



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Nuno Alexandre Guerreiro Alves

**NOVAS ESPIRO- $\beta$ -LACTAMAS COM POTENTE  
DUPLA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Tese no âmbito do Doutoramento em Química, ramo de Química Médica, orientada pela Professora Doutora Teresa Margarida Vasconcelos Dias de Pinho e Melo, coorientada pelo Doutor Carlos Simões e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Agosto de 2021

Universidade de Coimbra  
Departamento de Química – Faculdade de Ciências e Tecnologia



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Nuno Alexandre Guerreiro Alves

**NOVAS ESPIRO- $\beta$ -LACTAMAS COM POTENTE  
DUPLA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**Tese no âmbito do Doutoramento em Química, ramo de Química Médica,  
orientada pela Professora Doutora Teresa Margarida Vasconcelos Dias  
de Pinho e Melo, coorientada pelo Doutor Carlos Simões e apresentada  
ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade de Coimbra.**

Coimbra, 2021



*Ao avô Acácio, à avó Margarida e à minha mãe,  
que sempre madrugaram para acender o lume.*



*“(...) se a pátria é minha mãe e é meu pai, dizem também, de meus verdadeiros pais sei eu, e todos sabem dos seus, que tiraram à boca para não faltar à nossa, e então a pátria deverá tirar à sua própria boca para não faltar à minha, e se eu tiver de comer cardos, coma-os a pátria comigo (...)”*

*José Saramago em “Levantado do Chão”*

## **Agradecimentos**

É minha plena convicção que o desenvolvimento de um projeto de Doutorado é notoriamente caracterizado por uma dicotomia muito própria. Se por um lado, o processo inerente à escrita de uma tese de Doutorado é um processo altamente exaustivo, introspetivo e solitário, por outro é o culminar de um caminho envolto em cooperação e companheirismo, que o torna altamente recompensador do ponto de vista científico e, especialmente, humano. Desta forma, é minha intenção endereçar e deixar registados os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que me acompanharam ao longo desta enorme jornada.

À Professora Doutora Teresa Pinho e Melo, orientadora deste trabalho, pela oportunidade de trabalhar sob a sua orientação, pela confiança e constante incentivo, pela sua inatacável disponibilidade e por todos os conhecimentos que me transmitiu e que foram a força motriz da minha evolução científica ao longo de todo este percurso. Foi uma honra poder desenvolver este projeto sob a sua alçada.

Ao Doutor Carlos Simões, meu coorientador, e ao Professor Doutor Rui Brito, pela colaboração e pelas discussões em torno deste projeto e por me terem introduzido à química computacional e ao meio empresarial.

Ao Professor Doutor Nuno Taveira e à Doutora Inês Bártolo, pela colaboração em todos os estudos relacionados com o vírus do HIV, assim como por todo o conhecimento que partilharam comigo acerca deste tema e que foi uma enorme mais-valia no desenvolvimento do meu trabalho e, conseqüentemente, na escrita desta tese.

Aos diretores do programa doutoral MedChemTrain, Professor Doutor Luís Arnaut e Professor Doutor Rui Moreira, e ao restante painel executivo, pela oportunidade e confiança em mim depositada aquando da minha seleção para integrar este programa doutoral.

Ao Professor Doutor Miguel Prudêncio, pela colaboração nos estudos de inibição do parasita da malária.

À Ana Mata e ao Américo Alves, com quem partilhei frustrações e sucessos, por me terem acompanhado ao longo desta jornada, pela sua aura positiva inquebrável e por todo o seu companheirismo e solidariedade, estando sempre presentes e dispostos a ajudar no necessário sem nunca pedir nada em contrapartida.

À Doutora Susana Lopes e à Doutora Isabel Soares, pela partilha de conhecimentos e constante ajuda e disponibilidade.

À Doutora Ana Lúcia Cardoso, ao Doutor Nelson Pereira, à Carla Grosso, à Cláudia Alves, à Carla Gomes, à Nélia Tavares e a todos os restantes membros do grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra, pela forma como me receberam e acolheram, assim como por todos os momentos de convívio que partilhámos no laboratório.

À Dona Lurdes, por todo o carinho, genuinidade e constante disponibilidade e preocupação.

Ao João Luís, à Andreia Cunha, e aos restantes membros do grupo RMBLab, por todas as partilhas de ideias, companheirismo e apoio ao longo deste projeto.

Ao Pedro Cruz, pela colaboração nos estudos de ressonância magnética nuclear.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo financiamento (PD/BD/135287/2017), que permitiu a concretização do trabalho apresentado nesta tese.

Ao Professor Doutor Amadeu Brigas e ao Professor Doutor Américo Lemos, pelo encorajamento e apoio para que nunca desistisse deste meu objetivo.

Aos meus amigos de sempre, pela amizade e pela presença constante ao longo deste percurso, mesmo quando separados por centenas de quilómetros.

À Patrícia, minha melhor amiga e minha namorada, por ser o meu ponto de equilíbrio, o meu maior apoio e muitas vezes, arrisco-me eu a dizer, o meu garante de lucidez, estando presente neste percurso desde o início, sempre de forma altruísta.

À minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai, por todos os sacrifícios, pelas saudades, pela compreensão, incentivo e motivação, e por todo o orgulho que têm em mim.

Por fim, o agradecimento mais agridoce, à minha avó Margarida e ao meu avô Acácio, a quem não poderei abraçar após o culminar deste percurso, mas a quem devo mais do que algum dia poderei pagar. Ainda que nunca tenham sequer podido imaginar que existe no mundo algo a que chamam de  $\beta$ -lactama, quero que saibam que este trabalho também é vosso.

# Índice

Resumo	i
Abstract	iv
Prefácio	vii
Abreviaturas	x
Nomenclatura	xiii
<b>Capítulo 1 - Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Importância e diversidade dos compostos $\beta$ -lactâmicos	3
1.1.1. $\beta$ -Lactamas	3
1.1.2. Espiro- $\beta$ -lactamas	7
1.2. Estratégias sintéticas para a obtenção de espiro- $\beta$ -lactamas	9
1.2.1. Lactamização de compostos contendo uma subunidade estrutural cíclica	9
1.2.1.1. Cicloadição de Staudinger	9
1.2.1.2. Reação de Mannich/Lactamização sequenciais	20
1.2.1.3. Reação de Reformatsky	24
1.2.1.4. Lactamização intramolecular independente de catálise por metais	26
1.2.1.5. Reações de lactamização catalisadas por metais	31
1.2.2. Espirociclização de moléculas contendo um anel 2-azetidiona	36
1.2.2.1. Espirociclização de $\alpha$ -alquilideno- $\beta$ -lactamas	36
1.2.2.2. Espirociclização mediada por halogéneos	41
1.3. Conclusão e enquadramento do projeto de Doutorado	44
1.4. Bibliografia	46
<b>Capítulo 2 - Descoberta de espiro-<math>\beta</math>-lactamas com dupla atividade contra HIV e <i>Plasmodium</i></b>	<b>58</b>
2.1. Introdução	61
2.2. Bioatividade	67
2.2.1. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	67

2.2.2. Atividade anti- <i>Plasmodium</i>	71
2.2.3. Ausência de atividade antibacteriana e antifúngica	73
2.3. Relação estrutura-atividade	74
2.4. Mecanismo de ação	76
2.4.1. Estudos de tempo de adição	76
2.4.2. Pesquisa de similaridade estrutural	77
2.4.3. Pesquisa de subestrutura	78
2.4.4. Estudos de sobreposição de farmacóforo e <i>docking</i>	79
2.4.5. Ensaio <i>single-target</i> contra a protease do HIV	83
2.4.6. Estudos de microscopia eletrônica	85
2.5. Conclusão	87
2.6. Bibliografia	89
<b>Capítulo 3 - Modelação estrutural de uma espiro-3<i>H</i>-pirazole-<math>\beta</math>-lactama quiral com dupla atividade contra HIV e <i>Plasmodium</i></b>	98
3.1. Introdução	101
3.2. Síntese e modelação estrutural	104
3.2.1. Síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas análogas à molécula BSS-593	104
3.2.2. Síntese de novas espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas análogas da espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593	111
3.2.2.1. Modelação do grupo éster metílico na posição 5' do anel pirazole	111
3.2.2.2. Modelação do grupo ácido carboxílico na posição 3 da tiazolidina do <i>core</i> penicilanato.	112
3.3. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	114
3.4. Relação estrutura-atividade	115
3.4.1. Importância do anel $\beta$ -lactama	115
3.4.2. Importância do grupo éster metílico existente na posição 5' do anel pirazole	118
3.4.3. Importância do ácido carboxílico na posição 3 da tiazolidina	120
3.5. Conclusão	121
3.6. Bibliografia	123

<b>Capítulo 4 - Novas espirociclopentenil-<math>\beta</math>-lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e <i>Plasmodium</i>. Parte 1</b>	127
4.1. Introdução	130
4.2. Síntese e modelação estrutural	137
4.2.1. Remoção do éster benzidrilo da molécula <i>lead</i> BSS-730A	137
4.2.2. Modelação do éster benzílico do anel ciclopenteno da molécula <i>lead</i> BSS-730A	138
4.2.3. Modelação do grupo benzoílo do anel ciclopenteno da molécula <i>lead</i> BSS-730A	141
4.2.4. Modelação do sistema $\alpha,\beta$ -insaturado	141
4.2.5. Remoção do éster benzidrilo da molécula BSS-730B, isómero $\alpha$ da molécula <i>lead</i> BSS-730A	145
4.3. Bioatividade	145
4.3.1. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	145
4.3.2. Atividade anti-malária	147
4.4. Relação estrutura-atividade	149
4.4.1. Éster benzidrilo da molécula <i>lead</i> BSS-730A	149
4.4.2. Grupo éster benzílico da molécula <i>lead</i> BSS-730A	151
4.4.3. Grupo benzoílo da molécula <i>lead</i> BSS-730A	153
4.4.4. Grupo carbonilo $\alpha,\beta$ -insaturado ou aceitador de Michael	154
4.4.5. Isómeros $\alpha$ das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas	157
4.5. Conclusão	157
4.6. Bibliografia	158
<b>Capítulo 5 – Novas espirociclopentenil-<math>\beta</math>-lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e <i>Plasmodium</i>. Parte 2</b>	165
5.1. Introdução	167
5.2. Síntese e modelação estrutural	169
5.2.1. Síntese dos alenos monossustituídos	169
5.2.2. Síntese derivados da molécula BSS-730A	171
5.3. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	172
5.4. Relação estrutura-atividade	175
5.5. Conclusão	182

5.6. Bibliografia	184
<b>Capítulo 6 - Pesquisa de alvo biológico utilizando técnicas computacionais baseadas em similaridade de ligantes</b>	187
6.1. Introdução	190
6.2. Pesquisa de similaridade com recurso a técnicas computacionais	192
6.2.1. Construção de uma biblioteca química virtual de compostos bioativos com alvo molecular conhecido	192
6.2.2. Pesquisa de similaridade 2D com recurso a descritores ECFP4	195
6.2.3. Pesquisa de similaridade 3D de forma e electrostática	199
6.3. Conclusão e Perspetivas Futuras	208
6.4. Bibliografia	212
<b>Capítulo 7 - Parte experimental</b>	222
7.1. Aparelhagem Utilizada	225
7.2. Solventes e reagentes	226
7.3. Índice de compostos	227
7.4. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 3	234
7.4.1. Síntese de novas espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas	234
7.4.1.1 - Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas via cicloadição 1,3-dipolar entre uma diazo- $\gamma$ -lactama e diferentes alquinos deficientes em electrões como dipolarófilos.	238
7.4.1.2. Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas ácidas	239
7.4.2. Síntese de novas espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas	240
7.4.2.1. Procedimento geral para a esterificação de ácidos carboxílicos acetilénicos com difenildiazometano	240
7.4.2.2. Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas via cicloadição 1,3-dipolar entre um 6-diazopenicilanato e diferentes alquinos deficientes em electrões como dipolarófilos.	241

7.4.2.3. Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas ácidas	244
7.4.2.4. Procedimentos para a síntese de outros derivados da molécula <i>lead</i> BSS-593 por derivatização estrutural do seu grupo ácido carboxílico	246
7.5. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 4	248
7.5.1. Síntese de 6-alquilidenopenicilanatos	248
7.5.2. Síntese de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas pela cicloadição [3+2] formal entre um 6-alquilidenopenicilanato e 2-butinoatos	248
7.5.3. Síntese dos restantes espiropenicilanatos análogos da molécula <i>lead</i> BSS-730A	251
7.5.4. Síntese de espiropenicilanatos análogos da molécula <i>lead</i> BSS-730B	254
7.6. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 5	256
7.6.1. Procedimento geral para a síntese de alenos monossubstituídos a partir de iletos de fósforo	256
7.6.2. Síntese de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas pela cicloadição [3+2] formal entre um 6-alquilidenopenicilanato e alenoatos monossubstituídos	262
7.7. Ensaio de bioatividade <i>in vitro</i>	279
7.7.1. Cultura de células	279
7.7.2. Ensaio de viabilidade celular	280
7.7.3. Ensaio de atividade anti-HIV	280
7.7.4. Estudos de tempo de adição	281
7.7.5. Inibição da infeção de <i>P. berghei</i> na fase hepática	281
7.7.6. Inibição da infeção de <i>P. falciparum</i> na fase sanguínea	282
7.7.7. Determinação dos valores de IC <sub>50</sub> e IC <sub>90</sub>	282
7.7.8. Ensaio <i>singlet-target</i> contra uma protéase recombinante do HIV	283
7.8. Estudos computacionais	283
7.8.1. Cálculos conformacionais de energia mínima	283
7.8.2. Construção de base de dados de compostos bioativos com alvo molecular conhecido	283
7.8.3. Pesquisa de similaridade estrutural 2D com descritores do tipo ECFP4	285



7.8.4. Determinação da subestrutura máxima comum entre moléculas	285
7.8.5. Pesquisa de subestrutura molecular	285
7.8.6. Pesquisa de similaridade 3D de forma e electrostática	285
7.8.7. Mapeamento de farmacóforo	286
7.8.8. Estudos de docking	286
7.9. Bibliografia	287
<b>Anexos</b>	292
<b>Anexo 1.</b> Espectros de RMN 1H, 13C e 2D representativos dos novos compostos	294
<b>Anexo 2.</b> Cálculos computacionais teóricos ao nível de teoria DFT – Geometrias otimizadas, energia mínima e coordenadas cartesianas	389
<b>Anexo 3.</b> Alves N. G., Mata A. I., Luís J. P., Brito R. M. M., Simões C. J. V., An Innovative Sequence-to-Structure-Based Approach to Drug Resistance Interpretation and Prediction: The Use of Molecular Interaction Fields to Detect HIV-1 Protease Binding-Site Dissimilarities. <i>Front. Chem.</i> <b>2020</b> , <i>8</i> , 243.	413

## Resumo

O trabalho apresentado nesta tese de Doutorado teve como principal objetivo a descoberta de novos espiroenicilanos quirais com atividade antimicrobiana contra o vírus do HIV e *Plasmodium*, o parasita da malária. Este propósito foi alcançado através de uma estratégia com uma forte componente de modelação estrutural racional de um conjunto de espiro- $\beta$ -lactamas previamente identificados como tendo uma potente bioatividade contra ambos os agentes patógenos.

Este trabalho foi desenvolvido no seguimento de um estudo prévio de bioatividade de uma biblioteca de espiro- $\beta$ -lactamas que permitiu a identificação de uma espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593 e duas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas análogas BSS-730A e BSS-722A, com uma promissora dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*. A molécula BSS-730A revelou-se como a mais promissora da série, demonstrando uma notável atividade submicromolar contra várias estirpes do vírus HIV-1 e HIV-2, incluindo estirpes multirresistentes, e contra as fases hepática e sanguínea da infeção por *Plasmodium*. A identificação destas espiro- $\beta$ -lactamas constituiu o ponto de partida para o presente projeto de Doutorado, servindo estas como moléculas *lead* no *design* de novos espiroenicilanos quirais potencialmente bioativos. A estes resultados altamente promissores sucederam-se um conjunto de estudos visando a descrição e interpretação do mecanismo de ação da molécula BSS-730A. Apesar de não ter sido possível identificar o alvo molecular da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, os resultados obtidos indicam que esta exerce a sua atividade antiviral por um mecanismo complexo e diferente do mecanismo associado aos fármacos anti-HIV atualmente disponíveis no mercado.

As modelações estruturais em torno da espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama identificada como tendo atividade contra HIV e *Plasmodium*, focaram-se no seu anel  $\beta$ -lactama, nos grupos substituintes do anel 3*H*-pirazole e no grupo ácido carboxílico do núcleo penicilano. Neste contexto, foram utilizadas abordagens sintéticas variadas, nomeadamente a cicloadição 1,3-dipolar entre diazo-lactamas e alquinos deficientes em eletrões, desproteção seletiva de ésteres benzidrilos e conversão de ácidos carboxílicos a ésteres e ácidos hidroxâmicos. No caso específico da modelação do anel  $\beta$ -lactama, foi desenvolvida uma nova via sintética que resultou na síntese *de novo* de um núcleo estrutural  $\gamma$ -lactâmico bicíclico análogo da penicilina, a partir do aminoácido natural D-penicilamina. Esta estratégia sintética permitiu a síntese de um conjunto de derivados  $\gamma$ -

lactâmicos, análogos da espiro-3*H*-pirazole-β-lactama bioativa. As novas moléculas sintetizadas pela modelação estrutural da espiro-β-lactama BSS-593 foram testadas para a sua atividade *in vitro* contra o vírus do HIV-1, permitindo a recolha de informações valiosas acerca da relação estrutura-atividade desta classe de espiro-β-lactamas, assim como sobre o seu potencial mecanismo de ação.

Relativamente à classe das espirociclopentenil-β-lactamas, adotou-se uma estratégia de modelação estrutural preliminar em volta de diversos grupos substituintes da espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A, assente em estratégias como a desproteção seletiva de ésteres benzidrilos e a cicloadição [3+2] formal entre 6-alquilidenopenicilanatos e 2-butinoatos ou alenoatos. Esta abordagem permitiu a identificação do éster benzilo da posição 2' do anel ciclopenteno da espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A como sendo suscetível a modelações estruturais, sem que estas comprometam significativamente a atividade antiviral e anti-*Plasmodium* dos derivados. A modelação de tal posição pela substituição do respetivo éster benzilo por pequenos ésteres alquílicos, nomeadamente um éster metílico e etílico, resultou na síntese de dois compostos com atividade nanomolar contra o HIV-1, e atividade micromolar contra *Plasmodium berghei* e *Plasmodium falciparum*. Adicionalmente, foi ainda possível identificar algumas características estruturais críticas para a atividade da classe das espirociclopentenil-β-lactamas.

A identificação de dois novos compostos bioativos, obtidos através da modelação da posição 2' do anel espirociclopenteno da espiro-β-lactama *lead*, serviu de base racional e impulsionadora a uma nova ronda de modelações estruturais focadas exclusivamente naquela posição, visando dotá-la com outros grupos éster variados, como são exemplo ésteres arílicos, ésteres alquílicos de cadeia longa ou ésteres benzílicos substituídos. Com este objetivo foi utilizada uma estratégia sintética exclusivamente baseada na cicloadição [3+2] formal entre um 6-alquilidenopenicilanato e diferentes alenoatos monossustituídos. As novas espirociclopentenil-β-lactamas tiveram a sua atividade *in vitro* anti-HIV-1 determinada, o que resultou na identificação de seis moléculas adicionais com uma atividade antiviral nanomolar, de entre as quais duas demonstraram um notável valor de IC<sub>50</sub> inferior a 20 nM.

Por fim, foram estabelecidos dois protocolos computacionais diferentes, baseados em pesquisas de similaridade contra compostos bioativos de alvo molecular conhecido, com o intuito de recolher informações acerca do alvo molecular putativo da classe das

espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas bioativas desenvolvidas ao longo deste trabalho. Este procedimento implicou a construção de uma base de dados interna contendo a estrutura e dados de bioatividade de cerca de 283 mil compostos com alvo molecular conhecido.

Em suma, os estudos desenvolvidos no decurso desta tese de Doutorado conduziram à síntese de uma biblioteca extensa de novas espiro- $\beta$ -lactamas quirais, de entre as quais foi possível identificar um conjunto relevante de moléculas com uma notável atividade nanomolar contra o vírus do HIV-1. De entre as moléculas com atividade antiviral, todas aquelas cuja atividade anti-*Plasmodium* foi avaliada demonstraram também atividade contra o parasita. Este comportamento é concordante com o anteriormente observado para as moléculas *lead*, e é indicativo de que esta atividade antimicrobiana dupla possa ser transversal a todos os restantes espiropenicilanatos identificados como bioativos contra o vírus do HIV. Esta abordagem resultou ainda na recolha de uma elevada quantidade de informação que permitiu uma interpretação qualitativa extensa e compreensiva da relação de estrutura-atividade das classes de espiro- $\beta$ -lactamas exploradas ao longo deste trabalho. Em termos de resultados relativos ao mecanismo de ação antiviral, focados na molécula *lead* ativa representativa da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, associados à dupla atividade antimicrobiana observada, constituem uma indicação de que estas moléculas possam atuar ao nível do hospedeiro e, conseqüentemente, poderão demonstrar atividade contra outros agentes patógenos para além dos já explorados. No cômputo geral, os notáveis resultados de bioatividade e mecanismo de ação apresentados ao longo desta tese de Doutorado, traduzem-se numa afirmação inequívoca do potencial farmacoterapêutico da classe das espiro- $\beta$ -lactamas no panorama da saúde pública atual, justificando a aposta no seu desenvolvimento como uma possível alternativa às terapias antivirais e anti-malária atualmente disponíveis.

## Abstract

The main goal of this PhD thesis was the discovery of new chiral spiropenicillanates with antimicrobial activity against HIV and *Plasmodium*. This purpose was achieved through a strategy relying on rational structural modulation of a set of spiro- $\beta$ -lactams previously identified as highly potent against the two pathogens.

The present work was developed following a prior bioactivity study focused on a library of spiro- $\beta$ -lactams which allowed the identification of a spiro-3*H*-pyrazol- $\beta$ -lactam BSS-593 and two spirocyclopentenil- $\beta$ -lactams BSS-730A and BSS-722A, displaying a promising dual activity against both HIV and *Plasmodium*. The most promising molecule, BSS-730A, presented a remarkable submicromolar activity against multiple strains of HIV-1 and HIV-2, including multidrug resistant strains, and against both hepatic and erythrocytic stages of *Plasmodium* infection. The identification of these spiro- $\beta$ -lactams was the starting point for this PhD thesis, as these served as lead molecules for the rational design of new chiral spiro- $\beta$ -lactams potentially bioactive. These highly promising preliminary results were followed by studies focused on determining the mechanism of action of the most promising molecule BSS-730A. Although it was not possible to identify its molecular target, the results suggest that spiro- $\beta$ -lactam BSS-730A exerts its antiviral activity through a complex mechanism, different from those of the currently approved anti-HIV drugs.

Spiro-3*H*- $\beta$ -lactam BSS-593, active against HIV and *Plasmodium*, was target of structural modulations on its  $\beta$ -lactam ring, 3*H*-pyrazol ring substituents and carboxylic acid moiety. This approach comprised synthetic strategies such as 1,3-dipolar cycloaddition between diazo-lactams and electron-deficient alkynes, selective deprotection of benzhydryl esters and carboxylic acid conversion to an ester or an hydroxamic acid. Concerning the structural modulation of the  $\beta$ -lactam ring, an unprecedented synthetic route was developed, resulting in the *de novo* synthesis of a penicillin analogue  $\gamma$ -lactam bicyclic structural core, from the natural amino acid D-penicillamine. The previous synthetic approach allowed the synthesis of spiro-3*H*-pyrazol- $\gamma$ -lactams analogues of BSS-593. All the new molecules synthesized through structural modulation of spiro- $\beta$ -lactam BSS-593 were assayed for their *in vitro* activity against HIV-1, allowing the gathering of relevant information about the spiro-3*H*-pyrazol- $\beta$ -lactams' structure-activity relationship and mechanism of action.

Concerning the synthesis of new spirocyclopentenyl- $\beta$ -lactams, a preliminary structural modulation strategy was performed using BSS-730A as lead molecule. This strategy included synthetic approaches such as selective deprotection of benzhydryl esters and [3+2] annulation of 6-alkylidenepenicilanates with allenes or 2-butynoates. The benzyl ester present on position 2' of BSS-730A's cyclopentenene ring was identified as susceptible to structural modulations, since structural changes on this functional group did not significantly compromise the obtained derivatives' bioactivity. In fact, the replacement of the benzyl ester with small alkyl esters, namely a methyl and an ethyl ester, afforded two new spirocyclopentenil- $\beta$ -lactams with nanomolar activity against HIV-1 and micromolar activity against *Plasmodium berghei* and *Plasmodium falciparum*. Moreover, the later structural modulation strategy allowed the identification of some structural features which are critical for BSS-730A antiviral activity. These promising results led to a new round of structural modulations exclusively focused on position 2' of BSS-730A's cyclopentenyl ring, namely by endowing this position with different classes of esters, like aryl esters, long chain alkyl esters or substituted benzyl esters as the main examples. The new spirocyclopentenil- $\beta$ -lactams were synthesized via [3+2] annulation of a 6-alkylidenepenicilanate with a set of different monosubstituted allenes. The new BSS-730A's analogues were assayed for their *in vitro* anti-HIV-1 activity, being identified six additional molecules with nanomolar activity against HIV-1, among which two showed a remarkable IC<sub>50</sub> value lower than 20 nM.

Finally, two different computational approaches relying on similarity search were employed with the purpose of gathering information regarding the bioactive spiro- $\beta$ -lactams putative molecular target. The former approach required the building of an internal database containing structural and bioactivity data of around 283 thousand bioactive compounds with known molecular target.

In summary, the work developed during this PhD thesis led to the synthesis of an extensive library of new chiral spiro- $\beta$ -lactams, among which was identified a set of molecules with a potent *in vitro* activity against HIV-1. Two of the spiro- $\beta$ -lactams which displayed antiviral activity were tested for their antiparasitic activity, proving to also inhibit both the parasite's hepatic and blood infectious stage. Such behaviour agrees with the bioactivity profile observed for the lead molecules, suggesting that this dual antimicrobial activity may be transversal to all the identified bioactive spiro- $\beta$ -lactams. Moreover, this approach allowed an extensive and comprehensive qualitative analysis

and interpretation concerning the structure-activity relationship of the spiro-3*H*-pyrazol- $\beta$ -lactams and spirocyclopentenil- $\beta$ -lactams explored during this work. Studies focused on unveiling the lead molecule BSS-730A's mechanism of action combined with the observed dual antimicrobial activity suggest that the bioactive spiro- $\beta$ -lactams may display activity against other pathogens, apart from those already explored. Overall, the studies and respective results reported herein support the claim that the spiro- $\beta$ -lactam's class present a remarkable pharmacotherapeutic potential, justifying its further development as a possible alternative to currently available antiviral and antiplasmodial therapies.

## Prefácio

Após a descoberta da penicilina G por Alexander Fleming em 1928, as  $\beta$ -lactamas tornaram-se numa das mais importantes classes de fármacos de toda a história mundial. Apesar de maioritariamente reconhecidas pela sua ação antibacteriana, a versatilidade da classe das  $\beta$ -lactamas revelou-se notável, traduzindo-se no desenvolvimento de vários compostos  $\beta$ -lactâmicos com utilidade terapêutica nos mais variados quadrantes da farmacoterapia. No seio das  $\beta$ -lactamas, as espiro- $\beta$ -lactamas surgem como um subgrupo de destaque. À imagem do que acontece com os seus análogos não espirocíclicos, a classe das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas contém derivados que no seu conjunto apresentam um amplo espectro de bioatividade, onde se incluem atividades biológicas variadas como são exemplo a atividade antimicrobiana e a inibição da absorção de colesterol ou da ação das  $\beta$ -lactamases. Adicionalmente, as  $\beta$ -lactamas espirocíclicas são também caracterizadas por apresentarem uma conformação tridimensional única, que deriva do facto de apresentarem dois anéis distintos que partilham um carbono quaternário entre si. Esta conjugação de características funcionais e estruturais estabeleceu as espiro- $\beta$ -lactamas como um dos focos de atenção da química medicinal, na procura por novas entidades com atividade farmacológica.

Atualmente, infeções pelo vírus do HIV e a malária são dois dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial, afetando milhões de pessoas, sendo verificada uma especial incidência em países subdesenvolvidos onde a prevalência destas doenças constitui um fator impeditivo ao progresso social e económico. Adicionalmente, existe uma considerável sobreposição geográfica entre o HIV e o *Plasmodium*, o parasita da malária, especialmente na região da África Subsaariana. Desta forma, a coinfeção é comum nestas regiões, o que contribui extensivamente para a patogénese e propagação de ambas as doenças. Tendo em conta todo o contexto envolvente das infeções por HIV e malária, o desenvolvimento de um fármaco com atividade contra ambos os agentes patógenos seria de relevância extrema para a saúde pública mundial.

Tendo por base as reconhecidas potencialidades de bioatividade das espiro- $\beta$ -lactamas e as necessidades de saúde pública atuais, a presente tese de Doutoramento focou-se no desenvolvimento de novos espiropenicilanatos com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*, num trabalho que sucede a um extenso conjunto de estudos focados



na síntese de novas espiro- $\beta$ -lactamas quirais, desenvolvidos pelo grupo de Pinho e Melo ao longo dos últimos anos.

No primeiro capítulo da presente tese foram reunidos e discutidos de forma extensiva os avanços na síntese de  $\beta$ -lactamas espirocíclicas que ocorreram desde 2015, matéria esta que assume um carácter introdutório neste trabalho.

No segundo capítulo são introduzidas três espiro- $\beta$ -lactamas identificadas como tendo atividade anti-HIV e anti-*Plasmodium*, nomeadamente uma espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593 e duas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas análogas BSS-730A e BSS-722A, cuja descoberta constituiu o mote para o presente trabalho. Neste capítulo são apresentados uma panóplia de resultados relativos à bioatividade das três espiro- $\beta$ -lactamas com especial ênfase na molécula BSS-730A, identificada como a mais promissora da série. São também apresentados vários estudos focados na descoberta e caracterização do mecanismo de ação biológico da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A.

O terceiro capítulo versa sobre a modelação estrutural da espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593, sendo apresentada a síntese dos seus derivados por estratégias sintéticas como a cicloadição 1,3-dipolar entre diazo-lactamas e alquinos deficientes em electrões, desproteção seletiva de ésteres benzidrilos e a conversão de ácidos carboxílicos a ésteres e ácidos hidroxâmicos. A síntese de espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactamas análogas da molécula BSS-593 também se insere neste capítulo. Os resultados de atividade contra HIV-1 respetivos às moléculas sintetizadas, assim como a relação de estrutura-atividade estabelecida para este conjunto de lactamas espirocíclicas são também apresentados e discutidos.

Por sua vez, os capítulos 4 e 5 são ambos dedicados às modelações estruturais da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, com recurso a estratégias sintéticas como a desproteção seletiva de ésteres benzidrilos e cicloadição [3+2] formal entre 6-alquilidenopenicilانات e 2-butinoatos ou alenoatos. Nestes capítulos são também apresentados os resultados de atividade anti-HIV dos compostos sintetizados. No capítulo 4 é igualmente apresentada a atividade anti-*Plasmodium* dos compostos mais ativos contra o vírus do HIV desenvolvidos ao longo do capítulo. A relação-estrutura atividade da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas é também discutida de forma

compartimentada entre os capítulos 4 e 5 e tendo por base os compostos respetivos a cada capítulo.

No capítulo 6 deste trabalho é apresentada a construção de uma biblioteca química virtual contendo apenas compostos bioativos com alvo molecular determinado, assim como os resultados das abordagens computacionais que visaram a recolha de informações potencialmente relevantes para a identificação do alvo molecular das espiro- $\beta$ -lactamas bioativas. No seguimento destes resultados são também abordadas as perspetivas futuras deste trabalho.

Finalmente, o capítulo 7 reúne os procedimentos experimentais utilizados ao longo deste trabalho assim como a caracterização dos compostos sintetizados.

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado durante o período compreendido entre Novembro de 2017 e Dezembro de 2020, no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, resultando na coautoria de três artigos científicos originais publicados em revistas científicas de circulação internacional, aos quais se acrescentam dois artigos de revisão na área da síntese de lactamas espirocíclicas. Os resultados obtidos ao longo do presente projeto de Doutoramento foram ainda apresentados em congressos nacionais e internacionais na forma de comunicações orais ou em painel. Foram ainda obtidos resultados entendidos como altamente relevantes que por motivos de confidencialidade não são apresentados na presente tese.

No decorrer deste projeto de Doutoramento foi ainda publicado um outro artigo numa revista científica de circulação internacional, no qual é apresentado o desenvolvimento de um procedimento computacional de previsão de suscetibilidade da protéase do HIV aos respetivos inibidores utilizados em terapia anti-retroviral. Este trabalho pode ser consultado no anexo 3. O conteúdo deste mesmo artigo não foi abordado na presente tese de modo a manter a uniformidade e coerência da mesma.

## Abreviaturas

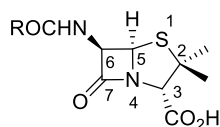
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico
2-Me-THF	2-Metiltetrahidrofurano
Ar	Derivados do fenil
ART	do inglês <i>AntiRetroviral Therapy</i>
Bn	Benzil
Boc	<i>terc</i> -Butiloxicarbonil
Bu	Butil
CC <sub>50</sub>	do inglês <i>half maximal Cytotoxic Concentration</i>
COSY	do inglês <i>CORrelated SpectroscopY</i>
d	Dubleto
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCE	1,2-Dicloroetano
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dest	Destilação
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DIB	diacetato de iodobenzeno
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
DRV	Darunavir
dt	Duplo tripleto
DTG	Dolutegravir
e.g.	Por exemplo (do latim <i>exempli gratia</i> )
ECFP	do inglês <i>Extended-Conectivity FingerPrints</i>
EEDQ	<i>N</i> -etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
EI	Inibidor de Entrada
EMAR	Espectroscopia de massa de alta resolução
Equiv.	Equivalentes

ESI	do inglês <i>ElectroSpray</i>
Et	Etil
HBTM	Homobenzotetramisol
HCMV	Citomegalovirus Humano (do inglês <i>Human CytoMegalovirus</i> )
HCTU	<i>O</i> -(1H-6-clorobenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilurônio hexafluorofosfato
HFIP	Hexafluoro-2-propanol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HMBC	do inglês <i>Heteronuclear Multi-Bond Correlation</i>
HSQC	do inglês <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
IC <sub>50</sub>	do inglês <i>half maximal Inhibitory Concentration</i>
II	Inibidor de Integrase
IUPAC	do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Espectroscopia de Infra-Vermelho
LPV	Lopinavir
m	Multiplete
M	Ião Molecular
MCS	Subestrutura Máxima Comum (do inglês <i>Maximum Common Substructure</i> )
Me	Metil
Ms	Mesil
MTBE	Metil <i>terc</i> -butil éter
n.d.	Não determinado
NHC	Carbenos N-heterocíclicos (do inglês <i>N-heterocyclic carbene</i> )
NMM	<i>N</i> -metilmorfolina
NMO	<i>N</i> -metilmorfolina <i>N</i> -óxido
NNRTI	Inibidor da Transcriptase Reversa Não-Análogo de Nucleosídeos
NOE	do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	do inglês <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NRTI	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos
p.f.	Ponto de Fusão
PBMC	do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBP	do inglês <i>Penicillin Binding Proteins</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Ph	Fenil (do inglês <i>Phenyl</i> )

PI	Inibidor de Protease
PMB	<i>p</i> -Metoxibenzil
PMI	Porcentagem Máxima de Inibição
PMP	<i>p</i> -Metoxibenzil
PMP	<i>p</i> -Metoxifenil
ppm	Partes por milhão
Pr	Propil
Py	Piridina
q	Quarteto
RAL	Raltegravir
RMN	Espectroscopia de ressonância magnética
RMN <sup>13</sup> C	Espectroscopia de ressonância magnética de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Espectroscopia de ressonância magnética protónica
RT	Transcriptase reversa
s	Singleto
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
sl	Singleto largo
t	Tripleto
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TAF	tenofovir alafanamida
TFA	Ácido trifluoroacético
TFT	$\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluorotolueno
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia de camada fina (do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i> )
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Trifenilmetil
Ts	Tosil

## Nomenclatura

Nesta tese de Doutorado utilizou-se a ordem de numeração clássica dos compostos  $\beta$ -lactâmicos. Esta numeração continua a ser utilizada na literatura<sup>a</sup> e é apresentada no Exemplo 1.



### Exemplo 1

Para todos os restantes compostos, a nomenclatura utilizada seguiu as regras gerais da IUPAC.<sup>b</sup>

Na escrita desta tese foi adotado o plural “óis”, para compostos heterocíclicos em que o singular é “le”, como demonstra o Exemplo 2.

### Exemplo 2: índole → indóis

Ao longo desta tese foram utilizadas as seguintes expressões anglo-saxónicas: reação ou síntese *one-pot*, relativamente a sínteses químicas que compreendem múltiplas reações sucessivas que ocorrem no mesmo meio reacional de modo a fornecer um determinado produto; molécula *lead*, que diz respeito a uma molécula líder de uma determinada classe, usada para propósitos de modelação estrutural; *fingerprints*, traduzido para o português como “impressões digitais” e que refere a uma classe de descritores de estrutura molecular bidimensional; *target fishing* referente a estratégias de pesquisa de alvo recorrendo a procedimentos computacionais; e molécula *query*, molécula que constitui a referência comparativa no âmbito de uma pesquisa de similaridade.

<sup>a</sup> Jastrzebski, J. T. B. H.; Koten, G. *Penicillins*. In: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* (Eds.: Katritzky, A. R.; Rees, C. W.; Scriven, E. F. V.), Elsevier, Oxford, 1996, vol. 1B, cap. 1.20.

<sup>b</sup> 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.

# **Capítulo 1**

## **Introdução**

## Capítulo 1 - Introdução

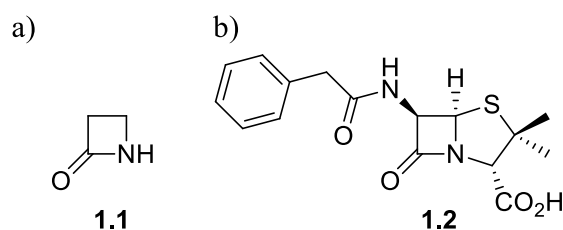
1.1. Importância e diversidade dos compostos $\beta$ -lactâmicos	3
1.1.1. $\beta$ -Lactamas	3
1.1.2. Espiro- $\beta$ -lactamas	7
1.2. Estratégias sintéticas para a obtenção de espiro- $\beta$ -lactamas	9
1.2.1. Lactamização de compostos contendo uma subunidade estrutural cíclica	9
1.2.1.1. Cicloadição de Staudinger	9
1.2.1.2. Reação de Mannich/Lactamização sequenciais	20
1.2.1.3. Reação de Reformatsky	24
1.2.1.4. Lactamização intramolecular independente de catálise por metais	26
1.2.1.5. Reações de lactamização catalisadas por metais	31
1.2.2. Espirociclização de moléculas contendo um anel 2-azetidinona	36
1.2.2.1. Espirociclização de $\alpha$ -alquilideno- $\beta$ -lactamas	36
1.2.2.2. Espirociclização mediada por halogéneos	41
1.3. Conclusão e enquadramento do projeto de Doutorado	44
1.4. Bibliografia	46



## 1.1. Importância e diversidade dos compostos $\beta$ -lactâmicos

### 1.1.1. $\beta$ -Lactamas

As  $\beta$ -lactamas, ou 2-azetidionas, constituem uma classe moléculas caracterizadas pela presença na sua estrutura de um anel  $\beta$ -lactâmico (**1.1**), um anel heterocíclico de 4 membros contendo uma ligação amida (Figura 1.1).<sup>1-7</sup> Apesar de terem sido sintetizadas pela primeira vez em 1907 por Hermann Staudinger,<sup>8,9</sup> o potencial destas moléculas manteve-se desconhecido durante aproximadamente 20 anos. De facto, foi apenas em 1928 que as  $\beta$ -lactamas se tornaram num foco de interesse do mundo científico quando por um acaso fortuito Alexander Fleming descobriu a penicilina G (**1.2**), comumente referida apenas como penicilina e a primeira molécula identificada como tendo propriedades antibióticas (Figura 1.1).<sup>10</sup> Apesar da descoberta de Fleming ter revelado um imenso potencial terapêutico, o seu uso generalizado e a necessária produção industrial apenas têm início nos primórdios dos anos 40, num contexto histórico muito particular, nomeadamente durante o desenrolar da Segunda Guerra Mundial.<sup>11,12</sup> E é em resposta a este mesmo contexto bélico devastador e de elevada mortalidade, que a penicilina se assume inequivocamente como uma das mais importantes descobertas da história da Humanidade, salvando milhares de vidas devido à sua atividade antibiótica. A produção de penicilina e a sua disponibilidade na frente de batalha tornam-se partes indispensáveis de toda a logística envolvente do confronto por parte dos Aliados, fazendo o antibiótico parte do inventário das tropas.<sup>13-16</sup>



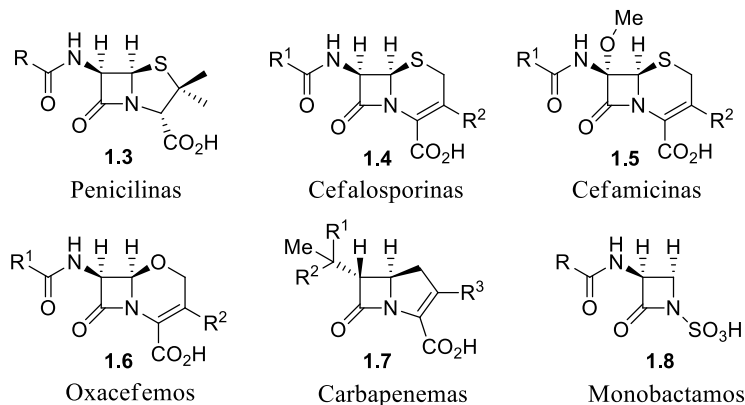
**Figura 1.1** - a) Anel de  $\beta$ -lactama ou 2-azetidionona (**1.1**) e b) estrutura molecular da penicilina G (**1.2**).

O sucesso da penicilina associado à publicação da sua estrutura cristalográfica por Dorothy Crowfoot Hodgkin em 1949, demonstrando de forma inequívoca a presença do anel  $\beta$ -lactâmico,<sup>17</sup> e a primeira síntese total da penicilina V alcançada por Sheehan em 1957,<sup>18</sup> lançaram as bases para a síntese e desenvolvimento de uma enorme panóplia de compostos  $\beta$ -lactâmicos naturais, sintéticos e semi-sintéticos. Estes esforços deram origem a diversas moléculas com atividade antibacteriana que partilham o mesmo anel  $\beta$ -

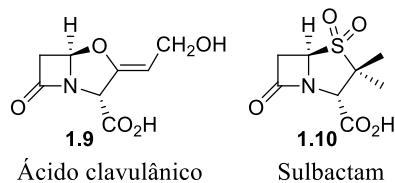
lactâmico mas divergem nos seus substituintes, podendo o anel aparecer fundido com estruturas cíclicas, como são exemplo a própria penicilina e as cefalosporinas<sup>19</sup>, ou ligado a substituintes não cíclicos como acontece nos monobactamos<sup>20</sup> (Figura 1.2). No seu conjunto, este arsenal terapêutico consolidou a classe das  $\beta$ -lactamas como uma classe antibiótica ampla e de excelência, que é altamente valorizada não apenas pela sua elevada eficácia antibacteriana e largo espectro, mas também devido à sua baixa toxicidade e baixo custo de produção.<sup>21,22</sup>

Apesar do seu sucesso a nível terapêutico, o uso indiscriminado e irresponsável dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem contribuído para o desenvolvimento de estirpes bacterianas resistentes, maioritariamente através de mutações e transferência de genes das  $\beta$ -lactamases, enzimas bacterianas responsáveis pela inativação das  $\beta$ -lactamas.<sup>23,24</sup> Ainda assim, a polivalência da classe das  $\beta$ -lactamas foi materializada no desenvolvimento de inibidores de  $\beta$ -lactamases contendo um anel  $\beta$ -lactâmico. São exemplos os casos do ácido clavulânico (**1.9**) e do sulbactam (**1.10**), fármacos utilizados como coadjuvantes na terapia antibiótica com  $\beta$ -lactamas, prevenindo a sua inativação pelas  $\beta$ -lactamases bacterianas (Figura 1.2).<sup>25-28</sup>

**a) Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos**

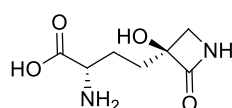


**b) Inibidores das  $\beta$ -lactamases**



**Figura 1.2** – Estrutura dos principais a) antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e b) fármacos inibidores das  $\beta$ -lactamases.

Em termos gerais, as  $\beta$ -lactamas são miméticos estruturais do resíduo dipeptídico terminal D-Alanina-D-Alanina das cadeias peptidoglicanas individuais, biossintetizadas pelas bactérias. Tirando partido deste mimetismo, as  $\beta$ -lactamas exercem a sua atividade antibacteriana por interagirem e inibirem a função das carboxipeptidases e DD-transpeptidases bacterianas (PBPs – *Penicillin Binding Proteins*), enzimas estas que são responsáveis pela polimerização e *cross-linking* entre cadeias na síntese da matriz de peptidoglicano.<sup>29-31</sup> Este biopolímero é o componente maioritário e essencial da parede celular das bactérias, cuja integridade estrutural é indispensável à viabilidade celular na medida em que impede a ruptura osmótica e consequente lise celular do patógeno.<sup>32,33</sup> A inibição molecular ocorre por inibição covalente do resíduo de serina da tríade catalítica das PBPs, através de um mecanismo concertado de abertura do anel  $\beta$ -lactâmico e subsequente acilação das enzimas.<sup>34</sup> O alívio da elevada tensão do anel torna o presente mecanismo de acilação energeticamente favorável. Adicionalmente, foi também descrita a importância da presença de um grupo ionizável, como um ácido carboxílico, na proximidade do anel  $\beta$ -lactâmico para a atividade antibacteriana das  $\beta$ -lactamas. Em suma, o grupo ionizável após ser protonado no centro ativo da enzima, atua como catalisador da abertura do anel ao estabelecer uma ponte de hidrogénio com o azoto da ligação amida, facilitando assim a reação de acilação.<sup>35</sup> É de notar, no entanto, que a  $\beta$ -lactama tabtoxinina (**1.11**) constitui uma exceção ao mecanismo típico de ação antibacteriana das  $\beta$ -lactamas, exercendo a sua atividade por inibição da enzima bacteriana glutamina sintase (Figura 1.3).<sup>36,37</sup>

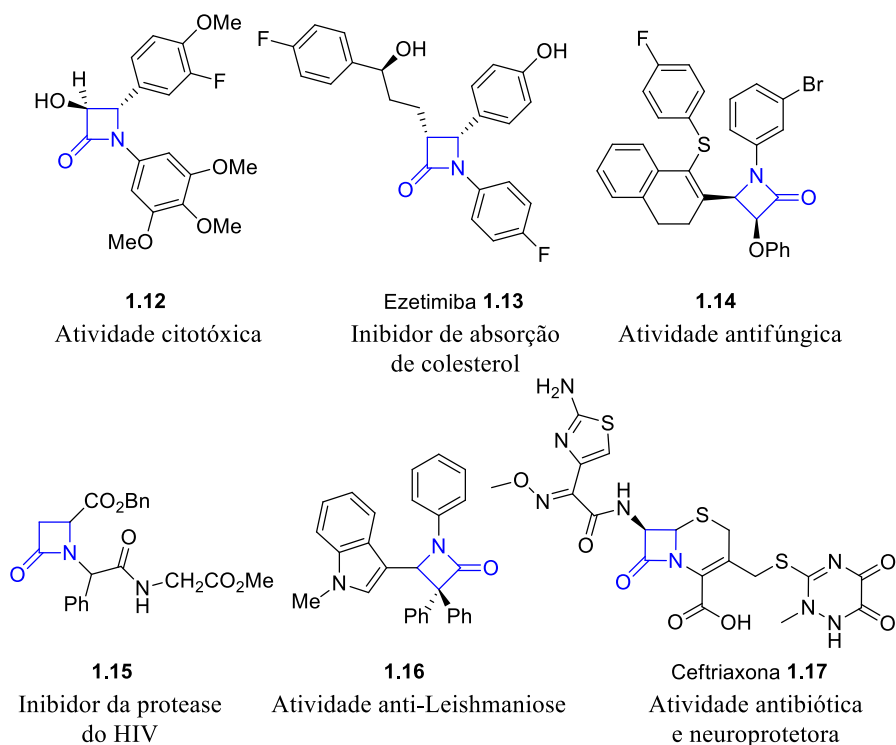


**1.11**  
Tabtoxinina

**Figura 1.3** – Estrutura molecular do antibiótico  $\beta$ -lactâmico tabtoxinina que atua por inibição da enzima bacteriana glutamina sintase.

No entanto, a importância das descobertas de Staudinger e Fleming foram além da descoberta da maior e mais bem-sucedida classe de antibióticos da história, já que o crescente interesse nestes heterociclos levou à afirmação das  $\beta$ -lactamas como uma das mais versáteis classes de moléculas dentro da química medicinal. A atividade das  $\beta$ -lactamas provou ser significativamente mais abrangente que a sua altamente explorada atividade antibacteriana e de inibição de  $\beta$ -lactamases. Hoje são conhecidos vários

exemplos de  $\beta$ -lactamas com as mais variadas bioatividades que vão desde atividade antioxidante,<sup>38</sup> citotóxica,<sup>39-42</sup> antiviral,<sup>43,44</sup> antiparasitária<sup>45-49</sup> ou antifúngica,<sup>50-53</sup> à inibição da absorção de colesterol<sup>54,55</sup> e enzimas endógenas<sup>56,57</sup> (Figura 1.4). A ceftriaxona (**1.17**), uma molécula da família das cefalosporinas, é um fármaco aprovado e comercialmente disponível, apresentando atividade neuroprotetora para além da sua atividade antibacteriana convencional.<sup>58-60</sup> As  $\beta$ -lactamas são também importantes intermediários na síntese de orgânica de  $\alpha$ - e  $\beta$ -aminoácidos e péptidos.<sup>61-63</sup>



**Figura 1.4** – Exemplos da diversidade de atividades biológicas associadas à classe das  $\beta$ -lactamas.

Numa altura em que a resistência antibacteriana às terapias convencionais em geral continua a aumentar, assumindo-se cada vez mais como um problema de saúde pública e pondo em causa a futura utilidade dos fármacos antibacterianos presentemente disponíveis, torna-se imperativo o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para combater este problema. Assim a reinvenção da classe das  $\beta$ -lactamas torna-se uma via plausível para a renovação do atual arsenal terapêutico de ação antibiótica, seja pela modelação estrutural de  $\beta$ -lactamas já existentes que permita prevenir a sua inativação por parte das enzimas bacterianas, ou pelo *design* racional e síntese de novas moléculas desta classe com atividade antibacteriana ou de inibição de  $\beta$ -lactamases.<sup>23,64-66</sup> No seguimento desta procura por inovação e reinvenção da classe das  $\beta$ -lactamas como

antibióticos de eleição, é também desejável que a mesma estratégia permita expandir ainda mais o espectro de atividades biológicas desta classe de moléculas no panorama terapêutico geral.

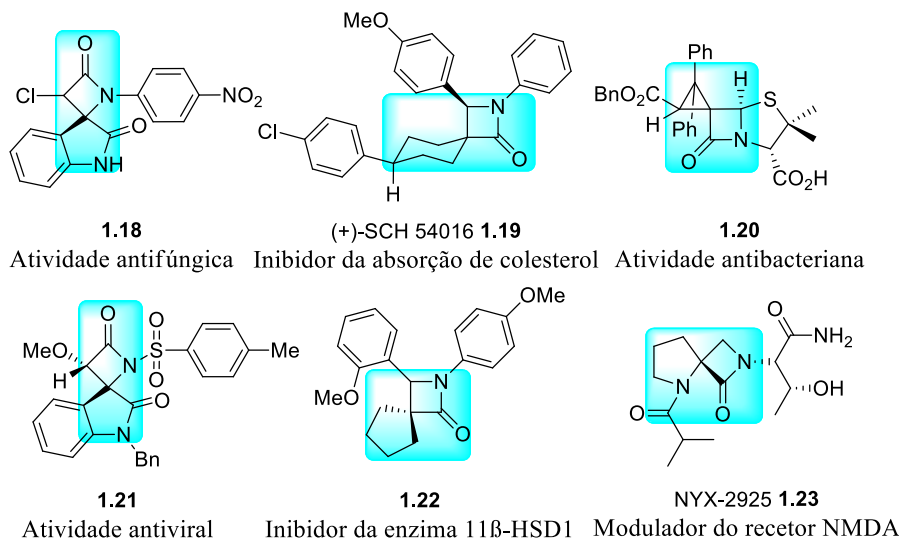
Ciente desta necessidade e da importância e potencial das  $\beta$ -lactamas no panorama da saúde geral e da química medicinal e orgânica, a comunidade científica tem explorado várias abordagens sintéticas para a preparação do anel  $\beta$ -lactâmico. Para além da tradicional e histórica reação de Staudinger que compreende uma ciclo-adição [2+2] formal (ou ciclocondensação) entre um ceteno e uma imina, têm sido também utilizados outros procedimentos visando a síntese de  $\beta$ -lactamas baseados em reações de inserção de carbenos, reações de lactamização intramolecular, entre outras abordagens. Na senda destes esforços, vários artigos de revisão foram produzidos, inclusive num passado recente, abordando exatamente a temática da síntese e reatividade de  $\beta$ -lactamas,<sup>2,67-71</sup> indo ao encontro das atuais necessidades da saúde mundial no que ao desenvolvimento de terapias alternativas e eficientes diz respeito.

### 1.1.2. Espiro- $\beta$ -lactamas

Resumidamente, os compostos espirocíclicos são caracterizados pela presença de dois anéis distintos que partilham um mesmo átomo, usualmente um carbono quaternário, permitindo a disposição permanente de dois anéis em planos diferentes na mesma molécula. Esta característica estrutural induz rigidez e possibilita uma disposição tridimensional única dos grupos funcionais da molécula. A rigidez estrutural inerente aos compostos espirocíclicos em geral, leva também a uma diminuição da entropia conformacional nas interações da molécula espirocíclica potencialmente bioactiva e o seu alvo molecular putativo.<sup>72,73</sup> Neste contexto, surgem várias moléculas com atividade biológica cujo seu núcleo estrutural é espirocíclico. Desta forma, os compostos espirocíclicos têm vindo a atrair muita atenção na área dos produtos naturais e da química medicinal.

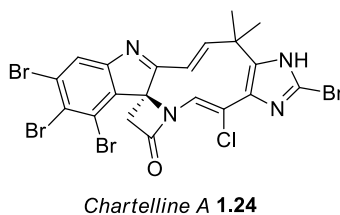
Na interseção entre as  $\beta$ -lactamas e os compostos espirocíclicos surgem as espiro- $\beta$ -lactamas, cujo carácter espirocíclico lhe confere características estruturais e funcionais muito próprias e diferenciadas das apresentadas pelas  $\beta$ -lactamas convencionais (Figura 1.5). Esta classe proeminente de moléculas inclui diversas moléculas bioativas como são exemplo a espiro-oxindole- $\beta$ -lactama **1.18** com atividade antifúngica,<sup>74</sup> o inibidor de absorção de colesterol (+)-SCH 54016 (**1.19**),<sup>75</sup> o espiropenicilanato **1.20** que apresenta

atividade antimicrobiana,<sup>76</sup> o antiviral **1.21**,<sup>77</sup> o inibidor da enzima humana 11 $\beta$ -HSD1 **1.22**<sup>78</sup> ou o modulador do recetor NMDA, NYX-2925 (**1.23**)<sup>79</sup>.



**Figura 1.5** - Exemplos da diversidade de atividades biológicas associadas à classe das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas.

O núcleo estrutural espiro- $\beta$ -lactâmico encontra-se ainda na estrutura molecular de produtos naturais como é o caso da *Chartelline A* (Figura 1.6), um alcalóide isolado a partir do briozoário marinho *Chartella papyracea*.<sup>80-83</sup> Por fim, as espiro- $\beta$ -lactamas podem ser utilizadas ainda como precursores de  $\beta$ -aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -dissubstituídos e péptidos ou miméticos de  $\beta$ -turns.<sup>84,85</sup>



**Figura 1.6** – Estrutura molecular do alcalóide *Chartelline A*, isolado da espécie *Chartella papyracea*.

No entanto, a importância e potencial das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas não se resume à sua utilidade em química medicinal e descoberta de novos fármacos. A sua estrutura complexa faz com que as espiro- $\beta$ -lactamas tenham assumido também um papel relevante na área da síntese orgânica e assimétrica, sendo que estes compostos têm vindo a ser explorados como precursores sintéticos ou indutores de quiralidade.

Acompanhando a crescente relevância das espiro- $\beta$ -lactamas em diversos ramos da química, vários grupos de investigação têm dedicado o seu trabalho ao desenvolvimento e otimização de estratégias para a síntese de  $\beta$ -lactamas espirocíclicas. Estes esforços têm sido consideravelmente frutíferos, resultando numa panóplia de estratégias sintéticas que vão desde o método clássico de Staudinger até estratégias mais recentes e elaboradas como é o caso das reações de anulação catalisadas por carbenos N-heterocíclicos. Alguns artigos de revisão têm vindo a compilar de forma mais ou menos extensa os avanços sintéticos na área da síntese de espiro- $\beta$ -lactamas, sendo que nalguns casos são destacadas também as propriedades biológicas desta classe de moléculas.<sup>7,86</sup>

Tanto quanto se sabe de acordo com a informação disponível, os primeiros avanços no desenvolvimento de  $\beta$ -lactamas espirocíclicas remontam às décadas de 60 e 70.<sup>87,88</sup> No entanto, dado o elevado volume de trabalho que tem vindo a ser produzido nesta área, neste trabalho apenas são apresentados os desenvolvimentos mais relevantes relativamente à síntese de espiro- $\beta$ -lactamas desde 2015. Esta informação está organizada de acordo com a estratégia de construção do espirociclo, nomeadamente se o mesmo foi construído a partir da lactamização de um precursor contendo uma subunidade estrutural cíclica ou através da construção do segundo anel a partir de um precursor contendo um anel  $\beta$ -lactâmico.

De referir por fim que ao longo dos capítulos 2, 3, 4 e 5 serão também focados com especial detalhe os casos específicos de desenvolvimentos anteriores a 2015 alcançados pelo grupo de Pinho e Melo na síntese de espiropenicilانات, pois os mesmos constituem o mote do presente trabalho.

## **1.2. Estratégias sintéticas para a obtenção de espiro- $\beta$ -lactamas**

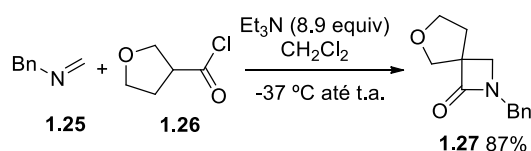
### **1.2.1 - Lactamização de compostos contendo uma subunidade estrutural cíclica**

#### **1.2.1.1 - Cicloadição de Staudinger**

Como anteriormente referido, a reação de Staudinger foi a primeira abordagem utilizada para a síntese do anel  $\beta$ -lactâmico. Esta reação foi descrita em 1907 pelo químico alemão Hermann Staudinger, ficando exatamente conhecida pelo nome do seu autor. Esta reação ocorre entre uma imina e um ceteno que reagem por via de uma cicloadição [2+2] formal que origina o anel 2-azetidiona, num processo em dois passos sequenciais e que envolve um intermediário zwitteriônico. Os cetenos são usualmente sintetizados a partir

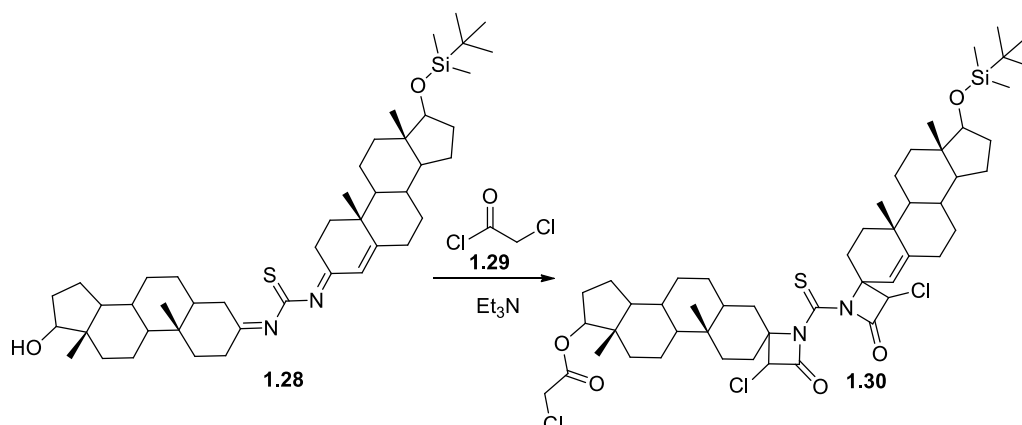
da reação entre cloretos de acilo e trietilamina, sendo muitas vezes gerados *in situ* de forma a evitar os problemas de estabilidade e isolamento inerentes a este tipo de moléculas. Apesar de serem conhecidos diversos métodos alternativos à reação de Staudinger, esta estratégia continua a ser referência para a síntese da mais variada panóplia de  $\beta$ -lactamas, onde se inclui as espiro- $\beta$ -lactamas.<sup>89-92</sup>

Em 2015, Karlsson, Sörensen e colaboradores sintetizaram a espiro- $\beta$ -lactama **1.27**, através da cicloadição de Staudinger entre *N*-metileno-1-fenilmetanamina **1.25** e o cloreto de tetrahydrofurano-3-carbonilo **1.26** na presença de trietilamina (Esquema 1.1).<sup>93</sup> O produto foi obtido com um rendimento de 87%. De notar que esta reação foi feita também através da utilização de química de fluxo utilizando *N*-metilpiperidina como base, obtendo-se a espiro- $\beta$ -lactama com um rendimento de 56%.



**Esquema 1.1** - Síntese de Staudinger de 6-oxa-2-azaespiro[3.4]octan-1-ona.

A reação de Staudinger foi explorada também na síntese de uma bis-espiro- $\beta$ -lactama **1.30** derivada do androgénio, tendo como precursores uma imina **1.28** derivada da dihidrotestosterona e o cloreto de cloroacetilo (**1.29**), ocorrendo a reação na presença de trietilamina (Esquema 1.2).<sup>94</sup> A molécula foi obtida num processo envolvendo a construção de dois anéis 2-azetidínona com um rendimento de 76%.

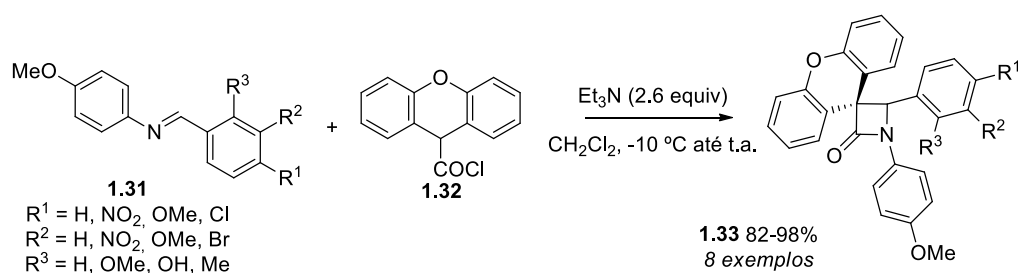


**Esquema 1.2** - Síntese de um derivado espiro- $\beta$ -lactâmico do androgénio.

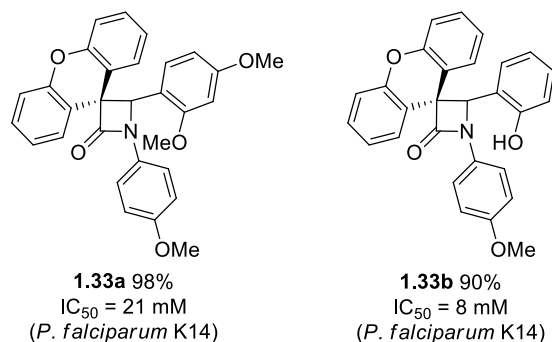
Um conjunto de oito espiro- $\beta$ -lactamas **1.33** contendo um resíduo de xanteno na posição C-3 do anel da 2-azetidínona foram sintetizadas com rendimentos elevados (82-



98%) recorrendo à reação de Staudinger (Esquema 1.3).<sup>47</sup> Para esta síntese, o cloreto de 9*H*-xanteno-9-carbonilo (**1.32**) foi utilizado como precursor do ceteno, reagindo com variadas iminas aromáticas **1.31**. Os estudos da estrutura de um dos derivados por difração de raios-X, demonstraram que o anel β-lactâmico assume uma disposição quase planar, enquanto o sistema de anéis do xanteno assume uma conformação em V, com os anéis de benzeno a estabelecerem um ângulo diédrico de 27.82° entre eles. No seio deste conjunto de espiro-β-lactamas **1.33** foram identificadas duas moléculas com uma atividade promissora contra a estirpe K14 de *P. falciparum*, sendo o composto mais ativo caracterizado por um valor de IC<sub>50</sub> de 8 μM.

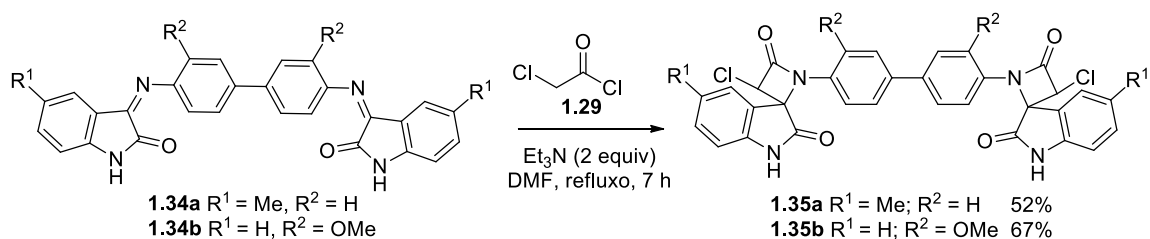


**Exemplos representativos**



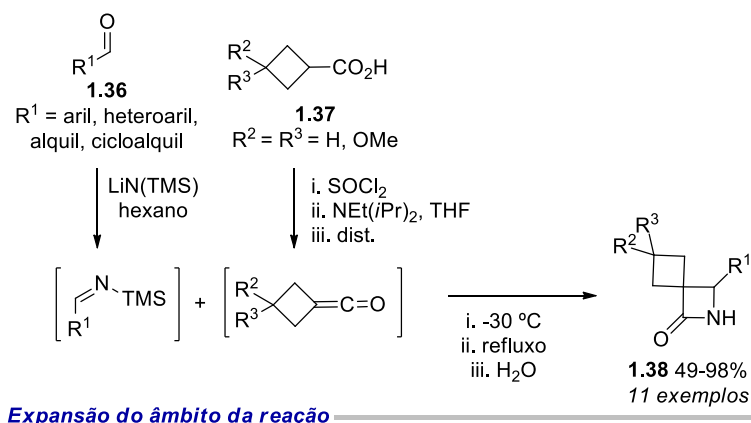
**Esquema 1.3 - Síntese de Staudinger de 1,4-difenilespiro[azetidina-3,9'-xanteno]-2-onas.**

A estratégia sintética desenvolvida por Hermann Staudinger foi também utilizada pelo grupo de Kandile na síntese de duas bis-espiro-β-lactamas **1.35** em rendimentos moderados (52-67%). Os produtos foram obtidos a partir da reação entre cloreto de cloroacetilo (**1.29**) e duas iminas **1.34** derivadas da isatina (Esquema 1.4).<sup>95</sup>

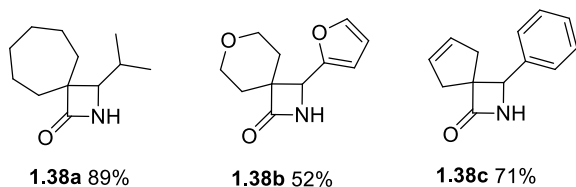


**Esquema 1.4** – Síntese de bis-espiro-β-lactamas pela reação de Staudinger.

Mykhailiuk e seus colaboradores exploraram a cicloadição [2+2] entre cetenos derivados de ácidos ciclobutanocarboxílicos **1.37**, via geração dos respectivos cloretos de ácido com recurso a cloreto de tionilo, e iminas geradas *in situ* pela condensação de aldeídos **1.36** com LiN(TMS) (Esquema 1.5). Esta abordagem permitiu a síntese de um grupo de onze β-lactamas espirocíclicas **1.38** contendo um sistema cíclico 2-azaespiro[3.3]heptan-2-ona como núcleo estrutural.<sup>96</sup> A presente estratégia sintética mostrou-se versátil na medida em que se revelou adaptável à incorporação tanto de anéis carbocíclicos de 5 a 7 átomos como também de heterociclos na estrutura dos produtos como resíduos espirocíclicos, através da variação do ácido carboxílico utilizado como reagente inicial. Estes últimos produtos foram obtidos com rendimentos entre os 14% e os 89%.<sup>96</sup>



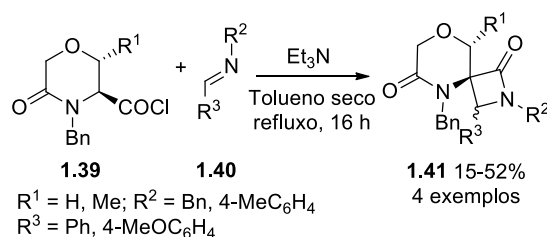
**Expansão do âmbito da reação**



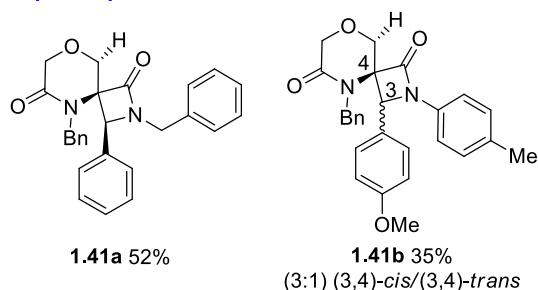
**Esquema 1.5** - Síntese de Staudinger de espiro-β-lactamas fundidas com anéis carbocíclicos e/ou heretocíclicos.

A síntese de quatro espiro-β-lactamas peptidomiméticas **1.41** contendo um anel de morfolina na sua estrutura, foi também efetuada utilizando a abordagem convencional

de Staudinger (Esquema 1.6).<sup>97</sup> Os produtos espirocíclicos foram obtidos pela reação entre iminas aromáticas **1.40** e cetenos. Foram usados cloretos de ácido morfolínicos **1.39** derivados dos aminoácidos serina e treonina como precursores dos cetenos. É de referir que apesar dos rendimentos baixos a moderados (15-52%), as β-lactamas espirocíclicas foram obtidas de forma diastereosselectiva, com o estereoisómero *cis* a ser obtido como produto maioritário ou único.



**Exemplos representativos**

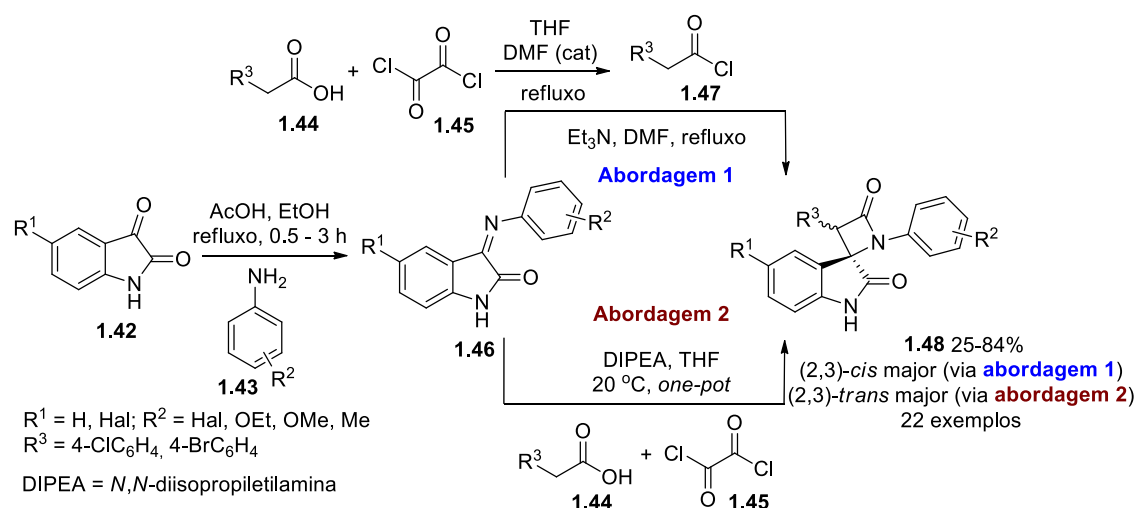


**Esquema 1.6** - Síntese de espiro-β-lactamas peptidomiméticas utilizando a reação de Staudinger.

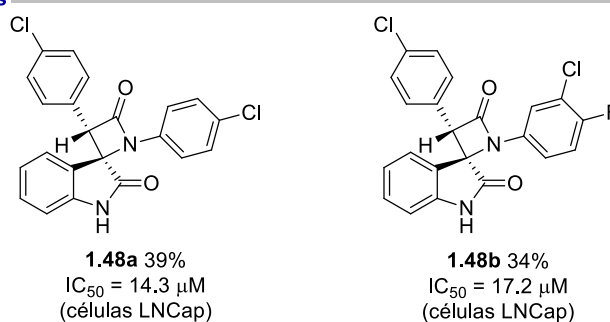
A utilização de cloretos de acilo para a preparação de cetenos constitui o procedimento mais convencional para o efeito, no entanto esta prática está geralmente associada a resultados inadequados como baixos rendimentos ou dificuldades na purificação dos produtos. Neste contexto, têm vindo a ser desenvolvidas alternativas aos cloretos de acilo como precursores de cetenos, nomeadamente pela utilização de ácidos carboxílicos ativados, por reagentes que não o cloreto de tionilo ou outros agentes de cloração, seguido do seu tratamento com uma base como via para a geração de cetenos *in situ*.

Neste contexto, Beloglazkina e colaboradores desenvolveram um estudo comparativo relativo à síntese de bis-espiro[azetidina-2,3-indole]-2,4(1*H*)-dionas **1.48** através de dois métodos baseados na abordagem de Staudinger (Esquema 1.7).<sup>98</sup> Apesar de partilharem as mesmas iminas análogas da isatina como reagente inicial, os métodos divergem no tipo de precursor do ceteno: Uma via de síntese utiliza derivados do cloreto

de fenilacetilo **1.47** previamente preparados, enquanto a segunda via utiliza ácidos fenilacéticos **1.44** ativados com cloreto de oxalilo (**1.45**) através da formação de um anidrido. Notavelmente e em resultado das duas abordagens, os produtos espirocíclicos foram obtidos com uma diastereosseletividade contrária, sendo o diastereoisómero *cis* obtido como produto maioritário aquando da utilização de cloreto de fenilacetilo **1.47** (Abordagem 1), verificando-se o resultado inverso quando o ceteno foi obtido pela ativação alternativa do ácido carboxílico **1.44** (Abordagem 2). De entre os vinte e dois espirocíclicos  $\beta$ -lactâmicos obtidos no conjunto das duas abordagens sintéticas, foram ainda identificados dois compostos com atividade citotóxica contra células de cancro da próstata LNCap expressoras da proteína p53.

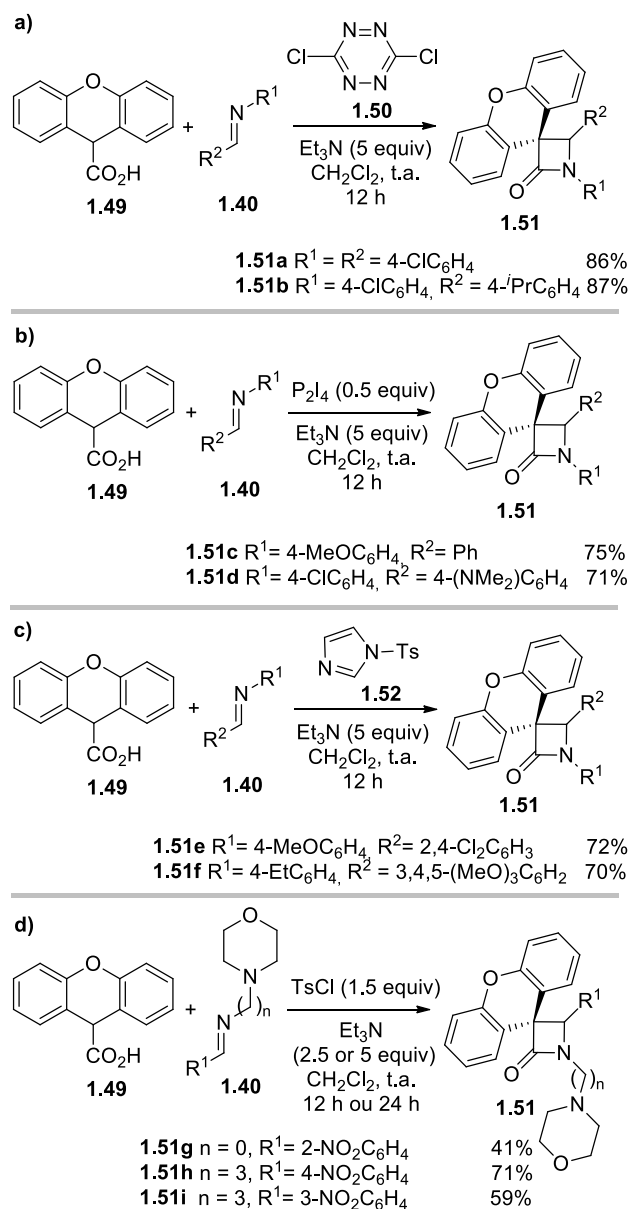


**Exemplos representativos**



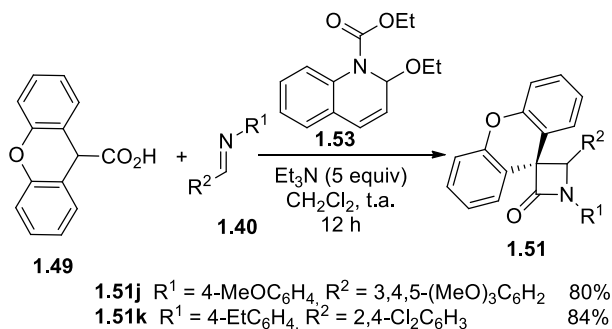
**Esquema 1.7 - Síntese de Staudinger de bis-aril espiro[azetidine-2,3-indole]-2,4(1H)-dionas.**

A ativação do ácido 9*H*-xanteno-9-carboxílico **1.49** com diversos reagentes, e respetiva reação de Staudinger com um conjunto de iminas aromáticas **1.40** permitiu a síntese de diversas espiro- $\beta$ -lactamas **1.51** com a fusão de anel no carbono C-3 (Esquema 1.8). Os ativadores de ácidos carboxílicos utilizados foram a 3,6-diclorotetrazina (**1.50**), o tetraiodeto de difósforo, o tosil-imidazol (**1.52**) e o cloreto de tosilo.<sup>99-102</sup>

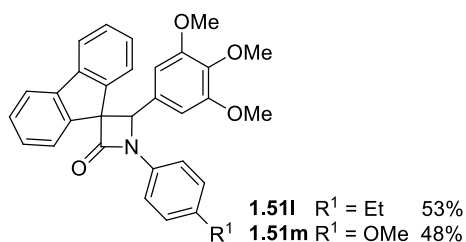


**Esquema 1.8** – Síntese de várias espiro- $\beta$ -lactamas derivadas do ácido 9*H*-xanteno-9-carboxílico.

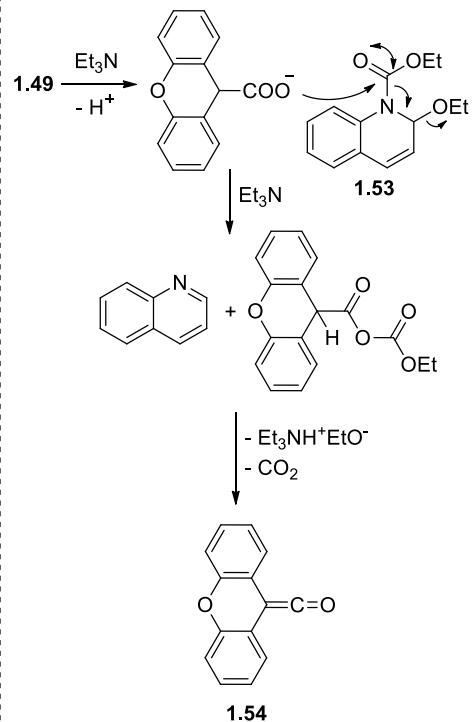
O mesmo grupo também explorou a *N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) (**1.53**) como ativador do ácido 9*H*-xanteno-9-carboxílico (**1.49**) para a síntese de cetenos *in situ* numa sequência reacional que compreende a libertação de uma molécula de quinolina (Esquema 1.9).<sup>103</sup> A presente abordagem permitiu a síntese das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas **1.51** com bons rendimentos (80-84%). Como parte do mesmo estudo foi também apresentada a síntese de duas espiro- $\beta$ -lactamas contendo um resíduo espirofluoreno na sua estrutura.



**Expansão do âmbito da reação**

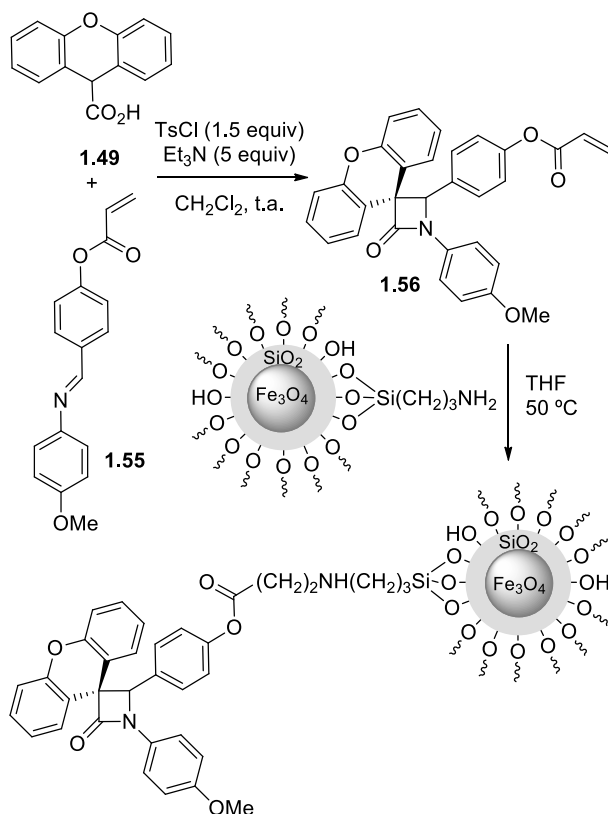


**Mecanismo de síntese do ceteno**



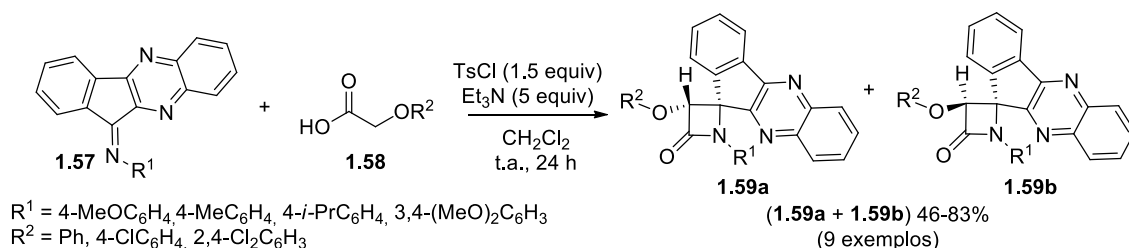
**Esquema 1.9** – Síntese de espiro- $\beta$ -lactamas derivadas do ácido 9*H*-xanteno-9-carboxílico utilizando EEDQ como ativador de ácidos carboxílicos.

Sardarian e colaboradores recorreram também à utilização de cloreto de tosilo como ativador do ácido 9*H*-xanteno-carboxílico (**1.49**) na reação de cicloadição [2+2] com uma imina aromática **1.55**, o que resultou na síntese de uma espiro- $\beta$ -lactama **1.56** contendo um sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado (Esquema 1.10).<sup>104</sup> Este grupo funcional permitiu que a molécula fosse posteriormente conjugada com nanopartículas magnéticas de ferro revestidas com 3-(trietoxi-silil)-propilamina via adição de Michael.



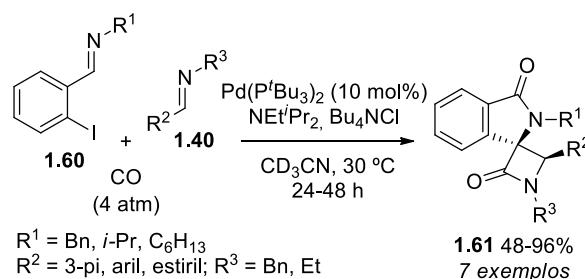
**Esquema 1.10** - Síntese de espiro- $\beta$ -lactamas derivada do ácido 9*H*-xanteno-9-carboxílico funcionalizada com uma nanopartícula de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ .

A reação de Staudinger entre derivados do ácido fenoxiacético **1.58** e diferentes iminas **1.57** foi utilizada para a síntese de uma série de espiro- $\beta$ -lactamas **1.59** contendo um grupo indeno[1,2-*b*]quinoxalina (Esquema 1.11).<sup>105</sup> Esta reação ocorreu na presença de trietilamina e utilizando o cloreto de tosilo como ativador dos ácidos fenoxiacéticos **1.58**, tendo sido os produtos obtidos como uma mistura diastereoisómerica (50:50) com rendimentos globais a variar entre os 46% e os 83%. De referir que a estereoquímica dos produtos foi determinada através de estudos de difração de raios-X.

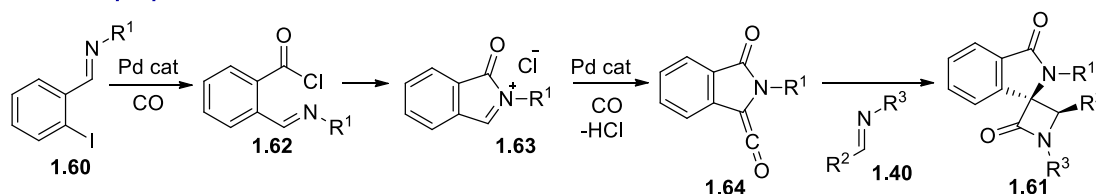


**Esquema 1.11.** Síntese de espiro- $\beta$ -lactamas contendo um grupo indeno[1,2-*b*]quinoxalina.

No entanto, os precursores de cetenos não se esgotam nas classes tradicionais dos cloretos de ácido ou ácidos carboxílicos, tendo vindo a ser reportadas diversas alternativas sintéticas a estas estratégias mais comuns. Exemplo disto foi a abordagem utilizada por Bengali, Arndtsen e seus colaboradores na síntese de um grupo de sete espiro- $\beta$ -lactamas **1.61** contendo um resíduo de isoindolinona na sua estrutura.<sup>106</sup> Estas moléculas tiveram como blocos de construção uma imina arílica **1.60** substituída com um átomo de iodo em posição *ortho*, uma segunda imina **1.40** e monóxido de carbono (CO), sendo sintetizadas através de uma reação catalisada por paládio (Esquema 1.12). Relativamente ao mecanismo de reação, a imina arílica **1.60** *ortho*-substituída origina o ceteno após uma sequência de duas carbonilações catalisadas por paládio, em que na primeira reação se gera um cloreto de ácido **1.62** que por via de uma ciclização intramolecular origina um sal *N*-acil imínio **1.63**. Esta última espécie iónica sofre uma nova carbonilação, produzindo-se assim o ceteno *in situ* que, por sua vez, reage com a imina **1.40** por via de uma cicloadição de Staudinger, resultando na obtenção das espiro- $\beta$ -lactamas **1.61** com rendimentos variáveis entre os 48% e os 96%.



#### Mecanismo proposto

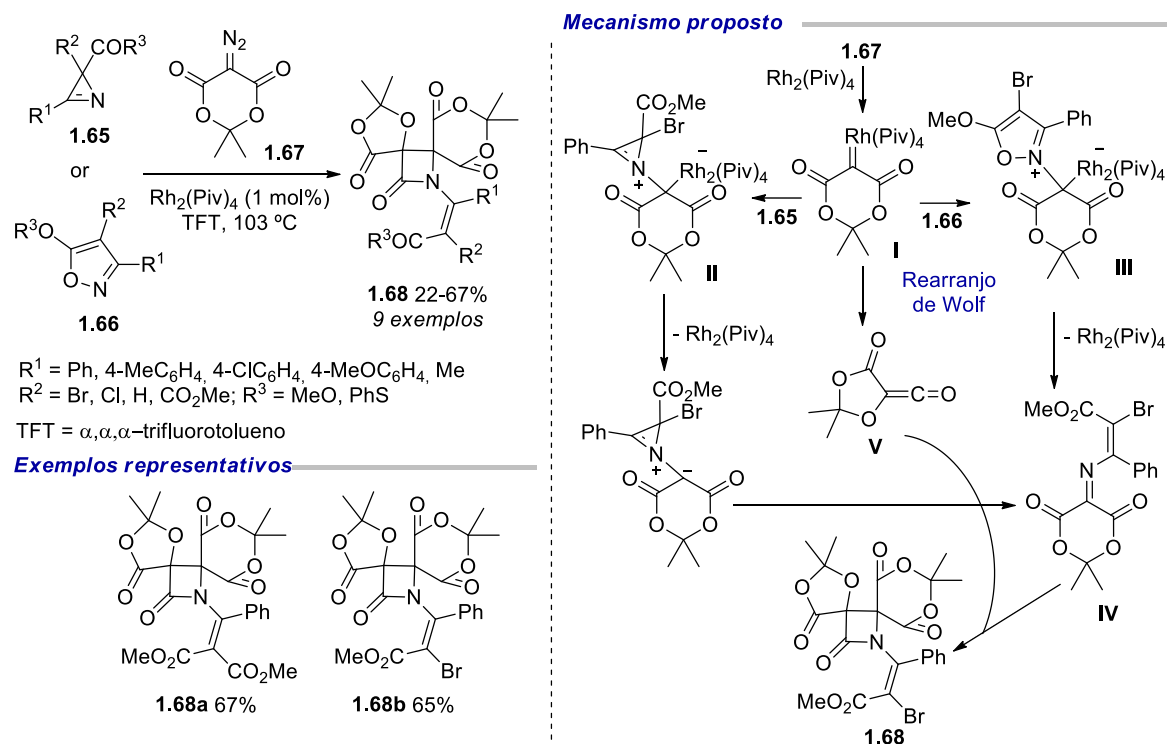


**Esquema 1.12** - Espiro- $\beta$ -lactamas sintetizadas a partir de aril iminas iodo-substituídas em posição *ortho* por via de duas carbonilações consecutivas catalisadas por paládio, seguidas de uma ciclocondensação de Staudinger.

Novikov e o seu grupo descreveram a síntese de *N*-vinil espiro- $\beta$ -lactamas **1.68** contendo dois carbonos espirocíclicos adjacentes.<sup>107</sup> Estas moléculas são obtidas a partir da reação entre um derivado diazo do ácido de Meldrum **1.67** e 2*H*-azirinas **1.65** ou 5-alcoxi-isoxazóis **1.66**, através da formação de um 2-azabuta-1,3-dieno catalisada por  $\text{Rh}_2(\text{Piv})_4$ , seguida de uma cicloadição de Staudinger (Esquema 1.13). Em termos

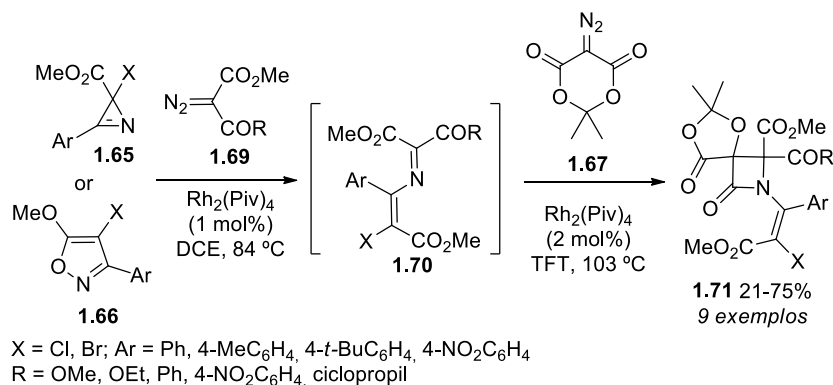


mecanísticos, o composto diazo **1.67** desempenha um papel duplo nesta reação, na medida em que o seu derivado carbenóide **I** é precursor do composto 2-azabuta-1,3-dieno **IV**, pela adição às 2*H*-azirinas **1.65** ou aos 5-alcóxi-isoxazóis **1.66**, mas também origina o ceteno por via de um rearranjo de Wolff. Os produtos espirolactâmicos **1.68** são obtidos assim pela cicloadição [2+2] entre o ceteno **V** e o composto 2-azabuta-1,3-dieno **IV** gerados no meio reacional.

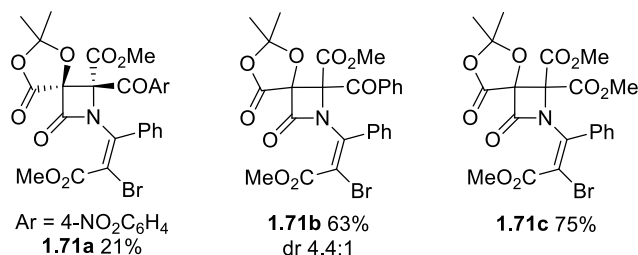


**Esquema 1.13** - Síntese de *N*-vinil di-espiro- $\beta$ -lactamas a partir da reação entre o derivado diazo do ácido de Meldrum e 2*H*-azirinas ou 5-alkoxi-isoxazóis.

A metodologia anteriormente apresentada foi adaptada pelo mesmo grupo para a síntese de espiro- $\beta$ -lactamas monofundidas **1.71** por via de uma reação de dois passos (Esquema 1.14).<sup>107</sup> Neste caso, o composto 2-azabuta-1,3-dieno **1.70** foi previamente obtido pela adição de um composto  $\alpha$ -diazo acíclico a heterociclos halogenados nomeadamente a 2*H*-azirina **1.65** e o 5-alkoxi-isoxazol **1.66**, numa reação catalisada por o  $\text{Rh}_2(\text{Piv})_4$ . Somente num segundo passo de reação foi adicionado o derivado diazo do ácido de Meldrum **1.67**, garantindo-se a sua função exclusiva de precursor do ceteno. Esta abordagem levou à síntese de nove  $\beta$ -lactamas espirocíclicas **1.71** com os rendimentos de reação a variar entre os 21% e os 75%.



**Exemplos representativos**

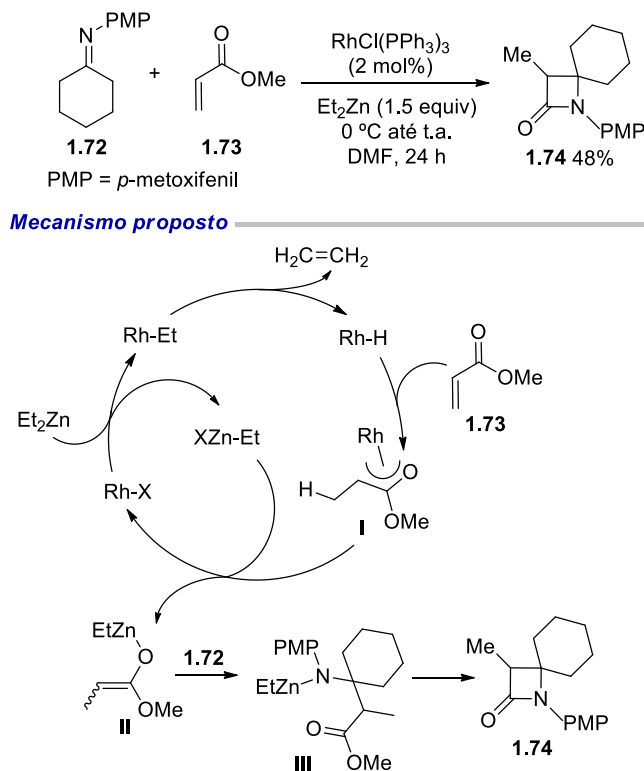


**Esquema 1.14** - Síntese de *N*-vinil espiro-β-lactamas a partir da reação entre diazoácido de Meldrum, compostos α-diazo acíclicos e 2*H*-azirinas ou 5-alcóxi-isoxazóis.

**1.2.1.2 - Reação de Mannich/Lactamização sequenciais**

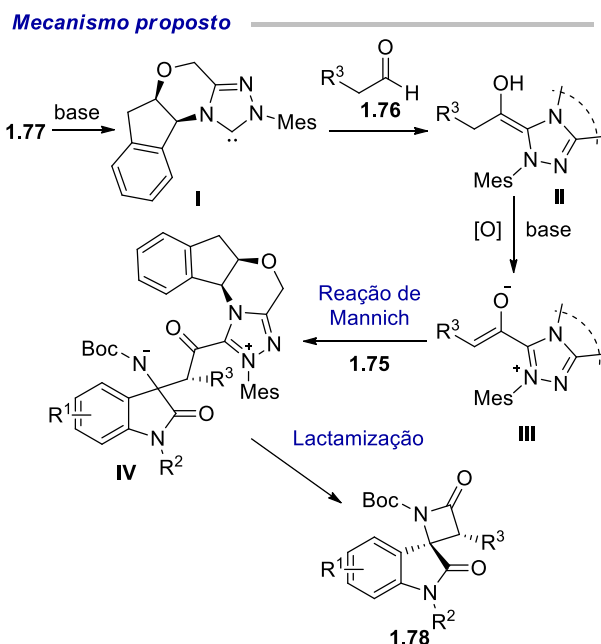
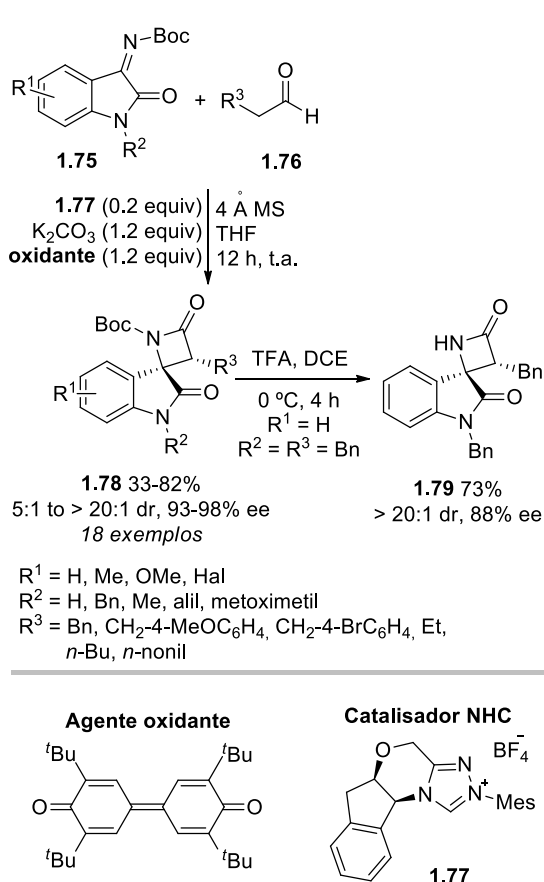
As iminas apresentam-se também como valiosos precursores na síntese de espiro-β-lactamas recorrendo a métodos alternativos à convencional cicloadição de Staudinger. É exemplo deste facto a abordagem sintética de construção de β-lactamas espirocíclicas em que uma reação de Mannich<sup>108</sup> precede uma lactamização intramolecular, numa sequência reacional do tipo cascata.

Utilizando esta estratégia, Ando e colaboradores sintetizaram a espiro-β-lactama **1.74** através de um reação de Mannich redutiva entre a imina **1.72** e o acrilato de metilo (**1.73**) (Esquema 1.15).<sup>109</sup> A reação ocorreu na presença de Et<sub>2</sub>Zn e RhCl(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. O mecanismo de reação compreende a geração inicial de um hidreto que catalisa a redução do tipo 1,4 do acrilato de metilo (**1.73**) o que resulta na formação dum enolato de zinco **II**. Por sua vez, o enolato ao atuar como um reagente do tipo-Reformatsky, adiciona à imina formando o intermediário **III**. A subsequente lactamização do intermediário **III** constitui o último passo da síntese da espiro-β-lactama **1.74**, que é obtida com 48% de rendimento.



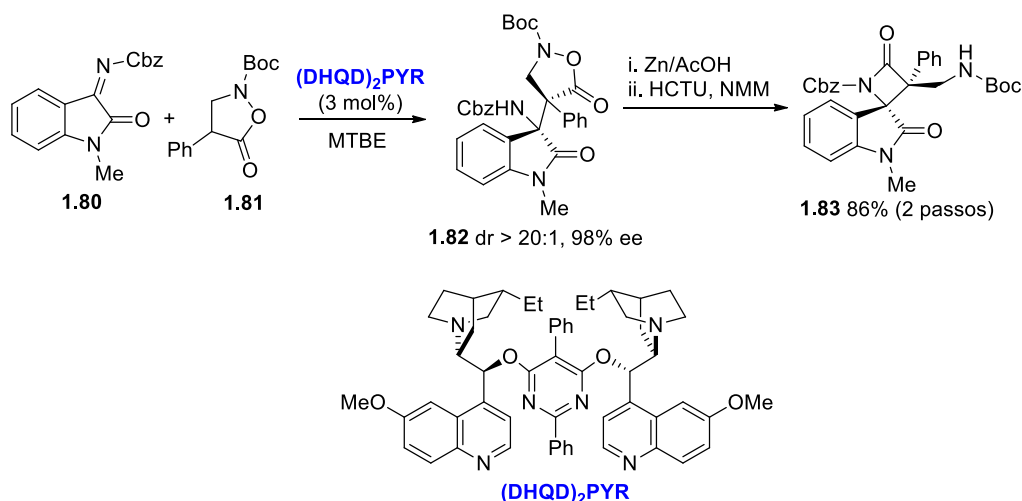
**Esquema 1.15** - Reação de Mannich entre uma imina e um éster  $\alpha,\beta$ -insaturado.

Um conjunto de dezoito espiro-oxindole- $\beta$ -lactamas **1.78** foram sintetizadas por via de uma ciclização assimétrica do tipo [2+2], tendo como precursores um conjunto de iminas **1.75** derivadas da isatina e aldeídos simples **1.76** (Esquema 1.16).<sup>110</sup> Inversão da reatividade do aldeído por ação do carbeno N-heterocíclico (NHC) **I** gera o intermediário quiral **III** que participa numa reação de Mannich por reação com a imina **1.75** levando à formação do aduto de Mannich **IV** de forma altamente estereosselectiva. Por fim, ocorre a lactamização intramolecular do aduto de Mannich **IV**, formando-se as espiro- $\beta$ -lactamas **1.78** com rendimento variáveis entre 33% e 82%, e com boa a excelente diastereo- e enantiosselectividade (5:1 a > 20:1 dr e 94 a 98% ee, respetivamente). A remoção do grupo protetor Boc das espiro- $\beta$ -lactama com TFA mostrou-se eficiente na obtenção do derivado contendo a amina livre, num processo em que não se verificou qualquer alteração da diastereo e enantiosselectividade.



**Esquema 1.16** - Ciclização oxidativa [2+2] catalisada por NHC entre iminas derivadas da isatina e aldeídos simples.

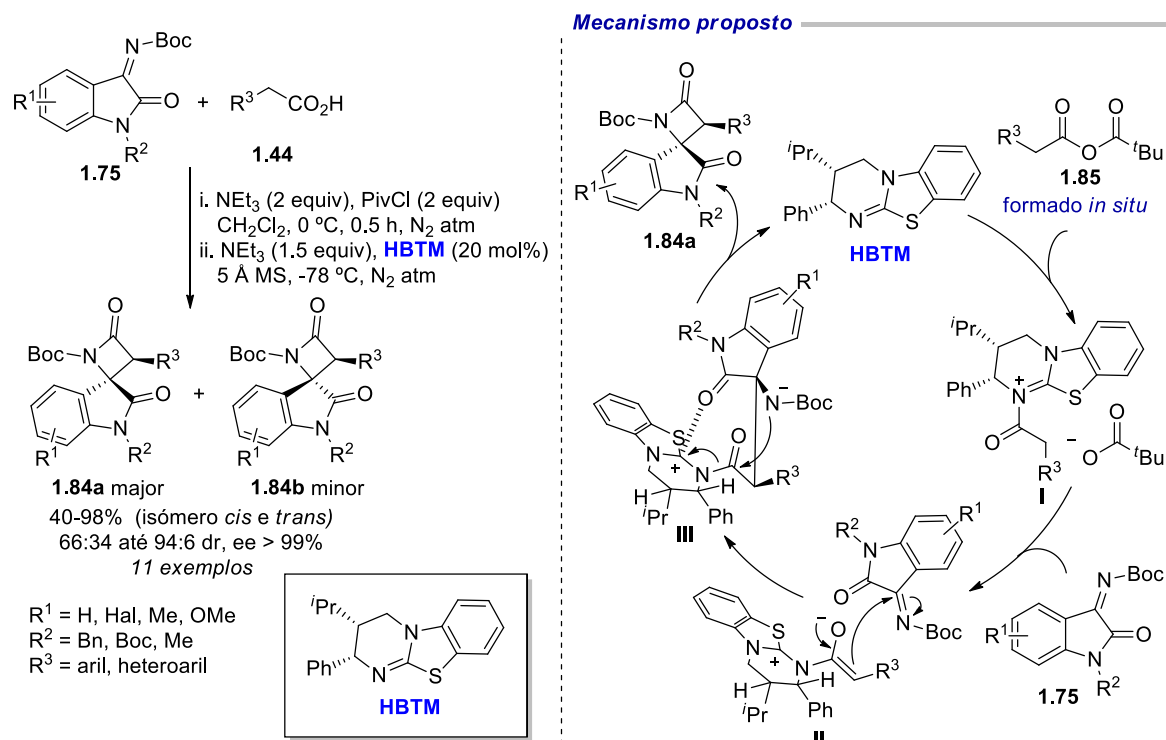
Noda, Shibasaki e colaboradores apresentaram a síntese da espiro-oxindole-β-lactama **1.83** pela reação entre uma imina **1.80** derivada da isatina e uma 5-isoxazolidinona racémica **1.81** substituída na posição 4, na presença do catalisador assimétrico (DHQD)2PYR (Esquema 1.17).<sup>111</sup> No primeiro passo de reação, a 5-isoxazolidinona racémica **1.81** reage com a imina **1.80** e forma um aduto de Mannich **1.82**, num processo diastereo- e enantiosselectivo em que se geram dois centros quirais contíguos. Este aduto de Mannich **1.82** derivado da isatina, pela quebra da ligação N-O sob condições redutoras, dá origem a um ácido carboxílico livre que, uma vez ativado pelo HCTU presente no meio reacional, sofre lactamização intramolecular espontânea produzindo a espiro-oxindole-β-lactama **1.83**. O produto espirocíclico é obtido com um rendimento global de 86%.



MTBE = metil *terc*-butil éter; NMM = *N*-metilmorfolina  
 HCTU = *O*-(1*H*-6-clorobenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio hexafluorofosfato

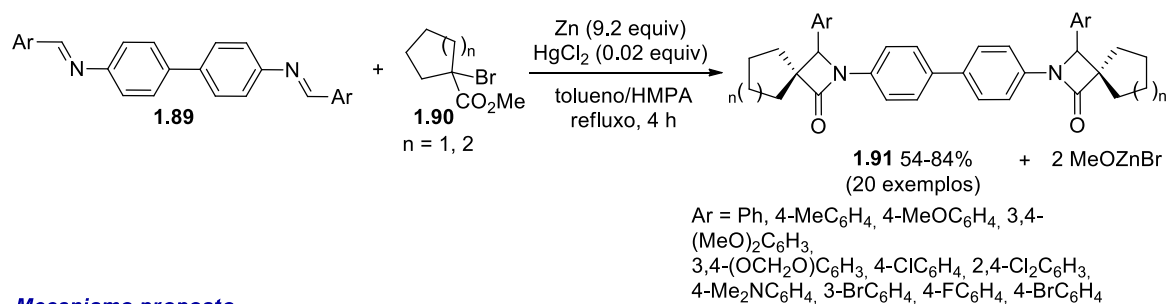
**Esquema 1.17** - Síntese de espiro- $\beta$ -lactamas a partir de um aduto de Mannich derivado da isatina.

No ano de 2019, Zhao, Deng e colaboradores sintetizaram uma biblioteca de vinte e duas espiro-oxindole- $\beta$ -lactamas **1.84** contendo dois centros quirais vicinais, a partir da reação do tipo cascata Mannich/lactamização catalisada por homobenzotetramisol (HBTM), e tendo como reagentes de partida um conjunto de iminas **1.75** derivadas da isatina e ácidos acéticos arílicos **1.44** (Esquema 1.18).<sup>112</sup> Os produtos espirocíclicos  $\beta$ -lactâmicos **1.84** foram obtidos com rendimentos elevados de até 98%, com elevada diastérosselectividade (até 94:6) e excelente enantiosselectividade ( $\geq 99\%$  ee). Em termos de mecanismo reacional, este compreende um passo inicial de ativação do ácido acético arílico **1.44** por parte do cloreto de pivaloilo, através da formação de um anidrido **1.85**. Este anidrido **1.85** atua então como agente acilante na acilação do HBTM originando o intermediário **I** que, após uma sequência de desprotonação e reação com a imina, é convertido no aduto de Mannich **III**. Este último intermediário, ao sofrer uma lactamização intramolecular gera a *cis*-espiro-oxindole- $\beta$ -lactama **1.84** e regenera o catalisador da reação.

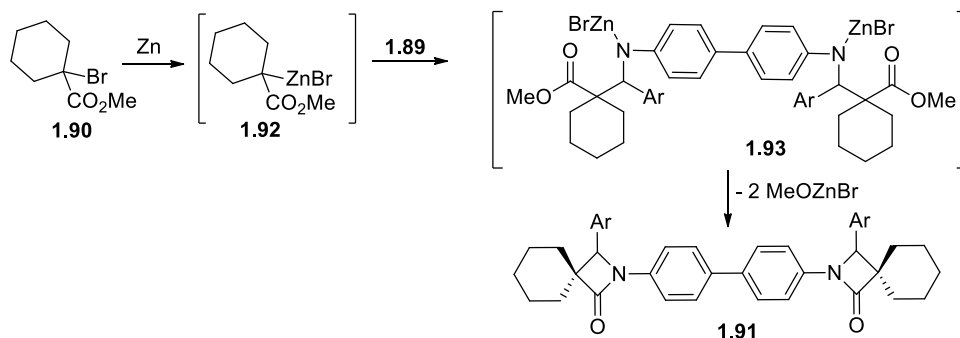


### 1.2.1.3 - Reação de Reformatsky

A reação de Reformatsky constitui uma alternativa à reação de Staudinger e às reações em cascata de Mannich/lactamização no que à síntese de anéis de  $\beta$ -lactama espirocíclicos diz respeito. Esta abordagem sintética foi utilizada por Kirillov e seus colaboradores para a síntese de uma biblioteca de vinte bis-espiro-cicloalcano- $\beta$ -lactamas **1.91** a partir da reação entre dois  $\alpha$ -bromocicloalcanocarboxilatos de metilo **1.90** e um conjunto de *N,N*-bis(arilmetilideno)benzidinas **1.89** na presença de zinco (Esquema 1.19).<sup>113</sup> O primeiro passo de reação compreende a formação *in situ* de um reagente de Reformatsky **1.92** a partir do 1-bromocarboxilato **1.90** e do zinco. Esta espécie organometálica adiciona então à bis-imina **1.89** formando o aduto **1.93**, que cicliza de forma espontânea, obtendo-se as bis-espiro-cicloalcano- $\beta$ -lactamas **1.91** com rendimentos variáveis entre 54% e 84%.

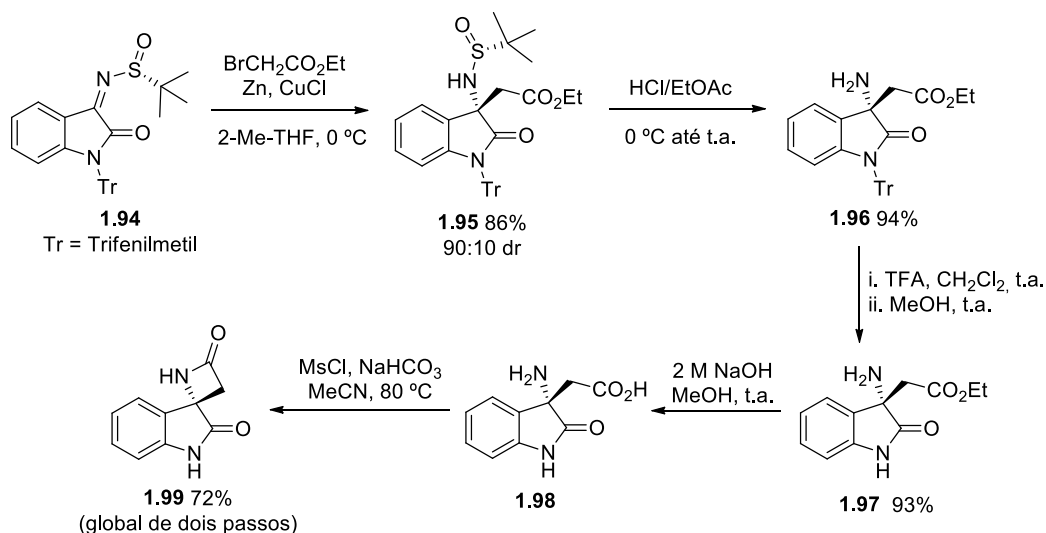


**Mecanismo proposto**



**Esquema 1.19** - Reação entre um  $\alpha$ -bromocicloalcanecarboxilato e *N,N*-bis(arilmetilideno)benzidinas mediada por zinco.

Xu e seus colaboradores utilizaram a reação de Reformatsky para a síntese diastéreo e enantioselectiva de um oxindolinil- $\beta^{3,3}$ -amino éster quiral **1.96** a partir de uma *N*-sulfinil imina **1.95** derivada da isatina (Esquema 1.20).<sup>114</sup> Este reagente obtido por uma reação de Reformatsky serviu de precursor para a síntese do núcleo estrutural espiro-oxindole- $\beta$ -lactâmico (**1.99**) dos alcalóides da classe das chartelinas. Sumariamente, esta última reação ocorre através de três passos consecutivos de desproteção do  $\beta^{3,3}$ -amino éster **1.96** que culminam na formação do  $\beta$ -aminoácido **1.98**, cuja lactamização origina a espiro-oxindole- $\beta$ -lactama **1.99** com um rendimento global de 63%.

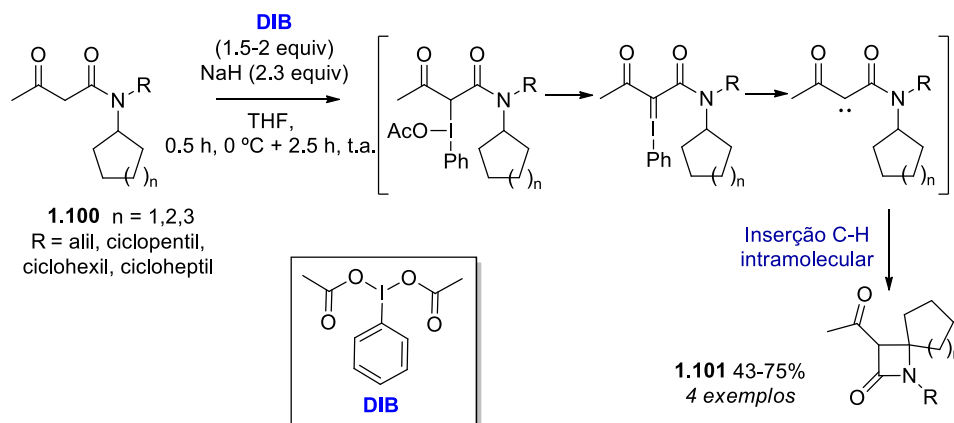


**Esquema 1.20** - Síntese do núcleo estrutural espiro-oxindole  $\beta$ -lactâmico da classe das chartelinas a partir dum 2-oxoindolinil- $\beta^{3,3}$ -amino ácido.

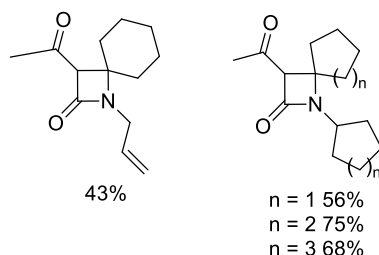
#### 1.2.1.4 - Lactamização intramolecular independente de catálise por metais

Afonso, Maulide e colaboradores desenvolveram a síntese de espirocicloalcano- $\beta$ -lactamas **1.101** através da reação de diacetato de iodobenzeno (DIB) e  $\beta$ -cetoamidas **1.100** na presença de base e via inserção C-H.<sup>115</sup> Esta abordagem sintética é particularmente interessante por ser uma alternativa ao uso de compostos diazo, associados a problemas de segurança, e por não requerer a presença de catalisadores metálicos (Esquema 1.21). A síntese tem como primeiro passo a reação entre a  $\beta$ -cetoamida **1.100** e o DIB, seguida da formação dum carbeno cuja lactamização intramolecular, via inserção C-H, leva à obtenção das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas **1.101** com rendimentos entre 43% e 75%.



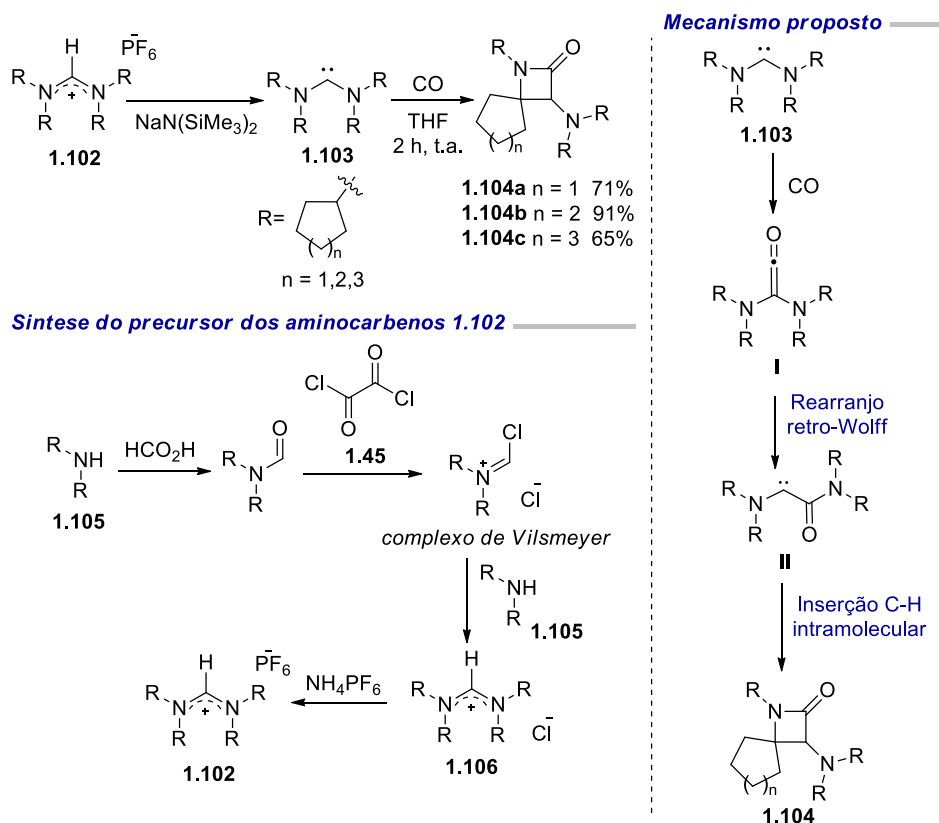


**Produtos**



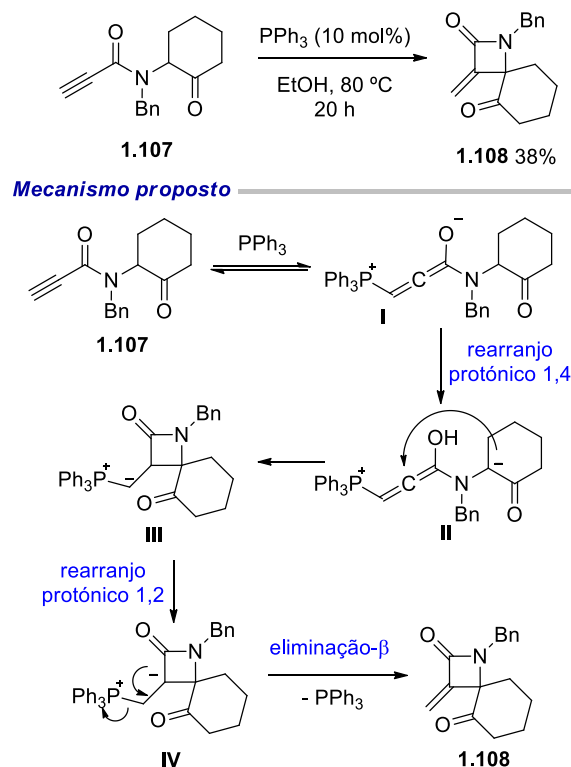
**Esquema 1.21** - Inserção C-H de  $\beta$ -cetoamidas na presença de DIB e base.

Outro método de síntese de espiro-cicloalcano- $\beta$ -lactamas via inserção C-H, que não requer a presença de catalisadores metálicos, foi desenvolvida por Siemeling e seus colaboradores (Esquema 1.22). Os produtos espirocíclicos **1.104** foram obtidos com rendimentos que variam entre os 65% e os 91%. Esta abordagem baseia-se na reatividade de diaminocarbenos acíclicos **1.103** contendo substituintes cicloalquílicos e recorre à utilização de monóxido de carbono como bloco de construção.<sup>116</sup> Os diaminocarbenos **1.103** são gerados a partir de aminas secundárias (ciclo- $C_nH_{2n-1}$ )<sub>2</sub>NH ( $n = 5, 6, 7$ ). As aminas **1.105** reagem com ácido fórmico e de seguida com cloreto de oxalilo, resultando no respetivo complexo de Vilsmeier. Por sua vez, este último reage com as aminas secundárias **1.105** dando origem ao cloreto de formamidínio **1.106**. Uma troca aniônica feita com recurso a hexafluorofosfato de amónia permitiu a obtenção dos hexafluorofosfatos de formamidínio **1.102**, que são posteriormente convertidos aos diaminocarbenos **1.103** pelo tratamento com  $NaN(SiMe_3)_2$ . Relativamente ao mecanismo proposto para a síntese das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas **1.104** propriamente dita, este inclui um primeiro passo de carbonilação do diaminocarbeno acíclico **1.103** e subsequente rearranjo do respetivo diaminoceteno **I** a um (amido)(amino)carbeno **II**. Esta última espécie carbenóide participa numa reação de inserção C-H intramolecular, que constitui o último passo da síntese dos espirocíclos **1.104**.



**Esquema 1.22** - Carbonilação de diaminocarbenos acíclicos como estratégia para a síntese de espiro-β-lactamas.

A síntese da α-metileno-β-lactama espirocíclica **1.108** através da ciclização catalisada por trifenilfosfina (PPh<sub>3</sub>) de uma propiolamida **1.107** substituída com um grupo ciclohexanona foi descrita por Li e colaboradores (Esquema 1.23).<sup>117</sup> O mecanismo de espirociclização proposto inicia-se com uma adição conjugada da PPh<sub>3</sub> à ligação tripla terminal da propiolamida **1.107**, seguida de uma migração protónica do tipo 1,4 que leva à formação da cetona aniónica **II**. Uma adição intramolecular conjugada do tipo 4-*exo*, seguida de uma migração protónica do tipo 1,2 e da β-eliminação da PPh<sub>3</sub> resulta na obtenção da α-metileno-espiro-β-lactama **1.108** com um rendimento de 38% com regeneração do catalisador.

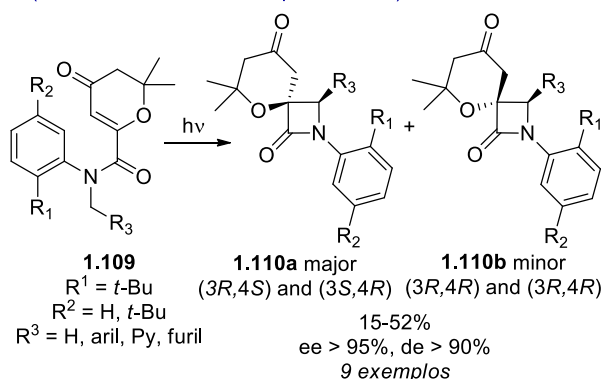


**Esquema 1.23** - Cicliza\u00e7\u00e3o de uma propiolamida catalisada por PPh<sub>3</sub> como estrat\u00e9gia para a s\u00edntese de uma  $\alpha$ -metileno-espiro- $\beta$ -lactama.

O grupo de Sivaguru demonstrou que as enona-carboxamidas atropis\u00f3mericas **1.109** originam espiro- $\beta$ -lactamas via rea\u00e7\u00e3o de Norrish-Yang quando foto-irradiadas (Esquema 1.24).<sup>118,119</sup> A presen\u00e7a de grupos substituintes volumosos nas mol\u00e9culas causa restri\u00e7\u00f5es \u00e0 sua liberdade conformacional o que permite uma pr\u00e9-organiza\u00e7\u00e3o quiral do substrato durante a rea\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica, organiza\u00e7\u00e3o esta que \u00e9 mantida pelos produtos espiroc\u00edclicos **1.110**. A presente abordagem resultou na s\u00edntese de nove fotoprodutos espiro- $\beta$ -lact\u00eamicos **1.110** com elevada estereo- e diastereosseletividade (>95% e >90%, respetivamente). De notar que este tipo de reatividade n\u00e3o ocorre no caso das enonas aquirais an\u00e1logas, onde se obt\u00e9m 3,4-dihidroquinolin-2-onas **1.111** por via de uma fotocicliza\u00e7\u00e3o do tipo  $6\pi$ .

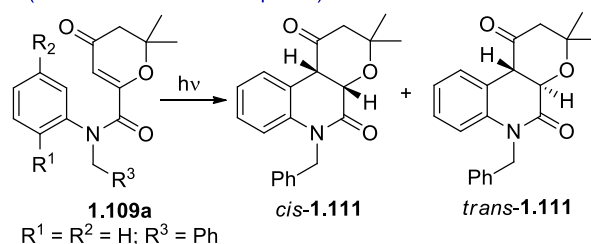
**a) Reação Norrish-Yang**

(Enona-carboxamidas atropisoméricas)



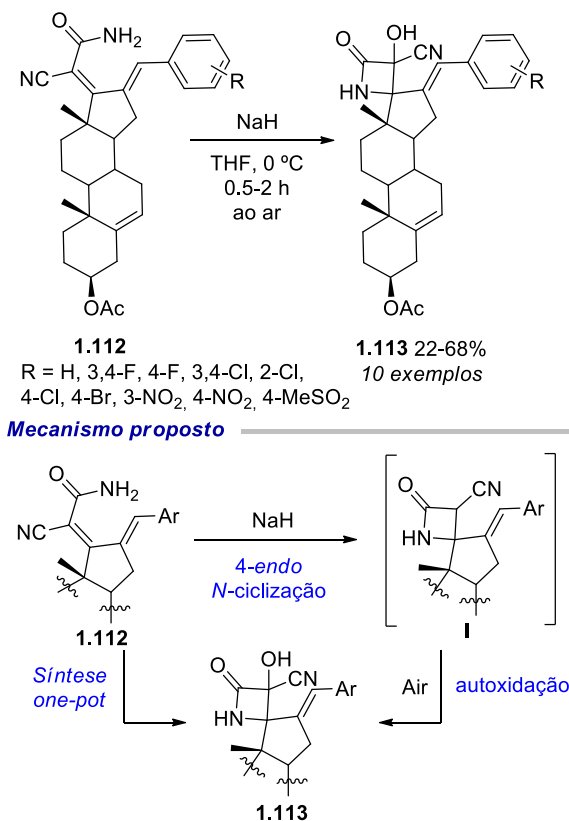
**b) Fotociclização  $6\pi$**

(Enona-carboxamidas aquirais)



**Esquema 1.24** - Diferente reatividade foto-induzida apresentada por enona-carboxamidas atropisoméricas e aquirais.

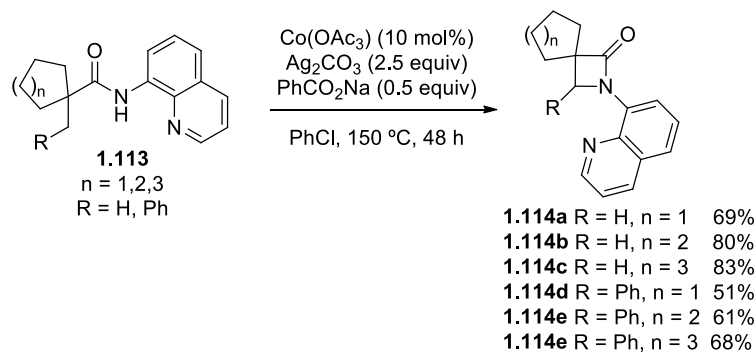
A síntese de espiro- $\beta$ -lactamas esteroides **1.113** contendo um grupo funcional cianidrino foi também apresentada (Esquema 1.25).<sup>120</sup> Os produtos espirocíclicos foram obtidos em rendimentos baixos a moderados (22-68%), em condições de reação razoáveis, num procedimento *one-pot*. O mecanismo proposto pelos autores pressupõe uma lactamização intramolecular das dienamidas **1.112** por via de uma *N*-ciclização seletiva do tipo *4-endo*, seguida por uma oxidação mediada por base que introduz um grupo hidroxilo na posição  $\alpha$  do anel 2-azetidinona, gerando o produto espirocíclico final **1.113**. É de notar a formação de dois centros quirais contíguos e a ausência de produtos resultantes de uma reação de *N*-ciclização do tipo *6-endo*. No entanto, não há informação relativa à estereoquímica do carbono espiro dos produtos. A presente classe de espiro- $\beta$ -lactamas esteróides apresenta um elevado potencial de modelação estrutural devido à reatividade do grupo funcional cianidrino presente na sua estrutura.



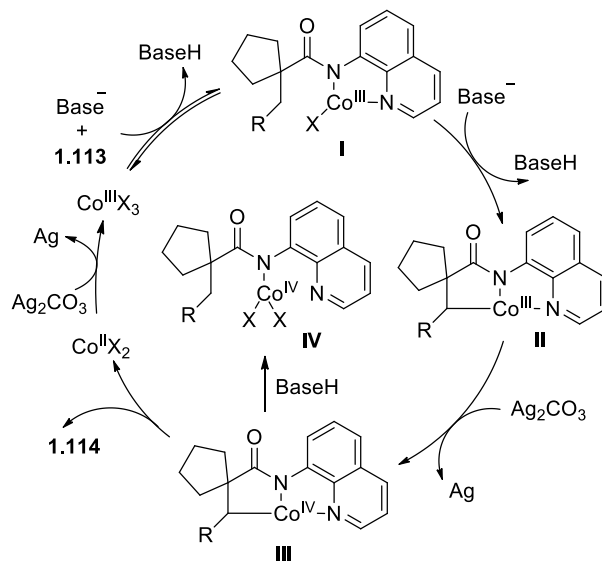
**Esquema 1.25** - Síntese de espiro-β-lactamas esteroides contendo um grupo funcional cianoidrina.

### 1.2.1.5 - Reações de lactamização catalisadas por metais

A síntese de espirocicloalcano-β-lactamas **1.114**, contendo um grupo 8-quinolina na sua estrutura, foi conseguida por funcionalização intramolecular, catalisada por cobalto, de uma ligação C(sp<sup>3</sup>)-H não ativada das amidas **1.113**.<sup>121</sup> A presente estratégia, descrita em 2015 por Li, Ge e colaboradores, é seletiva relativamente à posição onde ocorre a inserção, sendo esta facilitada e direcionada pela presença e posição do resíduo quinolina (Esquema 1.26). Como resultado desta abordagem, os produtos espirocíclicos **1.114** foram obtidos com rendimento entre 51% e 83%. O mecanismo reacional proposto pelos autores compreende um passo inicial de formação de um complexo de Co<sup>III</sup> **I** por coordenação do metal com os dois átomos de azoto do composto **1.113**, e subsequente ciclometalação produzindo o intermediário **II**. Após oxidação deste intermediário com Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, forma-se o complexo de Co<sup>IV</sup> **III**, que ao sofrer uma eliminação redutiva dá origem à 2-(quinolin-8-il)-2-azaespiro[3.4]alcan-1-ona **1.114**. Neste último passo liberta-se também a espécie de Co<sup>II</sup> que sendo reoxidada a Co<sup>III</sup> reinicia o ciclo catalítico.

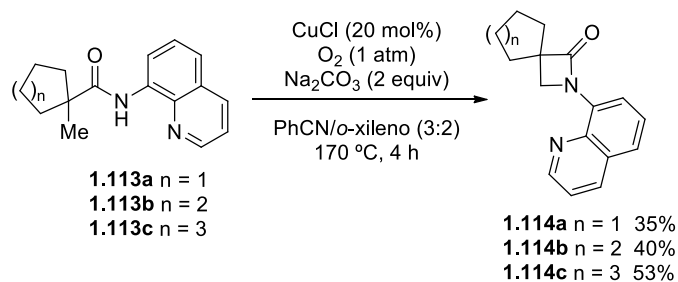


**Mecanismo proposto**

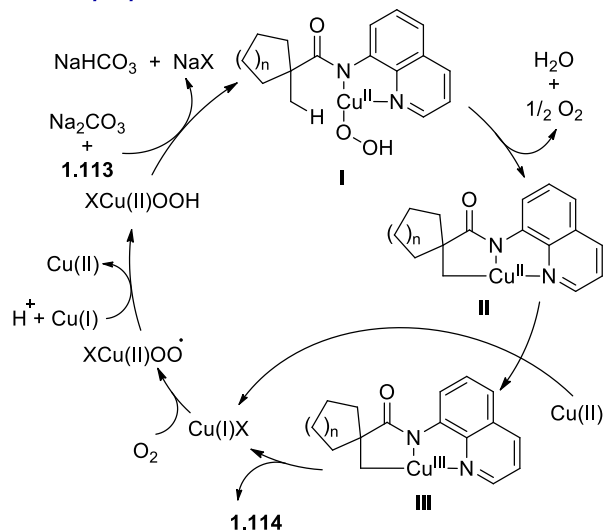


**Esquema 1.26** – Funcionalização direta de uma ligação  $C(sp^3)-H$  não ativada em amidas alifáticas por catálise com cobalto.

As 2-(quinolin-8-il)-2-azaespiro[3.4]alcan-1-onas **1.114a-c** foram também sintetizadas por Yang, You e colaboradores recorrendo a um procedimento análogo, divergindo da abordagem anterior por utilizar cobre ( $CuCl$ ) como catalisador metálico e oxigénio molecular ( $O_2$ ) como único oxidante (Esquema 1.27).<sup>122</sup>

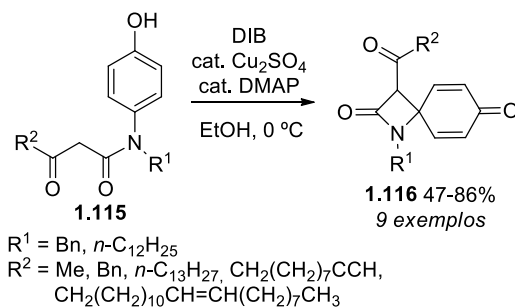


**Mecanismo proposto**

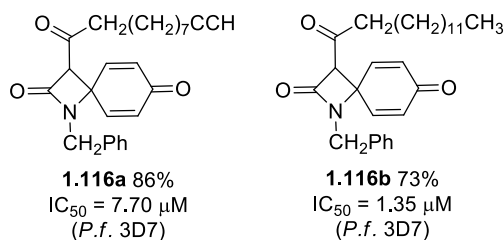


**Esquema 1.27** - Funcionalização direta de uma ligação  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  não ativada em amidas alifáticas por catálise com cobalto.

A síntese de nove espirociclohexadienona- $\beta$ -lactamas **1.116** contendo substituintes alquílicos a partir da lactamização intramolecular de  $\beta$ -cetoamidas **1.115** derivadas do 4-aminofenol foi desenvolvida por Wong e colaboradores.<sup>123</sup> A reação de ciclização ocorre pela ação oxidante do reagente DIB e é catalisada por *N,N*-dimetil-4-aminopiridina (DMAP) e sulfato de cobre (Esquema 1.28). Quatro das espirociclohexadienona- $\beta$ -lactamas mostraram atividade promissora ( $\text{IC}_{50} = 1.35\text{-}9.78 \mu\text{M}$ ) contra a estirpe 3D7 do *P. falciparum*.



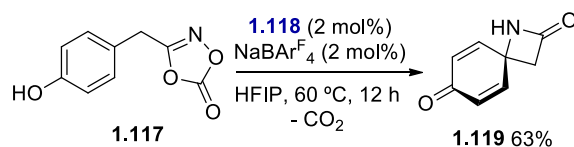
**Exemplos representativos**



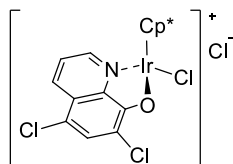
**Esquema 1.28** - Espirociclohexadienona-β-lactamas sintetizadas a partir de β-cetoamidas derivadas do 4-aminofenol.

Chang e colaboradores desenvolveram a síntese de uma espirociclohexadienona-β-lactama **1.119** utilizando uma estratégia baseada na espirociclicização por desaromatização de um substrato fenólico **1.117** contendo um resíduo de dioxazolona (Esquema 1.29). A reação é catalisada por irídio.<sup>124</sup> O mecanismo reacional proposto assenta num primeiro passo de coordenação entre o catalisador de irídio **I** e o substrato fenólico **1.117**, seguido por uma descarboxilação que origina a espécie intermediária **II**. Este último intermediário por sua vez, sofre uma amidação via substituição aromática eletrofílica seguida da perda do próton fenólico, numa sequência que culmina na regeneração do catalisador e na concomitante formação da espiro-β-lactama **1.119** com um rendimento de 63%.

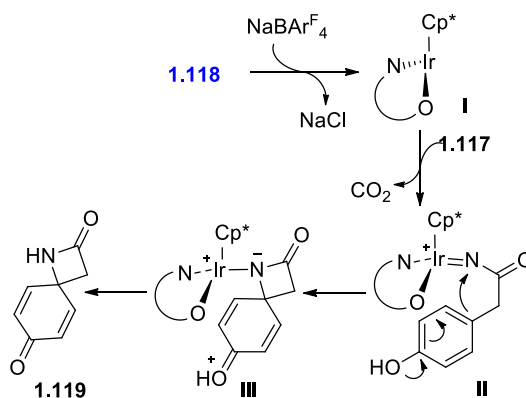




**Catalisador de Irídio**

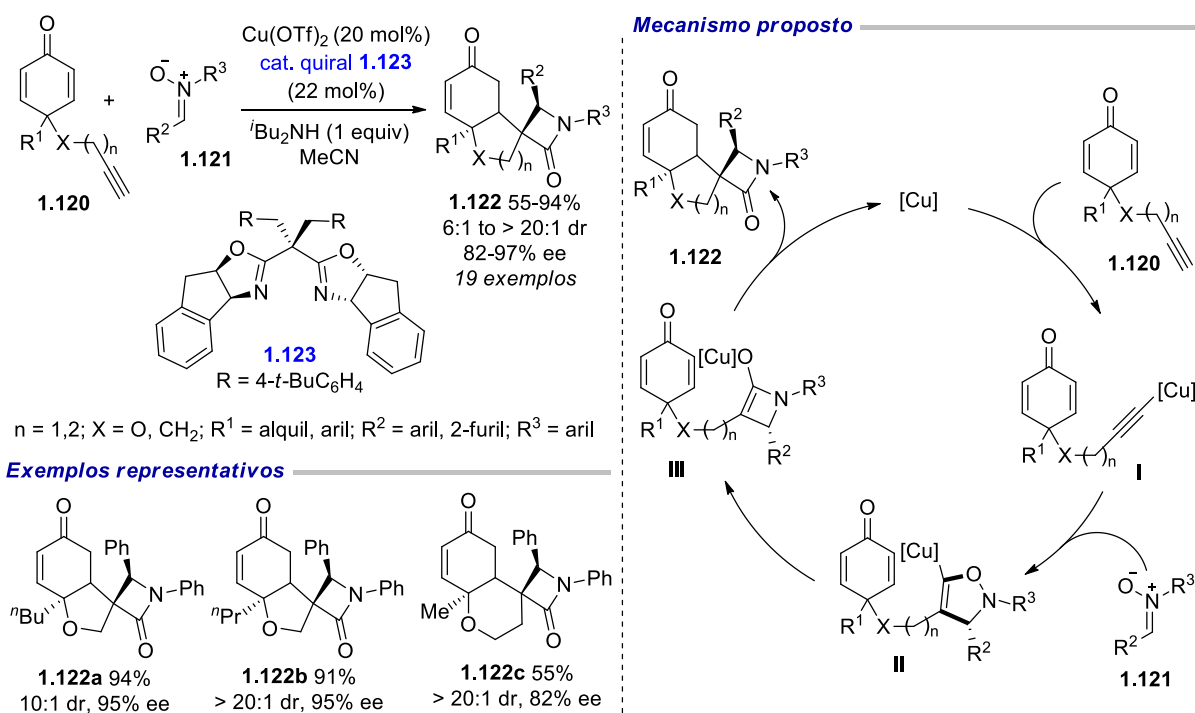


**Mecanismo proposto**



**Esquema 1.29** - Espirociclicização por desaromatização catalisada por irídio de uma dioxazolona contendo um grupo fenol.

O grupo de Enders descreveu a síntese de uma biblioteca de dezanove espiro- $\beta$ -lactamas **1.122** contendo quatro centros quirais adjacentes. Para esta síntese foi utilizada uma abordagem sintética baseada numa reação de Kinugasa seguida por uma adição de Michael, tendo como reagentes iniciais um conjunto de nitronas **1.121** e ciclohexadienonas **1.120** substituídas com cadeias alquílicas contendo um alquino terminal (Esquema 1.30). A reação é catalisada por cobre e utiliza também um ligando quiral indano-BOX **1.123**.<sup>125</sup> Os produtos espirocíclicos da reação foram obtidos com rendimentos que variaram entre os 55% e os 94%, com excelente estereo- e enantiosseletividade (até 97% ee e > 20:1 dr). Os autores propuseram um mecanismo reacional que compreende um passo inicial de redução *in situ* do Cu(II) que origina o intermediário **I**. A ativação do alquino terminal permite que ocorra a cicloadição de Kinugasa que dá origem ao intermediário **II**. No passo seguinte, um rearranjo do grupo isoxazolina presente no intermediário **II** produz o intermediário enolato **III** sendo convertido na espiro- $\beta$ -lactama **1.122** via adição de Michael assimétrica ao grupo ciclohexadienona, ao mesmo tempo que se regenera o catalisador.



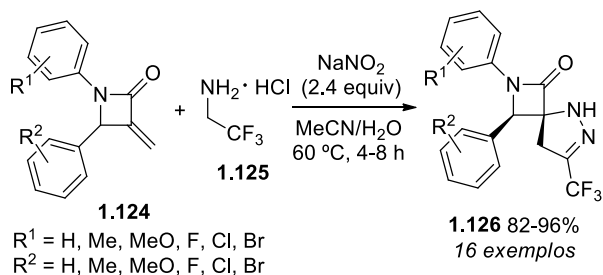
**Esquema 1.30** - Reação tipo dominó Kinugasa/Michael catalisada por cobre, entre nitronas e ciclohexadionas contendo uma cadeia alquílica com um alquino terminal.

## 1.2.2 - Espirociclização de moléculas contendo um anel 2-azetidiona

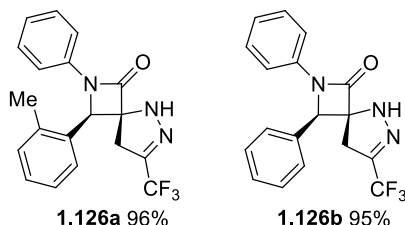
### 1.2.2.1 - Espirociclização de $\alpha$ -alquilideno- $\beta$ -lactamas

A síntese de espiro- $\beta$ -lactamas é também possível recorrendo a precursores contendo um anel  $\beta$ -lactâmico. Neste contexto, a classe das  $\alpha$ -alquilideno- $\beta$ -lactamas é uma das classes de precursores que têm vindo a ser exploradas na síntese de  $\beta$ -lactamas espirocíclicas, fazendo-se uso da ligação dupla exocíclica do anel da  $\beta$ -lactama. Esta característica estrutural típica destas moléculas e respetiva reatividade, permite uma panóplia de abordagens sintéticas de espirociclização, nomeadamente por via de epoxidação, ciclopropanação, reação de Diels-Alder e cicloadição 1,3-dipolar.

Em 2016, Ma e colaboradores apresentaram a síntese de uma biblioteca de dezasseis 2-pirazolinaespiro- $\beta$ -lactamas **1.126**, utilizando uma abordagem sintética em que exploraram a cicloadição [3+2] entre diversos  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas **1.124** e o 2,2,2-trifluorodiazooetano gerado *in situ* (Esquema 1.31).<sup>126</sup> Esta abordagem permitiu a obtenção dos produtos espirocíclicos com rendimentos entre 82% e 96%.

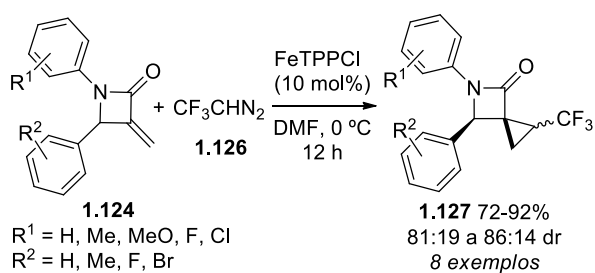


**Exemplos representativos**

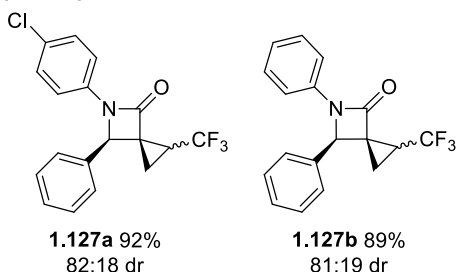


**Esquema 1.31** - Cicloadição [3+2] entre 2,2,2-trifluorodiazotano e  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas.

No seguimento deste último trabalho, os autores demonstraram também que as mesmas  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas **1.124** e o 2,2,2-trifluorodiazotano na presença de um catalisador de ferro (FeTPPCI) reagem por ciclopropanação originando espirociclopropano- $\beta$ -lactamas **1.127** (Esquema 1.32).<sup>126</sup> Esta abordagem resultou na síntese de oito  $\beta$ -lactamas espirocíclicas com bom rendimento (79-92%) e boa diastereoselectividade (de 81:19 dr a 86:14 dr).

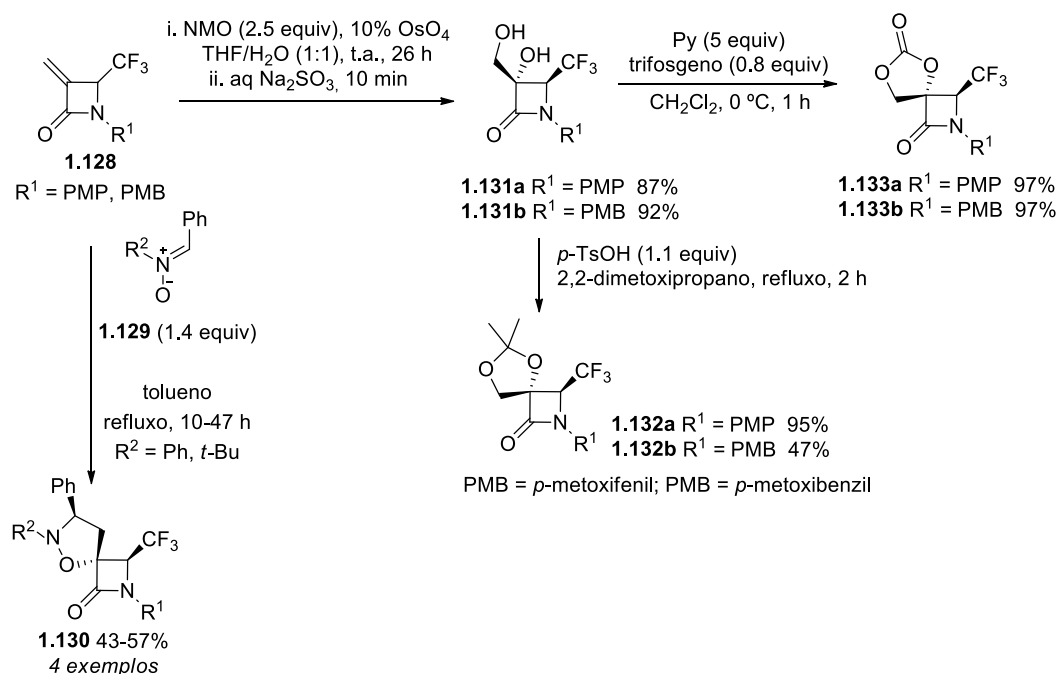


**Exemplos representativos**



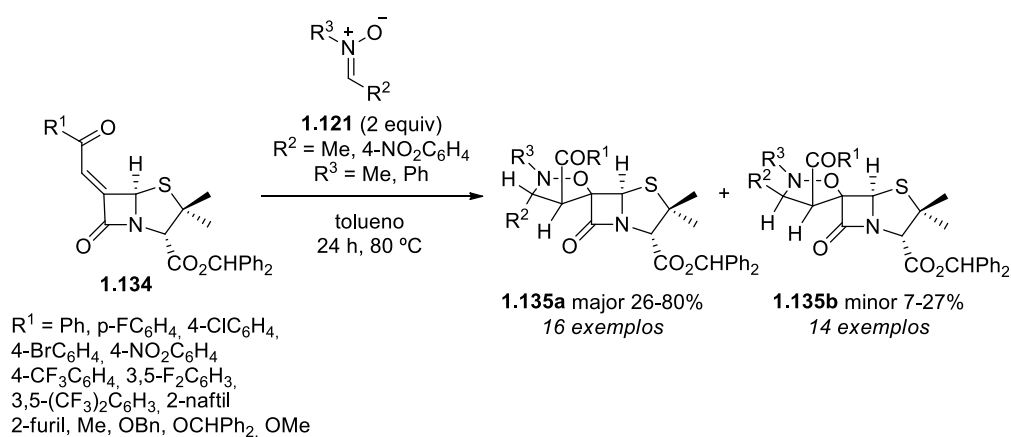
**Esquema 1.32** - Ciclopropanação de  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas com 2,2,2-trifluorodiazotano catalisada por FeTPPCI.

O grupo de D'hooghe também explorou a classe das  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas, mais propriamente 3-metileno-4-(trifluorometil)azetidín-2-onas **1.128**, como reagente inicial em três vias sintéticas que exploram de forma distinta a reatividade da ligação dupla exocíclica das  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas, culminando na síntese de três diferentes classes de espiro- $\beta$ -lactamas que divergem na natureza do novo anel espirocíclico formado (Esquema 1.33).<sup>127,128</sup> Numa primeira abordagem, foi sintetizado um grupo de espiro- $\beta$ -lactamas **1.130** contendo uma espiroisoxazolina com rendimento global moderado (43-57%), através de uma cicloadição 1,3-dipolar entre nitronas contendo um grupo fenilo (**1.129**) e 3-metileno-4-(trifluorometil)azetidín-2-onas **1.128**. Recorrendo a uma oxidação mediada por OsO<sub>4</sub>, os mesmos autores converteram também as 3-metileno-4-(trifluorometil)azetidín-2-onas **1.128** aos respectivos dióis vicinais **1.131**. Estas moléculas revelaram-se precursores versáteis de espiro- $\beta$ -lactamas na medida em que permitiram a síntese eficiente das 3-trifluorometil-5,7-dioxa-2-azaespiro[3.4]octan-1-onas **1.132** com um rendimento global moderado a elevado, assim como das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas **1.133** com um rendimento global elevado. Estas classes de moléculas foram sintetizadas, respetivamente, através de uma acetalização com *p*-TsOH em 2,2-dimetoxipropano e da reação com trifosgeno em diclorometano e na presença de piridina.



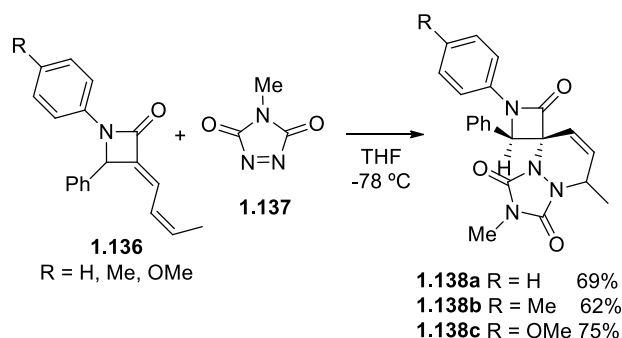
**Esquema 1.33** - 3-Metileno-4-(trifluorometil)azetidín-2-onas como blocos de construção na síntese de diferentes classes de espiro- $\beta$ -lactamas.

Recentemente, o grupo de Pinho e Melo também utilizou nitronas **1.121** como dipolos na síntese de espiroisoxazolidina-penicilanatos **1.135** quirais a partir de 6-alkilidenopenicilanatos **1.134** via cicloadição 1,3-dipolar, numa reação em que a ligação dupla exocíclica dos alkilidenopenicilanatos atua como dipolarófilo.<sup>129</sup> Os compostos espiro-β-lactâmicos produzidos por esta abordagem sintética caracterizam-se pela presença na sua estrutura de três centro quirais, tendo sido os produtos obtidos de forma regio- e estereosselectiva, sendo que em dois casos a reação provou mesmo ser estereoespecífica (Esquema 1.34). Os produtos maioritários foram sintetizados com rendimentos entre os 26% e os 80% sendo resultado de uma cicloadição *endo* da nitrona pelo lado α do 6-alkilidenopenicilanato. Em contraste, os cicloadutos *exo* foram isolados como produtos minoritários, com rendimentos a variar entre os 7% e os 27%.



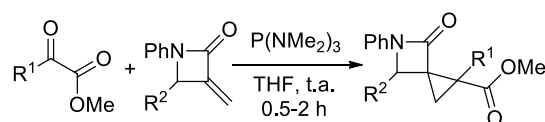
**Esquema 1.34** - Cicloadição 1,3-dipolar entre nitronas e 6-alkilidenopenicilanatos.

Bhargava e colaboradores também reforçaram o potencial da classe das α-alkilideno-β-lactamas na síntese de espiro-β-lactamas quando exploraram a cicloadição [4+2] entre α-1,3-pentadieno-β-lactamas **1.136** com a 4-metil-[1,2,4]triazole-3,5-diona **1.137** (Esquema 1.35). Esta abordagem permitiu a síntese de espiro[[1,2,4]triazolo[1,2-a]piridazina-5,3'-azetidina]-1,2',3(2*H*,8*H*)-trionas **1.138** com bons rendimentos (62-75%).<sup>130</sup>

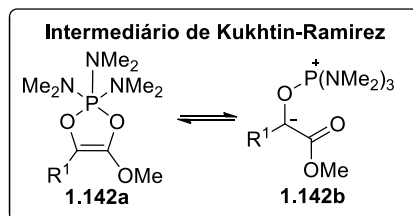


**Esquema 1.35** - Cicloadição [4+2] entre  $\alpha$ -alquilideno- $\beta$ -lactamas e 4-metil-[1,2,4]triazol-3,5-diona.

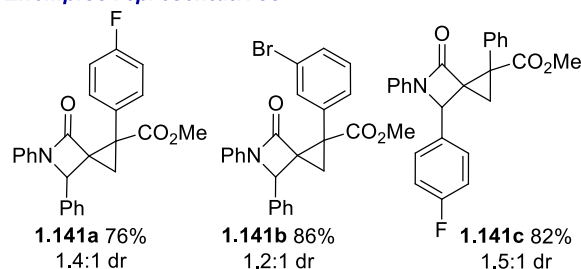
Luo e seus colaboradores apresentaram recentemente a síntese de espirociclopropil- $\beta$ -lactamas **1.141** através da ciclopropanação de  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas **1.140** com  $\alpha$ -cetoésteres **1.139**, numa reação de carácter redutivo e mediada por uma fosfina (i.e  $\text{P}(\text{NMe}_2)_3$ ) (Esquema 1.36).<sup>131</sup> O mecanismo reacional compreende um passo inicial de adição da fosfina ao  $\alpha$ -cetoéster **1.139** resultando na formação de um intermediário de Kukhtin-Ramirez **1.142**. Este intermediário, cuja estrutura dipolar mimetiza a de um carbeno, atua então como nucleófilo numa adição de Michael à ligação dupla exocíclica do sistema  $\alpha,\beta$ -conjugado da  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactama **1.140**, seguindo-se uma ciclização do tipo 3-*exo-tet* que resulta na obtenção das espirociclopropil- $\beta$ -lactamas **1.141** como uma mistura de diastereoisómeros.



**1.139**      **1.140**      **1.141** 76-86%  
 $R^1$  = aril, 2-naftil, 2-tienil      1.1:1 a 5:1 dr  
 $R^2$  = Ph, 4-FC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>Et      15 exemplos



#### Exemplos representativos



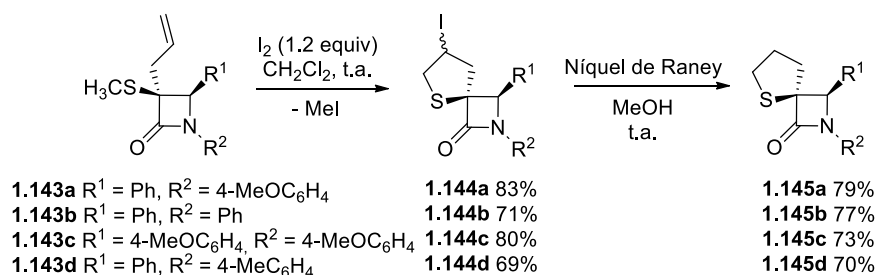
**Esquema 1.36** - Ciclopropanação de  $\alpha$ -metileno- $\beta$ -lactamas com  $\alpha$ -cetoésteres numa reação mediada por  $P(NMe_2)_3$ .

#### 1.2.2.2 - Espirociclicação mediada por halogéneos

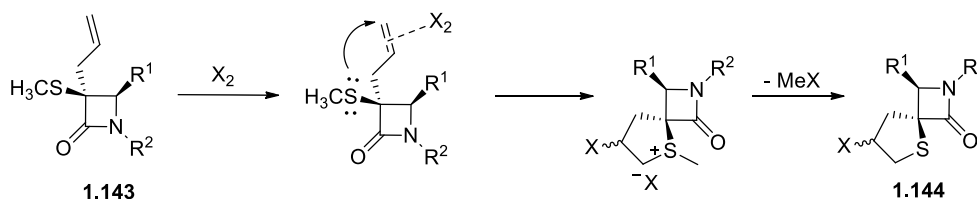
Reações de ciclicação mediadas por halogéneos também constituem estratégias sintéticas alternativas válidas para a construção de espiro- $\beta$ -lactama a partir de  $\beta$ -lactamas convencionais.

O grupo de Bari desenvolveu a síntese das halo-espiro- $\beta$ -lactamas **1.144** fundidas na posição C-3 a partir da ciclização intramolecular das 3-alil-metil- $\beta$ -lactamas **1.143**, numa reação mediada por iodo molecular (Esquema 1.37).<sup>132</sup> Os produtos espirocíclicos iodados **1.144** foram obtidos com bom rendimento (69-83%) como misturas de diastereoisómeros, misturas essas que ao serem sujeitas à reação com níquel de Raney deram origem aos análogos desalogenados **1.145** de forma eficiente (70-79%). Esta reatividade foi reproduzida recorrendo a bromo molecular como halogéneo resultando, no entanto, em rendimentos mais baixos na síntese dos análogos bromados dos compostos **1.144a** e **1.144b** (58% e 67% respetivamente). O mecanismo de reação proposto pelos autores assenta num passo inicial de coordenação entre o halógeno e o alqueno terminal,

ao que se segue uma adição nucleofílica e uma desalquilação, numa sequência semelhante à desenvolvida anteriormente por Tuross e colaboradores.<sup>133</sup>



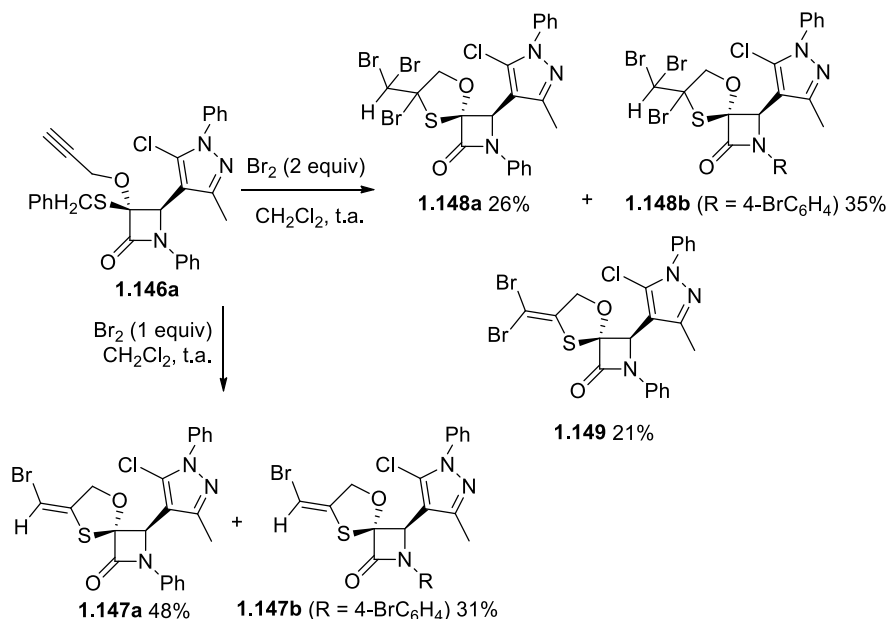
**Mecanismo proposto**



**Esquema 1.37** - Ciclização de 3-alil-metiltio-β-lactama mediada por halogéneos.

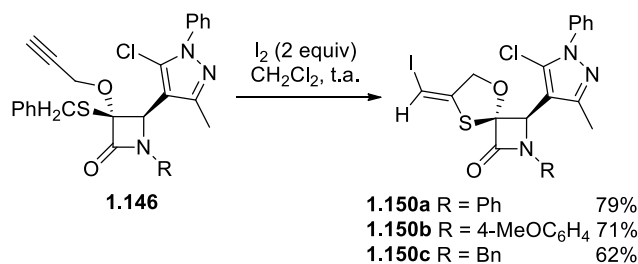
O mesmo grupo de investigação preparou 4-pirazolil-espiro-β-lactamas através de um procedimento análogo ao anterior, nomeadamente pela intrasulfenilciclização de *cis*-3-(prop-2'-iniloxi)-4-pirazolil-β-lactamas **1.146** na presença de um halogéneo (Esquema 1.38).<sup>134</sup> O tipo de produtos espirocíclicos obtidos mostrou-se dependente do número de equivalentes de bromo, na medida em que a ciclização intramolecular pode ser acompanhada pela polibromação da molécula, por reações envolvendo a ligação dupla carbono-carbono e o anel aromático ou pela eliminação de HBr a partir dos derivados trihalogenados (*e.g.* **1.148**). A reação mostrou-se igualmente aplicável a moléculas análogas contendo outros substituintes aromáticos na amina do anel β-lactâmico, tais como o grupo benzilo ou o grupo 4-metoxifenilo.





**Esquema 1.38** - Intrasulfenil-ciclização de *cis*-3-(prop-2'-iniloxi)-4-pirazolil- $\beta$ -lactamas mediada por bromo.

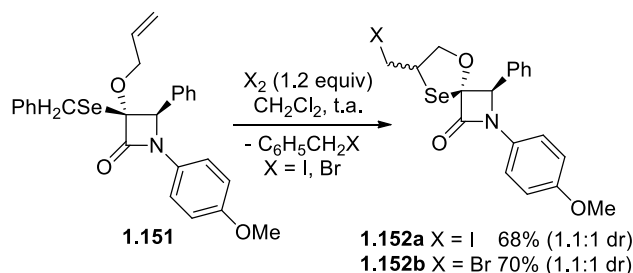
No entanto, ao utilizar o iodo molecular como halogéneo a reação revelou-se mais seletiva, na medida em que foram obtidas 4-pirazolil-espiro- $\beta$ -lactamas monohalogenadas **1.150** como produtos únicos (Esquema 1.39).<sup>134</sup>



**Esquema 1.39** - Intrasulfenil-ciclização de *cis*-3-(prop-2'-iniloxi)-4-pirazolil- $\beta$ -lactamas mediada por iodo.

A síntese de 4-halometil-1,3-oxaselenolanoespiro- $\beta$ -lactamas **1.152** a partir de uma intraselenil ciclização de *cis*-3-aliloxi-3-benzilseleno- $\beta$ -lactamas **1.151** mediada por halogéneos foi descrita pelo grupo de Bhalla.<sup>135</sup> Esta abordagem utilizou  $\text{I}_2$  e  $\text{Br}_2$  tendo ambos os casos levado à obtenção das moléculas alvo com rendimentos similares (Esquema 1.40). O mecanismo proposto compreende uma sequência iniciada com a coordenação do halogéneo com o alqueno terminal, seguindo-se uma adição nucleofílica

e subsequente desalquilação, originando-se assim o produto espiro- $\beta$ -lactâmico **1.152**, de uma forma similar à apresentada anteriormente no esquema 1.37.



**Esquema 1.40** - Intraselenil-ciclização de *cis*-3-aliloxi-3-benzilseleno- $\beta$ -lactamas mediada por halogéneos.

### 1.3. Conclusão e enquadramento do projeto de Doutorado

As espiro- $\beta$ -lactamas são uma subclasse das  $\beta$ -lactamas, caracterizadas por apresentarem na sua estrutura um núcleo espirocíclico em que o anel 2-azetidina partilha um carbono quaternário com outra subunidade estrutural cíclica. Esta característica estrutural confere às espiro- $\beta$ -lactamas rigidez estrutural e uma disposição tridimensional única em que os dois anéis espirocíclicos se dispõem em planos diferentes na molécula.

A identificação de espiro- $\beta$ -lactamas bioativas, assim como a sua complexa estrutura tridimensional têm atraído a atenção de variados quadrantes da química, nomeadamente a química medicinal e a síntese orgânica. Este crescente interesse resultou em diversos trabalhos focados no desenvolvimento e otimização de estratégias para a síntese de  $\beta$ -lactamas espirocíclicas. Neste capítulo foi reunido o conjunto de avanços sintéticos, descritos desde 2015, relativos a esta classe de moléculas. Apesar de a cicloadição de Staudinger continuar a ser a metodologia mais utilizada para a síntese de espiro- $\beta$ -lactamas, outras abordagens sintéticas alternativas têm vindo a ser exploradas como, por exemplo, a reação de Reformatsky para a construção do anel 2-azetidina, ou a cicloadição 1,3-dipolar de  $\alpha$ -alquilideno- $\beta$ -lactamas para a construção do anel não-lactâmico.

A apresentação desta revisão da literatura assume carácter introdutório na presente tese de Doutorado, cujo principal objetivo foi a síntese de novos espiropenicilanatos com atividade antimicrobiana dupla contra HIV e *Plasmodium*. Este trabalho vem no seguimento de diversos avanços na área da síntese de espiropenicilanatos desenvolvidos

pelo grupo de Pinho e Melo, e focou-se na síntese de novas espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactamas e espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas derivadas de espiropenicilanatos identificados como tendo potente dupla atividade antimicrobiana, numa estratégia com uma forte componente de modelação estrutural racional. O presente projeto de Doutoramento compreendeu também a avaliação da atividade *in vitro* das novas moléculas sintetizadas contra o vírus do HIV e *Plasmodium*, de modo a identificar novos compostos bioativos e estabelecer relações de estrutura-atividade da presente classe de compostos. Por fim, e em paralelo com a síntese e avaliação da bioatividade de novas espiro- $\beta$ -lactamas, pretendeu-se também explorar técnicas computacionais de pesquisa de similaridade química e estrutural, com o intuito de obter indicações valiosas no processo de identificação do alvo biológico e caracterização do mecanismo de ação antimicrobiana associado a esta classe de moléculas, que se afirma como altamente promissora do ponto de vista da química medicinal.

## 1.4. Bibliografia

1. Arya, N.; Jagdale, A. Y.; Patil, T. A.; Yeramwar, S. S.; Holikatti, S. S.; Dwivedi, J.; Shishoo, C. J.; Jain, K. S., The chemistry and biological potential of azetidin-2-ones. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74* (3), 619-656.
2. Veinberg, G.; Potorocina, I.; Vorona, M., Recent Trends in the design, synthesis and biological exploration of  $\beta$ -lactams. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21* (4), 393-416.
3. Mehta, P. D.; Sengar, N. P. S.; Pathak, A. K., 2-Azetidinone – A new profile of various pharmacological activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (12), 5541-5560.
4. Kluge, A. F.; Petter, R. C., Acylating drugs: redesigning natural covalent inhibitors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14* (3), 421-427.
5. Singh, G. S.,  $\beta$ -Lactams in the new millennium. Part-I: Monobactams and carbapenems. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4* (1), 69-92.
6. Singh, G. S.,  $\beta$ -Lactams in the new millennium. Part-II: Cephems, oxacephems, penams and sulbactam. *Mini Rev. Med. Chem.* **2004**, *4* (1), 93-109.
7. Singh, G. S.; D'hooghe, M.; De Kimpe, N., Synthesis and reactivity of spiro-fused  $\beta$ -lactams. *Tetrahedron* **2011**, *67* (11), 1989-2012.
8. Staudinger, H., Zur kenntniss der ketene. diphenylketen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1907**, *356* (1-2), 51-123.
9. Tidwell, T. T., Hugo (Ugo) Schiff, Schiff bases, and a century of  $\beta$ -lactam synthesis. *Angewandte Chemie* **2008**, *47* (6), 1016-1020.
10. Fleming, A., On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Rev. Infect. Dis.* **1980**, *2* (1), 129-139.
11. Rolinson, G. N., Forty years of beta-lactam research. *J. Antimicrob. Chemother.* **1998**, *41* (6), 589-603.
12. Fernandes, R.; Amador, P.; Prudêncio, C.,  $\beta$ -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev. Med. Microbiol.* **2013**, *24* (1), 7-17.
13. Gaynes, R., The discovery of Penicillin—New insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infect. Dis.* **2017**, *23* (5), 849-853.
14. Swann, J. P., The search for synthetic Penicillin during World War II. *Br. J. Hist. Sci.* **2009**, *16* (2), 154-190.
15. Shama, G., The role of the media in influencing public attitudes to penicillin during World War II. *Dynamis* **2015**, *35* (1), 131-152.

16. Quinn, R., Rethinking antibiotic research and development: World War II and the Penicillin collaborative. *Am. J. Public Health* **2012**, *103* (3), 426-434.
17. Crowfoot, D.; Bunn, C. W.; Rogers-Low, B. W.; Turner-Jones, A., XI. The X-Ray crystallographic investigation of the structure of Penicillin. In *The Chemistry of Penicillin*, Princeton University Press: Princeton, 1949; 310-366.
18. Sheehan, J. C.; Henery-Logan, K. R., The total synthesis of Penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (5), 1262-1263.
19. Chaudhry, S. B.; Veve, M. P.; Wagner, J. L., Cephalosporins: A focus on side chains and  $\beta$ -lactam cross-reactivity. *Pharmacy (Basel)* **2019**, *7* (3), 103.
20. Decuyper, L.; Jukič, M.; Sosič, I.; Žula, A.; D'Hooghe, M.; Gobec, S., Antibacterial and  $\beta$ -lactamase inhibitory activity of monocyclic  $\beta$ -lactams. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38* (2), 426-503.
21. Aminov, R., History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133*, 4-19.
22. Lenhard, J. R.; Bulman, Z. P., Inoculum effect of  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74* (10), 2825-2843.
23. Wilke, M. S.; Lovering, A. L.; Strynadka, N. C. J.,  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8* (5), 525-533.
24. Bush, K., Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62* (10), e01076-18.
25. Bush, K.; Bradford, P. A., Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17* (5), 295-306.
26. Papp-Wallace, K. M., The latest advances in  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Expert Opin. Pharmacother.* **2019**, *20* (17), 2169-2184.
27. Tooke, C. L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E. C.; Colenso, C. K.; Hirvonen, V. H. A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J.,  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431* (18), 3472-3500.
28. Toussaint, K. A.; Gallagher, J. C.,  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase inhibitor combinations: From then to now. *Ann. Pharmacother.* **2014**, *49* (1), 86-98.
29. Chiang, Y.-C.; Wong, M. T. Y.; Essex, J. W., Molecular dynamics simulations of antibiotic Ceftaroline at the allosteric site of Penicillin-Binding Protein 2a (PBP2a). *Isr. J. Chem.* **2020**, *60* (7), 754-763.

30. Lu, Z.; Wang, H.; Zhang, A.; Liu, X.; Zhou, W.; Yang, C.; Guddat, L.; Yang, H.; Schofield, C. J.; Rao, Z., Structures of Mycobacterium tuberculosis Penicillin-Binding Protein 3 in complex with five  $\beta$ -lactam antibiotics reveal mechanism of inactivation. *Mol. Pharmacol.* **2020**, *97* (4), 287-294.
31. Sharifzadeh, S.; Brown, N. W.; Shirley, J. D.; Bruce, K. E.; Winkler, M. E.; Carlson, E. E., Chapter Two - Chemical tools for selective activity profiling of bacterial penicillin-binding proteins. In *Methods in Enzymology*, Chenoweth, D. M., Ed. Academic Press: 2020; Vol. 638, 27-55.
32. Egan, A. J. F.; Errington, J.; Vollmer, W., Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18* (8), 446-460.
33. Cochrane, S. A.; Lohans, C. T., Breaking down the cell wall: Strategies for antibiotic discovery targeting bacterial transpeptidases. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *194*, 112262.
34. Gordon, E.; Mouz, N.; Duée, E.; Dideberg, O., The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from Streptococcus pneumoniae and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *J. Mol. Biol.* **2000**, *299* (2), 477-485.
35. Mucsi, Z.; Chass, G. A.; Ábrányi-Balogh, P.; Jójárt, B.; Fang, D.-C.; Ramirez-Cuesta, A. J.; Viskolcz, B.; Csizmadia, I. G., Penicillin's catalytic mechanism revealed by inelastic neutrons and quantum chemical theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (47), 20447-20455.
36. Hart, K. M.; Reck, M.; Bowman, G. R.; Wencewicz, T. A., Tabtoxinine- $\beta$ -lactam is a “stealth”  $\beta$ -lactam antibiotic that evades  $\beta$ -lactamase-mediated antibiotic resistance. *MedChemComm* **2016**, *7* (1), 118-127.
37. Patrick, G. J.; Fang, L.; Schaefer, J.; Singh, S.; Bowman, G. R.; Wencewicz, T. A., Mechanistic basis for ATP-dependent inhibition of Glutamine Synthetase by Tabtoxinine- $\beta$ -lactam. *Biochemistry* **2018**, *57* (1), 117-135.
38. Martelli, G.; Giacomini, D., Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 91-105.
39. Fu, D.-J.; Zhang, Y.-F.; Chang, A.-Q.; Li, J.,  $\beta$ -Lactams as promising anticancer agents: Molecular hybrids, structure activity relationships and potential targets. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *201*, 112510.
40. Malebari, A. M.; Fayne, D.; Nathwani, S. M.; O’Connell, F.; Noorani, S.; Twamley, B.; O’Boyle, N. M.; O’Sullivan, J.; Zisterer, D. M.; Meegan, M. J.,  $\beta$ -Lactams

with antiproliferative and antiapoptotic activity in breast and chemoresistant colon cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *189*, 112050.

41. Mohamadzadeh, M.; Zarei, M., Anticancer activity and evaluation of apoptotic genes expression of 2-azetidinones containing anthraquinone moiety. *Mol. Divers.* **2020**.
42. Payili, N.; Yennam, S.; Rekula, S. R.; Naidu, C. G.; Bobde, Y.; Ghosh, B., Design, synthesis, and evaluation of the anticancer properties of novel quinone bearing carbamyl  $\beta$ -lactam hybrids. *J. Heterocycl. Chem.* **2018**, *55* (6), 1358-1365.
43. Sperka, T.; Pitlik, J.; Bagossi, P.; Tözsér, J., Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (12), 3086-3090.
44. Déziel, R.; Malenfant, E., Inhibition of human cytomegalovirus protease No with monocyclic  $\beta$ -lactams. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (11), 1437-1442.
45. Singh, G. S.; Al-kahraman, Y. M. S. A.; Mpadi, D.; Yasinzai, M., Synthesis of *N*-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)methyleneamines and 3,3-diaryl-4-(1-methyl-1*H*-indol-3-yl)azetidin-2-ones as potential antileishmanial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (17), 5704-5706.
46. Avilés, E.; Prudhomme, J.; Le Roch, K. G.; Rodríguez, A. D., Structures, semisyntheses, and absolute configurations of the antiplasmodial  $\alpha$ -substituted  $\beta$ -lactam monamphilectines B and C from the sponge *Svenzea flava*. *Tetrahedron* **2015**, *71* (3), 487-494.
47. Jarrahpour, A.; Rezaei, S.; Sinou, V.; Latour, C.; Brunel, J. M., Synthesis of some novel 3-spiro monocyclic  $\beta$ -lactams and their antibacterial and antifungal investigations. *Iran J. Sci. Technol. Trans. A Sci.* **2016**, *41* (2), 337-342.
48. Vandekerckhove, S.; D'hooghe, M., Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (16), 5098-5119.
49. Kumar, K.; Pradines, B.; Madamet, M.; Amalvict, R.; Kumar, V., 1*H*-1,2,3-triazole tethered mono- and bis-ferrocenylchalcone- $\beta$ -lactam conjugates: Synthesis and antimalarial evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 113-121.
50. Raj, R.; Singh, P.; Haberkern, N. T.; Faucher, R. M.; Patel, N.; Land, K. M.; Kumar, V., Synthesis of 1*H*-1,2,3-triazole linked  $\beta$ -lactam–isatin bi-functional hybrids and preliminary analysis of in vitro activity against the protozoal parasite *Trichomonas vaginalis*. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 897-906.
51. Mishra, M. K.; Singh, V. N.; Muhammad, S.; Aloui, Z.; Sangeeta, S.; Noorussabah, N.; Ahmad, K.; Choudhary, M.; Sharma, S., An efficient and eco-friendly

synthesis, computational assay and antimicrobial evaluation of some novel diastereoselective monocyclic cis- $\beta$ -lactams. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1219*, 128638.

52. Mishra, M. K.; Singh, V. N.; Ahmad, K.; Sharma, S., Synthesis and antimicrobial activities of some novel diastereoselective monocyclic cis- $\beta$ -lactams using 2-ethoxy carbonyl DCPN as a carboxylic acid activator. *Mol. Divers.* **2020**.

