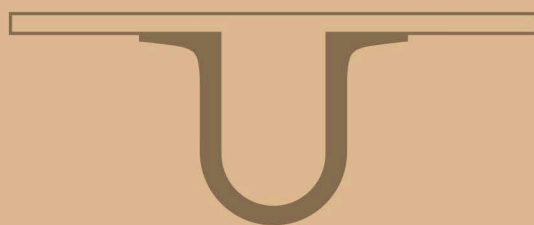




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Margarida Inês Madeira Esteves

SÍNTESE DE ESPIRO- γ -LACTAMAS QUIRAIS DERIVADAS DA *L*-CISTEÍNA

Dissertação de Mestrado em Química, na área de especialização em Química Avançada Industrial,
orientada pela Professora Doutora Teresa Pinho Melo e pela Doutora Maria Isabel Soares,
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2018

Margarida Inês Madeira Esteves

Síntese de Espiro- γ -Lactamas Quirais derivadas da *L*-Cisteína

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química
Área de especialização em Química Avançada e Industrial

Orientação:

Professora Doutora Teresa Margarida de Vasconcelos Dias de Pinho e Melo

Doutora Maria Isabel Lopes Soares

Setembro 2018

Universidade de Coimbra

*“Whatever you do in life will be insignificant,
but it’s very important that you do it.”*

Mahatma Gandhi

Agradecimentos

O nosso caminho na vida não existe apenas para chegarmos a uma meta, existe para conseguirmos aprender o valor da nossa caminhada. Durante esta caminhada muitos desafios e obstáculos põem-nos à prova, e são as nossas decisões perante estes que determinam a nossa aprendizagem e crescimento. O mais importante disto tudo é saber reconhecer os nossos altos e baixos, descobrir que estes fazem parte do nosso percurso, que nos fazem crescer e nos desafiam a melhorar as nossas capacidades. Nenhum caminho pode ser totalmente perfeito, no entanto, este proporciona-nos oportunidades únicas de conseguir realizar sonhos ou objetivos, e dá-nos o privilégio de conhecer pessoas incríveis, que nos ajudam e apoiam, tornando este processo de aprendizagem mais enriquecedor. Assim, gostaria de deixar aqui algumas palavras de agradecimento a todas as pessoas que, de certo modo, me acompanharam e permitiram que este projeto de tese fosse possível.

À Professora Doutora Teresa Pinho e Melo gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a orientação ao longo deste trabalho. Agradeço também por todos os ensinamentos que me transmitiu, pelo apoio e confiança nas minhas capacidades, por toda a disponibilidade e incentivo prestados, e pela oportunidade de desenvolver o trabalho apresentado nesta dissertação no seu grupo de investigação.

À Doutora Isabel Soares um agradecimento especial por toda a ajuda, orientação e todo o tempo e ensinamentos que disponibilizou, ao longo destes anos, para o meu projeto, para a minha formação, e para o meu crescimento dentro do laboratório. Agradeço por todos os conhecimentos científicos, os conselhos cedidos, todo o apoio, confiança e ensinamentos que sempre me transmitiu. A sua orientação foi essencial para a realização deste projeto.

À Doutora Susana Lopes agradeço todo o apoio e ensinamentos transmitidos. Por toda a sua disponibilidade e grande profissionalismo prestados durante a realização deste projeto.

A todos os elementos do grupo de Química Orgânica também gostaria de deixar o meu agradecimento, em especial, à Professora Doutora Elisa Serra, à Professora Doutora Dina Murtinho, à Doutora Ana Lúcia Cardoso, ao Doutor Nelson Pereira, e ao Doutor Bruno Nascimento por todo o acolhimento, disponibilidade, ajuda e ensinamentos que dispensaram no decurso deste projeto. À Dona Lurdes agradeço todos os conselhos, ajuda e apoio prestados, bem como pela forma carinhosa com que sempre me tratou e por estar sempre disponível.

Ao Professor Doutor Nuno Taveira pela colaboração no estudo da atividade de inibição HIV.

Ao Mestre Pedro Cruz o meu obrigado pela colaboração nos estudos de RMN e pela sua prestabilidade durante esta etapa.

Ao Doutor Cláudio Nunes agradeço por todo o trabalho prestado nos cálculos computacionais de estruturas moleculares neste projeto de investigação.

Aos meus colegas deste projeto de investigação, à Cátia Caratão e ao Nuno Alves, agradeço todo o apoio e ajuda, pela discussão de ideias que partilhámos, pelo trabalho que desenvolvemos em conjunto. Em especial, deixo o meu grande obrigado, ao Américo Alves, por todos os momentos que partilhámos a debater o nosso trabalho, novas ideias, e possíveis soluções para ultrapassar algum obstáculo, bem como por todos os momentos de brincadeira e descontração que compartilhámos. Foram verdadeiramente essenciais para a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório gostaria de agradecer, particularmente à Nélia, à Andreia, ao Francisco, à Carla, à Cláudia, ao João e à Vanessa, pelo acolhimento, espírito de entreatajuda, apoio e pela amizade que criámos. Todos os momentos que partilhámos de trabalho laboratorial e científico, bem como de brincadeira, diversão e momentos de cumplicidade, tornaram-se fatores imprescindíveis para um bom ambiente de trabalho e foram essenciais ao longo deste ano. Também gostaria de agradecer à Inês Fonseca por toda a amizade, por todos os conselhos, todo o tempo que disponibilizou para me incentivar e ensinar a prosperar neste meu percurso.

À minha melhor amiga, Ana Patrícia, um agradecimento especial por toda a paciência e compreensão para me aturar, por não ter estado tão presente este ano. Já são muitos anos de momentos e histórias partilhadas e os poucos que tivemos este ano foram essenciais! Obrigada por todo o incentivo e motivação, e por nunca me deixares desistir. Obrigada pelo apoio incondicional e por toda a nossa amizade.

À Beatriz Martins, a melhor pessoa que Coimbra me deu a conhecer, a minha madrinha, a minha colega de casa, e mais do que isso uma verdadeira amiga. Foram 5 anos de muitos momentos e histórias partilhadas, momentos de alegria, diversão, bem como momentos difíceis, de superação, de enfrentar medos, de crescimento pessoal e profissional, e também de muitas conquistas. Nada disto seria possível sem ti a acompanhar-me, a apoiar-me, amparando quedas ou estendo a mão para me ajudares a levantar, dando-me força para lutar e nunca desistir. Um simples obrigado nunca será suficiente para te agradecer tudo aquilo que fizeste por mim, por me aturares, pela paciência que tiveste comigo, e por tudo o que me ensinaste durante estes anos. Foste, sem dúvida, a minha melhor escolha. Obrigada por seres quem és.

A toda a minha família, em especial aos meus avós, à minha tia Susana, e ao meu tio João, agradeço todo o carinho, incentivo, apoio, e compreensão por ter faltado a tantos almoços de família. Um obrigado muito especial, à minha avó Vitória e à minha tia Tinita que marcaram a minha vida, são dois exemplos de vida, e sempre estarão presentes no meu coração.

À minha irmã, Catarina, o meu grande exemplo a seguir, a pessoa que me mostrou o verdadeiro significado de amizade e me ensinou a lutar pelos meus sonhos. Obrigada por seres quem és, por nunca desistires de mim, por todo o apoio e segurança que me dás, por todos os momentos que me proporcionaste, e por todas as histórias que partilhámos. Um obrigado não chega para te agradecer por tudo o que me ensinaste, pelo amor incondicional, pelo carinho, e pelo orgulho que tens em mim. Obrigada por me acolheres neste mundo, e por me dares a conhecer o verdadeiro sentido da vida.

Aos meus pais não existem palavras que consigam descrever o quão agradecida eu sou, por todo o amor, carinho, apoio, educação, todas as portas que me abriram e pela vida que me proporcionaram, ensinando a ser a pessoa que sou hoje. Obrigada por sempre me incentivarem a trabalhar, a ser melhor e nunca desistir dos meus objetivos. Obrigada por todos os sacrifícios, pela compreensão, pelo orgulho que têm em mim, e por cada palavra de sabedoria. A pessoa que sou hoje é graças a vocês.

Ao Tomás, a alegria e o amor que nasceu há um ano e pouco na família, e conquistou com toda a sua felicidade, peripécias, choros e risadas. Obrigada por me fazeres sempre sorrir, de uma forma tão simples e genuína.

*Felicidade pura e genuína me deram a conhecer,
Acompanhando e apoiando cada decisão,
Mostraram-me a viver com a melhor definição.
Ídolos foram e muito me deram a aprender,
Lutando na vida me ensinaram com afeição.
Incondicional amor me partilharam sem temer,
Agradeço-vos por tudo, são a luz do meu coração!*

Índice

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Esquemas	xv
Nomenclatura e Abreviaturas	xvii
Resumo	xix
Abstract	xxi
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1 β -Lactamas.....	3
1.1.1 Problemas no manuseamento e administração de compostos β -lactâmicos.....	5
1.1.2 Espiro- β -lactamas.....	7
1.2 γ -Lactamas.....	11
1.2.1 Vias sintéticas para a obtenção de γ -lactamas.....	15
1.3 Compostos espirocíclicos.....	22
1.3.1 Vias sintéticas para a obtenção de espiro- γ -lactamas.....	25
CAPÍTULO II - SÍNTESE DE DIAZO-γ-LACTAMAS QUIRAIS	31
2.1. Objetivos	33
2.2. Síntese de γ -lactamas bicíclicas.....	33
2.3. Conversão à diazo- γ -lactama	45
2.4. Conclusão	47
CAPÍTULO III - SÍNTESE DE ESPIRO-γ-LACTAMAS QUIRAIS	49
3.1. Objetivos	51
3.2. Reações de ciclo-adição 1,3-dipolar.....	52
3.3. Síntese de espiro- γ -lactamas ácidas.....	59
3.4. Avaliação de atividade biológica.....	62
3.5. Conclusão	64
CAPÍTULO IV - PARTE EXPERIMENTAL	67
4.1. Instrumentação	69
4.2. Solventes e reagentes	70
4.3. Métodos Sintéticos referentes ao Capítulo II.....	71

Índice

4.3.1. Síntese de Tiazolidinas	72
4.3.2. Síntese de γ -lactamas bicíclicas	74
4.3.3. Síntese de Diazo- γ -lactamas quirais	76
4.4. Métodos Sintéticos referentes ao Capítulo III	78
4.4.1. Síntese de Espiro- γ -lactamas ésteres.....	78
4.4.2. Síntese de Espiro- γ -lactamas ácidas.....	80
CAPÍTULO V - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

Índice de Figuras

Figura 1.1. Representação das estruturas de: a) 2-azetidinonas; b) 1,3,3,4-Tetrafenilazetidina-2-ona, sintetizada por Staudinger; c) penicilina G.	3
Figura 1.2. Estrutura química das principais subfamílias de compostos β -lactâmicos. A azul estão as famílias dos antibióticos β -lactâmicos sintéticos.	4
Figura 1.3. Exemplos ilustrativos de compostos espiro- β -lactâmicos com diferentes atividades biológicas.	7
Figura 1.4. Estrutura do anel γ -lactâmico.	11
Figura 1.5. Exemplos de compostos com núcleos γ -lactâmicos que possuem interesse biológico e farmacêutico.	12
Figura 1.6. Compostos naturais que possuem núcleos γ -lactâmicos.	13
Figura 1.7. Estrutura de γ -lactamas naturais isoladas a partir de origens animais.	13
Figura 1.8. Estrutura de γ -lactamas derivadas de plantas.	14
Figura 1.9. Estrutura de γ -lactamas naturais isoladas a partir de bactérias.	14
Figura 1.10. Estrutura de γ -lactamas provenientes de fungos.	15
Figura 1.11. Exemplos de espiro- γ -lactamas 1.60	22
Figura 1.12. Exemplos de produtos naturais espirocíclicos.	23
Figura 1.13. Compostos biologicamente ativos que contêm o esqueleto 3,2'-espiropirrolidina oxindole.	23
Figura 1.14. Espirolactamas peptidomiméticas.	24
Figura 2.1. Espetro de RMN protônico do composto 2.15 (DMSO- d_6).	42
Figura 2.2. Principais correlações observadas no espectro NOESY do composto 2.15	42
Figura 2.3. Espetro NOESY do composto 2.15 (DMSO- d_6).	43
Figura 2.4. a) Estrutura determinada por cristalografia de raios-X de (3R,6R,7aS)-6-((<i>tert</i> -butoxicarbonil)amino)-5-oxohexahidropirrolo[2,1- <i>b</i>]tiazol-3-carboxilato de metilo; b) Síntese do produto maioritário <i>exo</i> - γ -lactama bicíclica.	44
Figura 2.5. Comparação dos espectros de RMN protônico dos compostos 2.15 e 2.18 (DMSO- d_6).	45
Figura 2.6. a) Estrutura molecular otimizada de (3R,6S,7aS)-6-amino-5-oxohexahidropirrolo[2,1- <i>b</i>]tiazol-3-carboxilato de benzidrido (2.19), através do método B3LYP/6-31G* pelo programa Gaussian 09. b) Estrutura molecular do ácido (+)-6-aminopenicilânico determinada por cristalografia de raios-X.	46
Figura 3.1. Espetro RMN protônico do composto 3.2 (CDCl ₃).	53
Figura 3.2. Espetro de RMN protônico do composto 3.6 (CDCl ₃).	55
Figura 3.3. Expansão do espectro de NOESY do composto 3.6 (CDCl ₃).	56
Figura 3.4. Expansão do espectro de HSQC do composto 3.6 (CDCl ₃).	57
Figura 3.5. Expansão do espectro de HMBC do composto 3.6 (CDCl ₃).	57
Figura 3.6. Espetro de RMN protônico do composto 3.9b (CD ₃ OD).	60
Figura 3.7. Expansão do espectro de NOESY do composto 3.9b (CD ₃ OD).	61
Figura 3.8. Expansão do espectro de HSQC do composto 3.9b (CD ₃ OD).	61
Figura 3.9. Compostos espiro- γ -lactâmicos cuja atividade biológica foi estudada.	63

Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Condições de reação para a síntese dos compostos bicíclicos 2.5a e 2.5b	35
Tabela 2.2. Condições de reação para a síntese da tiazolidina-4-carboxilato de metilo 2.9a e de benzidrilo 2.9b	36
Tabela 2.3. Condições de reação para a síntese dos compostos bicíclicos 2.5a e 2.5b	38
Tabela 2.4. Condições de reação utilizadas na síntese da amino- γ -lactama 2.12	39
Tabela 2.5. Otimização das condições de reação para a síntese do ácido tiazolidina-4-carboxílico 2.13	40
Tabela 2.6. Otimização das condições de reação para a síntese da γ -lactama bicíclica ácida 2.14	41
Tabela 2.7. Otimização das condições de reação para a síntese da diazo- γ -lactama 2.20	47
Tabela 3.1. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3 dipolar da diazo- γ -lactama 2.20 com o acetileno-carboxilato de dimetilo (3.1)	52
Tabela 3.2. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3 dipolar da diazo- γ -lactama 2.20 com o propiolato de metilo (3.3)	54
Tabela 3.3. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3 dipolar da diazo- γ -lactama 2.20 com a <i>N</i> -metilmaleimida (3.5).	55
Tabela 3.4. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3 dipolar da diazo- γ -lactama 2.20 com a <i>N</i> -fenilmaleimida (3.7).	58
Tabela 3.5. Valores de CC50 das espiro- γ -lactamas.	63
Tabela 3.6. Percentagem inibitória máxima (MIP) Anti-HIV a 10 μ g/mL das espiro- γ -lactamas.	63
Tabela 3.7. Percentagem inibitória máxima (MIP) Anti-HIV a 50 μ g/mL das espiro- γ -lactamas.	64

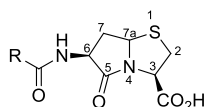
Índice de Esquemas

Esquema 1.1.....	8
Esquema 1.2.....	9
Esquema 1.3.....	10
Esquema 1.4.....	11
Esquema 1.5.....	15
Esquema 1.6.....	16
Esquema 1.7.....	16
Esquema 1.8.....	17
Esquema 1.9.....	18
Esquema 1.10.....	19
Esquema 1.11.....	19
Esquema 1.12.....	19
Esquema 1.13.....	20
Esquema 1.14.....	20
Esquema 1.15.....	21
Esquema 1.16.....	22
Esquema 1.17.....	24
Esquema 1.18.....	26
Esquema 1.19.....	27
Esquema 1.20.....	27
Esquema 1.21.....	28
Esquema 1.22.....	28
Esquema 1.23.....	29
Esquema 1.24.....	30
Esquema 2.1.....	33
Esquema 2.2.....	34
Esquema 2.3.....	35
Esquema 2.4.....	37
Esquema 2.5.....	41
Esquema 2.6.....	43
Esquema 2.7.....	44
Esquema 2.8.....	45
Esquema 2.9.....	46
Esquema 2.10.....	48
Esquema 3.1.....	51
Esquema 3.2.....	59
Esquema 3.3.....	62
Esquema 3.4.....	65

Nomenclatura e Abreviaturas

Nomenclatura

Nesta dissertação de mestrado, a nomenclatura utilizada, relativamente aos compostos γ -lactâmicos e aos restantes compostos, segue as regras gerais das normas da IUPAC.¹ Relativamente ao sistema de nomenclatura para anéis fundidos foi utilizado o sistema Hantzsch-Widman (exemplo 1).²



Exemplo 1

Abreviaturas

17 β -HSD	do inglês <i>17β-Hydroxysteroid dehydrogenase</i>
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico (do inglês <i>6-aminopenicillanic acid</i>)
API	do inglês <i>Active Pharmaceutical Ingredient</i>
ATR	do inglês <i>Attenuated Total Reflectance</i>
CGMP	do inglês <i>Current Good Manufacturing Practices</i>
d	Dubleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
DMAD	Dimetil acetilnodicarboxilato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EMAR	Espetrometria de Massa de Alta Resolução
Equiv.	Equivalente
ESI	do inglês <i>ElectroSpray Ionization</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>

GABA	Ácido γ -aminobutírico (do inglês <i>gamma-Aminobutyric acid</i>)
GMP	do inglês <i>Good Manufacturing Practices</i>
HIV	do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMBC	do inglês <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HSQC	do inglês <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
IUPAC	do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Espetroscopia de Infravermelho
m	Multiplato
MDM2	do inglês <i>Murine Doble Minute 2</i>
MIP	Porcentagem Inibitória Máxima (do inglês <i>Maximum Inhibitory Percentage</i>)
NOESY	do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PDE	Fosfodiesterase (do inglês <i>Phosphodiesterase</i>)
p.f.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluenosulfônico
RMN	Espetroscopia de ressonância magnética nuclear
RMN de ^{13}C	Espetroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN de ^1H	Espetroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
t.a.	Temperatura ambiente
TACE	do inglês <i>Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i>
TEA	Trietilamina
TFA	Ácido trifluoracético
THF	Tetra-hidrofurano
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês <i>Thin-layer chromatography</i>)
TMS	Tetrametilsilano

Resumo

A descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com maior bioatividade e estabilidade é um campo de elevado interesse. Deste modo, a síntese de espiro- β -lactamas despertou interesse, uma vez que a introdução de sistemas espirocíclicos pode alterar substancialmente a reatividade destes compostos.

O grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra realizou um estudo sobre a síntese de compostos β -lactâmicos espirocíclicos, que resultou no desenvolvimento de compostos líder com propriedades anti-HIV e anti-*Plasmodium berghei* muito interessantes. No entanto, a síntese de β -lactamas é sujeita a requisitos GMP (*Good Manufacturing Practices*) bastantes exigentes, de modo a evitar contaminação cruzada com outros fármacos e possíveis reações de hipersensibilidade. Desta forma, a síntese de derivados não- β -lactâmicos (γ -lactamas) foi a estratégia definida para ultrapassar esta dificuldade, com o objetivo de obter espiro- γ -lactamas com propriedades antimicrobianas semelhantes às aquelas observadas nas espiro- β -lactamas. Este propósito foi atingido através do estudo da síntese e reatividade de diazo- γ -lactamas em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar.

No primeiro capítulo desta dissertação são descritos alguns exemplos relevantes da literatura que evidenciam as propriedades químicas e biológicas de β -lactamas, espiro- β -lactamas, γ -lactamas e espiro- γ -lactamas. Além disso, são também apresentados exemplos de estratégias sintéticas para a obtenção de espiro- β -lactamas, do núcleo γ -lactâmico e de espiro- γ -lactamas.

No segundo capítulo é apresentada a otimização da via sintética utilizada para a obtenção da diazo- γ -lactama alvo derivada da *L*-cisteína, um composto constituído por um 1,3-dípolo do tipo diazoalcano. A síntese de γ -lactamas bicíclicas ésteres e ácidas, desenvolvida com o objetivo de encontrar uma via mais eficiente para a síntese da diazo- γ -lactama é também apresentada neste capítulo.

No terceiro capítulo é descrito o estudo da reatividade da diazo- γ -lactama com diferentes dipolarófilos com o objetivo de preparar novas espiro- γ -lactamas quirais *via* reações de ciclo-adição 1,3-dipolar. A diazo- γ -lactama reagiu com dipolarófilos como o acetileno dicarboxilato de dimetilo, o propiolato de metilo ou maleimidias *N*-substituídas, permitindo a síntese de espiro- γ -lactamas protegidas com o éster benzidrílico. Foi também estudada a conversão destes ésteres aos correspondentes derivados ácidos, preparando, deste modo, outros derivados γ -lactâmicos espirocíclicos. Ainda neste capítulo é apresentado o estudo da citotoxicidade e da atividade do vírus de imunodeficiência humana (HIV-1), de alguns compostos espiro- γ -lactâmicos preparados no decurso deste trabalho.

Abstract

The discovery and development of novel antimicrobial agents with increased bioactivity and stability is a of high interest field. Consequently, the synthesis of spiro- β -lactams has raised interest, since the introduction of spirocyclic systems may alter their function.

Previous studies developed in our research group on the synthesis and biological assays of spirocyclic- β -lactams originated the development of lead compounds with remarkable anti-HIV and anti-*Plasmodium berghei* properties. However, the synthesis of β -lactams is subject to very demanding GMP's (good manufacturing practices), to avoid cross-contamination with other drugs and possible hypersensitivity reactions. Therefore, the synthesis of non- β -lactam derivatives (γ -lactams) was the strategy defined to overcome this issue, in order to obtain spiro- γ -lactams with antimicrobial properties similar to those observed for spiro- β -lactams. To accomplish this goal, the synthesis and reactivity of diazo- γ -lactams was explored in 1,3-dipolar cycloaddition reactions.

The first chapter of this dissertation presents some relevant examples of the literature that demonstrate the chemical and biological properties of β -lactams, spiro- β -lactams, γ -lactams and spiro- γ -lactams. Several synthetic methods to obtain spiro- β -lactams, the γ -lactam moiety and spiro- γ -lactam compounds are also described.

The second chapter describes the optimization of each step of the synthetic procedure in order to obtain the target diazo- γ -lactam derived from *L*-cysteine, a 1,3-dipole-containing compound of the diazoalkane type. In addition, the synthesis of bicyclic esters and acid γ -lactams was studied, to find the most favorable way to progress in this synthetic route.

In the third chapter, the studies on the reactivity of diazo- γ -lactam towards different dipolarophiles, leading to new chiral spiro- γ -lactams via 1,3-dipolar cycloadditions is described. Diazo- γ -lactams reacted with dipolarophiles such as dimethyl acetylenedicarboxylate, methyl propiolate, *N*-substituted-maleimides, to afford benzhydryl ester-protected spiro- γ -lactams compounds. The conversion of these esters into their acid form led to novel spirocyclic- γ -lactams derivatives. The study of the cytotoxicity and activity of the human immunodeficiency virus (HIV-1), of selected spiro- γ -lactam compounds prepared in the course of this work, is also presented in this chapter.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

As lactamas são uma das classes de compostos naturais mais valorizadas, tanto do ponto de vista biológico como sintético. Estas amidas cíclicas possuem uma estrutura química muito diversificada, sendo que o tamanho do anel pode variar entre 4 a 60 membros.³ Desde o início do século XX que o estudo de lactamas naturais e o desenvolvimento sintético de novos derivados lactâmicos tem sido explorado extensivamente na área de Química Medicinal. A principal razão para o elevado interesse nesta classe de compostos surge no facto de o núcleo lactâmico estar presente num vasto número de compostos naturais e sintéticos, que apresentam um amplo espectro de propriedades biológicas.

1.1 β -Lactamas

A química dos compostos heterocíclicos é considerada uma das áreas de investigação mais relevante em Química Medicinal.⁴ Os heterociclos β -lactâmicos são considerados um importante contributo para a ciência,⁵ devido à sua presença no organismo humano, em produtos naturais, fármacos e noutros compostos de interesse medicinal e biológico. As β -lactamas demonstraram possuir diversas atividades biológicas, como agentes antibacterianos, inibição da absorção do colesterol, inibição de diferentes tipos de enzimas e atividade antituberculosa, hipoglicémica e anticancerígena.^{6,7}

A 2-azetidionona, conhecida por β -lactama, é uma amida cíclica de quatro membros derivada do ácido 3-amino propanóico, em que o carbono carbonílico está na posição β relativamente ao anel de nitrogénio (figura 1.1a). O primeiro derivado desta classe de compostos foi sintetizado por Staudinger⁸ em 1907 (figura 1.1b), no entanto a importância das β -lactamas como antibióticos apenas foi reconhecida após a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928, uma substância com propriedades antibacterianas.⁹ O núcleo cíclico da β -lactama é bastante utilizado como elemento estérico controlador, tirando proveito da funcionalização e da possível quiralidade destes derivados, para a modelação e construção de estruturas heterocíclicas fundidas ao anel de quatro membros.¹⁰ No princípio da década de 40, foi descoberto o primeiro antibiótico β -lactâmico, a penicilina natural benzilpenicilina (ou penicilina G). Deste modo, foi possível iniciar a produção industrial e o uso terapêutico deste fármaco (figura 1.1c).¹¹

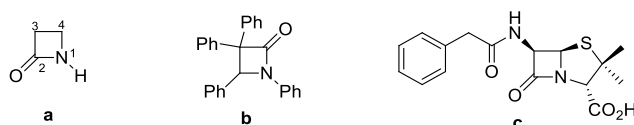


Figura 1.1. Representação das estruturas de: a) 2-azetidiononas; b) 1,3,3,4-Tetrafenilazetidionona, sintetizada por Staudinger; c) penicilina G.

Desde a descoberta da penicilina em 1928 que várias β -lactamas naturais e sintéticas foram descritas. Na figura 1.2 podemos observar a família dos antibióticos β -lactâmicos, entre eles temos as penicilinas (penamas), os penemas, as cefalosporinas (cefemas), as carbapenemas, as carbacefemas, os oxapenemas, os oxacefemas, as clavamas (ex.: ácido clavulânico) e as monobactamas.^{12,13} Todos os compostos representados possuem um anel lactâmico de quatro membros essencial na atividade biológica, que pode existir como anel isolado, ou estar fundido a outros anéis para formar estruturas bicíclicas.¹⁴

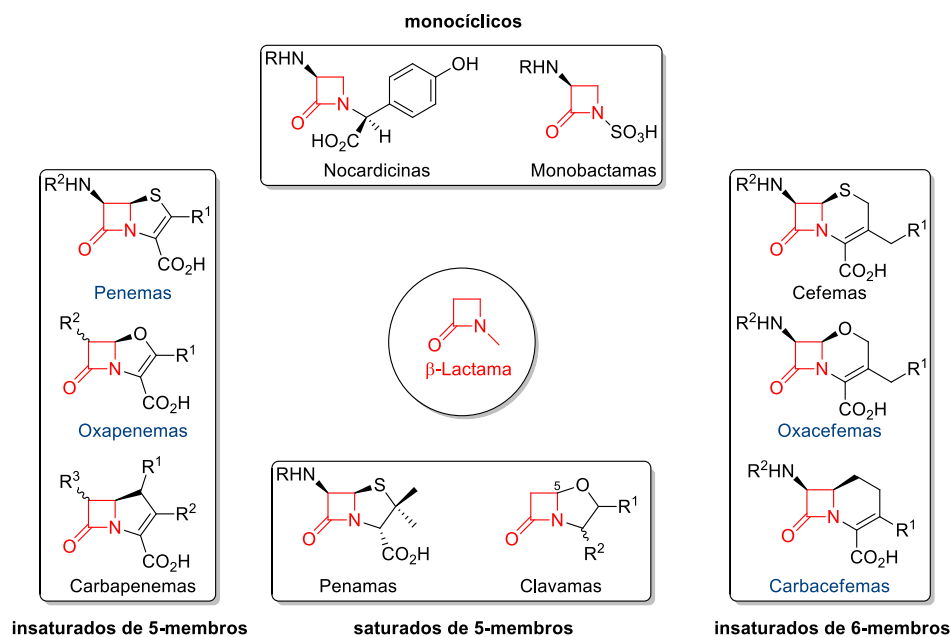


Figura 1.2. Estrutura química das principais subfamílias de compostos β -lactâmicos. A azul estão as famílias dos antibióticos β -lactâmicos sintéticos.¹⁵

A reatividade química do anel β -lactâmico e os seus substituintes, em particular o átomo de azoto do anel, são os componentes determinantes do tipo de atividade biológica do esqueleto β -lactâmico, sendo que podem variar os substituintes na posição N-1, C-3 e C-4. Os diferentes substituintes ligados ao núcleo β -lactâmico (o grupo R em particular) determinam a atividade de um composto β -lactâmico, sendo que os compostos β -lactâmicos são mais reativos em condições hidrolíticas do que as amidas lineares ou outras lactamas com anéis maiores devido à rigidez do anel β -lactâmico. Esta rigidez aumenta com a fusão de um segundo anel, e a substituição do átomo de enxofre pelo átomo de oxigênio pode aumentar a atividade biológica.¹⁶

Os agentes antimicrobianos são definidos como qualquer tipo de agente com propriedades inibitórias ou letais para um microrganismo. O antibiótico é um termo mais restritivo, que implica a fonte natural do agente antimicrobiano, sendo que o termo quimioterapêutico refere-se à origem artificial de um agente antimicrobiano por síntese química.¹⁵

Os antibióticos β -lactâmicos atuam na bactéria inibindo o passo final da biossíntese da parede celular bacteriana através da inibição de enzimas bacterianas, transpeptidases e carboxipeptidases, que catalisam as reações de síntese do peptidoglicano.¹⁷ Os polímeros de peptidoglicano são reticulados por estas enzimas, chamadas de proteínas de ligação à penicilina. Dado que o peptidoglicano é um componente essencial da parede celular bacteriana, protege o organismo de ruptura osmótica, fornece rigidez estrutural e a forma da célula, faz parte do crescimento e divisão celular, é este componente que mantém a integridade e viabilidade celular. Os fármacos β -lactâmicos interrompem este processo crucial através da acilação irreversível do grupo hidroxilo da unidade terminal catalítica, dentro do sítio ativo da enzima, o que resulta na formação de um aducto enzima-fármaco cataliticamente inativo e estável. A inibição das proteínas de ligação à penicilina causa bacteriólise, produzindo uma parede incapaz de resistir a forças osmóticas.¹⁸

1.1.1 Problemas no manuseamento e administração de compostos β -lactâmicos

Os antibióticos atuam no tratamento de doenças infecciosas, no entanto como resultado de doenças novas e emergentes, e também devido ao predomínio crescente de patógenos resistentes a antibióticos estas continuam a ser a causa principal de morte a nível mundial.¹⁹ A resistência aos antibióticos é uma consequência inevitável de pressões seletivas impostas pelo uso excessivo de antibióticos.

A capacidade da bactéria produzir uma família de enzimas (as β -lactamases), que hidrolisam o anel β -lactâmico, essencial para a atividade antibacteriana, é a principal limitação dos antibióticos β -lactâmicos. Existem diferentes tipos de β -lactamases, pelo que é variável a sua capacidade de hidrolisar o anel eficazmente.²⁰ Outras medidas defensivas bacterianas incluem mutações no alvo molecular dos fármacos β -lactâmicos, eliminação de porinas na membrana celular, aquisição e ativação de proteínas exportadoras de efluxo, e a modificação da parede celular de modo a minimizar o acesso de antibióticos β -lactâmicos aos seus alvos moleculares.

Para além da capacidade bacteriana de adaptabilidade e resistência diversa a estes compostos, o manuseamento e utilização dos derivados β -lactâmicos pode causar efeitos adversos de contaminação cruzada, apresentando o risco de possíveis reações autoimunes alérgicas e efeitos secundários que podem afetar os sistemas hematológico renal e neurológico.²¹

A estrutura central característica dos fármacos β -lactâmicos é possivelmente a maior causa de hipersensibilidade β -lactâmica. No entanto as modificações do núcleo β -lactâmico, que se focaram em alterações à cadeia lateral na posição 6, de modo a melhorar a atividade, biodisponibilidade oral e propriedades farmacodinâmicas, também são de importância crítica para a reatividade alérgica e a reatividade cruzada.

Até abril de 2013, a *Food and Drug Administration* (FDA) tinha aprovado mais de 34 compostos β -lactâmicos como substâncias ativas em fármacos para o uso humano. Nesta mesma data, foi publicado um regulamento de orientação para o manuseamento de fármacos β -lactâmicos. Este descreve a importância de implementar uma produção controlada no âmbito de evitar a contaminação cruzada de produtos farmacêuticos acabados e substâncias ativas (APIs) com fármacos β -lactâmicos não penicilínicos. Também refere o risco de saúde devido à reatividade cruzada nas classes de β -lactamas sensibilizantes (incluindo penicilinas e β -lactamas não penicilínicas).²²

A contaminação cruzada de fármacos consiste na contaminação de um medicamento com um ou mais medicamentos diferentes. A penicilina pode ser um agente sensibilizante que, em alguns casos, desencadeia uma resposta imune alérgica hipersensível.²³ Por conseguinte, implementar métodos para prevenir a contaminação cruzada de outros fármacos com a penicilina é um elemento-chave da produção de penicilinas, e os atuais regulamentos de boas práticas de produção (CGMP) exigem o uso de tais métodos.

