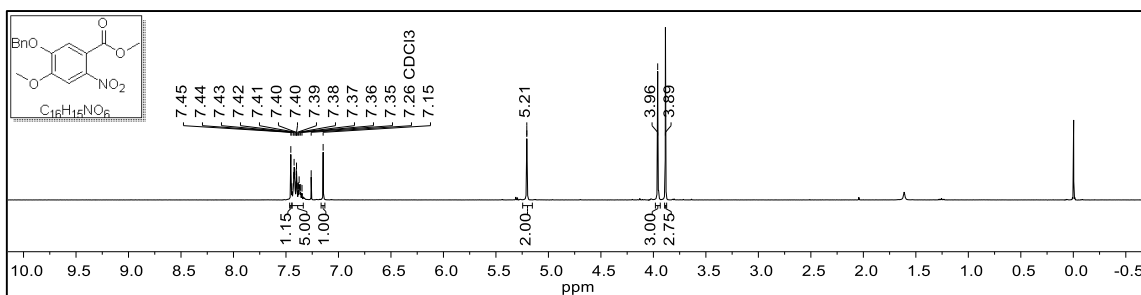
**HRMS (ES+) - 6-acetoxi-7-metoxiquinazolin-4(3H)-ona. (21)**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> 235,0719; encontrado 235,0712



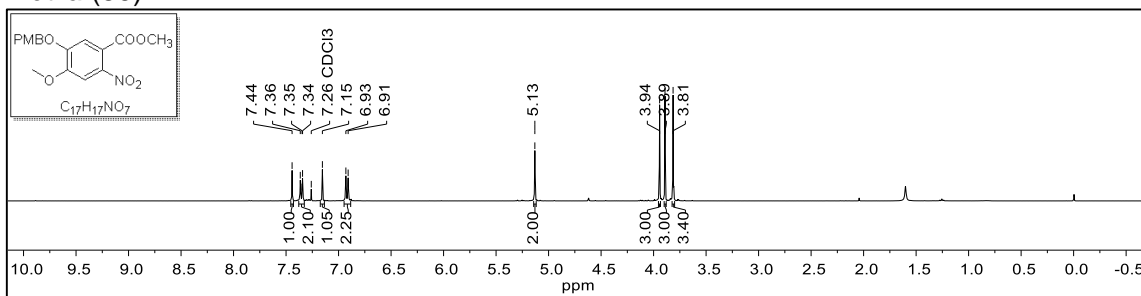
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) - 5-hidroxi-4-metoxi-2-nitrobenzoate de metila (29)**



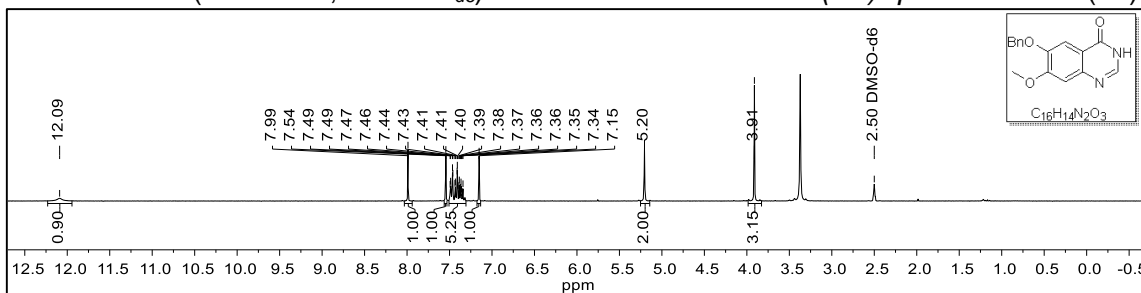
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - 5-(Benziloxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (30)**



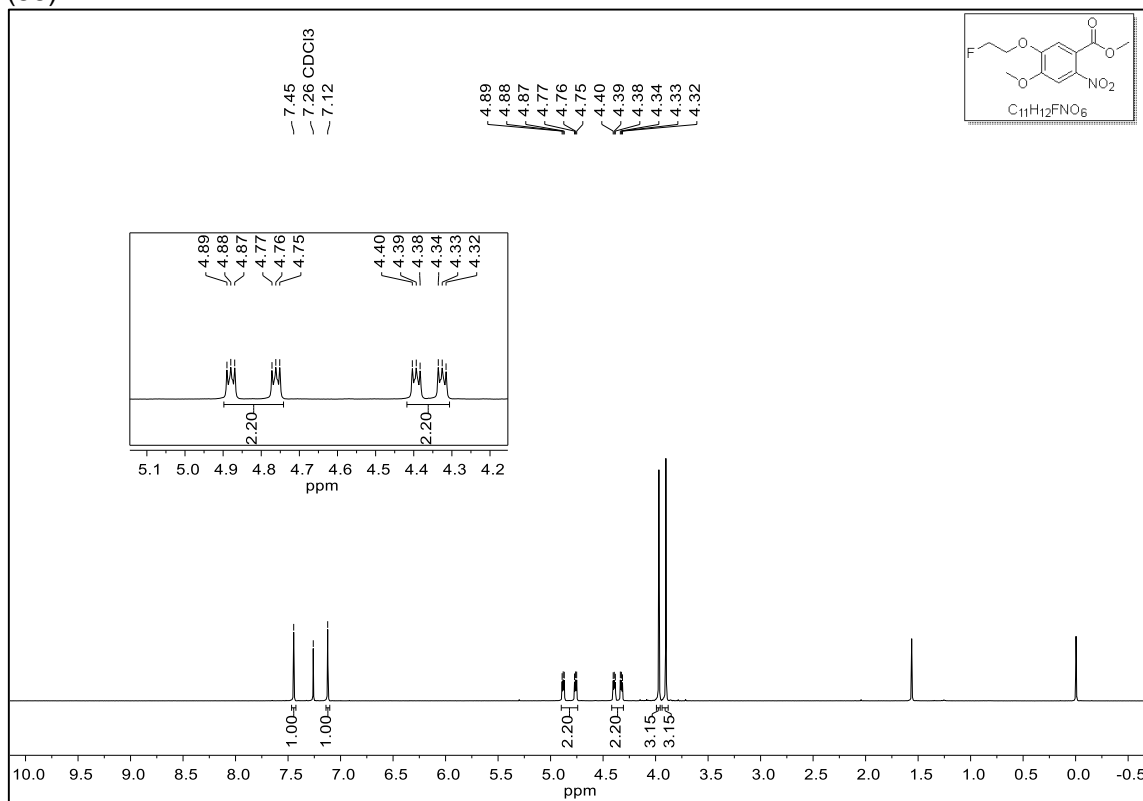
RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - 5-(*p*-metoxibenziloxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (**30**)



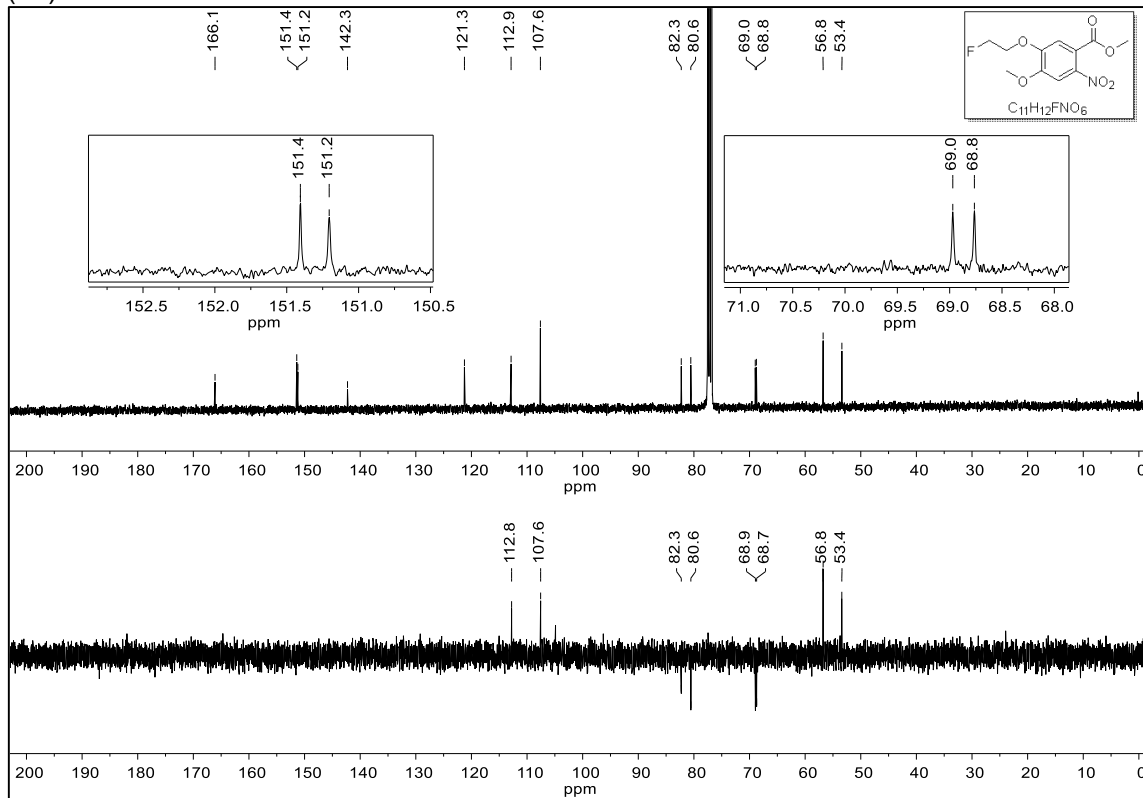
RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) - 6-benziloxi-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (**32**)



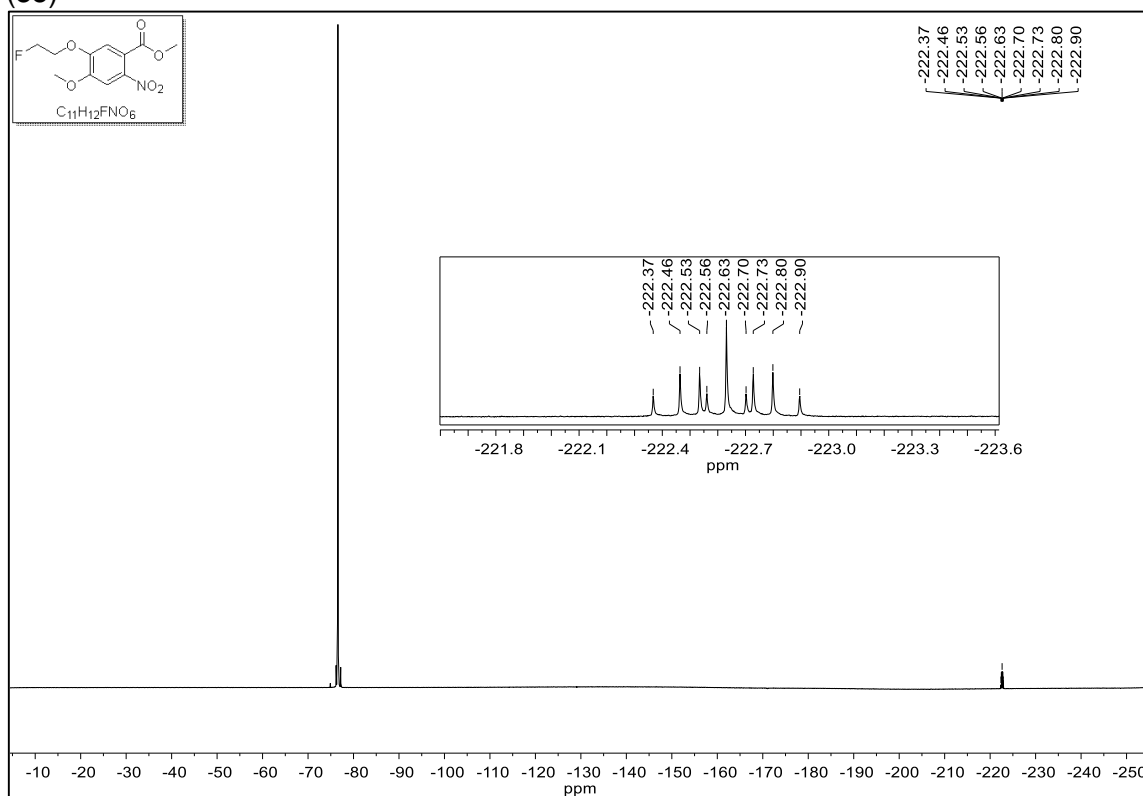
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 5-(2-fluoroetoxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (35)



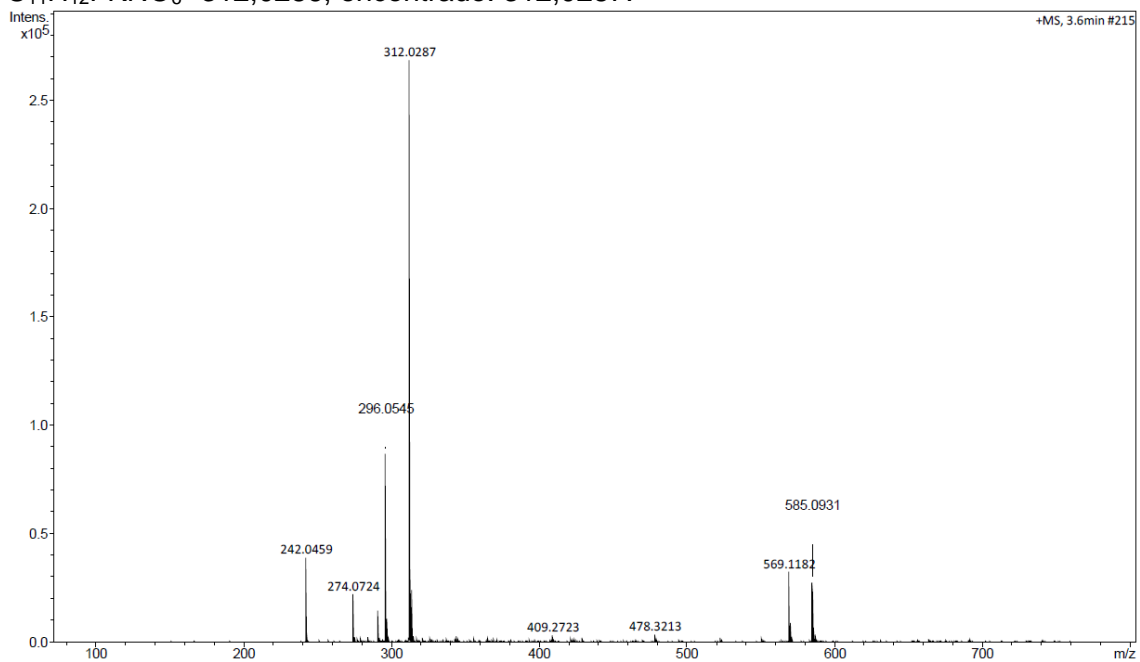
RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 5-(2-fluoroetoxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (35)



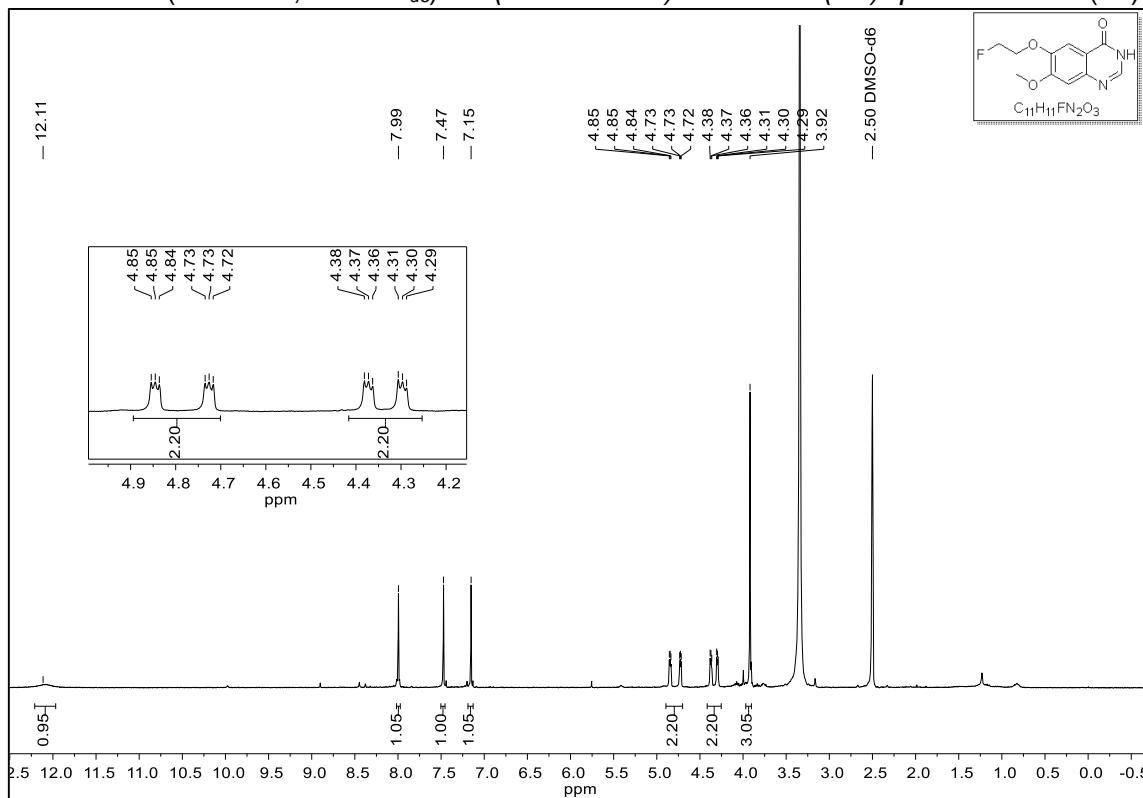
**RMN de  $^{19}\text{F}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 5-(2-fluoroetoxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (35)**



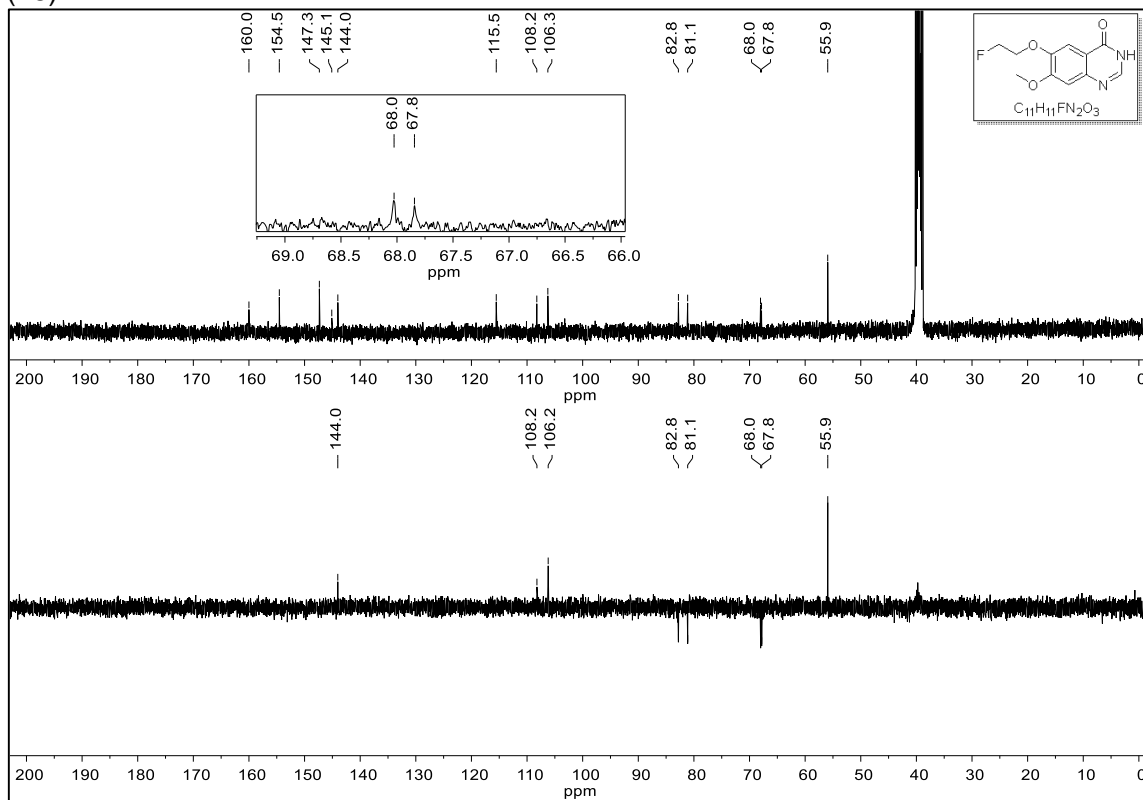
**HRMS (ES+):** 5-(2-fluoroetoxi)-4-metoxi-2-nitrobenzoato de metila (35).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{FNO}_6$  274,0727; encontrado: 274,0724;  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FNaNO}_6$  296,0546; encontrado: 296,0545;  $m/z$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FKNO}_6^+$  312,0286, encontrado: 312,0287.



RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (18)

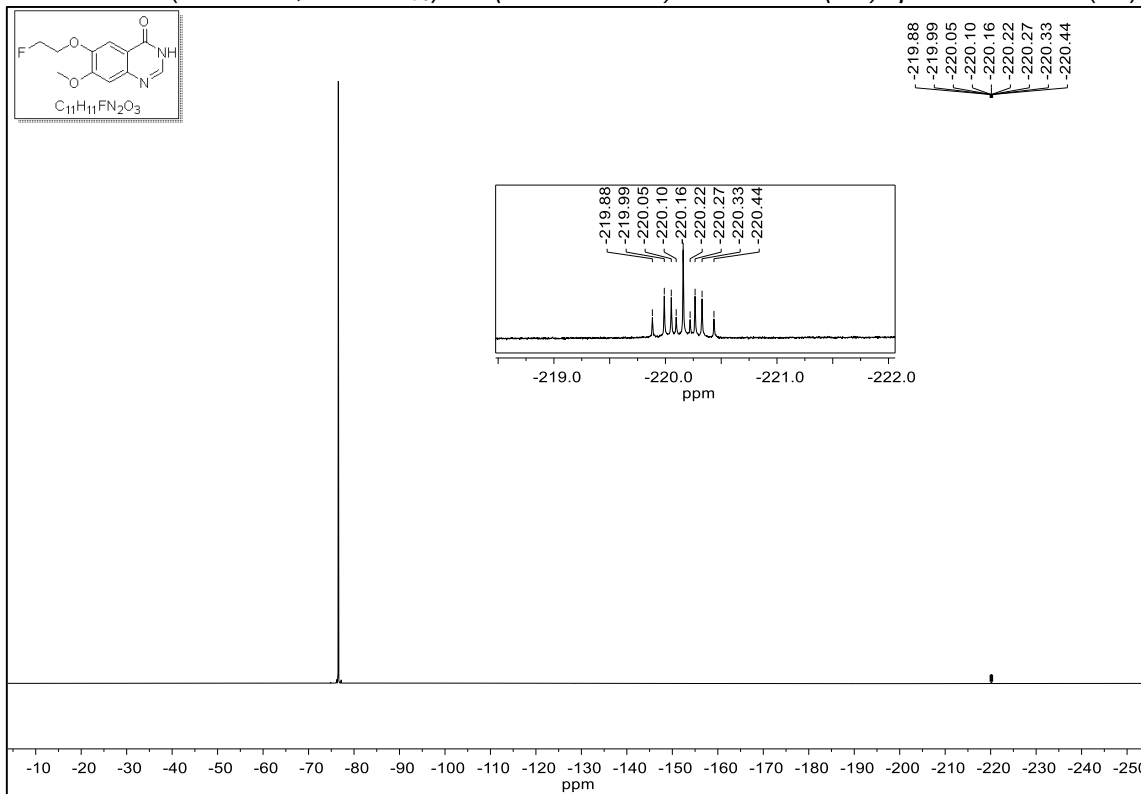


RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (18)

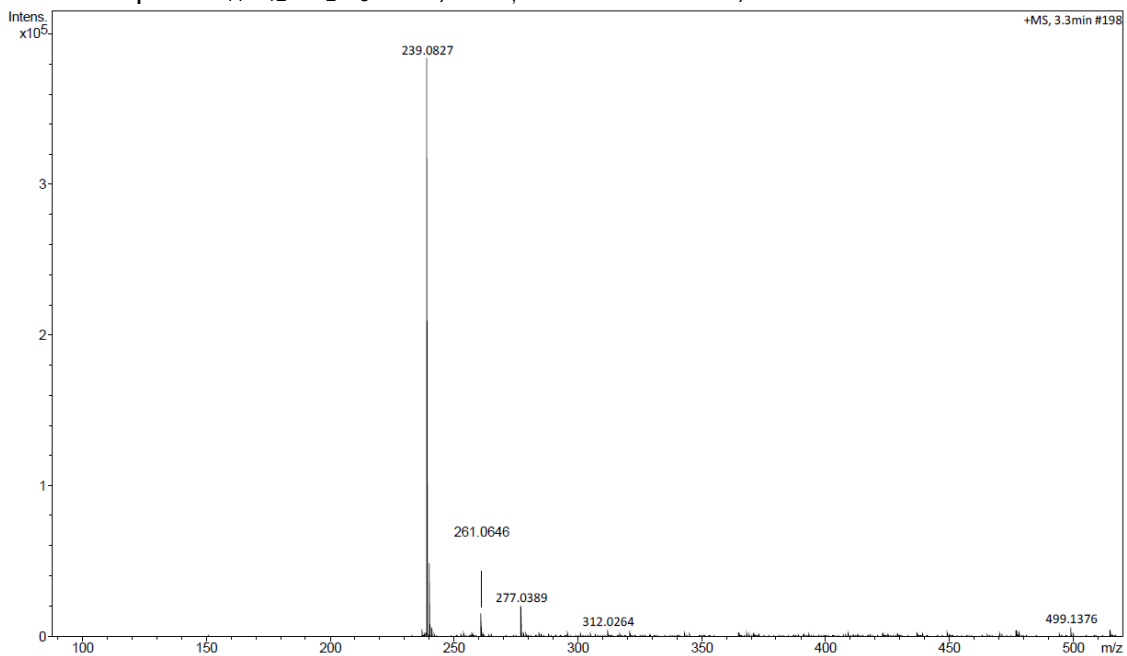


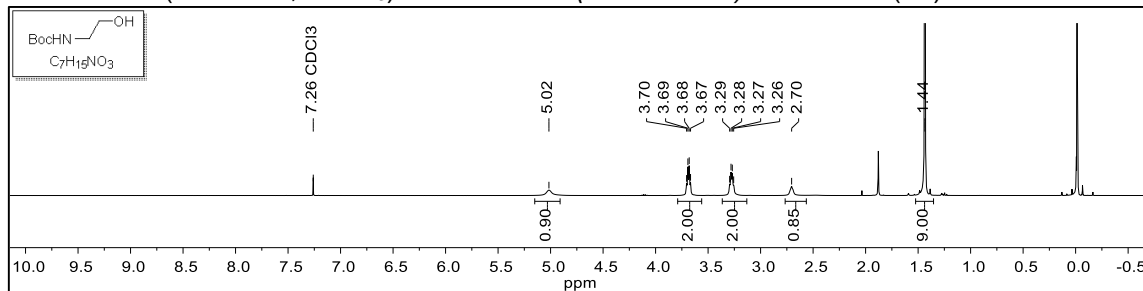


RMN de  $^{19}\text{F}$  (282 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (18)