53. Divse, J. M.; Mhaske, S. B.; Charolkar, C. R.; Sant, D. G.; Tupe, S. G.; Deshpande, M. V.; Khedkar, V. M.; Nawale, L. U.; Sarkar, D.; Pore, V. S., Synthesis and biological evaluation of new fluconazole  $\beta$ -lactam conjugates linked via 1,2,3-triazole. *New J. Chem.* **2017**, *41* (2), 470-479.

54. Burnett, D. A.; Caplen, M. A.; Davis, H. R.; Burrier, R. E.; Clader, J. W., 2-Azetidinones as inhibitors of cholesterol absorption. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (12), 1733-1736.

55. Phan, B. A. P.; Dayspring, T. D.; Toth, P. P., Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vasc. Health Risk Manag.* **2012**, *8*, 415-427.

56. Scheidt, K. A.; Roush, W. R.; McKerrow, J. H.; Selzer, P. M.; Hansell, E.; Rosenthal, P. J., Structure-based design, synthesis and evaluation of conformationally constrained cysteine protease inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6* (12), 2477-2494.

57. Mermer, A.; Bayrak, H.; Şirin, Y.; Emirik, M.; Demirbaş, N., Synthesis of novel Azol- $\beta$ -lactam derivatives starting from phenyl piperazine and investigation of their antiurease activity and antioxidant capacity comparing with their molecular docking studies. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1189*, 279-287.

58. Amin, B.; Hajhashemi, V.; Abnous, K.; Hosseinzadeh, H., Ceftriaxone, a beta-lactam antibiotic, modulates apoptosis pathways and oxidative stress in a rat model of neuropathic pain. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 937568-937568.

59. Kristensen, P. J.; Gegelashvili, G.; Munro, G.; Heegaard, A. M.; Bjerrum, O. J., The  $\beta$ -lactam clavulanic acid mediates glutamate transport-sensitive pain relief in a rat model of neuropathic pain. *Eur. J. Pain* **2018**, *22* (2), 282-294.

60. Gegelashvili, G.; Bjerrum, O. J., High-affinity glutamate transporters in chronic pain: an emerging therapeutic target. *J. Neurochem.* **2014**, *131* (6), 712-730.

61. Szakonyi, Z.; Gyónfalvi, S.; Forró, E.; Hetényi, A.; De Kimpe, N.; Fülöp, F., Synthesis of 3- and 4-hydroxy-2-aminocyclohexanecarboxylic acids by iodocyclization. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *2005* (18), 4017-4023.



62. Alcaide, B.; Almendros, P.; Aragoncillo, C.,  $\beta$ -Lactams: Versatile building blocks for the stereoselective synthesis of non- $\beta$ -lactam products. *Chemical Rev.* **2007**, *107* (11), 4437-4492.
63. Leemans, E.; D'Hooghe, M.; Dejaegher, Y.; Törnroos, K. W.; De Kimpe, N., Synthesis of 3,4-fused bicyclic  $\beta$ -lactams and their transformation into methyl cis-3-aminotetrahydrofuran-2-carboxylates. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *2010* (2), 352-358.
64. Foster, T. J., Can  $\beta$ -lactam antibiotics be resurrected to combat MRSA? *Trends Microbiol.* **2019**, *27* (1), 26-38.
65. Noval, M.; Banoub, M.; Claeys, K. C.; Heil, E., The battle is on: New Beta-lactams for the treatment of multidrug-resistant gram-negative organisms. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2020**, *22* (1), 1.
66. Ribeiro da Cunha, B.; Fonseca, L. P.; Calado, C. R. C., Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go? *Antibiotics (Basel)* **2019**, *8* (2), 45.
67. Brandi, A.; Cicchi, S.; Cordero, F. M., Novel syntheses of azetidines and azetidiones. *Chemical Rev.* **2008**, *108* (9), 3988-4035.
68. Pitts, C. R.; Lectka, T., Chemical synthesis of  $\beta$ -lactams: Asymmetric catalysis and other recent advances. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (16), 7930-7953.
69. Kumar, Y.; Singh, P.; Bhargava, G., Recent developments in the synthesis of condensed  $\beta$ -lactams. *RSC Adv.* **2016**, *6* (101), 99220-99250.
70. Hosseyni, S.; Jarrahpour, A., Recent advances in  $\beta$ -lactam synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (38), 6840-6852.
71. Japheth, O. O.; Girija, S. S., Recent progress in chemistry of  $\beta$ -lactams. *Mini Rev. Org. Chem.* **2019**, *16* (6), 544-567.
72. Chupakhin, E.; Babich, O.; Prosekov, A.; Asyakina, L.; Krasavin, M., Spirocyclic motifs in natural products. *Molecules* **2019**, *24* (22), 4165.
73. Zheng, Y.; Tice, C. M.; Singh, S. B., The use of spirocyclic scaffolds in drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (16), 3673-3682.
74. Shah, R. J.; Modi, N. R.; Patel, M. J.; Patel, L. J.; Chauhan, B. F.; Patel, M. M., Design, synthesis and in vitro antibacterial and antifungal activities of some novel spiro[azetidine-2,3'-indole]-2,4(1'H)-dione. *Med. Chem. Res.* **2011**, *20* (5), 587-594.
75. Chen, L. Y.; Zaks, A.; Chackalamannil, S.; Dugar, S., Asymmetric synthesis of substituted 2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones: An enantioselective synthesis of the cholesterol absorption inhibitor (+)-SCH 54016. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (23), 8341-8343.

76. Sheehan, J. C.; Chacko, E.; Lo, Y. S.; Ponzi, D. R.; Sato, E., Some new spiro penicillins. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (25), 4856-4859.
77. Skiles, J. W.; McNeil, D., Spiro indolinone beta-lactams, inhibitors of poliovirus and rhinovirus 3C-proteinases. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (50), 7277-7280.
78. McCoull, W.; Augustin, M.; Blake, C.; Ertan, A.; Kilgour, E.; Krapp, S.; Moore, J. E.; Newcombe, N. J.; Packer, M. J.; Rees, A.; Revill, J.; Scott, J. S.; Selmi, N.; Gerhardt, S.; Ogg, D. J.; Steinbacher, S.; Whittamore, P. R. O., Identification and optimisation of 3,3-dimethyl-azetidino-2-ones as potent and selective inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1). *MedChemComm* **2014**, *5* (1), 57-63.
79. Khan, M. A.; Houck, D. R.; Gross, A. L.; Zhang, X. L.; Cearley, C.; Madsen, T. M.; Kroes, R. A.; Stanton, P. K.; Burgdorf, J.; Moskal, J. R., NYX-2925 is a novel NMDA receptor-specific spirocyclic-beta-lactam that modulates synaptic plasticity processes associated with learning and memory. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2018**, *21* (3), 242-254.
80. Lin, X.; Weinreb, S. M., Model studies on total synthesis of the chartellines, spirocyclic  $\beta$ -lactam alkaloids from a marine bryozoan. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42* (14), 2631-2633.
81. Pinder, J. L.; Weinreb, S. M., Preliminary feasibility studies on total synthesis of the unusual marine bryozoan alkaloids chartellamide A and B. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (21), 4141-4143.
82. Kajii, S.; Nishikawa, T.; Isobe, M., Synthetic studies and biosynthetic speculation on marine alkaloid chartelline. *Chem. Commun.* **2008**, (27), 3121-3123.
83. Nakane, Y.; Nakazaki, A.; Nishikawa, T., Studies toward the synthesis of Chartelline C. *J. Org. Chem.* **2020**, *85* (11), 7534-7542.
84. Alonso, E.; López-Ortiz, F.; del Pozo, C.; Peralta, E.; Macías, A.; González, J., Spiro  $\beta$ -Lactams as  $\beta$ -turn mimetics. Design, synthesis, and NMR conformational analysis. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (19), 6333-6338.
85. Bittermann, H.; Gmeiner, P., Chiroselective synthesis of spirocyclic  $\beta$ -lactams and their characterization as potent type II  $\beta$ -turn inducing peptide mimetics. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (1), 97-102.
86. Dao Thi, H.; D'Hooghe, M., An update on the synthesis and reactivity of spiro-fused  $\beta$ -lactams. *Arkivoc* **2018**, 314-347.
87. Manhas, M. S.; Chib, J. S.; Chiang, Y. H.; Bose, A. K., Studies on lactams—XII: Synthesis of some spiro- $\beta$ -lactams. *Tetrahedron* **1969**, *25* (18), 4421-4426.

88. Hirai, K.; Iwano, Y.; Saito, T.; Hiraoka, T.; Kishida, Y., Functionalization of C6(7) of penicillins and cephalosporins via 1,3-dipolar intermediate. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17* (16), 1303-1306.
89. Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Ganboa, I.; Oiarbide, M., Asymmetric synthesis of  $\beta$ -lactams by Staudinger ketene-imine cycloaddition reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *1999* (12), 3223-3235.
90. Fu, N.; Tidwell, T. T., Preparation of  $\beta$ -Lactams by [2+2] cycloaddition of ketenes and imines. *Tetrahedron* **2008**, *64* (46), 10465-10496.
91. Xu, J., Stereoselectivity in the synthesis of 2-Azetidinones from ketenes and imines via the Staudinger reaction. *Arkivoc* **2009**, 21-44.
92. Jiao, L.; Liang, Y.; Xu, J. X., Origin of the relative stereoselectivity of the  $\beta$ -lactam formation in the Staudinger reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 6060-6069.
93. Karlsson, S.; Bergman, R.; Löfberg, C.; Moore, P. R.; Pontén, F.; Tholander, J.; Sörensen, H., Development of a large-scale route to an MCH1 receptor antagonist: Investigation of a Staudinger ketene-imine cycloaddition in batch and flow mode. *Org. Process. Res. Dev.* **2015**, *19* (12), 2067-2074.
94. Lauro, F. V.; Francisco, D. C.; Elodia, G. C.; Eduardo, P. G.; Maria, L. R.; Marcela, R. N.; Lenin, H. H.; Bety, S. A., Synthesis and antibacterial activity evaluation of two androgen derivatives. *Steroids* **2015**, *93*, 8-15.
95. Kandile, N. G.; Mohamed, M. I.; Ismaeel, H. M., Synthesis of new Schiff bases bearing 1,2,4-triazole, thiazolidine and chloroazetidone moieties and their pharmacological evaluation. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **2017**, *32* (1), 119-129.
96. Kirichok, A. A.; Shton, I.; Kliachyna, M.; Pishel, I.; Mykhailiuk, P. K., 1-Substituted 2-azaspiro[3.3]heptanes: Overlooked motifs for drug discovery. *Angewandte Chemie* **2017**, *56* (30), 8865-8869.
97. Lenci, E.; Innocenti, R.; Menchi, G.; Trabocchi, A., Diversity-oriented synthesis and chemoinformatic analysis of the molecular diversity of  $sp^3$ -rich morpholine peptidomimetics. *Frontiers in chemistry* **2018**, *6*, 522.
98. Filatov, V.; Kukushkin, M.; Kuznetsova, J.; Skvortsov, D.; Tafeenko, V.; Zyk, N.; Majouga, A.; Beloglazkina, E., Synthesis of 1,3-diaryl-spiro azetidone-2,3'-indoline -2',4'-diones via the staudinger reaction: *cis*- or *trans*-diastereoselectivity with different addition modes. *RSC Adv.* **2020**, *10* (24), 14122-14133.

99. Zarei, M.; Salehinezhad, A., Facile synthesis of  $\beta$ -lactam derivatives by the Staudinger reaction using 3,6-dichlorotetrazine. *J. Chem. Res.* **2015**, *39* (12), 698-700.
100. Zarei, M.; Maaqooli, F., Preparation of 2-azetidinones by cyclocondensation of carboxylic acids and imines via diphosphorustetraiodide. *Synth. Commun.* **2016**, *46* (6), 523-527.
101. Zavar, S.; Zarei, M.; Saraei, M., Tosylimidazole-mediated one-pot synthesis of 2-azetidinones. *J. Chem. Res.* **2016**, *40* (9), 532-534.
102. Heiran, R.; Sepehri, S.; Jarrahpour, A.; Digiorgio, C.; Douafer, H.; Brunel, J. M.; Gholami, A.; Riazimontazer, E.; Turos, E., Synthesis, docking and evaluation of *in vitro* anti-inflammatory activity of novel morpholine capped  $\beta$ -lactam derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *102*, 104091.
103. Zavar, S.; Zarei, M.; Saraei, M., Synthesis of  $\beta$ -lactams via Staudinger reaction using N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline as a carboxylic acid activator. *Synth. Commun.* **2016**, *46* (24), 2031-2036.
104. Esmailpour, M.; Sardarian, A. R.; Jarrahpour, A.; Ebrahimi, E.; Javidi, J., Synthesis and characterization of  $\beta$ -lactam functionalized superparamagnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$  nanoparticles as an approach for improvement of antibacterial activity of  $\beta$ -lactams. *RSC Adv.* **2016**, *6* (49), 43376-43387.
105. Rad, J. A.; Jarrahpour, A.; Ersanli, C. C.; Atioglu, Z.; Akkurt, M.; Turos, E., Synthesis of some novel indeno[1,2-*b*]quinoxalin spiro- $\beta$ -lactam conjugates. *Tetrahedron* **2017**, *73* (8), 1135-1142.
106. Torres, G. M.; De La Higuera Macias, M.; Quesnel, J. S.; Williams, O. P.; Yempally, V.; Bengali, A. A.; Arndtsen, B. A., Palladium-catalyzed, multicomponent approach to  $\beta$ -lactams via aryl halide carbonylation. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (24), 12106-12115.
107. Golubev, A. A.; Smetanin, I. A.; Agafonova, A. V.; Rostovskii, N. V.; Khlebnikov, A. F.; Starova, G. L.; Novikov, M. S., [2+1+1] Assembly of spiro  $\beta$ -lactams by Rh(II)-catalyzed reaction of diazocarbonyl compounds with azirines/isoxazoles. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (28), 6821-6830.
108. Mannich, C.; Krösche, W., Ueber ein kondensationsprodukt aus formaldehyd, ammoniak und antipyrin. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1912**, *250* (1), 647-667.
109. Isoda, M.; Sato, K.; Funakoshi, M.; Omura, K.; Tarui, A.; Omote, M.; Ando, A., Diastereoselective synthesis of syn- $\beta$ -lactams using Rh catalyzed reductive Mannich-type reaction of  $\alpha, \beta$ -unsaturated Esters. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (16), 8398-8405.

110. Xu, J.; Yuan, S.; Peng, J.; Miao, M.; Chen, Z.; Ren, H., Enantioselective [2+2] annulation of simple aldehydes with isatin derived ketimines via oxidative N-heterocyclic carbene catalysis. *Chem. Commun.* **2017**, 53 (24), 3430-3433.
111. Yu, J. S.; Noda, H.; Shibasaki, M., Exploiting  $\beta$ -amino acid enolates in direct catalytic diastereo- and enantioselective C-C bond-forming reactions. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24 (59), 15796-15800.
112. Jin, J.-H.; Zhao, J. H.; Yang, W.-L.; Deng, W.-P., Asymmetric synthesis of spirooxindole  $\beta$ -lactams via isothiourea-catalyzed Mannich/lactamization reaction of aryl acetic acids with isatin-derived ketimines. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, 361 (7), 1592-1596.
113. Kirillov, N. F.; Nikiforova, E. A.; Baibarodskikh, D. V.; Zakharova, T. A.; Govorushkin, L. S., Synthesis of new bis(spiro- $\beta$ -lactams) via interaction of methyl 1-bromocycloalcanecarboxylates with zinc and *N,N'*-bis(arylmethylidene)benzidines. *J. Chem.* **2019**, 2019, 1-7.
114. Xu, M.-H.; Su, L., Asymmetric Reformatsky-type reaction of isatin-Derived *N*-sulfinyl ketimines: Efficient and practical synthesis of enantiopure chiral 2-oxindoliny- $\beta^{3,3}$ -amino esters. *Synthesis* **2016**, 48 (16), 2595-2602.
115. Gomes, L. F.; Veiros, L. F.; Maulide, N.; Afonso, C. A., Diazo- and transition-metal-free C-H insertion: A direct synthesis of  $\beta$ -lactams. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21 (4), 1449-1453.
116. Wallbaum, L.; Weismann, D.; Löber, D.; Bruhn, C.; Prochnow, P.; Bandow, J. E.; Siemeling, U., Stable and persistent acyclic diaminocarbenes with cycloalkyl substituents and their transformation to  $\beta$ -lactams by uncatalysed carbonylation with CO. *Chem.-Eur. J.* **2019**, 25 (6), 1488-1497.
117. Zhu, L.; Xiong, Y.; Li, C., Synthesis of  $\alpha$ -methylene- $\beta$ -lactams via  $\text{PPh}_3$ -catalyzed umpolung cyclization of propiolamides. *J. Org. Chem.* **2015**, 80 (1), 628-633.
118. Kumarasamy, E.; Ayitou, A. J.; Vallavoju, N.; Raghunathan, R.; Iyer, A.; Clay, A.; Kandappa, S. K.; Sivaguru, J., Tale of twisted molecules. Atropselective photoreactions: Taming light induced asymmetric transformations through non-biaryl atropisomers. *Accounts of chemical research* **2016**, 49 (12), 2713-2724.
119. Vallavoju, N.; Sreenithya, A.; Ayitou, A. J. L.; Jockusch, S.; Sunoj, R. B.; Sivaguru, J., Photoreactions with a twist: Atropisomerism-driven divergent reactivity of enones with UV and visible light. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22 (32), 11339-11348.

120. Fang, Y.; Liao, G.; Guo, H.; Yu, B.; Liu, H.-M., Synthesis of biologically relevant steroidal spiro  $\beta$ -lactams from dienamides through the cascade 4-endo *N*-cyclization/aerobic oxidation sequence. *Steroids* **2020**, *159*, 108635.
121. Wu, X.; Yang, K.; Zhao, Y.; Sun, H.; Li, G.; Ge, H., Cobalt-catalysed site-selective intra- and intermolecular dehydrogenative amination of unactivated  $sp^3$  carbons. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6462.
122. Wang, C.; Yang, Y.; Qin, D.; He, Z.; You, J., Copper-catalyzed intramolecular dehydrogenative amidation of unactivated  $C(sp^3)$ -H bonds using  $O_2$  as the sole oxidant. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (16), 8424-8429.
123. Winkler, M.; Maynadier, M.; Wein, S.; Lespinasse, M.-A.; Boumis, G.; Miele, A. E.; Vial, H.; Wong, Y.-S., Uncovering new structural insights for antimalarial activity from cost-effective aculeatin-like derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (7), 2064-2077.
124. Hwang, Y.; Park, Y.; Kim, Y. B.; Kim, D.; Chang, S., Revisiting arene  $C(sp^2)$ -H amidation by intramolecular transfer of Iridium nitrenoids: Evidence for a spirocyclization pathway. *Angewandte Chemie* **2018**, *57* (41), 13565-13569.
125. Shu, T.; Zhao, L.; Li, S.; Chen, X.-Y.; von Essen, C.; Rissanen, K.; Enders, D., Asymmetric synthesis of spirocyclic  $\beta$ -lactams through copper-catalyzed Kinugasa/Michael domino reactions. *Angewandte Chemie* **2018**, *57* (34), 10985-10988.
126. Ma, J.-A.; Li, S.; Cao, W.-J., Thieme Chemistry Journals Awardees – Where are they now? Stereoselective cycloaddition of 2,2,2-trifluorodiazaoethane with  $\alpha$ -methylene- $\beta$ -lactams: Facile synthesis of trifluoromethyl-substituted spirocyclic  $\beta$ -lactams. *Synlett* **2016**, *28* (06), 673-678.
127. Dao Thi, H.; Danneels, B.; Desmet, T.; Van Hecke, K.; Van Nguyen, T.; D'hooghe, M., Synthesis and applications of 3-methylene-4-(trifluoromethyl)azetidino-2-ones as building blocks for the preparation of mono- and spirocyclic 4-CF<sub>3</sub>- $\beta$ -lactams. *Asian J. Org. Chem.* **2016**, *5* (12), 1480-1491.
128. Dao Thi, H.; Van Nguyen, T.; D'hooghe, M., Synthesis and reactivity of 4-(trifluoromethyl)azetidino-2-ones. *Monatsh. Chem.* **2018**, *149* (4), 687-700.
129. Alves, A. J. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of novel chiral spiroisoxazolidine- $\beta$ -lactams from 6-alkylidenepenicillanates: A 1,3-dipolar cycloaddition approach. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (39), 6259-6269.
130. Kumar, Y.; Bedi, P. M. S.; Singh, P.; Adeniyi, A. A.; Singh-Pillay, A.; Bhargava, G., [2+2] Cycloadditions of sorbyl tosylate with imines/1-azadienes: A one-pot domino

approach for  $\alpha$ -alkylidene- $\beta$ -lactams and their computational studies and antimicrobial evaluation. *ChemistrySelect* **2018**, 3 (32), 9484-9492.

131. Luo, S.-Q.; Liu, W.; Ruan, B.-F.; Fan, S.-L.; Zhu, H. X.; Tao, W.; Xiao, H., P(NMe<sub>2</sub>)<sub>3</sub> Mediated cyclopropanation of  $\alpha$ -methylene- $\beta$ -lactams for rapid synthesis of spirocyclopropyl  $\beta$ -lactams. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18 (24), 4599-4603.

132. Reshma; Arora, R.; Hundal, G.; Bhalla, A.; Bari, S. S., An efficient synthesis of spiro- $\beta$ -lactams having sulfenyl, sulfinyl and sulfonyl moiety. *J. Chem. Sci.* **2015**, 127 (11), 1957-1966.

133. Ren, X.-F.; Turos, E.; Lake, C. H.; Churchill, M. R., Regiochemical and stereochemical studies on halocyclization reactions of unsaturated sulfides. *J. Org. Chem.* **1995**, 60 (20), 6468-6483.

134. Bhalla, A.; Bari, S. S.; Bhalla, J.; Khullar, S.; Mandal, S., Facile Synthesis of novel halogenated 4-pyrazolylspirocyclic- $\beta$ -lactams: Versatile heterocyclic synthons. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57 (25), 2822-2828.

135. Narula, D.; Bari, S. S.; Banik, B. K.; Bhalla, A., Synthesis of novel 4-halomethyl-1,3-oxaselenolane substituted spirocyclic azetidin-2-ones from *cis*-3-allyloxy-3-benzylselenoazetidin-2-ones. *Asian J. Chem.* **2017**, 29 (12), 2582-2586.

# Capítulo 2

## Descoberta de espiro- $\beta$ -lactamas com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*

### Resumo

Infeções pelo vírus do HIV e malária constituem dois dos mais preocupantes problemas de saúde pública à escala global, estando associados a elevadas taxas de morbidade e mortalidade. A existência de grande sobreposição geográfica da incidência destas infeções, em particular na África Subsaariana, leva a que a coinfeção se torne bastante comum, sendo potenciada pelas elevadas carências sociais e económicas dessas zonas. Os dois agentes microbianos estabelecem uma sinergia em que ambas as patologias se potenciam mutuamente, levando a um aumento do risco de transmissibilidade assim como de desenvolvimento de infeções mais severas. Neste contexto, a descoberta de novos princípios ativos com uma atividade potente contra ambos os agentes infecciosos é particularmente relevante. Existe igualmente uma continua necessidade de desenvolvimento de novos fármacos e regimes terapêuticos que permitam ultrapassar tanto as questões de tolerabilidade e segurança a longo-prazo relativas às



terapias correntemente disponíveis, como o crescente surgimento de resistências a fármacos direcionados ao combate ao HIV e malária.

O presente capítulo descreve a descoberta de novos compostos  $\beta$ -lactâmicos espirocíclicos derivados do ácido penicilânico, com uma potente atividade antimicrobiana *in vitro* contra HIV e *Plasmodium*, não apresentando qualquer atividade antibacteriana ou antifúngica. A molécula mais promissora da série, a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, demonstrou uma notável atividade à escala nanomolar contra o vírus do HIV-1 e HIV-2 ( $IC_{50} = 0.014 \mu M$  e  $IC_{50} = 0.008 \mu M$ , respetivamente), independente do tropismo dos isolados e revelando-se ainda ativa contra estirpes multirresistentes. A mesma molécula mostrou ser altamente ativa também contra o parasita *Plasmodium*, com atividade submicromolar contra ambos os estágios hepático e sanguíneo da infeção do parasita com valores respetivos de  $IC_{50}$  de  $0.550 \mu M$  e  $0.430 \mu M$ . Estudos de tempo de adição e *single-target*, indicam que a espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A exerce a sua atividade antiviral por um mecanismo complexo e inovador, diferente do exercido pelos fármacos anti-HIV correntemente disponíveis no mercado.

Estes resultados são produto dos esforços conjuntos de uma equipa multidisciplinar que compreende elementos do grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra sob a liderança da Prof. Teresa Pinho e Melo, o grupo de investigação para a “Evolução, Epidemiologia e Prevenção da infeção por HIV” sob a liderança do Prof. Nuno Taveira e o laboratório de investigação em malária “Prudêncio Lab”, liderado pelo Prof. Miguel Prudêncio.

Os resultados apresentados neste capítulo foram incluídos num artigo científico publicado numa revista de circulação internacional com arbitragem científica:

Bártolo, I.; Santos, B. S.; Fontinha, D.; Machado, M.; Francisco, D.; Sepodes, B.; Rocha, J.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Figueira, M. E.; Barroso, H.; Nascimento, T.; Alves de Matos, A. P.; Alves, A. J. S.; Alves, N. G.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Taveira, N., Spiro- $\beta$ -lactam BSS-730A displays potent activity against HIV and Plasmodium. *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7 (2), 421–434.

## Capítulo 2 - Descoberta de espiro- $\beta$ -lactamas com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*

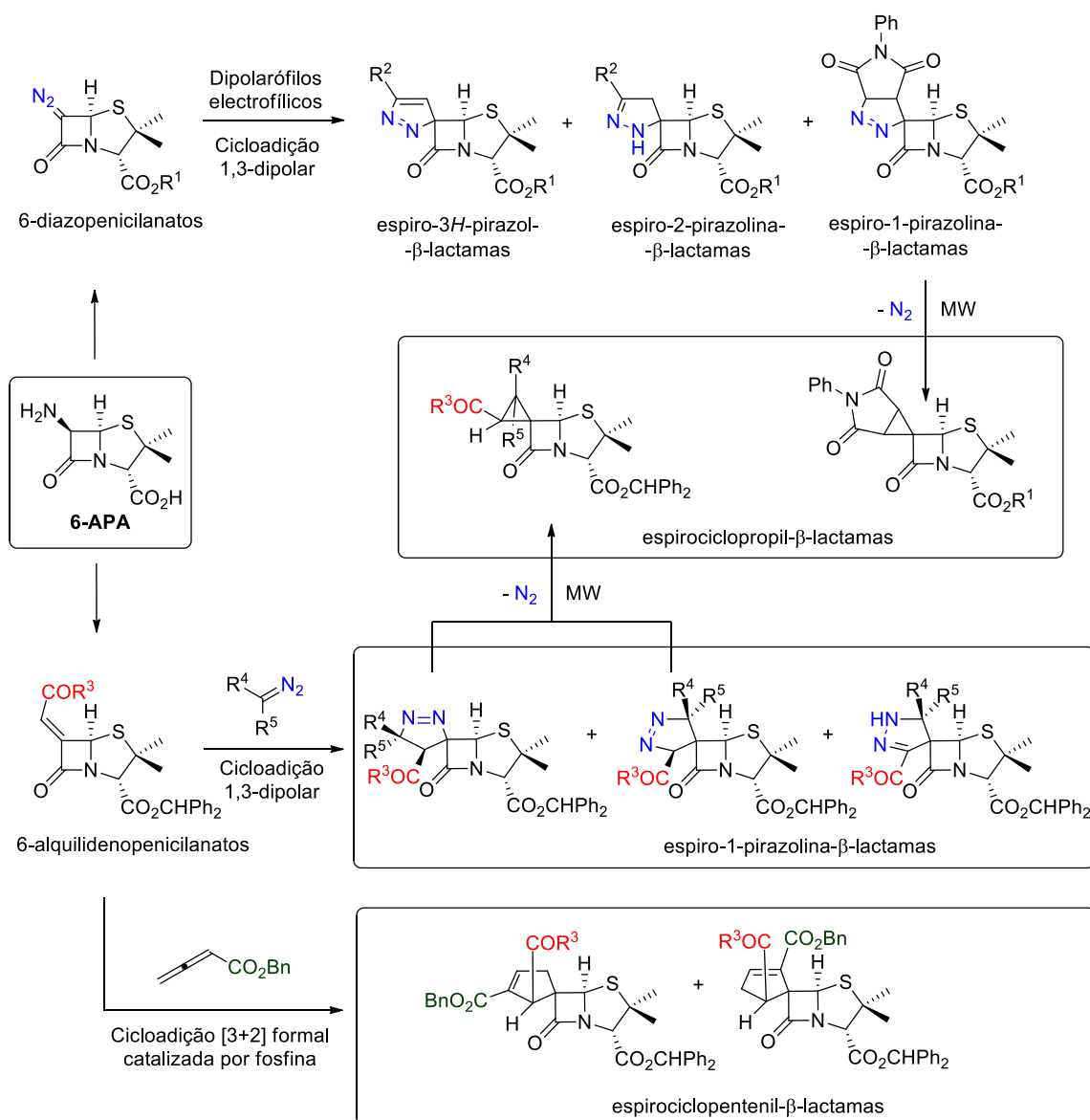
2.1. Introdução	61
2.2. Bioatividade	67
2.2.1. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	67
2.2.2. Atividade anti- <i>Plasmodium</i>	71
2.2.3. Ausência de atividade antibacteriana e antifúngica	73
2.3. Relação estrutura-atividade	74
2.4. Mecanismo de ação	76
2.4.1. Estudos de tempo de adição	76
2.4.2. Pesquisa de similaridade estrutural	77
2.4.3. Pesquisa de subestrutura	78
2.4.4. Estudos de sobreposição de farmacóforo e <i>docking</i>	79
2.4.5. Ensaio <i>single-target</i> contra a protease do HIV	83
2.4.6. Estudos de microscopia eletrônica	85
2.5. Conclusão	87
2.6. Bibliografia	89

## 2.1. Introdução

Como discutido anteriormente em detalhe no Capítulo 1, a classe das  $\beta$ -lactamas espirocíclicas tem como principal característica estrutural a presença de um núcleo espirocíclico em que o anel 2-azetidinona partilha um carbono  $sp^3$  com um outro resíduo cíclico. Desta forma, os dois anéis apresentam-se em planos distintos da molécula. Esta estrutura tão particular permite às espiro- $\beta$ -lactamas um arranjo tridimensional próprio em termos de disposição de grupos funcionais e, conseqüentemente, de características farmacofóricas. Para além destas valências estruturais, esta classe de moléculas apresenta ainda uma elevada rigidez estrutural, o que diminui consideravelmente a sua entropia, facto facilitador de potenciais interações seletivas com potenciais alvos biológicos.<sup>1,2</sup> Dadas todas estas vantagens de comportamento físico-químico e conformacional associadas à classe das espiro- $\beta$ -lactamas, não é de estranhar que este *core* estrutural se encontre presente em várias moléculas bioativas.<sup>3-7</sup>

Ao longo da última década, o grupo de Pinho e Melo tem vindo a desenvolver consideráveis esforços focados no estudo e síntese de novas espiro- $\beta$ -lactamas quirais derivadas do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). As abordagens desenvolvidas exploraram a reatividade de 6-diazopenicilanatos e de 6-alquilidenopenicilanatos, permitindo a construção de espiro- $\beta$ -lactamas a partir da espirociclicização de grupos funcionais exocíclicos ao anel 2-azetidinona, mantendo desta forma o núcleo estrutural da penicilina intacto (Figura 2.1). Numa primeira abordagem datada de 2012, foi explorada a cicloadição 1,3-dipolar entre 6-diazopenicilanatos e diferentes alquenos deficientes em electrões como dipolarófilos, nomeadamente acrilatos, metil vinil cetona, acrilonitrilo e diversas maleimidadas N-substituídas. Esta abordagem resultou na síntese de diferentes espiropirazolina- $\beta$ -lactamas, de forma estereoesselectiva. No mesmo trabalho foi também apresentada a reação análoga em que foram utilizados alquinos deficientes em electrões como dipolarófilos, numa abordagem sintética que permitiu a síntese estereoespecífica de espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactamas.<sup>8</sup> A síntese de espiro-1-pirazolina- $\beta$ -lactamas foi novamente explorada pelo grupo de Pinho e Melo, desta vez por uma via sintética que utilizou 6-alquilidenopenicilanatos como dipolarófilos em reações de cicloadição 1,3-dipolares com compostos diazo, nomeadamente diazometano e difenildiazometano.<sup>9</sup> Ainda no contexto da classe específica das espiro-1-pirazolina- $\beta$ -lactamas, foi também demonstrado que estas podem ser utilizadas de forma eficiente como precursores de espirociclopropil- $\beta$ -lactamas, por via de uma contração de anel

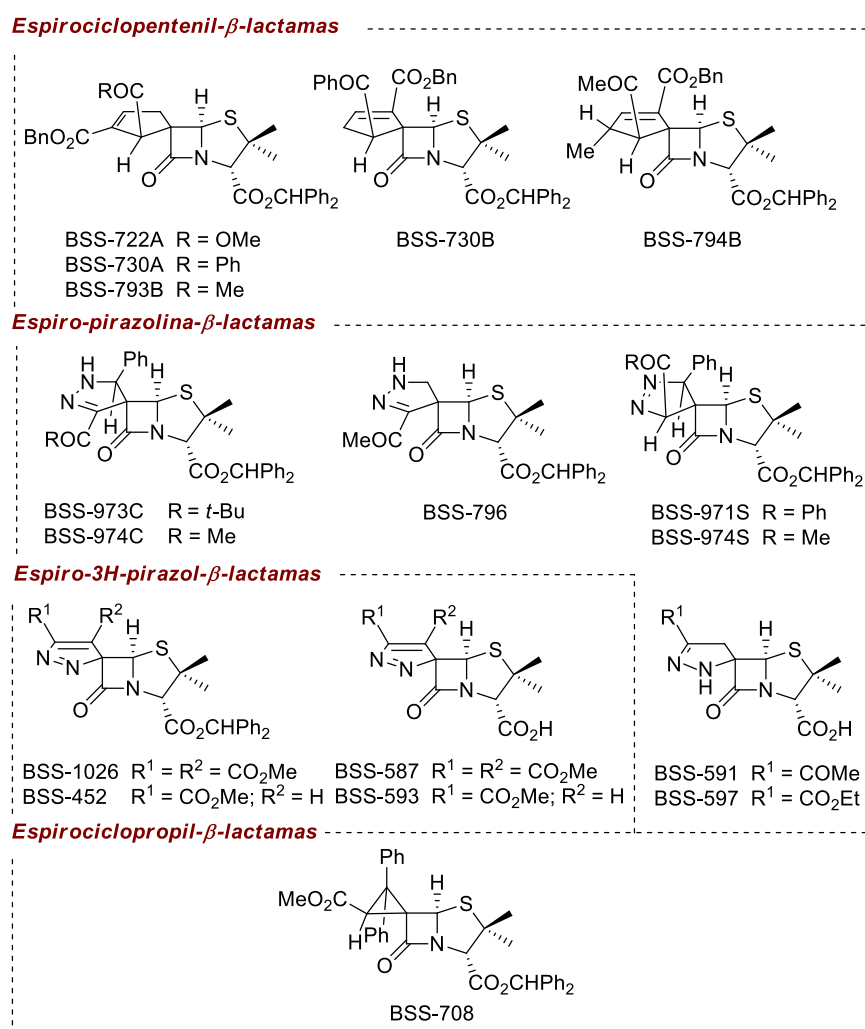
induzida por MW.<sup>9</sup> Por fim, o mesmo grupo de investigação descreveu também a síntese de espirociclopentenil-β-lactamas quirais, numa transformação envolvendo a criação de dois ou três novos centros quirais, explorando novamente a classe dos 6-alquilidenopenicilanatos como precursores, desta vez por via da sua cicloadição [3+2] formal com alenoatos.<sup>10</sup>



**Figura 2.1** – Resumo das sínteses de várias classes de espiropenicilanatos desenvolvidas pelo grupo de Pinho e Melo.

Estas múltiplas abordagens sintéticas que visaram a síntese de diferentes classes de espiro-β-lactamas permitiram a construção de uma considerável biblioteca de compostos. O seu carácter espirocíclico e inerente rigidez conformacional, associado à diversidade estrutural tanto ao nível do tipo de anel espirocíclico fundido com a β-lactama

quanto das características e disposição tridimensional dos seus substituintes, despoletaram o interesse em explorar potenciais atividades biológicas deste conjunto de espiro-β-lactamas. Assim, de entre a ampla biblioteca de espiro-β-lactamas sintetizadas, foram selecionadas dezassete moléculas (Figura 2.2), que tiveram a sua potencial atividade *in vitro* explorada contra os vírus HIV e *Plasmodium*, responsáveis por dois dos maiores flagelos da saúde pública mundial, a SIDA e a malária. Esta abordagem teve como base racional o facto de existirem diversos derivados lactâmicos e/ou espirocíclicos com atividade anti-infecciosa, como é exemplo a atividade apresentada por β-lactamas monocíclicas<sup>11</sup> e pirrolidona espirocíclicas<sup>12</sup> contra a protéase do HIV, ou os mais recentemente descobertos derivados β e γ-lactama espirocíclicos inibidores de enzimas do rinovírus, poliovírus e citomegalovírus,<sup>13,14</sup> ou com atividade antimalárica<sup>15</sup>.



**Figura 2.2** – Conjunto de espiropenicilanatos estudados na avaliação da atividade *in vitro* contra HIV e *Plasmodium*.

De acordo com os últimos dados apresentados pela UNAIDS, no fim de 2019 cerca de 38 milhões de pessoas encontravam-se infetadas com HIV-1 ou HIV-2, vírus estes que continuam a causar cerca de 1.7 milhões de novas infeções e 700 milhares de mortes anuais à escala global, com a grande maioria a ocorrerem na zona da África subsariana.<sup>16</sup> O vírus do HIV-1 é dividido em 4 diferentes grupos, nomeadamente o M, O, P e N. O grupo M é o maior responsável pela pandemia global da SIDA, enquanto que se estima que o grupo O tenha infetado um total de cerca de 100 mil indivíduos, maioritariamente na zona mais ocidental da África Central, zona geográfica onde existem também alguns casos esporádicos associados aos grupos N e P do HIV-1.<sup>17</sup> Relativamente ao HIV-2, que é endémico na zona da África Ocidental e Europa, estima-se que entre 1 e 2 milhões de pessoas tenham sido infetadas por este vírus.<sup>18</sup>

No contexto das terapias atualmente disponíveis, as classes de fármacos anti-HIV compreendem os Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (NRTI), Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (NNRTI), Inibidores de Protease (PIs), Inibidores da Integrase (IIs) e, por fim, os Inibidores de Entrada ou Fusão (EIs).<sup>19,20</sup> Nos finais de Junho de 2019, estimava-se que apenas cerca de 24.5 milhões (64.6%) dos infetados com HIV estariam a receber terapias anti-retrovirais (ART – *Antiretroviral therapy*), numa percentagem abaixo das desejadas por parte da UNAIDS para a cobertura de ART em 2020 de 81% e em 2030 de 90%.<sup>16,21</sup> Um tratamento anti-retroviral seguido de forma ideal por parte dos pacientes infetados com HIV leva a uma supressão da replicação viral e, conseqüentemente, a um aumento dos números de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, prevenindo assim a transmissão do vírus, a progressão da doença para SIDA e a morte dos pacientes.<sup>22</sup> No entanto, os regimes terapêuticos atualmente disponíveis, apesar de amplos, não conseguem restaurar completamente a saúde aos indivíduos infetados com HIV.<sup>23</sup> Por outro lado, estão também associados a uma rápida seleção de estirpes resistentes do vírus,<sup>24</sup> facto que tem levado a um aumento da resistência a nível mundial. Esta tendência crescente de surgimento de estirpes do HIV resistentes à ART, ameaça o controlo da pandemia, sendo que em 2018 apenas 53% dos pacientes recebendo ART se encontravam com cargas virais suprimidas,<sup>25</sup> enquanto se estima que a prevalência de resistência adquirida entre indivíduos sob regimes de ART possa chegar aos 29%.<sup>26</sup> Em termos factuais mais particulares, é estimado que os níveis de resistência pré-tratamento relativamente aos fármacos NNRTI mais utilizados, nomeadamente o efavirenz ou a nevirapina, chegam aos 10% em adultos.<sup>26</sup> Relativamente

aos isolados de HIV-2 estes apresentam uma suscetibilidade diminuída aos PI, assim como uma resistência natural a EIs e NNRTIs.<sup>27</sup> Esta resistência natural a NNRTI é também partilhada por isolados de HIV-1 do grupo O, característica à qual se acrescenta também uma suscetibilidade reduzida a alguns inibidores da protease e inibidores da integrase.<sup>28</sup> Adicionalmente, os fármacos anti-HIV presentemente disponíveis encontram-se associados a vários eventos de toxicidade, nomeadamente a nível hepático e neurológico, especialmente a longo termo.<sup>29-31</sup> Desta forma, devido à conjugação de fatores associados ao crescente aparecimento de resistências virais e da toxicidade inerentes aos regimes terapêuticos correntes, existe uma enorme necessidade de desenvolvimento de novas terapias alternativas para o combate ao vírus do HIV.

Por sua vez, a malária é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium*, entre os quais se destacam as cinco espécies *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* and *P. knowlesi*, por serem passíveis de causar desenvolvimento da doença em humanos.<sup>32</sup> A malária representa um problema de saúde pública mundial, afetando primariamente as zonas subdesenvolvidas do globo. Em termos quantitativos, a malária causa aproximadamente meio milhão de mortes anualmente, existindo ainda cerca de três biliões de pessoas sob constante risco de infeção.<sup>33</sup> O ciclo de vida do *Plasmodium* é consideravelmente complexo, sendo dividido entre um hospedeiro invertebrado, nomeadamente um mosquito *Anopheles* fêmea, no organismo do qual ocorre a replicação sexual do parasita, e um hospedeiro mamífero, onde o parasita se desenvolve de forma assexuada. Neste último hospedeiro, o ciclo do parasita compreende uma fase de infeção hepática em que o parasita se replica, e que precede obrigatoriamente a fase sanguínea, onde surgem os sintomas da doença. O carácter obrigatório e paralelamente assintomático da fase hepática da infeção do parasita torna-a uma fase preferencial de intervenção farmacológica, na medida em que fármacos capazes de inibir o desenvolvimento do parasita na fase hepática podem impedir a evolução da infeção e impedir o desenvolvimento da doença e respetivos sintomas.<sup>34-36</sup> Uma intervenção farmacológica a nível da fase hepática reveste-se de maior importância ainda nos casos das infeções por *P. vivax* e *P. ovale*, pois, estas espécies podem produzir hipnozoítos, formas do parasita estas que podem manter-se em estado latente durante extensos períodos de tempo, após os quais podem desencadear novos eventos de infeção e recidivas da doença.<sup>37</sup> No entanto, as opções terapêuticas disponíveis com atividade sobre a fase hepática do *Plasmodium* são limitadas, resumindo-se à primaquina e tafenaquina, fármacos com

efeitos secundários potencialmente letais em pacientes com deficiência de enzima Glucose-6-fosfato desidrogenase, uma característica genética comum nas zonas endêmicas da malária.<sup>38</sup> No caso específico da primaquina, apresenta ainda embriotoxicidade não podendo por isso ser administrada em período gestacional.<sup>39</sup> Considerando todas estas necessidades e limitações, é altamente desejável o desenvolvimento de novos agentes anti-*Plasmodium* com atividade sobre a fase hepática do ciclo de vida do parasita, de modo a servirem não só como agentes profiláticos e terapêuticos contra a malária no geral, mas também na cura de infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale*.<sup>39-41</sup>

A interseção entre o *Plasmodium* e o HIV em termos de impacto na saúde pública assume contornos muito particulares devido à sobreposição geográfica entre ambas as doenças, com especial incidência na zona da África subsariana, o que leva a que casos de coinfeção sejam comuns nesta área geográfica. Os casos de coinfeção são potenciados pelas elevadas carências sociais e económicas verificadas nas zonas afetadas conjuntamente por *Plasmodium* e HIV.<sup>42</sup> Nos casos de coinfeção existe uma sinergia entre os dois agentes patógenos que potencia tanto a propagação como o desenvolvimento de ambas as doenças.<sup>43,44</sup> A infeção por HIV mostrou estar relacionada com desenvolvimento severo de malária por *P. falciparum*,<sup>45-47</sup> enquanto a malária está associada a uma diminuição do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>,<sup>47</sup> e a um aumento da replicação e transmissão de HIV-1<sup>48,49</sup>. Em contexto farmacoterapêutico, o controlo de ambas as doenças é baseado na utilização de fármacos específicos e individuais para cada um dos tipos de infeção. No entanto, o risco de interação medicamentosa entre anti-retrovirais e antimaláricos é elevado, ocorrendo por um mecanismo de alteração da farmacocinética, por inibição ou indução enzimática, e/ou farmacodinâmica dos fármacos, por sobreposição de toxicidades individuais de cada fármaco.<sup>50</sup> Tais interações medicamentosas são comumente associadas a eventos pronunciados de toxicidade e desenvolvimento de reações adversas potencialmente graves.

No conjunto dos casos individuais da malária e HIV e principalmente no contexto da sua interseção nos casos de coinfeção, a descoberta e desenvolvimento de uma classe de fármacos que apresentem uma atividade antimicrobiana dupla contra ambas as doenças, constituiria um feito notável para o panorama da saúde pública mundial. Este feito permitiria não só acrescentar uma alternativa aos arsenais terapêuticos atualmente utilizados contra os casos individuais de HIV e malária, mas principalmente permitir a



utilização de um único fármaco em casos de coinfeção, algo altamente desejável de um ponto de vista farmacoterapêutico pois permitiria diminuir os efeitos secundários e as interações medicamentosas associadas à toma de múltiplos fármacos. Adicionalmente, presume-se que a toma de um único fármaco para ambas a doença pudesse facilitar tanto o acesso como a adesão à terapêutica.

No presente capítulo é apresentada a descoberta de três novas espiro- $\beta$ -lactamas com elevada atividade antimicrobiana dupla contra HIV e malária. A molécula mais promissora apresenta ainda atividade contra estirpes de HIV multirresistentes, tendo sido também alvo de estudos mais aprofundados visando descortinar o seu mecanismo de ação molecular. Este trabalho é produto de um esforço conjunto entre membros do grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra sob a liderança da Prof. Teresa Pinho e Melo, o grupo de investigação “Evolução, Epidemiologia e Prevenção da Infecção por HIV” sob a liderança do Prof. Nuno Taveira e o laboratório de investigação em malária “Prudêncio Lab”, liderado pelo Prof. Miguel Prudêncio. As três espiro- $\beta$ -lactamas revelaram-se altamente promissoras constituindo a sua descoberta e subsequente modelação estrutural a base de todo o presente projeto de Doutoramento.

## **2.2. Bioatividade**

### **2.2.1. Citotoxicidade e atividade anti-HIV**

As moléculas integrantes da biblioteca de espiro- $\beta$ -lactamas selecionada (Figura 2.2) foram testadas quanto à sua citotoxicidade *in vitro* em células TZM-bl, anteriormente à determinação da sua Percentagem Máxima de Inibição (PMI) anti-HIV (Tabela 2.1). É de realçar que nenhuma das 17  $\beta$ -lactamas espirocíclicas demonstrou ser consideravelmente citotóxica, variando os seus valores de  $CC_{50}$  entre os 47.69  $\mu$ M para a molécula BSS-793B e os 163.76  $\mu$ M para a molécula BSS-591. De referir que, tendencialmente, os espiropenicilanatos ácidos são os compostos menos citotóxicos da série. No computo geral, estes resultados são indicativos do perfil de segurança desta classe de moléculas, no que toca à sua citotoxicidade.

**Tabela 2.1** – Citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) e Percentagem Máxima de Inibição (PMI) contra duas estirpes com diferente tropismo de HIV-1 de uma biblioteca de espiro-β-lactamas.

Composto	CC <sub>50</sub> (μM)	PMI (10 μg/mL) (%) tropismo-R5	PMI (10 μg/mL) (%) tropismo-X4
<b>BSS-722A</b>	53.74	99	97
<b>BSS-730A</b>	76.84	99	99
<b>BSS-793B</b>	47.69	0	0
<b>BSS-730B</b>	74.45	0	0
<b>BSS-794B</b>	49.02	0	0
<b>BSS-973C</b>	79.80	4	0
<b>BSS-974C</b>	80.79	0	0
<b>BSS-796</b>	98.91	1	0
<b>BSS-971S</b>	81.98	65	12
<b>BSS-974S</b>	91.93	0	0
<b>BSS-591</b>	163.76	37	n.d.
<b>BSS-597</b>	151.79	33	n.d.
<b>BSS-1026</b>	82.01	15	0
<b>BSS-452</b>	104.73	0	15
<b>BSS-587</b>	135.83	53	n.d.
<b>BSS-593</b>	158.14	58	84
<b>BSS-708</b>	83.80	0	0

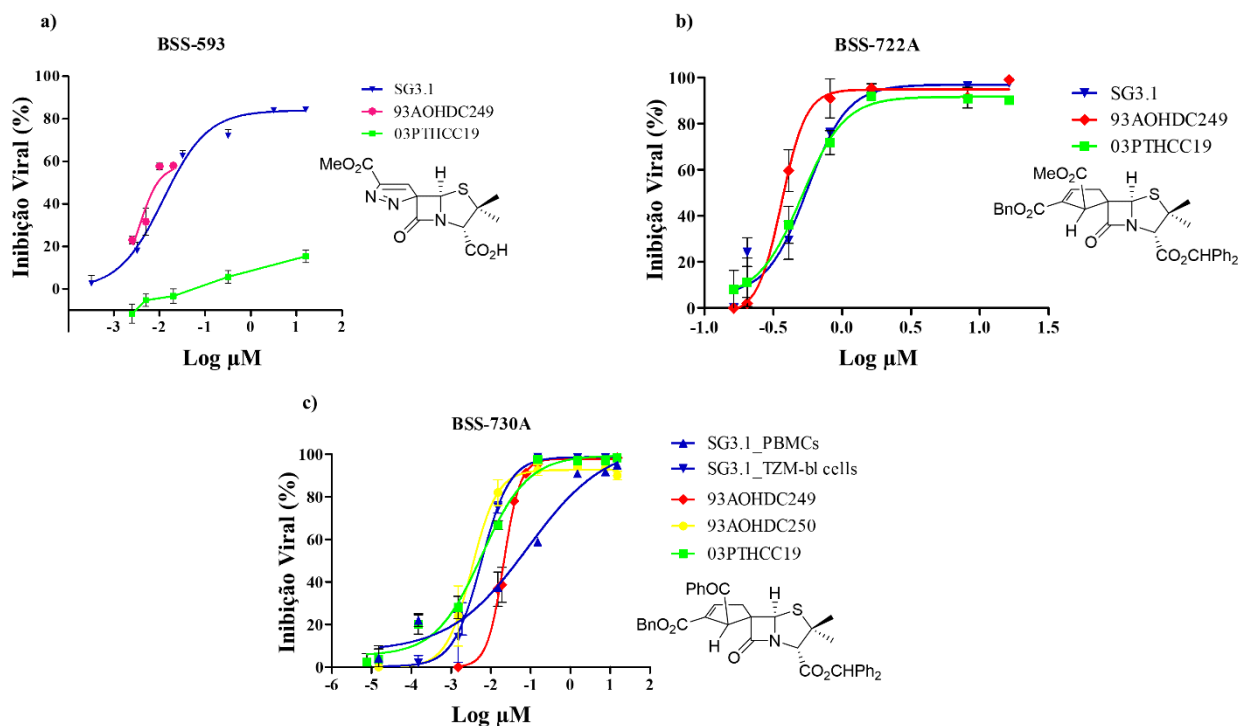
Após terem a sua citotoxicidade determinada, as dezassete espiro-β-lactamas tiveram a sua potencial atividade antiviral explorada por um ensaio preliminar em que foi determinada a PMI de todos os compostos a uma concentração fixa de 10 μg/mL contra duas estirpes do vírus do HIV-1, uma estirpe 93AOHDC249, cuja entrada nas células é feita por via do coreceptor CCR5 (tropismo R5) e uma outra estirpe SG3.1 que utiliza o coreceptor CXCR4 (tropismo X4). O ensaio foi feito em células TZM-bl. Este tipo de ensaio pressupõe que uma PMI superior a 50% é indicadora de que o composto possui atividade antiviral (Tabela 2.1). O estudo permitiu a identificação de três moléculas com valores de inibição viral promissores (PMI > 80%), nomeadamente a espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593, e as espirociclopentenil-β-lactamas BSS-730A e BSS-722A. Partindo destes resultados preliminares, as três moléculas foram testadas contra outras estirpes de HIV-1 assim como contra uma estirpe de HIV-2 (Tabela 2.2).

**Tabela 2.2** – Atividade antiviral da espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593 e das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas BSS-730A e BSS-722A.

Molécula	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Vírus	Estirpe	Tropismo	PMI (10 $\mu$ g/mL) (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>90</sub> ( $\mu$ M)	Index terapêutico
BSS-593	158.00	HIV-1	SG3.1	X4	84	0.012	n.d.	13144.76
		HIV-1	93AOHDC249	R5	58	0.035	n.d.	4553.31
		HIV-2	03PTHCC19	R5	0	n.d.	n.d.	n.d.
BSS-722A	53.70	HIV-1	SG3.1	X4	97	0.650	1.091	82.64
		HIV-1	93AOHDC249	R5	99	0.332	0.701	161.80
		HIV-2	03PTHCC19	R5	90	0.510	1.182	105.29
BSS-730A	76.84	HIV-1	SG3.1	X4	99	0.014	0.025	5584.30
		HIV-1	93AOHDC249	R5	99	0.026	0.118	2946.32
		HIV-1	93AOHDC250	R5	94	0.004	0.02	20247.69
		HIV-2	03PTHCC19	R5	99	0.008	0.064	9605.00

A espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593 revelou-se bastante ativa contra uma estirpe de tropismo X4 do HIV-1, apresentando uma PMI de 84% e um valor de IC<sub>50</sub> de 0.012  $\mu$ M. No entanto, a mesma molécula BSS-593 apresentou uma PMI a 10  $\mu$ M de apenas 58% contra uma estirpe de tropismo R5 do HIV-1, não obstante o valor de IC<sub>50</sub> apreciável (IC<sub>50</sub> = 0.035  $\mu$ M), e mostrou ainda ser inativa contra HIV-2 (Figura 2.3a).

Em contraste, ambas as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas BSS-730A e BSS-722A revelaram uma potente atividade contra todos os isolados de HIV-1 e HIV-2 (Figura 2.3b e c), com valores de PMI a variar entre os 90% e os 99%. A molécula BSS-722A apresentou valores de IC<sub>50</sub> contra HIV que variaram entre 0.332  $\mu$ M e os 0.650  $\mu$ M. No entanto, a molécula BSS-730A revelou-se a molécula mais promissora, apresentando valores notáveis de IC<sub>50</sub> contra HIV que variaram entre 0.004  $\mu$ M e 0.026  $\mu$ M. Adicionalmente, num ensaio exclusivamente focado na espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, foi observado um valor de IC<sub>50</sub> de 0.075  $\mu$ M contra a estirpe SG3.1 de HIV-1 com tropismo X4 em células PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*).



**Figura 2.3** – Curvas de  $IC_{50}$  das espiro- $\beta$ -lactamas contra HIV-1 e HIV-2.

Relativamente ao índice terapêutico, este constitui uma medida quantitativa respeitante à segurança de um determinado composto, obtida pela comparação em forma de rácio entre a concentração à qual se verifica toxicidade e a concentração a que se verifica o efeito terapêutico desejado.<sup>51</sup> Uma molécula bioativa é tão mais segura quanto maior for o intervalo de concentrações (*e.g.* janela terapêutica) entre o seu valor de  $CC_{50}$  e de  $IC_{50}$  e, conseqüentemente, o seu valor de índice terapêutico. O índice terapêutico determinado para as três espiro- $\beta$ -lactamas mais promissoras, corresponde a valores que variam entre os 82.64 para o BSS-722A e 20247.69 para o BSS-730A. Estes resultados confirmam um bom perfil de segurança *in vitro* das espiro- $\beta$ -lactamas, traduzido numa janela terapêutica ampla.

A atividade da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, foi ainda avaliada contra oito diferentes isolados de HIV-2 que apresentam resistência a diferentes fármacos anti-HIV. O isolado 03PTHCC19, sem resistências conhecidas, foi utilizado como controlo (Tabela 2.3). A molécula BSS-730A apresentou valores de  $IC_{50}$  contra os isolados resistentes que variaram entre 0.012  $\mu$ M e 0.030  $\mu$ M. Este último resultado de  $IC_{50}$  mais elevado foi apresentado contra o isolado 03PTHDECT, resistente ao dolutegravir (DTG), e representa um aumento de  $IC_{50}$  de 3.75 vezes comparativamente ao controlo, sendo considerado uma resistência de baixo nível. Esta atividade considerável e abrangente

face ao vírus do HIV-2 é altamente significativa tendo em conta que os fármacos anti-retrovirais correntemente no mercado apresentam uma atividade parcial ou mesmo nula contra este vírus.<sup>52-54</sup> No seu conjunto, estes resultados mostram que a β-lactama espirocíclica BSS-730A, tem potencial para ser explorada como fármaco para o tratamento de infeções causadas por isolados de HIV multirresistentes.<sup>26</sup>

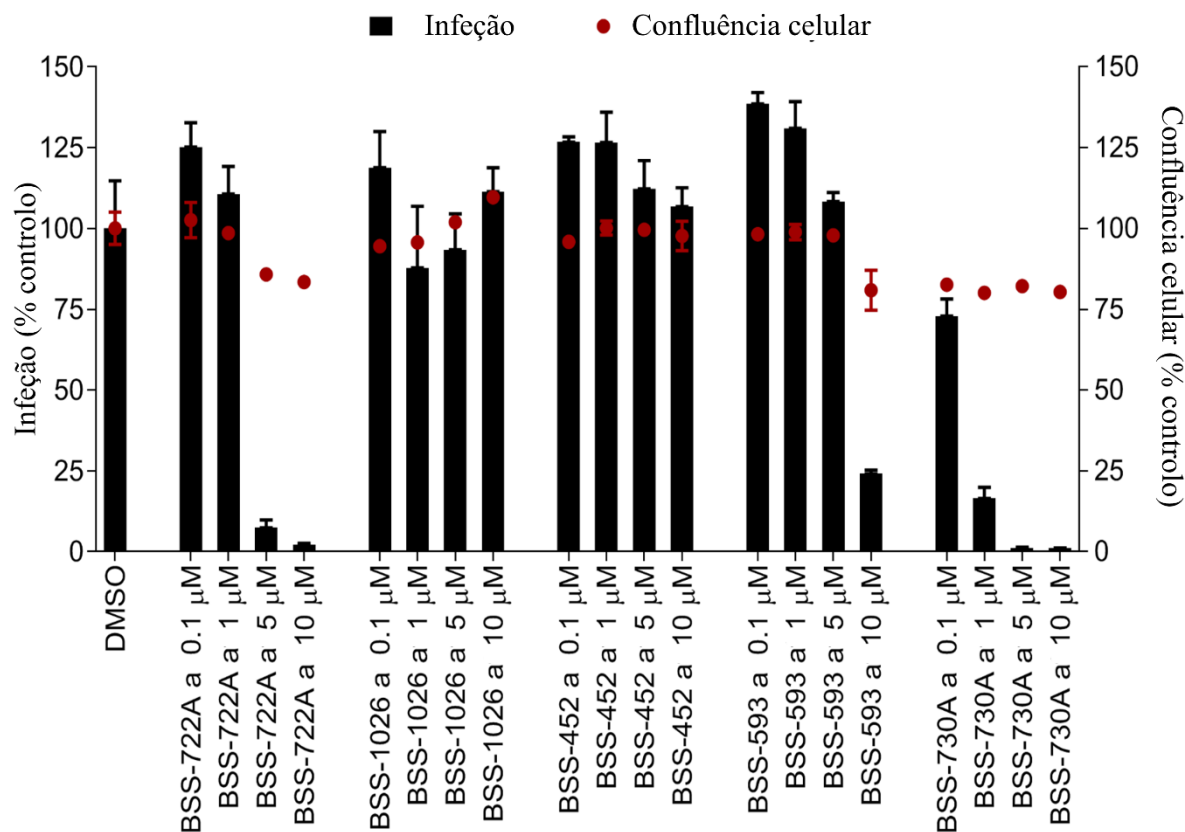
**Tabela 2.3** – Atividade da espiro-β-lactama BSS-730A contra estirpes multirresistentes de HIV-2.

Vírus	Estirpe	Tropismo	Susceptibilidade a antiretrovirais	IC <sub>50</sub> (μM)	IC <sub>90</sub> (μM)
HIV-2	03PTHCC19	R5	Sensível	0.008	0.064
	00PTHCC20	X4	Resistente a ABC, ZDV, d4T, ddI, LPV	0.018	0.073
	03PTHCC20	X4	Resistente a ABC, ZDV, d4T, ddI, LPV	0.019	0.095
	00PTHDECT	R5/X4	Resistente a DTG	0.023	0.057
	03PTHDECT	X4	Resistente a DTG	0.030	0.082
	03PTHSM9	X4	Resistente a SQV, LPV, DRV, TAF	0.016	0.116
	10PTHSJIG	R5	Resistente a RAL, DTG, LPV, SQV, DRV e todos os NRTIS	0.012	0.032
	15PTHSJIG	R5	Resistente a RAL, DTG, 3TC, FTC	0.018	0.056
	15PTHCEC	X4	Resistente a RAL, DTG, LPV, SQV, DRV, ABC, ddI, TDF, TAF, 3TC, d4T, FTC	0.017	0.051

ABC, abacavir; ZDV, zidovudina; d4T, stavudina; ddI, didanosina; 3TC, lamivudina; FTC, emtricitabina; TDF, tenofovir disoproxil fumarato; TAF, tenofovir alafenamida; LPV, lopinavir; SQV, saquinavir; DRV, darunavir; DTG, dolutegravir; RAL, raltegravir; NRTIs, inibidores nucleosídicos da Transcriptase Reversa.

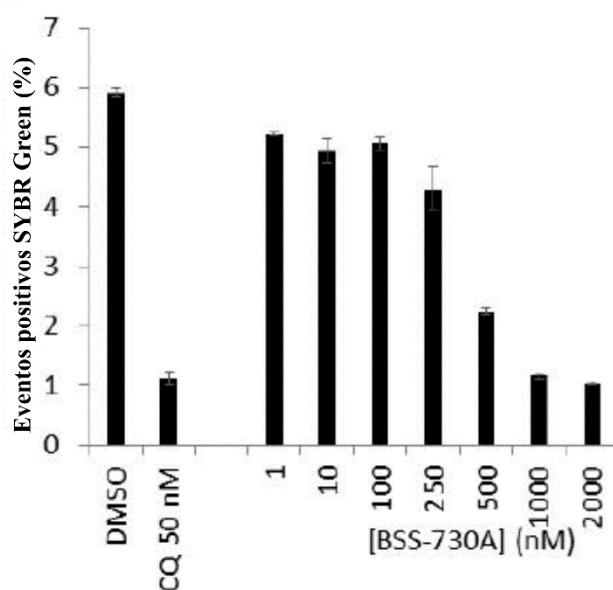
### 2.2.2. Atividade anti-*Plasmodium*

As espiro-β-lactamas BSS-730A, BSS-722A e BSS-593, identificadas como altamente ativas *in vitro* contra o vírus do HIV, tiveram também a sua potencial atividade *in vitro* avaliada contra a fase hepática do *P. berghei*. Foram testadas também duas espiro-β-lactamas inativas contra o HIV, nomeadamente as moléculas BSS-1026 e BSS-452 (Figura 2.4). Foi particularmente relevante observar que as três moléculas ativas contra o HIV mostraram também atividade anti-*Plasmodium*. Por outro lado, as moléculas BSS-1026 e BSS-452 revelaram-se inativas, à imagem do observado para o HIV. Tal como verificado para a sua atividade antiviral, a espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A também se afirmou-se como a mais promissora em termos de atividade anti-*Plasmodium* com um IC<sub>50</sub> de  $0.550 \pm 0.140$  μM, o maior valor de atividade de entre as três moléculas testadas.



**Figura 2.4** – Atividade de espiro-β-lactamas contra o estágio hepático do *P. berghei*.

Dada a promissora e destacada atividade *in vitro* da molécula BSS-730A contra a fase hepática do *P. berghei*, foi também determinada a sua atividade *in vitro* contra a fase eritrocítica do *P. falciparum*, espécie infecciosa para humanos. Os resultados demonstraram que a espiro-β-lactama BSS-730A é também ativa contra o *P. falciparum*, com um IC<sub>50</sub> de 0.430 μM (Figura 2.5). De notar que o facto de a espiro-β-lactama BSS-730A demonstrar atividade contra dois estágios diferentes do desenvolvimento do *Plasmodium*, sugere que o seu alvo biológico putativo é expresso durante todo o ciclo de vida do parasita.



**Figura 2.5** - Atividade da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A contra o estágio eritrocítico do *P. falciparum*.

Os resultados altamente promissores de atividade anti-HIV e anti-*Plasmodium* da espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A demonstram inequivocamente o potencial da molécula como um agente versátil e com atividade antimicrobiana submicromolar contra HIV-1, HIV-2 e *Plasmodium*, nas fases hepática e sanguínea do ciclo de vida do parasita.

### 2.2.3. Ausência de atividade antibacteriana e antifúngica

Um fármaco ideal para o tratamento ou prevenção de infecções virais ou parasitárias não deve apresentar atividade antibacteriana ou antifúngica, de modo a não causar disbiose da microflora humana, fator de risco para o desenvolvimento de múltiplas enfermidades.<sup>55,56</sup> Exemplo são as alterações na microbiota vaginal que podem resultar no desenvolvimento de vaginoses bacterianas, o que, por sua vez, aumenta o risco de transmissão vaginal de HIV.<sup>57</sup>

Algumas das espiro- $\beta$ -lactamas, entre as quais as bioativas BSS-730A e BSS-593, foram estudadas quanto ao seu potencial efeito no crescimento de diferentes bactérias gram-positivas e gram-negativas (Tabela 2.4). De entre as moléculas testadas, nenhuma mostrou atividade inibitória contra as bactérias estudadas, numa gama de concentrações que ascendeu até aos 1 mg/mL (1520  $\mu$ M para BSS-730A).

**Tabela 2.4** – Atividade antibacteriana de espiro-β-lactamas selecionadas.

Bactéria	Concentração Inibitória Mínima (MIC) (mg/mL)				
	BSS-587	BSS-591	BSS-593	BSS-597	BSS-730A
<i>E. coli</i> ATCC 10536	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
<i>E. coli</i> (estirpe clínica)	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (estirpe clínica)	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	> 1	> 1	> 1	> 1	> 1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	> 1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	> 1

A espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A foi também testada *in vitro* pelo método da difusão em disco contra três estirpes de fungos de referência, nomeadamente *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 15126) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), e utilizando o antifúngico fluzonazol como controlo (Tabela 2.5). A molécula não apresentou qualquer atividade antifúngica em concentrações até 152 μM. Em suma, os anteriores resultados demonstram que a espiro-β-lactama BSS-730A é inativa contra um conjunto considerável de bactérias e fungos, sugerindo que a molécula não é suscetível de afetar a microbiota humana normal.

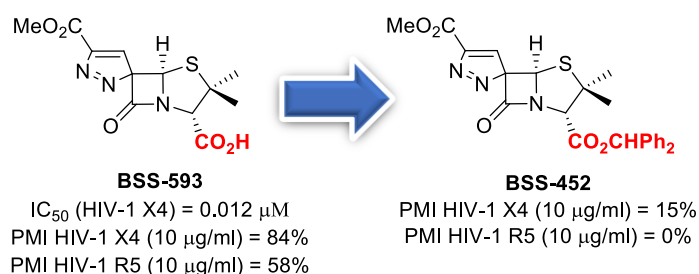
**Tabela 2.5** – Atividade antifúngica da espiro-β-lactama BSS-730A.

Composto	Concentração em disco (μM)	Halo de inibição (mm)		
		<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
BSS-730A	15	0	0	0
	76	0	0	0
	152	0	0	0
Fluconazol	25	25	15	24

### 2.3. Relação estrutura-atividade

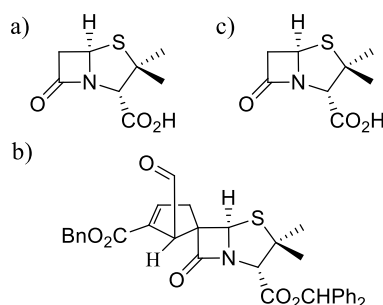
Uma análise qualitativa focada na estrutura atividade das moléculas mais promissoras mostra que a esterificação com um grupo benzidrilo da espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593 no seu análogo BSS-452, resulta na perda da sua atividade antiviral (Figura 2.6). No entanto, o mesmo grupo éster benzidrilo na posição 3 do anel de tiazolidina encontra-se presente nas espirociclopentenil-β-lactamas activas BSS-730A e BSS-722A.





**Figura 2.6** – Efeito da presença de um éster benzidrilo na atividade anti-HIV de uma espiro-3*H*-pirazole-β-lactama.

De forma a explorar com mais detalhe as divergências estruturais entre as três espiro-β-lactamas ativas BSS-593, BSS-730A e BSS-722A, a sua subestrutura máxima comum (MCS – *Maximum Common Substructure*) foi determinada (Figura 2.7). Os resultados demonstram que as espirociclopentenil-β-lactamas revelam uma alta similaridade estrutural, divergindo apenas no grupo substituinte na posição 1' do anel ciclopenteno. No entanto, relativamente à comparação entre estas últimas e a espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593, a similaridade estrutural resume-se ao *core* penicilânico, subestrutura esta que é comum a toda a biblioteca de espiro-β-lactamas testadas, bioativas ou não.



**Figura 2.7** – Representação gráfica da MCS entre a) as espiro-β-lactamas mais promissoras BSS-593, BSS-730A e BSS-722A, b) as espirociclopentenil-β-lactamas ativas BSS-730A e BSS-722A, e c) todas as espiro-β-lactamas testadas para a sua atividade anti-HIV.

As divergências estruturais acentuadas relativas ao tipo de anel espirocíclico e disposição de características farmacofóricas, e especialmente o comportamento contrário no que à tolerância da presença do éster benzidrilo diz respeito, apontam para que, apesar de terem em comum um sistema espiro-penicilânico, a molécula BSS-593 possa ter um sítio de ligação ou mesmo um alvo biológico diferente do partilhado pelas espirociclopentenil-β-lactamas BSS-730A e BSS-722A.

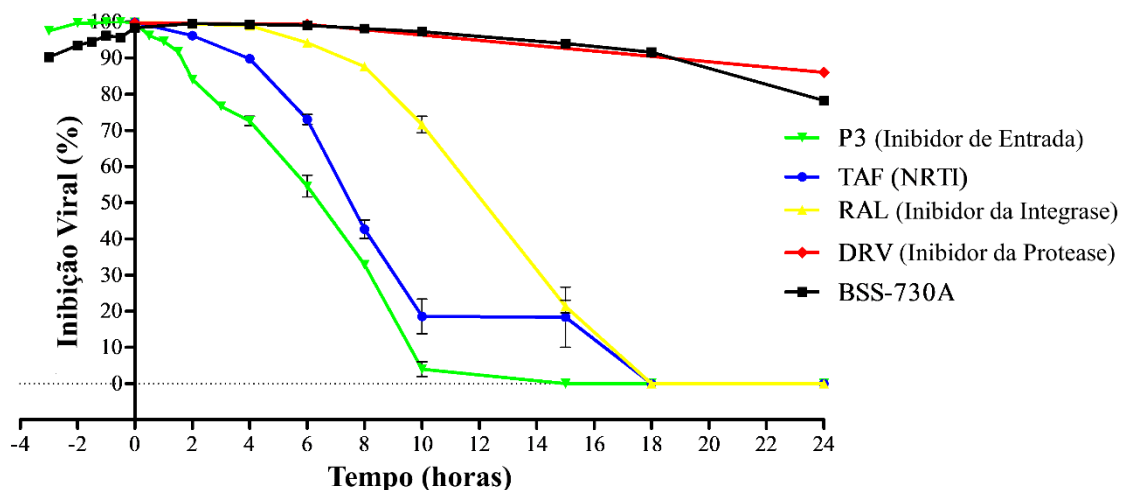
As anteriores considerações acerca da relação estrutura-atividade das espiro- $\beta$ -lactamas ativas BSS-593, BSS-730A e BSS-722A, sugerem que a natureza e disposição dos substituintes do anel espirocíclico ciclopenteno ou 3*H*-pirazole, seja determinante para as interações moleculares entre as espiro- $\beta$ -lactamas e os seus respetivos alvos biológicos. Um comportamento similar já foi descrito para outros grupos de compostos espirocíclicos.<sup>58,59</sup> Ainda assim, e fazendo o núcleo penicilânico parte do *core* espirocíclico, o seu papel na disposição tridimensional dos grupos substituintes das moléculas ativas não pode ser menosprezado.<sup>60,61</sup>

## 2.4. Mecanismo de ação

### 2.4.1. Estudos de tempo de adição

Foram efetuados estudos de tempo de adição para determinar que passo do ciclo replicativo do HIV é inibido pela ação da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A. Estes ensaios determinam por quanto tempo a adição de um determinado inibidor pode ser adiada ao longo do ciclo replicativo do vírus, sem que este perca a sua atividade antiviral. No caso específico do vírus do HIV-1, a adição de EIs não pode ser alvo de qualquer tipo de adiamento após a infeção viral, enquanto a adição de Inibidores da Transcriptase Reversa, NNRTIs ou NRTIs, pode ser adiada por 4-5 h, a adição de IIs pode ser adiada 5-9 h, e a de PIs pode ser adiada por 18-19 h.<sup>62</sup> Foram utilizados como controlo vários inibidores de HIV conhecidos, que atuam em diferentes passos do ciclo replicativo do HIV. Tanto a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A como os restantes inibidores foram adicionados em diferentes pontos temporais, antes ou após a infeção com HIV de células TZM-bl. Os inibidores de HIV utilizados como controlo foram o péptido P3, um EI, o tenofovir alafanamida (TAF), um NRTI, raltegravir (RAL), um II, e o darunavir (DRV), um PI.

Não foi observada uma redução significativa da atividade anti-HIV-1 da molécula BSS-730A mesmo quando a sua adição foi atrasada por 24 h após a infeção (Figura 2.8). No entanto, verificou-se um decréscimo de 10-16% da sua atividade quando adicionada durante o intervalo 15-24 h após a infeção. Este resultado sugere que a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A atua nos estágios tardios do ciclo de replicação do HIV-1, nomeadamente nas etapas de maturação e/ou libertação das partículas virais.



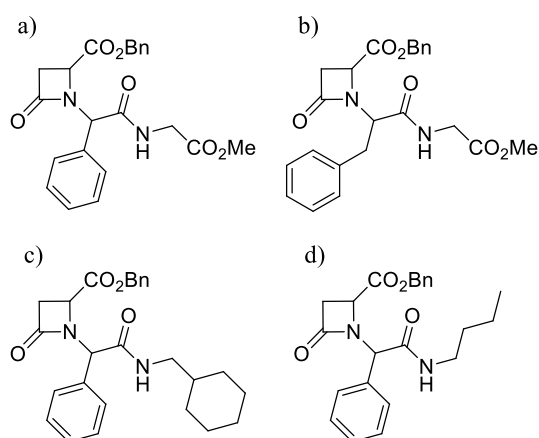
**Figura 2.8** – Estudos de tempo de adição contra a estirpe de SG3.1 de HIV-1. BSS-730A e diferentes inibidores do HIV.

#### 2.4.2. Pesquisa de similaridade estrutural

De modo a tentar recolher informações potencialmente relevantes quanto ao possível mecanismo de ação anti-HIV da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, procedeu-se a uma abordagem de pesquisa de similaridade, visando encontrar moléculas com alvo biológico definido e que apresentem uma similaridade estrutural relevante com a molécula BSS-730A. Esta abordagem baseia-se no princípio de similaridade química pelo qual se assume que moléculas cujas estruturas apresentem similaridades relevantes entre elas poderão também partilhar o mesmo alvo biológico.<sup>63,64</sup> Com este intuito, o primeiro passo consistiu na construção de uma base de dados de moléculas bioativas e com alvo conhecido, criada a partir da base de dados de bioatividade ChEMBL<sup>65,66</sup>.

Por fim, e de modo a quantificar a similaridade estrutural entre a espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A e a biblioteca de moléculas bioativas com alvo conhecido, recorreu-se a descritores ECFP4 (*Extended-Connectivity Fingerprints*)<sup>67</sup>, descritores 2D de topologia estrutural bastante utilizados em caracterização molecular e pesquisas de similaridade,<sup>68,69</sup> que descrevem a conectividade molecular até um diâmetro máximo de quatro ligações em torno de cada átomo da molécula. Este procedimento permitiu identificar quatro moléculas com atividade anti-HIV cujo coeficiente de similaridade, ou coeficiente de Tanimoto ( $T_c$ )<sup>70</sup>, com a molécula BSS-730A é superior a 0.300, um valor de referência para os descritores ECFP4 acima do qual existe grande probabilidade de duas moléculas partilharem o mesmo alvo biológico<sup>71</sup> (Figura 2.9). Estas moléculas

CHEMBL194164 ( $T_c=0.337$ ), CHEMBL362951 ( $T_c=0.318$ ), CHEMBL197266 ( $T_c=0.310$ ) e CHEMBL197349 ( $T_c=0.306$ ) são  $\beta$ -lactamas monocíclicas e apresentam atividade contra a protease do HIV.<sup>11</sup>

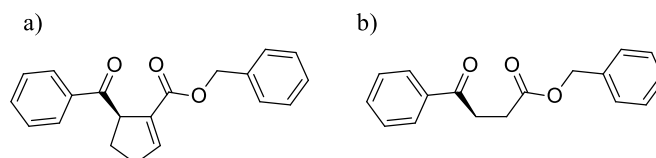


**Figura 2.9** – Estrutura molecular 2D das  $\beta$ -lactamas a) CHEMBL194164, b) CHEMBL362951, c) CHEMBL197266 e d) CHEMBL197349.

### 2.4.3. Pesquisa de subestrutura

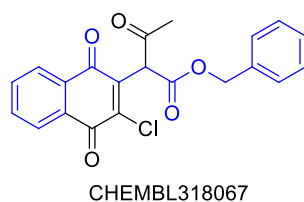
Todos os espirociclopentenilpenicilanatos cuja bioatividade foi avaliada ao longo deste trabalho, independentemente de terem ou não atividade antimicrobiana, têm em comum o mesmo núcleo derivado da penicilina. As diferenças estruturais entre as moléculas prendem-se com a natureza e posição dos substituintes do anel espirocíclico, sendo que estas características estruturais e farmacofóricas demonstraram-se determinantes para a bioatividade observada.

Desta forma, explorou-se uma estratégia de pesquisa de subestrutura na base de dados de bioatividade ChEMBL para identificar moléculas bioativas com alvo conhecido que partilhem subestrutura com o anel ciclopenteno da molécula BSS-730A. Como referência, ou *query*, para a pesquisa foi utilizada a subestrutura contendo o anel ciclopenteno e os seus substituintes (Figura 2.10 a) e também a sequência dos grupos substituintes sem estarem incluídos na estrutura cíclica insaturada (Figura 2.10 b).



**Figura 2.10** – Características estruturais da espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A utilizadas como referência para pesquisas de subestrutura.

A pesquisa que utilizou como *query* o anel ciclopenteno substituído da espiro-β-lactama BSS-730A, não permitiu identificar nenhuma molécula com esta subestrutura. Por outro lado, foi possível identificar uma única molécula com alvo conhecido contendo como subestrutura a mesma sequência de grupos substituintes que se encontra presente no anel espirociclopenteno da molécula BSS-730A (Figura 2.11). Esta molécula CHEMBL318067 é um inibidor covalente da protéase do Citomegalovírus Humano (HCMV), com um IC<sub>50</sub> de 700 nM.<sup>72</sup>



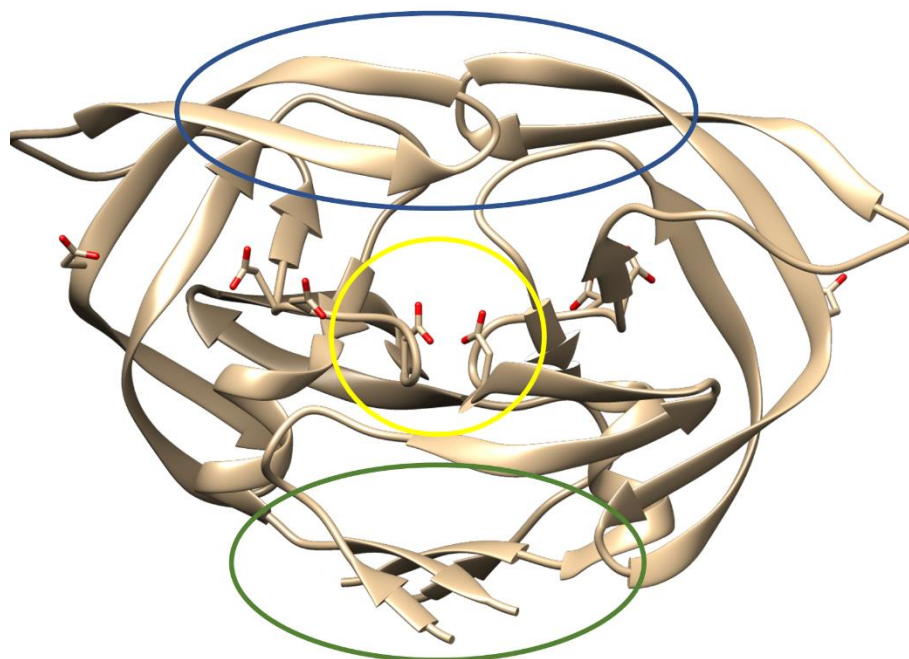
**Figura 2.11** – Molécula CHEMBL318067, um inibidor da protéase do HCMV. A azul encontra-se evidenciado a subestrutura comum com a espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A.

#### 2.4.4. Estudos de sobreposição de farmacóforo e *docking*

Os resultados de ambas as pesquisas de similaridade 2D e de subestrutura mostraram uma tendência comum, levando à identificação de inibidores de diferentes tipos de protéases que apresentam similaridades estruturais com a espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A. A pesquisa de similaridade 2D recorrendo a descritores circulares ECFP4, levou mesmo à identificação de quatro β-lactamas inibidores da protéase do HIV-1. Uma atividade putativa da molécula BSS-730A sobre este alvo do HIV, estaria de acordo com os resultados dos estudos de tempo de adição que indicam que a espiro-β-lactama exerce a sua atividade nos estágios tardios da infecção viral, onde se insere a ação da protéase que atua na maturação das partículas virais. Este mecanismo de atividade antiviral poderia ser justificativo também da atividade anti-*Plasmodium*, na medida em

que os inibidores da protéase do HIV demonstram também atividade *in vitro* contra o parasita.<sup>73-76</sup>

Resumidamente, a protéase do HIV-1 é uma enzima constituída por duas subunidades idênticas de 99 aminoácidos, cuja dimerização origina a proteína funcional, com um centro catalítico constituído por dois Aspartatos na posição 25 de cada cadeia e incluídos numa tríade Aspartato<sub>25</sub>-Treonina<sub>26</sub>-Glicina<sub>27</sub> (Figura 2.12). Estes resíduos catalisam a clivagem por hidrólise das poliproteínas virais Gag e Gag-pol em nove locais distintos, originando as formas maduras das proteínas funcionais e estruturais, componentes do virião e indispensáveis à progressão da infeção viral.<sup>77</sup> Em termos estruturais, a protéase do HIV é predominantemente constituída por uma estrutura secundária do tipo folha  $\beta$ , destacando-se três regiões importantes para a sua função, nomeadamente o já discutido centro catalítico, ao qual se juntam a região dos *flaps* e a interface do dímero. Os *flaps* da enzima apresentam uma estrutura tridimensional contendo duas folhas  $\beta$  orientadas em sentido antiparalelo, o que permite uma elevada flexibilidade a esta região da protéase viral. A dinâmica da região dos *flaps* é indispensável à ação da enzima, sendo a alternância entre a forma aberta e fechada dos *flaps* a coordenar o acesso e saída do substrato do centro catalítico da enzima.<sup>78</sup> Por sua vez, a região da interface do dímero compreende a região da enzima onde se estabelecem as interações principais de estabilização da enzima pelas quais se mantém a integridade estrutural do dímero.<sup>79</sup>

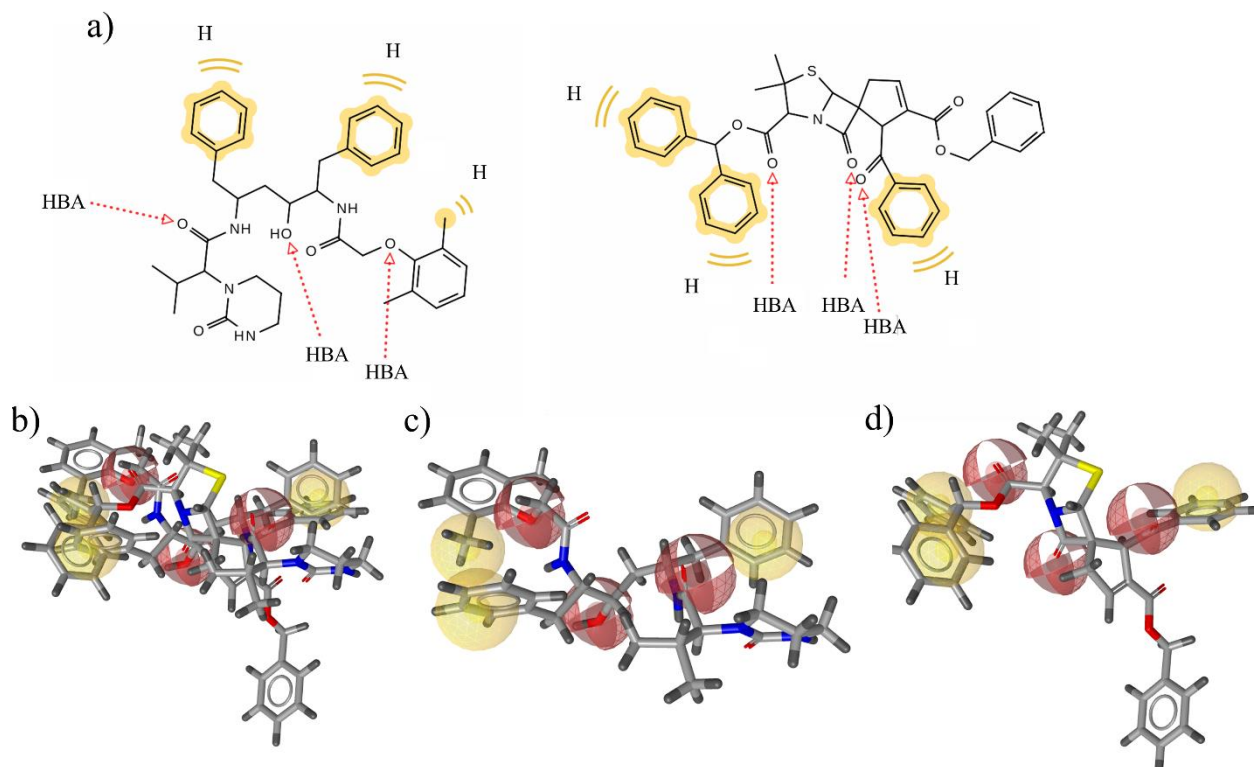


**Figura 2.12** – Representação da estrutura genérica da protease do HIV-1, criada a partir de uma estrutura cristalográfica à qual foi removida o ligando complexado. As zonas dos *flaps* e da interface do dímero estão assinaladas a azul e verde, respetivamente. A zona do centro catalítico da enzima encontra-se assinalada a amarelo, sendo possível identificar os dois aspartatos que catalisam a função da enzima.

Por sua vez, os PIs do HIV são uma classe ampla de compostos péptidomiméticos, caracterizados pelo seu elevado conteúdo aromático e hidrofóbico e ainda pela presença de um grupo hidroxilo.<sup>77-79</sup> Estas características estruturais comuns a todos os PIs são indispensáveis à sua atividade inibidora da enzima viral que se deve maioritariamente às interações hidrofóbicas estabelecidas entre o inibidor e a zona dos *flaps* da enzima, impedindo a abertura da enzima, e à interação por pontes de hidrogénio estabelecida pelo grupo hidroxilo e os dois aspartatos presentes no centro catalítico da proteína.

Tendo em conta os anteriores resultados e considerações, procedeu-se a um estudo de sobreposição e mapeamento de farmacóforo entre um elemento representativo da classe dos PIs do HIV, nomeadamente o lopinavir (LPV) (Figura 2.13a), e a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, com o intuito de aferir se esta última é passível de reproduzir algumas das interações fármaco-ligando críticas da classe dos PIs. Este estudo foi feito com recurso ao software LigandScout, utilizado para alinhamento estrutural e construção de farmacóforos.<sup>80</sup> Os resultados indicam que as características farmacofóricas do LPV e da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A são sobreponíveis,

sendo de notar o alinhamento das características farmacofóricas da molécula BSS-730A tanto com o grupo hidroxilo como com os grupos hidrofóbicos do LPV, características estas que, tal como discutido anteriormente, são indispensáveis à inibição da ação da protéase do HIV (Figura 2.13).

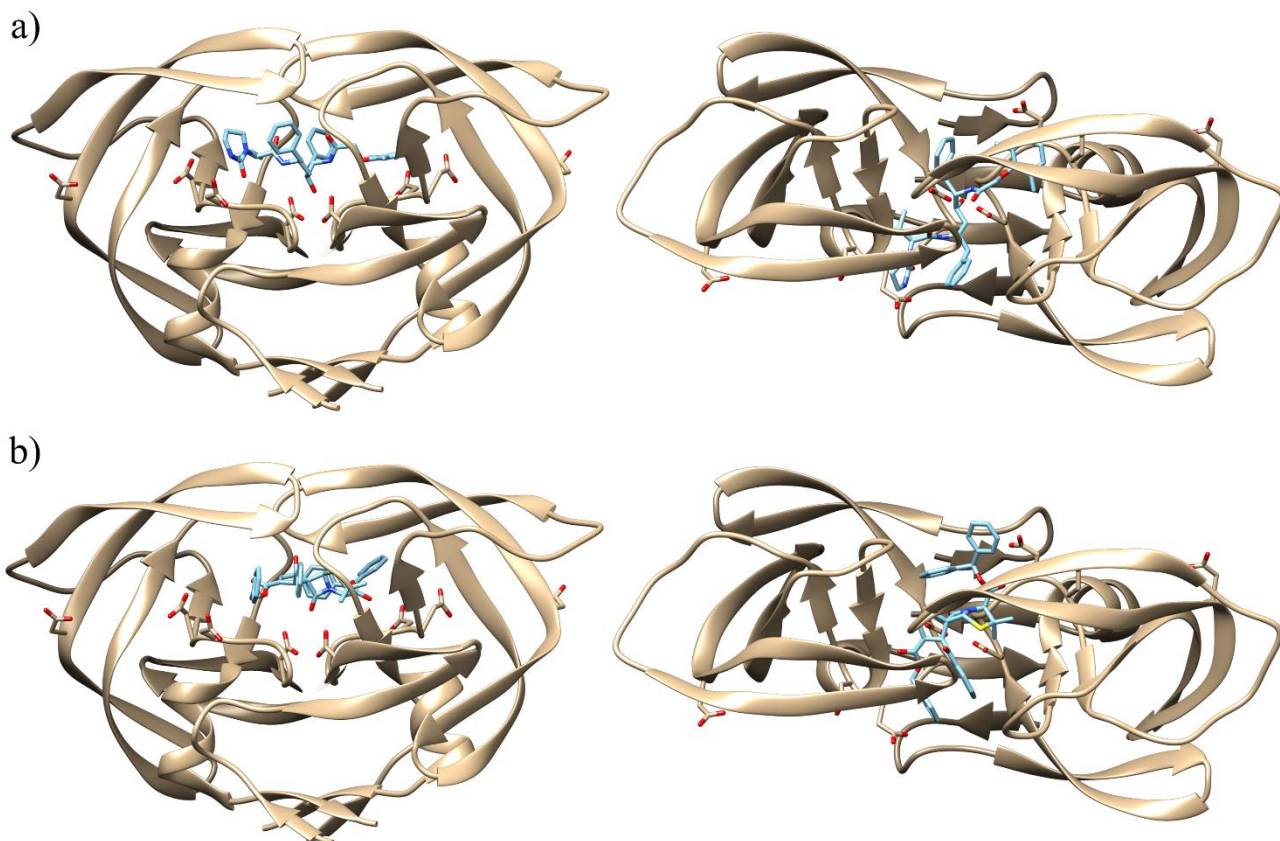


**Figura 2.13** – Representação das características farmacofóricas comuns ao LPV e BSS-730A em a) 2D e b) 3D, esta última com enfoque nos compostos individuais c) LPV e d) BSS-730A. H (amarelo) e HBA (vermelho) indicam características hidrofóbicas e aceitadoras de hidrogénio, respetivamente.

No seguimento deste resultado relativo ao alinhamento de farmacofóro entre a espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A e o LPV, procedeu-se a um estudo de *docking* para avaliar as potenciais interações estabelecidas pela molécula BSS-730A com a protéase do HIV. Neste estudo foi utilizada uma estrutura cristalográfica da enzima complexada com o LPV, obtida do Protein Data Bank (PDB),<sup>81</sup> nomeadamente a estrutura PDB 6dj1. Pela observação da estrutura complexada com o LPV, podemos identificar as interações críticas entre o fármaco e a enzima, nomeadamente as interações com os *flaps* e com o centro ativo da enzima (Figura 2.14a). Quanto aos resultados do *docking*, estes indicam que os resíduos aromáticos da molécula BSS-730A são teoricamente passíveis de interagir com a região hidrofóbica dos *flaps* da enzima, assim como o grupo carbonilo do



anel  $\beta$ -lactama pode estabelecer interação com os aspartatos do centro catalítico, à imagem do que ocorre para o grupo hidroxilo do LPV (Figura 2.14 b). Estima-se assim que em contexto de uma putativa interação com a protéase do HIV, a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A possa mimetizar as interações críticas próprias dos fármacos inibidores da enzima.



**Figura 2.14** – Comparação das interações do a) LPV e b) pose prevista por *docking* da molécula BSS-730A com a protéase do HIV.

#### 2.4.5. Ensaio *single-target* contra a protéase do HIV

A abordagem baseada em pesquisa de similaridade por descritores ECFP4 permitiu identificar quatro  $\beta$ -lactamas monocíclicas inibidoras da protéase do HIV que partilham uma relevante similaridade estrutural com a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A. Estudos de pesquisa de subestrutura também permitiram identificar um inibidor da protéase viral do HCMV que partilha características estruturais com a molécula BSS-730A. Estes resultados são também suportados por estudos de alinhamento de farmacóforo e *docking* que indicam que a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A pode mimetizar as interações farmacofóricas do LPV, um PI utilizado como fármaco contra o HIV. A hipótese de a molécula BSS-730A atuar como um PI seria concordante

com os resultados dos estudos de tempo de adição que demonstram que a molécula atua nos estágios tardios do ciclo replicativo do HIV, nomeadamente na maturação e/ou libertação das partículas virais. Adicionalmente, tal mecanismo de inibição viral, justificaria também a atividade dupla da molécula contra HIV e *Plasmodium*, pois a protéase do HIV apresenta uma homologia sequencial e estrutural relevante com as plasmepsinas, protéases aspárticas do *Plasmodium*.<sup>82,83</sup> De referir que alguns dos inibidores da protéase do HIV disponíveis no mercado, apresentam também atividade *in vitro* contra o *Plasmodium*.<sup>73-76</sup> Regimes terapêuticos anti-HIV que contemplam a toma de inibidores de protéase encontram-se também associados a uma incidência reduzida de malária em adultos e crianças infetados com HIV-1.<sup>84,85</sup>

Desta forma, assente em todo o conjunto de resultados anteriormente discutidos e de forma a elucidar se efetivamente a espiro-β-lactama BSS-730A exerce o seu mecanismo de ação antiviral por via da inibição da protéase do HIV, procedeu-se a um ensaio de inibição *single-target* entre a molécula BSS-730A e uma protéase de HIV-1 recombinante, segundo um protocolo da literatura<sup>86</sup>. A molécula BSS-730A foi testada a uma concentração de 10 μM, no entanto não mostrou atividade de inibição relevante da enzima (Tabela 2.6).

**Tabela 2.6** – Resultados do ensaio *single-target* da espiro-β-lactama BSS-730A contra uma protéase recombinante do HIV-1.

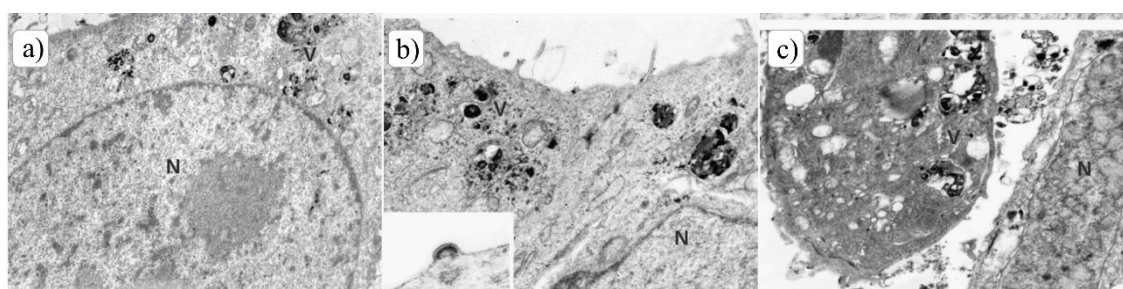
Molécula	Concentração (μM)	Inibição dos valores do controlo (%)			Composto referência	IC <sub>50</sub> do composto referência (μM)
		Ensaio 1	Ensaio 2	Média		
BSS-730A	10	10.3	5.3	7.8	Pepstatina A	1.2

Os estudos de tempo de adição e o ensaio *single-target* contra a protéase do HIV efetuados com o intuito de recolher informações quanto ao mecanismo de ação da β-lactama espirocíclica BSS-730A, no seu conjunto permitiram demonstrar, por exclusão de partes, que a molécula BSS-730A exerce a sua atividade anti-HIV por um mecanismo distinto daqueles inerentes aos fármacos anti-HIV presentemente disponíveis no mercado. Uma vez descartada a hipótese de atuar por mecanismos convencionais de ação anti-HIV já explorados terapêuticamente, e considerando a sua dupla atividade contra dois agentes patogénicos tão distintos quanto o HIV e o *Plasmodium*, é bastante plausível que a espiro-β-lactama BSS-730A possa atuar ao nível das células do hospedeiro, desencadeando uma resposta imune inata tanto à infeção viral como à parasitária.

#### 2.4.6. Estudos de microscopia eletrônica

O conjunto dos estudos anteriores de tempo de adição e *single-target* demonstraram que a molécula BSS-730A exerce a sua atividade antiviral nas fases tardias da infecção por HIV por um mecanismo diferente dos fármacos utilizados contra o HIV atualmente disponíveis no mercado. Desta forma e com o intuito de recolher mais informações acerca do seu mecanismo de ação e alvo molecular, foram realizados estudos de microscopia eletrônica utilizando células TZM-bl para explorar os efeitos da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A a nível da morfologia celular.

Os resultados demonstraram que a ultraestrutura das células tratadas com a molécula BSS-730A apresenta alterações consideráveis relativamente às células não tratadas ou tratadas com um PI (Figura 2.15). As células tratadas com a espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A são caracterizadas pela presença de conteúdos citoplasmáticos densos e vacuolização de organelos celulares, sugerindo deficiências ao nível da regulação osmótica no citoplasma, comportamento que pode ser relacionado com uma alteração da permeabilidade das membranas citoplasmáticas e/ou inativação das bombas iônicas membranares. Foram verificadas também a existência de alterações da cromatina, possivelmente resultantes da disrupção dos mecanismos de mitose, assim como a presença de células em apoptose. As células tratadas com BSS-730A também apresentam uma morfologia diferente da apresentada pelas células tratadas com DRV, um PI, sendo que estas últimas são caracterizadas pela preservação da morfologia celular associada a um aumento do número de vacúolos fagocíticos e autofágicos, podendo ser também observada a libertação de viriões.

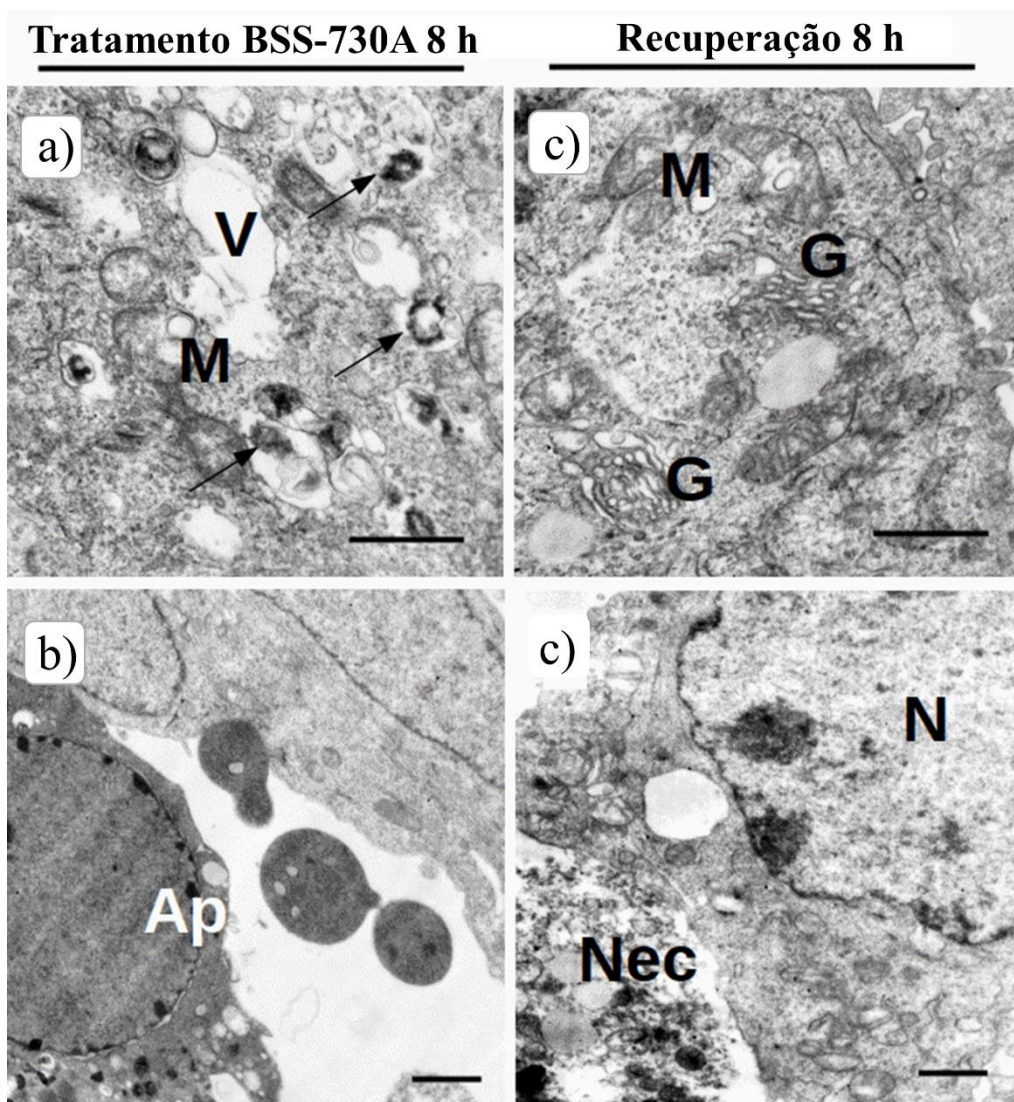


**Figura 2.15** – Morfologia celular de células TZM-bl infetadas com HIV a) sem adição de qualquer fármaco; b) tratadas com DRV; c) tratadas com BSS-730A.

A reversibilidade dos efeitos da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A na fisiologia celular foi também avaliada (Figura 2.16). As células TZM-bl foram tratadas



com BSS-730A durante 8 h, espaço temporal ao fim do qual eram visíveis as alterações morfológicas anteriormente discutidas e imputáveis à molécula. Após a remoção do composto e as células terem sido deixadas em recuperação durante 8 h adicionais, foi possível observar o desaparecimento quase completo de vacúolos e estruturas citoplasmáticas densas, enquanto organelos celulares como mitocôndrias e complexo de Golgi aumentaram em frequência e tamanho demonstrando que as alterações induzidas pela molécula BSS-730A são reversíveis. No entanto foram também observadas algumas células necróticas o que sugere que algumas células já tinham sofrido alterações irreversíveis.



**Figura 2.16** - a) e b) Células tratadas com BSS-730A durante 8 h; c) e d) células após a remoção do composto e recuperação durante 8 h. Abreviações: M - Mitocôndrias; V - Vacúolos; Ap - Células em apoptose; G - Complexo de Golgi; N - Núcleo; Nec - Células necróticas. As setas indicam inclusões densas e a barra corresponde a 1  $\mu$ m.

No cômputo geral dos resultados dos estudos de microscopia eletrônica é possível afirmar que a diferença nos comportamentos observados entre as células tratadas com DRV e BSS-730A demonstram que os efeitos a nível celular induzidos pela última diferem inequivocamente dos induzidos pelo PI, um resultado concordante com o resultado do ensaio *single-target* que demonstrou que a espiro-β-lactama não tem atividade sobre a protéase do HIV. No entanto, as informações recolhidas com maior relevância são relativas ao putativo mecanismo de ação antimicrobiana da molécula BSS-730A, na medida em que as consideráveis alterações na morfologia e fisiologia celular induzidas pela espirociclopentenil-β-lactama são plausíveis de causar a inibição tanto da produção de viriões do HIV como de parasitas *Plasmodium*, reforçando a hipótese de que a molécula possa atuar sobre o hospedeiro. Com base nesta suposição, coloca-se a hipótese de que a presente molécula BSS-730A possa apresentar-se como um potencial agente pan-antiviral<sup>87</sup>, podendo apresentar bioatividade contra uma panóplia de outros tipos de vírus, o que constitui um perfil farmacoterapêutico altamente desejado e relevante no atual panorama da saúde pública<sup>87,88</sup>, face ao crescente surgimento de novas ameaças virais como é exemplo máximo e atual a pandemia do Covid-19.

Em suma, e não obstante o facto de o seu alvo molecular continuar por identificar, os resultados relativos ao seu mecanismo de ação revestem-se de uma extrema importância, afirmando inequivocamente o carácter inovador da molécula BSS-730A e reforçando o seu potencial de desenvolvimento como alternativa terapêutica no panorama das doenças infectocontagiosas.

## 2.5. Conclusão

Foram identificados três novos espiropenicilanatos com uma promissora atividade antimicrobiana dupla contra HIV e *Plasmodium*, um perfil de bioatividade altamente valorizado e desejável devido à extensa sobreposição geográfica e casos de coinfeção verificados para estes dois agentes patógenos. A molécula mais promissora, BSS-730A, é uma espirociclopentenil-β-lactama que apresenta uma atividade notável contra o HIV ( $IC_{50} = 0.014 \mu M$  para o HIV-1 e  $IC_{50} = 0.008 \mu M$  para o HIV-2), sendo ainda bioativa contra ambas as fases hepática e eritrocítica da infeção por *Plasmodium* ( $IC_{50} = 0.550 \mu M$  e  $IC_{50} = 0.430 \mu M$ , respetivamente). Tanto quanto se sabe, esta é a primeira espiro-β-lactama identificada como tendo simultaneamente atividade *in vitro* contra HIV-1, HIV-2 e *Plasmodium*. Em termos de mecanismo de ação, demonstrou-se que a molécula BSS-

730A exerce a sua atividade antiviral por via de um mecanismo inovador e altamente complexo, diferente dos mecanismos de ação respetivos aos fármacos anti-HIV atualmente disponíveis no mercado. O conjunto destes resultados, sugere que a molécula BSS-730A possa atuar a nível do hospedeiro, sendo assim plausível que possa também mostrar atividade contra outros tipos de vírus.

A versatilidade e potência da sua atividade biológica das espiro- $\beta$ -lactamas identificadas fundamenta a sua utilização como moléculas *lead* para modelação estrutural e desenvolvimento de novas moléculas potencialmente bioativas, com especial ênfase na espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A não só pela sua superior e mais abrangente atividade antimicrobiana, mas especialmente devido ao seu mecanismo de ação antiviral distinto. De facto, o conjunto das valências e características da espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A justificam o investimento na aposta do seu próprio desenvolvimento como um potencial agente profilático ou terapêutico alternativo no combate ao HIV e *Plasmodium*.

## 2.6. Bibliografia

1. Zheng, Y. J.; Tice, C. M.; Singh, S. B., The use of spirocyclic scaffolds in drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (16), 3673-3682.
2. Chupakhin, E.; Babich, O.; Prosekov, A.; Asyakina, L.; Krasavin, M., Spirocyclic motifs in natural products. *Molecules* **2019**, *24* (22).
3. Shah, R. J.; Modi, N. R.; Patel, M. J.; Patel, L. J.; Chauhan, B. F.; Patel, M. M., Design, synthesis and in vitro antibacterial and antifungal activities of some novel spiro[azetidine-2,3'-indole]-2,4(1'H)-dione. *Med. Chem. Res.* **2011**, *20* (5), 587-594.
4. Chen, L. Y.; Zaks, A.; Chackalamannil, S.; Dugar, S., Asymmetric synthesis of substituted 2-azaspiro[3.5]nonan-1-ones: an enantioselective synthesis of the cholesterol absorption inhibitor (+)-SCH 54016. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (23), 8341-8343.
5. Sheehan, J. C.; Chacko, E.; Lo, Y. S.; Ponzi, D. R.; Sato, E., Some new spiro penicillins. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (25), 4856-4859.
6. McCoull, W.; Augustin, M.; Blake, C.; Ertan, A.; Kilgour, E.; Krapp, S.; Moore, J. E.; Newcombe, N. J.; Packer, M. J.; Rees, A.; Revill, J.; Scott, J. S.; Selmi, N.; Gerhardt, S.; Ogg, D. J.; Steinbacher, S.; Whittamore, P. R. O., Identification and optimisation of 3,3-dimethyl-azetidin-2-ones as potent and selective inhibitors of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD1). *MedChemComm* **2014**, *5* (1), 57-63.
7. Khan, M. A.; Houck, D. R.; Gross, A. L.; Zhang, X. L.; Cearley, C.; Madsen, T. M.; Kroes, R. A.; Stanton, P. K.; Burgdorf, J.; Moskal, J. R., NYX-2925 is a novel NMDA receptor-specific spirocyclic-beta-lactam that modulates synaptic plasticity processes associated with learning and memory. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **2018**, *21* (3), 242-254.
8. Santos, B. S.; Nunes, S. C. C.; Pais, A. A. C. C.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Chiral spiro- $\beta$ -lactams from 6-diazopenicillanates. *Tetrahedron* **2012**, *68* (19), 3729-3737.
9. Santos, B. S.; Gomes, C. S. B.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of chiral spiropyrazoline- $\beta$ -lactams and spirocyclopropyl- $\beta$ -lactams from 6-alkylidenepenicillanates. *Tetrahedron* **2014**, *70* (24), 3812-3821.
10. Santos, B. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of chiral spirocyclopentenyl- $\beta$ -lactams through phosphane-catalyzed [3+2] annulation of allenates with 6-alkylidenepenicillanates. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (18), 3901-3909.

11. Sperka, T.; Pitlik, J.; Bagossi, P.; Tözsér, J., Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (12), 3086-3090.
12. Kazmierski, W. M.; Furfine, E.; Spaltenstein, A.; Wright, L. L., Novel spirocyclic pyrrolidones as P2/P1 mimetics in potent inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (23), 3431-3433.
13. Skiles, J. W.; McNeil, D., Spiro indolinone beta-lactams, inhibitors of poliovirus and rhinovirus 3C-proteinases. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (50), 7277-7280.
14. Mehta, P. D.; Sengar, N. P. S.; Pathak, A. K., 2-Azetidinone – A new profile of various pharmacological activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (12), 5541-5560.
15. Jarrahpour, A.; Ebrahimi, E.; De Clercq, E.; Sinou, V.; Latour, C.; Djouhri Bouktab, L.; Brunel, J. M., Synthesis of mono-, bis-spiro- and dispiro-β-lactams and evaluation of their antimalarial activities. *Tetrahedron* **2011**, *67* (45), 8699-8704.
16. UNAIDS *Global HIV Statistics - Fact Sheet - World AIDS Day 2020*; UNAIDS: Genève, 1 December 2020, 2020.
17. Hemelaar, J.; Elangovan, R.; Yun, J.; Dickson-Tetteh, L.; Fleminger, I.; Kirtley, S.; Williams, B.; Gouws-Williams, E.; Ghys, P. D.; Abimiku, A. I. G.; Agwale, S.; Archibald, C.; Avidor, B.; Barbás, M. G.; Barre-Sinoussi, F.; Barugahare, B.; Belabbes, E. H.; Bertagnolio, S.; Birx, D.; Bobkov, A. F.; Brandful, J.; Bredell, H.; Brennan, C. A.; Brooks, J.; Bruckova, M.; Buonaguro, L.; Buonaguro, F.; Buttò, S.; Buve, A.; Campbell, M.; Carr, J.; Carrera, A.; Carrillo, M. G.; Celum, C.; Chaplin, B.; Charles, M.; Chatzidimitriou, D.; Chen, Z.; Chijiwa, K.; Cooper, D.; Cunningham, P.; Dagnra, A.; de Gascun, C. F.; Del Amo, J.; Delgado, E.; Dietrich, U.; Dwyer, D.; Ellenberger, D.; Ensoli, B.; Essex, M.; Gao, F.; Fleury, H.; Fonjungo, P. N.; Foulongne, V.; Gadkari, D. A.; García, F.; Garsia, R.; Gershy-Damet, G. M.; Glynn, J. R.; Goodall, R.; Grossman, Z.; Lindenmeyer-Guimarães, M.; Hahn, B.; Hamers, R. L.; Hamouda, O.; Handema, R.; He, X.; Herbeck, J.; Ho, D. D.; Holguin, A.; Hosseinipour, M.; Hunt, G.; Ito, M.; Bel Hadj Kacem, M. A.; Kahle, E.; Kaleebu, P. K.; Kalish, M.; Kamarulzaman, A.; Kang, C.; Kanki, P.; Karamov, E.; Karasi, J.-C.; Kayitenkore, K.; Kelleher, T.; Kitayaporn, D.; Kostrikis, L. G.; Kucherer, C.; Lara, C.; Leitner, T.; Liitsola, K.; Lingappa, J.; Linka, M.; Lorenzana de Rivera, I.; Lukashov, V.; Maayan, S.; Mayr, L.; McCutchan, F.; Meda, N.; Menu, E.; Mhalu, F.; Mloka, D.; Mokili, J. L.; Montes, B.; Mor, O.; Morgado, M.; Mosha, F.; Moussi, A.; Mullins, J.; Najera, R.; Nasr, M.; Ndembi, N.; Neilson, J. R.; Nerurkar, V. R.; Neuhann, F.; Nolte, C.; Novitsky, V.; Nyambi, P.; Ofner, M.; Paladin, F. J.; Papa,



A.; Pape, J.; Parkin, N.; Parry, C.; Peeters, M.; Pelletier, A.; Pérez-Álvarez, L.; Pillay, D.; Pinto, A.; Quang, T. D.; Rademeyer, C.; Raikanikoda, F.; Rayfield, M. A.; Reynes, J.-M.; Rinke de Wit, T.; Robbins, K. E.; Rolland, M.; Rousseau, C.; Salazar-Gonzales, J.; Salem, H.; Salminen, M.; Salomon, H.; Sandstrom, P.; Santiago, M. L.; Sarr, A. D.; Schroeder, B.; Segondy, M.; Selhorst, P.; Sempala, S.; Servais, J.; Shaik, A.; Shao, Y.; Slim, A.; Soares, M. A.; Songok, E.; Stewart, D.; Stokes, J.; Subbarao, S.; Sutthent, R.; Takehisa, J.; Tanuri, A.; Tee, K. K.; Thapa, K.; Thomson, M.; Tran, T.; Urassa, W.; Ushijima, H.; van de Perre, P.; van der Groen, G.; van Laethem, K.; van Oosterhout, J.; van Sighem, A.; van Wijngaerden, E.; Vandamme, A.-M.; Vercauteren, J.; Vidal, N.; Wallace, L.; Williamson, C.; Wolday, D.; Xu, J.; Yang, C.; Zhang, L.; Zhang, R., Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19* (2), 143-155.

18. Gottlieb, G. S.; Raugi, D. N.; Smith, R. A., 90-90-90 for HIV-2? Ending the HIV-2 epidemic by enhancing care and clinical management of patients infected with HIV-2. *Lancet HIV* **2018**, *5* (7), e390-e399.

19. De Clercq, E.; Li, G., Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29* (3), 695-747.

20. Gulick, R. M.; Flexner, C., Long-acting HIV drugs for treatment and prevention. *Annu. Rev. Med.* **2019**, *70* (1), 137-150.

21. UNAIDS *Understanding fast-track; accelerating action to end the AIDS epidemic by 2030*; Genève, 2015.

22. Saag, M. S.; Benson, C. A.; Gandhi, R. T.; Hoy, J. F.; Landovitz, R. J.; Mugavero, M. J.; Sax, P. E.; Smith, D. M.; Thompson, M. A.; Buchbinder, S. P.; del Rio, C.; Eron, J. J., Jr.; Fätkenheuer, G.; Günthard, H. F.; Molina, J.-M.; Jacobsen, D. M.; Volberding, P. A., Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *JAMA* **2018**, *320* (4), 379-396.

23. Solomon, D. A.; Sax, P. E., Current state and limitations of daily oral therapy for treatment. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2015**, *10* (4), 219-225.

24. Chen, T. K.; Aldrovandi, G. M., Review of HIV antiretroviral drug resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2008**, *27* (8), 749-752.

25. UNAIDS *Global AIDS Update 2019*; Genève, 2019.

26. Organization, W. H. *HIV Drug Resistance Report 2019*; World Health Organization: Genève, 2019.

27. Tzou, P. L.; Descamps, D.; Rhee, S.-Y.; Raugi, D. N.; Charpentier, C.; Taveira, N.; Smith, R. A.; Soriano, V.; de Mendoza, C.; Holmes, S. P.; Gottlieb, G. S.; Shafer, R. W., Expanded spectrum of antiretroviral-selected mutations in Human Immunodeficiency Virus type 2. *J. Infect. Dis.* **2020**, *221* (12), 1962-1972.
28. Tebit, D. M.; Patel, H.; Ratcliff, A.; Alessandri, E.; Liu, J.; Carpenter, C.; Plantier, J.-C.; Arts, E. J., HIV-1 group O genotypes and phenotypes: Relationship to fitness and susceptibility to antiretroviral drugs. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2016**, *32* (7), 676-688.
29. Chawla, A.; Wang, C.; Patton, C.; Murray, M.; Puneekar, Y.; de Ruiter, A.; Steinhart, C., A Review of long-term toxicity of antiretroviral treatment regimens and implications for an aging population. *Infect. Dis. Ther.* **2018**, *7* (2), 183-195.
30. Lanman, T.; Letendre, S.; Ma, Q.; Bang, A.; Ellis, R., CNS neurotoxicity of antiretrovirals. *J. Neuroimmune. Pharmacol.* **2021**, *16*, 130-143.
31. Pillaye, J. N.; Marakalala, M. J.; Khumalo, N.; Spearman, W.; Ndlovu, H., Mechanistic insights into antiretroviral drug-induced liver injury. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2020**, *8* (4), e00598.
32. Müller-Sienerth, N.; Shilts, J.; Kadir, K. A.; Yman, V.; Homann, M. V.; Asghar, M.; Ngasala, B.; Singh, B.; Färnert, A.; Wright, G. J., A panel of recombinant proteins from human-infective *Plasmodium* species for serological surveillance. *Malar. J.* **2020**, *19* (1), 31.
33. Organization, W. H. *World Malaria Report 2019*; Genève, 2019.
34. Prudêncio, M.; Rodriguez, A.; Mota, M. M., The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4* (11), 849-856.
35. Rodrigues, T.; Prudêncio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F., Targeting the liver stage of Malaria parasites: A yet unmet goal. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (3), 995-1012.
36. Derbyshire, E. R.; Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Clardy, J., Liver-stage malaria parasites vulnerable to diverse chemical scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109* (22), 8511-8516.
37. White, N. J.; Imwong, M., Chapter Two - Relapse. In *Advances in Parasitology*, Hay, S. I.; Price, R.; Baird, J. K., Eds. Academic Press: 2012; Vol. 80, pp 113-150.
38. Luzzatto, L.; Ally, M.; Notaro, R., Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Blood* **2020**, *136* (11), 1225-1240.
39. Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P., Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (3), 937-953.

40. Baird, J. K.; Hoffman, S. L., Primaquine therapy for Malaria. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *39* (9), 1336-1345.
41. Hanboonkunupakarn, B.; White, N. J., Advances and roadblocks in the treatment of malaria. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2020**, 1-9
42. Njunda, A. L.; Njumkeng, C.; Nsagha, S. D.; Assob, J. C. N.; Kwenti, T. E., The prevalence of malaria in people living with HIV in Yaounde, Cameroon. *BMC Public Health* **2016**, *16* (1), 964.
43. Abu-Raddad, L. J.; Patnaik, P.; Kublin, J. G., Dual Infection with HIV and Malaria Fuels the Spread of Both Diseases in Sub-Saharan Africa. *Science* **2006**, *314* (5805), 1603-1606.
44. Skinner-Adams, T. S.; McCarthy, J. S.; Gardiner, D. L.; Andrews, K. T., HIV and malaria co-infection: interactions and consequences of chemotherapy. *Trends Parasitol.* **2008**, *24* (6), 264-271.
45. Fleteau, C.; Le Loup, G.; Pialoux, G., Consequences of HIV infection on malaria and therapeutic implications: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11* (7), 541-556.
46. Otieno, R. O.; Ouma, C.; Ong'echa, J. M.; Keller, C. C.; Were, T.; Waindi, E. N.; Michaels, M. G.; Day, R. D.; Vulule, J. M.; Perkins, D. J., Increased severe anemia in HIV-1-exposed and HIV-1-positive infants and children during acute malaria. *AIDS* **2006**, *20* (2), 275-280.
47. Patnaik, P.; Jere, C. S.; Miller, W. C.; Hoffman, I. F.; Wirima, J.; Pendame, R.; Meshnick, S. R.; Taylor, T. E.; Molyneux, M. E.; Kublin, J. G., Effects of HIV-1 serostatus, HIV-1 RNA concentration, and CD4 cell count on the incidence of Malaria infection in a cohort of adults in rural Malawi. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192* (6), 984-991.
48. Alemu, A.; Shiferaw, Y.; Addis, Z.; Mathewos, B.; Birhan, W., Effect of malaria on HIV/AIDS transmission and progression. *Parasit. Vectors* **2013**, *6* (1), 18.
49. Kublin, J. G.; Patnaik, P.; Jere, C. S.; Miller, W. C.; Hoffman, I. F.; Chimbiya, N.; Pendame, R.; Taylor, T. E.; Molyneux, M. E., Effect of *Plasmodium falciparum* malaria on concentration of HIV-1-RNA in the blood of adults in rural Malawi: a prospective cohort study. *Lancet* **2005**, *365* (9455), 233-240.
50. Seden, K.; Gibbons, S.; Marzolini, C.; Schapiro, J. M.; Burger, D. M.; Back, D. J.; Khoo, S. H., Development of an evidence evaluation and synthesis system for drug-drug interactions, and its application to a systematic review of HIV and malaria co-infection. *PLoS ONE* **2017**, *12* (3), e0173509.

51. Muller, P. Y.; Milton, M. N., The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2012**, *11* (10), 751-761.
52. Witvrouw, M.; Pannecouque, C.; Switzer, W. M.; Folks, T. M.; De Clercq, E.; Heneine, W., Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. *Antivir. Ther.* **2004**, *9* (1), 57-65.
53. Camacho, R. J., Special aspects of the treatment of HIV-2-infected patients. *Intervirology* **2012**, *55* (2), 179-183.
54. Mendoza, C.; Lozano, A. B.; Caballero, E.; Cabezas, T.; Ramos, J. M.; Soriano, V., Antiretroviral therapy for HIV-2 infection in non-endemic regions. *AIDS Rev.* **2020**, *22* (1), 44-56.
55. Rashid, M.-U.; Weintraub, A.; Nord, C. E., Effect of new antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Anaerobe* **2012**, *18* (2), 249-253.
56. DeGruttola, A. K.; Low, D.; Mizoguchi, A.; Mizoguchi, E., Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm. Bowel Dis.* **2016**, *22* (5), 1137-1150.
57. Schellenberg, J. J.; Plummer, F. A., The microbiological context of HIV resistance: Vaginal microbiota and mucosal inflammation at the viral point of entry. *Int. J. Inflam.* **2012**, *2012*, 131243.
58. Yamato, M.; Hashigaki, K.; Ikeda, M.; Ohtake, H.; Tasaka, K., Synthesis and structure-activity relationship of spiro[isochromanpiperidine] analogs for inhibition of histamine release. 1. *J. Med. Chem.* **1981**, *24* (2), 194-198.
59. Sharma, P.; Kumar, A.; Sahu, V.; Upadhyay, S.; Singh, J., Synthesis of bioactive spiro-2-[3'-(2'-phenyl)-3H-indolyl]-1-aryl-3-phenylaziridines and SAR studies on their antimicrobial behavior. *Med. Chem. Res.* **2009**, *18* (5), 383-395.
60. Mohan, S.; Kerry, P. S.; Bance, N.; Niikura, M.; Pinto, B. M., Serendipitous discovery of a potent Influenza Virus A neuraminidase inhibitor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53* (4), 1076-1080.
61. Saraswat, P.; Jeyabalan, G.; Hassan, M. Z.; Rahman, M. U.; Nyola, N. K., Review of synthesis and various biological activities of spiro heterocyclic compounds comprising oxindole and pyrrolidine moieties. *Synth. Commun.* **2016**, *46* (20), 1643-1664.
62. Pannecouque, C.; Pluymers, W.; Van Maele, B.; Tetz, V.; Cherepanov, P.; De Clercq, E.; Witvrouw, M.; Debyser, Z., New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr. Biol.* **2002**, *12* (14), 1169-1177.

63. Schuffenhauer, A.; Floersheim, P.; Acklin, P.; Jacoby, E., Similarity metrics for ligands reflecting the similarity of the target proteins. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43* (2), 391-405.
64. Bajorath, J., Molecular similarity concepts for informatics applications. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1526*, 231-245.
65. ChEMBL ChEMBL. <https://www.ebi.ac.uk/chembl/> (accessed January 2021).
66. Wassermann, A. M.; Bajorath, J., BindingDB and ChEMBL: online compound databases for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6* (7), 683-687.
67. Rogers, D.; Hahn, M., Extended-Connectivity Fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (5), 742-754.
68. Huang, H.; Zhang, G.; Zhou, Y.; Lin, C.; Chen, S.; Lin, Y.; Mai, S.; Huang, Z., Reverse screening methods to search for the protein targets of chemopreventive compounds. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 138.
69. Yang, S.-Q.; Ye, Q.; Ding, J.-J.; Ming-Zhu, Y.; Lu, A.-P.; Chen, X.; Hou, T.-J.; Cao, D.-S., Current advances in ligand-based target prediction. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2020**, e1504.
70. Bajusz, D.; Rácz, A.; Héberger, K., Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J. Cheminformatics* **2015**, *7* (1), 20.
71. Jasial, S.; Hu, Y.; Vogt, M.; Bajorath, J., Activity-relevant similarity values for fingerprints and implications for similarity searching. *FI000Research* **2016**, *5*, 591.
72. Ertl, P.; Cooper, D.; Allen, G.; Slater, M. J., 2-Chloro-3-substituted-1,4-naphthoquinone inactivators of human cytomegalovirus protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9* (19), 2863-2866.
73. Parikh, S.; Gut, J.; Istvan, E.; Goldberg, D. E.; Havlir, D. V.; Rosenthal, P. J., Antimalarial activity of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49* (7), 2983-2985.
74. Nsanjabana, C.; Rosenthal, P. J., In Vitro activity of antiretroviral drugs against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (11), 5073.
75. Machado, M.; Sanches-Vaz, M.; Cruz, J. P.; Mendes, A. M.; Prudêncio, M., Inhibition of *Plasmodium* hepatic infection by antiretroviral compounds. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 329.
76. Azevedo, R.; Mendes, A. M.; Prudêncio, M., The impact of antiretroviral therapy on Malaria parasite transmission. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 3048.

77. Nascimento, A. L. C. S.; Fernandes, R. P.; Quijia, C.; Araujo, V. H. S.; Pereira, J.; Garcia, J. S.; Trevisan, M. G.; Chorilli, M., Pharmacokinetic parameters of HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem* **2020**, *15* (12), 1018-1029.
78. Weber, I. T.; Agniswamy, J., HIV-1 protease: Structural perspectives on drug resistance. *Viruses* **2009**, *1* (3), 1110-1136.
79. Pietrucci, F.; Vargiu, A. V.; Kranjc, A., HIV-1 protease dimerization dynamics reveals a transient druggable binding pocket at the interface. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 18555.
80. Wolber, G.; Langer, T., LigandScout: 3-D Pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45* (1), 160-169.
81. Burley, S. K.; Bhikadiya, C.; Bi, C.; Bittrich, S.; Chen, L.; Crichlow, G. V.; Christie, C. H.; Dalenberg, K.; Di Costanzo, L.; Duarte, J. M.; Dutta, S.; Feng, Z.; Ganesan, S.; Goodsell, D. S.; Ghosh, S.; Green, R. K.; Guranović, V.; Guzenko, D.; Hudson, B. P.; Lawson, Catherine L.; Liang, Y.; Lowe, R.; Namkoong, H.; Peisach, E.; Persikova, I.; Randle, C.; Rose, A.; Rose, Y.; Sali, A.; Segura, J.; Sekharan, M.; Shao, C.; Tao, Y.-P.; Voigt, M.; Westbrook, John D.; Young, J. Y.; Zardecki, C.; Zhuravleva, M., RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49* (D1), D437-D451.
82. Evelina, T.; Andrea, S.; Flavia De, B.; Roberto, C.; Antonio, C., Candidiasis and HIV-Protease inhibitors: The expected and the unexpected. *Curr. Med. Chem. Immunol. Endocr. Metab. Agents* **2004**, *4* (1), 49-59.
83. Savarino, A.; Cauda, R.; Cassone, A., Aspartic proteases of *Plasmodium falciparum* as the target of HIV-1 protease inhibitors. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191* (8), 1381-1382.
84. Achan, J.; Kakuru, A.; Ikilezi, G.; Ruel, T.; Clark, T. D.; Nsanzabana, C.; Charlebois, E.; Aweeka, F.; Dorsey, G.; Rosenthal, P. J.; Havlir, D.; Kanya, M. R., Antiretroviral agents and prevention of Malaria in HIV-infected ugandan children. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367* (22), 2110-2118.
85. Kasirye, R. P.; Grosskurth, H.; Munderi, P.; Levin, J.; Anywaine, Z.; Nunn, A.; Kamali, A.; Baisley, K., Effect of antiretroviral therapy on malaria incidence in HIV-infected Ugandan adults. *AIDS* **2017**, *31* (4), 577-582.

86. Toth, M. V.; Marshall, G. R., A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, 36 (6), 544-550.
87. Villamagna, A. H.; Gore, S. J.; Lewis, J. S.; Doggett, J. S., The need for antiviral drugs for pandemic coronaviruses from a global health perspective. *Front. Med.* **2020**, 7, 998.
88. Kleandrova, V.; Speck-Planche, A., The urgent need for pan-antiviral agents: from multitarget discovery to multiscale design. *Future Med. Chem.* **2020**, 13(1), 5-8.

# Capítulo 3

## Modelação estrutural de uma espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama quiral com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*

### Resumo

No presente capítulo apresenta-se a síntese de várias espiro-3*H*-pirazole-lactamas obtidas pela modelação estrutural de uma espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama previamente identificada como tendo uma excelente atividade contra o vírus do HIV-1. Esta modelação estrutural abrangeu três características estruturais distintas da molécula *lead*, tendo sido feita por via de diversas abordagens sintéticas, nomeadamente a cicloadição 1,3-dipolar entre diazo-lactamas e alquinos deficientes em electrões, desproteção seletiva de ésteres benzidrilos e conversão de ácidos carboxílicos a ésteres e ácidos hidroxâmicos. Com o intuito de estudar a importância do anel 2-azetidiona na sua atividade, foram também sintetizados derivados  $\gamma$ -lactâmicos análogos da molécula *lead* ativa. De notar que esta síntese assentou numa abordagem sintética sem precedente que permitiu a síntese *de novo* de um *core* estrutural  $\gamma$ -lactama bíciclico análogo da penicilina, tendo o aminoácido natural D-penicilamina como precursor.



As moléculas foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade em células TZM-bl e atividade de inibição da replicação viral do vírus do HIV-1. Os resultados dos ensaios biológicos permitiram recolher informações valiosas acerca da relação estrutura-atividade da molécula ativa, assim como do seu potencial mecanismo de ação.

Os resultados apresentados neste capítulo foram incluídos em dois artigos científicos publicados em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Alves, J. S.; Alves, N. G.; Caratão, C. C.; Esteves, M. I. M.; Fontinha, D.; Bárto, I.; Soares, M. I. L.; Lopes, S. M. M.; Prudêncio, M.; Taveira, N.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Spiro-lactams as novel antimicrobial agents, *Curr. Top. Med. Chem.* **2020**, *20* (2), 140–152.

e;

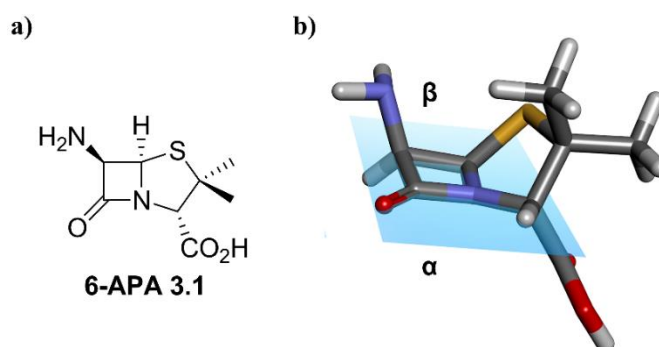
Alves, N. G.; Bárto, I.; Alves, A. J. S.; Fontinha, D.; Francisco, D.; Lopes, S. M. M.; Soares, M. I. L.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Taveira, N.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Chiral Spiro- $\beta$ -lactams Highly Active Against HIV-1 and Plasmodium, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *219*, 113439.

## Capítulo 3 - Modelação estrutural de uma espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama quiral com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*

3.1. Introdução	101
3.2. Síntese e modelação estrutural	104
3.2.1. Síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas análogas à molécula BSS-593	104
3.2.2. Síntese de novas espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas análogas da espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593	111
3.2.2.1. Modelação do grupo éster metílico na posição 5' do anel pirazole	111
3.2.2.2. Modelação do grupo ácido carboxílico na posição 3 da tiazolidina do <i>core</i> penicilanato.	112
3.3. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	114
3.4. Relação estrutura-atividade	115
3.4.1. Importância do anel $\beta$ -lactama	115
3.4.2. Importância do grupo éster metílico existente na posição 5' do anel pirazole	118
3.4.3. Importância do ácido carboxílico na posição 3 da tiazolidina	120
3.5. Conclusão	121
3.6. Bibliografia	123

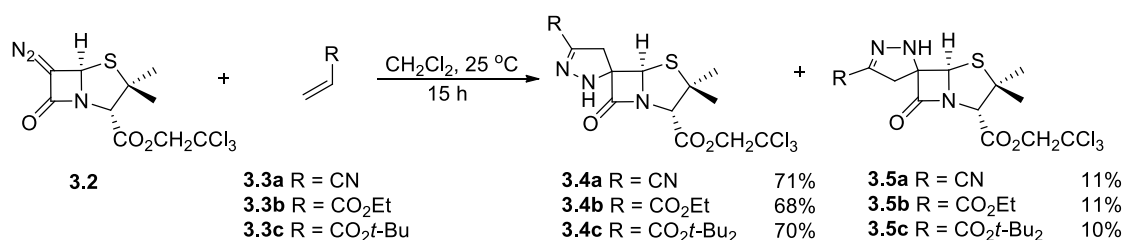
### 3.1. Introdução

A reatividade de diazopenicilanatos tem sido explorada para a obtenção de diferentes espiropenicilanatos, numa abordagem geral que se baseia na funcionalização do carbono-6 mantendo intacto o núcleo penicilânico, recorrendo a diversas estratégias sintéticas.<sup>1-4</sup> A conformação em borboleta inerente ao núcleo penicilanato<sup>5,6</sup> leva a que a aproximação de reagentes seja feita preferencialmente pelo lado  $\alpha$  da  $\beta$ -lactama por este apresentar menor impedimento estérico (Figura 3.1), garantindo que as reações na posição 6 do penicilanato ocorram com elevada seletividade.



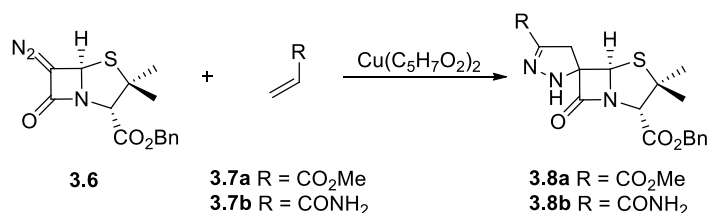
**Figura 3.1** – Representação da a) estrutura do ácido (+)-aminopenicilânico (6-APA) e b) sua conformação tridimensional, com indicação dos lados  $\alpha$  e  $\beta$  da lactama, como exemplo da conformação em borboleta apresentada pelos penicilanatos.

Sheehan e seus colaboradores utilizaram pela primeira vez diazopenicilanatos como precursores de espiropenicilanatos, numa abordagem que contemplou a cicloadição 1,3-dipolar entre o 6-diazopenicilanato **3.2** e diferentes acrilatos **3.3**, resultando na síntese dos regioisómeros espiro-2-pirazolinapenicilanatos **3.4** e **3.5** com bons rendimentos globais (Esquema 3.1).<sup>1</sup> A estereosseletividade observada pelos autores foi justificada pela aproximação do alqueno pelo lado  $\alpha$  da  $\beta$ -lactama, devido ao menor impedimento estérico.



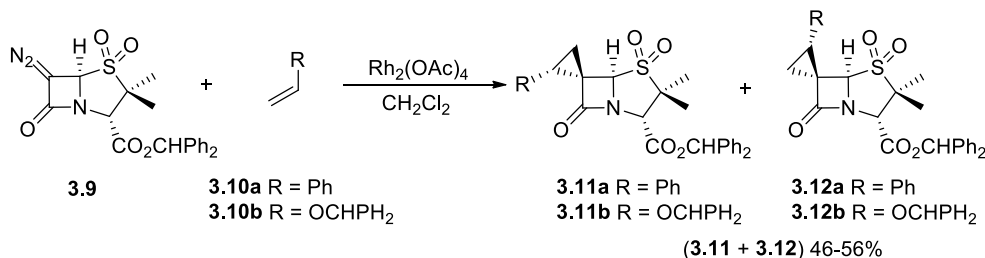
**Esquema 3.1** – Síntese de espiro-2-pirazolinapenicilanatos apresentada por Sheehan e colaboradores.

Numa abordagem análoga à anterior, os espiro-2-pirazolinapenicilanatos **3.8** foram sintetizados de forma estereoespecífica pela reação do 6-diazopenicilanato **3.6** com acrilato de metilo (**3.7a**) e acrilamida (**3.7b**), na presença e ausência de acetilacetato de cobre (II) (Esquema 3.2).<sup>2</sup>



**Esquema 3.2** – Síntese de espiro-2-pirazolinapenicilanatos a partir de um 6-diazopenicilanato na presença de acetilacetato de cobre (II).

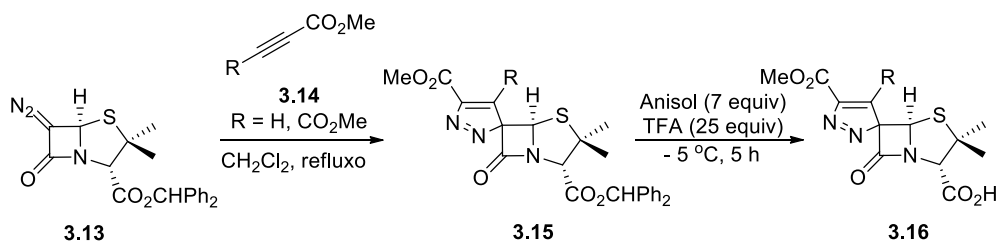
A classe dos 6-diazopenicilanatos foi ainda explorada em reações de ciclopropanação com alquenos, catalisadas por ródio (Esquema 3.3).<sup>3</sup> A reação entre a 6-diazopenicilanato sulfona **3.9** com estireno (**3.10a**) originou uma mistura das espirociclopropil-β-lactamas **3.11a** e **3.12a** (1.7:1) com um rendimento global moderado (46%), enquanto a mesma reação com o difenilmetil vinil éter (**3.10b**) permitiu a síntese das espirociclopropil-β-lactamas **3.11b** e **3.12b** (1:1), num rendimento global de 56%.



**Esquema 3.3** – Ciclopropanação de uma 6-diazopenicilanato sulfona catalisada por ródio.

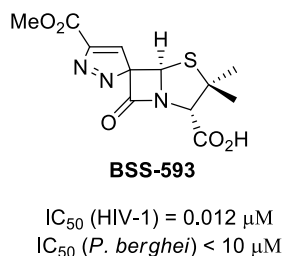
Como apresentado e discutido no capítulo anterior, o grupo de Pinho e Melo tem vindo a focar vários esforços no desenvolvimento de diversas metodologias visando a síntese de espiro-β-lactamas quirais.<sup>4, 7-11</sup> Uma destas abordagens focou-se na cicloadição 1,3-dipolar entre 6-diazopenicilanatos e diversos dipolarófilos, nomeadamente acrilonitrilo, acrilatos, metil vinil cetona, maleimidas *N*-substituídas e alquinos deficientes em electrões.<sup>4</sup> E foi exatamente ao explorar esta última reatividade (Esquema 3.4) e utilizando o alquino metil propiolato como dipolarófilo, que foi sintetizada a espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593, uma molécula espirocíclica com um *core* estrutural

penicilânico e contendo um ácido carboxílico como substituinte do anel tiazolidina, que veio a revelar-se como tendo uma potente atividade *in vitro* contra o vírus do HIV-1.<sup>12</sup>



**Esquema 3.4** – Síntese de espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas pela cicloadição 1,3-dipolar entre um 6-diazopenicilanato e alquinos deficientes em electrões.

A espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593 apresentou um notável IC<sub>50</sub> de 0.012 μM contra uma estirpe SG3.1 com tropismo X4 de HIV-1. Adicionalmente, a molécula revelou também alguma atividade contra o *P. berghei* (IC<sub>50</sub> < 10 μM) (Figura 3.2).<sup>12</sup> Não obstante a sua promissora atividade antiviral, o seu mecanismo de ação permanece desconhecido. É assim altamente desejável obter informação estrutural adicional que permita uma interpretação do potencial mecanismo de ação desta promissora espiro-β-lactama.

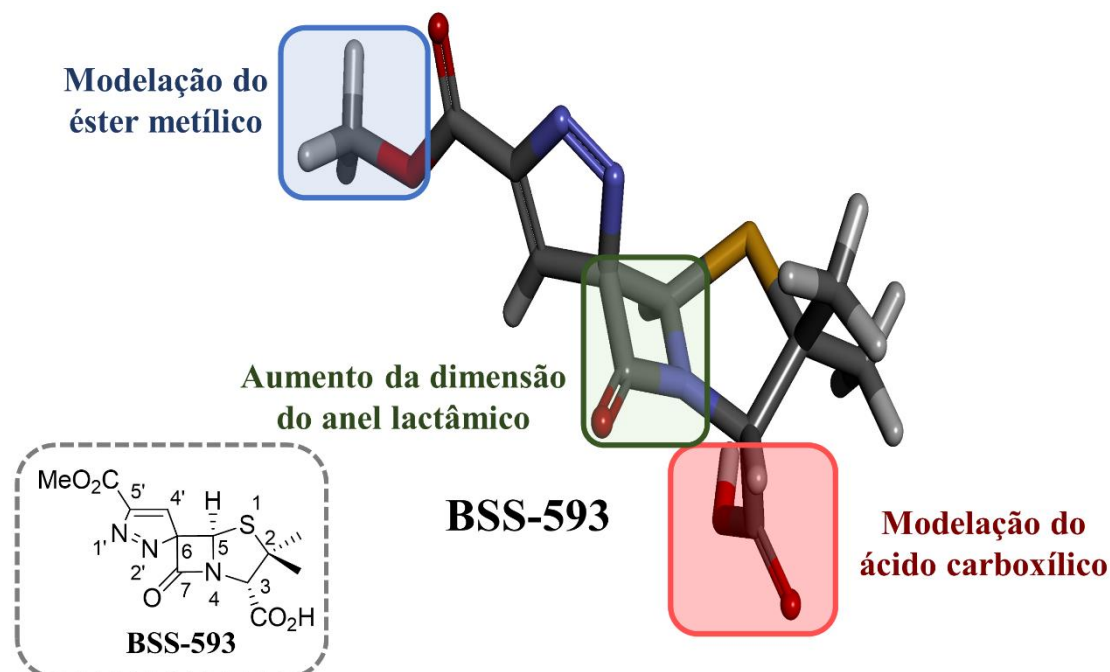


**Figura 3.2** – Estrutura da espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593 e suas bioatividades contra HIV-1 e *Plasmodium*.

Dada a atual situação mundial relativa à incidência e mortalidade associada ao HIV-1,<sup>13,14</sup> e especialmente devido à carência de novas terapias antivirais e crescente surgimento de resistências às terapias disponíveis,<sup>13,15-17</sup> facto focado em detalhe no capítulo anterior, é imperativo que sejam desenvolvidas novas classes de moléculas que possam assumir-se como alternativas inovadoras e viáveis às terapias convencionais.

No presente trabalho, a espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593, pela sua estrutura espirocíclica inovadora e potente atividade contra HIV-1, foi explorada como molécula *lead* para a síntese de novos derivados espirolactâmicos, visando recolher informação

relevante acerca da sua relação estrutura-reatividade assim como obter novas moléculas da mesma classe potencialmente ativas contra o HIV-1. No seguimento desta estratégia, as modelações estruturais foram projetadas de forma racional e incidiram sobre diferentes grupos funcionais da molécula, nomeadamente o anel  $\beta$ -lactâmico, o grupo ácido carboxílico da posição 3 da tiazolidina e o grupo éster presente na posição 5 do espiro-3*H*-pirazole (Figura 3.3). As moléculas sintetizadas foram alvo de estudos de citotoxicidade e de atividade antiviral contra o HIV-1.



**Figura 3.3** – Representação gráfica dos grupos funcionais da molécula BSS-593 alvo de modelação estrutural.

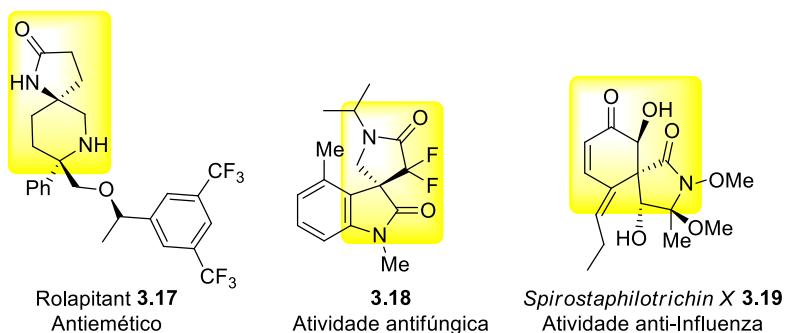
## 3.2. Síntese e modelação estrutural

### 3.2.1. Síntese de espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactamas análogas à molécula BSS-593

Sendo a molécula BSS-593 um espiroenicilinato, a presença de um anel 2-azetidina na sua estrutura é notoriamente uma das suas características estruturais mais relevantes. Como já discutido anteriormente no capítulo 1 deste trabalho, a atividade antimicrobiana convencional das  $\beta$ -lactamas ocorre por via de um mecanismo de acilação das enzimas bacterianas PBP dependente da abertura do anel  $\beta$ -lactâmico, num evento energeticamente favorável pelo alívio da tensão de anel.<sup>18</sup> Assim uma das estratégias de modelação estrutural da molécula BSS-593 compreendeu a síntese de espiro-pirazole- $\gamma$ -

lactamas análogas, de modo a aferir a importância do anel β-lactâmico e da tensão de anel a ele associado na bioatividade da molécula *lead* BSS-593.

As espiro-γ-lactamas, ou espiropirrolinin-2-onas, são caracterizadas pelo facto de o seu anel lactâmico ter cinco membros e, à imagem do que acontece com os seus análogos β-lactâmicos, têm vindo também a atrair considerável atenção por parte da comunidade científica. Esta classe de compostos tem-se assumido como de extrema importância em áreas como a química medicinal e orgânica ou na área dos produtos naturais, seja pelas suas características estruturais e pela sua reatividade, seja pela enorme abrangência da sua atividade biológica (Figura 3.4). Em termos concretos, podemos encontrar o núcleo espiro-γ-lactâmico em várias moléculas bioativas como é exemplo o fármaco antiemético Rolapitant (**3.17**)<sup>19</sup> ou o espiro-oxindol antifúngico **3.18**<sup>20</sup>. O mesmo núcleo estrutural pode também ser encontrado em compostos naturais bioativos como a *Spirostaphilotrichin X* (**3.19**), um inibidor da RNA polimerase PB2 do vírus Influenza, composto obtido a partir do fungo marinho *Cochliobolus lunatus*.<sup>21</sup> Todo o interesse em volta das potencialidades da classe das espiro-γ-lactamas levou a que diversos trabalhos tenham vindo a ser produzidos focados na síntese e bioatividade desta classe de moléculas, com uma especial incidência sobre a subclasse dos espiro-oxindóis (e.g. **3.18**)<sup>22-24</sup>.



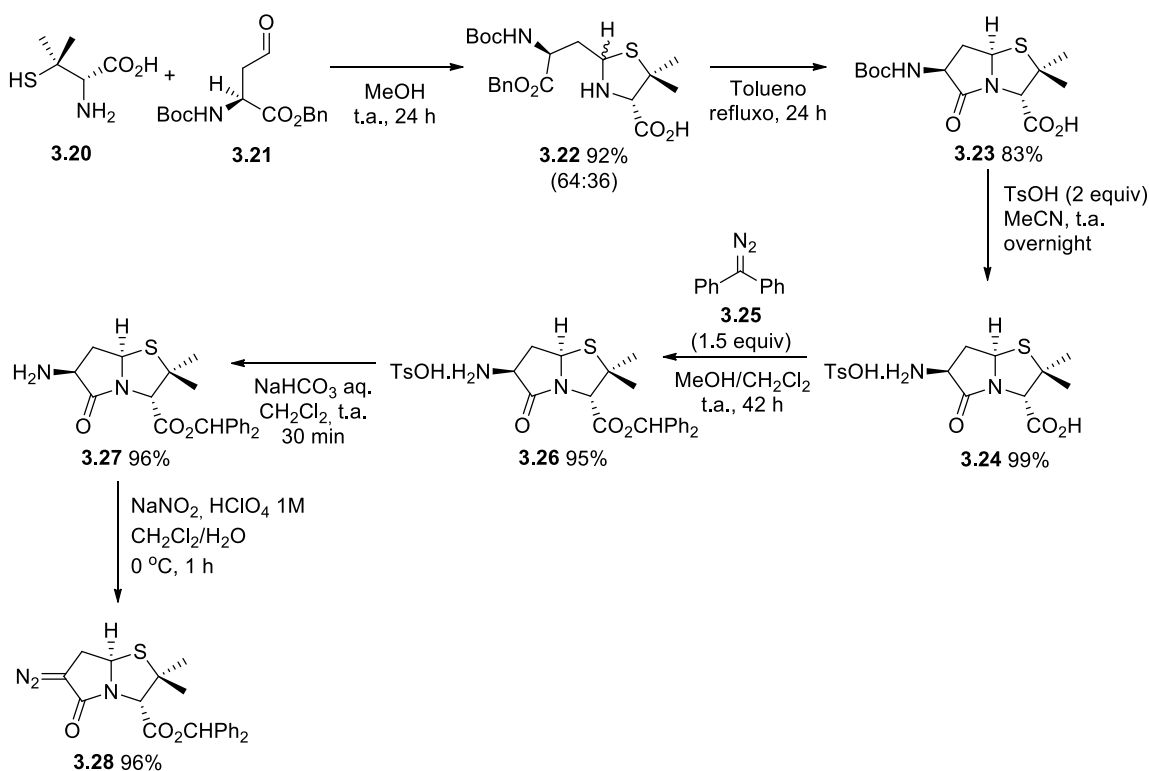
**Figura 3.4** – Estruturas de espiro-γ-lactamas bioativas.

Comparativamente aos seus análogos β-lactâmicos, as espiro-γ-lactamas são geralmente consideradas menos problemáticas a nível da sua estabilidade apresentando também uma menor toxicidade, nomeadamente por não estarem associadas ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidade frequentes, ao contrário do que ocorre com as β-lactamas.<sup>25</sup> Este comportamento relativamente mais favorável das espiro-γ-lactamas também as torna mais facilmente manuseáveis em contexto industrial, onde a produção de compostos β-lactâmicos requer um elevado controlo.<sup>26</sup> Apesar de

ligeiramente mais flexíveis quando comparadas com as espiro- $\beta$ -lactamas devido ao carbono extra existente no anel da lactama, na condição de compostos espirocíclicos as espiro- $\gamma$ -lactamas têm também a particularidade de serem moléculas cuja conformação é consideravelmente rígida. Assim, no computo geral, a substituição de um anel de  $\beta$ -lactama por um anel de  $\gamma$ -lactama é uma estratégia altamente viável em modelação estrutural de espiro-lactamas, visando obter compostos com um balanço satisfatório entre as propriedades físico-químicas, toxicidade e bioatividade.

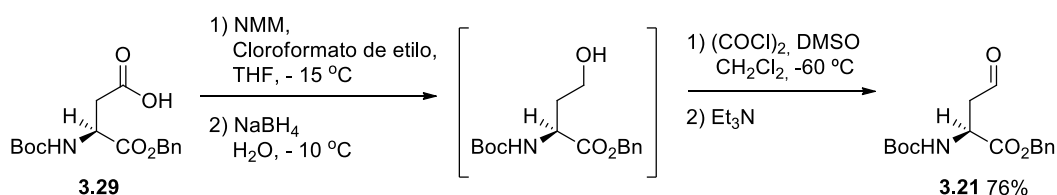
Procedeu-se então à síntese de espiro- $\gamma$ -lactamas quirais análogas à molécula ativa BSS-593, nomeadamente duas espiro-pirazole- $\gamma$ -lactamas esterificadas com um grupo benzidrilo e as correspondentes espiro-pirazole- $\gamma$ -lactamas contendo o ácido carboxílico livre, num trabalho que vem no seguimento de alguns desenvolvimentos produzidos durante o trabalho de um aluno de mestrado. Os compostos espiro- $\gamma$ -lactâmicos quirais foram obtidos num procedimento similar ao da síntese da molécula *lead* BSS-593, através da formação do sistema espirocíclico via reação de cicloadição 1,3-dipolar entre uma 6-diazo-lactama e alquinos deficientes em electrões, estes últimos atuando como dipolarófilos. No entanto, contrariamente ao que acontece em relação aos diazopenicilanatos cujo núcleo estrutural é obtido a partir do 6-APA, disponível comercialmente, para a síntese de espiro- $\gamma$ -lactamas foi necessário sintetizar *de novo* o núcleo bíciclico **3.24**, que serviria de precursor da síntese da 6-diazo- $\gamma$ -lactama **3.28**. Deste modo, com o propósito de sintetizar a 6-diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** recorreu-se a uma metodologia sintética de vários passos e que tem como reagente inicial um aminoácido natural, nomeadamente a D-penicilamina (**3.4**) (Esquema 3.5).





### Esquema 3.5 – Síntese da 6-diazo- $\gamma$ -lactama **3.28**.

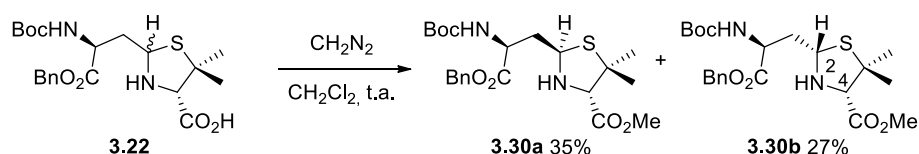
O benzilo (2*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato (**3.21**)<sup>27</sup>, aldeído derivado do ácido L-aspártico, foi sintetizado de acordo com o método descrito na literatura para a síntese do seu enantiómero *R*.<sup>28</sup> De forma sumária, a preparação do aldeído **3.21** envolve um primeiro passo de redução do ácido carboxílico **3.29** ao álcool correspondente que, sem purificação prévia, é diretamente oxidado por via de uma oxidação de Swern (Esquema 3.6). Este procedimento permitiu a obtenção do aldeído desejado **3.21** com um rendimento global de 76%.



### Esquema 3.6 - Síntese do benzilo (2*S*)-2-(*t*-butoxicarbonilamino)-4-oxobutanoato (**3.21**).

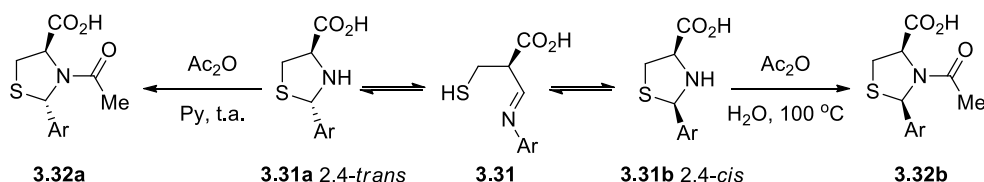
O primeiro passo da síntese da 6-diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** compreendeu a reação entre a D-penicilamina (**3.20**) e o aldeído **3.21** com formação da correspondente tiazolidina, obtido como uma mistura de diastéreisómeros **3.22** (64:36) com um rendimento de 92%. A determinação da estrutura das tiazolidinas **3.22** requereu a sua conversão aos respetivos

ésteres metílicos por tratamento com uma solução de diazometano em éter etílico (Esquema 3.7). Os dois isómeros (2*R*,4*S*)-**3.30a** e (2*S*,4*S*)-**3.30b** foram separados por cromatografia em coluna sendo obtidos com os respetivos rendimentos de 35% e 27%, o que permitiu a sua caracterização completa. A atribuição da estereoquímica foi justificada com base na forte correlação observada no espectro NOESY entre os prótons H-2 e H-4 do isómero **3.30b** (Figura 6 do Anexo 1).



**Esquema 3.7** – Esterificação da mistura de diastereoisómeros da tiazolidina **3.6**.

A mistura de diastereoisómeros foi refluxada em tolueno durante 24 h, num procedimento que se revelou diastereoselectivo e permitiu a síntese da  $\gamma$ -lactama bicíclica **3.23** com 83% de rendimento (Esquema 3.5). Este resultado é concordante com a informação disponível na literatura,<sup>29,30</sup> que descreve que a *N*-acilação de uma mistura diastereoisomérica de tiazolidinas mono-substituídas na posição 2 permite a síntese diastereosseletiva dos respetivos produtos *trans* ou *cis*. Dependendo das condições reacionais utilizadas, a reação poderá ocorrer mediante controlo termodinâmico ou controlo cinético. Neste processo verifica-se uma inversão de configuração seletiva do C2 da tiazolidina, por um mecanismo de abertura e fecho do anel através de um intermediário do tipo base de Schiff e uma vez consumado o passo de *N*-acilação, o processo de epimerização deixa de poder ocorrer, permitindo a obtenção de diastereoisómeros puros. Um exemplo ilustrativo deste tipo de reatividade foi apresentado por Györgydeák e seus colaboradores, ao demonstrar que a acilação de uma mistura de diastereoisómeros (2*R*,4*R*) e (2*S*,4*R*) do ácido 2-fenil-1,3-tiazolidina-4-carboxílico **3.31** com anidrido acético em piridina à temperatura ambiente permite obter o isómero *trans* **3.32a** de forma seletiva, enquanto a mesma reação ocorrendo numa mistura de anidrido acético e água a 100 °C conduz à formação exclusiva do isómero *cis* **3.32b** (esquema 3.8).<sup>29</sup>



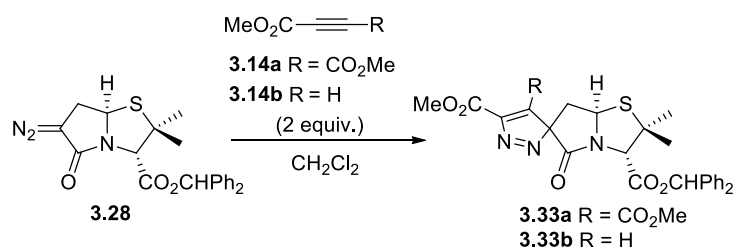
**Esquema 3.8** – *N*-acilação diastérosselectiva de ácidos 2-fenil-1,3-tiazolidina-4-carboxílicos.

No passo seguinte da reação procedeu-se à desproteção da amina pela remoção do grupo *N*-Boc através da utilização de ácido *p*-toluenosulfónico em acetonitrilo, seguindo um procedimento da literatura.<sup>31</sup> Esta abordagem de desproteção da amina revelou-se altamente eficiente na medida em que permitiu a obtenção da  $\gamma$ -lactama **3.24** de forma quantitativa. De seguida, a  $\gamma$ -lactama **3.24** foi tratada com difenildiazometano (**3.25**) obtendo-se o seu análogo esterificado **3.26** com um rendimento elevado (90%). A amino- $\gamma$ -lactama **3.27** foi depois obtida quantitativamente pelo tratamento da  $\gamma$ -lactama tosilada **3.26** com uma solução aquosa de NaHCO<sub>3</sub>. Finalmente, a diazo- $\gamma$ -lactama bicíclica **3.28** foi sintetizada com um rendimento de 97% a partir do tratamento da amino- $\gamma$ -lactama **3.27**, previamente dissolvida num sistema bifásico CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, com nitrito de sódio na presença de HClO<sub>4</sub>, num procedimento idêntico ao apresentado por Sheehan e Commons para moléculas  $\beta$ -lactâmicas (Esquema 3.5).<sup>32</sup>

Uma vez sintetizada, a reatividade da diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** como dipolo em reações de cicloadição 1,3-dipolar utilizando diferentes alquinos deficientes em electrões **3.14a** e **3.14b** como dipolarófilos, foi explorada como via para a obtenção das espiro- $\gamma$ -lactamas **3.33** análogas da molécula BSS-593 (Tabela 3.1). Numa primeira abordagem foi reproduzido o procedimento apresentado na literatura para a síntese de espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactamas via cicloadição 1,3-dipolar entre um 6-diazopenicilanato e alquinos deficientes em electrões.<sup>4</sup> Assim a diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** reagiu com o acetilenodicarboxilato de dimetilo (**3.14a**) durante 4 h a 45 °C, sendo obtida a  $\gamma$ -lactama espirocíclica **3.33a** com 30% de rendimento (entrada 1). Não se verificaram alterações significantes no rendimento da reação quando esta foi feita à temperatura ambiente independente da duração da mesma (entrada 2 e 3). No entanto, foi verificado um aumento significativo de rendimento da reação (72%) quando a temperatura de reação foi diminuída para 0 °C (entrada 4). Estas condições otimizadas foram então aplicadas à síntese da espiro- $\gamma$ -lactama **3.33b**, sendo esta molécula obtida de forma regioselectiva e

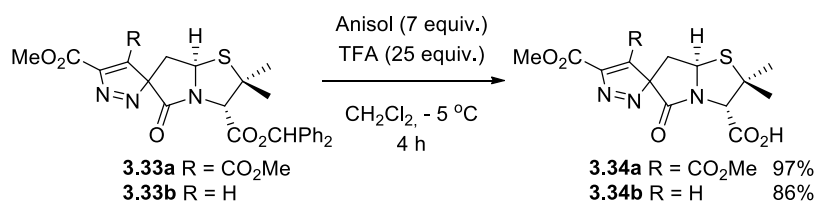
com um rendimento de 28% pela cicloadição 1,3-dipolar entre a diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** e o propiolato de metilo.

**Tabela 3.1** – Cicloadição 1,3-dipolar entre a diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** e alquinos deficientes em electrões.



Entrada	Dipolarófilo	Condições de reação	Rendimento (%)
1	<b>3.14a</b> (R = CO <sub>2</sub> Me)	45 °C, 4 h	30
2	<b>3.14a</b> (R = CO <sub>2</sub> Me)	t.a., 4 h	31
3	<b>3.14a</b> (R = CO <sub>2</sub> Me)	t.a., 1 h	34
4	<b>3.14a</b> (R = CO <sub>2</sub> Me)	0 °C, 4 h	72
5	<b>3.14b</b> (R = H)	0 °C, 4 h	28

Numa segunda abordagem sintética procedeu-se à desproteção do ácido carboxílico das moléculas **3.33a** e **3.33b** recorrendo ao mesmo procedimento utilizado no último passo de síntese da molécula BSS-593 (Esquema 3.9).<sup>12</sup> Como anteriormente descrito, esta estratégia sintética baseia-se no tratamento das espiro- $\gamma$ -lactamas contendo um éster benzidrilo com TFA e anisol a - 5 °C durante 4 h. À imagem do previamente demonstrado para as espiro- $\beta$ -lactamas<sup>12</sup> (Esquema 3.4), esta reação provou ser eficientemente aplicável também à desproteção de espiro- $\gamma$ -lactamas substituídas com um éster benzidrilo permitindo a síntese das  $\gamma$ -lactamas espirocíclicas **3.34a** e **3.34b** com rendimentos elevados (97% e 86%, respetivamente).

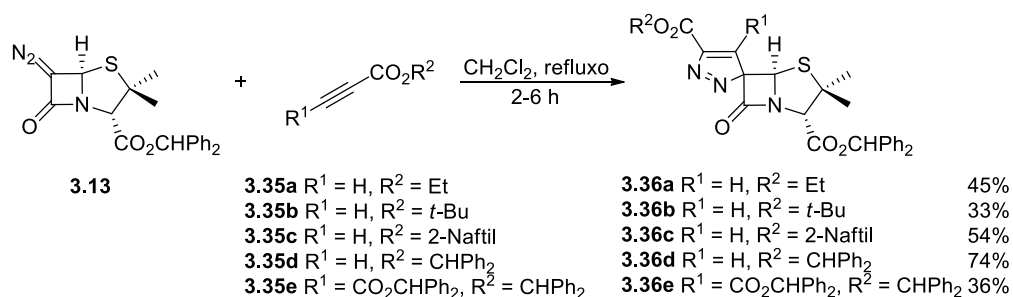


**Esquema 3.9** – Desproteção do éster benzidrilo das espiro- $\gamma$ -lactamas **3.33** com formação dos correspondentes ácidos carboxílicos **3.34**.

### 3.2.2. Síntese de novas espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas análogas da espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593

#### 3.2.2.1. Modelação do grupo éster metílico na posição 5' do anel pirazole

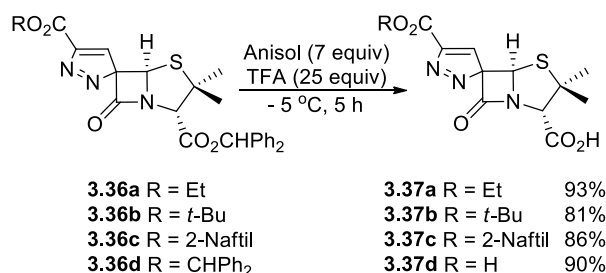
A espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593 contém um éster metílico na posição 5 do anel pirazole. Como demonstrado anteriormente, a presença de um éster metílico adicional na posição 4 do mesmo anel, leva a um decréscimo de atividade (secção 2.2 do Capítulo 2). Assim o *design* de novos análogos espiro-3*H*-pirazole-β-lactâmicos da molécula BSS-593, teve como principais objetivos a modelação estrutural do éster metílico substituinte do anel 3*H*-pirazole e o aumento do conteúdo de grupos aromáticos. De forma a alcançar estes pressupostos estruturais, recorreu-se à cicloadição 1,3-dipolar entre o 6-diazopenicilanato **3.13** e alquinos **3.35** (Esquema 3.10), seguindo a abordagem sintética previamente descrita pelo grupo de Pinho e Melo para a síntese de espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas.<sup>4</sup> Obtiveram-se assim quatro novas 3*H*-pirazole-β-lactamas espirocíclicas **3.36**, contendo diferentes ésteres na posição 5' do anel 3*H*-pirazole, nomeadamente um éster etílico, 2-naftílico, *t*-butílico e éster benzidrilo. A reação entre o 6-diazopenicilanato **3.13** e o 2-butinodioato de dibenzidrilo **3.35e** permitiu a síntese do espiro-3*H*-pirazole-β-lactama **3.36e** contendo dois grupos éster benzidrilo no anel 3*H*-pirazole. Os produtos espirocíclicos foram obtidos em rendimentos moderados que variaram entre os 33% e os 74%.



**Esquema 3.10** – Síntese de novas espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas.

As espiro-β-lactamas **3.36a-d** foram posteriormente convertidas ao seu respetivo penicilanato ácido **3.37**, através da remoção dos grupos éster benzidrilo (Esquema 3.11). Este procedimento de desproteção do ácido carboxílico foi feito recorrendo ao tratamento das espiro-β-lactamas com anisol e TFA em diclorometano anidro a -5 °C, numa reação com a duração de 5 h. Este procedimento permitiu a síntese dos novos ácidos espiro-3*H*-pirazole-penicilânicos **3.37** de forma eficiente com rendimentos a variar entre os 81% e

os 93%. De notar a dupla desproteção no caso do composto **3.36d** o que permitiu a síntese do análogo **3.37d** da molécula BSS-593 contendo dois ácidos carboxílicos na sua estrutura molecular.



**Esquema 3.11** – Remoção do grupo benzidrilo das espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas **3.36** para a obtenção dos seus análogos ácidos.

O espectro NOESY do composto **3.37c** apresenta picos cruzados entre o protão H-4' ( $\delta = 7.25$  ppm) e o protão H-5 ( $\delta = 6.65$  ppm), corroborando a seletividade observada na cicloadição 1,3-dipolar entre o 6-diazopenicilinato **3.13** e os propiolatos (Figura 30 do Anexo 1). Este resultado é concordante com o anteriormente observado para este tipo de reações,<sup>4</sup> não só em relação à regiosselectividade observada, mas também no que diz respeito à diastereoselectividade que resulta da aproximação do dipolarófilo pela face  $\alpha$ , com menor impedimento estéreo, do 6-diazopenicilinato.

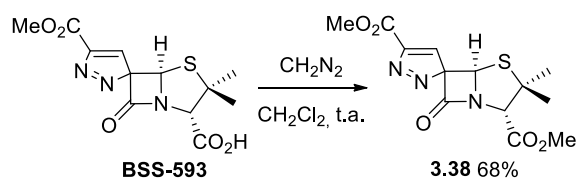
### 3.2.2.2. Modelação do grupo ácido carboxílico na posição 3 da tiazolidina do *core* penicilinato.

Como exposto e discutido anteriormente, o ácido carboxílico ligado ao resíduo de tiazolidina do *core* estrutural das penicilinas, aparenta desempenhar um papel crucial para o mecanismo de ação antibiótica desta classe de moléculas. O ácido carboxílico, quando protonado no centro catalítico da PBP, funciona como um catalisador da abertura do anel 2-azetidina por estabelecer uma ponte de hidrogénio com o azoto da ligação amida, o que torna esta última ligação mais frágil promovendo assim o mecanismo de acilação do centro ativo da enzima.<sup>33</sup>

No caso de a atividade anti-HIV da molécula BSS-593 ser dependente do carácter acilante da molécula, é de esperar que uma alteração ou remoção do grupo ionizável se possa refletir numa alteração ou mesmo inibição da sua atividade biológica. Assim de modo a aferir a importância da presença do ácido carboxílico vicinal ao anel 2-azetidina no mecanismo putativo de ação da molécula BSS-593, este grupo funcional foi alvo de

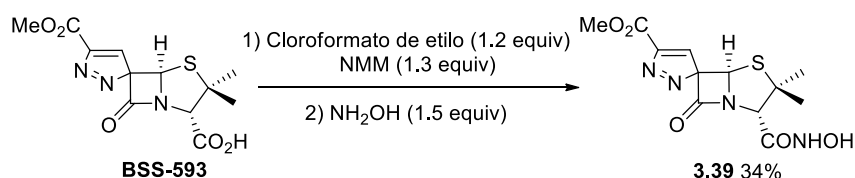
duas derivatizações nomeadamente a sua conversão num éster metílico e num ácido hidroxâmico (Esquema 3.12 e 3.13, respetivamente). Em termos sintéticos, ambas as estratégias utilizaram a molécula BSS-593 como reagente inicial, sendo esta preparada de acordo com a literatura.<sup>12</sup>

A primeira derivatização estrutural visou desprovir o grupo funcional do seu carácter ionizável, com as mínimas alterações possíveis no volume da molécula, contrariamente ao que ocorre aquando de uma esterificação com um éster volumoso como o éster benzidrilo (vide molécula BSS-452, secção 2.2 do Capítulo 2). Com este propósito, a estratégia sintética consistiu na esterificação do ácido carboxílico a um éster metílico, a partir do tratamento da molécula BSS-593 com um excesso de uma solução de diazometano em éter (Esquema 3.12). Após o consumo completo do reagente inicial e purga do excesso de diazometano, a espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama diéster **3.38** foi purificada por coluna de cromatografia sendo obtido com um rendimento de 68%.



**Esquema 3.12** – Esterificação da espiro- $\beta$ -lactama BSS-593 com diazometano.

A segunda derivatização estrutural visou substituir o ácido carboxílico por outro grupo ionizável, nomeadamente um ácido hidroxâmico, seguindo um protocolo existente na literatura.<sup>34</sup> A síntese deste derivado compreendeu um passo inicial de ativação do ácido carboxílico da molécula BSS-593 por via da formação de um anidrido, numa reação com cloroformato de etilo, seguido da hidroxiamidação direta do anidrido com hidroxilamina (Esquema 3.13). Esta abordagem sintética permitiu que a espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama **3.39** contendo um ácido hidroxâmico na posição 3 da tiazolidina fosse obtido com um rendimento moderado (34%).



**Esquema 3.13** – Conversão da espiro- $\beta$ -lactama BSS-593 ao respetivo ácido hidroxâmico **3.39**.

### 3.3. Citotoxicidade e atividade anti-HIV

As novas lactamas espirocíclicas sintetizadas pela modelação estrutural da molécula BSS-593, ativa contra o HIV-1, foram avaliadas para a sua citotoxicidade *in vitro* (CC<sub>50</sub>) em células TZM-bl, antes de se determinar a sua potencial atividade antiviral. De entre as doze moléculas testadas, nenhuma mostrou ser significativamente citotóxica, apresentando valores de CC<sub>50</sub> que variam entre 33.55  $\mu$ M (espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama **3.36e**) e 108.60  $\mu$ M (espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactama **3.34b**) (Tabela 3.2). Estes resultados estão de acordo com dados de citotoxicidade respeitantes aos estudos anteriormente apresentados no capítulo 2. Os dois estudos em conjunto, demonstram que a classe das spiro-3*H*-pirazole-lactamas apresenta baixa citotoxicidade *in vitro*, uma característica altamente relevante no desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico.

Quanto à atividade antiviral, esta foi avaliada por um ensaio preliminar em que foi determinada a PMI de todos os compostos contra o vírus do HIV-1 (estirpe SG3.1 de tropismo X4, a mesma para a qual a molécula *lead* BSS-593 se mostrou altamente ativa) a uma concentração fixa de 10  $\mu$ g/mL, num ensaio feito em células TZM-bl. Este tipo de ensaio pressupõe que uma PMI superior a 50% é indicadora de que o composto possui atividade antiviral.



**Tabela 3.2** – Citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) em células TZM-bl e atividade antiviral (PMI) contra HIV-1 (SG3.1, tropismo X4) do conjunto de espiro-lactamas derivadas da molécula *lead* BSS-593.

Composto	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PMI (10 $\mu$ g/mL) (%) <sup>a)</sup>
<b>3.33a</b>	30.34	18
<b>3.34a</b>	52.34	30
<b>3.34b</b>	108.60	27
<b>3.36a</b>	46.85	0
<b>3.36b</b>	55.14	0
<b>3.36c</b>	49.10	0
<b>3.36d</b>	54.39	0
<b>3.36e</b>	33.55	0
<b>3.37a</b>	83.81	0
<b>3.37b</b>	79.00	0
<b>3.37c</b>	68.60	0
<b>3.37d</b>	101.38	0
<b>3.38</b>	89.75	0
<b>3.39</b>	76.79	0

<sup>a)</sup> HIV-1, estirpe SG3.1, tropismo X4

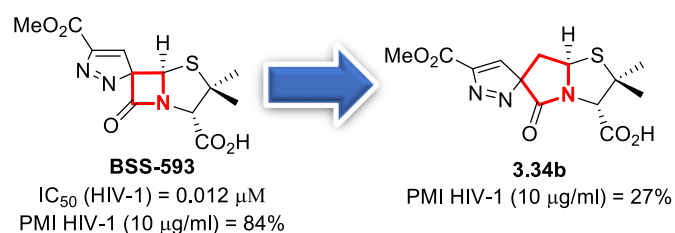
No entanto, nenhum dos compostos testados se provou ativo contra o HIV-1, na medida em que nenhum mostrou uma PMI relevante (> 50%). De facto, apesar de serem valores consideravelmente baixos e não representativos de atividade biológica, apenas as espiro- $\gamma$ -lactamas apresentaram alguma capacidade de inibição da replicação viral, sendo que o maior valor de PMI foi de 30%, apresentado pela espiro- $\gamma$ -lactama **3.34a**. Todas as espiro- $\beta$ -lactamas apresentaram valores de PMI nulos. No entanto, apesar de nenhuma das moléculas ter revelado atividade contra o vírus do HIV-1, estes resultados mostraram-se bastante valiosos do ponto de vista de interpretação do mecanismo e relação estrutura-atividade da molécula *lead* BSS-593.