No que diz respeito aos fármacos β -lactâmicos, a primeira regra exigida é que todas “as intervenções relativas à produção, processamento e embalagem da penicilina sejam realizadas em instalações separadas daquelas utilizadas para outros medicamentos para o uso humano”.²² Requisita-se que os fabricantes devem separar completamente os sistemas de tratamento de ar para os fármacos β -lactâmicos daqueles usados para outros medicamentos para uso humano. Além disso, exige-se que os fabricantes testem os produtos β -lactâmicos para possíveis vestígios de penicilina. No caso de ocorrer contaminação cruzada, é proibida a sua comercialização com níveis de penicilina detetáveis.

Portanto, a FDA exige que, com poucas exceções, todos os medicamentos sejam fabricados em conformidade com as boas práticas de produção atuais (CGMPs). Os fármacos que não estão em concordância com as CGMPs são considerados adulterados.

1.1.2 Espiro- β -lactamas

Nos últimos anos houve um notável progresso da síntese de antibióticos β -lactâmicos mono e bicíclicos. No entanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos com maior bioatividade e estabilidade em relação às β -lactamases permanecem um desafio. Além disso, a procura de novos derivados com diferentes atividades biológicas continua a ser um campo de elevado interesse. Deste modo, a síntese de espiro- β -lactamas despertou interesse, uma vez que a introdução de sistemas espirocíclicos deve alterar substancialmente a reatividade destes compostos.

As espiro- β -lactamas, para além do núcleo β -lactâmico, são caracterizadas por uma estrutura de dois anéis fundidos onde apenas um átomo é comum aos dois anéis. A preparação de compostos espirocíclicos pela fusão de dois anéis impõe uma restrição conformacional nestes derivados. Desta forma, é imposta uma penalização de entropia conformacional nos derivados espirocíclicos que é reduzida após a ligação ao local ativo da proteína.

As espiro- β -lactamas são moléculas alvo bastante atrativas devido às propriedades biológicas relevantes que alguns derivados evidenciam possuir (figura 1.3), nomeadamente atividade antibacteriana,²⁴ antiviral,²⁵ antifúngica,²⁶ antimalária,²⁷ inibição de β -lactamases²⁸ e de absorção de colesterol²⁹. Para além disso, estes compostos também podem desempenhar outras funções como precursores de β -aminoácidos- α,α -dissubstituídos, péptidos e β -turn miméticos.^{10,30,31}

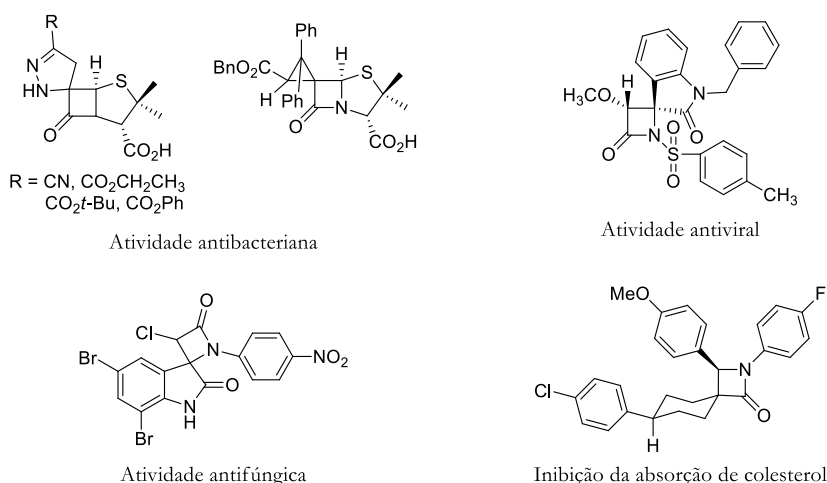
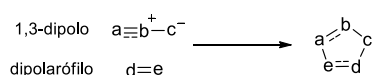


Figura 1.3. Exemplos ilustrativos de compostos espiro- β -lactâmicos com diferentes atividades biológicas.

Atualmente encontram-se descritas na literatura várias vias sintéticas de compostos espiro- β -lactâmicos, destacando-se alguns artigos de revisão que evidenciam a importância destes compostos com propriedades químicas e biológicas interessantes. Singh e colaboradores descreveram extensivamente a relevância biológica de diferentes tipos de espiro- β -lactamas, e várias metodologias de síntese, incluindo reações de ciclo-adição, ciclização e transformação de grupos substituintes.³² Bari e colaboradores destacaram a aplicação destes compostos em diversas áreas, bem como o progresso na síntese estereosseletiva e a análise biológica de espiro- β -lactamas.¹⁰ Além destes, o grupo de investigação de Alcaide descreveu diferentes vias sintéticas utilizadas na preparação de espiro- β -lactamas não convencionais, nomeadamente reações de ciclização radicalar, de ciclo-adição e catalisadas por metais de transição.³³

Nos últimos anos, o grupo de investigação de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra dedicou particular atenção ao estudo e desenvolvimento de compostos espiro- β -lactâmicos.³⁴⁻³⁶ A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar foi uma das vias sintéticas exploradas para a síntese destes derivados espirocíclicos.

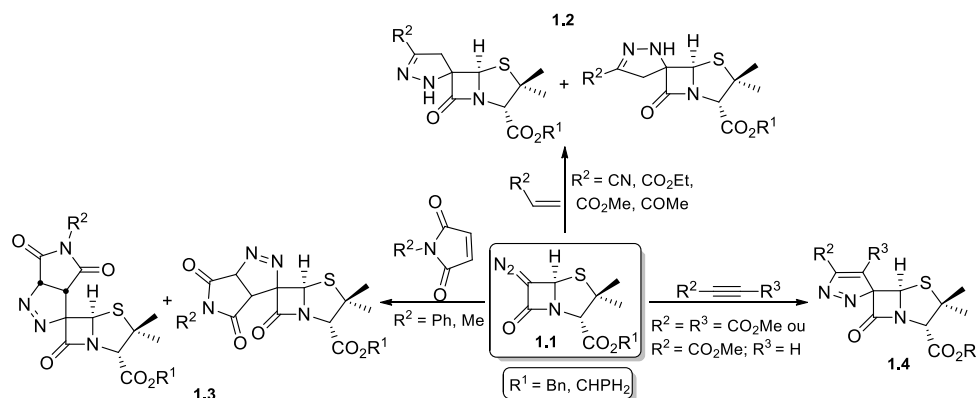
A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar é um dos métodos mais importantes utilizado na construção de anéis heterocíclicos de cinco membros. A ciclo-adição 1,3-dipolar consiste na reação de um dipolarófilo (como alquenos, alquinos, carbonilos e nitrilos) com um 1,3-dipolo (sistemas de quatro elétrons π distribuídos por três átomos) (esquema 1.1).^{37,38}



Esquema 1.1

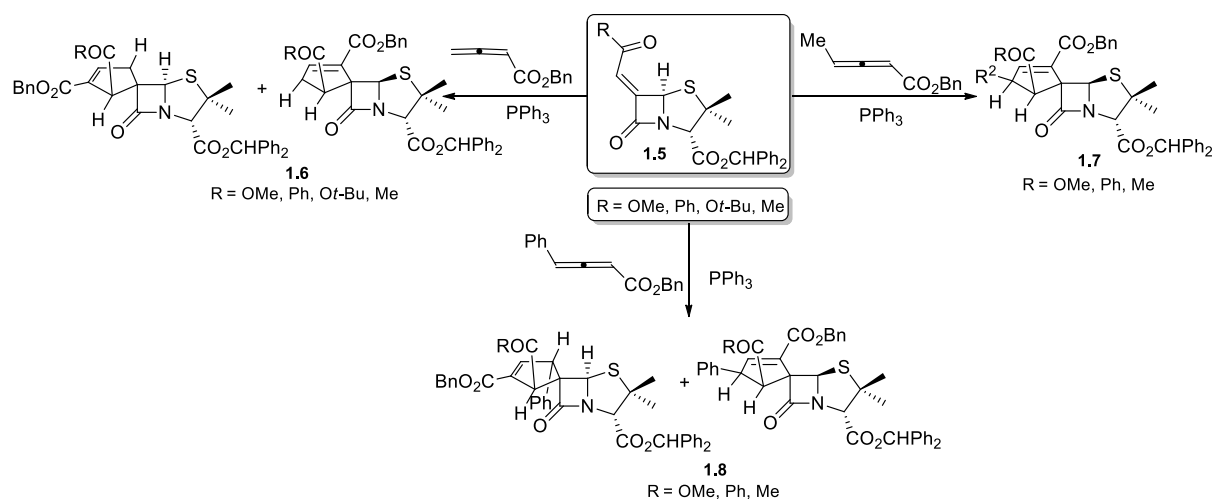
Os grupos de investigação de Sheehan e de Campbell, na década de 70, descreveram a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar de 6-diazopenicilanatos com acrilamidas, acrilonitrilos e acrilatos, como via sintética de espiro-2-pirazolinopenicilanatos.^{39,40} Recentemente, o grupo de Química Orgânica explorou a síntese de derivados de espiro-2-pirazolina- β -lactamas quirais **1.2** através de reações de ciclo-adição 1,3-dipolar entre 6-diazopenicilanatos **1.1** com outros dipolarófilos (acrilonitrilos, acrilatos de etilo e de metilo, metil vinil cetonas). Além disso, foram desenvolvidas vias sintéticas para obter espiro-1-pirazolina- β -lactamas **1.3** e espiro-3*H*-pirazol- β -lactamas **1.4**, através da reação de 6-diazopenicilanatos **1.1** com maleimididas *N*-substituídas e alquinos deficientes em elétrons, respetivamente. Deste modo foram obtidos compostos quirais puros derivados do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Este estudo demonstrou que a presença do grupo éster na posição 3 do penicilanato tem influência significativa no rendimento destas reações. Verificou-se que os ciclo-aductos eram obtidos com melhores rendimentos quando se

partia do 6-diazopenicilinato de benzidrilo em vez do 6-diazopenicilinato de benzilo. Todas estas reações ocorreram de forma estereosseletiva, o que pode ser explicado considerando que o ciclo-aducto maioritário resultou da adição do dipolarófilo pelo lado α da β -lactama, o lado com menor impedimento estérico (esquema 1.2).³⁴

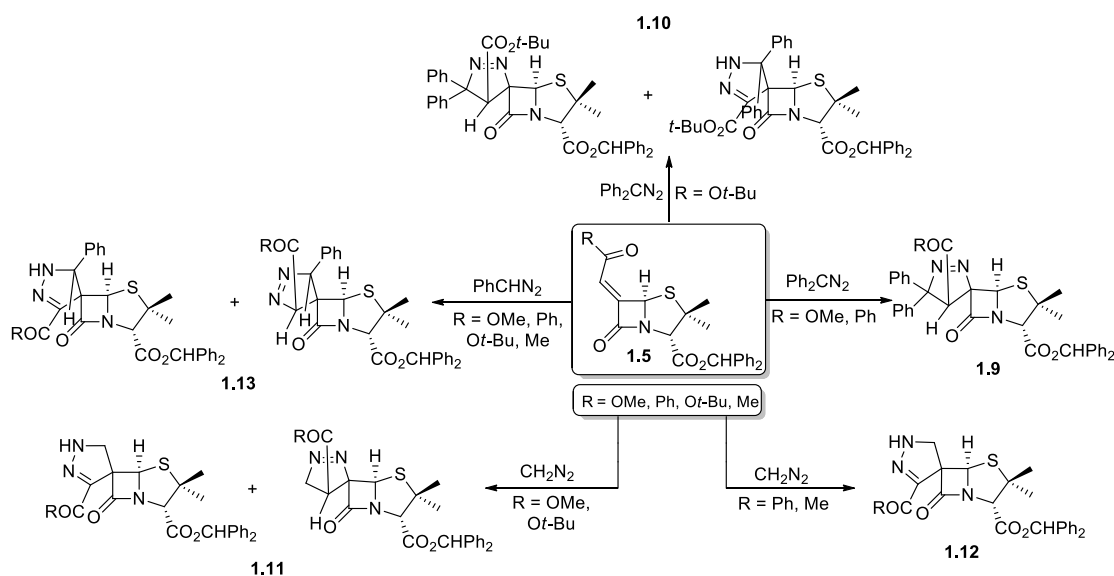


Esquema 1.2

Com o objetivo de estudar a reatividade da ligação dupla exocíclica de 6-alquilidenopenicilanos **1.5**, Pinho e Melo e colaboradores propuseram uma estratégia sintética de reações de ciclo-adução [3+2] formal catalisada por trifetilfosfina com diferentes alenoatos (ésteres α -alénicos), permitindo a síntese de espirociclopenteno- β -lactamas quirais (esquema 1.3).³⁵ A reação de ciclo-adução [3+2] formal do 6-(1-metoxicarbonilmetileno)penicilinato **1.5** ($R = \text{OMe}$) com 2,3-butadienoato de benzilo permitiu obter as espiro- β -lactamas regioisoméricas **1.6**, sendo o produto maioritário o γ -regioisómero. Através da reação do 6-(1-*tert*-butoxicarbonilmetileno)penicilinato **1.5** ($R = \text{O}t\text{-Bu}$) com 2,3-butadienoato de benzilo obteve-se a mistura das espiro- β -lactamas regioisoméricas **1.6**. Na reação do 6-(1-acetilmetileno)penicilinato **1.5** ($R = \text{Me}$) é formado apenas o γ -regioisómero, enquanto que com o 6-(1-benzoilmetileno)penicilinato **1.5** ($R = \text{Ph}$) é observada uma regioselectividade oposta. A síntese regio- e estereosseletiva de espirociclopenteno- β -lactamas **1.7**, foi observada na reação do 2,3-pentadienoato de benzilo com os 6-alquilidenopenicilanos **1.5**. A reação do 6-alquilidenopenicilinato com 4-fenil-2,3-butadienoato de benzilo conduziu à obtenção das correspondentes espiro- β -lactamas **1.8**. Dependendo do substituinte no alquilideno, obteve-se seletivamente o γ -regioisómero, o α -regioisómero, ou mistura de ambos, respetivamente para $R = \text{OMe, Ph}$ e Me . A síntese deste novo tipo de β -lactamas envolve a criação de dois ou três centros estereogénicos consecutivos, incluindo um centro quiral quaternário. Neste estudo demonstrou-se que a regioselectividade é dependente da natureza do derivado metilopenicilinato e da natureza da substituição na posição γ dos alenoatos.



Em 2014, Pinho e Melo e colaboradores descreveram a ciclo-adição 1,3-dipolar dos 6-alkilidenopenicilanos **1.5** com diferentes compostos diazo (difenildiazometano, fenildiazometano, e diazometano) e provaram que esta é uma metodologia eficaz para a preparação de espiropirazolina-β-lactamas (esquema 1.4).³⁶ A reação de ciclo-adição dos alkilidenos **1.5** (R = OMe, Ph) com difenildiazometano conduziu à síntese regio- e estereosseletiva de espiro-1-pirazolinopenicilanos **1.9**. Todavia, quando se partiu do 6-(Z)-(1-*tert*-butoxicarbonilmetileno)penicilano **1.5** (R = *Ot*-Bu) foram obtidos dois produtos (**1.10**), resultantes de regioquímicas opostas. As reações de ciclo-adição 1,3-dipolar entre o 6-(1-metoxicarbonilmetileno)- e 6-(1-*tert*-butoxicarbonilmetileno)penicilano com diazometano levaram à formação de dois regioisómeros (**1.11**), contrariamente aos derivados acetilo e benzoílo em que se observou regioespecificidade (**1.12**). O fenildiazometano reagiu com os 6-alkilidenopenicilanos **1.5** regio- e estereosseletivamente para dar espiropirazolinopenicilanos **1.13**, onde se verificou tautomerização de um dos ciclo-actos obtidos. Todas as espiropirazolina-β-lactamas descritas neste estudo foram obtidas de forma estereosseletiva, o que pode ser explicado pelo facto de a adição ocorrer pela face α da β-lactama que possui menor impedimento estéreo.



Esquema 1.4

1.2 γ -Lactamas

O anel γ -lactâmico, denominado como γ -butirolactama, pirrolidin-2-ona, azolidin-2-ona ou 2-oxopirrolidina, faz parte da estrutura base de um vasto número de compostos naturais e não naturais que possuem um amplo espectro de atividades biológicas. Consequentemente, as γ -lactamas são moléculas de interesse primário em Química Medicinal, surgindo a necessidade de desenvolver novas estratégias para a obtenção desta porção estrutural (figura 1.4).

Figura 1.4. Estrutura do anel γ -lactâmico.

O interesse neste esqueleto estrutural começou com a incidência crescente da resistência bacteriana contra antibióticos β -lactâmicos. De modo a ultrapassar este problema de resistência, uma das soluções passava pelo afastamento do núcleo β -lactâmico. Como um dos fatores essenciais para a atividade é a ligação de amida ativada, a atenção mudou-se naturalmente para as γ -lactamas e seus análogos, mais especificamente para γ -lactamas bicíclicas como por exemplo os derivados dos penemas.⁴¹⁻⁴³

Estes compostos heterocíclicos são utilizados frequentemente como precursores de pirróis, pirrolidinas ou derivados de aminoácidos, sendo estas substâncias biologicamente relevantes.⁴⁴⁻⁴⁶ Adicionalmente, estes heterociclos podem possuir atividade antitumoral, antifúngica e antibiótica. Exemplos de compostos com atividade antitumoral são a lactacistina,⁴⁷ uma γ -lactama isolada de micro-organismos, e a salinosporamida A⁴⁸. De realçar também a (+)-clausenamida como fármaco neuroprotetor,⁴⁹ a (-)-pramanicina com atividade antifúngica,⁵⁰ e os antibióticos β -lactâmicos, 1 β -metilcarbapenems,⁵¹ que possuem um núcleo γ -lactâmico (figura 1.5).

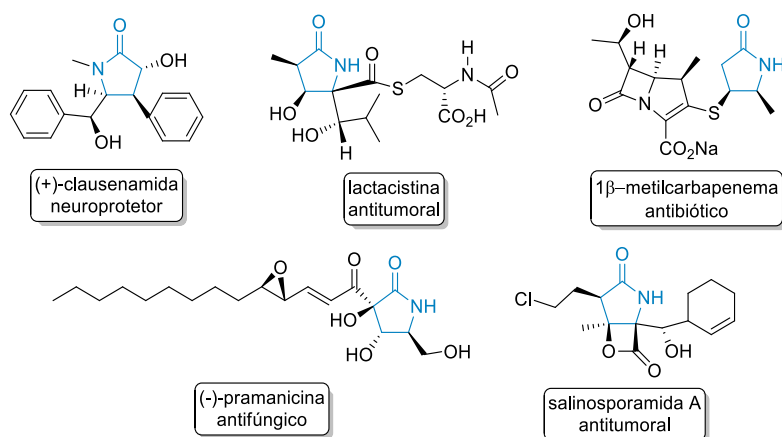


Figura 1.5. Exemplos de compostos com núcleos γ -lactâmicos que possuem interesse biológico e farmacêutico.

Atualmente existem vários exemplos na literatura que dão ênfase à importância e atenção que estes compostos atraem devido às suas potenciais propriedades biológicas e à sua estrutura sinteticamente desafiadora.

As γ -lactamas podem ser amplamente funcionalizadas, desta forma são sintões versáteis numa série de processos sintéticos e também na preparação de diversas moléculas naturais e não-naturais, sendo considerados relevantes a nível biológico e medicinal. A hormona libertadora da gonadotrofina possui um grupo piroglutâmico, onde a lactama tem a função de estabilizar o *N*-terminal do peptídeo contra a degradação do peptídeo aminoprotease. Noutros casos, a γ -lactama funciona como um esqueleto rígido conformacional, como o composto **1.14**, que estabiliza conformações β -turn quando é incorporado em peptídeos.⁵² Os compostos γ -lactâmicos altamente substituídos mostram uma ampla gama de atividades, como por exemplo o composto **1.15** antagonista de integrinas,⁵³ e o composto **1.16** antagonista do recetor de quimiocinas CCR4^{54,55}. Outras γ -lactamas, como o composto **1.17** são utilizadas para inibir a biossíntese de colesterol e ácidos gordos, para o tratamento de distúrbios de lipoproteínas, e o composto **1.18** para inibir a fosfodiesterase (PDE) tipo IV, uma enzima ligada a doenças

alérgicas e inflamatórias.⁵⁶ Por fim, γ -lactamas 4-substituídas, como o composto **1.19**,⁵⁷ podem exibir atividade antiepiléptica dez vezes mais eficaz, relativamente ao Levetiracetam, para a proteção contra a atividade convulsiva em ratos sensíveis ao som (figura 1.6).

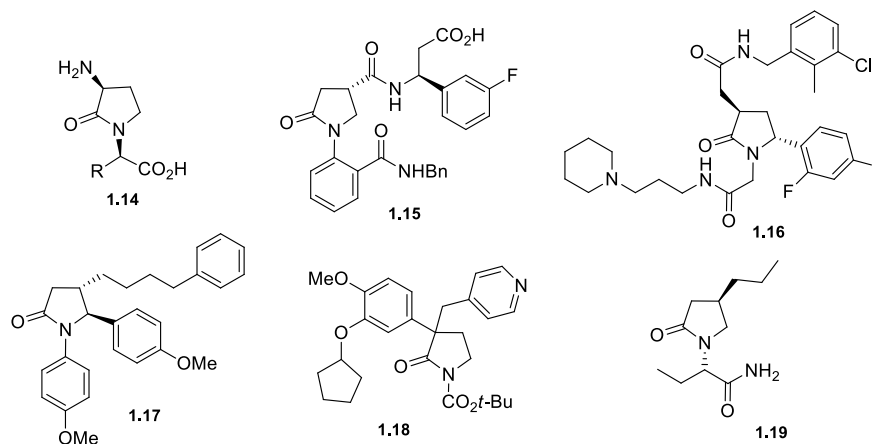


Figura 1.6. Compostos naturais que possuem núcleos γ -lactâmicos.

Existe uma variedade de moléculas naturais biologicamente ativas que possuem o núcleo γ -lactâmico como única base estrutural.⁵⁸ O núcleo γ -lactâmico é a característica estrutural chave num vasto número de compostos naturais biologicamente ativos. A diversidade de fontes naturais de γ -lactamas reflete-se no espectro de atividades biológicas exibidas. Os principais precursores das γ -lactamas em organismos vivos são o ácido glutâmico, a glutatona,⁵⁹ a prolina e o ácido γ -aminobutírico (GABA),⁶⁰ embora a informação descrita na literatura seja escassa, relativamente à biossíntese de γ -lactamas.⁶¹ Este núcleo central está presente em vários organismos como animais, plantas, bactérias ou fungos.

O ácido piroglutâmico e a disibetaina são dois compostos γ -lactâmicos com origem animal (figura 1.7). O ácido piroglutâmico é a lactama cíclica do ácido glutâmico, este é comercializado como uma “*smart drug*” com efeito em melhorar a circulação sanguínea no cérebro, além de também ser utilizada no tratamento de distúrbios neurodegenerativos.⁵⁹ A disibetaina é um derivado do $\alpha\alpha$ -disubstituído- α -aminoácido, extraída e isolada da esponja marinha *Dysidea herbacea*. Quando injetado intracerebralmente em ratos atua nos recetores de glutamato do sistema nervoso central induzindo um sinal precoce de convulsão.⁶²

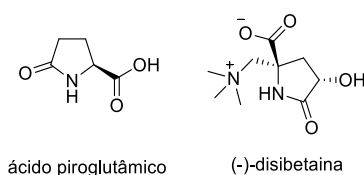


Figura 1.7. Estrutura de γ -lactamas naturais isoladas a partir de origens animais.

Exemplos de compostos naturais γ -lactâmicos extraídos de plantas são a erisotramidina 2 e a estemoamida (figura 1.8). A erisotramidina 2 foi isolada a partir de plantas tropicais e subtropicais pertencente a uma classe de produtos utilizados em medicinas indígenas. Este alcalóide possui uma grande variedade de atividades biológicas incluindo propriedades anticonvulsivas, sedativas e hipnóticas, sendo também descrito com um agente bloqueador neuromuscular.⁶³ A estemoamida é um alcalóide isolado a partir da planta *Stemona tuberosa* em 1992, utilizado como agente anti-tosse e também no tratamento de doenças respiratórias, como asma e tuberculose.⁶⁴

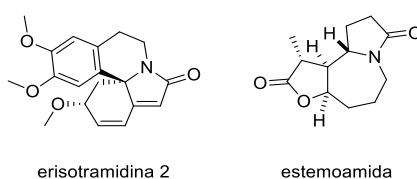


Figura 1.8. Estrutura de γ -lactamas derivadas de plantas.

Exemplos de compostos naturais γ -lactâmicos isolados a partir de bactérias são a lajolamicina e a neo-oxazolomicina (figura 1.9). A lajolamicina foi isolada a partir do atinomiceto marinho *Streptomyces nodosus* encontrado em sedimentos nos Estados Unidos da América. Esta nitro-tetraeno-espiro- β -lactona- γ -lactama é um agente antimicrobiano contra uma série de bactérias, que também tem efeito inibitório no crescimento do melanoma murino.⁶⁵ A neo-oxazolomicina é um produto natural biologicamente ativo isolado a partir de várias estirpes da espécie *Streptomyces* em 1985, este apresenta um núcleo fundido de γ -lactama- γ -lactona e demonstrou possuir atividades antitumoral e antiviral contra o *influenza*, o *herpes simplex* tipo I e a *vaccinia*.⁶⁶

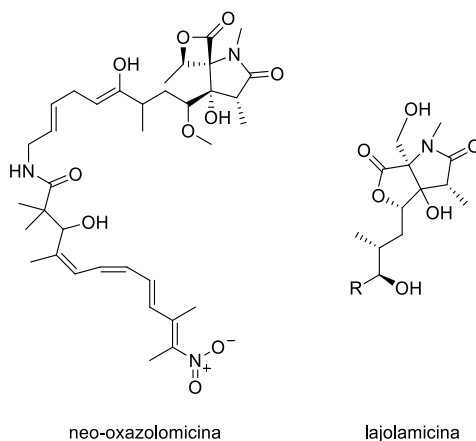


Figura 1.9. Estrutura de γ -lactamas naturais isoladas a partir de bactérias.

A equisetina e o azaspireno são compostos naturais γ -lactâmicos derivados de fungos (figura 1.10). A equisetina foi descoberta e isolada em 1974 a partir do fungo *Fusarium pallidoroseum*, sendo estruturalmente caracterizada em 1989 pelo grupo de investigação de Lynn.⁶⁷ O azaspireno foi isolado em 2002 a partir do fungo da espécie *Neosartorya*, e é composto por um sistema azaspirocíclico oxigenado e dois grupos hidroxilo nas posições C8 e C9, tendo a sua síntese completa sido realizada por Hayashi e seus colaboradores em 2002.⁶⁸ Enquanto a equisetina apresenta atividade citotóxica, fitotóxica, antibiótica e é um potencial inibidor de ATPases mitocondriais e HIV-integrase,⁶⁹ o azaspireno é um potencial inibidor da angiogênese e demonstrou capacidade de inibir a migração endotelial induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular⁷⁰.

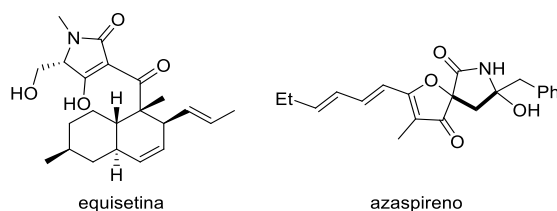
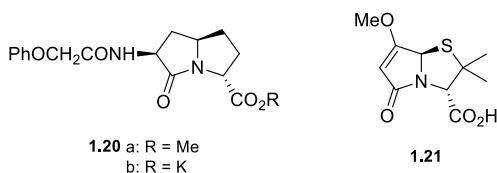


Figura 1.10. Estrutura de γ -lactamas provenientes de fungos.

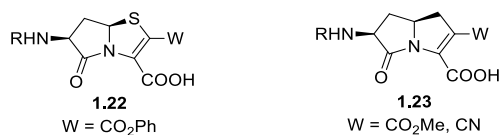
1.2.1 Vias sintéticas para a obtenção de γ -lactamas

Em 1983, Baldwin e colaboradores descreveram a primeira síntese seletiva de compostos γ -lactâmicos quirais análogos das penicilinas. Sabendo que a exigência estrutural mínima para a atividade biológica era um anel β -lactâmico adequadamente ativado, estes autores exploraram a possibilidade de obter compostos biologicamente ativos desprovidos da porção β -lactâmica. Estes autores conseguiram a síntese das γ -lactamas fundidas **1.20** e **1.21** (esquema 1.5)⁴¹, no entanto estes compostos não apresentavam qualquer tipo de atividade antibiótica ou inibição da β -lactamase.



Esquema 1.5

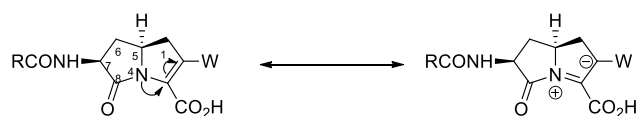
Foi em 1986 que se descreveram os primeiros exemplos de análogos γ -lactâmicos das penicilinas com atividade antibiótica. As descobertas foram apresentadas independentemente por Baldwin e colaboradores, composto **1.22**,⁷¹ e os investigadores da empresa farmacêutica de Eli Lilly's, compostos **1.23**⁷² (esquema 1.6).



Esquema 1.6

O mecanismo de ação de antibióticos β -lactâmicos envolve a acilação dos locais ativos de enzimas necessárias para a síntese da parede celular bacteriana. Com isto, surgiu a hipótese de que lactamas adequadamente ativadas, de um tipo estrutural diferente pudessem ser eficazes neste mecanismo, iniciando-se assim o estudo de análogos γ -lactâmicos dos penemas.⁷³

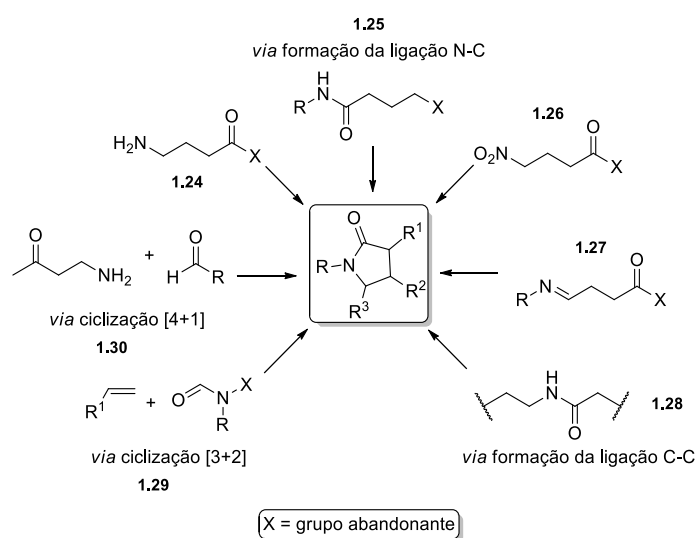
De acordo com Baldwin, o aumento da reatividade traduz-se num aumento da atividade biológica dos análogos γ -lactâmicos dos penemas. Isto deve-se à deslocalização do par de elétrons não ligantes do átomo de azoto lactâmico com o sistema π da olefina (e estabilização na presença de um grupo W aceitador de elétrons) (esquema 1.7).⁷⁴ Estudos adicionais de modulação molecular, realizados pelos investigadores de Eli Lilly's, mostraram que γ -lactamas bicíclicas substituídas por uma cadeia lateral acilamino em C7, em vez de na posição 6, eram análogos conformacionais de antibióticos β -lactâmicos (esquema 1.7).⁷⁵ Portanto a diminuição da atividade resultante do anel γ -lactâmico com menor tensão, quando comparado ao anel β -lactâmico, poderia ser compensada por uma cadeia lateral acilamino. Assim desenvolveram o composto **1.23** que teoricamente poderia ter atividade biológica devido à influência conhecida da cadeia lateral nas ligações dos locais ativos de enzimas e na penetração da membrana exterior. No entanto, estes compostos mostraram atividade antibacteriana reduzida, pelo que não foram disponibilizados no mercado. Porém, estes resultados inspiraram muitos investigadores a desenhar novos compostos potencialmente ativos constituídos por um anel γ -lactâmico, desenvolvendo vias sintéticas eficazes para a sua obtenção.



Esquema 1.7

Atualmente existem alguns artigos de revisão que destacam as diversas metodologias aplicadas na síntese e reatividade de γ -lactamas, evidenciando as propriedades biológicas que estes compostos possuem. Rinaldi e seus colaboradores enfatizaram a síntese enantiosseletiva de γ -lactamas a partir de precursores acíclicos ou cíclicos e a funcionalização do anel γ -lactâmico via formação de uma ligação C-C ou C-Heteroátomo, evidenciando a importância destes derivados enantiomericamente puros para ensaios biológicos.^{76,77} Os avanços feitos, na última década, nas diferentes metodologias sintéticas utilizadas na preparação de γ -lactamas e na síntese completa de produtos naturais formados por γ -lactamas, foram descritos pelo grupo de investigação de Ling.⁷⁸ Robiette e colaboradores destacaram a síntese, as origens naturais e as atividades biológicas que caracterizam os compostos γ -lactâmicos.⁷⁹

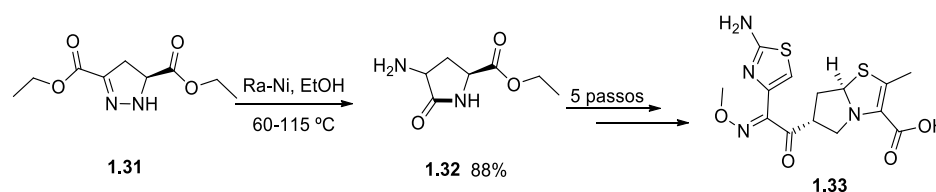
A preparação de estruturas γ -lactâmicas está descrita em inúmeras metodologias sintéticas desenvolvidas nos últimos anos. A via sintética mais utilizada consiste na ciclização a partir da formação de uma amida via uma reação intramolecular entre um grupo carboxílico ou derivados com uma amina (**1.24** e **1.25**) ou precursores de amidas (**1.26** e **1.27**). Outra estratégia de ciclização envolve a formação de uma ligação C-C (**1.28**). Mais recentemente, foram também divulgadas duas metodologias sintéticas que permitem obter de uma forma mais confluyente o núcleo γ -lactâmico, através de uma série de reações de ciclização do tipo [3+2] (**1.29**) e [4+1] (**1.30**) (esquema 1.8). Além disso, através de processos de redução e oxidação alterando anéis de cinco membros pré-existent é possível obter-se o núcleo γ -lactâmico.⁷⁶⁻⁷⁹ Estas estratégias sintéticas são um tema central em Química Orgânica, e são extremamente importantes pois possibilitam a exploração do potencial deste núcleo estrutural em Química Medicinal.



