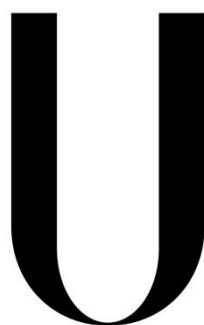


Universidade de Lisboa - Faculdade de Farmácia



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

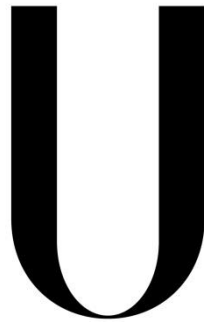
Desenvolvimento de Novos Antagonistas do Recetor NMDA

Nuno Alexandre Lousa Pereira

Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica

2013

Universidade de Lisboa - Faculdade de Farmácia



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Desenvolvimento de Novos Antagonistas do Recetor NMDA

Dissertação orientada pela
Prof^a. Doutora Maria M. M. Santos e
pelo co-orientador Prof. Doutor Daniel J. V. A. dos Santos

Nuno Alexandre Lousa Pereira
Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica
2013

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha gratidão a todos aqueles que me deram a possibilidade da realização desta dissertação:

Á minha orientadora, a Prof.^a Dr.^a Maria M. M. Santos, pelas suas marcantes sugestões na área da síntese orgânica, disponibilidade demonstrada para a realização desta dissertação, valiosos conselhos e também pela oportunidade de usufruir de uma bolsa de investigação que me foi atribuída através do seu projeto.

Ao meu co-orientador, o Prof. Dr. Daniel J. V. A. dos Santos, pelos essenciais conhecimentos transmitidos na área da química computacional e importantes sugestões.

Ao Prof. Dr. Rui Moreira, pelos seus relevantes conselhos e exemplar liderança.

Aos líderes do grupo de investigação Sintefarma da Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona, Prof.^a Dr.^a Mercedes Amat Tusón e Prof. Dr. Joan Bosch Cartes pela sua confiança e permissão para utilização dos seus laboratórios, valiosos conselhos e orientações profissionais.

Á Prof.^a Dr.^a Maria Pérez Bosch, pelo seu acompanhamento do meu trabalho na Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona, simpatia, alegria no laboratório, disponibilidade e por me ter cedido um aldeído utilizado na elaboração da presente dissertação.

Ao Prof. Dr. Francesc X. Sureda da Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde da Universidade de Rovira e Virgili pela avaliação biológica dos compostos descritos nesta tese.

Ao Prof. Dr. Elies Molins do Instituto de Ciências dos Materiais da Universidade Autónoma de Barcelona pela análise por difração de raios-X.

Ao João Ferreira dos Serviços de Análise Elementar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pelas análises elementares e espectrometria de massa.

Á Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo apoio financeiro através do projecto PTDC/QUI-QUI/111664/2009.

A todos os meus colegas de laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, em especial para os post-docs e alunos de doutoramento do grupo de Química Medicinal. Foi através da sua motivação, dedicação, organização e perseverança na realização e organização das tarefas de laboratório que esta dissertação pôde ser feita.

A todos os meus colegas do laboratório Sintefarma que transformaram a minha estadia em Barcelona num dos melhores momentos da minha vida. Um agradecimento muito especial ao Carlos Ramos Bosch, pela sua grande ajuda num momento aflitivo, companheirismo, amizade, cumplicidade, alegria no laboratório e pelos bons momentos vividos em Barcelona.

Ao Carlos Ribeiro, Rudi Oliveira, André Dias e Ângelo Monteiro pelo companheirismo e pelos bons momentos vividos dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos João Domingos, Mauro Sinimbú, Daniel Duarte e Ivan Cruz pela longa amizade e pelos bons momentos que vivemos juntos.

À Filipa Cardoso pelo seu entusiasmo, alegria, disponibilidade e pelo equilíbrio emocional que me deu. Sem ela eu estaria perdido.

E finalmente, aos meus pais a quem eu dedico este trabalho, pela paciência, compreensão, atenção e sacrifício que sempre demonstraram. Por me fazerem crer que posso ir mais além e por nunca me terem deixado sair do caminho certo.

Parte dos resultados desta dissertação foram incluídos nas seguintes comunicações científicas:

Publicações:

Pereira N. A. L., Turch M., Sureda F. X., Amat M., Bosch J., Santos M.M.M. Synthesis of phenylalaninol-derived oxazolopyrrolidone lactams and evaluation as NMDA receptor antagonists. *Monatsh. Chem*, 144(4), p.473-477, **2013**. (DOI: 10.1007/s00706-012-0880-8)

Patentes:

Saraiva L., Santos M. M. M., Pereira N. A. L., Pereira C., Moreira S., Leão M., Monteiro A., Soares J., "Small-molecule p53 activators" **2013**. Processo nº01 107025 (patente em avaliação)

Posters:

Monteiro A., Pereira N. A. L., Soares J., Saraiva L., Santos M. M. M. Hit optimization of a new class of p53-MDM2 interaction inhibitors. *X Encontro Nacional de Química Orgânica, 1º Simpósio Luso-Brasileiro de Química Orgânica*, Lisbon, Portugal, September 4-6, **2013**, PC137

Pereira N. A. L., Sureda F. X., Amat M., Bosch J., Santos M. M. M.. Chiral induced cyclocondensation reactions: a versatile approach to obtain a new class of NMDAR antagonists. *X Encontro Nacional de Química Orgânica, 1º Simpósio Luso-Brasileiro de Química Orgânica*, Lisboa, Portugal, 4-6 de Setembro, **2013**, PC168

Pereira N. A. L., Monteiro A., Santos M. M. M. Targeting the wt p53: synthesis of a new family of modulators. *COST Action CM1106*, Porto, Portugal, 21-22 de Fevereiro, **2013**, P13

Soares J., Pereira N. A. L., Bessa C., Leão M., Bisio A., Ciribilli Y., Inga A., Pereira C., Santos M. M. M., Lucília Saraiva. NAPs: potential activators of p53 activity identified using yeast cell-based screening assays. *3rd Portuguese Meeting on Medicinal Chemistry*, Aveiro, Portugal, 28-30 de Novembro, **2012**, P69

Pereira N. A. L., Sureda F. X., Turch M., Amat M., Bosch J., Santos M. M. M. Synthesis of phenylalaninol-derived oxazolopyrrolidone lactams and evaluation as NMDA receptor antagonists. *3rd Portuguese Meeting on Medicinal Chemistry*, Aveiro, Portugal, 28-30 de Novembro, **2012**, P89

Santos M. M. M., Pereira N. A. L., Amat M., Bosch J.. New Indole Derivatives as Potential NMDA Receptor Antagonists. *XXII International Symposium on Medicinal Chemistry*, Berlin, Germany, 2-6 de Setembro, **2012**, P052

Resumo

O recetor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDAR) exerce um papel fundamental no controlo da plasticidade sinática nomeadamente nos processos de aprendizagem e memória. No entanto, foi demonstrado que uma atividade exacerbada destes recetores está implicada no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer e de Parkinson através de um fenómeno designado por excitotoxicidade. Neste processo, a acumulação na fenda sinática do neurotransmissor glutamato excitatório ativa os NMDAR localizados na membrana neuronal, permitindo o influxo de iões cálcio (Ca^{2+}) para o compartimento celular. A excessiva entrada de Ca^{2+} ativa uma cascata de sinalização intracelular que culminam em dano mitocondrial assim como em morte neuronal por apoptose ou necrose. Nos últimos 30 anos tem-se verificado uma vasta procura por novos antagonistas deste recetor que sejam vantajosos no tratamento da demência mental. De especial interesse são os casos de sucesso dos adamantanos – memantina e amantadina – atualmente utilizados no tratamento de fases avançadas das doenças de Alzheimer e de Parkinson. Esta dissertação consiste no desenvolvimento de novos antagonistas do NMDAR através de modernas técnicas de síntese enantioselectiva para a produção de estudos de estrutura-atividade. Foram sintetizadas pequenas bibliotecas de oxazolo-isoindolinonas, oxazolo-pirrolidonas, oxazolo-piperidonas, indolo[2,3a]quinolizidinas e spiro-indolinonas para avaliação biológica como antagonistas do NMDAR. As oxazolo-isoindolinonas revelaram-se como uma nova classe de antagonistas, sendo que o composto mais eficaz desenvolvido apresentou um IC_{50} de $154\mu\text{M}$. Também foram obtidos bons resultados para as oxazolo-pirrolidonas, em que o composto mais eficiente desta série exibiu um IC_{50} de $62\mu\text{M}$, sendo assim 1.5x mais potente que a amantadina ($\text{IC}_{50} = 92\mu\text{M}$). Da mesma forma, as oxazolo-piperidonas também demonstraram ser uma nova classe de antagonistas com um IC_{50} de $63\mu\text{M}$ para o composto ativo mais potente, novamente sendo 1.5x mais potente que a amantadina. No que diz respeito às indolo[2,3a]quinolizidinas, estas também apresentaram atividade como antagonistas do NMDAR. Nesta série, o composto detetado mais potente apresentou um IC_{50} de $30.4\mu\text{M}$ e sendo por isso 3x mais ativo que a amantadina. Quanto às spiro-indolinonas, estes compostos encontram-se de momento em avaliação biológica. Todos os resultados obtidos foram racionalizados com recurso a técnicas de química computacional, nomeadamente por *docking* molecular e por geração de farmacóforos. Os resultados obtidos sugerem que os

novos antagonistas revelados possuem um modo de ação ainda desconhecido. Através deste trabalho foi possível elaborar estudos de estrutura-atividade com estas séries de compostos que revelaram os requisitos estruturais necessários para a atividade como antagonistas do NMDAR.

Abstract

N-methyl-*D*-aspartate receptors (NMDAR) exerts a fundamental role in the control of the synaptic cleft, namely in the processes of learning and memory. However, it has been demonstrated that an exacerbated activity of these receptors is implied in the development of neurodegenerative diseases as Alzheimer's and Parkinson's through a phenomenon named excitotoxicity. During this process, the accumulation in the synaptic cleft of the excitatory neurotransmitter glutamate activates the NMDAR located in the neuronal membrane, allowing the influx of calcium ions (Ca^{2+}) into the cellular compartment. The excessive entry of Ca^{2+} activates an intracellular signaling cascade that culminates in mitochondrial damaging as well as neuronal death by apoptosis or necrosis. In the last 30 years there has been a wide search for new antagonists of this receptor that may be useful in the treatment of mental dementia. Of particular interest are the successful cases of the adamantanes – memantine and amantadine – currently used in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases at advanced stages. The main goal of this thesis consists in the development of new NMDAR antagonists by use of modern techniques in order to achieve an enantioselective synthesis for further structure-activity studies. We synthesized small libraries of oxazolo-isoindolinones, oxazolo-pyrrolidones, oxazolo-piperidones, indolo[2,3a]quinolizidines and spiro-indolines to evaluate its biological activity as NMDAR antagonists. Oxazolo-isoindolinones revealed to be a new class of antagonists, with the most effective compound presenting an IC_{50} of $154\mu\text{M}$. Oxazolo-pyrrolidones also showed good results, where the most effective compound displayed an IC_{50} of $62\mu\text{M}$ and therefore being 1.5x more potent than amantadine ($\text{IC}_{50} = 92\mu\text{M}$). Similarly, oxazolo-piperidones also demonstrated to be a new class of antagonists with an IC_{50} of $63\mu\text{M}$ for the most effective compound, again being 1.5x more potent than amantadine. Regarding indolo[2,3a]quinolizidines, these also showed activity as NMDAR antagonists. In this series, the most effective compound displayed an IC_{50} of $30.4\mu\text{M}$ and thus being 3x more active than amantadine. As for the spiro-indolinones, these compounds are currently under biological evaluation. All the data obtained were rationalized resorting to computational chemistry techniques, more specifically to molecular docking and by pharmacophores search. The obtained results suggest that these new antagonists have a mode of action that has not yet been described. With this work it was possible to develop structure-activity studies with these series of compounds, which have revealed the structural requirements for NMDAR antagonism.

Índice Geral

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | v |
| Abstract..... | vii |
| Índice de Figuras | xi |
| Índice de Esquemas | xiii |
| Índice de Tabelas | xv |
| Abreviaturas..... | xvii |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 O Recetor <i>N</i> -Metil- <i>D</i> -Aspartato e a Neurodegeneração | 1 |
| 1.2 Recetores Ionotrópicos do Glutamato..... | 2 |
| 1.3 Arquitetura Molecular dos NMDAR | 3 |
| 1.4 Desenvolvimento de Antagonistas dos NMDAR | 5 |
| 1.4.1 Antagonistas Competitivos – Sítio do Glutamato | 6 |
| 1.4.2 Antagonistas Competitivos – Sítio da Glicina..... | 8 |
| 1.4.3 Antagonistas não-competitivos – Bloqueadores de Canal..... | 12 |
| 1.4.4 Antagonistas não-competitivos – Subunidade NR2B..... | 15 |
| 1.4.5 Outros inibidores seletivos entre subunidades NR1-NR2 | 17 |
| 1.4.6 Antagonistas não-competitivos - Oxazolidinas | 19 |
| 1.4.7 Antagonistas não-competitivos - Derivados da <i>Uncaria</i> | 20 |
| 2. Resultados e Discussão | 23 |
| 2.1 Síntese e Avaliação Biológica de Oxazolo-Isoindolinonas e Oxazolo-Pirrolidonas | 23 |
| 2.2 Síntese e Avaliação Biológica de Oxazolo-Piperidonas | 34 |
| 2.3 Síntese e Avaliação Biológica de Indolo[2,3a]quinolizidinas | 42 |
| 2.4 Síntese e Avaliação Biológica de Spiro-Indolinas | 49 |
| 2.5 Química Computacional | 55 |
| 2.5.1 <i>Docking</i> Molecular | 55 |
| 2.5.2 Geração de Farmacóforos..... | 59 |
| 3. Conclusões | 64 |
| 4. Procedimento Experimental..... | 66 |
| 4.1 Síntese Orgânica | 66 |
| 4.1.1 Síntese dos compostos do capítulo 2.1 | 66 |
| 4.1.2 Síntese dos compostos do capítulo 2.2 | 76 |
| 4.1.3 Síntese dos compostos do capítulo 2.3 | 84 |
| 4.1.4 Síntese dos compostos do capítulo 2.4..... | 93 |
| 4.2 Avaliação da Atividade Antagonística sobre o NMDAR | 101 |
| 5. Referências | 102 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - O aminoácido excitatório glutamato..... | 1 |
| Figura 2 - A superfamília dos iGluR. | 2 |
| Figura 3 - Representação do funcionamento dos iGluR..... | 3 |
| Figura 4 - Estrutura tridimensional de um recetor AMPA funcional. | 4 |
| Figura 5 - Representação dos vários locais de inibição e modulação de um NMDAR | 5 |
| Figura 6 - Estruturas dos compostos D-APV e cis-2,3-PDA | 6 |
| Figura 7 - Derivados da 2-(carboxi)-ciclopropil-glicina (CCG). | 7 |
| Figura 8 - Estruturas dos compostos CPP e CGS-19755. | 7 |
| Figura 9 - Estrutura do composto SDZ EAB 515..... | 8 |
| Figura 10 - Ligandos do NMDAR que actuam no sítio de ligação da glicina.. | 8 |
| Figura 11 - Estruturas de derivados do ácido quinúrico..... | 9 |
| Figura 12 - Requisitos estruturais do pocket da glicina. | 10 |
| Figura 13 - Estruturas de derivados do 2-carboxi-indole. | 10 |
| Figura 14 - Estruturas dos derivados quinoxaledionas. | 11 |
| Figura 15 - Estruturas de derivados quinolona..... | 11 |
| Figura 16 - Estruturas dos primeiros bloqueadores de canal do NMDAR..... | 12 |
| Figura 17 - Estruturas de derivados do MK-801. | 13 |
| Figura 18 - Derivados de adamantano..... | 14 |
| Figura 19 - Estrutura do Ifenprodil..... | 15 |
| Figura 20 – Ifenprodil complexado com as subunidades NR1 e NR2B..... | 16 |
| Figura 21 - Estrutura de um análogo do Ifenprodil, o Ro-25,6981..... | 17 |
| Figura 22 – Ro-25,6981 complexado com as subunidades NR1 e NR2B..... | 17 |
| Figura 23 - Estrutura do TCN-201. | 18 |
| Figura 24 - Estrutura do QNZ46 | 18 |
| Figura 25 - Estrutura do DQP1105..... | 19 |
| Figura 26 - Estruturas das oxazolidinas descritos como antagonistas dos NMDAR em 2009 | 20 |
| Figura 27 - Estruturas dos alcalóides do <i>Choto-san</i> responsáveis pela atividade neuroprotetora. | 21 |
| Figura 28 – Objectivos desta dissertação. | 21 |
| Figura 29 – Estrutura cristalográfica do composto 50d..... | 26 |

| | |
|--|----|
| Figura 30 - Correlações detectadas por NOESY no composto 51b. | 28 |
| Figura 31 - Correlações observadas no NOESY do composto 52a..... | 30 |
| Figura 32 - Conformações de menor energia das oxazolo-piperidonas.. | 38 |
| Figura 33 – Estratégia de <i>docking</i> adotada..... | 56 |
| Figura 34 – Validação do <i>docking</i> molecular no sitio de ligação da glicina..... | 57 |
| Figura 35 – Validação do <i>docking</i> molecular no sítio de ligação do Ifenprodil..... | 58 |
| Figura 36 - Estratégia farmacofórica adotada. | 59 |
| Figura 37 – Validação do farmacóforo dos inibidores do sítio de ligação da glicina | 61 |
| Figura 38 – Validação do farmacóforo dos inibidores do sítio de ligação do glutamato | 61 |
| Figura 39 – Validação do farmacóforo dos bloqueadores de canal..... | 62 |
| Figura 40 – Validação do farmacóforo dos inibidores das subunidades NR1-NR2.63 | |

Índice de Esquemas

| | |
|--|----|
| Esquema 1 - Proposta de retróssíntese para oxazolo-pirrolidonas. | 23 |
| Esquema 2 - Mecanismo de reação proposto, para as reações de ciclocondensação de aminoalcoóis com β -oxo-acidos/esteres. | 24 |
| Esquema 3 - Síntese de oxazolo-isoindolinonas derivadas de <i>S</i> -aminoalcoóis. | 24 |
| Esquema 4 - Síntese das oxazolo-isoindolinonas derivadas de <i>R</i> -aminoalcoóis. | 25 |
| Esquema 5 - Racional para os rendimentos observados na síntese de oxazolo-isoindolinonas. | 26 |
| Esquema 6 - Síntese das oxazolo-pirrolidonas derivadas de <i>S</i> -aminoalcoóis. | 28 |
| Esquema 7 - Síntese da oxazolo-pirrolidona 52f derivada do <i>S</i> -Leucinol. | 32 |
| Esquema 8 - Síntese de oxazolo-pirrolidonas derivadas de <i>R</i> -aminoalcoóis. | 33 |
| Esquema 9 - Vantagens da estratégia de síntese de oxazolo-piperidonas. | 34 |
| Esquema 10 - Síntese de oxazolo-piperidonas derivadas do <i>S</i> -triptofanol. | 35 |
| Esquema 11 - Mecanismo proposto para a ciclocondensação de aminoalcoóis enantiopuros, com γ -oxo-esteres. | 35 |
| Esquema 12 - Síntese das oxazolo-piperidonas derivadas do <i>R</i> -triptofanol. | 36 |
| Esquema 13 - Síntese dos análogos do composto 57a a partir de <i>R</i> -aminoalcoóis. | 40 |
| Esquema 14 - Modulação da ligação NH-indole do composto 57a. | 40 |
| Esquema 15 - Estratégia adotada para sintetizar análogos dos produtos ativos Hirsutina (48) e Hirsuteína (49). | 42 |
| Esquema 16 - Síntese estereoseletiva de Indolo[2,3- <i>a</i>]quinolizidinas derivadas do <i>S</i> -triptofanol. | 42 |
| Esquema 17 - Síntese estereoseletiva de Indolo[2,3- <i>a</i>]quinolizidinas derivadas do <i>R</i> -triptofanol. | 43 |
| Esquema 18 - Mecanismo proposto para a síntese estereoseletiva de Indolo[2,3- <i>a</i>]quinolizidinas com HCl. | 44 |
| Esquema 19 - Mecanismo proposto para a síntese estereoseletiva de Indolo[2,3- <i>a</i>]quinolizidinas com o procedimento b. | 45 |
| Esquema 20 - Remoção do apêndice hidroximetilo por reação radicalar. | 48 |
| Esquema 21 - Estratégia adotada para a síntese de análogos dos spiro-oxoindoles ativos como antagonistas do NMDAR presentes na <i>Uncaria Sinensis</i> | 49 |
| Esquema 22 - Síntese das lactamas 80-82 derivadas do <i>S</i> - triptofanol. | 49 |
| Esquema 23 - Síntese das lactamas 83 e 84 derivadas do <i>R</i> - triptofanol. | 50 |

| | |
|--|----|
| Esquema 24 - Síntese da lactama 85 derivada do <i>R</i> -triptofanol..... | 50 |
| Esquema 25 - Proposta de mecanismo para a síntese de spiro-indolinas a partir de oxazolo-lactamas <i>N</i> -protegidas com grupos aril-sulfonamida..... | 51 |
| Esquema 26 - Síntese das spiro-indolinas derivadas do <i>S</i> -triptofanol..... | 51 |
| Esquema 27 - Síntese das spiro-indolinas derivadas do <i>R</i> -triptofanol. | 52 |
| Esquema 28 - Modulação da spiro-indolina 86..... | 53 |
| Esquema 29 - Esquema reacional para a modulação da spiro-indolina 91. | 53 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Rendimentos obtidos para a síntese de oxazolo-isoindolinonas partindo de <i>S</i> -aminoalcoóis. | 24 |
| Tabela 2 - Rendimentos obtidos para a síntese de oxazolo-isoindolinonas derivadas de <i>R</i> -aminoalcoóis. | 25 |
| Tabela 3 - Desvios químicos de ¹ H RMN observados para as oxazolo-isoindolinonas 50a-e. | 27 |
| Tabela 4 - Rendimentos obtidos para a síntese de oxazolo-pirrolidonas derivadas de <i>S</i> -aminoalcoóis. | 29 |
| Tabela 5 - Desvios químicos δ (ppm) observados em experiências de RMN com os derivados 52a-e. | 29 |
| Tabela 6 - Atividades biológicas das oxazolo-isoindolinonas como antagonistas do NMDAR. | 31 |
| Tabela 7 - Atividades biológicas das oxazolo-pirrolidonas como antagonistas NMDAR. | 32 |
| Tabela 8 - Atividades biológicas dos novos derivados de oxazolo-pirrolidona. | 33 |
| Tabela 9 - Rendimentos obtidos nas reações de ciclocondensação entre γ-oxo-ésteres e <i>S</i> -triptofanol. | 36 |
| Tabela 10 - Rendimentos nas sínteses de oxazolo-piperidonas derivadas do <i>R</i> -triptofanol. | 37 |
| Tabela 11 - Análise dos desvios químicos δ (ppm) dos prótons H-8a e H-3. | 37 |
| Tabela 12 - Atividades biológicas das oxazolo-pirrolidonas como antagonistas do NMDAR. | 39 |
| Tabela 13 - Atividades biológicas dos novos derivados oxazolo-piperidonas, análogos do composto 57a. | 41 |
| Tabela 14 - Rendimentos obtidos para a síntese de Indolo[2,3- <i>a</i>]quinolizidinas derivadas do <i>S</i> -triptofanol. | 43 |
| Tabela 15 - Rendimentos obtidos para a síntese de Indolo[2,3- <i>a</i>]quinolizidinas derivadas do <i>R</i> -triptofanol. | 43 |
| Tabela 16 - Atividades biológicas das Indolo[2,3- <i>a</i>]quinolizidinas sintetizadas. | 46 |
| Tabela 17 - Desvios químicos δ (ppm) observados para as spiro-indolinas 80 – 85. | 52 |
| Tabela 18 - Atividades biológicas das spiro-indolinas. | 54 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| 3DQ SAR | Relações quantitativas estrutura-atividade tridimensionais |
| AMPA | ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolepropanóico |
| ATD | Domínio amino-terminal |
| BHE | Barreira hemato-encefálica |
| TD | Domínio C-terminal |
| DA | Doença de Alzheimer |
| D-APV | d-(-)-2-amino-5-ácido-2-fosfonopentanóico |
| DH | Doença de Huntington |
| DP | Doença de Parkinson |
| ED ₅₀ | Dose efetiva para 50% da população |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| HTS | <i>High-throughput screening</i> |
| IC ₅₀ | Concentração inibitória para 50% da população |
| iGluR | Recetores ionotrópicos do glutamato |
| KAR | Recetores do ácido caínico |
| LBD | Domínio de ligação de agonistas |
| MOE | Molecular Operating Environment |
| NMDAR | Recetor <i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato |
| NOE | Efeito nuclear de <i>Overhauser</i> |
| NOESY | Espectroscopia de efeito nuclear de <i>Overhauser</i> |
| PCP | Fenilciclidina |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| RMSD | Raiz quadrada do desvio quadrático |
| SAR | Relações estrutura-atividade |
| SNC | Sistema nervoso central |
| TM | Domínio transmembranar |

1. Introdução

1.1 O Recetor *N*-Metil-*D*-Aspartato e a Neurodegeneração

As doenças neurodegenerativas são um dos maiores flagelos da sociedade, em particular nos países desenvolvidos onde a esperança média de vida é maior na medida em que os indivíduos que sofrem destas patologias são muitas vezes confrontados com a falta de terapias adequadas para a cura total. Atualmente o tratamento mais comum passa pela administração de medicamentos para utilização crónica que apenas atrasam os processos bioquímicos inerentes à evolução da enfermidade [1].

Em várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (DA), Parkinson (DP) e Huntington (DH), são observados episódios de excitotoxicidade que culminam com a extensa morte celular - apoptótica ou necrótica - do tecido nervoso [2]. Este fenómeno ocorre após a

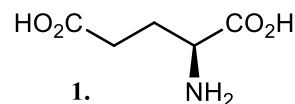


Figura 1 - O aminoácido excitatório glutamato (1).

acumulação na fenda sinática de Glutamato (**Figura 1**), um neurotransmissor responsável por cerca de 40% das sinapses no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos [3]. As suas propriedades agonistas sobre os recetores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDAR) desencadeiam uma série de estímulos intracelulares que, em caso de ativação excessiva, poderão induzir a apoptose ou necrose da célula neuronal [4].

Os mecanismos bioquímicos que estão na origem destas alterações celulares estão relacionados com o rápido aumento da permeabilidade do Ca^{2+} para o meio intracelular [5], o que dará origem à despolarização membranar mitocondrial e a consequente libertação de fatores pró-apoptóticos no citosol [6, 7]. No entanto, o influxo normal de Ca^{2+} através destes recetores faz parte de uma orquestra bem sincronizada de sinalizações intracelulares que são fundamentais para a plasticidade sinática.

A inovação biotecnológica nas recentes décadas tem permitido aos cientistas desvendar os pormenores dos mecanismos bioquímicos que estão na base das doenças neurodegenerativas. Desta forma tem sido possível encontrar novos alvos biológicos cuja função possa ser modulada de modo a controlar os avanços da neurodegeneração. Em relação aos NMDAR, nos últimos 30 anos foi possível elucidar a sua localização celular, a sua expressão ao longo do SNC e as funções sinalizadoras intracelulares das diferentes isoformas destes recetores.

Os recentes avanços na elucidação da estrutura tridimensional do recetor têm vindo a manter vivo o interesse terapêutico no desenvolvimento de fármacos que apresentem um perfil de efeitos secundários toleráveis. Um caso particular de sucesso no desenvolvimento de antagonistas NMDAR é a aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA), da administração da memantina, para reduzir a progressão da doença de Alzheimer em fase avançada [8].

Entender a relação entre estrutura e função dos NMDAR pode demonstrar-se útil na elucidação dos mecanismos de transmissão sináptica, na revelação dos mecanismos fisiopatológicos de diversas condições do SNC, bem como na conceção eficaz de novos compostos com propriedades moduladoras da sua atividade.

1.2 Recetores Ionotrópicos do Glutamato

Os recetores ionotrópicos do glutamato (iGluR) encontram-se largamente difundidos pelo SNC dos vertebrados sendo os principais responsáveis pela transmissão sináptica excitatória. Os iGluR são classificados em 3 subgrupos de acordo com a afinidade de três agonistas (**Figura 2**). Existem os recetores do ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolepropanóico (AMPA), recetores do ácido caínico (KAR) e recetores do ácido *N*-metil-*D*-aspartato (NMDAR). São ainda classificados em 18 subtipos com base nos genes que codificam isoformas destas proteínas transmembranares com propriedades e funções distintas no SNC [9].

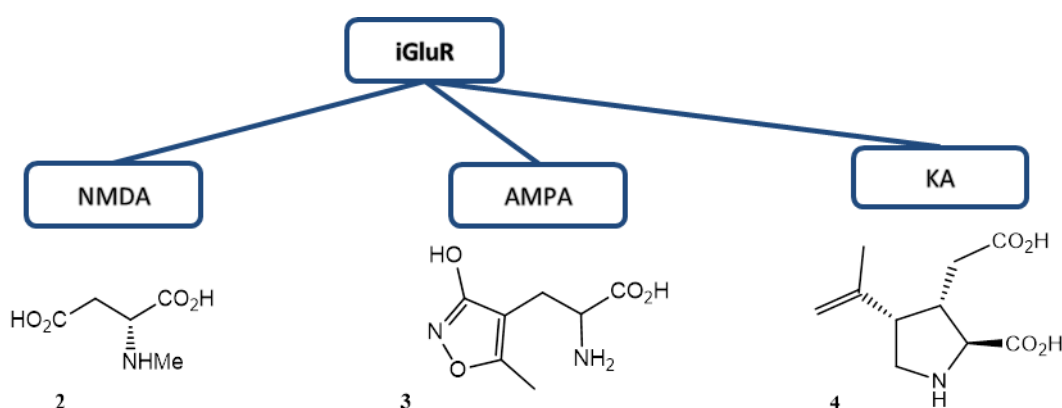


Figura 2 - A superfamília dos iGluR. 2 - ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolepropanóico; 4 - ácido caínico.

A presença de vários tipos de iGluR na fenda sináptica dá origem a uma interação extremamente afinada – ao ocorrer uma estimulação dos AMPAR, alteram-se os potenciais de voltagem membranares que por sua vez ativa a permeabilidade dos

NMDAR ao Ca^{2+} de forma a restabelecer o potencial de membrana (**Figura 3**). Já os KAR regulam o grau de excitabilidade do neurónio e, juntamente com os AMPAR, não apresentam afinidade para o ácido *N*-Metil-*D*-Aspartato.

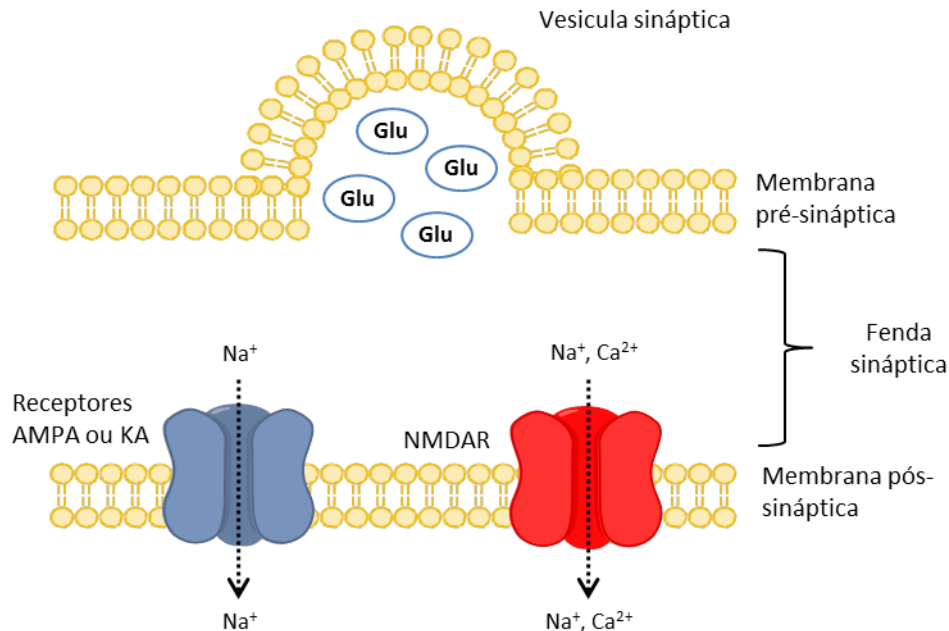


Figura 3 - Representação do funcionamento dos iGluR. O glutamato libertado na sinapse, ativa os iGluR que permitem a entrada de iões Na^+ e Ca^{2+} para o interior do neurónio.

1.3 Arquitetura Molecular dos NMDAR

Os NMDAR apresentam características estruturais bastante distintas dos restantes iGluR, o que tem feito surgir o interesse na elucidação da sua estrutura quaternária e mecanismos de associação. Os NMDAR que participam na plasticidade sináptica são heterómeros tetraméricos formados por diferentes combinações de subunidades classificadas de NR1, NR2 e NR3. As subunidades NR2 e NR3 possuem ainda um conjunto de isoformas que se classificam de NR2A-D e NR3A-B. A associação de 4 subunidades, em que existe pelo menos um dímero do tipo NR1-NR2 [10], forma um poro iónico na zona membranar [11]. A forma como as diferentes subunidades se associam, dá origem a quatro domínios distintos designados por domínio amino-terminal (ATD), domínio de ligação de agonistas (LBD), domínio transmembranar (TM) e já no interior da célula, o domínio C-terminal (TD) (**Figura 4**). A grande variedade de subunidades origina recetores com diferentes propriedades tais como a afinidade agonística, mecanismos de sinalização intracelular e regulação alostérica [12].

Estas diferenças nas propriedades bioquímicas dos NMDAR são detetadas ainda durante o desenvolvimento do SNC e sofrem alterações em indivíduos adultos [13].

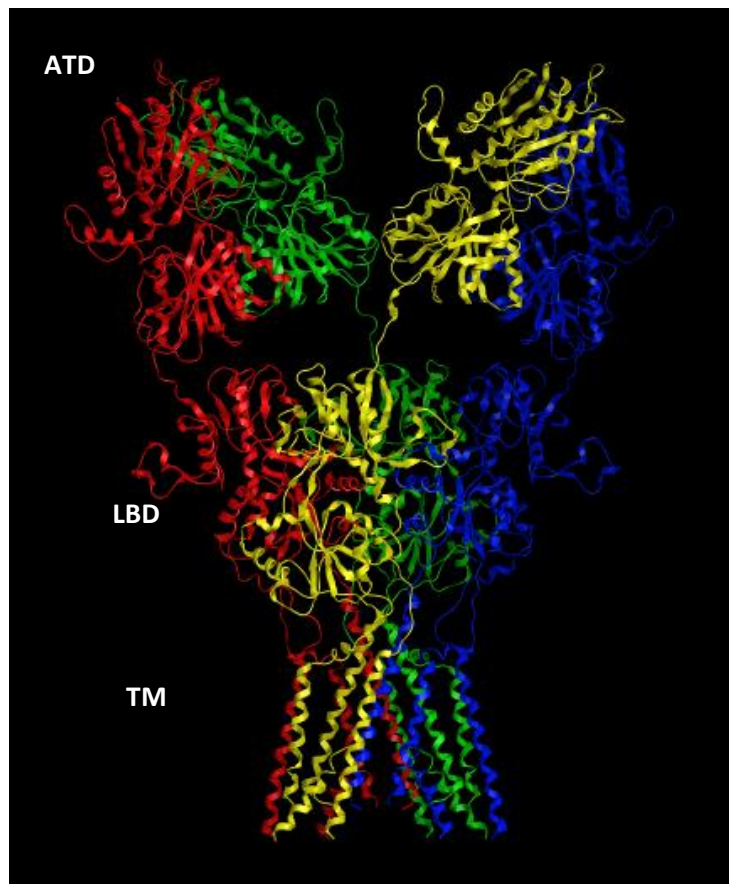


Figura 4 - Estrutura tridimensional de um AMPA funcional, usada para estudar a estrutura quaternária de um NMDAR. ATD – Domínio amino-terminal; LBD – Domínio de ligação de agonistas; TM – Domínio transmembranar. As diferentes subunidades estão representadas com as cores vermelha, amarela, verde e azul.

Outra importante característica a ter em consideração sobre os NMDAR no contexto da sua influência na morte celular, é o fato da consequência do influxo de Ca^{2+} variar consoante a localização do recetor ao longo da membrana neuronal [14]. Os recetores sinápticos localizados na membrana da zona sináptica quando ativados pelo glutamato libertado durante a sinapse [15], dão origem a estímulos intracelulares de pró-sobrevivência. Por outro lado, a ativação de recetores extrasinápticos localizados fora do espaço sináptico anula as vias de sobrevivência celular [6].

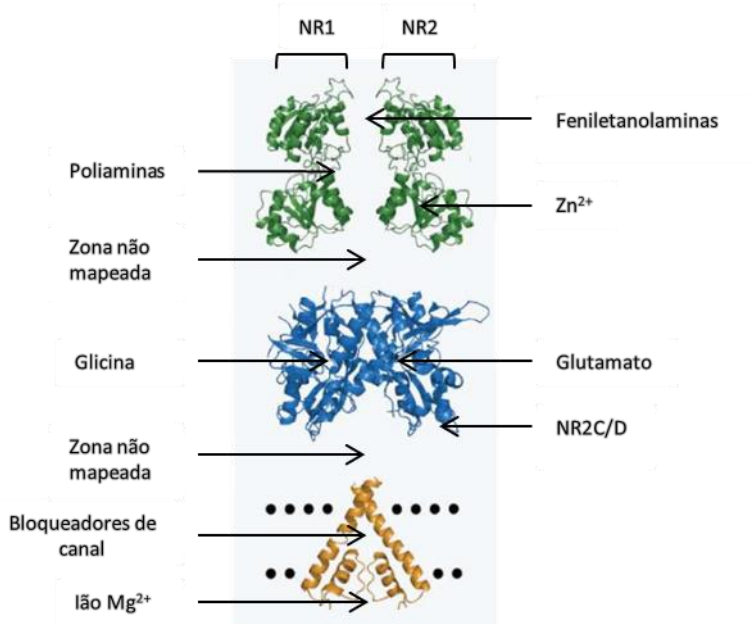
Como a maioria dos antagonistas NMDAR inicialmente desenvolvidos demonstraram efeitos secundários intoleráveis em ensaios clínicos [16], o aprofundar do conhecimento sobre a organização molecular destes recetores deu origem a uma estratégia terapêutica que passa pelo desenvolvimento de agentes moduladores dos recetores extrasinápticos, cuja atividade desequilibra a sinalização das vias de viabilidade

neuronal. Estes recetores são enriquecidos em subunidades NR2B [17]. Atualmente estas subunidades representam alvos biológicos muito interessantes pois a sua localização encontra-se restrita a determinadas zonas do SNC, o que pode reduzir os efeitos secundários normalmente observados em ensaios clínicos [18].

1.4 Desenvolvimento de Antagonistas dos NMDAR

Existem inúmeras famílias de compostos que atuam nos NMDAR. Para facilitar o seu estudo e comparar vantagens e desvantagens entre eles, os vários antagonistas destes recetores são classificados de acordo com o seu modo de ação. Os antagonistas podem ser competitivos se atuarem no sítio de ligação da Glicina ou do Glutamato, podem ser não competitivos como os bloqueadores do canal iónico, ou podem mesmo atuar de forma alostérica induzindo alterações nos sítios de ligação. De forma a exercerem a sua função biológica, os NMDAR necessitam da ligação simultânea de dois

agonistas endógenos – a glicina no LBD da subunidade NR1 e o glutamato no LBD da subunidade NR2 [11]. A ligação destes dois agonistas, em conjunto com a variação do potencial de membrana, promove a libertação do íon magnésio (Mg^{2+}) que bloqueia o poro iónico



[19] (Figura 5). As diferenças estruturais

Figura 5 - Representação dos vários locais de inibição e modulação de um NMDAR

entre os vários tetrâmeros já levaram à descoberta de vários inibidores não-competitivos seletivos para as subunidades NR2A, NR2B e NR2C-D. Outra particularidade destes recetores, envolve a existência de um sítio de ligação modulatório da sua atividade através da ligação de poliaminas endógenas como a espermina e também de alguns

esteróides [20], um local para ligação do ião zinco (Zn^+) [21] e um local de ligação de feniletanolaminas [22].

1.4.1 Antagonistas Competitivos – Sítio do Glutamato

A estratégia inicial na procura de antagonistas deste sítio de ligação passou pelo desenvolvimento de compostos que mimetizavam o seu ligando endógeno, o glutamato. Os registos que descrevem os primeiros antagonistas do sítio do glutamato surgiram no início da década de 80 (**Figura 6**). O D-APV (**5**) (também conhecido por AP-5, $K_i = 1.4 \mu M$ (NMDAR)) apresenta um grupo fosfato separado por uma cadeia alquílica linear de um grupo carboxílico com uma α -amina [23, 24]. Já o cis-2,3-PDA (**6**) apresenta uma estrutura mais rígida que o D-APV, e demonstrou reduzir as correntes elétricas geradas pelos NMDAR em experiências eletrofisiológicas bem como atividade antidepressiva *in vivo* [25].

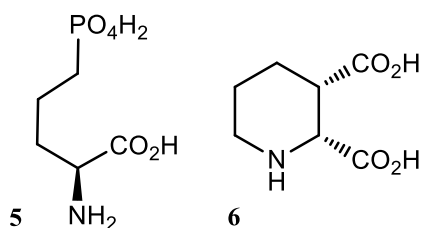


Figura 6 - Estruturas dos compostos **5** (D-APV) e **6** (cis-2,3-PDA).

Os primeiros estudos com derivados da 2-(carboxi)-ciclopropil-glicina (CG) (**Figura 7**) deram origem às primeiras ideias sobre qual era a conformação ativa do glutamato [26, 27]. Nestes estudos, foi avaliada a capacidade agonística de oito estereoisómeros da CG sobre as voltagens geradas pelo NMDAR. O isómero **7** demonstrou ser 5 vezes mais potente que o *N*-metil-*D*-aspartato tendo sido revelada a conformação ativa do glutamato (**9**).

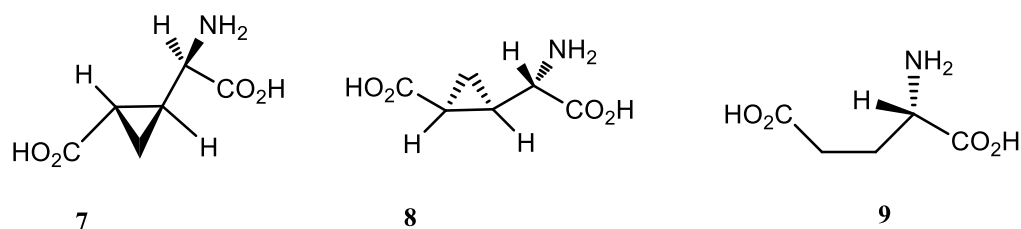


Figura 7 - Derivados da 2-(carboxi)-ciclopropil-glicina (CCG). **7** - D-CCG-II; **8** - L-CCG-IV; **9** - a conformação activa do glutamato.

Uma vez na posse de informações sobre os requisitos estruturais de antagonistas deste sítio de ligação, surge o composto CPP (**10**) (**Figura 8**). Este análogo rígido do D-composto **5** exibiu um IC_{50} de 8 μ M na libertação de acetilcolina induzida pelo *N*-metil-*D*-aspartato [28]. Quase simultaneamente, surge o composto CGS-19755 (**11**) que reunia as características rígidas do D-APV (**5**) e a estereoquímica do cis-2,3-PDA (**6**). Foi talvez o antagonista mais importante desenvolvido para este sítio de ligação - apresentou um $IC_{50} = 50$ nM, $[H^3]$ -CPP e não tem afinidade para os restantes iGluR. É ativo por administração oral, exibindo propriedades anti-convulsantes ($ED_{50} = 2.0$ mg/kg, i.p.) em ratos [29]. O composto **11** chegou mesmo a entrar em ensaios clínicos que infelizmente foram descontinuados devido a efeitos secundários que envolviam halucinações e neurotoxicidade [30].

