

(12) **PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2016.08.26**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2018.02.26**

(45) Data e BPI da concessão: /

(73) Titular(es):

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
LARGO DOS COLEGIAIS, Nº 2 7000-803 ÉVORA
PT

(72) Inventor(es):

ANTHONY BURKE **PT**
CAROLINA SILVA MARQUES **PT**

(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **N-(1,2,3-TRIAZOLMETIL)-3-HIDROXI-3-ARILOXINDOLES QUIRAIS NÃO-RACÉMICOS**

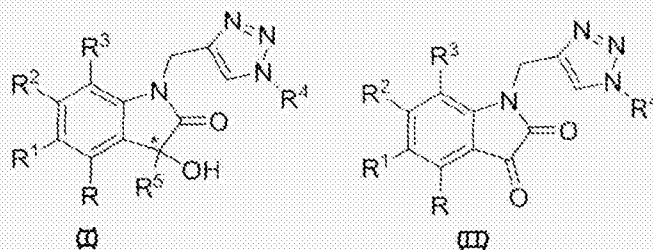
(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A SÍNTESE CATALÍTICA ASSIMÉTRICA DE NOVOS N-(1,2,3-TRIAZOLMETIL)-3-HIDROXI-3-ARILOXINDOLES QUIRAIS A PARTIR DE PRECURSORES DERIVADOS DA ISATINA, UTILIZANDO CATALISADORES DE METAIS DE TRANSIÇÃO QUIRAIS. ESTES COMPOSTOS FORAM PLANEADOS E SINTETIZADOS COM FUTURA APLICAÇÃO COMO INIBIDORES BIOLÓGICOS. ESTES COMPOSTOS QUIRAIS N-(1,2,3-TRIAZOLMETIL)-3-HIDROXI-3-ARILOXINDOLES DE FÓRMULA (I) SÃO OBTIDOS ENANTIOSELECTIVAMENTE A PARTIR DE PRECURSORES DE FÓRMULA (11) ATRAVÉS DE UMA EFICIENTE REACÇÃO DE ARILAÇÃO UTILIZANDO REAGENTES DE BORO OU DERIVADOS E UM CATALISADOR DE METAL DE TRANSIÇÃO QUIRAL, SOB CONDIÇÕES REACIONAIS SUAVES. A PRESENTE APLICAÇÃO DESCREVE A PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS N-(1,2,3-TRIAZOLMETIL)-3-HIDROXI-3-ARILOXINDOES QUIRAIS DE FÓRMULA (I), OS QUAIS DEVEM SER BONS INIBIDORES NUMA SÉRIE DE ALVOS BIOLÓGICOS, EM ESPECIAL NA DOENÇA DE ALZHEIMER E CANCRO.

RESUMO

"*N*-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxindoles quirais não-racêmicos"

A presente invenção refere-se à síntese catalítica assimétrica de novos *N*-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxindoles quirais a partir de precursores derivados da isatina, utilizando catalisadores de metais de transição quirais. Estes compostos foram planeados e sintetizados com futura aplicação como inibidores biológicos. Estes compostos quirais *N*-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxindoles, de fórmula (I) são obtidos enantioselectivamente a partir de precursores de fórmula (II) através de uma eficiente reação de arilação utilizando reagentes de boro ou derivados e um catalisador de metal de transição quiral, sob condições reacionais suaves.



A presente aplicação descreve a preparação dos compostos *N*-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxindoles quirais de fórmula (I), os quais devem ser bons inibidores numa série de alvos biológicos, em especial na doença de Alzheimer e cancro.

D E S C R I Ç Ã O

"N-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxindoles quirais não-racêmicos"

Domínio Técnico

A presente aplicação refere-se à síntese de novos N-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxindoles quirais a partir de precursores derivados da isatina utilizando catalisadores de metais de transição. Estes compostos foram planeados e sintetizados com futura aplicação como inibidores biológicos.

Estado da arte

A presente invenção refere-se à síntese de novos N-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxindoles quirais a partir de precursores derivados da isatina utilizando catalisadores de metais de transição. Estes compostos foram planeados e sintetizados com futura aplicação como inibidores biológicos.

Nos dias de hoje, a maior parte dos fármacos existentes no mercado ou em desenvolvimento são quirais, existindo geralmente apenas numa forma enantiomérica, pois na maioria dos casos apenas um dos enantiómeros é eficaz. Em alguns casos o outro enantiómero anula o efeito do primeiro, ou poderá mesmo ser bastante prejudicial ao organismo (NG, 2004).

3-Hidroxiindoles 3-substituídos exibem uma boa gama de atividades biológicas, nos quais podemos incluir SSR-149415, um composto não peptídico, ativo oralmente, um recetor antagonista de vasopressina (Gal et al. 2002), AG-041R, um recetor antagonista de gastrina/CCK-B, eficiente na

reparação de cartilagem (Ochi et al. 2001), um derivado *N*-metilo-espiro[2,3']-oxindolespiro[3,2'']-5,6-dimetoxi-1''-indanona-4-(arilo-substituído)-pirrolidina que foi identificado como um inibidor de acetilcolinesterase (AChE) (Ali et al. 2010) e NITD609, um candidato como fármaco antimalárico (Rottmann et al. 2010). Desenvolvemos uma família de derivados de oxíndoles 2-substituídos-2-hidroxilo que manifestaram boa inibição em butirilcolinesterase (Totobenazara et al. 2016).

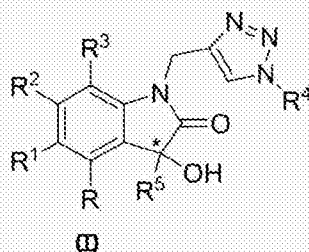
Por outro lado, a unidade 1,2,3-triazole está presente em muitos compostos biologicamente ativos (Burke e Marques 2015, Thirumurugan et al. 2013, Trone et al. 2007 and Totobenezara and Burke 2015). Por exemplo, carboxiamido-triazole (CAI), um inibidor de transdução de sinal utilizado no tratamento do cancro (Perabo et al. 2004). o antibiótico β -lactama tazobactam (Yang et al. 1999) e a cefalosporina ceftriaxona (Neu and Fu 1979).

Pelo nosso conhecimento, moléculas que possuem no seu esqueleto estes farmacóforos, como os *N*-(1,2,3-triazolmetil)-3-hidroxi-3-ariloxíndoles, são atualmente desconhecidas, apesar do seu enorme potencial terapêutico. Então, a presente invenção disponibiliza a síntese de novas famílias de derivados de *N*-(1,2,3)-triazolmetil)-3-hidroxilo-3-ariloxíndoles de fórmula **(I)** quirais não racêmicos, dos quais se espera possuírem boas atividades biológicas em alvos celulares específicos.

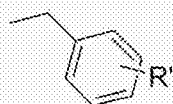
Sumário

O objetivo desta aplicação é a descrição da síntese de novas famílias de derivados de *N*-(1,2,3)-triazolmetil)-3-hidroxilo-3-ariloxíndoles de fórmula **(I)** quirais não racêmicos, utilizando catalisadores de metais de transição,

Então, esta aplicação descreve compostos de fórmula (I)

[illegible]

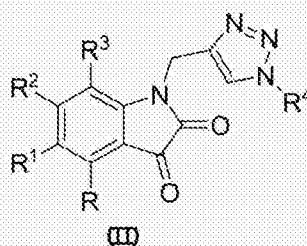
Um grupo benzilo ou derivado,



R^0 representa um grupo arilo.

Todos estes compostos podem ser obtidos numa única forma enantiomérica - pura ou enriquecida.

Os compostos de fórmula **(I)** são obtidos a partir dos compostos de fórmula **(II)**



A introdução da unidade 1,2,3-triazole em **(II)** é facilmente conseguida utilizando a reação click de Sharpless-Meldal, bastante eficiente.