Esquema 1.8

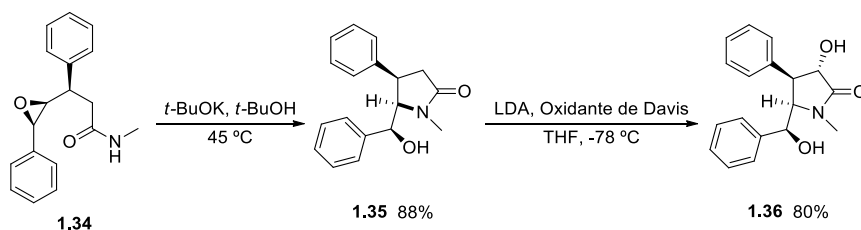
Outras metodologias desenvolvidas para sintetizar γ -lactamas incluem reações de cicloadição, expansão de anéis β -lactâmicos, reações de adição catalisadas por carbenos *N*-Heterocíclicos, reações de *aza*-Michael, e inserções C-H de carbenóides mediadas por metais de transição.⁸⁰ Na literatura estão descritos alguns exemplos destas metodologias sintéticas para a preparação de núcleos γ -lactâmicos, que serão descritos de seguida.

Em 1986, Boyd e seus colaboradores estudaram o efeito da presença do substituinte 2-amino-tiazol-4-metoximino-acetamido na posição alfa do carbonilo, conhecido por potenciar a atividade biológica nos derivados β -lactâmicos. A pirazolina **1.31** ao reagir com níquel de Raney sofre clivagem reductiva obtendo-se um éster diamino que cicliza espontaneamente conduzindo à formação de dois diastereoisómeros, as aminopirrolidinonas **1.32** (esquema 1.9).⁷² O composto **1.33** foi obtido após uma sequência de 5 passos reacionais, e demonstrou possuir atividade antimicrobiana relativamente baixa contra três microorganismos, *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.⁸¹



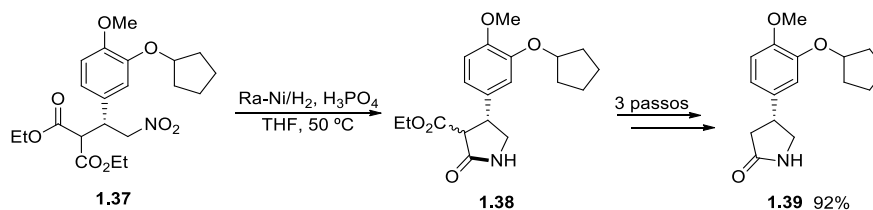
Esquema 1.9

Em 2013, Huang e colaboradores obtiveram o núcleo γ -lactâmico através de uma reação intramolecular. Na presença de base a desproteção do grupo amida promove um ataque nucleófilo ao epóxido, levando à sua abertura e obtenção do produto cíclico desejado (esquema 1.10).⁸² Esta reação demonstrou ser direta e permitiu obter a γ -lactama **1.35** com rendimento elevado. Utilizando esta estratégia sintética foi obtido apenas um isómero do composto natural (-)-clausenamida **1.36**. Quando a clausenamida é extraída a partir de planta *Clausena lansium* esta é obtida como um racemato. Deste modo, esta metodologia permitiu a síntese total de um único estereoisómero, foi muito importante porque a (+)-clausenamida revelou não possuir atividade, enquanto que a (-)-clausenamida demonstrou ter grande potencial no tratamento da doença do Alzheimer.⁸³



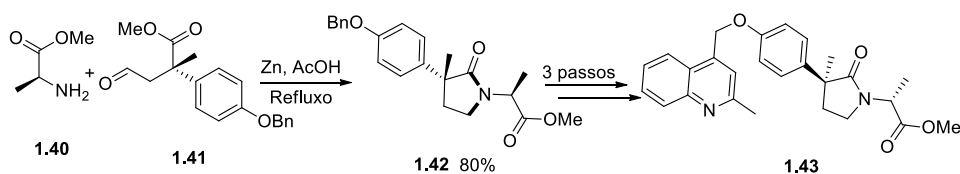
Esquema 1.10

O grupo de Barnes divulgou, em 2002, a síntese do (R)-rolipram **1.39** através da reação de redução do γ -nitroéster **1.37** para a γ -aminoéster que cicliza *in situ* para a γ -lactama **1.38** (esquema 1.11).⁸⁴ Partindo do composto **1.38** foi possível sintetizar com rendimento de 92% o (R)-rolipram **1.39**, um potencial inibidor da fosfodiesterase IV, que apresenta atividade anti-inflamatória e antidepressiva.⁸⁵



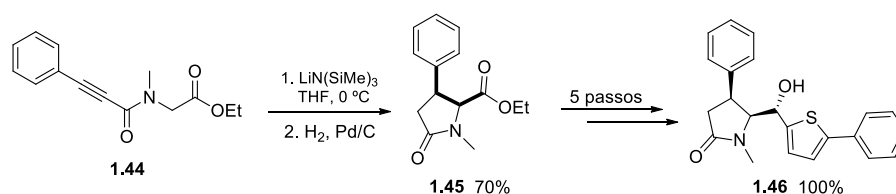
Esquema 1.11

O grupo de Decicco desenvolveu um processo sintético de redução/ciclização num só passo para a formação de uma γ -lactama partindo de uma imina.⁸⁶ Através da reação de condensação dos compostos **1.40** e **1.41** obtém-se *in situ* a imina, que após redução e ciclização conduz à formação de uma mistura diastereoisomérica (1:1) do composto **1.42** (esquema 1.12). Uma sequência de 3 passos conduz à formação da γ -lactama **1.43** funcionalizada, que é descrita como um potencial inibidor da enzima de conversão $\text{TNF}\alpha$ (TACE).



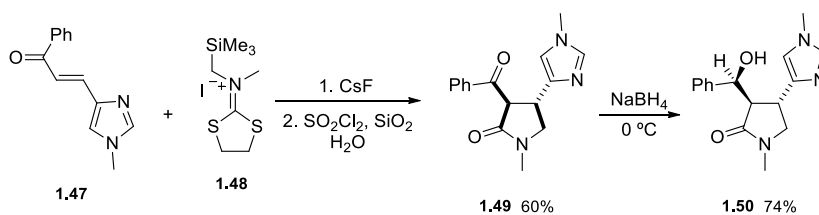
Esquema 1.12

Com o objetivo de obter compostos γ -lactâmicos com atividade inibitória para a enzima desidrogenase 17β -hidroxiesteroide (17β -HSD) tipo II, em 2005, Cook e colaboradores descreveram uma metodologia que envolvia uma reação de Michael intramolecular (esquema 1.13).⁸⁷ Inspirados no trabalho de Wolfgang Hartwing,⁸⁸ na sua investigação sobre inibidores de 17β -HSD tipo II, os autores desenvolveram uma reação de adição de Michael intramolecular obtendo o núcleo desejado com bons rendimentos (68%), no entanto com uma baixa proporção *cis/trans* (2:1). Alterando as condições reacionais, conseguiram obter o composto **1.45** com melhor rendimento (70%) e uma melhor proporção *cis/trans* (10:1). Assim, o composto **1.45** foi obtido, realizando a reação de ciclização 5-*endo-dig* intramolecular da alquino-amida **1.44** na presença de bis(trimetilsilil)amida de lítio, seguida de um passo de hidrogenação. Após uma sequência de 5 passos foi possível obter o composto *cis* **1.46** que demonstrou ser um potencial inibidor da 17β -HSD tipo II. Ensaio biológicos comprovaram que a configuração *cis* é necessária para a atividade biológica.



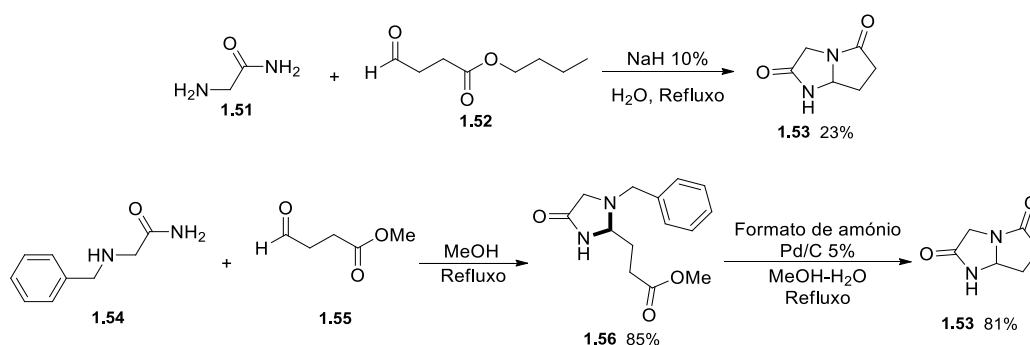
Esquema 1.13

O grupo de investigação de Carr foi o primeiro a descrever a aplicação da metodologia (3+2) na síntese de γ -lactamas biologicamente ativas. A reação chave nesta via sintética consiste numa reação de ciclo-adição 1,3-dipolar entre a enona **1.47** e o iodeto de imínio **1.48** que conduz à formação do composto **1.49**. A posterior reação de redução do composto **1.49** permite obter a γ -lactama funcionalizada **1.50** (esquema 1.14).⁸⁹ Esta estratégia que permite a síntese deste anel de 5 membros demonstrou ser um método rápido, regio- e estereosseletivo. Este método foi valorizado na síntese total de um composto analgésico natural, chamado cinometrina (composto **1.50**).



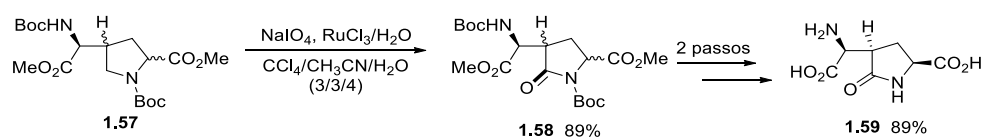
Esquema 1.14

A primeira aplicação de uma estratégia sintética de ciclização (4+1) na síntese de γ -lactamas biologicamente ativas foi divulgada pelo grupo de investigação de Dorigotti, em 1993. A 1-azabicyclo[3.3.0]octano-3,8-diona **1.53** foi sintetizada através da reação entre o aldeído **1.52**, como uma unidade de 1 átomo, e uma α -aminoamida, a glicinamida (**1.51**), como uma unidade de 4 átomos, na presença de uma base e em refluxo de água (esquema 1.15).⁹⁰ No entanto, o rendimento da síntese do composto **1.53** não foi satisfatório, pelo que os autores desenvolveram uma metodologia sintética que envolvia dois passos. A reação entre a α -aminoamida **1.54**, protegida com o éster benzílico, com o aldeído **1.55** conduziu à obtenção eficiente do composto **1.56**. Após desproteção foi obtido o correspondente amina, que após reação de ciclização, deu origem à síntese diastereosseletiva da lactama bicíclica **1.53** com um rendimento global de 80%. O composto **1.53** é descrito como um potencial potenciador cognitivo.



Esquema 1.15

Outra estratégia que pode ser aplicada na síntese do núcleo γ -lactâmico consiste na utilização de derivados estruturais, constituídos por um anel de 5 membros, como blocos de construção (por exemplo pirrolidinas, pirrolidinonas, hemiaminais cíclicos). Um exemplo bastante utilizado é a reação de oxidação de derivados da pirrolidina. Denis e seus colaboradores desenvolveram uma estratégia sintética que consistia na oxidação de um derivado da prolina, o composto **1.57**, tendo conseguido a síntese do ácido penmácrico. O primeiro passo consistiu na reação de **1.57** com cloreto de ródio hidratado, que permitiu obter o derivado do ácido piroglutâmico protegido **1.58** como uma mistura diastereoisomérica (razão 1:1) (esquema 1.46).⁹¹ Após uma sequência de 2 passos foi possível obter a molécula pretendida, o ácido penmácrico **1.59**, um composto biologicamente ativo, aplicado na alimentação e com atividade anti-inflamatória.



Esquema 1.16

1.3 Compostos espirocíclicos

Atualmente uma das estratégias em que o desenvolvimento de fármacos se baseia é a reavaliação da disponibilidade e função de produtos naturais, e a síntese de compostos similares a produtos naturais.

Uma estratégia bastante utilizada no desenvolvimento de fármacos é a fusão de estruturas cíclicas, de modo a aumentar a rigidez conformacional da molécula biologicamente ativa.⁹² Os sistemas espirocíclicos têm vindo a prevalecer por permitirem que exista controlo conformacional e possibilitarem o desenvolvimento de estruturas moleculares bem definidas, devido à relação ortogonal que existe entre os dois planos principais de interseção dos anéis heterocíclicos. Além disso, a sua estrutura altamente rígida permite que estes compostos tenham outras propriedades interessantes, nomeadamente como catalisadores eficientes ou ativadores moleculares (figura 1.11).⁹³

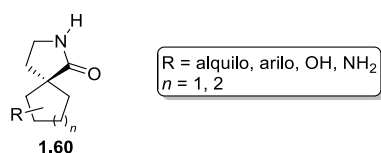


Figura 1.11. Exemplos de espiro- γ -lactamas 1.60.

O plano dos anéis está praticamente na posição perpendicular entre si devido à natureza tetraédrica do carbono espiro (carbono comum aos dois anéis). Estes compostos espirocíclicos com estruturas cíclicas fundidas a um carbono central são muito apelativos devido às suas interessantes características conformacionais e ao seu envolvimento estrutural em sistemas biológicos. A característica assimétrica da molécula devido ao carbono espiro é um dos critérios mais importantes para a atividade biológica.⁹⁴

As lactamas espirocíclicas são moléculas bastante atrativas, estando presentes em estruturas complexas como alcalóides e espiropirrolidiniloxindóis, e também em produtos naturais bioativos, como alstonisina, amadaspiramida, azaspireno, elacomina, horsfilina, pseurotina e espirotriptostatina (figura 1.12).⁹⁵ São também muito interessantes devido à sua semelhança com produtos naturais e espiropirrolizidinas que atuam como potenciais agentes antimicrobianos para patógenos humanos,⁹⁶ espiro-indolonas que atuam como agentes anti-malária⁹⁷ e espirolactamas que atuam como inibidores da p53:MDM2.⁹⁸

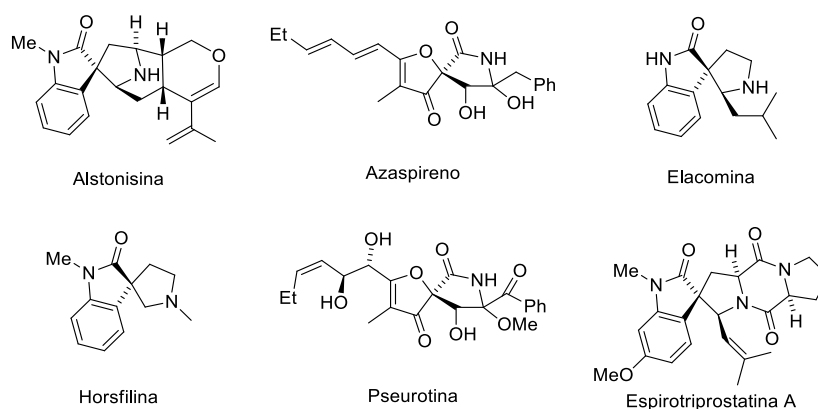


Figura 1.12. Exemplos de produtos naturais espirocíclicos.

De realçar a síntese de compostos espirocíclicos contendo os anéis oxindole (γ -lactama fundida com anel benzênico) e pirrolidina, como moléculas alvo interessantes devido ao seu alargado espectro de atividades biológicas relevantes, nomeadamente inibição da acetilcolinesterase,⁹⁹ atividade antitumoral,¹⁰⁰ atividade antibacteriana e anticancerígena¹⁰¹ (figura 1.13).

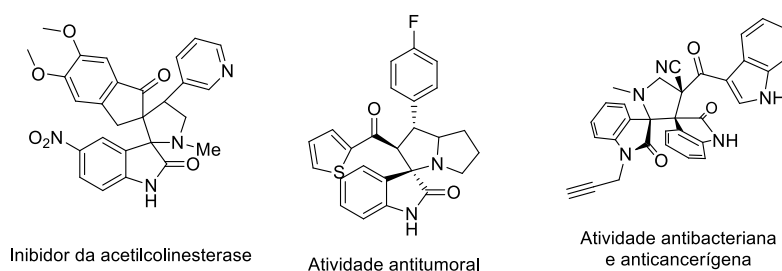


Figura 1.13. Compostos biologicamente ativos que contêm o esqueleto 3,2'-espiropirrolidina oxindole.

Para além das atividades biológicas já mencionadas, as lactamas espirocíclicas podem também desempenhar o papel de péptidos miméticos. Foram descritas várias metodologias sintéticas de espirolactamas que atuam como peptidomiméticos, melhorando a potência, seletividade e estabilidade metabólica de fármacos baseados em péptidos. As espirolactamas **1.61** – **1.64** (figura 1.14), que possuem ângulos fixos semelhantes a péptidos γ -turn naturais, são compostos de grande interesse no desenvolvimento de fármacos peptidomiméticos.¹⁰² Johnson e colaboradores descreveram a sua síntese através da reação de Mitsunobu intramolecular,¹⁰³ o grupo de investigação de Casamitjana desenvolveu estes derivados pela reação de acoplamento de amida,¹⁰⁴ e ainda Torres e seus colaboradores estudaram a reação de adição de Michael seguida de subsequentes reações de ciclização nitro-redutivas que permitiu a síntese de bispirolactamas.¹⁰⁵

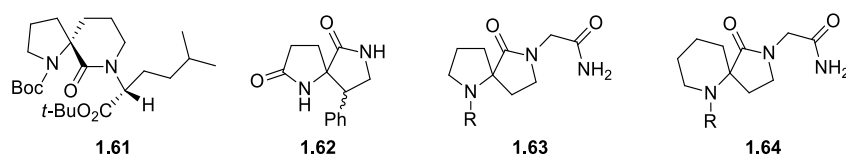
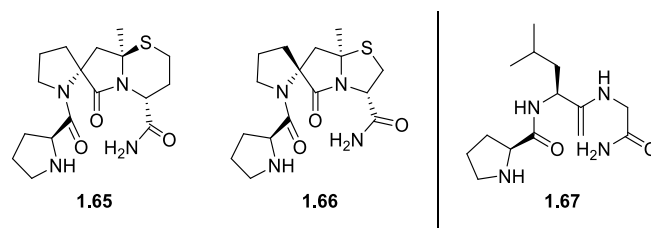


Figura 1.14. Espirolactamas peptidomiméticas.

Um exemplo concreto de espirolactamas peptidomiméticas foi observado por Johnson e colaboradores na sua investigação sobre a doença de Parkinson. Os autores descreveram que as lactamas espirocíclicas **1.65** e **1.66** eram peptidomiméticos da *L*-prolil-leucil-glicinamida (**1.67**),¹⁰⁶ e que exibiam um perfil farmacológico semelhante a este péptido (esquema 1.17). Este estudo permitiu concluir que estas lactamas produziam um desvio maior, de um estado de afinidade baixa para um estado de afinidade elevada, no recetor de dopamina D₂ do que o péptido *L*-prolil-leucil-glicinamida (**1.67**).¹⁰⁷



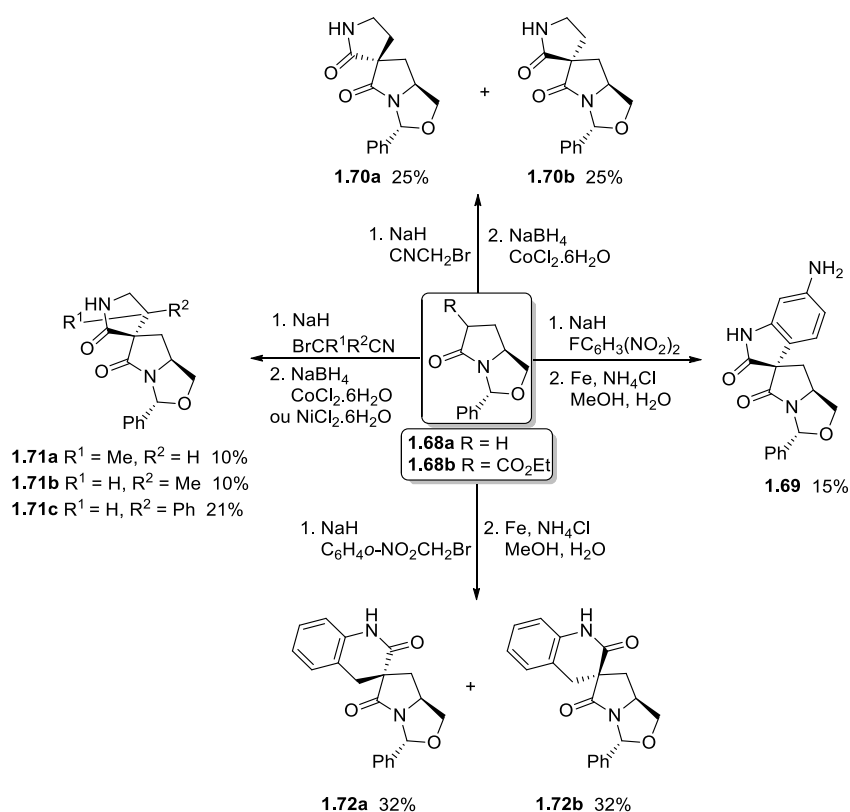
Esquema 1.17

Com os recentes avanços nas vias sintéticas para a construção de anéis espirocíclicos e o interesse em estruturas moleculares com propriedades tridimensionais melhores, os compostos biologicamente ativos constituídos por um esqueleto espirocíclico estão a ser muito explorados.^{108,109}

1.3.1 Vias sintéticas para a obtenção de espiro- γ -lactamas

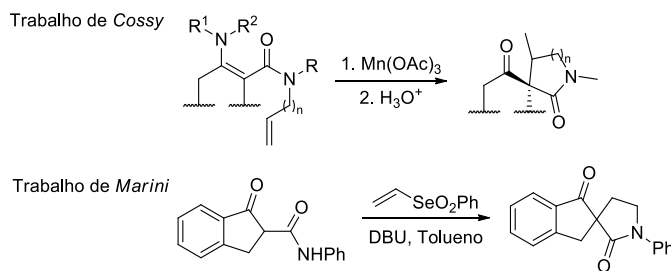
Nas duas últimas décadas várias metodologias foram descritas para a síntese assimétrica de espiro-2-pirrolidin-5-onas,¹¹⁰⁻¹¹² nomeadamente através da reação de inserção de α -diazocarbonilos,¹¹³ amidações intramoleculares catalisadas com paládio,¹¹⁴ e iodocarbociclições.¹¹⁵

Em 2011, Thompson e colaboradores estudaram a síntese e conformação estrutural de bislactamas espirocíclicas derivadas do ácido piroglutâmico. Os autores demonstraram que lactamas espirocíclicas são facilmente obtidas a partir de núcleos piroglutâmicos, e que os seus parâmetros quimioinformáticos estão dentro das normas desejadas para estruturas alvo. A reação de substituição nucleófila aromática do éster **1.68b** com hidreto de sódio e 2,4-dinitro-1-fluorobenzeno, seguida da redução e lactamização espontânea do produto arilado permitiu obter o composto **1.69**. A reação de alquilação do éster **1.68b** com hidreto de sódio e vários bromonitrilos em THF, seguida de redução e ciclização *in situ* da amina obtida, permitiu sintetizar os sistemas espirolactâmicos pretendidos (**170a,b** e **171a-c**). Por outro lado, a reação de redução com ferro e cloreto de amónio num sistema de solventes metanol/água permitiu a síntese de uma mistura de dois diastereoisómeros de bislactamas espirocíclicas **1.72a,b** (esquema 1.18).⁹⁵



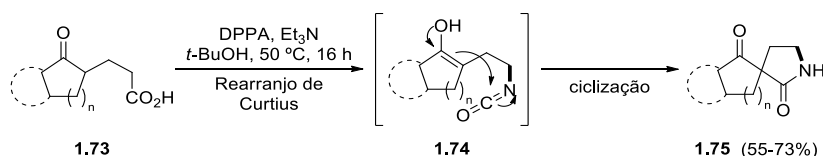
Esquema 1.18

A síntese de β -ceto-lactamas espirocíclicas também tem sido muito explorada devido às suas características estruturais e grande potencial como esqueleto multifuncional no desenvolvimento de fármacos. Vários métodos sintéticos foram desenvolvidos, nomeadamente Cossy e colaboradores descreveram a síntese de lactamas espirocíclicas através da ciclização radicalar catalisada por acetato de manganésio de β -ceto-carboxamidas insaturadas,¹¹⁶ Marini e seus colaboradores sintetizaram espirolactamas via adição de Michael seguida de ciclização utilizando metil vinil selenona como aceitador de Michael (esquema 1.19).¹¹⁷ Para além de estarem descritas várias metodologias para a preparação de espirolactamas utilizando reações de transquilidenação catalisadas por ruténio (grupo de investigação de Rodriguez)¹¹⁸, e carboxiciclicações catalisadas por paládio (Sui e colaboradores)¹¹⁹.



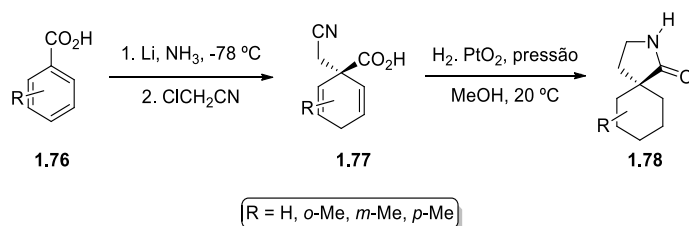
Esquema 1.19

Por outro lado, em 2015, Xue e colaboradores desenvolveram uma nova metodologia sintética para a preparação de lactamas espirocíclicas a partir de ácidos β -ceto carboxílicos (**1.73**), que consistiu numa única etapa reacional envolvendo um rearranjo de Curtius e uma reação de adição intramolecular nucleófila do carbono enólico ao intermediário isocianato (**1.74**) (esquema 1.20).¹²⁰ Deste modo, através desta via sintética prática, rápida e sem a utilização de catalisadores hostis ao meio ambiente, foram sintetizadas as lactamas espirocíclicas **1.75** com bons rendimentos.



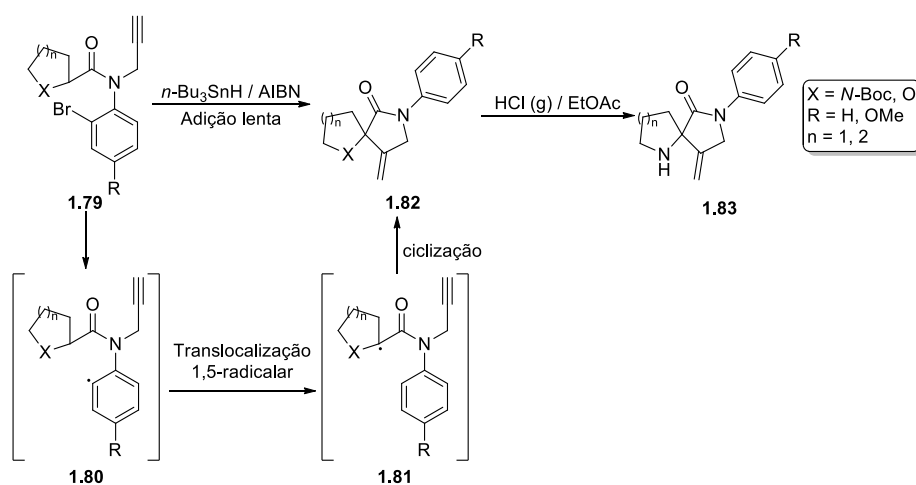
Esquema 1.20

Em 2017, Linker e colaboradores descreveram uma via sintética simples de preparação de espiro- γ -lactamas, em apenas dois passos, através da redução de Birch de ácidos benzoicos. Para obter a espiro- γ -lactama **1.78** através desta estratégia tem de ser introduzido um átomo de azoto durante a redução de Birch. O ciclo-hexadieno **1.77** foi obtido com bons rendimentos via redução de Birch do ácido benzoico **1.76** seguida da reação de alquilação com cloro-acetonitrilo (esquema 1.21).¹²¹ O segundo passo consistiu na reação de hidrogenação catalisada por óxido de platina (IV), reduzindo estereosseletivamente o grupo nitrilo e as ligações duplas no mesmo passo, seguida de ciclização do intermediário aminoácido formado. As espiro- γ -lactamas **1.78** pretendidas foram sintetizadas com rendimentos elevados.



Esquema 1.21

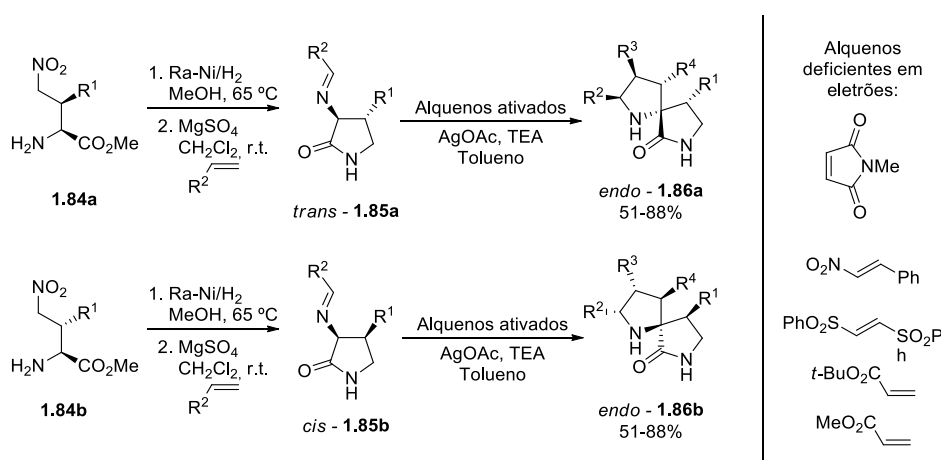
A reação de ciclização de translocação radicalar foi descrita em 2005 pelo grupo de investigação de Bai como metodologia sintética para a preparação de aza/oxa-espirolactamas. Esta estratégia consiste numa série de reações radicalares iniciadas pela formação do radical arilo **1.80** a partir do precursor bromado **1.79**. O radical **1.80** abstrai o próton- α do heterociclo e produz o radical **1.81**. A reação de *exo*-ciclização intramolecular do radical **1.81** envolvendo a ligação tripla *N*-propinilo permite obter a espirolactama **1.82** com bons rendimentos (esquema 1.22).¹⁰² Esta metodologia permitiu a síntese de aza/oxa-espirolactamas que poderão ser utilizados como peptidomiméticos no desenvolvimento de fármacos.



Esquema 1.22

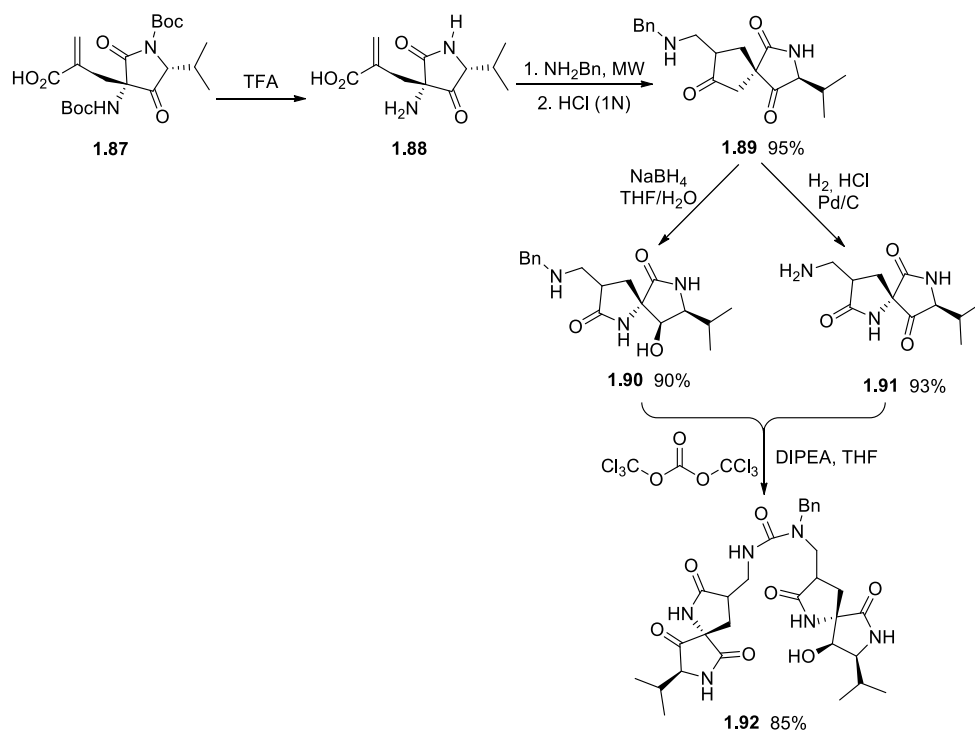
Em 2015, o grupo de investigação de Cossío descreveu uma via sintética para a preparação de bis-espiropirrolidinas **1.86** através de reações de ciclo-adição 1,3-dipolar entre íletos azometinos derivados de γ -lactamas **1.85** e alquenos ativados (esquema 1.23).¹²² Os α -amino- γ -nitroésteres **1.84a** e **1.84b**, após reação de redução catalítica e ciclização intramolecular, permitiram obter α -amino- γ -lactamas. Estas são transformadas quantitativamente nas correspondentes iminas, as *trans*-lactamas **1.85a** e as *cis*-lactamas **1.85b**. A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar dos íletos azometinos formados *in situ* a partir das lactamas **1.85a** e **1.85b** com

alquenos deficientes em elétrons, conduziu à síntese de *endo*-bis-espirolidinas enantiotópicas **1.86a** e **1.86b** com rendimentos e enantiosseletividades elevadas.



