



**Universidad de Jaén**  
Escuela de Doctorado



**Universidad de La Habana**  
Facultad de Química

## **TESIS DOCTORAL**



# **Desarrollo de nuevos híbridos moleculares heterociclo-esteroide y esteroide-[60]fullereno con potencial actividad biológica**

**PRESENTADA POR:  
Luis Enmanuel Almagro Rodríguez**

**DIRIGIDA POR:  
Justo Cobo Domingo  
Margarita Suárez Navarro**

**JAÉN, 20 de marzo de 2022**





**Universidad de Jaén**  
Escuela de Doctorado



**Universidad de La Habana**  
Facultad de Química

## **Desarrollo de nuevos híbridos moleculares heterociclo-esteroide y esteroide-[60]fullereno con potencial actividad biológica**

Memoria presentada por Luis Enmanuel Almagro Rodriguez para optar al  
Grado de Doctor por la Universidad de Jaén  
“Mención Doctorado Internacional”  
“Mención Doctorado en Coturela Internacional”

V°B° Director y Tutor  
Dr. Justo Cobo Domingo  
Universidad de Jaén

V°B° Directora  
Dra. Margarita Suárez Navarro  
Universidad de La Habana  
(Cuba)

Fdo. Luis Enmanuel Almagro Rodriguez

Jaén, a 20 de Marzo de 2022



*A mi familia y amigos*  
*En especial a mis abuelos Ramón y Caridad, los extraño*

*"Sólo hay un bien: el conocimiento, sólo hay un mal: la ignorancia"*  
(Sócrates)

*"El verdadero arte del maestro consiste en despertar la alegría  
por el trabajo y el conocimiento"*  
(Albert Einstein)



## AGRADECIMIENTOS

Siempre será pequeño cualquier esfuerzo por intentar reflejar la inmensa gratitud que siento por todas las personas que tuvieron que ver con la realización de esta tesis y que han influido en mi formación profesional.

Los primeros agradecimientos van dirigidos a mis directores de tesis, el Prof. Justo Cobo Domingo y la Prof. Margarita Suárez Navarro, sin los cuales cualquier éxito o mérito que pudiera tener este trabajo no sería posible, y por quienes siento una enorme admiración y respeto. A Justo por brindarme la oportunidad de acogerme como estudiante de doctorado en el Departamento de Química Orgánica y Orgánica de la UJA, y de quien he aprendido mucho de la química de los heterociclos y de su gran conocimiento de las técnicas de caracterización. A Margarita, por ser como una madre y enseñarme a seguir amando la Química Orgánica y de quien he aprendido que siempre, si se pone empeño, se puede hacer más y mejor.

Agradecer al profesorado de la UJA que estuvo involucrado en mi formación como parte del Programa Iberoamericano de Formación de Doctores en Ciencias Básicas de la AUIP, muy especialmente a la coordinadora Prof. María Victoria López Ramón, por estar siempre pendiente de mí, además por su enorme ayuda financiera en los gastos derivados del depósito, impresión y lectura de esta tesis.

Agradecer a los técnicos del CICT de la UJA los que contribuyeron a la caracterización de una gran parte de los compuestos obtenidos, pero en especial a Oscar del Pico, por su paciencia y gran profesionalidad, buscando siempre una solución a los problemas que afrontamos con algunas caracterizaciones por RMN.

También agradecer a mis compañeros de la UJA, Juan, Alfonso, Alba por su apoyo en los momentos difíciles. Pero destacar a Iván, que aunque nos conocemos hace poco tiempo ha sido un amigo incondicional, como el hermano que no tuve, dispuesto siempre a lo que haga falta, y haciendo más llevadero el trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros colombianos del doctorado, Claudia, Lucía y Miller; por compartir durante tres estancias seguidas la vida en Jaén, con ustedes aprendí lo que es convivencia. En este aspecto un lugar especial a Juan Manuel y Charo, por ser excelentes personas y permitirme estar alojado durante más de un año en su apartamento, y gracias a ello pude terminar todo el trabajo pendiente.

No quiero dejar de mencionar a todos mis compañeros de la Universidad de La Habana, que de una forma u otra ha influido en mi formación doctoral y ayudado a su realización. En especial al Departamento de Química General e Inorgánica por su apoyo con la cobertura de la docencia, sobre todo en el último período.

Por último, y no menos importante, agradecer a toda mi familia. Sin su apoyo constante no podría alcanzar las metas y objetivos trazados para la realización de esta tesis. A mi prima Ochy mención especial, por todo su apoyo moral y económico desde que comencé el doctorado. Y a mi madre, todo lo que pueda agradecer siempre será insuficiente, por ser mi sostén y alentarme cada día a seguir adelante, a pesar de las muchas dificultades afrontadas, y a la distancia.

A todos, realmente, mi eterna gratitud.

El trabajo recogido en esta Memoria se ha realizado en el Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universidad de Jaén, bajo la tutoría y dirección del Dr. Justo Cobo Domingo, y en el Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO) de la Facultad de Química de la Universidad de La Habana, bajo la codirección de la Dra. Margarita Suárez Navarro; como parte del convenio de cotutela firmado entre ambas universidades. La financiación que ha permitido llevarlo a cabo procede del Programa de Formación de Doctores en Ciencias Básicas de la AUIP del 2015, y del Programa de Ayudas de la EDUJA para la realización de tesis doctorales en régimen de cotutela internacional.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis han sido publicados en:

- 1- **Almagro L.**, Noguera M., Suárez M., Cobo J., Glidewell C. Synthesis, spectroscopic characterization, and molecular and supramolecular structures of chloro-formyl steroids as precursors for hybrid heterosteroids. *Acta Cryst. C*, **2018**, C74, 1667–1673. (<https://doi.org/10.1107/S2053229618015887>).
- 2- **Almagro L.**, Hernández-Castillo D., Ortiz O., Alonso D., Ruiz A., Coro J., Herranz M. A., Molero D., Martínez R., Maroto E., Filippone S., Suárez M., Martín N. Steroid–Fullerene Hybrids from Epiandrosterone: Synthesis, Characterization and Theoretical Study. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4512-4522. (<https://doi.org/10.1002/ejoc.201800622>)
- 3- D. Alonso, D. Hernández-Castillo, **L. Almagro**, R. González-Aleman, D. Molero, M. A. Herranz, E. Medina-Páez, J. Coro, R. Martínez-Álvarez, M. Suarez, N. Martín. Diastereoselective Synthesis of Steroid-[60]Fullerene Hybrids and Theoretical Underpinning. *J. Org. Chem.* **2020**, 85, 4, 2426–2437. (<https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03121>)
- 4- **L. Almagro**, R. Lemos, K. Makowski, H. Rodríguez, O. Ortiz, W. Cáceres, M. Á. Herranz, D. Molero, R. Martínez, M. Suárez, N. Martín. [60]Fullerene Hybrids Bearing “Steroid Wings”: A Joined Experimental and Theoretical Investigation. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 5926–5937. (<https://doi.org/10.1002/ejoc.202000989>)



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$\delta$	Desplazamiento químico en ppm
$\lambda$	Longitud de onda
Å	Angstroms
<b>ADT</b>	<i>Androgen Deprivation Therapy</i>
<b>AER</b>	Abiraterona
<b>AM1</b>	<i>Austin Model 1</i>
<b>Ar</b>	Arilo
<b>CAN</b>	Nitrato cérico amónico
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>cols.</b>	Colaboradores
<b>COSY</b>	<i>Correlation spectroscopy</i>
<b>CRPC</b>	<i>Castration-Resistant Prostate Cancer</i>
<b>CYP11A1</b>	Citocromo P450 11A1
<b>CYP17A1</b>	Citocromo P450 17A1
<b>CYP21A2</b>	Citocromo P450 21A2
<b>CYP2D6</b>	Citocromo P450 2D6
<b>CYP3A4</b>	Citocromo P450 3A4
<b>CYP3A5</b>	Citocromo P450 3A5
<b>DBA</b>	3,5-ácido dinitrobenzoico
<b>DBU</b>	1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno
<b>DCC</b>	Dicilohexilcarbodimida
<b>DDQ</b>	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
<b>DEPT</b>	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<b>DHEA</b>	Deshidroepiandrosterona
<b>DM</b>	Dinámica Molecular.
<b>DMAP</b>	<i>N,N</i> -dimetilamino piridina
<b>DOS</b>	<i>Diversity Oriented Synthesis</i>
<b>DU-145</b>	Línea celular asociada al cáncer de próstata
<b>EM-IE</b>	Espectrometría de masas con ionización por impacto de electrones
<i>e.d.</i>	Exceso diastereomérico
<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GAFF</b>	<i>General AMBER Force Field</i>

<b>HBE</b>	Híbridos Benzazol-Esteroide
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
<b>HOMO</b>	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
<b>HRMS</b>	Espectrometría de masa de alta resolución.
<b>HSD17β3</b>	17β-Hidroxiesteroide 3-deshidrogenasa
<b>HSD3β2</b>	3β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
<b>HTS</b>	<i>High-throughput screening</i>
<b>IE</b>	Impacto Electrónico
<b>IC<sub>50</sub></b>	<i>Half maximal Inhibitory Concentration</i>
<b>I<sub>h</sub></b>	<i>Icosahedra</i>
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de disociación
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inhibición.
<b>LIE-D</b>	Método de estimación lineal de la energía libre basado en el cálculo del parámetro D.
<b>LNCaP</b>	Línea celular asociada al cáncer de próstata
<b>LUMO</b>	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
<b>MALDI</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
<b>m/z</b>	Relación masa carga
<b>MCF-7</b>	Línea celular asociada al cáncer de mama
<b>min.</b>	minuto
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i>
<b>PBC</b>	<i>Periodic Boundary Conditions</i>
<b>PC-3</b>	Línea celular asociada al cáncer de próstata
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PM3</b>	Modelo Parametrizado numero 3
<b>p.f.</b>	punto de fusión
<b>PREG</b>	Pregnenolona
<b>PROG</b>	Progesterona
<b>r.d.</b>	Relación diastereomérica
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retención
<b>RMC</b>	Reacciones multicomponentes
<b>RMC-I</b>	Reacciones multicomponentes basadas en isonitrilos.

<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RMSD</b>	<i>Root mean square deviation</i>
<b>RMPI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TBS</b>	<i>ter</i> -butildimetilsililo.
<b>TFE</b>	Trifluoretanol
<b>TORSDOF</b>	Número de grados de libertad torsionales del ligando
<b>TOF</b>	<i>Time of fly.</i>
<b>TOS</b>	<i>Target Oriented Synthesis</i>
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>uma</b>	Unidad de masa atómica
<b>USD</b>	Dólar estadounidense
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-visible
<b>VC</b>	Voltimetría Cíclica
<b>VH</b>	Vilsmeier-Haack
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana



## RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se aborda la obtención de compuestos estructuralmente novedosos y con potencial interés biológico, aplicando la hibridación molecular como herramienta sintética de diseño racional. Para ello, se utiliza como plataforma de conjugación esteroides convenientemente funcionalizados, los que se unen covalentemente a otras moléculas de relevancia química y biológica, como los heterociclos y los fullerenos. Los resultados derivados de la síntesis y caracterización de estos compuestos se dividen en dos partes bien diferenciadas.

La obtención de los híbridos heterociclo-esteroide se lleva a cabo aplicando dos estrategias diferentes. Mediante la síntesis orientada a un blanco (TOS, *Target-oriented synthesis*), se obtuvieron doce nuevos compuestos del tipo benzazol-esteroide, como análogos de la Abiraterona (fármaco empleado en la terapia del cáncer de próstata). Estudios combinados de Anclaje y Dinámica Moleculares predijeron que cuatro de los compuestos sintetizados pueden ser potenciales inhibidores de CYP17A1 y más selectivos frente a CYP21A2 que la Abiraterona, los que podría disminuir los efectos colaterales indeseables que presenta la actual administración del fármaco comercial.

Como segunda estrategia se aplicó la síntesis orientada a la diversidad (DOS, *Diversity-oriented synthesis*) para generar estructuras conjugadas entre derivados esteroidales y heterociclos farmacóforos. Se desarrollaron nuevas metodologías basadas en reacciones multicomponentes y de ciclación, empleando aldehídos y cetonas esteroidales. Se obtuvieron variedad de compuestos donde el fragmento heterocíclico que se genera está conjugado de forma exocíclica (benzimidazol, imidazo[1,2-*a*]piridina, quinoxalina), espirocíclica (3,4-dihidroquinoxalina), o fusionado (benzodiazepina, quinoxalina) en los anillos A y/o D del esqueleto esteroideal. También se reporta la síntesis diastereoselectiva de *N*-benzoil-tiazolidinas y pirrolo[1,2-*b*]tiazol sin precedentes para sustratos esteroidales.

Un grupo seleccionado de los híbridos obtenidos fueron evaluados mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Aunque los resultados mostraron en términos generales una baja actividad antiproliferativa; algunos compuestos presentaron efecto citotóxico frente a líneas celulares de leucemia y cáncer de próstata.

Por otra parte, para la síntesis de los híbridos esteroide-[60]fullereno se emplearon las reacciones de ciclopropanación de Bingel-Hirsch y la cicloadición [3+2] de Prato. Se obtuvieron ocho compuestos del tipo metano[60]fullereno y fulleropirrolidina, los que son debidamente caracterizados por técnicas de análisis estructural. Además, se estudiaron las propiedades electroquímicas de todos los compuestos, así como las propiedades de agregación en agua para dos híbridos del tipo esteroide-metano[60]fullereno. Finalmente, se empleó el Anclaje Molecular con el objetivo de determinar la potencial aplicación de estos derivados fullerénicos como inhibidores de la proteasa de VIH-1.



## ABSTRACT

In this doctoral thesis the synthesis of novel compounds with potential biological interest is tackled by the application of molecular hybridization as a synthetic tool in the Fragment Based Drug Design (FBDD). In order to do so, conveniently functionalized steroids are used as starting building blocks which are lately bonded to other relevant chemical entities considered to be biologically privileged, such as heterocycles and fullerenes. The results obtained from the synthesis and characterization of these compounds are divided in two different sections.

The synthesis of the heterocycle-steroid hybrids is implemented with two different approaches. By the Target-Oriented Synthesis (TOS) twelve new compounds benzazole-steroid were obtained as Abiraterone analogues (drug used in the treatment of prostate cancer). Combined studies of Molecular Docking and Molecular Dynamic predicted that four of the synthesised compounds were potential inhibitors of CYP17A1 as well as more selective towards CYP21A2 than Abiraterone, what might diminish the undesired side-effects coming from the administration of the current commercial drug.

The other approach applied is known as Diversity-Oriented Synthesis (DOS). This approach enabled the synthesis of conjugated structures among steroid derivatives and pharmacophoric heterocycles. In that regard, novel methodologies based in multicomponent reactions (MCR) were developed together with cyclization reactions by using steroidal aldehydes and ketones. A huge variety of compounds were obtained. In those structures the heterocyclic fragment generated is conjugated exocyclicly (benzimidazole, imidazo[1,2-*a*]pyridine, quinoxaline), spirocyclic (3,4-dihydroquinoxaline) or fusionated (benzodiazepine, quinoxaline) in the A and/or D rings of the steroidal moiety.

A selected group of the obtained hybrids were evaluated *in vitro* in cytotoxicity assays. Despite the results showed, in general terms, low antiproliferative activity, some of the compounds showed cytotoxic effect against cell lines of leukaemia and prostate cancer.

On the other hand, for the synthesis of the steroid-[60]fullerene hybrids Bingel-Hirsch cyclopropanation together with Prato [3+2] cycloaddition reactions were used. This way, eight compounds with methano[60]fullerene and fulleropyrrolidine structures were obtained and characterized by structural analysis techniques. Moreover, the electrochemical properties of all the compounds, as well as aggregation properties in water for two steroid-methano[60]fullerene, were studied. Finally, the molecular assembling was applied in order to determine the potential applications of this fullerene derivatives as VIH-1 protease inhibitors.



# ÍNDICE

<b>INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>PRIMERA PARTE:. HÍBRIDOS HETEROCICLO-ESTEROIDE.....</b>	<b>11</b>
<b>I.1-CAPÍTULO 1:.....</b>	<b>13</b>
<b>Síntesis y estudio <i>in silico</i> de híbridos benzazol-esteroide como análogos estructurales de inhibidores de la enzima CYP17A1 .....</b>	<b>13</b>
1.1. ANTECEDENTES .....	15
1.1.1. Esteroides. Aspectos estructurales e importancia biológica. ....	15
1.1.2. Cáncer de próstata. Generalidades y tratamientos. ....	21
1.1.3. Benzimidazoles. Aspectos estructurales e importancia biológica. ....	28
1.1.4. Diseño de fármacos a partir de herramientas computacionales .....	37
1.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	39
1.2.1. Síntesis de los híbridos (benzazol-2'-il)-esteroide. (Serie 1) .....	40
1.2.2. Estudio estructural de los híbridos (benzazol-2'-il)-esteroide. ....	44
1.2.3. Predicción de la actividad inhibitoria <i>in silico</i> . ....	54
<b>I.2-CAPÍTULO 2:.....</b>	<b>69</b>
<b>Síntesis Orientada a la Diversidad (DOS) de conjugados heterociclo-esteroide .....</b>	<b>69</b>
2.1. ANTECEDENTES .....	71
2.1.1. Síntesis Orientada a la Diversidad estructural. ....	71
2.1.2. Metodologías para generar diversidad estructural en esteroides.....	73
2.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS. ....	86
2.2.1. Obtención de esteroides cloro-formilados como precursores sintéticos en la generación de diversidad estructural. ....	87
2.2.2. Reactividad de $\beta$ -cloro-enaldehydos frente a <i>o</i> -fenilendiamina. ....	92
2.2.3. Obtención de híbridos heterociclo-esteroide mediante (RMC-I).....	107
2.2.4. Obtención de derivados tiazolidínicos conjugados a esteroide (Serie 5). ....	133
<b>I.3-CAPÍTULO 3:.....</b>	<b>145</b>
3.1. Generalidades. ....	147
3.2. Evaluación de actividad antiproliferativa a una dosis.....	148
3.3. Estudios de inhibición enzimáticos esteroideogénicos.....	151
<b>I.4-CONCLUSIONES:.....</b>	<b>153</b>
<b>I.5-SECCION EXPERIMENTAL:.....</b>	<b>157</b>
5.1. Características de los productos de partida y los reactivos empleados. ....	159
5.2. Equipamiento y técnicas generales utilizadas.....	159
5.3. Obtención de híbridos benzazol-esteroide (Serie 1).....	161
5.4.- Obtención de derivados esteroidales cloro-formil-sustituidos. ....	170

5.5. Reactividad de $\beta$ -cloro-enaldehydos frente a <i>o</i> -fenilendiamina (Serie 2) .....	174
5.6. Obtención de híbridos Imidazo[1,2- <i>a</i> ]piridina-esteroide (Serie 3) .....	179
5.7. Obtención de híbridos quinoxalina-esteroide (Serie 4) .....	184
5.7.1. - Síntesis de los quinoxalinas exocíclicas XX y XXI .....	184
5.7.2. - Síntesis de 3,4-dihidroquinoxalinas espirocíclicas .....	187
5.8. Obtención de híbridos tiazolidina-esteroide (Serie 5) .....	193
5.9. Cálculos computacionales. ....	197
5.9.1. Anclaje Molecular.....	197
5.9.2. Dinámica Molecular (DM) .....	199
5.10. Evaluación de la actividad antiproliferativa .....	202
<b>SEGUNDA PARTE: HÍBRIDOS ESTEROIDE-[60]FULLERENO .....</b>	<b>203</b>
<b>II.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>205</b>
II.1.1. [60]fullereno. Estructura y propiedades. ....	207
II.1.2. Reactividad química del C <sub>60</sub> . Propiedades de sus derivados. ....	209
II.1.2.1. Obtención de Metanofullerenos. Ciclopropanación de Bingel-Hirsch.....	211
II.1.2.2. Obtención de fulleropirrolidinas. Reacción de cicloadición [3+2] de Prato.....	216
II.1.3. Híbridos esteroide-[60]fullereno.....	220
<b>II.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>227</b>
II.2.1- Steroid–Fullerene Hybrids from Epiandrosterone: Synthesis, Characterization and Theoretical Study. ....	231
II.2.2- [60]Fullerene Hybrids Bearing “Steroid Wings”: A Joined Experimental and Theoretical Investigation.....	257
II.2.3- Diastereoselective Synthesis of Steroid–[60]Fullerene Hybrids and Theoretical Underpinning. ....	285
II.2.4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE RESULTADOS. ....	311
II.2.4.1. Síntesis, caracterización y estudio teórico de híbridos esteroide-metano[60]fullerenos. ....	311
II.2.4.2- Síntesis diastereoselectiva de fulleropirrolidinas esteroideas.....	326
II.2.4.3- Estudio de anclaje molecular de los conjugados esteroide-fullereno. ....	333
<b>II.3. CONCLUSIONES .....</b>	<b>339</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>343</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>347</b>

## **INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS**



Entre los mayores desafíos para la química moderna se destaca el diseño de nuevas metodologías capaces de proporcionar tanto diversidad estructural como complejidad molecular. En este sentido, la síntesis orgánica ha jugado un papel fundamental, y dentro de sus principales objetivos está la obtención de compuestos que muestren novedosas propiedades tanto físicas, químicas como biológicas.<sup>[1]</sup> El desarrollo de este tipo de compuestos se ha potenciado con la obtención de *estructuras híbridas*, estrategia que consiste en la conjugación de dos o más entidades químicas que al ensamblarse generan moléculas funcionales en las que las características de sus constituyentes son moduladas, amplificadas u originan totalmente nuevas propiedades con relación a sus precursores.<sup>[2]</sup>

La Naturaleza ha jugado un papel primordial como fuente de inspiración en la búsqueda de este tipo de moléculas, ya que muchos productos naturales biológicamente activos son derivados de la biosíntesis mixta, lo que involucra la integración de componentes provenientes de diferentes rutas biosintéticas para generar estructuras de gran diversidad y complejidad.<sup>[3]</sup> La Estrictina, un complejo del tipo indol-alcaloide derivado del triptófano y un precursor monoterpénico; así como la Clorofila *a*, glicoproteínas, antibióticos, vitaminas, flavonoides y glicósidos esteroidales como la Dioscina, son ejemplos de productos naturales en los cuales varios segmentos de la molécula tienen diferente origen biosintético, pero están enlazados covalentemente en una sola entidad funcional (Figura 1).

Los atributos presentes en este tipo de compuestos, donde los diferentes fragmentos que le dieron origen actúan de forma sinérgica para controlar y modular la conformación, el reconocimiento, la comunicación, el transporte y la solubilidad en diferentes procesos biológicos; podría llevar a la idea de generar novedosas entidades moleculares por la combinación racional de dos o más clases diferentes de estructuras, tanto de origen natural como de origen sintético, que permitan su aplicación en química médica.<sup>[4]</sup>

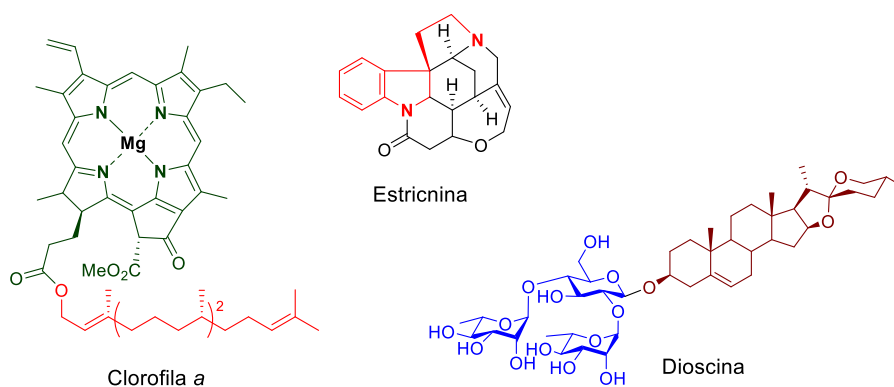
---

<sup>1</sup> Nicolaou, K.C.; Rigol, S. Perspectives from nearly five decades of total synthesis of natural products and their analogues for biology and medicine. *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1404 – 1435.

<sup>2</sup> Mehta, G.; Singh, V. Hybrid systems through natural product leads: An approach towards new molecular entities. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 324–334.

<sup>3</sup> Eljounaidi, K.; Lichman, B.R. Nature's Chemists: The Discovery and Engineering of Phytochemical Biosynthesis. *Front. Chem.*, **2020**, *8*: 596479.

<sup>4</sup> Shaveta, A.; Mishra, S.; Singh, P. Hybrid molecules: The privileged scaffolds for various pharmaceuticals. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *124*, 500-536.



**Figura 1:** Ejemplos de productos naturales obtenidos mediante biosíntesis mixta.

En los últimos años el diseño de sistemas híbridos ha recibido una creciente atención, y también han sido referidas en la literatura como *quimeras*<sup>[5]</sup> y/o *conjugados moleculares*.<sup>[6]</sup> La posibilidad de generar entidades con gran diversidad estructural es prácticamente ilimitada, y unido a la potencialidad de obtener compuestos con propiedades mejoradas mediante la correcta selección de los fragmentos precursores, han permitido el rápido descubrimiento de híbridos bioactivos para un amplio rango de áreas terapéuticas y en un período de tiempo razonable.<sup>[7]</sup>

Dentro de esta importante temática, los esteroides representan excelentes precursores al abordar la preparación de sistemas híbridos o conjugados; debido fundamentalmente a las características únicas de su estructura rígida, quiral, liposoluble y con un nivel variable de funcionalización. Además, constituyen una familia de compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, con un perfil diverso de actividad biológica.<sup>[8]</sup> Un amplio número de sus derivados son empleados como agentes antiinflamatorios, inmunosupresores, progestacionales, diuréticos, anabólicos, anticonceptivos y anticancerígenos; siendo la producción de fármacos esteroidales en el año 2015, la segunda categoría después de los antibióticos.<sup>[9]</sup>

En las últimas décadas, la comunidad científica ha centrado su atención en la síntesis de esteroides que contienen heterociclos conjugados a su estructura, debido al

<sup>5</sup> Gilad, Y.; Tuchinsky, H.; Ben-David, G.; Minnes, R.; Gancz, A.; Senderowitz, H.; Luboshits, G.; Firer, M.A.; Gellerman, G. Discovery of potent molecular chimera (CM358) to treat human metastatic melanoma. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, 138, 602-615.

<sup>6</sup> Rossi, R.; Ciofalo, M. An Updated Review on the Synthesis and Antibacterial Activity of Molecular Hybrids and Conjugates Bearing Imidazole Moiety. *Molecules*, **2020**, 25, 5133.

<sup>7</sup> Bérubé, G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert. Opin. Drug Discov.*, **2016**, 11:3, 281-305.

<sup>8</sup> Lednicer, D. *Steroid Chemistry at a Glance*, Ed. John Wiley & Sons, **2011**, p 10-15.

<sup>9</sup> García, J.L.; Ramos, R.; Gómez, J.; Vázquez, J.C.; Cano, A. Biotransformación de Esteroides Con Diferentes Microorganismos. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **2015**, 46, 17-32.

amplio espectro de actividad farmacológica que presentan este tipo de moléculas híbridas.<sup>[10]</sup> Varios derivados modificados con heterociclos en los anillos A y D del esqueleto esteroidal, fundamentalmente, ejercen efectos antiproliferativos significativos en líneas de células cancerosas de origen diverso. Además, algunos de estos compuestos son inhibidores específicos de ciertas enzimas y, por lo tanto, pueden aplicarse en el tratamiento de enfermedades dependientes de hormonas (como la hiperplasia prostática benigna o el cáncer de próstata).<sup>[11]</sup> Sin embargo, común a otras terapias, algunos de los fármacos comerciales empleados en la actualidad, presentan una baja eficacia y un incremento de los efectos colaterales al ser administrados, debido a la falta de especificidad entre células cancerosas y normales.<sup>[12]</sup> Esto, unido a la emergencia provocada por el aumento del efecto de resistencia a múltiples fármacos, se ha convertido en uno de los principales desafíos para el control y erradicación del cáncer. Por lo tanto, es de vital importancia el desarrollo de nuevos agentes antitumorales con mayor especificidad, dirigidos hacia dianas terapéuticas presentes o activadas solo en células malignas.

Por otra parte, desde su descubrimiento en 1985 y su posterior preparación en cantidades multigramo, los fullerenos despertaron un marcado interés en la comunidad científica. El estudio de su reactividad química y propiedades electroquímicas, biológicas y fotofísicas han estado dirigidos, principalmente, a la búsqueda de posibles aplicaciones prácticas.<sup>[13]</sup> Esto, sin embargo, constituye un verdadero reto debido a la geometría esférica que presentan estos alótropos del carbono, donde el más abundante y conocido es el que contiene 60 átomos de carbono.

La principal limitante que presentan es su completa insolubilidad en agua y poca solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos, debido a que forman agregados moleculares, lo que provoca su baja solubilidad.<sup>[14]</sup>

---

<sup>10</sup> Farhan, A.M.; Alshamusi, Q.K.; Jebur, M.H. Synthesis of steroid bearing heterocyclic derivatives and biological activity. Review 2014-2020. *J. Phys.: Conf. Ser.*, **2021**, 1853, 012057.

<sup>11</sup> Tantawy, M.A.; Nafie, M.S.; Elmegeed, G.A.; Ali, I.A.I. Auspicious role of the steroidal heterocyclic derivatives as a platform for anti-cancer drugs. *Bioorg. Chem.*, **2017**, 73, 128 – 146.

<sup>12</sup> Rana, A.; Alex, J.M.; Chauhan, M.; Joshi, G.; Kumar, R. A review on pharmacophoric designs of antiproliferative agents. *Med. Chem. Res.*, **2015**, 24, 903–920.

<sup>13</sup> Hirsch, A.; Bettreich, M. *Fullerenes, Chemistry and Reactions*, Eds. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, **2005**, p 5-10.

<sup>14</sup> Marcus, Y.; Smith, A.L.; Korobov, M.V.; Mirakyan, A.L.; Avramenko, N.V.; Stukalin, E.B. *J. Phys. Chem. B*, **2001**, 105, 2499-2506.

El desarrollo de la química de los fullerenos con el objetivo de realizar su funcionalización en la búsqueda de derivados apropiados para investigaciones biológicas, es de interés actual. Entre las estrategias más empleadas se encuentra su acoplamiento a biomoléculas, como péptidos, carbohidratos, heterociclos, entre otras; a través de reacciones de cicloadición, fundamentalmente.<sup>[15]</sup> Estas transformaciones han dado lugar a una gran variedad de productos estables y con una alta solubilidad en disolventes polares, haciéndolos más biocompatibles y reduciendo sus efectos tóxicos en medios biológicos.<sup>[16]</sup>

Pese a los numerosos ejemplos que han sido descritos de compuestos fullerénicos acoplados a relevantes estructuras moleculares derivadas de productos naturales, la síntesis y aplicaciones de híbridos esteroide-fullereno ha sido poco estudiada, a pesar de que se ha comprobado que el fragmento esteroideal le confiere al conjugado una solubilidad adecuada en fluidos biológicos.<sup>[17]</sup> En consecuencia, parte del esfuerzo por desarrollar este tipo de conjugados moleculares está dirigido a la búsqueda de nuevos procedimientos sintéticos que permitan el acoplamiento eficiente de fullerenos a esteroides.

Como continuación de los trabajos de nuestro grupo en la búsqueda de compuestos estructuralmente novedosos y con potencial interés biológico, hemos abordado la obtención de nuevas moléculas híbridas utilizando como plataforma esteroides convenientemente funcionalizados.

De esta manera, se plantea como **primer objetivo general** el *desarrollo de híbridos heterociclo-esteroide estructuralmente diversos con potencial actividad antiproliferativa, aplicando herramientas del diseño racional de fármacos*. Además, como continuación de las investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO) de la Universidad de La Habana en la obtención de derivados fullerénicos conjugados a moléculas bioactivas, se propone como **segundo objetivo general** de esta

---

<sup>15</sup> Langa, F.; Nierengarten, J. F. *Fullerenes, Principles and Application*, Eds. RSC Publishing: Cambridge, UK, **2007**.

<sup>16</sup> a) Castro, E.; Garcia, A.H.; Zavala, G.; Echegoyen, L. *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 6523–6535; b) Pochkaeva, E.I.; Podolsky, N.E.; Zakusilo, D.N.; Petrov, A.V.; Charykov, N.A.; Vlasov, T.D.; Penkova, A.V.; Vasina, L.V.; Murin, I.V.; Sharoyko, V.V. *Prog. Solid State Chem.* **2020**, 57, 100255

<sup>17</sup> MacFarland, D.; Zhang, J.; Zhou, Z.; Lenk, R.P.; Wilson, S.R. *U.S. Pat. Appl. Publ.* US 2008214514 A1 20080904, **2008**.

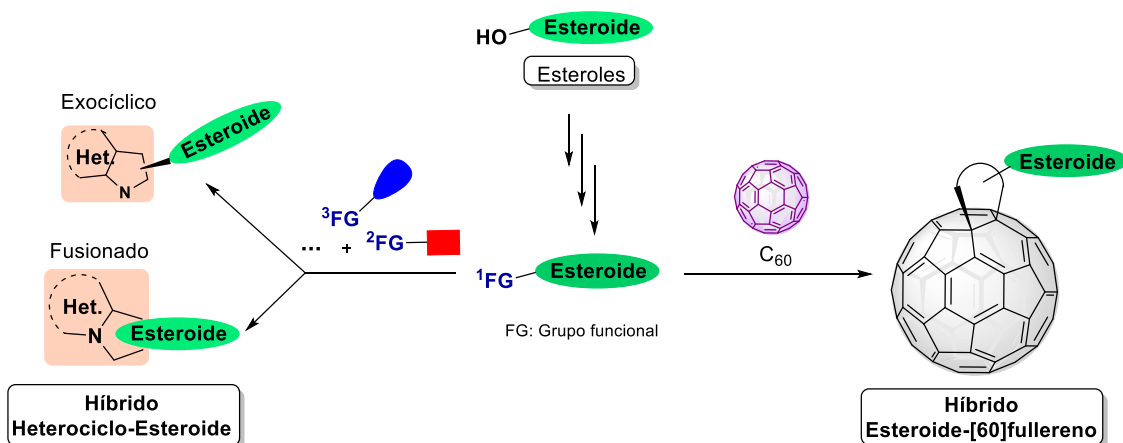
Memoria el *empleo de metodologías aplicadas a la funcionalización de fullerenos para la obtención de nuevos híbridos esteroide-C<sub>60</sub> y estudiar sus propiedades físicas.*

A partir de los objetivos generales se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- 1.1- Desarrollar una metodología para la obtención de híbridos benzazol-esteroide como análogos estructurales de inhibidores de enzimas esteroideogénicas involucradas en neoplasias prostáticas, utilizando la estrategia de Síntesis Orientada hacia un Objetivo (*Target Oriented Synthesis – TOS*).
- 1.2- Predecir la selectividad *in silico* de los conjugados benzazol-esteroide obtenidos hacia las enzimas citocromos P450 17A1 y 21A2, mediante herramientas de Anclaje y Dinámica Molecular.
- 1.3- Desarrollar metodologías de conjugación de derivados esteroideales funcionalizados a estructuras heterocíclicas de reconocido efecto farmacológico (benzimidazoles, benzodiazepinas, imidazo[1,2-*a*]piridinas, quinoxalinas y tiazolidinas); como herramientas aplicadas a la Síntesis Orientada a la Diversidad (*Diversity Oriented Synthesis – DOS*).
- 1.4- Realizar la evaluación biológica de los híbridos heterociclo-esteroide obtenidos mediante ensayos específicos *in vitro* de inhibición enzimática, y ensayos de proliferación en líneas celulares tumorales.
- 2.1- Sintetizar esteroides malonil-sustituidos derivados del androstano como precursores en la obtención de híbridos esteroide-metano[60]fullereno, utilizando la reacción de ciclopropanación de Bingel-Hirsch.
- 2.2- Obtener fulleropirrolidinas mediante el acoplamiento de aldehídos esteroideales al C<sub>60</sub>, a partir de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de iluros de azometino.
- 2.3- Caracterizar por métodos espectroscópicos y electroquímicos todos los cicloadductos obtenidos, así como estudiar las propiedades de agregación en agua de alguno de ellos.
- 2.4- Realizar estudios teóricos mediante métodos computacionales para predecir la estabilidad de los nuevos híbridos esteroide-fullereno y sus potenciales aplicaciones biológicas.

Para ello, se plantea una estrategia que consiste en transformar esteroides procedentes de fuentes naturales (androstano, pregnano, colestano y colano) en derivados con grupos reactivos que permitan combinarse a estructuras de relevancia química y biológica. Los híbridos heterociclo-esteroide se generan por formación del fragmento

farmacofórico durante la reacción, que se conjuga de forma exocíclica o fusionada al esqueleto esteroideal; mientras los híbridos esteroide-[60]fullereno se generan por unión covalente de las entidades moleculares precursoras (ver Esquema 1). De esta forma se obtienen compuestos donde las propiedades resultantes de la combinación estructural, pueden ser interesantes desde el punto de vista biomédico.



**Esquema 1:** Estrategia general de síntesis de híbridos heterociclo-esteroide y esteroide-C<sub>60</sub>.

Los resultados obtenidos en la consecución de los objetivos anteriormente planteados se recogen en la presente Tesis Doctoral, divididos en dos partes bien diferenciadas.

La primera describe el trabajo llevado a cabo en el Grupo de Investigación de Compuestos de Interés Biológico (GICIB) de la Universidad de Jaén (UJA), en el desarrollo de nuevos sistemas híbridos heterociclo-esteroide con potencial actividad antiproliferativa; y se encuentra estructurada en tres capítulos. En el **Capítulo 1** se describe la síntesis, caracterización y estudio *in silico* de híbridos benzazol-esteroides, como análogos de inhibidores de la enzima CYP17A1. En el **Capítulo 2** se describen las estrategias desarrolladas para la síntesis de nuevos conjugados heterociclo-esteroides estructuralmente diversos; mientras el **Capítulo 3** se centra en el estudio de la actividad biológica de una gran parte de los híbridos obtenidos en los capítulos anteriores. También, se exponen las Conclusiones correspondientes a los resultados alcanzados de esta primera parte, así como una Sección Experimental donde se recogen las técnicas generales de caracterización y los procedimientos sintéticos desarrollados para cada compuesto.

La segunda parte agrupa todos los resultados relacionados a la síntesis y caracterización de los nuevos sistemas híbridos esteroide-fullereno, los que han sido publicados. Está organizada en tres secciones: Antecedentes, Discusión de Resultados y

Conclusiones, atendiendo al cumplimiento de la normativa establecida por la UJA para la defensa de tesis doctorales.

Al final de la Memoria se exponen de forma conjunta un grupo de Perspectivas para trabajos futuros. Además, se han incluido un apartado de Anexos en formato electrónico, donde se relaciona todos los datos de la caracterización estructural de los compuestos que no han sido publicados.

Todo el trabajo de investigación reflejado en la presente Tesis Doctoral, en su conjunto, constituye una importante contribución al desarrollo de la ciencia básica. Se diseñaron diferentes metodologías sintéticas, fundamentalmente a través de reacciones de ciclación, multicomponentes y de cicloadición. De esta forma, se obtuvieron un total de 43 conjugados esteroidales no descritos en la literatura científica, componiendo un amplio grupo de compuestos con potenciales aplicaciones biológicas. Entre ellos destaca la formación de una novedosa estructura de seis anillos condensados, constituida por un fragmento quinoxalínico fusionado al esqueleto esteroideal, mediante un posible proceso de expansión del anillo D que no tiene precedentes. Adicionalmente, los resultados de los experimentos de resonancia magnética nuclear mono y bidimensional, espectrometría de masas, difracción de rayos-X de monocristal, así como los derivados del empleo de las técnicas computacionales en la predicción de la actividad inhibitoria, representan un punto de partida para trabajos futuros en esta temática, y contribuyen al conocimiento de la química de este tipo de sistemas moleculares.



**PRIMERA PARTE:**  
**HÍBRIDOS HETEROCICLO-ESTEROIDE**



## **I.1-CAPÍTULO 1:**

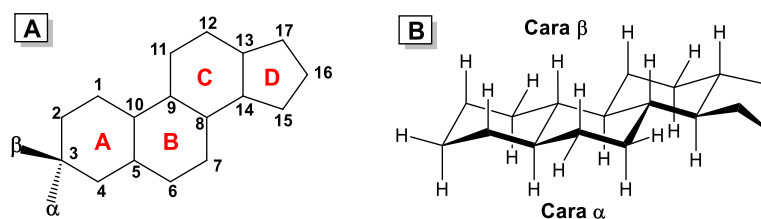
**Síntesis y estudio *in silico* de híbridos benzazol-esteroide como análogos estructurales de inhibidores de la enzima CYP17A1**



## 1.1. ANTECEDENTES

### 1.1.1. Esteroides. Aspectos estructurales e importancia biológica.

Los esteroides son lípidos no hidrolizables, los cuales se encuentran fundamentalmente en la fracción lipídica de animales y plantas. Son un grupo de compuestos estructuralmente relacionados entre sí y que están constituidos por una estructura policíclica básica de diecisiete átomos de carbono, dispuestos en un esqueleto condensado de tres anillos de seis miembros (A, B, C) y uno de cinco miembros (D), ver Figura I.1A, para un total de cuatro anillos completamente saturados, a lo que se denomina núcleo esteroidal. De acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC se conoce como 2',3'-ciclopentanoperhidrofenantreno. Los grupos que se encuentran por encima del plano del sistema condensado de anillos están orientados hacia la cara  $\beta$ , y los que están por debajo de este plano, se encuentran orientados hacia la cara  $\alpha$ ,<sup>[8]</sup> según se muestra en la Figura I.1.B.



**Figura I.1.** Sistema de numeración y representación espacial del núcleo esteroidal.

La familia de esteroides incluye una gran variedad de compuestos de origen natural, y se clasifican principalmente según el número de átomos de carbono del esqueleto base. También, pueden agruparse atendiendo a las propiedades farmacológicas que presenten, en: esteroides, ácidos biliares, hormonas sexuales y adrenocorticales, glicósidos cardíacos, sapogeninas y alcaloides.<sup>[8]</sup>

Sus propiedades biológicas se deben fundamentalmente a su función como hormonas en mamíferos, así como de regulación de otros procesos metabólicos.<sup>[18]</sup> Por ejemplo, el colesterol **1** (Figura I.2) es esencial para la estabilidad y desarrollo de la membrana celular; además, constituye el precursor de las hormonas esteroideas y de los ácidos biliares, como el ácido cólico **2**, que participan en la digestión y absorción de las grasas. La epiandrosterona **3** es una hormona con actividad anabólica débil, y estudios

<sup>18</sup> a) Ruíz, A.M.; Ortiz, P.A. Hormonas y Epilepsia, *Acta Neurol. Colomb*, **2005**, *21*, 34-42. b) Veiga, S.; García-Segura, L.M.; Azcoitia, I. Propiedades neuroprotectoras de los esteroides sexuales y los neuroesteroides, *Rev. Neurol.* **2004**, *39*, 1043-1051.

realizados demuestran que puede actuar como antagonista tipo-L del calcio, similar a las 1,4-dihidropiridinas bloqueadoras de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , empleadas como fármacos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.<sup>[19]</sup> Otro de los esteroides que juega un papel importante en el organismo es la pregnenolona **4**, perteneciente al grupo de los neuroesteroides, los cuales se encuentran en altas concentraciones en el cerebro.<sup>[20]</sup>

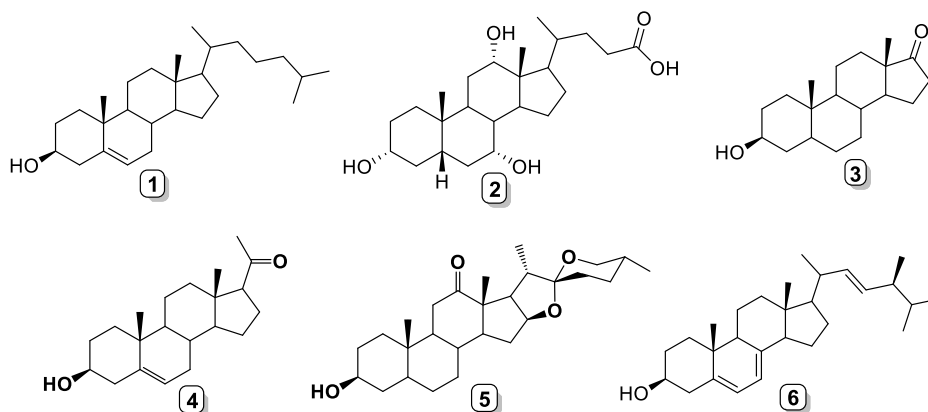


Figura I.2. Ejemplos de esteroides de origen natural.

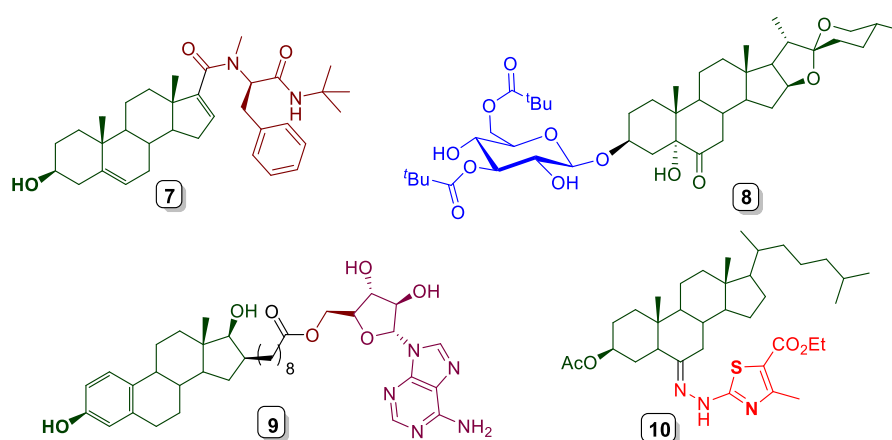
La diversidad de agentes terapéuticos y agroquímicos de naturaleza esteroideal que se comercializan en la actualidad, se debe en gran medida a la disponibilidad de precursores naturales utilizados como materias primas en la industria químico-farmacéutica.<sup>[9]</sup> Estos pueden obtenerse con facilidad de desechos de la producción animal, como el colesterol **1** y el ácido cólico **2**. También, de fuentes vegetales: los fitosteroles y las sapogeninas, como la hecogenina **5**; y de hongos, como el ergosterol **6**, (ver Figura I.2). De esta forma, se dispone de una amplia variedad de compuestos esteroideos para la obtención de nuevos derivados bioactivos, ya sea mediante modificación o funcionalización estructural de los sustratos naturales; o por acoplamiento a otras entidades moleculares biológicamente relevantes.

Los esteroides presentan una estructura alifática que combina características importantes como quiralidad, lipofilicidad y rigidez en un mismo sistema. La presencia de los metilos en los carbonos C10 y C13, numerados 19 y 18, respectivamente, introducen impedimento estérico en la cara  $\beta$ , influyendo en la estereoselectividad de las reacciones químicas de estos compuestos.

<sup>19</sup> Gupte, S.A.; Tateyama, M.; Okada, T.; Oka, M.; Ochi, R. Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channel, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2002**, *34*, 679-688.

<sup>20</sup> Kawatoa, S.; Yamadab, M.; Kimoto, T. Brainneurosteroids are 4th generation neuromessengers in the brain: Cell biophysical analysis of steroid signal transduction, *Adv. Biophys.* **2001**, *37*, 1-30.

La mayoría de estos compuestos naturales poseen grupos hidroxilos o carbonilos en diferentes posiciones de su estructura (C3, C6, C11, C17), los que pueden ser reemplazados por otros grupos funcionales a través de activación, sustitución o adición nucleofílica.<sup>[21]</sup> Estas características estructurales que permiten la funcionalización, ya sea por vía química o biológica<sup>[9]</sup> en diferentes posiciones y disposiciones, axial y/o ecuatorial, son las que hacen atractivos a los esteroides como plataformas o puntos de partida en el diseño y síntesis de moléculas con mayor complejidad. De esta forma, se han descrito algunos ejemplos de su conjugación a péptidos **7**,<sup>[22]</sup> carbohidratos **8**,<sup>[23]</sup> nucleósidos **9**,<sup>[24]</sup> heterociclos **10**,<sup>[25]</sup> entre otros; dando lugar a moléculas híbridas con actividad antiinflamatoria, citotóxica y antimicrobiana, principalmente (ver Figura I.3).



**Figura I.3.** Híbridos esteroidales con variada actividad biológica.

Actualmente, los derivados esteroidales ocupan el espectro más amplio de utilidad clínica y son reconocidos en el mercado global como la clase de compuestos terapéuticos más diversificada.<sup>[26]</sup> En este sentido, desde hace décadas se vienen utilizando con éxito fármacos quimioterapéuticos basados en esteroides para el tratamiento de diferentes tipos

<sup>21</sup> Hanson, J.R. Steroids: partial synthesis in medicinal chemistry, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 887-899.

<sup>22</sup> Chen, H.; Han, C.; Wu, J.; Liu, X.; Zhan, Y.; Chen, J.; Chen, Y.; Gu, R.; Zhang, L.; Chen, S.; Jia, J.; Zhen, X.; Zheng, L.T.; Jiang, B. Accessible method for the development of novel sterol analogues with dipeptide-like side chains that act as neuroinflammation inhibitors. *ACS Chem. Neurosci.*, **2016**, 7, 305–315.

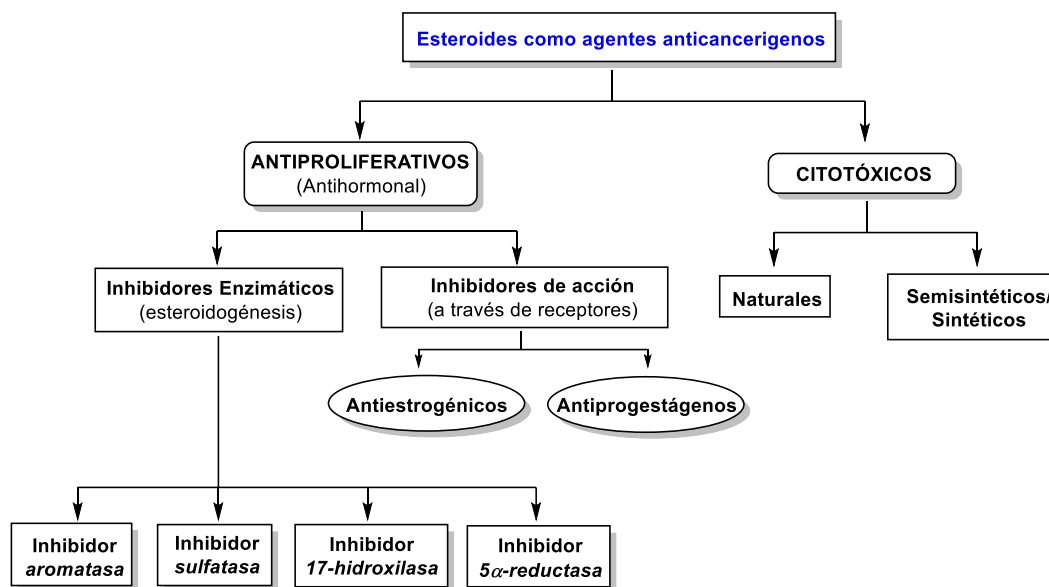
<sup>23</sup> Pérez-Labrada, K.; Brouard, I.; Estévez, S.; Marrero, M. T.; Estévez, F.; Bermejo, J.; G. Rivera, D. New insights into the structure-cytotoxicity relationship of spirostan saponins and related glycosides, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 2690-2700.

<sup>24</sup> Qiu, W.; Campbell, R.L.; Gangloff, A.; Dupuis, P.; Boivin, R.P.; Tremblay, M.R.; Poirier, D.; Lin, S.-X. A concerted, rational design of type 1 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: estradiol-adenosine hybrids with high affinity. *Faseb. J.: Off. Publ. Feder. Am. Soc. Exp. Biol.*, **2002**, 16(13), 1-26.

<sup>25</sup> Ansari, A.; Ali, A.; Asif, M.; Rauf, M.A.; Owais, M. Facile one-pot multicomponent synthesis and molecular docking studies of steroidal oxazole/thiazole derivatives with effective antimicrobial, antibiofilm and hemolytic properties. *Steroids*, **2018**, 134, 22-36.

<sup>26</sup> Bath, R.; Nicolle, C.; Cuciurean, I.S.; Simonsen, H.T. Biosynthesis and Industrial Production of Androsteroids. *Plants*, **2020**, 9, 1144.

de cáncer, y son clasificados dependiendo del mecanismo de acción farmacológica en agentes citotóxicos o en agentes antiproliferativos<sup>[27]</sup> (Esquema I.1).



**Esquema I.1:** Clasificación de los agentes anticancerígenos esteroidales.

Un gran número de estos compuestos, obtenidos mediante modificación química del esqueleto de precursores naturales, actúan como inhibidores específicos de enzimas relacionadas a la biosíntesis esteroideogénica (CYP19A1/aromatasa, sulfatasas, CYP17A1/17 $\alpha$ -hidroxilasa y 5 $\alpha$ -reductasa), las que han demostrado estar involucradas en procesos hiperproliferativos.<sup>[28]</sup> En la Figura I.4 se muestran algunos ejemplos, empleados en el tratamiento clínico de tumores esteroide-dependientes como el cáncer de mama, endometrial, hiperplasia prostática y cáncer avanzado de próstata, así como de otros desordenes hormonales.<sup>[29]</sup>

Por otra parte, como una alternativa a la terapia tradicional, en los últimos años se ha potenciado la conjugación de derivados esteroidales a otras moléculas de reconocida acción anticancerígena. Por ejemplo, se han estudiado híbridos esteroidales del Clorambucilo, Cisplatino y Elipticina, entre otros, en los que se ha observado que el fragmento citotóxico dicta el mecanismo de acción antitumoral, mientras la entidad esteroideal facilita la internalización celular del fármaco<sup>[30]</sup> (Figura I.5). Esto constituye

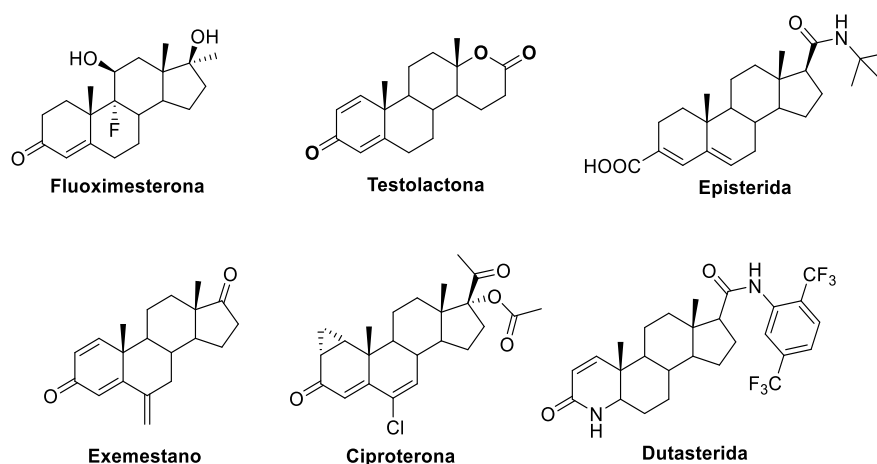
<sup>27</sup> Gupta, A.; Kumar, B.S.; Negi, A.S. Current Status on Development of Steroids as Anticancer Agents. *J. Steroid. Biochem. Mol. Bio.*, **2013**, 137, 242–270.

<sup>28</sup> Salvador, J.A.R.; Silva, M.M.C.; Luisa, M.S. Anticancer Steroids: Linking Natural and Semi-Synthetic Compounds. *Nat Prod Rep.* **2013**, 30, 324–374.

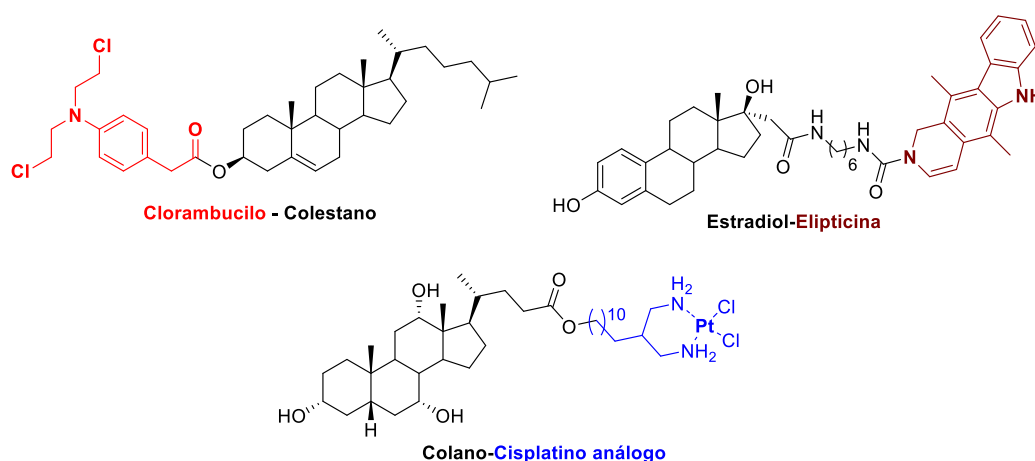
<sup>29</sup> Bansal, R.; Acharya, P.C. Man-Made Cytotoxic Steroids: Exemplary Agents for Cancer Therapy. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 6986–7005.

<sup>30</sup> Zolottsev, V.A.; Latysheva, A.S.; Pokrovsky, V.S.; Khan, I.I.; Misharin, A.Y. Promising applications of steroid conjugates for cancer research and treatment. *Eur. J. Med. Chem.*, **2021**, 210, 113089.

un resultado alentador a la hora de buscar moléculas con mayor especificidad farmacológica, menor toxicidad sistémica y para combatir los mecanismos de resistencia múltiple a fármacos que desarrollan las células cancerosas.



**Figura I.4:** Ejemplos de fármacos esteroidales empleados en la quimioterapia del cáncer.



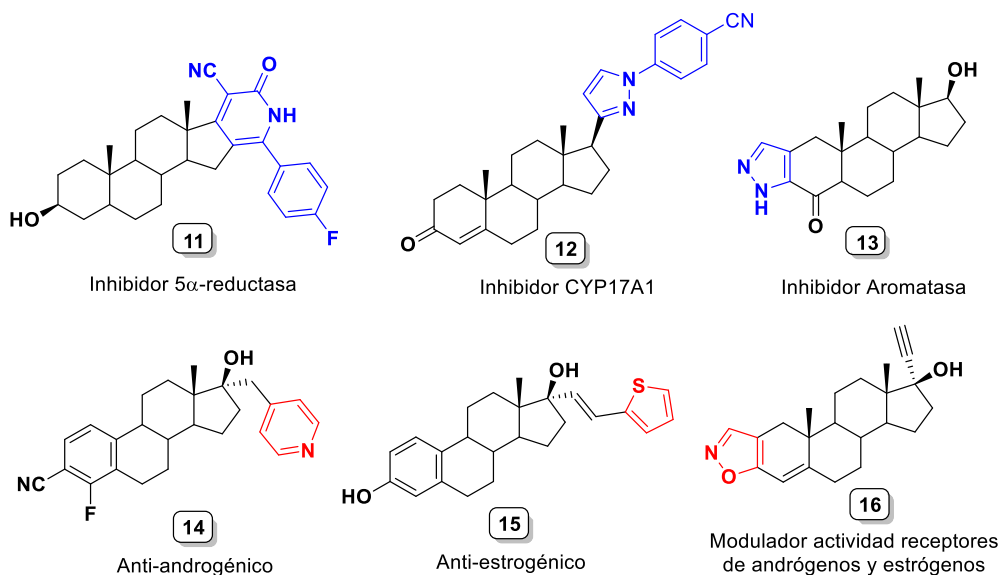
**Figura I.5:** Derivados esteroidales conjugados a agentes citotóxicos.

La obtención de sistemas híbridos heterociclo-esteroide también ha sido de intensa investigación desde finales del siglo XX.<sup>[31]</sup> Estudios realizados con este tipo de compuestos demuestran que la modificación del esqueleto esteroide, mediante la fusión o unión exocíclica de fragmentos heterocíclicos han dado lugar a conjugados con una amplia diversidad en sus mecanismos de acción farmacológica.<sup>[11]</sup>

En este sentido, derivados del estrano (**14**, **15**) y el androstano (**11** – **13**, **16**) con sustituyentes heterocíclicos en los anillos A o D del esqueleto esteroide constituyen candidatos potenciales para el diseño de fármacos en el tratamiento de enfermedades del

<sup>31</sup> Singh, H.; Jindal, D.P.; Yadav, M.R.; Kumar, M. 5 Heterosteroids and drug research. *Progress in medicinal chemistry*, Eds. G.P. Ellis, G.B. West, **1991** (28), p. 233-300.

tipo hormono-dependientes. En la Figura I.6 se muestran algunos ejemplos representativos, con actividad antiproliferativa frente a diferentes líneas celulares de cáncer de próstata y mama, actuando como inhibidores enzimáticos de la esteroidogénesis (**11 - 13**) o como moduladores de receptores hormonales (**14 - 16**).<sup>[28]</sup>



**Figura I.6:** Ejemplos de heteroesteroides con actividad antiproliferativa.

Recientemente Farhan y col., en un artículo publicado en 2021, exponen la diversidad de compuestos esteroidales conjugados a heterociclos de cinco y seis miembros que contienen N, O y S en sus estructuras, los cuales presentan una potente actividad citotóxica frente a tejidos neoplásicos de pulmón, colon y ovario; en algunos casos superior a la mostrada por el fármaco de referencia.<sup>[10]</sup> Sin embargo, aquellos derivados unidos por la posición 17 del esqueleto esteroideal a fragmentos de oxazol,<sup>[32]</sup> pirazol,<sup>[33]</sup> imidazol y triazol,<sup>[34]</sup> así como de piridina y análogos,<sup>[35]</sup> constituyen los más promisorios para el desarrollo de nuevos agentes en la terapia contra el cáncer de próstata, ya que inhiben el crecimiento de las células neoplásicas hasta nivel nanomolar.<sup>[11]</sup>

<sup>32</sup> Banday, A.H.; Giri, A.K.; Parveen, R.; Bashir, N. Design and synthesis of D-ring steroidal isoxazolines and oxazolines as potential antiproliferative agents against LNCaP, PC-3 and DU-145 cells. *Steroids*, **2014**, 87, 93–98.

<sup>33</sup> Li, J.; Zhao, X.; Li, L.; Yuan, Z.; Tan, F.; Shi, B.; Zhang, J. Design, synthesis and cytotoxic activity of a novel series of steroidal phenylpyrazoles. *Steroids*, **2016**, 107, 45–54.

<sup>34</sup> Silva-Ortiz, A.V.; Bratoeff, E.; Ramírez-Apan, M.T.; García-Becerra, R.; Ordaz-Rosado, D.; Noyola-Martínez, N.; Castillo-Bocanegra, R.; Barrera, D. Synthesis and biological activity of two pregnane derivatives with a triazole or imidazole ring at C-21. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2016**, 159, 8–18.

<sup>35</sup> a) Shi, Y.K.; Wang, B.; Shi, X.L.; Zhao, Y.D.; Yu, B.; Liu, H.M. Synthesis and biological evaluation of new steroidal pyridines as potential anti-prostate cancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 145, 11–22. b) Samanta, S., Ghosh, A.K., Ghosh, S.K., Iliina, A.A., Volkova, Y.A., Zavarzin, I.V., Scherbakov, A.M., Salnikova, D.I., Dzichenka, Y.U., Sachenko, A.B., Shirinian, V.Z., Hajra, A. Fe(III)-Catalyzed synthesis of steroidal imidazoheterocycles as potent antiproliferative agents. *Org. Biomol. Chem.*, **2020**, 18, 5571–5576.

### 1.1.2. Cáncer de próstata. Generalidades y tratamientos.

El cáncer de próstata es una neoplasia hormono-dependiente que constituye la segunda causa de muerte en el sexo masculino a nivel mundial, con un estimado de 330.000 casos nuevos cada año.<sup>[36]</sup> Como características de la enfermedad, se observa un incremento de los niveles del receptor de andrógenos en las células prostáticas, por lo que los andrógenos producidos a su vez estimulan la proliferación de las células cancerígenas e inician la progresión de los tumores malignos.<sup>[37]</sup> La mayoría de los andrógenos son sintetizados en los testículos y en las glándulas suprarrenales a partir de precursores tipo pregnano. Por lo tanto, los testículos son la fuente primaria de producción de testosterona en los hombres y contribuyen al 90–95 % de los andrógenos que circulan en el organismo.<sup>[38]</sup>

La terapia de privación de andrógenos (ADT, por sus siglas en inglés) es una estrategia utilizada desde que se descubrió la relación del cáncer de próstata y la testosterona. Esta se basa en métodos quirúrgicos o químicos como la castración o la luteinización mediante la liberación de hormonas antagonistas, para inducir apoptosis (muerte celular programada) en las células cancerosas de la próstata.<sup>[39]</sup> La ADT usualmente reduce en un 90 % la cantidad de testosterona en el suero sanguíneo.<sup>[40]</sup> Sin embargo, estos métodos tienen baja efectividad porque no afectan la biosíntesis de andrógenos en las glándulas suprarrenales,<sup>[41]</sup> las que son responsables de los niveles remanentes de andrógenos que son convertidos a testosterona y dihidrotestosterona en pacientes con resistencia a la castración (CRPC, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, estos pacientes manifiestan los síntomas de la enfermedad, a pesar de la ADT.<sup>[42]</sup>

<sup>36</sup> Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2020. *CA Cancer. J. Clin.* **2020**, *70*, 7–30.

<sup>37</sup> Lunardi, A.; Ala, U.; Epping, M. T.; Salmena, L.; Clohessy, J.G.; Webster, K.A.; Wang, G.; Mazzucchelli, R.; Bianconi, M.; Stack, E.C.; et al. A Co-Clinical Approach Identifies Mechanisms and Potential Therapies for Androgen Deprivation Resistance in Prostate Cancer. *Nat. Publ. Gr.* **2013**, *45*, 747–755.

<sup>38</sup> Denis, L. J.; Griffiths, K. Endocrine Treatment in Prostate Cancer. *Semin. Surg. Oncol.* **2000**, *18*, 52–74.

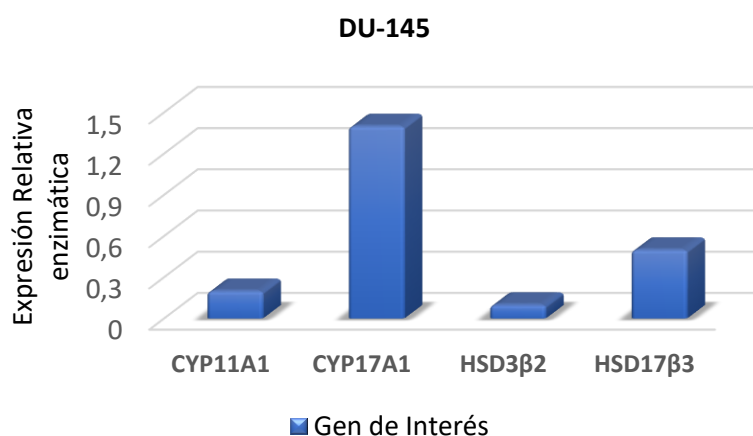
<sup>39</sup> Chatterjee, B. The role of the Androgen Receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol. Cell. Biochem.* **2003**, *253*, 89–101.

<sup>40</sup> Labrie, F.; Cusan, L.; Luis, J.; Martel, C.; Bérubé, R.; Bélanger, P.; Bélanger, A.; Vandenput, L.; Mellström, D.; Ohlsson, C. Comparable amounts of sex steroids are made outside the gonads in men and women: strong lesson for hormone therapy of prostate and breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *113*, 52–56.

<sup>41</sup> Aragon-ching, J.B.; Dahut, W.L. Novel Androgen Deprivation Therapy (ADT) in the treatment of advanced prostate cancer. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* **2011**, *7*, 31–35.

<sup>42</sup> Vasaitis, T.S.; Bruno, R.D.; Njar, V.C.O. CYP17 inhibitors for prostate cancer therapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *125*, 23–31.

Investigaciones llevadas a cabo por Bennett y cols.<sup>[43]</sup> demostraron que las líneas celulares tumorales, como la denominada DU-145, son capaces de sintetizar grandes cantidades de testosterona y dihidrotestosterona endógenas a partir del colesterol. Esto se debe a que en estos tumores existe una sobreexpresión (aumento de la biosíntesis de proteínas) de CYP11A1, CYP17A1, HSD3 $\beta$ 2, y HSD17 $\beta$ 3, enzimas relacionadas con la biosíntesis de esteroides. En la Figura I.7 se muestra que CYP17A1 presenta la mayor expresión, por lo que al estar involucrada en la producción de andrógenos ocurre una elevada acumulación de estos, derivando en una rápida progresión de la enfermedad. Este es el motivo por el cual la inhibición de la biosíntesis de andrógenos es la opción más acertada en CRPC.<sup>[44]</sup>



**Figura I.7.** Expresión relativa de las enzimas responsables de la biosíntesis de esteroides en la línea celular DU-145.

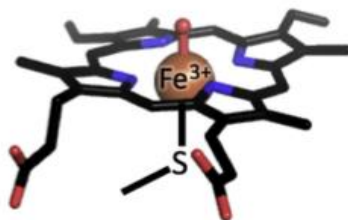
#### 1.1.2.1.- Citocromo P450 17A1 (CYP17A1). Desarrollo de inhibidores.

El citocromo humano microsomal P450 17A1 (17 $\alpha$ -hidroxilasa, 17,20-liasa) pertenece a una súper familia de citocromos P450 que contienen un grupo Hemo prostético en el sitio activo, donde el hierro está coordinado por un enlace axial a un sulfuro proveniente de un residuo de cisteína y especies de oxígeno necesarias para la actividad catalítica (Figura I.8).<sup>[45]</sup>

<sup>43</sup> Bennett, N. C.; Hooper, J. D.; Lambie, D.; Lee, C. S.; Yang, T.; Vesey, D. A.; Samaratunga, H.; Johnson, D. W.; Gobe, G. C. Evidence for steroidogenic potential in human prostate cell lines and tissues. *Am. J. Pathol.* **2012**, 181, 1078–1087.

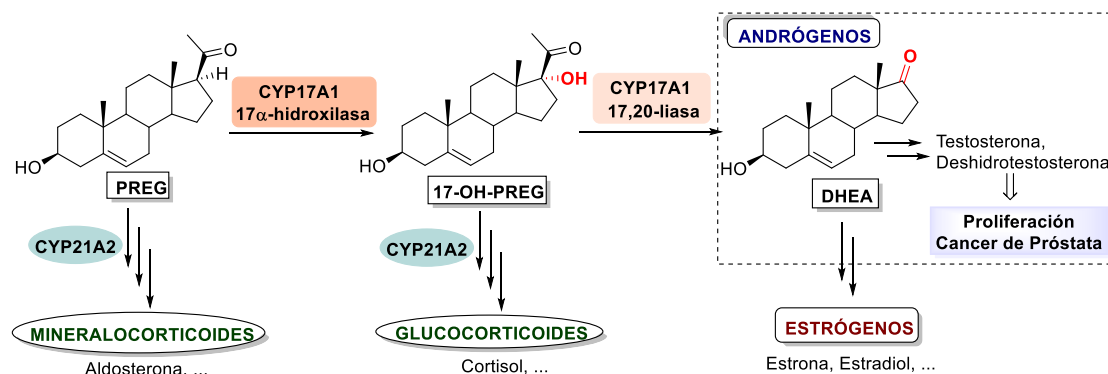
<sup>44</sup> Njar, V.C.; Brodie, A.M.H. Inhibitors of 17  $\alpha$ -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17): potential agents for the treatment of prostate cancer. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, 5, 163–180.

<sup>45</sup> Yadav, R.; Petrunak, E.M.; Estrada, D.F.; Scott, E.E. Structural insights into the function of steroidogenic cytochrome P450 17A1. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2017**, 441, 68–75.



**Figura I.8.** Representación del sitio catalítico del citocromo P450 17A1.

Esta enzima tiene un papel crítico en el metabolismo de esteroides y participa en dos reacciones. La actividad  $17\alpha$ -hidroxilasa es requerida para convertir a la pregnenolona (PREG) en el producto  $17\alpha$ -hidroxi-pregnenolona ( $17\alpha$ -OH-PREG), precursor de los mineralocorticoides; mientras la actividad  $17,20$ -liasa sobre  $17\alpha$ -OH-PREG produce dehidroepiandrosterona (DHEA). Este esteroide constituye el precursor de todos los andrógenos y las hormonas sexuales (Esquema I.2).<sup>[46]</sup> La actividad  $17,20$ -liasa determina el mecanismo que seguirá el sustrato ( $17$ -OH-PREG), ya sea hacia la producción de hormonas sexuales masculinas (testosterona y sus metabolitos), relacionadas con la proliferación del cáncer de próstata, o a la formación de glucocorticoides en varias reacciones, donde la primera etapa está catalizada por la enzima CYP21A2.<sup>[47]</sup>



**Esquema I.2.** Funciones esteroidogénicas de la CYP17A1 en la corteza suprarrenal humana.

Hasta la fecha, varios de los medicamentos empleados en el tratamiento clínico de tumores esteroide-dependientes, actúan principalmente como inhibidores de la CYP17A1.<sup>[48]</sup> Sin embargo, también presentan una elevada afinidad por otros citocromos

<sup>46</sup> Devore, N.M.; Scott, E.E. Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs Abiraterone and TOK-001. *Nature* **2012**, 482, 116–119.

<sup>47</sup> Akhtar, M.K; Kelly, S.L.; Kaderbhai, M.A. Cytochrome b<sub>5</sub> Modulation of  $17\alpha$ -hydroxylase and  $17,20$ -lyase (CYP17) activities in steroidogenesis. *J. Endocrinol.* **2005**, 187, 267–274.

<sup>48</sup> Wróbel, T.M.; Rogova, O.; Andersen, K.L.; Yadav, R.; Brixius-Anderko, S.; Scott, E.E.; Olsen, L.; Jørgensen, F.S.; Björkling, F. Discovery of novel non-steroidal cytochrome P450 17A1 inhibitors as potential prostate cancer agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 4868.

involucrados en la esteroidogénesis, como por ejemplo CYP21A2, lo que afecta los niveles de glucocorticoides y la aparición consigo de efectos secundarios indeseables.

Los inhibidores de CYP17A1 son clasificados en esteroidales y no esteroidales. Como característica general todos presentan en sus estructuras, al menos un fragmento heterocíclico nitrogenado, responsable de la interacción con el hierro del grupo Hemo, y de esta forma el bloqueo del sitio catalítico donde se producen las reacciones metabólicas 17 $\alpha$ -hidroxilasa y 17,20-liasa. En estos compuestos las interacciones N-Fe tienen un 80% de carácter van der Waals, dando lugar a complejos enzima-inhibidor más estables.<sup>[42]</sup>

Como ejemplos de inhibidores de tipo no esteroidal se encuentran el Ketoconazol, reconocido fármaco antimicótico,<sup>[49]</sup> así como los compuestos *S*-orteronel **17**,<sup>[50]</sup> *S*-serviteronel **18**<sup>[51]</sup> y BMS-351 (**19**)<sup>[52]</sup> (Figura I.9), los que poseen una mayor selectividad en la inhibición de la actividad 17,20-liasa frente a la 17 $\alpha$ -hidroxilasa.<sup>[53]</sup>

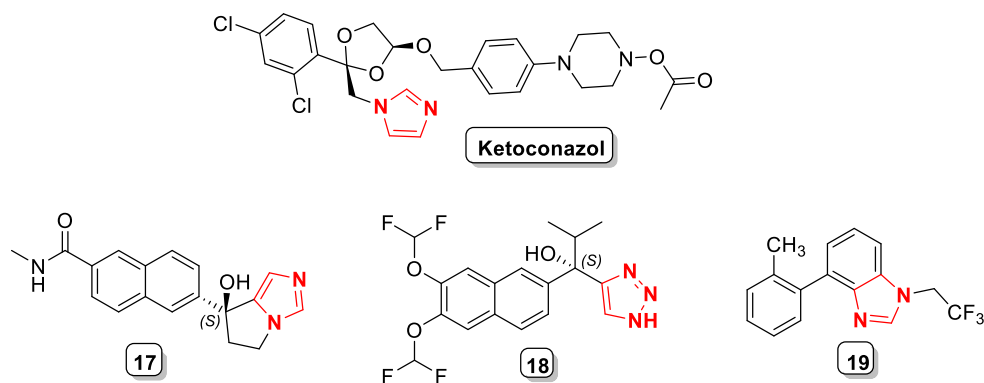


Figura I.9. Ejemplos de inhibidores no-esteroidales de CYP17A1.

Por otra parte, los inhibidores esteroidales son compuestos donde el fragmento esteroidal presenta una estructura similar a los sustratos naturales de la enzima, pero han sido modificados químicamente para introducir un sistema heterocíclico en la posición 17 del anillo D. De esta manera se generan derivados híbridos con un fragmento polar

<sup>49</sup> Kunio, N.; Isamu, M.; Ryoyu, T.; Katsuko, S.; Masayuki, K. Effect of ketoconazole, etomidate and other inhibitors of steroidogenesis on cytochrome P-450c17a catalyzed reactions. *J. Steroid. Biochem.* **1987**, *28*, 333-336.

<sup>50</sup> Yamaoka, M.; Hara, T.; Hitaka, T.; Kaku, T.; Takeuchi, T.; Takahashi, J.; Asahi, S.; Miki, H.; Tasaka, A.; Kusaka, M. Orteronel (TAK-700), a novel non-steroidal 17,20-lyase inhibitor: Effects on steroid synthesis in human and monkey adrenal cells and serum steroid levels in cynomolgus monkeys. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *129*, 115-128.

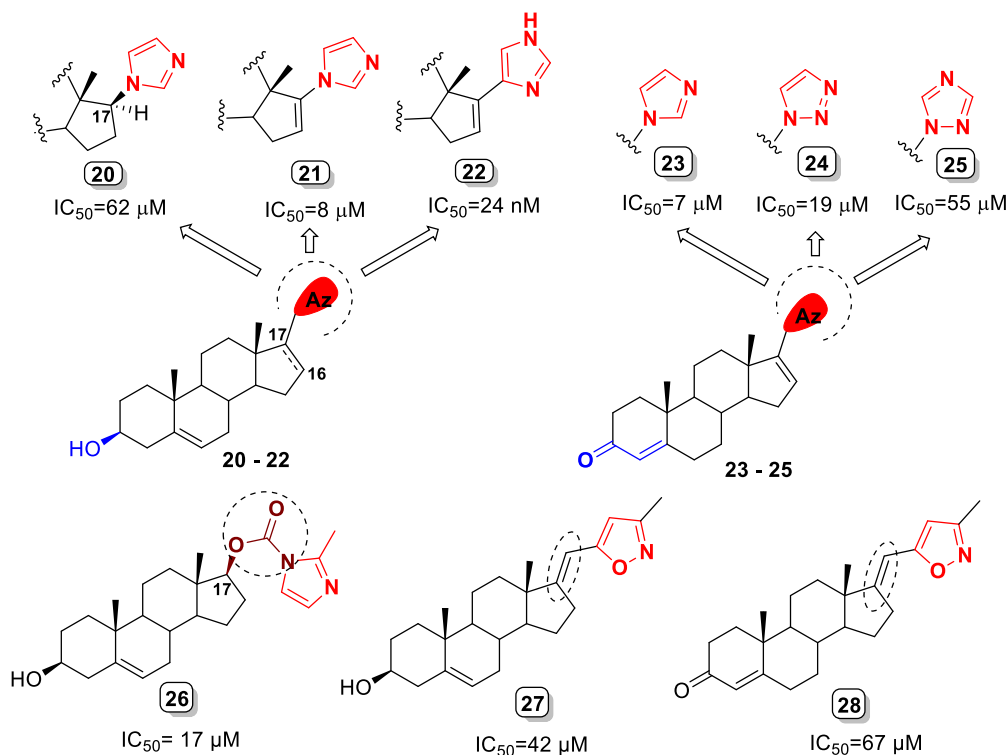
<sup>51</sup> Rafferty, S.W.; Eisner, J.R.; Moore, W.R.; Schotzinger, R.J.; Hoekstra, W.J. Highly-selective 4-(1,2,3-triazole)-based P450c17a 17,20-lyase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2444-2447.

<sup>52</sup> Huang, A.; Jayaraman, L.; Fura, A.; Vite, G.D.; Trainor, G.L.; Gottardis, M.M.; Spires, T.E.; Spires, V.M.; Rizzo, C.A.; Obermeier, M.; et al. Discovery of the selective CYP17A1 lyase inhibitor BMS-351 for the treatment of prostate cancer. *ACS Med. Chem.* **2016**, *7*, 40-45.

<sup>53</sup> Petrunak, E.M.; Rogers, S.A.; Aubé, J.; Scott, E.E. Structural and Functional Evaluation of Clinically Relevant Inhibitors of Steroidogenic Cytochrome P450 17A1. *Drug Metab. Dispos.* **2017**, *45*, 635-645.

(*N*-heterocíclico) capaz de interactuar con el centro metálico, y un fragmento apolar con una mayor afinidad por la cavidad hidrofóbica de CYP17A1.<sup>[54]</sup>

Algunos ejemplos de inhibidores del tipo heterociclo-esteroide son mostrados en la Figura I.10, junto a sus respectivos valores de IC<sub>50</sub>.



**Figura I.10.** Ejemplos inhibidores esteroidales de CYP17A1 y sus valores de IC<sub>50</sub>.

Es de señalar, que la potencia mostrada por estos compuestos depende del ensayo realizado. Los autores generalmente incluyen a inhibidores conocidos en sus estudios, para así poder establecer una comparación fiable de los resultados obtenidos.<sup>[28]</sup> Entre los primeros inhibidores descritos en la literatura científica destacan los conjugados esteroide-azoles (**20 – 25**).<sup>[55]</sup> Fueron desarrollados a finales del siglo XX, y el estudio de su actividad antiproliferativa permitió establecer los requerimientos estructurales para inhibir a CYP17A1. De estas investigaciones se determinó que los fragmentos provenientes de la pregnenolona (**20 - 22**) o la progesterona (**23 - 25**) pueden ser más o menos activos, en dependencia del sistema heterocíclico enlazado al anillo D esteroideal.

<sup>54</sup> Zhao, L.; Sun, N.; Tian, L.; Zhao, S.; Sun, B.; Sun, Y.; Zhao, D. Strategies for the development of highly selective cytochrome P450 Inhibitors : several CYP targets in current research. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2019**, *29*, 2016–2024.

<sup>55</sup> a) Ling, Y.; Li, J.; Liu, Y.; Kato, K.; Klus, G.T.; Brodie, A. 17-imidazolyl, pyrazolyl, and isoxazolyl androstene derivatives. Novel steroidal inhibitors of human cytochrome C17,20-lyase (P450 17α). *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3297–3304. b) Njar, V.C.O.; Kato, K.; Nnane, I.P.; Grigoryev, D.N.; Long, B.J.; Brodie, A.M.H. Novel 17-azolyl steroids, potent inhibitors of human cytochrome prostate cancer. *J. Med. Chem.* **1998**, *2623*, 902–912.

Un requerimiento estructural importante es el doble enlace C16-C17 presente en el esqueleto esteroide, ya que se observó un aumento considerable de la potencia inhibitoria en los derivados  $\Delta^{16-17}$ -(1*H*-imidazolil)-androstano como **21** ( $IC_{50} = 8 \mu M$ ), respecto a los híbridos  $17\beta$ -(1*H*-imidazolil)-androstano como **20** ( $IC_{50} = 62 \mu M$ ). En general, todos presentaron valores de  $IC_{50}$  inferiores al valor determinado para el ketoconazol ( $IC_{50} = 78 \mu M$ ) utilizado como referencia; siendo **22** el de mayor actividad inhibitoria ( $IC_{50} = 24 nM$ ).<sup>[44]</sup>

Estos primeros resultados constituyeron la base para el desarrollo de nuevos inhibidores esteroideogénicos durante las siguientes dos décadas, muchos de ellos con una elevada actividad antiproliferativa frente a varias líneas tumorales. También, se han obtenido conjugados donde el fragmento esteroide y el heterociclo se encuentran unidos por C17 a través de espaciadores o “linkers”. Como ejemplos, el carbamato esteroide **26**<sup>[56]</sup> y los derivados heteroarilideno **27** y **28**<sup>[57]</sup> (Figura I.10), los cuales mostraron su capacidad de suprimir la actividad de CYP17A1 y de inhibir el crecimiento de células LNCaP y PC-3 asociadas a carcinoma de próstata.

Dentro del gran número de inhibidores obtenidos hasta la fecha con potencial efecto anticancerígeno, destacan la Abiraterona **29** y la Galeterona **30**, ver Figura I.11.<sup>[46]</sup> El primero es el único derivado esteroide aprobado por la FDA en 2011 para el tratamiento clínico del cáncer de próstata, con un notable impacto en los estudios posteriores de nuevos agentes hormonales;<sup>[58]</sup> mientras el segundo es un candidato a fármaco avanzado que ha llegado a ensayos clínicos Fase III y posee tres mecanismos de acción antiproliferativa: inhibición de CYP17A1, antagonista de los receptores de andrógeno e inducción de la degradación de los receptores de andrógeno.<sup>[59]</sup>

A pesar de que la inhibición de la enzima CYP17A1 ha sido clínicamente eficaz, el tratamiento con los fármacos actualmente en uso provoca con frecuencia en los pacientes

---

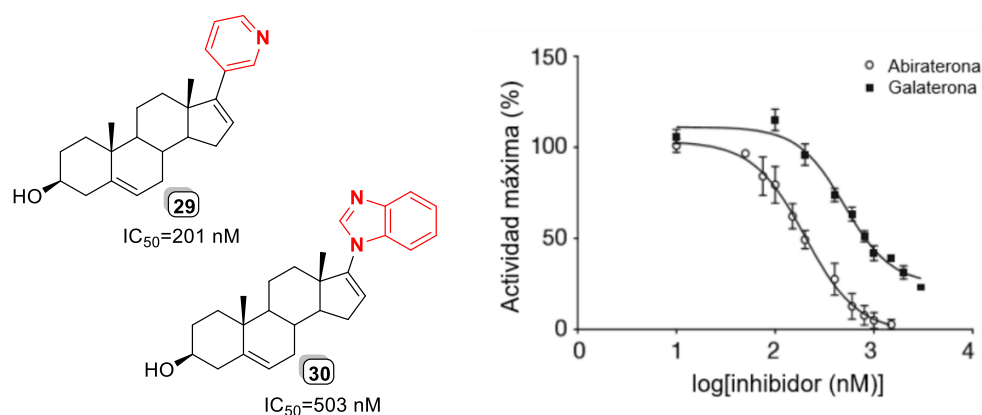
<sup>56</sup> Moreira, V. M. A.; Vasaitis, T. S.; Guo, Z.; Njar, V. C. O.; Salvador, J. A. R. Synthesis of Novel C17 Steroidal Carbamates. Studies on CYP17 Action, Androgen Receptor Binding and Function, and Prostate Cancer Cell Growth. *Steroids* **2008**, *73*, 1217–1227.

<sup>57</sup> Dalidovich, T. S.; Hurski, A. L.; Morozevich, G. E.; Latysheva, S.; Sushko, T. A.; Strushkevich, N. V.; Gilep, A. A.; Misharin, A. Y.; Zhabinskii, V. N.; Khripach, V. A. New Azole Derivatives of [17(20)E]-21-Norpregnene: Synthesis and Inhibition of Prostate Carcinoma Cell Growth. *Steroids* **2019**, *147*, 10–18.

<sup>58</sup> Bono, J. S. De; Logothetis, C. J.; Molina, A.; Fizazi, K.; North, S.; Chu, L.; Chi, K. N.; Jones, R. J.; Goodman, O. B.; Saad, F.; et al. Abiraterone and Increased Survival in Metastatic Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 1995–2005.

<sup>59</sup> Njar, V. C. O.; Brodie, A. M. H. Discovery and Development of Galeterone (TOK-001 or VN/124-1) for the Treatment of All Stages of Prostate Cancer. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2077–2087.

efectos secundarios graves como hipertensión, hipocalcemia y edemas.<sup>[60]</sup> Estos efectos adversos han sido atribuidos a la inhibición dual de la abiraterona **29**, la galeterona **30** y el *S*-orteronel **17** sobre CYP21A2, enzima responsable de la biosíntesis de mineralocorticoides y glucocorticoides<sup>[61]</sup> (ver Esquema I.3). Según datos de 2017<sup>[62]</sup> estos compuestos presentan una baja selectividad hacia CYP17A1, como se observa en la Tabla I.1. Además, se conoce que la abiraterona también bloquea la actividad de otras enzimas encargadas del metabolismo de medicamentos como CYP2D6, CYP3A4 y CYP3A5, pero su acción específica no ha sido esclarecida aún.<sup>[61]</sup>



**Figura I.11.** Actividad inhibitoria comparativa de **29** y **30** sobre CYP17A1.

**Tabla I.1.** Valores de IC<sub>50</sub> para inhibidores de CYP17A1 y su factor de selectividad frente a CYP21A2.<sup>[62]</sup>

Inhibidores	CYP17A1 IC <sub>50</sub> (nM)	CYP21A2 IC <sub>50</sub> (nM)	Factor de selectividad 17A1/21A2
<i>S</i> -orteronel <b>17</b>	4730	4870	1
Abiraterona <b>29</b>	130	296	2.3
Galeterona <b>30</b>	282	248	0.9

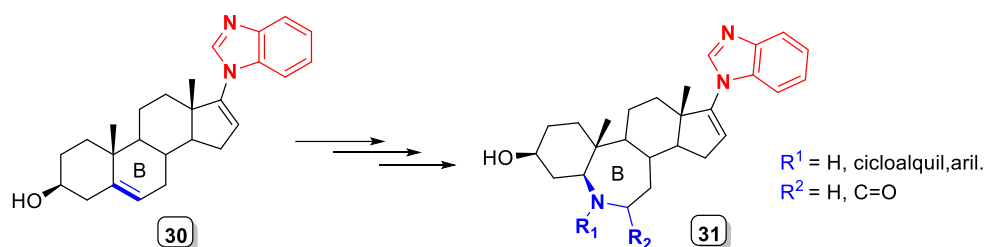
A pesar de estos inconvenientes, han surgido alternativas para desarrollar nuevos análogos de estos fármacos, con mayor selectividad. En este sentido, Aube y cols.<sup>[62]</sup> han patentado la obtención de varios compuestos como análogos de la Abiraterona y la Galeterona, mediante la introducción de modificaciones en el anillo B del fragmento

<sup>60</sup> Attard, G.; Reid, A.H.M.; Auchus, R.J.; Hughes, B.A.; Cassidy, A.M.; Thompson, E.; Oommen, N.B.; Folkard, E.; Dowsett, M.; Arlt, W.; et al. Clinical and biochemical consequences of CYP17A1 inhibition with Abiraterone given with and without exogenous glucocorticoids in castrate men with advanced prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 507–516.

<sup>61</sup> Malikova, J.; Brixius-Anderko, S.; Udhane, S.S.; Parween, S.; Dick, B.; Bernhardt, R.; Pandey, A.V. CYP17A1 inhibitor Abiraterone, an anti-prostate cancer drug, also inhibits the 21-hydroxylase activity of CYP21A2. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *174*, 192–200.

<sup>62</sup> Aube, J.; Scott, E.E.; Fehl, C. Inhibitors of CYP17A1. *U.S. Pat. Appl. Publ.* US009611270b2, **2017**.

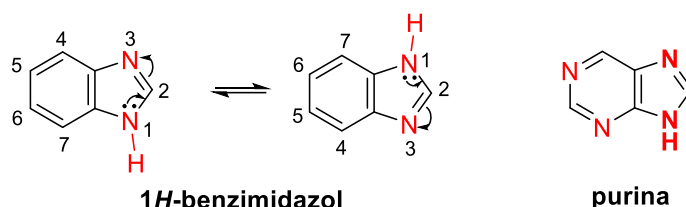
esteroidal. Entre ellos destacan los híbridos del tipo benzimidazol-esteroide **31** (Esquema I.3), los que mostraron un incremento en la selectividad de inhibición a CYP17A1 entre 5 - 50 veces respecto a la que presenta su precursor **30**.



**Esquema I.3.** Obtención de inhibidores análogos de la Galeterona mediante modificación del anillo B del fragmento esteroidal.

### 1.1.3. Benzimidazoles. Aspectos estructurales e importancia biológica.

El 1*H*-benzimidazol y sus derivados son compuestos formados por la fusión entre un anillo bencénico y un anillo de imidazol. Presentan una estructura plana, con un sistema de orbitales p paralelos y solapados que cumplen con la regla de Hückel ( $4n+2$ ), siendo clasificados como heterociclos aromáticos.<sup>[63]</sup> En disolución pueden encontrarse como una mezcla de tautómeros (Esquema I.4), y debido a su semejanza estructural con la purina exhiben un amplio rango de actividad biológica, interactuando con varias macromoléculas y receptores. Por ello, este núcleo heterocíclico multifuncional constituye un importante farmacóforo para la química médica actual.<sup>[64]</sup>



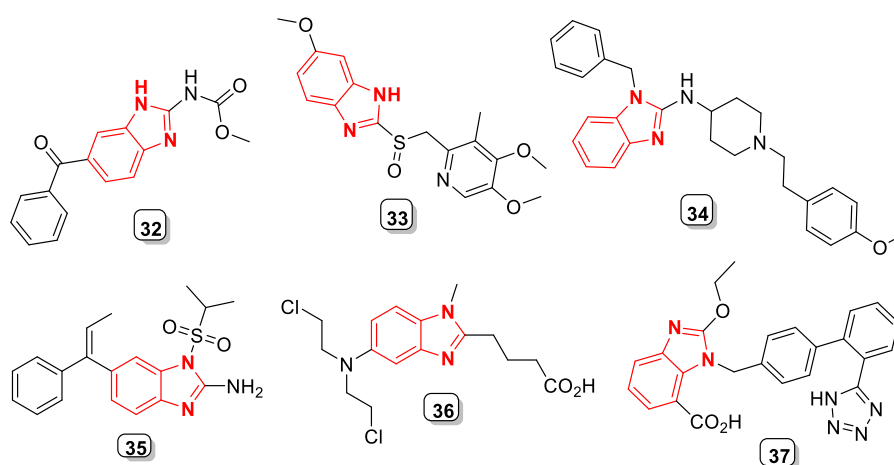
**Esquema I.4** Sistema de numeración y tautomerismo de 1*H*-benzimidazol, y semejanza estructural con la purina.

El 1*H*-benzimidazol ha sido catalogado como estructura privilegiada en la síntesis de potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de numerosas enfermedades. Algunos de los fármacos comerciales en los que se encuentra presente esta entidad molecular son: antihelmínticos (Mebendazol **32**), inhibidores de la bomba de protones (Omeprazol **33**), antihistamínicos (Astemizol **34**), antivirales (Enviradina **35**),

<sup>63</sup> Solomons, T.W.G. *Organic Chemistry 10th Ed*; John Wiley & Sons, Ed.; **2011**, pp 1064-1073.

<sup>64</sup> Tahlan, S.; Kumar, S.; Narasimhan, B. Pharmacological significance of heterocyclic 1*H*-benzimidazole scaffolds: a review. *BMC Chem.* **2019**, 13: 101.

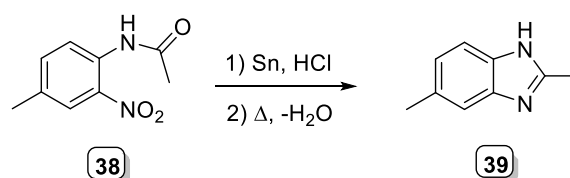
anticancerígenos (Bendamustina **36**), y antihipertensivos (Candesartan **37**); los que constituyen ejemplos del amplio espectro de actividad biológica que poseen sus derivados más conocidos (Figura I.12).<sup>[65]</sup>



**Figura I.12.** Ejemplos de fármacos que presentan el núcleo benzimidazol.

### 1.1.3.1. Metodologías de síntesis de derivados 1*H*-benzimidazol-2-sustituidos.

Debido al prominente rol que juega el benzimidazol como fragmento estructural clave en la generación de compuestos bioactivos, se han descrito variadas metodologías para su síntesis. La primera se remonta al año 1872, donde se obtiene el 2,5-dimetil-1*H*-benzimidazol **39** por reducción y posterior deshidratación de la 2-nitro-4-metilacetanilida **38**, ver Esquema I.5.<sup>[66]</sup>



**Esquema I.5.** Síntesis del 2,5-dimetil-1*H*-benzimidazol primer benzimidazol obtenido.

La mayoría de los métodos actuales de síntesis de estas moléculas involucran la reacción de 1,2-diaminas aromáticas o sus derivados *N*-sustituidos con diferentes compuestos: ésteres, anhídridos, amidas, cloruros de ácidos, aldehídos y cetonas, entre otros; donde los ácidos carboxílicos y los aldehídos son los sustratos más utilizados.<sup>[67]</sup>

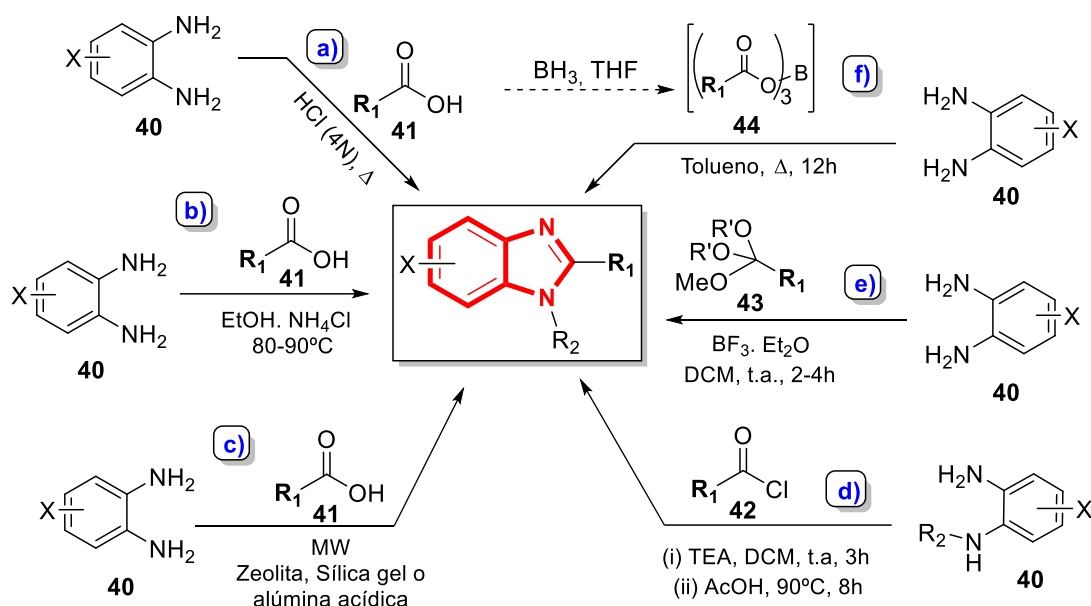
<sup>65</sup> Bansal, Y.; Silakari, O. The therapeutic journey of benzimidazoles: a review. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 6208–6236.

<sup>66</sup> Hobrecker, F. Ueber reductionsprodukte der nitracetamidverbindungen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1872**, 5(2), 920-924.

<sup>67</sup> Alaqeel, S.I. Synthetic approaches to benzimidazoles from o-phenylenediamine: a literature review. *J. Saudi Chem. Soc.* **2017**, 21, 229–237.

Algunos ejemplos, entre la gran variedad de rutas sintéticas reportadas, se muestran en los Esquema I.6 y I.7, con rendimientos de reacción entre 60 y 90 % de manera general.

Cuando la reacción se realiza entre *o*-fenilendiaminas **40** y ácidos carboxílicos **41** [Esquema I.6, **a**), **b**) y **c**)]<sup>[67]</sup> o alguno de sus derivados [cloruros de ácidos **42 d**),<sup>[68]</sup> ortoésteres **43 e**),<sup>[69]</sup> triaciloxiborano **44** generado *in situ* **f**)],<sup>[70]</sup> esta procede mediante un mecanismo de formación de amida y posterior ciclocondensación. Para ello, son necesarias condiciones drásticas como altas temperaturas o el uso de ácidos minerales y agentes que favorezcan el proceso de deshidratación (zeolita, alúmina acida o sílica gel).



**Esquema I.6.** Ejemplos de metodologías para la obtención de benzimidazoles 2-sustituídos a partir de ácidos carboxílicos y sus derivados.

En los casos que se utilizan aldehídos como precursores (ver Esquema I.7) se requieren condiciones oxidantes para dar lugar a la formación del compuesto final. Este proceso involucra la ciclodeshidrogenación de las bases de Schiff que se generan como intermedios a partir de la condensación de aldehídos **45** con *o*-fenilendiaminas **40**.<sup>[67]</sup> La oxidación puede ser realizada por el dióxígeno del aire **g**),<sup>[71]</sup> aunque otros agentes no También han sido investigados catalizadores metálicos en esta reacciones, como por

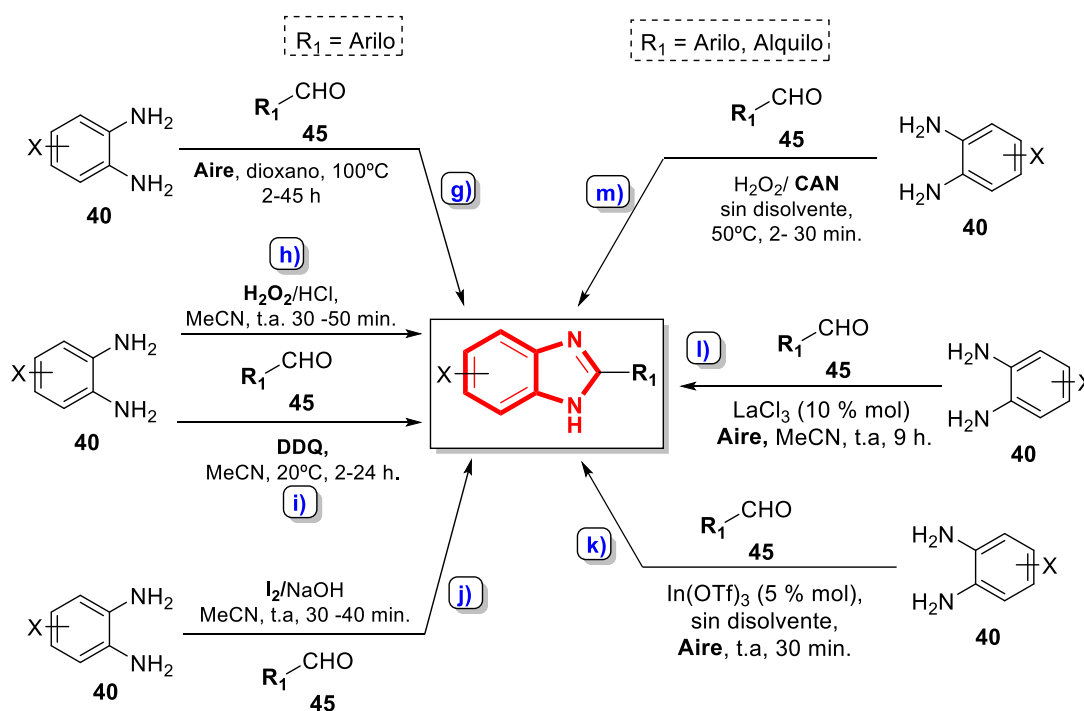
<sup>68</sup> Gowda, N.R.T.; Kavitha, C.V.; Chiruvella, K.K.; Joy, O.; Rangappa, K.S.; Raghavan, S.C. Synthesis and biological evaluation of novel 1-(4-methoxyphenethyl)-1H-benzimidazole-5-carboxylic acid derivatives and their precursors as antileukemic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4594-4600.

<sup>69</sup> Bastug, G.; Eviolitte, C.; Markó, I.E. Functionalized orthoesters as powerful building blocks for the efficient preparation of heteroaromatic bicycles. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3502-3505.

<sup>70</sup> Cui, W.; Kargbo, R.B.; Sajjadi-Hashemi, Z.; Ahmed, F.; Gauuan, J.F. Efficient one-pot synthesis of 2-substituted benzimidazoles from triacyloxyborane intermediates. *Synlett* **2012**, *23*, 247-250.

<sup>71</sup> Lin, S.; Yang, L. A simple and efficient procedure for the synthesis of benzimidazoles using air as the oxidant. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 4315-4319.

metálicos empleados con frecuencia son  $\text{H}_2\text{O}_2$  **h**),<sup>[72]</sup> Oxone,<sup>[73]</sup> 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ) **i**),<sup>[74]</sup>  $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ <sup>[75]</sup> y  $\text{I}_2/\text{NaOH}$  **j**).<sup>[76]</sup> ejemplo  $\text{In}(\text{OTf})_3$  **k**),<sup>[77]</sup>  $\text{LaCl}_3$  **l**),<sup>[78]</sup>  $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ ,<sup>[79]</sup>  $\text{Co}(\text{OH})_2$ <sup>[80]</sup> y nitrato cérico amónico (CAN) **m**),<sup>[81]</sup> entre otros.



**Esquema I.7.** Ejemplos de metodologías para la obtención de benzimidazoles 2-sustituídos a partir de aldehídos.

En la mayoría de las síntesis publicadas de benzimidazoles 2-sustituídos, los aldehídos aromáticos son los reactivos más estudiados, limitándose a escasos ejemplos

<sup>72</sup> Bahrami, K.; Khodaei, M.M.; Kavianinia, I. A simple and efficient one-pot synthesis of 2-substituted benzimidazoles. *Synthesis* **2007**, 4, 547–550.

<sup>73</sup> Beaulieu, A.; Haché, B.; Moos, E.Von. A Practical Oxone®-Mediated, High-Throughput, Solution-Phase Synthesis of Benzimidazoles from 1,2-Phenylenediamines and Aldehydes and Its Application to Preparative Scale Synthesis. *Synthesis*. **2003**, 11, 1683–1692.

<sup>74</sup> Jacques, J.; Eynde, V.; Delfosse, F.; Lor, P.; Van Haverbeke, Y. 2,3-Dichloro-5,6-Dicyano-1,4-Benzoquinone, a Mild Catalyst for the Formation of Carbon-Nitrogen Bonds. *Tetrahedron*, **1995**, 51, 5813–5818.

<sup>75</sup> Du, L-H.; Wang, Y. A Rapid and Efficient Synthesis of Benzimidazoles Using Hypervalent Iodine as Oxidant. *Synthesis*. **2007**, 5, 675–678.

<sup>76</sup> Naeimi, H.; Alishahi, N. Efficient, rapid and one pot synthesis of 2-substituted benzimidazoles using the  $\text{NaOH}/\text{I}_2$  system as an oxidant under mild conditions. *J. Chem. Res.* **2013**, 37, 208-209.

<sup>77</sup> Trivedi, R.; De, S. K.; Gibbs, R. A. A Convenient One-Pot Synthesis of 2-Substituted Benzimidazoles. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2006**, 245, 8–11.

<sup>78</sup> Venkateswarlu, Y.; Kumar, S. R.; Leelavathi, P. Facile and Efficient One-Pot Synthesis of Benzimidazoles Using Lanthanum Chloride. *Org. Med. Chem. Lett.* **2013**, 3, 7.

<sup>79</sup> Srinivasulu, R.; Kumar, K. R.; Veera, P.; Satyanarayana, V. Facile and Efficient Method for Synthesis of Benzimidazole Derivatives Catalyzed by Zinc Triflate. *Green Sustain. Chem.* **2014**, 4, 33–37.

<sup>80</sup> Chari, M. A.; Mossa, Z-A.; Shobha, D.; Malayalama, S. Synthesis of multifunctionalised 2-substituted benzimidazoles using copper (II) hydroxide as efficient solid catalyst. *Int. J. Org. Chem.* **2013**, 4, 243-250.

<sup>81</sup> Bahrami, K.; Khodaei, M.M.; Naali, F. Mild and highly efficient method for the synthesis of 2-arylbenzimidazoles and 2-arylbenzothiazoles. *J Org Chem.* **2008**, 73, 6835-6837.

para aldehídos alifáticos de cadena corta.<sup>[77, 80]</sup> A pesar de que estas metodologías, en general, puedan considerarse como eficientes, su principal desventaja radica en el empleo de reactivos corrosivos y caros; además de su baja aplicabilidad a sustratos alifáticos.

Por otra parte, el hexanitrito-*O-O*-cerato(IV) de amonio (Figura I.13) nombrado comúnmente como nitrato cérico amónico (CAN), ha emergido como un reactivo versátil y útil para una gran variedad de transformaciones sintéticas en química orgánica, como reacciones de oxidación, ciclización-oxidativa, nitración, foto-oxidación, desprotección y polimerización.<sup>[82]</sup>

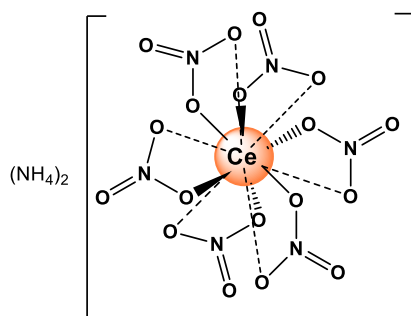


Figura I.13. Estructura del CAN.

El cerio tiene propiedades únicas entre los lantánidos, que le permiten participar en reacciones donde ocurre la transferencia de un electrón. Esto se debe a su capacidad de existir en dos estados estables  $\text{Ce}^{\text{III}}$  ( $[\text{Xe}]4f^1$ ) y  $\text{Ce}^{\text{IV}}$  ( $[\text{Xe}]4f^0$ ). Además, este metal tiene un elevado potencial de reducción de 1.61 V, lo que lo convierte en un excelente agente oxidante en comparación con otros cationes metálicos.<sup>[83]</sup> Por lo tanto, acorde a estas propiedades, el CAN puede funcionar como catalizador en tres condiciones diferentes: *i*) al generar un radical y especies catión-radical debido a la reducción  $\text{Ce}^{\text{IV}}/\text{Ce}^{\text{III}}$ . (mecanismo propuesto con mayor frecuencia), *ii*) como ácido de Brønsted por la generación de protones provenientes de la hidrólisis de los aniones nitrato coordinados al cerio, y *iii*) como ácido de Lewis debido a la coordinación con el cerio. Es por esto que tiene un papel importante como mediador en la formación de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo (N, S, Se, Cl); y en la síntesis de compuestos heterocíclicos ha probado su aplicabilidad desde hace varias décadas.<sup>[84]</sup>

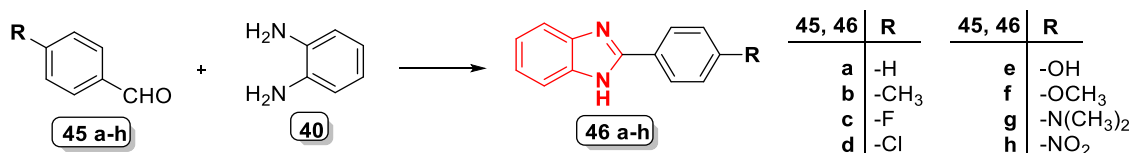
<sup>82</sup> Sridharan, V.; Menéndez, J.C. Cerium(IV) ammonium nitrate as a catalyst in organic synthesis. *Chem Rev.* **2010**, 110, 3805-3849.

<sup>83</sup> Nair, V.; Mathew, J.; Radhakrishnan, K.V. Facile synthesis of dihydrofurans by the Cerium (IV) Ammonium Nitrate mediated oxidative addition of 1,3-dicarbonyl compounds to cyclic and acyclic alkenes. Relative superiority over the manganese (III) acetate mediated process. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1995**, 3, 187-188.

<sup>84</sup> Prajapati, N.; Vekariya, R.; Patel, H. Ceric Ammonium Nitrate (CAN)-catalyzed multicomponent reactions: an efficient catalyst for Green Organic Synthesis. *Synth. Commun.* **2015**, 45, 2399-2425.

En la obtención de benzimidazoles, el CAN también ha demostrado su eficiencia como catalizador, reportándose algunas metodologías desarrolladas para la síntesis de derivados 2-aryl sustituidos (**46 a-h**), a partir de *o*-fenilendiamina **40** y varios benzaldehídos **45 a-h**, ver Tabla I.2. Cuando la reacción se lleva a cabo a reflujo de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se emplea el CAN al 50 % mol, los productos son generados en corto tiempo con rendimientos moderados de 65 – 78 % (entrada 1).<sup>[85]</sup> Resultados similares obtuvieron Sadek y cols.,<sup>[86]</sup> utilizando una baja proporción del catalizador (10 % mol) y MeOH como disolvente, pero después de 12 hora de reacción a temperatura ambiente (entrada 2). Como alternativa de metodologías más eficientes y sostenibles, Kidwai y cols.<sup>[87]</sup> reportan el empleo del polietilenglicol (PEG), un disolvente reutilizable y de bajo impacto ambiental. En este caso, los rendimientos fueron superiores (90 – 98 %), y se requirió muy poca cantidad de CAN (ver entrada 3).

**Tabla I.2.** Ejemplos de metodologías donde el CAN participa como catalizador en la síntesis de benzimidazoles.



Entrada	Condiciones de reacción	Tiempo	Rendimiento
<b>1</b>	CAN (50% mol), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , reflujo	45 - 50 min	65 - 78 %
<b>2</b>	CAN (10% mol), MeOH, t.a.	12 h	55 - 82 %
<b>3</b>	CAN (5 % mol), PEG, 50°C	1.5 - 3 h	90 - 98 %

Recientemente, el Grupo de Investigación de Compuestos de Interés Biológico (GICIB) de la Universidad de Jaén (UJA) se ha publicado un artículo donde se describe el uso del CAN como mediador en la síntesis de un novedoso conjugado benzimidazol-pirimidina **49**, (ver Esquema I.8).<sup>[88]</sup> Para ello, la diamina *N*-sustituida **47**, obtenida previamente a partir de fuentes comerciales, es transformada en la imina **48**. Este

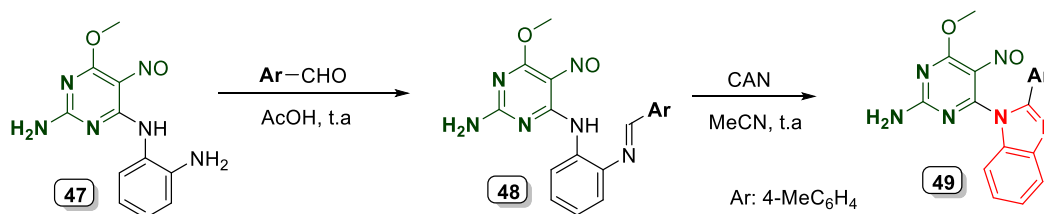
<sup>85</sup> Kumar, R.; Joshi, Y.C. Mild and Efficient One Pot Synthesis of Imidazolines and Benzimidazoles from Aldehydes. *E- J. Chem.* **2007**, *4*, 606–610.

<sup>86</sup> Sadek, K.U.; Al-Qalaf, F.; Mekheimer, R.A.; Elnagdi, M.H. Cerium (IV) ammonium nitrate-mediated reactions: simple route to benzimidazole derivatives. *Arab. J. Chem.* **2012**, *5*, 63–66.

<sup>87</sup> Kidwai, M.; Jahan, A.; Bhatnagar, D. Polyethylene glycol: A recyclable solvent system for the synthesis of benzimidazole derivatives using CAN as catalyst. *J. Chem. Sci.* **2010**, *122*, 607–612.

<sup>88</sup> Cobo, J.; Vicentes, D.E.; Rodríguez, R.; Marchal, A.; Glidewell, C. A concise synthesis of a highly substituted 6-(1*H*-benzimidazol-1-yl)-5-nitroso-pyrimidin-2-amine: synthetic sequence and the molecular and supra-molecular structures of one product and two intermediates. *Acta Cryst.* **2018**, *C74*, 696–702.

intermediario experimenta finalmente una ciclización oxidativa intramolecular, proceso que ocurre rápidamente a temperatura ambiente en acetonitrilo cuando se hace reaccionar con dos equivalentes de CAN, aislándose la correspondiente 4-metoxi-6-[2-(4-metilfenil)-1*H*-benzimidazol-1-il]-5-nitrosopirimidin-2-amina (**49**) en un 42 % de rendimiento.



**Esquema I.8.** Síntesis conjugado benzimidazol-pirimidina empleando CAN como catalizador

El CAN presenta otras ventajas que lo hacen atractivo en síntesis orgánica, como son: baja toxicidad, soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, estable al aire y de fácil manipulación.<sup>[82]</sup> Teniendo esto en consideración, constituye un reactivo alternativo a los caros e higroscópicos triflatos y sales de lantánido, empleados como catalizadores en la obtención de benzimidazoles. Entre los disolventes más estudiados y aplicados en la síntesis de estos heterociclos nitrogenados catalizada por CAN resalta el metanol, debido a que en este medio se obtienen los mejores rendimientos en comparación con agua, acetona y cloroformo. También se obtienen altos rendimientos en etanol, acetonitrilo y tolueno, pero los tiempos de reacción generalmente son superiores a cuando se utiliza metanol.<sup>[84]</sup>

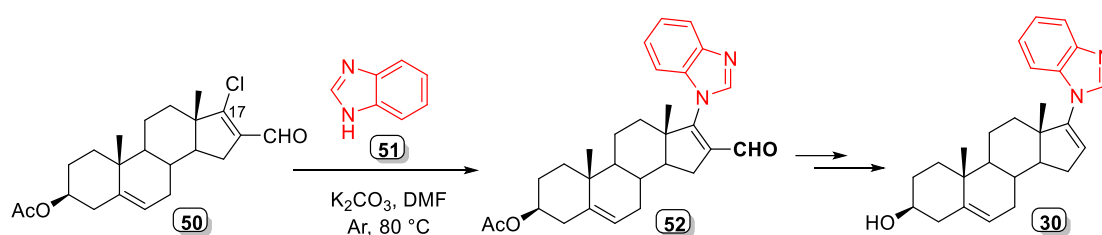
Es importante señalar que en los experimentos en los que participan aldehídos aromáticos, las reacciones en atmósfera de nitrógeno no proceden o se obtienen muy bajos rendimientos. Este hecho indica que la presencia de dióxígeno es importante en la formación del producto.<sup>[82]</sup>

### 1.1.3.2. Síntesis de híbridos benzimidazol-esteroide.

Las metodologías de síntesis de benzimidazoles a partir de aldehídos con diaminas arílicas han sido desarrolladas fundamentalmente para sustratos aromáticos, siendo menos empleados los aldehídos alifáticos. Como fue planteado en el Epígrafe 1.1.1, el esqueleto esteroideal puede ser funcionalizado en diversas posiciones para su posterior acoplamiento con otros farmacóforos. La formación de los híbridos benzimidazol-esteroide puede ocurrir a través de dos estrategias: *i*) conjugación de los fragmentos

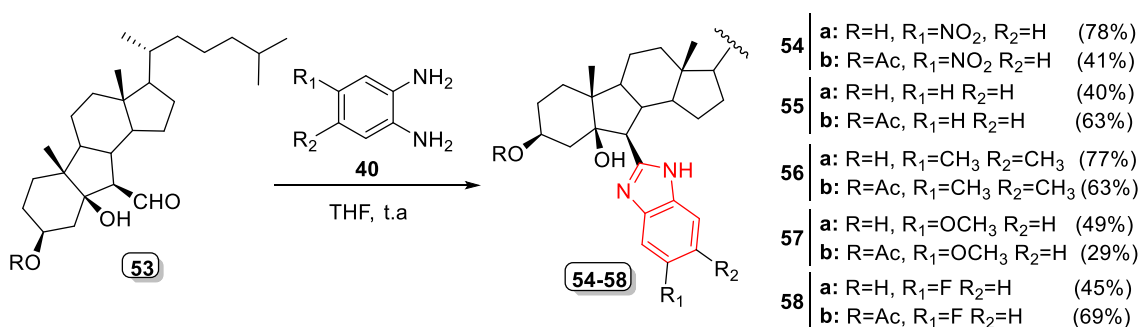
moleculares individuales de forma directa o mediante un espaciador (“linker”) y, *ii*) por generación de la estructura heterocíclica durante la reacción.

Como ejemplo de la primera estrategia, se encuentra la síntesis de la Galeterona **30** desarrollada por Handratta y cols.<sup>[89]</sup> (ver Esquema I.9). Para ello, se hace reaccionar el derivado 17-cloro-16-formil esteroide **50** en condiciones básicas con el 1*H*-benzimidazol **51**, ocurriendo una sustitución nucleofílica sobre la posición 17 del esqueleto esteroideal. El compuesto **52** obtenido es sometido a transformaciones de desformilación e hidrólisis para dar lugar a **30**, constituyendo una ruta alternativa para la síntesis de este importante fármaco y sus análogos.



**Esquema I.9.** Ruta de síntesis de la Galeterona **30** a partir del  $\beta$ -cloro-vinil-aldehído **50**.

Por otra parte, el benzimidazol también ha sido enlazado covalentemente al anillo B de los esteroides, formando derivados de B-norcolesteril-benzimidazol. Para ello, el fragmento heterocíclico es generado por reacción del aldehído esteroideal **53** con diferentes diaminas aromáticas sustituidas **40** en THF, asilándose los conjugados **54** – **58** con rendimientos de 29 – 78 % y tiempos de reacción de 8 – 24 h (Esquema I.10).<sup>[90]</sup>



**Esquema I.10.** Síntesis de híbridos B-norcolesteril-benzimidazol **54-58**.

<sup>89</sup> Handratta, V.D.; Vasaitis, T.S.; Njar, V.C.O.; Gediya, L.K.; Kataria, R.; Chopra, P.; Newman, D.; Farquhar, R.; Guo, Z.; Qiu, Y.; Brodie, A.M.H. Novel C-17-Heteroaryl Steroidal CYP17-Inhibitors/Antiandrogens: Synthesis, In Vitro Biological Activity, Pharmacokinetics, and Antitumor Activity in the LAPC4 Human Prostate Cancer Xenograft Model. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2972–2984.

<sup>90</sup> Cui, J.; Qi, B.; Gan, C.; Liu, Z.; Huang, H.; Lin, Q.; Zhao, D.; Huang, Y. Synthesis and in vitro antiproliferative evaluation of some B-Norcholesteryl Benzimidazole and Benzothiazole derivatives. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 2488–2504.

Sin embargo, cuando las diaminas reactivas presentan grupos con un fuerte efecto electroceptor (ejemplo: 2,3-diaminopiridina y 4-trifluorometil-1,2-diaminobenceno), no se forman los correspondientes benzimidazoles en las condiciones de reacción evaluadas, sino que se aislaron la imina **59** y la isoxazolidina **60**, respectivamente (ver Figura I.14).

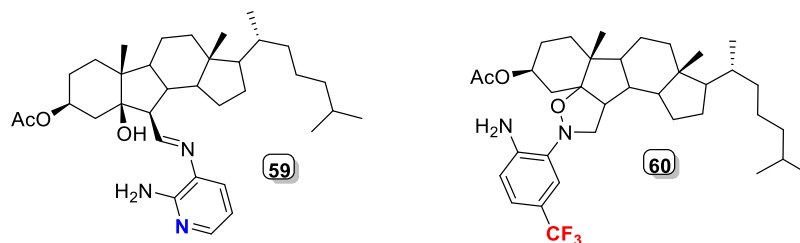
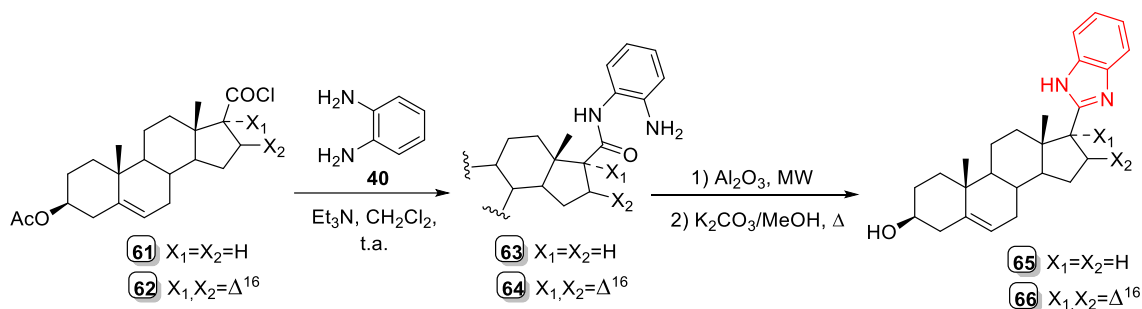


Figura I.14. Estructura de la imina **59** y la isoxazolidina esteroideal **60**.

La obtención de derivados 17-(1*H*-benzimidazol-2'-il)-esteroide, reportado por Latysheva y col. en 2020 es el trabajo más reciente sobre este tipo de compuestos.<sup>[91]</sup> Como se muestra en el Esquema I.11, la síntesis se realiza a partir de la condensación de cloruros de ácido esteroidales **61** y **62** con *o*-fenilendiamina **40** y Et<sub>3</sub>N como catalizador, para formar las amidas **63** y **64**. Estos intermediarios experimentan posteriormente un proceso de ciclación mediado por Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> bajo irradiación MW. Una vez formado los correspondientes benzimidazoles, se lleva a cabo la hidrólisis del grupo acetato en C3 y así obtener los derivados hidroxilados **65** y **66**, con un rendimiento global de 67% y 64% respectivamente.



Esquema I.11. Ruta para la síntesis de híbridos 1*H*-benzimidazol-esteroide **65** y **66**.

Como se evidencia a lo largo del epígrafe, el desarrollo de metodologías basadas en la utilización de catalizadores metálicos como ácidos de Lewis y agentes oxidantes en la obtención de benzimidazoles a partir de aldehídos esteroidales, son poco frecuentes. Por otra parte, el uso de estos catalizadores en otros sustratos alifáticos muestra varias

<sup>91</sup> Latysheva, A.S.; Zolottsev, V.A.; Veselovsky, A.V.; Scherbakov, K.A.; Morozevich, G.E.; Pokrovsky, V.S.; Novikov, R.A.; Timofeev, V.P.; Tkachev, Y.V.; Misharin, A.Y. New Steroidal Oxazolines, Benzoxazoles and Benzimidazoles Related to Abiraterone and Galeterone. *Steroids* **2020**, 153, 108534.

desventajas como son: largos tiempos de reacción, condiciones de altas temperaturas y productos con bajos rendimientos.

#### 1.1.4. Diseño de fármacos a partir de herramientas computacionales

El proceso de investigación y desarrollo de un fármaco está dominado por el costo total de su descubrimiento, lo que suele ser un procedimiento extremadamente caro, valorado en aproximadamente 2870 millones USD según datos de 2016.<sup>[92]</sup> Un gran número de los fármacos hoy disponibles en el mercado fueron desarrollados a partir de determinar su actividad usando técnicas de cribado (*Screening* en inglés) convencionales. Sin embargo, el porcentaje de éxitos de esta metodología se estima inferior a 1 por cada 10 000 compuestos sintetizados.<sup>[93]</sup>

La práctica actual, denominada cribado de alto rendimiento (*HTS* por sus siglas en inglés) se basa en ensayar cientos de miles de compuestos al día para buscar actividad contra una diana molecular específica; mientras que los métodos computacionales se basan en simular los resultados de los experimentos de HTS, proceso referido como Cribado Virtual (en inglés *Virtual Screening*). El Cribado Virtual es un término general para los métodos computacionales que ensayan bases de datos de candidatos a fármacos virtuales para identificar compuestos prometedores.<sup>[94]</sup>

Las principales ventajas de los métodos computacionales de cribado virtual en comparación con los métodos experimentales son:

- Bajo costo, debido a que no se compran o sintetizan compuestos.
- Es posible investigar compuestos que no han sido sintetizados.
- Pueden reducir el número inicial de compuestos a ensayar por los métodos HTS.
- Mayor amplitud en la búsqueda dentro del espacio químico. El número de moléculas virtuales disponibles es mucho mayor que el número de compuestos que actualmente están disponibles para HTS.

En general, el proceso de Cribado Virtual está dirigido a incrementar la probabilidad de sintetizar un fármaco activo, y se basa en encontrar correlaciones entre la estructura química de una serie de compuestos y su actividad biológica mediante métodos

---

<sup>92</sup> Dimasi, J.A.; Grabowski, H.G.; Hansen, R.W. Innovation in the Pharmaceutical Industry: New Estimates of R&D Costs. *J. Health Econ.* **2016**, *47*, 20–33.

<sup>93</sup> Surabhi, S.; Singh, B. Computer aided drug design: an overview. *JDDT* **2018**, *8*, 504-509.

<sup>94</sup> De Souza Neto, L.R.; Moreira-Filho, J.T.; Neves, B.J.; Maidana, R.L.B.R.; Guimarães, A.C.R.; Furnham, N.; Andrade, C.H.; Silva, F.P. In silico Strategies to Support Fragment-to-Lead Optimization in Drug Discovery. *Front. Chem.* **2020**, *8*:93.

computacionales. En los métodos de modelación molecular, se consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones y son importantes, entre otros, el análisis conformacional, la mecánica cuántica, los campos de fuerzas, la termodinámica estadística, y los gráficos moleculares interactivos. Este método nos permite estudiar la interacción entre ligandos (posibles fármacos) y receptores macromoleculares.<sup>[95]</sup> Dentro de este último grupo están las técnicas de Anclaje Molecular y Dinámica Molecular, entre otras.

#### **1.1.4.1. Diseño racional de inhibidores de CYP17A1**

Hasta el año 2010, el Ketoconazol era el único inhibidor del CYP17A1 aprobado para el tratamiento clínico de la enfermedad, a pesar de su elevada toxicidad. En ese momento el acetato de Abiraterona, la Galeterona y el S-orterone se encontraban en ensayos clínicos. Al no existir información estructural de complejos de CYP17A1, el diseño de nuevos inhibidores se realizaba principalmente a partir de modificaciones sobre los sustratos naturales de la enzima.<sup>[42]</sup>

Solo con la elucidación de la estructura 3D de la CYP17A1, a partir del complejo formado de la proteína con la Abiraterona y Galeterona, reportada en la revista *Nature* en 2012,<sup>[46]</sup> fue posible el estudio de inhibidores de esta enzima basándose en herramientas computacionales como el Anclaje Molecular<sup>[96]</sup> y la Dinámica Molecular,<sup>[97]</sup> o una combinación de ambas.<sup>[91]</sup> Estos trabajos permitieron estudiar las interacciones en el sitio catalítico de CYP17A1 y CYP21A2, y por tanto, mejorar el diseño racional en la búsqueda de inhibidores más selectivos.

---

<sup>95</sup> Langridge, R.; Ferrin, T.E.; Kui, I.D.; Conno, M.L. Real-Time Color Graphics in Studies of Molecular Interactions. *Science* **1981**, 211, 661–666.

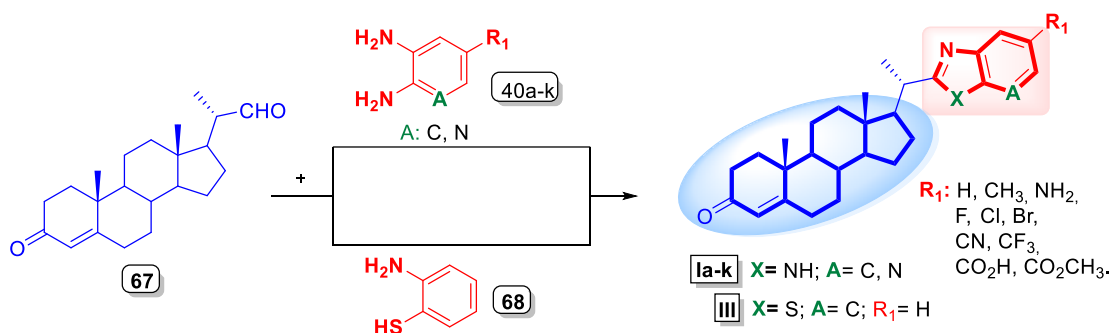
<sup>96</sup> Fehl, C.; Vogt, C.D.; Yadav, R.; Li, K.; Scott, E.E.; Aubé, J. Structure-Based Design of Inhibitors with Improved Selectivity for Steroidogenic Cytochrome P450 17A1 over Cytochrome P450 21A2. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 4946–4960.

<sup>97</sup> Xiao, F.; Yang, M.; Xu, Y.; Vongsangnak, W. Comparisons of Prostate Cancer Inhibitors Abiraterone and TOK-001 Binding with CYP17A1 through Molecular Dynamics. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2015**, 13, 520–527.

## 1.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento del cáncer de próstata continúa siendo un reto de investigación actual. En particular, el estudio de híbridos heterociclo-esteroide resulta un tema de interés, debido al amplio espectro de actividad biológica que presentan algunos fragmentos heterocíclicos que lo conforman, al potencial sintético que se deriva de su obtención y a sus propiedades como inhibidores de la enzima CYP17A1, que constituye la diana molecular más estudiada para el tratamiento de esta neoplasia, como fue reflejado en los Antecedentes.

En este sentido, para dar cumplimiento a los objetivos trazados, se diseñaron 12 híbridos benzazol-esteroide (HBE) (**Ia-k**, **III**) como análogos estructurales de la Abiraterona **29** y la Galeterona **30**. Se utilizó como precursor esteroideal el (20S)-3-oxo-4-pregnen-20-carboxaldehído (**67**), que se hace reaccionar con diferentes diaminas aromáticas **40a-k** y *o*-aminotiofenol **68**, para generar heterociclos conjugados de manera exocíclica a la cadena lateral del esqueleto esteroideal (ver Esquema I.12).