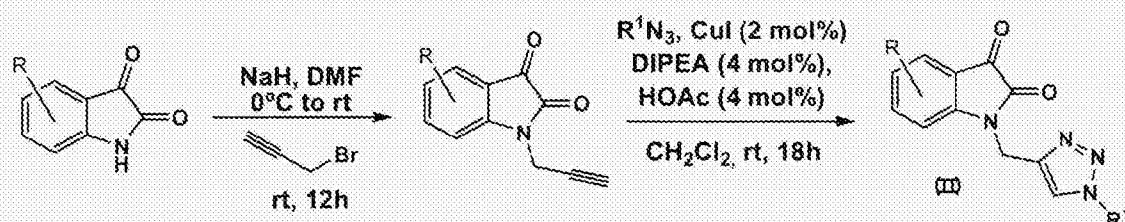
Esperamos obter elevada atividade biológica com estes compostos tendo em conta possuírem dois potentes farmacóforos, nomeadamente as unidades 3-arilo-3-hidroxiindole e 1,2,3-triazole, e além disso, eles existem na sua forma enantiomericamente pura ou estado enriquecido.

Descrição geral

Esta aplicação tem como objetivo reportar o desenvolvimento de novas famílias de derivados de N-(1,2,3)-triazolemetil)-3-hidroxilo-3-ariloxindoles de fórmula **(I)** quirais não racémicos, esperando obter boa atividade biológica em potenciais alvos biológicos chave.

Os compostos de fórmula **(I)** são obtidos a partir de precursores derivados de isatina de fórmula **(II)**, através da adição de ácidos arilo-boronicos, esterres ou reagentes do tipo trifluoroborato, numa reação catalisada por metais de transição (Burke e Marques 2015).

Os substratos de fórmula (II) são obtidos a partir de precursores de *N*-propargilo-isatina e sujeitos à reação click dipolar de ciclo-adição de Sharpless-Meldal com os azidos orgânicos apropriados (Rostovtsev et al. 2002, Tornøe et al. 2002). Estas reações são realizadas utilizando catalisadores de cobre (Burke e Marques 2015) (Esquema 1).



Esquema 1

A reação catalítica assimétrica de (II) para (I) é realizada utilizando um catalisador apropriado de metal de transição, contendo Rh (preferível), Pd, Ru, Ir ou Cu. As reações são normalmente realizadas pela simples adição do pré-catalisador e do ligando quiral ao substrato (como (I), Tabela 1), num balão sob atmosfera inerte na presença de um reagente de boro e uma base.

No caso de reações onde o Rh é utilizado como catalisador, geralmente os seguintes complexos disponíveis comercialmente são utilizados: ródio (I) cloro-(1,5-ciclooctadieno)-dímero, $[\text{Rh}(\text{COD})\text{Cl}]_2$, $[\text{Rh}(\text{COD})\text{OH}]_2$, $[\text{Rh}(\text{nbd})\text{Cl}]_2$, $\text{Rh}(\text{COD})_2\text{BF}_4$, $[\text{Rh}(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{Cl}]_2$, $\text{Rh}(\text{acac})(\text{coe})_2$ e $\text{Rh}(\text{acac})(\text{eth})_2$.

A quantidade de pré-catalisador varia entre 1 e 10 mol%. Os ligandos quirais que podem ser utilizados incluem: BINAP, TolBINAP, DIOP, DIPAMP, DioxPhos, DeguPhos, Xylyl-P-Phos, (*R*)-Phanephos, (*R*)-ShiP, (*R*)-SIPHOS, (*R,R*)-Chiraphos, C₃-TunePhos, TangPhos, BINAPINE, BINAPHANE, PhanePhos, Synphos, DuanPhos, Walphos, Josiphos, Naud, SchmalzPhos, QuinNap, derivados de fosforamidite (MonoPhos®) etc, NHCs quirais,

dienos, como; Bíciclo[2.2.2]octadieno de simetria C_2 e ligandos quirais derivados de sulfinamida-alceno e ligandos derivados de oxazolina, como: PyBox, Pyrox, Quinox.

A quantidade de ligando quiral varia entre 1 e 10 mol%.

No caso da base, podem ser utilizadas geralmente as seguintes bases: trietilamina, K_2CO_3 , Na_2CO_3 , $CaCO_3$, $Ba(OH)_2$, KOAc, DIPEA, K_3PO_4 , NMM, DBU, KOH, KF, Cs_2CO_3 e KOtBu.

A quantidade de base varia entre 1 a 3 equivalentes.

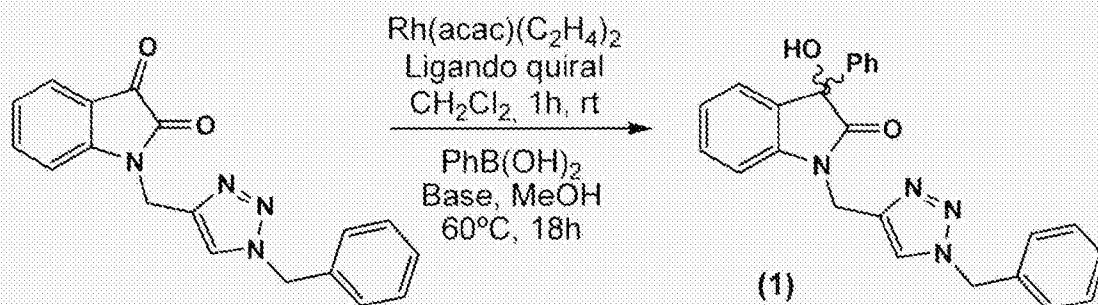
Os seguintes solventes podem ser utilizados: tolueno, éter dimetilico, éter dietílico, dicloroetano, THF, 1,4-dioxano, acetona, acetonitrilo, metanol, etanol, isopropanol, 1,2-dicloroetano, DMF, DMA e NMP.

As reações são realizadas sob atmosfera inerte (isto é, sob atmosfera de azoto seco ou árgon).

As reações são realizadas geralmente a temperaturas na gama de 25°C e 100°C. Podem ser obtidas elevadas conversões (>99%) e enantioselectividades (97% ee). O tempo reacional varia entre 10 e 24 horas.

Alguns exemplos podem ser vistos na Tabela 1 e Figura 1.

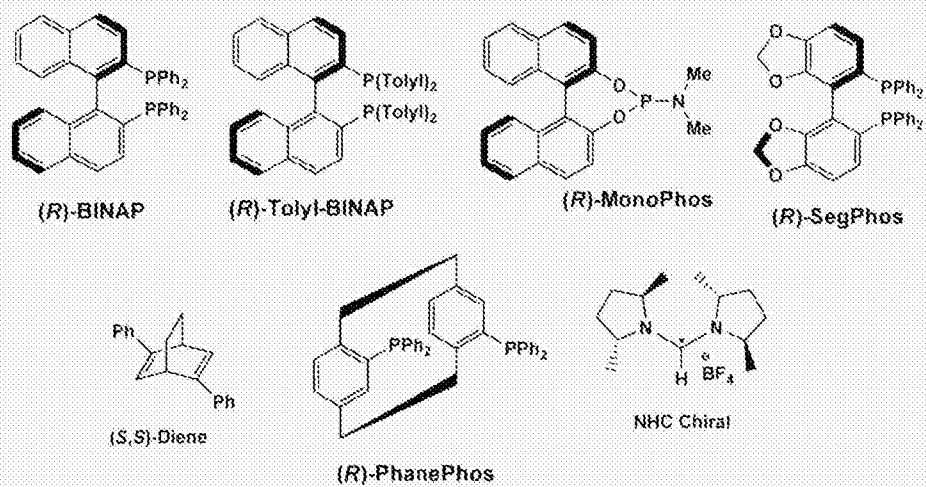
Tabela 1. Reação assimétrica de adição de ácido fenilborônico ao derivado de isatina *N*-triazole-benzilo, catalisada por ródio, para obtenção de (1).