Esquema 1.23

Em 2013, Martinez e colaboradores descreveram uma metodologia alternativa para a síntese de espirolactamas com características e atividade semelhante às hélices de poliprolina II, estrutura secundária proteica que está presente em sequências lineares que reconhecem módulos de interação proteína-proteína. A pirrolidina-2,4-diona **1.88**, obtida por desproteção do composto **1.87** com ácido trifluoroacético, foi sujeita a sucessivas reações intramoleculares: reação de espirociclicização, adição de *α*-Michael e formação de imina. Após um tratamento ácido adequado, foi obtida a espirolactama funcionalizada **1.89** com bom rendimento. A reação de redução do espirociclo **1.89** com boro-hidreto de sódio permitiu obter diastereosseletivamente o monómero **1.90**. Por outro lado, a reação de hidrogenólise do composto **1.89** com paládio em carbono a 10% sob uma atmosfera de hidrogénio num meio ácido, conduziu à síntese da amina primária **1.91**. A ligação dos dois monómeros (**1.90** e **1.91**) foi realizada pela formação de uma ligação de ureia na presença de trifosgênio e *N,N*-diisopropiletilamina (esquema 1.24).⁹³ Foi sintetizado o dímero **1.92** com bom rendimento, um composto com propriedades de reconhecimento de interações proteína-proteína e com possíveis propriedades no reconhecimento molecular, catálise e nanociência.



Esquema 1.24

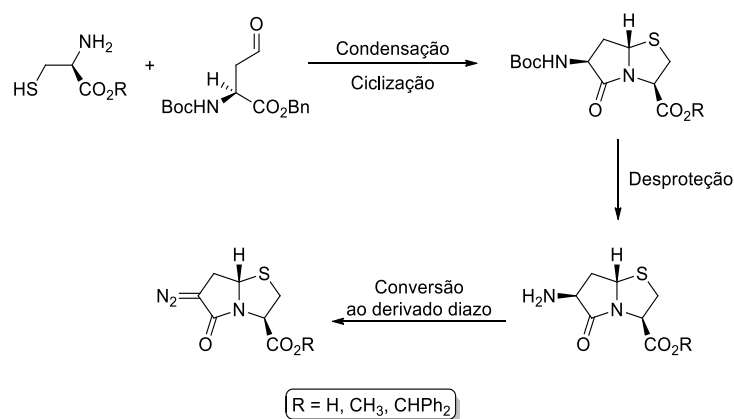
CAPÍTULO II

SÍNTESE DE DIAZO- γ -LACTAMAS QUIRAIS

2.1. Objetivos

O trabalho apresentado neste capítulo centra-se na síntese de diazo- γ -lactamas bicíclicas derivadas da *L*-cisteína, um composto constituído por um 1,3-dipolo do tipo diazoalcano. Esta síntese permitirá o estudo posterior da reatividade destes compostos em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar com diferentes dipolarófilos, como estratégia para a síntese de novas espiro- γ -lactamas quirais.

No esquema 2.1 é apresentada a estratégia sintética desenvolvida. A síntese da γ -lactama bicíclica *via* condensação inicial de um aldeído, derivado do ácido *L*-aspártico, com a *L*-cisteína na forma ácida ou esterificada para dar origem a uma tiazolidina, seguida de uma reação de ciclização. A desproteção do grupo amino e subsequente conversão ao derivado diazo permitiu a síntese da diazo- γ -lactama pretendida.



Esquema 2.1

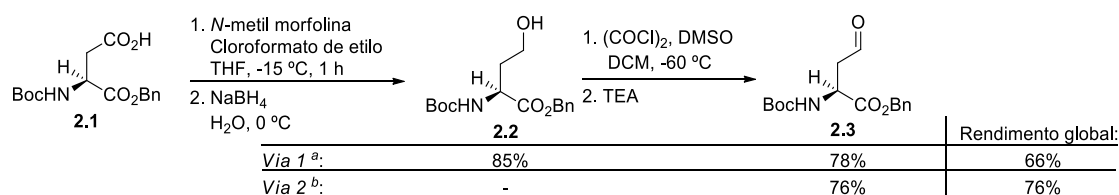
2.2. Síntese de γ -lactamas bicíclicas

Este trabalho de investigação foi iniciado com a síntese do aldeído **2.3** derivado do ácido *L*-aspártico, como precursor quiral específico para a síntese de γ -lactamas bicíclicas via reações de ciclização com aminoácidos (como a *D*-penicilamina e a *L*-cisteína). Para a síntese do aldeído **2.3** foi preparado o álcool **2.2** derivado do ácido *L*-aspártico a partir do ácido Boc-*L*-Asp-OBzl **2.1** (esquema 2.2).

O álcool **2.2** foi preparado através de uma metodologia sintética descrita na literatura.¹²³ A reação envolve a formação inicial de um anidrido através do tratamento do derivado do ácido *L*-aspártico (**2.1**) com *N*-metil morfolina, seguido da reação com cloroformato de etilo, e por fim, redução com boro-hidreto de sódio. Após purificação por cromatografia em coluna o composto **2.2** é obtido com um rendimento de 85%.

O aldeído **2.3** foi obtido através de uma oxidação de Swern, tendo como base um procedimento descrito na literatura.¹²⁴ Inicialmente promove-se a ativação do dimetilsulfóxido por reação deste com o cloreto de oxalilo, à temperatura de -60 °C, e de seguida adiciona-se o álcool **2.2**. Após tratamento com trietilamina é obtido o aldeído **2.3**, que é purificado e isolado como um óleo amarelado com rendimento de 78%. O rendimento global desta reação é de 66% (via 1).

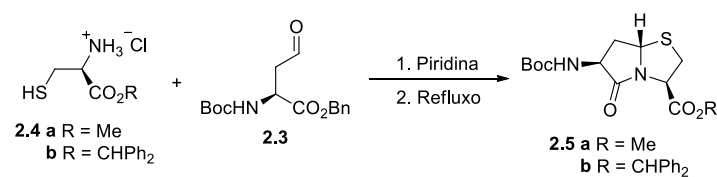
Esta metodologia foi também efetuada sem proceder à purificação do álcool **2.2**, tendo conduzido à obtenção do aldeído **2.3** com rendimento global de 76% (via 2). Uma vez que houve um aumento do rendimento global e se eliminou um passo de purificação, foi adaptada esta estratégia para a síntese do aldeído.



(a) realizada com isolamento do álcool **2.2** por cromatografia em coluna
 (b) realizada sem isolamento do álcool **2.2**

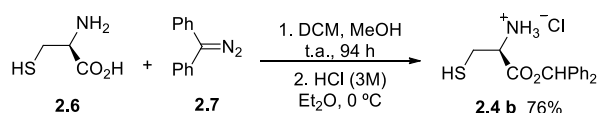
Esquema 2.2

Seguidamente procedeu-se à síntese dos derivados esterificados das γ -lactamas bicíclicas (éster metílico e benzidrílico). Foi sintetizado o éster metílico da γ -lactama (**2.5a**) e o éster benzidrílico da γ -lactama (**2.5b**), adaptando um procedimento descrito na literatura para a síntese de γ -lactamas análogas de penemas.¹²⁵ A condensação do aldeído **2.3** com o hidrocloreto do éster de *L*-cisteína (**2.4a** e **2.4b**), em piridina, permitiu a obtenção das γ -lactamas **2.5a** e **2.5b** num só passo reacional (tabela 2.1). As primeiras 5 horas de reação foram realizadas à temperatura ambiente e de seguida a mistura reacional foi aquecida a refluxo, durante 19 horas. Após purificação por cromatografia em coluna, o composto **2.5a** foi obtido com um rendimento de 58% (reação 1).

Tabela 2.1. Condições de reação para a síntese dos compostos bicíclicos **2.5a** e **2.5b**.

Reação	R	Condições de reação	Rendimento (2.5)
1	Me	t.a., 5 h 100 °C, 19 h	58%
2	CHPh ₂	t.a., 5 h 100 °C, 19 h	6%
3	CHPh ₂	t.a., 7 h 100 °C, 64 h	6%

Nos estudos anteriores, o éster benzidrílico revelou ter influência nos compostos lactâmicos, devido às suas propriedades resultarem numa hidrólise seletiva e específica, e por conseguinte possibilitar a funcionalização destes compostos.^{34,126} Para se obter o éster benzidrílico da γ -lactama, foi necessário sintetizar o hidrocloreto do éster benzidrílico da *L*-cisteína **2.4b** (esquema 2.3). O derivado da *L*-cisteína foi obtido a partir da reação da *L*-cisteína **2.6** com difenildiazometano **2.7**, seguido de tratamento com uma solução de HCl (3 M), num banho de gelo, até se verificar pH 1. O hidrocloreto de *L*-cisteína **2.4b** foi isolado como um sólido branco, com um rendimento de 76%.

**Esquema 2.3**

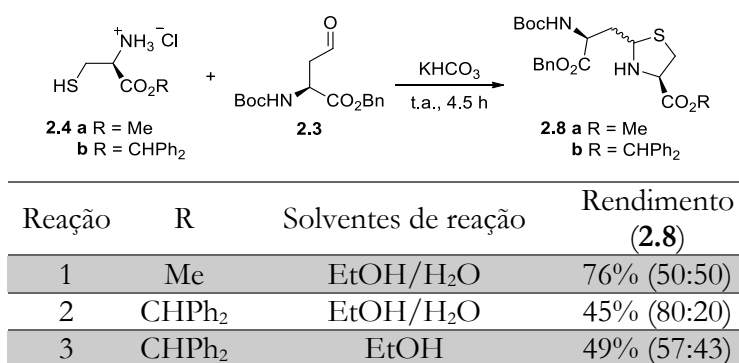
Seguindo a metodologia sintética apresentada na tabela 2.1, o composto **2.5b** foi obtido com um rendimento de 6%, após purificação por cromatografia em coluna (reação 2). Foi ainda realizado outro ensaio aumentando o tempo de reação (reação 3), como tentativa de sintetizar a γ -lactama **2.5b** com melhor rendimento, no entanto o resultado manteve-se pouco satisfatório.

Como a via sintética tradicional utilizada na síntese da γ -lactama benzidrilo éster **2.5b** não foi eficiente, foi desenvolvida no nosso grupo de investigação uma estratégia alternativa às metodologias existentes para a síntese de γ -lactamas bicíclicas. Esta estratégia consiste numa síntese em 2 passos: síntese da tiazolidina, seguida de ciclização para a obtenção do anel lactâmico.

A reação de condensação do aldeído **2.3**, em etanol, com os derivados ésteres da *L*-cisteína (**2.4a** e **2.4b**), em água, foi realizada na presença de hidrogenocarbonato de potássio, à temperatura ambiente (tabela 2.2). Após 4.5 horas de reação, o produto **2.8a** foi purificado por cromatografia em coluna e obtido com um rendimento de 76% (reação 1). A tiazolidina-4-carboxilato de benzidrilo **2.8b** foi obtida com um rendimento de 45%, após 4.5 horas de reação, e purificação por cromatografia em coluna (reação 2). Realizando a síntese do composto **2.8b** usando apenas etanol como solvente conduziu a melhores rendimentos (reação 3).

Por observação dos espectros de RMN protônico verifica-se que ambos os compostos sintetizados (**2.8a** e **2.8b**) são obtidos como uma mistura de dois diastereoisômeros, visto que se observam dois conjuntos de sinais correspondentes aos prótons de ambos os diastereoisômeros.

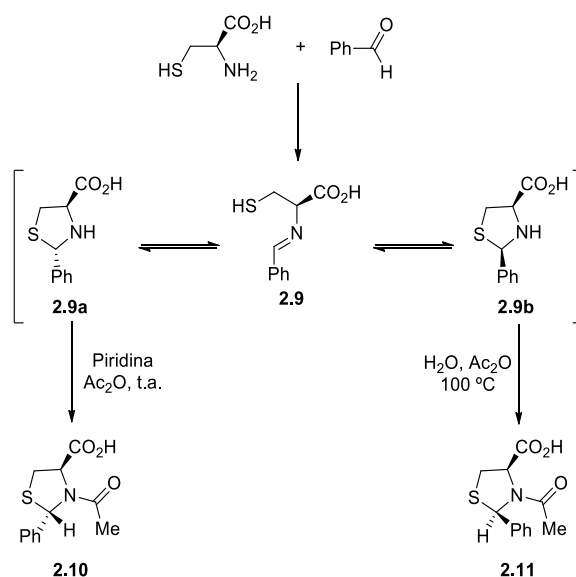
Tabela 2.2. Condições de reação para a síntese da tiazolidina-4-carboxilato de metilo **2.8a** e de benzidrilo **2.8b**.



Estes resultados estão de acordo com os dados descritos na literatura.¹²⁷ Efetivamente, a reação de condensação de aldeídos ou cetonas com a *D*- ou *L*-cisteína conduz à formação de um novo centro assimétrico na posição C2 da tiazolidina, num processo que não afeta o centro quiral α (C4 na tiazolidina).

A aplicação destes derivados na preparação de novos compostos heterocíclicos quirais é uma estratégia amplamente utilizada, devido à sua reatividade e à sua capacidade de originar reações diastereosseletivas. Com base nesta informação, a preparação de tiazolidinas diastereoisomericamente puras é possível a partir da funcionalização (por exemplo reação de *N*-acilação) de uma mistura diastereoisomérica de tiazolidinas **2.9**, existindo equilíbrio entre os diastereoisômeros **2.9a** e **2.9b**, sob condições de reação específicas.^{128,129} A reação de acilação do ácido 2-fenil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico **2.9** (a mistura de tiazolidinas (2*S*,4*R*) e (2*R*, 4*R*)) com anidrido acético em piridina à temperatura ambiente permite obter unicamente o isômero *trans* **2.10** com a estereoquímica (2*S*, 4*R*). Por outro lado, a reação de acilação do composto **2.9**

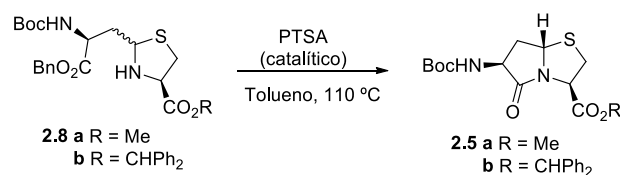
(2*S*,4*R*) e (2*R*, 4*R*) numa mistura de anidrido acético e água a 100 °C conduz à formação exclusiva do diastereoisómero *cis* **2.11** (2*R*, 4*R*) (esquema 2.4).



Esquema 2.4

Deste modo, procedeu-se a uma reação de acilação intramolecular da mistura diastereoisomérica das tiazolidinas **2.8**, com o objetivo de sintetizar as γ -lactamas bicíclicas **2.5** (tabela 2.3). A reação de ciclização das tiazolidinas **2.8a** e **2.8b** foi realizada na presença de ácido *p*-toluenosulfónico em refluxo de tolueno a 110 °C. Após 117 horas e purificação por cromatografia em coluna obteve-se o produto **2.5a** com um rendimento de 36% (reação 1). A partir da tiazolidina **2.8b** foram realizados 3 ensaios com diferentes tempos de reação (reação 2-4). Em todos os casos foi verificado a formação do produto desejado, no entanto o melhor resultado foi alcançado quando se efetuou a reação durante 48 horas, isolando a lactama bicíclica **2.5b** com um rendimento de 68% como único produto (reação 3).

A preparação da γ -lactama bicíclica **2.5a** a partir da via tradicional de ciclização num só passo permitiu obter o composto pretendido com rendimentos bastante satisfatórios (58%), enquanto que o rendimento global da sua ciclização em dois passos reacionais foi de apenas 26%. Por outro lado, a síntese da γ -lactama benzidrilo éster **2.5b** através da metodologia alternativa foi obtida com um rendimento global de 33%, superior ao do procedimento inicial que utiliza piridina, que permitiu obter o derivado γ -lactâmico com um rendimento de 6%. Assim conclui-se que a metodologia sintética que envolve dois passos de ciclização é mais eficaz para a preparação da γ -lactama benzidrilo éster **2.5b**, e não requer a presença de piridina, um solvente inflamável e tóxico.

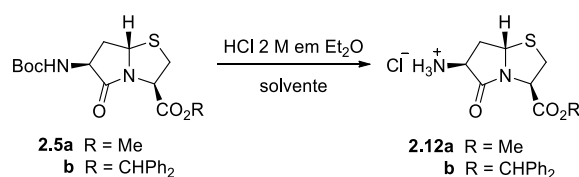
Tabela 2.3. Condições de reação para a síntese dos compostos bicíclicos **2.5a** e **2.5b**.

Reação	R	Tempo de reação	Rendimento (2.5)	Rendimento global ^a
1	Me	117 h	36%	27%
2	CHPh ₂	24 h	45%	22%
3	CHPh ₂	48 h	68%	33%
4	CHPh ₂	70 h	40%	20%

^(a) Síntese da tiazolidina **2.8** e γ -lactama **2.5**.

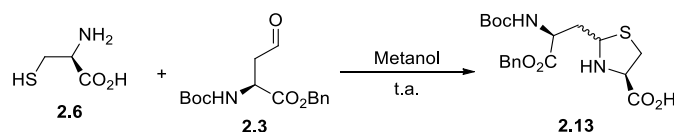
Seguidamente foram estudadas estratégias de desproteção do grupo amina da γ -lactama **2.5**. Para tal utilizou-se uma solução de HCl 2 M em Et₂O, tendo sido testados diferentes solventes bem como diferentes equivalentes de ácido clorídrico, por forma a isolar o hidrocloreto **2.12** com estabilidade e de forma eficiente (tabela 2.4). Iniciou-se por estudar a desproteção do éster metílico da γ -lactama **2.5a**, utilizando a solução de HCl 2 M em Et₂O, com *tert*-butanol como solvente, à temperatura ambiente durante 6 dias. No entanto, apesar de estar na forma de hidrocloreto, não se conseguiu isolar o produto **2.12a** com estabilidade (reação 1).

Como o éster benzidrílico da γ -lactama **2.5b** era a forma que mais interessava para o objetivo do trabalho, este foi utilizado sob condições diferentes com o intuito de conseguir isolar o composto desprotegido (reações 2-6). A primeira tentativa efetuada com a mesma solução de HCl, utilizando *tert*-butanol como solvente, após 11 dias de reação não permitiu o isolamento do produto **2.12b** (reação 2). Em função destes resultados, foram utilizados outros solventes, nomeadamente metanol e diclorometano, e uma quantidade inferior da solução de HCl. A reação em metanol, à temperatura ambiente, conduziu à obtenção de um sólido por cristalização em éter etílico (reação 3). Este composto foi analisado por espectroscopia de RMN ¹H onde se observaram uns sinais minoritários, suspeitando que poderia ter ocorrido transterificação por ação do solvente. Foi realizada a reação a uma temperatura inferior (10 °C), e obteve-se um composto que apresentava um espectro de RMN ¹H com os mesmos sinais que poderiam pertencer ao éster metílico (reação 4). Utilizando diclorometano, à temperatura ambiente, após 24 horas não se teve evidência de produto (reação 5). Realizou-se um último ensaio com diclorometano, em que prolongámos o tempo de reação para 51 horas. Neste caso foi obtido um sólido por cristalização em éter etílico. O espectro de RMN ¹H indica que se pode tratar do composto pretendido, porém o produto obtido continha muitas impurezas (reação 6).

Tabela 2.4. Condições de reação utilizadas na síntese da amino- γ -lactama **2.12**.

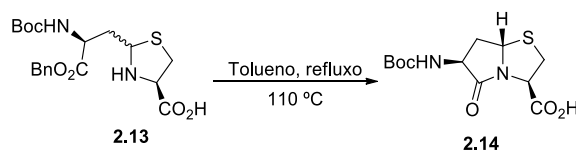
Reação	R	HCl 2 M em Et ₂ O (equiv.)	Condições de reação	Rendimento (2.12)
1	Me	15	<i>t</i> -BuOH, t.a., 6 dias	-
2	CHPh ₂	15	<i>t</i> -BuOH, t.a., 11 dias	-
3	CHPh ₂	5	MeOH, t.a., 24 h	-
4	CHPh ₂	5	MeOH, 10 °C, 43 h	-
5	CHPh ₂	5	DCM, t.a., 24 h	-
6	CHPh ₂	5	DCM, t.a., 51 h	Impuro

Visto que não se conseguiu a síntese das amino- γ -lactamas ésteres, decidi explorar-se a condensação direta da *L*-cisteína na forma ácida **2.6** com o aldeído **2.3**. Esta estratégia permitiu a preparação da tiazolidina **2.13**, obtida como mistura de diastereoisómeros. As diferentes condições de reação testadas encontram-se descritas na tabela 2.5. Foram otimizadas as condições de reação variando os equivalentes de *L*-cisteína **2.6** e o tempo de reação, com o objetivo de sintetizar o produto desejado com o melhor rendimento (reações 1-3). A reação de condensação em que se utilizou 0.9 equivalentes do aminoácido à temperatura ambiente em metanol permitiu obter a tiazolidina **2.13** com rendimento de 68%, após 18 horas (reação 1). Por outro lado, quando se diminuiu os equivalentes molares de cisteína para 0.8 e se realizaram ensaios com tempos de reação maiores, observou-se um aumento significativo no rendimento após purificação por cristalização em éter etílico (reações 2 e 3). O melhor resultado foi obtido quando se efetuou a reação de condensação do aldeído **2.3** com 0.8 equivalentes da *L*-cisteína **2.6**, em metanol à temperatura ambiente, durante 24 horas. A tiazolidina **2.13** foi obtida como um sólido branco, com rendimento de 95%, como uma mistura de diastereoisómeros na proporção de 64:36 (reação 3).

Tabela 2.5. Otimização das condições de reação para a síntese do ácido tiazolidina-4-carboxílico **2.13**.

Reação	<i>L</i> -cisteína (Equiv.)	Tempo de reação	Rendimento (2.13)
1	0.9	18 h	69% (62:38)
2	0.8	22 h	81% (62:38)
3	0.8	24 h	95% (64:36)

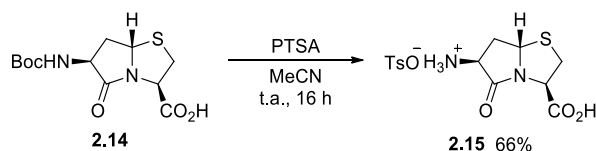
Para a reação de ciclização da tiazolidina **2.13** também foram realizados vários ensaios de otimização de condições de reação (tabela 2.6). Em primeiro lugar, a reação do composto **2.13** em refluxo de tolueno a 110 °C foi testada na presença de ácido *p*-toluenosulfônico (PTSA) durante 24 horas, obtendo a γ -lactama **2.14** com um rendimento de 25% (reação 1). Nesta reação, também se verificou a formação de um único produto quiral a partir da mistura de diastereoisômeros **2.13**. De seguida, foi realizado um ensaio na ausência de ácido *p*-toluenosulfônico, com o mesmo tempo de reação e sob as mesmas condições, isolando a γ -lactama **2.14** com um rendimento de 29% (reação 2). Este resultado permitiu concluir que o ácido *p*-toluenosulfônico não é necessário para a síntese do composto desejado. Foram ainda realizados dois ensaios com tempos de reação diferentes, 48 e 65 horas, que permitiram obter o composto **2.14** com rendimentos de 62% e 23% respetivamente (reação 3 e 4). O produto **2.14** foi isolado após tratamento com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio, extração com diclorometano, seguido de neutralização da fase aquosa com uma solução de ácido clorídrico (3 M) e posterior extração com acetato de etilo. O melhor resultado foi obtido após 48 horas de reação, na ausência de PTSA, isolando a γ -lactama bicíclica **2.14** com um rendimento de 62%, que correspondeu a um rendimento global de 59% (reação 3).

Tabela 2.6. Otimização das condições de reação para a síntese da γ -lactama bicíclica ácida**2.14.**

Reação	Condições de reação	Rendimento (2.14)	Rendimento global ^a
1	24 h, PTSA	25%	24%
2	24 h	29%	28%
3	48 h	62%	59%
4	65 h	23%	22%

^(a) Síntese da tiazolidina **2.13** e γ -lactama **2.14**.

A desproteção do grupo amina da γ -lactama ácida foi realizada através da adaptação de uma metodologia sintética descrita na literatura,¹³⁰ visto que o procedimento inicialmente realizado com solução de HCl 2 M em éter etílico nos derivados ésteres da γ -lactama bicíclica (**2.5a** e **2.5b**) não permitiu obter os compostos pretendidos. A reação de desproteção da γ -lactama **2.14** foi realizada com ácido *p*-toluenosulfônio, em acetonitrilo à temperatura ambiente. Após 16 horas de reação o tosilato da γ -lactama ácida **2.15** foi isolado por filtração como um sólido branco, com um rendimento de 66%.

**Esquema 2.5**

A atribuição da estereoquímica do novo centro quiral, formado na γ -lactama bicíclica, foi realizada com recurso à espectroscopia de RMN protónica e bidimensional NOESY (400 MHz) do derivado **2.15**.

O espectro de RMN protónica do composto **2.15** está representado na figura 2.1, onde se podem observar todos os sinais correspondentes aos prótons que constituem a estrutura da γ -lactama **2.15**, sendo possível verificar a ausência do sinal do grupo Boc e a presença dos sinais correspondentes aos prótons aromáticos do tosilato.

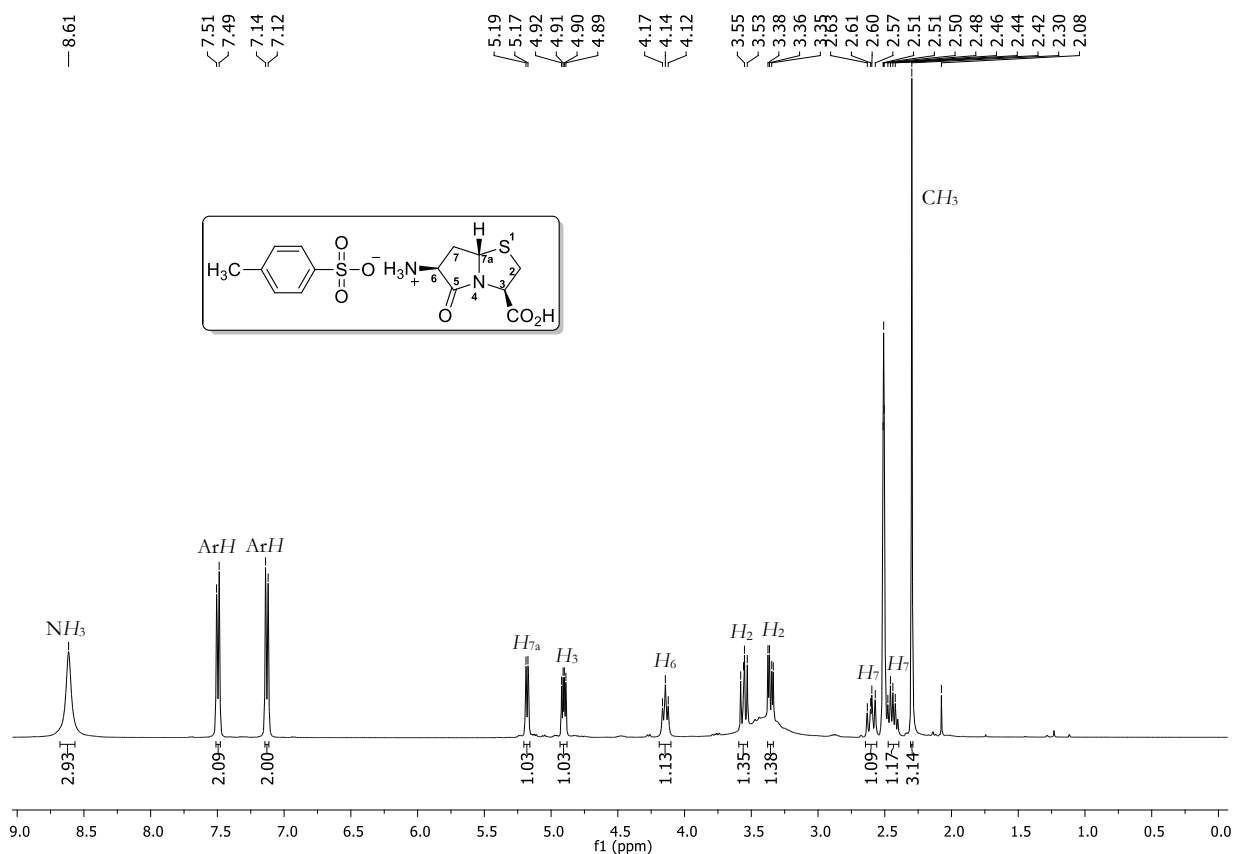


Figura 2.1. Espectro de RMN protónico do composto **2.15** (DMSO- d_6).

Com base no espectro bidimensional NOESY (figura 2.3) do composto **2.15** foi possível atribuir a estereoquímica das γ -lactamas bicíclicas derivadas da *L*-cisteína por observação das principais correlações protônicas (figura 2.2). No espectro de NOESY verificam-se picos cruzados entre o próton H-7a (5.18 ppm) e um dos prótons H-7 (2.40-2.47 ppm), enquanto que não se observam picos cruzados entre H-7a e o próton H-6 (4.14 ppm). Por outro lado, o próton H-6 apresenta picos cruzados com o outro próton H-7 (2.57-2.63 ppm), o que permite concluir que o próton H-7a está orientado para o lado oposto ao do próton H-6 (figura 2.3).

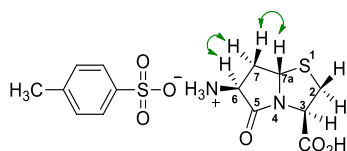


Figura 2.2. Principais correlações observadas no espectro NOESY do composto **2.15**.

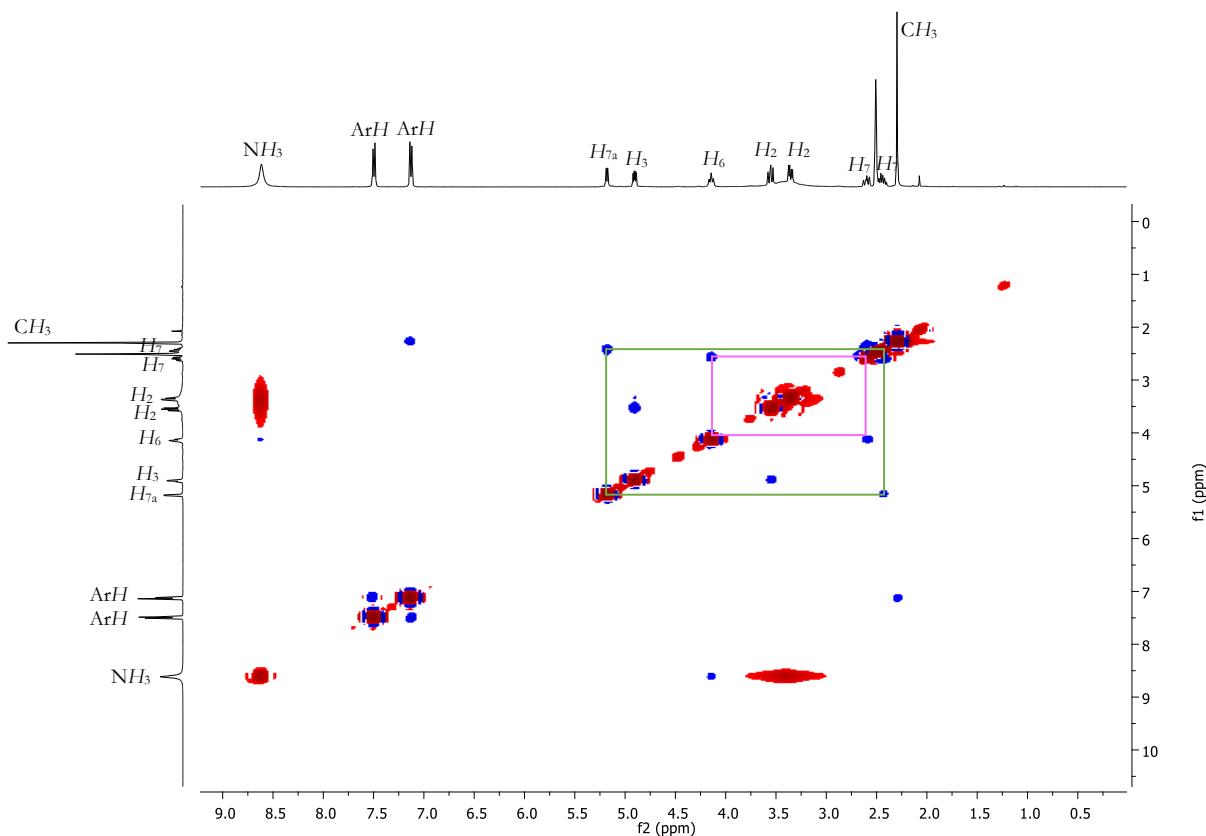
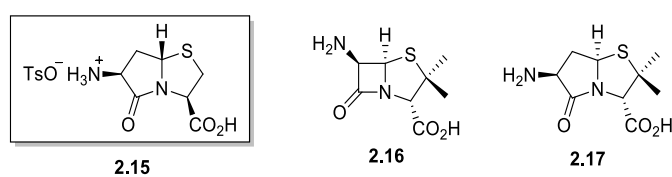


Figura 2.3. Espectro NOESY do composto **2.15** (DMSO- d_6).