**Esquema I.12.** Metodología general de síntesis de los híbridos benzazol-esteroide (Serie 1).

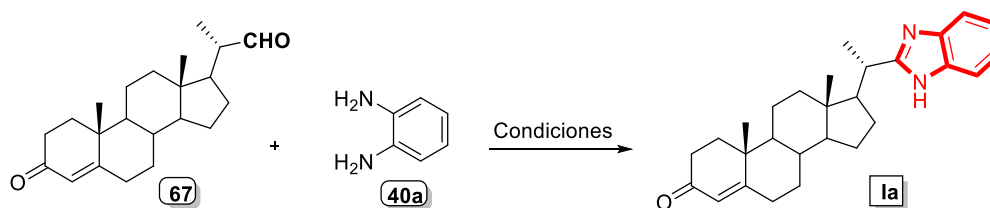
Para predecir la potencial actividad de los híbridos obtenidos como inhibidores selectivos de la enzima CYP17A1, se utilizaron herramientas computacionales de Anclaje (*Docking*) y Dinámica Moleculares.

A continuación, se relacionan los aspectos más significativos de cada uno de los procesos de síntesis utilizados, así como la caracterización estructural de los compuestos obtenidos a partir del análisis de los datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC, y espectrometría de masas. Además, se discuten los resultados más relevantes de la predicción de la actividad inhibitoria *in silico*.

### 1.2.1. Síntesis de los híbridos (benzazol-2'-il)-esteroide. (Serie 1)

Para llevar a cabo la obtención de los conjugados diseñados, se realizó un estudio preliminar, donde se evaluaron diferentes condiciones de reacción. Se utilizaron para todos los experimentos como reaccionantes el aldehído esteroide **67** y la *o*-fenilendiamina **40a**, mezclándose en cantidades equivalentes. En algunos casos, se observó la formación de una turbidez amarilla en la disolución, que desaparece con el avance de la reacción, lo que puede corresponder a la formación de la imina esteroide intermediaria. Esta posteriormente fue aislada, caracterizada e identificada como **II** (ver Parte Experimental y Anexo 2). Una vez finalizada la reacción, las mezclas se vertieron sobre agua fría. El precipitado formado, se filtra y seguidamente se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (en gradiente creciente de polaridad de 2:1 a 1:1). Después de rotoevaporar el disolvente se obtiene el compuesto **Ia** como un sólido amorfo. En la Tabla I.3 se relacionan cada uno de los experimentos realizados, así como los rendimientos obtenidos.

**Tabla I.3.** Estudio de las condiciones de reacción entre aldehído **67** y *o*-fenilendiamina **40a**.



Entrada	Condiciones de reacción	Temp.	Tiempo	Rendimiento
1	Cu(OTf) <sub>2</sub> (5 % mol), DMF, aire	t.a	45 min.	50 %
2	Oxone <sup>[a]</sup> (65 % mol), DMF-H <sub>2</sub> O (30:1)	t.a	1.5 h	53 %
3	DMF-H <sub>2</sub> O (9:1), aire	80° C	24 h	85 %
4	<b>CAN (10 %), MeOH, O<sub>2</sub>(g)</b>	<b>t.a</b>	<b>14 h</b>	<b>90 %</b>
5	CAN (10 %), MeOH, aire	t.a	15 h	62 %
6	CAN (5 %), MeOH, O <sub>2</sub> (g)	t.a	16 h	78 %
7	<b>CAN (5 %), MeOH, O<sub>2</sub>(g)</b>	<b>60° C</b>	<b>6 h</b>	<b>90 %</b>

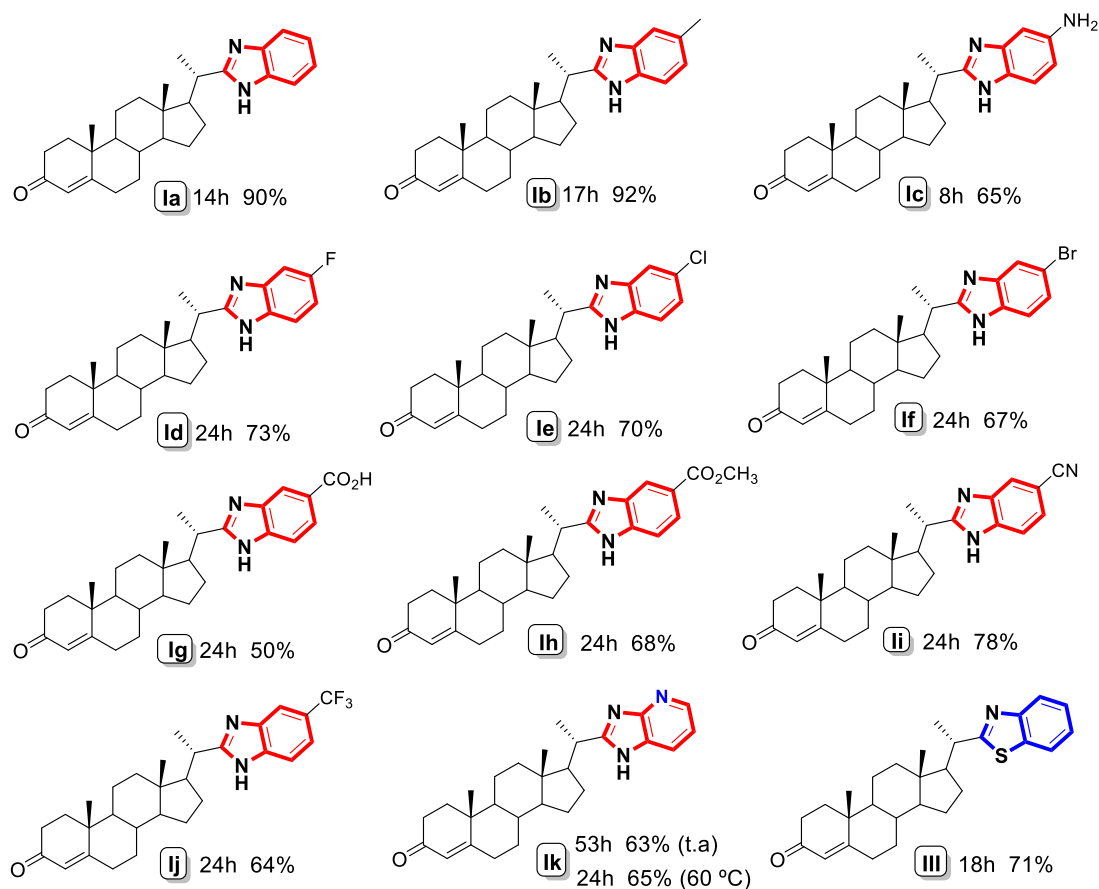
<sup>[a]</sup> Oxone<sup>®</sup>: nombre comercial del peroximonosulfato de potasio (KHSO<sub>5</sub>).

De la Tabla I.3 se observa que los mejores resultados se obtienen con el empleo del CAN en cantidades catalíticas y en condiciones aeróbicas (entradas 4 y 7), con altos rendimientos (90 %), teniendo en consideración la menor reactividad que presentan los aldehídos alifáticos en comparación con los aldehídos aromáticos frente al ataque nucleofílico de *o*-fenilendiaminas.<sup>[85,86]</sup>

Si se comparan las condiciones utilizadas en las entradas 4 y 5, se observa que al emplear una atmósfera de O<sub>2</sub> en lugar de aire se favorece el proceso de deshidrogenación y, por tanto, la formación del producto deseado en mayor rendimiento. Por otra parte, al comparar los resultados de las entradas 6 y 7 se observa que el aumento de temperatura disminuye el tiempo de reacción y se incrementa el rendimiento del producto **Ia**.

La literatura reporta<sup>[87]</sup> que el CAN puede oxidar el aldehído esteroide de partida. Sin embargo, en estos experimentos no se detectó el producto de su oxidación ya que esta reacción sólo se favorece a altas temperaturas.

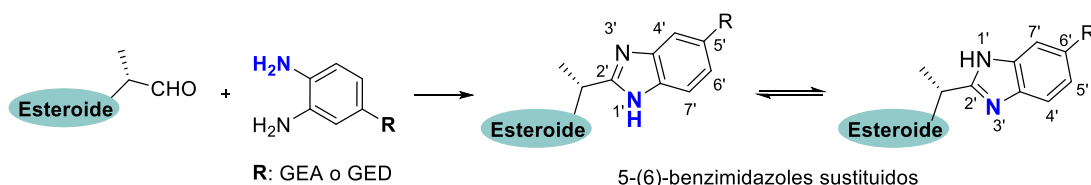
Por tanto, se seleccionaron las condiciones de la entrada 4 como metodología general para la síntesis de los compuestos de interés, debido a que puede ser aplicable a otros aldehídos o diaminas sensibles al aumento de la temperatura. En la Figura I.15 se muestran los híbridos benzazol-esteroide obtenidos (**Ia-k** y **III**) a partir de diaminas aromáticas sustituidas y *o*-aminotiofenol, con rendimientos de 50 – 90 %, y tiempos de reacción entre 8 y 53 horas.



**Figura I.15.** Conjugados obtenidos (1'*H*-benzimidazol-2'-il)-esteroide **Ia-j**, (1'*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2'-il)-esteroide **Ik** y (benzotiazol-2'-il)-esteroide **III**.

Estos resultados están estrechamente relacionados con la capacidad nucleofílica de los grupos  $\text{NH}_2$  de las *o*-fenilendiaminas y los efectos electrónicos que ejercen los sustituyentes en el anillo aromático o heteroaromático. Todos los sustituyentes se encuentran en posición *meta* respecto a uno de los grupos amino y en *para* respecto al otro. Como el efecto inductivo es de corto alcance y se transmite a través de los electrones  $\sigma$ , su influencia es menor en estas posiciones. Por lo tanto, el efecto mesomérico tendrá mayor influencia en la densidad electrónica del anillo aromático, y por consiguiente de los grupos aminos.

En términos generales, los sustituyentes electrodonores (GED) tendrán una influencia positiva en la reactividad, aumentando la nucleofilicidad del grupo  $-\text{NH}_2$  en posición *para*; mientras que los sustituyentes electroceptores (GEA) disminuirán la nucleofilia de dicho grupo, sin afectar significativamente a los grupos *meta*- $\text{NH}_2$ . En ambas situaciones, el grupo carbaldehído del compuesto **67** será atacado primeramente por el grupo amino más activado para generar el intermedio imínico correspondiente, que sufre a continuación el ataque del segundo  $-\text{NH}_2$ , en la obtención de los híbridos **Ia-k**. Sin embargo, este orden no es relevante para el resultado regioquímico de la reacción, debido al equilibrio tautomérico presente en el benzimidazol formado (Esquema I.13). Este hecho no ocurre para el benzotiazol **III**.



Esquema I.13. Equilibrio tautomérico de benzimidazoles aril-sustituídos (**Ia-k**).

Todo este análisis está en correspondencia con los resultados experimentales. En la diamina con  $\text{R} = -\text{CH}_3$  (efecto +I, hiperconjugación) existe poca influencia sobre la nucleofilicidad de los grupos amino, mientras la diamina con  $\text{R} = -\text{NH}_2$  incrementa la densidad electrónica en los grupos amino por la conjugación del par de electrones no enlazante del nitrógeno. Estos efectos se observan en el menor tiempo de reacción de toda la serie para **Ic** ( $\text{R} = -\text{NH}_2$ ), y en el rendimiento de **Ib** ( $\text{R} = -\text{CH}_3$ ), en comparación con la *o*-fenilendiamina. No obstante, el rendimiento de **Ic** es mucho menor de lo esperado. Esto se debe a que, otro de los factores que influye en el caso particular de esta síntesis, es que la triamina aromática que reacciona se genera *in situ* por reacción del diclorohidrato de 1,2,4-triaminobenceno con trietilamina. Existe la posibilidad de que los grupos amino no

hayan reaccionado con esta base y que se encuentren en forma de  $-\text{NH}_3^+$ , por tanto, no esté disponible el nucleófilo necesario para la reacción.

Por el contrario, a diferencia de los grupos anteriores, cuando los sustituyentes son ( $\text{R} = -\text{F}, -\text{Cl}, -\text{Br}, -\text{CO}_2\text{H}, -\text{CO}_2\text{CH}_3, -\text{CN}$  y  $-\text{CF}_3$ ) se observa un mayor tiempo de reacción, lo cual está relacionado con la disminución de la densidad electrónica en el anillo aromático por el efecto electrón-atrayente de estos grupos. Este efecto es más marcado en el caso del grupo  $\text{R} = -\text{COOH}$ , determinado por el efecto  $-\text{M}$ , lo cual se aprecia considerablemente en el menor rendimiento del producto **Ig** respecto al resto de los compuestos (Figura I.15). En los híbridos **Id** (73%), **Ie** (70%) y **If** (67%), el valor del rendimiento disminuye de forma directa con el efecto mesomérico del halógeno sustituyente ( $-\text{F} > -\text{Cl} > -\text{Br}$ ). Esto es consecuencia del mejor solapamiento entre el sistema  $\pi$  y los electrones no compartidos en el orbital 2p del flúor, en comparación con los análogos en los orbitales 3p y 4p del cloro y el bromo, respectivamente.<sup>[98]</sup>

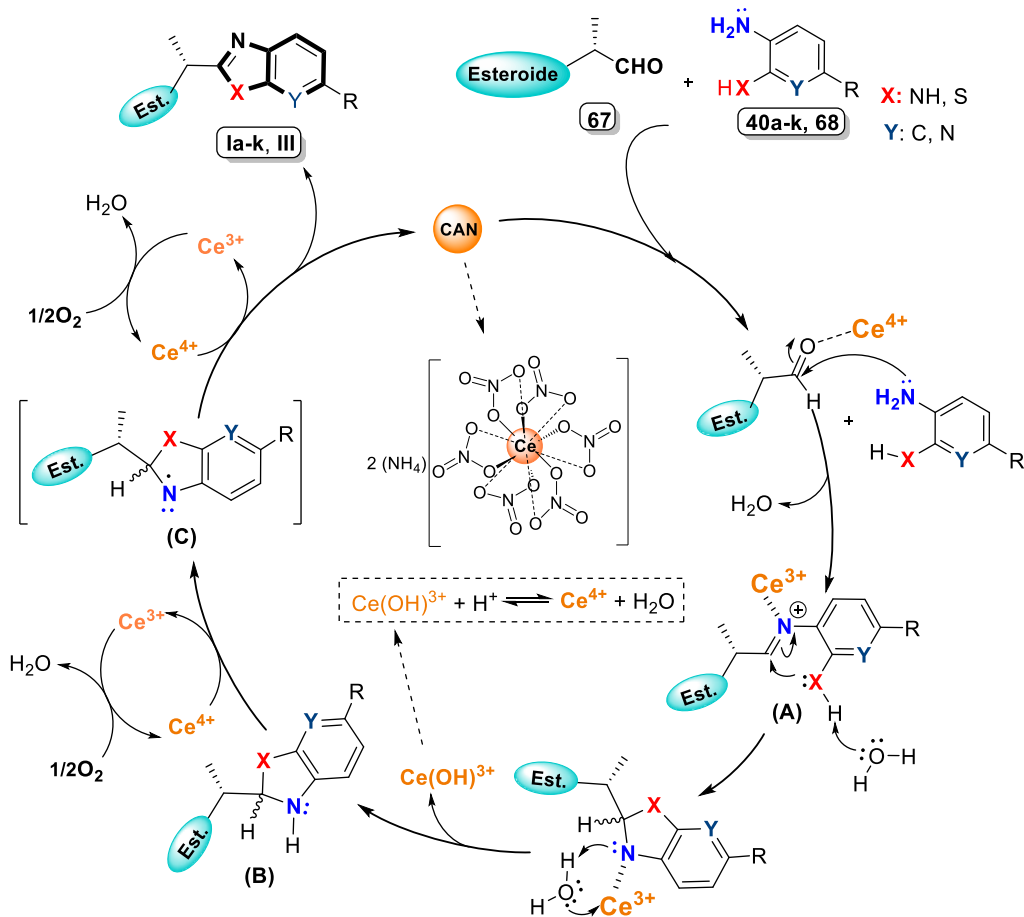
La mayor influencia del efecto  $-\text{I}$  se observa en la 2,3-diaminopiridina, donde el nitrógeno del heterociclo se encuentra muy cerca de los grupos amino, influyendo negativamente en la nucleofilia de éstos; lo que se evidencia en los largos tiempos de reacción (53 h a t.a ó 24 h a 60 °C) y rendimientos entre 63 y 65 % en la síntesis de **Ik**.

Al tener como base el mecanismo que se describe en la literatura científica para compuestos semejantes, donde se emplea el CAN como catalizador con doble función (ácido de Lewis y oxidante),<sup>[99]</sup> en el Esquema I.14 se representa el propuesto para los productos sintetizados. El mecanismo procede por una primera etapa de formación de la imina (**A**), que parte del ataque nucleofílico de un grupo  $-\text{NH}_2$  de las diaminas aromáticas **40a-k** o del *o*-aminotiofenol **68** sobre el grupo carbaldehído del esteroide **67** (su carácter electrofílico es incrementado por la interacción del átomo de oxígeno con el  $\text{Ce}^{\text{IV}}$  del CAN). En una segunda etapa ocurre la reacción de ciclización, donde el ataque nucleofílico del segundo grupo amino (o grupo tiol) sobre el carbono imínico activado, permite la formación de la benzazolina (**B**). Posteriormente, este intermedio experimenta

<sup>98</sup> Clark, D.T.; Murrell, J.N.; Tedder, J.M. The Magnitudes and Signs of the Inductive and Mesomeric Effects of the Halogens. *J. Chem. Soc.* **1963**, 1250–1253.

<sup>99</sup> a) Rodríguez, R.; Vicentes, D.E.; Cobo, J.; Noguerras, M. Synthesis of new 1,2-diaryl[2]benzopyrano[3,4-*d*]imidazol-5(1*H*)-one derivatives mediated by ceric ammonium nitrate. *Tetrahedron Lett.*, **2017**, 58, 1487-1489; b) Kalhor, M.; Seyezade, Z. Rapid Synthesis of 2-Amino Maleonitrile Schiff Bases in Aqueous Media Catalyzed by Cerium(IV) Ammonium Nitrate (CAN) and a New Method for the One-pot Preparation of Their Dicyano Imidazoles (DCI). *Res. Chem. Intermed.*, **2017**, 43, 3349–3360. c) Kalhor, M.; Seyezade, Z.; Zarnegar, Z.  $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6/\text{HNO}_3$  as a High-performance Oxidation Catalyst for the one-Step, Solvent-free Synthesis of Dicyano Imidazoles. *Polycycl. Aromat. Compd.*, **2019**, 1–9.

un proceso oxidativo mediado por el CAN (algunos autores plantean que se genera  $[\text{Ce}(\text{OH})^{3+}]$  como la especie reactiva de  $\text{Ce}^{\text{IV}}$ ),<sup>[99b-c]</sup> dando lugar al catión-radical (C); que consecutivamente es convertido en los benzazoles **Ia-k** y **III**, a través de la reducción del  $\text{Ce}^{\text{IV}}$  a  $\text{Ce}^{\text{III}}$ . El catalizador es regenerado en todo el proceso por del  $\text{O}_2$ , para de esta manera continuar el ciclo catalítico.



**Esquema I.14.** Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de los conjugados **Ia-k** y **III**, empleando CAN como catalizador en medio aerobio.

## 1.2.2. Estudio estructural de los híbridos (benzazol-2'-il)-esteroides.

### 1.2.2.1. Caracterización mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

Las estructuras de los heterociclo-esteroides (**Ia-k**, **III**) se determinaron de forma inequívoca a partir de los datos espectroscópicos de RMN. En la Tabla I.4 se resumen los desplazamientos químicos de las señales más significativas de cada uno de estos compuestos, obtenidos de los espectros  $\text{RMN}^{\text{-}1\text{H}}$  y  $\text{RMN}^{\text{-}13\text{C}}$ . Para facilitar el análisis se utilizan los espectros del híbrido **Ik** en comparación con los registrados para el aldehído esteroidal **67**.

De manera general, se observa en todos los espectros protónicos la desaparición de la señal del protón H22, que corresponde con el grupo carbaldehído y que aparece a 9.58 ppm en el espectro del esteroide precursor **67**; así como la aparición de nuevas señales en la región de los hidrógenos unidos a carbonos  $sp^2$  aromáticos entre 6.50 – 8.50 ppm. Estos resultados indican que la reacción ocurrió sobre el grupo formilo y muestra la presencia de los hidrógenos presentes en el heterociclo formado. Además, solamente el multiplete H20 ( $\delta = 3.20$  ppm) y el doblete H21 ( $\delta = 1.54$  ppm) se muestran a desplazamientos químicos a campo bajo como consecuencia del desapantallamiento que produce el resto heteroarilo; mientras el resto de las señales protónicas del esqueleto esteroidal se mantienen sin variaciones significativas, entre las que destacan el singlete H4 unido a  $C_{sp^2}$  en  $\sim 5.70$  ppm y los metilos angulares H18 ( $\delta = 0.90$  ppm) y H19 ( $\delta = 1.20$  ppm) en la región alifática. En algunos casos es posible observar la señal correspondiente al grupo –NH del anillo de imidazol, que aparece como una señal ancha en el área entre 11 – 14 ppm. En la Figura I.16 se muestra el espectro correspondiente al compuesto **Ik** como ejemplo, donde se evidencian los resultados comentados anteriormente.

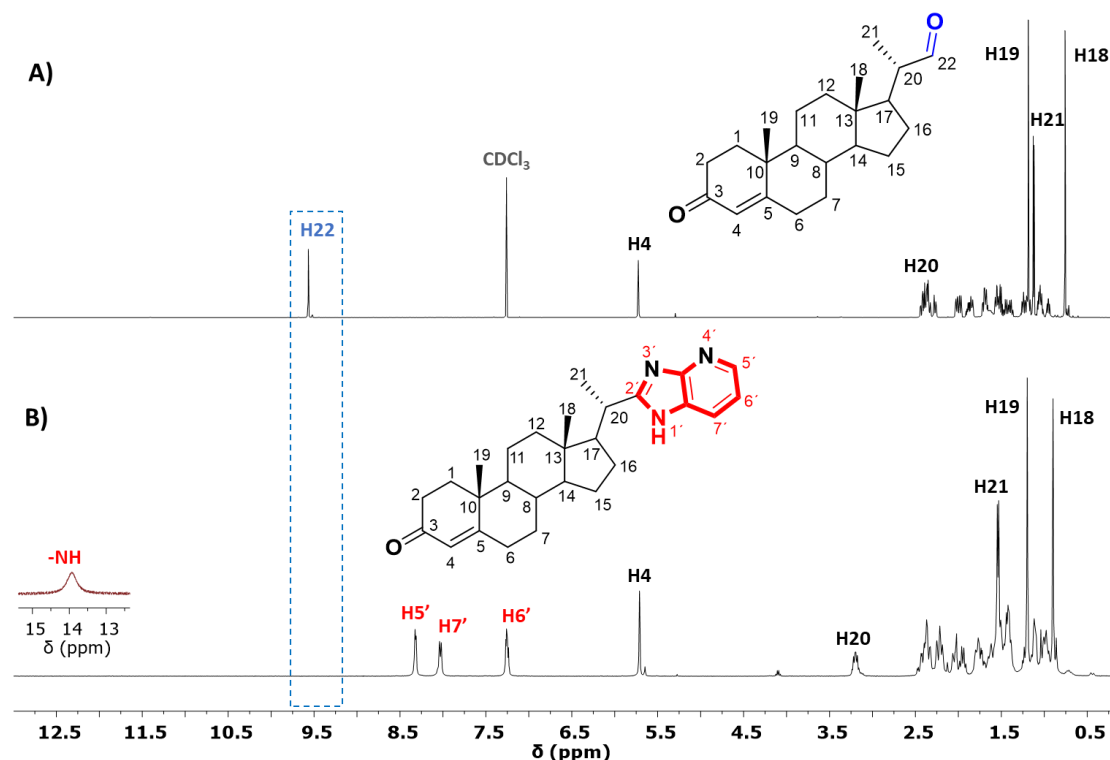
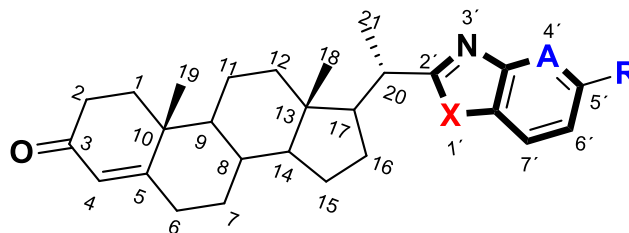


Figura I.16. Espectros RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) del formil-esteroide **67**(A) en comparación con **Ik**(B).

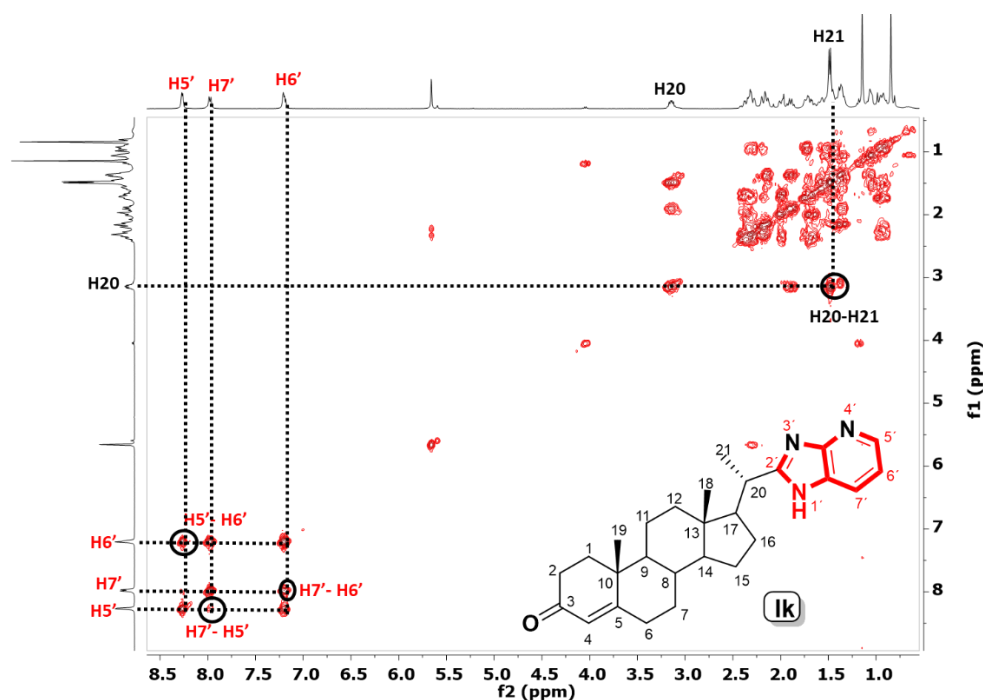
**Tabla I.4.** Asignación de señales en los espectros de RMN más significativas de los híbridos (benzazol-2'-il)-esteroide aril sustituidos.



Compuestos <sup>[a]</sup>		<sup>1</sup> H-RMN							<sup>13</sup> C-RMN							
		Fragmento Benzazol δ (ppm)					Fragmento esteroidal δ (ppm)		Fragmento Benzazol δ (ppm)						Fragmento esteroidal δ (ppm)	
		-NH	H4'	H5'	H6'	H7'	H20	H21	C2'	C4'	C5'	C6'	C7'	R	C20	C21
<b>Ia</b> <sup>[b]</sup>	R=H	12.09	7.43	7.08	7.08	7.43	2.94	1.32	159.7	-	120.9	120.9	-	-	36.7	19.6
<b>Ib</b> <sup>[b]</sup>	R=CH <sub>3</sub>	11.98	7.21	R	6.89	7.30	2.91	1.31	159.4	-	129.8	122.2	122.2	21.2	36.6	19.5
<b>Ic</b> <sup>[c]</sup>	R=NH <sub>2</sub>	-	6.75	R	6.57	7.29	3.01	1.38	159.0	99.3	142.1	111.8	116.0	-	37.6	19.8
<b>Id</b> <sup>[b]</sup>	R=F	12.21	7.41	R	6.93	7.23	2.92	1.31	161.2	108.8	158.1	108.8	101.1	-	36.7	19.5
<b>Ie</b> <sup>[b]</sup>	R=Cl	12.09	7.49	R	7.11	7.43	2.93	1.31	161.3	114.3	125.4	121.1	121.1	-	36.6	19.4
<b>If</b> <sup>[b]</sup>	R=Br	12.36	7.63	R	7.23	7.40	2.93	1.31	161.1	-	113.2	123.8	123.8	-	36.6	19.4
<b>Ig</b> <sup>[b]</sup>	R=CO <sub>2</sub> H	11.54	8.30	R	8.08	7.87	3.33	1.49	160.3	115.6	133.8	126.5	114.1	166.7	35.2	17.8
<b>Ih</b> <sup>[b]</sup>	R=CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	12.49	8.12 8.01	R	7.76	7.57 7.48	2.98	1.33	162.0	119.8 112.4	-	122.7 122.4	117.9 110.7	166.9 (C=O) 51.8 (CH <sub>3</sub> O)	36.8	19.4
<b>Ii</b> <sup>[b]</sup>	R=CN	12.69	7.97	R	7.49	7.60	2.99	1.33	163.1	-	103.0	124.8	124.8	120.1	36.7	19.2
<b>Ij</b> <sup>[b]</sup>	R=CF <sub>3</sub>	12.55	7.79	R	7.41	7.62	2.99	1.33	162.6	-	121.8	117.8	117.8	125.2	36.7	19.3
<b>Ik</b> <sup>[c]</sup>	A=N	13.90	-	8.32	7.25	8.03	3.20	1.54	162.4	-	141.5	117.9	127.3	-	38.4	19.6
<b>III</b> <sup>[c]</sup>	X=S	-	7.95	7.43	7.34	7.83	3.26	1.45	178.2	122.7	126.0	124.8	121.7	-	42.9	21.5

<sup>[a]</sup> A= CH en todos los casos excepto en **Ik** que A= N; <sup>[b]</sup> en DMSO-*d*<sub>6</sub>; <sup>[c]</sup> en CDCl<sub>3</sub>

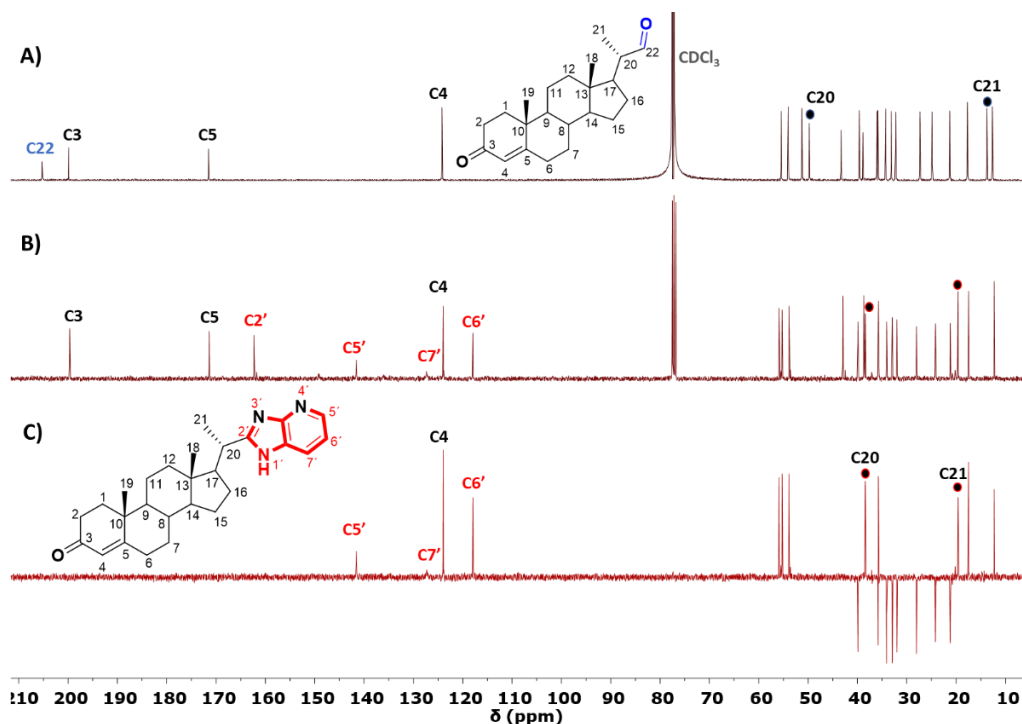
El espectro COSY de **Ik** (Figura I.17) justifica la posición asignada a los protones aromáticos. Se observan los picos de cruce correspondientes a los acoplamientos H5'-H6' ( $J \sim 4.7$  Hz) y H6'-H7' ( $J \sim 8.0$  Hz), mientras que un pequeño acoplamiento escalar a cuatro enlaces entre H5' y H7'. También es posible ver el acoplamiento escalar ( $J = 6.8$  Hz) de los protones correspondientes a las posiciones 20 y 21 del fragmento esteroidal. De igual forma se hizo la asignación de estas señales para el resto de los compuestos.



**Figura I.17.** Espectro COSY del compuesto **Ik**.

Por otra parte, los datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$  de todos los híbridos evidencian un comportamiento similar al analizado en los espectros protónicos. La señal correspondiente al grupo carbaldehído del esteroide de partida, que resuena a 204.9 ppm, no se observa en los productos obtenidos; y aparecen nuevas señales en el área de los carbonos con hibridación  $\text{sp}^2$  correspondientes al sistema heterocíclico. Los  $-\text{CH}$  ( $\text{sp}^2$ ) resuenan entre los 110-145 ppm, mientras que los carbonos cuaternarios en el sitio de fusión de los anillos que componen los fragmentos de benzimidazol no son observables, en general debido al equilibrio tautomérico y a su bajo tiempo de relajación. La señal correspondiente al C2', sitio de conjugación con el esteroide, se observa entre 159-163 ppm, aunque en el caso del benzotiazol **III**, esta señal se desapantalla hasta los 178.2 ppm debido a la influencia directa del átomo de azufre en la estructura. La presencia del esqueleto esteroidal en los híbridos se confirma por las señales características como, por ejemplo: el grupo carbonilo C3 ( $\sim 197 - 199$  ppm), los carbonos del doble enlace C4-C5 en  $\sim 124$  ppm y 170 ppm, respectivamente, así como los metilos angulares C18 ( $\delta \sim 12$

ppm) y C19 ( $\delta \sim 17$  ppm). A diferencia de estas señales, que se mantienen con semejantes desplazamientos químicos a las que presentan en el aldehído precursor **67**, las señales de los carbonos 20 y 21 se observaron desplazadas. En el caso de C20, aparecen entre 35-42 ppm, mientras que C21 se encuentran entre 17-21 ppm (ver Tabla I.4). Como ejemplo, en la Figura I.18 se muestra el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT-135 del conjugado **Ik** en comparación con el espectro RMN- $^{13}\text{C}$  del aldehído esteroideal **67**, como una evidencia de las características estructurales de los compuestos obtenidos.



**Figura I.18.** Espectros RMN- $^{13}\text{C}$  del aldehído **67** (A) y **Ik** (B). Espectro DEPT-135 de **Ik** (C).

Para la asignación inequívoca de los -CH se emplearon los espectros HSQC y HMBC (ver Anexo 1). A través de las correlaciones heteronucleares a un enlace se asignaron los picos de cruce entre las señales correspondientes a protones y carbonos del anillo aromático (C5'-H5', C6'-H6' y C7'-H7'). En el espectro de HMBC de **Ik**, tomado como ejemplo, se corrobora la señal asignada a C2' debido a que acopla con H20, por de la correlación heteronuclear a varios enlaces. (ver Figura A72).

Es de destacar, para los híbridos **Id** y **Ij**, se observan los acoplamiento de  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  y  $^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$ , en los espectros de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ , respectivamente (ver Anexo 1) El desdoblamiento de estas señales en presencia de flúor se debe a que su isótopo  $^{19}\text{F}$  con abundancia 100%, tiene un momento cuántico de espín nuclear  $I=1/2$  y al igual que los núcleos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , es activo en RMN. De esta forma, por ejemplo, en el espectro de  $^{13}\text{C}$

(Figura I.19) se aprecian los acoplamientos  $^1J_{C-F}$  y  $^2J_{C-F}$  para cada compuesto en forma de dobletes (**Id**) y cuartetos (**Ij**).

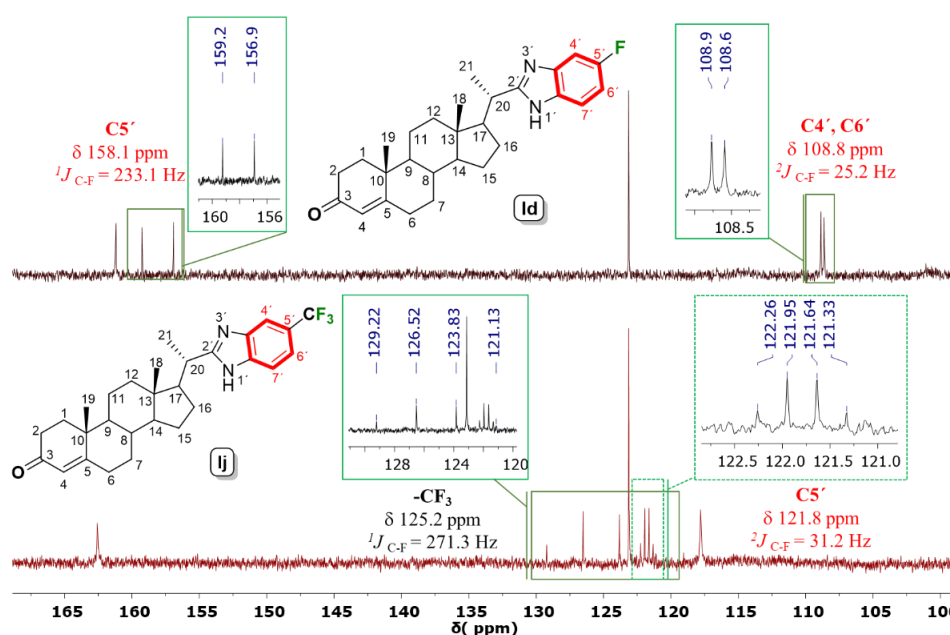


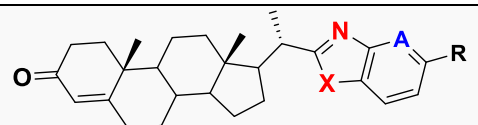
Figura I.19. Fragmento del espectro de RMN- $^{13}C$  de **Id** y **Ij**.

### 1.2.2.2. Caracterización mediante espectrometría de masas.

La masa molecular exacta de los híbridos se determinó mediante la técnica de ionización suave HRMS-ESI, obteniéndose en cada caso los iones quasimoleculares  $[M+H]^+$ . Las masas moleculares determinadas experimentalmente coinciden con las masas teóricas calculadas para los compuestos, como se observa en la Tabla I.5. Estos resultados corroboraron las fórmulas moleculares propuestas para los híbridos (benzazol-2'-il)-esteroide (**Ia-k**, **III**).

Por otra parte, y como complemento del análisis estructural de los híbridos sintetizados, se utilizó la técnica EM-IE. Esta es una técnica de ionización, que produce iones con un gran exceso de energía y genera una mayor fragmentación. El análisis del patrón de fragmentación, permitió corroborar la estructura molecular de los (benzazol-2'-il)-esteroide. En la Tabla I.6 se resumen los picos fundamentales encontrados en los espectros de masa. Para todos los compuestos se observa el ion molecular de poca intensidad, lo cual es común cuando se utiliza la técnica de impacto electrónico como fuente de ionización. En los casos de **Ie** (R = Cl) y **If** (R = Br) se observan los correspondientes picos isotópicos característicos de estos elementos (M: M+2), con relación de intensidades 3:1 y 1:1, respectivamente.

**Tabla I.5** Comparación entre las masas moleculares determinadas por HRMS-ESI con las masas teóricas calculadas para los híbridos (benzazol-2'-il)-esteroide.



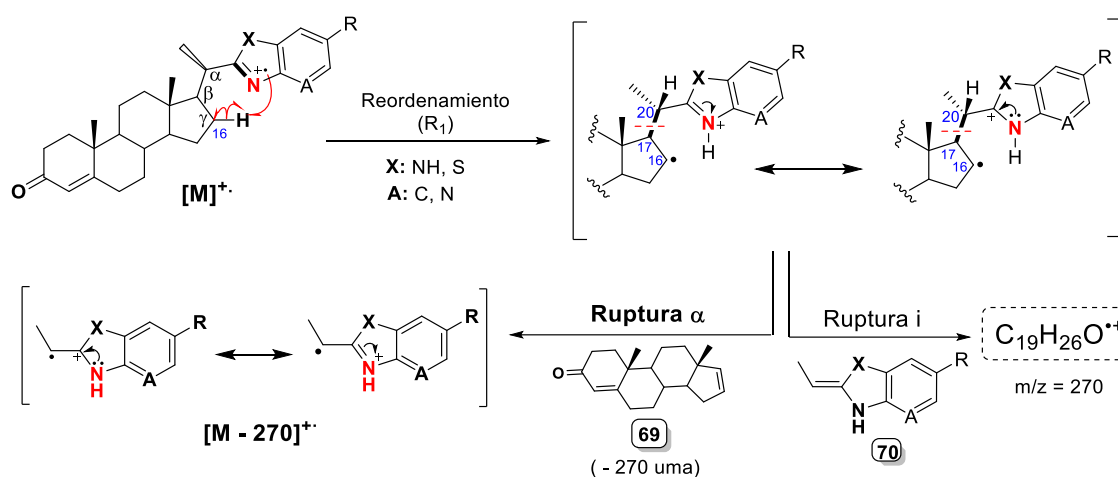
Compuesto	R	Fórmula Molecular	m/z [M+H] <sup>+</sup> (uma)	
			Experimental	Calculada
Ia	-H	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O	417.2891	417.2900
Ib	-CH <sub>3</sub>	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O	431.3049	431.3057
Ic	-NH <sub>2</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>37</sub> N <sub>3</sub> O	432.3010	432.3009
Id	-F	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> FN <sub>2</sub> O	435.2805	435.2806
Ie	-Cl	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> ClN <sub>2</sub> O	451.2507 ( <sup>35</sup> Cl)	451.2511
			453.2484 ( <sup>37</sup> Cl)	453.2494
If	-Br	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> BrN <sub>2</sub> O	495.1999 ( <sup>79</sup> Br)	495.2006
			497.1988 ( <sup>81</sup> Br)	497.1989
Ig	-CO <sub>2</sub> H	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	461.2793	461.2799
Ih	-CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	475.2951	475.2955
Ii	-CN	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O	442.2850	442.2853
Ij	-CF <sub>3</sub>	C <sub>29</sub> H <sub>35</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O	485.2775	485.2774
Ik	A=N	C <sub>27</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O	418.2848	418.2853
III	X=S	C <sub>28</sub> H <sub>35</sub> NOS	434.2504	434.2512

**Tabla I.6.** Picos principales de los espectros de masas (EM-IE) de los híbridos Ia-k y III.

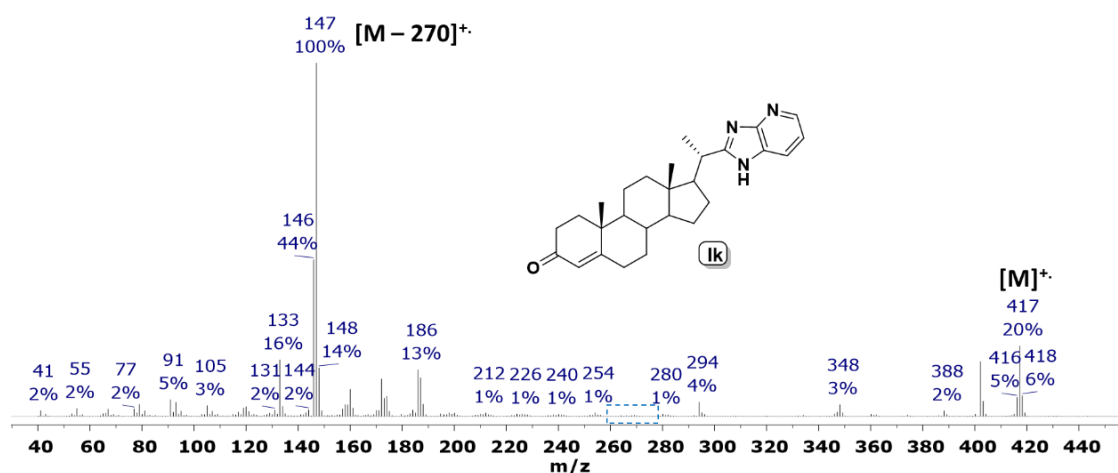
Compuestos		Picos principales e intensidad			
		[M] <sup>+</sup>		[M-270] <sup>+</sup>	
		m/z	Abundancia (%)	m/z	Abundancia (%)
Ia	R=H	416	23	146	100
Ib	R=CH <sub>3</sub>	430	22	160	100
Ic	R=NH <sub>2</sub>	431	48	161	100
Id	R=F	434	22	164	100
Ie	R=Cl	450	23 ( <sup>35</sup> Cl)	180	100
		452	8 ( <sup>37</sup> Cl)	182	33
If	R=Br	494	24 ( <sup>79</sup> Br)	224	100
		496	26 ( <sup>81</sup> Br)	226	98
Ig	R=CO <sub>2</sub> H	460	13	190	100
Ih	R=CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	474	16	204	100
Ii	R=CN	441	17	171	100
Ij	R=CF <sub>3</sub>	484	16	214	100
Ik	A=N	417	20	147	100
III	X=S	433	15	163	100

De manera general, como patrón de fragmentación de estos híbridos, se observa que el pico base se origina por la pérdida de 270 uma, que corresponde con la molécula neutra androst-4,17-dien-3-ona (**69**), a través de un mecanismo que se propone en el Esquema

I.15. La pérdida de este fragmento puede estar antecedida por un reordenamiento ( $R_1$ ) tipo McLafferty<sup>[100]</sup> del ion radical  $[M]^+$ , donde uno de los protones H16 que encuentra en posición  $\gamma$  respecto al enlace  $C2'=N3'$  del azol es captado por el nitrógeno. En este tipo de reordenamiento se favorece la fragmentación entre las posiciones  $\alpha$  y  $\beta$ , H20 y H17 respectivamente, que pueden dar lugar a diferentes productos si la ruptura es iniciada por la carga (ruptura i) o por el radical (ruptura  $\alpha$ ). En los espectros de todos los híbridos analizados no se detecta ningún pico con  $m/z = 270$ , que podría generarse por la pérdida del fragmento neutro **70** (ruptura i). El producto observado corresponde a la ruptura  $\alpha$  ( $[M-270]^+$ ), ion radical favorecido mediante la estabilización por resonancia. A modo de ejemplo, en la Figura I.20 se ilustra el espectro de masas obtenido para el compuesto **Ik**.



**Esquema I.15.** Mecanismo de fragmentación tipo McLafferty propuesto para la obtención del pico base de los híbridos **Ia-k**, **III**.



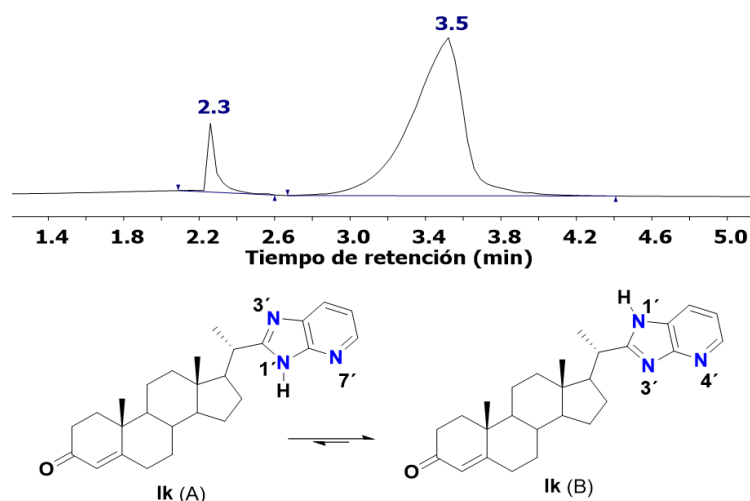
**Figura I.20.** Espectro de masas (EM-IE) del compuesto **Ik**.

<sup>100</sup> Pérez, C.S.; Ortiz, P.J. *Espectroscopía Tomo I*, Ed. Félix Varela; **2015**, pp 316-317.

### 1.2.2.3. Equilibrio tautomérico y caracterización por DRX.

Como fue mencionado, los 1*H*-benzimidazoles se encuentran en disolución como mezcla de tautómeros, debido a que puede ocurrir un intercambio del protón activo que permuta de la posición N1' a la posición N3' (ver Esquema I.13). Este intercambio es intermolecular e involucra otra molécula de benzimidazol o de un disolvente polar prótico como el metanol. Generalmente este proceso es tan rápido que solo el promedio de ambas especies es observable en RMN con un experimento a temperatura ambiente.<sup>[101]</sup> En este sentido, en todos los espectros de <sup>13</sup>C de los híbridos benzimidazol-esteroide **Ia-k** aparecen algunas señales anchas y de poca intensidad, mientras que en **Ih** (R = -CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) las señales de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de las posiciones 4' y 7' fundamentalmente se muestran desdobladas (ver Tabla I.4), al ser las más afectadas por el intercambio protónico entre los átomos de nitrógeno del anillo heterocíclico vecino.

También, en la caracterización por EM-IE de algunos híbridos aril sustituidos, se observaron dos picos en los cromatogramas procedentes del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas. Estos picos, correspondientes a cada muestra vaporizada, presentaron un patrón de fragmentación semejante, lo que podría indicar la formación de los tautómeros en estas condiciones. A modo de ejemplo, en la Figura I.21 se muestra el cromatograma registrado para el híbrido **Ik**, en el que se observa dos picos con diferentes tiempos de retención (2.3 y 3.5 min), y que se atribuyen a cada tautómero de este compuesto.

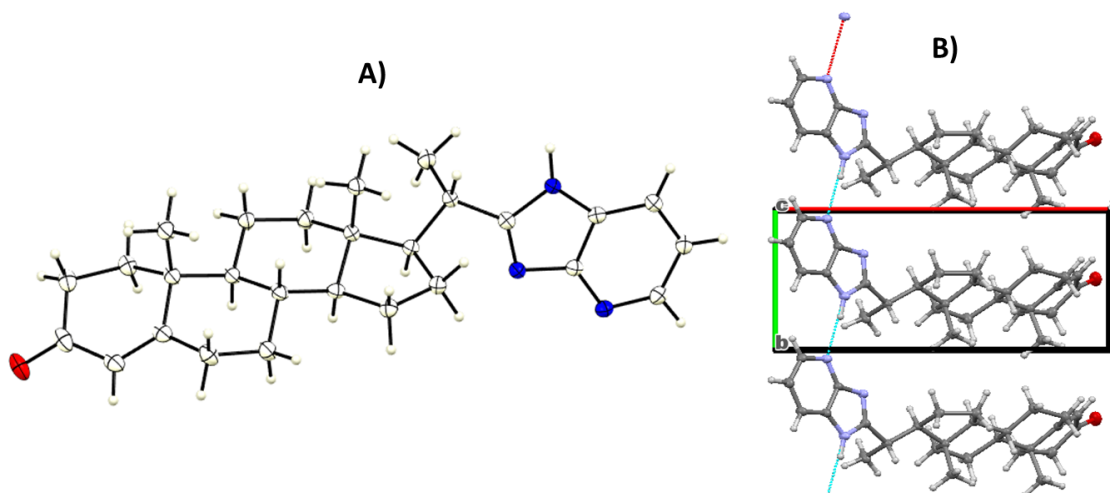


**Figura I.21.** Cromatograma obtenido en la caracterización de **Ik** por EM-IE, indicando cada pico su correspondencia con los tautómeros en diferente proporción.

<sup>101</sup> Grimmett, M. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Elsevier.; Katritzky, A.R., Rees, C.W., Scriven, E.F.V, Eds.; Oxford, **1996**, pp 77.

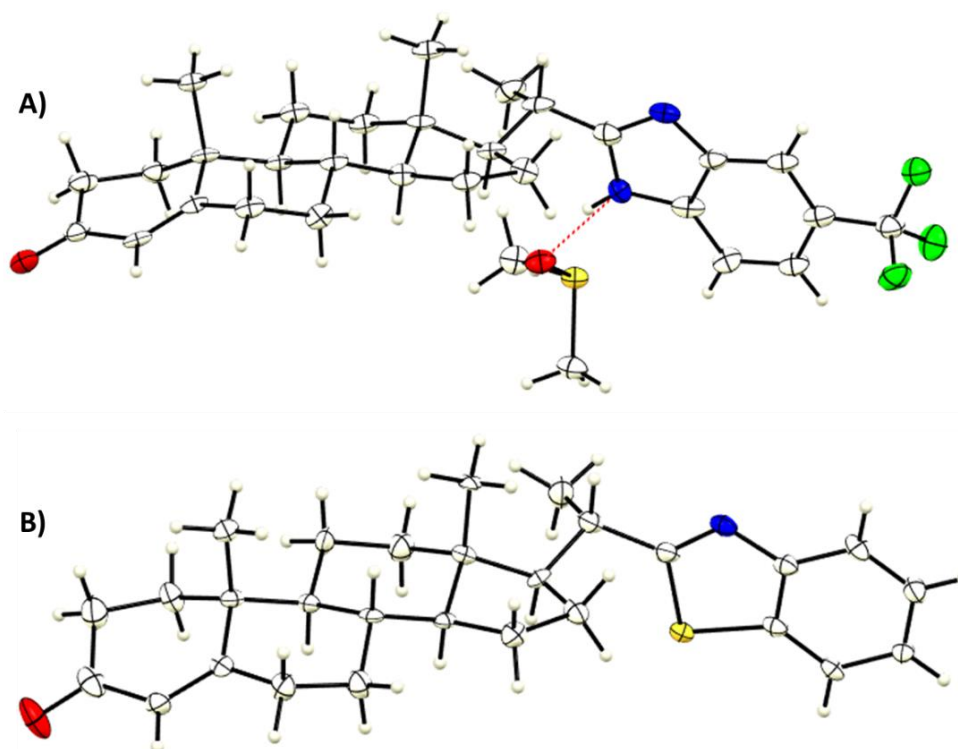
La interconversión de estos isómeros no ocurre en fase sólida. Por lo tanto, empleando Difracción de Rayos X de monocristal (DRX) se puede determinar la estructura del tautómero mayoritario. Sin embargo, solo fue posible obtener cristales adecuados para ser caracterizados en los compuestos **Ij** (R = -CF<sub>3</sub>) y **Ik**, luego de un proceso de evaporación lenta a temperatura ambiente de disoluciones en DMSO y metanol, respectivamente.

En la Figura I.22 se representa el diagrama de la estructura molecular de **Ik** del tautómero aislado. Como se puede apreciar, este corresponde con el isómero que presenta el átomo de nitrógeno del anillo de piridina en la posición 4' (Figura I.22 A). La mayor proporción en fase sólida para este tautómero puede argumentarse porque en la estructura cristalina existe un enlace de hidrógeno intermolecular (Figura I.22 B) entre el protón del grupo NH1' y el nitrógeno del anillo de piridina.



**Figura I.22.** Diagrama ORTEP de la estructura molecular de **Ik** (A) y esquema de enlace de hidrógeno intermolecular paralelo al eje *b* del tautómero mayoritario (B), obtenidos por DRX.

En el caso de conjugado **Ij**, en la Figura I.23 A se muestra la estructura determinada del isómero mayoritario, que corresponde a la que presenta el sustituyente -CF<sub>3</sub> en posición 5' (*para*) respecto al NH1', donde se observa un enlace de hidrógeno con una molécula de DMSO de la unidad asimétrica. Adicionalmente, cabe destacar, que el benzotiazol **III** también fue caracterizado por DRX de monocristal, determinándose el arreglo tridimensional de la estructura confirmada (ver Figura I.23 B).



**Figura I.23.** Diagramas ORTEP de las estructuras moleculares de **Ij** (A) y **III** (B), obtenidos por DRX. En rojo se observan los átomos de oxígeno, en azul los de nitrógeno, en amarillo los de azufre y en verde los átomos de flúor.

### 1.2.3. Predicción de la actividad inhibitoria *in silico*.

Las herramientas computacionales aplicadas a la predicción de la actividad biológica *in silico*, están dirigidas a incrementar la probabilidad de encontrar un fármaco activo. Esto contribuye a identificar compuestos como potenciales inhibidores selectivos a CYP17A1. El análisis se hizo en base a las correlaciones entre la estructura de los híbridos benzazol-esteroide (HBE) **Ia-k** y **III**, la conformación (pose) que estos ocupan en el sitio activo de la enzima y la energía asociada a las interacciones no enlazantes que se establecen entre los ligandos y el receptor.

#### 1.2.3.1. Predicción del modo de unión usando Anclaje Molecular.

Con el objetivo de obtener modelos iniciales de los complejos entre la CYP17A1 (diana molecular) y los ligandos sintetizados (HBE), se realizó un estudio por Anclaje (*Docking*) Molecular empleando el programa AutoDock 4.2.<sup>[102]</sup> Este método permite predecir el modo de unión más probable de los ligandos con la enzima, basada en una alta

<sup>102</sup> Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.

población de las poses. Además, se empleó el criterio descrito por Rosenfeld y col.<sup>[103]</sup> basado en escoger como mejores aquellos ligandos que formen pocas poses diferentes con elevada afinidad.

Durante la simulación, la diana molecular se mantuvo rígida, lográndose la reproducción del modo de unión de la Abiraterona (AER) con los parámetros escogidos, donde el valor de la desviación cuadrática media de la posición de los átomos pesados (RMSD), en comparación con la estructura cristalográfica reportada (PDB: 3RUK)<sup>[46]</sup> fue de 0.53 Å (ver Anexo 3). Esto significa que los parámetros seleccionados para el anclaje (ver Parte Experimental) son adecuados para el sistema en estudio.

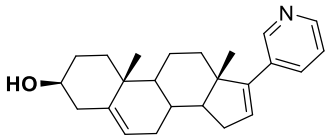
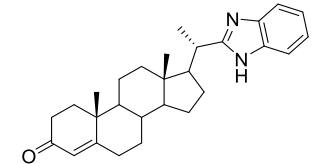
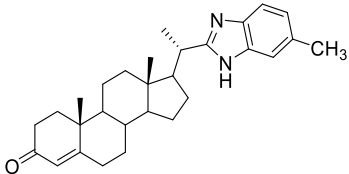
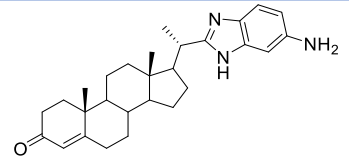
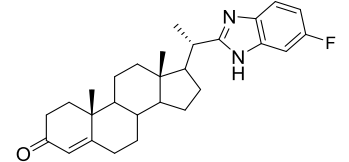
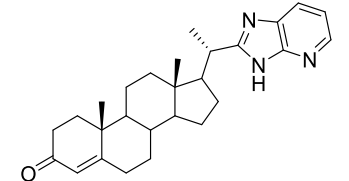
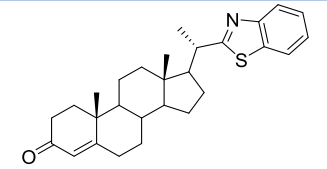
Para cada complejo enzima-ligando se obtuvieron 20 soluciones de la simulación de anclaje molecular, las cuales fueron agrupadas tomando como base el RMSD de los átomos pesados de los ligandos, y usando como distancia de corte un máximo de 2Å. Posteriormente se determinó la energía de unión media de cada grupo. El grupo con mayor cantidad de soluciones y menor energía promedio se eligió como el modo de unión representativo para cada complejo. El criterio de selección de los ligandos como posibles inhibidores se basó en tres parámetros: que presentaran una energía de unión inferior a cero, una elevada probabilidad del modo de unión y las interacciones con los residuos aminoacídicos claves del proceso enzimático.

En la Tabla I.7 se muestra la afinidad promedio y la población del modo de unión representativo de aquellos ligandos que presentaron energías inferiores a cero (afinidad positiva). Como se puede observar, solo 6 de los 12 híbridos sintetizados poseen energías de unión negativas, el resto no presentó afinidad por el sitio activo de esta enzima (Energía > 0 kcal/mol). La población expresa la cantidad de veces que la pose se repite en las 20 soluciones de simulación realizadas, lo que da una medida de la probabilidad de que se presente ese modo de unión. En general estos ligandos presentaron pocos grupos con una elevada población, lo que significa que existe una alta probabilidad de unión a la CYP17A1. En los ligandos que mostraron dos modos de unión, representados como Grupos 1 y 2 (entradas 2, 5, 6 y 7), la mayor diferencia entre ambos radica en que la molécula se encuentra rotada 180° en una disposición donde el fragmento heterocíclico está orientado en dirección opuesta al grupo Hemo, como se observa en la Figura I.24.

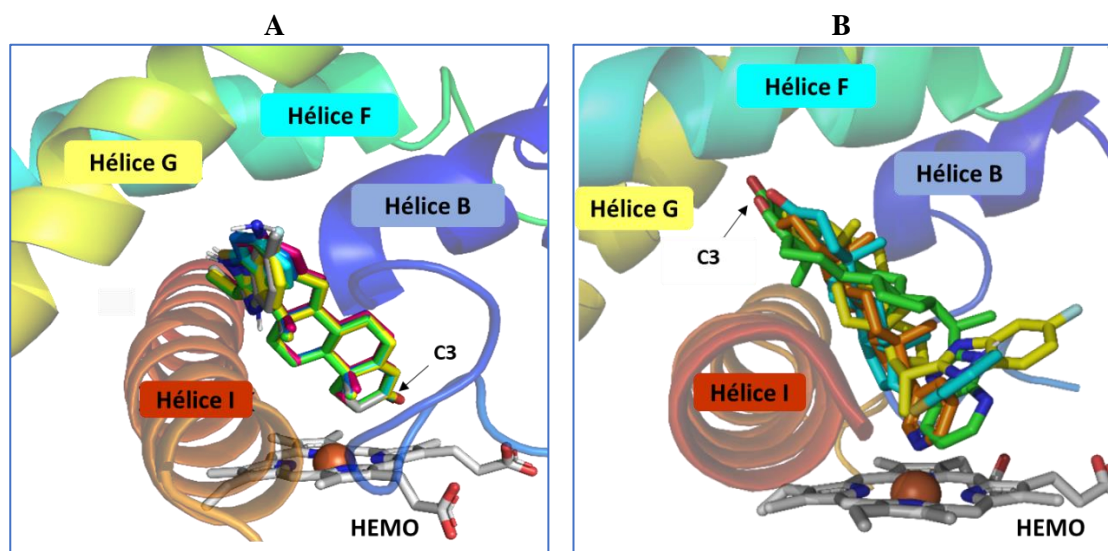
---

<sup>103</sup> Rosenfeld, R.J.; Goodsell, D.S.; Musah, R.A.; Morris, G.M.; David, B. Automated Docking of Ligands to an Artificial Active Site: Augmenting Crystallographic Analysis with Computer Modeling. *J. Comput. Mol. Des.* **2003**, *17*, 525–536.

**Tabla I.7.** Afinidad promedio y población de la AER y los HBE con la CYP17A1.

Entrada	Ligandos	Estructura	Grupos	Afinidad Promedio (kcal/mol)	Población
1	AER		1	-11	20
2	Ia		1	-6.29	6
			2	-4.81	6
3	Ib		1	-2.37	12
4	Ic		1	-3.38	8
5	Id		1	-3.81	14
			2	-1.00	4
6	Ik		1	-4.58	4
			2	-5.39	13
7	III		1	-4.73	3
			2	-6.93	12

El criterio de Rosenfeld por sí solo permite identificar posibles ligandos capaces de unirse a la enzima. Sin embargo, la capacidad de inhibición de estos híbridos debe evaluarse utilizando otros parámetros. Una vía para discriminar compuestos activos de inactivos es considerando los contactos interatómicos entre la enzima CYP17A1 y los ligandos analizados.



**Figura I.24.** Disposición espacial de los modos de unión, (A) Grupos 1 y (B) Grupos 2 en el sitio activo de CYP17A1. Los ligandos son representados como bastones: **Ia** (fucsia), **Id** (amarillo), **Ik** (verde), **III** (cian) y Abiraterona (naranja). Los residuos del grupo Hemo se encuentran señalados en bastones grises y el Fe en forma de esfera.

El AuPosSOM (del inglés *Automatic analysis of Poses using Self-Organizing Maps*) representa un acercamiento alternativo en la evaluación de los resultados del Anclaje Molecular. Este método se basa en agrupar los compuestos acoplados de acuerdo a la similitud de contactos con la diana molecular, en comparación con ligandos conocidos.<sup>[104]</sup>

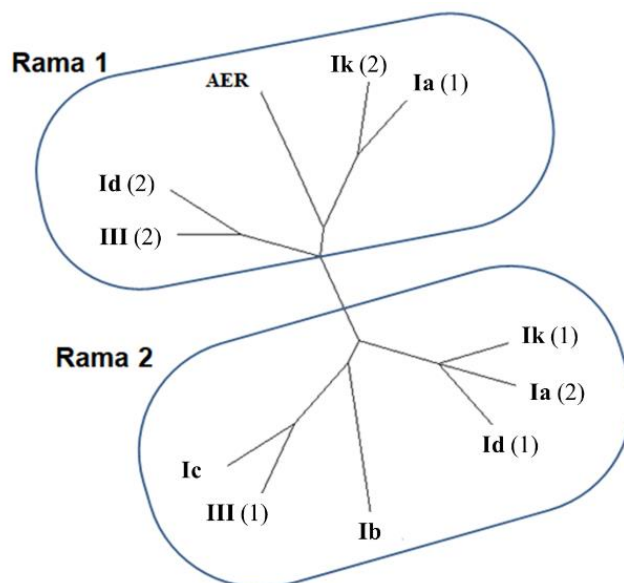
Se utilizó este programa para agrupar todos los modos de unión representativos de los HBE que presentaron una alta afinidad (Tabla I.7), incluyendo en el análisis a la AER, inhibidor conocido de la CYP17A1. Los ligandos que presentaron dos modos de unión representativos (**Ia**, **Id**, **Ik** y **III**) fueron incluidos en el análisis. A partir del agrupamiento de los ligandos según su patrón de interacción con la proteína, se creó un árbol Newick, utilizando Dendroscope<sup>[105]</sup> para su visualización. En este árbol (Figura I.25) se observa que los HBE forman dos grupos diferentes (Rama 1 y 2), donde los miembros de cada grupo presentan similitud de contactos entre sí.

En la Rama 1 se observa que los ligandos **Ia**(1), **Id**(2), **Ik**(2) y **III**(2) presentan un patrón de interacción similar a AER, en una disposición donde los anillos heterocíclicos se dirige hacia el grupo Hemo. En particular el anillo aromático de **Ik**(2) interacciona con

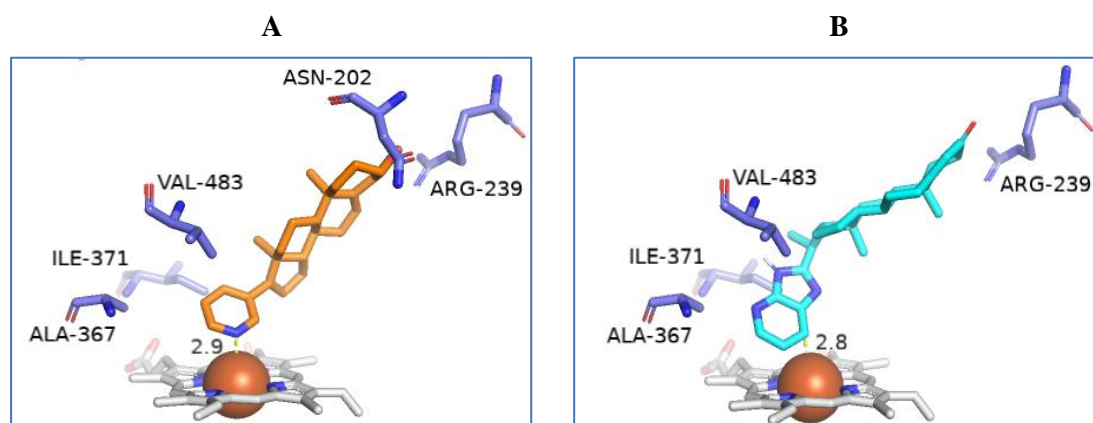
<sup>104</sup> Mantsyzov, A.B.; Bouvier, G.; Evrard-Todeschi, N.; Bertho, G. Contact-based ligand-clustering approach for the identification of active compounds in virtual screening. *Adv. Appl. Bioinforma. Chem.* **2012**, *5*, 61–79.

<sup>105</sup> Iersel, L. Van; Kelk, S.; Rupp, R.; Huson, D. Phylogenetic networks do not need to be complex: using fewer reticulations to represent conflicting clusters. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 124–131.

el Fe a una distancia de 2.8 Å (Figura I.26 B) similar a la Abiraterona, donde el nitrógeno del anillo de piridina se encuentra a una distancia de 2.9 Å (Figura I.26 A).



**Figura I.25.** Árbol mapa obtenido del programa AuPosSOM para CYP17A1. Los números entre paréntesis indican el modo de unión representativo, para los ligandos que presentan más de uno.



**Figura I.26.** Disposición espacial y contactos de: (A) **AER** (naranja) y (B) **Ik(2)** (cian), en el sitio activo de CYP17A1. Los residuos del grupo Hemo se encuentran señalados en bastones grises y el Fe como esfera. El resto de los residuos necesarios para la inhibición están señalados como bastones azules.

Por otra parte, los HBE que pertenecen a la Rama 2 [**Ia(2)**, **Ib**, **Ic**, **Id(1)**, **Ik(1)** y **III(1)**] muestran un patrón de interacción diferente a **AER**. Esto se debe principalmente a la orientación de 180° del sistema híbrido respecto al grupo Hemo en el sitio activo de CYP17A1, donde el grupo carbonilo de C3 es el que interacciona. A pesar de estas diferencias, los contactos cercanos con residuos claves para la inhibición (Asn<sup>202</sup>, Arg<sup>239</sup>, Ala<sup>367</sup>, Ile<sup>371</sup>, Val<sup>483</sup> y el grupo Hemo)<sup>[46]</sup> se conservan entre ambas ramas (Tabla I.8).

**Tabla I.8.** Interacciones conservadas de los ligandos (poses) con los residuos del sitio activo de la CYP17A1.

	<b>Ligandos y sus modos de unión</b>	<b>Contactos conservados en las ramas</b>
Rama 1	<b>AER, Ia(1), Id(2), Ik(2) y III(2)</b>	Phe <sup>114</sup> , <b>Asn<sup>202</sup></b> , Ile <sup>205</sup> , <b>Arg<sup>239</sup></b> , Thr <sup>306</sup> , Val <sup>366</sup> , <b>Ala<sup>367</sup></b> , Ile <sup>371</sup> , Val <sup>482</sup> , <b>Val<sup>483</sup></b> , <b>HEMO.</b>
Rama 2	<b>Ia(2), Ib, Ic, Id(1), Ik(1) y III(1)</b>	<b>Asn<sup>202</sup></b> , Ile <sup>205</sup> , <b>Arg<sup>239</sup></b> , Ala <sup>302</sup> , Thr <sup>306</sup> , <b>Ala<sup>367</sup></b> , Ile <sup>371</sup> , Val <sup>482</sup> , <b>Val<sup>483</sup></b> , <b>HEMO.</b>

En general, se tomaron en consideración diversos criterios para identificar posibles inhibidores de la enzima CYP17A1. Teniendo en cuenta la energía de unión negativa, la cantidad de grupos generados (menor de dos), y la capacidad de interactuar con el grupo Hemo y ciertos residuos aminoacídicos importantes, se concluye que 6 de los 12 ligandos analizados pueden considerarse como potenciales inhibidores.

Debido a que los inhibidores de CYP17A1 utilizados actualmente en el tratamiento de pacientes ocasionan efectos colaterales como consecuencia de su interacción con otros citocromos involucrados en la biosíntesis de esteroides,<sup>[96]</sup> es necesario realizar un estudio de selectividad de los HBE. Se analizó la capacidad de unión, y posible inhibición, de los HBE hacia el citocromo P450 21A2 (CYP21A2). Para ello, se realizó el mismo procedimiento de anclaje que el desarrollado para la enzima CYP17A1 (ver Parte Experimental), utilizando como ligandos la AER y los híbridos que resultaron afines por CYP17A1 (**Ia-d, Ik y III**). Adicionalmente, se incluyó a la progesterona (PROG), sustrato natural de CYP21A2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.9.

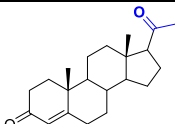
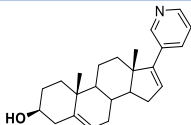
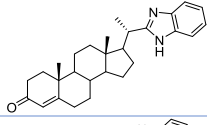
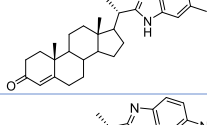
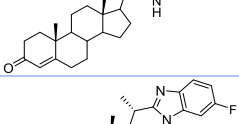
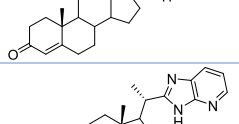
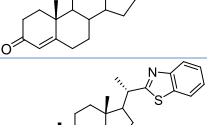
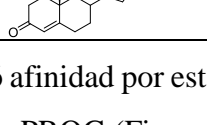
Considerando la elevada afinidad que presentó la PROG (entrada 1, Tabla I.9) y el alto número de conformaciones iguales a la estructura cristalográfica (PDB: 4Y8W),<sup>[106]</sup> se estima que los parámetros establecidos para el Anclaje Molecular fueron correctos. Del análisis se observa que la Abiraterona presenta una elevada afinidad hacia la CYP21A2, lo cual concuerda con lo reportado en relación a su baja selectividad hacia la CYP17A1.<sup>[61]</sup>

En general, los HBE seleccionados para el estudio presentaron poca afinidad hacia CYP21A2, mostrando en varios casos energías de unión positivas (entradas 4, 5, 6 y 8), o energías cercanas a 0 kcal/mol (entradas 3 y 7). Aunque para estos híbridos el fragmento esteroide presenta una conformación similar a la Abiraterona (Figura I.27 A), el

<sup>106</sup> Zhao, B.; Lei, L.; Kagawa, N.; Sundaramoorthy, M.; Banerjee, S.; Nagy, L.D.; Guengerich, F.P.; Waterman, M.R. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 10613–10622.

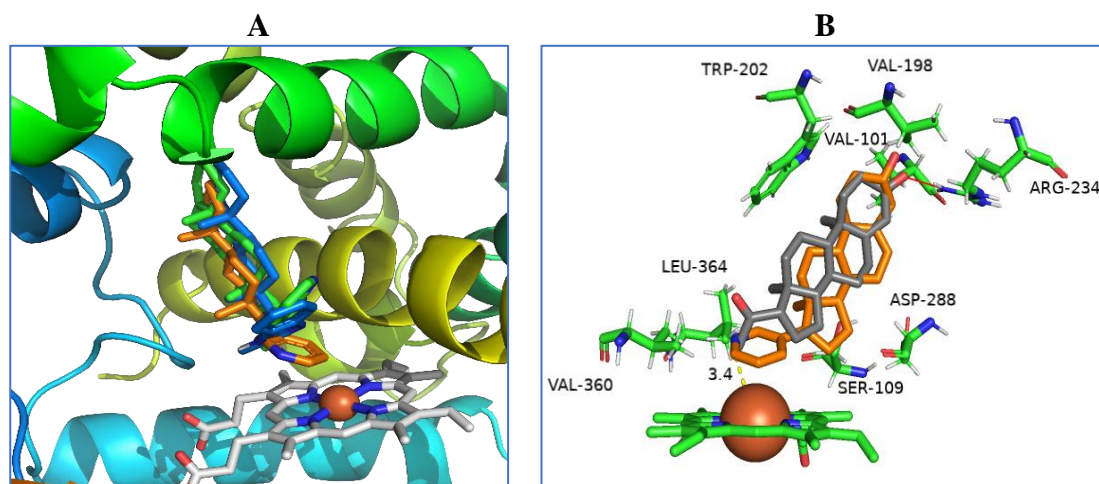
fragmento heterocíclico tiene una orientación diferente que provoca que no exista interacción con el grupo Hemo. Esto puede ser consecuencia de los dos enlaces rotables (C17–C20 y C20–C2') que permiten un mejor arreglo tridimensional con la cavidad hidrofóbica.

**Tabla I.9.** Afinidad promedio y población de la AER y los HBE con el CYP21A2.

Entrada	Ligandos	Estructura	Afinidad Promedio	Población
1	PROG		-10.76	20
2	AER		-9.45	16
3	Ia		-2.59	16
4	Ib		+15.39	11
5	Ic		+15.90	7
6	Id		+3.59	8
7	Ik		-1.68	14
8	III		+0.22	12

Por otra parte, AER sí mostró afinidad por esta enzima y adicionalmente se observó un patrón de interacción similar a la PROG (Figura I.27 B), con los residuos importantes para que CYP21A2 exhiba su actividad.<sup>[61]</sup> La PROG es el sustrato natural de la CYP21A2 y el C=O de la posición 20 (señalado en azul en la Tabla I.9) se encuentra a una distancia de 3.2 Å del grupo Hemo.<sup>[107]</sup> De forma similar, el nitrógeno en la AER está a una distancia de 3.4 Å (Figura I.27 B).

<sup>107</sup> Pallan, P.S.; Wang, C.; Lei, L.; Yoshimoto, F.K.; Auchus, R.J.; Waterman, M.R.; Guengerich, F.P.; Egli, M. Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid Structure of the Enzyme-Progesterone Substrate Complex and Rate-Limiting C-H Bond Cleavage. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 13128–13143.



**Figura I.27.** Comparación de **Ia** (azul), **Ib** (verde), AER (naranja) y PROG (gris) en el sitio activo de CYP21A (A). Se observa la disposición espacial del sitio activo de CYP21A2 (bastones verdes) en interacción con AER y PROG (B).

En base a la alta afinidad que presenta la AER por la CYP21A2 (-9.45 kcal/mol), la alta población de conformaciones y el hecho de que se une a la enzima interaccionando con residuos claves, pudiera sugerir que actúa como inhibidor de la CYP21A2. Este resultado está en correspondencia con lo observado por Malikova y cols. en 2017,<sup>[61]</sup> donde la AER inhibe a CYP21A2 con una  $K_D$  de  $6,3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ . Varios de los efectos adversos que exhiben los pacientes que utilizan este fármaco son resultado de esta inhibición.<sup>[96]</sup>

El análisis del acoplamiento molecular permitió corroborar que la AER es capaz de inhibir tanto a la CYP17A1 como a la CYP21A2. El resto de los compuestos evaluados que exhibieron afinidad por CYP17A1, presentaron además una baja afinidad (**Ia** y **Ib**) o nula (**Ib** – **Id** y **III**) hacia la CYP21A2. Por tanto, este estudio permite predecir que estos ligandos son candidatos selectivos para ser evaluados contra el cáncer de próstata.

A pesar de que los programas de Anclaje Molecular como el Autodock 4.2, permiten hacer predicciones razonables del modo de unión de un ligando hacia una diana proteica,<sup>[108]</sup> consideran pobremente la flexibilidad conformacional y el papel de las moléculas de agua, lo cual limita la exactitud de la energía determinada por el método.<sup>[109]</sup> Esto se debe a que las funciones de puntuación tratan a las interacciones receptor-ligando con modelos teóricos simples, no consideran las contribuciones entrópicas, los efectos

<sup>108</sup> Gallicchio, E.; Levy, R. Recent theoretical and computational advances for modeling protein-ligand binding affinities. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2011**, *85*, 27–80.

<sup>109</sup> Cozzini, P. Target Flexibility: An Emerging Consideration in Drug Discovery and Design. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6237–6255.

del disolvente y se obtiene una solución que puede no ser representativa del conjunto de conformaciones del sistema en equilibrio.<sup>[110]</sup>

Para evaluar la estabilidad de estos complejos y calcular la afinidad de los ligandos por ambas enzimas de forma más precisa se hace necesario realizar simulaciones de Dinámica Molecular (DM). Este análisis permite conocer cómo influye la libertad conformacional de la enzima en la estabilidad de los complejos y en las interacciones proteína-ligando.

### **1.2.3.2. Simulaciones de DM de los complejos CYP17A1-HBE y CYP21A2-HBE.**

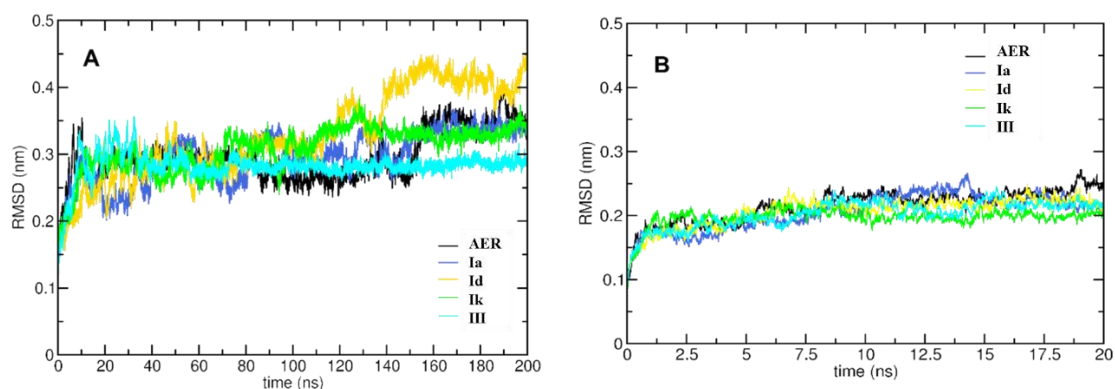
Para el estudio se seleccionaron los complejos CYP17A1-ligando y CYP21A2-ligando, donde el ligando corresponde a: AER, **Ia**, **Id**, **Ik** y **III**. Se ejecutaron simulaciones productivas de 200 ns para el caso de los complejos CYP17A1-ligando y 20 ns, para CYP21A2-ligando, tomando como estructura inicial los complejos predichos en el anclaje molecular: **Ia**(1), **Id**(2), **Ik**(2) y **III**(2). En este trabajo se parametrizaron los complejos debido a que las interacciones grupo Hemo-ligandos no están descritas en los campos de fuerzas.

### **Análisis de la estabilidad a partir de los valores de RMSD.**

La estabilidad de los complejos durante el tiempo de simulación se determinó a partir de los valores de RMSD de cada complejo enzima-ligando en comparación con su estructura inicial. De igual manera se determinó la desviación de la posición de cada ligando respecto a su posición inicial. Como resultado, se obtuvo que los HBE conservan en el tiempo el modo de unión con CYP17A1 (Figura I.28 A). y CYP21A2 (Figura I.28 B). Los complejos de los ligandos con ambas enzimas son estables en el tiempo, debido a que los ligandos de forma general presentan una baja movilidad dentro del complejo (<0,5 nm). En el caso del complejo CYP17A1-**Id** se observa una variación pequeña, inferior a 0,4 nm, lo que puede sugerir un cambio en la conformación que adopta el ligando dentro del complejo. Sin embargo, al final de la simulación este regresa nuevamente a la conformación de equilibrio. Estos resultados sugieren que existe un único modo de unión entre los ligandos y las enzimas, y la existencia de interacciones intermoleculares fuertes de alta prevalencia entre ambas entidades.

---

<sup>110</sup> Yilmazer, N.; Korth, M. Comparison of Molecular Mechanics, SemiEmpirical Quantum Mechanical, and Density Functional Theory Methods for Scoring Protein-Ligand Interactions. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 8075-8084.



**Figura I.28.** Evolución en el tiempo (ns) de los valores de RMSD (nm) para diferentes conjuntos de átomos pesados en los HBE evaluados: A) complejos CYP17A1-ligando y B) complejos CYP21A2-ligando.

### Análisis de las interacciones intermoleculares.

Las interacciones intermoleculares son atracciones de tipo no covalente (enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals) que son las responsables de la estabilidad de los complejos. Primeramente, se analizaron las interacciones de enlace de hidrógeno entre CYP17A1 y sus respectivos ligandos. En la Tabla I.10 se muestran los átomos de nitrógeno (N) y oxígeno (O) que forman enlace de hidrógeno entre los ligandos y la CYP17A1.

**Tabla I.10.** Grupos donores y aceptores de la AER y los HBE con la CYP17A1, formando enlace de hidrógeno y su prevalencia (%) durante las simulaciones productivas.

Ligandos		Donor	Aceptor	Prevalencia (%)*	
<b>AER</b>	-	AER(OH)	Asn <sup>202</sup> (O)	96.8	
<b>Ia</b>	R=H	Ia (N1')	Tyr <sup>306</sup> (O)	20.3	
		Arg <sup>239</sup> (NH2)	Ia (O)	54.1	
<b>Id</b>	R=F	Arg <sup>239</sup> (NE)	Ia (O)	94.2	
		Id (N1')	Ala <sup>105</sup> (O)	30.8	
<b>Ik</b>	A=N	Ala <sup>302</sup> (N)	Id (N3')	35.0	
		Arg <sup>239</sup> (NH2)	Ik (O)	17.9	
<b>III</b>	X=S	Arg <sup>239</sup> (NH1)	Ik (O)	27.0	
		Arg <sup>239</sup> (NE)	Ik (O)	23.0	
		Arg <sup>239</sup> (NH1)	III(O)	95.6	

\*Solo se muestran los que presentaron una prevalencia mayor del 10%.

La dinámica productiva concuerda con los datos cristalográficos extraídos del complejo CYP17A1-Abiraterona, donde existe un enlace de hidrógeno estable con el

residuo Asn<sup>202</sup> de la enzima, que se mantiene durante el 97% del tiempo de simulación, el cual se observa en la estructura obtenida por DRX (PDB: 3RUK).<sup>[46]</sup> Como se muestra en la Tabla I.10, entre los ligandos y la proteína se forman pocos enlaces de hidrógeno relativamente estables, menos del 50% del tiempo de simulación. También se observa que, excepto **Id**, el resto de los ligandos forman un enlace de hidrógeno estable con el residuo Arg<sup>239</sup>, uno de los aminoácidos importantes para la actividad de la CYP17A1.<sup>[46]</sup>

Adicionalmente, se determinaron las interacciones de van der Waals a partir del porcentaje de ocupación de los HBE sobre cada residuo de CYP17A1 durante la simulación, con una distancia de corte de 4Å. La Tabla I.11 muestra estos valores para residuos claves del sitio activo. Estos datos indican que los ligandos están unidos a la enzima mediante interacciones de van der Waals, principalmente a través de los residuos del sitio activo (Arg<sup>239</sup>, Ala<sup>367</sup>, Ile<sup>371</sup> y Val<sup>483</sup>), y para todos los HBE estas interacciones se mantienen durante casi toda la simulación. Los resultados revelan que estas interacciones pudieran ser las principales responsables en la estabilidad de los complejos.

**Tabla I.11.** Porcentaje de ocupación de los HBE respecto a residuos claves de CYP17A1.

Residuo	AER	Ia	Id	Ik	III
Asn <sup>202</sup>	100	100	92	48.7	27.3
Arg <sup>239</sup>	96.5	100	100	100	100
Ala <sup>367</sup>	100	79.7	100	95.3	100
Ile <sup>371</sup>	98.3	29.1	97.9	86.3	100
Val <sup>483</sup>	100	100	96.7	100	100
<b>Hemo</b>	100	100	100	100	100
<b>Fe</b>	100	69.2	61.2	100	0

Por otra parte, todos los HBE se encuentran a menos de 4Å del grupo Hemo durante todo el tiempo de simulación (200 ns), sugiriendo su papel inhibitorio. Adicionalmente, los ligandos **Ia** y **Id** se encuentran a menos de 4Å del ion Fe<sup>3+</sup> durante el 70% de la simulación, lo que sugiere que pudieran actuar como inhibidores reversibles. El compuesto **Ik** fue el único con un comportamiento similar a la Abiraterona, donde ambos interaccionan durante toda la simulación con el grupo Hemo y con el ion Fe<sup>3+</sup>.

Con el objetivo de profundizar en la capacidad selectiva de los HBE sobre la CYP17A1, se analizaron las interacciones no covalentes entre los ligandos y la CYP21A2. Para ello, se obtuvo la prevalencia de los enlaces de hidrógeno (Tabla I.12) y el porcentaje de ocupación de los ligandos sobre residuos del sitio activo de CYP21A2 durante el tiempo de simulación, a una distancia  $\leq 4$  Å (Tabla I.13).

**Tabla I.12.** Grupos donores y aceptores, de la AER y los HBE con la CYP21A2, formando enlaces de hidrógeno y su prevalencia (%) durante las simulaciones productivas.

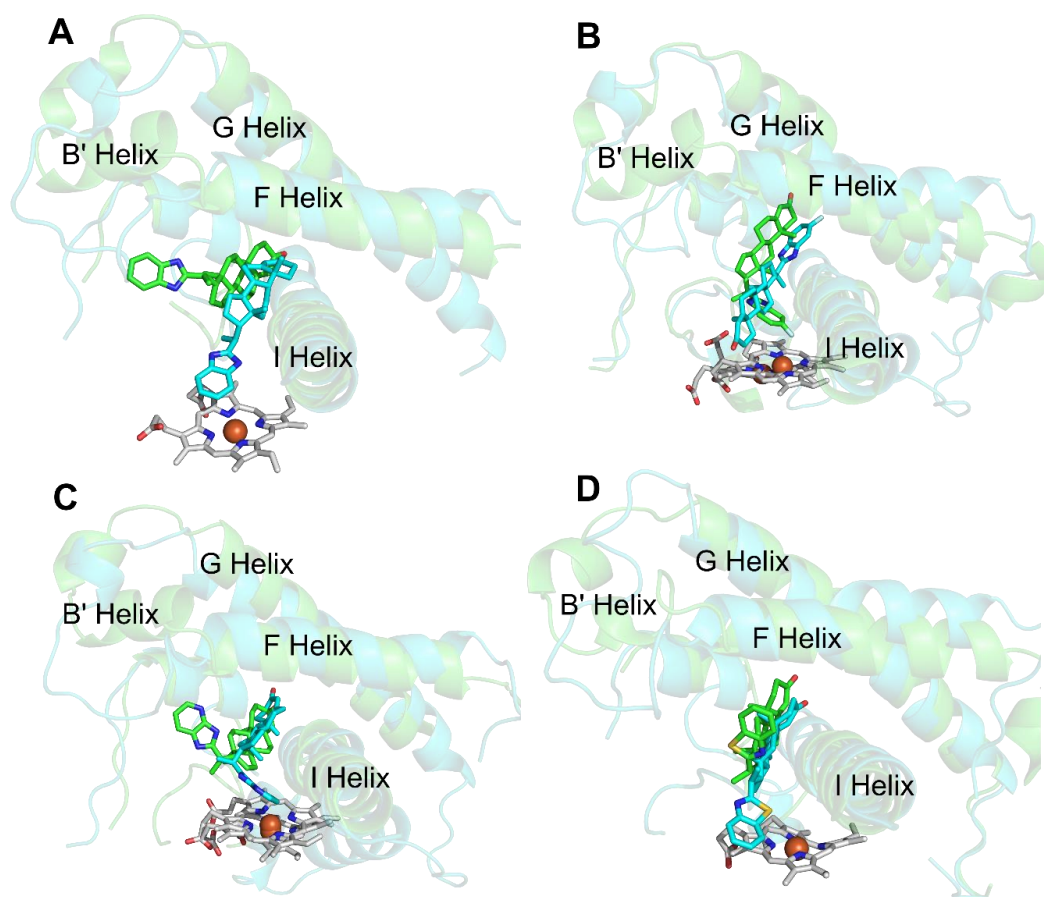
Ligando	Donor	Aceptor	Prevalencia (%)
<b>AER</b>	AER(OH)	Val <sup>198</sup> (O)	5
<b>Ia</b>	Arg <sup>234</sup> (NH1)	Ia (O)	98.6
<b>Id</b>	-	-	0
<b>Ik</b>	Arg <sup>234</sup> (NH1)	Ik (O)	96.7
	Ser <sup>203</sup> (OH)	Ik (O)	47.3
<b>III</b>	Arg <sup>234</sup> (NH1)	III(O)	85.9

**Tabla I.13.** Porcentaje de ocupación de los ligandos respecto a residuos claves de CYP21A2.

CYP21A2/CYP17A1 Residuo	AER	Ia	Id	Ik	III
Val <sup>101</sup> /Ala <sup>105</sup>	100	100	100	100	100
Gln <sup>196</sup> /Asn <sup>202</sup>	0	0	0	0	0
Arg <sup>234</sup> /Arg <sup>239</sup>	56	100	100	100	100
Asp <sup>288</sup> /Asp <sup>298</sup>	90.8	100	100	100	100
Val <sup>359</sup> /Val <sup>366</sup>	82	0	0.2	0	0
Val <sup>360</sup> /Ala <sup>367</sup>	10	100	100	100	100
Leu <sup>364</sup> /Ile <sup>371</sup>	100	100	64.1	100	100
Ile <sup>471</sup> /Val <sup>483</sup>	57.7	100	11.6	99.9	100
<b>Hemo</b>	100	66.8	100	100	100
<b>Fe</b>	99.3	0	100	0.2	36

Como se observa en la Tabla I.12, los HBE forman menor cantidad de enlaces de hidrógeno con CYP21A2 que con la CYP17A1 (Tabla I.10), aunque estos son estables en el tiempo. Solo **Id** no forma ningún enlace de hidrógeno durante toda la simulación con esta enzima; para el resto de los HBE el enlace formado con Arg<sup>234</sup> es el más frecuente. En la Tabla I.2.13 se relacionan los contactos de los HBE y la AER, con residuos análogos a CYP17A1 (resaltados en rojo), reportados por Malikova y cols.<sup>[61]</sup> Todos los ligandos presentaron interacciones de van der Waals con el grupo Hemo, manteniendo una distancia inferior a 4 Å respecto al átomo de hierro, y en los casos de la **AER** y **Id** durante toda la simulación. Sin embargo, en el híbrido **Id** como el sustituyente flúor es el que interactúa con el centro metálico del grupo hemo, es menos probable que se produzca una interacción fuerte. Esto se debe a que la transferencia de un par de electrones para establecer un complejo de coordinación con el Fe podría ocurrir en presencia de átomos de N o S, pero para el F esto no ocurre, como consecuencia de su alta electronegatividad. Estos resultados refuerzan la tesis de que los HBE pudieran ser selectivos a CYP17A1.

Las diferencias estructurales entre los complejos CYP17A1 y CYP21A2, descritas anteriormente, no son suficientes para predecir las diferencias en la afinidad que estos ligandos pueden tener, y por lo tanto su selectividad. Si bien la orientación del resto heterocíclico es diferente en ambos sitios activos (Figura I.29), el análisis cualitativo de los contactos interatómicos y los enlaces de hidrógeno no permite establecer una relación cuantitativa entre interacciones y afinidad de complejos.



**Figura I.29.** Comparación de la conformación final (200 ns) de **Ia** (A), **Id** (B), **Ik** (C) y **III** (D) en el sitio activo de CYP17A1 (cian) y CYP21A2 (verde).

### Determinación de la energía libre de unión empleando el método LIE-D

Se procedió entonces a calcular la energía libre de unión, a partir de las simulaciones de dinámica de cada complejo utilizando el método LIE-D.<sup>[111]</sup> Los valores de  $\Delta G_{calc}$  se determinaron utilizando la Ecuación I.1 a partir de los coeficientes  $\alpha=0.233$ ;<sup>[112]</sup>  $\beta$  y  $\gamma$  (ver Parte Experimental); y las energías de interacción electrostáticas

<sup>111</sup> Miranda, W.E.; Noskov, S.Y.; Valiente, P.A. Improving the LIE Method for Binding Free Energy Calculations of Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55*, 1867–1877.

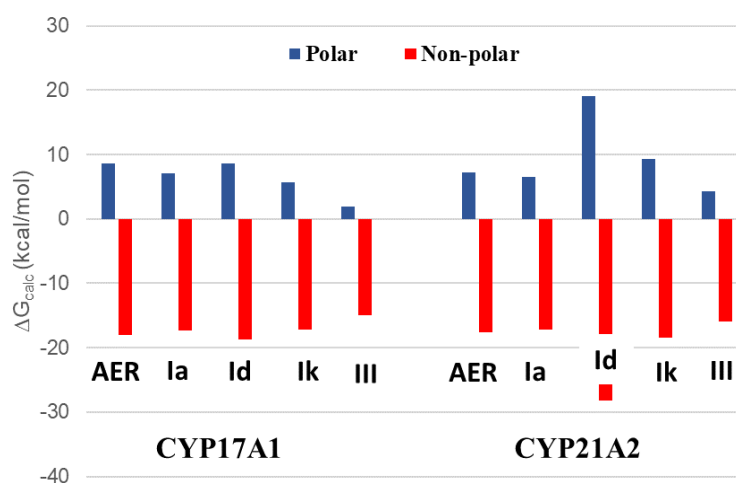
<sup>112</sup> Van Dijk, M.; Ter Laak, A.M.; Wichard, J.D.; Capoferri, L.; Vermeulen, N.P.E.; Geerke, D.P. Comprehensive and Automated Linear Interaction Energy Based Binding-Affinity Prediction for Multifarious Cytochrome P450 Aromatase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 2294–2308.

y de van der Waals se obtienen a partir de la simulación en un tiempo entre 0-20 ns (ver Anexo 3).

$$\Delta G_{enlace} = \beta(\Delta\langle V_{l-s}^{el} \rangle + \Delta\langle V_{l-l}^{el} \rangle) + \alpha\Delta\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle + \gamma \quad (\text{Ec. I. 1})$$

En todos los casos, la componente no polar de la energía libre de unión [ $\alpha\Delta\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle + \gamma$ ] fue la que más influyó en la formación de los complejos, que se refleja en la Figura I.30. La energía asociada a los contactos de van der Waals explica el alto porcentaje de ocupación de los ligandos en interacción con residuos claves de las enzimas durante la simulación. Estos resultados apoyan el argumento de que las interacciones de van der Waals son las principales responsables en la estabilidad de los complejos.

Además, la alta energía asociada a las interacciones electrostáticas explica el hecho de que existen pocos enlaces de hidrógeno entre los ligandos y las enzimas. En este grupo resalta **Id**, que presenta la mayor energía asociada a la componente polar de la energía libre de unión [ $\beta(\Delta\langle V_{l-s}^{el} \rangle + \Delta\langle V_{l-l}^{el} \rangle)$ ] de la serie. Esto se debe precisamente a que este compuesto no forma enlaces de hidrógeno con CYP21A2 y los que forma con CYP17A1 no son estables durante la simulación (menor del 35%, ver Tabla I.10).



**Figura I.30.** Energías asociadas a las interacciones polares y no polares (kcal/mol).

La validez de un inhibidor enzimático suele venir determinada por la potencia asociada a su constante de disociación o inhibición ( $K_i$ ), la cual indica la concentración necesaria para inhibir a una enzima; y por su especificidad, es decir, su incapacidad de unirse a otras proteínas ( $K_i^{enzima1}/K_i^{enzima2}$ ). Una alta especificidad y potencia asegura la reducción de los efectos secundarios y por tanto una baja toxicidad.<sup>[113]</sup>

<sup>113</sup> Lemke, T.L.; Williams, D.A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, Seventh Ed.; Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins, 2013 pp 130-131, 180.

Los valores de las  $K_i$  de los diferentes ligandos para ambas enzimas se calcularon a partir de las energías libres de unión teóricas, determinadas por el método LIE-D, empleando la ecuación ( $\Delta G_{calc} = RT * \ln K_i$ ). Los resultados se muestran en la Tabla I.14. La AER es el compuesto menos selectivo, lo que está en correspondencia con los datos experimentales descritos para este inhibidor.<sup>[96]</sup> De los valores calculados, se pueden predecir que los cuatro HBE estudiados pudieran comportarse como posibles inhibidores de CYP17A1, debido a su bajo valor de  $K_i$ ; y mucho más selectivos que la AER, con excepción del ligando **Ia**.

**Tabla I.14.** Valores calculados de la constante de inhibición ( $K_i^{calc}$ ) y el factor de selectividad, en ambas enzimas ( $K_i^{CYP21A2} / K_i^{CYP17A1}$ ).

	$\Delta G_{calc}$ (kcal/mol)	$K_i^{calc}$ (nM/mol)		$\Delta G_{calc}$ (kcal/mol)	$K_i^{calc}$ (nM/mol)	Factor de selectividad
CYP17A1			CYP21A2			$K_i^{CYP21A2} / K_i^{CYP17A1}$
<b>AER</b>	-10.50	3.98	<b>AER</b>	-11.56	0.70	0.18
<b>Ia</b>	-11.42	0.89	<b>Ia</b>	-11.86	0.44	0.49
<b>Id</b>	-11.28	1.11	<b>Id</b>	-10.26	5.86	5.29
<b>Ik</b>	-12.80	0.09	<b>Ik</b>	-10.10	7.53	79.86
<b>III</b>	-14.59	0.005	<b>III</b>	-12.84	0.09	16.92

Se predice entonces a **Ik** y **III** como los compuestos más selectivos de la serie, presentando **Ik** una relación de selectividad muy cercana a 80. Este alto valor pudiera explicarse a través de la disposición espacial del ligando en el sitio activo de ambas enzimas. Como se ilustra en la Figura I.29 C, en el complejo CYP17A1-**Ik** (color cian) el sistema heterocíclico se encuentra dirigido hacia el grupo Hemo e interacciona con este mediante apilamiento  $\pi$ - $\pi$ . En el caso de otros híbridos 17-benzimidazol-2'-il-esteroide se ha descrito recientemente que cuando hay saturación entre las posiciones C16 - C17 del fragmento esteroideal, el sistema heterocíclico adopta una disposición cuasi paralela respecto al centro metálico.<sup>[91]</sup> Por tanto, la tesis de un mecanismo irreversible es descartada, porque es poco probable la formación de un enlace covalente entre algún nitrógeno del heterociclo y el  $Fe^{3+}$  del grupo Hemo, a pesar de la cercanía de ambos en el complejo formado. Sin embargo, en el complejo con CYP21A2 (Figura I.29 C en verde), el fragmento heterocíclico está dirigido en una dirección opuesta al grupo Hemo y es el fragmento esteroideal el que interacciona con este grupo, para formar un sistema menos estable.

**I.2-CAPÍTULO 2:**

**Síntesis Orientada a la Diversidad (DOS) de conjugados  
heterociclo-esteroide**



## 2.1. ANTECEDENTES

### 2.1.1. Síntesis Orientada a la Diversidad estructural.

Entre los principales retos para la química moderna destaca la búsqueda constante de compuestos orgánicos de interés biológico, que permitan su aplicación en la práctica médica. En este sentido, de forma tradicional, la Naturaleza ha sido la principal fuente de moléculas bioactivas, identificadas generalmente mediante cribados sistemáticos realizados a extractos naturales.<sup>[114]</sup> Una vez determinado el compuesto responsable de la actividad biológica, su estructura se convierte en blanco de estudio sistemático para la síntesis orgánica, por lo que su obtención constituye un ejemplo de la estrategia de síntesis orientada a una molécula objetivo (*Target Oriented Synthesis* – TOS). Las rutas sintéticas empleadas dentro de la aproximación TOS pueden ser lineales o convergentes, y se planifican siguiendo un planteamiento retrosintético que parte de la molécula final, desde lo complejo hacia lo sencillo.<sup>[115]</sup>

Otra de las herramientas que ha permitido explorar un mayor número de compuestos estructuralmente relacionados es la Química Combinatoria. En ella se parte de un único esqueleto y se consigue diversidad estructural modificando los sustituyentes y grupos funcionales unidos a dicha estructura de referencia. El origen de los compuestos de partida puede ser diverso e incluir productos naturales, fármacos conocidos, entre otros. De esta manera, la estructura química de los productos es muy similar a la molécula tomada como modelo, y, por tanto, se espera que la actividad biológica también lo sea, pero buscando mejorar las propiedades farmacológicas o farmacodinámicas respecto al precursor.<sup>[116]</sup>

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados que se han obtenido con estas estrategias su alcance es limitado, ya que no es capaz de abarcar una buena parte del espacio químico (definido como la región tridimensional en la que están comprendidas todas las posibles moléculas bioactivas). Esto deja una amplia variedad de potenciales compuestos sin explorar en el ámbito del descubrimiento de nuevos fármacos.

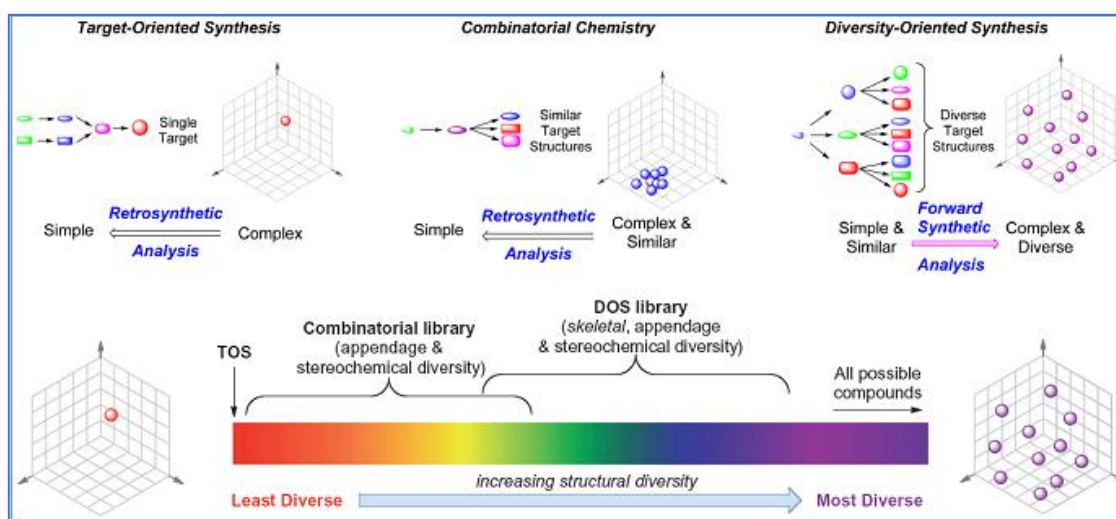
---

<sup>114</sup> Li, J. W.-H.; Vederas, J.C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, **2009**, 325, 161-165.

<sup>115</sup> Schreiber, S. L. Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science*, **2000**, 287, 1964–1969.

<sup>116</sup> Fischer, J.; Ganellin, R.; Proudfoot, J.; Alapi, E.M. *Analogue based drug discovery II*, 1st ed, (Eds.: Fischer, J.; Ganellin, R.), Wiley: Germany, **2010**, pp. 3–24.

En este contexto, a lo largo de las dos últimas décadas, ha venido creciendo el interés por el desarrollo de metodologías basadas en la síntesis orientada a la diversidad (*Diversity-Oriented Synthesis*, DOS).<sup>[115]</sup> Esta estrategia, a diferencia de las dos anteriores, se enfoca en la creación de quimiotecas de compuestos estructuralmente diversos. Para ello, emplea materiales de partida simples o “*building blocks*” que son sometidos a diferentes transformaciones, para generar moléculas con estructuras tridimensionalmente variadas y más complejas. De esta forma se incrementa la probabilidad de descubrir nuevos agentes bioactivos, al garantizar la mayor cobertura del espacio químico. Las vías de síntesis utilizadas en DOS son ramificadas y divergentes, y se planean en un sentido sintético directo, en contrapunto a la retrosíntesis (ver Figura I.31). La máxima diversidad estructural se logra considerando tres elementos distintos: apéndices, estereoquímica y esqueleto, siendo la modificación de los apéndices la estrategia más sencilla para lograr la diversidad molecular.<sup>[117]</sup>



**Figura I.31:** Comparación de las estrategias TOS, Química Combinatoria y DOS.<sup>[115]</sup>

Como fue reflejado en el Capítulo 1, gracias a las características estructurales y al amplio espectro de actividad biológica que presentan los esteroides, estos constituyen excelentes sustratos de partida para la generación de moléculas más complejas y diversas. En los siguientes apartados se resumen algunas de las herramientas aplicadas con éxito en la diversificación del esqueleto esteroideal, lo que ha permitido obtener una amplia colección de compuestos con interesantes propiedades farmacológicas, entre los que destacan los sistemas híbridos heterociclo-esteroide.<sup>[10]</sup>

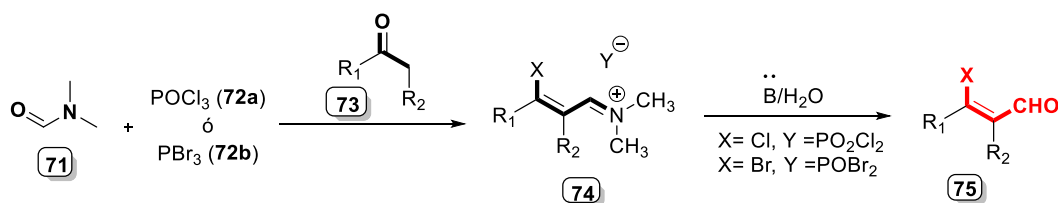
<sup>117</sup> Trabocchi, A. *Diversity-oriented synthesis: basics and applications in organic synthesis, drug discovery, and chemical biology*. John Wiley & Sons, 2013.

## 2.1.2. Metodologías para generar diversidad estructural en esteroides.

### 2.1.2.1- Derivados $\beta$ -halo enaldehydos en la obtención de hetero-esteroides.

Entre las reacciones con mayor aplicaciones sintéticas en la química de esteroides se encuentra la reacción de Vilsmeier-Haack (VH), que permite introducir funcionalidades muy reactivas en una gran variedad de sustratos, entre los que destacan compuestos con grupos carbonilos enolizables.<sup>[118]</sup>

Es bien conocido que los haluros de ácido inorgánicos reaccionan con amidas disustituidas para formar complejos activos (sales de halometilenimino), popularmente referidos como reactivo de Vilsmeier. El reactivo se prepara mediante la reacción *in situ* de una formamida *N,N*-disustituida, generalmente *N,N*-dimetilformamida **71**, con un haluro de ácido, donde los más utilizados son el oxiclورو de fósforo **72a** y el tribromuro de fósforo **72b** en frío.<sup>[119]</sup> Cuando las cetonas **73** reaccionan con el reactivo de VH producen **74**, que tras una hidrólisis básica da lugar a  $\beta$ -halo enaldehydos sustituidos **75** como se muestra en el Esquema I.16.<sup>[120]</sup>



**Esquema I.16.** Reacción de Vilsmeier sobre cetonas enolizables.

La introducción del grupo carbaldehído en diversas posiciones del esqueleto esteroideal se puede realizar empleando variadas metodologías, donde la reacción de VH ha sido empleada con este propósito. En nuestro grupo de investigación se ha empleado con anterioridad esta reacción para funcionalizar esqueletos esteroidales en los anillos A y D.<sup>[121]</sup> Las condiciones de reacción (temperatura, disolventes y cantidad equivalente de los reaccionantes) determinan el producto de formación. Por ejemplo, en el caso de los esteroides **76**, **78** y **80** se emplean diferentes condiciones de reacción para producir los correspondientes derivados  $\beta$ -cloro enaldehydos **77**, **79** y **81**, como se muestra en el

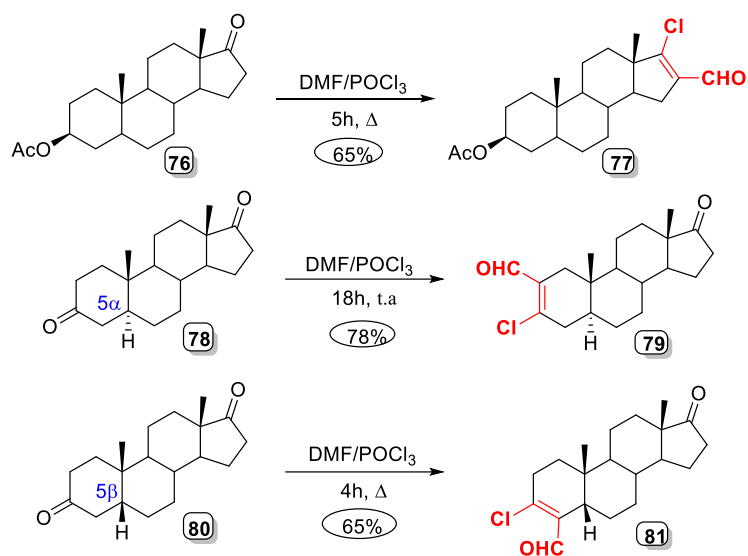
<sup>118</sup> Rajput, A.P.; Girase, P.D. Review Article On Vilsmeier-Haack Reaction. *Ijpcbs.*, **2012**, 3, 25–43.

<sup>119</sup> Su, W.; Weng, Y.; Jiang, L.; Yang, Y.; Zhao, L. Recent Progress in the Use of Vilsmeier Type Reagents. *Org. Prep. Proced. Int.* **2010**, 42, 503–555.

<sup>120</sup> Meth-Cohn O., S.S.P. *Comprehensive Organic Synthesis.*; Trost B.M., Fleming I., Ed.; Pergamon Press: New York, **1990**, pp 558-559.

<sup>121</sup> Ruiz, A.; Coro, J.; Almagro, L.; Ruiz, J.A.; Molero, D.; Maroto, E.E.; Filippone, S.; Herranz, M.A.; Martínez-Álvarez, R.; Sancho-García, J.C.; Di Meo, F.; Suárez, M.; Martín, N. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 2819–2826

Esquema I.17. La diferencia en la reactividad de los grupos carbonilos se debe al anillo donde estos se encuentran, la serie a la que pertenezca el esteroide ( $5\alpha$  o  $5\beta$ ) y al efecto estérico que ejerce el metilo 18 sobre la posición 17 del anillo D, según se describe en estudios realizados por Sciaky y Pallini.<sup>[122]</sup>



**Esquema I.17.** Diferente reactividad de cetonas esteroidales en el anillo A y D.

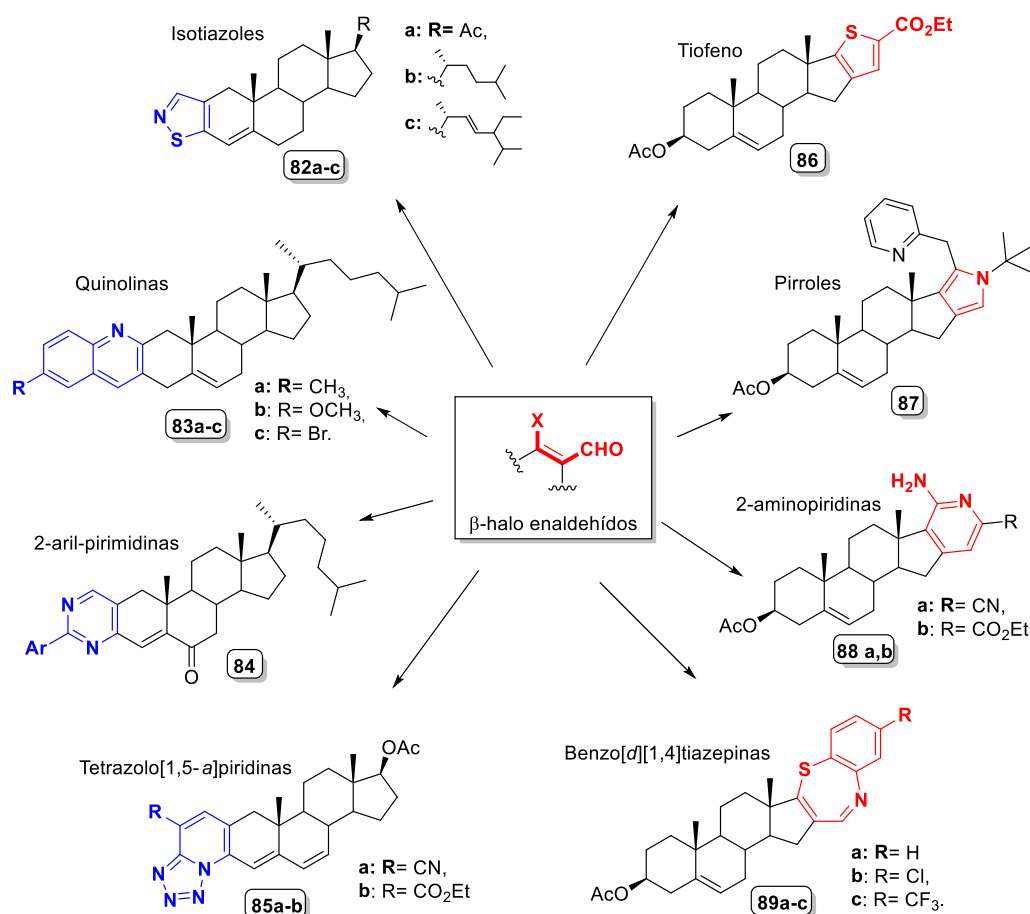
La formación de estos derivados funcionales mediante la reacción de VH ha permitido la conjugación de esteroides a diversas estructuras heterocíclicas, empleando variadas metodologías de síntesis. En el Esquema I.18 se resumen un grupo de estos compuestos, entre los que destacan isotiazoles **82**, quinolinas **83**, 2-arilpirimidinas **84**, y tetrazolo[1,5-*a*]piridinas **85** fusionados al anillo A de derivados del androstano, colestano y ergostano; así como tiofeno **86**, pirroles **87**, 2-aminopiridinas **88** y benzo[*d*][1,4]tiazepinas **89** fusionados por el anillo D esteroidal.<sup>[123]</sup>

Como consecuencia de la reactividad de los  $\beta$ -halo enaldehydos esteroidales, actuando preferentemente como electrófilos ambidentados, la mayoría de los híbridos heterociclo-esteroides corresponden a sistemas fusionados. Sin embargo, con el objetivo de preparar nuevos compuestos estructuralmente diversos, algunos autores han desarrollado metodologías para la fusión o unión exocíclica de heterocíclicos al esqueleto esteroidal de forma selectiva.<sup>[124]</sup>

<sup>122</sup> Sciaky R., Pallini U., Action of the Vilsmeier-Haack reagent on steroidal ketones and derivatives, *Tetrahedron Lett.*, **1964**, 27, 1839-1841.

<sup>123</sup> Boruah, G.; Nongthombam, S.; Romesh, C. Divergent Synthesis of Steroid Analogs. *Heterocycles*, **2019**, 98, 19–62

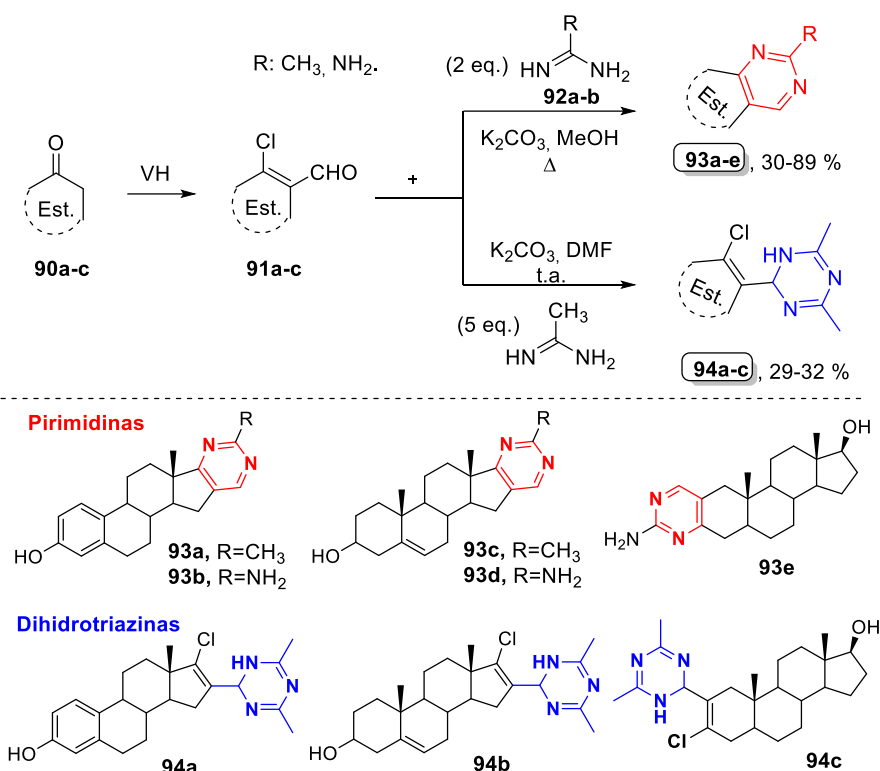
<sup>124</sup> Ibrahim-ouali, M.; Dumur, F. Recent Synthesis of Steroidal Derivatives Containing Heterocycles. *Arkivoc*, **2019**, i, 304–339.



**Esquema I.18.** Diversos heteroesteroides derivados de  $\beta$ -halo enaldehidos esteroidales.<sup>[123]</sup>

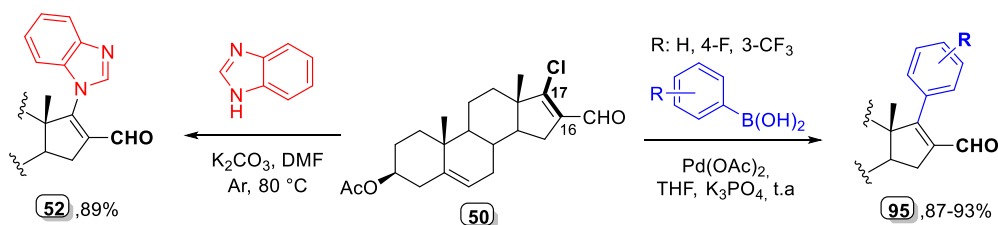
Por ejemplo, en 2018 Scherbakov y col.<sup>[125]</sup> reportan la síntesis de Azaesteroides que poseen un *N*-heterociclo de seis miembros fusionados o enlazados a los anillos A/D de hormonas esteroidales, como nuevos agentes con un fuerte efecto antiproliferativo en células de cáncer de mama. Para ello utilizan una ruta en dos pasos: 1) la obtención de  $\beta$ -cloro-vinil aldehidos **91a-c** mediante la reacción de VH sobre las cetonas esteroidales **90a-c** (estrona, dihidrotestosterona, deshidroepiandrosterona) y, 2) la condensación de estos intermedios con amidinas en medio básico. En dependencia de las condiciones de reacción, se obtienen mayoritariamente las pirimidinas fusionadas **93a-e** con rendimientos entre 30 y 89 % al utilizar 2 equivalentes de amidina y reflujo de metanol; mientras que al emplear un gran exceso de acetamidina **92a** y DMF como disolvente a temperatura ambiente los compuestos aislados corresponden a derivados de dihidrotriazinas **94a-c**, pero en un bajo rendimiento (29 – 32 %), ver Esquema I.19.

<sup>125</sup> Scherbakov, A.M.; Komkov, A.V.; Komendantova, A.S.; Yastrebova, M.A.; Andreeva, O.E.; Shirinian, V.Z.; Hajra, A.; Zavarzin, I.V.; Volkova, Y.A. Steroidal Pyrimidines and Dihydrotriazines as Novel Classes of Anticancer Agents against Hormone-Dependent Breast Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* **2018**, 8:979.



**Esquema I.19.** Síntesis de Azaesteroides funcionalizados en anillos A/D de derivados de hormonas esteroidales.

También, el derivado  $\beta$ -cloro enaldehído **50** ha sido sometido a reacciones selectivas de acoplamiento carbono-nitrógeno y carbono-carbono, para dar lugar a compuestos formilados 17-aryl/heteroaryl sustituidos (Esquema I.20). Por ejemplo, como fue descrito en el Capítulo 1, el intermediario **52** es obtenido mediante la sustitución del átomo de cloro en C17 por el fragmento 1*H*-benzimidazol, en la búsqueda de una ruta alternativa para la síntesis de la Galeterona<sup>[89]</sup>. Posteriormente Gogoi y col.<sup>[126]</sup> desarrollaron una metodología basada en el acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura, para obtener nuevos derivados 17-aryl sustituidos **95**, empleando diferentes compuestos borónicos.



**Esquema I.20.** Síntesis de aldehídos esteroidales 17-heteroaryl (**52**) y 17-aryl (**95**) sustituidos a partir del derivado  $\beta$ -cloro enaldehído **50**.

<sup>126</sup> Gogoi, P.; Bezboruah, P.; Boruah, R. C. Ligand-Free Suzuki Cross-Coupling Reactions: Application to  $\beta$ -Halo- $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 5032-5035.

### 2.1.2.2- Diversificación por Reacciones Multicomponentes.

Las Reacciones Multicomponentes (RMC) son definidas como procesos convergentes de alta eficiencia química donde se combinan tres o más reactivos para generar un producto final, de modo que contenga en su estructura fragmentos significativos de todos los componentes.<sup>[127]</sup> Durante las últimas dos décadas las RMC han recibido especial atención para la industria farmacéutica, dada su excepcional eficiencia sintética en la obtención de compuestos bioactivos.<sup>[128]</sup>

La utilización de las RMC en la funcionalización y derivatización de biomoléculas ha tenido un continuo crecimiento en los últimos años, dado su probado éxito en el acoplamiento de péptidos,<sup>[129]</sup> macrociclizaciones,<sup>[130]</sup> glicoconjugación de proteínas<sup>[131]</sup> y modificación de carbohidratos.<sup>[132]</sup> En la química de esteroides han demostrado ser importantes procesos generadores de diversidad y complejidad estructural, emergiendo como herramientas efectivas para la rápida derivatización del esqueleto esteroide en la búsqueda de aplicaciones en química médica y supramolecular.<sup>[133]</sup>

A continuación, se resumen algunos ejemplos representativos de RMC aplicadas a la obtención de híbridos heterociclo-esteroides, mediante la modificación del núcleo y la cadena lateral en esteroides.

Entre los procesos multicomponentes más estudiados, se encuentran las que utilizan isonitrilos como uno de sus materiales de partida (RMC-I). Aunque estas reacciones están normalmente orientadas a la obtención de estructuras peptídicas, basadas generalmente en la reacción clásica descrita por Ivar Ugi (ver Esquema I.21), también han sido

---

<sup>127</sup> Zhu, J.; Wang, Q.; Wang, M.-X., Eds. *Multicomponent Reactions in Organic Synthesis*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, Germany, **2014**.

<sup>128</sup> Younus, H.A.; Al-Rashida, M.; Hameed, A.; Uroos, M.; Uzma, S.; Rana, S.; Khan, K. M. Multicomponent reactions (MCR) in medicinal chemistry: a patent review (2010-2020). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2021**, 31, 267-289.

<sup>129</sup> Reguera, L.; Méndez, Y.; Humpierre, A.R.; Valdés, O.; Rivera, D.G. Multicomponent Reactions in Ligation and Bioconjugation Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2018**, 51, 1475-1486

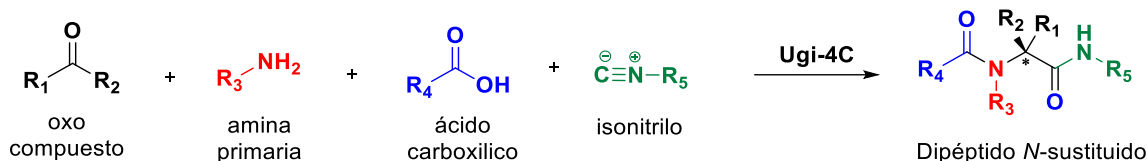
<sup>130</sup> White, C.J.; Yudin, A.K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nat. Chem.* **2011**, 3, 509-524.

<sup>131</sup> Méndez, Y.; Chang, J.; Humpierre, A.R.; Zanuy, A.; Garrido, R.; Vasco, A.V.; Pedrosa, J.; Santana, D.; Rodríguez, L.M.; García-Rivera, D.; Valdés, Y.; Vérez-Bencomo, V.; Rivera, D.G. Multicomponent polysaccharide-protein bioconjugation in the development of antibacterial glycoconjugate vaccine candidates. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 2581-2588.

<sup>132</sup> Khan, M.M.; Yousuf, R.; Khan, S.; Shafiullah, S. Recent advances in multicomponent reactions involving carbohydrates. *RSC Adv.* **2015**, 5, 57883-57905.

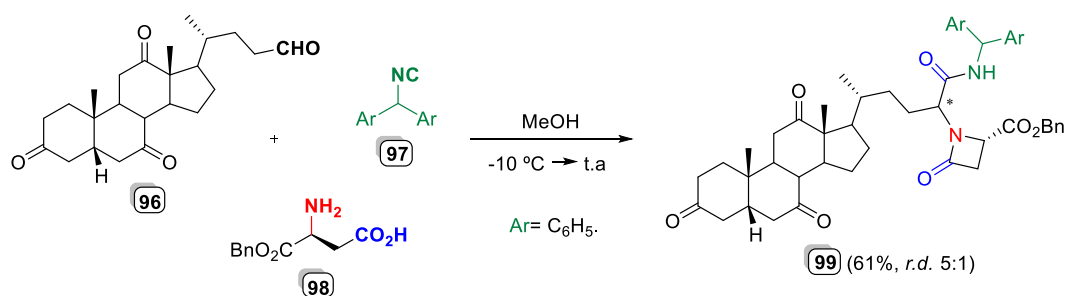
<sup>133</sup> Reguera, L.; Attorresi, C.I.; Ramírez, J.A.; Rivera, D.G. Steroid diversification by multicomponent reactions. *Beilstein J. Org. Chem.* **2019**, 15, 1236-1256.

aplicadas a la formación de estructuras heterocíclicas de relevancia química y biológica.<sup>[134]</sup>



**Esquema I.21.** Descripción general de la reacción multicomponente de Ugi (1959).

Uno de los primeros métodos de derivatización de esteroides corresponde a la síntesis de la  $\beta$ -lactama esteroidal **99**, vía reacción de Ugi 3-componentes-4-centros, (Esquema I.22).<sup>[135]</sup> Como componente carbonilo se utilizó el aldehído colánico **96**; que se hace reaccionar con el isonitrilo **97** y el  $\beta$ -aminoácido **98**, induciendo la formación del fragmento  $\beta$ -lactámico difícil de generar a través de otros métodos tradicionales. El compuesto final es aislado con un 61 % de rendimiento, como una mezcla diastereomérica en proporción 5:1.



**Esquema I.22.** Síntesis de una  $\beta$ -lactama esteroidal **99** vía reacción Ugi-3C-4C.

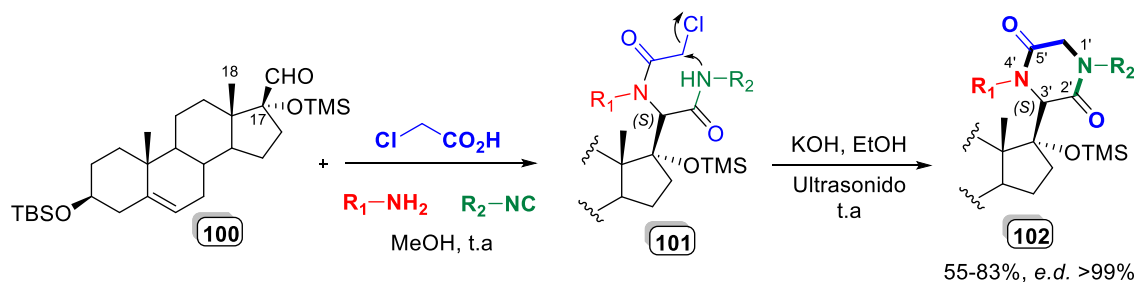
Para mejorar la estereoselectividad de los productos que se obtienen a través de este tipo de reacción, Bruttomesso y col.<sup>[136]</sup> reportan el empleo del aldehído **100** como componente director de la estereoquímica, al presentar el grupo carbaldehído unido a C17 en la cara  $\beta$  del esqueleto esteroidal, en una posición estéricamente controlada por el metilo axial C18. Como se muestra en el Esquema I.23, los autores observaron una alta diastereoselectividad (*e.d.* > 99%) en las 2,5-diketopiperazinas esteroidales **102** obtenidas

<sup>134</sup> a) Váradi, A.; Palmer, T.C.; Notis Dardashti, R.; Majumdar, S. Isocyanide-Based Multicomponent Reactions for the Synthesis of Heterocycles. *Molecules* **2016**, *21*, 19. b) Bhat, S. I.; Kigga, M.; Heravi, M. M. Multicomponent Reactions Based on In Situ Generated Isocyanides for the Construction of Heterocycles. *Chem. Heterocycl. Comp.*, **2021**, *57*, 709–719.

<sup>135</sup> Dömling, A.; Kehagia, K.; Ugi, I. Employment of a Steroidal Aldehyde in a New Synthesis of  $\beta$ -Lactam Derivatives. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9519–9522.