## 3.4. Relação estrutura-atividade

### 3.4.1. Importância do anel $\beta$ -lactama

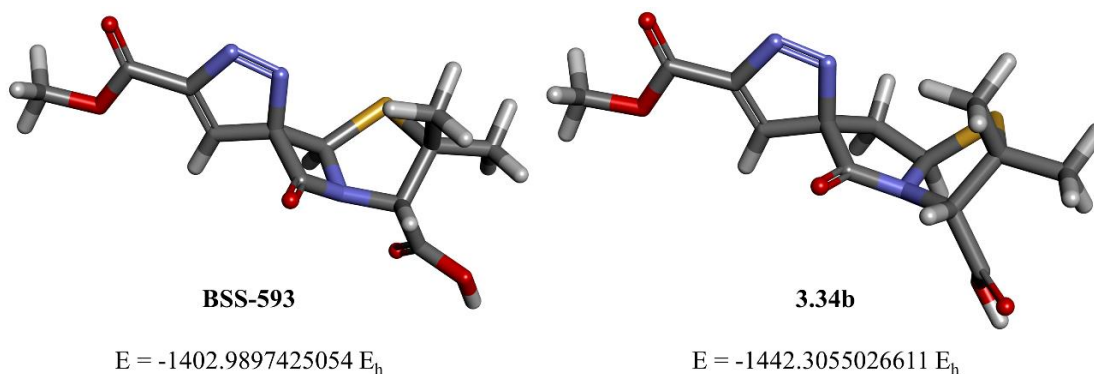
Como anteriormente referido, um anel  $\gamma$ -lactama incluído num sistema espirocíclico permite uma maior liberdade conformacional em comparação com o anel análogo de 4 membros. Assim não é de menosprezar que este facto se possa refletir de forma relevante na estabilidade ou na conformação e disposição das características farmacológicas da espiro- $\gamma$ -lactama **3.34b** em relação à espiro- $\beta$ -lactama BSS-593, o que

seria potencialmente justificativo da diferença de atividades observada entre as duas moléculas (Figura 3.5). Desta forma, foram realizados cálculos ao nível de teoria DFT (*Density Functional Theory*), utilizando o funcional híbrido B3LYP<sup>35-37</sup> e a base de funções 6-31G(d), para determinar a geometria otimizada das espiro-lactamas BSS-593 e **3.34b**. Foram também efetuados estudos de sobreposição estrutural das conformações de energia mínima e respetivo mapeamento de características de farmacóforo.



**Figura 3.5** – Expansão do tamanho do anel de lactama e seu efeito na atividade anti-HIV-1.

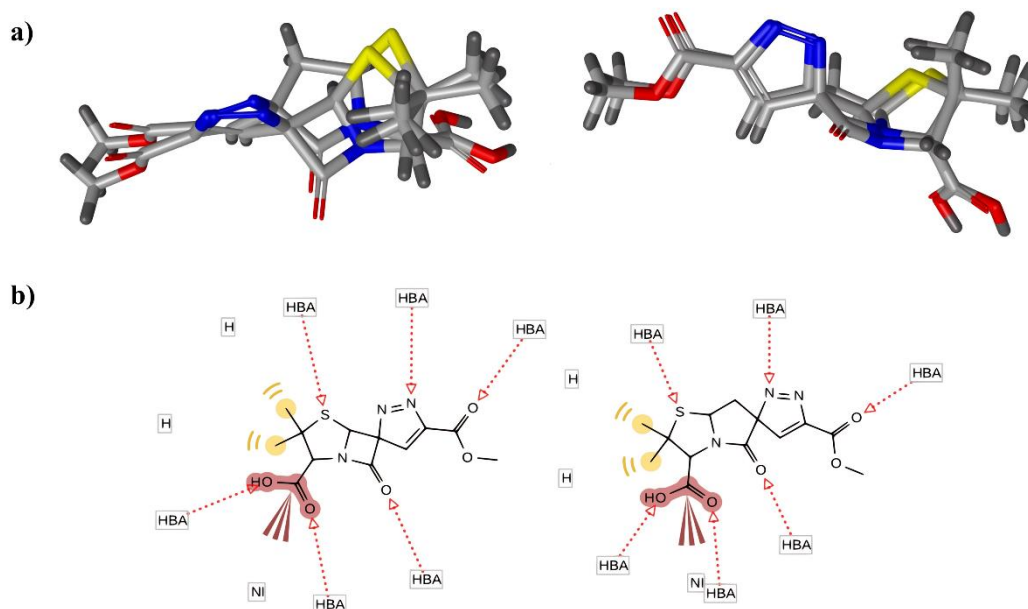
Os estudos de otimização conformacional mostram que ambas as lactamas espirocíclicas apresentam energias mínimas similares, independentemente da dimensão do anel lactâmico. A conformação de ambas as espiro-lactamas é também semelhante, sendo que em ambas o seu núcleo lactâmico bicíclico assume uma conformação em borboleta (Figura 3.6).



**Figura 3.6** – Geometrias otimizadas da espiro- $\beta$ -lactama *lead* BSS-593 e da sua espiro- $\gamma$ -lactama análoga **3.34b**.

Foram obtidos resultados similares nos estudos de sobreposição e mapeamento farmacofórico. De facto, esta abordagem permitiu uma visualização gráfica que demonstra de forma elucidativa que as características farmacofóricas de ambas as lactamas espirocíclicas são sobreponíveis de forma quase perfeita (Figura 3.7). Este resultado mostra que, apesar da pequena diferença estrutural a nível da dimensão do *core*

lactâmico, a espiro- $\gamma$ -lactama **3.34b** consegue assumir a mesma disposição tridimensional das características farmacofóricas que a espiro- $\gamma$ -lactama bioativa BSS-593 e, como tal, deve ser capaz também de reproduzir as mesmas interações com o seu alvo putativo.



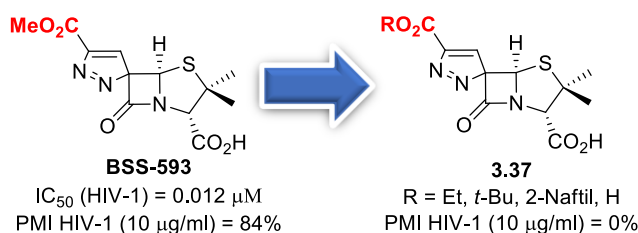
**Figura 3.7** – a) Representação da sobreposição das respetivas conformações de energia mínima entre a espiro- $\beta$ -lactama bioativa BSS-593 e a sua espiro- $\gamma$ -lactama análoga **3.34b**. b) Representação gráfica das características farmacofóricas comuns entre espiro- $\beta$ -lactama bioativa BSS-593 e a sua espiro- $\gamma$ -lactama análoga **3.34b**. As características representadas são átomos aceitadores de Hidrogénio (HBA), resíduos hidrofóbicos (H) e grupos aniónicos (NI).

No entanto, e apesar das similaridades conformacionais e farmacofóricas apresentadas e discutidas nos parágrafos anteriores, a espiro- $\gamma$ -lactama **3.34b** não apresenta atividade relevante contra o vírus do HIV-1 ao contrário da molécula *lead* BSS-593. Este resultado é revelador da importância inequívoca do anel  $\beta$ -lactama para a atividade antiviral da espirolactama BSS-593, anel este associado a uma maior tensão e por isso também mais reativo comparativamente ao seu análogo  $\gamma$ -lactâmico. Com base em todos estes resultados, a discrepância de atividades verificada entre a espiro- $\beta$ -lactama BSS-593 e o seu análogo  $\gamma$ -lactâmico **3.34b**, parece indicar a possibilidade de que a molécula BSS-593 possa exercer a sua atividade biológica por via de um mecanismo dependente de acilação de um alvo biológico putativo, à imagem do que acontece ao nível do mecanismo de atividade antibacteriana convencional das penicilinas.

### 3.4.2. Importância do grupo éster metílico existente na posição 5' do anel pirazole

A molécula *lead* BSS-593, bioativa contra o HIV-1, apresenta um éster metílico na posição 5' do anel espiro-3*H*-pirazole. Este grupo funcional constitui uma característica farmacofórica e foi também alvo de modelações estruturais, o que se traduziu na síntese de nove espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas. As respetivas alterações estruturais consistiram em aumentar o volume do grupo éster, para um éster etílico, *t*-butilíco e 2-naftilíco, ou substituir o éster metilo por um ácido carboxílico livre. Nenhuma destas novas espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas revelou atividade antiviral.

No caso das novas moléculas contendo um éster no anel pirazole (Figura 3.8), a falta de atividade biológica observada pode ser relacionada com o aumento do volume do éster naquela posição em comparação com o éster metílico presente na espiro-β-lactama *lead* BSS-593. Esta alteração estrutural leva a um aumento do impedimento estérico em torno do anel 3*H*-pirazole, o que é passível de impedir por completo uma interação eficiente entre a β-lactama espirocíclica e o seu potencial alvo, justificando-se desta forma o facto de nenhuma das moléculas **3.37a-c** apresentar atividade contra o HIV ao contrário da molécula BSS-593.

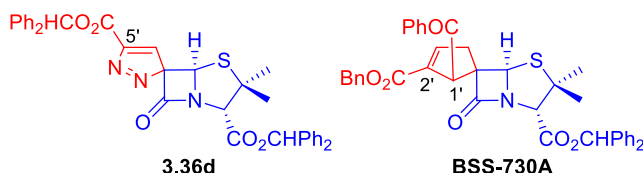


**Figura 3.8** – Efeito da modelação do éster metílico na atividade dos derivados ácidos da espiro-3*H*-pirazole-β-lactama BSS-593.

Quanto ao caso da molécula **3.37d**, em que, comparativamente à molécula *lead*, se procedeu à substituição do éster metílico na posição 5' do pirazole por um ácido carboxílico livre, a sua falta de atividade carece de uma interpretação mais abrangente. É plausível que a falta de atividade apresentada pela espiro-3*H*-pirazole-β-lactama **3.37d** em comparação com a molécula *lead* BSS-593, possa dever-se exclusivamente à ausência do éster metílico por este representar uma interação hidrofóbica crítica na interação entre a espiro-β-lactama BSS-593 e o seu alvo biológico. Por outro lado, o novo grupo carboxílico na posição 5' da lactama **3.37d**, por força do seu carácter iónico, poder ser

alvo de repulsões eletrónicas nas imediações do sítio de ligação ao seu alvo putativo, num evento electrostático que seria impeditivo ao estabelecimento de uma interação ligando-alvo capaz de despoletar uma resposta biológica. Por fim, há que ter também em atenção que o facto de a molécula **3.37d** apresentar dois ácidos carboxílicos na sua estrutura pode comprometer a sua capacidade de atravessar barreiras biológicas devido à sua considerável carga formal a pH fisiológico. Esta hipótese poderia resultar numa inacessibilidade por parte da espiro- $\beta$ -lactama diácida a um alvo molecular putativo de localização intracelular, o que justificaria a sua falta de atividade anti-HIV-1. Não obstante o facto de nenhuma das moléculas ter apresentado qualquer atividade antiviral, estes resultados enfatizam a importância crítica da presença de um grupo éster metílico na posição 5' do 3*H*-pirazole para a atividade anti-HIV-1 da molécula *lead* BSS-593.

Por fim, a síntese de espiropirazole- $\beta$ -lactamas **3.36d,e**, contendo respetivamente um e dois grupos éster benzidrilo no seu anel 3*H*-pirazole, constituiu uma estratégia sintética que visava dotar a estrutura das moléculas com mais anéis aromáticos, características estas que estão presentes no anel espirociclopenteno da  $\beta$ -lactama altamente promissora BSS-730A. Esta abordagem acabou por provar-se completamente infrutífera na medida estas duas moléculas não mostraram qualquer atividade contra o HIV-1. A espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama **3.36d** e a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, partilham a mesma subestrutura derivada da penicilina e o mesmo número total de anéis aromáticos no anel espiro. No entanto, apesar de ambos terem anéis de 5 membros fundidos ao anel 2-azetidionona, estes anéis são estruturalmente muito diferentes na sua natureza (3*H*-pirazole vs. ciclopenteno). Para além desta factual diferença, existe também uma divergência na posição e consequente orientação das características farmacofóricas entre ambas as moléculas (Figura 3.9). No caso da espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama esta apresenta o éster benzidrilo orientado para o lado  $\alpha$  da  $\beta$ -lactama estando este substituinte localizado numa posição distal do anel 3*H*-pirazole (posição 5'), relativamente ao plano estabelecido pelo anel 2-azetidionona. Este posicionamento é diferente do verificado para os substituintes existentes no anel ciclopenteno da molécula BSS-730A, em que o grupo benzoílo e o éster benzilo se encontram orientados e posicionados do lado  $\beta$  do plano da  $\beta$ -lactama (posição 1' e 2').



**Figura 3.9** – Representação das estruturas das espiro- $\beta$ -lactamas **3.36d** e BSS-730A, com ênfase na respetiva subestrutura comum (azul) e nas diferenças nos anéis espirocíclicos (vermelho).

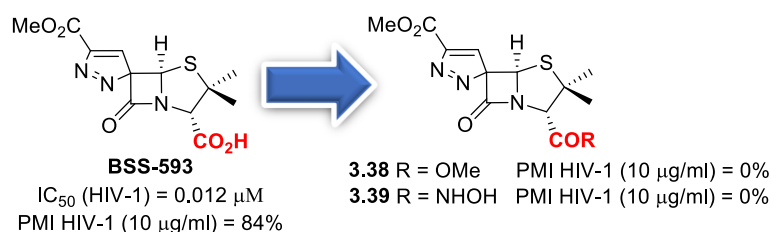
### 3.4.3. Importância do ácido carboxílico na posição 3 da tiazolidina.

A importância da presença de um grupo ácido carboxílico vicinal ao anel 2-azetidínona da espiro- $\beta$ -lactama bioativa BSS-593 foi também avaliada. Com este propósito procedeu-se a duas derivatizações deste grupo funcional, nomeadamente a sua conversão ao éster metílico e a sua conversão a um ácido hidroxâmico. Ambas estas derivatizações estruturais foram feitas de forma direta a partir da molécula BSS-593, cuja síntese se encontra descrita na literatura e foi anteriormente discutida.

Era conhecido que a esterificação da molécula BSS-593 com formação do correspondente éster benzidrilo levava à perda de bioatividade contra o vírus do HIV-1 (secção 2.2 do Capítulo 2). Os presentes resultados de bioatividade demonstram que o mesmo comportamento de inatividade biológica é transversal a todos os derivados espiro- $\beta$ -lactâmicos **3.36** contendo um éster benzidrilo na posição 3 do anel de tiazolidina.

No entanto o éster benzidrilo é um éster consideravelmente volumoso. Como tal, não pode ser subestimada a hipótese de que a inatividade das moléculas possa dever-se exclusivamente a efeitos de impedimento estérico associado ao volume do éster que prejudiquem uma interação eficaz entre a molécula e o seu alvo putativo, e não necessariamente devido à ausência do grupo ionizável. Assim, para estabelecer de forma inequívoca se a esterificação do grupo ácido carboxílico leva a uma perda de atividade da molécula, procedeu-se à conversão deste grupo funcional a um éster metílico (e.g. molécula **3.38**). A presença do éster metílico inviabiliza a ionização da molécula, mas também permite minimizar ao máximo o potencial efeito de impedimento estérico em comparação com outros ésteres, na medida em que o éster metílico é o éster menos volumoso de toda a classe. De modo a estudar se o grupo ácido carboxílico da  $\beta$ -lactama espirocíclica BSS-593 é passível de ser substituído por um outro grupo ionizável sem afetar a atividade da molécula, o mesmo grupo foi convertido num grupo ácido

hidroxâmico (e.g. molécula **3.39**). Ambas as estratégias de derivatização do ácido carboxílico da molécula ativa BSS-593, resultaram em derivados inativos (Figura 3.10), indicando que a presença e carácter ionizável do ácido carboxílico são vitais para atividade anti-HIV-1 da molécula.



**Figura 3.10** – Efeito da modelação do ácido carboxílico na atividade dos derivados da espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593.

No seguimento do resultado anteriormente discutido relativo à modelação do anel  $\beta$ -lactâmico, também os presentes resultados de derivatização do grupo ionizável vicinal ao anel 2-azetidínica, abonam a favor da hipótese apresentada de a espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama BSS-593 exercer a sua atividade antiviral por um mecanismo dependente de acilação.

### 3.5. Conclusão

No presente capítulo foram apresentadas diversas modelações estruturais em torno de uma espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama *lead* com elevada atividade contra HIV-1. Estas modelações compreenderam a modelação estrutural do anel  $\beta$ -lactama assim como dos grupos funcionais éster metílico e ácido carboxílico presentes na molécula BSS-593. No âmbito destas modelações estruturais foram sintetizados análogos espiro- $\gamma$ -lactâmicos da molécula bioativa BSS-593, numa abordagem que requereu a síntese *de novo* de todo o *core*  $\gamma$ -lactâmico bíciclico. Esta síntese foi feita por via de uma estratégia sintética sem precedente que utilizou o aminoácido natural D-penicilamina (**3.20**) como precursor na síntese de uma 6-diazo- $\gamma$ -lactama, molécula esta que posteriormente serviu de dipolo numa cicloadição 1,3-dipolar com propiolato de metilo e acetileno dicarboxilato de dimetilo. Por sua vez, a modelação estrutural do éster metílico da posição 5' do anel pirazole fundido com o anel 2-azetidínica foi feita com recurso também a uma reacção de cicloadição 1,3-dipolar, desta vez entre um 6-diazopenicilinato e diferentes alquinos deficientes em electrões contendo diferentes ésteres na sua estrutura, nomeadamente um estér etílico, *t*-butílico, 2-naftílico ou benzidrílico. A desproteção seletiva de ésteres

benzidriolo permitiu ainda a obtenção dos derivados lactâmicos na sua forma ácida com bons rendimentos. Por fim, as modelações estruturais focadas no ácido carboxílico da posição 3 da tiazolidina do núcleo penicilânico englobaram a sua conversão a um éster metílico e a um ácido hidroxâmico

Nenhuma das moléculas mostrou ser citotóxica em células TZM-bl, um resultado demonstrativo do perfil de segurança associado à classe das espiro-3*H*-pirazole-lactamas como potenciais agentes terapêuticos.

Em relação aos estudos de atividade anti-HIV-1, não obstante o facto de nenhuma das moléculas ter mostrado atividade significativa, os resultados foram altamente relevantes do ponto de vista da recolha de informações relativas à estrutura-atividade da molécula BSS-593 assim como da interpretação do seu mecanismo de ação. Os resultados demonstram que a presença de um éster metílico na posição 5' do anel pirazole é crucial para a atividade anti-HIV-1 observada da espiro-3*H*-pirazole-lactama BSS-593. Por fim, a presença do anel  $\beta$ -lactâmico e de um ácido carboxílico vicinal a este, nomeadamente na posição 3 da tiazolidina do núcleo penicilânico, mostraram-se também indispensáveis à atividade antiviral da molécula BSS-593. Estes últimos resultados suportam a hipótese de que esta molécula possa atuar por via de um mecanismo de acilação de um potencial alvo biológico.



### 3.6. Bibliografia

1. Sheehan, J. C.; Chacko, E.; Lo, Y. S.; Ponzi, D. R.; Sato, E. Some new spiro penicillins. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (25), 4856-4859.
2. Campbell, M. M.; G. Marcus, R.; Ray, S. J. Reactions of 6-diazopenams and 7-diazocephems: spirocyclopropyl and spiropyrazolinyl  $\beta$ -lactams. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (16), 1441-1444.
3. Sandanayaka, V. P.; Prashad, A. S.; Yang, Y.; Williamson, R. T.; Lin, Y. I.; Mansour, T. S. Spirocyclopropyl  $\beta$ -lactams as mechanism-based inhibitors of serine  $\beta$ -lactamases. Synthesis by Rhodium-catalyzed cyclopropanation of 6-diazopenicillanate sulfone. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (13), 2569-2571.
4. Santos, B. S.; Nunes, S. C. C.; Pais, A. A. C. C.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Chiral spiro- $\beta$ -lactams from 6-diazopenicillanates. *Tetrahedron* **2012**, *68* (19), 3729-3737.
5. Crowfoot, D.; Bunn, C. W.; Rogers-Low, B. W.; Turner-Jones, A. Chemistry of Penicillin. In *XI. The X-Ray Crystallographic Investigation of the Structure of Penicillin*, Princeton University Press: 1949; 310-366.
6. Saouane, S.; Buth, G.; Fabbiani, F. P. A. Crystal structure and packing energy calculations of (+)-6-aminopenicillanic acid. *Acta Crystallogr. C Struct. Chem.* **2013**, *69*, 1238-1242.
7. Santos, B. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Synthesis of chiral spirocyclopentenyl- $\beta$ -lactams through phosphane-catalyzed [3+2] annulation of allenates with 6-alkylidenepenicillanates. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (18), 3901-3909.
8. Santos, B. S.; Gomes, C. S. B.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Synthesis of chiral spiropyrazoline- $\beta$ -lactams and spirocyclopropyl- $\beta$ -lactams from 6-alkylidenepenicillanates. *Tetrahedron* **2014**, *70* (24), 3812-3821.
9. Pinho e Melo, T. M. V. D.; Taveira, N.; Prudêncio, M.; Santos, B.; S.; Bártolo, I. Novel spiro-lactams, process and uses thereof. WO/2018/207165, **2017**.
10. Alves, A. J. S.; Alves, N. G.; Caratao, C. C.; Esteves, M. I. M.; Fontinha, D.; Bartolo, I.; Soares, M. I. L.; Lopes, S. M. M.; Prudencio, M.; Taveira, N.; Pinho e Melo, T. M. V. Spiro-Lactams as novel antimicrobial agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2020**, *20* (2), 140-152.
11. Alves, A. J. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D. Synthesis of novel chiral spiroisoxazolidine-beta-lactams from 6-alkylidenepenicillanates: A 1,3-dipolar cycloaddition approach. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (39), 6259-6269.

12. Bártolo, I.; Santos, B. S.; Fontinha, D.; Machado, M.; Francisco, D.; Sepodes, B.; Rocha, J.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Figueira, M. E.; Barroso, H.; Nascimento, T.; Alves de Matos, A. P.; Alves, A. J. S.; Alves, N. G.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Taveira, N. Spiro-β-lactam BSS-730A displays potent activity against HIV and Plasmodium. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (2), 421–434.
13. UNAIDS. *Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet*; UNAIDS: Geneve, 2020.
14. Hemelaar, J.; Elangovan, R.; Yun, J.; Dickson-Tetteh, L.; Fleminger, I.; Kirtley, S.; Williams, B.; Gouws-Williams, E.; Ghys, P. D. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990-2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious diseases* **2019**, *19* (2), 143-155.
15. UNAIDS. *Understanding fast-track; accelerating action to end the AIDS epidemic by 2030.*; Geneva, 2015.
16. Solomon, D. A.; Sax, P. E. Current state and limitations of daily oral therapy for treatment. *Curr. Opin. HIV AIDS* **2015**, *10* (4), 219-25.
17. Chen, T. K.; Aldrovandi, G. M. Review of HIV antiretroviral drug resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2008**, *27* (8), 749-52.
18. Sauvage, E.; Terrak, M. Glycosyltransferases and transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable targets for new antibacterials. *Antibiotics-Basel* **2016**, *5* (1), 12.
19. Schwartzberg, L. S.; Modiano, M. R.; Rapoport, B. L.; Chasen, M. R.; Gridelli, C.; Urban, L.; Poma, A.; Arora, S.; Navari, R. M.; Schnadig, I. D. Safety and efficacy of rolapitant for prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting after administration of moderately emetogenic chemotherapy or anthracycline and cyclophosphamide regimens in patients with cancer: a randomised, active-controlled, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2015**, *16* (9), 1071-1078.
20. Wang, Q.; Qu, Y.; Xia, Q.; Song, H.; Song, H.; Liu, Y.; Wang, Q. Synthesis of gem-difluorinated spiro-g-lactam oxindoles by visible-light-induced consecutive difluoromethylative dearomatization, hydroxylation, and oxidation. *Chemistry* **2018**, *24* (44), 11283-11287.
21. Wang, J.; Chen, F.; Liu, Y.; Liu, Y.; Li, K.; Yang, X.; Liu, S.; Zhou, X.; Yang, J. Spirostaphylotrichin X from a marine-derived fungus as an anti-influenza agent targeting RNA polymerase PB2. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81* (12), 2722-2730.

22. Mei, G.-J.; Shi, F. Catalytic asymmetric synthesis of spirooxindoles: Recent developments. *Chem. Commun.* **2018**, 54 (50), 6607-6621.
23. Yan-Tao, Y.; Jun-Fang, Z.; Guochao, L.; Hai-Jiang, X.; Bin, Y. The development of biologically important spirooxindoles as new antimicrobial agents. *Curr. Med. Chem.* **2018**, 25 (19), 2233-2244.
24. Zhou, L.-M.; Qu, R.-Y.; Yang, G.-F. An overview of spirooxindole as a promising scaffold for novel drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, 15 (5), 603-625.
25. Blanca-Lopez, N.; Jimenez-Rodriguez, T. W.; Somoza, M. L.; Gomez, E.; Al-Ahmad, M.; Perez-Sala, D.; Blanca, M. Allergic reactions to penicillins and cephalosporins: diagnosis, assessment of cross-reactivity and management. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2019**, 15 (7), 707-721.
26. FDA. Non-Penicillin beta-lactam Drugs: A CGMP framework for preventing cross-contamination. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/non-penicillin-beta-lactam-drugs-cgmp-framework-preventing-cross-contamination> (4 November, 2020).
27. Brasile, G.; Mauri, L.; Sonnino, S.; Compostella, F.; Ronchetti, F. A practical route to long-chain non-natural α,ω-diamino acids. *Amino Acids* **2013**, 44 (2), 435-441.
28. Martín-Martínez, M.; De la Figuera, N.; Latorre, M.; Herranz, R.; García-López, M. T.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río, J.; González-Muñiz, R. β-Turned dipeptoids as potent and selective CCK1 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, 43 (20), 3770-3777.
29. Szilagyi, L.; Gyorgydeak, Z. Comments on the putative stereoselectivity in cysteine-aldehyde reactions. Selective C(2) inversion and C(4) epimerization in thiazolidine-4-carboxylic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101 (2), 427-432.
30. 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. Cycloaddition reactions of 3-aryl-5-phenyl-5H,7H-thiazolo[3,4-c]oxazol-4-ium-1-olates. *Tetrahedron* **2002**, 58 (25), 5093-5102.
31. Chauvette, R. R.; Pennington, P. A.; Ryan, C. W.; Cooper, R. D. G.; Jose, F. L.; Wright, I. G.; Van Heyningen, E. M.; Huffman, G. W. Chemistry of cephalosporin antibiotics. XXI. Conversion of penicillins to cephalixin. *J. Org. Chem.* **1971**, 36 (9), 1259-1267.
32. Sheehan, J. C.; Commons, T. J. Reaction of 6(7)-diazopenicillanates and diazocephalosporanates with sulfenyl chlorides. Preparation of 6(7).α-methoxy-

substituted thiol penicillanates and thiol cephalosporanates. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (11), 2203-2208.

33. Mucsi, Z.; Chass, G. A.; Abranyi-Balogh, P.; Jojart, B.; Fang, D. C.; Ramirez-Cuesta, A. J.; Viskolcz, B.; Csizmadia, I. G. Penicillin's catalytic mechanism revealed by inelastic neutrons and quantum chemical theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (47), 20447-20455.

34. Reddy, A. S.; Kumar, M. S.; Reddy, G. R. A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (33), 6285-6288.

35. Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A Gen. Phys.* **1988**, *38* (6), 3098-3100.

36. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1988**, *37* (2), 785-789.

37. Becke, A. D. Density-Functional thermochemistry .3. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648-5652.

# Capítulo 4

## Novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*. Parte 1

### Resumo

No presente capítulo é apresentada a síntese e atividade antimicrobiana de novas espiro- $\beta$ -lactamas. Estas novas moléculas resultaram de um *design* racional baseado na modelação estrutural de uma espirociclopentenil- $\beta$ -lactama previamente identificada como apresentando uma elevada e dupla atividade antimicrobiana contra HIV e *Plasmodium*. A bioatividade *in vitro* contra o vírus do HIV-1 das novas espiro- $\beta$ -lactamas foi determinada, permitindo a recolha de informação altamente relevante quanto à relação estrutura-atividade desta classe de moléculas. Foram identificadas duas novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, de entre o grupo de novas espiro- $\beta$ -lactamas, com uma notável bioatividade nanomolar contra HIV-1. Estas duas últimas moléculas mostraram também atividade *in vitro* anti-*Plasmodium*, revelando-se bioativas contra ambos os estágios, hepático e sanguíneo, do parasita. De notar também que estas mesmas novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas bioativas representam os primeiros exemplos de  $\beta$ -

lactamas sintetizadas pela cicloadição [3+2] formal entre 6-alkilidenopenicilanos e 2-butinoatos.

Os resultados apresentados neste capítulo foram incluídos em dois artigos científicos publicados em revistas de circulação internacional com arbitragem científica:

Alves, J. S.; Alves, N. G.; Caratão, C. C.; Esteves, M. I. M.; Fontinha, D.; Bártolo, I.; Soares, M. I. L.; Lopes, S. M. M.; Prudêncio, M.; Taveira, N.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Spiro-lactams as novel antimicrobial agents, *Curr. Top. Med. Chem.* **2020**, *20* (2), 140–152.

e;

Alves, N. G.; Bártolo, I.; Alves, A. J. S.; Fontinha, D.; Francisco, D.; Lopes, S. M. M.; Soares, M. I. L.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Taveira, N.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis and Structure-Activity Relationships of New Chiral Spiro- $\beta$ -lactams Highly Active Against HIV-1 and Plasmodium, *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *219*, 113439.

## Capítulo 4 - Novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*. Parte 1

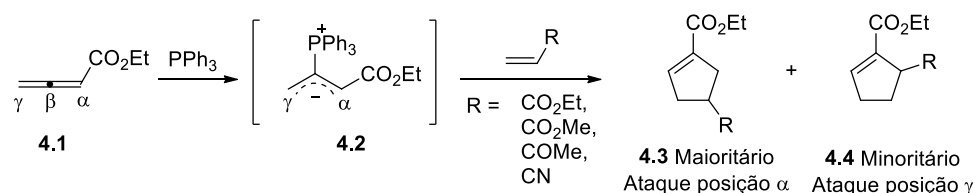
4.1. Introdução	130
4.2. Síntese e modelação estrutural	137
4.2.1. Remoção do éster benzidrilo da molécula <i>lead</i> BSS-730A	137
4.2.2. Modelação do éster benzílico do anel ciclopenteno da molécula <i>lead</i> BSS-730A	138
4.2.3. Modelação do grupo benzoílo do anel ciclopenteno da molécula <i>lead</i> BSS-730A	141
4.2.4. Modelação do sistema $\alpha,\beta$ -insaturado	141
4.2.5. Remoção do éster benzidrilo da molécula BSS-730B, isómero $\alpha$ da molécula <i>lead</i> BSS-730A	145
4.3. Bioatividade	145
4.3.1. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	145
4.3.2. Atividade anti-malária	147
4.4. Relação estrutura-atividade	149
4.4.1. Éster benzidrilo da molécula <i>lead</i> BSS-730A	149
4.4.2. Grupo éster benzílico da molécula <i>lead</i> BSS-730A	151
4.4.3. Grupo benzoílo da molécula <i>lead</i> BSS-730A	153
4.4.4. Grupo carbonilo $\alpha,\beta$ -insaturado ou aceitador de Michael	154
4.4.5. Isómeros $\alpha$ das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas	157
4.5. Conclusão	157
4.6. Bibliografia	158

## 4.1. Introdução

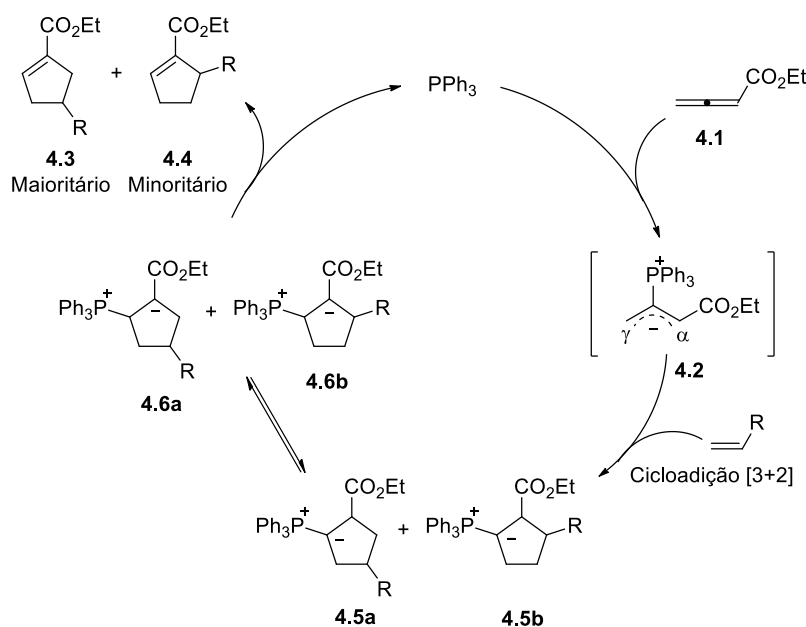
O anel insaturado ciclopenteno e seus derivados encontram-se presentes em várias moléculas bioativas, sejam elas naturais ou sintéticas.<sup>1-6</sup> Não é, portanto, de estranhar que vários esforços tenham sido direcionados para o desenvolvimento e otimização das mais diversas estratégias sintéticas para a preparação deste tipo de *scaffold*.<sup>7-14</sup> Neste contexto, a reatividade entre alenoatos com alquenos deficientes em electrões por via de uma cicloadição [3+2] formal catalisada por fosfina assume um papel de relevo.<sup>15</sup>

Cristau e seus colaboradores demonstraram pela primeira vez a utilidade de alenos como precursores de 1,3-dipolos. Nos seus estudos foi observado que na presença de fosfina a adição de nucleófilos ao aleno ocorria na ligação carbono-carbono- $\beta,\gamma$  (inversão de reatividade), originando um aducto- $\gamma$  ao invés de um aducto do tipo Michael, que se forma convencionalmente na ausência de fosfina por adição nucleofílica na posição  $\beta$  do aleno.<sup>16</sup> No entanto, os primeiros desenvolvimentos da estratégia de formação de compostos cíclicos remontam aos estudos pioneiros de Lu, que recorreu a alenoatos como precursores de dipolos na presença de trifenilfosfina, e os utilizou pela primeira vez em cicloadições [3+2] formais com alquenos deficientes em electrões.<sup>17</sup> Esta abordagem, à altura inovadora, permitiu a síntese de vários derivados ciclopentenil regioisoméricos a partir da reação do alenoato **4.1** com uma variedade de alquenos como acrilatos, acrilonitrilo ou metil vinil cetona (Esquema 4.1). O mecanismo proposto pelos autores compreende um passo inicial em que a fosfina adiciona ao carbono  $\beta$  do alenoato **4.1** e assim origina uma espécie zwitteriônica dipolar **4.2**. Por sua vez, esta espécie reage com o alqueno via adição conjugada seguida de ciclização, numa reação que origina a formação dos intermediários zwitteriônicos **4.5** que se encontram em equilíbrio com as espécies zwitteriônicas **4.6**. No último passo do mecanismo proposto, os intermediários **4.6** sofrem eliminação da fosfina, evento que origina os productos cíclicos finais com regeneração do catalisador. A abordagem utilizada por Lu provou ser regioselectiva, num comportamento que foi racionalizado como sendo resultado de uma adição conjugada por parte do carbono  $\alpha$  do dipolo ao alqueno, mais favorável do que o ataque nucleofílico por parte do carbono  $\gamma$ . Estudos mais recentes vieram a corroborar a hipótese mecanística apresentada por Lu e seus colaboradores.<sup>18</sup>





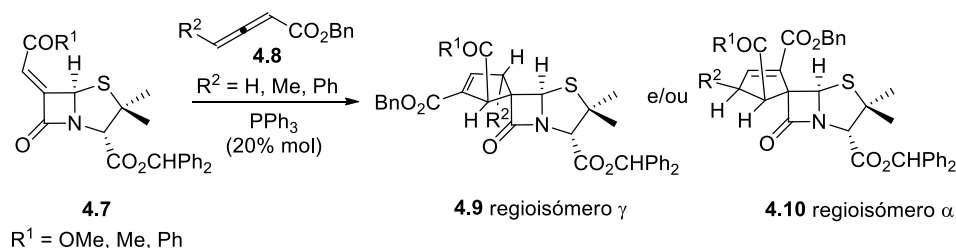
**Mecanismo proposto**



**Esquema 4.1** – Cicloadição [3+2] formal catalisada por fosfinas entre alenoatos e alquenos deficientes em electrões, apresenta por Lu e colaboradores.

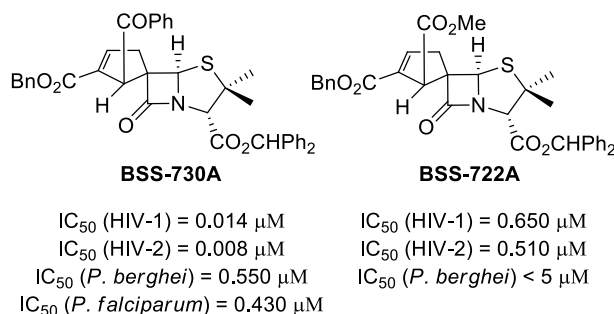
O sucesso da estratégia sintética publicada por Lu *et al.* abriu as portas ao surgimento de vários exemplos de reações de cicloadição entre alenoatos e os mais variados tipos de alquenos deficientes em electrões, numa corrente de produção científica que se tem mantido até aos dias de hoje, tendo permitido a síntese de uma vasta panóplia de derivados contendo anéis ciclopenteno na sua estrutura molecular.<sup>15,19-22</sup> Dentro deste contexto é de referir a existência de exemplos em que o uso de fosfinas ou outros substratos quirais permitiram respetivamente a síntese enantio<sup>23-25</sup> e diastereosselectiva<sup>15,22,26-29</sup> de ciclopentenos.

A cicloadição [3+2] formal entre alenos e alquenos deficientes em electrões foi também estendida de forma bem-sucedida à síntese de diversos compostos espirocíclicos.<sup>30-35</sup> Um destes exemplos foi exatamente uma das várias estratégias sintéticas exploradas pelo grupo de Pinho e Melo visando a síntese de novos derivados penicilânicos espirocíclicos, em que foi explorada pela primeira vez a cicloadição [3+2] formal entre 6-alquilidenopenicilanatos **4.7** e alenoatos **4.8** (Esquema 4.2).<sup>35</sup>



**Esquema 4.2** - Cicloadição [3+2] formal catalisada por fosfinas entre alenoatos e 6-alkilidenopenicilanatos.

Esta via sintética resultou na síntese de diversas espirociclopentenil-β-lactamas de entre as quais duas se revelaram altamente promissoras do ponto de vista da sua bioatividade, apresentando uma potente dupla atividade antimicrobiana contra HIV e malária (Figura 4.1).<sup>36</sup> De entre estas duas β-lactamas bioativas, a molécula BSS-730A mostrou ser a mais promissora, apresentando uma atividade altamente relevante contra HIV-1 (0.014 μM), HIV-2 (0.008 μM) e ambos os estágios infecciosos da malária (0.550 μM e 0.430 μM contra *P. berghei* na fase hepática e *P. falciparum* na fase sanguínea, respetivamente).



**Figura 4.1** – Estruturas moleculares de duas espirociclopentenil-β-lactamas que apresentam uma potente dupla atividade antimicrobiana contra HIV e malária.

Não obstante a necessidade de desenvolvimento de novas terapias individuais contra HIV ou malária, o potencial farmacológico da molécula BSS-730A é ainda mais significativo no contexto da sua ação antimicrobiana dupla se tivermos em conta a elevada sobreposição geográfica endémica do HIV e malária e as sinergias nefastas que se estabelecem entre estas duas enfermidades em casos de coinfeção. De um ponto de vista clínico e farmacoterapêutico, é altamente desejável que possa ser utilizado um único fármaco no combate a estas duas doenças tão distintas, seja pela minimização de potenciais reações adversas e interações medicamentosa inerentes à toma de fármacos individuais para cada uma das doenças, seja pelo próprio intuito de facilitar o acesso e a

adesão à terapia. Com as devidas ressalvas, os resultados de bioatividade *in vitro* da molécula BSS-730A mostram que a mesma apresenta esse potencial farmacológico, perspetivando-se assim que a molécula possa vir a desempenhar futuramente um papel de agente terapêutico multivalente de ação contra HIV e malária. Estas anteriores considerações estão discutidas com maior detalhe ao longo do Capítulo 2.

Adicionalmente, os resultados alusivos ao seu mecanismo de ação apresentados e discutidos no capítulo 2 do presente trabalho, indicam que a espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A exerce a sua atividade antiviral por via de um mecanismo a nível celular no hospedeiro. Este mecanismo de ação molecular é inovador e, concomitantemente, diferente dos mecanismos apresentados pelos fármacos anti-HIV correntemente disponíveis no mercado. Desta forma, a espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A perfila-se como uma alternativa terapêutica no combate ao HIV, que pelo seu mecanismo de ação inovador é suscetível de contrariar a crescente tendência de desenvolvimento de resistências virais.

Se em termos individuais, a ciclopentenil- $\beta$ -lactama espirocíclica BSS-730A se apresenta como um potencial agente terapêutico inovador e altamente promissor, numa conjuntura mais abrangente e ambiciosa a molécula pode ser também encarada como altamente relevante e valorizável num contexto de molécula *lead* servindo de *template* para modelação estrutural. É plausível que por via de uma estratégia de modelação estrutural, a molécula bioativa BSS-730A possa abrir portas ao desenvolvimento de uma classe ampla de novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas que partilhem o seu mecanismo de ação biológica inovador e a sua múltipla e potente atividade antimicrobiana. É legítimo ambicionar também que futuramente esta classe se possa vir a estabelecer como uma potencial alternativa terapêutica no combate ao HIV.

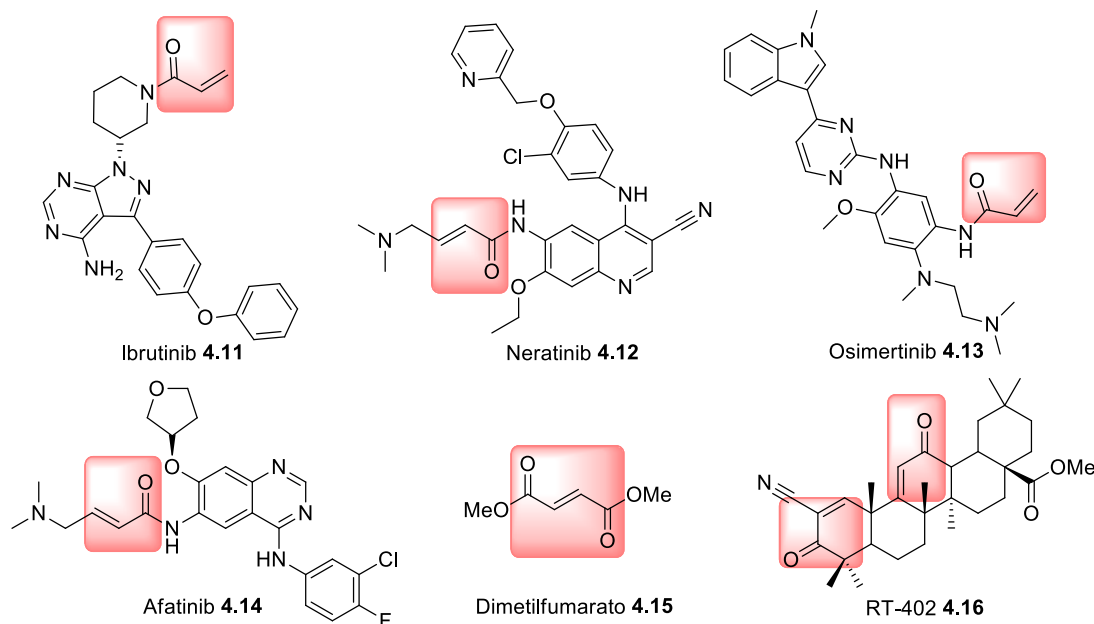
Em termos de características estruturais e físico-químicas adicionais ao seu núcleo espiro-penicilânico, a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, é caracterizada pela sua elevada hidrofobicidade resultante do seu elevado conteúdo em anéis aromáticos. Estes anéis constituem parte integrante de grupos substituintes do anel espirociclopentenil, nomeadamente o grupo benzoílo e o éster benzilo, e também do éster benzidrilo substituinte do anel tiazolidina do núcleo penicilânico.

A espirociclopentenil- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A apresenta ainda na sua estrutura um grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, vulgo aceitador de Michael, grupo funcional que devido a diversas condicionantes e características reacionais merece especial atenção



recorrentemente responsáveis por falsos positivos e são por isso incluídos na categoria de PAINs (*Pan-Assay Interference Compounds*).<sup>51,52</sup> Todas estas questões relativas à reatividade molecular, promiscuidade e toxicidade geralmente associadas à maioria das moléculas contendo grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados na sua estrutura, tem levado a que o potencial terapêutico e desenvolvimento farmacêutico desta classe de moléculas tenha vindo a ser negligenciado ou mesmo evitado ao longo dos anos.

No entanto, e não obstante as limitações intrínsecas à reatividade dos aceitadores de Michael em contexto de desenvolvimento de fármacos, durante a última década tem vindo a surgir uma nova vaga de investigação e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contendo grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados.<sup>53-55</sup> Esta estratégia é baseada numa abordagem de *design* racional de novas moléculas seletivas, cujo mecanismo de ação é focado na modificação covalente dos seus alvos terapêuticos por via de uma adição de Michael, de forma direcionada. Esta linha de trabalho provou ser altamente satisfatória, resultando na aprovação por parte da FDA dos fármacos ibrutinib<sup>56</sup> (**4.11**), neratinib<sup>57</sup> (**4.12**), osimertinib<sup>58</sup> (**4.13**) e afatinib<sup>59</sup> (**4.14**), agentes antineoplásicos que atuam por inibição covalente específica de cinases por via de uma adição de Michael a resíduos de cisteína altamente conservados nos seus centros ativos (Figura 4.3). Outro caso ilustrativo da utilidade de fármacos contendo aceitadores de Michael na sua estrutura é o caso do dimetilfumarato<sup>60</sup> (**4.15**), um composto com propriedades anti-inflamatórias, aprovado por a FDA e EMA para o tratamento da esclerose múltipla e psoríase. Para além destes fármacos aprovados, é de referir também o caso do triterpenóide semissintético RT-402 (**4.16**).<sup>61</sup> Este derivado do ácido oleanólico que contém dois grupos aceitadores de Michael na sua estrutura, chegou até à fase III de ensaios clínicos para o tratamento da hipertensão pulmonar<sup>61</sup> e doença renal policística autossómica dominante<sup>62</sup>.



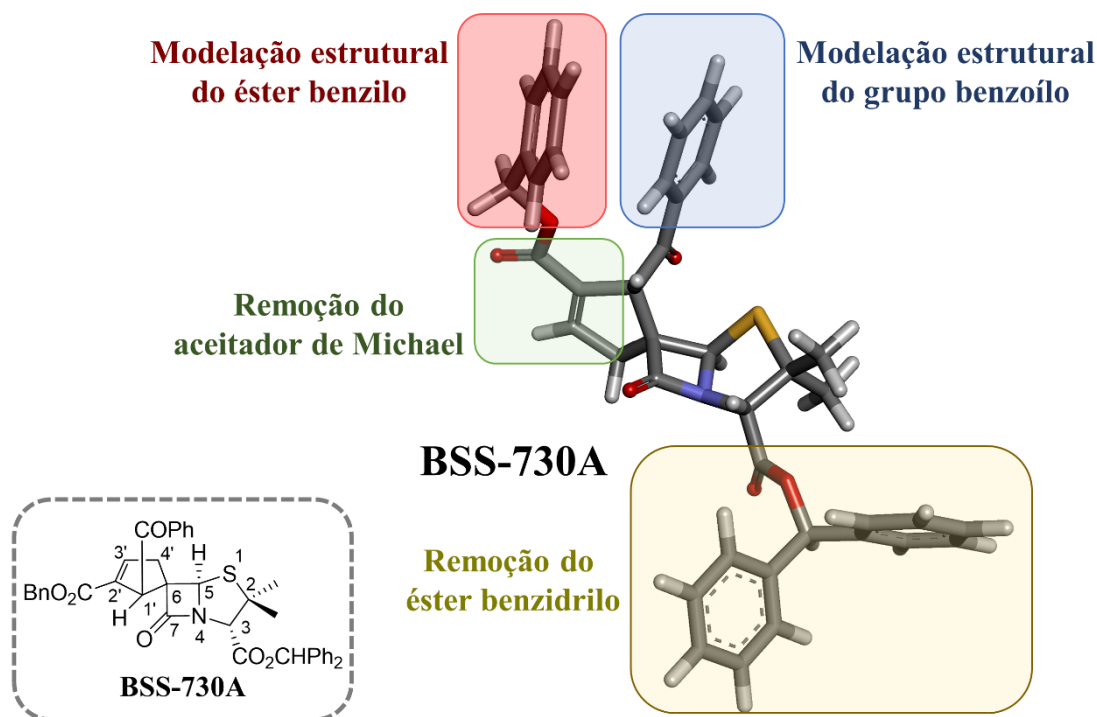
**Figura 4.3** – Exemplos de fármacos aprovados ou em desenvolvimento clínico que contêm sistemas carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados na sua estrutura molecular.

Apesar da alteração de paradigma verificada na última década no que ao desenvolvimento de fármacos contendo grupos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados diz respeito, no cômputo geral ainda prevalecem as considerações quanto à sua elevada reatividade, promiscuidade e toxicidade, continuando por isso a serem colocadas bastantes reticências à aposta no desenvolvimento de moléculas bioativas que exerçam a sua atividade mediante um mecanismo de alquilação por via de um aceitador de Michael.

Tendo em conta todas as características estruturais e farmacofóricas identificadas, a espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A foi explorada como molécula *lead* no desenvolvimento de novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas potencialmente bioativas contra o vírus do HIV e malária, numa abordagem de modelação estrutural racional. A presente abordagem visa também a obtenção de novas informações acerca da relação estrutura-atividade da espiro- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A.

Numa primeira vaga de estudos, a molécula BSS-730A foi alvo de modelações estruturais em torno de todos os grupos funcionais da sua estrutura identificados como potencialmente críticos para a sua atividade farmacológica (Figura 4.4), com a exceção do núcleo penicilânico e conseqüentemente o anel  $\beta$ -lactâmico. Não desconsiderando as nítidas diferenças estruturais entre as classes das espiro- $\beta$ -lactamas, a opção de não dedicar esforços à modelação do anel  $\beta$ -lactama prendeu-se com a ausência de atividade

biológica relevante, verificada no caso dos derivados espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactâmicos da molécula bioativa BSS-593, resultado este apresentado e discutido anteriormente no capítulo 3. Finalmente, a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730B, isômero  $\alpha$  da molécula BSS-730A, foi também alvo de modelações estruturais no seu éster benzidrilo.



**Figura 4.4** – Representação gráfica das posições da molécula BSS-730A que foram alvo de modelação estrutural.

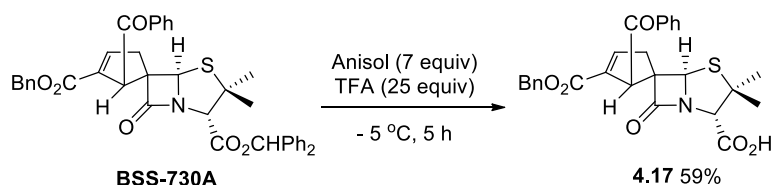
## 4.2. Síntese e modelação estrutural

### 4.2.1. Remoção do éster benzidrilo da molécula *lead* BSS-730A

No capítulo anterior apresentou-se de forma detalhada a interpretação da relação estrutura-atividade da espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama bioativa BSS-593. Recorrendo a modelações estruturais da molécula mostrou-se que a sua atividade anti-HIV-1 é dependente da presença de um ácido carboxílico na posição 5 do anel de tiazolidina do seu núcleo penicilânico. No entanto e contrariamente ao verificado para a espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama bioativa BSS-593, a molécula BSS-730A apresenta um éster benzidrilo nessa mesma posição do resíduo de tiazolidina.

De modo a avaliar a importância da presença do éster benzidrilo na estrutura molecular da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, procedeu-se à sua remoção convertendo a molécula *lead* ao seu derivado ácido (Esquema 4.3). Esta abordagem teve

também como intuito a obtenção de uma espirociclopentenil-β-lactama potencialmente bioativa que apresentasse um carácter mais hidrofílico comparativamente ao seu precursor. O procedimento compreendeu o tratamento da molécula BSS-730A com anisol e TFA, numa abordagem em tudo similar à anteriormente apresentada para a síntese de espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas ácidas (secção 3.2.2 do Capítulo 3). A espirociclopentenil-β-lactama ácida **4.17** foi obtida com 59% de rendimento.



**Esquema 4.3** – Desproteção do éster benzídrico da espiro-β-lactama BSS-730A.

#### 4.2.2. Modelação do éster benzílico do anel ciclopenteno da molécula *lead* BSS-730A

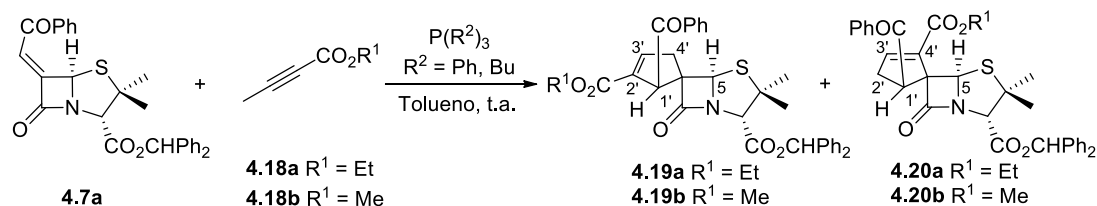
A espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A apresenta um éster benzílico na posição 2'. Em termos de modelação estrutural deste grupo funcional, optou-se por uma abordagem preliminar visando a diminuição da dimensão do grupo substituinte e concomitante remoção do anel aromático. Com este fim, concebeu-se a substituição do éster benzílico por pequenos ésteres alquílicos saturados, nomeadamente um éster metílico e etílico (Tabela 4.1).

Como anteriormente referido, a estratégia sintética utilizada para a síntese da classe dos espirociclopentenil-penicilanatos da mesma classe que a molécula *lead* BSS-730A, compreende uma cicloadição [3+2] formal entre o 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** e o alenoato **4.8a**, catalisada por trifetilfosfina. O éster proveniente do alenoato assume a posição 2' do novo anel ciclopenteno formado aquando da espirociclicização do regioisómero γ. No entanto, os alenoatos, ou 2,3-butadienoatos, monossustituídos, contendo pequenos grupos éster alquílicos são bastante voláteis e, por isso, consideravelmente difíceis de manusear. Desta forma, foi explorada a classe dos 2-butinoatos monossustituídos, nomeadamente o 2-butinoato de etilo (**4.18a**) e o 2-butinoato de metilo (**4.18b**), em alternativa aos 2,3-butadienoatos análogos, como precursores de 1,3-dipolos formais na síntese de novas espirociclopentenil-β-lactamas derivadas da molécula *lead* BSS-730A. A utilidade de 2-butinoatos como precursores de dipolos em reações de cicloadição [3+2] formal catalisada por fosfina é conhecida,<sup>63-65</sup>



no entanto a presente abordagem assume-se como a primeira descrição deste tipo de reatividade entre 6-alkilidenopenicilanatos e 2-butinoatos.

Numa primeira tentativa de reação, foram reproduzidas as condições de reação usado na síntese da molécula *lead* BSS-730A, com o 2,3-butadienoato de benzilo a ser substituído por 2-butinoato de etilo (**4.18a**). No entanto, após 5 h de reação não havia qualquer evidência da formação de produtos. De facto, apenas ao fim de 120 h de reação entre o 6-alkilidenopenicilanato e o 2-butinoato de etilo (**4.18a**) (1 equiv) na presença de PPh<sub>3</sub> (20%-mol) se conseguiu verificar a evidência da presença vestigial de produtos de cicloadição (Tabela 4.1, Entrada 1). O aumento da temperatura da reação para 40 °C (Tabela 4.1, Entrada 2) ou 80 °C (Tabela 4.1, Entrada 3), assim como a substituição da PPh<sub>3</sub> por PBu<sub>3</sub> (Tabela 4.1, Entrada 4), uma fosfina com maior carácter nucleofílico, também se revelaram estratégias ineficazes para melhorar o resultado da reação. No entanto, ao aumentar a quantidade inicial de 2-butinoato de etilo (**4.18a**) para 6 equivalentes e mantendo o rácio 2-butinoato/fosfina, foi possível obter as espirociclopropil- $\beta$ -lactamas **4.19a** e **4.20a** com um rendimento global de 70%, ao fim de 120 h de reação (Tabela 4.1, Entrada 5). Impulsionado pelo resultado anterior, procedeu-se também à duplicação do rácio 2-butinoato/fosfina para 40%, o que permitiu não só aumentar o rendimento da reação de cicloadição para 93% como diminuir consideravelmente o tempo de reação para 48 h (Tabela 4.1, Entrada 6). Estas condições de reação otimizadas foram então aplicadas à cicloadição [3+2] formal catalisada por fosfina entre o 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** e o 2-butinoato de metilo (**4.18b**), sendo os respetivos produtos  $\beta$ -lactâmicos espirocíclicos **4.19b** e **4.20b** obtidos com um rendimento global de 74% (Entrada 7).

**Tabela 4.1** - Cicloadição [3+2] formal entre um 6-alkilidenopenicilanato e 2-butinoatos catalisada por fosfinas.

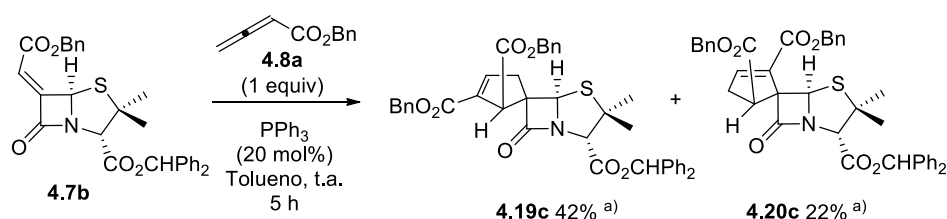
Entrada	R <sup>1</sup>	2-Butinoato (equiv)	R <sup>2</sup>	Fosfina (equiv)	Condições de reação	Rendimento isolado (%)
						4.19 + 4.20
1	Et	1	Ph	0.2	t.a., 120 h	Qtd vestigial
2	Et	1	Ph	0.2	55 °C, 120 h	Qtd vestigial
3	Et	1	Ph	0.2	80 °C, 120 h	Qtd vestigial
4	Et	1	Bu	0.2	t.a., 120 h	----
5	Et	6	Ph	1.2	t.a., 120 h	30 + 40
6	Et	6	Ph	2.4	t.a., 48 h	53 + 40
7	Me	6	Ph	2.4	t.a., 48 h	25 + 49

Estudos de NOE 2D corroboraram as estruturas dos dois regioisómeros (e.g. **4.19b** e **4.20b**) assim como a elevada estereosseletividade, que envolve a adição do dipolo formal pelo lado menos impedido, a face  $\alpha$  do 6-alkilidenopenicilanato. Pela análise do espectro de NOESY dos dois compostos é possível observar picos cruzados entre os prótons do grupo  $\beta$ -Me ( $\delta = 1.51$  ppm) e o próton H-1' ( $\delta = 5.15$  ppm e  $\delta = 4.55$  ppm, para os compostos **4.19b** e **4.20b**, respetivamente) (Figuras 38 e 40 do Anexo 1). Adicionalmente, para o composto **4.19b** verifica-se a existência de NOE entre os prótons H-4' ( $\delta = 3.12$  e  $3.54$  ppm) e o próton H-5 ( $\delta = 5.44$  ppm). No caso do regioisómero **4.20b** é possível observar correlação entre o próton H-1' ( $\delta = 4.55$  ppm) e os prótons H-2' ( $\delta = 2.54$  e  $3.17$  ppm), e nenhuma correlação foi observada entre estes últimos e o próton H-5.

No computo geral, a presente abordagem sintética assente na cicloadição [3+2] formal entre 2-butinoatos **4.18** e o 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** permitiu a síntese de novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas em rendimento elevado que variou entre os 74% e os 93%, em condições reacionais suaves. Estas novas  $\beta$ -lactamas espirocíclicas são análogas da molécula *lead* BSS-730A, destacando-se desta, no entanto, por terem um menor conteúdo aromático e, conseqüentemente, um carácter menos hidrofóbico. Este estudo demonstrou ainda que 2-butinoatos constituem uma alternativa sintética válida aos alenoatos análogos, atuando como precursores de 1,3-dipolos formais em presença de fosfinas.

### 4.2.3. Modelação do grupo benzoílo do anel ciclopenteno da molécula *lead* BSS-730A

As espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas BSS-730A e BSS-722A divergem em termos estruturais no substituinte da posição 1' do anel ciclopenteno espirocíclico. Enquanto a molécula mais promissora BSS-730A tem um grupo benzoílo, o seu análogo BSS-722A apresenta um éster metílico. De acordo com as diferenças de bioatividade observadas entre ambas as moléculas, concebeu-se sintetizar uma nova espirociclopentenil- $\beta$ -lactama análoga da molécula *lead* BSS-730, que apresentasse um grupo de maior dimensão na posição 1', mantendo um anel aromático terminal. Desta forma, procedeu-se à síntese da ciclopentenil- $\beta$ -lactama espirocíclica **4.19c**, a partir da cicloadição [3+2] formal entre o benzilo 6-alkilidenopenicilanato **4.7b** e o alenoato 2,3-butadienoato de benzilo (**4.8a**) (Esquema 4.4). A reação foi catalisada por trifenilfosfina, em condições de reação idênticas às utilizadas na síntese das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas BSS-730A e BSS-722A.<sup>35</sup> Os produtos foram obtidos com um rendimento global moderado (64%). Não se conseguiu obter o  $\alpha$ -regioisómero **4.20c** puro, pois não foi possível separá-lo do  $\gamma$ -regioisómero **4.19c** por cromatografia em coluna. No entanto, foi possível obter-se uma porção pura do  $\gamma$ -regioisómero **4.19c**. É de notar que a mesma dificuldade técnica em separar os dois isómeros produtos deste tipo de reação já tinha sido anteriormente observada.<sup>35</sup>



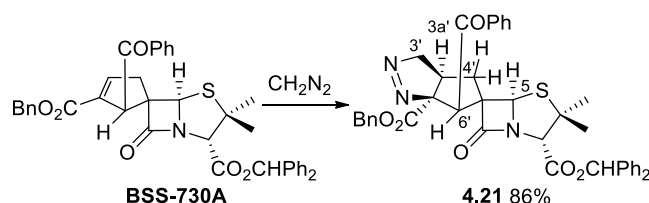
**Esquema 4.4** – Síntese de derivados da molécula BSS-730A por modelação do grupo benzoílo. <sup>a)</sup> Rendimento calculado por RMN  $^1\text{H}$ .

### 4.2.4. Modelação do sistema $\alpha,\beta$ -insaturado

Tendo em conta todas as questões anteriormente discutidas inerentes à classe dos aceitadores de Michael e de modo a esclarecer se a bioatividade da molécula *lead* BSS-730A contra o vírus do HIV-1 é exclusivamente dependente da presença deste tipo de grupo funcional electrofílico na sua estrutura molecular, foram projetadas e efetuadas três modelações estruturais. Estas modelações focaram-se na síntese de análogos da espiro-

$\beta$ -lactama BSS-730A sem a presença do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado na sua estrutura molecular.

A molécula quiral **4.21** foi sintetizada pela cicloadição 1,3-dipolar entre o diazometano e a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A, numa reação em que o sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado atua como dipolarófilo. A espiro- $\beta$ -lactama **4.21** foi obtida com um rendimento de 86%, sendo obtida de forma altamente regio- e estereosseletiva (Esquema 4.5).



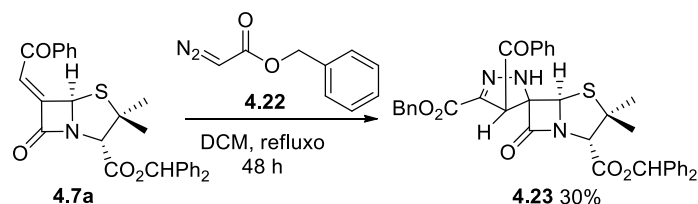
**Esquema 4.5** - Cicloadição 1,3-dipolar entre o diazometano e a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A

A estrutura do produto espirocíclico **4.21** foi determinada com base em estudos de RMN bidimensional. A multiplicidade dos prótons H-3a', H-4' e H-3' no espectro de RMN  $^1\text{H}$  assim como as respetivas correlações no espectro de COSY (Figuras 43 e 44 do Anexo 1), demonstram e justificam a regioquímica observada, sendo esta concordante com a literatura disponível onde é descrito que em cicloadições entre diazo-alcanos e acrilatos, o carbono-diazo se liga ao carbono  $\beta$  do sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado.<sup>66-68</sup>

Através da análise do espectro de HSQC foi possível fazer a atribuição dos prótons diastereotópicos H-4' ( $\delta = 2.17$  e  $3.22$  ppm) (Figura 45 do Anexo 1). A estereoquímica da espiro- $\beta$ -lactama **4.21** foi então determinada com base nas correlações de NOESY dos prótons diastereotópicos H4', sendo elas a forte correlação NOESY observada entre um dos prótons diastereotópicos (H-4',  $\delta = 3.22$  ppm) com o próton H-5 ( $\delta = 5.20$  ppm), e o pico cruzado existente entre o outro próton diastereotópico (H-4',  $\delta = 2.17$  ppm) e o próton H-3a' ( $\delta = 3.15$  ppm) (Figura 44 do Anexo 1). Estas duas correlações de NOESY são elucidativas e permitiram a determinação inequívoca da estereoquímica da espiro- $\beta$ -lactama quiral **4.21**.

Por sua vez, a espiropirazolina- $\beta$ -lactama **4.23**, análoga da molécula bioativa BSS-730A, foi obtida com rendimento moderado (30%), pela cicloadição 1,3-dipolar entre o

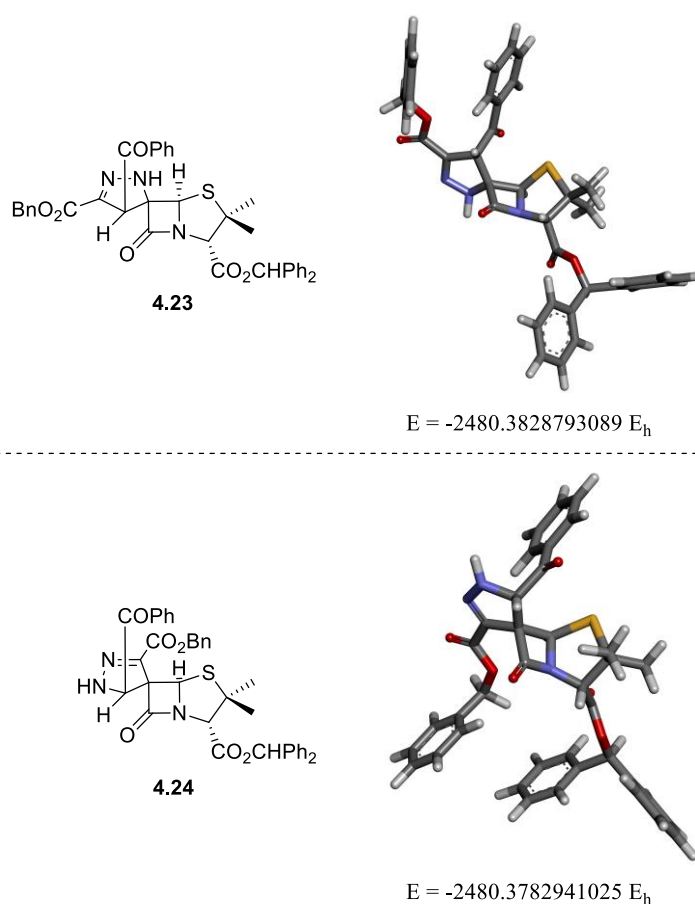
6-alkilidenopenicilinato **4.7a** e o diazoacetato de benzilo (**4.22**), com este último a atuar como dipolo (Esquema 4.6).



**Esquema 4.6** - Cicloadição 1,3-dipolar entre um 6-alkilidenopenicilinato e diazoacetato de benzilo.

A estrutura da molécula **4.23** foi confirmada com base em diversos estudos de RMN 2D. De acordo com a literatura, a cicloadição 1,3-dipolar entre 6-alkilidenopenicilatos e derivados diazo (difenildiazometano, diazometano e fenildiazometano) pode originar os correspondentes espiro-1-pirazolinopenicilatos e/ou espiro-2-pirazolinopenicilatos.<sup>69-71</sup> De forma a discriminar a natureza química do produto, analisou-se o seu espectro de HSQC que revela uma ausência de conectividade para o próton com desvio de  $\delta = 6.24$  ppm, confirmando assim que este próton se encontra ligado a um átomo de azoto (Figura 48 do Anexo 1). Desta forma foi excluída a hipótese de estarmos perante um espiro-1-pirazolinopenicilato. No entanto, dependendo da regioselectividade da reação esta pode resultar em dois isómeros espiro-2-pirazolinopenicilatos **4.23** e **4.24** (Figura 4.5). Pela análise cuidadosa do espectro NOESY do composto, foi observado um pico cruzado entre os prótons do grupo  $\beta$ -Me presente no núcleo penicilinato ( $\delta = 1.52$  ppm) e o próton H-1' do anel pirazolina ( $\delta = 5.65$  ppm) (Figura 47 do Anexo 1). Este tipo de correlação encontra-se descrita na literatura para espiropenicilatos obtidos a partir de cicloadições a 6-alkilidenopenicilatos, correlação possível dada a conformação tridimensional das moléculas espirocíclicas, conformação em borboleta inerente ao núcleo penicilânico.<sup>35,69</sup> Este tipo de correlação NOESY seria possível para ambas as estruturas **4.23** e **4.24**. No entanto, foram efetuados cálculos quânticos ao nível de teoria DFT (B3LYP/6-31G(d))<sup>72-74</sup> com o intuito de recolher mais informação que permitisse distinguir as duas moléculas, através da estimativa e análise das distâncias internucleares e respetivas intensidades de NOE. No caso do espiropenicilato **4.23** as distâncias estimadas entre  $\beta$ -Me e H-4' e entre H-4' e H(Ar) foram 5.005 Å e 3.831 Å, respetivamente, o que está de acordo com os NOEs observados, em que os picos cruzados entre o grupo  $\beta$ -Me e H-4' apresentaram

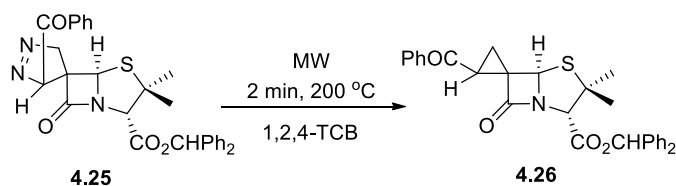
menor intensidade do que os picos cruzados entre H4'-H(Ar). As distâncias internucleares  $\beta$ -Me-H-4' e H-4'-H(Ar) para o composto **4.24** (3.034 Å e 5.542 Å, respetivamente) deveriam originar NOEs com um comportamento de intensidades oposto ao observado. Por outro lado, para a molécula **4.24** seria de esperar que se verificasse a existência de NOE entre o grupo metileno do éster benzílico e o próton H-5, algo que não é observado. Finalmente, e como esperado devido aos efeitos estéreo, os cálculos de otimização estrutural mostram que a estrutura **4.23** apresenta uma energia mínima inferior em 12.04 kJ/mol comparativamente com o seu isómero **4.24**. Considerando todos os resultados discutidos, a estrutura do espiropenicilanato **4.23** foi inequivocamente atribuída.



**Figura 4.5** - Geometrias otimizadas ao nível de teoria DFT (B3LYP/6-31G(d)) para as estruturas racionalizadas como potenciais produtos da cicloadição dipolar entre o alquilidenopenicilanato **4.7a** e o diazoacetato de benzilo.

Finalmente, em relação à espirociclopropil- $\beta$ -lactama **4.26**, esta constitui um análogo da molécula *lead* BSS-730A no qual há uma conservação de todas as características estruturais, com exceção do aceitador de Michael e respetivo éster. A síntese da espiro- $\beta$ -lactama **4.26** foi executada de acordo com a literatura,<sup>69</sup> a partir de

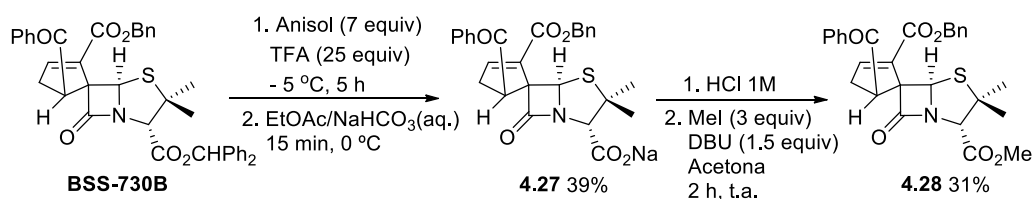
uma reação de contração de anel de uma espiro-1-pirazolina-β-lactama **4.25** via extrusão de azoto molecular (Esquema 4.7).



**Esquema 4.7** – Síntese de uma espirociclopropil-β-lactama análoga da molécula *lead* BSS-730A.

#### 4.2.5. Remoção do éster benzidrilo da molécula BSS-730B, isómero α da molécula *lead* BSS-730A

A espirociclopentenil-β-lactama BSS-730B, o isómero α da molécula BSS-730A, também foi alvo da modelação do seu éster benzidrilo. A espirociclopentenil-β-lactama **4.27**, contendo um grupo carboxílico, foi obtida na forma de sal com um rendimento de 39%, sendo esterificada com iodometano originando a molécula **4.28** com um rendimento de 31% (Esquema 4.8).



**Esquema 4.8** – Modelação estrutural do éster benzidrilo da espirociclopentenil-β-lactama BSS-730B.

### 4.3. Bioatividade

#### 4.3.1. Citotoxicidade e atividade anti-HIV

As novas β-lactamas espirocíclicas sintetizadas pela modelação estrutural da molécula *lead* BSS-730A foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade *in vitro* (CC<sub>50</sub>) em células TZM-bl, antes de se determinar a sua potencial atividade antiviral. De entre as moléculas testadas, apenas a espiropirazolina-β-lactama **4.23** mostrou ser consideravelmente citotóxica com um valor CC<sub>50</sub> de 17.2 μM. As restantes espiro-β-lactamas apresentaram valores de CC<sub>50</sub> aceitáveis que variam entre 30.34 μM (espirociclopentenil-β-lactama ácida **4.17**) e 58.95 μM (espirociclopentenil-β-lactama

**4.19a)** (Tabela 4.2). Estes resultados estão de acordo com dados de citotoxicidade respeitantes aos estudos anteriormente apresentados no capítulo 2. Os dois estudos em conjunto, demonstram que a classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactama apresenta baixa citotoxicidade *in vitro*, uma característica altamente relevante no desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico.

Quanto à atividade antiviral esta foi avaliada por um ensaio preliminar em que foi determinada a PMI de todos os compostos contra o vírus do HIV-1 (SG3.1) a uma concentração fixa de 10  $\mu\text{g/mL}$ , num ensaio *single-round* feito em células TZM-bl. Este tipo de ensaio pressupõe que uma PMI superior a 50% é indicadora de que o composto possui atividade antiviral.

**Tabela 4.2** – Citotoxicidade ( $\text{CC}_{50}$ ) e atividade antiviral (PMI) contra HIV-1 (estirpe SG3.1, tropismo X4) do conjunto de espiro- $\beta$ -lactamas derivadas da molécula *lead* BSS-730A.

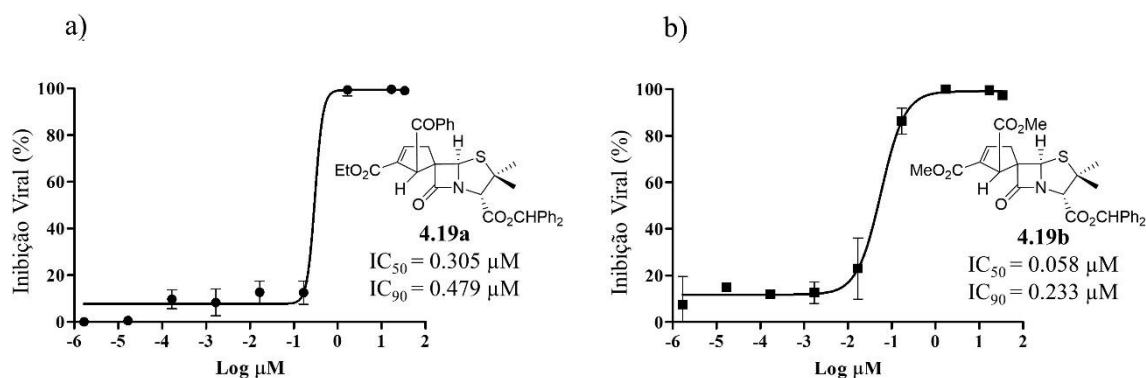
Composto	$\text{CC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	PMI (10 $\mu\text{g/mL}$ ) (%) <sup>a)</sup>
<b>4.17</b>	30.34	0
<b>4.19a</b>	58.95	99
<b>4.19b</b>	53.21	99
<b>4.19c</b>	43.22	0
<b>4.20a</b>	57.09	0
<b>4.20b</b>	54.88	0
<b>4.21</b>	41.83	0
<b>4.23</b>	17.16	n.d.
<b>4.26</b>	48.50	79
<b>4.27</b>	56.65	0
<b>4.28</b>	55.38	0

<sup>a)</sup> HIV-1, estirpe SG3.1, tropismo X4

De entre as espiro- $\beta$ -lactamas testadas, três compostos revelaram-se ativos contra o vírus do HIV-1, apresentando valores de PMI iguais ou superiores a 79%. Nenhuma das restantes  $\beta$ -lactamas espirocíclicas demonstrou qualquer atividade inibitória do vírus do HIV-1. No seguimento dos resultados preliminares promissores de atividade anti-HIV-1, procedeu-se à determinação de valores de  $\text{IC}_{50}$  e  $\text{IC}_{90}$  *in vitro* contra HIV-1. No entanto optou-se por limitar este estudo apenas às moléculas **4.19a** e **4.19b** dado os seus elevados valores de PMI e a sua elevada similaridade estrutural relativamente à espirociclopentenil- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A.



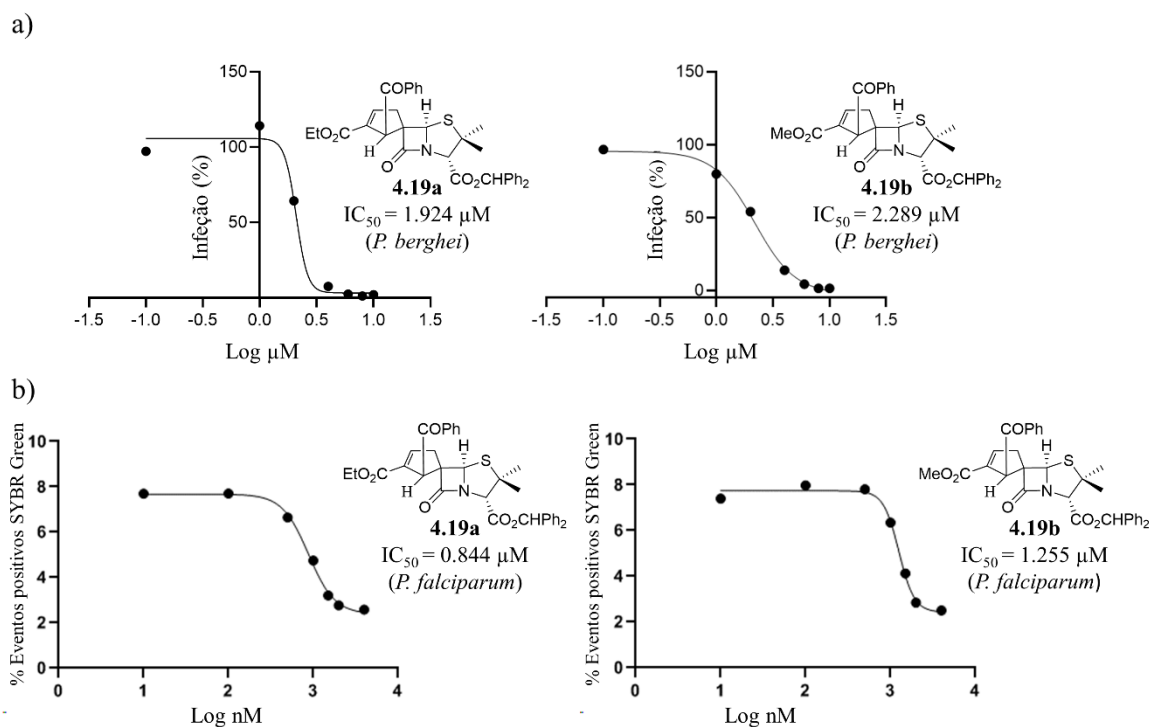
Ambas as espirociclopentenil-β-lactamas **4.19a** e **4.19b** apresentaram valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> contra HIV-1 altamente promissores (Figura 4.6). A espiro-β-lactama **4.19b** revelou ser a mais ativa, com um valor de IC<sub>50</sub> de 0.058 μM e um valor de IC<sub>90</sub> de 0.233 μM. Relativamente à espirociclopentenil-β-lactamas **4.19a**, esta apresentou uma menor, mas ainda assim considerável, atividade antiviral com valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> de 0.305 e 0.479 μM, respetivamente. A identificação destas novas moléculas com elevada atividade reforça o potencial das espiro-β-lactamas no geral e das espirociclopentenil-β-lactamas em particular, como compostos altamente promissores contra o vírus do HIV-1.



**Figura 4.6** – Atividade anti-HIV-1 das espirociclopentenil-β-lactamas **4.19a** e **4.19b**.

### 4.3.2. Atividade anti-malária

Para além da sua notável atividade contra o vírus do HIV, a espirociclopentenil-β-lactama *lead* BSS-730A, também apresenta uma promissora bioatividade na escala submicromolar contra o *Plasmodium* em ambas as fases de infeção do parasita, nomeadamente na fase hepática (IC<sub>50</sub> *P. berghei* = 0.550 μM) e fase sanguínea (IC<sub>50</sub> *P. falciparum* = 0.430 μM).<sup>36</sup> Assim, depois de mostraram uma atividade elevada contra HIV-1, a atividade anti-*Plasmodium* das espiro-β-lactamas **4.19a** e **4.19b** foi também testada, determinando-se o seu valor de IC<sub>50</sub> contra a fase hepática do *P. berghei* e fase eritrocítica do *P. falciparum*. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados como um valor médio de dois ensaios independentes e utilizando DMSO como controlo (Figura 4.7).



**Figura 4.7** – Atividade anti-malária das espirociclopentenil-β-lactamas **4.19a** e **4.19b** contra a) fase hepática do *P. berghei* e b) fase eritrocítica do *P. falciparum*.

Relativamente ao contexto referente aos ensaios de atividade na fase hepática do *P. berghei*, nenhum dos compostos testados revelou citotoxicidade contra as células hospedeiras Huh-7. Ambas as espiro-β-lactamas **4.19a** e **4.19b** se mostraram ativas contra este estágio do parasita, com a molécula **4.19a** a apresentar um valor de  $IC_{50}$  de  $1.924 \pm 0.240 \mu\text{M}$ , enquanto a molécula **4.19b** se revelou ligeiramente menos ativa com um valor de  $IC_{50}$  de  $2.289 \pm 0.151 \mu\text{M}$ .

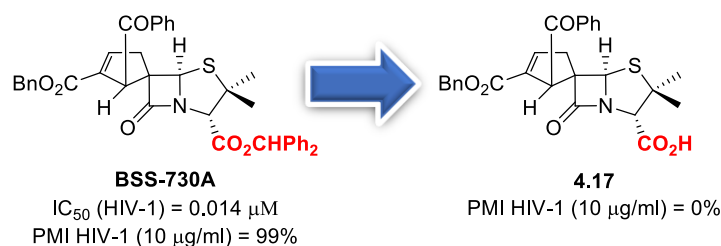
Contudo, os dois compostos **4.19a** e **4.19b** provaram ser mais ativos contra o parasita na sua fase eritrocítica, com a espiro-β-lactama **4.19a** a apresentar um valor de  $IC_{50}$  de  $0.844 \pm 0.036 \mu\text{M}$ , enquanto a espiro-β-lactama **4.19b** apresentou um valor de  $IC_{50}$  de  $1.255 \pm 0.003 \mu\text{M}$ .

É de notar que os presentes resultados de bioatividade contra o *Plasmodium*, em que a molécula **4.19a** apresenta uma maior atividade comparativamente ao seu análogo **4.19b** em ambos os estágios de infecção do parasita, representam uma inversão de tendência relativamente ao observado para os resultados de atividade antiviral contra o HIV-1, nos quais a molécula **4.19b** se apresenta como mais ativa que a molécula **4.19a**.

## 4.4. Relação estrutura-atividade

### 4.4.1. Éster benzidrilo da molécula *lead* BSS-730A

De forma a determinar a relevância da presença do éster benzidrilo para a bioatividade da molécula BSS-730A e, paralelamente, na procura por um seu derivado potencialmente bioativo com características mais hidrofílicas, procedeu-se à conversão do éster benzidrilo da molécula BSS-730A no correspondente ácido carboxílico, obtendo-se o seu análogo ácido **4.17**. Esta espirociclopentenil- $\beta$ -lactama ácida não apresentou qualquer atividade contra o vírus do HIV-1 (Figura 4.8).

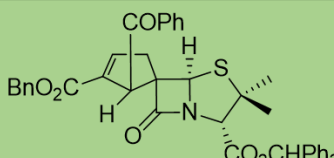
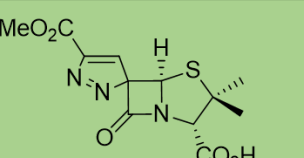
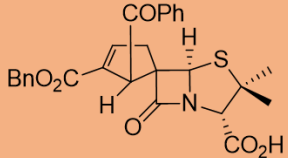
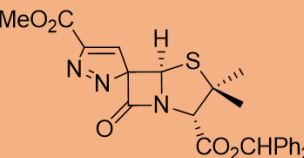


**Figura 4.8** – Espiro- $\beta$ -lactamas BSS-730A e **4.17** e respetivas atividades anti-HIV-1.

Esta ausência de atividade parece ser indicativa de que os anéis aromáticos do grupo benzidrilo, constituem uma característica farmacofórica essencial para uma interação entre a molécula BSS-730A e o seu alvo biológico putativo. Ainda assim, não deve ser menosprezada a hipótese de que a presença de um grupo aniónico na estrutura da espiro- $\beta$ -lactama possa levar a algum tipo de repulsão eletrónica no seu local de ligação, não permitindo assim que o espiroenicilinato **4.17** possa reproduzir a interação de molécula bioativa BSS-730A com o seu alvo e, conseqüentemente, não permitindo qualquer atividade antiviral. É também plausível que a diminuição da lipofilicidade da molécula pela conversão do éster num grupo ionizável tenha efeitos consideráveis a nível da solubilidade desta, podendo influenciar negativamente a sua movimentação através de membranas biológicas. Tal comportamento pode limitar o acesso por parte da espiro- $\beta$ -lactama **4.17** a determinados compartimentos celulares e/ou ao próprio alvo. Não obstante as possíveis explicações plausíveis para o resultado obtido, o mesmo indica claramente que a presença do éster benzidrilo na posição 5 da tiazolidina do núcleo penicilânico se perfila como determinante para a atividade anti-HIV da molécula *lead* BSS-730A.

A ausência de bioatividade demonstrada pelo espiroenicilinato **4.17** para além de mostrar a importância do éster benzidrilo para a atividade anti-HIV da espiro- $\beta$ -

lactama *lead* BSS-730A, permite estabelecer um inequívoco ponto de divergência ao nível da estrutura-atividade entre as espiro-3*H*-pirazole-β-lactama ácida BSS-593 e a espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A. Como anteriormente discutido (secção 3.4 do Capítulo 3), a conversão do ácido carboxílico da molécula bioativa BSS-593 a um éster leva a uma total perda de atividade por parte da molécula. Um exemplo deste comportamento foi verificado para espiropenicilanato de benzidrilo BSS-452 (capítulo 2), análogo da molécula BSS-593 em que o ácido livre foi substituído por um éster benzidrilo. No entanto, e contrariamente ao observado para a lactama BSS-593, o estudo da importância do mesmo éster benzidrilo para a atividade da molécula BSS-730A mostra que a remoção deste grupo funcional leva a uma total perda de atividade contra o HIV (Figura 4.9).

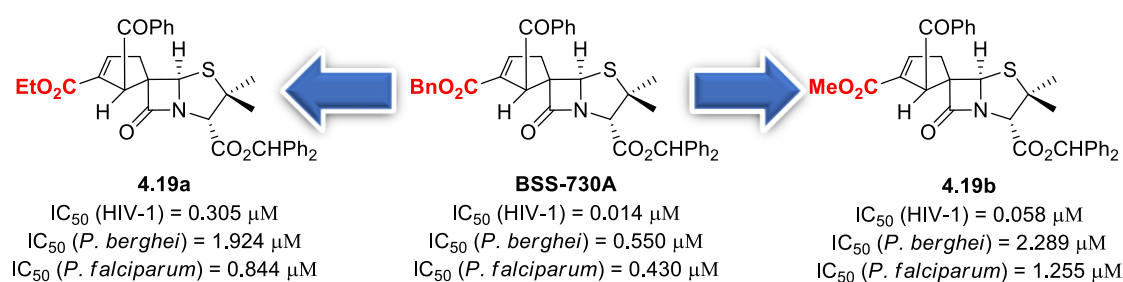
	Espirociclopentenil-β-lactama	Espiro-3 <i>H</i> -pirazol-β-lactama
Ativo	 <p><b>BSS-730A</b>  <math>IC_{50}</math> (HIV-1) = 0.014 <math>\mu</math>M                      PMI HIV-1 (10 <math>\mu</math>g/ml) = 99%</p>	 <p><b>BSS-593</b>  <math>IC_{50}</math> (HIV-1) = 0.012 <math>\mu</math>M                      PMI HIV-1 (10 <math>\mu</math>g/ml) = 84%</p>
Inativo	 <p><b>4.17</b>                      PMI HIV-1 (10 <math>\mu</math>g/ml) = 0%</p>	 <p><b>BSS-452</b>                      PMI HIV-1 (10 <math>\mu</math>g/ml) = 0%</p>

**Figura 4.9** – Modelação estrutural do grupo benzidrilo em espiropenicilanatos e o seu efeito na atividade anti-HIV-1 dos mesmos.

O presente comportamento completamente contrário das moléculas bioativas BSS-593 e BSS-730A relativamente à presença de um éster benzidrilo na posição 5 da tiazolidina do seu núcleo penicilânico, em que foi observado que o éster é necessário à atividade anti-HIV de uma das moléculas (e.g. BSS-730A) e incompatível com a atividade da outra (e.g. BSS-593), aponta para que as duas moléculas não partilhem o mesmo sítio de ligação, alvo e/ou mecanismo de ação relativamente à sua inibição do HIV-1.

#### 4.4.2. Grupo éster benzílico da molécula *lead* BSS-730A

Quanto à modelação do éster benzílico presente na posição 2' do anel ciclopenteno da espiro-β-lactama *lead* BSS-730A, este grupo funcional foi também alvo de uma modelação estrutural assente na sua substituição por ésteres alquílicos de cadeia curta, nomeadamente um éster etílico ou metílico, resultando na síntese das moléculas **4.19a** e **4.19b**, respetivamente. Apesar de estas novas espirociclopentenil-β-lactamas apresentarem uma bioatividade menor comparativamente à molécula *lead* BSS-730A, as suas atividades são ainda assim notáveis, com valores de IC<sub>50</sub> submicromolares. Estes resultados relativamente à modelação do éster benzílico presente na molécula BSS-730A, indicam que a presença deste grupo está associada a uma maior bioatividade (Figura 4.10). A diferença de atividades observada é passível de estar relacionada com a capacidade em estabelecer interações não covalentes do tipo  $\pi$ -stacking<sup>75</sup> por parte do anel de benzeno do éster benzílico, comportamento este que é inviabilizado aquando da remoção desta característica farmacofórica e sua substituição por um resíduo não aromático, como ocorre no caso das espiro-β-lactamas **4.19a** e **4.19b**. No entanto, os resultados de atividade das moléculas **4.19a** e **4.19b** mostram que a posição 2' do anel ciclopenteno também tolera a presença de ésteres alquílicos menos volumosos, como é exemplo o éster etílico e metílico, sem esta alteração estrutural causar uma diminuição abrupta ou mesmo a perda total de atividade biológica contra o HIV-1.

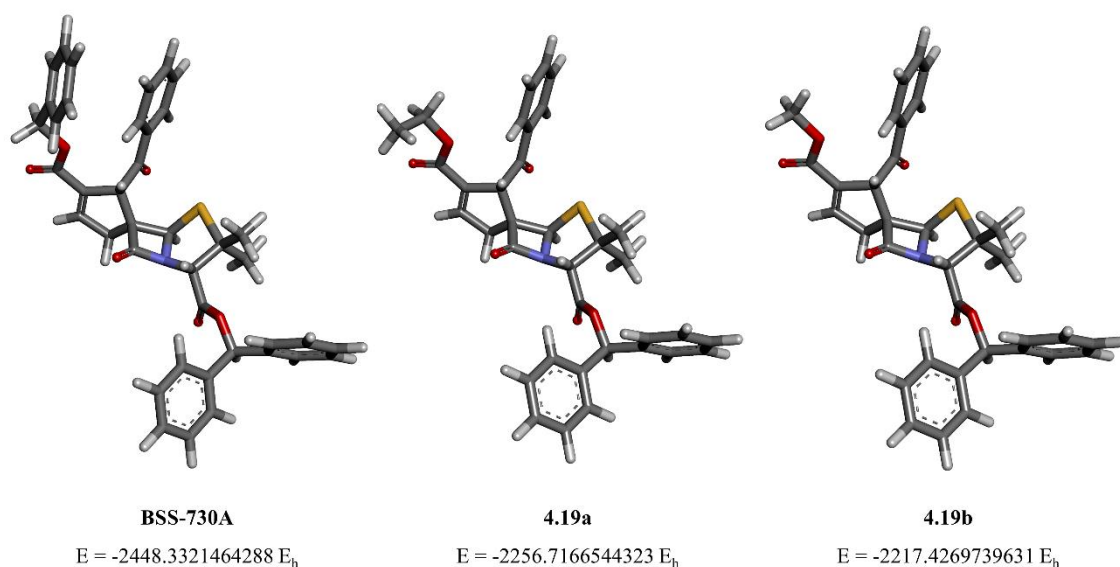


**Figura 4.10** - Modelação estrutural do éster benzílico da molécula *lead* BSS-730A e respetivo efeito na atividade antiviral dos seus análogos.

Centrando a discussão na nova espirociclopentenil-β-lactama **4.19b**, o facto de esta apresentar uma atividade anti-HIV (IC<sub>50</sub> = 0.058 μM) na mesma ordem de grandeza da que é apresentada pela molécula *lead* BSS-730A (IC<sub>50</sub> = 0.014 μM), constitui um resultado altamente relevante na medida em que a substituição do éster benzílico por um éster metílico permite diminuir o conteúdo aromático e, conseqüentemente, a hidrofobicidade da molécula. Esta alteração estrutural confere assim à espiro-β-lactama

**4.19b** um perfil de solubilidade mais próximo do ideal tendo em vista uma potencial farmacocinética satisfatória, comparativamente à molécula BSS-730A. Não obstante a menor atividade e maior lipofílicidade relativamente ao seu análogo **4.19b**, as anteriores considerações quanto à relevância da remoção do grupo benzilo também se aplicam à espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **4.19a**.

Por fim, a elevada similaridade estrutural partilhada entre as espiro- $\beta$ -lactamas **4.19a** e **4.19b** e a molécula *lead* BSS-730A, suportam a hipótese de que estas novas moléculas partilhem o mesmo mecanismo de ação antiviral inovador da última. No seguimento desta suposição, foram também efetuados cálculos ao nível de teoria DFT (*Density Functional Theory*), utilizando o funcional híbrido B3LYP<sup>72-74</sup> e a base de funções 6-31G(d), para determinar e comparar as geometrias otimizadas das espiro-lactamas BSS-730A, **4.19a** e **4.19b**. Como esperado, dada a elevada similaridade estrutural entre as três espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, os estudos conformacionais confirmam que as moléculas **4.19a** e **4.19b** apresentam também uma conformação de energia mínima similar à molécula *lead* BSS-730A (Figura 4.11). O presente resultado reforça a proposta de que as novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas **4.19a** e **4.19b** partilham o mesmo mecanismo inovador de ação antiviral apresentado pela molécula *lead* BSS-730A, discutido no Capítulo 2.

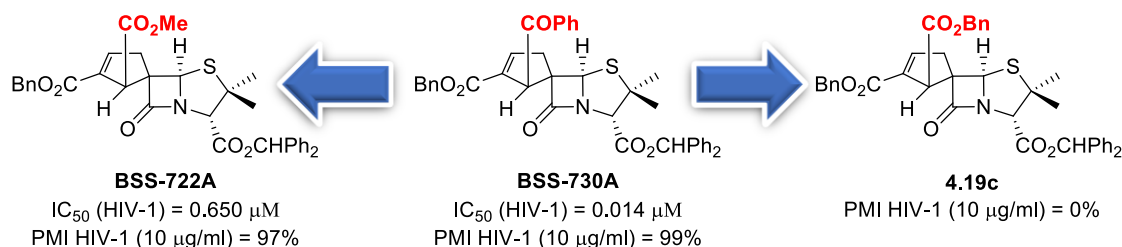


**Figura 4.11** - Conformações de energia mínima das espiro- $\beta$ -lactamas BSS-730A, **4.19a** e **4.19b**.

Finalmente, os resultados relativos à atividade anti-malária das novas espirociclopentenil-β-lactamas **4.19a** e **4.19b** são também inequivocamente indicativos da importância do grupo éster benzílico para a maior atividade anti-*Plasmodium* apresentada pela espiro-β-lactama *lead* BSS-730A, em ambas as fases hepática e sanguínea da infecção do parasita. Os anteriores resultados mostram ainda que existe uma correlação direta entre o aumento da cadeia do éster presente na posição 2' do anel espirociclopentenil (Bn > Et > Me) e a atividade anti-*Plasmodium* apresentada pelas espirociclopentenil-β-lactamas referidas na presente discussão (BSS-730A > **4.19a** > **4.19b**).

#### 4.4.3. Grupo benzoílo da molécula *lead* BSS-730A

A comparação estrutural entre as duas espirociclopentenil-β-lactamas ativas BSS-730A e BSS-722A mostra que estas divergem no substituinte na posição 1' do anel ciclopenteno espirocíclico. Apesar de serem ambas ativas, a molécula *lead* BSS-730A, contendo um grupo benzoílo nesta posição, apresenta uma atividade anti-HIV cerca de 46 vezes superior ao seu análogo BSS-722A, que apresenta um éster metílico na posição 1' do anel ciclopenteno espirocíclico (Figura 4.12).



**Figura 4.12** – Efeito da modelação estrutural do grupo benzoílo da molécula BSS-730A na atividade anti-HIV-1 dos seus derivados.

Esta relação de estrutura-atividade entre ambas as espirociclopentenil-β-lactamas indica claramente que, apesar de ambos os resíduos terem carácter hidrofóbico, a presença de um resíduo aromático na posição 1' do anel espirociclopentenil potencia a atividade anti-HIV da molécula em comparação com um resíduo alquílico. Uma vez mais, esta diferença de atividades poderá estar relacionada com a capacidade em estabelecer interações não covalentes do tipo  $\pi$ -stacking<sup>75</sup> por parte do anel de benzeno, algo que não se verifica para um resíduo de cadeia alquílica como é exemplo o éster metílico.

Tendo em conta estas considerações prévias de estrutura-atividade por comparação entre as moléculas bioativas BSS-730A e BSS-722A, concebeu-se a síntese

da espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas **4.19c**, composto que apresenta um éster benzílico na posição 1' do anel ciclopenteno espirocíclico. Este grupo funcional é hidrofóbico, e combina em si o resíduo éster da molécula BSS-722A ao mesmo tempo que conserva um grupo fenilo terminal, uma característica estrutural aparentemente potenciadora de uma maior bioatividade, como discutido no parágrafo anterior. No entanto, há também a notar que o éster benzílico apresenta uma maior dimensão comparativamente com os grupos benzoílo e éster metílico, presentes nas moléculas BSS-730A e BSS-722A, respetivamente.

Apesar de a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **4.19c** ter sido alvo de um *design* racional, visando a preservação da topologia das características farmacofóricas de ambas as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas bioativas BSS-730A e BSS-722A, a molécula revelou-se completamente inativa contra o vírus do HIV-1. É plausível que esta ausência de atividade seja produto do aumento da dimensão e, conseqüentemente, do volume do grupo substituinte, sendo plausível que o maior impedimento estérico resultante obstrua totalmente uma interação molécula-alvo eficiente e capaz de despoletar uma inibição da replicação viral.

As diferenças de atividade entre a molécula *lead* BSS-730A e as suas espiro- $\beta$ -lactamas análogas BSS-722A e **4.19c**, mostram que o substituinte na posição 1' do anel espirociclopentenil constitui uma característica importante para a elevada atividade observada para a molécula BSS-730A. Para além disso, e apesar de a amostra ser relativamente limitada, as consideráveis variações de atividade verificadas aquando do aumento ou diminuição da dimensão do grupo substituinte parecem indicativas de que a molécula BSS-730A é altamente sensível a derivatizações estruturais deste substituinte.

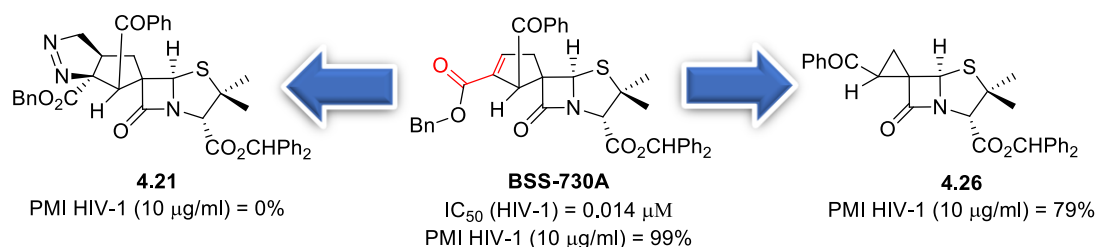
#### **4.4.4. Grupo carbonilo $\alpha,\beta$ -insaturado ou aceitador de Michael**

Foram sintetizados três análogos da molécula *lead* BSS-730A, cujas estruturas não apresentam um grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado. Estas modelações estruturais tiveram como propósito determinar se este grupo funcional eletrofílico altamente reativo e comumente associado a reações de alteração covalente de proteínas, é responsável pela atividade anti-HIV-1 apresentada pela espiro- $\beta$ -lactama 730A.

A espiropirazolina- $\beta$ -lactama **4.23** revelou-se consideravelmente citotóxica o que inviabilizou o seu ensaio de bioatividade contra HIV-1. Assim, não foi possível recolher qualquer tipo de informação de relação estrutura-atividade com base nesta molécula.



As duas espiro-β-lactamas **4.21** e **4.26**, análogas da molécula *lead* BSS-730A, apresentaram resultados dispares a nível de atividade contra o vírus do HIV-1. A espiro-β-lactama **4.21**, resultado da cicloadição 1,3-dipolar de diazometano à dupla ligação carbono-carbono do sistema α,β-insaturado da espiro-β-lactama BSS-730A não apresentou qualquer atividade. No entanto, a espirociclopropil-β-lactama **4.26** mostrou ser ativa contra o HIV-1 apresentando um valor de PMI de 79% (Figura 4.13).

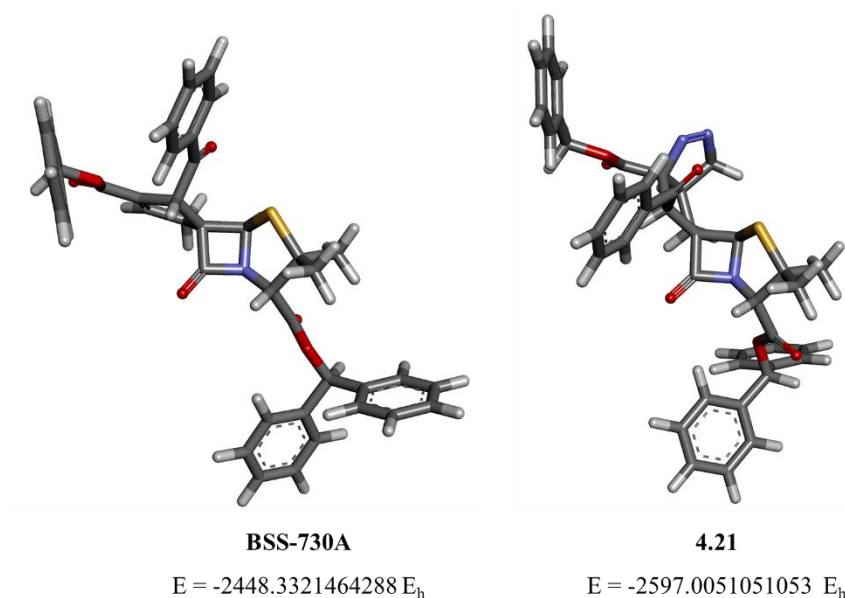


**Figura 4.13** – Modelação estrutural do aceitador de Michael na molécula *lead* BSS-730A e respetivo efeito na atividade antiviral dos seus análogos.

O facto de a molécula **4.26** apresentar atividade anti-HIV-1, apesar de não ter um aceitador de Michael na sua estrutura, indica claramente que este último grupo funcional não é indispensável à atividade da molécula BSS-730A. A diferença de atividades verificada pode ser justificada pela total remoção de uma característica farmacofórica, nomeadamente o éster benzilo, grupo este que, como demonstrado anteriormente na secção 4.4.2, está associado a uma potenciação da atividade anti-HIV-1 da classe das espirociclopentenil-β-lactamas.

A ausência de bioatividade verificada para a espiro-β-lactama **4.21**, pode ser facilmente justificada pelas diferenças estruturais entre esta molécula e a lactama bioativa BSS-730A. A presença de um novo anel pirazole na estrutura da β-lactama espirocíclica **4.21** leva não só a um aumento do volume da molécula como também provoca uma alteração na disposição tridimensional do grupo éster benzílico. É plausível que estas alterações estruturais, no seu conjunto, sejam de tal forma pronunciadas que impossibilitem a molécula **4.21** de interagir com o alvo putativo da molécula BSS-730A. Esta anterior consideração é suportada também pelos resultados dos cálculos de química computacional efetuados para determinar a geometria otimizada das espiro-lactamas BSS-730A e **4.21** ao nível de teoria DFT, utilizando o funcional híbrido B3LYP<sup>72-74</sup> e a base de funções 6-31G(d). As conformações de energia mínima das duas moléculas apresentam diferenças notórias a nível do sistema espirocíclico, observando-se que a

espiro- $\beta$ -lactama **4.21** apresenta maior distorção do anel espirocíclico não-lactâmico e, conseqüentemente, uma diferente disposição dos seus substituintes, relativamente à espiro- $\beta$ -lactama bioativa BSS-730A (Figura 4.14).



**Figura 4.14** – Conformações de energia mínima das espiro- $\beta$ -lactamas BSS-730A e **4.21**.

Complementariamente a todas as considerações apresentadas atrás relativas à importância do grupo funcional carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado, existe ainda uma característica estrutural da molécula BSS-730A que abona a favor da hipótese de esta exercer a sua atividade anti-HIV por um mecanismo de ação não dependente do aceitador de Michael, nomeadamente a presença do éster benzidrilo na sua estrutura. A posição que este assume na estrutura da espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A associado ao seu considerável volume, levam a que este grupo funcional constitua um fator de impedimento estéreo a ataques nucleofílicos ao carbono electrofílico  $\beta$  do aceitador de Michael, limitando assim a reatividade deste grupo funcional.

Em suma, as modelações da molécula BSS-730A relativas ao aceitador de Michael presente na sua estrutura e discutidas na presente secção suportam a hipótese de que a sua atividade anti-HIV não seja dependente da reatividade do sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado. Este resultado reveste-se de extrema importância, na medida em que exclui um possível foco estrutural de promiscuidade reacional e toxicidade, reforçando o grande potencial da espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A e sua respetiva classe como agentes terapêuticos contra o vírus do HIV.

#### 4.4.5. Isómeros $\alpha$ das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas

O grupo éster benzidrilo da molécula BSS-730B, isómero  $\alpha$  da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama ativa BSS-730A, também foi alvo de modelações estruturais. Num comportamento concordante com a falta de atividade anti-HIV observada para a molécula BSS-730B, o presente trabalho confirma que nenhum dos isómeros  $\alpha$  **4.20a-b**, ou os derivados **4.27** e **4.28**, revelam qualquer atividade antiviral.

#### 4.5. Conclusão

Neste capítulo foi descrito o estudo do *design* racional de novas espiro- $\beta$ -lactamas através da modelação estrutural de uma espirociclopentenil- $\beta$ -lactama previamente identificada como apresentando uma atividade antimicrobiana dupla contra HIV e *Plasmodium*, assim como um mecanismo inovador de inibição do vírus do HIV. Esta abordagem visou a identificação de novas moléculas bioativas e a recolha de informações estruturais que permitam uma melhor interpretação da relação estrutura-atividade desta classe de moléculas espirocíclicas. Desta forma as moléculas sintetizadas foram testadas *in vitro* quanto à sua citotoxicidade e atividade contra o vírus do HIV-1, o que resultou na identificação de duas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com uma notável atividade antiviral ( $IC_{50} < 0.4 \mu M$ ). Paralelamente e de forma concordante com o comportamento da sua molécula *lead*, ambas as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas revelaram uma atividade *in vitro* anti-*Plasmodium* bastante promissora, inibindo a infeção do parasita tanto no estágio hepático ( $IC_{50} < 2.3 \mu M$ ) como no sanguíneo ( $IC_{50} < 1.3 \mu M$ ).

Dada a elevada similaridade estrutural e conformacional verificada entre estas duas novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas bioativas e a molécula *lead* previamente identificada, é estimado que estas novas moléculas sintetizadas partilhem também o seu inovador mecanismo antiviral.

No computo geral, a identificação destas novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com atividade antimicrobiana dupla abre caminho ao desenvolvimento de novas  $\beta$ -lactamas espirocíclicas bioativas e, acima de tudo, reforça o potencial da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos altamente promissores, com um mecanismo de ação inovador e dupla atividade contra HIV e malária.

## 4.6. Bibliografia

1. Zhao, G.; Souers, A. J.; Voorbach, M.; Falls, H. D.; Droz, B.; Brodjian, S.; Lau, Y. Y.; Iyengar, R. R.; Gao, J.; Judd, A. S.; Wagaw, S. H.; Ravn, M. M.; Engstrom, K. M.; Lynch, J. K.; Mulhern, M. M.; Freeman, J.; Dayton, B. D.; Wang, X.; Grihalde, N.; Fry, D.; Beno, D. W. A.; Marsh, K. C.; Su, Z.; Diaz, G. J.; Collins, C. A.; Sham, H.; Reilly, R. M.; Brune, M. E.; Kym, P. R., Validation of diacyl glycerolacyltransferase I as a novel target for the treatment of obesity and dyslipidemia using a potent and selective small molecule inhibitor. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 380-383.
2. Zuzana, S.; Milan, P.; David, N.; Jitka, U.; Jan, V., Chemical properties and biological activities of cyclopentenediones: A review. *Mini Rev. Med. Chem.* **2014**, *14* (4), 322-331.
3. Elsebai, M. F.; Ghabbour, H. A.; Legrave, N.; Fontaine-Vive, F.; Mehiri, M., New bioactive chlorinated cyclopentene derivatives from the marine-derived Fungus *Phoma* sp. *Med. Chem. Res.* **2018**, *27* (8), 1885-1892.
4. Mokhtari, M.; Jackson, M. D.; Brown, A. S.; Ackerley, D. F.; Ritson, N. J.; Keyzers, R. A.; Munkacsi, A. B., Bioactivity-guided metabolite profiling of *Feijoa* (*Acca sellowiana*) cultivars identifies 4-cyclopentene-1,3-dione as a potent antifungal inhibitor of chitin synthesis. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (22), 5531-5539.
5. Hong, S.-H.; Ban, Y. H.; Byun, W. S.; Kim, D.; Jang, Y.-J.; An, J. S.; Shin, B.; Lee, S. K.; Shin, J.; Yoon, Y. J.; Oh, D.-C., Camporidines A and B: Antimetastatic and anti-inflammatory polyketide alkaloids from a gut bacterium of *Camponotus kiusiuensis*. *J. Nat. Prod.* **2019**, *82* (4), 903-910.
6. Kossack, R.; Breinlinger, S.; Nguyen, T.; Moschny, J.; Straetener, J.; Berscheid, A.; Brötz-Oesterhelt, H.; Enke, H.; Schirmeister, T.; Niedermeyer, T. H. J., Nostotrebins 6 related cyclopentenediones and  $\delta$ -lactones with broad activity spectrum isolated from the cultivation medium of the cyanobacterium *Nostoc* sp. CBT1153. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (2), 392-400.
7. Chen, C.; Wei, R.; Yi, X.; Gao, L.; Zhang, M.; Liu, H.; Li, Q.; Song, H.; Ban, S., Diastereo- and enantioselective synthesis of functionalized cyclopentenones containing a quaternary chiral center via a thiosquaramide-catalyzed cascade Michael–Henry reaction. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (23), 15655-15661.

8. Cobo, A. A.; Armstrong, B. M.; Fettingner, J. C.; Franz, A. K., Catalytic asymmetric synthesis of cyclopentene-spirooxindoles bearing vinylsilanes capable of further transformations. *Org. Lett.* **2019**, *21* (20), 8196-8200.
9. Ding, W.-P.; Zhang, G.-P.; Jiang, Y.-J.; Du, J.; Liu, X.-Y.; Chen, D.; Ding, C.-H.; Deng, Q.-H.; Hou, X.-L., Electron-deficient alkynes as dipolarophile in Pd-catalyzed enantioselective (3+2) cycloaddition reaction with vinyl cyclopropanes. *Org. Lett.* **2019**, *21* (17), 6805-6810.
10. Wang, R.; Chen, Y.; Shu, M.; Zhao, W.; Tao, M.; Du, C.; Fu, X.; Li, A.; Lin, Z., AuCl<sub>3</sub>-catalyzed ring-closing carbonyl-olefin metathesis. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (9), 1941-1946.
11. Vaishnav, N. K.; Chandrasekharan, S. P.; Zaheer, M. K.; Kant, R.; Mohanan, K., Substrate-controlled, PBu<sub>3</sub>-catalyzed annulation of phenacylmalononitriles with allenates enables tunable access to cyclopentenones. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (75), 11054-11057.
12. Nguyen, H. M.; Chand, H. R.; Golantsov, N. E.; Trushkov, I. V.; Voskressensky, L. G., Cyclopentene assembly by microwave-assisted domino reaction of donor-acceptor cyclopropanes with ketals. *Synlett* **2020**, *31* (3), 295-299.
13. Xu, C.; Wei, N.; Zhu, D.; Wang, M., Cyclopentene synthesis by a catalytic [3+2] annulation of donor-acceptor cyclopropanes with polarized alkenes. *ChemistrySelect* **2020**, *5* (36), 11399-11402.
14. Yamamoto, K.; López, E.; Barrio, P.; Borge, J.; López, L. A., Gold-Catalyzed [3+2] carbocycloaddition reaction of pinacol alkenylboronates: Stereospecific synthesis of boryl-functionalized cyclopentene derivatives. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26* (31), 6999-7003.
15. Wei, Y.; Shi, M., Lu's [3 + 2] cycloaddition of allenes with electrophiles: discovery, development and synthetic application. *Org. Chem. Front.* **2017**, *4* (9), 1876-1890.
16. Cristau, H. J.; Viala, J.; Christol, H., Inversion of polarity by phosphorylated groups - Inversion of the regioselectivity of nucleophilic-addition to allenes activated by electron withdrawing groups. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1985**, (5), 980-988.
17. Zhang, C.; Lu, X., Phosphine-Catalyzed Cycloaddition of 2,3-Butadienoates or 2-Butynoates with Electron-Deficient Olefins. A Novel [3 + 2] Annulation Approach to Cyclopentenones. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (9), 2906-2908.

18. Liang, Y.; Liu, S.; Xia, Y.; Li, Y.; Yu, Z.-X., Mechanism, regioselectivity, and the kinetics of phosphine-catalyzed [3+2] cycloaddition reactions of allenoates and electron-deficient alkenes. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (14), 4361-4373.
19. Zhou, W.; Wang, H.; Tao, M.; Zhu, C.-Z.; Lin, T.-Y.; Zhang, J., Phosphine-catalyzed enantioselective [3 + 2] cycloadditions of  $\gamma$ -substituted allenoates with  $\beta$ -perfluoroalkyl enones. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (6), 4660-4665.
20. Wang, H.; Zhang, J.; Tu, Y.; Zhang, J., Phosphine-catalyzed enantioselective dearomative [3+2]-cycloaddition of 3-nitroindoles and 2-nitrobenzofurans. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (16), 5422-5426.
21. Cardoso, A. L.; Soares, M., I. L., 1,3-Dipolar cycloadditions involving allenes: Synthesis of five-membered rings. *Curr. Org. Chem.* **2019**, *23* (27), 3064-3134.
22. Li, M.; Zhou, W., Highly enantioselective [3+2] cycloadditions of terminal allenoates with  $\beta$ -trifluoromethyl  $\alpha,\beta$ -enones. *Chem. Commun.* **2020**, *56* (62), 8842-8845.
23. Marco-Martínez, J.; Marcos, V.; Reboredo, S.; Filippone, S.; Martín, N., Asymmetric organocatalysis in fullerenes chemistry: Enantioselective phosphine-catalyzed cycloaddition of allenoates onto C60. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (19), 5115-5119.
24. Lee, S. Y.; Fujiwara, Y.; Nishiguchi, A.; Kalek, M.; Fu, G. C., Phosphine-Catalyzed enantioselective intramolecular [3+2] annulations to generate fused ring systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (13), 4587-4591.
25. Ni, H.; Yao, W.; Lu, Y., Enantioselective [3 + 2] annulation of  $\alpha$ -substituted allenoates with  $\beta,\gamma$ -unsaturated N-sulfonylimines catalyzed by a bifunctional dipeptide phosphine. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 343-348.
26. Du, Y.; Lu, X., A Phosphine-catalyzed [3+2] cycloaddition strategy leading to the first total synthesis of (-)-Hinesol. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (16), 6463-6465.
27. García Ruano, J. L.; Núñez, J. A.; Rosario Martín, M.; Fraile, A., Totally Regio- and stereoselective behavior of mono- and deactivated cyclic alkenes in the Lu reaction: Synthesis of enantiopure functionalized cyclopentanes. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (23), 9366-9371.
28. Wang, D.; Wang, G.-P.; Sun, Y.-L.; Zhu, S.-F.; Wei, Y.; Zhou, Q.-L.; Shi, M., Chiral phosphine-catalyzed tunable cycloaddition reactions of allenoates with benzofuranone-derived olefins for a highly regio-, diastereo- and enantioselective synthesis of spiro-benzofuranones. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (12), 7319-7325.

29. Liu, R.; Qin, Z.; Fan, B.; Li, R.; Zhou, R.; He, Z., Phosphine-catalyzed chemo- and diastereoselective [2 + 2 + 2] and [3 + 2] annulations of  $\gamma$ -methyl allenates with doubly activated olefins: Syntheses of highly substituted cyclohexanes and cyclopentenes. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (19), 12490-12498.
30. Wallace, D. J.; Sidda, R. L.; Reamer, R. A., Phosphine-catalyzed cycloadditions of allenic ketones: New substrates for nucleophilic catalysis. *J. Org. Chem.* **2007**, *72* (3), 1051-1054.
31. Fujiwara, Y.; Fu, G. C., Application of a new chiral phosphine to the catalytic asymmetric synthesis of highly functionalized cyclopentenes that bear an array of heteroatom-substituted quaternary stereocenters. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (31), 12293-12297.
32. Zhang, X.-C.; Cao, S.-H.; Wei, Y.; Shi, M., Phosphine- and nitrogen-containing Lewis Base catalyzed highly regioselective and geometric selective cyclization of isatin derived electron-deficient alkenes with ethyl 2,3-butadienoate. *Org. Lett.* **2011**, *13* (5), 1142-1145.
33. Duvvuru, D.; Pinto, N.; Gomez, C.; Betzer, J.-F.; Retailleau, P.; Voituriez, A.; Marinetti, A., Heterocyclic spiranes and dispiranes via enantioselective phosphine-catalyzed [3+2] annulations. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354* (2-3), 408-414.
34. Voituriez, A.; Marinetti, A.; Gicquel, M., Phosphine organocatalysis for the synthesis of spirocyclic compounds. *Synlett* **2015**, *26* (2), 142-166.
35. Santos, B. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of chiral spirocyclopentenyl- $\beta$ -lactams through phosphane-catalyzed [3+2] annulation of allenates with 6-alkylidenepenicillanates. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (18), 3901-3909.
36. Bártolo, I.; Santos, B. S.; Fontinha, D.; Machado, M.; Francisco, D.; Sepodes, B.; Rocha, J.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Figueira, M. E.; Barroso, H.; Nascimento, T.; Alves de Matos, A. P.; Alves, A. J. S.; Alves, N. G.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Taveira, N., Spiro- $\beta$ -lactam BSS-730A displays potent activity against HIV and Plasmodium. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (2), 421-434.
37. Jackson, P. A.; Widen, J. C.; Harki, D. A.; Brummond, K. M., Covalent modifiers: A chemical perspective on the reactivity of  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyls with thiols via hetero-Michael addition reactions. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (3), 839-885.
38. Caprioglio, D.; Minassi, A.; Avonto, C.; Tagliatela-Scafati, O.; Appendino, G., Thiol-trapping natural products under the lens of the cysteamine assay: friends, foes, or simply alternatively reversible ligands? *Phytochem. Rev.* **2020**, *19* (6), 1307-1321.

39. Del Prete, D.; Tagliatalata-Scafati, O.; Minassi, A.; Sirignano, C.; Cruz, C.; Bellido, M. L.; Muñoz, E.; Appendino, G., Electrophilic triterpenoid enones: A comparative thiol-trapping and bioactivity study. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80* (8), 2276-2283.
40. Gersch, M.; Kreuzer, J.; Sieber, S. A., Electrophilic natural products and their biological targets. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29* (6), 659-682.
41. Piesche, M.; Roos, J.; Kühn, B.; Fettel, J.; Hellmuth, N.; Brat, C.; Maucher, I. V.; Awad, O.; Matrone, C.; Comerma Steffensen, S. G.; Manolikakes, G.; Heinicke, U.; Zacharowski, K. D.; Steinhilber, D.; Maier, T. J., The emerging therapeutic potential of nitro fatty acids and other Michael acceptor-containing drugs for the treatment of inflammation and cancer. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11* (1297).
42. Mandal, S. K.; Debnath, U.; Kumar, A.; Thomas, S.; Mandal, S. C.; Choudhury, M. D.; Palit, P., Natural sesquiterpene lactones in the prevention and treatment of inflammatory disorders and cancer: A systematic study of this emerging therapeutic approach based on chemical and pharmacological aspect. *Lett. Drug Des. Discov.* **2020**, *17* (9), 1102-1116.
43. Garuti, L.; Roberti, M.; Bottegoni, G., Irreversible protein kinase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (20), 2981-2994.
44. Tran, Q. T. N.; Tan, D. W. S.; Wong, W. S. F.; Chai, C. L. L., From irreversible to reversible covalent inhibitors: Harnessing the andrographolide scaffold for anti-inflammatory action. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *204*, 112481.
45. Mohamed, M. F. A.; Abuo-Rahma, G. E.-D. A., Molecular targets and anticancer activity of quinoline–chalcone hybrids: literature review. *RSC Adv.* **2020**, *10* (52), 31139-31155.
46. Schmitz, T.; Bäuml, C. A.; Imhof, D., Inhibitors of blood coagulation factor XIII. *Anal. Biochem.* **2020**, *605*, 113708.
47. Shao, J.; Liu, S.; Liu, X.; Pan, Y.; Chen, W., Design, synthesis and SAR study of 2-aminopyrimidines with diverse Michael addition acceptors for chemically tuning the potency against EGFR L858R/T790M. *Bioorg. Med. Chem.* **2020**, *28* (19), 115680.
48. Perković, I.; Beus, M.; Schols, D.; Persoons, L.; Zorc, B., Itaconic acid hybrids as potential anticancer agents. *Mol. Divers.* **2020**.
49. Lalmanach, G.; Saidi, A.; Bigot, P.; Chazeirat, T.; Lecaille, F.; Wartenberg, M., Regulation of the proteolytic activity of cysteine cathepsins by oxidants. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (6), 1944.



50. Poater, A., Michael acceptors tuned by the pivotal aromaticity of Histidine to block COVID-19 activity. *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11* (15), 6262-6265.
51. Baell, J. B.; Nissink, J. W. M., Seven Year Itch: Pan-assay interference compounds (PAINS) in 2017—Utility and Limitations. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (1), 36-44.
52. Jasial, S.; Gilberg, E.; Blaschke, T.; Bajorath, J., Machine learning distinguishes with high accuracy between Pan-assay interference compounds that are promiscuous or represent dark chemical matter. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (22), 10255-10264.
53. Bauer, R. A., Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (9), 1061-1073.
54. Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W. R., Covalent inhibition in drug discovery. *ChemMedChem* **2019**, *14* (9), 889-906.
55. Roskoski, R., Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacol. Res.* **2019**, *139*, 395-411.
56. Cameron, F.; Sanford, M., Ibrutinib: First global approval. *Drugs* **2014**, *74* (2), 263-271.
57. Deeks, E. D., Neratinib: First global approval. *Drugs* **2017**, *77* (15), 1695-1704.
58. Greig, S. L., Osimertinib: First global approval. *Drugs* **2016**, *76* (2), 263-273.
59. Dungo, R. T.; Keating, G. M., Afatinib: First global approval. *Drugs* **2013**, *73* (13), 1503-1515.
60. Blair, H. A., Dimethyl Fumarate: A review in moderate to severe Plaque Psoriasis. *Drugs* **2018**, *78* (1), 123-130.
61. Wang, Y.-Y.; Yang, Y.-X.; Zhe, H.; He, Z.-X.; Zhou, S.-F. Bardoxolone methyl (CDDO-Me) as a therapeutic agent: an update on its pharmacokinetic and pharmacodynamic properties. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *2014* (8), 2075-2088.
62. Rossing, P.; Block, G. A.; Chin, M. P.; Goldsberry, A.; Heerspink, H. J. L.; McCullough, P. A.; Meyer, C. J.; Packham, D.; Pergola, P. E.; Spinowitz, B.; Sprague, S. M.; Warnock, D. G.; Chertow, G. M., Effect of bardoxolone methyl on the urine albumin-to-creatinine ratio in patients with type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2019**, *96* (4), 1030-1036.
63. Zhang, C. M.; Lu, X. Y., Phosphine-catalyzed cycloaddition of 2,3-butadienoates or 2-butynoates with electron-deficient olefins - A novel 3+2 annulation approach to cyclopentenes. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (9), 2906-2908.

64. Pham, T. Q.; Pyne, S. G.; Skelton, B. W.; White, A. H., Regioselective and diastereoselective phosphine-catalysed 3+2 cycloadditions to 5-methylenehydantoins: reversal of regioselectivity using chiral *N*-2-butynoyl-(4*S*)-benzyloxazolidinone. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43* (34), 5953-5956.
65. Pinto, N.; Fleury-Brégeot, N.; Marinetti, A., Enantioselective binaphthophosphine-promoted [3+2] annulations of *N*-Ts- and *N*-DPP-imines with allenates and 2-butynoates. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, *2009* (1), 146-151.
66. Andrews, S. D.; Day, A. C.; McDonald, A. N., Cycloadditions. Part I. Steric effects in the addition of diazoalkanes to  $\alpha\beta$ -unsaturated esters. *J. Chem. Soc. C*, **1969**, (5), 787-790.
67. Benchouk, W.; Mekelleche, S. M., Theoretical study of the mechanism and regioselectivity of the 1,3-dipolar cycloaddition of diazomethane with methyl acrylate using theoretical approaches. *J. Mol. Struct. Theochem* **2008**, *862* (1), 1-6.
68. Kissane, M.; Maguire, A. R., Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions of acrylamides. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (2), 845-883.
69. Santos, B. S.; Gomes, C. S. B.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of chiral spiropyrazoline- $\beta$ -lactams and spirocyclopropyl- $\beta$ -lactams from 6-alkylidenepenicillanates. *Tetrahedron* **2014**, *70* (24), 3812-3821.
70. Sheehan, J. C.; Chacko, E.; Lo, Y. S.; Ponzi, D. R.; Sato, E., Some new spiro penicillins. *J. Org. Chem.* **1978**, *43* (25), 4856-4859.
71. Habich, D.; Metzger, K., Inhibitors of beta-lactamases. 2. Synthesis of 6-sulfonylmethylene, 6-sulfinylmethylene-penicillanic and spiropyrazoline-penicillanic acids. *Heterocycles* **1986**, *24* (2), 289-296.
72. Becke, A. D., Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A Gen. Phys.* **1988**, *38* (6), 3098-3100.
73. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1988**, *37* (2), 785-789.
74. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. 3. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648-5652.
75. Martinez, C. R.; Iverson, B. L., Rethinking the term "pi-stacking". *Chem. Sci.* **2012**, *3* (7), 2191-2201.

# Capítulo 5

## Novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*. Parte 2

### Resumo

Resultados anteriormente apresentados focados no estudo de relações de estrutura-atividade da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, permitiram a identificação de um seu grupo funcional cuja modelação estrutural provou ser uma estratégia válida e promissora para a obtenção de novos compostos bioativos. Neste contexto, foi explorada a síntese de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas que resultaram de novas modelações do éster benzílico da posição 2' do anel ciclopenteno da molécula *lead* BSS-730A, por uma metodologia sintética baseada na cicloadição [3+2] formal entre alenoatos monossustituídos e 6-alkilidenopenicilanos. O estudo da atividade anti-HIV-1 das novas moléculas sintetizadas permitiu a identificação de seis novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com atividade antiviral submicromolar, duas delas apresentando valores de bioatividade comparáveis aos da molécula *lead*.

## **Capítulo 5 - Novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*. Parte 2**

5.1. Introdução	167
5.2. Síntese e modelação estrutural	169
5.2.1. Síntese dos alenos monossustituídos	169
5.2.2. Síntese derivados da molécula BSS-730A	171
5.3. Citotoxicidade e atividade anti-HIV	172
5.4. Relação estrutura-atividade	175
5.5. Conclusão	182
5.6. Bibliografia	184

## 5.1. Introdução

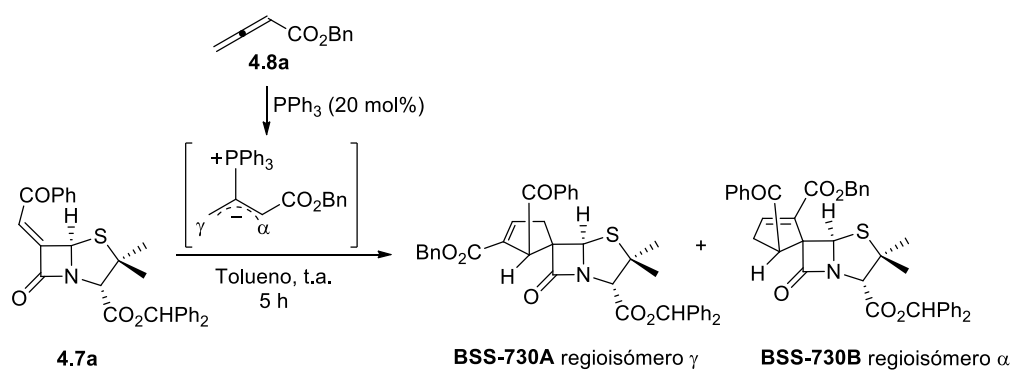
Uma vez concluídos e interpretados os estudos de bioatividade contra o HIV-1, respetivos ao primeiro conjunto de moléculas obtido na primeira ronda de modelações estruturais em torno da molécula *lead* BSS-730A e apresentada no Capítulo 4, os seus resultados serviram de base racional e impulsionadora da síntese de um novo conjunto de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas cuja estrutura é produto da modelação estrutural exclusiva do éster benzílico presente na posição 2' do anel ciclopenteno da molécula BSS-730A.

Como tem vindo a ser extensivamente discutido ao longo do presente trabalho, a espiro- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A apresenta uma elevada atividade antimicrobiana contra HIV e *Plasmodium* assim com um mecanismo de ação anti-HIV inovador<sup>1</sup>, tendo sido por isso explorada como *template* estrutural para o *design* e síntese de novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas potencialmente bioativas. A modelação da posição 2' do anel ciclopenteno da espiro- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A pela substituição do éster benzílico por pequenos ésteres alquílicos, como o éster metílico ou etílico, revelou ser uma estratégia eficiente para a obtenção de novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas contra o HIV. Esta estratégia de modelação estrutural preliminar resultou na síntese de duas novas moléculas **4.19a** e **4.19b** com elevada bioatividade contra o HIV-1, apresentando também uma atividade promissora contra *Plasmodium*, tanto na sua fase hepática como na eritrocítica. Com base nestes resultados altamente promissores, concebeu-se então proceder a uma nova ronda de modelações estruturais exclusivamente em torno desta posição da molécula *lead* BSS-730A.

Contrariamente ao verificado para alenoatos monossustituídos com pequenos ésteres alquílicos, os alenoatos contendo grupos éster que se conceberam incluir na posição 2' do anel ciclopenteno espirocíclico apresentam cadeias de maior peso molecular, não revelando uma volatilidade exagerada, o que facilitou o seu manuseamento. Esta característica dos compostos, permitiu que a estratégia de modelação estrutural em torno da molécula *lead* BSS-730A se baseasse na reação do 6-alquilidenopenicilinato **4.7a** com diferentes alenoatos monossustituídos, por via de uma cicloadição [3+2] formal,<sup>2</sup> à imagem do procedimento utilizado para a síntese da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A<sup>3</sup> (Esquema 5.1).

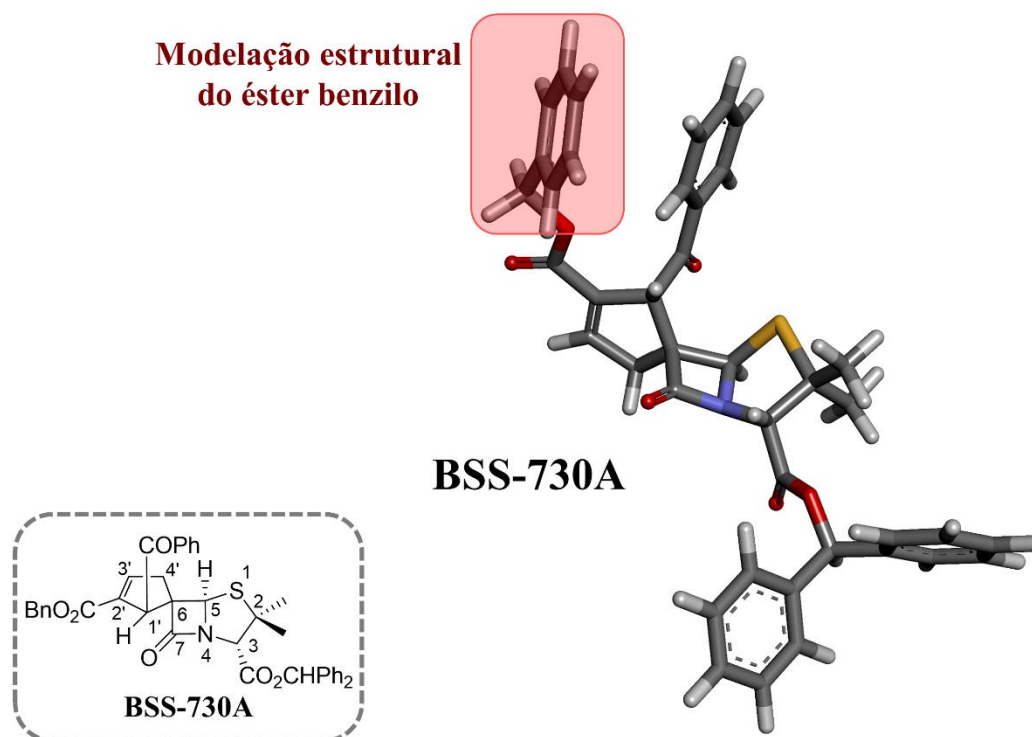
A cicloadição [3+2] formal catalisada por fosfinas, envolvendo a geração de uma espécie zwitteriônica<sup>4</sup> que atua como o componente de três-átomos a partir de um

alenoato, tem vindo a ser bastante explorado na síntese de moléculas contendo anéis ciclopenteno na sua estrutura.<sup>5-12</sup> O mecanismo de reação de formação dos compostos carbocíclicos foi discutido em detalhe no Capítulo 4 deste trabalho. 6-Alquilidenopenicilanos (*e.g.* **4.7a**) participam neste tipo de cicloadições de forma estereosseletiva, uma vez que a adição do dipolo formal ocorre exclusivamente pelo lado  $\alpha$  da  $\beta$ -lactama. Estas reações são caracterizadas pela formação de dois cicloadutos regioisoméricos, regioisómero  $\alpha$  e regioisómero  $\gamma$ , correspondendo ao ataque inicial do carbono  $\alpha$  ou  $\gamma$  do dipolo ao carbono-6 da  $\beta$ -lactama.<sup>2,5,13</sup>



**Esquema 5.1** – Síntese da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A como exemplo de uma reação de cicloadição [3+2] formal entre um alenoato monossustituído e um alquilidenopenicilano.

De forma mais concreta, esta nova ronda de modelações estruturais visou dotar a posição 2' do anel ciclopenteno da molécula *lead* BSS-730A com diferentes classes de ésteres (Figura 5.1), desde ésteres fenólicos a ésteres de cadeia alquílica longa, passando por ésteres benzílicos contendo substituintes aromáticos na posição 4 do grupo fenilo, e ainda outros ésteres como o éster propargílico ou o cinamílico. Esta abordagem pretende obter novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas que possam apresentar uma atividade promissora contra o HIV, aumentando assim a panóplia de espiro- $\beta$ -lactamas bioativas. Assume-se também que tamanha variedade de grupos substituintes seja abrangente o suficiente para recolher uma considerável quantidade de informações relevantes quanto à interpretação da relação de estrutura-atividade inerente à presente classe de compostos.

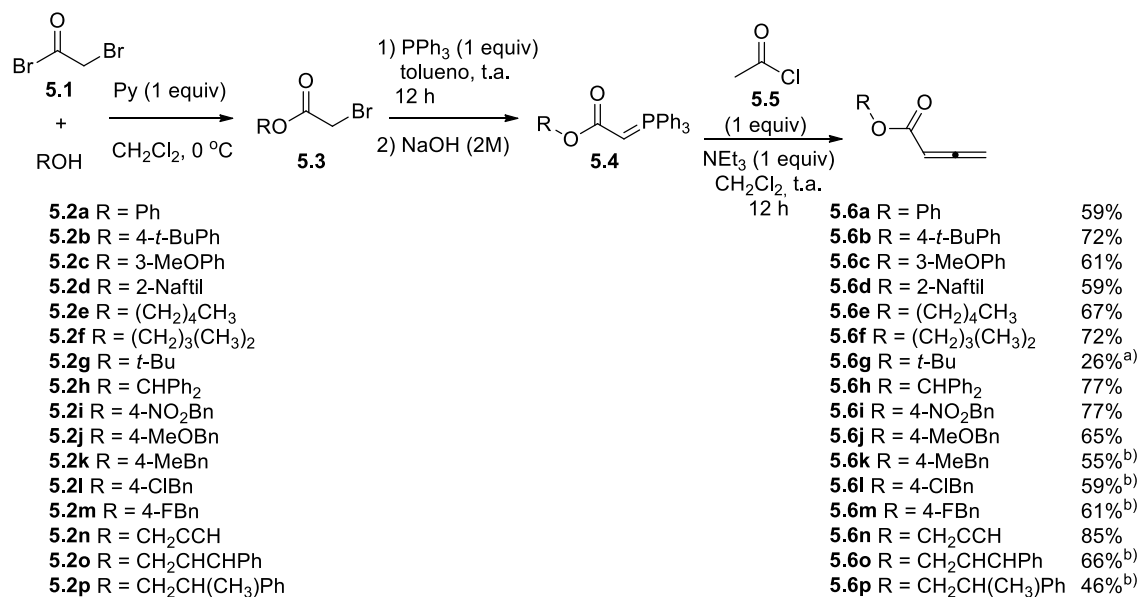


**Figura 5.1** – Representação gráfica da estrutura da molécula BSS-730A, colocando em evidência a posição 2' do anel espirociclopentenil que foi alvo de modelação estrutural.

## 5.2. Síntese e modelação estrutural

### 5.2.1. Síntese dos alenos monossustituídos

Os alenos monossustituídos **5.6** foram sintetizados de acordo com um procedimento da literatura.<sup>14</sup> Em termos gerais, esta estratégia de síntese compreende uma reação de Wittig<sup>15</sup> entre um ileto de fósforo e um ceteno gerado *in situ* a partir de um cloreto de acilo na presença de trietilamina. Neste caso específico em que se visou a síntese de alenos monossustituídos, utilizou-se o cloreto de acetilo (**5.5**) de forma transversal a todas as sínteses (Esquema 5.2). Com exceção do aleno **5.6g**, cujo respetivo bromoéster precursor se encontra disponível comercialmente, todos os restantes bromoésteres precursores e os seus respetivos iletos de fósforo foram sintetizados *de novo* e utilizados sem purificação para a síntese do aleno, por via de uma estratégia sintética cujo primeiro passo compreende a esterificação do brometo de bromoacetilo (**5.1**) com o álcool apropriado e subsequente síntese do respetivo ileto de fósforo, de acordo com um procedimento adaptado da literatura.<sup>16</sup>



**Esquema 5.2** – Síntese de alenos monossustituídos via reação de Wittig. <sup>a)</sup> Sintetizado a partir do bromoéster adquirido comercialmente; <sup>b)</sup> Obtido na forma de mistura com o respectivo isômero 2-butinoato.

Os alenoatos foram obtidos com rendimentos de moderados a altos (26%-85%). No caso específico do alenoato **5.6g** que apresentou o rendimento mais baixo da série (26%), este resultado é imputável à sua ainda assim razoável volatilidade, que causou perdas aquando do procedimento de secagem do composto.

Na sequência sintética de preparação do alenoato **5.6p** foi utilizado o álcool 2-fenilpropan-1-ol na forma racémica.

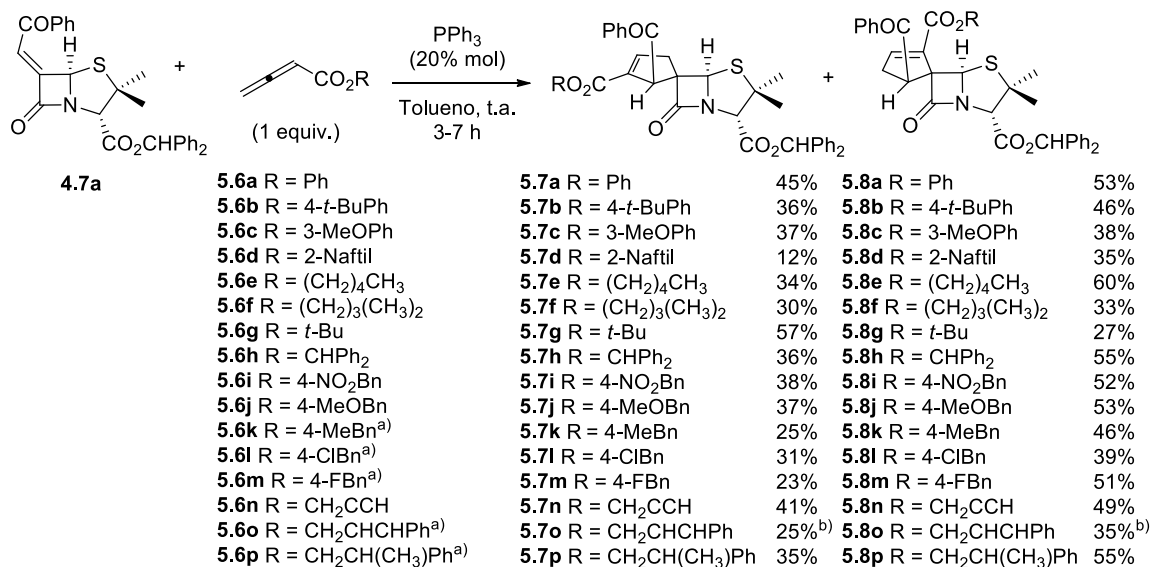
De notar que nalguns casos particulares se revelou impossível separar por cromatografia em coluna o 2,3-butadienoato do seu respectivo isômero 2-butinoato que se forma durante a reação<sup>17,18</sup>, sendo apresentado o seu rendimento conjunto. Estas situações não foram consideradas como potencialmente comprometedoras da estratégia sintética preconizada já que, tal como explorado anteriormente no Capítulo 4 do presente trabalho, os 2-butinoatos apresentam o mesmo tipo de reatividade que os 2,3-butadienoatos em cicloadições [3+2] formais com 6-alkilidenopenicilanos na presença de fosfina, desempenhando igualmente o papel de precursores de dipolos<sup>2</sup>. Desta forma, considerou-se como válida a utilização da mistura de isómeros nas reações de cicloadição com o 6-alkilidenopenicilano **4.7a** de modo a obter-se os respectivos derivados da espirociclopentenil-β-lactama *lead* BSS-730A.



### 5.2.2. Síntese de derivados da molécula BSS-730A

Como via para a síntese de novas espirociclopentenil-β-lactamas análogas da molécula *lead* BSS-730A, seguiu-se a mesma abordagem sintética utilizada para a obtenção desta última e cujo protocolo se encontra disponível na literatura.<sup>3</sup> Assim, o 6-alquilidenopenicilanato **4.7a** reagiu com os alenoatos **5.6** de forma equimolar e na presença de PPh<sub>3</sub> (20% mol) (Esquema 5.3) permitindo a síntese de dezasseis novos análogos da molécula *lead* BSS-730A, assim como os seus respetivos isómeros α, com rendimentos globais de moderados a excelentes (47-98%). A cicloadição ocorreu à temperatura ambiente com tempos de reação entre 3 a 7 h. No entanto, no caso específico da reação com o aleno **5.6o**, contendo um éster cinamílico, o tempo de reação foi consideravelmente superior (72 h).

À imagem do já anteriormente reportado na literatura para este tipo de reatividade,<sup>3</sup> a aproximação do dipolo formal ocorre pelo lado α com menor impedimento estereo do 6-alquilidenopenicilanato, resultando na formação estereosseletiva dos espiropenicilanatos quirais **5.7** e **5.8**. Relativamente à regioselectividade da reação, regra geral o isómero α **5.8** foi obtido como produto maioritário, com exceção da cicloadição com o alenoato **5.6g** em que se verificou um comportamento contrário.



**Esquema 5.3** – Síntese de novas espirociclopentenil-β-lactamas via reação de cicloadição [3+2] formal entre alenoatos monossustituídos e um alquilidenopenicilanato. <sup>a)</sup> Utilizado na forma de mistura com o respetivo isómero 2-butinoato; <sup>b)</sup> O tempo de reação foi de 72 h.

É de referir o caso específico das espiro- $\beta$ -lactamas **5.7p** e **5.8p**, produtos da cicloadição do aleno **5.6p** com o alquilideno **4.7**, que foram ambos obtidos como uma mistura de diastereoisómeros. Este resultado é comprovado pela presença de diversos sinais duplicados nos respetivos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 96 do Anexo 1). No entanto, e dado que a análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  não permite identificar qualquer evidência da presença da mistura de diastereoisómeros, não foi possível determinar o rácio respetivo.

### 5.3. Citotoxicidade e atividade anti-HIV

As novas  $\beta$ -lactamas espirocíclicas **5.7**, análogos da molécula *lead* BSS-730A, foram avaliadas quanto à sua citotoxicidade *in vitro* ( $\text{CC}_{50}$ ) em células TZM-bl, antes de se determinar a sua potencial atividade antiviral. É de referir que o facto de as moléculas **5.8** não terem sido alvo de ensaios biológicos se justifica pela falta de atividade anti-HIV verificada para a totalidade dos regioisómeros  $\alpha$  das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas apresentadas ao longo deste trabalho.

As moléculas testadas apresentaram valores de  $\text{CC}_{50}$  que variam entre 35.78  $\mu\text{M}$  (espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7j**) e 215.46  $\mu\text{M}$  (espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7a**) (Tabela 5.1). Estes resultados estão de acordo com dados de citotoxicidade respeitantes aos estudos anteriormente apresentados nos capítulos 2 e 4, confirmando novamente a baixa citotoxicidade *in vitro* das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, uma característica altamente relevante no desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico.

**Tabela 5.1** – Citotoxicidade (CC<sub>50</sub>) e atividade antiviral (PMI) contra HIV-1 (estirpe SG3.1, tropismo X4) do conjunto de espiro- $\beta$ -lactamas sintetizadas pela modelação da posição 2' da molécula *lead* BSS-730A.

Composto	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	PMI (25 $\mu$ g/mL) (%) <sup>a)</sup>
<b>5.7a</b>	215.46	0
<b>5.7b</b>	54.67	0
<b>5.7c</b>	58.13	0
<b>5.7d</b>	38.02	54
<b>5.7e</b>	60.29	44
<b>5.7f</b>	53.40	21
<b>5.7g</b>	44.39	0 <sup>b)</sup>
<b>5.7h</b>	45.28	0
<b>5.7i</b>	55.99	0
<b>5.7j</b>	35.78	100
<b>5.7k</b>	60.03	93
<b>5.7l</b>	54.06	84
<b>5.7m</b>	55.83	100
<b>5.7n</b>	60.11	94
<b>5.7o</b>	62.29	100
<b>5.7p</b>	44.74	0

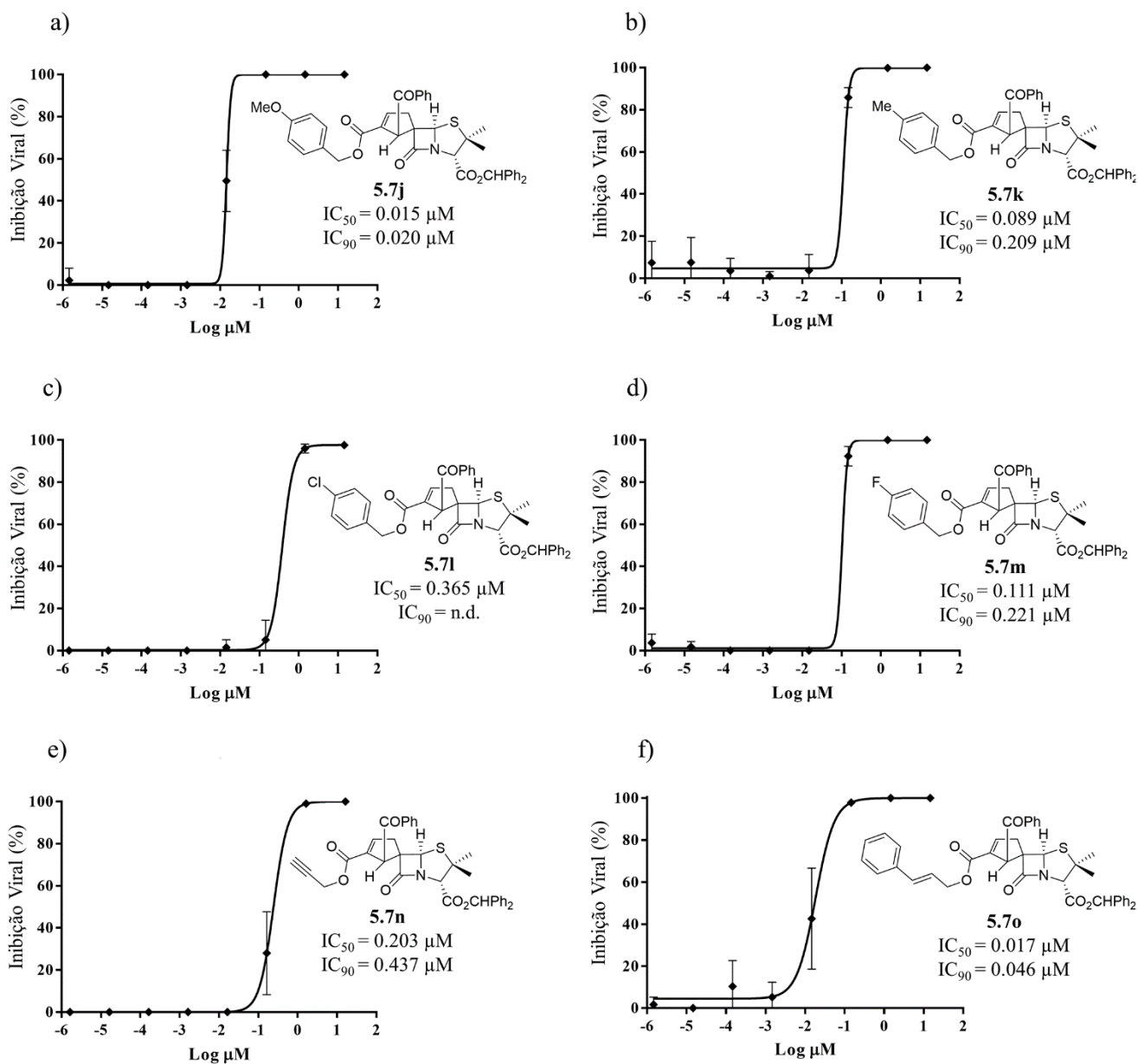
<sup>a)</sup> HIV-1, estirpe SG3.1, tropismo X4

<sup>b)</sup> MPI a 10  $\mu$ g/mL

Quanto à atividade antiviral esta foi avaliada por um ensaio preliminar em que foi determinada a PMI de todos os compostos contra o vírus do HIV-1 (SG3.1, tropismo X4) a uma concentração fixa de 25  $\mu$ g/mL, num ensaio *single-round* feito em células TZM-bl. As espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com uma PMI superior a 80% são consideradas como tendo uma promissora atividade anti-HIV, justificando-se a determinação dos seus valores de IC<sub>50</sub>.

A determinação da PMI à concentração de 25  $\mu$ g/mL permitiu a identificação de seis espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas que apresentaram uma atividade promissora contra HIV-1 (PMI > 80%), três das quais apresentaram uma PMI de 100%. De entre as restantes espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, o valor de PMI mais elevado foi verificado para a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7e** (PMI = 54%) enquanto seis não mostraram qualquer atividade anti-HIV-1 (PMI = 0%). No seguimento dos resultados de PMI, determinou-se os valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> dos seis compostos que apresentaram uma PMI superior a 80%.

As seis moléculas mostraram valores de  $IC_{50}$  notáveis contra o HIV-1 (Figura 5.2). De entre as moléculas bioativas, o menor valor de atividade observado foi o da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7l** com um valor de  $IC_{50}$  de 0.366  $\mu$ M, seguida das moléculas **5.7n** e **5.7m**, com valores respetivos de  $IC_{50}$  de 0.203  $\mu$ M e 0.111  $\mu$ M. As moléculas **5.7j** e **5.7o** apresentaram-se como as moléculas mais ativas da série, apresentando valores de  $IC_{50}$  bastante aproximados entre si, de 0.015  $\mu$ M e 0.017  $\mu$ M, respetivamente. Estes valores são também comparáveis ao apresentado pela espirociclopentenil- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A contra a mesma estirpe do vírus do HIV-1 ( $IC_{50} = 0.014 \mu\text{M}$ )<sup>1</sup>. No entanto, é de notar que a molécula **5.7j** apresenta um valor de  $IC_{90}$  de 0.020  $\mu$ M, ligeiramente inferior ao apresentado pela molécula *lead* BSS-730A, cujo valor de  $IC_{90}$  é de 0.025  $\mu$ M. Para além de aumentar consideravelmente o número de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas identificadas como tendo elevada atividade contra o HIV, os presentes resultados de bioatividade confirmam ainda inequivocamente a utilidade e potencial da molécula BSS-730A como molécula *lead*, ou *template* estrutural, para o *design* e subsequente síntese de novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com elevada atividade anti-HIV-1.



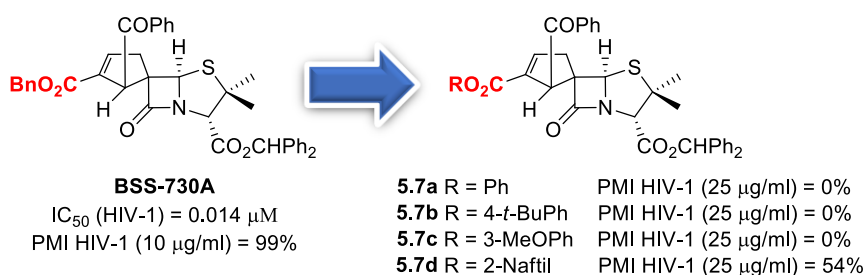
**Figura 5.2** – Atividade anti-HIV-1 das espirociclopentenil-β-lactamas a) **5.7j**, b) **5.7k**, c) **5.7l**, d) **5.7m**, e) **5.7n** e f) **5.7o**.

#### 5.4. Relação estrutura-atividade

Após o sucesso da substituição do éster benzílico presente na posição 2' da espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A por pequenos ésteres alquílicos (*e.g.* metílico e etílico), modelações estruturais estas que resultaram na síntese de duas novas espirociclopentenil-β-lactamas com dupla atividade contra HIV-1 e *Plasmodium*, estendeu-se esta estratégia à incorporação de ésteres de maior dimensão na mesma posição (Esquema 5.3). Esta abordagem resultou na identificação de seis novas

espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com elevada atividade contra HIV-1. Analisando as diferenças estruturais entre a espiro- $\beta$ -lactama *lead* BSS-730A e estes seus novos análogos identificados e apresentados no presente capítulo, foi possível estabelecer algumas relações de estrutura-atividade.

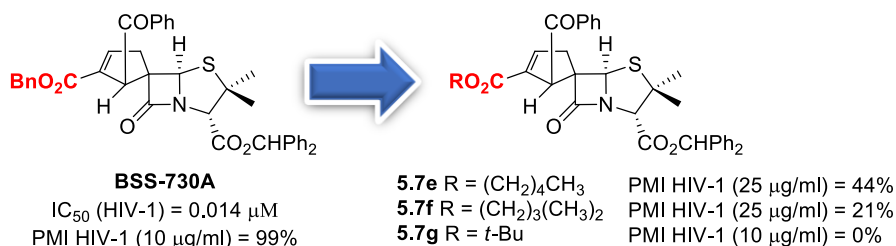
Primariamente, a molécula *lead* BSS-730A foi alvo de um conjunto de derivatizações estruturais visando a substituição do éster benzílico na posição 2' por ésteres fenílicos e derivados (Figura 5.3). A espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7a** contém um éster fenílico na posição 2' do anel ciclopenteno, em lugar do éster benzílico presente na molécula *lead* BSS-730A. Ambas as moléculas apresentam um grupo aromático terminal nessa posição divergindo, no entanto, pela maior liberdade conformacional no éster benzílico da espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A comparativamente ao éster fenílico da molécula **5.7a**. Contrariamente à molécula BSS-730A, a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7a** não demonstrou qualquer atividade antiviral contra o vírus do HIV-1, indiciando a importância da presença do grupo metileno ( $\text{CH}_2$ ) do éster benzílico. Em concordância com o resultado anterior, também os restantes derivados contendo ésteres fenílicos substituídos **5.7b-c** não mostraram qualquer atividade contra o vírus do HIV-1. A espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7d**, contendo um éster 2-naftílico na posição 2' do anel ciclopenteno, revelou baixa atividade anti-HIV-1 mesmo a uma concentração elevada (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), apresentando uma PMI de apenas 54%.



**Figura 5.3** – Modelação estrutural por substituição do grupo éster benzílico da molécula BSS-730A por ésteres fenílicos e o seu efeito na atividade anti-HIV-1.

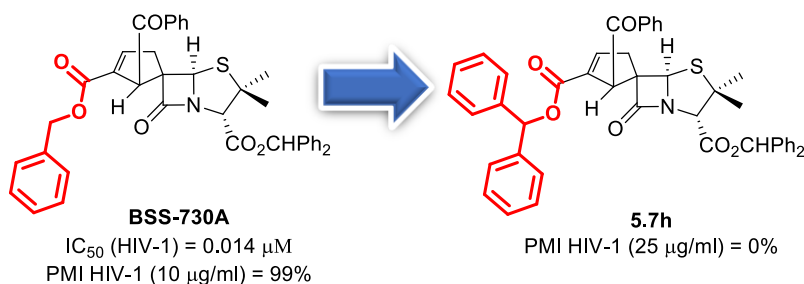
Ao contrário do verificado para pequenos ésteres alquílicos (secção 4.3 do Capítulo 4), nomeadamente o éster metílico e etílico, a introdução de ésteres alquílicos de maior dimensão, como o pentílico **5.7e**, isopentílico **5.7f** e *tert*-butílico **5.7g**, na posição 2' da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama levou a moléculas sem atividade relevante ( $\text{PMI} \leq 44\%$ ) ou inativas contra o HIV-1, mesmo a uma concentração elevada (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Figura 5.4). Tais resultados de bioatividade demonstram que a atividade antiviral da

presente classe de espirociclopentenil-β-lactamas é incompatível com a presença de ésteres alquílicos volumosos na posição 2' do anel espirociclopentenil.



**Figura 5.4** – Modelação estrutural por substituição do grupo éster benzílico da molécula BSS-730A por ésteres alquílicos volumosos e o seu efeito na atividade anti-HIV-1.

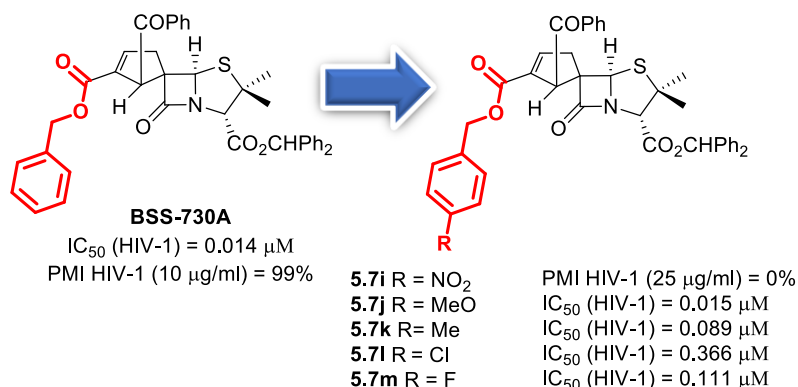
A molécula inativa **5.7h**, tem a molécula *lead* BSS-730A como subestrutura, variando estruturalmente desta última pela presença de um grupo mais volumoso, o éster benzidrílico, como substituinte na posição 2' do anel ciclopenteno (Figura 5.5). É plausível que o aumento de impedimento estérico na molécula inativa **5.7h**, devido à presença de um anel fenilo adicional, impeça esta última de reproduzir as interações estabelecidas pela espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A e o seu alvo putativo, justificando-se desta forma a total ausência de atividade antiviral observada para a espirociclopentenil-β-lactama **5.7h**.



**Figura 5.5** – Modelação estrutural por substituição do grupo éster benzílico da molécula BSS-730A por um éster benzidrílico e o seu efeito na atividade anti-HIV-1.

A modelação estrutural por adição de substituintes em resíduos aromáticos é uma estratégia recorrente para a modelação e otimização de moléculas *lead* e consequente desenvolvimento de novos compostos bioativos.<sup>19-25</sup> Esta abordagem foi utilizada no presente trabalho resultando na identificação de quatro novas espirociclopentenil-β-lactamas ativas que têm como subestrutura comum a molécula *lead* BSS-730A. As novas

$\beta$ -lactamas incluem derivados contendo diferentes substituintes na posição 4 do anel aromático do grupo éster benzílico presente no éster da posição 2' (Figura 5.6).



**Figura 5.6** – Modelação estrutural via introdução de substituintes na posição 4 do anel aromático do grupo éster benzílico da molécula BSS-730A e o seu efeito na atividade anti-HIV-1.

Dentro deste contexto de introdução de substituintes em sistemas aromáticos incluiu-se a preparação de derivados contendo os grupos *p*-clorofenilo e *p*-fluorofenilo, numa abordagem similar a diversas exploradas na literatura e cujos resultados foram satisfatórios.<sup>19,20,22</sup> No entanto, no caso específico da presente classe de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, a adição de halogéneos como substituintes aromáticos traduziu-se numa diminuição da atividade das moléculas **5.7l** e **5.7m** comparativamente à molécula *lead* BSS-730A, diminuição esta que foi mais acentuada no caso da substituição com Cl. Em termos comparativos, a atividade das novas moléculas bioativas identificadas (**5.7m** > **5.7l**) é inversamente proporcional ao volume do halogéneo substituinte (F < Cl). Por outro lado, e não obstante a sua relativa maior eletronegatividade, o efeito atrator de elétrons por indução do átomo de F em posição *para* ( $\sigma_F = 0.45$ ) é contrabalançado pela sua considerável componente de ressonância ( $\sigma_R = -0.39$ ), o que faz com que este apresente um efeito atrator de elétrons global ( $\sigma_P = 0.06$ ) inferior ao do Cl ( $\sigma_P = 0.23$ ) como substituinte aromático,<sup>26</sup> característica que pode ser justificativa da diferença de atividades observada.

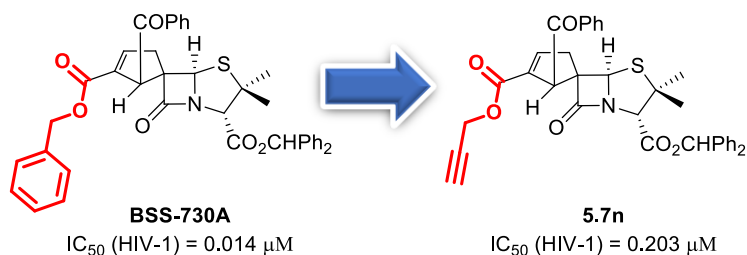
No caso da molécula **5.7i**, a incorporação dum grupo nitro, um grupo volumoso e altamente eletronegativo que como substituinte aromático em posição *para* apresenta um elevado efeito atrator de elétrons global ( $\sigma_P = 0.78$ )<sup>26</sup>, resultou mesmo numa completa ausência de atividade contra o HIV-1 por parte da molécula.



No seu conjunto, os resultados das moléculas **5.7i**, **5.7l** e **5.7m** indicam que a presença de grupos atratores de elétrons em posição *para* no anel aromático do benzilo das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas derivadas da molécula *lead* BSS-730A está associada a uma diminuição de atividade anti-HIV, de forma proporcional à grandeza do efeito atrator de elétrons global do substituinte aromático e, consequentemente, da diminuição da densidade eletrónica do anel fenilo. Esta consideração é também suportada pela relativa maior atividade apresentada pela molécula **5.7k** e, especialmente, pela molécula **5.7j**, cujos substituintes do grupo fenilo são o grupo metilo (Me) e o grupo metoxilo (MeO), respetivamente, grupos dadores de elétrons. De facto, entre as moléculas **5.7j** e **5.7k**, existe também uma relação direta entre a magnitude do carácter dador de elétrons global do substituinte aromático em posição *para* ( $\sigma_p = -0.27$  para o MeO e  $\sigma_p = -0.17$  para o Me)<sup>27</sup> e a maior atividade anti-HIV-1. Desta forma, com base no conjunto de resultados de bioatividade dos derivados da molécula BSS-730A obtidas pela introdução de substituintes na posição 4 do anel aromático do grupo éster benzílico, é possível estabelecer uma relação qualitativa de proporcionalidade direta entre a potência antiviral dos compostos (**5.7j**>**5.7k**>**5.7m**>**5.7l**>**5.7i**) e a densidade eletrónica do anel aromático do respetivo grupo benzilo (*p*-metoxifenilo > *p*-metilfenilo > *p*-fluorofenilo > *p*-clorofenilo > *p*-nitrofenilo).

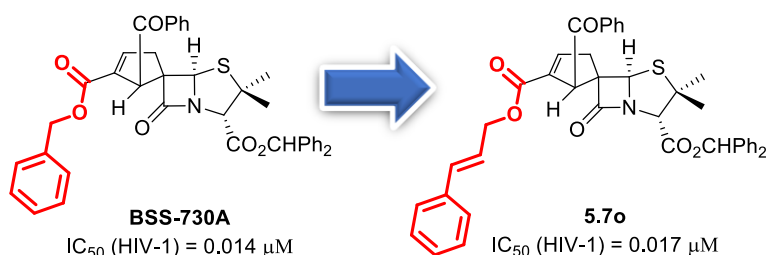
A substituição do éster benzílico da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A por um éster propargílico resultou na espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7n**, muito ativa contra o vírus do HIV-1 (IC<sub>50</sub> = 0.203  $\mu$ M) embora correspondendo a uma diminuição de atividade relativamente à molécula *lead* (IC<sub>50</sub> = 0.014  $\mu$ M) (Figura 5.7). Comparativamente ao grupo benzilo presente na molécula BSS-730A, o alquino terminal apresenta uma densidade eletrónica inferior e é incapaz de reproduzir as interações de  $\pi$ -*stacking* próprias dos anéis aromáticos. Este resultado demonstra mais uma vez a importância da presença de um grupo aromático terminal na posição 2' do anel ciclopenteno, para a potenciação da atividade antiviral desta classe de moléculas. Ainda assim, e não obstante a diminuição de bioatividade verificada, a molécula **5.7n** é merecedora de uma especial atenção. A presença de um alquino terminal na sua estrutura possibilita que esta nova espirociclopentenil- $\beta$ -lactama **5.7n**, ativa contra o vírus HIV-1, seja explorada numa vertente de química de click<sup>28-31</sup>. No contexto do presente trabalho, esta funcionalidade estrutural poderia ser útil no estudo do mecanismo de ação e localização intracelular das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas através de microscopia de

fluorescência, pela conjugação *in situ* da molécula ativa **5.7n** com uma sonda fluorescente por química de click, numa abordagem geral descrita na literatura.<sup>32</sup>



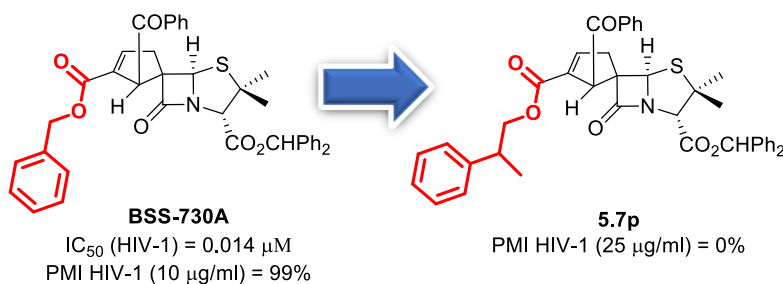
**Figura 5.7** – Modelação estrutural por substituição do grupo éster benzílico da molécula BSS-730A por um éster propargílico e o seu efeito na atividade anti-HIV-1.

A espirociclopentenil-β-lactama **5.7o** contém na posição 2' do anel espirociclopenteno um éster cinamílico, um grupo caracterizado por uma conjugação de electrões  $\pi$  alargada, e mostrou ser particularmente ativa contra o vírus HIV-1 (Figura 5.8). O facto de esta β-lactama espirocíclica **5.7o** apresentar uma atividade antiviral comparável à da molécula *lead* BSS-730A suporta a anterior consideração estrutural relativa à relevância da presença dum grupo aromático de elevada densidade eletrónica na posição 2' espirociclopentenil-β-lactamas para garantir uma potente atividade anti-HIV-1.



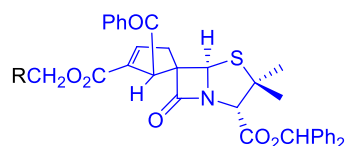
**Figura 5.8** – Modelação estrutural por substituição do grupo éster benzílico da molécula BSS-730A por um éster cinamílico e o seu efeito na atividade anti-HIV-1.

Por o éster 2-fenilpropílico conjugar na sua subestrutura uma cadeia alquílica saturada e um anel de benzeno terminal, concebeu-se a sua inclusão na posição 2' do anel espirociclopentenil (Figura 5.9). Não obstante o facto de ter sido obtida como uma mistura de diastereoisómeros, a espiro-β-lactama **5.7p** foi ainda assim testada para a sua atividade inibitória contra o vírus do HIV. No entanto, a estratégia de modelação estrutural atrás referida provou-se infrutífera, na medida em que a molécula **5.7p** não apresentou qualquer atividade antiviral.



**Figura 5.9** – Modelação estrutural por substituição do grupo éster benzílico da molécula BSS-730A pelo éster 2-fenilpropílico e o seu efeito na atividade anti-HIV-1.

No seguimento das considerações anteriores, e pela análise estrutural exclusivamente focada na molécula *lead* BSS-730A e no conjunto das espirociclopentenil-β-lactamas suas derivadas e identificadas como tendo atividade anti-HIV-1, apresentadas neste capítulo e no anterior, é possível determinar uma subestrutura comum entre elas (Figura 5.10). Nesta representação estrutural das características estruturais transversais a todas as moléculas bioativas identificadas, evidencia-se exatamente como característica aparentemente imprescindível para a atividade antiviral a presença de uma subestrutura  $CO_2CH_2$  no grupo éster da posição 2' do anel espirociclopenteno. Este resultado é indicativo de que este grupo metileno ( $CH_2$ ) poderá representar um ponto estrutural crucial de interação entre as moléculas e o seu alvo putativo, uma informação estrutural relevante para o *design* racional de novas espirociclopentenil-β-lactamas potencialmente ativas contra HIV-1. De notar também que a importância desta característica estrutural já tinha sido sugerida aquando da análise da estrutura-atividade do composto inativo **5.7a** cuja estrutura molecular varia da espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A apenas pela ausência do grupo metileno no éster da posição 2'.



<b>BSS-730A</b> R = Ph	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.014 μM
<b>4.19a</b> R = Me	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.305 μM
<b>4.19b</b> R = H	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.058 μM
<b>5.7j</b> R = 4-MeOPh	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.015 μM
<b>5.7k</b> R = 4-MePh	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.089 μM
<b>5.7l</b> R = 4-CIPh	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.366 μM
<b>5.7m</b> R = 4-FPh	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.111 μM
<b>5.7n</b> R = CCH	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.203 μM
<b>5.7o</b> R = CHCHPh	IC <sub>50</sub> (HIV-1) = 0.017 μM

**Figura 5.10** – Estruturas das espirociclopentenil-β-lactamas ativas contra o HIV-1 desenvolvidas ao longo deste trabalho e da respetiva molécula *lead* BSS-730A. A subestrutura comum a todas estas moléculas encontra-se assinalada a azul.

## 5.5. Conclusão

Procedeu-se ao *design* racional e síntese de novas espiro-β-lactamas através de uma estratégia de modelação estrutural exclusivamente focada na posição 2' do anel espirociclopenteno de uma espirociclopentenil-β-lactama previamente identificada como tendo uma potente atividade antimicrobiana dupla contra HIV e *Plasmodium*, assim como um mecanismo inovador de inibição do vírus do HIV. Esta estratégia teve como objetivo a identificação de novas espirociclopentenil-β-lactamas ativas contra o HIV-1 e, paralelamente, a obtenção de mais informação relativa à relação estrutura-atividade desta classe de espiropenicilanatos com propriedades antimicrobianas.

Foi determinada a citotoxicidade e atividade anti-HIV-1 das novas moléculas sintetizadas, permitindo a identificação de seis novas espirociclopentenil-β-lactamas com elevada atividade antiviral (IC<sub>50</sub> > 0.370 μM). A molécula mais ativa da série, a espirociclopentenil-β-lactama **5.7j**, revelou valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> de 0.015 μM e 0.020 μM, respetivamente, uma atividade antiviral comparável à da molécula *lead* BSS-730A. Dada a sua elevada similaridade estrutural relativamente às espirociclopentenil-β-lactamas BSS-730A e **4.19a-b**, estima-se que as novas espirociclopentenil-β-lactamas identificadas como tendo atividade anti-HIV-1, apresentem também atividade contra ambos os estágios de infeção hepático e sanguíneo do *Plasmodium*.

A análise qualitativa da relação de estrutura-atividade das várias moléculas testadas permitiu também evidenciar determinadas características estruturais aparentemente importantes para a atividade anti-HIV-1 desta classe de moléculas. Neste

contexto, foi possível identificar uma subestrutura comum a todas as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas sintetizadas ao longo do presente trabalho, que evidencia a importância da presença de um grupo metileno no éster presente da posição 2' para a atividade das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas derivadas da molécula BSS-730A. Adicionalmente, estabeleceu-se também uma relação qualitativa de estrutura-atividade demonstrativa de que uma maior densidade eletrônica do sistema aromático do éster presente na posição 2' do anel ciclopenteno das moléculas bioativas está associada a uma potenciação da sua atividade anti-HIV-1. Estas informações estruturais compreendem um avanço relevante para o *design* racional e desenvolvimento de novas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas potencialmente bioativas.

Por fim, a identificação destas novas moléculas com elevada atividade anti-HIV alarga consideravelmente o número de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas bioativas derivadas da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, pressupondo-se que todas elas partilhem o mecanismo de ação antiviral inovador. Desta forma, as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com atividade anti-HIV sintetizadas ao longo deste trabalho que se somam às moléculas BSS-730A e BSS-722A, previamente identificadas, perfazem um conjunto numeroso de moléculas que confirmam o potencial de desenvolvimento das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas como uma classe inovadora de agentes anti-infecciosos.

## 5.6. Bibliografia

1. Bártolo, I.; Santos, B. S.; Fontinha, D.; Machado, M.; Francisco, D.; Sepodes, B.; Rocha, J.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Figueira, M. E.; Barroso, H.; Nascimento, T.; Alves de Matos, A. P.; Alves, A. J. S.; Alves, N. G.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Taveira, N., Spiro- $\beta$ -lactam BSS-730A displays potent activity against HIV and Plasmodium. *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7 (2), 421–434.
2. Zhang, C.; Lu, X., Phosphine-catalyzed cycloaddition of 2,3-butadienoates or 2-butynoates with electron-deficient olefins. A novel [3 + 2] annulation approach to cyclopentenenes. *J. Org. Chem.* **1995**, 60 (9), 2906-2908.
3. Santos, B. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of chiral spirocyclopentenyl- $\beta$ -lactams through phosphane-catalyzed [3+2] annulation of allenates with 6-alkylidenepenicillanates. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 2013 (18), 3901-3909.
4. Cristau, H. J.; Viala, J.; Christol, H., Inversion of polarity by phosphorilated groups - Inversion of the regioselectivity of nucleophilic-addition to allenes activated by electron withdrawing groups. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1985**, (5), 980-988.
5. Wei, Y.; Shi, M., Lu's [3 + 2] cycloaddition of allenes with electrophiles: discovery, development and synthetic application. *Org. Chem. Front.* **2017**, 4 (9), 1876-1890.
6. Zhou, W.; Wang, H.; Tao, M.; Zhu, C.-Z.; Lin, T.-Y.; Zhang, J., Phosphine-catalyzed enantioselective [3 + 2] cycloadditions of  $\gamma$ -substituted allenates with  $\beta$ -perfluoroalkyl enones. *Chem. Sci.* **2017**, 8 (6), 4660-4665.
7. Wang, H.; Zhang, J.; Tu, Y.; Zhang, J., Phosphine-catalyzed enantioselective dearomative [3+2]-cycloaddition of 3-nitroindoles and 2-nitrobenzofurans. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58 (16), 5422-5426.
8. Ana, L. C.; Maria, I. L. S., 1,3-Dipolar cycloadditions involving allenes: Synthesis of five-membered rings. *Curr. Org. Chem.* **2019**, 23 (27), 3064-3134.
9. Li, M.; Zhou, W., Highly enantioselective [3+2] cycloadditions of terminal allenates with  $\beta$ -trifluoromethyl  $\alpha,\beta$ -enones. *Chem. Commun.* **2020**, 56 (62), 8842-8845.
10. Marco-Martínez, J.; Marcos, V.; Reboredo, S.; Filippone, S.; Martín, N., Asymmetric organocatalysis in fullerenes chemistry: enantioselective phosphine-catalyzed cycloaddition of allenates onto C60. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52 (19), 5115-5119.