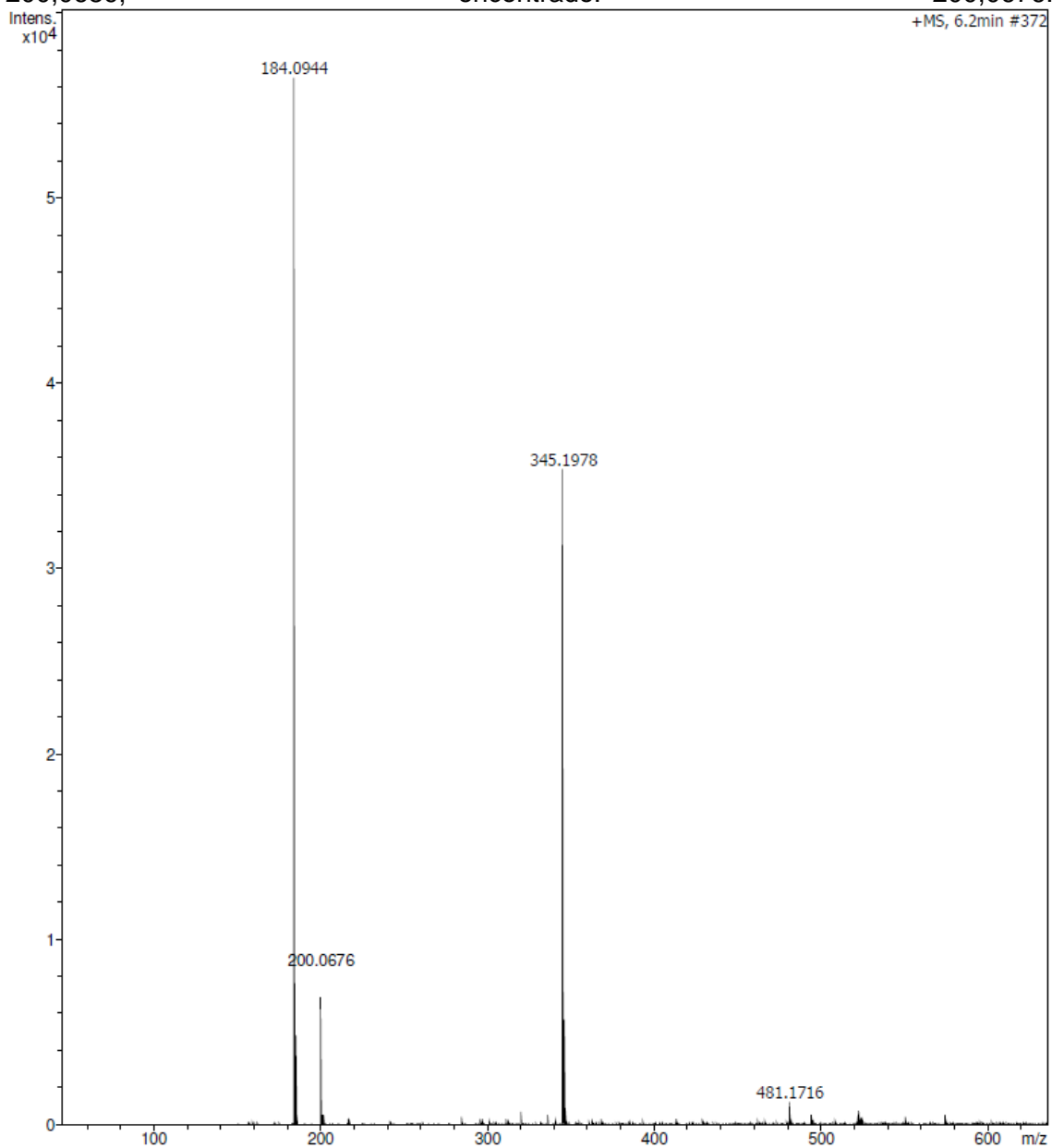


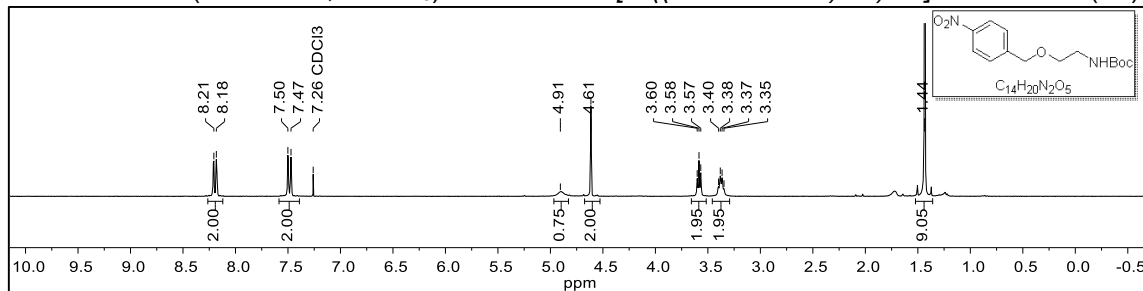
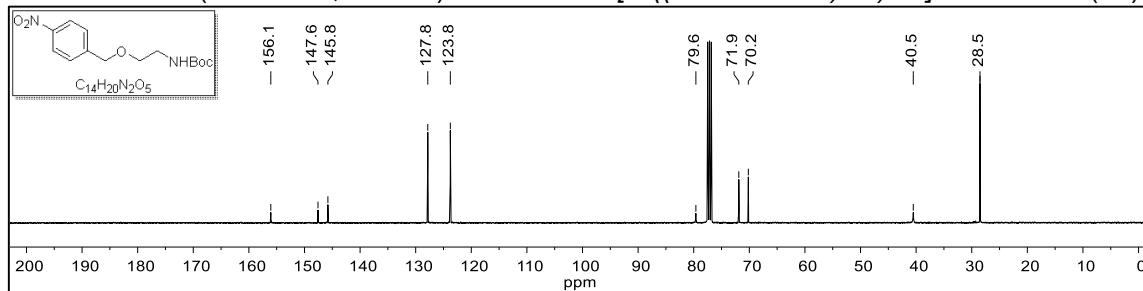
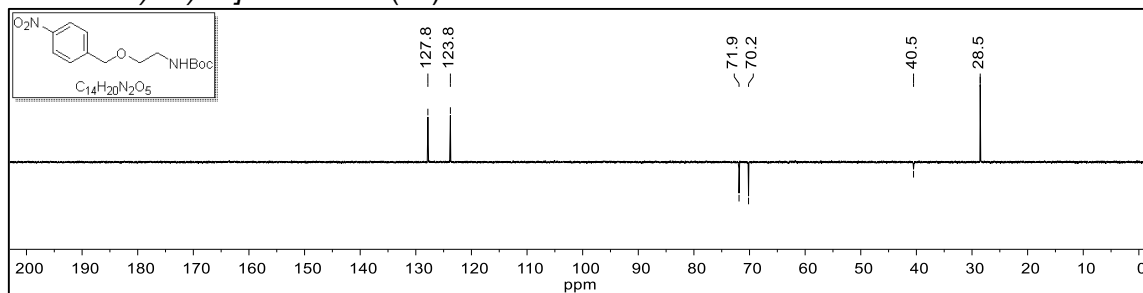
HRMS (ES<sup>+</sup>): 6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-4(3H)-quinazolinona (18).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{FN}_2\text{O}_3^+$  239,0832; encontrado: 239,0827.



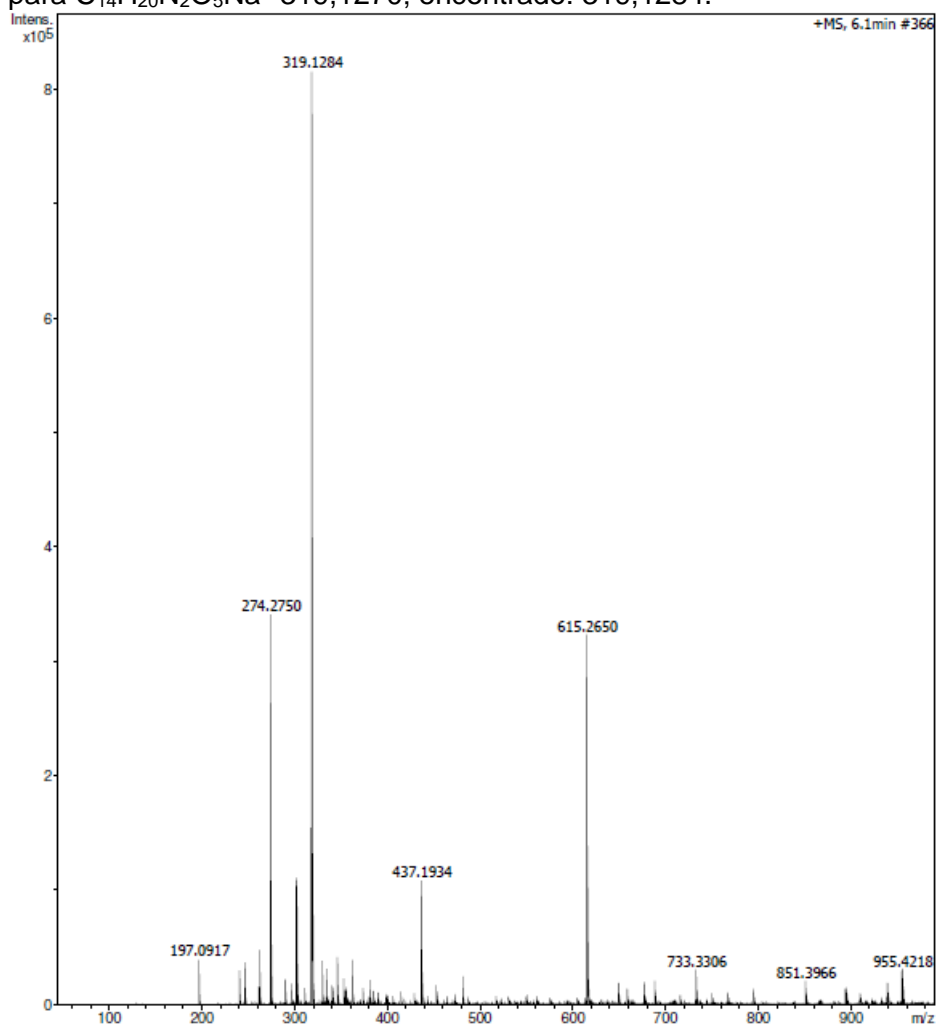
**RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *tert*-butil *N*-(2-hidroxi)etil)carbamato (**44**)**


**HRMS (ES<sup>+</sup>):** *tert*-butil *N*-(2-hidroxi)etil)carbamato (**44**).  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calculado para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> 184,0944; encontrado:184,0950;  $m/z$   $[\text{M}+\text{K}]^+$  calculado para C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>K 200,0689; encontrado: 200,0676.

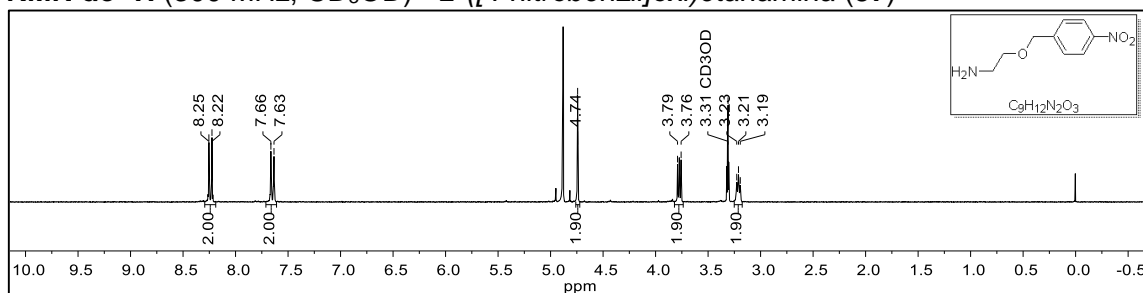


**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *tert*-butil [2-((4-nitrobenzil)oxi)etil]carbamato (45)****RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *tert*-butil [2-((4-nitrobenzil)oxi)etil]carbamato (45)****RMN de  $^{13}\text{C}$  {DEPT-135} (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *tert*-butil [2-((4-nitrobenzil)oxi)etil]carbamato (45)**

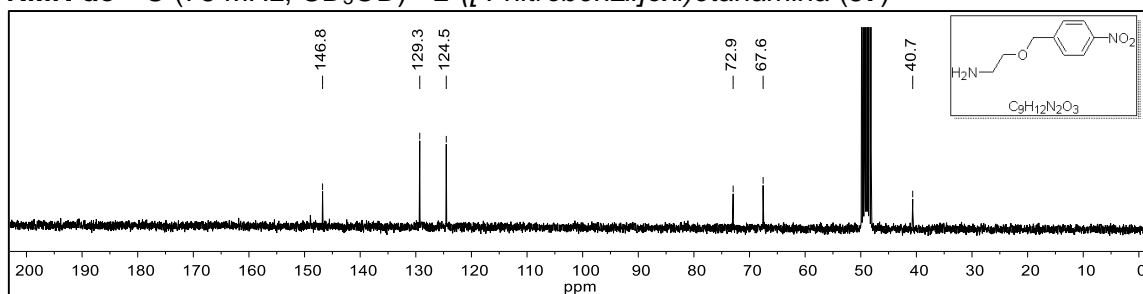
**HRMS (ES+):** *terc-butil* [2-((4-nitrobenzil)oxi)etil]carbamato (**39**).  $m/z$   $[M+Na]^+$  calculado para  $C_{14}H_{20}N_2O_5Na^+$  319,1270; encontrado: 319,1284.

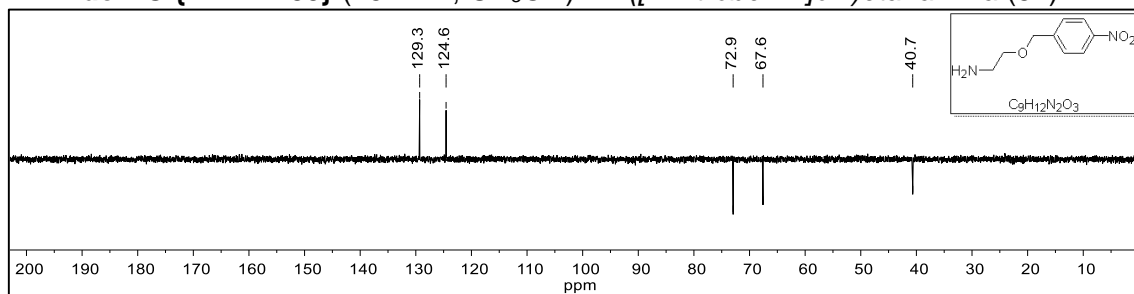
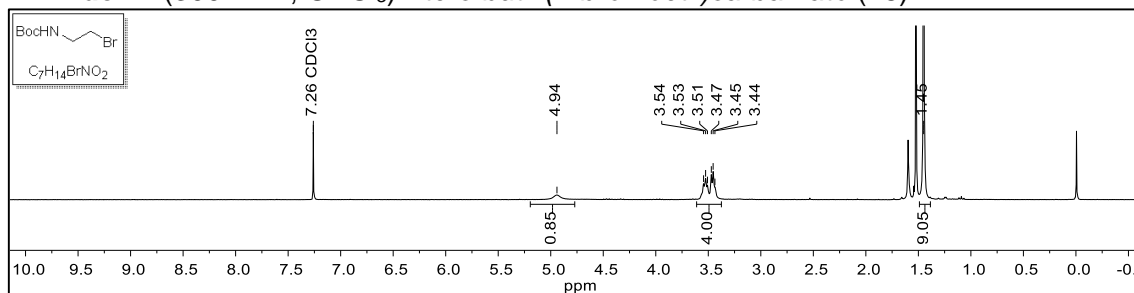
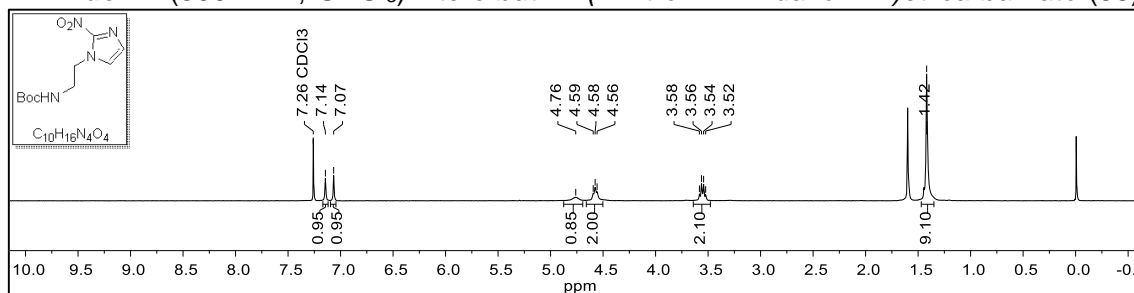
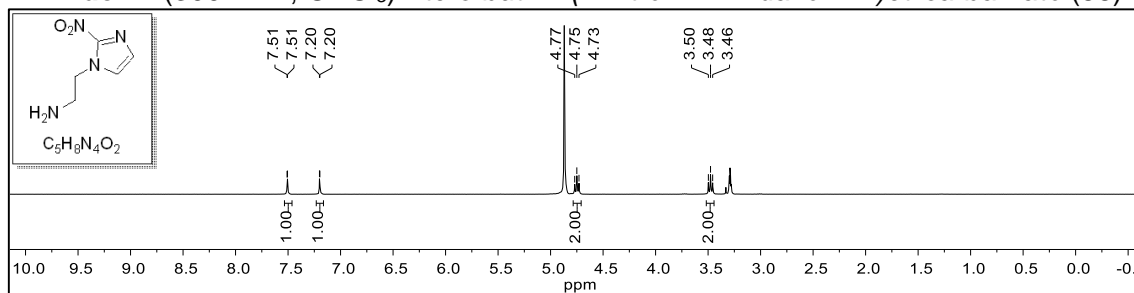
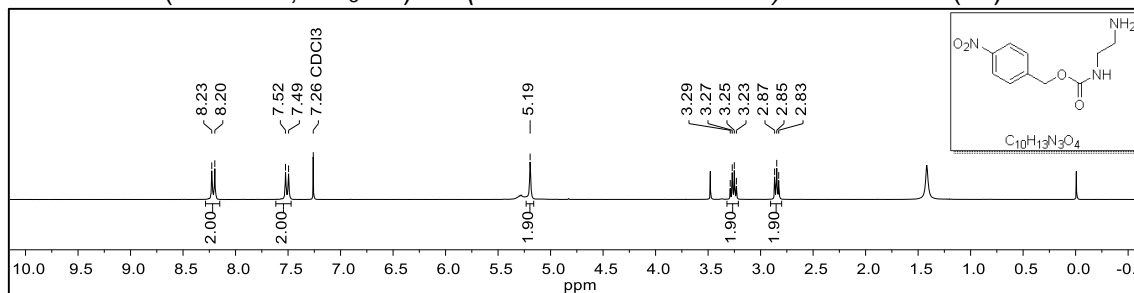


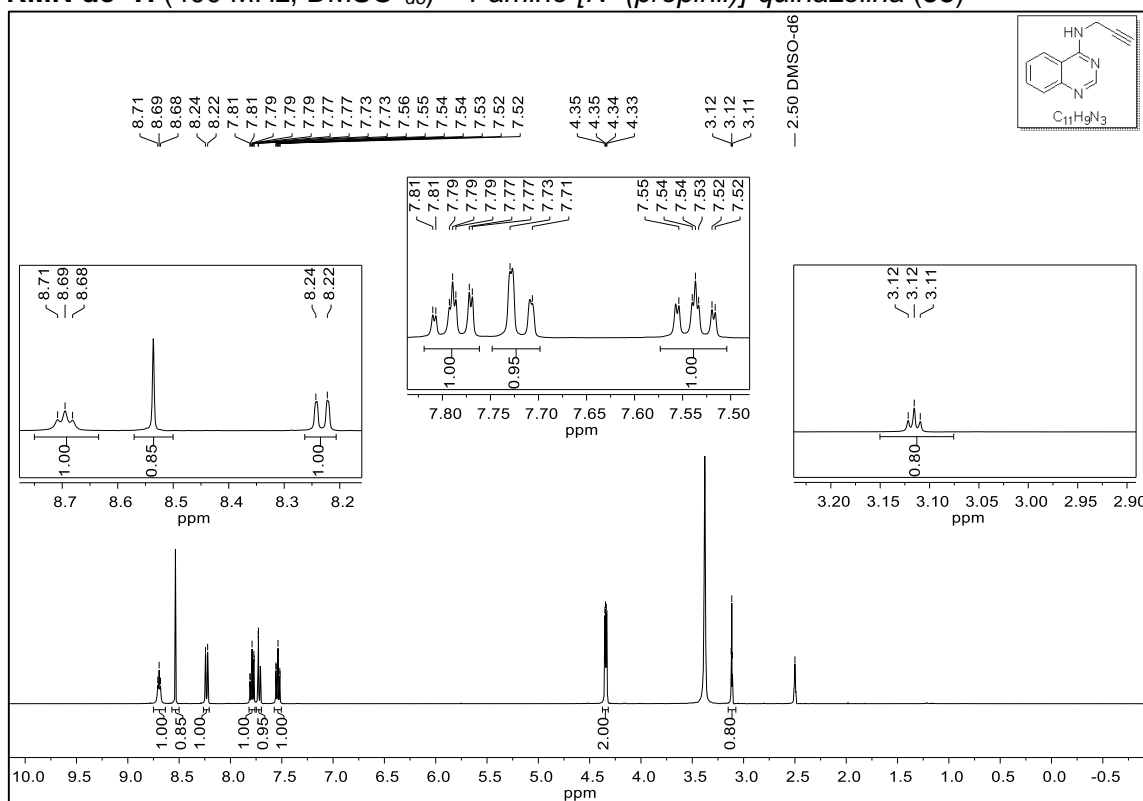
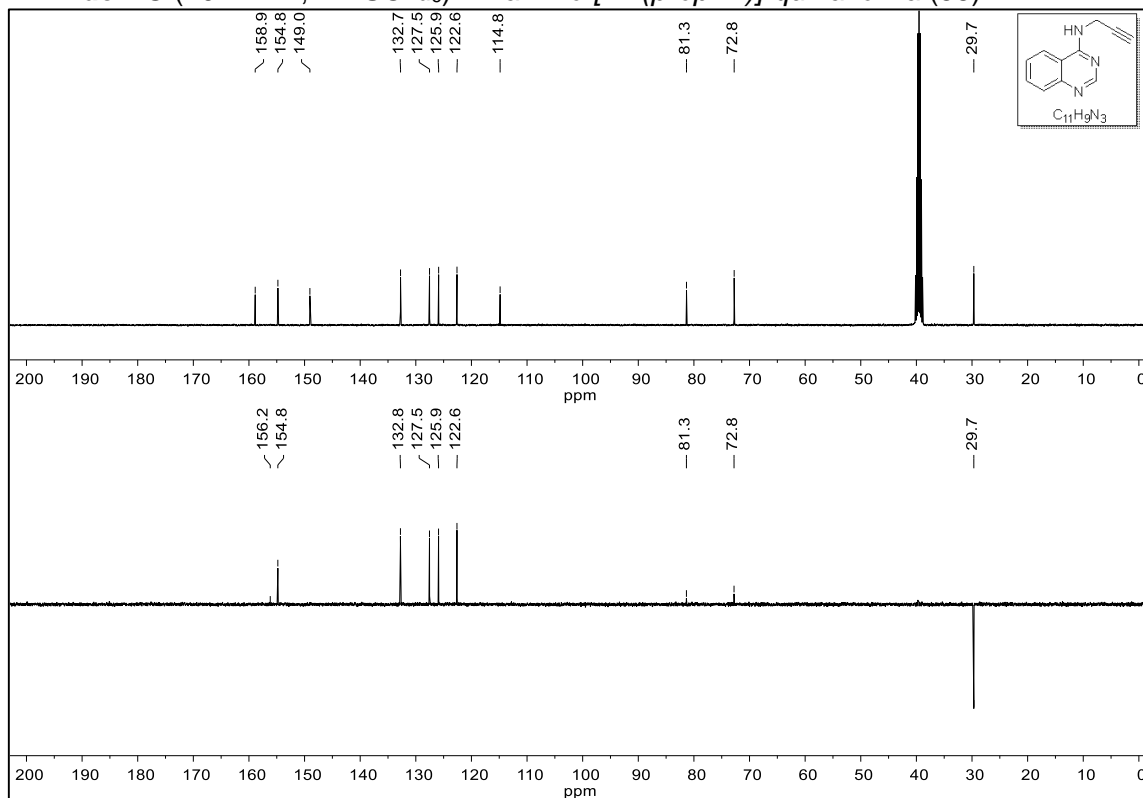
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) - 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**)**



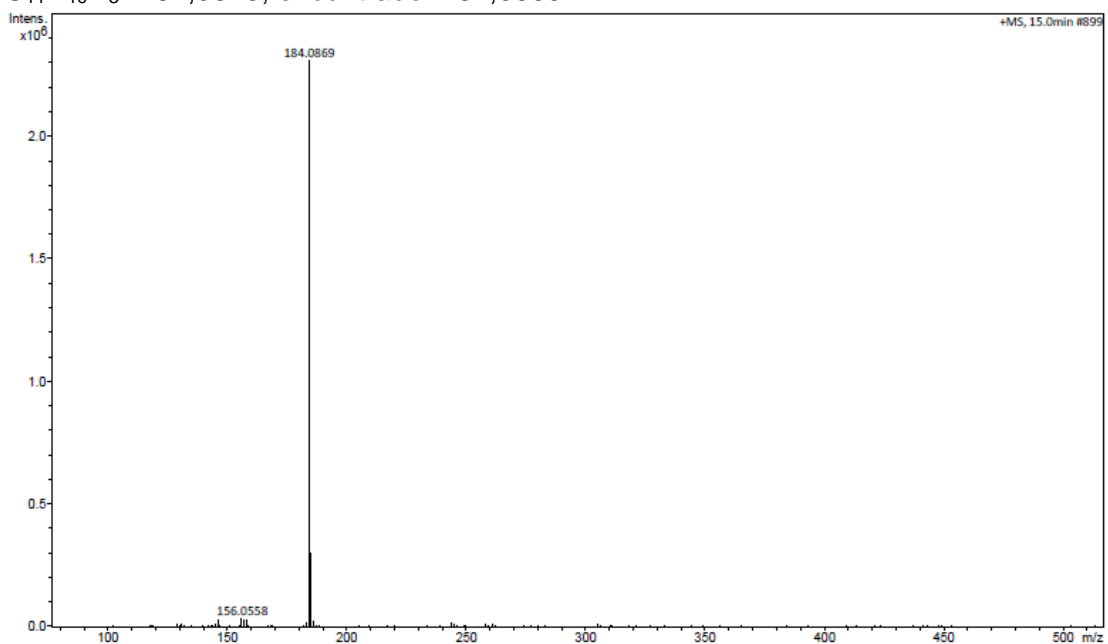
**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) - 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (**37**)**



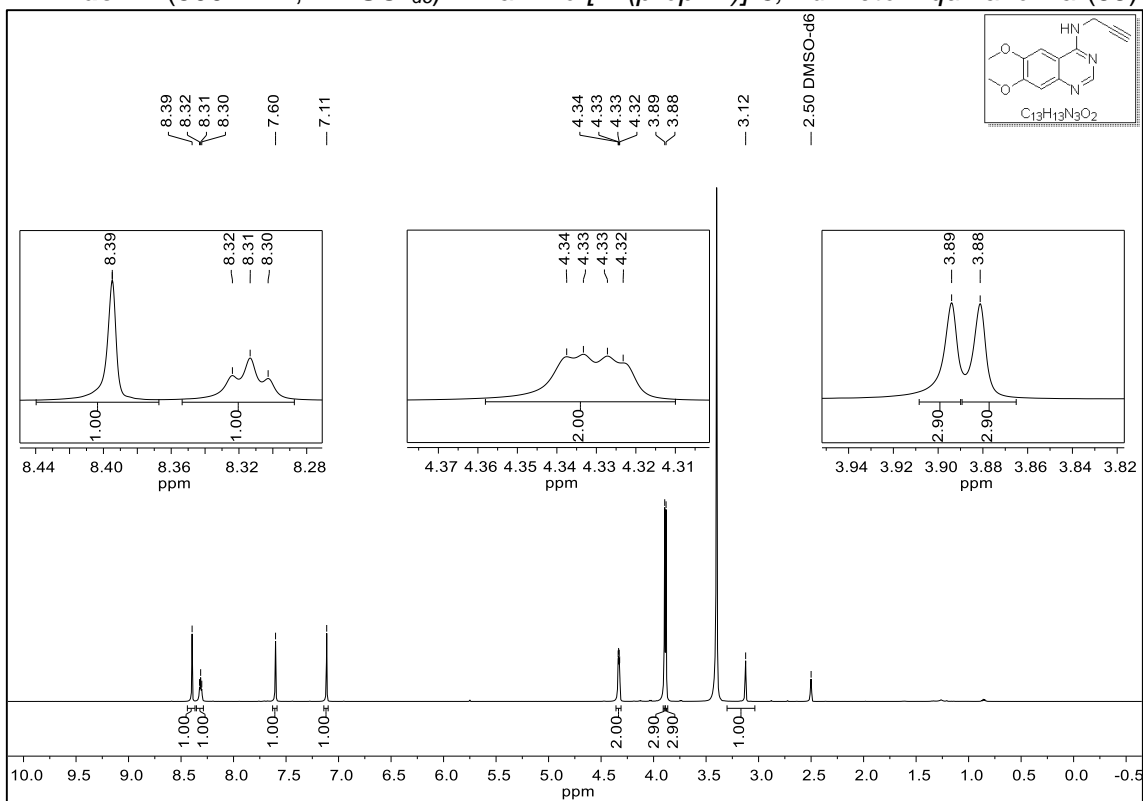
**RMN de  $^{13}\text{C}$  {DEPT-135} (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 2-([4-nitrobenzil]oxi)etanamina (37)**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *terc-butil* (2-bromoetil)carbamato (48)**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *terc-butil* 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)etilcarbamato (38)**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *terc-butil* 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)etilcarbamato (38)**

**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) etanoamina (39)**


**RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 4-amino-[N-(propinil)]-quinazolina (58)**

**RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 4-amino-[N-(propinil)]-quinazolina (58)**


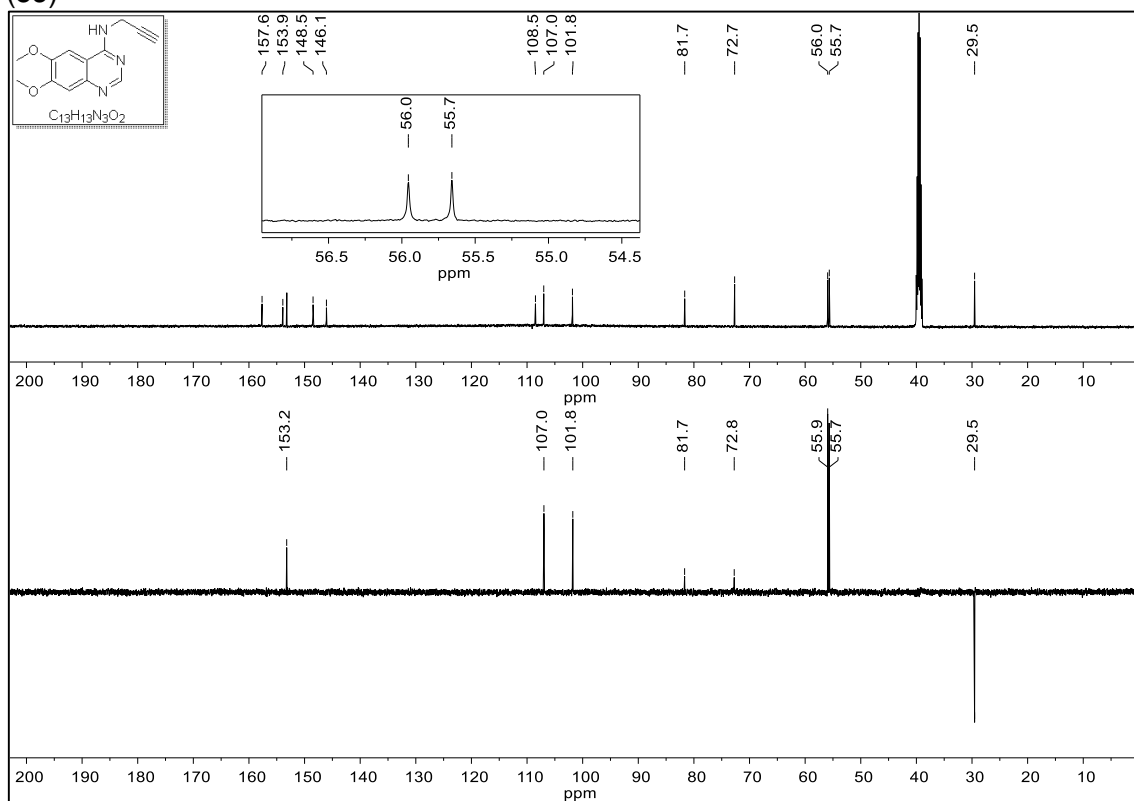
**HRMS (ES<sup>+</sup>):** 4-amino-[N-(propinil)]-quinazolina (**58**).  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub><sup>+</sup> 184,0875; encontrado: 184,0869.