Entrada ^[a]	Ligando quiral	Base	Conversão ^[b] / %	ee ^[c] / %
1	(<i>R</i>)-BINAP	DIPEA	89	87
2	(<i>R</i>)-BINAP	NEt_3	<10	94
3	(<i>R</i>)-BINAP	KOtBu	16	97
4	(<i>R</i>)-Tolyl-BINAP	DIPEA	<10	21
5	(<i>R</i>)-MonoPhos	DIPEA	77	<i>rac</i>
6	NHC Chiral	DIPEA	46	<i>rac</i>
7	(<i>S,S</i>)-Diene	DIPEA	<5	22
8	(<i>R</i>)-PhanePhos	DIPEA	<10	13
9 ^[d]	(<i>R</i>)-BINAP	NEt_3	<10	56

[a] Condições reacionais: 3 mol% $\text{Rh(acac)(C}_2\text{H}_4)_2$, 6 mol% Ligando quiral (ver as estruturas dos ligandos no esquema 2), CH_2Cl_2 , 1h, rt; 0.16 mmol derivado de isatina *N*-triazole-benzilo, 0.32 mmol PhB(OH)_2 , 0.08 mmol Base, MeOH (2 mL), 60°C , 18h. [b] e [c] Determinado utilizando HPLC, com uma fase estacionária quiral. [d] Tolueno foi utilizado como solvente. [e] Acetona foi utilizada como solvente. [f] Reação foi realizada a temperatura ambiente.

Ligandos quirais:



Esquema 2.

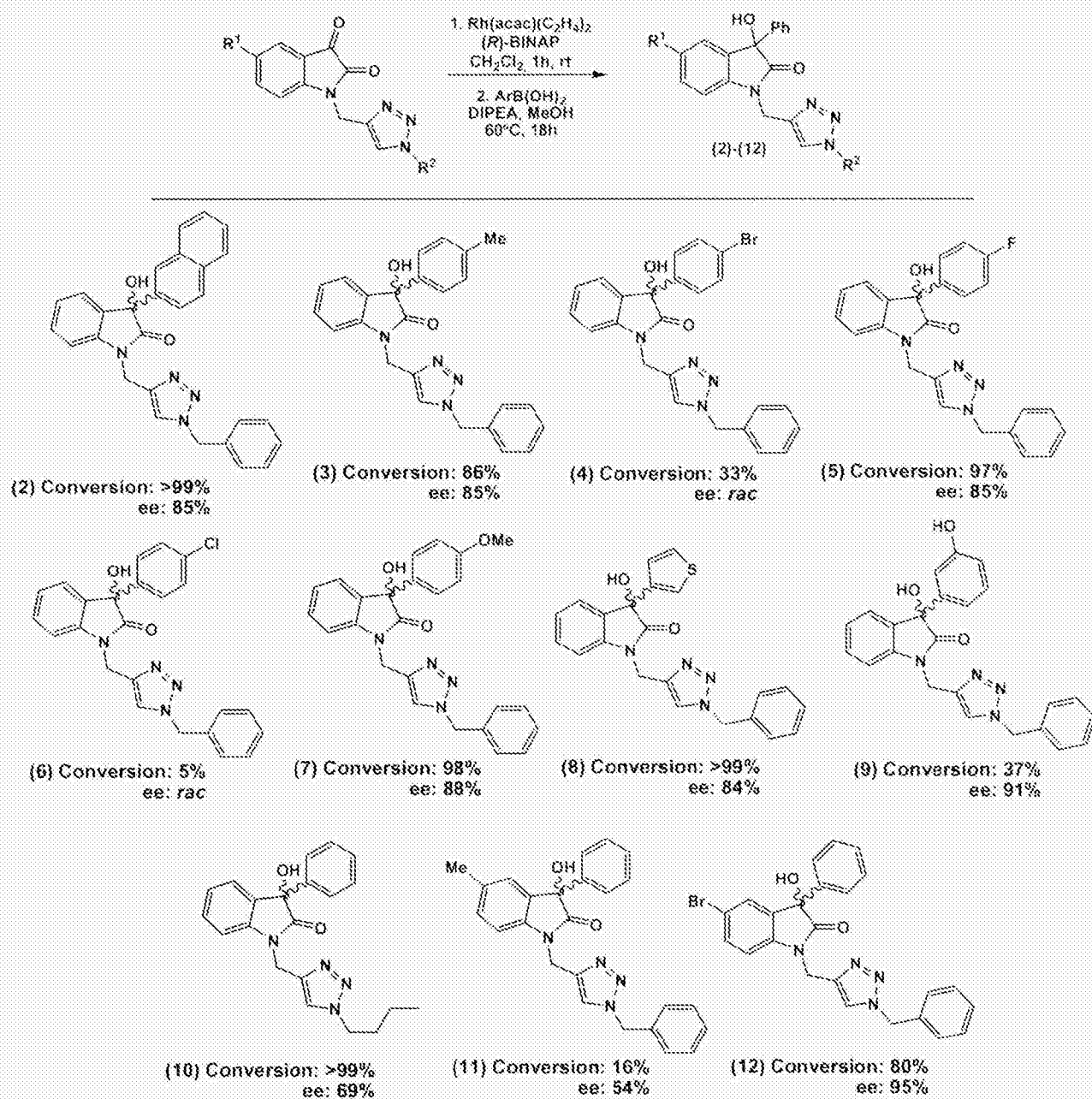


Figura 1

Exemplos

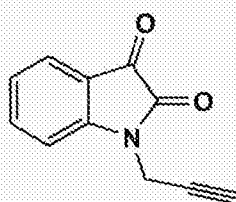
Síntese de substratos *N*-propargilo-isatina

Procedimento geral

A uma solução de isatina e seus derivados, em DMF, foi adicionado NaH (1.5 equivalentes), a 0°C e a mistura foi

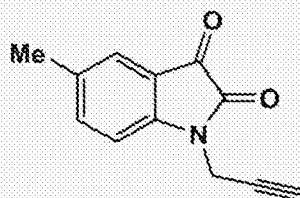
agitada durante 10 minutos. Uma solução de cor roxa pode ser vista no balão reacional. a mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante uma hora, e depois o brometo de propargilo (1.1 equivalentes) foi adicionado gota-a-gota. A mistura reacional foi deixada em agitação durante 12 horas à temperatura ambiente. O DMF foi removido sob pressão reduzida e foi adicionado AcOEt e H₂O. A fase aquosa foi extraída com AcOEt (3×30 mL) e as fases orgânicas juntas foram lavadas com *brine*, secas sob MgSO₄ e evaporadas no rotavapor para se obterem os derivados *N*-propargilo desejados.

1-(Prop-2-inilo)indoline-2,3-diona



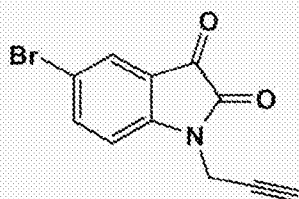
Sólido laranja (50% de rendimento). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 2.32-2.33 (m, 1H, CH), 4.55 (s, 2H, CH₂), 7.14-7.21 (m, 2H, Ar), 7.64-7.68 (m, 2H, Ar). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ : 29.56, 73.46, 75.80, 111.21, 117.79, 124.32, 125.57, 138.56, 149.72, 157.27, 182.65.