11. Lee, S. Y.; Fujiwara, Y.; Nishiguchi, A.; Kalek, M.; Fu, G. C., Phosphine-catalyzed enantioselective intramolecular [3+2] annulations to generate fused ring systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (13), 4587-4591.
12. Ni, H.; Yao, W.; Lu, Y., Enantioselective [3 + 2] annulation of  $\alpha$ -substituted allenates with  $\beta,\gamma$ -unsaturated N-sulfonylimines catalyzed by a bifunctional dipeptide phosphine. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 343-348.
13. Liang, Y.; Liu, S.; Xia, Y.; Li, Y.; Yu, Z.-X., Mechanism, regioselectivity, and the kinetics of phosphine-catalyzed [3+2] cycloaddition reactions of allenates and electron-deficient alkenes. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14* (14), 4361-4373.
14. Lang, R. W.; Hansen, H.-J., Eine einfache allencarbonsäureester-synthese mittels der Wittig-reaktion. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63* (2), 438-455.
15. Byrne, P. A.; Gilheany, D. G., The modern interpretation of the Wittig reaction mechanism. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (16), 6670-6696.
16. Mo, D.-L.; Wink, D. J.; Anderson, L. L., Solvent-controlled bifurcated cascade process for the selective preparation of dihydrocarbazoles or dihydropyridoindoles. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (41), 13217-13225.
17. Taylor, D. R., The chemistry of allenes. *Chem. Rev.* **1967**, *67* (3), 317-359.
18. Becker, J. Y., Isomerization of mono- and diacetylenic hydrocarbons. *Tetrahedron* **1976**, *32* (24), 3041-3043.
19. Kirk, S. R.; Andrade, A. L.; Melich, K.; Jackson, E. P.; Cuellar, E.; Karpen, J. W., Halogen substituents on the aromatic moiety of the tetracaine scaffold improve potency of cyclic nucleotide-gated channel block. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (21), 6417-6419.
20. Fanfrlík, J.; Kolář, M.; Kamlar, M.; Hurný, D.; Ruiz, F. X.; Cousido-Siah, A.; Mitschler, A.; Řezáč, J.; Munusamy, E.; Lepšík, M.; Matějček, P.; Veselý, J.; Podjarný, A.; Hobza, P., Modulation of aldose reductase inhibition by halogen bond tuning. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (11), 2484-2492.
21. German, N.; Decker, A. M.; Gilmour, B. P.; Gay, E. A.; Wiley, J. L.; Thomas, B. F.; Zhang, Y., Diarylureas as allosteric modulators of the cannabinoid CB1 receptor: Structure-activity relationship studies on 1-(4-chlorophenyl)-3-{3-[6-(pyrrolidin-1-yl)pyridin-2-yl]phenyl}urea (PSNCBAM-1). *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (18), 7758-7769.
22. Gagné-Boulet, M.; Moussa, H.; Lacroix, J.; Côté, M.-F.; Masson, J.-Y.; Fortin, S., Synthesis and biological evaluation of novel N-phenyl ureidobenzenesulfonate

derivatives as potential anticancer agents. Part 2. Modulation of the ring B. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 563-573.

23. Álvarez, S.; Lieb, M.; Martínez, C.; Khanwalkar, H.; Rodríguez-Barrios, F.; Álvarez, R.; Gronemeyer, H.; de Lera, A. R., Modulation of retinoic acid receptor subtypes by 5- and 8-substituted (naphthalen-2-yl)-based arotinoids. *ChemMedChem* **2015**, *10* (8), 1378-1391.

24. Shao, L.; Campbell, U. C.; Fang, Q. K.; Powell, N. A.; Campbell, J. E.; Jones, P. G.; Hanania, T.; Alexandrov, V.; Morganstern, I.; Sabath, E.; Zhong, H. M.; Large, T. H.; Spear, K. L., In vivo phenotypic drug discovery: applying a behavioral assay to the discovery and optimization of novel antipsychotic agents. *MedChemComm* **2016**, *7* (6), 1093-1101.

25. Kishori Ramachandra, H.; Balladka Kunhanna, S.; Badiadka, N.; Anupam Glorious, L.; Bhuvanesh Sukhlal, K., Molecular docking of 4-ethoxychalcones on oxidoreductase/pirin inhibitors and cytotoxic evaluation on breast/skin cancer cell lines. *Lett. Drug Des. Discov.* **2020**, *17* (10), 1245-1260.

26. Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A., Applications of fluorine in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (21), 8315-8359.

27. Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W., A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91* (2), 165-195.

28. Majid, M. H.; Mahzad, D.; Vahideh, Z.; Manijheh, G., Alkynes as privileged synthons in selected organic name reactions. *Curr. Org. Synth.* **2019**, *16* (2), 205-243.

29. Bozorov, K.; Zhao, J.; Aisa, H. A., 1,2,3-Triazole-containing hybrids as leads in medicinal chemistry: A recent overview. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27* (16), 3511-3531.

30. Ping, D.; Xueyi, W.; Junwei, Z.; Xiaoyang, Z.; Yiwen, L.; Haoxing, W.; Lin, L., Recent advances in targeting nuclear molecular imaging driven by tetrazine bioorthogonal chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2020**, *27* (23), 3924-3943.

31. Ahmed, F.; Xiong, H., Recent developments in 1,2,3-triazole-based chemosensors. *Dyes Pigm.* **2021**, *185*, 108905.

32. Luo, Z.; Tikekar, R. V.; Nitin, N., Click chemistry approach for imaging intracellular and intratissue distribution of curcumin and its nanoscale carrier. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (1), 32-42.



# Capítulo 6

## Pesquisa de alvo biológico utilizando técnicas computacionais baseadas em similaridade de ligantes

### Resumo

O trabalho apresentado neste capítulo focou-se no desenvolvimento de abordagens computacionais de pesquisa de alvo, com o objetivo de recolher informações sobre o alvo putativo da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas bioativas desenvolvidas ao longo deste trabalho. Estas abordagens foram baseadas em pesquisas de similaridade estrutural de ligantes, com recurso a descritores 2D e 3D. A estratégia global de pesquisa de alvo utilizada implicou a construção de uma biblioteca química contendo apenas compostos bioativos com alvo conhecido.

A estratégia de pesquisa de alvo por similaridade estrutural resultou na identificação de um conjunto de moléculas com alvo molecular conhecido que apresentam similaridade com três das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com atividade contra HIV e *Plasmodium*. Com base numa revisão da literatura, foi feita uma discussão crítica da relação entre os alvos respetivos das moléculas identificadas e potenciais mecanismos de ação antiviral, tendo sido indicados um conjunto de alvos que estão

implicados diretamente no desenvolvimento ou inibição de infecções por agentes microbianos e que podem ajudar a explicar a atividade antimicrobiana da classe de espiro- $\beta$ -lactamas explorada ao longo desta tese.

Por fim, neste capítulo são também discutidas as perspectivas futuras do presente trabalho que têm como finalidade a concretização do desenvolvimento pré-clínico da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas como agentes com múltipla atividade antimicrobiana.

## **Capítulo 6 - Pesquisa de alvo biológico utilizando técnicas computacionais baseadas em similaridade de ligantes**

6.1. Introdução	190
6.2. Pesquisa de similaridade com recurso a técnicas computacionais	192
6.2.1. Construção de uma biblioteca química virtual de compostos bioativos com alvo molecular conhecido	192
6.2.2. Pesquisa de similaridade 2D com recurso a descritores ECFP4	195
6.2.3. Pesquisa de similaridade 3D de forma e electrostática	199
6.3. Conclusão e Perspetivas Futuras	208
6.4. Bibliografia	212

## 6.1. Introdução

A espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A demonstrou uma potente atividade antimicrobiana contra HIV e *Plasmodium*,<sup>1</sup> tendo sido sintetizados ao longo do presente trabalho vários derivados desta molécula, também com uma bioatividade bastante elevada e promissora. Os resultados obtidos nos estudos de mecanismo de ação da molécula BSS-730A parecem sugerir que esta atue por via de um mecanismo complexo, diferente dos mecanismos associados aos fármacos anti-HIV atualmente disponíveis no mercado. Estes resultados, em conjunto com a dupla atividade antimicrobiana observada, sustenta a hipótese de que a molécula BSS-730A e seus derivados possam ativar mecanismos bioquímicos de defesa inata do hospedeiro e, desta forma, apresentar atividade contra outros vírus, assumindo o perfil de um antiviral de largo espectro, também designado como agente pan-antiviral<sup>2</sup>. Não obstante os resultados promissores em volta da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, o alvo biológico através do qual exerce atividade continuar por elucidar.

À imagem do que acontece com a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A e os seus derivados, uma fração significativa dos compostos bioativos identificados na indústria e academia não têm alvo biológico determinado.<sup>3-7</sup> A identificação do alvo molecular dos compostos bioativos é, no entanto, um elemento crítico para a compreensão do seu mecanismo de ação, facilitando também uma potencial estratégia de otimização estrutural orientada para a obtenção de novas moléculas com propriedades farmacológicas mais adequadas.<sup>8-11</sup> A identificação de alvos secundários também assume importância no âmbito da polifarmacologia, podendo ainda revelar-se útil na interpretação e previsão de potenciais reações adversas ou mesmo interações medicamentosas.<sup>12-14</sup> A crescente disponibilidade de dados de bioatividade em repositórios e bases de dados públicos, como são exemplos a ChEMBL<sup>15</sup>, PubChem<sup>16</sup>, DrugBank<sup>17</sup> ou a BindingDB<sup>18</sup>, tem permitido o desenvolvimento de várias estratégias computacionais de previsão de alvos moleculares, comumente referidas como *target fishing*. Os métodos de *target fishing* podem ser divididos em dois grupos principais: i) métodos baseados na estrutura química de ligantes com bioatividade reportada e ii) métodos baseados na estrutura molecular de alvos farmacológicos. A rápida evolução da área da Inteligência Artificial, incluindo a Aprendizagem Automática (do anglo-saxónico *Machine Learning*), tem propiciado o aparecimento de novas abordagens de *target fishing* híbridas e cuja complexidade dificulta a sua categorização. Naturalmente, encontra-se

atualmente disponível uma vasta panóplia de revisões da literatura que cobrem este tema.<sup>19-23</sup> Em termos comparativos, as estratégias baseadas em ligantes têm vindo a receber maior atenção e evolução, revelando resultados notáveis ao nível da previsão de alvos, estando associados a uma elevada flexibilidade, rapidez e menores requisitos de poder computacional.<sup>19,24</sup>

Resumidamente, os métodos de *target fishing* baseados em ligantes assentam no princípio da similaridade molecular, baseado nos pressupostos originalmente propostos por Johnson e Maggiora<sup>25</sup>, pelo qual moléculas similares tipicamente apresentam características físico-químicas similares e se ligam aos mesmo alvos moleculares ou a alvos similares.<sup>26,27</sup> Assim, estas estratégias produzem previsões de interações alvo-ligante pela determinação de similaridade (comparação) entre uma determinada molécula de interesse e alvo desconhecido, a molécula *query*, e um conjunto alargado de compostos bioativos com alvos moleculares conhecidos, emergindo as moléculas com maior similaridade como mais prováveis de partilhar o mesmo alvo.<sup>22,24</sup> De modo a permitir uma quantificação da similaridade estrutural entre as moléculas, estas são representadas por descritores moleculares, tipicamente unidimensionais (1D), bidimensionais (2D) ou tridimensionais (3D). Neste contexto, as *fingerprints* (traduzido em português para impressões digitais) bidimensionais, descritas por uma cadeia simples de *bits* binários que codifica a presença ou ausência de grupos funcionais numa molécula, constituem o tipo de descritor mais comumente utilizado em *target fishing*. Atualmente, estão disponíveis diferentes tipos de *fingerprints* bidimensionais: topológicas, circulares e baseadas em subestrutura, podendo ser mais segmentadas em função do grau de sofisticação associado à sua codificação. Relativamente às métricas para quantificação de similaridade entre moléculas codificadas na forma de descritores, o coeficiente de Tanimoto<sup>28</sup> assume-se como referência, sendo calculado pela Equação 6.1, em que *N<sub>c</sub>* diz respeito às características estruturais (*bits*) comuns às duas moléculas comparadas, enquanto *N<sub>a</sub>* e *N<sub>b</sub>* dizem respeito às características estruturais individuais de cada uma. O coeficiente de Tanimoto varia entre 0 e 1.

$$T_c = \frac{N_c}{N_a + N_b - N_c}$$

**Equação 6.1** – Fórmula de cálculo do coeficiente de Tanimoto.

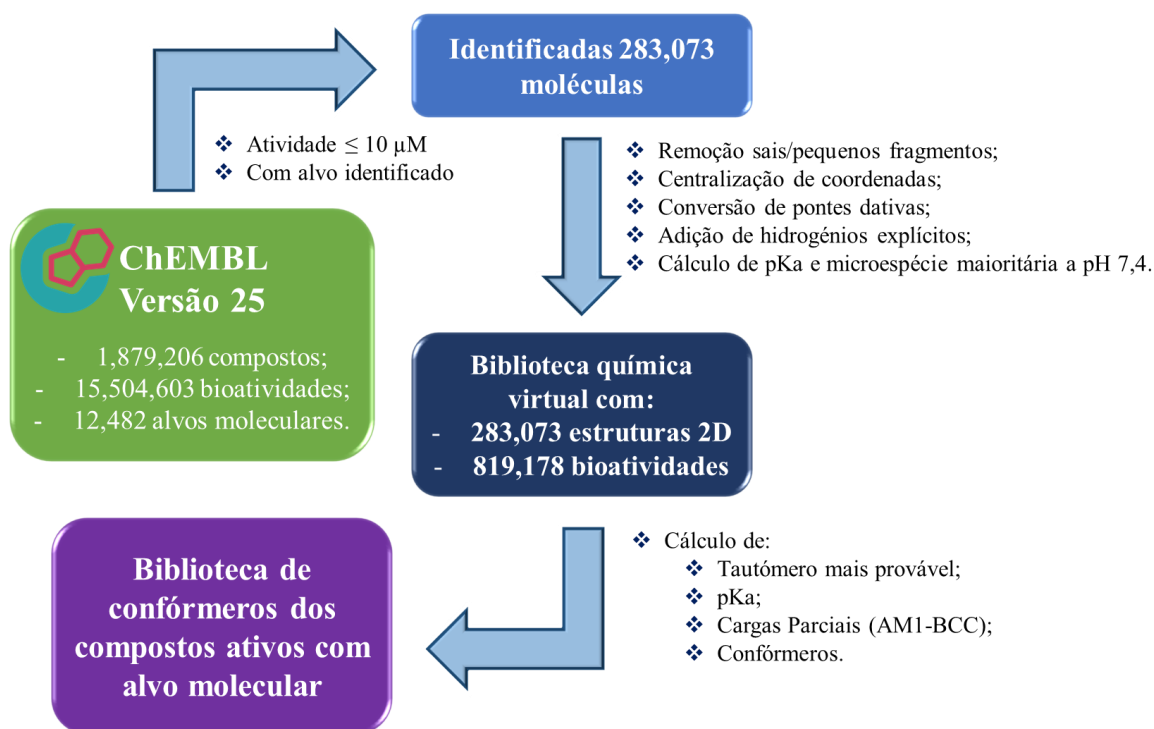
Apesar de existirem diversas ferramentas de *target fishing* implementadas e disponíveis em recursos *web* acessíveis pela internet, quer baseadas na estrutura de ligantes<sup>29-31</sup> quer na estrutura de alvos moleculares<sup>32-34</sup>, por questões de confidencialidade e proteção dos resultados neste trabalho foram exploradas apenas ferramentas implementadas em servidores informáticos locais. Foram elaboradas de raiz duas estratégias distintas. Ambas as abordagens foram baseadas em ligantes, tirando partido da superior disponibilidade de dados de bioatividade relativamente à disponibilidade de estruturas de alvos moleculares, e focaram-se em descritores 2D, *fingerprints* circulares do tipo ECFP4 (*Extended Connectivity Fingerprints*)<sup>35</sup>, e em descritores 3D codificantes da forma e das propriedades electroestáticas das moléculas. As estratégias de *target fishing* preconizadas implicaram a construção de uma biblioteca virtual própria, contendo apenas compostos bioativos com alvo conhecido, uma ferramenta com aplicações de plataforma de grande utilidade em projetos futuros. Os resultados das pesquisas de similaridade permitiram identificar uma panóplia de moléculas com alvo molecular conhecido que apresentam elevada similaridade com três das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas contra HIV e *Plasmodium*. Com base numa revisão da literatura, foi feita uma interpretação crítica da relação entre os alvos respetivos das moléculas identificadas e potenciais mecanismos de ação antiviral, sendo sinalizados um conjunto de alvos que estão implicados diretamente no desenvolvimento ou inibição de infeções por agentes microbianos e que podem ajudar a explicar a atividade antimicrobiana da classe de espiro- $\beta$ -lactamas explorada ao longo desta tese. Estes resultados requerem, no entanto, uma investigação mais aprofundada e uma validação experimental ainda em curso. No seguimento desta necessidade são também discutidas as perspetivas futuras do presente trabalho, com a finalidade de concretizar o desenvolvimento pré-clínico da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas como agentes com múltipla atividade antimicrobiana.

## **6.2. Pesquisa de similaridade com recurso a técnicas computacionais**

### **6.2.1. Construção de uma biblioteca química virtual de compostos bioativos com alvo molecular conhecido**

Com o intuito de proceder a pesquisas de similaridade tendo em vista a recolha de informações sobre um mecanismo e/ou alvo molecular putativos da molécula BSS-730A, foi construída uma biblioteca química virtual de compostos bioativos com alvo molecular conhecido. Esta biblioteca foi construída a partir da base de dados de bioatividade

ChEMBL<sup>15</sup> versão 25, e todo o respetivo procedimento é apresentado de forma esquemática na Figura 6.1. A versão da ChEMBL utilizada contém informação acerca de 1,879,206 compostos, que representam um total de 15,504,603 bioatividades, 1,125,387 ensaios de bioatividade e 12,482 alvos moleculares diferentes.



**Figura 6.1** – Fluxograma alusivo à construção de uma biblioteca química de compostos bioativos com alvo molecular conhecido e seus respetivos conformémeros.

Em termos de tratamento de dados, o primeiro passo consistiu em descarregar toda a informação de bioatividade disponível na base de dados ChEMBL v25, assim como as respetivas estruturas moleculares em formato SDF. Os dados de bioatividade foram filtrados, mantendo-se apenas os dados relativos a compostos com bioatividade relevante definidos de acordo com a literatura disponível,<sup>36</sup> nomeadamente com valores de  $K_i$ ,  $IC_{50}$ ,  $AC_{50}$ ,  $GI_{50}$  e Potência inferiores a  $10 \mu\text{M}$ , e inibição superior a 50%, e tendo alvo molecular conhecido. Esta estratégia permitiu uma redução importante da biblioteca de estruturas moleculares, contemplando apenas as moléculas com bioatividade relevante e com alvo molecular conhecido. No total, esta biblioteca reúne 283,073 compostos ativos, correspondentes a um total de 904,160 pares de bioatividade com alvo molecular identificado. Os compostos da biblioteca resultante desta última filtragem, foram então alvo de um procedimento de remoção de sais e pequenos fragmentos, centralização de coordenadas, conversão de pontes dativas, por exemplo  $[N+](O-)=O$  para  $N(=O)=O$ , e

adição de hidrogénios explícitos, recorrendo ao *software* OpenBabel<sup>37</sup>. Por fim, utilizando o *software* cxcalc da empresa ChemAxon, cada uma das moléculas teve calculada a sua espécie maioritária a pH fisiológico (pH = 7.4), sendo esta a estrutura utilizada para efeitos de pesquisa de similaridade 2D.

De modo a permitir o uso desta biblioteca virtual de compostos bioativos com alvo conhecido em pesquisas de similaridade tridimensional, gerou-se ainda novo conjunto de dados inclusivo de múltiplas conformações de cada composto (confórmeros), ou seja, várias estruturas tridimensionais alternativas permitidas de energia de tensão favorável. O protocolo de geração dos confórmeros, compreendeu uma sequência preliminar de determinação de tautómeros e posterior determinação do estado de ionização da estrutura 2D de cada molécula a pH fisiológico, desta vez utilizando respetivamente os *softwares* Tautomers e Fixpka ambos da empresa OpenEye. De seguida foi gerado um confórmero de baixa energia único para cada uma das moléculas e procedeu-se ao cálculo de cargas parciais do mesmo, através do modelo de cargas parciais AM1-BCC<sup>38,39</sup>, com o *software* OpenEye Quacpac. Após este último cálculo, procedeu-se por fim à geração de múltiplos confórmeros respetivos a cada uma das moléculas, com o *software* OpenEye Omega, resultando numa biblioteca virtual contendo estruturas 3D dos compostos bioativos com alvo biológico identificado. Esta última biblioteca foi gerada por um modo predefinido do *software* OpenEye Omega para ser posteriormente utilizado como *input* pelo *software* OpenEye ROCS. No processo de geração de confórmeros foram utilizadas as configurações padrão do *software*, nomeadamente um número máximo de 200 confórmeros por molécula e um valor de corte de RMSD de 0.5 Å, acima do qual dois confórmeros são considerados como diferentes e, consequentemente, retidos.

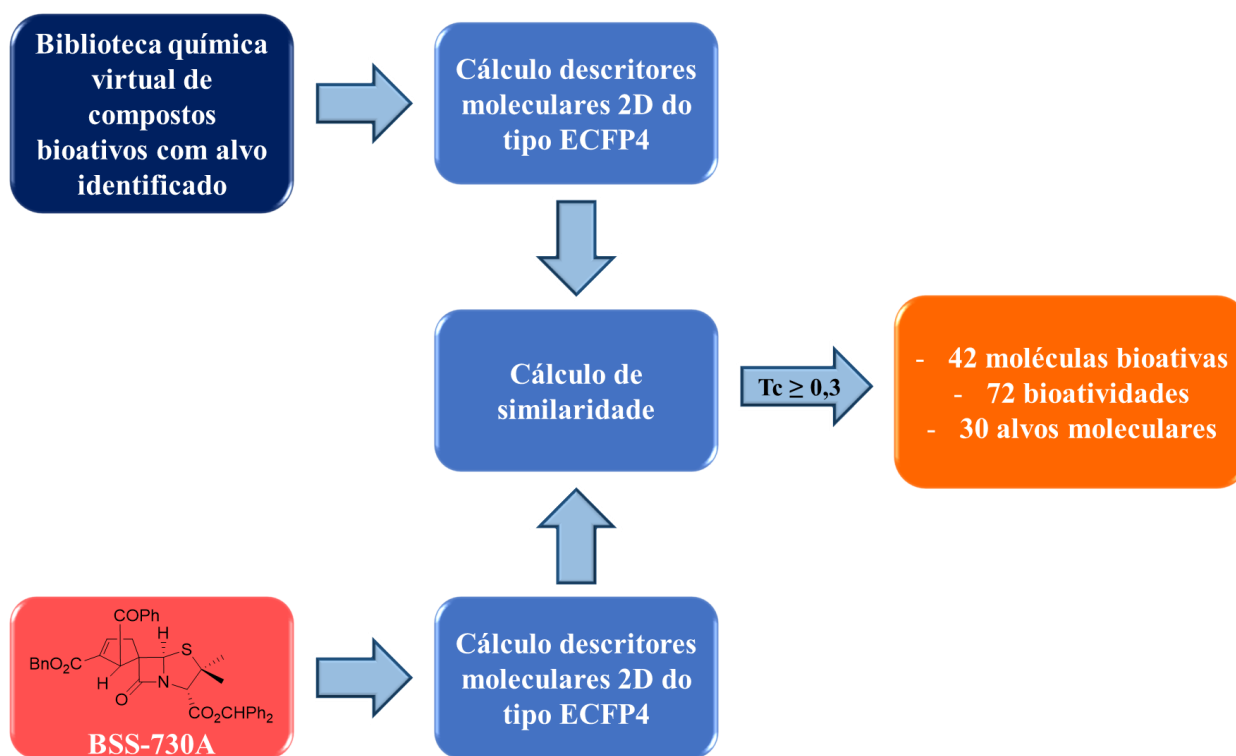
Para além do conjunto de dados inclusivo de confórmeros dos compostos bioativos com alvo conhecido compilado, o procedimento acima descrito permitiu a criação de duas componentes adicionais complementares: uma folha de cálculo de bioatividade contendo apenas informação relativa aos compostos bioativos identificados, e uma biblioteca independente contendo apenas as suas estruturas 2D. Estes diferentes componentes permitem uma utilização independente dos respetivos conjuntos de dados em pesquisas, de acordo com o propósito do estudo pretendido, numa perspetiva de otimização de recursos.



### 6.2.2. Pesquisa de similaridade 2D com recurso a descritores ECFP4

De modo a recolher informação sobre potenciais alvos da espirociclo-pentenil-β-lactama BSS-730A, foram realizadas pesquisas de similaridade 2D entre esta molécula e todas as moléculas bioativas da biblioteca construída (Figura 6.2). Este procedimento teve como finalidade identificar as moléculas bioativas que apresentam maior similaridade com a molécula BSS-730A, partindo do princípio de que é provável que esta última possa partilhar o mesmo alvo biológico com moléculas que lhe sejam altamente similares.<sup>27</sup> A similaridade é expressa por um coeficiente de Tanimoto (Tc)<sup>28</sup>.

Nesta estratégia foram utilizadas *fingerprints* do tipo ECFP4, descritores topológicos circulares de estrutura molecular 2D, amplamente utilizados não só para caracterização molecular e pesquisas de similaridade, mas também em estudos de relação estrutura-atividade, constituindo umas das ferramentas de pesquisa de similaridade mais populares no âmbito da descoberta de novos fármacos.<sup>24</sup>

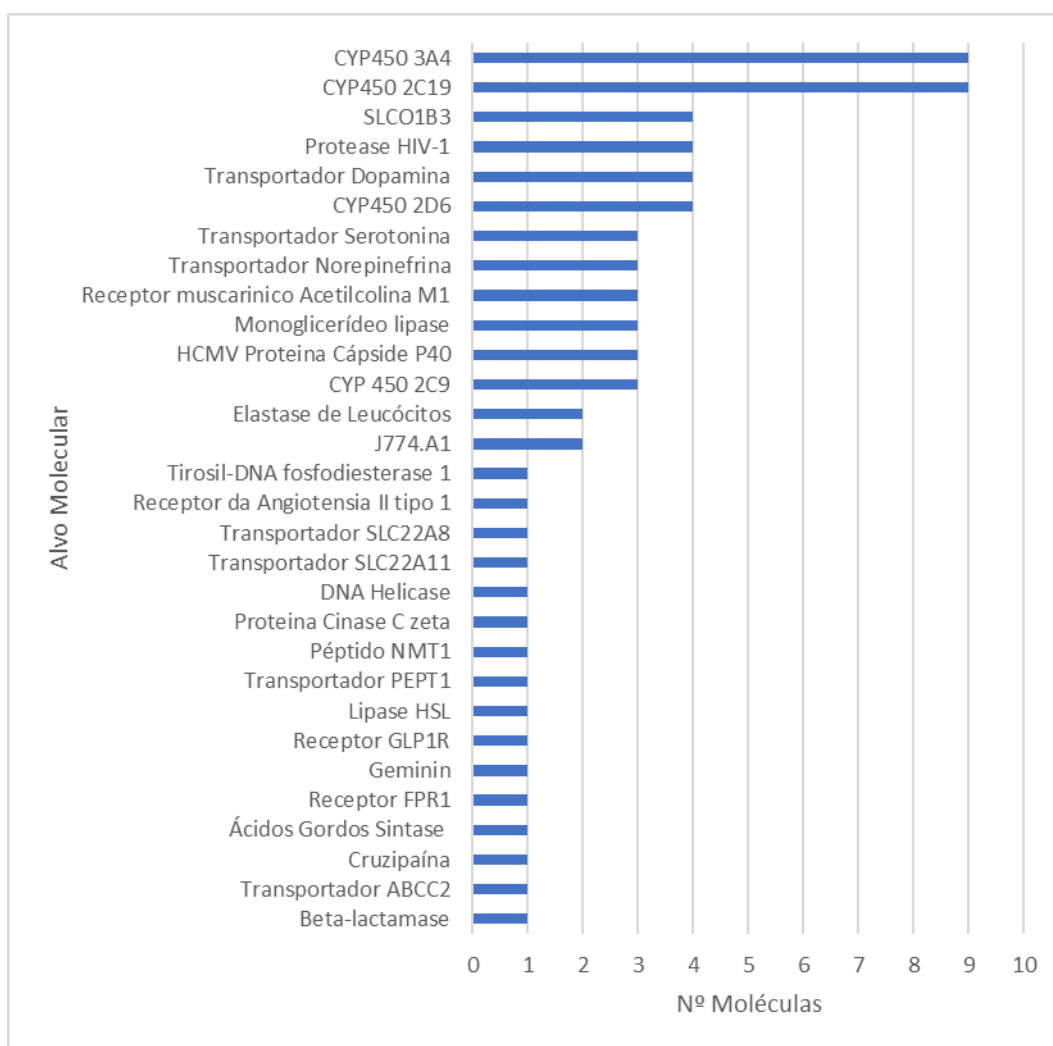


**Figura 6.2** – Esquema ilustrativo da abordagem de pesquisa de similaridade 2D.

Em geral, este tipo de descritores topológicos 2D tem como grande vantagem, face a outros métodos de pesquisa de similaridade, permitirem a análise de grandes bibliotecas químicas num curto espaço de tempo, por serem descritores binários pouco complexos. Apesar de permitirem um elevado volume de cálculos num curto espaço de tempo, os

descritores moleculares 2D, como as ECFP, têm como grande desvantagem o facto de apenas descreverem a natureza e conectividade dos grupos substituintes de cada molécula, não descrevendo a sua disposição espacial tridimensional, uma característica determinante para a interação fármaco-ligando.

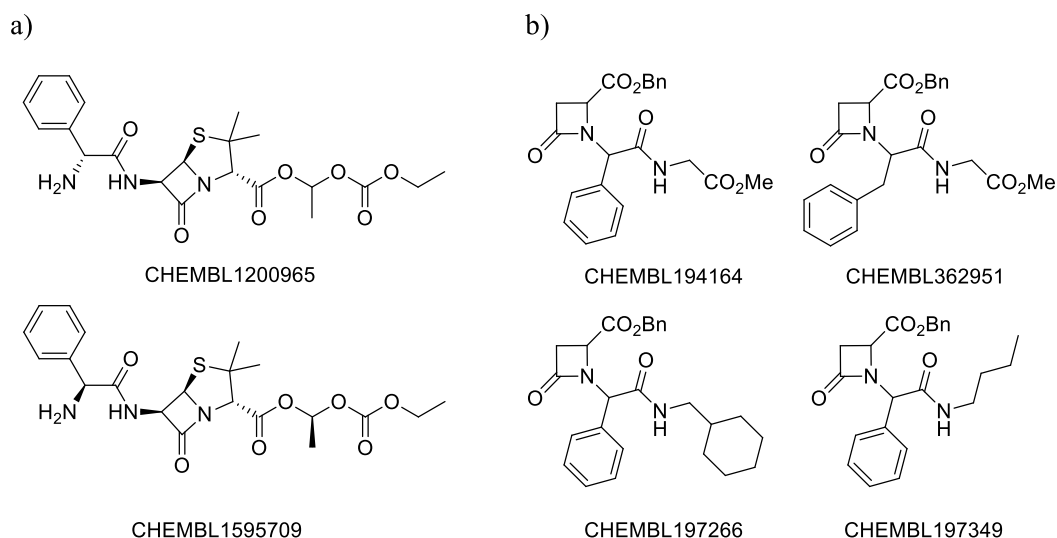
No caso particular da presente abordagem de pesquisa de similaridade foram utilizadas as *fingerprints* ECFP4 que descrevem a conectividade molecular até um diâmetro máximo de 4 ligações em torno de cada átomo da molécula. Apesar de existirem *fingerprints* do tipo ECFP com diferente diâmetro, o diâmetro dos descritores ECFP4 aparece referenciado como suficiente para pesquisas de similaridade.<sup>35</sup> As *fingerprints* ECFP4 e os coeficientes de similaridade foram calculadas com recurso ao *software* Chemistry Development Kit (CDK)<sup>40</sup>. O procedimento permitiu a identificação de 42 moléculas com um coeficiente de Tanimoto relativo à molécula BSS-730A superior a 0.3, um valor de corte de referência para os descritores ECFP4 acima do qual duas moléculas podem partilhar o mesmo alvo biológico.<sup>41</sup> Estas 42 moléculas apresentam um total de 72 atividades contra 30 diferentes alvos conhecidos (Figura 6.3).



**Figura 6.3** – Histograma das moléculas bioativas com similaridade estrutural ECFP4 ( $T_c > 0.3$ ) com a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A e seus respectivos alvos moleculares.

O coeficiente de similaridade mais elevado foi de 0.360 para os penicilanatos CHEMBL1200965 e CHEMBL1595709 com atividade biológica sobre a família de transportadores de aniões SLCO1B3 (*Solute carrier organic anion transporter family member 1B3*) e o Citocromo P450 (CYP450) 3A4, respetivamente (Figura 6.4 a). Os alvos com mais moléculas ativas associadas são o conjunto dos CYP450 2C19, 3A4 e 2D6, resultado justificável pelo facto de se tratar de um conjunto de enzimas envolvidas no biometabolismo de uma vasta panóplia de xenobióticos, principalmente hidrofóbicos.<sup>42</sup> No entanto, não foi possível estabelecer uma relação direta entre a potencial modulação da atividade destes alvos e a inibição de infeções microbianas, fora do âmbito da função de metabolização inerente aos CYP450 e consequente influência nas interações medicamentosas e farmacocinética de fármacos.

No contexto do levantamento de alvos moleculares diretamente associados ao HIV, foi identificado um conjunto de quatro  $\beta$ -lactamas análogas com atividade inibitória reportada da enzima protease do vírus,<sup>43</sup> nomeadamente as moléculas CHEMBL194164 (Tc=0.337), CHEMBL362951 (Tc=0.318), CHEMBL197266 (Tc=0.310) e CHEMBL197349 (Tc=0.306) (Figura 6.4 b). De notar ainda os casos de moléculas identificadas como tendo atividade sobre a cruzipaina, elastase dos leucócitos e a proteína de cápside P40 do HCMV, pois também estes alvos são proteases.

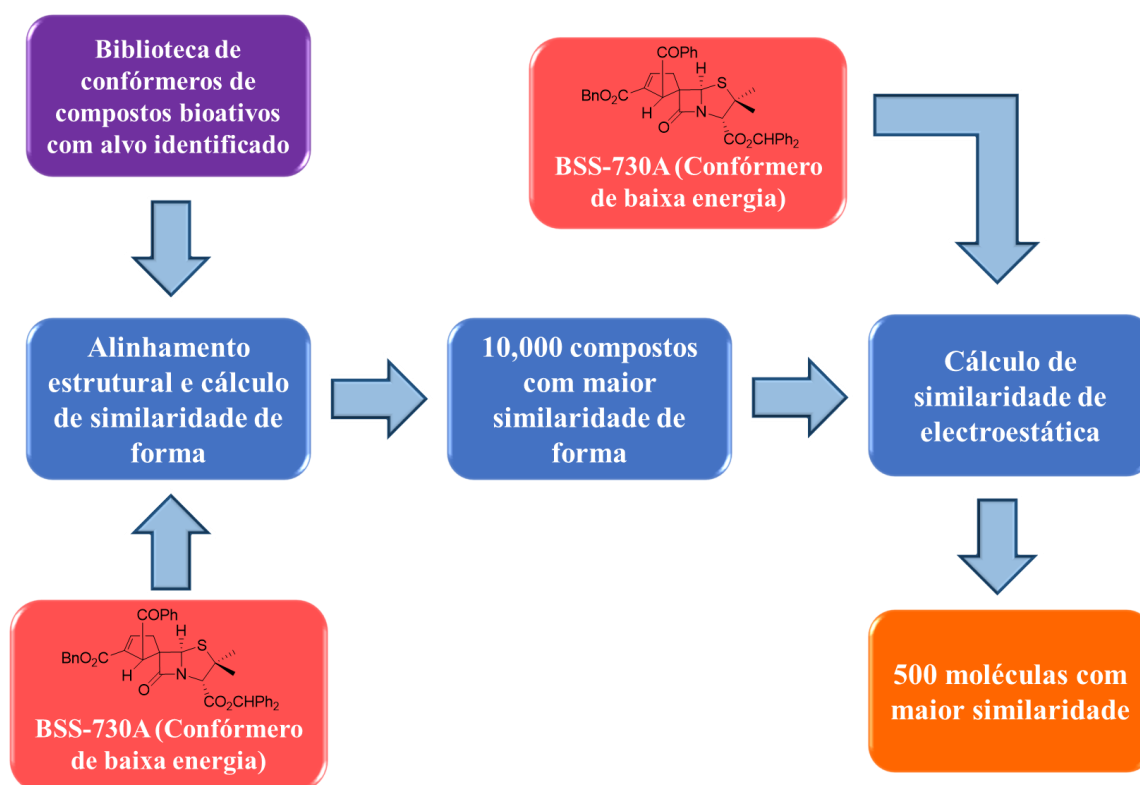


**Figura 6.4** – Estruturas moleculares de a) duas moléculas com maior similaridade 2D com a molécula BSS-730A e; b)  $\beta$ -lactamas inibidoras da protease do HIV identificadas como similares à molécula BSS-730A.

A identificação destes compostos inibidores de proteases, especialmente os inibidores da protease do HIV-1, associados aos resultados de tempo de adição que indicam que o composto BSS-730A atua nos estágios tardios da infeção por HIV, foram entendidos como justificativos da execução de um estudo de inibição enzimática, de modo a determinar se o composto atua por inibição desta protease viral. Assim foi efetuado um ensaio fluorométrico segundo um procedimento da literatura,<sup>44</sup> para avaliar a inibição da atividade da protease do HIV-1 na presença da molécula BSS-730A a uma concentração de 10  $\mu$ M. A espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A não apresentou uma atividade relevante no estudo, constatando-se que esta não atua como um inibidor convencional da protease do HIV. Estes resultados de validação experimental foram apresentados anteriormente e com maior detalhe no Capítulo 2 do presente trabalho.

### 6.2.3. Pesquisa de similaridade 3D de forma e electrostática

Dado o seu carácter espirocíclico, a molécula BSS-730A, assim como os seus derivados, têm uma elevada componente tridimensional associada, contendo vários grupos funcionais e ligações covalentes simples (flexíveis) e, conseqüentemente, características farmacofóricas dispostas em diferentes planos da molécula. Assim, de modo a ter em conta o aspeto conformacional, procedeu-se a pesquisas de similaridade 3D com enfoque na forma e nas propriedades electrostática das moléculas (Figura 6.5). Esta abordagem focou-se na pesquisa de compostos similares não só à espirociclipentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A, mas também aos seus análogos ativos contra HIV-1 e *Plasmodium*, BSS-722A e **4.19b**, partindo do princípio de que, pela elevada similaridade estrutural verificada entre as três, estas partilhem o mesmo alvo biológico. Esta abordagem permite limitar a análise apenas aos alvos que sejam comuns às três moléculas. Com esta finalidade utilizou-se os *software* ROCS e EON da OpenEye Scientific Software<sup>45</sup>, bastante reputado em procedimentos de pesquisa de similaridade 3D.<sup>46-49</sup> O *software* permite o cálculo de métricas de similaridade de forma e electrostática por um coeficiente de Tanimoto adaptado.<sup>28</sup> O *software* utilizado neste procedimento apresenta ainda uma métrica de similaridade denominada TanimotoCombo ( $T_{\text{combo}}$ ) que conjuga ambas as similaridades de forma e electrostática, sendo o seu valor numérico equivalente à soma dos dois coeficientes respetivos a cada medida de similaridade, variando assim entre 0 e 2. De notar que esta última métrica está associada a elevadas performances em protocolos de pesquisas de similaridade.<sup>50</sup>

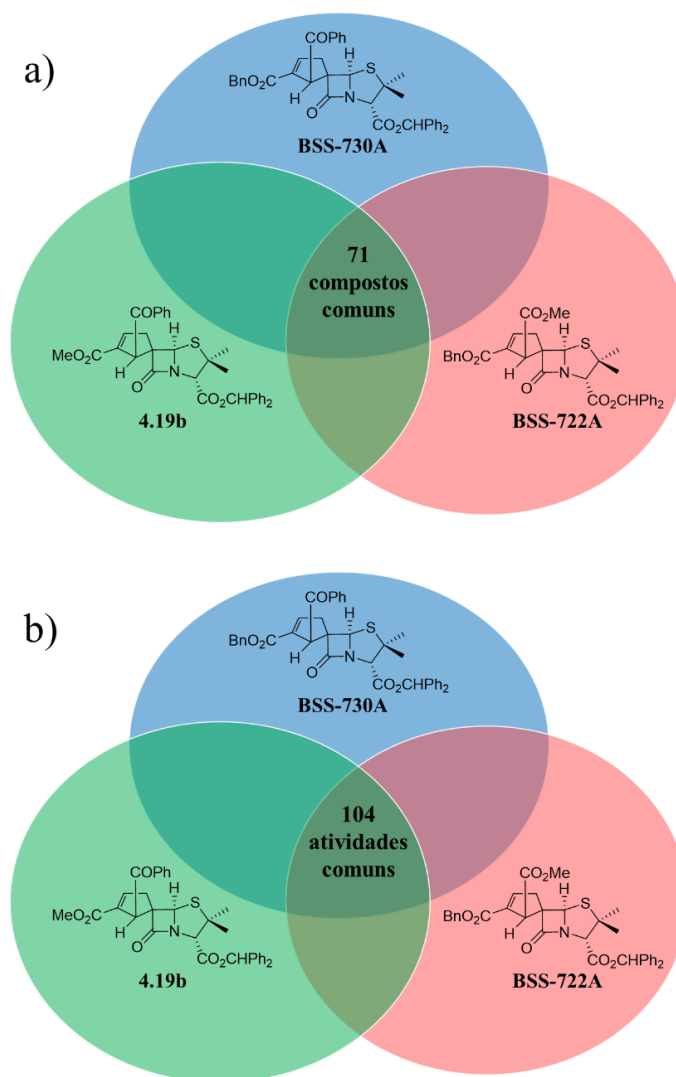


**Figura 6.5** - Esquema ilustrativo da abordagem de pesquisa de similaridade 3D baseada em forma e electroestática.

Em termos de procedimento, cada uma das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas bioativas BSS-730A, BSS-722A e **4.19b** foi alvo da mesma abordagem para identificação de moléculas similares (Figura 6.5), mas em estudos individuais. Tomando a molécula BSS-730A como exemplo, a estratégia teve uma sequência de cálculo de tautômeros, espécie iônica maioritária a pH fisiológico e cargas parciais como passos prévios à geração de um seu confórmero de baixa energia. De notar que esta abordagem é fundamentada em estudos disponíveis na literatura que demonstram que procedimentos de *virtual screening* baseado em forma em que se utiliza um confórmero de baixa energia determinada pelo software Open Eye Omega como *query*, apresentam desempenhos análogos relativamente à utilização da pose bioativa cristalográfica do mesmo composto.<sup>51</sup> Assim, a estrutura tridimensional de baixa energia calculada serviu de referência para o alinhamento estrutural de toda a biblioteca de conforméros de compostos bioativos obtidos da ChEMBL com recurso à ferramenta de alinhamento estrutural ROCS, sendo mantidas para o passo seguinte do procedimento apenas as 10 mil moléculas com melhor alinhamento de forma e complementaridade química relativamente à referência. Uma vez gerado este último conjunto de estruturas alinhadas,

foram calculados os seus coeficientes de similaridade de forma e electroestática contra a molécula de referência BSS-730A. A métrica  $T_{\text{combo}}$  foi utilizada para seleccionar as 500 moléculas com maior similaridade com a espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A. O procedimento acima descrito foi repetido para as restantes duas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas. Em termos de resultados globais de similaridade, todas as moléculas identificadas apresentaram um valor de  $T_{\text{combo}}$  superior a 0.8 relativamente às respectivas espiro- $\beta$ -lactamas contra as quais se calcularam os coeficientes de similaridade, valor que equivale a uma similaridade estrutural percentual de 40% já que o valor de  $T_{\text{combo}}$  varia entre 0 e 2.

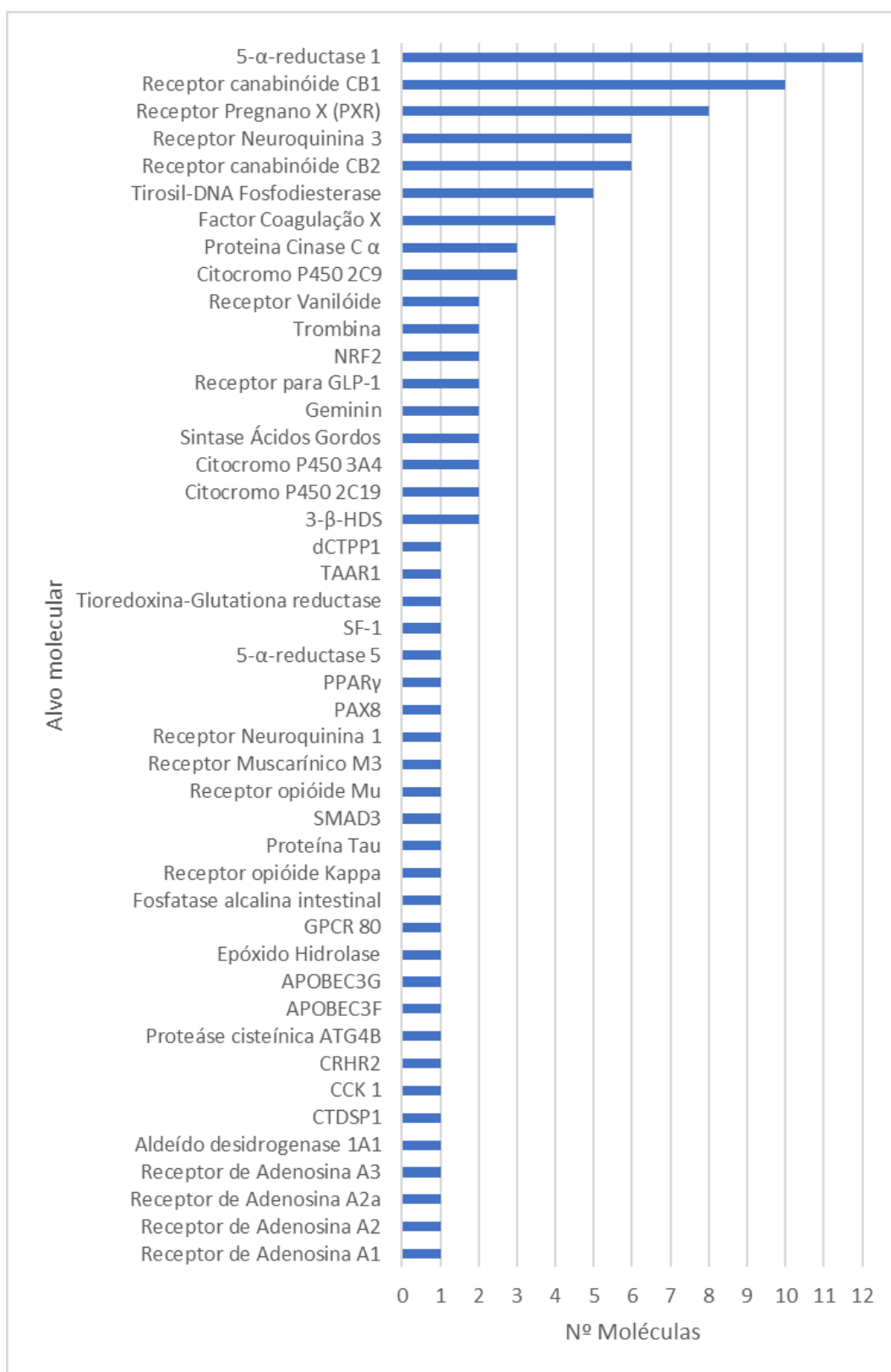
Por fim, após gerados os três conjuntos independentes, cada um contendo as 500 moléculas com maior similaridade relativamente a cada uma das três espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas BSS-730A, BSS-722A e **4.19b**, analisou-se a interseção entre os três conjuntos permitindo a identificação de 71 moléculas com elevada similaridade com as três moléculas ativas (Figura 6.6 a). Estas 71 moléculas identificadas representam um total de 103 bioatividades contra 45 alvos moleculares conhecidos (Figura 6.6 b).



**Figura 6.6** – Diagrama de Venn ilustrativo da interseção dos resultados de pesquisa de similaridade 3D para três espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, representando a) as moléculas similares comuns e b) o total das suas atividades.

A distribuição do número de moléculas identificadas por cada alvo é apresentada na Figura 6.7. Contrariamente ao que ocorreu aquando das pesquisas de similaridade 2D, pela presente estratégia de pesquisa de similaridade não foi identificada nenhuma molécula similar às três espiro- $\beta$ -lactamas que tenha como alvo uma proteína da maquinaria viral do HIV. O alvo com o maior número de moléculas associadas é 5- $\alpha$ -reductase 1, uma das três formas da 5- $\alpha$ -reductase.<sup>52</sup> Esta classe de enzimas atua na metabolização de esteroides, participando em três diferentes vias metabólicas, nomeadamente na síntese de ácidos biliares, e metabolismo do estrogénio e androgénio. No entanto, com base na literatura disponível não foi possível estabelecer qualquer relação direta entre esta enzima e a infeção por HIV-1 e/ou *Plasmodium*.





**Figura 6.7** – Alvos e respetiva distribuição de frequências das moléculas bioativas com similaridade estrutural com as espirociclopentenil- $\beta$ -lactama bioativas.

Os recetores canabinóides do tipo 1 (CB1) e tipo 2 (CB2) são o alvo respetivo de dez e seis moléculas identificadas como similares com as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas ativas contra HIV e *Plasmodium*, utilizadas como referência na pesquisa de similaridade de forma e electroestática. Estas duas formas de recetores canabinóides partilham uma elevada similaridade estrutural entre si sendo usualmente ativados pelos mesmos agonistas, apresentando, no entanto, uma distribuição diferente no organismo. O recetor CB1 é expresso maioritariamente no sistema nervoso central e em menor escala nos pulmões, fígado e rins, enquanto o recetor CB2 é predominante expresso em células do sistema imunitário e em tecidos periféricos.<sup>53,54</sup> A funcionalidade do sistema canabinóide é consideravelmente complexa e abrangente,<sup>55</sup> mas ambos os recetores CB1 e CB2 exercem uma atividade de modelação da resposta inflamatória e imune, embora estejam associados à indução de diferentes fatores pró-inflamatórios e conseqüentemente a diferentes tipo de mecanismo de resposta.<sup>53,56,57</sup> Dentro do contexto da atividade antiviral, vários estudos têm vindo a apontar ambos os recetores canabinóides como potenciais alvos terapêuticos a explorar. O fármaco rimonabant, um agonista inverso do recetor CB1, demonstrou atividade *in vitro* contra o HBV, suprimindo a fase de transcrição do RNA viral.<sup>58</sup> Por sua vez, o composto AM-251, também um agonista inverso do recetor CB1 e um análogo estrutural do rimonabant, revelou-se um potente inibidor do HCV em estudos *in vitro*.<sup>59</sup> A administração de canabinóides foi associada também a uma atenuação da progressão do SIV em macacos rhesus.<sup>60</sup> Relativamente à infeção por HIV, o composto WIN55,212-2, um agonista de ambos os recetores canabinóides, demonstrou suprimir a infeção do vírus em culturas de células da microglia por via de um mecanismo associado à ativação dos recetores CB2.<sup>61</sup> Adicionalmente, foi também sugerido que o agonismo dos recetores canabinóides CB2 em células CD4+ T inibe a infeção por HIV pelo bloqueio da reorganização da actina.<sup>62</sup> Alguns estudos apontam ainda uma relação entre os recetores canabinóides e a infeção por *Plasmodium*. Ratinhos *knock-out* para o gene do recetor CB2 mostraram-se resistentes ao desenvolvimento de malária cerebral.<sup>63</sup> Por outro lado, um outro estudo demonstrou que o rimonabant assim como o composto SR144528, um antagonista do recetor CB2, atuam como inibidores do crescimento do *P. falciparum* na sua fase eritrocítica.<sup>64</sup>

No conjunto dos resultados da pesquisa de similaridade de forma e electroestática, oito moléculas têm como alvo o Recetor Pregnano X, comumente referido como PXR (*Pregnane X Receptor*), sendo o terceiro alvo com mais moléculas associadas. O recetor

PXR é um recetor nuclear que atua através da regulação da expressão de proteínas responsáveis pelo metabolismo e eliminação de xenobióticos e hormonas esteróides, como são exemplo enzimas do CYP450, a UDP-glucuronosiltransferase, Sulfotransferases ou MDR1.<sup>65</sup> No contexto do HIV, alguns compostos com atividade contra a protéase ou RT do vírus demonstraram também ser ligandos do PXR.<sup>66,67</sup> No entanto, é de notar que estudos de tempo de adição e *single-target* levaram a que estes tipos de inibição viral fossem excluídos como possibilidade de mecanismo de ação da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A. Por outro lado, vários estudos têm vindo a revelar a importância do PXR na modelação da imunidade inata, atuando na regulação da produção de citocinas inflamatórias como por exemplo Fatores de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-6.<sup>68-70</sup> Estudos em macrófagos e células endoteliais vasculares apontam que esta atividade imunomoduladora do recetor ocorre por via da sua ação na ativação do inflamassoma NLRP3, levando consequentemente à libertação de fatores pró-inflamatórios, como a caspase-1 e a interleucina-1 $\beta$ .<sup>71,72</sup> É de notar que a ativação do inflamassoma NLRP3 se encontra descrita como um mecanismo preponderante na resposta imune inata do hospedeiro contra agentes patógenos, como *Streptococcus pneumoniae*<sup>73</sup>, *Candida Albicans*<sup>74</sup> ou o vírus do Influenza A<sup>75</sup>. No entanto, no que toca à infeção por HIV, o papel do inflamassoma NLRP3 é ambíguo. Se por um lado há resultados que apontam para uma atividade inibitória do NLRP3 nas fases iniciais da infeção por inibição da reorganização do citoesqueleto celular necessária à entrada viral e pela produção de fatores pró-inflamatórios, por outro o próprio vírus induz a produção do inflamassoma ao longo da infeção, sendo que na sua fase crónica a ativação constitutiva do inflamassoma NLRP3 contribui para a evolução da infeção estando associada a um pior prognóstico da doença.<sup>76,77</sup>

Relativamente aos alvos Receptor da Neuroquinina 3 (NK3R)<sup>78</sup> e Tirosil-DNA fosfodiesterase<sup>79</sup> não foi possível estabelecer qualquer relação entre a modelação da sua atividade e a inibição da infeção por HIV ou *Plasmodium* com base na literatura disponível. O mesmo acontece com o Factor de Coagulação X<sup>80</sup>, com a ressalva de que no caso desta enzima existem vários estudos que demonstram que a sua ligação ao capsídeo dos adenovírus desempenha um papel de proteção e potenciação da infeção por este agente viral.<sup>81-83</sup> Relativamente ao CYP450 2C9, alvo de três das moléculas identificadas pela pesquisa de similaridade, este potencial alvo já foi abordado

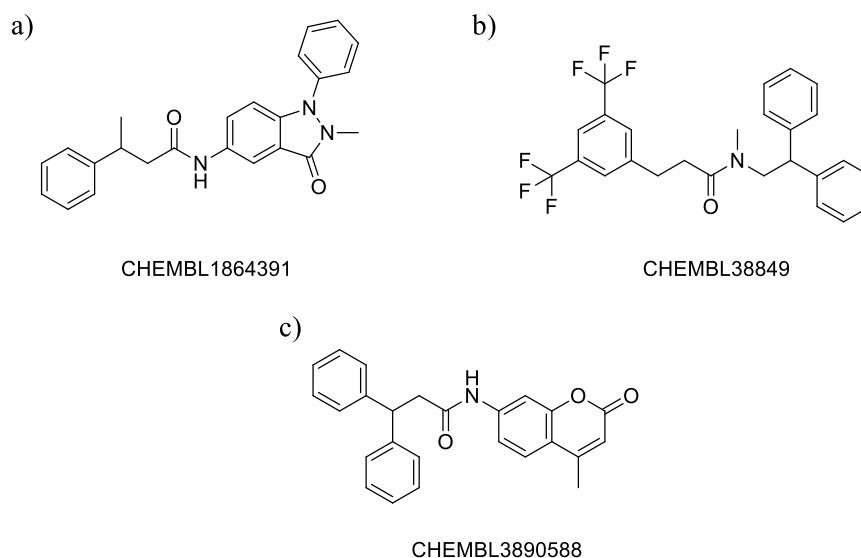
anteriormente na seção 6.2.2, aquando da interpretação dos resultados da pesquisa de similaridade recorrendo a descritores do tipo ECFP4.

A presente estratégia de pesquisa de similaridade permitiu também identificar três diferentes moléculas similares às espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas usadas como referência no estudo, que têm como alvo a Proteína Cinase C  $\alpha$  ( $\alpha$ PKC)<sup>84</sup>, uma cinase endógena. Esta cinase foi descrita como responsável pela fosforilação da proteína Gag do HIV-1 durante a infeção viral, regulando positivamente a incorporação da proteína Vpr (*Viral Protein R*) nos viriões e, conseqüentemente, a infecciosidade do vírus.<sup>85</sup> O mesmo estudo demonstrou que o tratamento com um inibidor da  $\alpha$ PKC de macrófagos previamente infetados com duas estirpes diferentes de HIV-1, suprimiu consideravelmente a replicação viral. A  $\alpha$ PKC também se encontra descrita como responsável pela fosforilação e estimulação da função do fator EF-1 do *P. falciparum*, um elemento determinante para a síntese proteica do parasita.<sup>86</sup>

Relativamente aos alvos com menor representatividade em termos do número de moléculas associadas ( $N \leq 2$ ), é importante referir os casos das APOBEC3F e APOBEC3G, assim como do Recetor da Neuroquina 1 (NK1R) e a protéase ATG4B. No caso das proteínas da classe das APOBEC3, estas são componentes críticos da imunidade inata do hospedeiro funcionando como potentes fatores de controlo e restrição do desenvolvimento de infeções virais.<sup>87,88</sup> Em termos de mecanismo, as APOBEC3 são citidina-desaminases que atuam sobre o genoma viral, convertendo resíduos de citidina a resíduos de uridina, inibindo assim a replicação do vírus por hipermutação e conseqüente inviabilização e degradação do seu genoma.<sup>88,89</sup> O mecanismo de ação inibitório das APOBEC3 sobre a infeção por HIV é o mais explorado no panorama da ampla atividade antiviral desta classe de enzimas, especialmente para o caso específico da enzima APOBEC3G.<sup>90-92</sup> Apesar de a sua atividade antiviral se dever maioritariamente à sua ação de desaminase, no caso do HIV tem vindo a ser demonstrado que a APOBEC3G também atua em paralelo por um mecanismo de oligomerização e bloqueio físico da RT do HIV, inibindo a transcrição viral.<sup>88</sup> No entanto, o vírus do HIV apresenta um mecanismo próprio de antagonismo das APOBEC3 altamente eficiente, por via da proteína viral acessória Vif (*Viral Infective Factor*), que promove a degradação das APOBEC3 por ubiquitinação, permitindo assim a propagação da infeção viral.<sup>93,94</sup> É de notar que existem divergências entre os vírus HIV-1 e HIV-2 ao nível das respetivas proteínas Vif, nomeadamente em termos de homologia estrutural e seus resíduos determinantes para a

interação com as proteínas APOBEC3.<sup>95</sup> No contexto da presente pesquisa de similaridade, as duas proteínas APOBEC3F e APOBEC3G são alvo da mesma molécula CHEMBL1864391 (Figura 6.8 a), que por sua vez atua ao impedir exatamente a interação entre a proteína viral Vif e as duas enzimas APOBEC3, inibindo desta forma a degradação das últimas. No contexto da malária é de referir que foi também demonstrado que a deleção do gene da APOBEC3G tem um forte impacto na suscetibilidade à infecção por *P. falciparum*, sendo que no mesmo estudo é também sugerido que este gene desempenha um papel importante na imunidade inata contra o parasita.<sup>96</sup> Desta forma, um potencial mecanismo de ação antimicrobiana das ciclopentenil- $\beta$ -lactamas via interação e proteção das enzimas APOBEC3, constitui uma hipótese de mecanismo de ação a ser despistada.

Respetivamente à identificação de uma molécula CHEMBL38849 (Figura 6.8 b) cujo alvo é o recetor NK1R, é de referir que vários estudos têm demonstrado que a interação deste recetor com o seu ativador SP (*Substance P*) promove a replicação e progressão da infecção de vírus como o HIV, HSV, RSV ou EBV.<sup>97,98</sup> Por outro lado, antagonistas do recetor NK1R como o vaporeotide<sup>99</sup> ou o aprepitant<sup>100</sup>, demonstraram atividade *in vitro* contra o HIV. Finalmente, é de mencionar também a identificação do composto CHEMBL3890588 (Figura 6.8 c), um inibidor da ATG4B, uma protease de cisteína indispensável ao processo de autofagia celular.<sup>98</sup> Por sua vez, este processo endógeno tem vindo a ser implicado na patogénese do HIV, sendo que o próprio vírus induz a expressão de genes ATG durante a sua morfogénese e propagação da infecção.<sup>101,102</sup>



**Figura 6.8** – Estruturas moleculares de três moléculas identificadas como similares às espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, cujos alvos moleculares se encontram potencialmente relacionados com a patogénese do HIV.

Os resultados ora apresentados são indicativos, carecendo ainda de uma validação experimental. No entanto, é de realçar a identificação de uma variedade de alvos que, independentemente de se encontrarem ou não relacionados com atividade antimicrobiana, devem ser tidos em conta também na compreensão do potencial polifarmacológico associado às espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas. O facto de alguns dos alvos identificados estarem diretamente envolvidos em mecanismos de metabolismo endógeno, como são exemplo a 5- $\alpha$ -reductase 1, as proteínas do CYP450 ou o recetor PXR, é também indicativo de que possam vir a ser verificadas interações medicamentosas ou implicações a nível da farmacocinética da presente classe de moléculas bioativas.

### 6.3. Conclusão e Perspetivas Futuras

A espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A e todo o conjunto de seus derivados revelaram uma elevada e altamente promissora bioatividade conjunta contra HIV e *Plasmodium*. Apesar de os resultados relativamente ao mecanismo de ação focados na molécula BSS-730A apontarem para que esta exerça a sua atividade antiviral por um mecanismo complexo e inovador, o seu alvo biológico permanece desconhecido.

À luz do princípio da similaridade molecular, que sugere que moléculas semelhantes são propícias a partilhar propriedades e a atuar sobre os mesmos alvos biológicos, e no contexto alargado dos esforços de química medicinal computacional

associados a este projeto, foram levadas a cabo várias pesquisas de similaridade, com recurso a ferramentas avançadas e de reconhecida qualidade pela indústria farmacêutica, com vista a identificar moléculas com alvo biológico conhecido que apresentem características estruturais, conformacionais e/ou electrostáticas semelhantes a três das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com dupla atividade antimicrobiana contra HIV e *Plasmodium*. Esta abordagem teve como principal objetivo identificar potenciais alvos biológicos da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas.

Os resultados obtidos pela pesquisa de similaridade bidimensional e a sua subsequente tentativa de validação em conjunto com estudos *in vitro* de tempo de adição, permitiram, numa primeira fase, despistar a possibilidade de a molécula BSS-730A atuar sobre algum dos alvos convencionais da maquinaria viral do HIV.

Tendo em conta a elevada componente tridimensional inerente ao carácter espirocíclico da estrutura das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, foram posteriormente exploradas pesquisas de similaridade tridimensionais com enfoque na forma e nas propriedades electrostáticas. Esta última abordagem permitiu sinalizar uma panóplia de possíveis alvos passíveis de justificar a bioatividade observada para as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas. De notar que de entre os possíveis alvos identificados pela similaridade 3D, nenhum faz parte da maquinaria do HIV ou *Plasmodium*, um resultado concordante com estudos prévios de mecanismo de ação *in vitro*. No entanto, no seio do conjunto de potenciais alvos identificados, alguns foram destacados por ter sido possível estabelecer uma relação direta entre as funções dos mesmos e diferentes atividades antimicrobianas, com base em resultados disponíveis na literatura. De notar que todos estes potenciais alvos atrás referenciados são caracterizados por estarem envolvidos em mecanismos de imunidade inata do hospedeiro. É de notar assim que os presentes resultados sustentam a hipótese de que a classe das presentes espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas possa apresentar uma atividade pan-antiviral, inibindo a infeção de diferentes vírus, e até mesmo de outros parasitas para além do *Plasmodium*.

Relativamente aos restantes alvos moleculares sugeridos pelas pesquisas de similaridade 3D, e apesar de ainda não ter sido possível confirmar o seu potencial impacto na atividade antimicrobiana dos compostos em estudo, eles constituem pistas importantes que não devem ser menosprezadas. Em contexto biológico, estes resultados sinalizam possíveis interações da classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas com alvos endógenos que podem ter implicações a nível da polifarmacologia e efeitos secundários, ou a nível

de farmacocinética e interações medicamentosas, especialmente pela identificação de diversos alvos associados ao metabolismo endógeno de xenobióticos. Ainda assim, e não obstante o facto de não ter sido possível confirmar experimentalmente as diversas relações entre alvos identificados pela pesquisa de similaridade 3D e a sua função em mecanismos de atividade imune inata que possam explicar a elevada atividade antimicrobiana apresentada pelas espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas, de momento estes resultados podem ser encarados como previsões que podem constituir um ponto de partida relevante e racional para futuros estudos de mecanismo de ação. Indispensavelmente, a plausibilidade de todas as hipóteses aventadas carece de uma investigação mais aprofundada e, em última instância, de uma validação experimental.

No contexto global do presente trabalho, a classe das espiro- $\beta$ -lactamas no geral e as espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas derivadas da molécula BSS-730A em particular, assumem-se inequivocamente como compostos de elevado potencial contra HIV. Como referido ao longo do presente capítulo, o estudo do mecanismo de ação da molécula BSS-730A, utilizada como molécula representativa da classe, apontam para a possibilidade de a mesma exercer a sua atividade antiviral através de um mecanismo complexo e inovador, eventualmente associado ao hospedeiro. Em conjunto com a atividade antimicrobiana dupla sobre dois agentes patógenos tão distintos quanto o HIV e o *Plasmodium*, estes resultados abonam a favor de um potencial espectro antiviral abrangente da espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A e seus derivados, podendo estas vir a constituir uma nova classe de agentes pan-antivirais que possa servir como alternativa às opções terapêuticas correntemente disponíveis. Com o surgimento da pandemia de Covid-19 no início do ano 2020, tornou-se clara a existência de uma lacuna no arsenal terapêutico disponível, em particular no que a fármacos pan-antivirais diz respeito. Desta forma, o desenvolvimento de antivirais de largo espectro que possam ser utilizados em resposta a novas ameaças virais que venham a surgir assume-se como imperativo e coloca este perfil de fármaco no centro das atenções da química medicinal.

Dado o elevado potencial reconhecido à classe das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas derivadas da molécula BSS-730A, foram estabelecidas várias perspectivas futuras. Um ponto fulcral do desenvolvimento destas moléculas passa pela extensão dos seus estudos de bioatividade a diferentes classes de vírus, de modo a aferir e confirmar a sua atividade pan-antiviral. Dentro deste contexto, estão já em curso novos estudos de bioatividade e determinação de mecanismo de ação, sendo que os respetivos resultados preliminares se



revelaram bastante promissores, carecendo, no entanto, de consolidação. Por questões de confidencialidade estes resultados não foram apresentados na presente tese. A potencial confirmação da atividade pan-antiviral da presente classe de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas reforçaria a hipótese de estas atuarem num alvo do hospedeiro. A determinação inequívoca do alvo molecular das moléculas constitui também um dos passos críticos no futuro, não só para a compreensão e caracterização do mecanismo de ação das espiro- $\beta$ -lactamas, mas também por permitir uma conjectura de otimização e *design* racional de novas moléculas potencialmente bioativas com base na estrutura do alvo.

As perspectivas futuras tendo em vista o desenvolvimento farmacêutico das espiro- $\beta$ -lactamas têm como finalidade a avaliação da bioatividade *in vivo* das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas. Desta forma, o planeamento futuro compreende ainda a determinação de parâmetros farmacocinéticos e de toxicidade *in vivo*, estudos estes cujos resultados poderão determinar a necessidade de investir em novas modelações estruturais para obter, por exemplo, moléculas bioativas com carácter mais hidrofílico. Com o mesmo propósito, é também de colocar a hipótese de desenvolvimento de formulações, como por exemplo conjugados ou encapsulamento em ciclodextrinas, como estratégia para contornar a elevada lipofilicidade das moléculas atualmente disponíveis. Por fim, e assim os estudos de farmacocinética e toxicidade apresentem resultados satisfatórios, pressupõe-se a realização de estudos *in vivo* para avaliar a atividade anti-HIV e anti-*Plasmodium* da classe das espiro- $\beta$ -lactamas, sendo de considerar também a realização de estudos *in vivo* contra outros tipos de vírus, caso os respetivos resultados de bioatividade *in vitro* assim o justifiquem.

## 6.4. Bibliografia

1. Bártolo, I.; Santos, B. S.; Fontinha, D.; Machado, M.; Francisco, D.; Sepodes, B.; Rocha, J.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Figueira, M. E.; Barroso, H.; Nascimento, T.; Alves de Matos, A. P.; Alves, A. J. S.; Alves, N. G.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Taveira, N., Spiro- $\beta$ -lactam BSS-730A displays potent activity against HIV and Plasmodium. *ACS Infect. Dis.* **2021**, 7 (2), 421–434.
2. Kleandrova, V.; Speck-Planche, A., The urgent need for pan-antiviral agents: from multitarget discovery to multiscale design. *Future Med. Chem.* **2020**, 13 (1), 5-8.
3. Li, J. W. H.; Vederas, J. C., Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science* **2009**, 325 (5937), 161-165.
4. Moffat, J. G.; Rudolph, J.; Bailey, D., Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, 13 (8), 588-602.
5. Pasquer, Q. T. L.; Tsakoumagkos, I. A.; Hoogendoorn, S., From phenotypic hit to chemical probe: Chemical biology approaches to elucidate small molecule action in complex biological systems. *Molecules* **2020**, 25 (23), 5702.
6. Carolino, K.; Winzeler, E. A., The antimalarial resistome – finding new drug targets and their modes of action. *Curr. Opin. Microbiol.* **2020**, 57, 49-55.
7. Partridge, F. A.; Forman, R.; Bataille, C. J. R.; Wynne, G. M.; Nick, M.; Russell, A. J.; Else, K. J.; Sattelle, D. B., Anthelmintic drug discovery: target identification, screening methods and the role of open science. *Beilstein J. Org. Chem.* **2020**, 16, 1203-1224.
8. Terstappen, G. C.; Schlüpen, C.; Raggiaschi, R.; Gaviraghi, G., Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6 (11), 891-903.
9. Xiong, M.; Su, H.; Zhao, W.; Xie, H.; Shao, Q.; Xu, Y., What coronavirus 3C-like protease tells us: From structure, substrate selectivity, to inhibitor design. *Med. Res. Rev.* **2021**, 1-34.
10. Negi, A.; Murphy, P. V., Development of Mcl-1 inhibitors for cancer therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, 210, 113038.
11. Picarazzi, F.; Vicenti, I.; Saladini, F.; Zazzi, M.; Mori, M., Targeting the RdRp of emerging RNA viruses: The structure-based drug design challenge. *Molecules* **2020**, 25 (23), 5695.

12. Peón, A.; Naulaerts, S.; Ballester, P. J., Predicting the reliability of drug-target Interaction predictions with maximum coverage of target space. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 3820.
13. Ladds, M. J. G. W.; Popova, G.; Pastor-Fernández, A.; Kannan, S.; van Leeuwen, I. M. M.; Håkansson, M.; Walse, B.; Tholander, F.; Bhatia, R.; Verma, C. S.; Lane, D. P.; Laín, S., Exploitation of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) and p53 activation as therapeutic targets: A case study in polypharmacology. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (52), 17935-17949.
14. Wetzell, C.; Lonneman, M.; Wu, C., Polypharmacological drug actions of recently FDA approved antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112931.
15. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, F.; Bellis, L. J.; Cibrián-Uhalte, E.; Davies, M.; Dedman, N.; Karlsson, A.; Magariños, M. P.; Overington, J. P.; Papadatos, G.; Smit, I.; Leach, A. R., The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (D1), D945-D954.
16. Kim, S.; Thiessen, P. A.; Bolton, E. E.; Chen, J.; Fu, G.; Gindulyte, A.; Han, L.; He, J.; He, S.; Shoemaker, B. A.; Wang, J.; Yu, B.; Zhang, J.; Bryant, S. H., PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D1202-D1213.
17. Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Guo, A. C.; Lo, E. J.; Marcu, A.; Grant, J. R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Sayeeda, Z.; Assempour, N.; Iynkkaran, I.; Liu, Y.; Maciejewski, A.; Gale, N.; Wilson, A.; Chin, L.; Cummings, R.; Le, D.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M., DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (D1), D1074-D1082.
18. Gilson, M. K.; Liu, T.; Baitaluk, M.; Nicola, G.; Hwang, L.; Chong, J., BindingDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D1045-D1053.
19. Huang, H.; Zhang, G.; Zhou, Y.; Lin, C.; Chen, S.; Lin, Y.; Mai, S.; Huang, Z., Reverse screening methods to search for the protein targets of chemopreventive compounds. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 138.
20. Mounbock, A. F. A.; Li, J.; Mishra, P.; Gao, M.; Günther, S., Current computational methods for predicting protein interactions of natural products. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2019**, *17*, 1367-1376.
21. Chaudhari, R.; Fong, L. W.; Tan, Z.; Huang, B.; Zhang, S., An up-to-date overview of computational polypharmacology in modern drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2020**, *15* (9), 1025-1044.

22. Agamah, F. E.; Mazandu, G. K.; Hassan, R.; Bope, C. D.; Thomford, N. E.; Ghansah, A.; Chimusa, E. R., Computational/in silico methods in drug target and lead prediction. *Brief. Bioinformatics* **2020**, *21* (5), 1663-1675.
23. Pinzi, L.; Rastelli, G., Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (18), 4331.
24. Yang, S.-Q.; Ye, Q.; Ding, J.-J.; Ming-Zhu, Y.; Lu, A.-P.; Chen, X.; Hou, T.-J.; Cao, D.-S., Current advances in ligand-based target prediction. *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2020**, *11* (3), e1504.
25. Johnson, M. A.; Maggiora, G. M., *Concepts and applications of molecular similarity*. John Willey & Sons: New York, 1990.
26. Schuffenhauer, A.; Floersheim, P.; Acklin, P.; Jacoby, E., Similarity metrics for ligands reflecting the similarity of the target proteins. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43* (2), 391-405.
27. Bajorath, J., Molecular similarity concepts for informatics applications. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1526*, 231-245.
28. Bajusz, D.; Rácz, A.; Héberger, K., Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J. Cheminformatics* **2015**, *7* (1), 20.
29. Gfeller, D.; Grosdidier, A.; Wirth, M.; Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V., SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (W1), W32-W38.
30. Wang, L.; Ma, C.; Wipf, P.; Liu, H.; Su, W.; Xie, X.-Q., TargetHunter: An in silico target identification tool for predicting therapeutic potential of small organic molecules based on chemogenomic database. *AAPS J.* **2013**, *15* (2), 395-406.
31. Hamad, S.; Adornetto, G.; Naveja, J. J.; Chavan Ravindranath, A.; Raffler, J.; Campillos, M., HitPickV2: a web server to predict targets of chemical compounds. *Bioinformatics* **2019**, *35* (7), 1239-1240.
32. Li, H.; Gao, Z.; Kang, L.; Zhang, H.; Yang, K.; Yu, K.; Luo, X.; Zhu, W.; Chen, K.; Shen, J.; Wang, X.; Jiang, H., TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (suppl\_2), W219-W224.
33. Wang, J.-C.; Chu, P.-Y.; Chen, C.-M.; Lin, J.-H., idTarget: a web server for identifying protein targets of small chemical molecules with robust scoring functions and a divide-and-conquer docking approach. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (W1), W393-W399.
34. Liu, X.; Ouyang, S.; Yu, B.; Liu, Y.; Huang, K.; Gong, J.; Zheng, S.; Li, Z.; Li, H.; Jiang, H., PharmMapper server: a web server for potential drug target identification

using pharmacophore mapping approach. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (suppl\_2), W609-W614.

35. Rogers, D.; Hahn, M., Extended-connectivity fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (5), 742-754.

36. Peón, A.; Dang, C. C.; Ballester, P. J., How reliable are ligand-centric methods for target fishing? *Front. Chem.* **2016**, *4*, 15.

37. O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R., Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminformatics* **2011**, *3* (1), 33.

38. Jakalian, A.; Bush, B. L.; Jack, D. B.; Bayly, C. I., Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21* (2), 132-146.

39. Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I., Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23* (16), 1623-1641.

40. Steinbeck, C.; Han, Y.; Kuhn, S.; Horlacher, O.; Luttmann, E.; Willighagen, E., The Chemistry Development Kit (CDK): An open-source Java library for chemo- and bioinformatics. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43* (2), 493-500.

41. Jasial, S.; Hu, Y.; Vogt, M.; Bajorath, J., Activity-relevant similarity values for fingerprints and implications for similarity searching. *FI000Research* **2016**, *5*, 591.

42. Palrasu, M.; Siddavaram, N., Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr. Drug Targets* **2018**, *19* (1), 38-54.

43. Sperka, T.; Pitlik, J.; Bagossi, P.; Tözsér, J., Beta-lactam compounds as apparently uncompetitive inhibitors of HIV-1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (12), 3086-3090.

44. Toth, M. V.; Marshall, G. R., A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *36* (6), 544-550.

45. OpenEye EON. <https://www.eyesopen.com/EON> (accessed February 2021).

46. Muchmore, S. W.; Souers, A. J.; Akritopoulou-Zanze, I., The use of three-dimensional shape and electrostatic similarity searching in the identification of a melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonist. *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67* (2), 174-176.

47. Naylor, E.; Arredouani, A.; Vasudevan, S. R.; Lewis, A. M.; Parkesh, R.; Mizote, A.; Rosen, D.; Thomas, J. M.; Izumi, M.; Ganesan, A.; Galione, A.; Churchill, G. C.,

Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5 (4), 220-226.

48. Hevener, K. E.; Mehboob, S.; Su, P.-C.; Truong, K.; Boci, T.; Deng, J.; Ghassemi, M.; Cook, J. L.; Johnson, M. E., Discovery of a novel and potent class of *F. tularensis* enoyl-reductase (FabI) inhibitors by molecular shape and electrostatic matching. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (1), 268-279.

49. Boström, J.; Grant, J. A.; Fjellström, O.; Thelin, A.; Gustafsson, D., Potent fibrinolysis inhibitor discovered by shape and electrostatic complementarity to the drug tranexamic acid. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (8), 3273-3280.

50. Fells, J. I.; Ai, X.; Weinglass, A.; Feng, W.; Lei, Y.; Finley, M.; Hoveyda, H. R.; Fraser, G. L.; Machacek, M., Identification of free fatty acid receptor 2 agonists using virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, 30 (21), 127460.

51. Kirchmair, J.; Ristic, S.; Eder, K.; Markt, P.; Wolber, G.; Laggner, C.; Langer, T., Fast and efficient in silico 3D screening: Toward maximum computational efficiency of pharmacophore-based and shape-based approaches. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47 (6), 2182-2196.

52. Langlois, V. S.; Zhang, D.; Cooke, G. M.; Trudeau, V. L., Evolution of steroid-5 $\alpha$ -reductases and comparison of their function with 5 $\beta$ -reductase. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2010**, 166 (3), 489-497.

53. Tahamtan, A.; Tavakoli-Yaraki, M.; Rygiel, T. P.; Mokhtari-Azad, T.; Salimi, V., Effects of cannabinoids and their receptors on viral infections. *J. Med. Virol.* **2016**, 88 (1), 1-12.

54. Lu, H.-C.; Mackie, K., An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry* **2016**, 79 (7), 516-525.

55. Zou, S.; Kumar, U., Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19 (3).

56. Argenziano, M.; Tortora, C.; Bellini, G.; Di Paola, A.; Punzo, F.; Rossi, F., The endocannabinoid system in pediatric inflammatory and immune diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20 (23).

57. Peyravian, N.; Deo, S.; Daunert, S.; Jimenez, J. J., Cannabidiol as a novel therapeutic for immune modulation. *Immunotargets Ther.* **2020**, 9, 131-140.

58. Sato, A.; Ono, C.; Tamura, T.; Mori, H.; Izumi, T.; Torii, S.; Fauzyah, Y.; Yamamoto, T.; Morioka, Y.; Okuzaki, D.; Fukuhara, T.; Matsuura, Y., Rimonabant

suppresses RNA transcription of hepatitis B virus by inhibiting hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ . *Microbiol. Immunol.* **2020**, *64* (5), 345-355.

59. Shahidi, M.; Tay, E. S. E.; Read, S. A.; Ramezani-Moghadam, M.; Chayama, K.; George, J.; Douglas, M. W., Endocannabinoid CB1 antagonists inhibit hepatitis C virus production, providing a novel class of antiviral host-targeting agents. *J. Gen. Virol.* **2014**, *95* (11), 2468-2479.

60. Molina, P. E.; Winsauer, P.; Zhang, P.; Walker, E.; Birke, L.; Amedee, A.; Stouwe, C. V.; Troxclair, D.; McGoey, R.; Varner, K.; Byerley, L.; LaMotte, L., Cannabinoid administration attenuates the progression of Simian Immunodeficiency Virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **2010**, *27* (6), 585-592.

61. Rock, R. B.; Gekker, G.; Hu, S.; Sheng, W. S.; Cabral, G. A.; Martin, B. R.; Peterson, P. K., WIN55,212-2-Mediated inhibition of HIV-1 expression in microglial cells: Involvement of cannabinoid receptors. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2007**, *2* (2), 178-183.

62. Costantino, C. M.; Gupta, A.; Yewdall, A. W.; Dale, B. M.; Devi, L. A.; Chen, B. K., Cannabinoid receptor 2-mediated attenuation of CXCR4-tropic HIV infection in primary CD4+ T cells. *PLoS One* **2012**, *7* (3), e33961.

63. Buckley, N. E., The peripheral cannabinoid receptor knockout mice: an update. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153* (2), 309-318.

64. Asahi, H.; Inoue, S.-I.; Niikura, M.; Kunigo, K.; Suzuki, Y.; Kobayashi, F.; Sendo, F., Profiling molecular factors associated with pyknosis and developmental arrest induced by an opioid receptor antagonist and dihydroartemisinin in *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* **2017**, *12* (9), e0184874.

65. Mackowiak, B.; Hodge, J.; Stern, S.; Wang, H., The roles of xenobiotic receptors: Beyond chemical disposition. *Drug Metab. Dispos.* **2018**, *46* (9), 1361.

66. Healan-Greenberg, C.; Waring, J. F.; Kempf, D. J.; Blomme, E. A. G.; Tirona, R. G.; Kim, R. B., A Human Immunodeficiency Virus protease inhibitor is a novel functional inhibitor of human Pregnane X Receptor. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36* (3), 500-507.

67. Cheng, Y.; Redinbo, M. R., Activation of the human nuclear xenobiotic receptor PXR by the reverse transcriptase-targeted anti-HIV drug PNU-142721. *Protein Sci.* **2011**, *20* (10), 1713-1719.

68. Mencarelli, A.; D'Amore, C.; Renga, B.; Cipriani, S.; Carino, A.; Sepe, V.; Perissutti, E.; D'Auria, M. V.; Zampella, A.; Distrutti, E.; Fiorucci, S., Solomonsterol A,

a marine pregnane-X-receptor agonist, attenuates inflammation and immune dysfunction in a mouse model of arthritis. *Mar. Drugs* **2013**, *12* (1), 36-53.

69. Qiu, Z.; Cervantes, J. L.; Cicek, B. B.; Mukherjee, S.; Venkatesh, M.; Maher, L. A.; Salazar, J. C.; Mani, S.; Khanna, K. M., Pregnane X Receptor regulates pathogen-induced inflammation and host defense against an intracellular bacterial infection through Toll-like Receptor 4. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 31936.

70. Erickson, S. L.; Alston, L.; Nieves, K.; Chang, T. K. H.; Mani, S.; Flannigan, K. L.; Hirota, S. A., The xenobiotic sensing pregnane X receptor regulates tissue damage and inflammation triggered by *C difficile* toxins. *FASEB J.* **2020**, *34* (2), 2198-2212.

71. Hudson, G.; Flannigan, K. L.; Venu, V. K. P.; Alston, L.; Sandall, C. F.; MacDonald, J. A.; Muruve, D. A.; Chang, T. K. H.; Mani, S.; Hirota, S. A., Pregnane X Receptor activation triggers rapid ATP release in primed macrophages that mediates NLRP3 inflammasome activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2019**, *370* (1), 44-53.

72. Wang, S.; Lei, T.; Zhang, K.; Zhao, W.; Fang, L.; Lai, B.; Han, J.; Xiao, L.; Wang, N., Xenobiotic Pregnane X Receptor (PXR) regulates innate immunity via activation of NLRP3 inflammasome in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (43), 30075-30081.

73. McNeela, E. A.; Burke, Á.; Neill, D. R.; Baxter, C.; Fernandes, V. E.; Ferreira, D.; Smeaton, S.; El-Rachkidy, R.; McLoughlin, R. M.; Mori, A.; Moran, B.; Fitzgerald, K. A.; Tschopp, J.; Pétrilli, V.; Andrew, P. W.; Kadioglu, A.; Lavelle, E. C., Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* **2010**, *6* (11), e1001191.

74. Hise, A. G.; Tomalka, J.; Ganesan, S.; Patel, K.; Hall, B. A.; Brown, G. D.; Fitzgerald, K. A., An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **2009**, *5* (5), 487-497.

75. Allen, I. C.; Scull, M. A.; Moore, C. B.; Holl, E. K.; McElvania-TeKippe, E.; Taxman, D. J.; Guthrie, E. H.; Pickles, R. J.; Ting, J. P. Y., The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to Influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity* **2009**, *30* (4), 556-565.

76. Paoletti, A.; Allouch, A.; Caillet, M.; Saïdi, H.; Subra, F.; Nardacci, R.; Wu, Q.; Muradova, Z.; Voisin, L.; Raza, S. Q.; Law, F.; Thoreau, M.; Dakhli, H.; Delelis, O.; Poirier-Beaudouin, B.; Dereuddre-Bosquet, N.; Le Grand, R.; Lambotte, O.; Saez-Cirion, A.; Pancino, G.; Ojcius, D. M.; Solary, E.; Deutsch, E.; Piacentini, M.; Gougeon, M.-L.;



Kroemer, G.; Perfettini, J.-L., HIV-1 Envelope Overcomes NLRP3-Mediated Inhibition of F-Actin Polymerization for Viral Entry. *Cell Rep.* **2019**, *28* (13), 3381-3394.e7.

77. Leal, V. N. C.; Reis, E. C.; Pontillo, A., Inflammasome in HIV infection: Lights and shadows. *Mol. Immunol.* **2020**, *118*, 9-18.

78. Zhang, W.-w.; Wang, Y.; Chu, Y.-X., Tacr3/NK3R: Beyond their roles in reproduction. *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11* (19), 2935-2943.

79. Brettrager, E. J.; Segura, I. A.; van Waardenburg, R. C. A. M., Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I N-terminal domain modifications and interactions regulate cellular function. *Genes* **2019**, *10* (11), 897.

80. Basavaraj, M. G.; Krishnaswamy, S., Exosite binding drives substrate affinity for the activation of coagulation factor X by the intrinsic Xase complex. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (45), 15198-15207.

81. Duffy, M. R.; Doszpoly, A.; Turner, G.; Nicklin, S. A.; Baker, A. H., The relevance of coagulation factor X protection of adenoviruses in human sera. *Gene Ther.* **2016**, *23* (7), 592-596.

82. Findlay, J. S.; Cook, G. P.; Blair, G. E., Blood Coagulation Factor X Exerts Differential Effects on Adenovirus Entry into Human Lymphocytes. *Viruses* **2018**, *10* (1), 20.

83. Allen, R. J.; Byrnes, A. P., Interaction of adenovirus with antibodies, complement, and coagulation factors. *FEBS Lett.* **2019**, *593* (24), 3449-3460.

84. Singh, R. K.; Kumar, S.; Gautam, P. K.; Tomar, M. S.; Verma, P. K.; Singh, S. P.; Kumar, S.; Acharya, A., Protein kinase C- $\alpha$  and the regulation of diverse cell responses. *Biomol. Concepts* **2017**, *8* (3-4), 143-153.

85. Kudoh, A.; Takahama, S.; Sawasaki, T.; Ode, H.; Yokoyama, M.; Okayama, A.; Ishikawa, A.; Miyakawa, K.; Matsunaga, S.; Kimura, H.; Sugiura, W.; Sato, H.; Hirano, H.; Ohno, S.; Yamamoto, N.; Ryo, A., The phosphorylation of HIV-1 Gag by atypical protein kinase C facilitates viral infectivity by promoting Vpr incorporation into virions. *Retrovirology* **2014**, *11* (1), 9.

86. Mamoun, C. B.; Goldberg, D. E., Plasmodium protein phosphatase 2C dephosphorylates translation elongation factor 1 $\beta$  and inhibits its PKC-mediated nucleotide exchange activity in vitro. *Mol. Microbiol.* **2001**, *39* (4), 973-981.

87. Milewska, A.; Kindler, E.; Vkovski, P.; Zeglen, S.; Ochman, M.; Thiel, V.; Rajfur, Z.; Pyrc, K., APOBEC3-mediated restriction of RNA virus replication. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 5960.

88. Chemudupati, M.; Kenney, A. D.; Bonifati, S.; Zani, A.; McMichael, T. M.; Wu, L.; Yount, J. S., From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866* (3), 382-394.
89. Biron, C. A., Innate immunity: Recognizing and responding to foreign invaders—No training needed. In *Viral Pathogenesis (Third Edition)*, Katze, M. G.; Korth, M. J.; Law, G. L.; Nathanson, N., Eds. Academic Press: Boston, 2016; 41-55.
90. Okada, A.; Iwatani, Y., APOBEC3G-Mediated G-to-A hypermutation of the HIV-1 genome: The missing link in antiviral molecular mechanisms. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2027.
91. Ma, L.; Zhang, Z.; Liu, Z.; Pan, Q.; Wang, J.; Li, X.; Guo, F.; Liang, C.; Hu, L.; Zhou, J.; Cen, S., Identification of small molecule compounds targeting the interaction of HIV-1 Vif and human APOBEC3G by virtual screening and biological evaluation. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 8067.
92. Bennett, R. P.; Salter, J. D.; Smith, H. C., A new class of antiretroviral enabling innate immunity by protecting APOBEC3 from HIV Vif-dependent degradation. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24* (5), 507-520.
93. Ball, K. A.; Chan, L. M.; Stanley, D. J.; Tierney, E.; Thapa, S.; Ta, H. M.; Burton, L.; Binning, J. M.; Jacobson, M. P.; Gross, J. D., Conformational dynamics of the HIV-Vif protein complex. *Biophys. J.* **2019**, *116* (8), 1432-1445.
94. Azimi, F. C.; Lee, J. E., Structural perspectives on HIV-1 Vif and APOBEC3 restriction factor interactions. *Protein Sci.* **2020**, *29* (2), 391-406.
95. Smith, J. L.; Izumi, T.; Borbet, T. C.; Hagedorn, A. N.; Pathak, V. K., HIV-1 and HIV-2 Vif interact with human APOBEC3 proteins using completely different determinants. *J. Virol.* **2014**, *88* (17), 9893-9908.
96. Jha, P.; Sinha, S.; Kanchan, K.; Qidwai, T.; Narang, A.; Singh, P. K.; Pati, S. S.; Mohanty, S.; Mishra, S. K.; Sharma, S. K.; Awasthi, S.; Venkatesh, V.; Jain, S.; Basu, A.; Xu, S.; Indian Genome Variation, C.; Mukerji, M.; Habib, S., Deletion of the APOBEC3B gene strongly impacts susceptibility to falciparum malaria. *Infect. Genet. Evol.* **2012**, *12* (1), 142-148.
97. O'Connor, T. M.; O'Connell, J.; O'Brien, D. I.; Goode, T.; Bredin, C. P.; Shanahan, F., The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cell. Physiol.* **2004**, *201* (2), 167-180.

98. Fernández, Á. F.; López-Otín, C., The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125* (1), 33-41.
99. Spitsin, S.; Tuluc, F.; Meshki, J.; Ping Lai, J.; Tustin Iii, R.; Douglas, S. D., Analog of somatostatin vapreotide exhibits biological effects in vitro via interaction with neurokinin-1 receptor. *Neuroimmunomodulation* **2013**, *20* (5), 247-255.
100. Barrett, J. S.; Spitsin, S.; Moorthy, G.; Barrett, K.; Baker, K.; Lackner, A.; Tulic, F.; Winters, A.; Evans, D. L.; Douglas, S. D., Pharmacologic rationale for the NK1R antagonist, aprepitant as adjunctive therapy in HIV. *J. Transl. Med.* **2016**, *14* (1), 148-148.
101. Kyei, G. B.; Dinkins, C.; Davis, A. S.; Roberts, E.; Singh, S. B.; Dong, C.; Wu, L.; Kominami, E.; Ueno, T.; Yamamoto, A.; Federico, M.; Panganiban, A.; Vergne, I.; Deretic, V., Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages. *J. Cell Biol.* **2009**, *186* (2), 255-268.
102. Eekels, J. J. M.; Sagnier, S.; Geerts, D.; Jeeninga, R. E.; Biard-Piechaczyk, M.; Berkhout, B., Inhibition of HIV-1 replication with stable RNAi-mediated knockdown of autophagy factors. *Viol. J.* **2012**, *9* (1), 69.

# Capítulo 7

## Parte experimental

### Resumo

O presente capítulo reúne os vários procedimentos experimentais utilizados ao longo deste trabalho. Relativamente à caracterização dos compostos, esta foi efetuada através de ponto de fusão, espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) e de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia de infra-vermelho (IV), espectrometria de massa de alta resolução (EMAR) ou análise elementar, e rotação específica  $[\alpha]$ .

## Capítulo 7 - Parte experimental

7.1. Aparelhagem Utilizada	225
7.2. Solventes e reagentes	226
7.3. Índice de compostos	227
7.4. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 3	234
7.4.1. Síntese de novas espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas	234
7.4.1.1 - Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas via cicloadição 1,3-dipolar entre uma diazo- $\gamma$ -lactama e diferentes alquinos deficientes em electrões como dipolarófilos.	238
7.4.1.2. Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\gamma$ -lactamas ácidas	239
7.4.2. Síntese de novas espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas	240
7.4.2.1. Procedimento geral para a esterificação de ácidos carboxílicos acetilénicos com difenildiazometano	240
7.4.2.2. Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas via cicloadição 1,3-dipolar entre um 6-diazopenicilanato e diferentes alquinos deficientes em electrões como dipolarófilos.	241
7.4.2.3. Procedimento geral para a síntese de espiro-3 <i>H</i> -pirazole- $\beta$ -lactamas ácidas	244
7.4.2.4. Procedimentos para a síntese de outros derivados da molécula <i>lead</i> BSS-593 por derivatização estrutural do seu grupo ácido carboxílico	246
7.5. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 4	248
7.5.1. Síntese de 6-alkilidenopenicilanatos	248
7.5.2. Síntese de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas pela cicloadição [3+2] formal entre um 6-alkilidenopenicilanato e 2-butinoatos	248
7.5.3. Síntese dos restantes espiropenicilanatos análogos da molécula <i>lead</i> BSS-730A	251
7.5.4. Síntese de espiropenicilanatos análogos da molécula <i>lead</i> BSS-730B	254

7.6. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 5	256
7.6.1. Procedimento geral para a síntese de alenos monossustituídos a partir de iletos de fósforo	256
7.6.2. Síntese de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas pela cicloadição [3+2] formal entre um 6-alkilidenopenicilinato e alenoatos monossustituídos	262
7.7. Ensaio de bioatividade <i>in vitro</i>	279
7.7.1. Cultura de células	279
7.7.2. Ensaio de viabilidade celular	280
7.7.3. Ensaio de atividade anti-HIV	280
7.7.4. Estudos de tempo de adição	281
7.7.5. Inibição da infecção de <i>P. berghei</i> na fase hepática	281
7.7.6. Inibição da infecção de <i>P. falciparum</i> na fase sanguínea	282
7.7.7. Determinação dos valores de IC <sub>50</sub> e IC <sub>90</sub>	282
7.7.8. Ensaio <i>singlet-target</i> contra uma protease recombinante do HIV	283
7.8. Estudos computacionais	283
7.8.1. Cálculos conformacionais de energia mínima	283
7.8.2. Construção de base de dados de compostos bioativos com alvo molecular conhecido	283
7.8.3. Pesquisa de similaridade estrutural 2D com descritores do tipo ECFP4	285
7.8.4. Determinação da subestrutura máxima comum entre moléculas	285
7.8.5. Pesquisa de subestrutura molecular	285
7.8.6. Pesquisa de similaridade 3D de forma e electrostática	285
7.8.7. Mapeamento de farmacóforo	286
7.8.8. Estudos de docking	286
7.9. Bibliografia	287

## 7.1. Aparelhagem Utilizada

### Cromatografia

Nas reações cuja evolução foi acompanhada por cromatografia em camada fina (TLC) utilizaram-se placas de sílica 60 F254, em suporte de alumínio, fornecidas pela Macherey-Nagel ou Merck.

As cromatografias em coluna foram feitas utilizando gel de sílica 60 (0,035-0,070 mm) fornecida pela Acros Organics, Merck ou Fluka.

### Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

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

Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ), dimetilsulfóxido ( $\text{DMSO-}d_6$ ) e metanol ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ). Os desvios químicos ( $\delta$ ) são apresentados em ppm relativamente ao padrão interno trimetilsilano (TMS). Os valores das constantes de acoplamento ( $J$ ) são expressos em Hz.

### Pontos de Fusão

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

### Espetroscopia de Infra-Vermelho (IV)

Os espectros de infra-vermelho foram obtidos num espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 630 FTIR, utilizando o método de Refletância Total Atenuada (ATR).

### Rotação Específica

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

### Análise Elementar

As análises elementares foram feitas com um analisador Elemental Vario Micro Cube.

## **Espetrometria 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) ou impacto electrónico (EI), ou num espectrómetro Orbitrap q-Exactive Focus (Thermo scientific) acoplado a um HPLC Vanquish (Thermo Scientific) com ESI.

### **7.2. Solventes e reagentes**

#### **Acetato de Etilo**

Refluxado durante 3 horas na presença de carbonato de potássio e de seguida destilado.

#### **Clorofórmio e diclorometano**

Refluxados na presença de cloreto de cálcio e destilados. Ambos os solventes foram guardados sobre peneiros moleculares 4 Å. No caso específico do clorofórmio, o mesmo foi passado por uma coluna de alumina,

#### **Etanol e metanol**

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

#### **Éter etílico, hexano, THF e tolueno**

Refluxados na presença de fios de sódio, utilizando benzofenona como indicador, e destilados. Os solventes foram guardados sobre peneiros moleculares 4 Å.

Todos os restantes solventes e reagentes foram adquiridos às empresas Aldrich, Acros Organics, Alfa Aesar ou Fluorochem, tendo sido utilizados diretamente e sem qualquer tipo de purificação adicional.

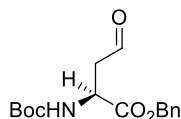


## 7.3. Índice de compostos

**Capítulo 3** - Modelação estrutural de uma espiro-3*H*-pirazole- $\beta$ -lactama quiral com dupla atividade contra HIV e *Plasmodium*.

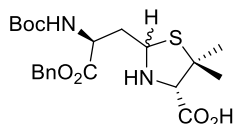
### Síntese de novas espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactamas

Precusores



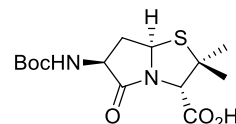
**3.21**

p. 234



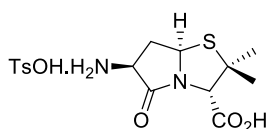
**3.22**

p. 234



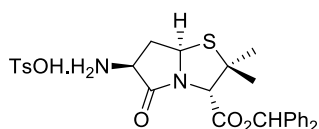
**3.23**

p. 235



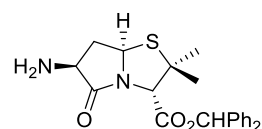
**3.24**

p. 236



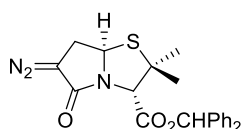
**3.26**

p. 236



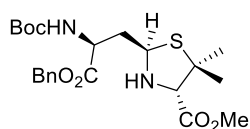
**3.27**

p. 237



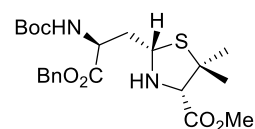
**3.28**

p. 237



**3.30a**

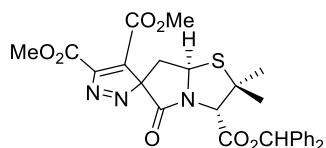
p. 234



**3.30b**

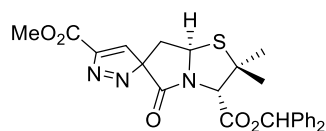
p. 234

Produtos finais



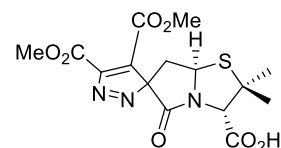
**3.33a**

p. 238



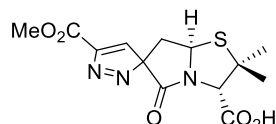
**3.33b**

p. 238



**3.34a**

p. 239

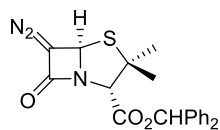


**3.34b**

p. 240

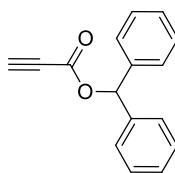
## Síntese de novas espiro-3*H*-pirazole-β-lactamas

### Precusores



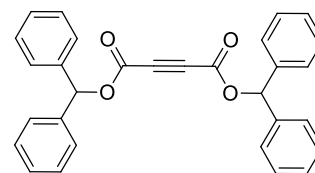
**3.13**

p. 240



**3.35d**

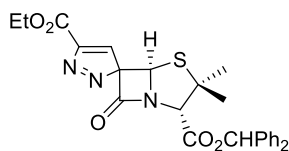
p. 241



**3.35e**

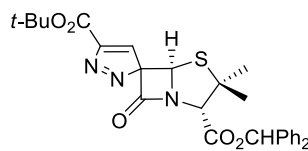
p. 241

### Produtos finais



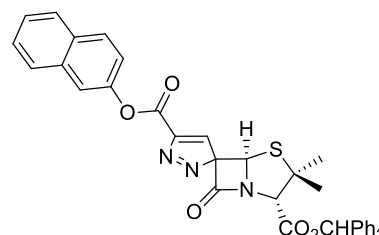
**3.36a**

p. 242



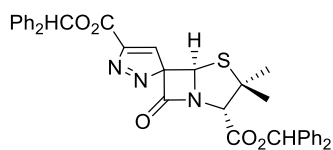
**3.36b**

p. 242



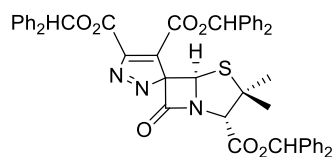
**3.36c**

p. 243



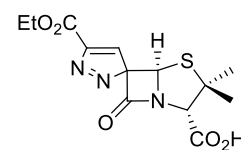
**3.36d**

p. 243



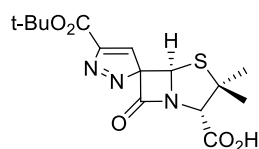
**3.36e**

p. 244



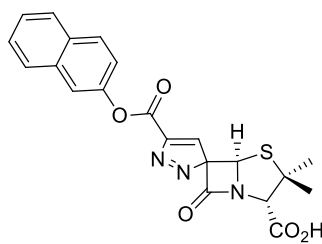
**3.37a**

p. 245



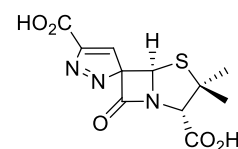
**3.37b**

p. 245



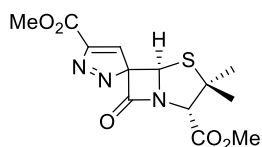
**3.37c**

p. 245



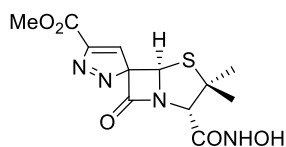
**3.37d**

p. 246



**3.38**

p. 246

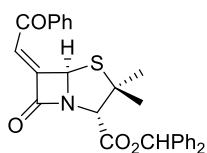


**3.39**

p. 247

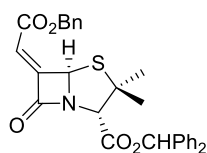
**Capítulo 4 - Novas espirociclopentenil-β-lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e Plasmodium. Parte 1**

Precusores



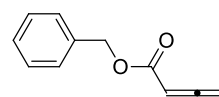
**4.7a**

p. 248



**4.7b**

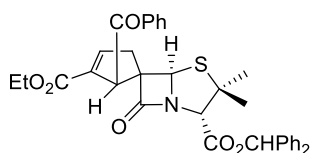
p. 248



**4.8a**

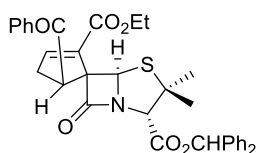
p. 251

Produtos finais



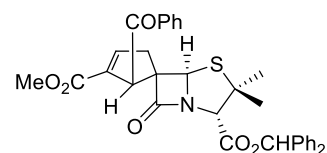
**4.19a**

p. 249



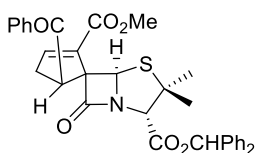
**4.20a**

p. 249



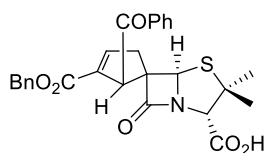
**4.19b**

p. 250



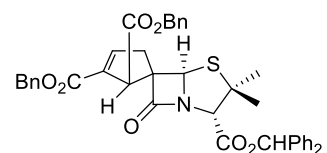
**4.20b**

p. 250



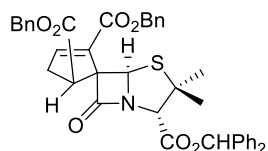
**4.17**

p. 251



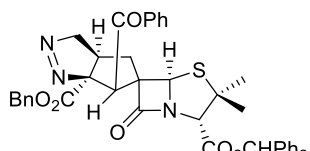
**4.19c**

p. 252



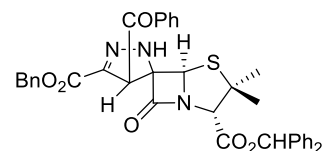
**4.20c**

p. 252



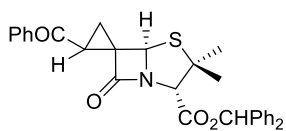
**4.21**

p. 253



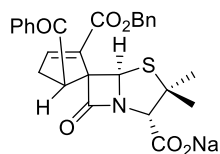
**4.23**

p. 253



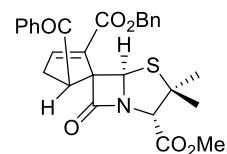
**4.26**

p. 254



**4.27**

p. 254

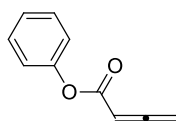


**4.28**

p. 255

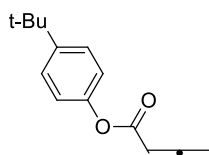
**Capítulo 5 - Novas espirociclopentenil-β-lactamas quirais com dupla atividade contra HIV e Plasmodium. Parte 2**

Precursores



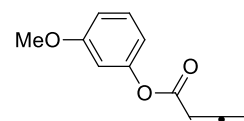
**5.6a**

p. 257



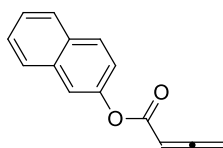
**5.6b**

p. 257



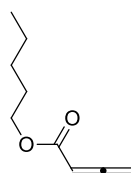
**5.6c**

p. 257



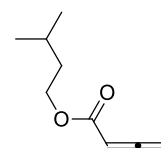
**5.6d**

p. 258



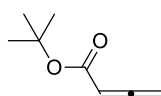
**5.6e**

p. 258



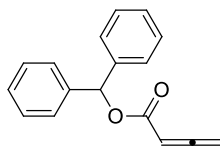
**5.6f**

p. 258



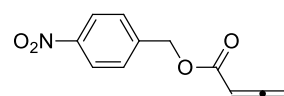
**5.6g**

p. 259



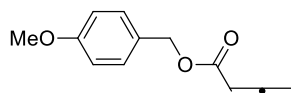
**5.6h**

p. 259



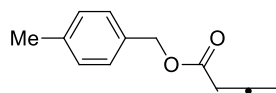
**5.6i**

p. 259



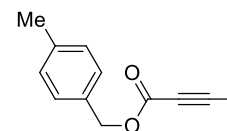
**5.6j**

p. 259



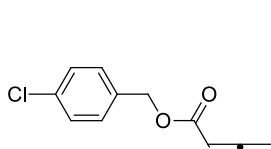
**5.6k**

p. 260



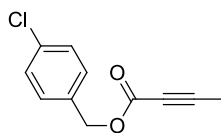
**5.6k'**

p. 260



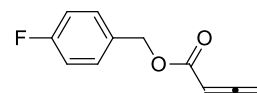
**5.6l**

p. 260



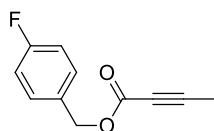
**5.6l'**

p. 260



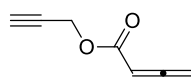
**5.6m**

p. 260



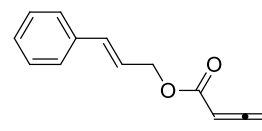
**5.6m'**

p. 260



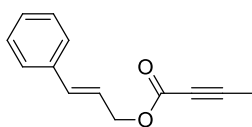
**5.6n**

p. 261



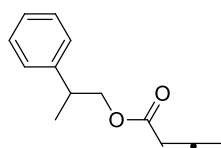
**5.6o**

p. 261



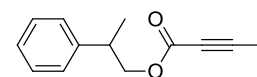
**5.6o'**

p. 261



**5.6p**

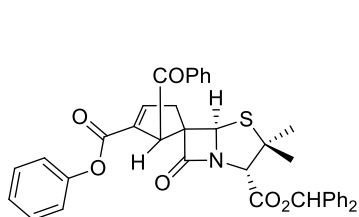
p. 262



**5.6p'**

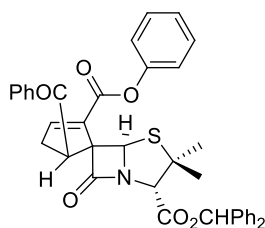
p. 262

**Produtos Finais**



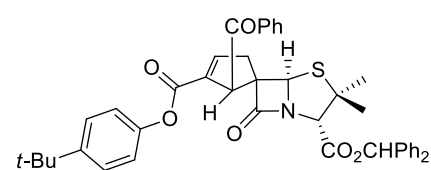
**5.7a**

p. 263



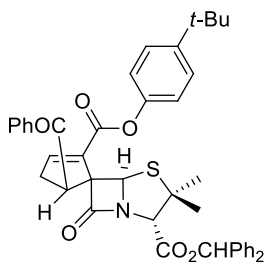
**5.7a**

p. 263



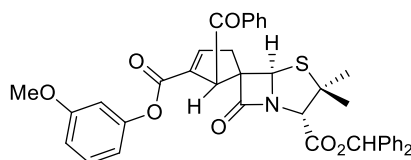
**5.7b**

p. 264



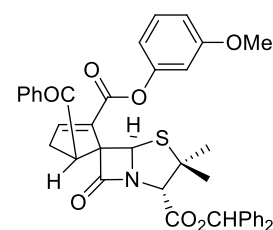
**5.7b**

p. 264



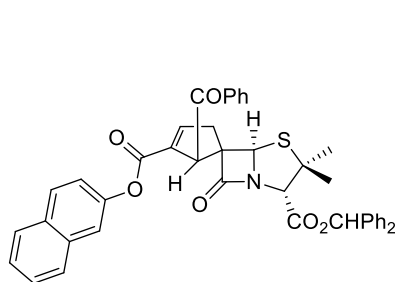
**5.7c**

p. 265



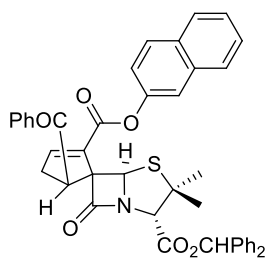
**5.7c**

p. 265



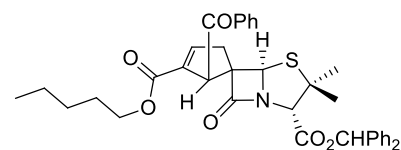
**5.7d**

p. 266



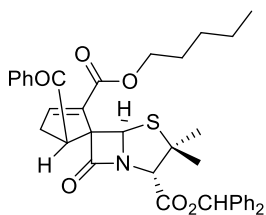
**5.8d**

p. 266



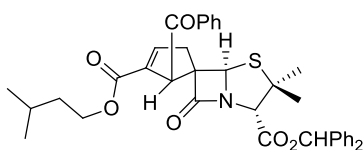
**5.7e**

p. 267



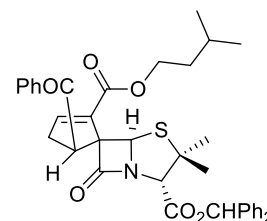
**5.8e**

p. 267



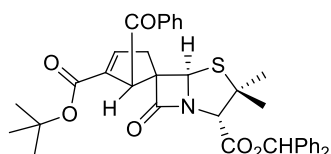
**5.7f**

p. 268



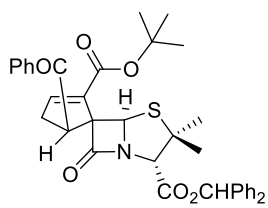
**5.8f**

p. 268



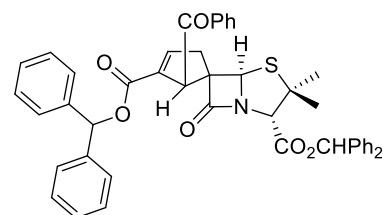
**5.7g**

p. 269



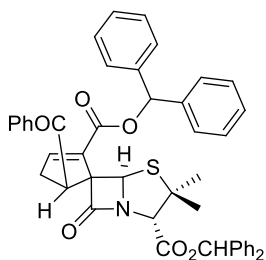
**5.8g**

p. 269



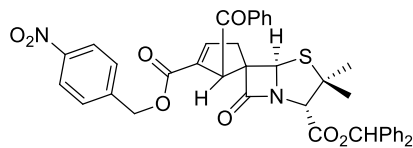
**5.7h**

p. 270



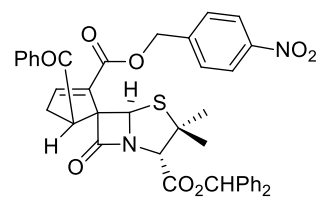
**5.8h**

p. 270



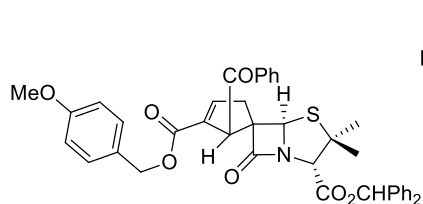
**5.7i**

p. 271



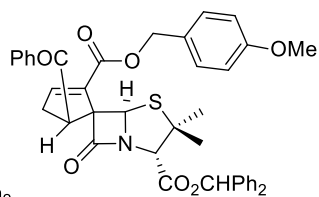
**5.8i**

p. 271



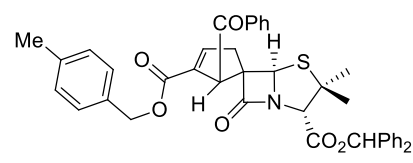
**5.7j**

p. 272



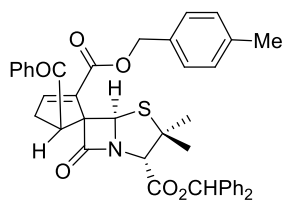
**5.8j**

p. 272



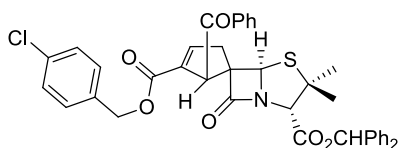
**5.7k**

p. 273



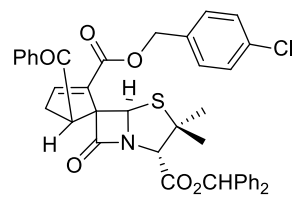
**5.8k**

p. 273



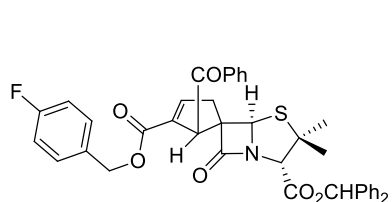
**5.7l**

p. 274



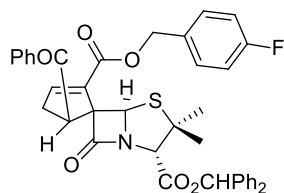
**5.8l**

p. 274



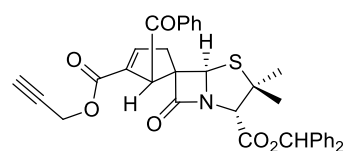
**5.7m**

p. 275



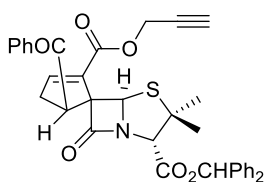
**5.8m**

p. 275



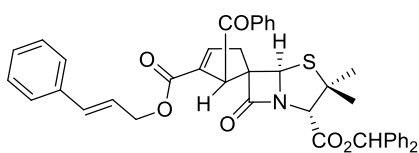
**5.7n**

p. 276



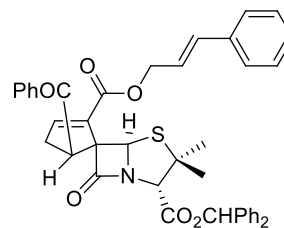
**5.8n**

p. 276



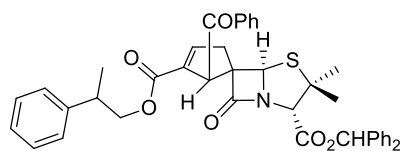
**5.7o**

p. 277



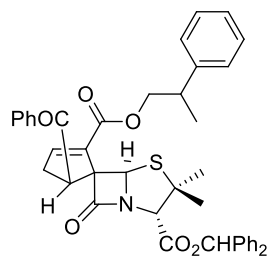
**5.8o**

p. 277



**5.7p**

p.278



**5.8p**

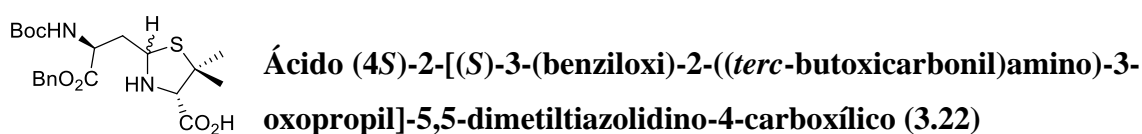
p. 278

## 7.4. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 3

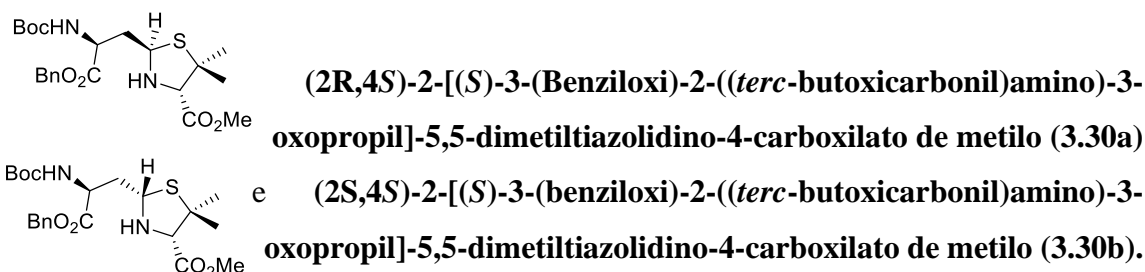
### 7.4.1. Síntese de novas espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactamas



O aldeído **3.21**<sup>1</sup> foi preparado segundo um método descrito na literatura.<sup>2</sup> RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  = 1.42 (s, 9H), 2.99-3.13 (m, 2H), 4.63 (s, 1H), 5.17 (s, 2H), 5.41 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 7.33-7.35 (m, 5H), 9.71 (s, 1H).



A uma solução de *D*-penicilamina (**3.20**) (0.073 g, 0.49 mmol, 0.75 equiv.) em metanol (10.0 mL), foi adicionado o aldeído **3.21** (0.200 g, 0.65 mmol, 1.0 equiv.). A reação ficou em agitação à temperatura ambiente durante 18 horas, após o qual o solvente foi evaporado a pressão reduzida. O composto **3.22** foi precipitado com éter de petróleo e filtrado, sendo obtido como um sólido branco (0.198 g, 0.45 mmol, 92%). O espectro de RMN <sup>1</sup>H revelou a presença de uma mistura de diastereoisômeros (64:36). P. f. 87.6-89.1 °C. IV (ATR):  $\nu$  = 2973, 1734, 1702, 1686 cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) Isômero maioritário:  $\delta$  = 1.33 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.66 (s, 3H), 2.25-2.37 (m, 2H), 3.64 (s, 1H), 4.21 (dd,  $J$  = 9.6 e 4.8 Hz, 1H), 4.66 (dd,  $J$  = 8.0 e 5.6 Hz, 1H), 5.14-5.23 (m, 2H), 7.36-7.39 (m, 5H). EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 439.1883; Encontrada 439.1897.



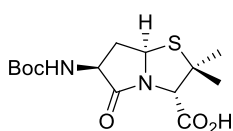
A uma solução da tiazolidina **3.22** (0.730 g, 1.51 mmol) em diclorometano a 0 °C, foi adicionado gota-a-gota um excesso de uma solução de diazometano em éter etílico. A reação foi agitada manualmente e a sua evolução monitorizada por TLC. Após verificada a inexistência de reagente de partida na reação, o excesso de diazometano foi purgado



com azoto. A purificação do crude da reação por coluna de cromatografia [(acetato de etilo/hexano (1:3)], deu por ordem de eluição o produto **3.30a** como um óleo amarelo (0.241 g, 0.53 mmol, 35%) e o produto **3.30b** como um sólido branco (0.180 g, 0.50 mmol, 27%).

Composto **3.30a**:  $[\alpha]_D^{25} = +45$  (*c* 1 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 3358, 3281, 1751, 1735, 1695, 1495, 1152$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.16$  (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.60 (s, 3H), 1.91-1.95 (m, 1H), 2.12-2.18 (m, 1H), 3.38 (sl, 1H), 3.69 (sl, 1H), 3.77 (s, 3H), 4.48 (sl, 1H), 4.62 (dd, *J* = 10.4 e 2.4 Hz, 1H), 4.70 (s, 1H), 5.13 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 12.0 Hz 1H), 5.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.35-7.38 (m, 5H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 27.2, 27.8, 28.3, 40.9, 52.2, 52.9, 59.1, 62.8, 67.1, 71.7, 79.9, 128.2, 128.4, 128.5, 128.6, 135.5, 155.6, 169.6, 172.2$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 453.2035; Encontrada 453.2054.

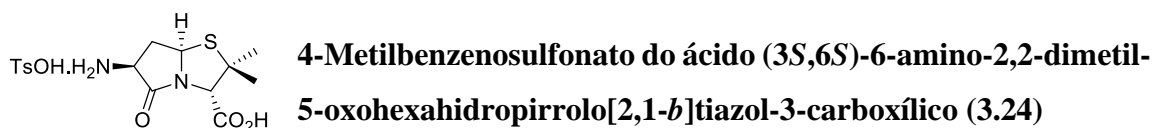
Composto **3.30b**: P. f. 104.5-106.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +50$  (*c* 1 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 3322, 2977, 1746, 1711, 1702, 1202, 1152$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.19$  (s, 3H, 2 $\alpha$ -Me), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.62 (s, 3H, 2 $\beta$ -Me), 2.28-2.36 (m, 2H, H-6), 2.78 (sl, 1H, H-4), 3.55 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-3), 3.76 (s, 3H, CO<sub>2</sub>Me), 4.44 (sl, 1H, H-7), 4.62 (sl, 1H, H-5), 5.15 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.22 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.27 (sl, 1H, NH), 7.35-7.38 (m, 5H, Ar-H);. RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 28.3, 28.4, 29.3, 38.3, 52.1, 52.3, 59.1, 63.9, 67.5, 74.4, 80.1, 128.5, 128.6, 135.2, 155.2, 169.7, 171.7$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 453.2041; Encontrada 453.2054.



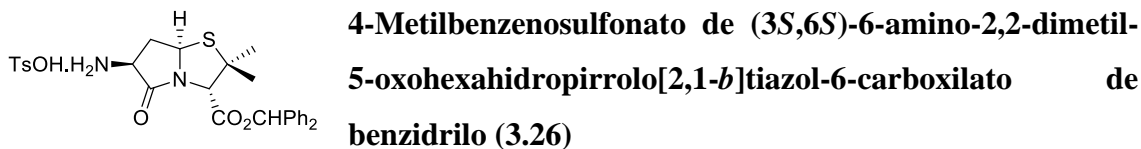
**Ácido (3S,6S)-6-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]-2,2-dimetil-5-oxohexahidropirrol[2,1-*b*]tiazol-3-carboxílico (3.23)**

Uma solução da tiazolidina ácida **3.22** (3.16 g, 7.21 mmol) em tolueno (150 mL) foi colocada a refluxo durante 24 horas. Após este tempo, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o composto **3.23** foi precipitado com éter etílico, sendo filtrado e obtido como um sólido esbranquiçado (1.97 g, 5.98 mmol, 83%). P. f. decompõe aos 225 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +145$  (*c* 1 em MeOH). IV (ATR):  $\nu = 3399, 2961, 1708, 1671, 1513$  cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.39$  (s, 9H), 1.45 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 2.00-2.08 (m, 1H), 2.75-2.81 (m, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.49-4.56 (m, 1H), 5.31 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.30 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta = 30.9, 33.4, 36.4, 41.9, 58.7, 62.1,$

66.5, 72.4, 83.4, 160.3, 174.6, 176.1. EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para  $C_{14}H_{23}N_2O_5S$   $[M+H]^+$  331.1319; Encontrada 331.1322.

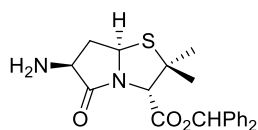


A uma solução da lactama **3.23** (2.23 g, 6.75 mmol) em acetonitrilo, adicionou-se ácido *p*-toluenesulfônico monohidratado (2.57 g, 13.50 mmol). A reação ficou a agitar durante a noite à temperatura ambiente. O produto **3.24** precipitou, foi filtrado e lavado com acetonitrilo frio, sendo obtido como um sólido branco (2.69 g, 99%). P. f. decompõe aos 253 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +130$  (*c* 0.5 em MeOH). IV (ATR):  $\nu = 3412, 2931, 1707, 1617, 1517$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta = 1.46$  (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 2.04 (dd,  $J = 11.6$  e 3.4 Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.96-3.01 (m, 1H), 4.37 (s, 1H), 4.49 (dd,  $J = 11.4$  e 8.0 Hz, 1H), 5.42 (dd,  $J = 8.0$  e 5.8 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.47 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.49 (sl, NH<sub>3</sub>). RMN  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta = 20.8, 25.7, 31.1, 35.6, 52.0, 57.4, 62.2, 67.0, 125.5, 128.1, 137.6, 145.8, 168.2, 168.9$ . Anal. Calculada para  $C_{16}H_{22}N_2O_6S_2$ : C, 47.75; H, 5.51; N, 6.96; S, 15.93. Encontrada: C, 47.47; H, 5.28; N, 6.85; S, 15.01.



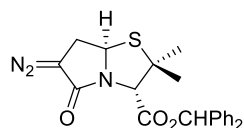
A uma solução do composto **3.24** (1 g, 2.49 mmol) em metanol (2.5 mL) foi adicionado gota-a-gota uma solução de difenildiazometano (0.483 g 2.49 mmol) em diclorometano (10 mL). Após agitar durante 24 h à temperatura ambiente, foi adicionada uma porção de difenildiazometano (0.242 g, 1.25 mmol) e a reação foi deixada a agitar por mais 20 h. O solvente foi então evaporado sob baixa pressão e adicionou-se éter etílico. O produto **3.26** precipitou e foi filtrado, sendo obtido como um sólido bege (1.34 g, 95%). P. f. 117.3-118.7 °C.  $[\alpha]_D^{25} = -120$  (*c* 0.5 em MeOH). IV (ATR):  $\nu = 2964, 1717, 1495, 1420$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.80-2.86 (m, 1H), 4.25 (sl, 1H), 4.56 (s, 1H), 5.17 (dd,  $J = 7.9$  e 6.0 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 7.05 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.21-7.31 (m, 10H), 7.73 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 8.37 (sl, NH<sub>3</sub>). RMN  $^{13}C$  (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 21.5, 25.7, 30.8, 35.8, 53.1, 58.2, 62.6, 67.2, 78.7, 126.4, 127.0, 127.8, 128.2, 128.5, 128.7, 128.7, 129.1, 139.3, 139.4, 140.5, 141.3, 167.0, 168.5$ .

EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para  $C_{22}H_{25}N_2O_6S$  [M-TsO] 397.1580; Encontrada 397.1577.



**(3S,6S)-6-Amino-2,2-dimetil-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de benzidrilo (3.27)**

A uma solução do composto **3.26** (0.300 g, 0.528 mmol) em diclorometano (15.0 mL) foi adicionada uma solução aquosa de  $NaHCO_3$  (15.0 mL). A mistura ficou em agitação durante 30 minutos e depois separou-se a fase orgânica, e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (2 x 10 mL). Secou-se a fase orgânica com  $Na_2SO_4$ , filtrou-se e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **3.27** foi obtido como um óleo amarelado (0.201 g, 0.507 mmol, 96%).  $[\alpha]_D^{25} = +128.75$  ( $c$  4 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 3377, 2976, 1735, 1705, 1495$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)  $\delta = 1.24$  (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.73-1.81 (m, 1H), 1.99 (sl, NH<sub>2</sub>), 2.84-2.90 (m, 1H), 3.80 (dd,  $J = 11.2$  e 8.0 Hz, 1H), 4.58 (s, 1H), 5.34 (dd,  $J = 8.0$  e 6.0 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.30-7.46 (m, 10H). RMN  $^{13}C$  (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)  $\delta = 25.4, 30.7, 39.8, 54.9, 57.4, 61.7, 66.9, 77.5, 126.4, 126.9, 127.9, 128.1, 128.3, 128.5, 128.5, 139.8, 139.9, 167.1, 175.2$ . EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para  $C_{22}H_{25}N_2O_3S$  [M+H<sup>+</sup>] 397.1576; Encontrada 397.1580.

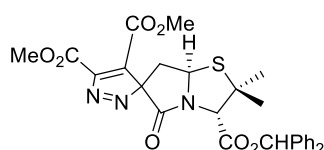


**(3S)-6-Diazo-2,2-dimetil-5-oxohexahidropirrolo[2,1-*b*]tiazol-3-carboxilato de benzidrilo (3.28)**

A uma solução da amino- $\gamma$ -lactama **3.27** (0.200 g, 0.51 mmol) em diclorometano (40.0 mL), num banho de gelo estabilizado a 0 °C, foi adicionada  $H_2O$  destilada fria (40.0 mL), seguida da adição de  $NaNO_2$  (2.5 equiv.) e uma solução de 1M de  $HClO_4$  (1.3 mL). A reação ficou em agitação a 0 °C durante 1 hora, após o qual se separou a fase orgânica e extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (2 x 10 mL). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com solução saturada de  $NaCl$ , e depois secou-se com  $Na_2SO_4$ , filtrou-se e evaporou-se o solvente a pressão reduzida. O composto **3.28** foi obtido como um sólido de baixo ponto de fusão amarelado (0.198 g, 0.49 mmol, 96%). IV (ATR):  $\nu = 3286, 1701, 1262, 1157$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.28$  (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 3.20 (dd,  $J = 14.4$  e 2.0 Hz, 1H), 3.54 (dd,  $J = 14.4$  e 7.6 Hz, 1H), 4.85 (s, 1H), 5.59 (dd,  $J = 7.6$  e 1.6 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.29-7.35 (m, 10H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.3, 26.5, 33.1, 52.3, 53.4, 58.8, 64.4, 69.9, 78.3, 126.9, 127.7, 128.1, 128.4, 128.6, 128.6, 139.2, 168.0, 170.7$ .

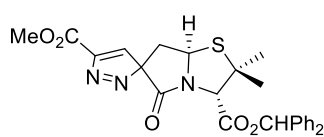
**7.4.1.1 - Procedimento geral para a síntese de espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactamas via cicloadição 1,3-dipolar entre uma diazo- $\gamma$ -lactama e diferentes alquinos deficientes em electrões como dipolarófilos.**

A uma solução da diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** em diclorometano (5 mL) foi adicionada uma solução do alquino correspondente em diclorometano (2 mL). A reação ficou em agitação a 0 °C sob atmosfera inerte durante o tempo indicado em cada caso. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o crude foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano].



**(3*R*,3'*S*,7*a*'*R*)-2',2'-Dimetil-5'-oxo-2',3',7',7*a*'-tetrahydro-5'*H*-espiro[pirazole-3,6'-pirrolo[2,1-*b*]tiazol]-3',4,5-tricarboxilato de 3'-benzidrilo e 4,5-dimetilo (3.33a)**

Obtido a partir da diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** (0.285 g, 0.70 mmol) e do acetilenodicarboxilato de dimetilo (0.17 mL, 1.40 mmol) de acordo com o procedimento geral. Reagiu durante 4 h a 0 °C. O produto **3.33a** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um óleo castanho (0.246 g, 0.45 mmol, 64%). IV (ATR):  $\nu = 3395, 2923, 2853, 1735, 1719 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.33$  (s, 3H), 1.70 (s, 3H), 3.23 (dd,  $J = 16.8$  e 12.8 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.91 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 4.94 (s, 1H), 5.60 (dd,  $J = 13.2$  e 4.4 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 7.31-7.35 (m, 10H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 25.6, 30.8, 33.5, 52.3, 52.9, 53.8, 59.9, 71.2, 79.0, 112.0, 126.9, 127.9, 128.1, 128.5, 128.6, 128.7, 138.8, 138.9, 144.0, 144.8, 147.1, 161.5, 161.8, 167.4$ . EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  550.1636; Encontrada 550.1642.



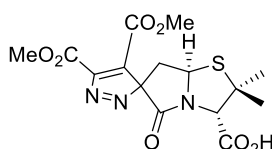
**(3*R*,3'*S*,7*a*'*R*)-2',2'-Dimetil-5'-oxo-2',3',7',7*a*'-tetrahydro-5'*H*-espiro[pirazole-3,6'-pirrolo[2,1-*b*]tiazol]-3',5-dicarboxilato de 3'-benzidrilo e 5-metilo (3.33b)**

Obtido a partir da diazo- $\gamma$ -lactama **3.28** (0.205 g, 0.50 mmol) e do propiolato de metilo (0.09 mL, 1.01 mmol) de acordo com o procedimento geral. Reagiu durante 4 h a 0 °C. O produto **3.33b** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um óleo castanho (0.068 g, 0.14 mmol, 28%). IV (ATR):  $\nu = 3407, 2964, 1720, 1218 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.25$  (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 3.36 (dd,  $J = 16.0$  e 4.0 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 4.90 (s, 1H), 5.52 (dd,  $J = 12.8$  e 4.0 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 7.25-7.28 (m, 10H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta =$

24.6, 29.9, 32.6, 52.7, 59.3, 70.1, 77.9, 106.2, 125.9, 125.9, 126.6, 126.7, 126.9, 127.5, 127.6, 139.2, 144.5, 146.1, 161.1, 166.3, 166.7, 173.8. EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para  $C_{26}H_{26}N_3O_5S$   $[M+H]^+$  492.1585; Encontrada 492.1588.

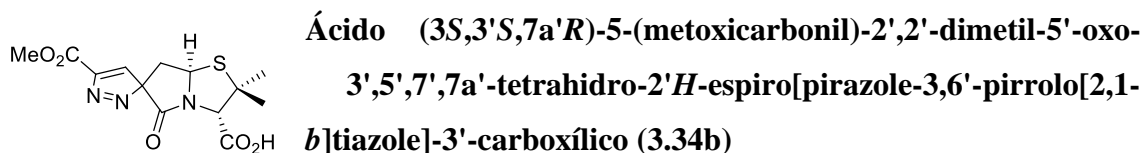
#### 7.4.1.2. Procedimento geral para a síntese de espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactamas ácidas

A uma solução da respectiva espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactama em diclorometano (2 mL), foi adicionado anisole (7 equiv.) e TFA (25 equiv.). A mistura reacional ficou a agitar durante 5 h, a -5 °C e sob atmosfera inerte. Após completa, a reação foi diluída com éter etílico frio (10 mL) e o solvente foi evaporado. O crude foi então dissolvido em THF (5 mL) e  $NaHCO_3$  saturado (15 mL) e a mistura foi agitada durante 15 minutos a 0 °C, sendo depois particionada entre  $H_2O$  desionizada (5 ml) e acetato de etilo (20 mL). As duas fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (2 x 20 mL). A fase aquosa foi acidificada a pH 3 num banho de gelo com HCl (1 N) e foi extraída com acetato de etilo (3 x 20 mL). As fases orgânicas combinadas foram então secas com sulfato de sódio anidro ( $Na_2SO_4$ ) e concentradas sob pressão reduzida, obtendo-se assim espiro-3*H*-pirazole- $\gamma$ -lactama ácida desejada.



**Ácido (3*S*,3'*S*,7*a*'*R*)-4,5-Bis(metoxicarbonil)-2',2'-dimetil-5'-oxo-3',5',7',7*a*'-tetrahidro-2'*H*-espiro[pirazole-3,6'-pirrolo[2,1-*b*]tiazole]-3'-carboxílico (3.34a)**

Obtido a partir do composto **3.33a** (0.105 g, 0.191 mmol), de acordo com o procedimento geral. Após cristalização com acetato de etilo/hexano o composto **3.34a** foi obtido como um sólido cinzento (0.071 g, 0.18 mmol, 97%). P. f. decompõe aos 184 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +140$  ( $c$  0.5 em MeOH). IV (ATR):  $\nu = 3357, 2960, 1741, 1710, 1560$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.57$  (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 3.23 (dd,  $J = 16.9$  e 13.0 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.89- 3.96 (m, 4H), 4.76 (s, 1H), 5.56 (dd,  $J = 12.9$  e 4.2 Hz, 1H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.0, 30.3, 32.9, 52.5, 53.1, 53.4, 59.9, 71.3, 112.1, 144.3, 145.0, 147.0, 161.6, 161.9, 170.8$ . EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para  $C_{15}H_{17}N_3O_7S$   $[M+H]^+$  384.0860; Encontrada 384.0865.



Obtido a partir do composto **3.33b** (0.522 g, 1.06 mmol), de acordo com o procedimento geral. Após cristalização com acetato de etilo/hexano o composto **3.34b** foi obtido como um sólido branco (0.298 g, 0.92 mmol, 86%). P. f. decompõe aos 105 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +200$  (*c* 0.5 em MeOH). IV (ATR):  $\nu = 3362, 2975, 1716, 1641 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.57$  (s, 3H), 1.72 (s, 3H), 3.14-3.23 (m, 1H), 3.41-3.48 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 4.79 (s, 1H), 5.56 (dd, 1H,  $J = 12.7$  e 3.9 Hz), 6.66 (s, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.1, 30.6, 33.2, 52.6, 53.3, 60.2, 71.3, 107.3, 140.6, 145.7, 146.9, 162.1, 170.7$ . EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  326.0805; Encontrada 326.0807.

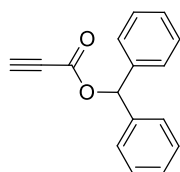
#### 7.4.2. Síntese de novas espiro-3H-pirazole-β-lactamas



O 6-diazopenicilanato de benzidrilo **3.13** foi preparado de acordo com um procedimento da literatura.<sup>3</sup> RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.23$  (3H, s), 1.62 (3H, s), 4.46 (1H, s), 6.19 (1H, s), 6.92 (1H, s), 7.30-7.36 (10H, m). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 25.6, 34.2, 63.1, 64.3, 69.1, 70.2, 78.3, 127.1, 127.5, 128.2, 128.3, 128.6, 128.6, 139.2, 139.3, 166.4, 167.2$ .

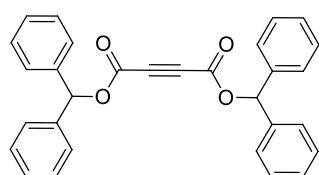
##### 7.4.2.1. Procedimento geral para a esterificação de ácidos carboxílicos acetilénicos com difenildiazometano

A uma solução do ácido carboxílico acetilénico apropriado (1.5 mmol) em metanol (2.5 mL), adicionou-se gota-a-gota uma solução de difenildiazometano em diclorometano (1 equiv. relativo ao número de ácidos carboxílicos presentes na molécula a esterificar). A reação agitou durante 24 h à temperatura ambiente, após as quais se adicionou outra porção de difenildiazometano (0.5 equiv. relativo ao número de ácidos carboxílicos presentes na molécula a esterificar). A reação foi deixada a agitar por 20 h adicionais, ao fim das quais o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o alquino foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano].



**Propiolato de benzidrilo (3.35d)**

Preparado de acordo com o procedimento geral a partir do ácido propiólico (0.107 g, 1.5 mmol) e difenildiazometano (0.437 g, 2.25 mmol). O composto **3.35d**<sup>4</sup> foi obtido após coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:9)] como um sólido branco (0.350 g, 1.48 mmol, 98%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 2.93 (s, 1H), 6.96 (s, 1H), 7.31-7.37 (m, 10H).

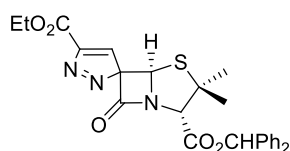


**2-butinodioato de benzidrilo (3.35e)**

Preparado de acordo com o procedimento geral a partir do ácido 2-butinodióico (0.171 g, 1.5 mmol) e difenildiazometano (0.874 g, 4.5 mmol). O composto **3.35e** foi obtido após coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:7)] como um sólido branco (0.317 g, 1.13 mmol, 75%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 6.97 (s, 2H), 7.30-7.36 (m, 20H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ = 75.3, 79.9, 127.3, 128.6, 128.8, 138.6, 151.1.

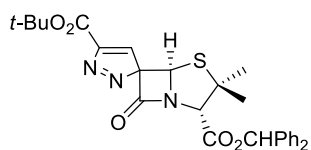
**7.4.2.2. Procedimento geral para a síntese de espiro-3H-pirazole-β-lactamas via cicloadição 1,3-dipolar entre um 6-diazopenicilanato e diferentes alquinos deficientes em elétrons como dipolarófilos.**

A uma solução do 6-diazopenicilanato **3.13** (0.50 mmol) em diclorometano (5 mL) foi adicionada uma solução do correspondente alquino em diclorometano (2 mL). A reação ficou em agitação a 45 °C sob atmosfera inerte durante o tempo indicado em cada caso. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o crude foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano].



**Espiro[penicilinato-6,3'-(5-etoxicarbonil-3H-pirazole)]-3-carboxilato de benzidrilo (3.36a)**

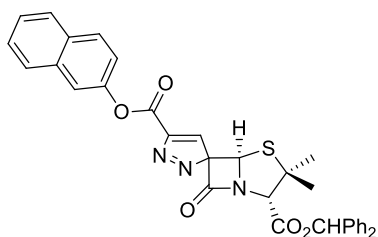
Preparado a partir do 6-diazopenocilanato **3.13** (0.939 g, 2.39 mmol) e do propiolato de etilo (**3.35a**) (0.351 g, 3.58 mmol). A mistura reacional ficou em agitação durante 4 h. O composto **3.36a** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um *fluffy* amarelo (0.524 g, 1.07 mmol, 45%). P. f. 58.7-60.4 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +270$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1780, 1719, 1559, 1449$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.33$  (s, 3H), 1.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.56 (s, 3H), 4.43 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.81 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.85 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.32-7.38 (m, 10H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 14.4, 26.0, 32.1, 60.6, 62.0, 62.4, 79.1, 104.5, 127.1, 127.9, 128.5, 128.7, 128.8, 128.9, 138.9, 139.0, 145.7, 149.8, 152.2, 161.5, 166.9$ . Anal. Calculada para C<sub>26</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S: C, 63.53; H, 5.13; N, 8.85; S, 6.52. Encontrada: C, 63.91; H, 5.31; N, 8.49; S, 6.57.



**Espiro[penicilinato-6,3'-(5-terc-butoxicarbonil-3H-pirazole)]-3-carboxilato de benzidrilo (3.36b)**

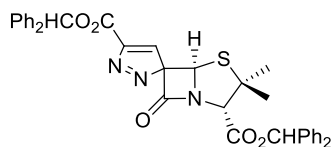
Preparado a partir do 6-diazopenocilanato **3.13** (0.469 g, 1.19 mmol) e do propiolato de *terc*-butilo (**3.35b**) (0.226 g, 1.790 mmol). A mistura reacional ficou em agitação durante 6 h. O composto **3.36b** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:6)], sendo obtido como um sólido branco (0.203 g, 0.39 mmol, 33%). P. f. 156.5-159.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +260$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1772, 1735, 1711, 1559, 1449$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.32$  (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.61 (s, 9H), 4.82 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.79 (d, *J* = 0.4 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.31-7.38 (m, 10H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.0, 28.3, 32.2, 60.6, 62.3, 69.2, 79.1, 83.1, 104.4, 127.1, 127.8, 128.5, 128.7, 128.8, 128.8, 138.9, 139.0, 145.6, 150.0, 153.7, 160.7, 167.0$ . EMAR (ESI-TOF) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> Calculada para C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S 520.1901; Encontrada 520.1902.





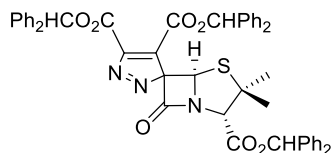
**Espiro[penicilano-6,3'-(5-2-naftoxicarbonil-3H-pirazole)]-3-carboxilato de benzidrilo (3.36c)**

Preparado a partir do 6-diazopenocilanato **3.13** (0.295 g, 0.75 mmol) e do propiolato de 2-naftilo (**3.35c**) (0.220 g, 1.13 mmol). A mistura reacional ficou em agitação durante 3 h. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e o composto **3.36c** foi dissolvido numa mistura de acetato de etilo/hexano (1:3) e deixado *overnight* a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O composto precipitou e foi filtrado, sendo obtido como um sólido branco (0.237 g, 0.40 mmol, 54%). P. f. 210.5-212.3  $^{\circ}\text{C}$ .  $[\alpha]_D^{25} = +270$  (*c* 0.5 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1776, 1758, 1731, 1576, 1457$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.36$  (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 4.86 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 7.03 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 7.31-7.40 (m, 11H), 7.47-7.54 (m, 2H), 7.72 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.83-7.89 (m, 2H), 7.90 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.0, 32.1, 60.6, 62.5, 69.3, 79.2, 105.1, 118.8, 121.0, 126.1, 126.8, 127.1, 127.9, 127.9, 128.5, 128.8, 128.8, 128.9, 129.7, 131.8, 133.9, 138.9, 139.0, 146.0, 148.0, 149.6, 151.4, 160.1, 166.9$ . Anal. Calculada para  $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ : C, 69.25; H, 4.62; N, 7.13; S, 5.44. Encontrada: C, 69.50; H, 4.36; N, 7.22; S, 5.30.



**Espiro[penicilano-6,3'-(5-benzidriloxicarbonil-3H-pirazole)]-3-carboxilato de benzidrilo (3.36d)**

Preparado a partir do 6-diazopenocilanato **3.13** (0.751 g, 1.91 mmol) e do propiolato de benzidrilo (**3.35d**) (0.350 g, 1.481 mmol). A mistura reacional ficou em agitação durante 3 h. O composto **3.36d** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um sólido branco (0.691 g, 1.10 mmol, 74%). P. f. 82.5-84.3  $^{\circ}\text{C}$ .  $[\alpha]_D^{25} = +230$  (*c* 0.5 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1781, 1724, 1494, 1449$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.33$  (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 4.82 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.89 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 7.29-7.38 (m, 16H), 7.44-7.46 (m, 4H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.0, 32.2, 60.5, 62.4, 69.2, 78.3, 79.1, 104.8, 127.1, 127.4, 127.8, 128.3, 128.5, 128.7, 128.8, 128.9, 138.9, 139.0, 139.7, 145.8, 149.9, 152.0, 160.6, 166.9$ . Anal. Calculada para  $\text{C}_{37}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ : C, 70.57; H, 4.96; N, 6.67; S, 5.09. Encontrada: C, 70.14; H, 4.96; N, 6.48; S, 4.82.



**Espiro[penicilinato-6,3'-(4,5-dibenzidriloxicarbonil-3H-pirazole)]-3-carboxilato de benzidrilo (3.36e)**

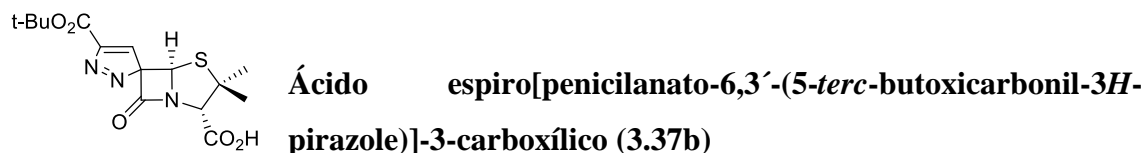
Preparado a partir do 6-diazopenocilinato **3.13** (0.751 g, 1.91 mmol) e do 2-butinodioato de benzidrilo (**3.35e**) (0.592 g, 2.465 mmol). A mistura reacional ficou em agitação durante 2 h. O composto **3.36e** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um *fluffy* amarelo (0.0574 g, 0.68 mmol, 36%). P. f. 87.4-88.3 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +160$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1789, 1735, 1585, 1449$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.30$  (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 4.80 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.27-7.43 (m, 30H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 32.3, 61.4, 62.1, 69.5, 78.7, 79.2, 79.3, 110.7, 127.1, 127.4, 127.4, 127.8, 128.2, 128.3, 128.5, 128.7, 128.7, 128.8, 128.9, 138.9, 139.5, 139.5, 139.6, 149.3, 150.1, 151.0, 158.9, 159.9, 166.5$ . Anal. Calculada para C<sub>51</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S: C, 72.93; H, 4.92; N, 5.00; S, 3.82. Encontrada: C, 72.84; H, 4.79; N, 4.89; S, 3.71.

#### 7.4.2.3. Procedimento geral para a síntese de espiro-3H-pirazole-β-lactamas ácidas

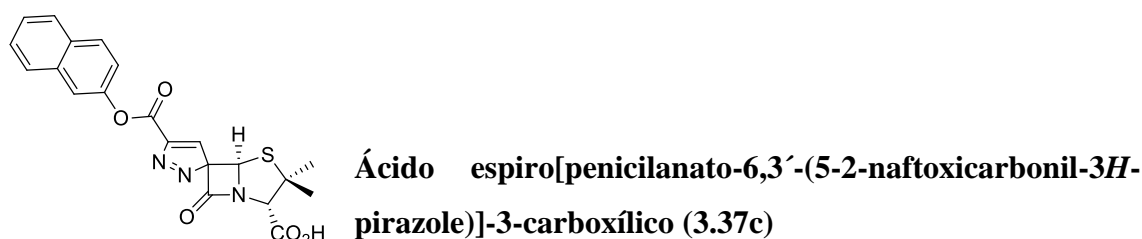
A uma solução da respetiva espiro-3H-pirazole-β-lactama contendo um éster benzidrilo na sua estrutura em diclorometano (2 mL), foi adicionado anisole (7 equiv.) e TFA (25 equiv.). A mistura reacional ficou a agitar durante 5 h, a -5 °C e sob atmosfera inerte. Após completa, a reação foi diluída com éter etílico frio (10 mL) e o solvente foi evaporado. Este procedimento de co-evaporação foi repetido cinco vezes. O crude foi então dissolvido em acetato de etilo (5 mL) e NaHCO<sub>3</sub> saturado (15 mL) e a mistura foi agitada durante 15 minutos a 0 °C, sendo depois particionado entre H<sub>2</sub>O desionizada (5 mL) e acetato de etilo (20 mL). As duas fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (2 x 20 mL). A fase aquosa foi acidificada a pH 3 num banho de gelo com HCl (1 N) e foi extraída com acetato de etilo (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram então juntas, secas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentradas sob pressão reduzida, obtendo-se assim o ácido penicilânico desejado.



Preparado de acordo com o procedimento geral, a partir da espiro-3H-pirazole- $\beta$ -lactama **3.36a** (0.196 g, 0.40 mmol). O composto **3.37a** foi obtido como um sólido de baixo ponto de fusão amarelo (0.120 g, 0.37 mmol, 93%).  $[\alpha]_D^{25} = +320$  (*c* 0.25 em Acetona). IV (ATR):  $\nu = 3148, 2974, 1777, 1719, 1559, 1457$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.41$  (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.64 (s, 3H), 1.68 (s, 3H), 4.44 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 4.72 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.87 (s, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ , 100 MHz)  $\delta = 14.1, 25.7, 30.3, 60.00, 61.1, 61.2, 68.8, 104.7, 146.1, 149.6, 150.8, 160.9, 168.7$ . EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  326.0818; Encontrada 326.0805.

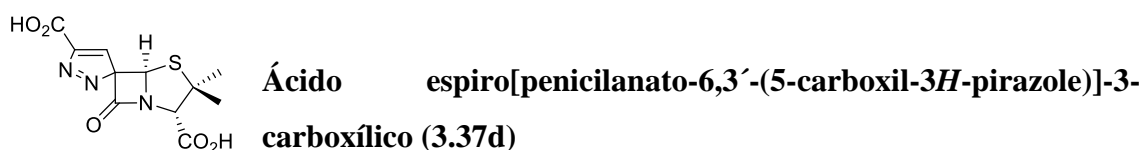


Preparado de acordo com o procedimento geral, a partir da espiro-3H-pirazole- $\beta$ -lactama **3.36b** (0.252 g, 0.49 mmol). O composto **3.37b** foi obtido como um sólido castanho claro (0.139 g, 0.37 mmol, 81%). P. f. 139.2-142.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +330$  (*c* 0.35 em Acetona). IV (ATR):  $\nu = 2970, 2933, 1773, 1713, 1559, 1457$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.61$  (s, 9H), 1.62 (s, 3H), 1.66 (s, 3H), 4.73 (s, 1H), 6.32 (s, 1H), 6.80 (d,  $J = 0.8$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.3, 28.3, 31.7, 60.5, 61.9, 69.0, 83.3, 104.5, 145.4, 150.00, 153.6, 160.7, 171.4$ . EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  354.1118; Encontrada 354.1131.



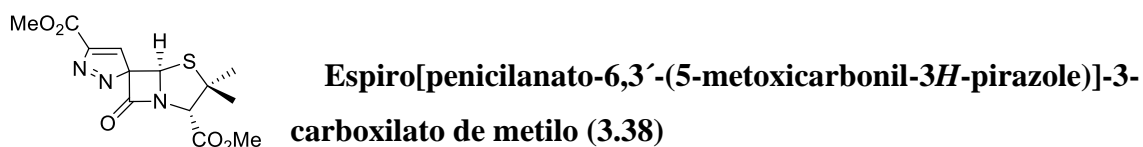
Preparado de acordo com o procedimento geral, a partir da espiro-3H-pirazole- $\beta$ -lactama **3.36c** (0.237 g, 0.40 mmol). O composto **3.37c** precipitou quando da adição de éter etílico frio, foi filtrado e foi obtido como um sólido branco (0.144 g, 0.34 mmol, 86%). P. f. decompõe aos 209.5 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +340$  (*c* 0.25 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu =$

3197, 2480, 1773, 1722, 1601, 1449. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ = 1.57 (s, 3H, 2α-Me), 1.60 (s, 3H, 2β-Me), 4.63 (s, 1H, H-3), 6.64 (s, 1H, H-5), 7.25 (d, *J* = 0.4 Hz, 1H, H-4'), 7.50 (dd, *J* = 9.2 e 2.4 Hz, 1H, Ar-*H*) 7.54-7.61 (m, 2H, Ar-*H*), 7.87 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.95-8.01 (m, 2H, Ar-*H*), 8.04 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar-*H*). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ = 25.7, 30.5, 60.1, 61.1, 68.9, 105.5, 118.7, 121.3, 126.1, 126.9, 127.6, 127.8, 129.6, 131.2, 133.3, 146.5, 147.7, 149.5, 149.9, 159.7, 168.7. EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 424.0962; Encontrada 424.0980.



Preparado de acordo com o procedimento geral, a partir da espiro-3*H*-pirazole-β-lactama **3.36d** (0.315 g, 0.50 mmol). O composto **3.37d** foi obtido como um sólido de baixo ponto de fusão castanho claro (0.134 g, 0.45 mmol, 90%). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 300 (*c* 0.25 em acetona). IV (ATR): ν = 2972, 2935, 1773, 1719, 1559, 1465. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 1.55 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 4.56 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 6.95 (d, *J* = 0.4 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz) δ = 25.8, 30.4, 60.00, 61.1, 68.9, 104.7, 146.0, 149.8, 152.00, 162.4, 168.8. EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 298.0492; Encontrada 298.0499.

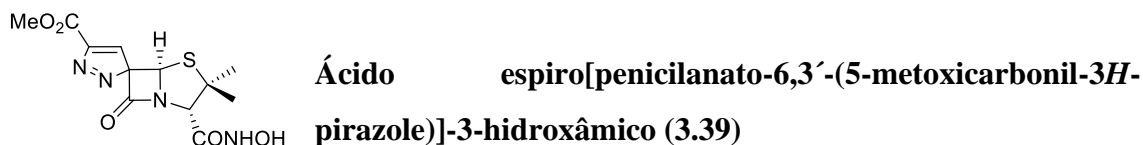
#### 7.4.2.4. Procedimentos para a síntese de outros derivados da molécula *lead* BSS-593 por derivatização estrutural do seu grupo ácido carboxílico



A molécula *lead* BSS-593 foi sintetizada de acordo com a literatura.<sup>5</sup>

A uma solução da molécula BSS-593 (0.100 g, 0.32 mmol) em diclorometano a 0 °C foi adicionado gota-a-gota um excesso de uma solução de diazometano em éter etílico. A reação foi agitada manualmente e a sua evolução monitorizada por TLC. Após verificada a inexistência de reagente de partida na reação, o excesso de diazometano foi purgado com azoto. O produto **3.38** foi então purificado por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um sólido de baixo ponto de fusão

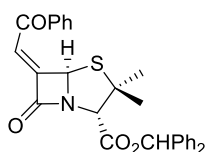
branco (0.071 g, 0.22 mmol, 68%).  $[\alpha]_D^{25} = + 390$  (*c* 0.5 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1777$ , 1722, 1559, 1458. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.54$  (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.69 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.85 (s, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.3$ , 31.9, 52.7, 52.8, 60.4, 62.1, 69.1, 104.4, 145.6, 149.5, 151.7, 161.9, 168.2. EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  326.0805; Encontrada 326.0808.



A molécula **3.39** foi sintetizada seguindo um protocolo adaptado da literatura.<sup>6</sup> A uma solução da molécula *lead* BSS-593<sup>5</sup> (0.118 g, 0.38 mmol) em éter dietílico (10 mL) a 0 °C foi adicionado cloroformato de etilo (0.049 g, 0.46 mmol) e *N*-metilmorfolina (0.050 g, 0.49 mmol), e a reação foi deixada a agitar durante 20 minutos. O sólido formado foi filtrado e descartado, enquanto o solvente foi adicionado a uma solução de hidroxilamina<sup>7</sup> (0.019 g, 0.57 mmol) em metanol (4.5 mL) previamente preparada. A mistura reacional foi agitada durante 15 minutos à temperatura ambiente. O solvente foi depois evaporado sob baixa pressão, e o composto foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (2:1) e depois acetato de etilo/metanol (9:1)], sendo o composto **3.39** obtido como um sólido branco (0.042 g, 0.129 mmol, 34%). P.f. decompõe aos 190.2 °C.  $[\alpha]_D^{25} = + 200$  (*c* 0.25 em acetona). IV (ATR):  $\nu = 3284$ , 3815, 2954, 1768, 1726, 1681, 1654, 1576. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)  $\delta = 1.62$  (s, 3H), 1.63 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 4.44 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 6.95 (s, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)  $\delta = 26.1$ , 31.0, 53.0, 61.7, 62.9, 64.5, 105.3, 147.6, 151.5, 152.6, 163.1, 166.3. EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  327.0758; Encontrada 327.0758.

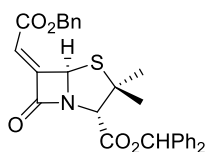
## 7.5. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 4

### 7.5.1. Síntese de 6-alkilidenopenicilanatos



**6-(Z)-(1-Benzoilmetileno)penicilinato de benzidrilo (4.7a)**

Preparado de acordo com um procedimento descrito na literatura.<sup>8</sup> Após purificação por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)], o 6-alkilidenopenicilinato **4.7a** foi obtido como um sólido de baixo ponto de fusão amarelo (1.020 g, 2.11 mmol, 47 %).  $[\alpha]_D^{25} = +110$  (*c* 1 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1774, 1745, 1638 \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.28$  (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 4.68 (s, 1H), 6.16 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 7.31-7.41 (m, 11H), 7.50-7.54 (m, 2H), 7.62-7.66 (m, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.5, 33.4, 63.8, 69.7, 71.1, 78.4, 116.2, 127.1, 127.5, 128.2, 128.4, 128.6, 128.7, 129.0, 134.1, 135.0, 137.0, 139.0, 139.2, 156.3, 166.8, 167.4, 188.3$ ; EMAR (ESI): calculada para C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>NNaO<sub>4</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 506.13965; Encontrada 506.13752;



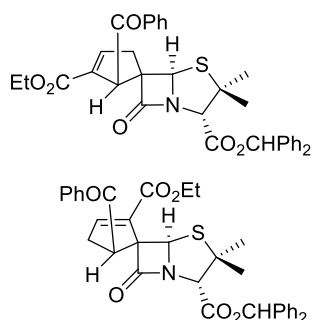
**6-(Z)-(1-Benziloximetileno)penicilinato de benzidrilo (4.7b)**

Preparado de acordo com um procedimento descrito na literatura.<sup>9</sup> Após purificação por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)], o 6-alkilidenopenicilinato **4.7b** foi obtido como um sólido de baixo ponto de fusão branco (0.581 g, 1.13 mmol, 49 %).  $[\alpha]_D^{25} = +270$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 2966, 1774, 1719, \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta = 1.25$  (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 4.64 (s, 1H), 5.22 (s, 2H), 6.00 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.32-7.38 (m, 15H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.5, 33.8, 64.1, 67.6, 69.3, 70.9, 77.5, 115.8, 127.2, 127.6, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 128.8, 128.8, 128.8, 135.1, 139.2, 139.3, 157.1, 163.7, 166.4, 166.8$ . EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>5</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 514.1683; Encontrada 514.1688.

### 7.5.2. Síntese de espirociclopentenil-β-lactamas pela cicloadição [3+2] formal entre um 6-alkilidenopenicilinato e 2-butinoatos

A uma mistura de 6-alkilidenopenicilinato **4.7a** (0.075 g, 0.156 mmol) e PPh<sub>3</sub> (0.098 g, 0.374 mmol) em tolueno (3 mL), foi adicionada uma solução do 2-butinoato (0.936 mmol) em tolueno (2 mL). A mistura reacional foi agitada à temperatura ambiente

durante 48 h. Depois de completa a reação, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o crude foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano].

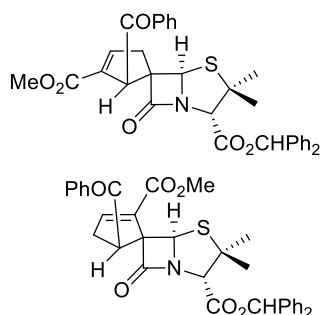


**(1'R,6R)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilano-2',3-dicarboxilato de 2'-etilo e 3-benzidrilo (4.19a)** e **(1'R,6S)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilano-3,4'-dicarboxilato de 4'-etilo e 3-benzidrilo (4.20a)**

Obtidos a partir do 2-butinoato de etilo (**4.18a**) (0.104 g, 0.936 mmol) e do 6-alquilidenopenicilano **4.7a** (0.075 g, 0.156 mmol) de acordo com o procedimento geral. A purificação do crude da reação por coluna de cromatografia [(acetato de etilo/hexano (1:4) e depois (acetato de etilo/ hexano (1:3)], deu por ordem de eluição o produto **4.19a** como um sólido de baixo ponto de fusão amarelo (0.049 g, 0.082 mmol, 53%) e o produto **4.20a** como um sólido de baixo ponto de fusão branco (0.037 g, 0.062 mmol, 40%).

Composto **4.19a**:  $[\alpha]_D^{25} = +340$  (*c* 0.5 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1740, 1710, 1669, 1448$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.01$  (t, *J* = 7.2, 3H) 1.12 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 3.11 (dd, *J* = 18.4 e 3.2 Hz, 1H), 3.53 (dt, *J* = 18.4 e 2.4 Hz, 1H), 3.92-4.03 (m, 2H), 4.54 (s, 1H), 5.15 (sl, 1H), 5.44 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.02 (sl, 1H), 7.27-7.36 (m, 10H), 7.45-7.49 (m, 2H), 7.56-7.60 (m, 1H), 8.08-8.10 (m 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 13.9, 26.1, 32.6, 40.7, 52.9, 60.8, 64.2, 69.1, 70.7, 71.2, 78.4, 127.1, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.7, 129.4, 133.6, 136.6, 137.7, 139.2, 139.3, 145.3, 163.0, 167.0, 176.5, 201.4$ . Anal. Calculada para  $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{NO}_6\text{S}$ : C, 70.57; H, 5.58; N, 2.35; S, 5.38. Encontrada: C, 70.58; H, 5.99; N, 2.61; S, 5.01.

Composto **4.20a**:  $[\alpha]_D^{25} = +520$  (*c* 0.25 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1772, 1741, 1724, 1667, 1449$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.13$  (s, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.2, 3H) 1.52 (s, 3H), 2.51 (dd, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.18 (ddd, *J* = 18.8, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.22 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.54-4.56 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 6.27 (s, 1H), 6.88 (dd, *J* = 2.8 e 2.0 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.28-7.36 (m, 6H), 7.40-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.93-7.95 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 14.2, 25.9, 32.9, 35.9, 49.5, 60.9, 62.6, 69.1, 71.2, 74.0, 78.3, 127.4, 127.5, 128.2, 128.2, 128.6, 128.6, 128.7, 129.0, 133.6, 134.8, 135.2, 139.6, 139.6, 144.2, 162.8, 166.8, 174.5, 198.4$ . EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para  $\text{C}_{35}\text{H}_{34}\text{NO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  596.2101; Encontrada: 596.2123.



(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilano-2',3-dicarboxilato de 2'-metilo e 3-benzidrilho (4.19b) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilano-3,4'-dicarboxilato de 4'-metilo e 3-benzidrilho (4.20b)

Obtidos a partir do 2-butinoato de metilo **4.18b** (0.091 g, 0.936 mmol) e do 6-alquilidenopenicilano **4.7a** (0.075 g, 0.156 mmol) de acordo com o procedimento geral. A purificação do crude da reação por coluna de cromatografia [(acetato de etilo/hexano (1:4)], deu por ordem de eluição o produto **4.19b** como um *fluffy* amarelo (0.023 g, 0.039 mmol, 25%) e o produto **4.20b** como um *fluffy* branco (0.044 g, 0.076 mmol, 49%).

Composto **4.19b**: P. f. 92.2-94.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +390$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1771, 1740, 1715, 1665, 1448$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.12$  (s, 3H, 2 $\alpha$ -Me), 1.52 (s, 3H, 2 $\beta$ -Me), 3.11 (dd, *J* = 18.4 e 2.8 Hz, 1H, H-4'), 3.51-3.57 (m, 1H, H-4'), 3.53 (s, 3H, OMe), 4.53 (s, 1H, H-3), 5.16 (dd, *J* = 2.4 e 1.2 Hz, 1H, H-1'), 5.44 (s, 1H, H-5), 6.92 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 7.01 (sl, 1H, H-3'), 7.27-7.35 (m, 10H, Ar-H), 7.46-7.50 (m, 2H, Ar-H), 7.57-7.60 (m, 1H, Ar-H), 8.09-8.10 (m, 2H, Ar-H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.6, 40.7, 51.7, 53.1, 64.2, 69.1, 70.7, 71.2, 78.4, 127.1, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 129.4, 133.6, 135.9, 137.5, 139.2, 139.3, 145.5, 163.4, 167.0, 176.5, 201.2$ . Anal. Calculada para C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>S: C, 70.20; H, 5.37; N, 2.41; S, 5.51. Encontrada: C, 70.54; H, 5.69; N, 2.40; S, 5.62.

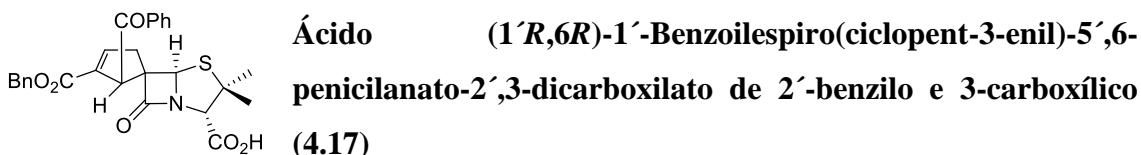
Composto **4.20b**: P. f. 163.4-165.4 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +470$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1772, 1729, 1665, 1449$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.13$  (s, 3H, 2 $\alpha$ -Me), 1.52 (s, 3H, 2 $\beta$ -Me), 2.52 (dd, *J* = 18.4 e 2.0 Hz, 1H, H-4'), 3.19 (ddd, *J* = 18.4, 9.2 e 2.0 Hz, 1H, H-4'), 3.70 (s, 3H, OMe), 4.55-4.57 (m, 1H, H-1'), 4.55 (s, 1H, H-3), 6.26 (s, 1H, H-5), 6.88 (dd, *J* = 2.8 e 2.4 Hz, 1H, H-3'), 6.96 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 7.27-7.37 (m, 6H, Ar-H), 7.41-7.51 (m, 6H, Ar-H), 7.59-7.62 (m, 1H, Ar-H), 7.93-7.95 (m, 2H, Ar-H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 33.1, 35.9, 49.5, 51.8, 62.7, 69.1, 71.2, 74.0, 78.4, 127.4, 127.5, 128.2, 128.6, 128.6, 128.7, 129.1, 133.7, 134.5, 135.2, 139.6, 144.6, 163.2, 166.9, 174.3, 198.4$ ; Anal. Calculada para C<sub>34</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>6</sub>S: C, 70.20; H, 5.37; N, 2.41; S, 5.51. Encontrada: C, 70.35; H, 5.67; N, 2.39; S, 5.60.



### 7.5.3. Síntese dos restantes espiropenicilanatos análogos da molécula *lead* BSS-730A



O aleno **4.8a**<sup>10</sup> foi sintetizado de acordo com um procedimento da literatura<sup>11</sup>. O composto foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:2)], sendo obtido como um óleo amarelado (64%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  = 5.20 (s, 2H), 5.24 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 5.70 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 7.34-7.38 (m, 5H).

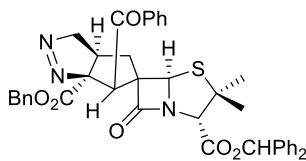


A molécula *lead* BSS-730A foi sintetizada de acordo com a literatura.<sup>8</sup>

A uma solução da espiro- $\beta$ -lactama BSS-730A (0.250 g, 0.381 mmol) em diclorometano seco (2 mL), foi adicionado anisole (0.288 g, 2.667 mmol) e TFA (1.085 g, 9.513 mmol). A mistura reacional ficou a agitar durante 5 h, a -5 °C e sob atmosfera inerte. Após completa, a reação foi diluída com éter etílico frio (10 mL) e o solvente foi evaporado. Este procedimento de co-evaporação foi repetido cinco vezes. O crude foi então dissolvido em acetato de etilo (5 mL) e NaHCO<sub>3</sub> saturado (15 mL) e a mistura foi agitada durante 15 minutos a 0 °C. A mistura foi então particionada em água destilada (5 mL) e acetato de etilo (20 mL). As duas fases foram separadas e a fase aquosa foi lavada com acetato de etilo (2 x 20 mL). A fase aquosa foi acidificada a pH 3 num banho de gelo com HCl (1 N) e foi extraída com acetato de etilo (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram então juntas, secas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentradas sob pressão reduzida, sendo obtido o composto **4.17** como um sólido de baixo ponto de fusão acastanhado (0.111 g, 0.226 mmol, 59%).  $[\alpha]_D^{25} = +350$  ( $c$  0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu$  = 1000, 1063, 1104, 1200, 1330, 1371, 1448, 1667, 1711, 2973. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  = 1.42 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 3.13 (dd,  $J$  = 18.4 e 3.2 Hz, 1H), 3.55 (dt,  $J$  = 18.8 e 2.0 Hz, 1H), 4.42 (s, 1H), 4.94 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 4.98 (d,  $J$  = 12.2 Hz, 1H), 5.17 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 1H), 5.39 (s, 1H), 7.06 (sl, 1H), 7.12-7.14 (m, 2H) 7.27-7.29 (m, 3H), 7.38-7.42 (m, 2H), 7.53-7.57 (m, 1H), 8.05-8.07 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  = 26.6,



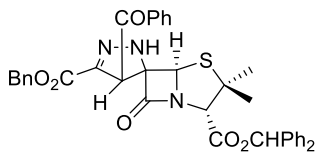
(m, 4H), 6.15 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.98-7.00 (s, 1H), 7.27-7.36 (m, 16H), 7.40-7.46 (m, 4H).



**(2S,3a'S,5R,5'R,6'R,6a'S)-2-benzidril 6a'-benzil 6'-benzoi-3,3-dimetil-7-oxo-3a',4',6',6a'-tetrahidro-3'H-4-tia-1-azaespiro[biciclo[3.2.0]heptano-6,5'-ciclopenta[c]pirazole]-2,6a'-dicarboxilato (4.21)**

A molécula *lead* BSS-730A foi sintetizada de acordo com a literatura.<sup>8</sup>

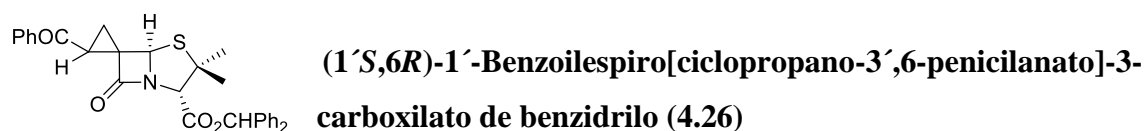
A uma solução da molécula BSS-730A (0.200 g, 0.30 mmol) em diclorometano a 0 °C foi adicionado gota-a-gota um excesso de uma solução de diazometano em éter etílico. A reação foi agitada manualmente e a sua evolução monitorizada por TLC. Após verificada a inexistência de molécula BSS-730A na reação, o excesso de diazometano foi purgado com azoto. O produto **4.21** foi então purificado por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um sólido branco (0.182 g, 0.260 mmol, 86%). P. f. 139.6-142.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +270$  (*c* 0.5 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 972, 1020, 1093, 1151, 1177, 1200, 1235, 1276, 11307, 1332, 1448, 1491, 1684, 1735, 1763$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.07$  (s, 3H, 2 $\alpha$ -Me), 1.45 (s, 3H, 2 $\beta$ -Me), 2.17 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H, H-4'), 3.15 (dt, *J* = 8.8 e 3.6 Hz, 1H, H-3a') 3.22 (dd, *J* = 13.4 e 9.6 Hz, 1H, H-4'), 4.44 (s, 1H, H-3), 4.44 (d, *J* = 12.4, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.75 (d, *J* = 12.4, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.82 (dd, *J* = 14.8 e 8.8 Hz, 2H, H-3'), 5.08 (s, 1H, H-6'), 5.20 (s, 1H, H-5) 6.88 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 7.00-7.02 (m, 2H, Ar-*H*), 7.21-7.34 (m, 13H, Ar-*H*), 7.41-7.45 (m, 2H, Ar-*H*), 7.55-7.58 (m, 1H, Ar-*H*), 8.06-8.09 (m, 2H, Ar-*H*). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.2, 38.4, 41.8, 53.4, 64.3, 67.7, 69.4, 69.5, 70.6, 78.4, 87.3, 110.9, 127.1, 127.7, 128.2, 128.3, 128.5, 128.5, 128.6, 128.7, 129.1, 133.7, 134.4, 137.8, 139.2, 139.3, 167.00, 167.2, 174.8, 198.4$ . Anal. Calculada para C<sub>41</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S: C, 70.37; H, 5.33; N, 6.00; S, 4.58. Encontrada: C, 70.74; H, 5.64; N, 5.93; S, 4.73.



**(1'R,6R)-1'-Benzoilespiro[penicilinato-6,5'-3benziloxicarbonil-2-pirazolina]-3-carboxilato de benzidrilo (4.23)**

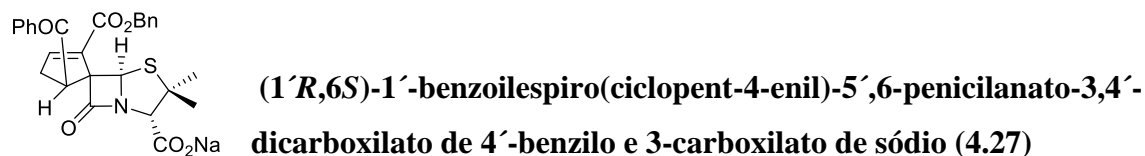
A uma solução do 6-alquilidenopenicilinato **4.17a** (0.250 g, 0.517 mmol) em diclorometano seco (2 mL), foi adicionada gota-a-gota uma solução de diazoacetato de

benzilo (0.164 g, 0.930 mmol) em diclorometano seco (3 mL), sob atmosfera inerte. Após a adição, a mistura reacional ficou a agitar a 45 °C durante 48 h. O produto **4.23** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um sólido amarelo (0.102 g, 0.155 mmol, 30%). P. f. 142.6-144.3 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +720$  (c 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 3303, 1174, 1729, 1668, 1448$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.12$  (s, 3H, 2 $\alpha$ -Me), 1.52 (s, 3H, 2 $\beta$ -Me), 4.59 (s, 1H, H-3), 5.30 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.33 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 5.65 (s, 1H, H-4'), 6.22 (sl, 1H, NH), 6.29 (s, 1H, H-5), 6.95 (s, 1H, CHPh<sub>2</sub>), 7.29-7.36 (m, 9H, Ar-H), 7.40-7.43 (m, 6H, Ar-H), 7.53-7.57 (m, 2H, Ar-H), 7.65-7.69 (m, 1H, Ar-H), 7.95-7.97 (m, 2H, Ar-H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 32.9, 63.4, 67.0, 67.3, 69.4, 69.6, 73.8, 78.6, 127.4, 127.5, 128.3, 128.3, 128.6, 128.7, 128.7, 128.8, 129.6, 134.4, 134.8, 135.3, 139.5, 139.6, 160.5, 166.4, 170.8, 191.8$ . Anal. Calculada para C<sub>38</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>6</sub>S: C, 69.18; H, 5.04; N, 6.37; S, 4.86. Encontrada: C, 68.87; H, 5.23; N, 6.25; S, 4.90.