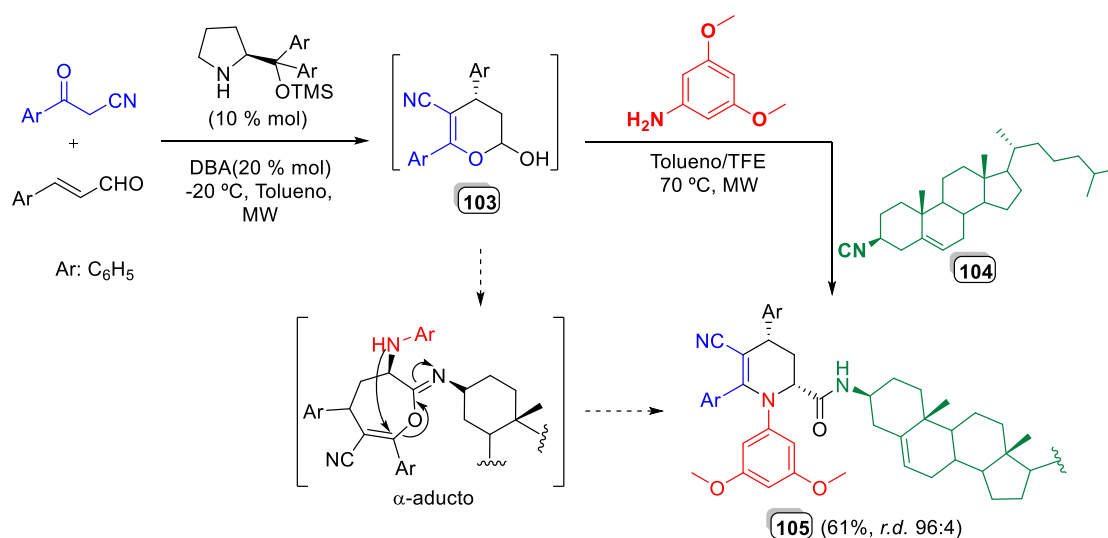
<sup>136</sup> Bruttomesso, A.C.; Eiras, J.; Ramírez, J.A.; Galagovsky, L.R. Highly stereoselective synthesis of steroidal 2,5-diketopiperazines based on isocyanide chemistry. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4022–4024.

como productos finales. Para ello, como primera etapa se generan los dipéptidos *N*-sustituídos **101**, a partir de la reacción de Ugi-4C entre el derivado del androstano **100**, el ácido cloroacético, variadas aminas e isonitrilos. Estos intermediarios posteriormente son tratados con KOH en etanol bajo ultrasonido, dando lugar a los compuestos cíclicos **102**, con una configuración *S* del nuevo centro quiral C3' del anillo de piperazina formado.



**Esquema I.23.** Ruta de síntesis de 2,5-dicetopiperazinas esteroidales **102**, basada en reacción diastereoselectiva de Ugi-4C y posterior ciclación.

Un ejemplo reciente de reacción secuencial tipo Ugi altamente diastereoselectiva fue desarrollada por Echemendía, Paixão y colaboradores en la preparación de derivados tetrahidropiridínicos (THPs).<sup>[137]</sup> El procedimiento comprendió como primera etapa la síntesis organocatalítica del compuesto bifuncional **103** (no aislado), que posteriormente se hace reaccionar con el isonitrilo esteroidal **104** y la 3,5-dimetoxianilina. De esta forma, tras un proceso de reordenamiento se obtiene el híbrido de THP-colestano **105** con buen rendimiento y excelente diastereoselectividad, ver Esquema I.24.

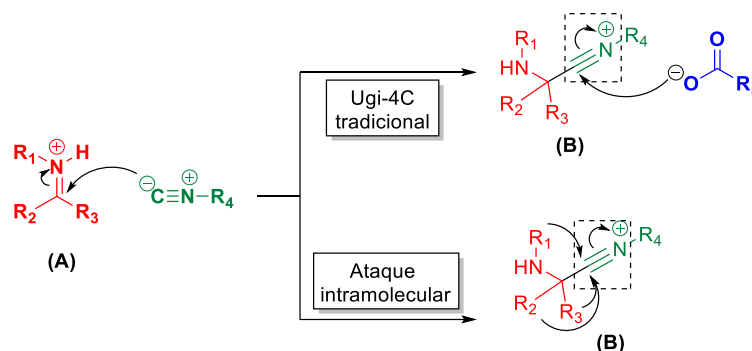


**Esquema I.24.** Síntesis multicomponente secuencial tipo Ugi del híbrido THP-colestano **105**.

<sup>137</sup> Echemendía, R.; da Silva, G.P.; Kawamura, M.Y.; de la Torre, A. F.; Corrêa, A.G.; Ferreira, M.A.B.; Rivera, D.G.; Paixão, M.W. A stereoselective sequential organocascade and multicomponent approach for the preparation of tetrahydropyridines and chimeric derivatives. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 286–289.

Hasta aquí, se puede plantear que la reacción de Ugi en su forma tradicional constituye una valiosa herramienta para la preparación de compuestos estructuralmente diversos, si se seleccionan adecuadamente sus componentes iniciales. El éxito alcanzado en las metodologías desarrolladas e introducidas para la obtención de heterociclos ha estado en el empleo de reactivos bifuncionales, necesarios para que se produzca la formación del anillo correspondiente.<sup>[138]</sup>

Otra forma prometedora de ampliar el alcance de la reacción multicomponente de Ugi, y de otras en general, implicaría utilizar funcionalidades “no clásicas”, lo que conlleva a nuevas RMC-I. En el mecanismo aceptado para la reacción de Ugi-4C un intermediario importante es el ion *nitrilium* (**B**), generado por el ataque nucleofílico del isonitrilo sobre la imina activada (**A**). Este intermediario es altamente reactivo, y puede reaccionar con el ácido carboxílico, que además de nucleófilo actúa como activador de (**B**). Sin embargo, si se emplean componentes bifuncionales, con grupos nucleofílicos adicionales, el ion *nitrilium* puede ser capturado por un ataque nucleofílico intramolecular, ver Esquema I.25.<sup>[134]</sup>



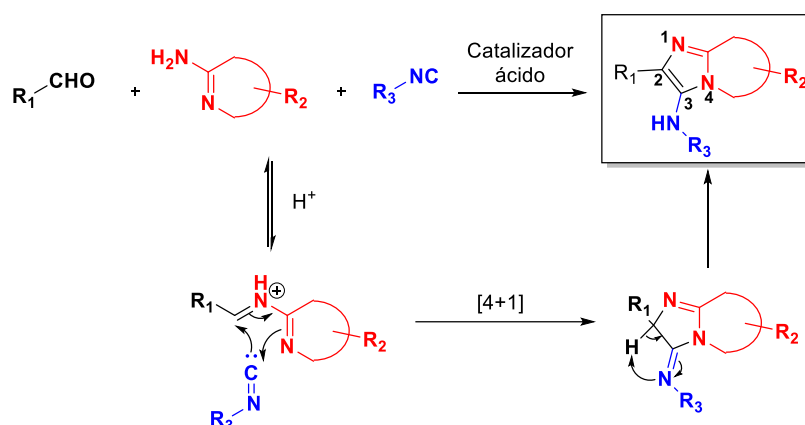
**Esquema I.25.** Captura del ion *nitrilium* (**B**) por ataques externo o intramolecular en RMC-I.

En este sentido, un ejemplo ilustrativo de este enfoque, es la introducción de aminoazaheterociclos como reactivos bifuncionales en RMC-I, reportado por primera vez simultáneamente por los grupos de Groebke y Blackburn, y más tarde por Bienaymé y colaboradores, recibiendo el nombre de reacción de GBB-3C.<sup>[139]</sup> En este proceso tricomponente reaccionan un aldehído, un isonitrilo y el mencionado reactivo bifuncional para formar derivados de 3-amino-imidazoles, generalmente en presencia de un catalizador ácido (Esquema I.26). Desde su introducción, variedad de materiales de partida se han

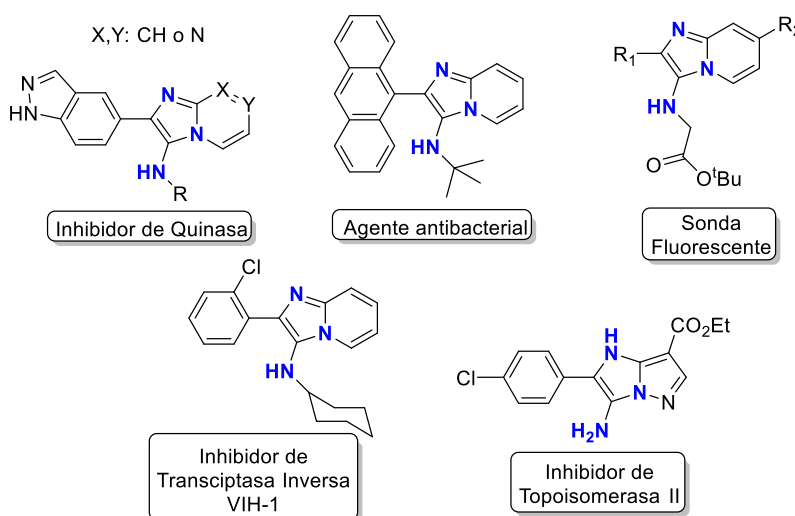
<sup>138</sup> Fouad, M.A.; Abdel-Hamid, H.; Ayoup, M.S. Two decades of recent advances of Ugi reactions: synthetic and pharmaceutical applications. *RSC Adv.*, **2020**, 10, 42644-42681.

<sup>139</sup> Boltjes A.; Dömling A.; Multicomponent Reactions: The Groebke-Blackburn-Bienaymé Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 20, 7007-7049.

aplicado con éxito en esta reacción, lo que ha permitido generar una amplia quimioteca de compuestos estructuralmente diversos con potenciales aplicaciones como antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, antitumorales, entre otras. En la Figura I.32 se muestran algunos ejemplos representativos de 3-amino-imidzoles bioactivos, siendo considerados un importante fragmento estructural en el diseño y desarrollo de nuevos fármacos.<sup>[140]</sup>



**Esquema I.26.** Mecanismo de formación de 3-amino-imidzoles por reacción de GBB-3C.



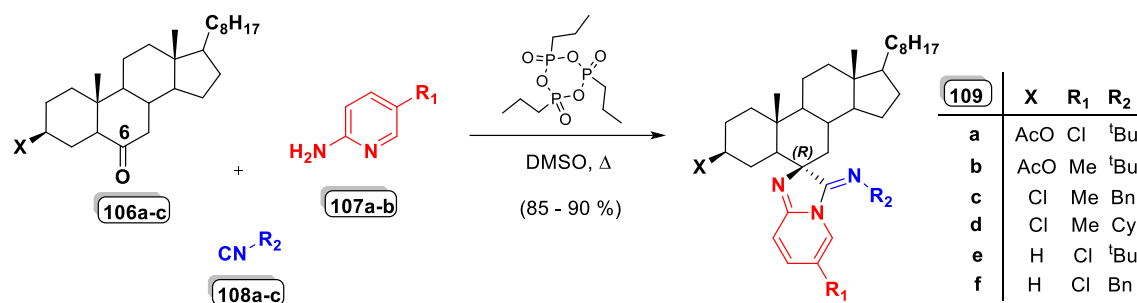
**Figura I.32.** Compuestos bioactivos sintetizados vía reacción de GBB-3C.

A pesar de la gran cantidad de sustratos estudiados en esta reacción, el empleo de esteroides como alguno de sus componentes está limitada a un solo ejemplo, trabajo publicado en 2015 por Dar y col.<sup>[141]</sup> En este caso, como componente carbonilo se

<sup>140</sup> Shaaban, S.; Abdel-Wahab, B.F. Groebke–Blackburn–Bienaymé multicomponent reaction: emerging chemistry for drug discovery. *Mol. Divers.* **2016**, *20*, 233–254.

<sup>141</sup> Dar, A.M.; Shamsuzzaman; Gatoo, M.A. Synthesis of new steroidal imidazo[1,2-*a*]pyridines: DNA binding studies, cleavage activity and in vitro cytotoxicity. *Steroids* **2015**, *104*, 163–175.

utilizaron cetonas esteroidales **106** derivadas del colestano, las que reaccionan con 2-aminopiridinas **107** y varios isonitrilos **108**, en presencia de anhídrido del ácido propilforfónico (<sup>®</sup>T3P) como catalizador (ver Esquema I.27). Los compuestos finales **109** son generados con el fragmento de imidazo[1,2-*a*]piridina unido por el anillo B del esqueleto esteroideal en forma de espirociclo, obtenidos en excelentes rendimientos (85 – 90 %) y alta diastereoselectividad. Sin embargo, los autores no determinaron la configuración absoluta del nuevo centro estereogénico que se crea durante la reacción, sino que asignan una configuración *R* para C6, teniendo en cuenta solo el mecanismo propuesto para la formación de los productos, sin más evidencia experimental que la caracterización por técnicas espectroscópicas 1D. Por otra parte, algunos híbridos presentaron interacción con ADN y actividad citotóxica frente a varias líneas celulares tumorales, por inducción de la apoptosis.

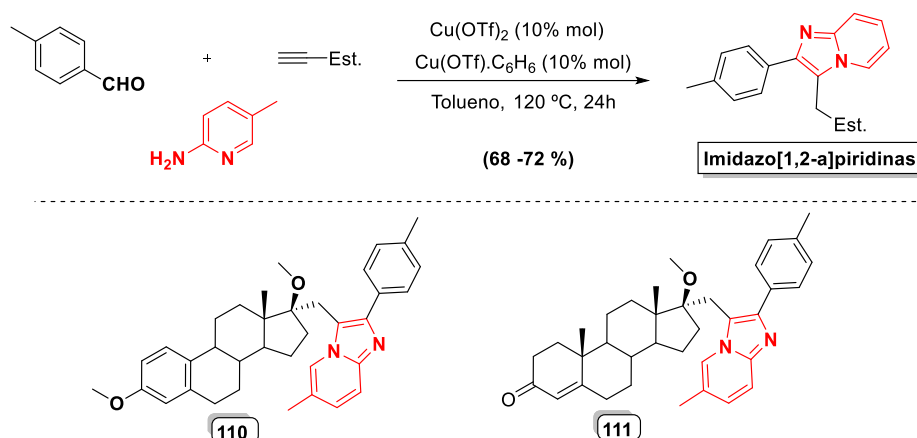


**Esquema I.27.** Síntesis de 2*H*-imidazo[1,2-*a*]piridinas empleando cetonas esteroidales como componente carbonilo vía reacción de GBB-3C.

Tomando como referencia este trabajo, y teniendo en cuenta que la disponibilidad comercial de los isonitrilos es limitada, debido a la poca estabilidad y olor penetrante que muchos presentan en estado líquido;<sup>[139]</sup> Rassokhina y cols. documentaron una nueva metodología multicomponente para la síntesis híbridos imidazo[1,2-*a*]piridina-esteroide.<sup>[142]</sup> Como se puede apreciar en el Esquema I.28, utilizaron alquinos esteroidales en sustitución del componente isonitrilo, y se hicieron reaccionar con 4-metilbenzaldehído y 5-metil-2-aminopiridina, mediante un proceso de ciclación 5-exo-dig/rearomatización catalizado por una mezcla de Cu(OTf)<sub>2</sub>/Cu(OTf)·C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> a reflujo de tolueno durante 24h. Los productos finales **110** y **111** son obtenidos con rendimientos del 68 y 76%, respectivamente, y fueron evaluadas sus propiedades citotóxicas. El conjugado **111** fue el más activo como inhibidor de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, con un valor de IC<sub>50</sub>= 3.2 μM inferior al mostrado por el cisplatino (IC<sub>50</sub>= 6.0 μM) utilizado

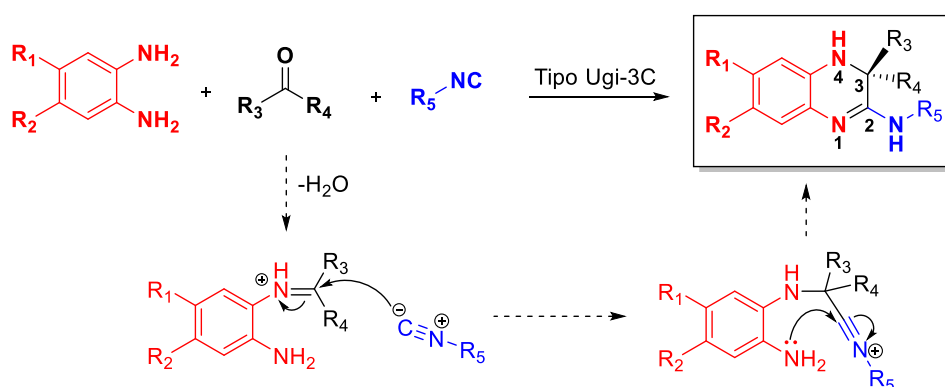
<sup>142</sup> Rassokhina, I.; Volkova, A.; Kozlov, S.; Scherbakov, A.; Andreeva, O.; Shirinian, V. et al. Synthesis and antiproliferative activity evaluation of steroidal imidazo[1,2-*a*]pyridines. *Steroids* **2016**, *113*, 29–37.

como referencia; mientras que **110** presentó un valor ligeramente superior ( $IC_{50} = 8.7 \mu M$ ). Sin embargo, frente a las líneas tumorales PC-3 y DU-145, vinculadas al cáncer de próstata, resultaron menos activos que el cisplatino.



**Esquema I.28.** Síntesis multicomponente de imidazo[1,2-*a*]piridinas empleando alquinos esteroidales en sustitución de isonitrilos como componente reactivo.

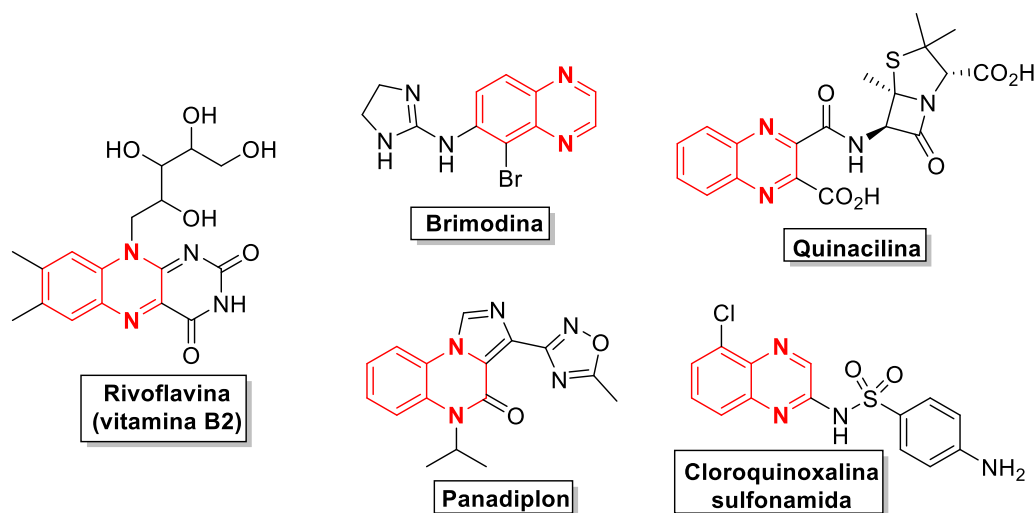
Por otra parte, la introducción de 1,2- y 1,3-diazanucleófilos como reactivo bifuncional en las RMC-I, también ha dado lugar a sistemas heterocíclicos nitrogenados interesantes, entre los que destacan los 2-amino-1,4-diazaheterociclos.<sup>[143]</sup> Tomando como base el mecanismo mostrado en el Esquema I.25, cuando se emplean diaminas como dinucleófilo, uno de los grupos amino reacciona con el componente carbonilo para formar la imina intermediaria, mientras que el segundo grupo amino puede reaccionar con el ión *nitrilium* generado por el ataque nucleofílico del componente isonitrilo. Este proceso es representando en el Esquema I.29 para *o*-fenilendiaminas, a partir de las cuales se obtienen 3,4-dihidroquinoxalin-2-aminas.



**Esquema I.29.** Síntesis multicomponente tipo Ugi-3C de 3,4-dihidroquinoxalin-2-aminas.

<sup>143</sup> Kysil, V.; Khvat, A.; Tsiurlikov, S.; Tkachenko, S.; Williams, C.; Churakova, M.; Ivachtchenko, A. General Multicomponent Strategy for the Synthesis of 2-Amino-1,4-diazaheterocycles: Scope, Limitations, and Utility. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1525-1543.

Las quinoxalinas han sido consideradas por mucho tiempo compuestos de marcado interés, debido a sus prolíficos perfiles de bioactividad.<sup>[144]</sup> La estructura quinoxalínica está presente en agentes terapéuticos, derivados farmacológicamente activos, agroquímicos, y también forma parte de algunos compuestos naturales como vitaminas, alcaloides o antibióticos (ver Figura I.33).<sup>[145]</sup> En consecuencia, las quinoxalinas son consideradas estructuras privilegiadas, y se emplean frecuentemente como bioisósteres de otros núcleos heterocíclicos, como por ejemplo quinolina, quinazolina o pteridina.<sup>[146]</sup>



**Figura I.33.** Ejemplos de compuestos naturales y agentes terapéuticos que contienen en su estructura el anillo de quinoxalina.

A pesar de todas estas aplicaciones, las metodologías sintéticas clásicas que se dirigen a este tipo de heterociclo siguen siendo escasas, considerando la limitada diversidad esquelética y funcional de las quimiotecas de compuestos quinoxalínicos disponibles.<sup>[147]</sup>

Teniendo en cuenta las potencialidades de los procesos multicomponentes como generadores de diversidad estructural, y la demanda en colecciones de heterociclos biológicamente relevantes para los programas de descubrimiento de fármacos, se han desarrollado algunas metodologías de RMC-I dirigidas a quinoxalinas.

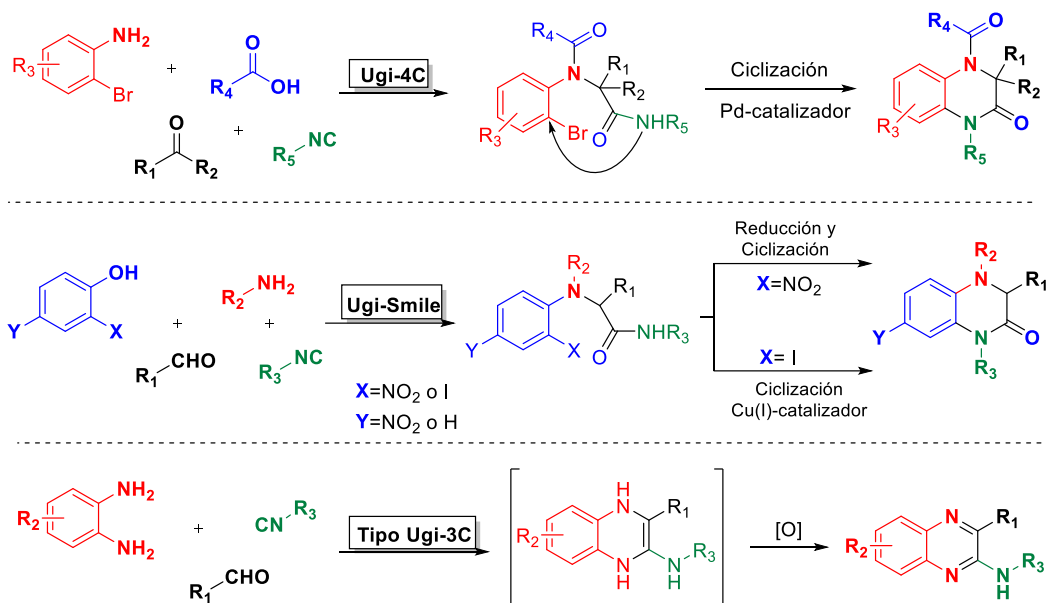
<sup>144</sup> Tariq, S.; Somakala, K.; Amir, M.; Quinoxaline: An insight into the recent pharmacological advances. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 542-557.

<sup>145</sup> Deepika, Y.; Nath, P.S.; Sachin, K.; Shweta, S. Biological activity of quinoxaline derivatives. *Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res.* **2011**, 1, 33-46.

<sup>146</sup> Welsch, M.E.; Snyder, S.A.; Strockwell, B.R. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2010**, 14, 347-361.

<sup>147</sup> Azuaje, J.; El-Maatougui, A.; García-Mera, X.; Sotelo, E. Ugi-Based Approaches to Quinoxaline Libraries. *ACS Comb. Sci.* **2014**, 16, 8, 403-411.

En el Esquema I.30 se muestran algunos ejemplos representativos donde se explota la reactividad de los isonitrilos, basadas en reacciones tipo Ugi.<sup>[148]</sup>



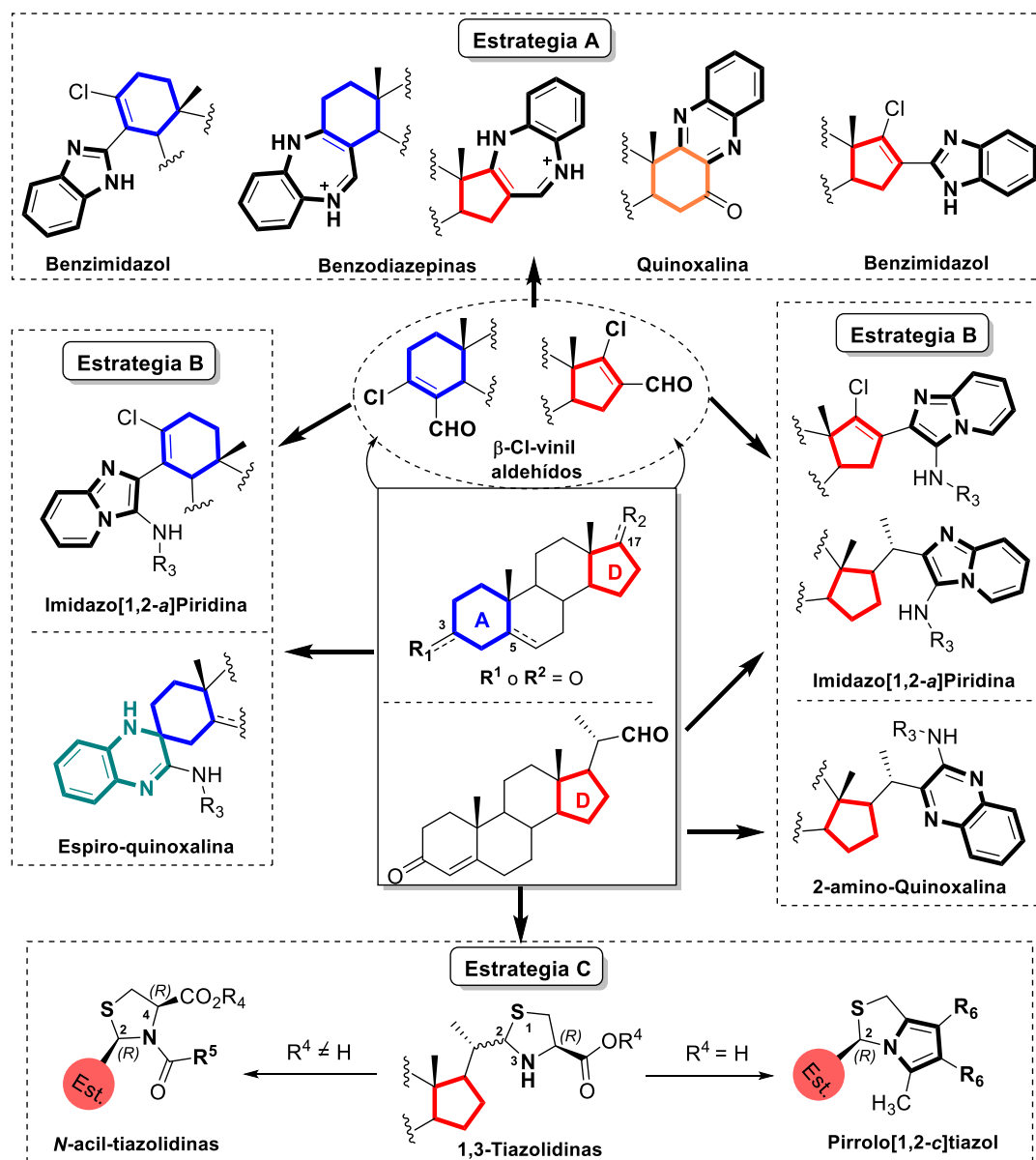
**Esquema I.30.** Síntesis multicomponente de quinoxalinas basadas en reacción de Ugi.<sup>[148]</sup>

Tras una búsqueda exhaustiva en la bibliografía, se encuentran escasos trabajos de conjugación de esteroides a sistemas heterocíclicos derivados de imidazo[1,2-*a*]piridina y quinoxalinas, a través de protocolos multicomponentes. Este hecho, unido a la variedad de compuestos esteroidales accesibles con funciones carbonílicas (ya sea por fuentes naturales o mediante funcionalización de esteroides), los convierte en excelentes candidatos para desarrollar nuevas metodologías vía RMC-I, que permitan generar sistemas híbridos potencialmente bioactivos.

<sup>148</sup> a) Kalinski, C.; Umkehrer, M.; Ross, G.; Kolb, J.; Burdack, C.; Hiller, W. Highly substituted indol-2-ones, quinoxalin-2-ones, and benzodiazepin-2,5-diones via a new Ugi(4CR)-Pd assisted *N*-aryl amidation strategy. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 3423–3426. b) Oble, J.; El Kaim, L.; Gizzi, M.; Grimaud, L. Ugi-Smiles access to quinoxaline derivatives. *Heterocycles* **2007**, 73, 503–517. c) Krasavin, M.; Parchinsky, V. Expedient entry into 1,4-dihydroquinoxalines and quinoxalines via a novel variant of isocyanide based MCR. *Synlett* **2008**, 645–648.

## 2.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Con el objetivo de obtener nuevos sistemas híbridos, donde se combinen diferentes tipos de fragmentos heterocíclicos con esteroides, se desarrollaron tres estrategias de síntesis, que permitan abarcar una mayor zona del espacio químico de compuestos con potencial interés estructural y biológico (ver Esquema I.31).



**Esquema I.31.** Resumen gráfico de la obtención de híbridos heterociclo-esteroides estructuralmente diversos.

En primer lugar, se llevó a cabo la transformación de grupos carbonilos enolizables en las posiciones C3 o C17 de compuestos esteroideos en los correspondientes derivados β-cloro vinil-aldehídos. Estos importantes precursores sintéticos se hicieron reaccionar posteriormente con diaminas aromáticas bajo diferentes condiciones, dando lugar a

heterociclos conjugados de forma exocíclica (benzimidazoles) o fusionados (benzodiazepinas y quinoxalinas) a los anillos A o D del esqueleto esteroideal (*Estrategia A*). De forma complementaria, y teniendo en cuenta la potencialidad de las reacciones multicomponentes en la generación de diversidad estructural se siguió la *Estrategia B*, dando lugar a híbridos del tipo imidazo[1,2-*a*]piridinas y quinoxalinas esteroidales.

Finalmente, dado el creciente interés de los heterociclos azufrados para la química médica,<sup>[149]</sup> se desarrolló una metodología de síntesis de las tiazolidinas y sus derivados en dos etapas. En el primer paso, se obtienen 1,3-tiazolidinas esteroidales como mezcla de diastereoisómeros, las cuales son sometidas a posteriores reacciones de *N*-acilación y cicloadición, para estudiar su diastereoselectividad (ver *Estrategia C*, Esquema I.31).

A continuación, se relacionan los aspectos más significativos de cada uno de los procesos de síntesis utilizados, así como la caracterización estructural de los compuestos obtenidos.

### 2.2.1. Obtención de esteroides cloro-formilados como precursores sintéticos en la generación de diversidad estructural.

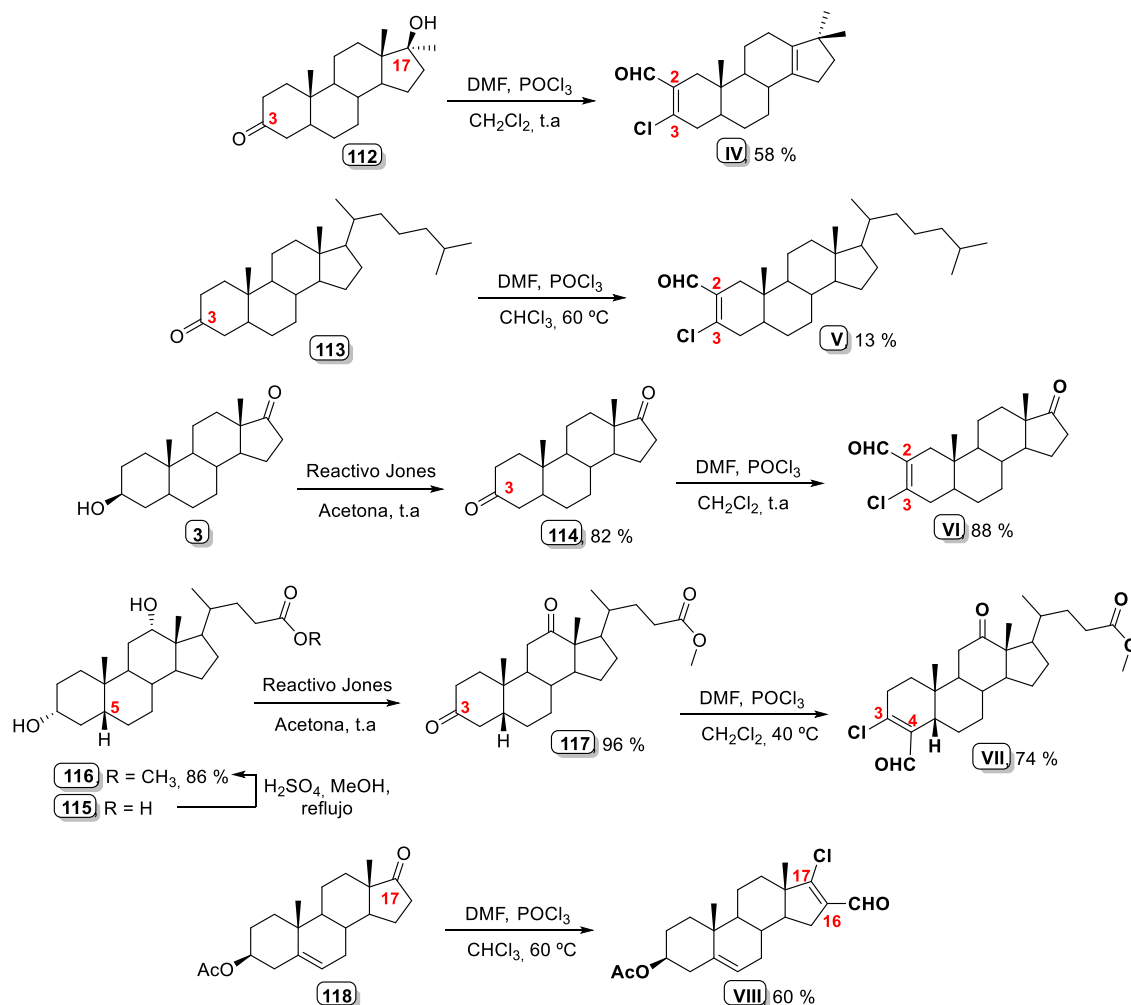
La síntesis de los derivados  $\beta$ -cloro formil-sustituídos **IV** – **VIII** se lleva a cabo a partir de la reacción de las cetonas esteroidales (**112**, **113**, **114**, **117** y **118**) con el reactivo de Vilsmeier-Haack (generado *in situ* a partir de oxicloruro de fósforo y dimetilformamida) bajo diferentes condiciones (ver Esquema I.32). En el caso de los derivados dicarbonílicos **114** y **117**, primero es necesaria las transformaciones químicas en los esteroides **3** y **115**, respectivamente; mediante metodologías establecidas para la obtención de estos compuestos.<sup>[121, 150]</sup>

Como se ilustra en el esquema, cuando la reacción se realiza en el anillo A del esqueleto esteroideal, el grupo carbonilo C3 es transformado en los 3-cloro-2-formil-derivados (**IV** – **VI**) a partir de los precursores **112-114**; mientras que la cetona **117** da lugar al 3-cloro-4-formil-12-oxo-5 $\beta$ -colan-3-en-24-oato de metilo (**VII**). Esta diferencia en el patrón de sustitución del grupo carbaldehído introducido está en correspondencia

<sup>149</sup> a) Pathania, S.; Narang, R.K.; Rawal, R.K. Role of sulphur-heterocycles in medicinal chemistry: An update. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 180, 486-508. b) Laxmikeshav, K.; Kumari, P.; Shankaraiah, N. Expedition of sulfur-containing heterocyclic derivatives as cytotoxic agents in medicinal chemistry: A decade update. *Med. Res. Rev.* **2021**, 1-63.

<sup>150</sup> Popadyuk, I.I.; Markov, A.V.; Salomatina, O.V.; Evgeniya, B.; Shernyukov, A.V.; Zenkova, M.A.; Nariman, F. Synthesis and Biological Activity of Novel Deoxycholic Acid Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 5022–5034.

con la conformación presente en los precursores, donde está bien establecido que los 3-ceto-esteroides de la serie 5 $\alpha$  dan lugar sustituciones en C2, a diferencia de los compuestos de la serie 5 $\beta$ , donde la sustitución ocurre en C4, para este tipo de reacción.<sup>[151]</sup>



**Esquema I.32.** Obtención de  $\beta$ -cloro vinil-carbaldehídos esteroidales **IV** – **VIII**.

Es de destacar, que a pesar de la similitud estructural entre las cetonas **112**, **113** y **114**, las que se diferencian solo por los sustituyentes en C17, se obtengan los correspondientes productos cloro-formilados en rendimientos muy diferentes. El compuesto **IV** se obtuvo a partir de 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstan-3-ona (**112**), con un 58 % de rendimiento. Este resultado, comparado con el 88 % en que se aisló el compuesto **VI**, se debe a que adicionalmente al proceso de cloro-formilación esperado, ocurre una reacción de deshidratación provocado por el exceso de POCl<sub>3</sub> que elimina el

<sup>151</sup> Marson, C. M.; Reactions of carbonyl compounds with (monohalo) methyleniminium salts (Vilsmeier reagents). *Tetrahedron*, **1992**, 48, 3659–3726.

grupo 17 $\beta$ -OH, seguido de un reordenamiento [1,2]-sigmatrópico del metilo 18, como se describe en la bibliografía para compuestos similares.<sup>[152]</sup>

La síntesis del derivado 17-cloro-16-formil esteroide **VIII** se lleva a cabo calentando a reflujo de cloroformo, mientras que la obtención de **VI** es a temperatura ambiente. Esta diferencia en el procedimiento se debe a la posición en la que se encuentra el grupo carbonilo por donde transcurre la reacción. En el esteroide **118** el grupo carbonilo se localiza en C17 en el anillo D del esqueleto esteroideal, mientras que en **114** se encuentra en C3 del anillo A, reaccionado selectivamente solo por esta posición. Este mismo comportamiento se observa para la dicetona **117**, en la formación del derivado **VII**. La diferencia en la reactividad de los grupos carbonilos puede deberse al tamaño del anillo donde se encuentran y al efecto estérico que ejercen los metilos 18 y 19.

En general, todos los compuestos se aislaron como sólidos blancos estables, con rendimientos entre 58 – 88 %, con excepción de **V** (derivado del colestano) que se obtiene en un 13 %. A pesar que se estudiaron varias condiciones de reacción, no fue posible aumentar este bajo rendimiento, lo que está en correspondencia con los primeros resultados descritos por Mikulás y col.<sup>[153]</sup> en la síntesis de este compuesto.

La caracterización de los esteroides cloro-formilados se realiza a través de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y masas. Para los derivados **V**, **VI** y **VIII**, la asignación espectroscópica se realizó por comparación con los datos reportados en la literatura (ver Parte Experimental).

En la Figura I.34, como ejemplo, se representan los espectros protónicos de los compuestos **116**, **117** y **VII**, donde se evidencian las transformaciones químicas realizadas. En estos espectros se observa la señal correspondiente al grupo metoxilo (OCH<sub>3</sub>) resultado de la reacción de esterificación. En la Figura I.34.B, correspondiente a **117**, no se detectaron las señales asignadas a H3 $\beta$ , H12 $\beta$  y -OH, debido a que se producen reacciones de oxidación en las posiciones 3 y 12. Además, se observó un desapantallamiento considerable (entre 0,5 y 1 ppm) en las señales de H2, H4, H11 y H18, protones adyacentes a los sitios de modificación. Finalmente, en la Figura I.34.C no se aprecia el multiplete de 2.64 – 2.54 ppm, sitio donde se produce la enolización, y se

---

<sup>152</sup> Parr, M. K.; Zöllner, A.; Fußhöller, G.; Opfermann, G.; Schlörer, N.; Zorio, M.; Bureik, M.; Schänzer, W. Unexpected contribution of cytochrome P450 enzymes CYP11B2 and CYP21, as well as CYP3A4 in xenobiotic androgen elimination – Insights from metandienone metabolism. *Toxicology Letters*, **2012**, 213, 381-391.

<sup>153</sup> Mikulás, M.; Möller, C.; Rust, S.; Wierschem, F.; Amrhein, P.; Rück-Braun, K. Preparation and Application of Iron-substituted (Z)-Enals: Synthesis of 5-Substituted  $\alpha,\beta$ -Butenolides *J. Prakt. Chem.* **2000**, 342 (8), 791- 803.

observa la señal correspondiente al protón del aldehído formado que resuena a 10.12 ppm. Asimismo, se muestran las señales correspondientes a H2 y H5 a un mayor desplazamiento químico, entre 2.55 – 2.48 ppm.

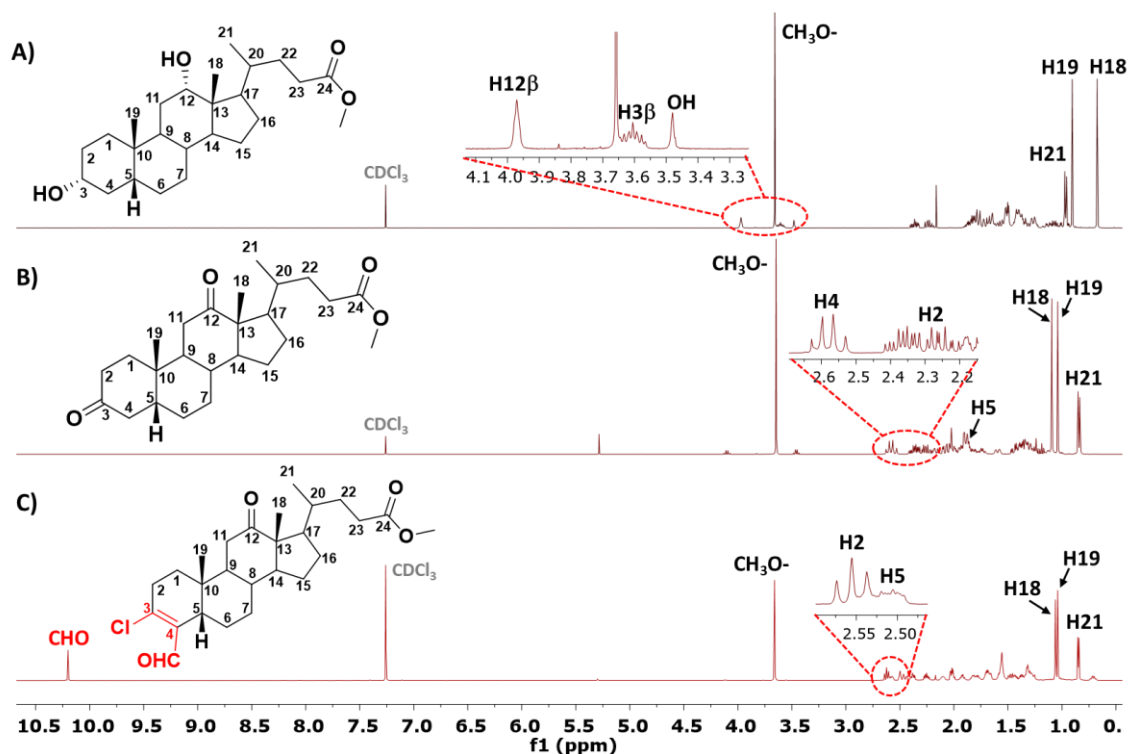


Figura I.34. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de **116** (A), **117** (B) y **VII** (C).

De igual forma, en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se evidencian las transformaciones anteriormente descritas (Figura I.35). La señal del –OCH<sub>3</sub> se observa a ~51 ppm como resultado de la reacción de esterificación. Además, se aprecian las señales correspondientes a los carbonilos C3 (212 ppm) y C12 (214 ppm) del compuesto **117** (Figura I.35.B). Mientras, en la Figura I.35.C, se muestra el espectro del derivado **VII**, donde se comprueba la desaparición de la señal en 212 ppm correspondiente al carbonilo de la posición 3 y la aparición de una señal a 192.5 ppm, asignada al grupo carbaldehído (–CHO). Dos nuevas señales correspondientes a carbonos cuaternarios con hibridación sp<sup>2</sup>, fueron asignadas al nuevo doble enlace formado entre C3 (151.0 ppm) y C4 (134.7 ppm). En tanto, la otra señal muestra una correlación a dos enlaces con el protón que resuena a ~10 ppm, según el espectro de HMBC. El resto de las señales del esqueleto esteroide, se mantuvieron con ligeras variaciones en sus desplazamientos químicos.

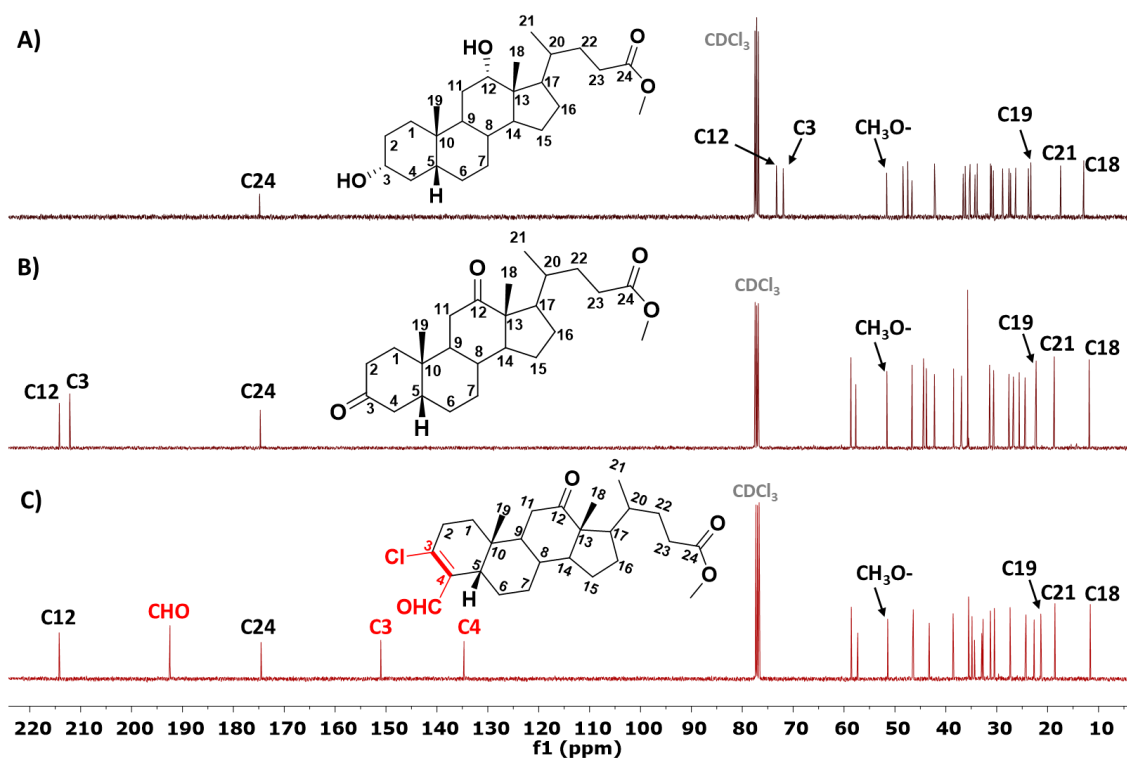


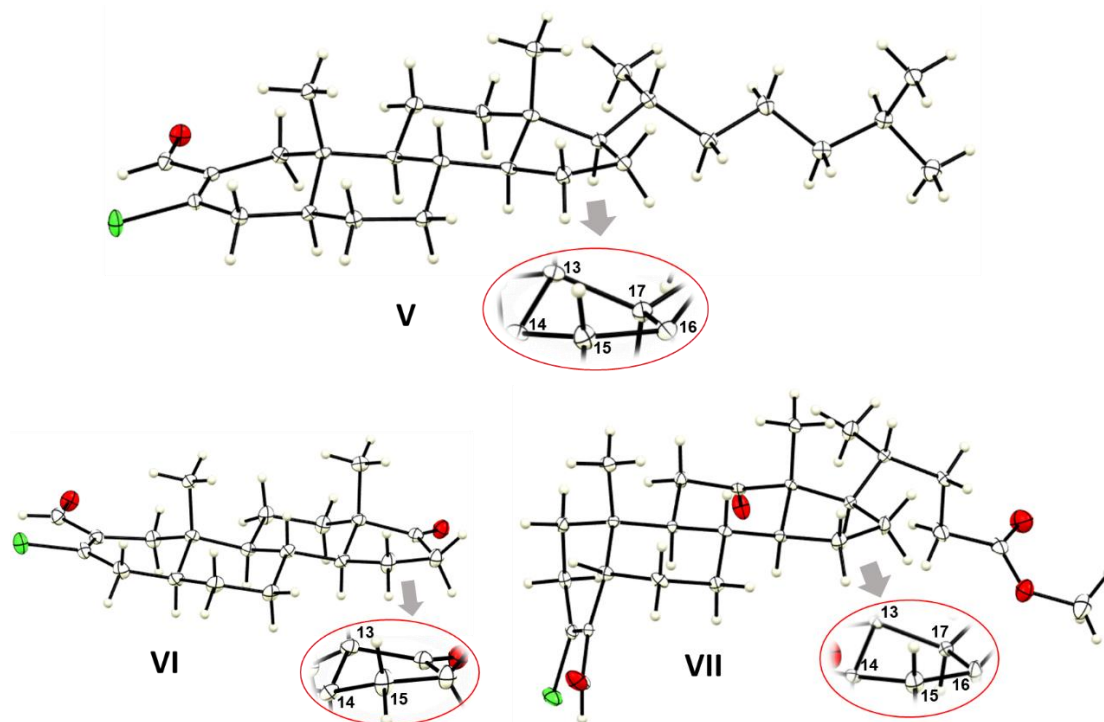
Figura I.35. Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  de **116** (A), **117** (B) y **VII** (C).

En el caso del compuesto **IV**, en el espectro  $^{13}\text{C}$  se observaron cuatro señales  $\text{Csp}^2$  cuaternarios en la región de 130 – 150 ppm, las que se corresponden inequívocamente con el patrón de sustitución  $\beta$ -cloro enaldehído formado en el anillo A, y al doble enlace entre C13 y C14 producto del reordenamiento [1,2] que experimenta el metilo en C13. (ver Anexo 4).

Las estructuras propuestas por RMN fueron confirmadas mediante Difracción de Rayos-X (DRX) de monocristal. Para ello se obtuvieron cristales mediante evaporación lenta a temperatura ambiente y en presencia de aire, de disoluciones en cloroformo-metanol (1:1 v/v). En la Figura I.36 se representan, mediante el diagrama ORTEP la estructura molecular obtenida de los cloro-formilos **V** – **VII**. Como se puede observar, el esqueleto tetracíclico de **VII** muestra algunas diferencias en comparación al que presentan **V** y **VI**. En primer lugar, y en correspondencia con los análisis de los espectros de RMN, el grupo formilo en **VII** ocupa la posición 4, a diferencia de los derivados **V** y **VI** donde se encuentra en la posición 2, con el doble enlace entre C3-C4 para **VII** y entre C2-C3 para **V** y **VI**. En segundo lugar, la fusión entre los anillos A y B es *cis* en **VII**, pero *trans* en los otros dos compuestos. Finalmente, el anillo D de cinco miembros adopta una conformación de semi-silla en **VII**, con los átomos C13 y C14 desplazados del plano definido por C15-C16-C17; mientras que este anillo en **V** y **VI** presenta una forma de

sobre retorcido (*twisted-boat*) a lo largo de las líneas C14-C15-C16-C17 y C13-C14-C15, respectivamente.

Todos los datos y parámetros cristalográficos se presentan en la información suplementaria (ver Anexo 9), y aparecen publicados en *Acta Cryst. C*, **2018**, C74, 1667–1673.



**Figura I.36.** Diagramas ORTEP de los compuestos **V** – **VII** obtenidos por DRX. En rojo se observan los átomos de oxígeno y en verde los átomos de cloro.

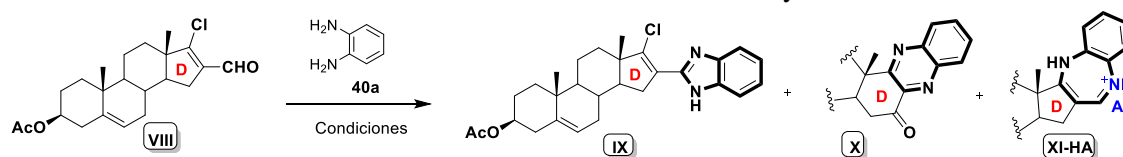
### 2.2.2. Reactividad de $\beta$ -cloro enaldehydos frente a *o*-fenilendiamina.

Para desarrollar la primera estrategia de síntesis (Esquema I.31, Estrategia A), se llevó a cabo un estudio preliminar para determinar la quimioselectividad de la reacción entre el compuesto **VIII** y la *o*-fenilendiamina **40a**, bajo diferentes condiciones. Esto viene justificado por la reactividad que presentan los derivados  $\beta$ -cloro enaldehydos frente a diferentes diaminas, en la formación de estructuras heterocíclicas diversas. En la Tabla I.15 se relacionan los resultados obtenidos.

Inicialmente se utilizaron las condiciones evaluadas previamente en la síntesis de los híbridos benzimidazol-esteroide **Ia-k** (Capítulo 1, Epígrafe 1.2), mediante la catálisis con CAN (10 % mol) en presencia de O<sub>2</sub> (g) (entrada 1, Tabla I.15). En este procedimiento, al mezclar los reactivos con metanol, ocurre un cambio de coloración de la disolución de amarillo pálido a morado, el cual se mantiene durante aproximadamente 1.5 horas, tiempo en el cual se detiene la reacción. El crudo resultante se vierte sobre

disolución amoniacal al 5 %, formándose un precipitado que se filtra y lava con abundante agua. Finalmente, se aisló un sólido amarillo en un 42 %, después de purificación por cromatografía en columna. La posterior caracterización estructural de este compuesto evidenció, de manera inesperada, la formación del sistema heterocíclico fusionado **X**, en lugar del esperado benzimidazol **IX**. Por ello, se realizaron otros experimentos, en los que se varió la cantidad de catalizador empleado, la temperatura del proceso, el disolvente y la presencia o no de una atmósfera de O<sub>2</sub>.

**Tabla I.15:** Estudio de condiciones en la reacción entre **VIII** y la *o*-fenilendiamina **40a**.



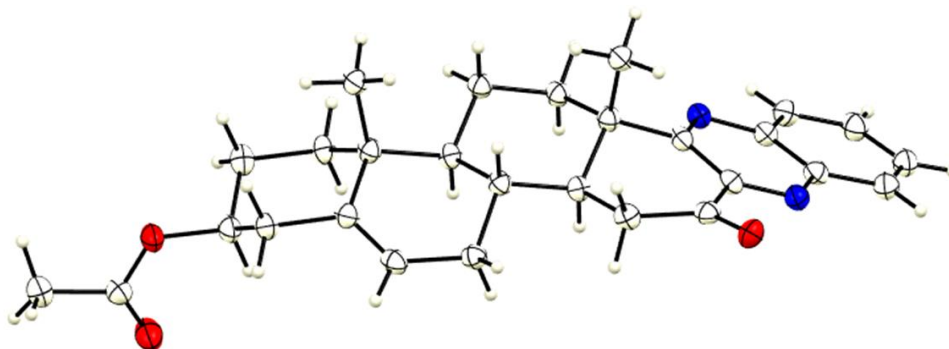
Entrada	Catalizador	Condiciones reacción	Rendimientos	
1	CAN (10 % mol)	O <sub>2</sub> (g), MeOH, t.a, 1.5h	<b>X (42 %)</b>	
2	CAN (10 % mol)	O <sub>2</sub> (g), CH <sub>3</sub> CN, t.a, 3h	<b>IX (16 %)</b>	<b>X (40 %)</b>
3	CAN (100 % mol)	O <sub>2</sub> (g), MeOH, t.a, 2h	<b>IX (5 %)</b>	<b>X (39 %)</b>
4	-	O <sub>2</sub> (g), MeOH, t.a, 20h.	<b>IX (20 %)</b>	<b>X (32 %)</b>
5	-	Ar, MeOH, MW, 65 °C, 10 min	<b>IX (6 %)</b>	<b>X (40 %)</b>
6	CAN (10 % mol)	O <sub>2</sub> (g), Et <sub>3</sub> N (100 % mol), MeOH, t.a, 48h.	<b>IX (75 %)</b>	<b>X (11 %)</b>
7	CAN (10 % mol)	O <sub>2</sub> (g), Et <sub>3</sub> N (100 % mol), MeOH, 65 °C, 3h.	<b>IX (29 %)</b>	<b>X + XI (46 %)</b>
8	TFA (100% mol)	Ar, THF, 1h	<b>XI-HA (97 %) <sup>a,b</sup></b>	

<sup>a</sup> A<sup>-</sup> = (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> + Cl<sup>-</sup>); <sup>b</sup> RMN-<sup>19</sup>F cuantitativo indicó relación 3:2 (CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>).

Como se puede apreciar en la tabla (entradas 2 – 5), los rendimientos obtenidos para el compuesto **X** se encuentran entre un 32 – 40 %, mientras que son más variables (5 – 20 %) para **IX**. Por ejemplo, cuando se utiliza cantidades equimolares de CAN en condiciones aerobias (entrada 3) o calentamiento en MW en atmósfera inerte y en ausencia del catalizador (entrada 5) se obtienen los rendimientos más bajos para el benzimidazol (5 – 6 %). Sin embargo, la presencia de Et<sub>3</sub>N (100 % mol), provoca que el rendimiento para este compuesto **IX** aumente hasta un 75 %, por tan solo un 11 % para el híbrido **X** (entrada 6), cuando la reacción se lleva cabo a temperatura ambiente. Un comportamiento diferente ocurre si se calienta a reflujo con similares condiciones (entrada 7), donde el rendimiento del benzimidazol **IX** disminuye hasta un 29 %, mientras que el 46 % corresponde a una mezcla de **X** y la benzodiazepina **XI**.

Finalmente, cuando se mezclan los reactivos con TFA en cantidades equimolares, se obtiene selectivamente un sólido morado en un 97 % de rendimiento correspondiente a la benzodiazepina protonada **XI-HA** (entrada 8), similar a los resultados descritos por Torres y Rebolledo<sup>[154]</sup> para derivados cloro-formilados de dihidropiridinas. Mediante cuantificación por RMN-<sup>19</sup>F, empleando la técnica ERETIC y como referencia externa el 2,2,2-trifluoroetanol (c = 0,2702 mol/L), se determinó que el catión benzodiazepino está acompañado de una mezcla de los aniones (A) CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup> y Cl<sup>-</sup>, en proporción 3:2 respectivamente.

Los híbridos obtenidos fueron caracterizados mediante RMN. Los datos espectroscópicos de **IX** y **XI-HA** permitieron confirmar las estructuras propuestas para los compuestos esperados. Sin embargo, para **X** fue imprescindible el empleo de la técnica DRX de monocristal, ya que su caracterización espectroscópica no correspondía con alguna estructura generada de forma razonable por la reactividad química de los precursores. En la Figura I.37 se representa la estructura molecular de la unidad asimétrica de **X**, como un sistema hexacíclico compuesto por un fragmento quinoxalínico fusionado al esqueleto esteroideal por el anillo D expandido (de cinco a seis miembros).



**Figura I.37.** Diagrama ORTEP del conjugado **X** obtenido por DRX. En rojo se observan los átomos de oxígeno y en azul los átomos de nitrógeno.

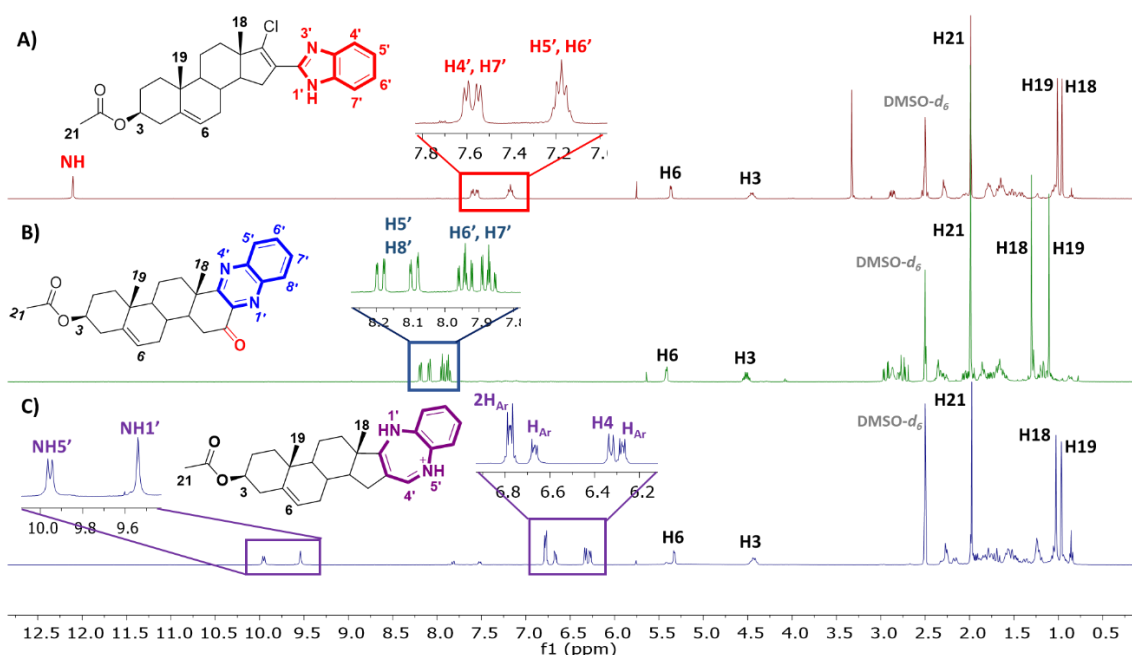
A continuación, se discuten las señales más representativas de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H registrados en DMSO-*d*<sub>6</sub> para los tres conjugados, representados en la Figura I.38 a modo comparativo.

En la región más desapantallada de los espectros A y C (Figura I.38), se observan las señales correspondientes a los protones intercambiables. Para el benzimidazol **IX** el grupo NH1' resuena a 12.10 ppm en forma de singlete; mientras que en la benzodiazepina

<sup>154</sup> Torres, S.Y.; Rebolledo, F.A Highly Efficient Synthesis of Optically Active Hybrid 1*H*-1,5-Benzodiazepine-1,4-Dihydropyridines. *Synthesis*, **2016**; 48, 1414-1420.

**XI-HA** aparecen dos señales: un singlete a 9.54 ppm y un doblete ( $J = 8.3$  Hz) en 9.95 ppm, asignadas a NH1' y NH5', respectivamente.

En la región de hidrógenos unidos a carbonos  $sp^2$  aromáticos, entre 6.20 – 8.30 ppm, se encuentran dos grupos de señales perfectamente diferenciadas en sus desplazamientos químicos para cada compuesto. Por ejemplo, en **IX** se observan dos dobletes ( $J \sim 7.7$  Hz) entre 7.65 - 7.50 ppm correspondientes a H4' y H7', y un multiplete en 7.17 ppm que integra a los protones H5' y H6'. Para el híbrido fusionado **X** (Figura I.38 B), las señales del grupo arilo muestran claramente el patrón *orto*-disustituido presente, ya que se observan dos señales a 8.19 y 8.09 ppm en forma doblete de doblete (H5' y H8') que acoplan entre sí y con los dobletes de dobletes de dobletes en 7.94 y 7.84 ppm, asignados a H6' y H7'. En el caso del conjugado **XI-HA**, entre 6.80 - 6.25 ppm aparecen cuatro señales: tres multipletes correspondientes a los cuatro protones aromáticos y un doblete ( $J = 8.2$  Hz) atribuido a H4', que correlaciona con la señal de 9.95 ppm (NH5').



**Figura I.38.** Espectros RMN- $^1\text{H}$  de **IX** (A), **X** (B) y **XI-HA** (C).

Por otra parte, algunas señales del esqueleto esteroidal presentan valores de  $\delta$  muy similares entre los tres conjugados como, por ejemplo: H6, H3 y H21 en  $\sim 5.40$ ,  $4.50$  y  $1.99$  ppm, respectivamente. También ocurre con los desplazamientos químicos de los metilos angulares C18 y C19 en los compuestos **IX** y **XI-HA** ( $\delta = 0.96 - 1.03$  ppm); a

excepción del compuesto **X**, donde las correspondientes señales para estos grupos se encuentran más desblindadas [ $\delta = 1.30$  ppm (H18) y 1.11 ppm (H19)].

De igual forma, los datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$ , extraídos de los espectros representados en la Figura I.39, evidencian un comportamiento similar al analizado en los espectros protónicos. Por ejemplo, las señales asignadas a C20 ( $\delta \sim 169$  ppm), C5 ( $\delta \sim 139$  ppm), C6 ( $\delta \sim 121$  ppm), C3 ( $\delta \sim 73$  ppm) y C21 ( $\delta \sim 20 - 21$  ppm) presentan valores muy similares en los tres híbridos; así como cada metilo angular C19 ( $\delta \sim 18$  ppm). Sin embargo, las señales correspondientes a los metilos C18, en el compuesto **X** se observa a 19.3 ppm, a diferencia de **IX** y **XI-HA**, que resuenan en 14.8 y 14.5 ppm, respectivamente. Este desapantallamiento podría estar dado al efecto de anisotropía de corriente de anillo del resto heteroarilo que actúa sobre el C18 adyacente, solo observado en **X**.

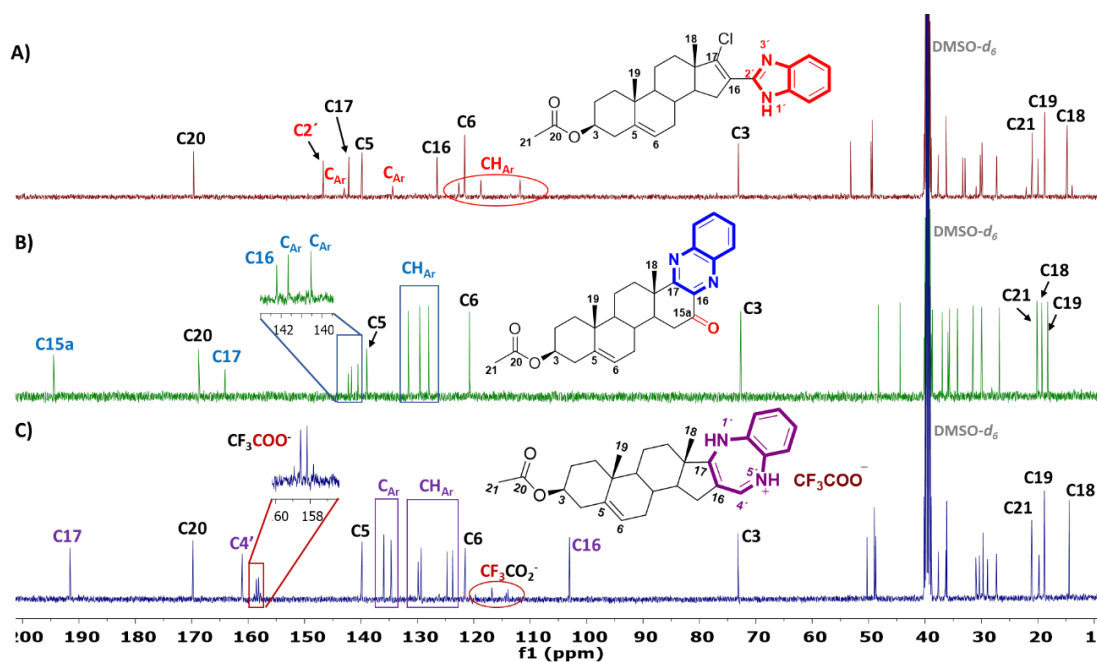
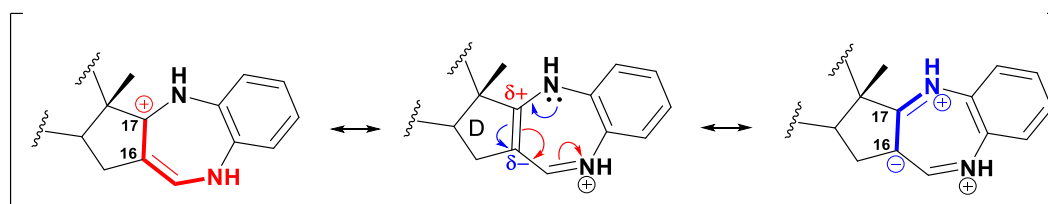


Figura I.39. Espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de **IX** (A), **X** (B) y **XI-HA** (C).

En la región de 110 – 143 ppm se encuentran las señales de los fragmentos heterocíclicos generados en cada conjugado. En el benzimidazol **IX** (Figura I.39 A), los  $-\text{CH}$  ( $\text{sp}^2$ ) resuenan entre los 111 - 122 ppm, mientras que los dos carbonos cuaternarios aromáticos y C2' lo hacen a 134.4, 142.9 y 146.7 ppm, respectivamente. En el caso de los híbridos fusionados (Figura I.39 B y C), se observa un comportamiento similar: cuatro  $-\text{CH}$  aromáticos (entre 128 – 132 ppm para **X** y 123 – 130 ppm para **XI-HA**), así como los carbonos cuaternarios en 140.5/141.7 ppm (**X**) y 134.6/135.9 ppm (**XI-HA**).

También, es de destacar las diferencias encontradas en los desplazamientos químicos de algunos carbonos del anillo D del fragmento esteroidal, donde ocurre las transformaciones estructurales de los nuevos compuestos. Las señales correspondientes a C16 y C17 se encuentran para **IX** en 126.5 y 142.2 ppm, respectivamente; mientras que algo más desblindadas en la quinoxalina **X** (C16: 142.2 ppm y C17: 164.1 ppm). En el caso de la sal de benzodiazepina **XI-HA**, estas señales aparecen con valores de  $\delta$  muy distantes entre sí: 191.6 ppm (C17) y 103.1 ppm (C16), lo que se debe al efecto *push-pull* que ejercen los grupos unidos al doble enlace olefínico (ver Figura I.40), similar a lo descrito por otros autores para moléculas análogas.<sup>[154]</sup>



**Figura I.40.** Efecto *push-pull* presente en **XI-HA**, representado mediante estructuras resonantes.

Otras señales de interés son los cuartetos en 116.8 ppm ( $^1J = 290.1$  Hz) y 158.4 ppm ( $^2J = 37.7$  Hz) provenientes del anión  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  en **XI-HA**. Además, la presencia de este grupo fue corroborado mediante RMN- $^{19}\text{F}$ , al detectar en el espectro registrado un singlete en -74.25 ppm (ver Anexo 5).

Por último, a campo bajo encontramos la señal del carbono imínico C4' en 161.1 ppm (**XI-HA**), y como la señal más desblindada del espectro de **X** al carbonilo (C15a) en 194.5 ppm.

Las estructuras propuestas de los compuestos analizados son corroboradas por espectrometría de masas de alta resolución HRMS-ESI en modo positivo (Tabla I.16). Para los tres conjugados se aprecia un pico con relación  $m/z$  igual al ion quasimolecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  y que coincide con la fórmula molecular calculada en cada caso. Para el benzimidazol **IX**, se corroboró la presencia del átomo de Cl, al observarse los picos isotópicos característicos para este elemento (M: M+2), con relación de intensidades 3:1.

**Tabla I.16.** Valores de  $m/z$  correspondientes a los iones quasimoleculares de **IX – XI**.

Compuesto	Fórmula Molecular	$m/z$ $[\text{M}+\text{H}]^+(\text{uma})$	
		Experimental	Calculada
<b>IX</b>	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{ClN}_2\text{O}_2$	465.2302 ( $^{35}\text{Cl}$ )	465.2303
		467.2282 ( $^{37}\text{Cl}$ )	467.2287
<b>X</b>	$\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3$	445.2482	445.2482
<b>XI</b>	$\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_2$	431.2692	431.2693

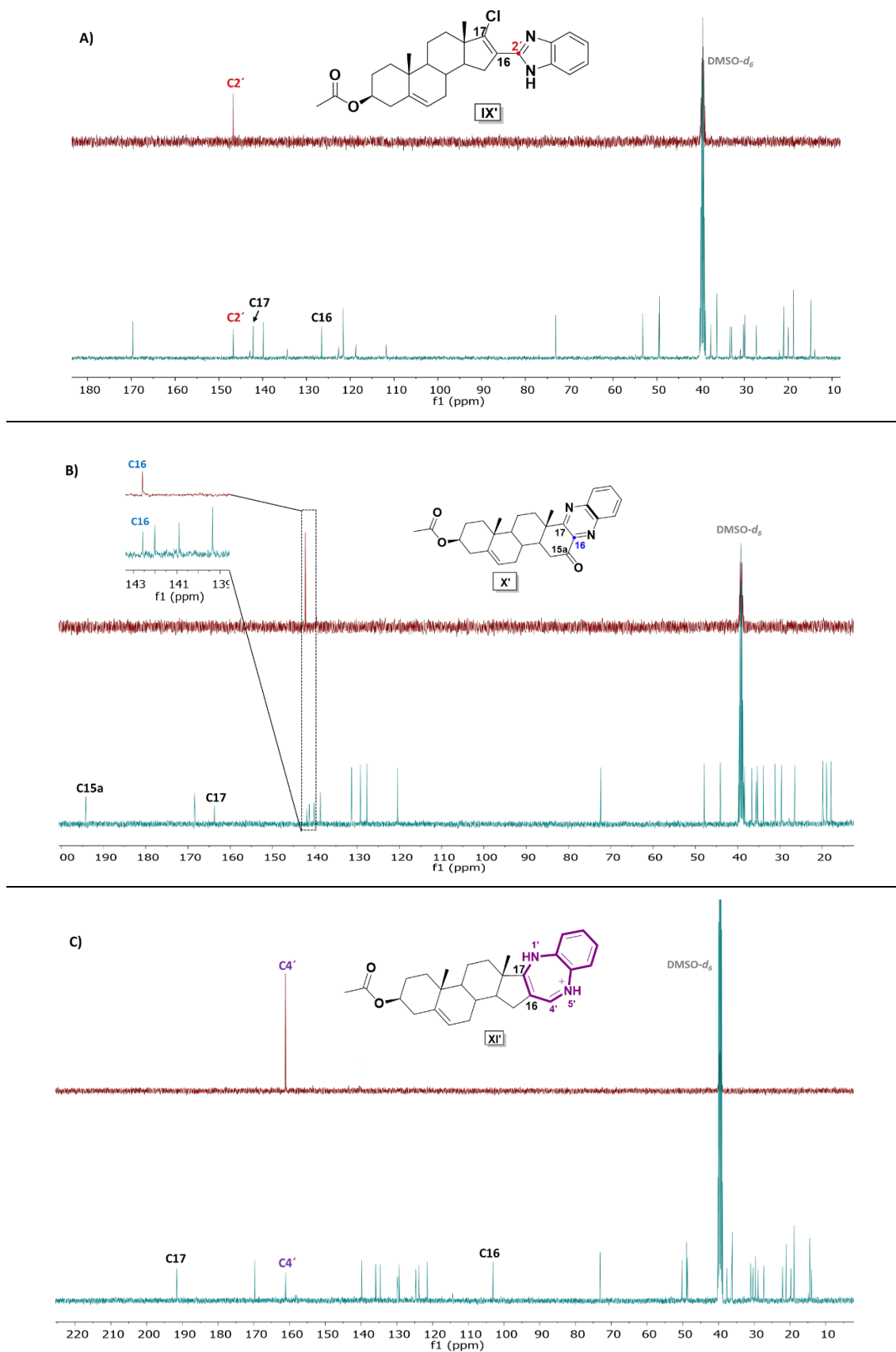
Teniendo en cuenta la novedosa estructura hexacíclica del compuesto **X**, se realizaron algunos estudios preliminares para establecer una propuesta de mecanismo de su formación.

Con el objetivo de demostrar si el nuevo carbonilo (C15a) de **X** procedía del grupo carbaldehído de **VIII**, se llevó a cabo la obtención del derivado  $\beta$ -cloroenaldehído, marcado con el isótopo  $^{13}\text{C}$  (99%) en el grupo -CHO. Para esto se utilizó como reactivo DMF marcada en el carbono de amida, suministrada por Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (CIL), y las condiciones de síntesis descritas para el derivado esteroideal sin marcar (ver Parte Experimental).

El nuevo intermediario **VIII'** fue caracterizado por RMN, confirmando la presencia del isótopo enriquecido  $^{13}\text{C}$ . En el espectro de  $^1\text{H}$  se observa un doblete ( $J = 177.2$  Hz) a 9.98 ppm, debido al acoplamiento directo del protón y el  $^{13}\text{C}$  (99%) del carbaldehído; mientras que en los espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  y DEPT-135 la señal de este carbono aparece como la más intensa en 188.3 ppm, con solo un *scan* de adquisición (ver Anexo 5).

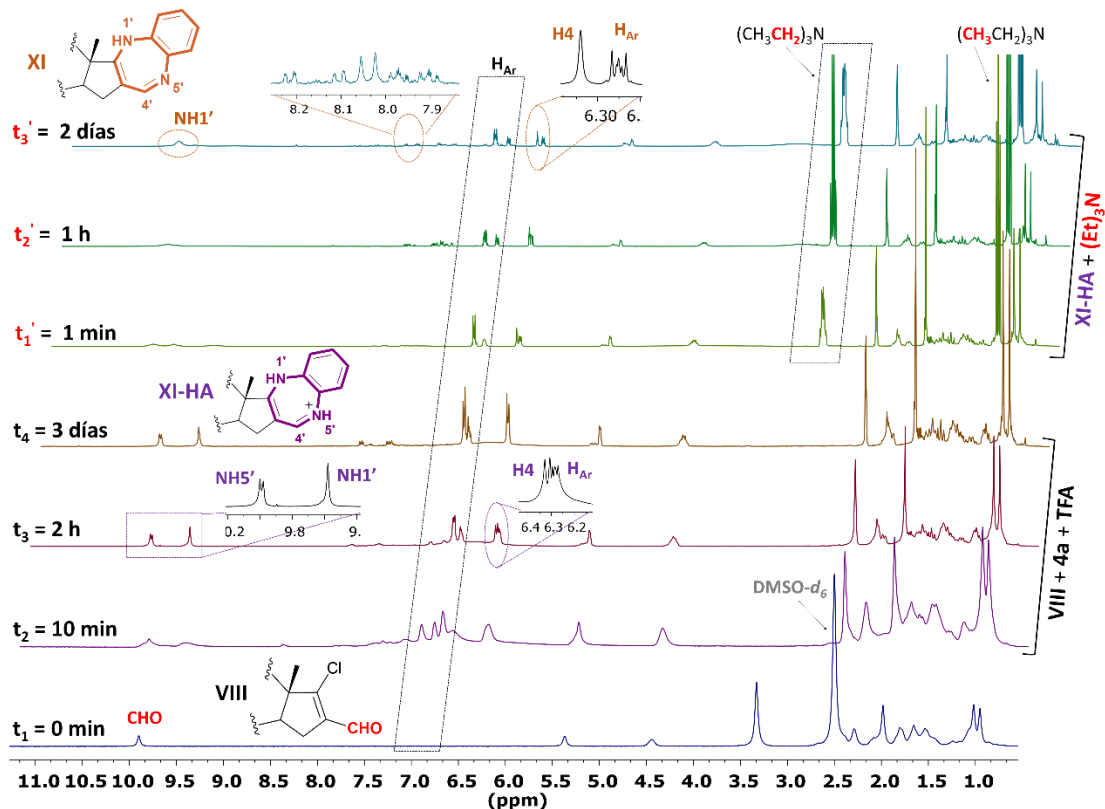
Posteriormente se hizo reaccionar **VIII'** con la *o*-fenilendiamina **40a**, bajo tres condiciones de reacción diferentes (ver Tabla I.15 entradas 1, 6 y 8). Después de los correspondientes procedimientos de purificación, se aislaron los tres conjugados de interés (**IX'**, **X'** y **XI'**) y se caracterizaron por RMN. El registro se realizó en DMSO- $d_6$  y con un *scan* de adquisición en los espectros de  $^{13}\text{C}$ , para garantizar que solo se observara la señal correspondiente al carbono enriquecido. En la Figura I.41 se comparan los espectros obtenidos para las muestras enriquecidas y sin enriquecer de cada conjugado.

Como se puede apreciar, solo se observa una señal en 146.8 ppm (espectro superior, Figura I.41 A), la que se corresponde con el carbono cuaternario C2' del benzimidazol **IX** de la muestra enriquecida. Este resultado, como era de esperar, concuerda con el mecanismo de síntesis propuesto en el Capítulo 1 para los benzimidazoles de la Serie 1. Por otra parte, el espectro de la benzodiazepina marcada **XI-HA'** mostró una señal en 161.1 ppm (positiva en DEPT-135), que se ajusta con la asignada al carbono imínico C4' (ver Figura I.41 C). En el caso del híbrido **X**, la única señal registrada para la muestra enriquecida (parte superior, Figura I.41 B) que resuena a 142.6 ppm, coincide en valor de  $\delta$  con la asignada al carbono cuaternario C16 (142.2 ppm) del compuesto no marcado, por lo que el grupo C=O vecino (C15a) no proviene del -CHO de **VIII**.



**Figura I.41.** Espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de las muestras enriquecidas (espectros superiores) y no enriquecidas (espectros inferiores) de **IX** (A), **X** (B) y **XI-HA** (C).

Una vez identificada la posición del carbono procedente del -CHO del esteroide precursor en la estructura de cada conjugado sintetizado, se realizó un estudio por RMN de la formación y estabilidad de la benzodiazepina **XI-HA**. Para ello, se mezclaron en un tubo de resonancia cantidades equimolares de **VIII**, *o*-fenilendiamina **40a** y TFA, disueltos en DMSO-*d*<sub>6</sub>. Seguidamente se registraron los espectros protónicos en diferentes intervalos de tiempo (**t**<sub>1</sub> – **t**<sub>4</sub>), y una segunda medición tras añadir trietilamina (**t**<sub>1</sub>' – **t**<sub>3</sub>'), los que se representan en la Figura I.42.



**Figura I.42.** Espectros RMN-<sup>1</sup>H registrados durante la formación de **XI-HA** y posterior evolución en el tiempo cuando se añade Et<sub>3</sub>N.

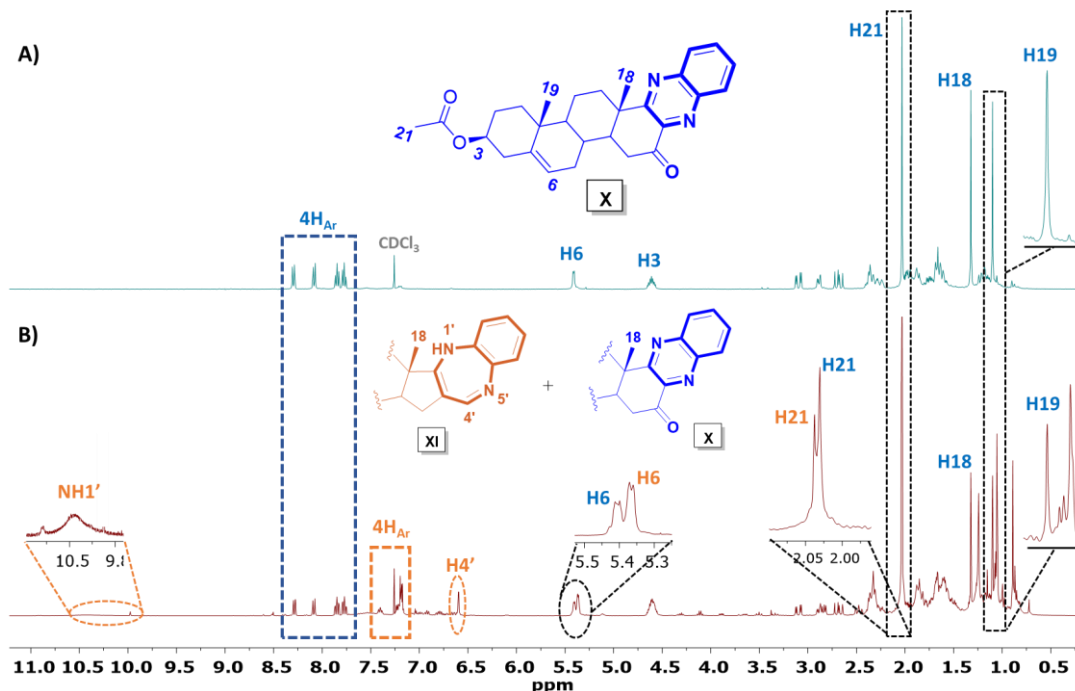
Como se muestra en la figura, la formación de **XI-HA** ocurre desde **t**<sub>1</sub> - **t**<sub>3</sub> con total selectividad, completándose a las 2h después de mezclados los reactivos. En el espectro correspondiente a **t**<sub>3</sub> se observan las señales características del anillo diazepínico: en 9.58 ppm el singlete de NH1' y el doblete (*J* = 8.5 Hz) a 9.99 ppm asignado a NH5', que correlaciona con el protón imínico H4' (6.32 ppm). Este patrón espectroscópico se mantiene sin variación alguna después de tres días (**t**<sub>4</sub>), al igual que el resto de señales, lo que indica la estabilidad de la benzodiazepina en forma de sal protonada.

Posteriormente se añadió trietilamina en exceso con el objetivo de estudiar la evolución de la forma no protonada, desde **t**<sub>1</sub>' a **t**<sub>3</sub>' (Figura I.42). Según el espectro registrado dos días después de la adición (**t**<sub>3</sub>'), en la región de protones activos solo se

observa un singlete ancho en 10.15 ppm, que se atribuye a NH1', mientras que la señal de H4' ahora resuena a 6.33 ppm, pero en forma de singlete debido a la ausencia de acoplamiento con protones vecinos en **XI**. Sin embargo, como aspecto a destacar son las nuevas y poco intensas señales en la región de 7.85 – 8.35 ppm, las que podrían corresponder con la incipiente formación del híbrido **X**.

Para evaluar la posible influencia del dióxígeno atmosférico, se realizó un experimento donde inicialmente se preformó la benzodiazepina protonada **XI-HA** bajo las condiciones previamente establecidas (ver Parte Experimental). Posteriormente se trató con disolución acuosa de NH<sub>3</sub> (5 %), dando lugar a un precipitado, que se filtró y lavó con abundante agua, similar al procesamiento habitual para aislar los compuestos **IX** y **X**. El sólido amarillo resultante fue caracterizado mediante RMN.

En la Figura I.43 B se muestra el espectro protónico registrado en CDCl<sub>3</sub>. Como se puede apreciar, en la región de 7.50 – 8.50 ppm, la forma y los valores de  $\delta$  de las cuatro señales coinciden con las asignadas a los cuatro protones aromáticos del conjugado **X** (Figura I.43 A), así como los singletes de los metilos H21, H18 y H19 en 2.03, 1.32 y 1.10 ppm, respectivamente.



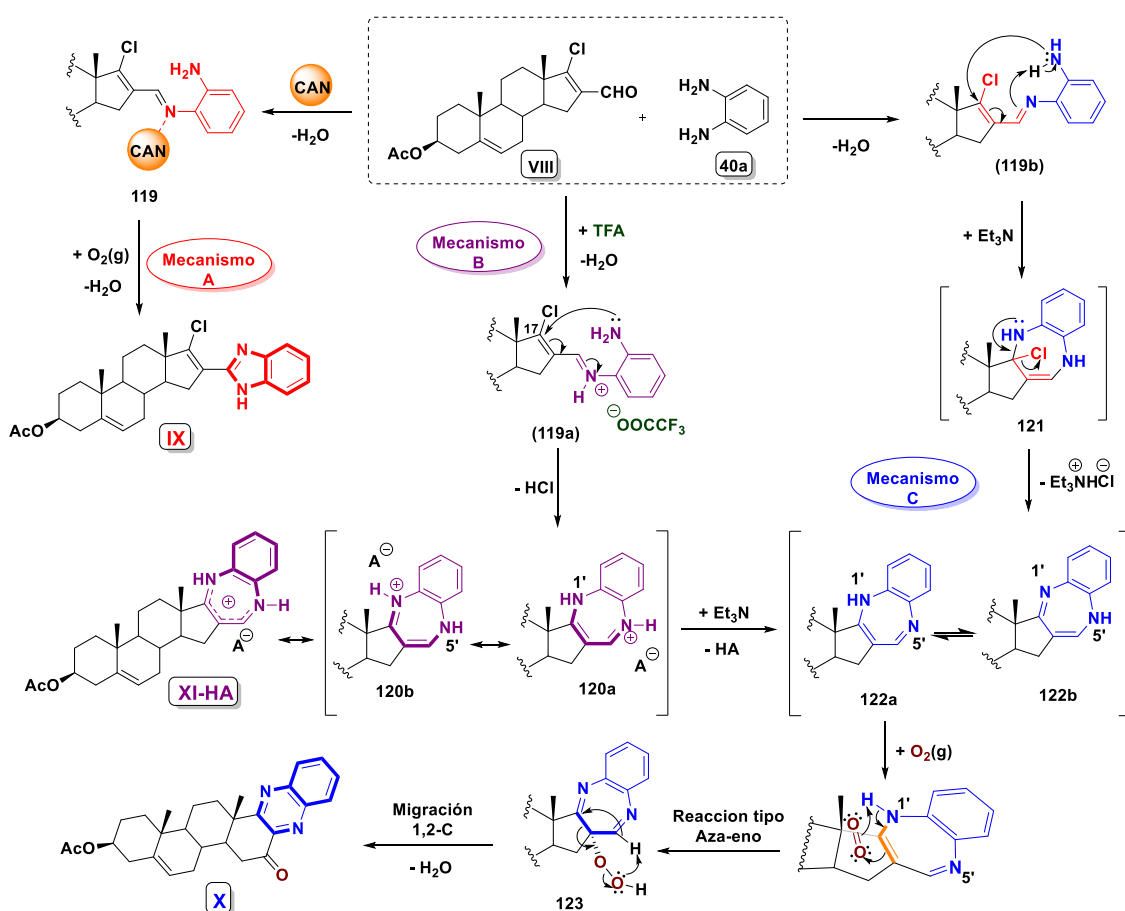
**Figura I.43.** Espectros RMN-<sup>1</sup>H de **X** (A), y mezcla **X** + **XI** (B), registrados en CDCl<sub>3</sub>.

También, entre 7.00 y 7.50 ppm se observan dos grupos de multipletes asignados a los protones aromáticos de **XI**, y en 6.60 ppm el singlete vecino de H4'. Esto indica que el sólido aislado se encuentra como una mezcla de compuestos (**X** y **XI**), y que la

benzodiazepina se halla en su forma no protonada, lo que justifica que solo aparezca la señal de NH1' en 10.41 ppm como un singlete ancho y poco intenso.

Atendiendo a los resultados del análisis espectroscópico en los experimentos realizados, se puede concluir que la formación del híbrido **X** tienen como punto de partida la benzodiazepina en forma de base libre **XI**, mediante un posible proceso de oxidación. Este tipo de transformación no tiene referente bibliográfico, y se favorece en presencia de oxígeno atmosférico y una base en la mezcla de reacción o durante el procesamiento del crudo resultante.

A continuación, en el Esquema I.33 se describen las propuestas de mecanismos de reacción para la obtención de los tres conjugados estudiados. En el caso del benzimidazol **IX**, su formación transcurre a través del mecanismo A, con empleo de CAN como catalizador en medio aerobio, similar al expuesto para los benzimidazoles de la Serie I (ver Esquema I.14, Capítulo 1), por lo que no será detallado.



Esquema I.33. Mecanismos de reacción propuestos para la obtención de **IX-XI**

La formación de **XI-HA** se describe a través del mecanismo B, en el que están involucradas dos etapas principales, en acuerdo con el mecanismo propuesto por Torres y Rebolledo<sup>[154]</sup> para derivados benzodiazepínicos semejantes. Inicialmente, se forma la sal de iminio **119a** al mezclar el aldehído **VIII** con la *o*-fenilendiamina **40a**, proceso catalizado por TFA. Posteriormente, ocurre ataque del grupo -NH<sub>2</sub> al C17 a través de una adición-eliminación intramolecular, y la consecuente pérdida de HCl. De esta forma, se obtiene la benzodiazepina en su forma protonada **XI-HA**, que puede ser representada a través de la superposición de las estructuras mesoméricas **120a** y **120b**.

Finalmente, tomando como referencia los estudios realizados por Wojtkielewicz y col.<sup>155</sup> en 2017, donde se explica la formación del producto D-homo-azaciclo fusionado a partir de la condensación entre el acetato de 16-deshidropregnenolona y 2-aminobenzimidazol; se propone de manera análoga el mecanismo C para la obtención del híbrido **X**.

La primera etapa involucra la formación de la benzodiazepina **XI** (no protonada), que puede ocurrir por dos procesos: a) generación de la base de Schiff **119b**, que posteriormente experimenta una adición-1,4 intramolecular, con eliminación de HCl por parte del intermediario **121** en medio básico o, b) por neutralización de **XI-HA** con Et<sub>3</sub>N. La benzodiazepina libre **XI** puede presentarse en disolución como una mezcla de los tautómeros **122a** y **122b**, debido al equilibrio tautomérico imina-enamina que permuta el protón entre las posiciones N1' y N5'. Sin embargo, los datos espectroscópicos mostraron, que tanto en DMSO-*d*<sub>6</sub> como en CDCl<sub>3</sub>, prevalece **122a**.

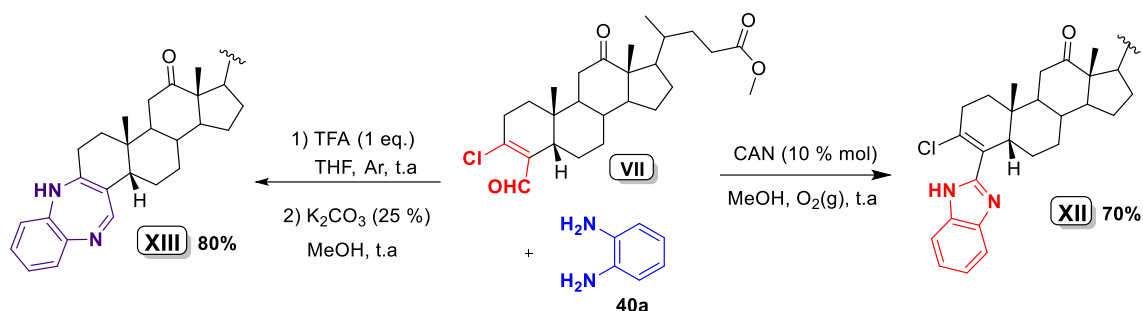
En una segunda etapa ocurre una reacción pericíclica tipo aza-eno entre el dioxígeno y la benzodiazepina, dando lugar al hidroperóxido **123**. Este intermedio, bajo condiciones básicas (Et<sub>3</sub>N o disolución acuosa de NH<sub>3</sub>) se transforma finalmente en el híbrido **X**, por rotura del enlace O-O a través de un posible proceso “concertado” de reordenamiento del fragmento heterocíclico y eliminación de agua, con la consecuente expansión del anillo D del esqueleto esteroideal y formación del nuevo grupo carbonilo.

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de la reactividad de la *o*-fenilendiamina **40a** frente a otros β-cloro enaldehydos esteroidales, se empleó el 3-cloro-

---

<sup>155</sup> Wojtkielewicz, A.; Uscinowicz, P.; Siemieńczyk, L.; Kielczewska, U.; Ratkiewicz, A.; Morzycki, J. W. A study on the reaction of 16-dehydropregnenolone acetate with 2-aminobenzimidazole. *Steroids* **2017**, *117*, 71-76.

4-formil-12-oxo-5 $\beta$ -colan-3-en-24-oato de metilo (**VII**), funcionalizado en el anillo A, y se hizo reaccionar bajo las condiciones representadas en el Esquema I.34.



**Esquema I.34.** Productos de reacción entre **VII** y la *o*-fenilendiamina **40a**.

Al mezclar ambos reaccionantes con MeOH, en presencia de dioxígeno y CAN (10 % mol) durante 9 horas, y posterior purificación mediante cromatografía en columna flash, se aisló el benzimidazol **XII** en un 70 % de rendimiento, sin que se detectara algún otro producto. Este resultado es diferente al obtenido para el cloro-formilo **VIII** (anillo D) frente a la *o*-fenilendiamina en similares condiciones de reacción, donde el compuesto mayoritario correspondió al D-homo-derivado **X** (ver entrada 1, Tabla I.15).

Como se evidenció previamente, el proceso de transformación al conjugado **X** tiene lugar a partir de la benzodiazepina no protonada **XI**. Por ello, se llevó a cabo la síntesis de la benzodiazepina **XIII** en dos etapas. Inicialmente se mezclaron **VII**, **40a** y TFA en cantidades equimolares, y se disolvieron en THF bajo atmósfera de Ar, según el procedimiento descrito para **XI-HA** (entrada 8, Tabla I.15). Después de 3 horas se detuvo la agitación, y se rotoevaporó el disolvente hasta sequedad. El crudo se disolvió en MeOH, y se añadió disolución acuosa de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (25 %) hasta pH ~ 10, con agitación mecánica durante 30 minutos. El precipitado resultante se filtró y lavó con agua, aislándose un sólido morado estable en un 80 % de rendimiento. La posterior caracterización por RMN evidenció que el compuesto corresponde a **XIII** en su forma no protonada, y que su obtención en medio básico y en presencia de dioxígeno atmosférico no conlleva a una posterior transformación, como si ocurre con **XI**.

Este resultado podría indicar, de manera preliminar que, en las condiciones de reacción evaluadas, el reordenamiento o expansión del sistema pentacíclico fusionado (anillo D del fragmento esteroideal de **XI**) es más favorable que para el sistema hexacíclico (anillo A de **XIII**).

Los conjugados sintetizados se caracterizaron a partir de los datos espectroscópicos de RMN y por espectrometría de masas. En las Figuras I.44 y I.45 se representan, a modo comparativo, los espectros de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  respectivamente, registrados para **XII** y **XIII** en  $\text{DMSO-}d_6$ .

Como señales más significativas de los espectros de  $\text{RMN-}^1\text{H}$ , en la región de hidrógenos unidos a carbonos  $\text{sp}^2$  aromáticos se observan los protones del fragmento heterocíclico de cada compuesto: para **XII** dos multipletes que integran a  $\text{H4}'/\text{H7}'$  y  $\text{H5}'/\text{H6}'$  en 7.51 ppm y 7.14 ppm, respectivamente; mientras que para **XIII** los cuatro protones aromáticos ( $\text{H}_{\text{Ar}}$ ) resuenan entre 6.40 – 7.00 ppm, y en 7.02 ppm  $\text{H4}'$  en forma de singlete, por la ausencia de acoplamiento con protones vecinos. Hacia la zona más desapantallada se observan dos singletes anchos y poco intensos, los que son asignados a los grupos  $\text{NH1}'$  del benzimidazol **XII** en 12.42 ppm y de la benzodiazepina **XIII** en 9.27 ppm. Otras señales características son las provenientes del fragmento esteroidal de cada compuesto, como el singlete intenso en  $\sim 3.56$  ppm correspondiente al grupo metoxilo y los metilos C18, C19 y C21, que aparecen entre 0.70 – 1.10 ppm.

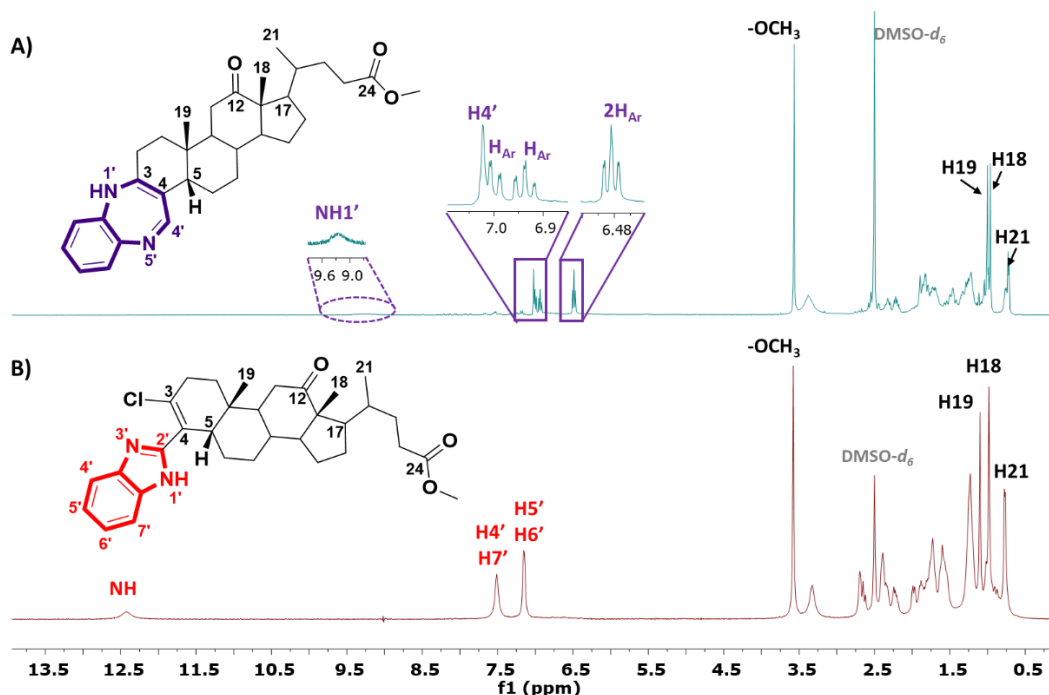


Figura I.44. Espectros  $\text{RMN-}^1\text{H}$  de **XIII** (A) y **XII** (B).

De manera similar, los espectros de  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  (Figura I.45) ratifican la formación de estos compuestos. En **XIII** (espectro superior) se observan todas las señales correspondientes a los carbonos aromáticos del fragmento arilo: los cuatro CH resuenan entre 120 y 130 ppm, mientras que los dos carbonos cuaternarios de fusión al fragmento

diazepínico en 138.8 y 136.9 ppm. A mayor valor de  $\delta$  se encuentra C4' (170.7 ppm), mientras los carbonos olefínicos C3 y C4 en 181.9 y 107.2 ppm debido al efecto *push-pull* presente en este tipo de sistemas, como se describió para la benzodiazepina **XI-HA**. En el caso de **XII** (espectro inferior), algunos de los  $-\text{CH}$  ( $\text{sp}^2$ ) se observan a 121.5 ppm, y los carbonos cuaternarios en el sitio de fusión del anillo que compone el fragmento del benzimidazol no son observables, a diferencia de C2' que resuena en  $\sim 130$  ppm; mientras los carbonos del enlace  $\text{C3}=\text{C4}$  presentan valores de  $\delta=149.8$  y  $133.4$  ppm respectivamente.

Para ambos conjugados, otras señales de interés provenientes del fragmento esteroidal correspondieron al carbonilo C12 ( $\sim 213$  ppm) como la más desapantallada de los espectros y al carboxilo C24 ( $\sim 173$  ppm). También en la región de  $\text{Csp}^3$  encontramos al grupo  $-\text{OCH}_3$  en 51.2 ppm, así como los metilos C19, C21 y C18 desde 22 – 11 ppm, en ese orden.

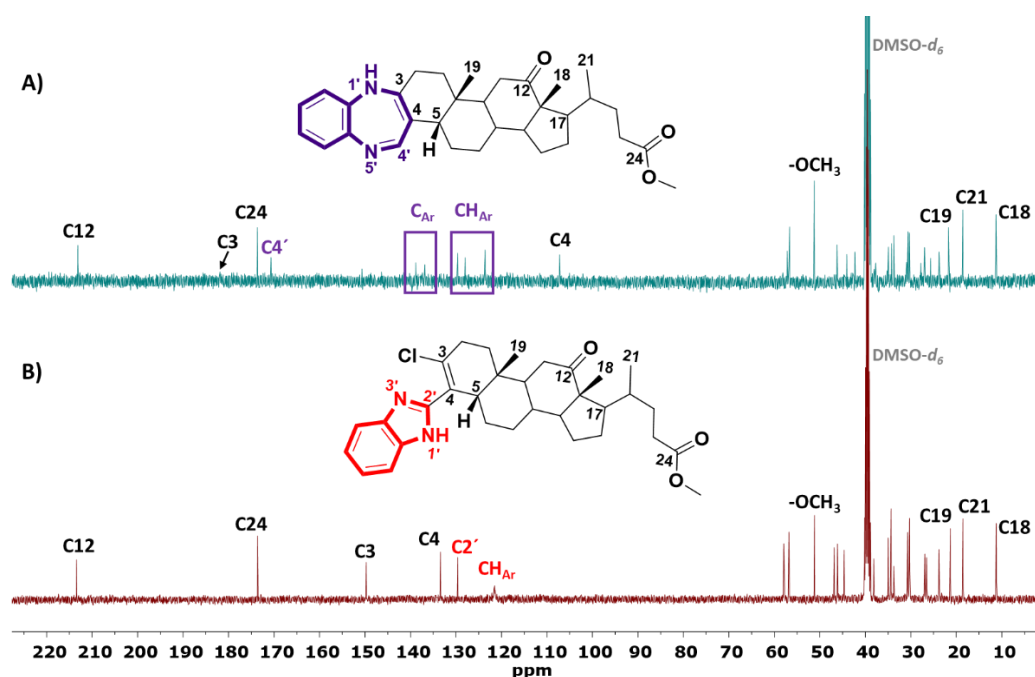


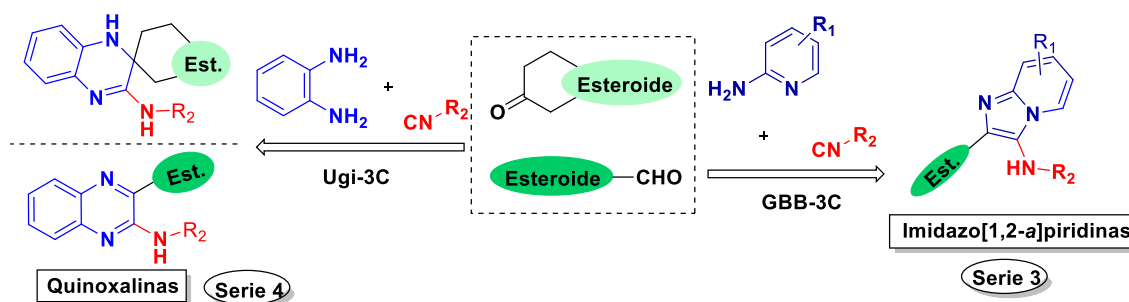
Figura I.45. Espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de **XIII** (A) y **XII** (B).

La confirmación de las estructuras propuestas se realizó a través del análisis de los espectros obtenidos por HRMS-ESI en modo positivo (ver Anexo 5). Para los dos híbridos se aprecia un pico en 537.2878 uma (**XII**) y 503.3266 uma (**XIII**), correspondientes al ion quasimolecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  y que está de acuerdo con el valor calculado para las fórmulas moleculares  $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{ClN}_2\text{O}_3$ : 537.2878 y  $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_3$ : 503.3268, respectivamente.

### 2.2.3. Obtención de híbridos heterociclo-esteroide mediante (RMC-I).

Como fue reflejado en los Antecedentes del capítulo, las RMC, y en especial las que utilizan isonitrilos como uno de sus componentes, constituyen una importante herramienta en la generación de complejidad y diversidad estructural. Por ello, resultó de interés desarrollar nuevas metodologías multicomponentes para la preparación de heterociclos conjugados a esteroides.

Se seleccionaron dos procedimientos conocidos: la reacción de Groebke-Blackburn-Bienaymé (GBB-3C) para obtener híbridos del tipo imidazo[1,2-*a*]piridina-esteroide (Serie 3), o una reacción tipo Ugi de tres componentes (Ugi-3C) que diera lugar a híbridos quinoxalina-esteroide (Serie 4); utilizando como componente carbonilo de las reacciones aldehídos o cetonas esteroidales (ver Esquema I.35).



**Esquema I.35:** Estrategia multicomponente de obtención de conjugados imidazo[1,2-*a*]piridina-esteroide (Serie 3) y quinoxalina-esteroide (Serie 4).

A continuación, se discuten los aspectos más significativos de cada uno de los procesos de síntesis utilizados, así como la caracterización estructural de los compuestos obtenidos a partir del análisis de los datos espectroscópicos de RMN y espectrometría de masas.

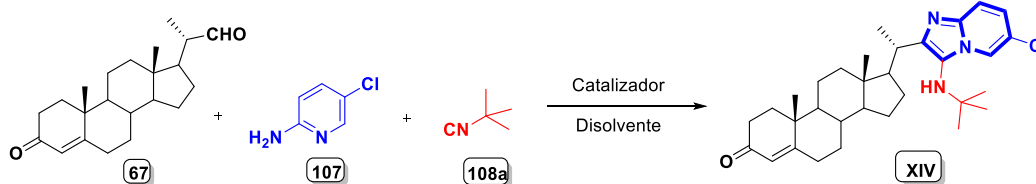
#### 2.2.3.1- Síntesis y caracterización de imidazo[1,2-*a*]piridina-esteroide (Serie 3)

En la obtención de esta familia de compuestos, se empleó la reacción de GBB-3C. Se utilizaron tres aldehídos esteroidales (**67**, **VII** y **VIII**), que se hicieron reaccionar con 2-amino-5-cloropiridina (**107**) y diferentes isonitrilos **108a-d**, dando lugar a imidazo[1,2-*a*]piridinas sustituidas en la posición 2 del anillo heterocíclico con el fragmento esteroideal.

Teniendo en cuenta el amplio uso y versatilidad del CAN como ácido de Lewis, así como la eficiencia demostrada en reacciones multicomponentes de formación de enlaces C-C, C-N, C-S; y en la síntesis de los híbridos benzimidazol-esteroide (Serie 1); se llevó

a cabo un estudio de condiciones de reacción para evaluar su eficiencia como catalizador en la reacción de GBB, donde no ha sido previamente descrita su aplicación. Para ello, se hicieron reaccionar el aldehído esteroideal **67**, la 2-amino-5-cloropiridina (**107**) y el *ter*-butilisonitrilo **108a** en presencia o no de CAN, bajo calentamiento convencional en diferentes disolventes (metanol, 2-propanol, acetonitrilo y dimetilsulfóxido). La determinación de los tiempos de reacción y el procesamiento posterior se realizan de forma semejante a la descrita para los compuestos de la Serie 1. En la Tabla I.17 se relacionan los resultados de la obtención del conjugado correspondiente (2*OS*)-[3-(*ter*-butilamino)-6-cloroimidazo[1,2-*a*]piridin-2-il]-4-pregnen-3-ona (**XIV**).

**Tabla I.17:** Estudio de condiciones de reacción en la síntesis de la imidazopiridina **XIV**.



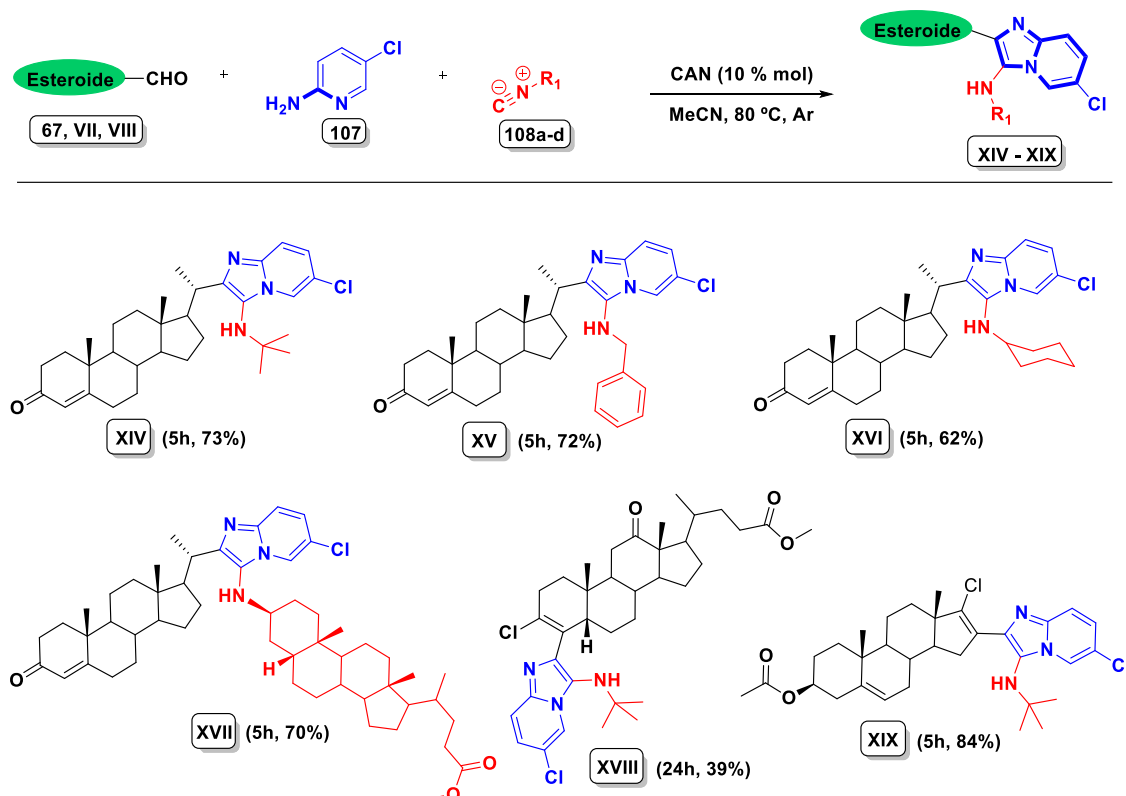
Entrada	Catalizador	Condiciones reacción	Rendimiento
1	-	Ar, MeOH, 65 °C, 24h	Trazas
2	<sup>a</sup> MSA-SiO <sub>2</sub> (50 % mol)	Ar, MeOH, 65 °C, 24h	12 %
3	AcOH (20 % mol)	Ar, MeOH, 65 °C, 24h	31 %
4	CAN (10 % mol)	Ar, MeOH, 65 °C, 6h	66 %
5	CAN (10 % mol)	Ar, 2-PrOH, 80 °C, 3h	67 %
6	<b>CAN (10 % mol)</b>	<b>Ar, MeCN, 80 °C, 5h</b>	<b>73 %</b>
7	CAN (10 % mol)	Ar, DMSO, 80 °C, 6h	15 %

<sup>a</sup> MSA-SiO<sub>2</sub>: ácido metanosulfónico soportado sobre sílica gel.

Como se puede observar en la tabla, cuando la reacción se realiza en ausencia de catalizador (entrada 1), después de calentamiento a reflujo de MeOH por 24 horas en argón, ocurre una escasa formación de la imidazopiridina **XIV**. Sin embargo, al emplear CAN (10 % mol) bajo similares condiciones (entrada 4), el rendimiento aumentó hasta 66 % en tan solo 6 horas de calentamiento, muy superior a los obtenidos cuando se utilizaron catalizadores descritos para este tipo de reacción como AcOH y MSA-SiO<sub>2</sub> (entradas 2 y 3, respectivamente). El mejor rendimiento se logró al emplear acetonitrilo a 80 °C durante 5h (entrada 6); metodología que se hizo extensiva a la síntesis del resto de compuestos diseñados.

De esta forma, se obtuvieron en total seis imidazo[1,2-*a*]piridina-esteroide (**XIV** - **XIX**), con rendimientos entre 62 y 84 %, en iguales tiempos de reacción, excepto para el

híbrido **XVIII** el cual se obtuvo con un 39 % en 24 horas (ver Esquema I.36). En el caso del compuesto bis-esteroide **XVII**, se empleó el 3 $\beta$ -isociano-5 $\beta$ -colano-24-ato de metilo (**108d**), isonitrilo esteroidal obtenido mediante la metodología reportada por Morales y col.<sup>[156]</sup>



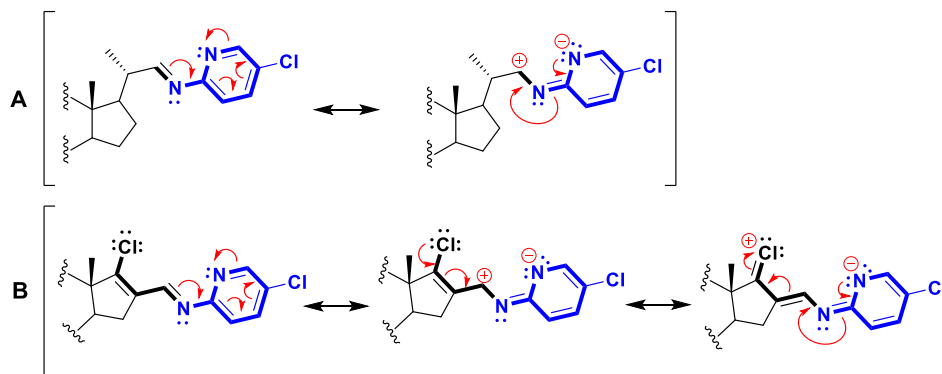
**Esquema I.36:** Conjugados imidazo[1,2-a]piridina-esteroide sintetizados (Serie 3).

En general, las diferencias encontradas en los rendimientos pueden ser explicadas atendiendo a la estabilidad de las bases Schiff (iminas) generadas como intermediarios en el transcurso de las reacciones para cada compuesto. Los cuatro híbridos **XIV**-**XVII** se originan a partir del aldehído **67**, con rendimientos 62 – 73 %; mientras que el híbrido **XIX** sintetizado a partir del formil-esteroide  $\alpha,\beta$ -insaturado **VIII** se obtiene en un 84 %. Este incremento en el rendimiento puede deberse a una mayor estabilidad de la imina formada a partir de **VIII** (Esquema I.37 B) que la generada a partir del aldehído **67** (Esquema I.37 A), ya que presenta una mayor deslocalización electrónica atribuible al efecto +M del átomo de cloro.

Por otra parte, el bajo rendimiento de 39 % obtenido para **XVIII** tras 24 horas de reacción, puede deberse a la influencia de factores estéricos que dificultan la formación

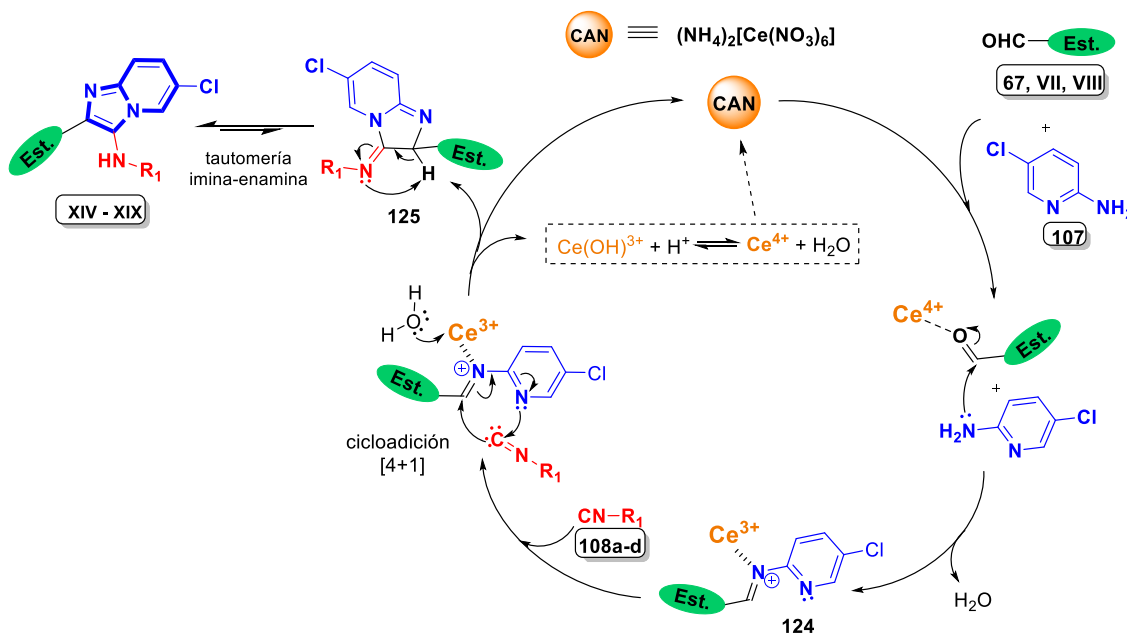
<sup>156</sup> Morales, F.E.; Garay, H.E.; Muñoz, D.F.; Augusto, Y.E.; Otero-González, A.J.; Reyes, O.; Rivera, D. G. Aminocatalysis-Mediated on-Resin Ugi Reactions: Application in the Solid-Phase Synthesis of N-Substituted and Tetrazolo Lipopeptides and Peptidosteroids. *Org. Lett.*, **2015**, 17, 2728-2731.

de la imina correspondiente, lo que explicaría también la diferencia observada al comparar los rendimientos de los benzimidazoles **Ia** (90 %) y **XII** (70 %), provenientes de los aldehídos esteroidales **67** y **VII** respectivamente, cuando reaccionan frente a la *o*-fenilendiamina en similares condiciones (ver Parte Experimental).



**Esquema I.37.** Representación esquemática de las estructuras resonantes de iminas generadas para: (A) aldehído **67** y (B) aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado **VIII**.

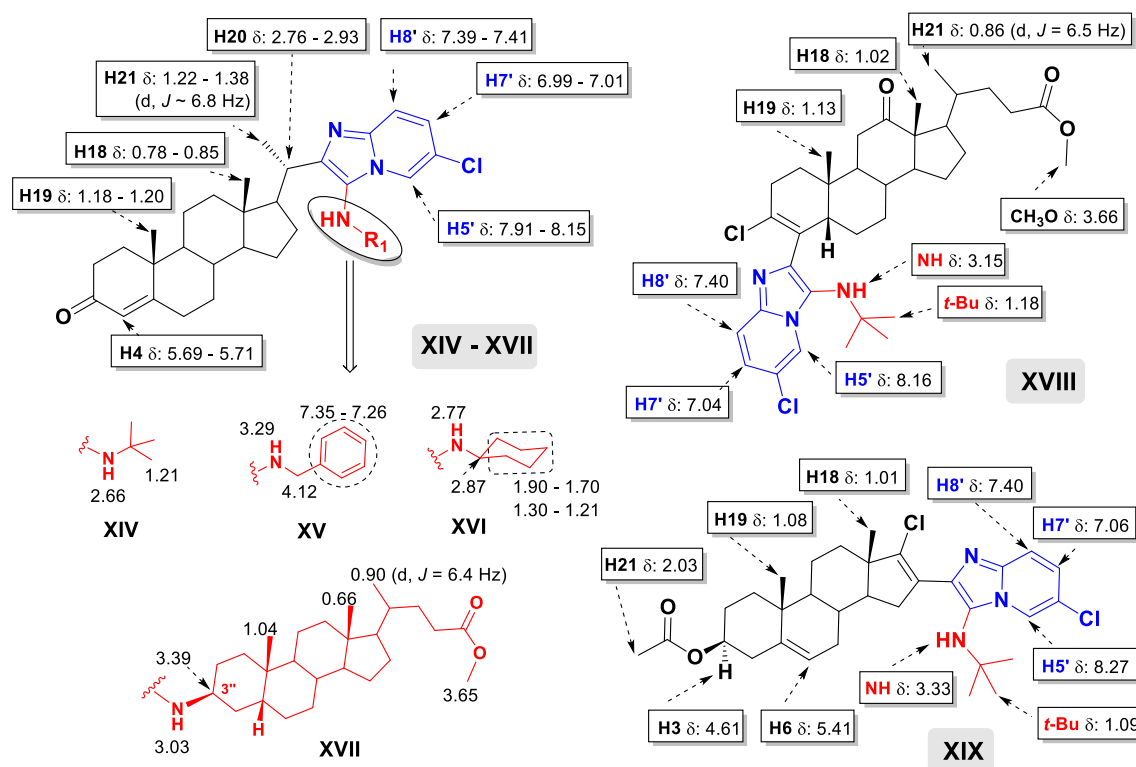
Teniendo en cuenta el mecanismo que se describe en la literatura científica para la reacción de Groebke-Blackburn-Bienaymé,<sup>[139]</sup> donde se emplea la catálisis con ácidos de Lewis; y tomando como referencia la acción catalítica del CAN en otras reacciones multicomponentes similares,<sup>[84]</sup> en el Esquema I.38 se representa el mecanismo propuesto para todas las imidazopiridina-esteroide obtenidas.



**Esquema I.38.** Mecanismo propuesto en la obtención de imidazo[1,2-*a*]piridinas, empleando CAN como ácido de Lewis.

Inicialmente, en este proceso ocurre la activación del grupo carbonilo de los aldehídos esteroidales **67**, **VII** y **VIII**, mediada por el catalizador. Esto facilita el ataque nucleofílico del grupo  $\text{-NH}_2$  de la 2-amino-5-cloropiridina (**107**), y la formación de la imina intermediaria **124**. Seguidamente se produce una cicloadición [4+1] de los isonitrilos **108a-d** sobre la imina activada, formando el cicloadducto **125**. Finalmente, este heterociclo experimenta un proceso de isomerización, mediado por el equilibrio tautomérico imina-enamina, para dar lugar a las correspondientes imidazo[1,2-*a*]piridinas (**XIV – XIX**) y regenerar el CAN, completando así el ciclo catalítico.

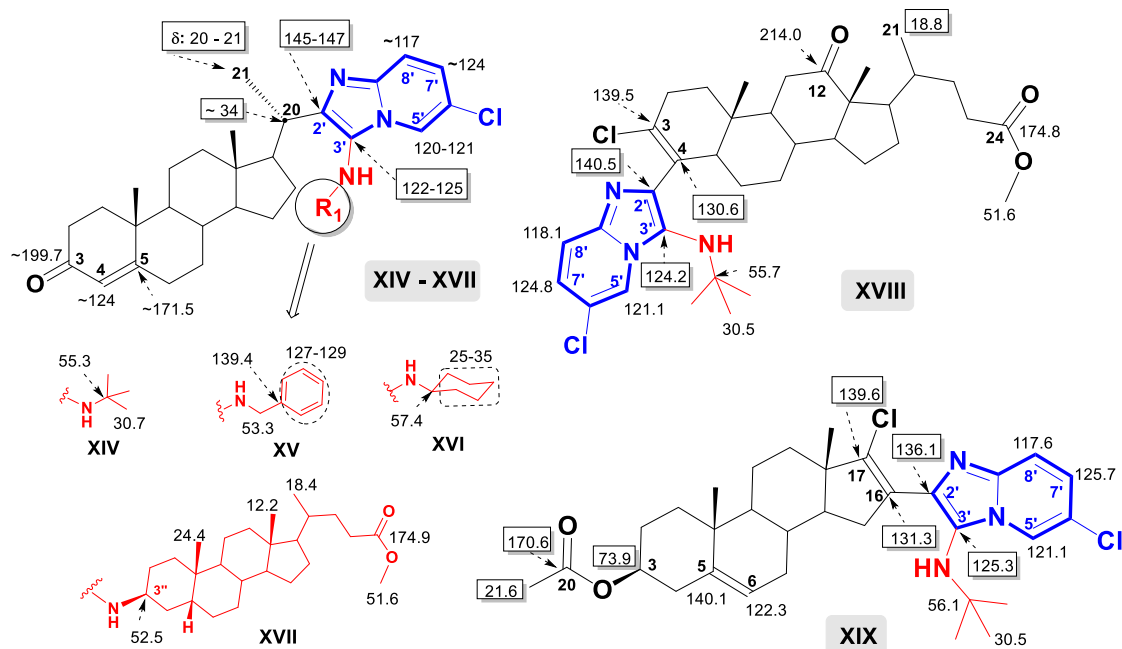
La estructura de los híbridos sintetizados se determinó de forma inequívoca a partir de los datos espectroscópicos de RMN. En las Figuras I.46 y I.47 se muestran los valores de desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  más significativos, que confirman la formación de los productos.



**Figura I.46.** Desplazamientos químicos protonicos más significativos de las imidazo[1,2-*a*]piridina-esteroide **XIV – XIX**.

A modo de ejemplo, en la Figura I.48 se representan los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de los híbridos **XIV-XVII**. Como se puede apreciar claramente, en todos los espectros desaparece la señal asociada al protón del grupo carbaldehído (9.58 ppm) del precursor esteroideal **67**, así como la presencia en la región de hidrógenos unidos a carbonos  $\text{sp}^2$  tres señales con diferentes multiplicidades, asignadas al fragmento de imidazopiridina

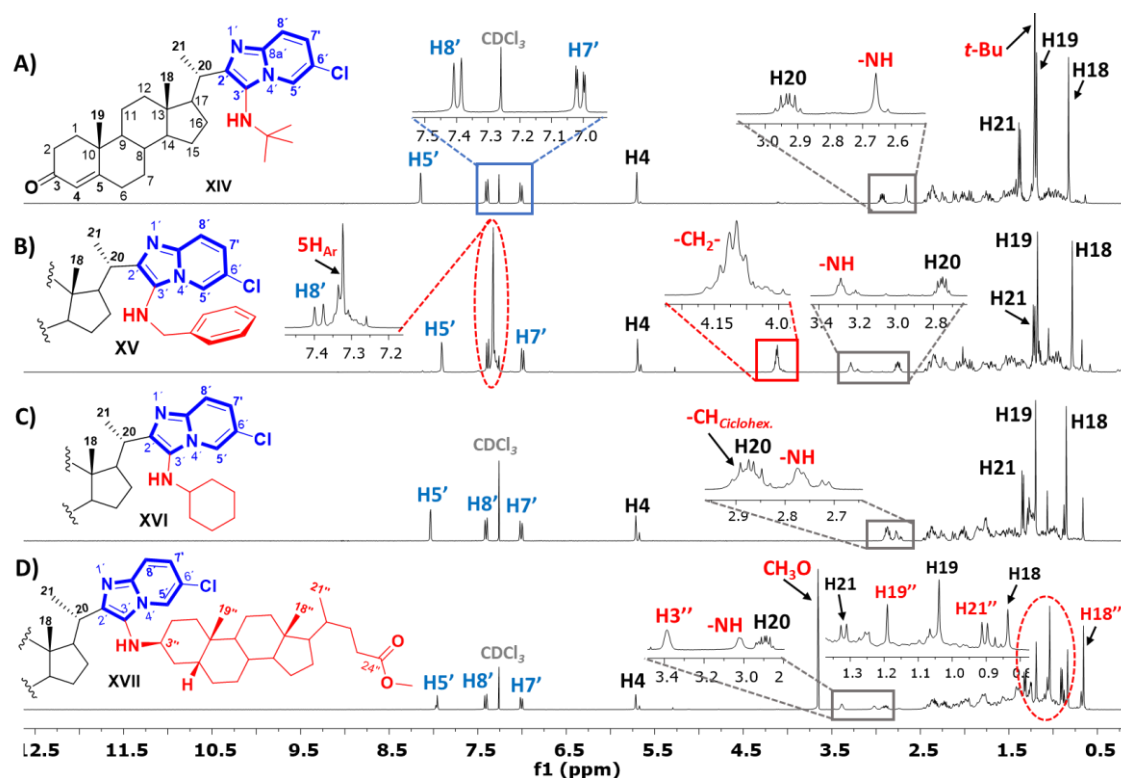
formado para los tres compuestos. En general, la señal más desapantallada de este grupo corresponde a H5', en forma de doblete ( $J \sim 2.0$  Hz) y con  $\delta$  de 7.99 – 8.15 ppm; mientras que H7' y H8' resuenan en el entorno de  $\sim 7.00$  ppm y  $\sim 7.40$  ppm, como dobletes de dobletes ( $J \sim 9.4$  Hz,  $\sim 2.0$  Hz) y dobletes ( $J \sim 9.4$  Hz), respectivamente.



**Figura I.47.** Desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  más significativos de las imidazo[1,2-a]piridina-esteroides **XIV – XIX**.

Para el híbrido **XV** adicionalmente, en esta región se observa un multiplete en 7.26 – 7.35 ppm que integra 5H, que junto al doblete de doblete ( $J = 10.5, 5.6$  Hz) en 4.12 ppm correspondiente a los dos protones diastereotópicos del metileno y la señal de 3.29 ppm en forma de doblete ( $J = 5.6$  Hz), indican la presencia del grupo bencilamino en la estructura (ver Figura I.48 B). El grupo *ter*-butilo (*t*-Bu) es identificado rápidamente en **XIV** como la señal más intensa del espectro a 1.21 ppm (Figura I.48 A); no así las señales correspondientes al grupo ciclohexilo del conjugado **XVI** (Figura I.48 C), las cuales se encuentran solapadas con las provenientes del esqueleto esteroidal en la región de protones alifáticos [2.87 ppm (-CH-) y 1.90 - 1.21 ppm (-CH<sub>2</sub>-)], por lo que requirió de un análisis más meticuloso. En el caso de **XVII** (Figura I.48 D), se identificaron algunas señales distintivas del fragmento proveniente del isonitrilo esteroidal **108d**: en 3.65 ppm el singlete intenso del grupo carbometoxi; el -NH en 3.03 ppm como doblete por su correlación con la señal ancha de 3.39 ppm asignada a H3''; así como los metilos angulares H18'' ( $\delta = 0.66$  ppm), H19'' ( $\delta = 1.04$  ppm) y de la cadena lateral H21'' ( $\delta = 0.90$  ppm).

También, en las cuatro estructuras de los híbridos analizados, se observan las señales provenientes del aldehído de partida **67**. Entre ellas destacan: el singlete de H4 en  $\sim 5.70$  ppm, mientras los metilos H18 y H19 aparecen entre 0.78 – 0.85 ppm y 1.18 – 1.20 ppm, respectivamente. El resto de señales protónicas del esqueleto esteroidal permanecen sin variación significativa en sus desplazamientos químicos, excepto el multiplete H20 ( $\delta = 2.76 - 2.93$  ppm) y el doblete H21 ( $\delta = 1.22 - 1.38$  ppm), que resuenan a campo bajo por el efecto desapantallante que ejerce el anillo heterocíclico vecino.



**Figura I.48.** Espectros RMN- $^1\text{H}$  de los híbridos: **XIV** (A), **XV** (B), **XVI** (C) y **XVII** (D).

En el caso de las imidazopiridinas esteroidales **XVIII** y **XIX**, tienen características espectroscópicas semejantes a **XIV**, mostradas en la Figura I.46; donde las diferencias se encuentran en las señales provenientes del fragmento esteroidal precursor.