5-Metilo-1-(prop-2-inilo)indoline-2,3-diona



Sólido laranja (21% de rendimento). ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ : 2.29 (s, 1H, CH), 2.35 (s, 3H, CH₃), 4.51 (s, 2H, CH₂), 7.01-7.03 (d, *J* = 8 Hz, 1H, Ar), 7.43-7.45 (m, 2H, Ar). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ : 20.86, 29.56, 73.33, 75.93, 111.02, 117.83, 125.93, 134.23, 138.98, 147.57, 157.45, 182.94.

5-Bromo-1-(prop-2-inilo)indoline-2,3-diona



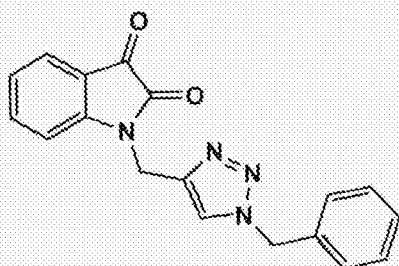
Sólido laranja (30% de rendimento). ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.33 (s, 1H, CH), 4.53 (s, 2H, CH_2), 7.04-7.06 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.29-7.35 (m, 1H, Ar), 7.75 (s, 1H, Ar). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 29.71, 73.91, 75.35, 112.98, 117.29, 118.95, 128.37, 140.78, 148.40, 156.53, 181.51.

Síntese dos substratos *N*-(1,2,3-Triazolmetilo)-isatina

Procedimento geral

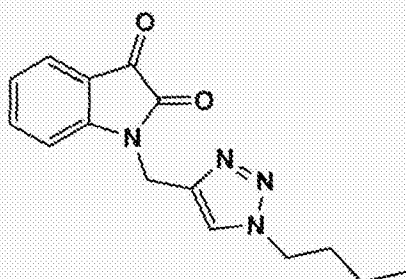
Num balão de fundo Redondo foram adicionados os derivados de *N*-propargilo isatina, os azidos (1 equivalente), CuI (0.02 equivalentes), DIFEA (0.04 equivalentes), HOAc (0.04 equivalentes) e CH_2Cl_2 . A mistura foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante 18 horas e monitorizada por CCF. A mistura reacional foi filtrada utilizando um funil de placa porosa com uma camada de celite e lavado com CH_2Cl_2 . O solvente foi evaporado no rotavapor e a mistura cruda foi purificada numa coluna cromatográfica de vidro com sílica gel usando hexano/AcOEt (5/1)-(1/1)-AcOEt como gradiente de solventes.

1-((1-Benzilo-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)indoline-2,3-diona



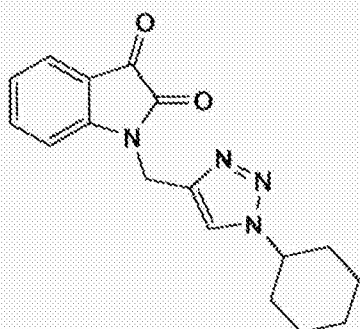
Sólido laranja (80% de rendimento). **p.f.** = 137.2-138.8°C. ¹H RMN ((CD₃)₂CO, 400 MHz) **δ**: 5.02 (s, 2H, CH₂), 5.60 (s, 2H, CH₂), 7.13-7.17 (t, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.22-7.24 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.32-7.36 (m, 5H, Ar), 7.54-7.56 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.62-7.66 (t, J = 8 Hz, 1H, Ar), 8.04 (s, 1H, =CH). ¹³C RMN ((CD₃)₂CO, 100 MHz) **δ**: 36.06, 54.26, 112.21, 118.70, 124.04, 124.29, 125.14, 128.87, 129.11, 129.66, 136.86, 138.93, 143.06, 151.67, 158.53, 184.13.

1-((1-Butilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)indoline-2,3-diona



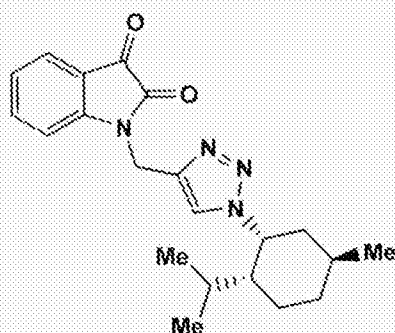
Sólido laranja (20% de rendimento). **p.f.** = 104.2-105.7°C. ¹H RMN ((CD₃)₂CO, 400 MHz) **δ**: 0.86-0.90 (t, J = 8 Hz, 3H, CH₃), 1.25-1.31 (q, J = 8 Hz, 2H, CH₂), 1.79-1.86 (m, 2H, CH₂), 4.35-4.39 (t, J = 8 Hz, 2H, CH₂), 5.02 (s, 2H, CH₂), 7.13-7.16 (t, 1H, Ar), 7.23-7.25 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.53-7.55 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.62-7.66 (t, J = 8 Hz, 1H, Ar), 8.02 (s, 1H, =CH). ¹³C RMN ((CD₃)₂CO, 100 MHz) **δ**: 13.65 (CH₃), 20.18 (CH₂), 32.88 (CH₂), 36.04 (CH₂), 50.36 (CH₂), 112.21 (CH), 118.60 (C), 123.79 (CH), 124.28 (CH), 125.13 (CH), 138.94 (CH), 142.51 (C), 151.64 (C), 158.49 (C=O), 184.16 (C=O). **EM (ESI) m/z**: 285.0 [M]⁺.

1-((1-Ciclohexilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)indoline-2,3-diona



Sólido laranja (10% de rendimento). ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz) δ : 1.17-1.23 (m, 1H, CH_2), 1.34-1.37 (m, 2H, CH_2), 1.62-1.79 (m, 5H, CH_2), 1.98-2.01 (m, 2H, CH_2), 4.39-4.45 (m, 1H, CH), 4.94 (s, 2H, CH_2), 7.10-7.17 (m, 2H, Ar), 7.55-7.57 (d, $J=8$ Hz, 1H, Ar), 7.61-7.65 (t, $J=8$ Hz, 1H, Ar), 8.20 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 100 MHz) δ : 24.54 (CH_2), 24.67 (CH_2), 32.83 (CH_2), 35.17 (CH_2), 59.05 (CH), 111.17 (CH), 117.62 (C), 121.52 (CH), 123.36 (CH), 124.45 (CH), 138.09 (CH), 141.16 (C), 150.25 (C), 157.80 (C=O), 183.15 (C=O). EM (ESI) m/z : 311.1 $[\text{M}]^+$.

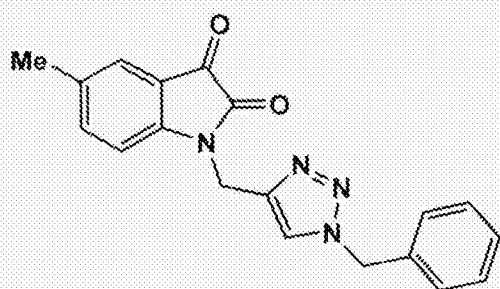
1-((1-((1R,2R,5S)-2-Isopropilo-5-metilciclohexilo)-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)indoline-2,3-diona



Sólido laranja (30% de rendimento). $p.f.$ = 155.2-156.7°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 0.69-0.71 (d, $J=8$ Hz, 3H, CH_3), 0.76-0.78 (d, $J=8$ Hz, 3H, CH_3), 0.81-0.83 (d, $J=8$ Hz, 3H, CH_3), 0.97-1.04 (m, 2H, CH_2), 1.31-1.45 (m, 2H, CH_2), 1.65-1.68 (m, 1H, CH), 1.78-1.90 (m, 4H, CH_2 , CH), 4.97 (s, 1H,

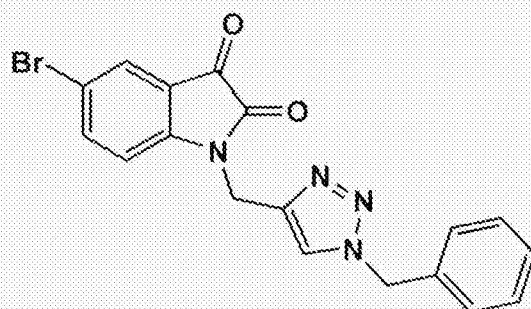
CH), 4.99 (s, 2H, CH₂), 7.07-7.11 (t, J= 8 Hz, 1H, Ar), 7.33-7.35 (d, J= 8 Hz, 1H, Ar), 7.55-7.58 (m, 2H, Ar), 7.68 (s, 1H, =CH). **¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ:** 20.48 (CH₃), 21.14 (CH₃), 22.28 (CH₃), 24.82 (CH₂), 26.35 (CH), 29.10 (CH), 34.55 (CH₂), 35.49 (CH₂), 40.63 (CH₂), 46.70 (CH), 59.62 (CH), 111.82 (CH), 117.57 (C), 124.04 (CH), 125.33 (CH), 138.70 (CH), 140.60 (C), 150.48 (C), 158.05 (C=O), 183.34 (C=O). **EM (ESI) m/z:** 367.2 [M]⁺.