Deste modo, foi possível confirmar que a estereoquímica no centro quiral da fusão de γ -lactamas bicíclicas derivadas da *L*-cisteína **2.15** é oposta aos compostos β -lactâmicos **2.16** e a compostos γ -lactâmicos derivados da *D*-penicilamina **2.17**¹²⁶ (esquema 2.6).



Esquema 2.6

Em 2009, Bhagwanth publicou um trabalho em que foi descrita a síntese e elucidação estrutural de uma γ -lactama bicíclica derivada do semi-aldeído do ácido Boc-*D*-aspártico (figura 2.4). A estereoquímica dos centros quirais, determinado por cristalografia de raios-X, permitiu a atribuição da configuração absoluta *S* ao centro quiral C7a. Este resultado está de acordo com os nossos resultados, uma vez que foram utilizadas condições de reação semelhantes (ambas com recurso a aquecimento prolongado) para a ciclização.¹³¹

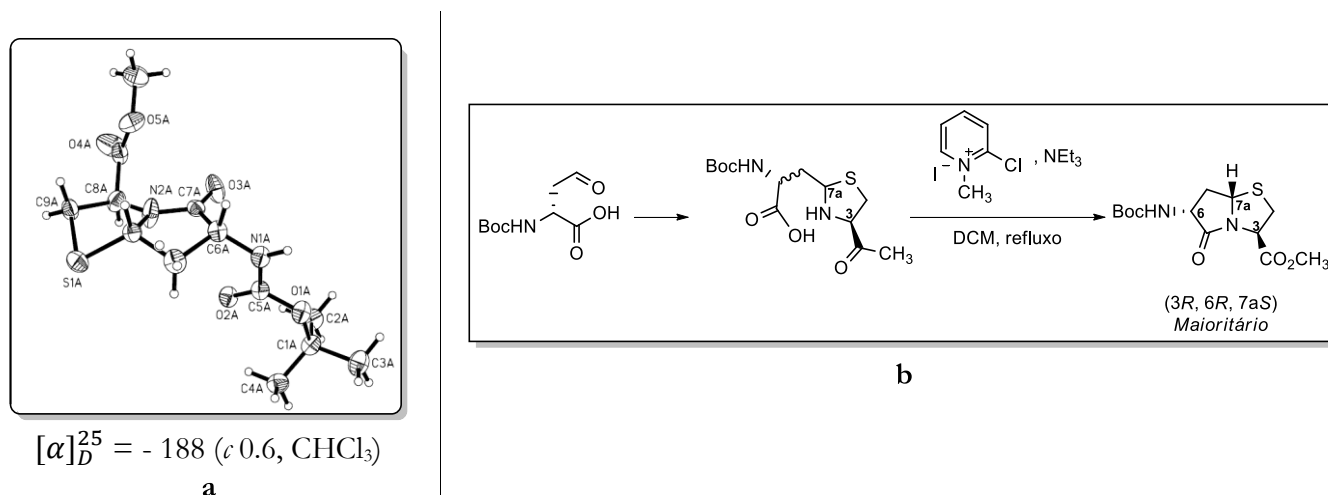
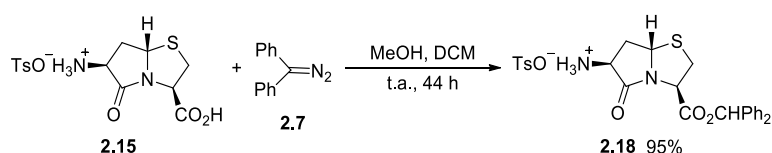


Figura 2.4. a) Estrutura determinada por cristalografia de raios-X de (3R,6R,7aS)-6-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de metilo; b) Síntese do produto maioritário *exo*- γ -lactama bicíclica.¹³¹

O passo seguinte consiste na conversão do grupo ácido da γ -lactama bicíclica **2.15** no éster benzidrílico, seguindo um procedimento conhecido da literatura para sintetizar outros derivados β -lactâmicos.¹³² A reação do tosilato da γ -lactama **2.15** com difenildiazometano **2.7**, numa solução de metanol e diclorometano, à temperatura ambiente durante 42 horas, conduziu à obtenção do tosilato da γ -lactama éster **2.18**, com um rendimento de 95%, após cristalização com éter etílico (esquema 2.7).



Esquema 2.7

Na figura 2.4 podemos observar a comparação dos espectros de RMN protónico do tosilato ácido **2.15** com o tosilato éster **2.18**. Nesta figura verifica-se o aparecimento dos sinais correspondentes aos 10 prótons aromáticos do éster benzidrílico (7.32-7.46 ppm) e o singlete característico do grupo benzidrílico (CHPh_2) a 6.87 ppm. Podemos ainda observar que esta reação de conversão ao éster benzidrílico não originou alterações significativas nos desvios químicos dos restantes prótons do núcleo γ -lactâmico, e deste modo os outros sinais são comuns a ambos os espectros de RMN protónico.

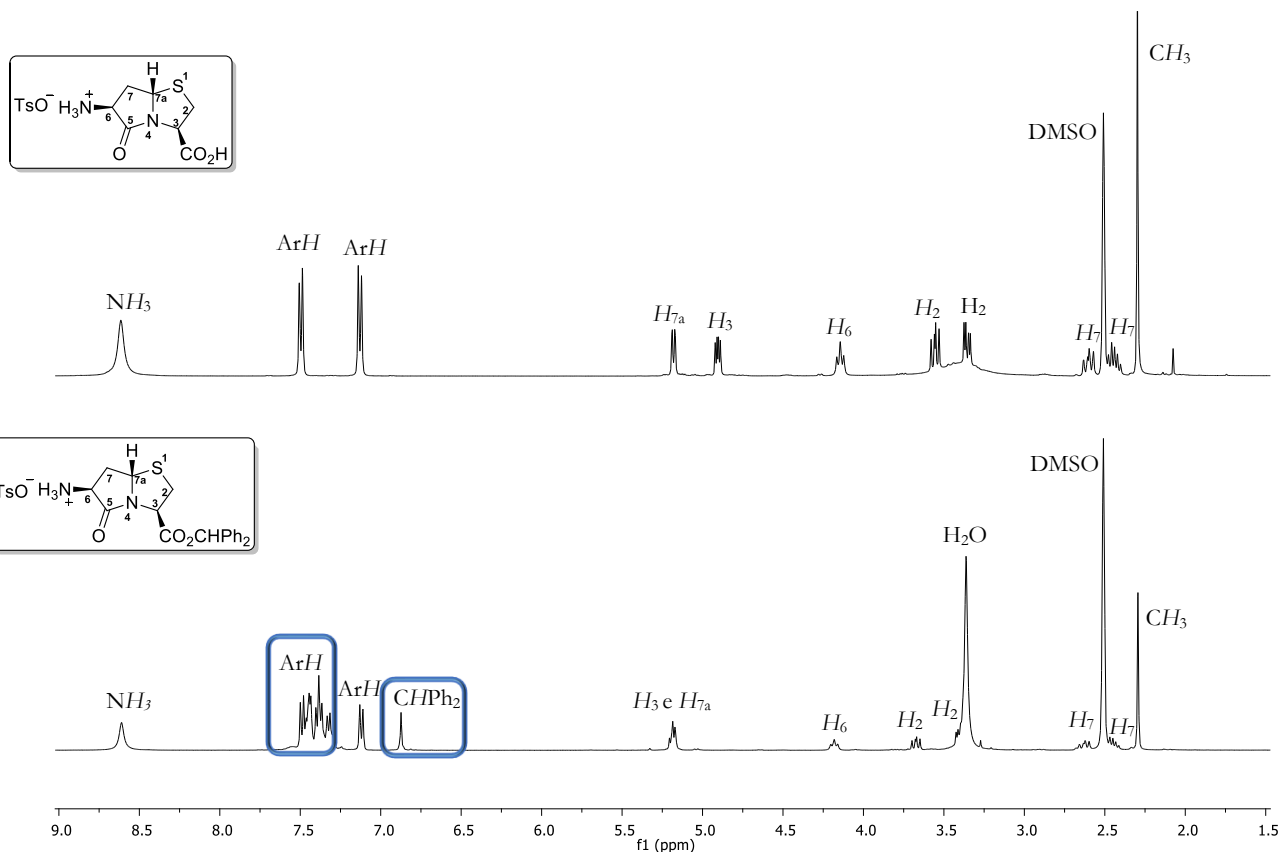


Figura 2.5. Comparação dos espectros de RMN protônico dos compostos **2.15** e **2.18** (DMSO- d_6).

2.3. Conversão à diazo- γ -lactama

Com o derivado γ -lactâmico éster **2.18** sintetizado, foi possível prosseguir a nossa estratégia sintética e avançar para a neutralização e posterior reação de conversão ao derivado diazo pretendido.

A reação de neutralização do tosilato da γ -lactama éster **2.18** foi realizada com uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 em diclorometano, à temperatura de 0°C . A amino- γ -lactama **2.19** foi obtida após 30 minutos de reação e isolamento por extração, com um rendimento de 90% (esquema 2.8).



Esquema 2.8

Como descrito no capítulo I, as penicilinas são moléculas bicíclicas constituídas por um anel β -lactâmico fundido a um anel tiazolidina. No caso dos derivados β -lactâmicos as reações na posição 6 ocorrem com seletividade, devido à existência de uma conformação em “borboleta” do núcleo penicilinato que permite a aproximação dos reagentes do lado α da β -lactama com menor impedimento estéreo (figura 2.6b). Quanto aos nossos derivados γ -lactâmicos bicíclicos, através do cálculo computacional foi possível determinar a estrutura molecular da amino- γ -lactama **2.19** (figura 2.6a) onde podemos observar uma estrutura com uma conformação oposta à do 6-APA, o que está de acordo com os valores da rotação específica $[\alpha]_D$.

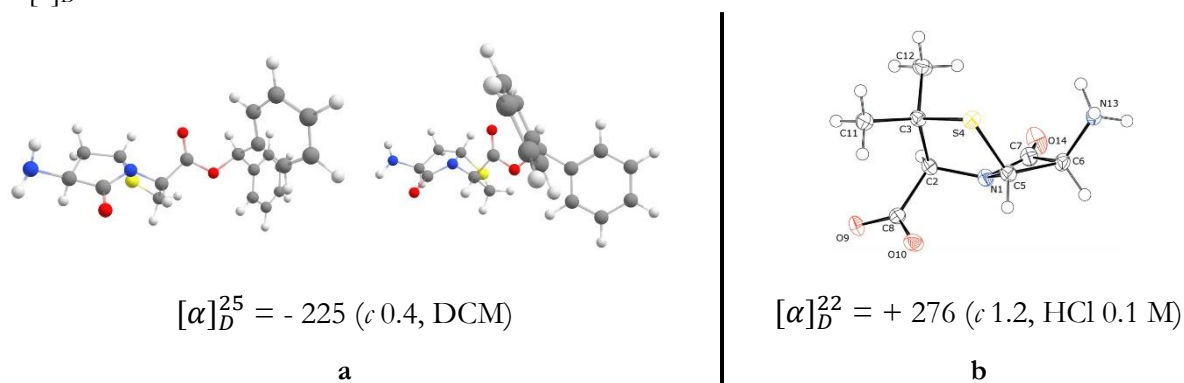
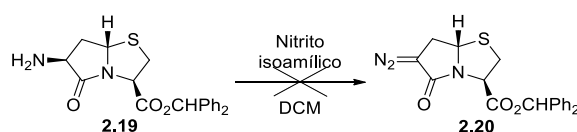


Figura 2.6. a) Estrutura molecular otimizada de (3R,6S,7aS)-6-amino-5-oxohexahidropirrol[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de benzidrido (**2.19**), através do método B3LYP/6-31G* pelo programa Gaussian 09.¹³³ b) Estrutura molecular do ácido (+)-6-aminopenicilânico determinada por cristalografia de raios-X.¹³⁴

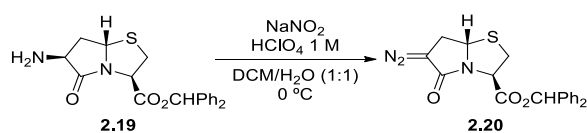
Após a síntese da amino- γ -lactama **2.19** procedeu-se à conversão à diazo- γ -lactama **2.20**, para tal, adaptou-se um procedimento descrito na literatura (esquema 2.9).¹³⁵ Inicialmente, realizou-se a reação com 5 equivalentes de nitrito isoamílico em diclorometano, a uma temperatura de -10 °C, no entanto após 6.5 horas de reação não se conseguiu obter o produto desejado. Tendo em conta os resultados anteriores, foi realizado outro ensaio utilizando 2 equivalentes de nitrito isoamílico a uma temperatura de 0 °C na presença de ácido trifluoroacético (quantidade catalítica). Como após 6 horas de reação, não se tinha evidência do produto **2.20**, adicionaram-se mais 2 equivalentes de nitrito isoamílico. Todavia, após 16 horas de reação sob estas condições, não houve novamente evidência de formação do produto desejado.



Esquema 2.9

Visto que pela via sintética inicialmente utilizada não se conseguiu a síntese da γ -lactama **2.20**, foi adaptado um procedimento da literatura que descreve um método clássico para a preparação de diazo- β -lactamas.¹³² Deste modo a reação de conversão foi realizada com a amino- γ -lactama **2.19** e nitrito de sódio, na presença de uma solução de ácido perclórico (1 M) a 60%, num sistema de solventes diclorometano/água (1:1), à temperatura de 0 °C. Foram realizados 3 ensaios com tempos de reação diferentes, que permitiu verificar que o fator tempo é importante na síntese destes derivados (tabela 2.7). Quando a reação é realizada durante 30 minutos a conversão não é completa, e quando o tempo de reação é aumentado para 2 horas ocorreu diminuição do rendimento e degradação do produto. O melhor resultado foi alcançado após 1 hora de reação, onde a diazo- γ -lactama **2.20**, isolada por extração, é obtida com um rendimento de 95%.

Tabela 2.7. Otimização das condições de reação para a síntese da diazo- γ -lactama **2.20**.



Reação	Tempo de reação	Rendimento (2.20)
1	30 minutos	81%
2	1 h	95%
3	2 h	86%

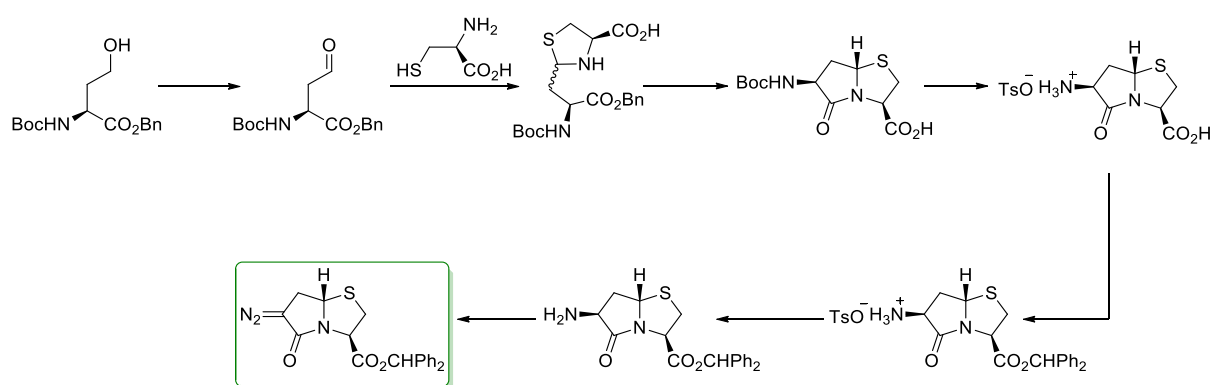
2.4. Conclusão

No presente capítulo foram apresentados todos os passos da estratégia sintética desenvolvida para a formação da diazo- γ -lactama **2.20**, e a sua respetiva otimização (esquema 2.10).

Foi estudada a síntese de γ -lactamas bicíclicas ácidas e ésteres a partir de reações de condensação de um aldeído derivado do ácido *L*-aspártico com a *L*-cisteína na forma ácida e esterificada. Este estudo permitiu sintetizar o derivado γ -lactâmico que possibilitou prosseguir com a via sintética desenvolvida. A otimização da síntese γ -lactama bicíclica através de uma estratégia que engloba dois passos – síntese da tiazolidina seguida de ciclização – permitiu a preparação da γ -lactama ácida com bons rendimentos.

No decurso desta estratégia, foi conseguida a desproteção do grupo amina da γ -lactama ácida, seguida da conversão ao éster benzidrílico da γ -lactama que permitiu obter o derivado éster pretendido. A diazo- γ -lactama alvo foi obtida após neutralização do derivado éster e subsequente reação de conversão ao derivado diazo.

Em suma, a estratégia sintética desenvolvida permitiu a obtenção da diazo- γ -lactama, abrindo a possibilidade da participação destes derivados em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar com diferentes dipolarófilos, com o intuito de obter novos compostos espirocíclicos γ -lactâmicos.



Esquema 2.10

CAPÍTULO III

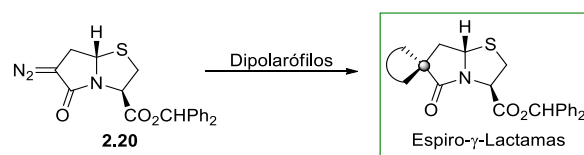
SÍNTESE DE ESPIRO- γ -LACTAMAS QUIRAIS

3.1. Objetivos

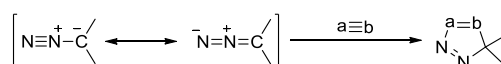
Estudos anteriores desenvolvidos no grupo de investigação de Química Orgânica da Universidade de Coimbra sobre a síntese e avaliação biológica de β -lactamas espirocíclicas permitiram o desenvolvimento de compostos líder com propriedades anti-HIV e anti-*Plasmodium berghei* muito interessantes.¹³⁶ Mais recentemente, o grupo de investigação concentrou-se na síntese de derivados não- β -lactâmicos (γ -lactâmicos) com o objetivo de preparar outras lactamas espirocíclicas com propriedades antimicrobianas semelhantes às aquelas observadas para as espiro- β -lactamas.¹²⁶ Deste modo, a estratégia sintética desenvolvida, que permitiu a síntese de novas espiro- γ -lactamas derivadas da *D*-penicilamina, foi aplicada na síntese de novas γ -lactamas espirocíclicas derivadas da *L*-cisteína.

Neste contexto, o trabalho apresentado neste capítulo consiste no estudo da reatividade da diazo- γ -lactama (composto **2.20** do capítulo 1) atuando como um 1,3-dipolo em reações de ciclo-adição com diferentes dipolarófilos (alquinos deficientes em eletrões e maleimidas *N*-substituídas) (esquema 3.1). Esta via sintética permitirá a síntese de espiro- γ -lactamas protegidas com o éster benzidrílico. Por sua vez, será explorada a conversão destes ésteres aos correspondentes derivados ácidos.

As espiro- γ -lactamas são moléculas de grande interesse sintético devido às suas propriedades biológicas, como descrito anteriormente. Desta forma, será apresentado o estudo da citotoxicidade e da atividade de inibição do vírus de imunodeficiência humana (HIV-1), de alguns compostos preparados no decurso deste trabalho.



Reação de ciclo-adição 1,3-dipolar de diazoalcanos



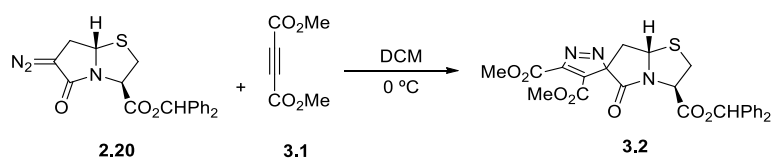
Esquema 3.1

3.2. Reações de ciclo-adição 1,3-dipolar

Inicialmente foi estudada a reatividade da diazo- γ -lactama **2.20** em reações de ciclo-adição 1,3-dipolar com alquinos deficientes em elétrons, com vista à obtenção de novas espiro- γ -lactamas e consequente introdução de um anel 3*H*-pirazol. No decurso do nosso trabalho foram utilizados o acetilenodicarboxilato de dimetilo (**3.1**) e o propiolato de metilo (**3.3**) como alquinos deficientes em elétrons.

Utilizando condições experimentais desenvolvidas anteriormente no grupo de investigação,¹²⁶ realizaram-se as reações em diclorometano à temperatura de 0 °C, variando os equivalentes do dipolarófilo **3.1** e o tempo de reação de modo a otimizar as condições de reação (tabela 3.1). Quando se utilizaram 2 equivalentes de acetilenodicarboxilato de dimetilo (**3.1**) num ensaio de 5 horas obteve-se o composto **3.2** com rendimento de 34%, após purificação por cromatografia em coluna (reação 1). O aumento do tempo de reação (16 h) ou do número de equivalentes molares do dipolarófilo **3.1** (4 equivalentes) conduziu à diminuição do rendimento da reação (reações 2 e 3). O melhor resultado foi obtido quando se utilizaram 2 equivalentes de dipolarófilo, num ensaio de 5 horas (reação 1), que resulta no isolamento da espiro- γ -lactama **3.2** com um rendimento de 34%.

Tabela 3.1. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com o acetilenodicarboxilato de dimetilo (**3.1**).



Reação	3.1 (equiv.)	Tempo de reação	Rendimento (3.2)
1	2	5 h	34%
2	2	16 h	28%
3	4	5 h	24%

Tal como se observou no estudo de ciclo-adição 1,3-dipolar de 6-diazopenicilanos com este dipolarófilo,³⁴ a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com o acetilenodicarboxilato de dimetilo (**3.1**) ocorreu de forma estereosseletiva. Este resultado pode ser explicado considerando que a formação do ciclo-adiuto resulta da adição do dipolarófilo ao lado com menor impedimento estérico, no nosso caso, o lado β da γ -lactama.

Na figura 3.1 apresenta-se o espectro de RMN protónico da espiro- γ -lactama **3.2**, representado todos os sinais correspondentes aos prótons que constituem a estrutura do composto espirocíclico **3.2**, onde é possível observar os sinais atribuídos aos grupos dos ésteres metílicos (3.87 e 3.96 ppm).

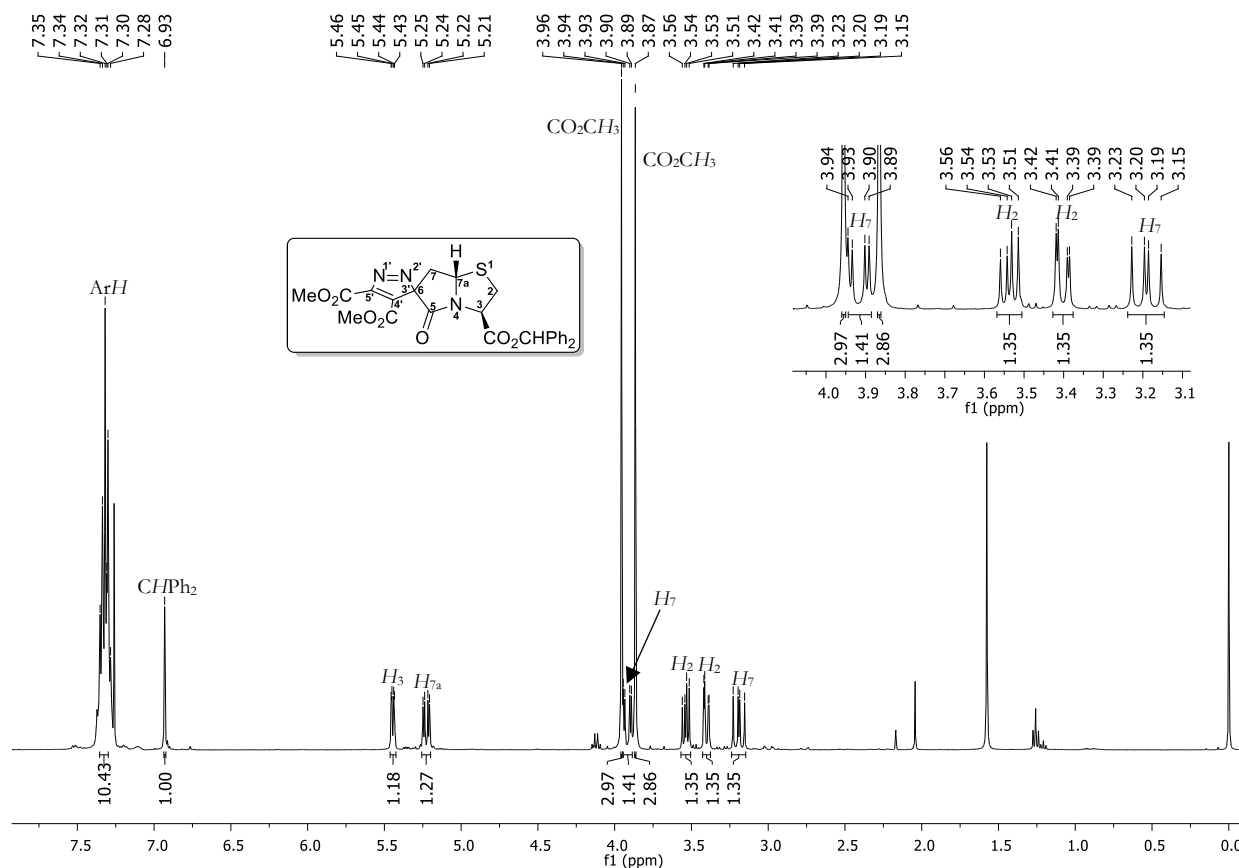


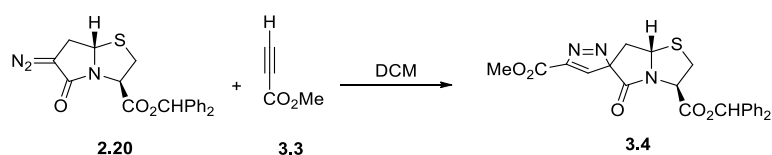
Figura 3.1. Espectro RMN protónico do composto **3.2** (CDCl_3).

Quando se utilizou o propiolato de metilo (**3.3**) como dipolarófilo, a reação de cicloadição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20**, foi realizada reproduzindo as condições de reação testadas no nosso grupo de investigação para a síntese de espiro- β -lactamas.³⁴ Na tabela 3.2 estão apresentados os diversos ensaios realizados para a obtenção do composto **3.4**, sendo que todos foram realizados com 2 equivalentes do dipolarófilo (reações 1-4). A reação à temperatura ambiente da diazo- γ -lactama **2.20** com o propiolato de metilo (**3.3**), em diclorometano, durante 16 horas permitiu obter o composto **3.4** com rendimento de 17%, após purificação por cromatografia em coluna (reação 1). Quando a reação de cicloadição foi realizada à temperatura de 45 °C durante 4 horas, o produto **3.4** foi obtido com um rendimento de 21% (reação 2). Observou-se que os rendimentos sob estas condições foram pouco satisfatórios em relação aos ensaios realizados a 0 °C para os outros derivados (espiro- γ -lactama **3.2**), e verificou-se por TLC

a presença de impurezas mais evidentes. Posto isto, procedemos para ensaios a 0 °C (reação 3 e 4), uma vez que a diazo- γ -lactama **2.20** é sintetizada a esta temperatura e, além disso, não é muito estável à temperatura ambiente. A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar durante 5 horas permitiu obter a espiro- γ -lactama **3.4** com rendimento de 15% (reação 3). Por sua vez, quando se aumentou o tempo de reação para 18 horas, obteve-se a espiro- γ -lactama **3.4** com rendimento de 24% (reação 4).

Neste caso, a reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com o propiolato de metilo (**3.3**) ocorreu de forma estereosseletiva e regiosseletiva (espiro- γ -lactama **3.4**).

Tabela 3.2. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com o propiolato de metilo (**3.3**).



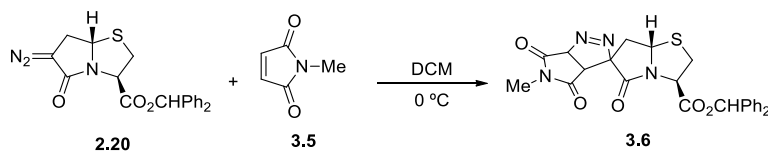
Reação	Condições de reação	Rendimento (3.4)
1	t. a., 16 h	17%
2	45 °C, 4 h	21%
3	0 °C, 5 h	15%
4	0 °C, 18 h	24%

O estudo da reatividade da diazo- γ -lactama **2.20** com maleimidas *N*-substituídas permitiu obter novas espiro- γ -lactamas com a introdução de um anel pirazolina. No decurso do nosso trabalho foram utilizadas a *N*-metilmaleimida (**3.5**) e a *N*-fenilmaleimida (**3.7**).

A reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com 1.6 equivalentes de *N*-metilmaleimida (**3.5**) em diclorometano foi realizada à temperatura de 0 °C, variando o tempo de reação com o objetivo de otimizar o rendimento (tabela 3.3). Após 5 horas de reação, a espiro- γ -lactama **3.6** foi purificada por cromatografia em coluna, e obtida com um rendimento de 16% (reação 1). Quando o tempo de reação foi aumentado para 16 horas, obteve-se o produto **3.6** com um rendimento de 12% (reação 2), sendo insatisfatoriamente inferior em relação ao ensaio anterior (reação 1).

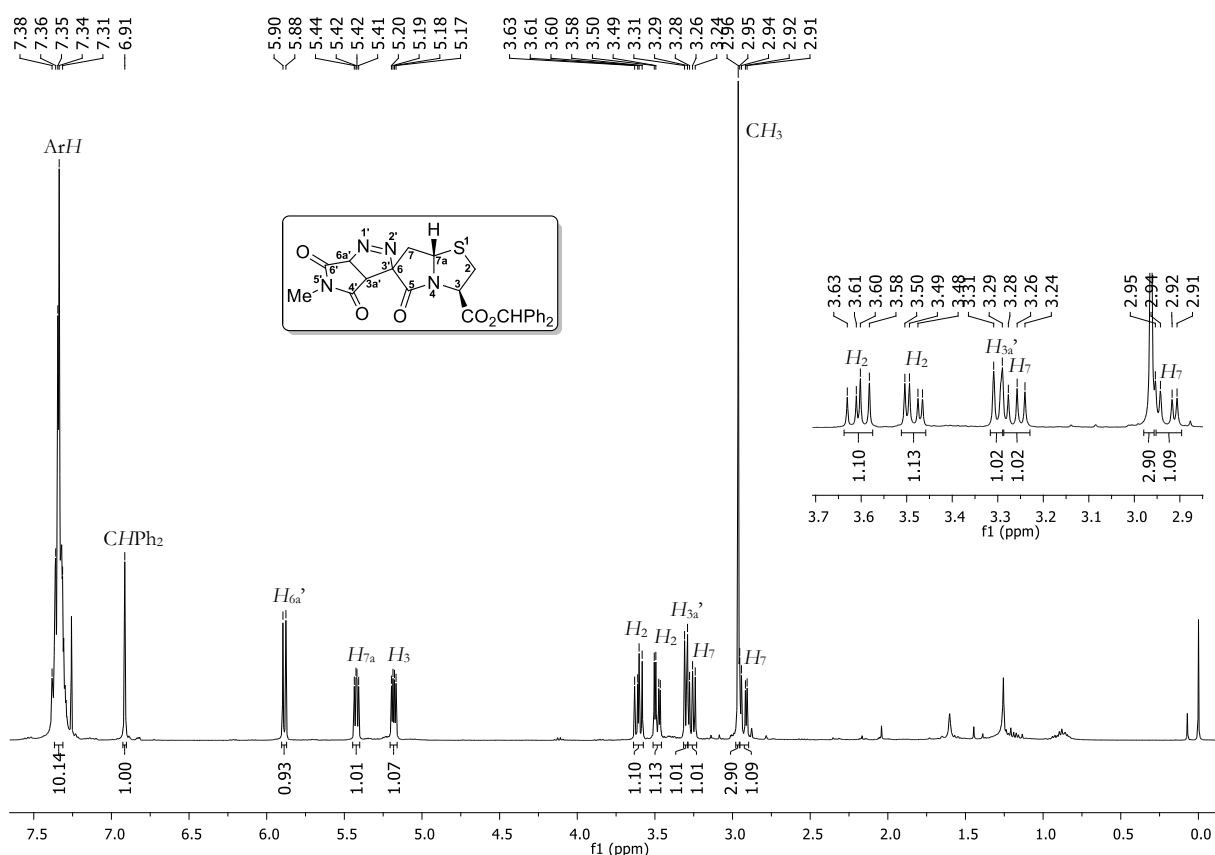
Esta reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com a *N*-metilmaleimida (**3.5**) também ocorreu de forma estereosseletiva (espiro γ -lactama **3.6**).

Tabela 3.3. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com a *N*-metilmaleimida (**3.5**).



Reação	Tempo de reação	Rendimento (3.6)
1	5 h	16%
2	16 h	12%

O espectro de RMN protônico da espiro- γ -lactama **3.6** derivada da *N*-metilmaleimida está representado na figura 3.2. Pela análise do espectro podem ser identificados alguns sinais que estão de acordo com a estrutura proposta, tais como: o singlete dos prótons do grupo metilo (2.96 ppm) e dois dubletos com desvios químicos de 3.30 ppm e 5.89 ppm correspondentes aos prótons da junção do anel de pirazolina (H-3a' e H-6a', respectivamente). Os restantes sinais presentes no espectro são referentes aos prótons do núcleo γ -lactâmico.



A análise do espectro bidimensional NOESY, apresentado na figura 3.3, permite observar a correlação entre os prótons H-3a' e H-6a'. Podem também verificar-se picos cruzados entre o próton H-7a e o próton H-7 mais desviado, e picos cruzados entre o próton H-3 e o próton H-2 mais desviado.