O composto **4.26** foi preparado de acordo com um método descrito na literatura.<sup>12</sup> RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.16$  (3H, s), 1.47 (s, 3H), 1.92 (dd,  $J = 8.4$  e 5.2 Hz, 1H), 2.09 (pseudo-t,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 3.44 (dd,  $J = 8.4$  e 5.2 Hz, 1H), 4.49 (s, 1H), 5.56 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.28-7.39 (m, 10H), 7.48-7.52 (m, 2H), 7.59-7.63 (m, 1H), 7.99 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H); RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 19.1, 26.0, 26.5, 31.8, 50.9, 63.1, 69.2, 78.3, 126.5, 127.0, 127.6, 128.1, 128.3, 128.3, 128.6, 128.6, 128.7, 133.6, 137.7, 139.2, 139.3, 167.2, 176.2, 196.2$ .

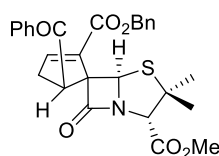
#### 7.5.4. Síntese de espiropenicilatos análogos da molécula *lead* BSS-730B



A molécula *lead* BSS-730B foi sintetizada de acordo com a literatura.<sup>8</sup>

A uma solução da espiro- $\beta$ -lactama BSS-730B (0.500 g, 0.761 mmol) em diclorometano (8 mL), foi adicionado anisole (0.576 g, 5.325 mmol) e TFA (2.170 g, 19.025 mmol). A mistura reacional ficou a agitar durante 5 h, a -5 °C e sob atmosfera

inerte. Após completa, a reação foi diluída com éter etílico frio (10 mL) e o solvente foi evaporado. Este procedimento de co-evaporação foi repetido cinco vezes. O crude foi então dissolvido em acetato de etilo (5 mL) e NaHCO<sub>3</sub> saturado (15 mL) e a mistura foi agitada durante 15 minutos a 0 °C. O composto **4.27** precipitou na interface, entre a fase orgânica e a fase aquosa. Assim este foi filtrado e lavado primeiro com água desionizada e depois com éter etílico. O composto foi obtido como um sólido branco (0.124 g, 0.242 mmol, 32%). P. f. decompõe aos 175.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +360$  (c 0.25 em THF). IV (ATR):  $\nu = 2970, 1749, 1721, 1669, 1591$ . RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.34$  (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 2.32 (dd, *J* = 18.8 e 2.8 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 18.0 e 9.6 Hz, 1H), 3.90 (s, 1H), 4.54 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H) 5.20 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 5.25 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 5.91 (s, 1H), 6.85 (sl, 1H), 7.32-7.41 (m, 3H), 7.48-7.55 (m, 4H), 7.63-7.66 (m, 1H), 7.99 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H). RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.5, 30.7, 33.1, 35.5, 49.0, 61.9, 65.7, 69.7, 72.5, 72.7, 128.1, 128.3, 128.4, 128.5, 128.9, 133.4, 134.0, 134.9, 136.0, 145.0, 162.4, 169.6, 172.7, 198.4$ . EMAR (ESI-TOF) *m/z*: Calculada para C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 514.1295; Encontrada 514.1298.



**(1'R,6S)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6'-penicilinato-3,4'-dicarboxilato de 4'-benzilo e 3-metilo (4.28)**

A molécula **4.27** foi dissolvida numa mistura de acetato de etilo (5 mL) e NaHCO<sub>3</sub> saturado (15 mL) e a mistura foi agitada a 0 °C. Após completa dissolução do composto **4.27**, a mistura foi particionada entre H<sub>2</sub>O desionizada (5 ml) e acetato de etilo (20 mL). As duas fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (2 x 20 mL). A fase aquosa foi acidificada a pH 3 num banho de gelo com HCl (1 N) e foi extraída com acetato de etilo (3 x 20 mL). As fases orgânicas foram então juntas, secas com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e concentradas sob pressão reduzida. O crude obtido foi então dissolvido em acetona seca (5 mL) e adicionou-se iodeto de metilo (0.128 g, 0.910 mmol) e 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (DBU) (0.069 g, 0.451 mmol). A reação ficou a agitar durante 2 h à temperatura ambiente e sob atmosfera inerte. Uma vez completa, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. O composto **4.28** foi purificado por coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um sólido branco (0.048 g, 0.095 mmol, 31%). P. f. 58.5-60.3 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +470$  (c 1 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1711, 1676, 1624, 1448$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.37$  (s, 3H), 1.54 (s,

3H), 2.50 (dd,  $J = 18.4$  e  $2.0$  Hz, 1H), 3.19 (ddd,  $J = 18.4$ ,  $9.2$  e  $2.0$  Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 4.47 (s, 1H), 4.56 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 5.24 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 5.28 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 6.18 (s, 1H), 6.92 (dd,  $J = 2.8$  e  $2.0$  Hz, 1H), 7.32-7.42 (m, 5H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.92-7.94 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.5$ ,  $32.2$ ,  $36.0$ ,  $49.6$ ,  $52.4$ ,  $62.4$ ,  $66.7$ ,  $69.0$ ,  $70.8$ ,  $73.6$ ,  $128.4$ ,  $128.4$ ,  $128.6$ ,  $128.7$ ,  $129.0$ ,  $133.7$ ,  $134.4$ ,  $135.1$ ,  $135.8$ ,  $145.2$ ,  $162.7$ ,  $168.2$ ,  $174.3$ ,  $198.2$ . EMAR (ESI-TOF)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{NO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  506.1632; Encontrada 506.1644.

## 7.6. Síntese de compostos referentes ao Capítulo 5

### 7.6.1. Procedimento geral para a síntese de alenos monossubstituídos a partir de iletos de fósforo

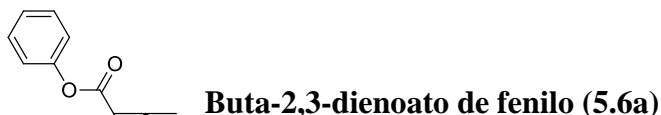
A síntese dos alenos e seus respectivos precursores seguiu um procedimento da literatura modificado.<sup>13</sup>

A uma solução de um álcool (2.90 mmol) e piridina (0.232 mL, 2.90 mmol) em DCM (10 mL) a  $0^\circ\text{C}$ , foi adicionado gota-a-gota o brometo de bromoacetilo (0.252 mL, 2.90 mmol). A suspensão formada foi agitada durante 20 minutos a  $0^\circ\text{C}$  e depois durante 30 minutos adicionais a  $25^\circ\text{C}$ , após o qual se adicionou 15 mL de água destilada. As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com DCM (2 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas, lavadas com uma solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), secas e concentradas, sendo obtido o respectivo bromoéster como um óleo que foi utilizado diretamente no passo seguinte de reação.

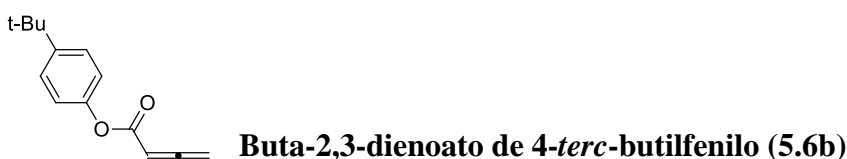
O bromoéster obtido no passo anterior foi adicionado gota-a-gota a uma solução de trifenilfosfina (0.754 g, 2.9 mmol) em tolueno (20 ml), e deixado a agitar durante a noite. O precipitado formado foi filtrado, lavado com tolueno e hexano, e de seguida dissolvido em água destilada (20 ml) à qual se adicionou NaOH (2M) para manter o pH  $> 7$ . A mistura ficou a agitar durante 30 minutos, após o qual se adicionou DCM (20 mL). A fase orgânica foi separada, lavada com uma solução saturada de cloreto de sódio (15 mL), seca e concentrada, obtendo-se o desta forma o ileto de fósforo. Tal como no procedimento adotado, os iletos de fósforo precursores foram utilizados diretamente no passo de síntese do aleno respectivo, sem qualquer purificação prévia.

O respectivo íleto de fósforo (2.90 mmol) foi dissolvido em DCM anidro (5 mL) num balão de duas tubuladuras, ao qual se adicionou  $\text{NEt}_3$  (0.405 mL, 2.90 mmol) gota-

a-gota. Após agitar durante 15 minutos, adicionou-se gota-a-gota uma solução previamente preparada de cloreto de acetilo (0.212 mL, 2.90 mmol) em DCM anidro (5 ml) ao longo de 30 minutos. A reação foi deixada a agitar sob atmosfera inerte e à temperatura ambiente durante 12 h. O sólido formado foi filtrado e descartado, e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O aleno foi purificado por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano], sendo obtido como um óleo ou um sólido de baixo ponto de fusão.



O aleno **5.6a**<sup>14</sup> foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:2)], sendo obtido como um sólido de baixo ponto de fusão branco (59%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 5.82 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.12-7.14 (m, 2H), 7.22-7.26 (m, 1H), 7.37-7.41 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ = 79.9, 87.9, 121.7, 126.0, 129.6, 150.9, 164.3, 216.8.



O aleno **5.6b** foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:8)], sendo obtido como um sólido branco (72%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 1.32 (s, 9H), 5.32 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 5.82 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.02-7.06 (m, 2H), 7.37-7.40 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ = 31.6, 34.6, 79.9, 87.9, 120.9, 126.5, 148.6, 148.8, 164.5, 216.7. EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 239.1043; Encontrada 239.1037.

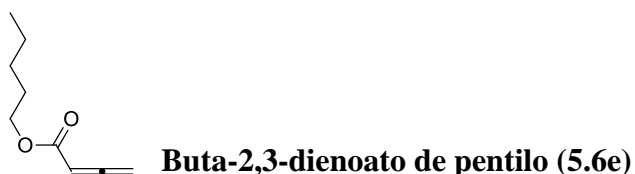


O aleno **5.6c** foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um sólido de baixo ponto de fusão branco (61%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 3.80 (s, 3H), 5.34 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 5.82 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.68-6.80 (m, 3H), 7.25-7.29 (m, 1H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ = 55.6, 80.00, 87.8,

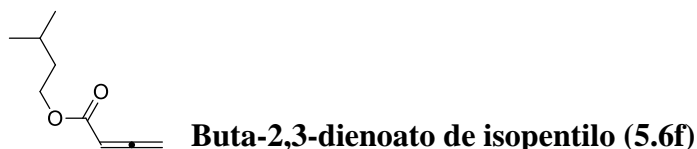
107.6, 112.00, 113.9, 129.9, 151.9, 160.6, 164.2, 216.8. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{11}H_{10}NaO_3$   $[M+Na]^+$  213.0522; Encontrada 213.0518.



O aleno **5.6d**<sup>14</sup> foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:8)], sendo obtido como um sólido branco (66%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 5.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 5.89 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 8.8 e 2.4 Hz, 1H), 7.45-7.52 (m, 2H), 7.61 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.80-7.87 (m, 3H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ = 80.0, 87.9, 118.7, 121.2, 125.9, 126.7, 127.8, 127.9, 129.5, 131.6, 133.9, 148.6, 164.5, 216.9.



O aleno **5.6e** foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um óleo incolor (67%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.32 (m, 4H), 1.64 (m, 2H), 4.13 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 5.20 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 5.62 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ = 14.1, 22.4, 28.1, 28.4, 65.3, 79.3, 88.2, 166.0, 215.9. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_9H_{14}NaO_2$   $[M+Na]^+$  177.0886; Encontrada 177.0885.

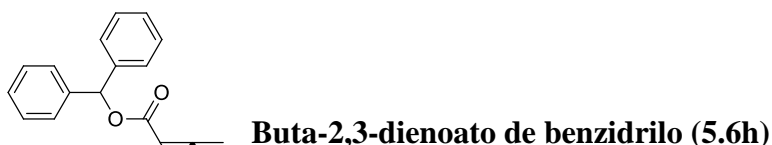


O aleno **5.6f** foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um óleo incolor (72%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ = 0.92 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H), 1.55 (q, *J* = 6.8, 2H), 1.69 (m, 1H), 4.18 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 5.21 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 5.63 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ = 22.6, 25.2, 37.4, 63.9, 79.4, 88.2, 166.0, 215.9. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_9H_{14}NaO_2$   $[M+Na]^+$  177.0886; Encontrada 177.0884.

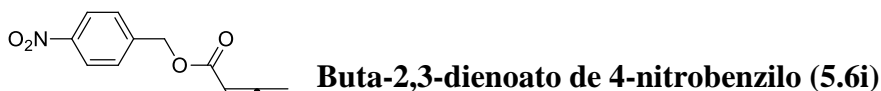




O aleno **5.6g**<sup>15</sup> foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um óleo incolor (26%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  = 1.47 (s, 9H), 5.16 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 5.54 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H).



O aleno **5.6c** foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um sólido de baixo ponto de fusão branco (77%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  = 5.27 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 5.74 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 7.27-7.38 (m, 10H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  = 79.6, 88.2, 127.2, 128.1, 128.6, 140.3, 164.9, 216.4. EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 273.0886; Encontrada 273.0881.

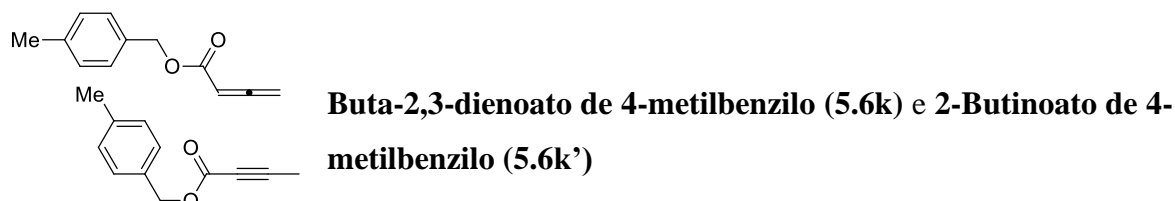


O aleno **5.6i** foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:3)], sendo obtido como um sólido branco (77%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  = 5.28 (s, 2H), 5.28 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 5.72 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 7.52-7.54 (m, 2H), 8.21-8.24 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  = 65.2, 79.8, 87.6, 124.0, 128.4, 143.3, 147.9, 165.4, 216.5. EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>4</sub> [M-H] 218.0459; Encontrada 218.0456.



O aleno **5.6j** foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)], sendo obtido como um óleo incolor (65%). RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  = 3.81 (s, 3H), 5.13 (s, 2H), 5.22 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 5.66 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 6.87-6.91 (m, 2H), 7.30-7.33 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta$  = 55.4, 66.6, 79.5, 88.1, 114.1, 128.1,

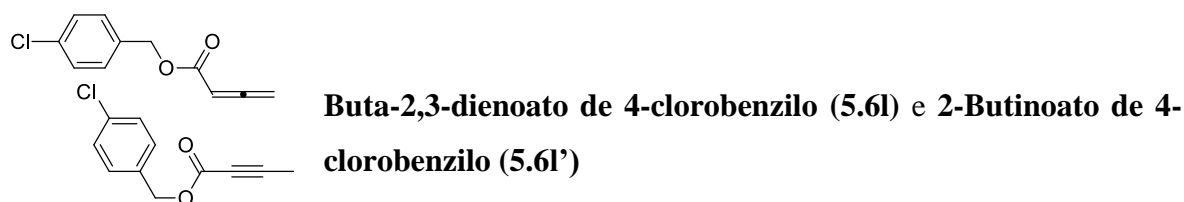
130.2, 159.8, 165.8, 216.1. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{12}H_{12}NaO_3$   $[M+Na]^+$  227.0679; Encontrada 227.0676.



Após coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)] foi obtida uma mistura dos produtos **(5.6k)** e **(5.6k')** (1:0.55) como um óleo incolor (55%).

Composto **5.6k**: RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 2.36 (s, 3H), 5.15 (s, 2H), 5.23 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 5.67 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 7.16-7.18 (m, 2H), 7.25-7.28 (m, 2H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{12}H_{13}O_2$   $[M+H]^+$  189.0910; Encontrada 189.0908.

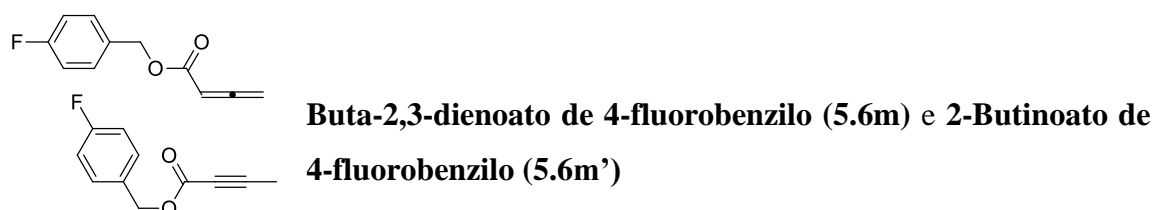
Composto **5.6k'**: RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 2.09 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 5.07 (s, 2H), 7.16-7.18 (m, 2H), 7.25-7.28 (m, 2H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{12}H_{13}O_2$   $[M+H]^+$  189.0910; Encontrada 189.0908.



Após coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)] foi obtida uma mistura dos produtos **(5.6l)** e **(5.6l')** (1:0.35) como um óleo incolor (59%).

Composto **5.6l**: RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 5.15 (s, 2H), 5.24 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 5.67 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 7.28-7.34 (m, 4H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{11}H_{10}O_2Cl$   $[M+H]^+$  209.0364; Encontrada 209.0362.

Composto **5.6l'**: RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 2.10 (s, 3H), 5.06 (s, 2H), 7.28-7.34 (m, 4H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{11}ClH_{10}O_2$   $[M+H]^+$  209.0364; Encontrada 209.0362.



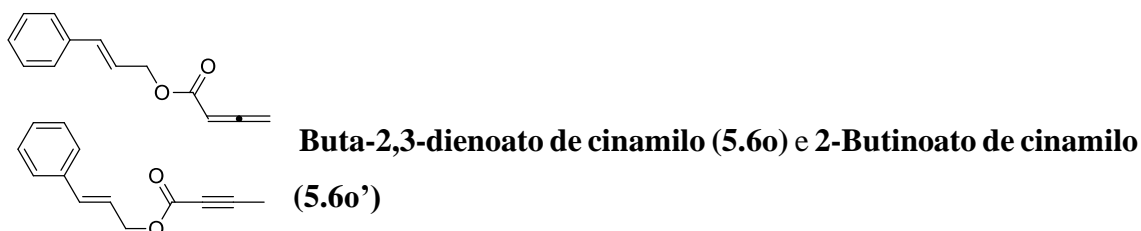
Após coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)] foi obtida uma mistura dos produtos **5.6m** e **5.6m'** (1:1) como um óleo incolor (61%).

Composto **5.6m**: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 5.15$  (s, 2H), 5.24 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 5.67 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 7.02-7.06 (m, 2H), 7.32-7.37 (m, 2H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{F}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  193.0659; Encontrada 193.0658.

Composto **5.6m'**: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 2.09$  (s, 3H), 5.07 (s, 2H), 7.02-7.06 (m, 2H), 7.32-7.37 (m, 2H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{11}\text{FH}_{10}\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  193.0659; Encontrada 193.0658.



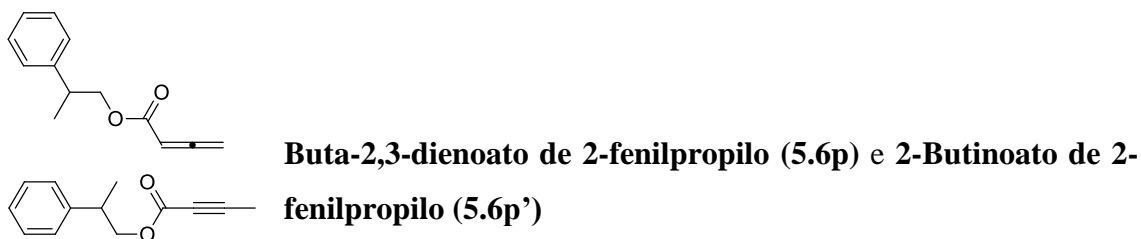
O aleno **5.6n**<sup>13</sup> foi purificado em coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:2)], sendo obtido como um sólido de baixo ponto de fusão branco (85%). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 2.48$  (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 4.74 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 5.26 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 5.67 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 52.5$ , 75.1, 77.6, 79.8, 87.4, 165.0, 216.4.



Após coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:2)] foi obtida uma mistura dos produtos **5.6o** e **5.6o'** (1:0.25) como um óleo amarelo (66%).

Composto **5.6o**: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 4.82$  (dd,  $J = 6.4$  e 1.2 Hz, 2H), 5.25 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 5.69 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 6.27-6.34 (m, 1H), 6.67 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.24-7.41 (m, 5H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  201.0910; Encontrada 201.0909.

Composto **5.6o'**: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 2.11$  (s, 3H), 4.73 (dd,  $J = 6.4$  e 1.2 Hz, 2H), 6.27-6.34 (m, 1H), 6.66 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 7.24-7.41 (m, 5H). EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  201.0910; Encontrada 201.0909.



Após coluna de cromatografia [acetato de etilo/hexano (1:4)] foi obtida uma mistura dos produtos **5.6p** e **5.6p'** (1:0.75) como um óleo amarelo (46%).

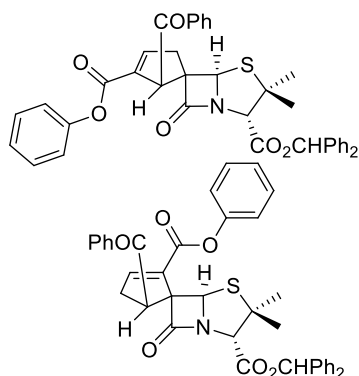
Composto **5.6p**: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.32 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 3.11-3.14 (m, 1H), 4.14-4.28 (m, 2H), 5.20 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 5.61 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 7.21-7.33 (m, 5H). EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NaO}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  225.0886; Encontrada 225.0882.

Composto **5.6p'**: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.32 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H), 2.02 (s, 3H), 3.11-3.14 (m, 1H), 4.14-4.28 (m, 2H), 7.21-7.33 (m, 5H). EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{NaO}_2$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  225.0886; Encontrada 225.0882.

### 7.6.2. Síntese de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas pela cicloadição [3+2] formal entre um 6-alkilidenopenicilanato e alenoatos monossustituídos

O procedimento geral para a síntese de espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas via cicloadição [3+2] catalisada por fosfinas entre 6-alkilidenopenicilinas e alenoatos encontra-se descrito na literatura.<sup>8</sup>

A uma mistura do respetivo 6-alkilidenopenicilanato (0.21 mmol) e trifetilfosfina ( $\text{PPh}_3$ ) (20 mol%) em tolueno (3 mL), foi adicionada uma solução do respetivo aleno (0.21 mmol) em tolueno (2 mL). A reação ficou em agitação à temperatura ambiente sob atmosfera inerte durante o tempo indicado em cada caso. A reação foi controlada por TLC. O solvente foi evaporado a pressão reduzida e os produtos espirocíclicos foram purificados por cromatografia em coluna [acetato de etilo/hexano].

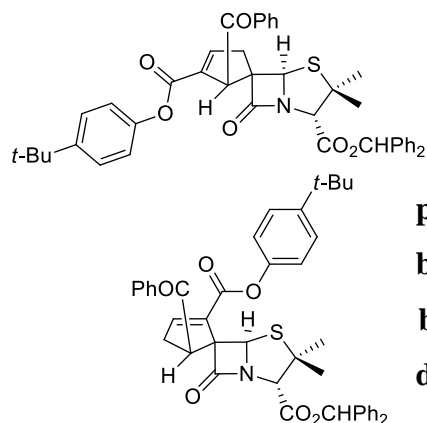


(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-fenilo e 3-benzidriilo (**5.7a**) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-fenilo e 3-benzidriilo (**5.8a**)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de fenilo (**5.6a**) (0.033 g, 0.21 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 6 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto **5.7a** como um sólido branco (0.061 g, 0.095 mmol, 46%) e o composto **5.8a** como um sólido branco (0.071 g, 0.110 mmol, 53%).

Composto **5.7a**: P. f. decompõe aos 137.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +340$  (*c* 0.25 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1772, 1735, 1657, 1490$  cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.13$  (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 3.21 (dd, *J* = 18.8 e 3.2 Hz, 1H), 3.64 (dt, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 5.27 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 6.80-6.83 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.25 (sl, 1H), 7.27-7.36 (m, 12H), 7.41-7.45 (m, 2H), 7.53-7.56 (m, 1H), 8.10-8.13 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.6, 41.0, 53.0, 64.3, 69.1, 70.8, 71.2, 78.5, 121.5, 126.0, 127.1, 127.7, 128.5, 128.6, 128.8, 129.4, 129.5, 133.7, 135.6, 137.5, 139.2, 139.3, 147.6, 150.3, 161.4, 167.0, 176.4, 201.2$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>39</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 666.1921; Encontrada 666.1913.

Composto **5.8a**: P. f. 92.5-95.0 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 87.1-89.5 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +420$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1769, 1735, 1684, 1591, 1490$  cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 2.62 (dd, *J* = 19.2 e 2.4 Hz, 1H), 3.29 (ddd, *J* = 18.8, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 7.12-7.20 (m, 6H), 7.24-7.30 (m, 4H), 7.35-7.42 (m, 6H), 7.50-7.54 (m, 2H), 7.61-7.64 (m, 1H), 7.97-7.99 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.8, 33.1, 36.2, 49.5, 62.8, 69.6, 71.1, 74.1, 78.3, 122.0, 126.0, 127.3, 127.6, 128.0, 128.2, 128.6, 128.6, 129.1, 129.5, 133.8, 134.0, 135.1, 139.5, 139.6, 146.3, 150.6, 161.0, 166.7, 174.2, 198.5$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>39</sub>H<sub>33</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 666.1921; Encontrada 666.1910.

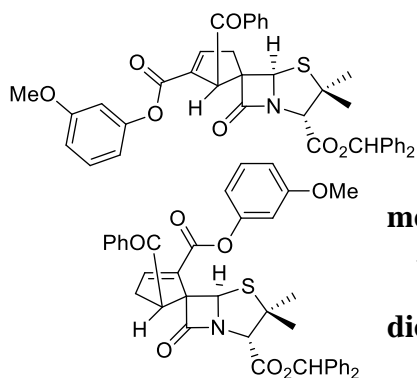


(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-*terc*-butilo e 3-benzidrilo (5.7b) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-*terc*-butilo e 3-benzidrilo (5.8b)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 4-*terc*-butilfenil (**5.6b**) (0.045 g, 0.21 mmol) e do 6-alquilidenepenicilanato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 6 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto **5.7b** como um sólido branco (0.052 g, 0.074 mmol, 36%) e o composto **5.8b** como um sólido branco (0.066 g, 0.094 mmol, 46%).

Composto **5.7b**: P. f. 206.7-208.9 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +320$  (*c* 0.25 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1770, 1734, 1671, 1626 \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.13$  (s, 3H), 1.26 (s, 9H), 1.53 (s, 3H), 3.20 (dd, *J* = 18.8 e 3.2 Hz, 1H), 3.63 (dt, *J* = 18.8 e 2.0 Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 5.27 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 6.73-6.77 (m, 2H), 6.93 (s, 1H), 7.25-7.36 (m, 13H), 7.42-7.46 (m, 2H), 7.53-7.57 (m, 1H), 8.11-8.133 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 31.5, 32.5, 34.6, 41.0, 53.0, 64.3, 69.1, 70.8, 71.2, 78.5, 120.8, 126.4, 127.1, 127.7, 128.4, 128.6, 128.6, 128.8, 129.5, 133.7, 135.7, 137.5, 139.2, 139.3, 147.4, 148.0, 148.8, 161.6, 167.0, 176.4, 201.2$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>43</sub>H<sub>41</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 722.2547; Encontrada 722.2536.

Composto **5.8b**: P. f. 91.8-93.5 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 87.4-89.2 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +390$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1768, 1735, 1676, 1448 \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.35 (s, 9H), 1.52 (s, 3H), 2.61 (dd, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.29 (ddd, *J* = 18.8, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 7.08-7.14 (m, 6H), 7.25-7.29 (m, 3H), 7.33-7.36 (m, 4H), 7.39-7.41 (m, 2H), 7.50-7.54 (m, 2H), 7.61-7.64 (m, 1H), 7.97-7.99 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 31.6, 33.0, 34.7, 36.2, 49.4, 62.8, 69.2, 71.1, 74.1, 78.3, 121.4, 126.3, 127.2, 127.6, 127.9, 128.2, 128.6, 128.6, 129.1, 133.8, 134.1, 135.1, 139.5, 139.7, 146.0, 148.3, 148.9, 161.3, 166.8, 174.2, 198.5$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>43</sub>H<sub>41</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 722.2547; Encontrada 722.2537.

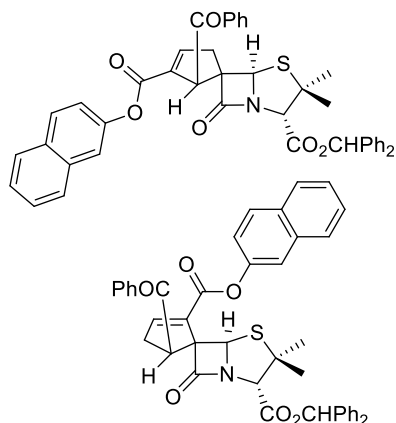


**(1'R,6R)-1'-Benzoilspiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-(3-metoxi)fenilo e 3-benzidrilo (5.7c) e (1'R,6S)-1'-benzoilspiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(3-metoxi)fenilo e 3-benzidrilo (5.8c)**

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 3-metoxifenilo (**5.6c**) (0.039 g, 0.21 mmol) e do 6-alquilidenopenicilanato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 3 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto **5.7c** como um sólido branco (0.051 g, 0.076 mmol, 37%) e o composto **5.8c** como um sólido branco (0.053 g, 0.079 mmol, 38%).

Composto **5.7c**: P. f. 67.8-69.7 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +240$  (*c* 0.25 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1735, 1669, 1591, 1490 \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.13$  (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 3.20 (dd, *J* = 18.8 e 3.2 Hz, 1H), 3.63 (dt, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 4.56 (s, 1H), 5.26 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.48 (s, 1H), 6.34-6.35 (m, 1H), 6.42-6.44 (m, 1H), 6.69-6.72 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 7.14-7.18 (m, 1H), 7.29-7.36 (m, 11H), 7.42-7.45 (m, 2H), 7.53-7.57 (m, 1H), 8.10-8.13 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 29.8, 32.6, 40.9, 53.0, 55.5, 64.3, 69.1, 70.8, 71.2, 78.5, 107.3, 112.2, 113.7, 127.1, 127.7, 128.4, 128.6, 128.6, 128.8, 129.5, 129.8, 133.7, 139.2, 147.7, 151.2, 160.5, 161.3, 167.0, 176.4, 201.2$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>40</sub>H<sub>35</sub>NNaO<sub>7</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 696.2026; Encontrada 696.2018.

Composto **5.8c**: P. f. 74.2-76.7 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +360$  (*c* 0.375 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1735, 1676, 1592, 1490 \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 2.62 (dd, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.29 (ddd, *J* = 18.8, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.54 (s, 1H), 4.62 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.34 (s, 1H), 6.76-6.83 (m, 3H), 6.89 (s, 1H), 7.12-7.17 (m, 4H), 7.24-7.31 (m, 4H), 7.34-7.37 (m, 4H), 7.50-7.54 (m, 2H), 7.61-7.64 (m, 1H), 7.96-7.98 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 33.0, 36.2, 49.5, 55.6, 62.8, 69.2, 71.1, 74.1, 78.4, 107.7, 112.3, 114.2, 127.3, 127.5, 128.0, 128.2, 128.6, 129.1, 129.8, 133.8, 134.0, 135.1, 139.4, 139.6, 146.3, 151.6, 160.6, 160.9, 166.7, 174.2, 198.5$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>40</sub>H<sub>35</sub>NNaO<sub>7</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 696.2026; Encontrada 696.2014.



(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'(2-naftilo) e 3-benzidrilo (**5.7d**) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(2-naftilo) e 3-benzidrilo (**5.8d**)

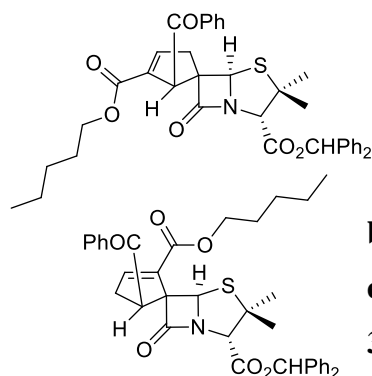
Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 2-naftilo (**5.6d**) (0.044 g, 0.21 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 4 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [diclorometano/acetato de etilo/ hexano (1:0.5:4)] deu por ordem de eluição o composto **5.7d** como um sólido branco (0.017 g, 0.024 mmol, 12%) e o composto **5.8d** como um sólido branco (0.051 g, 0.073 mmol, 35%).

Composto **5.7d**: P. f. decompõe aos 206.5 °C.  $[\alpha]_D^{25} = + 300$  (*c* 0.25 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1767, 1727, 1663, 1628 \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.14$  (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 3.23 (dd, *J* = 18.8 e 3.2 Hz, 1H), 3.66 (dt, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 4.57 (s, 1H), 5.31 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.50 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.94-6.97 (m, 1H), 7.23 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.30-7.36 (m, 11H), 7.42-7.46 (m, 4H), 7.53-7.56 (m, 1H), 7.73-7.79 (m, 3H), 8.13-8.15 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.6, 41.0, 53.1, 64.3, 69.1, 70.8, 71.2, 78.5, 118.6, 121.0, 125.9, 126.6, 127.2, 127.7, 127.8, 127.8, 128.4, 128.6, 128.6, 128.8, 129.5, 131.6, 133.7, 135.5, 137.5, 139.2, 139.3, 147.8, 161.6, 167.0, 176.4, 201.2$ . EMAR (ESI) *m/z*: Calculada para C<sub>43</sub>H<sub>35</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 716.2077; Encontrada 716.2066.

Composto **5.8d**: P. f. 195.6-198.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = + 400$  (*c* 0.375 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1777, 1739, 1724, 1681 \text{ cm}^{-1}$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.12$  (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 2.65 (dd, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.32 (ddd, *J* = 18.8, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.38 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.97-7.07 (m, 3H), 7.19-7.25 (m, 4H), 7.32-7.34 (m, 5H), 7.47-7.55 (m, 4H), 7.61-7.65 (m, 1H), 7.70 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.81-7.88 (m, 3H), 7.98-8.00 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 33.1, 36.3, 49.5, 62.8, 69.2, 71.1, 74.2, 78.3, 119.0, 121.4, 125.9, 126.7, 127.3, 127.5, 127.9, 128.0, 128.2, 128.5, 128.6, 128.6, 129.1, 129.4, 131.6, 133.8, 133.9, 134.1, 135.1, 139.4, 139.6, 146.4$ ,



148.3, 161.2, 166.7, 174.2, 198.5. EMAR (ESI-TOF) m/z:  $[M+H]^+$  Calculada for. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{43}H_{35}NNaO_6S$   $[M+Na]^+$  716.2077; Encontrada 716.2068.



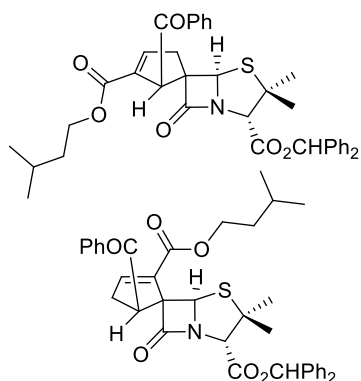
**(1'R,6R)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanoato-2',3-dicarboxilato de 2'-pentilo e 3-benzidriilo (5.7e) e (1'R,6S)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanoato-3,4'-dicarboxilato de 4'-pentilo e 3-benzidriilo (5.8e)**

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de pentilo (**5.6e**) (0.032 g, 0.21 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanoato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 6 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:5)] deu por ordem de eluição o composto **5.7e** como um sólido de baixo ponto de fusão amarelo (0.045 g, 0.071 mmol, 34%) e o composto **5.8e** como um sólido de baixo ponto de fusão amarelo (0.079 g, 0.124 mmol, 60%).

Composto **5.7e**:  $[\alpha]_D^{25} = +320$  (*c* 0.25 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1744, 1710, 1669$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 0.84$  (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) 1.12 (s, 3H), 1.15-1.26 (m, 4H), 1.36-1.41 (m, 2H), 1.52 (s, 3H), 3.13 (dd, *J* = 18.4 e 3.2 Hz, 1H), 3.54 (dt, *J* = 18.4 e 2.4 Hz, 1H), 3.88-3.96 (m, 2H), 4.54 (s, 1H), 5.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.02 (sl, 1H), 7.28-7.35 (m, 10H), 7.45-7.49 (m, 2H), 7.56-7.60 (m, 1H), 8.09-8.11 (m, 2H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 14.0, 22.4, 26.1, 28.0, 28.1, 32.5, 40.8, 52.9, 64.2, 65.1, 69.1, 70.7, 71.2, 78.4, 127.1, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.7, 129.4, 133.6, 136.3, 137.6, 139.2, 139.3, 145.2, 163.1, 167.0, 176.5, 201.3$ . EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{38}H_{39}NNaO_6S$   $[M+Na]^+$  660.2390; Encontrada 660.2382.

Composto **5.8e**:  $[\alpha]_D^{25} = +420$  (*c* 0.5 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1766, 1712, 1676, 1448$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 0.88-0.91$  (m, 3H), 1.12 (s, 3H), 1.23-1.38 (m, 4H), 1.52 (s, 3H), 1.62-1.69 (m, 2H), 2.51 (dd, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.19 (ddd, *J* = 18.4, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.14-4.19 (m, 2H), 4.55-4.57 (m, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.95 (sl, 1H), 7.27-7.36 (m, 6H), 7.41-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.93-7.96 (m, 2H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 14.1, 14.3, 22.5, 22.8, 25.9, 28.2, 28.3, 29.5, 29.8, 29.9, 32.1, 32.9, 35.9, 49.5, 62.7, 65.1, 69.1, 71.2, 74.1, 78.4, 127.4, 127.5, 128.2, 128.2, 128.6,$

128.7, 129.1, 133.6, 134.8, 135.2, 139.7, 144.2, 162.9, 166.8, 174.5, 198.4. EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $C_{38}H_{39}NNaO_6S$   $[M+Na]^+$  660.2390; Encontrada 660.2382.



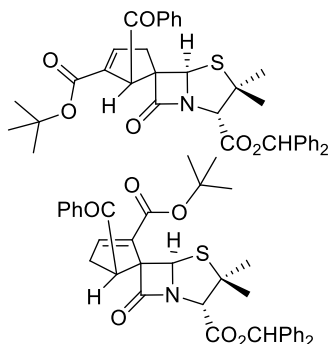
(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-isoamilo e 3-benzidrilo (**5.7f**) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-isoamilo e 3-benzidrilo (**5.8f**)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de isoamilo (**5.6f**) (0.032 g, 0.21 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 7 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto **5.7f** como um sólido de baixo ponto de fusão amarelo (0.040 g, 0.063 mmol, 30%) e o composto **5.8f** como um sólido de baixo ponto de fusão branco (0.044 g, 0.069 mmol, 33%).

Composto **5.7f**:  $[\alpha]_D^{25} = +360$  ( $c$  0.25 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1744, 1711, 1664$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 0.81$  (dd,  $J = 9.2$  e  $6.4$  Hz, 6H), 1.12 (s, 3H), 1.24-1.30 (m, 2H), 1.45-1.50 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 3.11 (dd,  $J = 18.4$  e  $3.2$  Hz, 1H), 3.53 (dt,  $J = 18.4$  e  $2.4$  Hz, 1H), 3.93-3.98 (m, 2H), 4.53 (s, 1H), 5.15 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.00 (sl, 1H), 7.29-7.35 (m, 8H), 7.45-7.51 (m, 3H), 7.56-7.60 (m, 1H), 7.80-7.82 (m, 1H), 8.08-8.10 (m, 2H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 22.5, 25.0, 26.1, 32.5, 37.1, 40.8, 52.9, 63.6, 64.2, 60.1, 70.7, 71.2, 78.4, 127.1, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.5, 128.8, 129.4, 130.2, 132.6, 133.6, 136.3, 139.2, 139.3, 145.2, 163.2, 167.0, 176.6, 201.4$ . EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $C_{38}H_{39}NNaO_6S$   $[M+Na]^+$  660.2390; Encontrada 660.2382.

Composto **5.8f**:  $[\alpha]_D^{25} = +430$  ( $c$  0.3 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1762, 1739, 1717, 1683$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 0.91$  (dd,  $J = 6.4$  e  $4.0$  Hz, 6H), 1.11 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 1.53-1.58 (m, 2H), 1.64-1.74 (m, 1H), 2.51 (dd,  $J = 18.8$  e  $2.4$  Hz, 1H), 3.19 (ddd,  $J = 18.4, 9.2$  e  $2.0$  Hz, 1H), 4.21 (t,  $J = 6.88$  Hz, 2H), 4.55 (s, 1H), 4.56 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.28 (s, 1H), 6.86 (sl, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.27-7.36 (m, 6H), 7.41-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.93-7.95 (d,  $J = 7.20$ , 2H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 22.6, 22.6, 25.3, 25.9, 33.0, 35.9, 37.3, 49.5, 62.7, 63.6, 69.1, 71.2, 74.1, 78.4, 127.4, 127.5, 128.2,$

128.6, 128.7, 128.7, 129.1, 133.6, 134.8, 135.2, 139.7, 144.1, 162.9, 166.8, 174.8, 198.4. EMAR (ESI) m/z: Calculada para C<sub>38</sub>H<sub>39</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 660.2390; Encontrada 660.2381.



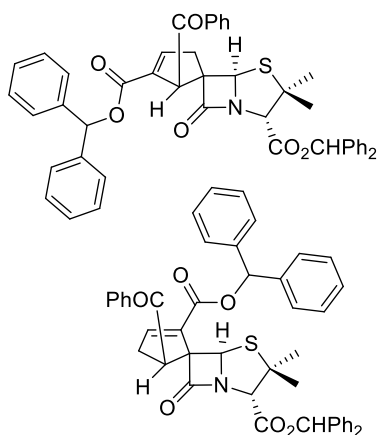
(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-*tert*-butilo e 3-benzidrilo (**5.7g**) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-*tert*-butilo e 3-benzidrilo (**5.8g**)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de *tert*-butilo (**5.6g**) (0.070 g, 0.50 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.241 g, 0.50 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 7 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:7)] deu por ordem de eluição o composto **5.7g** como um sólido branco (0.186 g, 0.298 mmol, 57%) e o composto **5.8g** como um sólido branco (0.083 g, 0.133 mmol, 27%).

Composto **5.7g**: P.f. decompõe aos 192.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +320$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1769, 1748, 1667, 1344$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.12$  (s, 3H), 1.21 (s, 9H), 1.54 (s, 3H), 3.09 (dd, *J* = 18.4 e 3.2 Hz, 1H), 3.48 (dt, *J* = 18.4 e 2.4 Hz, 1H), 4.53 (s, 1H), 5.10 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 6.91-6.92 (m, 2H), 7.27-7.35 (m, 10H), 7.44-7.48 (m, 2H), 7.55-7.59 (m, 1H), 8.04-8.06 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 27.9, 31.1, 32.6, 40.7, 53.0, 64.2, 69.1, 70.7, 71.3, 78.4, 81.5, 127.1, 127.7, 128.3, 128.5, 128.5, 128.7, 128.8, 129.4, 133.4, 137.7, 138.0, 139.2, 139.3, 144.2, 162.3, 167.0, 176.6, 201.7$ . Anal. Calculada para C<sub>37</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>S: C, 71.24; H, 5.98; N, 2.21; S, 5.14. Encontrada: C, 71.51; H, 6.09; N, 2.25; S, 5.12.

Composto **5.8g**: P. f. 84.0-86.1 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +450$  (*c* 0.5 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1707, 1676, 1448$ . RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.15$  (s, 3H), 1.48 (s, 9H), 1.51 (s, 3H), 2.47 (dd, *J* = 18.4 e 2.4 Hz, 1H), 3.15 (ddd, *J* = 18.4, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.53-4.55 (m, 1H), 4.54 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 6.78 (dd, *J* = 3.2 e 2.4 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.27-7.35 (m, 6H), 7.41-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.93-7.95 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 28.2, 32.8, 35.6, 49.8, 62.4, 69.1, 71.3, 74.0, 78.4, 81.7, 127.4, 127.4, 128.2, 128.2, 128.6, 128.7, 128.7, 129.0, 133.6, 135.3, 136.2, 139.7, 143.4, 162.1, 166.9$ ,

174.9, 198.4. Anal. Calculada para  $C_{37}H_{37}NO_6S$ : C, 71.24; H, 5.98; N, 2.21; S, 5.14. Encontrada: C, 71.51; H, 6.07; N, 2.24; S, 4.94.



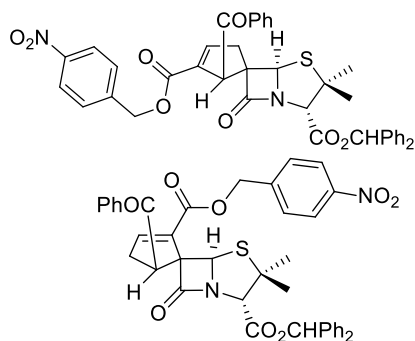
(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilspiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-benzidriilo e 3-benzidriilo (5.7h) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilspiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-benzidriilo e 3-benzidriilo (5.8h)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de benzidriilo (**5.6h**) (0.052 g, 0.21 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 6 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:5)] deu por ordem de eluição o composto **5.7h** como um sólido branco (0.054 g, 0.074 mmol, 36%) e o composto **5.8h** como um sólido branco (0.084 g, 0.114 mmol, 55%).

Composto **5.7h**: P. f. 83.4-85.2 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 75.2-78.6 °C)  $[\alpha]_D^{25} = +320$  ( $c$  0.25 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1744, 1715, 1669$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.10$  (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 3.15 (dd,  $J = 18.8$  e 3.2 Hz, 1H), 3.54 (dt,  $J = 18.4$  e 2.4 Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 5.19 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.07-7.10 (m, 2H), 7.12-7.15 (m, 3H), 7.24-7.38 (m, 18H), 7.50-7.54 (m, 1H), 8.04-8.06 (m, 2H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.4, 40.9, 52.8, 64.2, 69.1, 70.6, 71.2, 78.4, 127.1, 127.3, 127.7, 128.0, 128.1, 128.3, 128.5, 128.5, 128.6, 128.7, 129.5, 133.7, 136.0, 137.4, 139.2, 139.3, 139.7, 139.7, 146.0, 162.1, 167.0, 176.4, 201.1$ . EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $C_{46}H_{38}NO_6S$   $[M-H]$  732.2425; Encontrada 732.2428.

Composto **5.8h**: P. f. 95.1-96.8 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 88.8-92.0 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +350$  ( $c$  0.5 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1718, 1676, 1448$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.08$  (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 2.54 (dd,  $J = 18.8$  e 2.4 Hz, 1H), 3.21 (ddd,  $J = 18.8, 9.2$  e 2.0 Hz, 1H), 4.54 (s, 1H), 4.58 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.25 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.02-7.04 (m, 2H), 7.23-7.34 (m, 12H), 7.39-7.44 (m, 8H), 7.47-7.51 (m, 2H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.93-7.95 (m, 2H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta =$

25.9, 32.5, 36.0, 49.6, 62.6, 69.2, 70.9, 73.9, 78.3, 127.1, 127.4, 127.5, 127.6, 128.0, 128.1, 128.2, 128.6, 128.7, 128.7, 128.7, 129.1, 133.7, 134.4, 135.1, 139.6, 139.7, 140.1, 140.2, 145.2, 161.7, 166.7, 174.5, 198.3. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{46}H_{39}NNaO_6S$   $[M+Na]^+$  756.2390; Encontrada 756.2376.



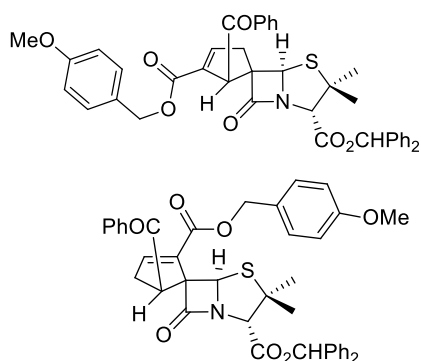
(1*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-(4-nitro)benzilo e 3-benzidrilo (5.7i) e (1*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(4-nitro)benzilo e 3-benzidrilo (5.8i)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 4-nitrobenzilo (5.6i) (0.068 g, 0.31 mmol) e do 6-alquilidenopenicilanato 4.7a (0.150 g, 0.31 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 4 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto 5.7i como um sólido branco (0.083 g, 0.118 mmol, 38%) e o composto 5.8i como um sólido branco (0.112 g, 0.160 mmol, 52%).

Composto 5.7i: P. f. 81.2-83.1 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +340$  (*c* 0.25 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1770, 1744, 1719, 1669, 1518, 1345, 1330$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.12$  (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 3.14 (dd, *J* = 18.4 e 2.8 Hz, 1H), 3.56 (dt, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 4.53 (s, 1H), 5.05 (q, *J* = 13.2 Hz, 2H), 5.17 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.12 (sl, 1H), 7.23-7.25 (m, 2H), 7.28-7.35 (m, 10H), 7.39-7.43 (m, 2H), 7.53-7.57 (m, 1H), 8.04-8.06 (m, 2H), 8.09-8.12 (m, 2H). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.5, 40.8, 52.8, 64.3, 65.1, 69.1, 70.6, 71.1, 78.5, 123.9, 127.1, 127.7, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 128.8, 129.4, 133.7, 135.4, 137.4, 139.2, 139.3, 142.6, 146.9, 147.8, 162.5, 166.9, 176.3, 200.9$ . EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $C_{40}H_{34}N_2NaO_8S$   $[M+Na]^+$  725.1928; Encontrada 725.1927.

Composto 5.8i: P. f. 83.8-85.2 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +370$  (*c* 0.5 em  $CH_2Cl_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1718, 1676, 1521, 1345$   $cm^{-1}$ . RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 2.53 (dd, *J* = 19.2 e 2.4 Hz, 1H), 3.22 (ddd, *J* = 18.4, 8.8 e 2.0 Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.28 (q, *J* = 9.6 Hz, 2H), 6.23 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.97 (sl, 1H), 7.27-7.35 (m, 6H), 7.39-7.44 (m, 4H), 7.50-7.54 (m, 4H), 7.59-7.63 (m, 1H), 7.93-7.95 (m,

2H), 8.18-8.20 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  = 26.0, 32.6, 36.0, 49.6, 62.7, 65.1, 69.2, 71.0, 73.8, 78.5, 124.0, 127.3, 127.6, 128.3, 128.3, 128.6, 128.7, 129.1, 133.8, 134.1, 135.0, 139.5, 139.5, 143.0, 146.0, 147.9, 162.3, 166.8, 174.3, 198.3. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{40}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  725.1928; Encontrada 725.1920.



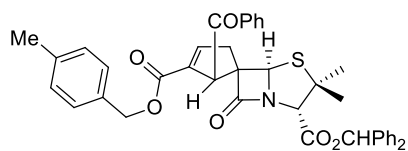
**(1'R,6R)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-(4-metoxi)benzilo e 3-benzidrilo (5.7j) e (1'R,6S)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(4-metoxi)benzilo e 3-benzidrilo (5.8j)**

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 4-metoxibenzilo (**5.6j**) (0.064 g, 0.31 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.150 g, 0.31 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 4 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto **5.7j** como um *fluffy* branco (0.079 g, 0.115 mmol, 37%) e o composto **5.8j** como um *fluffy* branco (0.114 g, 0.166 mmol, 53%).

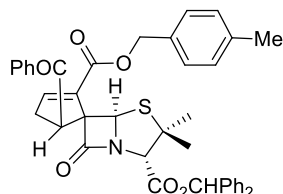
Composto **5.7j**: P. f. 65.3-67.4 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 60.8-62.6 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +300$  (*c* 0.5 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1744, 1713, 1676 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.11 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 3.10 (dd,  $J = 18.8$  e 3.2 Hz, 1H), 3.53 (dt,  $J = 18.4$  e 2.4 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.52 (s, 1H), 4.89 (s, 2H), 5.16 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 6.80 (d,  $J = 8.88$  Hz, 2H), 6.91 (s, 1H), 7.03 (sl, 1H), 7.05-7.07 (m, 2H), 7.29-7.34 (m, 10H), 7.39-7.42 (m, 2H), 7.53-7.57 (m, 1H), 8.05-8.07 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  = 26.1, 32.5, 40.8, 52.8, 55.4, 64.2, 66.5, 69.1, 70.7, 71.2, 78.4, 114.0, 127.1, 127.5, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 129.4, 130.4, 133.6, 136.0, 137.5, 139.2, 139.3, 145.8, 159.8, 162.9, 167.0, 176.5, 201.3. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{41}\text{H}_{37}\text{NNaO}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  710.2183; Encontrada 710.2172.

Composto **5.8j**: P. f. 74.4-76.3 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +350$  (*c* 0.5 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1740, 1713, 1676 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.11 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 2.50 (dd,  $J = 18.8$  e 2.4 Hz, 1H), 3.18 (ddd,  $J = 18.4, 9.2$  e 2.0 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 4.55 (s, 1H), 4.54-4.56 (m, 1H), 5.15 (q,  $J = 12.0$  Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.85-6.88 (m, 3H), 6.95 (s, 1H), 7.28-7.36 (m, 8H), 7.42-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.92-7.94 (m, 2H).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  = 25.9, 32.8, 36.0, 49.5, 55.4, 62.7, 66.4, 69.1, 71.1, 73.9, 78.4, 114.1, 127.4, 127.5, 128.0, 128.2, 128.2, 128.6, 128.6, 128.7, 129.1, 130.4, 133.7, 134.5, 135.1, 139.7, 144.7, 159.8, 162.6, 166.8, 174.4, 198.4. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{41}\text{H}_{37}\text{NNaO}_7\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  710.2183; Encontrada 710.2172.



**(1'R,6R)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-(4-metil)benzilo e 3-benzidrilo (5.7k)** e **(1'R,6S)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(4-metil)benzilo e 3-benzidrilo (5.8k)**



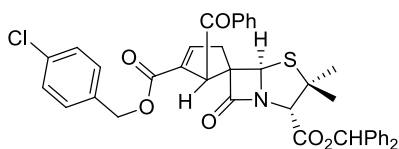
Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 4-metilbenzilo (**5.6k**) (0.059 g, 0.31 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.150 g, 0.31 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 4 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:5)] deu por ordem de eluição o composto **5.7k** como um *fluffy* branco (0.052 g, 0.077 mmol, 25%) e o composto **5.8k** como um *fluffy* branco (0.096 g, 0.143 mmol, 46%).

Composto **5.7k**: P. f. 59.0-60.8 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 53.2-55.6 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +340$  ( $c$  0.25 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1742, 1710, 1669 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.11 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 3.10 (dd,  $J = 18.4$  e 3.2 Hz, 1H), 3.53 (dt,  $J = 18.8$  e 2.4 Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.92 (s, 2H), 5.16 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.01-7.09 (m, 5H), 7.29-7.34 (m, 10H), 7.38-7.42 (m, 2H), 7.53-7.57 (m, 1H), 8.05-8.07 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  = 21.3, 26.1, 32.5, 40.8, 52.9, 64.2, 66.7, 69.1, 70.7, 71.2, 78.4, 127.1, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 129.3, 129.4, 132.4, 133.6, 136.0, 137.4, 138.2, 139.2, 139.3, 145.8, 162.9, 167.0, 176.5. EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{41}\text{H}_{37}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  694.2234; Encontrada 694.2228.

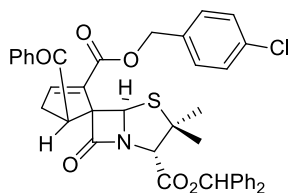
Composto **5.8k**: P. f. 60.7-62.7 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 50.6-52.7 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +375$  ( $c$  0.4 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1718, 1676, 1448 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.11 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 2.50 (dd,  $J = 18.4$  e 2.4 Hz, 1H), 3.18 (ddd,  $J = 18.4, 9.2$  e 2.0 Hz, 1H), 4.54-4.56 (m, 2H), 5.17 (s, 2H), 6.29 (s, 1H), 6.89 (sl, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.13-7.15 (m, 2H), 7.25-7.36 (m, 8H), 7.42-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.92-7.94 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  = 21.4,



25.9, 32.8, 36.0, 49.5, 62.7, 66.5, 69.2, 71.1, 74.0, 78.4, 127.5, 128.2, 128.2, 128.6, 128.6, 128.7, 129.1, 129.4, 132.9, 133.7, 134.5, 135.2, 138.2, 139.7, 144.7, 162.6, 166.8, 174.4, 198.4. EMAR (ESI) m/z: Calculada para C<sub>41</sub>H<sub>37</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 694.2234; Encontrada 694.2222.



**(1'R,6R)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-(4-cloro)benzilo e 3-benzidrilo (5.7I) e (1'R,6S)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(4-cloro)benzilo e 3-benzidrilo (5.8I)**



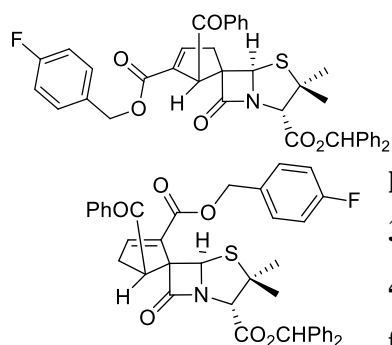
Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 4-clorobenzilo (**5.6I**) (0.065 g, 0.31 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.150 g, 0.31 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 5 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:5)] deu por ordem de eluição o composto **5.7I** como um *fluffy* branco (0.045 g, 0.065 mmol, 21%) e o composto **5.8I** como um *fluffy* branco (0.083 g, 0.120 mmol, 39%).

Composto **5.7I**: P. f. 49.8-51.5 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +320$  (*c* 0.25 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1744, 1715, 1667$  cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 3.12 (dd, *J* = 18.8 e 3.2 Hz, 1H), 3.54 (dt, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.92 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 5.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 6.91 (s, 1H), 7.02-7.04 (m, 2H), 7.07 (sl, 1H), 7.21-7.24 (m, 2H), 7.29-7.35 (m, 8H), 7.38-7.41 (m, 2H), 7.47-7.60 (m, 2H), 7.80-7.82 (m, 1H), 8.02-8.05 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.5, 40.8, 52.8, 64.3, 65.9, 69.1, 70.7, 71.1, 78.5, 127.1, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 129.4, 129.9, 130.2, 132.6, 133.6, 133.7, 134.3, 135.7, 137.4, 139.2, 139.3, 146.3, 162.7, 167.0, 176.4, 201.1$ . EMAR (ESI) m/z: Calculada para C<sub>40</sub>ClH<sub>34</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 714.1688; Encontrada 714.1680.

Composto **5.8I**: P. f. 86.0-88.3 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 80.7-84.0 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +360$  (*c* 0.375 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1715, 1676, 1490$  cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 2.52 (dd, *J* = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.19 (ddd, *J* = 18.8, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.55-4.57 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 6.25 (s, 1H), 6.91 (sl, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.28-7.35 (m, 10H), 7.41-7.51 (m, 6H), 7.59-7.62 (m, 1H), 7.92-7.94 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 25.9, 32.7, 36.0, 49.6, 62.7, 65.8,$



69.1, 71.0, 73.9, 78.4, 127.4, 127.6, 128.3, 128.6, 128.6, 128.7, 128.9, 129.1, 129.9, 133.7, 134.3, 134.3, 135.1, 139.5, 139.6, 145.2, 162.4, 166.8, 174.4, 198.3. EMAR (ESI) m/z: Calculada para C<sub>40</sub>ClH<sub>33</sub>NO<sub>6</sub>S [M-H] 690.1723; Encontrada 690.1724.



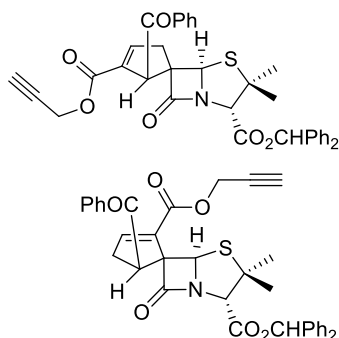
(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilspiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanoato-2',3-dicarboxilato de 2'-(4-fluoro)benzilo e 3-benzidriilo (**5.7m**) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilspiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanoato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(4-fluoro)benzilo e 3-benzidriilo (**5.8m**)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 4-fluorobenzilo (**5.6m**) (0.060 g, 0.31 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanoato **4.7a** (0.150 g, 0.31 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 7 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:5)] deu por ordem de eluição o composto **5.7m** como um *fluffy* branco (0.049 g, 0.073 mmol, 23%) e o composto **5.8m** como um *fluffy* branco (0.106 g, 0.157 mmol, 51%).

Composto **5.7m**: P. f. 67.2-69.3 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 59.5-61.9 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +340$  (*c* 0.25 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1769, 1744, 1711, 1664$  cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 3.11 (dd, *J* = 18.4 e 3.2 Hz, 1H), 3.54 (dt, *J* = 18.4 e 2.4 Hz, 1H), 4.52 (s, 1H), 4.92 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 5.16 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.42 (s, 1H), 6.91-6.96 (m, 3H), 7.06-7.10 (m, 3H), 7.29-7.35 (m, 10H), 7.38-7.42 (m, 2H), 7.54-7.57 (m, 1H), 8.03-8.06 (m, 2H). RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.5, 40.8, 52.8, 64.3, 66.0, 69.1, 70.7, 71.2, 78.5, 115.6$  (d, *J* = 22 Hz, 1C), 127.1, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.7, 128.8, 129.4, 130.6 (d, *J* = 8 Hz, 2C), 131.2 (d, *J* = 3 Hz, 2C), 133.6, 135.8, 137.4, 139.2, 139.3, 146.1, 162.7 (d, *J* = 246 Hz, 1C), 162.8, 167.0, 176.4, 201.1. EMAR (ESI) m/z: Calculada para C<sub>40</sub>FH<sub>34</sub>NNaO<sub>6</sub>S [M+Na]<sup>+</sup> 698.1983; Encontrada 698.1971.

Composto **5.8m**: P. f. 157.3-159.0 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +380$  (*c* 0.3 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). IV (ATR):  $\nu = 1760, 1736, 1716, 1677$  cm<sup>-1</sup>. RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 2.51 (dd, *J* = 18.4 e 2.4 Hz, 1H), 3.19 (ddd, *J* = 18.4, 8.8 e 2.0 Hz, 1H), 4.55-4.57 (m, 2H), 5.16 (s, 2H) 6.25 (s, 1H), 6.90 (sl, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.98-7.03 (s, 2H), 7.28-7.36

(m, 8H), 7.41-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.92-7.94 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  = 25.9, 32.7, 36.0, 49.6, 62.7, 65.9, 69.1, 71.0, 73.9, 78.4, 115.6 (d,  $J$  = 22 Hz, 1C), 127.4, 127.6, 128.3, 128.6, 128.7, 129.1, 129.4, 130.6 (d,  $J$  = 8 Hz, 2C), 131.7 (d,  $J$  = 3 Hz, 2C), 133.7, 134.4, 135.1, 139.6, 139.6, 145.1, 162.5, 162.8 (d,  $J$  = 245 Hz, 1C), 166.8, 174.4, 198.4. EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{40}\text{FH}_{34}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  698.1983; Encontrada 698.1975.



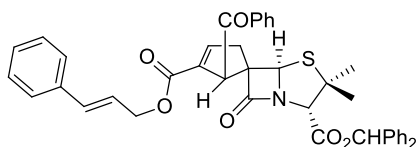
(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-propargilo e 3-benzidrilo (**5.7n**) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-propargilo e 3-benzidrilo (**5.8n**)

Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de propargilo (**5.6n**) (0.025 g, 0.21 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanato **4.7a** (0.100 g, 0.21 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 6 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:3)] deu por ordem de eluição o composto **5.7n** como um sólido branco (0.054 g, 0.085 mmol, 41%) e o composto **5.8n** como um sólido branco (0.061 g, 0.102 mmol, 49%).

Composto **5.7n**: P. f. 62.2-64.8 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 58.6-60.1 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +340$  ( $c$  0.25 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu$  = 1773, 1740, 1719, 1669  $\text{cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.12 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 2.38 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 3.13 (dd,  $J$  = 18.8 e 3.2 Hz, 1H), 3.56 (dt,  $J$  = 18.4 e 2.4 Hz, 1H), 4.54 (d,  $J$  = 0.8 Hz, 2H), 4.55 (s, 1H), 5.18 (d,  $J$  = 1.2 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.10 (sl, 1H), 7.28-7.35 (m, 10H), 7.45-7.49 (m, 2H), 7.57-7.60 (m, 1H), 8.10-8.12 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  = 26.1, 32.6, 40.8, 52.2, 52.9, 64.2, 69.1, 70.7, 71.1, 75.3, 78.5, 127.1, 127.7, 128.3, 128.5, 128.8, 129.5, 133.7, 135.2, 137.4, 139.2, 139.3, 146.9, 162.1, 167.0, 176.4, 201.0. EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{36}\text{H}_{31}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  628.1764; Encontrada 628.1756.

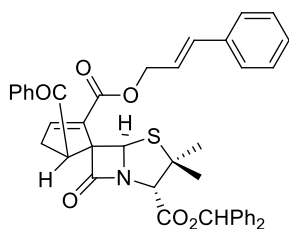
Composto **5.8n**: P. f. 78.0-79.9 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 70.4-73.0 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +480$  ( $c$  0.25 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu$  = 1763, 1719, 1676, 1448  $\text{cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  = 1.13 (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 2.44 (t,  $J$  = 2.4 Hz, 1H), 2.54 (dd,  $J$  = 18.8 e 2.4 Hz, 1H), 3.21 (ddd,  $J$  = 18.8, 9.2 e 2.0 Hz, 1H), 4.55-4.57 (m,

2H), 4.75 (t,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 6.28 (s, 1H), 6.95-6.97 (m, 2H), 7.27-7.37 (m, 6H), 7.41-7.52 (m, 6H), 7.59-7.63 (m, 1H), 7.93-7.95 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 25.9, 33.0, 36.1, 49.4, 52.2, 62.8, 69.1, 71.0, 74.0, 75.3, 78.4, 127.4, 127.5, 128.2, 128.2, 128.5, 128.6, 128.7, 129.1, 133.7, 135.1, 139.6, 139.7, 145.7, 161.8, 166.8, 174.1, 198.3$ . EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{36}\text{H}_{31}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  628.1764; Encontrada 628.1755.



(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-

penicilanato-2',3-dicarboxilato de 2'-(*E*)-cinamilo e 3-benzidrilo (5.7o) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-enil)-5',6-penicilanato-3,4'-dicarboxilato de 4'-(*E*)-cinamilo e 3-benzidrilo (5.8o)

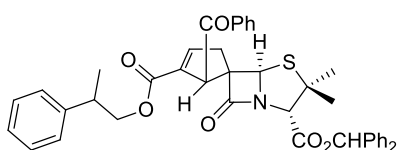


Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de (*E*)-cinamilo (5.6o) (0.062 g, 0.31 mmol) e do 6-alquilidenopenicilanato 4.7a (0.150 g, 0.31 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 72 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto 5.7o como um *fluffy* amarelo claro (0.052 g, 0.076 mmol, 25%) e o composto 5.8o como um *fluffy* amarelo claro (0.075 g, 0.110 mmol, 35%).

Composto 5.7o: P. f. 67.8-69.4 °C (verifica-se também uma alteração de aparência a 63.8-65.3 °C).  $[\alpha]_D^{25} = +340$  ( $c$  0.25 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1773, 1744, 1713, 1669 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.12$  (s, 3H), 1.52 (s, 3H), 3.12 (dd,  $J = 18.4$  e 3.2 Hz, 1H), 3.55 (dt,  $J = 18.4$  e 2.4 Hz, 1H), 4.52-4.62 (m, 3H), 5.18 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 5.91-5.98 (m, 1H), 6.46 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 6.92 (s, 1H), 7.08 (sl, 1H), 7.29-7.35 (m, 15H), 7.39-7.43 (m, 2H), 7.48-7.52 (m, 1H), 8.07-8.09 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.1, 32.6, 40.8, 53.0, 64.2, 65.5, 69.1, 70.7, 71.2, 78.4, 122.7, 126.8, 127.1, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 133.6, 134.7, 136.0, 136.2, 137.5, 139.2, 139.3, 145.9, 162.8, 167.0, 176.5, 201.3$ . EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  706.2234; Encontrada 706.2225.

Composto 5.8o: P. f. 70.3-73.6 °C.  $[\alpha]_D^{25} = +400$  ( $c$  0.375 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). IV (ATR):  $\nu = 1763, 1714, 1672, 1448 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.52 (s, 3H),

2.53 (dd,  $J = 18.8$  e  $2.8$  Hz, 1H), 3.21 (ddd,  $J = 18.8$ ,  $9.2$  e  $2.0$  Hz, 1H), 4.55-4.57 (m, 2H), 4.84 (dd,  $J = 6.8$  e  $1.2$  Hz, 2H), 6.30 (s, 1H), 6.32-6.37 (m, 1H), 6.65 (d,  $J = 16.0$  Hz, 1H), 6.92-6.94 (m, 2H), 7.27-7.41 (m, 13H), 7.45-7.51 (m, 4H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.93-7.95 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 26.1$ , 32.6, 40.8, 53.0, 64.2, 65.5, 69.1, 70.7, 71.2, 78.4, 122.7, 126.8, 127.1, 127.7, 128.2, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.7, 129.4, 133.6, 134.7, 136.0, 136.2, 137.5, 139.2, 139.3, 145.9, 162.8, 167.0, 176.5, 201.3. EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{42}\text{H}_{37}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  706.2234; Encontrada 706.2222.



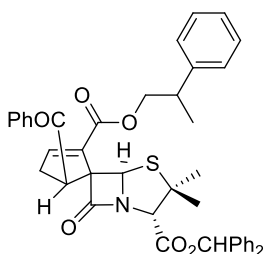
(1'*R*,6*R*)-1'-Benzoilespiro(ciclopent-3-enil)-5',6-

penicilano-2',3-dicarboxilato de 2'-(2-fenil)propilo e 3-

benzidrilo (5.7p) e (1'*R*,6*S*)-1'-benzoilespiro(ciclopent-4-

enil)-5',6-penicilano-3,4'-dicarboxilato de 4'-(2-

fenil)propilo e 3-benzidrilo (5.8p)



Preparados a partir do aleno 2,3-butadienoato de 2-fenilpropilo (**5.6p**) (0.062 g, 0.31 mmol) e do 6-alkilidenopenicilanoato **4.7a** (0.150 g, 0.31 mmol) como descrito no procedimento geral. A reação durou 72 h. A purificação do crude da reação por cromatografia de coluna [acetato de etilo/hexano (1:4)] deu por ordem de eluição o composto **5.7p** como um *fluffy* branco (0.075 g, 0.109 mmol, 35%) e o composto **5.8p** como um *fluffy* amarelo claro (0.116 g, 0.169 mmol, 55%).

Composto **5.7p**: IV (ATR):  $\nu = 1773$ , 1744, 1713, 1669  $\text{cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.16 (m, 3H) 1.51 (s, 3H), 2.85-2.92 (m, 1H), 3.10 (dt,  $J = 18.4$  e  $1.2$  Hz, 1H), 3.52 (dt,  $J = 18.8$  e  $2.4$  Hz, 1H), 3.89-4.08 (m, 2H), 4.53 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 5.11 (dd,  $J = 19.6$  e  $1.2$  Hz, 1H), 5.43 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.11-7.14 (m, 2H), 7.19-7.22 (m, 1H), 7.25-7.35 (m, 12H), 7.42-7.48 (m, 2H), 7.57-7.60 (m, 1H), 8.0-8.02 (m, 1H), 8.06-8.09 (m, 1H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 18.0$ , 26.1, 32.6, 38.9, 40.8, 52.9, 64.2, 69.1, 69.7, 69.8, 70.7, 70.8, 71.2, 78.4, 126.9, 127.1, 127.3, 127.4, 127.7, 128.3, 128.4, 128.5, 128.6, 128.6, 128.8, 129.4, 129.5, 133.6, 136.1, 137.5, 139.3, 143.1, 145.4, 167.0, 201.2. EMAR (ESI)  $m/z$ : Calculada para  $\text{C}_{42}\text{H}_{39}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  708.2390; Encontrada 708.2379.

Composto **5.8p**: IV (ATR):  $\nu = 1763, 1715, 1676, 1448 \text{ cm}^{-1}$ . RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta = 1.11$  (s, 3H), 1.26-1.31 (m, 3H), 1.51 (s, 3H), 2.49 (dd,  $J = 18.8$  e  $3.2$  Hz, 1H), 3.13-3.18 (m, 2H), 4.21-4.29 (m, 2H), 4.53-4.55 (m, 2H), 6.24 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 6.80 (t,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.95 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.19-7.25 (m, 3H), 7.27-7.35 (m, 8H), 7.40-7.51 (m, 6H), 7.58-7.62 (m, 1H), 7.93-7.95 (m, 2H). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta = 18.2, 25.9, 32.9, 33.1, 35.9, 39.0, 49.5, 62.7, 69.0, 69.8, 71.2, 74.1, 78.4, 126.8, 127.5, 128.2, 128.2, 128.6, 128.7, 128.7, 129.1, 133.7, 134.5, 134.6, 135.1, 135.2, 139.7, 143.2, 144.5, 162.7, 166.8, 174.4, 198.4$ . EMAR (ESI) m/z: Calculada para  $\text{C}_{42}\text{H}_{39}\text{NNaO}_6\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  708.2390; Encontrada 708.2378.

## 7.7. Ensaios de bioatividade *in vitro*

Os estudos de bioatividade contra o HIV foram realizados em colaboração com o grupo de investigação “Evolução, Prevenção e Epidemiologia do HIV” (iMed.Lisboa), sob a supervisão do Prof. Nuno Taveira. Por sua vez, os estudos de bioatividade contra o *Plasmodium* foram realizados em colaboração com o grupo de investigação “Prudêncio Lab”, sob a supervisão do Prof. Miguel Prudêncio.

### 7.7.1. Cultura de células

As células TZM-bl (AIDS Research and Reference Reagent Program, National Institutes of Health, EUA) e as células HEK293T (American Type Culture Collection) foram cultivadas num meio de cultura contendo DMEM (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-streptomicina (Gibco/Invitrogen, EUA), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco/Invitrogen, EUA), 2 mM de L-glutamina ((Gibco/Invitrogen, EUA), e 1 mM de aminoácidos não essenciais ((Gibco/Invitrogen, EUA). No caso das PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), obtidas de doadores de sangue saudáveis, foram separadas por centrifugação de gradiente de densidade Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA) e foram estimuladas durante 3 dias com 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fitohemaglutinina (PHA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As culturas de PBMCs foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina-streptomicina, 2 mM de L-glutamina, 0.3 mg/mL de gentamicina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de polibrene, ou brometo de hexadimetrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), e 20 U/mL de interleucina-2 recombinante (Roche, Basel, Suíça). Por fim, as células Huh-7,

uma linha celular de hepatócitos humanos, foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen), 1% v/v de aminoácidos não essenciais (Gibco/Invitrogen), 1% (v/v) de penicilina-estreptomicina (Gibco/Invitrogen), 1% (v/v) de glutamina (Gibco/Invitrogen) e 1% (v/v) de tampão HEPES, a pH 7. Todas as culturas de células foram mantidas a 37 °C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **7.7.2. Ensaio de viabilidade celular**

A citotoxicidade *in vitro* das espiro-β-lactamas foi avaliada em células TZM-bl e Huh-7, utilizando o reagente alamarBlue (Life Technologies, USA).<sup>16</sup> As células foram incubadas na presença e ausência de diluições em série de cada uma das espiro-β-lactamas. Foram executados pelo menos dois ensaios independentes para cada análise de citotoxicidade. Cada diluição foi feita em triplicado. Cada ensaio teve um controlo de meio (apenas meio de cultura), um controlo apenas de células (células sem o composto a testar), e um controlo citotóxico (células incubadas com um composto citotóxico). A citotoxicidade de cada composto foi apresentada como valor de CC<sub>50</sub>, que diz respeito à concentração de composto à qual há uma diminuição em 50% da viabilidade celular.

### **7.7.3. Ensaio de atividade anti-HIV**

Os isolados primários de HIV-1 e HIV-2 utilizados ao longo deste trabalho foram previamente descritos e caracterizados relativamente à utilização de co-receptor e suscetibilidade a fármacos anti-retrovirais. A estirpe SG3.1 do subtipo B do HIV-1 foi obtida pela transfeção de células HEK293T com um plasmídeo pSG3.1 utilizando o reagente de transfeção jetPrime (Polyplus-transfection SA, Ilkirch, França), de acordo com as instruções do fabricante. A dose infecciosa em cultura celular 50% (TCID<sub>50</sub>) de cada vírus foi determinada através de um ensaio de infecciosidade viral *single-round* em células TZM-bl utilizando um gene da Luciferase,<sup>17,18</sup> sendo o valor calculado de acordo com o método estatístico de Reed e Muench<sup>19</sup>.

A atividade antiviral das espiro-β-lactamas foi determinada num ensaio de infecciosidade viral do tipo *single-round* em células TZM-bl, como descrito na literatura.<sup>17,18,20</sup> Resumidamente, as células TZM-bl foram infectadas com 200 TCID<sub>50</sub> de vírus do HIV-1 ou HIV-2 na presença de diluições em série de cada uma das espiro-β-lactamas no meio de cultura, suplementado com DEAE-dextrano. Após 48 h de infeção, a expressão de luciferase foi quantificada com o kit Pierce Firefly Luc One-Step Glow

Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Rockford, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Relativamente aos ensaios em PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), as células foram obtidas de doadores de sangue. As células foram estimuladas com fitohemaglutinina e infetadas com 200 TCID<sub>50</sub> de vírus do HIV-1 na presença de diluições em série de uma das espiro-β-lactamas no meio de cultura, seguindo-se uma incubação de 7-15 dias. A replicação viral foi medida utilizando um ensaio de antigénio p24 (INNOTEST HIV Antigen mAb; Innogenetics, Ghent, Bélgica).

Pelo menos dois ensaios independentes foram feitos para cada análise de atividade antiviral. Para cada vírus e diluição dos compostos, o ensaio foi feito em poços triplicados.

#### **7.7.4. Estudos de tempo de adição**

Com o intuito de investigar o mecanismo de ação da espirociclopentenil-β-lactama BSS-730A foram feitos estudos de tempo de adição em células TZM-bl e utilizando a estirpe SG3.1 de HIV-1, num procedimento de acordo com a literatura.<sup>21,22</sup> Foram utilizados como controlo fármacos anti-retrovirais, nomeadamente o péptido P3, um inibidor de fusão, TDF, um inibidor nucleósido da transcriptase reversa, o RAL, inibidor da integrase, e o DRV, inibidor da protease. A molécula BSS-730A e os fármacos anti-retrovirais utilizados como controlo foram adicionados em vários pontos de tempo antes (-3, -2, -1.5, -1 e -0.5 h) e depois da infeção viral (0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 18, 24 h). No último, o composto foi adicionado a ambas células e vírus, separadamente. Quando adicionado apenas às células, foi feito um passo adicional de lavagem com PBS (2 x 200 mL) anterior ao procedimento de infeção. O composto BSS-730A e os compostos controlo foram adicionados numa concentração correspondente a duas vezes o seu valor de IC<sub>90</sub>. A inibição de infeção foi quantificada 48 h após a infeção, tal como descrito anteriormente.

#### **7.7.5. Inibição da infeção de *P. berghei* na fase hepática**

A atividade inibitória dos compostos testados contra a fase hepática da infeção por *P. berghei in vitro*, foi determinada pela comparação a carga de parasita em células Huh7 infetadas, na ausência e na presença dos compostos. A carga de parasita foi avaliada usando um protocolo baseado na medição da bioluminescência de lisados de células Huh-7, 48 horas após infeção com linhas de *P. berghei* geneticamente modificadas para

expressar luciferase (PbLuc), como descrito na literatura.<sup>23,24</sup> Resumidamente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com uma concentração de  $1.0 \times 10^4$  células por poço, no dia anterior ao tratamento com os compostos e infecção. O meio de cultura foi substituído por meio contendo os compostos nas concentrações desejadas, 1 hora antes da infecção com esporozoítos obtidos no momento pela disrupção das glândulas salivares de mosquitos *Anopheles stephensi* fêmea infetados. A adição dos esporozoítos foi seguida de uma centrifugação a  $1700 \times g$  durante 5 minutos. Após um período de incubação de 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  na presença de 5% de  $\text{CO}_2$ , a carga de parasita foi medida por um ensaio de bioluminescência com um kit de ensaio da luciferase (Biotium). O efeito dos compostos na viabilidade das células Huh-7 foi determinando usando o ensaio de Alamar Blue, seguindo os protocolos disponibilizados pelo fornecedor. A atividade dos compostos foi preliminarmente avaliada a 0.1, 1, 5 e  $10\ \mu\text{M}$ , e os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram determinados pela avaliação da atividade dos compostos num total de 7 diferentes concentrações que variaram entre os 0.1 e os  $10\ \mu\text{M}$ .

#### **7.7.6. Inibição da infecção de *P. falciparum* na fase sanguínea**

Culturas sincronizadas no estágio de anel da estirpe NF54 do *P. falciparum* a um hematócrito de 2.5% e parasitemia de 1%, foram incubadas com as espiro- $\beta$ -lactamas ou DMSO em placas de 96 poços, durante 48 h a  $37^\circ\text{C}$  numa atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e 5% de  $\text{O}_2$ . As soluções stock de cloroquina (controlo positivo) e das espiro- $\beta$ -lactamas foram preparadas em DMSO. As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções stock num meio de cultura CMCM (*Complete Malaria Culture Medium*), que consiste em RPMI 1640 suplementado com 25 mM de HEPES, 2.4 mM de L-glutamina, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicina, 0.5% w/v Albumax, 11 mM de glucose, 1.47 mM hipoxantina e 37.3 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Para cada medição 5  $\mu\text{L}$  da cultura (aproximadamente 800 000 células) foram coradas com o corante DNA-específico SYBR Green I. Após 20 minutos de incubação no escuro, a amostra corada foi analisada por citometria de fluxo. Foram analisados aproximadamente 100 000 eventos em cada medição de citometria de fluxo. Foram feitos dois ensaios independentes a todas as amostras foram analisadas em triplicado.

#### **7.7.7. Determinação dos valores de $\text{IC}_{50}$ e $\text{IC}_{90}$**

O tratamento dos dados estatísticos referentes às curvas de dose-resposta foi efetuado usando o GraphPad Prism versão 5.01 para o sistema operativo Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)), com um nível



de significância de 5%. Os valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> foram estimados pela equação sigmoide de dose-resposta.

### **7.7.8. Ensaio *singlet-target* contra uma protéase recombinante do HIV**

A espirociclopentenil- $\beta$ -lactama BSS-730A foi testada para a sua atividade inibitória contra a protéase do HIV-1, recorrendo a um ensaio fluorométrico. O composto foi testado a uma concentração de 10  $\mu$ M. O ensaio foi feito de acordo com um procedimento da literatura.<sup>25</sup> O efeito inibidor da protéase foi calculado pela percentagem de inibição da atividade da enzima, sendo que uma percentagem superior a 50% é considerada como indicadora de uma ação inibitória por parte do composto testado.

## **7.8. Estudos computacionais**

### **7.8.1. Cálculos conformacionais de energia mínima**

De modo a explorar a estrutura e conformação preferencial de diversas espiro- $\beta$ -lactamas, foram efetuados cálculos de química quântica. Num primeiro passo, foi gerado um confórmero de baixa energia de cada uma das espiro- $\beta$ -lactama a analisar utilizando o *software* Omega, da Open Eye<sup>26,27</sup>. Estas estruturas de baixa energia foram então otimizadas ao nível de teoria DFT, utilizando o funcional híbrido B3LYP<sup>28-30</sup> e o conjunto básico 6.31G(d). Todos os cálculos foram feitos utilizando o pacote de programas GAMESS<sup>31</sup>. As representações gráficas foram produzidas com o *software* Discovery Studio Visualizer v20.1.0.19295<sup>32</sup>.

### **7.8.2 Construção de uma biblioteca química virtual de compostos bioativos com alvo molecular conhecido**

Em primeiro lugar, toda a informação de bioatividade da base de dados ChEMBL<sup>33</sup> (versão 25) foi descarregada em formato CSV. Esta base de dados foi filtrada de acordo com valores de atividade limite, indicativos de que o composto seja considerado ativo, de forma a obter uma nova biblioteca química contendo apenas os compostos que apresentem pelo menos um resultado de atividade relevante. Os valores de atividade limite foram definidos de acordo com a literatura, considerando-se como ativo uma molécula apresentando um valor de atividade inferior a 10  $\mu$ M para Ki, IC<sub>50</sub>, GI<sub>50</sub>, AC<sub>50</sub> e Potency (em português Potência).<sup>34</sup> Nos casos em que os valores de atividade são expressos em percentagem, como é o caso da Inhibition ou Activity (em português Inibição e Atividade, respetivamente), o valor limite inferior definido foi de 50%,

enquanto no caso da MIC (do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*, traduzido em português por Concentração Mínima Inibitória), o valor limite inferior definido foi de 8 mg/mL.<sup>34</sup> De modo a facilitar o processo, a filtração foi feita individualmente para cada um dos tipos de atividade. Este procedimento originou diferentes conjuntos de resultados respetivos a cada uma das atividades que foram posteriormente filtrados de forma a manter apenas os compostos com alvo molecular conhecido. Os ficheiros individuais obtidos no passo anterior foram então concatenados num só ficheiro que foi sujeito a uma remoção dos duplicados com base no ChEMBL ID, resultando na biblioteca química final contendo apenas compostos bioativos com alvo molecular conhecido.

Após a criação da biblioteca química virtual contendo os dados de bioatividade de todos os compostos ativos da ChEMBL, as suas respetivas estruturas moleculares em 2D foram descarregadas do repositório da ChEMBL e combinadas num único ficheiro em formato SDF. Esta biblioteca de compostos ativos foi sujeita a um procedimento de normalização estrutural com recurso ao *software* OpenBabel<sup>35</sup>, que compreendeu a centralização de coordenadas, a remoção de sais e pequenos fragmentos, remoção e subsequente adição de hidrogénios explícitos e conversão de ligações dativas (e.g.  $[N^+][O^-]=O$  para  $N(=O)=O$ ). Finalmente, e com recurso ao *software* Cxcalc da ChemAxon<sup>36</sup>, foi determinada a microespécie maioritária de cada composto a pH = 7.4.

O ficheiro contendo a estrutura 2D dos compostos bioativos da ChEMBL, foi utilizada para construir uma biblioteca dos respetivos confórmeros, ou seja, estruturas tridimensionais de baixa energia. O procedimento de geração dos confórmeros, compreendeu um primeiro passo de conversão das estruturas moleculares do formato SDF para o formato SMI, utilizando o *software* Open Babel. De seguida procedeu-se a uma sequência preliminar de determinação de tautómeros e posterior determinação do estado de ionização da estrutura 2D de cada molécula a pH fisiológico, com recurso às aplicações FixPka e Tautomers, respetivamente. De seguida foi gerado um confórmero de baixa energia para cada uma das moléculas em formato Mol2, utilizando a aplicação Omega, e de seguida calculou-se as cargas parciais do mesmo, pelo modelo AM1-BCC<sup>37,38</sup> utilizando a aplicação Molcharge. Após este último cálculo, procedeu-se por fim à geração de múltiplos confórmeros respetivos a cada uma das moléculas, com recurso mais uma vez à ferramenta Omega, resultando numa biblioteca contendo estruturas tridimensionais de alta qualidade em formato OEB.GZ, indicado para pesquisas de similaridade com a ferramenta ROCS. No processo de geração de confórmeros foram

utilizadas as configurações padrão do *software* nomeadamente um número máximo de 200 conformémeros por molécula e um valor de corte de RMSD de 0.5 Å, acima do qual dois conformémeros são considerados como diferentes e consequentemente retidos. À exceção do *software* Open Babel, todas as restantes ferramentas (e.g. FixPka, Tautomers, Omega, Molcharge e ROCS) referidas e utilizadas na construção da biblioteca de conformémeros estão incluídas no pacote de *software* da Open Eye.<sup>39</sup>

### **7.8.3. Pesquisa de similaridade estrutural 2D com descritores do tipo ECFP4**

Todos os compostos ativos da ChEMBL presentes na biblioteca construída em formato SDF, assim como a molécula *query* BSS-730A também gravada em formato SDF, tiveram os seus descritores moleculares circulares ECFP4<sup>40</sup> calculados e a sua similaridade quantificada utilizando o *software* CDK<sup>41</sup>.

### **7.8.4. Determinação da subestrutura máxima comum entre moléculas**

A subestrutura máxima comum entre diferentes espiro- $\beta$ -lactamas foi determinada com recurso à extensão RDKit incluída no *software* KNIME Analytics Platform.<sup>42</sup>

### **7.8.5. Pesquisa de subestrutura molecular**

Após conversão da subestrutura a pesquisar em formato SMARTS<sup>43</sup>, a biblioteca de compostos ativos da ChEMBL construída foi sujeita a uma filtração por subestrutura molecular utilizando o *software* OpenBabel, permitindo identificar quais as moléculas contendo a subestrutura desejada.

### **7.8.6. Pesquisa de similaridade 3D de forma e electroestática**

Foi gerado um conformémero de baixa energia de cada uma das espirociclopentenil- $\beta$ -lactamas utilizadas na pesquisa de similaridade 3D de forma e electroestática com a ferramenta geradora de conformémeros Omega, de acordo com o mesmo procedimento anteriormente apresentado na seção 7.8.2. Estas estruturas tridimensionais serviram de referência para o alinhamento estrutural e cálculo de similaridade tridimensional de forma, procedimentos feitos em simultâneo com a ferramenta ROCS da OpenEye. Com base nos cálculos de similaridade de forma tridimensional, foi gerado um ficheiro contendo apenas os 10,000 compostos com maior similaridade relativa à respetiva molécula referência, em formato adequado para o *software* Eon, também da Open Eye, cuja utilização permitiu o cálculo da similaridade de electroestática.

### 7.8.7. Mapeamento de farmacóforo

No procedimento de mapeamento de farmacóforo utilizou-se o *software* LigandScout 4.1, uma ferramenta de geração automática de modelos de farmacóforo baseado em ligantes.<sup>44</sup> As representações de mapeamento de farmacóforos foram obtidas considerando apenas as características farmacofóricas comuns das moléculas utilizadas no procedimento. Anteriormente ao alinhamento farmacofórico, as moléculas tiveram os seus respetivos confórmeros calculados utilizando o gerador de confórmeros iCon<sup>45</sup>, incorporado no LigandScout. Este procedimento compreendeu a geração de um máximo de 200 confórmeros por molécula, com um valor limiar de RMSD (do inglês *Root-mean-square deviation*, traduzido em português por desvio médio quadrático) de 0.8 para discriminar entre conformações duplicadas e uma janela de energia para seleção de confórmeros de 15 kcal/mol (melhor configuração padrão do *software*). Todos os confórmeros foram considerados na pesquisa do melhor alinhamento e subsequente mapeamento farmacofórico entre as moléculas.

### 7.8.8. Estudos de *docking*

Os estudos de *docking* foram realizados com recurso ao *software* AutoDock Vina<sup>46</sup> incorporado no *software* PyRx<sup>47</sup>. Foi utilizada a estrutura cristalográfica PDB 6dj1, uma estrutura da protease do HIV complexada com o ligando LPV e obtida do Protein Data Bank<sup>48</sup>. Tanto a proteína como os ligantes foram convertidos no formato pdbqt, formato próprio para ser utilizado pelo *software* AutoDock Vina. A caixa, ou *grid box*, foi definida em volta da posição do ligando cristalográfico de forma a abranger toda a cavidade do centro ativo da enzima. De forma a avaliar a capacidade preditiva do método, foi realizado um procedimento preliminar de *re-docking* de modo a comparar, por RMSD, a pose prevista pelo *software* para o ligando cristalográfico da estrutura PDB 6dj1, e a respetiva pose cristalográfica. Os resultados da energia de afinidade de ligação previstos pelo *software* são expressos em kcal/mol. As poses de *docking* previstas foram avaliadas com o *software* de visualização Chimera<sup>49</sup>.

## 7.9. Bibliografía

1. Brasile, G.; Mauri, L.; Sonnino, S.; Compostella, F.; Ronchetti, F., A practical route to long-chain non-natural  $\alpha,\omega$ -diamino acids. *Amino Acids* **2013**, *44* (2), 435-441.
2. Martín-Martínez, M.; De la Figuera, N.; Latorre, M.; Herranz, R.; García-López, M. T.; Cenarruzabeitia, E.; Del Río, J.; González-Muñiz, R.,  $\beta$ -Turned dipeptoids as potent and selective CCK1 receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (20), 3770-3777.
3. Santos, B. S.; Nunes, S. C. C.; Pais, A. A. C. C.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Chiral spiro- $\beta$ -lactams from 6-diazopenicillanates. *Tetrahedron* **2012**, *68* (19), 3729-3737.
4. Blackman, G. L.; Brown, R. D.; Brown, R. F. C.; Eastwood, F. W.; McMullen, G. L.; Robertson, M. L., Methyleneketenes and methylenecarbenes. X. Precursors for the generation of methyleneketene and deuterated methyleneketenes for microwave spectroscopy. *Aust. J. Chem* **1978**, *31*, 209-213.
5. Bártolo, I.; Santos, B. S.; Fontinha, D.; Machado, M.; Francisco, D.; Sepodes, B.; Rocha, J.; Mota-Filipe, H.; Pinto, R.; Figueira, M. E.; Barroso, H.; Nascimento, T.; Alves de Matos, A. P.; Alves, A. J. S.; Alves, N. G.; Simões, C. J. V.; Prudêncio, M.; Pinho e Melo, T. M. V. D.; Taveira, N., Spiro- $\beta$ -lactam BSS-730A displays potent activity against HIV and Plasmodium. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7* (2), 421-434.
6. Reddy, A. S.; Kumar, M. S.; Reddy, G. R., A convenient method for the preparation of hydroxamic acids. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41* (33), 6285-6288.
7. Devlin, J. P.; Ollis, W. D.; Thorpe, J. E., Studies concerning the antibiotic actinonin. Part V. Synthesis of structural analogues of actinonin by the anhydride-ester method. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1975**, (9), 846-848.
8. Santos, B. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of chiral spirocyclopentenyl- $\beta$ -lactams through phosphane-catalyzed [3+2] annulation of allenates with 6-alkylidenepenicillanates. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (18), 3901-3909.
9. Alves, A. J. S.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of novel chiral spiroisoxazolidine-beta-lactams from 6-alkylidenepenicillanates: A 1,3-dipolar cycloaddition approach. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (39), 6259-6269.
10. Rout, L.; Harned, A. M., Allene carboxylates as dipolarophiles in Rh-catalyzed carbonyl ylide cycloadditions. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15* (47), 12926-12928.
11. Lang, R. W.; Hansen, H.-J., Eine einfache allencarbonsäureester-synthese mittels der Wittig-reaktion. *Helv. Chim. Acta.* **1980**, *63* (2), 438-455.

12. Santos, B. S.; Gomes, C. S. B.; Pinho e Melo, T. M. V. D., Synthesis of chiral spiropyrazoline- $\beta$ -lactams and spirocyclopropyl- $\beta$ -lactams from 6-alkylidenepenicillanates. *Tetrahedron* **2014**, *70* (24), 3812-3821.
13. Mo, D.-L.; Wink, D. J.; Anderson, L. L., Solvent-controlled bifurcated cascade process for the selective preparation of dihydrocarbazoles or dihydropyridindoindoles. *Chem. Eur. J.* **2014**, *20* (41), 13217-13225.
14. Conner, M. L.; Brown, M. K., Synthesis of 1,3-substituted cyclobutanes by allenolate-alkene [2 + 2] cycloaddition. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (17), 8050-8060.
15. Panchal, H.; Clarke, C.; Bell, C.; Karad, S. N.; Lewis, W.; Lam, H. W., Nickel-catalyzed, ligand-free, diastereoselective synthesis of 3-methyleneindan-1-ols. *Chem. Commun. (Camb.)* **2018**, *54* (87), 12389-12392.
16. Nakayama, G. R.; Caton, M. C.; Nova, M. P.; Parandoosh, Z., Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Methods* **1997**, *204* (2), 205-208.
17. Borrego, P.; Calado, R.; Marcelino, J. M.; Bartolo, I.; Rocha, C.; Cavaco-Silva, P.; Doroana, M.; Antunes, F.; Maltez, F.; Caixas, U.; Barroso, H.; Taveira, N., Baseline susceptibility of primary HIV-2 to entry inhibitors. *Antivir. Ther.* **2012**, *17* (3), 565-70.
18. Davis, K. L.; Bibollet-Ruche, F.; Li, H.; Decker, J. M.; Kutsch, O.; Morris, L.; Salomon, A.; Pinter, A.; Hoxie, J. A.; Hahn, B. H.; Kwong, P. D.; Shaw, G. M., Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2)/HIV-1 envelope chimeras detect high titers of broadly reactive HIV-1 V3-specific antibodies in human plasma. *J. Virol.* **2009**, *83* (3), 1240-59.
19. Reed, L. J.; Muench, H., A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* **1938**, *27* (3), 493-497.
20. Borrego, P.; Calado, R.; Marcelino, J. M.; Pereira, P.; Quintas, A.; Barroso, H.; Taveira, N., An ancestral HIV-2/simian immunodeficiency virus peptide with potent HIV-1 and HIV-2 fusion inhibitor activity. *AIDS* **2013**, *27* (7), 1081-90.
21. Pannecouque, C.; Pluymers, W.; Van Maele, B.; Tetz, V.; Cherepanov, P.; De Clercq, E.; Witvrouw, M.; Debyser, Z., New class of HIV Integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr. Biol.* **2002**, *12* (14), 1169-1177.
22. HH, L.; EN, G. T.; ME, D. Z.; L, M.; L, I.-T., Luciferase time-based, high-throughput screening assay for the discovery of HIV-1 inhibitors. *J. Hum. Virol. Retrovirol.* **2014**, *1* (3), 00017.

23. Ploemen, I. H. J.; Prudêncio, M.; Douradinha, B. G.; Ramesar, J.; Fonager, J.; van Gemert, G.-J.; Luty, A. J. F.; Hermsen, C. C.; Sauerwein, R. W.; Baptista, F. G.; Mota, M. M.; Waters, A. P.; Que, I.; Lowik, C. W. G. M.; Khan, S. M.; Janse, C. J.; Franke-Fayard, B. M. D., Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PLOS ONE* **2009**, *4* (11), e7881.
24. Mendes, A. M.; Albuquerque, I. S.; Machado, M.; Pissarra, J.; Meireles, P.; Prudêncio, M., Inhibition of Plasmodium liver infection by ivermectin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (2), e02005-16.
25. Toth, M. V.; Marshall, G. R., A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1990**, *36* (6), 544-550.
26. Hawkins, P. C.; Nicholls, A., Conformer generation with OMEGA: learning from the data set and the analysis of failures. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, *52* (11), 2919-36.
27. Hawkins, P. C. D.; Skillman, A. G.; Warren, G. L.; Ellingson, B. A.; Stahl, M. T., Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J. Chem Inf. Model.* **2010**, *50* (4), 572-584.
28. Becke, A. D., Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A Gen. Phys.* **1988**, *38* (6), 3098-3100.
29. Becke, A. D., Density-functional thermochemistry. 3. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7), 5648-5652.
30. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1988**, *37* (2), 785-789.
31. Schmidt, M. W.; Baldridge, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S. J.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A., General atomic and molecular electronic-structure system. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14* (11), 1347-1363.
32. Systèmes, D. BIOVIA Discovery Studio. <https://www.3ds.com/products-services/biovia/products/molecular-modeling-simulation/biovia-discovery-studio/> (accessed 31 Dez 2020).
33. Gaulton, A.; Hersey, A.; Nowotka, M.; Bento, A. P.; Chambers, J.; Mendez, D.; Mutowo, P.; Atkinson, F.; Bellis, L. J.; Cibrián-Uhalte, E.; Davies, M.; Dedman, N.; Karlsson, A.; Magariños, M. P.; Overington, J. P.; Papadatos, G.; Smit, I.; Leach, A. R., The ChEMBL database in 2017. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *45* (D1), D945-D954.

34. Peón, A.; Dang, C. C.; Ballester, P. J., How reliable are ligand-centric methods for target fishing? *Front. Chem.* **2016**, *4* (15).
35. O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R., Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminformatics* **2011**, *3* (1), 33.
36. Weber, L., JChem Base - ChemAxon. *Chem. World* **2008**, *5* (10), 65-66.
37. Jakalian, A.; Bush, B. L.; Jack, D. B.; Bayly, C. I., Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21* (2), 132-146.
38. Jakalian, A.; Jack, D. B.; Bayly, C. I., Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23* (16), 1623-1641.
39. Inc., O. S. S. Open Eye. <https://www.eyesopen.com/> (accessed 18 Março 2021).
40. Rogers, D.; Hahn, M., Extended-Connectivity Fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (5), 742-754.
41. Willighagen, E. L.; Mayfield, J. W.; Alvarsson, J.; Berg, A.; Carlsson, L.; Jeliaskova, N.; Kuhn, S.; Pluskal, T.; Rojas-Chertó, M.; Spjuth, O.; Torrance, G.; Evelo, C. T.; Guha, R.; Steinbeck, C., The Chemistry Development Kit (CDK) v2.0: atom typing, depiction, molecular formulas, and substructure searching. *J. Cheminformatics* **2017**, *9* (1), 33.
42. Berthold, M. R.; Cebron, N.; Dill, F.; Gabriel, T. R.; Kotter, T.; Meinl, T.; Ohl, P.; Sieb, C.; Thiel, K.; Wiswedel, B., KNIME: The Konstanz Information Miner. In *Data Analysis, Machine Learning and Applications. Studies in Classification, Data Analysis, and Knowledge Organization.*, Springer, Berlin, Heidelberg: **2008**; 319-326.
43. Schmidt, R.; Ehmki, E. S. R.; Ohm, F.; Ehrlich, H.-C.; Mashychev, A.; Rarey, M., Comparing molecular patterns using the example of SMARTS: Theory and algorithms. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59* (6), 2560-2571.
44. Wolber, G.; Langer, T., LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**, *45* (1), 160-169.
45. Poli, G.; Seidel, T.; Langer, T., Conformational sampling of small molecules with iCon: Performance assessment in comparison with OMEGA. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 229.



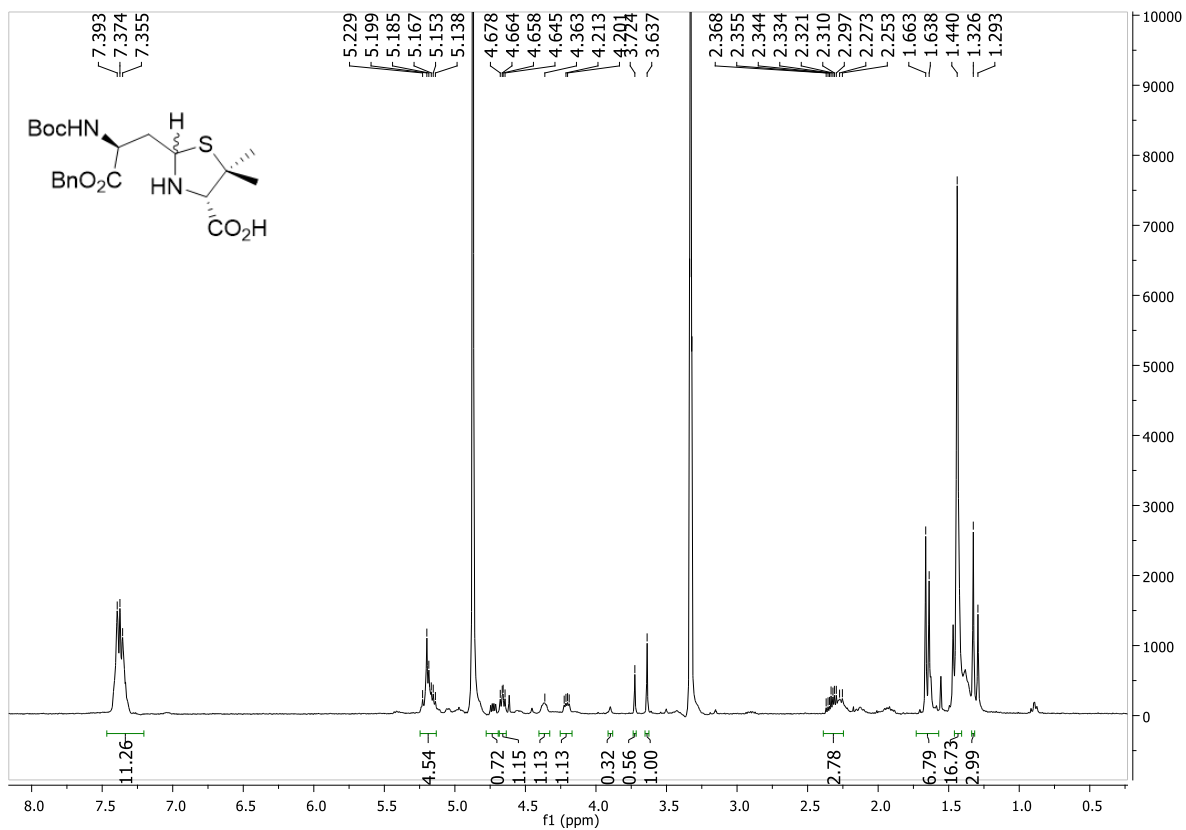
46. Trott, O.; Olson, A. J., AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455-461.
47. Dallakyan, S.; Olson, A. J., Small-Molecule library screening by docking with PyRx. In *Chemical Biology: Methods and Protocols*, Hempel, J. E.; Williams, C. H.; Hong, C. C., Eds. Humana Press Inc: Totowa, 2015; Vol. 1263, pp 243-250.
48. Goodsell, D. S.; Burley, S. K., RCSB Protein Data Bank tools for 3D structure-guided cancer research: human papillomavirus (HPV) case study. *Oncogene* **2020**, *39* (43), 6623-6632.
49. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1605-1612.

# Anexos

## **Anexos**

- Anexo 1.** Espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e 2D representativos dos novos compostos 294
- Anexo 2.** Cálculos computacionais teóricos ao nível de teoria DFT – Geometrias otimizadas, energia mínima e coordenadas cartesianas 389
- Anexo 3.** Alves N. G.; Mata A. I.; Luís J. P.; Brito R. M. M.; Simões C. J. V., An Innovative Sequence-to-Structure-Based Approach to Drug Resistance Interpretation and Prediction: The Use of Molecular Interaction Fields to Detect HIV-1 Protease Binding-Site Dissimilarities. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 243. 413

**Anexo 1. Espectros de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e 2D representativos dos novos compostos**



**Figura 1** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **3.22** (CD<sub>3</sub>OD).

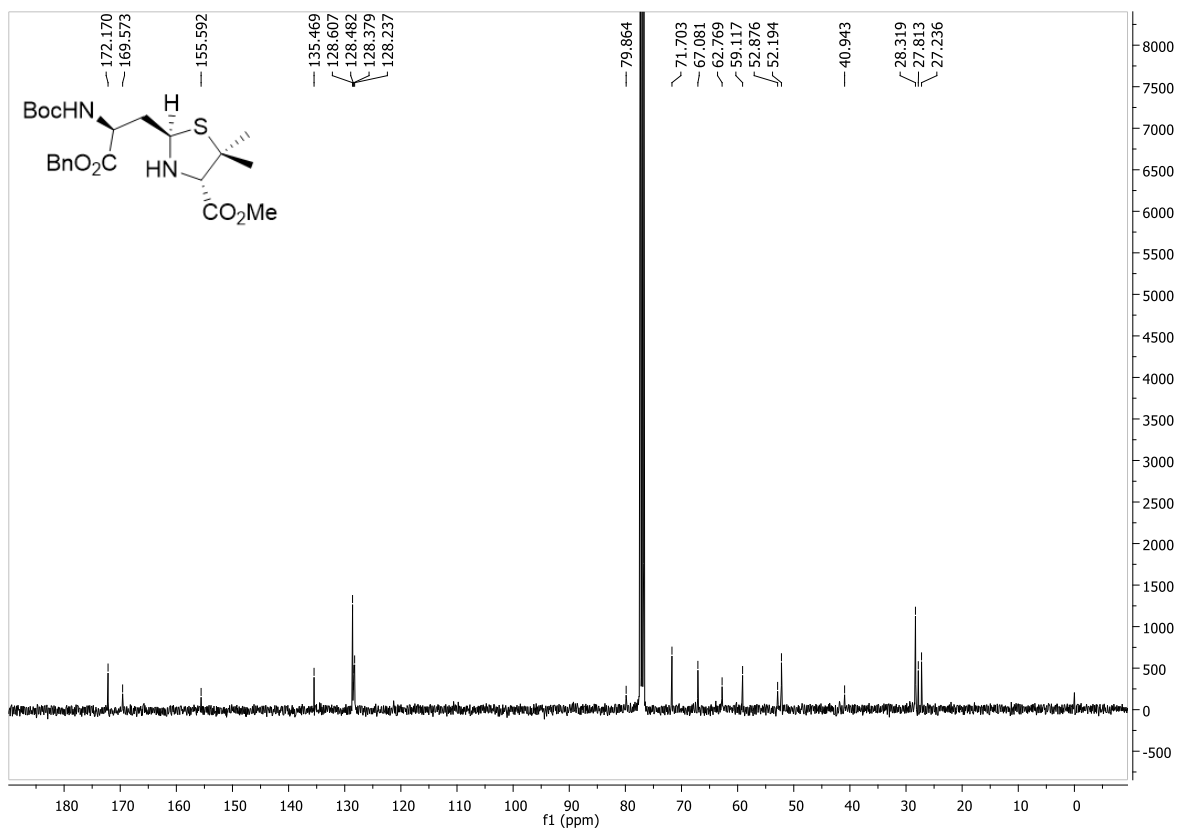
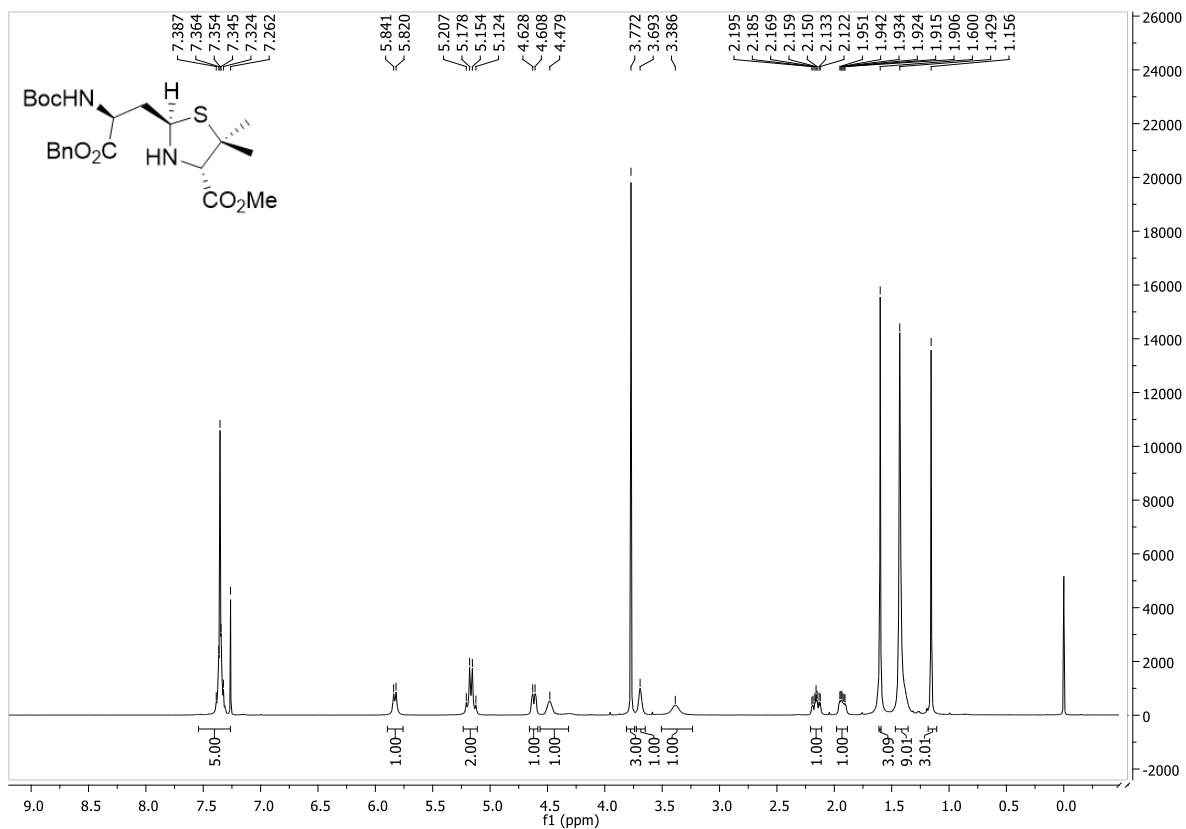
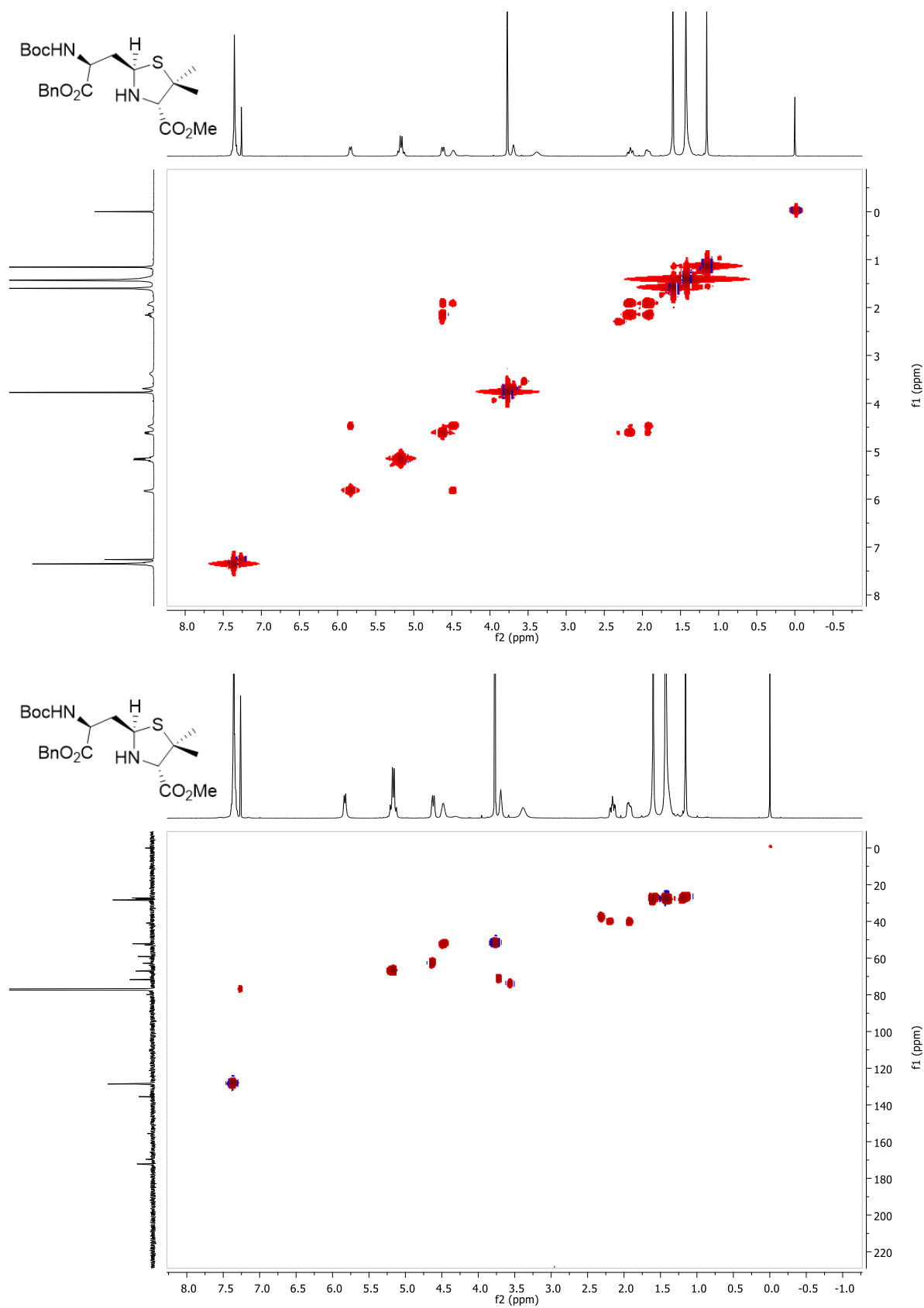
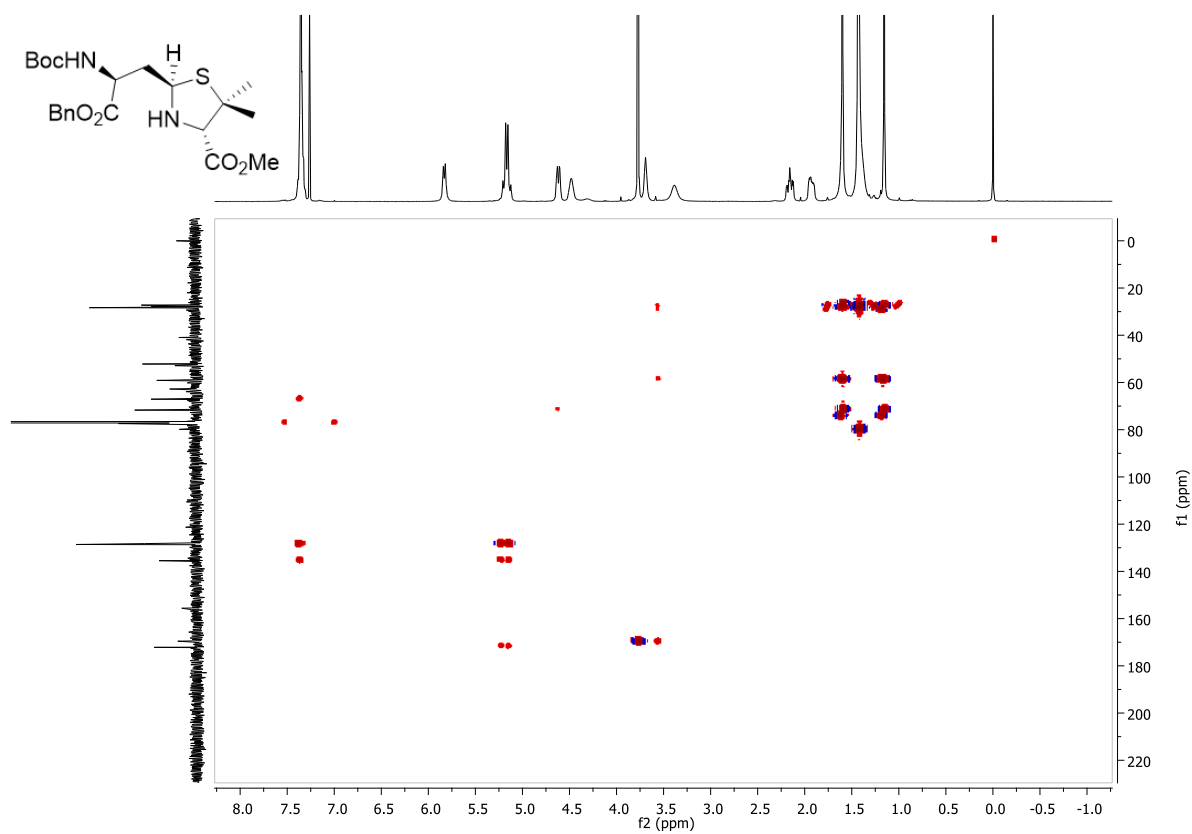


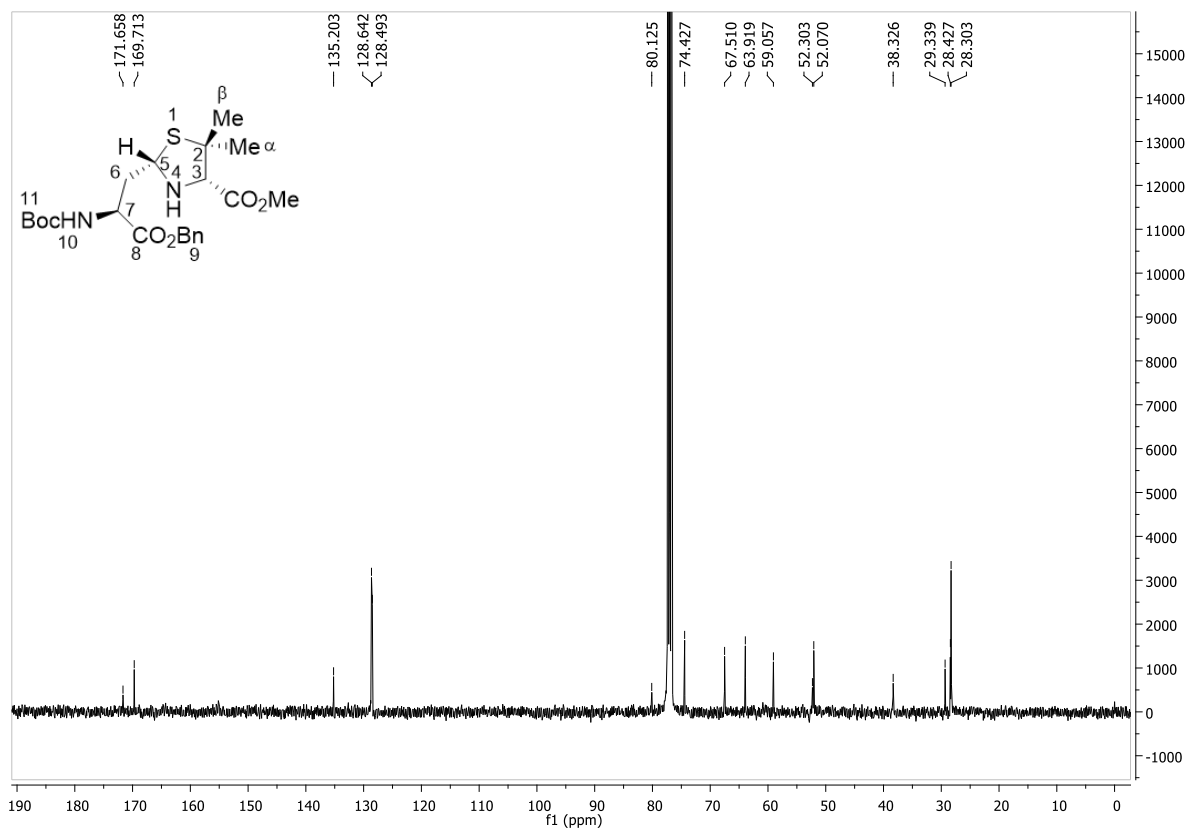
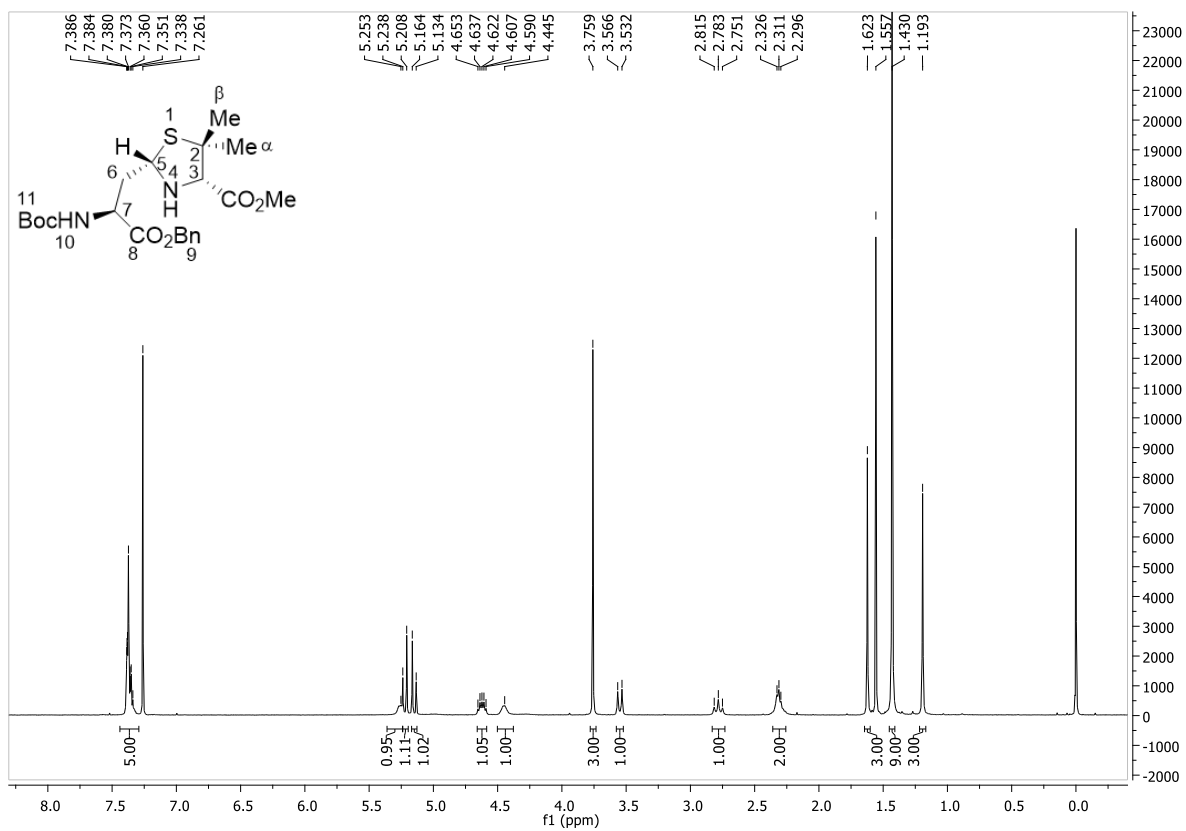
Figura 2 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **3.30a** ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 3** - Espectros de COSY e HSQC do composto **3.30a** (CDCl<sub>3</sub>).

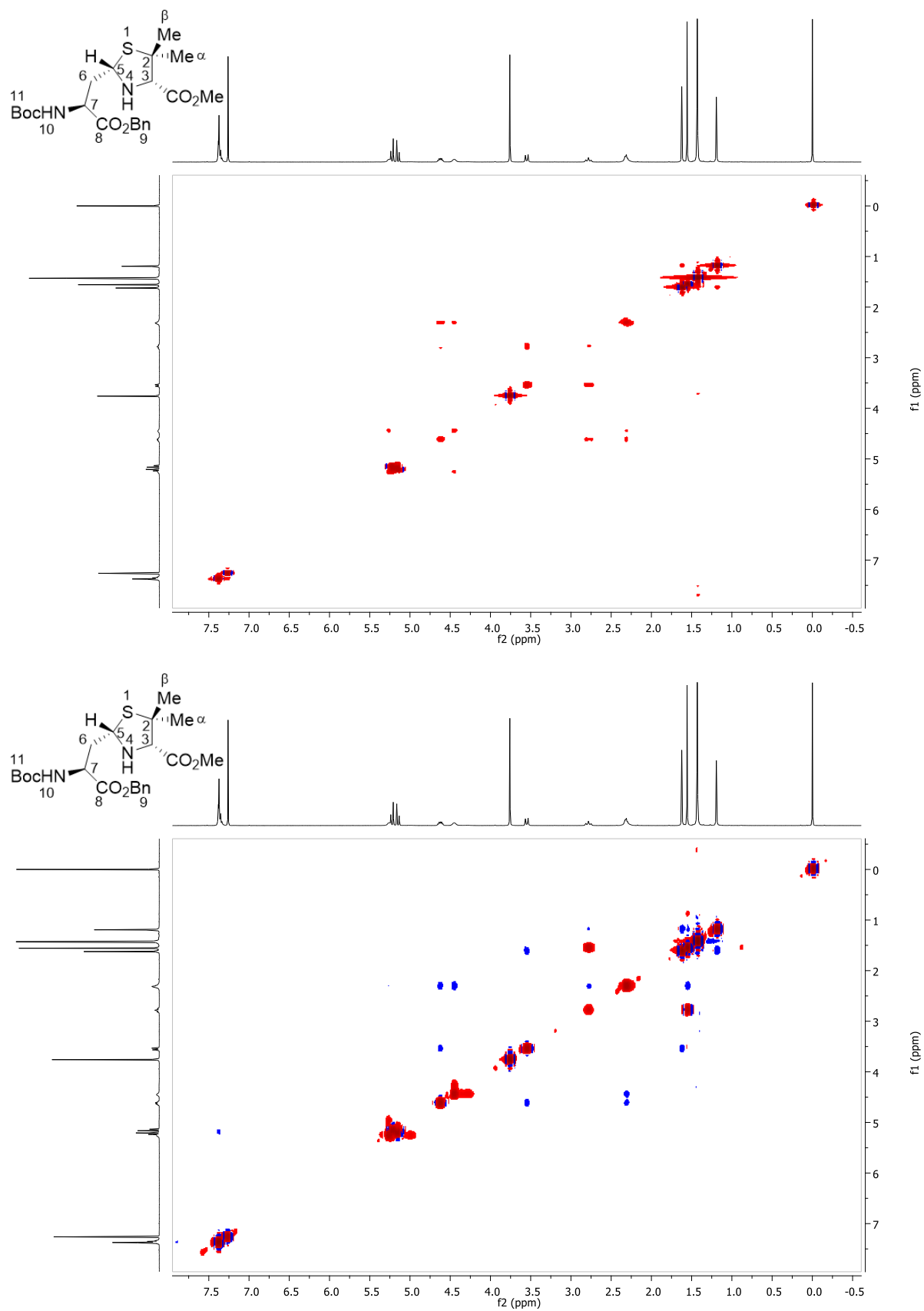


**Figura 4** - Espectro de HMBC do composto **3.30a** (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 5** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **3.30b** (CDCl<sub>3</sub>).





**Figura 6** - Espectros de COSY e NOESY do composto **3.30b** ( $\text{CDCl}_3$ ).

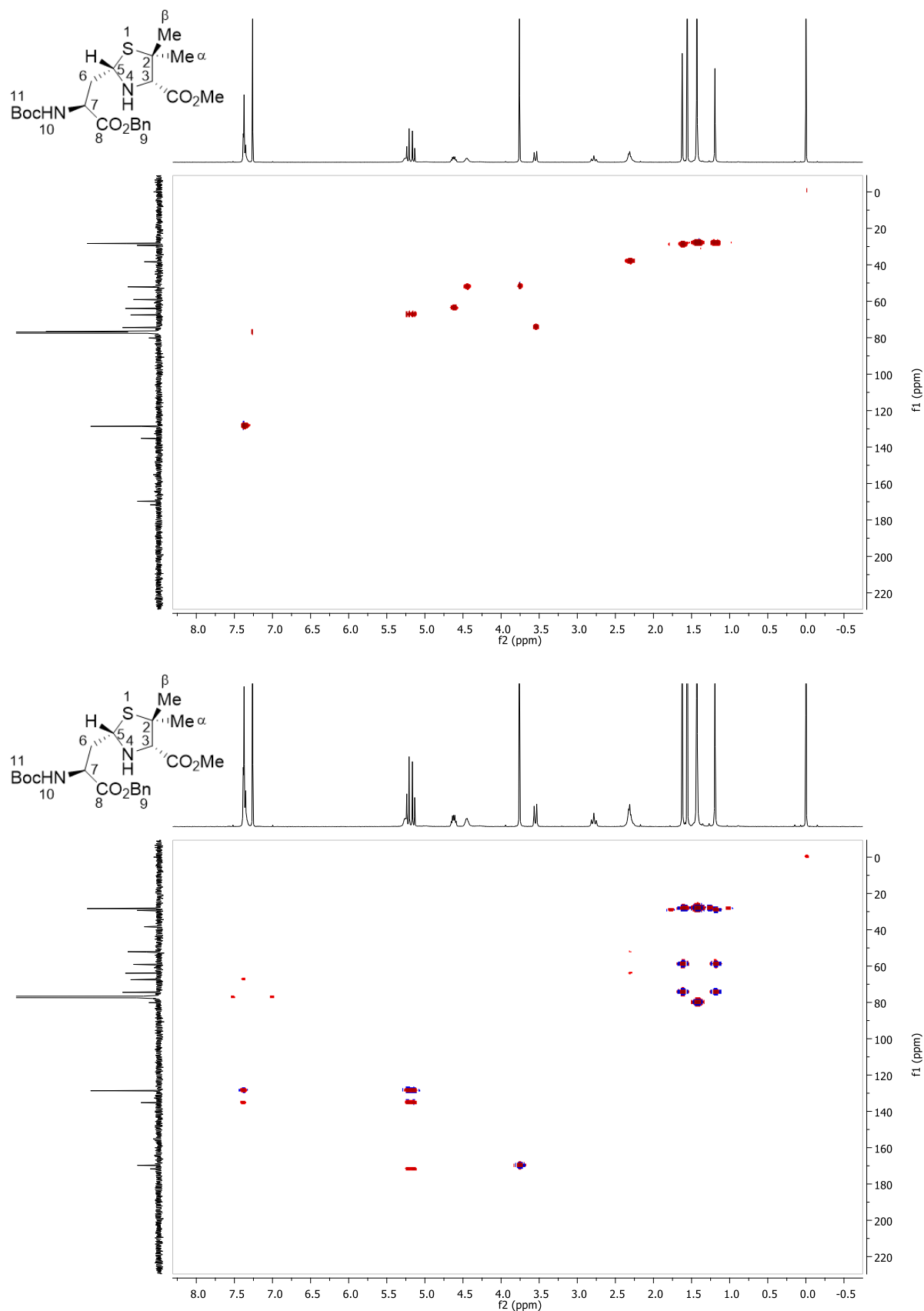


Figura 7 - Espectros de HSQC e HMBC do composto **3.30b** ( $\text{CDCl}_3$ ).

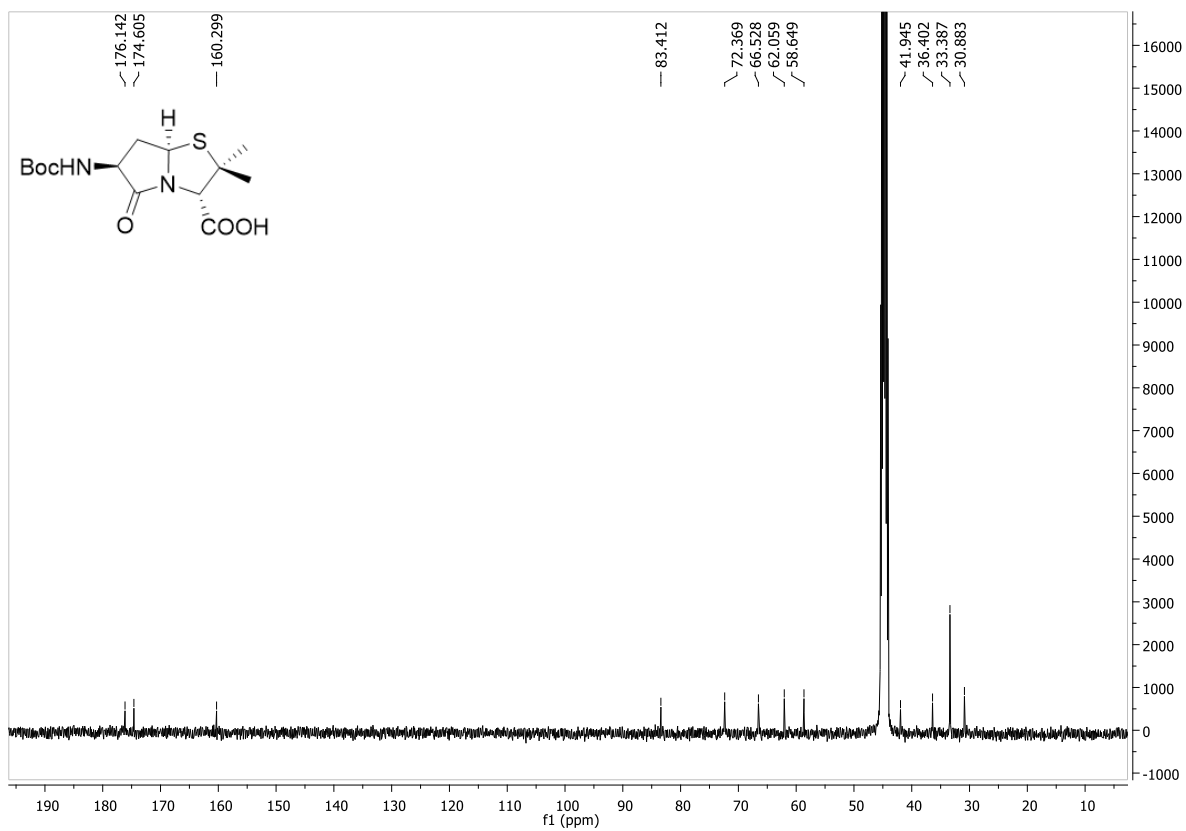
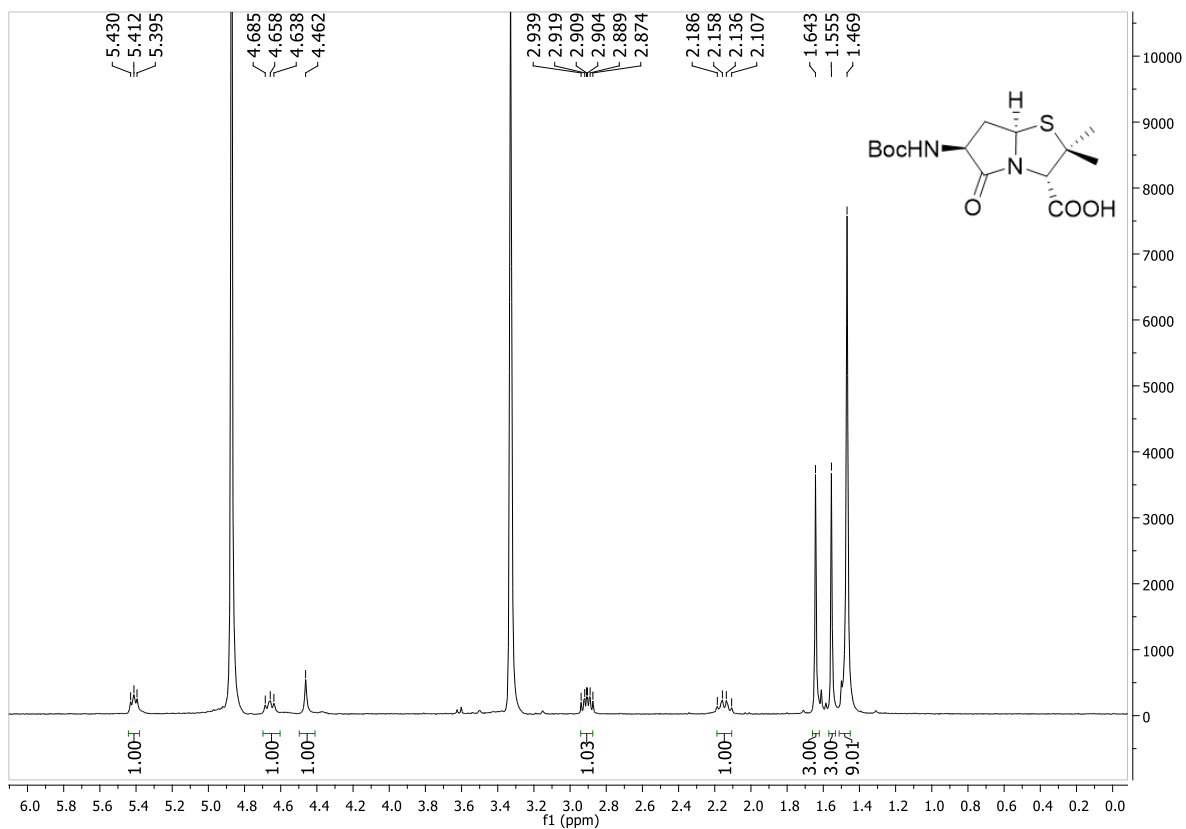


Figura 8 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 3.23 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

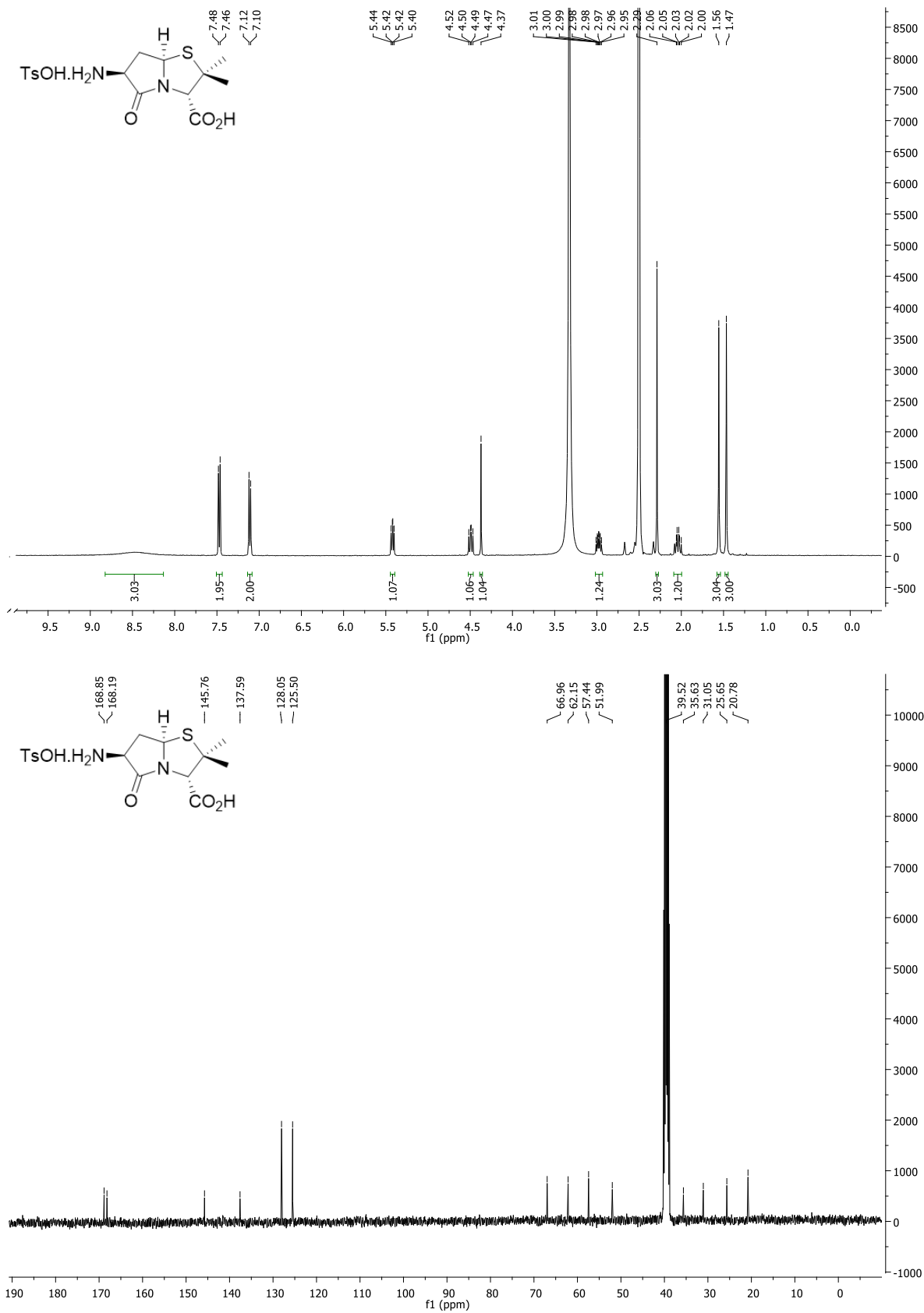


Figura 9 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 3.24 (DMSO-d<sub>6</sub>).

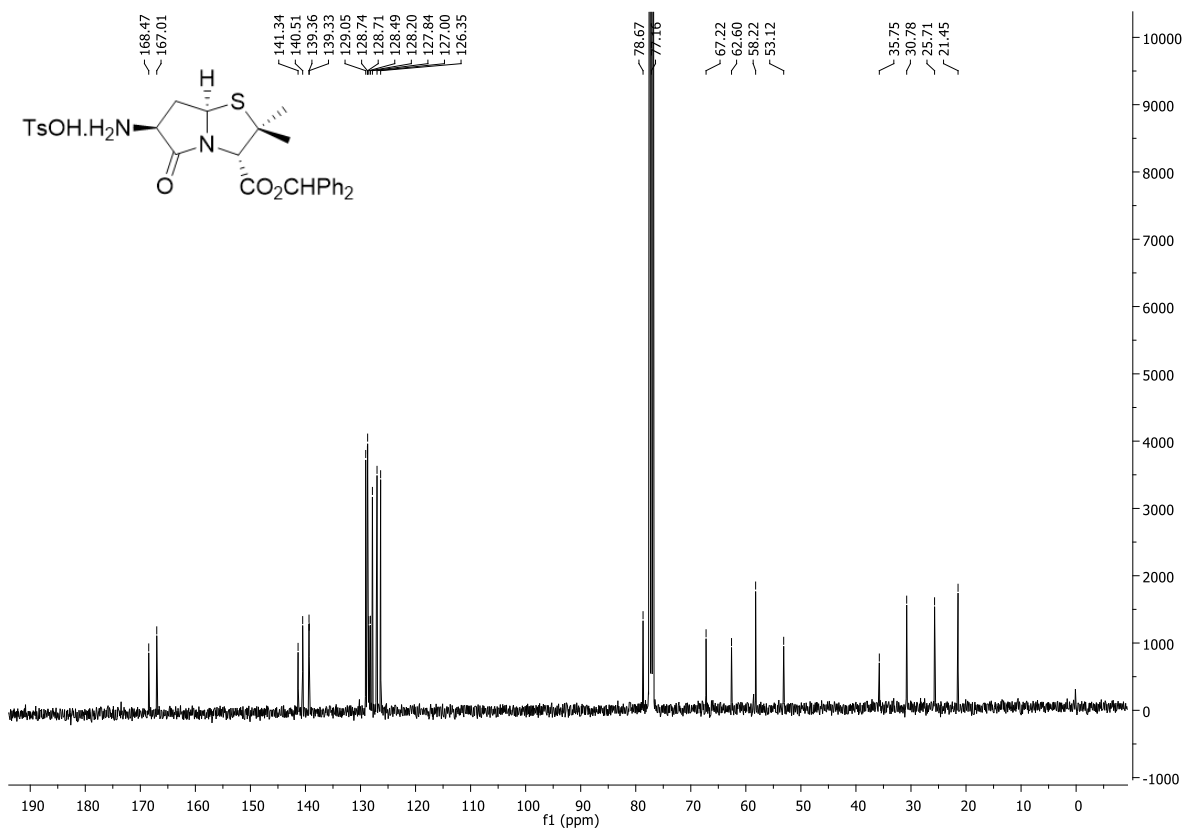
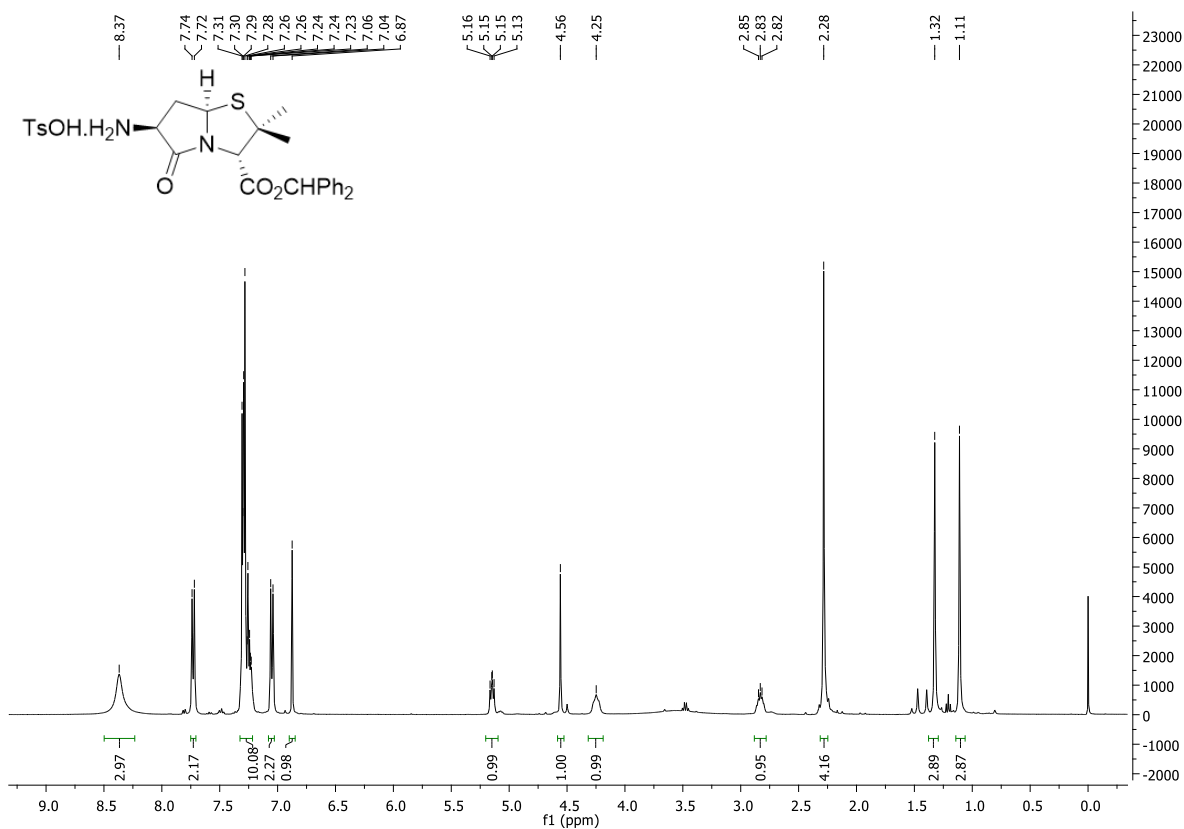


Figura 10 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 3.26 (CDCl<sub>3</sub>).

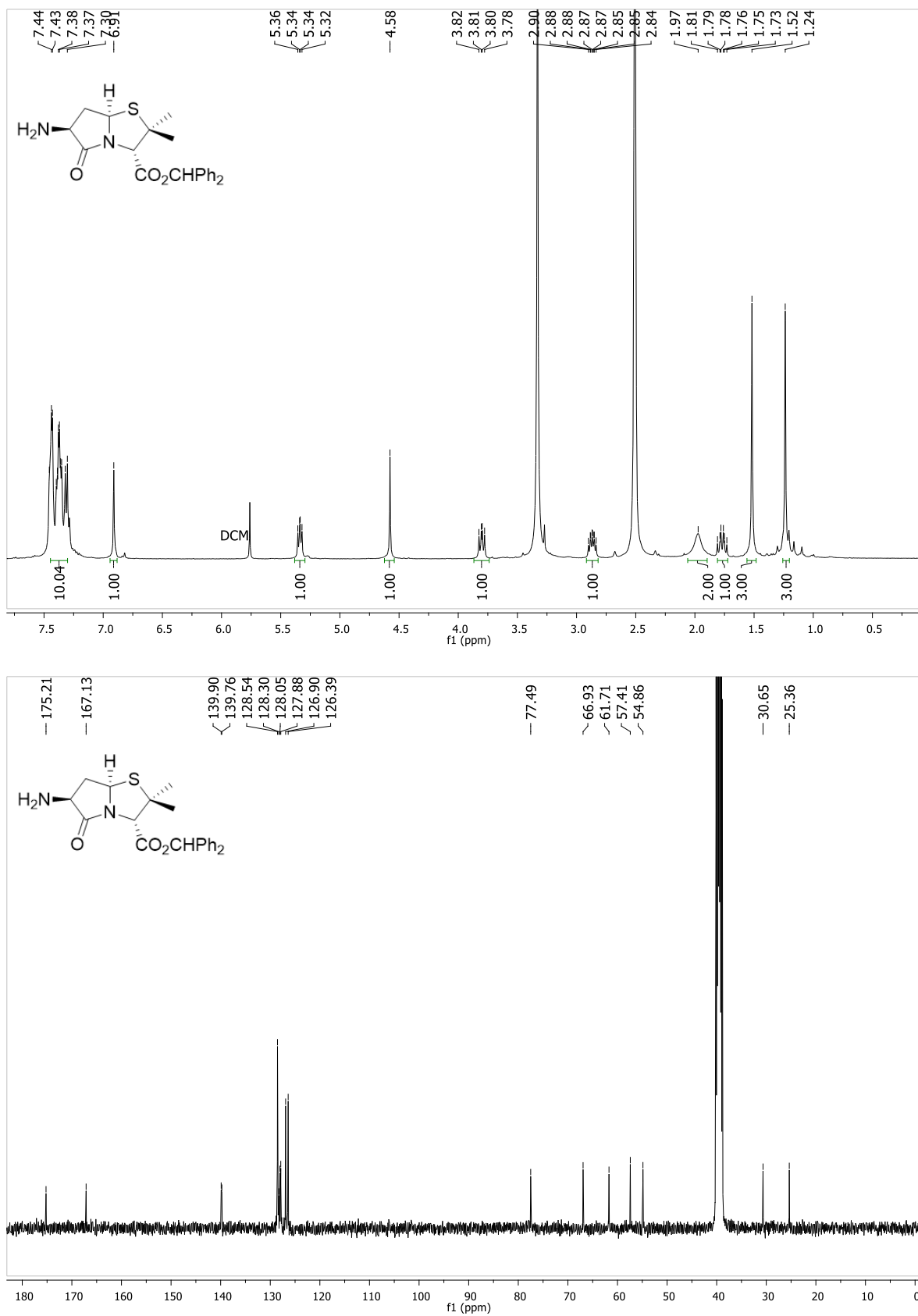


Figura 11 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 3.27 (DMSO-d<sub>6</sub>).

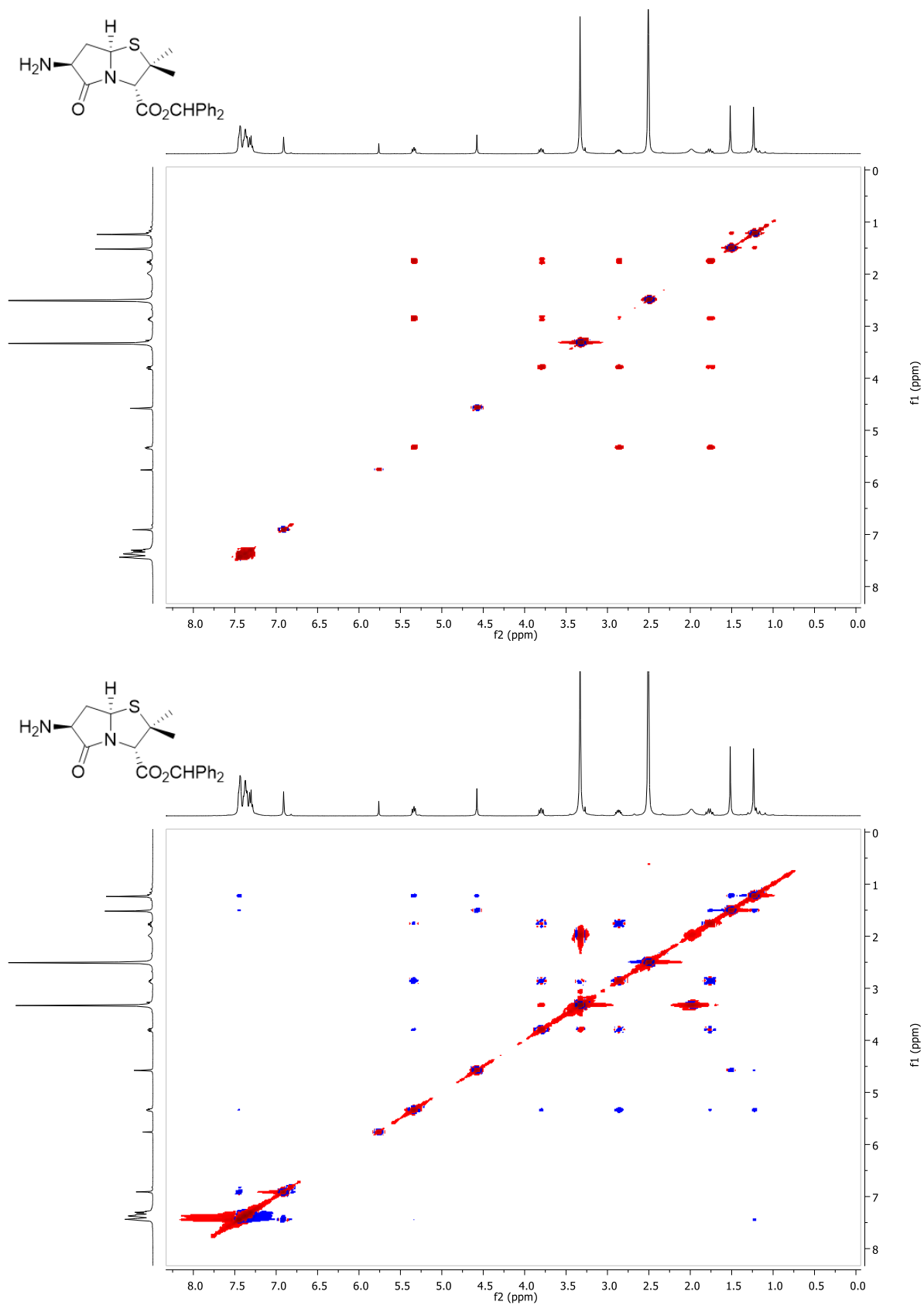


Figura 12 - Espectros de COSY e NOESY do composto 3.27 ( $\text{DMSO-d}_6$ ).

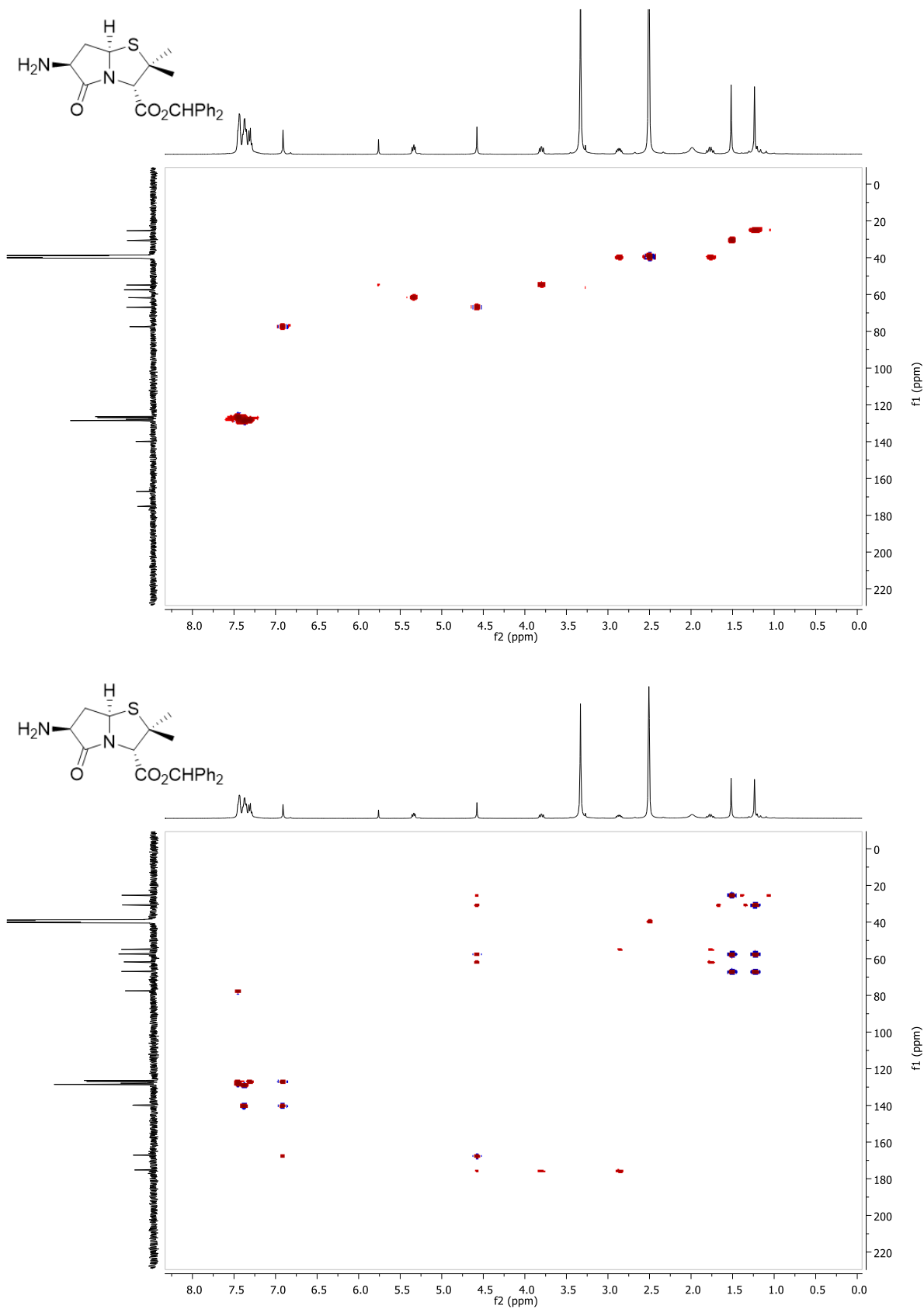


Figura 13 - Espectros de HSQC e HMBC do composto **3.27** (DMSO-*d*<sub>6</sub>).



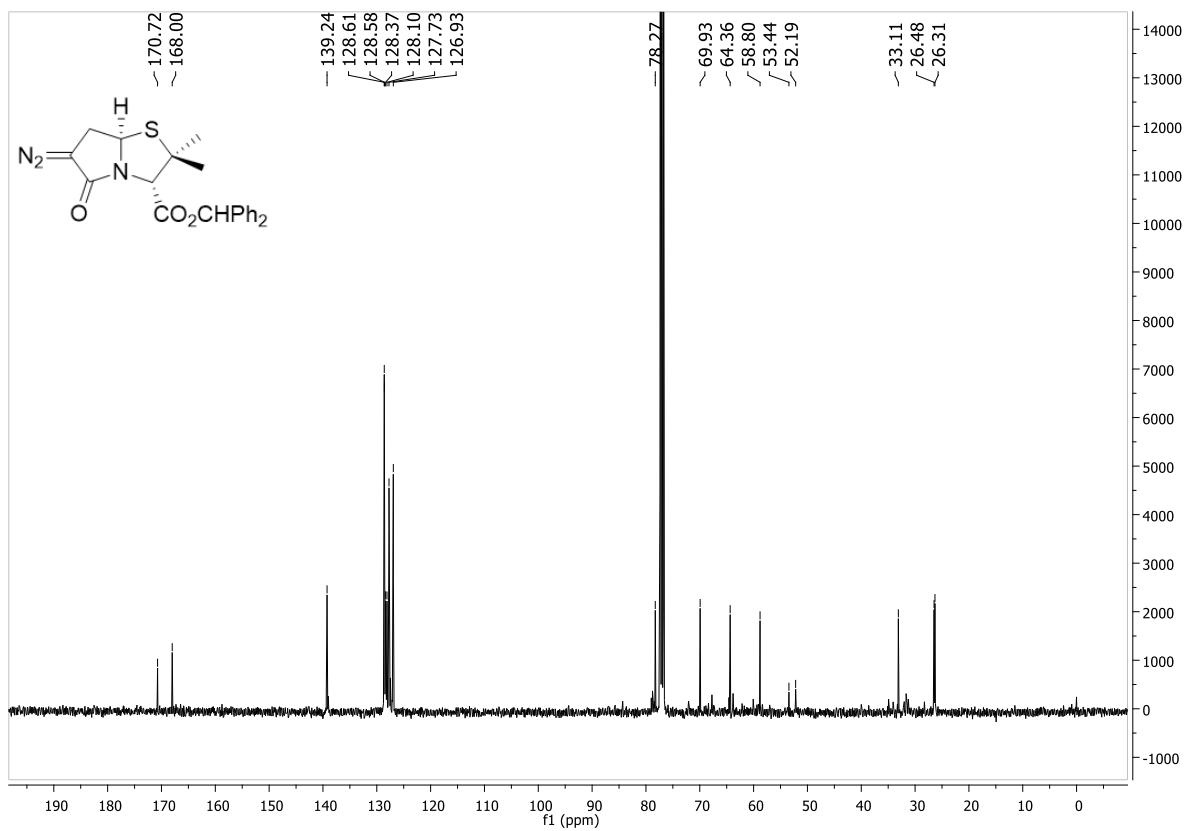
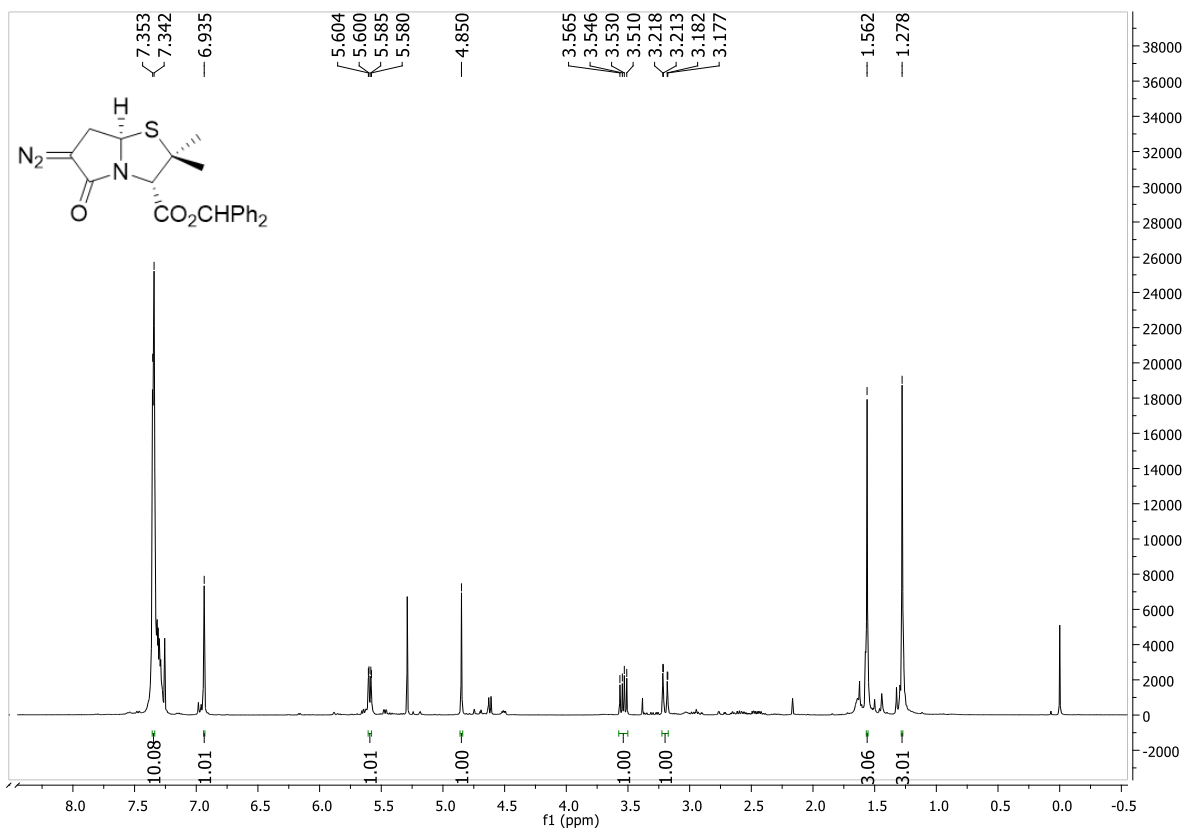


Figura 14 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 3.28 ( $\text{CDCl}_3$ ).

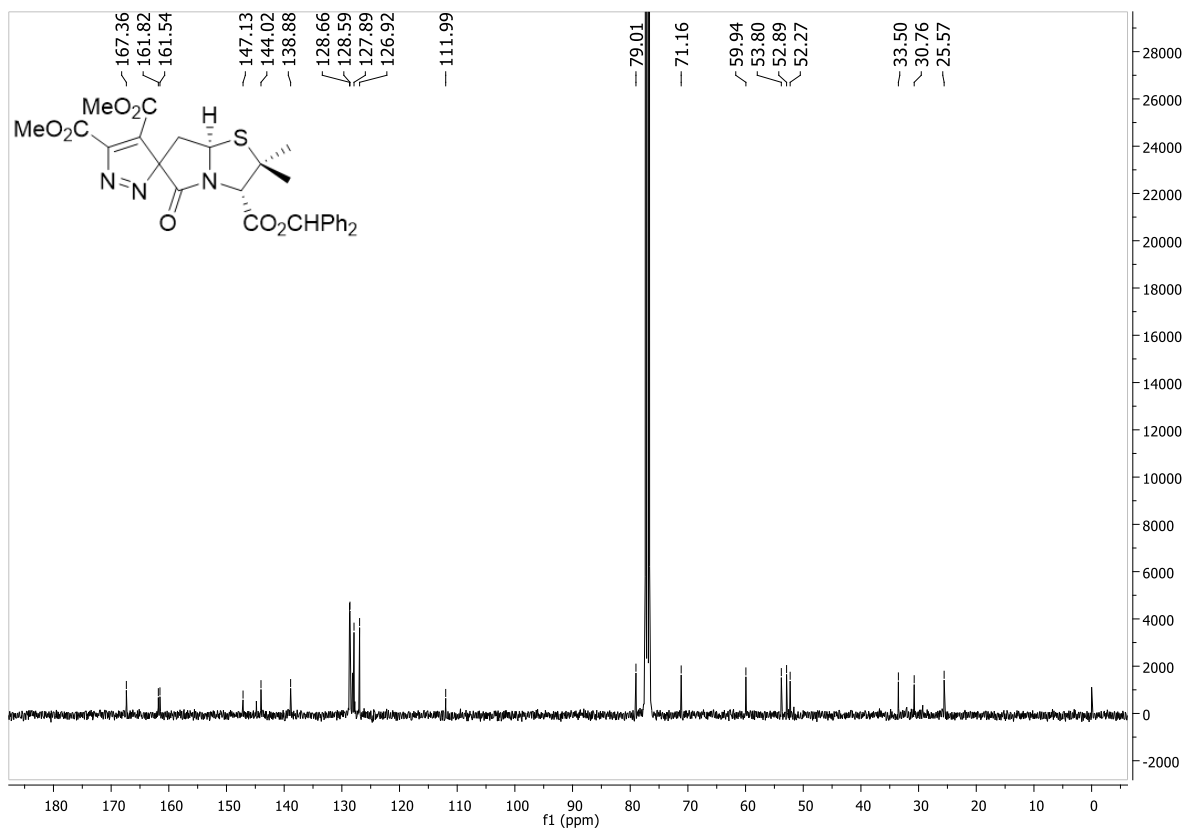
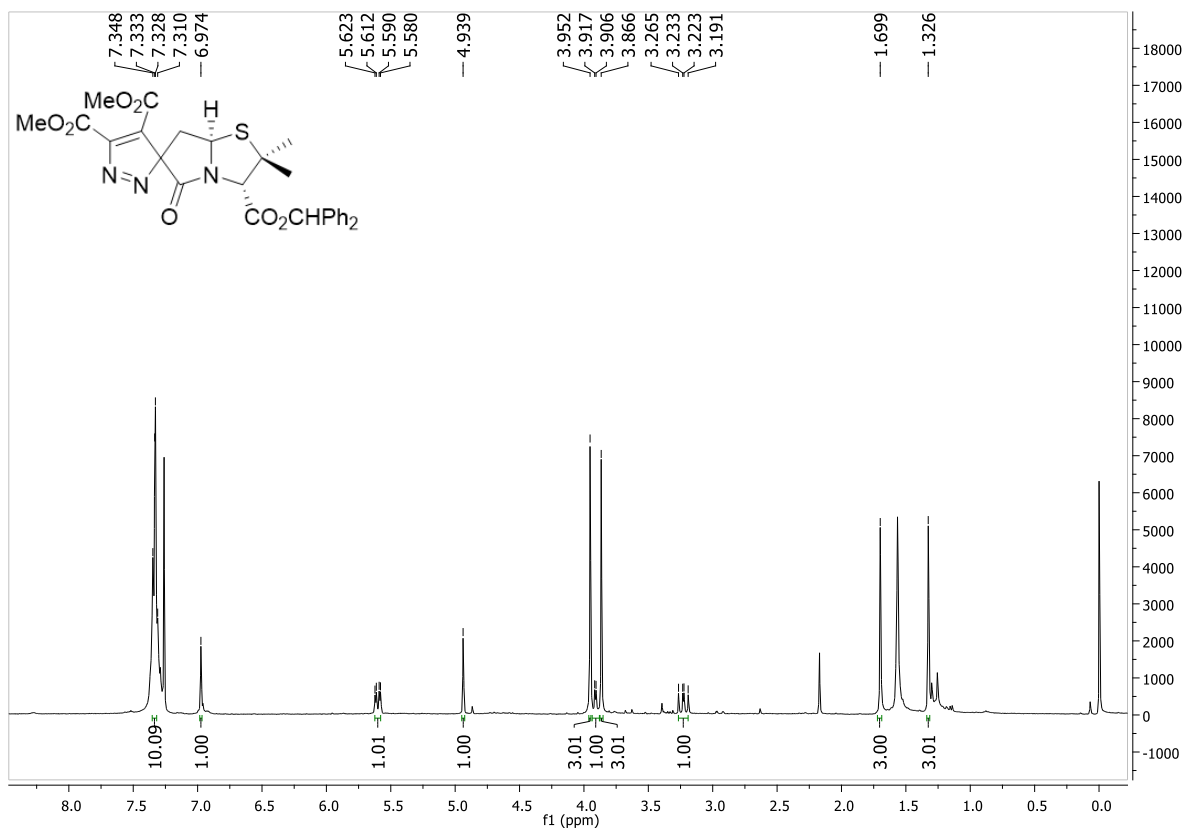
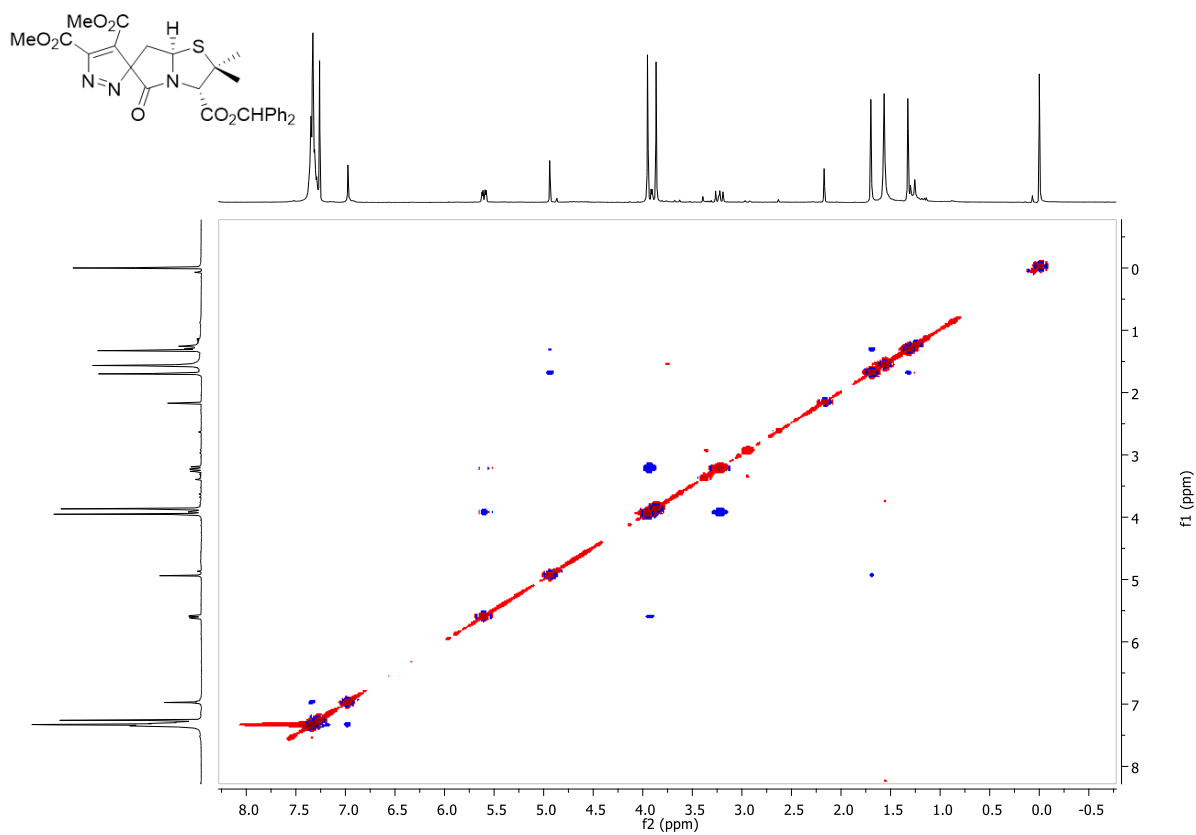
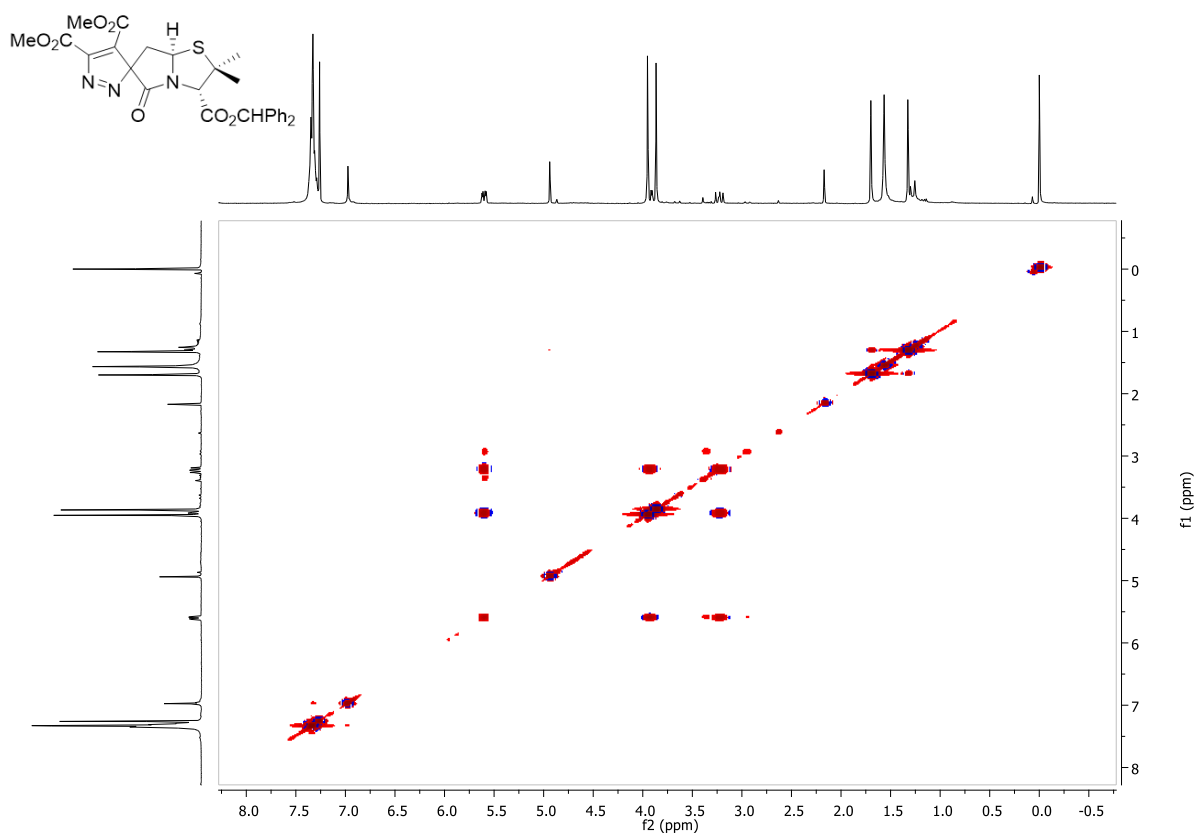


Figura 15 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 3.33a ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 16** - Espectros de COSY e NOESY do composto **3.33a** (CDCl<sub>3</sub>).