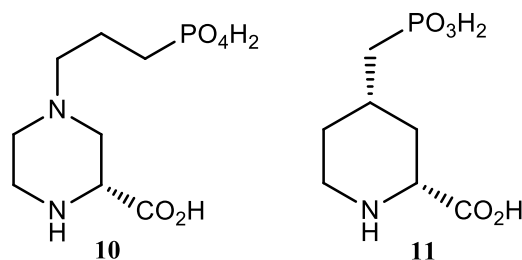


Figura 8 - Estruturas dos compostos **10** – CPP; **11**- CGS-19755.

Os problemas associados com o atravessamento da BHE impulsionaram o aparecimento de antagonistas com maior biodisponibilidade. É o caso do composto SDZ EAB 515 (**12**, **Figura 9**), que apresentou um IC_{50} entre 1.3 – 5.6 μ M, $[H^3]$ -CGS 19755. Através das experiências realizadas com este composto, surgiu a hipótese de que existe um *pocket* no sítio de ligação do glutamato com o qual se estabelecem interações hidrofóbicas com os grupos fenilo [31, 32]. Para além do aumento das propriedades lipofílicas, a existência de uma estereoquímica *S*, permite que estes compostos

atravessem a barreira hemato-encefálica através de um sistema de *uptake* de aminoácidos o que lhes confere uma maior capacidade de penetração na BHE [33].

Atualmente existem vários farmacóforos disponíveis que elucidam os principais pontos de ligação, volume e propriedades estereoeletrónicas desta classe de antagonistas. As principais interações entre esta classe de antagonistas e os resíduos do sítio de ligação são de carácter iónico e envolvem o grupo α -amino, o α -ácido e o grupo ácido terminal [34].

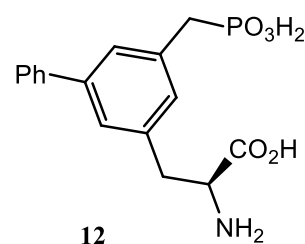


Figura 9 - Estrutura do composto **12** - SDZ EAB 515.

1.4.2 Antagonistas Competitivos – Sítio da Glicina

Em 1987, foi demonstrado que a glicina (**13**, **Figura 10**) funciona como estimulante da abertura do canal iónico. Os compostos que se pretendia que atuassem neste sítio de ligação teriam a árdua tarefa de disputar a ligação aos recetores com os elevados níveis endógenos de glicina que existem na fenda sinática [35].

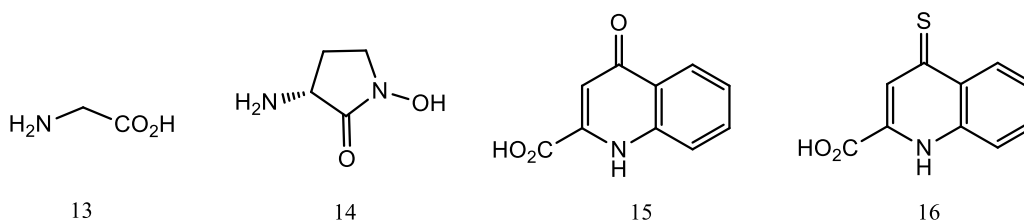


Figura 10 - Ligandos do NMDAR que actuam no sítio de ligação da glicina. **13** - glicina; **14** - *R* - HA966; **15** - Ácido Quinúrico; **16** - ácido tioletinúrico.

O *R*-HA966 (**14**) apresenta uma pequena estrutura cíclica que lhe confere relativa rigidez e juntamente com o ácido quinúrico (**15**), foram os primeiros compostos classificados como antagonistas do sítio da glicina. Em estudos de eletrofisiológicos, os compostos **14** e **15** provocaram a diminuição da voltagem gerada pelos NMDAR de forma dose-dependente em concentrações entre 10 μ M – 3.16 mM sendo que esta foi a primeira vez que se observou uma inibição competitiva no sítio da glicina [36].

A resolução ótica da mistura racémica do HA966 permitiu elucidar existência de enantioselectividade por parte do NMDAR. Ficou provado que o enantiómero **14** é o

isómero responsável pela atividade com um IC_{50} de 4.1 μM ($[H^3]$ -glicina), seguido da mistura racémica com um IC_{50} de 11.2 μM e finalmente, o isómero *S* com IC_{50} superior a 900 μM [37]. Estudos *in vivo* demonstraram a capacidade neuroprotetora do composto **14** em situações de excitotoxicidade mediada pelo glutamato [38, 39].

A descoberta do ácido quinúrico (**15**, **Figura 10**) como antagonista do sítio da glicina foi revolucionária, na medida em que se pensava que o sítio da glicina só tolerava pequenas moléculas. O seu primeiro derivado com um cloro na posição 7 do anel aromático exibiu um, IC_{50} de 0.56 μM ($[H^3]$ -glicina). Em experiências de seletividade entre os sítios de ligação da glicina e do glutamato ficou provado que este derivado era cerca de 70x mais seletivo que o ácido quinúrico original [40]. Modificações no carbonilo do composto **15** levam à retenção da afinidade. Em experiências *in vitro*, o ácido tiolquinúrico **16** apresentou um IC_{50} de 9 μM ($[H^3]$ -glicina) ao passo que o composto **15** apresentou um IC_{50} de 25 μM [41]. Os estudos realizados sobre o melhor padrão de substituição deram origem a vários derivados muito potentes, concretamente o ácido 5,7-dicloro-quinúrico (**Figura 11**) (**17**, 5,7-DCKA, $K_i = 79$ nM, $[H^3]$ -glicina) [42] e o ácido (5-Iodo,7-Cloro)-quinúrico ($K_i = 29$ nM, $[H^3]$ -glicina) [43]. O composto **18** apresentou IC_{50} de 2.31 μM ($[H^3]$ -glicina). A mesma saturação em conjunto com a redução do carbonilo resultou na redução de potência do composto **19** ($IC_{50} = 6.39$ μM). [44].

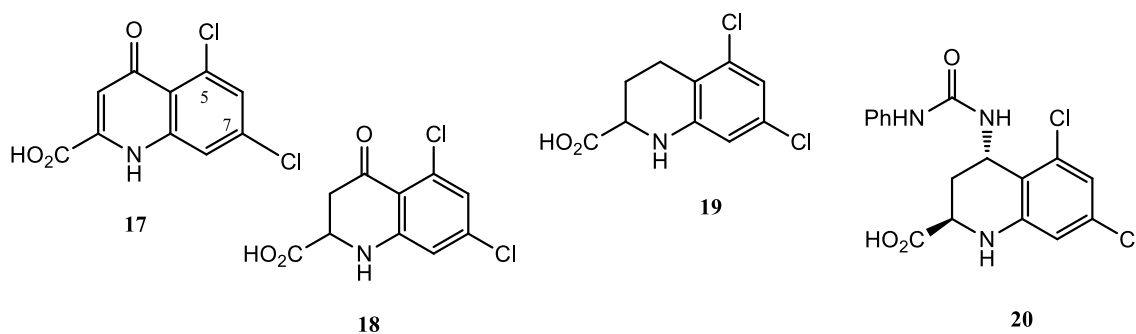


Figura 11 - Estruturas de derivados do ácido quinúrico. **17** – 5,7-DCKA; **18** – derivado com o anel heteroaromático saturado; **19** – derivado com saturação no anel aromático e carbonilo reduzido; **20** – L-689,560.

Os extensos estudos SAR (relações estrutura-atividade) realizados em torno da estrutura do 5,7-DCKA, deram origem a um dos mais potentes antagonistas do sítio da glicina desenvolvidos até à data, o L-689,560 (**20**) que apresenta um IC_{50} de 7.8nM ($[H^3]$ -glicina). A elevada afinidade exibida por este composto, permitiu a sua utilização

como marcador radioativo para elucidar os requisitos estruturais do *pocket* da glicina. Estas observações estão sumarizadas na **Figura 12** [45].

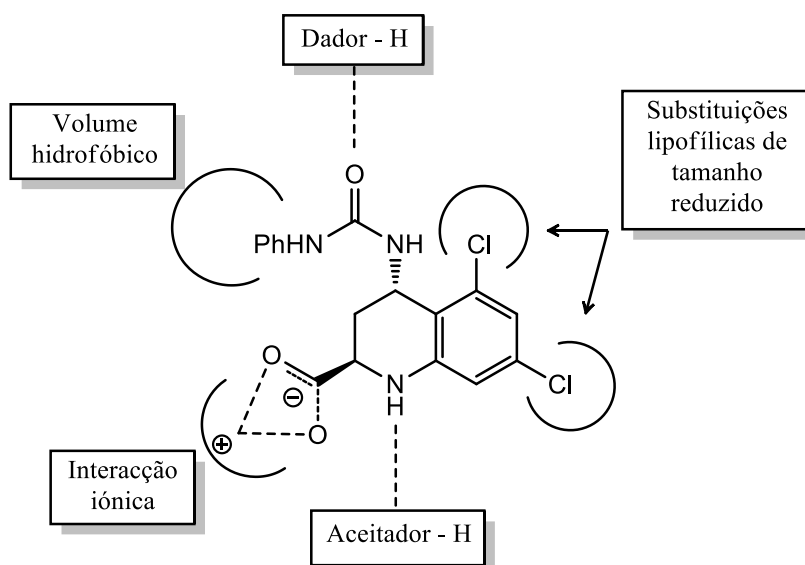


Figura 12 - Requisitos estruturais do pocket da glicina, aqui representados com o L-689,560 (**20**).

Uma vez elucidado o farmacóforo para o sítio da glicina, rapidamente surgiram novas famílias de antagonistas NMDAR. É de destacar a família dos 2-carboxil-indoles, as quinoxalinadionas e as quinolonas. Os derivados 2-carboxil-indoles (**Figura 13**) exibem as características do farmacóforo da **Figura 12**. O composto **21** exibiu um IC_{50} de 106 μM ($[H^3]$ -glicina). Ao acrescentar uma cadeia de ácido propanóico na posição 3 do indole (**22**), o IC_{50} detetado foi de 27 μM ao passo que o ácido quinúrico apresentou um IC_{50} de 16 μM . A posterior derivatização ao redor da estrutura do ácido 2-carboxil-indole-3-propanóico deu origem ao MDL-29,951 (**23**) que apresentou um IC_{50} de 140 nM [46, 47].

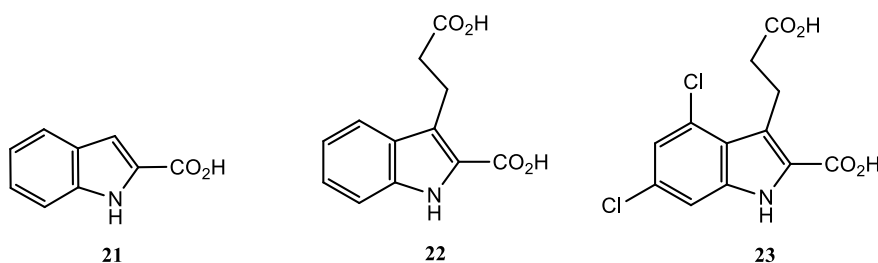


Figura 13 - Estruturas de derivados do 2-carboxil-indole. O composto **23** (MDL-29,951) é o antagonista mais potente desta família.

As quinoxalinas (24, **Figura 14**) foram inicialmente descritas como antagonistas dos recetores AMPA mas pouco tempo depois, ficou demonstrada a sua ação como antagonistas do NMDAR [48]. As subsequentes alterações efetuadas tinham como objetivo aumentar a seletividade entre estes dois recetores. Alterações no padrão de substituição do anel aromático, resultaram num aumento de afinidade mas não no aumento da seletividade – o composto CNQX (25) exibiu um IC_{50} de 14 μ M e 0.3 μ M em experiências com $[H^3]$ -glicina e $[H^3]$ -AMPA respetivamente o que demonstra alguma falta de seletividade entre o NMDAR e o AMPA. Já o composto 26 com um grupo nitro, exibiu um IC_{50} de 1.0 μ M ($[H^3]$ -glicina) e 2.4 μ M ($[H^3]$ -AMPA) [49]. O composto 27 foi sintetizado com o objetivo de explorar o espaço existente no *pocket* da glicina. A incorporação de um anel de 6 membros, aumentou drasticamente a afinidade (IC_{50} = 2.3 nM, $[H^3]$ -DCKA), e a seletividade em relação aos recetores AMPA (IC_{50} = 4600 nM, $[H^3]$ -AMPA) [50].

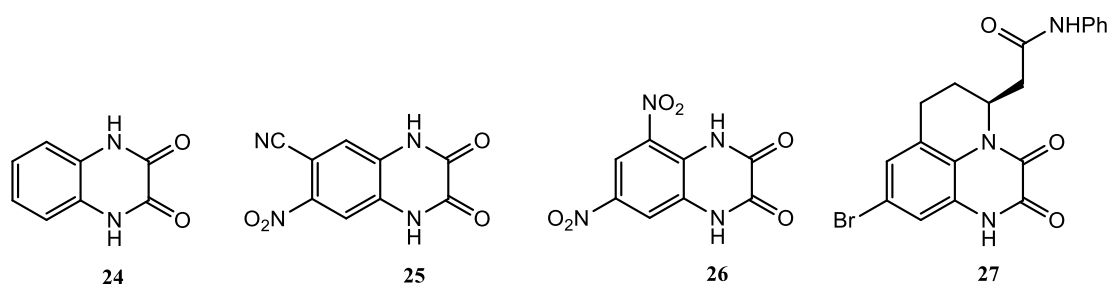


Figura 14 - Estruturas dos derivados quinoxalinedionas. O composto 27 é o composto desta série simultaneamente mais potente e mais selectivo entre NMDAR e recetores do AMPA.

As quinolonas foram inicialmente desenvolvidas com o objetivo de mimetizar simultaneamente, as características do ácido quinúrico e das quinoxalinedionas (**Figura 15**) [51]. O composto 28 demonstrou boa afinidade para ambos os recetores AMPA e NMDAR (K_i [NMDA] = 6.7 μ M, K_i [AMPA] = 9.2 μ M) e exibiu atividade anti-convulsiva (ED_{50} = 13.2mg/kg, i.p.) em ratos [52]. Através dos estudos SAR desenvolvidos com este tipo de estruturas foi possível encontrar o composto 29. Este composto demonstrou ser um antagonista muito potente (IC_{50} = 0.17 μ M, $[H^3]$ -L-689,560) e exibiu atividade anti-convulsiva (ED_{50} = 4.5 mg/kg, i.p.) em ratinhos [53].

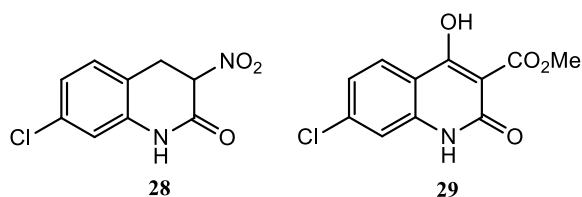


Figura 15 - Estruturas de derivados quinolona. O composto 29 revelou-se o mais potente desta série e exibiu atividade *in vivo*.

1.4.3 Antagonistas não-competitivos – Bloqueadores de Canal

Os bloqueadores do canal iónico atuam como antagonistas não-competitivos dos NMDAR que se alojam no domínio transmembranar do recetor. O acesso a este sítio de ligação faz-se de forma dependente de agonistas, ou seja, o poro necessita de estar aberto para que este género de compostos possa exercer a sua atividade biológica. Desta forma possuem uma seletividade para recetores excessivamente abertos não provocando uma inibição indiscriminada. Para além disso, este género de compostos apresenta alguma facilidade para atravessar a BHE devido à sua lipofilia e baixo peso molecular.

O primeiro composto identificado como bloqueador de canal foi a fenilciclidina (PCP) (**30**, **Figura 16**). Inicialmente sintetizada em 1926 foi patenteada na década de 50 pela indústria farmacêutica *Parke, Davis and Company* como anestésico sob o nome comercial *Sernyl* [54]. Com os primeiros estudos em modelos animais, verificou-se que atuava como estimulante do SNC a doses baixas e como antidepressivo a doses mais elevadas [55]. Em 1965 o seu desenvolvimento foi cancelado devido aos intoleráveis efeitos secundários em humanos, nomeadamente alucinações, delírios e desorientação [56, 57]. Em 1965, a mesma indústria farmacêutica numa outra tentativa de encontrar um anestésico alternativo ao PCP, desenvolveu a cetamina (**31**) [58]. No decorrer dos ensaios clínicos realizados com a cetamina, os pacientes queixaram-se de alucinações e distúrbios motores o que inviabilizou a sua utilização como agente terapêutico em humanos [59]. As propriedades psicotrópicas dos compostos **30** e **31** tornaram-nos em drogas recreativas de abuso de grande sucesso nas décadas de 70 e 80 [60]. Atualmente são usados como anestésicos em veterinária e no estudo da esquizofrenia em modelos animais [61, 62].

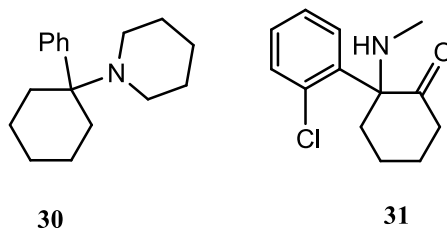


Figura 16 - Estruturas dos primeiros bloqueadores de canal do NMDAR. **30** - fenilciclidina (PCP); **31** - cetamina.

O MK-801 (**32**, **Figura 17**) surgiu em meados da década de 80. Foi sintetizado pelos laboratórios *Merck-Sharp and Dohme Research* na procura de novos moduladores

dos mecanismos de aminoácidos excitatórios do SNC. Ligandos desta família, apresentam estruturas rígidas formadas por grupos lipofílicos quase co-planares, orientados perpendicularmente a uma amina básica. As interações ligando-recetor são de caráter iónico através da amina protonada e também através de contatos hidrofóbicos com o grupo metilo e anéis aromáticos. Ficou provado que o MK-801 ($K_i = 37.2 \pm 2.7$ nM) atua de forma não competitiva no mesmo sítio de inibição que os compostos **30** e **31** em estudos com homogeneizado de fatias do cortex cerebral de rato [63].

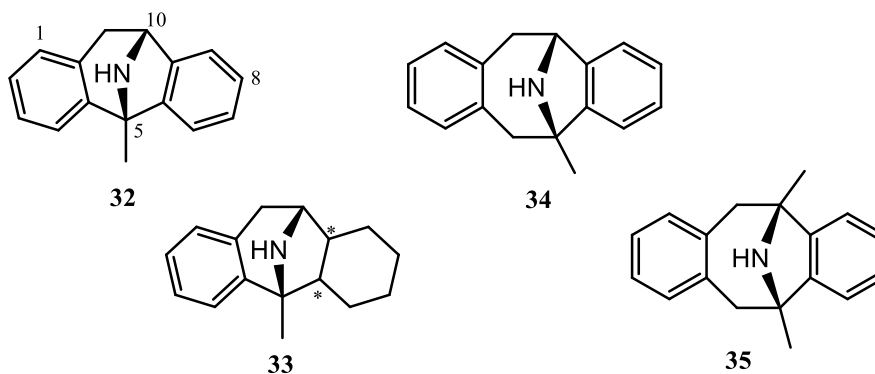


Figura 17 - Estruturas de derivados do MK-801 (32).

O seu modo de ação foi classificado como bloqueador de canal aberto. Estudos eletrofisiológicos provaram que o MK-801 apenas exerce a sua ação inibitória na presença de agonistas do NMDAR e não na presença de agonistas de outros iGluR [64]. Um estudo com derivados do MK-801 com os anéis saturados, demonstrou que a aromaticidade não é um requisito para a atividade, na medida em que o derivado com um anel saturado (**33**) apresentou um bom valor de atividade ($IC_{50} = 16$ nM, $[H^3]$ -MK-801)[65]. A introdução de um grupo isotiocianato na posição C-8, resulta na perda de atividade conduzindo a um IC_{50} de 100 nM [66]. Em estudos que utilizaram o MK-801 ($IC_{50} = 36$ nM) como controlo positivo, verificou-se que a introdução de um grupo metilo na posição C-10 ou C-3 gera derivados equipotentes com IC_{50} de 35 nM e 32 nM respetivamente. O aumento do anel central para 8 carbonos (**34**), resulta na perda de atividade ($IC_{50} = 86$ nM) mas o derivado **35**, com dois carbonos quaternários, apresenta retenção de atividade exibindo um IC_{50} de 30 nM. Em conjunto, os resultados obtidos demonstram que não existe muita tolerância para substituições muito volumosas na estrutura do MK-801 [67]. Estudos *in vivo* com derivados do MK-801, comprovaram a atividade anti-convulsiva desta família de compostos, sendo de destacar que o MK-801, apresentou um ED_{50} de 0.22mg/kg por administração intravenosa em ratos [68]. De

todos os bloqueadores de canal desenvolvidos até à data, destacam-se os derivados do adamantano (**Figura 18**), mais especificamente a memantina (**37**). Inicialmente sintetizada e patenteada pela *Eli Lilly and Company* em 1968 como anti-viral [69], foi apenas no final da década de 80 que as indústrias farmacêuticas *Merz-Pharma* detetaram a sua atividade neuroprotetora através da inibição dos NMDAR. Esta família de compostos apresenta uma boa afinidade e uma cinética de dissociação rápida, o que permite aos recetores manter uma atividade fisiológica normal reduzindo os efeitos secundários cognitivos [70]. A memantina exibe propriedades anti-descinésia em humanos [71] e atualmente encontra-se em comercialização sob os nomes Namenda® (*Forest*), Ebixa® e Abixa® (*Lundbeck*), Memox® (*Unipharm*), Axura® e Akatinol® (*Merz*), para tratamento da demência mental [72, 73]. A amantadina também foi aprovada nos EUA (*Symmetrel*®, *Endo Pharmaceuticals*) como anti-viral e para o tratamento dos sintomas da doença de Parkinson [74].

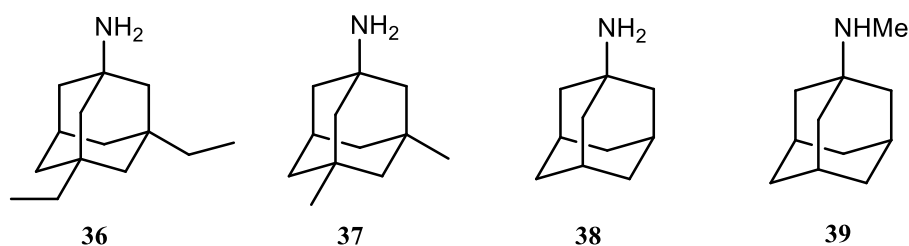


Figura 18 - Derivados de adamantano com propriedades antagonísticas sobre o NDMAR. A memantina (**37**) e a amantadina (**38**) são atualmente usados no estudo e tratamento de doenças neurodegenerativas.

No início da década de 90, foram publicados alguns estudos SAR com esta classe de compostos. Em experiências com homogeneizados de tecido *post-mortem* do cortex frontal humano, o composto **36** revelou-se como o adamantano mais potente com K_i de 0.19 μM ($[\text{H}^3]$ -MK-801). Já a memantina (**37**) apresentou um K_i de 0.54 μM e a amantadina (**38**) um K_i de 10.50 μM . Na amantadina, o aumento da basicidade da amina por introdução de um grupo metilo (**39**) resultou na perda de potência ($K_i = 21.72 \mu\text{M}$) [75]. Apesar da interação com o NMDAR ocorrer através da amina protonada, a diminuição de atividade do composto **39** está de acordo com os resultados obtidos para o MK-801, em que se destacou a falta de tolerância desta classe de compostos para a introdução de substituintes alquílicos.

1.4.4 Antagonistas não-competitivos – Subunidade NR2B

O desenvolvimento de antagonistas NMDAR seletivos entre subunidades tem permitido grandes avanços na elucidação dos mecanismos de funcionamento do recetor. Neste contexto, a subunidade NR2B tem vindo a adquirir especial interesse devido à sua localização restrita a determinadas zonas do cérebro. Em estudos que avaliaram a expressão genética das diferentes subunidades dos NMDAR, verificou-se que no cérebro adulto as subunidades NR2B estão localizadas em específicas zonas do cérebro, enquanto as subunidades NR1 estão virtualmente espalhadas por todo o SNC [76]. Esta observação pode ajudar a justificar os efeitos secundários mais toleráveis dos inibidores da NR2B em ensaios humanos para o tratamento da doença de Parkinson [77]. Já a nível subcelular, estudos recentes demonstram que os NMDAR extrasinápticos, responsáveis por estímulos de morte celular [6], estão mais enriquecidos com subunidades NR2B. Em conjunto, estas observações tornaram o Ifenprodil (**40**, **Figura 19**) no alvo de intensos estudos farmacológicos [15].

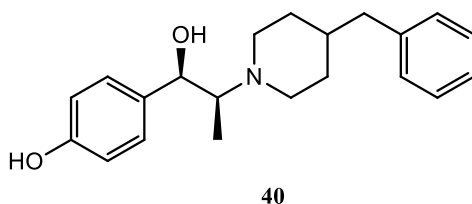


Figura 19 - Estrutura do Ifenprodil, o primeiro inibidor do NMDAR, selectivo para subunidades NR2B.

Apesar de inicialmente referido como vasodilatador cerebral, em 1988 ficou demonstrado que as propriedades neuroprotetoras se devem ao antagonismo não-competitivo dos NMDAR [78]. Em estudos eletrofisiológicos com subunidades NR1-NR2, o Ifenprodil demonstrou elevada seletividade para as subunidades NR1-NR2B, apresentando um IC_{50} de 0.43 μ M enquanto que para as subunidades NR1-NR2A apresentou um IC_{50} de 146 μ M. Para além de inibir preferencialmente a subunidade NR1-NR2B o tipo de inibição revelou-se não competitiva e não dependente de voltagem [79]. Em 2011, surgiu a primeira estrutura cristalográfica de uma subunidade NR1-NR2B. Foi possível elucidar as interações moleculares entre o Ifenprodil e o recetor (**Figura 20**) [80].

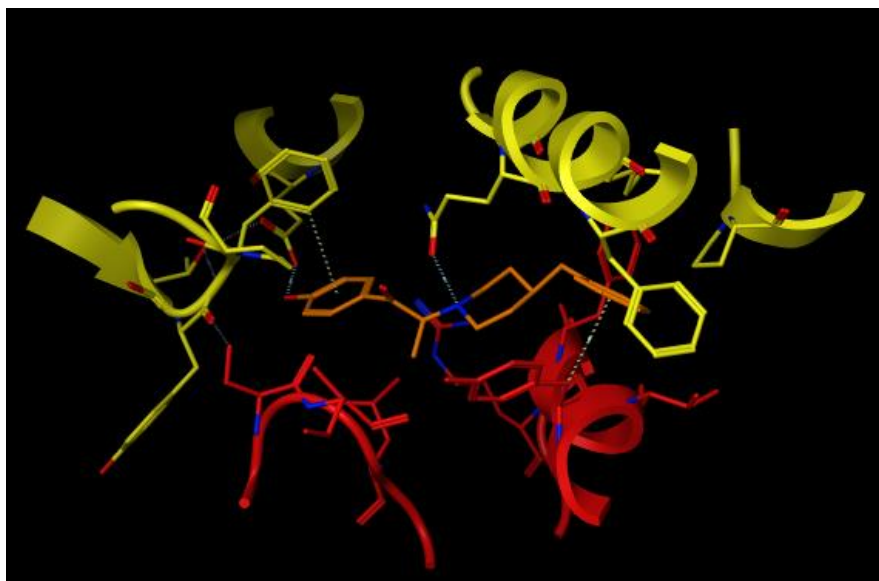


Figura 20 – Ifenprodil (laranja) complexado com as subunidades NR1 (vermelho) e NR2B (amarelo). São apenas representados os resíduos que definem o *pocket*. PDB: 3QEL.

As principais interações detetadas entre compostos da família do Ifenprodil e o NMDAR, são constituídas por uma ponte de hidrogénio com o álcool fenólico, um contato iónico com a amina protonada, e interações de sobreposição π - π .

Em 1997, as indústrias *F. Hoffmann-La Roche AG* descreveram o Ro-25,6981 (**41**, **Figura 21**) como antagonista seletivo das subunidades NR2B [81]. Este análogo do ifenprodil, apresentou valores de atividade muito interessantes para subunidades NR1-NR2B – $IC_{50} = 0.003 - 149 \mu\text{M}$, $[H^3]MK-801$ e em ensaios eletrofisiológicos, $IC_{50} = 0.009 \mu\text{M}$ e $52 \mu\text{M}$ para NR1-NR2B e NR1-NR2A respetivamente. Ficou também demonstrado que atua através de uma inibição não competitiva. Exerce atividade neuroprotetora em experiências com culturas de neurónios expostos ao glutamato, $IC_{50} = 0.4 \mu\text{M}$ e em modelos celulares de isquémia, $IC_{50} = 0.04 \mu\text{M}$. É de destacar que em todos os ensaios o Ro-25,6981 demonstrou ser mais potente que o ifenprodil. Para além disso, apresentou bastante seletividade em relação a outros importantes alvos biológicos pois não inibiu outros recetores iGluR nem bloqueou os canais de Na^+ and Ca^+ . Em conjunto, estas observações tornam o Ro-25,6981 num dos antagonistas das subunidades NR2B mais potentes desenvolvidos até hoje. A sua estrutura cristalográfica complexada com as subunidades NR1-NR2B foi revelada em 2011 (**Figura 22**) [80] e demonstrou estabelecer as interações já referidas para o Ifenprodil.

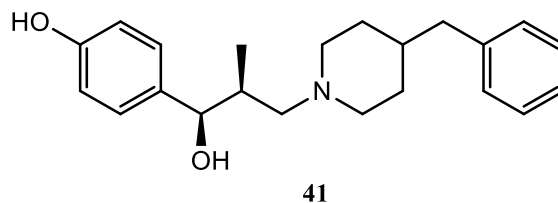


Figura 21 - Estrutura de um análogo do Ifenprodil mais potente, o Ro-25,6981 (**41**).

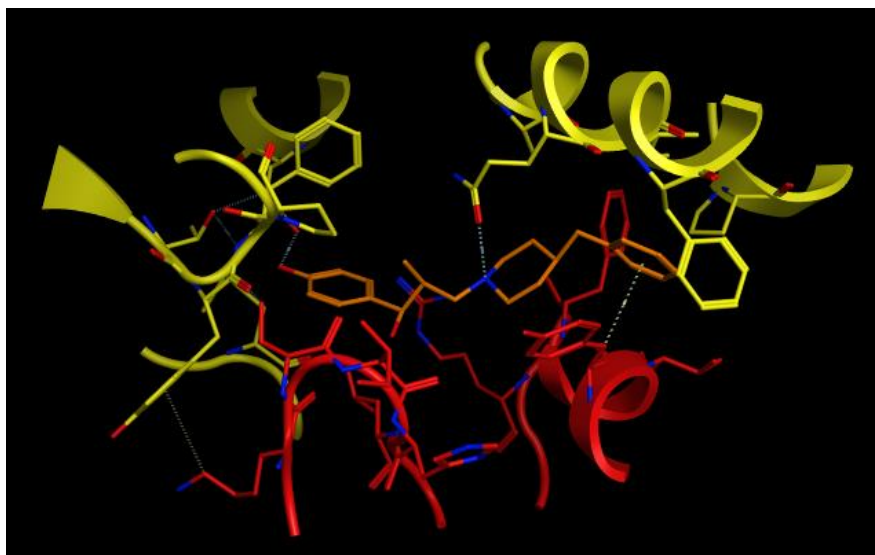


Figura 22 – Ro-25,6981 (laranja) complexado com as subunidades NR1 (vermelho) e NR2B (amarelo). São apenas representados os resíduos que definem o pocket. PDB 3QEM.

1.4.5 Outros inibidores seletivos entre subunidades NR1-NR2

Muito recentemente, a foi encontrada a estrutura de um inibidor seletivo para subunidades NR1-NR2A através de *high-throughput screening* (HTS) com métodos *in-vitro* [82]. O TCN-201 (**42**, **Figura 23**), apresentou em experiências eletrofisiológicas um IC_{50} de 109 nM e com uma concentração de 3 μ M bloqueou 95% do potencial de membrana mediado por NMDAR ricos em subunidades NR1-NR2A. Já em experiências com subunidades NR1-NR2B ou subunidades NR1-NR2D, concentrações de 30 μ M não tiveram nenhum efeito na corrente gerada pelos NMDAR. Também é de destacar, que a potência de inibição do TCN-201 aumenta na presença de 1 mM de glicina mas não na presença de glutamato. Em conjunto, estas observações fizeram surgir a hipótese de que o TCN-201 atua num sítio de ligação modulado alostéricamente pela ligação da glicina na subunidade NR1. Em conjunto com a seletividade para

recetores ricos em subunidades NR1-NR2A, surge também a hipótese de que poderá atuar na interface das subunidades NR1-NR2A.

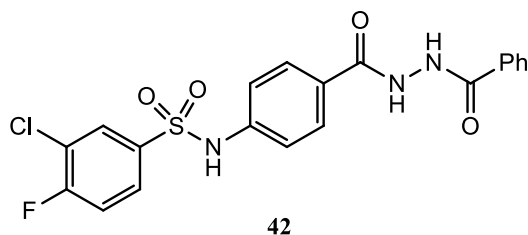


Figura 23 - Estrutura do TCN-201 (**42**) o primeiro inibidor do NMDAR seletivo para subunidades NR1-NR2A.

Também em 2010, surgiram os primeiros estudos que identificaram um conjunto de derivados de quinazolidin-4-onas como inibidores seletivos de subunidades NR1-NR2D e subunidades NR1-NR2C. O QNZ46 (**43**, **Figura 24**) apresentou valores de IC_{50} estimados de 1 μ M (NR1-NR2D), 2 μ M (NR1-NR2C) e >300 μ M (NR1-NR2B e NR1-NR2A) em experiências eletrofisiológicas. Através de estudos com recetores quiméricos e mutagênese dirigida, foi possível constatar que este composto interage com resíduos localizados na parte inferior do domínio LDB da subunidade NR2D. Para além disso, a sua capacidade inibitória aumenta na presença de glutamato. Em conjunto, estas observações sugerem que o composto **43** atua através de um mecanismo não-competitivo num sítio de ligação modulado alostéricamente pela ligação do glutamato à subunidade NR2D [83].

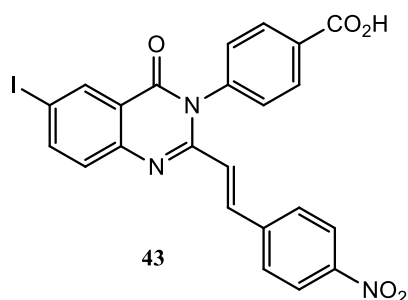


Figura 24 - Estrutura do QNZ46 (**43**), um inibidor do NMDAR seletivo para subunidades NR2C/D.

No ano seguinte, em 2011, surgiu uma família de derivados com um anel de pirazolina como com afinidade para NMDAR ricos em subunidades NR1-NR2D. O DQP1105 (**44**, **Figura 25**) foi o derivado com melhor seletividade, exibindo um IC_{50} de 7.0 μ M para NR1-NR2C, um $IC_{50} = 2.7$ μ M para NR1-NR2D e um $IC_{50} = 113$ μ M para NR1-NR2B, sendo inativo para NR1-NR2A, em experiências eletrofisiológicas. Para

além disso, através de experiências com recetores quiméricos e mutagénese dirigida, foi possível hipotetizar a existência de um sítio de ligação alostérico no LBD da subunidade NR2D. [84, 85].

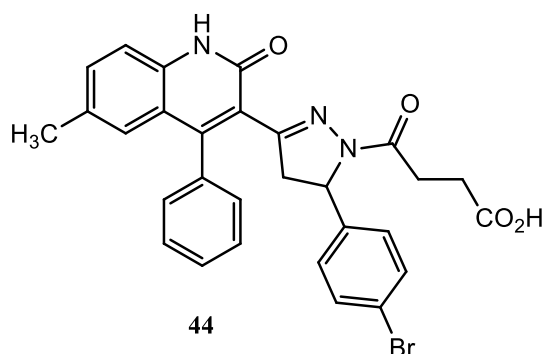


Figura 25 - Estrutura do DQP1105 (44), um inibidor do NMDAR selectivo para subunidades NR2C/D.

1.4.6 Antagonistas não-competitivos - Oxazolidinas

Em 2009, foi revelada uma nova classe de antagonistas de NMDAR que possuem um núcleo de oxazolidina polisubstituída com diversos grupos lipofílicos. Esta classe de compostos apresenta atividade oral anti-depressiva em ratos e até hoje desconhece-se o seu sítio de inibição específico. Os autores da patente, revelam que os compostos LC-06 e LC-25 (**Figura 26**) têm a capacidade de inibir a ligação dos ligandos do NMDAR sugerindo um modo de ação semelhante aos agonistas parciais. [86].

No contexto da química medicinal, o aprofundar do conhecimento sobre os NMDAR, juntamente com o aparecimento de novas estratégias de síntese orgânica, representam uma oportunidade de desenvolvimento de novos antagonistas destes recetores com potencial terapêutico, o que constitui a base desta dissertação. De forma a explorar o potencial das oxazolidinas como antagonistas NMDAR um dos objetivos da presente dissertação envolveu a síntese de pequenas bibliotecas de oxazoloisoindolinonas e oxazolo-pirrolidonas. Estes compostos podem ser vistos como análogos rígidos das oxazolidinas que trancam as conformações possíveis do grupo propilo. Para além disso, espera-se poder aumentar o número de interações ente ligando-recetor por introdução de uma amida e no caso particular das oxazoloisoindolinonas, o estabelecimento de interações hidrofóbicas através da introdução de um anel aromático

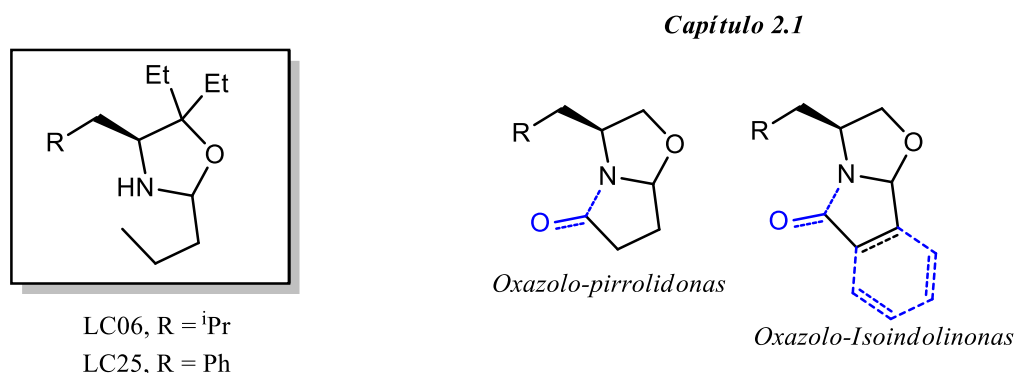


Figura 26 - Estruturas das oxazolidinas descritos como antagonistas dos NMDAR em 2009. Um dos objectivos da presente dissertação passou pela síntese e avaliação biológica de oxazolo-isoindolinonas e oxazolo-pirrolidonas (Capítulo 2.1).

1.4.7 Antagonistas não-competitivos - Derivados da *Uncaria*

Os extratos aquosos das folhas e caules de plantas do género *Uncaria* são há muitos anos utilizados na medicina tradicional japonesa e chinesa, sob o nome de *Choto-san* (Japão) e *Diao-Teng-san* (China) para o tratamento da demência e perturbações neurológicas [87]. Os primeiros registos científicos que comprovam a sua atividade neuroprotetora surgiram há cerca de duas décadas, quando foram realizados estudos controlados com placebos [88, 89]. Estes estudos impulsionaram a procura dos alvos biológicos dos princípios ativos contidos no *Choto-san* [90-92].

Em 1999 demonstrou-se que os extratos aquosos preveniam a morte neuronal induzida pelo glutamato em culturas de neurónios da camada granular do cerebelo. Esta atividade neuroprotetora do *Choto-san* deve-se à ação inibidora de um conjunto de alcalóides de indole e oxoindole (**Figura 26**) sobre o influxo celular de Ca^{2+} . Com recurso a culturas celulares de neurónios da zona granular do cerebelo, verificou-se que o influxo celular de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzido pelo glutamato, diminui consideravelmente na presença de 0.1mM dos alcalóides 61% - isoríncofilina (**45**); 45 % - isocorinoxeína (**46**), 50% - hirsuteína (**47**) e 58% - hirsutina (**48**) [93]. Posteriormente, estudos eletrofisiológicos comprovaram a atividade antagonística da rincofilina ($\text{IC}_{50} = 43.2 \mu\text{M}$) e da isorincofilina (**47**) ($\text{IC}_{50} = 48.3 \mu\text{M}$) sobre o NMDAR. Foi hipotetizado um mecanismo de inibição não-competitivo ainda desconhecido [94-96].

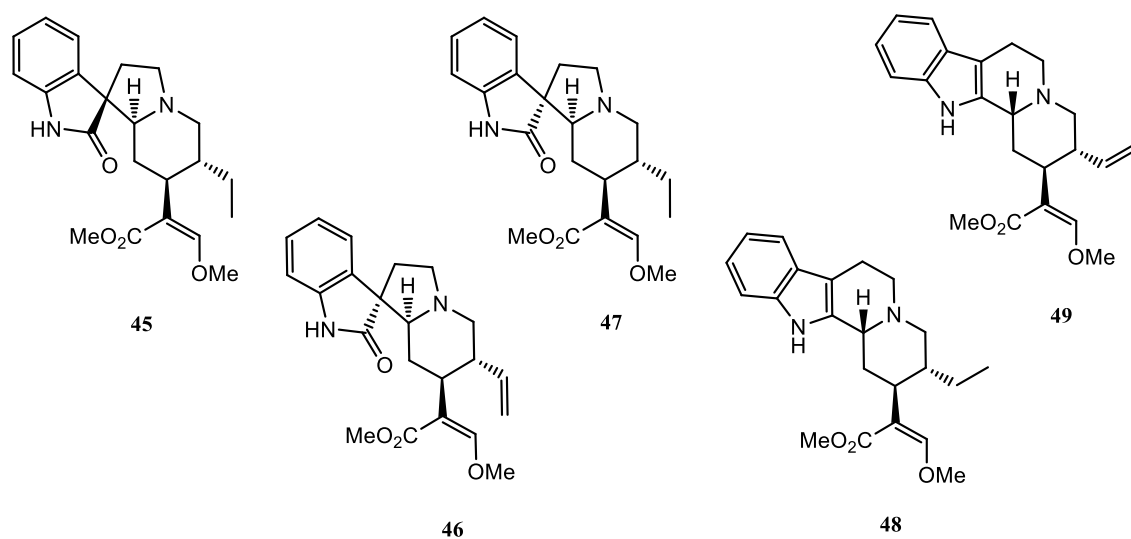


Figura 27 - Estruturas dos alcalóides do *Choto-san* responsáveis pela atividade neuroprotetora. **45** – rincofilina; **46** – isocorinoxefina; **47** – isorincofilina; **48** - hirsutina; **49** – hirsuteína.

Apesar da extensa investigação em torno dos constituintes dos extratos das plantas do género *Uncaria* [97, 98], não existem até à data quaisquer estudos SAR que explorem esta classe de compostos como antagonistas NMDAR. Tal poderá dever-se a possuírem um grande espectro de atividade biológica, pressupondo a existência de efeitos secundários de um potencial fármaco, ou talvez por não existir, até recentemente estratégias suficientemente atraentes de síntese estereoseletiva dos alcalóides de indole e oxindole presentes no *Choto-san*. Na presença de uma oportunidade de investigação científica nesta área, os objetivos desta dissertação envolveram também a preparação de uma biblioteca de oxazolo-piperidonas que serão utilizadas para a síntese de análogos dos alcalóides de indole presentes no *choto-san*, através da utilização de técnicas de síntese orgânica enantioselectiva (**Figura 27**).