La espectroscopía de RMN- $^{13}\text{C}$  también corroboró la formación del fragmento heterocíclico en la estructura de los híbridos esteroidales obtenidos. En la Figura I.49 se ilustran como ejemplo representativo de la serie los espectros de  $^{13}\text{C}$  y DEPT-135 del compuesto **XIV**. Como se puede apreciar, en la región de 150 ppm a 115 ppm se observan siete señales, que corresponden a los carbonos  $\text{sp}^2$  presentes en el fragmento imidazopiridínico formado. Entre las más desapantalladas de este grupo encontramos las asignadas a los carbonos cuaternarios C2' y C8a' en 147.6 ppm y 140.6 ppm,

respectivamente; mientras que a valores inferiores de  $\delta$  resuenan cinco señales: tres correspondientes a los -CH aromáticos (C5', C7' y C8'), y dos de menor intensidad asignadas a C3' (122.7 ppm) y C6' (119.3 ppm). Otras señales a destacar son las provenientes de los carbonos del grupo *ter*-butilo: la más intensa del espectro a 30.7 ppm atribuida a los tres metilos equivalentes, y en 55.3 ppm el carbono cuaternario unido al -NH.

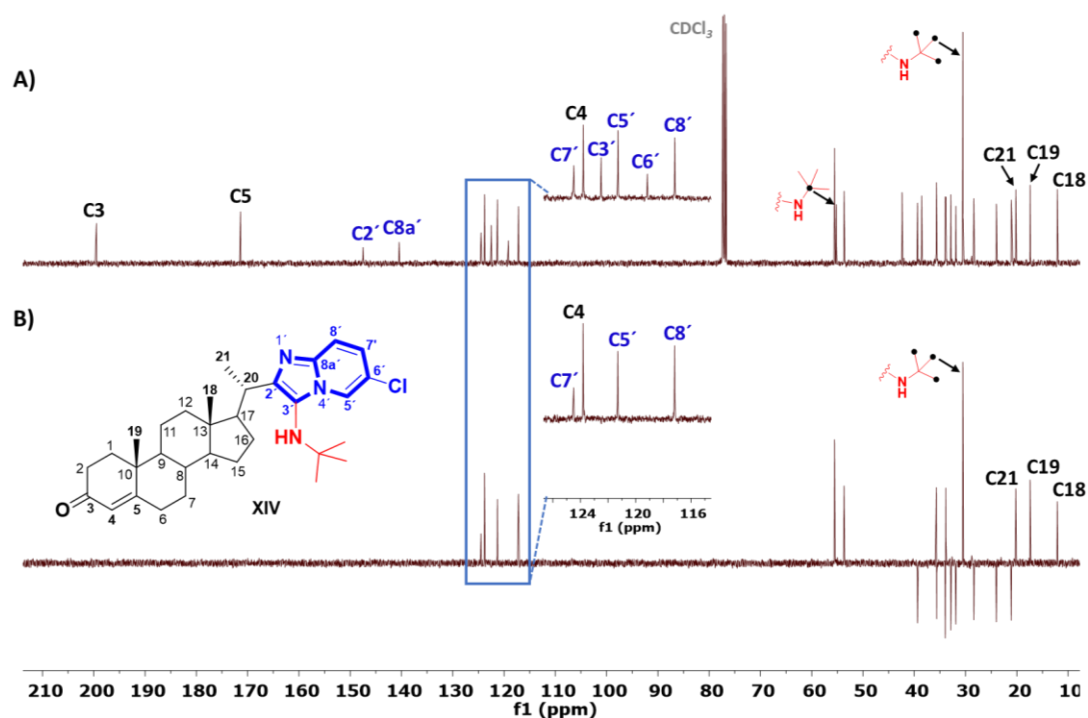


Figura I.49. Espectros RMN-<sup>13</sup>C (A) y DEPT-135 (B) del híbrido XIV.

Por otra parte, las señales pertenecientes al fragmento esteroidal no presentaron variación significativa en sus desplazamientos químicos con respecto al aldehído precursor **67**. Como ejemplo, las señales de C3, C5 y C4 del sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado (anillo A) se mantienen en 199.6, 171.5 y 123.9 ppm, respectivamente, por lo que este grupo funcional no reaccionó bajo las condiciones de síntesis evaluadas.

La asignación inequívoca de los -CH se realizó por medio del análisis de los espectros HSQC y HMBC (ver Anexo 6). A través de las correlaciones heteronucleares a un enlace se asignaron los picos de cruce entre las señales correspondientes a protones y carbonos del anillo imidazopiridínico (C5'-H5', C7'-H7' y C8'-H8'); así como todas las señales del núcleo esteroidal. Los espectros HMBC fueron de utilidad para asignar las señales de carbonos cuaternarios del anillo heterocíclico. Por ejemplo, en el híbrido XIV (ver Figura I.50), para C2' ( $\delta = 147.6$  ppm) se observa correlación a  $^2J_{C-H}$  y  $^3J_{C-H}$  con H20

y H21, respectivamente; mientras que C3' ( $\delta = 122.7$  ppm) solo lo hace con H20. También, la señal de 140.6 ppm que correlaciona con los tres protones aromáticos (H5', H7' y H8') fue asignada a C8a', no así C6' ( $\delta = 122.7$  ppm) que solo muestra el acoplamiento a tres enlaces con H8'.

Con los otros compuestos de la serie se procedió de forma semejante, ya que poseen características espectroscópicas similares. Destacar que para el híbrido **XVII**, al estar presente dos fragmentos esteroidales en su estructura, la cantidad de señales en los espectros registrados prácticamente se duplicó, por lo que requirió de un análisis más meticuloso que para el resto de conjugados.

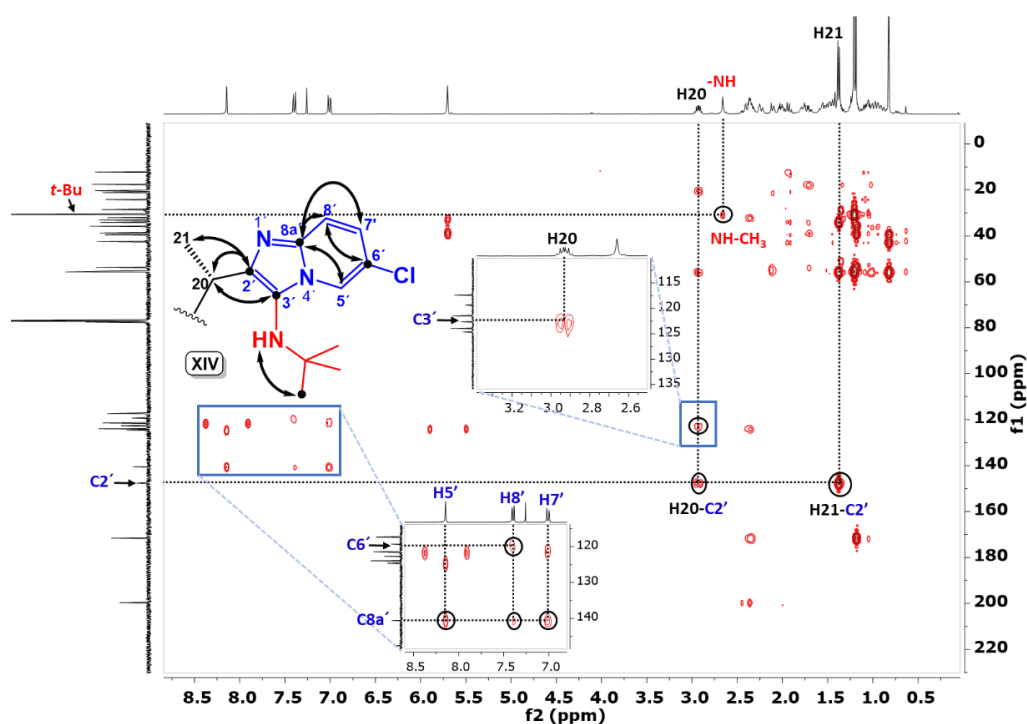


Figura I.50. Espectros HMBC del híbrido **XIV**.

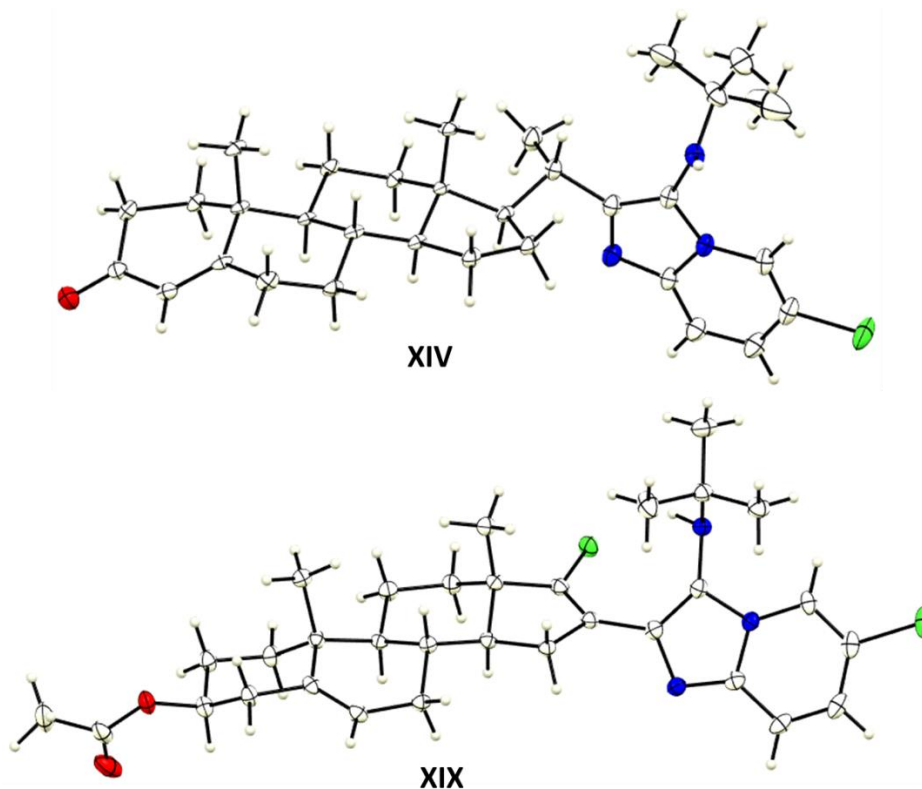
Las fórmulas moleculares correspondientes a las estructuras propuestas mediante el análisis espectroscópico son corroboradas a través de la espectrometría de masas de alta resolución HRMS-ESI en modo positivo. Para todos los compuestos se aprecia un pico con relación  $m/z$  igual al ion quasimolecular  $[M + H]^+$ , y que coincidió con las respectivas masas teóricas calculadas, como se observa en la Tabla I.18.

Finalmente, para los compuestos **XIV** y **XIX** se obtuvieron cristales, mediante evaporación lenta de una disolución de cloroformo-metanol (1:1), a temperatura ambiente y en presencia de aire. Estos cristales resultaron adecuados para ser caracterizados

mediante DRX de monocristal, determinándose para cada uno la estructura molecular de la unidad asimétrica, como se representa en la Figura I.51.

**Tabla I.18.** Valores de m/z correspondientes a los iones quasimoleculares de los híbridos **XIV** – **XIX**. Se representan los picos isotópicos de  $^{35}\text{Cl}$ .

Compuesto	Fórmula Molecular	m/z $[\text{M}+\text{H}]^+(\text{uma})$	
		Experimental	Calculada
<b>XIV</b>	$\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{ClN}_3\text{O}$	522.3238	522.3246
<b>XV</b>	$\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{ClN}_3\text{O}$	556.3080	556.3089
<b>XVI</b>	$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{ClN}_3\text{O}$	548.3402	548.3402
<b>XVII</b>	$\text{C}_{53}\text{H}_{77}\text{ClN}_3\text{O}_3$	838.5652	838.5648
<b>XVIII</b>	$\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3$	642.3224	642.3224
<b>XIX</b>	$\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$	570.2646	570.2649



**Figura I.51.** Diagramas moleculares 3-D de los compuestos **XIV** y **XIX**, obtenidos por DRX. En rojo se observan los átomos de oxígeno, en verde los átomos de cloro, y azul los átomos de nitrógeno.

#### 2.2.3.2.- Síntesis y caracterización de quinoxalina-esteroide (Serie 4)

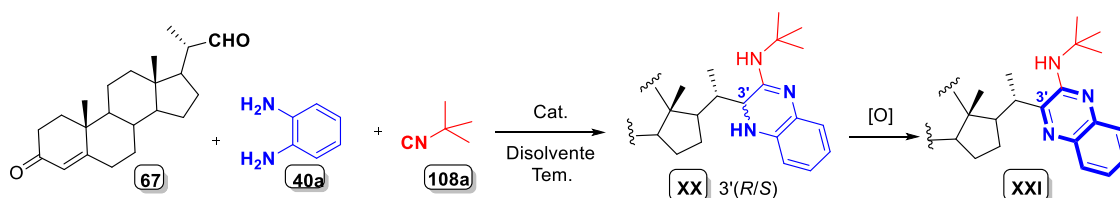
La segunda metodología para obtener nuevos conjugados consistió en la síntesis multicomponente entre una diamina aromática, un isonitrilo y un derivado carbonílico (aldehído o cetona esteroidales). De esta forma, como se muestra en el Esquema I.35, se

generan quinoxalinas estructuralmente diversas (Serie 4), enlazadas de forma exo- o espirocíclica al fragmento esteroidal en la posición 3 del heterociclo.

Como primera etapa, se llevó a cabo la obtención de la quinoxalina-esteroidal **XXI**, por reacción entre la *o*-fenilendiamina **40a**, el *ter*-butilisonitrilo **108a** y el aldehído esteroidal **67**. Teniendo en cuenta que el CAN ha sido satisfactoriamente empleado en la síntesis multicomponente de quinoxalinas,<sup>[157]</sup> fueron evaluadas diferentes condiciones de reacción (ver Tabla I.19).

Cuando se mezclan los reactivos con CAN (10 % mol) en MeOH, después de 4 horas de agitación a temperatura ambiente bajo atmósfera de O<sub>2</sub>(g), se detectó por CCF la formación de un único producto, que correspondió al benzimidazol **Ia** con un 62 % de rendimiento, tras posterior purificación por cromatografía en columna flash (entrada 1, Tabla I.19). Producto que en este medio aerobio evaluado se favorece la formación del benzimidazol, se redujo la proporción del catalizador hasta la mitad (5 % mol), y se llevó a cabo la reacción en EtOH y en atmósfera de Ar (entrada 2). Sin embargo, aunque estas condiciones han sido descritas para la síntesis de otras 3,4-dihidroquinoxalinas análogas, en este caso el producto aislado correspondió a la imina **II** previamente caracterizada.

**Tabla I.19:** Reacción entre aldehído **67**, *o*-fenilendiamina **40a** y *ter*-butilisonitrilo **108a** bajo diferentes condiciones.



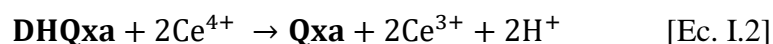
Entrada	Catalizador	Condiciones reacción	Rendimientos	
1	CAN (10 % mol)	O <sub>2</sub> (g), MeOH, t.a, 4h	<b>Ia</b> (62 %)	
2	CAN (5 % eq)	Ar, EtOH, t.a, 4 h	<b>II</b> (79 %)	
3	CAN (10 % mol)	Ar, CH <sub>3</sub> CN, 80 °C, 3 h	<b>XX</b> (76 %)	<b>XXI</b> (7 %)
4	CAN (10 % mol)	1) Ar, CH <sub>3</sub> CN, 80 °C, 3 h 2) O <sub>2</sub> (g), 80 °C, 48 h	<b>XX</b> (33 %)	<b>XXI</b> (40 %)
5	CAN (10 % mol)	1) Ar, MeOH, 65 °C, 3 h 2) O <sub>2</sub> (g), 65 °C, 13 h	<b>XX</b> (16 %)	<b>XXI</b> (36 %)
6	CAN (200 % mol)	<b>XX</b> , MeOH-H <sub>2</sub> O (1:1), t.a, 10 min	<b>XXI</b> (88 %)	
7	CAN (200 % mol)	<b>XX</b> , CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (1:1), t.a, 10 min	<b>XXI</b> (96 %)	

<sup>157</sup> Li, J.; Liu, Y.; Li, C.; Jia, X. CAN-catalyzed syntheses of 3,4-dihydroquinoxalin-2-amine derivatives based on isocyanides. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 6502-6505.

Dados estos resultados preliminares, se procedió a realizar el proceso multicomponente por calentamiento a reflujo de CH<sub>3</sub>CN, bajo atmósfera inerte (entrada 3). A las 3 horas de reacción se observó por CCF la desaparición de los reaccionantes y la formación de dos nuevas manchas con valores de R<sub>f</sub> diferentes a los que presentan **Ia** y **II**. Después del correspondiente tratamiento de la mezcla y purificación por cromatografía en columna flash, fueron aislados dos compuestos: la 3,4-dihidroquinoxalina **XX** más retenida que su producto oxidado **XXI**, en un 76 % y 7 % de rendimiento, respectivamente.

Como se puede apreciar en las entradas 4 y 5 (Tabla I.19), con el objetivo de incrementar el rendimiento de la quinoxalina **XXI**, se llevó a cabo un experimento en dos etapas: primero formación mayoritaria de **XX** y posteriormente un proceso de oxidación *in situ*. Sin embargo, aunque el rendimiento de **XXI** aumentó hasta un 40 %, quedó parte de **XX** (33%), después de 48 horas a reflujo de CH<sub>3</sub>CN (entrada 4). Resultados similares se obtuvieron al emplear MeOH, donde los rendimientos incluso fueron inferiores para ambos productos (entrada 5). Por lo tanto, esto nos indica que un 10 % mol de CAN no es suficiente para oxidar extensivamente la 3,4-dihidroquinoxalina de forma *in situ*.

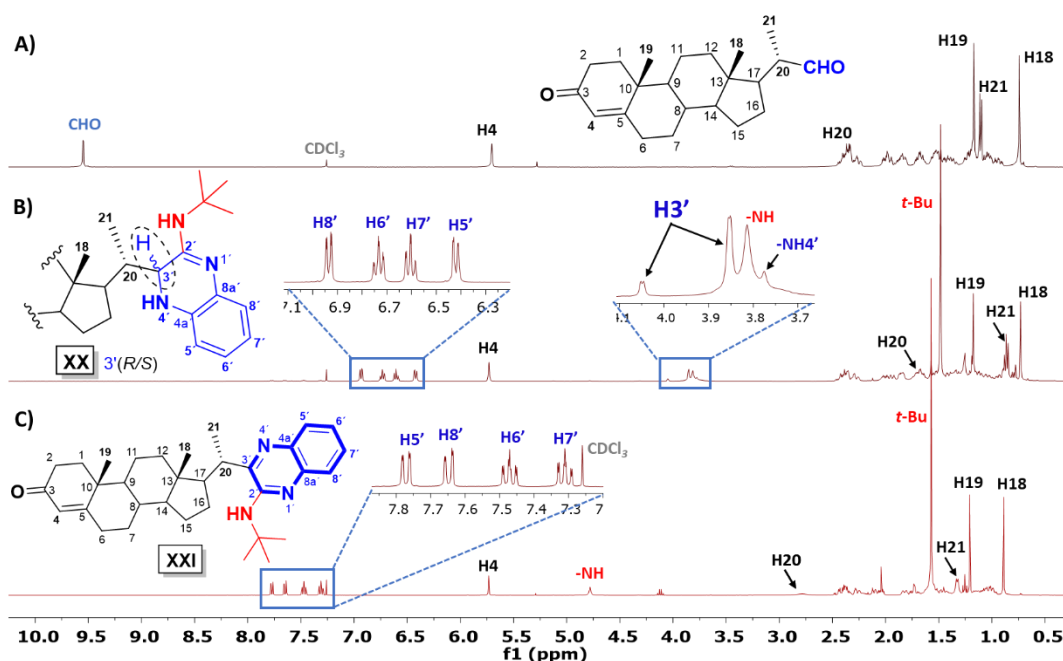
Teniendo en cuenta los trabajos de Boros y col.,<sup>[158]</sup> donde describen la oxidación de derivados de 1,4-dihidropiridinas a piridinas con CAN, se procedió a emplear la misma técnica operatoria, con ligeras modificaciones. Para ello, se disolvió **XX** (denotada como **DHQxa**) en el correspondiente disolvente (ver entradas 6 y 7), y se añadió gota a gota el doble de moles de CAN, previamente disuelto en agua. El proceso de oxidación ocurre rápidamente, ya que por cada adición de la disolución naranja del catalizador se observó la desaparición inmediata del color, cumpliendo con la estequiometría indicada en Ecuación I.2. A los 10 minutos de iniciada se detiene la agitación y la mezcla de reacción amarilla resultante se adicionó sobre disolución acuosa de NH<sub>3</sub> (5 %). El precipitado formado se filtró y lavó con abundante agua. Luego de una recristalización en MeOH se aisló **XXI** (**Qxa**), en un 88 % de rendimiento cuando se utiliza MeOH como disolvente y 96 % al emplear CH<sub>3</sub>CN.



---

<sup>158</sup> Boros, E.E.; Cowan, D.J.; Cox, R.F.; Mebrahtu, M.M.; Rabinowitz, M.H.; Thompson, J.B.; Wolfe, L.A. Hantzsch Synthesis of Pyrazolo[1',2':1,2]pyrazolo[3,4-*b*]pyridines: Partial Agonists of the Calcitonin Receptor. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 13, 5331–5334.

La caracterización estructural de estos dos nuevos conjugados se realizó por análisis de los espectros de RMN y masas. En la Figura I.52 se representan, los espectros de RMN- $^1\text{H}$  registrados en  $\text{CDCl}_3$  para los dos híbridos sintetizados **XX** y **XXI**, y se comparan con el obtenido para el aldehído esteroidal precursor. En ellos se observa, como evidencia de transformación química, la desaparición de la señal en 9.59 ppm correspondiente al protón del grupo  $-\text{CHO}$  del compuesto **67** (Figura I.52 A). Además, en la región de protones aromáticos, se observan cuatro señales agrupadas entre 6.30 y 7.00 ppm para **XX**, mientras más desapantalladas resuenan las de **XXI** (7.30 – 7.80 ppm). Estas fueron asignadas al sistema bencénico *orto*-disustituido fusionado al anillo heterocíclico que se genera en ambos conjugados.



**Figura I.52.** Espectros RMN- $^1\text{H}$  del aldehído **67** (A), y de los híbridos **XX** (B) y **XXI** (C).

La presencia del fragmento *ter*-butilamino en las nuevas estructuras se confirmó, por los singletes intensos que integran 9H pertenecientes a los tres metilos equivalentes de **XX** y **XXI** en 1.48 ppm y 1.57 ppm, respectivamente; mientras que los  $-\text{NH}$ - asociados a este grupo resuenan a diferente  $\delta$  como singletes anchos en 3.81 ppm (**XX**) y 4.78 ppm (**XXI**). En el caso de la 3,4-dihidroquinoxalina esteroidal, al ampliar la zona de 3.70 – 4.10 ppm (Figura I.52 B) se observa un grupo de señales adicionales: un singlete ancho muy poco intenso correspondiente a  $\text{NH}_4'$  en 3.78 ppm, y dos dobletes ( $J \sim 2.7$  Hz) en 3.86 ppm y 4.05 ppm con una relación de intensidades 85:15, asignados a  $\text{H}_3'$  y que confirma que el compuesto **XX** se obtiene como una mezcla de diastereómeros. Una vez

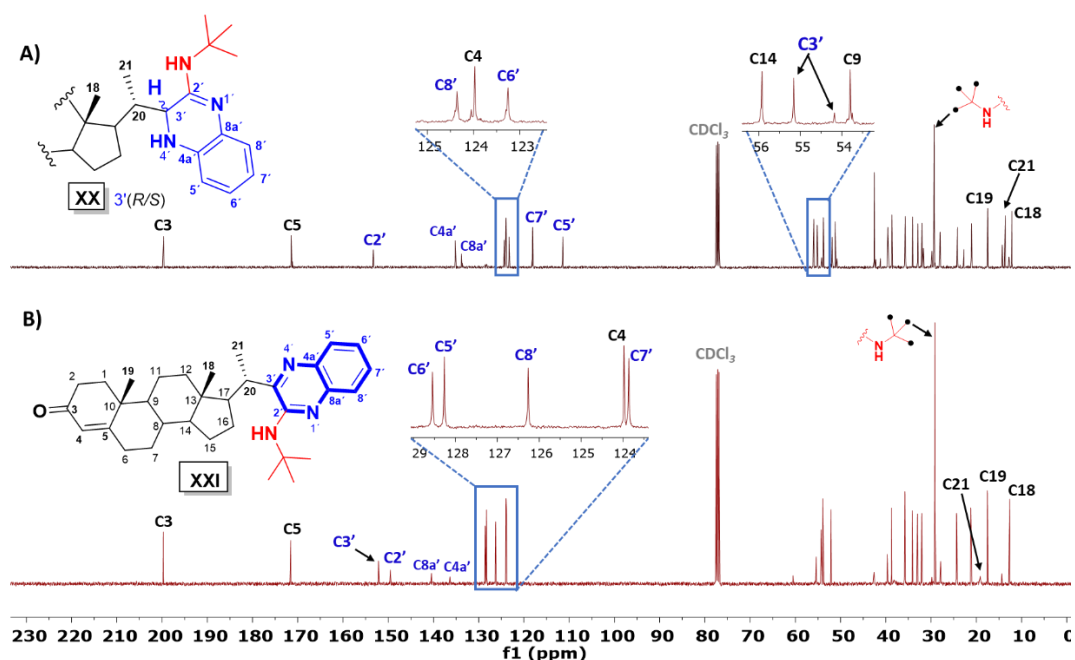
que se produce la oxidación, estas señales desaparecen del espectro protónico de **XXI** (Figura I.52 C).

En la región alifática, como señales características del esqueleto esteroideal, se identifican los protones de los metilos C18 y C19, entre 0.73 – 0.89 ppm y 1.18 – 1.21 ppm, respectivamente. Por otra parte, si comparamos los desplazamientos químicos que presentan los protones H20 y H21 de cada híbrido con los del aldehído precursor, se observa el efecto que produce los fragmentos heterocíclicos cercanos espacialmente a estas posiciones. Por ejemplo, en **XX**, las señales resuenan en ~ 1.65 ppm (H20) y en 0.86 ppm (H21), a valores más bajos que los asignados en el aldehído **67** [~ 2.37 ppm (H20) y 1.11 ppm (H21)]. Todo lo contrario, ocurre para el híbrido **XXI**, donde las señales de H20 y H21 aparecen a 2.78 ppm y 1.33 ppm, respectivamente. Este desapantallamiento, como se describió anteriormente para las imidazo[1,2-*a*]piridinas-esteroidales **XIV-XVII** (Serie 3), puede ser explicado a un mayor efecto de anisotropía de corriente de anillo que produce en el derivado oxidado aromático **XXI**, no así en la 3,4-dihidroquinoxalina **XX**. Finalmente, el singlete de H4 (~5.73 ppm), y el resto de señales protónicas del esqueleto esteroideal permanecen sin variación significativa en sus desplazamientos químicos.

De igual forma, los espectros de RMN-<sup>13</sup>C (Figura I.53) ratifican el análisis realizado anteriormente, indicando la formación del heterocíclico correspondiente en los conjugados obtenidos. En ambos compuestos, en la región de carbonos con hibridación sp<sup>2</sup> se observan los cuatro CH del anillo bencénico (H5' - H8'): entre 111.0 – 124.0 ppm para **XX**, y de 124.0 – 129.0 ppm en **XXI**. También, a mayores valores de δ resuenan los carbonos cuaternarios C4a' y C8a' entre ~133 y 141 ppm; así como C2' que aparecen más desapantallados en 149.5 ppm (**XXI**) y 153.3 ppm (**XX**).

Por otra parte, la asignación inequívoca del C3' en la 3,4-dihidroquinoxalina **XX**, se realizó a través del análisis del espectro de HSQC, donde se observa una correlación directa de las señales en 55.2 ppm y 54.2 ppm con las señales protónicas de 3.86 ppm y 4.05 ppm, respectivamente. En el caso de la quinoxalina **XXI**, este carbono C3' experimenta un cambio de hibridación de sp<sup>3</sup> a sp<sup>2</sup> producto de la oxidación, desplazándose hasta los 152.1 ppm. La presencia del grupo *ter*-butilo en ambos compuestos se detectó a través de la señal intensa en ~29 ppm correspondiente a los metilos equivalentes, y al carbono cuaternario en ~52 ppm.

Otras señales para destacar son las procedentes del sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado del fragmento esteroidal enlazado [C3 ( $\delta = 199.7$  ppm), C5 ( $\delta \sim 171.5$  ppm) y C4 ( $\delta = 124.0$  ppm)], así como los metilos angulares C18 y C19, entre  $\sim 12$  y 18 ppm. A diferencia de estas señales, que se mantienen con semejantes desplazamientos químicos entre ambos compuestos, la correspondiente al metilo C21 se observa para **XXI** a 19.2 ppm, muy diferente al valor que presenta en **XX** (13.6 ppm).



**Figura I.53.** Espectros RMN- $^{13}\text{C}$  de **XX** (A) y **XXI** (B).

El análisis de los espectros de masas obtenidos permitió corroborar las estructuras propuestas por RMN. La masa molecular exacta se determinó mediante la técnica de ionización suave HRMS-ESI, detectándose en cada caso los iones quasimoleculares  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Para los dos híbridos se aprecia un pico en 502.3789 uma (**XX**) y 500.3636 uma (**XXI**), que coinciden con el valor calculado para las fórmulas moleculares  $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}$ : 502.3792 y  $\text{C}_{33}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}$ : 500.3635, respectivamente.

Adicionalmente, y como complemento del análisis estructural, se utilizó la técnica de espectrometría de masas con fuente de ionización electrónica (EM-IE). Los espectros registrados en modo positivo (Figura I.54), muestran un pico de poca intensidad a 501 uma (**XX**) y 499 uma (**XXI**), correspondientes al ión molecular  $[\text{M}]^+$  de cada compuesto. También se observa, a pesar de la similitud estructural entre los dos derivados de quinoxalina, que los picos bases tienen diferente valor de  $m/z$ , por lo que se originan de diferente manera, (ver Esquema I.39). En la 3,4-dihidroquinoxalina **XX** el ión molecular

experimenta una pérdida del fragmento esterooidal radicalico de 299 uma, dando lugar al pico base del espectro  $\Phi_1[M^+ - C_{21}H_{31}O]^+$  en  $m/z = 202$ , a través de una ruptura en  $\alpha$  iniciada por el sitio radicalico  $NH_4^+$  (Esquema I.39 A). En el caso de la quinoxalina **XXI**, el proceso de formación del pico base como catión-radical  $R_1[M^+ - C_{19}H_{26}O]^+$  a  $m/z = 229$  puede ocurrir por la vía de un reordenamiento del tipo McLafferty, de manera similar al proceso mostrado para los benzimidazoles de la Serie 1 (Esquema I.39 B)

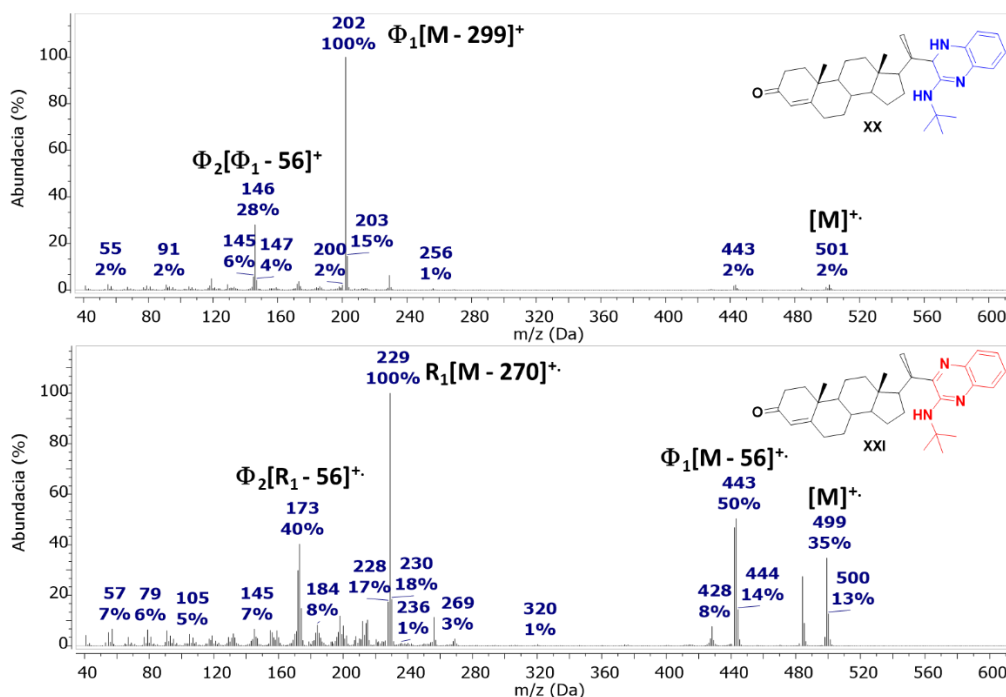
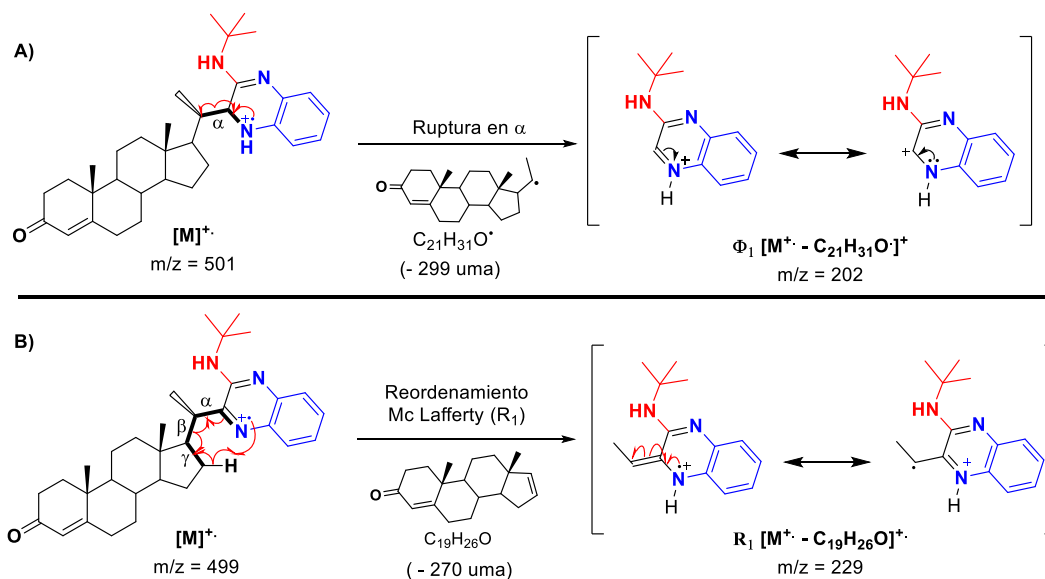


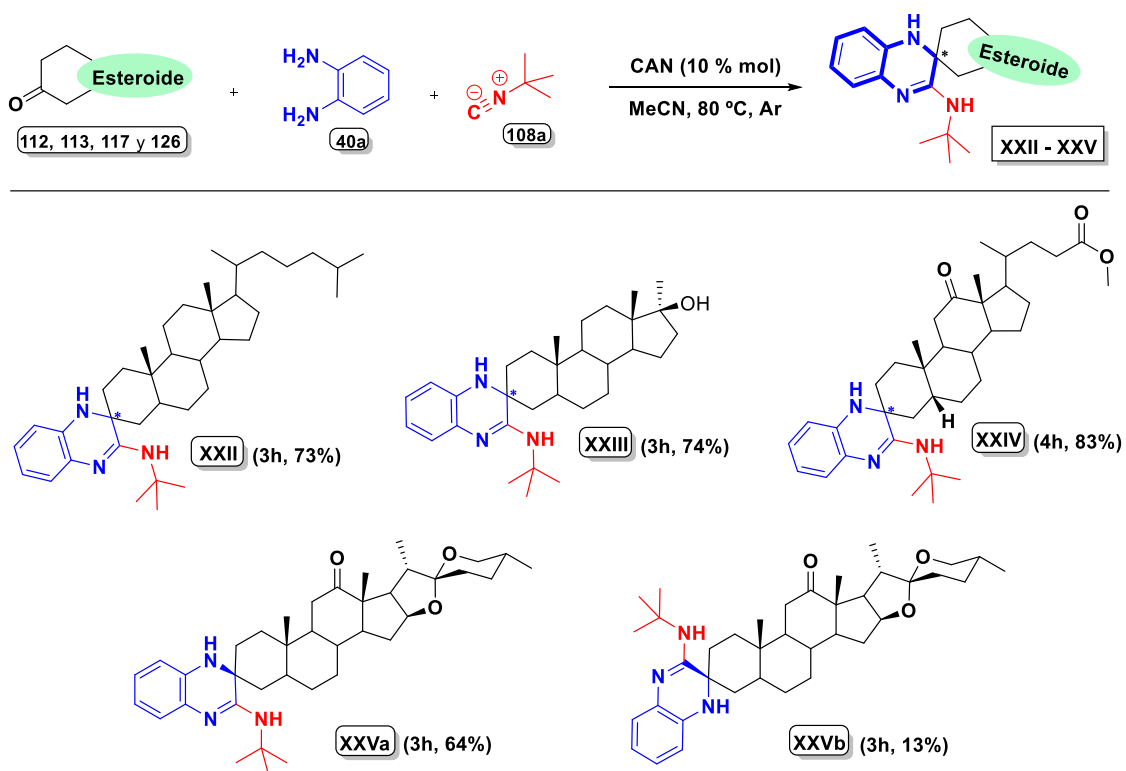
Figura I.54: Espectros de masas (EM-IE) de **XX** y **XXI**.



Esquema I.39. Mecanismos de fragmentación del ion molecular en la formación del pico base observado en los híbridos **XX** (A) y **XXI** (B).

Otros picos detectables son  $\Phi_1[M^+ - C_4H_8]^+$  a  $m/z = 443$  (I = 50 %) en **XXI**, así como las fragmentaciones de los picos bases que producen los iones  $\Phi_2[\Phi_1 - C_4H_8]^+$   $m/z$  146 (I = 28 %) y  $\Phi_2[R_1 - C_4H_8]^+$   $m/z$  173 (I = 40 %) en **XX** y **XXI**, respectivamente; todos correspondientes a la pérdida de metilpropeno (56 uma) como molécula neutra.

Una vez evaluada la eficiencia del CAN para generar quinoxalinas a partir del aldehído esteroideal **67**, y con el objetivo de buscar mayor diversidad estructural en la obtención de este tipo de heterociclo, se procedió a utilizar como componente carbonílico las cetonas esteroidales **112**, **113**, **117** y (20 $\alpha$ ,22R,25S)-5 $\alpha$ -espirostan-3,12-diona (**126**). De esta forma, se sintetizaron nuevas 3,4-dihidroquinoxalinas espirocíclicas conjugadas a esteroides (**XXII** – **XXV**), manteniendo el uso de los componentes *o*-fenilendiamina **40a** y el *ter*-butilisonitrilo **108a** (ver Esquema I.40).



**Esquema I.40.** Híbridos 3,4-dihidroquinoxalina-espiro-esteroide sintetizados (Serie 4).

Las reacciones se llevaron a cabo por calentamiento a reflujo de acetonitrilo bajo atmósfera de Ar y empleando CAN (10 % mol) como catalizador, de manera similar al procedimiento multicomponente de GBB descrito para los híbridos de la Serie 3. La formación del anillo dihidroquinoxalínico tiene lugar con la generación de un centro estereogénico en el C3 (carbono espirocíclico) de los esteroides precursores; que al ser enantiómeros puros y no cambian su configuración en el transcurso de la reacción, se

debe esperar que se obtenga como productos una mezcla de diastereoisómeros. Sin embargo, solo pudieron ser aislados mediante cromatografía en columna flash los diastereómeros **XXVa** y **XXVb** que se originan a partir de la dicetona derivada de la hecogenina **126**, en un 64 % y 13 %, respectivamente, para un rendimiento total del 77 %. Los tres conjugados quinoxalínicos **XXII**, **XXIII** y **XXIV** derivados del colestano, androstano y colano, en ese orden, se obtuvieron con rendimientos entre 73 y 83 %, correspondientes a la mezcla de isómeros no separados, lo que fue confirmado a través de los espectros de RMN.

Por otra parte, es importante destacar que se utilizaron también las cetonas 3 $\beta$ -acetoxi-5-androsten-17-ona (**118**) y 3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona o pregnenolona (**PREG**), como comunmente se nombra. Sin embargo, bajo las condiciones evaluadas anteriormente no experimentaron reacción, aún después de transcurridas 24 horas de iniciado el calentamiento.

Estos resultados pueden ser explicados analizando la posición del grupo carbonilo y las conformaciones de las cetonas esteroidales. Como se ilustra en la Figura I.55, los precursores de los compuestos **XXII**, **XXIII** y **XXV** presentan similar disposición espacial del carbonilo C3 en el anillo A (serie 5 $\alpha$ ), por lo que no existen diferencias significativas en los rendimientos globales (73 – 77 %); mientras que **117** (material de partida de **XXIV**) pertenece a la serie 5 $\beta$  con una conformación distinta. Sin embargo, para las cuatro cetonas esteroidales, esta funcionalidad en C3 tiene una débil influencia estérica del metilo angular C19, siendo **117** la más accesible y reactiva. Todo lo contrario, ocurre para **118** y **PREG**, donde sus grupos carbonilos de C17 y C20 respectivamente, se encuentran en una posición muy impedida con un fuerte efecto estérico ejercido por el metilo C18, lo que provoca que no reaccionen en las condiciones empleadas.

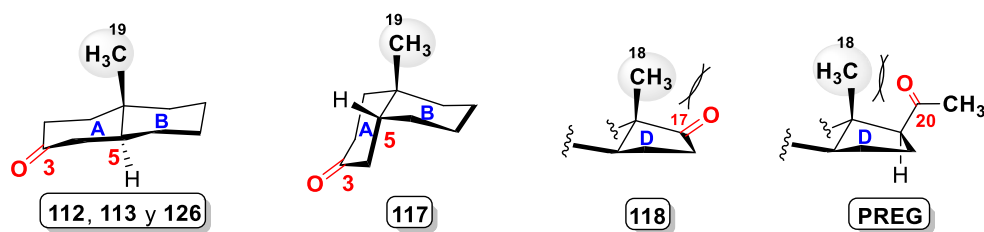
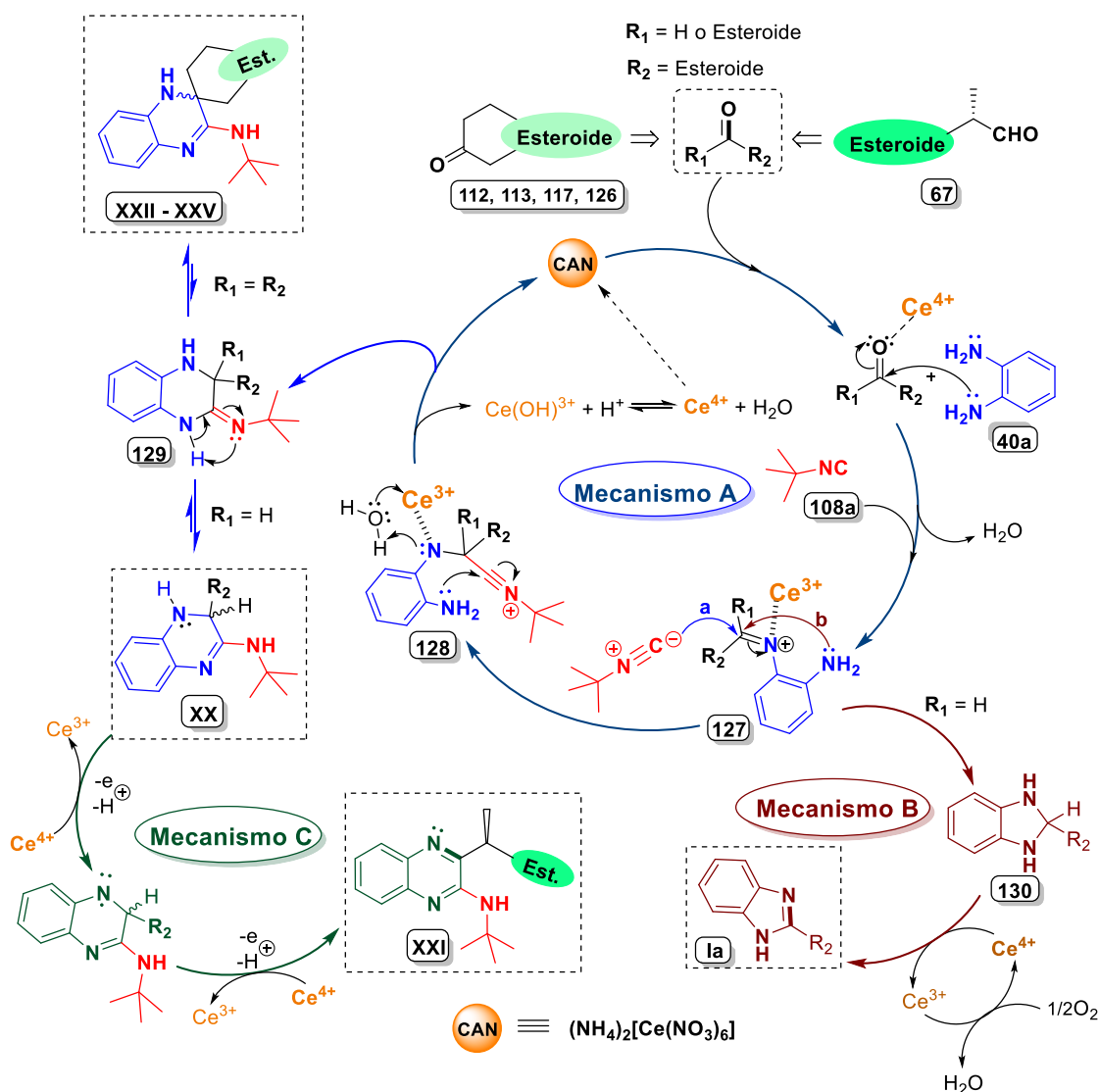


Figura I.55. Disposición espacial de los grupos carbonilos en las cetonas esteroidales utilizadas.

Considerando el mecanismo que se describe en la literatura científica para compuestos semejantes, donde se emplea la catálisis con CAN como ácido de

Lewis,<sup>[84,157]</sup> en el Esquema I.41 se representa el propuesto para la obtención de todas la quinoxalinas de la Serie 4. En este proceso, inicialmente ocurre la activación del grupo carbonilo en C3 de las cetonas esteroideas (**112**, **113**, **117** y **126**) mediada por el catalizador, lo que facilita el ataque nucleofílico de un grupo  $-NH_2$  de la *o*-fenilendiamina **40a** y la formación de la imina **127** como intermediario. Posteriormente, se produce la adición nucleofílica del *ter*-butilisonitrilo **108a** sobre la imina activada, dando lugar al intermediario *nitrilium* **128**, el cual experimenta seguidamente una ciclación intramolecular y la formación del heterocíclico **129**. Como última etapa, ocurre una isomerización y se producen las 3,4-dihidroquinoxalina-espiro-esteroide (**XXII** - **XXV**), ilustrado a través del Mecanismo A.



**Esquema I.41.** Mecanismos de síntesis propuestos empleando CAN como catalizador: (A) para los híbridos 3,4-dihidroquinoxalina-esteroide (**XX**, **XXII** - **XXV**); (B) para el producto competitivo benzimidazol **Ia**; y (C) para la quinoxalina **XXI**.

Sin embargo, cuando el esteroide precursor corresponde al aldehído **67**, en dependencia de las condiciones de reacción empleadas, pueden ocurrir dos procesos diferentes. Por ejemplo, la formación de la 3,4-dihidroquinoxalina **XX** se favorece cuando se utiliza reflujo de acetonitrilo en atmósfera inerte, representado en el Mecanismo A. Por otra parte, si el proceso multicomponente ocurre en MeOH a temperatura ambiente y en presencia de dioxígeno, sobre la base de Schiff **127** generada, se produce preferentemente el ataque intramolecular del átomo de nitrógeno del grupo –NH<sub>2</sub> sobre el carbono imínico activado, con la formación de la benzimidazolina **130**. Seguidamente, este intermediario experimenta un proceso oxidativo (representado para los híbridos de la Serie 1), dando lugar al correspondiente benzimidazol **Ia** (ver Mecanismo B).

Finalmente, la obtención de la quinoxalina **XXI** transcurre a partir de **XX** (Mecanismo C), mediante dos etapas consecutivas de oxidación y desprotonación mediados por el CAN, similar al descrito por otros autores para compuestos similares.<sup>[158,159]</sup>

La estructura de los híbridos sintetizados se determinó de forma inequívoca a partir de los datos espectroscópicos de RMN. Las señales más significativas con sus valores de desplazamiento químico de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se relacionan en la Tabla I.20. A modo de ejemplo representativo de la serie, en la Figura I.56 se muestran los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de (3*R/S*)-2'-(*ter*-butilamino)-4*H*-espiro[12-oxo-5β-colan-3,3'-dihidroquinoxalin]-24-oato de metilo (**XXIV**), los que se describen a continuación.

En el espectro protónico registrado en CDCl<sub>3</sub>, en la región entre 6.50 y 7.10 ppm aparecen tres grupos de señales: dos dobletes de dobletes (*J* ~ 7.0 y 2.1 Hz) que integran un protón cada una, y un multiplete que integra dos protones; asignadas a los cuatro protones aromáticos del anillo dihidroquinoxalínico formado. Las señales más intensas se observan como singletes a 3.66 ppm y 1.48 ppm correspondientes a los grupos -OCH<sub>3</sub> y *ter*-butilo, respectivamente; mientras que a menores valores de desplazamiento químico resuenan los metilos angulares C18 (1.03 ppm) y C19 (1.09 ppm), así como el metilo C21 de la cadena lateral del fragmento esteroidal a 0.85 ppm en forma de doblete (*J* = 6.5 Hz), ver Figura I.56 (izquierda).

---

<sup>159</sup> a) Behalo, M.S.; El Said, E.S. Green synthesis of 1,3,4-oxadiazole derivatives based on *N*-arylidene-2-(1-oxo-4-(4-phenoxyphenyl)phthalazin-2(1*H*)-yl)acetohydrazide as potential antitumor agents. *J Heterocyclic Chem.* **2021**, 58, 459 – 465. b) Pozgan, F.; Polanc, S.; Kocevar, M. The synthesis of heterocyclic derivatives from pyran-2-ones and hydrazine hydrate. Ammonium cerium(IV) nitrate as an efficient oxidant in pyridazine chemistry. *Tetrahedron* **2006**, 62, 9718-9725.

Tabla I.20. Desplazamientos químicos más importantes correspondientes a la mezcla de diastereoisómeros de **XXII** – **XIV** y los diastereómeros asilados **XXVa** y **XXVb**.

Comp.	RMN- <sup>1</sup> H δ (ppm)								RMN- <sup>13</sup> C δ (ppm)						
	H8'	H6'/H7'	H5'	NH- <i>t</i> Bu	NH4'	<i>t</i> Bu	H18	H19	C <sub>Ar</sub>	C2'	C3	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -C-	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> -C-	C18	C19
<b>XXII</b>	7.03 (m)	6.78 (m)	6.58(m)	4.63 (A) 4.31 (B)	3.41 (A) 4.18 (B)	1.50 (A) 1.48 (B)	0.66	0.83	113.8 -136.0	157.7	51.8	52.1	29.3 (A) 29.1 (B)	12.2	11.9
<b>XXIII</b>	7.04 (m)	6.78(m)	6.58(m)	4.61 (A) 4.30 (B)	3.40 (A) 4.13 (B)	1.51 (A) 1.48 (B)	0.85	0.85	113.8 -136.0	157.5	51.7	52.1	29.3 (A) 29.1 (B)	14.1	11.9
<b>XXIV</b>	7.02 (dd)	6.77(m)	6.56(dd)	4.51 (A) 4.28 (B)	3.54 (A) 4.10 (B)	1.48	1.03	1.09	114.0 -135.8	157.0	52.5	52.1	29.3 (A) 29.1 (B)	11.8	23.5
<b>XXVa</b>	7.04 (dd)	6.78(m)	6.58(dd)	4.51	3.43	1.47	1.05	0.92	113.8 -135.9	157.1	51.5	52.2	29.3	16.1	11.5
<b>XXVb</b>	7.03 (dd)	6.78(m)	6.59(dd)	4.28	4.11	1.47	1.05	0.93	114.1 -135.5	156.7	51.5	52.2	29.1	16.2	11.6

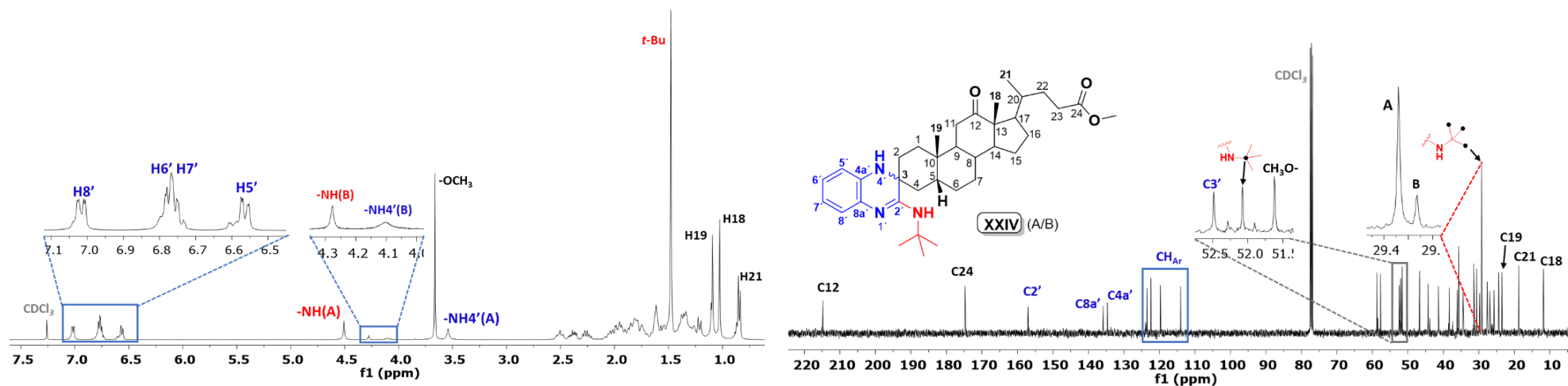


Figura I.56. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H (izquierda) y RMN-<sup>13</sup>C (derecha) del compuesto **XXIV**

Como fue descrito anteriormente, durante la reacción se generan dos diastéromeros (A y B). Estos son identificados a través de los singletes en 4.51 ppm y 4.28 ppm, asignados al protón del grupo  $\text{NH-C}(\text{CH}_3)_3$  de cada isómero. Mediante integración de estas señales se determinó que se encuentran en una proporción 85:15 (A:B). De igual forma, se observaron dos singletes poco intensos y anchos correspondientes al  $\text{NH}_4^+$ , en 4.10 ppm para el diastéromero minoritario B y en 3.54 ppm para el diastéromero mayoritario A. Para los híbridos **XXII** y **XXIII**, se realizó un análisis similar en este grupo de señales, detectándose la mezcla de diastéromeros A:B en proporciones 70:30 y 75:25, respectivamente. En el caso del par de diastéromeros aislados **XXVa** y **XXVb** provenientes de la cetona **126**, se observó el mismo comportamiento en los valores de  $\delta$  de los protones intercambiables: 4.51 ppm ( $\text{NH-}t\text{Bu}$ ) y 3.43 ppm ( $\text{NH}_4^+$ ) para el compuesto mayoritario **XXVa**, mientras 4.28 ppm ( $\text{NH-}t\text{Bu}$ ) y 4.11 ppm ( $\text{NH}_4^+$ ) para **XXVb**, (ver Tabla I.20).

De igual forma, el espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de **XXIV** (Figura I.56 derecha) ratifica la formación del fragmento heterocíclico. En la región entre 112.0 y 124.0 ppm se observan cuatro señales de CH ( $\text{sp}^2$ ) aromáticos; y a mayores valores de  $\delta$ , en 134.7 ppm y 135.8 ppm resuenan dos señales de carbonos cuaternarios: todas asignadas al anillo arilo fusionado. Las señales correspondientes al fragmento dihidroquinoxalínico se encuentran en 157.0 ppm para C2', mientras C3 (sitio de conjugación) aparece en la región de carbonos  $\text{sp}^3$  a 52.5 ppm.

Por otra parte, a 29.3 ppm se observa una señal muy intensa y otra muy próxima de menor intensidad en 29.1 ppm, las que pertenecen a los metilos del grupo *ter*-butilo de los diastéromeros A y B presentes, respectivamente. En el caso del carbono cuaternario de este grupo ( $\delta = 52.1$  ppm), resuena cercano a C3. El análisis riguroso del espectro de HMBC permitió diferenciarlos, al observar las correlaciones a múltiple enlace del carbono espirocíclico ( $\delta = 52.5$  ppm) con los protones del anillo A del esteroide (H1, H2, H4); mientras que la señal de 52.1 ppm solo correlaciona con los protones del grupo -NH(*t*-Bu), ver Figura I.57.

Como señales provenientes del esqueleto esteroideal se encuentran los metilos C18, C19 y C21 en 11.8, 23.5 y 18.8 ppm, respectivamente; mientras que el grupo  $-\text{OCH}_3$  se observa a 51.6 ppm. También, en la región más desapantallada del espectro resuenan los carbonilos C24 ( $\delta = 174.7$  ppm) y C12 ( $\delta = 214.8$  ppm), confirmando que la reacción ocurre selectivamente en C3.

El resto de 3,4-dihidroquinoxalinas espirocíclicas obtenidas, presentan características espectroscópicas similares a **XXIV** (ver Tabla I.20), donde las diferencias se encuentran en las señales provenientes del fragmento esterooidal precursor.

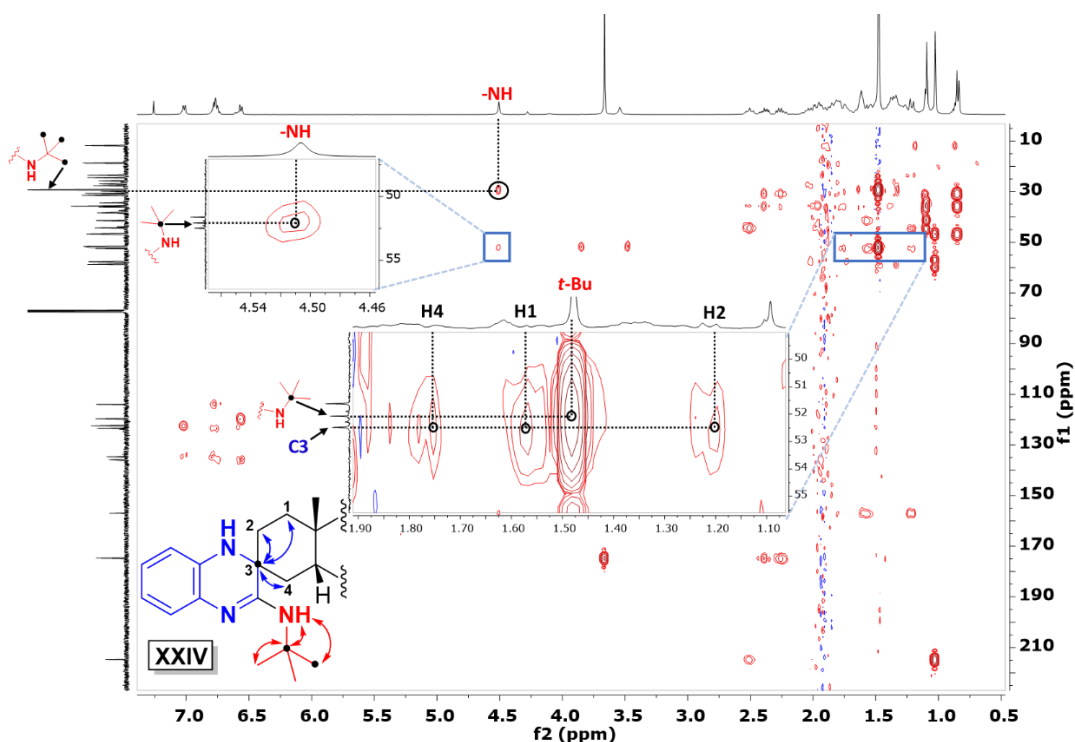


Figura I.57: Espectro HMBC ampliado del híbrido **XXIV**.

La espectrometría de masas de alta resolución HRMS-ESI en modo positivo permitió corroborar las fórmulas moleculares correspondientes a las estructuras propuestas de los compuestos analizados (ver Tabla I.21). Para **XXIII** y **XXIV**, fue posible detectar y separar la mezcla de diastereoisómeros, empleando el cromatógrafo HPLC acoplado al espectrómetro de masas. En estos dos conjugados se observan los picos con relación  $m/z$  igual a los iones quasimoleculares  $[M+H]^+$  para cada diastereoisómero, los cuales coinciden con las masas calculadas ( $C_{31}H_{47}N_3O$ : 478.3792 en **XXIII** y  $C_{36}H_{53}N_3O_3$ : 576.4160 en **XXIV**). Aunque en el híbrido **XXII** no fue posible separar los isómeros, el pico detectado a 560.4930 uma (correspondiente a la mezcla) sí coincidió con la masa calculada  $C_{38}H_{61}N_3$ : 560.4938, (ver Anexo 6).

Adicionalmente, mediante los valores de abundancia, determinados por las áreas bajo la curva de los picos detectados en los cromatogramas registrados (ver Anexo 6), se pudo calcular que los diastereoisómeros de **XXIII** y **XXIV** se encuentran en una relación 79/21 y 83/17, respectivamente; resultados similares a los determinados por RMN- $^1H$ .

**Tabla I.21.** Valores de m/z correspondientes a los picos analizados por HPLC-EM de las quinoxalina-espiro-esteroidales.

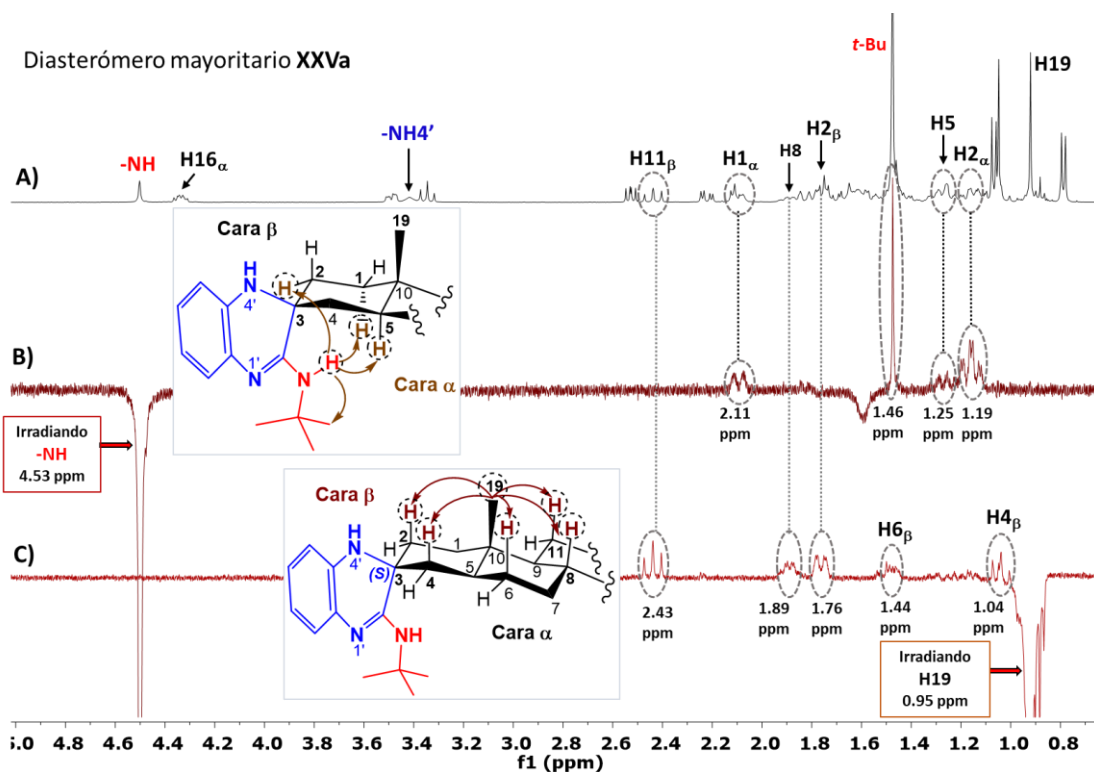
Compuesto	$t_R$ /min	Abundancia	Fórmula Molecular	m/z $[M+H]^+$ (uma)	
				Experimental	Calculada
<b>XXII</b>	7.73	-	$C_{38}H_{61}N_3$	560.4930	560.4938
<b>XXIII</b>	4.82	56542	$C_{31}H_{47}N_3O$	478.3787	478.3792
	4.95	15311		478.3780	
<b>XXIV</b>	5.40	48079	$C_{36}H_{53}N_3O_3$	576.4157	576.4160
	5.50	9736		576.4154	
<b>XXVa</b>	5.65	-	$C_{38}H_{56}N_3O_3$	602.4315	602.4316
<b>XXVb</b>	5.71	-	$C_{38}H_{56}N_3O_3$	602.4315	602.4316

Con el fin de establecer la configuración del nuevo centro estereogénico formado en el carbono 3 (espiro) de los diastereómeros aislados **XXVa** y **XXVb**, se realizaron experimentos NOE homonuclear ( $^1H\{^1H\}$ ) en cada isómero, irradiando selectivamente sobre los núcleos que pueden aportar información útil de vecindad espacial respecto a este centro quiral, como son el metilo angular C19 y el protón del grupo -NH exocíclico.

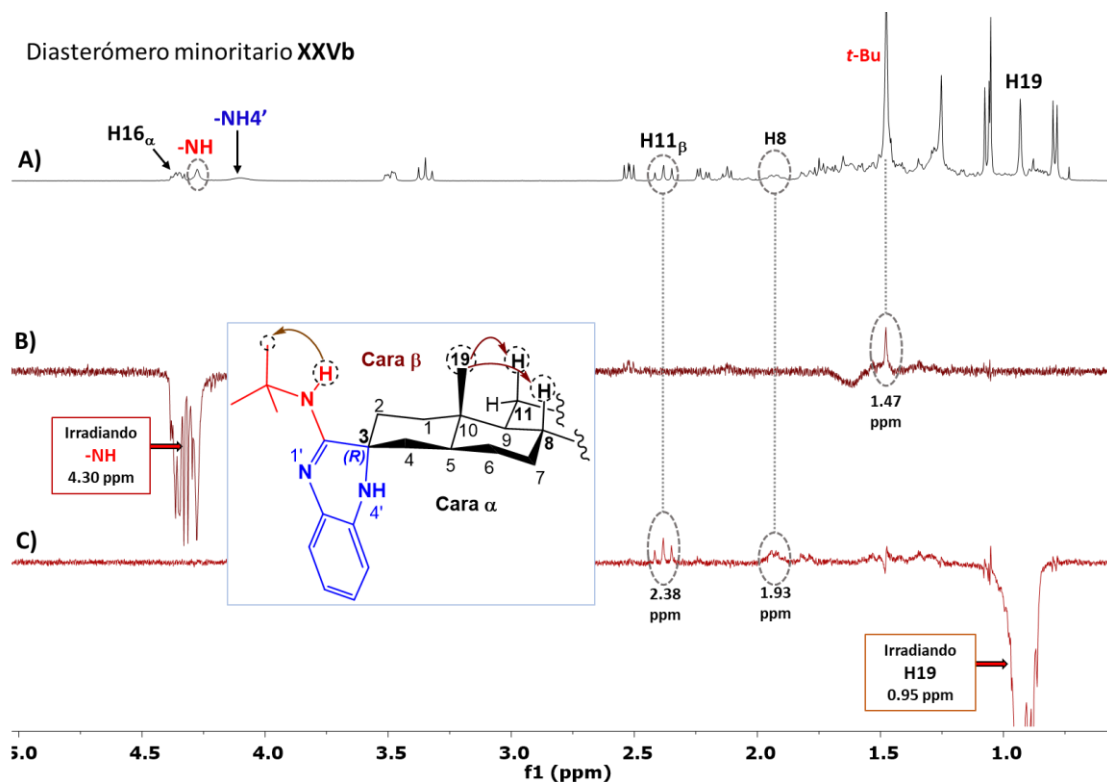
En la Figura I.58, se muestran los espectros de diferencias NOE registrados para el isómero **XXVa**. Como se puede apreciar, cuando se irradia los protones del metilo C19 ( $\delta = 0.95$  ppm), se detecta un débil contacto NOE con H11 $\beta$  (2.43 ppm), H8 (1.89 ppm), H2 $\beta$  (1.76 ppm), H6 $\beta$  (1.44 ppm) y H1 $\beta$  (1.04 ppm), lo que permite confirmar que todos estos protones se encuentran hacia la cara  $\beta$  del esqueleto esteroideal (ver Figura I.58 C). Por el contrario, cuando se irradia -NH ( $\delta = 4.53$  ppm), la detección de NOE con el otro protón H2 $\alpha$  (1.19 ppm), así como con H5 (1.25 ppm), H1 $\alpha$  (2.11 ppm) y los metilos del grupo *ter*-butilo (1.43 ppm) indica que el fragmento exocíclico -NH-*t*Bu está orientado hacia la cara  $\alpha$  (ver Figura I.58 B).

En el caso de **XXVb**, los espectros de diferencias NOE obtenidos por irradiación de los protones -NH y del metilo C19 (ver Figura I.59 B y C, respectivamente), mostraron un perfil espectroscópico diferente, debido a que la disposición espacial del fragmento espirocíclico de quinoxalina es opuesta al que presenta **XXVa**.

Finalmente, con el empleo de las reglas de secuencia se determina que la configuración absoluta correspondiente al carbono estereogénico C3 en el diastereómero **XXVa** es *S*, mientras en **XXVb** es *R*.

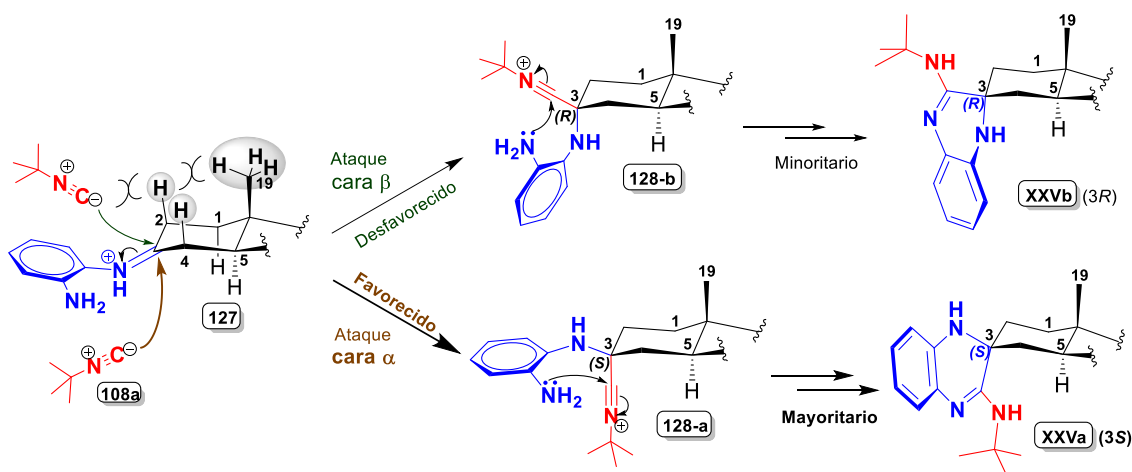


**Figura I.58.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  (A), y de diferencias NOE irradiando en  $\text{NH}-t\text{Bu}$  (B) y en  $\text{H}_{19}$  (C) del híbrido **XXVa**.



**Figura I.59.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  (A), y de diferencias NOE irradiando en  $\text{NH}-t\text{Bu}$  (B) y en  $\text{H}_{19}$  (C) del híbrido **XXVb**.

Una vez determinada la estereoquímica del carbono asimétrico C3 en cada isómero, la diastereoselectividad con la que se obtiene **XXVa** (*de* = 66%) como producto principal, es consecuente con el ataque nucleofílico preferido del *ter*-butilisonitrilo **108a** sobre la cara  $\alpha$  de la imina intermedia **127** (ver Esquema I.42). Como ha sido descrito por otros autores, esta etapa del mecanismo constituye el paso principal para la adición estereoselectiva en las reacciones tipo Ugi.<sup>[160]</sup> En el caso del sustrato esteroidal analizado, la aproximación axial del nucleófilo sobre el carbono imínico se ve favorecida, al ser la posición menos impedida de la molécula (cara  $\alpha$ ); mientras que en el ataque por la cara  $\beta$  (aproximación ecuatorial), los protones H<sub>2 $\beta$</sub> , H<sub>4 $\beta$</sub>  y el metilo C19 ejercen un efecto estérico considerable. De esta forma, se generan los intermediarios *nitrilium* **128-a** y **128-b** con sus respectivas configuraciones *S* y *R* en el C3, que se mantienen hasta el final del proceso de obtención de los correspondientes productos.



**Esquema I.42.** Aproximación espacial diastereoselectiva en el ataque del *ter*-butilisonitrilo **108a** en el mecanismo simplificado de formación de los estereoisómeros **XXVa** y **XXVb**.

Este análisis puede ser extrapolado a las mezclas de los híbridos **XXII** – **XXIV**, teniendo en cuenta las características espectroscópicas de algunas señales protónicas sensibles a la configuración que presente C3. Por ejemplo, el par  $\text{-NH}(t\text{-Bu})/\text{-NH4}'$ , en **XXVa** (3*S*) resuenan a 4.51/3.43 ppm; mientras en el resto de conjugados este par de señales presenta valores de  $\delta$  muy similares (4.63-4.51/3.54-3.40 ppm), correspondientes a los diastereómeros A (mayoritarios) de cada uno. Un comportamiento semejante se

<sup>160</sup> a) Ramos, L.M.; Rodrigues, M.O.; Neto, B.A.D. Mechanistic knowledge and noncovalent interactions as the key features for enantioselective catalysed multicomponent reactions: a critical review. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 7260-7269. b) Rafael O. Rocha, R.O.; Rodrigues, M.O.; Neto, B.A.D. Review on the Ugi Multicomponent Reaction Mechanism and the Use of Fluorescent Derivatives as Functional Chromophores. *ACS Omega* **2020**, *5*, 972-979.

observa entre estas señales en **XXVb** (3*R*) y las asignadas a los diastereómeros B, lo que explicaría las relaciones en las que se obtienen las mezclas de isómeros: 70:30 (**XXII**), 75:25 (**XXIII**) y 85:15 (**XXIV**), ver Tabla I.22.

**Tabla I.22:** Comparación de los valores de  $\delta$  (ppm) de las señales protónicas  $\underline{\text{NH}}\text{-}t\text{Bu}$  y  $\text{NH4}'$  de los híbridos **XXII** – **XIV** y los diastereómeros asilados **XXVa** y **XXVb**.

Compuestos	RMN- <sup>1</sup> H $\delta$ (ppm)				Proporción A/B <sup>§</sup>
	Diastereómero mayoritario (A)		Diastereómero minoritario (B)		
	$\underline{\text{NH}}\text{-}t\text{Bu}$	$\text{NH4}'$	$\underline{\text{NH}}\text{-}t\text{Bu}$	$\text{NH4}'$	
<b>XXII</b>	4.63	3.41	4.31	4.18	70:30
<b>XXIII</b>	4.61	3.40	4.30	4.13	75:25
<b>XXIV</b>	4.51	3.54	4.28	4.10	85:15
<b>XXVa</b>	4.51	3.43	-	-	-
<b>XXVb</b>	-	-	4.28	4.11	-

<sup>§</sup> Relación determinada de la integración de las señales correspondientes a  $\underline{\text{NH}}\text{-}t\text{Bu}$  de las mezclas diastereoméricas.

Es importante destacar que, aunque han sido descritas metodologías similares para la obtención de 3,4-dihidroquinoxalinas a partir de otros compuestos carbonílicos,<sup>[143,157,161]</sup> donde se generan mezclas de estereoisómeros; este trabajo constituye el primer ejemplo de síntesis diastereoselectiva de este tipo de heterociclo, mediante reacción tipo Ugi-3C.

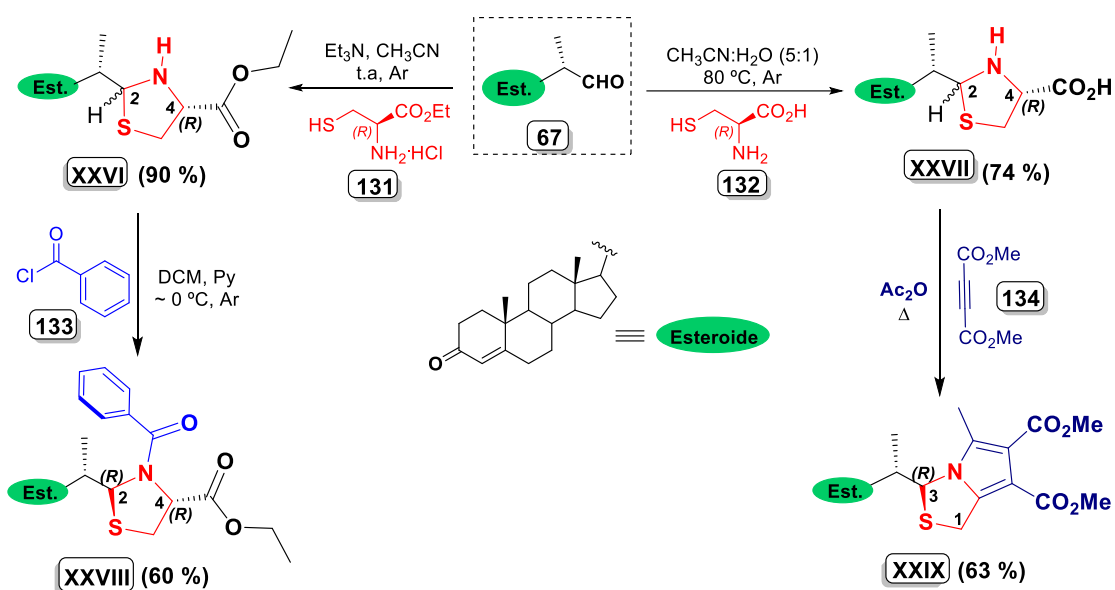
#### 2.2.4. Obtención de derivados tiazolidínicos conjugados a esteroide (Serie 5).

Con el objetivo de aumentar la diversidad estructural del farmacóforo conjugado al esteroide, y teniendo en cuenta el interés terapéutico que han mostrado los heterociclos azufrados, se llevó a cabo una estrategia de síntesis en dos etapas, para la obtención de nuevos híbridos heterociclo-esteroide, utilizando como reactivo la *L*-cisteína (ver Esquema I.43).

La primera etapa involucra la formación del anillo 1,3-tiazolidínico vía condensación de derivados de *L*-cisteína (etil ester **131** y aminoácido libre **132**) con el aldehído esteroidal **67**, aislándose los híbridos correspondientes **XXVI** y **XXVII** como sólidos blancos estables, con rendimientos del 90% y 74%, respectivamente. En este

<sup>161</sup> a) Kolla, S.R.; Lee, Y.R. EDTA-catalyzed synthesis of 3,4-dihydroquinoxalin-2-amine derivatives by a three-component coupling of one-pot condensation reactions in an aqueous medium. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 8938-8944. b) Mohlala, R.L.; Coyanis, E.M.; Fernandes, M.A.; Bode, M.L. Catalyst-free synthesis of novel 1,5-benzodiazepines and 3,4-dihydroquinoxalines using isocyanide-based one-pot, three- and four-component reactions. *RSC Adv.*, **2021**, 11, 24466-24473.

proceso de ciclación tiene lugar la generación de un centro estereogénico en el C2 del anillo heterocíclico. Como los reactivos son enantiómeros puros y no cambian su configuración en el transcurso de la reacción, se debe esperar que se obtenga una mezcla de diastereómeros (para simplificar los denotaremos como [(2*R*, 4*R*) y (2*S*, 4*R*)] con la numeración referida solo al heterociclo). Este hecho se comprueba a partir de los espectros de RMN registrados posteriormente, en los que se observan, por ejemplo, dos señales de diferente intensidad asignadas al protón H2' para cada isómero presente, con relación 90:10 (**XXVI**) y 75:25 (**XXVII**).



**Esquema I.43.** Ruta general para la síntesis de conjugados tiazolidina-esteroide (Serie 5)

Las mezclas de epímeros resultantes son sometidas a posteriores transformaciones, para favorecer la resolución diastereomérica. Está documentado que las reacciones de *N*-acilación de 1,3-tiazolidinas-2-(alquil/aril)-sustituidas, producen *N*-acil-tiazolidinas diastereoméricamente puras.<sup>[162]</sup> Así, cuando **XXVI** se mezcla con cloruro de bencilo **133** en DCM, a baja temperatura (~ 0 °C) y en presencia de piridina; tras dos horas de reacción y posterior purificación por cromatografía en columna flash, se aisló (2*S*)-[(2*R*,4*R*)-3-benzoil-4-etilcarbetoxi-tiazolidin-2-il]-4-pregnen-3-ona (**XXVIII**), como único isómero (*e.d.* ≥ 99%), con un rendimientos del 60%.

<sup>162</sup> a) Pinho e Melo, T.M.V.D.; Lopes, S.M.M.; Rocha Gonsalves, A.M.D.; Kaczor, A.; Fausto, R.; Paixão, J.A.; Beja, A.M.; Silva, M.R. Hexahydro-Pyrrolo[1',2',5':3,4,5]Thiazolo[3,4-c]Oxazol-1-ones: New Chiral Tricyclic *L*-Cysteine and *D*-Penicillamine Derivatives. *Lett. Org. Chem.* **2006**, 3, 820-826. b) Hansen, A.H.; Sergeev, E.; Bolognini, D.; Sprenger, R.R.; Ekberg, J.H.; Ejsing, C.S.; McKenzie, C.J.; Ulven, E.R.; Milligan, G.; Ulven, T. Discovery of a potent thiazolidine free fatty acid receptor 2 agonist with favorable pharmacokinetic properties. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 9534–9550.

En el caso de la tiazolidina esteroideal **XXVII** se hizo reaccionar con acetilendicarboxilato de dimetilo o DMAD **134** a reflujo de anhídrido acético (~ 110 °C), de forma análoga a una metodología de cicloadición 1,3-dipolar descrita por Pinho e Melo y col.<sup>[163]</sup> De esta forma, se obtiene el diasteroisómero puro (2*S*)-[(3*R*)-5-metil-6,7-dimetilcarbetoxi-1*H*,3*H*-pirrolo[1,2-*c*]tiazol-3-il]-4-pregnen-3-ona (**XXIX**) como un sólido blanco cristalino en un 63% de rendimiento.

A continuación, se discuten los aspectos más relevantes de la caracterización estructural de los compuestos sintetizados. Para realizar un análisis más simplificado, se comparan los datos espectroscópicos de RMN de las tiazolidinas precursoras **XXVI** y **XXVII** con los obtenidos para **XXVIII** y **XXIX**, productos derivados de las correspondientes síntesis asimétricas.

Primeramente, como evidencia de transformación química, en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H registrado para **XXVI** en CDCl<sub>3</sub> (ver Figura I.60 A), se puede apreciar claramente la desaparición de la señal del grupo carbaldehído (9.58 ppm) del precursor esteroideal **67**. Además, la formación del fragmento de tiazolidina se corrobora por la presencia de un grupo de señales entre 5.00 y 2.50 ppm. Por ejemplo, los dobletes de 4.68 ppm ( $J = 2.6$  Hz) y 4.90 ppm ( $J = 2.2$  Hz) con relación de intensidades 90:10 respectivamente, son asignados a H2', lo que confirma la formación de la mezcla de diasterómeros; mientras que el protón H4' se observa como doblete de doblete ( $J = 9.5, 6.9$  Hz) en 3.78 ppm, y que correlaciona con las señales en 3.23 ppm (dd,  $J = 10.2, 6.9$  Hz) y 2.69 ppm (t,  $J = 9.9$  Hz) correspondientes a los protones diasterotópicos del metileno 5'.

En el caso de la *N*-benzoil-tiazolidina **XXVIII**, en el espectro protónico registrado en DMSO-*d*<sub>6</sub> (Figura I.60 B), se observa un único doblete ( $J = 2.9$  Hz) en 5.30 ppm asignado a H2', lo que indica la diastereoselectividad del proceso de formación del híbrido analizado. También, ocurre un desapantallamiento en la señal de H4' ( $\delta = 4.82$  ppm) respecto al valor reportado en la tiazolidina precursora, mientras que los protones de H5' resuenan más cercanos entre sí, con  $\delta = 3.31$  y 3.15 ppm. En la región de hidrógenos unidos a carbonos sp<sup>2</sup> se observa un multiplete que integra cinco protones entre 7.49 y 7.42 ppm, correspondientes al fragmento fenilo de la amida generada.

---

<sup>163</sup> Pinho e Melo, T.M.V.D.; Gomes, C.S.B.; Rocha Gonsalves, A.M.d.A.; Paixão, J.A.; Beja, A.M.; Ramos Silva, M.; Alte da Veiga, L. Cycloaddition reactions of 3-aryl-5-phenyl-5*H*,7*H*-thiazolo[3,4-*c*]oxazol-4-ium-1-olates. *Tetrahedron* **2002**, 58, 5093–5102.

Por otra parte, los protones del grupo etoxilo presente en las estructuras de ambos compuestos, resuenan con multiplicidad de cuartete y triplete entre 4.13-4.23 ppm y 1.20-1.29 ppm, respectivamente. Otras señales a destacar pertenecientes al esqueleto esteroideal son el singlete de H4 en 5.71 ppm para **XXVI** y 5.60 ppm para **XXVIII**, así como los metilos H18 ( $\delta = 0.52-0.73$  ppm), H19 ( $\delta = 1.14-1.17$  ppm) y H21 ( $\delta \sim 1.04$  ppm).

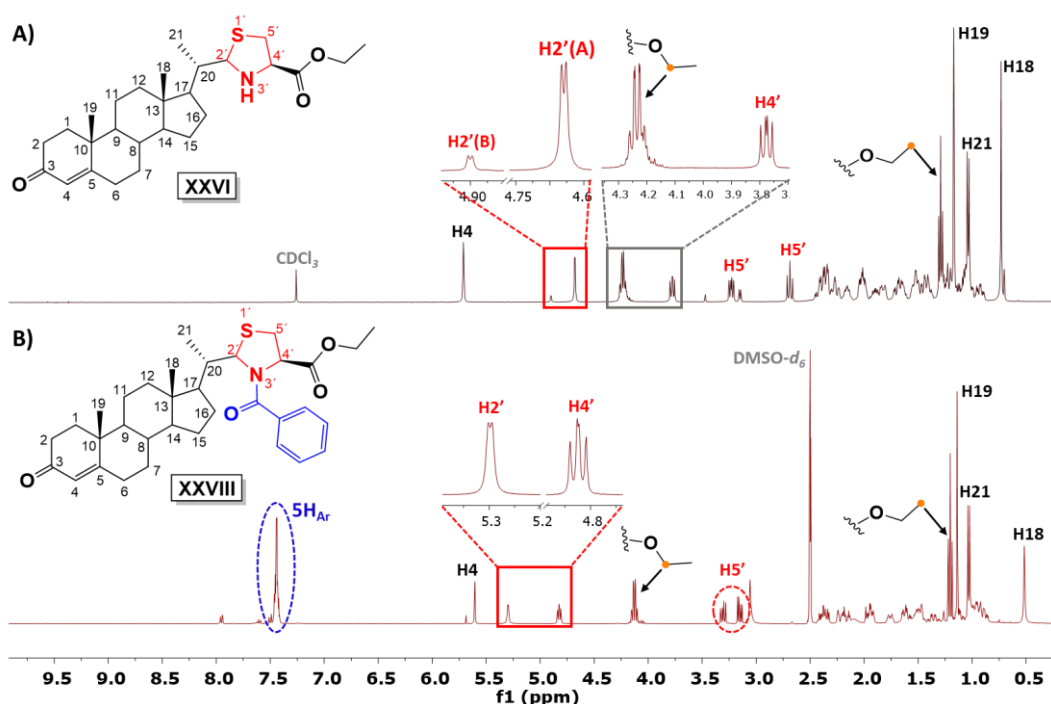


Figura I.60. Espectros RMN-<sup>1</sup>H de **XXVI** (A) y **XXVIII** (B).

De igual forma, los espectros de RMN-<sup>13</sup>C (Figura I.61) ratifican el análisis realizado anteriormente, indicando la formación de las estructuras híbridas correspondientes. Por ejemplo, para el compuesto **XXVI**, los carbonos del anillo heterocíclico se observan en 37.3 ppm (C5'), 65.0 ppm (C4'), y con diferente intensidad los C2' (75.4 y 72.9 ppm), lo que corrobora la mezcla de diastereómeros presente. El grupo etoxicarbonilo se identifica a partir de las señales en 171.5 ppm (C=O), 61.7 ppm (CH<sub>2</sub>) y 14.3 (CH<sub>3</sub>). En el conjugado **XXVIII** los valores de desplazamiento químico observados para los carbonos del fragmento tiazolidídico son semejantes a los descritos previamente, excepto para C2' que resuena a 69.6 ppm como única señal.

En ambos espectros, en la región de carbonos con hibridación sp<sup>2</sup>, se detectan las señales del sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado del fragmento esteroideal enlazado [C3 ( $\delta = 199.7 - 197.2$  ppm), C5 ( $\delta \sim 171$  ppm) y C4 ( $\delta = 124.0 - 122.7$  ppm)]; mientras para el

compuesto **XXVIII**, cinco señales correspondientes a los siete carbonos del sustituyente benzoílo resuenan a 169.7 (C=O) y entre 137.0 – 125.0 ppm (C<sub>Ar</sub>).

A campo alto aparecen las señales asignadas a los grupos metilo C18, C19 y C21 entre 11.0 y 18.0 ppm, que de manera semejante al resto de señales provenientes del esqueleto esteroidal no presentan diferencias significativas en sus desplazamientos químicos entre compuestos.

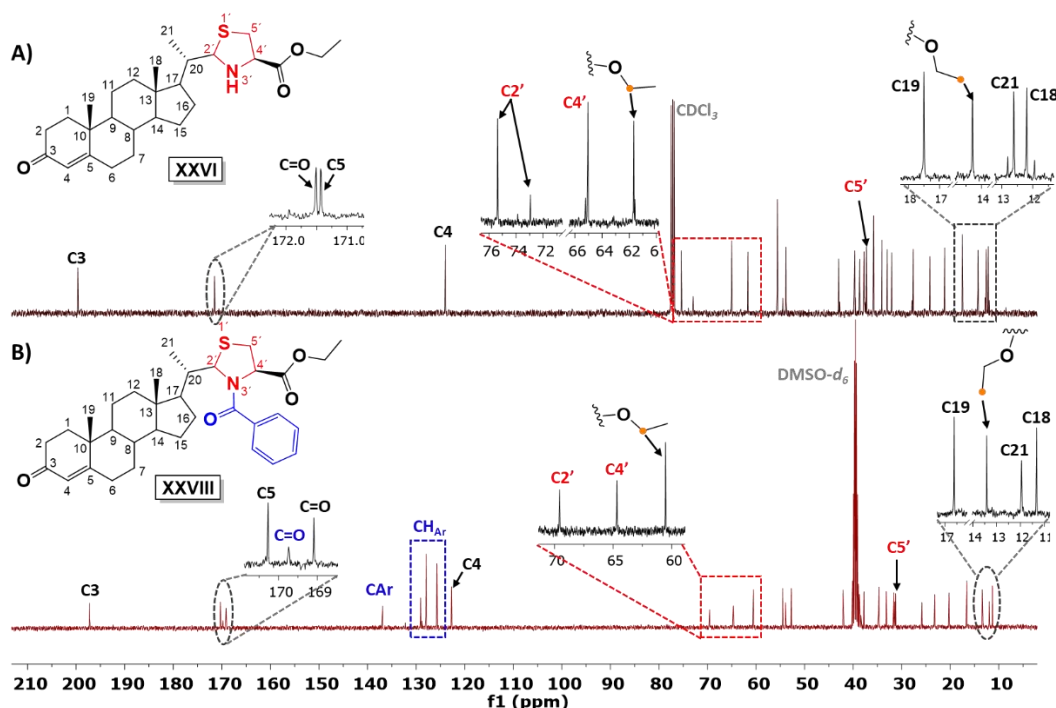


Figura I.61. Espectros RMN-<sup>13</sup>C de **XXVI** (A) y **XXVIII** (B).

También los conjugados **XXVII** y **XXIX** se caracterizaron a partir de los datos espectroscópicos de RMN. En las Figuras I.62 y I.63 se representan, a modo comparativo, los espectros de <sup>1</sup>H y de <sup>13</sup>C respectivamente, los que se discuten a continuación.

Conjuntamente con la desaparición del protón del grupo carbaldehído del esteroide precursor, en el espectro RMN-<sup>1</sup>H de **XXVII** (Figura I.62 A) se observan las señales que caracterizan al anillo heterocíclico generado. En 4.71 ppm y 4.92 ppm se muestran dos dobletes ( $J \sim 2.8$  Hz) asignadas a los protones H2' de la mezcla de diastereoisómeros que se forman (A y B), con una relación de intensidades 75:25, respectivamente. También se detectan dos señales asignadas a H4': un doblete de doblete ( $J = 7.1, 4.2$  Hz) en 4.30 ppm (isómero B) y un triplete ( $J = 7.1$  Hz) en 3.96 ppm; mientras que a menores valores de  $\delta$  encontramos los protones metilénicos H5' en forma de dobletes de dobletes ( $J = 10.9, 7.0$  Hz), entre 3.00 - 3.30 ppm.

Para el compuesto **XXIX**, el espectro protónico registrado en  $\text{CDCl}_3$  (Figura I.62 B), muestra las cinco señales características del nuevo sistema biciclo fusionado. El doblete ( $J = 2.6 \text{ Hz}$ ) en 5.44 ppm y el singlete en 4.12 ppm corresponden a  $\text{H}3'$  y  $\text{H}1'$ , respectivamente; y los tres singletes intensos que integran tres protones cada uno son asignados a los dos grupos  $-\text{OCH}_3$  ( $\delta = 3.77/3.83 \text{ ppm}$ ) y al metilo unido a  $\text{C}5'$  ( $\delta = 2.37 \text{ ppm}$ ) del fragmento de pirrol generado.

Otras señales a destacar son las atribuidas al esqueleto esteroideal de cada compuesto, como el singlete  $\text{H}4$  en  $\sim 5.72 \text{ ppm}$  y los metilos  $\text{C}18$ ,  $\text{C}19$  y  $\text{C}21$ , que resuenan entre 0.65 – 1.25 ppm.

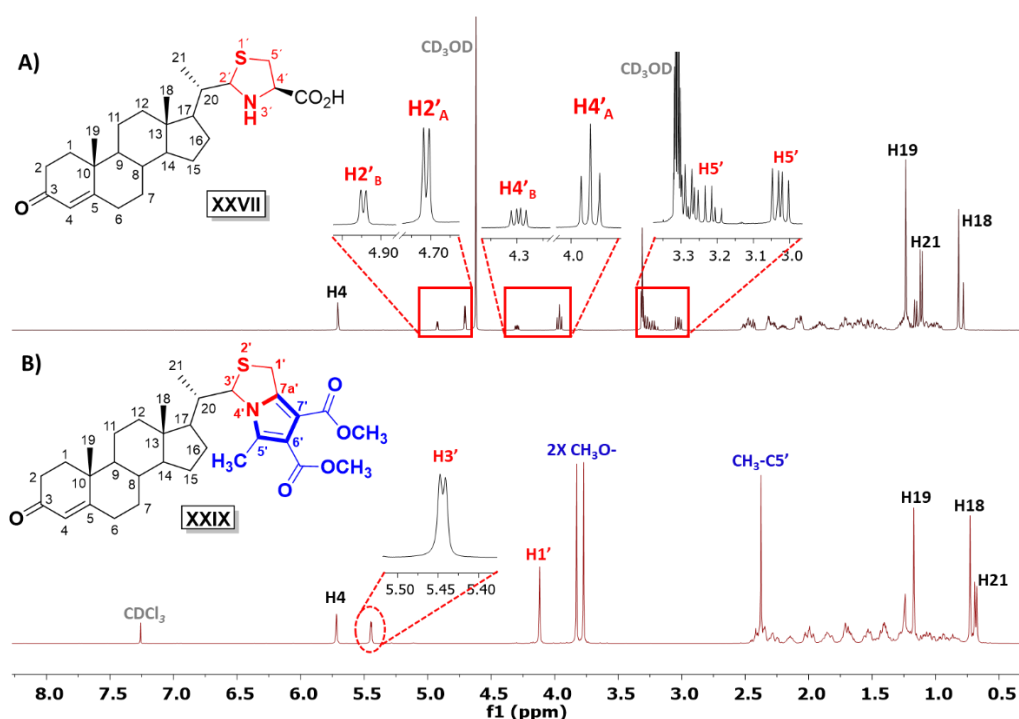


Figura I.62. Espectros RMN- $^1\text{H}$  de **XXVII** (A) y **XXIX** (B).

Por otro lado, los datos espectroscópicos de  $^{13}\text{C}$ , extraídos de los espectros representados en la Figura I.63, evidencian un comportamiento similar al analizado en los espectros de  $^1\text{H}$ . Por ejemplo, para la tiazolidina **XXVII**, la señal del grupo carboxilo resuena a 173.3 ppm; mientras los carbonos del heterociclo se encuentran a menores valores de  $\delta$ :  $\text{C}5'$  (36.5 ppm),  $\text{C}4'$  [65.5 ppm(A)/66.1 ppm(B)] y  $\text{C}2'$  [74.9 ppm(A)/72.3 ppm(B)], los que fueron asignados inequívocamente mediante el espectro HSQC. También, como señales características del fragmento esteroideal conjugado se observan  $\text{C}3$ ,  $\text{C}5$  y  $\text{C}4$ , en  $\sim 202$ , 175 y 124 ppm, respectivamente; no así los metilos  $\text{C}18$ ,  $\text{C}19$  y  $\text{C}21$ , que se encuentran entre 12 y 18 ppm.

En el espectro registrado para el híbrido **XXIX** (Figura I.63 B) hay un incremento en el número de señales en la región de carbonos  $sp^2$ , correspondientes al anillo de pirrol generado en la nueva estructura. Entre 142.0 – 106.0 ppm se observan los carbonos cuaternarios de dicho heterociclo, mientras que los carbonos C1' y C3' del fragmento de tiazol fusionado aparecen en 30.3 ppm y 68.1 ppm, respectivamente. Por otra parte, la presencia de los grupos -carboximetil- se detectó a través de las dos señales en  $\sim 165.0$  ppm (C=O) y en  $\sim 51.4$  ppm (CH<sub>3</sub>O-). El resto de señales procedentes del esqueleto esteroidal presentan valores de  $\delta$  muy similares a los reportados anteriormente para **XXVII**.

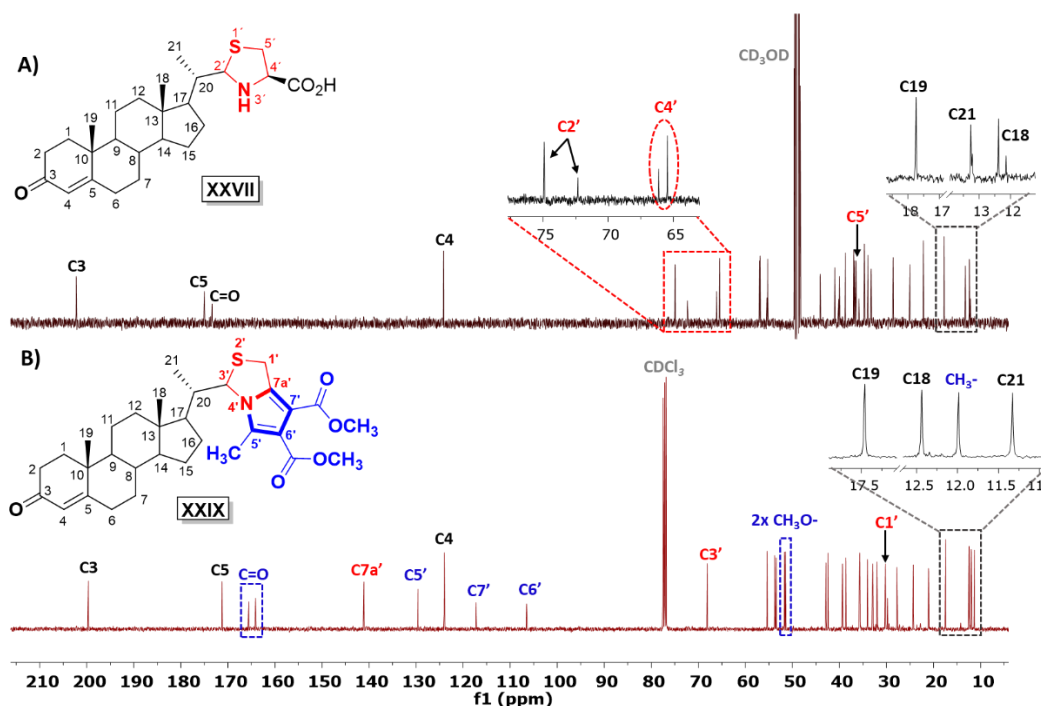


Figura I.63. Espectros RMN-<sup>13</sup>C de **XXVII** (A) y **XXIX** (B).

Los cuatro nuevos híbridos fueron caracterizados también mediante espectrometría de masas, lo que permitió corroborar las estructuras propuestas por RMN. La masa molecular exacta se determinó mediante la técnica de ionización suave HRMS-ESI, detectándose en cada compuesto el ion quasimolecular  $[M+H]^+$ , que coincidió con las correspondientes masas teóricas calculadas (ver Tabla I.23).

Para las tiazolidinas esteroidales que se obtienen como mezcla de diastereoisómeros, solo en el caso de **XXVII** se pudieron separar e identificar los isómeros correspondientes. Mediante los valores de abundancia, determinados por las áreas bajo la curva de los picos detectados en los cromatogramas registrados (ver Anexo 7), se pudo calcular que los

diastereoisómeros se encuentran en una relación 76/24; coincidiendo con el resultado extraído de la integración de las señales de H2' (75:25) por RMN.

**Tabla I.23.** Valores de m/z correspondientes a los picos analizados por HPLC-HRMS de las tiazolidinas-esteroidales **XXVI** - **XXIX**.

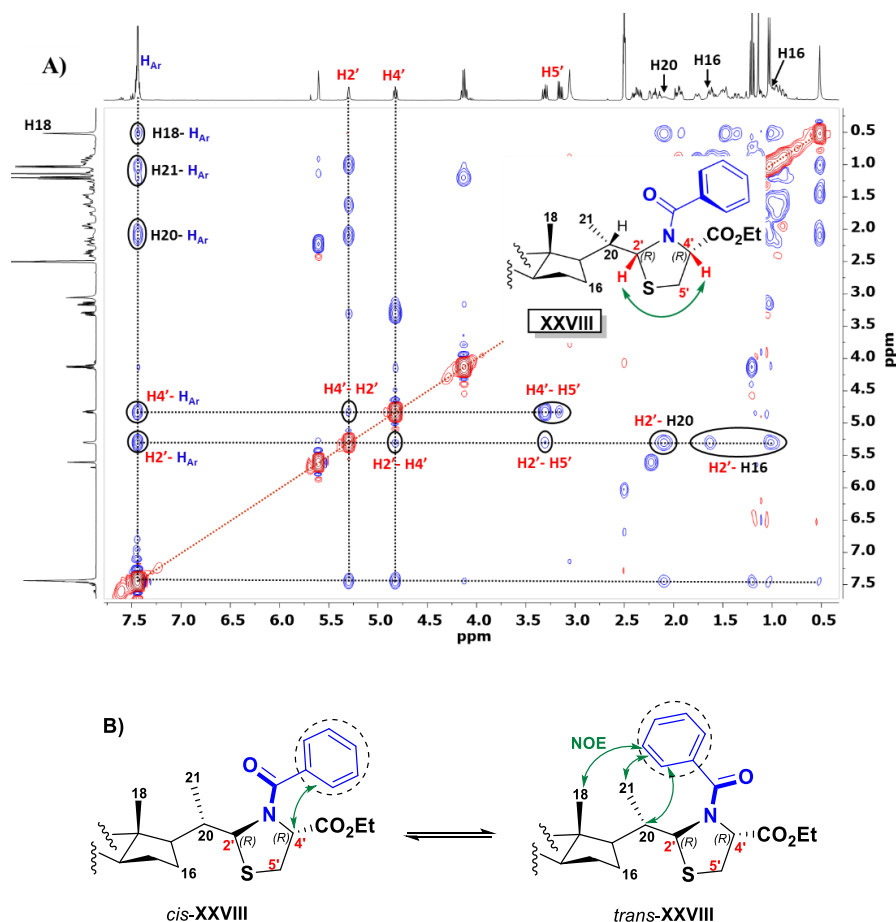
Compuesto	t <sub>R</sub> /min	Abundancia	Fórmula Molecular	m/z [M+H] <sup>+</sup> (uma)	
				Experimental	Calculada
<b>XXVI</b>	6.79	-	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>3</sub> S	460.2876	460.2880
<b>XXVII</b>	4.78	88525	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>3</sub> S	432.2567	432.2567
	4.91	28138		432.2565	
<b>XXVIII</b>	7.21	-	C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>4</sub> S	564.3143	564.3142
<b>XXIX</b>	7.18	-	C <sub>32</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>5</sub> S	554.2939	554.2935

Con el objetivo de determinar la disposición espacial de los protones unidos a los carbonos estereogénicos C2' (**XXVIII**) y C3' (**XXIX**), se realiza un experimento NOESY-2D a ambos compuestos.

Como se puede apreciar en la Figura I.64 A, para la *N*-benzoil tiazolidina esteroidal **XXVIII**, el protón H2' asignado a δ 5.30 ppm presenta un débil contacto NOE con H4' (δ = 4.82 ppm). Este resultado indica que estos protones se encuentran en una disposición *cis*. Si tenemos en cuenta que la configuración de C4'es *R* y esta se mantiene durante el transcurso de la formación del anillo de tiazolidina, se puede establecer que la configuración absoluta de C2' es *R*. También se detectó acoplamiento dipolar de H2' con uno de los protones del metileno 5' (3.31 ppm) y con ambos protones de H16 (1.62/~0.99 ppm), lo que implica cercanía (< 5 Å); además del acoplamiento escalar con H20 (2.09 ppm).

Adicionalmente, se observó contacto NOE de los protones aromáticos (δ = 7.49 – 7.42 ppm) con H2' y H4', así como con H20, H21 (1.03 ppm) y el metilo angular H18 (0.52 ppm). Esto sugiere que en disolución existe un equilibrio de conformeros (*cis*, *trans*) respecto al enlace amida (ver Figura I.64 B), lo que ha sido descrito por otros autores<sup>[164]</sup> para derivados de *N*-acil tiazolidinas.

<sup>164</sup> Ershov, A.Y.; Nasledov, D.G.; Lagoda, I.V.; Shamanin, V.V. Synthesis of 2-Substituted (2R,4R)-3-(3-Mercapto-Propionyl)Thiazolidine-4-Carboxylic Acids. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2014**, 50, 1032–1038.



**Figura I.64.** A) Espectro NOESY y B) equilibrio conformacional *cis-trans* detectado para el híbrido **XXVIII**.

En el caso del pirrolo[1,2-*c*]tiazol-esteroide **XXIX**, se observa la existencia de efecto NOE del protón H3' ( $\delta = 5.44$  ppm) con  $\delta 1.86/1.40$  (2 x H16),  $\delta 2.14$  H20 y  $\delta 2.37$  ( $\text{CH}_3\text{-C5}'$ ); mientras que el H1' asignado a  $\delta 4.12$  lo hace con el metilo H21 ( $\delta = 0.68$  ppm), ver Figura I.65. Teniendo en cuenta que la configuración de todos los carbonos estereogénicos del esqueleto esteroidal no cambia en el transcurso de la reacción de formación del bis-heterociclo, y que H3' presenta una vecindad espacial similar a la de su análogo H2' en **XXVIII**, la configuración del carbono C3' en **XXIX** es *R* también.

Para comprobar estos resultados, se llevó a cabo una caracterización por DRX de monocristal. En la Figura I.66 se representan las estructuras moleculares de las unidades asimétricas de cada compuesto, donde se confirma que la configuración absoluta de los centros estereogénicos del heterociclo en **XXVIII** es ( $2'R, 4'R$ ), y para **XXIX** ( $3'R$ ). También se lograron obtener cristales adecuados de la tiazolidina precursora **XXVI**, determinándose la estructura molecular del diastereoisómero mayoritario, con la configuración ( $2'R, 4'R$ ).

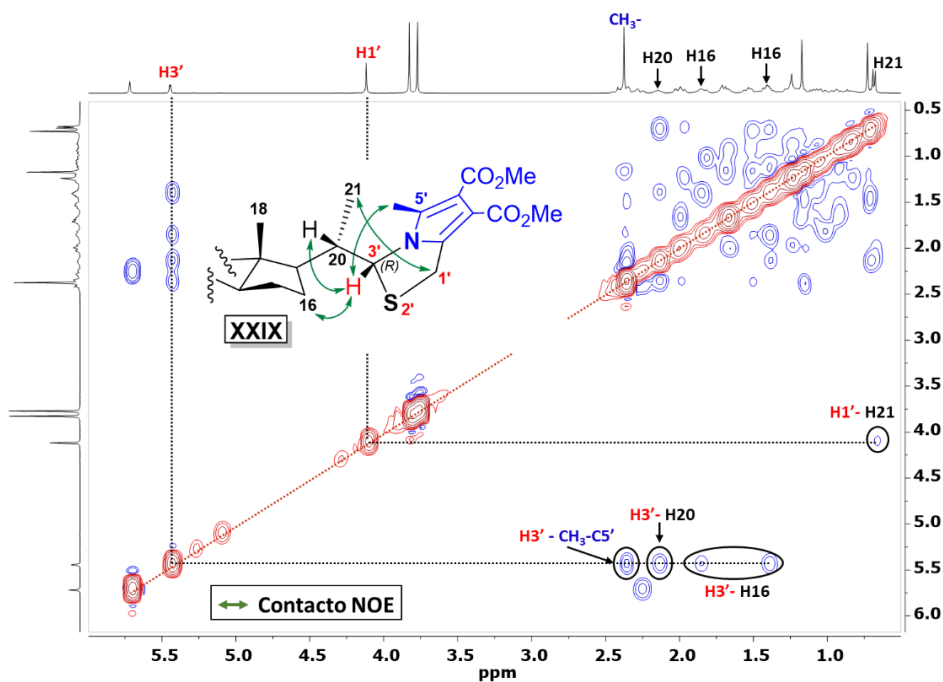


Figura I.65. Espectro NOESY del híbrido XXIX.

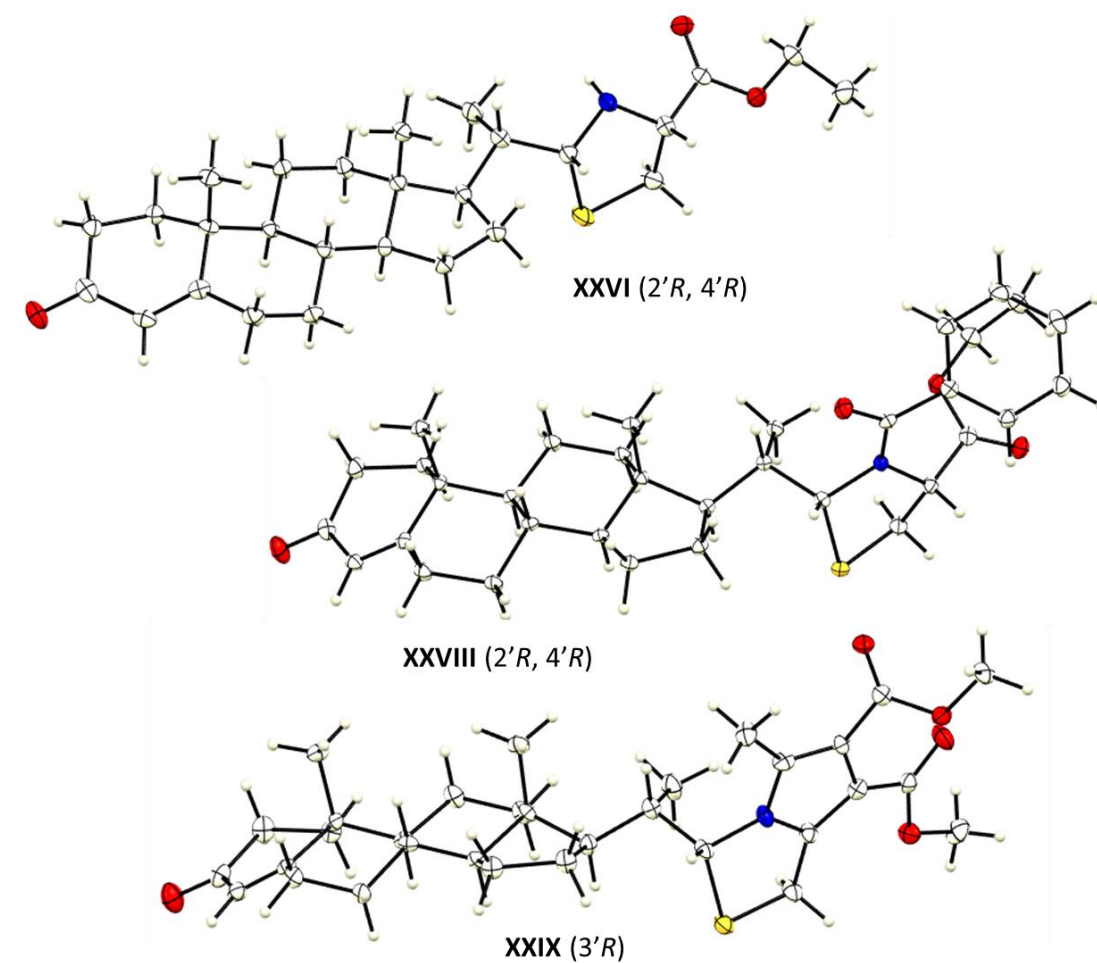
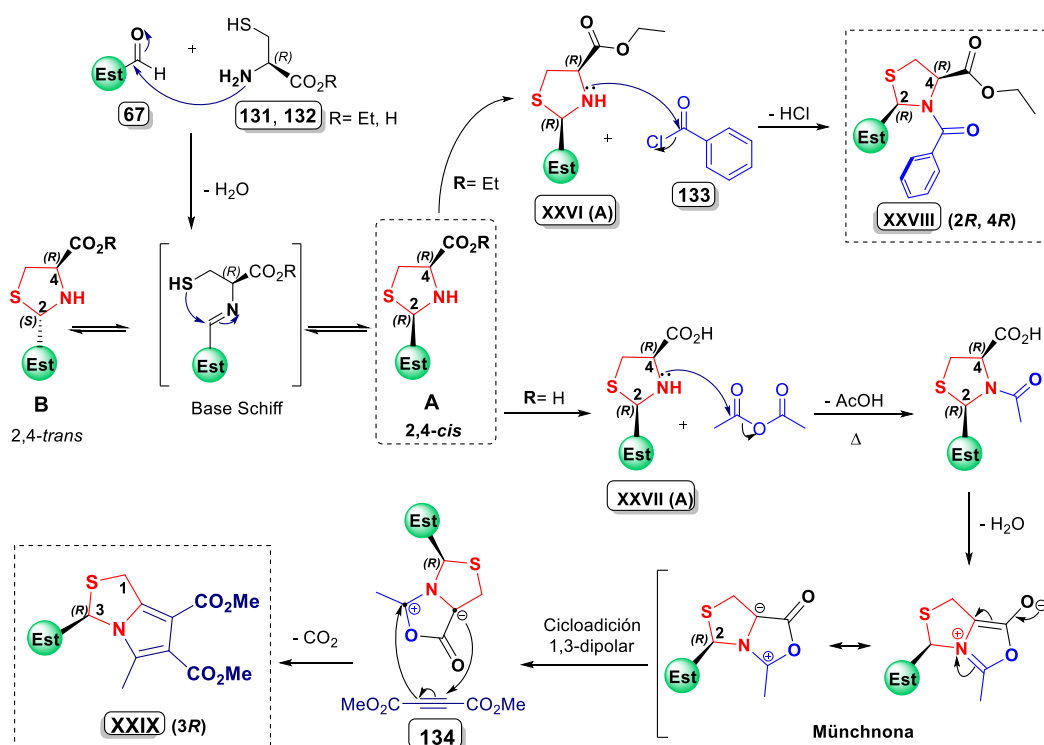


Figura I.66. Diagrama ORTEP de los conjugados XXVI, XXVIII y XXIX obtenidos por DRX. En rojo se observan los átomos de oxígeno, en azul los átomos de nitrógeno y en amarillo los de azufre.

Finalmente, en el Esquema I.44 se describen las propuestas de mecanismos para la obtención de híbridos tiazolidina-esteroide (Serie 5), en acuerdo con los resultados observados. La primera etapa involucra la formación de **XXVI** y **XXVII**, por reacción del aldehído esteroideal **67** con los derivados de la *L*-cisteína (**131** y **132**). Las correspondientes bases de Schiff generadas como intermediarios, experimentan un ataque nucleofílico intramolecular del grupo tiol sobre el carbono imínico proquiral, para dar lugar a las respectivas 1,3-tiazolidinas como mezclas de epímeros *2,4-cis* (A) y *2,4-trans* (B) en diferente proporción. Este proceso es mediado por un mecanismo en equilibrio de cierre y apertura de anillo, con la consecuente inversión de la configuración del C2.

En una segunda etapa, teniendo en cuenta que la configuración absoluta de C2' es *R* para diasterómero **XXVIII**, su formación se produce por la reacción selectiva del epímero **XXVI** (A) con cloruro de benzoílo **133**, mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica acídica. En el caso de la tiazolidina **XXVII**, de manera similar, su epímero *2,4-cis* (A) reacciona selectivamente con anhídrido acético para formar el derivado *N*-acetilo, que tras una deshidratación da lugar al 1,3-dipolo (Münchnona). Como paso final, ocurre la cicloadición de este intermediario al DMAD **134**, y generar el pirrolo[1,2-*c*]tiazol-esteroide **XXIX** por eliminación de CO<sub>2</sub>, como proponen otros autores para compuestos similares.<sup>[163]</sup>



**Esquema I.44.** Mecanismos de reacción propuestos para la obtención de los cuatro híbridos tiazolidina-esteroide (Serie 5).



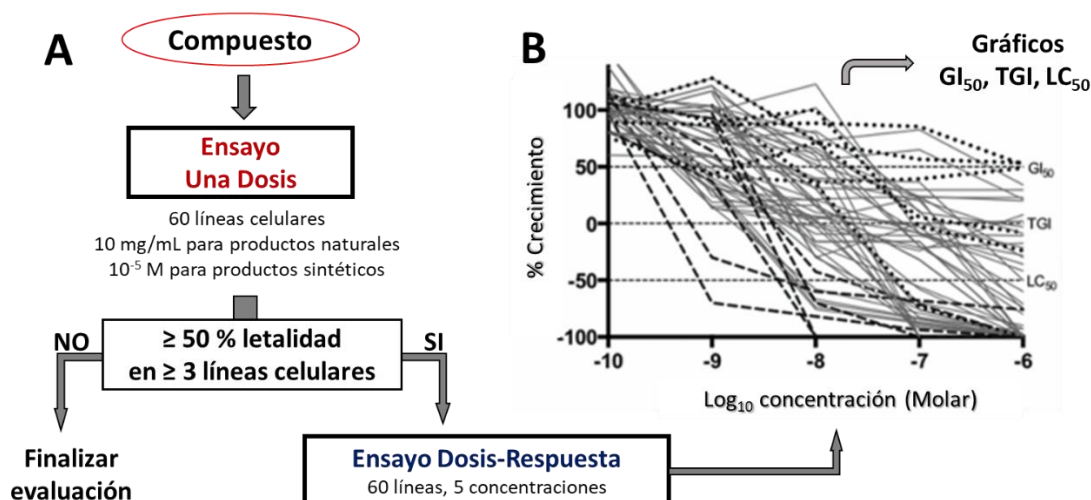
**I.3-CAPÍTULO 3:**  
**Estudios de actividad biológica de conjugados  
heterociclo-esteroide**



### 3.1. Generalidades.

Como fue expuesto en los Antecedentes del Capítulo 1, la conjugación de esteroides a diferentes heterociclos ha dado lugar a compuestos con variadas propiedades biológicas, entre las que resalta la actividad anticancerígena. Con el objetivo de evaluar la potencialidad de los nuevos híbridos heterociclo-esteroide como moléculas bioactivas antiproliferativas, fueron sometidos a ensayos de citotoxicidad *in vitro* en el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos de América, dentro del Programa de Desarrollo de Terapéuticos (DPT).

El protocolo de evaluación, mostrado simplificado en el Esquema I.45, consiste en un cribado sobre 60 líneas de células tumorales humanas (en inglés *NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen*),<sup>[165]</sup> y está diseñado para examinar compuestos tanto de origen natural como sintético.



**Esquema I.45.** Protocolo de evaluación en el programa NCI-60 para ensayos de actividad anticancerígena.

El proceso consta de tres fases. En la primera ocurre una preselección en función de que cumplan una serie de requerimientos estructurales. Los compuestos seleccionados son enviados y evaluados a una dosis (10  $\mu$ M) frente al panel completo de células neoplásicas (Esquema I.45 A). Aquellos que produzcan una inhibición significativa del crecimiento celular, considerando los criterios establecidos por el NCI (letalidad superior al 50% en al menos tres líneas celulares diferentes), pasarán a una tercera fase donde se

<sup>165</sup> (a) National Cancer Institute, Protocolo y parámetros empleados para la evaluación de la actividad anti-cancerígena [en línea]: <[https://ntp.cancer.gov/discovery\\_development/nci-60/methodology.htm](https://ntp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm)>, [fecha de acceso: 21 de abril 2020]. (b) National Cancer Institute, Criterios de selección [en línea]: <[https://ntp.cancer.gov/discovery\\_development/nci60/docs/ScreeningSubFlowChart.pdf](https://ntp.cancer.gov/discovery_development/nci60/docs/ScreeningSubFlowChart.pdf)>, [fecha de acceso: 21 de abril 2020].

evaluarán de forma similar, pero a cinco concentraciones diferentes (0.1 nM – 1 μM). Finalmente, con el empleo de los gráficos de dosis-respuesta generados (Esquema I.45 B), se calculan los parámetros de toxicidad: GI<sub>50</sub> (concentración requerida para inhibir el crecimiento celular al 50 %), TGI (concentración requerida para inhibir totalmente el crecimiento) y LC<sub>50</sub> (concentración requerida para disminuir la población celular al 50 %).

### 3.2. Evaluación de actividad antiproliferativa a una dosis.

De todos los híbridos heterociclo-esteroides sintetizados, se seleccionaron veintidós (ver Figura I.67) y se enviaron al NCI para evaluación de la citotoxicidad en líneas celulares de leucemia, melanoma, cánceres de pulmón, colon, ovario, mama, próstata y del sistema nervioso central (CNS). El procedimiento y los parámetros empleados se describen detalladamente en la Parte Experimental.

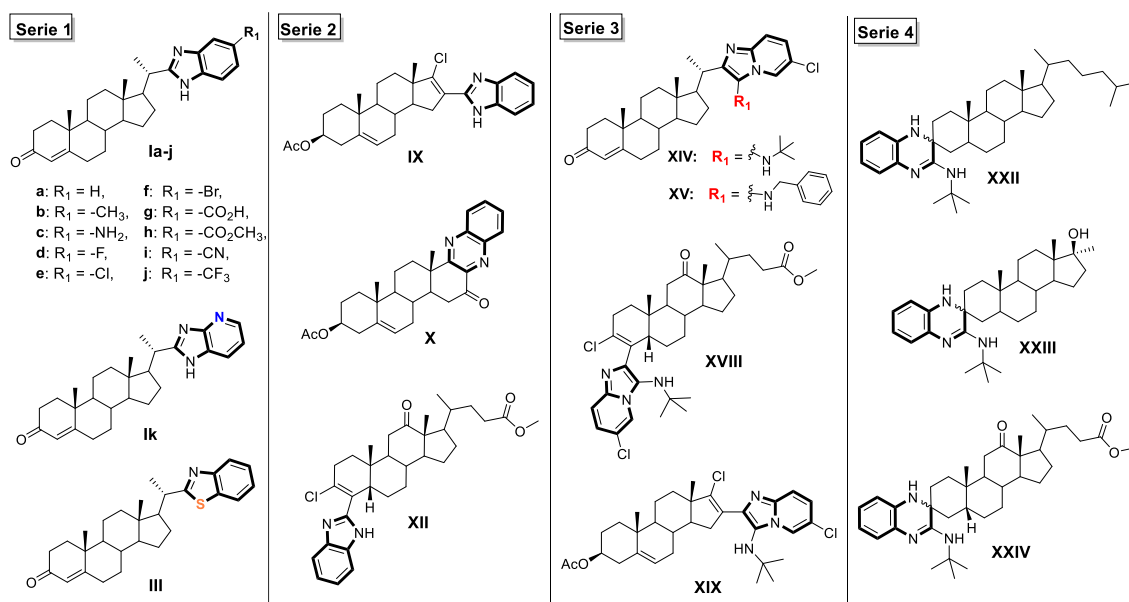


Figura I.67. Conjugados heterociclo-esteroides evaluados por el NCI.

Los datos obtenidos en el ensayo a una dosis se reportan en un gráfico (ver Anexo 8), el cual indica el porcentaje de crecimiento (PC) de cada una de las líneas celulares expuestas a una concentración de 10 μM del compuesto en estudio. El valor que se reporta en este ensayo es relativo al control sin fármaco y al tiempo cero del cultivo celular. Esto permite determinar el PC (valores entre 0 y 100), o la letalidad (valores < 0). El porcentaje de inhibición del crecimiento (%GI) se calcula restando de 100 el porcentaje de crecimiento encontrado. Por ejemplo, un valor de PC=100 significa que no hay inhibición del crecimiento, un valor de 60 significa un porcentaje de inhibición del crecimiento del

40%, un valor de 0 significa que no hay un crecimiento neto en el curso del experimento, y un valor de -100 significa que todas las células están muertas.

En la Tabla I.24 se muestran los valores promedio de %GI para cada compuesto evaluado por el programa de cribado NCI-60, que representan una medida de la actividad general frente a todas las líneas de células cancerosas. Estos resultados indican una baja actividad antiproliferativa de todos los compuestos, al presentar valores inferiores al 70% de inhibición del crecimiento celular. Sin embargo, aunque esto constituye un criterio fundamental del NCI para discriminar a los compuestos no activos de los potencialmente activos, se encontraron otros resultados interesantes si se analiza el valor de %GI de cada línea celular individualmente, que se discuten a continuación.

Cómo se puede apreciar en la Tabla I.24, los compuestos **Ic** (R = -NH<sub>2</sub>), **Ii** (R = -CN) y **XXIV** mostraron efecto citotóxico (valores negativos de letalidad) sobre las líneas celulares K-562 en Leucemia y HOP-92 en cáncer de pulmón, respectivamente. Además, dentro del grupo de (benzazol-2'-il)-4-pregnen-3-ona (Serie 1, Figura I.67), el híbrido **Ii** resultó el más activo, con valores de %GI  $\geq 70$  frente a otras cuatro líneas celulares: RPMI-8226 (leucemia), PC-3 (cáncer de próstata), T-47D y MDA-MB-468 (ambas en cáncer de mama); mientras el benzimidazol **Ig** (R = -CO<sub>2</sub>H), presentó una pérdida total de la actividad inhibitoria (valor promedio del %GI cercano a cero). En la Serie 2 destaca el benzimidazol **XII** (derivado del colanoato de metilo), capaz de inhibir en más de un 70 % el crecimiento de cinco líneas celulares diferentes, siendo más potente en general que sus análogos heterocíclicos **IX** (derivado del androstano) y **Ia** (derivado del pregnano, Serie 1). De los conjugados obtenidos a través de procesos multicomponentes de síntesis, la imidazopiridina **XV** y la espiroquinoxalina **XXIII** resultaron los más activos de sus respectivas Series.

Sin embargo, aunque ningún compuesto pasó a la segunda fase del ensayo, al no cumplir los requerimientos establecidos por el NCI, estos resultados permiten correlacionar de forma muy preliminar algunos datos de estructura con la actividad antiproliferativa mostrada. En general, los híbridos más activos de cada serie ejercieron una mayor inhibición sobre el crecimiento de la mayoría de las líneas celulares de leucemia, comportándose con relativa selectividad para este tipo de tejido tumoral.

**Tabla I.24.** Resultados más relevantes del cribado de los híbridos heterociclo-esteroides evaluados sobre 60 líneas celulares tumorales.

Compuesto		% GI promedio	Línea celular más sensible/ Tipo de tejido tumoral	% GI o letalidad
Serie 1	Ia	11,7	HT29 /Colon	48,1
	Ib	18,7	HT29 /Colon	55,4
	Ic	21,1	K-562 /Leucemia	<b>-50,2</b>
	Id	22,0	HL-60(TB) /Leucemia	58,1
	Ie	15,7	HL-60(TB) /Leucemia	46,1
	If	14,9	HL-60(TB) /Leucemia	39,1
	Ig	0	HOP-92 /Pulmón	49,1
	Ih	20,0	T-47D /Mama	47,0
	Ii	38,2	HOP-92 /Pulmón	<b>-9,3</b>
			RPMI-8226 /Leucemia	<b>79,7</b>
			PC-3 /Próstata	<b>71,5</b>
			T-47D /Mama	<b>70,6</b>
	Ij	23,9	MDA-MB-468 /Mama	<b>84,5</b>
Ij	23,9	HOP-92 /Pulmón	<b>77,6</b>	
Ik	9,0	HOP-92 /Pulmón	37,2	
III	9,3	OVCAR-4 /Ovario	32,0	
Serie 2	IX	16,0	HL-60(TB) /Leucemia	55,8
	X	16,6	HL-60(TB) /Leucemia	64,8
	XII	36,4	K-562 /Leucemia	<b>86,5</b>
			HL-60(TB) /Leucemia	<b>73,8</b>
			HCT-116 /Colon	<b>74,4</b>
			LOXI IMVI /Melanoma	<b>70,4</b>
		PC-3 /Próstata	<b>70,0</b>	
Serie 3	XIV	13,4	PC-3 /Próstata	55,2
	XV	35,8	K-562 /Leucemia	<b>88,8</b>
			RPMI-8226 /Leucemia	<b>71,5</b>
			HCT-116 /Colon	<b>70,0</b>
	XVIII	29,8	HOP-92 /Pulmón	<b>80,0</b>
CAKI-1 /Renal			<b>71,2</b>	
XIX	9,2	HOP-92 /Pulmón	<b>84,4</b>	
Serie 4	XXII	1,7	UO-31 /Renal	<b>19,6</b>
	XXIII	43,2	HL-60(TB) /Leucemia	<b>72,1</b>
			NCI-H460 /Pulmón	<b>72,0</b>
			SK-MEL-5 /Melanoma	<b>78,2</b>
	XXIV	17,7	HOP-92 /Pulmón	<b>-2,1</b>
HCT-116 /Colon			<b>71,7</b>	

### 3.3. Estudios de inhibición enzimáticos esteroideogénicos.

Los híbridos benzazol-esteroides (Serie 1) están siendo evaluados actualmente como inhibidores competitivos análogos de la Abiraterona, fármaco actualmente empleado contra el cáncer de próstata. Los estudios se llevan a cabo por el grupo del Dr. Amit V Pandey<sup>[166]</sup> en el Departamento de Investigaciones Clínicas de la Universidad de Berna, Suiza, mediante ensayos de inhibición de las actividades de CYP17A1 y CYP21A2.