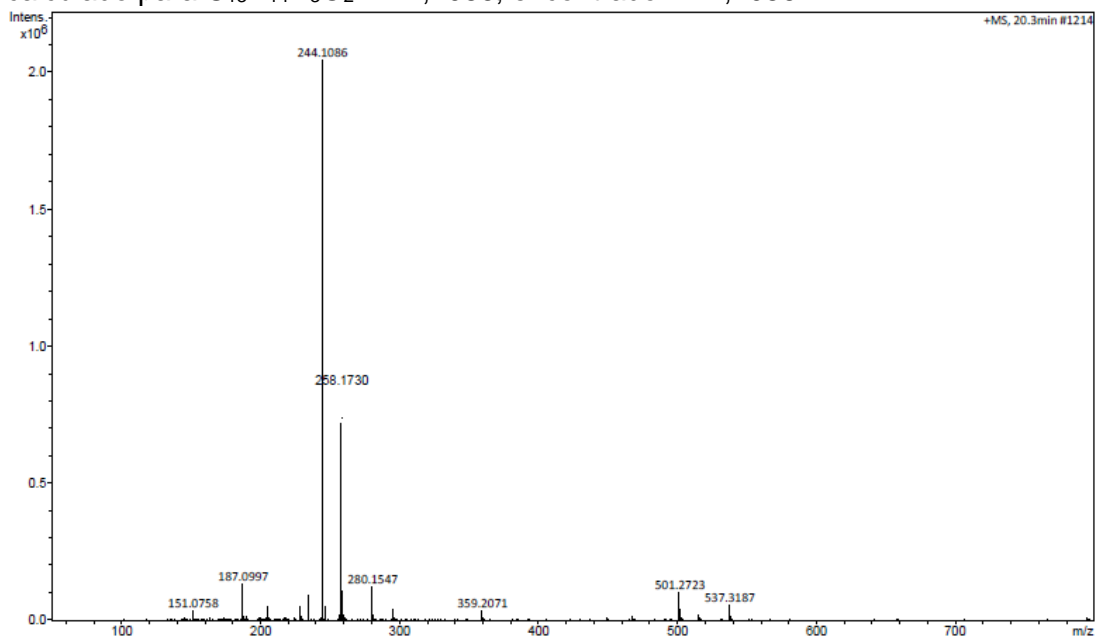
**RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) - 4-amino-[N-(propinil)]-6,7-dimetoxi-quinazolina (**59**)**



RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 4-amino-[N-(propinil)]-6,7-dimetoxi-quinazolina (59)

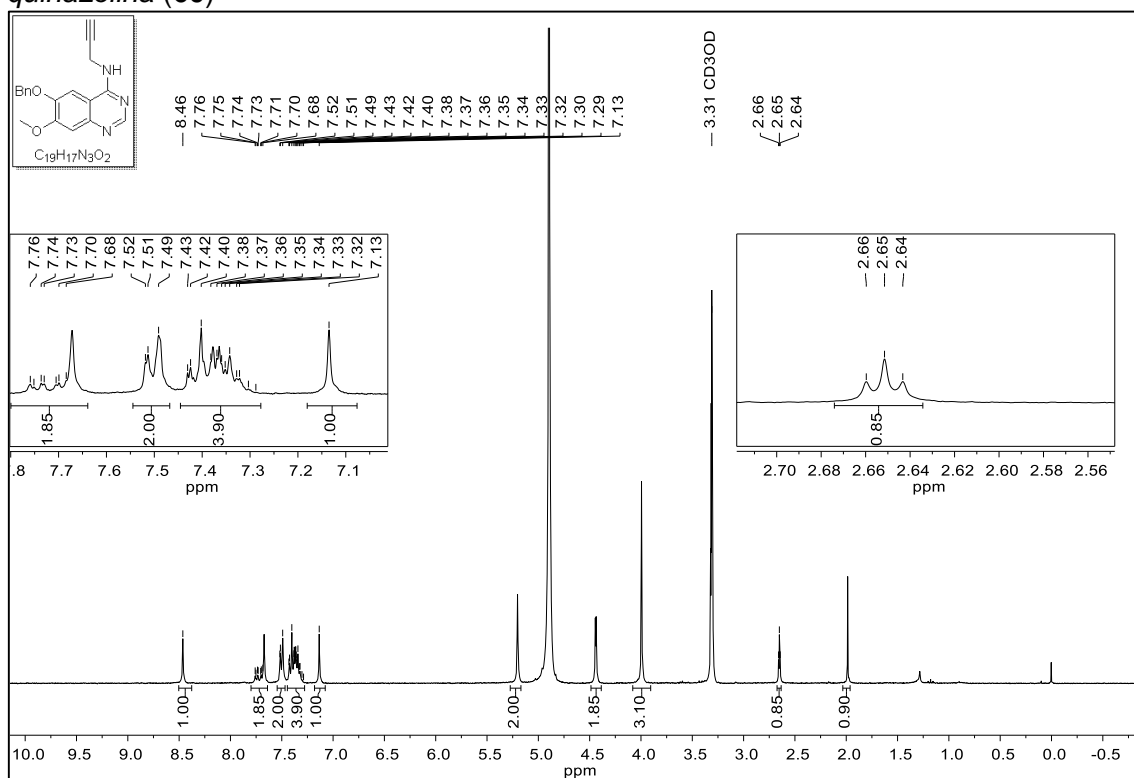


HRMS (ES<sup>+</sup>): 4-amino-[N-(propinil)]-6,7-dimetoxi-quinazolina (59).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_2^+$  244,1086; encontrado: 244,1086.

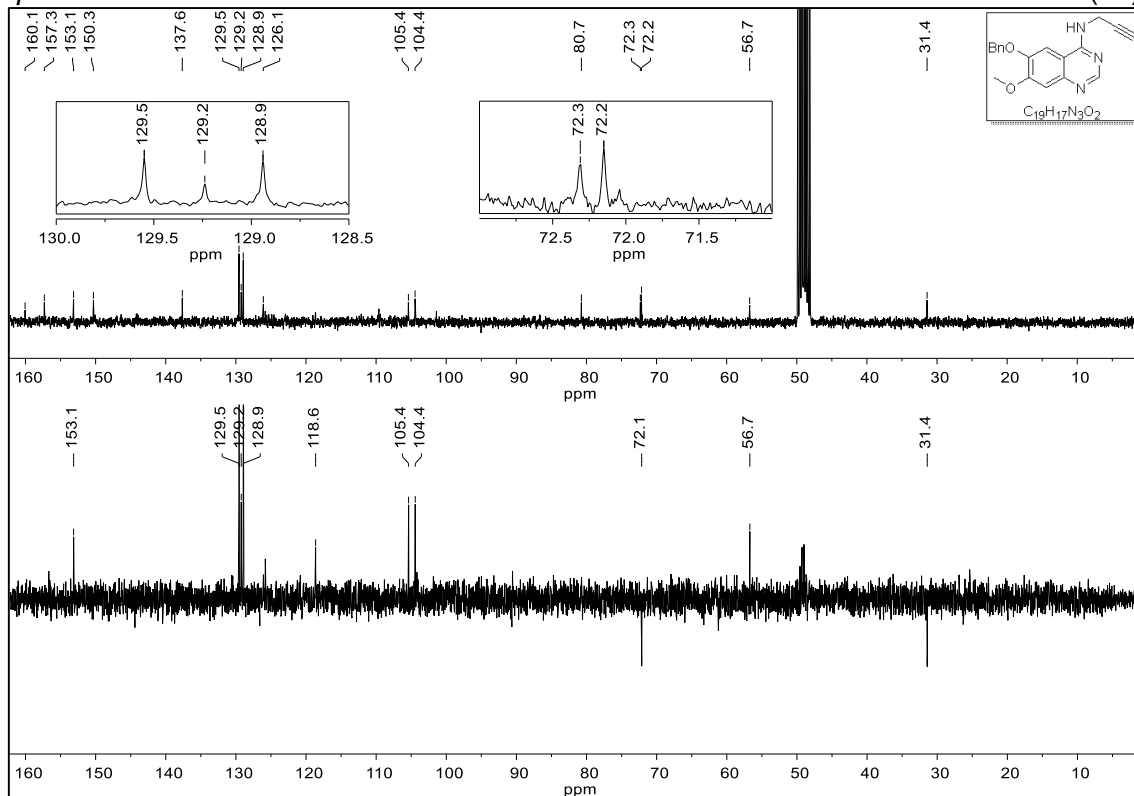




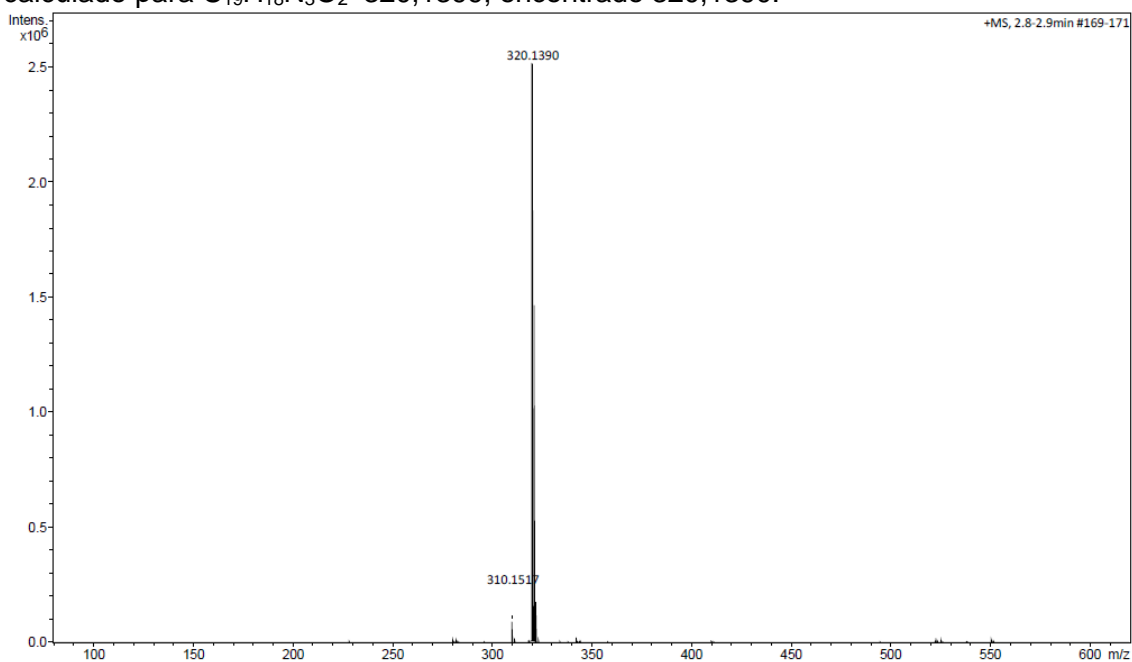
RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 4-amina-[N-(propinil)]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (60)



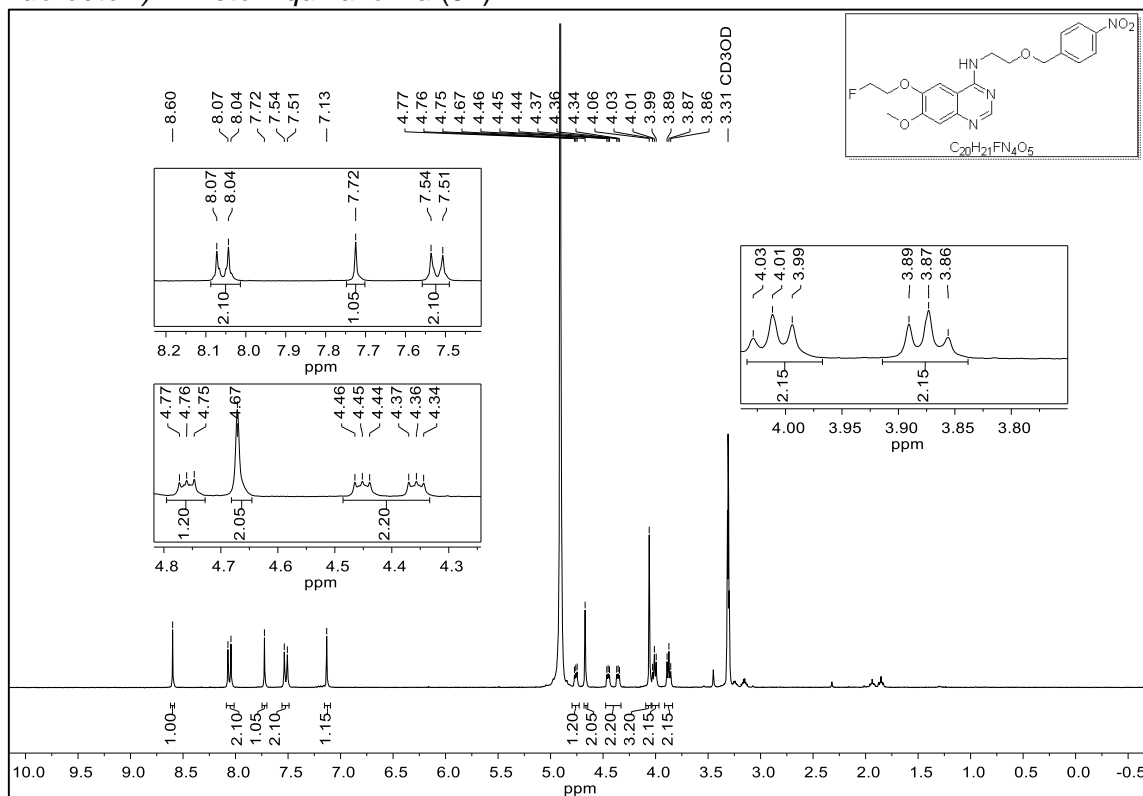
RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 4-amina-[N-(propinil)]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (60)



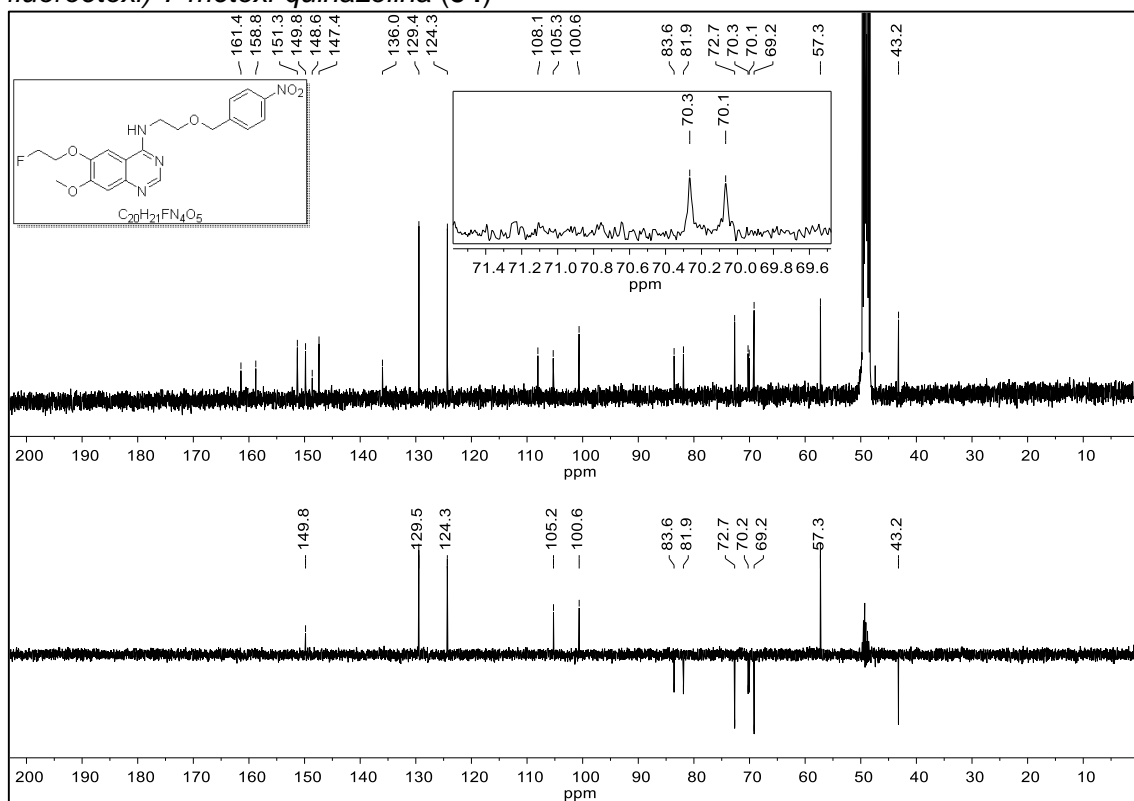
**HRMS (ES+):** 4-amina-[N-(propinil)]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**60**).  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 320,1399; encontrado 320,1390.



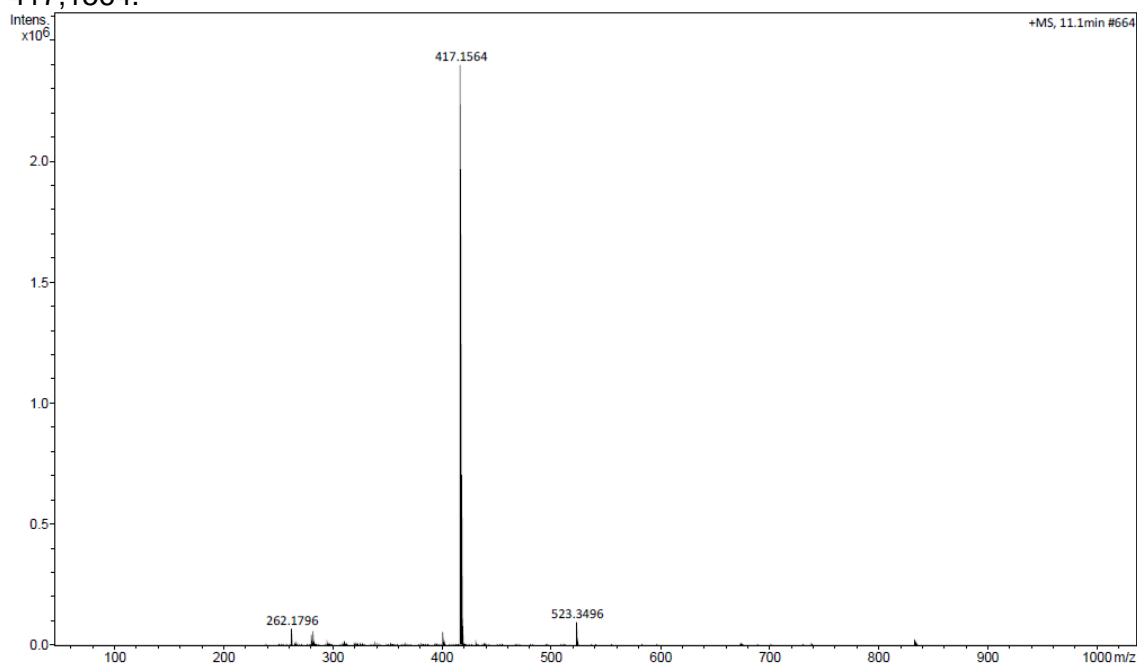
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) - 4-amina-[N-(2-([4-nitrofenil]metiloxi)etil)-6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-quinazolina (**54**)**



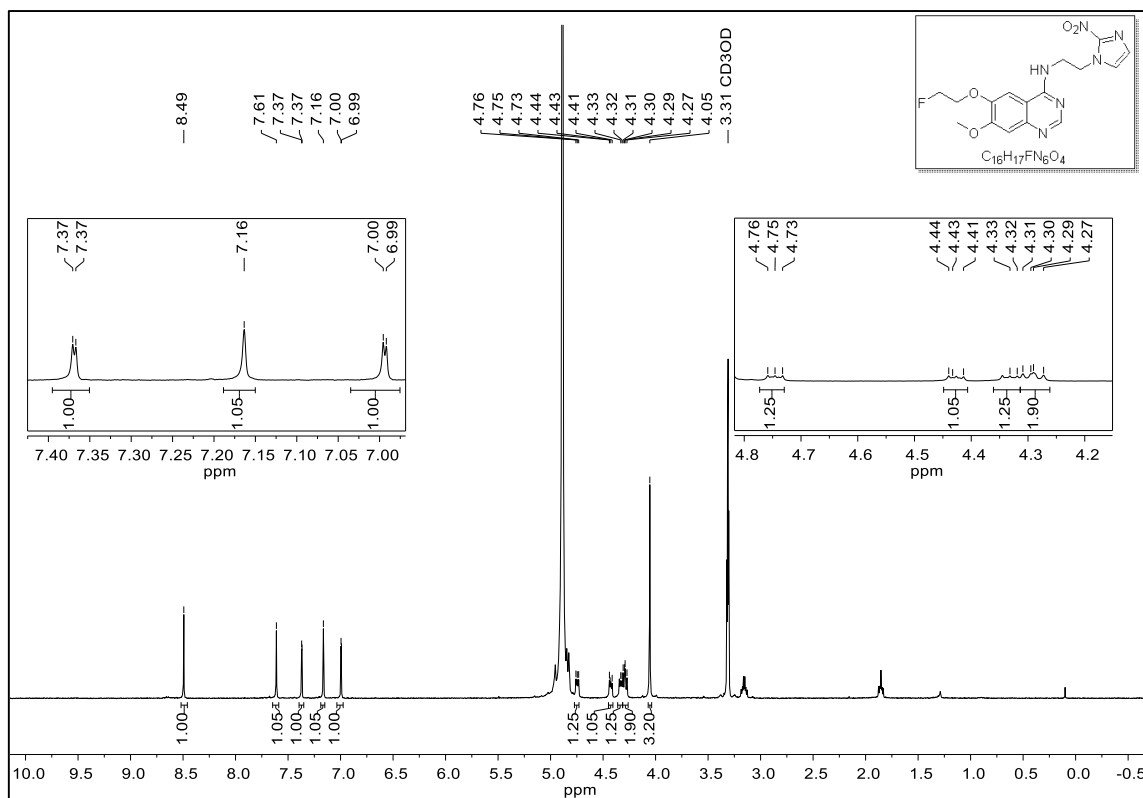
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 4-amina-[N-(2-([4-nitrofenil]metiloxi)etil)-6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-quinazolina (54)**



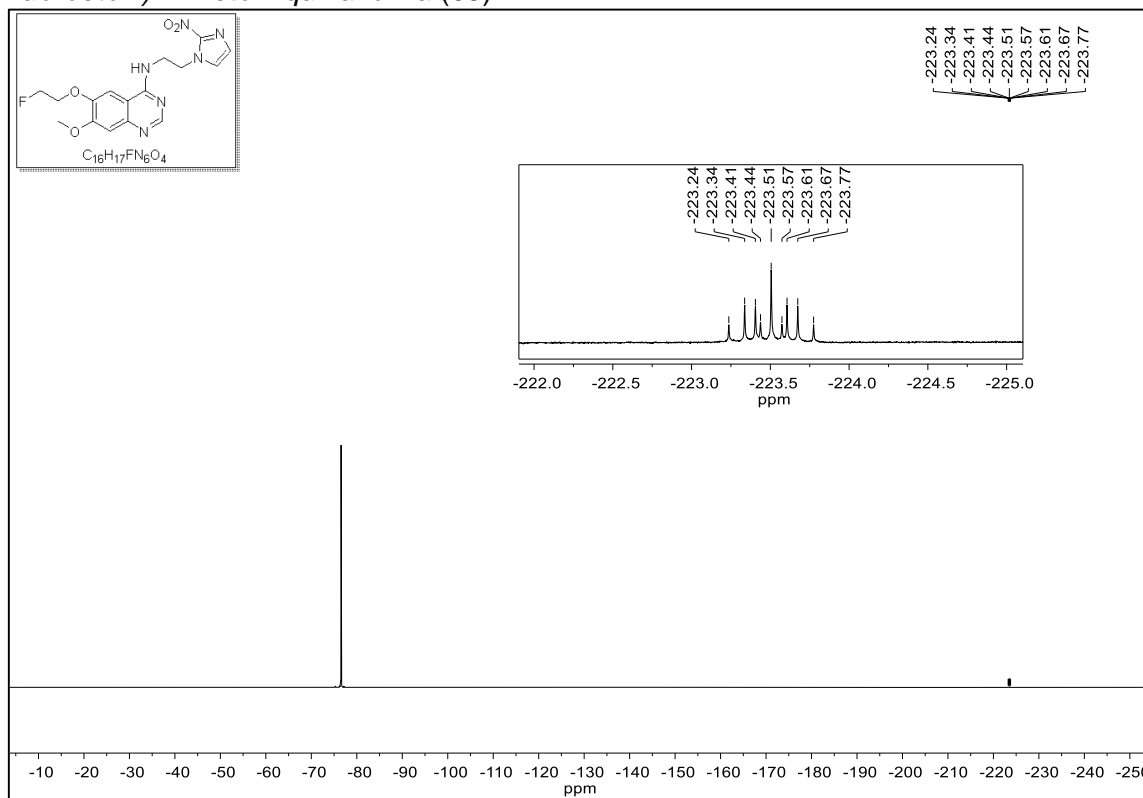
**HRMS (ES+) - 4-amina-[N-(2-([4-nitrofenil]metiloxi)etil)-6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-quinazolina (54).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{FN}_4\text{O}_5^+$  417,1574; encontrado 417,1564.**