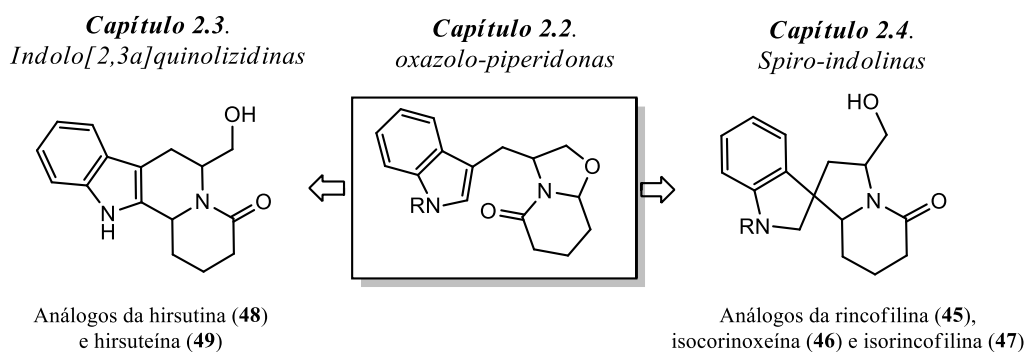
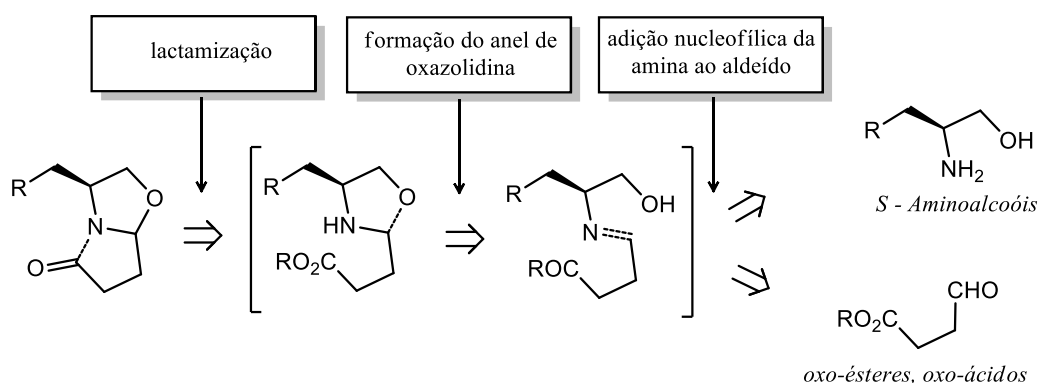


Figura 28 – Alguns objectivos desta dissertação envolveram a síntese e avaliação biológica de pequenas bibliotecas de oxazolo-piperidonas (Capítulo 2.2), indolo[2,3a]quinolizidinas (Capítulo 2.3) e spiro-indolinas (Capítulo 2.4).

2. Resultados e Discussão

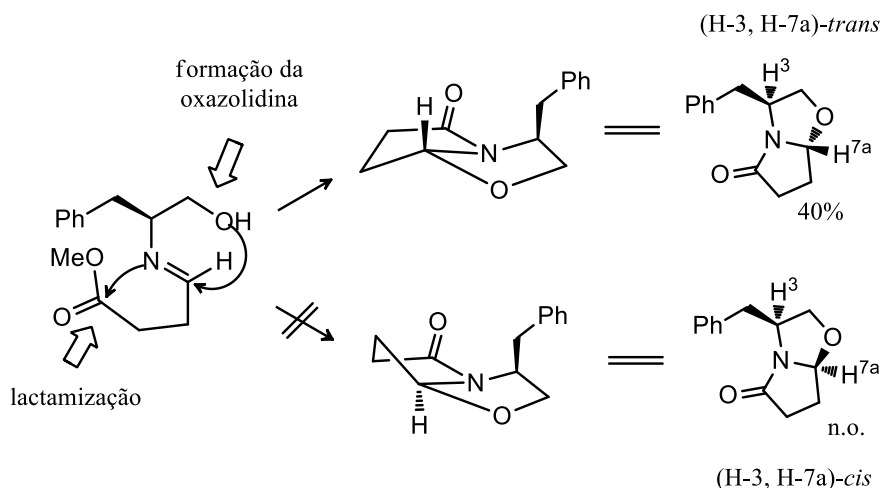
2.1. Síntese e Avaliação Biológica de Oxazolo-Isoindolinonas e Oxazolo-Pirrolidonas.

Inicialmente foi necessário analisar a retróssíntese de oxazolidinas. No **Esquema 1** podemos ver que através de três cisões heterolíticas é possível gerar o esqueleto de oxazolo-pirrolidona a partir de reagentes comercialmente disponíveis.



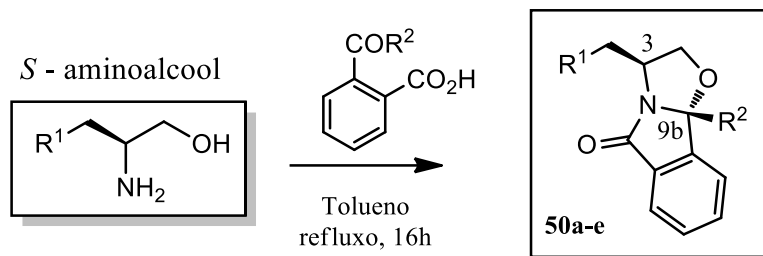
Esquema 1 - Proposta de retróssíntese para oxazolo-pirrolidonas.

Através de reações de ciclocondensação em tolueno entre β -oxo-ácidos benzóicos comercialmente disponíveis e derivados *S* de vários aminoalcoóis foi possível construir uma pequena biblioteca de oxazolo-isoindolinonas. De forma a deslocar o equilíbrio químico para a formação dos produtos, as reações foram feitas utilizando um *dean-stark* que permite a eliminação de água do meio reacional que se liberta nas reações de ciclocondensação. Estas reações são relativamente rápidas (16h), apresentaram rendimentos entre 71-92%. Em todas as reações de ciclocondensação em que se gera um anel de pirrolidona (oxazolo-isoindolinonas e oxazolo-pirrolidonas), seria de esperar a possível formação dos diastereoisómeros *-cis* e *-trans*. No entanto, apenas se observa a formação do isómero *-trans*. Tal observação pode ser explicada analisando o mecanismo de reação (**Esquema 2**). O isómero (H-3, H-7a)-*cis* não é formado, muito provavelmente devido ao efeito de repulsão entre os dois hidrogénios. Neste tipo de ciclocondensações, o equilíbrio químico parece favorecer a formação do produto termodinamicamente mais estável.



Esquema 2 - Mecanismo de reação proposto, para as reações de ciclocondensação de aminoalcoóis com β-oxo-ácidos/ésteres.

Todas as ciclocondensações são estereoseletivas, tendo sido obtido apenas um isómero detetável por ^1H RMN (**Esquema 3**). Com o *S*-fenilalaninol como indutor quiral os produtos finais apresentam uma configuração 3*S*, 9*bR*. Os rendimentos obtidos para os compostos **50a-e** foram de 75-85% e estão de acordo com os valores descritos na literatura para análogos semelhantes [99] (**Tabela 1**). Já no caso dos compostos **50d** e **50e** derivados do *S*-triptofanol, os rendimentos foram de 75% e 71% para os substituintes em C-9b, metilo e fenilo respetivamente.

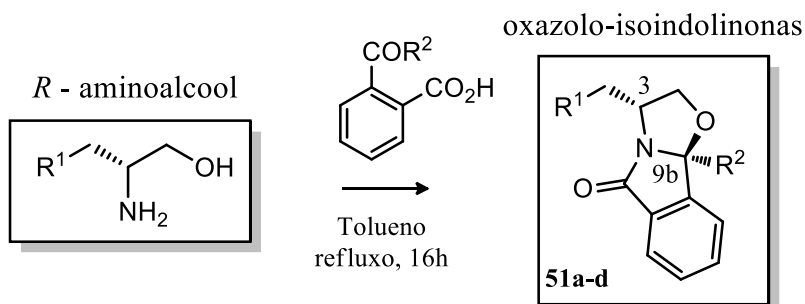


Esquema 3 - Síntese de oxazolo-isoindolinonas derivadas de *S*-aminoalcoóis.

Tabela 1 - Rendimentos obtidos para a síntese de oxazolo-isoindolinonas partindo de *S*-aminoalcoóis.

| Composto | R ¹ | R ² | η(%) |
|----------|----------------|----------------|------|
| 50a | Ph | H | 70 |
| 50b | Ph | Me | 92 |
| 50c | Ph | Ph | 85 |
| 50d | 3-Indole | Me | 75 |
| 50e | 3-Indole | Ph | 71 |

Os alvos biológicos podem interagir de modo seletivo com ligandos quirais. Tendo este fato em mente, foi sintetizada uma pequena biblioteca de oxazolo-isoindolinonas utilizando *R*-aminoalcoóis como indutores quirais (**Esquema 4**), estando os resultados sumarizados na **Tabela 2**. À semelhança dos seus enantiómeros, os derivados do *R*-fenilalaninol, **51a-c**, foram sintetizados com rendimentos entre 71 – 85%. Já em relação aos derivados do *R*-triptofanol, **51d-e**, os rendimentos foram de 76% e 70% para os substituintes em C-9b, metilo e fenilo respetivamente.



Esquema 4 - Síntese das oxazolo-isoindolinonas derivadas de *R*-aminoalcoóis.

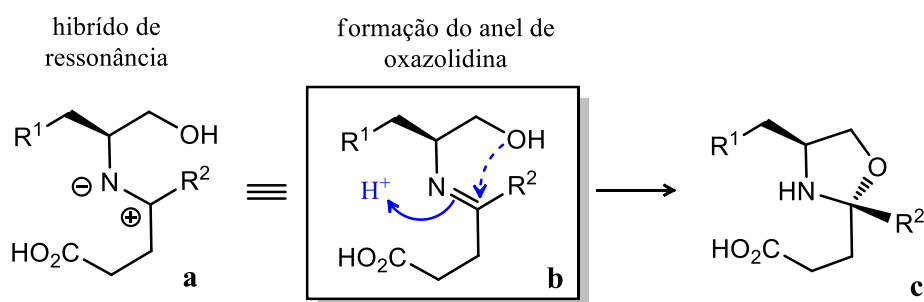
Tabela 2 - Rendimentos obtidos para a síntese de oxazolo-isoindolinonas derivadas de *R*-aminoalcoóis.

| Composto | R ¹ | R ² | η(%) |
|----------|----------------|----------------|------|
| 51a | Ph | H | 71 |
| 51b | Ph | Me | 85 |
| 51c | Ph | Ph | 71 |
| 51d | 3-Indole | Me | 76 |
| 51e | 3-Indole | Ph | 70 |

Ao comparar os valores de rendimento dos derivados do fenilalaninol com os derivados do triptofanol, observou-se uma diminuição média de cerca de 10%. Os problemas da solubilidade do triptofanol em tolueno podem estar na origem destas observações. Os derivados com um metilo na posição C-9b apresentaram sempre melhor rendimento, sendo de destacar o rendimento dos compostos **50b** (92%) e **51b** (85%) na série do fenilalaninol e dos compostos **50d** (75%) e **51d** (76%) na serie do triptofanol. Estas observações sugerem que o rendimento da reação é influenciado pelo tipo de substituinte em C-9b. Parece haver um equilíbrio entre o volume estéreo do substituinte em C-9b e a sua capacidade de estabilização o catião imínio por ressonância. No **Esquema 5** podemos ver que o intermediário imina **b**, vai sofrer o ataque estereoseletivo por parte do oxigénio para dar origem ao anel de oxazolidina **c**.

Este ataque ocorre com maior extensão caso o intermediário **b** apresente maior tempo de semi-vida. O tempo de semi-vida da espécie **b**, aumenta na presença de grupos R^2 que possam estabilizar da melhor forma o híbrido de ressonância **a**.

Na reação de formação dos compostos **50a** e **51a** ($R^2=H$, 70 e 71%), o hidrogénio facilita o ataque por parte do oxigénio por ser um substituinte pequeno mas não estabiliza o intermediário **b** e por isso apresenta os menores rendimentos. Já para substituintes mais volumosos como o grupo fenilo (compostos **50c** e **51c**, $R^2=Ph$, 85 e 71%) há um maior tempo de semi-vida do intermediário **b**, mas menor possibilidade de ataque por parte do oxigénio devido a impedimento estereoquímico. Para o substituinte metilo (**50b** e **51b**, $R^2 = CH_3$, 85 e 92%) os rendimentos são os mais elevados porque o intermediário **b** é mais estabilizado que no caso do hidrogénio e o ataque à imina por parte do oxigénio é mais facilitado que no caso do fenilo.



Esquema 5 - Racional para os rendimentos observados na síntese de oxazolo-isoindolinonas.

De forma a confirmar a estereoquímica absoluta desta classe de compostos, foram analisados os cristais obtidos após recristalização do composto **50d** (**Figura 29**). Os cristais organizam-se em *zig-zag*, através do estabelecimento de uma ponte de hidrogénio intermolecular entre o N-H do indole e o carbonilo da amida. A possibilidade de estabelecimento desta interação intermolecular, pode estar na origem dos elevados pontos de fusão observados para os derivados de indole, quando comparados com os derivados com um grupo fenilo.

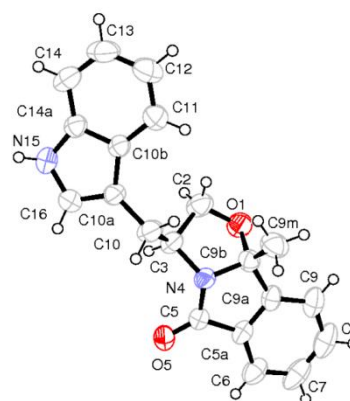


Figura 29 – Estrutura cristalográfica do composto **50d**.

Esta série de derivados apresenta espectros de ^1H RMN em que o próton H-3 surge sempre como um multipletto entre 3.99 e 4.45 ppm (**Tabela 3**). Já os prótons $\text{CH}_2\text{-ar}$ e H-2, por serem diastereotópicos apresentam-se sempre na forma de duplos dupletos que por vezes coalescem dando origem a falsos tripletos. Em relação ao espectro de ^{13}C RMN, o desvio químico do C-3 está perto de 56ppm e não sofre grandes alterações entre os vários derivados. Já o desvio químico do C-9b desloca-se para campo mais baixo consoante os requisitos eletronegativos do substituinte aumentam, $90.99 < 98.93 < 101.04$ ppm para C-9b = H < CH_3 < Ph respetivamente.

Tabela 3 - Desvios químicos de ^1H RMN observados para as oxazolo-isoindolinonas **50a-e**.

| Composto (Solvente) | ^1H RMN δ (ppm) | | | ^{13}C RMN δ (ppm) | |
|-------------------------|----------------------------------|------|-------------|------------------------------------|--------|
| | $\text{CH}_2\text{-ar}'\text{s}$ | H-3 | H-2's | C-3 | C-9b |
| 50a (CDCl_3) | 3.18 – 2.99 | 4.48 | 4.33 – 4.00 | 55.51 | 90.99 |
| 50b (CDCl_3) | 3.21 – 2.95 | 4.39 | 4.21 – 4.07 | 56.77 | 98.93 |
| 50c (CDCl_3) | 3.02 – 2.51 | 4.6 | 4.44 – 3.96 | 56.80 | 101.04 |
| 50d (CDCl_3) | 3.31 – 2.84 | 3.99 | 4.44 – 4.26 | 55.95 | 98.87 |
| 50e (DMSO) | 2.96 – 2.61 | 4.55 | 4.55 – 3.86 | 55.87 | 100.79 |

De forma a confirmar que a estereoquímica absoluta do carbono C-9b não é alterada pela introdução de substituintes mais volumosos, foram realizadas experiências de ^1H RMN bidimensionais (NOESY) com o composto **51b**. Foi possível observar as correlações espaciais intramoleculares assinaladas na **Figura 30**. O grupo metilo em C-9b interage com apenas um dos prótons H-2 e com ambos os prótons $\text{CH}_2\text{-ar}$. Estas observações sugerem que o grupo metilo está projetado na mesma direção do indutor quiral, tal como acontece no caso de compostos análogos já descritos na literatura [99].

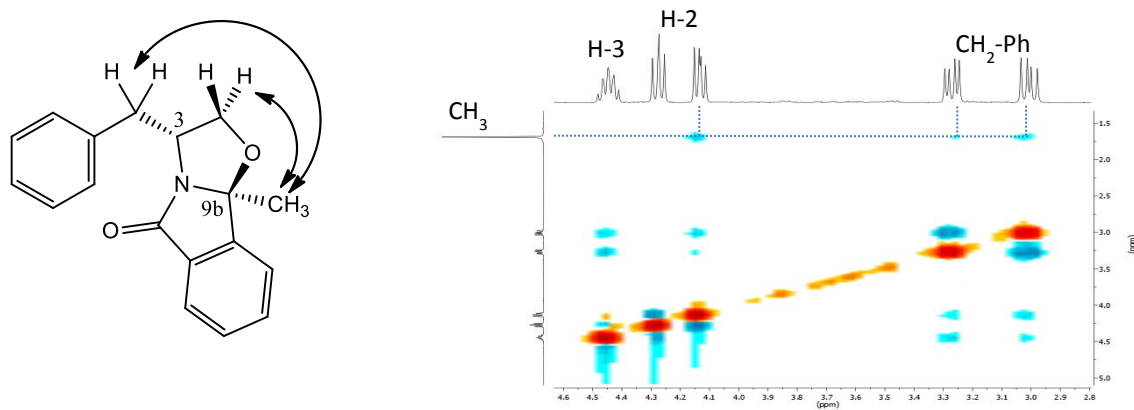
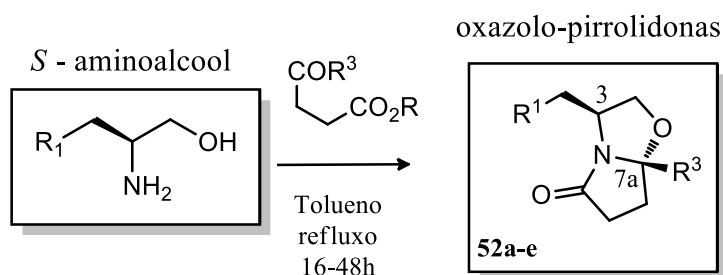


Figura 30 - Correlações detectadas por NOESY, no composto **51b**. O grupo metilo em C-9b apresenta correlação com um protão H-2 e com ambos os prótons CH₂-Ph.

Também foi levada a cabo a síntese de uma biblioteca de oxazolo-pirrolidonas através de reações de ciclocondensação entre aminoalcoóis enantiopuros e β -oxo-ésteres/ácidos em tolueno utilizando um *dean-stark*. Partindo de *S*-aminoalcoóis (**Esquema 6**), esta série de compostos apresenta uma configuração absoluta *3S,7aR* e como acontece no caso das oxazolo-isoindolinonas, o novo centro quiral formado orienta o substituinte para a frente do plano bicíclico (**Tabela 4**). Os rendimentos obtidos para os compostos **52a-c** foram de 42-72 % e estão de acordo com os resultados obtidos em outros estudos. De forma a poder comparar resultados, o tempo de reação escolhido para a síntese dos compostos **52a-c** foi de 48h [100]. Nos derivados do *S*-fenilalaninol, os rendimentos foram de 40, 62 e 72% para os substituintes, hidrogénio (**52a**), metilo (**52b**) e fenilo (**52c**), respetivamente. No caso dos derivados do *S*-triptofanol, os rendimentos obtidos foram de 33% (**52d**) e 90% (**52e**). Em ambos os aminoalcoóis usados, os melhores rendimentos (72% e 90%) foram obtidos com o substituinte fenilo em C-7a (compostos **52c** e **52e** respetivamente). É de realçar que se notam rendimentos mais baixos para os compostos **52a** (40%) e **52d** (33%), ambos sintetizados a partir de um β -oxo-éster. Esta observação pode sugerir que as reações são catalisadas em meio ácido pois na presença de β -oxo-ácidos e para o mesmo tempo de reação, os rendimentos são sempre maiores.



Esquema 6 - Síntese das oxazolo-pirrolidonas derivadas de *S*-aminoalcoóis.

Tabela 4 - Rendimentos obtidos para a síntese de oxazolo-pirrolidonas derivadas de *S*-aminoalcoóis.

| Composto | R ¹ | R ² | Tempo de Reacção (h) | η(%) |
|----------|----------------|----------------|----------------------|------|
| 52a | Ph | H | 48 | 40 |
| 52b | Ph | Me | 48 | 62 |
| 52c | Ph | Ph | 48 | 72 |
| 52d | 3-Indole | H | 6 | 33 |
| 52e | 3-Indole | Ph | 6 | 90 |

Tal como acontece com os derivados de isoindolinona, esta série de pirrolidonas apresenta um conjunto de desvios químicos característicos (**Tabela 5**). No espetro de ¹H RMN, os prótons H-2 e CH₂-ar surgem sempre como duplos dupletos ou na forma de falsos tripletos. Verifica-se o desvio químico do próton H-3 se movimenta para campo mais baixo com o aumento da eletronegatividade do indutor quiral, fenilo (4.43ppm, **52c**) < Indole (4.57ppm, **52e**), compostos **52c** e **52e**. Ao analisar os espetros de ¹³C RMN dos compostos **52a-c**, também se pode verificar que o desvio químico do C-7a, se movimenta para campo mais baixo quando aumenta a eletronegatividade do substituinte (hidrogénio < metilo < fenilo).

Tabela 5 - Desvios químicos δ (ppm) observados em experiências de RMN com os derivados **52a-e**.

| Composto | ¹ H RMN δ (CDCl ₃ , ppm) | | | ¹³ C RMN δ (CDCl ₃ , ppm) | |
|----------|--|------|-------------|---|--------|
| | CH ₂ -ar's | H-3 | H-2's | C-3 | C-7a |
| 52a | 3.04 – 2.78 | 4.38 | 4.07 – 3.65 | 55.16 | 91.63 |
| 52b | 3.15 – 2.87 | 4.26 | 4.08 – 3.92 | 55.69 | 100.07 |
| 52c | 2.94 – 2.35 | 4.43 | 4.13 – 3.65 | 56.44 | 102.27 |
| 52d | 3.14 – 2.95 | 4.50 | 4.13 – 3.71 | 54.61 | 91.80 |
| 52e | 3.08 – 2.71 | 4.57 | 4.16 – 4.68 | 55.53 | 102.35 |

De forma a confirmar que a estereoquímica absoluta desta família de compostos, continua a ser a mesma das oxazolo-isoindolinonas apresentadas até aqui, tornou-se necessário avaliar o efeito NOE com um dos compostos. No caso particular do composto **52a** foi possível identificar as interações assinaladas na **Figura 31**. O H-7a apresenta correlação com os prótons alquílicos do indutor quiral, o que sugere que estes grupos estão projetados no mesmo plano, tal como sucede com as oxazolo-isoindolinonas.

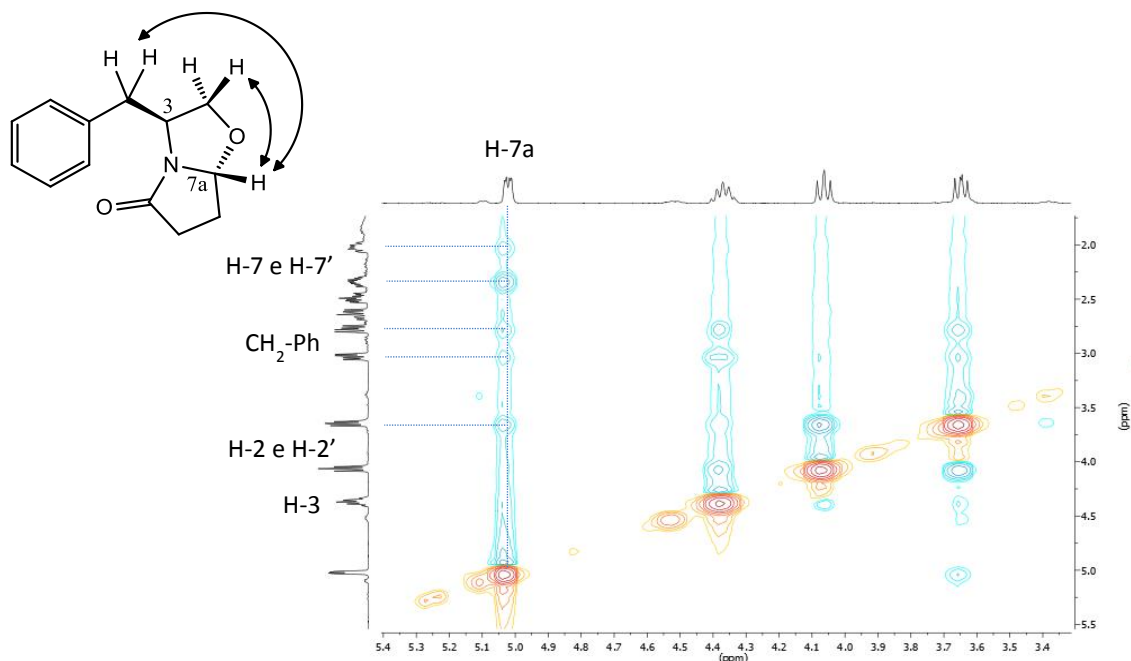
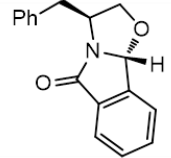
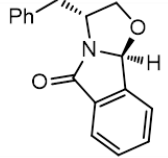
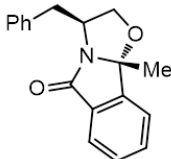
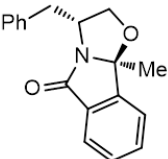
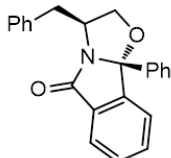
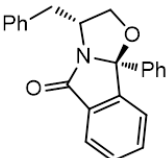
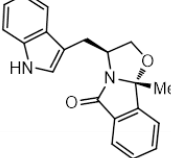
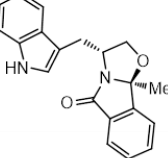
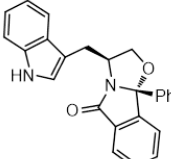
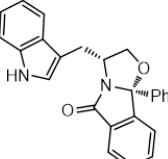


Figura 31 - Correlações observadas no NOESY do composto **52a**.

A atividade biológica dos compostos sintetizados como inibidores do NMDAR foi avaliada através da medição da sua capacidade de reduzir o influxo celular de Ca²⁺ mediado por este recetor, em culturas de neurónios da zona granular do cerebelo. A adição de ácido *N*-metil-*D*-aspartato (100 µM) e glicina (10 µM) produz um aumento estável e robusto no influxo de Ca²⁺ que foi contrariado pela adição de diferentes concentrações dos compostos a testar. Nestes ensaios, a amantadina foi usada como controlo positivo e apresentou um IC₅₀ de 92 µM. Foram avaliadas 12 oxazolo-isoindolinonas tendo três dos compostos testados, exibido um IC₅₀ abaixo de 301 µM. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 6**. O composto **50e**, com um anel de indole e um grupo fenilo na posição C-9b, foi o derivado mais potente com um IC₅₀ = 154 µM. A substituição do grupo fenilo por um grupo metilo resulta em perda de atividade como demonstra o composto **50d** (IC₅₀ > 500 µM). A troca do anel de indole por um anel de benzeno resulta num derivado 1.6x menos potente como é o caso do composto **50c** (IC₅₀

= 254 μM). Ao avaliar os resultados dos derivados do *S*-fenilalaninol (**50a-c**) verifica-se uma clara preferência pela presença de grupos volumosos na posição C-9b, observando-se um $\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{M}$ para o composto com hidrogénio, e IC_{50} 's 404 e 254 μM para os compostos com metilo e fenilo, respetivamente. O resultado obtido com o composto **51e** ($\text{IC}_{50} = 301 \mu\text{M}$), o único composto ativo nos derivados de *R*-aminoalcoois sugere que pode haver enantioselectividade por parte do NMDAR na medida em que o seu enantiómero (**50e**) é 2 vezes mais potente.

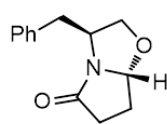
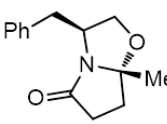
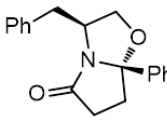
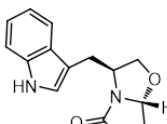
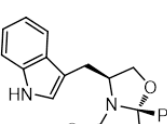
Tabela 6 - Atividades biológicas das oxazolo-isoindolinonas como antagonistas do NMDAR.

| Derivados <i>S</i> | | | Derivados <i>R</i> | | |
|--------------------|---|------------------------------------|--------------------|---|------------------------------------|
| Ref. | Estrutura | IC_{50} (μM) | Ref. | Estrutura | IC_{50} (μM) |
| 50a |  | >500 | 51a |  | >500 |
| 50b |  | 404 | 51b |  | >500 |
| 50c |  | 254 | 51c |  | >500 |
| 50d |  | >500 | 51d |  | >500 |
| 50e |  | 154 | 51e |  | 301 |

Controlo positivo – Amantadina, $\text{IC}_{50} = 92 \mu\text{M}$

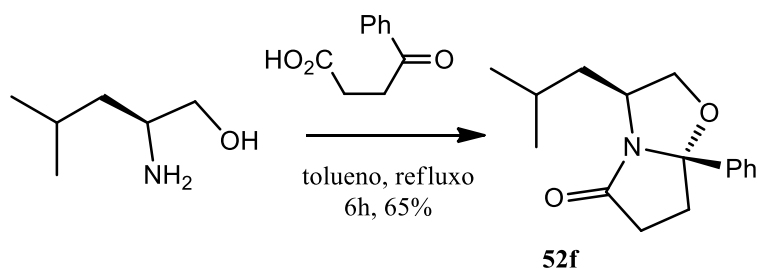
Em relação às oxazolo-pirrolidonas inicialmente foram avaliados 5 derivados enantiopuros e o único composto ativo detetado foi o **52c** com um $\text{IC}_{50} = 62 \mu\text{M}$. As atividades registadas encontram-se na **Tabela 7**. Os resultados obtidos são muito motivadores na medida em que o composto **52c** demonstrou ser um antagonista do NMDAR mais potente que o controlo positivo utilizado (amantadina, $\text{IC}_{50} = 92 \mu\text{M}$).

Tabela 7 - Atividades biológicas das oxazolo-pirrolidonas como antagonistas NMDAR.

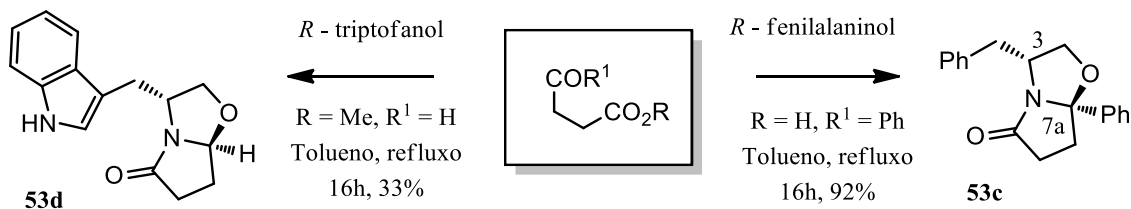
| Ref. | Estrutura | IC ₅₀ (μM) |
|------|---|-----------------------|
| 52a |  | >500 |
| 52b |  | >500 |
| 52c |  | 62 |
| 52d |  | >500 |
| 52e |  | >500 |

Controlo positivo – Amantadina, IC₅₀ = 92 μM

Este derivado apresenta uma estereoquímica absoluta 3*S*,7*aR* e um grupo fenilo em C-7*a*. A substituição deste grupo fenilo por grupos menos volumosos resulta em perda total de atividade (composto **52a-b** e **52d-e**). Por comparação com os resultados obtidos para as oxazolo-isoindolinonas **50e** (IC₅₀ = 154 μM) e **50c** (IC₅₀ = 254 μM) podemos concluir que - i) anel aromático das isoindolinonas não é um requisito para atividade; ii) a substituição de um grupo fenilo em C-9*b* (compostos **51a-d**) e em C-7*a* (compostos **52a-d**) é um requisito para a atividade; iii) a existência de um grupo CH₂-aromático parece ser um requisito para a atividade. Para confirmar a última observação procedeu-se à síntese do composto **52f** a partir de um aminoalcoól não aromático, o *S*-leucinol. A *S*-leucina é um aminoácido que um grupo isopropilo, lipofílica mas pouco volumosa. Este aminoácido foi reduzido na presença de LiAlH₄ e com o aminoalcoól resultante sintetizou-se o composto **52f** através da ciclocondensação com o ácido 3-benzoilo-propanóico em tolueno (**Esquema 7**).

**Esquema 7** - Síntese da oxazolo-pirrolidona **52f** derivada do *S*-Leucinol.

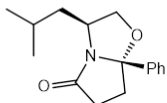
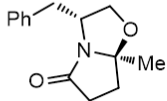
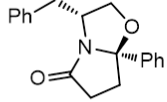
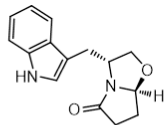
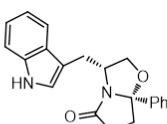
De maneira a elucidar melhor os requisitos estruturais para a atividade das oxazolo-pirrolidonas, decidimos testar a capacidade inibitória de um conjunto de derivados sintetizados com indutores quirais *R*. Neste contexto, o composto **53c** foi sintetizado a partir do *S*-fenilalaninol e o composto **53e** a partir do *R*-triptofanol (Esquema 8)



Esquema 8 - Síntese de oxazolo-pirrolidonas derivadas de *R*-aminoalcoóis.

Procedeu-se novamente à avaliação biológica dos novos compostos sintetizados. Foi avaliado um total de 5 oxazolo-pirrolidonas e muito interessante, dois compostos (**53c** e **53d**) apresentaram um IC_{50} abaixo de $327 \mu M$. Os resultados obtidos

Tabela 8 - Atividades biológicas dos novos derivados de oxazolo-pirrolidona.

| Ref. | Estrutura | IC_{50} (μM) |
|------|---|-----------------------|
| 52f |  | >500 |
| 53b |  | >500 |
| 53c |  | 246 |
| 53d |  | 327 |
| 53e |  | >500 |

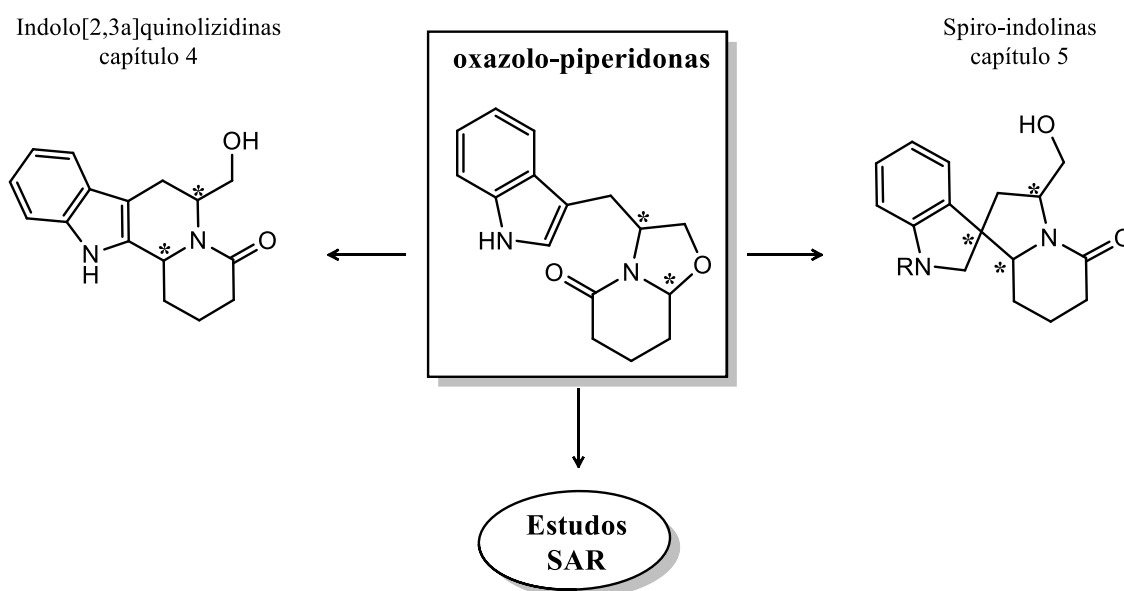
Controlo positivo – Amantadina, $IC_{50} = 92 \mu M$

recetor.

estão sumarizados na Tabela 8. O composto **52f** apresentou um IC_{50} superior a $500 \mu M$. Este resultado sugere que a presença de um grupo lipofílico volumoso na zona do indutor quiral é um requisito para a atividade. Pode hipotetizar-se a existência de uma zona hidrofóbica no *pocket* do sítio de ligação dos compostos **50c**, **50e** e **52c** do recetor NMDAR que necessita de ser preenchido com resíduos lipofílicos volumosos como o fenilo. É de realçar também, que o enantiómero *3R,7aS* do composto mais potente deste estudo (**53c**) apresentou um IC_{50} de $246 \mu M$, 4x menos potente que o composto **52c**. Em conjunto com as observações feitas para as oxazolo-isoindolinonas, os enantiómeros *3S,7aR* ou *3S,9bR* parecem ter mais afinidade para o

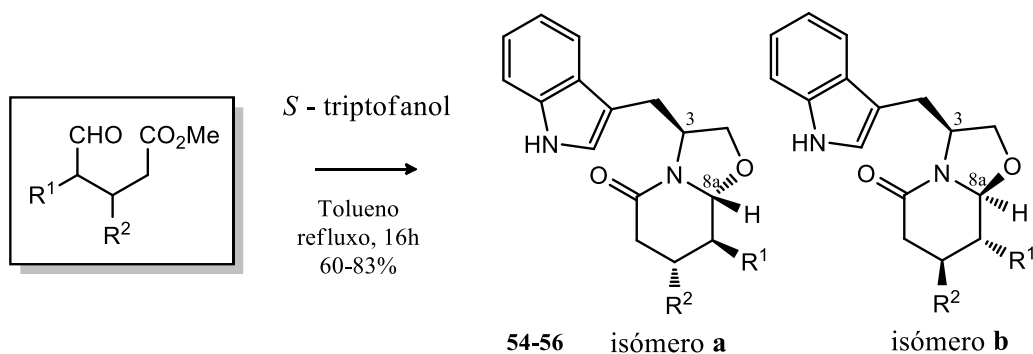
2.2. Síntese e Avaliação Biológica de Oxazolo-Piperidonas

Encorajados pelos bons resultados observados com as oxazolo-indolinonas e oxazolo-pirrolidonas, o segundo passo do desenvolvimento de novos antagonistas do NDMAR envolveu a síntese de oxazolo-piperidonas derivadas do triptofanol. No seguimento do procedimento descrito no capítulo 2.1, as sínteses foram levadas a cabo num *dean-stark* e utilizando tolueno como solvente. Esta estratégia apresenta diversas vantagens, nomeadamente a possibilidade destes compostos serem usados para estabelecer estudos SAR e simultaneamente serem usados como materiais de partida para a síntese das bibliotecas de indolo[2,3a]quinolizidinas e spiro-indolinas (Ver capítulos 2.3 e 2.4) (**Esquema 9**).



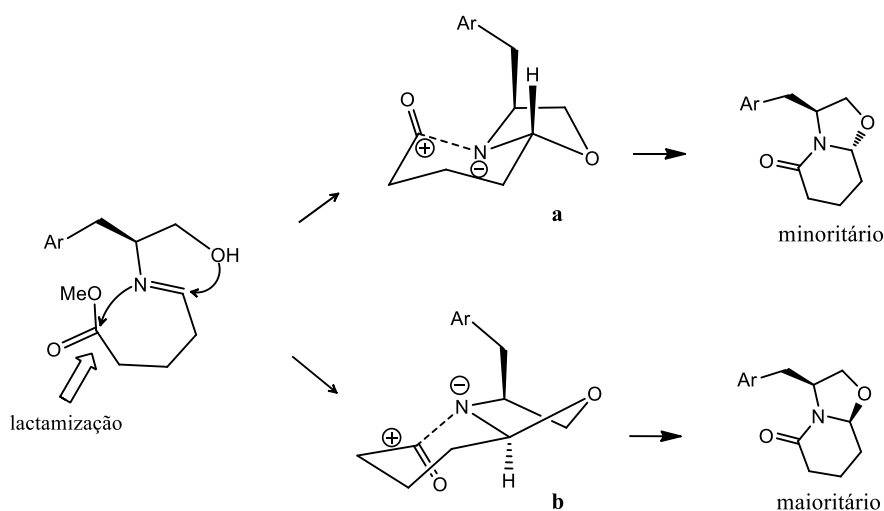
Esquema 9 - Vantagens da estratégia de síntese de oxazolo-piperidonas. Estes compostos servem de intermediários para a síntese de indolo[2,3a]quinolizidinas, spiro-indolinas e serão também usados para desenvolver antagonistas do NMDAR.

Os diversos γ -oxo-ésteres utilizados foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito em [101]. As reações de ciclocondensação entre *S*-aminoalcoóis e γ -oxo-ésteres em tolueno geram sempre uma mistura de diastereoisómeros [102] (**Esquema 10**). Ao utilizar misturas racémicas de γ -oxo-ésteres, é possível introduzir de forma estereoseletiva, os grupos R^1 e R^2 no anel de piperidona do produto final.



Esquema 10 - Síntese de oxazolo-piperidonas derivadas do *S*-triptofanol.

A diastereoseletividade desta reação pode ser explicada tendo em conta o mecanismo da reação. É interessante verificar que, ao contrário das pirrolidonas, o isómero maioritário obtido não é o termodinamicamente mais estável. Esta observação pode ser justificada devido à ocorrência de um processo designado de resolução cinética dinâmica um efeito que só pode ocorrer em reações com duas ou mais etapas distintas (**Esquema 11**).



Esquema 11 - Mecanismo proposto para a ciclocondensação de aminoalcoóis enantiopuros, com γ -oxo-ésteres. Lactamização - formação do anel de piperidona.

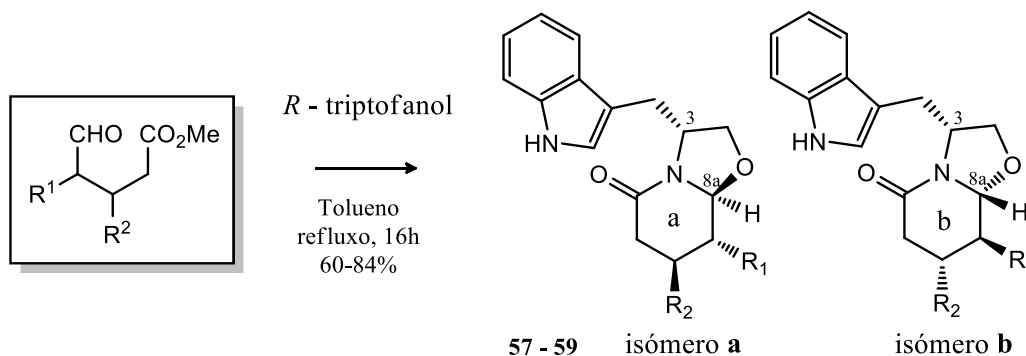
Estas reações apresentam três etapas distintas. Inicialmente dá-se a formação do intermediária imina por ataque da amina primária do aminoalcoól ao aldeído com eliminação de água. Após formação da oxazolidina por ataque do oxigénio, vai ocorrer a latamização entre o éster e a amina secundária da oxazolidina. Apesar de a latamização da oxazolidina **a** ser termodinamicamente mais favorável, a latamização da

oxazolidina **b** é mais rápida. Em ambos os casos, há a formação de um estado transitório com uma conformação em cadeira. No entanto, na latamização **b**, a aproximação do grupo éster à amina faz-se pelo lado oposto ao do indutor quiral. Esta diferença no impedimento estereoquímico vai aumentar a constante cinética de latamização e consequentemente desloca o equilíbrio químico na direção dos produtos termodinamicamente menos favoráveis. Os rendimentos obtidos nas reações de ciclocondensação entre o *S*-triptofanol e γ -oxo-ésteres foram de 60-83%. Os resultados estão de acordo com resultados descritos na literatura [102] e encontram-se sumarizados na **Tabela 9**. Os rácios diastereoisoméricos calculados com base nos rendimentos isolados foram de 1:5 (**54**), 1:4 (**55**) e 1:4.5 (**56**). A síntese das oxazolo-piperidonas **54** foi a que apresentou o rendimento mais baixo (60%) provavelmente devido às impurezas presentes no γ -oxo-éster utilizado na reação. Já os derivados **56** apresentaram o melhor rendimento (83%) nesta série de oxazolo-piperidonas.