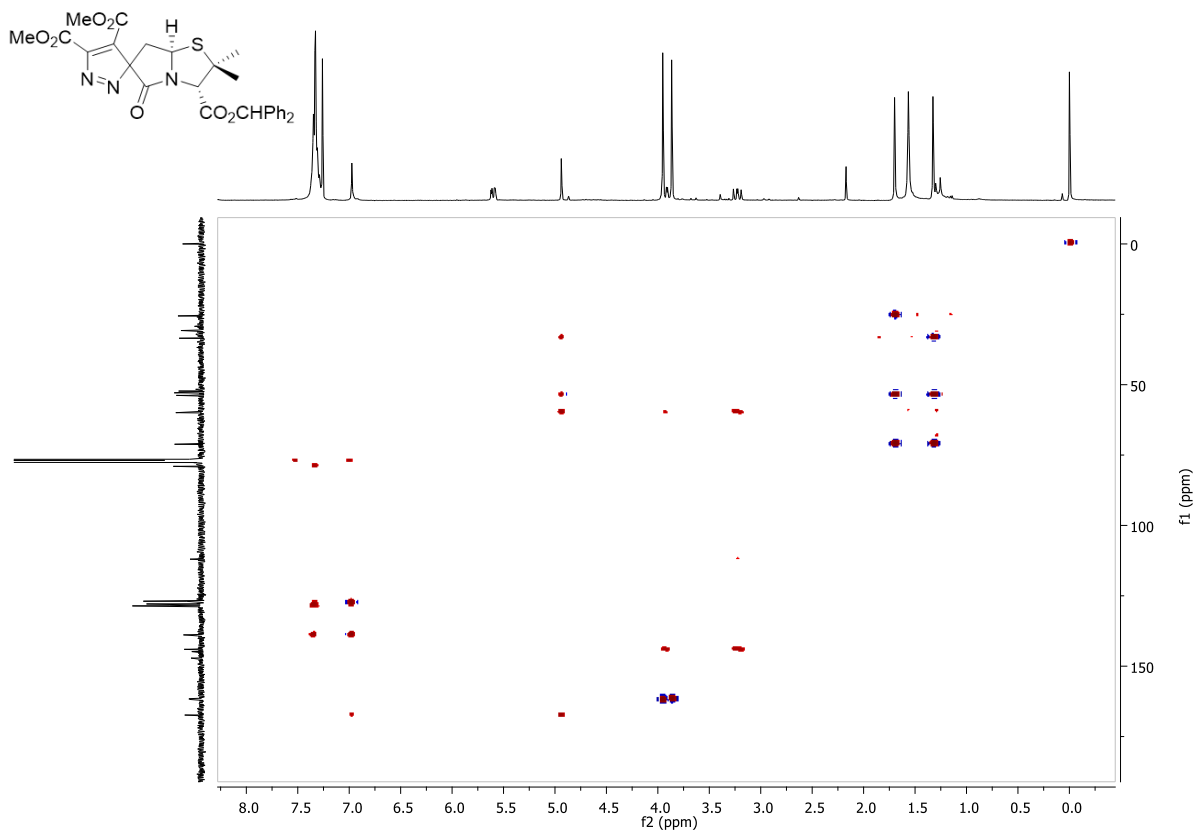
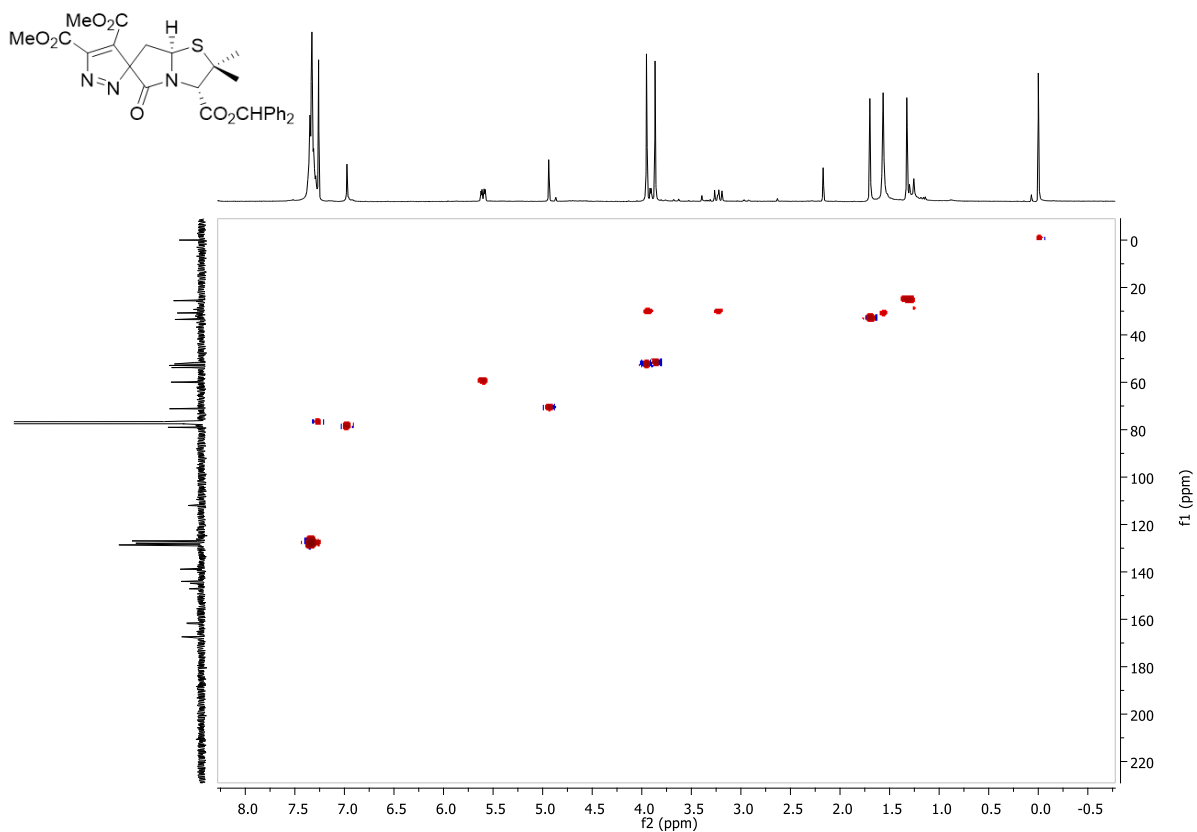
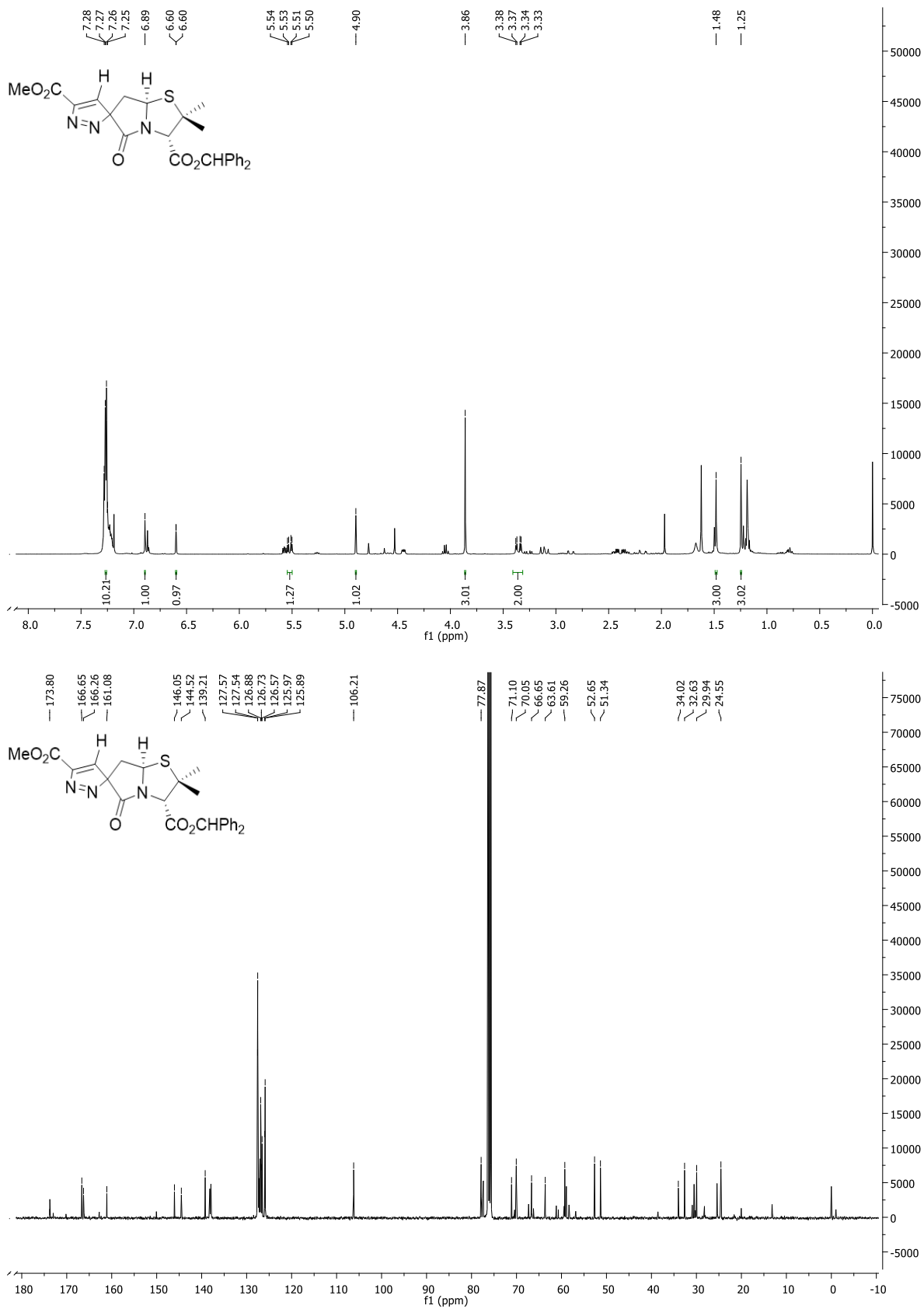
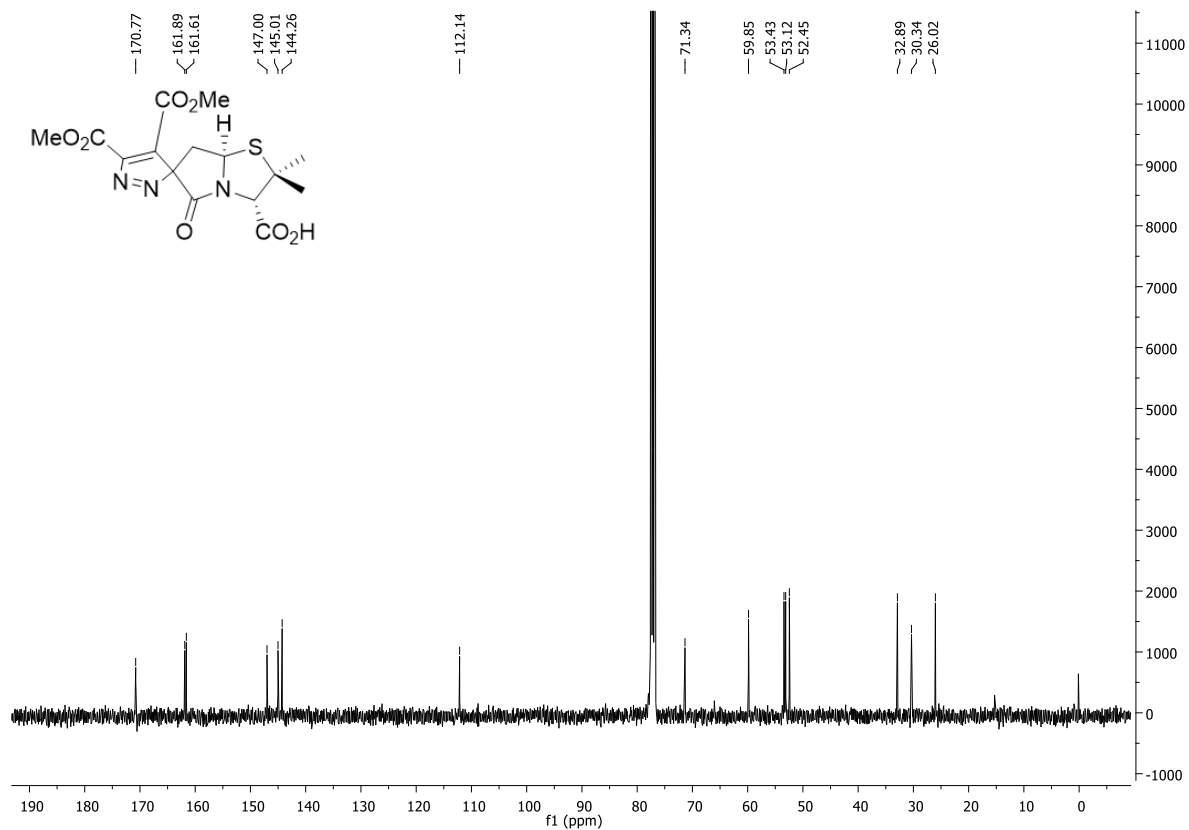
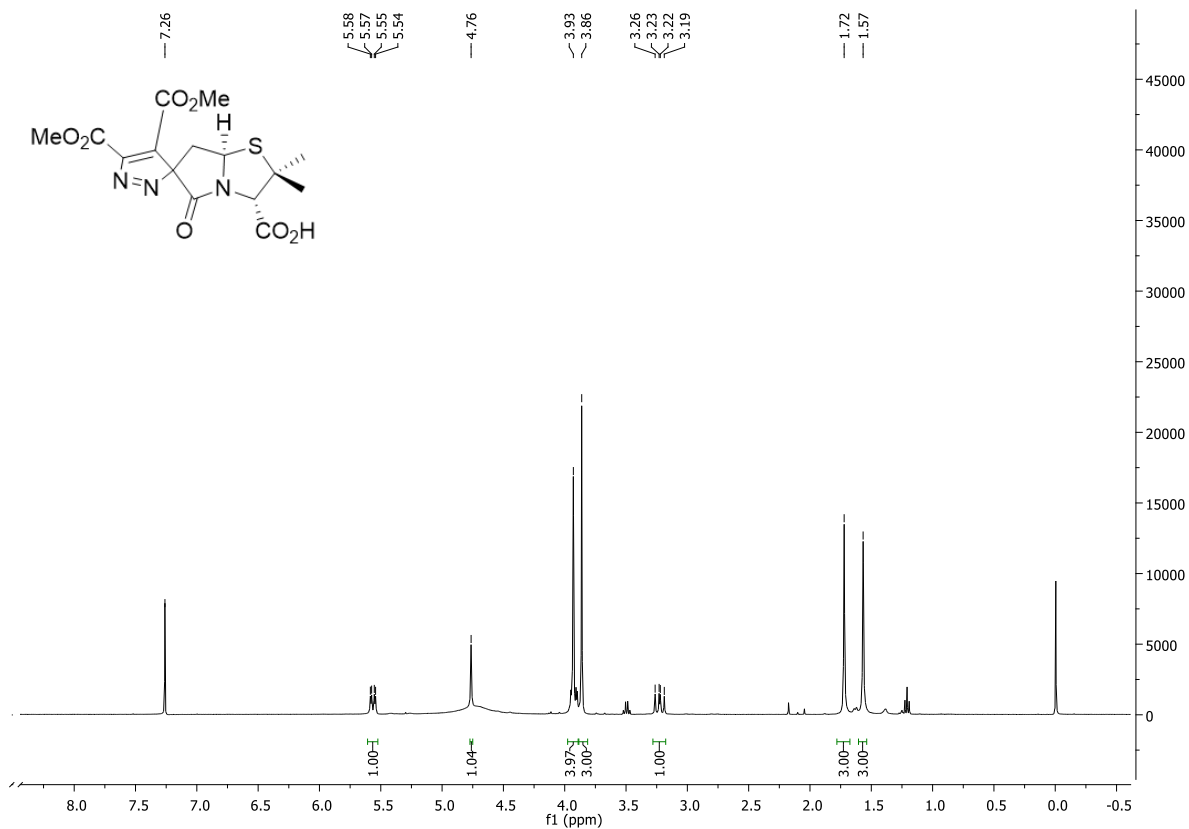


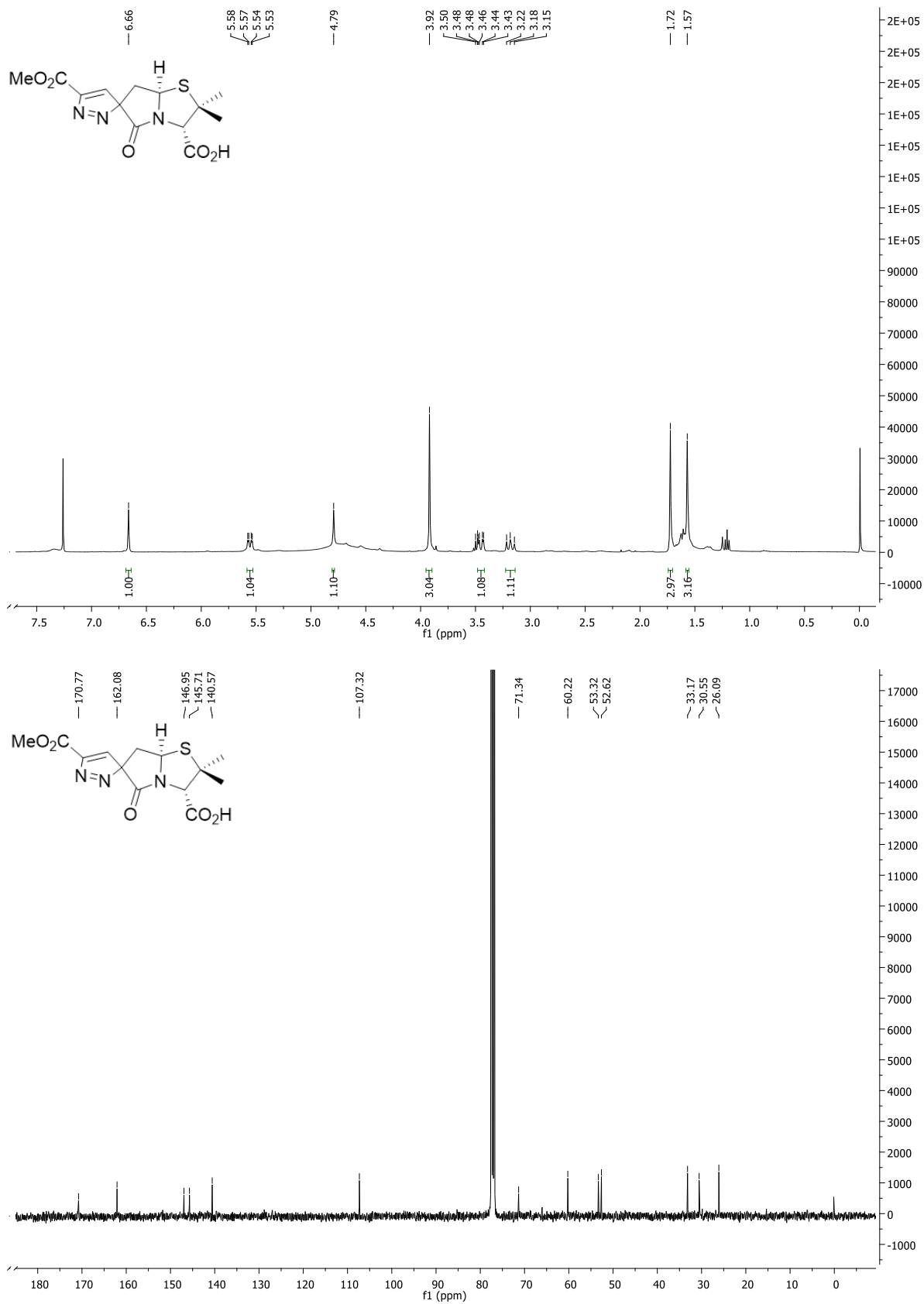
Figura 17 - Espectros de HSQC e HMBC do composto 3.33a (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 18** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **3.33b** (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 19** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **3.34a** (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 20** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **3.34b** (CDCl<sub>3</sub>).

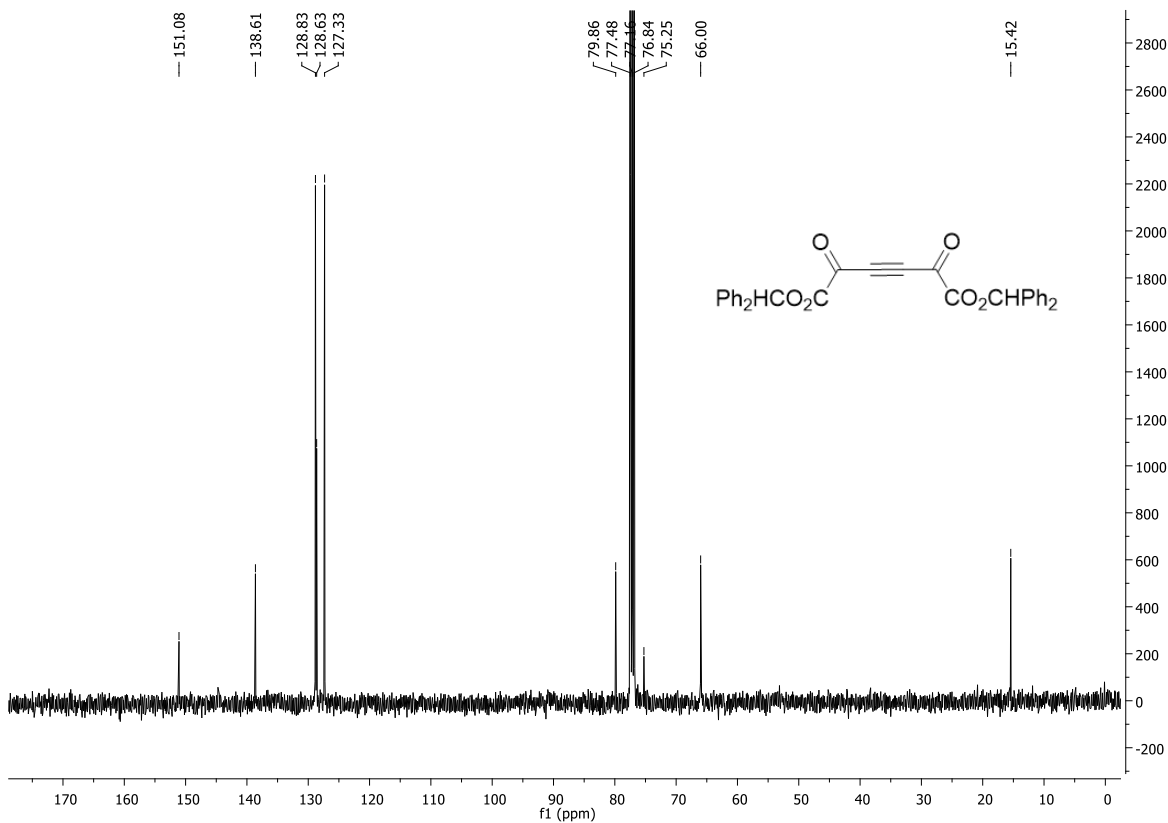
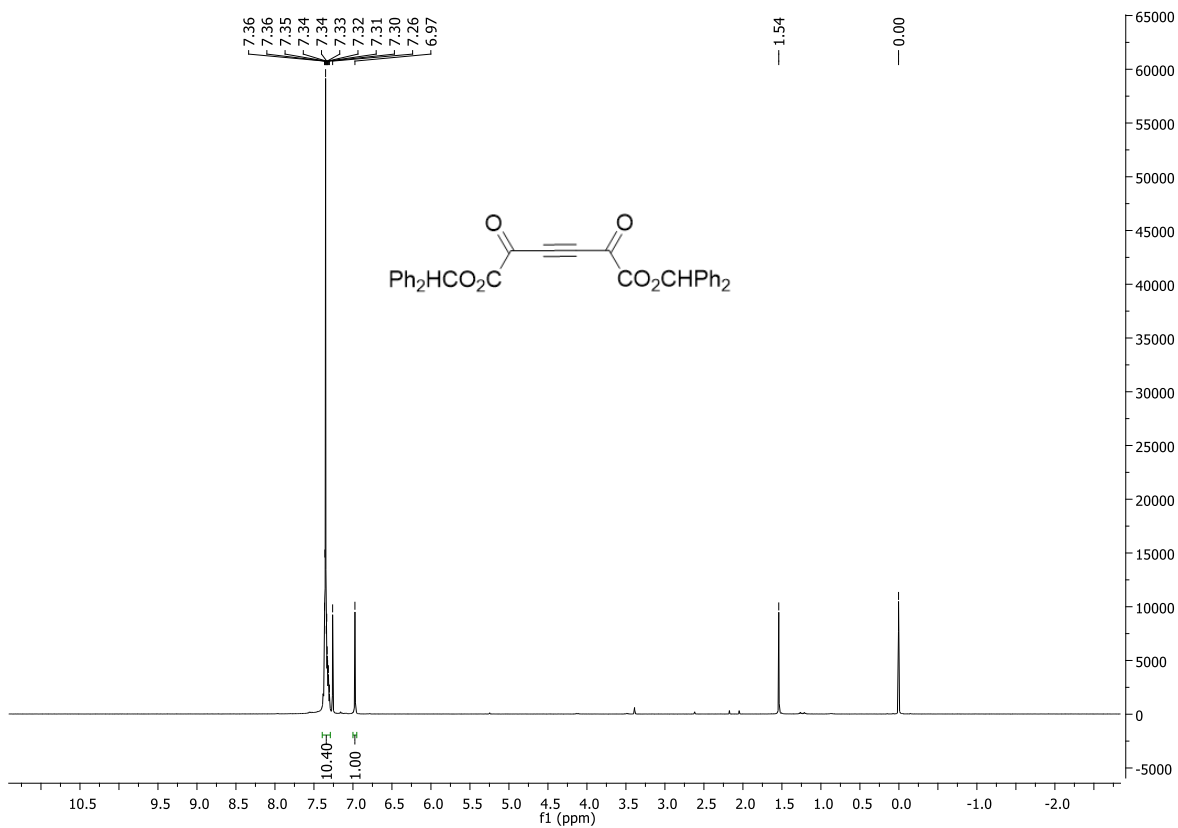


Figura 21 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **3.35e** ( $\text{CDCl}_3$ ).



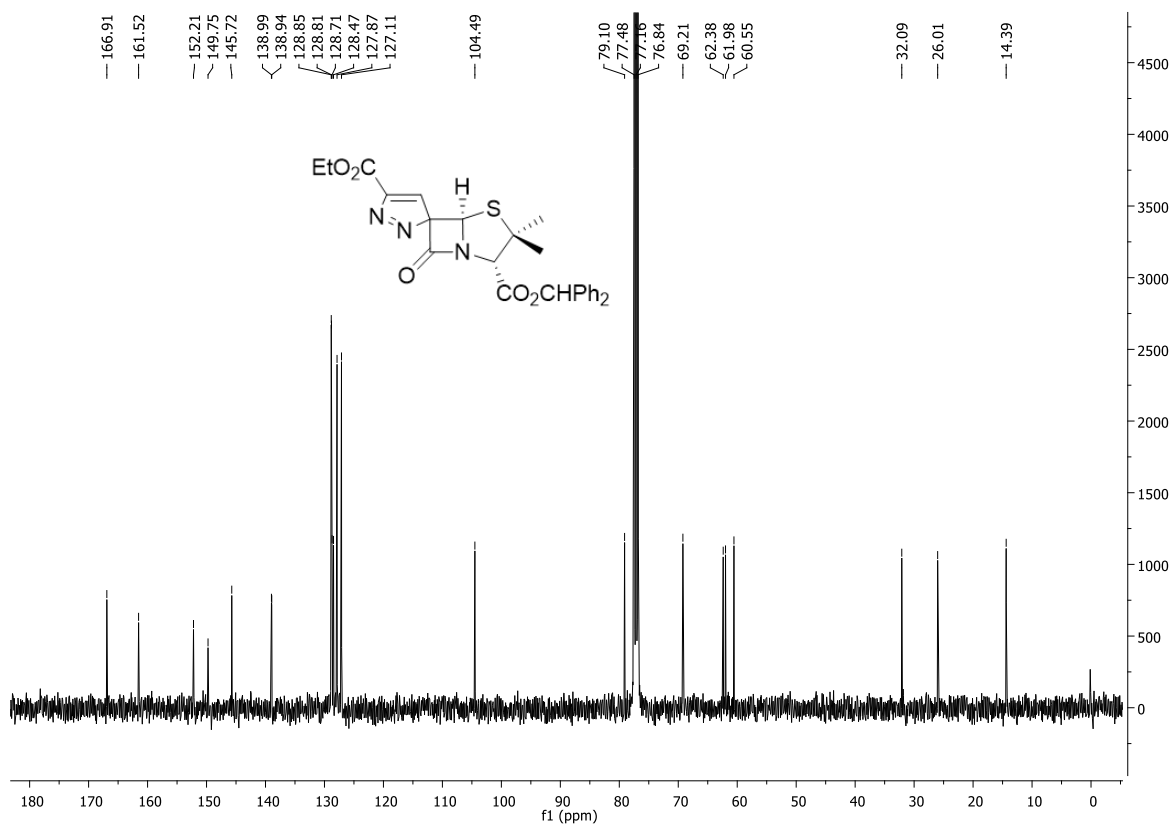
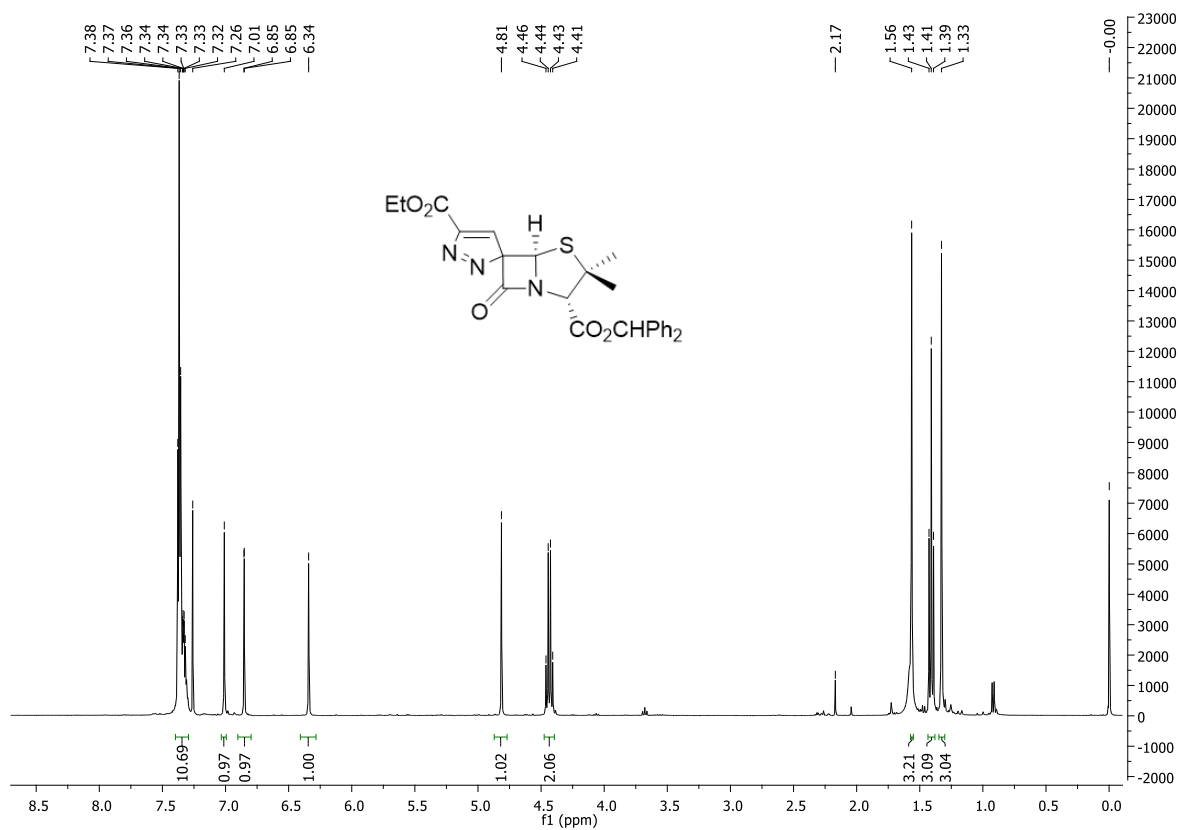
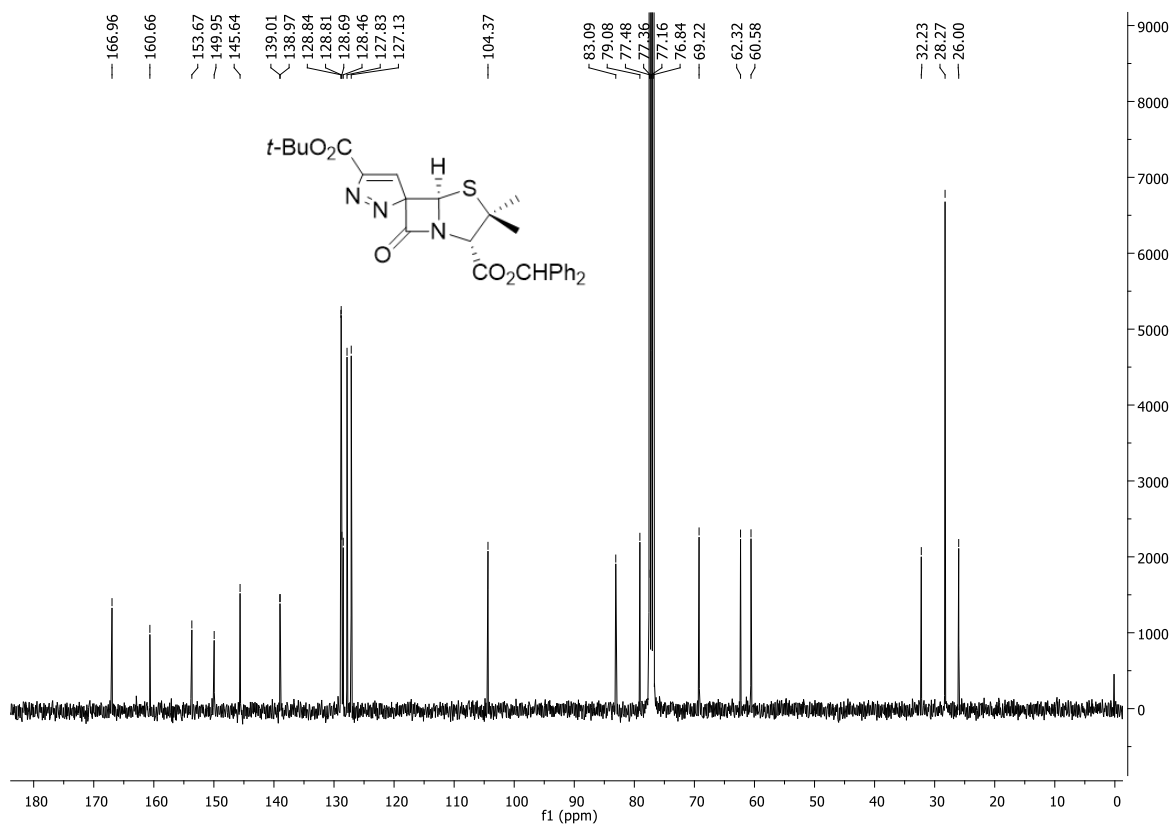
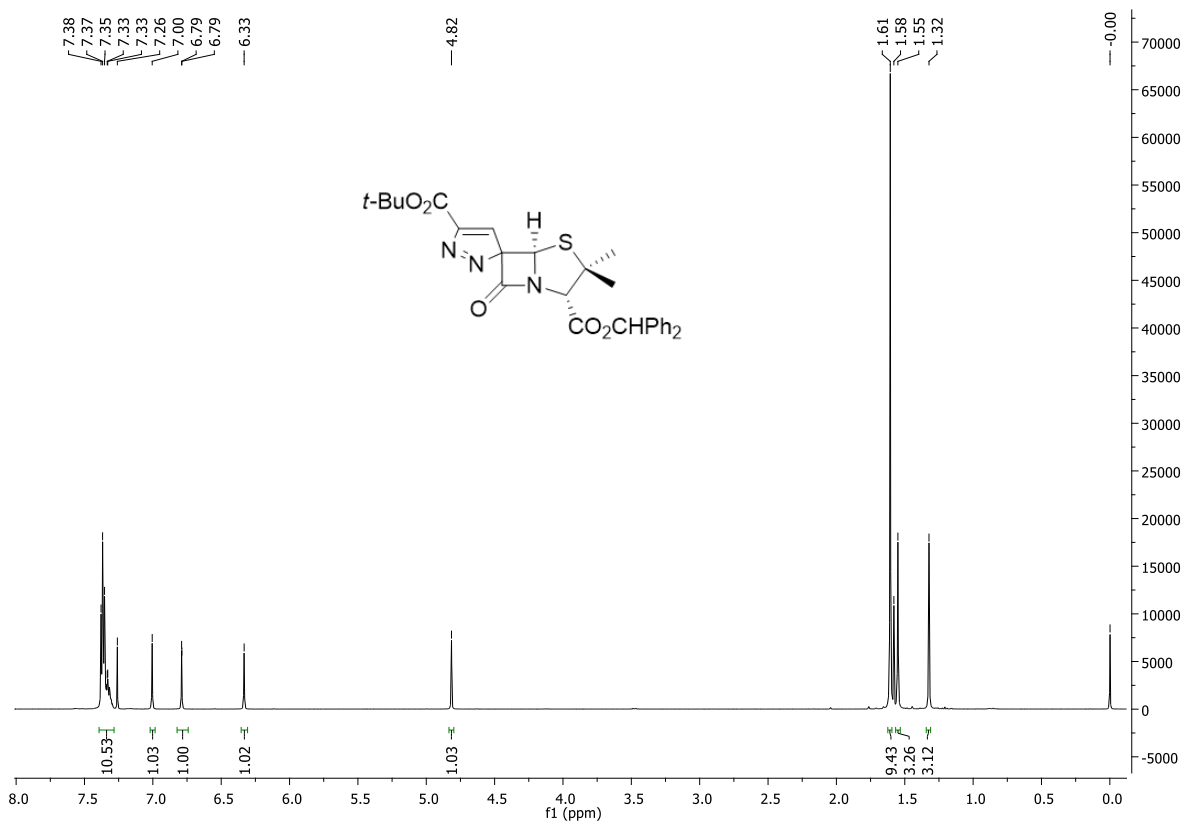
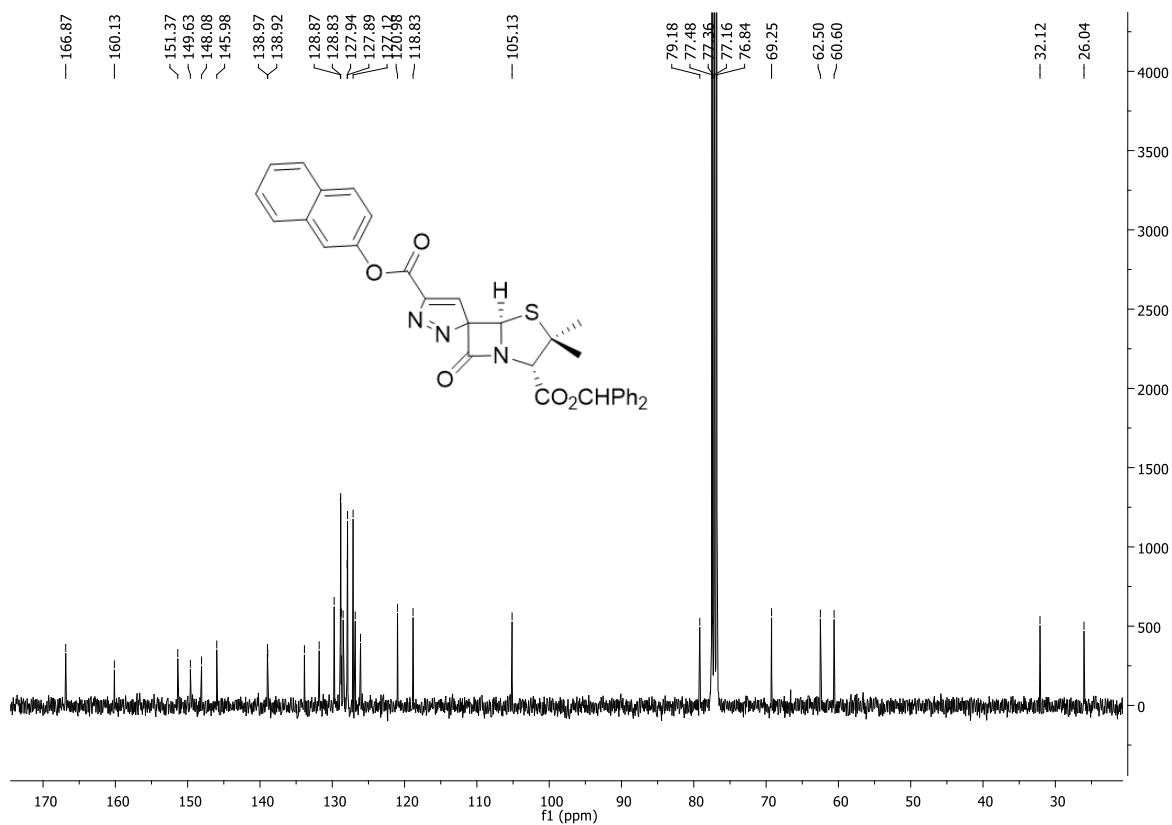
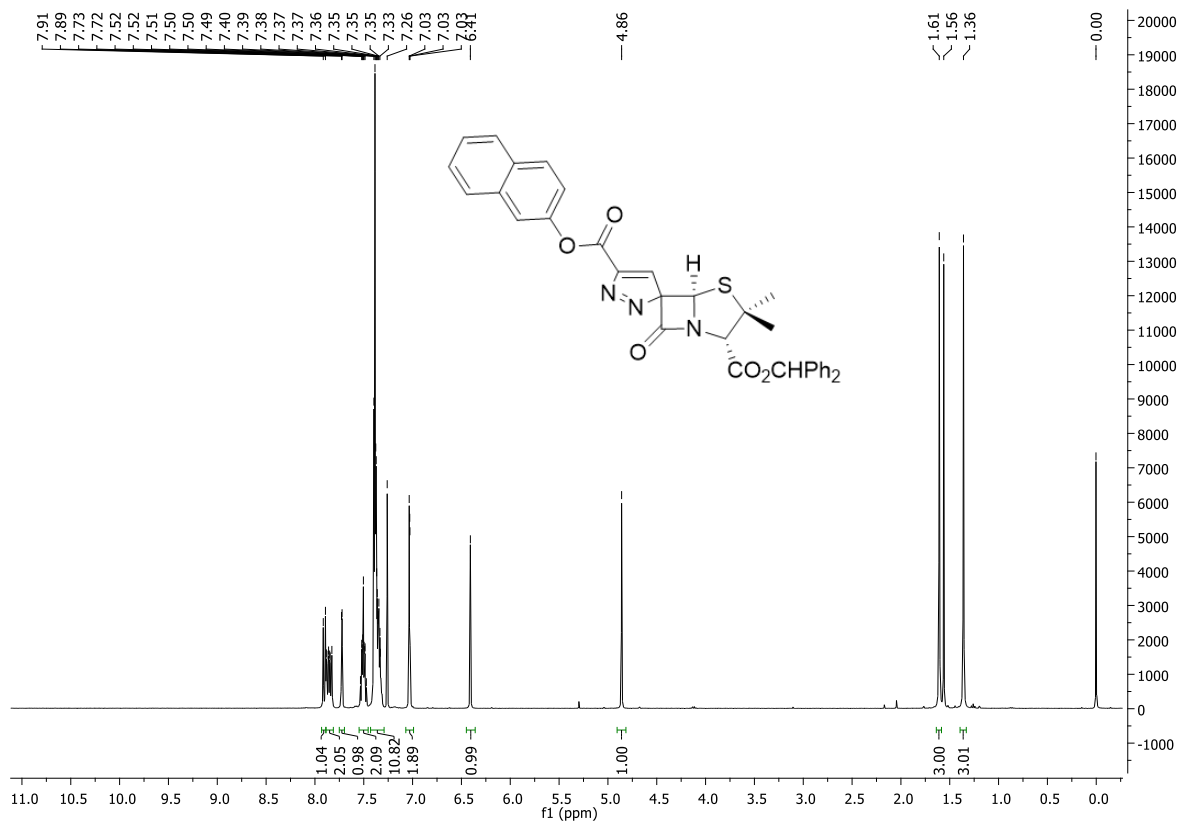


Figura 22 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 3.36a ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 23** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **3.36b** (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 24** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 3.36c (CDCl<sub>3</sub>).

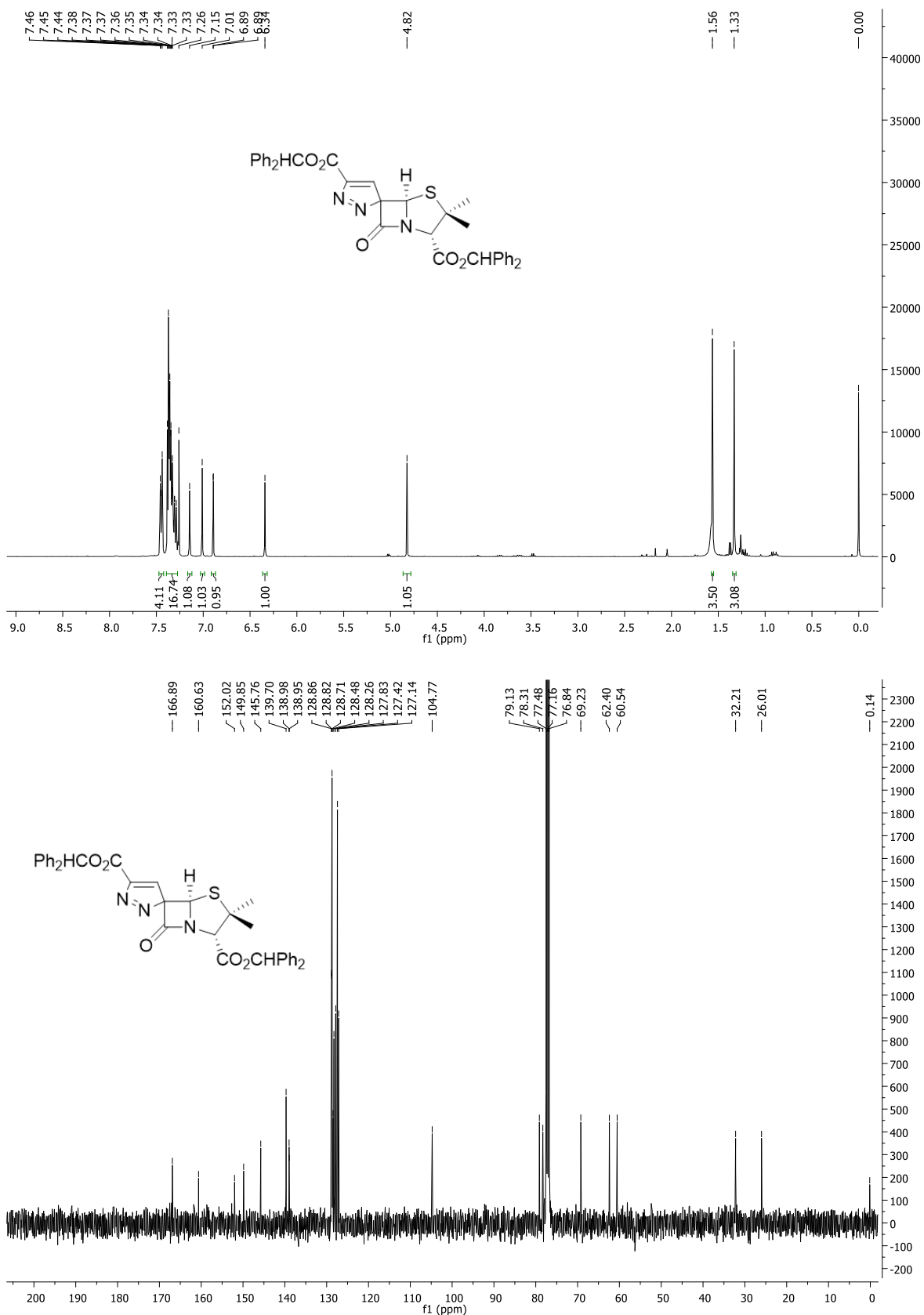
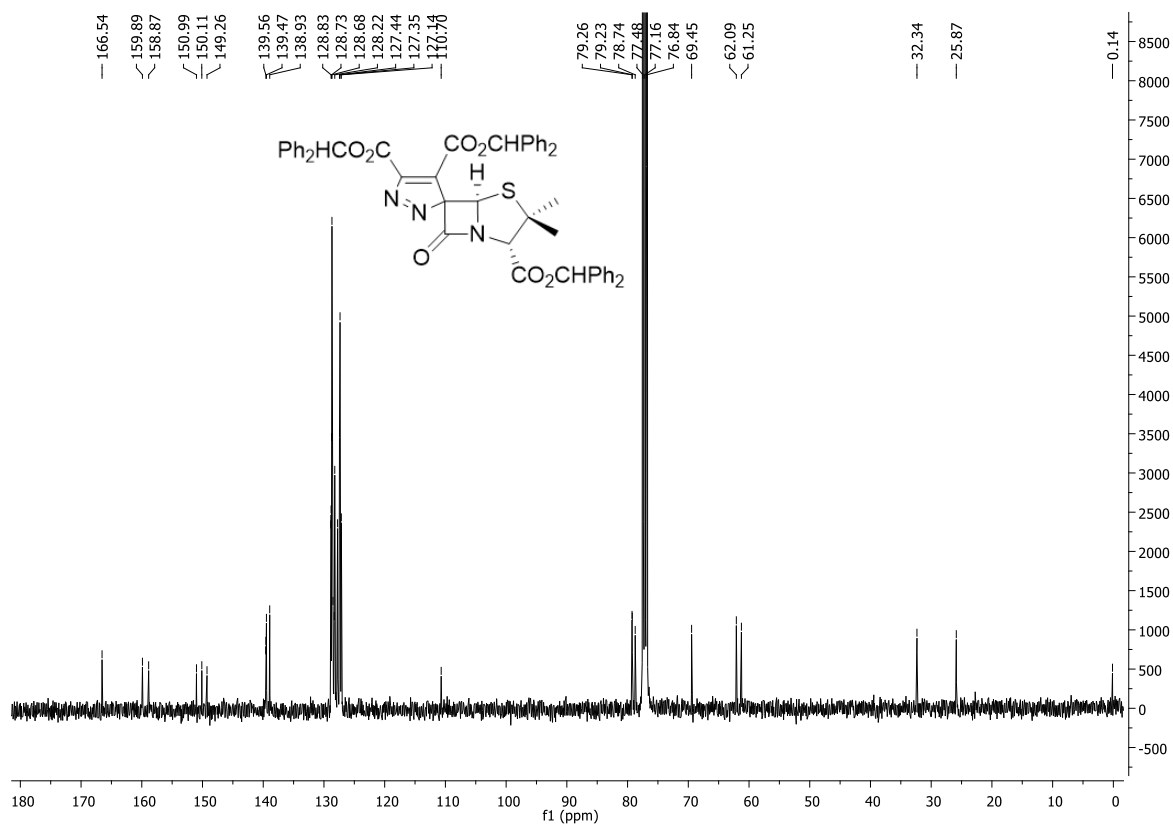
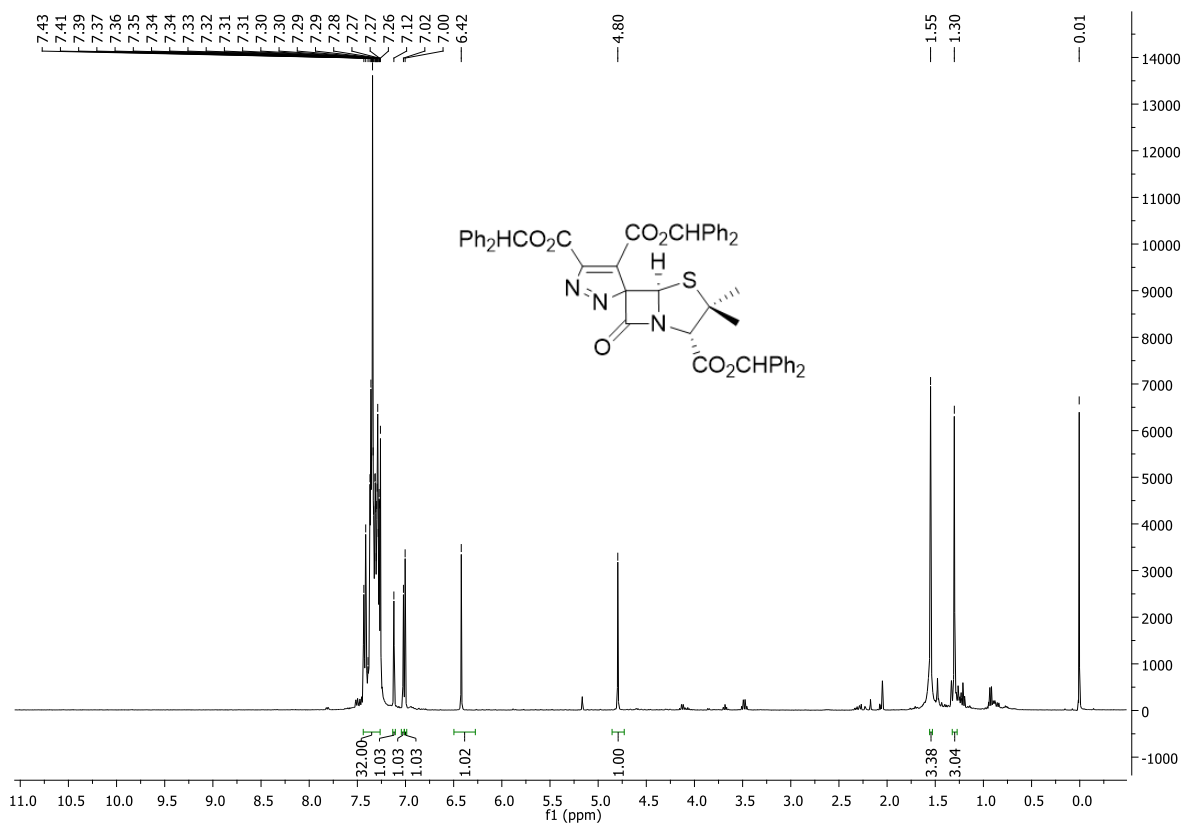


Figura 25 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 3.36d (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 26** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **3.36d** (CDCl<sub>3</sub>).

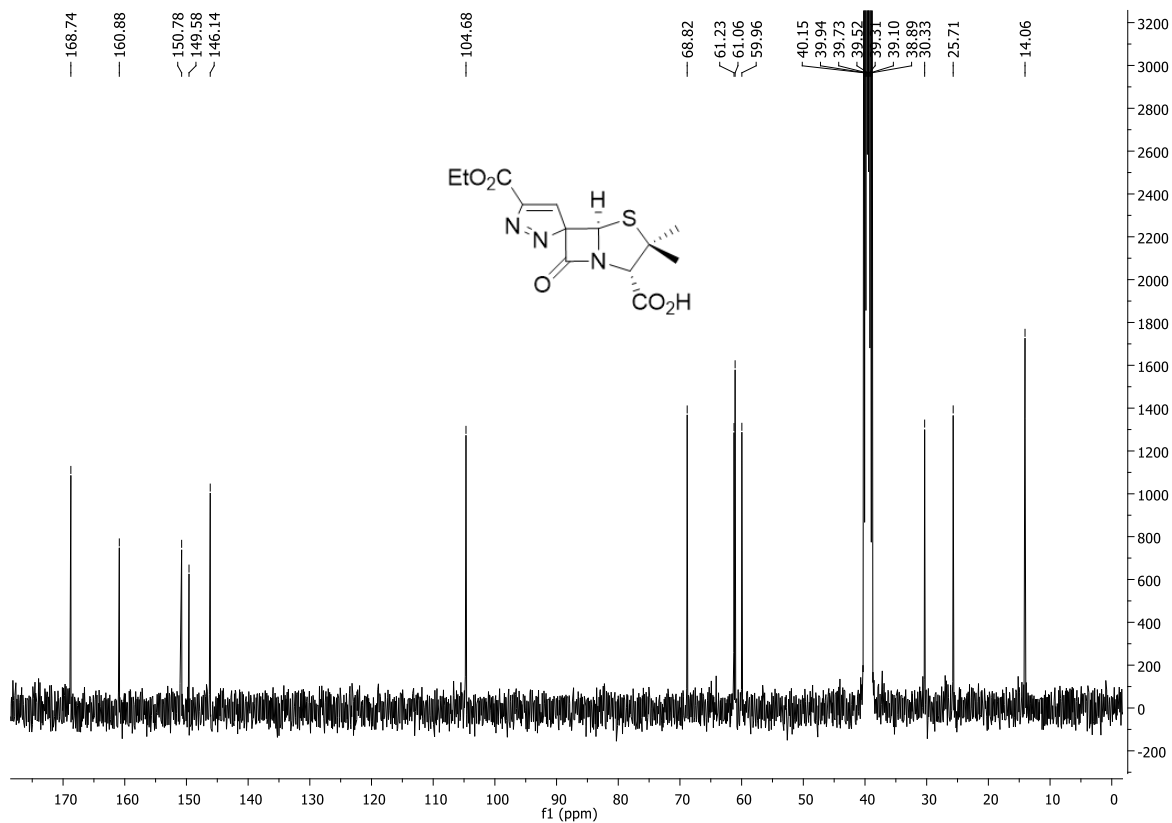
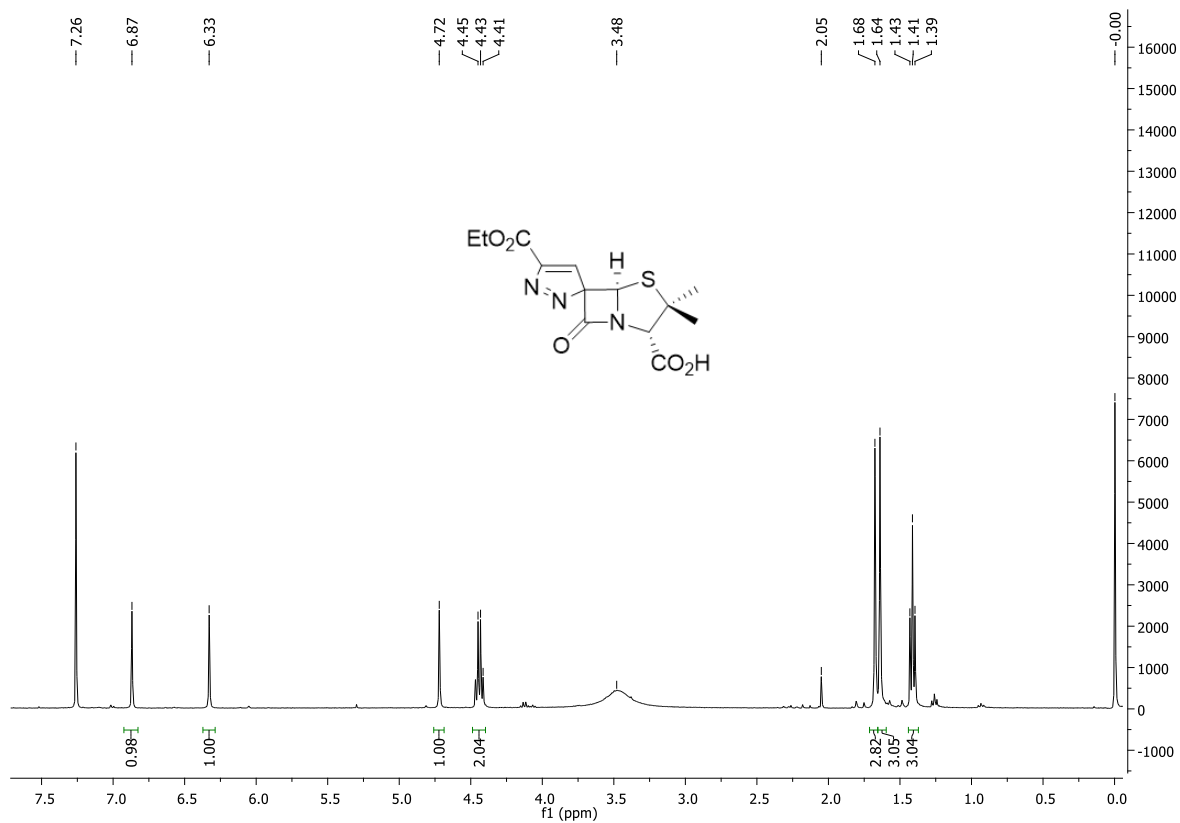


Figura 27 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **3.37a** ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO}-d_6$ , respetivamente).

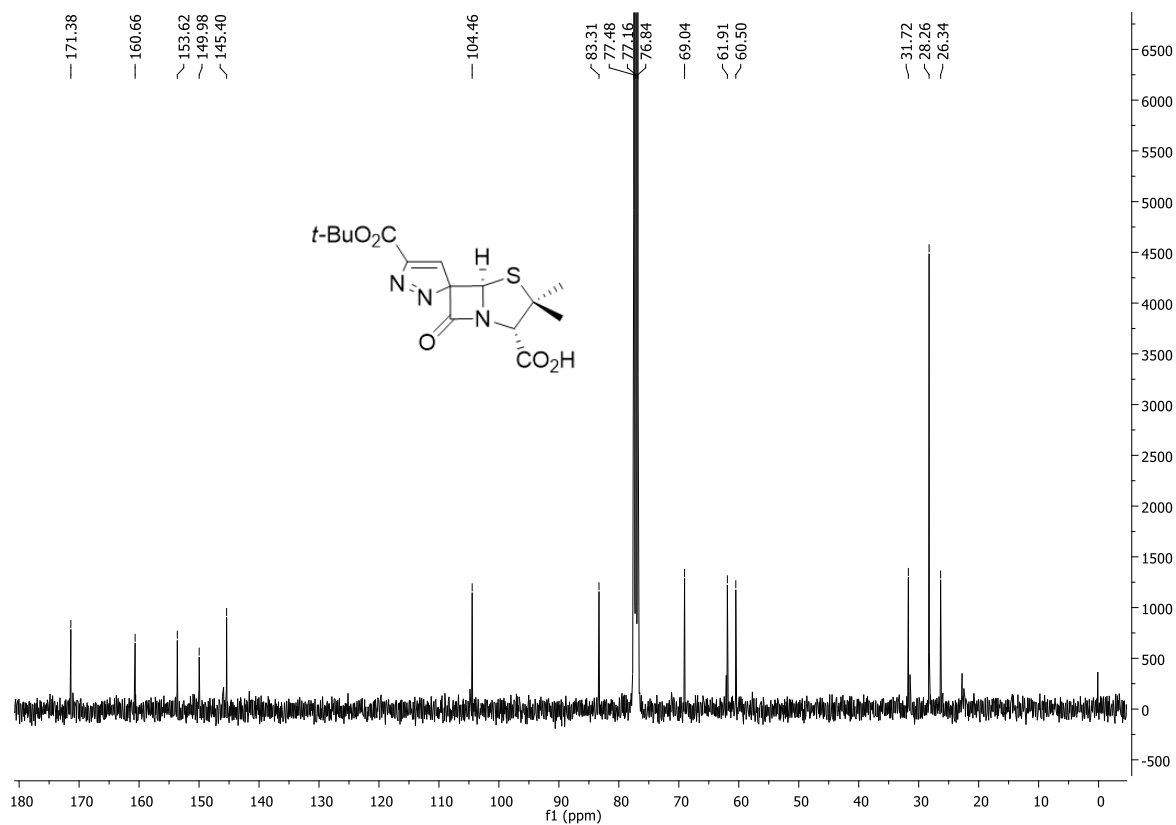
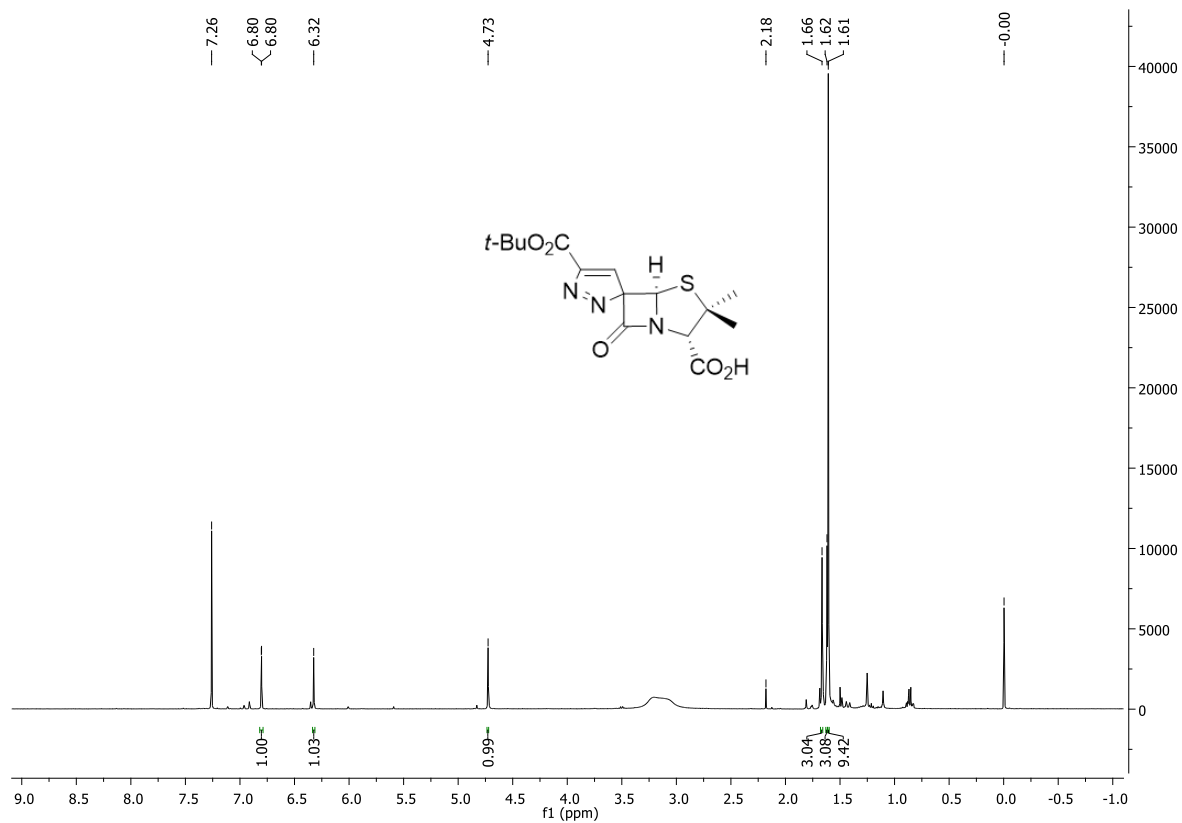
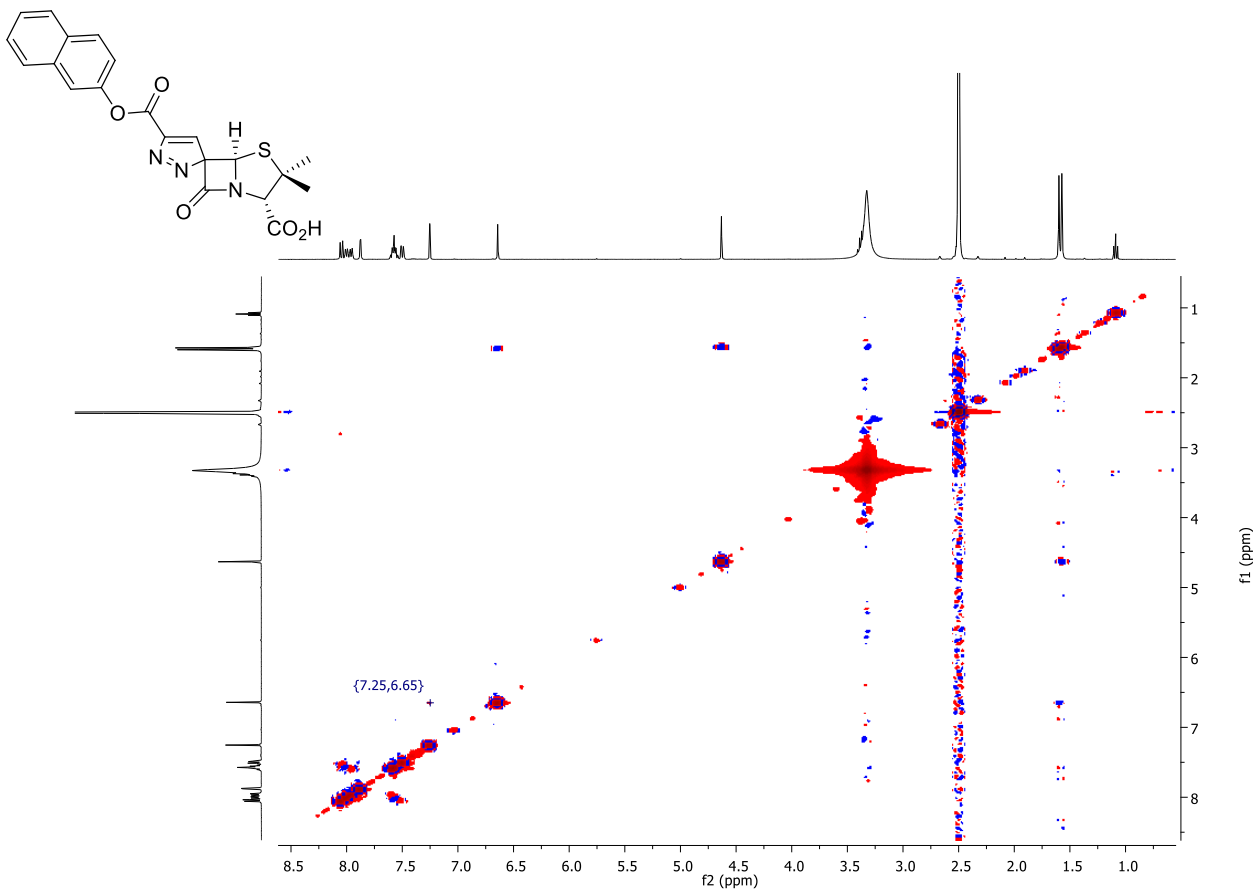


Figura 28 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 3.37b ( $\text{CDCl}_3$ ).





Anexo I



**Figura 30** - Espectros de NOESY do composto **3.37c** (DMSO-*d*<sub>6</sub>).

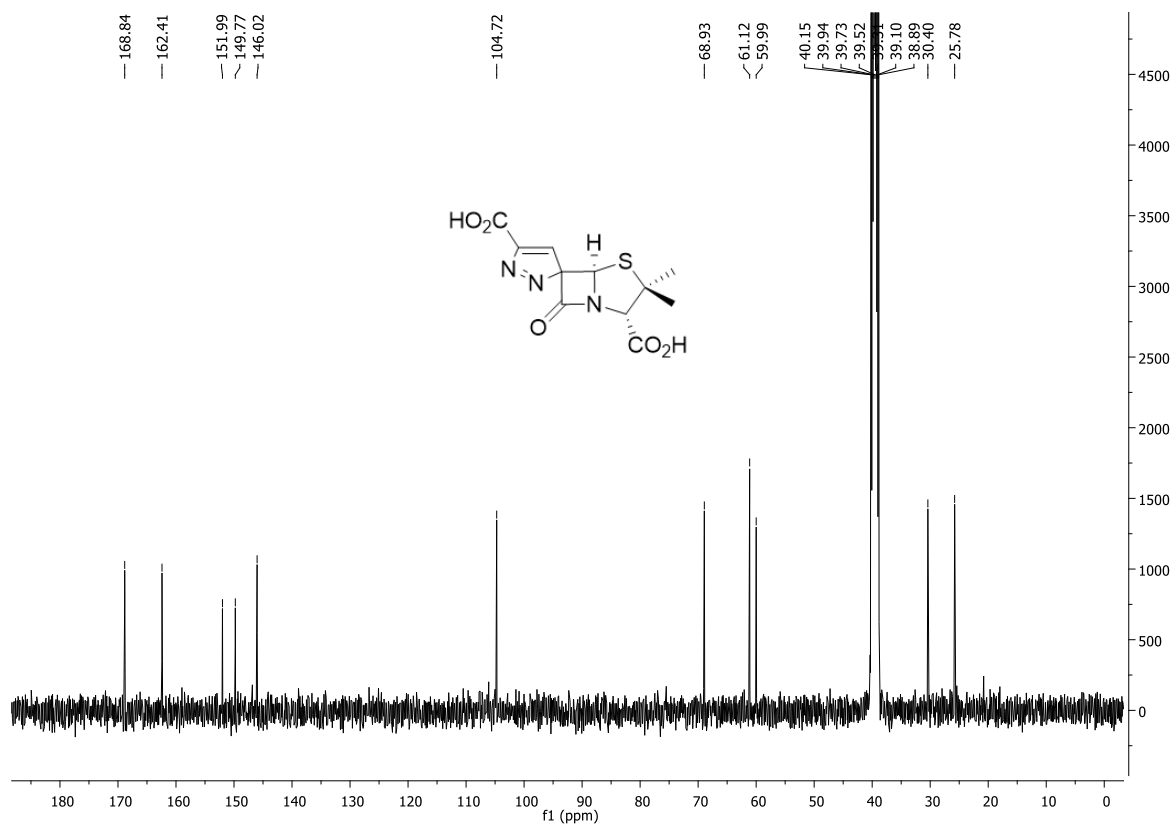
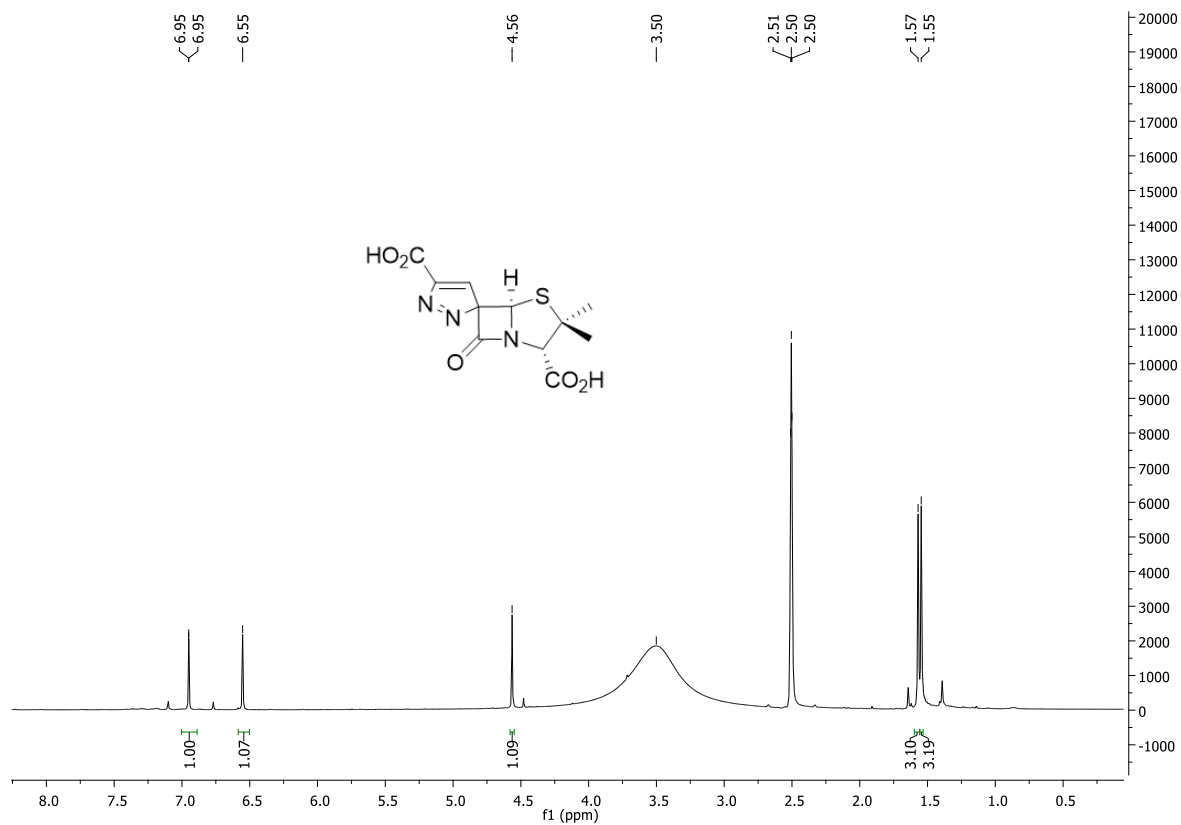


Figura 31 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **3.37d** ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

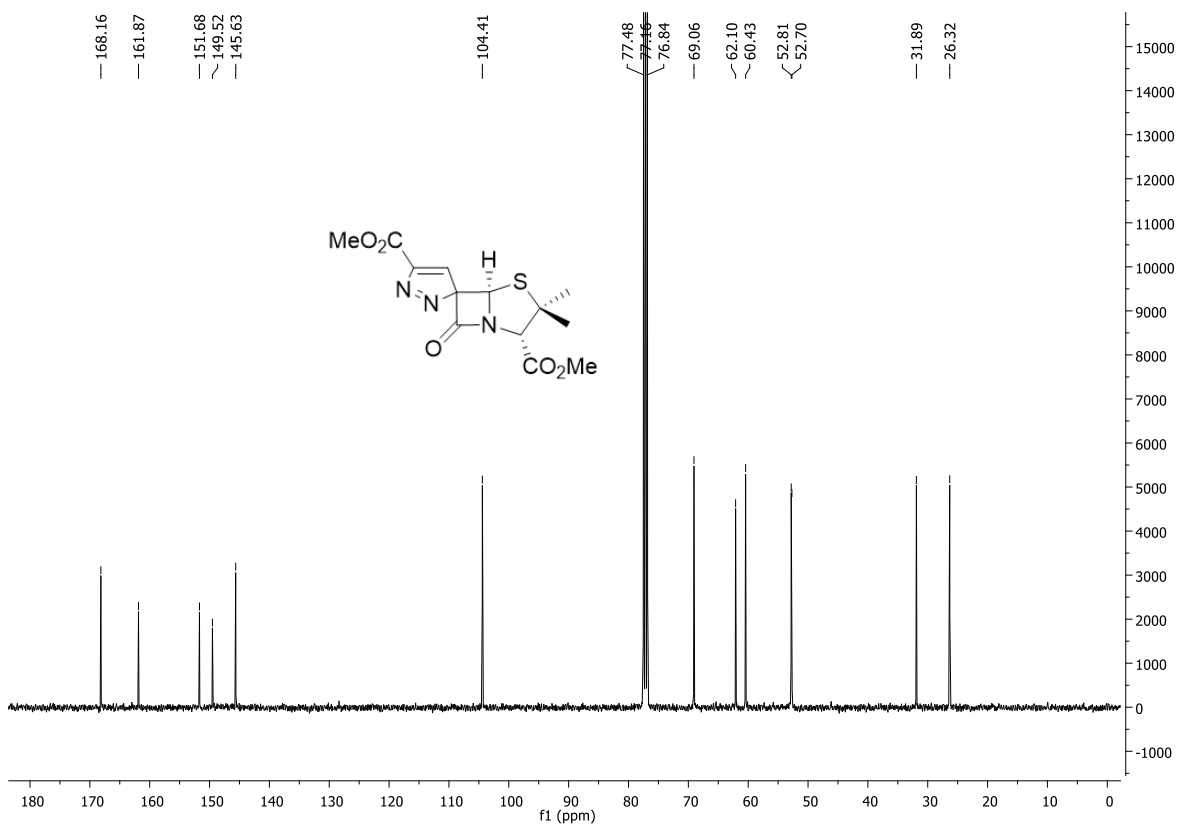
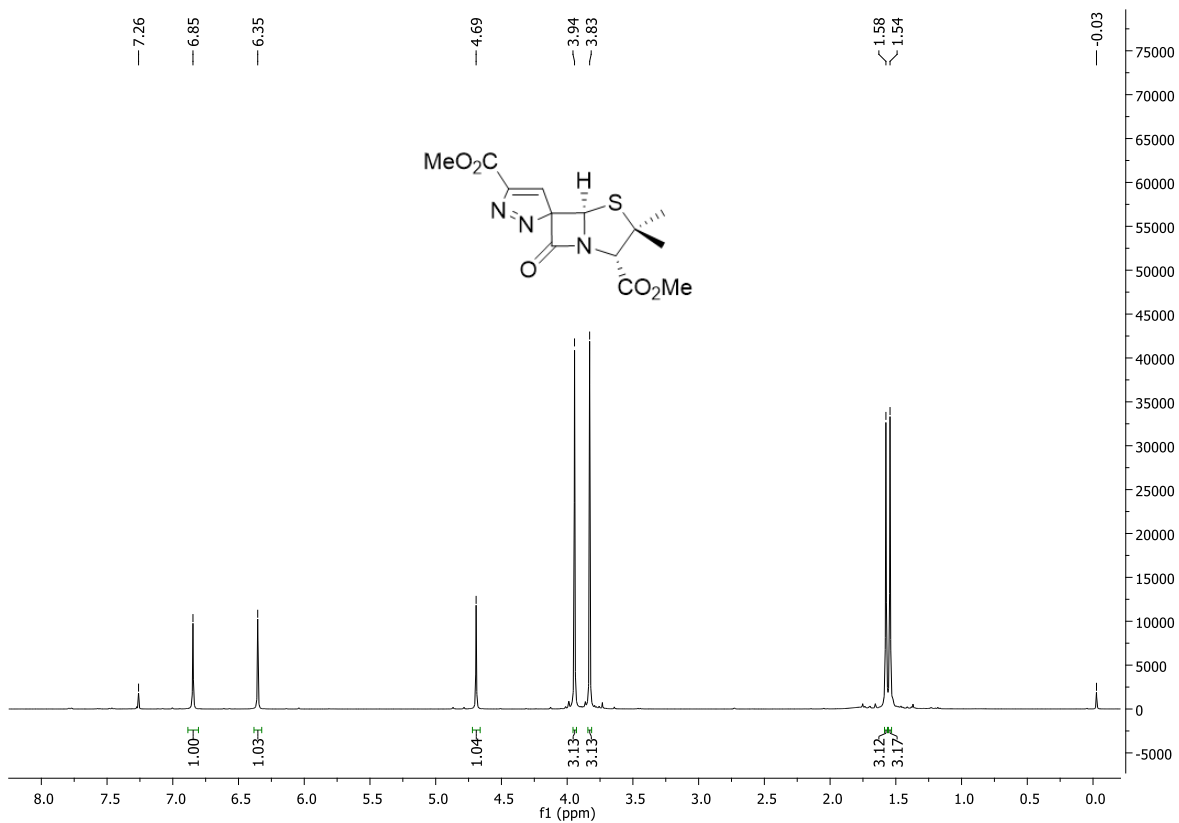


Figura 32 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 3.38 ( $\text{CDCl}_3$ ).

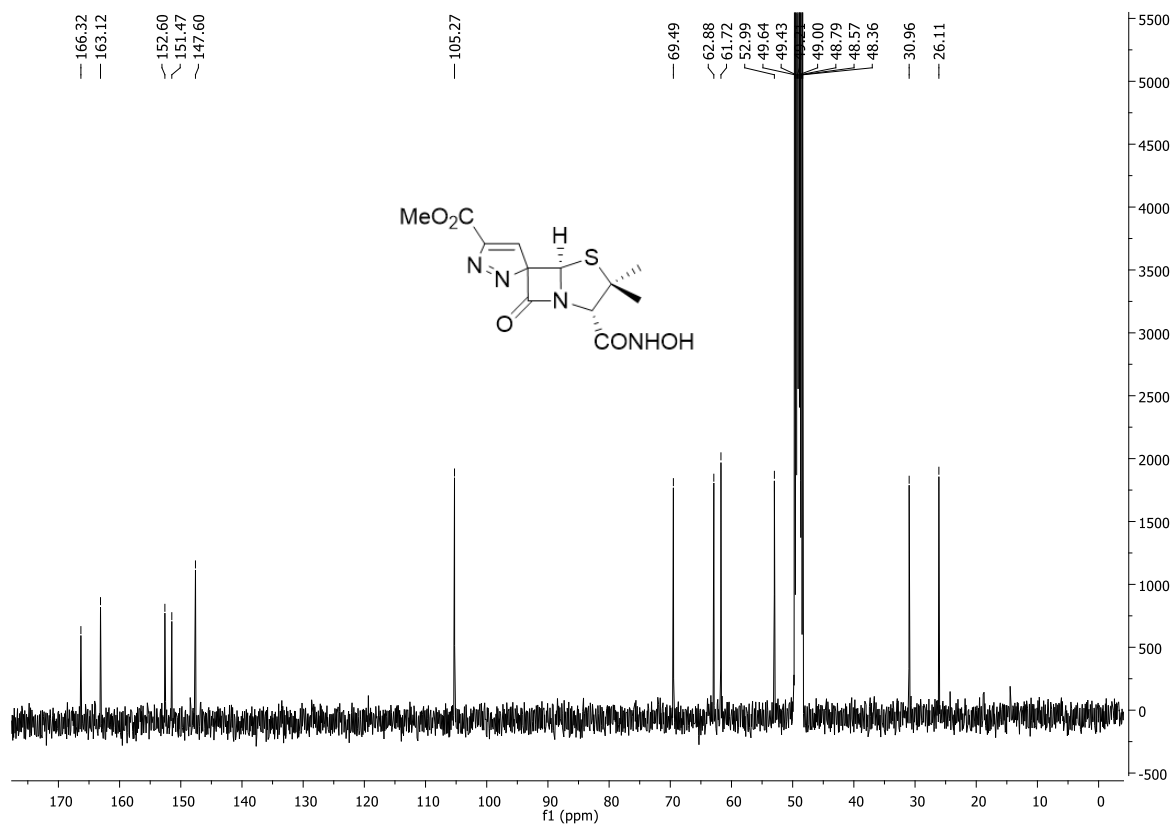
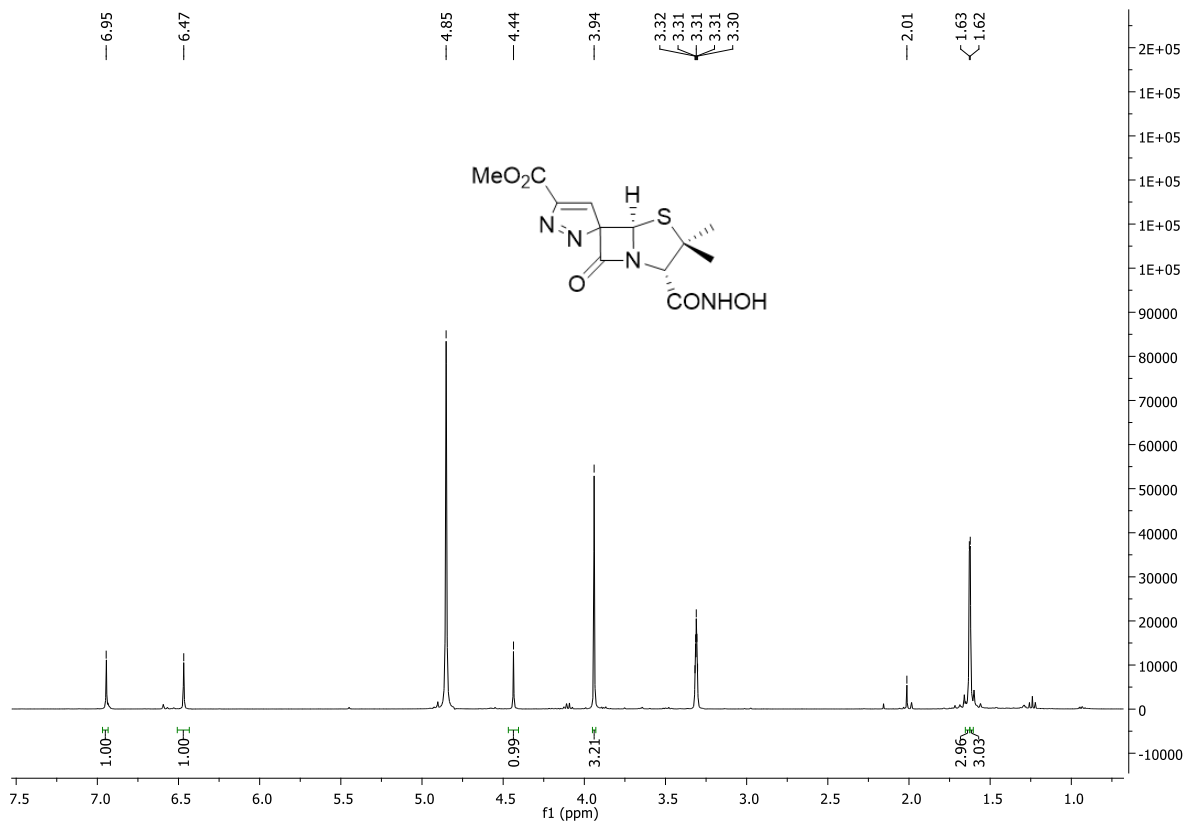


Figura 33 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 3.39 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

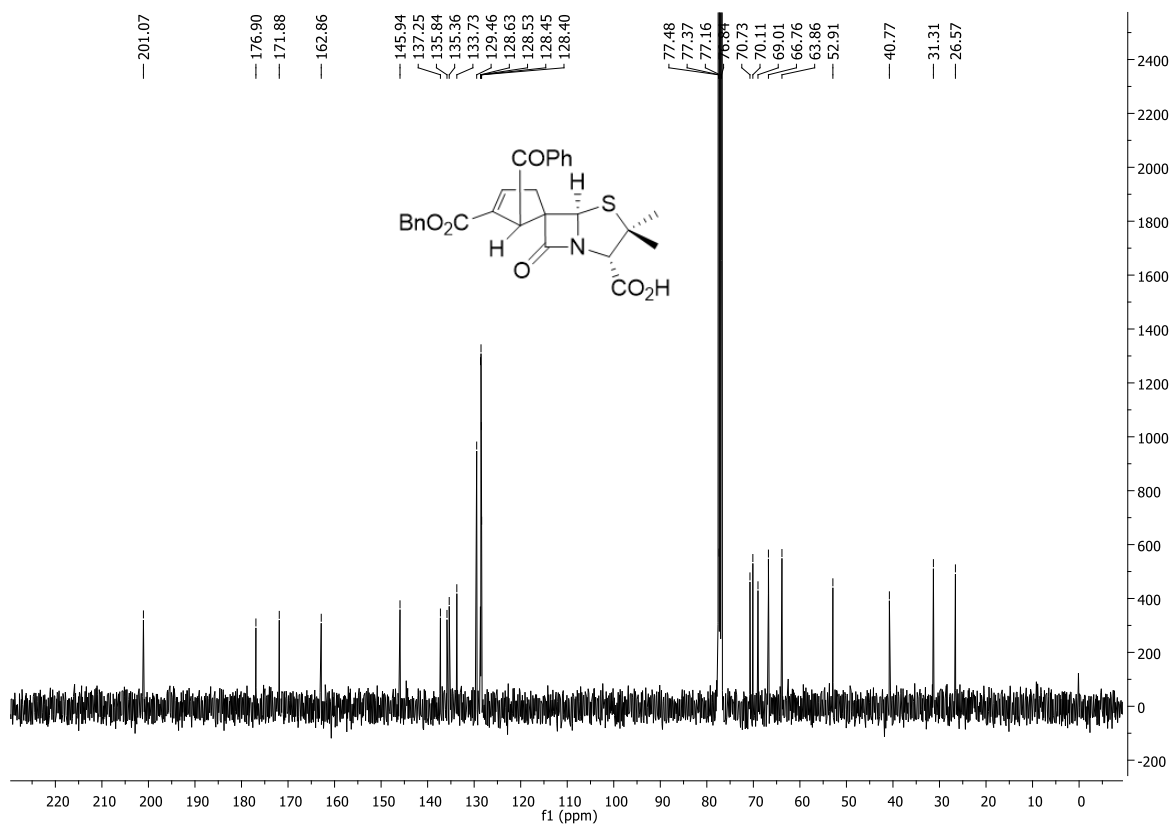
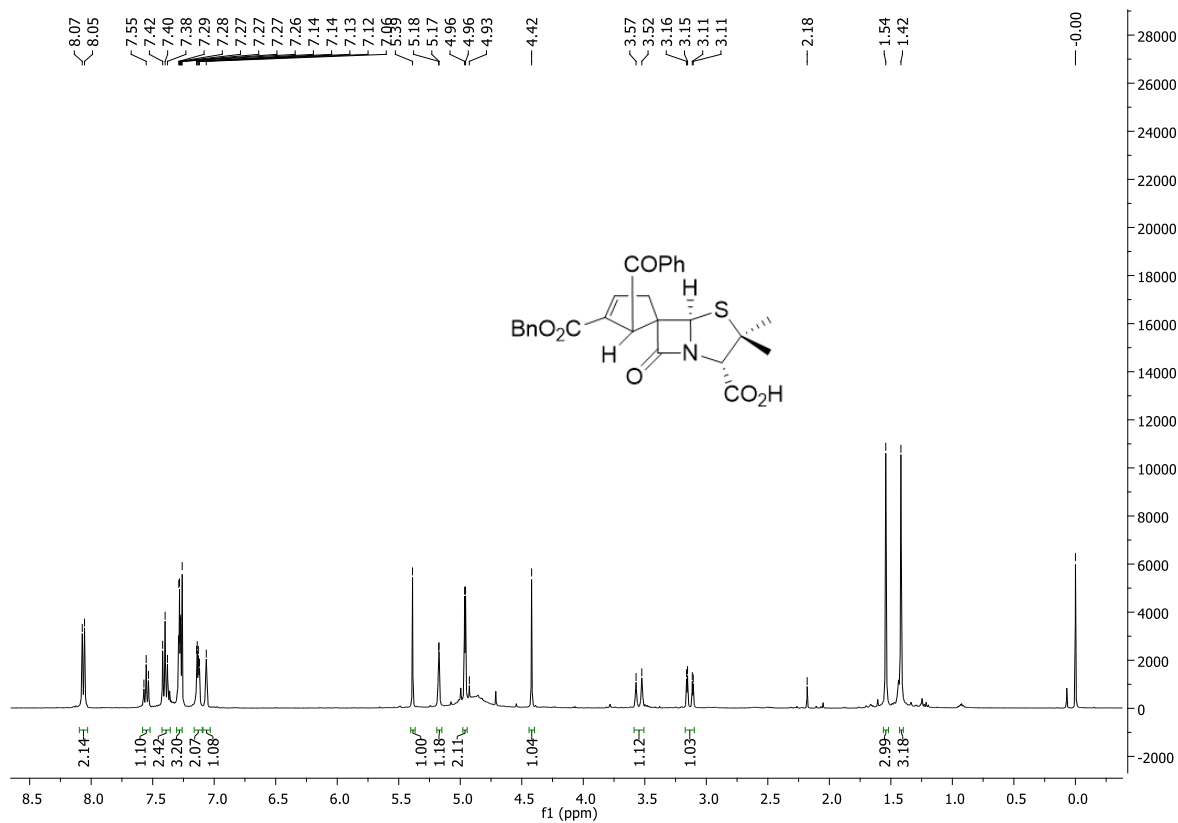
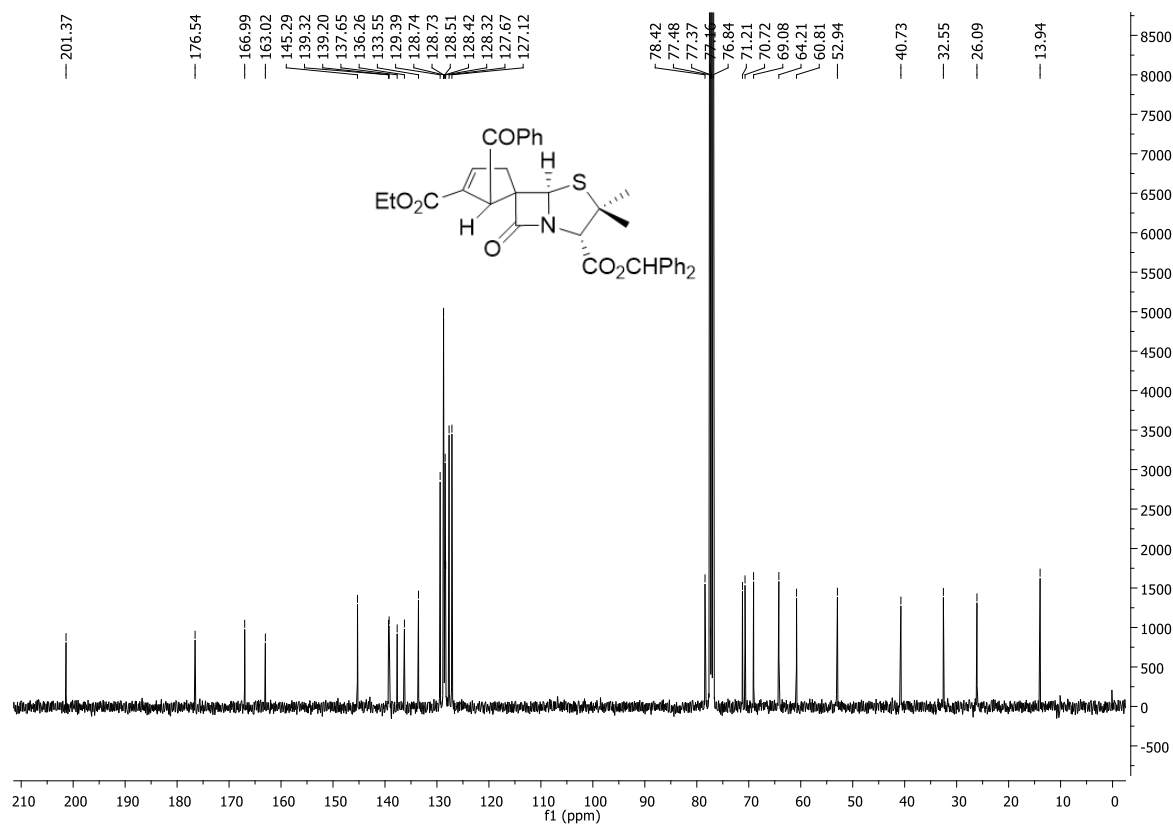
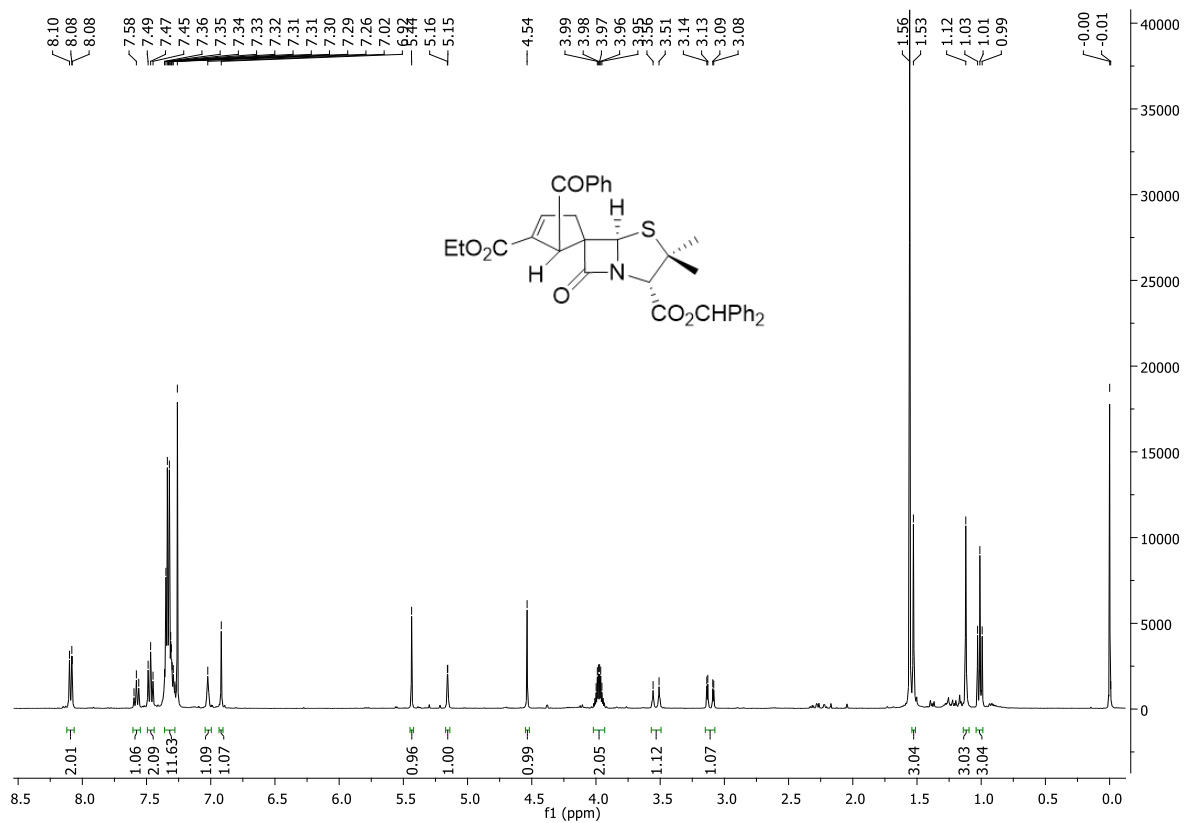


Figura 34 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 4.17 (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 35** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **4.19a** (CDCl<sub>3</sub>).

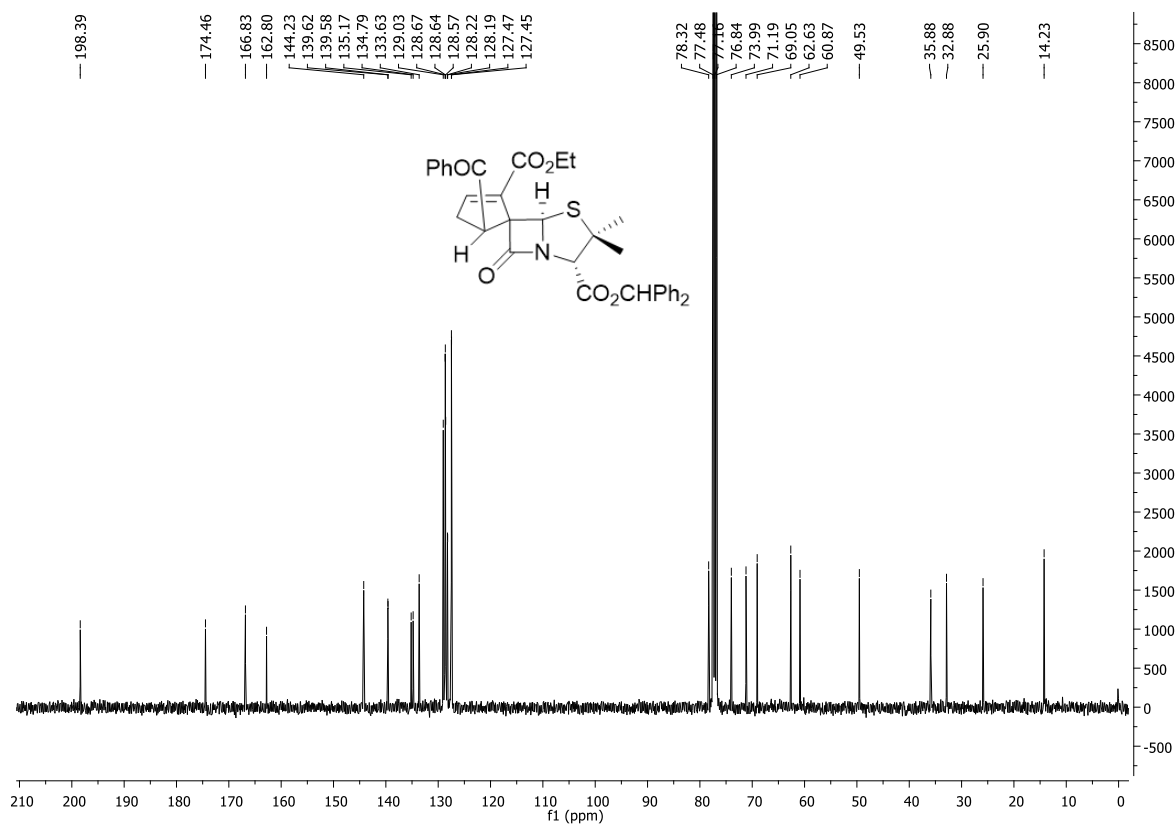
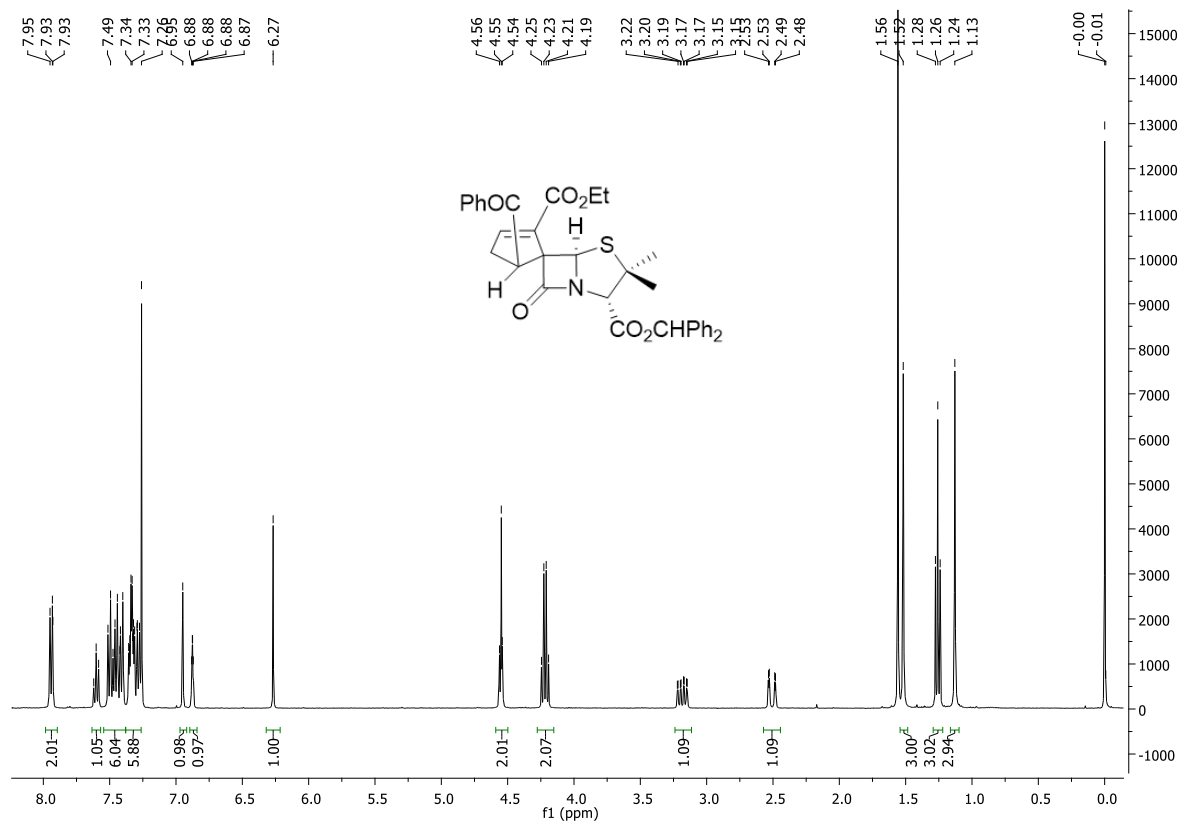


Figura 36 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 4.20a (CDCl<sub>3</sub>).

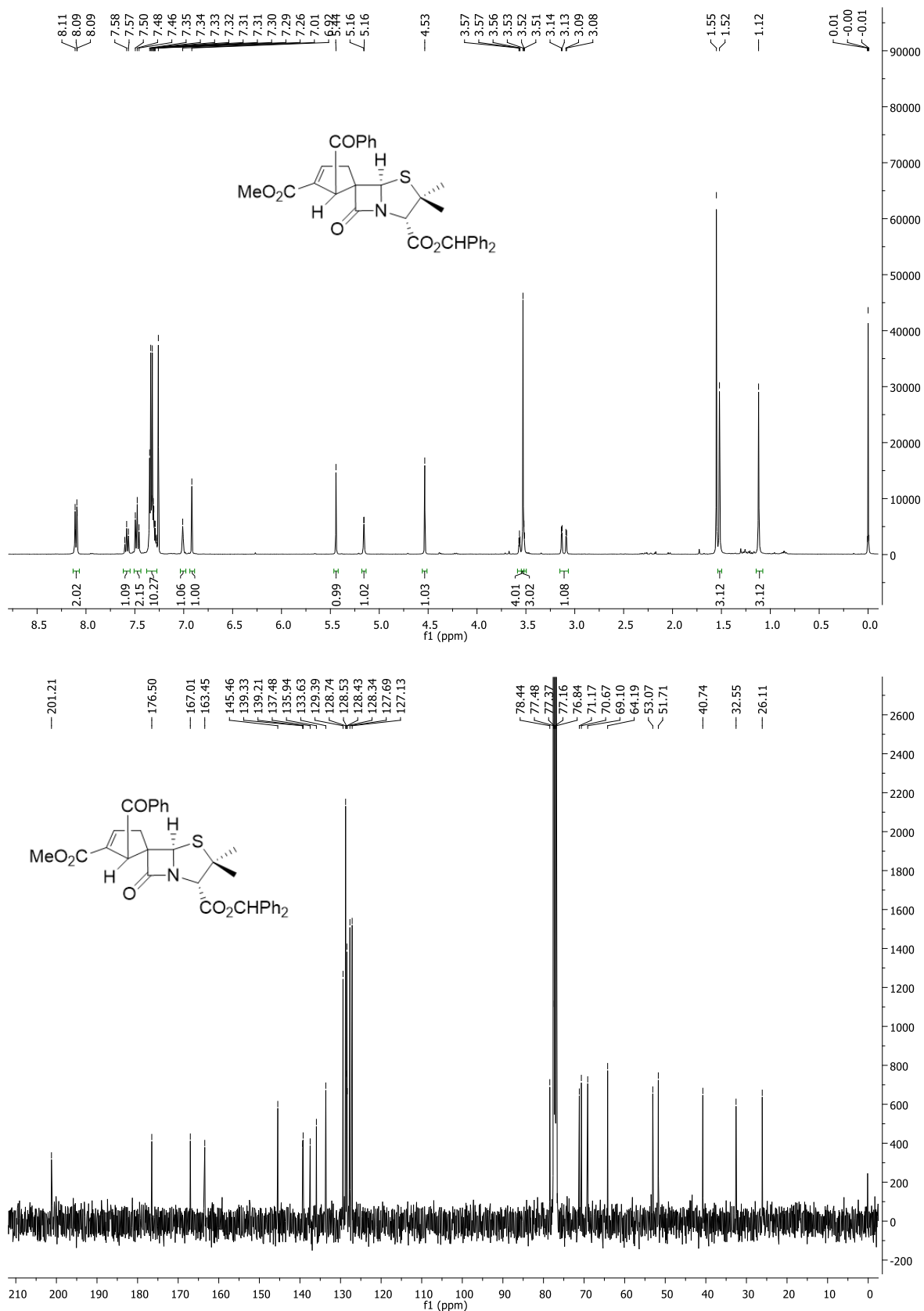
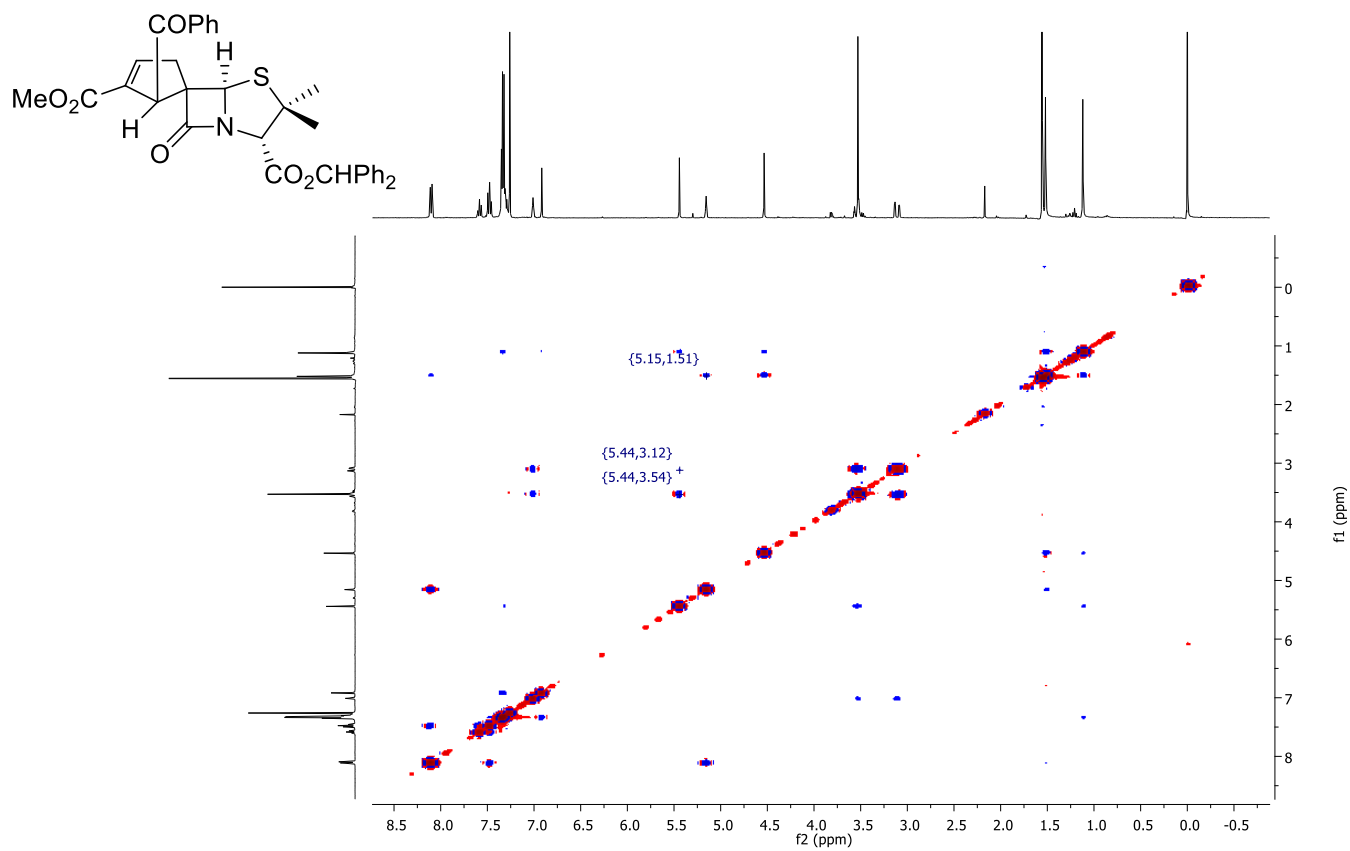


Figura 37 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 4.19b (CDCl<sub>3</sub>).





**Figura 38** - Espectro de NOESY do composto **4.19b** ( $\text{CDCl}_3$ ).

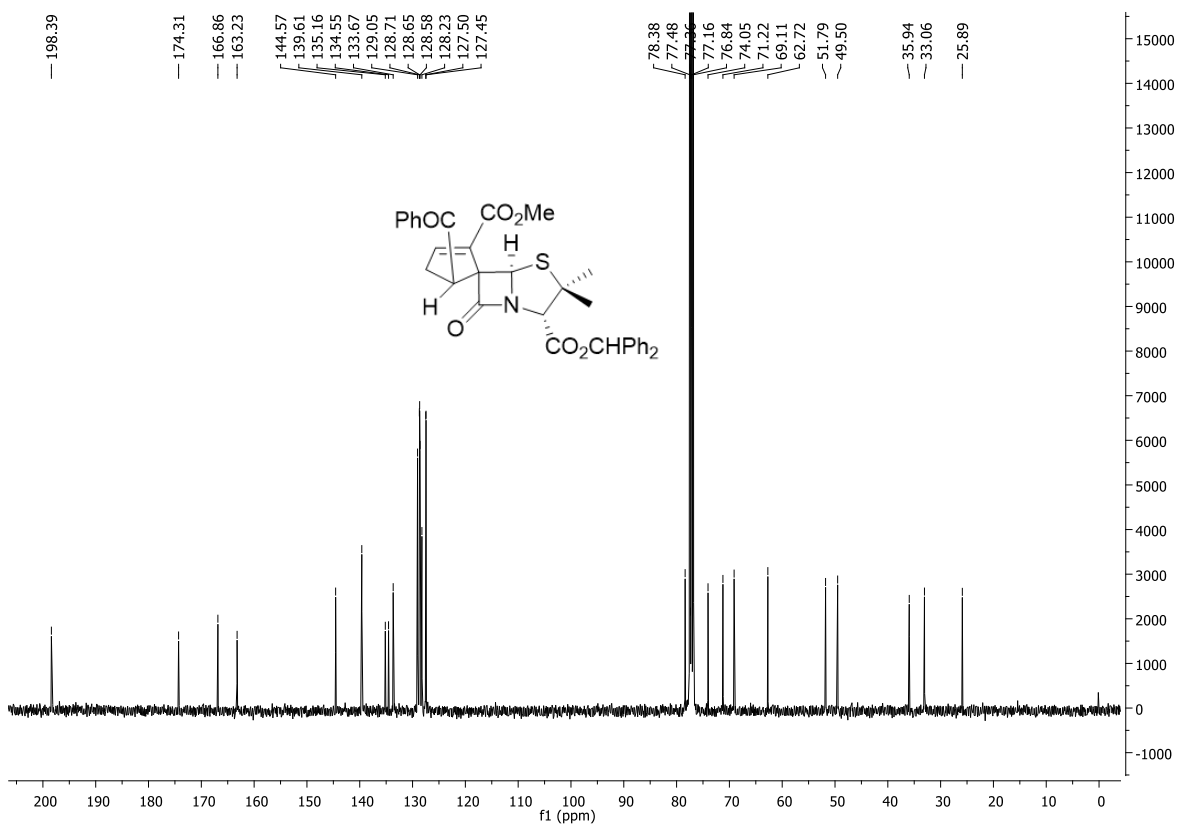
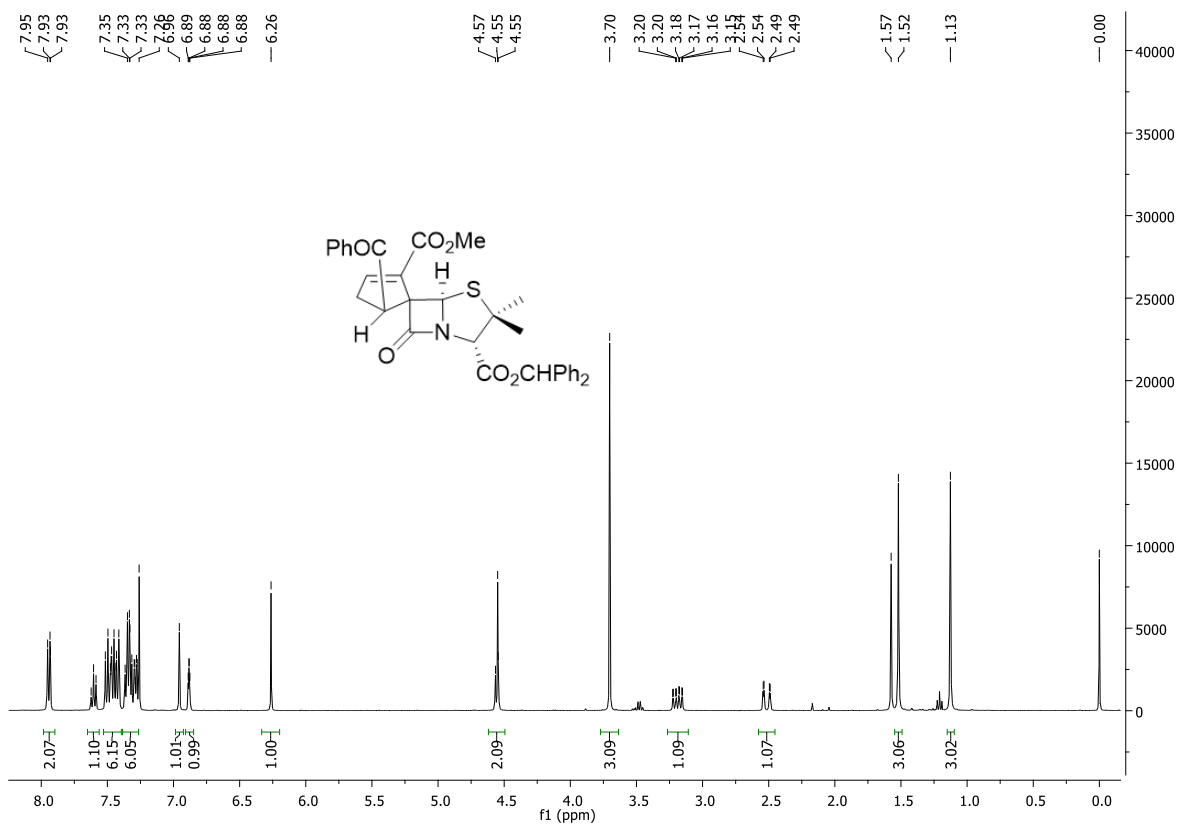
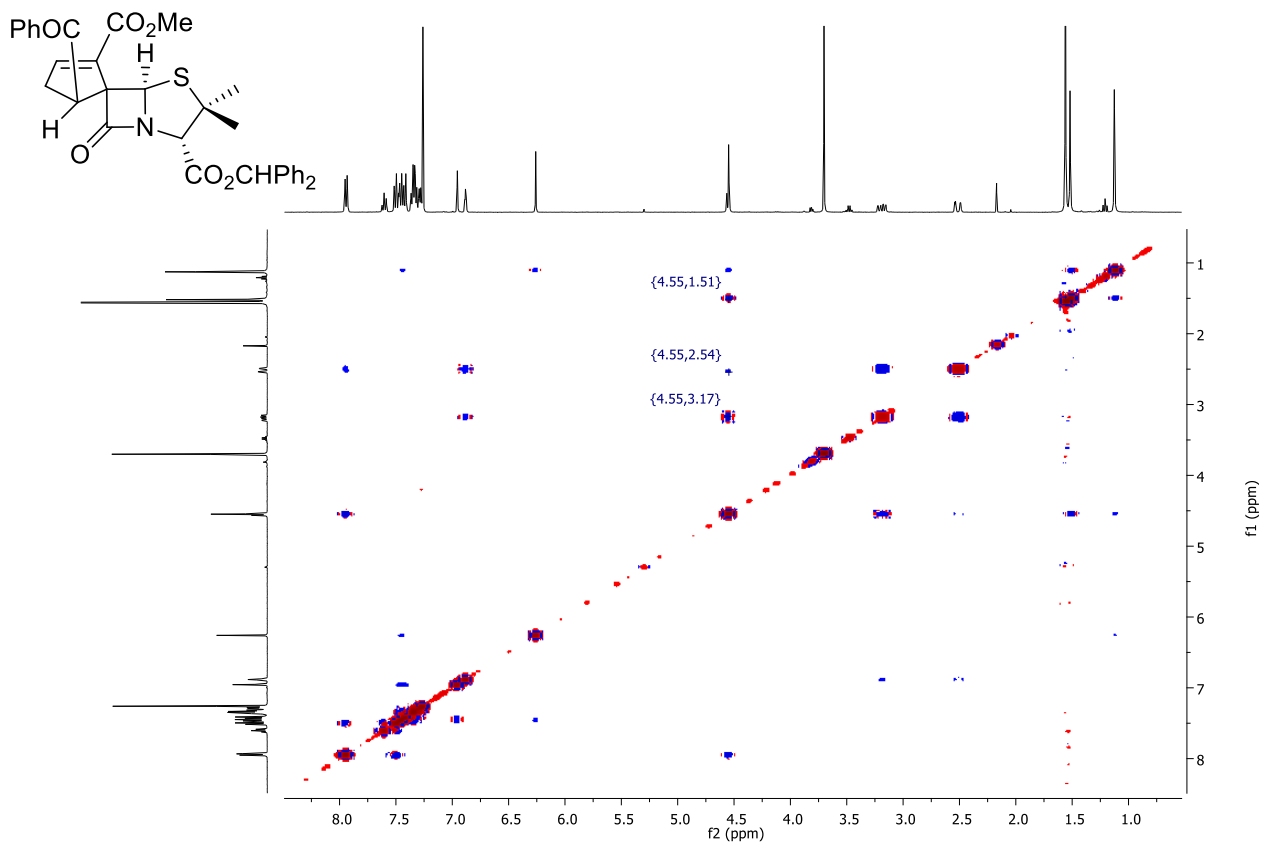


Figura 39 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 4.20b (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 40** - Espectro de NOESY do composto **4.20b** (CDCl<sub>3</sub>).

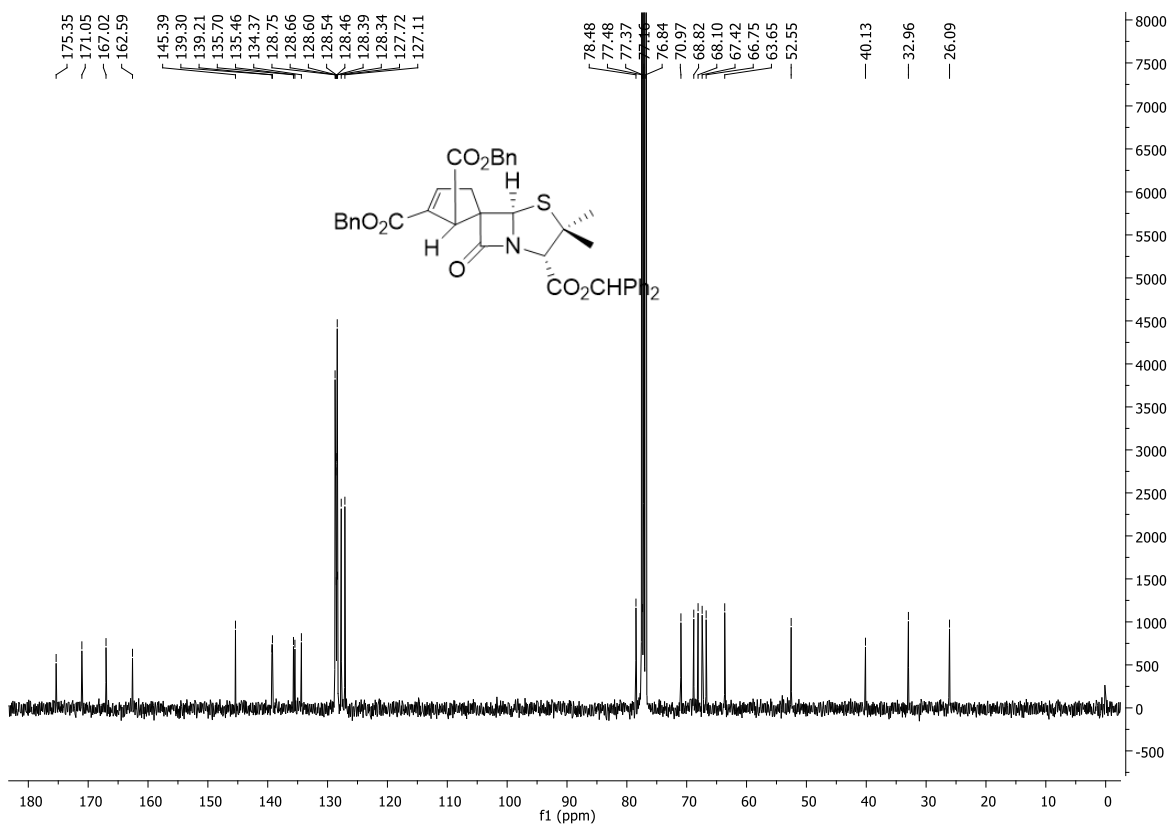
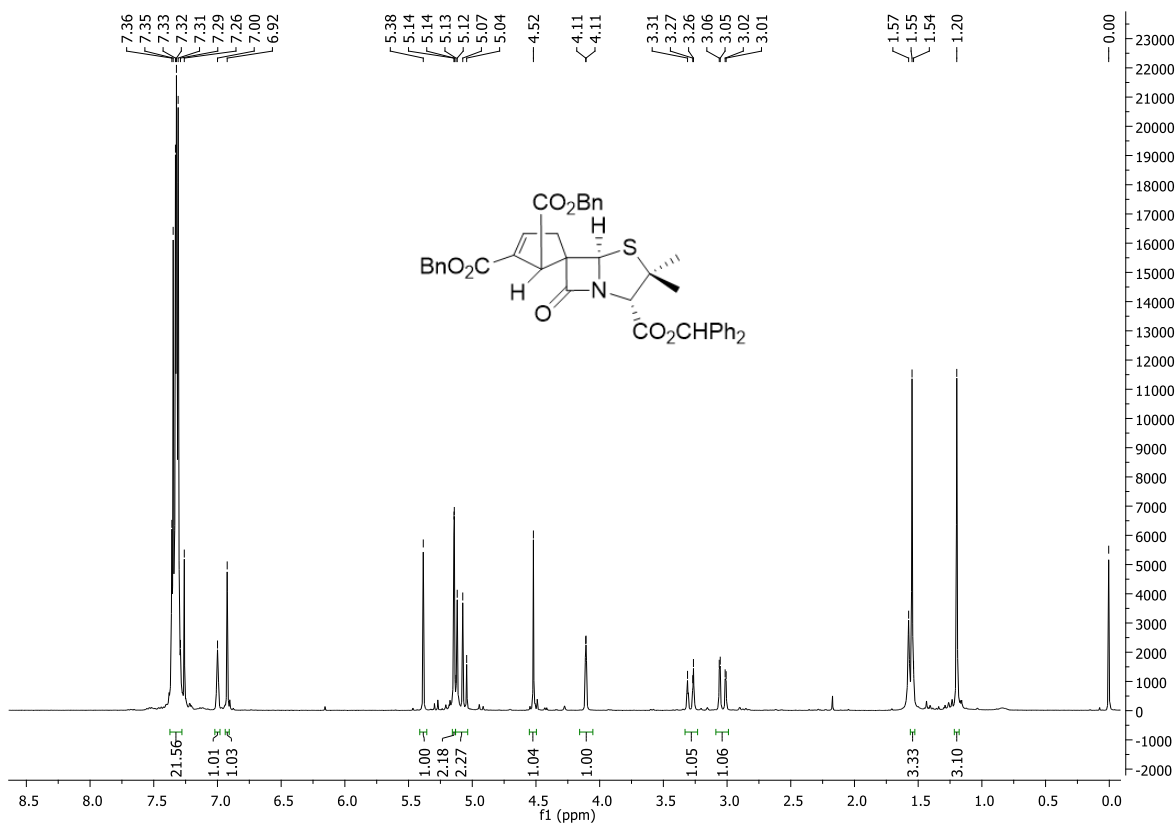
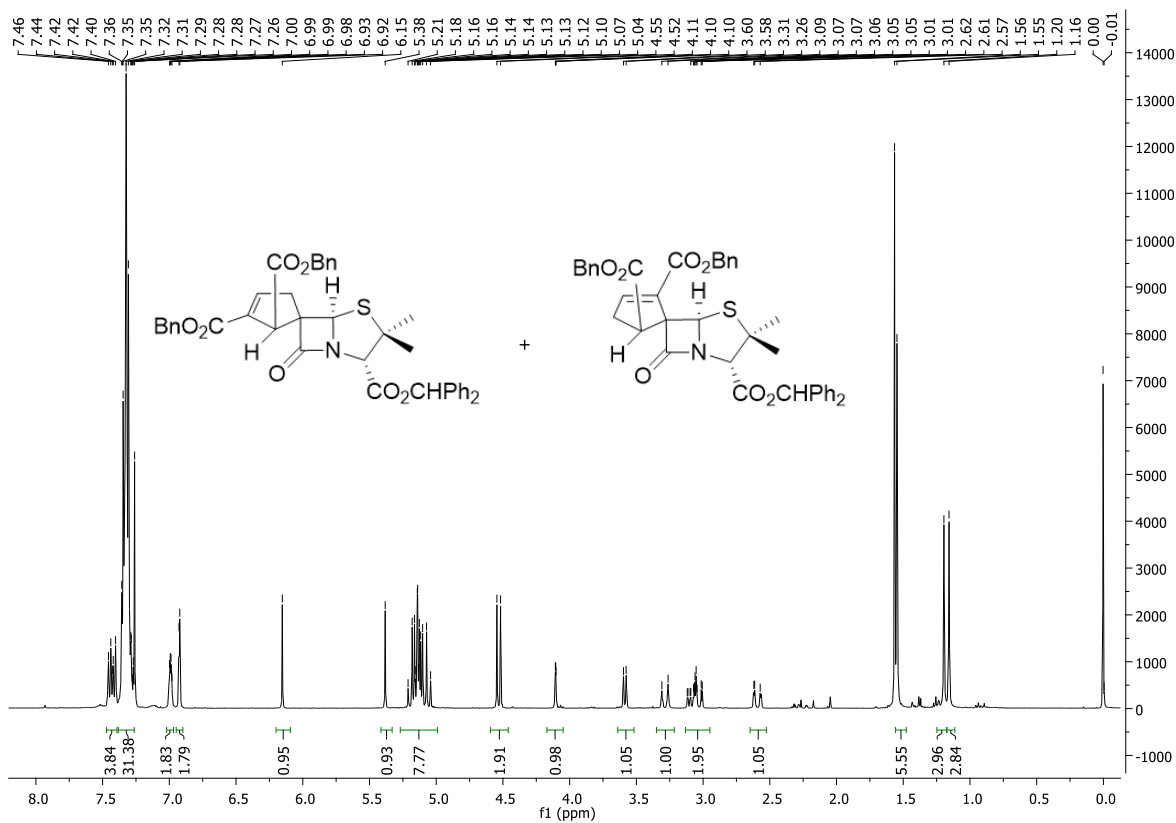


Figura 41 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 4.19c (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 42** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos compostos **4.19c** e **4.20c** ( $\text{CDCl}_3$ ).

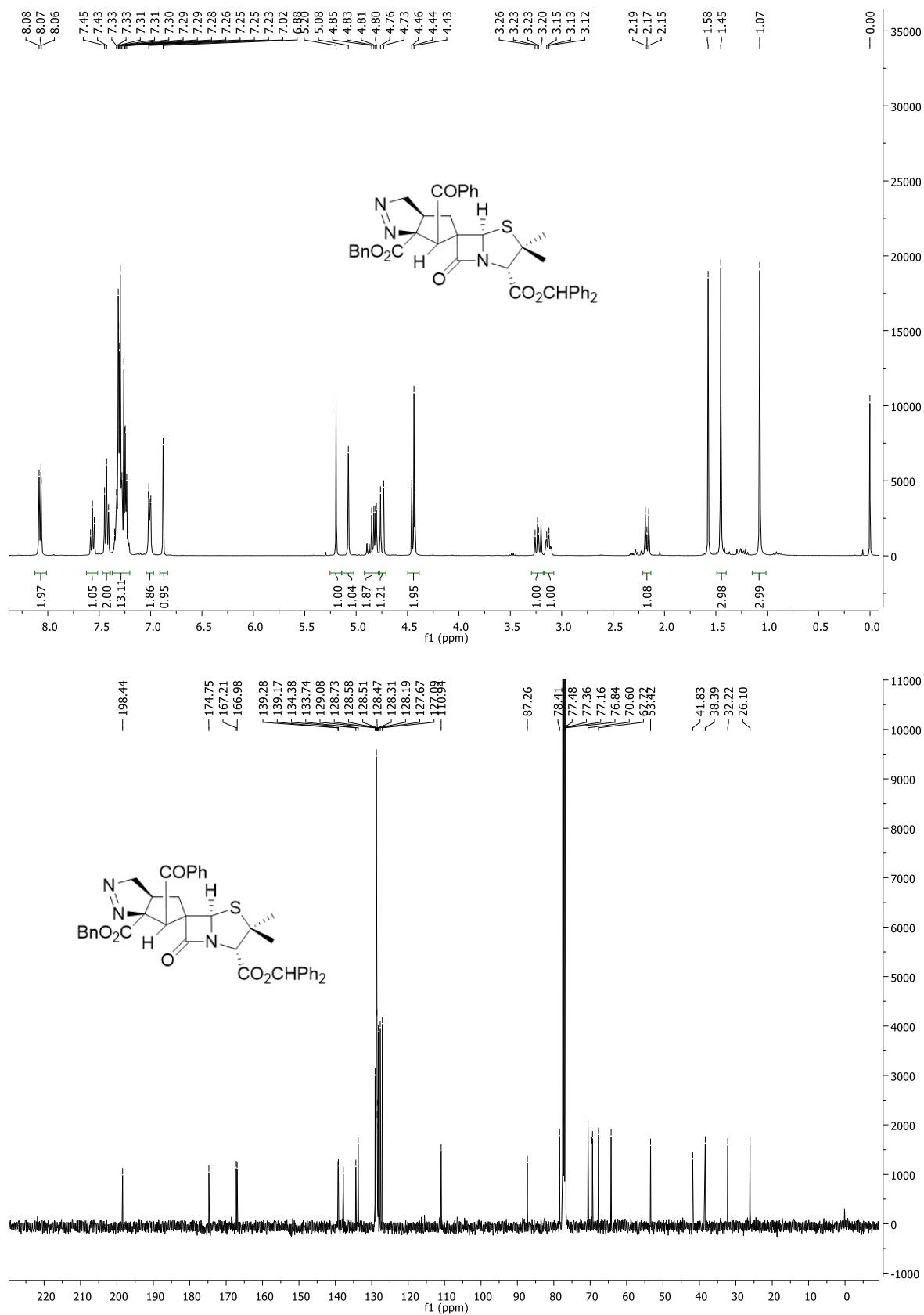


Figura 43 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **4.21** (CDCl<sub>3</sub>).

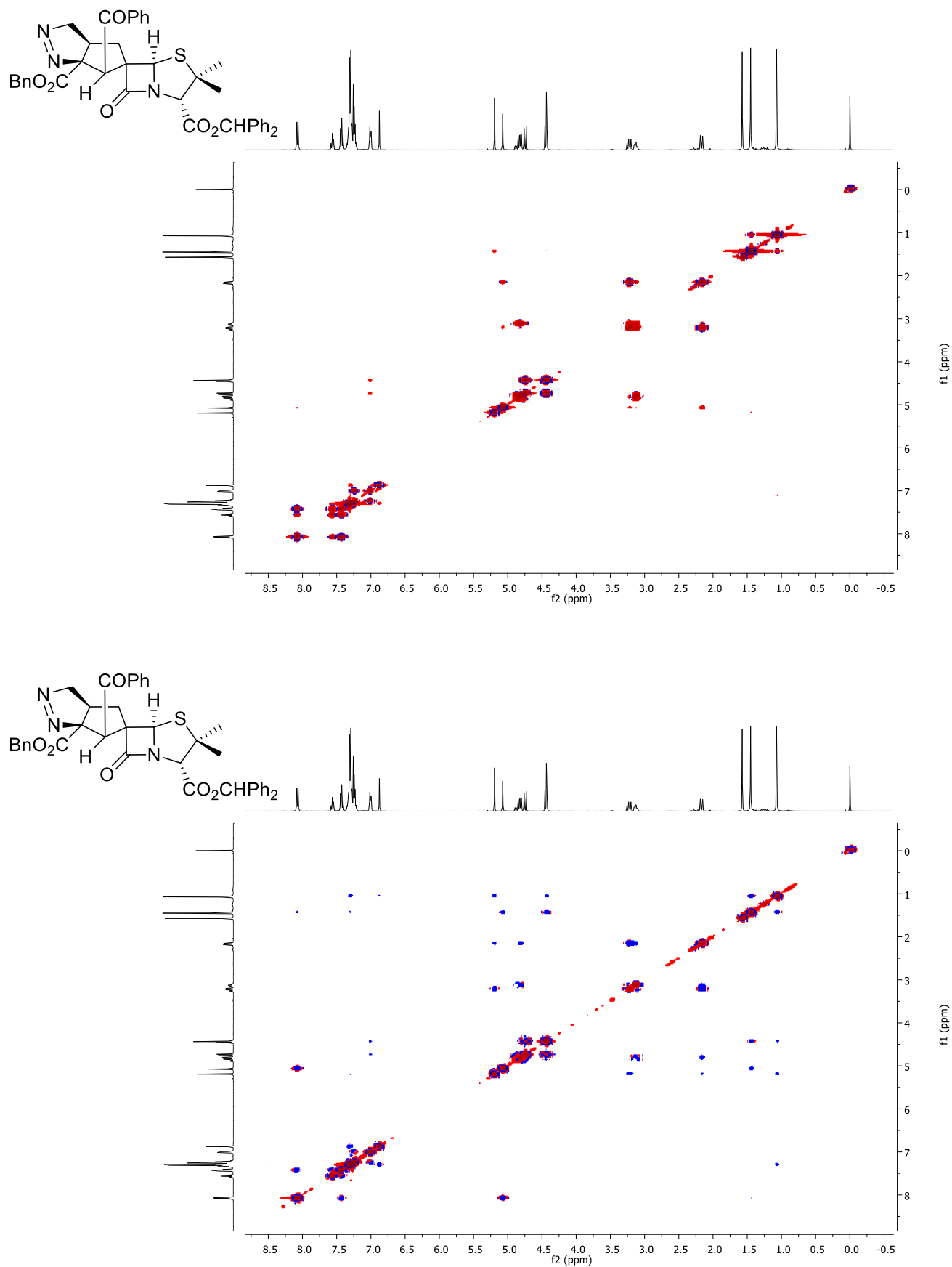
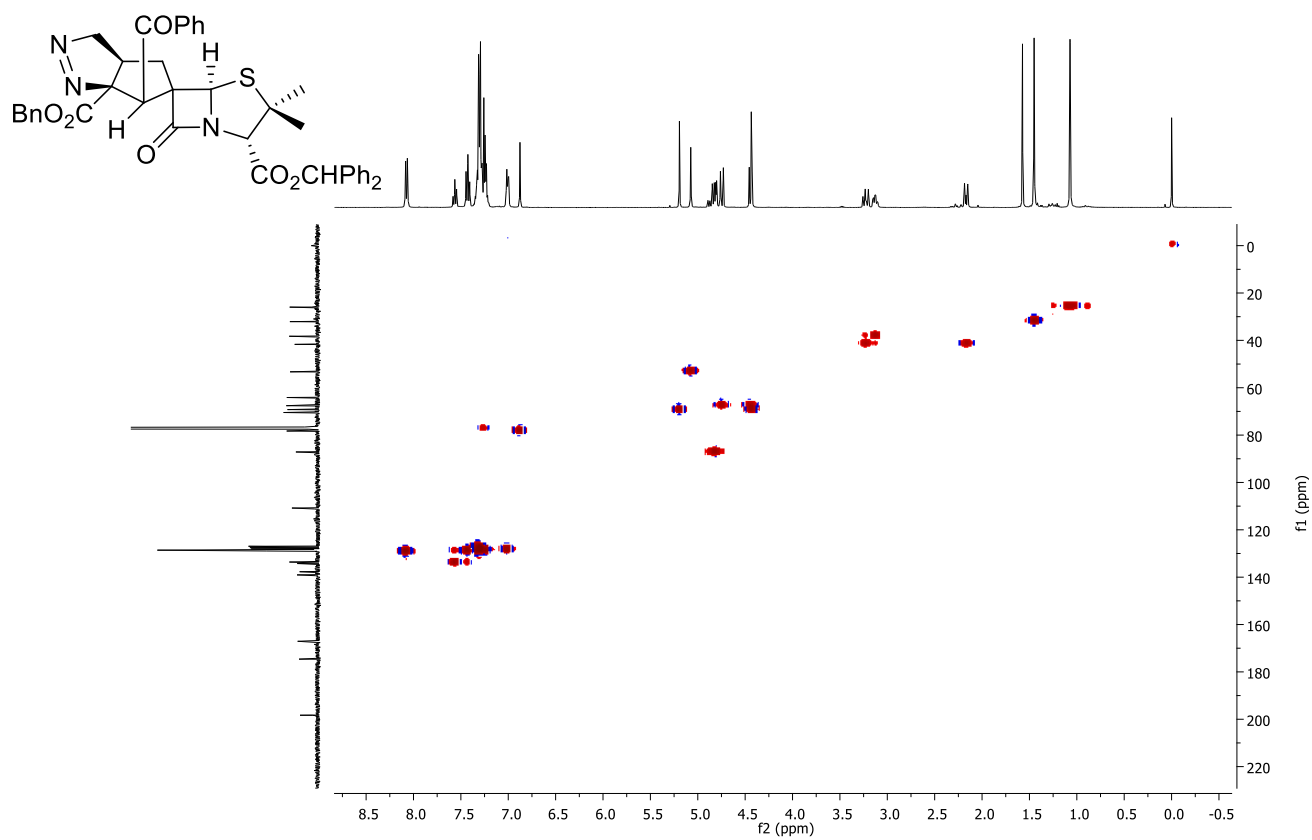


Figura 44 - Espectros de COSY e NOESY do composto 4.21 (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 45** - Espectro de HSQC do composto **4.21** (CDCl<sub>3</sub>).



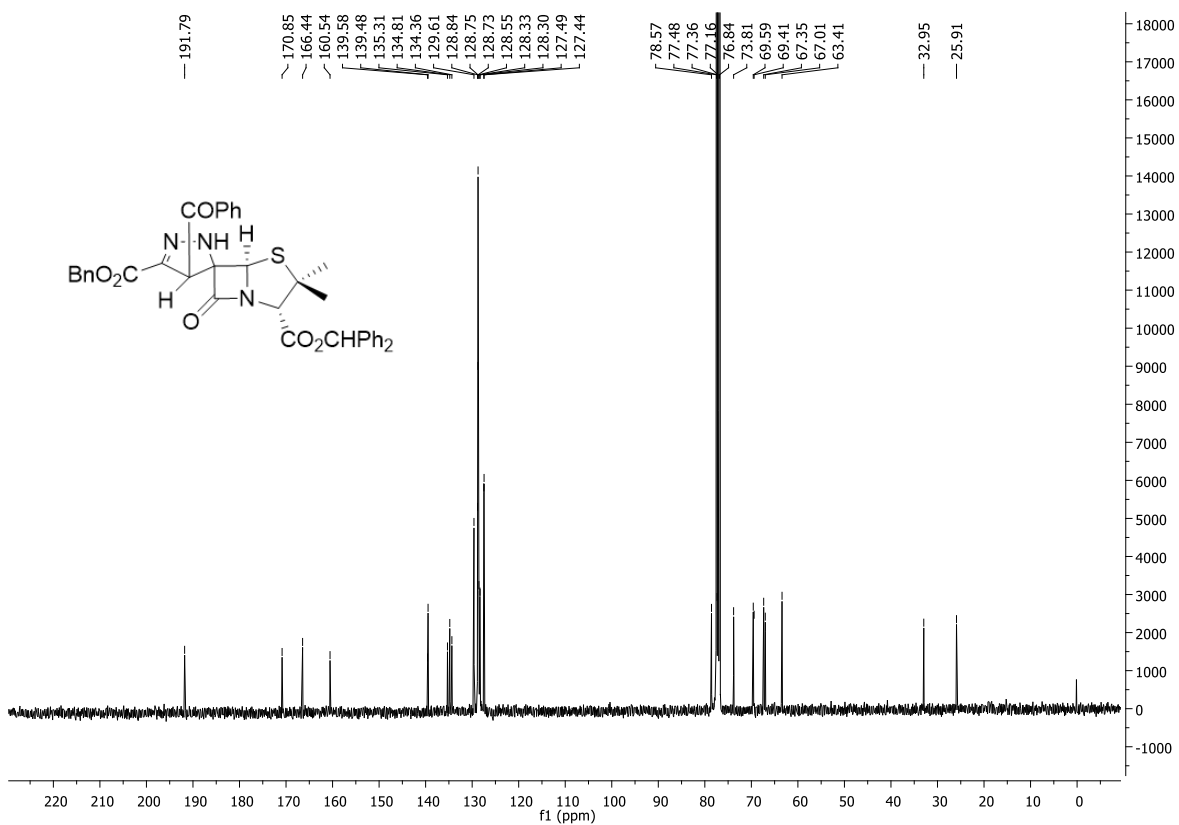
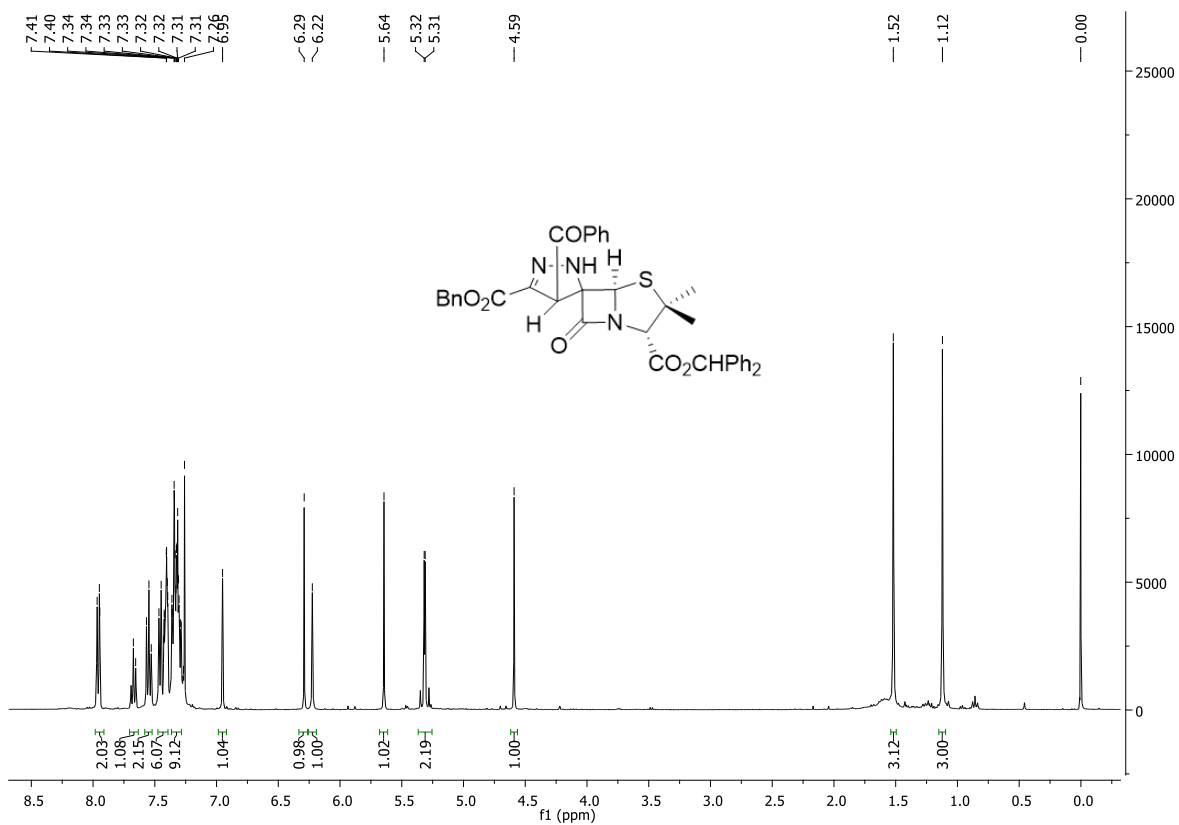
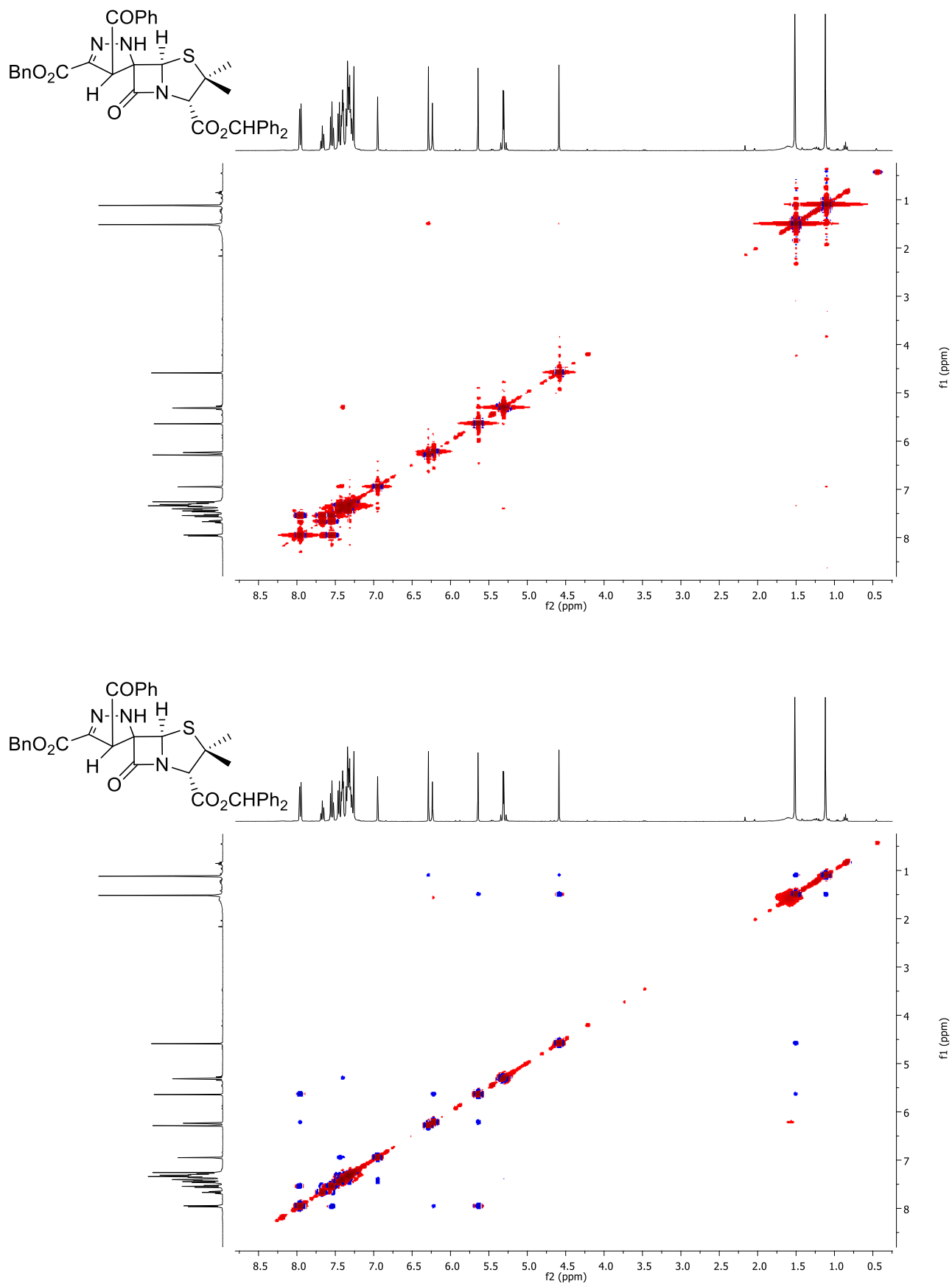


Figura 46 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **4.23** (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 47** - Espectros de COSY e NOESY do composto **4.23** (CDCl<sub>3</sub>).

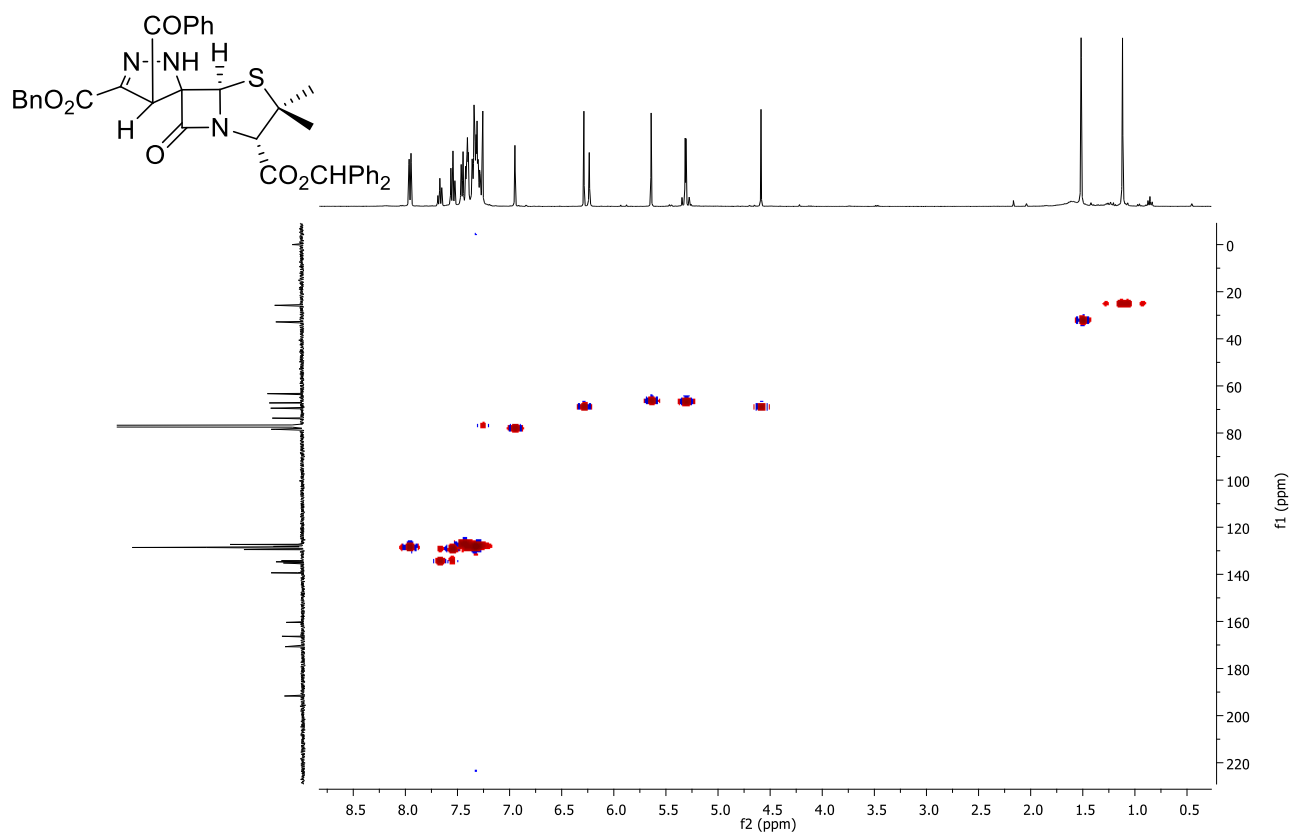


Figura 48 - Espectros de HSQC do composto 4.23 (CDCl<sub>3</sub>).

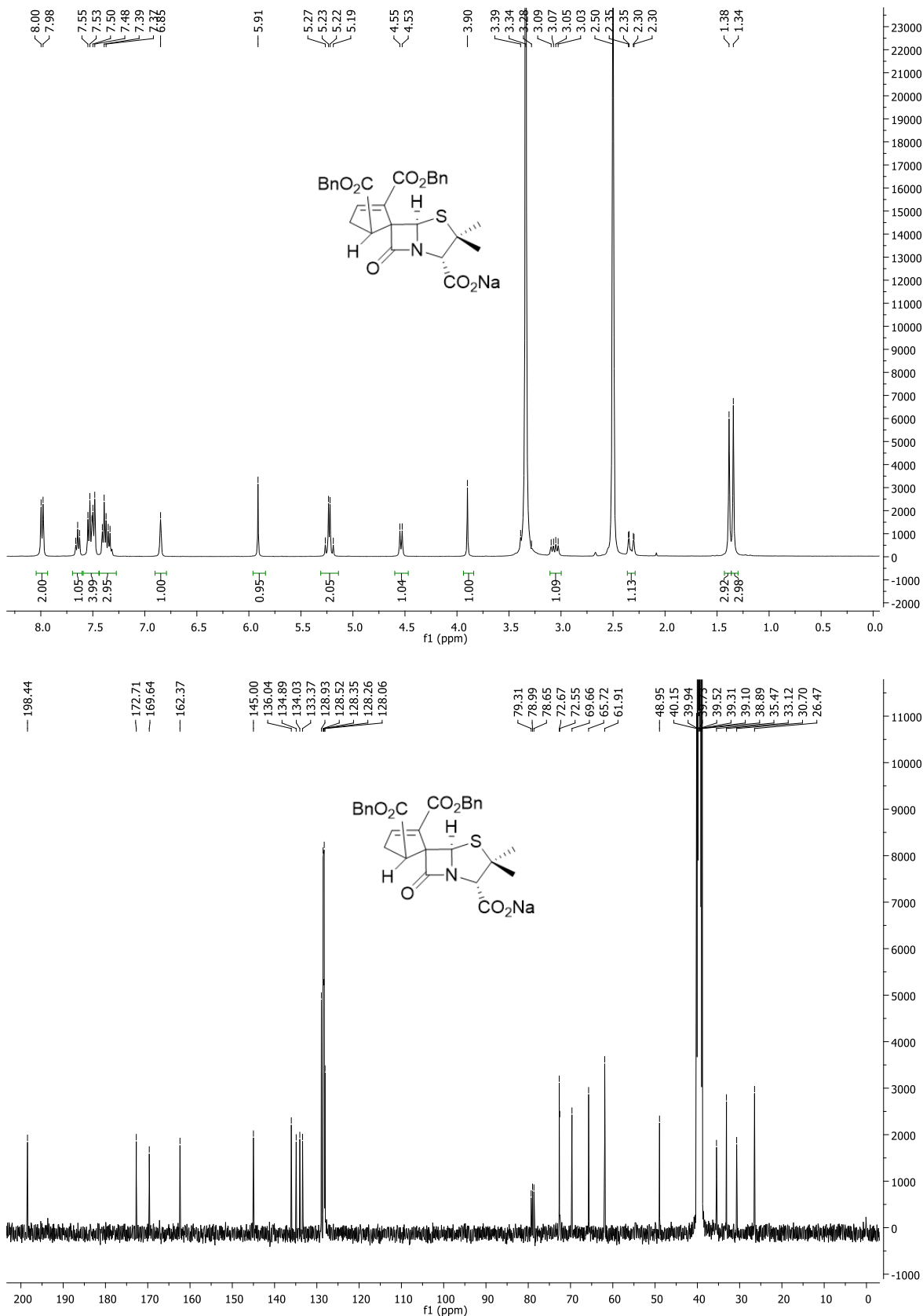
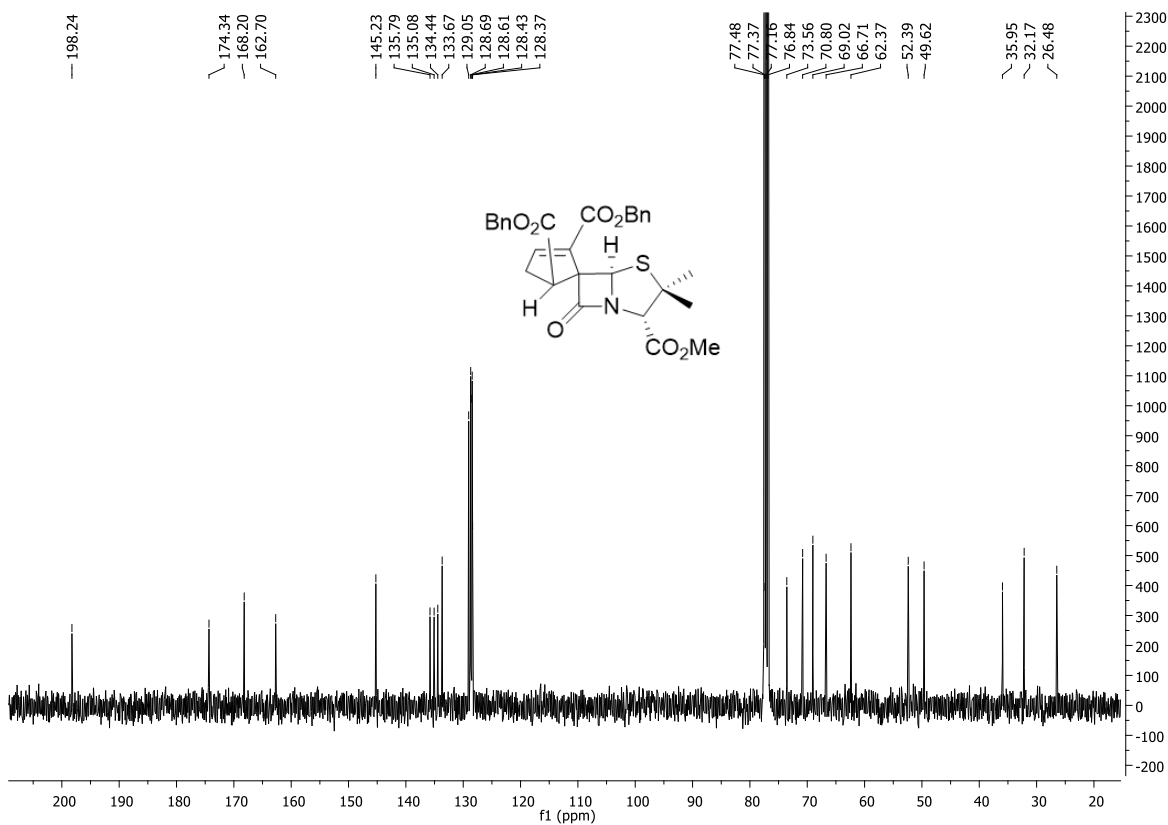
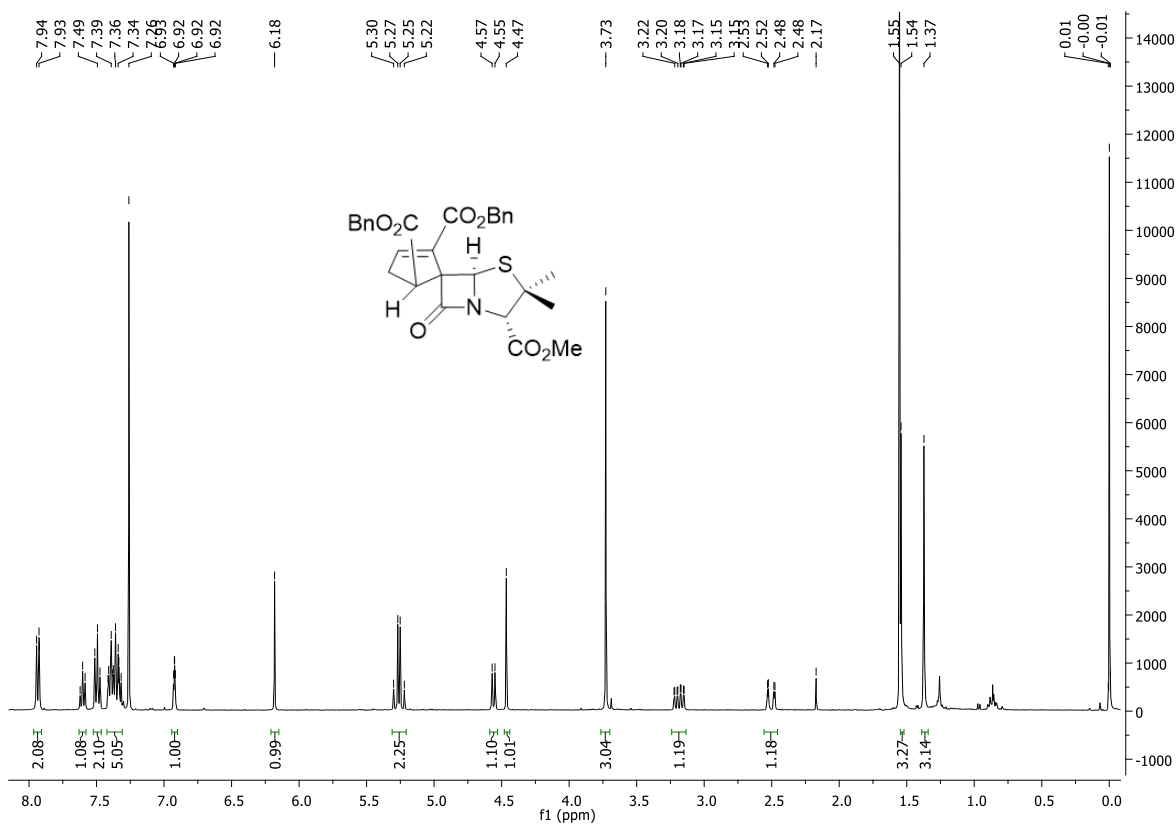


Figura 49 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 4.27 (DMSO-d<sub>6</sub>).



**Figura 50** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **4.28** (CDCl<sub>3</sub>).

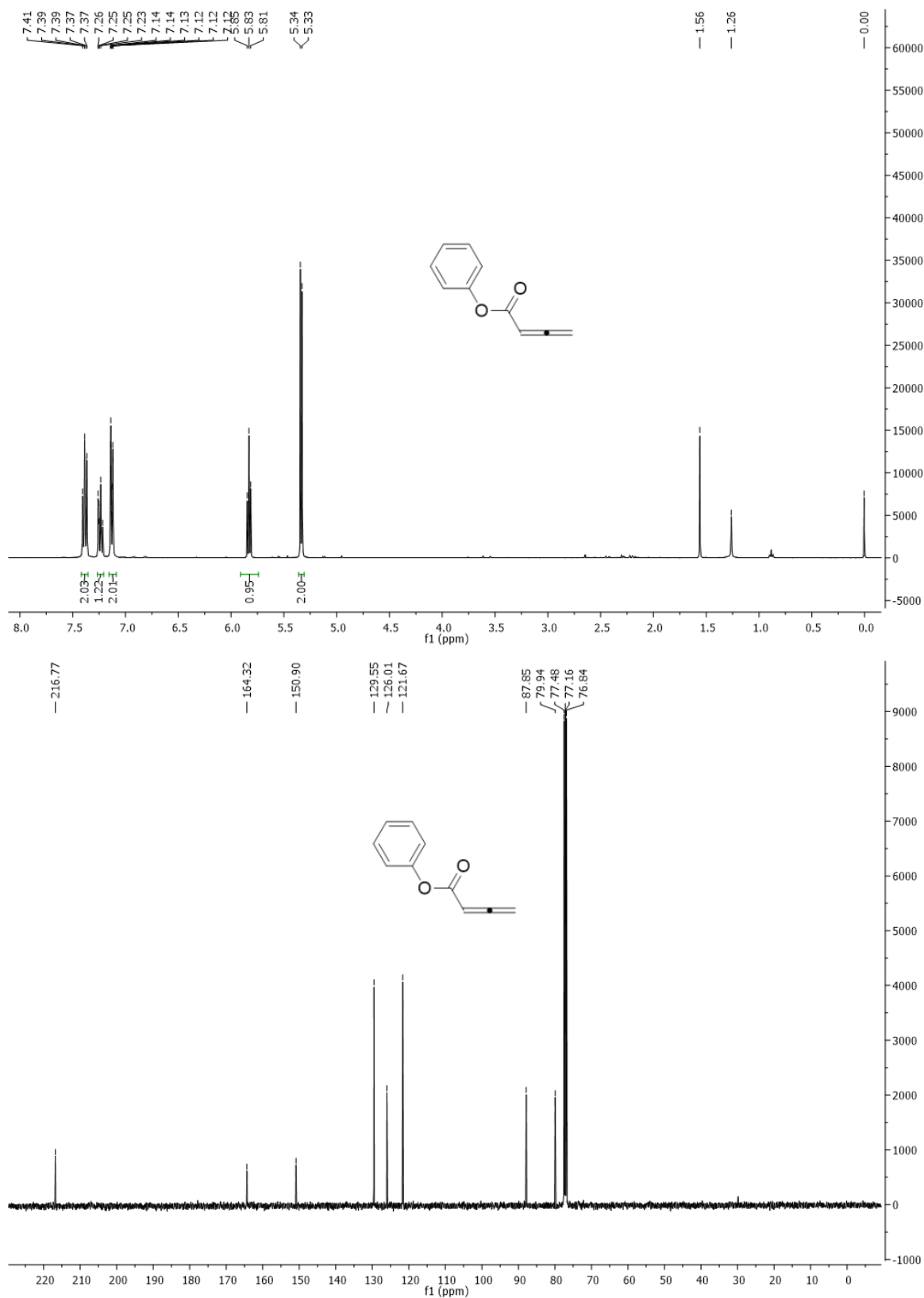


Figura 51 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.6a (CDCl<sub>3</sub>).

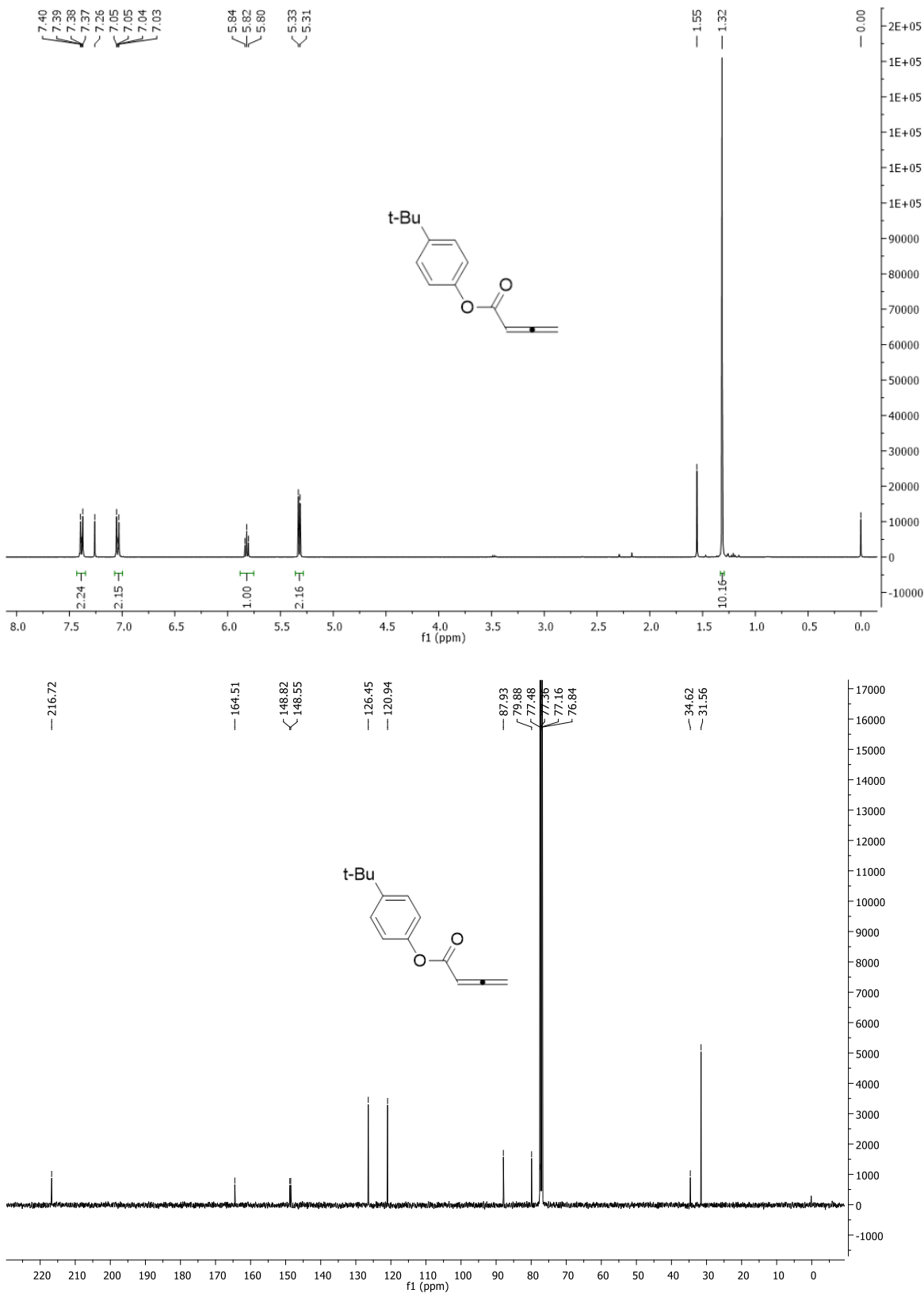


Figura 52 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.6b** (CDCl<sub>3</sub>).

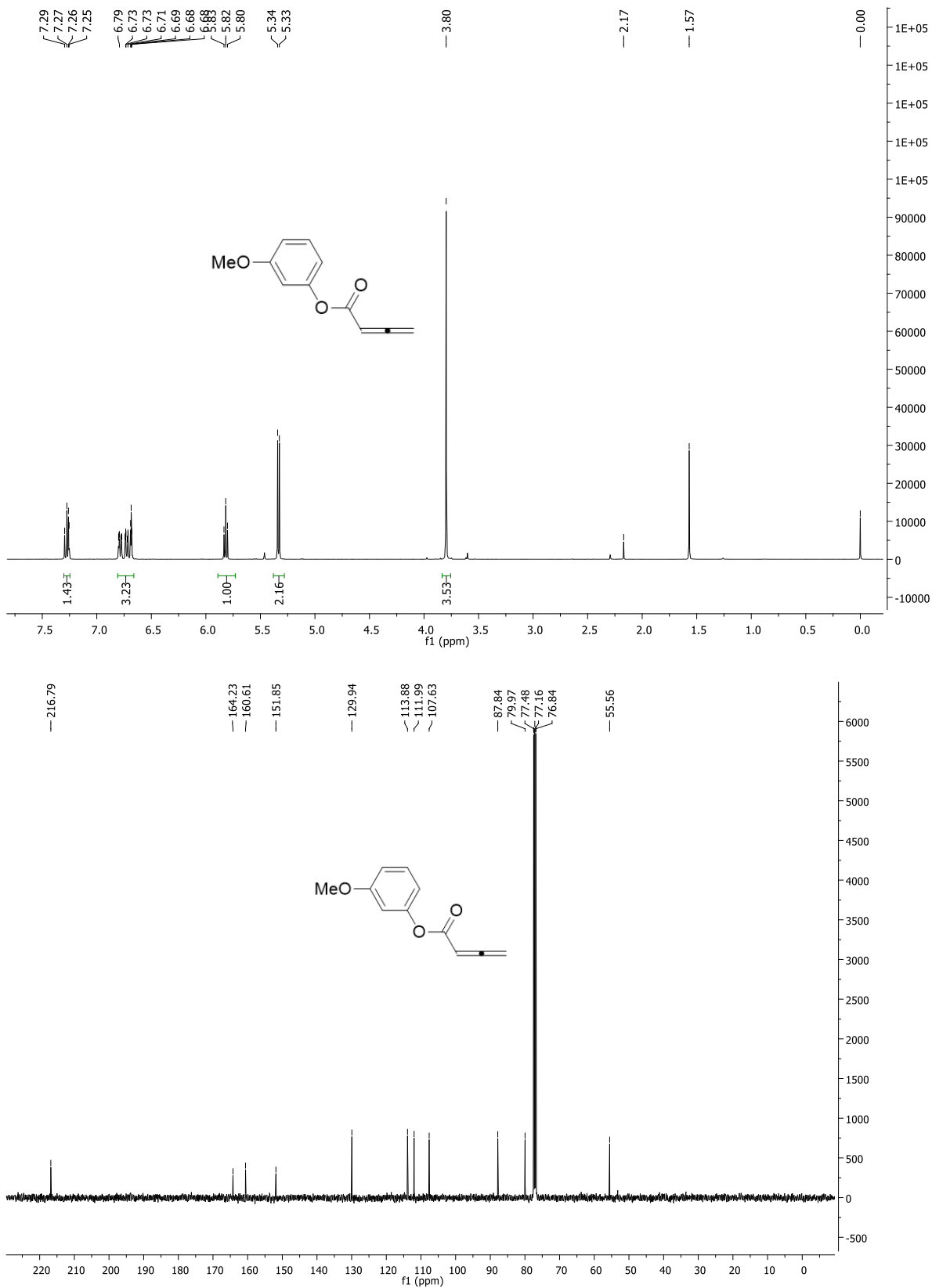


Figura 53 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.6c** (CDCl<sub>3</sub>).