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-5-metilo-indoline-2,3-diona



Sólido laranja (67% de rendimento). **p.f.**= 143.1-144.0°C. **¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ:** 2.30 (s, 3H, CH₃), 4.96 (s, 2H, CH₂), 5.47 (s, 2H, CH₂), 7.18-7.20 (d, J= 8 Hz, 1H, Ar), 7.24-7.26 (m, 2H, Ar), 7.35-7.37 (m, 5H, Ar), 7.50 (s, 1H, =CH). **¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) δ:** 20.80 (CH₃), 35.52 (CH₂), 54.54 (CH₂), 111.46 (CH), 117.64 (C), 122.90 (CH), 125.76 (CH), 128.40 (CH), 129.12 (CH), 129.35 (CH), 134.02 (C), 134.13 (C), 139.16 (CH), 142.34 (C), 148.17 (C), 158.17 (C=O), 183.47 (C=O). **EM (ESI) m/z:** 333.1 [M]⁺.

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-5-bromo-indoline-2,3-diona



Sólido laranja (62% de rendimento). **p.f.** = 173.1-175.0°C. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) **δ**: 4.96 (s, 2H, CH₂), 5.47 (s, 2H, CH₂), 7.24-7.28 (m, 3H, Ar), 7.36 (m, 3H, Ar), 7.52 (s, 1H, =CH), 7.66-7.69 (m, 2H, Ar). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) **δ**: 35.55 (CH₂), 54.57 (CH₂), 113.54 (CH), 117.07 (C), 118.75 (C), 122.97 (CH), 128.14 (CH), 128.43 (CH), 129.17 (CH), 129.37 (CH), 134.04 (C), 140.93 (CH), 141.80 (C), 149.04 (C), 157.27 (C=O), 182.08 (C=O). **EM (ESI) m/z**: 397.0 [M]⁺.

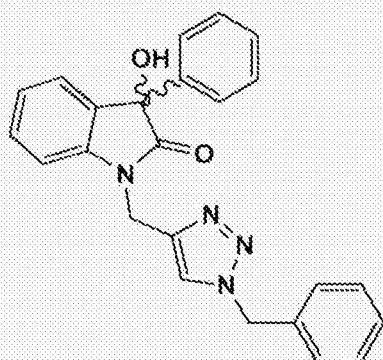
Síntese catalítica assimétrica de N-(1,2,3-triazolmetilo)-3-hidroxi-3-ariloxindoles quirais não-racêmicos

Procedimento geral

Num balão de fundo Redondo foi adicionado sob atmosfera inerte Ph(acac)(C₂H₅)₂ (1.2 mg, 0.005 mmol, 3 mol%), (R)-BINAP (5.9 mg, 0.010 mmol, 6 mol%) e CH₂Cl₂ (1 mL). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora, após a qual o solvente foi removido no rotavapor. Sob atmosfera inerte foi adicionado sequencialmente ao balão reacional o substrato N-triazole isatina (0.16 mmol), o ácido arilborônico (0.32 mmol, 2 equiv.), metanol (2 mL) e DIPEA (14.6 µL, 0.08 mmol, 0.5 equiv.). A mistura foi agitada a 60°C durante 18 horas. O methanol foi evaporado no ratavapor. Para determinar o rendimento do produto pretendido, a mistura cruda foi purificada por cromatografia de coluna em

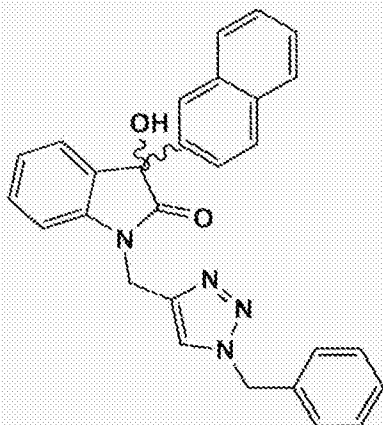
silica gel, utilizando hexano/AcOEt (1/1) como eluente, obtendo-se o produto pretendido **(1)-(12)**. Para determinar a conversão, a mistura cruda foi filtrada num funil de placa porosa contendo uma camada de celite e uma camada de silica gel, e a mistura eluida com Et₂O. O solvente foi evaporado no rotavapor e a mistura cruda analisada por HPLC.

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-3-fenilindolin-2-ona (1)



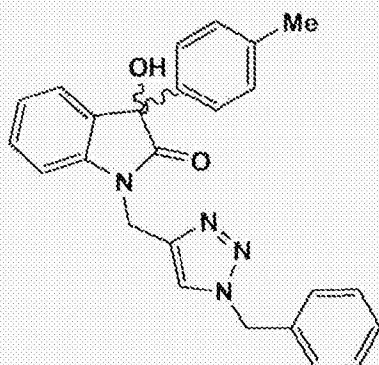
Sólido branco. **p.f.** = 156.8-157.7°C. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) **δ**: 3.47 (s br, 1H, OH), 4.99 (s, 2H, CH₂), 5.37-5.49 (q, J = 16 Hz, 2H, CH₂), 7.04-7.07 (t, 1H, Ar), 7.19-7.34 (m, 13H, Ar), 7.42 (s, 1H, =CH). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) **δ**: 35.82, 54.38, 78.00, 110.18, 122.62, 123.86, 125.03, 125.41, 128.21, 128.45, 128.73, 128.96, 129.27, 130.14, 131.58, 134.39, 140.01, 142.18, 143.00, 177.34. **EMAR (ESI)**: m/z calcd para C₂₄H₂₀N₄O₂: 396.15863, encontrado para C₂₄H₂₁N₄O₂ [M]⁺: 397.16590. **HPLC**: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/1-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 22.707 min (menor), 33.933 min (maior).

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-3-(naftalen-2-ilo)indolin-2-ona (2)



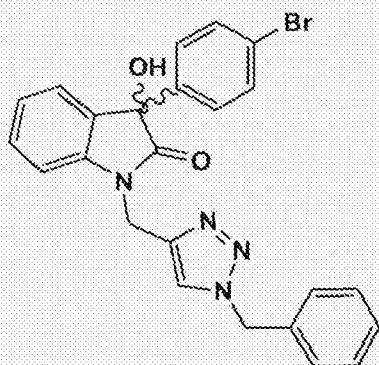
Sólido laranja claro. **p.f.** = 75.4-76.0°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.03 (s, 2H, CH_2), 5.30 (s br, 1H, OH), 5.37-5.48 (q, J = 16 Hz, 2H, CH_2), 7.05-7.08 (t, 1H, Ar), 7.19-7.35 (m, 9H, Ar), 7.44-7.48 (m, 3H, Ar), 7.69-7.71 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.75-7.78 (m, 2H, Ar), 7.88 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 35.89, 54.40, 78.21, 110.28, 122.65, 123.15, 123.93, 124.48, 125.12, 126.49, 126.54, 127.71, 128.22, 128.42, 128.73, 128.97, 129.28, 130.27, 131.50, 133.16, 133.21, 134.38, 137.30, 142.26, 143.02, 177.28. **EM (ESI)** m/z : 447.2 $[\text{M}]^+$. **HPLC**: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 35.513 min (menor), 39.607 min (maior).