Tabela 9 - Rendimentos obtidos nas reações de ciclocondensação entre γ -oxo-ésteres e *S*-triptofanol.

| Composto | R ¹ | R ² | η (%)a | η (%)b |
|----------|----------------|------------------------------------|-------------|-------------|
| 54a/54b | H | H | 10 | 50 |
| 55a/55b | Et | H | 17 | 63 |
| 56a/56b | H | CH ₂ CO ₂ Me | 15 | 68 |

Em seguimento da necessidade de avaliar a enantioselectividade do NMDAR em relação a potenciais antagonistas, também foi levada a cabo a síntese de oxazolo-piperidonas com *R*-triptofanol (**Esquema 12**). Os rendimentos obtidos foram de 53-84% e os resultados estão sumarizados na **Tabela 10**. Os rácios diastereoisoméricos calculados com base nos rendimentos utilizados foram de 1:4.5 (**57**), 1:5 (**58**) e 1:5.5 (**59**).



Esquema 12 - Síntese das oxazolo-piperidonas derivadas do *R*-triptofanol.

| Composto | R ¹ | R ² | R ³ | η (%)a | η (%)b |
|----------|----------------|----------------|------------------------------------|-------------|-------------|
| 57a/57b | 3-Indole | H | H | 11 | 49 |
| 58a/58b | 3-Indole | Et | H | 13 | 64 |
| 59a/59b | 3-Indole | H | CH ₂ CO ₂ Me | 13 | 71 |

Tabela 10 - Rendimentos nas sínteses de oxazolo-piperidonas derivadas do *R*-triptofanol.

Os rendimentos e rácios diastereoisoméricos obtidos na síntese de oxazolo-piperidonas com *R*-triptofanol são muito semelhantes aos dos seus enantiómeros. As oxazolo-piperidonas sem padrão de substituição no anel de piperidona (**54** e **57**) apresentaram os menores rendimentos (60%). Em ambos os casos (*S* ou *R*-triptofanol), as piperidonas com um grupo metileno-éster na posição C-7 (**56** e **59**) apresentaram rendimentos superiores a 80%. Através da análise dos espetros de ¹H RMN pode-se verificar os efeitos da estereoquímica absoluta no desvio químico dos prótons H-8a e H-3 (**Tabela 11**). Nos isómeros minoritários (**54-56a**), o próton H-8a surge sempre a campo mais alto (4.46, 4.16 e 4.53 ppm, respetivamente) quando comparado com os isómeros maioritários (**54-56b**, 4.61, 4.29 e 4.72ppm). Já o próton H-3 surge sempre a campo mais baixo, por volta de 4.60 ppm (compostos **54-56a**), quando comparado com o desvio químico dos seus diastereoisómeros (4.28ppm, **54-56b**).

| Composto | ¹ H RMN δ (CDCl ₃ , ppm) | | ¹³ C RMN (CDCl ₃ , ppm) | |
|----------|---|------|---|------|
| | Minoritários (a) | | Minoritários (b) | |
| | H-8a | H-3 | H-8a | H-3 |
| 54 | 4.46 | 4.64 | 4.61 | 4.24 |
| 55 | 4.16 | 4.62 | 4.29 | 4.26 |
| 56 | 4.53 | 4.61 | 4.72 | 4.29 |

Tabela 11 - Análise dos desvios químicos δ (ppm) dos prótons H-8a e H-3.

Estas observações exemplificam bem os diferentes ambientes magnéticos das conformações dos produtos finais. Através da análise das conformações de menor energia para os compostos **54a** e **54b** (**Figura 32**), é possível ver que no caso dos isómeros minoritários, o próton H-8a parece estar mais exposto ao cone de desblindagem gerado pelo anel de indole, uma observação que explica os desvios químicos a campo mais baixo. Já no caso do próton H-3, podemos ver que nos isómeros minoritários ele projeta-se para o mesmo plano que o oxigénio da oxazolidina. A

proximidade tridimensional a este átomo eletronegativo, pode explicar os valores de desvio químico a campo mais baixo observados para os isómeros minoritários.

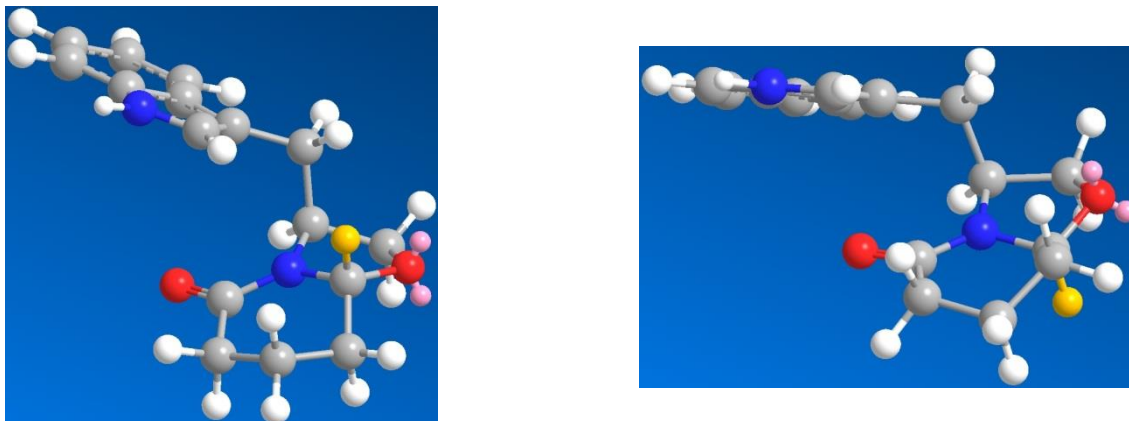
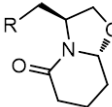
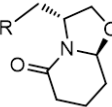
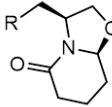
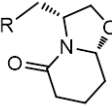
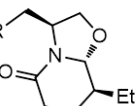
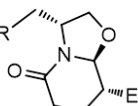
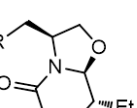
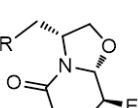
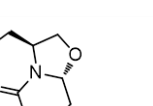
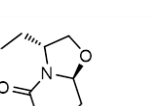
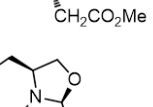
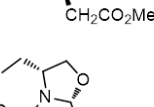


Figura 32 - Representações tridimensionais das conformações de menor energia das oxazolo-piperidonas. Composto **54a** (esquerda) e **54b** (direita). O próton H-8a está realçado a amarelo. Simulações realizadas com o *software* ChemBioDraw3D Ultra.

Uma vez sintetizada uma pequena biblioteca de 12 oxazolo-piperidonas enantiopuras e estruturalmente relacionadas entre si, foi levada a cabo a avaliação biológica destes compostos como antagonistas do NMDAR. Os resultados obtidos estão sumarizados na **Tabela 12**. Dois compostos exibiram uma atividade biológica abaixo de 307 μM , sendo de destacar o composto **57a** que apresentou um IC_{50} de 63.4 μM , sendo 1.5x mais potente que o controlo positivo utilizado (amantadina, $\text{IC}_{50} = 92 \mu\text{M}$), logo apresenta potencial para desenvolvimento de novos antagonistas. Apesar de ter havido apenas dois derivados ativos, a análise dos resultados obtidos permite retirar importantes conclusões em relação aos requisitos estruturais para a atividade das oxazolo-piperidonas. A substituição do anel de piperidona parece ser crucial para a atividade na medida em que todos os compostos com substituições em C-7 e C-8 foram inativos (**54**, **55**, **58** e **59**, $\text{IC}_{50} > 500\mu\text{M}$). O resultado obtido com o composto **55a** ($\text{IC}_{50} = 450 \mu\text{M}$) dá a entender que há espaço para a introdução de pequenos substituintes alquílicos em C-8. De momento ainda estamos a aguardar com expectativa o resultado da atividade biológica do composto **59a** que permitirá avaliar o efeito da substituição em C-7. É de destacar que a estereoquímica dos substituintes no anel de piperidona talvez não seja a mais adequada e até ao momento não é possível concluir se há tolerância para substituições. Em relação aos compostos **54** e **57**, há uma clara preferência para uma orientação para o mesmo plano entre o indutor quiral ($\text{CH}_2\text{-R}$) e o H-8. Em ambos os casos, os isómeros minoritários (**54a** e **57a**) foram ativos com IC_{50} de 306.2 e 63.4 μM respetivamente. O composto **57a**, que apresenta uma estereoquímica absoluta 3*R*,8*aS*, é

5x mais potente que o seu enantiómero **54a**. Isto significa que há enantioselectividade por parte do recetor do NMDAR, um fato que necessita de ser tido em mente no desenvolvimento de novos antagonistas.

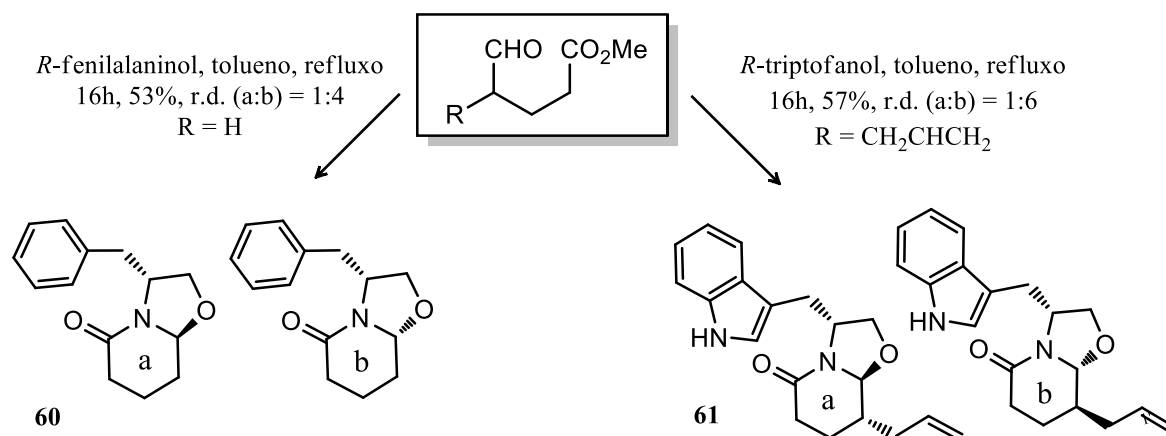
Tabela 12 - Atividades biológicas das oxazolo-pirrolidonas como antagonistas do NMDAR. ** composto em avaliação biológica.

| Derivados S | | | Derivados R | | |
|-------------|---|-----------------------|-------------|--|-----------------------|
| Ref. | Estrutura R = 3-Indole | IC ₅₀ (μM) | Ref. | Estrutura R = 3-Indole | IC ₅₀ (μM) |
| 54a |  | 306.2 | 57a |  | 63.4 |
| 54b |  | >500 | 57b |  | >500 |
| 55a |  | 450 | 58a |  | >500 |
| 55b |  | >500 | 58b |  | >500 |
| 56a |  | >500 | 59a |  | ** |
| 56b |  | >500 | 59b |  | >500 |

Controlo positivo – Amantadina, IC₅₀ = 92 μM

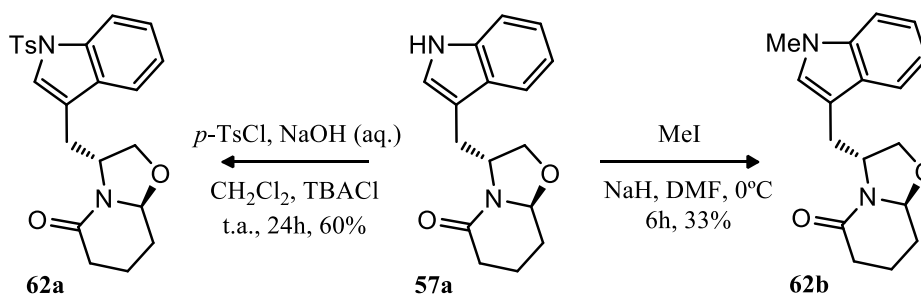
De forma a perceber melhor os requisitos estruturais das oxazolo-piperidonas que são responsáveis pela atividade inibitória do NMDAR e com base nas informações recolhidas inicialmente, foi sintetizado um conjunto de oxazolo-piperidonas, análogas do composto **57a** através de reações de ciclocondensação de *R*-aminoalcoóis com γ -oxo-esteres (**Esquema 13**) e também através da modulação da estrutura do composto **59a**. A síntese dos compostos **60a** e **60b**, apresentou um rendimento de 53% e um rácio diastereoisomérico de (a:b) = 1:4. Os compostos **61a** e **61b** foram sintetizados com 57% de rendimento e um rácio diastereoisomérico de (a:b) = 1:6. Em ambos os casos, os

rendimentos estão de acordo com os resultados obtidos com as primeiras oxazolo-piperidonas.



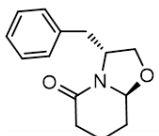
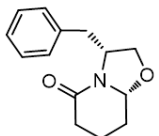
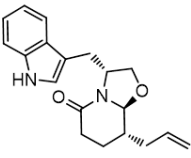
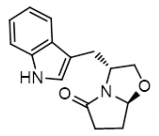
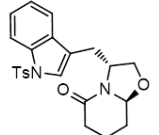
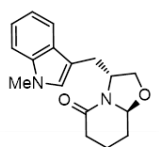
Esquema 13 - Síntese dos análogos do composto **57a** a partir de *R*-aminoalcoóis.

Utilizando o composto **57a** como material de partida, foi explorada a reatividade da ligação N-H através de dois protocolos distintos (**Esquema 14**). A síntese da N-arilsulfonamida **62a** decorreu de um protocolo de transferência de fase na presença de uma solução aquosa de NaOH e cloreto de *p*-toluenosulfonilo e apresentou um rendimento de 60%. A síntese do composto **62b** envolveu a utilização de DMF anidro e iodeto de metilo na presença de uma base forte (NaH). Este procedimento apresentou menor rendimento que as reações de transferência de fase (33%), mas tem a vantagem de ser 4x mais rápido (6h) e de gerar menos produtos secundários que dificultam a purificação como acontece nas reações de transferência de fase.



Esquema 14 - Modulação da ligação NH-indole do composto **57a**.

Tabela 13 - Atividades biológicas dos novos derivados oxazolo-piperidonas, análogos do composto **57a**.

| Ref. | Estrutura | IC ₅₀ (μM) |
|------|---|-----------------------|
| 60a |  | ** |
| 60b |  | >500 |
| 61a |  | >500 |
| 53d |  | 327 |
| 62a |  | >500 |
| 62b |  | ** |

Controlo positivo – Amantadina, IC₅₀ = 92 μM

Os novos derivados sintetizados foram em tão avaliados como antagonistas NMDAR.

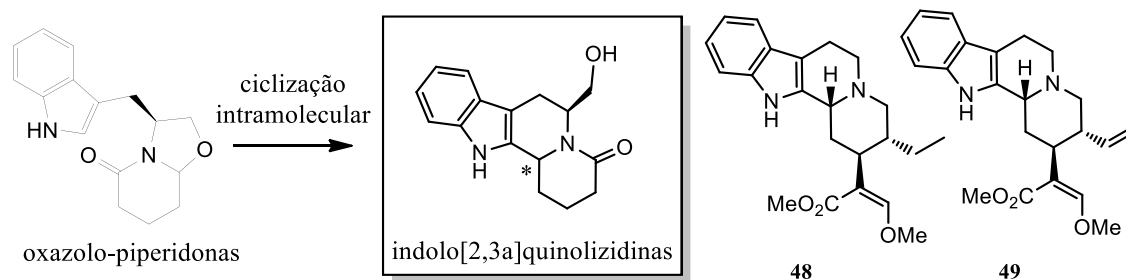
Os dados obtidos sumarizados na **Tabela 13**.

Através da análise da atividade exibida pelo composto **53d** (Capítulo 2), podemos ver que a contração do anel de piperidona resulta em perda de atividade na medida em que o composto **53d** é 5x menos potente (IC₅₀ = 327 μM) que o composto **57a**. O composto **60b** revelou-se inativo. Este resultado está em concordância com os resultados obtidos no primeiro *screening*, reforçando a ideia de que há a necessidade de uma projeção oposta entre o indutor quiral (CH₂-ar) e o H-8, isto é, uma estereoquímica 8aS. A introdução de um substituinte alílico na posição C-8 resulta na perda de atividade do composto **61a**. Este resultado parece reforçar a ideia de que não há possibilidade para substituições muito volumosas na posição C-8. O derivado N-arilsulfonamida **62a**, também é inativo. Esta

observação indica que possivelmente não há espaço no sítio de ligação, para a presença de um anel aromático volumoso como o tosil, na vizinhança do anel de indole. Atualmente, aguardamos com expectativa os resultados da avaliação biológica dos compostos **60a** e **62b**. O composto **60a** permitirá perceber se há necessidade para um anel de indole na posição do indutor quiral ou se são tolerados outros grupos aromáticos como o fenilo. Já o composto **62b** permitirá retirar duas conclusões – i) avaliar a necessidade de uma ligação NH livre para estabelecimento de pontes de hidrogénio; ii) verificar a influência do aumento de basicidade da amina

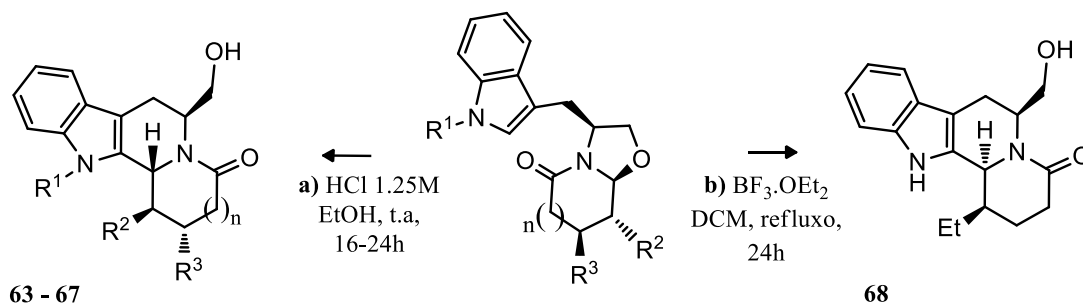
2.3. Síntese e Avaliação Biológica de Indolo[2,3a]quinolizidinas

De forma a sintetizar análogos da hirsutina (**48**) e hirsuteína (**49**), utilizou-se as oxazolo-piperidonas derivadas do triptofanol (capítulo 2.2) para gerar uma pequena biblioteca de indolo[2,3-a]quinolizidinas. O triptofanol além de atuar como auxiliar quiral tem a vantagem de integrar o indole na estrutura tetracíclica final (**Esquema 15**). A existência de substituições no anel de piperidina e a possibilidade de variação da estereoquímica do centro quiral C-12b permitiu recolher informações muito importantes sobre os requisitos estruturais do NMDAR.



Esquema 15 - Estratégia adotada para sintetizar análogos dos produtos ativos Hirsutina (**48**) e Hirsuteína (**49**).

Inicialmente retirámos partido da existência de dois protocolos distintos para reações de α -amidociclização intramolecular em que a estereoquímica absoluta final do carbono C-12b depende da escolha do reagente para abertura do anel de oxazolidina (**Esquema 16**). Os compostos **63-67** foram sintetizados através da reação das oxazolo-piperidonas apropriadas na presença de HCl em etanol (procedimento **a**). Estas ciclizações apresentaram rendimentos entre 36-98% tendo sido obtido um único isómero de estereoquímica 6*S*,12*bR*. Já o composto **68** foi sintetizado na presença de um ácido de lewis (BF₃·OEt₂) em diclorometano (procedimento **b**). Apresentou um rendimento de 46% e tendo sido obtido um único isómero de estereoquímica 6*S*,12*bS* (**Tabela14**) [103].

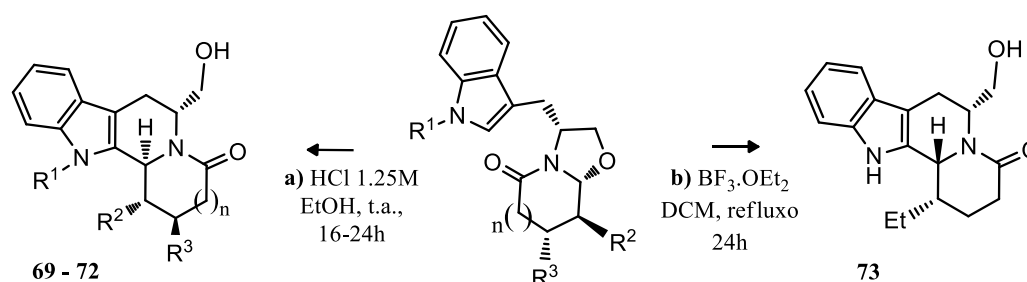


Esquema 16 - Síntese estereoseletiva de Indolo[2,3-a]quinolizidinas derivadas do S-triptofanol. Procedimento **a**: HCl/EtOH, t.a.; procedimento **b**: BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, Δ.

Tabela 14 - Rendimentos obtidos para a síntese de Indolo[2,3-a]quinolizidinas derivadas do *S*-triptofanol

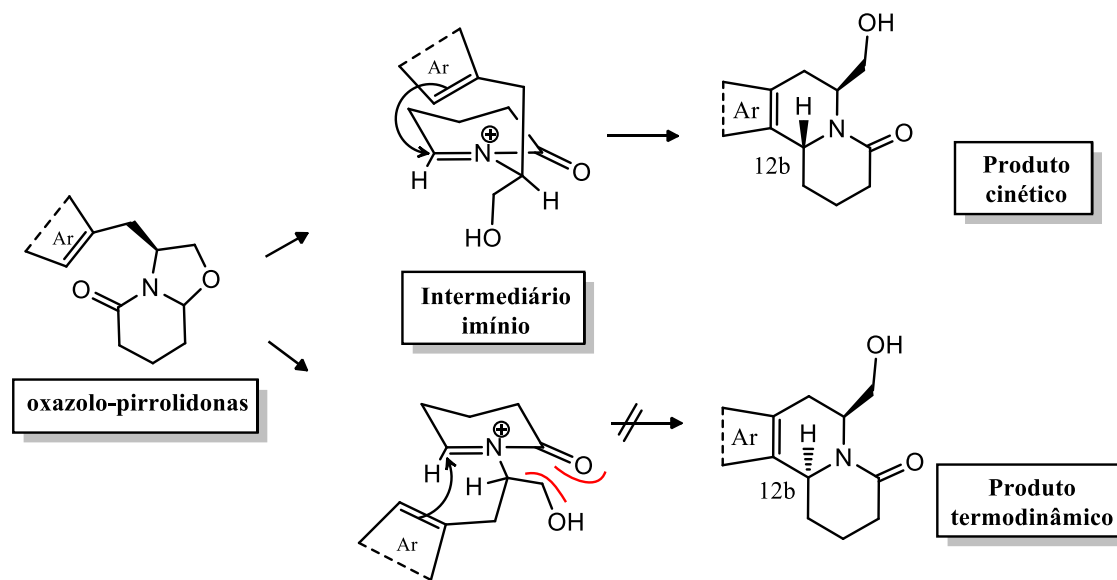
| Composto | n | R ¹ | R ² | R ³ | Procedimento | Tempo de Reacção (h) | η(%) |
|----------|---|----------------|----------------|------------------------------------|--------------|----------------------|------|
| 63 | 0 | H | H | H | a | 16 | 36 |
| 64 | 1 | H | H | H | a | 48 | 52 |
| 65 | 1 | Bn | H | H | a | 24 | 80 |
| 66 | 1 | H | Et | H | a | 48 | 53 |
| 67 | 1 | H | H | CH ₂ CO ₂ Me | a | 24 | 98 |
| 68 | 1 | H | Et | H | b | 6 | 46 |

No seguimento da nossa estratégia enantioselectiva, também foi sintetizada uma pequena biblioteca de indolo[2,3a]quinolizidinas derivadas do *R*-triptofanol (**Esquema 17**). Os compostos **69-72** foram sintetizados através da reacção das oxazolo-piperidonas apropriadas de acordo com o procedimento **a**. As reacções apresentaram um rendimento entre 60-92% (**Tabela 15**). O composto **69** foi obtido através da ciclização de uma oxazolo-pirrolidona tendo sido obtida uma indolo[2,3a]indolizidina que servirá para explorar o efeito de contração de um anel de piperidona.

**Esquema 17** - Síntese estereoselectiva de Indolo[2,3-a]quinolizidinas derivadas do *R*-triptofanol. Procedimento **a**: HCl/EtOH, t.a.; procedimento **b**: BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, Δ.**Tabela 15** - Rendimentos obtidos para a síntese de Indolo[2,3-a]quinolizidinas derivadas do *R*-triptofanol

| Composto | n | R ¹ | R ² | R ³ | Procedimento | Tempo de Reacção (h) | η(%) |
|----------|---|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------------|------|
| 69 | 0 | H | H | H | a | 16 | 60 |
| 70 | 1 | H | H | H | a | 24 | 75 |
| 71 | 1 | Bn | H | H | a | 3 | 80 |
| 72 | 1 | H | Et | H | a | 24 | 92 |
| 73 | 1 | H | Et | H | b | 16 | 92 |

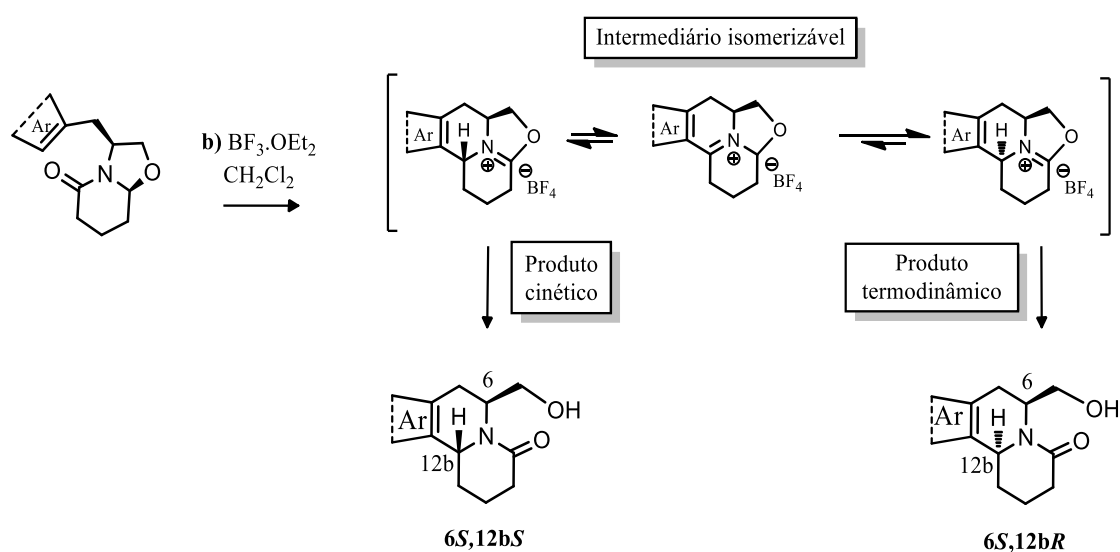
Em comparação com a série de derivados do *S*-triptofanol, os derivados do *R*-triptofanol apresentaram em média rendimentos superiores. É o caso dos pares de enantiómeros **64/70** (52% - 48h; 75% - 24h, respetivamente) e **66/72** (53% - 48h; 92% - 16h, respetivamente) sintetizados utilizando HCl. O mesmo se verificou para as reações com BF₃.OEt₂, como se observa para o par de enantiómeros **68/73** (46% - 36h; 92% - 16h). Estes resultados parecem sugerir que tempos de reação superiores a 24h resultam em menor rendimento. No caso particular dos derivados *N*-benzilados o tempo de reação não parece influenciar o rendimento obtido na medida em que o composto **65** apresentou 80% de rendimento após 24h de reação e composto **71** foi obtido com exatamente o mesmo rendimento com apenas 3h de reação. Este resultado pode ser explicado se tivermos em conta o mecanismo reacional para esta ciclização intramolecular. A introdução de um substituinte alquílico confere maior capacidade de deslocalização do par de eletrões não partilhado do NH-indole. Esta maior possibilidade de deslocalização eletrónica revela-se como uma vantagem para a estabilização do intermediário imínio, quando comparado com os seus análogos 1H-Indole. A estereoquímica final exibida pelas indolo[2,3-*a*]quinolizidinas, também pode ser explicada pela análise do mecanismo da reação (**Esquema 18**) [104].



Esquema 18 - Mecanismo proposto para a síntese estereoseletiva de Indolo[2,3-*a*]quinolizidinas com HCl.

Nas reações com HCl (procedimento **a**), a estereoquímica absoluta do centro quiral 12b_S é controlada pelo grupo hidroximetil que atua como um bom indutor quiral. Após abertura do anel de oxazolidina vai ocorrer o ataque nucleofílico por parte

do anel de indole ao carbono α -imínio. Este ataque ocorre pelo lado estericamente menos impedido devido às repulsões eletrónicas entre o carbonilo da piperidona e o grupo hidroximetilo. O anel de indole aproxima-se do catião imínio pela face oposta ao grupo hidroximetilo o que resulta na orientação do H-12b para cima do plano definido pela quinolizidina. Já a reação com $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (procedimento **b**) dá origem a uma estereoquímica 12bR. Este resultado pode ser explicado se considerarmos a formação de um intermediário que permite a isomerização do centro quiral C-12b (**Esquema 19**). Esta isomerização é favorecida na medida em que gera o produto termodinamicamente mais estável, em que o hidrogénio H-12b está orientado para o lado oposto ao grupo hidroximetilo [103].



Esquema 19 - Mecanismo proposto para a síntese estereoseletiva de Indolo[2,3-a]quinolizidinas com o procedimento **b**.

As indolo[2,3a]quinolizidinas foram então avaliadas como antagonistas do NMDAR e os resultados obtidos estão sumarizados na **Tabela 16**. O composto **65** foi o derivado mais potente e revelou um IC_{50} de 30.4 μM . Este composto é um derivado do *S*-triptofanol e partilha a mesma estereoquímica dos produtos naturais ativos em C-12b, mas não apresenta substituintes no anel de piperidona. Sendo 3x mais potente que a amantadina, apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novos antagonistas do NMDAR. Em relação aos derivados do *S*-triptofanol, o composto **63**, com um anel de pirrolidona, apresentou um IC_{50} de 503 μM . Este resultado indica que a existência de um anel de piperidona é essencial para a atividade. Sendo ligeiramente mais lipofílico e com maior grau de liberdade que o anel de pirrolidona, pode hipotetizar-se que permite o estabelecimento de mais contatos hidrofóbicos com o NMDAR. O derivado *N*-

benzilado **65** revelou-se inativo. Esta observação dá origem a duas hipóteses: i) provavelmente não existe espaço no sítio ativo desta classe de compostos para acomodar um substituinte lipofílico e volumoso na vizinhança do anel de indole; ii) a ligação NH-indole do composto **64** pode estabelecer pontes de hidrogénio com o NMDAR e a sua alquilação resulta na impossibilidade dessa interação.

Tabela 16 - Atividades biológicas das Indolo[2,3a]quinolizidinas sintetizadas.

| Derivados S | | | Derivados R | | |
|-------------|-----------|-----------------------|-------------|-----------|-----------------------|
| Ref. | Estrutura | IC ₅₀ (μM) | Ref. | Estrutura | IC ₅₀ (μM) |
| 63 | | 503 | 69 | | >500 |
| 64 | | 30,4 | 70 | | >300 |
| 65 | | >500 | 71 | | 392 |
| 66 | | >500 | 72 | | 430 |
| 67 | | >100 | | | |
| 68 | | >500 | 73 | | 420 |

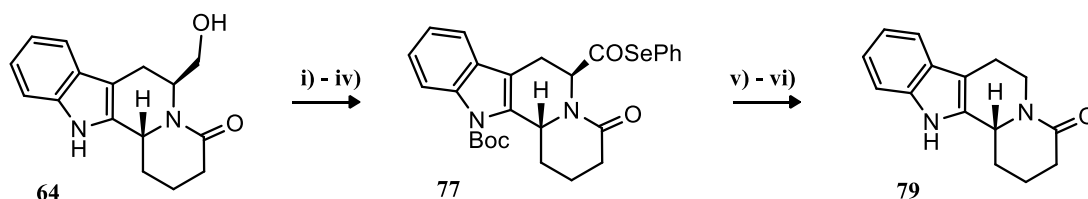
Controlo positivo – Amantadina, IC₅₀ = 92 μM

O composto **67**, com um grupo metileno-éster metílico em C-2, apresentou um IC₅₀ superior a 100 μM. Por comparação com o composto **64**, podemos observar que a substituição em C-2 não parece favorecer a atividade no entanto, mais ensaios

biológicos necessitam de ser feitos de forma a determinar o seu valor de IC_{50} e retirar conclusões concretas. Os compostos **66** e **68**, de estereoquímicas opostas em C-12b, demonstram que a presença de um grupo etilo em C-1 resulta na diminuição da atividade. Através da análise dos resultados obtidos para os derivados do *R*-triptofanol, pode hipotetizar-se que existe enantioseletividade por parte do NMDAR, na medida em que o composto **70** (enantiómero do composto **64**) foi pelo menos 10x menos ativo que o composto mais potente. No entanto, observou-se alguma atividade para os compostos com substituições lipofílicas, como é o caso dos derivados **71-73**. O composto *N*-benzilado **71**, apresentou um IC_{50} de 392 μ M, sendo mais potente que o seu enantiómero *S*. A introdução de um grupo etilo em C-1, nos compostos **72** e **73**, parece conferir alguma atividade a estes derivados (IC_{50} de 430 e 420 μ M, respetivamente). Ainda em relação aos compostos **66** e **68**, a variação da estereoquímica em C-12b resulta na retenção da atividade. Em conjunto, estes resultados são difíceis de racionalizar, pois a estereoquímica em C-12b define a orientação tridimensional do anel de piperidona e conseqüentemente a orientação espacial do grupo etilo não é idêntica. No entanto, são mais ativos que os seus enantiómeros **66** e **68** provavelmente por estabelecimento de mais contatos hidrofóbicos com o NMDAR. Será necessário sintetizar e avaliar mais análogos destes compostos para se poder retirar conclusões mais objetivas.

Tornou-se imperativo verificar o efeito da presença do grupo hidroximetilo do composto **64** pois os produtos naturais ativos **48** e **49** não possuem este tipo de substituinte em C-6. Com esse objetivo em mente, adotámos uma estratégia de descarboxilação radical já descrita na literatura para remover o grupo CH_2OH (**Esquema 20**) [105, 106]. Este processo apresentou um total de 6 etapas, envolveu a utilização de grupos protetores e apresentou um rendimento global de 9%. Utilizando como material de partida a indolo[2,3a]quinolizidina **64**, procedeu-se à oxidação do grupo hidroximetilo a aldeído na presença de IBX (**i**). O aldeído **74** foi isolado com um rendimento de 62%. De seguida, protegeu-se a ligação N-H do indole na forma de carbamato (**ii**, composto **75**). Para tal utilizou-se Boc_2O na presença de TEA (base) e DMAP (catalisador). Esta proteção decorreu com um rendimento de 85% e é fundamental para evitar a formação de *N*-óxidos durante a oxidação de *pinnick*. A oxidação do aldeído a ácido carboxílico (**iii**, composto **76**) foi levada a cabo na presença de $tBuOH$, 1-metil-ciclohexeno e uma solução aquosa oxidante de $NaClO_2$ e NaH_2PO_4 e apresentou um rendimento de 71%. Uma vez gerado o ácido carboxílico, a reação com

Se₂Ph₂ deu origem ao composto **77** (**iv**) com 48% de rendimento. O derivado selenado **77**, na presença de AIBN (**v**), dá origem a uma cisão homolítica da ligação selénio-(C=O) gerando um radical Se[•]-Ph, monóxido de carbono e um radical no carbono C-6 da indolo[2,3a]quinolizidina. A reação radicalar termina por adição de TBTH (fornecedor de H[•]) e o composto **78** foi isolado com 98% de rendimento. Por fim, a desproteção da amina na presença de TBAF em THF (**vi**) gerou o composto desejado (**79**) com 53% de rendimento.

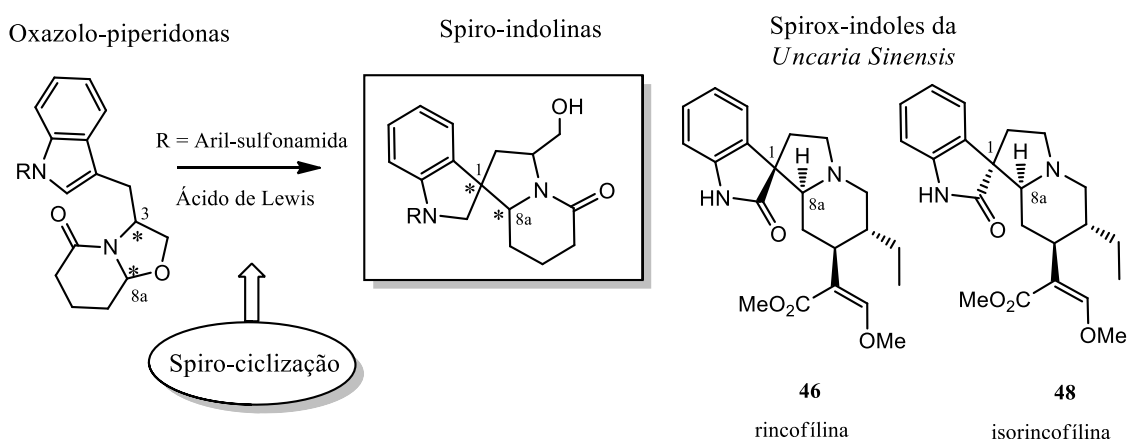


Esquema 20 - Remoção do apêndice hidroximetilo por reação radicalar: **i)** DMSO, IBX, t.a., 24h, 62%; **ii)** THF, TEA, DMAP, Boc₂O, t.a., 2h, 85%; **iii)** oxidação de *pinick* - CH₃CN, ^tBuOH, NaClO₂, NaH₂PO₄, 1-metil-ciclohexeno, t.a., 24h, 71%; **iv)** CH₂Cl₂, Se₂Ph₂, P(Bu)₄, 0°C, 22h, 48%; **v)** Tolueno, Δ, AIBN, TBTH, 1h, 98%; **vi)** solução 1.0M de TBAF em THF, Δ, 20h, 53%.

De momento aguardamos com expectativa os resultados da atividade biológica do composto **79** pois permitirá avaliar se a presença do grupo hidroximetilo é importante, para a atividade do composto **64**.

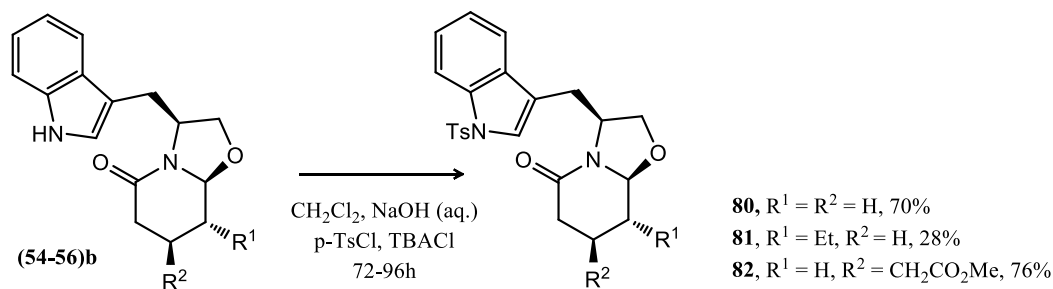
2.4. Síntese e Avaliação Biológica de Spiro-Indolinas

Na tentativa de mimetizar a estrutura dos spirox-indoles da *Uncaria Sinensis* que atuam como inibidores do NMDAR, sintetizou-se uma pequena biblioteca de spiro-indolinas a partir das oxazolo-piperidonas (**54-56**)b e (**57-59**)b (**Esquema 21**). Estas oxazolo-piperidonas foram protegidas no átomo de azoto do indole com grupos aril-sulfonamidas.



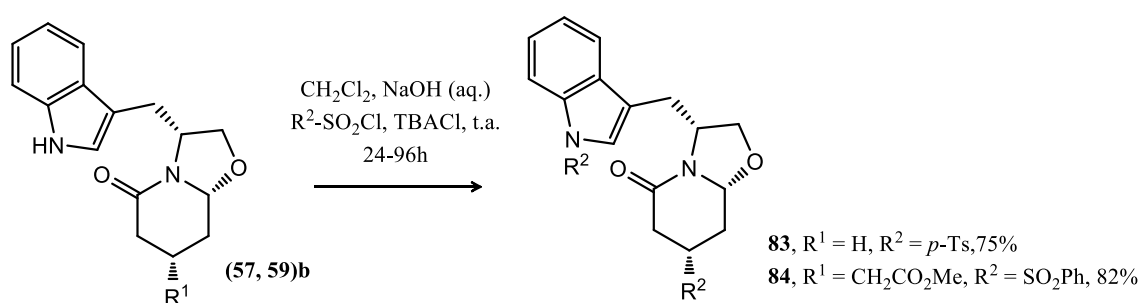
Esquema 21 - Estratégia adotada síntese de análogos (spiro-indolinas) dos spiro-oxoindoles ativos como antagonistas do NMDAR presentes na *Uncaria Sinensis*.

Os compostos **80** e **82** foram sintetizados com recurso a um protocolo de transferência de fase (**Esquema 22**) com rendimentos de 70% e 76%, respetivamente. Estes valores estão de acordo com resultados descritos na literatura [107]. No caso do composto **81** o rendimento foi de apenas 28%. Este resultado justifica-se pelo pouco consumo de material de partida observado, que ainda subsistia ao final de 96h de reação.



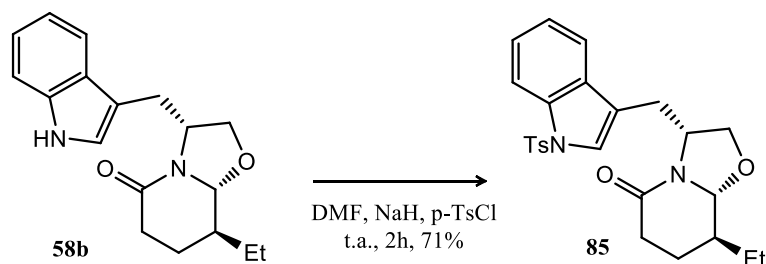
Esquema 22 - Síntese das lactamas **80-82** derivadas do *S*-triptofanol

Tendo em mente a enantioselectividade exibida pelo NMDAR, foi também sintetizado uma série de derivados do *R*-triptofanol (**Esquema 23**). Novamente, a utilização de um protocolo de transferência de fase tornou-se útil na síntese dos compostos **83** e **84** que apresentaram rendimentos de 75% e 82% respetivamente. Através da utilização de cloreto de benzeno-sulfonilo na síntese do composto **84**, foi possível observar um aumento de rendimento de quase 10% em comparação com o seu análogo *N*-*p*-toluenosulfonamida **82**. Também é de realçar que esta reação estava concluída ao final de 24h provavelmente devido à utilização da mínima quantidade de CH₂Cl₂. Desta maneira foi possível aumentar a concentração do material de partida que entra em contato com o NaOH da fase aquosa.