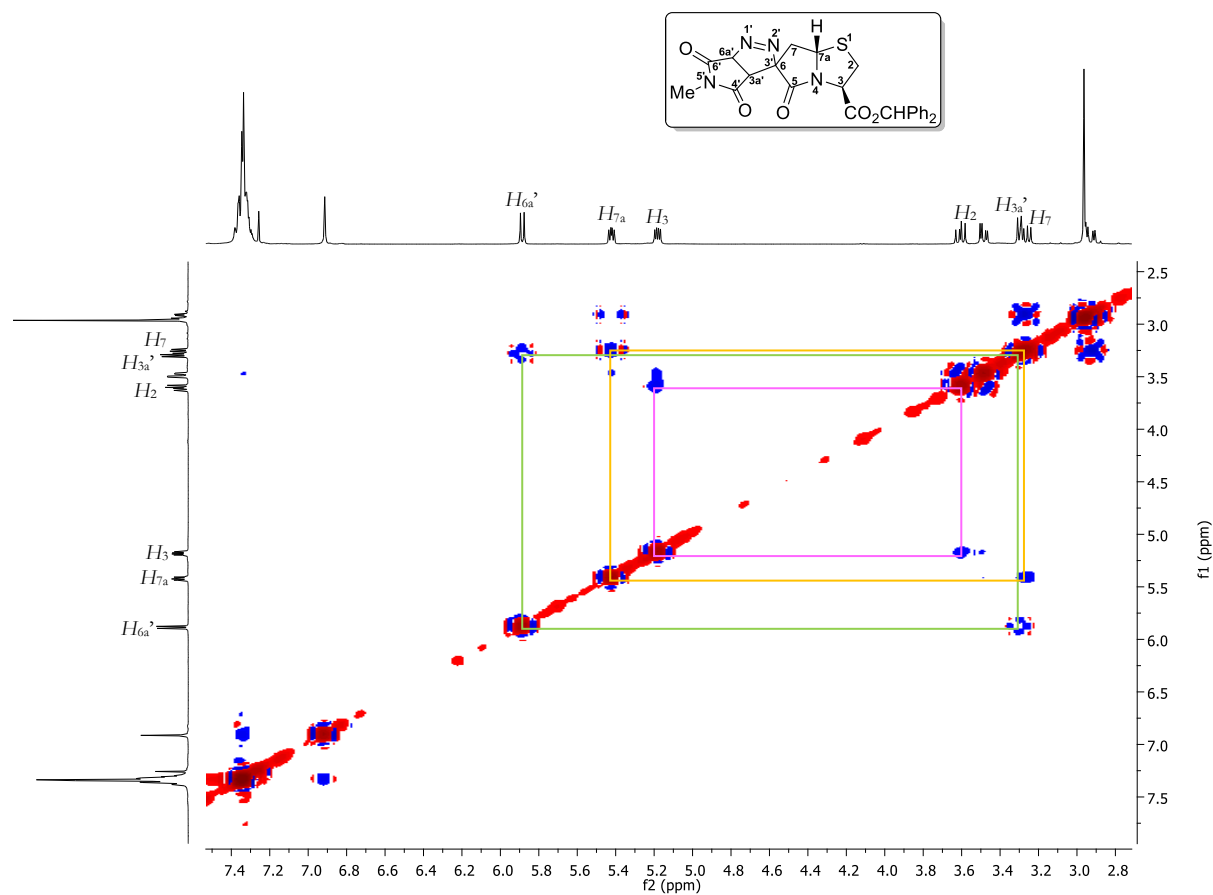


Figura 3.3. Expansão do espectro de NOESY do composto **3.6** (CDCl_3).

Nas figuras 3.4 e 3.5 estão representadas expansões dos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear, HSQC e HMBC, que permitem retirar mais informações com o objetivo de confirmar a estrutura proposta. Pela análise do espectro de HSQC, é possível confirmar-se a atribuição correta dos prótons H-3a' e H-7, pois o carbono correspondente ao próton H-3a' apresenta um desvio químico superior devido à influência do carbono carbonílico, e os prótons H-7 diastereotópicos apresentam correlação com um carbono com menor desvio químico. Por fim, através da análise do espectro de HMBC podem verificar-se as correlações dos prótons H-3a', H-6a' e do grupo metilo com os carbonos carbonílicos do anel de pirazolina, e a correlação do próton H-3 e o próton do benzidrilo (CHPh_2) com o carbono carbonílico do éster benzidrílico.

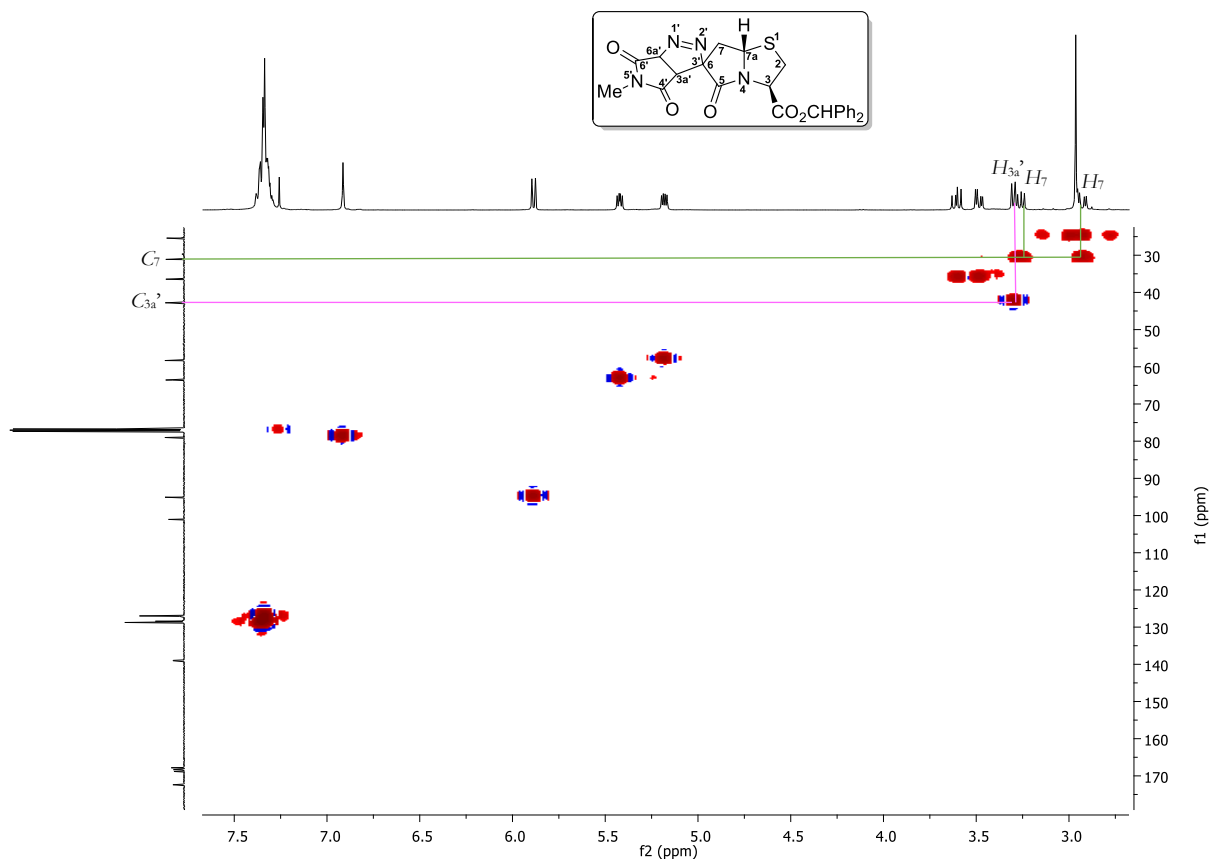


Figura 3.4. Expansão do espectro de HSQC do composto **3.6** (CDCl_3).

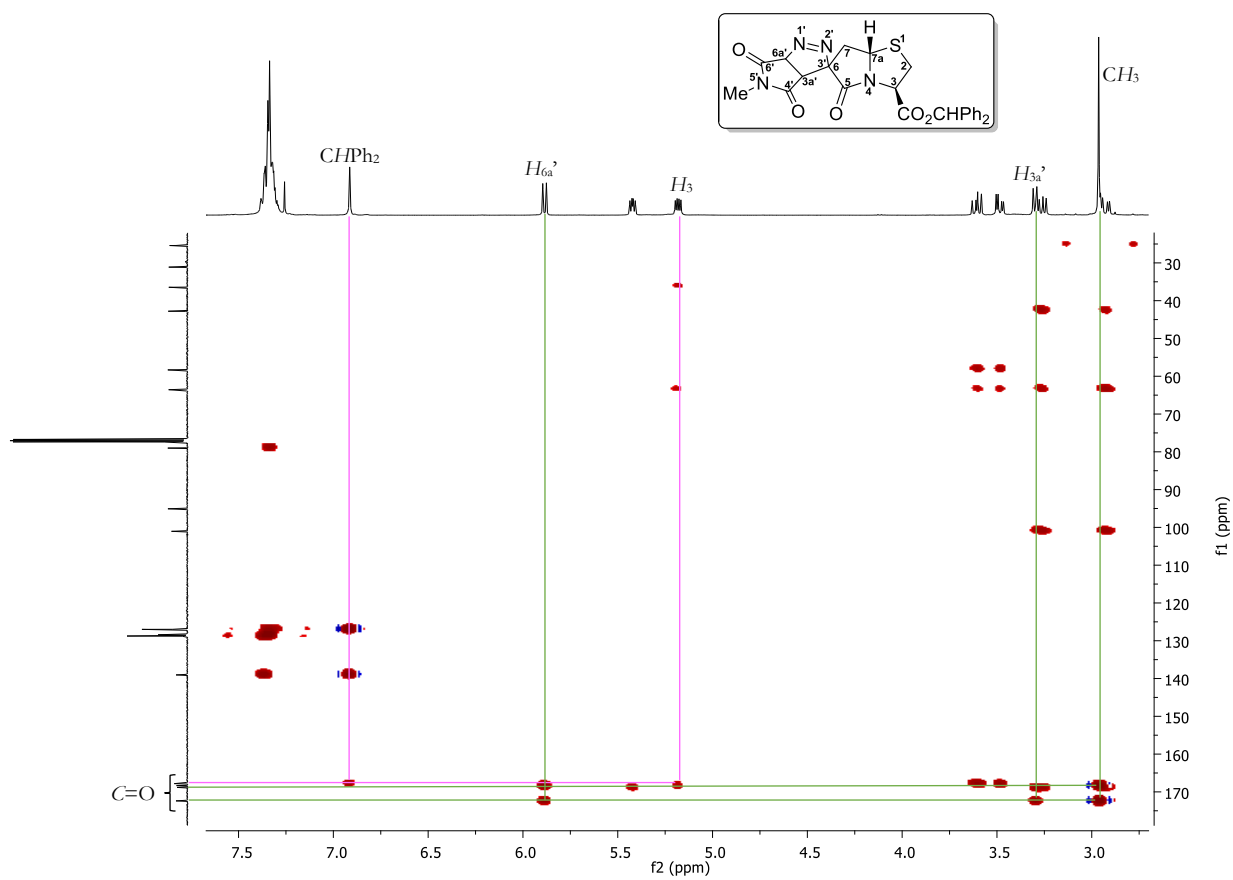
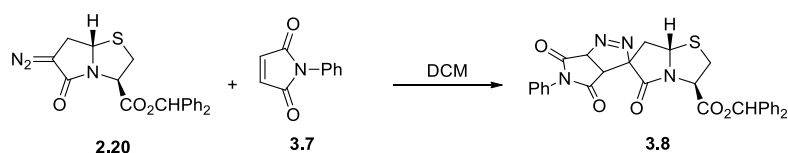


Figura 3.5. Expansão do espectro de HMBC do composto **3.6** (CDCl_3).

Quando se utilizou a *N*-fenilmaleimida **3.7** (1.6 equivalentes) como dipolarófilo na reação de ciclo-adição 1,3-dipolar com a diazo- γ -lactama **2.20** foram igualmente realizados diferentes ensaios fazendo variar a temperatura e o tempo de reação (tabela 3.4). A reação com a maleimida **3.7**, a uma temperatura de -10 °C em diclorometano, conduziu à obtenção da espiro- γ -lactama **3.8**, após 6 horas de reação, com um rendimento de 20%, após purificação por cromatografia em coluna (reação 1). O aumento da temperatura para 0 °C permitiu obter o derivado espirocíclico **3.8**, após 5 horas de reação, com um rendimento de 31% (reação 2). Por sua vez, quando se aumentou o tempo de reação (16 horas), verificou-se uma diminuição significativa do rendimento para 19% (reação 3).

Nesta reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com a *N*-fenilmaleimida (**3.7**), temos evidência da formação de dois produtos na proporção (72:28), sendo possível observar, por espectroscopia de RMN protônico, duplicação de todos os sinais correspondentes aos prótons da espiro- γ -lactama **3.8**. A formação destes estereoisômeros resulta da adição do dipolarófilo simétrico pelo lado α e β da γ -lactama. A estereosseletividade observada nesta reação pode ser explicada considerando que o produto maioritário resulta da adição pelo lado com menor impedimento estéreo da γ -lactama.

Tabela 3.4. Otimização das condições de reação de ciclo-adição 1,3-dipolar da diazo- γ -lactama **2.20** com a *N*-fenilmaleimida (**3.7**).



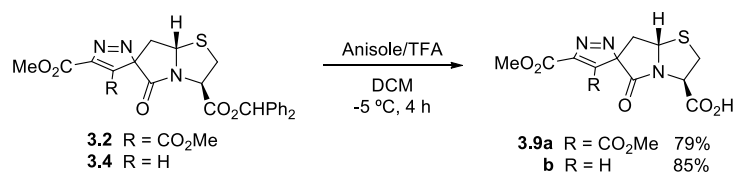
Reação	Condições de reação	Rendimento (3.8)
1	-10 °C, 6 h	20% (69:31)
2	0 °C, 5 h	31% (72:28)
3	0 °C, 16 h	19% (61:39)

3.3. Síntese de espiro- γ -lactamas ácidas

Estudos anteriores desenvolvidos pelo nosso grupo de investigação demonstraram que a reação de conversão dos ésteres benzidrílicos aos respectivos derivados ácidos permitia a obtenção de espiro-3*H*-pirazol- β -lactama com melhores propriedades biológicas.¹³⁶ Deste modo, foi realizada a conversão das espiro- γ -lactamas ésteres para os seus derivados ácidos.

A conversão das espiro-3*H*-pirazol- γ -lactamas ésteres **3.2** e **3.4** foi realizada com ácido trifluoracético na presença de anisole, em diclorometano, à temperatura de -5 °C, durante 4 horas (esquema 3.2).

O isolamento da espiro-3*H*-pirazol- γ -lactama ácida **3.9** foi simples. Através de um tratamento com solução de hidrogenocarbonato de sódio, extração com acetato de etilo, seguido de neutralização da fase aquosa com uma solução de ácido clorídrico (1 M), e posterior extração com acetato de etilo. O composto **3.9a** derivado do acetileno dicarboxilato de dimetilo foi obtido com um rendimento de 79%. Seguindo o mesmo método de purificação, a espiro-3*H*-pirazol- γ -lactama ácida **3.9b** derivada do propiolato de metilo foi sintetizada com um rendimento de 85% (esquema 3.2).



Esquema 3.2

O espetro de RMN protónico da espiro- γ -lactama ácida **3.9b** está representado na figura 3.6. Pela análise do espetro podem ser identificados alguns sinais que estão acordo com a estrutura proposta, tais como: o singlete dos protões do éster metílico (3.93 ppm) e o singlete com desvio químico de 6.75 ppm correspondente ao protão do anel 3*H*-pirazol (H-4'). Os restantes sinais presentes no espetro são referentes aos protões do núcleo γ -lactâmico.

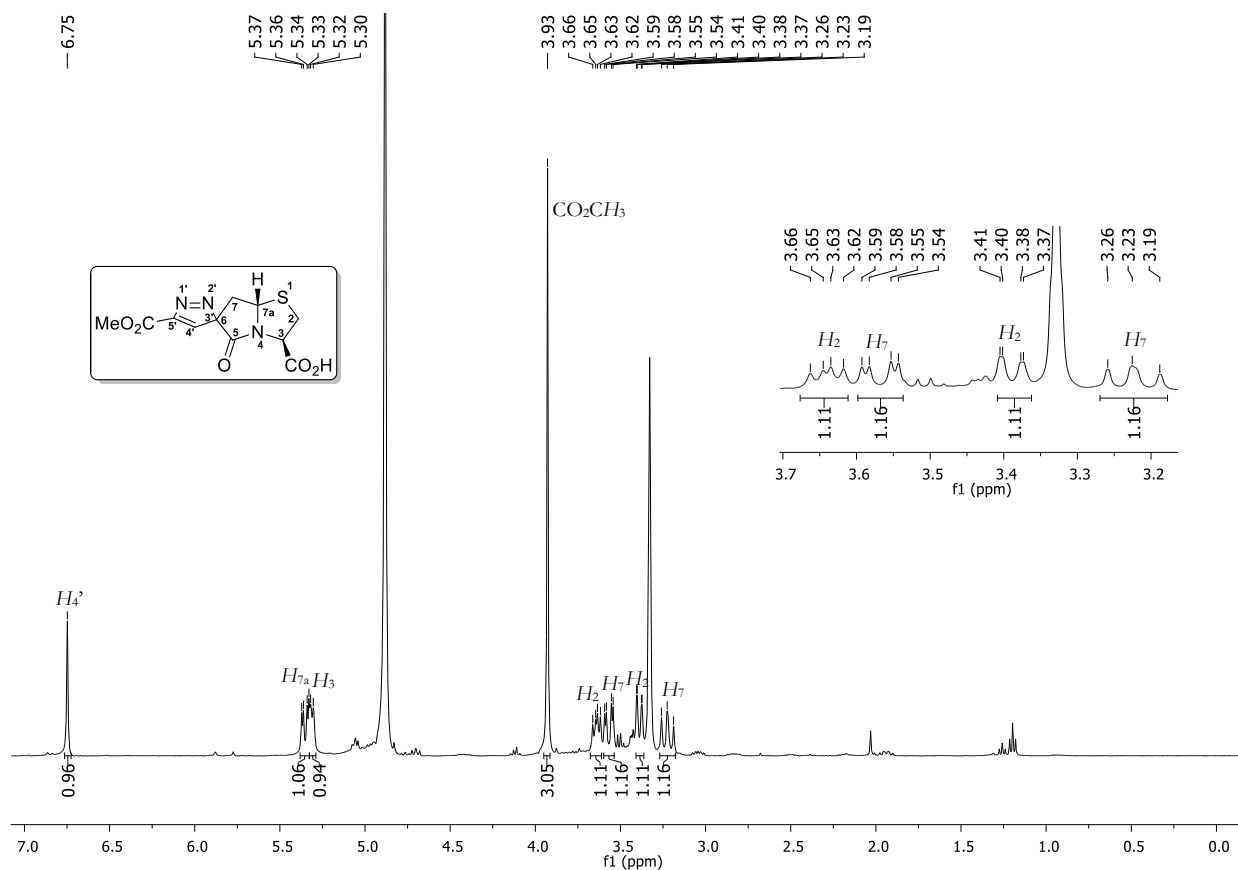


Figura 3.6. Espectro de RMN protônico do composto **3.9b** (CD_3OD).

A análise do espectro bidimensional NOESY, apresentado na figura 3.7, permite observar a correlação entre os prótons $\text{H}-4'$ e um dos prótons $\text{H}-7$. Podem também verificar-se picos cruzados entre o próton $\text{H}-7a$ e os prótons $\text{H}-7$, e picos cruzados entre o próton $\text{H}-3$ e os prótons $\text{H}-2$, evidenciando que estes prótons diastereotópicos ficaram com desvios químicos mais distanciados neste derivado ácido espirocíclico.

Na figura 3.8 está representada a expansão do espectro bidimensional de correlação heteronuclear, HSQC, que permite retirar mais informações com o objetivo de confirmar a estrutura proposta. Pela análise do espectro de HSQC, é possível confirmar-se a atribuição correta dos prótons $\text{H}-2$ e $\text{H}-7$, pois o carbono correspondente aos prótons diastereotópicos $\text{H}-2$ apresenta um desvio químico superior devido à influência do carbono carbonílico, e os prótons $\text{H}-7$ diastereotópicos apresentam correlação com um carbono com menor desvio químico.

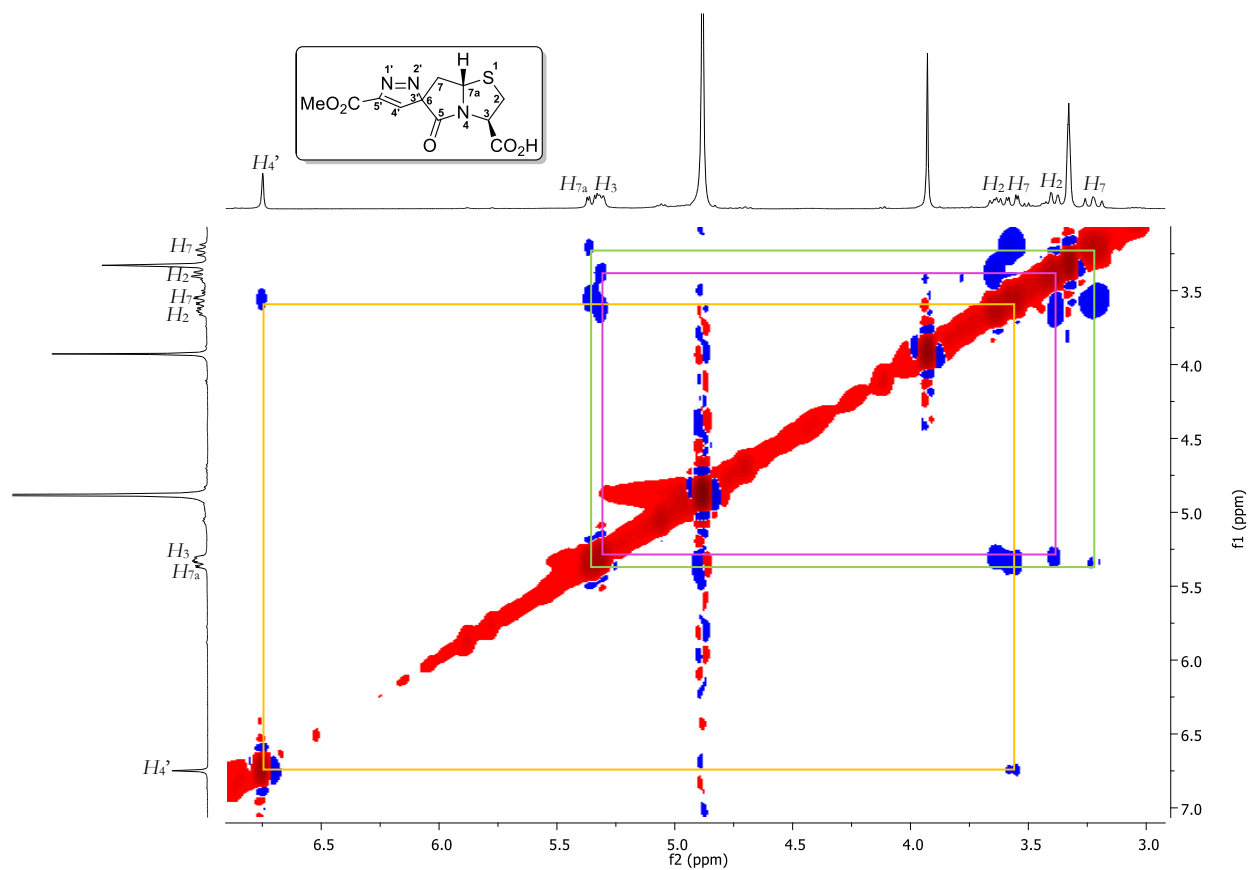


Figura 3.7. Expansão do espectro de NOESY do composto **3.9b** (CD_3OD).

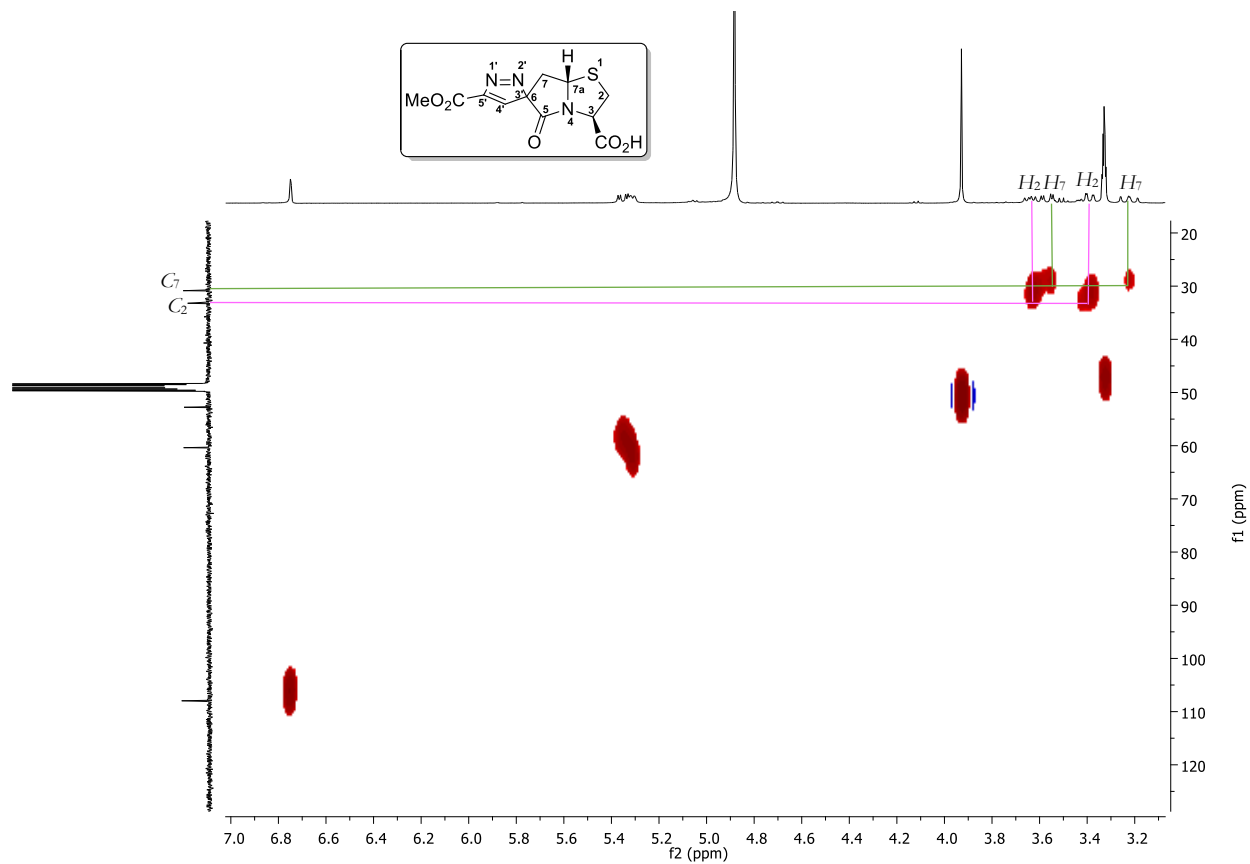
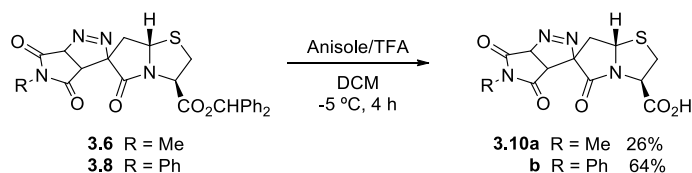


Figura 3.8. Expansão do espectro de HSQC do composto **3.9b** (CD_3OD).

Foi também estudada a conversão das espiro-pirazolina- γ -lactamas ésteres (**3.6** e **3.8**) para os seus derivados ácidos. As reações de conversão foram realizadas com ácido trifluoracético na presença de anisole, em diclorometano, à temperatura de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 horas (esquemas 3.3).

Como realizado no composto **3.9**, a espiro-pirazolina- γ -lactama ácida **3.10** foi purificada através de um tratamento simples com hidrogenocarbonato de sódio e posterior acidificação com ácido clorídrico (1 M). O composto **3.10a** derivado da *N*-metilmaleimida foi obtido com um rendimento de 26%. A espiro-pirazolina- γ -lactama ácida **3.10b** derivada da *N*-fenilmaleimida foi sintetizada com um rendimento de 64%, após isolamento seguindo a mesma metodologia (esquema 3.5).



Esquema 3.3

Apesar de existir evidência da formação do ácido **3.10a** é necessária uma otimização, porque o espectro de RMN protónico indica a presença de um composto secundário, formado nesta reação. Por análise do espectro de RMN protónico do ácido **3.10b** temos também evidência da sua desproteção e da presença de um produto secundário, sendo que este foi obtido a partir de uma mistura de diastereoisómeros do éster **3.8**, derivado da *N*-fenilmaleimida **3.7**.

3.4. Avaliação de atividade biológica^a

Os estudos anteriores realizados pelo grupo de investigação sobre a síntese e avaliação biológica de β -lactamas espirocíclicas permitiram o desenvolvimento de compostos líder com propriedades biológicas muito interessantes.¹³⁶ Como descrito anteriormente, as espiro- γ -lactamas são moléculas de grande interesse sintético devido às suas propriedades biológicas.

^a Os estudos da atividade de inibição HIV por espiro- γ -lactamas foram realizados por Nuno Guerreiro Alves (aluno de doutoramento) em colaboração com o grupo de investigação do Professor Doutor Nuno Taveira (iMed.Ulisboa).

Desta forma, foi estudada a citotoxicidade e a atividade de inibição do vírus de imunodeficiência humana (HIV-1), de três compostos (**3.2**, **3.9a** e **3.9b**) preparados no decurso deste trabalho, análogos das espiro- β -lactamas que demonstraram possuir atividade biológica (figura 3.9).

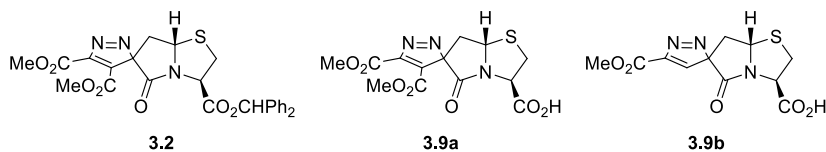


Figura 3.9. Compostos espiro- γ -lactâmicos cuja atividade biológica foi estudada.

Inicialmente, foi avaliado o potencial de citotoxicidade *in vitro* destes compostos em células TZM-bl e verificou-se que, para uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, nenhum dos compostos é tóxico para as células utilizadas (tabela 3.5).

Tabela 3.5. Valores de CC50 das espiro- γ -lactamas.

Espiro- γ -lactama	CC50 (μM)
3.2	424.7
3.9a	728.6
3.9b	270.3

Foi testada a atividade antiviral dos 3 compostos em estudo sobre uma estirpe de HIV-1 (tropismo X4), com 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada composto como ensaio de bioatividade preliminar. Apenas se pode considerar que um composto possui atividade anti-HIV promissora se a percentagem inibitória máxima (MIP), a 10 $\mu\text{g/mL}$, for maior que 80%. No entanto, nenhuma das 3 espiro- γ -lactamas apresentou atividade anti-HIV significativa, observando-se atividades a variar entre os 30% a 42% (tabela 3.6). Verifica-se, portanto, que estes resultados de atividade são inferiores ao valor limiar da MIP a 10 $\mu\text{g/mL}$ (80%).

Tabela 3.6. Percentagem inibitória máxima (MIP) anti-HIV a 10 $\mu\text{g/mL}$ das espiro- γ -lactamas.

Espiro- γ -lactama	MIP 10 $\mu\text{g/mL}$ (HIV-1)
3.2	36%
3.9a	42%
3.9b	30%

O procedimento experimental foi repetido utilizando 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dos compostos, de modo a confirmar os resultados obtidos para a concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De notar que estes ensaios foram repetidos com uma concentração 5 vezes maior em comparação com aquela utilizada nos ensaios preliminares, e uma concentração inibitória pouco satisfatória.

Os resultados mostraram comportamentos diferentes entre as espiro- γ -lactamas, sendo que, de um modo geral, confirmaram a falta de atividade anti-HIV dos compostos. De fato, os resultados que o composto **3.2** apresentou permitem especular que este pode promover a infeção viral nestas condições de ensaios biológicos (tabela 3.7).

Tabela 3.7. Percentagem inibitória máxima (MIP) anti-HIV a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das espiro- γ -lactamas.

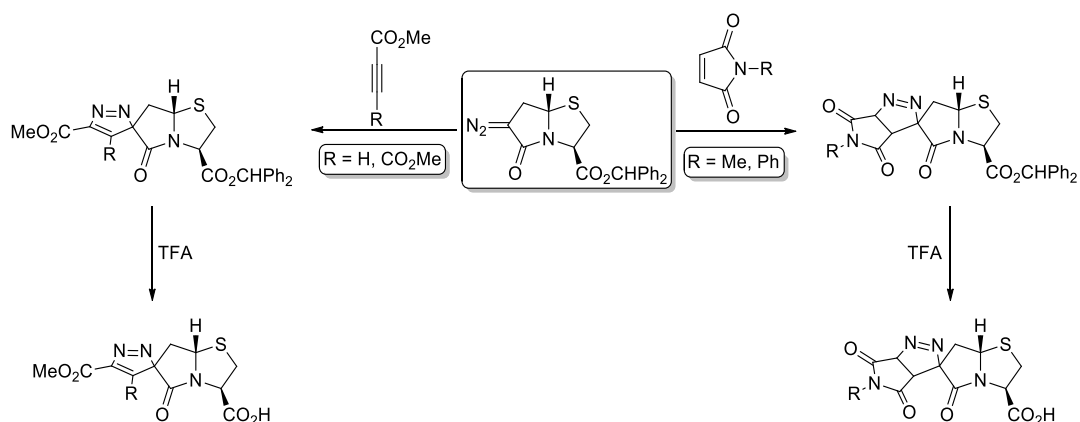
Espiro- γ -lactama	MIP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (HIV-1)
3.2	-64%
3.9a	8%
3.9b	citotóxico

As três espiro- γ -lactamas foram desenvolvidas e sintetizadas como análogos de 5 membros de compostos β -lactâmicos espirocíclicos, que demonstraram possuir atividade anti-HIV.¹³⁶ Esta modificação estrutural foi estudada com o objetivo de alcançar moléculas mais estáveis e com menor tensão de anel. No entanto, nenhum dos compostos γ -lactâmicos espirocíclicos que foram avaliados apresentou atividade promissora contra o HIV.