---

<sup>166</sup> Laboratory of Amit Pandey at University of Bern (pandeylab.org) <https://www.pandeylab.org/>



## **I.4-CONCLUSIONES:**

### **Parte I**



De los resultados alcanzados en la consecución de los objetivos planteados en la primera parte de esta Memoria, se concluye lo siguiente:

1. Se obtuvieron doce nuevos híbridos benzazol-esteroide (HBE) (**Ia-k**, **III**) con rendimientos entre 50 – 92 %, mediante la reacción de ciclodeshidrogenación del (20S)-3-oxo-4-pregnen-20-carboxaldehído con diferentes diaminas aromáticas y 2-aminotiofenol.
2. Se aplicaron las herramientas computacionales de Anclaje y Dinámica Moleculares de forma combinada para predecir la actividad biológica. Los cálculos indican que cuatro HBE (**Ia**, **Id**, **Ik** y **III**) podrían ser potenciales inhibidores de CYP17A1 y más selectivos frente a CYP21A2 que el fármaco Abiraterona, destacando a **Ik** con una selectividad hasta 80 veces superior.
3. Se obtuvieron cinco nuevos compuestos (**IX** – **XIII**) con el fragmento heterocíclico conjugado de forma exocíclica (benzimidazol) o fusionados (benzodiazepina y quinoxalina) en los anillos A y/o D de los sustratos esteroideos, bajo diferentes condiciones de reacción entre  $\beta$ -cloro enaldehydos (**VII**, **VIII**) y *o*-fenilendiamina.
4. Se propone que el híbrido quinoxalina-esteroide **X** se forma por oxidación de la benzodiazepina **XI** (en su forma no protonada), mediado por un proceso de expansión del anillo D pentacíclico del fragmento esteroideal sin precedentes.
5. Se obtuvieron trece nuevos conjugados heterociclo-esteroide derivados de imidazo[1,2-*a*]piridinas (**XIV-XIX**) y quinoxalinas (**XX-XXV**) con buenos rendimientos, mediante dos metodologías basadas en las reacciones multicomponentes de GBB-3C y Ugi-3C.
6. Las 3,4-dihidroquinoxalinas espirocíclicas **XXII** – **XXIV** se obtienen como parejas de diasterómeros con relativa estereoselectividad. Para el híbrido **XXV** se separaron los isómeros correspondientes: **XXVa** (3*S*) como el producto mayoritario en un 64%, y **XXVb** (3*R*) con un 13 %. Estos resultados sugieren que el mecanismo de su formación está gobernado por factores estéricos.
7. Se ha demostrado la utilidad del CAN como catalizador versátil en la formación de fragmentos heterociclos tipo benzimidazol, benzotiazol, imidazo[1,2-*a*]piridina y quinoxalina conjugados a esteroides.

8. Se obtuvieron dos nuevas tiazolidinas (**XXVI** y **XXVII**) como mezcla de epímeros, por reacción de derivados de *L*-cisteína con (20*S*)-3-oxo-4-pregnen-20-carboxaldehído. Estos compuestos se sometieron a posteriores reacciones de *N*-acilación y cicloadición, produciéndose los correspondientes diasterómeros puros **XXVIII** [2'*R*, 4'*R*] y **XXIX** [3'*R*] con rendimientos de 63 y 60 %, respectivamente.
9. Se evaluaron las propiedades biológicas de un grupo de híbridos sintetizados mediante ensayos de citotoxicidad. Los resultados obtenidos indicaron una baja actividad antiproliferativa en términos generales, aunque algunos presentaron efecto citotóxico frente a líneas celulares de cáncer de pulmón y leucemia.

**I.5-SECCION EXPERIMENTAL:**

**Parte I**



### 5.1. Características de los productos de partida y los reactivos empleados.

Los reactivos y disolventes utilizados para la síntesis y purificación de los productos son de calidad para síntesis o análisis según el caso, procedentes de las firmas Merck, Acros Organics, Alfa Aesar y Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Para la síntesis de todos los compuestos se emplean esteroides comerciales: (20S)-3-oxo-4-pregnen-20-carboxaldehído (**67**), 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstan-3-ona (**112**), 5 $\alpha$ -colestán-3-ona (**113**), 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-17-ona (**3**), ácido 3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -colan-24-oico (**115**), 3 $\beta$ -acetoxi-5-androsten-17-ona (**118**), 3 $\beta$ -isociano-5 $\beta$ -colano-24-ato de metilo (**108d**), (20 $\alpha$ ,22R,25S)-5 $\alpha$ -espirostan-3,12-diona (**126**) y 3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (PREG).

### 5.2. Equipamiento y técnicas generales utilizadas.

- ✓ **Cromatografía en capa fina:** Los procesos de síntesis descritos se controlan por cromatografía en capa fina (CCF), empleando cromatofolios Merck (DC-Alufolien, kieselgel 60 F<sub>254</sub>) de 0.2 mm de espesor. Los sistemas de disolventes utilizados como eluyente se especifican en cada uno de los métodos y las manchas en las cromatoplasas se revelan bajo luz ultravioleta a 254 y 366 nm. En algunos casos las placas se revelan también con disolución metanólica de ácido sulfúrico al 10 % o disolución etanólica de ácido fosfomolibdico al 15%, con posterior calentamiento.
- ✓ **Purificación de los compuestos sintetizados:** se realizan por recristalización de metanol o cromatografía en columna flash ( $\varnothing = 15$  mm) sobre gel de sílice (Merck, kieselgel 60, 230 - 240 mesh), y eluyendo con mezclas de *n*-hexano/acetato de etilo.
- ✓ **Punto de fusión (p.f.):** se determinan en un aparato Electrothermal 9100 y no son corregidas. El valor reportado corresponde al promedio de tres determinaciones consecutivas.
- ✓ **Rotación específica:** La rotación óptica se mide en un polarímetro JASCO P-200 con una cubeta de 10 cm, a 20° C y cloroformo como disolvente (concentraciones expresadas en g/100 mL), con lámpara de sodio ( $\lambda = 589$  nm). Solo se determina para los compuestos diastereoméricamente puros aislados de las reacciones donde se genera un nuevo centro estereogénico respecto a los reactivos de partida.
- ✓ **Cromatografía HPLC:** las cromatografías HPLC para el análisis por espectrometría de masas de los compuestos obtenidos se realizan en un equipo Agilent-1200,

empleando una columna Kinetex C-18 (2,10 mm x 50 mm x 2,6  $\mu\text{m}$ ) y el siguiente método de HPLC: flujo 0.4 mL/min, elución en gradiente 0 – 5 min desde 10 % acetonitrilo/agua (0.1 % ácido fórmico) a 100 % acetonitrilo (0.1 % ácido fórmico), más 2 min adicionales a esta concentración. Los tiempos de retención ( $t_R$ ) y las áreas de los picos (PAs) reportadas, se determinan con una longitud de onda de 320 nm.

- ✓ **Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN):** Los espectros unidimensionales de RMN- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT-135; así como los espectros bidimensionales de correlación homonuclear (COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), y heteronuclear (HSQC, HMBC) se registraron en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén (UJA), en un equipo Bruker Avance III-400 operando a 400 MHz. Los desplazamientos químicos se registran en la escala  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. La multiplicidad de las señales correspondientes a los protones se designó como sigue: singlete (s), singlete ancho (s.a), doblete (d), triplete (t), cuartete (q), multiplete (m), doblete de doblete (dd), doblete de triplete (dt) y doblete de cuartete (dq). Los espectros fueron registrados en  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO}-d_6$  o  $\text{MeOH}-d_4$ , y TMS como referencia interna. Para los experimentos de RMN- $^{19}\text{F}$  se empleó como referencia al 2,2,2-trifluoroetanol. La cuantificación de las muestras fluoradas se realiza utilizando una señal de radiofrecuencia externa como referencia, según procedimiento descrito en el programa ERETIC ([www.bruker.com](http://www.bruker.com)).
- ✓ **Espectrometría de masas:** Los espectros de masas de baja resolución fueron adquiridos en un espectrómetro Shimadzu-GCMS-QP2010, con detector selectivo de masas HP 5972 y acoplado con un cromatógrafo de gases HP 5890 A Serie II, con ionización por impacto de electrones (EM-IE) a 70 eV y analizador de cuadrupolo. Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se registraron en un espectrómetro QTOF Agilent modelo 6520B, acoplado a un HPLC Agilent-1200, con ionización por *electrospray* (ESI), en modo positivo. Los espectros se describen en unidades de relación masa/carga ( $m/z$ ), reportándose el pico correspondiente al ion molecular y los picos de iones-fragmento principales en los espectros de baja resolución.
- ✓ **Difracción de Rayos X:** Las estructuras moleculares tridimensionales obtenidas mediante el uso de la técnica de difracción de rayos X de monocristal, se registraron en el difractor Bruker D8-Venture perteneciente al CICT de la UJA, que posee

una doble fuente de radiación, con sendos tubos microfoco de molibdeno y cobre, y como detector Photon II.

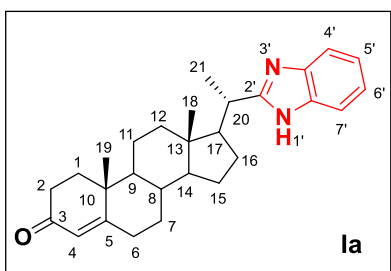
- ✓ **Síntesis Orgánica Asistida por MW:** Algunas reacciones fueron asistidas mediante irradiación de microondas, para lo que se empleó un reactor de microondas CEM Discover monomodo de 300 W de potencia máxima, trabajando en modo estándar a la temperatura que se indica en cada caso, perteneciente al Departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la UJA.

### 5.3. Obtención de híbridos benzazol-esteroide (Serie 1).

#### Procedimiento general:

En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron en cantidades equimolares al (20*S*)-3-oxo-4-pregnen-20-carboxaldehído (**67**) y la correspondiente *o*-diamina aromática **40a-k** en 5 mL de metanol seco. Posteriormente se adicionó nitrato de cérico amónico CAN (10% mol), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente en presencia de dioxígeno. La reacción se siguió por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1) y se detuvo por consumo de los materiales de partida. La mezcla se vertió sobre disolución acuosa de amoniaco a 0 °C, dando lugar a un precipitado abundante que se filtró y lavó varias veces con agua. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna flash, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (en gradiente creciente de polaridad de 2:1 a 1:1).

#### 5.3.1.- Síntesis de (20*S*)-(1*H*-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona

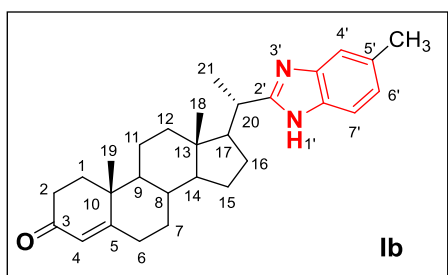


Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroideal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y *o*-fenilendiamina **40a** (32.4 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 14h. **Rendimiento:** 113 mg (0.27 mmol, 90 %); sólido amarillo pálido; **p.f.:** 138 – 140 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.19 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 12.09 (s.a, 1H, H1'); 7.43 (dd, *J* = 5.9; 3.3 Hz, 2H, H4', H7'); 7.08 (dd, *J* = 5.9; 3.2 Hz, 2H, H5', H6'); 5.62 (s, 1H, H4); 2.94 (dq, *J* = 13.7; 6.8 Hz, 1H, H20); 2.46 – 2.32 (m, 2H, H2, H6); 2.27 – 2.12 (m, 2H, H2, H6); 2.10 – 2.02 (m, 1H, H12); 2.01 - 1.93 (m, 1H, H1); 1.88 – 1.69 (m, 2H, H7, H17); 1.67 – 1.50 (m, 3H, H1, H8, H11); 1.50 – 1.37 (m, 2H, H11, H15); 1.32 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H21); 1.30 – 1.28 (m, 1H, H12); 1.28 – 1.19 (m, 2H, H16); 1.16 (s, 3H, H19); 1.13 – 1.00 (m, 2H, H14, H15); 1.00 – 0.88 (m, 2H, H7, H9); 0.80 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,

DMSO,  $\delta$  ppm): 197.9 (C3); 170.9 (C5); 159.7 (C2'); 123.1 (C4); 120.9 (C5', C6'); 120.8 (C4', C7'); 55.3 (C14); 54.5 (C17); 53.1 (C9); 42.1 (C13); 39.0 (C12); 38.1 (C10); 36.7 (C20); 35.1 (C1); 35.00 (C8); 34.0 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 29.0 (C16); 27.4 (C15); 20.6 (C11); 19.6 (C21); 16.9 (C19); 11.8 (C18). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 416 ( $M^+$ , 23), 401 (17), 185 (17), 146 (100). **HRMS:**  $m/z$  = 417.2891 [ $M+H$ ] $^+$ ; calculada para  $C_{28}H_{37}N_2O$ : 417.2900.

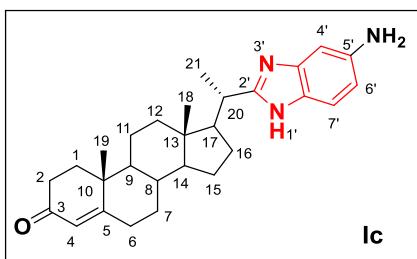
### 5.3.2.- Síntesis de (20S)-(5-metil-1H-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona



Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 2-amino-4-metil-anilina (36.8 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 17h. **Rendimiento:** 118.5 mg (0.28 mmol, 92 %); sólido amarillo pálido; **p.f.:** 125 – 130 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.21 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): 11.98 (sa, 1H, -NH); 7.30 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, H7'); 7.21 (s, 1H, H4'); 6.90 (dd,  $J$  = 8.1, 1.6 Hz, 1H, H6'); 5.62 (s, 1H, H4); 2.91 (dq,  $J$  = 10.0; 6.8 Hz, 1H, H20); 2.46 – 2.30 (m, 5H, H2, H6, -CH<sub>3</sub>); 2.25 – 2.11 (m, 2H, H2, H6); 2.08 – 2.01 (m, 1H, H12); 1.99 – 1.91 (m, 1H, H1); 1.80 (q,  $J$  = 9.7 Hz, 1H, H17); 1.75 – 1.69 (m, 1H, H7); 1.61 (dd,  $J$  = 14.3; 4.5 Hz, 1H, H1); 1.56 – 1.48 (m, 2H, H8, H11); 1.47 – 1.37 (m, 2H, H11, H15); 1.31 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, H21); 1.28 – 1.19 (m, 4H, H12, H16); 1.14 (s, 3H, H19); 1.07 – 1.02 (m, 2H, H14, H15); 0.95 – 0.89 (m, 2H, H7, H9); 0.78 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO,  $\delta$  ppm): 197.9 (C3); 170.8 (C5); 159.3 (C2'); 129.8 (C5'); 123.1 (C4); 122.2 (C6', C7'); 55.3 (C14); 54.5 (C17); 53.1 (C9); 42.0 (C13); 38.7 (C12); 38.1 (C10); 36.6 (C20); 35.1 (C1); 34.9 (C8); 33.6 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 27.4 (C16); 23.6 (C15); 21.2 (-CH<sub>3</sub>); 20.6 (C11); 19.5 (C21); 16.9 (C19); 11.8 (C18). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 430 ( $M^+$ , 22), 415 (16), 199 (15), 160 (100). **HRMS:**  $m/z$  = 431.3049 [ $M+H$ ] $^+$ ; calculada para  $C_{29}H_{39}N_2O$ : 431.3057.

### 5.3.3.- Síntesis de (20S)-(5-amino-1H-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona



Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y diclorohidrato de 1,2,4-triaminobenceno (59.6 mg, 0.3 mmol) liberado con Et<sub>3</sub>N. Tiempo de reacción de 8h. **Rendimiento:** 42 mg (0.24 mmol, 65%); sólido marrón; **p.f.:** > 300 °C

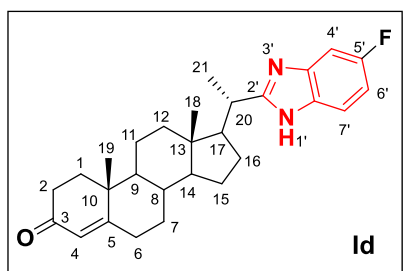
(descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.16 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:3).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.29 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H7'); 6.75 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H4'); 6.57 (dd, *J* = 8.5; 2.2 Hz, 1H, H6'); 5.70 (s, 1H, H4); 3.02 (dq, *J* = 11.0, 6.8 Hz, 1H, H20); 2.50 – 2.24 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H6); 2.19 (dt, *J* = 14.4; 3.3 Hz, 1H, H6); 2.04 – 1.98 (m, 2H, H1, H12); 1.77 (m, 2H, H7, H17); 1.65 (td, *J* = 13.8; 4.7 Hz, 1H, H1); 1.55 – 1.40 (m, 5H, H8, 2H<sub>11</sub>, H15, H16); 1.38 (d, *J* = 6.9 Hz, 4H, H16, H21); 1.16 (s, 4H, H12, H19); 1.08 – 0.92 (m, 3H, H7, H14, H15); 0.86 (m, 1H, H9); 0.72 (s, 3H, H18).

**RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 200.3 (C3); 172.4 (C5); 159.0 (C2'); 142.1 (C5'); 138.2 (C7a'); 133.0 (C3a'); 123.7 (C4); 116.0 (C7'); 111.8 (C6'); 99.3 (C4'); 55.9 (C14); 55.2 (C17); 54.1 (C9); 42.7 (C13); 39.6 (C12); 38.7 (C10); 37.6 (C20); 35.9 (C1); 35.6 (C8); 32.9 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 28.1 (C16); 24.1 (C15); 21.1 (C11); 19.8 (C21); 17.4 (C19); 12.0 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 431 (M<sup>+</sup>, 48), 416 (15), 200 (18), 161 (100).

**HRMS:** *m/z* = 432.3010 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>N<sub>3</sub>O:432.3009.

### 5.3.4.- Síntesis de (20S)-(5-fluor-1H-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona

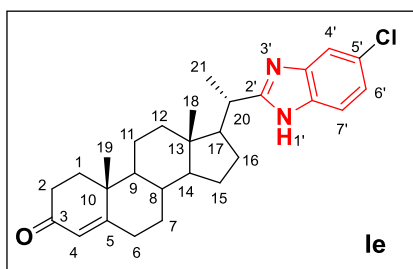


Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 2-amino-4-fluoranilina (38.3 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 24h. **Rendimiento:** 97 mg (0.22 mmol, 73 %); sólido amarillo; **p.f.:** 175 - 177 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.25 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 12.21 (sa, 1H, -NH); 7.41 (dd, *J* = 8.6, 5.0 Hz, 1H, H4'); 7.23 (dd, *J* = 9.6, 2.5 Hz, 1H, H7'); 6.93 (td, *J* = 9.4, 2.6 Hz, 1H, H6'); 5.62 (s, 1H, H4); 2.93 (dq, *J* = 13.8; 7.1 Hz, 1H, H20), 2.44 - 2.32 (m, 2H, H2, H6); 2.17 (m, 2H, H2, H6); 2.08 – 2.01 (m, 1H, H12); 2.00 - 1.91 (m, 1H, H1); 1.81 (m, 1H, H17); 1.76 – 1.66 (m, 1H, H7); 1.61 (dd, *J* = 14.4; 4.2 Hz, 1H, H1); 1.58 – 1.35 (m, 4H, H8, 2H<sub>11</sub>, H15); 1.31 (d, *J* = 6.7 Hz, 4H, H12, H21); 1.22 (m, 2H, H16); 1.14 (s, 3H, H19); 1.09 – 1.00 (m, 2H, H14, H15); 0.91 (m, 2H, H7, H9); 0.78 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,

DMSO,  $\delta$  ppm): 197.9 (C3); 170.8 (C5); 161.2 (C2'); 158.1 (d,  $^1J_{C-F} = 233.4$  Hz, C5') 123.1 (C4); 108.8 (d,  $^2J_{C-F} = 25.2$  Hz, C4', C6') 55.2 (C14); 54.4 (C17); 53.1 (C9); 42.1 (C13); 39.5 (C12); 38.1 (C10); 36.7 (C20); 35.1 (C1); 34.9 (C8); 33.6 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 27.4 (C16); 23.6 (C15); 20.6 (C11); 19.5 (C21); 16.9 (C19); 11.8 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 434 ( $M^+$ , 22), 419 (14), 203 (15), 164 (100). **HRMS:** m/z = 435.2805  $[M+H]^+$ ; calculada para  $C_{28}H_{36}FN_2O$ : 435.2806.

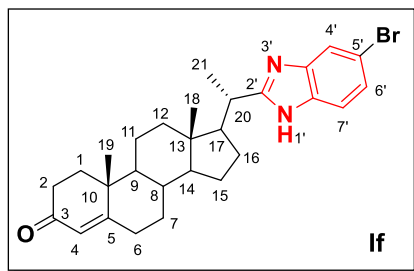
### 5.3.5.- Síntesis de (20S)-(5-cloro-1H-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona



Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 2-amino-4-cloroanilina (43.3 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 24h. **Rendimiento:** 96 mg (0.21 mmol, 70 %); sólido marrón pálido; **p.f.:** 270 °C (descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.23 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): 12.09 (sa, 1H, -NH); 7.49 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, H4'); 7.43 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, H7'); 7.11 (dd,  $J = 8.6; 2.1$  Hz, 1H, H6'); 5.61 (s, 1H, H4); 2.94 (dq,  $J = 13.7; 6.7$  Hz, 1H, H20); 2.45 – 2.29 (m, 2H, H2, H6); 2.17 (m, 2H, H2, H6); 2.08 – 2.00 (m, 1H, H12); 1.95 (dt,  $J = 12.4; 3.6$  Hz, 1H, H1); 1.79 (q,  $J = 9.7$  Hz, 1H, H17); 1.71 (m, 1H, H7); 1.59 (m, 1H, H1); 1.55 – 1.49 (m, 2H, H8, H11); 1.45 – 1.35 (m, 2H, H11, H15); 1.31 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H21); 1.26 – 1.17 (m, 3H, H12, 2H16); 1.13 (s, 3H, H19); 1.07 -1.01 (m, 2H, H14, H15); 0.89 (td,  $J = 11.4; 4.0$  Hz, 2H, H7, H9); 0.77 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO,  $\delta$  ppm): 197.9 (C3); 170.8 (C5); 161.2 (C2'); 125.4 (C5'); 123.1 (C4); 121.2 (C6', C7'); 114.3 (C4'); 55.2 (C14); 54.4 (C17); 53.1 (C9); 42.1 (C13); 39.0 (C12); 38.1 (C10); 36.6 (C20); 35.1 (C1); 34.9 (C8); 33.6 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 27.4 (C16); 23.6 (C15); 20.6 (C11); 19.4 (C21); 16.8 (C19); 11.8 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 450 ( $M^+$ , <sup>35</sup>Cl: 22), 435 (14), 219 (16), 180 (100). **HRMS:** m/z = 451.2510  $[M+H]^+$ ; calculada para  $C_{28}H_{36}ClN_2O$ : 451.2511.

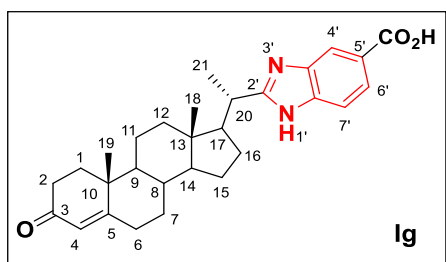
### 5.3.6.- Síntesis de (20S)-(5-bromo-1H-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona



Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 2-amino-4-bromoanilina (56.8 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 24h. **Rendimiento:** 99 mg (0.2 mmol, 67 %); sólido naranja pálido; **p.f.:** 278 °C (descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.22 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 12.36 (sa, 1H, -NH); 7.63 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H4'); 7.40 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H7'); 7.23 (dd, *J* = 8.5, 1.9 Hz, 1H, H6'); 5.62 (s, 1H, H4); 2.93 (dt, *J* = 13.6; 7.0 Hz, 1H, H20); 2.46 – 2.33 (m, 2H, H2, H6); 2.23 – 2.13 (m, 2H, H2, H6); 2.04 (m, 1H, H12); 1.96 (m, 1H, H1); 1.79 (q, *J* = 9.8 Hz, 1H, H17); 1.71 (m, 1H, H7); 1.60 (m, 1H, H1); 1.54 (m, 2H, H8, H11); 1.47 – 1.38 (m, 2H, H11, H15); 1.31 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H, H12, H21); 1.21 (m, 2H, H16); 1.15 (s, 3H, H19); 1.09 – 1.02 (m, 2H, H14, H15); 0.92 (dt, *J* = 11.7; 4.0 Hz, 2H, H7, H9); 0.78 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO, δ ppm): 197.9 (C3); 170.9 (C5); 161.1 (C2'); 123.8 (C6', C7'); 123.1 (C4); 113.2 (C5'); 55.2 (C14); 54.4 (C17); 53.1 (C9); 42.1 (C13); 39.0 (C12); 38.1 (C10); 36.6 (C20); 35.1 (C1); 34.9 (C8); 33.6 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 27.3 (C16); 23.6 (C15); 20.6 (C1); 19.4 (C21); 16.9 (C19); 11.8 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 494 (M<sup>+</sup>, <sup>79</sup>Br: 24), 479 (12), 263 (14), 224 (100). **HRMS:** *m/z* = 495.1999 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>BrN<sub>2</sub>O: 495.2006.

### 5.3.7.- Síntesis de (20S)-(5-carboxi-1H-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona.



Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y ácido 3,4-diaminobenzoico (46.3 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 24h. **Rendimiento:** 70 mg (0.19 mmol, 50 %); sólido gris; **p.f.:** 296°C

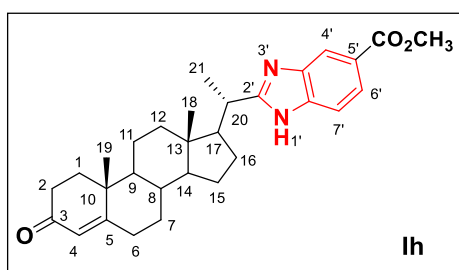
(descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.15 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:3).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm):<sup>[167]</sup> 11.54 (sa, 2H, -NH, -CO<sub>2</sub>H); 8.30 (s, 1H, H4'); 8.08 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H6'); 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H7'); 5.60 (s, 1H, H4); 3.33 (m, 1H, H20); 2.43 – 2.31 (m, 2H, H2, H6); 2.25 – 2.10 (m, 2H, H2, H6); 2.06 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H, H12); 1.96 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, H1); 1.85 (q, *J* = 9.6 Hz, 1H, H17); 1.72 (m,

<sup>167</sup> Para el registro de los espectros se adicionaron 10 mL de TFA.

1H, H7); 1.64 – 1.53 (m, 4H, H1, H8, 2H15); 1.49 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H21); 1.41 (m, 1H, H11); 1.35 – 1.18 (m, 3H, H12, 2H16); 1.14 (s, 3H, H19); 1.07 (m, 2H, H14, H15); 0.92 (m, 2H, H7, H9); 0.81 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO,  $\delta$  ppm): 198.0 (C3); 170.8 (C5); 166.7 (-CO<sub>2</sub>H); 160.3 (C2'); 133.8 (C5'); 126.5 (C6'); 123.2 (C4); 115.6 (C4'); 114.1 (C7'); 55.1 (C14); 53.7 (C17); 53.1 (C9); 42.8 (C13); 38.7 (C12); 38.2 (C10); 35.2 (C1, C20); 35.0 (C8); 33.7 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 26.9 (C16); 23.6 (C15); 20.6 (C11); 17.8 (C21); 16.9 (C19); 11.6 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 460 (M<sup>+</sup>, 13), 445 (7), 229 (14), 190 (100). **HRMS:** m/z = 461.2793 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 461.2799.

### 5.3.8.- Síntesis de (20S)-(5-metoxicarbonil-1H-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona



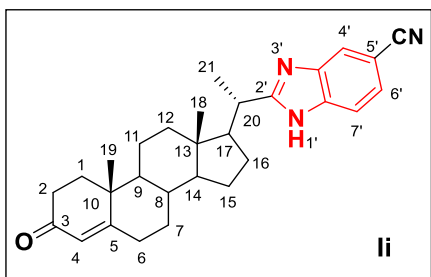
Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroideal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 3,4-diaminobenzoato de metilo (50.5 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 24h. **Rendimiento:** 98 mg (0.21 mmol, 68 %); sólido gris; **p.f.:** 226 –

228 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.19 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1); mezcla de tautómeros (A/B ~ 50:50)<sup>[168]</sup>.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): 12.49 (s, 1H, -NH); [8.12 (*tautómero A*)/8.01 (*tautómero B*)](s, 1H, H4'); 7.76 (t,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H6'); [7.57 (*tautómero A*)/7.48 (*tautómero B*)](d,  $J = 8.7$  Hz, 1H, H7'); 5.61 (s, 1H, H4); 3.84 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 2.98 (dq,  $J = 12.5; 5.8$  Hz, 1H, H20); 2.44 – 2.32 (m, 2H, H2, H6); 2.22 – 2.13 (m, 2H, H2, H6); 2.04 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H, H12); 1.95 (td,  $J = 10.5; 2.9$  Hz, 1H, H1); 1.81 (q,  $J = 9.7$  Hz, 1H, H17); 1.71 (m, 1H, H7); 1.63 – 1.39 (m, 5H, H1, H8, H11, 2H15); 1.33 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H21); 1.29 – 1.21 (m, 3H, H12, 2H16); 1.14 (s, 3H, H19); 1.08 – 1.01 (m, 2H, H14, H15); 0.90 (m, 2H, H7, H9); 0.78 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO,  $\delta$  ppm): 197.9 (C3); 170.8 (C5); 166.9 (COO<sup>-</sup>); 162.0 (C2'); 122.7/122.4 (C6'); 123.1 (C4); 119.8/112.4 (C4'); 117.9/110.7 (C7'); 55.2 (C14); 54.4 (C17); 53.1 (C9); 51.8 (-OCH<sub>3</sub>); 42.8 (C13); 39.0 (C12); 38.1 (C10); 36.8 (C20); 35.1 (C1); 34.9 (C8); 33.6 (C2); 32.0 (C6); 31.6 (C7); 27.4 (C16); 23.6 (C15); 20.6 (C11); 19.4 (C21); 16.9 (C19); 11.8 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 474 (M<sup>+</sup>, 16), 459 (9), 243 (13), 204 (100). **HRMS:** m/z = 475.2951 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 475.2955.

<sup>168</sup> Relación de tautómeros detectado por RMN, mediante integración se las señales H4' y H7'.

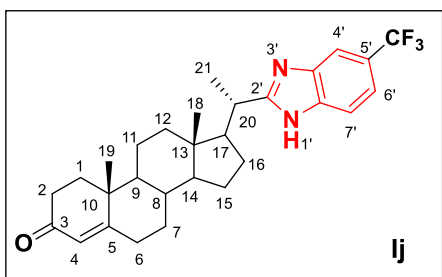
### 5.3.9.- (2*S*)-(5-ciano-1*H*-benzimidazol-2-il)-4-pregnen-3-ona.



Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 2-amino-4-cianoanilina (40.5 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 24h. **Rendimiento:** 105 mg (0.24 mmol, 78 %); sólido beige; **p.f.:** 173 – 175 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.22 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 12.69 (sa, 1H, –NH); 7.97 (s, 1H; H4'); 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H7'); 7.49 (dd, *J* = 8.3; 1.6 Hz, 1H, H6'); 5.61 (s, 1H, H4); 2.99 (dq, *J* = 10.3; 6.8 Hz, 1H, H20); 2.43 – 2.31 (m, 2H, H2, H6); 2.24 – 2.10 (m, 2H, H2, H6), 2.04 (td, *J* = 12.5; 3.1 Hz, 1H, H12); 1.98 – 1.90 (m, 1H, H1); 1.80 (q, *J* = 9.7 Hz, 1H, H17); 1.75 – 1.67 (m, 1H, H7); 1.64 – 1.48 (m, 3H, H1, H8, H11); 1.47 – 1.38 (m, 2H, H11, H15); 1.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H21); 1.30 – 1.17 (m, 3H, H12, 2H16); 1.14 (s, 3H, H19); 1.08 – 0.99 (m, 2H, H14, H15); 0.96 – 0.86 (m, 2H, H7, H9); 0.78 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO, δ ppm): 197.8 (C3); 170.8 (C5); 163.1 (C2'); 124.8 (C6'; C7'); 123.1 (C4); 120.1 (–CN); 103.0 (C5'); 55.2 (C14); 54.3 (C17); 53.1 (C9); 42.2 (C13); 38.7 (C12); 38.1 (C10); 36.7 (C20); 35.1 (C1); 34.9 (C8); 33.6 (C2); 31.9 (C6); 31.6 (C7); 27.3 (C16); 23.6 (C15); 20.6 (C11); 19.2 (C21); 16.8 (C19); 11.7 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 441 (M<sup>+</sup>, 17), 426 (10), 210 (12), 171 (100). **HRMS:** *m/z* = 442.2850 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O: 442.2853.

### 5.3.10.- (2*S*)-(5-trifluorometil-1*H*-benzimidazol-2-il)- 4-pregnen-3-ona

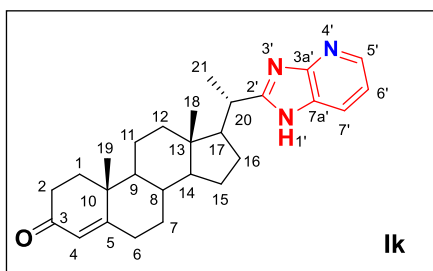


Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 1,2-diamino-4-(trifluorometil)benceno (53.5 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 24h. **Rendimiento:** 93 mg (0.19 mmol, 64 %); Sólido beige; **p.f.:** 176 - 180 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.24 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 12.55 (sa, 1H, –NH); 7.79 (s, 1H, H4'); 7.62 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H7'); 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H6'); 5.61 (s, 1H, H4); 3.00 (dq, *J* = 10.5, 6.8 Hz, 1H, H20); 2.43 – 2.31 (m, 2H, H2, H6); 2.24 – 2.10 (m, 2H, H2, H6); 2.04 (dt, *J* = 12.2; 3.2 Hz, 1H, H12); 1.99 – 1.87 (m, 1H, H1); 1.82 (q, *J* = 9.6 Hz, 1H, H17); 1.76 – 1.65 (m, 1H, H7); 1.60 – 1.48 (m, 3H, H1, H8, H11); 1.47 – 1.38 (m, 2H, H11, H15); 1.33 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H, H12, H21); 1.26 – 1.18 (m, 2H, H16); 1.13 (s, 3H, H19); 1.07 –

1.01 (m, 2H, H14, H15); 0.95 – 0.83 (m, 2H, H7, H9); 0.78 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO,  $\delta$  ppm): 197.8 (C3); 170.8 (C5); 162.6 (C2'); 125.2 (q,  $^1J_{C-F} = 271.3$  Hz, –CF<sub>3</sub>); 123.1 (C4); 121.8 (q,  $^2J_{C-F} = 31.2$  Hz, C5'); 117.8 (C6'; C7'); 55.2 (C14); 54.4 (C17); 53.1 (C8); 42.1 (C13); 39.0 (C12); 38.1 (C10); 36.7 (C20); 35.1 (C1); 34.9 (C8); 33.6 (C2); 31.9 (C6); 31.6 (C7); 27.3 (C16); 23.6 (C15); 20.6 (C11); 19.3 (C21); 16.8 (C19); 11.7 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 484 (M<sup>+</sup>, 16), 469 (7), 254 (13), 214 (100). **HRMS:** m/z = 485.2775 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O: 485.2774.

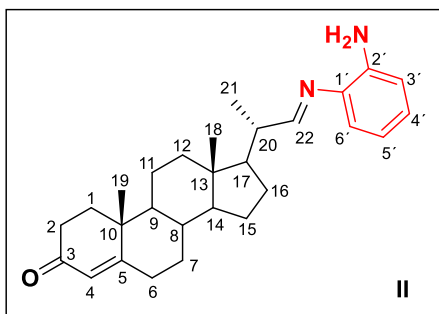
### 5.3.11.- (20S)-(1H-imidazo[4,5-b]piridin-2-il)- 4-pregnen-3-ona



Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroidal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y 2,3-diaminopiridina (32.7 mg, 0.3 mmol) en un tiempo de reacción de 53h. **Rendimiento:** 82 mg (0.20 mmol, 63 %); sólido beige; **p.f.:** 255 °C (descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.27 (n-hexano: acetato de etilo 1:3).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 13.90 (sa, 1H, –NH); 8.32 (d,  $J = 4.3$  Hz, 1H, H5'); 8.03 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H7'); 7.25 (dd,  $J = 8.0; 4.7$  Hz, 1H, H6'); 5.71 (s, 1H, H4); 3.20 (m, 1H, H20); 2.48 – 2.33 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H6); 2.27 – 2.17 (m, 2H, H6, H12); 2.04 (m, 1H, H1); 1.95 (q,  $J = 9.8$  Hz, 1H, H17); 1.83 – 1.69 (m, 2H, H7, H1); 1.66 – 1.62 (m, 2H, H8, H11); 1.54 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H21); 1.51 (m, 2H, H11, H15); 1.47 – 1.35 (m, 3H, H12, 2H16); 1.20 (s, 3H, H19); 1.15 – 1.09 (m, 2H, H14, H15); 1.04 – 0.95 (m, 2H, H7, H9); 0.90 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.7 (C3); 171.4 (C5); 162.3 (C2'); 149.2 (C3a'); 141.5 (C5'); 136.1 (C7a'); 127.3 (C7'); 124.0 (C4); 117.9 (C6'); 55.9 (C14); 55.2 (C17); 53.8 (C9); 43.0 (C13); 39.9 (C12); 38.7 (C10); 38.4 (C20); 35.8 (C1); 35.8 (C8); 34.1 (C2); 32.9 (C6); 32.0 (C7); 28.0 (C16); 24.2 (C15); 21.2 (C11); 19.6 (C21); 17.5 (C19); 12.3 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 417 (M<sup>+</sup>, 20), 402 (16), 186 (13), 147 (100). **HRMS:** m/z = 418.2848 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O: 418.2853.

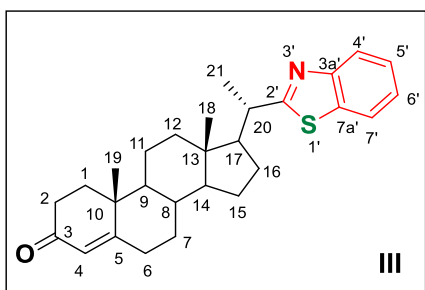
## 5.3.12 - Síntesis de 2-[(20S)-3-oxo-4-pregnen-20-il]metilén]aminoanilina



En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron en cantidades equimolares 100 mg del aldehído esteroideal **67** y 33 mg de *o*-fenilendiamina **40a** en 5 mL de MeOH seco. Posteriormente se adicionaron 4  $\mu$ L de ácido acético glacial (20 % mol), y se agitó a temperatura ambiente, monitoreándose la reacción por CCF (n-hexano: acetato de etilo 1:1). A la hora de iniciada se detiene la agitación por consumo del aldehído de partida. El precipitado formado se filtró y lavó sucesivamente con agua y metanol frío. **Rendimiento:** 100 mg (0.24 mmol, 79%); sólido amarillo; **p.f.:** 153 - 156 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.45 (n-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 7.74 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H, H2); 7.00 (ddd,  $J$  = 7.9, 7.2, 1.6 Hz, 1H, H4'); 6.77 – 6.66 (m, 3H, H3', H5', H6'); 5.73 (s, 1H, H4); 3.99 (sa, 2H, -NH<sub>2</sub>); 2.57 (m, 1H, H20); 2.50 – 2.34 (m, 3H, 2H2, H6); 2.32 – 2.24 (m, 1H, H6); 2.08 – 2.00 (m, 2H, H1, H12); 1.88 – 1.78 (m, 2H, H7, H16); 1.76 – 1.63 (m, 2H, H1, H15); 1.61 – 1.41 (m, 5H, H8, 2H11, H16, H17); 1.27 (m, 1H, H12); 1.22 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, H21); 1.19 (s, 3H, H19); 1.18 (m, 1H, H15); 1.13 – 1.01 (m, 2H, H7, H14); 0.96 (ddd,  $J$  = 12.2, 10.9, 4.3 Hz, 1H, H9); 0.81 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.7 (C3); 171.5 (C5); 169.1 (C22); 141.1 (C2'); 138.3 (C1'); 126.9 (C4'); 124.0 (C4); 118.6 (C5'); 118.0 (C6'); 115.2 (C3'); 55.7 (C14); 53.9 (C9); 53.6 (C17); 43.2 (C20); 43.0 (C13); 39.6 (C12); 38.7 (C10); 35.9 (C1); 35.8 (C8); 34.1 (C2); 33.0 (C6); 32.1 (C7); 27.7 (C16); 24.5 (C15); 21.2 (C11); 17.5 (C19); 17.2 (C21); 12.6 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 418 (M<sup>+</sup>, < 1), 187 (1), 146 (2), 119 (100).

## 5.3.13.-Síntesis de 20(S)-(benzo[d]tiazol-2-il)-4-pregnen-3-ona



En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron el aldehído esteroideal **67** (200 mg; 0.60 mmol) con 8 mL de acetonitrilo seco. Seguidamente se añadieron lentamente con jeringa 66  $\mu$ L (0.60 mmol) de 2-aminotiofenol **68** y la disolución resultante se agitó bajo atmósfera de argón por 2 horas. Posteriormente se adicionó CAN (33 mg, 0.06 mmol), y se hizo pasar una corriente de dióxígeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y se siguió por CCF (n-hexano: acetato de etilo 3:1). Transcurridas 18 horas se detuvo por consumo del

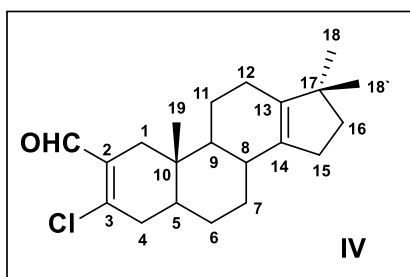
material de partida y se vertió sobre disolución fría de  $\text{NH}_3$  (5 %), dando lugar a un precipitado que se filtró y lavó con abundante agua. El crudo de la reacción se purificó por cromatografía en columna flash, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo en gradiente creciente de polaridad (10:1 a 5:1), asilándose como un sólido blanco. **Rendimiento:** 184 mg (0.43 mmol, 71 %); **p.f.:** 200 - 205 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.35 (*n*-hexano: acetato de etilo 3:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 7.95 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, H4'); 7.83 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H, H7'); 7.43 (ddd,  $J = 8.2; 7.1; 1.4$  Hz, 1H, H6'); 7.34 (m, 1H, H5'); 5.72 (s, 1H, H4); 3.27 (dq,  $J = 10.7, 6.8$  Hz, 1H, H20); 2.44 – 2.31 (m, 3H, 2H2, H6); 2.25 (m, 1H, H6); 2.11 (dt,  $J = 12.3, 3.2$  Hz, 1H, H12); 2.03 (m, 1H, H1); 1.87 – 1.78 (m, 2H, H7, H17); 1.71 (td,  $J = 13.9, 5.0$  Hz, 1H, H1); 1.61 – 1.49 (m, 5H, H8, 2H11, H15, H16); 1.45 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H, H21); 1.42 – 1.36 (m, 2H, H12, H16); 1.19 (s, 3H, H19); 1.15 – 1.06 (m, 2H, H14, H15); 1.04 – 0.93 (m, 2H, H7, H9); 0.85 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 199.6 (C3); 178.2 (C2'); 171.4 (C5); 152.9 (C3a'); 134.7 (C7a'); 126.0 (C5'); 124.8 (C6'); 124.0 (C4); 122.7 (C4'); 121.7 (C7'); 56.4 (C17); 55.8 (C14); 53.8 (C9); 43.1 (C13); 42.9 (C20); 39.6 (C12); 38.7 (C10); 35.82 (C1); 35.76 (C8); 34.1 (C2); 33.0 (C6); 32.1 (C7); 28.3 (C16); 24.3 (C15); 21.5 (C21); 21.2 (C11); 17.5 (C19); 12.3 (C18). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 433 ( $\text{M}^+$ , 15), 418 (8), 202 (7), 163 (100). **HRMS:**  $m/z$  = 434.2504 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>; calculada para  $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{NOS}$ : 434.2512.

#### 5.4.- Obtención de derivados esteroideos cloro-formil-sustituídos.

Los derivados  $\beta$ -cloro enaldehydos fueron preparados acorde el procedimiento descrito por nuestro grupo de investigación, con ligeras modificaciones.<sup>[121]</sup>

##### 5.4.1.- Síntesis de 3-cloro-17,17-dimetil-18-nor-5 $\alpha$ -androst-2,13-dien-2-carboxaldehído

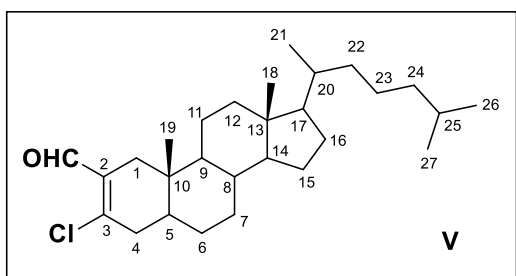


Sobre una disolución de 17 $\beta$ -hidroxi-17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstano-3-ona (**112**) (0.5 g, 1.6 mmol) en 20 mL de diclorometano seco, se adicionó lentamente una mezcla fría (< 5 °C) de  $\text{POCl}_3$  (0.6 mL, 6.4 mmol) y DMF (0.6 mL, 8 mmol), previamente preparada. Terminada la adición se dejó ascender a temperatura ambiente y se agitó la mezcla resultante durante 18 horas bajo atmósfera de argón. Posteriormente, se vertió lentamente la mezcla de reacción en una disolución fría de acetato de sodio (2 g en 15 mL de agua), y se agitó durante una hora. La mezcla se extrajo

con DCM (2 x 20 mL), y la fase orgánica se lavó con salmuera (2 x 20 mL) y se secó posterior con sulfato de sodio anhidro. El extracto orgánico se rotoevaporó y el sólido resultante se purificó por cromatografía en columna flash, empleando como fase móvil hexano – acetato de etilo (9:1). El producto **IV** fue aislado como sólido blanco. **Rendimiento:** 0.31 g (0.93 mmol, 58 %); **p.f.:** 109 - 114 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.42 (*n*-hexano: acetato de etilo 3:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 10.20 (s, 1H, -CHO); 2.62 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H1); 2.42 (m, 1H, H4); 2.36 (m, 1H, H16); 2.22 (m, 1H, H15); 2.07 (m, 1H, H15); 2.04 - 1.98 (m, 2H, H6, H8); 1.96 (m, 1H, H7); 1.92 (m, 1H, H11); 1.85 (m, 1H, H6); 1.77 (d, *J* = 17.1 Hz, 1H, H1); 1.64 - 1.59 (m, 3H, H4, H5, H16); 1.56 (m, 1H, H12); 1.31 (m, 1H, H12); 1.25 (m, 1H, H7); 1.01 (m, 1H, H11); 0.98 (m, 1H, H9); 0.96 (s, 6H, H18, H18'); 0.70 (s, 3H, H19). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 191.7 (CHO); 150.1 (C3); 141.8 (C13); 135.5 (C14); 132.4 (C2); 51.2 (C9); 45.6 (C17); 42.6 (C5); 40.4 (C4); 39.7 (C16); 38.0 (C1); 36.5 (C8); 34.4 (C10); 30.7 (C11); 29.9 (C15); 28.2 (C12); 26.9 (C18); 26.6 (C18'); 22.9 (C7); 22.3 (C6); 11.6 (C19). **EM-IE:** *m/z* (%) = 332 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 10), 317 (100), 161 (21), 91 (16). **HRMS:** *m/z* = 355.1783 [M+Na]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>ClNaO: 355.1799.

#### 5.4.2.- Síntesis de 3-cloro-5α-colest-2-en-2-carboxaldehído



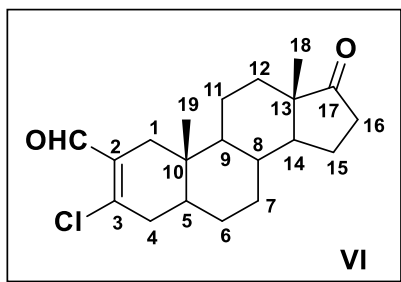
Este compuesto fue obtenido a partir de 5α-colestan-3-ona (**113**) mediante metodología descrita en la literatura.<sup>[153]</sup> **Rendimiento:** 0.03 g (0.07 mmol, 13 %); sólido blanco; **p.f.:** 129 – 131 °C (no se describe en la literatura consultada). Los datos espectroscópicos

coincidieron con los reportados por Mikulás y col.<sup>[153]</sup>

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 10.19 (s, 1H, -CHO); 2.53 (d, *J* = 17.3 Hz, 1H, H1); 2.42 (m, 1H, H4); 2.32 (m, 1H, H4); 2.03 – 1.96 (m, 1H, H12); 1.88 – 1.64 (m, 4H, H1, H7, H16, H8); 1.60 – 1.48 (m, 5H, H5, H6, H11, H16, H25); 1.39 - 1.32 (m, 4H, H11, H20, H22, H23); 1.29 – 1.20 (m, 3H, H6, H8, H16); 1.16 – 1.07 (m, 5H, H12, H14, H23, 2H24); 1.04 – 0.97 (m, 3H, H15, H17, H22); 0.90 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H, H21, H7); 0.87 (d, *J* = 1.7 Hz, 3H, H26); 0.85 (d, *J* = 1.7 Hz, 3H, H27); 0.74 (m, 1H, H9), 0.72 (s, 3H, H19); 0.66 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 191.6 (CHO); 150.0 (C3); 132.4 (C2); 56.41 (C14); 56.38 (C17); 53.6 (C9); 42.65 (C5); 42.62 (C13); 40.6 (C4); 39.9

(C12); 39.7 (C24); 38.0 (C1); 36.3 (C22); 35.9 (C20); 35.3 (C8); 34.3 (C10); 31.5 (C7); 28.3 (C16); 28.2 (C25); 27.9 (C6); 24.3 (C15); 24.0 (C23); 23.0 (C26); 22.7 (C27); 21.3 (C11); 18.8 (C21); 12.1 (C18); 11.8 (C19). **EM-IE:** m/z (%) = 432 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 48), 417 (15), 277 (100), 263 (30).

#### 5.4.3.- Síntesis de 3-cloro-2-formil-5 $\alpha$ -androst-2-en-17-ona

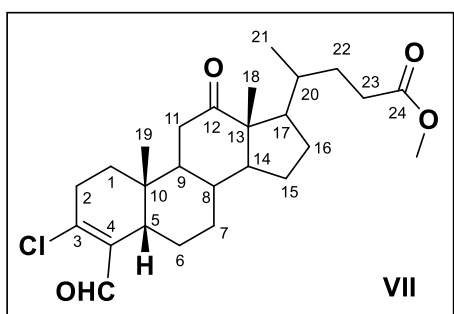


El compuesto **VI** fue obtenido mediante una metodología secuencial descrita en la literatura.<sup>[121]</sup>

**Rendimiento:** 0.3 g (0.9 mmol, 88 %); sólido blanco; **p.f.:** 141–142 °C (lit. p.f.: 140 – 142 °C). Los datos espectroscópicos coincidieron con los reportados por Ruiz y col.<sup>[121]</sup>

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 10.18 (s, 1H, CHO); 2.55 (d,  $J$  = 17.2 Hz, 1H, H1); 2.48 – 2.41 (m, 2H, H4, H16); 2.36 (m, 1H, H4); 2.07 (dt,  $J$  = 19.1, 9.0 Hz, 1H, H16); 1.94 (m, 1H, H15); 1.84 (m, 2H, H7, H12); 1.79 – 1.71 (m, 2H, H7, H11); 1.62 – 1.46 (m, 5H, H1, H8, H6, H5, H15); 1.41 (m, 1H, H11); 1.33 – 1.22 (m, 3H, H6, H12); 0.99 (m, 1H, H14); 0.87 (s, 3H, H18); 0.82 (m, 1H, H9); 0.76 (s, 3H, H19). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 220.9 (C17); 191.5 (CHO); 149.7 (C3); 132.2 (C2); 53.7 (C9); 51.4 (C14); 47.8 (C13); 42.6 (C5); 40.4 (C4); 38.0 (C1); 35.9 (C16); 35.1 (C8); 34.5 (C10); 31.6 (C12); 30.4 (C7); 27.5 (C6); 21.9 (C15); 20.6 (C11); 13.9 (C18); 11.8 (C19).

#### 5.4.4.- Síntesis de 3-cloro-4-formil-12-oxo-5 $\beta$ -colan-3-en-24-oato de metilo



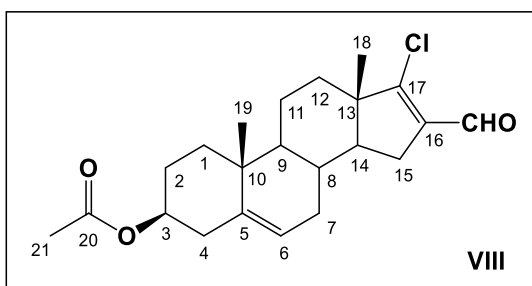
Para la obtención del compuesto **VII**, fue necesario sintetizar previamente la dicetona **117**, mediante una metodología secuencial descrita en la literatura.<sup>[150]</sup>

Sobre una disolución de 3,12-dioxo-5 $\beta$ -colan-24-oato de metilo (**117**) (0.2 g, 0.5 mmol) en 8 mL de diclorometano seco, se adicionó lentamente una mezcla fría (< 5 °C) de POCl<sub>3</sub> (0.11 mL, 1.2 mmol) y DMF (0.12 mL, 1.5 mmol), previamente preparada. Terminada la adición se dejó ascender la temperatura hasta temperatura ambiente y se calentó la reacción hasta 45 °C por 4 horas en atmósfera de argón, monitoreándose por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1). Posteriormente, se vertió lentamente la mezcla de reacción en una disolución de acetato de sodio (1 g en 10 mL de agua), y se agitó durante una hora. La mezcla se

extraído con DCM (2 x 10 mL), y la fase orgánica se lavó con agua (2 x 10 mL) y secado posterior con sulfato de sodio anhidro. El extracto orgánico se rotoevaporó y el sólido resultante se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil *n*-hexano – acetato de etilo (4:1). El producto **XVI** se aisló como un sólido amarillo pálido. **Rendimiento:** 0.16 g (0.36 mmol, 74 %); **p.f.:** 124 – 126 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.45 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 10.19 (s, 1H, –CHO); 3.65 (s, 3H, –OCH<sub>3</sub>); 2.66 – 2.57 (m, 1H, H11); 2.57 – 2.52 (m, 2H, H2); 2.48 (dtt, *J* = 9.7; 3.9; 1.9 Hz, 1H, H5); 2.38 (ddd, *J* = 15.3; 9.9; 5.3 Hz, 1H, H23); 2.24 (ddd, *J* = 15.8; 9.3, 6.8 Hz, 1H, H23); 2.10 (dq, *J* = 14.1; 4.7 Hz, 1H, H6); 2.05 – 1.98 (m, 2H, H11, H17); 1.95 – 1.87 (m, 1H, H16); 1.85 – 1.74 (m, 2H, H8, H22); 1.72 – 1.62 (m, 3H, H1, H6, H15); 1.57 (dq, *J* = 13.9; 4.7 Hz, 1H, H16); 1.50 – 1.43 (m, 2H, H1, H9); 1.37 (m, 1H, H22); 1.33 – 1.26 (m, 4H, H7, H14, H15, H20); 1.05 (s, 3H, H18); 1.03 (s, 3H, H19); 0.84 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H21); 0.70 (dt, *J* = 11.1; 4.5 Hz, 1H, H7). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 214.2 (C12); 192.5 (–CHO); 174.6 (C24); 151.0 (C3); 134.7 (C4); 58.6 (C14); 57.3 (C13); 51.4 (–OCH<sub>3</sub>); 46.5 (C9); 46.4 (C17); 43.2 (C5); 38.6 (C11); 35.5 (C20); 34.9 (C10); 34.4 (C8); 32.9 (C1); 32.7 (C2); 31.2 (C23); 30.5 (C22); 27.4 (C16); 27.3 (C7); 24.3 (C15); 22.7 (C6); 21.3 (C19); 18.6 (C21); 11.6 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 448 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 92), 293 (100), 121 (80), 81 (79). **HRMS:** *m/z* = 449.2453 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>26</sub>H<sub>38</sub>ClO<sub>4</sub>: 449.2453.

#### 5.4.5.- Síntesis de 3β-acetoxi-17-cloro-androst-5,16-dien-16-carboxaldehído



Este compuesto fue obtenido a partir de 3β-acetoxi-5-androsten-17-ona (**118**) (2 g, 6.1 mmol) mediante metodología descrita en la literatura.<sup>[89]</sup> **Rendimiento:** 1.4 g (3.7 mmol, 60 %); sólido blanco; **p.f.:** 179 – 181 °C (lit. p.f: 178-183 °C). Los datos espectroscópicos

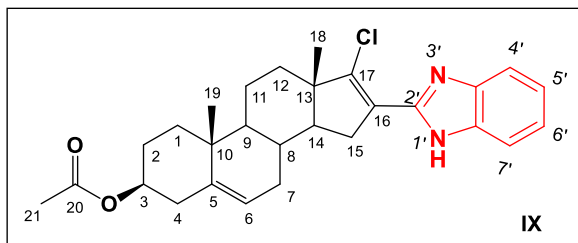
coincidieron con los reportados por Handratta y col.<sup>[89]</sup>

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 9.97 (s, 1H, CHO); 5.38 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H6); 4.59 (m, 1H, H3); 2.54 (dd, *J* = 14.8, 6.4 Hz, 1H, H15); 2.37 – 2.27 (m, 2H, H4); 2.09 – 2.05 (m, 2H, H7, H15); 2.02 (s, 3H, H21); 1.89 – 1.82 (m, 3H, H1, H2, H12); 1.75 – 1.66 (m, 3H, H7, H11, H14); 1.62 – 1.42 (m, 4H, H2, H8, H11, H12); 1.18 – 1.05 (m, 2H, H1,

H9); 1.05 (s, 3H, H19); 0.98 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 188.1 (CHO); 170.6 (C20); 162.3 (C17); 140.1 (C5); 136.6 (C16); 121.9 (C6); 73.8 (C3); 53.8 (C14); 50.7 (C13); 50.4 (C9); 38.2 (C4); 37.0 (C10); 36.9 (C1); 33.0 (C12); 30.9 (C7); 30.6 (C8); 28.6 (C15); 27.8 (C2); 21.5 (C21); 20.4 (C11); 19.3 (C19); 15.1 (C18).

## 5.5. Reactividad de β-cloro enaldehydos frente a *o*-fenilendiamina (Serie 2).

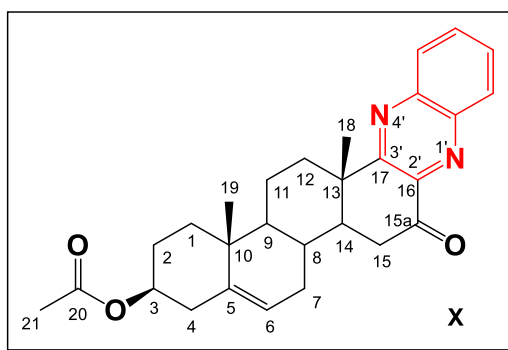
### 5.5.1.- Síntesis de 3β-acetoxi-17-cloro-16-(1*H*-benzimidazol-2-il)-androst-5,16-dieno



En un matraz redondo de 10 mL se mezclaron en cantidades equivalentes el derivado β-cloro enaldehydo **VIII** (100 mg, 0.27 mmol) y la *o*-fenilendiamina **40a** (29 mg, 0.27 mmol) en 4 mL de

metanol seco. Posteriormente se adicionó CAN (15 mg, 0.027 mmol) y Et<sub>3</sub>N (37 μL, 0.27 mmol) en ese orden. La mezcla se agitó a temperatura ambiente en presencia de dioxígeno. La reacción se siguió por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1) y se detuvo a las 48 horas por consumo de los materiales de partida. La mezcla se vertió sobre disolución acuosa fría de amoníaco (5%), dando lugar a un precipitado abundante que se filtró y lavó varias veces con agua. El sólido resultante se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (en gradiente de polaridad de 5:1 a 4:1). Se aisló mayoritariamente el producto **IX** como sólido amarillo pálido. **Rendimiento:** 92 mg (0.20 mmol, 75 %); **p.f.:** 120 – 123 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.30 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 12.10 (s, 1H, -NH); 7.60 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>); 7.55 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>); 7.17 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>); 5.38 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, H6); 4.45 (m, 1H, H3); 2.87 (dd, *J* = 14.5, 5.9 Hz, 1H, H15); 2.50 (m, 1H, H15); 2.35 – 2.22 (m, 2H, H4); 2.05 (m, 1H, H7); 1.99 (s, 3H, H21); 1.83 – 1.73 (m, 3H, H1, H2, H12); 1.71 – 1.59 (m, 4H, H7, H8, H11, H14); 1.56 – 1.47 (m, 2H, H2, H11); 1.41 (m, 1H, H12); 1.04 (m, 2H, H1, H9); 1.01 (s, 3H, H19); 0.96 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO, δ ppm): 169.7 (C20); 146.7 (C2'); 142.9 (C<sub>Ar</sub>); 142.2 (C17); 139.8 (C5); 134.4 (C<sub>Ar</sub>); 126.5 (C16); 122.7 (C5', C6'); 121.6 (C6); 118.7 (CH<sub>Ar</sub>); 111.8 (CH<sub>Ar</sub>); 73.1 (C3); 53.2 (C14); 49.6 (C9); 49.4 (C13); 37.7 (C4); 36.3 (C10); 36.2 (C1); 33.3 (C12); 32.9 (C15); 30.2 (C7); 29.9 (C8); 27.3 (C2); 21.0 (C21); 20.0 (C11); 18.8 (C19); 14.8 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 464 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 11), 404 (40), 389 (100), 369 (22). **HRMS:** m/z = 465.2302 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 465.2303.

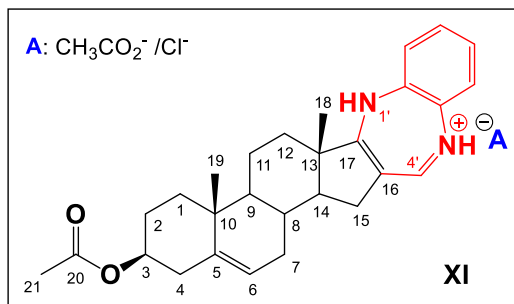
5.5.2.- Síntesis de 3 $\beta$ -acetoxi-15 $\alpha$ -oxo-15 $\alpha$ -Homo-5-androsten[16,17-*b*]quinoxalina

En un matraz redondo de 10 mL se mezclaron en cantidades equivalentes el derivado  $\beta$ -cloro enaldehído **VIII** (100 mg, 0.27 mmol) y la *o*-fenilendiamina **40a** (29 mg, 0.27 mmol) en 4 mL de metanol seco. Posteriormente se adicionó CAN (15 mg, 0.027 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura

ambiente en presencia de dioxígeno, y se monitoreó por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1). Después de 1.5 horas se detiene la agitación por consumo de los materiales de partida y la disolución morada resultante se vertió sobre disolución acuosa fría de amoníaco (5%), dando lugar a un precipitado abundante que se filtró y lavó varias veces con agua. El sólido resultante se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (en gradiente de polaridad de 3:1 a 2:1). Se aisló el producto **X** como sólido amarillo pálido. **Rendimiento:** 49 mg (0.11 mmol, 42 %); **p.f.:** 132 – 135 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.22 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): 8.19 (ddd,  $J$  = 8.3, 1.5, 0.6 Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>); 8.09 (ddd,  $J$  = 8.4, 1.5, 0.6 Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>); 7.94 (ddd,  $J$  = 8.4, 6.9, 1.6 Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>); 7.87 (ddd,  $J$  = 8.3, 6.9, 1.5 Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>); 5.42 (m, 1H, H<sub>6</sub>); 4.52 (m, 1H, H<sub>3</sub>); 2.94 (dd,  $J$  = 18.4, 4.5 Hz, 1H, H<sub>15</sub>); 2.80 (m, 1H, H<sub>12</sub>); 2.73 (dd,  $J$  = 18.4, 13.5 Hz, 1H, H<sub>15</sub>); 2.38 – 2.24 (m, 3H, 2H<sub>4</sub>, H<sub>7</sub>); 2.05 (m, 1H, H<sub>14</sub>); 1.99 (s, 3H, H<sub>21</sub>); 1.95 (m, 1H, H<sub>1</sub>); 1.90 – 1.82 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>11</sub>); 1.77 (m, 1H, H<sub>8</sub>); 1.71 – 1.59 (m, 4H, H<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>); 1.30 (s, 3H, H<sub>18</sub>). 1.23 – 1.14 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>9</sub>); 1.11 (s, 3H, H<sub>19</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO,  $\delta$  ppm): 194.5 (C<sub>15a</sub>); 168.8 (C<sub>20</sub>); 164.1 (C<sub>17</sub>); 142.2 (C<sub>16</sub>); 141.7 (C<sub>Ar</sub>); 140.5 (C<sub>Ar</sub>); 139.0 (C<sub>5</sub>); 131.6 (CH<sub>Ar</sub>); 129.6 (CH<sub>Ar</sub>); 129.5 (CH<sub>Ar</sub>); 128.0 (CH<sub>Ar</sub>); 120.7 (C<sub>6</sub>); 72.7 (C<sub>3</sub>); 48.3 (C<sub>9</sub>); 44.4 (C<sub>14</sub>); 39.7 (C<sub>13</sub>); 38.7 (C<sub>15</sub>); 37.0 (C<sub>4</sub>); 35.9 (C<sub>10</sub>); 35.7 (C<sub>1</sub>); 34.2 (C<sub>12</sub>); 31.5 (C<sub>8</sub>); 30.0 (C<sub>7</sub>); 26.8 (C<sub>2</sub>); 20.2 (C<sub>21</sub>); 19.3 (C<sub>18</sub>); 19.2 (C<sub>11</sub>); 18.2 (C<sub>19</sub>). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 444 (M<sup>+</sup>, 11), 430 (4), 384 (100), 369 (39). **HRMS:**  $m/z$  = 445.2482 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>28</sub>H<sub>33</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 445.2482.

5.5.3.- Síntesis de la sal mixta trifluoroacetato/cloruro (3:2) de 1H-benzo[b](3β-acetoxi-5-androsten)[17,16-e][1,4]diazepino

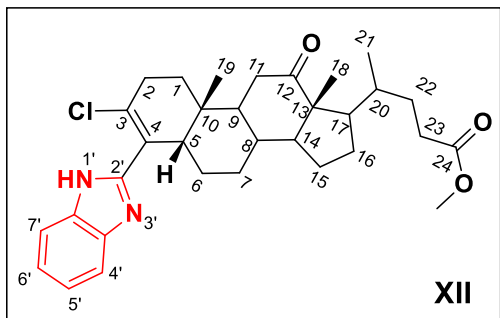


En un matraz redondo de 10 mL se mezclaron en cantidades equivalentes el derivado β-cloro enaldehído **VIII** (50 mg, 0.13 mmol) y la *o*-fenilendiamina **40a** (14 mg, 0.13 mmol) en 2 mL de THF seco. Posteriormente se adicionó TFA (10 μL, 0.13 mmol), y la

mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después de 1 hora se detiene la reacción y se rotoevaporó el disolvente. El sólido resultante se lavó con una mezcla de n-hexano: dietiléter. Se aisló el producto **XI** como sólido morado en forma de sal mixta. **Rendimiento:** 70 mg (0.12 mmol, 97 %); **p.f.:** 190 – 194 °C.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 9.95 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, CH=NH); 9.54 (s, 1H, -NH); 6.78 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>); 6.67 (m, 1H, H<sub>Ar</sub>); 6.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, CH=NH); 6.28 (m, 1H, H<sub>Ar</sub>); 5.33 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>); 4.44 (m, 1H, H<sub>3</sub>); 2.33 - 2.27 (m, 2H, H<sub>4</sub>); 2.16 (m, 1H, H<sub>7</sub>); 1.97 (s, 3H, H<sub>21</sub>); 1.94 (m, 1H, H<sub>15</sub>); 1.89 – 1.84 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>12</sub>); 1.79 (m, 1H, H<sub>2</sub>); 1.69 (m, 1H, H<sub>15</sub>); 1.59 – 1.45 (m, 4H, H<sub>2</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>12</sub>); 1.36 (m, 1H, H<sub>11</sub>); 1.27 – 1.22 (m, 2H, H<sub>7</sub>, H<sub>14</sub>); 1.05 (m, 1H, H<sub>1</sub>); 1.03 (s, 3H, H<sub>18</sub>). 0.96 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 0.93 (m, 1H, H<sub>9</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO, δ ppm): 191.6 (C<sub>17</sub>); 169.8 (C<sub>20</sub>); 161.1 (CH=N); 158.4 (q, <sup>2</sup>*J* = 37.7 Hz, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 139.8 (C<sub>5</sub>); 135.9 (C<sub>Ar</sub>); 134.6 (C<sub>Ar</sub>); 129.9 (CH<sub>Ar</sub>); 129.3 (CH<sub>Ar</sub>); 124.7 (CH<sub>Ar</sub>); 123.8 (CH<sub>Ar</sub>); 121.5 (C<sub>6</sub>); 116.8 (q, <sup>1</sup>*J* = 290.1 Hz, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>), 103.1 (C<sub>16</sub>); 73.1 (C<sub>3</sub>); 50.2 (C<sub>14</sub>); 48.9 (C<sub>13</sub>); 48.7 (C<sub>9</sub>); 37.6 (C<sub>4</sub>); 36.3 (C<sub>1</sub>); 36.1 (C<sub>10</sub>); 30.9 (C<sub>7</sub>); 30.3 (C<sub>12</sub>); 29.7 (C<sub>8</sub>); 28.9 (C<sub>15</sub>); 27.3 (C<sub>2</sub>); 21.1 (C<sub>21</sub>); 19.8 (C<sub>11</sub>); 18.8 (C<sub>19</sub>); 14.5 (C<sub>19</sub>). **RMN-<sup>19</sup>F** (376 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): -74.25. **EM-IE:** m/z (%) = 430 (M<sup>+</sup>, 11), 370 (68), 355 (100), 197 (48). **HRMS:** m/z = 431.2692 [MH]<sup>+</sup>; calculada para [C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 431.2693.

### 5.5.4.- Síntesis de 4-(1H-benzimidazol-2-il)-3-cloro-12-oxo-5 $\beta$ -colan-3-en-24-oato de metilo

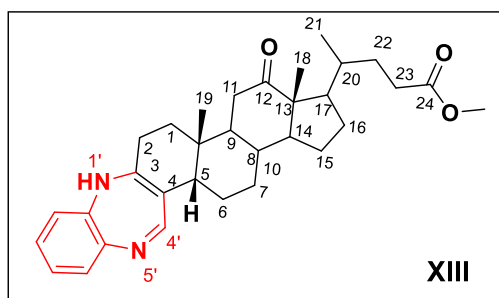


En un matraz redondo de 10 mL se mezclaron en cantidades equivalentes el 3-cloro-4-formil-12-oxo-5 $\beta$ -colan-3-en-24-oato de metilo **VII** (90 mg, 0.2 mmol) y la *o*-fenilendiamina **40a** (22 mg, 0.2 mmol) en 3 mL de metanol seco. Posteriormente se adicionó CAN (11 mg, 0.02 mmol), y la mezcla se agitó a temperatura

ambiente en presencia de dioxígeno. La reacción se siguió por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1) y se detuvo por consumo de los materiales de partida a las 9 horas después de iniciada. La mezcla se vertió sobre disolución acuosa fría de amoniac (5%), dando lugar a un precipitado abundante que se filtró y lavó varias veces con agua. El sólido resultante se purificó por cromatografía en columna a presión, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (2:1). Se aisló el compuesto **XII** como sólido amarillo pálido. **Rendimiento:** 75 mg (0.14 mmol, 70 %); **p.f.:** 170 – 173 °C; **R<sub>f</sub>**=0.35 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$  ppm): 12.42 (sa, 1H, –NH); 7.51 (sa, 2H, H4', H7'); 7.14 (sa, 2H, H5', H6'); 3.58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O–); 2.72 – 2.61 (m, 2H, H5, H11); 2.43 – 2.31 (m, 3H, 2H<sub>22</sub>, H<sub>23</sub>); 2.22 (m, 1H, H<sub>23</sub>); 1.98 (dd, *J* = 12.6; 4.3 Hz, 1H, H<sub>11</sub>); 1.88 (m, 1H, H<sub>17</sub>); 1.81 – 1.67 (m, 4H, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>16</sub>); 1.65 – 1.50 (m, 4H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>15</sub>); 1.32 – 1.15 (m, 6H, H<sub>1</sub>, H<sub>6</sub>, H<sub>7</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>20</sub>); 1.10 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 1.02 (m, 1H, H<sub>15</sub>); 0.98 (s, 3H, H<sub>18</sub>); 0.89 (m, 1H, H<sub>7</sub>); 0.77 (d, *J* = 5.6 Hz, 3H, H<sub>21</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO,  $\delta$  ppm): 213.4 (C<sub>12</sub>); 173.6 (C<sub>24</sub>); 149.8 (C<sub>3</sub>); 133.4 (C<sub>4</sub>); 129.7 (C<sub>2'</sub>); 121.5 (2 x CH<sub>Ar</sub>); 57.9 (C<sub>14</sub>); 56.8 (C<sub>13</sub>); 51.2 (CH<sub>3</sub>O–); 46.9 (C<sub>5</sub>); 46.1 (C<sub>9</sub>); 44.7 (C<sub>17</sub>); 38.2 (C<sub>11</sub>); 35.0 (C<sub>20</sub>); 34.4 (C<sub>10</sub>); 34.3 (C<sub>8</sub>); 33.7 (C<sub>2</sub>); 30.7 (C<sub>23</sub>); 30.3 (C<sub>1</sub>, C<sub>22</sub>); 26.9 (C<sub>16</sub>); 26.5 (C<sub>7</sub>); 23.8 (C<sub>6</sub>, C<sub>15</sub>); 21.3 (C<sub>19</sub>); 18.6 (C<sub>21</sub>); 11.2 (C<sub>18</sub>). **EM-IE:** m/z (%) = 536 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 98), 521 (20), 501 (100), 245 (78). **HRMS:** m/z = 537.2878 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 537.2878.

5.5.5.- Síntesis de 1H-benzo[b](12-oxo-23-metoxicarbonil-5β-colan)[3,4-e][1,4]diazepina



En un matraz redondo de 10 mL se mezclaron en cantidades equivalentes el 3-cloro-4-formil-12-oxo-5β-colan-3-en-24-oato de metilo **VII** (50 mg, 0.11 mmol) y la *o*-fenilendiamina **40a** (12 mg, 0.11 mmol) en 2 mL de THF seco. Posteriormente se adicionó TFA (9 μL, 0.11

mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón. Después de 3 hora se detiene la reacción y se rotoevaporó el disolvente. El crudo se disolvió en MeOH y se adicionó gota a gota una disolución acuosa de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (25 %) hasta pH ~ 10. El precipitado formado se filtró y lavó con abundante agua. Se aisló el producto **XIII** como sólido morado. **Rendimiento:** 45 mg (0.09 mmol, 80 %); **p.f.:** 183 – 186 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.10 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:3).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 9.27 (sa, 1H, –NH); 7.02 (s, 1H, CH=N); 7.01 (m, 1H, H<sub>Ar</sub>); 6.94 (td, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H, H<sub>Ar</sub>); 6.49 (ddd, *J* = 8.1, 6.7, 1.5 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>); 3.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O–); 2.55 (m, 1H, H11); 2.36 – 2.29 (m, 2H, H22); 2.24 – 2.16 (m, 2H, H2); 1.90 – 1.79 (m, 5H, H5, H6, H11, H16, H17); 1.76 – 1.65 (m, 3H, H8, H15, H22); 1.58 – 1.42 (m, 4H, H1, H7, H9); 1.36 – 1.18 (m, 6H, H6, H7, H14, H15, H16, H20); 1.04 (m, 1H, H1); 1.00 (s, 3H, H19); 0.96 (s, 3H, H18); 0.72 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H, H21).

**RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO, δ ppm): 213.1 (C12); 181.9 (C3); 173.3 (C24); 170.7 (CH=N); 138.8 (C<sub>Ar</sub>); 136.9 (C<sub>Ar</sub>); 129.7 (CH<sub>Ar</sub>); 128.0 (CH<sub>Ar</sub>); 123.7 (CH<sub>Ar</sub>); 123.6 (CH<sub>Ar</sub>); 107.2 (C4); 57.2 (C14); 56.7 (C13); 51.2 (CH<sub>3</sub>O–); 46.2 (C17); 44.1 (C9); 42.3 (C5); 37.7 (C11); 34.9 (C20); 34.2 (C8); 33.7 (C10); 30.9 (C23); 30.7 (C22); 30.6 (C2); 30.3 (C1); 27.0 (C6, C16); 25.7 (C7); 23.8 (C15); 21.7 (C19); 18.6 (C21); 11.2 (C18).

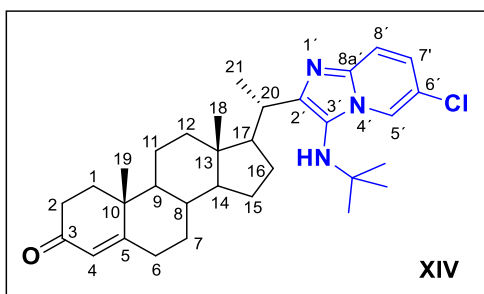
**EM-IE:** m/z (%) = 502 (M<sup>+</sup>, 27), 487 (8), 347 (12), 118 (100). **HRMS:** m/z = 503.3266 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>32</sub>H<sub>43</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 503.3268.

### 5.6. Obtención de híbridos Imidazo[1,2-*a*]piridina-esteroide (Serie 3)

#### Procedimiento general:

En un matraz redondo de 10 mL se mezclaron en cantidades equimolares el aldehído esteroideal correspondiente (**67**, **VII** o **VIII**) y 2-amino-5-cloro-piridina (**107**) en 5 mL de acetonitrilo seco. Posteriormente se adicionaron CAN (10% mol) y el correspondiente isonitrilo **108a-d** (103 % mol), en ese orden. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (~ 80 °C) bajo atmósfera de argón, y se siguió por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1). Una vez finalizada la reacción (los tiempos se especifican para cada producto) por consumo de los materiales de partida, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La mezcla se vertió sobre disolución fría de amoníaco (5%), dando lugar a un precipitado abundante que se filtró y lavó varias veces con agua. El sólido resultante se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (la proporción se especifica para cada compuesto).

#### 5.6.1- Síntesis de (20*S*)-[3-(*ter*-butilamino)-6-cloroimidazo[1,2-*a*]piridin-2-il]-4-pregnen-3-ona



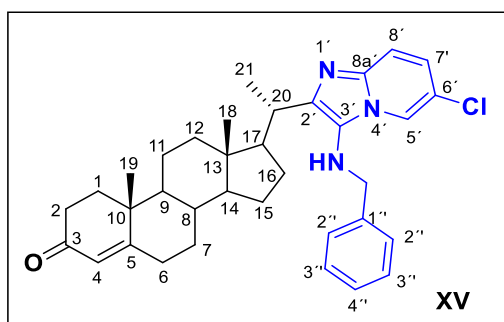
Compuesto obtenido a partir del aldehído esteroideal **67** (100 mg, 0.3 mmol), 2-amino-5-cloropiridina **107** (39 mg, 0.3 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (36  $\mu$ L, 0.31 mmol) y CAN (17 mg, 0.03 mmol), en un tiempo de reacción de 5h. Para su purificación se empleó como

eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo en gradiente creciente de polaridad (3:1 a 1:1). **Rendimiento:** 115 mg (0.22 mmol, 73%); sólido amarillo pálido; **p.f.:** 210 °C (descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.23 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8.15 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H5'); 7.40 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H8'); 7.01 (dd, *J* = 9.4, 2.0 Hz, 1H, H7'); 5.70 (s, 1H, H4); 2.93 (dq, *J* = 10.5, 6.7 Hz, 1H, H20); 2.66 (s, 1H, -NH); 2.43 – 2.30 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H6); 2.23 (ddd, *J* = 14.5, 3.9, 2.2 Hz, 1H, H6); 2.11 (m, 1H, H12); 2.02 (ddd, *J* = 14.2, 5.0, 3.3 Hz, 1H, H1); 1.94 (q, *J* = 9.8 Hz, 1H, H17); 1.79 (m, 1H, H7); 1.72 (m, 1H, H1); 1.55 (m, 2H, H8, H11); 1.47 (m, 2H, H11, H15); 1.42 (m, 1H, H12); 1.38 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H21); 1.24 (m, 1H, H16); 1.21 (s, 9H, *t*-Bu); 1.19 (s, 3H, H19); 1.10 (m, 1H, H14); 1.05 (m, 1H, H15); 1.01 (m, 1H, H7); 0.97 (m, 1H, H9); 0.91 (m, 1H, H16); 0.82 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.6 (C3); 171.5 (C5); 147.6 (C2'); 140.6 (C8a'); 124.6 (C7'); 123.9

(C4); 122.7 (C3'); 121.4 (C5'); 119.3(C6'); 117.3 (C8'); 55.7 (C17, C14); 55.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-] 53.8 (C9); 42.5 (C13); 39.5 (C12); 38.7 (C10); 35.84 (C8); 35.78 (C1); 34.1 (C2); 34.0 (C20); 33.0 (C6); 32.0 (C7); 30.7 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 28.5 (C16); 24.1 (C15); 21.2 (C11); 20.3 (C21); 17.5 (C19); 12.3 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 521 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 45), 464 (100), 437 (57), 194 (40). **HRMS:** m/z = 522.3238 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>32</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>3</sub>O: 522.3246.

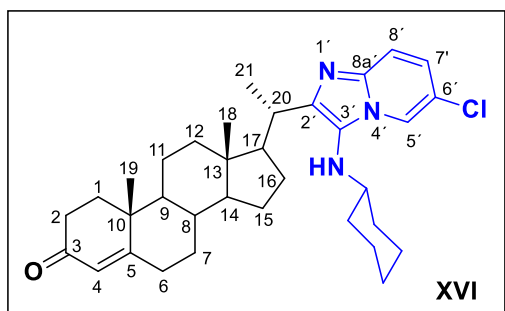
### 5.6.2.- Síntesis de (20S)-[3-(bencilamino)-6-cloroimidazo[1,2-a]piridin-2-il]-4-pregnen-3-ona



Compuesto obtenido a partir de aldehído esteroideal **67** (100 mg, 0.3 mmol), 2-amino-5-cloropiridina **107** (39 mg, 0.3 mmol), bencilisonitrilo **108b** (38 μL, 0.31 mmol) y CAN (17 mg, 0.03 mmol), en un tiempo de reacción de 5h. Para su purificación se empleó como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (1:1). **Rendimiento:** 123 mg (0.22 mmol, 72%); sólido verde pálido; **p.f.:** 200 °C (descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.25 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.91 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H5'); 7.39 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H8'); 7.35 – 7.26 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>); 6.99 (dd, *J* = 9.5, 2.0 Hz, 1H, H7'); 5.69 (s, 1H, H4); 4.12 (dd, *J* = 10.5, 5.6 Hz, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-); 3.29 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, -NH); 2.76 (dq, *J* = 10.6, 6.7 Hz, 1H, H20); 2.43 – 2.30 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H6); 2.23 (ddd, *J* = 14.7, 4.2, 2.3 Hz, 1H, H6); 2.07 (m, 1H, H12); 2.02 (m, 1H, H1); 1.93 (q, *J* = 9.5 Hz, 1H, H17); 1.79 (m, 1H, H7); 1.70 (m, 1H, H1); 1.53 (m, 1H, H11); 1.50 (m, 1H, H8); 1.47 (m, 2H, H11, H15); 1.38 (m, 1H, H12); 1.33 (m, 1H, H16); 1.22 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H21); 1.18 (s, 3H, H19); 1.08 (m, 1H, H14); 1.05 (m, 1H, H15); 1.01 (m, 1H, H7); 0.94 (m, 2H, H9, H16); 0.78 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 199.6 (C3); 171.6 (C5); 145.8 (C2'); 139.9 (C8a'); 139.4 (C1''); 128.8 (C3''); 128.4 (C2''); 127.8 (C4''); 124.6 (C3'); 124.3 (C7'); 123.9 (C4); 120.3 (C5'); 119.6 (C6'); 117.5 (C8'); 55.7 (C14); 54.9 (C17); 53.8 (C9); 53.3 (NH-CH<sub>2</sub>); 42.5 (C13); 39.5 (C12); 38.7 (C10); 35.8 (C8); 35.7 (C1); 34.4 (C20); 34.1 (C2); 33.0 (C6); 32.0 (C7); 28.8 (C16); 24.2 (C15); 21.1 (C11); 20.7 (C21); 17.5 (C19); 12.2 (C18). **EM-IE:** m/z (%) = 555 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 28), 464 (100), 437 (74), 194 (24). **HRMS:** m/z = 556.3080 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>35</sub>H<sub>43</sub>ClN<sub>3</sub>O: 556.3089.

### 5.6.3.- Síntesis de (20S)-[3-(ciclohexilamino)-6-cloroimidazo[1,2-a]piridin-2-il]-4-pregnen-3-ona

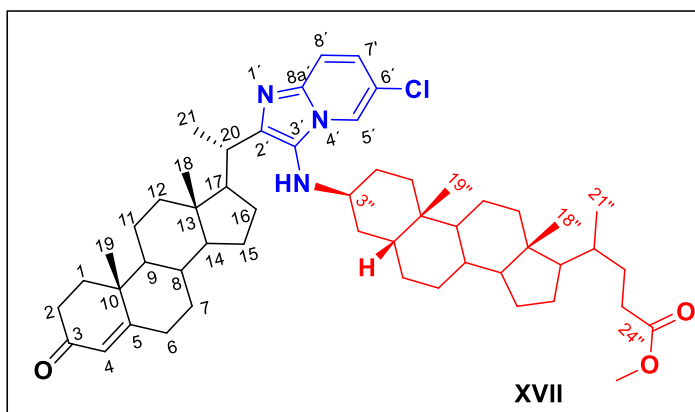


Compuesto obtenido a partir de aldehído esteroideal **67** (100 mg, 0.3 mmol), 2-amino-5-cloropiridina **107** (39 mg, 0.3 mmol), ciclohexilisonitrilo **108c** (39  $\mu$ L, 0.31 mmol) y CAN (17 mg, 0.03 mmol), en un tiempo de reacción de 5h. Para su purificación se empleó

como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (2:1). **Rendimiento:** 104 mg (0.19 mmol, 62%); sólido amarillo oscuro; **p.f.:** 189 - 191 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.29 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8.04 (dd, *J* = 2.1, 0.8 Hz, 1H, H5'); 7.41 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H8'); 7.01 (dd, *J* = 9.5, 2.0 Hz, 1H, H7'); 5.71 (s, 1H, H4); 2.87 (m, 2H, H20, CH-Ciclohex.); 2.77 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, -NH); 2.43 – 2.32 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H6); 2.26 (m, 1H, H6); 2.12 (m, 1H, H12); 2.04 (m, 1H, H1); 2.01 (m, 1H, H17); 1.90 – 1.70 (m, 6H, CH<sub>2</sub>-Ciclohex., H7, H1); 1.65 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-Ciclohex.); 1.56 (m, 1H, H11); 1.54 – 1.40 (m, 4H, H8, H11, H15, H12); 1.34 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H21); 1.32 (m, 1H, H16); 1.30 – 1.21 (m, 5H, CH<sub>2</sub>-Ciclohex.); 1.20 (s, 3H, H19); 1.13 (m, 1H, H14); 1.07 (m, 1H, H15); 0.99 (m, 1H, H7); 0.96 (m, 2H, H9, H16); 0.85 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.7 (C3); 171.5 (C5); 145.7 (C2'); 141.0 (C8a'); 124.0 (C4); 123.9 (C7'); 123.7 (C3'); 120.7 (C5'); 117.2 (C8'); 57.4 (CH-Ciclohex.); 55.7 (C14); 55.1 (C17); 53.8 (C9); 42.6 (C13); 39.5 (C12); 38.7 (C10); 35.9 (C8); 35.8 (C1); 34.5 (CH<sub>2</sub>-Ciclohex.); 34.4 (C2); 34.15 (C20); 34.12 (CH<sub>2</sub>-Ciclohex.); 33.0 (C6); 32.1 (C7); 28.7 (C16); 25.9 (CH<sub>2</sub>-Ciclohex.); 25.1 (CH<sub>2</sub>-Ciclohex.); 25.0 (CH<sub>2</sub>-Ciclohex.); 24.2 (C15); 21.2 (C11); 20.7 (C21); 17.6 (C19); 12.3 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 547 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 100), 464 (27), 437 (35), 194 (44). **HRMS:** *m/z* = 548.3402 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>ClN<sub>3</sub>O: 548.3402.

5.6.4.- Síntesis de (20S)-[3-(23-metoxicarbonil-5β-colan-3β-amino)-6-cloroimidazo[1,2-a]piridin-2-il]-4-pregnen-3-ona

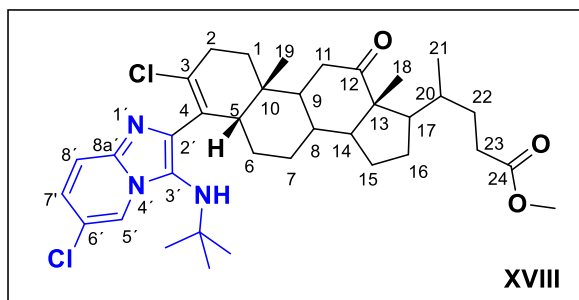


Compuesto obtenido a partir de aldehído esteroideal **67** (61 mg, 0.19 mmol), 2-amino-5-cloropiridina **107** (24 mg, 0.19 mmol), 3β-isociano-5β-colano-24-ato de metilo<sup>[156]</sup> (**108d**), (81 mg, 0.20 mmol) y CAN (10 mg, 0.019 mmol), en un tiempo de

reacción de 5h. Para su purificación se empleó como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo en gradiente creciente de polaridad de (2:1) a (1:1). **Rendimiento:** 107 mg (0.13 mmol, 70%); sólido amarillo pálido; **p.f.:** 145 °C (descompone); **R<sub>f</sub>** = 0.27 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.96 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H5'); 7.41 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H8'); 7.00 (dd, *J* = 9.5, 2.1 Hz, 1H, H7'); 5.71 (s, 1H, H4); 3.65 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.39 (s.a, 1H, H3''); 3.03 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H, -NH); 2.90 (m, 1H, H20); 2.42 – 2.31 (m, 3H, 2H2, H6); 2.26 (m, 1H, H6); 2.10 (m, 1H, H12); 2.04 – 1.95 (m, 2H, H1, H17); 1.87 – 1.72 (m, 3H, H1, H7, H16); 1.62 - 1.51 (m, 3H, H8, H11, H15); 1.42 (m, 2H, H11, H12); 1.32 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, H21); 1.24 (m, 1H, H16); 1.19 (s, 3H, H19); 1.10 (m, 2H, H14, H15); 1.04 (s, 3H, H19''); 1.01 (m, 1H, H7); 0.97 (m, 1H, H9); 0.90 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, H21''); 0.84 (s, 3H, H18); 0.66 (s, 3H, H18''). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 199.8 (C3); 174.9 (C24''); 171.7 (C5); 145.8 (C2'); 140.0 (C8a'); 124.5 (C3'); 124.1 (C7'); 123.9 (C4); 120.6 (C5'); 119.6 (C6'); 117.2 (C8'); 56.7 (CH); 56.1 (CH); 55.7 (C14); 55.1 (C17); 53.8 (C9); 52.5 (C3''); 51.6 (-OCH<sub>3</sub>); 42.9 (C13); 42.5 (C13''); 40.3 (CH<sub>2</sub>); 40.1 (CH); 39.5 (C12); 38.7 (C10); 37.6 (CH); 35.8 (C8); 35.7 (C1); 35.5 (CH); 35.4 (C10''); 34.1 (C2); 34.0 (C20); 33.0 (C6); 32.0 (C7); 31.9 (CH<sub>2</sub>); 31.2 (CH<sub>2</sub>); 31.1 (CH<sub>2</sub>); 30.8 (CH<sub>2</sub>); 28.7 (CH<sub>2</sub>); 28.3 (C16); 26.9 (CH<sub>2</sub>); 26.4 (CH<sub>2</sub>); 25.6 (CH<sub>2</sub>); 24.4 (C19''); 24.3 (C15); 24.2 (CH<sub>2</sub>); 21.2 (C11); 20.8 (C21); 18.4 (C21''); 17.5 (C19); 12.23 (C18); 12.20 (C18''). **EM-IE:** *m/z* (%) = 838 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 100), 566 (5), 437 (10), 194 (25). **HRMS:** *m/z* = 838.5652 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>53</sub>H<sub>77</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 838.5648.

**5.6.5.- Síntesis de 4-[3-(*ter*-butilamino)-6-cloroimidazo[1,2-*a*]piridin-2-il]-3-cloro-12-oxo-5 $\beta$ -colan-3-en-24-oato de metilo**

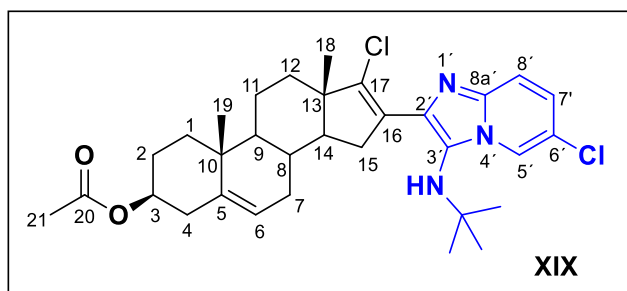


Compuesto obtenido a partir del 3-cloro-4-formil-12-oxo-5 $\beta$ -colan-3-en-24-oato de metilo **VII** (90 mg, 0.20 mmol), 2-amino-5-cloropiridina **107** (26 mg, 0.20 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (23  $\mu$ L, 0.21 mmol) y CAN (11 mg, 0.02 mmol),

en un tiempo de reacción de 24h. Para su purificación se empleó como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (3:1). **Rendimiento:** 50 mg (0.08 mmol, 39%); sólido marrón pálido, **p.f.:** 157 - 159 °C; **R<sub>f</sub>** = 0.24 (*n*-hexano: acetato de etilo 3:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8.16 (s, 1H, H5'); 7.40 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H, H8'); 7.04 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H, H7'); 3.66 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.15 (s.a, 1H, -NH); 2.62 – 2.49 (m, 3H, H2, H5, H11); 2.42 – 2.33 (m, 2H, H23); 2.25 (ddd, *J* = 15.8, 9.3, 6.8 Hz, 1H, H2); 2.10 – 1.99 (m, 2H, H11, H17); 1.95 – 1.84 (m, 3H, H9, H16, H22); 1.72 – 1.62 (m, 3H, H1, H6, H15); 1.54 (m, 3H, H1, H6, H14); 1.40 (m, 1H, H22); 1.35 – 1.22 (m, 5H, H7, H15, H16, H8, H20); 1.18 (s, 10H, H7, *t*-Bu); 1.13 (s, 3H, H19); 1.02 (s, 3H, H18); 0.86 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H21). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 214.0 (C12); 174.8 (C24); 140.0 (C8a'); 139.5 (C3); 134.0 (C2'); 130.6 (C4); 124.8 (C7'); 124.2 (C3'); 121.1 (C5'); 119.9 (C6'); 118.1 (C8'); 57.7 (C14); 57.5 (C13); 55.7 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 51.6 (-OCH<sub>3</sub>); 47.6 (C5); 46.6 (C17); 44.8 (C9); 38.8 (C11); 35.8 (C20); 35.3 (C8); 35.1 (C10); 34.8 (C1); 31.5 (C23); 30.8 (C2); 30.7 (C22); 30.5 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 27.6 (C16); 26.9 (C7); 24.9 (C15); 24.3 (C6); 22.4 (C19); 18.8 (C21); 11.8 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 641 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 50), 585 (78), 549 (100), 294 (19). **HRMS:** *m/z* = 642.3224 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>36</sub>H<sub>50</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 642.3224.

### 5.6.6.- Síntesis de 16-[3-(*ter*-butilamino)-6-cloroimidazo[1,2-*a*]piridin-2-il]-3 $\beta$ -acetoxi-17-cloro-5,16-androstandieno



Compuesto obtenido a partir del 3 $\beta$ -acetoxi-17-cloro-16-formil-androst-5,16-dieno **VIII** (80 mg, 0.21 mmol), 2-amino-5-cloro-piridina **107** (27 mg, 0.21 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (25  $\mu$ L, 0.22

mmol) y CAN (11 mg, 0.02 mmol), en un tiempo de reacción de 5h. Para su purificación se empleó como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (4:1). **Rendimiento:** 102 mg (0.18 mmol, 84%), sólido rosado pálido, **p.f.:** 182 - 185 °C, **R<sub>f</sub>** = 0.23 (*n*-hexano: acetato de etilo 4:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 8.27 (dd,  $J = 2.1, 0.8$  Hz, 1H, H5 $\wedge$ ); 7.40 (dd,  $J = 9.5, 0.8$  Hz, 1H, H8 $\wedge$ ); 7.06 (dd,  $J = 9.5, 2.1$  Hz, 1H, H7 $\wedge$ ); 5.41 (d,  $J = 4.9$  Hz, 1H, H6); 4.61 (tdd,  $J = 10.5, 6.0, 4.4$  Hz, 1H, H3); 3.33 (s, 1H, -NH); 2.81 (dd,  $J = 14.5, 5.0$  Hz, 1H, H15); 2.59 (dd,  $J = 14.3, 10.8$  Hz, 1H, H15); 2.40 – 2.27 (m, 2H, H4); 2.07 (m, 1H, H7); 2.03 (s, 3H, H21); 1.88 (m, 1H, H2); 1.85 (m, 2H, H1, H12); 1.74 (m, 2H, H8, H14); 1.69 (m, 2H, H7, H11); 1.62 (dt,  $J = 12.6, 4.0$  Hz, 1H, H2); 1.56 (dt,  $J = 13.4, 4.6$  Hz, 1H, H11); 1.43 (td,  $J = 12.4, 4.7$  Hz, 1H, H12); 1.16 (m, 1H, H1); 1.14 (m, 1H, H9); 1.09 (s, 9H, *t*-Bu); 1.08 (s, 3H, H19); 1.01 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 170.6 (C20); 140.8 (C8a $\wedge$ ); 140.1 (C5); 139.6 (C17); 136.1 (C2 $\wedge$ ); 131.3 (C16); 125.7 (C7 $\wedge$ ); 125.3 (C3 $\wedge$ ); 122.3 (C6); 121.7 (C5 $\wedge$ ); 119.9 (C6 $\wedge$ ); 117.6 (C8 $\wedge$ ); 73.9 (C3); 56.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 55.1 (C14); 50.5 (C9); 49.3 (C13); 38.2 (C4); 37.0 (C1, C10); 35.3 (C15); 34.3 (C12); 31.1 (C7); 30.7 (C8); 29.8 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 27.9 (C2); 21.6 (C21); 20.6 (C11); 19.4 (C19); 14.8 (C18). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 569 (M<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl: 48), 512 (100), 498 (41), 485 (41). **HRMS:**  $m/z = 570.2646$  [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>32</sub>H<sub>42</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 570.2649.

## 5.7. Obtención de híbridos quinoxalina-esteroide (Serie 4)

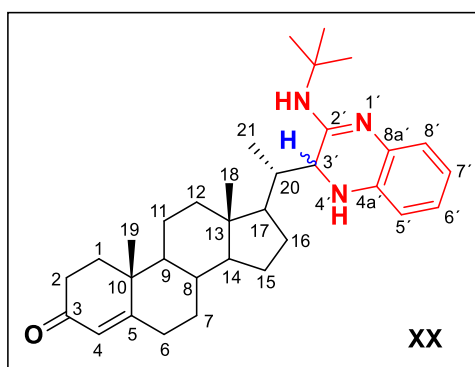
### 5.7.1. - Síntesis de los quinoxalinas exocíclicas XX y XXI

#### Método A:

En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron en cantidades equimolares el aldehído esteroideal **67** (100 mg, 0.3 mmol) y *o*-fenilendiamina **40a** (33 mg, 0.3 mmol) en 5 mL de acetonitrilo seco. Posteriormente se adicionaron *ter*-butilisonitrilo **108a** (36  $\mu$ L, 0.32 mmol) y CAN (17 mg, 0.03 mmol), en ese orden. La mezcla de reacción se calentó

a reflujo (~ 80 °C) bajo atmósfera de argón por 3h y posteriormente bajo atmósfera de O<sub>2(g)</sub> por 48 h, siguiéndose por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1). Una vez concluida se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Se rotoevaporó hasta un volumen mínimo de disolvente y la mezcla se adicionó sobre disolución fría de amoníaco (5 %). El precipitado formado se filtró y lavó con abundante agua. El sólido resultante se purificó por cromatografía en columna, y se empleó como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo en gradiente creciente de polaridad de (5:1) a (1:1). Fueron aislados dos compuestos, los cuales se relacionan a continuación:

**(20S)-[3(R/S)-2-(*ter*-butilamino)-3,4-dihidroquinoxalin-3-il]-4-pregnen-3-ona**



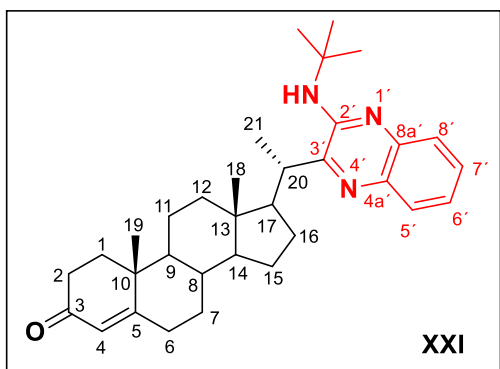
**Rendimiento:** 50 mg (0.10 mmol, 33%). Mezcla de diasterómeros (A/B = 85:15),<sup>[169]</sup> sólido amarillo, **p.f.:** 143 - 146 °C, **R<sub>f</sub>** = 0.21 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 6.93 (dd, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, H8'); 6.73 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H, H6'); 6.60 (td, *J* = 7.5, 1.3 Hz, 1H, H7');

6.42 (dd, *J* = 7.6, 1.2 Hz, 1H, H5'); 5.73 (s, 1H, H4); 4.05 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H3' *diasterómero minoritario B*); 3.86 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H3' *diasterómero mayoritario A*); 3.81 (s.a, 1H, -NH); 3.78 (s.a, 1H, -NH); 2.42 – 2.35 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H6); 2.28 (ddd, *J* = 14.7, 4.4, 2.5 Hz, 1H, H6); 2.02 (ddd, *J* = 13.4, 5.0, 3.1 Hz, 1H, H1); 1.94 (dt, *J* = 12.9, 3.5 Hz, 1H, H12); 1.87 – 1.84 (m, 2H, H7, H16); 1.72 – 1.64 (m, 3H, H1, H15, H20); 1.53 (m, 1H, H8); 1.48 (s, 10H, H11, *t*-Bu); 1.42 (m, 1H, H11); 1.35 (m, 2H, H16, H17); 1.18 (s, 3H, H19); 1.15 (m, 2H, H12, H15); 1.12 (m, 1H, H14); 1.03 (m, 1H, H7); 0.93 (m, 1H, H9); 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H21); 0.73 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 199.7 (C3); 171.4 (C5); 153.3 (C2'); 135.2 (C4a'); 133.8 (C8a'); 124.4 (C8'); 124.0 (C4); 123.3 (C6'); 122.7 (C3'); 118.1 (C7'); 111.4 (C5'); 55.9 (C14); 55.2 (C3' *diasterómero mayoritario A*); 54.2 (C3' *diasterómero minoritario B*); 53.8 (C9); 51.9 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 51.2 (C17); 42.6 (C13, C20); 39.5 (C12); 38.6 (C10); 35.8 (C1); 35.7 (C8); 34.1 (C2); 32.9 (C6); 32.0 (C7); 29.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 28.0 (C16); 24.2 (C15); 21.1 (C11); 17.5 (C19); 13.6 (C21); 12.1 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 501 (M<sup>+</sup>, 2), 443 (2), 202 (100), 146 (28). **HRMS:** *m/z* = 502.3789 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O: 502.3792.

<sup>169</sup> Relación determinada de la integración de las señales correspondientes de H3'.

**(20S)-[2-(*ter*-butilamino)quinoxalin-3-il]-4-pregnen-3-ona**



**Rendimiento:** 61 mg (0.12 mmol, 40%); sólido amarillo pálido, **p.f.:** 137 - 139 °C, **R<sub>f</sub>** = 0.53 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.77 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H, H5'); 7.65 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H, H8'); 7.47 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.5 Hz, 1H, H6'); 7.31 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.5 Hz, 1H,

H7'); 5.73 (s, 1H, H4); 4.78 (s.a, 1H, -NH); 2.78 (s.a, 1H, H20); 2.45 – 2.32 (m, 3H, 2H2, H6); 2.27 (ddd, *J* = 14.6, 4.3, 2.4 Hz, 1H, H6); 2.22 (m, 1H, H17); 2.11 (m, 1H, H12); 2.04 (ddd, *J* = 13.4, 5.0, 3.1 Hz, 1H, H1); 1.82 (m, 1H, H7); 1.73 (m, 1H, H1); 1.62 (m, 2H, H11, H16); 1.57 (s, 9H, *t*-Bu); 1.55 (m, 2H, H8, H15); 1.45 (m, 1H, H11); 1.43 (m, 1H, H12); 1.33 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, H21); 1.21 (s, 3H, H19); 1.13 (m, 1H, H14); 1.08 (m, 1H, H15); 1.05 – 0.99 (m, 3H, H7, H9, H16); 0.89 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 199.7 (C3); 171.6 (C5); 152.1 (C3'); 149.5 (C2'); 140.4 (C8a'); 136.3 (C4a'); 128.6 (C6'); 128.3 (C5'); 126.3 (C8'); 124.0 (C4); 123.3 (C7'); 55.4 (C14); 54.3 (C17); 53.9 (C9); 52.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 42.6 (C13); 39.6 (C12); 38.7 (C10); 38.2 (C20); 35.82 (C1); 35.78 (C8); 34.1 (C2); 33.0 (C6); 32.1 (C7); 29.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 27.9 (C16); 24.4 (C15); 21.2 (C11); 19.2 (C21); 17.5 (C19); 12.6 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 499 (M<sup>+</sup>, 35), 484 (27), 443 (50), 229 (100). **HRMS:** *m/z* = 500.3636 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>33</sub>H<sub>46</sub>N<sub>3</sub>O: 500.3635.

**Método B:**

En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron en cantidades equimolares el aldehído esteroidal **67** (200 mg, 0.6 mmol) y *o*-fenilendiamina **40a** (66 mg, 0.6 mmol) en 10 mL de acetonitrilo seco. Posteriormente se adicionaron *ter*-butilisonitrilo **108a** (72 μL, 0.64 mmol) y CAN (34 mg, 0.06 mmol), en ese orden. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (~ 80 °C) bajo atmósfera de argón, y se siguió por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1). A las 3 horas se detuvo el calentamiento por consumo de los materiales de partida y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La mezcla se rotoevaporó hasta un volumen mínimo de disolvente y se extrajo con 80 mL de DCM. Se hicieron lavados sucesivos con 60 mL de disolución de amoníaco (5 %) y 60 mL de salmuera. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) y se rotoevaporó a sequedad. El crudo se purificó por cromatografía en columna, y se empleó como eluyente una mezcla de *n*-

hexano/acetato de etilo en gradiente creciente de polaridad de (3:1) a (1:1), y se aislaron los compuestos **XX** y **XXI** en diferente proporción. **Rendimiento:** **XX** [174 mg (0.46 mmol, 76 %)] y **XXI** [17 mg (0.04 mmol, 7 %)]

#### **Método C:**

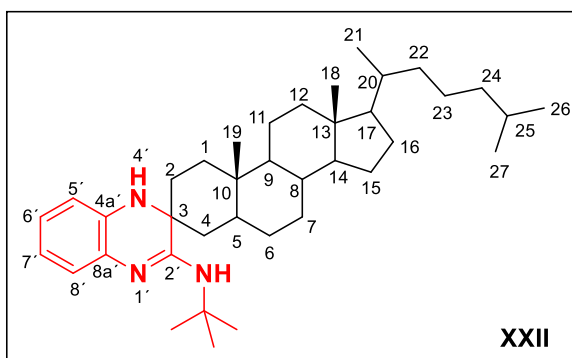
En un matraz redondo de 25 mL se disolvieron 25 mg (0.05 mmol) de la dihidroquinoxalina **XX** en 2 mL de acetonitrilo. Seguidamente se añadieron lentamente con pipeta 55 mg (0.1 mmol) de CAN, previamente disueltos en 2 mL de acetonitrilo: H<sub>2</sub>O (1:1). Terminada la adición se agitó la mezcla de reacción por 10 minutos, tiempo en el cual ocurre la total transformación del material de partida. Se añadieron 5 mL de MeOH y se rotoevaporó hasta un volumen mínimo de disolvente. El crudo se adicionó sobre disolución fría de amoníaco (5 %). El precipitado formado se filtró y lavó con abundante agua. El producto se purificó por recristalización de MeOH. **Rendimiento:** **XXI** [24 mg (0.048 mmol, 96 %)]

### **5.7.2. - Síntesis de 3,4-dihidroquinoxalinas espirocíclicas**

#### **Procedimiento general**

En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron en cantidades equimolares la cetona esteroideal correspondiente (**112**, **113**, **117** y **126**) y *o*-fenilendiamina **40a** en 5 mL de acetonitrilo seco. Posteriormente se adicionaron CAN (10 % mol) y *ter*-butilisonitrilo **108a** (103 % mol), en ese orden. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (~ 80 °C) bajo atmósfera de argón, y se siguió por CCF (*n*-hexano: acetato de etilo 3:1). Una vez finalizada la reacción (los tiempos se especifican para cada producto) por consumo de los materiales de partida, se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La mezcla se vertió sobre disolución fría de amoníaco (5 %), dando lugar a un precipitado abundante que se filtró y lavó varias veces con agua. El crudo se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (la proporción se especifica para cada compuesto).

5.7.2.1.- (3R/S)-N-(*ter*-butil)-4'*H*-espiro[5 $\alpha$ -colestano-3,3'-dihidroquinoxalin]-2'-amina



Compuesto obtenido a partir de la cetona esteroideal **112** (100 mg, 0.26 mmol), *o*-fenilendiamina **40a** (28 mg, 0.26 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (30  $\mu$ L, 0.27 mmol) y CAN (14 mg, 0.026 mmol), en un tiempo de reacción de 3h. Para su purificación se empleó como eluyente

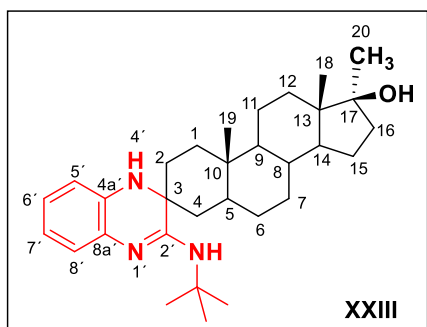
una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (15:1). Se aisló una única fracción que correspondió a la mezcla de diasterómeros (A/B) en proporción (70:30).<sup>[170]</sup>

**Rendimiento global:** 114 mg (0.19 mmol, 73 %), sólido blanco esponjoso, **p.f:** 103-105 °C.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 7.03 (m, 1H, H8'); 6.78 (m, 2H, H6', H7'); 6.58 (m, 1H, H5'); 4.63 (s, 1H, NH-*t*Bu diasterómero mayoritario A); 4.31 (s, 1H, NH-*t*Bu diasterómero minoritario B); 4.18 (sa, 1H -NH4' diasterómero minoritario B); 3.41 (sa, 1H; -NH4' diasterómero mayoritario A); 2.09 (ddd,  $J = 15.1, 4.3, 2.2$  Hz, 1H, H2); 2.00 (dt,  $J = 12.6, 3.4$  Hz, 1H, H12); 1.88 (ddd,  $J = 14.1, 5.1, 2.0$  Hz, 1H, H1); 1.83 (m, 1H, H16); 1.79 (dd,  $J = 13.8, 2.7$  Hz, 1H, H4); 1.66 (dq,  $J = 12.5, 3.2$  Hz, 1H, H7); 1.57 (m, 1H, H23); 1.54 (m, 1H, H25); 1.50 (s, 9H, *t*-Bu diasterómero mayoritario A); 1.49 (m, 1H, H11); 1.48 (s, 9H, *t*-Bu diasterómero minoritario B); 1.46 (m, 1H, H2); 1.40 - 1.30 (m, 5H, H20, H8, H11, H15, H22); 1.25 (m, 2H, H5, H16); 1.22 (m, 1H, H6); 1.20 - 1.08 (m, 7H, H1, H6, H12, H14; H15, 2H24); 1.07 - 1.01 (m, 4H, H4, H17; H22, H23); 0.91 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, H21); 0.88 (d,  $J = 1.7$  Hz, 3H, H27); 0.87 (d,  $J = 1.6$  Hz, 4H, H26, H7); 0.83 (s, 3H, H19); 0.66 (s, 4H, H18, H9). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 157.7 (C2'); 136.0 (C8a'); 134.8 (C4a'); 123.4 (C8'); 122.2 (C7'); 119.7 (C6'); 113.8 (C5'); 56.5 (C17); 56.4 (C14); 55.4 (C9); 52.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 51.8 (C3); 43.6 (C5); 42.7 (C13); 40.1 (C12); 39.7 (C24); 38.8 (C4); 38.2 (C1); 36.3 (C22); 35.90 (C20); 35.86 (C10); 35.6 (C8); 32.1 (C7); 31.4 (C2); 29.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C- diasterómero mayoritario A]; 29.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C- diasterómero minoritario B]; 28.7 (C6); 28.3 (C16); 28.2 (C25); 24.3 (C23); 23.9 (C15); 22.9 (C27); 22.7 (C26); 21.3 (C11); 18.8 (C21); 12.2 (C18); 11.9 (C19). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 559 (M<sup>+</sup>, 97), 502 (20), 228 (100), 172 (54). **HRMS:**  $m/z$  = 560.4930 [M + H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>38</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>: 560.4938.

<sup>170</sup> Relación determinada de la integración de las señales correspondientes de NH-*t*Bu'.

**5.7.2.2.- (3*R/S*)-2'-*(ter-butilamino)*-4'*H*-espiro[17 $\alpha$ -metil-5 $\alpha$ -androstano-3,3'-dihidro quinoxalin]-17 $\beta$ -ol**



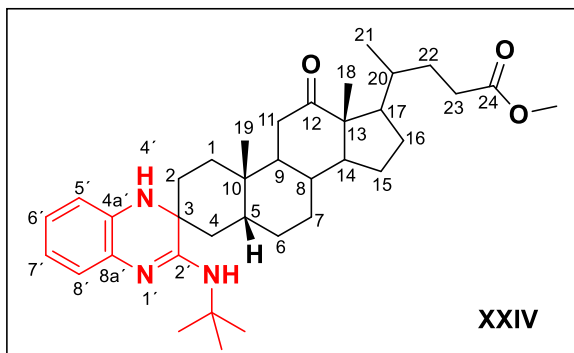
Compuesto obtenido a partir de la cetona esteroidal **113** (90 mg, 0.29 mmol), *o*-fenilendiamina **40a** (35 mg, 0.29 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (34  $\mu$ L, 0.30 mmol) y CAN (16 mg, 0.029 mmol), en un tiempo de reacción de 3h. Para su purificación se empleó como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (3:1). Se aisló una única fracción que

correspondió a la mezcla de diastéromeros (A/B) en proporción (75:25).<sup>[170]</sup>

**Rendimiento global:** 104 mg (0.22 mmol, 74 %). Sólido blanco, **p.f:** 132 – 134 °C.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 7.04 (m, 1H, H8<sup>^</sup>); 6.78 (m, 2H, H6<sup>^</sup>, H7<sup>^</sup>); 6.58 (m, 1H, H5<sup>^</sup>); 4.61 (sa, 1H, NH-*t*Bu *diastéromero mayoritario A*); 4.30 (sa, 1H, NH-*t*Bu *diastéromero minoritario B*); 4.13 (s, 1H; -NH4' *diastéromero minoritario B*); 3.40 (s, 1H; -NH4' *diastéromero mayoritario A*); 2.08 (m, 1H, H2); 1.89 (ddd,  $J = 13.8, 5.2, 2.3$  Hz, 1H, H1); 1.82 – 1.75 (m, 2H, H4, H16); 1.67 (ddd,  $J = 12.8, 6.5, 3.5$  Hz, 1H, H12); 1.59 (m, 1H, H11); 1.57 (m, 1H, H15), 1.52 (m, 1H, H7); 1.51 (s, 9H, *t*-Bu *diastéromero mayoritario A*); 1.48 (s, 9H, *t*-Bu *diastéromero minoritario B*); 1.47 (m, 1H, H2); 1.44 (m, 1H, H6); 1.41 (m, 1H, H8); 1.36 (m, 1H, H11); 1.32 (m, 1H, H12); 1.26 (m, 2H, H5, H6); 1.23 (s, 3H, H20); 1.22 (m, 2H, H14, H15); 1.14 (m, 1H, H1); 1.09 (m, 1H, H16); 1.06 (m, 1H, H4); 0.85 (sa, 7H, H18, H19, H7); 0.62 (td,  $J = 11.6, 4.1$  Hz, 1H, H9). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 157.6 (C2<sup>^</sup>); 136.0 (C8a<sup>^</sup>); 134.8 (C4a<sup>^</sup>); 123.4 (C8<sup>^</sup>); 122.3 (C7<sup>^</sup>); 119.7 (C6<sup>^</sup>); 113.8 (C5<sup>^</sup>); 81.8 (C17); 55.3 (C9); 52.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 51.7 (C3); 50.7 (C14); 45.7 (C13); 43.7 (C5); 39.1 (C4); 38.8 (C16); 38.2 (C1); 36.5 (C8); 36.0 (C10); 31.81 (C7); 31.76 (C12); 31.3 (C2); 29.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C- *diastéromero mayoritario A*]; 29.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C- *diastéromero minoritario B*]; 28.6 (C6); 26.0 (C20); 23.3 (C15); 20.9 (C11); 14.1 (C18); 11.9 (C19). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 477 (M<sup>+</sup>, 100), 420 (35), 228 (63), 172 (31). **HRMS:** *Diastéromero A* ( $t_R = 4.82$  min),  $m/z = 478.3787$  [M + H]<sup>+</sup> y *Diastéromero B* ( $t_R = 4.95$  min),  $m/z = 478.3780$  [M + H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>O: 478.3792.

5.7.2.3.- (3R/S)-2'-(*ter*-butilamino)-4'H-espiro[12-oxo-5β-colan-3,3'-dihidro quinoxalin]-24-oato de metilo



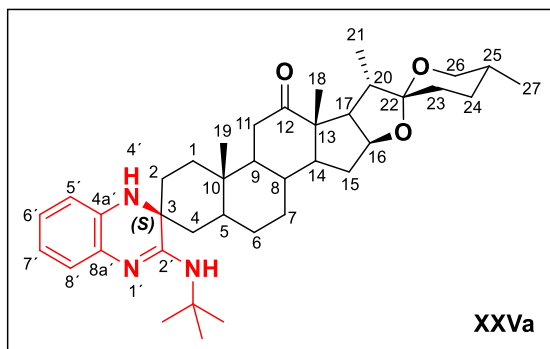
Compuesto obtenido a partir de la cetona esteroideal **117** (100 mg, 0.25 mmol), *o*-fenilendiamina **40a** (27 mg, 0.25 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (19 μL, 0.26 mmol) y CAN (14 mg, 0.025 mmol), en un tiempo de reacción de 4h. Para su purificación se empleó como eluyente

una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (3:1). Se aisló una única fracción que correspondió a la mezcla de diasterómeros (A/B) en proporción (85:15).<sup>[170]</sup>

**Rendimiento global:** 119 mg (0.21 mmol, 83 %), sólido blanco, **p.f.:** 154 – 156 °C.

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 7.02 (dd, *J* = 7.1, 2.1 Hz, 1H, H8'); 6.77 (m, 2H, H6', H7'); 6.56 (dd, *J* = 6.9, 2.1 Hz, 1H, H5'); 4.51 (s, 1H, NH-*t*Bu diasterómero mayoritario A); 4.28 (s, 1H, NH-*t*Bu diasterómero minoritario B); 4.10 (s, 1H; -NH4' diasterómero minoritario B); 3.66 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>); 3.54 (s, 1H; -NH4' diasterómero mayoritario A); 2.51 (m, 1H, H11); 2.39 (ddd, *J* = 15.2, 9.8, 5.3 Hz, 1H, H23); 2.25 (ddd, *J* = 16.0, 9.0, 7.0 Hz, 1H, H23); 2.04 (m, 1H, H17); 2.01 – 1.90 (m, 4H, H16, H11, 2H6); 1.88 – 1.77 (m, 4H, H2, H22, H8, H9); 1.75 (m, 2H, H4, H15); 1.61 (m, 3H, H5, H1, H4); 1.54 (m, 1H, H7), 1.48 (s, 9H, *t*-Bu); 1.42 - 1.32 (m, 4H, H14, H22, H15, H16); 1.27 (m, 1H, H20); 1.23 (m, 1H, H1); 1.20 (m, 1H, H2); 1.10 (m, 1H, H7); 1.09 (s, 3H, H19); 1.03 (s, 3H, H18); 0.84 (d, *J* = 6.5 Hz, H21). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 214.8 (C12); 174.7 (C24); 157.0 (C2'); 135.8 (C8a'); 134.7 (C4a'); 123.5 (C8'); 122.4 (C7'); 119.7 (C6'); 114.0 (C5'); 58.8 (C14); 57.7 (C13); 52.5 (C3); 52.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 51.6 (-OCH<sub>3</sub>); 46.7 (C17); 44.3 (C9); 41.4 (C5); 38.4 (C11); 36.1 (C4); 35.8 (C20); 35.7 (C10); 35.6 (C8); 34.4 (C1); 31.4 (C23); 30.7 (C22); 29.8 (C2); 29.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-diasterómero mayoritario A]; 29.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-diasterómero minoritario B]; 27.6 (C16); 27.0 (C6); 25.7 (C7); 24.4 (C15); 23.5 (C19); 18.8 (C21); 11.8 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 575 (M<sup>+</sup>, 38), 518 (9), 228 (100), 172 (58). **HRMS:** Diasterómero A (*t<sub>R</sub>* = 5.40 min), *m/z* = 576.4157 [M + H]<sup>+</sup> y Diasterómero B (*t<sub>R</sub>* = 5.50 min), *m/z* = 576.4157 [M + H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>36</sub>H<sub>54</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 576.4160.

**5.7.2.4.- (3S)-(20 $\alpha$ , 22R, 25S)-2'-(*ter*-butilamino)-4'H-espiro[5 $\alpha$ -espirostan-3,3'-dihidroquinoxalin]-12-ona**

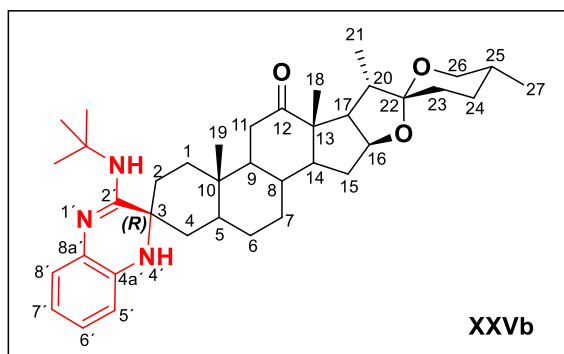


**Diasterómero A:** Obtenido a partir de la reacción cetona esteroidal (20 $\alpha$ ,22R,25S)-5 $\alpha$ -espirostan-3,12-diona (**126**) (100 mg, 0.23 mmol), *o*-fenilendiamina **40a** (25 mg, 0.23 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (28  $\mu$ L, 0.25 mmol) y CAN (13 mg, 0.023 mmol), en un tiempo de reacción de 3h.

Fue aislado como producto mayoritario mediante proceso de purificación por cromatografía flash, empleando como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (3:1). **Rendimiento:** 89 mg (0.15 mmol, 64 %, *e.d.* = 66 %), sólido blanco, **p.f.:** 173 – 174 °C, **R<sub>f</sub>** = 0.32 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1),  $[\alpha]_D^{20}$  = - 39.6° (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 7.04 (dd, *J* = 6.7, 2.4 Hz, 1H, H8'); 6.78 (m, 2H, H6', H7'); 6.58 (dd, *J* = 6.7, 2.4 Hz, 1H, H5'); 4.50 (s, 1H, NH-*t*Bu); 4.34 (td, *J* = 8.0, 5.4 Hz, 1H, H16 $\alpha$ ); 3.49 (dd, *J* = 10.0, 2.8 Hz, 1H, H26 $\beta$ ); 3.43 (s.a, 1H; -NH<sub>4</sub><sup>+</sup>); 3.35 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H, H26 $\alpha$ ); 2.53 (dd, *J* = 8.7, 6.7 Hz, 1H, H17 $\alpha$ ); 2.43 (t, *J* = 13.7 Hz, 1H, H11); 2.22 (dd, *J* = 14.3, 4.9 Hz, 1H, H11); 2.11 (m, 2H, H1, H15), 1.89 (m, 1H, H8); 1.82 (m, 1H, H4); 1.77 – 1.71 (m, 3H, H2, H20, H23); 1.69 – 1.56 (m, 5H, H1, H7, H23, H24, H25); 1.47 (s, 11H, *t*-Bu, H14, H15); 1.44 (m, 1H, H6); 1.29 (m, 1H, H24); 1.25 (m, 1H, H5); 1.20 – 1.13 (m, 3H, H2, H6, H9); 1.07 (d, *J* = 7.0 Hz, H21); 1.05 (s, 3H, H18); 1.03 (m, 1H, H4); 0.92 (s, 4H, H7, H19); 0.79 (d, *J* = 6.3 Hz, H27). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 213.4 (C12); 157.1 (C2'); 135.9 (C8a'); 134.6 (C4a'); 123.5 (C8'); 122.3 (C7'); 119.8 (C6'); 113.8 (C5'); 109.4 (C22); 79.2 (C16); 67.0 (C26); 56.3 (C9); 55.7 (C14); 55.2 (C13); 53.6 (C17); 52.2 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 51.5 (C3); 43.1 (C5); 42.3 (C20); 38.6 (C4); 37.7 (C2, C11); 36.5 (C10); 34.4 (C8); 31.51 (C15); 31.49 (C23); 31.2 (C7); 30.8 (C1); 30.3 (C25); 29.3 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 28.9 (C6); 28.2 (C24); 17.2 (C27); 16.1 (C18); 13.4 (C21); 11.5 (C19). **EM-IE:** *m/z* (%) = 601 (M<sup>+</sup>, 100), 545 (16), 228 (61), 172 (37). **HRMS:** *m/z* = 602.4315 [M + H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>38</sub>H<sub>56</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 602.4316.

5.7.2.5.- (3R)-(20 $\alpha$ , 22R, 25S)-2'-(*ter*-butilamino)-4'*H*-espiro[5 $\alpha$ -espirostan-3,3'-dihidroquinoxalin]-12-ona



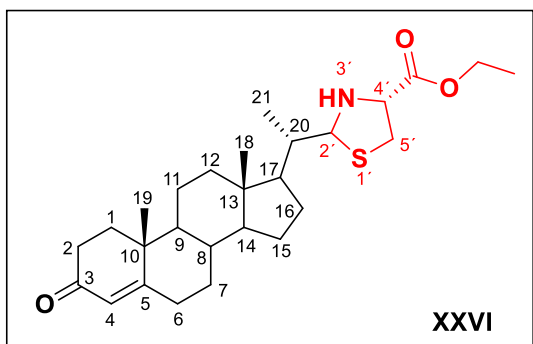
**Diasterómero B:** Obtenido a partir de la reacción cetona esteroidal (20 $\alpha$ ,22R,25S)-5 $\alpha$ -espirostan-3,12-diona (**126**) (100 mg, 0.23 mmol), *o*-fenilendiamina **40a** (25 mg, 0.23 mmol), *ter*-butilisonitrilo **108a** (28  $\mu$ L, 0.25 mmol) y CAN (13 mg, 0.023 mmol), en un tiempo de reacción de 3h.

Fue aislado como producto minoritario mediante proceso de purificación por cromatografía flash, empleando como eluyente una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (3:1). **Rendimiento:** 18 mg (0.03 mmol, 13 %), sólido blanco, **p.f:** 171 – 173 °C, **R<sub>f</sub>** = 0.21 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:1), [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 9.8° (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 7.03 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, H8'); 6.78 (td, *J* = 7.5, 1.8 Hz, 2H, H6', H7'); 6.59 (dd, *J* = 7.2, 1.8 Hz, 1H, H5'); 4.35 (td, *J* = 7.8, 4.0 Hz, 1H, H16 $\alpha$ ); 4.28 (s, 1H, -NH-*t*Bu); 4.11 (s.a, 1H; -NH4'); 3.49 (dd, *J* = 10.6, 3.7 Hz, 1H, H26 $\beta$ ); 3.35 (t, *J* = 11.0 Hz, 1H, H26 $\alpha$ ); 2.52 (m, 1H, H17 $\alpha$ ); 2.38 (t, *J* = 13.7 Hz, 1H, H11); 2.22 (dd, *J* = 14.3, 4.9 Hz, 1H, H11); 2.12 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H15); 1.93 (m, 1H, H8); 1.78 (m, 1H, H23), 1.75 – 1.68 (m, 3H, H6, H7, H20); 1.65 – 1.57 (m, 4H, H4, H23, H24, H25); 1.53 (m, 2H, H2, H6); 1.47 (s, 10H, *t*-Bu, H14); 1.41 (m, 2H, H1, H15); 1.38 (m, 1H, H2); 1.34 (m, 2H, H5, H24); 1.25 (m, 2H, H4, H9); 1.17 (m, 1H, H1); 1.07 (d, *J* = 7.1 Hz, H21); 1.05 (s, 3H, H18); 0.99 (m, 1H, H7); 0.93 (s, 3H, H19), 0.79 (d, *J* = 6.3 Hz, H27). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 213.2 (C12); 156.7 (C2'); 135.5 (C8a'); 133.7 (C4a'); 123.9 (C8'); 122.6 (C7'); 119.8 (C6'); 114.1 (C5'); 109.4 (C22); 79.3 (C16); 67.0 (C26); 55.9 (C14); 55.4 (C9); 55.2 (C13); 53.6 (C17); 52.2 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 51.8 (C3); 42.3 (C20); 40.7 (C5); 37.6 (C11); 36.4 (C10); 34.4 (C8); 34.1 (C2), 32.7 (C1), 31.5 (C7, C23); 31.2 (C15); 30.3 (C25); 29.1 [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-C-]; 28.9 (C4); 28.0 (C24); 27.2 (C6); 17.3 (C27); 16.2 (C18); 13.4 (C21); 11.6 (C19). **EM-IE:** *m/z* (%) = 601 (M<sup>+</sup>, 100), 545 (15), 228 (71), 172 (39). **HRMS:** *m/z* = 602.4315 [M + H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>38</sub>H<sub>56</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>: 602.4316.

## 5.8. Obtención de híbridos tiazolidina-esteroide (Serie 5)

### 5.8.1.- Síntesis de (20S)-[(4R)-etilcarbetoxi-tiazolidin-2(R/S)-il]-4-pregnen-3-ona



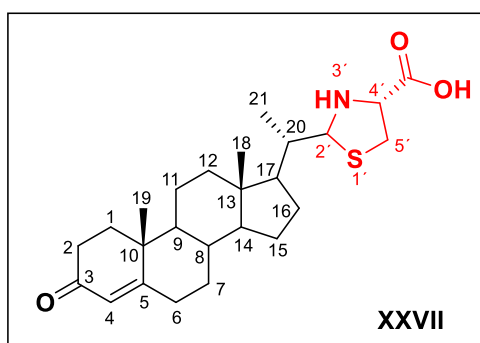
En un matraz redondo de 25 mL se mezclaron el aldehído esteroideal **67** (200 mg, 0.61 mmol) y el clorhidrato de *L*-cisteinato de etilo **131** (170 mg, 0.91 mmol) con 10 mL de acetonitrilo seco. Seguidamente se añadió Et<sub>3</sub>N (127  $\mu$ L, 0.91 mmol) y se agitó a temperatura ambiente

bajo atmósfera de argón. Al cabo de 3 horas se detiene la reacción, con la formación de un precipitado abundante. La mezcla se adicionó sobre agua fría. Posteriormente se filtró y lavó con abundante agua. Se aisló el compuesto **XXVI** como una mezcla de diasterómeros (A/B 90:10).<sup>[171]</sup> **Rendimiento:** 250 mg (0.82 mmol, 90 %), sólido blanco, **p.f.:** 157 – 159 °C, **R<sub>f</sub>** = 0.28 (*n*-hexano: acetato de etilo 3:2).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5.71 (s, 1H, H4); 4.90 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H2' *diasterómero minoritario B*); 4.68 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, H2' *diasterómero mayoritario A*); 4.23 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O-); 3.78 (dd, *J* = 9.5, 6.9 Hz, 1H, H4'); 3.23 (dd, *J* = 10.2, 6.9 Hz, 1H, H5'); 2.69 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H5'); 2.42 – 2.33 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H6), 2.26 (m, 1H, H6), 2.16 (m, 1H, H20); 2.01 (m, 2H, H1, H12); 1.90 (m, 1H, H16); 1.82 (m, 1H, H7), 1.69 (m, 1H, H1), 1.65 (m, 1H, H15); 1.52 (m, 2H, H8, H11); 1.43 (m, 2H, H11, H16); 1.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-); 1.23 (m, 2H, H12, H17); 1.17 (s, 3H, H19); 1.12 (m, 1H, H15); 1.08 (m, 1H, H14); 1.04 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H21); 1.00 (m, 1H, H7); 0.92 (td, *J* = 11.6, 4.3 Hz, 1H, H9); 0.91 (m, 1H, H16), 0.73 (s, 3H, H18). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.6 (C3); 171.5 (C=O); 171.4 (C5); 124.0 (C4); 75.4 (C2' *diasterómero mayoritario A*); 72.9 (C2' *diasterómero minoritario B*); 65.0 (C4'); 61.7 (CH<sub>2</sub>O-); 55.6 (C17, C14); 53.8 (C9); 43.0 (C13); 39.7 (C12); 38.7 (C10); 37.8 (C20); 37.3 (C5'); 35.81 (C1); 35.79 (C8); 34.1 (C2); 33.0 (C6); 32.1 (C7); 27.6 (C16); 24.2 (C15); 21.2 (C11); 17.5 (C19); 14.3 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-); 12.6 (C21); 12.2 (C18). **EM-IE:** *m/z* (%) = 459 (M<sup>+</sup>, < 1), 386 (3), 160 (100), 86 (11). **HRMS:** *m/z* = 460.2876 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>3</sub>S: 460.2880.

<sup>171</sup> Relación determinada de la integración de las señales correspondientes de H2'.