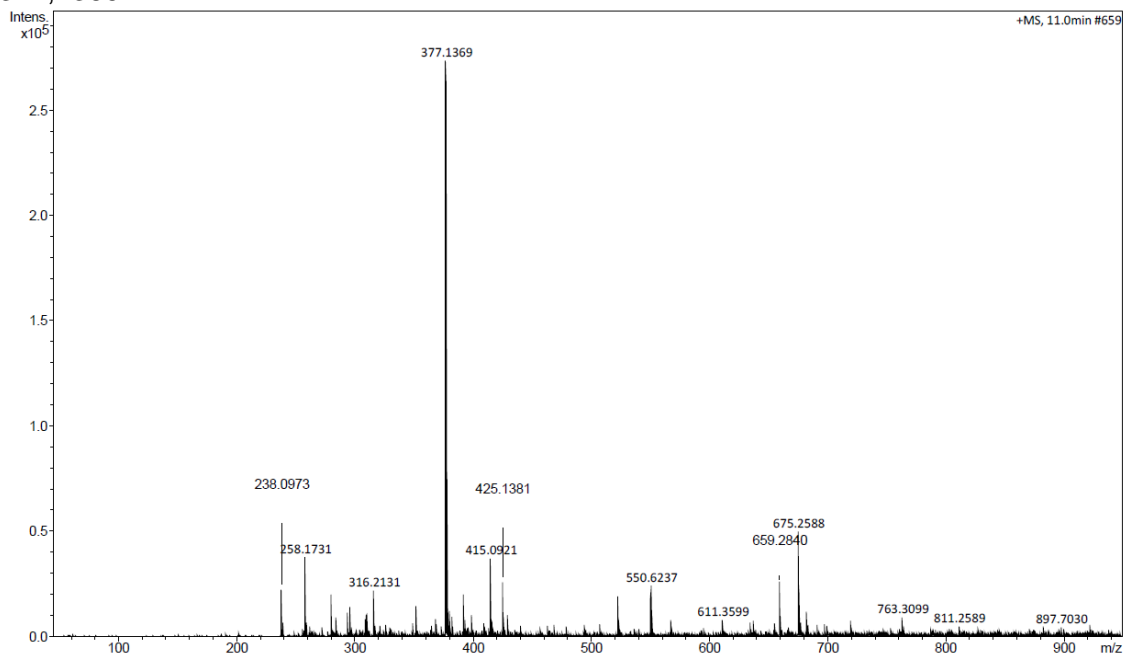
**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 4-amina-[N-(2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)etil)-6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-quinazolina (65)**



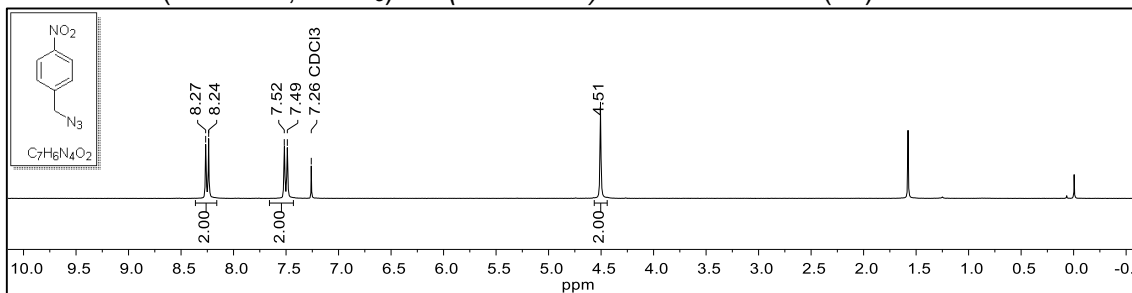
**RMN <sup>19</sup>F (282 MHz, CD<sub>3</sub>OD) - 4-amino-[N-(2-(2-nitro-1H-imidazol-1-yl)ethyl)-6-(2-fluoroethoxy)-7-methoxy-quinazolina (65)**



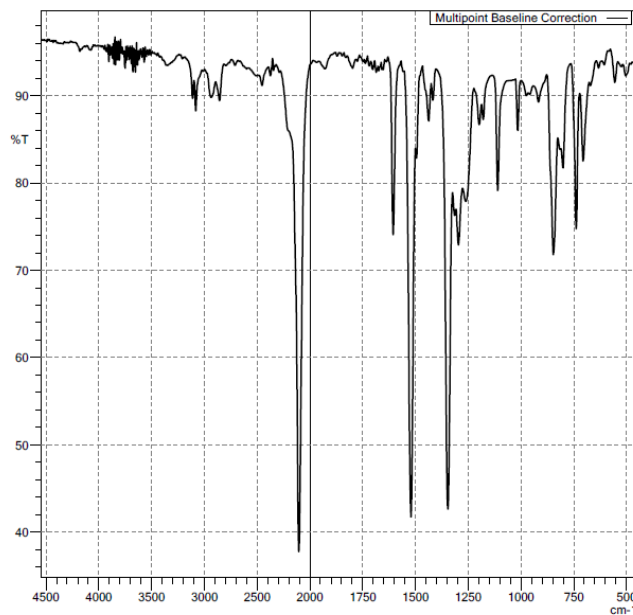
**HRMS (ES+) - 4-amina-[N-(2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il)etil]-6-(2-fluoroetoxi)-7-metoxi-quinazolina (65).**  $m/z$   $[M+H]^+$  calculado para  $C_{16}H_{18}FN_6O_4^+$  377,1374; encontrado: 377,1369.



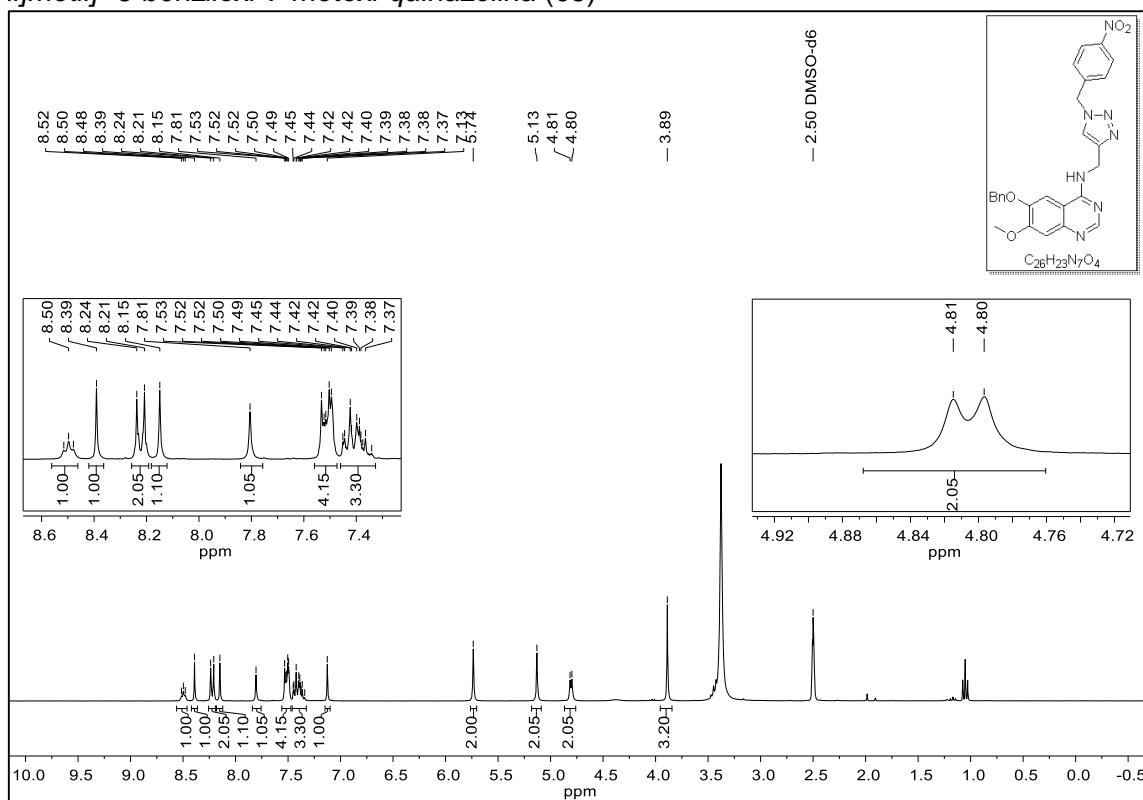
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - 1-(azidometil)-4-nitro-benzo (62)**



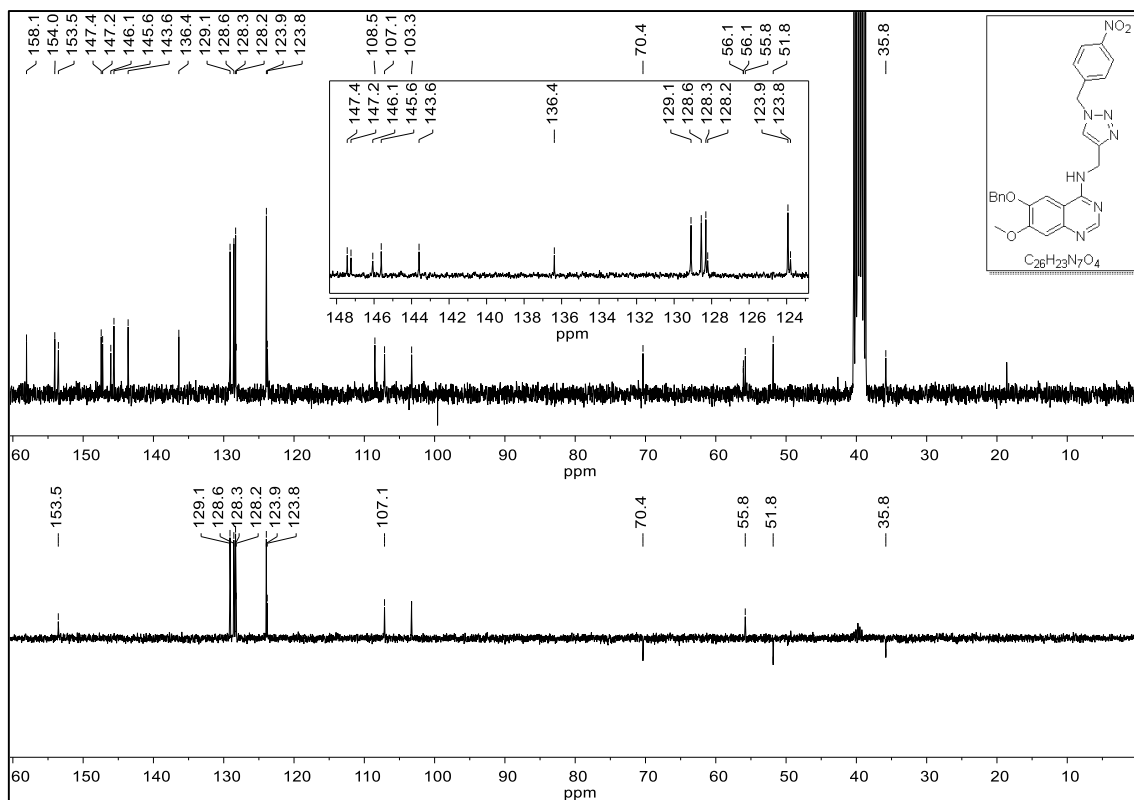
**IV - 1-(azidometil)-4-nitro-benzo (62)**



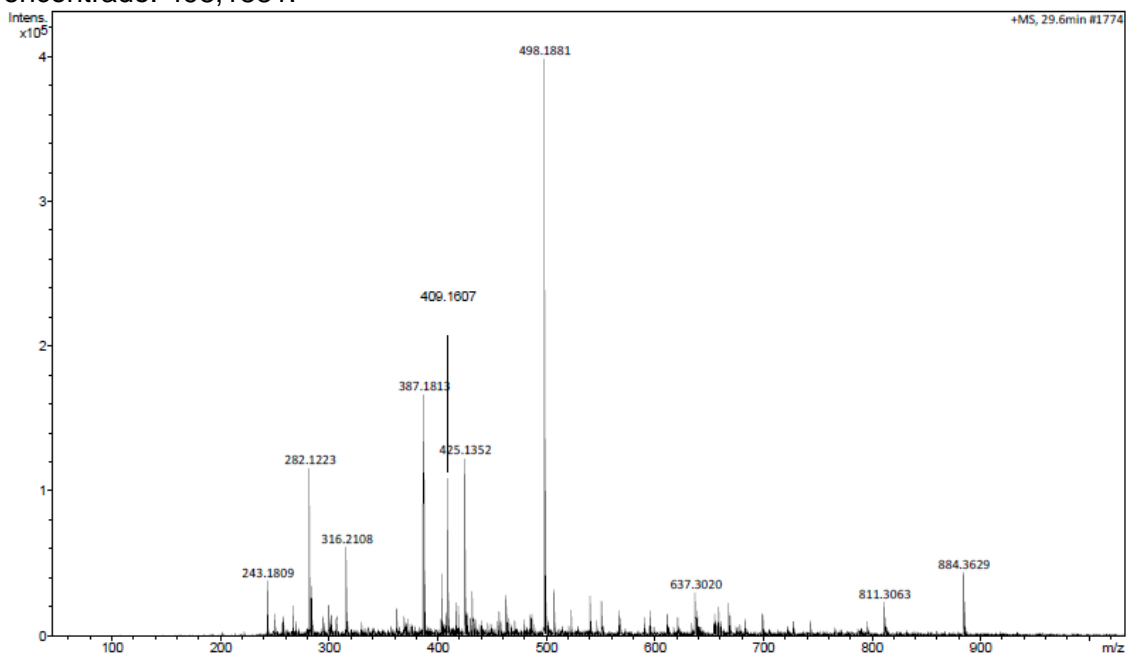
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 4-amino-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]- 6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**63**)



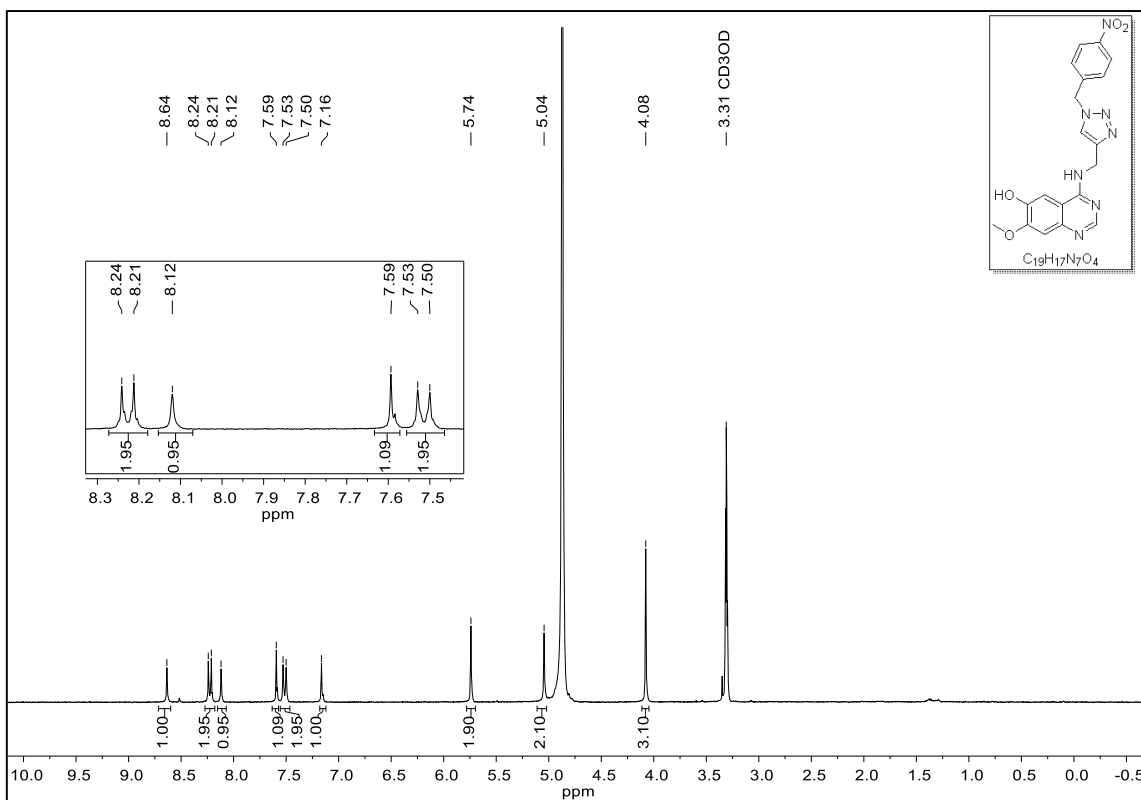
RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) - 4-amina-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]- 6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**63**)



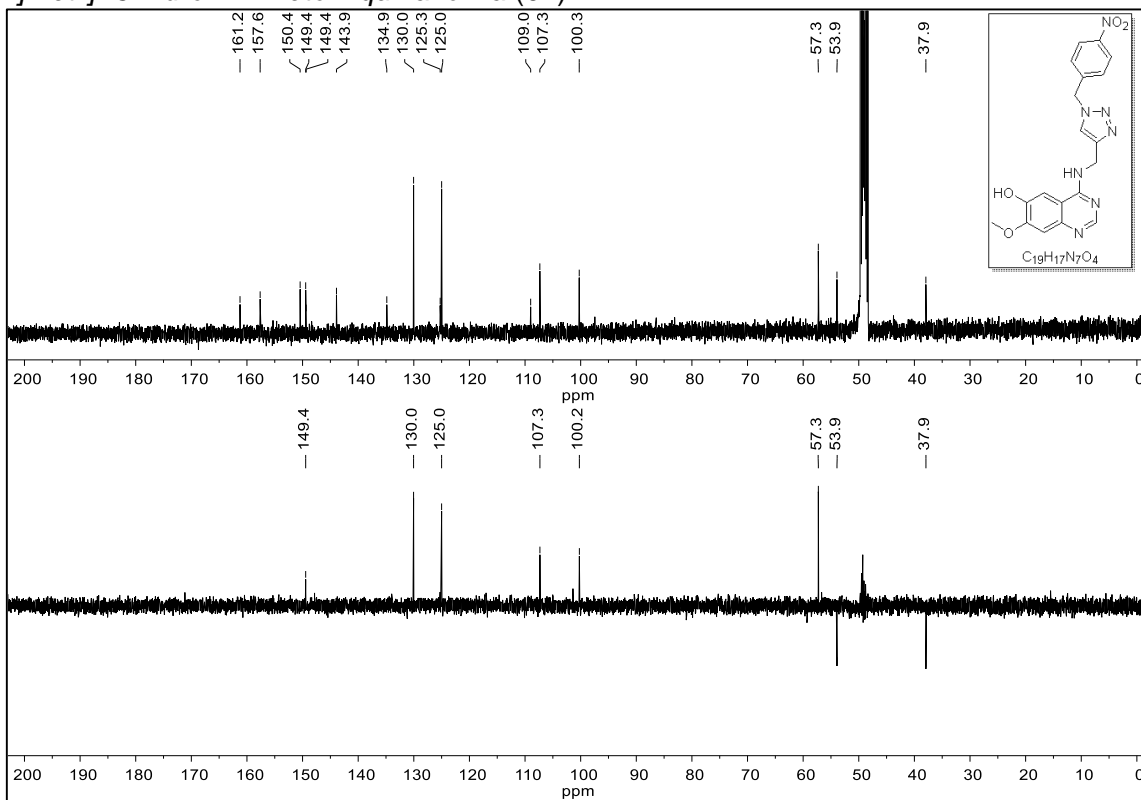
**HRMS (ES+):** 4-amino-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]- 6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**63**).  $m/z$   $[M+H]^+$  calculado para  $C_{26}H_{24}N_7O_4^+$  498,1890; encontrado: 498,1881.



**RMN de  $^1H$**  (300 MHz,  $CD_3OD$ ) - 4-amino-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]- 6-hidroxi-7-metoxi-quinazolina (**61**)

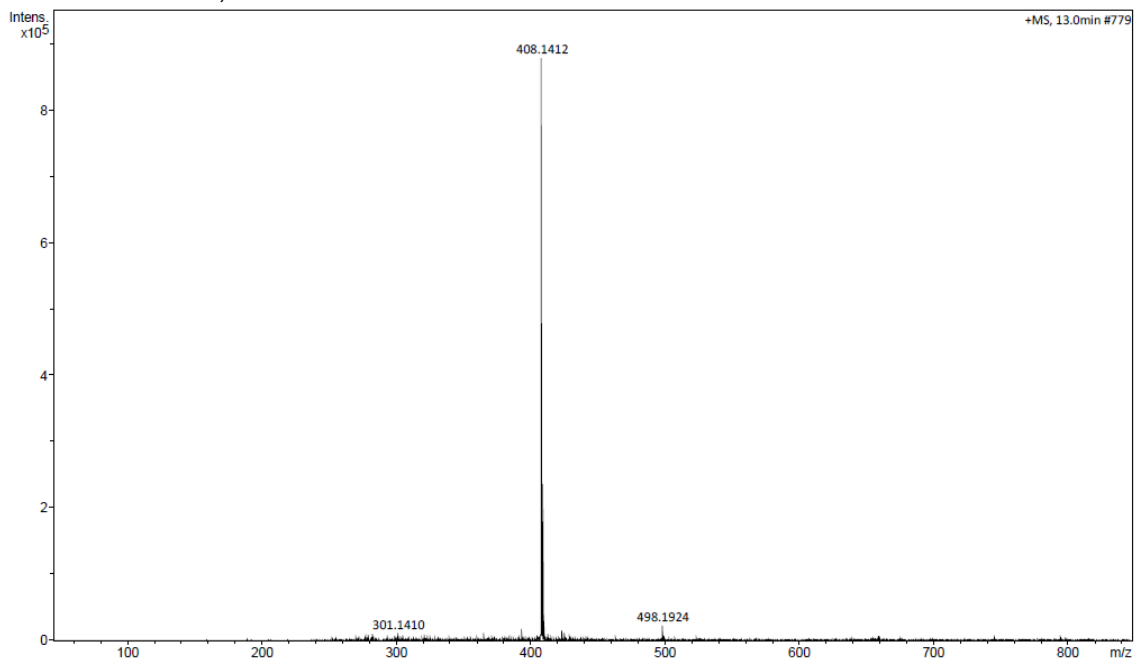


**RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD) - 4-amino-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]-6-hidroxi-7-metoxi-quinazolina (61)**

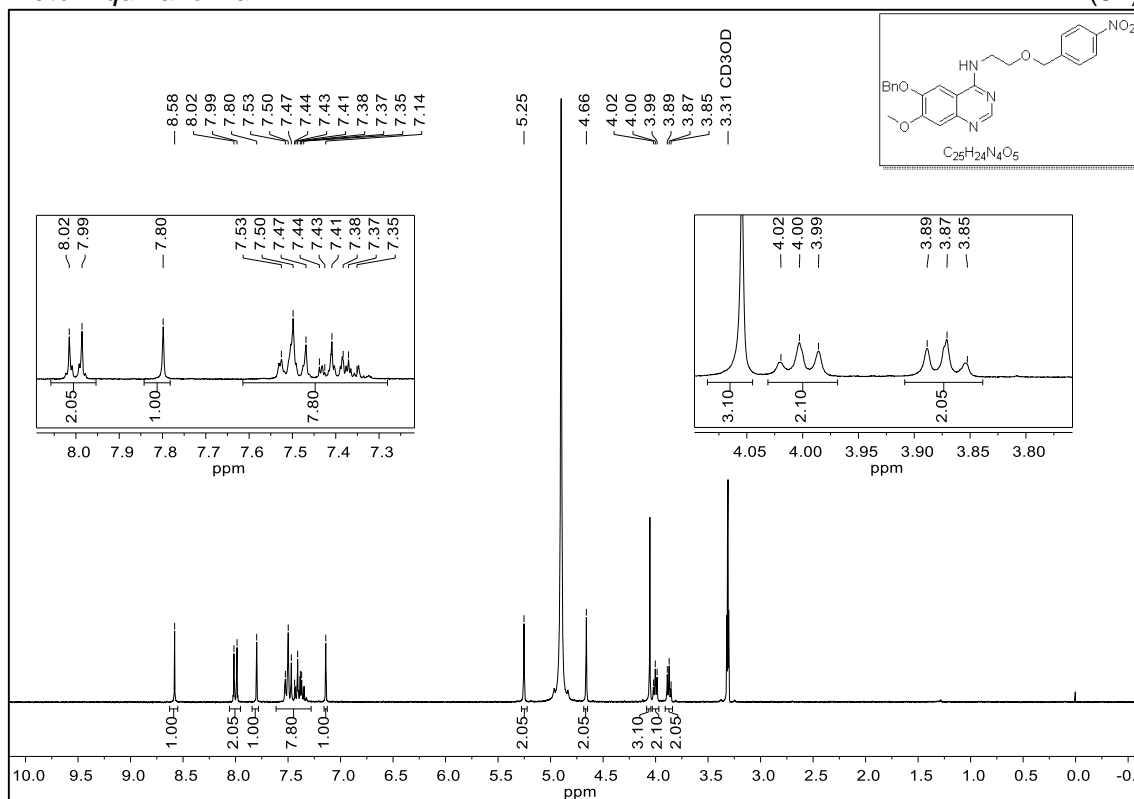




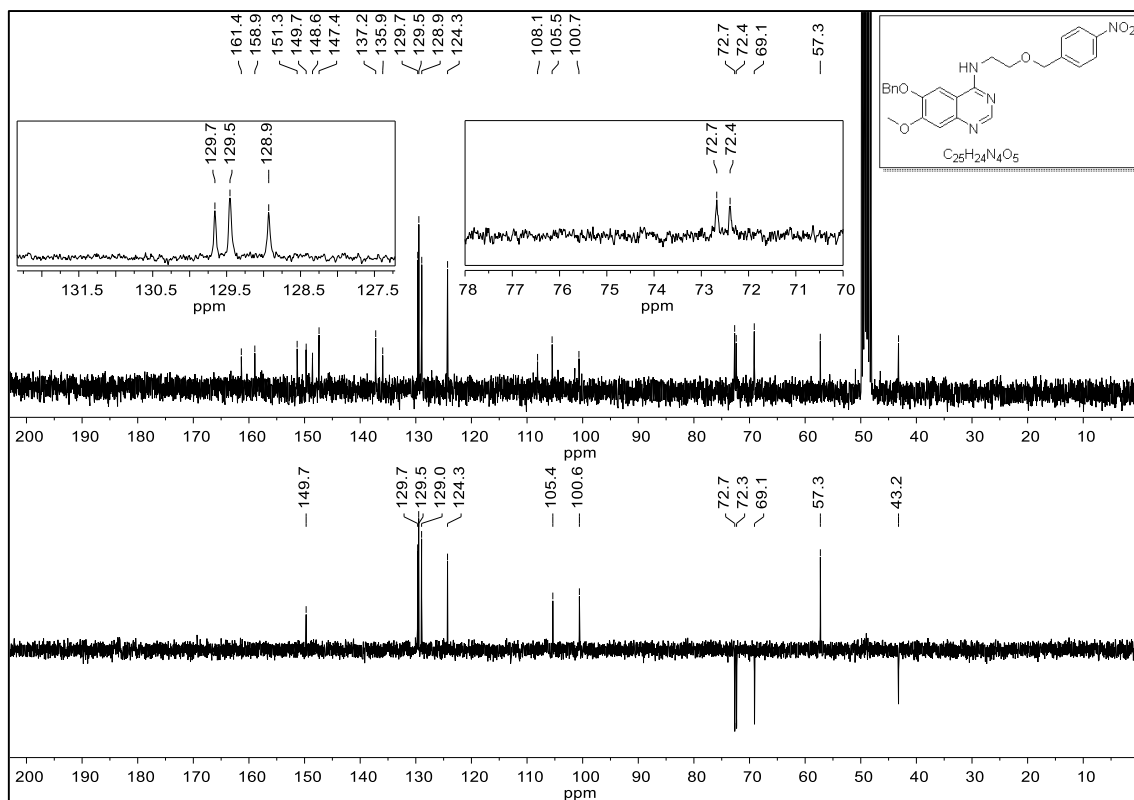
**HRMS (ES<sup>+</sup>)** - 4-amino-[N-[1-(4-nitrofenilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil]- 6-hidroxi-7-metoxi-quinazolina (**61**).  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> 408,1420; encontrado: 408,1408.