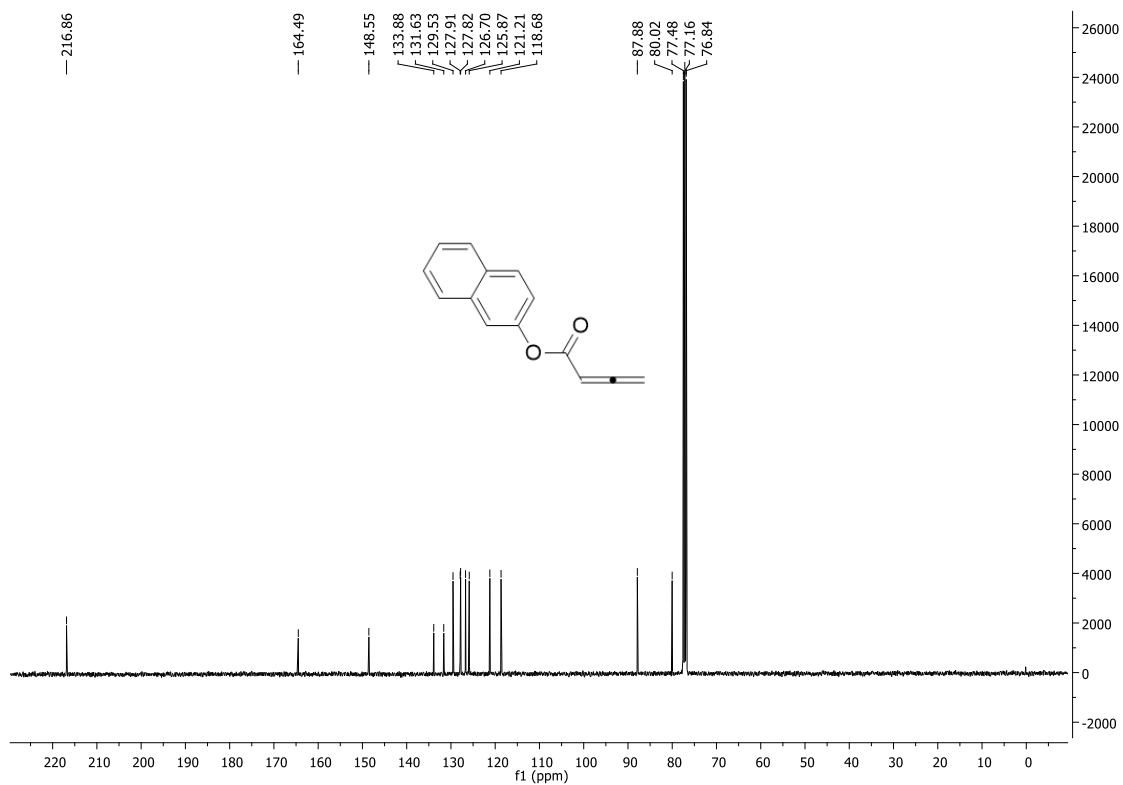
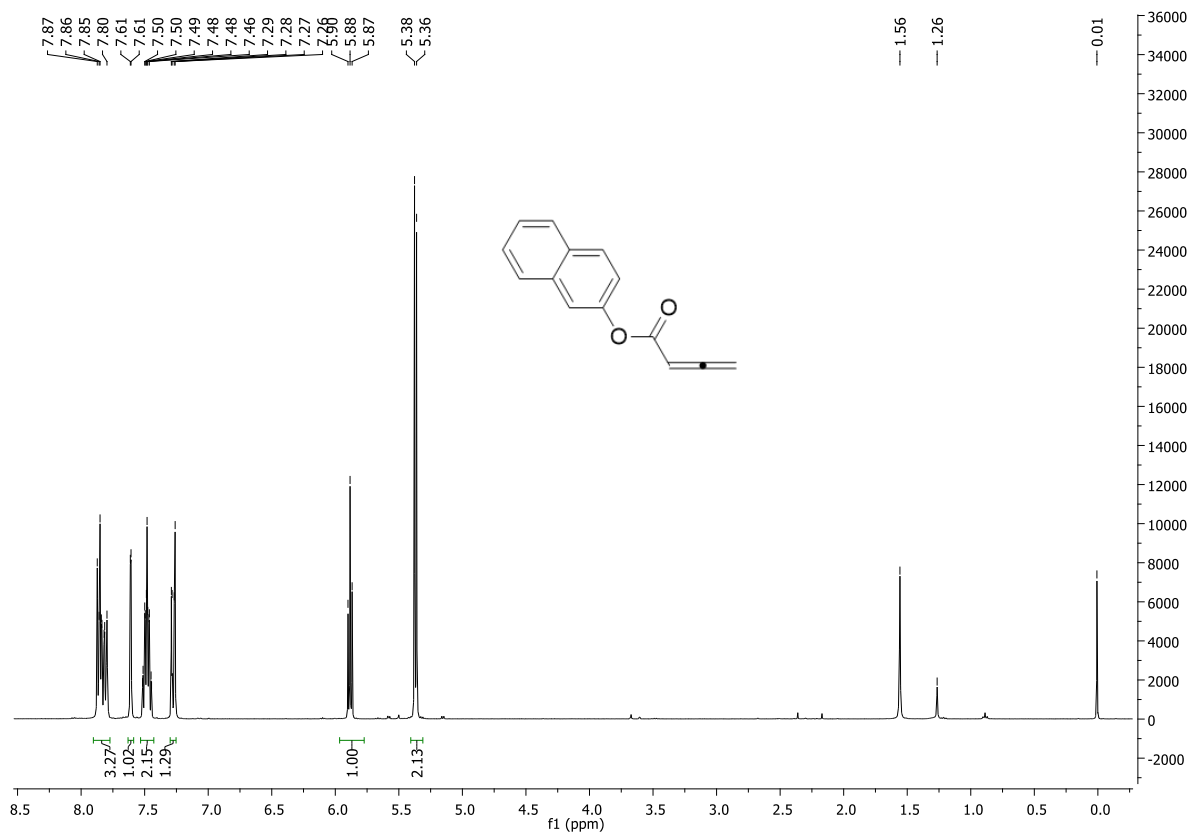


Figura 54 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.6d** (CDCl<sub>3</sub>).

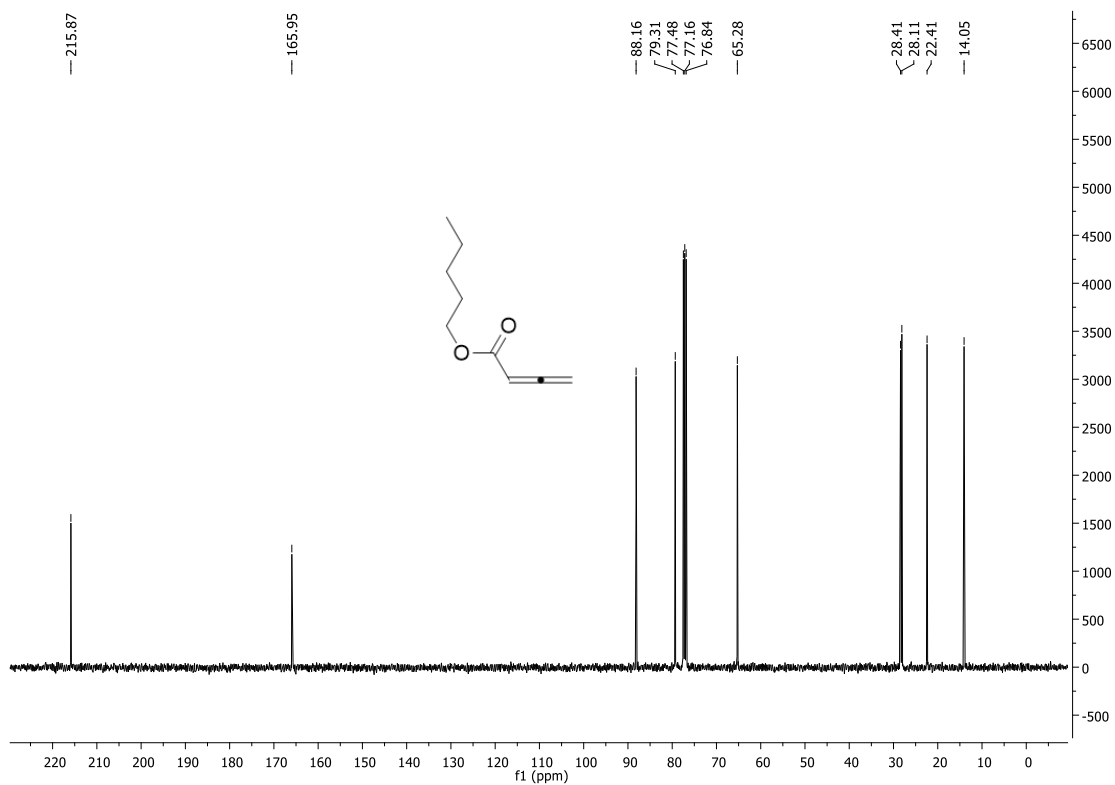
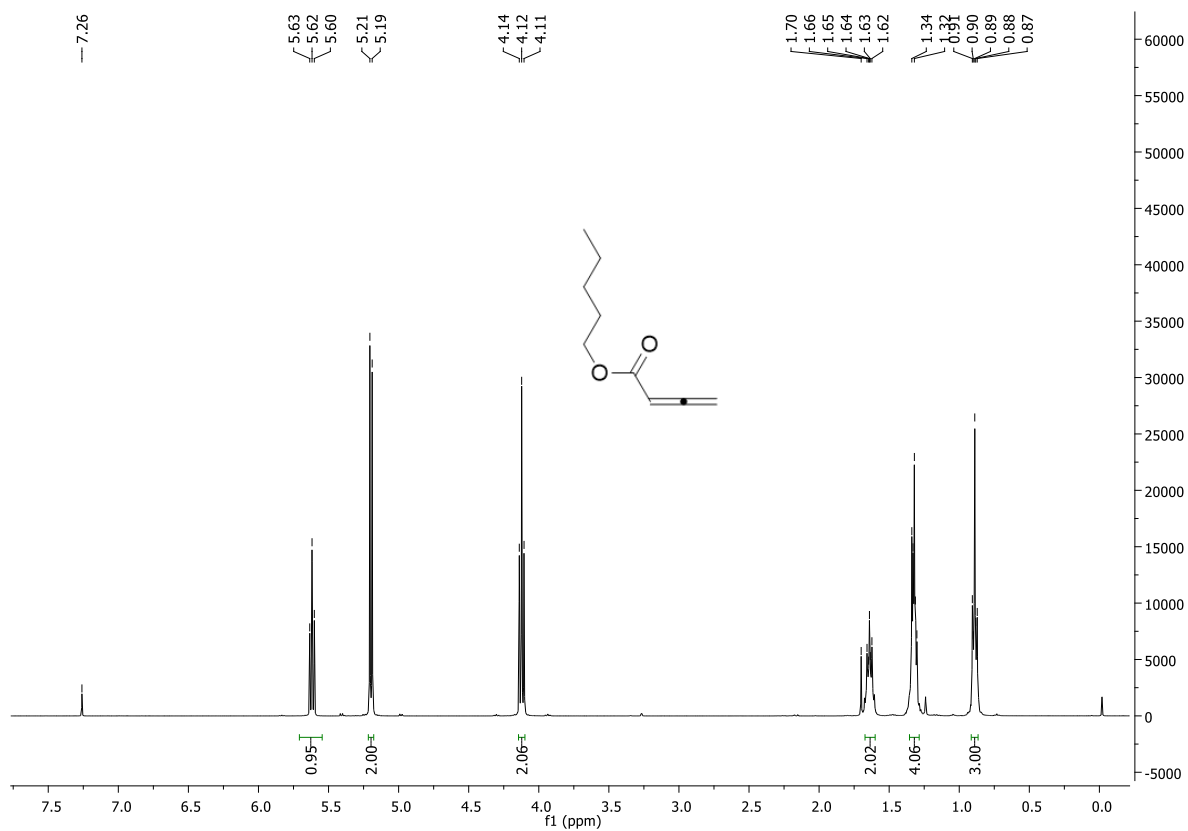


Figura 55 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **5.6e** ( $\text{CDCl}_3$ ).

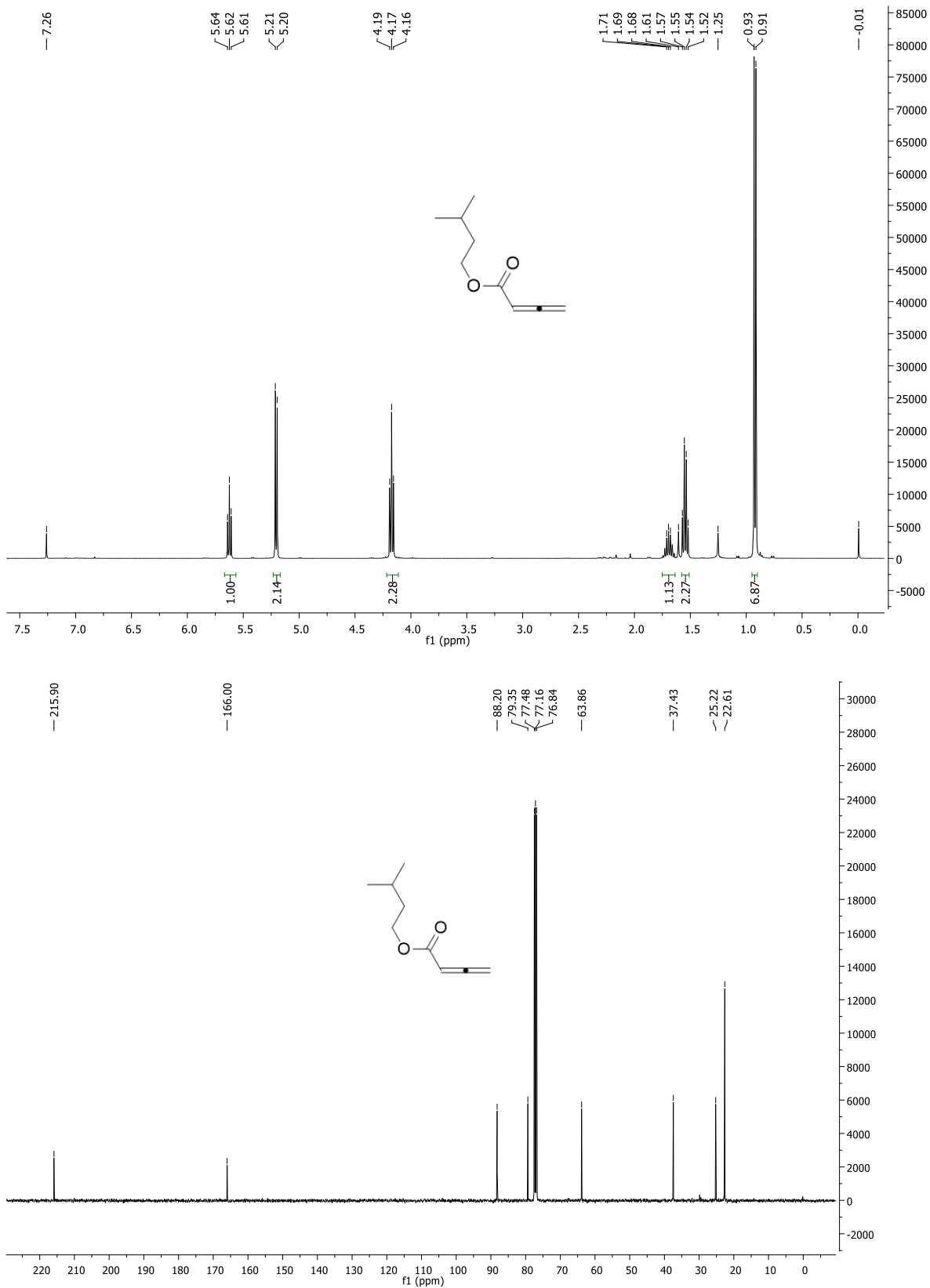
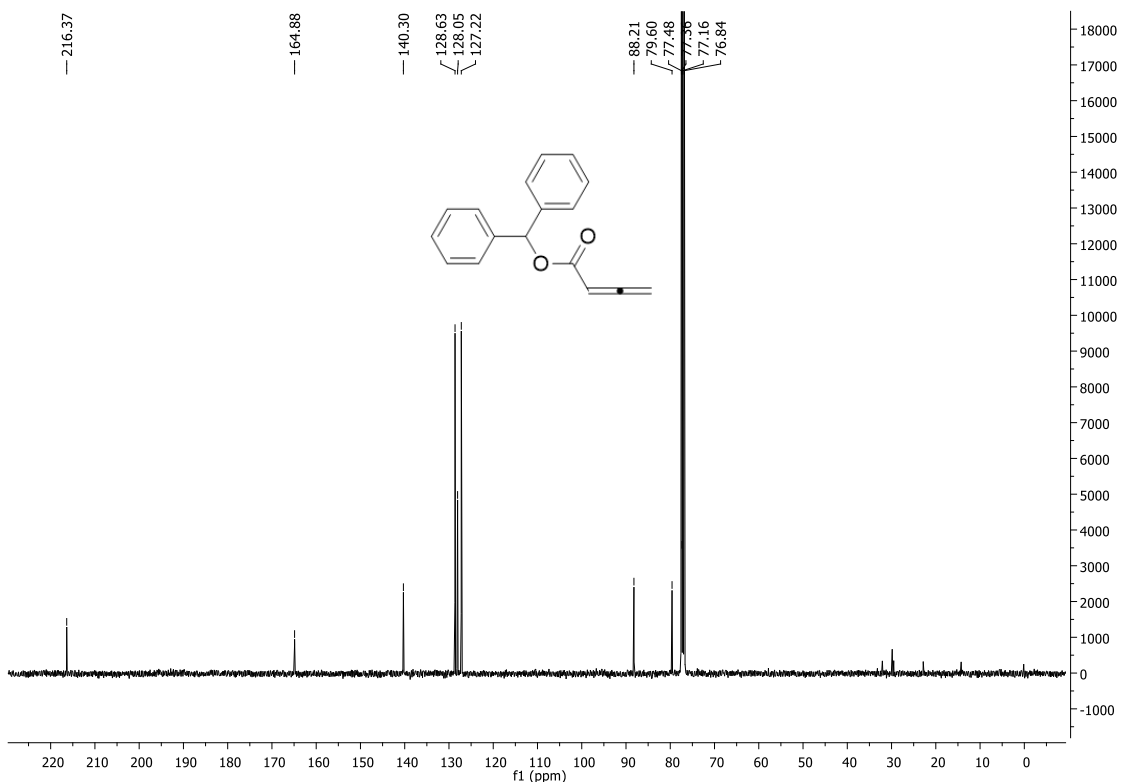
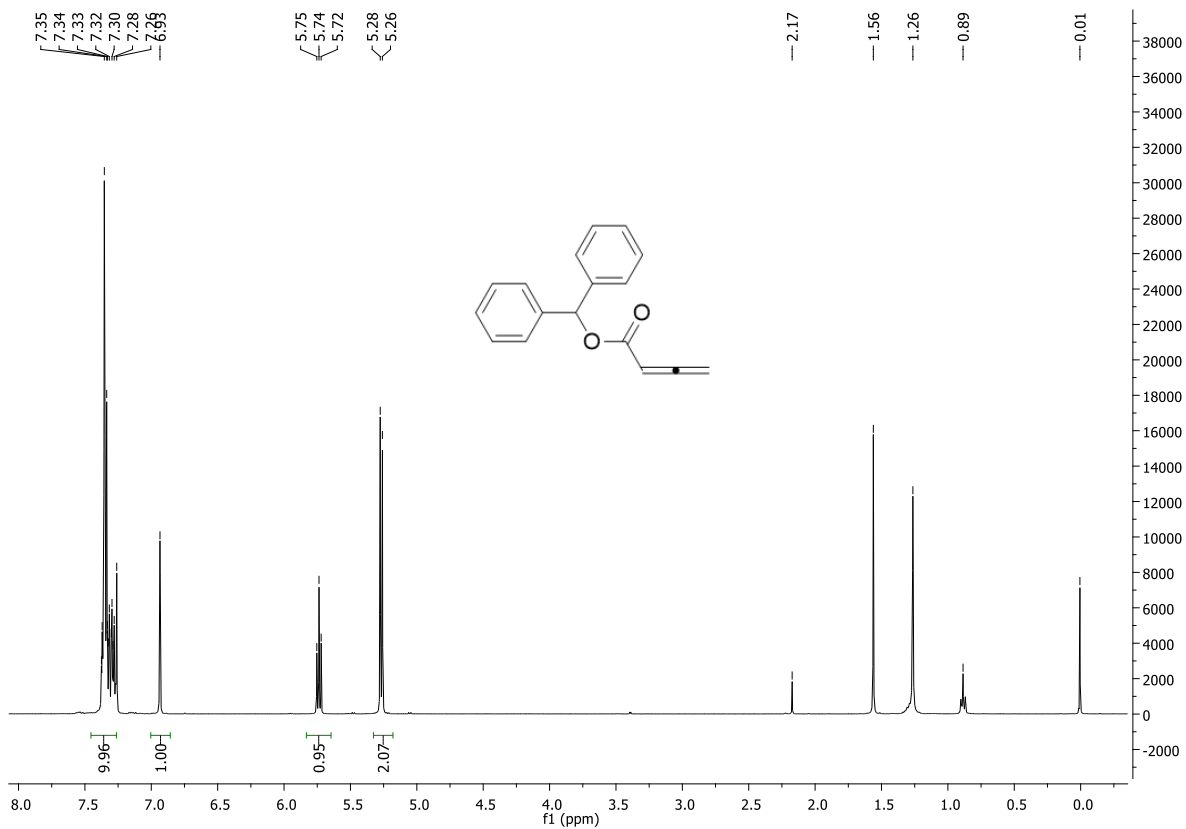


Figura 56 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.6f** (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 57** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.6h** (CDCl<sub>3</sub>).

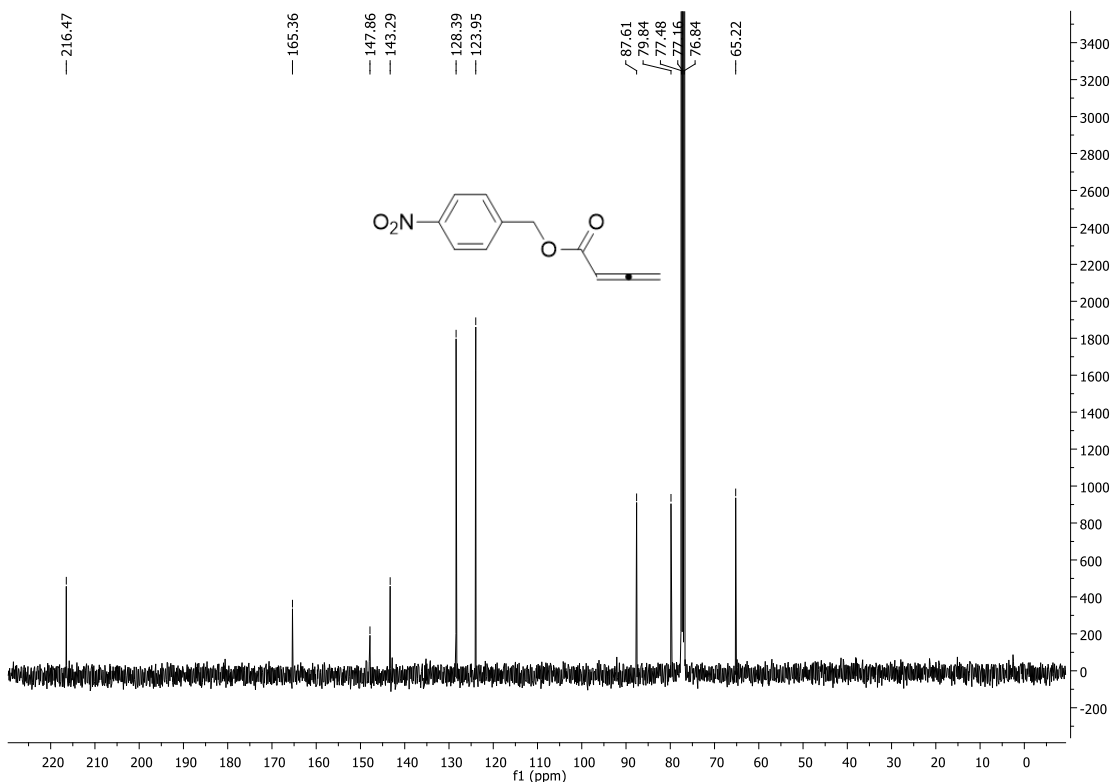
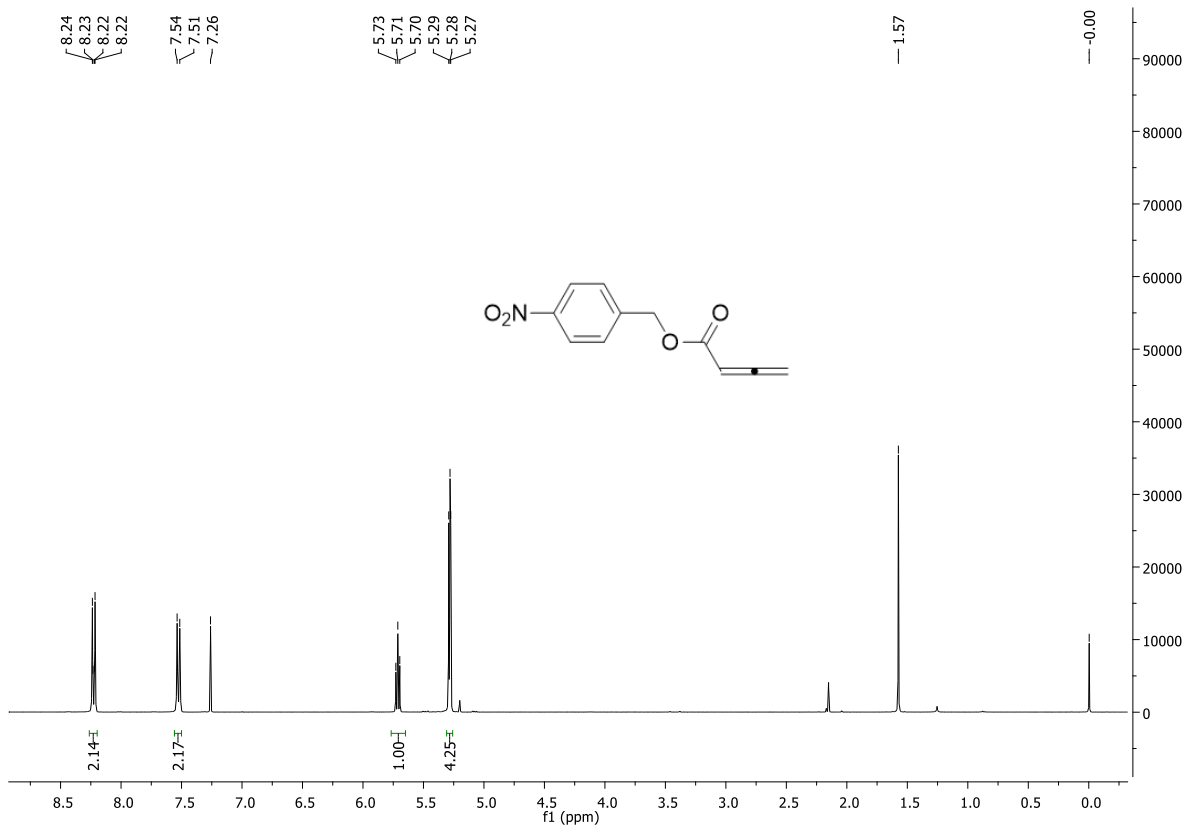


Figura 58 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.6i** (CDCl<sub>3</sub>).

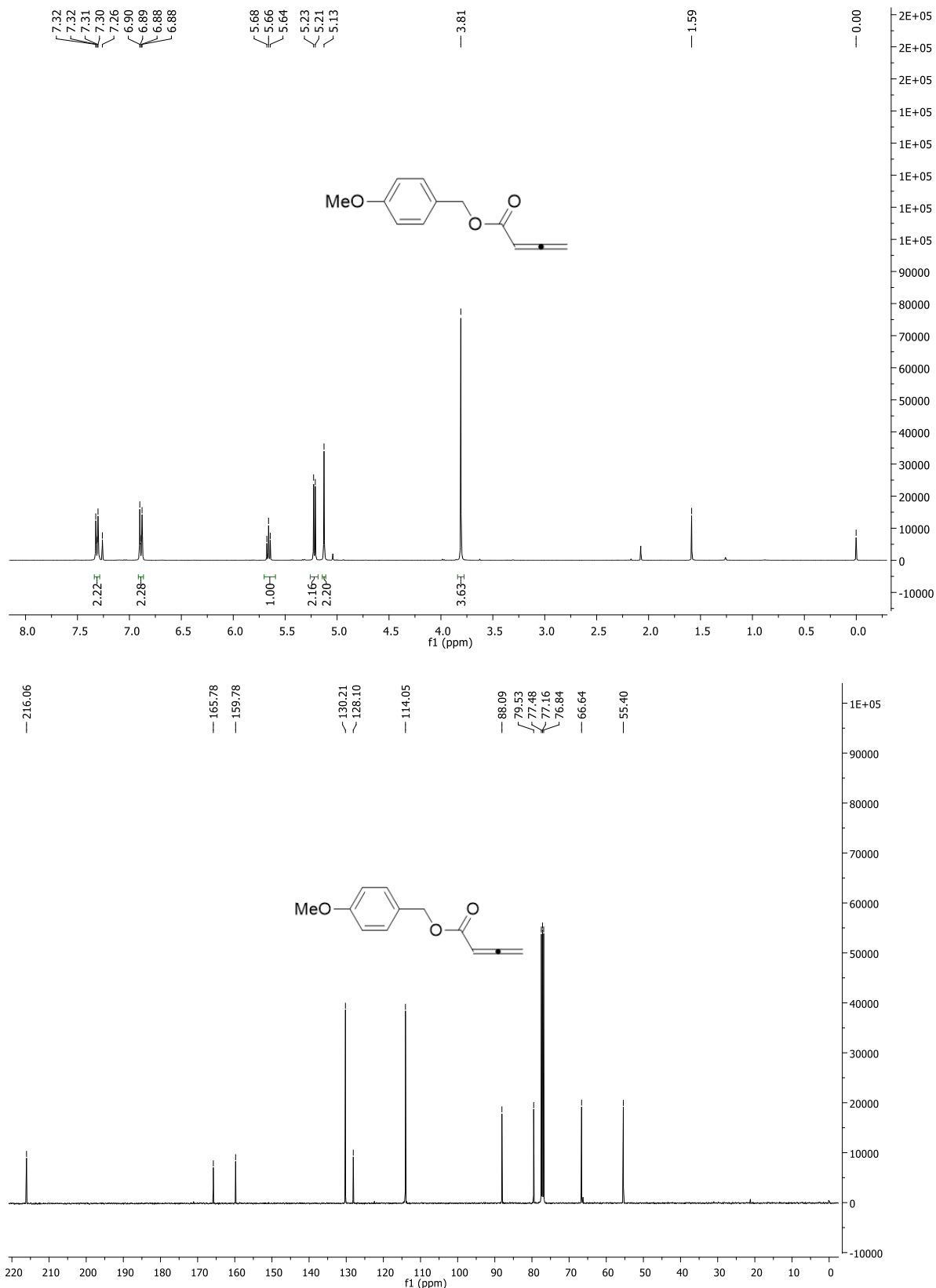


Figura 59 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.6j (CDCl<sub>3</sub>).

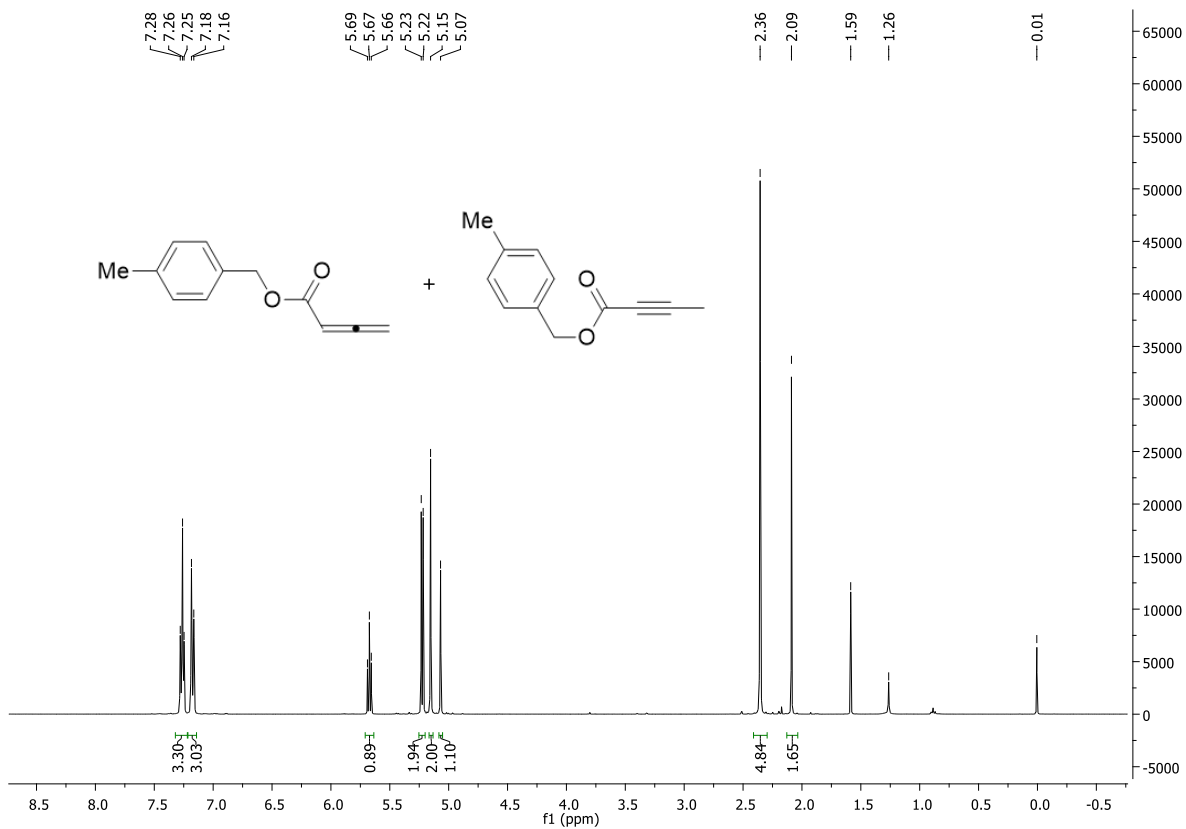


Figura 60 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos compostos **5.6k** e **5.6k'** ( $\text{CDCl}_3$ ).

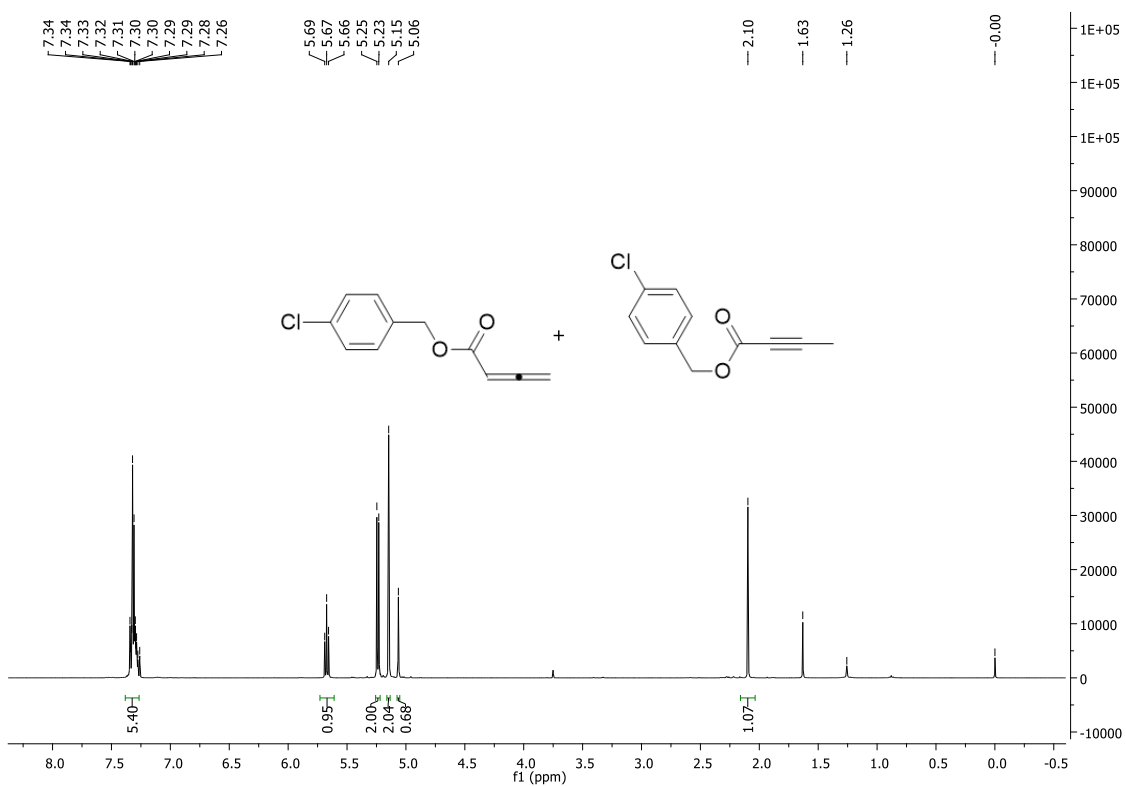
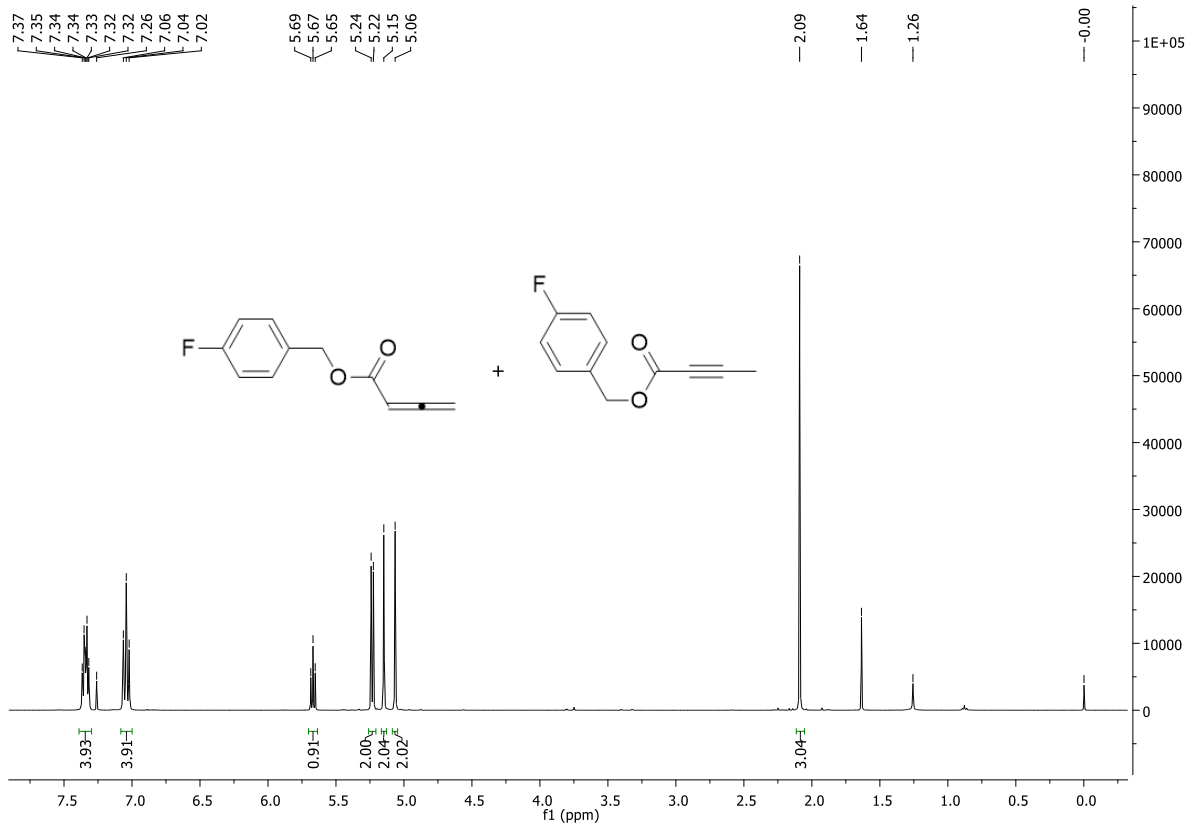


Figura 61 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos compostos **5.6l** e **5.6l'** ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 62** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H da mistura dos compostos **5.6m** e **5.6m'** (CDCl<sub>3</sub>).



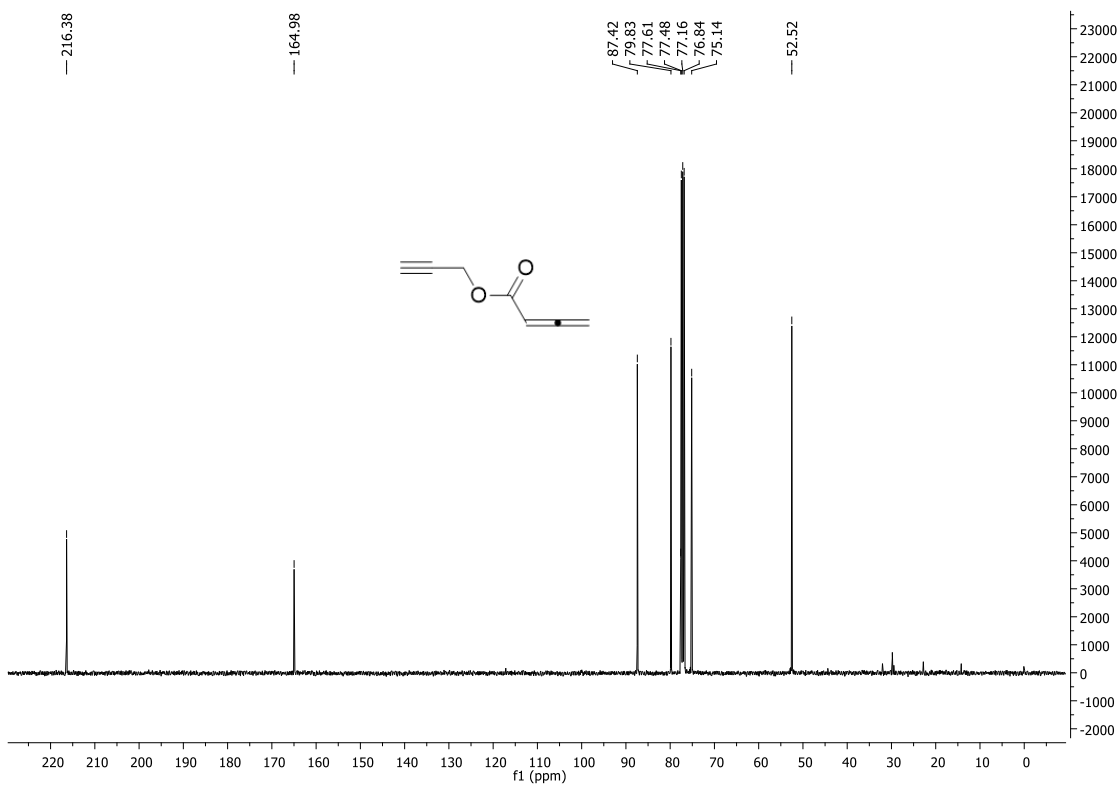
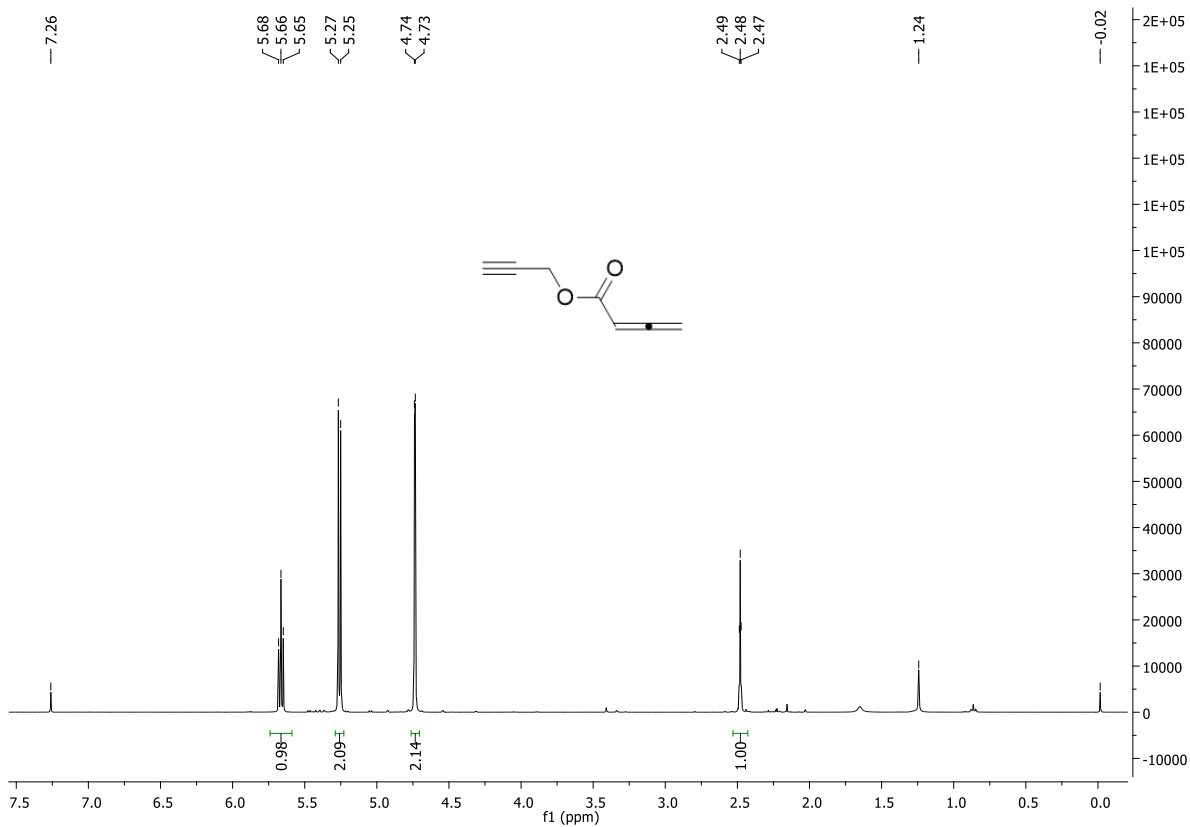


Figura 63 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.6n (CDCl<sub>3</sub>).

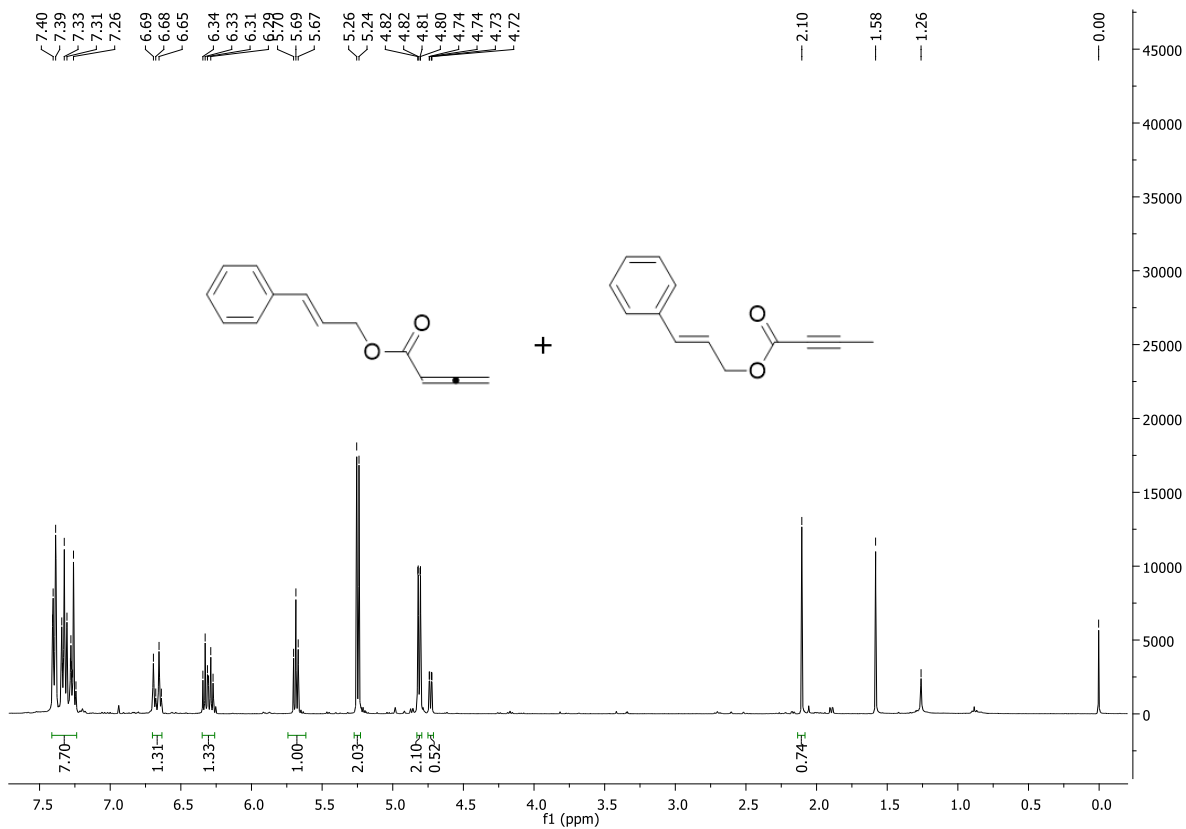


Figura 64 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos compostos 5.6o e 5.6o' ( $\text{CDCl}_3$ ).

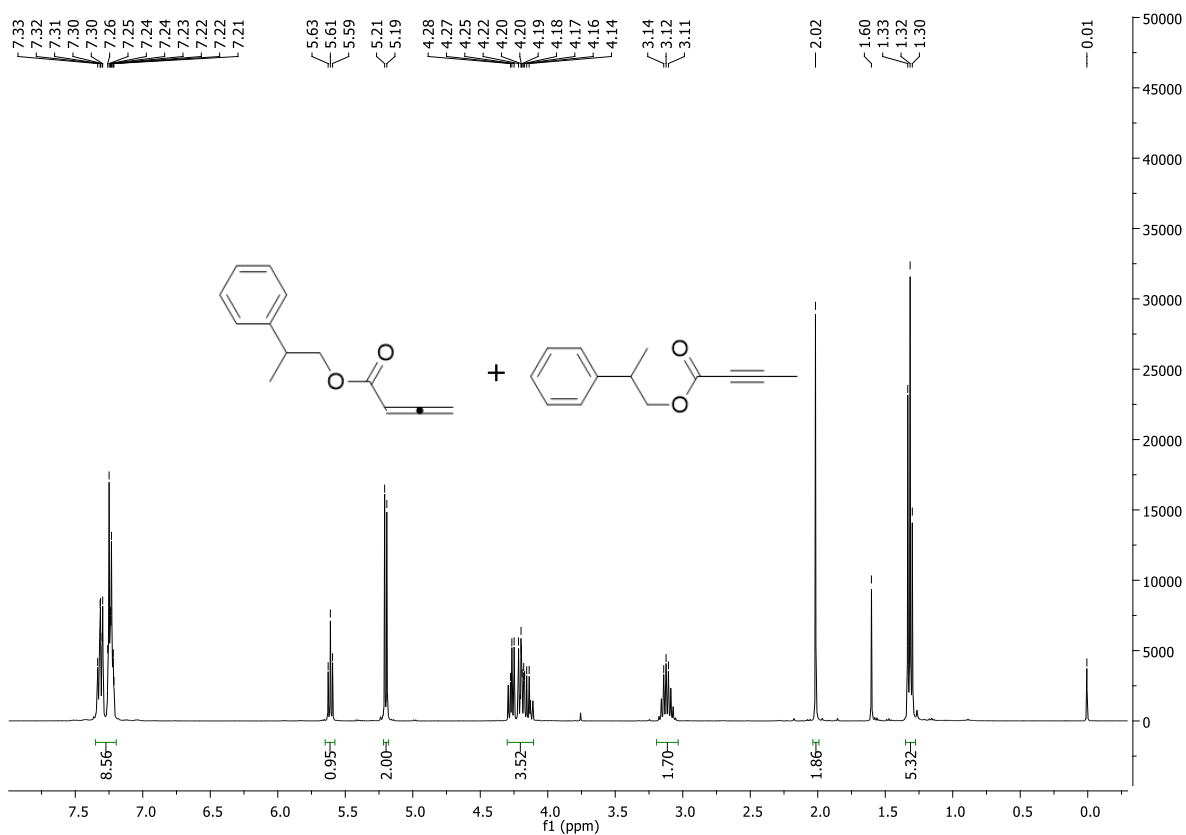


Figura 65 - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura dos compostos 5.6p e 5.6p' ( $\text{CDCl}_3$ ).

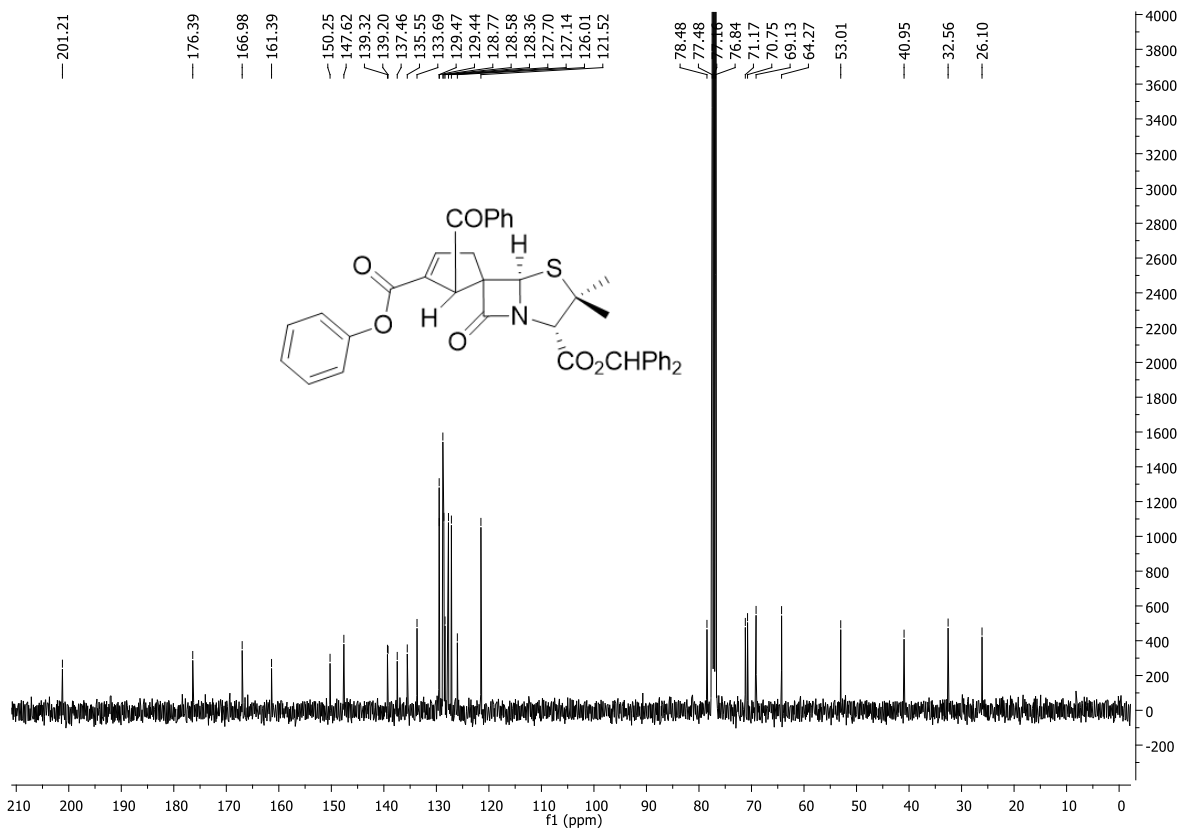
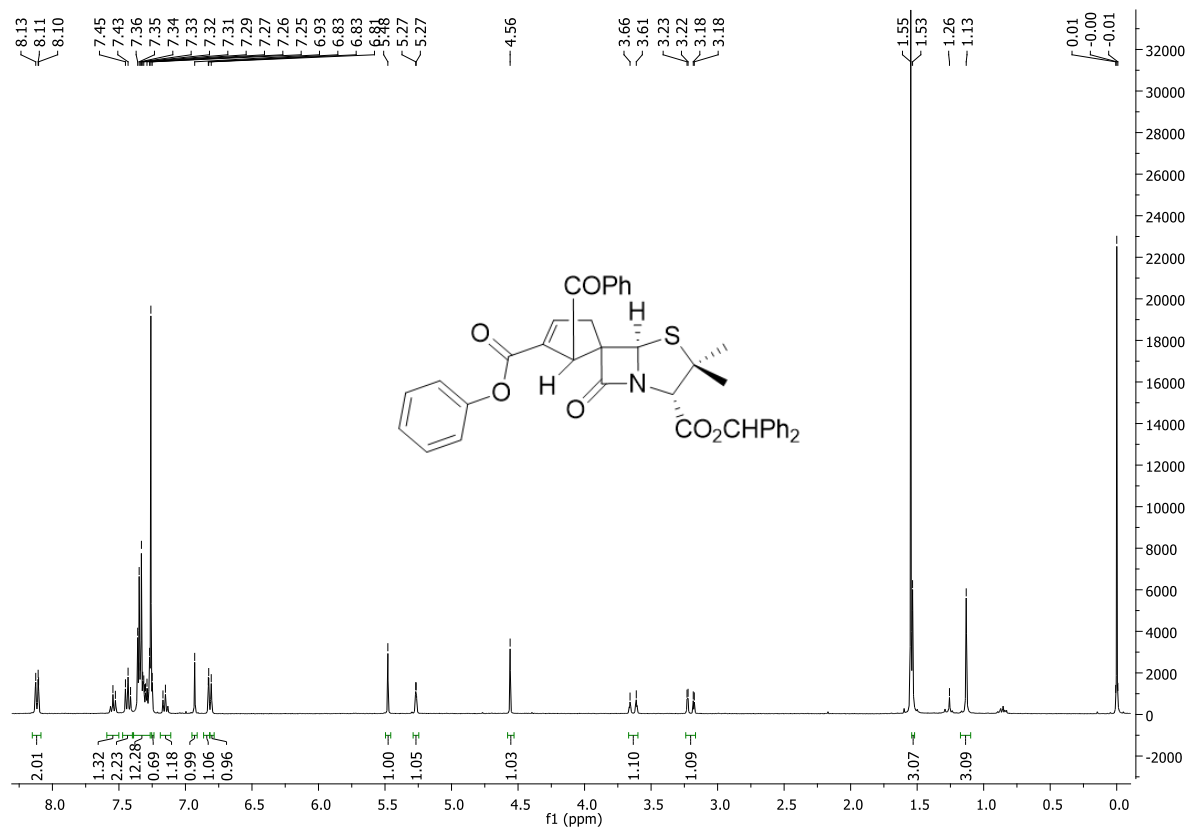


Figura 66 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.7a** (CDCl<sub>3</sub>).

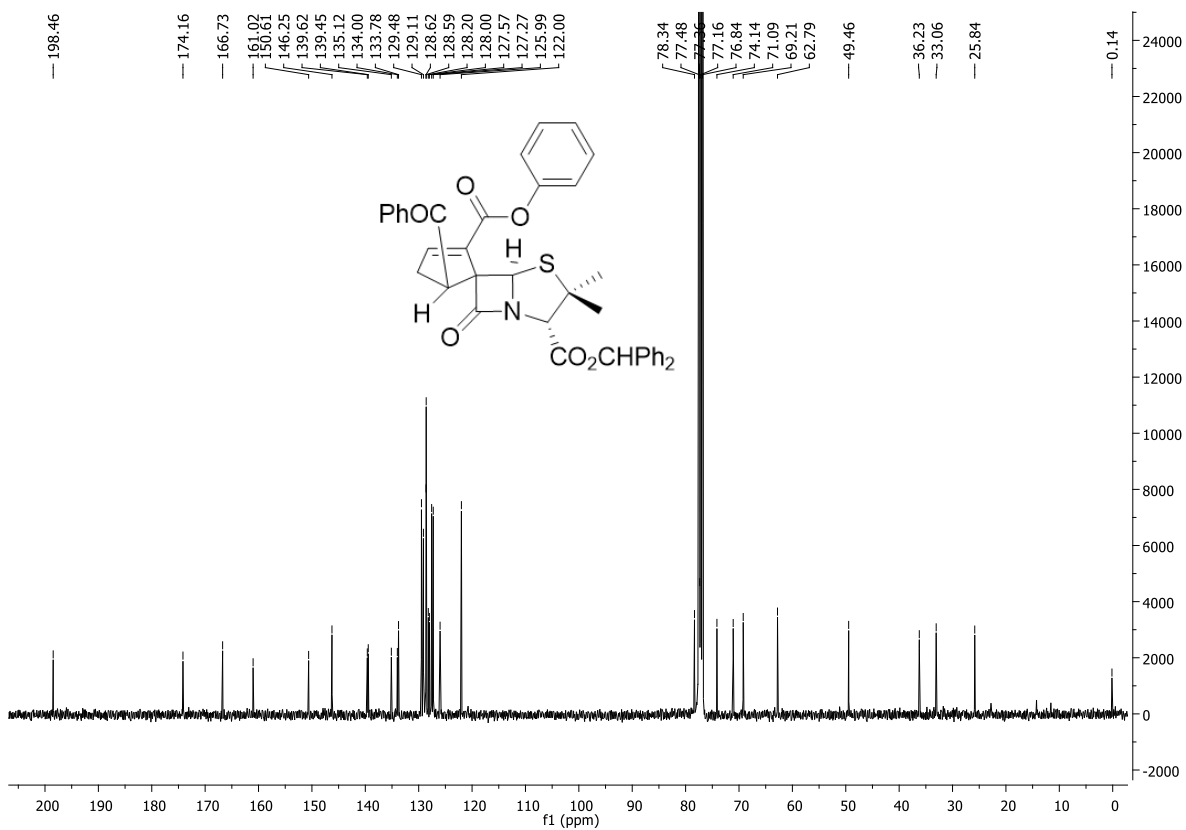
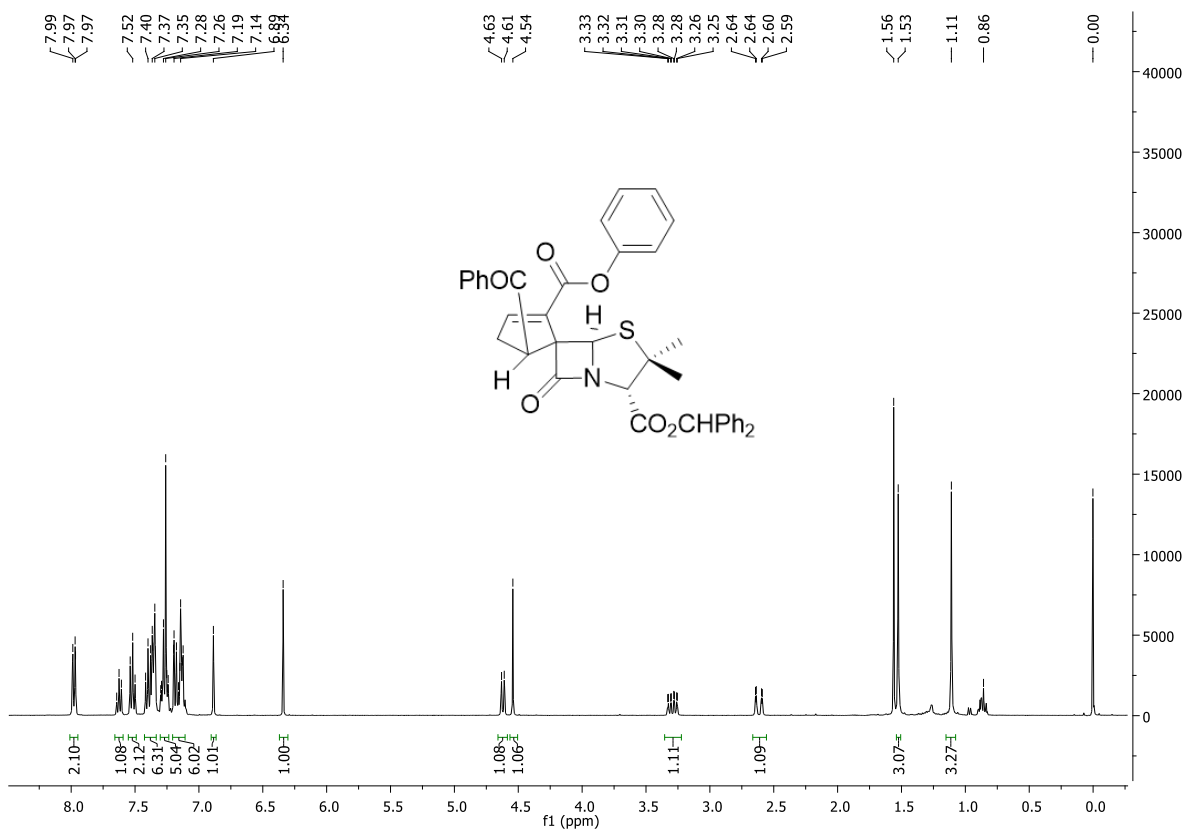


Figura 67 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.8a (CDCl<sub>3</sub>).

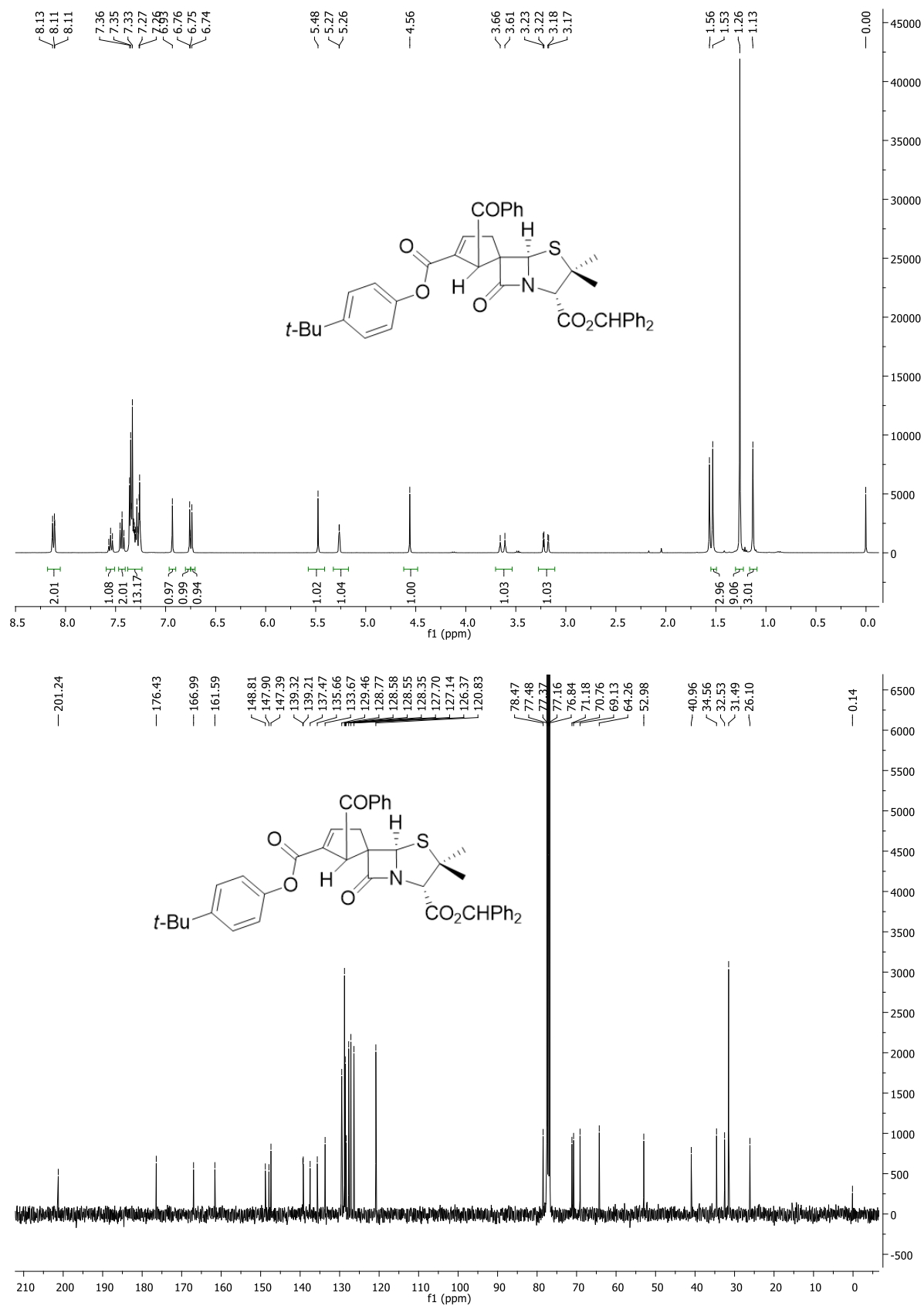


Figura 68 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.7b** (CDCl<sub>3</sub>).

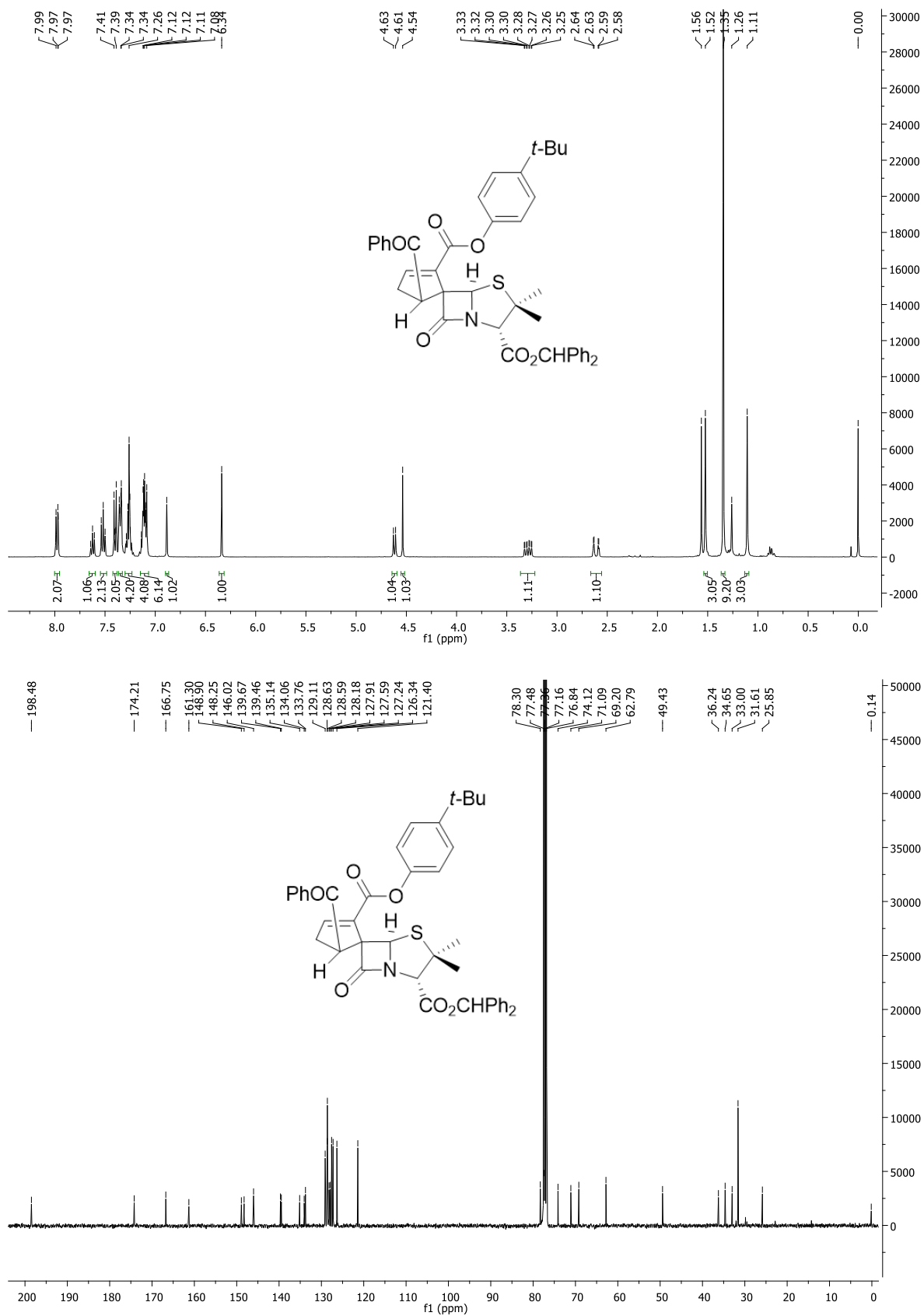
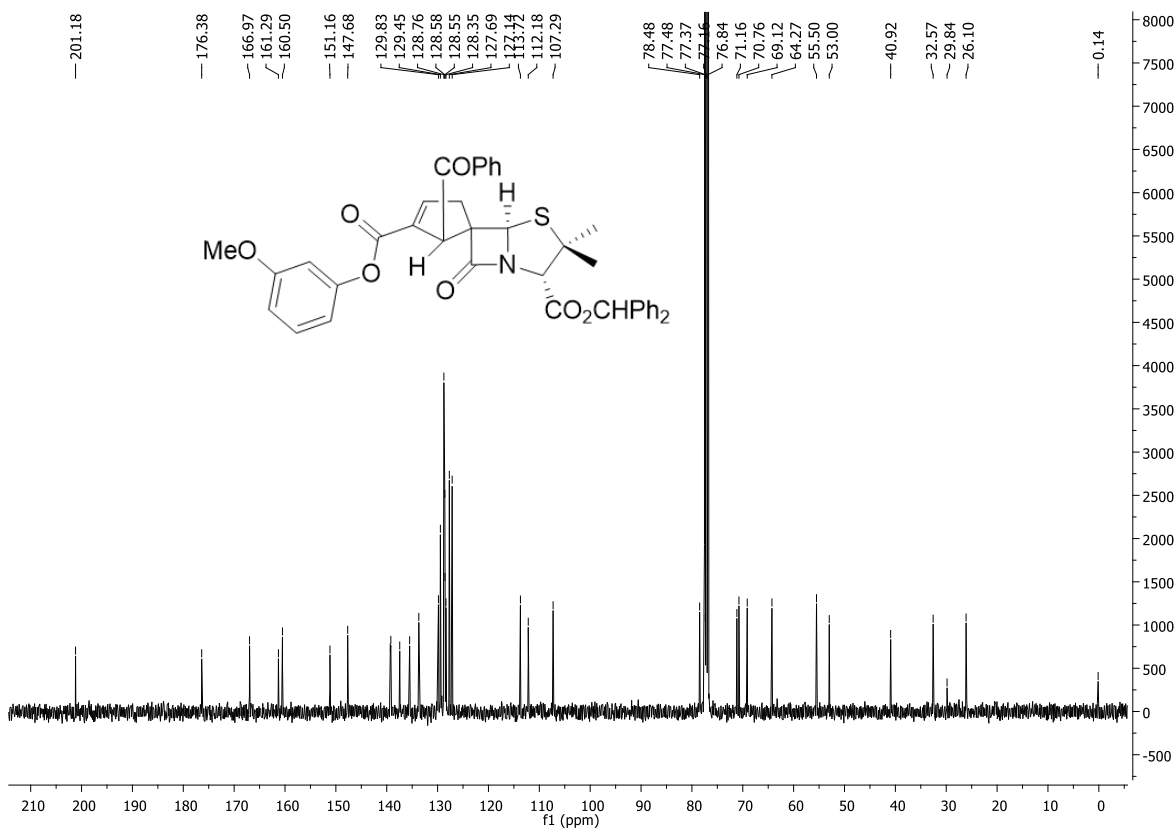
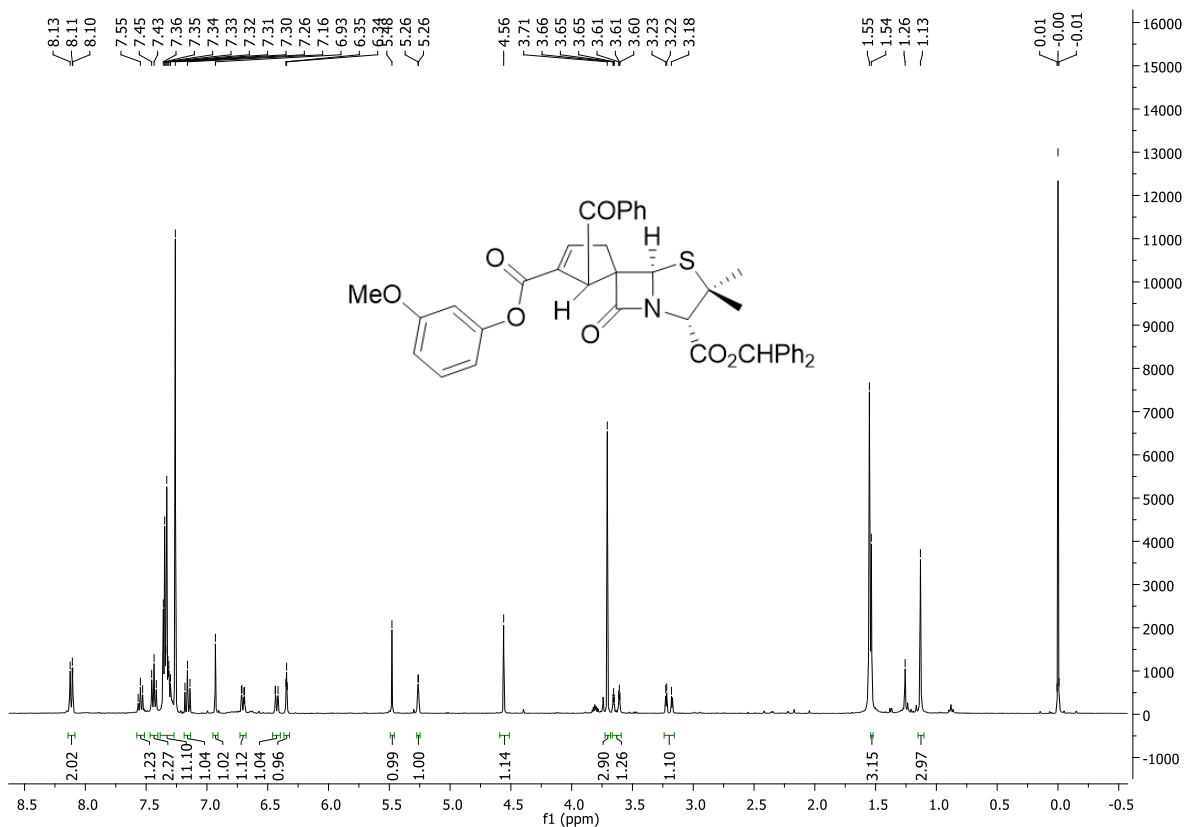


Figura 69 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8b** (CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 70 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.7c** (CDCl<sub>3</sub>).**

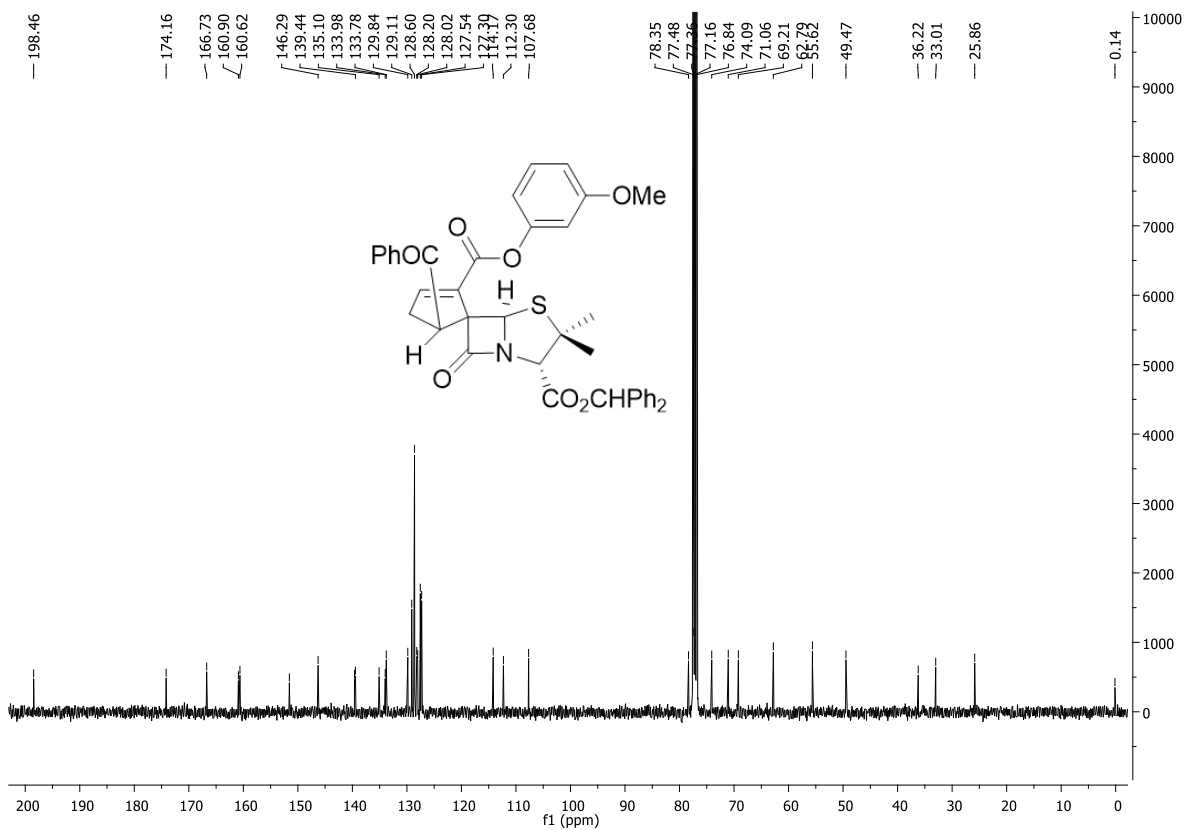
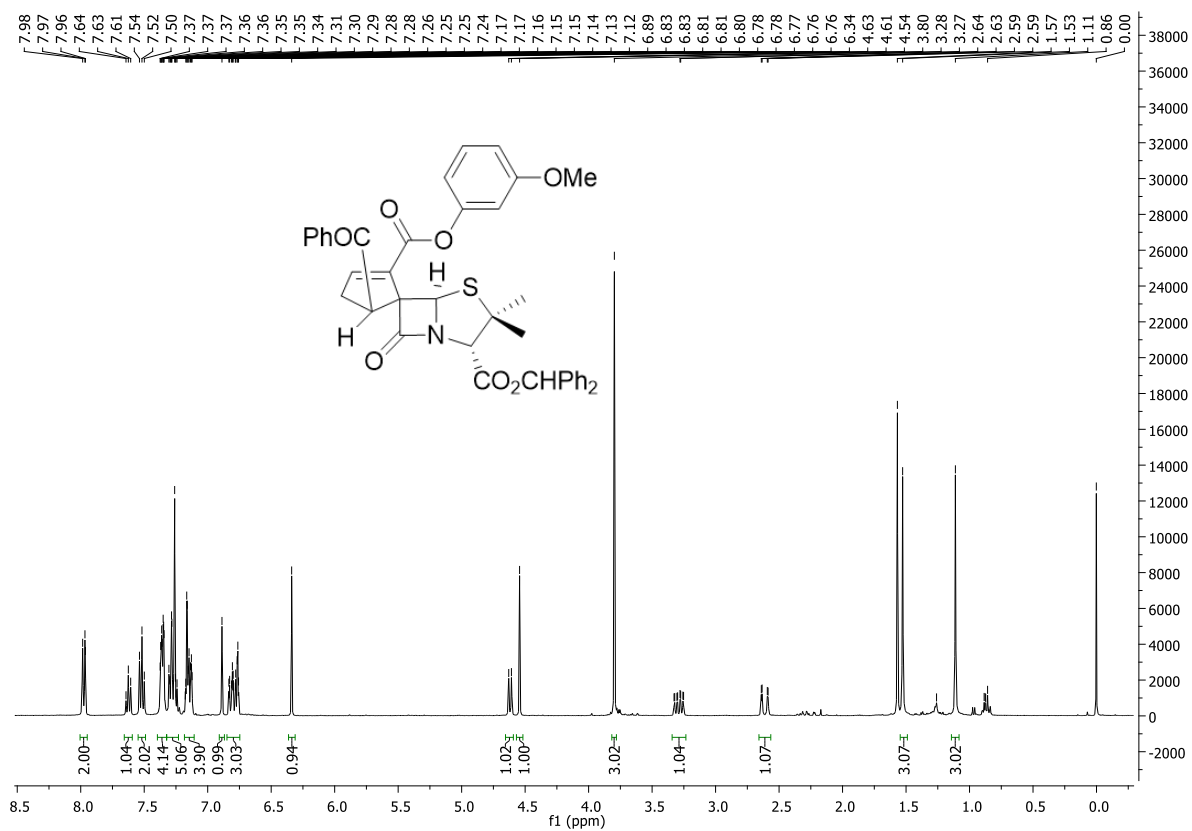


Figura 71 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8c** (CDCl<sub>3</sub>).



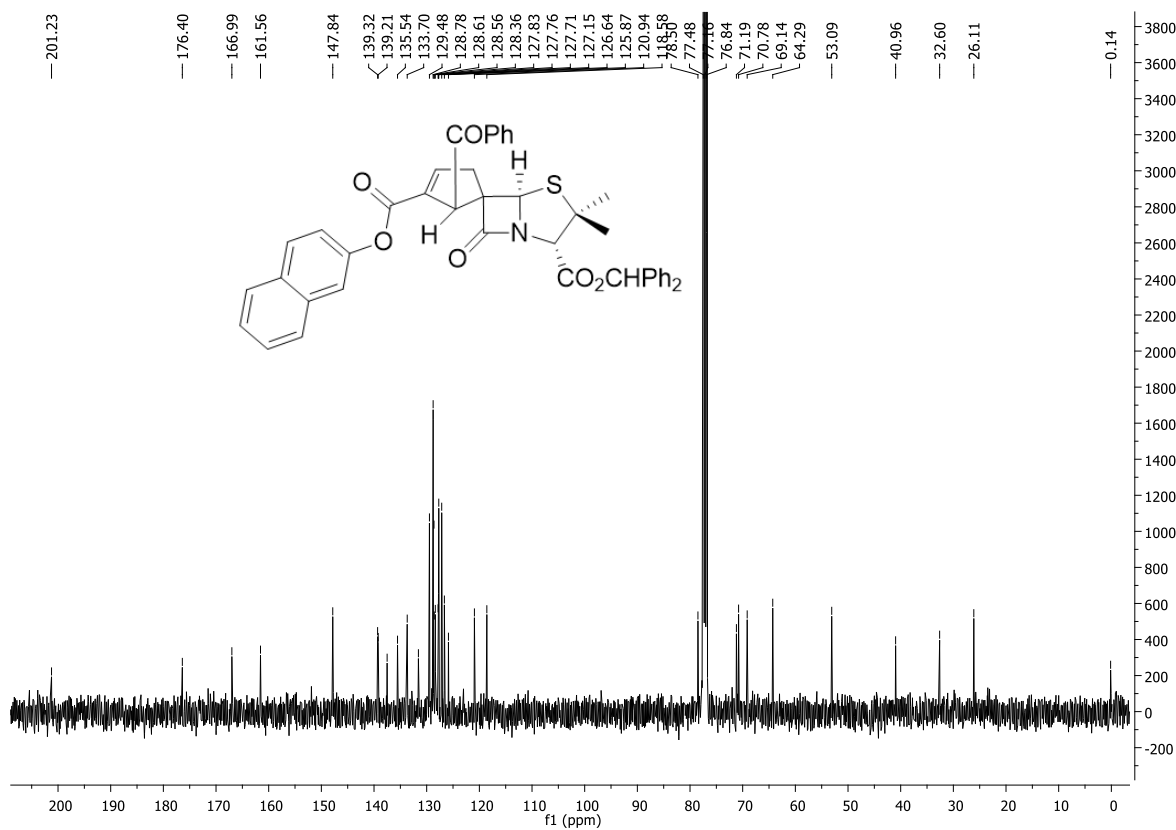
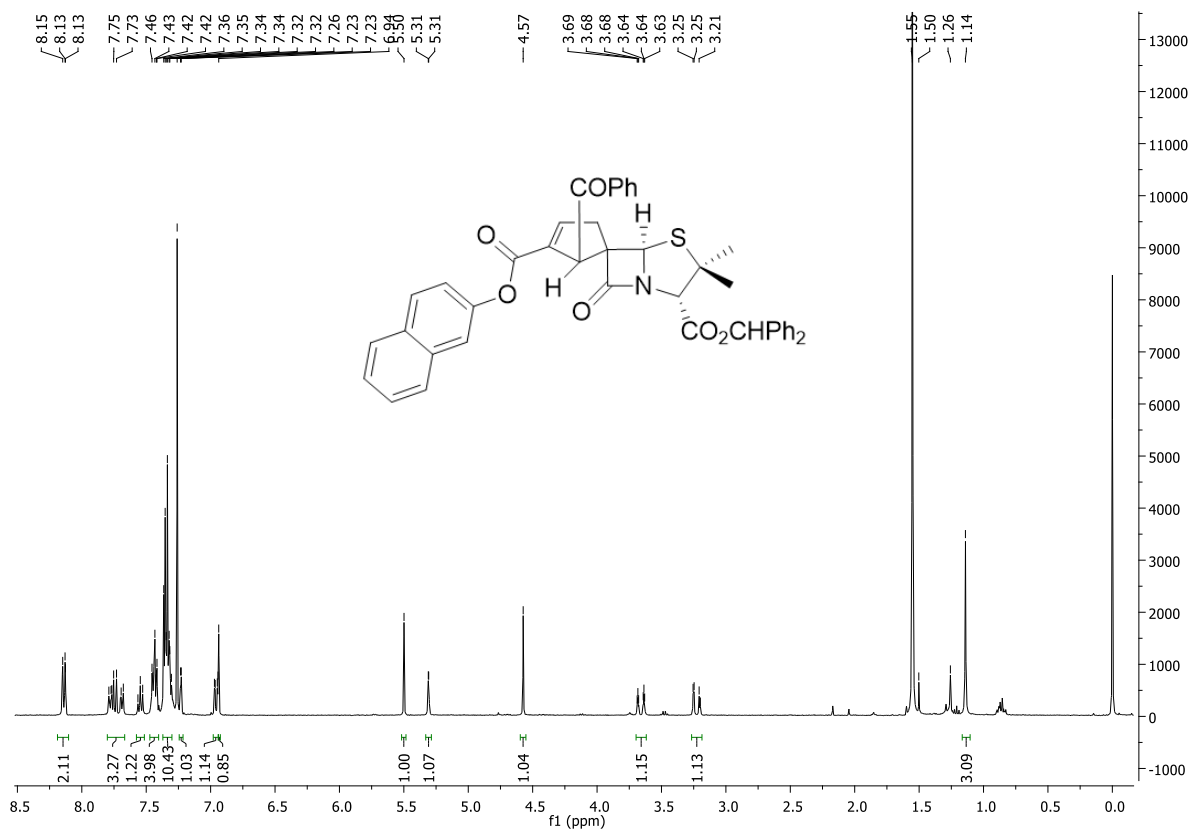


Figura 72 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.7d** (CDCl<sub>3</sub>).

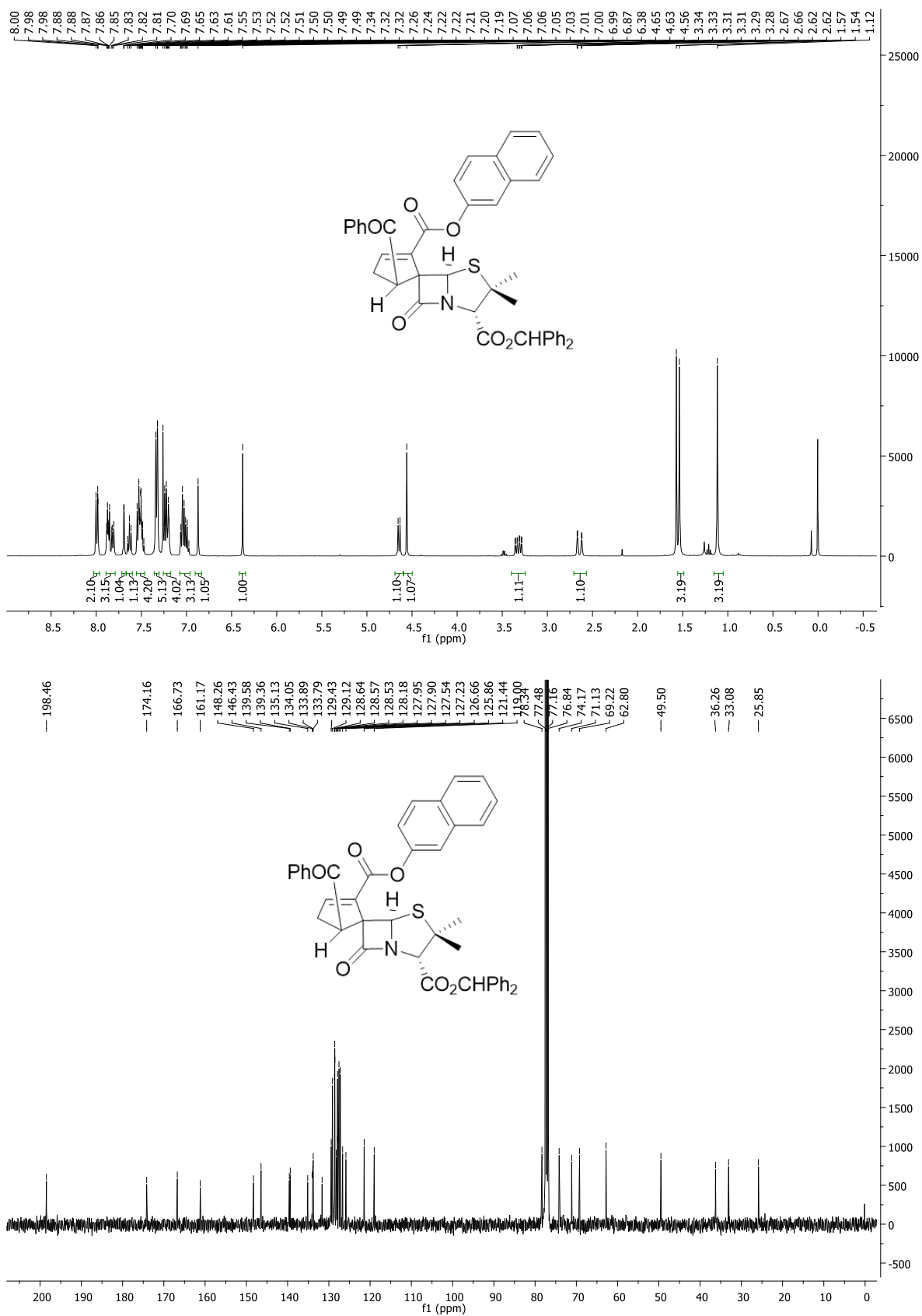


Figura 73 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8d** (CDCl<sub>3</sub>).

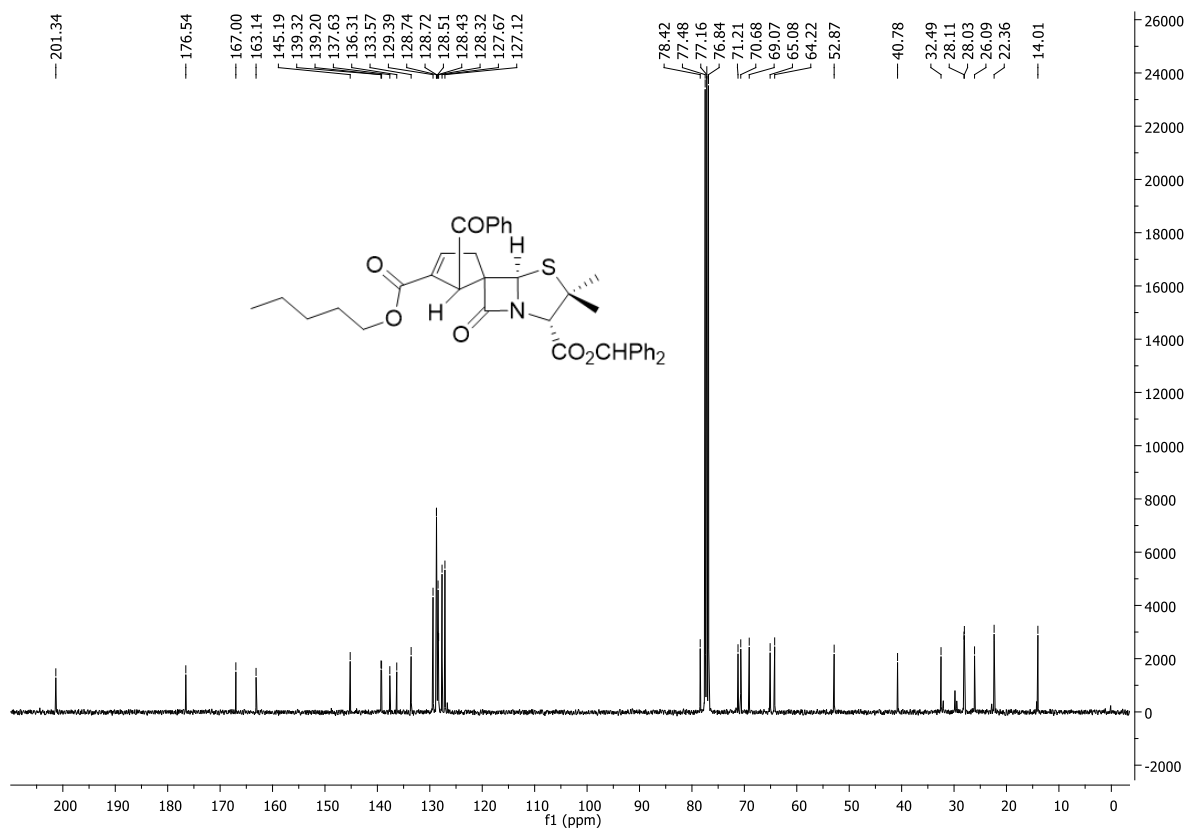
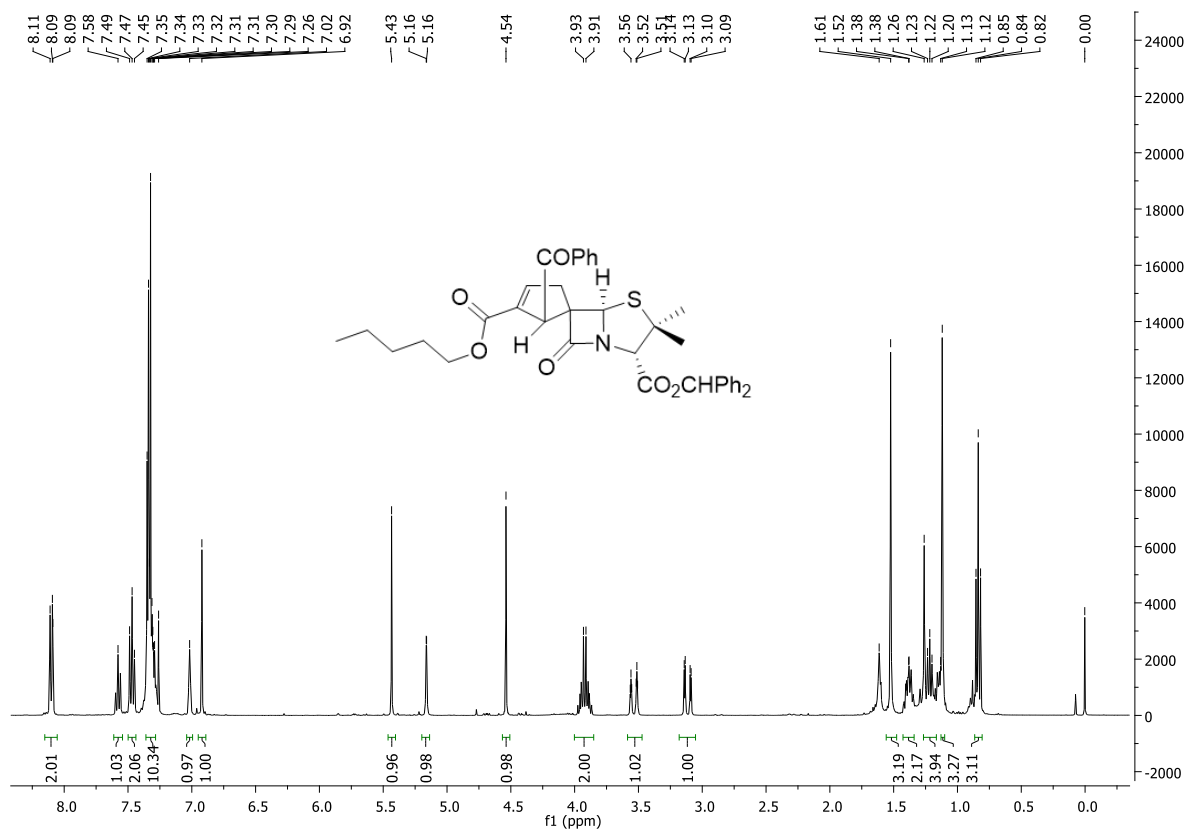


Figura 74 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.7e (CDCl<sub>3</sub>).

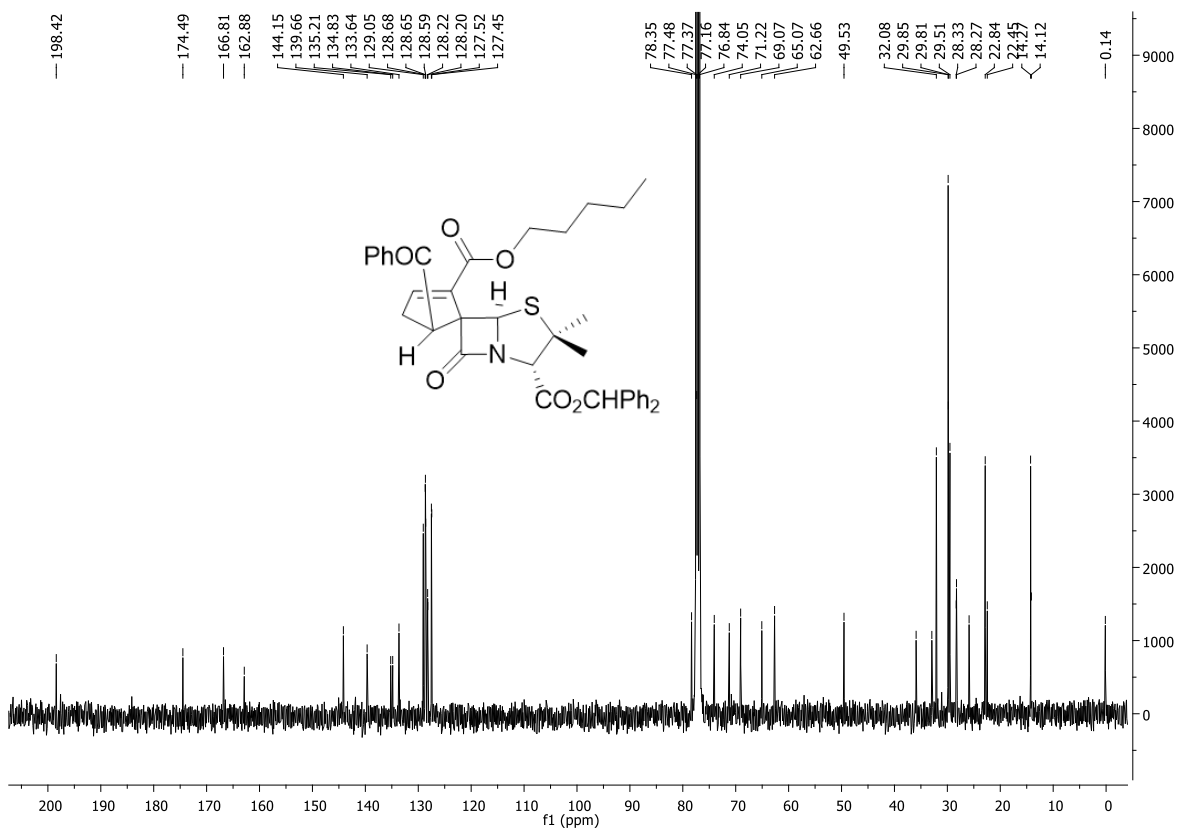
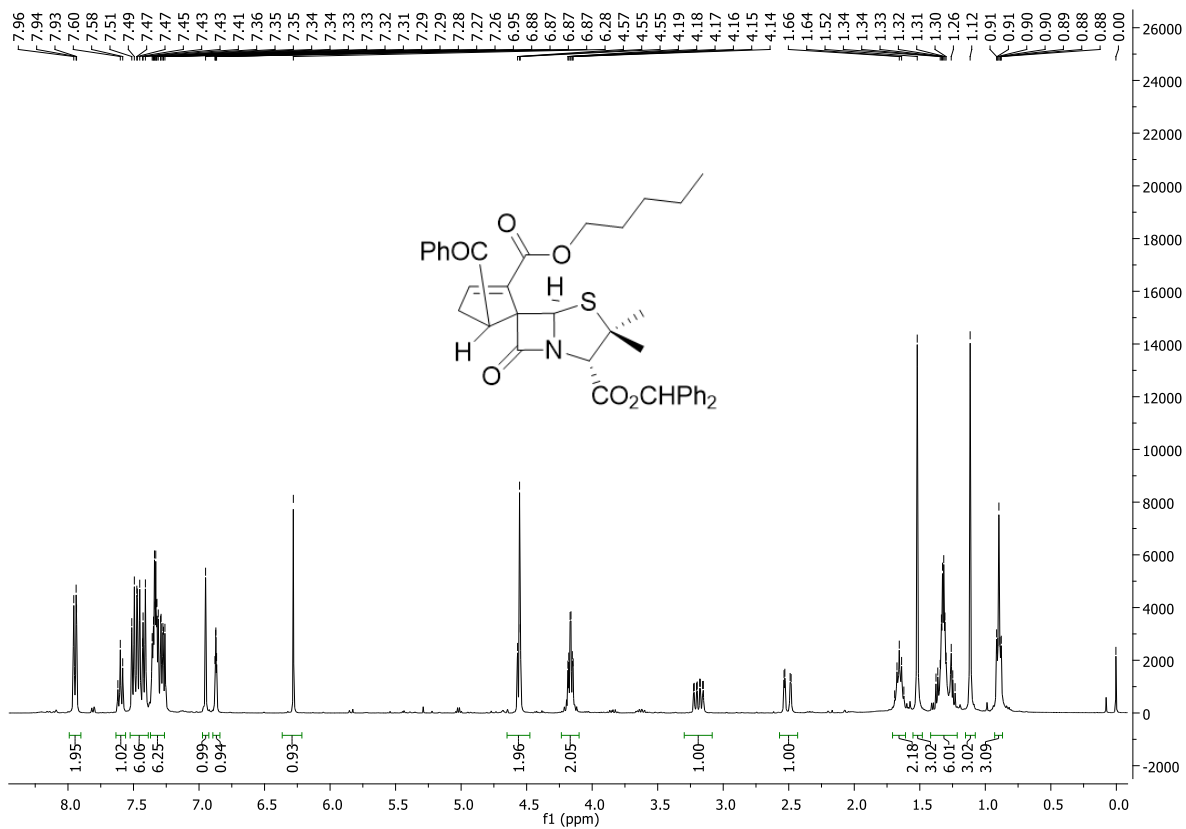


Figura 75 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.8e (CDCl<sub>3</sub>).

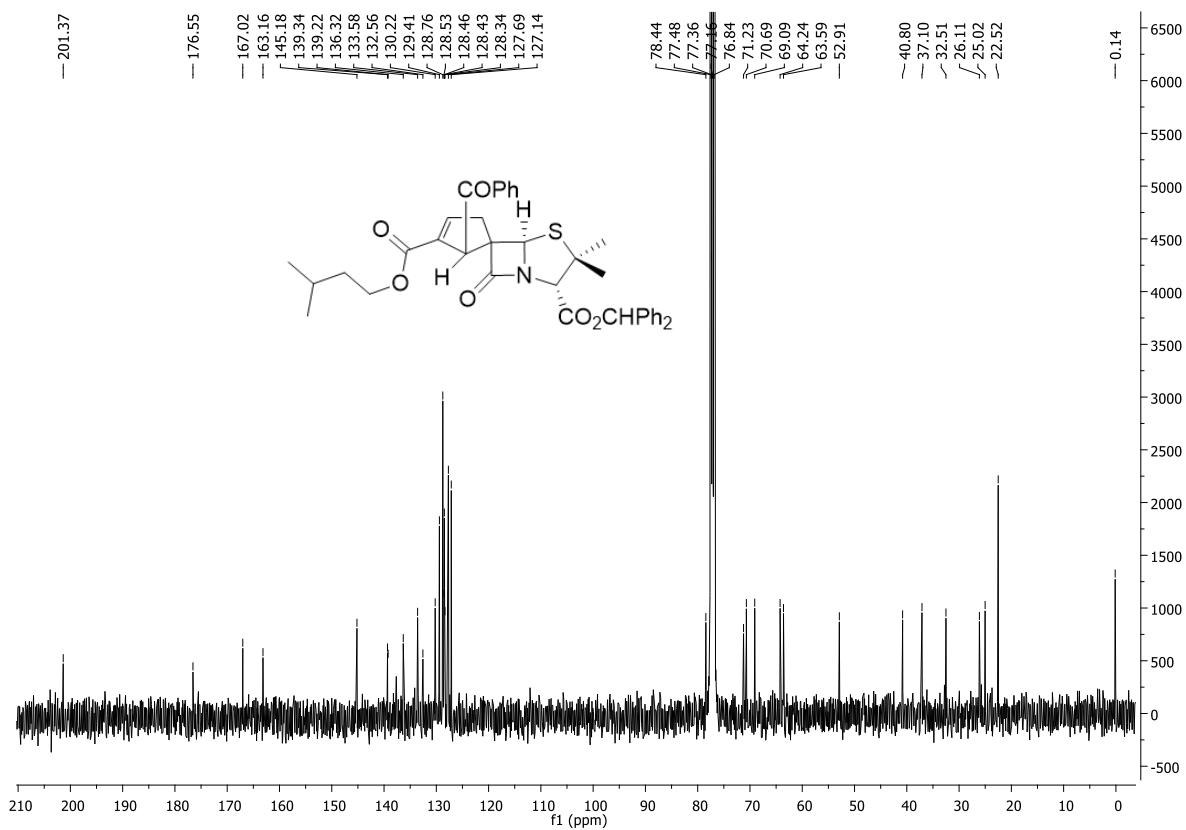
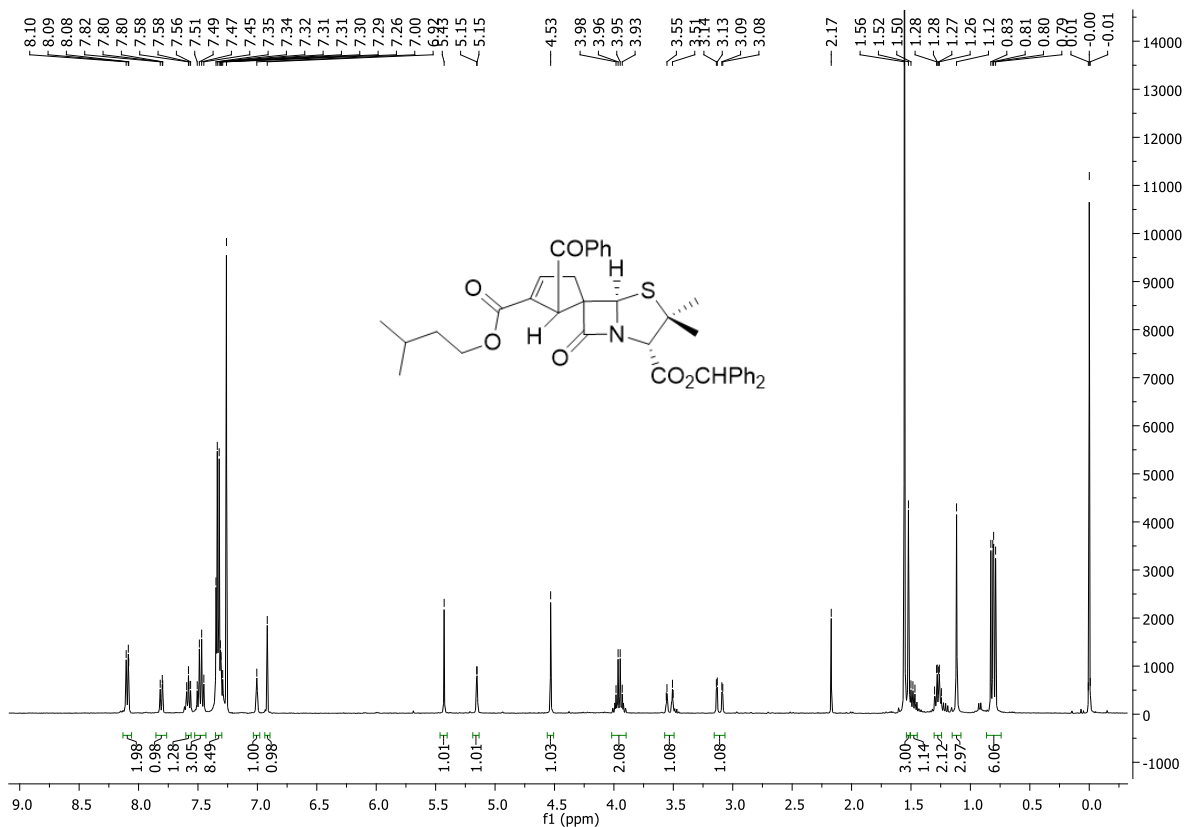


Figura 76 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.7f (CDCl<sub>3</sub>).

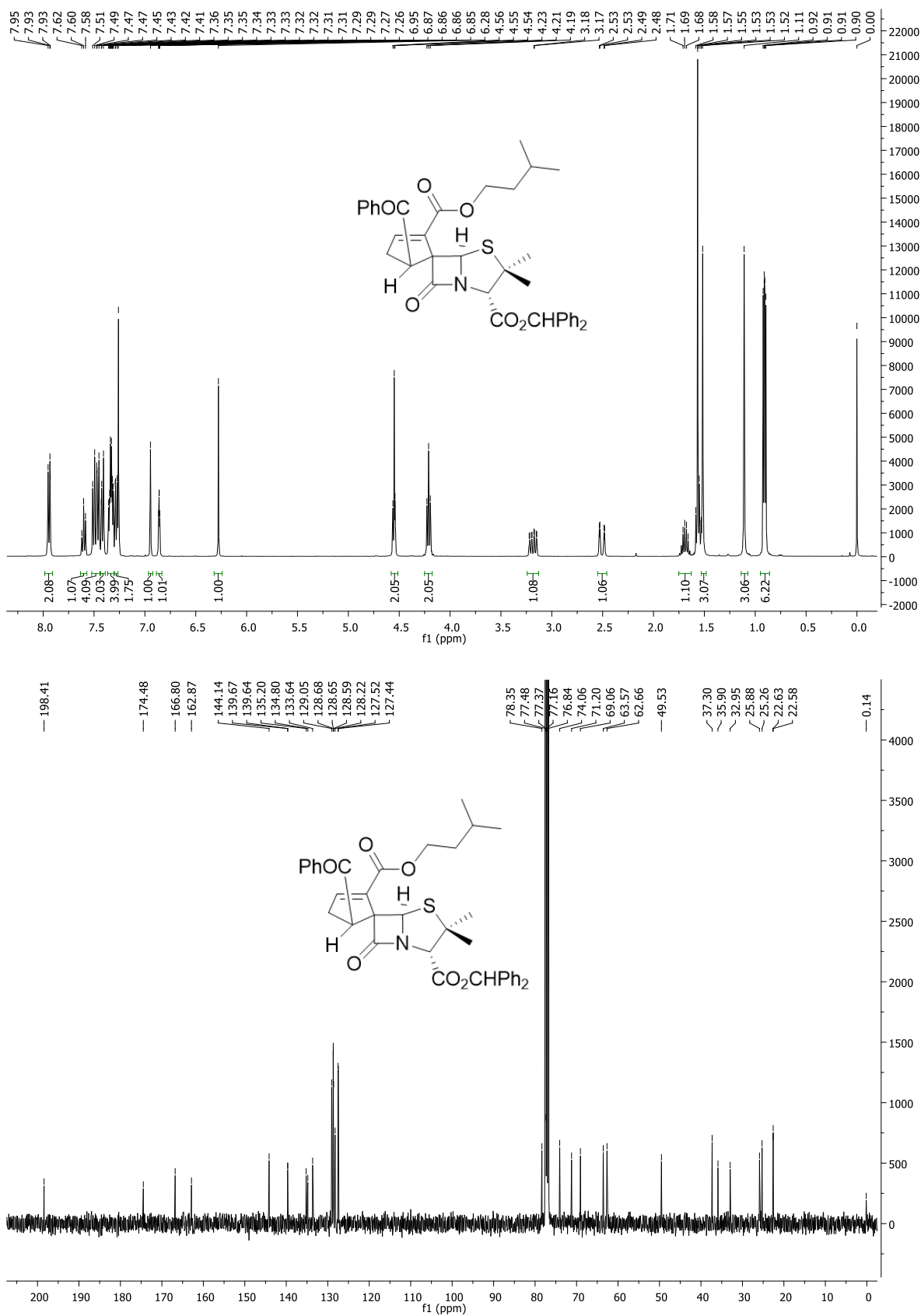


Figura 77 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.8f (CDCl<sub>3</sub>).

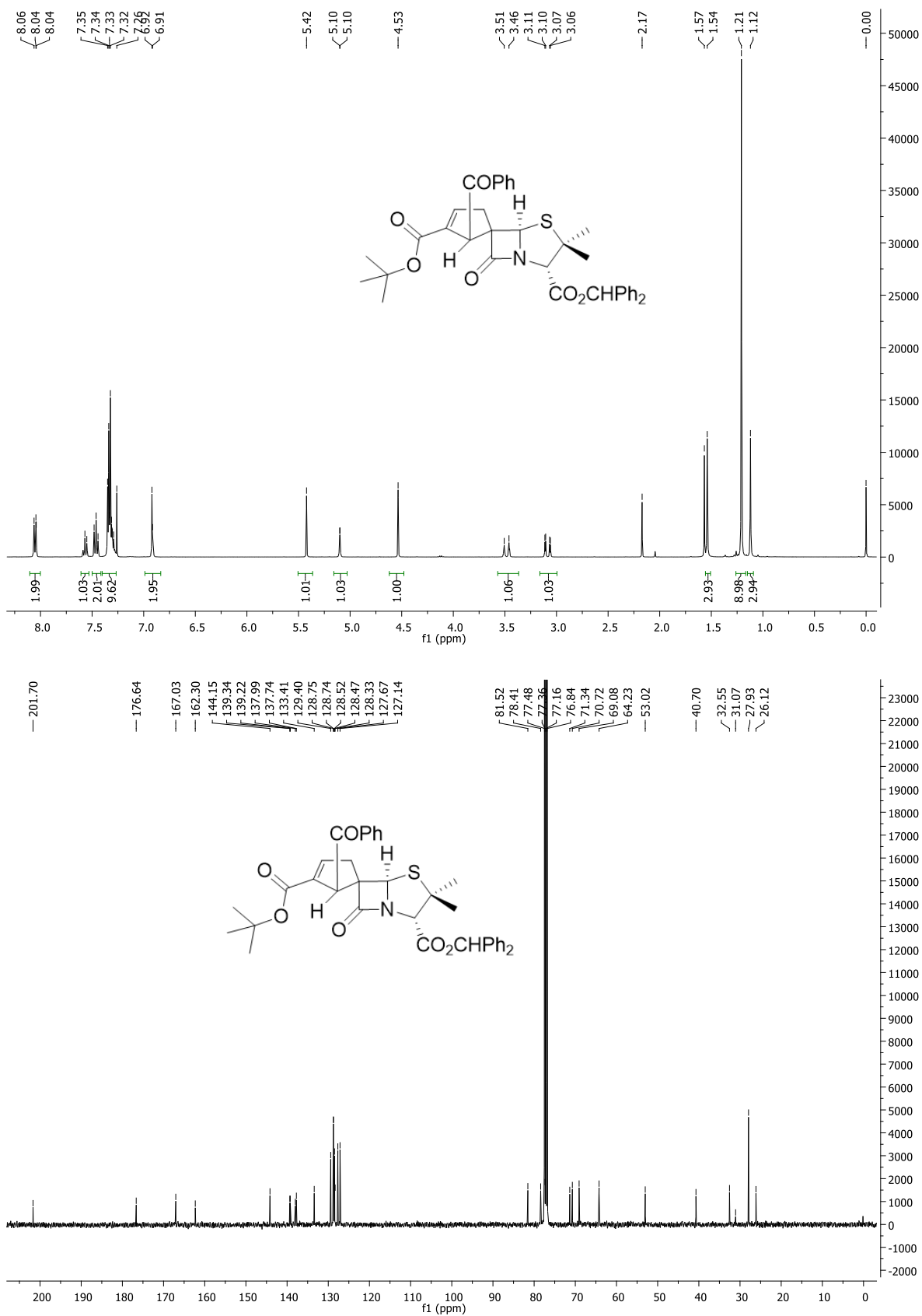


Figura 78 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.7g (CDCl<sub>3</sub>).

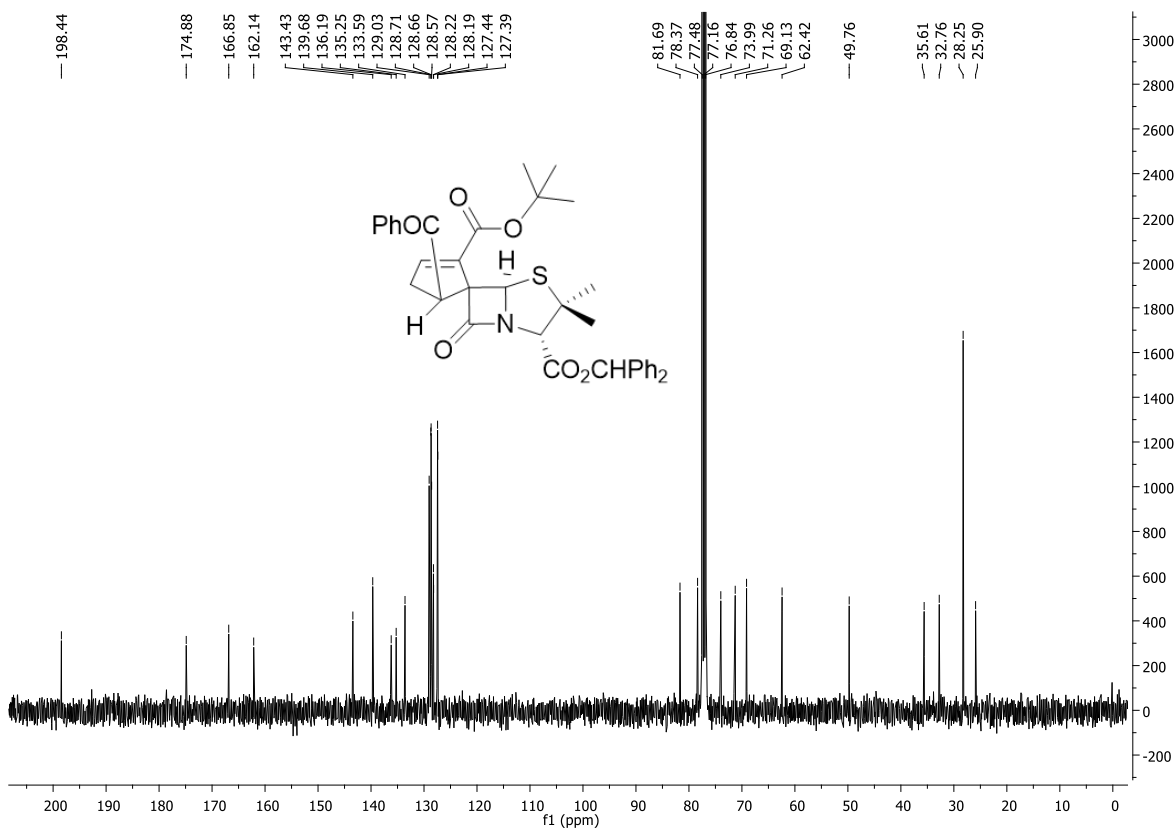
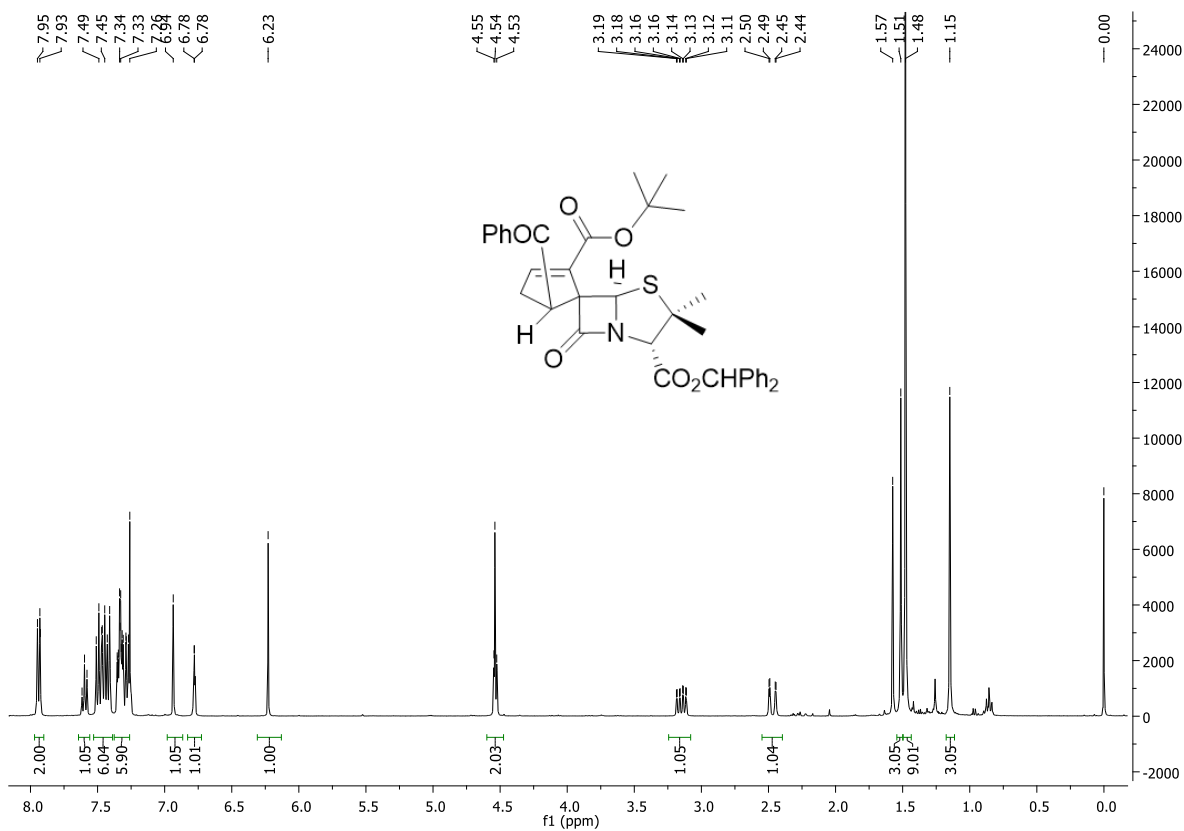


Figura 79 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.8g (CDCl<sub>3</sub>).



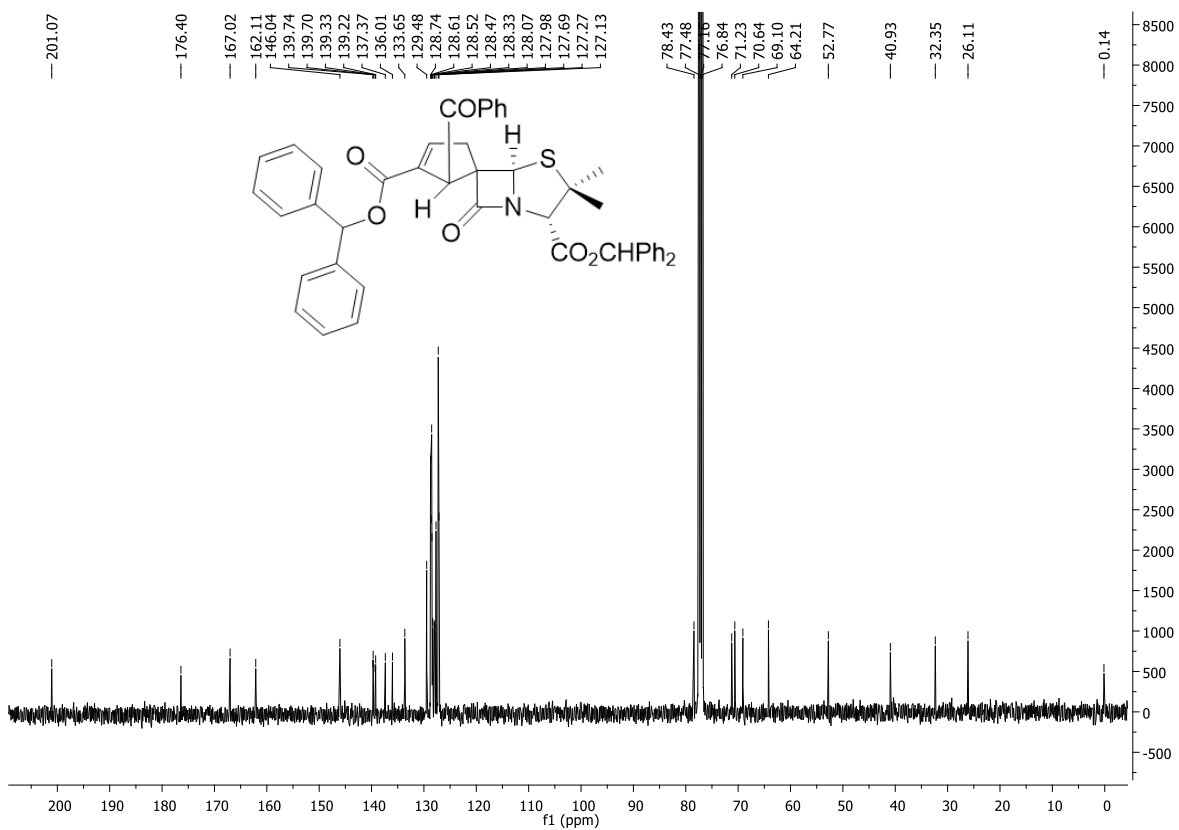
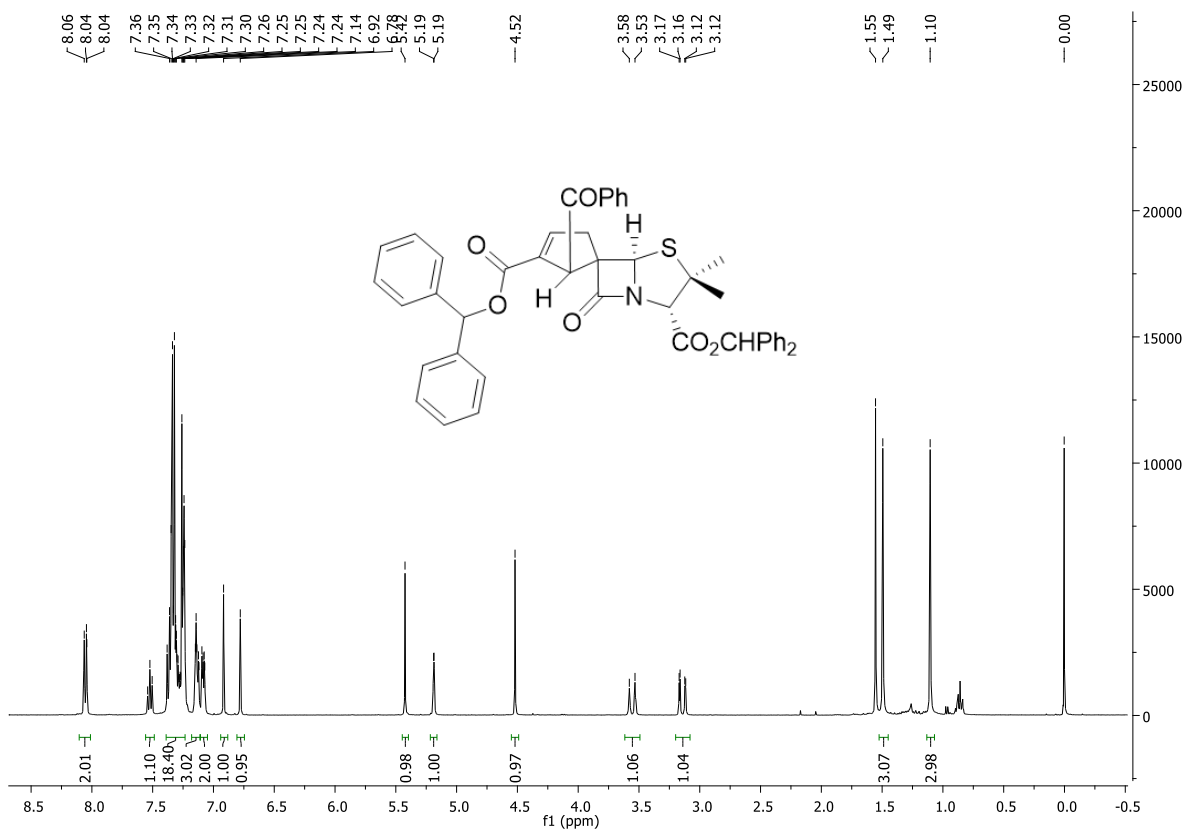
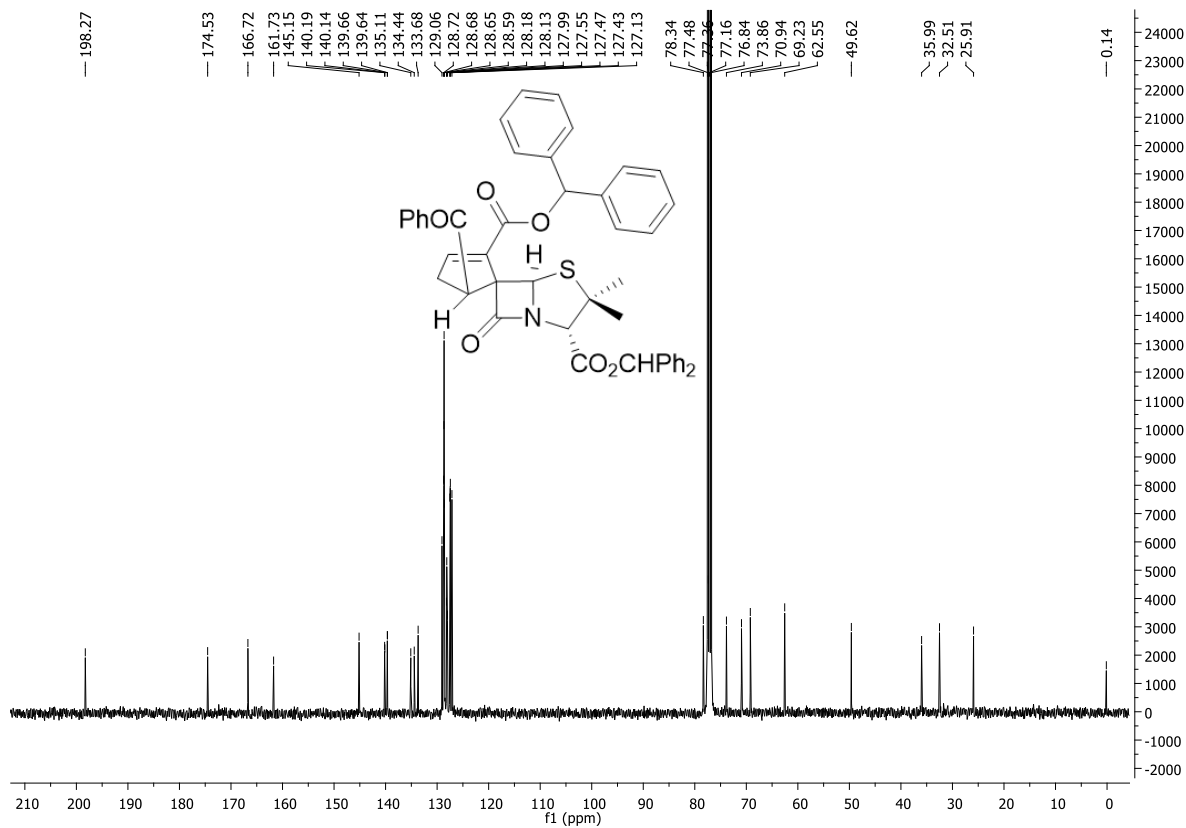
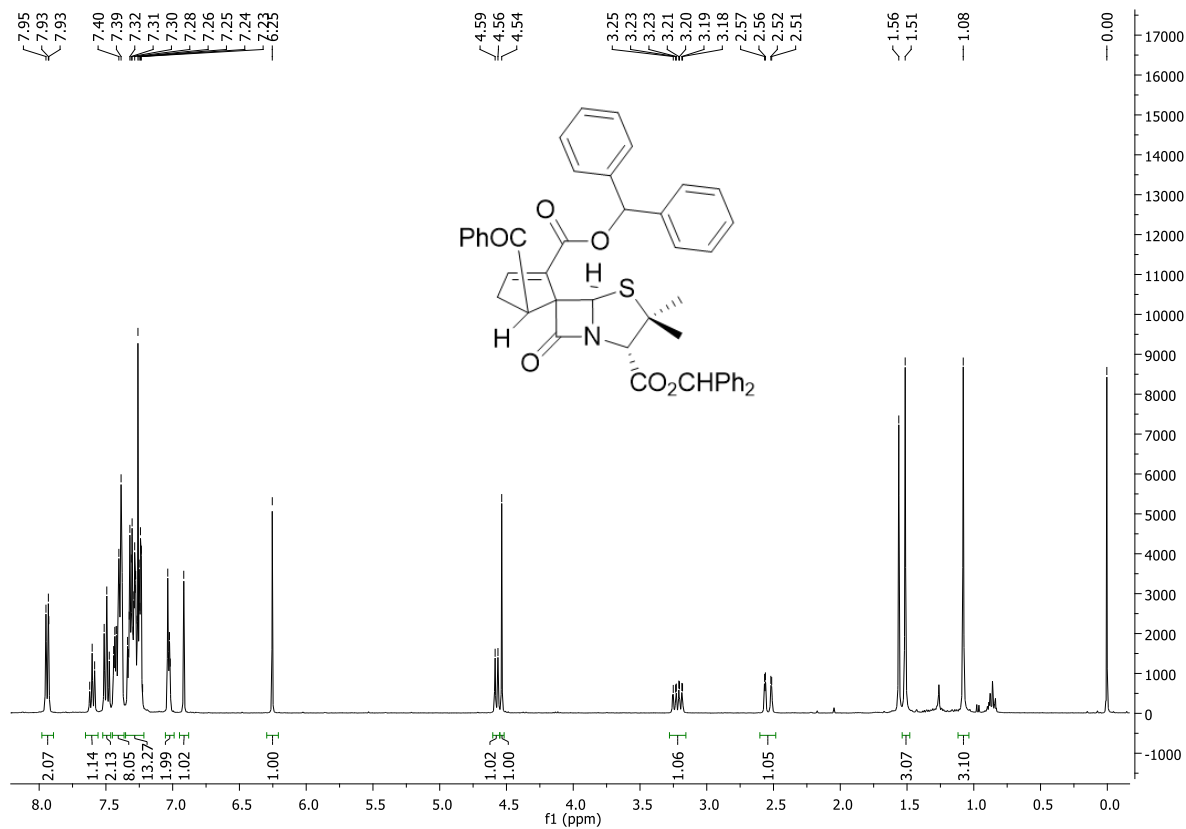


Figura 80 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **5.7h** ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 81** - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8h** (CDCl<sub>3</sub>).

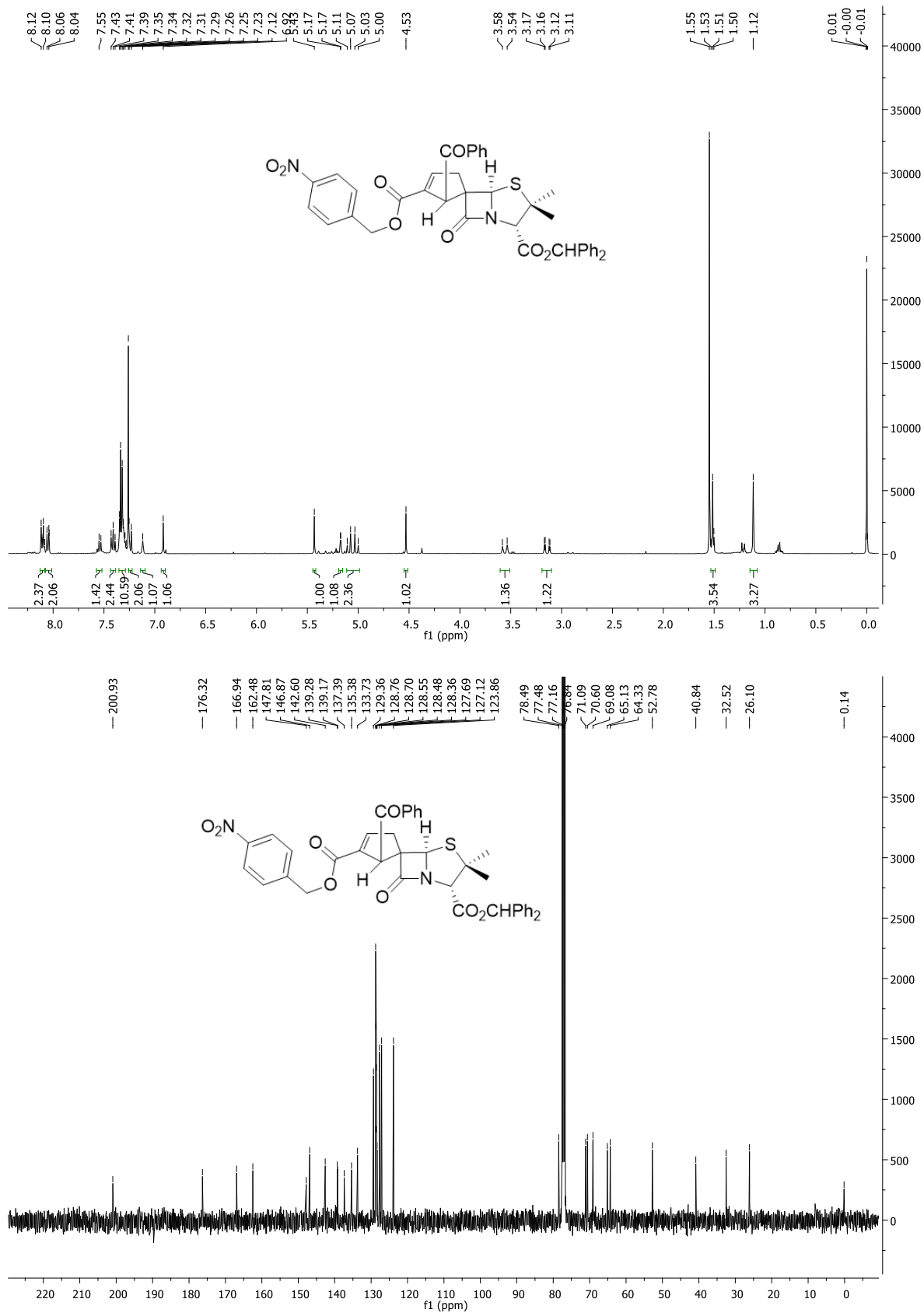


Figura 82 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.7i (CDCl<sub>3</sub>).

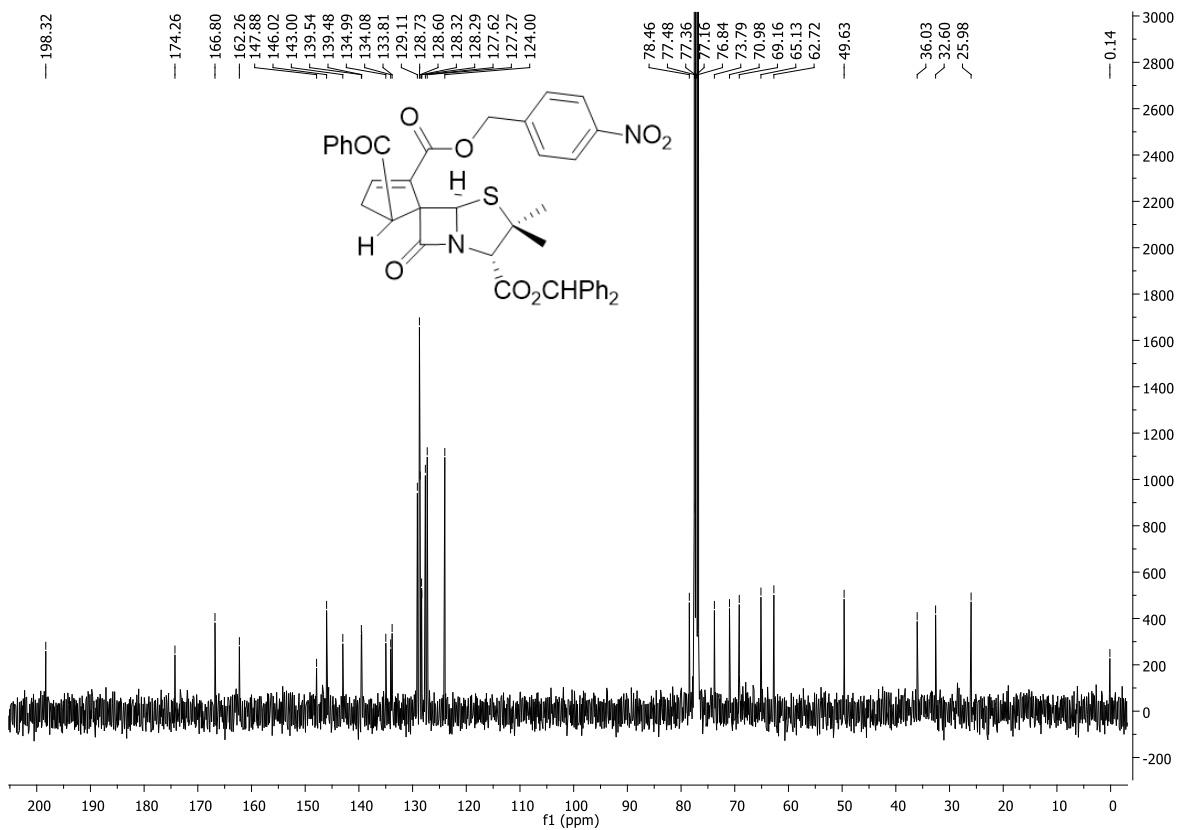
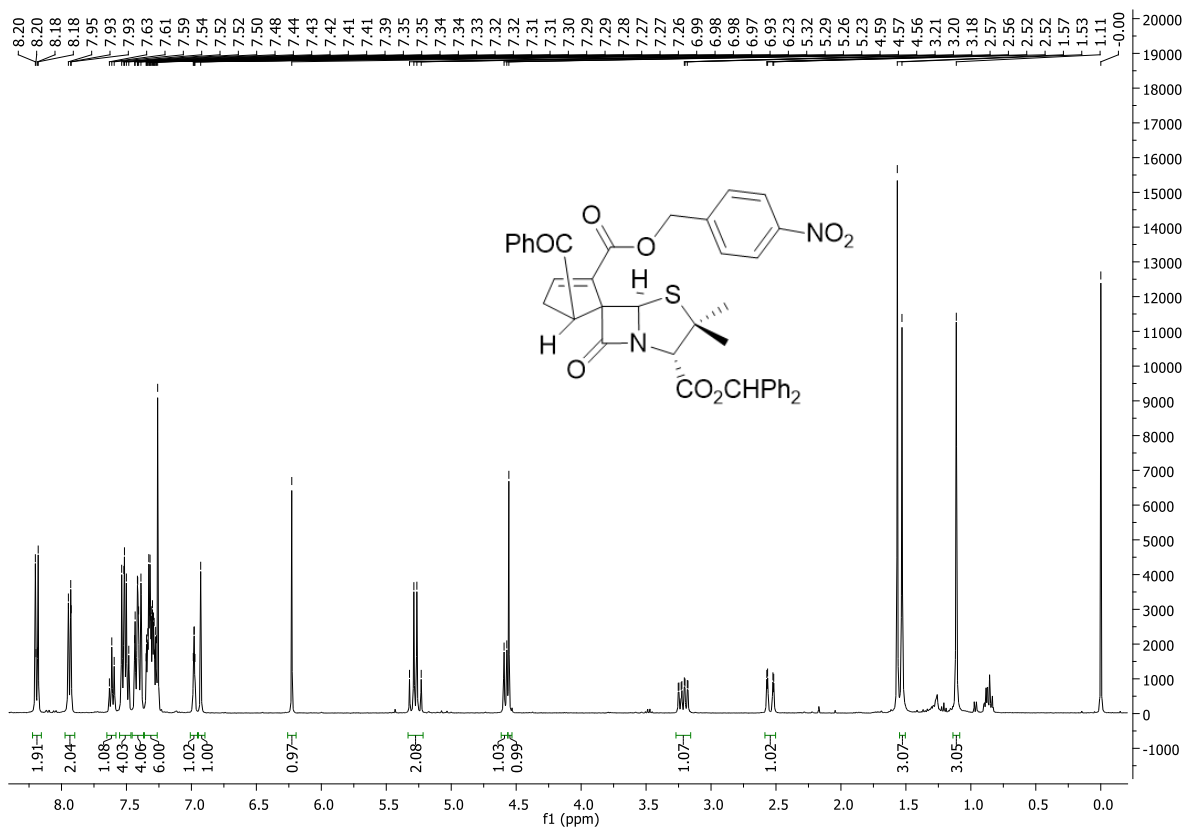


Figura 83 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8i** (CDCl<sub>3</sub>).

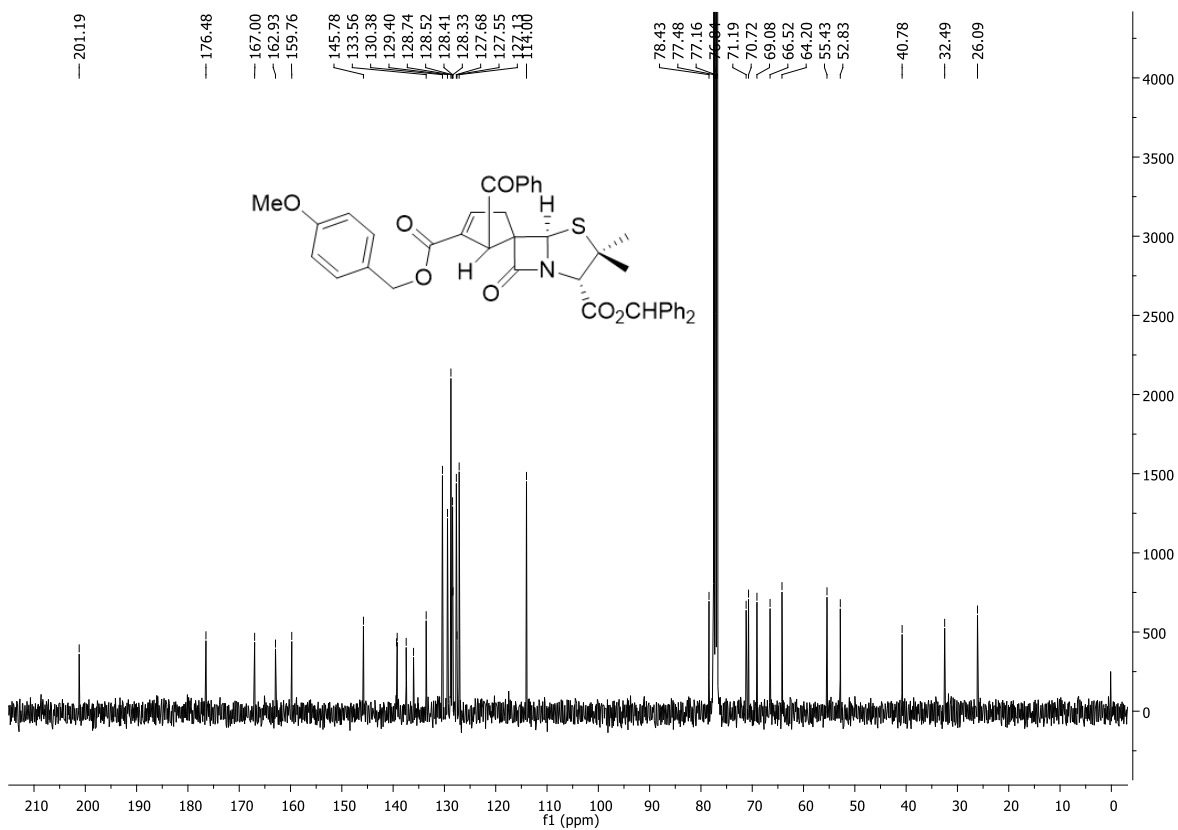
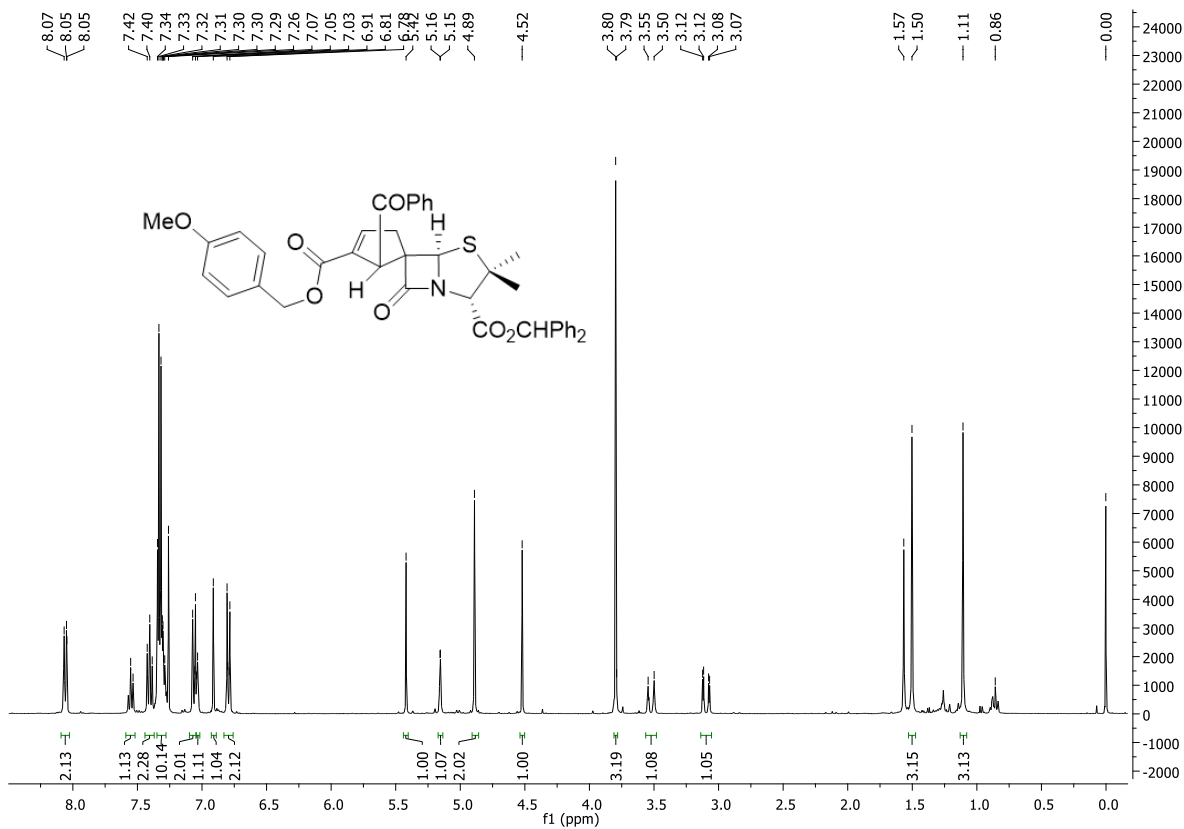


Figura 84 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto **5.7j** ( $\text{CDCl}_3$ ).

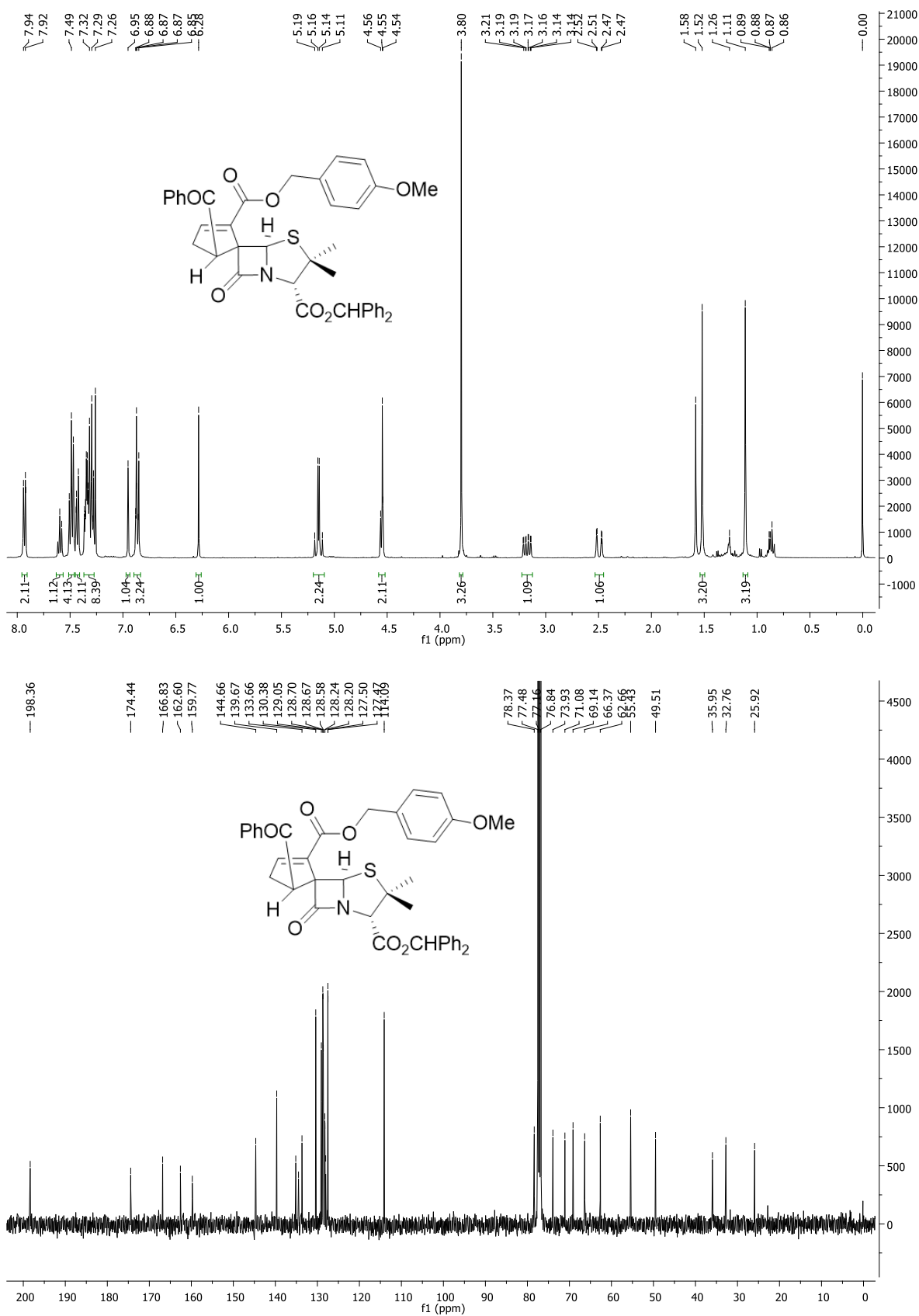


Figura 85 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8j** (CDCl<sub>3</sub>).

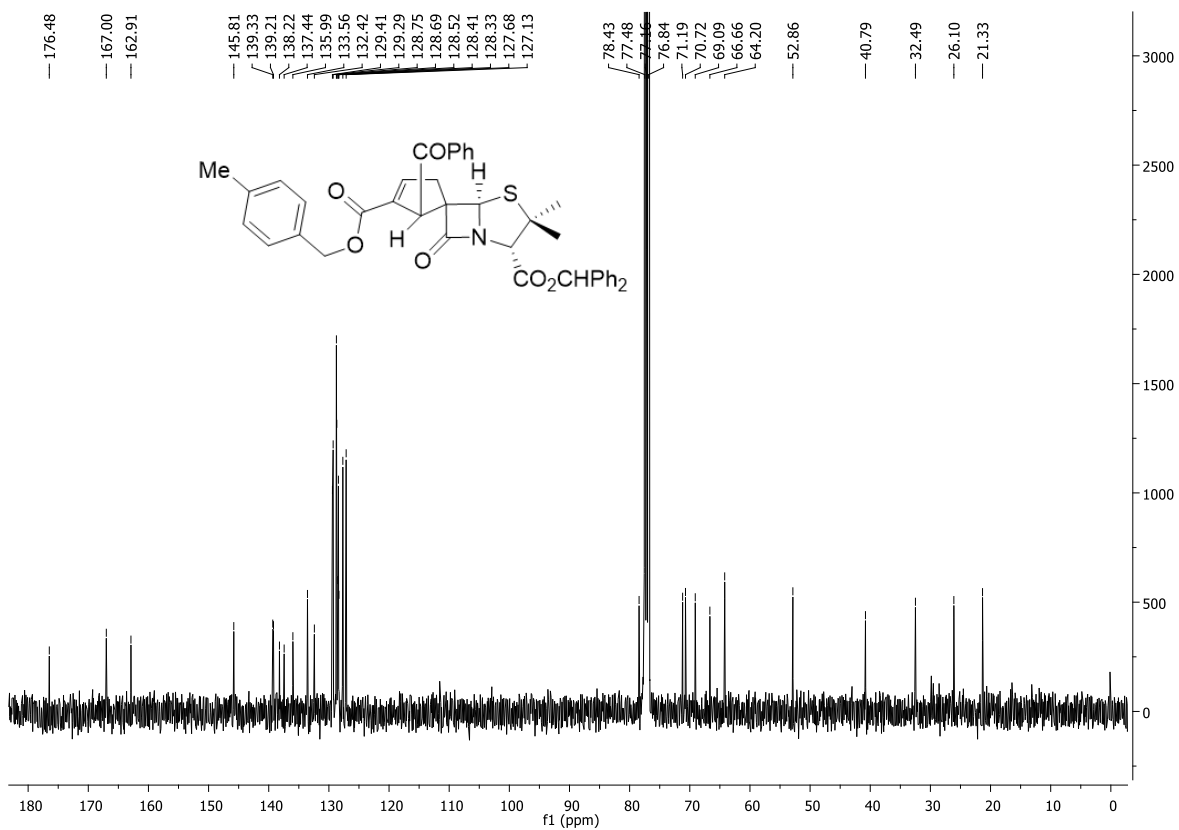
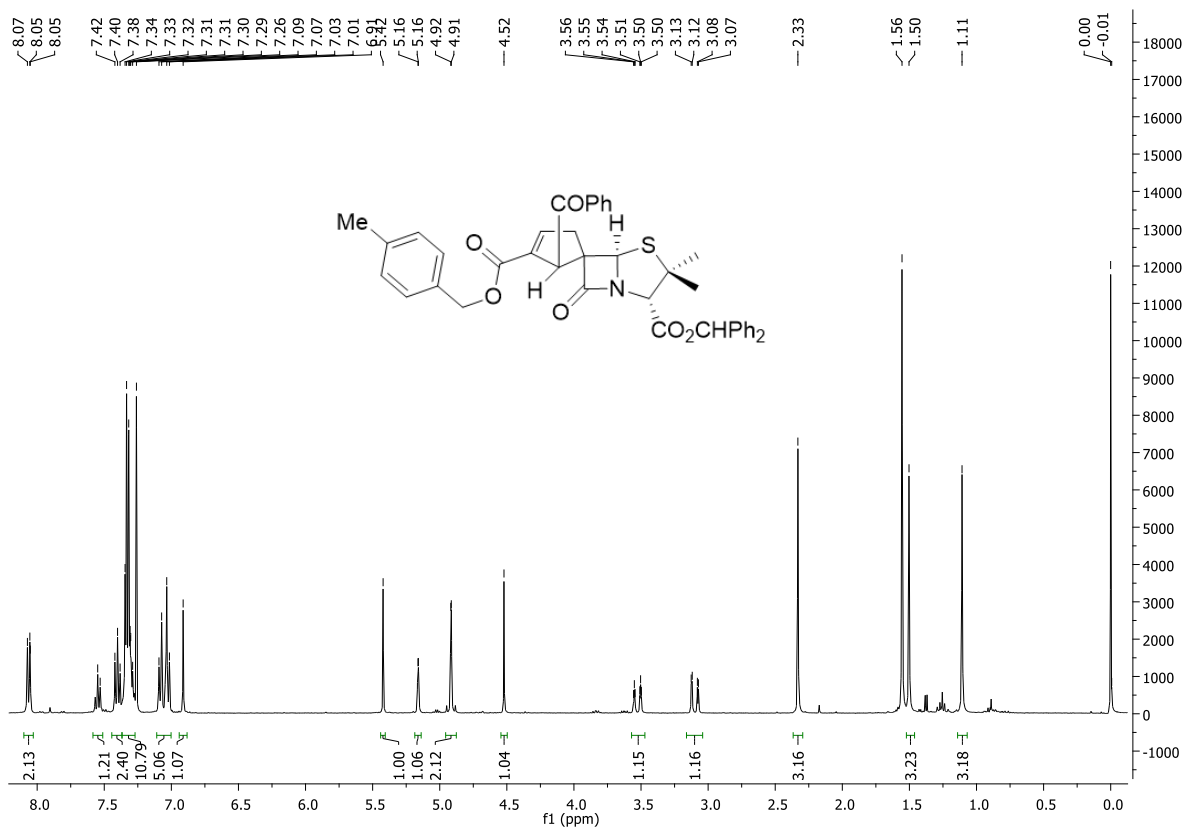


Figura 86 - Espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 5.7k ( $\text{CDCl}_3$ ).

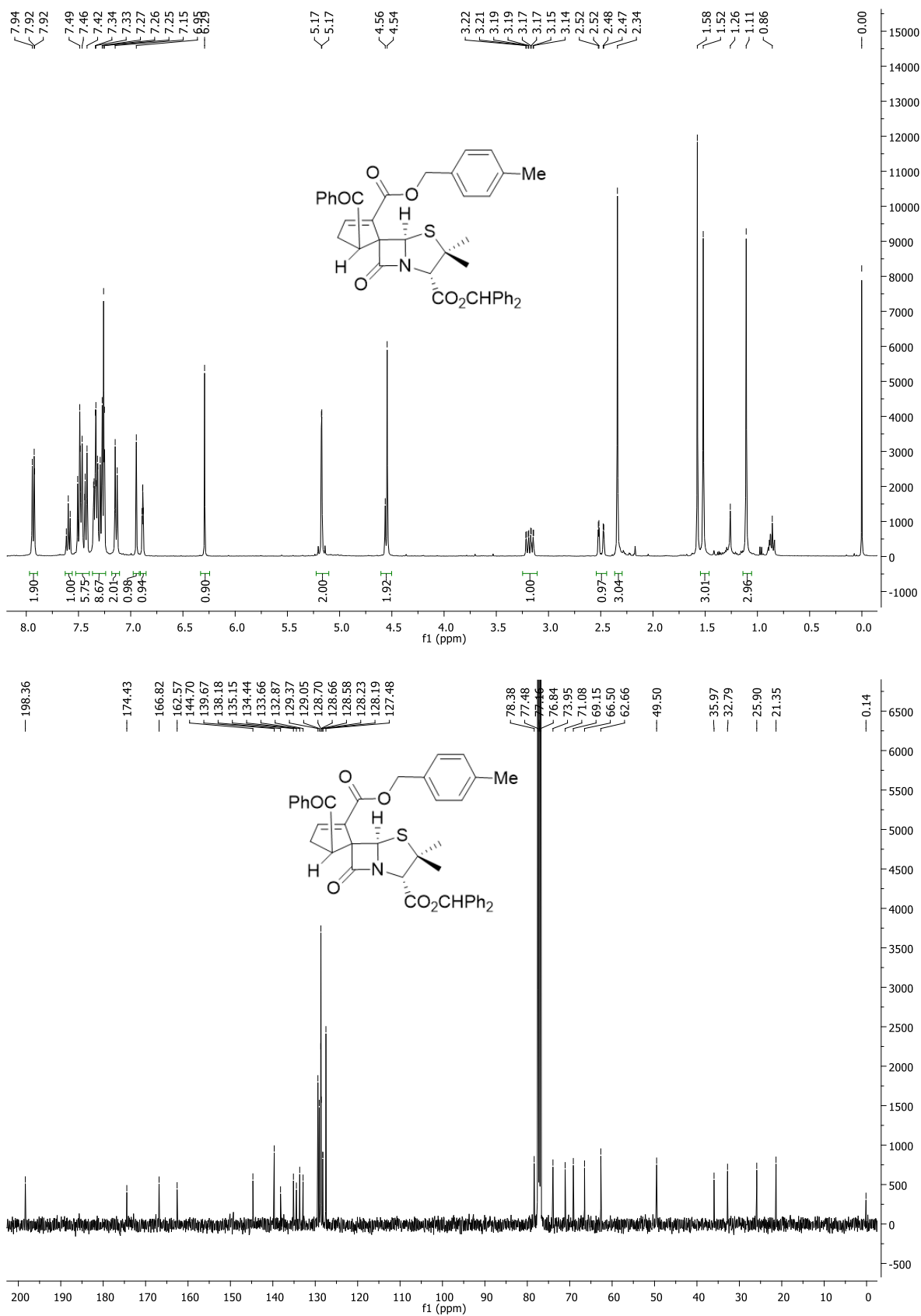


Figura 87 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.8k (CDCl<sub>3</sub>).



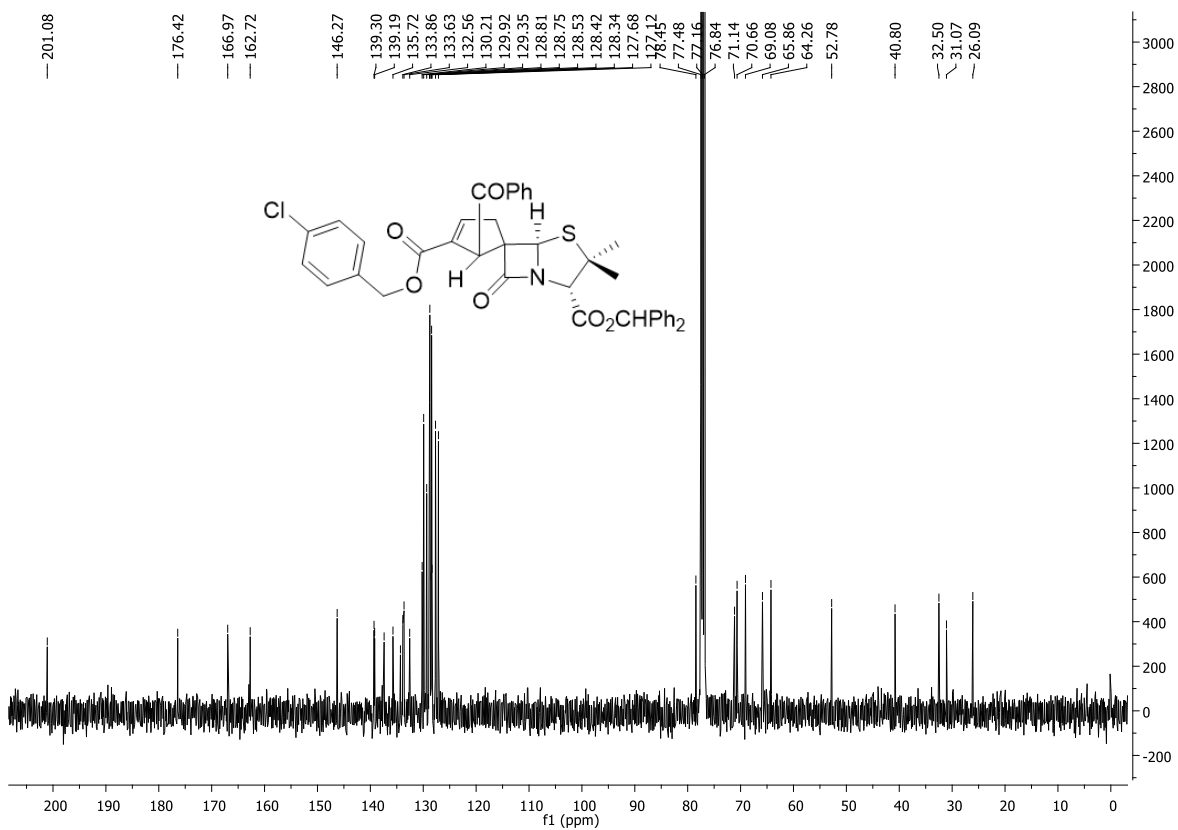
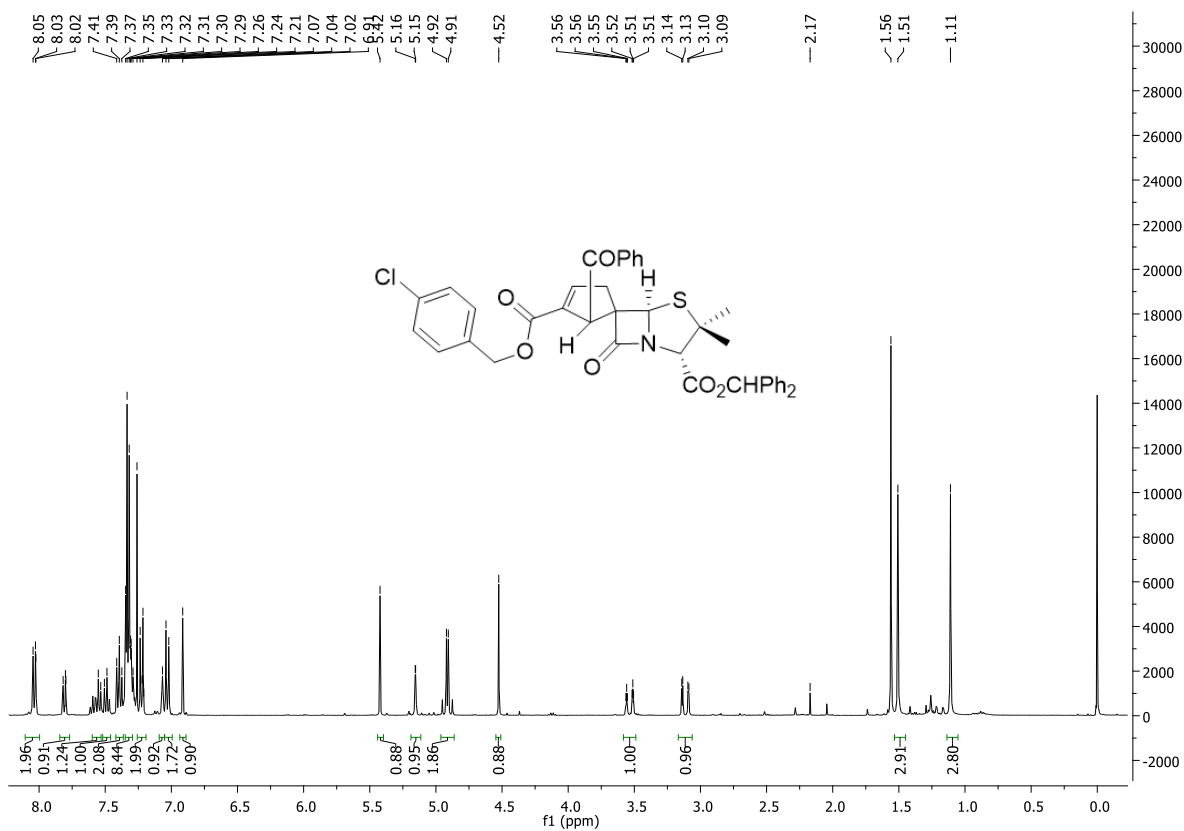


Figura 88 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.71 (CDCl<sub>3</sub>).