5.8.2.- Síntesis de (20S)-[(4R)-carboxi-tiazolidin-2(R/S)-il]-4-pregnen-3-ona

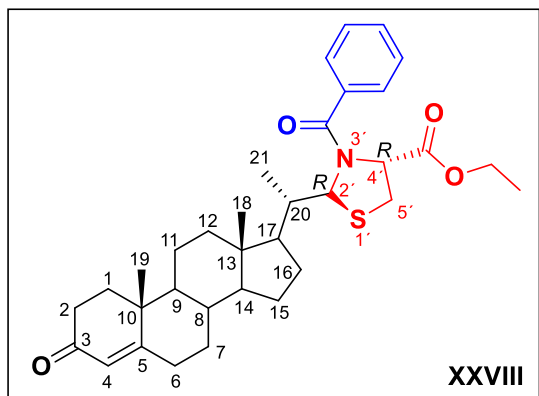


En un matraz redondo de 100 mL se disolvió el aldehído esteroidal **67** (1 g, 3.04 mmol) en 50 mL de acetonitrilo. Seguidamente se añadió *L*-cisteína **132** (0.49 g, 4 mmol) previamente disuelta en 10 mL de agua, y se agitó a 80 °C bajo atmósfera de argón. Al cabo de 2 horas se detiene la agitación y la mezcla se deja enfriar

hasta temperatura ambiente. El precipitado formado se filtró y lavó con acetonitrilo frío. Se aisló el compuesto **XXVII** como una mezcla de diasterómeros (A/B 75:25).<sup>[171]</sup>

**Rendimiento:** 0.96 g (0.82 mmol, 74 %), sólido blanco, **p.f.:** 165 °C (descompone), **R<sub>f</sub>** = 0.10 (*n*-hexano: acetato de etilo 1:3). **RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 5.71 (s, 1H, H<sub>4</sub>); 4.92 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, H<sub>2'</sub> diasterómero minoritario B); 4.71 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, H<sub>2'</sub> diasterómero mayoritario A); 4.30 (dd, *J* = 7.1, 4.2 Hz, 1H, H<sub>4'</sub> diasterómero minoritario B); 3.78 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H<sub>4'</sub> diasterómero mayoritario A); 3.27 (m, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.03 (dd, *J* = 10.9, 7.0 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 2.52 – 2.43 (m, 3H, 2H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 2.31 (m, 1H, H<sub>6</sub>); 2.20 (m, 1H, H<sub>20</sub>); 2.10 – 2.05 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>12</sub>); 1.95 (m, 1H, H<sub>16</sub>); 1.91 (m, 1H, H<sub>7</sub>); 1.71 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>15</sub>); 1.65 – 1.56 (m, 2H, H<sub>8</sub>, H<sub>11</sub>); 1.54 – 1.44 (m, 2H, H<sub>11</sub>, H<sub>16</sub>); 1.27 (m, 2H, H<sub>12</sub>, H<sub>15</sub>); 1.24 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 1.23 (m, 1H, H<sub>17</sub>); 1.16 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H<sub>21</sub> diasterómero minoritario B); 1.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 4H, H<sub>14</sub>, H<sub>21</sub> diasterómero mayoritario A); 1.07 (m, 1H, H<sub>7</sub>); 1.00 (m, 1H, H<sub>9</sub>); 0.82 (s, 3H, H<sub>18</sub> diasterómero mayoritario A); 0.78 (s, 3H, H<sub>18</sub> diasterómero minoritario B). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 202.2 (C<sub>3</sub>); 175.0 (C<sub>5</sub>); 173.1 (COOH); 124.1 (C<sub>4</sub>); 74.9 (C<sub>2'</sub> diasterómero mayoritario A); 72.3 (C<sub>2'</sub> diasterómero minoritario B); 66.1 (C<sub>4'</sub> diasterómero minoritario B); 65.5 (C<sub>4'</sub> diasterómero mayoritario A); 57.0 (C<sub>14</sub>); 56.9 (C<sub>17</sub>); 55.2 (C<sub>9</sub>); 44.1 (C<sub>13</sub>); 41.0 (C<sub>12</sub>); 40.0 (C<sub>10</sub>); 38.7 (C<sub>20</sub>); 37.0 (C<sub>8</sub>); 36.8 (C<sub>1</sub>); 36.5 (C<sub>5'</sub>); 34.7 (C<sub>2</sub>); 33.9 (C<sub>6</sub>); 33.2 (C<sub>7</sub>); 28.6 (C<sub>16</sub>); 25.1 (C<sub>15</sub>); 22.2 (C<sub>11</sub>); 17.7 (C<sub>19</sub>); 13.3 (C<sub>21</sub> diasterómero mayoritario A); 13.2 (C<sub>21</sub> diasterómero minoritario B); 12.4 (C<sub>18</sub> diasterómero mayoritario A); 12.1 (C<sub>18</sub> diasterómero minoritario B). **EM-IE:** *m/z* (%) = 397 [(M<sup>+</sup> - 34), < 1], 340 (6), 88 (100), 85 (15). **HRMS:** Diasterómero A (*t<sub>R</sub>* = 4.78 min), *m/z* = 432.2567 [M + H]<sup>+</sup> y Diasterómero B (*t<sub>R</sub>* = 4.91 min), *m/z* = 432.2565 [M + H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>3</sub>S: 432.2567.

### 5.8.3.- Síntesis de (2*S*)-[(2*R*,4*R*)-3-benzoil-4-etilcarbetoxi-tiazolidin-2-il]-4-pregnen-3-ona

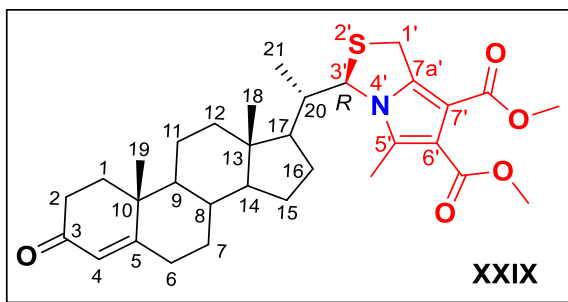


En un matraz redondo de 25 mL se disolvió la tiazolidina esteroideal **XXVI** (274 mg, 0.60 mmol) en 10 de DCM seco y se colocó un baño de hielo (~ 0 °C). Seguidamente se añadieron en ese orden piridina (58 µL, 0.72 mmol) y cloruro de benzoílo **133** (84 µL, 0.72 mmol), y se agitó la mezcla de reacción bajo atmósfera de argón por 2 horas.

Posteriormente se retiró el baño de hielo, se adicionaron 20 mL de agua y se extrajo con DCM (2 x 20 mL). Las fases orgánicas resultantes se unieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro). El crudo se purificó por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo en gradiente creciente de polaridad (4:1) a (1:1). Se aisló el compuesto **XXVIII** como un sólido blanco. **Rendimiento:** 160 mg (0.36 mmol, 60 %), **p.f.:** 182 -184 °C, **R<sub>f</sub>** = 0.28 (*n*-hexano: acetato de etilo 3:2), [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 52.3° (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

**RMN-<sup>1</sup>H** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 7.49 – 7.42 (m, 5H, H<sub>Ar</sub>); 5.60 (s, 1H, H<sub>4</sub>); 5.30 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, H<sub>2'</sub>); 4.82 (dd, *J* = 6.9, 5.5 Hz, 1H, H<sub>4'</sub>); 4.13 (q, *J* = 7.1, 2H, CH<sub>2</sub>O); 3.31 (dd, *J* = 11.8, 7.1 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 3.15 (dd, *J* = 11.8, 5.4 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>); 2.43 – 2.33 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>6</sub>); 2.23 (m, 1H, H<sub>6</sub>); 2.16 (dt, *J* = 16.7, 4.2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>); 2.09 (s.a, 1H, H<sub>20</sub>); 1.99 – 1.91 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>12</sub>); 1.76 (m, 1H, H<sub>7</sub>); 1.62 (m, 2H, H<sub>1</sub>, H<sub>16</sub>); 1.54 – 1.44 (m, 3H, H<sub>8</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>15</sub>); 1.36 (qd, *J* = 13.3, 3.9 Hz, 1H, H<sub>11</sub>); 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-); 1.14 (s, 3H, H<sub>19</sub>); 1.12 (m, 1H, H<sub>12</sub>); 1.03 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H, H<sub>21</sub>, H<sub>17</sub>); 0.99 – 0.86 (m, 5H, H<sub>7</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>14</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>16</sub>); 0.52 (s, 3H, H<sub>18</sub>). **RMN-<sup>13</sup>C** (100 MHz, DMSO, δ ppm): 197.2 (C<sub>3</sub>); 170.3 (C<sub>5</sub>); 169.7 (C=O); 169.1 (COO); 136.9 (C<sub>Ar</sub>); 129.1 (CH<sub>Ar</sub>); 127.9 (CH<sub>Ar</sub>); 125.7 (CH<sub>Ar</sub>); 122.7 (C<sub>4</sub>); 69.6 (C<sub>2'</sub>); 64.7 (C<sub>4'</sub>); 60.5 (CH<sub>2</sub>O-); 54.5 (C<sub>14</sub>); 53.9 (C<sub>17</sub>); 52.7 (C<sub>9</sub>); 42.1 (C<sub>13</sub>); 38.7 (C<sub>12</sub>); 38.4 (C<sub>20</sub>); 37.8 (C<sub>10</sub>); 34.8 (C<sub>1</sub>); 34.7 (C<sub>8</sub>); 33.2 (C<sub>2</sub>); 31.7 (C<sub>6</sub>); 31.4 (C<sub>7</sub>); 31.3 (C<sub>5'</sub>); 25.8 (C<sub>16</sub>); 23.2 (C<sub>15</sub>); 20.3 (C<sub>11</sub>); 16.6 (C<sub>19</sub>); 13.4 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-); 12.0 (C<sub>21</sub>); 11.3 (C<sub>18</sub>). **EM-IE:** *m/z* (%) = 463 [(M<sup>+</sup> - 100), 3], 358 (2), 264 (67), 105 (100). **HRMS:** *m/z* = 564.3143 [M+H]<sup>+</sup>; calculada para C<sub>34</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>4</sub>S: 564.3142.

5.8.4.- Síntesis de (20S)-[(3R)-5-metil-6,7-dimetilcarbetoxi-1H,3H-pirrolo[1,2-c]tiazol-3-il]-4-pregnen-3-ona



En un matraz redondo de 25 mL se disolvió la tiazolidina esteroidal **XXVII** (100 mg, 0.23 mmol) en 5 mL de anhídrido acético. Seguidamente se añadió acetilendicarboxilato de metilo **134** (DMAD) (42  $\mu$ L, 0.35 mmol) y la

mezcla se calentó a reflujo ( $\sim 110$   $^{\circ}$ C) por 2 h. Pasado ese tiempo se detiene el calentamiento y se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Se adicionaron 20 mL de DCM y se hicieron lavados con salmuera (2 x 20 mL). La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro) y se purificó el crudo resultante por cromatografía en columna, empleando como fase móvil una mezcla de *n*-hexano/acetato de etilo (2:1). Se aisló el compuesto **XXIX** como un sólido blanco. **Rendimiento:** 80 mg (0.15 mmol, 63 %), **p.f.:** 187 – 189  $^{\circ}$ C,  $R_f = 0.25$  (*n*-hexano: acetato de etilo 2:1),  $[\alpha]_D^{20} = +158.0^{\circ}$  (*c* 1.0,  $\text{CHCl}_3$ ). **RMN- $^1\text{H}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 5.72 (s, 1H, H4); 5.44 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H, H3'); 4.12 (s, 2H, H1'); 3.83 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O-}$ ); 3.77 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O-}$ ); 2.42 (m, 1H, H2); 2.37 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-C5'}$ ); 2.35 (m, 2H, H2, H6); 2.27 (m, 1H, H6); 2.14 (m, 1H, H20); 1.99 (m, 2H, H1, H12); 1.86 (m, 2H, H7, H16); 1.69 (m, 2H, H1, H15); 1.53 (m, 2H, H8, H11); 1.40 (m, 3H, H11, H16, H17); 1.24 (m, 2H, H12, H15); 1.17 (s, 3H, H19); 1.09 (m, 1H, H14); 1.04 (m, 1H, H7); 0.94 (td,  $J = 12.0, 4.1$  Hz, 1H, H9); 0.73 (s, 3H, H18); 0.68 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, H21). **RMN- $^{13}\text{C}$**  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 199.7 (C3); 171.3 (C5); 165.6 (C=O); 164.2 (C=O); 141.1 (C7a'); 129.6 (C5'); 124.0 (C4); 117.3 (C7'); 106.5 (C6'); 68.1 (C3'); 55.4 (C14); 53.8 (C9); 53.4 (C17); 51.7 ( $\text{CH}_3\text{O-}$ ); 51.4 ( $\text{CH}_3\text{O-}$ ); 42.8 (C13); 42.4 (C20); 39.4 (C12); 38.6 (C10); 35.8 (C1); 35.7 (C8); 34.1 (C2); 32.9 (C6); 32.0 (C7); 30.3 (C1'); 27.8 (C16); 24.3 (C15); 21.0 (C11); 17.5 (C19); 12.4 (C18); 12.0 ( $\text{CH}_3\text{-C5'}$ ); 11.3 (C21). **EM-IE:**  $m/z$  (%) = 553 ( $\text{M}^+$ , 7), 521 (3), 254 (74), 222 (100). **HRMS:**  $m/z = 554.2939$  [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$ ; calculada para  $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{NO}_5\text{S}$ : 554.2935.

## 5.9. Cálculos computacionales.

### 5.9.1. Anclaje (*Docking*) Molecular

Los híbridos benzazol-esteroide (HBE) **Ia-k** y **III** obtenidos fueron analizados mediante herramientas computacionales, para predecir la actividad inhibitoria *in silico* de los mismos frente a los citocromos P450 17A1 (CYP17A1) y P450 21A2 (CYP21A2).

Las estructuras 2D de los ligandos se obtuvieron mediante el programa ChemBioDraw Ultra 14.0.<sup>[172]</sup> Las coordenadas tridimensionales de los ligandos estudiados (3D) se generaron mediante ChemBio3D Ultra 14.0 empleando los parámetros por defecto; y se realizó una posterior optimización preliminar en Avogadro 1.1.1.<sup>[173]</sup> A continuación todas las estructuras de los ligandos fueron optimizadas mediante el método semi-empírico AM1 empleando MOPAC 2016.<sup>[174]</sup> Los estados de protonación de los átomos ionizables de los ligandos a pH = 7.4 se determinaron con el software ChemAxon (<https://chemaxon.com>).

La estructura 3D de CYP17A1 y CYP21A2, ambas resueltas mediante difracción de rayos X [código PDB: 3RUK, resolución (R= 2,60 Å)<sup>[46]</sup> y 4Y8W, resolución (R= 2,64 Å),<sup>[107]</sup> respectivamente] se obtuvieron de la base de datos PDB (del inglés *Protein Data Bank*). La cadena D de 3RUK y la cadena B de 4Y8W se seleccionaron como dianas moleculares, estos monómeros corresponden a la unidad mínima activa de ambas holoenzimas. Posteriormente, se eliminaron todas las moléculas de agua y los ligandos de la estructura, empleando el programa PyMOL versión 2.1.0.<sup>[175]</sup>

#### 5.9.1.1.- Preparación de los ligandos y la diana molecular:

Todos los archivos PDB de los ligandos, de la Abiraterona (extraída del PDB: 3RUK), la Progesterona (extraída del PDB: 4Y8W) y de las holoenzimas CYP17A1 y CYP21A2 se convirtieron a formato PDBQT, para realizar las simulaciones de anclaje molecular con el programa AutoDock 4.2.<sup>[102]</sup> Las cargas parciales se calcularon empleando el modelo de *Gasteiger*, los átomos de hidrógeno no polares se fusionaron a los átomos pesados. En el caso de los ligandos, los enlaces rotables se mantuvieron por

<sup>172</sup> ChemBioDraw Ultra. PerkinElmer Informatics: Cambridge **2014**.

<sup>173</sup> Hanwell, M.D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *J. Cheminform.* **2012**, *4*, 17–34.

<sup>174</sup> Stewart, J.J.P. MOPAC2016. Stewart Computational Chemistry **2016**.

<sup>175</sup> The PyMOL Molecular Graphics System. Version 2.1.0. Schrodinger, LLC **2018**.

defecto utilizando la herramienta TORSDOF en AutoDockTools. Para realizar el anclaje molecular de los complejos CYP17A1-HBE se construyó una caja de simulación de  $24 \times 30 \times 24 \text{ \AA}^3$ , mientras que para los complejos CYP21A2-HBE fue de  $18 \times 22 \times 22 \text{ \AA}^3$ . El centro de la caja de simulación se hizo coincidir con el centro del sitio activo de las holoenzimas.

#### **5.9.1.2.- Simulación de anclaje molecular:**

Se realizaron simulaciones de anclaje molecular utilizando el Algoritmo Genético de Lamarckian (LGA por sus siglas en inglés) que se encuentra disponible en el programa AutoDock 4.2. Durante la simulación, el sitio activo de CYP17A1 y CYP21A2 se mantuvo rígido. Los parámetros del anclaje fueron seleccionados por defecto, excepto por los siguientes: se eligieron 20 corridas LGA para cada ligando ( $ga\_run = 20$ ), generando una población inicial de 300 conformaciones y posiciones aleatorias ( $ga\_pop\_size = 300$ ), de las cuales se evalúa la energía 2500000 veces ( $ga\_num\_evals = 2500000$ ).

#### **5.9.1.3.- Análisis de los complejos enzima-ligando:**

Los 20 diferentes conformeros de cada complejo CYP17A1-HBE y CYP21A2-HBE, obtenidos a partir de las simulaciones de anclaje molecular, se agruparon empleando como criterio un valor de  $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$  y se determinó la energía libre de unión promedio de cada grupo. Se realizó una posterior agrupación basándose en los contactos interatómicos (enlaces de hidrógeno y contactos hidrofóbicos) entre CYP17A1, CYP21A2 y los ligandos. Para ello se utilizó AuPosSOM.<sup>[104]</sup> Las interacciones de los complejos holoenzima-HBE se representaron mediante el programa LigPlot<sup>+</sup> v.1.4.5.<sup>[176]</sup> La estructura 3D de los modos de unión representativos de los complejos holoenzima-HBE se representaron con el programa PyMOL versión 2.1.0.

---

<sup>176</sup> Laskowski, R. A.; Swindells, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand À Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2778–2786.

## 5.9.2. Dinámica Molecular (DM)

### 5.9.2.1.- Preparación de los complejos:

Se parametrizó el sitio activo de cada holoenzima (CYP17A1 y CYP21A2) utilizando el modelo enlazante (*bonded model*).<sup>[177]</sup> Para el grupo Hemo se empleó el MCPB.py,<sup>[178]</sup> implementado en el paquete AmberTools18,<sup>[179]</sup> y se parametrizó con los residuos coordinados a una distancia  $\leq 2,5$  Å. Se obtuvieron las topologías de todos los ligandos (excepto Abiraterona) para el campo de fuerza GAFF (*Generalized AMBER force-field*).<sup>[180]</sup> Se calcularon las cargas parciales de cada ligando con el método semi-empírico AM1-BCC implementado en *antechamber*.<sup>[181]</sup> Se asignó carga neta cero a todos los ligandos. La optimización de la geometría, el cálculo de las constantes de fuerza y de las cargas parciales Merz-Kollman RESP de los modelos del grupo hemo, generados por la distancia de corte, se realizaron empleando Gaussian09 al nivel de teoría B3LYP/6-31G\*. Las simulaciones de cada complejo se realizaron bajo condiciones periódicas de contorno (PBC del inglés, *Periodic Boundary Conditions*). Se garantizó la electro-neutralidad adicionando la mínima cantidad de iones Cl<sup>-</sup> y el valor del pH se fijó en 7,4 simulando las condiciones experimentales utilizadas en la determinación de  $IC_{50}$  de la Abiraterona.<sup>[53]</sup>

### 5.9.2.2.- Simulaciones de Dinámica Molecular:

Una vez equilibrado el sistema se procedió a la dinámica productiva sin restricción de la posición, empleando el algoritmo de integración salto de rana con un paso de integración  $\Delta t = 2$  fs por un tiempo total de 200 ns en el caso de la CYP17A1, 20 ns en el caso de CYP21A2 y 5 ns en el caso de los HBE libres. Cada sistema fue simulado en condiciones de temperatura y presión a  $T = 310$  K y  $p = 1$  atm, respectivamente.

<sup>177</sup> Peters, M. B.; Yang, Y.; Wang, B.; Füsti-Molnár, L.; Weaver, M. N.; Merz, K. M. J. Structural Survey of Zinc-Containing Proteins and Development of the Zinc AMBER Force Field (ZAFF). *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6*, 2935–2947.

<sup>178</sup> Li, P.; Merz, K.M.J. MCPB.Py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56*, 599–604.

<sup>179</sup> Case, D. A.; Ben-Shalom, I. Y.; Brozell, S. R.; Cerutti, D. S.; Cheatham, T. E. I.; Cruzeiro, V. W. D.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Ghoreishi, D.; Gilson, M. K.; et al. AmberTools18. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2018**, 280–311

<sup>180</sup> H++ <http://biophysics.cs.vt.edu> **2012**

<sup>181</sup> Li, P.; Roberts, B. P.; Chakravorty, D. K.; Merz, K. M. Rational Design of Particle Mesh Ewald Compatible Lennard-Jones Parameters for +2 Metal Cations in Explicit Solvent. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 2733–2748

### 5.9.2.3.- Análisis estructural de los complejos CYP17A1-HBE y CYP21A2-HBE durante las simulaciones de DM:

Para analizar la estabilidad estructural de los complejos enzima-ligando durante las simulaciones de DM se calculó la desviación cuadrática media (RMSD) (Ecuación I.3) del conjunto de átomos pesados del ligando, mediante la herramienta *g\_rms*, implementada en GROMACS v4.6.5-1.<sup>[182]</sup>

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i)^2} \quad (\text{Ec. I. 3})$$

Donde  $x_i$  es la posición de la partícula “ $i$ ” y  $N$  es la cantidad total de valores de  $x_i$ . Se utilizó la herramienta *g\_analyze* (GROMACS v4.6.5-1) para el cálculo de la distribución de los valores de RMSD de cada ligando y complejo durante toda la simulación.

### 5.9.2.4.- Cálculo de la energía libre de unión de los complejos CYP17A1-HBE y CYP21A2-HBE:

Los valores de las energías de interacción de los complejos proteína-ligando se calcularon mediante la herramienta *g\_energy* del paquete GROMACS v4.6.5. Estos valores se usaron para calcular la energía libre de unión utilizando el modelo LIE-D de Miranda y cols,<sup>[111]</sup> mediante la Ecuación I.1:

$$\Delta G_{enlace} = \beta(\Delta\langle V_{l-s}^{el} \rangle + \Delta\langle V_{l-l}^{el} \rangle) + \alpha\Delta\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle + \gamma \quad (\text{Ec. I. 1})$$

Donde  $\Delta\langle V_{l-l}^{el} \rangle$  representa el cambio en las interacciones intra-ligando cuando este se transfiere desde el disolvente (estado libre) hacia el sitio de unión en la proteína (estado asociado). El valor del coeficiente  $\alpha$  se fijó en 0.233 de acuerdo a trabajos previos donde se emplean otros citocromos.<sup>[112]</sup> Para cada ligando, el coeficiente  $\beta$  se calculó como  $\beta_{FEP}$  según el modelo de parametrización propuesto por Almlöf y cols.<sup>[183]</sup> (Tabla I.25) a partir de la Ecuación I.4:

$$\beta_{FEP} = \beta_0 + \frac{\sum_i w_i \Delta\beta_i}{\sum_i w_i} \quad (\text{Ec. I. 4})$$

---

<sup>182</sup> Pronk, S.; Apostolov, R.; Shirts, M.R.; Smith, J.C.; Kasson, P.M.; Spoel, D. Van Der; Hess, B.; Lindahl, E. Structural Bioinformatics Molecular Simulation Toolkit. *Bioinformatics* **2013**, 1–10

<sup>183</sup> Almlöf, M., Carlsson, J., and Åqvist, J. Improving the Accuracy of the Linear Interaction Energy Method for Solvation Free Energies. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, 3, 2162-2175.

Según este modelo los valores de  $\beta_0$  y  $\Delta\beta_i$  se relacionan con grupos químicos específicos (Tabla I.25), donde se emplea  $w_i = 1$  para los grupos funcionales neutros.

**Tabla I.25.** Coeficientes  $\beta$  optimizados según el Modelo E de Almlöf y cols.

$\beta_0$	0,43
$\Delta\beta_1(\text{alcoholes})$	-0,06
$\Delta\beta_2(1,2 - \text{aminas})$	-0,04
$\Delta\beta_3(1 - \text{amidas})$	-0,02
$\Delta\beta_4(\text{COOH})$	-0,03
$\Delta\beta_5(\text{aniones})$	0,02
$\Delta\beta_6(\text{cationes})$	0,09
$\Delta\beta_7(\text{otros})$	0

Se utilizó el parámetro  $D$  (Ecuación. I.5), para el cálculo del coeficiente  $\gamma$  mediante la ecuación  $\gamma = -0,95D - 2,06$ ; a partir del modelo de parametrización LIE-D.

$$D = \beta(\Delta\langle V_{l-s}^{el} \rangle + \Delta\langle V_{l-l}^{el} \rangle) - \alpha\Delta\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle \quad [kcal/mol] \quad (\text{Ec. I.5})$$

La afinidad entre una molécula diana y su inhibidor, puede ser evaluada como la energía libre de unión  $\Delta G_{exp} = RT * \ln K_i$ , donde  $R$  es la constante universal de los gases,  $T$  es la temperatura absoluta [K] y  $K_i$  representa la constante de equilibrio para el proceso de asociación proteína-inhibidor. Generalmente lo que se mide experimentalmente es la concentración de inhibidor, que reduce la actividad de una molécula diana en un 50% ( $IC_{50}$ ). La relación entre  $IC_{50}$  y la  $K_i$ , va estar dada según el mecanismo de inhibición; y asumiendo que los ligandos se comportaran como inhibidores reversibles competitivos el modelo propuesto responde a la expresión de la Ecuación I.6.<sup>[184]</sup>

$$K_i = \frac{IC_{50}}{L/K_d + 1} \quad (\text{Ec. I.6})$$

<sup>184</sup> Brandt, R.B.; Laux, J.E.; Yates, S.W. Calculation of Inhibitor  $K_i$  and Inhibitor Type from the Concentration of Inhibitor for 50 % Inhibition for Michaelis-Menten Enzymes. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **1987**, 37, 344–349.

### **5.10. Evaluación de la actividad antiproliferativa**

Los compuestos son sometidos a una evaluación de su actividad antiproliferativa *in vitro*, frente a un panel de 60 líneas celulares tumorales diferentes de origen humano, mediante un protocolo de cribado a dosis única establecido por el NCI. A continuación, se describe de forma general, el procedimiento establecido.<sup>[165]</sup>

Los compuestos seleccionados son inicialmente solubilizados en una mezcla DMSO: glicerol 9:1 a una concentración de 4.0 mM. En el momento de realizar los ensayos, la solución madre es diluida 1:400 hasta las mayores concentraciones previstas para cada uno de los compuestos (10  $\mu$ M). Las 60 líneas celulares de tumores humanos del panel se cultivan en un medio RPMI 1640 que contiene 5% de suero fetal bovino y 2 mM de *L*-glutamina. Las células se inoculan en pozos durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire y el 100% de humedad relativa, antes de adicionar los nuevos compuestos. Después de las 24 horas de incubación, dos pozos de cada línea celular son fijados con ácido tricloroacético (TCA) con el fin de medir la población celular antes de la adición del fármaco (tiempo cero, Tz). Posteriormente, alícuotas de 100  $\mu$ L del doble de la concentración deseada de las soluciones de los nuevos compuestos se adicionan a cada uno de los pozos que ya contiene 100  $\mu$ L del medio de cultivo. La solución del compuesto a evaluar contiene gentamicina (antibiótico) a una concentración de 50  $\mu$ g/mL. Inmediatamente después que se ha efectuado la adición del fármaco, las células se incuban durante 48 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de aire y el 100% de humedad relativa. Pasado este tiempo, se fijan las células con TCA y, a continuación, se adiciona una solución de Sulforodamina B en 1% de ácido acético, y nuevamente se incuban durante 10 min a temperatura ambiente. Después de la tinción se lee la absorbancia en un lector de placas a la longitud de onda de 515 nm. Con estos valores de absorbancia se determina el porcentaje de crecimiento celular (PC), teniendo en cuenta el tiempo cero (Tz), el control de crecimiento (C), y el crecimiento en presencia de los nuevos compuestos evaluados (Ti), usando las siguientes expresiones matemáticas:

$$PC = \frac{Ti - Tz}{C - Tz} * 100 \text{ (si } Ti \geq Tz) \quad [\text{Ec. I.7}]$$

$$PC = \frac{Ti - Tz}{Tz} * 100 \text{ (si } Ti < Tz) \quad [\text{Ec. I.8}]$$

**SEGUNDA PARTE**  
**HÍBRIDOS ESTEROIDE-[60]FULLERENO**



## **II.1. ANTECEDENTES**



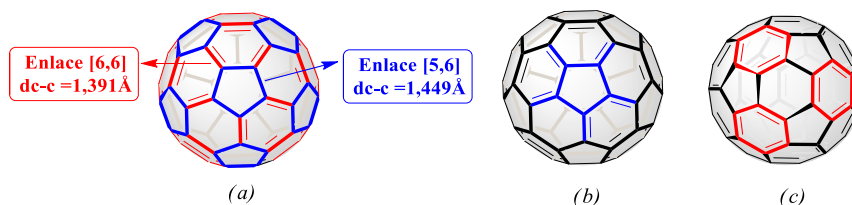
### II.1.1. [60]Fullereno. Estructura y propiedades.

Los fullerenos son moléculas altamente simétricas en forma de jaulas cerradas, donde cada átomo de carbono se encuentra enlazado a otros tres vecinos, en una formación de anillos de cinco y seis miembros.<sup>[13]</sup>

El más estudiado de los fullerenos es el que contiene sesenta átomos de carbono, nombrado según la nomenclatura de la IUPAC ( $C_{60}$ - $I_h$ )[5,6]fullereno. Está constituido por 30 dobles enlaces carbono-carbono, formando una estructura estable con geometría icosaédrica ( $I_h$ ), donde cada pentágono está rodeado por hexágonos, en correspondencia con los postulados de la regla del pentágono aislado.<sup>[185]</sup>

Mediante el estudio de su estructura por difracción de rayos-X, se determina que el  $C_{60}$  tiene un diámetro medio de  $7.1 \text{ \AA}$ .<sup>[186]</sup> Tomando en cuenta los radios de van der Waals de los átomos de carbono, el diámetro externo es  $10.4 \text{ \AA}$  y el interno es de  $3.5 \text{ \AA}$ . Además, como consecuencia de la presencia de anillos de cinco y seis miembros en su estructura, los experimentos mostraron la existencia de dos tipos de enlace: denominados enlaces de unión entre dos hexágonos o “enlaces cortos” ([6,6], distancia media =  $1,391 \text{ \AA}$ ), y enlaces de unión entre un hexágono y un pentágono “enlaces largos” ([5,6], distancia media =  $1,449 \text{ \AA}$ ) (Figura II.1a).

El  $C_{60}$  presenta una baja deslocalización electrónica sobre la superficie esférica, donde los 30 dobles enlaces están localizados en los anillos de seis miembros. De esta forma su estructura electrónica puede ser descrita como subestructuras fusionadas de [5]radialeno para los pentágonos y 1,3,5-ciclohexatrieno para los hexágonos (Figura II.1b y c).<sup>[13]</sup>



**Figura II.1:** Representación esquemática de (a) diferentes tipos de enlaces, y subestructuras de (b) [5]radialeno y (c) 1,3,5-ciclohexatrieno en el  $C_{60}$ .

<sup>185</sup> Kroto, H.W. The stability of the fullerenes  $C_n$ , with  $n = 24, 28, 32, 36, 50, 60$  and  $70$ . *Nature*, **1987**, 329, 529-531.

<sup>186</sup> Hawkins, J.M.; Meyer, A.; Lewis, T.A.; Loren, S.; Hollander, F.J. Crystal structure of osmylated  $C_{60}$ : confirmation of the soccer ball framework. *Science*, **1991**, 252, 312-313.

El [60]fullereno es muy poco soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos y forma agregados moleculares, lo que provoca su baja solubilidad.<sup>[14]</sup> Este hecho se justifica, ya que al ser descrito como un sólido de van der Waals, presenta débiles interacciones intermoleculares en el que las moléculas esféricas se encuentran rotando libremente a temperatura ambiente. Por lo tanto, la energía requerida para romper las interacciones del disolvente no se compensa con la interacción entre el soluto y el disolvente.

En la Tabla II.1 se muestra la solubilidad de este alótropo del carbono en algunos disolventes comunes. Como se puede observar, en disolventes polares como el metanol, tetrahidrofurano y agua, es prácticamente insoluble. Esta baja solubilidad también puede ser apreciada en alcanos, mientras que en cloroalcanos es ligeramente superior. Por otro lado, en disolventes aromáticos y en el disulfuro de carbono la solubilidad es considerablemente mayor.

**Tabla II.1:** Solubilidad del C<sub>60</sub> en varios disolventes.<sup>[13]</sup>

Disolvente	[C <sub>60</sub> ] (mg/mL)
Agua	$1.3 \cdot 10^{-11}$
Metanol	$3.5 \cdot 10^{-5}$
Tetrahidrofurano	0.000
<i>n</i> -Pentano	0.005
<i>n</i> -Hexano	0.043
Cloroformo	0.16
Diclorometano	0.26
Tolueno	2.8
Disulfuro de carbono	7.9
1,2-Diclorobenceno	27
1-Cloronaftaleno	51

La solubilidad juega un papel fundamental en los procesos de extracción, purificación cromatográfica y modificación química de fullerenos, por lo que esta propiedad del C<sub>60</sub> ha sido investigada sistemáticamente.<sup>[15]</sup>

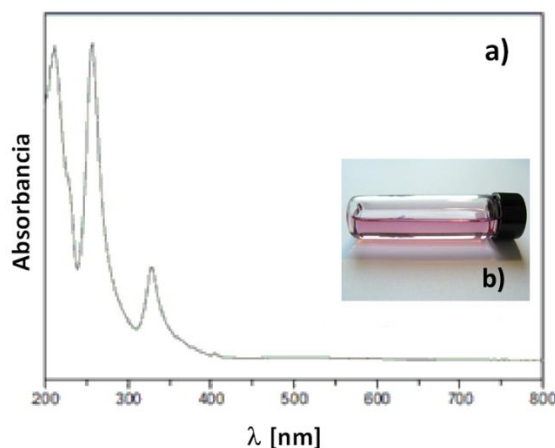
El espectro UV/Vis del C<sub>60</sub> se caracteriza por bandas de absorción intensas entre 190 y 410 nm (máximos a 208, 253 y 326 nm), así como débiles bandas anchas en la zona del visible (Figura II.2 a). Las absorciones entre 190 y 410 nm se deben a transiciones permitidas <sup>1</sup>T<sub>1u</sub>-<sup>1</sup>A<sub>g</sub>, mientras que las que se encuentran entre 410 y 620 nm corresponden a transiciones singlete-singlete prohibidas por simetría.<sup>[187]</sup> Estas últimas son las

---

<sup>187</sup> Ma, B.; Bunker, C.E.; Guduro, R.; Zhang, X.-F.; Sun, Y.-P. Quantitative Spectroscopic Studies of the Photoexcited State Properties of Methano- and Pyrrolidino-[60]fullerene Derivatives. *J. Phys. Chem. A.* **1997**, 101, 5626–5632.

responsables del color púrpura del  $C_{60}$  (Figura II.2 b). Por otra parte, la funcionalización química del  $C_{60}$  modifica su estructura electrónica, lo que es fuertemente reflejado en el espectro UV/Vis de sus derivados.

La derivatización de este alótropo del carbono reduce su simetría, aumentando de esta forma la probabilidad de transiciones. Consecuentemente, derivados fullerénicos muestran fuertes absorciones en la región visible del espectro con respecto al  $C_{60}$  sin funcionalizar. Así, muy característico para todos los productos de monoación es una débil banda de absorción en los  $\sim 430$  nm.<sup>[188]</sup> La influencia de una subsecuente funcionalización puede seguirse por el color característico de los correspondientes derivados en solución. La introducción de grupos adicionales reduce el sistema- $\pi$  del núcleo de  $C_{60}$ , con cambios de color desde marrón (monoadductos), naranja (pentaadductos) hasta amarillo (hexaadductos).<sup>[187,188]</sup>



**Figura II.2:** a) Espectro UV/Vis en hexano del  $C_{60}$ , y b) disolución en tolueno.

### II.1.2. Reactividad química del $C_{60}$ . Propiedades de sus derivados.

Después de su descubrimiento, los fullerenos se producen solamente en pequeñas cantidades, lo cual dificulta su estudio. A partir de 1990, la química del [60]fullereno experimenta un auge importante debido a que Huffman y Krätschmer<sup>[189]</sup> establecen un método para su producción a escala multigramo.

Teniendo en cuenta las características estructurales del [60]fullereno, de no contener hidrógenos ni otros grupos funcionales, las reacciones de sustitución no son

<sup>188</sup> Armaroli, N.; Diederich, F.; Buchecker, C.O.D.; Falmigni, L.; Marconi, G.; Nierengarten, J.-F.; Sauvage, J.-P. A Copper(I)-Complexed Rotaxane with Two Fullerene Stoppers: Synthesis, Electrochemistry, and Photoinduced Processes. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 406–416.

<sup>189</sup> Krätschmer, W.; Lamb, L.D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D.H. Solid  $C_{60}$ : A new form of carbon. *Nature*, **1990**, 347, 354–358.

posibles para funcionalizar estos sistemas. Esta simple consideración pone de manifiesto la gran diferencia existente entre la reactividad de los fullerenos y la de los sistemas aromáticos planos clásicos. Ello conduce a tres tipos básicos de transformaciones químicas sobre la molécula de C<sub>60</sub>: las reacciones de transferencia electrónica, las reacciones de apertura y degradación, y las reacciones de adición. El estudio de estas últimas indica que el comportamiento químico del fullereno es análogo al de una poliolefina electrodeficiente con los pares electrónicos localizados, lo que trae como consecuencia que sus enlaces [6,6] actúen como buenos dienófilos y puedan reaccionar con diferentes tipos de nucleófilos.<sup>[15]</sup> Además, la adición de una molécula orgánica al C<sub>60</sub> produce un único monoderivado conocido como monoadducto, debido a su elevada simetría, lo que no ocurre en el C<sub>70</sub> y los fullerenos superiores.<sup>[13]</sup>

Aunque la funcionalización exoédrica de los fullerenos ha alcanzado un gran desarrollo, las reacciones de cicloadición han sido, sin duda, las más estudiadas y las que han conducido a un mayor número de derivados. Estas constituyen una poderosa herramienta sintética, ya que casi cualquier fragmento molecular puede ser enlazado covalentemente al fullereno por la cicloadición de adendos adecuados. Sin embargo, estos aductos pueden experimentar retrocicloadición, por lo que hay que tener precaución al manipular los productos obtenidos.<sup>[190]</sup>

Entre las reacciones representativas que experimenta el C<sub>60</sub> se encuentran las cicloadiciones [2+1], [2+2], [3+2], y [4+2], con formación de cicloaductos estables de anillos de tres, cuatro, cinco y seis miembros respectivamente (Esquema II.1), los cuales son ampliamente descritos en la literatura.<sup>[13,15, 191]</sup>

De esta forma, los derivados obtenidos mediante estas reacciones muestran un amplio rango de interesantes propiedades físicas, químicas y biológicas, lo que los hace atractivos para la preparación de estructuras supramoleculares<sup>[192]</sup> y nanoestructuradas,<sup>[193]</sup> el desarrollo de nuevos materiales avanzados para dispositivos

---

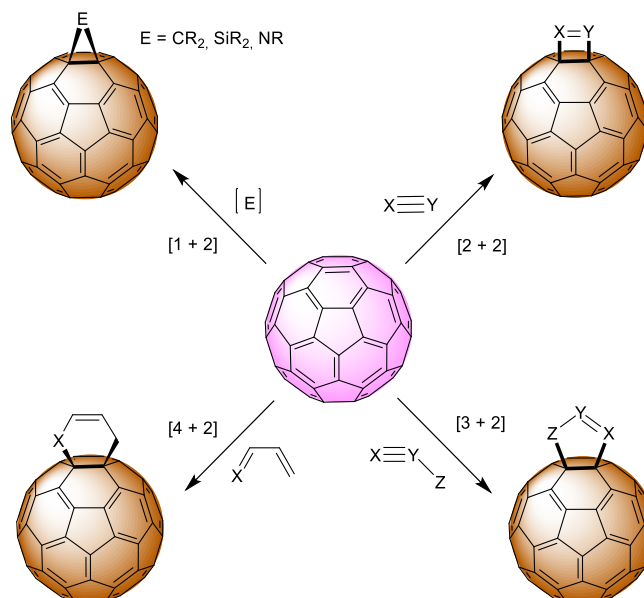
<sup>190</sup> a) Herranz, M.A.; Martín, N.; Ramey, J.; Guldi, D.M. Thermally reversible C<sub>60</sub>-based donor-acceptor ensembles. *Chem. Commun.* **2002**, 2968-2969; b) Martín, N.; Altable, M.; Filippone, S.; Martín-Domenech, A.; Martínez-Álvarez, R.; Suárez, M.; Plonska-Brzezinska, M.E.; Lukoyanova, O.; Echegoyen, L. Highly efficient retrocycloaddition reaction of isoxazolino[4,5:1,2][60]- and -[70]fullerenes. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3840-3846.

<sup>191</sup> Guldi, D.M.; Martín, N. *Fullerenes: From synthesis to optoelectronic properties*, Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, **2002**.

<sup>192</sup> Bonifazi, D.; Enger, O.; Diederich, F. Supramolecular [60]fullerene chemistry on surfaces. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 390-414.

<sup>193</sup> Lu, F.; Neal, E.A.; Nakanishi, T. Self-Assembled and Nonassembled Alkylated-Fullerene Materials. *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 1834-1843.

optoelectrónicos<sup>[194]</sup> y materiales poliméricos,<sup>[195]</sup> así como la obtención de compuestos potenciales para aplicaciones biomédicas.<sup>[16]</sup>



**Esquema II.1.** Reacciones de cicloadición típicas sobre [60]fullereno con formación de los correspondientes monoadductos.

Aunque se describen numerosos ejemplos de reacciones de Diels-Alder ([4+2]) en fullerenos, las más empleadas para funcionalizar el C<sub>60</sub> son la cicloadición 1,3-dipolar de iluros de azometino (obtención de fulleropirrolidinas a partir de la reacción [3+2] de Prato)<sup>[196]</sup> y la de ciclopropanación (obtención de metanofullerenos a partir de la reacción [2+1] de Bingel- Hirsch).<sup>[197]</sup>

### II.1.2.1. Obtención de Metanofullerenos. Ciclopropanación de Bingel-Hirsch.

La ciclopropanación (u obtención de anillos de tres miembros) del C<sub>60</sub> representa una de las más eficaces alternativas de funcionalizar fullerenos. Las primeras publicaciones corresponden a los trabajos realizados por Wudl y col.,<sup>[198]</sup> donde describen

<sup>194</sup> a) Hizume, Y.; Tashiro, K.; Charvet, R.; Yamamoto, Y.; Saeki, A.; Seki, S.; Aida, T. Chiroselective Assembly of a Chiral Porphyrin-Fullerene Dyad: Photoconductive Nanofiber with a Top-Class Ambipolar Charge-Carrier Mobility. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6628–6629; b) Guldi, D.M.; Martín, N. Functionalized Fullerenes: Synthesis and Functions, *Comprehensive Nanoscience and Technology*, **2011**, 5, 378-398.

<sup>195</sup> Martín, N.; Giacalone, F. *Fullerene Polymers. Synthesis, Properties and Applications*, Eds. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, **2009**; b) Harris, P.J. F. Fullerene Polymers: A Brief Review. *C*, **2020**, 6, 71.

<sup>196</sup> Maggini, M.; Scorrano, G.; Prato, M. Addition of azomethine ylides to C<sub>60</sub>: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9798-9799.

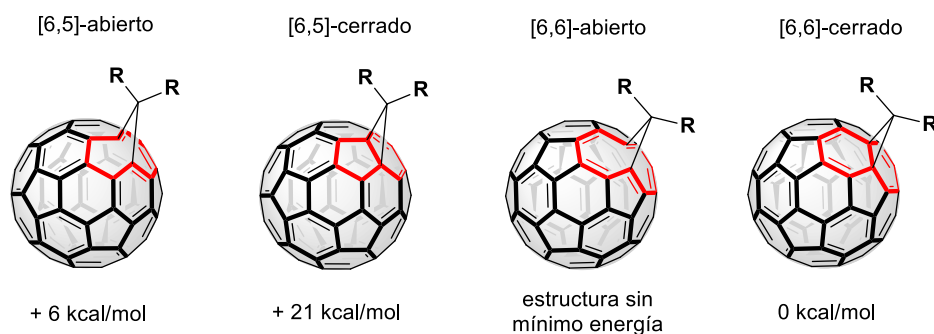
<sup>197</sup> a) Bingel, C. Cyclopropanierung von fullerenen, *Chem. Ber.* **1993**, 126, 1957-1959; b) Camps, X.; Hirsch, A. Efficient cyclopropanation of C<sub>60</sub> starting from malonates, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1997**, 11, 1595-1596.

<sup>198</sup> Suzuki, T.; Li, Q.; Khemani, C.; Wudl F.; Almarsson, Ö. Systematic Inflation of Buckminsterfullerene C<sub>60</sub>: synthesis of diphenylfulleroids C<sub>61</sub> to C<sub>66</sub>. *Science*, **1991**, 254, 1186-1188.

la obtención de metanofullerenos por adición de diazocompuestos al  $C_{60}$ . Desde entonces, múltiples trabajos se realizan para desarrollar la síntesis de esta familia de compuestos, con vista a la preparación de derivados fullerénicos con potenciales aplicaciones prácticas.<sup>[199]</sup>

Entre los métodos más empleados para la obtención de metano[60]fullerenos se encuentran: (a) adición térmica de diazocompuestos seguida de termólisis o fotólisis,<sup>[200]</sup> (b) adición de carbenos libres,<sup>[201]</sup> y (c) adición/desplazamiento intramolecular de haluro (reacción de Bingel-Hirsch).<sup>[197,199]</sup>

Teóricamente, pueden existir cuatro posibles metanofullerenos isómeros: [6,5]-abierto, [6,5]-cerrado, [6,6]-abierto y [6,6]-cerrado. Esto se debe a la presencia de los dos tipos de enlaces diferentes en el  $C_{60}$ , [5,6] y [6,6], en los que puede ocurrir la adición; así como a la posibilidad de isomería de valencia, análoga a la encontrada en los metanoanulenos, dependiendo de si el enlace transanular de la subunidad de metanoanuleno en la esfera del fullereno está abierto o cerrado. Experimentalmente, los isómeros [6,5]-cerrado y [6,6]-abierto no son observados. Estudios computacionales muestran que estos están energéticamente desfavorecidos porque contienen en su estructura, dos o tres dobles enlaces endocíclicos localizados en pentágonos (Figura II.3).<sup>[202]</sup>



**Figura II.3.** Isómeros posibles de metanofullerenos y sus energías relativas por cálculos semiempíricos PM3. (Unidad de metanoanuleno resaltada en rojo).

<sup>199</sup> Nierengarten, J.F. *Synthesis of methanofullerenes for materials science and biological applications*, en Fullerenes: From synthesis to optoelectronic properties, Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda, **2002**, Capítulo 4, p. 51..

<sup>200</sup> Biglova, Y.N. [2 + 1] Cycloaddition reactions of fullerene  $C_{60}$  based on diazo compounds. *Beilstein J. Org. Chem.* **2021**, 17, 630–670.

<sup>201</sup> Yinghuai, Z.; Bahnmueller, S.; Chibun, C.; Carpenter, K.; Hosmane, N.S.; Maguire J.A. An effective system to synthesize methanofullerenes: substrate-ionic liquid-ultrasonic irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 5473-5476.

<sup>202</sup> Diederich, F.; Isaacs, L.; Philp D. Syntheses, structures, and properties of methanofullerenes. *Chem. Soc. Rev.* **1994**, 243-255.

Los isómeros [6,5]-abierto solamente son formados en la cicloadición 1,3-dipolar de diazoalcanos y  $\alpha$ -diazocarbonilos al C<sub>60</sub>, bajo control cinético de la reacción,<sup>[200]</sup> siendo necesarios posteriores procesos térmicos o fotoquímicos para la conversión en los isómeros [6,6]-cerrados, térmicamente más estables. Por el contrario, cuando la ciclopropanación se realiza empleando la adición de carbenos o la reacción de Bingel-Hirsch, se obtienen exclusivamente metanofullerenos [6,6]-cerrados,<sup>[202]</sup> sin la necesidad de realizar procedimientos tediosos de equilibrios térmicos.

La reacción de Bingel-Hirsch tiene como ventajas: los buenos rendimientos que se pueden alcanzar bajo condiciones moderadas de reacción, y el fácil acceso en un único paso a la formación de aductos superiores (desde bis- hasta hexakisaductos).<sup>[203]</sup> Es por ello que constituye el procedimiento que se utiliza regularmente para la obtención de metanofullerenos.

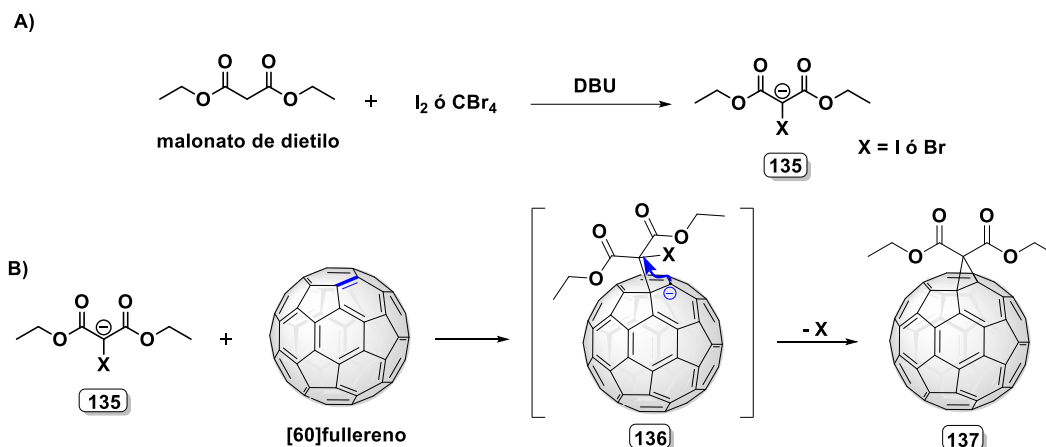
En esta ciclopropanación, como se ilustra en el Esquema II.2 B), inicialmente ocurre una adición del  $\alpha$ -halocarbanión **135** - formado por la acción previa de una base - al C<sub>60</sub>, seguida por un desplazamiento intramolecular del haluro por el centro aniónico generado sobre el fullereno **136**, lo que permite que se forme el correspondiente metanofullereno **137**, mediante un mecanismo de adición-eliminación.<sup>[199]</sup> Los metano[60]fullerenos aislados son térmicamente estables y presentan un anillo rígido de ciclopropano que mantiene direccionalmente separados los grupos iloxicarbonilos. Entre los reactivos más empleados en esta reacción se encuentran los malonatos que, al reaccionar con I<sub>2</sub><sup>[203]</sup> ó CBr<sub>4</sub><sup>[197]</sup> en presencia de DBU (1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-eno) como base, dan lugar al  $\alpha$ -halomalonato **135** *in situ* que reacciona con el [60]fullereno (Esquema II.2 A).

La reacción de Bingel-Hirsch no está limitada solamente al empleo de malonatos,<sup>[197]</sup> sino que también resulta efectiva para compuestos que presenten protones ácidos entre los que se describen ésteres fosfónicos y trihalometanos,<sup>[204]</sup>  $\alpha$ -

<sup>203</sup> a) Nierengarten, J.F.; Gramlich, V.; Cardullo, F.; Diederich, F. Regio and diastereoselective bisfunctionalization of C<sub>60</sub> and enantioselective synthesis of a C<sub>60</sub> derivative with a chiral addition pattern. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2101-2103; b) Pavlovic, R.Z.; Mitrovic, A.; Coldren, W.H.; Bielakovic, M.S. Cyclopropanation Reactions of Azomethine Ylides and 1,3- dienes on the C<sub>2v</sub>-Symmetrical Pentakisadducts. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (4), 2166-2172.

<sup>204</sup> Cheng, F.; Yang, X.; Zhu, H.; Song, Y. Synthesis and optical properties of tetraethyl methano[60]fullerenediphosphonate. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 3947-3952.

bromonitrometanos y  $\alpha$ -bromocianoacetatos,<sup>[205]</sup> así como más recientes  $\beta$ -cetoesteres<sup>[206]</sup> y  $\alpha$ -halocetonas,<sup>[207]</sup> Con el objetivo de mejorar los rendimientos de reacción se han realizado modificaciones a la técnica clásica, desarrollando ésta en ausencia de disolventes,<sup>[208]</sup> empleando técnicas no convencionales de síntesis y sustituyendo a la DBU por catalizadores como la trietilamina, la piperidina y el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .<sup>[209]</sup>



**Esquema II.2.** Mecanismo de la reacción de Bingel-Hirsch entre el malonato de dietilo y el  $\text{C}_{60}$ .

Mediante la reacción de Bingel se pueden obtener derivados fullerénicos con variedad de propiedades físico-químicas y mecánicas, los que han demostrado su aplicación en el campo de los materiales orgánicos. La gran cantidad de metanofullerenos con interesantes funciones, donde se combinan las propiedades físicas del núcleo carbonado del  $\text{C}_{60}$  y las propiedades específicas del adendo orgánico empleado en la funcionalización, lo evidencian. De esta forma, se describe la síntesis de sistemas porfirina-metanofullerenos **138**, útiles en procesos de transferencia electrónica

<sup>205</sup> Benito, A.M.; Darwish, A.D.; Kroto, H.W.; Meidine, M.F.; Taylor, R.D.; Walton, R. Synthesis and characterization of the methanofullerenes,  $\text{C}_{60}$  (CHCN) and  $\text{C}_{60}$  (CBr<sub>2</sub>). *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1085–1094.

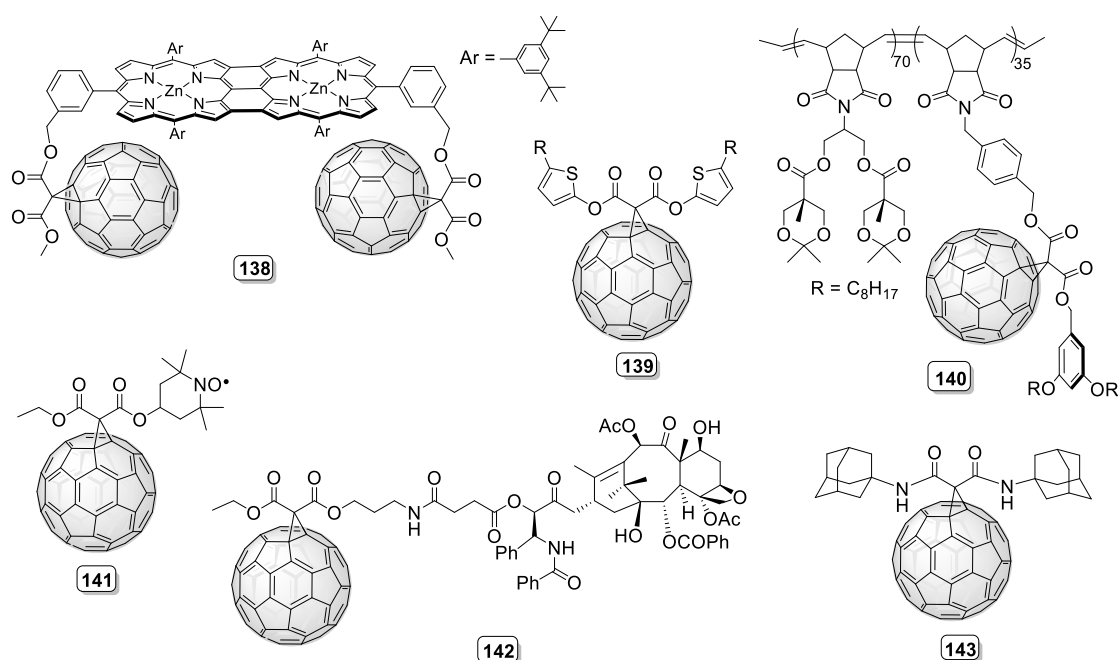
<sup>206</sup> Yang, H.-L.; Xu, L.-J.; Li, W.-Z.; Sun, T.; Duan, B.-R.; Chen, S.; Gao, X. Base-iodine-promoted metal-catalyst-free reactions of [60]fullerene with  $\beta$ -keto esters for the selective formation of [60]fullerene derivatives. *RSC Adv.*, **2020**, *10*, 24549.

<sup>207</sup> Biglova, Y.N.; Sakhautdinov, I.M.; Garifullin, R.N.; Sakhautdinova, G.F.; Mustafin, A.G. Kinetic investigation of the cyclopropanation process of fullerene  $\text{C}_{60}$  by halogenmethyl ketones under the conditions of the Bingel reaction. *New J. Chem.* **2020**, *44*, 7277–7285.

<sup>208</sup> Zhang, T.-H.; Wang, G.-W.; Lu, P.; Li, Y.-J.; Peng, R.-F.; Liu, Y.-Ch.; Murataand, Y.; Komatsu, K. Solvent-free reactions of  $\text{C}_{60}$  with active methylene compounds; either with or without carbon tetrabromide; in the presence of bases under high-speed vibration milling conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1698–1702.

<sup>209</sup> Moriwaki, K.; Matsumoto, F.; Takao, Y.; Shimizu, D.; Ohno, T. Synthesis and properties of novel methanofullerenes having ethylthienyl and/or *n*-pentyl group for photovoltaic cells. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 7316–7321.

fotoinducida<sup>[210]</sup> y materiales aceptores de electrones tipo *n* (**139**), para el diseño de celdas solares orgánicas,<sup>[211]</sup> así como la preparación de materiales poliméricos **140** con propiedades anfifílicas en disolución<sup>[212]</sup> (Figura II.4). Igualmente, con el empleo de esta reacción se han sintetizado metanofullerenos solubles en sistemas acuosos, con vistas a sus posibles aplicaciones biológicas.<sup>[213]</sup> Como ejemplos, Nuretdinov y col.<sup>[214]</sup> obtienen algunos monoadductos de nitroso-metanofullereno **141**, capaces de atrapar radicales libres; mientras que se obtuvieron también los conjugados **142**<sup>[215]</sup> y **143**,<sup>[216]</sup> los cuales pueden utilizarse para desarrollar sistemas de liberación de fármacos (ver Figura II.4).



**Figura II.4.** Metano[60]fullerenos obtenidos por reacción de Bingel con interesantes estructuras y propiedades.

<sup>210</sup> Bonifazi, D.; Accorsi, G.; Aramaroli, N.; Song, F.; Palkar, A.; Echegoyen, L.; Scholl, M.; Seiler, P.; Jaun, B.; Diederich, F. Oligoporphyrin arrays conjugated to [60]fullerene: preparation. NMR analysis, and photophysical and electrochemical properties. *Helv. Chim. Acta*, **2005**, *88*, 1839-1884.

<sup>211</sup> Bagher, A. M. Introduction to Organic Solar Cells. *Sustainable Energy*, **2014**, *2* (3), 85-90.

<sup>212</sup> Ball, Z.T.; Sivula, K.; Fréchet, J.M.J. Well-Defined Fullerene-Containing Homopolymers and Diblock Copolymers with High Fullerene Content and their use for Solution-Phase and Bulk Organization *Macromolecules*. **2006**, *39*, 70-72.

<sup>213</sup> a) Anilkumar, P.; Lu, F.; Cao, L.; Luo, P. G.; Liu, J.-H.; Sahu, S.; Tackett II, K.N.; Wang, Y.; Sun, Y.-P. Fullerenes for Applications in Biology and Medicine. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2045-2059; b) Montellano, A.; Da Ros, T.; Bianco, A.; Prato, M. Fullerene C<sub>60</sub> as a multifunctional system for drug and gene delivery. *Nanoscale*. **2011**, *3*, 4035-4041

<sup>214</sup> Gubskaya, V.P.; Berezhnaya, L. Sh.; Gubaidullin, A.T.; Faingold, I.I.; Kotelnikova, R.A.; Konovalova, N.P.; Morozov, V.I.; Litvinov, I.A.; Nuretdinov, I.A. Synthesis, structure and biological activity of nitroxidemalonate methanofullerenes. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 976-981.

<sup>215</sup> Gautam, A.; Koshkina, N.V. Paclitaxel (Taxol) and Taxoid Derivates for Lung Cancer Treatment: Potential for Aerosol Delivery. *Curr. Cancer Drug Targets*, **2003**, *3*, 287-296.

<sup>216</sup> Nakazono, M.; Hasegawa, S.; Yamamoto, T.; Zaitso, K. Synthesis of 61-bis(1-adamantylcarbamoyl)-1,2-methano[60]fullerene and its antagonistic effect on haloperidol-induced catalepsy in mice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5619-5621.

### II.1.2.2. Obtención de fulleropirrolidinas. Reacción de cicloadición [3+2] de Prato.

Las cicloadiciones [3+2] se han utilizado también para funcionalizar el [60]fullereno, encontrándose ejemplos de adiciones de alquil y arilazidas,<sup>[217]</sup> óxidos de nitrilo,<sup>[218]</sup> iluros de azometino,<sup>[219]</sup> entre otras. Dentro de este grupo, la adición de iluros de azometino es la más frecuente debido a la alta estabilidad de los derivados formados, aunque son reacciones en equilibrio, que ocurren bajo el principio de reversibilidad microscópica, y pueden sufrir retrocicloadición.<sup>[220]</sup>

Maggini y Prato<sup>[196]</sup> describieron una metodología para la obtención de fulleropirrolidinas a partir de la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de iluros de azometino sobre el C<sub>60</sub>. Este es un procedimiento ventajoso por la sencillez sintética y la disponibilidad de los reactivos empleados. La reacción provee fullerenos funcionalizados con una alta selectividad, debido a que la cicloadición es un proceso concertado que ocurre siempre sobre el enlace [6,6] del C<sub>60</sub>, y además permite la obtención de fulleropirrolidinas con diferentes sustituyentes en el anillo heterocíclico que se genera.

En esta reacción el iluro de azometino **145**, que constituye el intermediario 1,3-dipolar, es generado *in situ* por descarboxilación de la sal de imino resultante de la condensación de  $\alpha$ -aminoácidos con aldehídos o cetonas. El primer ejemplo, descrito en 1993,<sup>[196]</sup> involucra la síntesis de la *N*-metilfulleropirrolidina **146** por reacción de sarcosina **144** y formaldehído en reflujo de tolueno con C<sub>60</sub>, obteniéndose con rendimiento del 41% (Esquema II.3).

La gran variedad de iluros de azometino sustituidos que pueden generarse, y la elevada reactividad de estas especies frente a olefinas deficientes de electrones,<sup>[221]</sup> como clasifica el [60]fullereno, permite la obtención de fulleropirrolidinas altamente funcionalizadas con relativa facilidad. Esto se debe, a que la introducción de sustituyentes en tres posiciones diferentes del anillo pirrolidínico depende del aldehído o cetona

---

<sup>217</sup> Ikuma, N.; Mikie, T.; Doi, Y.; Nakagawa, K.; Kokubo, K.; Oshima, T. Facile and exclusive formation of aziridinofullerenes by acid-catalyzed denitrogenation of triazolinfullerenes. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 6040-6043.

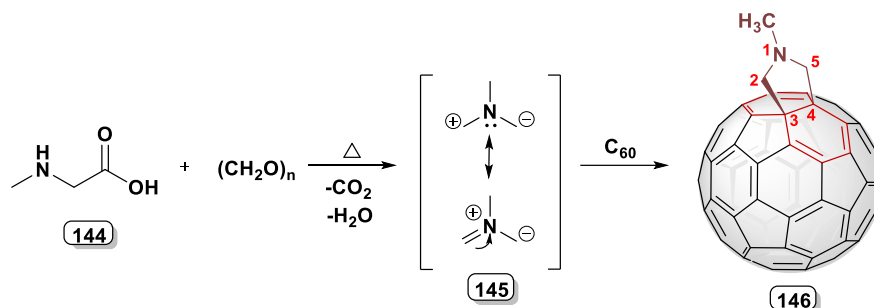
<sup>218</sup> Yang, H.T.; Ruan, X.J.; Miao, C.B.; Sun, X.Q. An efficient one-step synthesis of fulleroisoxazolines and fulleropyrazolines mediated by (diacetoxyiodo)benzene. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6056-6059.

<sup>219</sup> Zhu, S.E.; Cheng, X.; Li, Y.J.; Mai, Ch.K.; Huang, Y.Sh.; Wang, G.W.; Peng, R.F.; Jin, B.; Chu, Sh.J. Study on the thermal reactions of [60]fullerene with amino acids and amino acid esters. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 8720-8729.

<sup>220</sup> Morera-Boado, C.; Martínez González, M.; Miranda-Quintana, R.A.; Suárez, M.; Martínez-Álvarez, R.; Martín, N.; García de la Vega, J.M. Theoretical Study on the Mechanism of the Thermal Retro-Cycloaddition of Isoxazolinofullerenes. *J Phys Chem A.* **2016**, *120*, 8830-8842.

<sup>221</sup> Pellissier, H. Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions. *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 3235-3285.

utilizado y el respectivo aminoácido. La reacción con aldehídos funcionalizados proporciona fulleropirrolidinas sustituidas en posición dos del anillo heterocíclico que se genera, mientras que la reacción con glicinas *N*-sustituidas, como la sarcosina **144**, conducen a fulleropirrolidinas *N*-sustituidas.



**Esquema II.3:** Obtención de fulleropirrolidina por cicloadición [3+2] de iluros de azometino al  $C_{60}$ .

Además es posible obtener, bajo condiciones moderadas de reacción, fulleropirrolidinas quirales con buenos rendimientos, a partir de la combinación de sales metálicas de Ag(I) o Cu(II) y complejos metálicos quirales en cantidades catalíticas, lo que permite generar pirrolidin[60]fullerenos con una elevada diastereoselectividad y un elevado exceso enantiomérico.<sup>[222]</sup>

A partir de iluros de azometino debidamente funcionalizados y de modificaciones químicas de los aductos formados, se diseñan estructuras fullerénicas con propiedades muy útiles para su potencial aplicación biológica<sup>[16, 213]</sup> y tecnológica.<sup>[191, 193, 194]</sup>

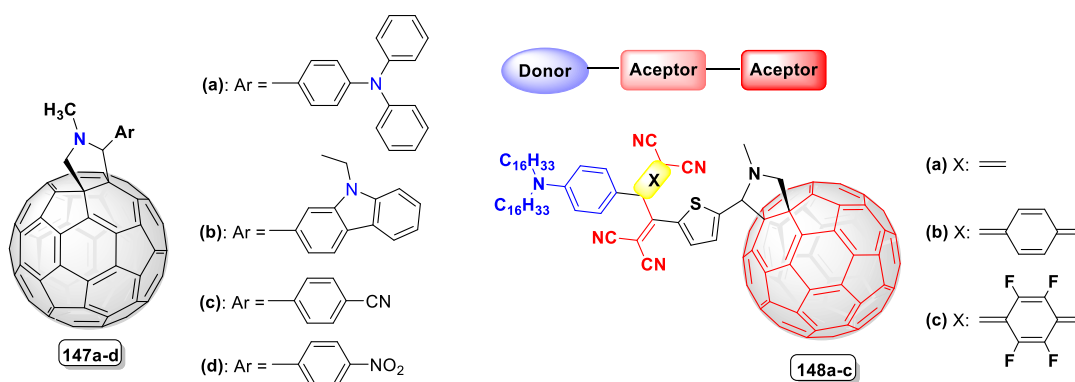
Entre las propiedades más estudiadas en derivados fullerénicos se encuentran las fotofísicas y electroquímicas, para la fabricación de dispositivos optoelectrónicos. Por ejemplo, las fulleropirrolidinas **147a-d** (Figura II.5), funcionalizadas con grupos electrodonantes como con grupos electroaceptores mediante la reacción de Prato, mostraron ser eficientes en el transporte de electrones, por lo que pueden ser empleadas como conductores tipo *n* en la construcción de transistores orgánicos de efecto de campo (OFETs) y celdas solares poliméricas.<sup>[223]</sup>

También se obtienen un gran número de fulleropirrolidinas para su uso en sistemas dador-aceptor. Para ello, el  $C_{60}$  se ha conjugado a diferentes dadores tales como

<sup>222</sup> Filippone, S.; Maroto, E.; Martín-Domenech, A.; Suárez, M.; Martín, N. An efficient approach to chiral fullerene derivatives by catalytic enantioselective 1,3-dipolar cycloaddition. *Nature Chem.* **2009**, *1*, 578-582.

<sup>223</sup> Song, H.; Choi, J.; Kim, K.; Jeong, H.J.; Kim, S.Y.; Kim, N.; Kim, F.S. Synthesis of pyrrolidino fullerenes and their applications as an *n*-type component in organic transistors and polymer solar cells. *Polym. Bull.* **2016**, *73*, 2477-2484.

dendrimeros,<sup>[224]</sup> porfirinas,<sup>[225]</sup> tetraiafulvaleno,<sup>[226]</sup> oligómeros  $\pi$  conjugados,<sup>[227]</sup> y recientemente a metalofullereno endohedrico ( $\text{Lu}_3\text{N}@I_h\text{-C}_{80}$ ),<sup>[228]</sup> entre otros. Como ejemplo, en la Figura II.5 se representan los derivados **148a-c**. Este nuevo tipo de complejo monodonor-biaceptor (D-A-A) exhibe notable propiedades de transferencia de carga y una respuesta óptica no lineal de tercer orden, de manera que se refuerzan las propiedades óptico-eléctricas de los materiales.<sup>[229]</sup>



**Figura II.5.** Ejemplos de fulleropirrolidinas obtenidas por reacción de Prato utilizadas en dispositivos optoelectrónicos.

Por otra parte, mediante la cicloadición [3+2] de Prato se hace posible la introducción de grupos funcionales hidrofílicos, los que incrementan grandemente la solubilidad del  $\text{C}_{60}$  en disolventes polares, haciéndolo más biocompatible.<sup>[16]</sup> Así, la conjugación de fulleropirrolidinas a moléculas biológicamente activas como péptidos,<sup>[230]</sup>

<sup>224</sup> Campidelli, S.; Lenoble, J.; Barbera, J.; Paolucci, F.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Deschenaux, R. Supramolecular fullerene materials: dendritic liquid-crystalline fulleropyrrolidines. *Macromolecules*, **2005**, *38*, 7915-7925.

<sup>225</sup> Sánchez, L.; Sierra, M.; Martín, N.; Myles, J.; Dale, T.J.; Jr. Rebek, J.; Seitz, W.; Guldi, D.M. Exceptionally strong electronic communication through hydrogen bonds in porphyrin- $\text{C}_{60}$  pairs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4637-4641.

<sup>226</sup> Giacalone, F.; Segura, J.L.; Martín, N.; Ramey, J.; Guldi, D.M. Probing molecular wires: synthesis, structural, and electronic study of donor-acceptor assemblies exhibiting long-range electron transfer. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 4819-4834.

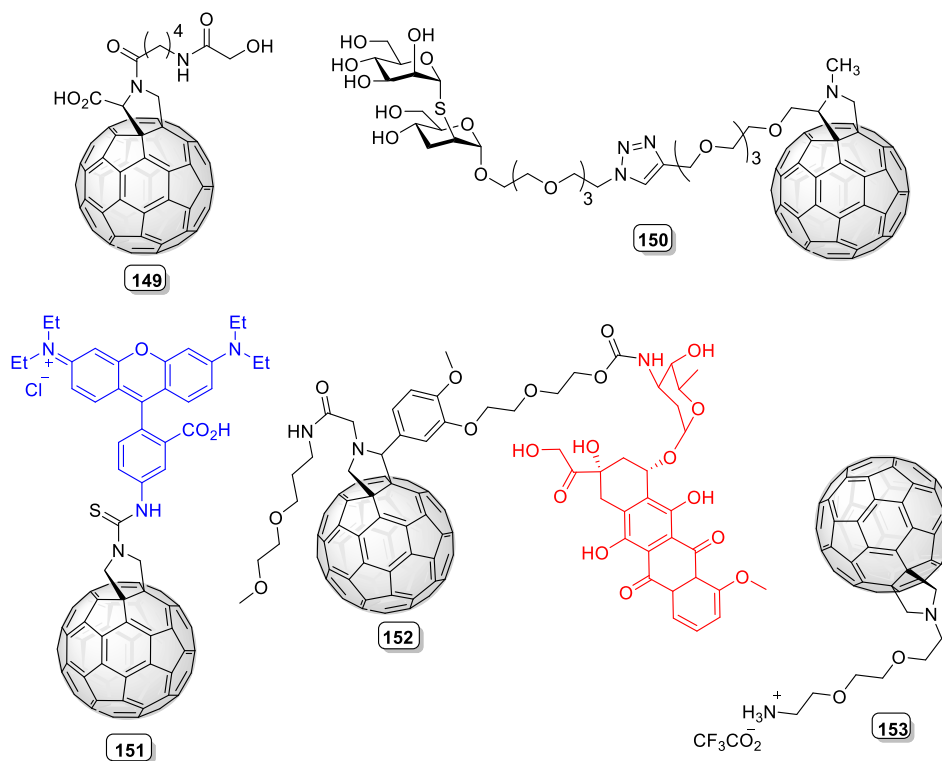
<sup>227</sup> Guldi, D.M.; Luo, C.P.; Swartz, A.; Gómez, R.; Segura, J.L.; Martín, N.; Brabec, C.; Sariciftci, N.S. Molecular engineering of  $\text{C}_{60}$ -based conjugated oligomer ensembles: modulating the competition between photoinduced energy and electron transfer processes. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1141-1152.

<sup>228</sup> Izquierdo, M.; Platzer, B.; Stasyuk, A. J.; Stasyuk, O.A.; Voityuk, A.A.; Cuesta, S.; Solà, M.; Guldi, D.M.; Martín, N. All-Fullerene Electron Donor-Acceptor Conjugates. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 6932-6937.

<sup>229</sup> Liu, X.; Wang, D.; Gao, H.; Yang, Z.; Xing, Y.; Cao, H.; He, W.; Wang, H.; Gu, J.; Hu, H. Click chemistry functionalization improving the wideband optical-limiting performance of fullerene derivatives. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 7341-7348.

<sup>230</sup> Aroua, S.; Schweizer, W.B.; Yamakoshi, Y.  $\text{C}_{60}$  Pyrrolidine Bis-carboxylic Acid Derivative as a Versatile Precursor for Biocompatible Fullerenes. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1688-1691.

carbohidratos,<sup>[231]</sup> compuestos aromáticos y heterociclos,<sup>[232]</sup> entre otras, han dado lugar a compuestos con potencial aplicación en el tratamiento de diferentes enfermedades. En particular, estos derivados han mostrado propiedades como antioxidante,<sup>[233]</sup> anticancerígena,<sup>[234]</sup> antiviral<sup>[235]</sup> y hasta inmunológica.<sup>[236]</sup> Algunos ejemplos son ilustrados en la Figura II.6.



**Figura II.6:** Derivados de fulleropirrolidinas con actividad biológica: agentes antivirales **149** y **150**; conjugados **151** y **152** empleados en terapia fotodinámica y como anticancerígeno, respectivamente; y sal *N*-pegilada **153** como modulador de la respuesta inmune.

<sup>231</sup> Csavas, M.; Demeter, T.; Herczeg, M.; Timari, I.; Kover, K.E.; Herczegh, P.; Borbas, A. Rapid synthesis of self-assembling 1,2-thiomannobioside glycoconjugates as potential multivalent ligands of mannose-binding lectins. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 6983-6986.

<sup>232</sup> a) Fazylov, S.D.; Nurkenov, O.A.; Arinova, A.E.; Seilkanov, T.M.; Tuktarov, A.R.; Khuzin, A.A.; Bakirova, R.E.; Muravleva, L.E. Synthesis and structure of *N*-methyl-1-[(4-bromo-3,5-dimethyl-1H-pyrazol-1-yl)phenyl]fullerene-C<sub>60</sub>-[1,9-*c*]pyrrolidine. *Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, 85, 1049-1051; b) Suárez, M.; Verdecia, Y.; Illescas, B.; Martínez-Alvarez, R.; Alvarez, A.; Ochoa, E.; Seoane, C.; Kayalib, N.; Martín, N. Synthesis and study of novel fulleropyrrolidines bearing biologically active 1,4-dihydropyridines. *Tetrahedron* **2003**, 59, 9179-9186.

<sup>233</sup> Enes, R.F.; Tomé, A.C.; Cavaleiro, J.A.S.; Amorati, R.; Fumo, M.G.; Pedulli, G.F.; Valgimigli, L. Synthesis and Antioxidant Activity of [60]Fullerene-BHT Conjugates. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4646-4653.

<sup>234</sup> Magoulas, G.E.; Bantzi, M.; Messari, D.; Voulgari, E.; Gialeli, C.; Barbouri, D. Synthesis and Evaluation of Anticancer Activity in Cells of Novel Stoichiometric Pegylated Fullerene-Doxorubicin Conjugates. *Pharm. Res.* **2015**, 32, 1676-1693.

<sup>235</sup> Yasuno, T.; Ohe, T.; Kataoka, H.; Hashimoto, K.; Ishikawa, Y.; Furukawa, K.; Tateishi, Y.; Kobayashi, T.; Takahashi, K.; Nakamura, S.; Mashino, T. Fullerene derivatives as dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, 31, 127675.

<sup>236</sup> Hirai, T.; Yoshioka, Y.; Udaka, A.; Uemura, E.; Ohe, T.; Aoshima, H.; Gao, J.Q.; Kokubo, K.; Oshima, T.; Nagano, K.; Higashisaka, K.; Mashino, T.; Tsutsumi, Y. Potential suppressive effects of two C<sub>60</sub> fullerene derivatives on acquired immunity. *Nanoscale Res. Lett.* **2016**, 11, 449-457.

### II.1.3. Híbridos esteroide-[60]fullereno.

El C<sub>60</sub> se ha unido covalentemente a esteroides con el objetivo fundamental de disminuir su carácter hidrófobo, y se ha comprobado que el fragmento esteroideal le confiere al conjugado una solubilidad adecuada en fluidos biológicos,<sup>[17]</sup> convirtiéndolos en moléculas biocompatibles. Sin embargo, existen muy pocas publicaciones basadas en híbridos del tipo esteroide-fullereno, respecto al mayor número descrito en la literatura científica de derivados fullerénicos unidos a otras biomoléculas.

Los reportes iniciales se remontan a mediados de la década de los 90 del siglo pasado y en general se pueden agrupar en dos grandes grupos según la metodología sintética de obtención del híbrido: (i) acoplamiento de esteroides funcionalizados al C<sub>60</sub> por reacciones de cicloadición (Diels-Alder, Prato o ciclopropanación fundamentalmente) y, (ii) mediante reacciones de esterificación/amidación de esteroides con cicloaductos del C<sub>60</sub> sintetizados previamente.

Entre las primeras investigaciones desarrolladas en este campo, se encuentran el empleo de la reacción de Diels-Alder entre dienos esteroidales análogos del colestano,<sup>[237]</sup> la testosterona<sup>[238]</sup> y la pregnenolona<sup>[239]</sup> con el C<sub>60</sub>, que actúa como dienófilo. Estudios preliminares indicaron que los cicloaductos sintetizados tenían actividad anticancerígena por mecanismos de inhibición enzimática para el derivado **154** (Figura II.7), mientras el conjugado **155** presentó actividad anti-VIH.

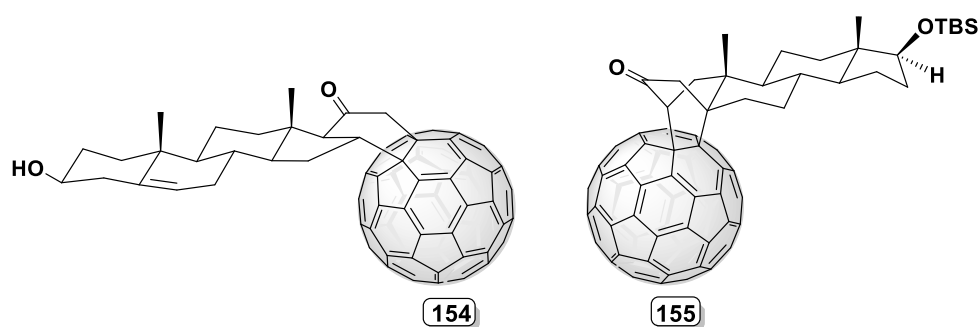


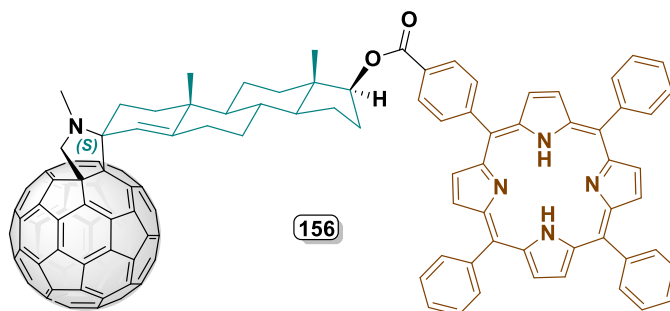
Figura II.7. Conjugados fullereno-esteroideales obtenidos mediante reacción de Diels-Alder.

<sup>237</sup> De Riccardis, F.; Izzo, I.; Tedesco, C.; Sodano, G. Synthesis of unusual cholestane analogs by Diels-Alder reaction. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2155-2158.

<sup>238</sup> Ganapathi, P.S.; Rubin, Y. Sequential "bis-Michael" additions of dienolates with C<sub>60</sub>: rapid access to sterically congested Buckminsterfullerene derivatives with defined stereochemistry. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 2954-2955.

<sup>239</sup> Li, L. S.; Hu, Y.; Wu, Y.; Wu, Y. L.; Yue, J.; Yang, F. Steroid-fullerene adducts from Diels-Alder reactions: characterization and the effect on the activity of Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2001**, 617-621.

Mediante la reacción de cicloadición 1,3-dipolar de iluros de azometino a fullerenos (reacción de Prato) se obtienen interesantes estructuras. Entre ellas se encuentra la síntesis de diferentes sistemas dador-aceptor fullereno-porfirinas **156** (Figura II.8), donde se emplean unidades esteroidales como espaciador, para estudiar sus propiedades fotofísicas y potenciales aplicaciones como fotosensibilizadores en la terapia fotodinámica.<sup>[240]</sup>



**Figura II.8.** Fulleropirrolidina esteroidal conjugada a una porfirina.

McFarland y col. patentaron la síntesis de híbridos esteroide-fullereno en los cuales, el colesterol o sus derivados están enlazados a través de enlaces éster, amida o éter al anillo pirrolidínico de un derivado fullerénico.<sup>[17]</sup>

De igual forma Bjelakovic y col.<sup>[241]</sup> describen la síntesis, caracterización, estudio morfológico y ensayos preliminares de actividad antioxidante de conjugados esteroide-péptido-[60]fullereno. Estos derivados se obtienen por acoplamiento entre péptidos-esteroidales de extremo *N*-terminal **158** con un intermediario de fulleropirrolidina (Fp) **157**, que posee una unidad de ácido  $\gamma$ -amino butírico (*GABA* por sus siglas en inglés) como grupo funcional (Esquema II.4). Así se obtuvieron dos nuevos híbridos covalentes de tipo Fp-GABA-Gly-GABA-Pregnenolona **159a** y Fp-GABA-GABA-Gly-GABA-Pregnenolona **159b** con rendimientos de 63 y 19% respectivamente.

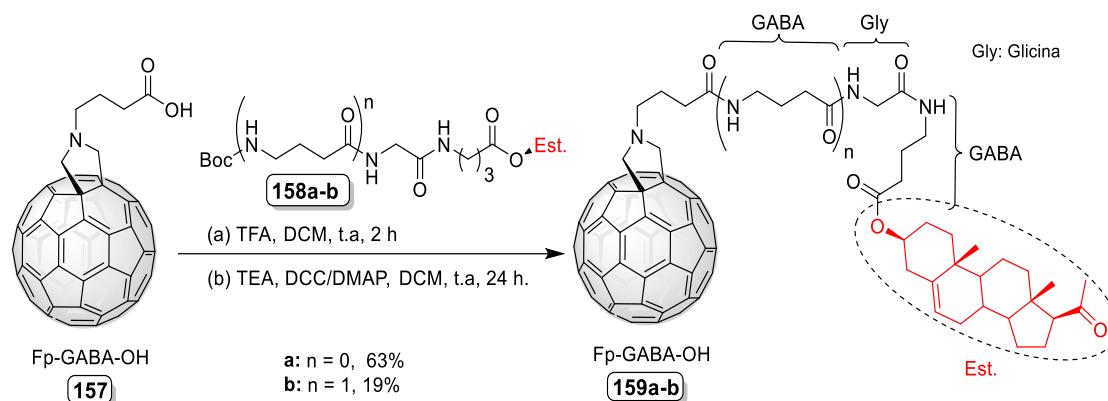
Estos compuestos se suman a otros híbridos tipo Fp-GABA-esteroides sintetizados previamente por los mismos autores, aislados con rendimientos entre 43 y 58 %.<sup>[242]</sup> La actividad antioxidante evaluada es doce y trece veces mayor para los productos obtenidos que la determinada para el C<sub>60</sub> y la vitamina C, respectivamente; esta última tomada como antioxidante de referencia.

<sup>240</sup> Fong II, R.; Schuster, D.I.; Wilson, S.R. Synthesis and photophysical properties of steroid-linked porphyrin-fullerene hybrids. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 729-732.

<sup>241</sup> Bjelakovic, M.S.; Kop, T.J.; Vlajic, M.; Dordevic, J.; Milic, D.R. Design, synthesis, and characterization of fullerene-peptide-steroid covalent hybrids. *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 8564-8570.

<sup>242</sup> Bjelakovic, M.S.; Godjevac, D.M.; Milic, D.R. Synthesis and antioxidant properties of fullero-steroidal covalent conjugates. *Carbon*, **2007**, *45*, 2260-2265.

Se realizaron adicionalmente pruebas de solubilidad en disolventes de diferente polaridad como tolueno,  $\text{CHCl}_3$ , DMSO, y en mezclas binarias de tolueno/ $\text{CHCl}_3$  (9:1) y  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:1). Los híbridos, particularmente el compuesto **159a**, tuvieron un aumento significativo de su solubilidad respecto al  $\text{C}_{60}$ , principalmente en los disolventes apolares y de baja polaridad, y mucho menor para los de alta polaridad. En contraste, el compuesto **159b** resultó ser menos soluble. En ambos conjugados, la solubilidad en metanol es prácticamente nula.

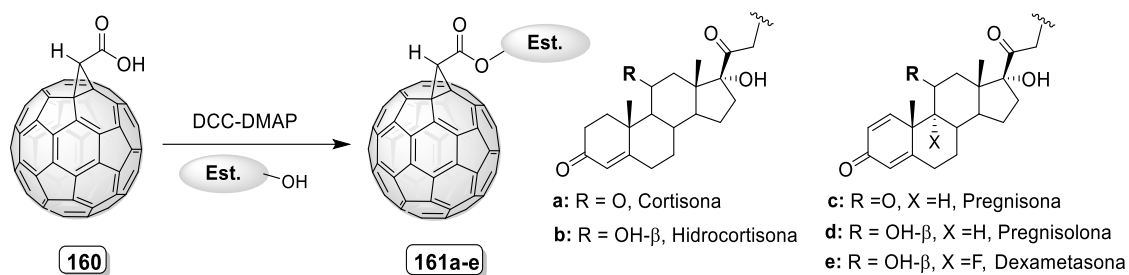


**Esquema II.4.** Conjugados esteroide-peptido-fullereno con propiedades antioxidantes.

Como se describe en el Epígrafe II.1.2.1, la preparación de metanofullerenos constituye una herramienta eficiente en la generación de grupos funcionales sobre la estructura del  $\text{C}_{60}$  sí como el acoplamiento de fragmentos moleculares de interés. En este sentido, Liu y col.<sup>[243]</sup> describen la síntesis de cinco híbridos glucocorticoide-fullereno **161**. La metodología de síntesis desarrollada consiste en hacer reaccionar el ácido carboxílico metanofullereno **160** con los correspondientes glucocorticoides, mediante el protocolo de acoplamiento DCC/DMAP (Esquema II.5). La reacción se lleva a cabo durante 7 días a temperatura ambiente y en atmosfera de  $\text{N}_2$ , utilizando cloroformo como disolvente, en el que el derivado **160** es parcialmente soluble, causa fundamental de tan largos tiempos de reacción. Posteriores estudios de bioactividad en animales para el conjugado dexametasona- $\text{C}_{60}$  **161e**, mostraron que mantiene las propiedades antiinflamatorias de la dexametasona, mientras que el acoplamiento del fullereno provoca una disminución considerable de los efectos colaterales indeseables del derivado

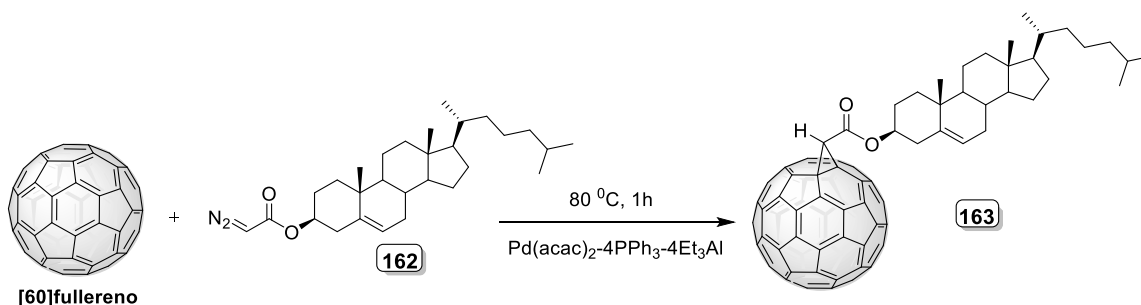
<sup>243</sup> Liu, R.; Yin, J.; Li, W. Synthesis of glucocorticoid- $\text{C}_{60}$  hybrids. *Carbon*, **2006**, *44*, 381-392.

esteroidal. Estos estudios son de importancia con vistas al desarrollo de nuevos conjugados con potencial farmacéutico.<sup>[244]</sup>



**Esquema II.5.** Síntesis de híbridos glucocorticoide-fullereno.

También, se ha descrito un efectivo método de catálisis para cicloadiciones de diazoalcanos y diazoacetatos al [60]fullereno en presencia de un sistema catalítico de tres componentes en base a paladio.<sup>[200]</sup> El resultado más relevante es que por primera vez, son sintetizados carboxi-derivados de metanofullerenos [6,6]-cerrados **163** en una sola etapa preparativa, a partir de diazoacetatos **162** que contienen en el grupo éster una molécula de colesterol, con un 50 % de rendimiento en 1 hora de reacción (Esquema II.6).



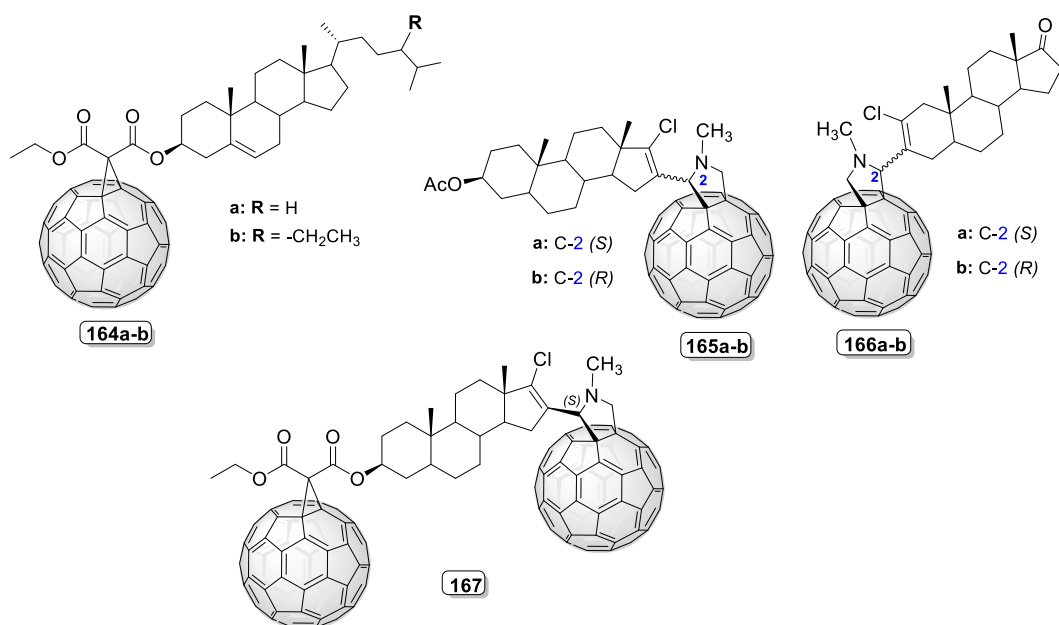
**Esquema II.6.** Cicloadición del diazoacetato de colesterol **162** al C<sub>60</sub> mediante catálisis metálica.

El grupo de Moléculas Híbridas, perteneciente al Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO) de la Universidad de La Habana, hace más de 10 años, realiza estudios encaminados a desarrollar nuevas metodologías la síntesis de novedosos sistemas híbridos en base a esteroides y a fullerenos, en colaboración con la Universidad Complutense de Madrid.

Entre los primeros trabajos de investigación en esta temática, se encuentran aquellos dirigidos a la obtención y caracterización de nuevos híbridos esteroides-

<sup>244</sup> Zhang, Y.; Wang, L.; Sun, Y.; Zhu, Y.; Zhong, Z.; Shi, J.; Fan, C.; Huang, Q. Conjugation of Dexamethasone to C<sub>60</sub> for the Design of an Anti-Inflammatory Nanomedicine with Reduced Cellular Apoptosis. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5, 5291-5297.

metano[60]fullerenos. Para ello se hacen reaccionar esteroides convenientemente funcionalizados por el grupo malonato en el carbono C3 del esqueleto esteroideal con el C<sub>60</sub>, bajo las condiciones de la ciclopropanación de Bingel-Hirsch, dando lugar a los correspondientes conjugados **164** (Figura II.9) con excelentes rendimientos entre 75 y 85 %.<sup>[245]</sup>



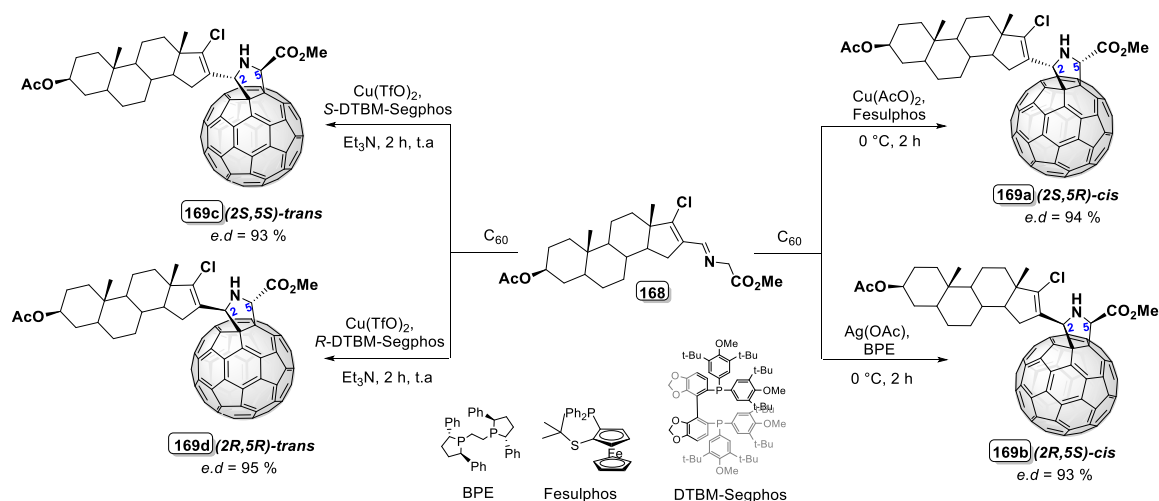
**Figura II.9.** Ejemplos de conjugados esteroide-metano[60]fullereno (**164**), esteroide-fulleropirrolidina (**165** y **166**) y aducto tipo mancuerna (**167**).

Como continuación, en el año 2013 se realizó la síntesis diastereoselectiva de nuevas fulleropirrolidinas **165** y **166** mediante el protocolo de Prato, a partir de aldehídos esteroidales derivados del androstano.<sup>[121]</sup> Se reportó que en cada caso se obtienen un par de diastereoisómeros y que estas reacciones son sensibles a los efectos estéricos que producen los esteroides quirales, reaccionando el C<sub>60</sub> con moderada diastereoselectividad. Estos compuestos fueron aislados y caracterizados morfológicamente en medios acuosos mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y por Dispersión Dinámica de Luz (DDL), para estudiar las propiedades de agregación en agua que pueden presentar. Los resultados indican que son sistemas polidispersos de nanopartículas, fundamentalmente esféricas con ligeras desviaciones hacia vesículas ovoides y tamaños predominantes de 10 a 20 nm para los diastereoisómeros **165** y de 30-50 nm para los isómeros **166**; lo que resulta interesante, si se tienen en cuenta la potencial

<sup>245</sup> Coro, J.; Rodríguez, H.; García, D.G.; Suárez, M.; Molero, D.; Herranz M.A.; Martínez-Álvarez, R.; Filippone, S.; Martín N. Functional Chimeras: New Bingel-Hirsch-Type Steroid-Fullerene Hybrids. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4810-4817.

aplicación futura de estos derivados del fullereno en sistemas de liberación de fármacos.<sup>[246]</sup> También se obtuvo un nuevo híbrido esteroide-fullereno tipo mancuerna **167** (Figura II.9).<sup>[247]</sup> En este conjugado, dos moléculas de fullereno se encuentran conectadas covalentemente a través de un derivado de la epiandrosterona difuncionalizado. Para obtenerlo, se empleó un diseño de síntesis por pasos a partir de dos reacciones de cicloadición diferentes (reacciones de Prato y de Bingel-Hirsch).

Más reciente, se prepararon híbridos esteroide-fullereno tipo **169** (Esquema II.7) con control estereoquímico, a través de la cicloadición 1,3-dipolar estereoselectiva de iluros de azometino esteroidales *N*-metalados (generados de la imina **168**) al C<sub>60</sub>, empleando una combinación apropiada de un ligando quiral y sales metálicas a bajas temperaturas. Los estereoisómeros son obtenidos con buenos rendimientos y con un exceso diastereomérico superior al 93%.<sup>[248]</sup>



Esquema II.7. Síntesis estereodivergente de fulleropirrolidinas-esteroide.

<sup>246</sup> Ruiz, A.; Suárez, M.; Martín, N.; Albericio, F.; Rodríguez, H. Morphological characterization of fullerene-androsterone conjugates. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 374–379.

<sup>247</sup> Ruíz, A.; Morera-Boado, C.; Almagro, L.; Coro, J.; Maroto, E.E.; Herranz, M.A.; Filippone, S.; Molero, D.; Martínez-Alvarez, R.; García de la Vega, J.M.; Suárez, M.; Martín, N. Dumbbell-Type Fullerene-Steroid Hybrids: A Join Experimental and Theoretical Investigation for Conformational, Configurational, and Circular Dichroism Assignments. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3473–3486.

<sup>248</sup> Suárez, M.; Ruiz, A.; Almagro, L.; Coro, J.; Maroto, E.E.; Filippone, S.; Molero, D.; Martínez-Álvarez, R.; Martín, N. Catalytic Stereodivergent Synthesis of Steroid-Fulleropyrrolidine Hybrids. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4654–4660.

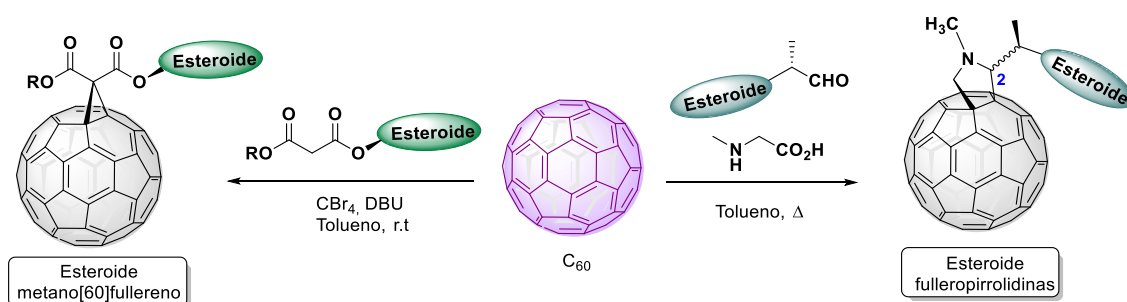


## **II.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



Si bien el conocimiento que actualmente se tiene sobre el [60]fullereno y sus derivados es amplio, no se puede considerar que su química esté completamente establecida, de ahí que sean numerosos los aspectos que quedan por explorar. Uno de los elementos a tener en cuenta para la aplicación práctica de los fullerenos es disponer de derivados solubles, por lo que la conjugación de estos compuestos con esteroides es una vía para proveer solubilidad en diferentes disolventes, como se describió previamente.

Por tal motivo, resultó de interés la conjugación del  $C_{60}$  a esteroides de probada actividad biológica, que permitieran integrar la química de ambas familias de moléculas y evaluar las características que definen las potenciales propiedades del híbrido obtenido. Teniendo en cuenta, que están establecidos los procedimientos para la síntesis de metanofullerenos y fulleropirrolidinas, se seleccionan estas reacciones con el propósito de obtener los híbridos en cuestión, como se muestra en el Esquema II.8.

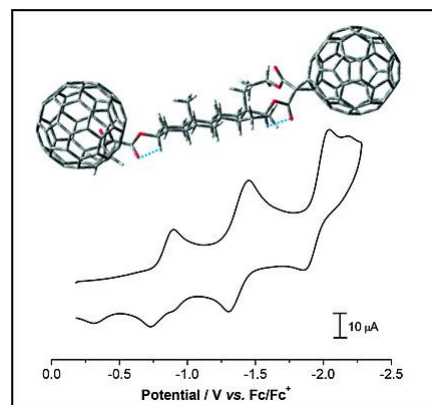


**Esquema II.8.** Esquema general de síntesis de conjugados esteroide- $C_{60}$

En este apartado se describen los resultados obtenidos en el estudio de las cicloadiciones [1+2] de Bingel-Hirsch (subapartados II.2.1 y II.2.2) y [3+2] de Prato (subapartado II.2.3) sobre el  $C_{60}$  con esteroides convenientemente funcionalizados.

En cada subapartado se recoge el artículo publicado asociado al mismo, respetando el formato original, y donde además se incluye la bibliografía referenciada para cada uno. Finalmente, se dispone de un subapartado resumen (II.2.4) donde se realiza una discusión conjunta de los resultados más relevantes de lo recogido anteriormente, así como una valoración crítica de los objetivos propuestos inicialmente.





### II.2.1- Steroid–Fullerene Hybrids from Epiandrosterone: Synthesis, Characterization and Theoretical Study.

**Abstract:** New hybrid fullerene–steroid derivatives were prepared by using the Bingel–Hirsch protocol, by treatment of [60]fullerene with malonates bearing the appropriate steroid moieties obtained, in turn, from the functionalization of epiandrosterone, an important naturally occurring steroid hormone. Monocycloadduct C<sub>60</sub>-steroid conjugates were obtained by functionalization of ring A or ring D of the steroid moiety. We have also described the multistep preparation of a [60]fullerene hybrid dumbbell endowed with two fullerene units connected through an epiandrosterone molecule by a cyclopropanation reaction. The new compounds have been spectroscopically characterized and their redox potentials, determined by cyclic voltammetry, reveal three reversible reduction waves for monocycloadducts (**8**, **9** and **11**, **12**), whereas dumbbell-type derivative **10** exhibits the best electron-accepting abilities of the Bingel-type fullerene–steroid series. Theoretical calculations at semiempirical (AM1) and single point B3LYP-D3/6-31G+(d,p) levels have predicted the most stable conformations for the hybrid compounds and allow explaining the observed regioselectivity in the cyclopropanation reaction with dimalonate **7** during the synthesis of the dumbbell derivative.

*Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4512–4522.

## **Introduction**

The discovery of fullerenes paved the way for developing new molecules with applications in both bio-medical chemistry<sup>[1,2]</sup> and materials science.<sup>[3,4]</sup> It is well known that suitably functionalized fullerenes exhibit different biological applications like neuroprotective agents,<sup>[5]</sup> antioxidants,<sup>[6]</sup> Anti-HIV activity,<sup>[7]</sup> enzyme inhibition,<sup>[8]</sup> as potent inhibitors in a model of Ebola virus infection,<sup>[9,10]</sup> and anticancer activity,<sup>[11]</sup> to name a few. Furthermore, they have also been utilized as singular drug carrier systems.<sup>[12]</sup>

On the other hand, steroids form a group of structurally related compounds that are widely distributed in mammals and, thus representing one of the most important class of natural products. Steroids show a broad biological activity profile and, due to their rigid skeleton and potential for varying levels of functionalization, they have become ideal structures for the development of hybrid molecules.<sup>[13,14]</sup> It has also been shown that certain structural modifications induced the change of biological response, giving compounds with a wide scope of biological activity.<sup>[15-17]</sup> In particular, the roles of sterols in diverse biological systems have been widely studied, and it has been determined that hydroxyl groups have a strong impact in the interaction with the receptor.<sup>[18,19]</sup>

The synthesis of hybrid molecules by covalent linkage of steroids to [60]fullerene is an interesting topic, and nowadays is a common approach in the pursuit of compounds for biomedical and chemical applications.<sup>[17,18,20,21]</sup> Gathering these two entities has allowed these conjugates to be more soluble than pristine [60]fullerene in aqueous medium as well as in organic solvents.<sup>[22]</sup> The hybrids thus formed not only may modulate the properties of each one of the components, but also allow obtaining chimeric molecular entities with completely new properties and functions.<sup>[23]</sup>

The synthetic methods for preparing hybrid steroid-fullerenes are based on the electrophilic character of C<sub>60</sub>, the most common reactions reported for the modifications of fullerenes being the cycloadditions. Commonly, these reactions have been employed for the synthesis of fullerene-steroids hybrids. For example the well-known Prato reaction is an example of a 1,3-dipolar cycloaddition to form a five membered ring leading to fulleropyrrolidines endowed with an steroid moiety.<sup>[24]</sup> 4-Membered rings have also been obtained by [2+2] cycloaddition involving steroids<sup>[25]</sup> and cyclopropanation (Bingel's reaction) yields steroid-methanofullerenes.<sup>[26]</sup>

A variety of biological activities have been reported for fullerene–steroid conjugates. Thus, some studies have been published reporting on the antioxidant activity of fulleropyrrolidines endowed with a steroid unit,<sup>[20,21,27]</sup> the effect of steroid–fullerene adducts on sarcoplasmic reticulum (SR) Ca<sup>2+</sup>-ATPase and survival of human lung adenocarcinoma cancer A549 cells.<sup>[25]</sup> Employing cholesterol, or cholesterol derivatives, attached to [60]fullerene through a pyrrolidine ring, some hybrids have been described, demonstrating that the steroid moiety can confer useful solubility in components of biological fluids, impacting on the biodistribution of the fullerenes, which makes these derivatives useful in imaging, diagnosis, and in the treatment or in management of disease.<sup>[23]</sup>

Previously, the synthesis of chiral [60]fullerene–steroid hybrid using steroid templates afforded regio- and stereoselective bisadducts.<sup>[28]</sup> Actually, a hybrid steroid–fullerene has been employed for developing a [60]fullerene modified electrode as a sensitive voltammetric sensor for detection of nandrolone, an anabolic steroid used in doping.<sup>[29]</sup>

One of the main research lines of our group rely on the efficient development of molecular hybrids based on fullerenes, therefore we have reported the synthesis of novel steroid–[60]fullerene conjugates employing different synthetic protocols. For example, the Bingel–Hirsch methodology has allowed us the obtaining of a variety of methanofullerenes coupled to different steroid moieties, which exhibited solubility in different organic solvents. This result could increase the biomedical application of these promising functional chimeras.<sup>[26]</sup> On the other hand, using Prato's procedure, we synthesized new molecular steroid–fullerene hybrids, by 1,3-cycloaddition of the corresponding formyl–steroid, sarcosine and C<sub>60</sub>. In that case, we selected the naturally occurring steroid epiandrosterone, which was conveniently functionalized. This reaction gave rise to the formation of a diastereoisomeric mixture of fulleropyrrolidines due to the generation of a new stereogenic center in the cyclization process.<sup>[30]</sup> In that way, we recently reported, for the first time, the diastereoselective synthesis of chiral steroid–fulleropyrrolidines in a controlled manner. In order to achieved this goal were used copper or silver *N*-metalated azomethine ylide and chiral ligands which proof to be an efficient protocol.<sup>[31]</sup> We have also described the multistep preparation of a fullerene hybrid dumbbell endowed with two [60]fullerene units connected through an epiandrosterone molecule. Suitably functionalized epiandrosterone required a previous chemical

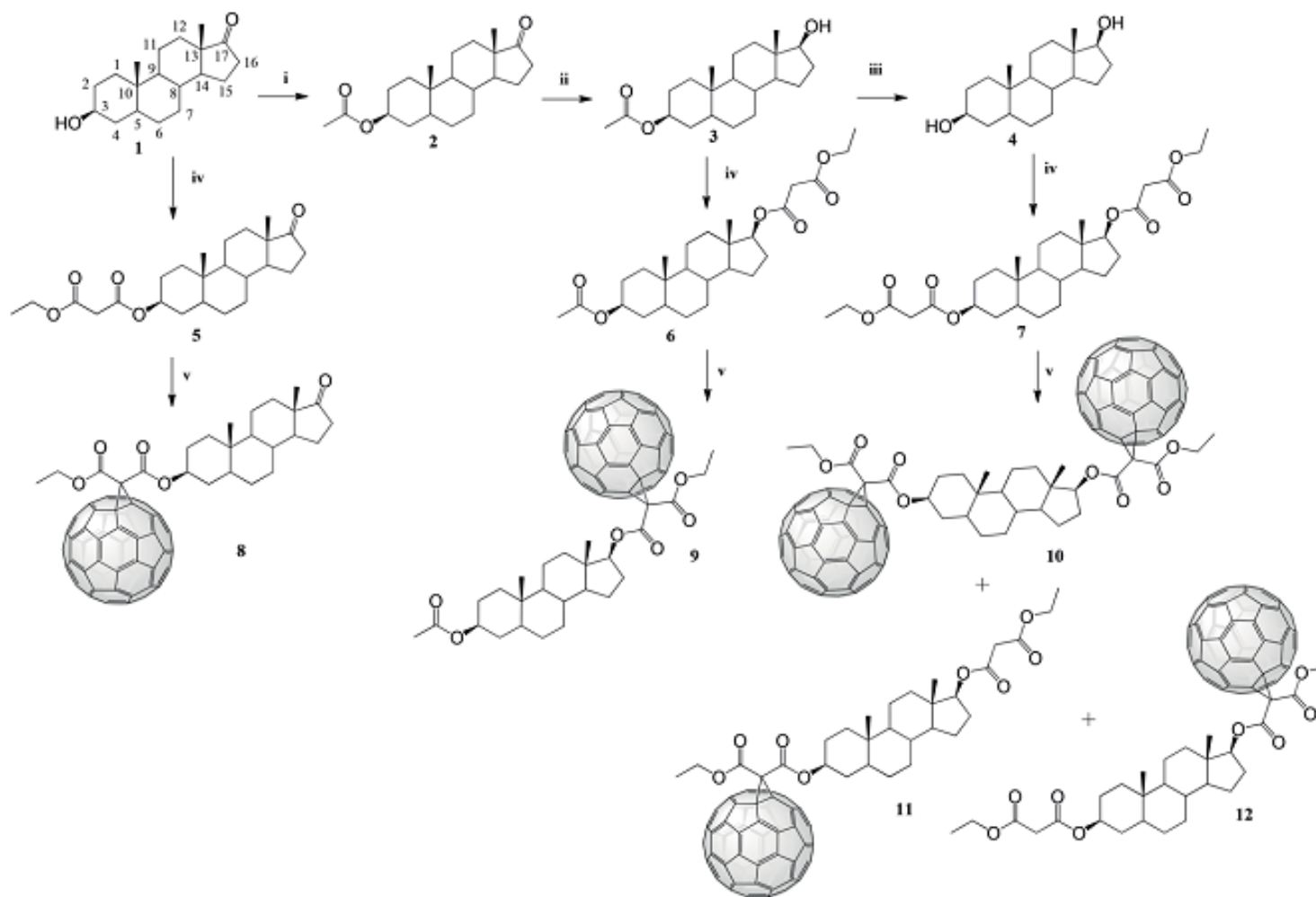
modification to introduce a formyl and a malonate reactive groups for further covalent connectivity to the C<sub>60</sub> units, first by 1,3-cycloaddition and subsequent cyclopropanation reaction.<sup>[32]</sup>

In continuation with our interest in the chemistry of fullerene hybrids, here we report on the design of new steroid–fullerene hybrids using the naturally occurring epiandrosterone as the starting material due to its well-known biological activity as L-type Ca<sup>2+</sup> channels antagonist<sup>[33]</sup> which may increase the ability of C<sub>60</sub> to cross the cell membrane envelopes,<sup>[34]</sup> and could be used in treatment of cardiovascular diseases. We have carried out its transformation into other sterols in order to obtain mono- and dimalonates. Using the Bingel–Hirsch protocol, we describe new mono-adducts steroid-[60]fullerene and a novel dumbbell molecule in which the two C<sub>60</sub> moieties have been introduced by cyclopropanation reactions from the corresponding steroid di-malonate.

## **Results and Discussion**

The fullerene–steroid hybrids (**8–12**) were obtained in a multistep synthetic route in which pristine [60]fullerene has been covalently connected to the steroid by a cyclopropanation reaction following the Bingel–Hirsch protocol, which involves the preparation of the corresponding malonyl-steroid derivatives. Thus, the first step required the preparation of steroid derivatives **5**, **6** and **7** as depicted in Scheme 1.

Starting from commercially available epiandrosterone (**1**), the synthesis of sterols **3** and **4** has been accomplished by the transformation of the functional groups in C3 and C17 positions of the androstanic skeleton. The convenient transformation of the hydroxyl group on C3 of the epiandrosterone (**1**) by reaction with acetic anhydride in pyridine gave the corresponding 3β-acetoxy-5α-androstan-17-one (**2**), further reaction of **2** with sodium borohydride in methanol afforded with stereoselective control the 3β-acetoxy-5α-androstan-17β-ol (**3**) as was expected.<sup>[35,36]</sup> Finally, the hydrolysis in basic medium of the former compound gave 5α-androstan-3β,17β-diol (**4**). All compounds were obtained in yields similar to those previously reported.<sup>[35,37]</sup>



**Scheme 1.** Synthesis of hybrid fullerene–steroid compounds **8–12** by Bingel–Hirsch reactions between [60]fullerene and the corresponding steroid-containing malonates **5–7**. (i) acetic anhydride, pyridine, 5 h, room temp.; (ii) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, room temp. 25 min; (iii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 %, MeOH, room temp. 24 h. (iv) CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>O-COCH<sub>2</sub>COCl, pyridine, DCM, 0 °C, (v) C<sub>60</sub>, DBU, CBr<sub>4</sub>, toluene, room temp.

The steroid malonates (**5–7**) were synthesized by reaction of the corresponding sterols **1**, **3** and **4** with commercially available (ethoxycarbonyl)acetyl chloride (Scheme 1). The reactions were carried out in anhydrous dichloromethane and pyridine at 0 °C. Isolation of the formed products was achieved by flash chromatography with hexane/ethyl acetate mixture as the eluent. Compounds **5**, **6**, and **7** were obtained in 80, 72, and 75 % yields, respectively. The new compounds were fully characterized by analytical and spectroscopic techniques (see the Experimental Section and Supporting Information).

The <sup>1</sup>H NMR spectra of compounds **5** and **7** show the signal corresponding to the proton H3 of the steroid ring A, as a multiplet at  $\delta = 4.75$  ppm, while this proton in compound **6** appears, with the same multiplicity, at  $\delta = 4.66$  ppm, in a similar position to the signals assigned to proton H17 of the ring D in compounds **6** and **7**. The methylene protons of the malonate fragment appear as singlets at  $\delta \approx 3.3$  ppm.

<sup>13</sup>C NMR spectrum of the malonyl steroid shows the signals assigned to the methylene carbon at  $\approx 41$  ppm and those corresponding at C3 at  $\approx 74$  ppm and the signal assigned to C17 for compounds **6** and **7** appears around 84 ppm.

The chemical structures of the new compounds were further confirmed by MS. Under MALDI conditions, compounds **6** and **7** show  $[M - H]^-$  peaks at  $m/z = 447.27538$  and  $519.29634$ , respectively. Under ESI conditions compound **5** exhibits a peak at  $m/z = 427.3$  corresponding to the  $[M + Na]^+$ .

The synthesis of methano[60]fullerenes was carried out under Bingel–Hirsch conditions, by treatment of C<sub>60</sub> with the malonyl steroid **5**, **6** or **7**, with CBr<sub>4</sub> and DBU at room temperature (see Scheme 1). After addition of DBU, the color of the solution changed from purple to brown, which confirms that the cyclopropanation process is taking place, with formation of the [6,6] mono-adduct, as expected.<sup>[38,39]</sup>

For compounds **8** and **9**, the reactions progressed rapidly and, after 2 h, the formation of the expected derivatives was clearly completed. After purification by flash chromatography, initially with carbon disulfide to elute unreacted C<sub>60</sub>, followed by dichloromethane, compounds **8** and **9** were obtained in 68 and 58 % yields, respectively, as stable brown solids. The HPLC chromatograms of each reaction mixtures (toluene/acetonitrile, 9:1; 1 mL min<sup>-1</sup>) show peaks at 4.3, or 5.2 min, corresponding to **8**, and **9**, respectively (See Supporting Information). In each of these chromatograms an

additional peak – assigned to the C<sub>60</sub> starting material – appears at 8.7 min, together with other minor peaks attributed to the formation of bis-cycloadducts.

In the case of the Bingel–Hirsch reaction between dimalonate **7** and C<sub>60</sub>, the HPLC chromatogram of the reaction mixture (See Figure S53 in Supporting Information) shows four peaks at 4.57, 6.01, 10.3 and 8.8 min. From the UV/Vis spectra of each one was established that the three first peaks correspond to [6,6]-mono-adducts, and the last one was assigned to C<sub>60</sub> starting material. The purification of the reaction mixture was developed using carbon disulfide to elute unreacted C<sub>60</sub>, and mixtures of dichloromethane/hexane to elute compounds **10**, **11** and **12** in 42 %, 12 % and 11 % yields, respectively (See Experimental section).

In order to determine unambiguously the structure of all final compounds (**8–12**), <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, DEPT, HMQC, and HMBC experiments were carried out (see Experimental section and Supporting Information).

For compounds **8** and **9**, <sup>1</sup>H NMR spectroscopy revealed the presence of C<sub>60</sub>-steroid hybrids. Besides the disappearance of the methylene protons (signals seen at  $\delta = 3.33$  ppm) in the malonates **5**, **6**, and **7**, new signals at  $\delta \approx 1.5$  ppm and 4.5 ppm, corresponding to the protons of the ethoxycarbonyl groups, had appeared in **8**, and **9**. In addition to the expected signals corresponding to the steroid moiety, the presence of the malonate fragment deshields the proton on C3 in ring A of the steroid, which is observed as a typical signature at  $\delta = 5.13$  ppm in compound **8** and at  $\delta = 4.69$  ppm in **9**, while in **9** the signal of H17 appears at  $\delta = 4.98$  ppm.

On the other hand, the number of signals observed in the <sup>13</sup>C NMR spectra reveal the lack of symmetry in these compounds. The <sup>13</sup>C NMR spectra of **8** and **9** show the presence of the two carbonyl groups at  $\delta \approx 163$  ppm. The positions of the rest of the steroid carbon atoms are relatively insensitive to the presence of the C<sub>60</sub> cage, the only exception being the C3 carbon atom in the steroid A ring in compound **8** at  $\delta = 77.4$  ppm and C17 carbon atom in the steroid D ring of compound **9** at  $\delta = 86.2$  ppm, which are strongly deshielded by ca. 2 ppm, due to the presence of the C<sub>60</sub> sphere. The signals for the sp<sup>3</sup> carbon atoms of the cyclopropane rings in hybrids **8** and **9** appear at  $\delta \approx 72$  and 74 ppm for those at the 6,6-ring junction of the C<sub>60</sub> cage, whereas the signals of the quaternary carbon atoms are at  $\delta \approx 52$  ppm. Because we had achieved unambiguous assignments for the <sup>1</sup>H NMR resonances, the <sup>13</sup>C NMR resonances were assigned in a straightforward manner by analysis of the HMQC spectra for the protonated carbon atoms on the basis of

chemical shift theory, substituent effects, and DEPT data. Quaternary carbon atoms were assigned by analysis of the HMBC spectra. It is interesting to note that the compounds showed similar trends in the chemical shifts of the common moiety of the molecular backbone, thus confirming their chemical structures (see Experimental section and Supporting Information).

MS supported the proposed structures. The MALDI spectra for compounds **8** and **9** show peaks at  $m/z= 1122.2392$  and  $1166.2639$  respectively, which nicely correspond with their molecular ions.  $[M]^-$ .

As aforementioned, the reaction mixture of the cyclopropanation with compound **7** after 2 hours, allows three mono-adducts. In compound **7**, two malonate moieties are present, one join to carbon C3 of ring A of the steroid and the other one to C17 of ring D, with the possibility to obtain several compounds. Therefore, determination of the chemical structure of **10**, **11** and **12**, was not an easy task, and a thorough mass spectrometry study was necessary to establish the number of fullerene cages present in each compound. HRMS-MALDI/TOF mass spectrum for compound **10** reveals a peak at  $m/z= 1956.2628$  that corresponds to the molecular formula  $C_{149}H_{40}O_8$ , corresponding to  $[M]^+$  ion, confirming the presence of two fullerene units in this compound as a dumbbell type molecule. For compounds **11** and **12**, the molecular ion appears at  $m/z= 1238.2868$  ( $[M]^+$  ion) and  $1238.2859$  ( $[M]^-$  ion), respectively, indicating the presence of only one fullerene moiety in each compound.

Besides the disappearance of the two methylene protons (signals at  $\delta= 3.34$  and  $3.31$  ppm), compound **10** shows a  $^1H$  NMR spectrum quite similar to precursor **7**. However, the positions of the H3 and H7 protons appears at  $\delta= 5.13$  ppm and  $5.01$  ppm, respectively, strongly deshielded, due to the presence of the  $C_{60}$  cage. For the same reason, the position of the protons of C4 and C16 is found at higher values of chemical shift in comparison with the positions of the same protons in compound **7** (See Experimental Section).

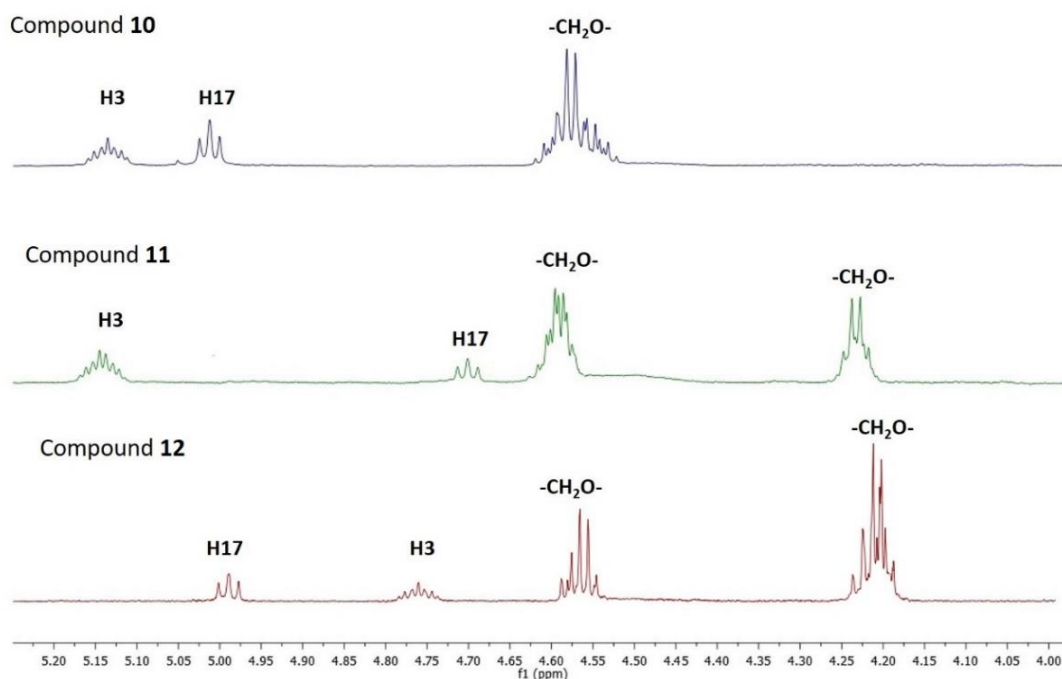
The  $^{13}C$  NMR spectrum reveal the lack of symmetry in this  $C_{60}$  derivative. Signals at the interval of  $145-138$  ppm denote the presence of the fullerene cages. Signals at ca.  $74$  ppm and ca.  $72$  ppm indicated the 6,6-ring junction of both  $C_{60}$  to the cyclopropane rings. Also, the signals of C3 and C7 of the steroid moiety appear at  $\delta= 77.35$  and  $86.00$  ppm respectively, also deshielded by  $2$  ppm with relation to the same carbon atoms of dimalonate **7**. Moreover, at  $163.63$ ,  $163.57$ ,  $163.45$ , and  $163.01$  ppm appear four signals

corresponding to similar ethoxycarbonyl groups. These results confirm unambiguously the presence of two units of C<sub>60</sub> in compound **10**.

NMR spectra of compounds **11** and **12** confirmed the presence of one unit of C<sub>60</sub>. Therefore, the H3 ( $\delta=5.13$  ppm) and C3 ( $\delta=77.36$  ppm) signals of compound **11** are deshielded in comparison with the position of the same atoms in compound **7**, while H17 and C17 appear at 4.70 and 84.03 ppm nearly to those in **7** (H3 at  $\delta= 4.64$  ppm and C17 at  $\delta= 83.99$  ppm), indicating that the moiety with the fullerene ring is join to C3. NMR spectra of compound **12** shows the signals corresponding to H17 ( $\delta= 4.98$  ppm) and C17 ( $\delta= 86.15$  ppm), deshielded, due to the presence of the C<sub>60</sub> cage near to C17 position.

Both **11** and **12** show one signal at  $\delta= 3.36$  ppm revealing the existence in the molecules of only one methylene group whereas <sup>13</sup>C NMR spectra show signals at ca. 74 ppm, ca.72 ppm and ca. 52 ppm confirming the presence of one cyclopropane ring.

The variation of the signal positions of H3 and H17 in the <sup>1</sup>H NMR spectra of **10**, **11** and **12** depending of the proximity of the fullerene cage to these atoms, as shown in Figure 1, is characteristic in this type of derivatives.

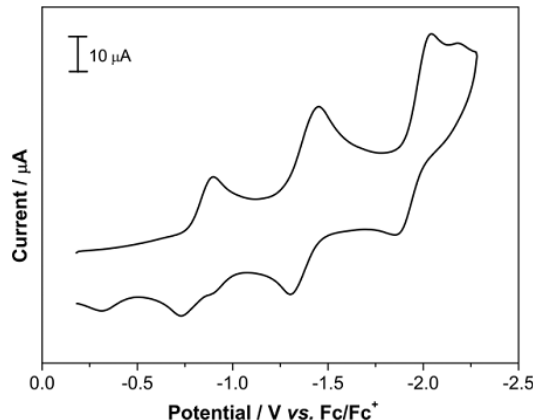


**Figure 1.** <sup>1</sup>H-NMR spectra of compounds **10**, **11**, and **12** in the region of the H3 and H17 protons.

Attempts to enhance the formation of compound **10** were unsuccessful, since an increase in reaction time resulted in the formation of bis-adducts which decreased the yield of the mono-adducts.

The electrochemical properties of the fullerene-steroids **8–12**, were investigated by cyclic voltammetry (CV) and Osteryoung Square Wave Voltammetry (OSWV) in solution using THF as solvent. Selected CV and OSWV graphs are given in Figure 2 and Figure 3, respectively. Calculated reduction potentials from CV vs. Fc/Fc<sup>+</sup> are given in Table 1.

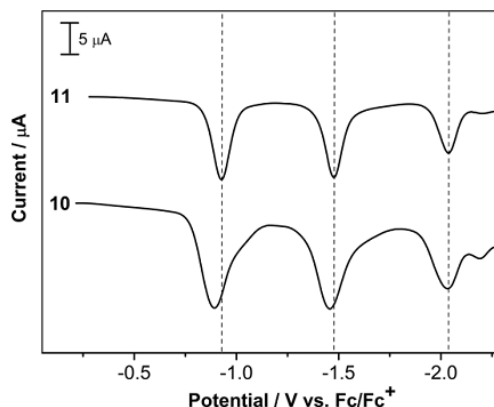
The electrochemical behaviour of all fullerene-steroids is very similar as could be anticipated for the common framework of the structures. Based on typical fullerene core reductions, these compounds exhibit two quasi-reversible fullerene-based reductions. The third reduction is chemically irreversible, presumably due to the cleavage of one of the cyclopropane bonds connecting the addend to the C<sub>60</sub>.<sup>[41,42]</sup> For all compounds, additional voltammetric information about a retro-cyclopropanation reaction was noticed by the appearance of a small (irreversible) oxidation peak at ca. -0.5 V when the potential is reversed after the third reduction wave (Figure 2).<sup>[43]</sup>



**Figure 2.** CV of **10** in THF containing 0.1 M Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup> and at a scan rate of 100 mV/s.

Upon adduct formation, the saturation of a double bond leads to a higher LUMO energy than C<sub>60</sub> and to a decrease of the electron affinity. This is reflected in cathodically shifted reduction potentials (ca. 60–80 mV of E<sup>1</sup><sub>1/2,red</sub>) for all fullerosteroids, when compared with those of C<sub>60</sub> taken under the same experimental conditions (Table 1). For the dumbbell type conjugate **10** (Figure 3), the cathodic shift is slightly different from the general trend. The fullerene-dimer **10** exhibits the best electron-acceptor ability of the Bingel-type fullerene-steroid series (a cathodic shift of only 33 mV of its first reduction

potential vs.  $C_{60}$ ). The spatial proximity of the two  $C_{60}$  units in **10** might influence the reduction potential of the fullerene units, although the simultaneous reduction of the individual spheres, indicates the absence of a strong electronic coupling between the two fullerene units.<sup>[44]</sup>



**Figure 3.** OSWV of **10** and **11** in THF containing 0.1 M  $Bu_4N^+PF_6^-$ .

**Table 1.** Redox potentials of fullerene–steroid derivatives obtained by CV vs.  $Fc/Fc^+$  in THF [mV].<sup>[a]</sup>

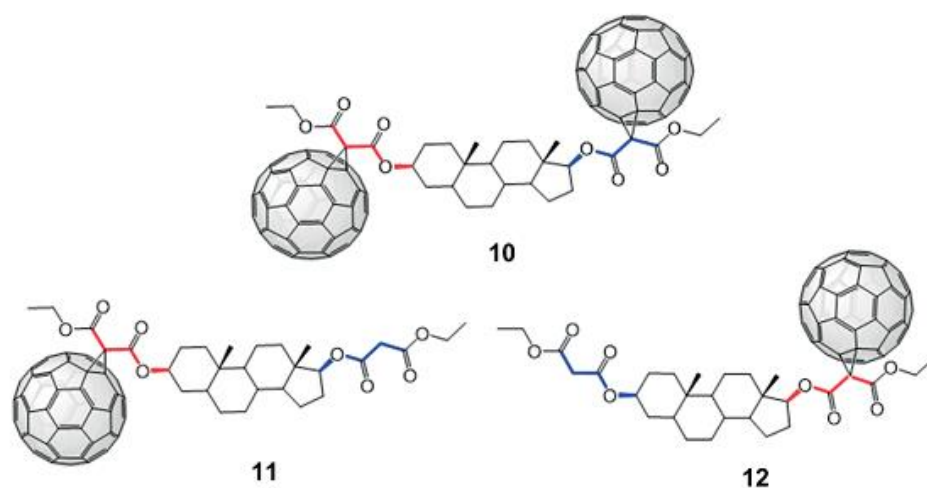
Compound	$E^1_{1/2, red}$	$E^2_{1/2, red}$	$E^3_{red}$
$C_{60}$ <sup>[b]</sup>	-860	-1440	-2000
<b>8</b>	-923	-1477	-2088 <sup>[c]</sup>
<b>9</b>	-921	-1479	-2106 <sup>[c]</sup>
<b>10</b>	-893	-1416	-1989 <sup>[c]</sup>
<b>11</b>	-928	-1468	-2147 <sup>[c]</sup>
<b>12</b>	-920	-1440	-2070 <sup>[c]</sup>

[a] Experimental conditions: GCE as working electrode, Pt as counter electrode,  $Ag/AgNO_3$  as reference electrode,  $Bu_4N^+PF_6^-$  (0.1M) as supporting electrolyte, 100 mV/s scan rate. [b] See ref.<sup>[40]</sup> The concentration of  $Bu_4N^+PF_6^-$  is 0.2 M. [c] Cathodic peak potentials, irreversible processes.