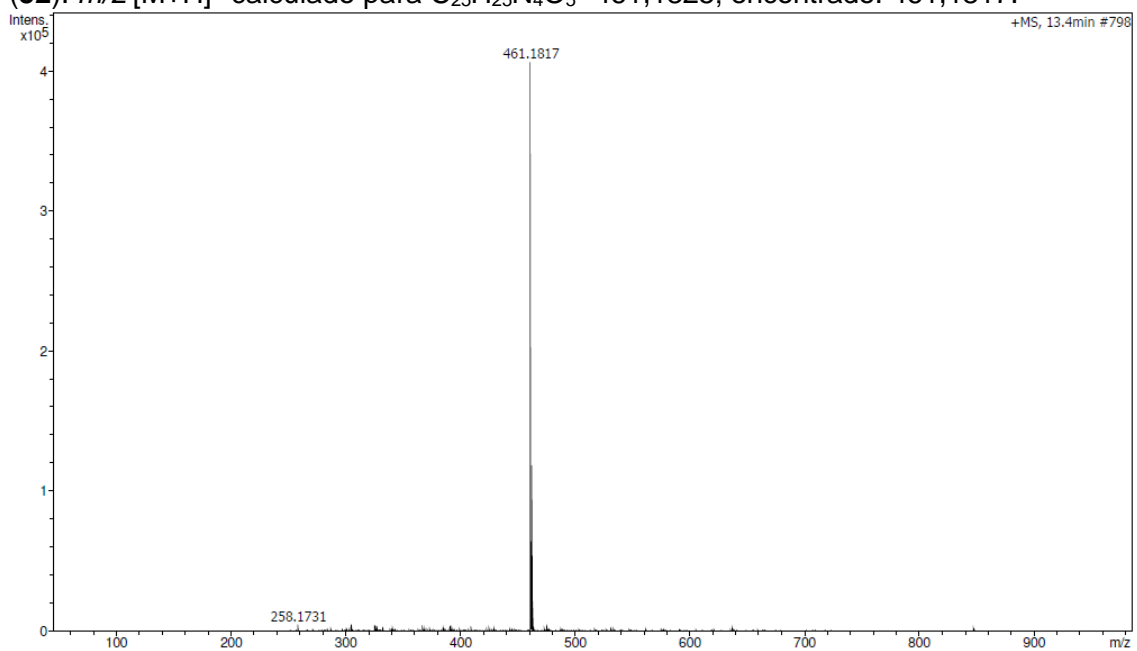
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** - 4-amino-[N-2-[(4-nitrofenil)metiloxi]etil]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**52**)



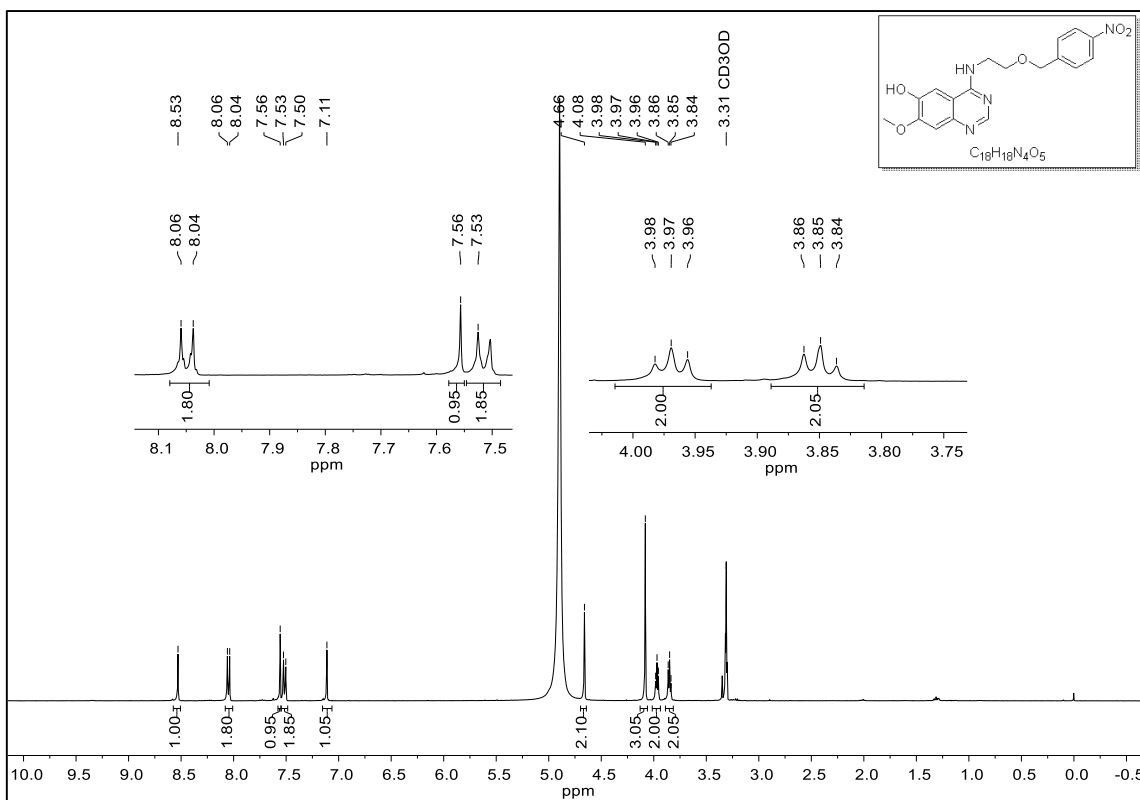
**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** - 4-amino-[N-2-[(4-nitrofenil)metiloxi]etil]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (**52**)



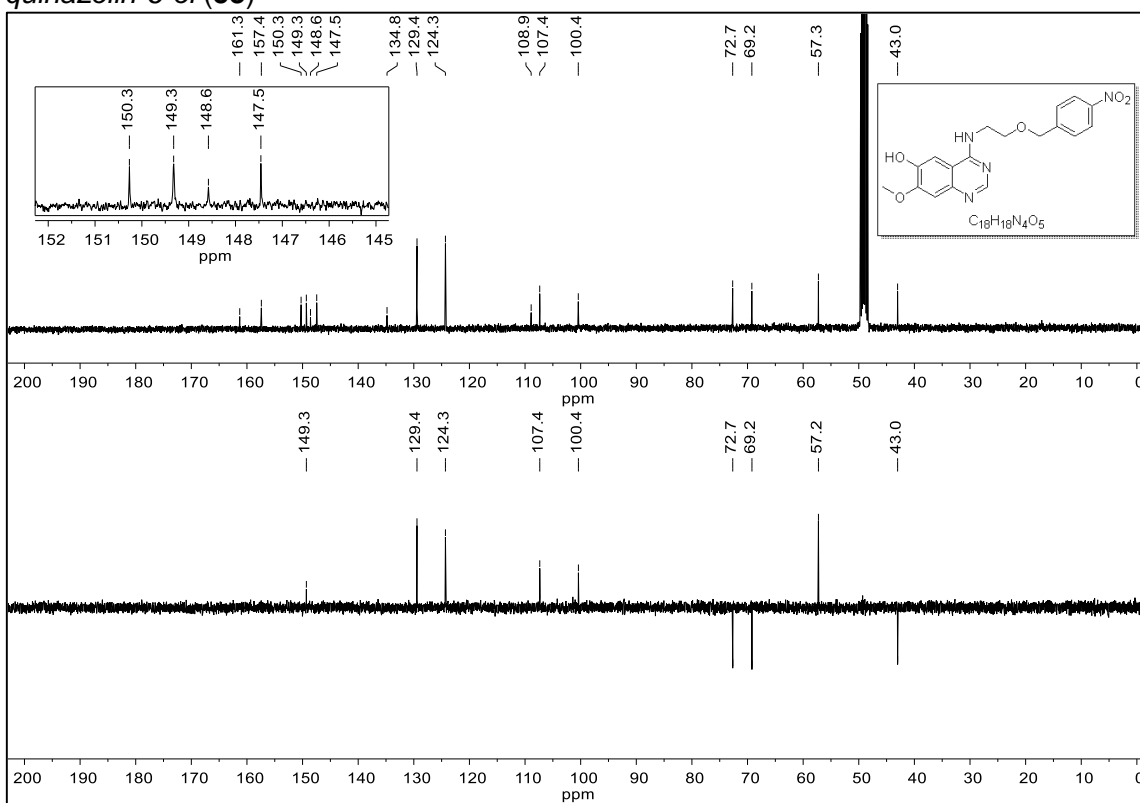
**HRMS (ES<sup>+</sup>) - 4-amino-[N-2-[(4-nitrofenil)metiloxi]etil]-6-benziloxi-7-metoxi-quinazolina (52).**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> 461,1825; encontrado: 461,1817.



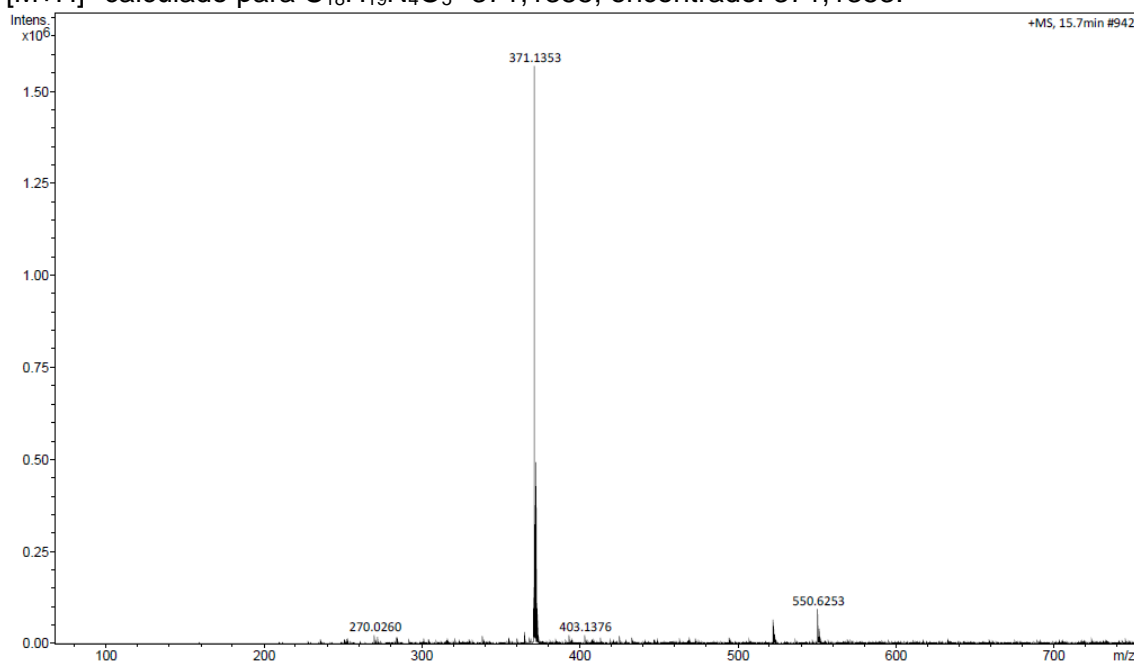
**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) - 7-metoxi-4-((2-((4-nitrobenzil)oxi)etil)amino)quinazolin-6-ol (53)**



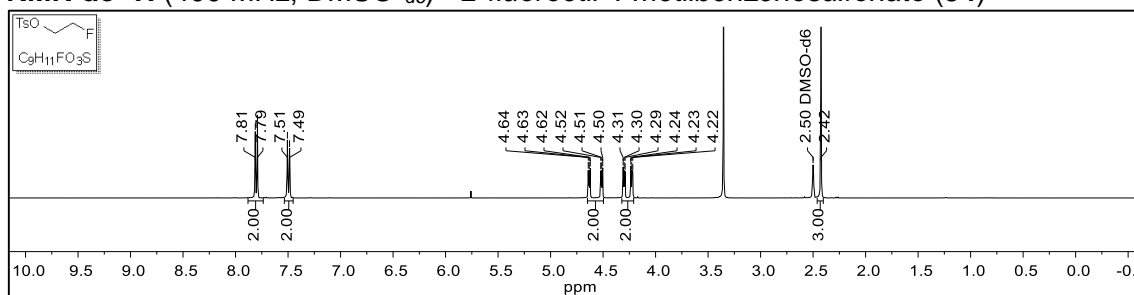
RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - 7-metoxi-4-((2-((4-nitrobenzil)oxi)etil) amino) quinazolin-6-ol (**53**)



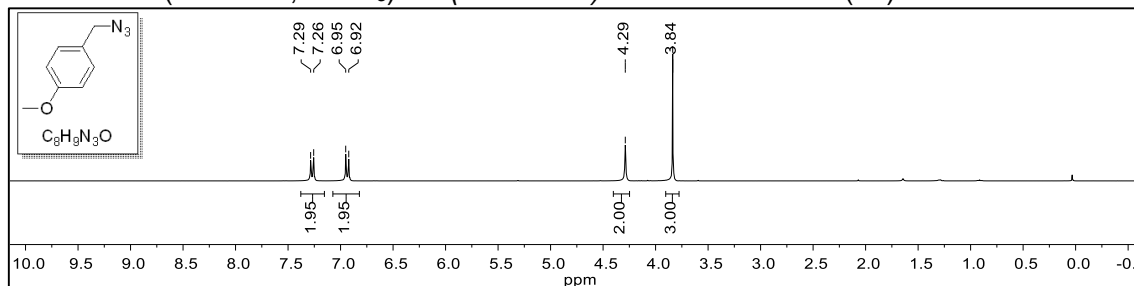
**HRMS (ES<sup>+</sup>):** 7-metoxi-4-((2-((4-nitrobenzil)oxi)etil)amino)quinazolin-6-ol (**53**).  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> 371,1355; encontrado: 371,1353.



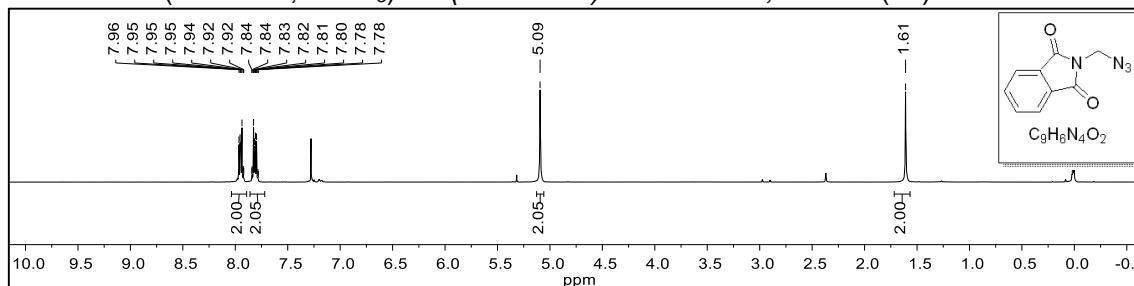
**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) - 2-fluoroetil 4-metilbenzenosulfonato (**34**)**



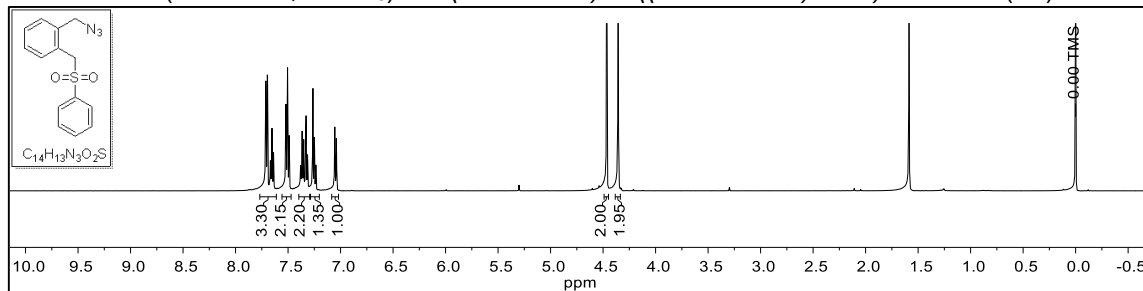
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - 1-(azidometil)-4-metoxibenzeno (**69**)**



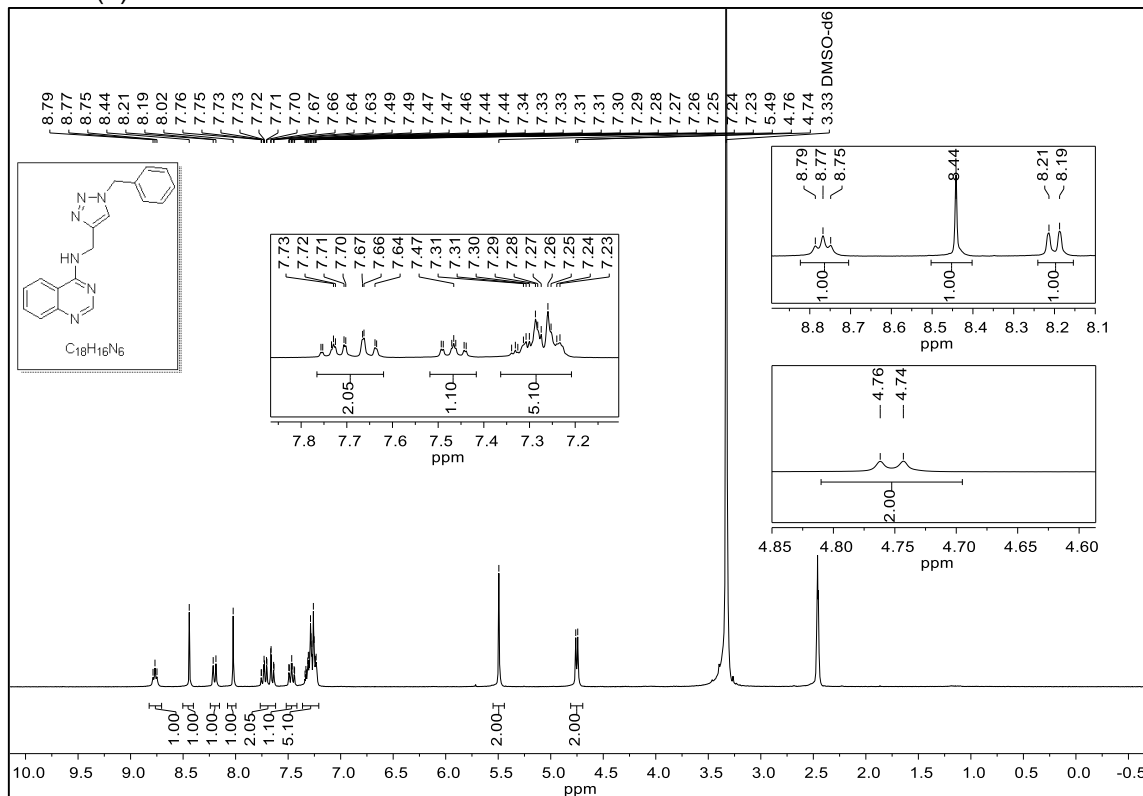
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - 2-(azidometil)isoindolina-1,3-diona (**71**)**



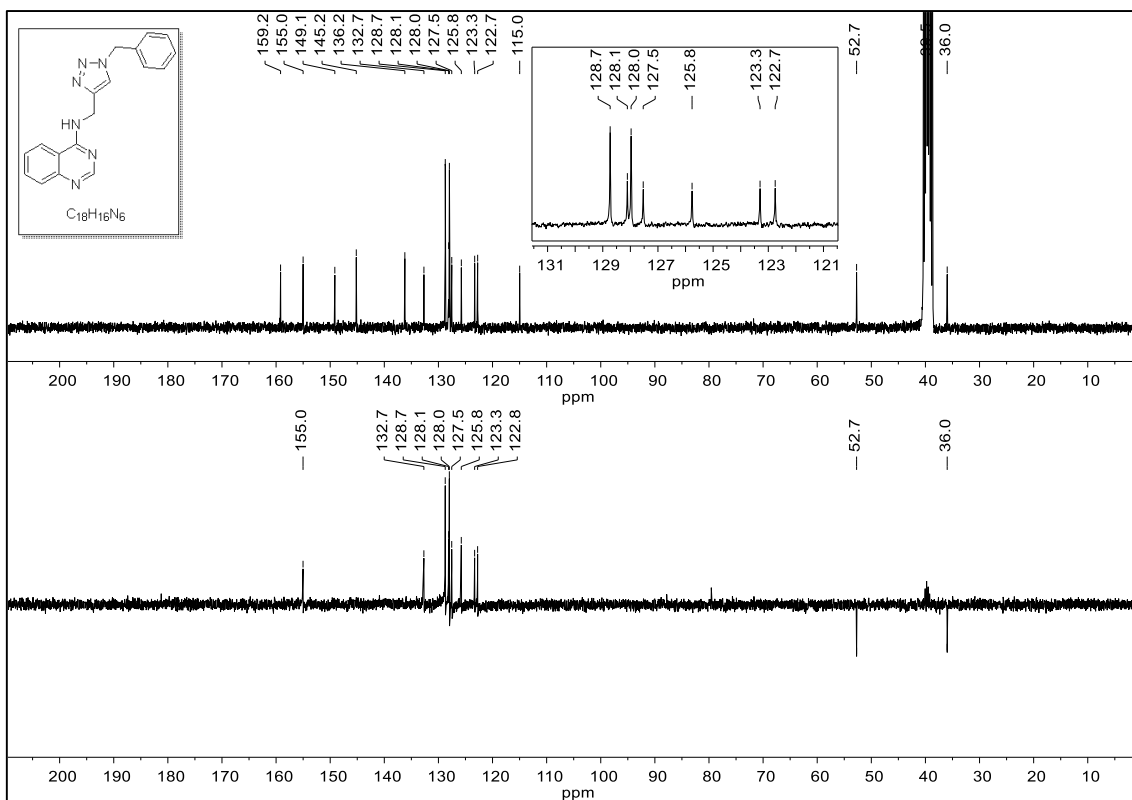
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - 1-(azidometil)-2-((fenilsulfonil)metil)benzeno (72)



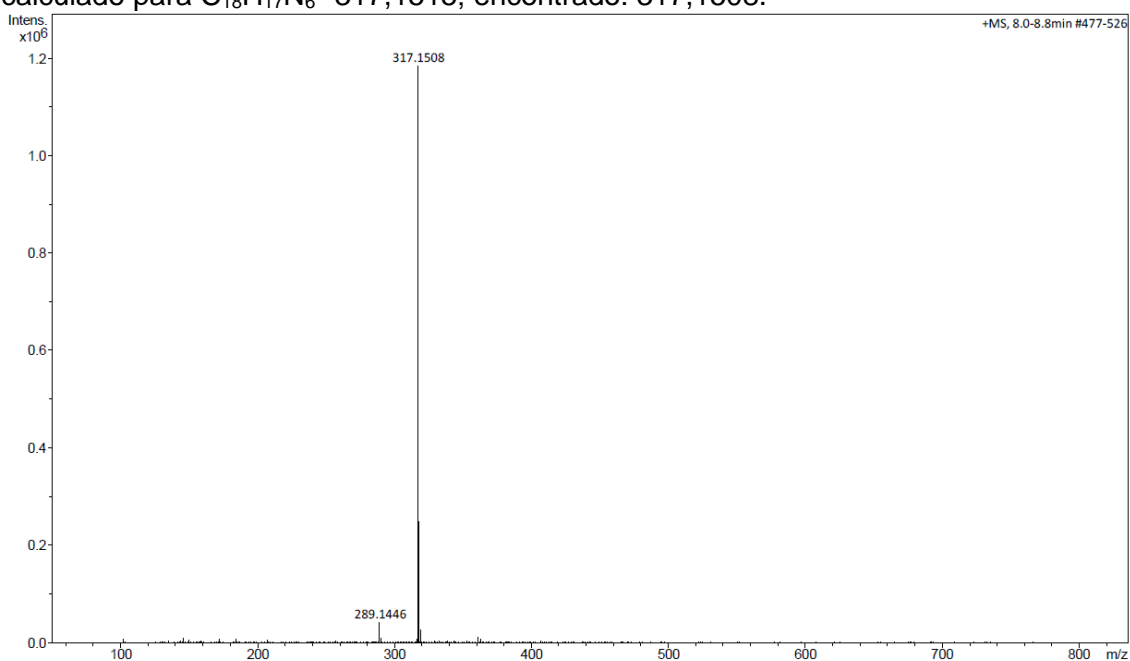
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - *N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (1)



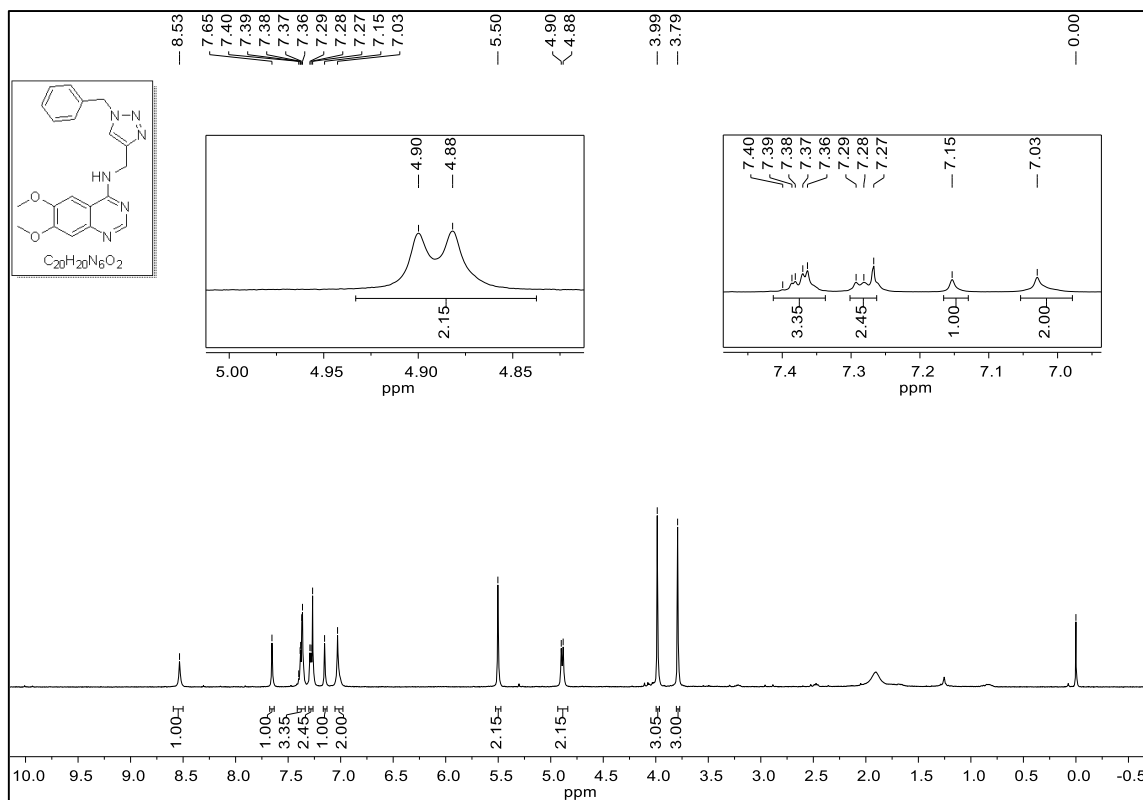
RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - *N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (1)



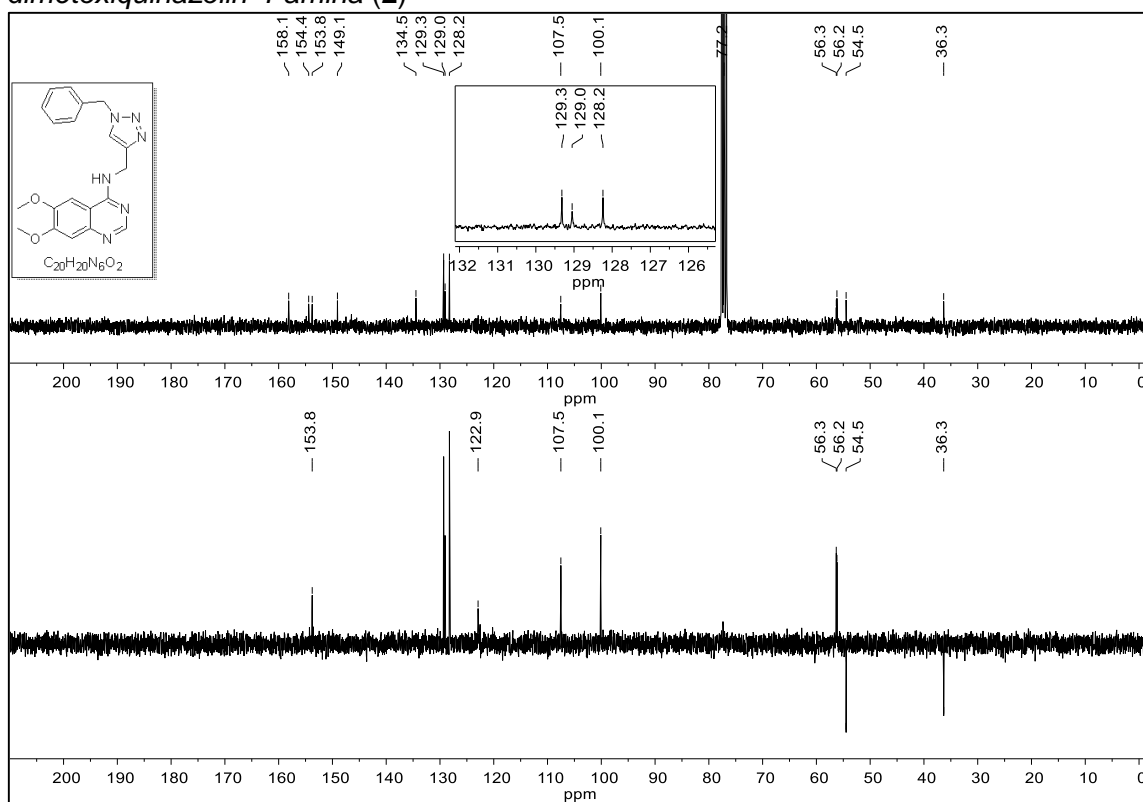
**HRMS (ES<sup>+</sup>) - *N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)quinazolin-4-amina (1) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>6</sub><sup>+</sup> 317,1515; encontrado: 317,1508.**