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-3-p-tolilindolin-2-ona (3)



Sólido branco. **p.f.** = 153.8–155.0°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.30 (s, 3H, CH_3), 4.96 (s, 2H, CH_2), 5.34–5.46 (q, J = 16 Hz, 2H, CH_2), 7.02–7.08 (m, 3H, Ar), 7.16–7.33 (m, 10H, Ar), 7.41 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 21.23, 35.79, 54.34, 77.89, 110.12, 122.65, 123.80, 124.97, 125.36, 128.19, 128.91, 129.24, 129.41, 130.03, 131.69, 134.43, 137.07, 138.25, 142.15, 143.04, 177.47. **EM (ESI)** m/z : 411.2 $[\text{M}]^+$. **HPLC**: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/*i*-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 22.273 min (menor), 29.020 min (maior).

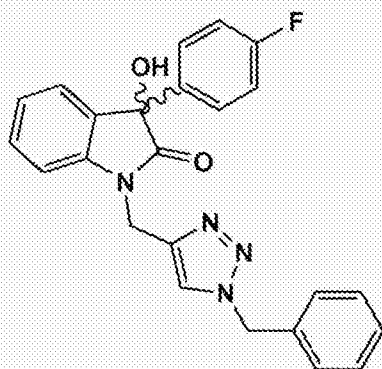
1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-(4-bromofenilo)-3-hidroxindolin-2-ona (4)



Sólido amarelo claro. **p.f.** = 152.1–153.0°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.97 (s, 2H, CH_2), 5.38–5.50 (q, J = 16 Hz, 2H, CH_2),

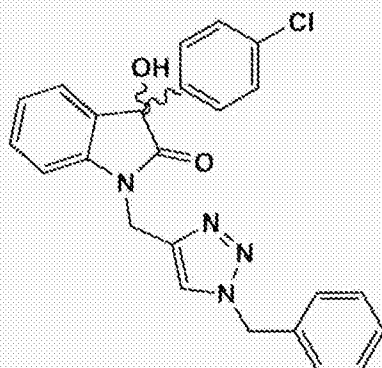
7.05-7.09 (t, $J = 8$ Hz, 1H, Ar), 7.16-7.22 (m, 6H, Ar), 7.31-7.41 (m, 7H, Ar). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 35.81, 54.46, 77.64, 110.32, 122.54, 122.65, 124.02, 124.96, 127.29, 128.27, 129.07, 129.33, 130.44, 131.09, 131.84, 134.33, 139.05, 142.18, 142.84, 176.79. EM (ESI) m/z : 477.1 $[\text{M}]^{+2}$. HPLC: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 25.140 min (menor), 27.453 min (maior).

1-((1-benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-(4-fluorofenilo)-3-hidroxindolin-2-ona (5)



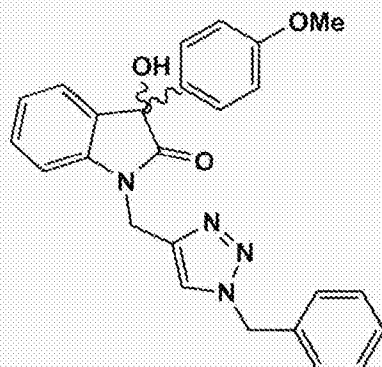
Óleo laranja claro. ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz) δ : 4.91-5.07 (q, $J = 16$ Hz, 2H, CH_2), 5.58 (s, 2H, CH_2), 5.89 (s br, 1H, OH), 7.01-7.06 (m, 3H, Ar), 7.17-7.22 (m, 2H, Ar), 7.28-7.35 (m, 6H, Ar), 7.41-7.44 (m, 2H, Ar), 7.92 (s, 1H, $=\text{CH}$). ^{13}C RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 100 MHz) δ : 35.89, 54.15, 77.85, 110.50, 115.48, 115.70, 123.75, 123.77, 125.36, 128.53, 128.62, 128.76, 129.04, 129.60, 130.26, 133.41, 136.78, 138.29, 138.32, 143.40, 143.57, 161.86, 164.29, 177.05. EM (ESI) m/z : 415.1 $[\text{M}]^+$. HPLC: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 19.673 min (menor), 23.127 min (maior).

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-(4-clorofenilo)-3-hidroxiindolin-2-ona (6)



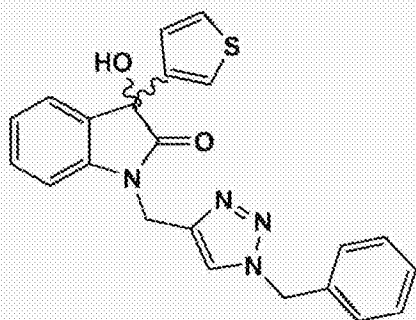
Sólido amarelo claro. p.f. = 141.4-142.8°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.98 (s, 2H, CH_2), 5.39-5.50 (q, J = 12 Hz, 2H, CH_2), 7.05-7.09 (t, J = 8 Hz, 1H, Ar), 7.21-7.23 (m, 8H, Ar), 7.31-7.35 (m, 4H, Ar), 7.41 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 35.82, 54.46, 77.59, 110.32, 122.54, 124.01, 124.97, 126.99, 128.26, 128.90, 129.07, 129.33, 130.43, 131.14, 134.33, 134.45, 138.50, 142.19, 142.86, 176.87. EM (ESI) m/z : 431.1 $[\text{M}]^+$. HPLC: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 20.447 min (maior), 23.687 min (menor).

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-3-(4-metoxifenilo)indolin-2-ona (7)



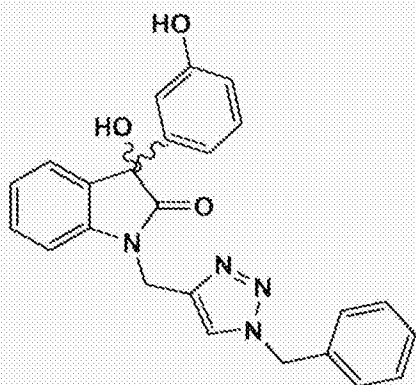
Sólido laranja claro. **p.f.** = 130.4-131.8°C. ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz) δ : 3.71 (s, 3H, OMe), 4.87-5.02 (q, J = 16 Hz, 2H, CH_2), 5.57 (s, 2H, CH_2), 6.68 (s, 1H, OH), 6.82-6.84 (d, J = 8 Hz, 2H, Ar), 7.01-7.04 (t, 1H, Ar), 7.13-7.19 (m, 4H, Ar), 7.26-7.37 (m, 6H, Ar), 8.10 (s, 1H, =CH). ^{13}C RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 100 MHz) δ : 34.81, 52.79, 55.11, 76.60, 109.46, 113.50, 122.77, 123.52, 124.45, 126.74, 127.87, 128.15, 128.76, 129.10, 133.13, 133.26, 136.03, 142.06, 142.31, 158.73, 176.53. **EM (ESI)** m/z : 427.1 $[\text{M}]^+$. **HPLC**: Daicel Chiralpak IA, *n*-hexano/*i*-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 32.767 min (menor), 38.927 min (maior).