Furthermore, for a better understanding of the structural properties of compounds **10–12**, and the observed regioselectivity in the formation of isomers **11** and **12**, we performed a theoretical conformational analysis. Each one of the hybrids androstane-[60]fullerene analyzed has twelve rotatable bonds. For exploring the energy hypersurfaces of molecular systems, with a high number of degrees of freedom, the more elaborated methodologies for conformational search may be classified either as systematic or stochastic.<sup>[45–47]</sup> Nowadays, most methods, either systematic or stochastic, relies on force field energies.

In this work, a fragment-based stochastic conformational minima search methodology is proposed. In a general description, there were selected different molecular regions that are unlikely to interact, and their geometries were optimized in different steps. Firstly, was generated for compounds **10**, **11** and **12**, a set of 300 random geometries varying only the bonds highlighted in red color (step A, see Figure 4), which are the most important in order to predict the most stable conformations. Then, this set of geometries were fully optimized using the AM1 semiempirical Hamiltonian.<sup>[48]</sup>

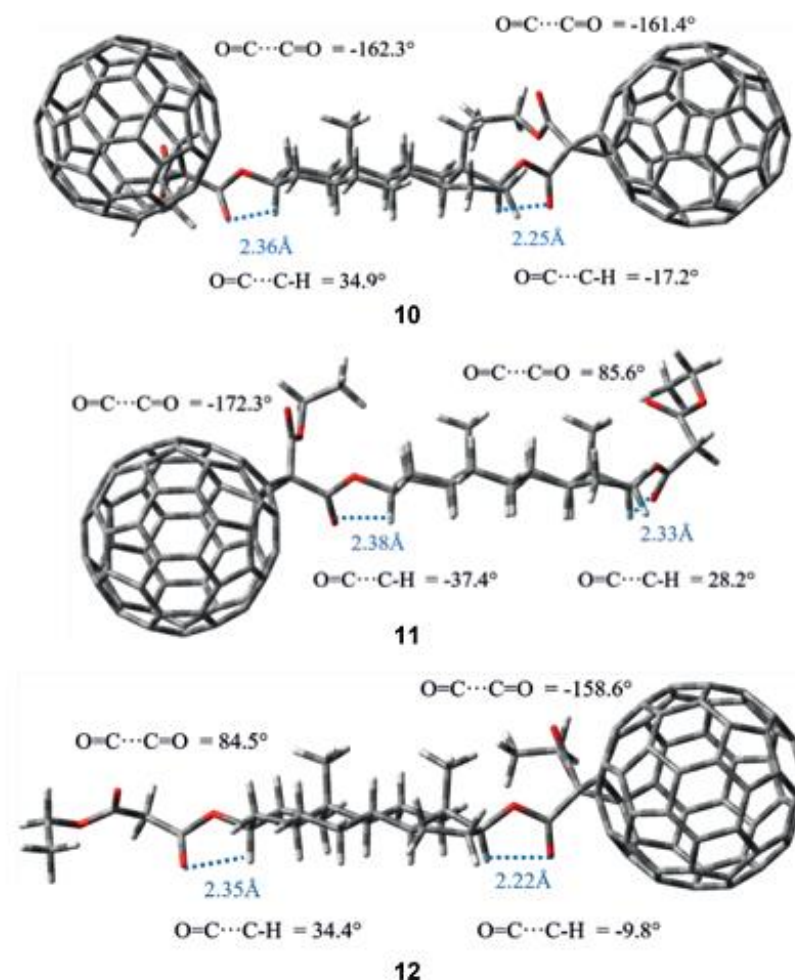
Next, the most stable conformer of each set was selected and then were generated 200 more random geometries for each one, but now varying the rotatable bonds highlighted in blue (step B) in Figure 4. All geometries were again fully relaxed using the AM1 Hamiltonian. In the case of molecule **10** were generated 300 geometries in both steps. As it can be seen, the objective was to locate a very low laying minima in the energy hypersurface, if not the global one, at the AM1 level of theory.



**Figure 4.** Rotatable bonds selected for the conformational search. In red, those used at the first step (A) of the procedure proposed in this work and in blue those used in the second step (B).

Figure 5 shows the minimum energy conformation of compounds 10–12 which was obtained by the AM1 method. Firstly, it is relevant to emphasize that when the second fragment selected in the procedure described above (bonds highlighted in blue) was optimized, it was not necessary to impose any geometrical constraints because the bonds in red do not vary significantly their geometry during the process (see Supporting Information). This is probably due to the lack of interaction, initially assumed, between both fragments.

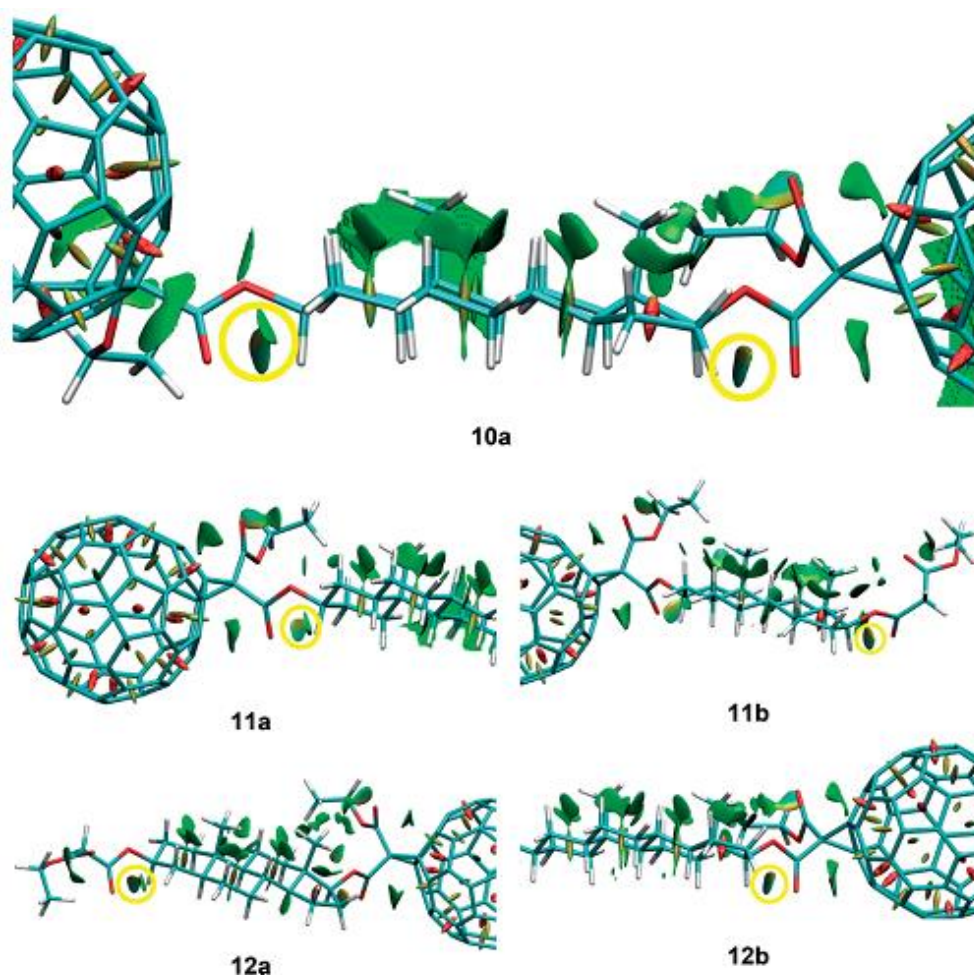
Theoretical calculations predicted that the preferred orientation of the carbonyl groups in C17-ethyl-malonate fragment, without the fullerene cage on it, have for compound **11**, a  $\text{O}=\text{C}\cdots\text{C}=\text{O}$  dihedral angle of  $85.6^\circ$ , while in compound **12**, where a similar ethylmalonate functionality is attached to C3 of the steroid, this dihedral angle has a value of  $84.5^\circ$  as shown in Figure 5. When the fullerene cage is present in the C3-ethylmalonate functionality, this dihedral angle has a value of  $-162.3^\circ$  and  $-172.3^\circ$  for **10** and **11**, respectively, and  $161.4^\circ$  and  $-158.6^\circ$  when the fullerene moiety is present at the C17-ethylmalonate fragment in **10** and **12**, respectively. Hence, by gathering these results, it can be seen a tendency to a close *trans* disposition of the carbonyl groups when the fullerene aggregate is present at the ethylmalonate functionality, and other tendency to a close *cis* configuration when it is not. These results are in agreement with those previously reported by us after a conformational search on similar systems.<sup>[22]</sup>



**Figure 5.** Optimized geometries, at the AM1 level of theory, for molecules **10–12**.

Moreover, theoretical calculations predict that the relative disposition of hydrogens H3 and H17 of the corresponding rings A and D of the steroid moiety and the closest carbonyl groups to each one is nearly similar in all cases. Same results were found in a previous work,<sup>[22]</sup> and was eventually demonstrated by X-ray analysis.<sup>[49]</sup> These results show that the presence of a hydrogen bond, in all cases, has a major role in the final geometry of the ethylmalonate fragment together with the presence or not of the fullerene moiety, previously noted.

In order to get a better understanding of the geometrical features, a Non-Covalent Interactions (NCI) analysis was performed, following the approach proposed by Johnson et al.<sup>[50]</sup> which isolated these interactions as the regions with low reduce density gradient at low density values. Results are shown in Figure 6 and clearly revealed a weak interaction (highlighted in yellow) between the hydrogens and the carbonyl groups discussed above.



**Figure 6.** NCI surfaces for molecules 10–12. For molecules 11 and 12 two figures are shown for better visualization, where 11a/12a focus on interactions near to the A-ring of the steroid and 11b/12b focus on interactions near to the D-ring.

We want to add that, calculation of the AIM critical points, failed in almost all cases (except one) on finding a bond path between these atoms (see Supporting Information), being this one more example where a NCI analysis, through the reduce density gradient, succeeded over the AIM approach.<sup>[51,52]</sup>

Furthermore, we computed DFT single-point energies starting from the AM1 geometries of molecules **11** and **12**, at B3LYP-D3/6-31G+(d,p) level. Theoretical calculations predicted that **11** is more stable than the stereoisomer **12** by 1.6 kcal/mol (see Table 2). This near energy difference is in good agreement with the observed regioselectivity for both products, where experimental yields show a low difference, 12 % and 11 % for **11** and **12** respectively, therefore it could be inferred that the thermodynamic stability of the products might be related to the observed experimental results.

**Table 2.** Single point energies, at the B3LYP-D3/6-31G+(d,p) level of theory, starting from the optimized geometries obtained with the AM1 Hamiltonian.

Compounds	Total Energy in Hartrees	$\Delta E$ in [kcal/mol]
<b>11</b>	-4018,7503	0.00
<b>12</b>	-4018,7478	~ -1.6

In addition, according to the calculated LUMO energies, analogous of these androstane[60]fullerene hybrids can be thought as candidates in the design of acceptor molecules for a bulk heterojunction in organic photovoltaic devices, thus extending their applicability. This result was obtained after performing a single point energy calculation with the B3LYP hybrid functional<sup>[53,54]</sup> and the 6-31G(d) basis set, over the minimal structures obtained at the AM1 level of theory, showed in Figure 5, and then comparing with LUMO energies reported recently by Sikorska et al.<sup>[55]</sup> at the same level of theory for the PC<sub>61</sub>BM, which is the fullerene derivative most widely used as an electron acceptor in solar cells. For molecules **10**, **11** and **12** computed LUMO energies were -3.120 eV, -3.055 eV and -3.103 eV respectively and at the same level of theory a value of -3.003 eV was reported<sup>[55]</sup> for the PC<sub>61</sub>BM. These results are also in agreement with the electro-acceptor ability determined by CV, mentioned above. It should be noted that these theoretical values should only be considered useful for comparison with other already computed energies on similar molecules, at the same level of theory, according to Koopman's theorem,<sup>[56]</sup> since the faults calculating electron affinities energies with DFT (time-independent) are well known.<sup>[57]</sup>

## Conclusions

We have carried out the synthesis of new [60]fullerene–steroid hybrids by using Bingel–Hirsch protocol of the corresponding steroid-containing malonates (**5**, **6**, and **7**) with C<sub>60</sub>. The cyclopropanation reaction between the monomalonate steroid gives the methano[60]fullerenes **8** and **9** while the dimalonate **7** and C<sub>60</sub>, gives three compounds, two monoderivatives (**11** and **12**) and one dumbbell type (**10**) fullerene–steroid hybrids. A thorough spectroscopic and analytical study has allowed the chemical structures of the new methano[60]fullerene hybrids to be unambiguously determined. The proposed structures are supported by their electronic spectra as well as by voltammetric analysis. In addition, we have carried out an exhaustive structural and electronic study at the semiempirical AM1 and single point B3LYP-D3/6-31G+(d,p) level of theory that has allowed the determination of the most stable conformation for the obtained fullerene–steroids hybrids.

## Experimental Section

**General:** All reagents were of commercial quality and were used as supplied unless otherwise specified. Solvents were dried by standard procedures. All reactions were performed using an atmosphere of argon and oven-dried glassware. Reactions were monitored by thin-layer chromatography carried out on 0.25 mm silica gel plates (230–400 mesh). Flash column chromatography was performed using silica gel (60 Å, 32–63 μm). FTIR spectra were recorded in CHCl<sub>3</sub>. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 700 MHz, and <sup>13</sup>C NMR at 175 MHz; the one-bond heteronuclear correlation (HSQC) and the long-range <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C correlation (HMBC) spectra were obtained by use of the inv4gs and the inv4gslplrnd programs. Mass spectra and HRMS were recorded under ESI and MALDI (dithranol as matrix) conditions in positive and negative mode of detection. Microanalysis was performed with a Perkin–Elmer 2400 CHN instrument. High performance liquid chromatography (column, 4.6 × 250 mm) was used to determine the purities of the compounds synthesized. The retention times (*t<sub>R</sub>*) reported were determined at a wave length of 320 nm. UV/Vis spectra were recorded in CHCl<sub>3</sub>. Electrochemical measurements were performed at room temperature in a potentiostat/galvanostat equipped with a home-built one-compartment cell with a three-electrode configuration, containing 0.1 M tetrabutylammonium hexafluorophosphate (Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>−</sup>) as supporting electrolyte. A glassy carbon (GCE) was used as the working electrode, a platinum wire as the counter electrode, and a Ag/AgNO<sub>3</sub> non-aqueous electrode was used as reference.

Ferrocene (Fc) was added as an internal reference and all the potentials were referenced relative to the Fc/Fc<sup>+</sup> couple. Prior to each voltammetric measurement the cell was degassed under an argon atmosphere by ca. 20 min.

### Synthesis of Compounds.

**3 $\beta$ -Acetoxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (2):** This compound was prepared by following the method previously reported in the literature in 80 % yield (1.8 g, 5.4 mmol), m.p. 103–104 °C (lit.<sup>[35]</sup> m.p. 106–108 °C).

**3 $\beta$ -Acetoxy-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol (3):** This compound was prepared by following a similar method previously reported in the literature<sup>[35]</sup> in 92 % yield (1.8 g, 5.3 mmol), m.p. 116–117 °C (commercial product. m.p. 117–118 °C).

**5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (4):** This compound was prepared by following a similar method previously reported in the literature in 89 % yield (0.39 g, 1.3 mmol), m.p. 169–170 °C (lit.<sup>[37]</sup> m.p. 167–170 °C).

**Synthesis of Malonates 5, 6 and 7:** A solution of the appropriate steroid **1**, **3** or **4**, (2 mmol) in dichloromethane (100 mL) under argon was prepared. Pyridine (0.16 mL, 2 mmol) was added dropwise to the solution, and the resulting mixture was cooled in an ice bath. (Ethoxycarbonyl)acetyl chloride (0.26 mL, 2 mmol) was added dropwise. Once the solution had been stirred for 2 h, the ice bath was removed. The reaction mixture was then stirred at room temperature overnight. Water was added, and the residue was extracted with DCM. The combined extracts were dried (MgSO<sub>4</sub>) and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. Purification of products was achieved by column chromatography in silica gel with the eluent specified below for each compound.

**3 $\beta$ -Ethyl Malonate-5 $\alpha$ -androstan-17-one (5):** This compound was obtained from 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one (**1**). The purification of **5** was performed by column chromatography on silica gel with hexane/ethyl acetate (10:1) as the eluent. The product was isolated as a white solid; yield 646 mg (1.6 mmol, 80 %); m.p. 44–45 °C. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 4.74 (m, 1 H, H3), 4.18 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.32 (s, 2 H, OCCH<sub>2</sub>CO), 2.42 (dd,  $J$  = 8.8,  $J$  = 19.3 Hz, 1H, H16), 2.05 (m, 1 H, H16), 1.91 (m, 1H, H15), 1.83 (m, 1H, H2), 1.78 (m, 1H, H7), 1.77 (m, 1H, H12), 1.73 (dt,  $J$  = 3.8,  $J$  = 13.3 Hz, 1H, H1), 1.64 (m, 2H, H4, H11), 1.54 (m, 1H, H8), 1.51 (m, 1H, H2), 1.48 (m, 1H, H15), 1.38 (m, 1H, H4), 1.32 (m, 1H, H6), 1.30 (m, 1H, H11), 1.29–1.24 (m, 5H, H6, H14, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.22 (m, 1H, H12), 1.20 (m, 1H, H5), 1.03 (m, 1H, H7), 0.96 (m, 1H,

H1), 0.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.70 (td,  $J = 3.5$ ,  $J = 11.7$  Hz, 1H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta = 221.38$  (C17), 166.86 (C=O), 166.29 (C=O), 74.90 (C3), 61.55 (CH<sub>2</sub>O), 54.35 (C9), 51.43 (C14), 47.87 (C13), 44.70 (C5), 42.09 (OCCH<sub>2</sub>CO), 36.72 (C1), 35.94 (C16), 35.72 (C10), 35.10 (C8), 33.78 (C4), 31.60 (C12), 30.87 (C7), 28.32 (C6), 27.30 (C2), 21.87 (C15), 20.55 (C11), 14.16 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 13.91 (CH<sub>3</sub>-C13), 12.30 (CH<sub>3</sub>-C10) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\tilde{\nu} = 2938, 2858, 1735, 1187, 1150, 1027$  cm<sup>-1</sup>. MS (ESI):  $m/z$  [M + Na]<sup>+</sup> 427.3. C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub> (404.55): calcd. C 71.26, H 8.97; found C 71.30, H 9.02.

**3 $\beta$ -Acetoxy-17 $\beta$ -ethylmalonate-5 $\alpha$ -androstande (6):** This compound was obtained from 3 $\beta$ -acetoxy-5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol (**3**). The purification of **6** was performed by column chromatography on silica gel with hexane/ethyl acetate (80:1) as the eluent. The product was isolated as a viscous yellow liquid; yield 640 mg (1.46 mmol, 72 %). <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta = 4.66$  (m, 2H, H3, H17), 4.20 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.35 (s, 2H, OCCH<sub>2</sub>CO), 2.16 (m, 1H, H16), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.79 (m, 2H, H2, H12), 1.73 (dt,  $J = 13.5$ ,  $J = 3.4$  Hz, 1H, H1), 1.64 (m, 1H, H7), 1.63 (m, 1H, H15), 1.61 (m, 1H, H4), 1.58 (m, 1H, H11), 1.54 (m, 1H, H2), 1.49 (m, 1H, H16), 1.40 (m, 1H, H8), 1.35 (m, 1H, H4), 1.29–1.22 (m, 7H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, 2  $\times$  H6, H11, H15), 1.16 (m, 1H, H5), 1.14 (m, 1H, H12), 1.04 (1H, H14), 1.02 (m, 1H, H1), 0.88 (m, 1H, H7), 0.82 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.76 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.65 (m, 1H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta = 170.83$  (C=O), 166.88 (C=O), 166.77 (C=O), 84.04 (C17), 73.75 (C3), 61.59 (CH<sub>2</sub>O), 54.22 (C9), 50.73 (C14), 44.74 (C5), 42.96 (C13), 42.03 (OCCH<sub>2</sub>CO), 36.92 (C12), 36.86 (C1), 35.67 (C10), 35.36 (C8), 34.10 (C4), 31.60 (C7), 28.52 (C6), 27.55 (C2), 27.43 (C16), 23.63 (C15), 21.61 (CH<sub>3</sub>-CO), 20.76 (C11), 14.25 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 12.34 (CH<sub>3</sub>-C10), 12.16 (CH<sub>3</sub>-C13) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\tilde{\nu} = 2935, 2851, 1729, 1238, 1026$  cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI-TOF)  $m/z$  [M – H]<sup>-</sup> Calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>O<sub>6</sub> 447.27521, found 447.27538. C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> (448.60): calcd. C 69.61, H 8.99; found C 69.67, H 9.03.

**3 $\beta$ ,17 $\beta$ -Diethylmalonate-5 $\alpha$ -androstande (7):** This compound was obtained from 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (**4**). The purification of **7** was performed by column chromatography on silica gel with hexane/ethyl acetate (10:1) as the eluent. The product was isolated as a viscous yellow liquid, yield 780 mg (1.5 mmol, 75 %). <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta = 4.74$  (m, 1H, H3), 4.64 (m, 1H, H17), 4.19 (m, 2H, OCH<sub>2</sub>), 4.18 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.34 (s, 2H, OCCH<sub>2</sub>CO), 3.31 (s, 2H, OCCH<sub>2</sub>CO), 2.14 (m, 1H, H16), 1.82 (m, 1H, H2), 1.73 (m, 1H, H12), 1.71 (m, 1H, H1), 1.66 (m, 1H, H4), 1.62 (m, 2H,

H7, H15), 1.53 (m, 1H, H11), 1.51 (m, 1H, H2), 1.48 (m, 1H, H16), 1.40 (m, 1H, H8), 1.39 (m, 1H, H4), 1.37 (m, 1H, H7), 1.35 (m, 1H, H6), 1.29 (m, 1H, H6), 1.27–1.24 (m, 8H, H11, H15, 2 ×CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>), 1.15 (m, 1H, H5), 1.12 (m, 1H, H12), 1.04 (m, 1H, H14), 1.03 (m, 1H, H1), 0.81 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.75 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.65 (m, 1H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 166.87 (C=O), 166.85 (C=O), 166.74 (C=O), 166.29 (C=O), 83.99 (C17), 75.02 (C3), 61.56 (CH<sub>2</sub>O), 61.54 (CH<sub>2</sub>O), 54.15 (C9), 50.69 (C14), 44.67 (C5), 42.92 (C13), 42.10 (OCCH<sub>2</sub>CO), 41.99 (OCCH<sub>2</sub>CO), 36.88 (C12), 36.75 (C1), 35.62 (C10), 35.31 (C8), 33.82 (C4), 31.54 (C7), 28.45 (C6), 27.39 (C2), 27.32 (C16), 23.59 (C15), 20.73 (C11), 14.21 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 14.19 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 12.31 (CH<sub>3</sub>-C10), 12.12 (CH<sub>3</sub>-C13) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>): ν̃ = 2936, 2852, 1728, 1267, 1147, 1028 cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI-TOF) *m/z* [M – H]<sup>-</sup> Calcd for C<sub>29</sub>H<sub>43</sub>O<sub>8</sub> 519.29579, found 519.29634. C<sub>29</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub> (520.66): calcd. C 66.90, H 8.52; found C 66.97, H 8.59.

**Synthesis of Steroids Methano[60]fullerene 8, 9:** A solution of C<sub>60</sub> (100 mg, 0.14 mmol) in toluene (100 mL) was prepared. The corresponding malonate (0.14 mmol), CBr<sub>4</sub> (0.14 mmol), and diazabicyclo[4.2.0]undec-7-ene (DBU; 0.21 mL, 1.4 mmol) were added in that order. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 2 h. Water was added, and the residue was extracted with toluene. The combined extracts were dried (MgSO<sub>4</sub>) and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. Purification of the products was achieved by column chromatography on silica gel, first with CS<sub>2</sub> to elute unreacted C<sub>60</sub> and finally with the eluent specified below for each compound.

#### **61-(Ethoxycarbonyl)-61-(3β-O-carbetoxy-5α-androstan-17-one)methano[60]**

**fullerene (8):** This compound was prepared from 3β-ethyl malonate-5α-androstan-17-one (5). The purification was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and dichloromethane as eluents, chemical yield 100 mg (0.09 mmol, 68 %); amorphous brown solid; HPLC: toluene/acetonitrile, flow rate 1 mL/min, tR = 4.3 min. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 5.12 (m, 1H, H3), 4.56 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.45 (dd, *J* = 8.4, 19.2 Hz, 1H, H16), 2.08 (m, 1H, H16), 2.07 (m, 1H, H2), 1.95 (m, 1H, H15), 1.84 (m, 2H, H1, H4), 1.83 (m, 1H, H12), 1.82 (m, 1H, H7), 1.75 (m, 1H, H2), 1.68 (m, 1H, H11), 1.62 (m, 1H, H4), 1.60 (m, 1H, H8), 1.52 (m, 1H, H15), 1.50 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.42 (m, 1H, H6), 1.36 (m, 1H, H6), 1.34 (m, 1H, H11), 1.32 (m, 1H, H14), 1.30 (m, 2H, H5, H12), 1.14 (m, 1H, H1), 1.04 (m, 1H, H7), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.88 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.78 (m, 1H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ =

221.23 (C17), 163.81 (C=O), 163.27 (C=O), 145.63, 145.62, 145.41, 145.39, 145.33, 145.32, 145.02, 144.83, 144.75, 144.04, 144.03, 143.24, 143.17, 143.10, 142.36, 142.07, 142.04, 141.08, 139.31, 139.05, 139.03, 77.37 (C3), 73.83 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 71.83 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 63.50 (CH<sub>2</sub>O), 54.40 (C9), 52.50 (C61 cyclopropane ring), 51.49 (C14), 47.94 (C13), 44.92 (C5), 36.83 (C1), 36.06 (C16), 35.87 (C10), 35.18 (C8), 33.89 (C4), 31.65 (C12), 30.95 (C7), 28.44 (C6), 27.48 (C2), 21.93 (C15), 20.65 (C11), 14.28 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 13.98 (CH<sub>3</sub>-C13), 12.48 (CH<sub>3</sub>-C10) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\tilde{\nu}$  = 2926, 2854, 1739, 1239, 810, 755 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI)  $m/z$  [M<sup>-</sup>] Calc for C<sub>84</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub> 1122.2401, found 1122.2392.

**61-(Ethoxycarbonyl)-61-(17 $\beta$ -O-carbetoxy-3 $\beta$ -acetoxy-5 $\alpha$ -androstan)methano[60]**

**fullerene (9):** This compound was prepared from 3 $\beta$ -acetoxy-17 $\beta$ -ethylmalonate-5 $\alpha$ -androstan (6). The purification was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and dichloromethane as eluents, chemical yield 88 mg (0.075 mmol, 58 %), amorphous brown solid. HPLC: toluene/acetonitrile, 9:1, flow rate 1 mL/min, tR = 5.2 min. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 4.98 (t,  $J$  = 8.5 Hz, 1H, H17), 4.69 (m, 1H, H3), 4.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.36 (m, 1H, H16), 2.02 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-CO), 1.87 (m, 1H, H2), 1.81 (m, 1H, H16), 1.75 (m, 1H, H12), 1.72 (m, 1H, H1), 1.70 (m, 1H, H7), 1.63 (m, 1H, H15), 1.61 (m, 1H, H4), 1.56 (m, 1H, H11), 1.52 (m, 1H, H2), 1.49 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.46 (m, 1H, H8), 1.38 (m, 1H, H4), 1.30 (m, 2H, H6, H11), 1.25 (m, 1H, H15), 1.20 (m, 1H, H6), 1.15 (m, 1H, H5), 1.14 (m, 1H, H14), 1.05 (m, 1H, H12), 0.95 (m, 1H, H1), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.88 (m, 1H, H7), 0.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.72 (m, 1H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 170.87 (C=O), 163.87 (C=O), 163.67 (C=O), 145.75, 145.68, 145.40, 145.39, 145.32, 145.29, 145.21, 145.01, 144.83, 144.81, 144.74, 144.02, 143.21, 143.15, 143.10, 142.35, 142.07, 142.04, 141.12, 141.09, 141.08, 140.06, 139.40, 138.96, 138.94, 86.17 (C17), 73.90 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 73.74 (C3), 71.87 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 63.52 (CH<sub>2</sub>O), 54.23 (C9), 52.54 (C61 cyclopropane ring), 50.75 (C14), 44.75 (C5), 43.32 (C13), 37.11 (C12), 36.89 (C1), 35.71 (C10), 35.41 (C8), 34.11 (C4), 31.61 (C7), 28.52 (C6), 27.56 (C2), 27.53 (C16), 23.79 (C15), 21.63 (CH<sub>3</sub>-CO), 20.86 (C11), 14.46 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 12.49 (CH<sub>3</sub>-C13), 12.39 (CH<sub>3</sub>-C10) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\tilde{\nu}$  = 2967, 2850, 1737, 1432, 1238, 753 cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI-TOF)  $m/z$  [M<sup>-</sup>] Calcd for C<sub>86</sub>H<sub>38</sub>O<sub>6</sub> 1166.2663, found 1166.2639.

**Synthesis of Methano[60]fullerene 10–12:** A solution of C<sub>60</sub> (140 mg, 0.2 mmol) in toluene (150 mL) was prepared. 3β,17β-diethylmalonate-5α-androstane (**7**), (85 mg, 0.16 mmol), CBr<sub>4</sub> (66 mg, 0.2 mmol), and diazabicyclo[4.2.0]undec-7-ene (DBU, 0.24 mL, 1.6 mmol) were added in that order. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 4 h. Water was added, and the residue was extracted with toluene. The combined extracts were dried (MgSO<sub>4</sub>) and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. Purification of the products was achieved by column chromatography on silica gel, first with CS<sub>2</sub> to elute unreacted C<sub>60</sub> and finally with the eluent specified below for each compound.

**61-Ethoxycarbonyl-61-[3β-O-carbetoxy-5α-androstan-17β-(61'-O-carbetoxy-61'-ethoxycarbonylmethano[60]fullerene)methano[60]fullerene] (10):** HPLC: toluene/acetonitrile (9:1), flow rate 1 mL/min, t<sub>R</sub> = 10.3 min. The purification was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and dichloromethane/hexane (4:2) as eluents, to elute the corresponding fullerene dumbbell **10**, yield of isolate pure product 131 mg (0.067 mmol, 42 %), amorphous brown solid. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 5.13 (m, 1H, H3), 5.01 (m, 1H, H17), 4.58 (m, 4H, CH<sub>2</sub>O), 2.40 (m, 1 H, H16), 2.10 (m, 1H, H2), 1.93 (m, 1H, H12), 1.88 (m, 1H, H1), 1.86 (m, 1H, H4), 1.80 (m, 1H, H16), 1.78 (m, 2H, H7, H15), 1.76 (m, 1H, H2), 1.66 (m, 1H, H11), 1.64 (m, 1H, H4), 1.53 (m, 1H, H8), 1.52 (m, 6H, 2 ×CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.46 (m, 1H, H15), 1.45 (m, 1H, H6), 1.37 (m, 3H, H6, H11, H12), 1.31 (m, 2H, H5, H14), 1.17 (m, 1H, H1), 0.99 (m, 1H, H7), 0.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.74 (m, 1 H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 163.63 (C=O), 163.57 (C=O), 163.45 (C=O), 163.01 (C=O), 145.63, 145.55, 145.34, 145.30, 145.26, 145.15, 144.94, 144.77, 144.69, 143.97, 143.17, 143.10, 143.05, 142.30, 141.98, 141.95, 141.07, 141.03, 139.30, 139.24, 138.99, 138.96, 86.00 (C17), 77.35 (C3), 73.94 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 73.85 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 71.79 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 71.76 (C61 cyclopropane ring), 63.41 (CH<sub>2</sub>O), 63.37 (CH<sub>2</sub>O), 54.22 (C9), 52.43 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 52.37 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 50.78 (C14), 44.88 (C5), 43.28 (C13), 37.13 (C12), 36.93 (C1), 35.76 (C10), 35.40 (C8), 33.92 (C4), 31.6 (C7), 28.61 (C6), 27.56 (C2), 27.52 (C16), 22.95 (C15), 20.96 (C11), 14.43 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 14.33 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 12.49 (CH<sub>3</sub>-C13), 12.46 (CH<sub>3</sub>-C10) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>): ν̃ = 2956, 2922, 2852, 1741, 1461, 1260, 1019, 751 cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI/TOF) *m/z* [M<sup>+</sup>] Calcd for C<sub>149</sub>H<sub>40</sub>O<sub>8</sub> 1956.2718, found 1956.2628.

**61-(Ethoxycarbonyl)-61-(3 $\beta$ -O-carbetoxy-17 $\beta$ -ethylmalonate-5 $\alpha$ -androstan)**

**methano[60]fullerene (11):** HPLC: toluene/acetonitrile (9:1), flow rate 1 mL/min, tR = 4.57 min. The purification was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and dichloromethane/hexane (4:1) as eluents, to elute the corresponding methane fullerene **11**; yield of isolate pure product 24 mg (0.19 mmol, 12 %), amorphous brown solid; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 5.15 (m, 1H, H3), 4.70 (m, 1H, H17), 4.59 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.36 (s, 2H, OCCH<sub>2</sub>CO), 2.40 (m, 1H, H16), 2.20 (m, 1H, H16), 2.08 (m, 1H, H2), 1.87 (m, 2H, H1, H4), 1.85 (m, 2H, H12), 1.77 (m, 2H, H2, H15), 1.75 (m, 2H, H7, H11), 1.64 (m, 1H, H4), 1.52 (m 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.45 (m, 1H, H8), 1.43 (m, 1H, H6), 1.42 (m, 1H, H15), 1.40 (m, 1H, H6), 1.38 (m, 1H, H11), 1.32–1.23 (m, 5H, H5, H14, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.15 (m, 1H, H1), 1.07 (m, 1H, H12), 0.95 (m, 1H, H7), 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.87 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.74 (m, 1H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 166.93 (C=O), 166.81 (C=O), 163.82 (C=O), 163.69 (C=O), 145.77, 145.69, 145.64, 145.62, 145.41, 145.34, 145.22, 145.02, 144.84, 144.75, 144.04, 144.03, 143.23, 143.16, 143.11, 142.36, 142.06, 142.04, 141.13, 141.08, 139.41, 139.31, 139.05, 139.03, 138.96, 138.95, 84.03 (C17), 77.36 (C3), 73.91 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 71.83 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 63.50 (CH<sub>2</sub>O), 61.61 (CH<sub>2</sub>O), 54.20 (C9), 52.50 (C61, cyclopropane ring), 50.75 (C14), 44.92 (C5), 43.32 (C13), 42.16 (OCCH<sub>2</sub>CO), 37.09 (C12), 36.83 (C1), 35.70 (C10), 35.18 (C8), 33.83 (C4), 32.08 (C7), 28.44 (C6), 27.48 (C2), 27.37 (C16), 22.85 (C15), 20.65 (C11), 14.45 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 14.28 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 12.39 (CH<sub>3</sub>-C10), 12.19 (CH<sub>3</sub>-C13) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\tilde{\nu}$  = 2923, 2875, 1736 (C=O), 1463, 1368, 1235, 754 cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI-TOF) *m/z* [M<sup>+</sup>] Calcd for C<sub>39</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub> 1238.2874, found 1238.2868.

**61-(Ethoxycarbonyl)-61-(17 $\beta$ -O-carbetoxy-3 $\beta$ -ethylmalonate-5 $\alpha$ -androstan)**

**methano[60]fullerene (12):** HPLC: toluene/acetonitrile (9:1), flow rate 1 mL/min, tR = 6.01 min. The purification was performed by column chromatography on silica gel with dichloromethane as eluents, to elute the corresponding methane fullerene **12**; yield of isolate pure product 22 mg (0.018 mmol, 11 %); <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  = 4.98 (m, 1H, H17), 4.77 (m, 1H, H3), 4.56 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.36 (s, 2H, OCCH<sub>2</sub>CO), 2.33 (m, 1H, H16), 2.05 (m, 1H, H2), 1.87 (m, 1H, H12), 1.84 (m, 1H, H1), 1.78 (m, 1H, H16), 1.76 (m, 1H, H2), 1.72 (m, 2H, H7, H15), 1.67 (m, 1H, H4), 1.64 (m, 2H, H4, H11), 1.49 (m, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.44 (m, 1H, H8), 1.41 (m, 1H, H15), 1.40 (m, 1H, H4), 1.35 (m, 2H, H6, H12), 1.33 (m, 1H, H11), 1.30–1.28 (m, 5H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, 2 ×

H6), 1.22 (m, 1H, H5), 1.17 (m, 1H, H1), 1.06 (m, 1H, H14), 0.94 (m, 1H, H7), 0.92 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13), 0.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.72 (m, 1H, H9) ppm. <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ = 166.90 (C=O), 166.35 (C=O), 163.88 (C=O), 163.68 (C=O), 145.76, 145.69, 145.64, 145.45, 145.44, 145.40, 145.33, 145.31, 145.22, 145.01, 144.84, 144.74, 144.03, 143.23, 143.16, 143.10, 142.36, 142.08, 142.06, 142.05, 141.13, 141.10, 141.07, 139.41, 139.30, 139.05, 138.96, 138.95, 86.15 (C17), 75.04 (C3), 73.82 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 71.84 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 63.48 (CH<sub>2</sub>O), 61.60 (CH<sub>2</sub>O), 54.20 (C9), 52.54 (C61, cyclopropane ring), 50.75 (C14), 44.88 (C5), 43.32 (C13), 42.04 (COCH<sub>2</sub>CO), 37.09 (C12), 36.86 (C1), 35.77 (C10), 35.39 (C8), 33.92 (C4), 31.59 (C7), 28.56 (C6), 27.52 (C2), 27.50 (C16), 23.78 (C15), 20.86 (C11), 14.46 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 14.21 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 12.48 (CH<sub>3</sub>-C10), 12.19 (CH<sub>3</sub>-C13) ppm. IR (CHCl<sub>3</sub>):  $\tilde{\nu}$  = 2923, 2853, 1742, 1461, 1362, 1282, 1062, 755 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI) m/z [M<sup>-</sup>] Calcd for C<sub>89</sub>H<sub>42</sub>O<sub>8</sub> 1238.28852, found 1238.28589.

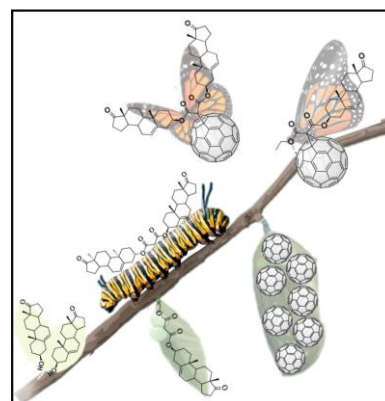
**Theoretical Calculations:** For generation of all random geometries, an in-house-made Fortran routine was employed. All structures were generated by randomly varying the selected dihedrals mentioned above and highlighted in Figure 1. All semiempirical AM1 calculations were performed using MOPAC2016 software<sup>[58]</sup> and the criteria for terminating all optimizations was increased by a factor of 100 through the PRECISE keyword. Single point energies used for comparing stereoisomers **11** and **12** were performed at the B3LYP/6-31G+(d,p) level with the D3 Grimme's dispersion correction<sup>[59]</sup> which provides higher accuracy and less empiricism compared to its predecessors. All DFT calculations were computed with the Gaussian 09 package.<sup>[60]</sup> NCI isosurfaces were obtained with the NCIPLOT program<sup>[61]</sup> using suggested default values. The wfn entries files, for the NCI analysis, were generated performing a single point energy calculation at the B3LYP/6-31G(d) level of theory starting from the AM1 optimized geometries; results were visualized with the VMD software.<sup>[62]</sup>

## References

- [1] P. Chawla, V. Chawla, R. Maheshwari, S. A. Saraf, K. Shailendra, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2010**, 10, 662–677.
- [2] N. Martín, T. Da Ros, J. F. Nierengarten, *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 6425–6427.
- [3] M. M. Gokhale, R. R. Somani, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2015**, 12, 355–366.
- [4] J. L. Delgado, S. Filippone, F. Giacalone, M. A. Herranz, B. Illescas, E. M. Pérez, N. Martín, *Top. Curr. Chem.* **2014**, 350, 1–64.
- [5] F. Y. Hsieh, A. V. Zhilenkov, I. I. Voronov, E. A. Khakina, D. V. Mischenko, P. A. Troshin, S. Hsu, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2017**, 9, 11482–11492.
- [6] M. J. Akhtar, M. Ahamed, H. A. Alhadlaq, A. Alshamsan, *Biochim. Biophys. Acta General Subjects.* **2017**, 1861, 802–813.
- [7] E. A. Khakina, O. A. Kraevaya, M. L. Popova, A. S. Peregudov, S. I. Troyanov, A. V. Chernyak, V. M. Martynenko, A. V. Kulikov, D. Schols, P. A. Troshin, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 773–777.
- [8] H. Kataoka, T. Ohe, K. Takahashi, S. Nakamura, T. Mashino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 4565–4567.
- [9] A. Muñoz, D. Sigwalt, B. M. Illescas, J. Luczkowiak, L. Rodríguez-Pérez, I. Nierengarten, M. Holler, J. Remy, K. Buffet, S. P. Vincent, J. Rojo, R. Delgado, J. Nierengarten, N. Martín, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 50–57.
- [10] B. M. Illescas, J. Rojo, R. Delgado, N. Martín, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 6018–6025.
- [11] Ch. Misra, M. Kumar, G. Sharma, R. Kumar, B. Singh, O. P. Katare, K. Raza, *Nanomedicine.* **2017**, 12, 1011–1023.
- [12] X. Guo, R. Ding, Y. Zhang, L. Ye, X. Liu, C. Chen, Z. Zhang, Y. Zhang, *J. Pharm. Sci.* **2014**, 103, 3225–3234.
- [13] G. Mehta, V. Singh, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, 324–334.
- [14] B. Deepak, B. G. H. Salunke, S. P. Vandana, *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 813–847.
- [15] I. Nogo, M. Sremacki, E. Durendic, *Asian J. Chem.* **2016**, 28, 2635–2640.
- [16] D. Abed Bakhotmah, *Int. J. Chem.* **2015**, 7, 98–103.
- [17] R. M. Mohareb, S. H. Doss, G. A. Elmegeed, E. F. Eskander, *Curr. Top. Steroid Res.* **2009**, 6, 49–61.
- [18] Q. Lv, L. Yan, Y. Lan, Y. Jiang, *Virulence* **2016**, 7, 649–659.
- [19] N. J. Spann, C. K. Glass, *Nat. Immunol.* **2013**, 14, 893–900.
- [20] M. S. Bjelakovic, T. J. Kop, M. Vlajic, J. Djordjevic, D. R. Milic, *Tetrahedron* **2014**, 70, 8564–8570.
- [21] M. Bjelakovic, T. Kop, R. Baosic, M. Zlatovic, A. Zekic, V. Maslak, D. Milic, *Monatsh. Chem.* **2014**, 145, 1715–1725.
- [22] A. Ruiz, M. Suárez, N. Martín, F. Albericio, H. Rodríguez, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, 5, 374–379.

- [23] D. MacFarland, J. Zhang, Z. Zhou, R. P. Lenk, S. R. Wilson, *U. S. Pat. Appl. Publ.* **2008**, US 20080214514 A1 20080904.
- [24] R. Fong II, D. I. Schuster, S. R. Wilson, *Org. Lett.* **1999**, 1, 729–732.
- [25] L. S. Li, Y. J. Hu, Y. Wu, Y. L. Wu, J. Yue, F. Yang, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.-1* **2001**, 617–621.
- [26] J. Coro, H. Rodríguez, D. G. Rivera, M. Suárez, D. Molero, M. A. Herranz, R. Martínez-Álvarez, S. Filippone, N. Martín, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4810–4817.
- [27] M. S. Bjelakovic, D. M. Godjevac, D. R. Milic, *Carbon* **2007**, 45, 2260–2265.
- [28] T. Ishi-I, S. Shinkai, *Tetrahedron* **1999**, 55, 12515–12530.
- [29] R. N. Goyal, V. K. Gupta, N. Bachheti, *Anal. Chim. Acta* **2007**, 597, 82–89.
- [30] A. Ruiz, J. Coro, L. Almagro, J. A. Ruiz, D. Molero, E. E. Maroto, S. Filippone, M. A. Herranz, R. Martínez-Alvarez, J. C. Sancho-García, F. Di Meo, M. Suarez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 2819–2826.
- [31] M. Suarez, A. Ruiz, L. Almagro, J. Coro, E. E. Maroto, S. Filippone, D. Molero, R. Martínez-Álvarez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2017**, 82, 4654–4660.
- [32] A. Ruiz, C. Morera-Boado, L. Almagro, J. Coro, E. E. Maroto, M. A. Herranz, S. Filippone, D. Molero, R. Martínez-Álvarez, J. M. García de la Vega, M. Suárez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 3473–3486.
- [33] S. A. Gupte, M. Tateyama, T. Okada, M. Oka, R. Ochi, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2002**, 34, 679–688.
- [34] S. Kraszewski, M. Tarek, W. Treptow, C. Ramseyer, *ACS Nano* **2010**, 4, 4158–4164.
- [35] M. Reyes-Moreno, A. Fuente-Hernández, J. A. Ruiz-García, Y. M. Álvarez Ginarte, H. Vélez-Castro, A. Fernández-Villalobo, S. Montiel-Smith, S. Meza-Reyes, J. Sandoval-Ramírez, *J. Mex. Chem. Soc.* **2007**, 51, 232–236.
- [36] G. M. Loudon, *Organic Chemistry*, 4th ed. **2002**, Oxford University Press, Chapter 19.
- [37] M. Reyes, J. A. Ruiz, Y. Ibarra, A. Fuente, H. Vélez, I. Hernández, I. Martínez, I. Rodeiro, J. Sandoval, S. Meza, S. Montiel, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 4567–4571.
- [38] F. Diederich, L. Isaacs, D. Philp, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 391–394.
- [39] N. M. Thong, T. C. Ngo, D. Q. Dao, T. Duang, Q. T. Tran, P. C. Nam, *J. Mol. Model.* **2016**, 22, 113.
- [40] S. A. Lerke, B. A. Parkinson, D. H. Evans, P. J. Fagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7807–7813.
- [41] M. A. Herranz, F. Diederich, L. Echegoyen, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2299–2316.
- [42] B. Knight, N. Martín, T. Ohno, E. Ortí, C. Rovira, J. Veciana, P. Vidal Gancedo, J. Viruela, R. Viruela, F. Wudl, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9871–9882.
- [43] L. E. Echegoyen, F. D. Djojo, A. Hirsch, L. Echegoyen, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 4994–5000.
- [44] J. L. Segura, N. Martín, *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 13–25.
- [45] J. P. Ebejer, G. M. Morris, C. M. Deane, *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 1146–1158.

- [46] P. C. Hawkins, *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57*, 1747–1756.
- [47] A. R. Leach, *Molecular Modeling: Principles and Applications*, 2<sup>nd</sup> ed.; Prentice Hall: Harlow, England, **2001**, Chapter 9, pp. 457–505.
- [48] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909.
- [49] A. Ruiz, H. Pérez, C. Morera-Boado, L. Almagro, C. C. P. da Silva, J. Ellena, J. M. García de la Vega, R. Martínez-Álvarez, M. Suárez, N. Martín, *CrystEngComm* **2014**, *16*, 7802–7814.
- [50] E. R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sánchez, J. Contreras-García, A. J. Cohen, W. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6498–6506.
- [51] J. Lane, J. Contreras-García, J. Piquemal, B. Miller, H. Kjaergaard, *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3263–3266.
- [52] J. Contreras-García, R. Boto, F. Izquierdo-Ruiz, I. Reva, T. Woller, M. Alonso, *Theor. Chem. Acc.* **2016**, *135*, 242.
- [53] C. Lee, W. Yang, R. G. Parr, *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- [54] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [55] C. Sikorska, T. Puzyn, *Nanotechnology* **2015**, *26*, 455702.
- [56] T. A. Koopmans, *Physica* **1934**, *1*, 104–113.
- [57] G. Zhang, C. Musgrave, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1554–1561.
- [58] MOPAC2016, Version: 17.151W, James J. P. Stewart, Stewart Computational Chemistry, web: [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net).
- [59] S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich, H. Krieg, *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- [60] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, *Gaussian 09, Revision E.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2013**.
- [61] J. Contreras-García, E. Johnson, S. Keinan, R. Chaudret, J. Piquemal, D. Beratan, W. Yang, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 625–632.
- [62] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.



### II.2.2- [60]Fullerene Hybrids Bearing “Steroid Wings”: A Joined Experimental and Theoretical Investigation

**Abstract:** Novel [60]fullerene-steroid hybrids have been synthesized by Bingel–Hirsch cyclopropanation reaction between  $C_{60}$  and steroid malonates, leading to conjugates in which a [60]fullerene unit is connected to one or two dehydroepiandrosterone moieties, an important naturally occurring steroid hormone. The obtained derivatives have been fully characterized by a whole set of instrumental techniques in order to determine their chemical structure. Moreover, their electrochemical properties, investigated by cyclic voltammetry, revealed the presence of three reversible reduction waves for both hybrids. Furthermore, Transmission Electron Microscopy studies allowed to determine the morphology and size of the fullerene hybrids in aqueous solution, showing a tendency to organize into spherical nanoscale structures. Theoretical calculations using the DFT-PBE method and 6-311G(d,p) basis set, were performed to predict the most stable conformations for the synthesized compounds, and to determine the factors that control the geometry of these hybrid molecules. In addition, parameters such as polarity, and lipophilicity were estimated. The obtained results corroborate the predicted activity against HIV-1 protease as suggested by molecular docking simulation.

*Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 5926–5937.

## **Introduction**

The discovery of fullerenes in late 1985 is among the biggest breakthroughs in chemistry.<sup>[1]</sup> The singular geometry and chemical and physical properties of these carbon allotropes make them suitable molecular building blocks for both biomedical chemistry<sup>[2]</sup> and materials science.<sup>[3]</sup> Among these molecular scaffolds, C<sub>60</sub> has been the most widely used chemical platform to synthesize novel compounds that display biological activity.<sup>[4]</sup> Remarkable examples relate with the synthesis of hybrid molecules, where the [60]fullerene is covalently connected to biological active compounds such as sugars,<sup>[5]</sup> amino acids,<sup>[6]</sup> and peptides,<sup>[7]</sup> which allowed synthesizing molecular conjugates displaying affinity to some nucleic acids, proteins, or cell receptors.<sup>[4a,8]</sup> In addition, these hybrid molecules are better to solubilize in aqueous medium, as well as in organic solvents than pristine C<sub>60</sub>, which represents a required feature for biological applications.<sup>[9]</sup>

On the other hand, steroids constitute an extensive and essential class of biologically active polycyclic compounds which are widely used for therapeutic purposes.<sup>[10]</sup> For instance, the most abundant endogenous steroid hormone in humans 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one (dehydroepiandrosterone, DHEA),<sup>[11]</sup> is a potent neurosteroid<sup>[12]</sup> that can be used as anchoring molecular receptor on cell surfaces.<sup>[13]</sup> Moreover, this metabolic intermediary in the biosynthesis of androgens and estrogens<sup>[14]</sup> is able to prevent spontaneous tumors, and chemically induces a delay in carcinogenesis in liver,<sup>[15]</sup> colon,<sup>[16]</sup> lungs<sup>[17]</sup> and breast.<sup>[18]</sup> Also this steroid modulates osteoarthritis-related pain.<sup>[19]</sup> Besides, it has been reported that DHEA and some derivatives could be employed as modulators of antituberculosis immune response in the context of HIV-TB coinfection<sup>[20]</sup> and to suppress neurovirulence.<sup>[21]</sup> Hence, the pursuit of hybrid systems combining covalently C<sub>60</sub> and steroids as molecular building blocks represents an attractive approach to synthesize novel conjugates with outstanding bio-medical applications.

Among the chemical reactions that have been used to functionalized [60]fullerene, the Bingel–Hirsch cyclopropanation reaction is by far the most widely employed.<sup>[22]</sup> It formally involves an addition–elimination mechanism to yield methanofullerene cycloadducts under mild reaction conditions.<sup>[23]</sup> A common experimental methodology consists in the in situ generation of a bromomalonate anion using carbon tetrabromide

(CBr<sub>4</sub>) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) in toluene at room temperature, resulting in the formation of the corresponding C<sub>60</sub> monoadducts with good yields.

In 1993 was reported the first water soluble and biologically active methanofullerene derivative that inhibited the activity of HIV-1 protease.<sup>[24]</sup> Recent studies demonstrated the wide range of possibilities in the use of methanofullerene derivatives for the treatment of different diseases.<sup>[25]</sup> It has also been reported the potential bioactivity of C<sub>60</sub>-steroids as antioxidants<sup>[26]</sup> and in the treatment for human lung adenocarcinoma cancer.<sup>[27]</sup>

Over the years our research groups have collaborated in the design and preparation of C<sub>60</sub>-steroid conjugates considering several synthetic protocols.<sup>[28]</sup> In this sense, the Bingel–Hirsch methodology has allowed us to obtain a variety of methanofullerenes coupled to different steroid moieties such as cholesterol,  $\beta$ -sitosterol, and ergosterol, which are soluble in different organic solvents and potential molecular prototypes to explore the bio-medical applications of C<sub>60</sub>-steroids conjugates.<sup>[29]</sup> In addition, our group has also developed a synthetic strategy to prepared dumbbell-type fullerene-steroid hybrids, endowed with two [60]fullerene moieties covalently attached through the naturally occurring steroid hormone epiandrosterone. The two C<sub>60</sub> moieties were introduced considering a combination of Bingel–Hirsch cyclopropanation reactions and 1,3-dipolar cycloaddition processes considering steroid dimalonate units adequately functionalized.<sup>[30]</sup>

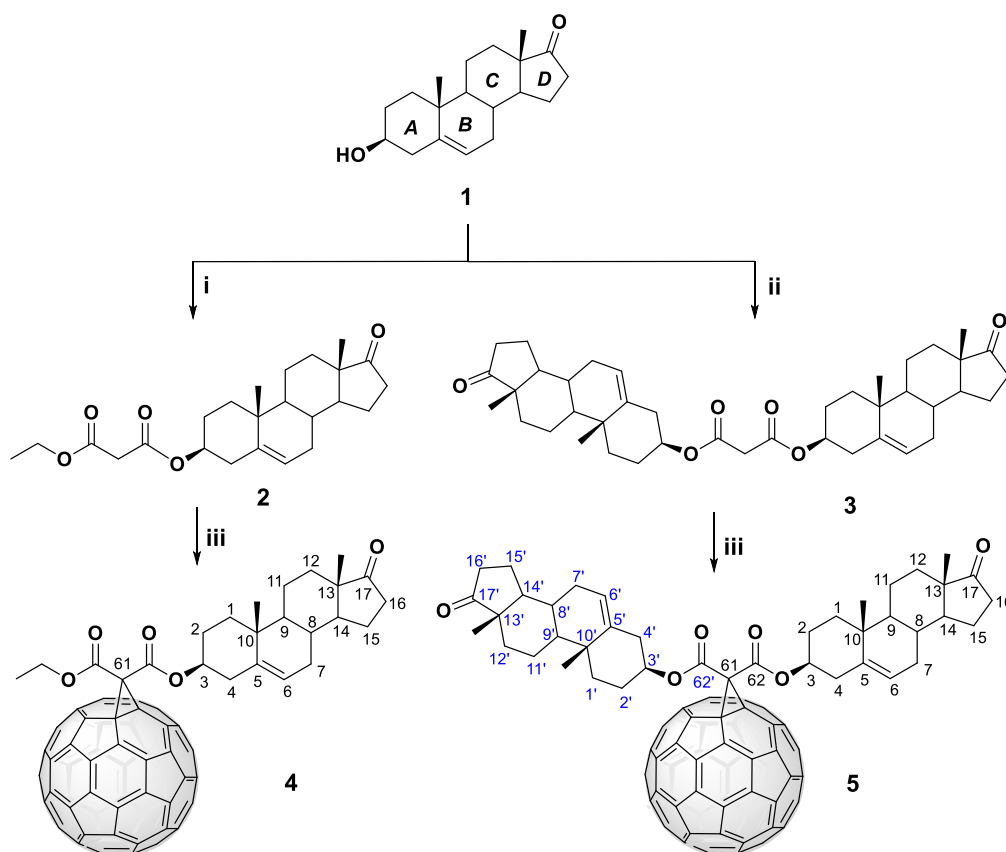
Based on previous reports<sup>[31]</sup> we developed a theoretical molecular docking set up for the investigation of C<sub>60</sub> derivatives, and it has shown to be very useful in predicting the activity against HIV-1 protease. The mentioned molecular docking study found that the covalent functionalization of [60]fullerene with steroidal moieties exerts a cornerstone role for improving interactions of C<sub>60</sub> with HIV-1 protease as well as for increasing its solubility.<sup>[28a]</sup>

Herein, we report the synthesis of new steroid–fullerene hybrids using the naturally occurring DHEA as the starting material, since the condensation of DHEA with [60]fullerene could improve the potential biomedical applications of fullerene-based biomolecules. In order to achieve such purpose, firstly, the hydroxyl group located at the C3 on the A ring of DHEA was chemically transformed into both symmetrical and asymmetrical steroid-malonates. Afterwards, the Bingel–Hirsch protocol was used to get

novel [6,6]closed steroid-[60]fullerene mono-adducts with one or two steroid wings, in an effort to determine the influence of the presence of one or two steroid moieties on the observed properties. The new hybrids were subjected to electrochemical and morphological studies. Moreover, a theoretical molecular docking was also developed in order to predict the affinity of the synthesized C<sub>60</sub> derivatives against HIV-1 protease. Additional, theoretical calculations were performed to shed light on the experimental parameters found.

## Results and Discussion

A synthetic strategy based on a multistep approach was developed in order to synthesize fullerene-steroids conjugates **4** and **5**. Thus, the first step involved the preparation of malonyl-steroid derivatives **2** and **3**, followed by the subsequent covalent attachment to the pristine [60]fullerene cage through a Bingel–Hirsch reaction in a second step, as depicted in Scheme 1.



**Scheme 1.** Synthesis of fullerene–steroid hybrids **4** and **5** by cyclopropanation reactions between [60]fullerene and the corresponding steroid-containing malonates **2** and **3**. (i) CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>2</sub>COCl, pyridine, DCM, 0 °C, (ii) ClOCCH<sub>2</sub>COCl, pyridine, DCM, 0 °C (iii) C<sub>60</sub>, DBU, CBr<sub>4</sub>, toluene, room temperature.

Dehydroepiandrosterone (**1**, DHEA) was chemically modified to synthesize the steroid malonates **2** and **3** by using commercially available (ethoxycarbonyl)acetyl chloride and malonyl chloride, respectively. Both reactions were performed in anhydrous dichloromethane (DCM) and pyridine at 0 °C. Once the reactions were concluded, the as-synthesized steroid-malonates were isolated by flash chromatography using a mixture of hexane/ethyl acetate as mobile phase. The purified compounds were obtained in 82 % (**2**) and 78 % (**3**) yields, respectively.

A complete characterization of compounds **2** and **3** was carried out by analytical and spectroscopic techniques (see Experimental Section and Supporting Information for details). In this regard, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR, as well as mass spectrometry (MS) allowed to corroborate the proposed structures. Thus, in the <sup>1</sup>H NMR spectrum of compound **2**, a multiplet at  $\delta = 4.59$  corresponding to the proton H3 located at ring A of the steroid backbone was observed, whereas the same signal with equal multiplicity was detected at  $\delta = 4.67$  for compound **3**. Furthermore, for both compounds the presence of the malonate moiety was confirmed by the existence of the methylene protons as singlets at ca.  $\delta \approx 3.3$ . Besides, the methylene carbons of the malonyl steroids were detected in the <sup>13</sup>C NMR spectra at  $\delta \approx 42$ , while the signals of C3 appears at ca.  $\delta \approx 75$ , which is slightly deshielded compared with the C3 of the non-functionalized DHEA ( $\delta = 71$ ).<sup>[32]</sup> Moreover, at 166.6 and 165.9 ppm two signals corresponding to the carbonyl groups of the malonate fragment in **2** are observed, while only one signal at 166.2 ppm appears for the symmetric compound **3**. Finally, the mass spectra under MALDI conditions showed the presence of  $[M + Na]^+$  peaks at  $m/z = 425.2319$  and  $667.3953$ , for compound **2** and **3**, respectively. Also, the structure of the compounds was confirmed by means of elemental analysis which were in good agreement with the calculated values.

The malonyl steroids **2** and **3** were used to obtain the novel methano[60]fullerenes **4** and **5** through the Bingel–Hirsch conditions, by mixing pristine [60]fullerene with either **2** or **3**, CBr<sub>4</sub> and DBU at room temperature (see Scheme 1). It is worth mentioning that after DBU addition the solution color changed from purple to brown, which indicates that a chemical transformation onto the C<sub>60</sub> molecule took place, leading to [6,6]-closed mono-adducts, later confirmed. This reaction was monitored by thin layer chromatography (TLC), progressing rapidly, and completed in 2 h. Afterwards, the obtained mono-adducts **4** and **5** were purified by flash chromatography using, in a first stage, carbon disulfide to elute the unreacted [60]fullerene, followed by DCM to elute the

mono-adducts. These compounds were isolated as stable brown solids with 74 and 51 % yields for conjugate **4** and **5**, respectively. The reaction mixtures were analyzed by HPLC, showing in the chromatograms (toluene/acetonitrile, 9:1; 1 mL min<sup>-1</sup>) peaks at 6.0, or 7.4 min. retention times, which are assigned to hybrid molecule **4** and **5**, respectively (see Figures S23 and S33 in Supporting Information). Moreover, in each chromatogram a peak at 9 min. corresponding to pristine C<sub>60</sub>, was observed.

The structural elucidation of the purified methano[60]fullerenes was carried out by combining different spectroscopic techniques (see Experimental Section and Supporting Information). For instance, the FTIR spectra of compounds **4** and **5** showed a C=O stretching vibration at around 1700 cm<sup>-1</sup>, and the characteristic band of organofullerene derivatives<sup>[33]</sup> at ca.730 cm<sup>-1</sup> (see Figures S21 and S31 in Supporting Information).

Also, the UV/Vis spectra of compounds **4** and **5** supported the formation of [6,6]-closed fullerene adducts, because both spectra show the typical profiles of [60]fullerene monoadducts, each one with a band centered at around 430 nm.<sup>[34]</sup> (See Figures S24 and S35).

Nevertheless, NMR spectroscopy proved to be the most useful technique to determine whether the covalent attachment of the malonate-steroids to the C<sub>60</sub> sphere was effective. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy confirmed the suggested structures for the hybrid derivatives **4** and **5**. In this sense, the lack of the methylene protons of the malonate moieties at  $\delta = 3.33$  in the spectra of both compounds allowed to corroborate the covalent functionalization of those carbons. Furthermore, new signals at 1.5 and 4.5 ppm, corresponding to the protons of the ethoxycarbonyl groups of conjugate **4** were observed. Due to the symmetrical structure of compound **5** each signal of the DHEA units in the <sup>1</sup>H NMR spectrum corresponds to a double number of protons than in the spectrum of **4**, and the same happens in the case of the <sup>13</sup>C NMR spectrum. In addition, the presence of the fullerene cage deshields the proton on C3 located at ring A of the steroid fragment, which is observed at  $\delta = 5.03$  for both compounds **4** and **5**, indicating that the moiety with the fullerene ring is join to C3.

On the other hand, the presence of the C<sub>60</sub> cage in the synthesized compounds was confirmed by the notable increase in the number of signals observed in the <sup>13</sup>C NMR spectra due to the lack of symmetry in hybrids **4** and **5**. Besides, for both conjugates the signals at ca.  $\delta \approx 163$  corresponding to the two carbonyl groups of the malonate moieties were detected. The position of the signals of the steroid backbone are almost insensitive

to the presence of the C<sub>60</sub> motif. Furthermore, for conjugate **4** the signal corresponding to C3 of ring A is observed at  $\delta = 77.4$  is deshielded by ca. 2 ppm, due to the presence of the [60]fullerene sphere. Lastly, the signals belonging to the sp<sup>3</sup> carbon atoms of the cyclopropane ring at the 6,6-ring junction of the C<sub>60</sub> cage appear at ca.  $\delta \approx 72$  and  $73$ , whilst quaternary carbon atoms were observed at ca.  $\delta \approx 52$ .

In the basis of chemical shift theory, substituent effects, and DEPT data, unambiguous assignments were performed for <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR resonances by analyzing the HSQC spectra of the protonated carbon atoms. Besides, the HMBC spectra allowed the assignment of the quaternary carbon atoms. In addition, both hybrids showed similar trends regarding the chemical shifts of the DHEA molecular backbone, which confirm the proposed structures (see Experimental section and Supporting Information). These results were further supported by MS. In the MALDI spectrum of compound **4** a peak at  $m/z = 1120.2270$  corresponding to M<sup>+</sup> ion was detected. The ESI spectrum of **5** show a peak at  $m/z = 1363.3943$ , which correspond to the protonated molecule.

It was found that the presence of the DHEA motif in the [60]fullerene derivatives **4** and **5** increases the solubility in organic solvents, such as chloroform, dichloromethane, dimethylformamide and dimethyl sulfoxide. These findings might be particularly relevant since preliminary biological investigations could be performed in some of these solvents. In general, due to the low solubility of fullerene derivatives in water, in vitro assays with the HIV-1 protease are carried out in DMSO.<sup>[35]</sup>

The electrochemical behavior of fullerene-steroid hybrids **4** and **5**, was investigated by cyclic voltammetry (CV) in solution using THF as a solvent (see Table 1 and Figure S36). They exhibit three reductions waves, with a first process that occurs at more negative potentials (by ca. 60–100 mV) than that measured for C<sub>60</sub>. The cathodic shifts are a consequence of the saturation of a double bond in the [60]fullerene sphere upon monoadduct formation, which leads to a higher LUMO energy than C<sub>60</sub> and to a decrease of the electron affinity.<sup>[36]</sup>

Bingel–Hirsch adducts experiment retrocyclopropanation reaction upon reduction, due to the cleavage of one of the cyclopropane bonds connecting the malonate addend to the C<sub>60</sub>.<sup>[39]</sup> This behavior is particularly evident in the case of cycloadduct **5**, where the appearance of a small (irreversible) oxidation peak at ca. –0.5 V is observed when the potential is reversed after the third reduction wave (Figure S36). In addition, in the case of bis-steroid **5**, the reduction is slightly more difficult than in the case of **4** and other

fullerene-steroids investigated in the same experimental conditions.<sup>[30]</sup> This behavior might be due to the geometry adopted by the two steroid fragments around the fullerene cage. Furthermore, the absence of significant potential shifts with respect to other methanofullerene monoadducts indicate that there is essentially no effect of the steroidal unit on the electronic properties of the C<sub>60</sub> core.<sup>[28,30]</sup>

**Table 1.** Redox potentials of steroid-fullerene hybrids **4** and **5** and C<sub>60</sub> vs. Fc/Fc<sup>+</sup> in THF (mV). Estimated LUMO levels (eV).

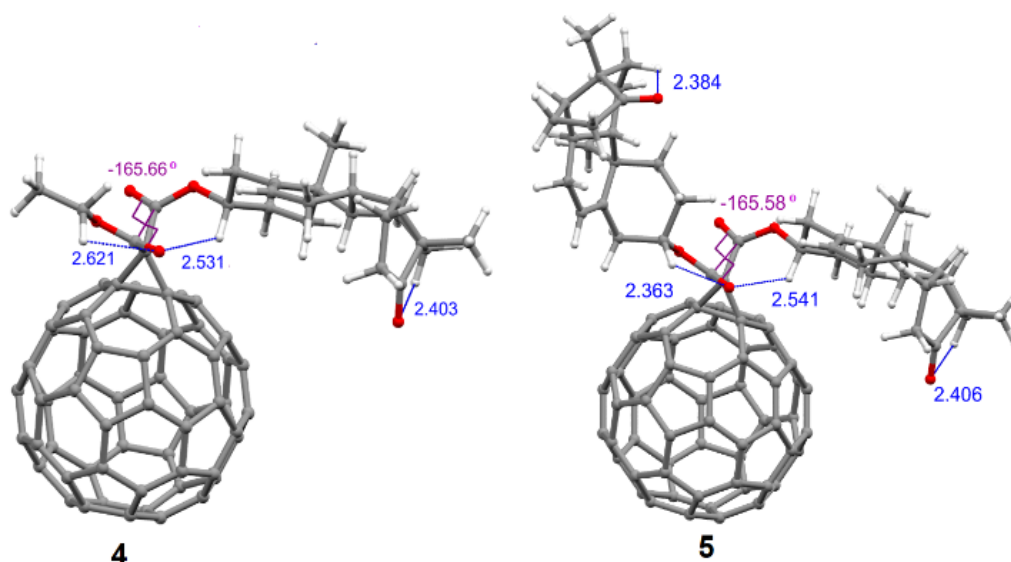
Compound	E <sup>1</sup> <sub>1/2, red</sub>	E <sup>2</sup> <sub>1/2, red</sub>	E <sup>3</sup> <sub>1/2, red</sub>	LUMO <sup>[c]</sup>
C <sub>60</sub> <sup>[a]</sup>	-860	-1440	-2000	-4.24
<b>4</b>	-940	-1500	-2050 <sup>[b]</sup>	-4.16
<b>5</b>	-961	-1540	-2273 <sup>[b]</sup>	-4.14

Experimental conditions: GCE as working electrode, Pt as counter electrode, Ag/AgNO<sub>3</sub> as reference electrode, Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup>PF<sub>6</sub><sup>-</sup> (0.1 M) as supporting electrolyte, 100 mV/s scan rate. Experimental error ± 5 mV. [a]Values obtained using TBAPF<sub>6</sub> 0.2 M.<sup>[37]</sup> [b]Cathodic peak potentials, irreversible processes. [c]LUMO = - (E<sup>1</sup><sub>1/2, red</sub> + 5.1).<sup>[38]</sup>

For a better understanding of the geometrical and electronic properties of these molecules, the structures of compounds **4** and **5** were pre-calculated using a relatively recent semiempirical PM6 method, which provides good results for fullerene derivatives.<sup>[40]</sup> After the pre-optimization, structures were submitted to a single point DFT calculations using the PBE (Perdew, Burke, and Ernzerhof) method<sup>[41]</sup> and the 6-311G(d,p) basis,<sup>[42]</sup> affording the minimum energy conformations of compounds **4** and **5** presented in Figure 1.

The Cartesian atom coordinates are given in Supporting Information (Tables S2–S3) together with dipole moments and total energies calculated using PM6 and DFT (Table S1). Overlap structures optimized by PM6 and DFT PBE 6-3111G(d,p) are shown in Figure S37.

Calculations predicted a tendency to a relative *s-trans* conformation of the carbonyl groups of the malonate unit, when the fullerene aggregate is present. The O=C⋯C=O dihedral angle has a value of -165.6° and -165.5° for **4** and **5**, respectively. These results are in agreement with those previously reported by our research group.<sup>[28a]</sup>

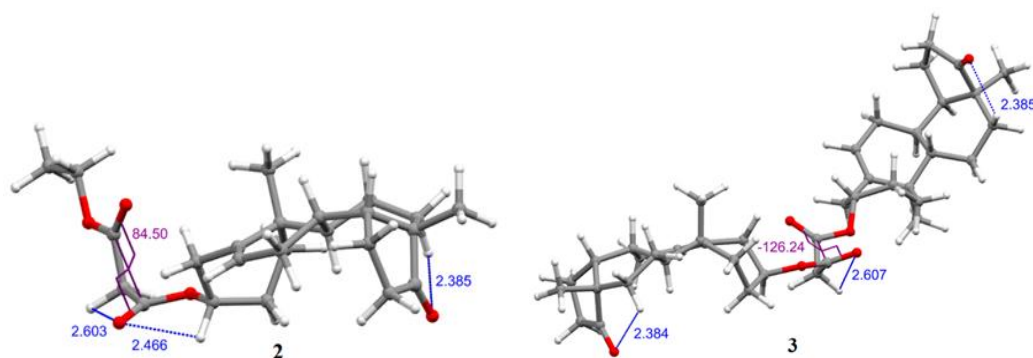


**Figure 1.** Minimum energy conformation of compounds **4** and **5** obtained by the DFT-PBE method using 6-311G(d,p) basis set. Bond distances are given in Å and dihedral angles in degree°.

Moreover, a different interaction of H3 and H3', of the corresponding ring A of the two steroids moieties in compound **5**, with the malonate carbonyl was found. The carbonyls *s-trans* conformation in the malonate moiety allow the formation of only one hydrogen bond C=O...H-C3 with the hydrogen of the closest ring, being achieved through a twisted boat conformation of ring A. In contrast, on another steroids the energy is lowered by the achievement of a chair conformation in ring A. Interestingly, the carbonyl groups of the malonate units also seem to be hydrogen-bond acceptors for the H3 of the furthest steroid moiety. The H3 distance to the oxygen from the furthest carbonyl is 2.541 Å (125.7°) and the length to the oxygen from the closest carbonyl is 2.363 Å (99.6°). In compound **4** the preferred conformation of ring A is a chair and can be observed hydrogen bond of H3 with the oxygen from the furthest carbonyl group with a length of 2.531 Å and 124.9° C3-H3...O angle.

In both compounds **4** and **5**, other hydrogen bonds can be observed between the carbonyls from the ring D and the H12 from ring C, in twisted boat conformation with similar values between 2.403–2.406 Å.

To estimate the influence of the fullerene cage on malonate units with steroids or ethyl moieties, the structure of the non-fullerene analogs **2** and **3**, and that for compound **4** and **5**, were optimized. Figure 2 shows the calculated minimum energy conformations.



**Figure 2.** Minimum energy conformations of compounds **2** and **3**, obtained by the DFT-PBE method using 6-311G(d,p) basis set. Bond lengths are given in Å and dihedral angles in degree °.

The structures were pre-calculated with the semiempirical PM6 method and then optimized with DFT-PBE/6-311(d,p) method. The results show that the relative orientation of the malonate carbonyls in **2** is synclinal, whereas for **4** an antiperiplanar disposition was observed, with dihedral  $O=C\cdots C=O$  angles of  $84.5^\circ$  and  $-165.6^\circ$ , respectively. (See Figure S38 and S39 in Supporting Information).

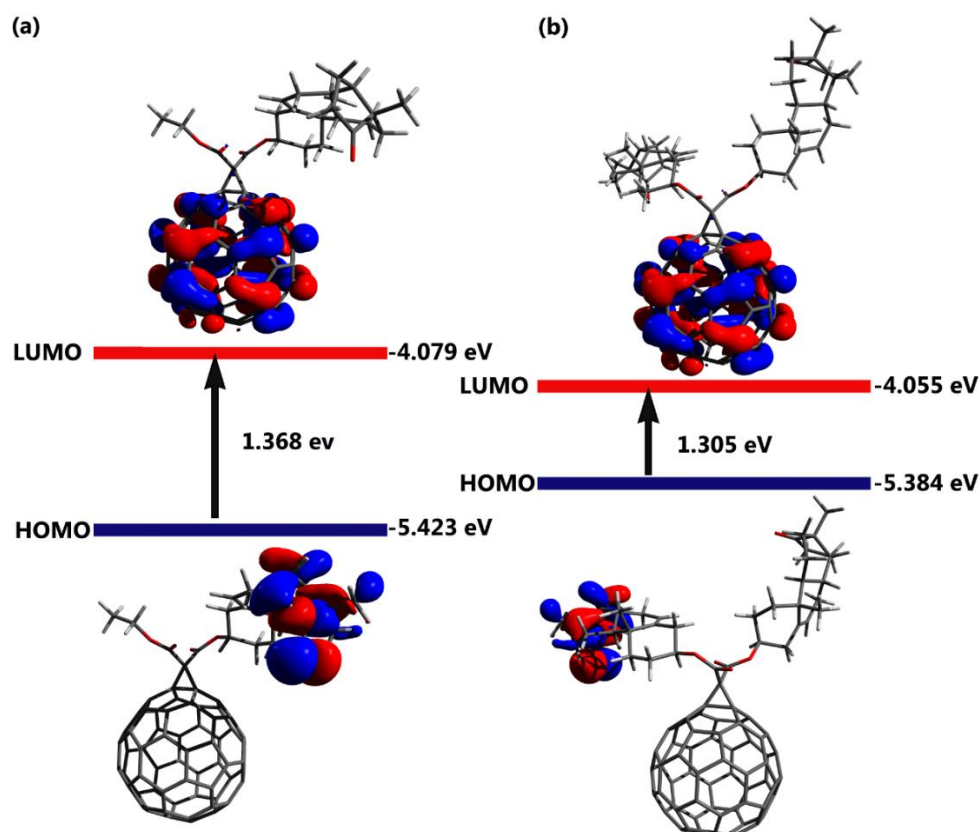
Another important change concerning these model compounds is that in **2** it can be observed the hydrogen bond between the closest carbonyl of the malonate and the H3 from ring A, which has a twisted boat conformation. On the contrary, when the fullerene is present (**4**), ring A adopts a chair conformation and, in this case, the arrangement of the atoms does not permit hydrogen bond formation. See Figure S39 in Supporting Information.

Compounds **3** and **5** also present some changes regarding the orientation of carbonyls, however not so severe. The dihedral  $O=C\cdots C=O$  angles are  $-126.2^\circ$  and  $-165.6^\circ$  in **3** and **5**, suggesting anticlinal and antiperiplanar conformations, respectively. Interestingly, in compound **3** both rings A have twisted boat conformations, although for compound **5** one chair and another twisted boat are observed for rings A conformations. The hydrogen bond between  $C62=O\cdots H3$  seems to be a little stronger in **5** ( $2.363 \text{ \AA}$ )  $C=O\cdots H3$  than in **3** ( $2.375 \text{ \AA}$ ), probably because in this case exists another interaction  $C=O\cdots H-C(\text{methylene})$  ( $2.613 \text{ \AA}$ ) and the weakened hydrogen bond may be a product of energetic consensus (See Figure S40 and S41 in Supporting Information).

These results show that, in all cases, the presence of hydrogen bonds, together with the presence or not of the fullerene moiety, has a major role in the final geometry of this type of molecules. Similar results were obtained performing the conformational analysis by using DFT with the B3LYP (6-31G(d)) base (See Supporting Information).

From the depiction of molecular orbitals (Figure 3), it can be observed that the LUMO orbitals are positioned exclusively on the fullerene core and the electron density of the HOMO on a cyclopentenone ring of the steroid moiety. The calculated LUMO and HOMO energy values are  $-4.079$  eV/ $-5.423$  eV for compound **4** and  $-4.055$  eV/ $-5.384$  eV for compound **5** respectively. A band-gap of  $1.368$  eV for **4** and  $1.305$  eV for **5** has been predicted.

In order to compare the experimental value of the LUMO estimated by cyclic voltammetry we calculated the LUMO values using the DFT-PBE<sup>[41]</sup> with the 6-311G(d,p) basis set method, which have been previously proved.<sup>[28a]</sup> This functional reproduces very well the energy compared with the experimental results in this kind of fullerene systems.<sup>[43]</sup> Very close values to those estimated from cyclic voltammetry were obtained, with energies of  $\approx -4.06$  eV for both products, which agrees well with the narrowed difference observed in the experiments. As can be seen, the deviation from the experimental values is only  $0.081$  and  $0.085$  eV for **4** and **5**, respectively.

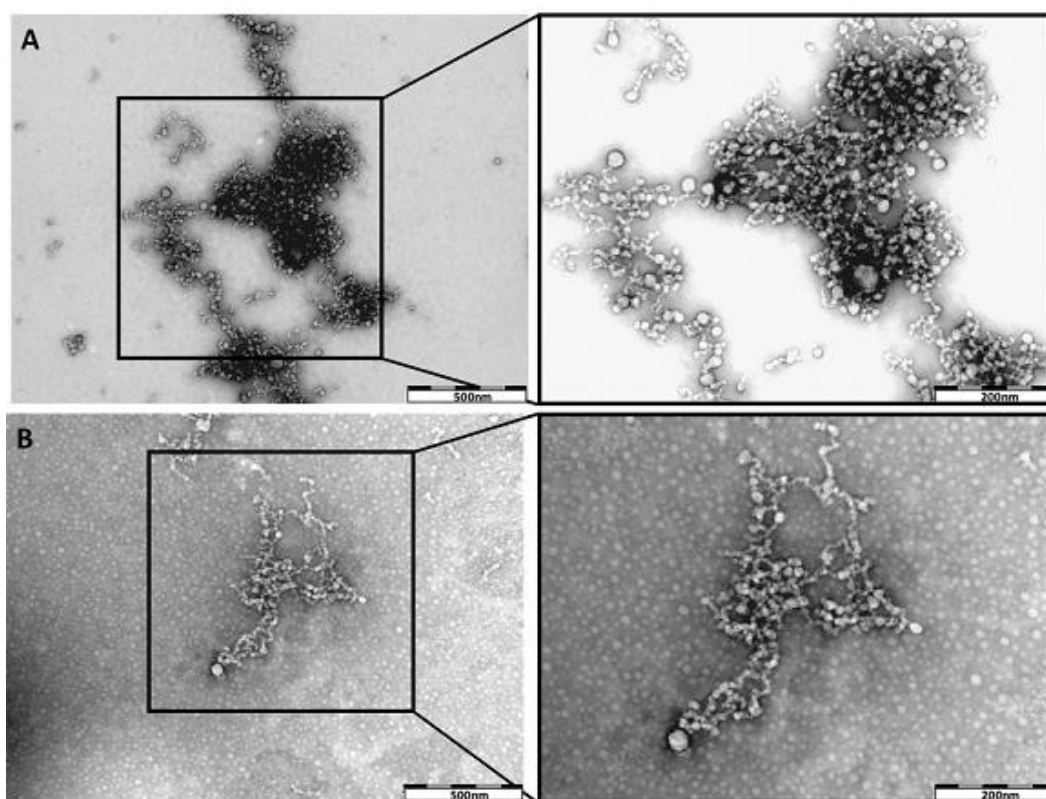


**Figure 3.** Molecular orbitals involved in the transitions HOMO-LUMO in (a) compound **4** and (b) compound **5**, calculated using DFT method at the PBE-6-311G(d,p) level of theory in the gas phase.

Beyond the chemical structure, the ability of carbon nanoparticles to self-assemble and form aggregates is an important property that might affect the biological activity. The size of C<sub>60</sub> derivatives is appropriate for its potential use in drug delivery, where small particles promote faster drug release, in spite of these particles be prone to aggregate. For this reason, and to establish the self-organization behavior in water of C<sub>60</sub>-steroid monoadducts **4** and **5**, a morphological characterization base on TEM was carried out.

In general, TEM images showed well-defined, mainly spherical and polydisperse nanoparticles, which also present slight angular features (Figure 4 and Supporting Information). In order to guarantee a representative study of each sample, certain areas of the grids were analyzed.

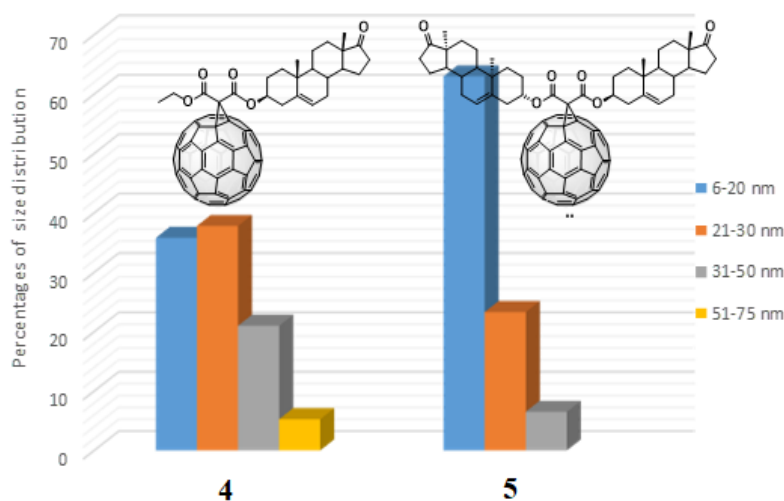
Regarding the micrographs, both samples followed the trend to form nanoparticles. Both compounds shown elongate molecular lattices with different sizes between 80–500 nm, which were detected frequently for **4** and only in a small number of cases for **5**. Additionally, for compound **4**, only some isolated nanoparticles were observed (Figure 4A). On the other hand, compound **5** showed a great population of separated nanoparticles, apparently at homogeneous sizes (Figure 4B).



**Figure 4.** Representatives uranyl acetate negative stain transmission electron micrographs (TEM) of fullerene-steroid hybrids, **A**: compound **4**, **B**: compound **5**.

The expected spherical self-assembly of C<sub>60</sub>-steroid derivatives **4** and **5** is due to different non-covalent interactions forces such as, hydrogen bonding, hydrophilic/hydrophobic interactions,  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions, and donor-acceptor interactions, promoted in these compounds by the amphiphilic character of these structures. A similar behavior has been reported by our group in C<sub>60</sub>-androsterone hybrids.<sup>[44]</sup>

The diameters of 400 nanoparticles were determined from the TEM images as analyzed by ImageJ software in order to establish the size distribution for the nanoparticle populations (Figure 5). The fullerene-steroid hybrid **4** showed a highly heterogeneous population, where those nanoparticles with size ranges between 21–30 nm are the most frequent with a 37.8 %; closely followed by nanoparticles of 6–20 nm of size with a 35.8 %. Nanoparticles with sizes ranging between 31–50 nm and 51–75 nm were represented with lower percentages of 21 %, and 5.26 %, respectively. On the contrary, fullerene-steroid hybrid **5** showed a more homogeneous population, where a 63 % of all nanoparticles measured correspond to a small range of 6–20 nm; a 23.3 % corresponding to nanoparticles with sizes of 21–30 nm, and a 6.5 % to particles of 31–50 nm diameter. Nanoparticles with diameter sizes higher than 51 nm were not observed.

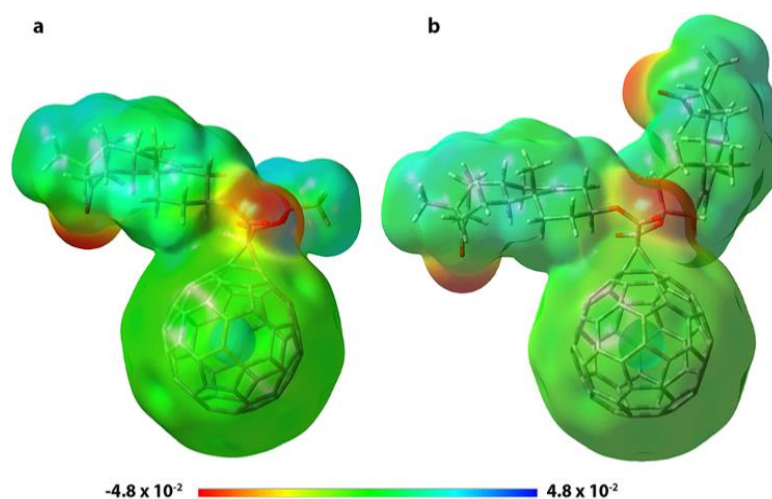


**Figure 5.** Percentages of size distribution of 400 nanoparticles of C<sub>60</sub>-steroid derivatives **4** and **5** adsorbed on the TEM grids.

The presence of two steroid moieties in compound **5** seems to induce molecules to self-assemble into more organized supramolecular structures allowing a better control of the size of the nanoparticles, but also minimizing the formation of conglomerates or nanoparticle networks. Related studies have been recently published showing that non-

covalent interactions (van der Waals forces) among the steroid residues of symmetric bi-steroids derived from terephthalic acid, but also the polarity of the solvent, promoted the self-assembly of the molecules into organized mesoscale supramolecular structures.<sup>[45]</sup>

On the other hand, in order to assess the intramolecular electrostatic interactions in hybrids **4** and **5**, a conformational search was carried out by calculating the electron density that surround each molecular hybrid. Thus, molecular electrostatic potential maps were obtained, as depicted in Figure 6. Furthermore, gaining insights regarding the electrostatic interactions allow us to predict the behavior of the as-synthesized fullerene derivatives in the presence of solvents with different polarities, as well as with solutes of different chemical functionalities.



**Figure 6.** Depiction of the molecular electrostatic potential maps for the most stable conformations of functionalized fullerenes a) **4** and b) **5**.

As illustrated in Figure 6 the covalent attachment of the steroid moieties to the fullerene cage induced a change in the electrostatic potential distribution due to a weak charge separation. In this regard, the negative potential, represented by red color, was mainly associated with the oxygen atoms belonging to carbonyl functions, whereas positive regions marked by blue color were located at some part of the steroid backbone. Moreover, most of the uncharged green regions are distributed throughout both molecular conjugates, which predicts an enhancement of the hydrophobic character of both compounds, making them more soluble in non-polar solvents. In addition, such electrostatic distribution could be beneficial to increase the lipophilicity of compounds **4** and **5**, as indicate by the calculated logP values of 11.96 and 22.34, respectively. Nevertheless, despite the small charge separation, dipole moments of 5.84 D (**4**) and 6.23 D (**5**) were predicted. Therefore, considering these results, it is expected that these hybrid

molecules could be able to penetrate through lipid membranes and the blood brain barrier (BBB), which would be of paramount importance for prospective biological applications.<sup>[46]</sup> These findings are in good agreement with the results reported for similar compounds.<sup>[26c]</sup>

In order to determine the potential use of compounds **4** and **5** in biomedicine, a molecular docking simulation was applied to find the optimal binding affinity of this fullerene derivatives with HIV-1 PR receptor [PDB code: 5ULT, (R = 1.53 Å)]<sup>[47]</sup> This protease is a symmetric homodimer with an active site in a hydrophobic cavity of 1 nm of diameter.<sup>[31b]</sup> This active site possesses catalytic triad amino acids, ASP25,25', THR26,26' and GLY27,27', which are conserved and not affected by mutations. The ability to remain unchanged the active site of this protease makes it a suitable target for viral inhibition.<sup>[48]</sup>

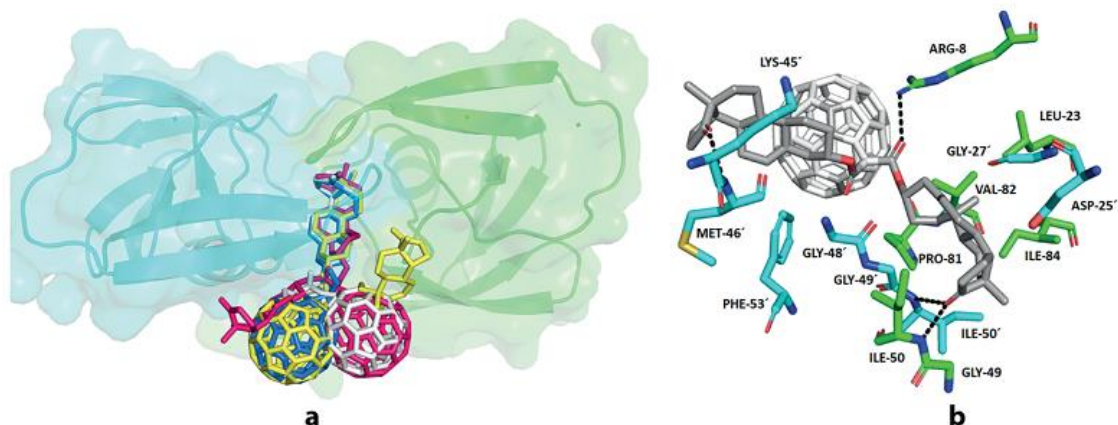
**Table 2** shows the calculated binding energies of both compounds considering the binding modes to the two chains of this homodimer protein, labeled A and B.

**Table 2.** Molecular docking results of steroid–fullerene hybrids with HIV-1 protease.

Compound	Cluster	E <sup>[a]</sup>
<b>4</b>	I	-11.7
	II	-11.1
<b>5</b>	I	-14.4
	II	-13.6

[a] Represents calculated binding energy (kcal/mol).

The calculated negative binding energy predicted that both compounds have affinity for the HIV-1 protease. Furthermore, hybrid **5**, that contain two steroid moieties, shows the lower energy values due to the presence of two steroid wings, increasing the van der Waals interactions in the hydrophobic cavity as expected by the calculated log P value. The [60]fullerene core blocked the active site entrance of the protease and the steroid interacts with the residues of the hydrophobic cavity. In the case of **5**, only one steroid unit occlude the active site, the other one interacts with the superficial residues. See also Figure S45 in the Supporting Information for more details. The DHEA moiety has similar conformations for all clusters, hence it interacts with common residues (Figure 7).



**Figure 7.** (a) Superimposed image of selected hybrids-HIV-PR complex: 4[I] (white), 4[II] (blue), 5[I] (yellow) and 5[II] (pink). Chain A and chain B surface of the receptor are shown in green and cyan respectively. (b) Structure of cluster 5[II]. Residues interacting are shown in green or cyan sticks and the H-bonds are represented in black discontinue lines.

The docking analysis revealed that ARG8, GLY49, ILE50, ILE84, ASP25', MET46', GLY48', GLY49', ILE50' and PHE53' are the main residues interacting with fullerene-steroids hereinafter referred to as ligands. These interactions have shown to be important to inhibit the HIV-1 protease activity as demonstrated by theoretical and in vitro assays.<sup>[49]</sup> Complementary interaction are shown in Table 3.

**Table 3.** Interactions of steroid–fullerene hybrid with HIV-1 protease residues.

Compound	Cluster	Interacting residues	H-bond forming residues
4	I	ARG8, GLY27, GLY49, ILE50, ILE84, ASP25', GLY27', ALA28', ASP29', ASP30', MET46', ILE47', GLY48', GLY49', ILE50', PHE53'	
	II	ARG8, GLY49, ILE50, LEU53, VAL82, ILE84, ASP25', ALA28', LYS45', MET46', GLY48', GLY49', ILE50', PHE53'	ARG8, GLY48', ILE50, ILE50'
5	I	ARG8, LUE23, LYS45, GLY49, ILE50, PRO81, VAL82, ILE84, ASP25', GLY27', MET46', GLY48', GLY49', ILE50', PHE53'	
	II	ARG8, LUE23, GLY49, ILE50, PRO81, VAL82, ILE84, ASP25', GLY27', LYS45', MET46', GLY48', GLY49', ILE50', PHE53'	ARG8, MET46', ILE50, ILE50'

Both compounds present interactions in different clusters with ASP25' a catalytic residue reported for this aspartyl protease.<sup>[31b,49]</sup> Besides, it was observed that the ligands formed H-bonds with the amino acid residues in the cavity. Moreover, the carbonyl group of DHEA forms H-bonds with ILE50 and ILE50' due to the high symmetry of the receptor's cavity. While, the malonate linker forms hydrogen bonds with GLY48' and

ARG8 of **4** and one H-bond ARG8. Furthermore, the cluster **5**[II] shows an H-bond with MET46' (see Figure 7b), which is not a residue of the active site but this interaction stabilizes the ligand conformation. Similar results were obtained by Ahmed et al. in the evaluation of different fullerene derivatives, where the formation of hydrogen bonding between HIV-1 protease and the carbonyl group of the ligand was observed.<sup>[31b]</sup> In addition, the C<sub>60</sub> cage exhibited an interaction with the phenyl group of the PHE53 through  $\pi$ - $\pi$  and T-shape interactions.<sup>[50]</sup> Therefore, taking these findings into account, compounds **4** and **5** could be use as potential HIV-1 protease inhibitors.

The biological data for these compounds will be reported elsewhere. It should be pointed out that compounds **4** and **5**, fulfil most geometrical features found for other related compounds exhibiting remarkable pharmacological activity.<sup>[51]</sup>

## **Conclusion**

We have carried out the synthesis of new [60]fullerene derivatives bearing one and two steroid wings by using the Bingel–Hirsch methodology. The cyclopropanation of the mono and bi-steroid malonates with C<sub>60</sub> provided methano[60]fullerene derivatives (**4** and **5**). Both molecular conjugates were exhaustively characterized, and their chemical structures unambiguously determined. The experimental and theoretical studies of the hybrids [60]fullerene derivatives lead to a better understanding of their properties. Besides, the proposed structures are supported by their electronic spectra as well as by cyclic voltammetry. The electrochemical properties shown that both systems exhibit three quasi-reversible reduction waves that are cathodically shifted compared to the C<sub>60</sub>. The TEM analysis allowed to conclude that the molecular self-assembly characteristics of C<sub>60</sub>-steroid derivatives in water lead to the formation of nano-sized spherical vesicles with highly heterogeneous size populations from 6 to 50 nm for compound **4**, and more homogeneous size population for hybrid **5**, being 6–20 nm the preferred size. Additionally, DFT theoretical calculations predicted the most stable conformations of the synthesized steroid-malonates and steroid-fullerene derivatives, showing that hydrogen bonds play a major role in the geometry of these hybrid molecules. Finally, molecular docking studies suggested the possible application of these compounds as HIV-1 protease inhibitors. The calculated polarity, and lipophilicity, achieved by the presence of steroid wings in these fullerene hybrids, could contribute to enhancing the predicted activity, which is a promising result to further explore the biomedical applications of these molecular chimeras.

## **Experimental Section**

**General:** All reagents were of commercial quality and were used as supplied unless otherwise specified. Solvents were dried by standard procedures. All reactions were performed using an atmosphere of argon and oven-dried glassware. Reactions were monitored by thin-layer chromatography carried out on 0.25 mm silica gel plates (230–400 mesh). Flash column chromatography was performed using silica gel (60 Å, 32–63 µm). <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 700 MHz, and <sup>13</sup>C NMR at 175 MHz; the one-bond heteronuclear correlation (HSQC) and the long-range <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C correlation (HMBC) spectra were obtained by use of the inv4gs and the inv4gslprnd programs. Mass spectra and HRMS were recorded under ESI and MALDI (dithranol as matrix) conditions in positive mode of detection. Microanalysis was performed with a Perkin–Elmer 2400 CHN instrument. A high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Cosmosil Buckyprep preparative column, dimensions, 4.6 × 250 mm<sup>2</sup>; flow rate 1.0 mL min<sup>-1</sup>, injection volume 15 µL, eluent toluene) was used to determine the purity of the compounds synthesized. The retention times (*t<sub>RS</sub>*) reported were determined at a wave length of 320 nm. FTIR spectra were carried out using ATR of the solid compounds. UV/Vis spectra were recorded in CHCl<sub>3</sub>. Electrochemical measurements were performed with a three-electrode configuration system. The measurements were carried out with THF solutions [0.1 M in tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>)]. A glassy carbon electrode (3 mm diameter) was used as the working electrode, and a platinum wire and an Ag/AgNO<sub>3</sub> electrode were employed as the counter and the reference electrode, respectively. Ferrocene (Fc) was added as an internal reference, and all potentials were determined relative to the Fc/Fc<sup>+</sup> couple. Both the counter and the reference electrodes were directly immersed in the electrolyte solution. The surface of the working electrode was polished with commercial alumina prior to use. Solutions were stirred and deaerated by bubbling argon for a few minutes prior to each measurement. Unless otherwise specified, the scan rate was 100mV/s and the experimental error ±5 mV.

**Transmission Electron Microscopy:** The nanoparticle solutions were made by dissolving the corresponding sample (10 mg) in H<sub>2</sub>O (10 mL) with ultrasonication for 2 h, followed by centrifugation (10 min, 3000 rpm) and the transparent Brown suspension was transferred to a clean vessel. The resulting suspension was analyzed by TEM. The aggregates were visualized using uranyl acetate negative staining. One drop of the clear solution was transferred to a TEM grid (copper grid, 3.0 mm, 200 mesh, coated with

Formvar film), together with a drop of uranyl acetate (2 % water solution) for 1 min, and allowed to dry.

**Computational Methods:** All molecules were built with Avogadro.<sup>[52,53]</sup> For the semiempirical calculations MOPAC2016<sup>[54]</sup> was used and DFT calculation were performed with ORCA4.2.1.<sup>[55]</sup> All structures were pre-calculated using semi-empirical PM6 method as a satisfactory starting point for large carbon structure, especially fullerene derivatives.<sup>[40]</sup> Then structures were optimized using Density Functional Theory at gradient-corrected exchange-correlation functional of Perdew, Burke, and Ernzerhof (PBE)<sup>[41]</sup> method using 6-31G(d) and refined with 6-311G(d,p) basis set as described somewhere else.<sup>[42]</sup> The frontier orbitals HOMO/LUMO were visualized directly from the optimized structure with DFT/PBE quantum mechanical calculation with 6-311G(d,p) basis set and this conformation were used for the calculation of dipole moment and visualization of the electrostatic potential map. Log P was calculate using XLOGP2v3.2.0.<sup>[56]</sup>

**Molecular Docking: Ligand/Protein Preparation.** The HIV-1 protease was used as molecular target and its X-ray structure [PDB code: 5ULT, (R = 1.53 Å)]<sup>[47]</sup> was retrieved from Protein Data Bank (PDB) (<http://rcsb.org>). Ligands optimized structures were obtained with the DFT PBE method.<sup>[41]</sup> The PDB files of the protease and ligands underwent a conversion to PDBQT format in order to perform molecular docking simulations with AutoDock Tools.<sup>[57]</sup> The Gasteiger model was used for the calculations of the partial charges of the ligands. Nonpolar hydrogen atoms were merged and default rotatable bonds were retained, except for the fullerene that was set to un-rotatable, using TORSDOF utility in AutoDockTools. The center of the simulation box of size 30 × 30 × 30 Å<sup>3</sup> was positioned at the center of the active site of the protease.

**Simulation and Analysis of HIV-Protease-Hybrid Complexes:** Nonflexible docking simulations were performed using AutoDock Vina 1.1.2.<sup>[58]</sup> Docking parameters were set to default, with the exception of exhaustiveness = 32 and num\_modes = 2. Ten independent runs were performed in each case and the two best-docked conformations (set by num\_modes = 2) of each run were analyzed, according to the affinity calculated with the scoring function. Each docking simulation produced 20 different docked conformations, which were then grouped based upon Root Mean Square Deviation (RMSD) of the different bound poses. The RMSD difference between conformations of the same cluster was set to less than 2 Å. The binding free energy (kcal/mol) of every

cluster was calculated as the mean binding free energy (MBFE) of all the conformations present in the same cluster. The cluster with best-scoring pose (higher number of conformations with lowest mean binding energy) was used as representative binding mode for each complex. 3D structures were represented using PyMOL 2.1.0.<sup>[59]</sup>

### **Synthesis and Characterization**

**3 $\beta$ -Ethyl Malonate-5-androsten-17-one (2):** To a solution of 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one (**1**) (288 mg, 1 mmol) in dichloromethane (60 mL) under argon was added dropwise pyridine (0.08 mL, 1 mmol). The resulting mixture was cooled in an ice bath and (ethoxycarbonyl)acetyl chloride (0.13 mL, 1 mmol) was added dropwise. The ice bath was removed, and the solution stirred for 2 h. The reaction mixture was kept at room temperature overnight. Water was added, and the residue was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined extracts were dried (MgSO<sub>4</sub>) and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. Purification of steroid malonate was achieved by column chromatography in silica gel using a mixture of hexane/ethyl acetate (5:1) as eluent. The product was isolated as a white solid. Chemical yield: 82 % (330 mg, 0.82 mmol). M.p. 71–73 °C. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5.34 (d,  $J$ = 4.7 Hz, 1H, H6), 4.59 (m, 1H, H3), 4.13 (q,  $J$ = 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.27 (s, 2H, OCCH<sub>2</sub>CO), 2.37 (dd,  $J$ = 19.3 Hz,  $J$ = 8.9 Hz, 1H, H16), 2.30 (m, 1H, H1), 2.26 (m, 1H, H1), 2.03 (m, 1H, H12), 2.00 (dd,  $J$ = 19.1 Hz,  $J$ = 9.4 Hz, 1H, H16), 1.88 (m, 1H, H15), 1.83 (m, 1H, H2), 1.81 (m, 1H, H4), 1.76 (dt,  $J$ = 12.9 Hz,  $J$ = 3.5 Hz, 1H, H7), 1.61 (m, 1H, H12), 1.59 (m, 1H, H8), 1.55 (m, 1H, H11), 1.53 (m, 1H, H2), 1.46 (m, 1H, H15), 1.41 (m, 1H, H11), 1.24 (m, 1H, H14), 1.22 (m, 1H, H7), 1.20 (t,  $J$ = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.07 (m, 1H, H4), 0.97 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C10), 0.94 (m, 1H, H9), 0.80 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-C13). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 220.5 (C17), 166.6 (C=O), 165.9 (C=O), 139.5 (C5), 122.1 (C6), 74.8 (C3), 61.4 (CH<sub>2</sub>O), 51.6 (C14), 50.0 (C9), 47.4 (C13), 41.8 (OCCH<sub>2</sub>CO), 37.7 (C1), 36.8 (C4), 36.6 (C10), 35.7 (C16), 31.4 (C8), 31.3 (C7), 30.7 (C12), 27.4 (C2), 21.8 (C15), 20.2 (C11), 19.3 (CH<sub>3</sub>-C10), 14.0 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 13.5 (CH<sub>3</sub>-C13). ATR-FTIR:  $\nu$  2947, 1737 (C=O), 1148, 1026 cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI-TOF)  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>NaO<sub>5</sub>: 425.2303, found 425.2319. Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>: C, 71.61; H, 8.51; found C, 71.66; H, 8.54.

**Bis-3 $\beta$ ,3' $\beta$ -(5-androsten-17-one) Malonate (3):** A solution of 3 $\beta$ -hydroxy-5-androsten-17-one (576 mg, 2 mmol) in dichloromethane (100 mL) under argon was prepared. Pyridine (0.16 mL, 2 mmol) was added dropwise to the solution, and the resulting mixture was cooled in an ice bath. Malonyl dichloride (0.1 mL, 1 mmol) was added dropwise.

The ice bath was removed, after the solution was stirred for 2 h. The reaction mixture was then stirred at room temperature overnight. Water was added, and the residue was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined extracts were dried (MgSO<sub>4</sub>) and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The purification was achieved by column chromatography in silica gel with hexane/ethyl acetate (6:1) as the eluent. The product was isolated as a yellow solid. Chemical yield: 78 % (500 mg, 0.78 mmol). M.p. 60–62 °C. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 5.42 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H6, H6'), 4.67 (m, 2H, H3, H3'), 3.33 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>CO), 2.46 (dd, *J* = 19.1 Hz, *J* = 8.8 Hz, 2H, H16, H16'), 2.37 (m, 4H, H1, H1'), 2.12 (m, 2H, H12, H12'), 2.06 (m, 2H, H16, H16'), 1.93 (m, 2H, H15, H15'), 1.87 (m, 2H, H2, H2'), 1.83 (m, 2H, H4, H4'), 1.69 (m, 2H, H7, H7'), 1.66 (m, 2H, H8, H8'), 1.63 (m, 2H, H12, H12'), 1.60 (m, 2H, H11, H11'), 1.54 (m, 2H, H2, H2'), 1.50 (m, 2H, H15, H15'), 1.46 (m, 2H, H11, H11'), 1.32 (m, 2H, H14, H14'), 1.28 (m, 2H, H7, H7'), 1.15 (m, 2H, H4, H4'), 1.04 (s, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-C10), 1.00 (m, 2H, H9, H9'), 0.88 (s, 6H, 2 × CH<sub>3</sub>-C13). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm): 221.2 (2 × C17), 166.2 (2 × C=O), 139.8 (2 × C5), 122.3 (2 × C6), 75.1 (2 × C3), 51.8 (2 × C14), 50.3 (2 × C9), 47.7 (2 × C13), 42.4 (OCCH<sub>2</sub>CO), 38.0 (2 × C1), 37.0 (2 × C4), 36.9 (2 × C10), 36.0 (2 × C16), 31.6 (2 × C8), 31.5 (2 × C7), 30.9 (2 × C12), 27.7 (2 × C2), 22.0 (2 × C15), 20.5 (2 × C11), 19.5 (2 × CH<sub>3</sub>-C10), 13.7 (2 × CH<sub>3</sub>-C13). ATR-FTIR: ν 2945, 1736 (C=O), 1623, 1463, 1020 cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI-TOF) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>NaO<sub>6</sub>: 667.3974, found 667.3953. Anal. Calcd for C<sub>41</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub>: C, 76.36; H, 8.75; found C, 76.41; H, 8.80.

**Synthesis of Bingel–Hirsch Conjugates:** A solution of C<sub>60</sub> (50 mg, 0.069 mmol) in toluene (50 mL) was prepared. The corresponding malonate (0.090 mmol), CBr<sub>4</sub> (0.090 mmol), and diazabicyclo-[4.2.0]undec-7-ene (DBU; 0.17 mL, 1.13 mmol) were added in that order. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 2 h. Water was added, and the residue was extracted with toluene. The combined extracts were dried (MgSO<sub>4</sub>) and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. Purification of the products was achieved by column chromatography on silica gel, first with CS<sub>2</sub> to elute unreacted C<sub>60</sub> and finally with the eluent specified below for each compound. For characterization purposes, additional purification of these compounds was carried out by repetitive precipitation and centrifugation using hexane, methanol, and diethyl ether as solvents.

**61-(Ethoxycarbonyl)-61-(3 $\beta$ -O-carbetoxy-5-androsten-17-one)-methano**

**[60]fullerene (4):** This compound was prepared from 3 $\beta$ -ethyl malonate-5-androsten-17-one (2). The purification was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and dichloromethane as eluents. Chemical yield: 74 % (58 mg, 0.052 mmol); amorphous brown solid. HPLC: toluene, flow rate 1 mL/min,  $t_R$  = 6.0 min. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5.52 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H, H6), 5.03 (m, 1H, H3), 4.57 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.58 (m, 2H, H1), 2.48 (dd,  $J$  = 19.3 Hz,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, H16), 2.17 (m, 1H, H12), 2.12 (m, 1H, H2), 2.10 (m, 1H, H16), 1.99 (m, 1H, H4), 1.97 (m, 1H, H15), 1.88 (m, 1H, H7), 1.84 (m, 1H, H2), 1.72 (m, 1H, H11), 1.70 (m, 1H, H8), 1.57 (m, 1H, H15), 1.55 (m, 1H, H11), 1.50 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.34 (m, 1H, H14), 1.32 (m, 1H, H7), 1.27 (m, 1H, H12), 1.25 (m, 1H, H4), 1.11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C10), 1.08 (m, 1H, H9), 0.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-C13). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 221.2 (C17), 163.8 (C=O), 163.1 (C=O), 145.60, 145.57, 145.40, 145.37, 145.32, 145.31, 145.0, 144.82, 144.75, 144.74, 144.03, 144.01, 143.22, 143.16, 143.14, 143.09, 142.4, 142.1, 142.0, 141.1, 139.4, 139.3, 139.0 (C5), 122.9 (C6), 77.4 (C3), 72.7 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 71.8 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 63.5 (CH<sub>2</sub>O), 52.4 (C61 cyclopropane ring), 51.8 (C14), 50.2 (C9), 47.7 (C13), 38.0 (C1), 37.0 (C10), 36.9 (C4), 36.0 (C16), 31.6 (C8), 31.5 (C7), 31.0 (C12), 27.8 (C2), 22.0 (C15), 20.5 (C11), 19.6 (CH<sub>3</sub>-C10), 14.5 (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 13.7 (CH<sub>3</sub>-C13). ATR-FTIR:  $\nu$  2929, 2856, 1740 (C=O), 1673 (C=O), 1240, 751 cm<sup>-1</sup>. HRMS (MALDI-TOF)  $m/z$ : M<sup>+</sup> Calcd for C<sub>84</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>: 1120.2244, found 1120.2270.

**61-[Bis(3 $\beta$ -O-carbetoxy-5-androsten-17-one)]methano[60]fullerene (5):** This compound was prepared from Bis-3 $\beta$ ,3' $\beta$ -(5-androsten-17-one) malonate (3). The purification was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and dichloromethane as eluents. Chemical yield 51 % (49 mg, 0.036 mmol); amorphous brown solid. HPLC: toluene acetonitrile (9:1), flow rate 1 mL/min,  $t_R$  = 7.4 min. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5.53 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, H6, H6'), 5.03 (m, 2H, H3, H3'), 2.61 (m, 4H, H1, H1'), 2.49 (dd,  $J$  = 19.0 Hz,  $J$  = 8.8 Hz, 2H, H16, H16'), 2.17 (m, 2H, H12, H12'), 2.14 (m, 2H, H2, H2'), 2.11 (m, 2H, H16, H16'), 2.01 (m, 2H, H15, H15'), 1.98 (m, 2H, H4, H4'), 1.86 (m, 2H, H7, H7'), 1.82 (m, 2H, H2, H2'), 1.73 (m, 2H, H11, H11'), 1.71 (m, 2H, H8, H8'), 1.59 (m, 2H, H15, H15'), 1.52 (m, 2H, H11, H11'), 1.35 (m, 2H, H14, H14'), 1.33 (m, 2H, H7, H7'), 1.29 (m, 2H, H12, H12'), 1.28 (m, 2H, H4, H4'), 1.12 (s, 6H, 2  $\times$  CH<sub>3</sub>-C10), 1.09 (m, 2H, H9, H9'), 0.91 (s, 6H, 2  $\times$  CH<sub>3</sub>-C13). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 221.1 (2  $\times$  C17), 163.17 (C=O), 163.15 (C=O), 145.6, 145.5,

145.43, 145.39, 145.3, 145.1, 144.86, 144.85, 144.77, 144.07, 144.05, 143.26, 143.19, 143.1, 142.4, 142.1, 141.1, 139.51, 139.47, 139.2 (2 × C5), 122.9 (2 × C6), 77.4 (2 × C3), 72.9 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 71.9 (Csp<sup>3</sup> cyclopropane ring), 52.6 (C61cyclopropane ring), 51.9 (2 × C14), 50.3 (2 × C9), 47.7 (2 × C13), 38.1 (2 × C1), 37.1 (2 × C10), 37.0 (2 × C4), 36.0 (2 × C16), 31.64 (2 × C8), 31.56 (2 × C7), 31.0 (2 × C12), 27.9 (2 × C2), 22.1 (2 × C15), 20.5 (2 × C11), 19.6 (2 × CH<sub>3</sub>-C10), 13.7 (2 × CH<sub>3</sub>-C13). ATR-FTIR:  $\nu$  2945, 1736 (C=O), 1463, 1373, 1081, 735 cm<sup>-1</sup>. HRMS (ESI)  $m/z$ : [M+H]<sup>+</sup> Calcd. for C<sub>101</sub>H<sub>55</sub>O<sub>6</sub>: 1363.3998, found 1363.3943.

## References

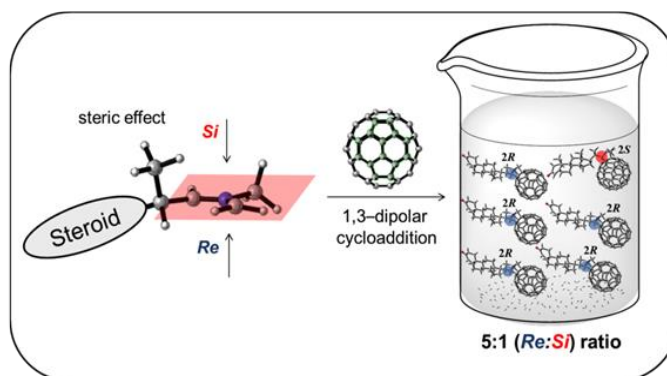
- [1] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* **1985**, 318, 162–163.
- [2] a) E. I. Pochkaeva, N. E. Podolsky, D. N. Zakusilo, A. V. Petrov, N. A. Charykov, T. D. Vlasov, A. V. Penkova, L. V. Vasina, I. V. Murin, V. V. Sharoyko, *Prog. Solid State Chem.* **2020**, 57, 100255; b) E. Castro, A. H. Garcia, G. Zavala, L. Echegoyen, *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 6523–6535; c) N. Martín, T. Da Ros, J.-F. Nierengarten, *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 6425–6427; d) B. M. Illescas, J. Rojo, R. Delgado, N. Martín, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 6018–6025.
- [3] a) F. Lu, E. A. Neal, T. Nakanishi, *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 1834–1843; b) S. Selmani, D. J. Schipper, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 6673–6692; c) T. Umeyama, H. Imahori, *Acc. Chem. Res.* **2019**, 52, 2046–2055.
- [4] a) G. Mehta, V. Singh, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, 324–334; b) A. Muñoz, D. Sigwalt, B. M. Illescas, J. Luczkowiak, L. Rodríguez-Pérez, I. Nierengarten, M. Holler, J.-S. Remy, K. Buffet, S. P. Vincent, J. Rojo, R. Delgado, J.-F. Nierengarten, N. Martín, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 50–57; c) A. Muñoz, B. M. Illescas, J. Luczkowiak, F. Lasala, R. Ribeiro-Viana, J. Rojo, R. Delgado, N. Martín, *J. Mater. Chem. B* **2017**, 5, 6566–6571; d) H. Kazemzadeh, M. Mozafari, *Drug Discovery Today* **2019**, 24, 898–905; e) J. Ramos-Soriano, J. J. Reina, B. M. Illescas, N. de la Cruz, L. Rodríguez-Pérez, F. Lasala, J. Rojo, R. Delgado, N. Martín, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 15403–15412.
- [5] M. Csavas, T. Demeter, M. Herczeg, I. Timari, K. E. Kover, P. Herczegh, A. Borbas, *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55, 6983–6986.
- [6] S. Aroua, W. B. Schweizer, Y. Yamakoshi, *Org. Lett.* **2014**, 16, 1688–1691.
- [7] Z. Hu, W. Guan, W. Wang, L. Huang, H. Xing, Z. Zhu, *Cell Biol. Int.* **2007**, 31, 798–804.
- [8] M. Mohajeri, B. Behnam, A. Sahebkar, *J. Cell. Physiol.* **2019**, 234, 298–319.
- [9] H. Kazemzadeh, M. Mozafari, *Drug Discovery Today* **2019**, 24, 898–905.
- [10] a) M. Ibrahim-Ouali, F. Dumur, *ARKIVOC* **2019**, 2019, 304–339; b) A. Pande, D. A. Culver, *Expert Rev. Respir. Med.* **2020**, 14, 285–298; c) M. C. Peters, S. E. Wenzel, *Lancet* **2020**, 395, 371–383.
- [11] W. L. Miller, R. J. Auchus, *Endocr. Rev.* **2011**, 32, 81–151.
- [12] E. Friess, T. Schiffelholz, T. Steckler, A. Steiger, *Eur. J. Clin. Invest.* **2000**, 30, 46–50.
- [13] S. J. Webb, T. E. Geoghegan, R. A. Prough, M. Miller, *Drug Metab. Rev.* **2006**, 38, 89–116.
- [14] Q. Mo, S. F. Lu, N. G. Simon, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2006**, 99, 50–58.
- [15] A. Martín-Montalvo, J. M. Villalba, P. Navas, R. de Cabo, *Oncogene* **2011**, 30, 505–520.
- [16] D. E. Corpet, S. Tache, *Nutr. Cancer* **2002**, 43, 1–21.
- [17] S. Yoshida, A. Honda, Y. Matsuzaki, S. Fukushima, N. Tanaka, A. Takagiwa, Y. Fujimoto, H. Miyazaki, G. Salen, *Steroids* **2003**, 68, 73–83.
- [18] A. Shilkaitis, A. Green, V. Punj, V. Steele, R. Lubet, K. Christov, *Breast Cancer Res.* **2005**, 7, 1132–1140.
- [19] K. Huang, H. Cai, L. Wu, *Steroids* **2019**, 150, 108433.

- [20] a) M. B. Vecchione, N. Laufer, O. Sued, M. Corti, H. Salomon, M. F. Quiroga, *J. Biomed. Sci.* **2020**, 27, 20; b) G. V. Suarez, M. T. Angerami, M. B. Vecchione, N. Laufer, G. Turk, M. J. Ruiz, V. Mesch, B. Fabre, P. Maidana, D. Ameri, *Eur. J. Immunol.* **2015**, 45, 2529–2541.
- [21] F. G. Maingat, M. J. Polyak, A. M. Paul, P. Vivithanaporn, F. Noorbakhsh, S. Ahboucha, G. B. Baker, K. Pearson, C. Power, *FASEB J.* **2013**, 27, 725–737.
- [22] C. Bingel, *Chem. Ber.* **1996**, 129, 1957–1959.
- [23] Y. N. Biglova, A. G. Mustafin, *RSC Adv.* **2019**, 9, 22428–22498.
- [24] R. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, J. A. Castoro, C. Wilkins, S. H. Friedman, D. L. DeCamp, G. L. Kenyon, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 6510–6512.
- [25] a) E. Castro, M. R. Cerón, A. Hernandez-Garcia, Q. Kim, A. EtcheverryBerríos, M. J. Morel, R. Díaz-Torres, Q. Qian, Z. Martinez, L. Mendez, F. Perez, C. A. Santoyo, R. Gimeno-Muñoz, R. Esper, D. A. Gutierrez, A. Varela-Ramirez, R. J. Aguilera, M. Llano, M. Soler, N. Aliaga-Alcalde, L. Echegoyen, *RSC Adv.* **2018**, 8, 41692–41698; b) A. R. Tuktarov, L. L. Khuzina, A. R. Akhmetov, R. A. Tuktarova, S. R. Ishmukhametova, L. U. Dzhemileva, V. A. D'yakonov, U. M. Dzhemilev, *ChemistrySelect* **2019**, 4, 12897–12901; c) N. V. Kalacheva, G. R. Tarasova, G. M. Fazleeva, V. P. Gubskaya, D. R. Gumerova, A. A. Rizvanov, G. V. Cherepnev, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28, 1097–1100; d) N. B. Melnikova, O. N. Solovyeva, V. M. Muzykina, V. P. Gubskaya, G. M. Fazleeva, A. I. Poddelsky, *Russ. Chem. Bull.* **2019**, 68, 149–157; e) S. J. Sabounchei, A. Hashemi, M. Sayadi, M. Bayat, A. Sedghi, R. Karamian, S. H. Moazzami Farida, R. W. Gable, *J. Mol. Struct.* **2018**, 1165, 142–152.
- [26] a) M. S. Bjelakovic, D. M. Godjevac, D. R. Milic, *Carbon* **2007**, 45, 2260–2265; b) M. S. Bjelakovic, T. J. Kop, M. Vlajic, J. Djordjevic, D. R. Milic, *Tetrahedron* **2014**, 70, 8564–8570; c) M. S. Bjelakovic, T. J. Kop, R. Baosic, M. Zlatovic, A. Zekic, V. Maslak, D. R. Milic, *Monatsh. Chem.* **2014**, 145, 1715–1725.
- [27] L. S. Li, Y. J. Hu, Y. Wu, Y. L. Wu, J. Yue, F. Yang, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* **2001**, 617–621.
- [28] a) D. Alonso, D. Hernandez-Castillo, L. Almagro, R. Gonzalez-Aleman, D. Molero, M. A. Herranz, E. Medina-Paez, J. Coro, R. Martinez-Alvarez, M. Suarez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2020**, 85, 2426–2437; b) A. Ruiz, J. Coro, L. Almagro, J. A. Ruiz, D. Molero, E. E. Maroto, S. Filippone, M. A. Herranz, R. Martinez-Alvarez, J. C. Sancho Garcia, F. Di Meo, M. Suárez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 2819–2826; c) M. Suarez, A. Ruiz, L. Almagro, J. Coro, E. E. Maroto, S. Filippone, D. Molero, R. Martinez-Alvarez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2017**, 82, 4654–4660.
- [29] J. Coro, H. Rodríguez, D. G. Rivera, M. Suárez, D. Molero, M. A. Herranz, R. Martínez-Alvarez, S. Filippone, N. Martín, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 2009, 4810–4817.
- [30] a) L. Almagro, D. Hernandez-Castillo, O. Ortiz, D. Alonso, A. Ruiz, J. Coro, M. A. Herranz, D. Molero, R. Martinez-Alvarez, M. Suarez, N. Martín, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 2018, 4512–4522; b) A. Ruiz, C. Morera-Boado, L. Almagro, J. Coro, E. E. Maroto, M. A. Herranz, S. Filippone, D. Molero, R. Martinez-Alvarez, J. M. Garcia de la Vega, M. Suárez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 3473–3486.
- [31] a) S. Durdagi, T. Mavromoustakos, N. Chronakis, M. G. Papadopoulos, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 9957–9974; b) L. Ahmed, B. Rasulev, M. Turabekova, D. Leszczynska, J. Leszczynski, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 5798–5808.

- [32] H. Li, H. M. Liu, W. Ge, L. Huang, L. Shan, *Steroids* **2005**, 70, 970–973.
- [33] A. Bianco, M. Maggini, G. Scorrano, C. Toniolo, G. Marconi, C. Villani, M. Prato, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4072–4080.
- [34] C. Du, J. Xu, Y. Li, W. Xu, D. Zhu, *Chin. Sci. Bull.* **2001**, 46, 1156–1159.
- [35] a) Z. S. Martínez, E. Castro, C.-S. Seong, M. R. Cerón, L. Echegoyen, M. Llano, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, 60, 5731–5741; b) E. Castro, Z. S. Martínez, C.-S. Seong, A. Cabrera-Espinoza, M. Ruiz, A. Hernández García, F. Valdez, M. Llano, L. Echegoyen, *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 10963–10973.
- [36] a) N. Martín, L. Sánchez, B. Illescas, I. Pérez, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2527–2547; b) D. M. Guldi, M. Maggini, E. Menna, G. Scorrano, P. Ceroni, M. Marcaccio, F. Paolucci, S. A. Roffia, *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 1597–1605.
- [37] S. A. Lerke, B. A. Parkinson, D. H. Evans, P. J. Fagan, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7807–7813.
- [38] C. M. Cardona, W. Li, A. E. Kaifer, D. Stockdale, G. C. Bazan, *Adv. Mater.* **2011**, 23, 2367–2371.
- [39] a) M. A. Herranz, M. W. Beulen, J. A. Rivera, L. Echegoyen, M. C. Diaz, B. M. Illescas, N. Martín, *J. Mater. Chem.* **2002**, 12, 2048–2053; b) M. A. Herranz, F. Diederich, L. Echegoyen, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2004, 2299–2316; c) N. Martín, M. Altable, S. Filippone, A. Martín-Domenech, L. Echegoyen, C. M. Cardona, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 110–114; d) O. Lukyanova, C. M. Cardona, M. Altable, S. Filippone, A. Martín-Domenech, N. Martín, L. Echegoyen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7430–7433.
- [40] C. Sikorska, T. Puzyn, *Nanotechnology* **2015**, 26, 455702.
- [41] J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 77, 3865–3868.
- [42] A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648–5652.
- [43] H. Wang, Y. He, Y. Li, H. Su, *J. Phys. Chem. A* **2012**, 116, 255–262.
- [44] A. Ruiz, M. Suárez, N. Martín, F. Albericio, H. Rodríguez, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, 5, 374–379.
- [45] G. Guerrero-Luna, M. G. Hernández-Linares, S. Bernès, A. CarrascoCarballo, D. Montalvo-Guerrero, M. A. Fernández-Herrera, J. Sandoval Ramírez, *Molecules* **2020**, 25, 1213.
- [46] a) J. Wong-Ekkabut, S. Baoukina, W. Triampo, I. M. Tang, D. P. Tieleman, L. Monticelli, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 363–368; b) C. W. Wong, A. V. Zhilenkov, O. A. Kraevaya, D. W. Mischenko, P. A. Troshin, S. H. Hsu, *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 7111–7125.
- [47] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, *J. Mol. Graphics* **1996**, 14, 33–38.
- [48] M. Ibrahim, N. A. Saleh, W. M. Elshemey, A. Elsayed, *J. Med. Chem.* **2012**, 12, 447–451.
- [49] A. K. Ghosh, K. V. Rao, P. R. Nyalapatla, H. L. Osswald, C. D. Martyr, M. Aoki, H. Hayashi, J. Agniswamy, Y. F. Wang, H. Bulut, D. Das, I. T. Weber, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 4267–4278.
- [50] A. Barzegar, E. Naghizadeh, M. Zakariazadeh, J. Azamat, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, 17, 633–647.

- [51] N. Zahin, R. Anwar, D. Tewari, M. T. Kabir, A. Sajid, B. Mathew, M. S. Uddin, L. Aleya, M. M. Abdel-Daim, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2019**, 27, 19151-19168
- [52] Avogadro: an open source molecular builder and visualization tool. Version 1.2, <http://avogadro.cc/>**2017**.
- [53] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, G. R. Hutchison, *J. Cheminf.* **2012**, 4, 17.
- [54] J. J. Stewart, *MOPAC2016*, Stewart Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, USA <http://OpenMOPAC.net/>**2016**.
- [55] F. Neese, *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2017**, 8, e1327.
- [56] T. Cheng, Y. Zhao, F. Lin, R. Wang, L. Lai, *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 2140–2148.
- [57] Python: A Programming Language for Software Integration and Development M. F. Sanner, *J. Mol. Graphics* **1999**, 17, 57–61.
- [58] O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 455–461.
- [59] L. L. C. Schrödinger, *The PyMOL Molecular Graphics System*, **2010**, Version 1.3r1





### II.2.3- Diastereoselective Synthesis of Steroid-[60]Fullerene Hybrids and Theoretical Underpinning.

**Abstract:** The reaction of  $C_{60}$  with pregnen-20-carboxaldehyde, a biologically active synthetic steroid, by using a 1,3-dipolar cycloaddition reaction (Prato's protocol) results in the formation of pyrrolidine rings bearing a new stereogenic center on the C2 of the five-membered ring. The formation of the fullerene-steroid hybrids proceeds with preference for the *Re* face of the 1,3-dipole, with formation of a diastereomeric mixture in 73:15 ratio. The investigation of the chiroptical properties of these conjugates allowed determining the absolute configuration of the new fulleropyrrolidines. In addition, a thorough spectroscopical study permitted to determine the structure of the two monocycloadducts. The electrochemical properties of the new hybrids were also evaluated by cyclic voltammetry, both systems exhibit three quasi-reversible reduction waves which are cathodically shifted in regard to the parent  $C_{60}$ . Theoretical calculations help supporting the experimental data. A conformational study combining semiempirical methods and density functional theory has predicted the most stable diastereomer. On the basis of this agreement, a possible reaction mechanism is presented. Additionally, a molecular docking simulation has been carried out using the HIV-1 protease as receptor, thus paving the way to study the possible application of these stereoisomers in biomedicine.

*J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 2426–2437.

## **Introduction**

One area of modern-day science and technology research, which has gained significant attention, is carbon-based materials research. Among these materials, C<sub>60</sub> is still the most important representative in the family of nanocarbons on account of the interesting properties and applications that have found some of their derivatives in research fields such as medicine<sup>[1]</sup> or materials chemistry.<sup>[2]</sup> The versatility of this molecule and its applications interlink several areas of science.<sup>[3]</sup>

It is commonly known that C<sub>60</sub> itself is not soluble in water and poorly soluble in most organic solvents, since C<sub>60</sub> can easily form molecular aggregates.<sup>[4]</sup> This fact has limited the use of C<sub>60</sub> in medicinal chemistry, even when the drawback was improved with the formation of fullerene hybrids, where C<sub>60</sub> is functionalized with different moieties such as porphyrins,<sup>[5]</sup> and other bioactive molecules such as amino acids,<sup>[6]</sup> peptides,<sup>[7]</sup> and sugars.<sup>[8]</sup> The obtained conjugates are soluble in organic solvents and in certain cases even in aqueous media. Furthermore, they could exhibit affinity to certain nucleic acids, proteins, or cell receptors, and their solubility might facilitate their biological activity.

Alternatively, steroids are ideal blocks of molecular construction widely used in the design of drugs, due to their biological activity and specific interaction with hormone receptors.<sup>[9]</sup> It has been demonstrated that the covalent functionalization of C<sub>60</sub> with a steroid unit changes its physicochemical properties, in particular its solubility and biocompatibility.<sup>[10]</sup>

Among the reactions that have been used to obtain highly functionalized fullerene derivatives, one of the most employed is the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of azomethine ylides to C<sub>60</sub>, also known as the Prato reaction in fullerenes' community,<sup>[11]</sup> which provides stable fulleropyrrolidines as products. By using this methodology it was possible to obtain hybrids where the [60]fullerene is attached to peptides,<sup>[7]</sup> heterocycles,<sup>[12]</sup> aromatic compounds,<sup>[13]</sup> carbohydrates,<sup>[8]</sup> and steroids.<sup>[10]</sup>

Recent studies illustrate the wide range of fulleropyrrolidines derivatives with a potential application in the treatment of different diseases. In particular, these derivatives have shown anticancer properties,<sup>[14]</sup> antioxidants properties,<sup>[15]</sup> and also act as antivirals,<sup>[16]</sup> even against HIV-1.<sup>[17]</sup>

Theoretical molecular docking has been shown to be very useful in predicting the activity of novel C<sub>60</sub> derivatives, showing that the functionalization of C<sub>60</sub> is crucial for improving  $\pi$  interactions of C<sub>60</sub> with HIV-1 protease as well as for increasing its solubility.<sup>[18]</sup>

In previous studies we reported the synthesis of new steroid–[60]fullerene hybrids following Prato and Bingel–Hirsch methodologies. C<sub>60</sub> was attached to different steroids such as cholesterol,  $\beta$ -sitosterol, ergosterol,<sup>[10]</sup> and epiandrosterone,<sup>[19]</sup> to obtain a variety of fulleropyrrolidines and methanofullerene conjugates that are soluble in organic solvents. The combination of the 1,3-dipolar cycloaddition reaction of azomethine ylides with the cyclopropanation reaction to [60]fullerene was used to synthesize symmetrical<sup>[19]</sup> and asymmetrical<sup>[20]</sup> dumbbell hybrids which combine two C<sub>60</sub> moieties covalently linked to a conveniently previously functionalized epiandrosterone molecule.