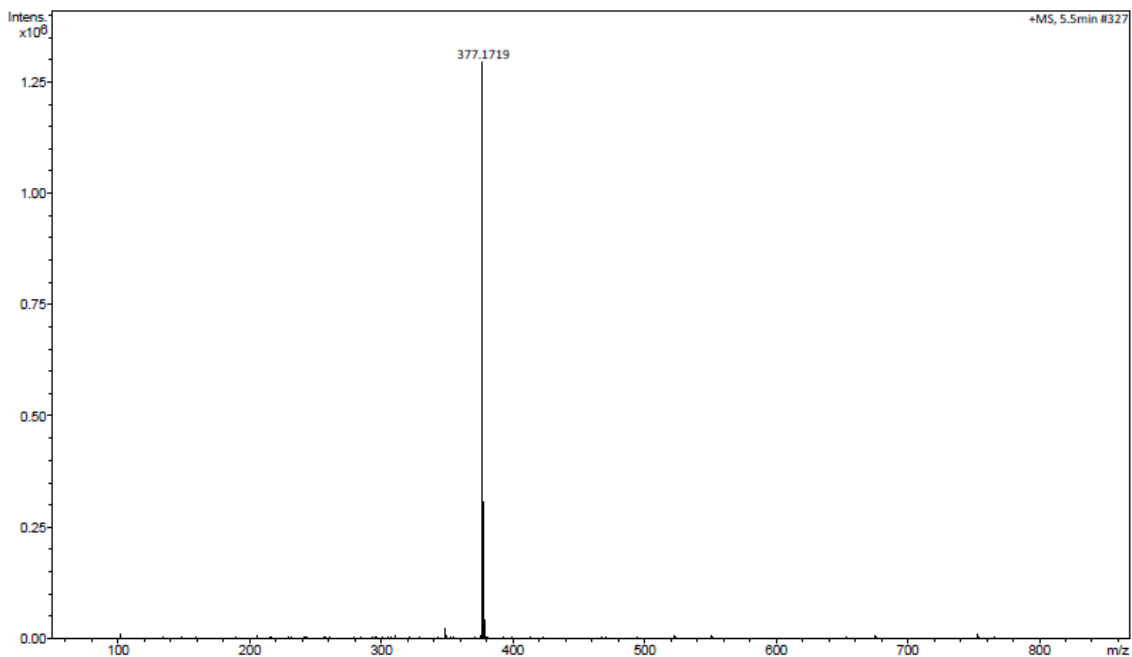
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) - *N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-amina (2)**



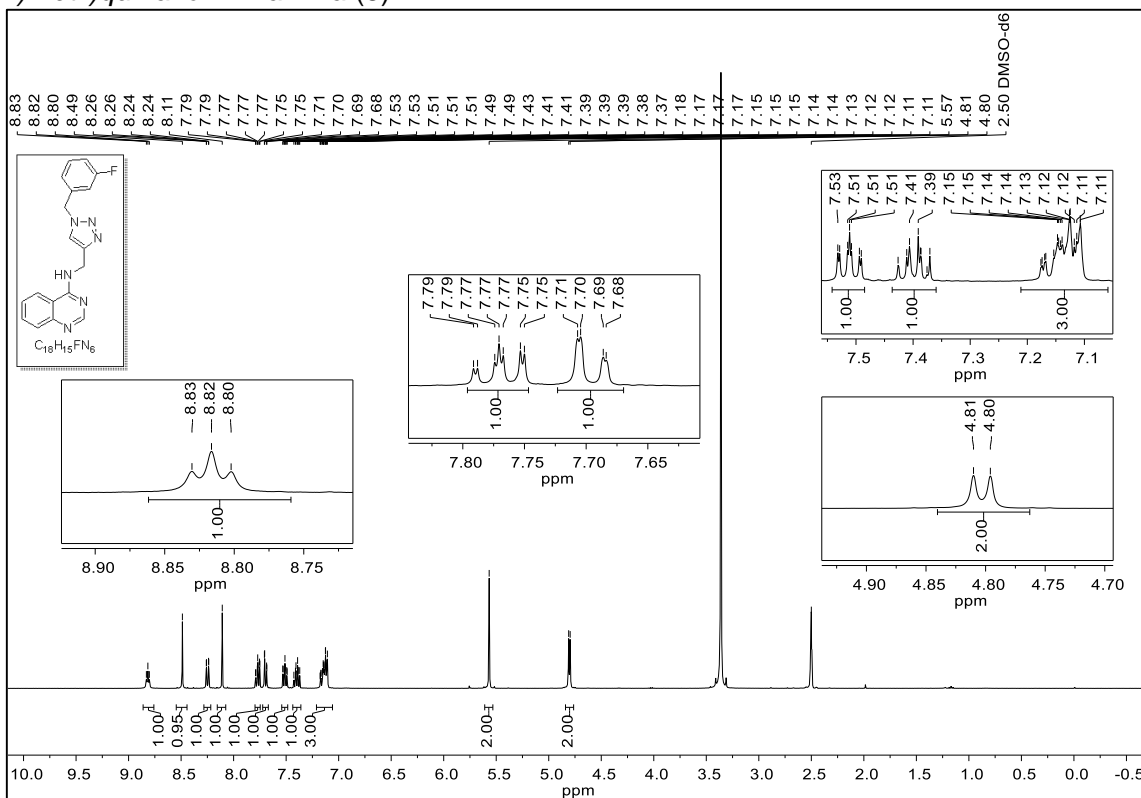
**RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) - *N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amina (2)**



**HRMS (ES<sup>+</sup>) - *N*-((1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amina (2) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 377,1726; encontrado: 377,1719.**

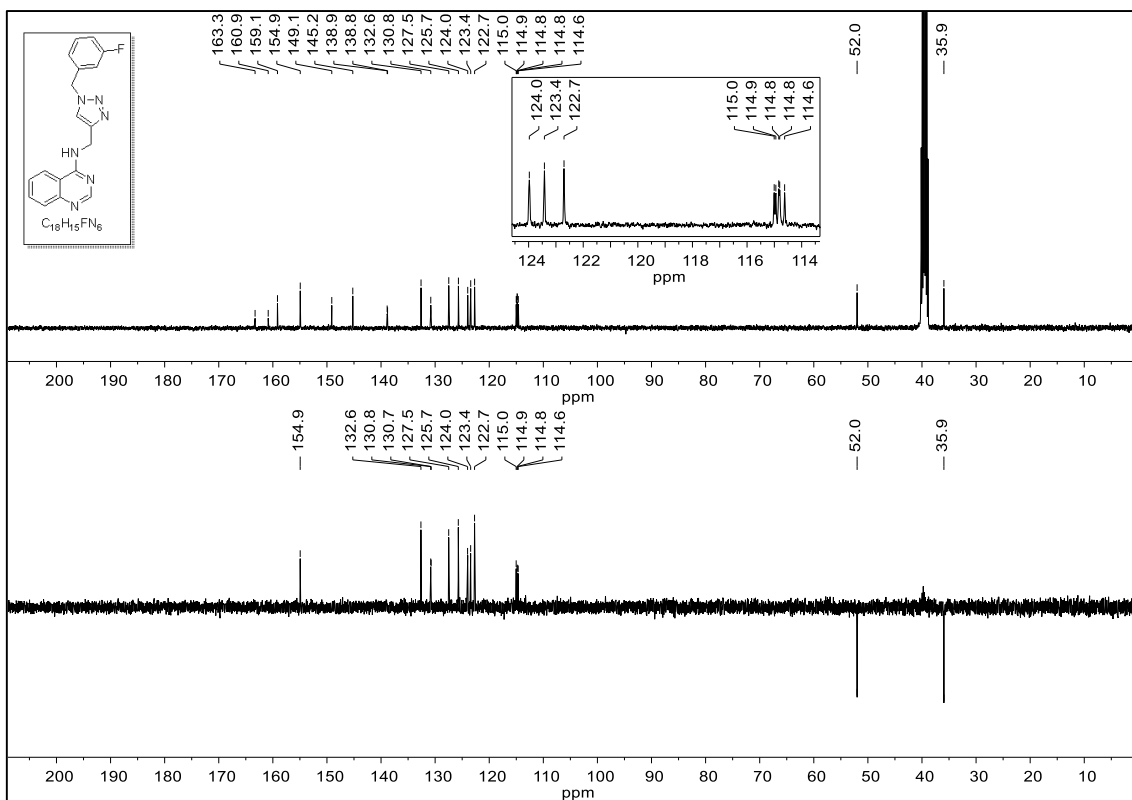


RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - *N*-((1-(3-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)methyl)quinazolin-4-amina (**3**)

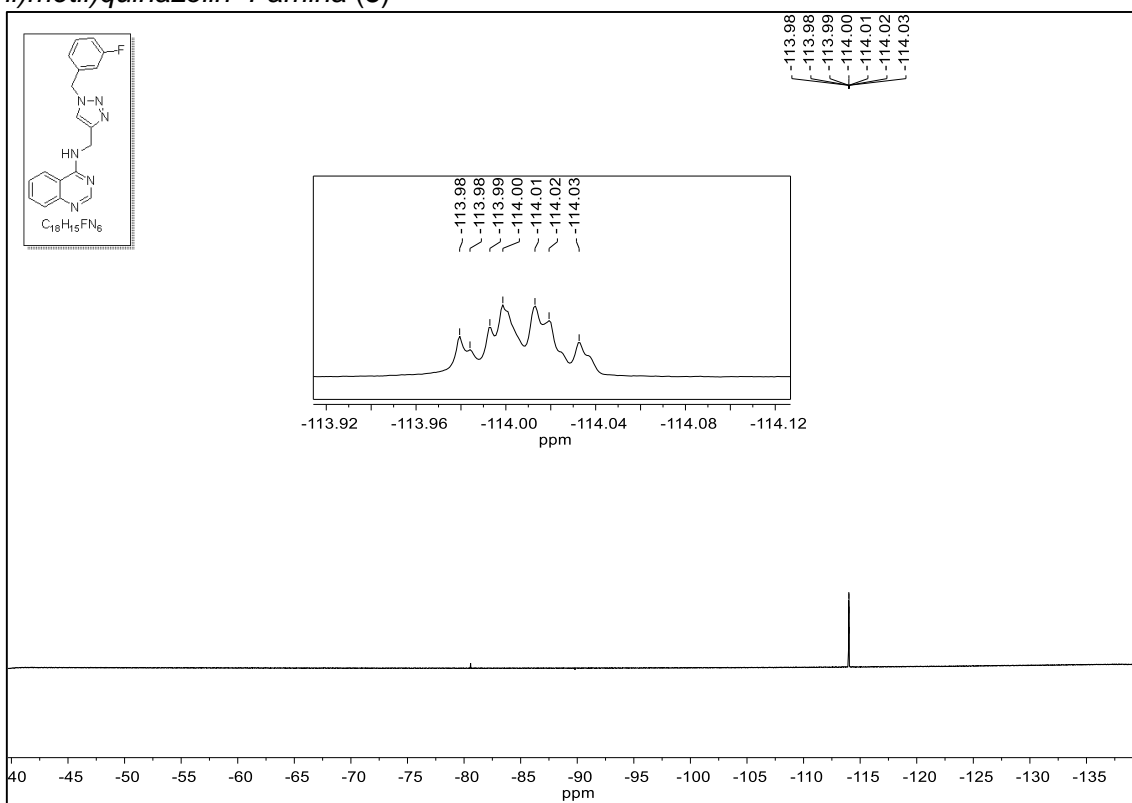


RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - *N*-((1-(3-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)methyl)quinazolin-4-amina (**3**)

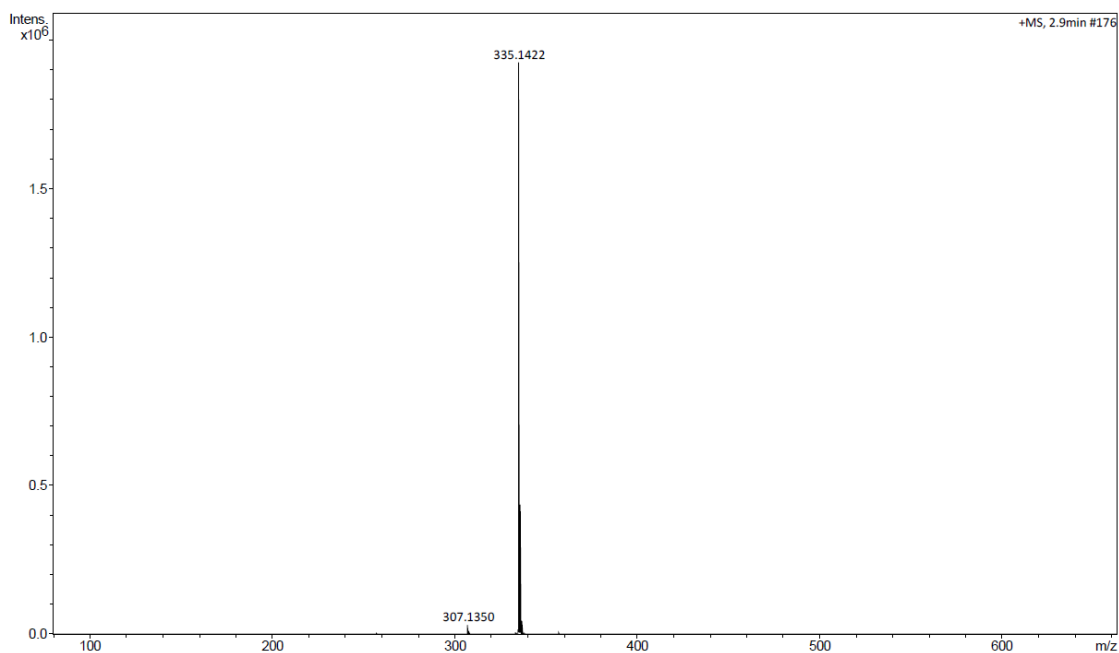




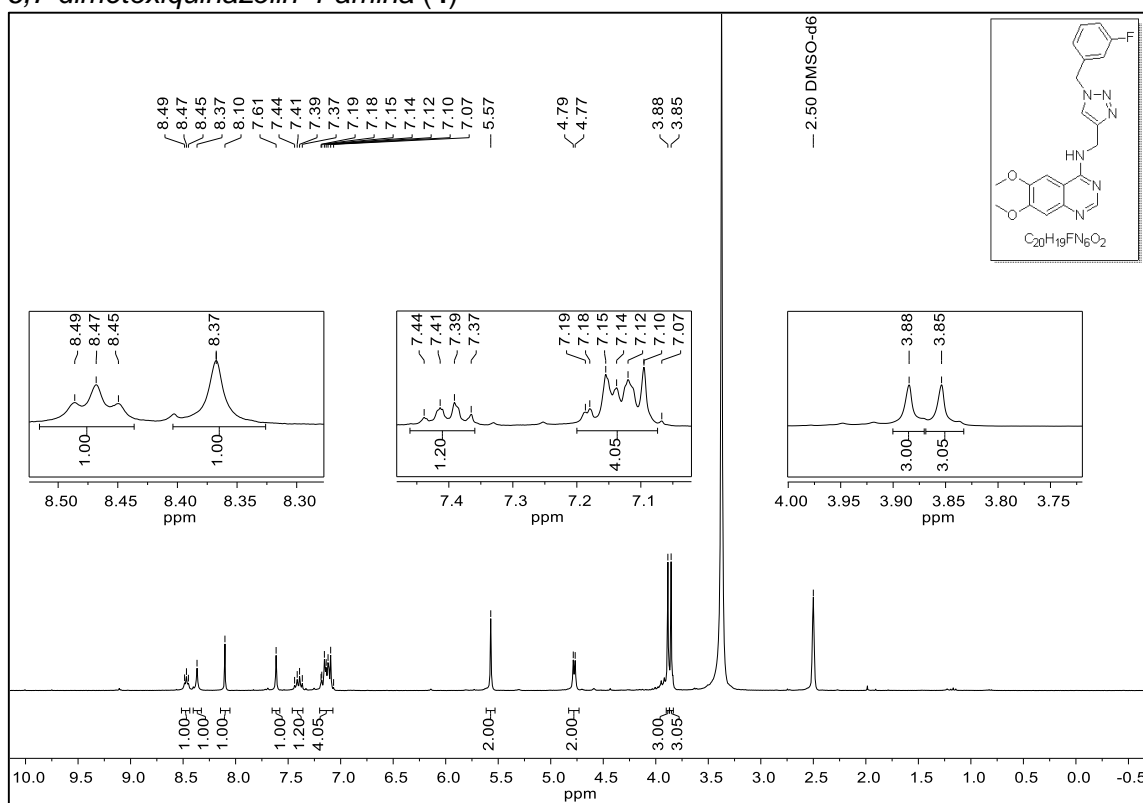
**RMN de <sup>19</sup>F (471 MHz, DMSO<sub>d6</sub>) - N-((1-(3-fluorobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (3)**



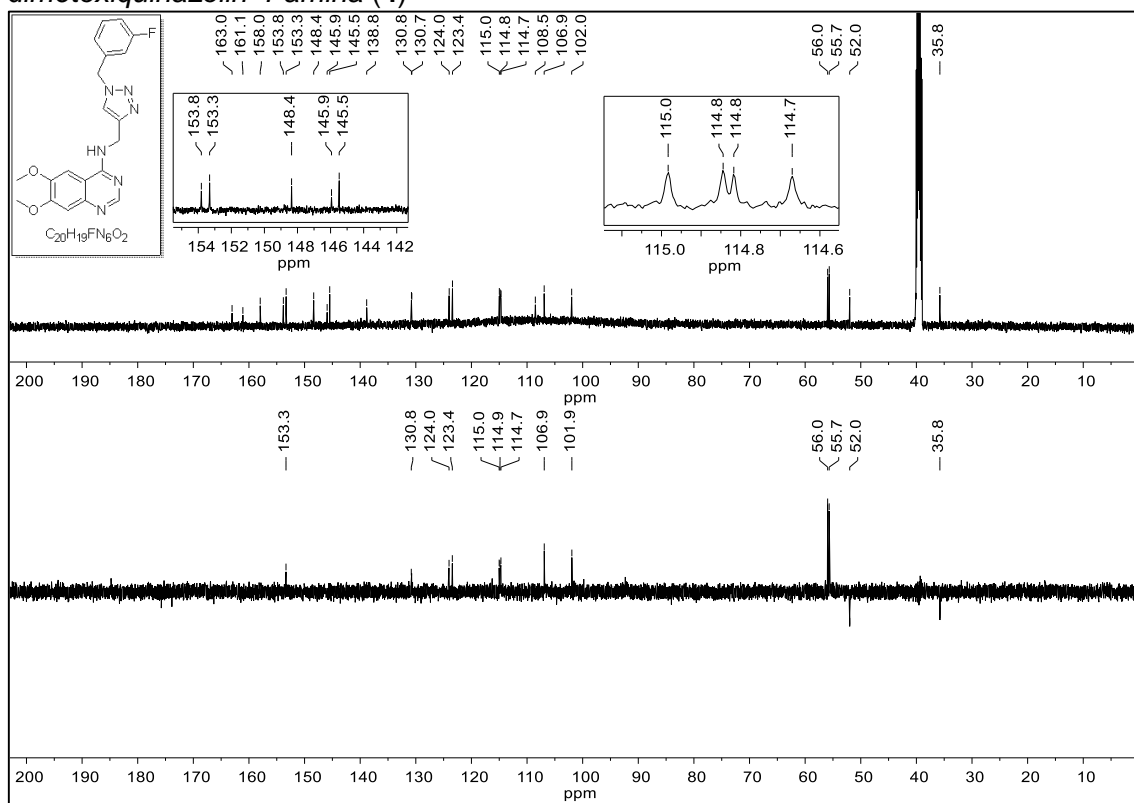
**HRMS (ES+) - *N*-((1-(3-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (3)**  
*m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>6</sub><sup>+</sup> 335,1420; encontrado: 335,1422.



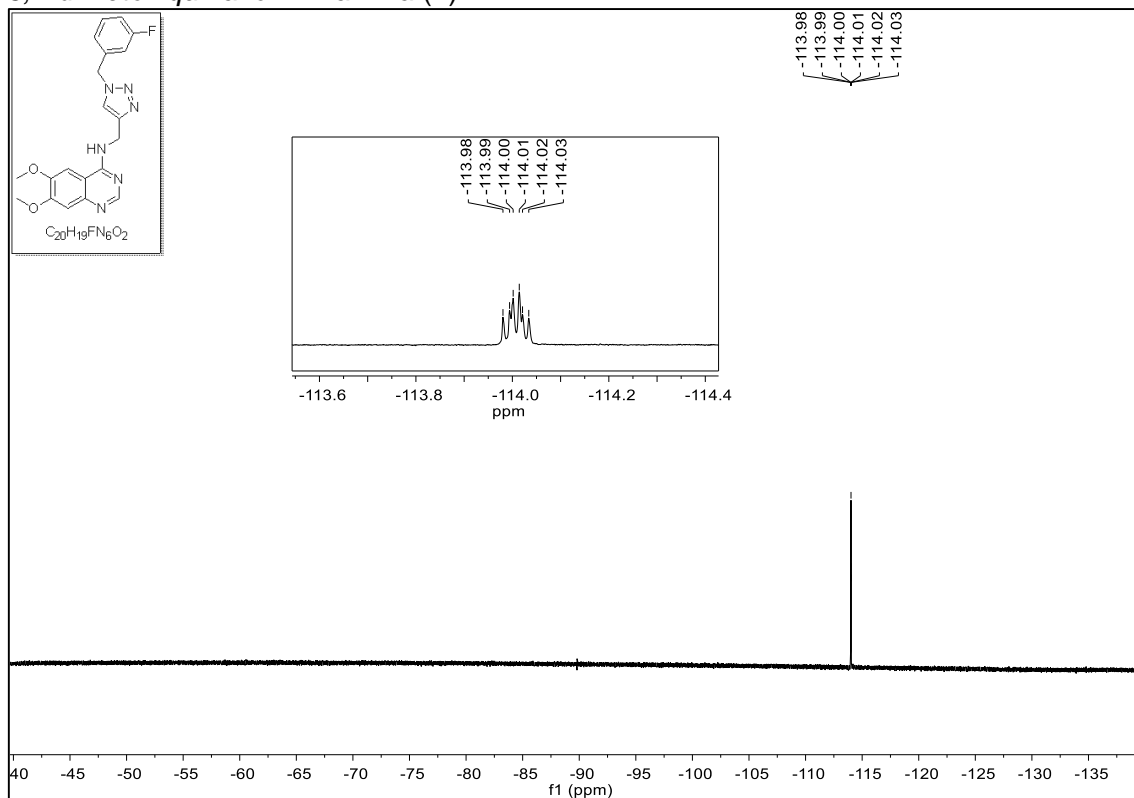
**RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) - *N*-((1-(3-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-amina (4)**



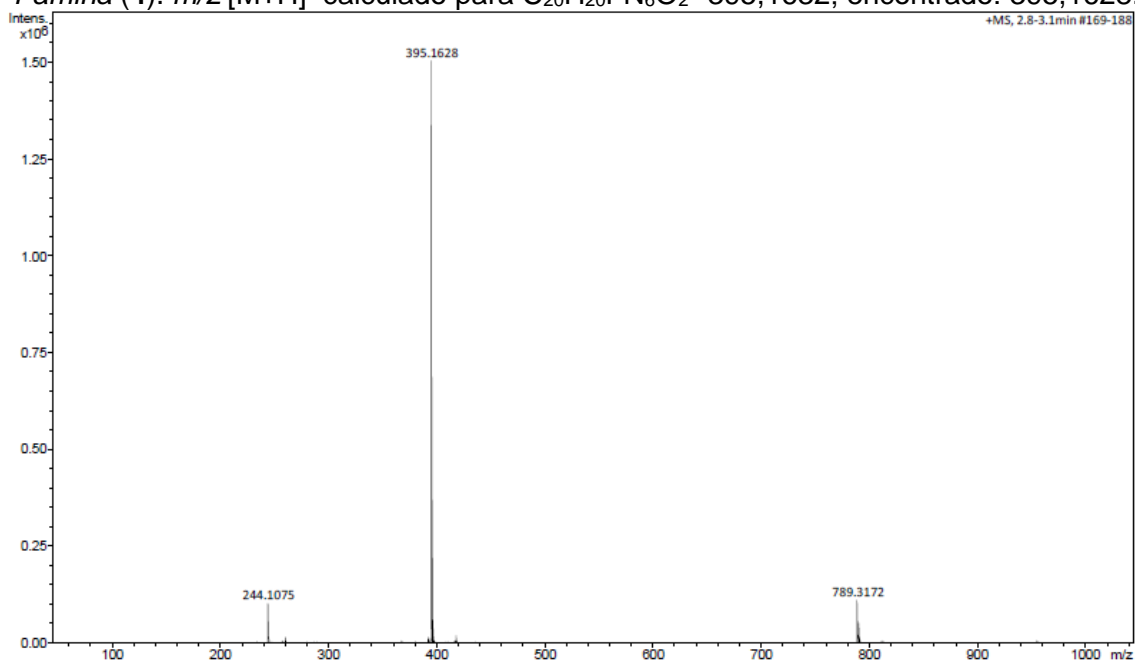
RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz, DMSO) - *N*-((1-(3-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-amina (**4**)



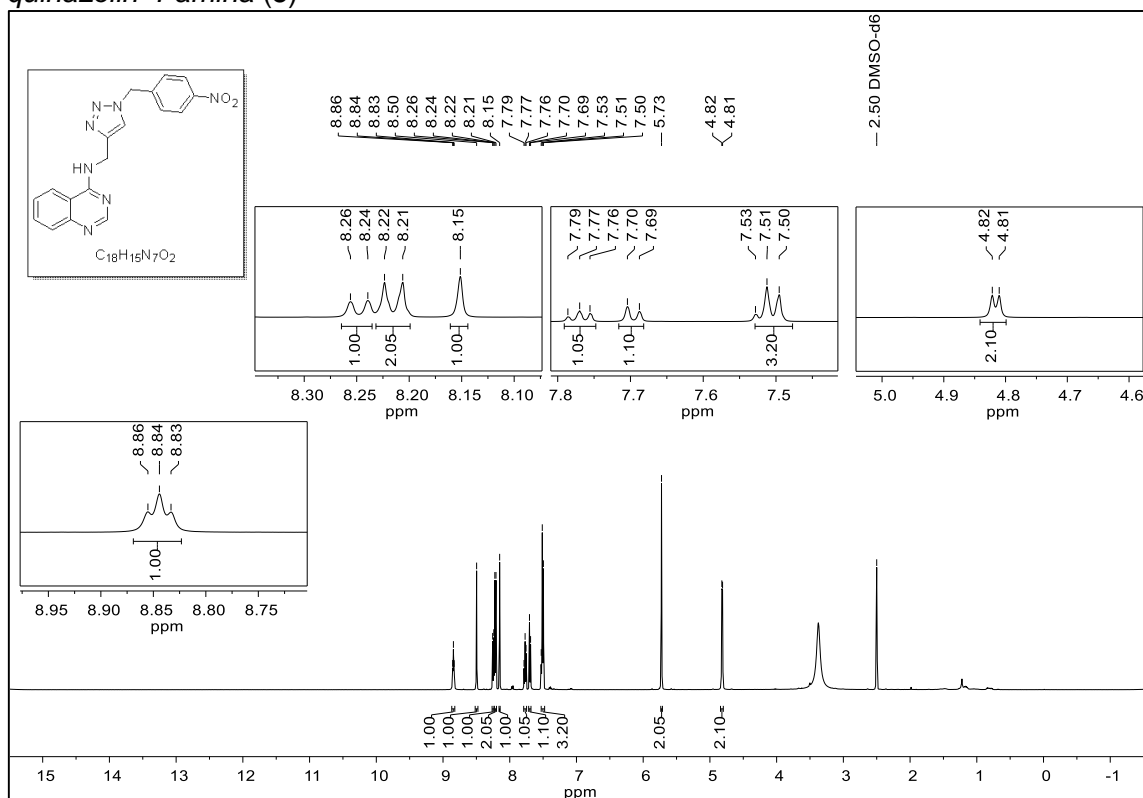
RMN de  $^{19}\text{F}$  (471 MHz, DMSO- $d_6$ ) - *N*-((1-(3-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-amina (**4**)



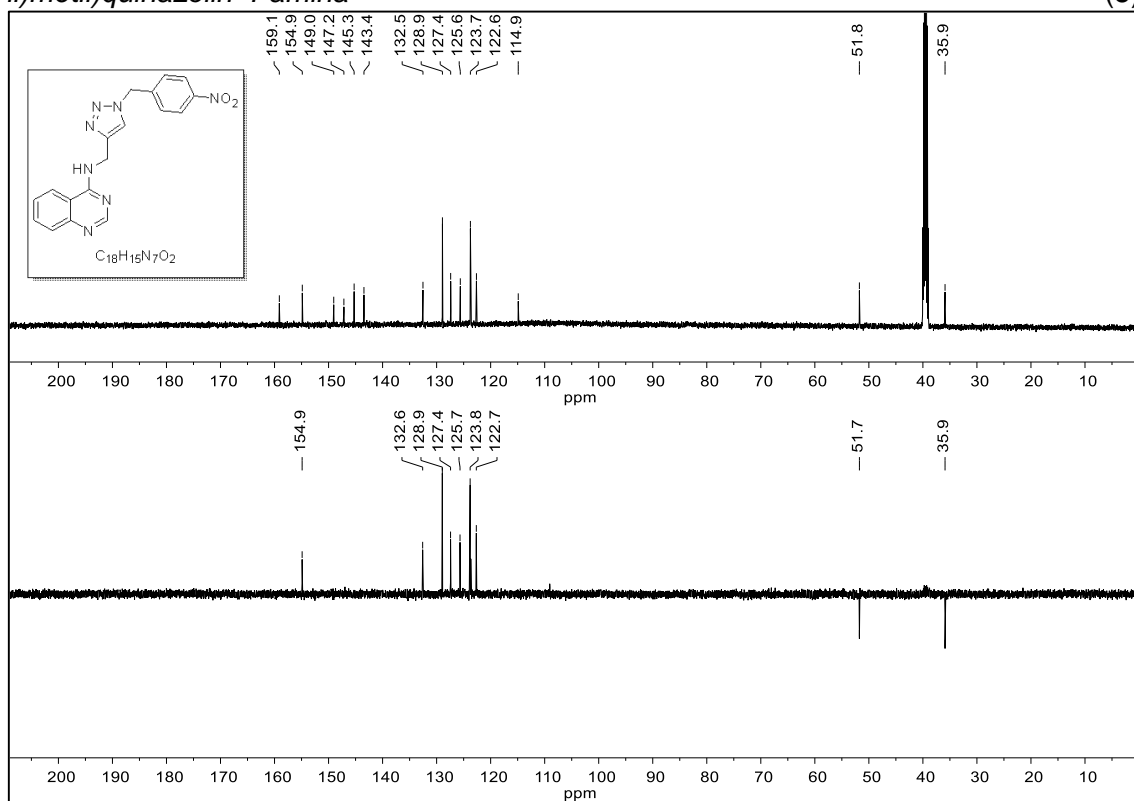
**HRMS (ES<sup>+</sup>) - *N*-((1-(3-fluorobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-*il*))metil)-6,7-dimetoxiquinazolin-4-*amina* (4).**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>6</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 395,1632; encontrado: 395,1628.