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-3-(tiofen-3-ilo)indolin-2-ona (8)



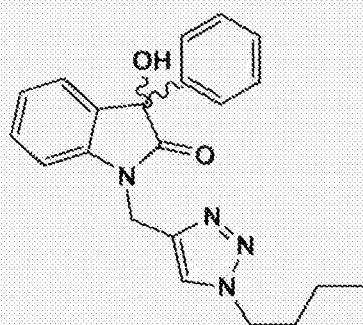
Sólido branco. **p.f.** = 147.8-148.3°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 4.98 (s, 2H, CH_2), 5.39-5.50 (q, J = 16 Hz, 2H, CH_2), 7.06-7.12 (m, 2H, Ar), 7.17-7.21 (m, 4H, Ar), 7.30-7.40 (m, 7H, Ar). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 35.85, 54.43, 75.96, 110.27, 122.57, 123.14, 123.77, 124.88, 125.65, 127.06, 128.24, 129.01, 129.31, 130.32, 130.57, 134.37, 140.76, 141.95, 143.00, 176.54. **EM (ESI)** m/z : 403.1 $[\text{M}]^+$. **HPLC**: Daicel Chiralpak IA, *n*-hexano/*i*-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 26.960 min (menor), 34.227 min (maior).

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-3-(3-hidroxifenilo)indolin-2-ona (9)



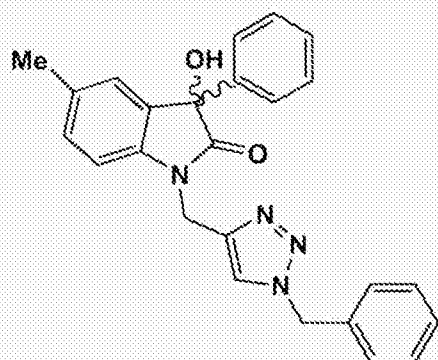
Sólido branco. p.f.= 212.1-213.9°C. ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz) δ : 4.88-5.01 (q, J = 16 Hz, 2H, CH_2), 5.57 (s, 2H, CH_2), 6.56-6.58 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 6.63-6.65 (d, J = 8 Hz, 1H, Ar), 6.68 (s, 1H, Ar), 6.80 (s, 1H, Ar), 7.01-7.05 (m, 2H, Ar), 7.11-7.16 (m, 2H, Ar), 7.26-7.37 (m, 6H, Ar), 8.10 (s, 1H, OH), 9.39 (s, 1H, OH). ^{13}C RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 100 MHz) δ : 34.83, 52.80, 76.89, 109.46, 112.55, 114.47, 115.93, 122.78, 123.57, 124.42, 127.89, 128.15, 128.77, 129.07, 129.12, 133.17, 136.01, 142.13, 142.28, 142.69, 157.19, 176.30. EM (ESI) m/z : 413.1 $[\text{M}]^+$. HPLC: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 40.500 min (menor), 44.553 min (maior).

1-((1-Butilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-3-fenilindolin-2-ona (10)



Óleo amarelo claro. ^1H RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz) δ : 0.88-0.91 (t, 3H, CH_3), 1.24-1.32 (m, 2H, CH_2), 1.77-1.85 (m, 2H, CH_2), 4.32-4.36 (t, $J=8$ Hz, 2H, CH_2), 4.92-5.08 (q, $J=16$ Hz, 2H, CH_2), 5.88 (s br, 1H, OH), 7.01-7.05 (t, $J=8$ Hz, 1H, Ar), 7.18-7.21 (m, 2H, Ar), 7.26-7.31 (m, 4H, Ar), 7.42-7.44 (d, $J=8$ Hz, 2H, Ar), 7.87 (s, 1H, $=\text{CH}$). ^{13}C RMN ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 100 MHz) δ : 13.68, 20.13, 32.86, 35.88, 50.27, 78.32, 110.42, 123.49, 123.62, 125.33, 126.38, 128.39, 128.88, 130.07, 133.79, 142.29, 143.13, 143.43, 177.28. EM (ESI) m/z : 363.2 $[\text{M}]^+$. HPLC: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 14.820 min (menor), 19.087 min (maior).

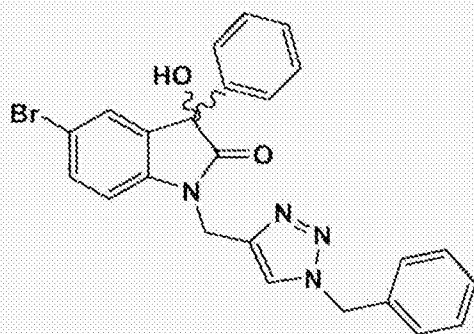
1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-3-hidroxi-5-metilo-3-fenilindolin-2-ona (11)



Sólido branco. p.f. = 163.7-164.3°C. ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 2.25 (s, 3H, CH_3), 3.44 (s br, 1H, OH), 4.96 (s, 2H, CH_2), 5.34-5.47 (q, $J=16$ Hz, 2H, CH_2), 7.05-7.08 (m, 3H, Ar), 7.20 (m, 2H, Ar), 7.28-7.33 (m, 8H, Ar), 7.41 (s, 1H, $=\text{CH}$). ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 21.16, 35.86, 54.36, 78.14, 109.98, 122.61, 125.35, 125.69, 128.20, 128.38, 128.72, 128.93, 129.25, 130.40, 131.56, 133.59, 134.42, 139.71, 140.19, 143.10, 177.32. EM (ESI) m/z : 411.2 $[\text{M}]^+$. HPLC: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210

nm, tempos de retenção: 24.727 min (menor), 31.080 min (maior).

1-((1-Benzilo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metilo)-5-bromo-3-hidroxi-3-fenilindolin-2-ona (12)



Sólido branco. **p.f.** = 149.1-150.9°C. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) **δ**: 4.88-4.98 (q, J= 16 Hz, 2H, CH₂), 5.35-5.47 (q, J= 16 Hz, 2H, CH₂), 7.08-7.10 (d, J= 8 Hz, 1H, Ar), 7.20-7.21 (m, 2H, Ar), 7.29 (m, 4H, Ar), 7.34 (m, 4H, Ar), 7.41-7.42 (m, 2H, Ar, =CH), 7.50-7.54 (t, J= 8 Hz, 1H, Ar), 8.24-8.26 (d, J= 8 Hz, 1H, Ar). ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) **δ**: 35.76, 54.45, 77.92, 111.79, 116.59, 125.32, 128.12, 128.26, 128.71, 128.87, 129.03, 129.30, 132.90, 133.62, 134.28, 135.76, 139.37, 141.18, 142.50, 176.88. **EM (ESI) m/z**: 477.1 [M]⁺. **HPLC**: Daicel Chiralpak IA, n-hexano/i-propanol = 80/20, 1.0 mL/min, 210 nm, tempos de retenção: 24.347 min (menor), 47.020 min (maior).

Abreviaturas

DIPEA	Diisopropiletilamina
DMA	Dimetilacetamida
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ee	Excesso enantiomérico

NHC	ligandos carbeno N-heterociclicos
NMP	N-Metilpiperidina
THF	Tetrahidrofurano
t.a.	temperatura ambiente
CCF	Cromatografia de camada fina
RMN	Ressonância magnética nuclear
EM	Espectro de massa
EMAR	Espectro de massa de alta resolução

Referências

M. A. Ali, R. Ismail, T. S. Choon, Y. K. Yoon, A. C. Wei, S. Pandian, R. S. Kumar, H. Osman, E. Manogaran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 7064.

Burke, A.J.; Marques, C.S. *Catalytic Arylation Methods From the Academic Lab to the Industrial Process*, Wiley-VCH, **2015**, Weinheim.

C. S.-L. Gal, J. Wagnon, J. Simiand, G. Griebel, C. Lacour, G. Guillon, C. Barberis, G. Brossard, P. Soubrié, D. Nisato, M. Pascal, R. Pruss, B. Scatton, J.-P. Maffrand, G. Le Fur, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 300, 1122.