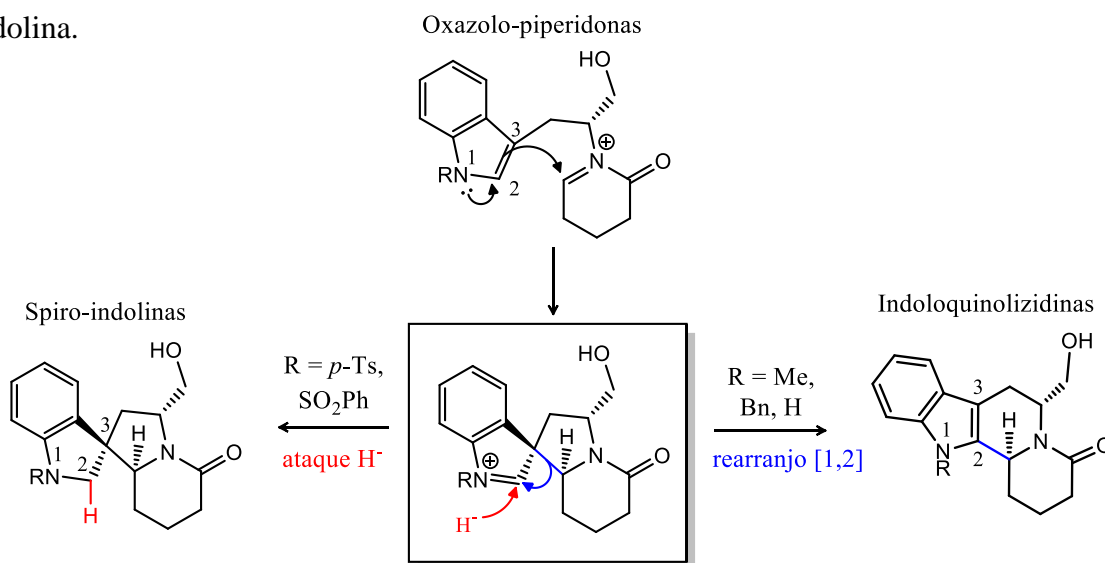
Esquema 23 - Síntese das lactamas **83** e **84** derivadas do *R*-triptofanol

De forma a tentar contornar os longos tempos de reação que se verificaram necessários com as reações de transferência de fase, na síntese do composto **85** foi adotada outra estratégia de *N*-tosilação com recurso a uma base forte (NaH) em DMF. Esta reação estava completa ao final de 2h e parte do composto **85** precipitou no final do *work-up* na forma de cristais brancos. Para além de ter apresentado um bom rendimento (71%) quando comparado com o seu enantiómero **81** (28%), este procedimento trouxe claras vantagens no que diz respeito à poupança de recursos laboratoriais.



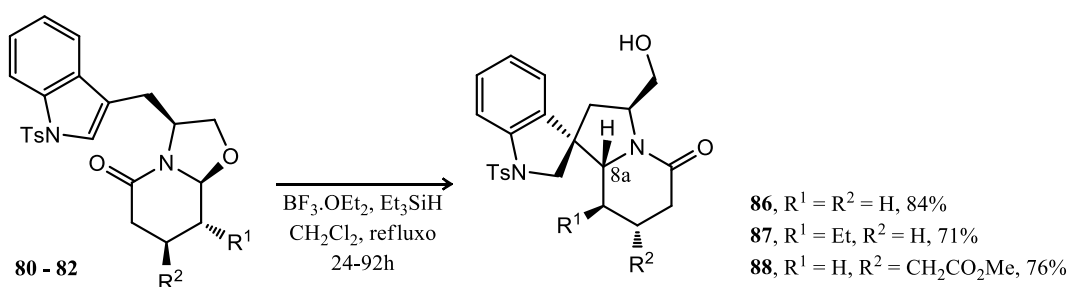
Esquema 24 - Síntese da lactama **85** derivada do *R*-triptofanol

Uma vez sintetizadas as latamas *N*-protegidas derivadas do *S* e do *R*-triptofanol, procedeu-se às reações de spiro-ciclicação. A abertura do anel de oxazolidina por $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ é seguida do ataque nucleofílico por parte do C-3 do indole. Ao contrário do que acontece na síntese de indolo[2,3a]quinolizidinas, quando o NH do indole está ligado a um grupo eletroatrator de elétrons como é o caso das sulfonamidas, não ocorre o rearranjo [1,2] marcado a azul no (Esquema 25). Assim, na presença do trietilsilano, o ataque nucleofílico estereoseletivo por parte do hidreto dá origem a uma spiro-indolina.



Esquema 25 - Proposta de mecanismo para a síntese de spiro-indolinas a partir de oxazolo-lactamas *N*-protegidas com grupos aril-sulfonamida.

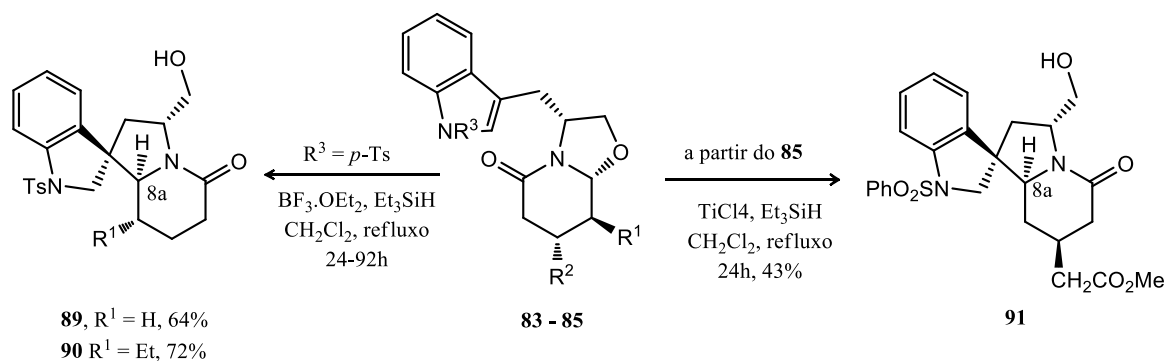
As spiro-indolinas derivadas do *S*-triptofanol (compostos **86 - 88**) apresentaram rendimentos entre 71-84% (Esquema 26). Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos já realizados [107].



Esquema 26 - Síntese das spiro-indolinas derivadas do *S*-triptofanol.

No seguimento da nossa estratégia enantioselectiva, foram também sintetizadas três spiro-indolinas derivadas do *R*-triptofanol com rendimentos entre 43-72% (compostos **86 - 88**, Esquema 27). À semelhança dos seus enantiómeros derivados do

S-triptofanol, os longos tempos de reação (24-92h) também se revelaram necessários para se observar o consumo do material de partida. O composto **89** apresentou o menor rendimento de todas as spiro-ciclizações. Curiosamente foi a única reação realizada com TiCl_4 como ácido de lewis. Com base nesta observação e se considerarmos que não há grande diferença de eletronegatividade entre o grupo benzeno-sulfonilo e o *p*-toluenosulfonilo, o ácido de lewis mais adequado para este género de reação parece ser o $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ uma observação que está de acordo com estudos já realizados [107].



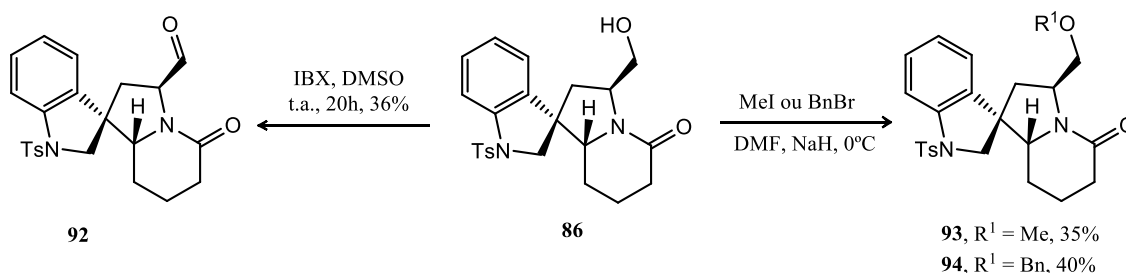
Esquema 27 - Síntese das spiro-indolinas derivadas do *R*-triptofanol.

Através da análise dos desvios químicos de ^1H RMN é possível observar o efeito da spiro-ciclização sobre o próton H-8a (**Tabela 17**). O desvio químico do próton H-8a nas lactamas *N*-tosiladas **80-81**, surge entre 4.34-4.70 ppm. Nas spiro-indolinas **83-85**, este próton surge entre 3.38-3.71 ppm. Após a spiro-ciclização, o sinal movimentou-se para campo mais alto. Esta variação está relacionada com o afastamento deste próton do oxigénio da oxazolidina para a vizinhança de um carbono quaternário (C-1), menos eletronegativo.

Tabela 17 – Desvios químicos δ (ppm) observados para as spiro-indolinas **80 – 85**.

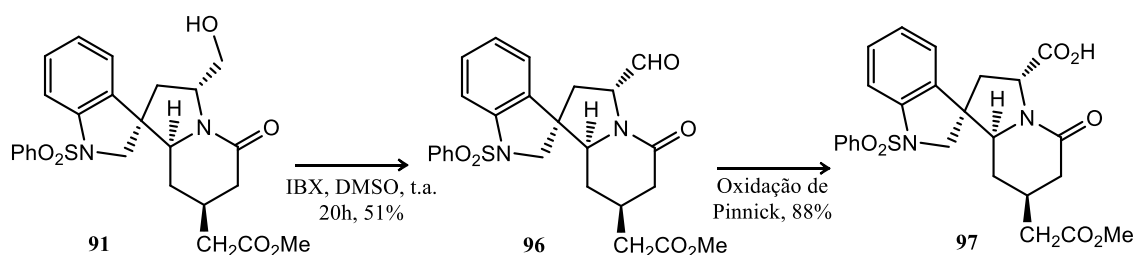
| ^1H RMN δ (CDCl_3 , ppm) | | | |
|--|------|-----------------|------|
| Lactamas <i>N</i> -tosiladas | | Spiro-Indolinas | |
| Composto | H-8a | Composto | H-8a |
| 80 | 4.35 | 83 | 3.71 |
| 81 | 4.34 | 85 | 3.38 |
| 82 | 4.70 | 84 | 3.71 |

De seguida, sintetizou-se um pequeno grupo de derivados para determinar os requisitos estruturais desta série de compostos como antagonistas do NMDAR. Face à grande estabilidade da ligação *N*-Tosilo, a restituição da função amina teria de ser levada a cabo com Na ou Mg, redutores muito fortes e incompatíveis com grupos hidroxilo. A eliminação do grupo hidroximetilo permitiria mimetizar mais corretamente os spiro-alcalóides ativos da *Uncaria Sinensis* e simultaneamente desproteger a amina da indolina. Tendo este fato em mente, a nossa estratégia inicial consistiu na descarboxilação induzida por uma reação radicalar que foi já descrita no Capítulo 4 (síntese do composto **79**). O aldeído **92**, foi sintetizado com IBX em DMSO. Infelizmente a reação apresentou apenas 36% de rendimento. Face a este revés e de forma a camuflar a reatividade ligação OH, tentamos transformar o grupo hidroxilo num éter. As *O*-alquilações com iodeto de metilo e brometo de benzilo em DMF deram origem aos compostos **93** e **94** com rendimentos de 35% e 40%. (**Esquema 28**).



Esquema 28 - Modulação da spiro-indolina **86**.

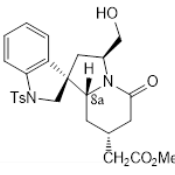
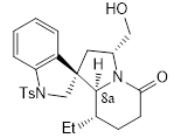
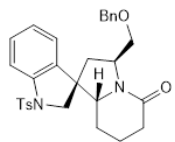
Por fim, derivatizou-se o composto **91** que apresenta a mesma estereoquímica em C-8a quando comparado com os produtos naturais da *Uncaria Sinensis*. Mais uma vez, procedeu-se à oxidação do grupo hidroximetilo com IBX tendo sido obtido o composto **96** com um rendimento de 51%. A transformação do aldeído a ácido carboxílico foi levada a cabo com recurso à oxidação de *pinnick*, tendo sido obtido o composto **97** com um rendimento de 88% (**Esquema 29**) [105].



Esquema 29 - Esquema reacional para a modulação do apêndice metileno-hidroxilo da spiro-indolina **91**. Síntese do aldeído **96** e a sua oxidação a ácido carboxílico **97**. Oxidação de *pinnick* – ¹BuOH, 1-metil-ciclohexeno, CH₃CN, NaClO₂, NaH₂PO₄; 3h, t.a., 88%.

Até à data de escrita desta dissertação, aguardamos com expectativa os resultados da avaliação biológica desta serie de spiro-indolinas. No entanto, os resultados disponíveis estão sumarizados na **Tabela 18**. Os compostos testados **88**, **90** e **94** não apresentam atividade como antagonistas do NMDAR. A partir desta observação e por comparação das estruturas das spiro-indolinas com os produtos naturais **46** e **48**, um dos requisitos para a atividade pode ser a existência de um grupo spirox-indole. No entanto e antes de se poder concluir que as spiro-indolinas não pertencem a uma classe nova de antagonistas do NMDAR, é necessário testar estes compostos sem a proteção do átomo de azoto da indolina. O grupo aril-sulfonamida pode conferir demasiado volume aos compostos e também pode inviabilizar o estabelecimento de pontes de hidrogénio por parte do NH da indolina.

Tabela 18 - Atividades biológicas das spiro-indolinas.

| Ref. | Estrutura | IC ₅₀ (μM) |
|-----------|---|-----------------------|
| 88 |  | >500 |
| 90 |  | >500 |
| 94 |  | >500 |

Controlo positivo – Amantadina, IC₅₀ = 92 μM

2.5. Química Computacional

A descoberta de novos princípios ativos desde a conceção, desenvolvimento e até à sua comercialização é um processo demorado e muito dispendioso financeiramente [108]. Qualquer ferramenta ou técnica que permita aumentar o rendimento de qualquer destas fases do desenvolvimento de novos princípios ativos traz consigo claras vantagens [109]. A química computacional ajuda a compreender melhor os detalhes do problema e a verificar hipóteses através da sua capacidade de coordenar e racionalizar as observações feitas experimentalmente [110]. As estratégias adotadas variam consoante a qualidade de informação que existe disponível. Caso não exista estrutura cristalográfica de boa resolução do alvo biológico em questão, é possível tentar uma estratégia mais indireta onde se utilizam critérios de similaridade estrutural para desenvolver análogos de ligandos já existentes. Caso exista informação estrutural sobre o alvo biológico, é possível explorar diretamente os requisitos tridimensionais que satisfazem as necessidades estereo-eletrónicas do sítio de ligação em questão [111]. No caso particular dos NMDAR, já várias técnicas computacionais foram usadas com sucesso. Alguns exemplos incluem a construção de modelos tridimensionais de recetores por homologia [112], estudos de docking para racionalização de resultados e previsão de novos ligandos [113] e na previsão de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas através da utilização de descritores moleculares das propriedades estereo-eletrónicas de ligandos (2D e 3DQSAR) [114-116]. Existem também técnicas para geração de farmacóforos a partir de ligandos conhecidos isto é, a procura do conjunto de características estruturais tridimensionais que reúnem as propriedades químicas necessárias para a atividade biológica [117] e *screening* virtual em bases de dados de compostos biologicamente ativos [118, 119].

2.5.1. Docking Molecular

Inicialmente foi levada a cabo uma estratégia em que se pretendia obter dados concretos que relacionavam as características estruturais do recetor com a atividade biológica dos compostos sintetizados (**Figura 33**). Isto é, estudando os vários sítios de ligação dos NMDAR através do *docking* molecular, seria possível identificar os grupos funcionais dos compostos sintetizados que seriam a chave para a sua atividade

biológica. Uma vez identificados os grupos químicos responsáveis pela atividade biológica, seria possível orientar a síntese de novos análogos dos compostos ativos descritos no capítulo 2.1 – 2.4 para o desenvolvimento de antagonistas que permitissem retirar conclusões SAR.

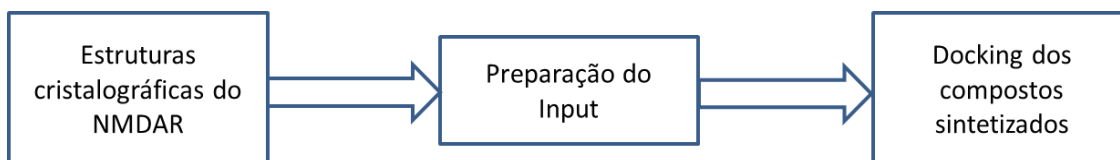


Figura 33 – Estratégia de docking adotada. O objectivo final era revelar os requisitos estruturais dos compostos sintetizados responsáveis pela atividade biológica.

Para tal, tornou-se necessário procurar a estrutura cristalográfica que reunisse as melhores condições para o estudo, nomeadamente boa resolução ($< 2.5\text{\AA}$) e um antagonista co-cristalizado. Após análise cuidada das estruturas cristalográficas descritas na literatura, foram escolhidos os sítios de ligação da glicina (código PDB: 1PBQ, ligando - 5,7-DCKA, **17**) e o sítio de ligação de inibidores NR1-NR2B (código PDB: 3QEL, ligando – ifenprodil, **40**). Uma vez escolhida a estrutura que melhor satisfazia os critérios anteriormente apontados, foi necessário preparar o *input*, nomeadamente remover as águas co-cristalizadas, prever a protonação dos resíduos do recetor a pH fisiológico, construir as bases de dados de compostos a testar e validar o *docking*. A validação do *docking* consistiu na criação de uma metodologia que avaliasse a reprodutibilidade dos dados experimentais pelo *software*. O método escolhido foi a avaliação do valor da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) por sobreposição da conformação do ligando co-cristalizado com a pose de *docking* devolvida pelo *software*. Valores de RMSD $< 1.2\text{\AA}$ foram considerados como aceitáveis. Após a validação do *docking*, as estruturas dos compostos sintetizados nos capítulos 2.1 a 2.4 foram divididas por famílias com base na sua estrutura (oxazolo-isoindolinonas, oxazolo-pirrolidonas, oxazolo-piperidonas e indolo[2,3a]quinolizidinas) e foram *dockados* no sítio de ligação em questão. Durante o processo de *docking*, o *software* gera pontuações (*scores*) que classificam o tipo de interação com o recetor – no caso do *software Molecular Operating Environment* (MOE), a referência usada foi a energia total do composto *dockado*, calculada com base na energia da conformação adotada e na energia da interação com os resíduos do recetor. O objetivo desejável era estabelecer uma correlação entre as moléculas com melhor pontuação e os compostos mais ativos

aqui descritos. Em relação ao sítio de ligação da glicina, o processo de validação de *docking* foi bastante satisfatório, pois o *software* conseguiu reproduzir a estrutura do 5,7-DCKA com um RMSD de apenas 0.2 Å. As principais interações que este ligando estabelece com o recetor estão sumarizadas na **Figura 34** e destaca-se a interação iónica com os resíduos arginina 131 e treonina 126, a interação π - π com o resíduo fenilalanina 92 e também uma ponte de hidrogénio com o resíduo prolina 124.

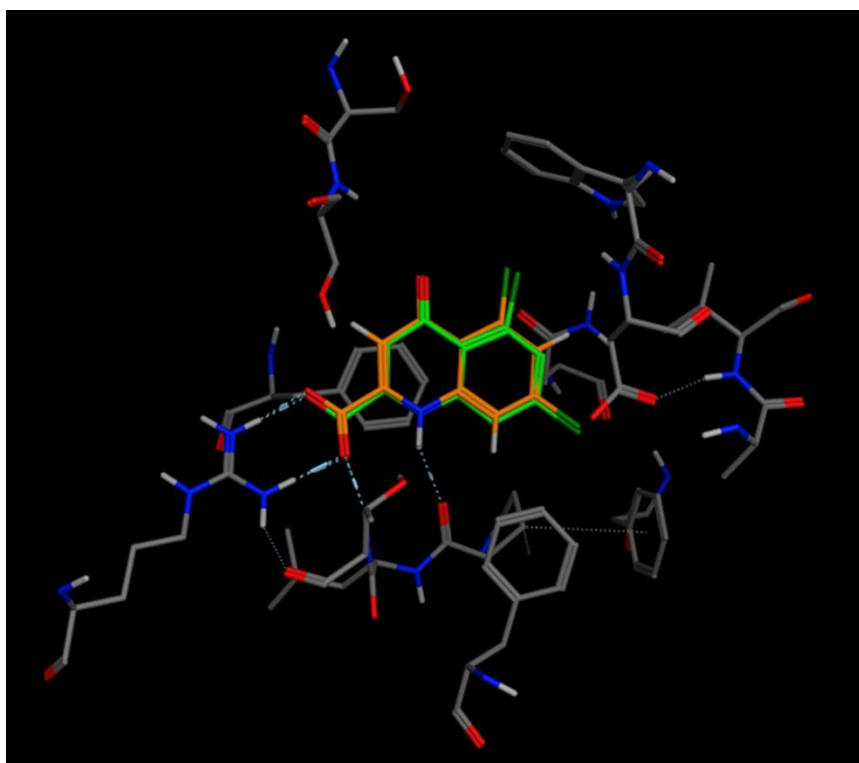
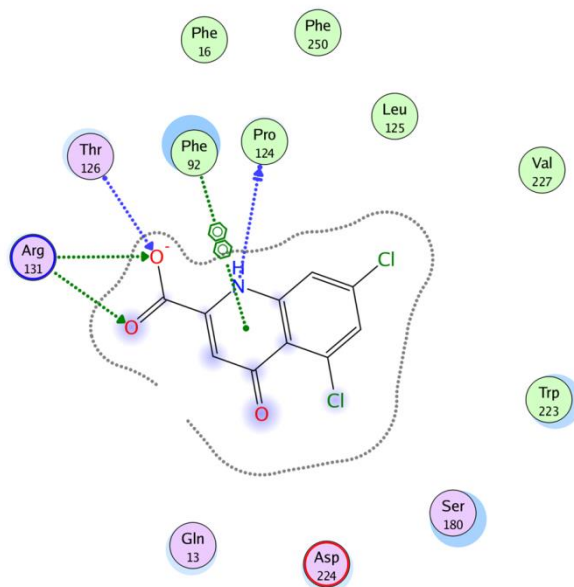


Figura 34 – Resultados obtidos na validação do *docking* molecular no sítio da glicina. Interações observadas do ligando 5,7-DCKA com os resíduos do sítio de ligação (fundo branco). Estrutura do 5,7-DCKA co-cristalizada (verde), sobreposta com a estrutura *dockada* pelo MOE (laranja) (fundo preto). RMSD = 0.23 Å.

Já em relação ao sítio de ligação do ifenprodil, a validação do *docking* também foi bastante satisfatória na medida em que o *software* conseguiu reproduzir a estrutura do ligando co-cristalizado com um RMSD de 1.17 Å. As principais interações deste ligando com o recetor estão sumarizadas na **Figura 35** e envolvem uma ponte de hidrogénio com o resíduo glutamato B236, interações H- π com os resíduos leucina A135, isoleucina B111, tirosina A109, fenilalanina B114 e também uma interação iónica com o resíduo glutamina B110.

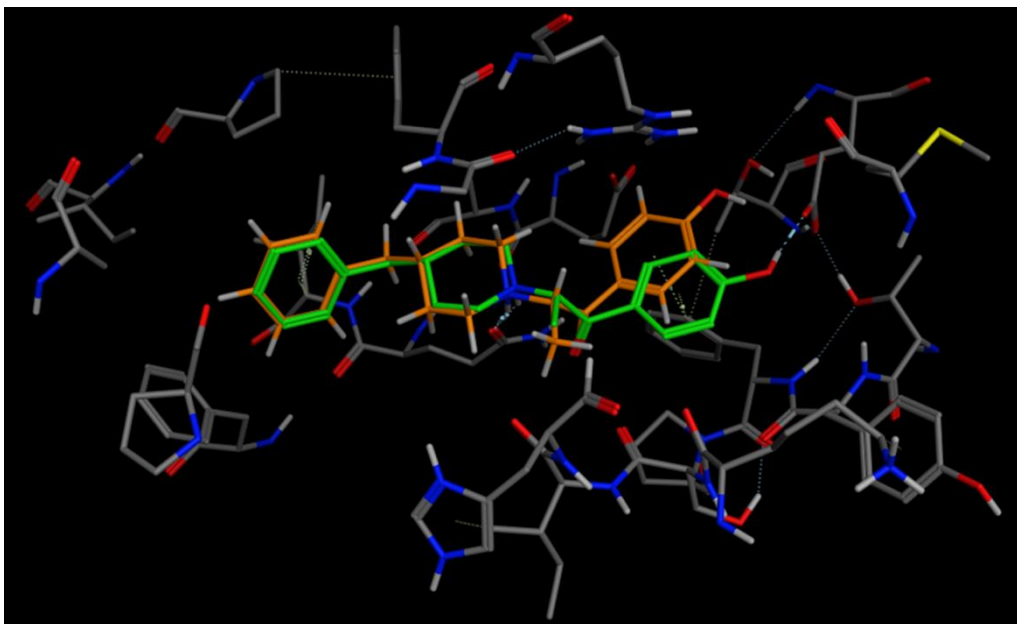
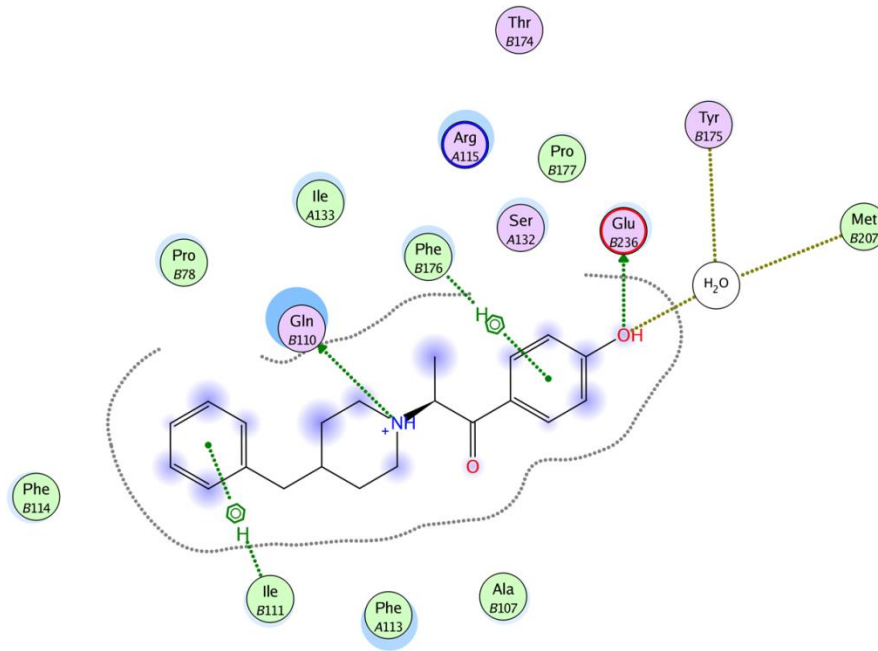


Figura 35 – Resultados obtidos na validação do docking molecular no sítio de ligação do Ifenprodil. Interações observadas entre o Ifenprodil e o sítio de ligação (fundo branco); Estrutura do Ifenprodil co-cristalizada (verde) sobreposta com a estrutura dockada pelo MOE (laranja) (fundo preto). RMSD = 1.17 Å.

Infelizmente, nos dois sítios de ligação estudados, não foi possível observar uma correlação entre as moléculas que apresentaram os melhores scores com os compostos biologicamente mais ativos. Estes resultados podem sugerir que os compostos ativos não atuam como inibidores competitivos da glicina ou como inibidores seletivos da subunidade NR1-NR2B.

2.5.2. Geração de Farmacóforos

Também foi explorada uma estratégia que envolveu a geração de farmacóforos a partir de inibidores NMDAR já conhecidos (**Figura 36**). Pretendia-se gerar um farmacóforo para cada classe de antagonistas conhecidos, agrupados de acordo com o seu modo de acção, de modo a reunir nas propriedades químicas dos pontos farmacóforicos e no seu respetivo arranjo tridimensional o motivo da atividade biológica. Uma vez gerado o farmacóforo, este seria comparado com a base de dados das estruturas sintetizadas nos capítulos 2.1 – 2.4. O objetivo desejável era que algum dos farmacóforos conseguisse detetar os compostos sintetizados ativos e, deste modo, providenciar pistas sobre o seu modo de ação.

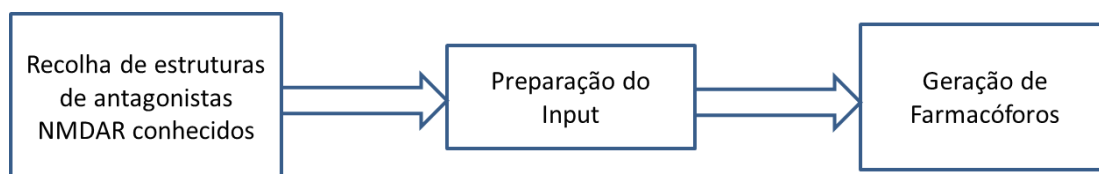


Figura 36 - Estratégia computacional adotada. O objectivo final era gerar farmacóforos de inibidores conhecidos, para detectar *hits* na base de dados dos compostos sintetizados.

Foram recolhidas 535 estruturas de compostos descritos como antagonistas NMDAR. De seguida, foram preparadas 4 bases de dados designadas por inibidores da glicina (88 estruturas), inibidores do glutamato (251 estruturas), bloqueadores de canal (164 estruturas) e inibidores análogos do ifenprodil (32 estruturas). A geração do ficheiro de *input* para o *software* MOE, envolveu a protonação das estruturas a pH fisiológico e a geração de bases de dados de conformações – este último processo revelou-se bastante demorado uma vez que o tempo de execução aumenta substancialmente com o número de graus de liberdade internos das estruturas químicas. De cada uma das bases de dados, foram seleccionadas 4 estruturas, utilizadas para construir 4 farmacóforos, um para cada modo de ação. As restantes estruturas foram

usadas para validação do farmacóforo. Os farmacóforos foram gerados através de duas ferramentas do *software* MOE, nomeadamente o alinhamento flexível e elucidação farmacofórica. Durante o alinhamento flexível, as estruturas químicas selecionadas são sobrepostas de acordo com volume molecular, dadores/aceitadores de prótons, ligações π e energia conformacional. As sobreposições energeticamente mais favoráveis foram escolhidas e os pontos farmacofóricos foram calculados através da ferramenta *consensus*, que avalia automaticamente os pontos farmacofóricos comuns às várias estruturas atribuindo-lhes uma determinada posição e volume tridimensional. A ferramenta de elucidação farmacofórica calcula todas as conformações das estruturas químicas selecionadas e verifica a existência de pontos farmacofóricos em comum entre elas. A diferença em relação ao alinhamento flexível, é que este método não dá tanta ênfase à sobreposição molecular focando-se mais na possibilidade da estrutura química poder colocar os seus grupos químicos dentro do volume do ponto farmacofórico definido com uma conformação energeticamente favorável. Este processo é interativo e envolve um elevado número de experiências tentativa-erro, em que os farmacóforos gerados pelo *software* são continuamente validados. Isto é, caso o farmacóforo não consiga discriminar os antagonistas da sua classe, é retificado e testado novamente até que consiga identificar apenas os antagonistas com o mesmo modo de ação. Quando isto se verifica, significa que o farmacóforo reúne os pontos farmacofóricos que distinguem as estruturas de acordo com o seu modo de ação. Estas propriedades tridimensionais são então consideradas como a “impressão digital” de potenciais antagonistas.

Os resultados para a validação do farmacóforo dos inibidores da glicina estão sumarizados na **Figura 37**. O farmacóforo dos inibidores da glicina apresenta 4 pontos farmacofóricos constituídos por uma zona hidrofóbica, uma zona aromática, um dador e um aceitador de pontes de hidrogénio. Interessantemente, quando comparamos estas interações com as identificadas nos resultados obtidos para o *docking* no sítio de ligação da glicina, apenas fica a faltar a interação iónica. O *software* reconheceu esta interação mas infelizmente teve de ser removida manualmente para que o farmacóforo da glicina não detetasse também os inibidores do sítio do glutamato, cujas interações são essencialmente de caráter iónico. Esta observação é de certo modo esperada, visto que a interação com o resíduo arginina no sítio da glicina da NR1 pode ocorrer com grupos químicos com ligações muito polarizadas como é o caso de uma amida (Ver quinoxalenedionas e quinolonas, figuras **14** e **15** capítulo 1). Este farmacóforo consegue

identificar 90% dos antagonistas do sítio da glicina. Porém, ainda são detetados 33% dos inibidores competitivos do glutamato e 15% dos inibidores selectivos NR1-NR2B (falsos positivos).

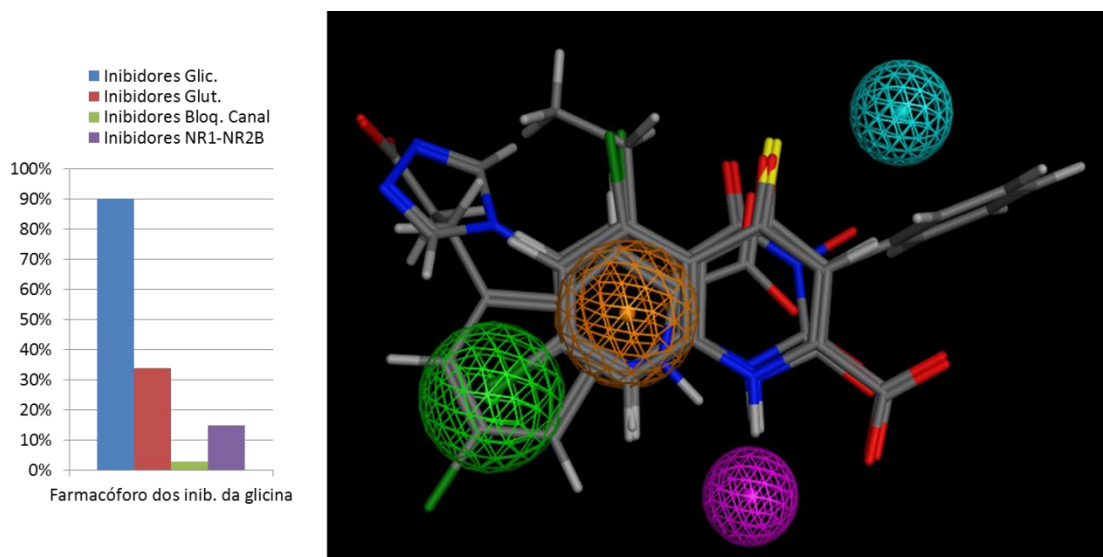


Figura 37 – Validação do farmacóforo dos inibidores do sítio da glicina. Esquerda - O poder discriminatório do farmacóforo. Direita - os pontos farmacofóricos selecionados: hidrofóbico (verde), aromático (laranja), Dador para pontes de hidrogénio (azul) e aceitador para pontes de hidrogénio (roxo).

O farmacóforo do glutamato assenta em 3 pontos farmacofóricos constituídos por 2 contatos aniónicos e um aceitador de pontes de hidrogénio como mostrado na **Figura 38**.

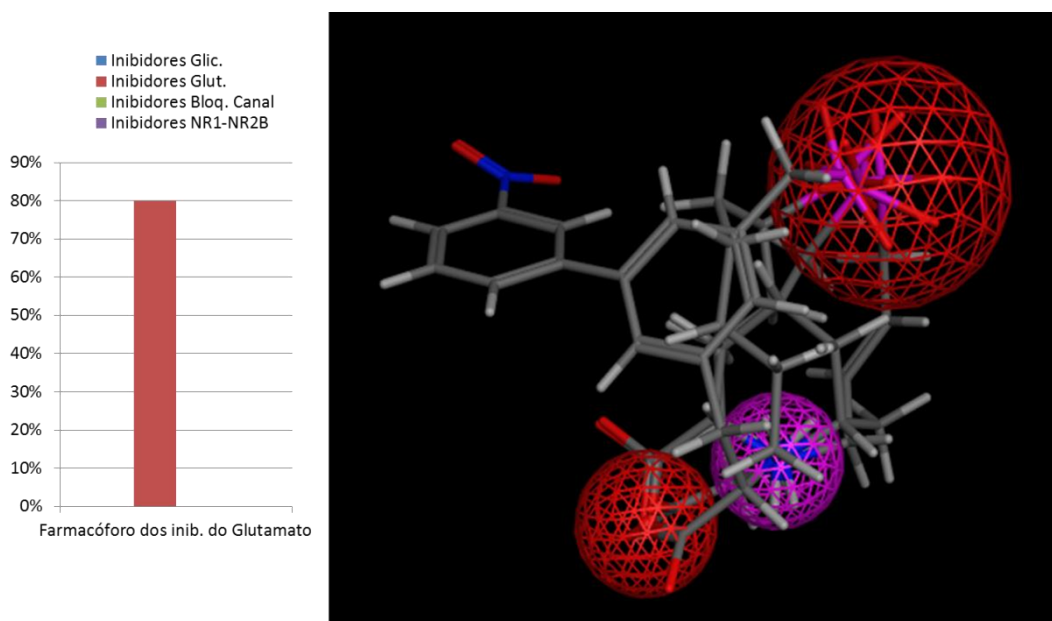


Figura 38 – Validação do farmacóforo dos inibidores do sítio de ligação do glutamato. Esquerda - O poder discriminatório do farmacóforo. Direita - Os pontos farmacofóricos selecionados: zona aniónica (vermelho) e aceitador para pontes de hidrogénio (roxo).

De todos os farmacóforos é o que apresentou a melhor capacidade discriminatória tendo reconhecido 80% das estruturas de inibidores do sítio do glutamato e não detetou falsos positivos quando comparado com as restantes bases de dados. É importante salientar que este farmacóforo identificou todos os requisitos estruturais dos inibidores do sítio do glutamato descritos na literatura.

O farmacóforo dos bloqueadores de canal apresenta 3 pontos farmacofóricos constituídos por um contacto catiónico, uma zona de resíduos hidrofóbicos e uma zona aromática (**Figura 39**). Apresenta uma boa capacidade discriminatória, na medida em que consegue identificar 85% dos inibidores bloqueadores de canal e apenas deteta, no máximo, menos de 15% de falsos positivos nas bases de dados dos restantes inibidores. Quando comparamos os pontos farmacofóricos detetados com os requisitos estruturais descritos na literatura para esta classe de antagonistas, podemos confirmar que o farmacóforo consegue reunir os grupos químicos responsáveis pela atividade biológica dos antagonistas NNMDAR com este modo de ação.

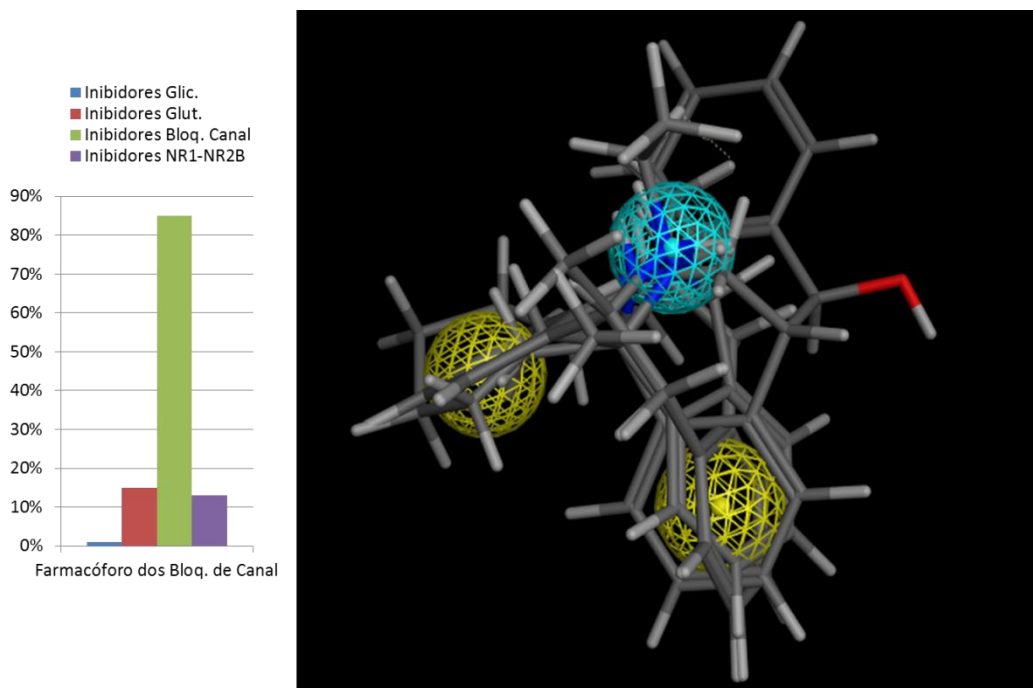


Figura 39 – Validação do farmacóforo dos bloqueadores de canal. Esquerda - O poder discriminatório do farmacóforo para os bloqueadores de canal. Direita - Os pontos farmacofóricos selecionados: duas zonas hidrofóbicas ou aromáticas (amarelo) e um contacto catiónico (azul).

O farmacóforo dos inibidores NR1-NR2B apresenta 4 pontos farmacofóricos constituídos por 2 zonas aromáticas, 1 contacto catiónico e uma zona hidrofóbica (**Figura 40**). Se relacionarmos estes requisitos com o farmacóforo descrito na literatura para os inibidores análogos do ifenprodil, verificamos que o *software* não identificou

um aceitador/dador de pontes de hidrogénio como requisito fundamental. Esta observação é esperada pois nas estruturas químicas selecionadas para gerar este farmacóforo, havia derivados que não possuíam um anel fenólico. O farmacóforo desenvolvido também apresenta uma capacidade discriminatória muito boa, na medida em que consegue detetar 72% das estruturas dos inibidores NR1-NR2B e apresenta menos de 10% de falsos positivos nas bases de dados das restantes classes de antagonistas.

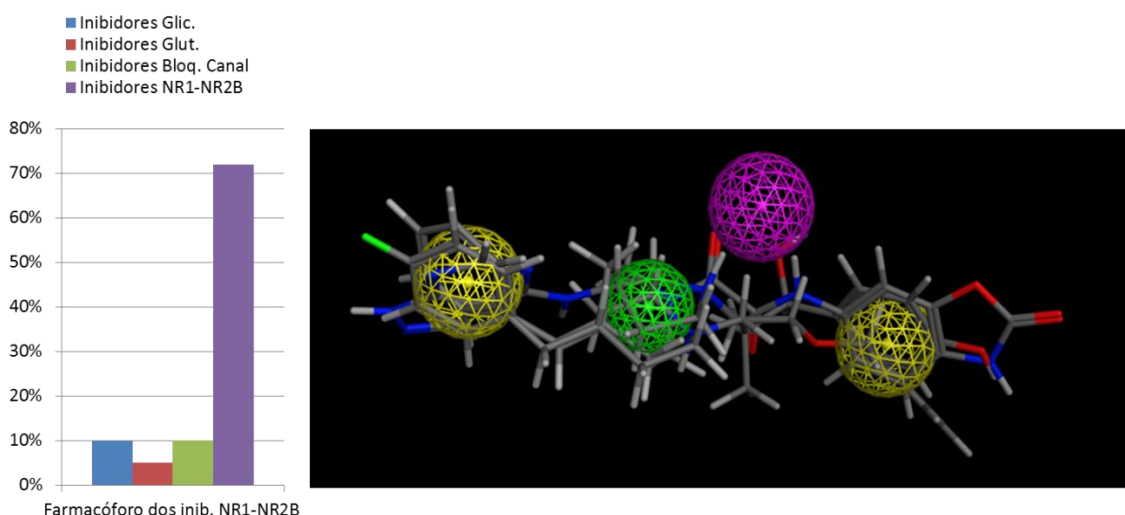


Figura 40 – Validação do farmacóforo dos inibidores selectivos para subunidades NR1-NR2. Esquerda - o poder discriminatório do farmacóforo. Direita - os pontos farmacofóricos selecionados: duas zonas hidrofóbicas ou aromáticas (amarelo), um contacto catiónico (roxo) e contactos hidrofóbicos (verde).

Após geração e validação dos farmacóforos para os vários tipos de inibidores NMDAR, e no seguimento da estratégia definida, verificamos se os compostos ativos sintetizados eram reconhecidos por algum dos 4 farmacóforos. Desta forma pretendia-se encontrar alguma similaridade estrutural entre os compostos sintetizados e os antagonistas descritos, de forma a obtermos alguma pista sobre o seu modo de ação. Nenhum dos farmacóforos desenvolvidos foi capaz de identificar os compostos ativos descritos no presente estudo. Esta observação sugere que provavelmente os novos antagonistas do NMDAR descritos nos capítulos 2.1 – 2.4 atuam através de um mecanismo de inibição ainda não descrito.