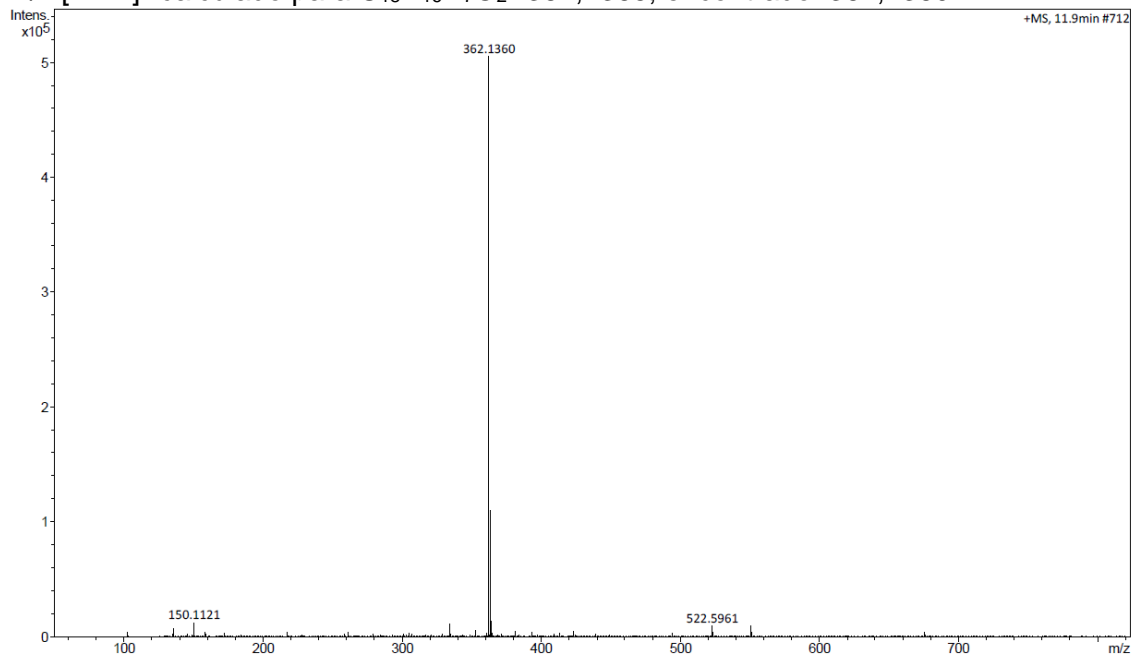
**RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) - *N*-((1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-*il*))metil)quinazolin-4-*amina* (5)**



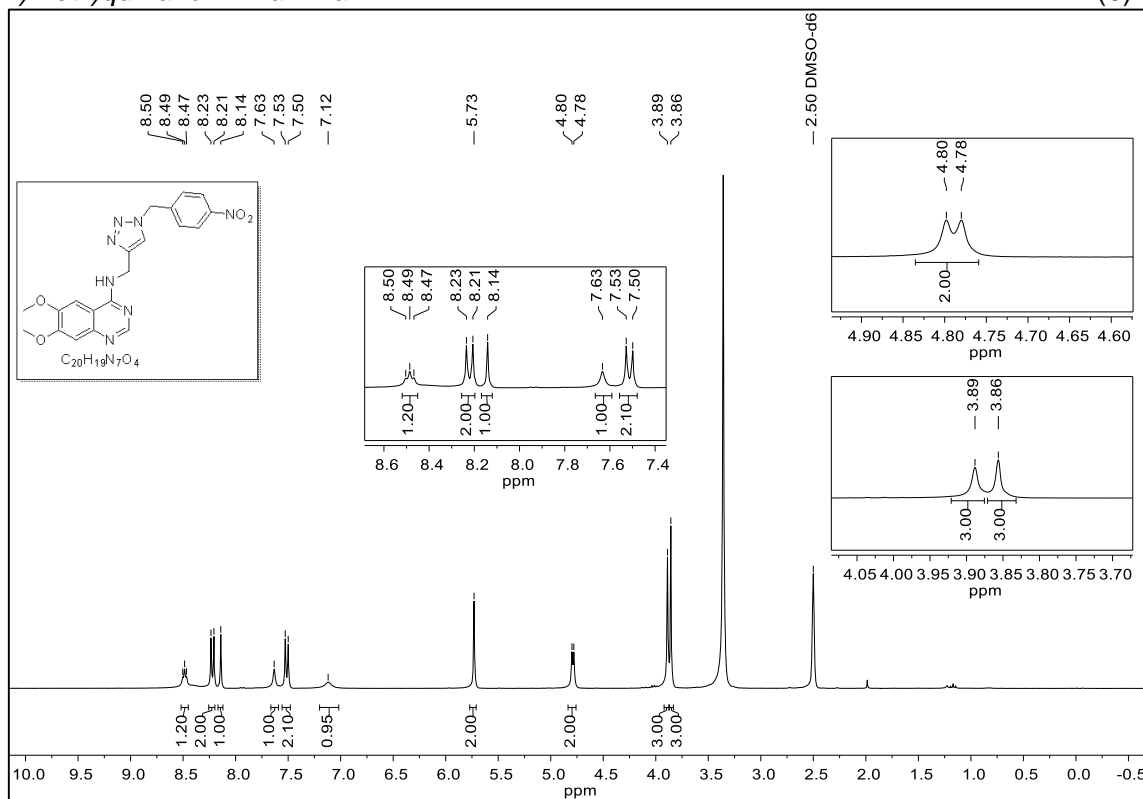
RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - *N*-((1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (5)



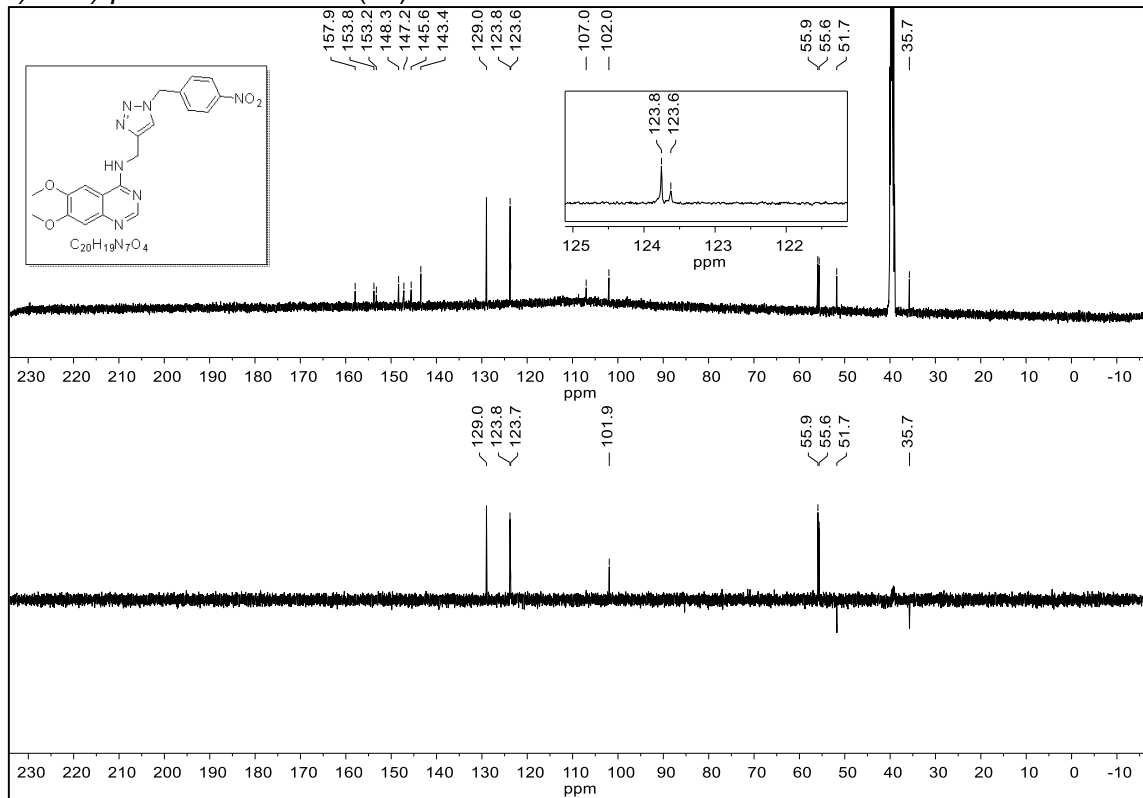
HRMS (ES<sup>+</sup>) - *N*-((1-(4-nitrobenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (5).  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_7\text{O}_2^+$  362,1365; encontrado: 362,1360.



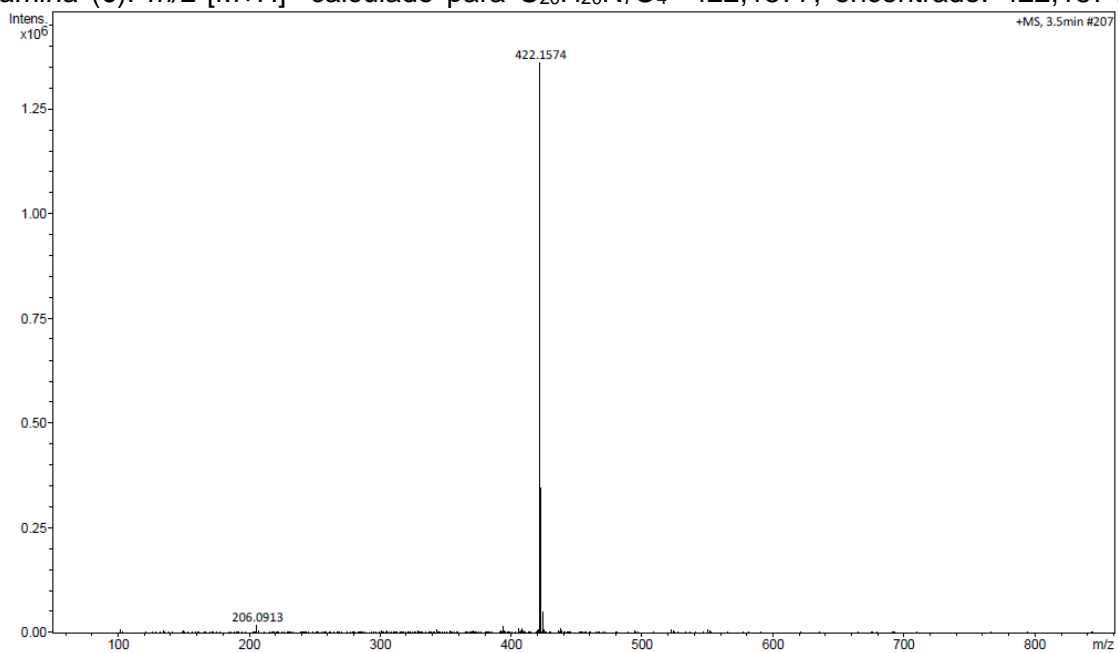
**RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - 6,7-dimetoxi-N-((1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (6).**



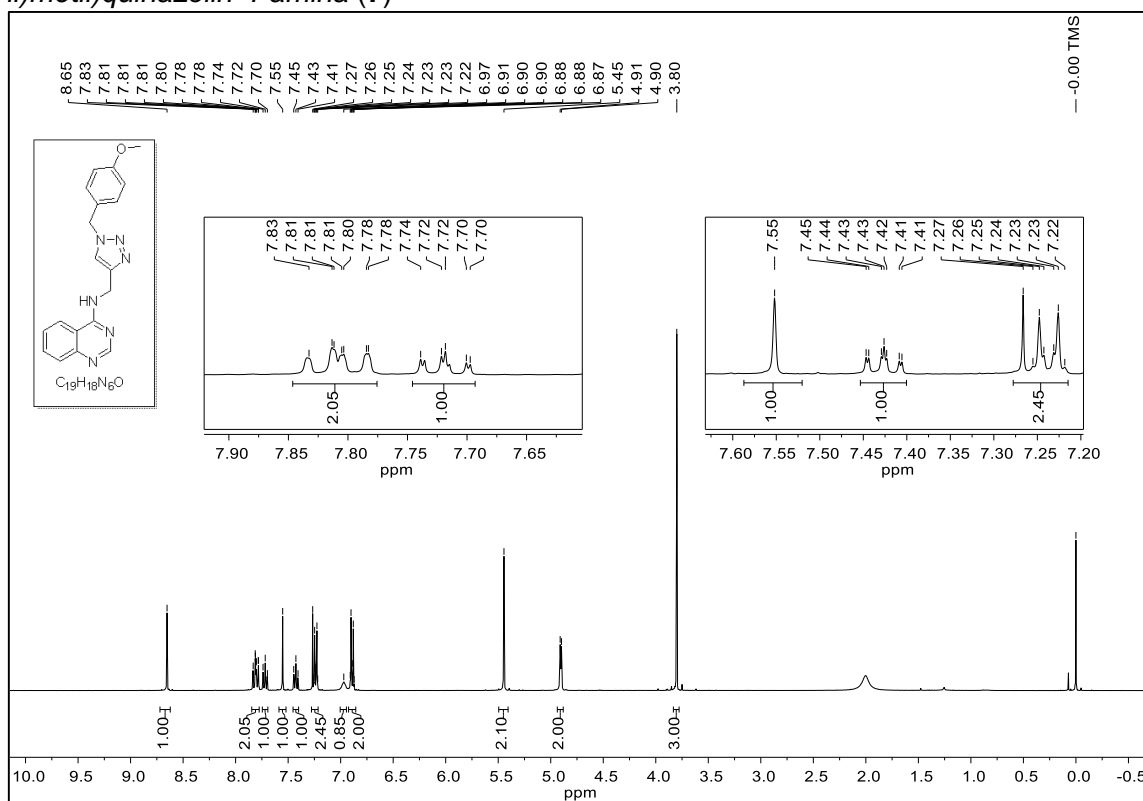
**RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - 6,7-dimetoxi-N-((1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (56).**



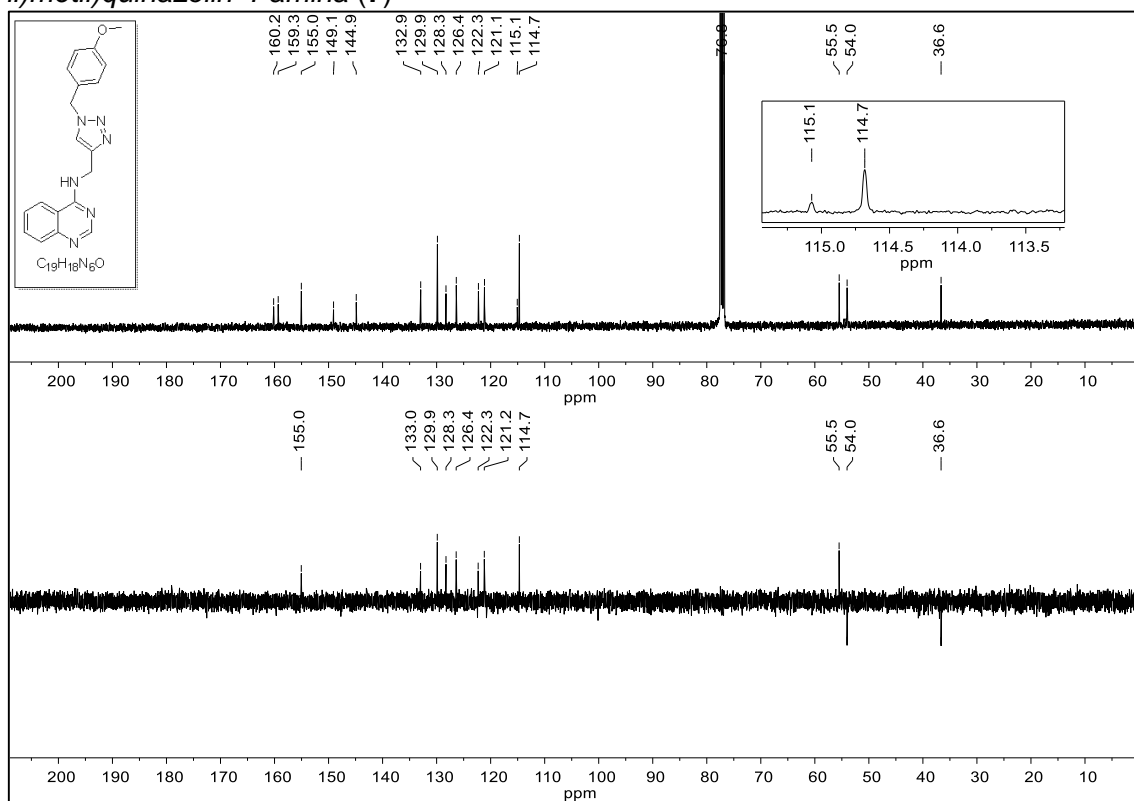
**HRMS (ES<sup>+</sup>)** - 6,7-dimetoxi-N-((1-(4-nitrobenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**6**).  $m/z$   $[M+H]^+$  calculado para  $C_{20}H_{20}N_7O_4^+$  422,1577; encontrado: 422,1574.



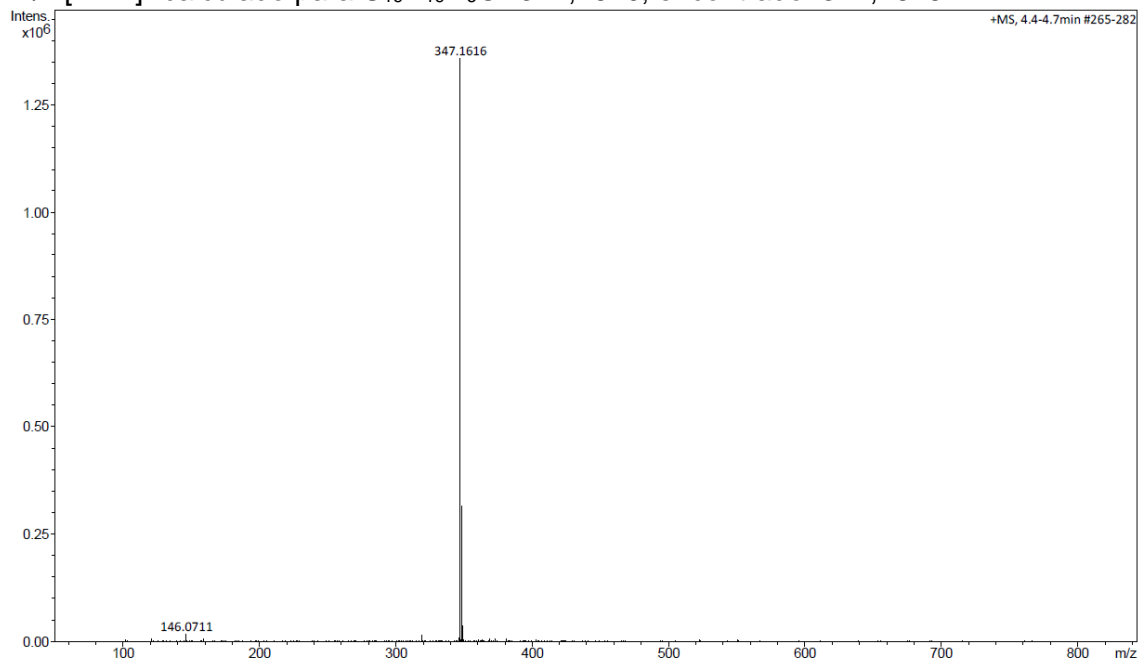
**RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** - N-((1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**7**)



**RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) - *N*-((1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (7)**

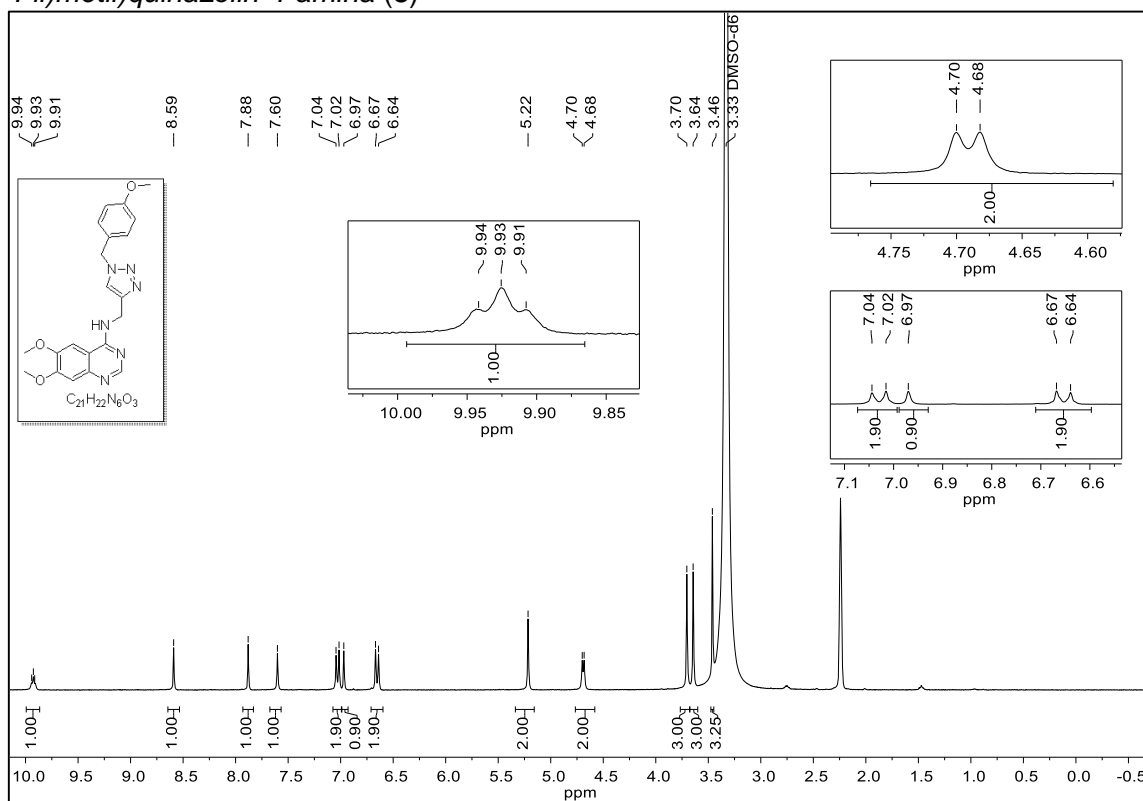


**HRMS (ES+) - *N*-((1-(4-metoxibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (7).**  
*m/z*  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}^+$  347,1620; encontrado: 347,1616.