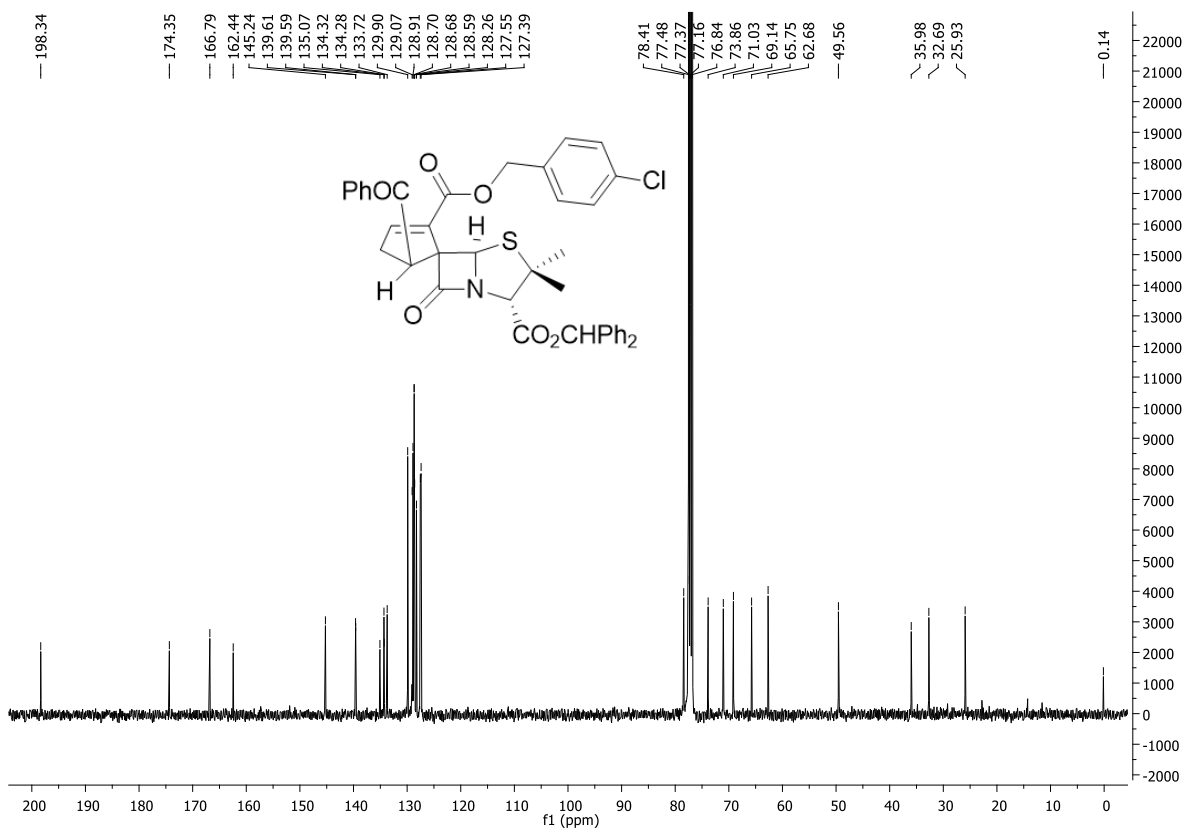
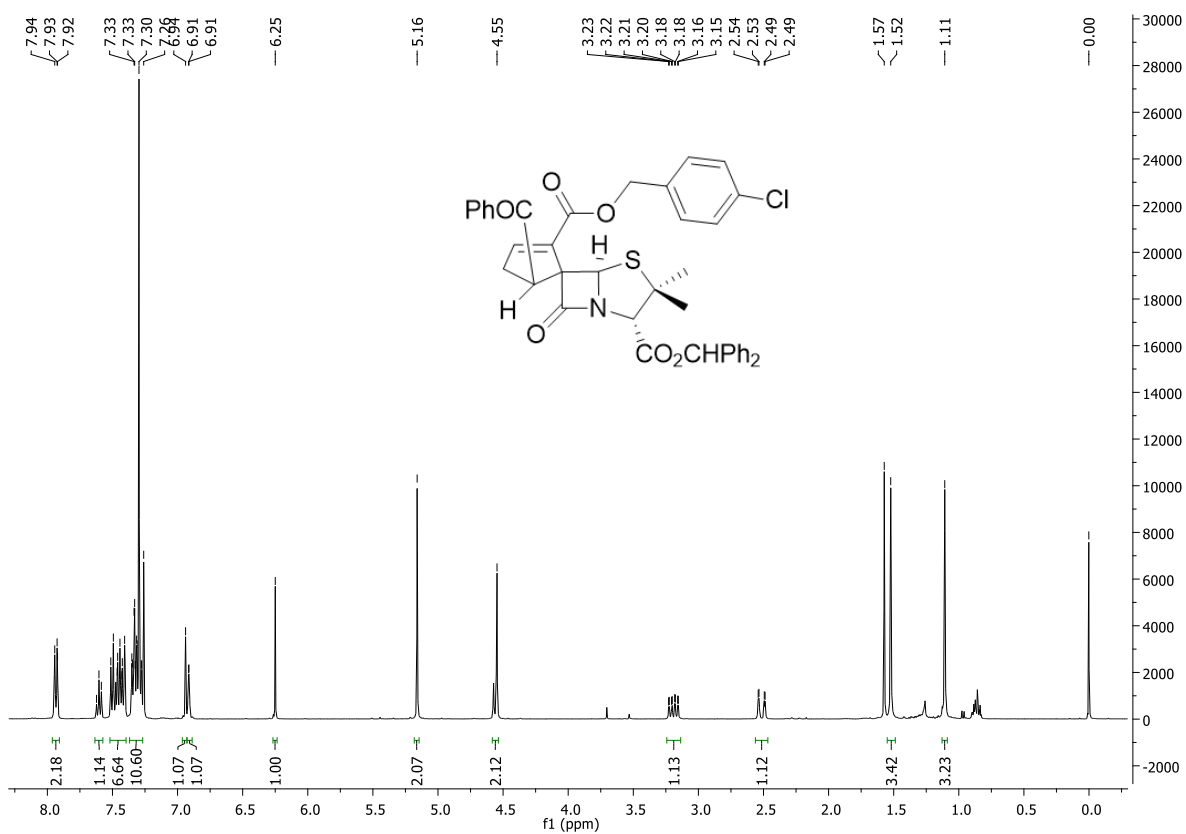


Figura 89 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.81 (CDCl<sub>3</sub>).

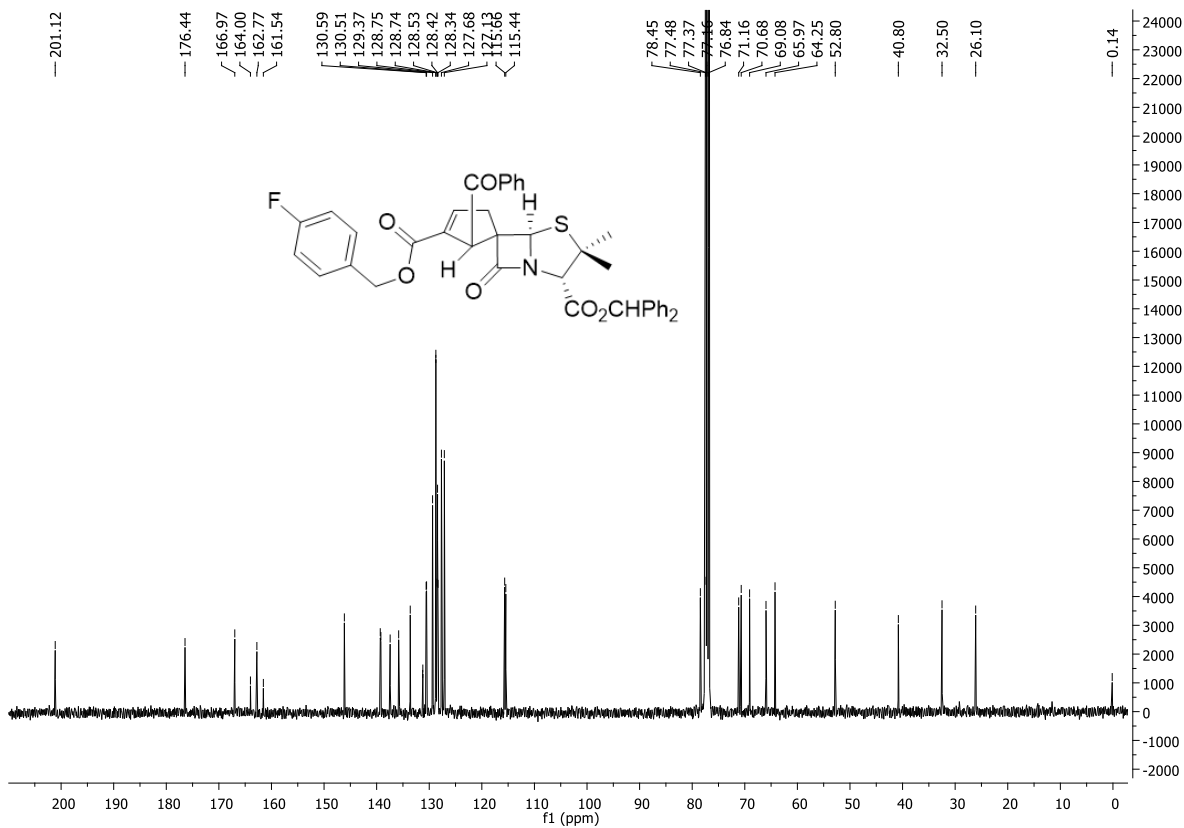
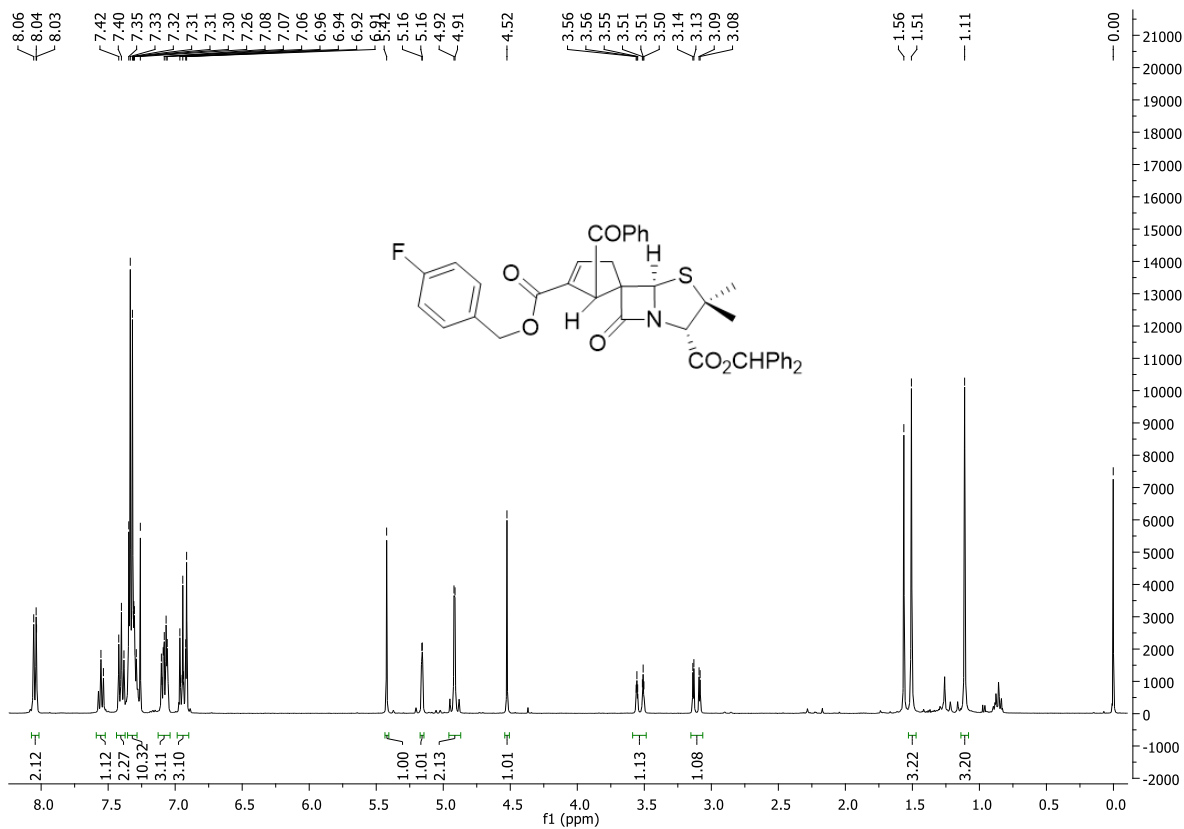


Figura 90 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.7m (CDCl<sub>3</sub>).

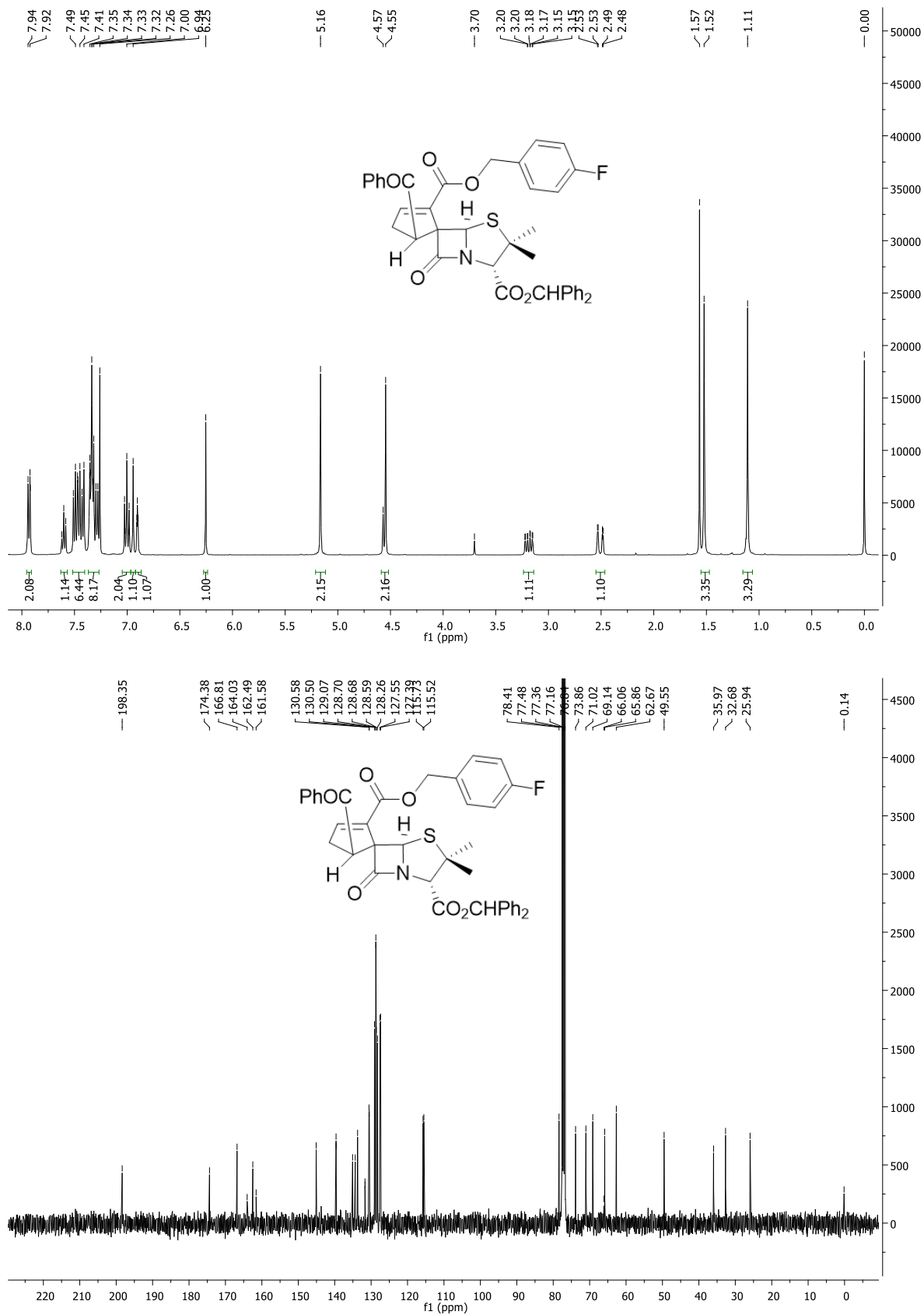


Figura 91 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.8m (CDCl<sub>3</sub>).

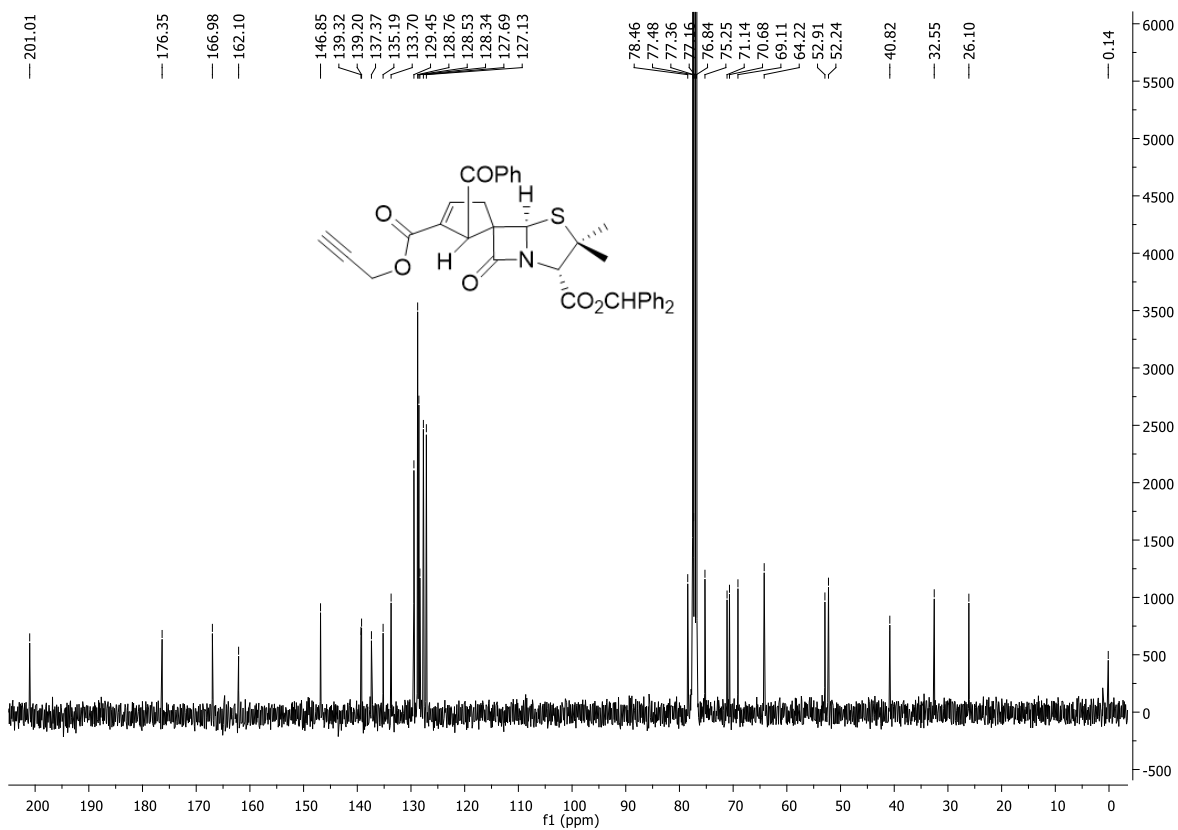
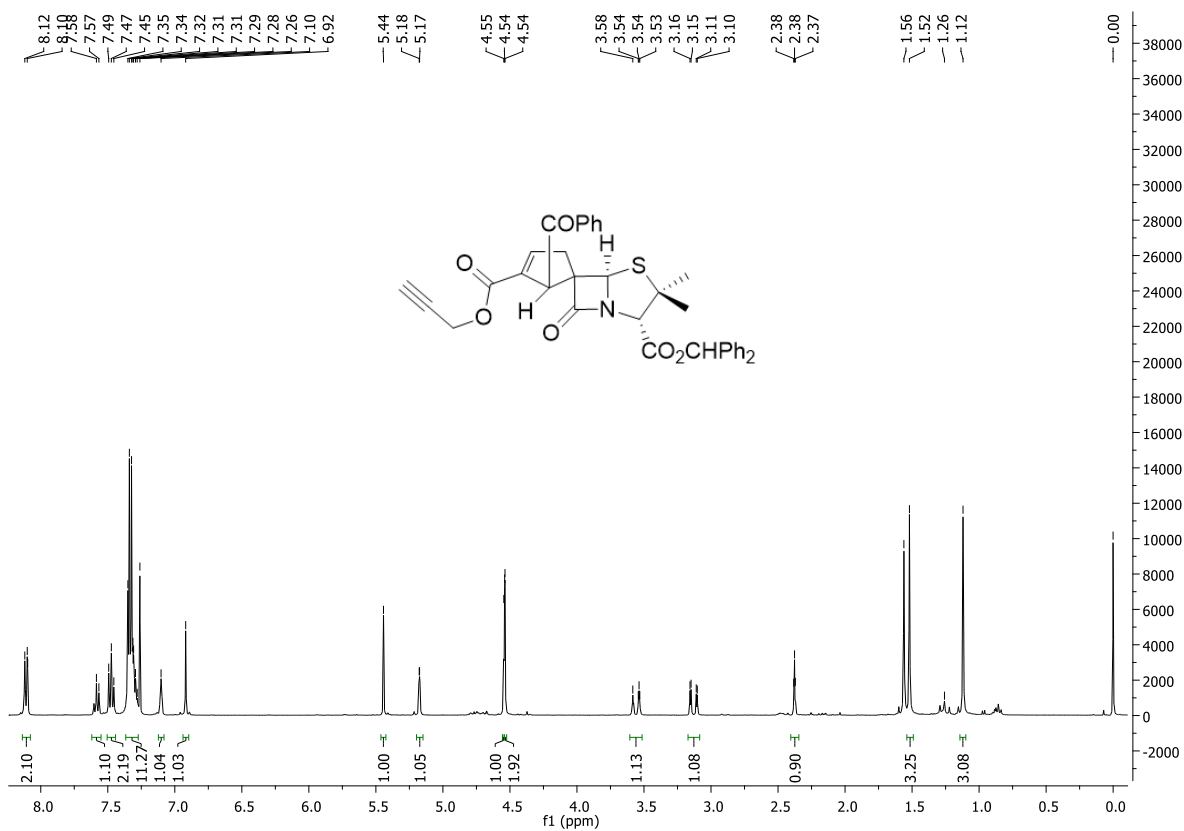


Figura 92 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.7n (CDCl<sub>3</sub>).

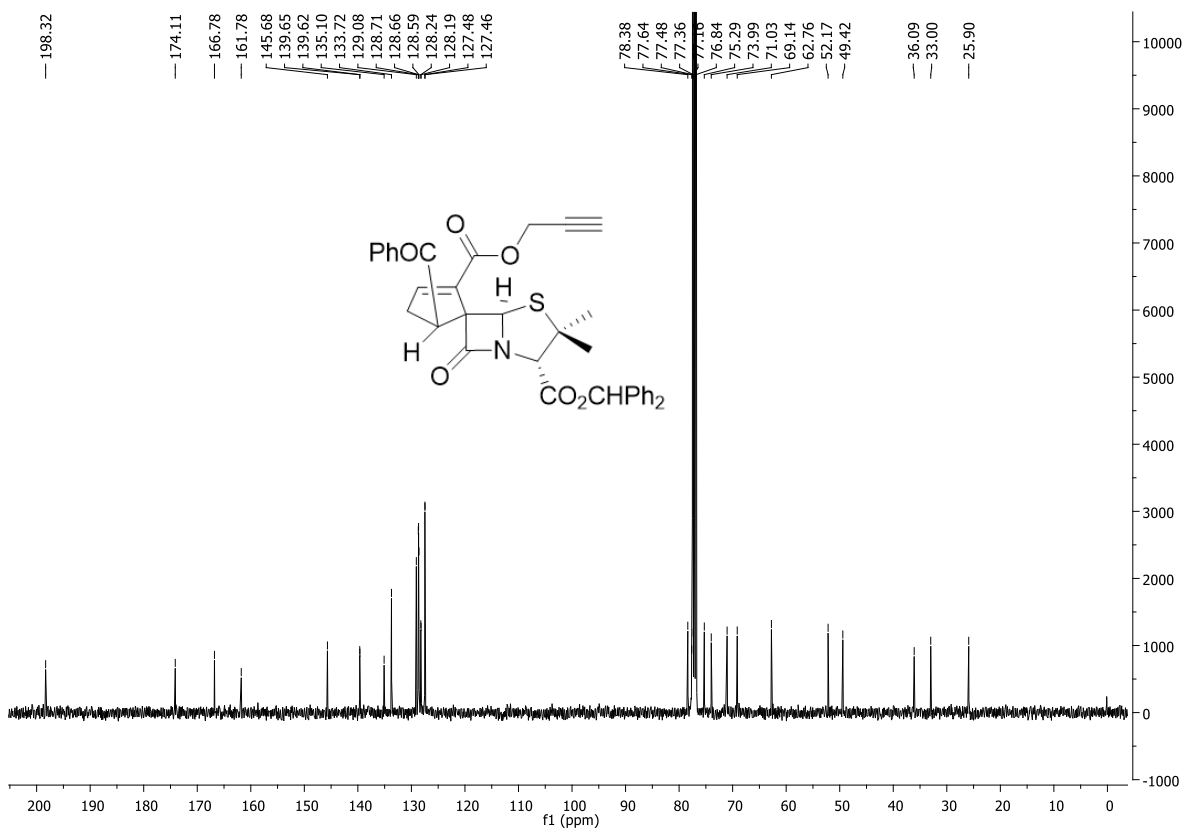
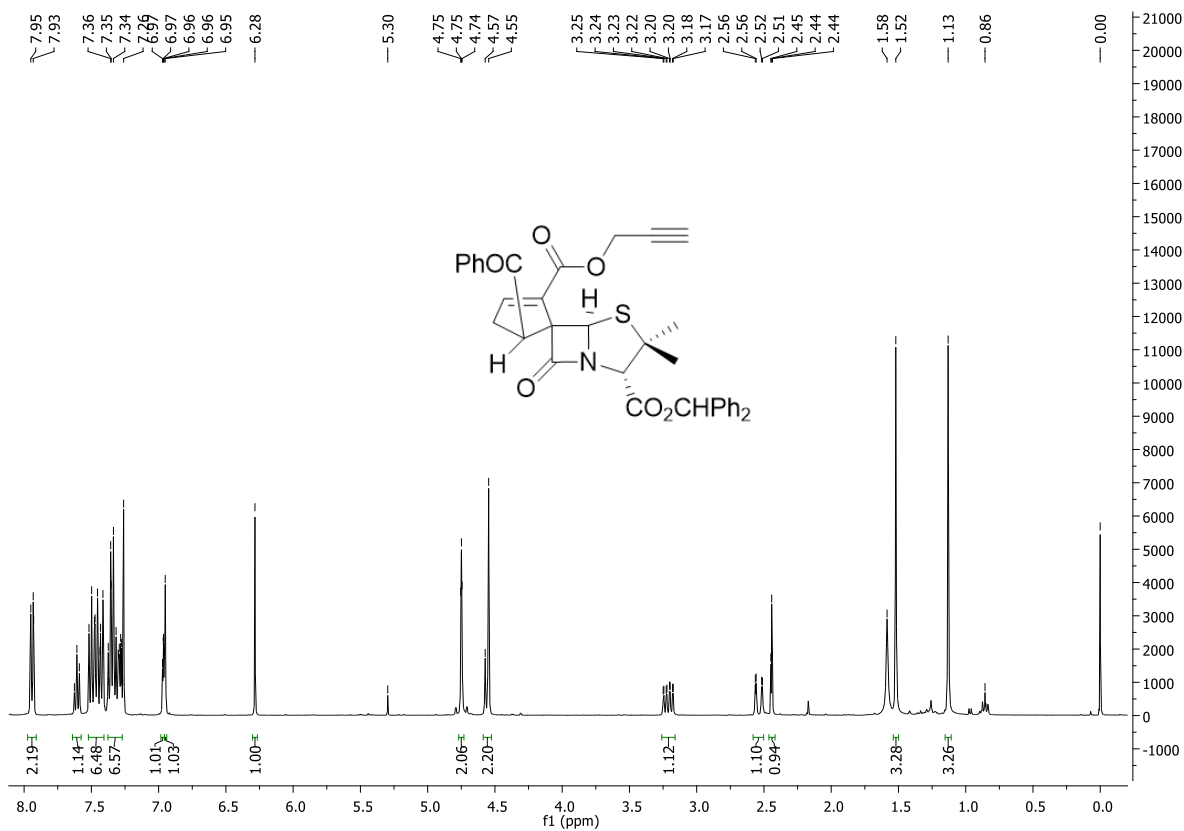


Figura 93 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto 5.8n (CDCl<sub>3</sub>).

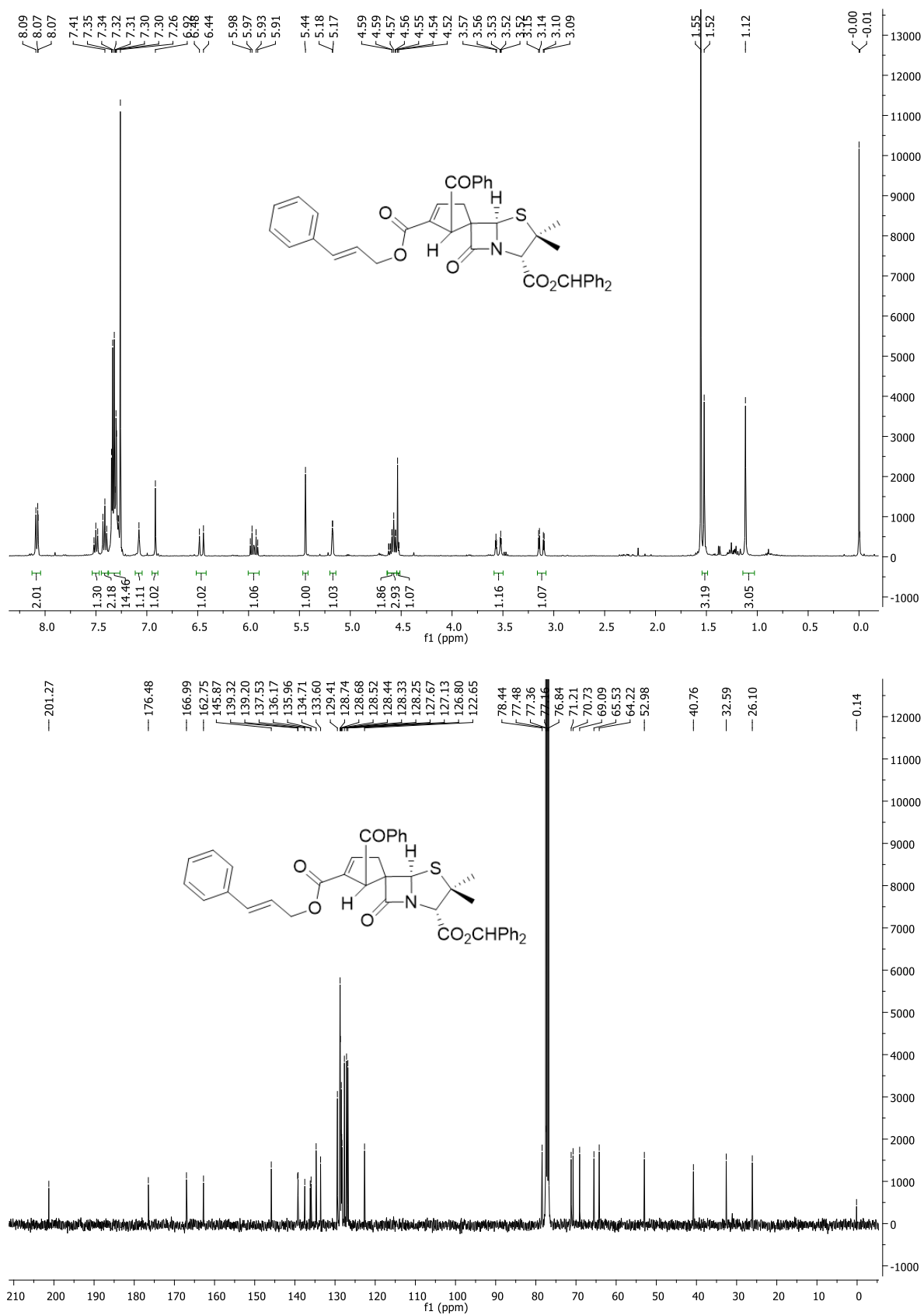


Figura 94 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.7o** (CDCl<sub>3</sub>).

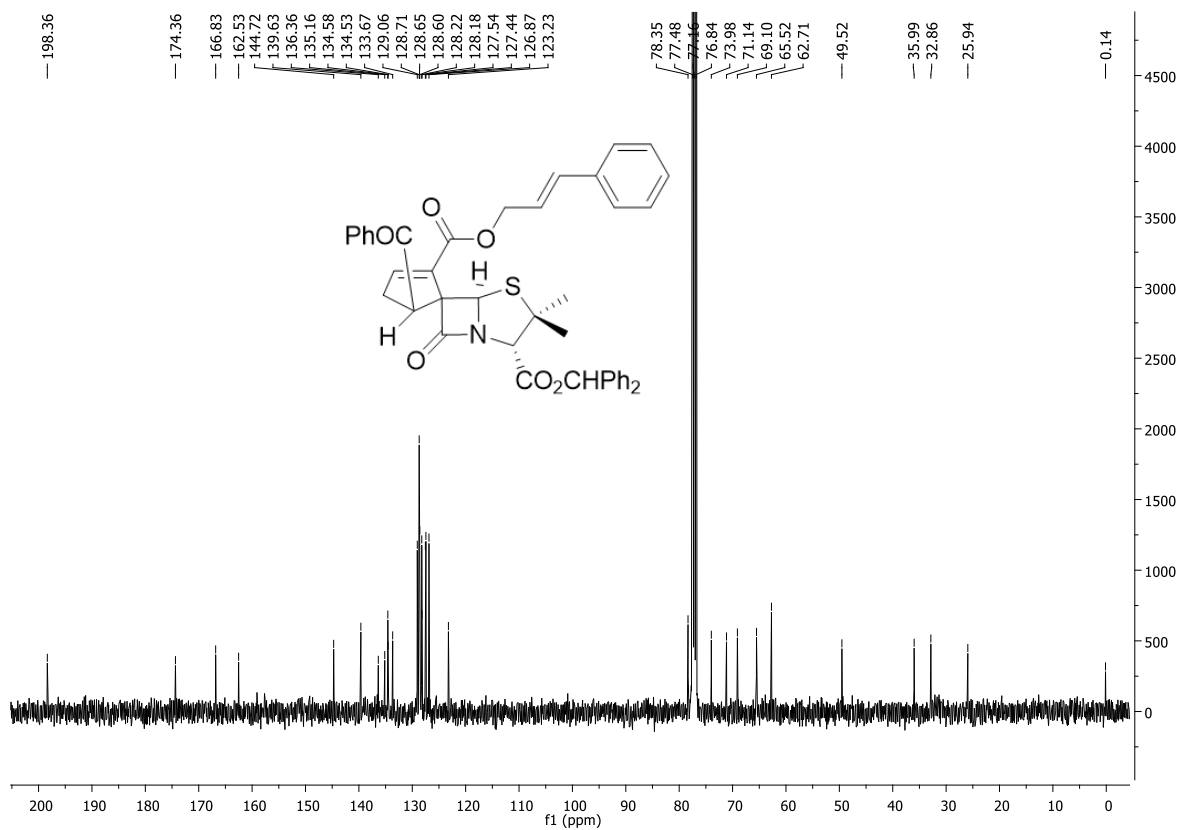
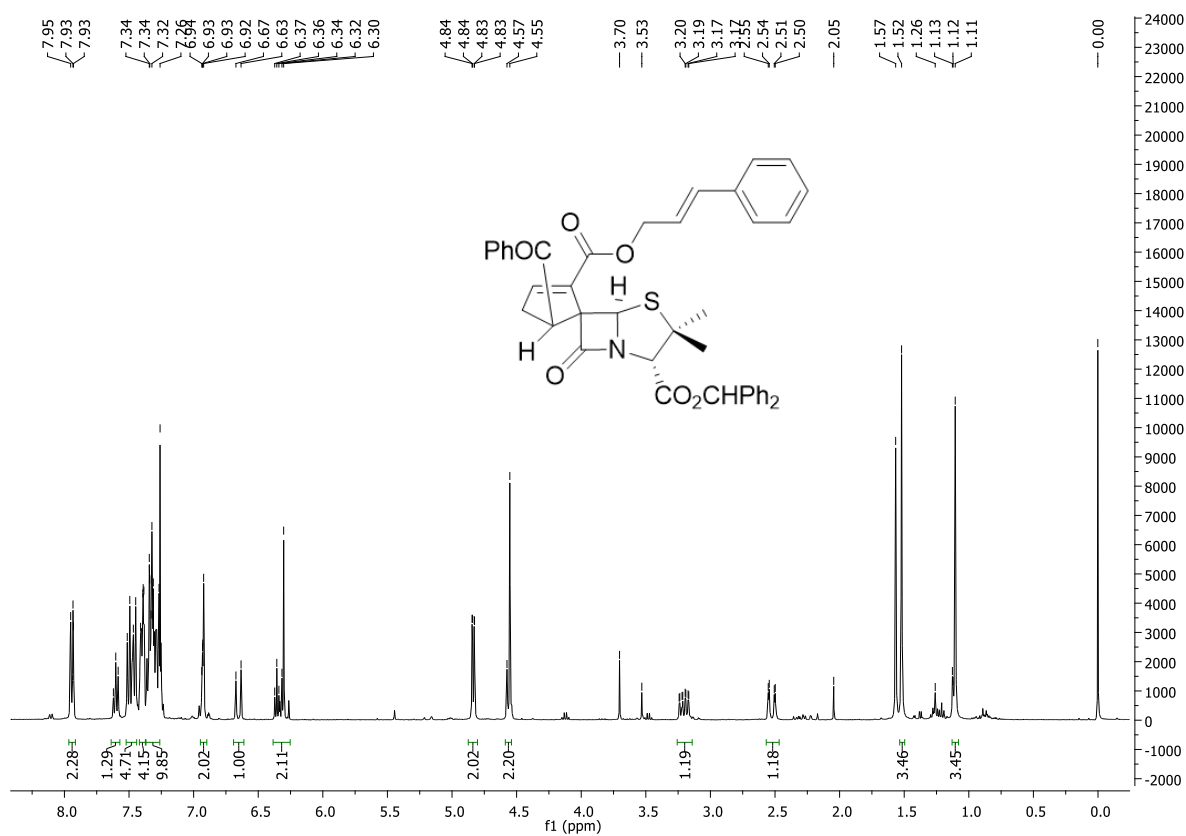


Figura 95 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8o** (CDCl<sub>3</sub>).



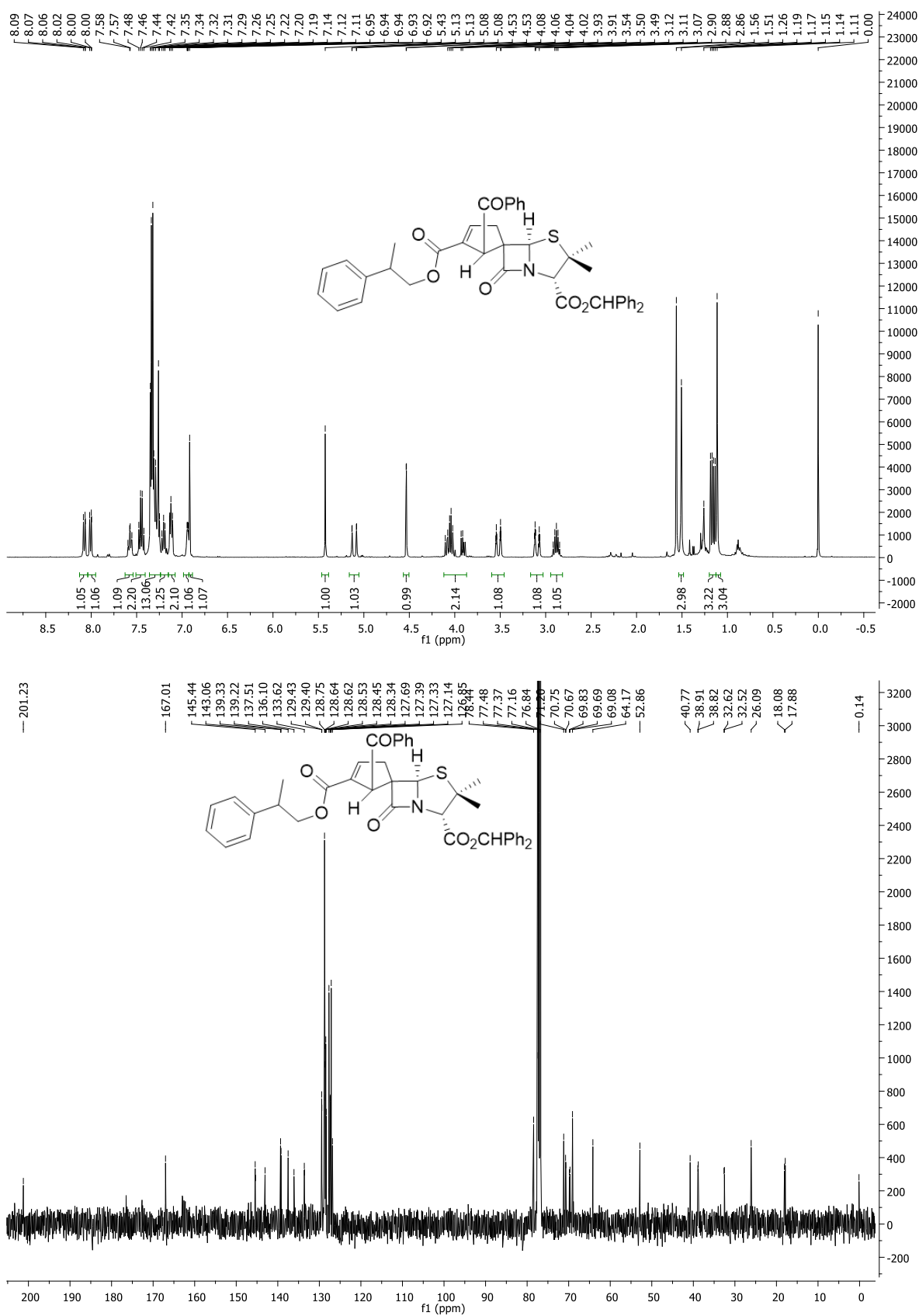


Figura 96 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.7p** (CDCl<sub>3</sub>).

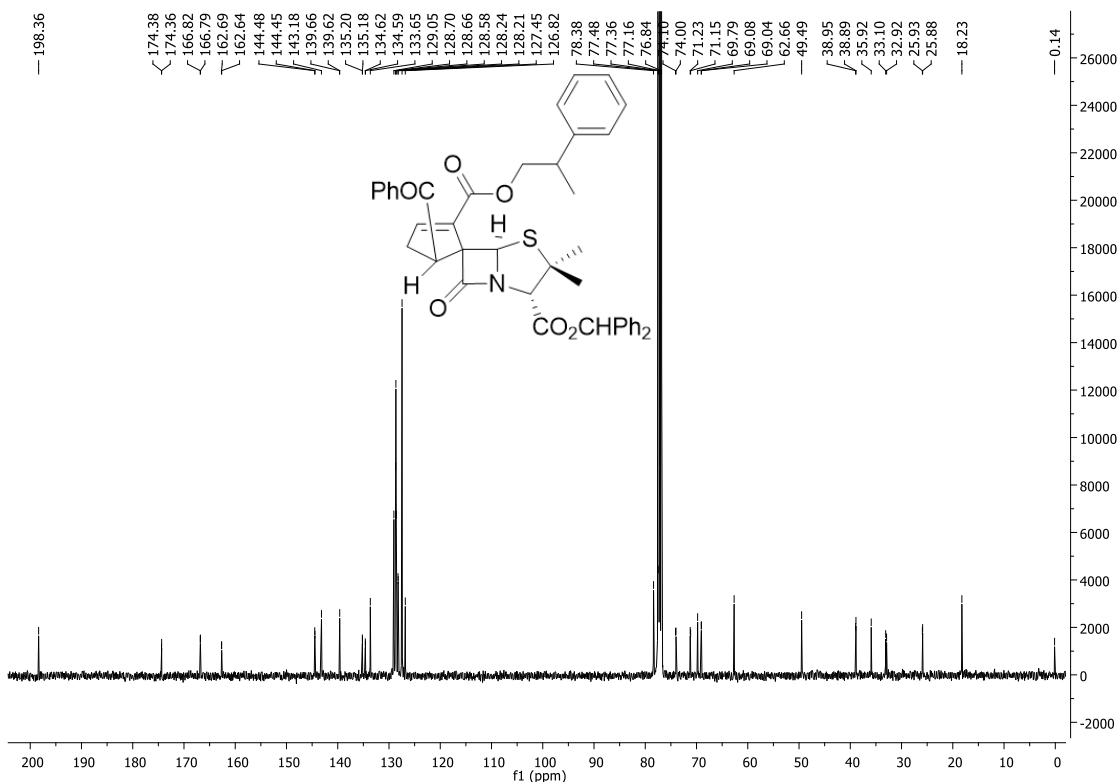
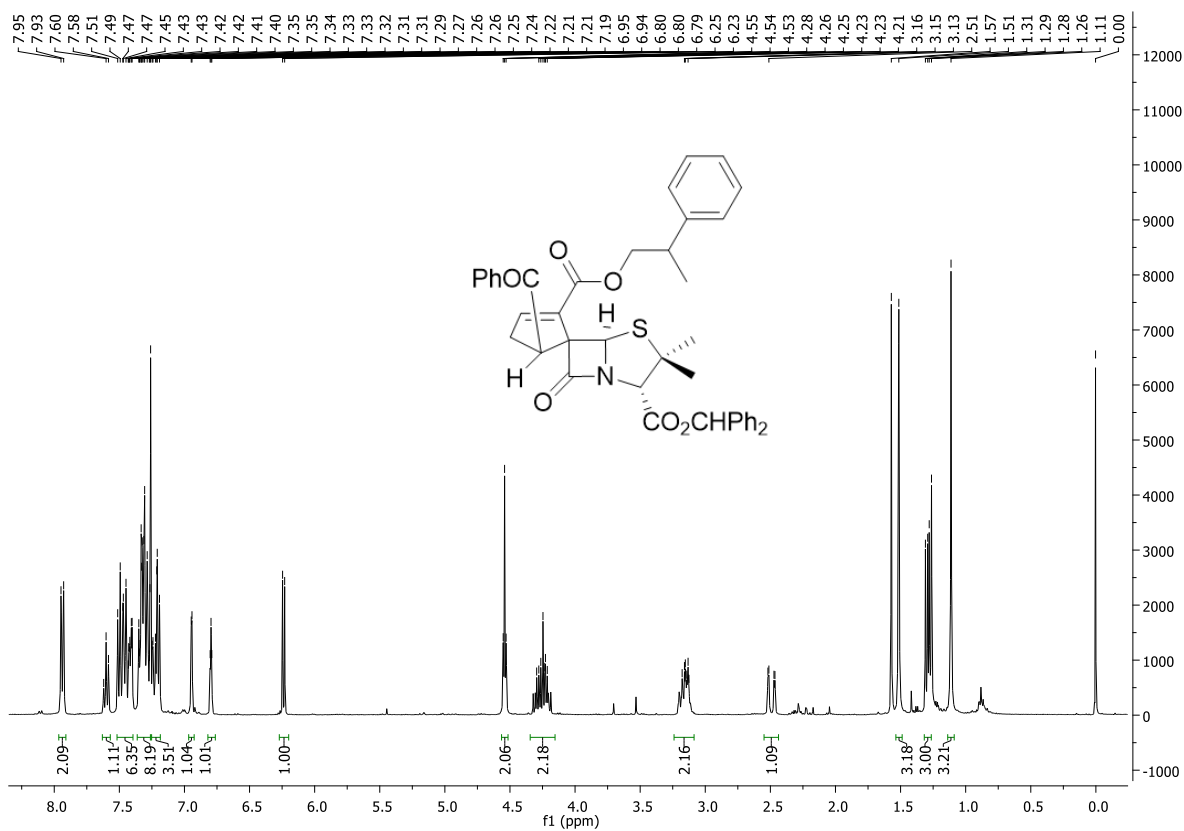
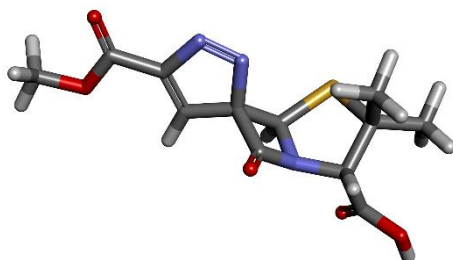


Figura 97 - Espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do composto **5.8p** (CDCl<sub>3</sub>).

## Anexo 2. Cálculos computacionais teóricos ao nível de teoria DFT – Geometrias otimizadas, energia mínima e coordenadas cartesianas



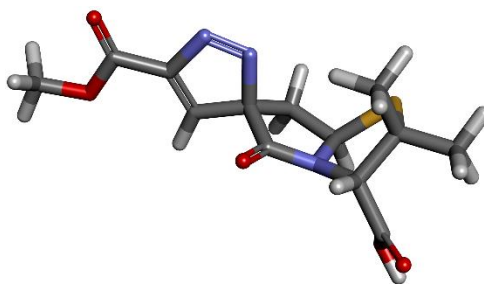
**Figura 1.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto BSS-593. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigénio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogénio.

**Tabela 1** – Energia mínima e respetivas e coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto BSS-593.

$$E = -1402.9897425054 E_h$$

Átomo	X	Y	Z
C	-0.8026318532	0.5750968857	-0.7654582251
C	0.5130073019	2.0724862569	-1.4606568643
N	0.4532844691	0.6102648268	-1.3399231756
O	-1.4795207259	-0.3042641740	-0.3131187440
C	1.6480183398	-0.0822057957	-0.9029080609
S	1.9838247005	2.6071388833	-0.4995200532
C	2.3705792894	0.8803318381	0.1254210084
C	1.7808583176	0.6769037432	1.5312232161
H	2.0183160931	-0.3302379354	1.8987878525
H	2.2104126733	1.4050192326	2.2264673443
H	0.6957191753	0.8123552278	1.5517171732
C	3.8966246780	0.7194107092	0.1576424563
H	4.3331692455	1.4204028587	0.8768731928
H	4.1648877487	-0.2947521705	0.4735271122

H	4.3492131038	0.9148669740	-0.8188757903
H	0.6147659035	2.4284853400	-2.4871979958
C	2.5043921415	-0.4491136957	-2.1107991231
O	3.2371506725	-1.5578284118	-1.8602802858
O	2.5432380254	0.1601022476	-3.1534715375
H	3.7810712706	-1.7198144719	-2.6551615299
C	-0.9509009217	2.1631929395	-0.9024926964
C	-2.0919769699	2.6939805891	-1.6731074267
C	-2.8361523448	3.3832497121	-0.7831883960
N	-1.1255533527	2.7183642801	0.4533623517
N	-2.2049417666	3.3663521725	0.5060920792
H	-2.3056654119	2.5188870927	-2.7186874255
C	-4.1185970926	4.1050851501	-0.9649987697
O	-4.7128890087	4.6972300251	-0.0927646076
O	-4.5363070965	4.0124677255	-2.2487327400
C	-5.7821401870	4.6707325183	-2.5290182467
H	-5.7071444856	5.7412359825	-2.3195204900
H	-5.9684637457	4.4989099066	-3.5891465408
H	-6.5858420738	4.2435783725	-1.9229002101
H	1.3512938871	-0.9998148354	-0.3890848515



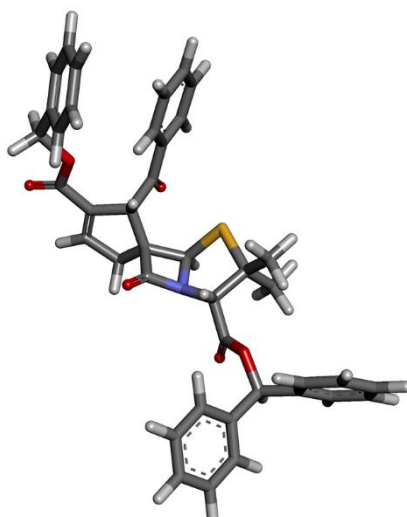
**Figura 2.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto **3.33b**. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigênio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogênio.

**Tabela 2** – Energia mínima e respectivas coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto **3.33b**.

$$E = -1442.3055026611 E_h$$

Átomo	X	Y	Z
S	-7.3889318011	0.2937625462	2.6488408596
C	-6.3095569434	-0.2903421295	1.2446283370
N	-6.1211717535	0.8676152849	0.3941972760
C	-7.2319365149	1.8047800738	0.3630418077
C	-7.7266899045	1.9656193184	1.8561939671
C	-3.9253589931	0.3538295890	1.1506730718
C	-4.8216938217	1.3226489015	0.3075960597
O	-4.4477953176	2.3184343389	-0.2698533137
C	-9.2194423170	2.2972371058	1.9789497751
C	-6.8813197063	3.0418764331	2.5590033731
C	-1.6773934628	0.6332679158	1.2016852203
N	-2.2541213743	1.3316675339	2.3189046057
N	-3.5003520941	1.1836406169	2.3271740880
C	-2.6381868371	0.0111213253	0.4946133224
C	-8.3396463066	1.4241300570	-0.6160565533
H	-6.8746354537	-1.0594150511	0.7164055834
O	-9.0718384740	2.2344870828	-1.1352186199
O	-8.4411367054	0.0924487171	-0.8326881268

H	-6.8465180143	2.7635970024	0.0073806732
H	-9.4874132943	2.4200919299	3.0333229380
H	-9.4428260554	3.2354234156	1.4589883439
H	-9.8517870854	1.5098789183	1.5596774397
H	-7.1517617051	3.0949854342	3.6184616473
H	-7.0688137752	4.0254010202	2.1082989330
H	-5.8103609610	2.8272111583	2.5045581437
H	-9.1833834679	-0.0249923652	-1.4567527918
C	-0.2096842239	0.6757104847	0.9920035681
O	0.5731557604	1.2733041916	1.6950934688
O	0.1382109798	-0.0474029913	-0.0978454720
C	1.5453458350	-0.0557878271	-0.3965926211
H	-2.5154852610	-0.5844121704	-0.3995389959
H	2.1119113710	-0.4749186483	0.4393202131
H	1.6505406084	-0.6785834286	-1.2853328921
H	1.8999675530	0.9596061005	-0.5932798418
C	-4.8812112180	-0.7808548789	1.5793339755
H	-4.6638226214	-1.6899169655	1.0111191199
H	-4.7645566436	-1.0045500402	2.6415934176



**Figura 3.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto BSS-730A. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigénio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogénio.

**Tabela 3** – Energia mínima e respetivas coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto BSS-730A.

$$E = -2448.3321464288 E_h$$

Átomo	X	Y	Z
C	1.5823560439	-2.2269705632	5.9403894477
C	4.5976846537	-6.3141317199	3.9083232706
C	5.6764090456	6.6904353766	-2.8957262489
C	3.6480597326	1.7022475555	-7.7491185041
C	2.1206293378	-2.6968745309	4.7415860299
C	0.3438184106	-1.5759886355	5.9437682205
C	3.4669467669	-6.6059366248	4.6719993725
C	4.4565778477	-5.9869085731	2.5558349473
C	4.3355943239	7.0471782068	-3.0403561191
C	6.0724146519	5.3695503603	-3.1280590997
C	3.0920782342	2.9842056152	-7.7476574573
C	3.9035565682	1.0606412678	-6.5371492176
C	1.4276333120	-2.5162679334	3.5444164064
C	-0.3488029954	-1.3963216995	4.7517129672

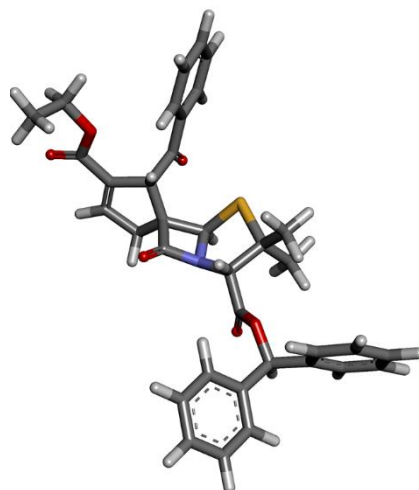
C	2.1989354595	-6.5655058350	4.0868070358
C	3.1908676978	-5.9576578435	1.9723423188
C	3.3931267839	6.0839088454	-3.4094351735
C	5.1329884925	4.4127729508	-3.5072210259
C	2.7971896913	3.6166788324	-6.5411757642
C	3.6094189706	1.6953117508	-5.3273902628
C	0.1842189724	-1.8648431195	3.5364344054
C	2.0484291380	-6.2439672104	2.7340495841
C	3.7821142941	4.7609331589	-3.6462133845
C	3.0543833070	2.9790564132	-5.3200877283
C	-1.9091510029	-3.0070446970	-0.3872683355
C	-0.9372711647	-3.3318331093	0.4779061540
C	0.5428663507	-0.8967324407	-1.2985700640
C	-0.6126932443	-1.6132997511	2.2979209934
C	-0.7284792652	-4.7302878519	0.9178485328
C	1.4234110872	2.3274832081	-2.5786587134
C	-1.9053447853	-1.5468173221	-0.7302687915
C	-0.1325057576	-2.1036209236	0.9112272936
C	1.5431958122	1.4105517428	-1.3583467631
C	-0.3618959713	0.4635366798	-0.0102421136
C	-0.5263572358	-1.0786885840	-0.1916461848
C	1.6132908228	2.2313531806	-0.0076241765
C	0.8273923190	3.5526316312	-0.0827250154
C	3.0663321459	2.4928426695	0.4077998228
C	0.6833850289	-6.2229633160	2.0989554870
C	2.7426996919	3.7231091119	-4.0302413100
N	0.4218025303	0.4931386200	-1.2585328129
O	1.2937359032	-1.6108259326	-1.9183777328
O	-1.6768124995	-1.0077172016	2.3529849933
O	-1.4637661197	-5.6573896057	0.6379852763
O	0.3953557972	2.6288352581	-3.1346642376
O	0.4019837557	-4.8710137958	1.6528009015
O	2.6545030308	2.7871137973	-2.9126674509



S	0.8085925834	1.1047942010	1.2610665716
H	2.1250315617	-2.3672937237	6.8720509442
H	5.5854937912	-6.3439311929	4.3609666818
H	6.4116998016	7.4370275141	-2.6066414418
H	3.8730571074	1.2055763070	-8.6894274049
H	3.0762492654	-3.2133321103	4.7339441343
H	-0.0773007888	-1.2098099603	6.8765503420
H	3.5688060471	-6.8624719532	5.7233739904
H	5.3345308538	-5.7627575236	1.9553184291
H	4.0207125197	8.0723503402	-2.8633159227
H	7.1168076970	5.0880027876	-3.0200402784
H	2.8813758141	3.4892714750	-8.6869931149
H	4.3285845886	0.0602511619	-6.5279398005
H	1.8549196465	-2.9051366113	2.6288801151
H	-1.3084935426	-0.8904499568	4.7300741549
H	1.3181274400	-6.7830847655	4.6864529977
H	3.0834936258	-5.7056065263	0.9198467442
H	2.3466058182	6.3620510224	-3.5148532807
H	5.4456039581	3.3912283203	-3.7051957074
H	2.3607739366	4.6133157122	-6.5462188964
H	3.7952990906	1.1836328233	-4.3882962709
H	-2.6145164334	-3.7252270104	-0.7926909245
H	-2.0227703461	-1.3586864923	-1.8046091146
H	-2.7215613095	-1.0245146426	-0.2136574433
H	0.9415026753	-2.2963593202	0.9013739068
H	2.4595741462	0.8203272542	-1.4701216338
H	-1.2825804642	1.0502512750	-0.0264006598
H	0.7917146281	4.0206686180	0.9052471709
H	-0.1991059600	3.4011090307	-0.4295440795
H	1.3171818392	4.2529651852	-0.7710396107
H	3.1044292963	3.0360358824	1.3583042838
H	3.5651175718	3.1044189342	-0.3521495578
H	3.6224170769	1.5571298445	0.5229827794

Anexo 2

H	0.6234435432	-6.8868231566	1.2304729145
H	-0.0958858140	-6.5295054571	2.8034624726
H	1.7655627646	4.2035753009	-4.1268032634



**Figura 4.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto **4.19a**. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigênio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogénio.

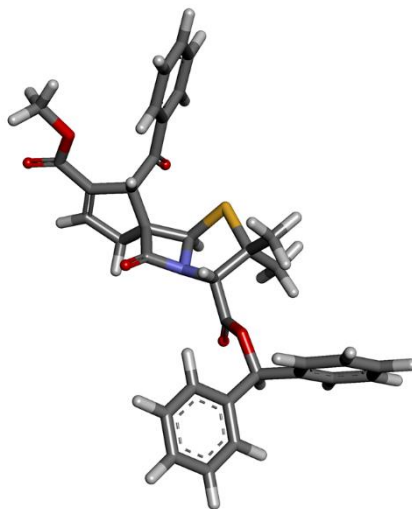
**Tabela 4** – Energia mínima e respetivas coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto **4.19a**.

$$E = -2256.7166544323 E_h$$

Átomo	X	Y	Z
C	1.3783779203	-2.2596637917	6.0930937655
C	5.6529968778	6.4279537615	-2.7035966811
C	4.1251866874	1.2031243912	-7.5177556597
C	1.9559562333	-2.6336123328	4.8781019598
C	0.1127238719	-1.6652074176	6.1104136165
C	4.3157082765	6.7597427996	-2.9229762510
C	6.0878245963	5.1168415902	-2.9197667262
C	3.8130318208	2.5634783103	-7.5978251577
C	4.0242135826	0.5454265174	-6.2927887987
C	1.2722105515	-2.4206537031	3.6810852626
C	-0.5671508378	-1.4451476232	4.9171169078
C	3.4149446423	5.7812926750	-3.3523850945
C	5.1904854115	4.1445154052	-3.3566167898
C	3.4057417055	3.2555563123	-6.4593159386

C	3.6149593320	1.2390546792	-5.1501324639
C	0.0011575770	-1.8242574061	3.6877890951
C	3.8434809825	4.4679106216	-3.5731443656
C	3.3023822774	2.5997090343	-5.2241860552
C	-2.1495086769	-2.9684091293	-0.1808110902
C	-1.1749362842	-3.2808800473	0.6851763966
C	0.3319570255	-0.9251994147	-1.1713601027
C	-0.7880122043	-1.5325379771	2.4509128634
C	-0.9816282162	-4.6597832464	1.1900902298
C	1.3900350035	2.2040438696	-2.5113599909
C	-2.1266714962	-1.5190990910	-0.5701479723
C	-0.3428383763	-2.0540945216	1.0670455223
C	1.4262066817	1.3309931699	-1.2540536098
C	-0.5373656429	0.4889347919	0.0850490357
C	-0.7372190361	-1.0538256233	-0.0575112938
C	1.4935036666	2.1966379988	0.0657139932
C	0.7515629284	3.5380636089	-0.0729228301
C	2.9452569104	2.4278744726	0.5029010980
C	0.4358171875	-6.0641068256	2.4996783921
C	2.8533852061	3.4029561243	-4.0104513735
N	0.2604079529	0.4683101663	-1.1563623491
O	1.0596583955	-1.6742479001	-1.7776896093
O	-1.8258066864	-0.8842780360	2.5158273206
O	-1.7292214101	-5.5899647739	0.9560806690
O	0.3932066134	2.5823211432	-3.0777316719
O	0.1446354442	-4.7624806332	1.9358393681
O	2.6602170761	2.5151736251	-2.8683152136
S	0.6301502998	1.1383187116	1.3541682958
H	1.9133206794	-2.4284595545	7.0243885513
H	6.3553722080	7.1871389196	-2.3691219492
H	4.4410308947	0.6620473027	-8.4059463572
H	2.9417684356	-3.0908297759	4.8608436680
H	-0.3393420510	-1.3723233078	7.0543968407

H	3.9717369278	7.7778179908	-2.7597567324
H	7.1294725659	4.8542986513	-2.7533141820
H	3.8852460679	3.0846263225	-8.5490471408
H	4.2606790692	-0.5130167221	-6.2197400336
H	1.7314347084	-2.7287899328	2.7496563648
H	-1.5452340388	-0.9756361043	4.9063696032
H	2.3713510192	6.0402694580	-3.5187774156
H	5.5320439330	3.1293496012	-3.5396479970
H	3.1677432541	4.3149185813	-6.5271572766
H	3.5299478627	0.7184031034	-4.2024168301
H	-2.8720864624	-3.6864088946	-0.5553407739
H	-2.2496720232	-1.3640259487	-1.6492080579
H	-2.9325362725	-0.9689359762	-0.0661259855
H	0.7264785072	-2.2694713306	1.0403699306
H	2.3171544585	0.6961220059	-1.3133877771
H	-1.4439588821	1.0957015077	0.0397465820
H	0.7037451121	4.0387318187	0.8983086667
H	-0.2683127461	3.4064518968	-0.4458112471
H	1.2818784828	4.1999735727	-0.7693156981
H	2.9805479419	3.0051376861	1.4330464487
H	3.4796980538	2.9941857733	-0.2679792330
H	3.4686909106	1.4800459931	0.6640980751
H	1.8856439882	3.8651181974	-4.2241905604
H	1.0551429308	-5.8421843786	3.3727058945
H	-0.5015896701	-6.5208950637	2.8271078625
C	1.1651769393	-6.9542624341	1.5045629979
H	1.4467814817	-7.8967145691	1.9891959516
H	0.5215668643	-7.1846088708	0.6512220264
H	2.0772549781	-6.4693598046	1.1404890806



**Figura 5.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto **4.19b**. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigénio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogénio.

**Tabela 5** – Energia mínima e respetivas coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto **4.19b**.

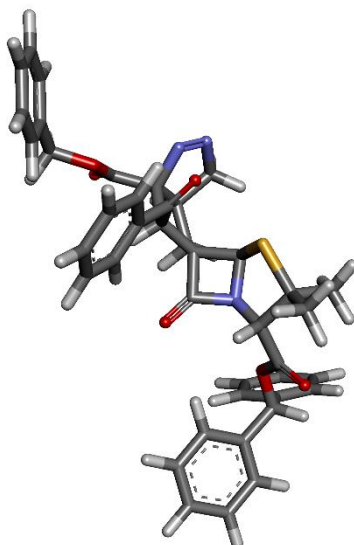
$$E = -2217.4269739631 E_h$$

Átomo	X	Y	Z
C	1.3882518580	-2.3797511568	6.0272198936
C	5.7122462899	6.4076781442	-2.7252944960
C	4.0354882647	1.2295955797	-7.5463082795
C	1.9490304331	-2.7431830430	4.8011917596
C	0.1291179555	-1.7725359468	6.0659050214
C	4.3736396866	6.7522516128	-2.9138643184
C	6.1312894329	5.0945619724	-2.9602538962
C	3.7145138922	2.5885079003	-7.6158742909
C	3.9744650062	0.5705556783	-6.3194143347
C	1.2552972027	-2.5066280622	3.6145446986
C	-0.5600355817	-1.5279958179	4.8828620186
C	3.4561822179	5.7849662602	-3.3323746230
C	5.2169994065	4.1332821761	-3.3863818367
C	3.3375158630	3.2777086260	-6.4651363567

C	3.5958121136	1.2612671699	-5.1646306516
C	-0.0085954702	-1.8954282186	3.6423825467
C	3.8688293485	4.4697336260	-3.5726106744
C	3.2740381068	2.6203819094	-5.2281110723
C	-2.2247177614	-2.9095453040	-0.2434879264
C	-1.2617027390	-3.2696520390	0.6167706042
C	0.3149138179	-0.9150967870	-1.1942557007
C	-0.8059765376	-1.5715916997	2.4188071928
C	-1.1184789840	-4.6619376292	1.0982780035
C	1.4047816642	2.2175319285	-2.4965106349
C	-2.1553246287	-1.4547487983	-0.6033414019
C	-0.3877531300	-2.0801201227	1.0219191425
C	1.4437284531	1.3265871099	-1.2518571819
C	-0.5178748941	0.4921474981	0.0936639630
C	-0.7527753410	-1.0427523536	-0.0791188339
C	1.5318814884	2.1714123621	0.0795779286
C	0.7943157372	3.5176840465	-0.0315183913
C	2.9894639394	2.3894599680	0.5032885811
C	0.1692048761	-6.1257485489	2.4271482813
C	2.8587020778	3.4197216337	-4.0000665759
N	0.2668999536	0.4788838377	-1.1561923644
O	1.0262709125	-1.6671690460	-1.8158753222
O	-1.8282365276	-0.9015892618	2.5046829500
O	-1.8596573382	-5.5790544766	0.8044526859
O	0.4055218906	2.6094933849	-3.0492025823
O	-0.0405453422	-4.8037367852	1.9065790263
O	2.6735721856	2.5251002569	-2.8614157566
S	0.6762017257	1.0968519032	1.3603910584
H	1.9309130118	-2.5669546454	6.9504896378
H	6.4278945260	7.1582745886	-2.3996239266
H	4.3266791435	0.6906106829	-8.4441325683
H	2.9296361195	-3.2106637722	4.7674740096
H	-0.3102105100	-1.4881668833	7.0184320754

H	4.0416539577	7.7716302055	-2.7348676704
H	7.1739607796	4.8225252355	-2.8175540886
H	3.7549925234	3.1106399409	-8.5684818478
H	4.2177756188	-0.4868635548	-6.2541673605
H	1.7026661454	-2.8054841754	2.6741925167
H	-1.5326449127	-1.0471372876	4.8890714009
H	2.4115754692	6.0535908884	-3.4748209075
H	5.5458075827	3.1168525042	-3.5850184476
H	3.0913251387	4.3357373857	-6.5254175296
H	3.5416165162	0.7390755899	-4.2153503429
H	-2.9700188520	-3.5974176017	-0.6296986689
H	-2.2712831140	-1.2734860585	-1.6790836538
H	-2.9450582393	-0.8898892957	-0.0898504602
H	0.6732727257	-2.3326715796	0.9835967667
H	2.3257881343	0.6811235613	-1.3281167938
H	-1.4124212041	1.1178127044	0.0701091229
H	0.7594229060	4.0052430738	0.9469679556
H	-0.2302274520	3.3949827139	-0.3943727638
H	1.3188860414	4.1869328117	-0.7252721419
H	3.0383324368	2.9547763581	1.4402460048
H	3.5180129606	2.9629343630	-0.2663703591
H	3.5105636648	1.4374940683	0.6469283139
H	1.0141948527	-6.0382236544	3.1113925243
H	0.3988318780	-6.8237521437	1.6170388151
H	-0.7212019195	-6.4753916846	2.9561090276
H	1.8935625462	3.8960661728	-4.1927164937





**Figura 6.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto **4.21**. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigênio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogénio.

**Tabela 6** – Energia mínima e respetivas coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto **4.21**.

$$E = -2597.0203098704 E_h$$

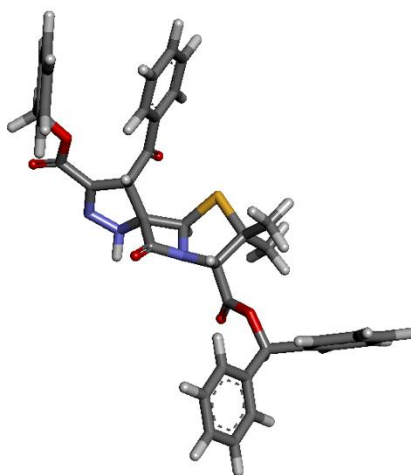
Átomo	X	Y	Z
H	2.5726134752	-3.1670565850	-4.0871706991
C	2.2897605016	-4.0226865557	-3.4681639512
N	1.5827050086	-3.6555991500	-2.2200265122
C	0.1249397928	-3.7173391679	-2.2129748643
C	-0.5620166443	-2.5108649728	-1.5670888582
O	0.3060271803	-1.7459932968	-0.8843242081
C	-0.2474728036	-0.6583825343	-0.0792630865
C	0.7396392560	0.4921846236	-0.1744127423
C	1.9011856148	0.5231164421	0.6076762365
C	2.8117797347	1.5712545373	0.4776299837
C	2.5697233737	2.6038691068	-0.4321562142
C	1.4127553567	2.5827890919	-1.2125056041
C	0.5041007853	1.5306107228	-1.0833539935

C	-0.5189866877	-1.1469603101	1.3351908955
C	0.0625893943	-2.3109892767	1.8513687816
C	-0.2047726645	-2.7035989465	3.1663069887
C	-1.0470436162	-1.9411327504	3.9751324022
C	-1.6281854570	-0.7776931221	3.4632738875
C	-1.3655269924	-0.3855725601	2.1522510527
O	-1.7591362431	-2.3237417952	-1.6304883952
C	-0.3199046140	-3.9963058892	-3.6909468201
C	-0.4408932848	-2.7049354265	-4.5185034515
C	-1.6254890494	-4.7984897672	-3.7445733441
S	1.0675798174	-5.0741850351	-4.3546026835
C	2.4263003013	-4.4110609959	-1.4245169490
C	3.4570070625	-4.5807475302	-2.5606866967
C	4.6290157882	-3.5757887842	-2.3937661461
H	4.9275952122	-3.5750185628	-1.3381988878
H	4.3276580447	-2.5517938067	-2.6402160761
C	5.7862198145	-4.1013339752	-3.2547751157
C	5.7928368819	-3.6617946085	-4.7316036368
N	5.7629705243	-4.9054877255	-5.5417799601
N	5.6236358200	-5.9295442268	-4.8626399785
H	6.7532608666	-3.8932807098	-2.7931892630
C	5.5689791591	-5.6258644043	-3.3713704633
C	6.6865524893	-6.4624807081	-2.7402308136
O	6.3677300848	-7.7655787745	-2.7623893677
C	7.3596409426	-8.6975162517	-2.2311855568
C	7.1431773976	-10.0411079576	-2.8695283371
C	6.1060040511	-10.8770840880	-2.4356650879
C	5.8955482156	-12.1142797776	-3.0435562794
C	6.7237693995	-12.5306796563	-4.0891475851
C	7.7610917572	-11.7049013019	-4.5257867115
C	7.9670232798	-10.4652552433	-3.9188362524
O	7.7186032832	-6.0078356723	-2.2931860497
C	4.1808950935	-5.9436534669	-2.6958816217

C	3.4133808988	-7.0935527654	-3.3695868410
C	2.9292692850	-8.2460962800	-2.5469017704
C	2.7935370630	-8.1986270414	-1.1495994879
C	2.3076271549	-9.3074948413	-0.4544037511
C	1.9649160826	-10.4732075572	-1.1419538340
C	2.0911546867	-10.5249660739	-2.5344682302
C	2.5613535116	-9.4169062696	-3.2320290972
O	3.2190005966	-7.0577542517	-4.5734143686
H	4.4073437861	-6.2263782376	-1.6628503175
O	2.3322044372	-4.7950464360	-0.2785627691
H	-0.1765759850	-4.5733140515	-1.5921702335
H	-1.1934673189	-0.3649377426	-0.5420333339
H	2.0862288618	-0.2713274948	1.3249126767
H	3.7087696910	1.5847201575	1.0914636953
H	3.2775039684	3.4233038528	-0.5279013060
H	1.2147647423	3.3848146435	-1.9191008382
H	-0.3961599843	1.5149065382	-1.6942693327
H	0.7154458910	-2.9185063944	1.2311207631
H	0.2489253911	-3.6117719651	3.5550208879
H	-1.2538489115	-2.2508657952	4.9963255017
H	-2.2905872576	-0.1789416735	4.0833118578
H	-1.8203431523	0.5202411361	1.7567424273
H	-0.6281444653	-2.9510943988	-5.5677256586
H	-1.2738418641	-2.0964973269	-4.1507901524
H	0.4704439598	-2.0980733416	-4.4720857115
H	-1.8959405425	-5.0263620593	-4.7814951173
H	-2.4336918021	-4.2109890685	-3.2979053489
H	-1.5330221895	-5.7429706282	-3.1981121586
H	4.9211492983	-3.0638372982	-5.0268025334
H	6.6838793808	-3.0948274790	-5.0214156806
H	8.3533252903	-8.2943274861	-2.4374817163
H	7.2200209059	-8.7319959078	-1.1453878716
H	5.4568680056	-10.5523400797	-1.6259841867

Anexo 2

H	5.0855143447	-12.7532189291	-2.7019261052
H	6.5611372507	-13.4962647789	-4.5612899461
H	8.4074761800	-12.0240037770	-5.3392023421
H	8.7715846862	-9.8188137705	-4.2619498878
H	3.0191120931	-7.2914090991	-0.5971018442
H	2.1925798519	-9.2559082001	0.6250787343
H	1.5929777572	-11.3369480957	-0.5962951342
H	1.8175791801	-11.4284972760	-3.0734421177
H	2.6608625360	-9.4339216106	-4.3123754834



**Figura 7.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto **4.23**. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigénio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogénio.

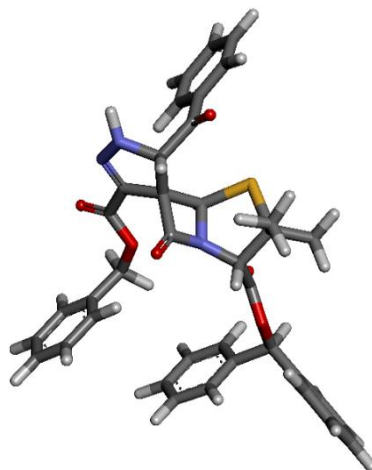
**Tabela 7** – Energia mínima e respetivas coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto **4.23**.

$$E = -2480.3828793089 E_h$$

Átomo	X	Y	Z
C	2.5557588288	-2.0466024206	-6.4947434184
C	2.5136245196	-7.3121509401	-4.1452114711
C	-3.8963260768	5.2553067387	2.2052722491
C	-1.0804069057	0.5706300306	6.9822199271
C	2.4427957268	-2.7557374084	-5.2975168521
C	3.3109062371	-0.8699420866	-6.5424727469
C	3.3924566309	-6.9534381980	-5.1679008407
C	2.7574008737	-6.8795257515	-2.8380230761
C	-2.6646150597	5.8936567723	2.3540929939
C	-4.0076326980	3.8887930155	2.4786543580
C	-0.9103896792	1.9530955886	7.0948558725
C	-1.0232113409	-0.0304759060	5.7250020827
C	3.0769314956	-2.2909079056	-4.1453873075
C	3.9459900644	-0.4064347609	-5.3959901673
C	4.5071083727	-6.1590318775	-4.8858339648

C	3.8761295384	-6.0965714775	-2.5575968760
C	-1.5477840401	5.1658041495	2.7713486902
C	-2.8940788991	3.1655197087	2.9022640371
C	-0.6871724216	2.7248912914	5.9562865050
C	-0.8008037646	0.7434295582	4.5827449521
C	3.8354337324	-1.1101853126	-4.1823630101
C	4.7610595751	-5.7257642393	-3.5807145956
C	-1.6517084713	3.7976555644	3.0491527776
C	-0.6326696106	2.1276241970	4.6895005770
N	6.4533264072	-1.1834352042	-0.3210203761
C	5.8340061594	-1.8201449638	-1.2585372813
C	3.2488019897	-0.4412957545	0.6140905263
C	4.5302804809	-0.5257726200	-2.9968603276
C	6.4466477252	-3.0276170540	-1.8516772481
C	1.3081525935	2.2160347658	2.0012469970
N	5.7195289680	-0.1106668402	0.0580218134
C	4.4703441028	-1.2084053823	-1.6103765480
C	1.5160508107	1.3799607011	0.7358451417
C	3.6608640574	1.2259303838	-0.5837994111
C	4.3468486396	-0.1762680371	-0.4617309262
C	1.1932485272	2.1983589740	-0.5792060015
C	1.4556661694	3.7061232031	-0.4133587311
C	-0.2491766921	1.9525455725	-1.0397814924
C	5.9760626268	-4.8908283343	-3.2686328098
C	-0.4191514686	3.0195656329	3.4773259744
N	2.8838798205	0.9014178890	0.6298526255
O	2.7958058898	-1.4076640214	1.1769991654
O	5.1740688197	0.5106670336	-3.0908428230
O	7.5682032163	-3.4340157783	-1.6426747458
O	2.1757375291	2.8101921605	2.5947489287
O	5.5412911640	-3.6533696064	-2.6537266459
O	-0.0061498060	2.2158294221	2.3266152865
S	2.3730011258	1.5077209560	-1.8674679352

H	2.0589505190	-2.4106659537	-7.3906878147
H	1.6444682177	-7.9276920306	-4.3629382344
H	-4.7673868841	5.8191159811	1.8817577538
H	-1.2501630139	-0.0328878214	7.8700306481
H	1.8689334727	-3.6771861334	-5.2592171860
H	3.4010732177	-0.3168774437	-7.4737232628
H	3.2101031321	-7.2857267589	-6.1867759773
H	2.0783943450	-7.1574140669	-2.0360273274
H	-2.5712411625	6.9566564000	2.1471178947
H	-4.9662022625	3.3882170365	2.3676899338
H	-0.9458517966	2.4297245258	8.0710900677
H	-1.1471841495	-1.1059718945	5.6282410073
H	2.9941875928	-2.8691848776	-3.2332839127
H	4.5359580128	0.5039612245	-5.4079559190
H	5.1837614131	-5.8722417341	-5.6877415014
H	4.0637415435	-5.7625189413	-1.5399862948
H	-0.5873890868	5.6641399365	2.8859070393
H	-2.9871415377	2.1074657104	3.1311748750
H	-0.5545974370	3.8007338955	6.0494283214
H	-0.7455460620	0.2697524705	3.6080195548
H	5.8676982836	0.1515924502	1.0264376208
H	3.6745288543	-1.9515488315	-1.5455973937
H	0.8533529429	0.5096317230	0.7903924219
H	4.3388332864	2.0760237636	-0.4923545458
H	0.7334111259	4.1471106836	0.2852170523
H	1.3425659257	4.2095588922	-1.3775120879
H	2.4617936225	3.9091573143	-0.0343768281
H	-0.9466786497	2.2969268807	-0.2681260099
H	-0.4337017970	0.8900079431	-1.2282072734
H	-0.4598706330	2.5088792459	-1.9593025349
H	6.5397227346	-4.6485960859	-4.1761059787
H	6.6579270496	-5.3919405787	-2.5748454790
H	0.3964736960	3.7167956470	3.6854075191



**Figura 8.** Geometria otimizada (B3LYP/6-31G\*) do composto **4.24**. Código de cores: Cinzento para carbono; vermelho para oxigénio; azul para azoto; amarelo para enxofre e branco para hidrogénio.

**Tabela 8** – Energia mínima e respetivas coordenadas cartesianas (Å) calculadas ao nível de teoria B3LYP/6-31G(d) para o composto **4.24**.

$$E = -2480.3782941025 E_h$$

Átomo	X	Y	Z
C	3.3274685525	-1.9888010923	-4.8145041305
C	4.2969938903	-0.8319530966	-5.0435697934
N	5.1684330258	-1.0767463744	-5.9755328492
N	5.0116035500	-2.3266344554	-6.4223284817
C	3.2665739866	-2.5914561980	-3.3728315135
N	1.9822414400	-2.1145308098	-3.1729113386
C	1.8029861715	-1.6476015933	-4.5461435434
C	0.8633964666	-2.7424250933	-2.5056135895
C	0.0957745947	-3.5768878593	-3.6026476294
S	0.4183431906	-2.6684997189	-5.2217134497
H	1.5469901497	-0.5923061202	-4.6346531413
C	-1.4201227474	-3.6477631421	-3.3674869016
C	0.6921687638	-4.9930818255	-3.6708930217
O	3.9989649799	-3.2691205224	-2.6945562194
H	4.1250901114	-3.9337217859	-5.3934836150



C	3.8126579031	-3.0112418115	-5.8916888947
C	2.8865536462	-3.5047833327	-7.0395548355
C	0.0095553519	-1.6580844087	-1.8455850698
O	-0.3419712805	-0.6394913256	-2.3990972507
O	-0.2918429018	-1.9932343984	-0.5767350176
C	-1.0556774674	-1.0157949113	0.2001142299
C	-0.1255375865	0.0855959575	0.6857375466
C	0.8781231012	-0.1828407029	1.6263754780
C	1.7520854637	0.8249623568	2.0306253226
C	1.6234345836	2.1165655043	1.5114500108
C	0.6187691506	2.3934416692	0.5828541008
C	-0.2463849613	1.3791220865	0.1659438440
C	-1.7658994781	-1.7663152058	1.3135096817
C	-1.4075465490	-3.0621698261	1.6991007635
C	-2.0813293541	-3.6985517416	2.7452637540
C	-3.1176944144	-3.0488625957	3.4150054463
C	-3.4807383562	-1.7546385131	3.0326911319
C	-2.8096993576	-1.1194339530	1.9895222148
O	2.7452246047	-4.7132900249	-7.1432981780
C	2.3115426132	-2.5710583353	-8.0594465995
C	1.5855500237	-3.1491015617	-9.1164237475
C	1.0199705259	-2.3520225907	-10.1054676747
C	1.1719147300	-0.9622589710	-10.0562967650
C	1.8907126717	-0.3775141610	-9.0125704303
C	2.4587860540	-1.1749246221	-8.0186496933
H	1.2521150361	-3.4143753183	-1.7365198939
H	-1.8782058668	-2.6557290961	-3.3831370695
H	-1.6285893461	-4.1208239678	-2.3996528726
H	-1.8969048731	-4.2562506280	-4.1430372271
H	1.7812932563	-4.9753930537	-3.7731273809
H	0.4423247928	-5.5500836811	-2.7579636247
H	0.2881615919	-5.5404456194	-4.5280363728
H	-1.7922326540	-0.5750143866	-0.4776131433

H	0.9733187207	-1.1835349357	2.0399178709
H	2.5359016688	0.6050116041	2.7504715587
H	2.3070325790	2.9001405077	1.8267852438
H	0.5117022618	3.3957127896	0.1757177688
H	-1.0089719456	1.5859039302	-0.5804068874
H	-0.6090041234	-3.5773373105	1.1764866544
H	-1.7929679706	-4.7062125635	3.0337978911
H	-3.6404492059	-3.5466195353	4.2275183314
H	-4.2894880431	-1.2399996551	3.5449530701
H	-3.0943532814	-0.1103982462	1.6990622753
H	1.4784802024	-4.2287048213	-9.1356042692
H	0.4597440051	-2.8106280130	-10.9160399009
H	0.7310835713	-0.3377961972	-10.8290570089
H	2.0137497157	0.7012345962	-8.9701121481
H	3.0164581121	-0.6942323463	-7.2227094520
C	4.3666812020	0.4597517969	-4.3230240094
O	5.0643257267	1.4013102887	-4.6264384270
O	3.5177145538	0.4416256678	-3.2607486963
C	3.5044698638	1.6130630212	-2.4146456390
C	4.5886739390	1.5749655839	-1.3600948710
C	5.2311632302	2.7581773178	-0.9797059782
C	6.1916397437	2.7515599590	0.0335550912
C	6.5293571980	1.5549781648	0.6679512139
C	5.8992362558	0.3681037301	0.2853808433
C	4.9300887948	0.3775542248	-0.7179754782
H	5.3672570783	-2.5062096962	-7.3523226048
H	3.6002781304	2.5056363596	-3.0381644253
H	2.5097735268	1.5906627988	-1.9590387730
H	4.9855927884	3.6894267360	-1.4859702542
H	6.6857486562	3.6782342149	0.3154701098
H	7.2852172715	1.5449028762	1.4492545507
H	6.1638461221	-0.5694844130	0.7680703737
H	4.4495728716	-0.5504275778	-1.0154565893

### **Anexo 3.**

Alves N. G., Mata A. I., Luís J. P., Brito R. M. M., Simões C. J. V., An Innovative Sequence-to-Structure-Based Approach to Drug Resistance Interpretation and Prediction: The Use of Molecular Interaction Fields to Detect HIV-1 Protease Binding-Site Dissimilarities. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 243.



# An Innovative Sequence-to-Structure-Based Approach to Drug Resistance Interpretation and Prediction: The Use of Molecular Interaction Fields to Detect HIV-1 Protease Binding-Site Dissimilarities

Nuno G. Alves<sup>1†</sup>, Ana I. Mata<sup>1†</sup>, João P. Luis<sup>1†</sup>, Rui M. M. Brito<sup>1,2</sup> and Carlos J. V. Simões<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Coimbra Chemistry Centre, University of Coimbra, Coimbra, Portugal, <sup>2</sup> BSIM Therapeutics, Instituto Pedro Nunes, Coimbra, Portugal

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Simone Brogi,  
University of Pisa, Italy

### Reviewed by:

Sinosh Skariyachan,  
St. Pius X College, Rajapuram, India  
Zhijun Li,  
University of the Sciences,  
United States

### \*Correspondence:

Carlos J. V. Simões  
carlos.simoes@bsimtr.com

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Theoretical and Computational  
Chemistry,  
a section of the journal  
Frontiers in Chemistry

Received: 06 December 2019

Accepted: 13 March 2020

Published: 29 April 2020

### Citation:

Alves NG, Mata AI, Luis JP, Brito RMM  
and Simões CJV (2020) An Innovative  
Sequence-to-Structure-Based  
Approach to Drug Resistance  
Interpretation and Prediction: The Use  
of Molecular Interaction Fields to  
Detect HIV-1 Protease Binding-Site  
Dissimilarities. *Front. Chem.* 8:243.  
doi: 10.3389/fchem.2020.00243

*In silico* methodologies have opened new avenues of research to understanding and predicting drug resistance, a pressing health issue that keeps rising at alarming pace. Sequence-based interpretation systems are routinely applied in clinical context in an attempt to predict mutation-based drug resistance and thus aid the choice of the most adequate antibiotic and antiviral therapy. An important limitation of approaches based on genotypic data exclusively is that mutations are not considered in the context of the three-dimensional (3D) structure of the target. Structure-based *in silico* methodologies are inherently more suitable to interpreting and predicting the impact of mutations on target-drug interactions, at the cost of higher computational and time demands when compared with sequence-based approaches. Herein, we present a fast, computationally inexpensive, *sequence-to-structure*-based approach to drug resistance prediction, which makes use of 3D protein structures encoded by input target sequences to draw binding-site comparisons with susceptible templates. Rather than performing atom-by-atom comparisons between input target and template structures, our workflow generates and compares Molecular Interaction Fields (MIFs) that map the areas of energetically favorable interactions between several chemical probe types and the target binding site. Quantitative, pairwise dissimilarity measurements between the target and the template binding sites are thus produced. The method is particularly suited to understanding changes to the 3D structure and the physicochemical environment introduced by mutations into the target binding site. Furthermore, the workflow relies exclusively on freeware, making it accessible to anyone. Using four datasets of known HIV-1 protease sequences as a case-study, we show that our approach is capable of correctly classifying resistant and susceptible sequences given as input. Guided by ROC curve analyses, we fine-tuned a dissimilarity threshold of classification that results in remarkable discriminatory performance (accuracy  $\approx$  ROC AUC  $\approx$  0.99), illustrating the high potential of *sequence-to-structure*-, MIF-based approaches in the context of drug

resistance prediction. We discuss the complementarity of the proposed methodology to existing prediction algorithms based on genotypic data. The present work represents a new step toward a more comprehensive and structurally-informed interpretation of the impact of genetic variability on the response to HIV-1 therapies.

**Keywords:** drug resistance prediction, Molecular Interaction Fields, sequence-to-structure algorithm, binding-site dissimilarities, HIV-1 protease

## INTRODUCTION

Drug resistance is one of the greatest threats of the twenty first century. Fundamentally, the problem resides in the development and spread of resistance-conferring mechanisms among infectious pathogens such as viruses and other microbial targets (McKeegan et al., 2002). Importantly, the selection of random mutations stands out as one of the main mechanisms of acquiring resistance, particularly relevant in viruses which mutate at high frequencies. RNA viruses, for instance, have a mutation rate estimated at  $10^{-4}$  per nucleotide per replication, while DNA viruses have a rate of  $10^{-8}$  per nucleotide per replication (Vere Hodge and Field, 2011; Mason et al., 2018). The extreme variability and rapid mutational spectrum of viral genomes, ongoing viral replication, and prolonged drug exposure linked with the selection and widespread of new drug-resistant strains is still a matter of great concern and importance, particularly in immunocompromised populations (Strasfeld and Chou, 2010; Mason et al., 2018). While a limited number of antiviral drug classes are getting approved for human use, an increasing resistance to some of the most effective available antivirals for HIV/AIDS, herpes, influenza and hepatitis, is being observed. Furthermore, the unpredictability of viral evolution and drug resistance means that antiviral treatments remain costly to the health care systems and are still associated with a significant risk of mortality, particularly in low- and middle-income countries (Irwin et al., 2016). Hence, *a priori* understanding and prediction of resistance against drug targets is of paramount importance toward developing more effective and longer lasting treatment options and regimens.

Antiviral drug resistance has been extensively studied in the rapidly mutating human immunodeficiency virus (HIV). HIV-1, in particular, is one of the most studied virus and the increasingly affordable and accessible genotypic data from clinical HIV-1 strains, together with corresponding data on strain susceptibility or resistance toward several drugs, have sparked the development of several genotypic interpretation systems for prediction of phenotypic drug resistance and therapy response based on genotype (Bonet, 2015). Said systems include (a) rule-based algorithms, including the *Agence Nationale de Recherche sur le Sida* (ANRS) (Brun-Vézinet et al., 2003), the Stanford HIV Drug Resistance Database interface (HIVdb) (Tang et al., 2012), Rega (Van Laethem et al., 2002), and HIV-GRADE (Obermeier et al., 2012a), which heavily rely on the periodic update of mutation-resistance profile lists, and on the knowledge of expert panels; and (b) machine learning-based algorithms trained on large sets of genotype-phenotype pairs to predict the *in vitro* resistance

to a specific drug, with renowned examples such as *geno2pheno* (Beerenwinkel et al., 2003) and SHIVA (Riemenschneider et al., 2016). These sequence-based methods are relatively fast and low cost, justifying their routine use to support medical decision in HIV pharmacotherapy (Vercauteren and Vandamme, 2006).

The most relevant computational predictors of antiviral drug resistance currently available share the shortcoming of being purely based on genotypic sequence data. By disregarding the three-dimensional structural context and enzymatic function of the mutated amino acid residues, these systems fail to capture the links between genetic viral mutations and the corresponding mutation-induced structural changes to the effector protein viral machinery (Cao et al., 2005; Weber and Harrison, 2016; Khalid and Sezerman, 2018). This means that such methods are limited in their predictive power and interpretability toward novel mutations and combinations of mutations that go beyond the information accessible for training, such as mutation patterns that are encountered in only a small number of patients.

In contrast, structure-based methods hold potential to help understanding and eventually predicting resistance mechanisms for previously unknown data, shedding light on the elusive link between novel mutations and drug resistance. This may be justified by the fact that such methods can take advantage of available structural information on protein-ligand complexes and structural modeling of point mutations in the protein structure (Hao et al., 2012). Reported examples of the use of structure-based methods include the application of molecular docking to predict resistance or susceptibility of HIV1-PR to different inhibitors (Jenwitheesuk and Samudrala, 2005; Toor et al., 2011), the use of molecular dynamics simulations to study the impact of mutations on enzyme dynamics, stability and binding affinity (Hou and Yu, 2007; Agniswamy et al., 2016; Sheik Amamuddy et al., 2018), and the use of computational mutation scanning protocols to extract insights on free energy and binding affinity changes resulting from active site and non-active site mutations (Hao et al., 2010). Even though these methods are constantly adding new pieces to the puzzle and opening opportunities in the understanding of drug resistance, they suffer from various drawbacks, such as being time-consuming and offering limited predictive accuracy. As a result of such limitations, the primary challenge facing structure-based drug resistance prediction is to achieve an acceptable balance between prediction accuracy and computational efficiency to become both reliable and fast tools to be used in clinic context (Hao et al., 2012). In fact, some of the most recent reports describe the use of machine learning strategies merging both sequence and structural data in attempt



to achieve such balance (Masso and Vaisman, 2013; Yu et al., 2014; Khalid and Sezerman, 2018).

In this contribution, we describe a fast, computationally inexpensive, *sequence-to-structure*-based approach to the prediction of drug resistance. The proposed workflow makes use of an archetypal GRID-based method (Goodford, 1985) involving the generation and comparison of Molecular Interaction Fields (MIFs). MIFs may be defined as the spatial variation of interaction energies between a molecular target structure and selected types of chemical probes laid out on a three-dimensional (3D) grid (Cruciani, 2005). The broad range of applications of MIFs extends from ligand-based methodologies, e.g., 3D Quantitative Structure-Activity Relationships (3D-QSAR) models, drug metabolism and pharmacokinetics (DMPK) predictions and pharmacophore elucidation, all the way to structure-based drug design, including binding site detection and molecular docking (Artese et al., 2013). Within the context of viral drug resistance, MIFs hold potential in capturing subtle, mutation-induced, chemical perturbations within the binding site of resistant or susceptible viral structures, thus representing a promising approach to anticipating the impact of mutations on the response to antiviral drugs with atomistic detail.

HIV-1 protease (HIV1-PR) is one of the most characterized viral enzymes, with extensive structural, inhibitor, and mutation data available (Weber and Agniswamy, 2009). As of late 2019, the RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB, 2000) ranks HIV-1 as the virus holding the highest number of available structures (2,586), majorly obtained through X-ray crystallography. Of these, the PDB returns 662 entities with at least 90% identity to the HIV1-PR subtype B *consensus* sequence from a BLAST sequence search (Stanford University, 1998a). The search by *consensus* sequences of other HIV-1 subtype B enzymes (Stanford University, 1998a) returns 586 structures for reverse transcriptase and 190 for integrase. With such amount of structural information available, we have built the framework of the present work using HIV1-PR as our first case-study. Commercially available HIV-1 protease inhibitors (PIs) are competitive peptidomimetics with a core structural scaffold that mimics the tetrahedral transition state of HIV1-PR substrate. Although these drugs are chemically distinct, their active conformations are superimposable, and generally establish the same pharmacophoric interactions with their target (Wlodawer and Erickson, 1993; King et al., 2004; Qiu and Liu, 2011; Nayak et al., 2019). Many mutations in HIV1-PR translate into changes in the structure and binding site physicochemical environment, thus affecting the affinity of PIs and representing a hurdle to achieving long-term viral suppression (Irwin et al., 2016; Pawar et al., 2019; Wensing et al., 2019). A quantitative analysis of HIV1-PR drug-resistant mutation frequency, with particular focus on the binding site, was performed using public sequence datasets to support the potential of a MIF-based approach to capturing mutation-induced active site dissimilarities. From this perspective, the workflow proposed here encompasses the use of a conservative structural modeling step for the generation of a HIV1-PR structure from its respective amino acid sequence, and a MIF-based structural alignment and chemical dissimilarity detection step comparing the input *sequence-structure* pair with a carefully selected naïve,

susceptible template *sequence-structure* pair. We demonstrate that the quantification of such dissimilarity, depicting the extent of structural, physicochemical and pharmacophoric alterations introduced by mutations, allows for an accurate prediction of HIV1-PR's resistance to PIs.

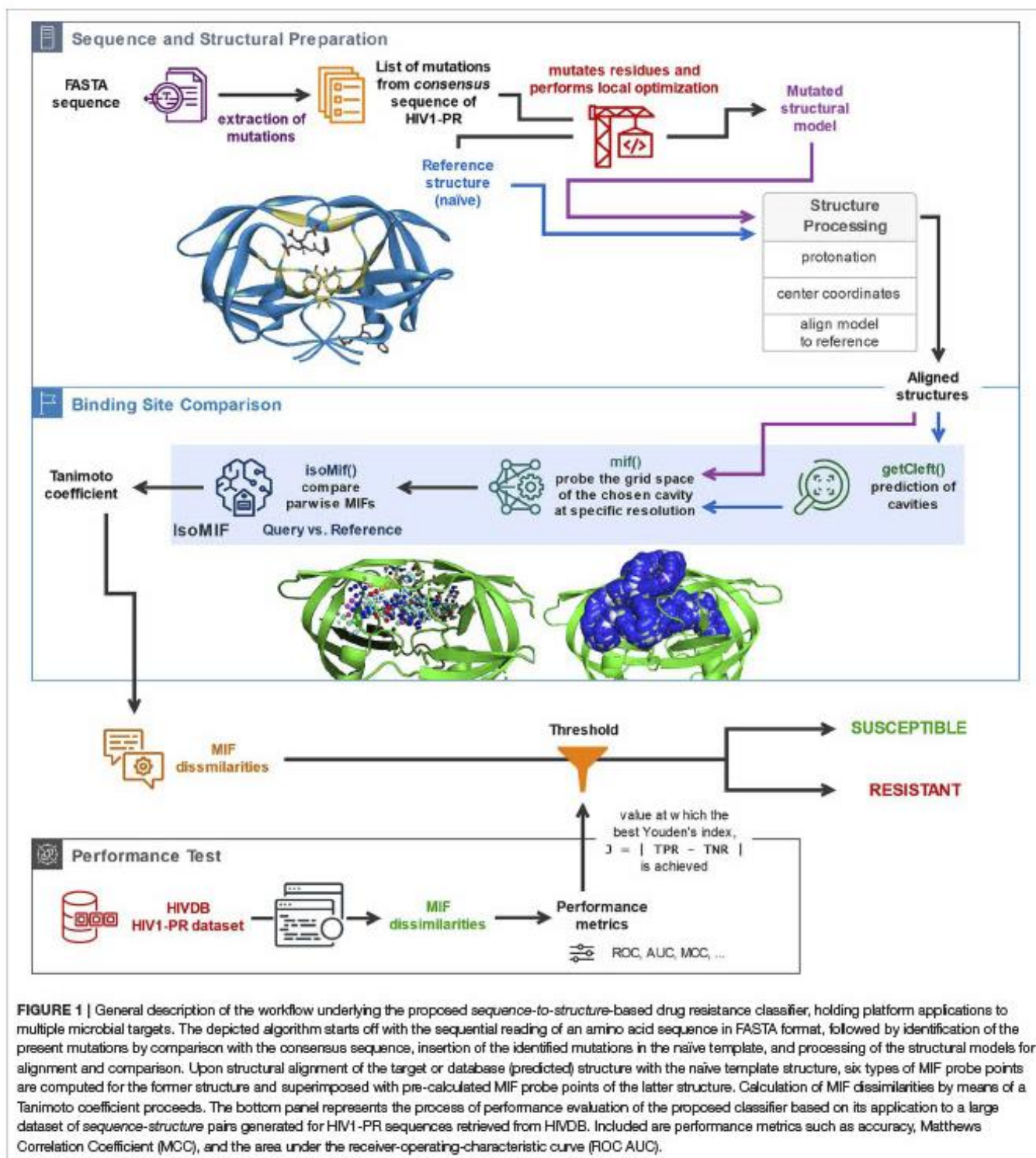
Compared with previous approaches reported in the literature, and to the best of our knowledge, this work stands out as a first implementation of a fast, *sequence-to-structure*-based algorithm capable of discriminating susceptible and resistant HIV1-PR sequences. Considering that the problem of mutation-induced resistance cuts across virtually all infectious diseases, we believe the approach reported herein may be extended to a wide range of microbial targets besides HIV-1, thus helping rationalize and personalize the therapeutic decision-making process.

## MATERIALS AND METHODS

The availability of a public and curated database such as HIVDB (Stanford University, 1998c; Rhee et al., 2003) allows access to HIV1-PR sequences with known levels of resistance, and thus to establish datasets for the development of new methodologies to predict HIV1-PR resistance to protease inhibitors (PIs). This section describes the materials and methods employed in (1) the preparation of sequence datasets with various levels of resistance to PIs; (2) frequency analysis of *major* and *minor* mutations in the sequence datasets in (1); (3) the structural modeling of the reference structure used as template for subsequent modeling of HIV1-PR structures corresponding to each sequence in the datasets; (4) the core components of the proposed algorithm, including the calculation and comparison of pairwise Molecular Interaction Field points between the resulting structural models and the selected naïve template structure; and (5) the performance metrics used to test and evaluate the predictive power of the developed structure-based drug-resistance classification algorithm. A general workflow illustrating (4) and (5) is sketched (draw.io, 2005) in **Figure 1** and the complete script *HIV1predict.sh* for running the sequences is available at GitHub (Alves et al., 2019b). Calculations were run on a 64-bit CentOS 6 Linux server with an Intel Xeon CPU (E5620) at 2.40 GHz (further information as **Supplementary Table S1**).

### Datasets of Resistant and Susceptible Sequences

A set of genotype-phenotype correlated HIV1-PR sequences was retrieved from HIVDB, version 8.7 (Stanford University, 1998b,c), and filtered by drug class for PIs. The considered PIs include darunavir, fosamprenavir, atazanavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, saquinavir, and tipranavir. Analyzing the subtype B HIV1-PR sequence of each isolate, i.e., a viral sample obtained from an infected individual, and considering positions with a mixture of amino acids, all possible mutation patterns were written to the FASTA format using a script written in-house (Alves et al., 2018f).



The genotype-phenotype correlation results from the *in vitro* PhenoSense assay (Zhang et al., 2005), which measures the levels of resistance to a PI compared to the wild-type sequence. Following the categorization of susceptibility to PIs described by Rhee et al. (2006), the collected sequences were classified as follows:

- **Susceptible.** Sequences holding <3.0-fold resistance to all PIs in the dataset were considered susceptible ( $N = 7,768$ ) [Susceptible].
- **Resistant.** Sequences holding more than 20.0-, or 15.0-, or 10.0-fold resistance to all PIs, resulting in three resistant subgroups of increasing degree of resistance: respectively, [Res<sub>20</sub>] ( $N =$



60) [Res<sub>20</sub>], [Res<sub>15</sub>] ( $N = 83$ ) [Res<sub>15</sub>], which encompasses [Res<sub>20</sub>] plus 23 sequences holding between 15- and 20-fold resistance, and [Res<sub>15</sub>] ( $N = 873$ ) [Res<sub>10</sub>], which encompasses [Res<sub>20</sub>] and [Res<sub>15</sub>] plus 790 additional sequences holding between 15- and 10-fold resistance.

### Counting of Mutations in HIV1-PR

The quantification of *major* and *minor* mutations (Weber and Agniswamy, 2009) in all datasets was carried out using scripts written in-house (Alves et al., 2018a,b, 2019a) that sequentially read the listing of mutations for each sequence, extract either the *major* or *minor* mutations, and count them for each sequence. Said script was applied to quantify *major* and *minor* mutations in the HIV1-PR binding site.

### Preparation of HIV1-PR Structures

Using PDB's BLAST utility (Altschul et al., 1990) to guide the choice of a template for homology modeling, a sequence search, with a 10.0 E-value cut-off and at least 50% identity to the HIV1-PR subtype B *consensus* (Stanford University, 1998a), resulted in 784 entities available. With a more refined query of at least 95% identity to the HIV1-PR subtype B *consensus*, there were still 376 structures available to work with.

Out of these 376 structures, PDB entry 1NH0 for HIV1-PR was chosen as template structure for homology modeling by using PDB's BLAST utility (Altschul et al., 1990). It returned an E-value of 7.20281E-51, but since the intended work was heavily based on structure, our choice was also based on having the best resolution possible. The structure of 1NH0 holds 99% sequence identity (98/99) with the *consensus* B amino acid sequence of protease, HXB2 (henceforth referred to as *consensus sequence*), with one single mutation at position 37 (S37N), has 100% coverage of the sequence, and has been determined at 1.03 Å X-ray resolution. Importantly, this HIV1-PR sequence is known to be susceptible to all PIs.

In this work, Modeler version 9.19 (Šali and Blundell, 1993; Šali, 2019a) was used for predictive modeling of all HIV1-PR structures from their respective sequences. The listing of mutations present in each sequence was automated by scripting (Alves et al., 2018c) and followed by sequentially running the *mutate\_model.py* script provided with Modeler (Šali, 2019b) to obtain the correct pattern of mutations and outputting the respective structural model. The procedure implemented in *mutate\_model.py* performs local optimization of the mutated residues region and ensures that the obtained structural models are comparable to the template structure. The PDB structure itself (1NH0) was subjected to *mutate\_model.py* in order to reverse the mutation present in the template with 99% identity (Asn37, on the outside of the protease) and keep on the *consensus sequence*, remove *HETATM* entries and *alt-locs*—thus yielding the reference template structure. This reference structure was used as template for the generation of the respective structural model of each input FASTA sequence present in the datasets.

All generated structural models were protonated using *Reduce*, version 3.23 (Word et al., 1999). The reference structure was centered to the origin of the axes of the cartesian coordinate system using *VMD*, version 1.9.3 (Humphrey et al., 1996).

Structural alignment of all query models onto the centered reference structure was performed with *LovoAlign*, version 16.342 (Martínez et al., 2007).

### Workflow for Detection and Scoring of Molecular Interaction Field Dissimilarities

The MIF module of the software package IsoMIF, version dated March 2015 (Chartier and Najmanovich, 2015), was used to generate Molecular Interaction Fields (MIFs) within the HIV1-PR binding sites. MIF-based alignment and calculation of pairwise MIF dissimilarities between reference and dataset binding sites proceeded using the IsoMIF module of the same package. The IsoMIF setup comprises three sequential modules: GetCleft, MIF, and IsoMIF.

#### Cavity Detection (GetCleft Module)

GetCleft (Gaudreault et al., 2015) was employed to predict cavities in the structure of the reference HIV1-PR (Alves et al., 2018e). This geometry-based method detects cavities by insertion of spheres of radius  $r$  between the non-hydrogen protein atoms, reducing such radius if they intersect with any neighboring atoms (clefts defined by the union of overlapping spheres). First, the top five largest cavities were searched at the same time, with a minimum and maximum sphere radius of 1.5 and 4.0 Å, respectively. The largest predicted cavity was visually confirmed to be completely enclosed within the HIV1-PR binding site, using *VMD*, version 1.9.3 (Humphrey et al., 1996). Next, such cavity volume represented by spheres was used to define the location of MIF interaction vectors to be calculated for the reference and all 3D HIV1-PR structural models.

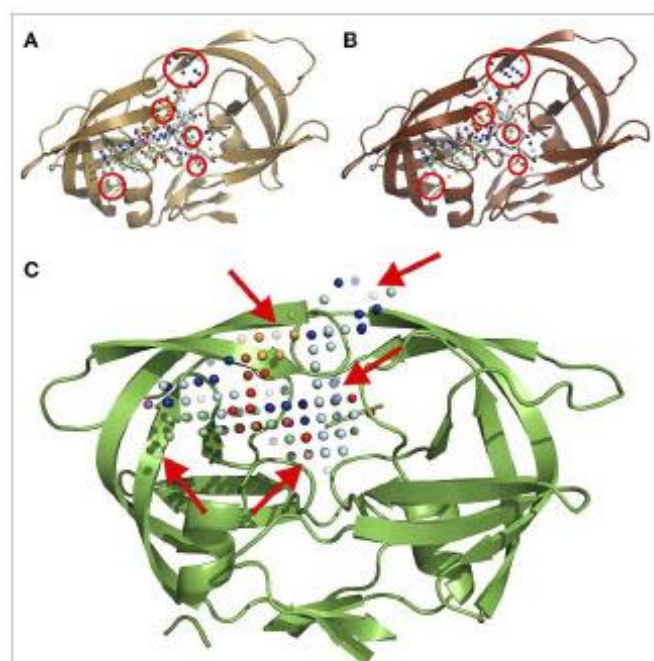
#### Generation of Molecular Interaction Field (MIF) Probe Points (MIF Module)

The MIF module of IsoMIF was used to compute molecular interaction fields (MIFs) for six different chemical probe types (Figure 2): hydrophobic, aromatic, H-bond donor, H-bond acceptor, positive charge and negative charge. The pharmacophoric features shared by PIs (Włodawer and Erickson, 1993; Nayak et al., 2019) highlight the importance of a conserved physicochemical environment in the binding site. Alterations of this environment are detected with the MIF probes (circled in Figures 2A,B) which allow for a quantification of changes caused by the presence of mutations. In this work, a grid resolution of 1.5 Å was defined to calculate the MIFs on the cleft covering the volume of the binding site. Such resolution was selected upon testing to achieve an adequate balance between speed and accuracy of IsoMIF pairwise field dissimilarity calculations.

#### Alignment of MIF Probe Points and Calculation of Dissimilarities (IsoMIF Module)

Field similarities were computed using the IsoMIF module, which employs a clique-based graph matching approach based on the Bron-Kerbosch algorithm (Bron and Kerbosch, 1973) to perform functional alignments between the probe points under comparison. A grid spacing of 1.5 Å, a geometric distance threshold of 1.0 Å and a maximum of 100 cliques were used as parameters for the calculation of similarities between the





**FIGURE 2 |** A three-dimensional ribbon depiction of the quaternary structure HIV1-PR dimeric unit, including the six different types of MIF probe points calculated on the enzyme's binding site. (A) Structure and probe points of the reference naive template. (B) Illustration of the structure and probe points of a mutated model resulting from a sequence holding over 20-fold resistance for Fls. (C) An exemplary output of IsoMIF, highlighting a MIF-based alignment and comparison of both structures: (A,B). The red circles in (A,B) denote areas where the difference in probe points is most visible. The arrows in (C) point to semi-transparent probes, representing the probes which are not shared between the two structures. Legend for the six (6) probe types legend: hydrophobic in light blue, aromatic in orange, H-bond donor in dark blue and acceptor in red, positive in green and negative charge in purple.

binding site of reference and structural models of HIV1-PR. Such similarities were then quantified by the Tanimoto coefficient ( $T_c$ ), calculated as in Equation 1:

$$T_c = \frac{N_c}{N_r + N_q - N_c} \quad (1)$$

where  $N_c$  is the number of common probe points to the two MIF maps under comparison;  $N_r$  and  $N_q$  represent the number of probe points present in the reference and query structure, respectively (Figure 2C) (Chartier and Najmanovich, 2015). The measurement of dissimilarity (Equation 2) between binding sites is justified by the fact that the focus of this work is set on the discrimination of resistant structures, when compared with a susceptible reference. Therefore, the chosen metric was dissimilarity rather than similarity:

$$\text{dissimilarity coefficient} = 1.0 - T_c \quad (2)$$

## Analysis of Mutation Patterns Across Thousands of HIV1-PR Sequences

Analyses of the number and position of mutations were performed on HIV1-PR sequences in order to obtain

information supporting and justifying the development of a *sequence-to-structure*-, MIF-based approach to antiviral resistance classification and prediction.

R version 3.4.3 (R Core Team, 2018) was used to conduct the analysis and generating the associated graphical representations. The R packages used in this work were ggplot2 (Wickham, 2009), gplots (Warnes et al., 2019), and ROCit (Khan and Brandenburger, 2019).

## "Outlier" Detection on Binding-Site MIF Dissimilarities

Tukey's method (Tukey, 1949; Hoaglin, 2003), also referred to as Tukey's fences method, was used to detect outliers in the binding-site MIF dissimilarities results. Tukey's method is a statistical approach used to determine whether a value should be considered an outlier or not: the method relies on the interquartile range (IQR) measurement, which is calculated by the difference between the first quartile (Q1) and the third quartile (Q3) (see Equation 3). Q1 stands for the value in the dataset that holds 25% of the values below it and Q3 is the value in the dataset that holds 25% of the values above it.

$$IQR = Q3 - Q1 \quad (3)$$

According to Tukey's method, a value is considered an outlier if it is observed in the range described in Equation 4:

$$\begin{aligned} \text{outlier} < Q1 - k \times IQR \vee \text{outlier} > Q3 + k \times IQR \\ \text{outlier} < \text{LowerBound} \vee \text{outlier} > \text{UpperBound} \end{aligned} \quad (4)$$

where  $k = 1.5$  indicates an outlier and  $k = 3$  indicates an extreme outlier. For the purpose of the present work, only extreme outliers were discarded.

## Evaluation of the Algorithm's Predictive Performance

The performance of our method at discriminating resistant from susceptible models was assessed by calculation of several metrics typically employed in the fields of predictive modeling and machine learning, particularly in cases where binary classification occurs. These included the Receiver Operating Characteristic (ROC) and the respective Area Under the Curve (ROC AUC). The ROC curve is a graphical representation of the True Positive Rate (TPR) as a function of the True Negative Rate (TNR), i.e., at various cut-off settings. The TPR is also known as Sensitivity (Equation 5), which measures the proportion of positive cases. On the other hand, the TNR is also calculated as 1-Specificity (Equation 6) and measures the proportion of true negative cases.

$$\text{Sensitivity} = \frac{TP}{TP + FN} \quad (5)$$

$$\text{Specificity} = \frac{TN}{TN + FP} \quad (6)$$

where  $TP$  represents the number of correctly identified resistant structures (true positives),  $TN$ , the number of correctly identified susceptible structures (true negatives),  $FP$ , the number of susceptible incorrectly predicted as resistant (false positives), and

FN the number of resistant incorrectly predicted as susceptible (false negatives).

Additional performance metrics included Accuracy (Equation 7) and Matthews Correlation Coefficient (MCC; see Equation 8) (Matthews, 1975; Florkowski, 2008; Powers, 2011).

$$\text{Accuracy} = \frac{TP+TN}{TP+FP+TN+FN} \quad (7)$$

$$\text{MCC} = \frac{TP \times TN - FP \times FN}{\sqrt{(TP+FP)(TP+FN)(TN+FP)(TN+FN)}} \quad (8)$$

The dissimilarity threshold used for classification in resistant or susceptible *sequence-structure* pairs was derived from ROC curves, corresponding to the highest Youden's index (Youden, 1950),  $J$ , calculated as in Equation 9:

$$J = \text{Sensitivity} + \text{Specificity} - 1 \quad (9)$$

This index defines the maximum potential effectiveness of a classifier. It can be determined for all points of an ROC curve, although its maximum value represents the classifier optimal differentiating ability cut-point when equal weight is given to Sensitivity and Specificity (Ruopp et al., 2008).

## RESULTS AND DISCUSSION

In this work, we describe a *sequence-to-structure*-, MIF-based method to assess binding-site dissimilarities across *sequence-structure* pairs, with the aim of predicting antiviral resistance—and using HIV1-PR as a case-study. It is generally accepted that the majority of resistance-conferring mutations occur in the binding site regions of viral enzymes (Weber and Agniswamy, 2009; Weber and Harrison, 2016). In order to further support the *rationale* and underlying assumptions of the proposed approach, we performed analysis of *major* and *minor* mutations of HIV1-PR binding site residues focusing on sequences known to be fully resistant and fully susceptible. For the sake of comparison, the quantification of mutations was also extended to *major* and *minor* mutations occurring in the remainder residues, i.e., residues not comprising the binding site region of HIV1-PR.

### Counting of PI-Resistant Mutations in HIV1-PR Sequences

Resistance to PIs develops upon accumulation of mutations that increasingly impact the structure of HIV1-PR, resulting in highly-resistant variants of HIV-1. As mentioned by Weber and Agniswamy (2009), PI resistance is linked to the occurrence of primary (*major*) mutations, commonly associated with the active site where HIV PIs typically bind, resulting from structural changes that disrupt the van der Waals contacts and/or hydrogen bonding patterns in the inhibitor-protein interaction and promote direct steric hindrance, by altering the pocket volume or its physicochemical environment. Secondary (*minor*) mutations occur in addition to *major* mutations, acting like accessory mutations that compensate the flaws produced by *major* mutations and enhancing the resistance level (synergistic

effect). Being less obvious, they seem to affect HIV1-PR catalysis, dimer stability, inhibitor binding kinetics, and/or active site reshaping through long-range structural perturbations (Weber and Agniswamy, 2009; Weber and Harrison, 2016).

Our workflow follows a *sequence-to-structure* approach in attempt to capture changes to the structural and physicochemical determinants of HIV1-PR's binding site upon mutation, based on the assumption that these changes represent the main driver of antiviral resistance. To support this assumption, quantification of mutations known to contribute to PI resistance was carried out across the retrieved datasets. The version 8.7 HIVDB (Stanford University, 1998b,c,d) listed the following PI-resistant mutations for HIV1-PR:

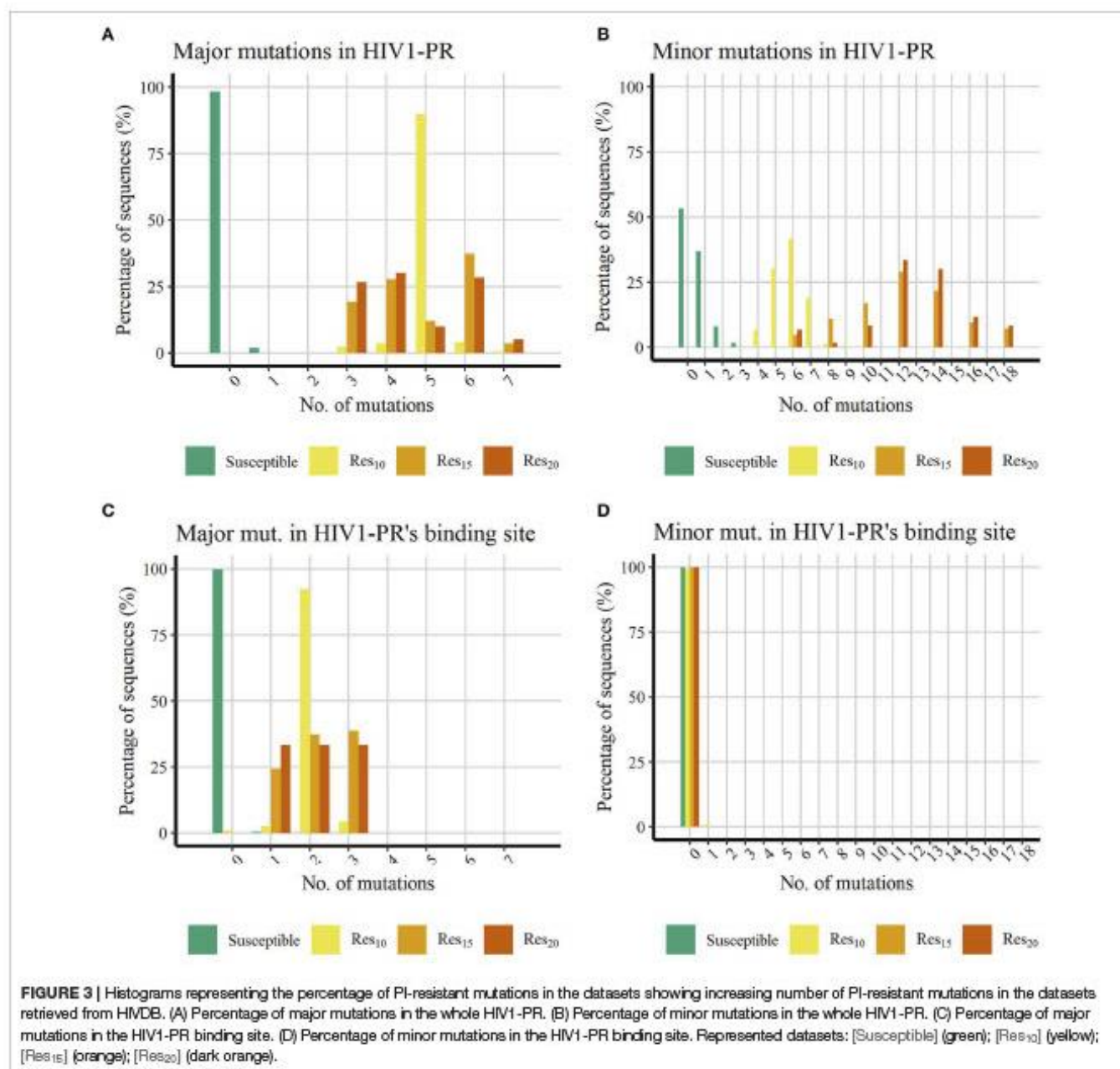
- *Major* mutations: D30N, V32I, L33F, M46IL, I47VA, G48VM, I50VL, I54VTALM, L76V, V82AFTSL, I84V, N88SD, and L90M;
- *Minor* mutations: L10FIVRY, V11IL, K20RIMTV, L23I, L24IFM, M36I, K43T, M46V, G48ASTQL, F53LY, I54ST, Q58E, A71VTIL, G73STCADV, T74PS, V82MC, N83DS, I84AC, I85V, N88TG, and L89VT.

Even though not all sequences exhibit the same degree of resistance to each PI, we selected these two groups of *major* and *minor* PI-resistant mutations and quantitatively characterized their presence in our subsets. Since all HIV1-PR sequences in our dataset were retrieved from the same unique source, HIVDB (Stanford University, 1998c; Rhee et al., 2003), the percentage of sequences holding PI-resistant mutations distributed across the entire HIV1-PR sequence, as well as the percentage of PI-resistant mutations manifesting in residues comprising the binding site of HIV1-PR, were determined and compared among all four subsets: [Susceptible], [Res<sub>10</sub>], [Res<sub>20</sub>], and [Resistant\*]—as represented in Figure 3.

Figures 3A,B shows that, as expected, all HIV1-PR sequences belonging to the *Susceptible* subset hold much less PIs-resistant mutations than those belonging to the *Resistant* subsets. The majority (98.24%) of susceptible HIV1-PR sequences does not hold any *major* mutations, while 1.74% contain one *major* mutation, and only one sequence (0.01%) comprises three *major* mutations. The presence of *major* mutations across drug-resistant sequences is higher, ranging from three to seven *major* mutations, implying that among these subsets the *major* mutations appear in the shape of mutation patterns rather than individual mutations. The presence of *minor* mutations (Figure 3B) follows a similar trend to that witnessed for *major* mutations, with susceptible sequences denoting a lower number when compared to their resistant counterparts. Approximately 98.25% of the susceptible sequences present two or less *minor* mutations, with about half of susceptible HIV1-PR sequences (53.3%) displaying no *minor* mutations.

When comparing susceptible vs. drug-resistant sequences, it can be observed that resistance against PIs is linked to the presence of *major* mutations, as implied above (Weber and Harrison, 2016). However, within the subsets of drug-resistant sequences, a direct relation between the number of *major* mutations and the increase of resistance is not observed. Drug-resistant sequences show a higher frequency of *minor*





mutations, ranging from three to 18, with a visual apparent difference between sequences with lower resistance ([Res<sub>10</sub>]) and the more resistant sequences ([Res<sub>15</sub>] and [Res<sub>20</sub>]). In [Res<sub>10</sub>], 98.2% of the sequences have up to seven *minor* mutations, while 78.3% in [Res<sub>15</sub>] and 93.3% [Res<sub>20</sub>] have more than eight *minor* mutations. This trend in the profile of mutation distribution among the resistant sequences is in line with *minor* mutations acting as accessory mutations, appearing as patterns and not as individual mutations, and showing a similar trait as the one observed for the distribution of *major* mutations.

Analysis of *major* mutations located in HIV1-PR's binding site residues (Figure 3C), corresponding to sequence positions 30, 32, 47, 48, 50, 82, and 84, shows that 99.78% of the susceptible

sequences do not display *major* mutations, while the remainder show only one *major* mutation. In contrast, less than 1% of resistant sequences lack *major* mutations in the drug binding site. Interestingly, the eight sequences representing this small fraction (0.91%) belong to the lower (10-fold) resistance subset ([Res<sub>10</sub>]). All remaining drug-resistant sequences hold from one to three *major* mutations in the enzyme's binding site.

Counting of mutations in binding site residues of HIV1-PR exposes a systematic presence of *major* mutations in resistant HIV1-PR sequences, while also highlighting the absence of such mutations on 99.78% of their susceptible counterparts. This contrasting trait observed between the binding site region of susceptible and resistant HIV1-PR supports the development

of a structure-based drug-resistance classifier focusing on the detection and quantification of binding site dissimilarities.

Regarding the distribution of *minor* mutations across binding site residues, as represented in Figure 3D, mutations localized in sequence positions 23, 48, 82, and 84 were quantified among both HIV1-PR susceptible and drug-resistant sequences, revealing that the great majority does not present *minor* mutations in their respective binding sites. Only a small percentage of susceptible (0.01%) and resistant sequences (0.91%) show *minor* mutations in this region. It should be noted that the small subset of resistant sequences holding a *minor* mutation in their binding site region correspond to sequences that do not display *major* mutations in the active site.

These results show that the binding site *minor* mutations are uncommon on the datasets of HIV1-PR sequences—be they resistant or susceptible. Although such mutations appear to be important to increase the enzyme resistance's by stabilizing the mutated protein structure, they seem to produce limited direct effect on the enzyme's binding site, where they are mostly absent. Thus, these results seem to be in agreement with our motivation to explore a quantitative detection of binding-site dissimilarities to predict HIV1-PR resistance to PIs, as the *major* mutations play the main role on altering the binding site conformation, volume and/or physicochemical environment.

The quantification of mutations in the datasets retrieved from HIVDB yielded distinct results between the susceptible and drug-resistant sequences. Most of the resistant sequences show a higher frequency of *major* mutations when compared to the susceptible set. All resistant sequences present at least one mutation in the binding site region, contrasting with 98% of susceptible sequences that do not present any *major* mutations in that site. It is worth noticing that half of the *major* mutations are found in the binding site of resistant sequences. However, when considering the total number of mutations, the increase in the number of mutations per sequence seems to hold a reflection on the increase in the resistance of the observed sequence. Furthermore, binding site *major* mutations are more likely to cause changes on the HIV1-PR binding cleft physicochemical environment when compared with susceptible enzymes which do not have such type of mutations.

## A Fast, Sequence-to-Structure-, MIF-Based Antiviral Drug Resistance Classifier

The quantification of resistance-conferring mutations in HIV1-PR sequences, using the datasets retrieved from HIVDB, prompted us to further develop a discriminative resistance-classifier approach focused on analysis and comparison of binding-site MIFs. In practice, the proposed workflow involves performing structural modeling of input HIV1-PR sequences using the same template (i.e., 1NH0) and a script (Alves et al., 2018d) that calls *mutate\_model.py* (Šali, 2019b) to conduct local energy minimization around the mutated residues of the HIV1-PR structure. Once the generation of structure models is concluded, the modules belonging to the IsoMIF package are deployed for cavity detection (GetCleft module), calculation of

**TABLE 1** | Tukey's method results to determine outliers.

	<i>Susceptible</i>	<i>Res</i> <sub>10</sub>	<i>Res</i> <sub>15</sub>	<i>Res</i> <sub>20</sub>
Q1	0.0057	0.1075	0.1173	0.0649
Q3	0.0225	0.2041	0.2041	0.2171
IQR	0.0168	0.0966	0.0868	0.1522
Lower Bound	-0.0447*	-0.1823*	-0.1431*	-0.3917*
Upper Bound	0.0729	0.4939	0.4645	0.6737

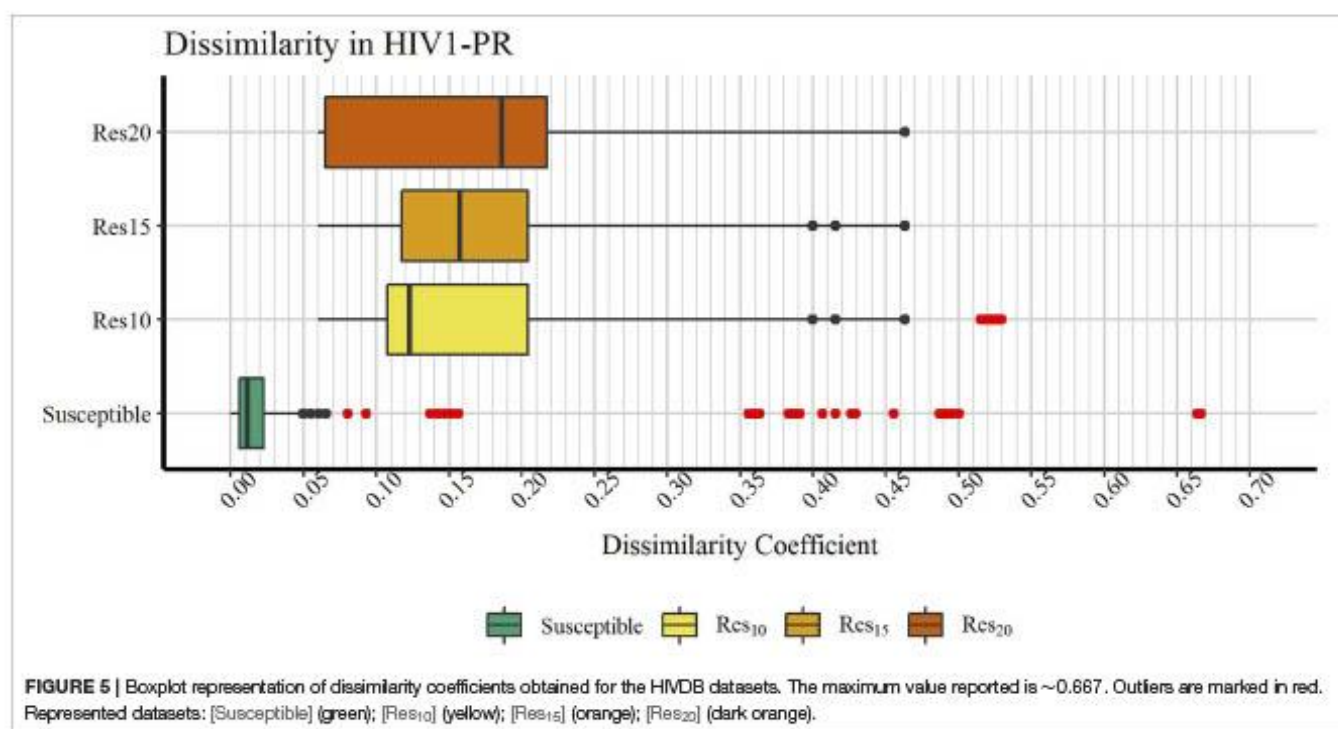
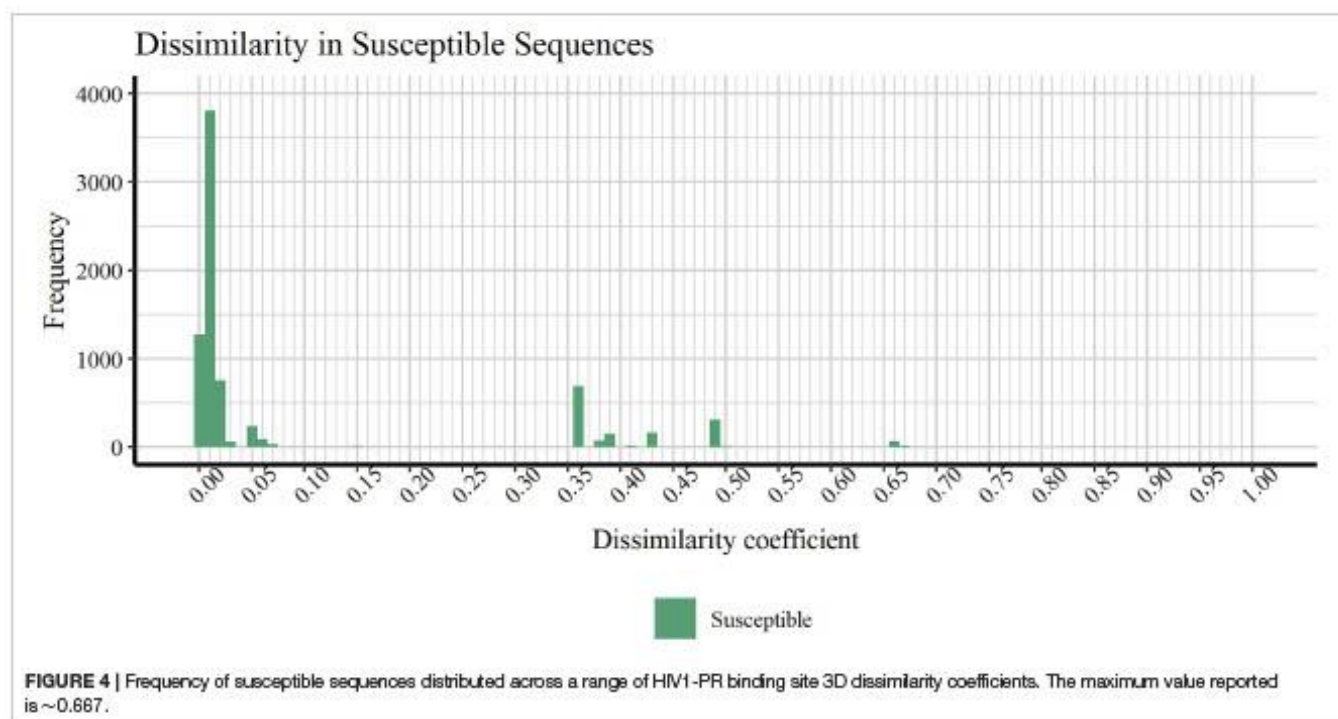
Quantile 1 (Q1), Quantile 3 (Q3), Inter Quantile Range (IQR), Upper Bound and Lower Bound values for susceptible sequences dissimilarity coefficient distribution. Upper and Lower Bound were calculated as described in Equation 4, with  $k = 3$ . Values above the upper bound and below the lower bound were considered outliers. \*Negative values are not realistic lower bounds; the minimum value must be 0.

MIFs within the selected cavity volume (MIF module), field alignment and quantification of dissimilarities between MIF points computed for the dataset HIV1-PR structural models and those computed for a high quality [*Susceptible*] reference HIV1-PR structure (1NH0) and, finally, scoring by means of a Tanimoto coefficient (IsoMIF module). The average running time of the workflow is  $\approx 77$  s per sequence (Supplementary Figure S1 and Supplementary Datasheet S1), considering that this value varies with the amount of mutations present in the HIV1-PR.

## Analysis of MIF Dissimilarities in HIV1-PR Binding Site

Figure 4 discloses the frequency of HIV1-PR *sequence-structure* pairs scattered across a spectrum of Tanimoto coefficient ( $T_c$ ) values (varying from 0.00 to 1.00), in turn reflecting binding-site MIF dissimilarities in the subset of susceptible sequences (containing 7,768 *sequence-structure* pairs) against the selected naïve, template structure. Analyzing this profile of binding site dissimilarities, we observe that there are substantially more susceptible sequences concentrated on lower end of the dissimilarity spectrum. However, a small number of sequences ( $N = 81$ ) present higher values, more visibly around the  $T_c$  value of 0.35. Since susceptible HIV1-PR *sequence-structure* pairs display a lower frequency of mutations in the binding site residues, we assume that  $T_c$  values deviating from the normal trend may highlight inconsistent data, errors and/or any form of outliers worthy of further investigation.

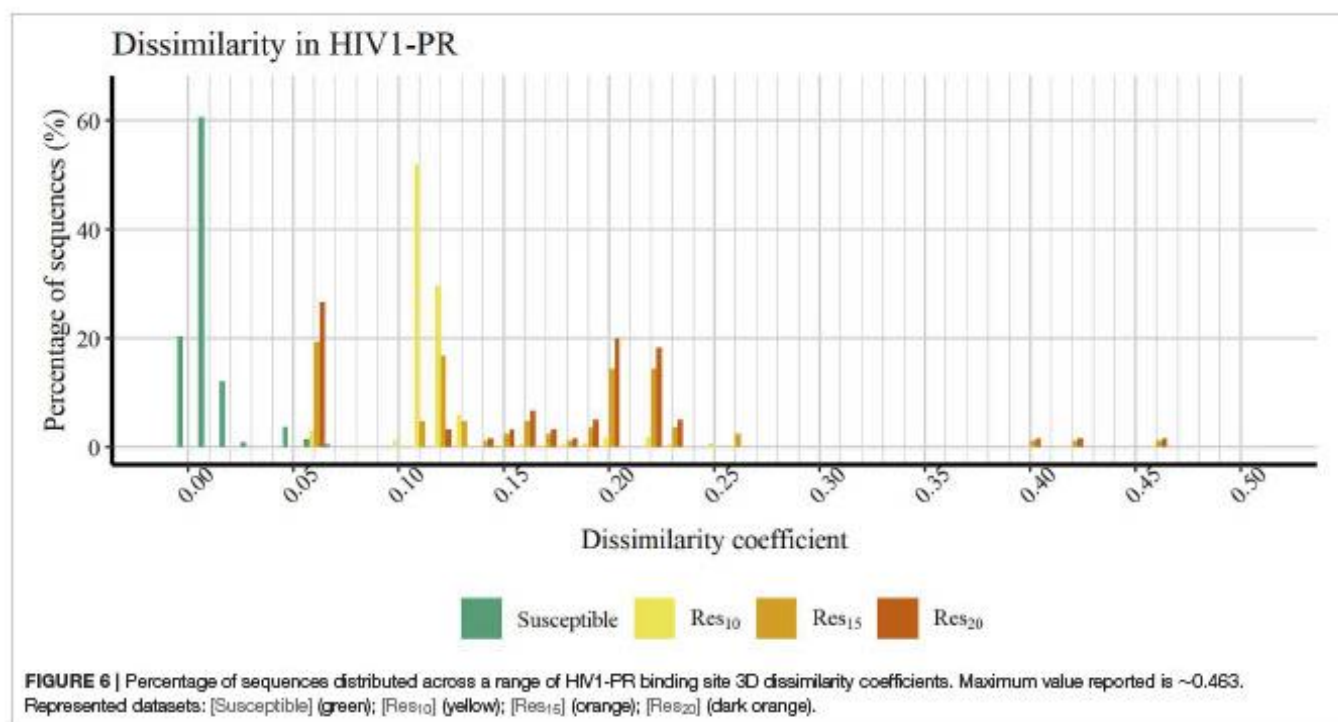
In order to verify if the higher  $T_c$  values could reflect true outliers, Tukey's outlier detection method was used (Tukey, 1949; Hoaglin, 2003). Table 1 shows the result of applying the statistical Tukey method to the MIF dissimilarity  $T_c$  values obtained for the dataset of susceptible *sequence-structure* pairs, and to the [*Res*<sub>10</sub>], [*Res*<sub>15</sub>], and [*Res*<sub>20</sub>] subsets. For each of the four groups, Figure 5 shows boxplots summarizing the distribution of the MIF dissimilarity  $T_c$  values. On the susceptible subset, the higher  $T_c$  values were identified as significantly different from the central tendency (values were below the determined lower bound; see Equation 4 in Methods). Looking at the dataset of resistant *sequence-structure* pairs, extreme outliers (as described in the Methods section) were only found in the [*Res*<sub>10</sub>] subset. These outliers were found to be associated with a software limitation wherein the same reference grid



(generated by GetCleft), covering the entire binding site volume, was not homogeneous across all HIV1-PR structure models. In fact, a wider grid was calculated for some structures when compared to the reference HIV1-PR structure, which resulted on a different number of grid points, consequently leading to an increase of dissimilarities. Thus, these *sequence-structure* pairs

were not considered relevant for performance evaluations, as they could introduce performance bias. The Tukey's boxplot analysis thus allowed the identification and removal of *extreme* outliers in the [Susceptible] and [Res<sub>10</sub>] subsets, resulting in 6269 and 680 HIV1-PR structural models, respectively. The [Res<sub>15</sub>] and [Res<sub>20</sub>] subsets remained unchanged with 83 and 60





HIV1-PR structural models, respectively. The resulting dataset has been used for further statistical analysis and as *test set* for performance calculations.

Figure 6 shows a profile of the HIV1-PR binding-site MIF dissimilarities across the susceptible dataset withdrawn of extreme outliers ([Susceptible\*]) and the stratified resistant data set (encompassing [Res<sub>10</sub>], [Res<sub>15</sub>], and [Res<sub>20</sub>]) also withdrawn of extreme outliers ([Susceptible\*]). As seen, susceptible HIV1-PR structures tend to present very low to null binding-site MIF dissimilarities compared to the ([Susceptible]) structure modeled from the *consensus* sequence. In fact, 93.91% of the *sequence-structure* pairs in the susceptible group show dissimilarities lower than 0.02, indicating a considerable degree of conservation within the binding site. Overall, these results show a segregation between susceptible and resistant *sequence-structure* pairs, when analyzing their binding-site MIF dissimilarities against a susceptible reference *sequence-structure* pair, suggesting that our method is able to quantitatively capture differences among susceptible and resistant HIV1-PR structures.

## Evaluation of the Classification Performance of Our Drug Resistance Classifier

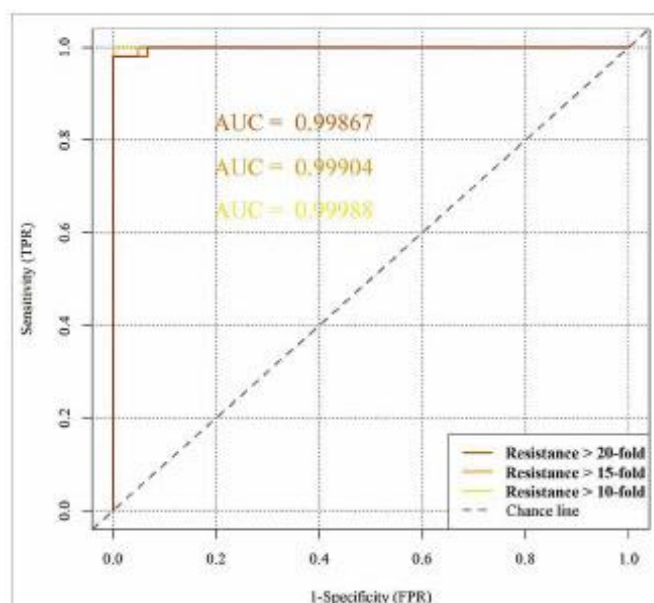
At the current stage of development, the proposed workflow only performs binary classification, meaning that each input sequence gets classified as either susceptible or resistant. Sequence data are used exclusively for the generation of the structural models on which dissimilarities are analyzed, but not to aid the classification itself. It is worth highlighting that our workflow relies on the detection of structural and chemical changes in viral enzymes that dictate susceptibility or resistance to drugs—rather than

on the training of predictive models using sequences with known phenotypic response to drugs. Therefore, instead of using performance evaluation methods, such as cross-validation, that assess the impact of hiding a portion of training data (observations) on the accuracy of the resulting predictions, we resorted to the calculation of metrics of overall performance of our binary classifier.

The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was used to assess the overall discriminatory performance of our method. The score assigned to each dataset entry (here used for testing), corresponding to binding-site dissimilarities between each input *sequence-structure* pair and the template *consensus sequence-structure*, were thus plotted as a ROC curve. ROC curves are conceptually simple plots that depicts a binary classifier's discriminative capability as its discrimination threshold is varied. Such graphical plots are created by plotting the method's true positive rate (sensitivity) against its false positive rate (1-specificity), at varying thresholds. The area under the ROC curve (ROC AUC) value is a single scalar value varying between 0 and 1, providing a measure of the overall discriminatory power of the method. A ROC AUC value of 1 (or 100%) entails a *perfect* discrimination, a value of 0.5 represents random classification, while values above 0.8 are commonly accepted as indicators of an acceptable discriminatory performance (Fawcett, 2006; Pines and Everett, 2008; Powers, 2011; Tape). Furthermore, several performance measures, such as the Sensitivity (Equation 5), Specificity (Equation 6), Accuracy (Equation 7), and MCC (Equation 8) were also determined.

Figure 7 represents the obtained ROC curves and their respective ROC AUC values for the susceptible and resistant HIV1-PR binding-site MIF dissimilarities. ROC AUC values for [Res<sub>10</sub>], [Res<sub>15</sub>], and [Res<sub>20</sub>] subsets were





**FIGURE 7 |** Predictive performance of the binary classification (resistant vs. susceptible) produced by the algorithm/workflow presented herein, quantified by means of Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and their respective Area Under the Curve (ROC AUC). The colors represent the ROC curves as follows: yellow for HIV1-PR sequences associated with 10-fold resistance; orange for HIV1-PR sequences associated with 15-fold resistance; and dark orange for HIV1-PR sequences associated with 20-fold resistance.

found to be similarly very high—0.9999, 0.9990, and 0.9987, respectively—suggesting that the method holds significant discriminatory power to distinguishing susceptible from fully resistant HIV1-PR *sequence-structure* pairs—based on their binding-site MIF dissimilarities to the [Susceptible] reference *sequence-structure* pair.

We have also used ROC curve analysis to guide the definition of an *optimal* discrimination threshold based on Youden's index (Equation 9) (Youden, 1950). The optimal threshold observed corresponded to a 0.06 dissimilarity  $T_c$  for all [Res<sub>10</sub>], [Res<sub>15</sub>], and [Res<sub>20</sub>] subsets. Table 2 presents the values of each performance metric obtained for each subset, when applying a classification threshold of 0.06. At this classification cut-off, the specificities and sensitivities were found to be 0.997 and 0.994 for the [Res<sub>10</sub>] subset, 0.997 and 0.952 for the [Res<sub>15</sub>] subset and 0.997 and 0.933 for the [Res<sub>20</sub>] subset, respectively. In all cases, there is strong discriminative performance toward susceptibility or resistance—as it can be appreciated by the high accuracy values highlighted in Table 2. Nevertheless, the best results are found for the [Res<sub>10</sub>] subset, with an accuracy of about 0.997. On the other hand, the subsets with increasing degree of resistance, [Res<sub>15</sub>] and [Res<sub>20</sub>], show only slightly worst results concerning Sensitivity determined at a threshold of 0.06.

The overall predictive performance of our method was also evaluated by the Matthews correlation coefficient (MCC) on the three resistant subsets, which summarizes the sensitivity and the specificity of a classification method within a unique value, also varying between 0 and 1. A higher value of MCC indicates that

**TABLE 2 |** Performance metrics obtained using a dissimilarity threshold of 0.0603.

Dissimilarity Threshold = 0.0603	Res <sub>10</sub>	Res <sub>15</sub>	Res <sub>20</sub>
ROC AUC	0.99988	0.99904	0.99867
Sensitivity	0.994118	0.951807	0.933333
Specificity	0.992184	0.992184	0.992184
Accuracy	0.99669	0.996379	0.996366
MCC	0.98151	0.874199	0.833085

the method has a better discriminatory performance. For the [Res<sub>10</sub>], [Res<sub>15</sub>], and [Res<sub>20</sub>] groups, MCC values of 0.982, 0.874, and 0.833 were, respectively, obtained. Still, such performance metrics seems to highlight the clear potential of our MIF-based method to predict drug resistance, especially within the most populated [Res<sub>10</sub>] group (MCC value close to 1).

## Positioning and Differentiation vs. Sequence-Based, PI-Resistance Prediction Tools

More than a decade ago, Lengauer and Sing pointed out the lack of commonly agreed benchmark (or test) datasets to assess and compare the performance of different prediction methods (Lengauer and Sing, 2006). The amount of available information on matched HIV genotype–resistance phenotype has increased significantly over recent years, with HIVDB embodying an important role as a centralized data repository (Rhee et al., 2003). As expected, sequence-based methods can make use of as much information as available to train their predictions, resulting in that they become proficient at “predicting” the phenotypic response for the sequences they have been trained on. Only in a few cases do we witness a concern in drawing prospective validation on unseen sequence sets and in making those test sets available to the community (Tarasova et al., 2018). This hinders the design of fair comparisons with methods that do not make direct use of sequence data for training, such as the one we propose here. On the other hand, over the past years genotypic-based methods have reached a level of sophistication that allows them to perform resistance predictions to specific drugs, exclusively based on sequence data matched to phenotypic response, while, at its current stage of development, our MIF-based method can only perform binary classification (susceptible or resistant) of input sequences.

Taken together, these aspects render the comparison of our algorithm with existing, sequence-trained, multi-classification predictors *non-trivial* to say the least. Further developments of our methodology, aiming at a more exhaustive exploration of specific MIF areas around the mutated binding sites, may enable stratification of classification into multiple drug classes by detecting the determinants of resistance to specific PIs. For the time being, we center the analysis of differentiation of our method on the answer to a recurrent question in the mind virologists or physicians who prescribe HIV-1 medications: *would it be possible to accurately predict whether a new, unknown HIV-1 strain will be susceptible to known PIs?*

**TABLE 3** | Performance metrics for exemplary sequence-based prediction tools tested against the datasets compiled in this work.

PI-resistance predictor	Sensitivity <sub>(A)</sub>	Sensitivity <sub>(B)</sub>	Specificity	FN <sub>(A)</sub> <sup>†</sup>	FN <sub>(B)</sub> <sup>†</sup>	FP <sup>‡</sup>
HIV-GRADE 07/2019	1.0000	0.1471	0.9809	0	580 12	120 8
ANRS 29_11/2018	1.0000	0.1868	0.8493	0	553 14	945 61
HIVdb 8.9.1	1.0000	1.0000	0.8818	0	0	741 21
Rega 10.0.0	1.0000	0.0838	0.9804	0	623 7	123 10
MIF-based Drug Resistance Classifier <sup>†</sup>	0.9941	0.9941	0.9922	4 1	4 1	49 11

<sup>†</sup> The proposed MIF-based drug resistance classifier is shown in the last row for comparison purposes.

<sup>‡</sup> False negatives (FN) corresponds to the number of sequences belonging to the Resistant<sup>†</sup> dataset (withdrawn of extreme outliers) that were predicted susceptible to all PIs. False positives (FP) corresponds to the number of sequences belonging to the Susceptible<sup>†</sup> dataset (withdrawn of extreme outliers) that were predicted resistant to at least one PI. In italics are indicated the number of viral isolates to which the sequences misclassified as FP belong. Rules for sensitivity analysis in (1) benchmark A [Sensitivity<sub>(A)</sub>]: resistance to one or more PIs is considered a correct prediction; and (2) benchmark B [Sensitivity<sub>(B)</sub>]: resistance to all PIs is considered a correct prediction.

In order to answer to this question, we first converted our test set containing susceptible and resistant HIV1-PR sequences withdrawn of extreme outliers ( $N = 6,269$  [[Susceptible\*]] and  $N = 680$  [[Resistant\*]], respectively) into codon code, using the EMBOSS Backtranseq online tool (Madeira et al., 2019a,b), and then submitted it to the HIV-GRADE web server (Obermeier et al., 2012a,b) for comparison with the sequence-based algorithms ANRS-rules (Brun-Vézinet et al., 2003), HIVdb (Rhee et al., 2003; Tang et al., 2012) and Rega (Van Laethem et al., 2002; Camacho et al., 2017). Unexpectedly, we were not able to obtain predictions from *geno2pheno* via HIV Grade due to a technical issue of the web platform. To eschew this problem, we tried to submit the test set directly through *geno2pheno*'s web server, but the interface is limited to an unpractical maximum of 20 sequences per run.

Because the existing sequence-based interpretation systems try to predict phenotypical susceptibility or resistance to the individual drugs for a given genotype, whereas our approach only performs binary classification (susceptibility or resistance to all PIs), in order to draw comparison between the methods we tried to “level the playing field” by converting the predictions made by sequence-based algorithms into simpler binary classifications. In a first benchmark (benchmark A), the prediction outputs were converted into (i) susceptibility to all PIs ([Susceptible]) or (ii) resistance to any PI (Resistant). In a second, more challenging benchmark (benchmark B), the outputs were encoded as either (i) susceptible to all PIs (Susceptible) or (ii) resistant to all PIs (Resistant). The full list of criteria applied to the conversion of multiple classifiers into binary classification is given in Supplementary Table S2. The full raw output of HIV-GRADE is available in Supplementary Datasheet S2.

The ability to accurately predict the susceptibility of the input sequences to all PIs was assessed by determining the rate of correct predictions, with reflection into the calculated methods' Sensitivity (Equation 5) and Specificity (Equation 6). Table 3 lists calculated performance metrics for the sequence-based algorithms on both benchmarks A and B, contrasted with the

performance of our sequence-to-structure-, MIF-based algorithm. Sensitivity<sub>(A)</sub> and the number of detected false negatives FN<sub>(A)</sub> translate the methods' ability to classifying a HIV1-PR sequence known to be resistant to all PIs as Resistant to at least one PI. In contrast, Sensitivity<sub>(B)</sub> and FN<sub>(B)</sub> translate the methods' ability to correctly predict the same sequences (known to be resistant to all PIs) as resistant to all PIs. From the methods' sensitivity viewpoint, the assessment of the results of both benchmarks A and B has been important to counterbalance the crudeness of the conversion of a multiple classifier of resistance toward specific PIs into a binary classification. Benchmark A clearly biases sensitivity in favor of a multi-classifier by considering any resistance prediction (in number or kind of PI) for sequences known to be resistant to all PIs as correct, whereas benchmark B offers a more stringent evaluation of sensitivity wherein only resistant-to-all-PIs predictions for the same set of fully resistant sequences are considered as correct.

As expected the discriminatory power of the methods in benchmark A is in stark contrast with that calculated for benchmark B. Sensitivity<sub>(A)</sub> suggests that sequence-based methods slightly outperform our sequence-to-structure-, MIF-based classifier, with 100% correct predictions of Resistant sequences vs. a Sensitivity<sub>(A)</sub> value of 0.994 obtained by our method. By contrast, benchmark B shows a considerable drop in performance by sequence-based methods at correctly predicting HIV1-PR sequences resistant to all PIs—aside HIVdb, which retains a Sensitivity of 1.000.

The results in Table 3 indicate that our workflow outperforms all other algorithms at identifying sequences susceptible to all PIs, with a Specificity of approximately 0.992, while its sequence-based counterparts display Specificities ranging from approximately 0.849 to 0.981. Still, it is worth noting that the large number of FP from the other sequence-based methods mostly come from the same isolates, similarly as mentioned above for FN<sub>(B)</sub>. This fact highlights the advantage of accounting for structural information besides genotypic data. While MIFs allow searching for differences in the structural and physicochemical



environment of proteins, which might not be significantly affected by mutations for similar amino acids, *sequence-based* approaches will consistently search for mutations at positions of interest and consistently assign them the same classification. At an early-stage of development, our workflow's performance is quite satisfactory, considering that the ability of correctly classifying a sequence as susceptible to all PIs is a highly relevant step at the beginning of antiretroviral therapy—where a false positive weights more on the flexibility of first-line therapy regimens and, consequently, quality of life of the patient.

## CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

In recent years, the availability of data in the form of matched HIV genotype–resistance phenotype has expanded greatly, enabling further training of statistical learning methods relating genotype to different levels of phenotypic resistance and against specific drugs. However, in spite of the increased access to and routine sequencing of HIV's genome in many countries, as well as the constant evolution of machine learning (ML)-based techniques, HIV's high mutation rate (estimated in  $3 \times 10^{-5}$  per nucleotide per replication) will continue to pose significant challenges: not only in terms of the constant demand for curation of genotypic and phenotypic data to be fed into ML algorithms, but also from the viewpoint of the interpretability and translation of said data into knowledge to assist the design of novel anti-microbial agents. Therefore, the exploration of innovative structure-based *in silico* approaches to the prediction of drug resistance, focusing at the molecular interface that bridges to drug design, holds clear interest and appeal as alternative or complement to some of the most developed sequence-based statistical methods.

In this contribution, we propose a novel approach to drug resistance prediction, which captures structural and physicochemical modifications induced by mutations in the binding site of an extensively studied viral target, HIV1-PR. We demonstrate that, even at an early, proof-of-principle stage of development, our methodology can identify HIV1-PR *sequence-structure* pairs belonging to three levels of increasing resistance—with impressively high accuracy—thus anticipating, on a purely structural basis, whether a given HIV1-PR sequence will translate into phenotypic resistance or susceptibility to PIs. Since our *sequence-to-structure*-based classifier does not rely on *training* from genotypic data and only uses an individual input sequence to derive the corresponding viral enzyme structure and yield a prediction, its potential real-world value in supporting clinical decision is clearly relevant. Due to the fact that the proposed workflow produced predictions of complete drug susceptibility to the HIV1-PR datasets with high predictive accuracy, said results highlight this methodology as a potential valuable resource on clinical practice. Being able to use the clinical isolate sequence data to accurately predict susceptibility to known PIs, before starting a therapeutic regimen, is of paramount importance to allow the initiation of PI-based therapy with the less expensive 1st

generation PIs, resulting in an economic benefit to the healthcare systems. Importantly, even though the method performs analysis on thousands of structural data points (atomic coordinates and MIF points), classification into *susceptible* or *resistant* takes place in a *couple-of-minutes* time scale.

It is worth emphasizing, nevertheless, that there is obvious room for methodological improvement and expansion. The upgrade to multi-classification functionality, where target structures known to be susceptible to specific inhibitors and drugs are used as template for structural modeling, is a critical milestone that will pave the way to predicting resistance to those specific anti-microbial agents. The growing amount of three-dimensional structural data on microbial target-inhibitor complexes, coupled with more elaborate use of sequence data, fuels our belief in that an improved *sequence-to-structure*-, MIF-based drug resistance classifier, will be able to combine the strengths and overcome the shortcomings of current approaches.

Claims of greatness must be backed by adequate validation designs. While the current version of our workflow does not allow drawing comprehensive and direct comparisons with more advanced sequence-based predictors of resistance to specific HIV1-PR inhibitors, further developments to our method will also be accompanied by the assembly and sharing of stratified benchmark sets of susceptible and resistant microbial target sequences—enabling fairer comparisons to be made both by ourselves and the scientific community.

As implied in our concluding words, a clear expectation around this work involves extending the application of our method to other targets, other than HIV1-PR, with inherent and multiple patterns of genetic variation. We realize, however, that this expectation may only be fulfilled if workable amounts of data are shared among the scientific community. Undoubtedly, one of the most critical aspects facing drug resistance prediction is the development of community-wide efforts to prepare and share useful datasets and tools to facilitate improvement and performance evaluation of existing and novel methodologies—which should be a clear priority for researchers working in the field. By basing its development on the use of freeware, our method is freely-available for non-commercial use.

To conclude, we see the results presented here as a promising example of the potential application of combined sequence- and structure-based *in silico* methods to achieve a more detailed interpretation and prediction of the impact of mutations in drug resistance. The ever-increasing emergence and widespread of drug-resistance calls in for the development of more efficient strategies to combat microbial threats in several fronts—be that in the drug discovery research setting or the clinical and medical therapeutic decision realm.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets analyzed and scripts for this study can be found in the PI-resistance\_Prediction GitHub [[https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction)]. Raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CS and RB developed the idea for the present work and provided critical revisions. NA, AM, and JL contributed equally to its conception, literature search, and manuscript writing. All authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

## ACKNOWLEDGMENTS

NA, AM, JL, CS, and RB thank Daniela Vaz, João Vaz, and Vitor Duque for the informative discussions on the HIV1 drug resistance topic, which lead to devising and developing of the present work. NA, AM, JL, CS, and RB also thank the

Coimbra Chemistry Centre (CQC) supported by the Portuguese Agency for Scientific Research, Foundation for Science and Technology (FCT), through Project UID/QUI/00313/2019. NA, AM, and JL acknowledge the MedChemTrain Ph.D. programme (PD/00147/2013) in Medicinal Chemistry—Ministry of Science, Technology, and Higher Education (MCTES), Portugal—for Ph.D. fellowships PD/BD/135287/2017, PD/BD/135289/2017 and PD/BD/135292/2017, respectively.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2020.00243/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Agniswamy, J., Louis, J. M., Roche, J., Harrison, R. W., and Weber, I. T. (2016). Structural studies of a rationally selected multi-drug resistant HIV-1 protease reveal synergistic effect of distal mutations on flap dynamics. *PLoS ONE* 11:e0168616. doi: 10.1371/journal.pone.0168616
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2018a). *GitHub: FilterMajor.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/fast-processing/filterMajor.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/fast-processing/filterMajor.sh) (accessed October 27, 2019).
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2018b). *GitHub: FilterMinor.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/fast-processing/filterMinor.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/fast-processing/filterMinor.sh) (accessed October 27, 2019).
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2018c). *GitHub: MutModels.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/model-structures/MutModels.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/model-structures/MutModels.sh) (accessed October 27, 2019).
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2018d). *GitHub: Pattern\_HIVp.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/model-structures/pattern-HIVp.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/model-structures/pattern-HIVp.sh) (accessed October 27, 2019).
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2018e). *GitHub: Ref\_process.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/isomif\\_run/ref\\_process.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/isomif_run/ref_process.sh) (accessed October 27, 2019).
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2018f). *GitHub: Separate\_sets.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/Dataset-processing/Separate\\_sets.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/Dataset-processing/Separate_sets.sh) (accessed October 27, 2019).
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2019a). *GitHub: Count\_mut.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/fast-processing/count\\_mut.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/fast-processing/count_mut.sh) (accessed October 27, 2019).
- Alves, N. G., Mata, A. I., and Luís, J. P. (2019b). *GitHub: HIV1predict.sh*. Available online at: [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/master/bin/HIV1predict.sh](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/master/bin/HIV1predict.sh) (accessed November 30, 2019).
- Artese, A., Cross, S., Costa, G., Distinto, S., Parrotta, L., Alcaro, S., et al. (2013). Molecular interaction fields in drug discovery: recent advances and future perspectives. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 3, 594–613. doi: 10.1002/wcms.1150
- Beerenwinkel, N., Däumer, M., Oette, M., Korn, K., Hoffmann, D., Kaiser, R., et al. (2003). Geno2pheno: estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes. *Nucleic Acids Res.* 31, 3850–3855. doi: 10.1093/nar/gkg575
- Bonet, I. (2015). Machine learning for prediction of HIV drug resistance: a review. *Curr. Bioinform.* 10, 579–585. doi: 10.2174/1574893610666151008011731
- Bron, C., and Kerbosch, J. (1973). Algorithm 457: finding all cliques of an undirected graph. *Commun. ACM* 16, 575–577. doi: 10.1145/362342.362367
- Brun-Vézinet, F., Descamps, D., Ruffault, A., Masquelier, B., Calvez, V., Peytavin, G., et al. (2003). Clinically relevant interpretation of genotype for resistance to abacavir. *AIDS* 17, 1795–1802. doi: 10.1097/00002030-200308150-00008
- Camacho, R., Laethem, K., Van Geretti, A. M., Verheyen, J., Paredes, R., and Vandamme, A.-M. (2017). *Algorithm for the Use of Genotypic HIV-1 Resistance Data (Version Rega v10.0.0)*. Available online at: <https://rega.kuleuven.be/cev/avd/software/rega-hiv1-rules-v10.pdf>
- Cao, Z. W., Han, L. Y., Zheng, C. J., Ji, Z. L., Chen, X., Lin, H. H., et al. (2005). Computer prediction of drug resistance mutations in proteins. *Drug Discov. Today* 10, 521–529. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03377-5
- Chartier, M., and Najmanovich, R. (2015). Detection of binding site molecular interaction field similarities. *J. Chem. Inf. Model* 55, 1600–1615. doi: 10.1021/acs.jcim.5b00333
- Cruciani, G. (2005). *Molecular Interaction Fields*. Weinheim: FRG, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA.
- draw.io. (2005). *Flowchart Maker & Online Diagram Software*. Available online at: <https://www.draw.io/> (accessed October 25, 2019).
- Fawcett, T. (2006). An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognit. Lett.* 27, 861–874. doi: 10.1016/j.patrec.2005.10.010
- Florowski, C. M. (2008). Sensitivity, specificity, receiver-operating characteristic (ROC) curves and likelihood ratios: communicating the performance of diagnostic tests. *Clin. Biochem. Rev.* 29(Suppl 1), S83–S87.
- Gaudreault, F., Morency, L.-P., and Najmanovich, R. J. (2015). NRGsuite: a PyMOL plugin to perform docking simulations in real time using FlexAID. *Bioinformatics* 31, 3856–3858. doi: 10.1093/bioinformatics/btv458
- Goodford, P. J. (1985). A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J. Med. Chem.* 28, 849–857. doi: 10.1021/jm00145a002
- Hao, G., Yang, G., and Zhan, C. (2010). Computational mutation scanning and drug resistance mechanisms of HIV-1 protease inhibitors. *J. Phys. Chem. B* 114, 9663–9676. doi: 10.1021/jp102546s
- Hao, G.-F., Guang-Fu, Y., and Zhan, C.-G. (2012). Structure-based methods for predicting target mutation-induced drug resistance and rational drug design to overcome the problem. *Drug Discov. Today* 17, 1121–1126. doi: 10.1016/j.drudis.2012.06.018
- Hoaglin, D. C. (2003). John W. Tukey and data analysis. *Stat. Sci.* 18, 311–18. doi: 10.1214/ss/1076102418
- Hou, T., and Yu, R. (2007). Molecular dynamics and free energy studies on the wild-type and double mutant HIV-1 protease complexed with amprevir and two amprevir-related inhibitors: mechanism for binding and drug resistance. *J. Med. Chem.* 50, 1177–1188. doi: 10.1021/jm0609162
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38. doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
- Irwin, K. K., Renzette, N., Kowalik, T. F., and Jensen, J. D. (2016). Antiviral drug resistance as an adaptive process. *Virus Evol.* 2:vev014. doi: 10.1093/ve/vev014
- Jenwitheesuk, E., and Samudrala, R. (2005). Prediction of HIV-1 protease inhibitor resistance using a protein-inhibitor flexible docking approach. *Antivir. Ther.* 10, 157–166.
- Khalid, Z., and Sezerman, O. U. (2018). Prediction of HIV drug resistance by combining sequence and structural properties. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinformatics* 15, 966–973. doi: 10.1109/TCBB.2016.2638821

- Khan, R. A., and Brandenburger, T. (2019). *ROCit: Performance Assessment of Binary Classifier with Visualization*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=ROCit>
- King, N. M., Prabu-Jeyabalan, M., Nalivaika, E. A., Wigerinck, P., de Bethune, M.-P., and Schiffer, C. A. (2004). Structural and thermodynamic basis for the binding of TMC114, a next-generation human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *J. Virol.* 78, 12012–12021. doi: 10.1128/JVI.78.21.12012-12021.2004
- Lengauer, T., and Sing, T. (2006). Bioinformatics-assisted anti-HIV therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 790–797. doi: 10.1038/nrmicro1477
- Madeira, F., Mi Park, Y., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., et al. (2019a). EMBOSS Backtranseq. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. doi: 10.1093/nar/gkz26
- Madeira, F., Mi Park, Y., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., et al. (2019b). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. doi: 10.1093/nar/gkz268
- Martinez, L., Andreati, R., and Martinez, J. M. (2007). Convergent algorithms for protein structural alignment. *BMC Bioinformatics* 8:306. doi: 10.1186/1471-2105-8-306
- Mason, S., Devincenzo, J. P., Toovey, S., Wu, J. Z., and Whitley, R. J. (2018). Comparison of antiviral resistance across acute and chronic viral infections. *Antiviral Res.* 158, 103–112. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.07.020
- Masso, M., and Vaisman, I. I. (2013). Sequence and structure based models of HIV-1 protease and reverse transcriptase drug resistance. *BMC Genomics* 14:S3. doi: 10.1186/1471-2164-14-S4-S3
- Matthews, B. W. (1975). Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* 405, 442–451. doi: 10.1016/0005-2795(75)90109-9
- McKeegan, K. S., Borges-Walmsley, M. L., and Walmsley, A. R. (2002). Microbial and viral drug resistance mechanisms. *Trends Microbiol.* 10, 8–14. doi: 10.1016/S0966-842X(02)02429-0
- Nayak, C., Chandra, I., and Singh, S. K. (2019). An *in silico* pharmacological approach toward the discovery of potent inhibitors to combat drug resistance HIV-1 protease variants. *J. Cell. Biochem.* 120, 9063–9081. doi: 10.1002/jcb.28181
- Obermeier, M., Pironi, A., Berg, T., Braun, P., Däumer, M., Eberle, J., et al. (2012a). HIV-GRADE: a publicly available, rules-based drug resistance interpretation algorithm integrating bioinformatic knowledge. *Intervirology* 55, 102–107. doi: 10.1159/000331999
- Obermeier, M., Pironi, A., Berg, T., Braun, P., Däumer, M., Eberle, J., et al. (2012b). HIV-GRADE: HIV-1 Tool. *Intervirology* 55, 102–107.
- Pawar, S., Wang, Y.-F., Wong-Sam, A., Agniswamy, J., Ghosh, A. K., Harrison, R. W., et al. (2019). Structural studies of antiviral inhibitor with HIV-1 protease bearing drug resistant substitutions of V32I, I47V and V82I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 514, 974–978. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.05.064
- Pines, J. M., and Everett, W. W. (2008). *Evidence-Based Emergency Care*, 2nd Edn, eds J. M. Pines, C. R. Carpenter, A. S. Raja, and J. D. Schuur. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
- Powers, D. M. W. (2011). Evaluation: from precision, recall and F-factor to ROC, informedness, markedness and correlation. *J. Mach. Learn. Technol.* 2, 37–63. Available online at: <http://bioinfopublication.org/viewhtml.php?artid=BIA0001114>
- Qiu, X., and Liu, Z.-P. (2011). Recent developments of peptidomimetic HIV-1 protease inhibitors. *Curr. Med. Chem.* 18, 4513–4537. doi: 10.2174/092986711797287566
- R Core Team (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Found. Stat. Comput. Available online at <https://www.r-project.org/>
- RCSB PDB (2000). *RCSB PDB*. Available at: <https://www.rcsb.org/> (accessed September 7, 2019).
- [Res<sub>10</sub>] Alves, Nuno G., Ana Isabel Mata, and João Pedro Luís. (2019) HIV-1 protease isolates from HIVdb Stanford University with more than 10-fold resistance to all inhibitors. GitHub. 20181102. [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/Dataset-processing/PI\\_dataset-res10](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/Dataset-processing/PI_dataset-res10)
- [Res<sub>15</sub>] Alves, Nuno G., Ana Isabel Mata, and João Pedro Luís. (2019) HIV-1 protease isolates from HIVdb Stanford University with more than 15-fold resistance to all inhibitors. GitHub. 20181102. [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/Dataset-processing/PI\\_dataset-res15](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/Dataset-processing/PI_dataset-res15)
- [Res<sub>20</sub>] Alves, Nuno G., Ana Isabel Mata, and João Pedro Luís. (2019) HIV-1 protease isolates from HIVdb Stanford University with more than 20-fold resistance to all inhibitors. GitHub. 20181102. [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/Dataset-processing/PI\\_dataset-res20](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/Dataset-processing/PI_dataset-res20)
- [Resistant\*] Alves, Nuno G., Ana Isabel Mata, and João Pedro Luís. (2019) HIV-1 protease isolates from HIVdb Stanford University with more than 10-fold resistance to all inhibitors, without extreme outliers. GitHub. 20181102. [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/Dataset-processing/Resistant\\_noOut](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/Dataset-processing/Resistant_noOut)
- Rhee, S.-Y., Gonzales, M. J., Kantor, R., Betts, B. J., Ravela, J., and Shafer, R. W. (2003). Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res.* 31, 298–303. doi: 10.1093/nar/gkg100
- Rhee, S.-Y., Taylor, J., Wadhwa, G., Ben-Hur, A., Brutlag, D. L., and Shafer, R. W. (2006). Genotypic predictors of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 17355–17360. doi: 10.1073/pnas.0607274103
- Riemenschneider, M., Hummel, T., and Heider, D. (2016). SHIVA - a web application for drug resistance and tropism testing in HIV. *BMC Bioinformatics* 17:314. doi: 10.1186/s12859-016-1179-2
- Ruopp, M. D., Perkins, N. J., Whitcomb, B. W., and Schisterman, E. F. (2008). Youden index and optimal cut-point estimated from observations affected by a lower limit of detection. *Biometrical J.* 50, 419–430. doi: 10.1002/bimj.200710415
- Šali, A. (2019a). *Modeller*. Available at: <https://salilab.org/modeller/> (accessed August 20, 2019).
- Šali, A. (2019b). *Modeller Wiki*. Available online at: [https://salilab.org/modeller/wiki/Mutate\\_model](https://salilab.org/modeller/wiki/Mutate_model) (accessed September 30, 2019).
- Šali, A., and Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 234, 779–815. doi: 10.1006/jmbi.1993.1626
- Sheik Amamuddy, O., Bishop, N. T., and Tastan Bishop, Ö. (2018). Characterizing early drug resistance-related events using geometric ensembles from HIV protease dynamics. *Sci. Rep.* 8:17938. doi: 10.1038/s41598-018-36041-8
- Stanford University (1998a). *HIVDB: Consensus B Amino Acid Sequences*. Available online at: [https://hivdb.stanford.edu/pages/documentPage/consensus\\_amino\\_acid\\_sequences.html](https://hivdb.stanford.edu/pages/documentPage/consensus_amino_acid_sequences.html) (accessed November 2, 2019).
- Stanford University (1998b). *HIVDB: Genotype-Phenotype Datasets*. Available online at: <https://hivdb.stanford.edu/pages/genopheno.dataset.html> (accessed November 2, 2018).
- Stanford University (1998c). *HIVDB: HIV Drug Resistance Database*. Available online at: <https://hivdb.stanford.edu/> (accessed October 23, 2019).
- Stanford University (1998d). *HIVDB: PI Resistance Notes*. Available online at: <https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/PI/> (accessed October 23, 2019).
- Strasfeld, L., and Chou, S. (2010). Antiviral drug resistance mechanisms and clinical implications. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 24, 413–437. doi: 10.1016/j.idc.2010.01.001
- [Susceptible] Alves, Nuno G., Ana Isabel Mata and João Pedro Luís. (2019) HIV-1 protease isolates from HIVdb Stanford University susceptible to all inhibitors. GitHub. 20181102. [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/Dataset-processing/PI\\_dataset-susceptible](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/Dataset-processing/PI_dataset-susceptible)
- [Susceptible\*] Alves, Nuno G., Ana Isabel Mata, and João Pedro Luís. (2019) HIV-1 protease isolates from HIVdb Stanford University susceptible to all inhibitors, without extreme outliers. GitHub. 20181102. [https://github.com/subject-am/PI-resistance\\_Prediction/blob/Dataset-processing/Susceptible\\_noOut](https://github.com/subject-am/PI-resistance_Prediction/blob/Dataset-processing/Susceptible_noOut)
- Tang, M. W., Liu, T. F., and Shafer, R. W. (2012). The HIVdb system for HIV-1 genotypic resistance interpretation. *Intervirology* 55, 98–101. doi: 10.1159/000331998
- Tape, T. G. (1990). *Interpreting Diagnostic Tests*. University of Nebraska Medical Center. Available online at: <http://gim.unmc.edu/dxtests/> (accessed October 24, 2019).
- Tarasova, O., Biziukova, N., Filimonov, D., and Poroikov, V. (2018). A computational approach for the prediction of HIV resistance based on amino acid and nucleotide descriptors. *Molecules* 23:2751. doi: 10.3390/molecules23112751
- Toor, J. S., Sharma, A., Kumar, R., Gupta, P., Garg, P., and Arora, S. K. (2011). Prediction of drug-resistance in HIV-1 subtype C based on protease sequences



- from ART naive and first-line treatment failures in North India using genotypic and docking analysis. *Antiviral Res.* 92, 213–218. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.08.005
- Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5:99. doi: 10.2307/3001913
- Van Laethem, K., De Luca, A., Antinori, A., Cingolani, A., Perna, C. F., and Vandamme, A.-M. (2002). A genotypic drug resistance interpretation algorithm that significantly predicts therapy response in HIV-1-infected patients. *Antivir. Ther.* 7, 123–9.
- Vercauteren, J., and Vandamme, A.-M. (2006). Algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic drug resistance information. *Antiviral Res.* 71, 335–342. doi: 10.1016/j.antiviral.2006.05.003
- Vere Hodge, A., and Field, H. J. (2011). "General mechanisms of antiviral resistance" in *Genetics and Evolution of Infectious Disease*, ed M. Tibayrenc (Amsterdam: Elsevier), 339–362.
- Wames, G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R., Liaw, W. H. A., Lumley, T., et al. (2019). *ggplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. Available online at: <https://cran.r-project.org/package=ggplots>
- Weber, I. T., and Agniswamy, J. (2009). HIV-1 protease: structural perspectives on drug resistance. *Viruses* 1, 1110–1136. doi: 10.3390/v1031110
- Weber, I. T., and Harrison, R. W. (2016). Tackling the problem of HIV drug resistance. *Postepy Biochem.* 62, 273–279.
- Wensing, A. M., Calvez, V., Ceccherini-Silberstein, F., Charpentier, C., Günthard, H. F., Paredes, R., et al. (2019). 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* 27, 111–121. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31634862>
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, NY: Springer-Verlag. Available online at: <https://ggplot2-book.org/>. doi: 10.1007/978-0-387-98141-3
- Wlodawer, A., and Erickson, J. W. (1993). Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 543–585. doi: 10.1146/annurev.bi.62.070193.002551
- Word, J. M., Lovell, S. C., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (1999). Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation. *J. Mol. Biol.* 285, 1735–1747. doi: 10.1006/jmbi.1998.2401
- Youden, W. J. (1950). Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3, 32–35.
- Yu, X., Weber, I. T., and Harrison, R. W. (2014). Prediction of HIV drug resistance from genotype with encoded three-dimensional protein structure. *BMC Genomics* 15:S1. doi: 10.1186/1471-2164-15-S5-S1
- Zhang, J., Rhee, S.-Y., Taylor, J., and Shafer, R. W. (2005). Comparison of the precision and sensitivity of the antiviogram and phenosense HIV drug susceptibility assays. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 38, 439–444. doi: 10.1097/01.qai.0000147526.64863.53

**Conflict of Interest:** CS and RB are cofounders of the company BSIM Therapeutics, however all work reported in this article was carried out at the University of Coimbra.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Alves, Mata, Luis, Brito and Simões. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