Até à data, antagonistas em número suficiente para gerar farmacóforos apenas existem para os inibidores da glicina, glutamato, bloqueadores de canal e seletivos para subunidades NR1-NR2B. De forma a estender esta estratégia aos restantes sítios de inibição já conhecidos, teremos de aguardar por mais avanços no desenvolvimento de antagonistas NMDAR.

3. Conclusões

Através da realização desta dissertação, foi possível sintetizar enantioselectivamente bibliotecas de oxazolo-isoindolinonas, oxazolo-pirrolidonas, oxazolo-piperidonas, indolo[2,3a]quinolizidinas e spiro-indolinas. Os compostos sintetizados foram avaliados como antagonistas dos receptores de *N*-metil-*D*-aspartato e os compostos **50e**, **52c**, **57a** e **64**, apresentaram IC_{50} de 154, 62, 63 e 31 μ M respectivamente. De destacar que os três últimos compostos foram mais potentes que o controlo positivo usado (amantadina, $IC_{50} = 92 \mu$ M) possuindo assim grande potencial para optimização e desenvolvimento de novos antagonistas do NMDAR.

Foram reunidos dados sobre os requisitos estruturais para a atividade biológica através de estudos de estrutura-atividade. Os resultados obtidos com o composto **50e**, sugerem que o NMDAR apresenta selectividade para os derivados de *S*-aminoalcoóis e mostra preferência para substituições volumosas e lipofílicas como um grupo fenilo na posição C-9b. Também foi possível concluir que há preferência para um anel de 3-indole na posição C-3 da oxazolidina e que o anel aromático presente nas isoindolinona não é um requisito obrigatório para a atividade antagonística.

O composto **52c** foi a oxazolo-pirrolidona mais activa e os resultados biológicos obtidos sugerem que há preferência pelos derivados do *S*-fenilalaninol e a presença de um grupo volumoso como o fenilo na posição C-7a.

Nas oxazolo-piperidonas, o composto **57a** foi o derivado mais ativo sendo 5x mais potente que o seu enantiómero, um resultado que aponta para a preferência de derivados do *R*-triptofanol com estereoquímica absoluta 3*R*,8*aS*. Ademais, concluímos que a presença de um anel de piperidona sem substituintes é um requisito para a atividade tal como a existência de um azoto livre (NH) no anel de indole.

Em relação às indolo[2,3a]quinolizidinas o composto **64** foi o derivado mais potente obtido. Concluímos que o recetor dá primazia a uma estereoquímica absoluta 6*S*,12*bR* e também que a substituição no anel de quinolizidina em C-1 e C-2 não favorece a atividade. Os resultados parecem indicar que há necessidade de um azoto livre (NH) no anel de indole.

As spiro-indolinas encontram-se ainda em avaliação biológica, contudo os resultados obtidos até à data sugerem que esta classe de compostos não atua como antagonistas do NMDAR.

Todos os resultados obtidos foram racionalizados através de técnicas de docking molecular e geração de farmacóforos para obter alguma informação sobre o modo de acção dos compostos aqui descritos. As experiências computacionais realizadas indicam que estes compostos devem ter um modo de acção ainda não descrito.

O trabalho desenvolvido contribuiu para a elucidação dos requisitos estruturais dos antagonistas do NMDAR tendo sido revelados dados muito importantes para o futuro desenvolvimento de terapias para a demência mental.

4. Procedimento Experimental

4.1. Síntese Orgânica

Todos os reagentes e solventes foram obtidos comercialmente e foram utilizados sem purificações adicionais. Os pontos de fusão foram determinados com um Monoscópio Bock M e uma câmara Kofler. Os espectros de infravermelhos foram obtidos com um espectrofotómetro de infravermelhos *Shimadzu IRAffinity-1 FTIR* e são expressos em cm^{-1} . Realizou-se espectrometria de massa de baixa resolução em LCLEM, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa. Foi feita microanálise num analisador elementar *Flash2000 ThermoScientific*, com valores teóricos entre $\pm 0.5\%$. Para cromatografia em camada fina foram usadas placas de sílica *Analysis Merck Silica Gel 60 F₂₅₄*, e a cromatografia flash foi realizada com *Merck Silica Gel (200-400 mesh)*. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H e ^{13}C foram registrados num *Bruker 400MHz Ultra-Shield*. Os espectros de ^1H RMN foram registrados a 400 MHz, e os espectros de ^{13}C RMN foram registrados a 100 MHz. Os desvios químicos de ^1H e ^{13}C RMN são indicados em δ (ppm), com referência ao solvente usado, e a constante de acoplamento do protão é indicada como J (Hz). Os espectros foram atribuídos usando sequências COSY, DEPT e HMQC apropriadas.

4.1.1. Síntese dos compostos do capítulo 2.1

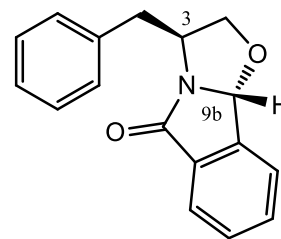
Procedimento geral para as reações de ciclocondensação descritas para Oxazolo-Isoindolinonas e Oxazolo-Pirrolidonas

A uma solução do aminoálcool apropriado em tolueno, adicionou-se 1.2eq. do β -oxo-ácido ou β -oxo-éster adequado. Manteve-se a mistura a refluxo numa montagem *dean-stark* com atmosfera inerte durante 3-48h. Após evaporação do solvente, adsorveu-se o composto bruto em sílica e purificou-se por cromatografia *flash* com o eluente apropriado.

Síntese do composto 50a*(3S,9bR)-3-benzyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one*

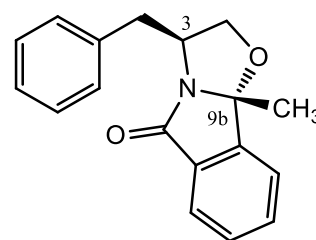
(S)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido 2-formil-benzóico (0.11g, 0.733mmol) em tolueno (7mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **50a** (0,104g, 66%) na forma de cristais brancos.

Recristalizado em Et₂O/*n*-Hex; pf 70-73 °C; $[\alpha]_D^{20} = +20.7^\circ$ (c = 2.3, CH₂Cl₂); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, H-ar), 7.63 – 7.48 (m, 3H, H-ar), 7.38 – 7.28 (m, 4H, H-ar), 7.29 – 7.23 (m, 1H, H-ar), 5.76 (s, 1H, H-9b), 4.55 – 4.42 (m, 1H, H-3), 4.33 (dd, *J* = 8.7, 7.0 Hz, 1H, H-2), 4.00 (dd, *J* = 8.8, 6.4 Hz, 1H, H-2), 3.18 (dd, *J* = 13.9, 5.6 Hz, 1H, CH₂Ph), 2.99 (dd, *J* = 13.8, 8.0 Hz, 1H, CH₂Ph) ppm; ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 173.55 (C=O), 142.43 (C-q), 136.94 (C-q), 133.28 (C-q), 132.96 (C-ar), 130.68 (C-ar), 129.60 (2xC-ar), 128.70 (2xC-ar), 126.91 (C-ar), 124.50 (C-ar), 124.05 (C-ar), 90.99 (C-9b), 75.21 (C-2), 55.51 (C-3), 39.87 (CH₂Ph) ppm; IV (KBr) 1710 (C=O) cm⁻¹; AE calculada para C₁₇H₁₅NO₂·0.15H₂O: C 76.18, H 5.77, N 5.23, encontrado: C 75.88, H 5.85, N 5.15.

**Síntese do composto 50b***(3S,9bR)-3-benzyl-9b-methyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one*

(S)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido 2-acetil-benzóico (0.12g, 0.731mmol) em tolueno (7mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (2:3). Isolou-se o composto **50b** (0.146g, 76%) na forma de um óleo incolor.

$[\alpha]_D^{20} = +27.3^\circ$ (c = 2.1, CH₂Cl₂); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.69 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 7.54 (m, 1H, H-ar), 7.45 (m, 2H, H-ar), 7.27 (m, 4H, H-ar), 7.20 (m, 1H, H-ar), 4.39 (m, 1H, H-3), 4.21 (dd, *J* = 8.9, 7.4 Hz, 1H, H-2), 4.07 (dd, *J* = 8.9, 6.5 Hz, 1H, H-2), 3.21 (dd, *J* = 13.8, 5.8 Hz, 1H, CH₂Ph), 2.95 (dd, *J* = 13.8, 8.6 Hz, 1H, CH₂Ph), 1.69 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 174.20 (C=O), 147.26 (C-q), 137.27 (C-q), 133.22 (C-ar), 131.60 (C-q), 130.16 (C-ar), 129.45 (2xC-ar), 128.59 (2xC-ar), 126.80 (C-ar), 124.33 (C-ar), 122.10 (C-ar), 98.93 (C-9b), 74.06 (C-2), 56.77 (C-3), 40.89 (CH₂Ph), 23.02 (CH₃) ppm; IV

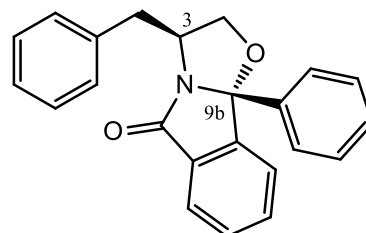


(NaCl) 1715 (C=O) cm^{-1} ; EM (ESI, CP 3.0 kV, SP 30V): m/z calculado: 279 [M], m/z encontrado: 280 [M+H]⁺;

Síntese do composto 50c

(3S,9bR)-3-benzyl-9b-phenyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one

(S)-Fenilalaninol (0.1g, 0.529mmol) e ácido 2-benzoilobenzóico (0.165g, 0.661mmol) em tolueno (10mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **50c** (0.193g, 86%) na forma de cristais brancos. Recristalizado em

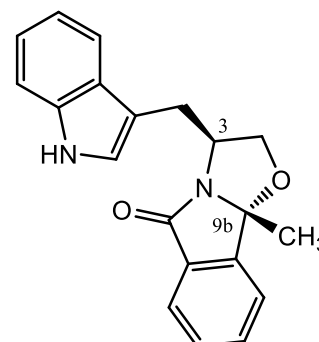


Et₂O/*n*-Hex; pf 92-94 °C; $[\alpha]_D^{20} = +144.6^\circ$ (c = 1.9, CH₂Cl₂); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.80 – 7.75 (m, 1H, H-ar), 7.68 – 7.62 (m, 2H, H-ar), 7.50 – 7.37 (m, 5H, H-ar), 7.31 – 7.20 (m, 4H, H-ar), 7.17 – 7.14 (m, 2H, H-ar), 4.66 – 4.52 (m, 1H, H-3), 4.44 (dd, *J* = 8.6, 7.5 Hz, 1H, H-2), 3.96 (dd, *J* = 8.7, 6.6 Hz, 1H, H-2), 3.02 (dd, *J* = 13.8, 6.8 Hz, 1H, CH₂Ph), 2.51 (dd, *J* = 13.8, 8.7 Hz, 1H, CH₂Ph) ppm; ¹³C RMN (101 MHz, CDCl₃) δ 174.52 (C=O), 147.27 (C-q), 138.95 (C-q), 137.61 (C-q), 133.41 (C-ar), 131.10 (C-q), 130.23 (C-ar), 129.11 (2xC-ar), 128.94 (2xC-ar), 128.86 (C-ar), 128.64 (2xC-ar), 126.77 (C-ar), 125.96 (2xC-ar), 124.52 (C-ar), 123.56 (C-ar), 101.04 (C-9b), 75.91 (C-2), 56.80 (C-3), 40.54 (CH₂Ph) ppm; IV (KBr) 1721 (C=O) cm^{-1} ; EM (ESI, CP 3.0 kV, SP 30V): m/z calculado: 341 [M], m/z encontrado: 342 [M+H]⁺; AE calculada para C₂₃H₁₉NO₂: C 80.91, H 5.62, N 4.10, encontrado: C 80.91, H 5.68, N 4.25.

Síntese do composto 50d

(3S,9bR)-3-((1H-indol-3-yl)methyl)-9b-methyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one

(S)-Triptofanol (0.16g, 0.842mmol) e ácido 2-acetilbenzóico (0,152g, 0.926mmol) em tolueno (15mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (2:1). Isolou-se o composto **50d** (0.2g, 75%) na forma de cristais brancos. Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 181 –

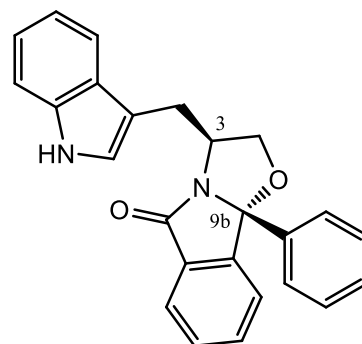


184 °C; $[\alpha]_D^{20} = +23.7^\circ$ ($c = 4.3$, MeOH); ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ 8.05 (s, 1H, NH), 7.86 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-ar), 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-ar), 7.68 (td, $J = 7.5$, 1.0 Hz, 1H, H-ar), 7.52 (td, $J = 7.5$, 0.6 Hz, 1H, H-ar), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-ar), 7.34 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-ar), 7.22 – 7.15 (m, 1H, H-ar), 7.14 – 7.08 (m, 1H, H-ar), 4.44 (dd, $J = 12.9$, 1.8 Hz, 1H, H-2), 4.26 (dd, $J = 12.9$, 5.5 Hz, 1H, H-2), 4.03 – 3.95 (m, 1H, H-3), 3.31 (dd, $J = 15.7$, 11.7 Hz, 1H, CH_2 indole), 2.84 (dd, $J = 15.7$, 4.0 Hz, 1H, CH_2 -indole), 1.91 (s, 3H, CH_3) ppm; ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 173.76 (C=O), 147.55 (C-q), 136.63 (C-q), 133.93 (C-ar), 131.40 (C-q), 130.81 (C-ar), 127.85 (C-q), 124.04 (C-ar), 123.87 (C-ar), 123.25 (C-ar), 121.49 (C-ar), 118.86 (C-ar), 118.70 (C-ar), 111.88 (C-ar), 110.60 (C-q), 98.87 (C-9b), 74.65 (C-2), 55.95 (C-3), 30.84 (CH_2 Indole), 22.79 (CH_3) ppm; IV (KBr) 3283 (NH), 1697 (C=O) cm^{-1} ; AE calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.15\text{H}_2\text{O}$: C 74.81, H 5.67, N 8.73, encontrado: C 74.86, H 5.67, N 8.75.

Síntese do composto 50e

(3*S*,9*bR*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-9*b*-phenyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-*a*]isoindol-5(9*bH*)-one

(*S*)-Tryptofanol (0.16g, 0.842mmol) e ácido 2-benzoilo-benzóico (0.210g, 0.928mmol) em tolueno (10mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **50e** (0.268g, 84%) na forma de cristais brancos. Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 227-229 °C; ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 10.88 (s, 1H, NH), 7.83 – 7.69 (m, 1H, H-Ar),



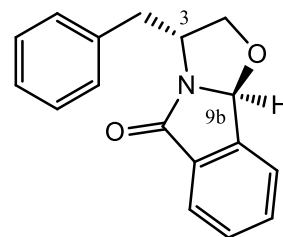
7.60 (tdd, $J = 12.2$, 5.6, 3.8 Hz, 4H, H-ar), 7.52 – 7.27 (m, 6H, H-ar), 7.24 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2-Indole), 7.10 – 7.02 (m, 1H, H-ar), 7.00 – 6.92 (m, 1H, H-ar), 4.55 (m, 2H, H-3 & H-2), 3.91 – 3.80 (m, 1H, H-2), 2.96 (dd, $J = 14.7$, 5.8 Hz, 1H, CH_2 Indole), 2.61 (dd, $J = 14.6$, 7.7 Hz, 1H, CH_2 Indole) ppm; ^{13}C RMN (101 MHz, DMSO) δ 173.90 (C=O), 147.34 (C-q), 139.23 (C-q), 136.54 (C-q), 136.38 (C-q), 134.16 (C-ar), 130.92 (C-ar), 130.83 (C-ar), 129.30 (2xC-ar), 129.19 (C-ar), 127.52 (C-q), 126.00 (2xC-ar), 124.36 (C-ar), 124.05 (C-ar), 123.42 (C-ar), 123.26 (C-ar), 121.48 (C-ar), 118.84 (C-ar), 118.30 (C-ar), 111.88 (C-ar), 110.36 (C-q), 100.79 (C-9b), 76.24 (C-2), 55.87 (C-3), 30.31 (CH_2 Indole) ppm; IV (KBr) 3334 (NH), 1693 (C=O) cm^{-1} ; AE calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.15\text{H}_2\text{O}$: C 78.36, H 5.35, N 7.31, encontrado: C 77.99, H 5.28, N 7.37.

Síntese do composto 51a*(3R,9bS)*-3-benzyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one

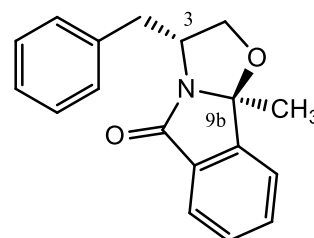
(*R*)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido 2-formil-benzóico (0.11g, 0.733mmol) em tolueno (10mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **51a** (0.125g, 71%) na forma de cristais brancos.

$[\alpha]_D^{20} = -32.5^\circ$ ($c = 1.9$, CH_2Cl_2); O espectro de ^1H RMN

revelou-se idêntico ao composto 50a; AE calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_2$: C 76.96, H 5.71, N 5.28, encontrado: C 77.06, H 5.81, N 5.45.

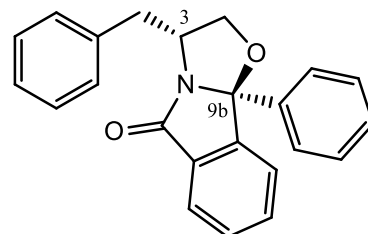
**Síntese do composto 51b***(3R,9bS)*-3-benzyl-9b-methyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one

(*R*)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido 2-acetil-benzóico (0.125g, 0.761mmol) em de tolueno (10mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:4). Isolou-se o composto **51b** (0.157g, 85%) na forma de um óleo incolor. $[\alpha]_D^{20} = -29.2^\circ$ ($c = 2.1$, CH_2Cl_2). O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao composto 50b.

**Síntese do composto 51c***(3R,9bS)*-3-benzyl-9b-phenyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-a]isoindol-5(9bH)-one

(*R*)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido 2-benzoilo-benzóico (0.165g, 0.729mmol) em tolueno (10mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:9). Isolou-se o composto **51c** (0.167g, 71%) na forma de cristais brancos. $[\alpha]_D^{20} = -138.0^\circ$ ($c =$

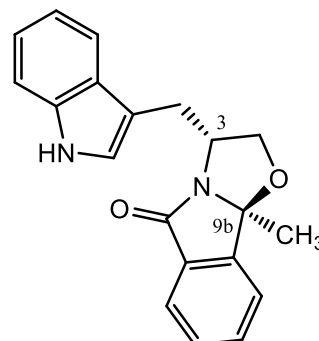
2.2, CH_2Cl_2); O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao composto 50c; AE calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{NO}_2$: C 80.91, H 5.62, N 4.10, encontrada: C 81.05, H 5.69, N 4.26.



Síntese do composto 51d

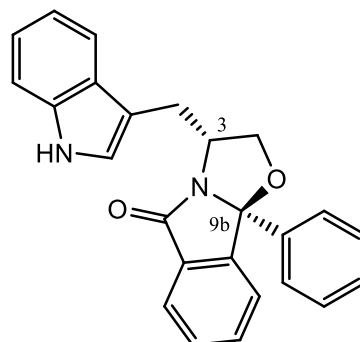
(3R,9bS)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-9*b*-methyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-*a*]isoindol-5(9*bH*)-one

(*R*)-Tryptofanol (0.1g, 0.526mmol) e ácido 2-acetilbenzóico (0.095g, 0.578mmol) em Tolueno (15mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **51d** (0.127g, 76%) na forma de um sólido cristalino branco. $[\alpha]_D^{20} = -27.1^\circ$ ($c = 4.1$, MeOH); O espectro ^1H RMN revelou-se idêntico ao composto 50d; AE calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: C 75.88, H 5.71, N 8.80, encontrado: C 75.61, H 5.66, N 8.81.

**Síntese do composto 51e**

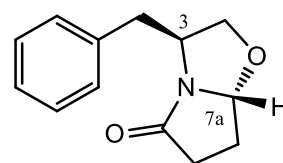
(3R,9bS)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-9*b*-phenyl-2,3-dihydrooxazolo[2,3-*a*]isoindol-5(9*bH*)-one

(*R*)-Tryptofanol (0.2g, 1.05mmol) e ácido 2-benzoilobenzóico (0.262g, 1.16mmol) em tolueno (25mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:4). Isolou-se o composto **51e** (0.28g, 70%) na forma de um sólido branco. $[\alpha]_D^{20} = -150.7^\circ$ ($c = 2.1$, MeOH); O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao do composto 50e; AE calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.15\text{H}_2\text{O}$: C 78.36, H 5.35, N 7.31, encontrada: C 77.99, H 5.28, N 7.37.

**Síntese composto 52a**

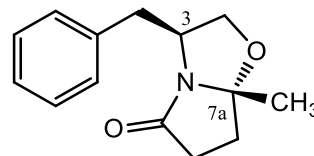
(3S,7aR)-3-benzyltetrahydropyrrolo[2,1-*b*]oxazol-5(6*H*)-one

(*S*)-Fenilalaninol (0.2g, 1.32mmol) e 4-oxo-butanoato de metilo (0.17g, 1.46mmol) em tolueno (20mL). Tempo de reação - 48h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **52a** (0.114g, 40%) na forma de óleo incolor. Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN revelaram-se idênticos ao descrito em [100].



Síntese do composto 52b*(3S,7aR)-3-benzyl-7a-methyltetrahydropyrrolo[2,1-b]oxazol-5(6H)-one*

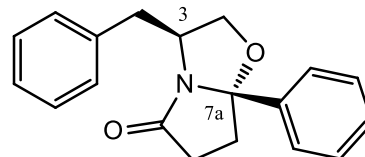
(S)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido levulínico (0.08mL, 0.793mmol) em tolueno (10mL). Tempo de reação - 48h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **52b** (0.095g, 62%) na forma de óleo incolor.



Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN revelaram-se idênticos aos descritos em [100].

Síntese do composto 52c*(3S,7aS)-3-benzyl-7a-phenyltetrahydropyrrolo[2,1-b]oxazol-5(6H)-one*

(S)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido 3-benzoilopropiónico (0.117g, 0.657mmol) em tolueno (15mL). Tempo de reação - 48h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **52c** (0.140g,



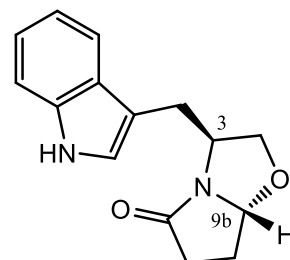
72%) na forma de cristais brancos. Recristalizado em Et₂O/*n*-Hex; pf 55-56 °C; $[\alpha]_D^{20} = +4.7^\circ$ (c = 1.9, CH₂Cl₂); ^1H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.51 (d, J = 7.4 Hz, 2H, H-ar), 7.44 – 7.38 (m, 3H, H-ar), 7.28 – 7.21 (m, 3H, H-ar), 7.08 (d, J = 7.3 Hz, 2H, H-Ar), 4.50 – 4.35 (m, 1H, H-3), 4.13 (t, J = 8.1 Hz, 1H, H-2), 3.65 – 3.49 (m, 1H, H-2), 2.94 (dd, J = 13.7, 6.2 Hz, 1H, CH₂Ph), 2.89 – 2.77 (m, 1H, H-6), 2.63 – 2.45 (m, 2H, H-6 & H-7), 2.35 – 2.18 (m, 2H, CH₂Ph & H-7) ppm; ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 179.87 (C=O), 142.55 (Cq), 137.26 (Cq), 128.90 (2CH-Ar), 128.70 (2CH-Ar), 128.49 (2CH-Ar), 128.31 (CH-Ar), 126.60 (CH-Ar), 125.07 (2CH-Ar), 102.27 (C-7a), 72.26 (CH₂), 56.44 (CH), 39.92 (CH₂-Ph), 35.05 (C-7), 32.57 (C-6) ppm; IV (KBr) 1721 (C=O) cm⁻¹; EM (ESI, CP 3.0 kV, SP 30V): *m/z* calculado: 293 [M], *m/z* encontrado: 294 [M+H]⁺; AE calculada para C₁₉H₁₉NO₂: C 77.78, H 6.54, N 4.78, encontrado: C 77.75, H 6.68, N 4.98.

Síntese do composto 52d

(3*S*,7*aR*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydropyrrolo[2,1-*b*]oxazol-5(6*H*)-one

(*S*)-Triptofanol (1g, 5.26mmol) e 4-oxo-butanoato de metilo (0.67g, 5.77mmol) em tolueno (80mL). Tempo de reação - 6h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **52d** (0.45g, 33%) na forma de um sólido branco.

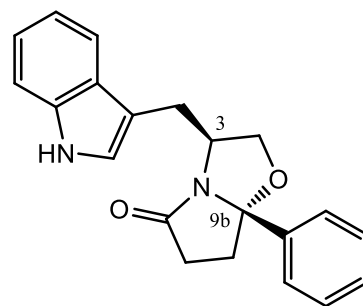
Recristalizado em AcOEt; $[\alpha]_D^{20} = +67.8^\circ$ ($c = 1.6$, CH_2Cl_2); pf 160.5 - 161.5 °C; ^1H RMN (CDCl_3) δ 8.20 (s, 1H, NH), 7.63 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-ar), 7.35 (dd, $J = 8.0, 0.9$ Hz, 1H, H-ar), 7.20 (m, 2H, H-ar), 7.13 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-ar), 5.04 (dd, $J = 6.1, 2.5$ Hz, 1H, H-7a), 4.58 – 4.44 (m, 1H, H-3), 4.13 (dd, $J = 8.7, 7.2$ Hz, 1H, H-2), 3.70 (dd, $J = 8.7, 6.2$ Hz, 1H, H-2), 3.14 (dd, $J = 14.9, 6.2$ Hz, 1H, CH_2 Indole), 2.95 (dd, $J = 15.0, 7.6$ Hz, 1H, CH_2 Indole), 2.65 (ddd, $J = 17.6, 10.2, 7.3$ Hz, 1H, H-6), 2.51 (ddd, $J = 17.6, 10.3, 4.7$ Hz, 1H, H-6), 2.31 (m, 1H, H-7), 2.11 – 1.95 (m, 1H, H-7) ppm; ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 179.53 (C=O), 136.21 (C-q), 127.61 (C-q), 122.44 (C-ar), 122.16 (C-ar), 119.51 (C-ar), 118.72 (C-ar), 111.23 (C-q), 111.17 (C-ar), 91.80 (C-7a), 72.32 (C-2), 54.61 (C-3), 31.73 (CH_2 indole), 29.18 (C-6), 24.45 (C-7) ppm; IV (KBr) 3272 (NH), 1697 (C=O) cm^{-1} ; AE calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: C 70.29, H 6.31, N 10.93, encontrado: C 70.26, H 6.36, N 10.93.

**Síntese do composto 52e**

(3*S*,7*aS*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-7*a*-phenyltetrahydropyrrolo[2,1-*b*]oxazol-5(6*H*)-one

(*S*)-Triptofanol (0.1g, 0.526mmol) e ácido 3-benzoilopropanóico (0.103g, 0.578mmol) em tolueno (10mL). Tempo de reação - 6h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **52e** (0.181g, 90%) na forma de um sólido branco amorfo.

Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 153-156 °C; $[\alpha]_D^{20} = 40.7^\circ$ ($c = 2.1$, CH_2Cl_2); ^1H RMN (CDCl_3) δ 8.07 (s, 1H, NH), 7.51 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-ar), 7.47 – 7.29 (m, 5H, H-ar), 7.17 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-ar), 7.11 – 7.01 (m, 2H, H-ar), 4.68 – 4.45 (m, 1H, H-3), 4.16 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-2), 3.68 – 3.54 (m, 1H, H-2), 3.08 (dd, $J = 14.7, 6.1$ Hz, 1H, CH_2 Indole), 2.85 (dd, $J = 17.0, 8.4$ Hz, 1H, H-6), 2.71 –

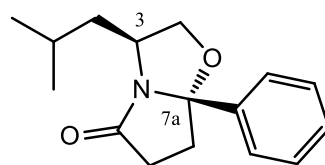


2.38 (m, 3H, H-7 & H-6 & CH_2 Indole), 2.32 – 2.17 (m, 1H, H-7) ppm; ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 180.15 (C=O), 142.67 (C-q), 136.07 (C-q), 128.69 (C-ar), 128.27 (C-ar), 127.35 (C-q), 125.07 (C-ar), 122.08 (C-ar), 122.03 (C-ar), 119.39 (C-ar), 118.75 (C-ar), 111.62 (C-q), 111.06 (C-ar), 102.35 (C-7a), 72.69 (C-2), 55.53 (C-3), 35.01 (C-7), 32.62 (C-6), 29.62 (CH_2 Indole) ppm; IV (KBr) 3262 (NH), 1686 (C=O) cm^{-1} ; AE calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$: C 75.88, H 6.08, N 8.43, encontrada: C 76.02, H 6.16, N 8.60.

Síntese do composto 52f

(3*S*,7*aS*)-3-isobutyl-7*a*-phenyltetrahydropyrrolo[2,1-*b*]oxazol-5(6*H*)-one

(*S*)-Leucinol (0.24g, 2.04mmol) e ácido 3-benzoilopropanóico (0.365g, 2.05mmol) em tolueno (15mL). Tempo de reação - 6h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **52f** (0.342g, 65%) na forma de

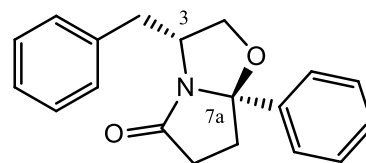


cristais brancos. Recristalizado em CH_2Cl_2 ; pf 83 – 84 °C; ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-ar), 7.34 (m, 3H, H-ar), 4.27 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-2), 4.23 – 4.12 (m, 1H, H-3), 3.40 (dd, $J = 7.9, 7.1$ Hz, 1H, H-2), 2.88 – 2.75 (m, 1H, H-6), 2.52 (m, 2H, H-6 & H-7), 2.24 – 2.13 (m, 1H, H-7), 1.65 (td, $J = 13.4, 6.7$ Hz, 1H, CH -iPr – 1.13 (m, 1H, CH_2 -iPr), 0.97 – 0.85 (m, 4H, CH_3 -iPr & CH_2 -iPr), 0.82 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH_3 -iPr) ppm; ^{13}C RMN (101 MHz, CDCl_3) δ 180.13 (C=O), 142.83 (C-q), 128.55 (C-ar), 128.13 (2xC-ar), 124.93 (2xC-ar), 102.10 (C-7a), 72.71 (C-2), 54.36 (C-3), 43.04 (CH_2 -iPr), 34.89 (C-7), 32.53 (C-6), 25.74 (CH -iPr), 22.92 (CH_3 -iPr), 22.10 (CH_3 -iPr) ppm; IV (KBr) 1713 (C=O) cm^{-1} ; AE calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_2$: C 74.10, H 8.16, N 5.40, encontrado: C 74.04, H 8.08, N 5.43.

Síntese do composto 53c

(3*R*,7*aR*)-3-benzyl-7*a*-phenyltetrahydropyrrolo[2,1-*b*]oxazol-5(6*H*)-one

(*R*)-Fenilalaninol (0.1g, 0.661mmol) e ácido 3-benzoilopropanóico (0.13g, 0.730mmol) em Tolueno (10mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **53c** (0.181g,



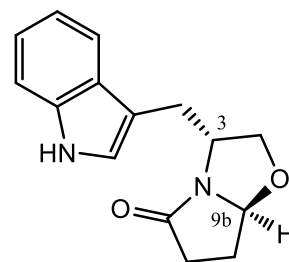
92%) na forma de um óleo incolor. $[\alpha]_D^{20} = -3.0^\circ$ ($c = 2.4$, CH_2Cl_2); O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao composto **52c**.

Síntese do composto **53d**

(3R,7aS)-3-((1H-indol-3-yl)methyl)tetrahydropyrrolo[2,1-b]oxazol-5(6H)-one

(*R*)-Tryptofanol (1g, 5.26mmol) e 4-oxo-pentanoato de metilo (0.67g, 5.77mmol) em tolueno (80mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **53d** (0.45g, 33%) na forma de um sólido branco. O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao composto **52d**.

$[\alpha]_D^{20} = -62.7^\circ$ ($c = 2.1$, CH_2Cl_2); AE calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: C 70.29, H 6.31, N 10.93, encontrado: C 70.28, H 6.35, N 10.94.



4.1.2. Síntese dos compostos do capítulo 2.2

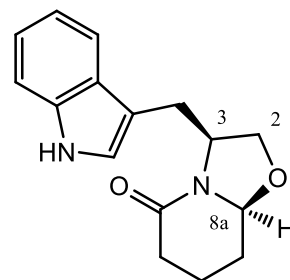
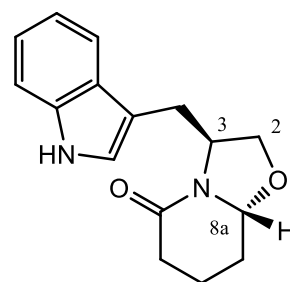
Procedimento geral para as reações de ciclocondensação descritas para Oxazolo-Piperidonas

A uma solução do aminoálcool apropriado em tolueno, adicionou-se 1.2eq. do β -oxo-ácido ou β -oxo-éster adequado. Manteve-se a mistura a refluxo numa montagem *dean-stark* com atmosfera inerte durante 3-48h. Após evaporação do solvente, adsorveu-se o composto bruto em sílica e purificou-se por cromatografia *flash* com o eluente apropriado.

Síntese do composto 54a e 54b

(3*S*,8*aR*) and (3*S*,8*aS*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one

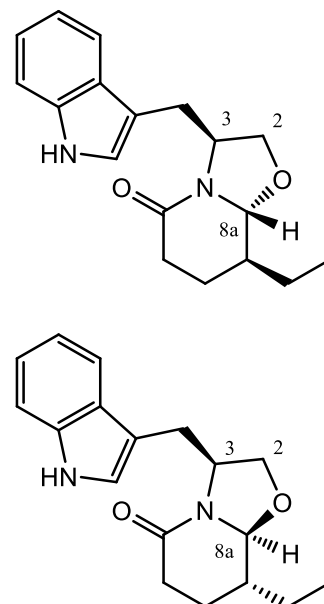
(*S*)-Tryptofanol (1.17g, 6.17mmol) e 5-oxo-pentanoato de metilo (0.936g, 7.19mmol) em tolueno (40mL). Tempo de reação - 16h. Purificação com o eluente AcOEt/*n*-Hex (2:1). Isolou-se o composto **54a** (0.167g, 10%) e o composto **54b** (0.836g, 50%) na forma de sólidos amarelos. **54a**: Recristalizado AcOEt/*n*-Hex; pf 147 - 148.5 °C; O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106]; AE calculada para C₁₆H₁₈N₂O₂·0.25H₂O: C 70.38, H 6.77, N 10.26, encontrado: C 70.62, H 6.82, N 9.78. **54b**: Recristalizado em CH₂Cl₂; O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106]; AE calculada para C₁₆H₁₈N₂O₂: C 71.08, H 6.73, N 10.37, encontrado: C 70.98, H 6.75, N 8.87.



Síntese do composto 55a e 55b

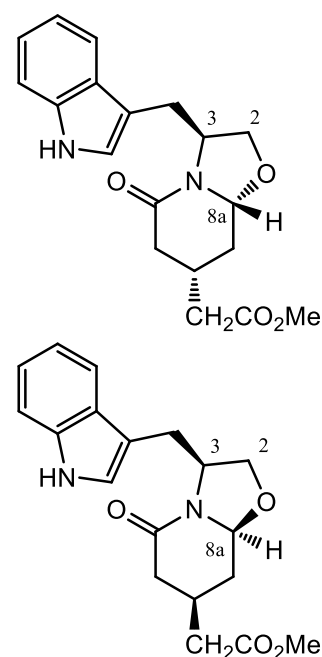
(3S,8S,8aR) and (3S,8R,8aS)-3-((1H-indol-3-yl)methyl)-8-ethyltetrahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-5(3H)-one

(S)-Triptofanol (1.01g, 5.3mmol) e 4-formil-hexanoato de metilo (0.924g, 5.84mmol) em tolueno (55mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação AcOEt/*n*-Hex (2:1). Isolou-se o composto **55a** (0.247g, 17%) e o composto **55b** (0.99g, 63%) na forma de sólidos brancos. **55a**: Recristalizado em Et₂O/*n*-Hex; AE calculada para C₁₈H₂₂N₂O₂: C 72.45, H 7.45, N, 9.39, encontrado: C 72.58, H 7.68, N 8.94. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [104]. **55b**: Recristalizado em Et₂O/*n*-Hex; AE calculada para C₁₈H₂₂N₂O₂·0.5H₂O: C 70.33, H 7.56, N 9.12, encontrado: C 70.00, H 7.61, N 9.63. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [104].

**Síntese do composto 56a e 56b**

(3S,7S,8aR) and methyl 2-((3S,7R,8aS)-3-((1H-indol-3-yl)methyl)-5-oxohexahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-7-yl)acetate

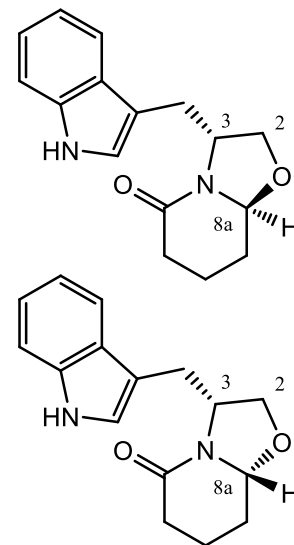
(S)-Triptofanol (1g, 5.26mmol) e 3-(2-oxoetilo)-pentanodioato de dimetilo (1,17g, 5.79mmol) em tolueno (55mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação - AcOEt/*n*-Hex (3:2). Isolou-se o composto **56a** (0.261g, 15%) na forma de um óleo castanho viscoso e o composto **56b** (1.22g, 68%) na forma de um sólido amarelo. **56a**: O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [104]. Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; AE calculada para C₁₉H₂₂N₂O₄·0,75H₂O: C 64.12, H 6.67, N 7.87, encontrada: C 64.25, H 6.44, N 7.80. **56b**: O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [104].



Síntese do composto 57a e 57b

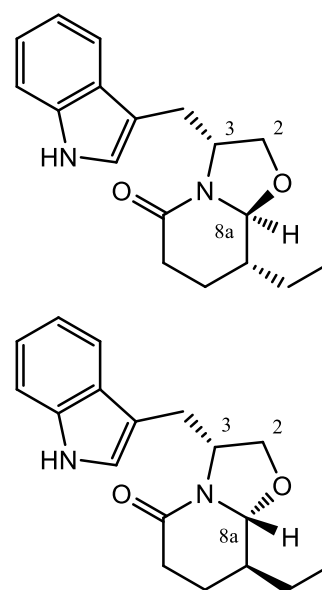
(3R,8aS) and *((3R,8aR)-3-((1H-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-5(3H)-one*

(*R*)-Tryptofanol (1.17g, 6.15mmol) e 5-oxo-pentanoato de metilo (0.936g, 7.19mmol) em tolueno (40mL). Tempo de reação – 16h. Eluente para purificação AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **57a** (0.183g, 11%) e o composto **57b** (0.812g, 49%) na forma de sólidos amarelos. **57a**: Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 153 – 154 °C; $[\alpha]_D^{20} = -7.9^\circ$ (*c* = 2.2, CH₂Cl₂); O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 54a; AE calculada para C₁₆H₁₈N₂O₂·0.15H₂O: C 70.38, H 6.77, N 10.26, encontrada: C 70.59, H 6.82, N 10.44. **57b**: Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 168.5 – 169.5 °C; $[\alpha]_D^{20} = +35.6^\circ$ (*c* = 1.9, CH₂Cl₂); O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao 54b. AE calculada para C₁₆H₁₈N₂O₂: C 71.08, H 6.73, N 10.37, encontrada: C 70.75, H 6.83, N 10.56.

**Síntese do composto 58a e 58b**

(3R,8R,8aS) and *(3R,8S,8aR)-3-((1H-indol-3-yl)methyl)-8-ethyltetrahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-5(3H)-one*

(*R*)-Tryptofanol (0.54g, 2.84mmol) e 4-formil-hexanoato de metilo (0.51g, 3.22mmol) em tolueno (20mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação – AcOEt/*n*-Hex (3:1). Isolou-se o composto **58a** (0.113g, 13%) e o composto **58b** (0.54g, 64%) na forma de sólidos brancos. **58a**: Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 134 - 135 °C; $[\alpha]_D^{20} = -18.2^\circ$ (*c* = 2.2, CH₂Cl₂); O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 55a; AE calculada para C₁₈H₂₂N₂O₂: C 72.45, H 7.45, N 9.39, encontrada: C 72.20, H 7.40, N 9.13. **58b**: Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 176 - 179 °C; $[\alpha]_D^{20} = +56.3^\circ$ (*c* = 2.1, CH₂Cl₂); O espectro de ¹H RMN

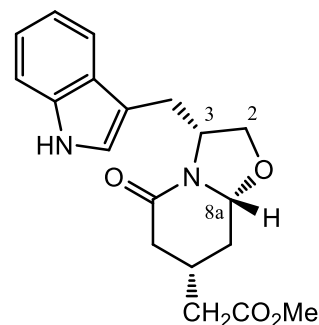
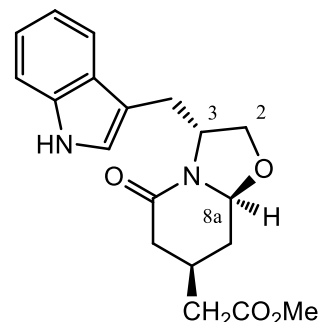


revelou-se idêntico ao composto 55b; AE calculada pra $C_{18}H_{22}N_2O_2 \cdot 0.15 H_2O$: C 71.80, H 7.48, N, 9.31, encontrada: C 72.03, H 7.65, N 8.84.

Síntese do composto 59a e 59b

(3R,7R,8aS) and methyl 2-((3*R,7S,8aR*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-5-oxohexahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-7-yl)acetate

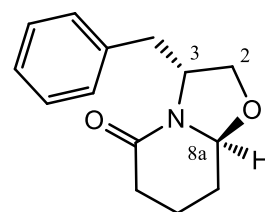
(*R*)-Tryptofanol (2g, 10.51mmol) e 3-(2-oxoetil)-pentanodioato de dimetilo (2.32g, 11.47mmol) em tolueno (150mL). Tempo de reação - 16h. Eluente para purificação – AcOEt/*n*-Hex (3:2). Isolou-se o composto **59a** (0.46g, 13%) na forma de um óleo viscoso castanho e o composto **59b** (2.05g, 71%) foi isolado na forma de um sólido amarelo. **59a**: $[\alpha]_D^{20} = -19.0$ ($c = 1.9$, CH_2Cl_2); O espectro de 1H RMN revelou-se idêntico ao composto 56a; AE calculada para $C_{19}H_{22}N_2O_4 \cdot H_2O$: C 63.31, H 6.73, N 7.77, encontrada: C 63.09, H 6.44, N 7.58; **59b**: Recristalizado em CH_2Cl_2 ; pf 126-128 °C; $[\alpha]_D^{20} = +21.9$ ($c = 2.0$, CH_2Cl_2); O espectro 1H RMN revelou-se idêntico ao composto 56b; AE calculada para $C_{19}H_{22}N_2O_4$: C 66.65, H 6.49, N 8.18, encontrada: C 66.82, H 6.58, N 8.22.