3.5. Conclusão

Neste capítulo foram estudadas as reações de ciclo-adição 1,3-dipolar de diazo- γ -lactamas (sintetizadas no capítulo 2) com diferentes dipolarófilos, alquinos deficientes em eletrões e maleimidadas *N*-substituídas. Esta reatividade permitiu a síntese de novas espiro- γ -lactamas quirais, derivadas da *L*-cisteína, com rendimentos moderados. As reações apresentadas ocorreram de forma diastereosseletiva, o que resultou da aproximação do dipolarófilo pela face β , o lado com menor impedimento estérico, da γ -lactama. Por sua vez, procedeu-se à conversão destes compostos γ -lactâmicos espirocíclicos ésteres para os seus derivados ácidos, visto que está descrito que as espiro-3*H*-pirazol- β -lactamas ácidas possuem melhores propriedades

biológicas. Deste modo, foram sintetizadas espiro-3*H*-pirazol- γ -lactamas ácidas e espiro-pirazolina- γ -lactamas ácidas com bons rendimentos (esquema 3.6).



Esquema 3.4

No presente capítulo foram também apresentados todos os resultados dos ensaios biológicos, citotoxicidade e atividade de inibição do vírus de imunodeficiência humana (HIV-1), realizados com 3 dos compostos sintetizados neste trabalho. Apesar destes compostos não apresentarem atividade anti-HIV, estes resultados permitiram um pequeno avanço na investigação desenvolvida para estes compostos e outros derivados. Futuramente, estudos adicionais são necessários para explorar a síntese de outros derivados, e estudar a possível atividade anti-*Plasmodium berghei* que estes compostos γ -lactâmicos espirocíclicos poderão possuir.

CAPÍTULO IV

PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo encontram-se descritos os instrumentos referentes às técnicas de identificação e caracterização utilizadas ao longo deste trabalho, bem como os métodos necessários à utilização adequada de reagentes e solventes. Dele fazem também parte os procedimentos seguidos com vista à síntese dos compostos descritos nos Capítulos II e III, bem como as respectivas caracterizações. A caracterização dos compostos foi efetuada através de ponto de fusão, espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), espectroscopia de infravermelho (IV), espectrometria de massa de alta resolução (EMAR), e rotação específica $[\alpha]$.

4.1. Instrumentação

Cromatografia

Nas reações cuja evolução foi acompanhada por cromatografia em camada fina utilizaram-se placas de sílica 60 F₂₅₄, com suporte de alumínio, fornecidas pela Macherey-Nagel. Para as cromatografias em coluna foi utilizado gel de sílica 60 (0,035-0,070 mm) fornecida pela Acros Organics.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III, operando a 400 MHz (^1H) e a 100 MHz (^{13}C).

Os solventes deuterados utilizados foram o clorofórmio (CDCl_3), o dimetilsulfóxido ($\text{DMSO}-d_6$) e o metanol (CH_3OD). Os desvios químicos (δ) são apresentados em ppm relativamente ao padrão interno trimetilsilano (TMS) e os valores das constantes de acoplamento (J) são expressos em Hz.

Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrofotómetro *Agilent Technologies Cary 630 FTIR*, utilizando o método de refletância total atenuada (ATR).

Espectrometria de Massa de Alta Resolução

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos num espectrómetro *TOF VG Autospec M* com ionização por *electrospray* (ESI).

Pontos de Fusão

Os pontos de fusão foram determinados num aparelho de fase aquecida *Falc* (pelo método de capilar de vidro aberto).

Rotação Específica

Os valores da rotação específica, $[\alpha]$, dos compostos opticamente ativos foram determinados num polarímetro digital automático *Optical Activity AA-5*.

4.2. Solventes e reagentes

Foram utilizados reagentes comercialmente disponíveis com elevado grau de pureza, sem purificação adicional. Outros reagentes foram por nós sintetizados seguindo procedimentos conhecidos e descritos na literatura.

Todos os solventes foram usados secos e destilados, de acordo com os procedimentos que se seguem, exceto em reações ou extrações com água, onde foram utilizados apenas destilados.

Acetato de etilo

Este solvente foi refluxado durante 3 horas na presença de carbonato de potássio e de seguida destilado.

Diclorometano

Foi refluxado na presença de cloreto de cálcio durante 3 horas, destilado e guardado sobre peneiros moleculares 4 Å.

Acetonitrilo

Este solvente foi refluxado durante 3 horas na presença de pentóxido de fósforo e de seguida destilado.

Etanol e metanol

Aquecidos a refluxo durante 2 horas com magnésio na presença de palhetas de iodo, seguindo-se a destilação a partir do alcóxido de sódio, e guardados sobre peneiros moleculares 3 Å.

Éter etílico, hexano, tetra-hidrofurano e tolueno

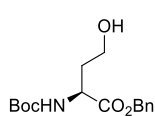
Estes solventes foram secos em refluxo, na presença de fios de sódio e benzofenona. Posteriormente foram destilados e guardados sobre peneiros moleculares 4 Å.

Trietilamina

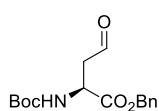
O reagente foi armazenado sobre palhetas de hidróxido de sódio.

Os outros solventes e reagentes foram fornecidos pela Aldrich, Acros Organics, Alfa Aesar ou Fluorochem e utilizados diretamente, sem qualquer tipo de purificação adicional.

4.3. Métodos Sintéticos referentes ao Capítulo II

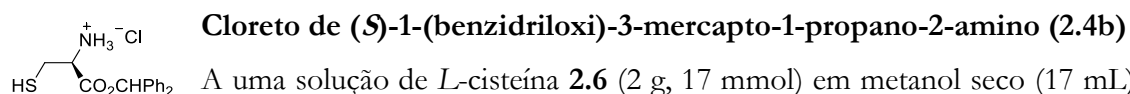
**(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-hidroxi-butanoato de benzilo (2.2)**

O composto **2.2** foi sintetizado a partir de um procedimento que se encontra na literatura.¹²³ Num balão de 2 tubuladuras colocou-se Boc-*L*-Asp-OBzl **2.1** (5 g, 15 mmol) dissolvido em tetra-hidrofurano (75 mL). Sob atmosfera inerte e à temperatura de -15 °C. Através do septo, foi adicionado *N*-metil morfolina (1.9 mL, 17 mmol, 1.1 equiv.) e cloroformato de etilo (1.8 mL, 19 mmol, 1.2 equiv.). Após 1 hora, filtrou-se a mistura e lavou-se com THF (20 mL). A fase orgânica foi arrefecida a 0 °C e adicionou-se boro-hidreto de sódio (0.88 g, 23 mmol, 1.5 equiv.), seguida da adição de H₂O (15 mL), gota a gota. Após 30 minutos a mistura reacional foi neutralizada com uma solução saturada de NH₄Cl (20 mL), agitada por 10 minutos, e extraiu-se com acetato de etilo (4 x 20 mL). Lavou-se a fase orgânica com solução saturada de NaCl. Adicionou-se agente secante (Na₂SO₄) e filtrou-se. Após evaporar, o composto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:2)]. Rendimento: 85%. RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.44 (s, 9H, (CH₃)₃OCO), 1.60 - 1.63 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 2.15 - 2.19 (m, 1H, CH₂CH₂OH), 3.12 - 3.15 (m, 1H, OH), 3.63 - 3.71 (m, 2H, CH₂OH), 4.51 - 4.56 (m, 1H, CH), 5.16 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH₂Ph), 5.20 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH₂Ph), 5.35 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, NH), 7.31 - 7.39 (m, 5H, ArH); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 28.25, 36.05, 50.72, 58.27, 67.28, 80.45, 128.28, 128.50, 128.63, 132.22, 156.42, 172.71.

**(S)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-4-oxobutanoato de benzilo (2.3)**

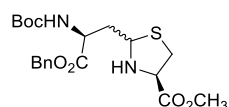
O composto **2.3** foi sintetizado a partir de um procedimento que se encontra na literatura.¹²⁴ Num balão de 3 tubuladuras colocou-se diclorometano seco (10 mL) e cloreto de oxalilo (2 M, 10 mL, 20 mmol, 1.1 equiv.) através do septo. Com o balão em atmosfera inerte, sob agitação e à temperatura de -60 °C. A esta solução adicionou-se dimetilsulfóxido (3 mL, 44 mmol, 2.4 equiv.) em diclorometano seco (10 mL), através do septo. Após 10 minutos, adicionou-se o composto **2.2** (5.6 g, 18 mmol) em diclorometano seco (19 mL), através do funil de adição. Após 30 minutos, tratou-se a mistura reacional com trietilamina (13 mL, 93 mmol, 5.1 equiv.), e aqueceu-se a solução à temperatura ambiente. Adicionou-se água (20 mL), separou-se a fase orgânica e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (3 x 20 mL). Secou-se com Na₂SO₄ e filtrou-se. Após evaporar, purificou-se o composto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:3)]. Rendimento: 76%. RMN ¹H (CDCl₃)

δ 1.42 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{OCO}$), 3.03 - 3.09 (m, 2H, β -H), 4.62 - 4.63 (m, 1H, α -H), 5.16 - 5.17 (m, 2H, OCH_2), 5.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, α -NH), 7.33 - 7.38 (m, 5H, ArH), 9.71 (s, 1H, CHO).



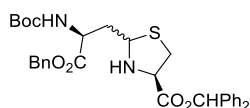
A uma solução de *L*-cisteína **2.6** (2 g, 17 mmol) em metanol seco (17 mL) foi adicionada uma solução de difenildiazometano **2.7** (3.3 g, 17 mmol) em diclorometano seco (51 mL). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente, em atmosfera inerte. Após 24 horas adicionou-se uma segunda porção de difenildiazometano **2.7** (1.4 g, 6.8 mmol, 0.4 equiv.). No final de 94 h de reação, o solvente foi evaporado a pressão reduzida sem aquecimento. Adicionou-se éter etílico seco (51 mL). Num banho de gelo, adicionou-se HCl (3 M), gota a gota, até se verificar pH 1. Os sais brancos precipitaram imediatamente e foram filtrados. Rendimento: 76%. p.f. 94.5-95.1 °C. IV (ATR) ν 695, 1216, 1491, 1742, 2942, 3390 cm^{-1} .

4.3.1. Síntese de Tiazolidinas



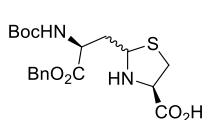
(4R)-2-((S)-3-(benziloxi)-2-((tert)-butoxicarbonil)amino)-3-oxopropil)tiazolidina-4-carboxilato de metilo (2.8a)

A uma solução do hidrocloreto do éster metílico da *L*-cisteína **2.4a** (468 mg, 2.73 mmol) em H_2O (7.5 mL) foi adicionado KHCO_3 (273 mg, 2.73 mmol). Seguidamente adicionou-se uma solução do aldeído **2.3** (840 mg, 2.73 mmol) em etanol (7.5 mL). A mistura reacional ficou em agitação à temperatura ambiente durante 4.5 horas. Adicionou-se H_2O (15 mL) e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (3 x). Secou-se com Na_2SO_4 , filtrou-se e evaporou-se. O produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:2)]. Rendimento: 73%. Por espectroscopia de RMN protónico foram observados 2 diastereoisómeros com razão aproximadamente de 50:50. RMN ^1H (CD_3OD) δ 1.44 (s, 18H, $(\text{CH}_3)_3\text{OCO}$), 2.13 - 2.17 e 2.27 - 2.32 (2 x m, 4H, H-6), 2.83 - 2.93 e 3.23 - 3.31 (2 x m, 4H, H-5), 3.75 e 3.77 (2 x s, 6H, CO_2CH_3), 3.75 - 3.79 e 3.87 - 3.90 (2 x m, 2H, H-4), 4.43 (sl, 2H), 4.57 (sl, 1H), 4.81 - 4.85 (m, 1H), 5.08 - 5.23 (m, 4H, CH_2Ph), 5.49 - 5.55 (m, 2H, NH), 7.33 - 7.37 (m, 10H, ArH).



(4R)-2-((S)-3-(benziloxi)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-oxopropil)tiiazolidina-4-carboxilato de benzidrilo (2.8b)

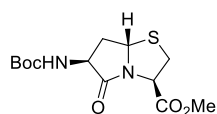
A uma solução do hidrocloreto do éster benzidrílico da *L*-cisteína **2.4b** (596 mg, 1.84 mmol) em etanol (5 mL) foi adicionado KHCO_3 (184 mg, 1.84 mmol). Seguidamente, adicionou-se a solução do aldeído **2.3** (568 mg, 1.84 mmol) em etanol (5 mL). A mistura reacional foi agitada sob atmosfera inerte, à temperatura ambiente. Após 4.5 horas de reação concentrou-se a mistura reacional por evaporação. Adicionou-se H_2O (25 mL) e extraiu-se com diclorometano. Secou-se com Na_2SO_4 , filtrou-se e evaporou-se. Adicionou-se éter etílico e filtrou-se o sólido branco. O restante foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:3)]. Rendimento: 49%. Por espectroscopia de RMN protónico foram observados 2 diastereoisómeros com razão aproximadamente de 57:43. p.f. 133.2-134.5 °C e 137.3-138.5 °C. IV (ATR) ν 699, 1102, 1507, 1709, 1736 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1.42 (s, 18H, $(\text{CH}_3)_3\text{OCO}$), 2.28 - 2.33 e 2.58 - 2.66 (2 x m, 4H, H-6), 2.83 - 2.88 e 3.28 - 3.37 (2 x m, 4H, H-5), 3.86 - 3.92 e 3.99 - 4.05 (2 x m, 2H, H-4), 4.37 - 4.46 (m, 2H), 4.55 (sl, 1H), 4.79 - 4.86 (m, 1H), 5.09 - 5.22 (m, 4H, CH_2Ph), 5.46 - 5.51 (m, 2H, NH), 6.92 e 6.94 (2 x s, 2H, CHPh_2), 7.31 - 7.37 (m, 30H, ArH); RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) δ 27.78, 28.10, 36.62, 37.93, 52.87, 64.31, 64.38, 65.94, 67.27, 77.01, 77.10, 78.31, 78.36, 126.35, 126.45, 127.66, 127.97, 127.79, 128.35, 128.52, 135.87, 135.96, 140.21, 140.25, 155.53, 169.97, 170.08, 171.92, 172.04.



Ácido (4R)-2-((S)-3-(benziloxi)-2-((tert-butoxicarbonil)amino)-3-oxopropil)tiiazolidina-4-carboxílico (2.13)

A uma solução de *L*-cisteína **2.6** (0.9 g, 7.5 mmol, 0.8 equiv.) em metanol (65 mL) adicionou-se uma solução do aldeído **2.3** (2.9 g, 9.4 mmol) em metanol (41 mL), e a mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente durante 24 horas. Após esse tempo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O composto **2.13** foi purificado por cristalização e obtido um sólido branco como uma mistura de diastereoisómeros (64:36). Rendimento: 95%. p.f. 97.2-99.1 °C e 109.4-111.7 °C. IV (ATR) ν 695, 1157, 1365, 1523, 1712 cm^{-1} ; RMN ^1H (CD_3OD) δ 1.44 (s, 18H, $(\text{CH}_3)_3\text{OCO}$), 2.10 - 2.18 e 2.21 - 2.30 (2 x m, 4H, H-6), 3.03 - 3.13 e 3.29 - 3.31 (2 x m, 4H, H-5), 3.89 - 3.93 e 4.12 - 4.16 (2 x m, 2H, H-4), 4.28 - 4.31 e 4.39 - 4.42 (2 x m, 2H, H-7), 4.57 - 4.61 e 4.80 - 4.84 (2 x m, 2H, H-2), 5.15-5.18 (m, 4H, CH_2Ph), 5.21 - 5.24 (m, 2H, NH) 7.33 - 7.39 (m, 10H, ArH); RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) δ 27.78, 28.11, 35.95, 36.97, 37.29, 38.36, 52.48, 52.75, 64.11, 65.43, 65.92, 67.05, 73.90, 78.33, 127.62, 127.70, 127.97, 128.35, 135.92, 135.96, 155.09, 155.51, 171.98, 172.06, 172.31, 172.56; EMAR (ESI): calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}^+]$ 411.1584, encontrada 411.1594; $[\alpha]_D^{25} = -104$ (c 0.5, MeOH).

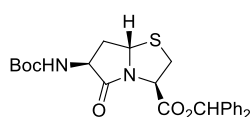
4.3.2. Síntese de γ -lactamas bicíclicas



(3*R*,6*S*,7*aS*)-6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de metilo (**2.5a**)

1^a via - O composto **2.5a** foi sintetizado por adaptação de um procedimento que se encontra na literatura.¹²⁵ Uma solução do aldeído **2.3** (375 mg, 1.22 mmol) e do hidrocloreto do éster metílico da *L*-cisteína **2.4a** (209 mg, 1.22 mmol) em piridina (2 mL), foi agitada à temperatura ambiente, durante 5 horas. Seguidamente a mistura reacional foi aquecida a refluxo. Após 19 horas, evaporou-se o solvente e adicionou-se tolueno de modo a facilitar a remoção de piridina. Purificou-se o composto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:3)]. Rendimento: 58%. RMN ¹H (CDCl₃) δ 1.45 (s, 9H, (CH₃)₃OCO), 2.39 - 2.46 (m, 1H, H-7), 2.67 - 2.73 (m, 1H, H-7), 3.38 (dd, *J* = 11.5 e 4.5 Hz, 1H, H-2), 3.48 (dd, *J* = 11.5 e 8.6 Hz, 1H, H-2), 3.78 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.39 - 4.40 (m, 1H, H-6), 5.00 (sl, 1H, NH), 5.05 (dd, *J* = 8.6 e 4.5 Hz, 1H, H-3), 5.17 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-7a).

2^a via - A uma solução da tiazolidina éster de metilo **2.8a** (384 mg, 0.90 mmol) em tolueno (25 mL) foi adicionada uma quantidade catalítica de ácido *p*-toluenosulfônico. A mistura reacional foi aquecida à temperatura de refluxo. Após 117 horas, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:3)]. Rendimento: 36%. O composto foi identificado por comparação com o espectro de RMN ¹H do composto sintetizado pela 1^a via.

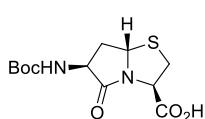


(3*R*,6*S*,7*aS*)-6-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de benzidrilo (**2.5b**)

1^a via - O composto **2.5b** foi sintetizado por adaptação de um procedimento que se encontra na literatura.¹²⁵ Uma solução do aldeído **2.3** (462 mg, 1.43 mmol) e do hidrocloreto do éster benzidrílico da *L*-cisteína **2.4b** (440 mg, 1.43 mmol) em piridina (2 mL), foi agitada à temperatura ambiente, durante 5 horas. Seguidamente a mistura reacional foi aquecida a refluxo. Após 19 horas, evaporou-se o solvente e adicionou-se tolueno de modo a facilitar a remoção de piridina. Purificou-se o composto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:3)]. A lavagem com Et₂O conduziu à obtenção do produto como um sólido branco que foi

filtrado. Rendimento: 6%. O composto foi identificado por comparação com o espectro de RMN ^1H do composto sintetizado pela 2^a via.

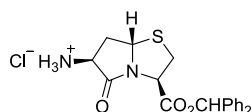
2^a via – A uma solução da tiazolidina éster de benzidrilo **2.8b** (181 mg, 0.35 mmol) em tolueno (35 mL) foi adicionada uma quantidade catalítica de ácido *p*-toluenosulfônico. A mistura reacional foi aquecida à temperatura de refluxo. Após 48 horas, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = (1:3)]. Adicionou-se éter de petróleo e filtrou-se o sólido branco. Rendimento: 45%. p.f. 122.4-123.9 °C. IV (ATR) ν 690, 1091, 1609, 1698, 3389 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1.45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{OCO}$), 2.37 - 2.44 (m, 1H, H-7), 2.66 - 2.72 (m, 1H, H-7), 3.36 (dd, $J = 11.5$ e 4.4 Hz, 1H, H-2), 3.49 (dd, $J = 11.4$ e 8.6 Hz, 1H, H-2), 4.37-4.41 (m, 1H, H-6), 4.97 (sl, 1H, NH), 5.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H, H-7a), 5.16 (dd, $J = 8.7$ e 4.4 Hz, 1H, H-3), 6.89 (s, 1H, CHPh_2), 7.30 - 7.37 (m, 10H, ArH); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 28.31, 30.41, 36.91, 52.03, 58.69, 64.06, 65.33, 78.59, 80.41, 127.00, 127.06, 128.29, 128.68, 128.71, 139.29, 155.24, 168.66, 175.06.



Ácido (3R,6S,7aS)-6-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxílico (2.14)

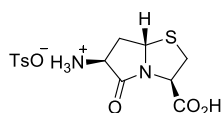
Uma solução da tiazolidina ácida **2.13** (2.8 g, 6.9 mmol, 1.0 equiv.) em tolueno (138 mL) colocou-se a refluxo durante 48 horas. Após este tempo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido numa pequena quantidade de diclorometano e tratado com uma solução de hidrogenocarbonato de sódio, deixando sob agitação durante alguns minutos. Extração com diclorometano, guardando a fase aquosa. Tratamento com solução de HCl (3 M), até pH 1. Extração com acetato de etilo. Secou-se com Na_2SO_4 , filtrou-se e evaporou-se. Rendimento: 62%. RMN ^1H (CDCl_3) δ 1.45 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{OCO}$), 2.39 - 2.46 (m, 1H, H-7), 2.67 - 2.73 (m, 1H, H-7), 3.38 (dd, $J = 11.5$ e 4.5 Hz, 1H, H-2), 3.48 (dd, $J = 11.5$ e 8.6 Hz, 1H, H-2), 4.39 - 4.40 (m, 1H, H-6), 5.00 (sl, 1H, NH), 5.06 (dd, $J = 8.6$ e 4.5 Hz, 1H, H-3), 5.17 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-7a). EMAR (ESI): calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 303.1009, encontrada 303.1013.

4.3.3. Síntese de Diazo- γ -lactamas quirais



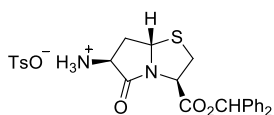
Hidrocloreto de (3R,6S,7aS)-6-amino-5-oxohexahidropirrólo[2,1-b]tiazol-3-carboxilato de benzidrilo (2.12b)

A uma solução do éster benzidrílico da γ -lactama **2.5b** (138 mg, 0.30 mmol) em diclorometano (6.4 mL) adicionou-se uma solução de HCl 2 M em éter etílico (0.74 mL, 1.47 mmol, 5.0 equiv.). A mistura reacional ficou sob agitação durante 51 horas à temperatura ambiente. Após este tempo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida sem aquecimento. Adicionou-se éter etílico (10 mL) e deixou-se sob agitação num banho de gelo durante 1.5 horas. O produto foi isolado como um sólido após decantação do solvente. RMN ^1H (CD_3OD) δ 1.46 (sl, 3H, NH_3), 2.56 - 2.60 (m, 1H, H-7), 2.76 - 2.80 (m, 1H, H-7), 3.45 (dd, $J = 11.6$ e 4.8 Hz, 1H, H-2), 3.68 (dd, $J = 11.5$ e 8.4 Hz, 1H, H-2), 4.20 - 4.23 (m, 1H, H-6), 5.20 (dd, $J = 8.4$ e 4.8 Hz, 1H, H-3), 5.26 (dd, $J = 7.2$ e 1.3 Hz, 1H, H-7a), 6.92 (s, 1H, CHPh_2), 7.35 - 7.41 (m, 10H, ArH).



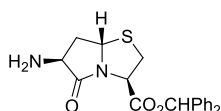
4-metilbenzenosulfonato do ácido (3R,6S,7aS)-6-amino-5-oxohexahidropirrólo[2,1-b]tiazol-3-carboxílico (2.15)

O composto **2.15** foi sintetizado adaptando de um procedimento que se encontra na literatura.¹³⁰ A uma solução da γ -lactama ácida **2.14** (151 mg, 0.50 mmol) em acetonitrilo (2.5 mL) adicionou-se ácido *p*-toluenosulfônico (172 mg, 1.00 mmol, 2.0 equiv.). A mistura reacional ficou em agitação durante 17 horas à temperatura ambiente. Após este tempo, filtrou-se o produto e lavou-se com acetonitrilo frio. O produto foi obtido como um sólido branco. Rendimento: 66%. p.f. 204.7-205.9 °C. IV (ATR) ν 685, 1010, 1160, 1492, 1709 cm^{-1} ; RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$) δ 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.40 - 2.48 (m, 1H, H-7), 2.57 - 2.63 (m, 1H, H-7), 3.36 (dd, $J = 11.3$ e 4.6 Hz, 1H, H-2), 3.55 (dd, $J = 11.3$ e 8.5 Hz, 1H, H-2), 4.14 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-6), 4.91 (dd, $J = 8.5$ e 4.6 Hz, 1H, H-3), 5.18 (d, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-7a), 7.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.50 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, ArH), 8.61 (sl, 3H, NH_3); RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$) δ 20.76 (CH_3), 27.18 (C-7), 36.28 (C-2), 49.73 (C-6), 58.38 (C-3), 63.64 (C-7a), 125.46 (ArCH), 128.06 (ArCH), 137.69 (ArC), 145.50 (ArC), 170.56 (C=O), 171.58 (C=O). $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ (374.43): C 44.91, H 4.85, N 7.48, S 17.13; encontrada C 44.71, H 4.66, N 7.55, S 17.48; $[\alpha]_D^{25} = -181$ (c 0.5, MeOH).



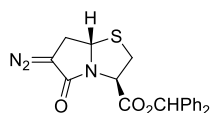
4-metilbenzenosulfonato de (3R,6S,7aS)-6-amino-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de benzidrilo (2.18)

O composto **2.18** foi sintetizado por adaptação de um procedimento que se encontra na literatura.¹³² A uma solução do tosilato da γ -lactama ácida **2.15** (862 mg, 2.30 mmol) em metanol (1.0 mL) adicionou-se gota a gota uma solução de difenildiazometano (447 mg, 2.30 mmol) em diclorometano (7.0 mL). Após 24 horas de reação à temperatura ambiente, adicionou-se mais uma porção de difenildiazometano (184 mg, 0.92 mmol, 0.4 equiv.) e a mistura fica sob agitação durante mais 20 horas. O solvente foi evaporado e o produto foi purificado por cristalização com éter etílico, tendo sido obtido como um sólido esbranquiçado. Rendimento: 95%. p.f. 127.7-129.1 °C. IV (ATR) ν 689, 1033, 1158, 1216, 1535, 1729, 3559 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3) δ 2.25 (s, 3H, CH_3), 2.28 - 2.34 (m, 1H, H-7), 2.50 - 2.58 (m, 1H, H-7), 3.16 (dd, $J = 11.3$ e 4.4 Hz, 1H, H-2), 3.27 (dd, $J = 11.3$ e 8.5 Hz, 1H, H-2), 4.03 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-6), 4.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-7a), 5.03 (dd, $J = 8.2$ e 4.4 Hz, 1H, H-3), 6.82 (s, 1H, CHPh_2), 6.98 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 7.22 - 7.31 (m, 10H, ArH), 7.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, ArH), 8.38 (sl, 3H, NH_3); RMN ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$) δ 20.75, 27.21, 36.23, 49.64, 58.74, 63.89, 77.86, 125.47, 126.45, 128.03, 128.30, 128.61, 137.63, 139.84, 145.62, 168.09, 171.93. EMAR (ESI): calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$ $[\text{M} + \text{H}^+]$ 541.1462, encontrada 541.1485; $[\alpha]_D^{25} = -124$ (c 0.5, DCM).



(3R,6S,7aS)-6-amino-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de benzidrilo (2.19)

A uma solução do tosilato do éster benzidrílico da γ -lactama **2.18** (409 mg, 0.76 mmol) em diclorometano (10 mL) adicionou-se uma solução aquosa saturada de NaHCO_3 (10 mL). A mistura reacional ficou sob agitação durante 30 minutos a 0 °C. Separou-se a fase orgânica e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (2 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 , filtrou-se e evaporou-se o solvente a pressão reduzida sem aquecimento. O composto **2.19** foi obtido como um óleo amarelado. Rendimento: 90%. IV (ATR) ν 695, 1166, 1494, 1703, 2937, 3367 cm^{-1} ; RMN ^1H (CDCl_3) δ 1.65 (sl, 3H, NH_3), 2.19 - 2.26 (m, 1H, H-7), 2.59 (ddd, $J = 14.1$, 9.0 e 1.8 Hz, 1H, H-7), 3.36 (dd, $J = 11.4$ e 4.3 Hz, 1H, H-2), 3.48 (dd, $J = 11.4$ e 8.5 Hz, 1H, H-2), 3.70 (dd, $J = 9.0$ e 7.5 Hz, 1H, H-6), 5.13-5.17 (m, 2H, H-7a e H-3), 6.90 (s, 1H, CHPh_2), 7.31 - 7.36 (m, 10H, ArH); RMN ^{13}C (CDCl_3) δ 32.47, 36.90, 53.08, 58.38, 64.08, 78.54, 127.01, 127.07, 128.30, 128.67, 128.71, 139.16, 139.26, 168.79, 178.55. EMAR (ESI): calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}^+]$ 369.1267, encontrada 369.1273; $[\alpha]_D^{25} = -225$ (c 0.4, DCM).

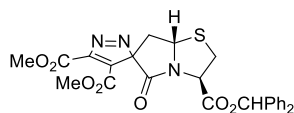


(3*R*,7*aS*)-6-diazo-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de benzidrilo (2.20)

O composto **2.20** foi sintetizado adaptando um procedimento que se encontra na literatura.¹³² A uma solução da amino- γ -lactama **2.19** (276 mg, 0.75 mmol) em diclorometano (20 mL) a 0 °C, adicionou-se H₂O destilada (20 mL). Seguidamente, adicionou-se uma solução de HClO₄ 1 M (1.6 mL) e, por último, NaNO₂ (129 mg, 1.87 mmol, 2.5 equiv.). A mistura reacional fica sob agitação a 0 °C durante 1 hora. Separou-se a fase orgânica e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (2 x 20 mL). As fases orgânicas foram lavadas com solução saturada de NaCl, secou-se com Na₂SO₄, filtrou-se e evaporou-se o solvente a pressão reduzida sem aquecimento. Rendimento: 95%. RMN ¹H (CDCl₃) δ 3.18 (dd, *J* = 14.3 e 0.6 Hz, 1H, H-7), 3.28 (dd, *J* = 11.1 e 3.4 Hz, 1H, H-2), 3.34 (dd, *J* = 11.1 e 7.9 Hz, 1H, H-2), 3.18 (dd, *J* = 14.3 e 7.3 Hz, 1H, H-7), 5.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-7*a*), 5.35 (dd, *J* = 7.8 e 3.3 Hz, 1H, H-3), 6.89 (s, 1H, *CHPh*₂), 7.30 - 7.35 (m, 10H, *ArH*).

4.4. Métodos Sintéticos referentes ao Capítulo III

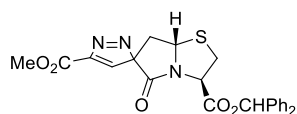
4.4.1. Síntese de Espiro- γ -lactamas ésteres



(3*R*,7*aS*)-5-oxo-3,5,7,7*a*-tetrahydro-2*H*-espiro[pirazol-3',6'-pirrolo[2,1-*b*]tiazol]-3,4',5'-tricarboxilato de 3-benzidrilo e 4',5'-dimetilo (3.2)

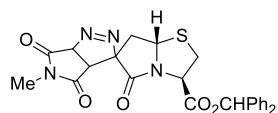
O composto **3.2** foi sintetizado por adaptação de um procedimento desenvolvido anteriormente no grupo de investigação.¹²⁶ A uma solução da diazo- γ -lactama **2.20** (230 mg, 0.61 mmol) em diclorometano seco (7 mL) a 0 °C adicionou-se acetileno dicarboxilato de dimetilo (**3.1**) (0.15 mL, 1.21 mmol, 2.0 equiv.). Após 5 horas, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida sem aquecimento. Purificou-se o produto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = 1:2]. O produto **3.2** foi recristalizado com acetato de etilo/hexano e obtido como um sólido branco. Rendimento: 34%. IV (ATR) ν 698, 1071, 1168, 1209, 1398, 1562, 1737 cm⁻¹; RMN ¹H (CDCl₃) δ 3.19 (dd, *J* = 16.9 e 12.7 Hz, 1H, H-7), 3.40 (dd, *J* = 11.3 e 2.2 Hz, 1H, H-2), 3.54 (dd, *J* = 11.3 e 6.8 Hz, 1H, H-2), 3.87 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.92 (dd, *J* = 16.9 e 4.3 Hz, 1H, H-7), 3.96 (s, 3H, CO₂CH₃), 5.23 (dd, *J* = 12.7 e 4.3 Hz, 1H, H-7*a*), 5.45 (dd, *J* = 6.8 e 2.2 Hz, 1H, H-3), 6.93 (s, 1H, *CHPh*₂), 7.28 - 7.35 (m, 10H, *ArH*); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 30.15, 32.50, 52.29, 52.92, 58.54, 62.23, 79.33, 111.99, 126.95, 127.25, 128.31, 128.40, 128.71, 138.85, 138.91, 143.72,

144.43, 147.23, 161.51, 161.81, 167.49. EMAR (ESI): calculada para $C_{26}H_{24}N_3O_7S$ $[M + H^+]$ 522.1329, encontrada 522.1340; $[\alpha]_D^{25} = -56$ (c 0.5, DCM).