H.C. Neu, K.P. Fu, *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, **1979**, 209.

R. Ng, *Drugs - From Discovery to Approval*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, **2004**.

M. Ochi, K. Kawasaki, H. Kataoka, Y. Uchio, H. Nishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 283, 1118.

F.G.E. Perabo, A. Wirger, S. Kamp, H. Lindner, D.H. Schmidt, S.C. Müller, E.C. Kohn, *Anticancer Res.* **2004**, 24, 2869.

V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596.

M. Rottmann, C. McNamara, B. K. S. Yeung, M. C. S. Lee, B. Zou, B. Russell, P. Seitz, D. M. Plouffe, N. V. Dharra, J. Tan, S. B. Cohen, K. R. Spencer, G. E. González-Páez, S. B. Lakshminarayana, A. Goh, R. Suwanarusk, T. Jegla, E. K. Schmitt, H.-P. Beck, R. Brun, F. Nosten, L. Renia, V. Dartois, T. H. Keller, D. A. Fidock, E. A. Winzeler, T. T. Diagana, *Science*, **2010**, 329, 1175.

P. Thirumurugan, D. Matosiuk, K. Jozwiak, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 4905.

C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057.

J. Totobenazara, A.J. Burke, *Tetrahedron Letters*, **2015**, 56, 2853.

J. Totobenazara, A.A. San Juan, P. Bacalhau, C.S. Marques, A. Goth, M. R. Martins, A. T. Caldeira, A.J. Burke, *ChemistrySelect*, 2016, 1, 3580.
Y. Yang, B.A., Rasmussen, D.M. Schlaes, *Pharmacol Ther.*, **1999**, 83, 141.

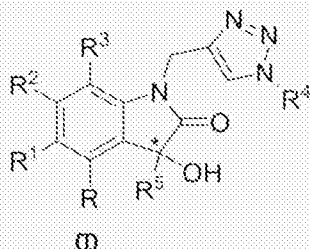
G.C. Tron, T. Pirali, R.A. Billington, P.L. Canonico, G. Sorba, A.A. Genazzani, *Med. Res. Rev.* **2008**, 28, 278.

Carolina Silva Marques, Anthony J. Burke.

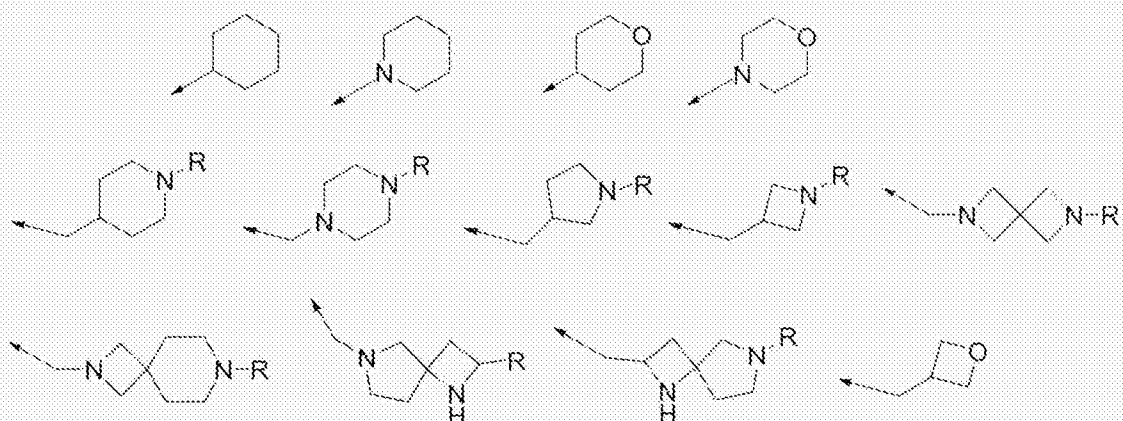
23-Agosto-2016

REIVINDICAÇÕES

1. Compostos com atividade biológica com formula (I), sendo que



nos quais, R, R¹, R² e R³ representam: H, grupos alquilo, arilo, vinilo, alilo, alcóxido, halogénios (F, Br, Cl), OH, CN, CHO e CO₂H. R⁴ representa um grupo alquilo linear com 1-6 carbonos, um grupo cicloheteroalquilo, como:

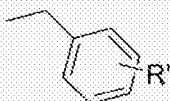


um grupo arilo ou heteroarilo, que inclui, um grupo fenilo substituído (contendo alcóxido, halogénio (F, Br, Cl), OH, CN, CHO, CO₂H), 2- e 4-piridina, pirimidina, piridazina, tiofeno, furano, pirano, benzoilo, pirrole.

Um grupo benzilo ou derivado,



onde R' é alcóxido, halogénio (F, Br, Cl), OH, CN, CHO e CO₂H,



onde R' é alcóxido, halogénio (F, Br, Cl), OH, CN, CHO e CO₂H, com um reagente organoboronado, um complexo de ródio (II) para formar o catalisador ativo *in situ*, um ligando, uma base apropriada num solvente adequado a uma temperatura apropriada numa atmosfera inerte.

4. Processo para produção de compostos de fórmula (I), de acordo com a 3ª reivindicação, caracterizado pela utilização de um complexo de ródio, como por exemplo, ródio (I) cloro-(1,5-ciclooctadieno)-dímero, [Rh(COD)Cl]₂, [Rh(COD)OH]₂, [Rh(nbd)Cl]₂, Rh(COD)₂BF₄, [Rh(C₂H₄)₂Cl]₂, Rh(acac)(coe)₂ e Rh(acac)(eth)₂, numa quantidade que varia entre 1 e 10 mol%.

5. Processo para produção de compostos de fórmula (I), de acordo com a 3ª reivindicação, caracterizado pela utilização de um ligando, como por exemplo, BINAP, TolBINAP, DIOP, DIPAMP, DioxPhos, DeguPhos, Xylyl-P-Phos, (R)-Phanephos, (R)-ShiP, (R)-SIPHOS, (R,R)-Chiraphos, C₃-TunePhos, TangPhos, BINAFINE, BINAPHANE, PhanePhos, Synphos, DuanPhos, Walphos, Josiphos, Naud, SchmalzPhos, QuinNap, derivados de fosforamidite (MonoPhos®) etc, NHCs quirais, dienos, como: Bíciclo[2.2.2]octadieno de simetria C₂ e ligandos quirais derivados de sulfinamida-alceno e ligandos derivados de oxazolina, como: PyBox, Pyrox, Quinox, numa quantidade que varia entre 1 e 10 mol%.

6. Processo para produção de compostos de fórmula (I), de acordo com a 3ª reivindicação, caracterizado pela utilização de uma base, como por exemplo, trietilamina, K₂CO₃, Na₂CO₃, CaCO₃, Ba(OH)₂, KOAc, DIPEA, K₃PO₄, NMM, DBU, KOH, KF, Cs₂CO₃ e KOtBu, numa quantidade que varia entre 1 a 3 equivalentes.

7. Processo para produção de compostos de fórmula (I), de acordo com a 3ª reivindicação, caracterizado pela utilização de um solvente, como por exemplo, tolueno, éter dimetílico, éter dietílico, dicloroetano, THF, 1,4-dioxano, acetona, acetonitrilo, metanol, etanol, isopropanol, 1,2-dicloroetano, DMF, DMA e NMP.

8. Processo para produção de compostos de fórmula (I), de acordo com a 3ª reivindicação, caracterizado pela utilização de uma temperatura na gama de 25°C e 100°C.

9. Processo para produção de compostos de fórmula (I), de acordo com a 3ª reivindicação, caracterizado pela utilização de uma atmosfera inerte criado por um gás inerte como por exemplo, nitrogénio ou árgon.