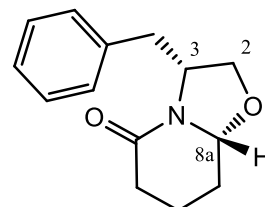
Síntese do composto 60a e 60b

(3R,8aS) and *(3R,8aR)*-3-benzyltetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one

(*R*)-Fenilalaninol (0.2g, 1.322mmol) e 5-oxo-pentanoato de metilo (0.19g, 1.46mmol) em tolueno (12mL). Tempo de reação – 16h. Eluente para purificação – AcOEt/*n*-Hex (3:7). Isolou-se o composto **60a** (0.032g, 10%) na forma de um óleo amarelo e o composto **60b** (0.13g, 43%) na forma de um sólido branco. **60a**: $[\alpha]_D^{20} = +1.6^\circ$ ($c = 3.8$, CH_2Cl_2); 1H NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ 7.25 (m, 5H, H-ar), 4.51 (m, 2H, H-3 & H-8a), 4.02 (dd, $J = 8.7$, 7.8 Hz, 1H, H-2), 3.62 (m, 1H, H-2), 3.27 (dd, $J = 13.3$, 3.4 Hz, 1H, CH_2Ph), 2.80 (dd, $J = 13.3$, 9.2 Hz, 1H, CH_2Ph), 2.51 (dd, $J = 18.1$, 5.7 Hz, 1H, H-6), 2.33 (dd, $J = 11.6$, 6.6 Hz, 1H, H-6), 2.22 (m, 1H, H-alquilo),



1.90 (m, 1H, H-alquilo), 1.59 (m, 1H, H-alquilo) 1.41 (m, 1H, H-alquilo); ^{13}C RMN (101MHz, CDCl_3) δ 168.74 (C=O), 136.84 (C-q), 129.53 (2xC-ar), 128.54 (2xC-ar), 126.70 (C-ar), 87.33 (C-8a), 69.28 (C-2), 55.02 (C-3), 37.74 (CH_2 -Indole), 31.33 (C-alquilo), 28.20 (C-alquilo), 17.15 (C-alquilo); IV (NaCl) = 1645 (C=O) cm^{-1} . **60b**: Recristalizado em $\text{Et}_2\text{O}/n\text{-Hex}$; pf 79.5 – 80.5 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.9^\circ$ (c = 2.2, CH_2Cl_2); ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ 7.33 – 7.27 (m, 2H, H-ar), 7.26 – 7.18 (m, 3H, H-ar), 4.65 (dd, $J = 9.9, 3.2$ Hz, 1H, H-8a), 4.25 – 4.13 (m, 1H, H-3), 4.00 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-2), 3.71 (dd, $J = 8.5, 7.0$ Hz, 1H, H-2), 3.56 (dd, $J = 13.2, 2.4$ Hz, 1H, CH_2 -Ph), 2.60 (dd, $J = 13.2, 9.7$ Hz, 1H, CH_2 -Ph), 2.41 (m, 2H, H-alquilo), 2.21 (dd, $J = 12.2, 3.5$ Hz, 1H, H-alquilo), 1.97 (m, 1H, H-alquilo), 1.70 (m, 1H, H-alquilo), 1.41 (m, 1H, H-alquilo); ^{13}C RMN (CDCl_3) δ 168.06 (C=O), 138.07 (Cq), 129.62 (2xC-ar), 128.51 (2xC-ar), 126.53 (C-ar), 88.96 (C-8a), 69.22 (C-2), 56.65 (C-3), 36.91 (CH_2 -Ph), 31.09 (C-alquilo), 28.25 (C-alquilo), 17.54 (C-alquilo); IV (KBr) 1599 (C=O) cm^{-1} .

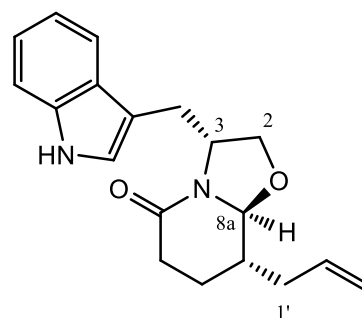


Síntese do composto 61a e 61b

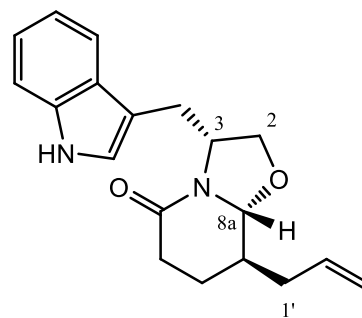
(3*R*,8*S*,8*aS*) and (3*R*,8*R*,8*aR*)-3-((1*H*-indol-3-yl)methyl)-8-allyltetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one

(*R*)-Tryptofanol (1.32g, 6.94mmol) e 4-formil-het-6-enoato de metilo (1.3g, 7.64mmol) tolueno (100mL). Tempo de reação 16h. Eluente para purificação – $\text{AcOEt}/n\text{-Hex}$ (2:1). Isolou-se o composto **61a** (0.167g, 8%) e o composto **61b** (1.06g, 49%) na forma de sólidos brancos. **61a**: Recristalizado em $\text{AcOEt}/n\text{-Hex}$; pf 164 - 165 $^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.5^\circ$ (c = 1.8, CH_2Cl_2); ^1H RMN

(400MHz, CDCl_3) δ 8.28 (s, 1H, NH), 7.71 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-ar), 7.36 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-ar), 7.19 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-ar), 7.12 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-ar), 7.01 (s, 1H, H-2-indole), 5.74 (m, 1H, H-2'), 5.04 (d, $J = 12.6$ Hz, 2H, H-3'), 4.63 (dt, $J = 10.6, 3.9$ Hz, 1H, H-3), 4.19 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-3), 4.05 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-2), 3.68 (dd, $J = 8.5, 7.6$ Hz, 1H, H-2), 3.34 (dd, $J = 14.2, 3.1$ Hz, 1H, CH_2 -indole), 3.02 (dd, $J = 14.2, 8.9$ Hz, 1H, CH_2 -indole), 2.56 (dd, $J = 18.2, 5.7$ Hz, 1H, H-alquilo), 2.48 – 2.28 (m, 2H, H-alquilo), 1.93 (dd, $J = 15.3, 7.2$ Hz, 1H, H-alquilo), 1.85 (dd, $J = 14.2, 7.0$ Hz, 1H, H-alquilo), 1.54 (m, 1H, H-8), 1.29 (qd, $J = 12.8, 6.0$ Hz, 1H, H-alquilo); ^{13}C RMN



(CDCl₃) δ 168.72 (C=O), 136.26 (C-q), 134.83 (C-2'), 127.75 (C-q), 122.51 (C-ar), 122.18 (C-ar), 119.55 (C-ar), 119.15 (C-ar), 117.32 (C-3'), 111.21 (C-q), 111.10 (C-ar), 90.73 (C-8a), 69.72 (C-2), 54.83 (C-3), 39.35 (C-8), 35.76 (C-alquilo), 31.55 (C-alquilo), 27.54 (CH₂-indole), 22.77 (C-alquilo); IV (KBr) 3292 (NH), 1639 (C=O) cm⁻¹; AE calculada para C₁₉H₂₂N₂O₂: C 73.52, H 7.16, N 9.03, encontrada: C 73.78, H 7.24, N 9.04. **61b**: Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 162 – 164 °C; $[\alpha]_D^{20} = +32.4^\circ$ (c = 2.1, CH₂Cl₂); ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ 8.26 (s, 1H, NH), 7.84 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H-ar), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-ar), 7.19 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 7.13 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 7.03 (s, 1H, H-2 indole), 5.81 (m, 1H, H-2'), 5.15 – 5.02 (m, 2H, H-3'), 4.38 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-8a), 4.34 – 4.27 (m, 1H, H-3), 4.03 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-2), 3.75 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H, CH₂-Indole), 3.67 (dd, *J* = 15.7, 8.4 Hz, 1H, H-2), 2.64 (dd, *J* = 13.8, 10.6 Hz, 1H, CH₂-Indole), 2.57 – 2.27 (m, 3H, H-alquilo & CH₂-1'), 2.00 (m, 2H, H-alquilo), 1.69 (m, 1H, H-8), 1.40 (m, 1H, H-alquilo) ppm; ¹³C RMN (101MHz, CDCl₃) δ 168.00 (C=O), 136.25 (C-q), 134.79 (C-2'), 127.68 (C-q), 122.38 (C-2 indole), 122.16 (C-ar), 119.57 (C-ar), 119.37 (C-ar), 117.35 (C-3'), 112.62 (C-q), 111.06 (C-ar), 92.14 (C-8a), 69.97 (C-2), 56.42 (C-3), 39.40 (C-8), 35.40 (C-alquilo), 31.45 (C-1'), 27.00 (CH₂-Indole), 23.59 (C-alquilo) ppm; IV (KBr) 3244 (NH), 1628 (C=O) cm⁻¹; AE calculada para C₁₉H₂₂N₂O₂: C 73.52, H 7.16, N 9.03, encontrada: C 73.43, H 7.26, N 8.70.

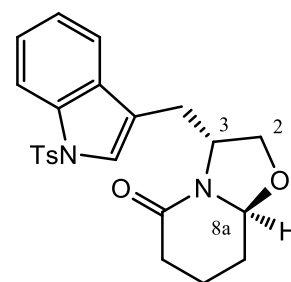


Modulação de oxazolo-piperidonas

Síntese do composto 62a

(3R)-3-((1-benzyl-1H-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-5(3H)-one

A uma solução do composto 57a (60mg, 0.222mmol) em CH₂Cl₂ (3mL) arrefecida a 0°C, adicionou-se uma quantidade catalítica de TBACl (6mg, 10%mol) e uma solução aquosa de NaOH (1mL, 30% p/v). Após 15min em agitação, adicionou-se p-TsCl (0.084g, 0.44mmol) e manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 24h. Adicionou-se CH₂Cl₂ (5mL), separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (5mL). Lavou-se os

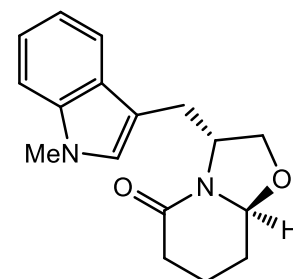


extratos orgânicos reunidos com uma solução aquosa de HCl (5mL, 2M), brine (5mL) e secou-se com Na₂SO₄ antes da evaporação do solvente. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia preparativa com AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **62a** (0.055g, 60%) na forma de um sólido branco. Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 70-71°C; ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ 7.98 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, ar), 7.73 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, ar), 7.63 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, ar), 7.36 – 7.29 (m, 1H, ar), 7.22 (m, 3H, ar), 4.61 – 4.50 (m, 1H, H-3), 4.36 (dd, *J* = 8.9, 4.4 Hz, 1H, H-8a), 4.05 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-2), 3.58 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-2), 3.24 (dd, *J* = 14.2, 2.8 Hz, 1H, CH₂-Indole), 2.94 (dd, *J* = 14.3, 8.9 Hz, 1H, CH₂-Indole), 2.48 (dd, *J* = 17.9, 5.4 Hz, 1H, H-alquilo), 2.36 – 2.22 (m, 4H, CH₃-tosilo & H-alquilo), 2.13 (m, 1H, H-alquilo), 1.85 (m, 1H, H-alquilo), 1.48 (m, 1H, H-alquilo), 1.41 – 1.33 (m, 1H, H-alquilo); ¹³C RMN (101MHz, CDCl₃) δ 168.99 (C=O), 144.96 (C-q), 135.23 (C-q), 135.06 (C-q), 131.00 (C-q), 129.85 (2xC-ar), 126.72 (2xC-ar), 125.00 (C-ar), 123.87 (C-ar), 123.34 (C-ar), 119.92 (C-ar), 118.29 (C-q), 113.73 (C-ar), 87.41 (C-8a), 69.54 (C-2), 53.53 (C-3), 31.31 (C-alquilo), 28.10 (C-alquilo), 27.34 (CH₂-Indole), 21.58 (CH₃-tosilo), 17.03 (C-alquilo); IV (KBr) 1645 (C=O), 1449 (S=O), 1369 (S=O) cm⁻¹; AE calculada para C₂₃H₂₄N₂O₄S·0.25H₂O: C 64.39, H 5.77, N 6.53, S 7.46, encontrado: C 64.24, H 5.62, N 6.47, S 7.47.

Síntese do composto 62b

(3*R*,8*a**S*)-3-((1-methyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one

A uma solução do composto 57a (0.035g, 0.129 mmol) em DMF anidro (5mL) arrefecida a 0°C, adicionou-se NaH (6mg, 0.25 mmol). Manteve-se a mistura sob agitação e atmosfera inerte durante 15min e adicionou-se iodometano (0.02mL, 0.32mmol) gota-a-gota. Manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 6h e de seguida adicionou-se água (10mL) e



AcOEt (10mL). Separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com AcOEt (2x10mL). Lavou-se os extratos orgânicos reunidos com *brine* (10mL) e secou-se com Na₂SO₄. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt/*n*-Hex (3:2). Isolou-se o composto **62b** (0.031g, 33%) na forma de um óleo amarelo; ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.69 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-ar), 7.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-ar), 7.22 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-ar), 7.11 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 6.88 (s, 1H, H-2-indole), 4.61 (qd, *J* = 8.0,

3.2 Hz, 1H, H-3), 4.47 (dd, $J = 9.0, 4.4$ Hz, 1H, H-8a), 4.06 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-2), 3.75 (s, 3H, NCH₃), 3.68 (dd, $J = 15.3, 6.7$ Hz, 1H, H-2), 3.31 (dd, $J = 14.3, 3.1$ Hz, 1H, CH₂-indole), 3.02 (dd, $J = 14.2, 8.8$ Hz, 1H, CH₂-indole), 2.52 (dd, $J = 18.0, 5.7$ Hz, 1H, H-alquilo), 2.31 (ddd, $J = 18.1, 11.6, 6.5$ Hz, 1H, H-alquilo), 2.16 (m, 1H, H-alquilo), 1.86 (m, 1H, H-alquilo), 1.55 (m, 1H, H-alquilo), 1.37 (ddd, $J = 13.2, 10.8, 3.0$ Hz, 1H, H-alquilo) ppm; ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃) δ 168.66 (C=O), 137.00 (C-q), 128.22 (C-q), 127.29 (C-ar), 121.75 (C-ar), 119.32 (C-ar), 119.04 (C-ar), 109.71 (C-q), 109.12 (C-ar), 87.26 (C-8a), 69.72 (C-2), 54.55 (C-3), 32.67 (NCH₃), 31.40 (C-alquilo), 28.20 (CH₂-indole), 27.53 (C-alquilo), 17.14 (C-alquilo) ppm; IV (NaCl) 1644 (C=O) cm⁻¹.

4.1.3. Síntese dos compostos do capítulo 2.3

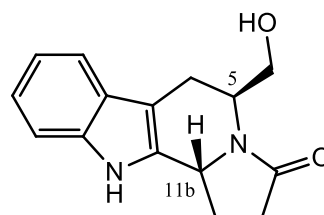
Procedimento geral para a ciclização intramolecular com HCl (procedimento a)

Dissolveu-se a oxazolo-piperidona adequada no mínimo volume de uma solução etanólica de HCl (1.25M) e manteve-se a mistura à temperatura ambiente durante 16-24h. Após este período, evaporou-se o solvente à secura e dissolveu-se o resíduo obtido em AcOEt. Lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa saturada de Na₂CO₃ e depois secou-se com Na₂SO₄. Ao concentrar a fase orgânica observou-se a formação de um precipitado. Após decantação, lavou-se o precipitado obtido com a mínima quantidade de AcOEt gelado.

Síntese do composto 63

(5*S*,11*bR*)-5-(*hydroxymethyl*)-5,6,11,11*b*-tetrahydro-1*H*-indolizino[8,7-*b*]indol-3(2*H*)-one

Oxazolo-pirrolidona 52d (0.14g, 0.55mmol). Tempo de reação: 16h. Isolou-se o composto **63** (0.051g, 36%) na forma de um sólido branco. Recristalizado em AcOEt; pf 254-256 °C; $[\alpha]_D^{20} = 150.0^\circ$ (c = 2.0, MeOH); ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ 10.99 (s, 1H, NH), 7.38 (d, *J* = 7.7 Hz,

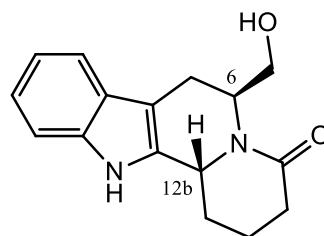


1H, H-ar), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-ar), 7.05 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-ar), 6.96 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, H-ar), 4.84 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-11b & OH), 4.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-5), 3.36 (m, 2H, OCH₂), 2.80 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H, CH₂-indole), 2.70 (dd, *J* = 15.7, 6.5 Hz, 1H, CH₂-indole), 2.53 (m, 2H, H-alquilo), 2.26 (m, 1H, H-alquilo), 1.81 (m, 1H, H-alquilo). ¹³C NMR (101MHz, CDCl₃) δ 172.84 (C=O), 136.29 (C-q), 133.51 (C-q), 126.82 (C-q), 121.03 (C-ar), 118.57 (C-ar), 117.88 (C-ar), 111.20 (C-ar), 104.25 (C-q), 60.25 (OCH₂), 50.88 (C-11b), 48.13 (C-5), 31.20 (C-alquilo), 25.57 (C-alquilo), 21.21 (CH₂-indole); IV (KBr) 3377 (OH), 3273 (NH), 1647 (C=O, amida); AE calculada para C₁₅H₁₆N₂O₂·0.15H₂O: C 69.56, H 6.36, N 10.93, encontrado: C 69.40, H 6.31, N 10.43.

Síntese do composto 64

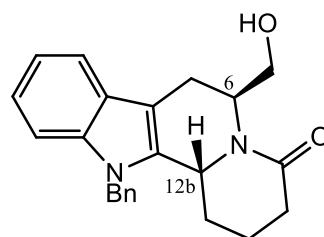
(6*S*,12*bR*)-6-(*hydroxymethyl*)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

Oxazolo-piperidona 54b (0.18g, 0.665mmol). Tempo de reação: 24h. Isolou-se o composto **64** (0.146g, 80%) na forma de um sólido amarelo. Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 276 - 279 °C; $[\alpha]_D^{20} = +143.6^\circ$ (c = 2.1, MeOH) ; O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106]. AE calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: C 71.08, H 6.73, N 10.37, encontrado: C 70.91, H 6.81, N 10.25.

**Síntese do composto 65**

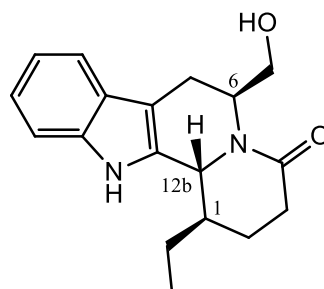
(6*S*,12*bR*)-12-benzyl-6-(*hydroxymethyl*)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

Oxazolo-piperidona (3*S*,8*aS*)-3-((1-benzyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one (0.07g, 0.194mmol). Tempo de reação: 24h. Isolou-se o composto **65** (0.056g, 80%) na forma de um sólido branco. Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 238.5 - 240 °C; O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [121]. AE calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C 75.69, H 6.78, N 7.68, encontrado: C 75.65, H 6.50, N 7.71.

**Síntese do composto 66**

(1*R*,6*S*,12*bR*)-1-ethyl-6-(*hydroxymethyl*)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

Oxazolo-piperidona 55b (0.2g, 0.67mmol). Tempo de reação: 24h. Isolou-se o composto **66** (0.138g, 69%) na forma de um sólido branco; Recristalizado em etanol; O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao descrito em

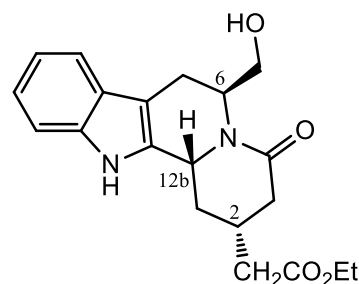


[104]. AE calculada para $C_{18}H_{22}N_2O_2 \cdot 0.15H_2O$: C 71.80, H 7.48, N 9.31, encontrado: C 72.19, H 7.63, N 8.87.

Síntese do composto 67

ethyl 2-((2R,6S,12bR)-6-(hydroxymethyl)-4-oxo-1,2,3,4,6,7,12,12b-otahydro-indolo[2,3-a]quinolizina-2-yl)acetate.

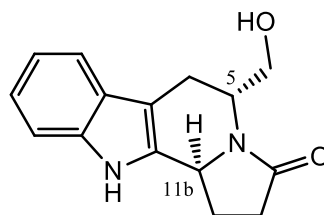
Oxazolo-piperidona 56b (0.05g, 0.146mmol). Tempo de reação: 24h. Isolou-se o composto **67** (0.047g, 97%) na forma de um sólido branco; Recristalizado em $CHCl_3$; pf 109.5 - 112 °C; 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$ com uma gota de CD_3OD) δ 7.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-ar), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-ar), 7.13 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-ar), 7.05 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-ar), 5.43 – 5.32 (m, 1H, H-6), 4.73 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H-12b), 4.14 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H, CH_2 -etilo), 3.64 – 3.49 (m, 2H, OCH_2), 2.92 (dd, $J = 15.9, 4.9$ Hz, 1H, CH_2 -indole), 2.68 (m, 2H, CH_2 -indole & H-alquilo), 2.60 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H, H-alquilo), 2.45 (m, 1H, H-2), 2.31 (m, 2H, CH_2CO_2Et), 2.11 (dd, $J = 17.3, 12.2$ Hz, 1H, H-alquilo), 1.43 (dd, $J = 24.4, 12.2$ Hz, 1H, H-alquilo), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, CH_3 -etilo). ^{13}C RMN (101, MHz $CDCl_3$) δ 172.66 (C=O, ácido), 171.76 (C=O, amida), 136.23 (C-q), 132.62 (C-q), 126.84 (C-q), 121.85 (C-ar), 119.45 (C-ar), 117.97 (C-ar), 111.21 (C-ar), 109.92 (C-q), 62.79 (OCH_2), 61.76 (OCH_2CH_3), 56.05 (C-12b), 51.76 (C-6), 38.97 (CH_2CO_2Et), 38.86 (C-alquilo), 31.80 (CH-alquilo), 26.48 (CH_2 -indole), 22.13 (CH_3 -etilo); IR (KBr) 3256 (NH), 1730 (C=O, ácido), 1618 (C=O, amida); AE calculada para $C_{20}H_{24}N_2O_4 \cdot 0.75H_2O$: C 64.92, H 6.69, N 7.57, encontrado: C 64.62, H 6.73, N 7.41.



Síntese do composto 69

(5R,11bS)-5-(hydroxymethyl)-5,6,11,11b-tetrahydro-1H-indolizino[8,7-b]indol-3(2H)-one.

Oxazolo-piperidona 53d (0.24g, 0.936mmol). Tempo de reação – 16h. Isolou-se o composto **69** na forma de um sólido branco (0.144g, 60%). Recristalizado em $AcOEt/n-$

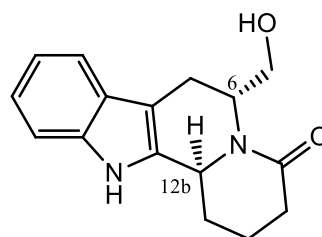


Hex; $[\alpha]_D^{20} = -172.2^\circ$ (c = 1.8, MeOH); O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao composto 63.

Síntese do composto 70

(6*R*,12*bS*)-6-(*hydroxymethyl*)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

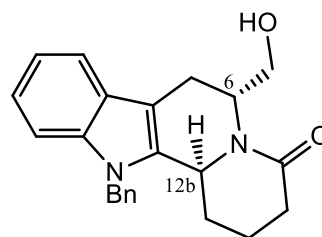
Oxazolo-piperidona 57b (0.1g, 0.37mmol). Tempo de reação: 24h. Isolou-se o composto **70** (0.075g, 75%) na forma de um sólido branco. Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 276 - 279 °C; $[\alpha]_D^{20} = -143.3^\circ$ (c = 1.9, MeOH); O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao composto 64; AE calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 0.25\text{H}_2\text{O}$: C 69.92, H 6.80, N 10.20, encontrado: C 69.80, H 6.62, N 10.01.



Síntese do composto 71

(6*R*,12*bS*)-12-*benzyl*-6-(*hydroxymethyl*)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

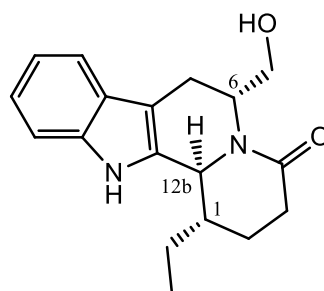
Oxazolo-piperidona (3*R*,8*aR*)-3-((1-*benzyl*-1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one (0.115g, 0.3129mmol). Tempo de reação – 3h. Isolou-se o composto **71** na forma de um sólido branco (0.092g, 80%). Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; O espectro de ^1H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [121].



Síntese do composto 72

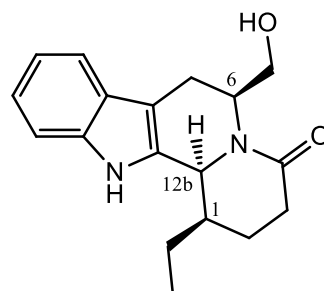
(1*S*,6*R*,12*bS*)-1-ethyl-6-(hydroxymethyl)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

Oxazolo-piperidona 58b (0.05g, 0.168mmol). Tempo de reação – 24h. Isolou-se o composto **72** na forma de um sólido branco. Recristalizado em AcOET/*n*-Hex; O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 66.

**Reações de ciclização intramolecular com BF₃·OEt₂ (procedimento b)****Síntese do composto 68**

(1*R*,6*S*,12*bS*)-1-ethyl-6-(hydroxymethyl)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

A uma solução da oxazolo-piperidona 55b (0.3g, 1.01mmol) em CH₂Cl₂ anidro (10mL), adicionou-se BF₃·OEt₂ (0.4mL, 3.03mmol) gota-a-gota. Colocou-se a mistura a refluxo durante 6h. Após esse período, adicionou-se *brine* (10mL) e separou-se as fases. Extraíu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (2x10mL) e secou-se os extratos orgânicos com Na₂SO₄ antes de evaporar o solvente.

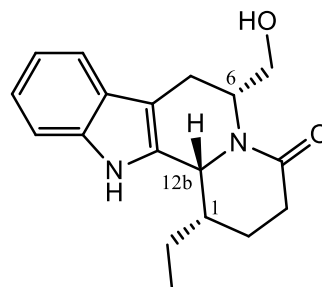


Dissolveu-se o resíduo obtido em CH₂Cl₂ (10mL) e adicionou-se KOH (0.34g, 6.06mmol). Manteve-se a mistura à temperatura ambiente durante 48h. Findo este período, adicionou-se água desionizada (10mL) e CH₂Cl₂ (10mL). Separou-se as fases e secou-se fase orgânica com Na₂SO₄. Ao concentrar o solvente, observou-se a formação de um precipitado amarelo que se lavou com a mínima quantidade de AcOEt gelado. Isolou-se o composto **68** (0.138, 46%) na forma de um sólido branco; Recristalizado em AcOEt/MeOH; O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [104]. AE calculada para C₁₈H₂₂N₂O₂·0.15H₂O: C 71.80, H 7.48, N 9.31, encontrado: C 71.92, H 7.01, N 9.24.

Síntese do composto 73

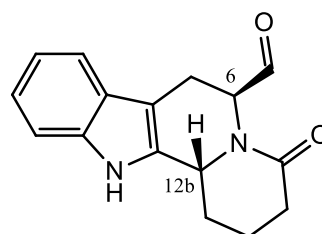
(1*S*,6*R*,12*bR*)-1-ethyl-6-(hydroxymethyl)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizina-4(12*H*)-one.

A uma solução da oxazolo-piperidona 58b (0.21g, 0.657mmol) em CH₂Cl₂ anidro (10mL), adicionou-se BF₃·OEt₂ (0.3mL, 2.27mmol) gota-a-gota. Colocou-se a mistura a refluxo durante 16h. Após este período, a reação foi diluída com CH₂Cl₂ (50mL) e lavou-se com *brine* (30mL). Extraíu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (2x30mL) e secou-se os extratos orgânicos com Na₂SO₄ antes da evaporação do solvente. Dissolveu-se o resíduo obtido em CH₂Cl₂/MeOH (9:1) (20mL) e adicionou-se KOH (0.2g, 3.56mmol). Manteve-se a mistura à temperatura ambiente durante 16h. Findo este período adicionou-se água desionizada (30mL) e separou-se as fases. A fase aquosa foi extraída com AcOEt (3x25mL) e os extratos orgânicos foram secos com Na₂SO₄. Ao evaporar o solvente observou-se a formação de um precipitado que foi lavado com a mínima quantidade de AcOEt gelado. Isolou-se o composto **73** na forma de um sólido branco (0.18g, 92%). Recristalizado em AcOEt/*n*-Hex; pf 265 - 267 °C; [α]_D²⁰ = -74.4° (c = 1.5, MeOH) O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 68.

**Descarboxilação induzida por reação radicalar****Síntese do composto 74**

(6*S*,12*bR*)-4-oxo-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-otahydroindolo[2,3-*a*]quinolizina-6-carbaldehide

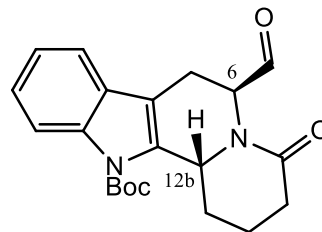
A uma solução do composto 64 (0.17g, 0.629mmol) em DMSO (3mL) adicionou-se IBX (0.36g, 1.29mmol) e manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 24h. Após este período, adicionou-se água desionizada (5mL) e AcOEt (5mL). Separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com AcOEt (2x5mL). Secou-se a fase orgânica com MgSO₄ e evaporou-se o solvente à *secura*. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt. Isolou-se o composto **74** (0.105g, 62%) na forma de um sólido amarelo. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106].



Síntese do composto 75

(6*S*,12*bR*)-*tert*-butyl 6-formyl-4-oxo-1,3,4,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizine-12(2*H*)-carboxylate

A uma solução do composto 74 (0.35g, 1.3mmol) THF seco (5mL) adicionou-se TEA anidra (0.4mL, 2.87mmol) e DMAP (0.04g, 0.33mmol) sob atmosfera inerte. Após 15min em agitação, adicionou-se rapidamente Boc₂O (0.38g, 1.74mmol) e manteve-se a reação à temperatura

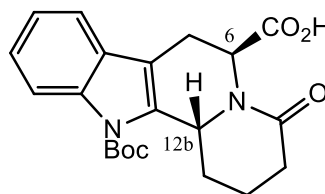


ambiente durante 2h. De seguida evaporou-se o solvente à secura e dissolveu-se o resíduo obtido em AcOEt (20mL). Lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de NH₄Cl (2x15mL), com uma solução saturada NaHCO₃ (2x15mL) e finalmente com *brine* (15mL). Secou-se a fase orgânica com MgSO₄ e após evaporação do solvente, obteve-se o composto **75** (0.407g, 85%) na forma de um sólido amarelo. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106].

Síntese do composto 76

(6*S*,12*bR*)-12-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-oxo-1,2,3,4,6,7,12,12*b*-otahydroindolo[2,3-*a*]quinolizine-6-carboxylic acid.

A uma solução do composto 75 (0.4g, 1.09mmol) em acetonitrilo (6mL) adicionou-se ^tBuOH (20mL, 209mmol) e 1-metil-ciclohexeno (10mL, 84.2mmol). De seguida, adicionou-se muito lentamente, uma solução aquosa (20mL) com NaClO₂ (1g, 11.1mmol) e NaH₂PO₄ (1g, 8.3mmol) e

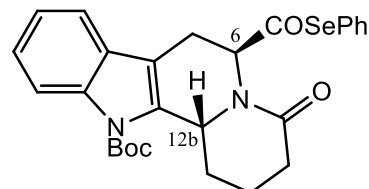


manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 24h. Após esse period, adicionou-se AcOEt (50mL) e *brine* (40mL) e corrigiu-se o pH do meio para 1, por adição de uma solução aquosa de HCl (2M). Separou-se as fases e lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa de Na₂S₂O₃ (20mL, 0.1M). Secou-se a fase orgânica com MgSO₄ e evaporou-se o solvente à secura. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com o gradiente de eluição AcOEt/*n*-Hex (1:1) – AcOEt/MeOH (9:1). Isolou-se o composto **76** (0.3g, 71%) na forma de um sólido castanho claro. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106].

Síntese do composto 77

(6*S*,12*bR*)-*tert*-butyl-4-oxo-6-((phenylselanyl)carbonyl)-1,3,4,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizine-12(2*H*)-carboxylate.

A uma solução do composto 76 (0.29g, 0.754mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) sob atmosfera inerte, adicionou-se Se₂Ph₂ (0.4g, 1.3mmol). Após 15min sob agitação, adicionou-se P(Bu)₃ (0.4mL, 1.6mmol) gota-a-gota e manteve-se a mistura à temperatura ambiente durante

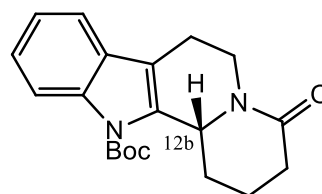


22h. Findo este período, adicionou-se CH₂Cl₂ (30mL) e água desionizada (30mL). Separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com CH₂Cl₂ (30mL). Lavou-se os extratos orgânicos com *brine* (30mL), e secou-se com MgSO₄ antes da evaporação do solvente. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt/*n*-Hex (2:3). Isolou-se o composto **77** (0.19g, 48%) na forma de um sólido amarelo. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106].

Síntese do composto 78

(*R*)-*tert*-butyl 4-oxo-1,3,4,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizine-12(2*H*)-carboxylate.

Preparou-se uma solução do composto 77 (0.18g, 0.344mmol) em tolueno anidro (20mL) numa montagem com material completamente seco. Borbulhou-se N₂ durante 15min e adicionou-se AIBN (6mg, cat.) sob atmosfera

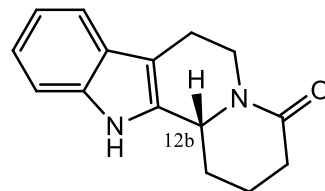


inerte. Colocou-se a solução a refluxo e adicionou-se TBTH (0.2mL, 0.75mmol) ao longo de um período de 20min. Manteve-se a reação a refluxo durante 1h e evaporou-se o solvente à *secura*. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **78** (0.102g, 98%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106].

Síntese do composto 79

(R)-1,2,3,6,7,12*b*-hexahydroindolo[2,3-*a*]quinolizin-4(12*H*)-one.

Dissolveu-se o composto 78 (0.025g, 0.073mmol) numa solução de TBAF em THF (5mL, 1.0M) e manteve-se a reação a refluxo durante 20h. Após este período, adicionou-se água desionizada (15mL) e extraiu-se a mistura com AcOEt (3x10mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ e



evaporou-se o solvente à secura. Purificou-se o resíduo obtido com AcOEt/*n*-Hex (3:1). Isolou-se o composto **79** (9mg, 53%) na forma de um sólido castanho. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [106].

4.1.4. Síntese dos compostos do capítulo 2.4

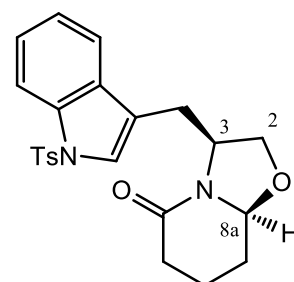
Procedimento geral para as reações de transferência de fase

A uma solução da oxazolo-piperidona apropriada em CH₂Cl₂, arrefecida a 0°C, adicionou-se o cloreto de aril-sulfonilo apropriado (1.2eq.), TBACl (cat., 10%mmol) e uma solução aquosa de NaOH (30% p/v). A mistura foi mantida à temperatura ambiente durante 16-96h. Após este tempo adicionou-se CH₂Cl₂ e separou-se as fases. Lavou-se a fase orgânica com uma solução aquosa de HCl (1M) e secou-se com Na₂SO₄. Após evaporação do solvente, purificou-se o resíduo bruto por cromatografia *flash* com o eluente adequado.

Síntese do composto 80

(3*S*,8*aS*)-3-((1-*tosyl*-1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one

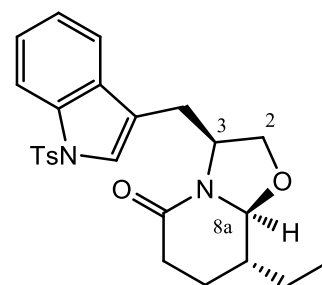
Oxazolo-piperidona 54b (0.29g, 1.07mmol) em CH₂Cl₂ (15mL) para *p*-TsCl (0.26g, 1.36mmol) e solução aq. de NaOH (5mL). Tempo de reação: 96h. Eluente para purificação: AcOEt/*n*-Hex (2:1). Isolou-se o composto **80** (0.034g, 70%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [107].



Síntese do composto 81

(3*S*,8*R*,8*aS*)-8-ethyl-3-((1-*tosyl*-1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one

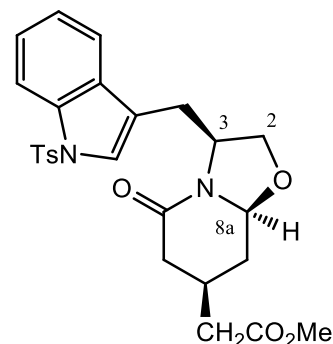
Oxazolo-piperidona 55b (0.14g, 0.469mmol) em CH₂Cl₂ (5mL) para *p*-TsCl (0.112g, 1.2eq) e solução aq. NaOH (3mL). Tempo de reação: 96h. Eluente para purificação: AcOEt/*n*-Hex (3:2). Isolou-se o composto **81** (0.06g, 28%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [107].



Síntese do composto 82

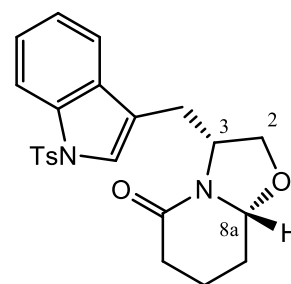
methyl 2-((3S,7R,8aS)-5-oxo-3-((1-tosyl-1H-indol-3-yl)methyl)hexahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-7-yl)acetate

Oxazolo-piperidona 56b (0.2g, 0.584mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) para *p*-TsCl (0.14g, 0.736mmol) e solução aq. NaOH (5mL). Tempo de reação: 72h. Eluente para purificação: AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **82** (0.134g, 46%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [107].

**Síntese do composto 83**

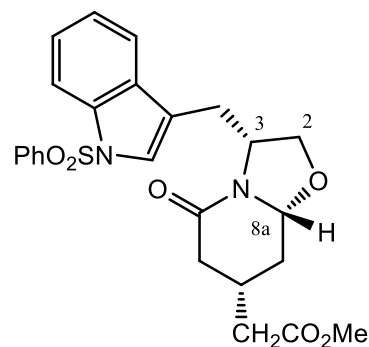
(3R,8aR)-3-((1-tosyl-1H-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-5(3H)-one

Oxazolo-piperidona 57b (0.2g, 0.74mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) para *p*-TsCl (0.180g, 0.946mmol) e solução aq. NaOH (3mL). Tempo de reação: 96h. Eluente para purificação: AcOEt/*n*-Hex (2:1). Isolou-se o composto **83** (0.236g, 75%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 80.

**Síntese do composto 84**

methyl 2-((3R,7S,8aR)-5-oxo-3-((1-(phenylsulfonyl)-1H-indol-3-yl)methyl)-hexahydro-2H-oxazolo[3,2-a]pyridin-7-yl)acetate

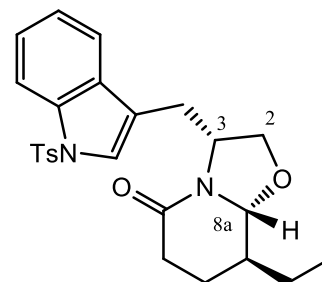
Oxazolo-piperidona 59b (2.05g, 5.99mmol) em CH₂Cl₂ (30mL) para cloreto de benzenosulfonilo (1.2mL, 9.4mmol) e solução aq. NaOH (40mL). Tempo de reação: 24h. Eluente para purificação: AcOEt/*n*-Hex (3:2). Isolou-se o composto **84** (2.4g, 82%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [105].



N-tosilação com hidreto de sódio**Síntese do composto 85**

(3*R*,8*S*,8*aR*)-8-ethyl-3-((1-tosyl-1*H*-indol-3-yl)methyl)tetrahydro-2*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridin-5(3*H*)-one

A uma solução arrefecida a 0°C da oxazolo-piperidona 58b (0.54g, 1.81mmol) em DMF anidro (40mL) adicionou-se NaH (0.09g, 2.25mmol, 60% dispersão em óleo mineral). Após 15min sob agitação, adicionou-se p-TsCl (0.54g, 2.84mmol) e a reação foi mantida à temperatura ambiente durante 2h. Após este período adicionou-se água desionizada



gelada (50mL) e extraiu-se a mistura com AcOEt (3x30mL). Lavou-se a fase orgânica com *brine* (30mL) e secou-se com Na₂SO₄ antes do solvente ser evaporado à *secura*. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt/*n*-Hex (1:1). Isolou-se o composto **85** (0.58g, 71%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 81.

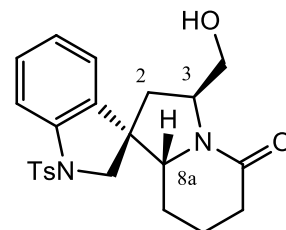
Procedimento geral para a síntese de spiro-indolinas

A uma solução arrefecida a 0°C da oxazolo-piperidona tosilada selecionada em CH₂Cl₂ anidro, adicionou-se o ácido de lewis apropriado (4eq.). Após alguns minutos sob agitação, adicionou-se lentamente Et₃SiH (4eq.) e colocou-se a reação a refluxo durante 24-96h. Após este período, arrefeceu-se a mistura a 0°C e adicionou-se *brine*. Separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa várias vezes com CH₂Cl₂. Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente à *secura*. Adsorveu-se o resíduo obtido em sílica e purificou-se por cromatografia *flash* com o eluente adequado.

Síntese do composto 86

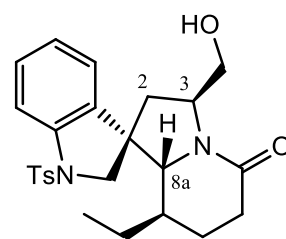
(1'S,3'S,8a'R)-3'-(hydroxymethyl)-1-tosyl-6',7',8',8a'-tetrahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-5'(3'H)-one

Composto 80 (0.165g, 0.39mmol) em CH₂Cl₂ (15mL) para BF₃·OEt₂ (0.53mL, 4.29mmol) e Et₃SiH (0.33mL, 2.1mmol). Tempo de reação: 24h. Eluente para purificação: AcOEt/MeOH (49:1). Isolou-se o composto **86** (0.139g, 84%) na forma de um sólido amarelo. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [107].

**Síntese do composto 87**

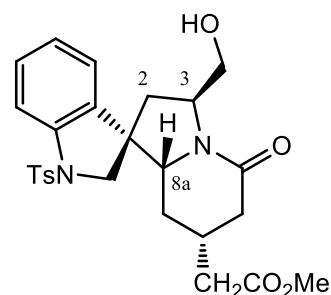
(1'S,3'S,8'R,8a'R)-8'-ethyl-3'-(hydroxymethyl)-1-tosyl-6',7',8',8a'-tetrahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-5'(3'H)-one

Composto 81 (0.1g, 0.22mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) para BF₃·OEt₂ (0.06mL, 0.49mmol) e Et₃SiH (0.05mL, 0.31mmol). Tempo de reação: 92h. Eluente para purificação: AcOEt:MeOH (49:1). Isolou-se o composto **87** (0.079g, 78%) na forma de um sólido amarelo. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [107].

**Síntese do composto 88**

methyl 2-((1'S,3'S,7'R,8a'R)-3'-(hydroxymethyl)-5'-oxo-1-tosyl-3',5',6',7',8',8a'-hexahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-7'-yl)acetate

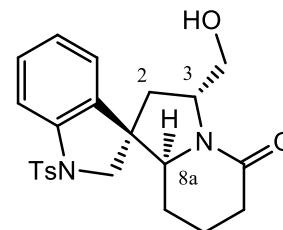
Composto 82 (0.065g, 0.13mol) em CH₂Cl₂ (10mL) para BF₃·OEt₂ (0.15mL, 1.22mmol) e Et₃SiH (0.1mL, 0.63mmol). Tempo de reação: 36h. Eluente para purificação: AcOEt/MeOH (9:1). Isolou-se o composto **88** (0.049g, 76%) na forma de um sólido amarelo. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [107].