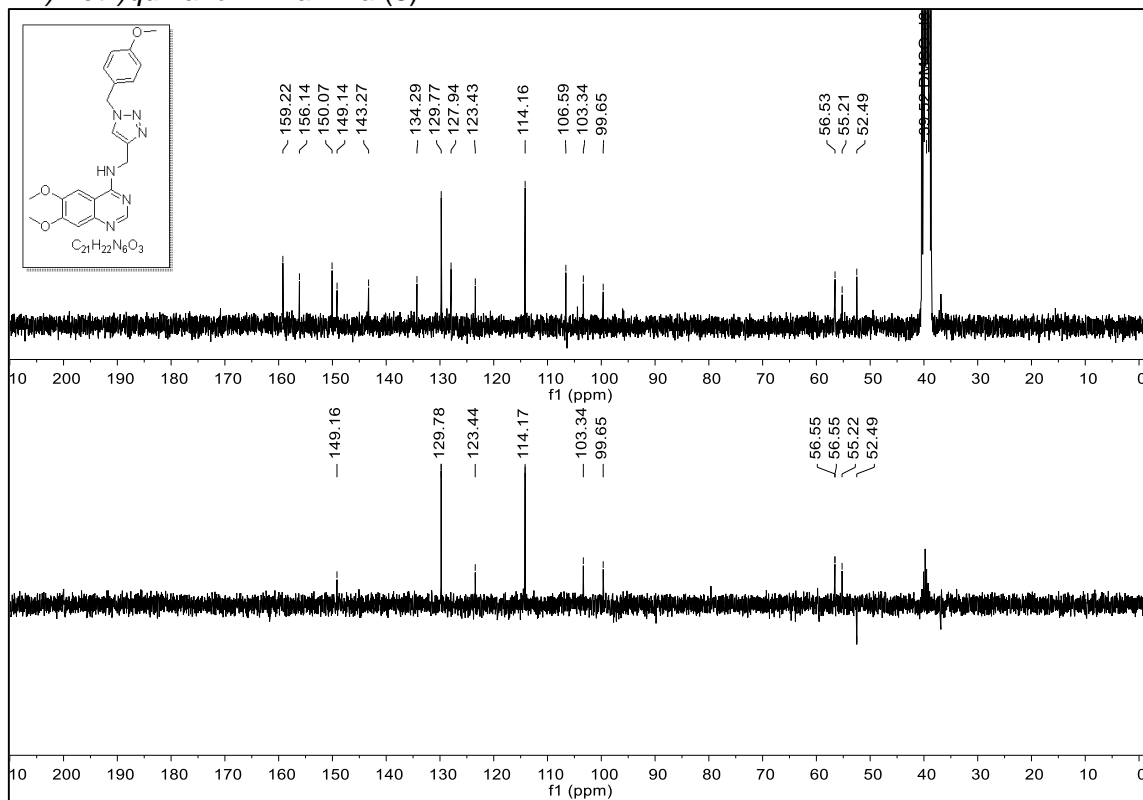




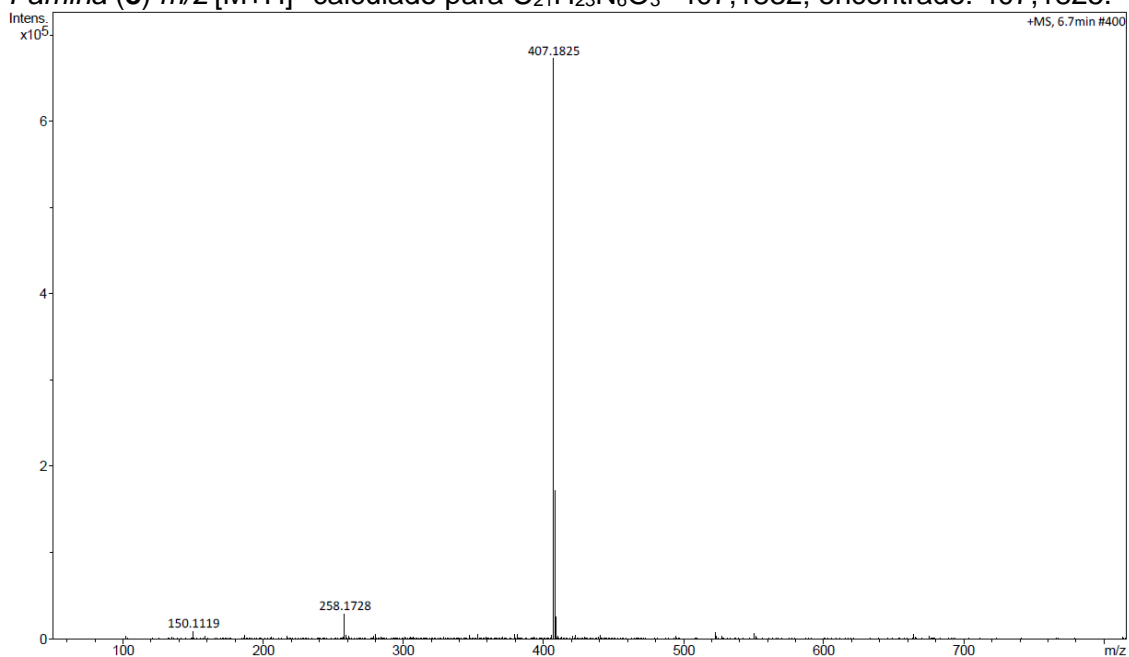
RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - 6,7-dimetoxi-N-((1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**8**)



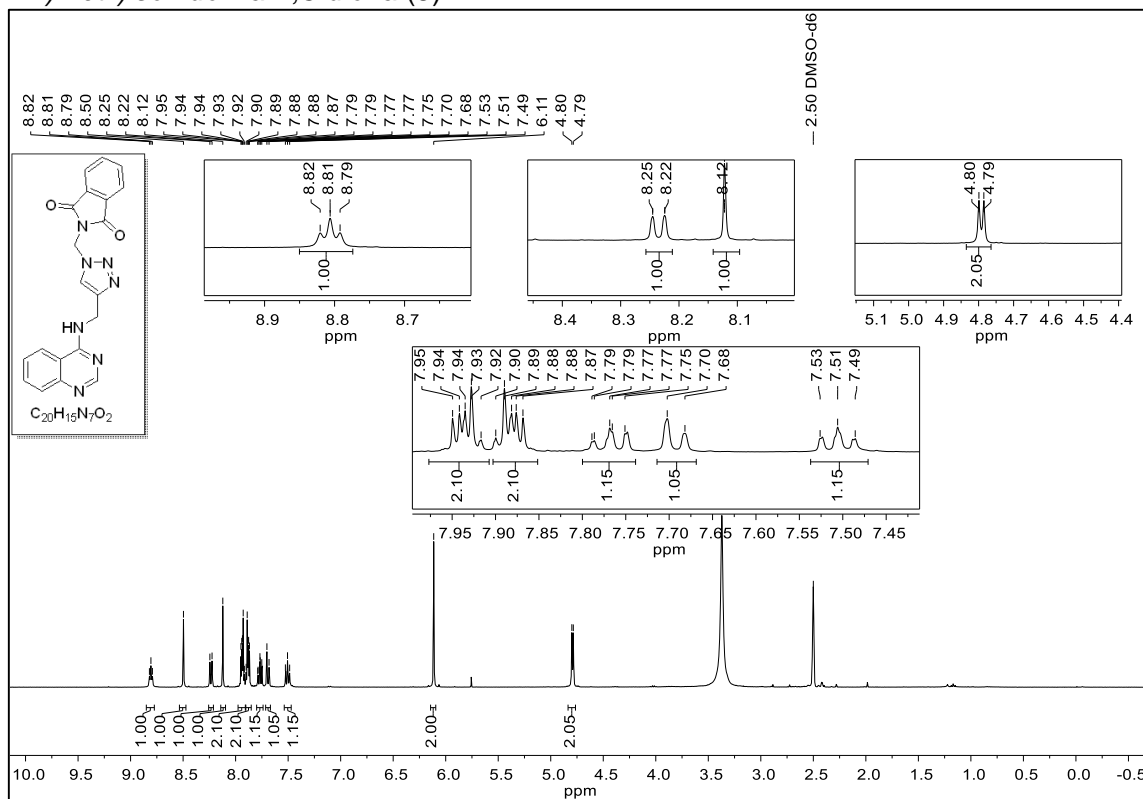
RMN de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - 6,7-dimetoxi-N-((1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**8**)



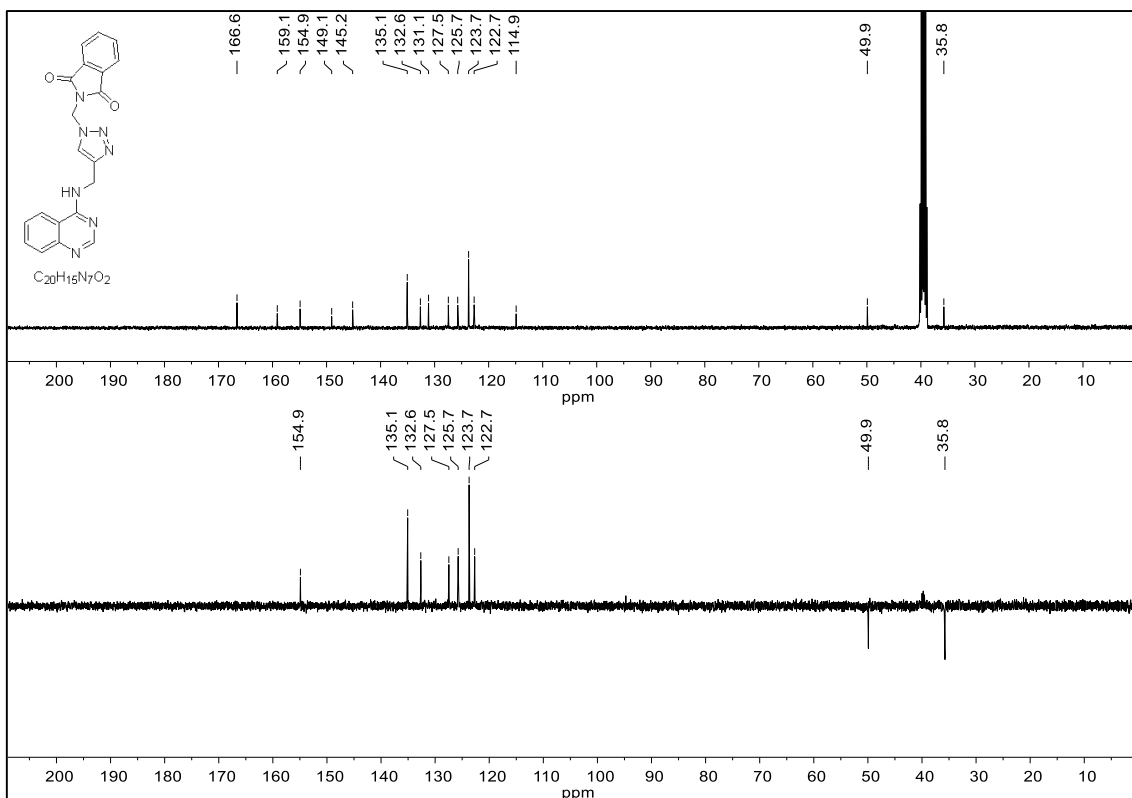
**HRMS (ES<sup>+</sup>) - 6,7-dimetoxi-N-((1-(4-metoxibenzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (8)**  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> 407,1832; encontrado: 407,1825.



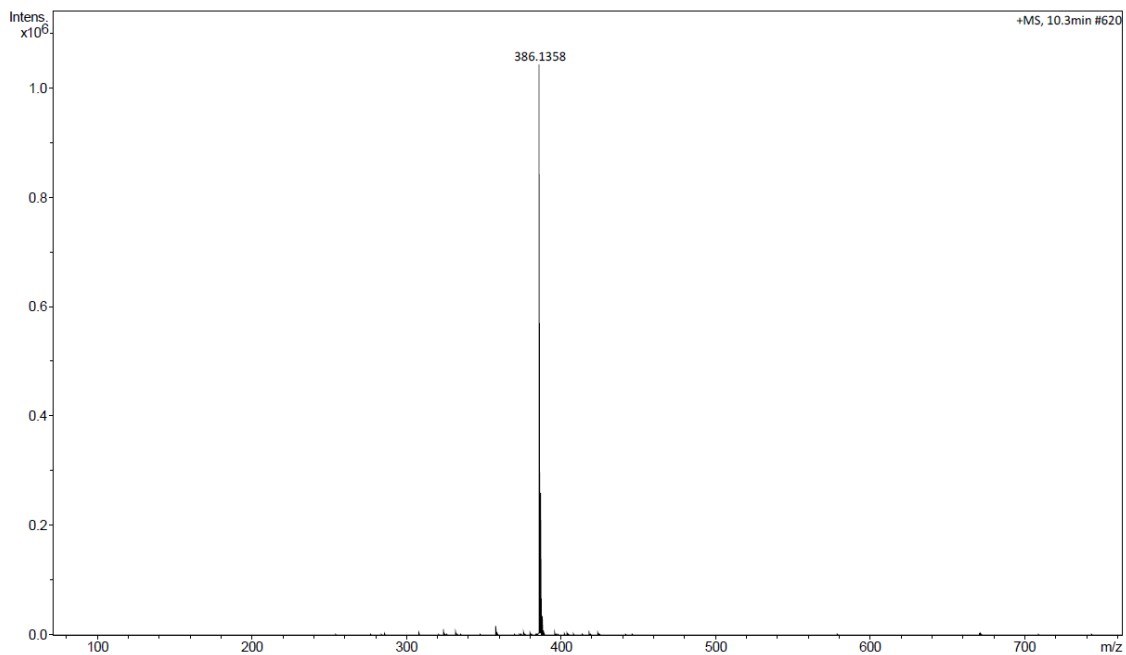
**RMN de <sup>1</sup>H δ<sub>H</sub> (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) - 2-((4-((quinazolin-4-ilamino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoindolina-1,3-diona (9)**



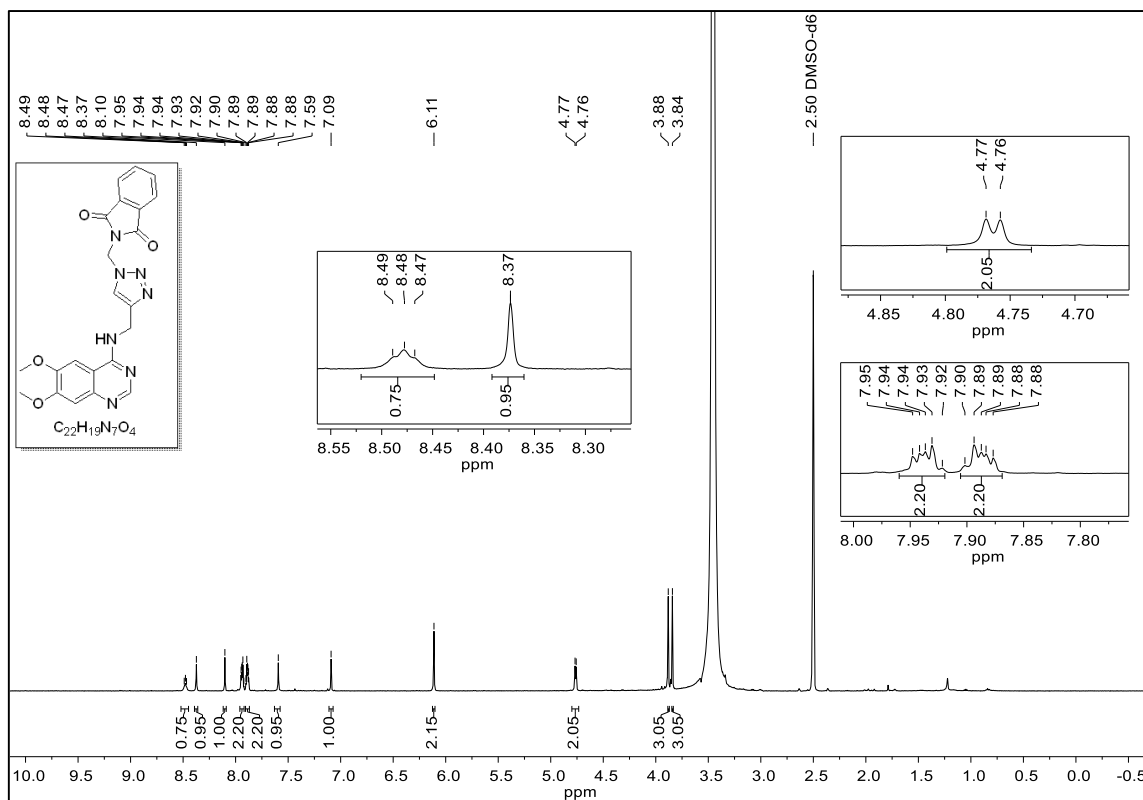
**RMN de <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) - 2-((4-((quinazolin-4-ilamino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoindolina-1,3-diona (9)**



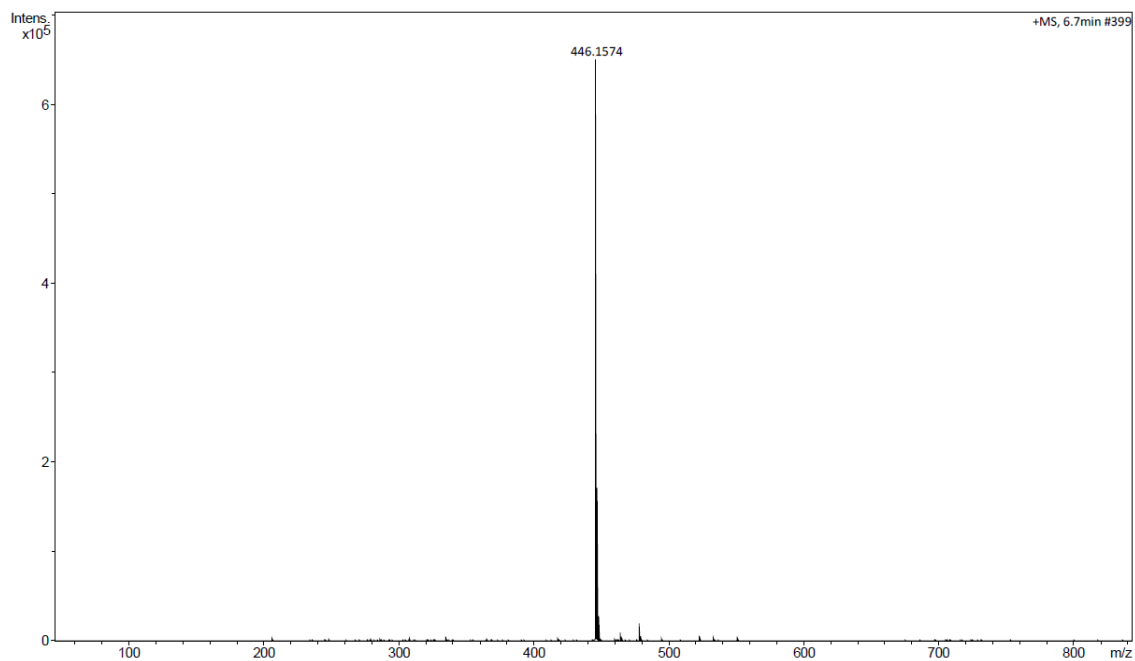
**HRMS (ES<sup>+</sup>)** - 2-((4-((quinazolin-4-ilamino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoindolina-1,3-diona (**9**).  $m/z$   $[M+H]^+$  calculado para  $C_{20}H_{16}N_7O_2^+$  386,1365; encontrado: 386,1358.



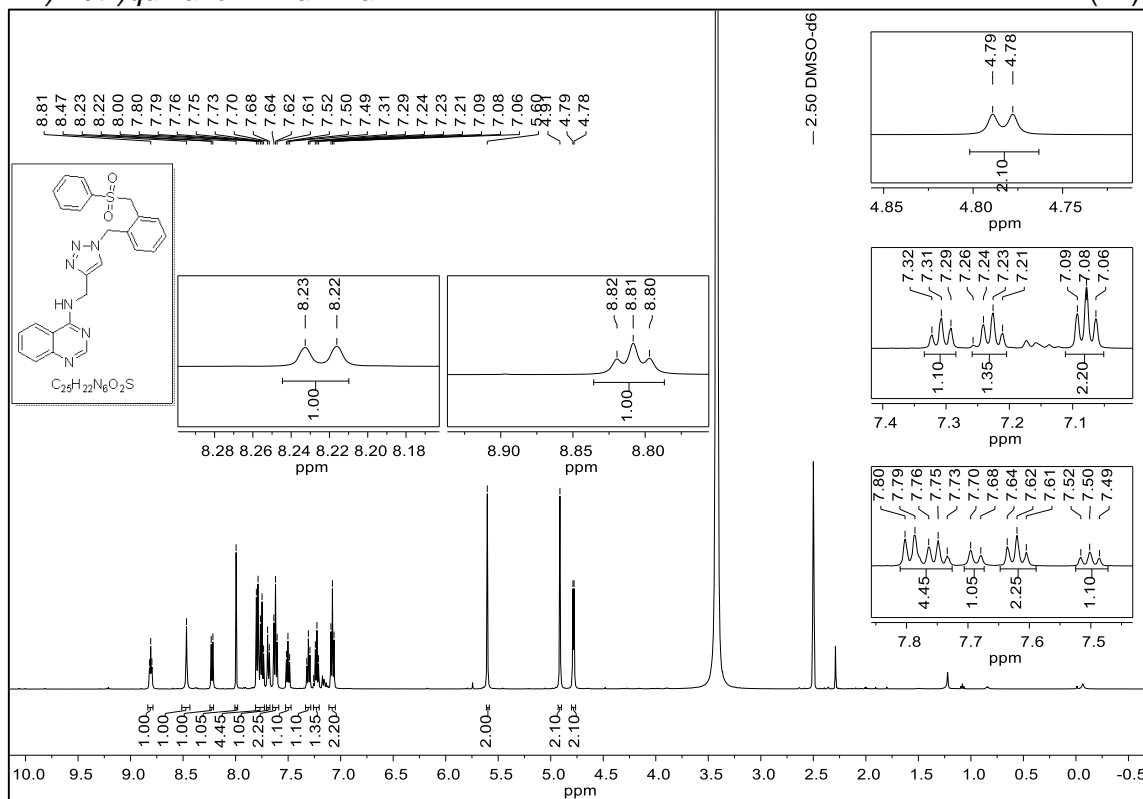
**RMN de  $^1H$**  (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ) - 2-((4-(((6,7-dimetoxiquinazolin-4-il)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoindolina-1,3-diona (**10**)



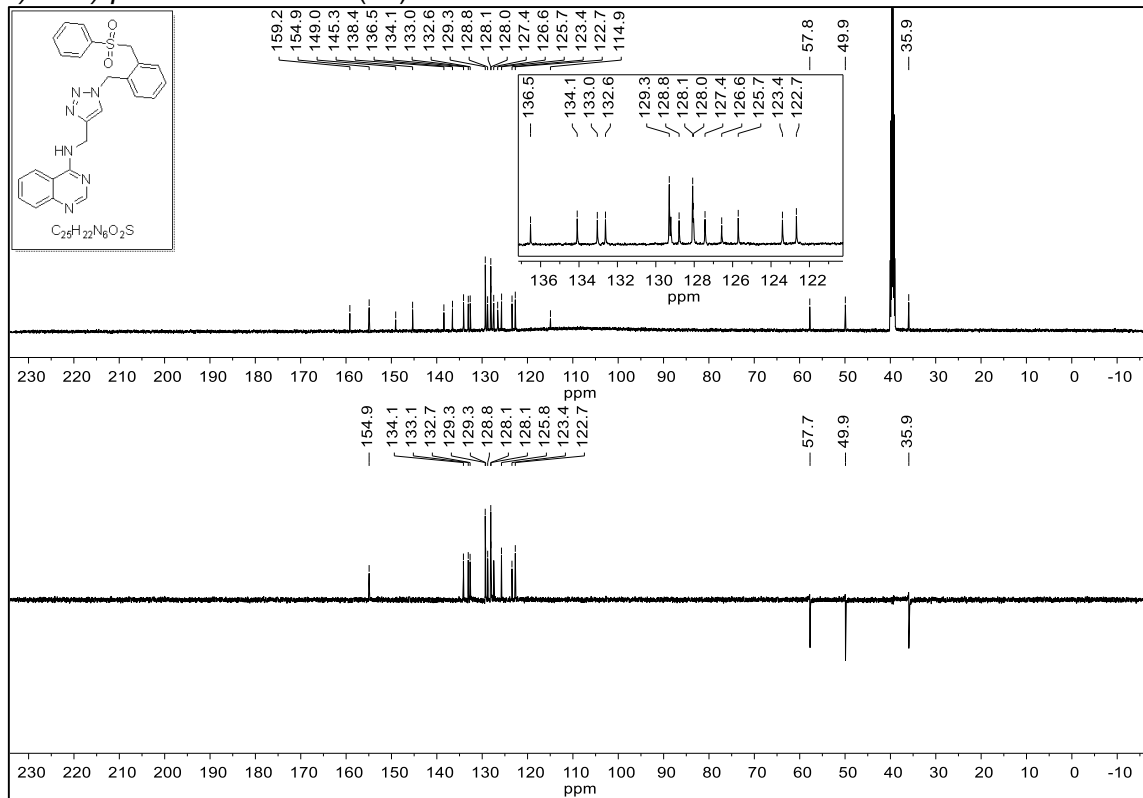
**HRMS (ES<sup>+</sup>) - 2-((4-(((6,7-dimetoquinazolin-4-il)amino)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil)isoindolina-1,3-diona (10).** *m/z* [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>N<sub>7</sub>O<sub>4</sub><sup>+</sup> 446,1577; encontrado: 446,1574.



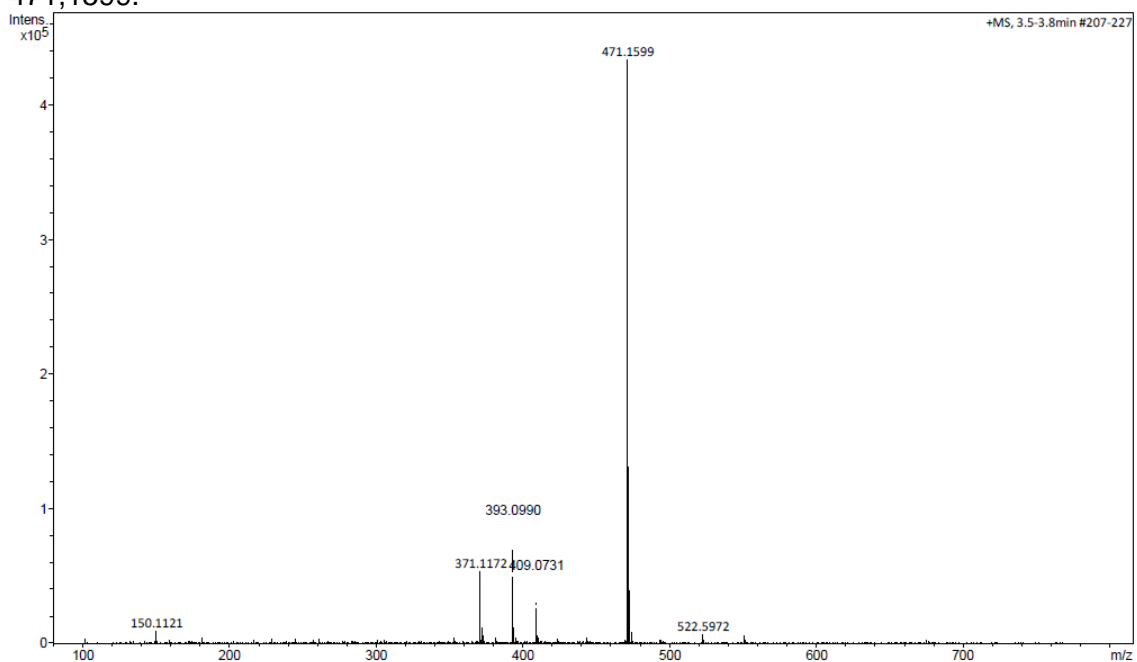
RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) - *N*-((1-(2-((fenilsulfonil)metil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (11)



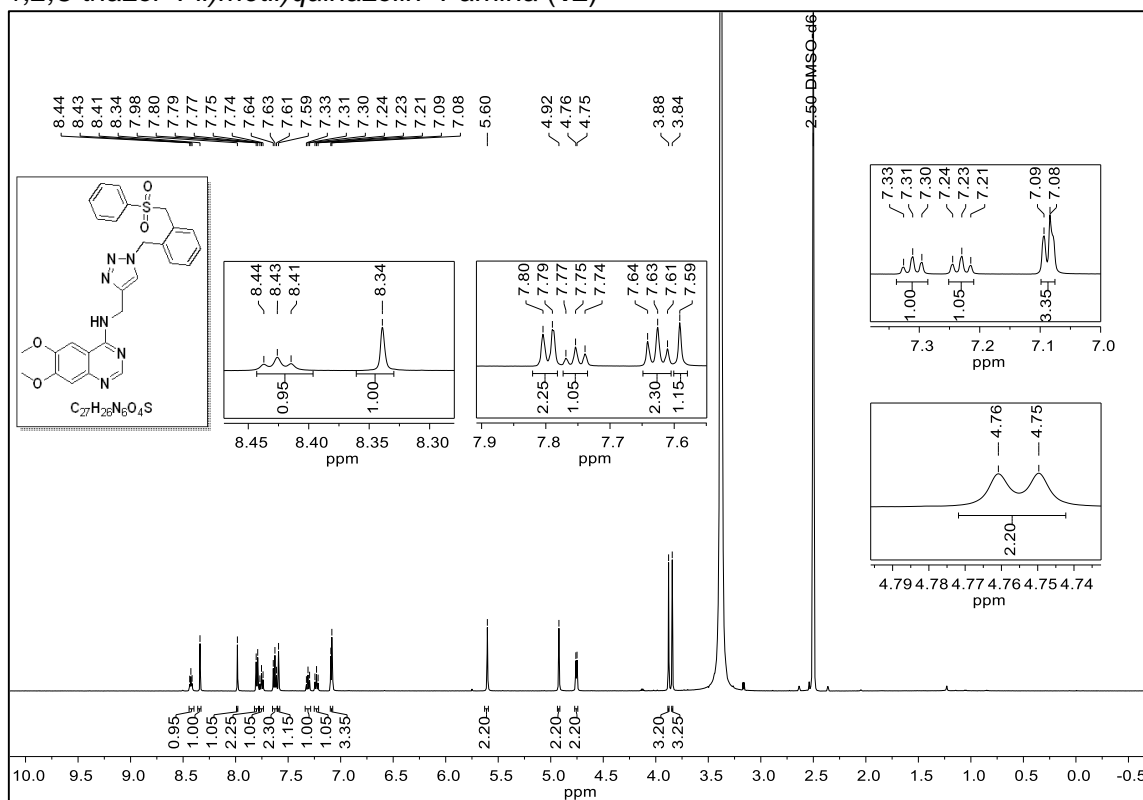
RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz;  $\text{DMSO}$ ) - *N*-((1-(2-((fenilsulfonil)metil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (61)



**HRMS (ES<sup>+</sup>)** - *N*-((1-(2-((fenilsulfonyl)metil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**11**).  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>25</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S<sup>+</sup> 471,1603; encontrado: 471,1599.



**RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)** - 6,7-dimetoxi-*N*-((1-(2-((fenilsulfonyl)metil)benzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**12**)



**HRMS (ES<sup>+</sup>)** - 6,7-dimetoxi-N-((1-(2-((fenilsulfonil)metil) benzil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil)quinazolin-4-amina (**12**)  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> calculado para C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S<sup>+</sup> 531,1814; encontrado: 531,1811.