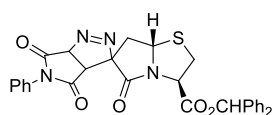
(3R,7aS)-5-oxo-3,5,7,7a-tetrahydro-2H-espiro[pirazol-3',6-pirrolo[2,1-b]tiazol]-3,5'-dicarboxilato de 3-benzidrilo e 5'-metilo (3.4)

O composto **3.4** foi sintetizado por adaptação de um procedimento desenvolvido anteriormente no grupo de investigação.¹²⁶ A uma solução da diazo- γ -lactama **2.20** (114 mg, 0.30 mmol) em diclorometano seco (7 mL) a 0 °C adicionou-se propiolato de metilo (**3.3**) (0.05 mL, 0.60 mmol, 2.0 equiv.). Após 18 horas, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida sem aquecimento. Purificou-se o produto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = 1:2]. Rendimento: 24%. RMN 1H ($CDCl_3$) δ 3.16 (ddd, $J = 15.8, 12.6$ e 1.4 Hz, 1H, H-7), 3.40 (dd, $J = 11.2$ e 2.1 Hz, 1H, H-2), 3.42 (dd, $J = 15.7$ e 4.2 Hz, 1H, H-7), 3.52 (dd, $J = 11.2$ e 6.8 Hz, 1H, H-2), 3.94 (s, 3H, CO_2CH_3), 5.22 (dd, $J = 12.6$ e 4.2 Hz, 1H, H-7a), 5.48 (dd, $J = 6.7$ e 2.0 Hz, 1H, H-3), 6.68 (s, 1H, H-4'), 6.92 (s, 1H, $CHPh_2$), 7.30 - 7.35 (m, 10H, ArH); RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ 30.39, 32.47, 52.41, 58.79, 62.18, 79.23, 107.27, 126.94, 127.25, 128.25, 128.34, 128.65, 128.69, 139.01, 139.90, 145.13, 146.08, 147.21, 161.33, 162.07, 167.72; $[\alpha]_D^{25} = -69$ (c 0.7, DCM).



(3R,7aS)-5'-metil-4'-5-6'-trioxo-3,4',5,5',6',6a',7,7a-octahidro-2H-3a'H-espiro[pirrolo[2,1-b]tiazol-6,3'-pirrolo[3,4-c]pirazol]-3-carboxilato de benzidrilo (3.6)

O composto **3.6** foi sintetizado por adaptação de um procedimento desenvolvido anteriormente no grupo de investigação.¹²⁶ A uma solução da diazo- γ -lactama **2.20** (139 mg, 0.37 mmol) em diclorometano seco (7 mL) a 0 °C adicionou-se *N*-metilmaleimida (**3.5**) (65 mg, 0.59 mmol, 1.6 equiv.). Após 5 horas, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida sem aquecimento. Purificou-se o produto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = 1:3]. Rendimento: 16%. RMN 1H ($CDCl_3$) δ 2.93 (dd, $J = 14.6$ e 4.4 Hz, 1H, H-7), 2.96 (s, 3H, N- CH_3), 3.27 (dd, $J = 14.6$ e 6.9 Hz, 1H, H-7), 3.30 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-3a'), 3.49 (dd, $J = 11.5$ e 4.0 Hz, 1H, H-2), 3.61 (dd, $J = 11.5$ e 7.9 Hz, 1H, H-2), 5.19 (dd, $J = 7.9$ e 4.0 Hz, 1H, H-3), 5.42 (dd, $J = 6.9$ e 4.4 Hz, 1H, H-7a), 5.89 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-6a'), 6.91 (s, 1H, $CHPh_2$), 7.31 - 7.38 (m, 10H, ArH); RMN ^{13}C ($CDCl_3$) δ 25.40, 31.13, 36.45, 42.79, 58.32, 63.56, 79.01, 95.08, 101.04, 126.99, 127.07, 128.42, 128.76, 138.94, 139.04, 167.82, 168.34, 168.82, 172.38.



(3R,7aS)-5'-fenil-4'-5-6'-trioxo-3,4',5,5',6',6a',7,7a-octahidro-2H-3a'H-espiro[pirrolo[2,1-*b*]tiazol-6,3'-pirrolo[3,4-*c*]pirazol]-3-carboxilato de benzidriolo (3.8)

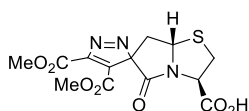
O composto **3.8** foi sintetizado por adaptação de um procedimento desenvolvido anteriormente no grupo de investigação.¹²⁶ A uma solução da diazo- γ -lactama **2.20** (92 mg, 0.24 mmol) em diclorometano seco (7 mL) a 0 °C adicionou-se *N*-fenilmaleimida (**3.7**) (67 mg, 0.39 mmol, 1.6 equiv.). Após 5 horas, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida sem aquecimento. Purificou-se o produto por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano = 1:3]. Rendimento: 31%. O composto **3.8** foi obtido como uma mistura de diastereoisómeros (72:28).

Componente maioritário. RMN ¹H (CDCl₃) δ 2.62 (dd, $J = 14.3$ e 4.6 Hz, 1H, H-7), 3.20 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-3a'), 3.30 (dd, $J = 14.3$ e 6.6 Hz, 1H, H-7), 3.49 (dd, $J = 11.1$ e 3.0 Hz, 1H, H-2), 3.64 (dd, $J = 11.1$ e 7.9 Hz, 1H, H-2), 5.26 (dd, $J = 7.9$ e 3.0 Hz, 1H, H-3), 5.29 (dd, $J = 6.6$ e 4.6 Hz, 1H, H-7a), 6.24 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-6a'), 6.91 (s, 1H, CHPh₂), 7.31 - 7.35 (m, 10H, ArH), 7.40 - 7.48 (m, 5H, N-Ph).

4.4.2. Síntese de Espiro- γ -lactamas ácidas

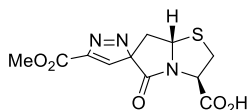
Procedimento geral:

A uma solução da espiro- γ -lactama éster (0.25 mmol) em diclorometano (3 mL) adicionou-se anisole (7 equiv.) e ácido trifluoracético (25 equiv.). A mistura ficou em agitação a -5 °C sob atmosfera inerte durante 4 horas. Após esse tempo a mistura reacional foi diluída em éter etílico frio (10 mL) e o solvente evaporado. O resíduo foi dissolvido em THF (5 mL) e adicionou-se uma solução saturada de NaHCO₃ (15 mL). A mistura ficou sob agitação a 0 °C durante 15 minutos. Adicionou-se acetato de etilo (20 mL), separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (2 x 20 mL). A fase aquosa foi tratada com uma solução de HCl (1 M), num banho de gelo, até pH 3, e foi extraída com acetato de etilo (3 x 20 mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄, filtrou-se e evaporou-se. A espiro- γ -lactama ácida foi cristalizada com éter etílico/hexano.



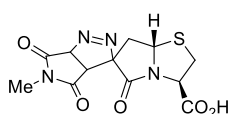
Ácido (3R,7aS)-5-oxo-3,5,7,7a-tetrahidro-2H-espiro[pirazol-3',6-pirrolo[2,1-*b*]tiazol]-4',5'-bis(metoxicarbonil)-3-carboxílico (3.9a)

O composto foi sintetizado e isolado seguindo o procedimento geral. A partir da espiro- γ -lactama éster **3.2** (118 mg, 0.23 mmol) em diclorometano seco (3 mL) adicionou-se anisole (0.17 mL, 1.58 mmol, 7 equiv.) e TFA (0.43 mL, 5.65 mmol, 25 equiv.). A espiro- γ -lactama ácida **3.9a** foi isolado como um sólido amarelado. Rendimento: 79%. RMN ^1H (CD_3OD) δ 3.30 (dd, $J = 16.5$ e 12.4 Hz, 1H, H-7), 3.40 (dd, $J = 11.2$ e 1.8 Hz, 1H, H-2), 3.64 (dd, $J = 11.3$ e 6.7 Hz, 1H, H-2), 3.87 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.94 (dd, $J = 16.6$ e 4.3 Hz, 1H, H-7), 3.95 (s, 3H, CO_2CH_3), 5.32 (dd, $J = 6.7$ e 1.9 Hz, 1H, H-3), 5.39 (dd, $J = 12.7$ e 4.2 Hz, 1H, H-7a). EMAR (ESI): calculada para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 356.0547, encontrada 356.0541.



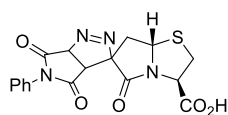
Ácido (3R,7aS)-5-oxo-3,5,7,7a-tetrahidro-2H-espiro[pirazol-3',6-pirrolo[2,1-*b*]tiazol]-5'-(metoxicarbonil)-3-carboxílico (3.9b)

O composto foi sintetizado e isolado seguindo o procedimento geral. A partir da espiro- γ -lactama éster **3.4** (100 mg, 0.22 mmol) em diclorometano seco (2 mL) adicionou-se anisole (0.16 mL, 1.51 mmol, 7 equiv.) e TFA (0.41 mL, 5.38 mmol, 25 equiv.). A espiro- γ -lactama ácida **3.9b** foi obtida como um sólido esbranquiçado. Rendimento: 85%. RMN ^1H (CD_3OD) δ 3.23 (dd, $J = 15.6$ e 12.6 Hz, 1H, H-7), 3.39 (dd, $J = 11.3$ e 1.5 Hz, 1H, H-2), 3.57 (dd, $J = 15.8$ e 4.0 Hz, 1H, H-7), 3.64 (dd, $J = 11.1$ e 7.0 Hz, 1H, H-2), 3.93 (s, 3H, CO_2CH_3), 5.31 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, H-3), 5.35 (dd, $J = 12.8$ e 4.0 Hz, 1H, H-7a), 6.75 (s, 1H, H-4'); RMN ^{13}C (CD_3OD) δ 30.85, 33.22, 49.08, 52.78, 60.37, 107.69, 142.95, 146.95, 147.98, 163.33.



Ácido (3R,7aS)-5'-metil-4'-5-6'-trioxo-3,4',5,5',6',6a',7,7a-octahidro-2H-3a'*H*-espiro[pirrolo[2,1-*b*]tiazol-6,3'-pirrolo[3,4-*c*]pirazol]-3-carboxílico (3.10a)

O composto foi sintetizado e isolado seguindo o procedimento geral. A partir da espiro- γ -lactama éster **3.6** (45 mg, 0.09 mmol) em diclorometano seco (2 mL) adicionou-se anisole (0.07 mL, 0.64 mmol, 7 equiv.) e TFA (0.18 mL, 2.30 mmol, 25 equiv.). A espiro- γ -lactama ácida **3.10a** foi obtida como um sólido amarelo. Rendimento: 26%. RMN ^1H (CD_3OD) δ 2.81 - 2.85 (m, 4H, N- CH_3 e H-7), 3.11 (dd, $J = 14.5$ e 6.7 Hz, 1H, H-7), 3.41 - 3.46 (m, 2H, H-3a' e H-2), 3.56 (dd, $J = 11.3$ e 7.8 Hz, 1H, H-2), 4.97 (dd, $J = 7.6$ e 4.5 Hz, 1H, H-3), 5.34 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-7a), 5.83 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-6a').



Ácido (3*R*,7*aS*)-5'-fenil-4'-5-6'-trioxo-3,4',5,5',6',6*a*',7,7*a*-octahidro-2*H*-3*a*'*H*-espiro[pirrolo[2,1-*b*]tiazol-6,3'-pirrolo[3,4-*c*]pirazol]-3-carboxílico (3.10b)

O composto foi sintetizado e isolado seguindo o procedimento geral. A partir da espiro- γ -lactama éster **3.8** (113 mg, 0.20 mmol) em diclorometano seco (3 mL) adicionou-se anisole (0.16 mL, 1.43 mmol, 7 equiv.) e TFA (0.39 mL, 5.09 mmol, 25 equiv.). A espiro- γ -lactama ácida **3.10b** foi obtida como um sólido amarelo. Rendimento: 64%. RMN ^1H (CD_3OD) δ 2.69 (dd, $J = 14.7$ e 4.3 Hz, 1H, H-7), 3.32 – 3.37 (m, 1H, H-7), 3.44 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-3*a*'), 3.53 (dd, $J = 11.0$ e 3.6 Hz, 1H, H-2), 3.67 (dd, $J = 11.0$ e 7.8 Hz, 1H, H-2), 5.12 (dd, $J = 7.7$ e 3.5 Hz, 1H, H-3), 5.63 (dd, $J = 6.9$ e 4.4 Hz, 1H, H-7*a*'), 6.33 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-6*a*'), 7.43 - 7.50 (m, 5H, N-*Pb*).

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Fernandes, A. C.; Herold, B.; Maia, H.; Rauter, A. P.; Rodrigues, J. A. R. *Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*; LIDEL: Lisboa, **2002**.
- (2) Mcnaught, A. D.; Smith, P. A. S., *Nomenclature of Heterocyclic Compounds*. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*; Meth-Cohn, O., Ed.; Pergamon Press, **1984**, Vol. 1, 7–45.
- (3) Janecki, T. *Natural Lactones and Lactams: Synthesis, Occurrence and Biological Activity*; WILEY-VCH, **2013**.
- (4) Balaban, A. T.; Oniciu, D. C.; Katritzky, A. R. *Chem. Rev* **2004**, *104* (5), 2777–2812.
- (5) Southgate, R. *Contemp. Org. Synth* **1994**, *1* (6), 417–431.
- (6) Singh, G. S. *Mini-Reviews Med. Chem.* **2004**, *4* (1), 69–92.
- (7) Singh, G. S. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4* (1), 93–109.
- (8) Staudinger, H. *Justus Liebigs Ann. Chem* **1907**, *356*, 51–123.
- (9) Rolinson, G. N. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41*, 589–603.
- (10) Bari, S. S.; Bhalla, A. *Top. Heterocycl. Chem* **2010**, *22*, 49–99.
- (11) Fernandes, R.; Amador, P.; Prudêncio, C. *Rev. Med. Microbiol.* **2013**, *24*, 7–17.
- (12) Sykes, R. B.; Bonner, D. P. *Am. J. Med.* **1985**, *78*, 2–10.
- (13) Livermore, D. M. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41*, 25–41.
- (14) Watkins, R. R.; Bonomo, R. A. *β -Lactam Antibiotics*, Fourth Edi.; Elsevier Ltd, **2017**.
- (15) Hamed, R. B.; Schofi, C. J.; Mcdonough, M. A.; Scho, C. J. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30* (1), 21–107.
- (16) Arya, Nikhilesh; Jagdale, Archana Y.; Patil, Tushar A.; Yeramwar, Shradha S.; Holikatti, Sidharam S.; Dwivedi, Jaya; Shishoo, Chamanlal J.; Jain, K. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 619–656.
- (17) Essack, S. Y. *Pharm. Res.* **2001**, *18* (10), 1391–1399.
- (18) Jacoby, G. A. *Antimicrob. Resist.* **1997**, *11* (4), 875–887.
- (19) Singh, Girija S; Pandeya, S. N. *J. Chem. Eng.* **1987**, *32*, 278–279.

- (20) Podlech, J.; Steurer, S. *Synthesis (Stuttg)*. **1999**, No. 4, 650–654.
- (21) Cunha, B. A. *Med. Clin. North Am.* **2001**, *85* (1), 149–185.
- (22) Guidance for Industry Non-Penicillin Beta-Lactam Drugs: A CGMP Framework for Preventing Cross- Contamination
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> (accessed Jun 27, 2018).
- (23) Prescott, Jr., W. A.; DePestel, D. D.; Ellis, J. J.; Regal, R. E. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38* (8), 1102–1107.
- (24) Joshi, K. C.; Jain, R.; Sharma, V. J. *Indian Chem. Soc.* **1986**, *63*, 430–431.
- (25) Doyle, M. P.; Forbes, D. C. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (2), 911–935.
- (26) Ojima, I.; Inaba, S. I.; Yoshida, K. *Tetrahedron* **1977**, *18* (41), 3643–3646.
- (27) Marco-Contelles, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2198–2200.
- (28) Hart, David J.; Ha, D.-C. *Chem. Rev.* **1989**, *89* (7), 1447–1465.
- (29) France, S.; Weatherwax, A.; Taggi, A. E.; Lectka, T. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (8), 592–600.
- (30) Alonso, E. .; López-Ortiz, F. .; Pozo, C. .; Peralta, E. .; Macías, A. .; González, J. J. *Org. Chem* **2001**, *66* (19), 6333–6338.
- (31) Bittermann, H.; Gmeiner, P. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (1), 97–102.
- (32) Singh, G. S.; Matthias, D.; De Kimpe, N. *Tetrahedron* **2011**, *67* (11), 1989–2012.
- (33) Alcaide, B.; Almendros, P. *Top Heterocycl Chem* **2010**, *22*, 1–48.
- (34) Santos, B. S.; Nunes, S. C. C.; Pais, A. A. C. C.; Pinho E Melo, T. M. V. D. *Tetrahedron* **2012**, *68* (19), 3729–3737.
- (35) Santos, B. S.; Pinho E Melo, T. M. V. D. *European J. Org. Chem.* **2013**, No. 18, 3901–3909.
- (36) Santos, B. S.; Gomes, C. S. B.; Pinho E Melo, T. M. V. D. *Tetrahedron* **2014**, *70* (24), 3812–3821.

- (37) Pinho e Melo, T. M. V. D. *Mecanismos de Reações Orgânicas*; LIDEL, **2005**.
- (38) Gothelf, K. V.; Jorgensen, K. A. *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **1998**, *98* (2), 863–909.
- (39) Sheehan, J. C.; Chacko, E.; Lo, Y. S.; Ponzi D. R.; Sato, E. *J Org Chem* **1978**, *43* (25), 4856–4859.
- (40) Campbell, M. M.; Marcus, R. G.; Ray, S. J. *Tetrahedron Lett.* **1979**, No. 16, 1441–1444.
- (41) Baldwin, J. E.; Fai, M.; Gerard, C.; Monk, P.; Proutb, K. J. *Chem. Soc., Chem. Commun* **1983**, No. 250, 250–252.
- (42) Baldwin, J. E.; Chan, M. F. A. I.; Gallacher, G.; Otsuka, M. *Tetrahedron* **1984**, *40* (21), 4513–4525.
- (43) Baldwin, J. E.; Adlington, R. M.; Jones, R. H.; Schofield, C. J.; Zarocostas, C.; Greengrassb, C. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun* **1985**, 194–196.
- (44) Gennari, C.; Moresca, D.; Vulpetti, A.; Pain, G. *Tetrahedron* **1997**, *53* (15), 5593–5608.
- (45) Haldar, P.; Barman, G.; Ray, J. K. *Tetrahedron* **2007**, *63* (14), 3049–3056.
- (46) Huang, P.; Zheng, X. *Arkivoc* **2003**, No. ii, 7–14.
- (47) Fukuda, N.; Sasaki, K.; Sastry, T. V.; Kanai, M.; Shibasaki, M. *J Org Chem* **2006**, *71* (3), 1220–1225.
- (48) Feling, R. H.; Buchanan, G. O.; Mincer, T. J.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (3), 355–357.
- (49) Zhu, X. Z.; Li, X. Y.; Liu, J. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 221–230.
- (50) Barrett, A. G. M.; Head, J.; Smith, M. L.; Stock, N. S.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (16), 6005–6018.
- (51) Pyun, D. K.; Kim, B. J.; Jung, H. J.; Kim, J. H.; Lee, J. S.; Lee, W. K.; Lee, C. H. *Chem. Pharm. Bull* **2002**, *50* (3), 415–418.
- (52) Montaner, A. D.; Mongiat, L.; Lux-Lantos, V. A. R.; Park, M. K.; Fischer, W. H.; Craig, A. G.; Rivier, J. E.; Lescheid, D.; Lovejoy, D.; Libertun, C.; Sherwood, N. M.; Somoza, G. M. *Neuroendocrinology* **2001**, *74* (3), 202–212.

- (53) Xi, N.; Arvedson, S.; Eisenberg, S.; Han, N.; Handley, M.; Huang, L.; Huang, Q.; Kiselyov, A.; Liu, Q.; Lu, Y.; Nunez, G.; Osslund, T.; Powers, D.; Tasker, A. S.; Wang, L.; Xiang, T.; Xu, S.; Zhang, J.; Zhu, J.; Kendall, R.; Dominguez, C. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (11), 2905–2909.
- (54) Newhouse, B.; Allen, S.; Fauber, B.; Anderson, A. S.; Eary, C. T.; Hansen, J. D.; Schiro, J.; Gaudino, J. J.; Laird, E.; Chantry, D.; Eberhardt, C.; Burgess, L. E. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (22), 5537–5542.
- (55) Davies, M. N.; Bayry, J.; Tchilian, E. Z.; Vani, J.; Shaila, M. S.; Forbes, E. K.; Draper, S. J.; Beverley, P. C. L.; Tough, D. F.; Flower, D. R. *PLoS One* **2009**, *4* (11), 1–12.
- (56) Dugar, S.; Kirkup, M.P.; Clader, J.W.; Lin, S.I.; Rizvi, R.; Snow, M. E. ; Davis, H.R. Jr.; McCombie, S. . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5* (24), 2947–2952.
- (57) Kenda, B. M.; Matagne, A. C.; Talaga, P. E.; Pasau, P. M.; Differding, E.; Lallemand, B. I.; Frycia, A. M.; Moureau, F. G.; Klitgaard, H. V.; Gillard, M. R.; Fuks, B.; Michel, P. J. *Med. Chem.* **2004**, *47* (3), 530–549.
- (58) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (3), 311–335.
- (59) Kumar, A.; Bachhawat, A. K. *Curr. Sci.* **2012**, *102* (2), 288–297.
- (60) Bodson, Q.; Denooz, R.; Serpe, P.; Charlier, C. *Acta Clin. Belg.* **2008**, *63* (3), 200–208.
- (61) Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, X.; Li, S. M.; Turner, G. *ChemBioChem* **2007**, *8* (14), 1736–1743.
- (62) Snider, B. B.; Gu, Y. *Org. Lett.* **2001**, *3* (11), 1999–2001.
- (63) Wink, M. *South African J. Bot.* **2013**, *89*, 164–175.
- (64) Pilli, R. A.; Rosso, G. B.; De Oliveira, M. D. C. F. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27* (12), 1908–1937.
- (65) Manam, R. R.; Teisan, S.; White, D. J.; Nicholson, B.; Grodberg, J.; Neuteboom, S. T. C.; Lam, K. S.; Mosca, D. A.; Lloyd, G. K.; Potts, B. C. M. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68* (2), 240–243.
- (66) Kawazu, K.; Kanzaki, H.; Kawabata, G.; Kawai, S.; Kobayashi, A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *56* (9), 1382–1385.

- (67) Phillips, N. J.; Goodwin, J. T.; Fraiman, A.; Cole, R. J.; Lynn, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (21), 8223–8231.
- (68) Hayashi, Y.; Shoji, M.; Yamaguchi, J.; Sato, K.; Yamaguchi, S.; Mukaiyama, T.; Sakai, K.; Asami, Y.; Takeya, H.; Osada, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (41), 12078–12079.
- (69) Whitt, J.; Shipley, S. M.; Newman, D. J.; Zuck, K. M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (1), 173–177.
- (70) Asami, Y.; Takeya, H.; Onose, R.; Yoshida, A.; Matsuzaki, H.; Osada, H. *Org. Lett.* **2002**, *4* (17), 2845–2848.
- (71) Baldwin, J.; Adlington, R. M.; Jones, R. H.; Schofield, C. J.; Zaracostas, C. *Tetrahedron* **1986**, *42* (17), 4879–4888.
- (72) Boyd, D. B.; Elzey, T. K.; Hatfield, L. D.; Kinnick, M. D.; Morin, J. M.; Lilly, E. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (30), 3453–3456.
- (73) Boyd, D. B.; Foster, B. . I.; Hatfield, L. D.; Hornback, W. J.; Jones, N. D.; Munroe, J. E.; Swartzendrube, J. K. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (30), 3457–3460.
- (74) Baldwin, J. E.; Lowe, C.; Schofield, C. J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (15), 2211–2212.
- (75) Baldwin, J. E.; Lynch, G. P.; Pitlik, J. *Rev. Lit. Arts Am.* **1991**, *44* (1), 1–24.
- (76) Martelli, G.; Orena, M.; Rinaldi, S. *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18* (11), 1373–1481.
- (77) Martelli, G.; Monsignor, A.; Rinaldi, M. O. and S. *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18* (12), 1539–1585.
- (78) Rivas, F.; Ling, T. *Org. Prep. Proced. Int.* **2016**, No. 48, 254–295.
- (79) Caruano, J.; Muccioli, G. G.; Robiette, R. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (43), 10134–10156.
- (80) Katritzky, A. R.; Ramsden, C. A.; Scriven, E. F. V.; Taylor, R. J. K. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III*; Pergamon: Oxford, **2008**.
- (81) Allen, N. E.; Boyd, D. B.; Campbell, J. B.; Deeter, J. B.; Elzey, T. K.; Foster, B. J.; Hatfield, L. D.; Hobbs, J. N.; Hornback, W. J.; Hunden, D. C.; Jones, N. D.; Kinnick, M. D.; Morin, J. M.; Munroe, J. E.; Swartzendruber, J. K.; Vogt, D. G. *Tetrahedron* **1989**,

- 45 (7), 1905–1928.
- (82) Liu, D.; Yu, X.; Huang, L. *Chinese J. Chem.* **2013**, *31* (3), 344–348.
- (83) Feng, Z.; Li, X.; Zheng, G.; Huang, L. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (8), 2112–2115.
- (84) Barnes, D. M.; Wittenberger, S. J.; Zhang, J.; Ji, J.; Fickes, M. G.; Fitzgerald, M. A.; King, S. A.; Morton, H. E.; Plagge, F. A.; Preskill, M.; Wagaw, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (44), 13097–13105.
- (85) Baures, P. W.; Eggleston, D. S.; Erhard, K. F.; Cieslinski, L. B.; Torphy, T. J.; Christensen, S. B. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (22), 3274–3277.
- (86) Duan, J. J. W.; Chen, L.; Wasserman, Z. R.; Lu, Z.; Liu, R. Q.; Covington, M. B.; Qian, M.; Hardman, K. D.; Magolda, R. L.; Newton, R. C.; Christ, D. D.; Wexler, R. R.; Decicco, C. P. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (23), 4954–4957.
- (87) Cook, J. H.; Barzya, J.; Brennan, C.; Lowe, D.; Wang, Y.; Redman, A.; Scott, W. J.; Wood, J. E. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (9), 1525–1528.
- (88) Hartwig, W.; Born, L. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (1), 4352–4358.
- (89) Fishwick, C. W. G.; Foster, R. J.; Carr, R. E. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (22), 3915–3918.
- (90) Pinza, M.; Farina, C.; Cerri, a; Pfeiffer, U.; Riccaboni, M. T.; Banfi, S.; Biagetti, R.; Pozzi, O.; Magnani, M.; Dorigotti, L. *J. Med. Chem.* **1993**, *36* (26), 4214–4220.
- (91) Berini, C.; Pelloux-Léon, N.; Minassian, F.; Denis, J. N. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (21), 4512–4516.
- (92) Zheng, Y.; Tice, C. M.; Singh, S. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (16), 3673–3682.
- (93) Chaubet, G.; Coursindel, T.; Morelli, X.; Roche, P.; Guari, Y.; Collette, Y.; Parrot, I.; Martinez, J. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4719–4726.
- (94) Sannigrahi, M. *Tetrahedron* **1999**, *55* (30), 9007–9071.
- (95) Cowley, A. R.; Hill, T. J.; Kocis, P.; Moloney, M. G.; Stevenson, R. D.; Thompson, A. L. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (20), 7042.
- (96) Periyasami, G.; Raghunathan, R.; Surendiran, G.; Mathivanan, N. *Synthesis of novel*

- spiropyrrolizidines as potent antimicrobial agents for human and plant pathogens*; **2008**; Vol. 18.
- (97) Yeung, B. K. S.; Zou, B.; Rottmann, M.; Lakshminarayana, S. B.; Ang, S. H.; Leong, S. Y.; Tan, J.; Wong, J.; Keller-maerki, S.; Fischli, C.; Goh, A.; Schmitt, E. K.; Krastel, P.; Francotte, E.; Kuhen, K.; Plouffe, D.; Henson, K.; Wagner, T.; Winzeler, E. A.; Petersen, F.; Brun, R.; Dartois, V.; Diagana, T. T.; Keller, T. H. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5155–5164.
- (98) Zinzalla, G.; Thurston, D. E. *Futur. Med. Chem* **2009**, *1* (1), 65–93.
- (99) Ali, M. A.; Ismail, R.; Choon, T. S.; Yoon, Y. K.; Wei, A. C.; Pandian, S.; Kumar, R. S.; Osman, H.; Manogaran, E. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (23), 7064–7066.
- (100) Thangamani, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (12), 6120–6126.
- (101) Arun, Y.; Bhaskar, G.; Balachandran, C.; Ignacimuthu, S.; Perumal, P. T. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (6), 1839–1845.
- (102) Xu, X.; Che, X.; Gao, S.; Wu, J.; Bai, X. *Synlett* **2005**, No. 12, 1865–1868.
- (103) Genin, M. J.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Johnson, R. L. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (8), 2334–2337.
- (104) Montserrat Fernández, M.; Diez, A.; Rubiralta, M.; Montenegro, E.; Casamitjana, N.; Kogan, M. J.; Giralt, E. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (22), 7587–7599.
- (105) Braña, M. F.; Garranzo, M.; de Pascual-Teresa, B.; Pérez-Castells, J.; Torres, M. R. *Tetrahedron* **2002**, *58* (24), 4825–4836.
- (106) Khalil, E. M.; Ojala, W. H.; Pradhan, A.; Nair, V. D.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (4), 628–637.
- (107) Srivastava, L. K.; Bajwa, S. B.; Johnson, R. L.; Mishra, R. K. *J. Neurochem.* **1988**, *50* (3), 960–968.
- (108) Kotha, S.; Deb, A. C.; Lahiri, K.; Manivannan, E. *Synthesis (Stuttg.)* **2009**, No. 2, 165–193.
- (109) Rosenberg, S.; Leino, R.; Zheng, Y.; Tice, C. M.; Singh, S. B. *Synthesis (Stuttg.)* **2009**, *24* (16), 2651–2673.

- (110) Bahajaj, A. A.; Moore, M. H.; Vernon, J. M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1235–1246.
- (111) Bahajaj, A. A.; Vernon, J. M.; Wilson, G. D. *Tetrahedron* **2004**, *60* (5), 1247–1253.
- (112) Marti, C.; Carreira, E. M. *European J. Org. Chem.* **2003**, *2003* (12), 2209–2219.
- (113) Muthusamy, S.; Azhagan, D.; Gnanaprakasam, B.; Suresh, E. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (43), 5662–5665.
- (114) Kamisaki, H.; Yasui, Y.; Takemoto, Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (21), 2589–2592.
- (115) Wei, H. L.; Piou, T.; Dufour, J.; Neuville, L.; Zhu, J. *Org. Lett.* **2011**, *13* (9), 2244–2247.
- (116) Cossy, J.; Bouzide, A.; Leblanc, C. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (22), 7257–7265.
- (117) Sternativo, S.; Battistelli, B.; Bagnoli, L.; Santi, C.; Testaferri, L.; Marini, F. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (49), 6755–6757.
- (118) Habib-Zahmani, H.; Viala, J.; Hacini, S.; Rodriguez, J. *Synlett* **2007**, No. 7, 1037–1042.
- (119) Kang, F. A.; Sui, Z. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52* (32), 4204–4206.
- (120) Yang, W.; Sun, X.; Yu, W.; Rai, R.; Deschamps, J. R.; Mitchell, L. A.; Jiang, C.; Mackerell, A. D.; Xue, F. *Org. Lett.* **2015**, *17* (12), 3070–3073.
- (121) Krüger, T.; Kelling, A.; Schilde, U.; Linker, T. *European J. Org. Chem.* **2017**, No. 6, 1074–1077.
- (122) Conde, E.; Rivilla, I.; Larumbe, A.; Cossío, F. P. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (23), 11755–11767.
- (123) Koseki, Y.; Yamada, H.; Usuki, T. *Tetrahedron Asymmetry* **2011**, *22* (5), 580–586.
- (124) Martín-Martínez, M.; Figuera, N. De; Latorre, M.; Herranz, R.; García-López, M. T. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3770–3777.
- (125) Baldwin, J. E.; Lowe, C.; Schofield, C. J.; Lee, E. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (30), 3461–3464.
- (126) Caratão, C. C. “Síntese de Novos Compostos Espiro-lactâmicos”, Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra, **2017**.
- (127) Pinho e Melo, T. M. V. D. In *Targets in Heterocyclic Systems – Chemistry and Properties*,

- Attanasi, A.; Spinelli, D.; Eds., Italian Society of Chemistry; 2004; Vol. 8, pp 288–329.*
- (128) Szilágyi, L. ; Györgydeák, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101* (2), 427–432.
- (129) Pinho E Melo, T. M. V. D.; Gomes, C. S. B.; Rocha Gonsalves, A. M. D. A.; Paixão, J. A.; Beja, A. M.; Ramos Silva, M.; Alte Da Veiga, L. *Tetrahedron* **2002**, *58* (25), 5093–5102.
- (130) Chauvette, R. R. ; Pennington, P. A. ; Ryan, C. W. ; Cooper, D. G. ; José, F. L. ; Wright, I. G. ; Van Heyningen, E. M. ; Huffman, G. W. *J. Org. Chem.* **1971**, *36* (9), 1259–1267.
- (131) Bhagwanth, S. “Synthetic Approaches Toward Azabicyclic and Azaspirobicyclic Scaffolds Relevant to Peptide Conformation Control”, PhD thesis, University of Minnesota, **2009**.
- (132) Sheehan, J. C. ; Commons, T. J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (11), 2203–2208.
- (133) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A. J.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, O.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian 09, Revision D.01*, Gaussian; Inc.: Wallingford, CT, **2013**.
- (134) Saouane, S.; Buth, G.; Fabbiani, F. P. A. *Cryst. Struct. Commun.* **2013**, *69* (11), 1238–1242.
- (135) Bycroft, B. W.; Shute, R. E.; Begleyb, M. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 274–276.
- (136) Pinho E Melo, T.; Taveira, N.; Prudêncio, M.; Santos, B.; Bártolo, I. “Novel Spiro-Lactams, Process and Uses Thereof”, Provisional Patent Application, **2017**.