Síntese do composto 89

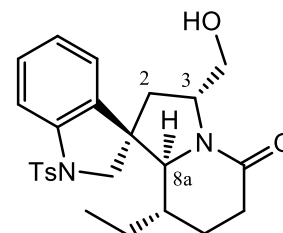
(1'R,3'R,8a'S)-3'-(hydroxymethyl)-1-tosyl-6',7',8',8a'-tetrahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-5'(3'H)-one

Composto 83 (0.165g, 0.39mmol) em CH₂Cl₂ (15mL) para BF₃·OEt₂ (0.53mL, 4.29mmol) e Et₃SiH (0.33mL, 2.1mmol). Tempo de reação: 44h. Eluente para purificação: AcOEt/MeOH (9:1). Isolou-se o composto **89** (0.105g, 64%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 86.

**Síntese do composto 90**

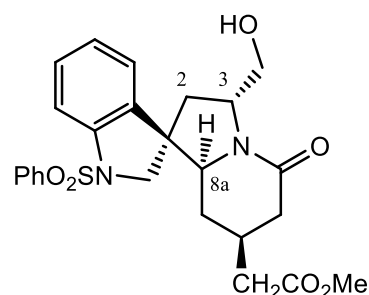
(1'R,3'R,8'S,8a'S)-8'-ethyl-3'-(hydroxymethyl)-1-tosyl-6',7',8',8a'-tetrahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-5'(3'H)-one

Composto 85 (0.1g, 0.22mmol) em CH₂Cl₂ (10mL) para BF₃·OEt₂ (0.06mL, 0.49mmol) e Et₃SiH (0.05mL, 0.31mmol). Tempo de reação: 80h. Eluente para purificação: AcOEt/MeOH (18:2). Isolou-se o composto **90** (0.072g, 72%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao composto 87.

**Síntese do composto 91**

methyl 2-((1'R,3'R,7'S,8a'S)-3'-(hydroxymethyl)-5'-oxo-1-(phenylsulfonyl)-3',5',6',7',8',8a'-hexahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-7'-yl)acetate

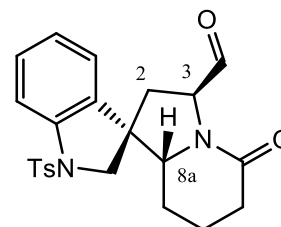
Composto 84 (0.5g, 1.01mmol) em CH₂Cl₂ (20mL) para TiCl₄ (0.4mL, 3.65mmol) e Et₃SiH (0.5mL, 3.13mmol). Tempo de reação: 24h. Eluente para purificação: EtOAc/MeOH (49:1). Isolou-se o composto **91** (0.215g, 43%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [105].



Modulação das spiro-indolinas**Síntese do composto 92**

(1'S,3'S,8a'R)-5'-oxo-1-tosyl-3',5',6',7',8',8a'-hexahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizine]-3'-carbaldehyde

A uma solução do composto 86 (0.33g, 0.774mmol) em DMSO (6mL) adicionou-se IBX (0.53g, 1.89mmol) e manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 20h. Após este período adicionou-se água desionizada (10mL) e extraiu-se a mistura com AcOEt (3x10mL). Lavou-se os extratos orgânicos com

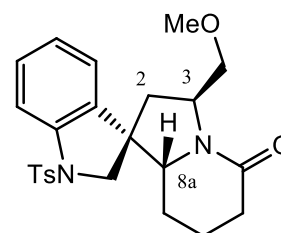


brine (15mL) e secou-se com Na₂SO₄ antes da evaporação do solvente. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt/*n*-Hex (4:1). Isolou-se o composto **92** (0.117g, 36%) na forma de um sólido branco. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.68 (s, 1H, CHO), 7.71 (dd, *J* = 18.1, 9.4 Hz, 3H, H-ar), 7.27 (dd, *J* = 9.2, 3.9 Hz, 5H, H-ar), 7.00 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH₂-indolina), 6.72 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, CH₂-indolina), 4.76 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-3), 3.87 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, H-2), 3.75 (d, *J* = 11.2 Hz, 1H, H-2), 3.55 (dd, *J* = 11.2, 4.2 Hz, 1H, H-8a), 2.47 (dd, *J* = 18.4, 4.9 Hz, 1H, H-alquilo), 2.38 (s, 3H, CH₃-tosilo), 2.29 (d, *J* = 20.2 Hz, 1H, H-alquilo), 2.12 – 2.03 (m, 1H, H-alquilo), 1.90 (dd, *J* = 13.1, 9.8 Hz, 1H, H-alquilo), 1.45 (d, *J* = 11.8 Hz, 1H, H-alquilo), 0.63 (dd, *J* = 25.4, 12.1 Hz, 1H, H-alquilo) ppm.

Síntese do composto 93

(1'S,3'S,8a'R)-3'-(methoxymethyl)-1-tosyl-6',7',8',8a'-tetrahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-5'(3'H)-one

A uma solução do composto 86 (0.15g, 0.352mmol) em DMF seco (5mL) adicionou-se NaH (0.021g, 0.525mmol, 60% dispersão em óleo mineral). Após 15min em agitação, adicionou-se Iodometano (0.04mL, 0.642mmol) lentamente e manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 1h. Após este período,



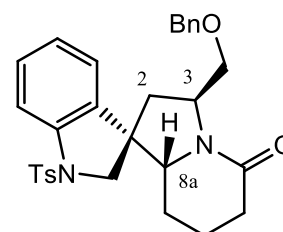
adicionou-se água desionizada gelada (10mL) e extraiu-se a mistura com AcOEt (2x10mL). Lavou-se os extratos orgânicos com *brine* (10mL) e secou-se com MgSO₄ antes da evaporação do solvente. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt/*n*-Hex (2:1). Isolou-se o composto **93** (0.055g, 35%) foi isolado na forma

de um sólido branco. ^1H NMR (300 MHz, cdcl_3) δ 7.76 – 7.65 (m, 3H, H-ar), 7.31 – 7.20 (m, 5H, H-ar), 6.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH_2 -indolina), 6.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, CH_2 -indolina), 4.41 (m, 1H, H-3), 3.88 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, OCH_2), 3.75 (m, 2H, OCH_2 & H-8a), 3.54 – 3.46 (m, 1H, H-alquilo), 3.34 (s, 3H, OCH_3), 2.45 – 2.32 (m, 4H, CH_3 -tosilo & H-2), 2.09 – 1.96 (m, 2H, H-alquilo), 1.81 (dd, $J = 13.1, 7.8$ Hz, 1H, H-alquilo), 1.61 – 1.54 (m, 1H, H-2), 1.37 (d, $J = 13.2$ Hz, 1H, H-alquilo), 0.46 (td, $J = 12.4, 6.4$ Hz, 1H, H-alquilo).

Síntese do composto **94**

(1'S,3'S,8a'R)-3'-((benzyloxy)methyl)-1-tosyl-6',7',8',8a'-tetrahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizin]-5'(3'H)-one

A uma solução do composto **86** (0.017g, 0.039mmol) em THF seco (5mL) adicionou-se NaH (0.005g, 1.25mmol, 60% dispersão em óleo mineral) e manteve-se a reação sob agitação à temperatura ambiente durante 1h. De seguida, adicionou-se BnBr (0.01mL, 0.084mmol) e a manteve-se reação à

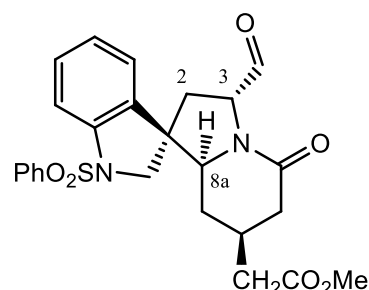


temperatura ambiente durante mais 44h. Após este período adicionou-se *brine* (5mL) e extraiu-se a mistura com AcOEt (2x10mL). Secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 e evaporou-se o solvente à *secura*. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt. Isolou-se o composto **94** (0.008g, 40%) na forma de um sólido branco. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.75 – 7.64 (m, 3H), 7.39 – 7.21 (m, 10H), 6.96 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH_2 -indolina), 6.70 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH_2 -indolina), 4.51 (s, 2H, CH_2Ph), 4.44 (m, 1H, H3), 3.85 (m, 2H, OCH_2 & H-8a), 3.73 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, OCH_2), 3.64 (dd, $J = 9.3, 1.6$ Hz, 1H, H-alquilo), 3.53 (dd, $J = 11.2, 4.4$ Hz, 1H, H-2), 2.40 – 2.30 (m, 4H, CH_3 -tosilo & H-2), 2.10 – 2.02 (m, 2H, H-alquilo), 1.53 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, H-alquilo), 1.37 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, H-alquilo), 0.45 (td, $J = 13.3, 2.7$ Hz, 1H, H-alquilo) ppm.

Síntese do composto 96

methyl 2-((1'R,3'R,7'S,8a'S)-3'-formyl-5'-oxo-1-(phenylsulfonyl)-3',5',6',7',8',8a'-hexahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizina]-7'-yl)acetate

A uma solução do composto 91 (0.35g, 0.72mmol) em DMSO (5mL) adicionou-se IBX (0.285g, 1.02mmol) e manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 20h. Após este período adicionou-se AcOEt (30mL) e lavou-se a mistura com NaHCO₃ (20mL) e *brine* (20mL). Secou-se a fase orgânica com Na₂SO₄ e evaporou-se o

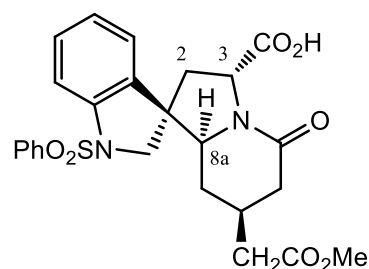


solvente à *secura*. Purificou-se o resíduo obtido por cromatografia *flash* com AcOEt/*n*-Hex (4:1). Isolou-se o composto **96** (0.176g, 51%) na forma de um sólido branco. O espectro de ¹H RMN revelou-se idêntico ao descrito em [105].

Síntese do composto 97

(1'R,3'R,7'S,8a'S)-7'-(2-methoxy-2-oxoethyl)-5'-oxo-1-(phenylsulfonyl)-3',5',6',7',8',8a'-hexahydro-2'H-spiro[indoline-3,1'-indolizina]-3'-carboxylic acid

Preparou-se uma solução do composto 96 (0.125g, 0.259mmol) em acetonitrilo (2mL), ¹butanol (7.3mL, 76.3mmol) e 1-metilciclohexeno (0.98mL, 8.25mmol). A esta solução, adicionou-se muito lentamente, uma solução de NaClO₂ (0.17g) e NaH₂PO₄ (0.21g) em água



desionizada (4mL). Manteve-se a reação à temperatura ambiente durante 3h. Findo este período, diluiu-se a reação com AcOEt (10mL) e adicionou-se uma solução de Na₂S₂O₃ (10mL, diluída 1:9 a partir de uma solução saturada). De seguida, corrigiu-se o pH da mistura para 1 através da adição de uma solução aquosa de HCl (2M). Separou-se as fases e extraiu-se a fase aquosa com AcOEt (2x10mL). Secou-se os extratos orgânicos com Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente à *secura*. Purificou-se o composto bruto por cromatografia *flash* com AcOEt/MeOH (9:1). Isolou-se o composto **97** (0.117g, 88%) na forma de um sólido branco. O espectro ¹H RMN revelou-se idêntico aos análogos descritos em [106].

4.2. Avaliação da Atividade Antagonística sobre o NMDAR

A atividade dos compostos sintetizados como antagonistas do recetor NMDA foi avaliada usando culturas primárias de neurónios de cerebelo de rato, tal como previamente descrito em [120]. Resumidamente, as culturas foram preparadas a partir de ratos Wistar com 7-8 dias pós-natal (**Charles River, France**). Os cerebelos foram dissecados, triturados e tripsinizados. Depois de várias sedimentações, as células obtidas foram plaqueadas em lamelas com revestimento de poli-lisina em caixas de cultura de 24 poços, com densidade de 1×10^6 cells/cm³. As placas foram mantidas numa estufa a 37 °C (**Heraus, Germany**). Após 16-18 h, adicionou-se 10 µM de citosina-arabinosídeo (**SIGMA-Aldrich**) por forma a evitar a proliferação excessiva de astrócitos. As culturas podem ser utilizadas para ensaios de atividade do recetor NMDA entre os dias 7 e 11 *in vitro*.

A atividade do recetor NMDA foi estimada com recurso a uma sonda fura-2 sensível a cálcio (**Invitrogen, USA**). Após incubação com 6 µM de éster acetoximetil fura-2 (fura-2 AM) durante 30-45 min a 37 °C, as lamelas foram transferidas para um suporte de plástico que por sua vez foi inserido numa célula de quartzo para medição de fluorescência. O registo da fluorescência de fura-2 foi realizado usando um espectrómetro luminescente PerkinElmer LS50B, com comprimentos de onda de excitação a 340 e a 380 nm, e com emissão a 510 nm. A proporção F_{340}/F_{380} (R) é proporcional ao cálcio intracelular. Todas as medições foram executadas a 37 °C e sob agitação moderada. Uma vez iniciado o registo, foram adicionados à célula de quartzo 10 µM de glicina e 100 µM de NMDA, aos 50s e aos 100s, respetivamente. Tal produz um aumento sustentado em F_{340}/F_{380} , indicando que os recetores NMDA foram ativados e que a concentração de cálcio intracelular foi elevada. Este aumento de cálcio intracelular foi contestado com concentrações cumulativas dos compostos em análise (de 1×10^{-7} a 3×10^{-4} M). Caso os compostos atuassem como antagonistas do recetor NMDA, tal seria detetado como um decréscimo do valor de F_{340}/F_{380} . As experiências foram realizadas em triplicado. A memantine foi usada como controlo positivo. Uma vez atingido um mínimo de 50 % de inibição do recetor, foi calculado o valor de IC_{50} por regressão linear com recurso ao programa GraphPad Prism 5.0.

5. Referências

1. Bartus, R.T., **2000**. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp Neurol*. 163(2): p. 495-529.
2. Chan, P., J.W. Langston, and D.A. Di Monte, **1993**. MK-801 temporarily prevents MPTP-induced acute dopamine depletion and MPP⁺ elimination in the mouse striatum. *J Pharmacol Exp Ther*. 267(3): p. 1515-20.
3. Coyle, J.T. and R. Schwarcz, **1976**. Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*. 263(5574): p. 244-6.
4. Choi, D.W., **1992**. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol*. 23(9): p. 1261-76.
5. Cowburn, R.F., B. Wiehager, and E. Sundstrom, **1995**. beta-Amyloid peptides enhance binding of the calcium mobilising second messengers, inositol(1,4,5)trisphosphate and inositol-(1,3,4,5)tetrakisphosphate to their receptor sites in rat cortical membranes. *Neurosci Lett*. 191(1-2): p. 31-4.
6. Hardingham, G.E., Y. Fukunaga, and H. Bading, **2002**. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*. 5(5): p. 405-14.
7. Nicholls, D.G. and S.L. Budd, **2000**. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 80(1): p. 315-60.
8. Parsons, C.G., A. Stoffler, and W. Danysz, **2007**. Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology*. 53(6): p. 699-723.
9. Furukawa, H., S.K. Singh, R. Mancusso, and E. Gouaux, **2005**. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*. 438(7065): p. 185-92.
10. Benveniste, M. and M.L. Mayer, **1991**. Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. Two binding sites each for glutamate and glycine. *Biophys J*. 59(3): p. 560-73.
11. Mayer, M.L., **2006**. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*. 440(7083): p. 456-62.

12. Ehlers, M.D., S. Zhang, J.P. Bernhardt, and R.L. Huganir, **1996**. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell*. 84(5): p. 745-55.
13. O'Hara, P.J., P.O. Sheppard, H. Thogersen, D. Venezia, B.A. Haldeman, V. McGrane, K.M. Houamed, C. Thomsen, T.L. Gilbert, and E.R. Mulvihill, **1993**. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron*. 11(1): p. 41-52.
14. Kohr, G., **2006**. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res*. 326(2): p. 439-46.
15. Scimemi, A., A. Fine, D.M. Kullmann, and D.A. Rusakov, **2004**. NR2B-containing receptors mediate cross talk among hippocampal synapses. *J Neurosci*. 24(20): p. 4767-77.
16. Ikonomidou, C. and L. Turski, **2002**. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol*. 1(6): p. 383-6.
17. Tovar, K.R. and G.L. Westbrook, **1999**. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci*. 19(10): p. 4180-8.
18. Chazot, P.L., **2004**. The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr Med Chem*. 11(3): p. 389-96.
19. Chahal, H., S.W. D'Souza, A.J. Barson, and P. Slater, **1998**. Modulation by magnesium of N-methyl-D-aspartate receptors in developing human brain. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 78(2): p. F116-20.
20. Mugnaini, M., **2006**. Allosteric Interactions at the NMDA Receptor Channel Complex, ed. N.G. Bowery.
21. Paoletti, P., P. Ascher, and J. Neyton, **1997**. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci*. 17(15): p. 5711-25.
22. Perin-Dureau, F., J. Rachline, J. Neyton, and P. Paoletti, **2002**. Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci*. 22(14): p. 5955-65.
23. Davies, J. and J.C. Watkins, **1982**. Actions of D and L forms of 2-amino-5-phosphonovalerate and 2-amino-4-phosphonobutyrate in the cat spinal cord. *Brain Res*. 235(2): p. 378-86.
24. Evans, R.H., A.A. Francis, A.W. Jones, D.A. Smith, and J.C. Watkins, **1982**. The effects of a series of omega-phosphonic alpha-carboxylic amino acids on

- electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal cord preparations. *Br J Pharmacol.* 75(1): p. 65-75.
25. Davies, J., R.H. Evans, A.A. Francis, A.W. Jones, D.A. Smith, and J.C. Watkins, **1982**. Conformational aspects of the actions of some piperidine dicarboxylic acids at excitatory amino acid receptors in the mammalian and amphibian spinal cord. *Neurochem Res.* 7(9): p. 1119-33.
 26. Shinozaki, H., M. Ishida, K. Shimamoto, and Y. Ohfune, **1989**. Potent NMDA-like actions and potentiation of glutamate responses by conformational variants of a glutamate analogue in the rat spinal cord. *Br J Pharmacol.* 98(4): p. 1213-24.
 27. Hayashi, Y., Y. Tanabe, I. Aramori, M. Masu, K. Shimamoto, Y. Ohfune, and S. Nakanishi, **1992**. Agonist analysis of 2-(carboxycyclopropyl)glycine isomers for cloned metabotropic glutamate receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells. *Br J Pharmacol.* 107(2): p. 539-43.
 28. Lehmann, J., J. Schneider, S. McPherson, D.E. Murphy, P. Bernard, C. Tsai, D.A. Bennett, G. Pastor, D.J. Steel, C. Boehm, and et al., **1987**. CPP, a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type receptor antagonist: characterization in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 240(3): p. 737-46.
 29. Lehmann, J., A.J. Hutchison, S.E. McPherson, C. Mondadori, M. Schmutz, C.M. Sinton, C. Tsai, D.E. Murphy, D.J. Steel, M. Williams, and et al., **1988**. CGS 19755, a selective and competitive N-methyl-D-aspartate-type excitatory amino acid receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 246(1): p. 65-75.
 30. Grotta, J., W. Clark, B. Coull, L.C. Pettigrew, B. Mackay, L.B. Goldstein, I. Meissner, D. Murphy, and L. LaRue, **1995**. Safety and tolerability of the glutamate antagonist CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke. Results of a phase IIa randomized trial. *Stroke.* 26(4): p. 602-5.
 31. Cheung, N.S., D. O'Callaghan, M.C. Ryan, R. Dutton, M.G. Wong, and P.M. Beart, **1996**. Structure-activity relationships of competitive NMDA receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 313(1-2): p. 159-62.
 32. Müller, W., Lowe, D. A., Neijt, H., Urwyler, S., Herrling, P. L., Blaser, D., Seebach, D., **1992**. Synthesis and N-Methyl-D-aspartate (NMDA) Antagonist Properties of the Enantiomers of α -Amino-5-(phosphonomethyl)[1,1'-biphenyl]-3-propanoic Acid. Use of a New Chiral Glycine Derivative. *Helvetica Chimica Acta.* 75(3): p. 855-864.

33. Li, J.H., C.F. Bigge, R.M. Williamson, S.A. Borosky, M.G. Vartanian, and D.F. Ortwine, **1995**. Potent, orally active, competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists are substrates for a neutral amino acid uptake system in Chinese hamster ovary cells. *J Med Chem.* 38(11): p. 1955-65.
34. Whitten, J.P., B.L. Harrison, H.J. Weintraub, and I.A. McDonald, **1992**. Modeling of competitive phosphono amino acid NMDA receptor antagonists. *J Med Chem.* 35(9): p. 1509-14.
35. Bonhaus, D.W., G.C. Yeh, L. Skaryak, and J.O. McNamara, **1989**. Glycine regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor-gated ion channel in hippocampal membranes. *Mol Pharmacol.* 36(2): p. 273-9.
36. Fletcher, E.J., J.D. Millar, S. Zeman, and D. Lodge, **1989**. Non-competitive antagonism of N-methyl-d-aspartate by displacement of an endogenous glycine-like substance. *Eur J Neurosci.* 1(3): p. 196-203.
37. Pullan, L.M., M. Britt, M.J. Chapdelaine, R.A. Keith, D. LaMonte, T.J. Mangano, J. Patel, R.J. Powel, R.J. Stumpo, P.J. Warwick, and et al., **1990**. Stereoselectivity for the (R)-enantiomer of HA-966 (1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2) at the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *J Neurochem.* 55(4): p. 1346-51.
38. McDonald, J.W., J. Uckele, F.S. Silverstein, and M.V. Johnston, **1989**. HA-966 (1-hydroxy-3-aminopyrrolidone-2) selectively reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated brain damage. *Neurosci Lett.* 104(1-2): p. 167-70.
39. Singh, L., A.E. Donald, A.C. Foster, P.H. Hutson, L.L. Iversen, S.D. Iversen, J.A. Kemp, P.D. Leeson, G.R. Marshall, R.J. Oles, and et al., **1990**. Enantiomers of HA-966 (3-amino-1-hydroxypyrrolid-2-one) exhibit distinct central nervous system effects: (+)-HA-966 is a selective glycine/N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, but (-)-HA-966 is a potent gamma-butyrolactone-like sedative. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(1): p. 347-51.
40. Kemp, J.A., A.C. Foster, P.D. Leeson, T. Priestley, R. Tridgett, L.L. Iversen, and G.N. Woodruff, **1988**. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(17): p. 6547-50.
41. Moroni, F., M. Alesiani, A. Galli, F. Mori, R. Pecorari, V. Carla, G. Cherici, and R. Pellicciari, **1991**. Thiokynurenates: a new group of antagonists of the glycine modulatory site of the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol.* 199(2): p. 227-32.

42. Baron, B.M., B.L. Harrison, F.P. Miller, I.A. McDonald, F.G. Salituro, C.J. Schmidt, S.M. Sorensen, H.S. White, and M.G. Palfreyman, **1990**. Activity of 5,7-dichlorokynurenic acid, a potent antagonist at the N-methyl-D-aspartate receptor-associated glycine binding site. *Mol Pharmacol.* 38(4): p. 554-61.
43. Foster, A.C., J.A. Kemp, P.D. Leeson, S. Grimwood, A.E. Donald, G.R. Marshall, T. Priestley, J.D. Smith, and R.W. Carling, **1992**. Kynurenic acid analogues with improved affinity and selectivity for the glycine site on the N-methyl-D-aspartate receptor from rat brain. *Mol Pharmacol.* 41(5): p. 914-22.
44. Carling, R.W., P.D. Leeson, A.M. Moseley, R. Baker, A.C. Foster, S. Grimwood, J.A. Kemp, and G.R. Marshall, **1992**. 2-Carboxytetrahydroquinolines. Conformational and stereochemical requirements for antagonism of the glycine site on the NMDA receptor. *J Med Chem.* 35(11): p. 1942-53.
45. Leeson, P.D., R.W. Carling, K.W. Moore, A.M. Moseley, J.D. Smith, G. Stevenson, T. Chan, R. Baker, A.C. Foster, S. Grimwood, and et al., **1992**. 4-Amido-2-carboxytetrahydroquinolines. Structure-activity relationships for antagonism at the glycine site of the NMDA receptor. *J Med Chem.* 35(11): p. 1954-68.
46. Baron, B.M., B.L. Harrison, I.A. McDonald, B.S. Meldrum, M.G. Palfreyman, F.G. Salituro, B.W. Siegel, A.L. Slone, J.P. Turner, and H.S. White, **1992**. Potent indole- and quinoline-containing N-methyl-D-aspartate antagonists acting at the strychnine-insensitive glycine binding site. *J Pharmacol Exp Ther.* 262(3): p. 947-56.
47. Huettner, J.E., **1989**. Indole-2-carboxylic acid: a competitive antagonist of potentiation by glycine at the NMDA receptor. *Science.* 243(4898): p. 1611-3.
48. Lester, R.A., M.L. Quarum, J.D. Parker, E. Weber, and C.E. Jahr, **1989**. Interaction of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione with the N-methyl-D-aspartate receptor-associated glycine binding site. *Mol Pharmacol.* 35(5): p. 565-70.
49. Sheardown, M.J., J. Drejer, L.H. Jensen, C.E. Stidsen, and T. Honore, **1989**. A potent antagonist of the strychnine insensitive glycine receptor has anticonvulsant properties. *Eur J Pharmacol.* 174(2-3): p. 197-204.
50. Nagata, R., N. Tanno, T. Kodo, N. Ae, H. Yamaguchi, T. Nishimura, F. Antoku, T. Tatsuno, T. Kato, Y. Tanaka, and et al., **1994**. Tricyclic quinoxalinediones: 5,6-dihydro-1H-pyrrolo[1,2,3-de] quinoxaline-2,3-diones and 6,7-dihydro-1H,5H-

- pyrido[1,2,3-de] quinoxaline-2,3-diones as potent antagonists for the glycine binding site of the NMDA receptor. *J Med Chem.* 37(23): p. 3956-68.
51. Leeson, P.D., Baker, R., Carling, R. W., Kulagowski, J. J., Mawer, I. M., Ridgill, M. P., Rowley, M., Smith, J. D., Stansfield, I., Stevenson, G. I., Foster, A. C., Kemp, J. A., **1993**. Amino acid bioisosteres: design of 2-quinolone derivatives as glycine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 3(2): p. 299–304.
 52. Carling, R.W., P.D. Leeson, K.W. Moore, J.D. Smith, C.R. Moyes, I.M. Mawer, S. Thomas, T. Chan, R. Baker, A.C. Foster, and et al., **1993**. 3-Nitro-3,4-dihydro-2(1H)-quinolones. Excitatory amino acid antagonists acting at glycine-site NMDA and (RS)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors. *J Med Chem.* 36(22): p. 3397-408.
 53. Carling, R.W., P.D. Leeson, K.W. Moore, C.R. Moyes, M. Duncton, M.L. Hudson, R. Baker, A.C. Foster, S. Grimwood, J.A. Kemp, G.R. Marshall, M.D. Tricklebank, and K.L. Saywell, **1997**. 4-substituted-3-phenylquinolin-2(1H)-ones: acidic and nonacidic glycine site N-methyl-D-aspartate antagonists with in vivo activity. *J Med Chem.* 40(5): p. 754-65.
 54. Richard, R.,**1998**. The Encyclopedia of Psychoactive Substances. New York: St. Martin's Press.
 55. Berman, R.M., A. Cappiello, A. Anand, D.A. Oren, G.R. Heninger, D.S. Charney, and J.H. Krystal, **2000**. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry.* 47(4): p. 351-4.
 56. Karch, S.B.,**1998**. Drug Abuse Handbook. Boca Raton, FL: CRC Press.
 57. Abuse, N.I.o.D., in *Research Report Series: Hallucinogens & Dissociative Drugs.* 2001.
 58. CESAR – Center for substance and drug abuse research, U.o.M. November 2013]; Available from: <http://www.cesar.umd.edu>.
 59. Chizh, B.A., **2007**. Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J Psychopharmacol.* 21(3): p. 259-71.
 60. Carson-DeWitt, R.,**2001**. Encyclopedia of Drugs, Alcohol, and Addictive Behavior. 2nd ed.: New York: Macmillan Reference USA.

61. Lahti, A.C., M.A. Weiler, B.A. Tamara Michaelidis, A. Parwani, and C.A. Tamminga, **2001**. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 25(4): p. 455-67.
62. Muir, W.W., R.T. Skarda, and D.W. Milne, **1977**. Evaluation of xylazine and ketamine hydrochloride for anesthesia in horses. *Am J Vet Res*. 38(2): p. 195-201.
63. Wong, E.H., J.A. Kemp, T. Priestley, A.R. Knight, G.N. Woodruff, and L.L. Iversen, **1986**. The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(18): p. 7104-8.
64. Huettner, J.E. and B.P. Bean, **1988**. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85(4): p. 1307-11.
65. Lyle, T.A., C.A. Magill, S.F. Britcher, G.H. Denny, W.J. Thompson, J.S. Murphy, A.R. Knight, J.A. Kemp, G.R. Marshall, D.N. Middlemiss, and et al., **1990**. Structure and activity of hydrogenated derivatives of (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801). *J Med Chem*. 33(3): p. 1047-52.
66. Linders, J.T., J.A. Monn, M.V. Mattson, C. George, A.E. Jacobson, and K.C. Rice, **1993**. Synthesis and binding properties of MK-801 isothiocyanates; (+)-3-isothiocyanato-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten- 5,10-imine hydrochloride: a new, potent and selective electrophilic affinity ligand for the NMDA receptor-coupled phencyclidine binding site. *J Med Chem*. 36(17): p. 2499-507.
67. Leeson, P.D., R.W. Carling, K. James, J.D. Smith, K.W. Moore, E.H. Wong, and R. Baker, **1990**. Role of hydrogen bonding in ligand interaction with the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel. *J Med Chem*. 33(5): p. 1296-305.
68. Thompson, W.J., P.S. Anderson, S.F. Britcher, T.A. Lyle, J.E. Thies, C.A. Magill, S.L. Varga, J.E. Schwering, P.A. Lyle, M.E. Christy, and et al., **1990**. Synthesis and pharmacological evaluation of a series of dibenzo[a,d]cycloalkenimines as N-methyl-D-aspartate antagonists. *J Med Chem*. 33(2): p. 789-808.
69. Lipton, S.A., **2004**. Failures and successes of NMDA receptor antagonists: molecular basis for the use of open-channel blockers like memantine in the treatment of acute and chronic neurologic insults. *NeuroRx*. 1(1): p. 101-10.
70. Bormann, J., **1989**. Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur J Pharmacol*. 166(3): p. 591-2.

71. Del Dotto, P., N. Pavese, G. Gambaccini, S. Bernardini, L.V. Metman, T.N. Chase, and U. Bonuccelli, **2001**. Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. *Mov Disord.* 16(3): p. 515-20.
72. Merz. Awards - Merz Pharma. 15 November 2013 30 September 2013]; Available from: http://www.merz.com/company/merz_pharmaceuticals/awards/index.jsp.
73. Agency, E.M. Ebixa - Memantine. 18 September 2013 November 2013]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000463/human_med_000750.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
74. Pharmaceuticals, E. Symmetrel. January 2009 November 2013]; Available from: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/016023s041,018101s016lbl.pdf.
75. Kornhuber, J., J. Bormann, M. Hubers, K. Rusche, and P. Riederer, **1991**. Effects of the 1-amino-adamantanes at the MK-801-binding site of the NMDA-receptor-gated ion channel: a human postmortem brain study. *Eur J Pharmacol.* 206(4): p. 297-300.
76. Watanabe, M., Y. Inoue, K. Sakimura, and M. Mishina, **1993**. Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol.* 338(3): p. 377-90.
77. Nutt, J.G., S.A. Gunzler, T. Kirchoff, P. Hogarth, J.L. Weaver, M. Krams, B. Jamerson, F.S. Menniti, and J.W. Landen, **2008**. Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and Parkinsonism. *Mov Disord.* 23(13): p. 1860-6.
78. Carter, C., J. Benavides, P. Legendre, J.D. Vincent, F. Noel, F. Thuret, K.G. Lloyd, S. Arbilla, B. Zivkovic, E.T. MacKenzie, and et al., **1988**. Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther.* 247(3): p. 1222-32.
79. Williams, K., **1993**. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol.* 44(4): p. 851-9.

80. Karakas, E., N. Simorowski, and H. Furukawa, **2011**. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature*. 475(7355): p. 249-53.
81. Fischer, G., V. Mutel, G. Trube, P. Malherbe, J.N. Kew, E. Mohacsi, M.P. Heitz, and J.A. Kemp, **1997**. Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 283(3): p. 1285-92.
82. Bettini, E., A. Sava, C. Griffante, C. Carignani, A. Buson, A.M. Capelli, M. Negri, F. Andretta, S.A. Senar-Sancho, L. Guiral, and F. Cardullo, **2010**. Identification and characterization of novel NMDA receptor antagonists selective for NR2A- over NR2B-containing receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 335(3): p. 636-44.
83. Mosley, C.A., T.M. Acker, K.B. Hansen, P. Mullasseril, K.T. Andersen, P. Le, K.M. Vellano, H. Brauner-Osborne, D.C. Liotta, and S.F. Traynelis, **2010**. Quinazolin-4-one derivatives: A novel class of noncompetitive NR2C/D subunit-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *J Med Chem*. 53(15): p. 5476-90.
84. Acker, T.M., H. Yuan, K.B. Hansen, K.M. Vance, K.K. Ogden, H.S. Jensen, P.B. Burger, P. Mullasseril, J.P. Snyder, D.C. Liotta, and S.F. Traynelis, **2011**. Mechanism for noncompetitive inhibition by novel GluN2C/D N-methyl-D-aspartate receptor subunit-selective modulators. *Mol Pharmacol*. 80(5): p. 782-95.
85. Acker, T.M., A. Khatri, K.M. Vance, C. Slabber, J. Bacsá, J.P. Snyder, S.F. Traynelis, and D.C. Liotta, **2013**. Structure-activity relationships and pharmacophore model of a noncompetitive pyrazoline containing class of GluN2C/GluN2D selective antagonists. *J Med Chem*. 56(16): p. 6434-56.
86. Ip, N.Y.-Y., Zhu, H.-J., Ip, F. C.-F., *Oxazolidines derivatives as NMDA antagonists*, L. Shanghai Patent and Trademark Law Office, Editor. 2009: China.
87. Nadaoka, T., Takeda, S., Kawakatsu, S., TotSuka, S.,**1995**. Herbal therapy in elderly patients with chronic headache: Experience with the use of Choto-San. *Biobehavioral Self-Regulation: Eastern and Western Perspectives*.
88. Itoh, T., Y. Shimada, and K. Terasawa, **1999**. Efficacy of Choto-san on vascular dementia and the protective effect of the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *Mech Ageing Dev*. 111(2-3): p. 155-73.

89. Terasawa, K., Y. Shimada, T. Kita, T. Yamamoto, H. Tosa, N. Tanaka, Y. Saito, E. Kanaki, S. Goto, N. Mizushima, M. Fujioka, S. Takase, H. Seki, I. Kimura, T. Ogawa, S. Nakamura, G. Araki, I. Maruyama, Y. Maruyama, and S. Takaori, **1997**. Choto-san in the treatment of vascular dementia: a double-blind, placebo-controlled study. *Phytomedicine*. 4(1): p. 15-22.
90. Endo, K., Y. Oshima, H. Kikuchi, Y. Koshihara, and H. Hikino, **1983**. Hypotensive principles of Uncaria hooks. *Planta Med*. 49(3): p. 188-90.
91. Horie, S., S. Yano, N. Aimi, S. Sakai, and K. Watanabe, **1992**. Effects of hirsutine, an antihypertensive indole alkaloid from *Uncaria rhynchophylla*, on intracellular calcium in rat thoracic aorta. *Life Sci*. 50(7): p. 491-8.
92. Ndagijimana, A., X. Wang, G. Pan, F. Zhang, H. Feng, and O. Olaleye, **2013**. A review on indole alkaloids isolated from *Uncaria rhynchophylla* and their pharmacological studies. *Fitoterapia*. 86: p. 35-47.
93. Shimada, Y., H. Goto, T. Itoh, I. Sakakibara, M. Kubo, H. Sasaki, and K. Terasawa, **1999**. Evaluation of the protective effects of alkaloids isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death in cultured cerebellar granule cells from rats. *J Pharm Pharmacol*. 51(6): p. 715-22.
94. Kang, T.H., Y. Murakami, K. Matsumoto, H. Takayama, M. Kitajima, N. Aimi, and H. Watanabe, **2002**. Rhynchophylline and isorhynchophylline inhibit NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol*. 455(1): p. 27-34.
95. Kang, T.H., Y. Murakami, H. Takayama, M. Kitajima, N. Aimi, H. Watanabe, and K. Matsumoto, **2004**. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on in vitro ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: putative neurotransmitter receptors involved in their action. *Life Sci*. 76(3): p. 331-43.
96. Watanabe, H., Q. Zhao, K. Matsumoto, M. Tohda, Y. Murakami, S.H. Zhang, T.H. Kang, P. Mahakunakorn, Y. Maruyama, I. Sakakibara, N. Aimi, and H. Takayama, **2003**. Pharmacological evidence for antidementia effect of Choto-san (Gouteng-san), a traditional Kampo medicine. *Pharmacol Biochem Behav*. 75(3): p. 635-43.
97. Hayashi, H., M. Tohda, H. Watanabe, Y. Murakami, and K. Matsumoto, **2005**. The effects of Choto-san on the mRNA expression of Alzheimer's disease related factors in the permanent ischemic rat brain. *Biol Pharm Bull*. 28(4): p. 744-6.

98. Xian, Y.F., Z.X. Lin, Q.Q. Mao, S.P. Ip, Z.R. Su, and X.P. Lai, **2012**. Protective effect of isorhynchophylline against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol.* 32(3): p. 353-60.
99. Allin, S.M., Northfield, J. C., Page, M. I., Slawin, A. M. Z., **1997**. A highly diastereoselective synthesis of tricyclic lactams and their application as novel N-Acyl iminium ion precursors in the synthesis of isoindolinone derivatives. *Tetrahedron Letters.* 38(20): p. 3627 - 3630.
100. Allin, S.M., James, S.L., Martin, W. P., Smith, T. A. D., Elsegoog, M. R. J., **2001**. Stereoselective synthesis of the pyrroloisoquinoline ring system. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 22: p. 3029 - 3036.
101. Amat, M., Bassas, O., Cantó, M., Llor, N., Santos, M. M. M., Bosch, J., **2005**. Synthesis of 3-acetyl- and 3-(2-oxoethyl)glutarates. *Tetrahedron.* 61: p. 7693-7702.
102. Amat, M., Pérez, M., Bosch, J., **2011**. Enantioselective synthesis of indole alkaloids from chiral lactams. *Synlett.* 2: p. 0143-0160.
103. Pérez, M., Arioli, F., Rigacci, G., Santos, M.M.M., Gómez-Esqué, A., Escolano, C., Florindo, P., Ramos, C., Bosch, J., Amat M., **2011**. Stereocontrolled generation of Benzo[a] – and Indolo[2,3-a]quinolizidines from (S)-Tryptophanol and (S)-(3,4-Dimethoxyphenyl)alaninol-derived lactams. *European Journal of Organic Chemistry.* 20(21): p. 3858-3863.
104. Amat, M., M.M. Santos, O. Bassas, N. Llor, C. Escolano, A. Gomez-Esque, E. Molins, S.M. Allin, V. McKee, and J. Bosch, **2007**. Straightforward methodology for the enantioselective synthesis of benzo[a]- and indolo[2,3-a]quinolizidines. *J Org Chem.* 72(14): p. 5193-201.
105. Amat, M., C. Ramos, M. Perez, E. Molins, P. Florindo, M.M. Santos, and J. Bosch, **2013**. Enantioselective formal synthesis of ent-rhynchophylline and ent-isorhynchophylline. *Chem Commun (Camb).* 49(19): p. 1954-6.
106. Allin, S.M., Thomas, C. I., allard, J. E., Doyle, K., Elsegood, M. R. J., **2005**. A highly stereoselective synthesis of the indolo[2,3-a]quinolizine ring system and application to natural product synthesis. *Eur J Org Chem:* p. 4179-4186.
107. Amat, M., Santos, M. M. M., Gómez, A. M., Jokic, D., Molins, E., Bosch, J., **2007**. Enantioselective spirocyclizations from tryptophanol-derived oxazolopiperidone lactams. *Org Lett.* 9(15): p. 2907-2910.

108. Morgan, S., P. Grootendorst, J. Lexchin, C. Cunningham, and D. Greyson, **2011**. The cost of drug development: a systematic review. *Health Policy*. 100(1): p. 4-17.
109. Moro, S., M. Bacilieri, and F. Deflorian, **2007**. Combining ligand-based and structure-based drug design in the virtual screening arena. *Expert Opin Drug Discov*. 2(1): p. 37-49.
110. Ooms, F., **2000**. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Curr Med Chem*. 7(2): p. 141-58.
111. Cohen, N.C., J.M. Blaney, C. Humblet, P. Gund, and D.C. Barry, **1990**. Molecular modeling software and methods for medicinal chemistry. *J Med Chem*. 33(3): p. 883-94.
112. Huggins, D.J. and G.H. Grant, **2005**. The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model*. 23(4): p. 381-8.
113. Gitto, R., L. De Luca, S. Ferro, M.R. Buemi, E. Russo, G. De Sarro, M. Chisari, L. Ciranna, and A. Chimirri, **2012**. Synthesis and biological characterization of 3-substituted 1H-indoles as ligands of GluN2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors. Part 2. *J Med Chem*. 55(23): p. 10532-9.
114. Bacilieri, M., F. Varano, F. Deflorian, M. Marini, D. Catarzi, V. Colotta, G. Filacchioni, A. Galli, C. Costagli, C. Kaseda, and S. Moro, **2007**. Tandem 3D-QSARs approach as a valuable tool to predict binding affinity data: design of new Gly/NMDA receptor antagonists as a key study. *J Chem Inf Model*. 47(5): p. 1913-22.
115. Patankar, S.J. and P.C. Jurs, **2002**. Prediction of glycine/NMDA receptor antagonist inhibition from molecular structure. *J Chem Inf Comput Sci*. 42(5): p. 1053-68.
116. Sapre, N.S., Pancholi, N., Gupta, S., Sikarwar, A., **2007**. 2-dimensional quantitative structure-activity relationship modeling study of Glycine/N-methyl-D-aspartate antagonist inhibition: Genetic function approximation vis-a-vis multiple linear regression methods. *Acta Chimica Slovenica*. 54(4): p. 797-804.
117. Chimirri, A., L. De Luca, S. Ferro, G. De Sarro, L. Ciranna, and R. Gitto, **2009**. Combined strategies for the discovery of ionotropic glutamate receptor antagonists. *ChemMedChem*. 4(6): p. 917-22.

118. Krueger, B.A., T. Weil, and G. Schneider, **2009**. Comparative virtual screening and novelty detection for NMDA-GlycineB antagonists. *J Comput Aided Mol Des.* 23(12): p. 869-81.
119. Mony, L., N. Triballeau, P. Paoletti, F.C. Acher, and H.O. Bertrand, **2010**. Identification of a novel NR2B-selective NMDA receptor antagonist using a virtual screening approach. *Bioorg Med Chem Lett.* 20(18): p. 5552-8.
120. Torres, E., Duque, M.D., López-Querol, M., Taylor, M.C., Naesens, L., Ma, C., Pinto, L.H., Sureda, F.X., Kelly, J.M., Vázquez, S., **2012**. Synthesis of benzopolycyclic cage amines: NMDAR receptor antagonist, trypanocidal and antiviral activities. *Bioorg Med Chem.* 20: p. 942-948.
121. Horrocks, P., Fallom, S., Denman, L., Devine, O., Duffy, L.J., Harper, A., Meredith E-L., Hasenkamp, S., Sidaway, A., Monnery, D., Phillips, T.R., **2012**. Synthesis and evaluation of a novel series of indoloisoquinolines as small molecule anti-malarial leads. *Bioorg Med Chem Lett.* 22: p.1770-1773.