We have also reported the diastereoselective synthesis of steroid–[60]fullerene conjugate using the Prato reaction and two steroidal aldehydes, both synthesized from epiandrosterone conveniently functionalized with a formyl group on the C2 (A ring) or on the C16 (D ring) positions of the steroid moiety. The reactions proceed with formation of a diastereomeric mixture caused by the creation of a new stereogenic center on the C2 position of the five-member pyrrolidine ring, formed in the cycloaddition process. In both cases, the diastereomer with R configuration on the new stereogenic center is obtained in higher yield.<sup>[21]</sup>

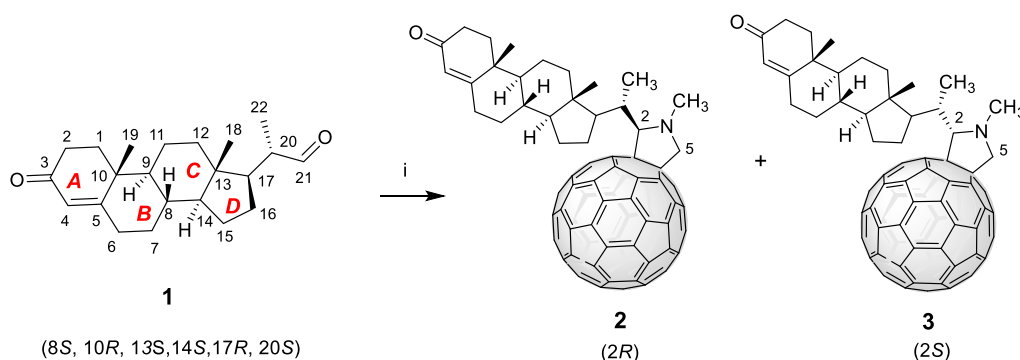
Soon afterward, by using an appropriate combination of *N*-metalated steroidal azomethine ylides [Cu(II) or Ag(I)], a chiral ligand, and low temperatures, we have reported the diastereoselective synthesis of *cis* and *trans* steroid–fulleropyrrolidine hybrids. In this case, two stereogenic centers were generated, affording four possible stereoisomers in good yields with a diastereomeric excess greater than 93%.<sup>[22]</sup>

As mentioned above,<sup>[21]</sup> we have developed the synthesis of fulleropyrrolidines using steroidal aldehydes where the formyl group was attached to the A or D ring of the steroid. Continuing our studies in the search for new steroid–[60]fullerene hybrids, in this work we report the synthesis of novel steroid–[60]fullerene hybrids via Prato reaction of C<sub>60</sub> and the pregnen-20-carboxaldehyde, (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*,20*S*)-3-oxopregn-4-ene-20-carboxaldehyde (**1**), which presents the formyl group in the side chain attached to the C17 position of the D ring. This steroid displays cytotoxic activity against HT-29, A-549, and MDA-MB231 tumor cells,<sup>[23]</sup> so its condensation with fullerene could give rise

to hybrids with promising potential biomedical applications. In order to predict its possible use as an HIV-1 protease inhibitor, an *in silico* study was carried out considering the obtained hybrids. Theoretical calculations were also employed to shed light on the mechanism of this cycloaddition reaction.

## Results and Discussion

*N*-methyl-2-substituted pyrrolidino[3,4:1,2][60]fullerenes endowed with steroidal moieties were synthesized by using *in situ* generated azomethine ylides, which reacted in a 1,3-dipolar cycloaddition process with C<sub>60</sub> acting as dipolarophile.<sup>[11]</sup> The enantiopure formyl steroid (8*S*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*S*, 17*R*, 20*S*)-3-oxopregn-4-ene-20-carboxaldehyde, (**1**), C<sub>60</sub>, and sarcosine (*N*-methylglycine) were refluxed in toluene under argon atmosphere for 5 h (Scheme 1). The color of the toluene solution of C<sub>60</sub> changed from purple to brown during the reaction, an indication that the corresponding fullerene cycloadducts are formed.



**Scheme 1.** Synthesis of fullerene-steroid hybrids by Prato reaction. (i) C<sub>60</sub>, *N*-methylglycine, toluene, reflux, under argon.

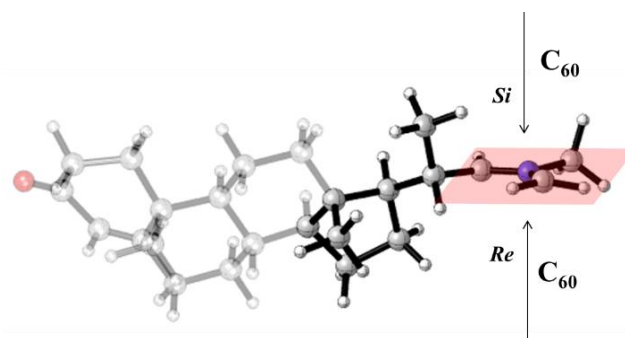
Analysis of the reaction mixture by HPLC (Figure S21) shows the peaks of two monoadducts that appear at 11.9 and 16.8 min in a 15:73 ratio. In the chromatogram, an additional peak, corresponding to the C<sub>60</sub> starting material, appears at 8.6 min.

The formation of the five-membered ring is a *syn* stereospecific reaction, which takes place with generation of a new stereogenic center on the C2 of the pyrrolidine ring. Since the configuration of the stereogenic centers of the steroid are not affected by the reaction, the cycloaddition affords to a diastomeric mixture of compounds **2** and **3**.

Both diastereoisomers were separated by flash chromatography, the column was initiated with carbon disulfide, to separate first the remaining C<sub>60</sub>, and afterwards the

solvent was changed to toluene. Compounds **2** and **3** were obtained as stable brown solids in 68% and 13% yields, respectively.

The formation of the diastereoisomers is stereoselective ( $de = 68\%$ ), being **2** the main product. This result might be rationalized considering a preferential electrophilic attack of [60]fullerene onto the *Re* face of the 1,3-dipole (Figure 1), as we have found in previous works.<sup>[21,22]</sup> In this case, probably the reaction of C<sub>60</sub> over the *Si* face occurs with steric interactions caused by the presence of the methyl group at C20. In contrast, a less steric hindrance in the reaction of C<sub>60</sub> by the *Re* face explains the observed 5:1 (*Re:Si*) ratio.



**Figure 1.** Depiction of the attack of C<sub>60</sub> onto the *two* faces of the azomethine-steroid ylide. The geometry of the 1,3-dipolar intermediate was obtained from theoretical calculations (see the Experimental Section and Computational Methods).

It should be noted that the diastereomeric excess (5:1 ratio) observed in this reaction is higher than when it is carried out with steroidal aldehydes where the formyl group is attached to ring D at C16 (3:1 ratio) or ring A at C2 (2:1 ratio) considering the same reaction time.<sup>[34]</sup> This observation points to the steric effect caused by the methyl group connected to the C20 position of the steroid **1**, which is close to prochiral C2 (in 2.5 Å) and to C5 (in 3.3 Å). The numbers 2 and 5 are also used for numbering the reactive centers in the azomethine ylide (see also below). These distances were extracted from theoretically optimized geometries.

Remarkably, the presence of the steroid motif in the C<sub>60</sub> derivatives increases the solubility of the new derivatives **2** and **3** in organic solvents such as chloroform, dichloromethane, and dimethylformamide, among others. This aspect might be particularly relevant to perform biological investigations on these materials.

Structural characterization of the obtained derivatives was carried by a combination of different spectroscopic techniques (see the Experimental Section and SI). For example, the FTIR spectra of compounds **2** and **3** showed the C=O stretching vibrations at around

1700 cm<sup>-1</sup> and the characteristic band of organofullerene derivatives at *ca.* 730 cm<sup>-1</sup>.<sup>[24]</sup> (See Figures S8 and S18).

NMR was the most valuable technique in order to establish the covalent linkage of the steroid to the C<sub>60</sub> sphere. In the <sup>1</sup>H NMR spectra, besides the disappearance of the formyl proton of the steroid precursor (signal at 9.58 ppm), the signals of the protons linked to the C5 of the pyrrolidine ring resonate at 4.81 and 4.10 ppm for compound **2** and at 4.80 and 4.05 ppm for compound **3** as doublets (*J* = 9.0 Hz). The proton attached to C2 appears at 3.96 and 3.85 ppm for **2** and **3**, respectively, and the *N*-methyl protons at 2.96 ppm for **2** and 2.79 ppm for **3**. The signal corresponding to the proton on C20 appears as a multiplet at 3.06 and at 2.63-2.57 ppm for compounds **2** and **3**, respectively, and the methyl group linked to this carbon appears as a doublet at 1.54 ppm (*J* = 6.9 Hz) for compound **2** and 1.51 ppm (*J* = 6.5 Hz) for compound **3**. The signals corresponding to the steroid moiety are present with slight variations according to the data reported<sup>[23]</sup> for steroid **1** used as raw material (see the Experimental Section).

<sup>13</sup>C NMR spectra evidence the lack of symmetry in the fullerene monoadducts because of the wide number of signals at the sp<sup>2</sup> carbon zone (see the Experimental Section and SI). The C<sub>60</sub> carbons at the [6,6]-ring junction are observed at 76.5 and 69.6 ppm for compound **2** and at 74.6 and 69.7 ppm for compound **3**. For compound **2**, carbons of the fulleropyrrolidine ring appear at 79.1 ppm (C2) and 71.2 ppm (C5), while these signals for compound **3** appear at 80.1 and 69.7 ppm, respectively. The C20, with *S* configuration, appears at 36.4 ppm and 38.2 ppm for compounds **2** and **3**, respectively. The <sup>13</sup>C NMR signals corresponding to the steroid fragment of the molecules are observed at the same values than those of derivative **1**, not been affected by the presence of the fullerene unit. See the theoretical section for more details on the assignment of each stereoisomer based on theoretical calculations and NOE/ROESY spectra.

Complementary characterization was carried out by other NMR techniques, namely DEPT 135, HSQC, HMBC and COSY experiments. For the assignment of the <sup>13</sup>C NMR resonances, analysis of the HSQC spectra for the protonated carbon atoms based on chemical shift theory, substituent effect, and DEPT data were used. HMBC spectra served to establish the presence of quaternary carbon atoms. Additionally, COSY, ROESY and NOE experiments were used to unambiguously assign <sup>1</sup>H NMR resonances.

Mass spectrometry confirmed the structure of the synthesized compounds. The HRMS-MALDI-TOF spectra for compounds **2** and **3** show a peak *m/z* = 1076.3057 and

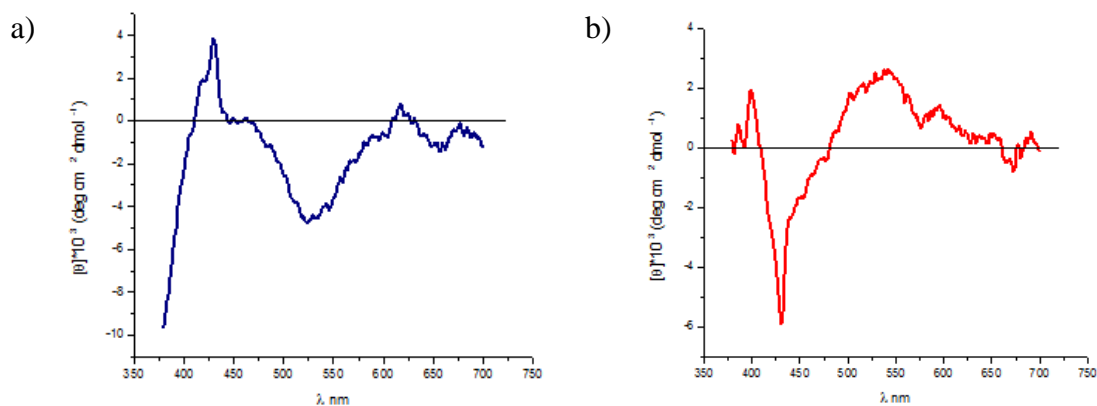
1076.2990 respectively (calculated for  $C_{84}H_{38}NO$ : 1076.2952), corresponding to the protonated molecule  $[M + H]^+$  (see Figure S9 and S19 in SI).

UV–Vis spectra of the steroid–fullerene hybrids **2** and **3** confirm the [6,6]-closed nature of the adducts, since both display the sharp band at 430 nm characteristic of [6,6]-closed fullerene adducts and absent in [5,6]-open structures (see Figure S20 in SI).<sup>[25]</sup> This UV–Vis band is typical of monoadducts at a [6,6] junction, regardless of the nature of the organic moiety saturating the double bond.<sup>[26]</sup>

Specific optical rotation measurements of both diastereoisomers were performed and compared with the starting steroid **1**. The obtained  $[\alpha]_D^{20}$  were:  $+105^\circ$  for **2** and  $+58^\circ$  for **3**, while for steroid **1** this value is  $+93^\circ$ .<sup>[23]</sup>

In order to determine the absolute configuration of the new stereogenic center created in C2 of **2** and **3**, the chiroptical properties of these derivatives were investigated by circular dichroism (CD). The spectra (Figure 2) showed nicely opposite signed curves in the 430 nm region of **2** and **3**, revealing an opposite absolute configurations at the C2 stereogenic center. We have previously used<sup>[20,21]</sup> the sector rule<sup>[27]</sup> to determine the configuration of stereogenic centers created in the reaction with fullerenes.<sup>[28]</sup>

This rule correlates the Cotton effect (CE) of the UV–Vis band at around 430 nm with the stereochemical environment around the [6,6] junction in mono-functionalized fullerenes. Fulleropyrrolidine **2** presents a positive Cotton effect at 430 nm (see Figure 2a) and the configuration of its stereogenic C2 center can be then assigned as *R*. On the other hand, compound **3**, whose CD spectrum shows a negative Cotton effect, should have a *S* configuration at the C2 (see Figure 2b). For additional details about the assignments, see Figures S24 and S25 in the SI.



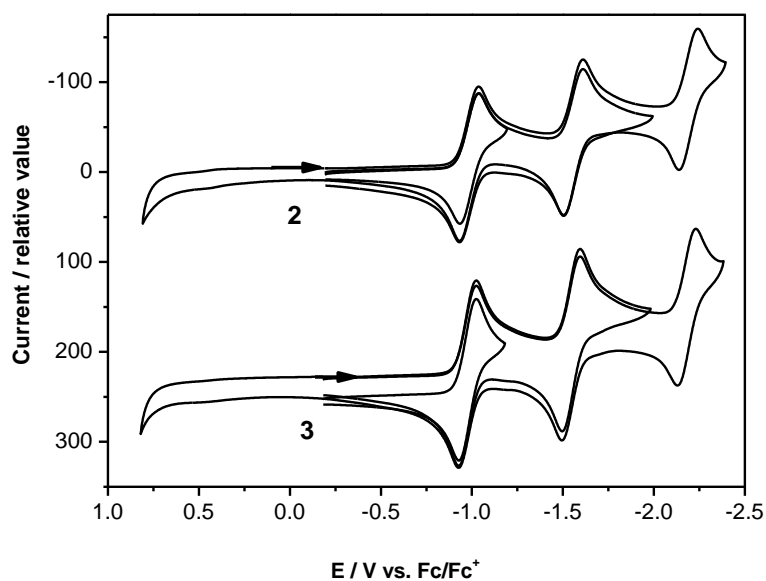
**Figure 2.** CD spectra of fulleropyrrolidines (a) **2** and b) **3** in  $CH_2Cl_2$  (conc,  $4 \times 10^{-4}$  M).

The electrochemical properties of the steroid–hybrids **2** and **3** were investigated by cyclic voltammetry (CV) in solution. The redox potentials for compounds **2** and **3**, are summarized in Table 1. The electrochemical properties of derivatives **2** and **3** reveal the usual behavior of fulleropyrrolidine mono-adduct derivatives exhibiting three quasi-reversible reduction waves ( $\Delta E = 85\text{-}96\text{ mV}$ ) in the solvent window (Figure 3). When compared with pristine  $C_{60}$ , the reductions of **2** and **3** are cathodically shifted by *ca.* 102–126 mV,<sup>[29]</sup> an effect of the saturation of a double bond of the  $C_{60}$  structure, which increments the LUMO energy.<sup>[30]</sup>

**Table 1.** Redox potentials of fulleropyrrolidines **2** and **3** and  $C_{60}$  vs. Fc/Fc<sup>+</sup> in THF (mV). <sup>a,b</sup>

Compound	$E^{1/2, \text{red}}$	$E^{2/2, \text{red}}$	$E^{3/2, \text{red}}$	LUMO <sup>d</sup>
$C_{60}$ <sup>c</sup>	-860	-1440	-2000	-4.24
<b>2</b>	-986	-1560	-2193	-4.11
<b>3</b>	-973	-1542	-2181	-4.13

<sup>a</sup> Estimated LUMO levels (eV). <sup>b</sup> Experimental conditions: GCE as working electrode, Pt as counter electrode, Ag/AgNO<sub>3</sub> as reference electrode, TBAPF<sub>6</sub> 0.1 M as supporting electrolyte, 100 mV/s scan rate. Experimental error  $\pm 5\text{ mV}$ . <sup>c</sup>Values obtained using TBAPF<sub>6</sub> 0.2 M.<sup>[29]</sup> <sup>d</sup> LUMO =  $-(E^{1/2, \text{red}} + 5.1)$ <sup>[31]</sup>

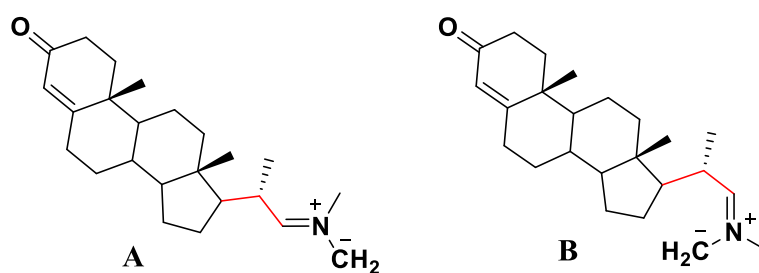


**Figure 3.** Cyclic voltammograms of monoadducts **2** and **3** in THF at room temperature.

Another conclusion of the electrochemical studies is that the steroidal unit has no effect on the electronic properties of the  $C_{60}$  core,<sup>[32]</sup> since no appreciable potential shifts are observed in comparison with other fulleropyrrolidine monoadducts. Interestingly, the different spatial orientation of the steroidal ligand in both monoadducts seems to somewhat affect the reduction potentials, presenting monoadduct **2** a slightly minor electron-acceptor capability than monoadduct **3**.

To get an insight into the observed ratio of diastereoisomers in the synthesis of compounds **2** and **3**, a theoretical study was performed. We first addressed the conformational study of the 1,3-dipole that gives rise to the formation of the diastereomeric products. The presence of only two rotatable bonds (see Figure 4), makes this 1,3-dipole suitable for a systematic conformational search. Previous works on similar molecular systems have stated the advantages of using a divide-and-conquer approach, by combining semi-empirical methods and Density Functional Theory (DFT), for performing a conformational study.<sup>[19,20]</sup> This strategy allows to reduce computational effort and hence to explore exhaustively the potential energy surface.

It should be noted that this 1,3-dipole can adopt the *S-cis* (Figure 4A) or *S-trans* conformations (Figure 4B) considering the steroidal substitution at prochiral C2 and the methyl group at the N atom. Hence, both possibilities were considered for the conformational study to discriminate between the *S-cis* and *S-trans* geometries for the further study of the reaction.

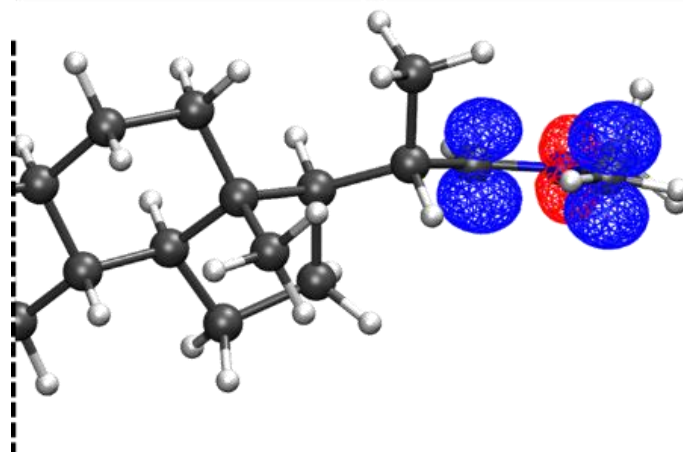


**Figure 4.** Reactant 1,3-dipole with a *S-cis* (A) and *S-trans* (B) conformations relative to the steroidal substitution at prochiral C2 and the methyl group at the N atom. Rotatable bonds have been highlighted in red.

The most stable conformers for the *S-cis* and *S-trans* geometries, as determined in the conformational search, are shown in Figure S27, where the *S-trans* isomer is the more stable one by 4.1 kcal/mol. Therefore, the *S-trans* disposition was used in all further calculations involving the 1,3-dipole.

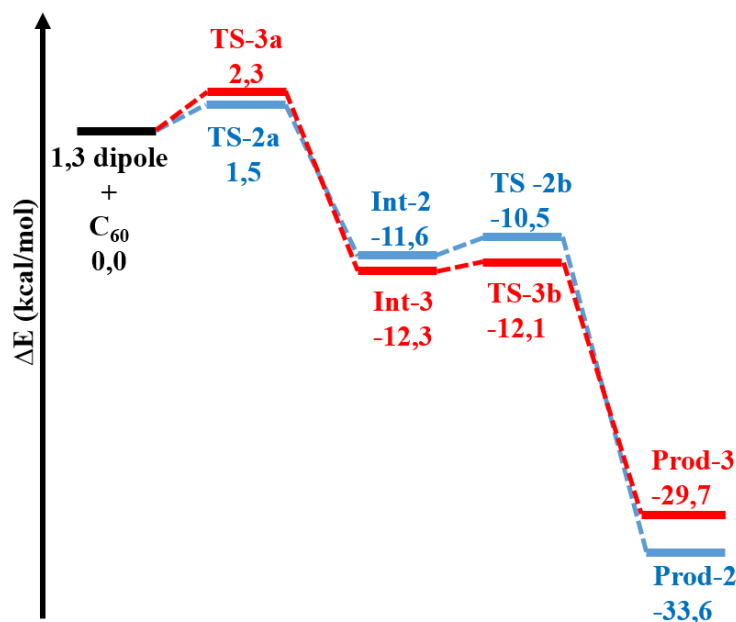
In order to explain the experimental ratio of diastereoisomers **2** and **3**, we first analyzed the nucleophilic character of the reactive carbon atoms of the 1,3-dipole employing the dual descriptor ( $\Delta f(\mathbf{r})$ ).<sup>[33]</sup> This tool has been proved useful for gaining insights into the regioselectivity and stereoselectivity of chemical reactions,<sup>[34]</sup> including 1,3-dipolar cycloadditions.<sup>[35]</sup> Looking at the sign of  $\Delta f(\mathbf{r})$  it is possible to identify the nucleophilic ( $\Delta f(\mathbf{r}) < 0$ ) and electrophilic ( $\Delta f(\mathbf{r}) > 0$ ) atomic regions, and from the spatial orientation of  $\Delta f(\mathbf{r})$  the stereoselectivity can be analyzed. Figure 5 displays the results of

calculating  $\Delta f(\mathbf{r})$  for the most stable conformer of the *S-trans* isomer of the 1,3-dipole. As expected, prochiral C2 and C5 display a nucleophilic (blue isosurfaces) character that makes them prompt to the electrophilic attack of the [60]fullerene. However, from a qualitative point of view, the spatial orientation of the dual descriptor does not show a prominently preferred face for the electrophilic attack. Only a slight preference at C5 is observed pointing to the *Si* face. This suggests that the nucleophilic character of the reacting carbon atoms in the 1,3-dipole is not the cause of the experimental products ratio.



**Figure 5.** Dual descriptor of the 1,3-dipole calculated from spin densities at the UB3LYP/6-31G(d) level of theory. Expected nucleophilic ( $\Delta f(\mathbf{r}) < 0$ ) and electrophilic ( $\Delta f(\mathbf{r}) > 0$ ) atomic regions are displayed in blue and red respectively.

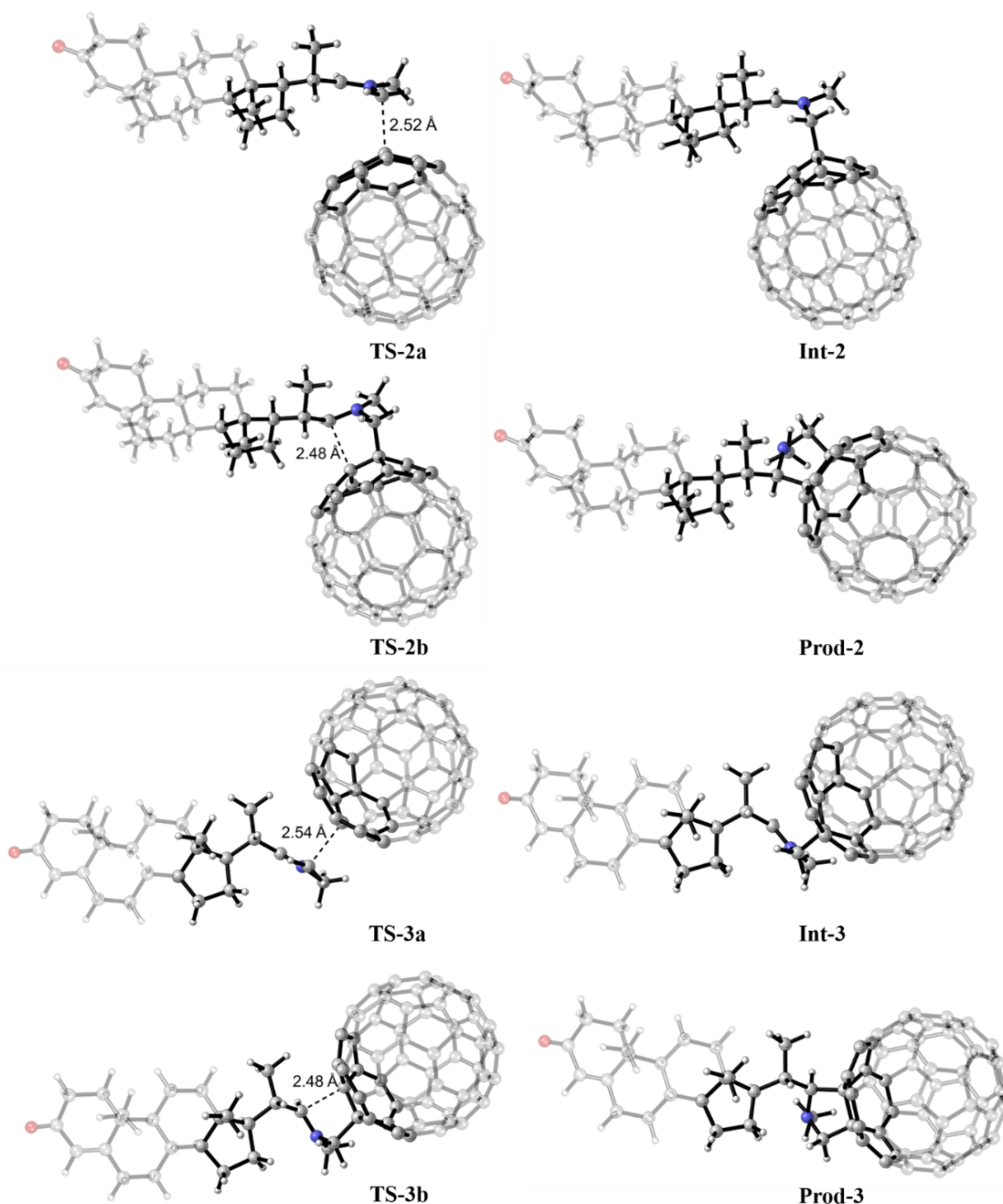
We proceeded to compute the reaction profile by locating the possible transition states (TSs) involved in the formation of the diastereoisomers. After several attempts, it was impossible to locate a TS leading to a concerted pathway which makes perfect sense when considering the high steric hindrance imposed by the methyl substituent present at C20 in the 1,3-dipole. Figure 6 shows a possible two-step mechanism, as determined by our calculations. Energies are reported in kcal/mol relative to the isolated reactants. In both cases, the rate-limiting step is the first one, with activation energies of 1.5 kcal/mol and 2.3 kcal/mol ( $\Delta\Delta E^\ddagger = 0.8$  kcal/mol) for the formation of **2** and **3**, respectively. This result leads to a theoretical 76:24 ratio (considering a reaction temperature of 80°C), which nicely agrees with the observed experimental values (68:13).



**Figure 6.** Computed reaction path leading to the formation of **2** (blue line) and **3** (red line), at the B3LYP/6-31+G(d,p)/C-PCM = toluene//OLYP/6-31G(d):PM6 level of theory.

A closer look at the 1,3-dipole in the first transition states (Figure 7) clearly shows a greater distortion in TS-3a than that in TS-2a, respect to the initial conformation of the isolated 1,3-dipole showed in Figure 1. This goes in line with our previous conclusions that the steric effect imposed by the methyl group at C20 could be the main cause of the observed product ratios, since the attack to the *Si* face will lead to the greater distortion observed at TS-3a, so that Int-3 can be formed. The formation of Prod-2 is also thermodynamically favored being 3.9 kcal/mol more exothermic than the path leading to Prod-3.

We also evaluated the possibility that after the formation of Prod-2 and Prod-3, both compounds could access to a more stable conformation through rotation over the equivalent bonds highlighted in Figure 4. To this end, it was applied to these structures the same procedure employed in the conformational exploration of the 1,3-dipole. These calculations indicate that the most stable conformation of **2** (see Figure S28-A) is identical to that of Prod-2 obtained from the above reaction path. This is not the case for **3** (see Figure S28-B) since the conformational search gave as most stable structure one different to Prod-3, which makes sense considering the distortions during the formation of Prod-3 that leads to a more strained geometry. The obtained energy difference from the conformational search  $E(\mathbf{2})-E(\mathbf{3}) = -1.1$  kcal/mol, still favors product **2** as the most stable.



**Figure 7.** Transition states, intermediaries and products involved in the formation of the diastereoisomers **2** and **3**, computed at the B3LYP/6-31+G(d,p)/CPCM = toluene//OLYP/6-31G(d):PM6 level of theory.

The results are consistent with the thermogravimetric analysis (TGA) of both diastereoisomers (Figure S26 in the Supporting Information). In the thermograms it is observed the larger stability of **2**, while **3** experiments a notable first mass loss at 249 °C, compound **2** experiences a smoother decomposition and has a higher remaining mass even at 600 °C. In this sense, TGA analysis validates the greater stability of product **2** vs. **3**.

Computational predictions of the diastereoisomer structures are supported by experimental findings in NOE and ROESY experiments. From optimized structures H2 is near H5 (3.8 Å), H20' (2.3 Å [diastereomer **3**] 2.5 Å [diastereomer **2**]), N-CH<sub>3</sub> (2.3 Å), H17' (2.9 Å [diastereomer **2**] and 3.1 Å [diastereomer **3**]) and both H16' (2.2 Å). Thus, the proton on the C2 of the pyrrolidine ring was irradiated for both stereoisomers. For compound **2**, both NOE and ROESY experiments, show that H2 assigned to  $\delta$  3.98 presented dipolar coupling with  $\delta$  4.12 (H5),  $\delta$  3.08 (H20'),  $\delta$  2.98 (N-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  2.04 (H17') and H16' ( $\delta$  2.38,  $\delta$  1.51) as it can be seen in the ROESY spectrum shown in Figure 8. Figure S7 in the Supporting Information show the corresponding NOE spectrum. In the case of compound **3**, H2 ( $\delta$  3.87) has a spatial proximity with  $\delta$  4.07 (H5),  $\delta$  2.82 (N-CH<sub>3</sub>),  $\delta$  2.63 (H17', H20') and H16' ( $\delta$  2.12,  $\delta$  1.73), see Figures S17 and S18 in the SI. These results are consistent with the predicted structures.

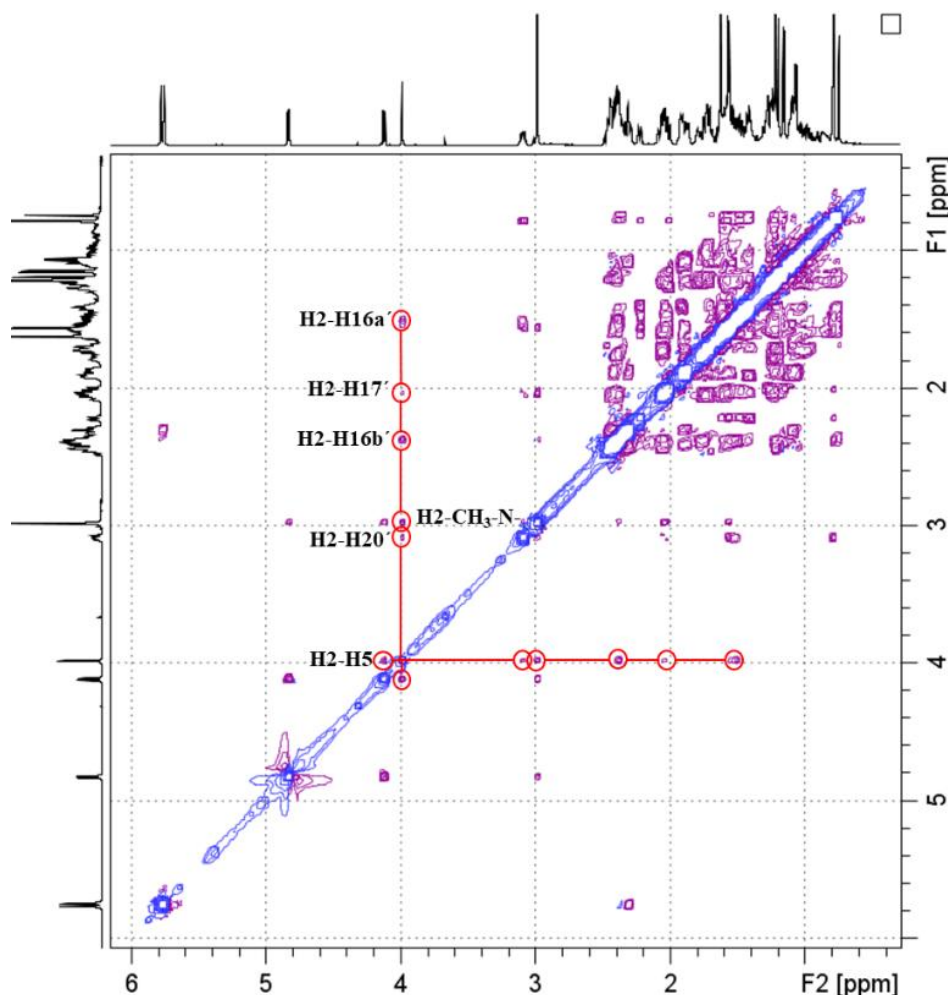


Figure 8. ROESY spectrum of compound **2**.

Single-point energy calculations were also carried out with gradient-corrected exchange-correlation functional of Perdew, Burke, and Ernzerhof (PBE),<sup>[36]</sup> with the 6-311G(d,p) basis set for estimating the LUMO energies of **2** and **3**. It has been proved that this functional reproduces very well these energies as compared with experimental results.<sup>[37]</sup> Very close values to those estimated from the cyclic voltammetry were obtained, with energies of  $\sim -4.05$  eV for both products, which agree well with the narrowed difference observed in the experiments. As it can be seen, the deviation from the experiments is of only 0.06 eV and 0.08 eV for **2** and **3**, respectively. Furthermore, the value of 4.05 eV is very close to the LUMO energy estimated at the same single-point level of theory for the PC<sub>61</sub>BM derivative (-3.992 eV).<sup>[37]</sup> Hence, is possible to consider the application of these steroid-fullerene hybrids as potential acceptor components for photovoltaic devices, a fact highlighted in previous works.<sup>[19]</sup>

We have previously discussed that the combination of fullerenes with steroids could improve the biological implementation of these carbon cages. Furthermore, the absolute configuration on chiral drugs is very important in biomedicine, since the induced biological response might depend of each stereoisomer,<sup>[25b]</sup> which could exhibit distinct pharmacodynamic and pharmacokinetic properties or a different interaction with a protein receptor.<sup>[38]</sup>

To study the possible application of these stereoisomers in biomedicine a molecular docking simulation using Autodock 4.2 and as receptor the HIV-1 protease (PDB code: 1T3R, with 1.2 Å resolution) was carried out.<sup>[39]</sup> As a result, we predicted that both stereoisomers have two binding modes with positive affinity for the active site (Table 2). Both binding modes were analyzed.

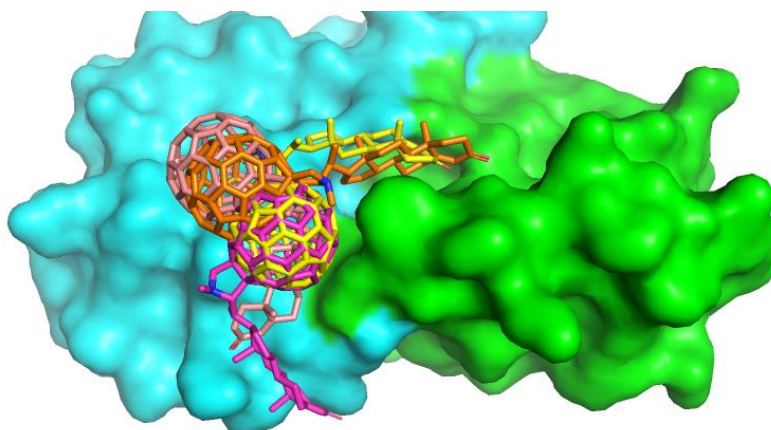
**Table 2.** Molecular docking results of steroid-fullerene hybrid with HIV-1 protease.

Compound	Cluster	E <sup>a</sup>	Lowest energy in the cluster
<b>2</b>	I	-5.96	-7.12
	II	-5.95	-6.41
<b>3</b>	I	-6.49	-7.29
	II	-5.64	-5.87

<sup>a</sup> E represents the average energy (kcal/mol).

Binding modes show similar affinity for the HIV-1 protease, however their interaction pattern with the receptor is diverse (Figure 9). In all cases, hybrid molecules interact with some exposed residues on the receptor surface, where the steroidal moiety is oriented to the active site.

The main interactions between steroid-C<sub>60</sub> hybrids are presented in Table 3. The more frequent contacts within Chain A are Phe53, Gly51, Gly52 and Ile50 whereas with Chain B the main interactions were with Pro79, Thr80, and Pro81.



**Figure 9.** Spatial disposition of HIV-1 protease in complex with the best docked poses of **2**[I] (orange), **2**[II] (pink), **3**[I] (yellow) and **3**[II] (magenta) represented by sticks. Chain A and Chain B surface of the receptor are shown in green and cyan respectively. Conformation/pose is shown between brackets.

**Table 3.** Main interactions of steroid–fullerene hybrid with HIV-1 protease.

Compound	Cluster	Main interactions	
		Chain A	Chain B
<b>2</b>	I	Met46, Ile47, Gly48, Phe 53	Pro79, Thr80, Pro81
	II	Gly49, Ile50, Gly51, Gly52, Phe53	Ile54, Lys55, Pro79, Thr80, Pro81
<b>3</b>	I	Ile47, Gly48, Gly49, Ile50, Gly51, Gly52, Phe53	Arg8, Pro81, Pro79
	II	Ile50, Gly51, Gly52, Phe53	Met46, Phe53, Lys55, Pro79, Pro81

The binding mode **3**[I] displayed the lowest binding energy among the clusters, since it interacts with some residues needed for the inhibition: Gly48, Gly49, and Ile50.<sup>[17b]</sup> Moreover it exhibits a T-shaped contact with Phe53, and consequently this is the more stable pose. It highlights the H-bond interaction (3.5 Å) between Lys55 and the carbonyl group at C3 in cluster **2**[I], see Figure S31 in the SI.

Nevertheless, all binding modes interact with Phe53; only those that correspond to the *S* stereoisomer exhibited  $\pi$ - $\pi$  interactions with C<sub>60</sub> cage. As was found by Barzegar et al.<sup>[17b]</sup> this residue is involved in  $\pi$ - $\pi$  and T-shaped interactions with C<sub>60</sub> and its derivatives (see also Figure S31 in the SI for more details). These results predict that **2** and **3** could be used as HIV-1 protease inhibitors.

## Conclusions

The synthesis of two new diastomeric steroid-[60]fullerene conjugates (**2** and **3**) in a single 1,3-dipolar cycloaddition reaction has been carried out. The reaction mechanism seems to be influenced by steric factors, since C<sub>60</sub> reacts with relative diastereoselectivity as predicted by theoretical calculations. The spectroscopic and analytical study permit unambiguously to determine the chemical structures of the new fulleropyrrolidines. The chiroptical properties of the obtained derivatives were investigated and the Cotton effects in CD spectra employed to assign the absolute configuration of **2** and **3**. The presence of the steroid in the fullerene mono-adducts improves the solubility of the obtained conjugates and the time that preserves the electrochemical properties of C<sub>60</sub>. Theoretical calculations predicted the reaction path in good agreement with experimental results. Furthermore, molecular docking investigations predicted the possible application of these compounds as HIV-1 protease inhibitors. These are promising results to further explore the biological or materials science applications of these structures.

## Experimental Section

**General Methods.** All reactions were performed using an atmosphere of argon and oven-dried glassware. Solvents were dried by standard procedures. All reagents were of commercial quality and were used as supplied unless otherwise specified. Reactions were monitored by thin-layer chromatography carried out on 0.25 mm silica gel plates (230–400 mesh). Flash column chromatography was performed using silica gel (60 Å, 32–63  $\mu$ m). A high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Cosmosil Buckyprep preparative column, dimensions, 4.6  $\times$  250 mm; flow rate 1.0 mL min<sup>-1</sup>, injection volume 15  $\mu$ L, eluent toluene) was used to determine the purity of the compounds synthesized. The retention times ( $t_R$ ) reported were determined at a wavelength of 320 nm. FTIR spectra were carried out using ATR of the solid compounds. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded at 700 MHz and <sup>13</sup>C NMR at 175 MHz; the one-bond heteronuclear correlation (HMQC) and the long-range <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C correlation (HMBC)

spectra were obtained by use of the inv4gs and the inv4gslplrnd programs. HRMS-MALDI (dithranol as matrix) experiments were carried out in positive mode of detection. UV/vis spectra were recorded in CHCl<sub>3</sub>. Optical rotations were measured using a polarimeter with a thermally jacketed 10 cm cell at 20 °C (concentration given as g/100 mL). Electrochemical measurements were performed with a three-electrode configuration system. The measurements were carried out with THF solutions [0.1 M in tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>)]. A glassy carbon electrode (3 mm diameter) was used as the working electrode, and a platinum wire and an Ag/AgNO<sub>3</sub> electrode were employed as the counter and the reference electrode, respectively. Ferrocene (Fc) was added as an internal reference, and all potentials were determined relative to the Fc/Fc<sup>+</sup> couple. Both the counter and the reference electrodes were directly immersed in the electrolyte solution. The surface of the working electrode was polished with commercial alumina prior to use. Solutions were stirred and deaerated by bubbling argon for a few minutes prior to each measurement. Unless otherwise specified, the scan rate was 100 mV/s and the experimental error  $\pm 5$  mV. TGA analyses were carried out under air and nitrogen in a TA-TGA-Q500 apparatus. The sample (~ 0.5 mg) was introduced inside a platinum crucible and equilibrated at 90 °C followed by a 10 °C min<sup>-1</sup> ramp between 90 and 1000 °C.

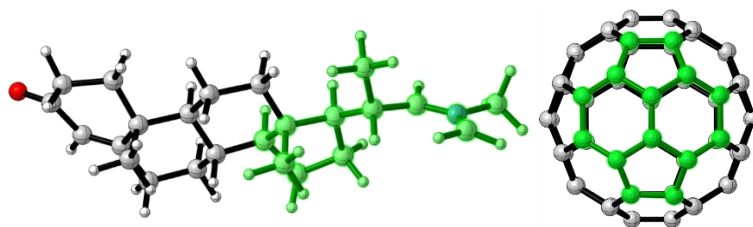
### **Computational methods**

The conformational search of the 1,3-dipole and products **2** and **3** was performed using an in-house-made Python code. Following the strategy that we have developed in previous works,<sup>[19,20]</sup> we first generated a grid by rotating the bonds highlighted in Figure 4 (and its equivalents at the products). In the case of the reactant 1,3-dipole rotations were made every 30° and 10° for the products. These geometries were fully relaxed using the AM1 semiempirical Hamiltonian<sup>[40]</sup> as implemented in MOPAC2016<sup>[41]</sup> and the criteria for terminating all optimizations was increase by a factor of 100 through the PRECISE keyword. Afterward, redundant structures are discarded according to energy degeneracies and RMSD similarities. For the later, our python code interfaces with the BitClust software,<sup>[42]</sup> developed in our group, and clusters structures according to Daura's algorithm.<sup>[43]</sup> The remaining structures were fully relaxed with the B3LYP density functional<sup>[44]</sup> adding the D3(BJ) dispersion correction<sup>[45]</sup> and using the 6-31G(d) Pople's basis set. Then the most stable conformer was selected. Since DFT calculations were used for full optimizations, instead of single-point energies, we denoted this level of theory as

(opt B3LYP-D3(BJ)/6-31G(d))//AM1. To check the confidence of the obtained results, all these calculations were also repeated with the PM7 Hamiltonian,<sup>[46]</sup> and nearly identical geometries were obtained in all cases (see Figures S29 and S30).

Calculation of the dual descriptor, for the chemical reactivity studies, was performed using spin densities as implemented in Multiwfn Version 3.7(dev)<sup>[47]</sup> and the wfn files needed were generated at the UB3LYP/6-31G(d), avoiding the use of diffuse functions, as suggested for 1,3-dipolar cycloadditions by Miranda-Quintana et al.<sup>[48]</sup>

Considering the size of the systems under study, mechanistic calculations were performed using the OLYP/6-31G(d):PM6 ONIOM scheme. This strategy has proven to be useful in the study of 1,3-dipolar cycloadditions involving fullerene derivatives.<sup>[22b]</sup> Previous studies have shown that the OLYP GGA functional can successfully locate difficult zwitterionic intermediates involving fullerenes.<sup>[49]</sup> For the selection of the high-level layer, we followed the recommendation of Osuna et.al.<sup>[50]</sup> of a pyracylene-like selection in the C<sub>60</sub> and for the 1,3-dipole the selection goes from C5 in the dipole to the whole D steroidal ring (see Figure 10). Single point calculations were also performed, at the B3LYP/6-31+G(d,p) level of theory, with Ultrafine integration grids, taking into account solvation effects (toluene) via the Conductor-like Polarizable Continuum Model (C-PCM).<sup>[51]</sup> We denoted this procedure as B3LYP/6-31+G(d,p)/C-PCM = toluene//OLYP/6-31G(d):PM6. All the stationary points were characterized by harmonic analysis where reactants, products and intermediates showed only positive frequencies and all TSs were characterized by the presence of one imaginary frequency corresponding to the approach of the reacting carbons. All DFT calculations and also those involving the ONIOM scheme were performed with the Gaussian 09-Revision E.01 package.<sup>[52]</sup> Figures were generated using the CYLView-v1.0.561-Beta<sup>[53]</sup> and VMD<sup>[54]</sup> software.



**Figure 10.** ONIOM selection scheme (OLYP/6-31G(d):PM6) used for computing the reaction mechanism. Atoms included in the high-level layer have been highlighted in green.

## Molecular Docking

*Ligand/Protein preparation:* HIV-1 protease 3D structure resolved by X-ray diffraction [PDB code: 1T3R resolution (R= 1.2 Å)]<sup>[54]</sup> was downloaded from Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>). Optimized structures and ligands initial coordinates were obtained from theoretical calculations, see Figure S28 in the Supporting Information. Protein and ligands PDB files were converted to PDBQT format using AutoDockTools.<sup>[55]</sup> Partial charges were calculated using the Gasteiger model. Non-polar hydrogen atoms were merged to the heavy atoms. In the case of ligands, rotatable bonds were set to default using the TORSDOF utility in AutoDockTools. All protein residues were kept rigid. A simulation box of size  $28 \times 24 \times 30 \text{ \AA}^3$  was constructed so that it could include the ligands flexible residues. The center of the simulation box was placed at the center of the active site. Affinity grid maps were generated for each of the atom types present in the protein (A, C, HD, N, NA, OA, SA) and all possible atom types (A, C, N, OA) in both ligands. An electrostatic and a desolvation grid map were also generated.

*Molecular docking simulation and analysis of HIV-protease-hybrid complexes:* Rigid docking simulations were performed using AutoDock 4.2.<sup>[56]</sup> Docking parameters were set to default, with the exception of the following: trials of 20 Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) runs for each derivate ( $ga\_run = 20$ ), with an initial population size of 300 random starting position and conformation ( $ga\_pop\_size = 300$ ) and 2,500,000 energy evaluations ( $ga\_num\_evals = 2,500,000$ ). The best docked conformation of protein–ligand complex was analyzed from 20 independent runs, where the binding affinity (kcal/mol) of 20 solutions were determined using a scoring function. Docked conformations were clustered according to an RMSD threshold of 2.0 Å and the mean binding free energy of each cluster was calculated. The cluster with best-scoring pose (higher number of conformations with lowest mean binding energy) was selected as the representative binding mode for each ligand. 3D structures were represented using PyMOL 2.1.0.<sup>[57]</sup>

## Synthesis of Compounds.

**Synthesis of *N*-Methyl-2-substituted-pyrrolidino[3,4:1,2][60]fullerenes (2 and 3).** A mixture of C<sub>60</sub> (108 mg, 0.15 mmol), *N*-methylglycine (68 mg, 0.76 mmol), and the formyl steroid **1** (55 mg, 0.17 mmol) in toluene (250 mL) under argon atmosphere was heated at reflux for 5h. The color of the solution changed from purple to brown. The solvent was removed under reduced pressure, and the solid residue thus obtained was

purified by column chromatography on silica gel, using CS<sub>2</sub> to elute unreacted C<sub>60</sub> and dichloromethane to elute the corresponding pyrrolidino[3,4:1,2][60]fullerenes. With characterization purposes, additional purification of these compounds was carried out by repetitive precipitation and centrifugation using hexane, methanol, and diethyl ether as solvents.

*N-methyl-(2R)-[(20'S)-3'-oxopregn-4'-en-20'-methyl-20'-yl]pyrrolidino[3,4:1,2]*

*[60]fullerene. (2)* The purification of **2** was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and toluene as the eluents. Chemical yield: 68% (124 mg); brown solid. HPLC: toluene, flow rate 1 mL/min,  $t_R = 16.8$  min.  $[\alpha]_D^{20} = + 105^\circ$  (c  $2 \times 10^{-4}$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), ATR-FTIR:  $\nu$  2980, 2854, 1720 (C=O), 1665 (C=C), 1453, 1378, 1181, 730 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5.75 (s, 1H, H4'), 4.81 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H, H5 pyrrolidine ring), 4.10 (d,  $J = 9.4$  Hz, 1H, H5 pyrrolidine ring), 3.96 (s, 1H, H2 pyrrolidine ring), 3.06 (m, 1H, H20'), 2.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N), 2.47-2.35 (m, 4H, 2H2', H6', H16'), 2.34-2.30 (m, 1H, H6'), 2.21 (m, 1H, H8'), 2.04 (m, 1H, H17'), 2.00 (m, 1H, H7'), 1.89 (m, 1H, H1'), 1.77 (m, 1H, H12'), 1.74-1.65 (m, 2H, H1', H11'), 1.62 (m, 1H, H14'), 1.54 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H, H21'), 1.45 (m, 2H, H15', H16'), 1.38 (m, 1H, H11'), 1.27 (br s, 1H, H15'), 1.19 (s, 3H, H19'), 1.07 (m, 1H, H12'), 1.04 (m, 1H, H7'), 1.00 (m, 1H, H9'), 0.76 (s, 3H, H18'). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.8 (C3), 171.5 (C5'), 156.4, 155.2, 154.4, 153.5, 147.4, 146.5, 146.4, 146.30, 146.26, 146.1, 146.0, 145.73, 145.69, 145.6, 145.5, 145.3, 145.0, 144.7, 144.6, 144.5, 143.4, 143.3, 142.9, 142.8, 142.4, 142.3, 142.22, 142.17, 142.1, 141.9, 141.8, 140.4, 140.3, 140.2, 139.8, 137.5, 136.5, 135.9, 135.4, 124.0 (C4'), 79.1 (C2 pyrrolidine ring), 76.5 (Csp<sup>3</sup>-C<sub>60</sub>), 71.2 (C5 pyrrolidine ring), 69.6 (Csp<sup>3</sup>-C<sub>60</sub>), 56.2 (C14'), 55.1 (C17'), 54.0 (C9'), 43.4 (C13'), 42.3 (CH<sub>3</sub>-N), 39.9 (C12'), 38.7 (C10'), 36.4 (C20'), 35.9 (C1'), 35.8 (C8'), 34.1 (C2'), 33.0 (C6'), 32.2 (C7'), 29.9 (C16'), 24.6 (C15'), 21.2 (C11'), 17.6 (C19'), 14.9 (C22'), 11.9 (C18'). HRMS (MALDI-TOF)  $m/z$ :  $[M + H]^+$  Calcd for C<sub>84</sub>H<sub>38</sub>NO 1076.2952; Found 1076.3057.

*N-methyl-(2S)-[(20'S)-3'-oxopregn-4'-en-20'-methyl-20'-yl]pyrrolidino[3,4:1,2]*

*[60]fullerene. (3)* The purification of **3** was performed by column chromatography on silica gel with CS<sub>2</sub> and toluene as the eluents. Chemical yield: 13% (14 mg); brown solid. HPLC: toluene, flow rate 1 mL/min,  $t_R = 11.9$  min.  $[\alpha]_D^{20} = + 58^\circ$  (c  $2 \times 10^{-4}$  CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). ATR-FTIR:  $\nu$  2927, 2855, 1738 (C=O), 1673 (C=C), 1459, 1375, 1183, 733 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 5.68 (s, 1H, H4'), 4.80 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H5

pyrrolidine ring), 4.05 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, H5 pyrrolidine ring), 3.85 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H, H2 pyrrolidine ring), 2.79 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-N), 2.63-2.57 (m, 2H, H17', H20'), 2.42-2.31 (m, 2H, H2', H6'), 2.25 (m, 1H, H2'), 2.06 (dt,  $J = 13.0$  Hz,  $J = 3.2$  Hz 1H, H6'), 2.01 (m, 1H, H16'), 1.97 (ddd,  $J = 13.6$  Hz,  $J = 4.9$  Hz,  $J = 3.3$  Hz, 1H, H1'), 1.79 (m, 1H, H7'), 1.72 (m, 1H, H16'), 1.64 (m, 2H, H12', H15'), 1.58 (brs, 1H, H1'), 1.54 (dd,  $J = 11.0$  Hz,  $J = 3.8$  Hz, 1H, H8'), 1.51 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H, H22'), 1.47 (td,  $J = 13.4$  Hz,  $J = 12.8$  Hz,  $J = 3.7$  Hz, 1H, H11'), 1.42 (m, 1H, H11'), 1.25 (br s, 1H, H15'), 1.17 (s, 3H, H19'), 1.02 (m, 1H, H12'), 0.97 (m, 1H, H7'), 0.91 (m, 1H, H9'), 0.88 (s, 3H, H18'), 0.84 (m, 1H, H14'). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (175 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm): 199.6 (C3), 171.4 (C5'), 156.6, 155.5, 154.8, 154.6, 147.3, 147.2, 146.9, 146.3, 146.2, 146.1, 146.0, 145.9, 145.7, 145.6, 145.5, 145.3, 145.3, 145.20, 145.16, 144.9, 144.6, 144.5, 144.3, 143.3, 142.74, 142.68, 142.23, 142.17, 142.12, 142.09, 142.0, 141.8, 141.7, 141.5, 140.4, 140.3, 138.94, 138.90, 136.9, 136.5, 135.9, 135.3, 123.8 (C4'), 80.1 (C2 pyrrolidine ring), 74.6 (Csp<sup>3</sup>-C<sub>60</sub>), 70.2 (Csp<sup>3</sup>-C<sub>60</sub>), 69.7 (C5 pyrrolidine ring), 55.5 (C14'), 53.3 (C9'), 51.6 (C17'), 43.6 (C13'), 39.7 (CH<sub>3</sub>-N), 39.6 (C12'), 38.5 (C10'), 38.2 (C20'), 35.63 (C8'), 35.55 (C1'), 33.9 (C2'), 32.9 (C6'), 31.8 (C7'), 29.0 (C16'), 24.5 (C15'), 21.0 (C11'), 17.4 (C19'), 15.2 (C22'), 11.6 (C18'). HRMS (MALDI-TOF) m/z: [M + H]<sup>+</sup> Calcd for C<sub>84</sub>H<sub>38</sub>NO: 1076.2952; Found 1076.2990.

## References

- (1) Castro, E.; Garcia, A. H.; Zavala, G.; Echegoyen, L. Fullerenes in biology and medicine. *J. Mater. Chem. B*, **2017**, *5*, 6523–6535.
- (2) Montellano López, A.; Mateo-Alonso, A.; Prato, M. Materials Chemistry of Fullerene C<sub>60</sub> Derivatives. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 1305–1318.
- (3) Nimibofa, A.; Newton, E. A.; Cyprai, A. Y.; Donbebe, W. Fullerenes: Synthesis and Applications. *J. Mater. Sci. Res.* **2018**, *7*, 22–36.
- (4) Goodarzi, S.; Da Ros, T.; Conde, J.; Sefat, F.; Mozafari, M. Fullerene: biomedical engineers get to revisit an old friend. *Materials Today* **2017**, *20*, 460–480.
- (5) Enes, R.F.; Cid, J. J.; Hausmann, A.; Trukhina, O.; Gouloumis, A.; Vazquez, P.; Cavaleiro, J. A.; Tom, A. C.; Guldi, D.M.; Torres, T. Synthesis and Photophysical Properties of Fullerene–Phthalocyanine Porphyrin Triads and Pentads. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1727–1736.
- (6) Hu, Z.; Guan, W.; Wang, W.; Huang, L.; Xing H.; Zhu, Z. Synthesis of  $\beta$ -alanine C<sub>60</sub> derivatives and its protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma cells. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 798–804.
- (7) Aroua, S.; Schweizer W. B.; Yamakoshi, Y. C<sub>60</sub> Pyrrolidine Bis-carboxylic Acid Derivative as a Versatile Precursor for Biocompatible Fullerenes. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1688–1691.
- (8) Csavas, M.; Demeter, T.; Herczeg, M.; Timari, I.; Kover, K. E.; Herczegh P.; Borbas A. Rapid synthesis of self-assembling 1,2-thiomannobioside glycoconjugates as potential multivalent ligands of mannose-binding lectins. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 6983–6986.
- (9) Huang, K.; Cai H.; Wu, L. Potential of dehydroepiandrosterone in modulating osteoarthritis-related pain. *Steroids* **2019**, *150*, 108433.
- (10) Coro, J.; Rodríguez, H.; Rivera, D. G.; Suárez, M.; Molero, D.; Herranz, M. A.; Martínez-Álvarez, R.; Filippone, S.; Martín, N. Functional Chimeras: New Bingel-Hirsch Type Steroid Fullerene Hybrids. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4810–4817.
- (11) Maggini, M.; Scorrano G.; Prato, M. Addition of azomethine ylides to C<sub>60</sub>: synthesis, characterization, and functionalization of fullerene pyrrolidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9798–9799.
- (12) Kulchitsky, V. A.; Alexandrova, R.; Suziedelis, K.; Paschkevich, S. G.; Potkin, V. I. Perspectives of Fullerenes, Dendrimers, and Heterocyclic Compounds Application in Tumor Treatment. *Recent Patents on Nanomedicine* **2014**, *4*, 82–89.
- (13) Fazylov, S. D.; Nurkenov, O. A.; Arinova, A. E.; Seilkhanov, T. M.; Tuktarov, A. R.; Khuzin, A. A.; Bakirova, R. E.; Muravleva, L. E. Synthesis and structure of *N*-methyl-1-[(4-bromo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrazol-1-yl)phenyl]fullerene-C<sub>60</sub>-[1,9-*c*]pyrrolidine. *Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, *85*, 1049–1051.
- (14) Magoulas, G. E.; Bantzi, M.; Messari, D.; Voulgari, E.; Gialeli, C.; Barbouri, D.; Giannis, A.; Karamanos, N. K.; Papaioannou, D.; Avgoustakis, K. Synthesis and Evaluation of Anticancer Activity in Cell of Novel Stoichiometric Pegylated Fullerene-doxorubicin conjugates. *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 1676–1693.
- (15) (a) Bjelakovic, M. S.; Kop, T. J.; Vlajic, M.; Djordjevic J.; Milic, D. R. Design, Synthesis and Characterization of Fullerene-peptides steroids covalent hybrids. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 8564–8570. (b) Bjelakovic, M. S.; Kop, T. J.; Baosic, R.; Zlatovic, M.; Zekic, A.; Maslak, V.; Milic, D. R. Electrochemical Theoretical, and morphological study of antioxidant fullerosteroids. *Monatsh. Chem.* **2014**, *145*, 1715–1725.

- (16) Muñoz, A.; Sigwalt, D.; Illescas, B. M.; Luczkowiak, J.; Rodríguez-Pérez, L.; Nierengarten, I.; Holler, M.; Remy, J.-S.; Buffet, K.; Vincent, S. P.; Rojo, J.; Delgado, R.; Nierengarten, J.-F.; Martín, N. Synthesis of giant globular multivalent glycofullerenes a potent inhibitor in a model of Ebola virus infection. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 50–57.
- (17) (a) Marchesan, S.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Balzarini, J.; Prato, M. Anti-HIV properties of cationic fullerene derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3615–3618. (b) Barzegar, A.; Naghizadeh, E.; Zakariazadeh, M.; Azamat, J. Molecular Dynamics Simulation Study of the HIV-1 Protease Inhibition Using Fullerene and New Fullerene Derivatives of Carbon Nanostructures. *Mini Rev. Med. Chem.* **2017**, *17*, 633–647.
- (18) (a) Durdagi, S.; Mavromoustakos, T.; Chronakis, N.; Papadopoulos, M.G. Computational design of novel fullerene analogues as potential HIV-1 PR inhibitors: Analysis of the binding interactions between fullerene inhibitors and HIV-1 PR residues using 3D QSAR, molecular docking and molecular dynamics simulations. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9957–9974. (b) Ahmed, L.; Rasulev, B.; Turabekova, M.; Leszczynska, D.; Leszczynski, J. Receptor- and ligand-based study of fullerene analogues: comprehensive computational approach including quantum-chemical, QSAR and molecular docking simulations. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 5798–5808.
- (19) Almagro, L.; Hernández-Castillo, D.; Ortiz, O.; Alonso, D.; Ruiz, A.; Coro, J.; Herranz, M. A.; Molero, D.; Martínez, R.; Maroto, E.; Filippone, S.; Suárez, M. Martín, N. Steroid–Fullerene Hybrids from Epiandrosterone: Synthesis, Characterization and Theoretical Study. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4512–4522.
- (20) Ruiz, A.; Morera, C.; Almagro, L.; Coro, J.; Maroto, E. E.; Herranz, M. A.; Filippone, S.; Martínez, R.; Molero, D.; García, J.; Suárez, M.; Martín, N. Dumbbell type Fullerene-Steroid Conjugates Hybrids: A Joint Experimental and Investigation for Conformational, Configurational and Circular Dichroism Assignments. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3473–3486.
- (21) Ruiz, A.; Coro, J.; Almagro, L.; Ruiz, J. A.; Molero, D.; Maroto, E. E.; Filippone, S.; Herranz, M. A.; Martínez, R.; Suárez, M.; Martín, N. Diastereoselective Synthesis of C<sub>60</sub>/Steroid Conjugates. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2819–2826.
- (22) (a) Suárez, M.; Ruiz, A.; Almagro, L.; Coro, J.; Maroto, E.; Filippone, S.; Molero, D.; Martínez, R.; Martín, N. Catalytic Stereodivergent Synthesis of Steroid–Fulleropyrrolidine Hybrids. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 4654–4660. (b) Maroto, E. E.; Filippone, S.; Suárez, M.; Martínez-Álvarez, R.; de Cózar, A.; Cossío F. P.; Martín, N. Stereodivergent Synthesis of Chiral Fullerenes by [3+2] Cycloadditions to C<sub>60</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 705–712.
- (23) Poza, J.; Fernández, R.; Reyes, F.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. Isolation, Biological Significance, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of New Natural Parathiosteroids A-C and Analogues from the Soft Coral *Paragorgia* sp. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7978–7984.
- (24) Bennia, S.; Milad, R.; Messaoudi, S.; de Person, M.; Moussa, F.; Abderrabba, M.; Merlet, D. Density Functional Theorybased study on structural, vibrational and NMR properties of *cis trans* fulleropyrrolidine mono-adducts. *PLoS ONE*, **2018**, *13*, e0207635.
- (25) (a) Isaacs, L.; Wehlig, A.; Diederich, F. Improved Purification of C<sub>60</sub> and Formation of  $\sigma$ - and  $\pi$ -Homoaromatic Methano-Bridged Fullerenes by Reaction with Alkyl Diazoacetates *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1231–1250. (b) Bianco, A.; Maggini, M.; Scorrano, G.; Toniolo, C.; Marconi, G.; Villani, C.; Prato, M. Synthesis, chiroptical properties, and configurational assignment of fulleroproline derivatives and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4072–4080.
- (26) Chimin, D. U.; XU Juhua, X. U.; Yuliang, LI.; Wei X. U.; Daoben, Z.H.U. Influence of organic acids on UV-Vis spectra of pyrrolidino- [60]fullerene derivatives, *Chinese Sci. Bull.* **2001**, *46*, 1156–1159

- (27) Wilson, S. R.; Lu, Q.; Cao, J.; Wu, Y.; Welch, C. J.; Schuster, D. I. Chiral non-racemic C<sub>60</sub> derivatives: A proposed sector rule for fullerene absolute configuration. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5131–5142.
- (28) Tan, X.; Schuster D. I.; Wilson, S. R. Resolution and absolute configuration of a C<sub>2</sub>-symmetric *trans*-2,5-disubstituted fulleropyrrolidine. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4187–4190.
- (29) Echegoyen, L.; Diederich, F.; Echegoyen, L. E. in *Fullerenes: Chemistry Physics and Technology*, Ruoff, R., Kadish, K.M., Eds.; Wiley and Sons: New York, **2000**; pp. 1–51.
- (30) Guldi, D. M.; Maggini, M.; Menna, E.; Scorrano, G.; Ceroni, P.; Marcaccio, M.; Paolucciand, F.; Roffia, R. A Photosensitizer Dinuclear Ruthenium Complex: Intramolecular Energy Transfer to a Covalently Linked Fullerene Acceptor. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 1597–1605.
- (31) Cardona, C. M.; Li, W.; Kaifer, A. E.; Stockdale, D.; Bazan, G. C. Electrochemical Considerations for Determining Absolute Frontier Orbital Energy Levels of Conjugated Polymers for Solar Cell Applications. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2367–2371.
- (32) Lerke, S. A.; Parkinson, B. A.; Evans D. H.; Fagan, P. J. Electrochemical studies on metal derivatives of buckminsterfullerene (C<sub>60</sub>). *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7807–7813.
- (33) Morell, C.; Grand, A.; Toro-labbe, A. New Dual Descriptor for Chemical Reactivity. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 205–212.
- (34) Geerlings, P.; Ayers, P. W.; Toro-Labbé, A.; Chattaraj, P. K.; De Proft, F. The Woodward–Hoffmann Rules Reinterpreted by Conceptual Density Functional Theory. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 683–695.
- (35) Martínez González, M.; Hernández-Castillo, D.; Montero-Cabrera, L. A.; Miranda-Quintana, R. A. Geometrical distortions and charge transfer in münchnone regio-selectivity: A conceptual density functional study. *Int. J. Quantum Chem.* **2017**, *117*, e25444.
- (36) Perdew, J. P.; Burke, K.; Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *77*, 3865–3868.
- (37) Wang, H.; He, Y.; Li, Y.; Su, H. Photophysical and Electronic Properties of Five PCBM-like C<sub>60</sub> Derivatives: Spectral and Quantum Chemical View. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 255–262.
- (38) Ariens, E. J.: Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1984**, *26*, 663-668.
- (39) Surleraux, D.L.; Tahri, A.; Verschuere, W.G.; Pille, G.M.; De Kock, H.A.; Jonckers, T.H.; Peeters, A.; De Meyer, S.; Azijn, H.; Pauwels, R. Discovery and selection of TMC114, a next generation HIV-1 protease inhibitor. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1813-1822.
- (40) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909.
- (41) Stewart, J. P. MOPAC2016, Version: 18.151L, Stewart Computational Chemistry, web: [HTTP://OpenMOPAC.net](http://OpenMOPAC.net).
- (42) González-Alemán, R.; Hernández-Castillo, D.; Rodríguez-Serradet, A.; Caballero, J.; Hernández-Rodríguez, E. W.; Montero-Cabrera, L. A. Bitclust: fast geometrical clustering of long molecular dynamics simulations. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, doi: 0.1021/acs.jcim.9b00828.
- (43) (a) Daura, X.; Gademann, K.; Jaun, B.; Van Gunsteren, W. F.; Mark, A. E. Peptide Folding: When Simulation Meets Experiment. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 236–240. (b) González-Alemán, R.; Hernández-Castillo, D.; Caballero, J.; Montero-Cabrera, L. A. Quality threshold clustering of molecular dynamics: a word of caution. *J. Chem. Inf. Model.* **2020**, *60*, 2, 467–472.
- (44) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789. (b) Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.

- (45) Grimme, S.; Ehrlich, S.; Goerigk, L. Effect of the damping function in dispersion corrected density functional theory. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 1456–1465.
- (46) Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* **2013**, *19*, 1–32.
- (47) Lu T.; Chen, F. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comput. Chem.* **2012**, *33*, 580–592.
- (48) Alain, R.; Quintana, M.; Ayers, P. W. Charge transfer and chemical potential in 1,3-dipolar cycloadditions. *Theor. Chem. Acc.* **2016**, *135*, 172.
- (49) Vidal, S.; Izquierdo, M.; Alom, S.; Garcia-Borràs, M.; Filippone, S.; Osuna, S.; Solà, M.; Whitby, R. J.; Martín, N. Effect of incarcerated HF on the exohedral chemical reactivity of HF@C<sub>60</sub>. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 10993–10996.
- (50) Osuna, S.; Morera, J.; Cases, M.; Morokuma, K.; Solà, M. Diels–Alder Reaction between Cyclopentadiene and C<sub>60</sub>: An Analysis of the Performance of the ONIOM Method for the Study of Chemical Reactivity in Fullerenes and Nanotubes. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 9721–9726.
- (51) (a) Barone V.; Cossi, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001. (b) Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669–681.
- (52) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery Jr., J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 09*, Revision E.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2013**.
- (53) Legault, C. Y. *CYLview*, 1.0b; Université de Sherbrooke, **2009** (<http://www.cylview.org>).
- (54) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38.
- (55) Sanner, M. F. Python: a programming language for software integration and development. *J. Mol. Graph. Model.* **1999**, *17*, 57–61.
- (56) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. Software news and update a semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28*, 1145–1152.
- (57) *The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 2.1.0 Schrodinger, LLC.



## II.2.4. DISCUSIÓN CONJUNTA DE RESULTADOS.

### II.2.4.1. Síntesis, caracterización y estudio teórico de híbridos esteroide-metano[60]fullerenos.

Como continuación de nuestras investigaciones en la búsqueda de nuevos derivados fullerénicos conjugados a moléculas biológicamente activas, y siendo las cicloadiciones uno de los métodos más eficaces para la funcionalización del C<sub>60</sub>, se diseñó una metodología para la obtención de híbridos esteroide-metano[60]fullereno basada en la ciclopropanación de Bingel-Hirsch. Para ello, primeramente, se realizaron transformaciones químicas que permitieron la obtención de esteroides malonil-sustituídos, los que posteriormente se acoplan con el C<sub>60</sub>. Para la selección de los esteroides precursores (derivados del androstano), se tuvo en cuenta no solo las propiedades biológicas que presentan, sino también la presencia de grupos funcionales (carbonilos y ésteres) en diferentes posiciones del esqueleto esteroidal, que pueden ser transformados químicamente. A continuación, se relacionan los resultados más relevantes de cada uno de los procesos de síntesis utilizados, así como la posterior caracterización.

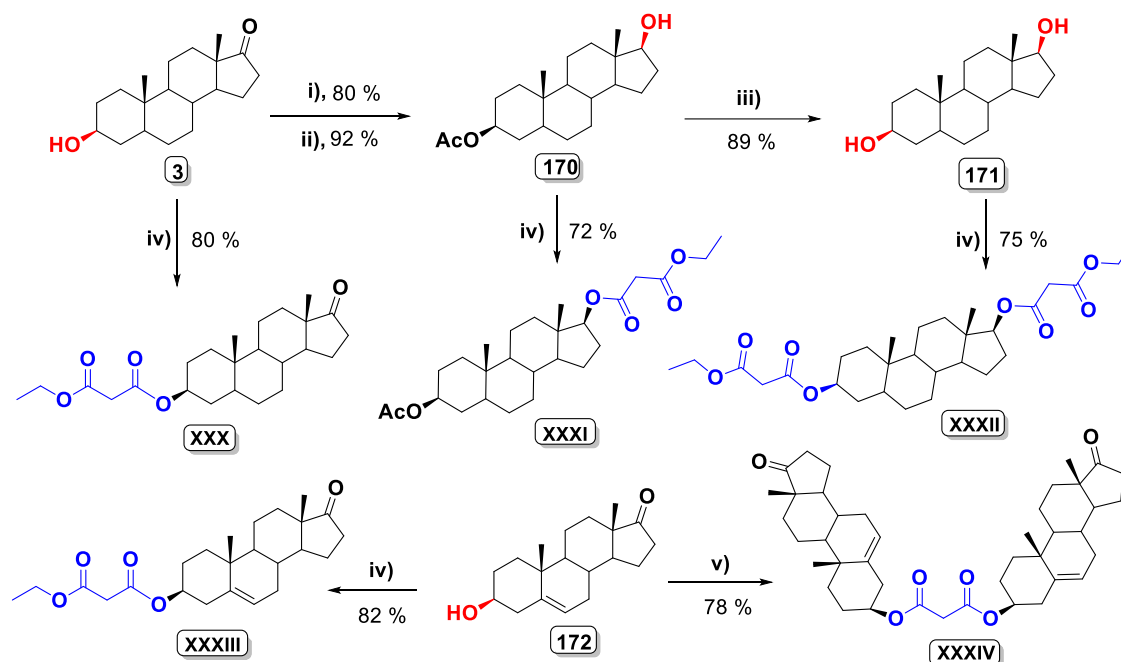
La primera etapa de síntesis consiste en la formación de grupos hidroxilos en diferentes posiciones del esqueleto esteroidal (fundamentalmente en anillo A y D), mediante reacciones de reducción de grupos carbonilo y la hidrólisis de grupos acetato, según metodología descrita para este tipo de compuestos<sup>[249]</sup> (ver Esquema II.9).

Posteriormente se procede a la introducción de grupos malonatos, mediante esterificación de los esteroides **3**, **170** - **172** con diferentes cloruros de ácido, en presencia de una base catalítica (piridina o DMAP) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como disolvente, bajo atmósfera inerte. Todos los derivados obtenidos son purificados por cromatografía en columna flash, dando lugar a cinco nuevos esteroides malonil-sustituídos **XXX** - **XXXIV**, con rendimientos que oscilan entre 72-82 %. Estos resultados son análogos a los reportados previamente por nuestro grupo de trabajo,<sup>[245]</sup> en el que son esterificados hidroxisteroides de la serie del colestano, ergostano y estigmastano, al emplear las mismas condiciones de reacción.

Todos estos compuestos fueron correctamente caracterizados por técnicas espectroscópicas de RMN, FTIR y espectrometría de masas.

---

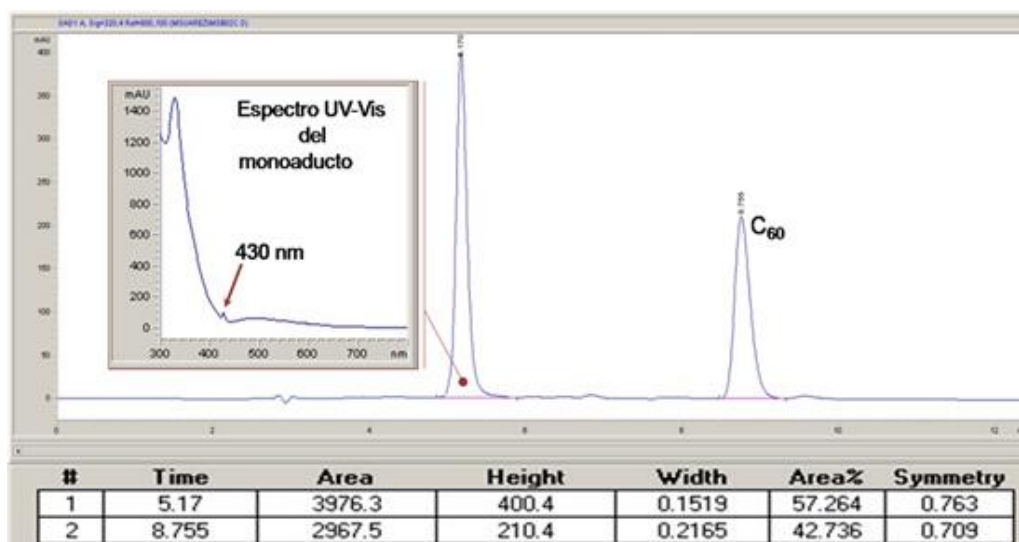
<sup>249</sup> Reyes, M.; Ruiz, J.A.; Ibarra, Y.; Fuente, A.; Vélez, H.; Hernández, I.; Martínez, I.; Rodeiro, I.; Sandoval, J.; Meza, S.; Montiel, S. Synthesis and anabolic/androgenic evaluation of novel 9 $\alpha$ -fluorosteroids. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4567-4571.



**Esquema II.9.** Síntesis de precursores esteroidales. Condiciones de reacción: (i) anhídrido acético, Py, 5 h., t.a.; (ii) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, t.a. 25 min; (iii) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5 %, MeOH, t.a. 24 h. (iv) CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>2</sub>COCl, Py, DCM, 0 °C; (v) ClOCCH<sub>2</sub>COCl, Py, DCM, 0 °C.

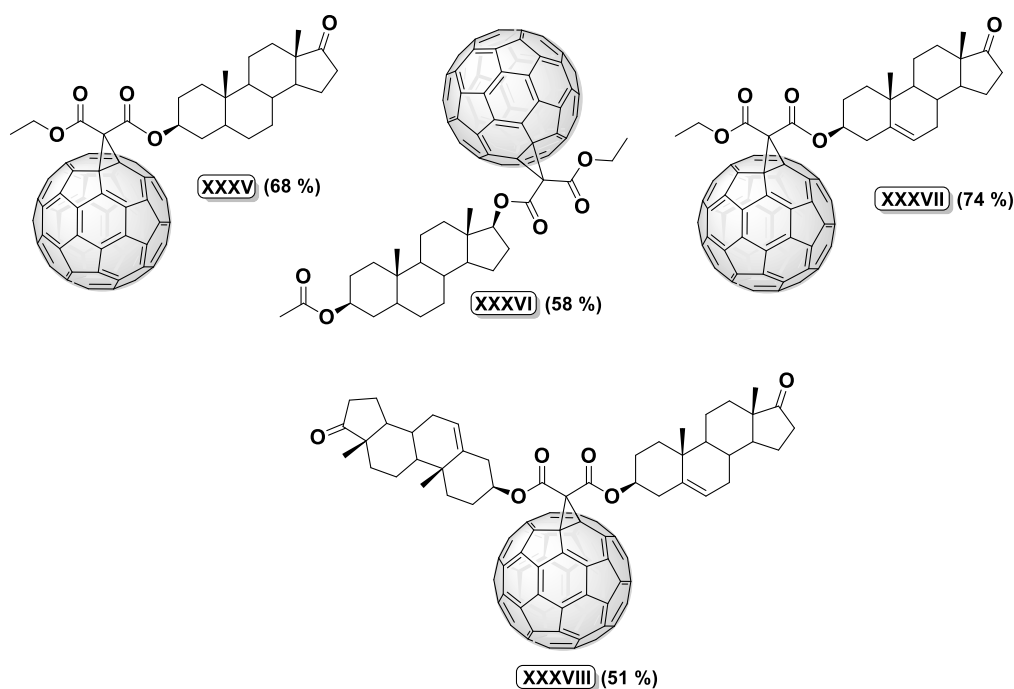
La unión covalente de los malonatos **XXX - XXXIV** al C<sub>60</sub> se realiza mediante bajo las condiciones de la ciclopropanación de Bingel-Hirsch en presencia de CBr<sub>4</sub> y DBU (Esquema II.8). La formación de los monoadductos ocurre rápidamente, con un cambio de coloración de la mezcla de reacción de púrpura a marrón. Pasadas dos horas se detiene la reacción al observar por CCF la formación de productos de poliadición de mayor polaridad con respecto al monoadducto.

Todas las reacciones se siguen por HPLC. En los cromatogramas se observan dos señales, una correspondiente al C<sub>60</sub> que no reacciona y otra al monoadducto que se obtiene. Estas señales se asignan de forma inequívoca a partir del análisis de los espectros UV-Vis de cada uno de los picos del cromatograma. Así, muy característico para todos los monoadductos [6,6]-cerrados de fullereno, es la débil banda de absorción que presentan en los ~ 430 nm. Esta se reconoce como una huella dactilar para este tipo de compuestos, que permite diferenciarlos del espectro obtenido para el C<sub>60</sub> sin funcionalizar. En la Figura II.10 se representa el cromatograma registrado para la mezcla de reacción de uno de los esteroide-metano[60]fullereno, en el que se observa una señal de mayor área correspondiente al híbrido (*t<sub>R</sub>* = 5.17 min.) y otra asignable al C<sub>60</sub> que no reacciona (*t<sub>R</sub>* = 8.7 min.), cuando se emplea como fase móvil tolueno/acetonitrilo (9:1). El resto de los cromatogramas obtenidos presentan un perfil cromatográfico equivalente.



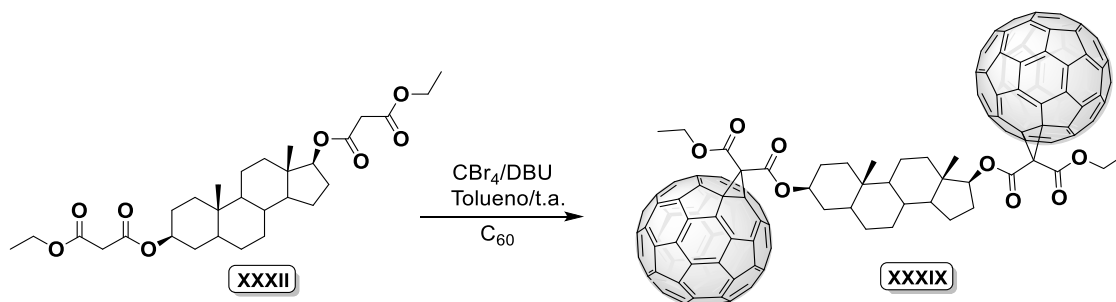
**Figura II.10.** Cromatograma HPLC de la mezcla de reacción entre el C<sub>60</sub> y el malonato **XXXI**.

La purificación de los compuestos se lleva a cabo por cromatografía en columna flash, inicialmente con disulfuro de carbono para eluir el C<sub>60</sub> que no reacciona y posteriormente con diclorometano para eluir el monoadocto de interés. Mediante este procedimiento de síntesis se obtienen los híbridos **XXXV** - **XXXVIII** como sólidos carmelitas estables con rendimientos entre 51-74 % (Figura II.11).



**Figura II.11.** Conjugados esteroide-metano[60]fullerenos

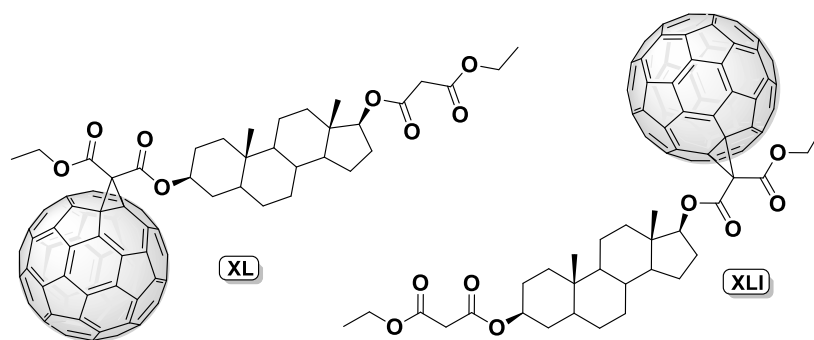
En el caso del derivado dimalonil-sustituido **XXXII**, se procede con igual metodología de síntesis, pero su unión covalente se realiza utilizando dos equivalentes de C<sub>60</sub>. De esta forma se obtiene el cicloadocto **XXXIX**, que presenta en su estructura dos unidades de fullereno (Esquema II.10).



**Esquema II.10.** Síntesis del híbrido tipo mancuerna **XXXIX**.

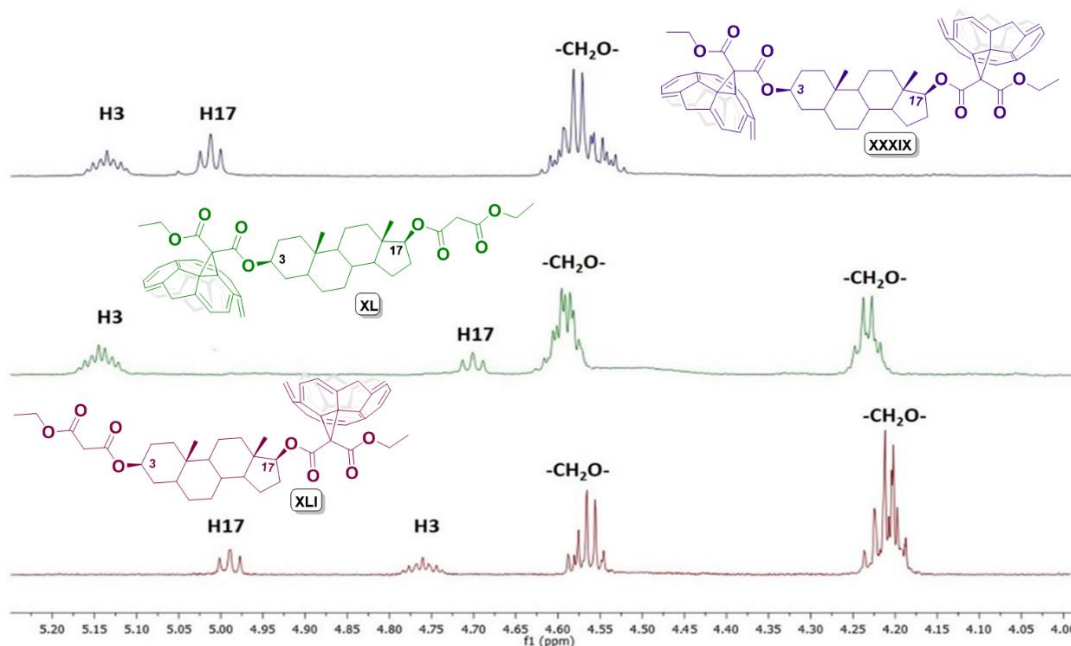
La formación de este producto, al igual que para los conjugados **XXXV - XXXVIII**, ocurre rápidamente con un cambio de coloración de la mezcla de reacción de púrpura a marrón. Al monitorear por CCF, se observan tres manchas correspondientes a la formación de diferentes monoadductos, lo que fue comprobado mediante análisis por HPLC. En el cromatograma correspondiente, sin embargo, se visualizaron también otros dos picos, que según sus espectros UV corresponden a productos de monoaddición.

Los aductos se separan por cromatografía en columna, inicialmente con disulfuro de carbono para eluir el fullereno que no reacciona y posteriormente con diclorometano. De esta manera se obtienen como sólidos carmelitas estables, con un 46 % de rendimiento para el bis-fullereno **XXXIX**, que constituye el producto mayoritario; mientras que los monoadductos **XL** y **XLI** en un 12 % y 11 %, respectivamente. (ver Figura II.12).



**Figura II.12.** Estructura de los monoadductos **XL** y **XLI**.

La estructura de todos los híbridos sintetizados se determina de forma inequívoca a partir de los datos espectroscópicos de RMN y masas. El análisis de los espectros de RMN- $^1H$ , RMN- $^{13}C$  y masas para los monoadductos **XL** y **XLI** permitió demostrar que ambos presentan una sola unidad de  $C_{60}$  en su estructura. En la Figura II.13 se ilustra comparativamente las señales en la región de los protones H3 y H17 para los compuestos **XXXIX**, **XL** y **XLI**.



**Figura II.13.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de los compuestos **XXXIX** - **XLI** en la región de los protones H3 y H17.

En el derivado **XL**, la señal asignable al protón de H3 (multiplete en 5.13 ppm) se desapantalla con respecto a la observada en el malonato de partida **XXXII** (4.75 ppm), no así para la señal de H17 (triplete a 4.66 ppm) que permanece a igual desplazamiento químico. Esto indica que el acoplamiento al fullereno ocurre por el grupo malonato de la posición 3 del esqueleto esteroideal solamente. En el caso del monoadducto **XLI** ocurre todo lo contrario. La señal que se desplaza hacia campos más bajos del espectro corresponde al protón H17 (5.01 ppm), mientras que la señal de H3 permanece a igual valor de  $\delta$  con respecto al que presenta en **XXXII**.

Para confirmar las estructuras propuestas, se registran los espectros HRMS-MALDI-TOF en modo negativo para ambos compuestos. En ellos se observan picos semejantes a  $m/z = 1238.2868$  y  $1238.253$  una para **XL** y **XLI** en ese orden, correspondientes a sus iones moleculares  $[\text{M}]^-$ . Ambos valores coinciden con el calculado para la fórmula molecular  $\text{C}_{89}\text{H}_{42}\text{O}_8$  1238.2874 uma.

Es importante destacar que el estudio de las propiedades físicas y químicas de todos los híbridos esteroide-fullereno sintetizados se lleva a cabo en disolución de cloroformo o diclorometano, lo cual evidencia un incremento en la solubilidad de los híbridos respecto al fullereno. De forma similar, un aumento en la solubilidad en disolventes como DMSO es un factor importante con vistas a futuros ensayos biológicos que se puedan realizar a estos derivados.

### Estudio electroquímico de los híbridos esteroide-metano[60]fullereno.

Con vistas a caracterizar electroquímicamente los híbridos obtenidos, se realiza el estudio por voltametría cíclica (VC) de los metanofullerenos sintetizados. En todos los casos el disolvente que se emplea es el tetrahidrofurano y la velocidad de barrido es de 100 mV/s. De los valores de potenciales obtenidos (Tabla II.2) se observa que los metanofullerenos tienen tres pasos de reducción a potenciales más negativos (~ 80 - 100 mV) que los medidos para el C<sub>60</sub>. Estos desplazamientos catódicos son una consecuencia de la saturación de uno de los dobles enlaces en la formación del aducto sobre el fullereno, que provoca un aumento en la energía del LUMO y por consiguiente una disminución en la electroafinidad.<sup>[250]</sup>

**Tabla II.2.** Potenciales redox de los metanofullerenos **XXXV – XLI** vs Fc/Fc<sup>+</sup> en THF (mV)<sup>[a]</sup>

Compuesto	E <sup>1</sup> <sub>1/2, red</sub>	E <sup>2</sup> <sub>1/2, red</sub>	E <sup>3</sup> <sub>1/2, red</sub>
C <sub>60</sub> <sup>[b]</sup>	-860	-1440	-2000
<b>XXXV</b>	-923	-1477	-2088 <sup>[c]</sup>
<b>XXXVI</b>	-921	-1479	-2106 <sup>[c]</sup>
<b>XXXVII</b>	-940	-1500	-2050 <sup>[c]</sup>
<b>XXXVIII</b>	-961	-1540	-2273 <sup>[c]</sup>
<b>XXXIX</b>	-893	-1416	-1989 <sup>[c]</sup>
<b>XL</b>	-928	-1468	-2147 <sup>[c]</sup>
<b>XLI</b>	-920	-1440	-2070 <sup>[c]</sup>

[a] Condiciones experimentales: GCE como electrodo de trabajo. Pt como electrodo contador, y Ag/AgNO<sub>3</sub> como electrodo de referencia. Electrolito soporte: TBAPF<sub>6</sub> (0,1 mol/L). [b] Valores obtenido utilizando TBAPF<sub>6</sub> (0,2 mol/L).<sup>[251]</sup> [c] Pico de potencial catódico, proceso irreversible.

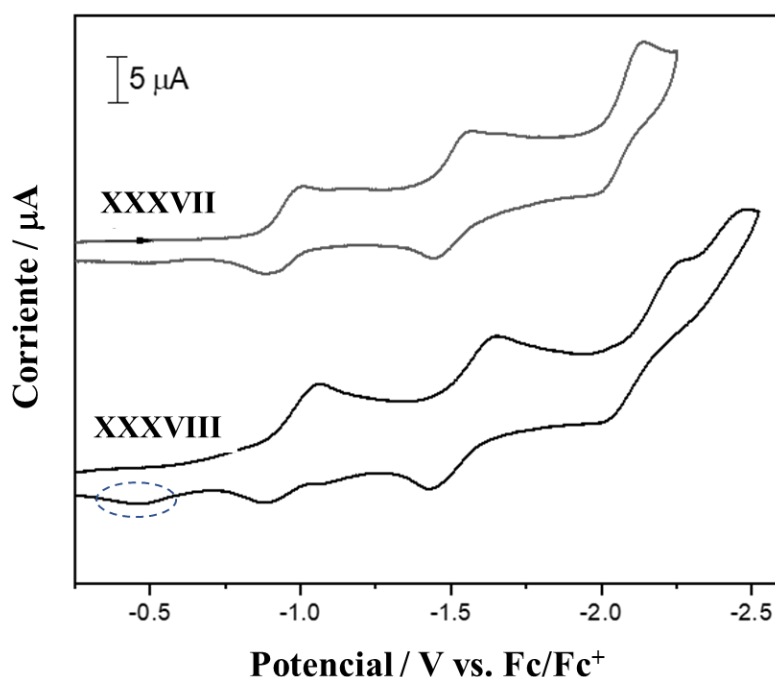
Sin embargo, para el conjugado tipo mancuerna **XXXIX**, el desplazamiento catódico observado (33 mV para el primer potencial de reducción vs. C<sub>60</sub>) es ligeramente diferente a la tendencia general, y exhibe las mejores habilidades electroceptoras de toda la serie de esteroide-fullerenos tipo Bingel. La proximidad espacial de las dos unidades de C<sub>60</sub> podría influir en el valor de potencial, aunque la reducción simultánea de los fragmentos fullerénicos individuales indica la ausencia de un fuerte acoplamiento electrónico entre ellos, como se ilustra en trabajos previos.<sup>[252]</sup>

<sup>250</sup> Echegoyen, L. E.; Herranz, M. A.; Echegoyen, L. *Fullerenes*. In *Encyclopedia of Electrochemistry, Inorganic Electrochemistry*, Geiger, W.E., Pickett, C., Eds. John Wiley & Sons: New York, **2006**; Vol. 7.

<sup>251</sup> Lerke, S.A.; Parkinson, B.A.; Evans, D.H.; Fagan, P.J. Electrochemical studies on metal derivatives of buckminsterfullerene (C<sub>60</sub>). *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 7807–7813.

<sup>252</sup> Segura, J.L.; Martín, N. [60]Fullerene dimers. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 13–25.

El estudio detallado en los voltamogramas registrados, muestra un comportamiento electroquímico similar entre todos los conjugados, en los que se observan tres ondas de reducción. Las dos primeras corresponden a procesos quasi-reversibles, mientras que la tercera reducción es químicamente irreversible, debido presumiblemente a la ruptura de uno de los enlaces del anillo de ciclopropano que une el malonato con el C<sub>60</sub>, como se reporta para derivados similares.<sup>[253]</sup> Esta característica es particularmente evidente en el caso del cicloaducto **XXXVIII**, donde la aparición de un pequeño pico de oxidación (irreversible) en aproximadamente -0.5 V es observado cuando el potencial se invierte después de la tercera onda de reducción. (ver Figura II.14). Además, para este derivado bis-esteroidal **XXXVIII**, la reducción ocurre ligeramente con mayor dificultad, cuando se compara con **XXXVII** y el resto de metano-fullerenos estudiados. Estas características podrían responder a la geometría adoptada por los dos fragmentos esteroidales alrededor de la jaula de fullereno.



**Figura II.14.** VC registrados para los híbridos **XXXVII** y **XXXVIII**. Se resalta el pequeño pico de oxidación irreversible que aparece en **XXXVIII**.

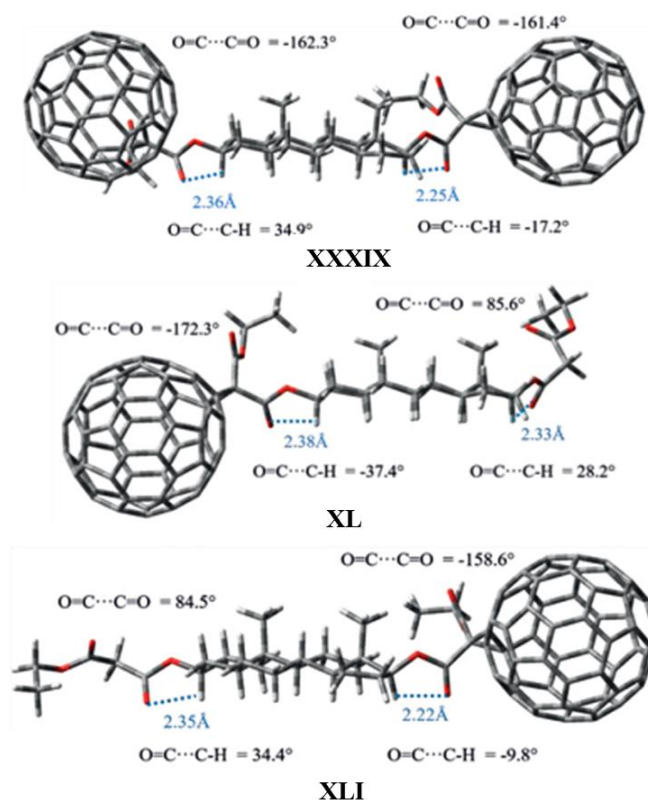
Todos estos resultados indican, que esencialmente no existe un efecto significativo de los fragmentos esteroidales sobre las propiedades electroquímicas de la molécula de fullereno conjugada, aspecto relevante desde un punto de vista de futura aplicación.

<sup>253</sup> Herranz, M.A.; Diederich, F.; Echegoyen, L. Electrochemically induced retro-cyclopropanation reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2299-2316.

### Estudio teórico de los cicloaductos esteroide-fullereno tipo Bingel.

Para comprender mejor las propiedades electrónicas y los factores que controlan la geometría de estas moléculas, así como la regioselectividad observada en la formación de los isómeros **XL** y **XLI**, se realiza un estudio conformacional con diferentes niveles de teoría.

Inicialmente, se procede al análisis conformacional de los conjugados **XXXIX** - **XLI**. Para ello, se propone una metodología estocástica de búsqueda de mínimos conformacionales basada en fragmentos, debido el alto número de grados de libertad en enlaces rotables que presentan estos sistemas. De modo general para cada compuesto, se seleccionan las regiones moleculares con poca probabilidad de interacción, y sus geometrías se calculan en dos etapas diferentes. En la Figura II.15 se muestran las conformaciones de mínima de los híbridos **XXXIX** - **XLI**, obtenidas mediante el método semiempírico AM1.



**Figura II.15.** Geometrías optimizadas a nivel de teoría AM1, para las moléculas **XXXIX** - **XLI**.

Los cálculos teóricos predicen que la orientación preferida de los grupos carbonilos en el fragmento etil-malonato de C17 sin la unidad de fullereno, tiene para el compuesto **XL**, un ángulo diedro  $O=C\cdots C=O$  de  $85.6^\circ$ ; mientras en el compuesto **XLI**, donde el

grupo etil-malonato similar se encuentra en el C3 del esteroide, este ángulo diedro es de  $84.5^\circ$ , como se observa en la Figura II.15. Cuando este grupo malonato en C3 se encuentra funcionalizado al C<sub>60</sub>, el ángulo diedro toma un valor de  $-162.3^\circ$  y  $-172.3^\circ$  para **XXXIX** y **XL**, respectivamente, y  $-161.4^\circ$  y  $-158.6^\circ$  cuando el fragmento fullerénico está unido al etil-malonato de C17 en **XXXIX** y **XLI**, respectivamente.

Puede analizarse, que existe una tendencia a una disposición *s-trans* de los grupos carbonilos cuando está agregado el C<sub>60</sub> a los grupos etil-malonilo, y otra tendencia a una configuración *cis* cerrada cuando no está presente. Además, como se ilustra en la Figura II.15, los cálculos predicen que la disposición relativa de los hidrógenos H3 y H17 de los correspondientes anillos A y D del esteroide y los grupos (C=O) más cercanos a estos, es similar en los tres metanofullerenos. Posteriormente se realizó un análisis de las Interacciones No-Covalentes (*NCI*, por sus siglas en inglés), el cuál confirma una débil interacción entre estos grupos discutidos.

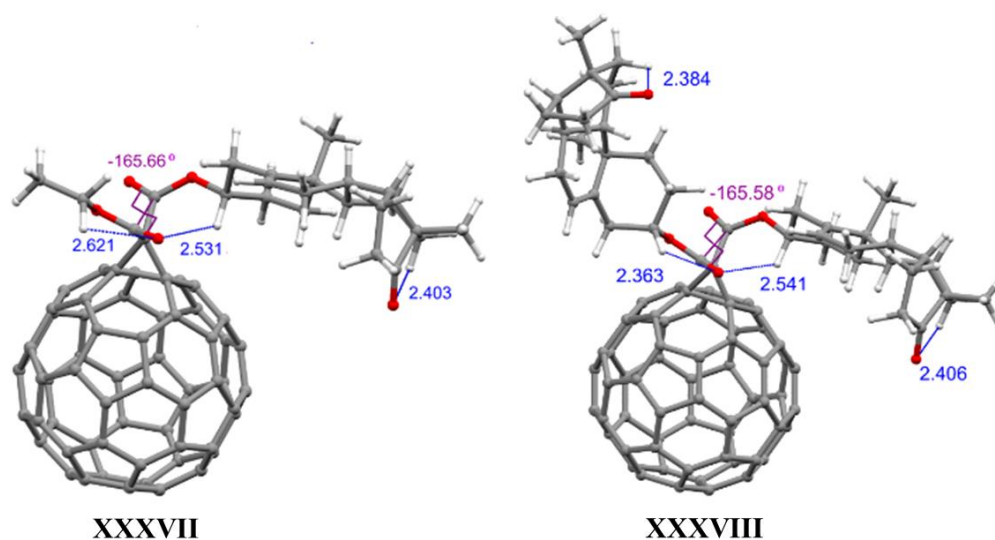
Estos resultados, evidencian que la presencia de un enlace de hidrógeno, en todos los casos, juega un papel importante en la geometría final de los fragmentos de etil-malonato, junto con la presencia o no de la molécula de fullereno, en acuerdo con estudios previos de búsqueda conformacional en sistemas similares descritos por nuestro grupo de investigación.<sup>[247]</sup>

Finalmente, para un cálculo energético más preciso, aunque computacionalmente más costoso, se utilizó el método DFT, a partir de las geometrías optimizadas previamente por AM1 y a nivel de teoría B3LYP-D3/6-31G+(d,p). En la Tabla II.3 se exponen los valores de energía potencial calculados, los que predicen una mayor estabilidad para el isómero **XL** respecto a **XLI**, con una diferencia energética cercana de 1.6 kcal/mol. Este resultado coincide con la regioselectividad observada para ambos productos, donde los rendimientos experimentales muestran una pequeña diferencia, 12 % y 11% para **XL** y **XLI** respectivamente. Por lo tanto, se puede inferir que la estabilidad termodinámica de los isómeros podría estar relacionada con los resultados experimentales observados.

**Tabla II.3.** Energías calculadas a nivel de teoría B3LYP-D3/6-31G+(d,p), partiendo de la geometrías optimizadas obtenidas con el Hamiltoniano AM1.

Compuesto	Energía total en Hartrees	$\Delta E$ en [kcal/mol]
<b>XL</b>	-4018.7503	0.00
<b>XLI</b>	-4018,7478	~ -1.6

En el caso de las estructuras de los híbridos esteroide-fullereno **XXXVII** y **XXXVIII**, fueron pre-calculadas utilizando el método semiempírico PM6, el cual provee buenos resultados para derivados fullerénicos.<sup>[254]</sup> Las geometrías pre-optimizadas fueron sometidas posteriormente a cálculos por método DFT, utilizando el funcional PBE (Perdew, Burke, y Ernzerhof) y nivel de teoría triple zeta 6-311G (d,p) como set de base, proporcionando las conformaciones de mínima energía presentadas en la Figura II.16.



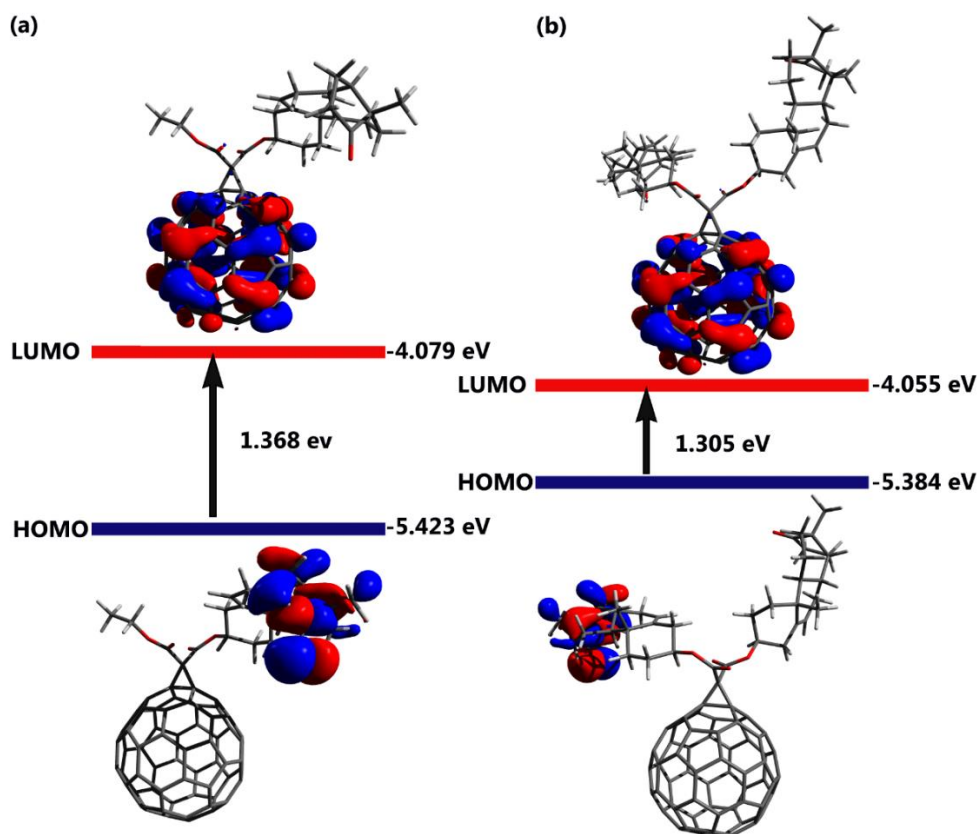
**Figura II.16.** Conformaciones de mínima energía de los híbridos **XXXVII** y **XXXVIII** obtenidas a nivel DFT-PBE/6-311G (d,p). Las distancias de enlaces son dadas en Å y los ángulos diedros en grados °.

Como se puede analizar de la figura, los cálculos predicen una tendencia a una conformación s-trans de los grupos carbonilos de los malonatos, con ángulos diedros O=C...C=O de  $-165.6^\circ$  y  $-165.5^\circ$  para **XXXVII** y **XXXVIII**, respectivamente, valores muy similares a los obtenidos para los conjugados **XXXIX** - **XLI** en los grupos malonatos funcionalizados al C<sub>60</sub>. De forma análoga a los resultados reflejados previamente para los esteroide-fullerenos derivados de la epiandrosterone, los enlaces de hidrógenos junto con la presencia o no de la jaula de C<sub>60</sub> son los factores que dictaminan la geometría final en este tipo de moléculas.

Por otra parte, dada la naturaleza electroceptora de estos cicloaductos, se calcularon las energías de los orbitales moleculares fronteras de las geometrías optimizadas de los compuestos **XXXVII** y **XXXVIII**, tomados como ejemplos representativos.

<sup>254</sup> Sikorska, C.; Puzyn, T. The performance of selected semi-empirical and DFT methods in studying C<sub>60</sub> fullerene derivatives. *Nanotechnology*, **2015**, 26, 455702.

En la Figura II.17 se puede apreciar, que los orbitales LUMO están exclusivamente posicionados sobre la jaula de fullereno, mientras que la densidad electrónica del HOMO se localiza sobre el anillo de ciclopentanona del fragmento esterooidal. Los valores de energía calculados de LUMO/HOMO son -4.079 eV/-5.423 eV para el conjugado **XXXVII** y -4.055 eV/-5.384 eV para el conjugado **XXXVIII**, respectivamente.

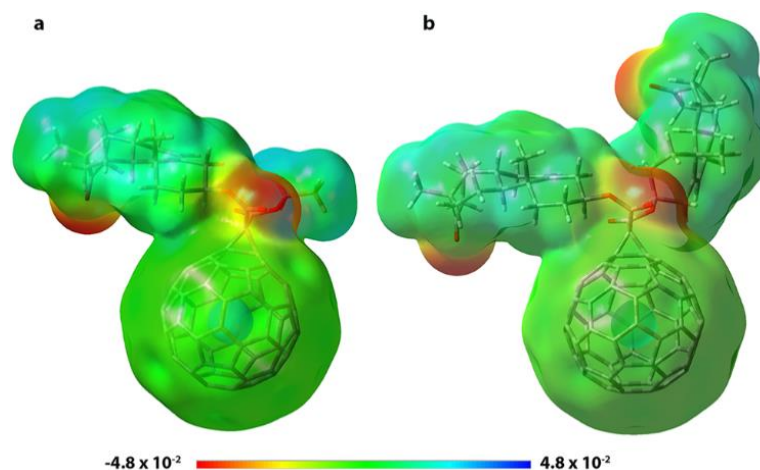


**Figura II.17.** Orbitales moleculares involucrados en la transición HOMO y LUMO en (a) compuesto **XXXVII** y (b) compuesto **XXXVIII**, calculados por DFT-PBE/6-311G (d,p) en fase gaseosa.

En orden de realizar una comparación con los valores teóricos calculados del LUMO ( $\sim -4.06$  eV para ambos productos), se determinaron los valores experimentales ( $-4.16$  eV para **XXXVII** y  $-4.14$  eV para **XXXVIII**), estimados por VC a partir de la fórmula  $[\text{LUMO} = -(E^{1/2}_{1/2, \text{red}} + 5.1)]$ ,<sup>[255]</sup> Como puede observarse los valores de energía calculados son muy cercanos, con una desviación de tan solo  $0.081$  y  $0.085$  eV para **XXXVII** y **XXXVIII**, respecto a los valores experimentales.

<sup>255</sup> Cardona, C.M.; Li, W.A.; Kaifer, E.; Stockdale, D.; Bazan, G.C. Electrochemical considerations for determining absolute frontier orbital energy levels of conjugated polymers for solar cell applications. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 2367–2371.

Por otra parte, con el objetivo de evaluar las interacciones electrostáticas intramoleculares se determinaron las densidades electrónicas superficiales para los híbridos **XXXVII** y **XXXVIII**. De esta forma se obtuvieron los mapas de potencial electrostático, los cuales se muestran en la Figura II.18. Así, obtener información sobre las interacciones electrostáticas permite predecir el comportamiento de los derivados de fullereno sintetizados en presencia de disolventes con diferentes polaridades, y con solutos de diferentes funcionalidades químicas.



**Figura II.18.** Representación de los mapas de potencial electrostático para las conformaciones más estables de los fullerenos funcionalizados (a) **XXXVII** y (b) **XXXVIII**.

Como se ilustra en la Figura II.18, la unión covalente del fragmento esteroidal sobre la estructura del fullereno induce un cambio en la distribución del potencial electrostático debido a una débil separación de carga. En este sentido, el potencial negativo representado por el color rojo, se asocia principalmente con los átomos de oxígeno pertenecientes a los grupos carbonilo, mientras que las regiones positivas marcadas por el color azul se localizan en el núcleo esteroidal. La mayoría de las regiones verdes no cargadas se distribuyen por ambos conjugados moleculares, lo que predice una mejora del carácter hidrófobo de estos compuestos, haciéndolos más solubles en disolventes poco polares. Por lo tanto, tal distribución electrostática podría ser beneficiosa para aumentar la lipofilidad de los híbridos **XXXVII** y **XXXVIII**, como lo indican los valores de  $\log P$  calculados de 11.96 y 22.34, respectivamente. Sin embargo, a pesar de la pequeña separación de carga, se predicen momentos dipolares de 5.84 D (**XXXVII**) y 6.23 D (**XXXVIII**). Considerando todos estos resultados, se espera que estas moléculas puedan penetrar a través de las membranas lipídicas y la barrera hematoencefálica (BBB por sus siglas en inglés), propiedades que poseen los esteroides precursores, pero no el fullereno aislado.

De esta forma, se establece una sinergia entre los fragmentos que componen el conjugado obtenido, lo que sería de suma importancia en la búsqueda de posibles aplicaciones biológicas.<sup>[256]</sup>

### Propiedades de agregación en agua.

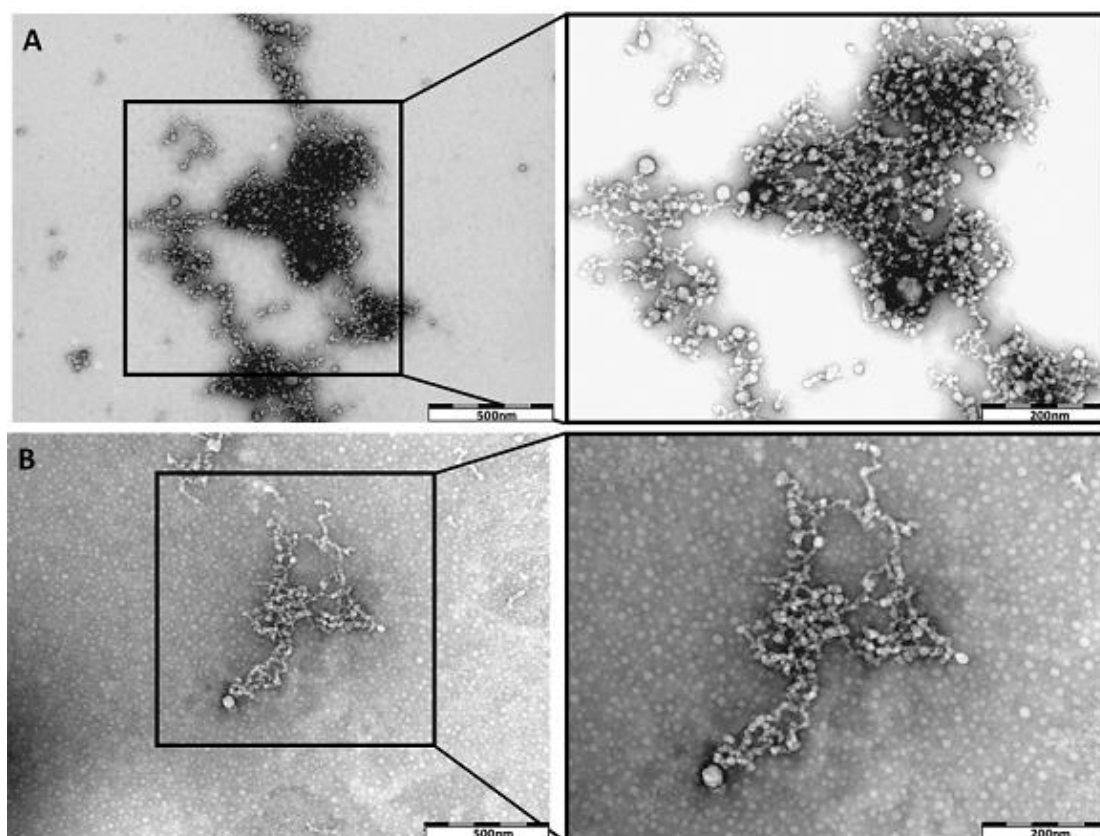
Estructuralmente, los compuestos sintetizados están formados por la unión covalente de un esteroide (compuesto hidrofóbico con sustituyentes hidrofílicos) y el C<sub>60</sub>. Más allá de la estructura química, la capacidad de las nanopartículas de carbono para auto-ensamblarse y formar agregados es una propiedad importante que podría afectar la actividad biológica. El tamaño de los derivados de C<sub>60</sub> es apropiado para su uso potencial en la administración de fármacos, donde las partículas pequeñas promueven una liberación más rápida del fármaco, a pesar de ser propensas estas partículas a agregarse.

Las interacciones no covalentes, como las fuerzas de van der Waals entre los esteroides y las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre las unidades de C<sub>60</sub> pueden determinar cómo ocurrirá el auto ensamblaje de estos conjugados. El balance apropiado entre estas fuerzas intermoleculares puede dar lugar a una amplia variedad de arquitecturas supramoleculares (tales como esferas, nanotubos, vesículas, nanoalambres y nanofibras), y de esta forma preparar el camino para el desarrollo de materiales supramoleculares blandos con variadas morfologías y funciones.<sup>[193]</sup>

Por esta razón, se estudian las propiedades de agregación en agua de los metanofullerenos **XXXVII** y **XXXVIII**, como muestra representativa, mediante una caracterización morfológica basada en TEM.

Primeramente, se preparan disoluciones de nanopartículas de cada muestra (10 mg en 10 ml de agua) por ultrasonicación durante 2 h, y posteriores procesos de centrifugación (10 min, 3000 rpm). La suspensión resultante es transferida a un frasco limpio y analizada por TEM, donde la visualización de los agregados se realiza por tinción negativa con acetato de uranilo. En la Figura II.19 se representan las imágenes obtenidas para las muestras de los metanofullerenos analizados.

<sup>256</sup> a) Wong-Ekkabut, J.; Baoukina, S.; Triampo, W.; Tang, I.M.; Tieleman, D.P.; Monticelli, L. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, 3, 363–368; b) Wong, C.W.; Zhilenkov, A.V.; Kraevaya, O.A.; Mischenko, D.W.; Troshin, P.A.; Hsu, S.H. Toward Understanding the Antitumor Effects of Water-Soluble Fullerene Derivatives on Lung Cancer Cells: Apoptosis or Autophagy Pathways. *J. Med. Chem.* **2019**, 62, 7111–7125.

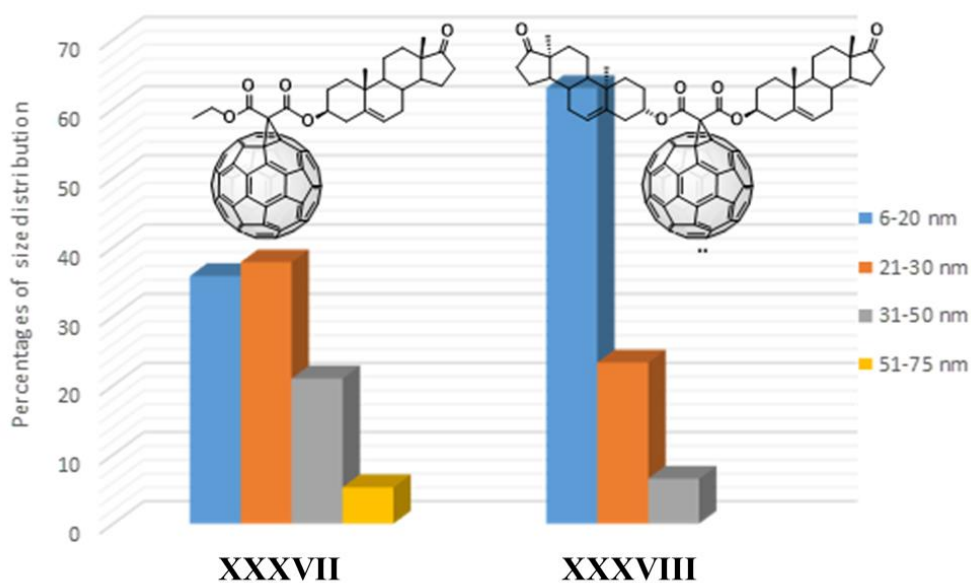


**Figura II.19.** Micrografías representativas de TEM de los metanofullerenos A) **XXXVII** y B) **XXXVIII**.

En general, los resultados indican que son sistemas polidispersos, fundamentalmente esféricos con ligeras características angulares. Con el fin de garantizar un análisis representativo de cada muestra, se observan en el microscopio varias áreas de las rejillas. Para las micrografías analizadas se encuentra una tendencia a formar nanopartículas. Ambos compuestos mostraron redes moleculares alargadas con diferentes tamaños entre 80 y 500 nm, que se detectaron con frecuencia para **XXXVII** y solo en un pequeño número de casos para **XXXVIII**. Además, para el compuesto **XXXVII**, solo se observaron algunas nanopartículas aisladas (Figura II.19 A). Por otro lado, el compuesto **XXXVIII** mostró una gran población de nanopartículas separadas, aparentemente en tamaños homogéneos (Figura II.19 B).

El auto ensamblado de los derivados esteroide- $C_{60}$  se debe a las interacciones no covalentes presentes, como son las fuerzas de van der Waals, los enlaces de hidrógeno, las interacciones hidrofílicas/hidrofóbicas, las interacciones  $\pi$ - $\pi$  y las dador-aceptor; promovido por el carácter anfifílico de estas estructuras. Comportamientos similares han sido descritos por nuestro grupo de investigación para conjugados del tipo androstano-fulleropirrolidina.<sup>[246]</sup>

Con objetivo de analizar la distribución en tamaño de los agregados en medio acuoso, se determinan los diámetros de 400 nanopartículas para cada muestra, a partir de las imágenes de micrografía y utilizando el software ImageJ. La Figura II.20 representa la distribución del tamaño de las nanopartículas. El híbrido **XXXVII** mostró una población altamente heterogénea, donde aquellas nanopartículas con rangos de tamaño entre 21-30 nm son las más frecuentes (37,8 %); seguido de cerca por nanopartículas de 6–20 nm de tamaño con un 35,8 %. Las nanopartículas con tamaños que oscilan entre 31-50 nm y 51-75 nm se representaron con porcentajes más bajos de 21% y 5,3 %, respectivamente. Por el contrario, el híbrido bis-esteroide-fullereno **XXXVIII** mostró una población más homogénea, donde un 63% de todas las nanopartículas medidas corresponden a un pequeño rango de 6-20 nm; un 23,3% corresponde a nanopartículas con tamaños de 21 a 30 nm, y un 6,5% a partículas de 31 a 50 nm de diámetro. No se observaron nanopartículas con diámetro superiores a 51 nm.



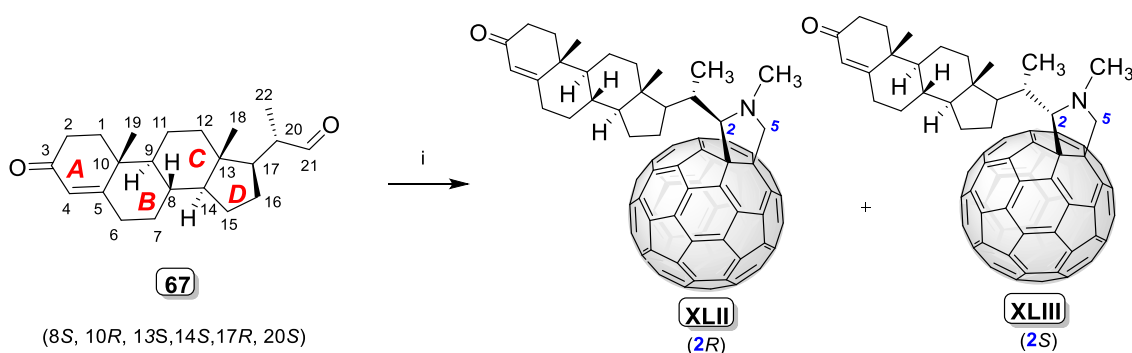
**Figura II.20.** Distribuciones de tamaño de 400 nanopartículas de los metanofullerenos **XXXVII** y **XXXVIII** adsorbidas sobre rejillas TEM.

Estos resultados indican, que la presencia de las dos unidades esteroideas en el conjugado **XXXVIII** parece inducir a las moléculas a auto ensamblarse en estructuras supramoleculares más organizadas, permitiendo un mejor control del tamaño de las nanopartículas, pero también minimizando la formación de conglomerados.

### II.2.4.2- Síntesis diastereoselectiva de fulleropirrolidinas esteroideas.

Para obtención de conjugados tipo esteroide-fulleropirrolidina, se empleó la reacción de Prato entre aldehídos esteroideas, aminoácidos y C<sub>60</sub>; metodología evaluada y descrita previamente por nuestro grupo de investigación. Para ello se utilizó un derivado de pregnenolona, que presenta un resto carbaldehído adjunto a la posición C17 del anillo D.

Los nuevos híbridos moleculares del tipo *N*-metil-2-pirrolidin[3',4':1,2][60]fullerenos fueron sintetizados a partir de iluros de azometino generados *in situ*, los que reaccionan en un proceso de cicloadición 1,3-dipolar con el C<sub>60</sub>, que actúa como dipolarófilo. El aldehído esteroideal enantiopuro (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*,20*S*)-3-oxo-4-pregnen-20-carboxaldehído (**67**), el C<sub>60</sub> y la sarcosina (*N*-metilglicina) se calientan a reflujo de tolueno bajo atmósfera inerte durante 5 horas (Esquema II.11). El cambio en la coloración de la disolución, de púrpura a marrón, durante el proceso indica la formación de los productos.

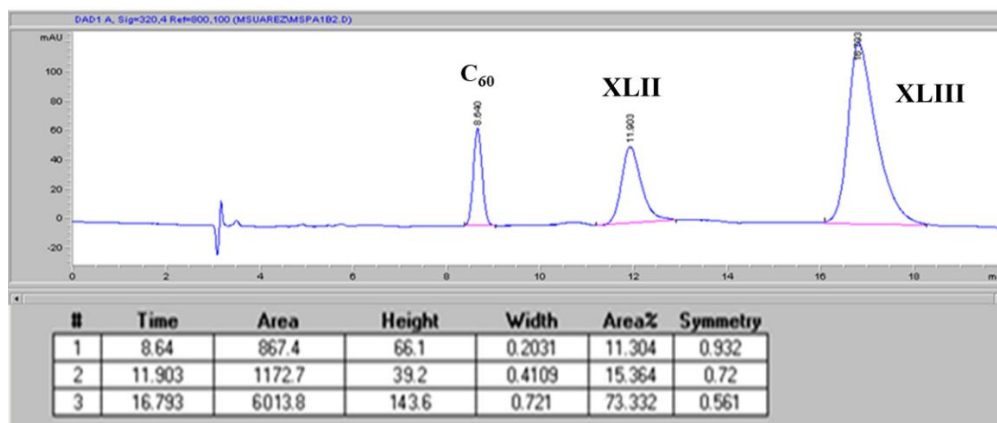


**Esquema II.11.** Síntesis de híbridos esteroide-fullereno por reacción de Prato. (i) C<sub>60</sub>, *N*-metilglicina, tolueno, reflujo bajo argón.

El análisis de la mezcla de reacción por HPLC (Figura II.21) muestra los picos de dos monoadductos que aparecen a los 11,9 y 16,8 min en una proporción de 15:73. En el cromatograma, se observa un pico adicional, correspondiente al C<sub>60</sub> de partida, a los 8,6 min.

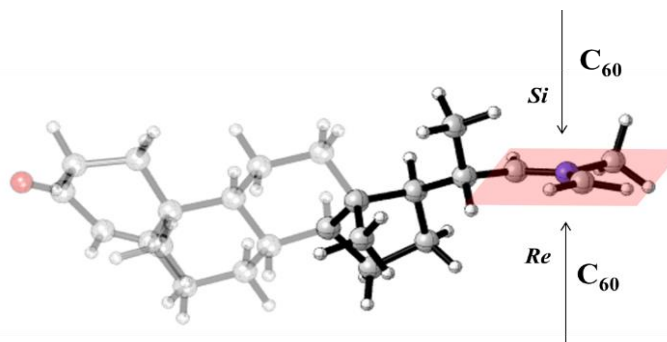
La formación del anillo de cinco miembros es una reacción estereoespecífica *syn*, que tiene lugar con la generación de un nuevo centro estereogénico en el C2 del anillo de pirrolidina. Dado que la configuración de los centros estereogénicos del esteroide no se ve afectada por la reacción, la cicloadición produce una mezcla diastereomérica de los compuestos **XLII** y **XLIII**. Se separaron ambos diastereoisómeros mediante cromatografía en columna flash, inicialmente con CS<sub>2</sub> para separar el C<sub>60</sub> que no reaccionó, y luego se

cambió el disolvente a tolueno. Los compuestos **XLII** y **XLIII** se obtienen como sólidos marrones estables con rendimientos del 68% y 13%, respectivamente.



**Figura II.21.** Cromatograma obtenido por HPLC para el crudo de reacción a las 5 horas, donde las señales **XLII** y **XLIII** son asignadas a los monoadductos.

La formación de los diastereoisómeros es estereoselectiva ( $de = 68\%$ ), siendo **XLII** el producto principal. Este resultado podría ser analizado si se considera un ataque electrófilo preferencial del [60]fullereno en la cara *Re* del 1,3-dipolo (Figura II.22), como se describe en trabajos anteriores.<sup>[121, 248]</sup> En este caso, probablemente la adición del  $C_{60}$  sobre la cara *Si* ocurre con interacciones estéricas causadas por la presencia del grupo metilo en C20. Por el contrario, un menor impedimento estérico en la adición por la cara *Re* explica la relación observada de 5: 1 (*Re*: *Si*).



**Figura II.22.** Ataque del  $C_{60}$  sobre ambas caras del iluro de azometino plano.

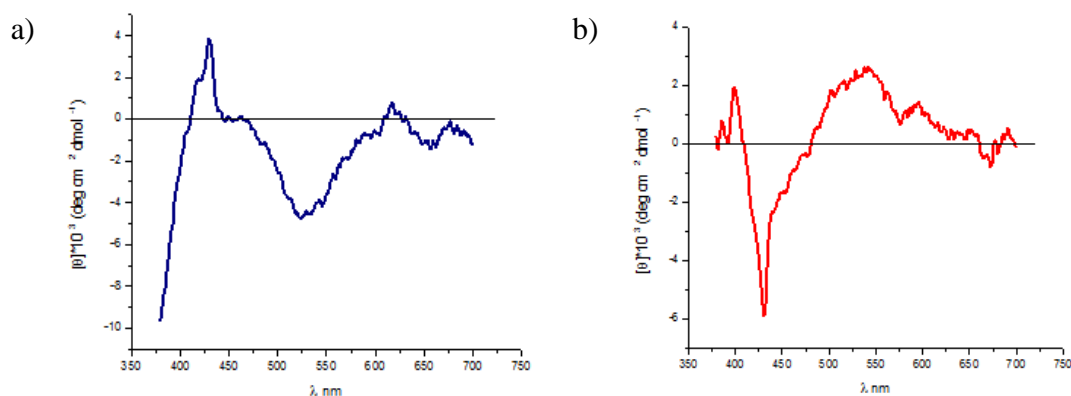
El exceso diastereomérico (relación 5:1) observado en esta reacción es mayor que cuando se lleva a cabo con aldehídos esteroides donde el grupo formilo está unido al anillo D en C16 (relación 3:1) o al anillo A en C2 (relación 2:1) considerando el mismo tiempo de reacción.<sup>[121]</sup> Esta observación apunta al efecto estérico causado por el grupo metilo conectado a la posición C20 del esteroide **67**, que está cerca del C2 proquiral (en 2,5 Å) y de C5 (en 3,3 Å). Los números 2 y 5 también se utilizan para numerar los centros

reactivos en el iluro de azometino. Estas distancias se extrajeron de geometrías optimizadas teóricamente.

Resaltar que, la presencia del fragmento esteroideal en estos derivados de C<sub>60</sub>, al igual que los esteroide-metanofullerenos, aumenta la solubilidad en disolventes orgánicos como cloroformo, diclorometano y dimetilformamida, entre otros. Este aspecto puede ser de especial relevancia para realizar investigaciones biológicas sobre estos materiales.

Las dos fulleropirrolidinas obtenidas fueron caracterizadas exhaustivamente mediante diferentes técnicas espectroscópicas (IR, RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, DEPT-135, HSQC, HMBC, COSY, NOE y ROESY) y espectrometría de masas, las que corroboraron las estructuras propuestas.

Para determinar la configuración absoluta del nuevo centro estereogénico creado en el C2 del anillo de pirrolidina en los híbridos obtenidos **XLII** y **XLIII**, fueron investigadas las propiedades quirópticas de estos derivados por Dicroísmo Circular (DC). Los espectros de DC registrado para ambos diastereomeros (Figura II.23) muestran, en cada uno, curvas de signo opuesto en la región de los 430 nm, que confirma la configuración opuesta en estos nuevos centros estereogénicos.



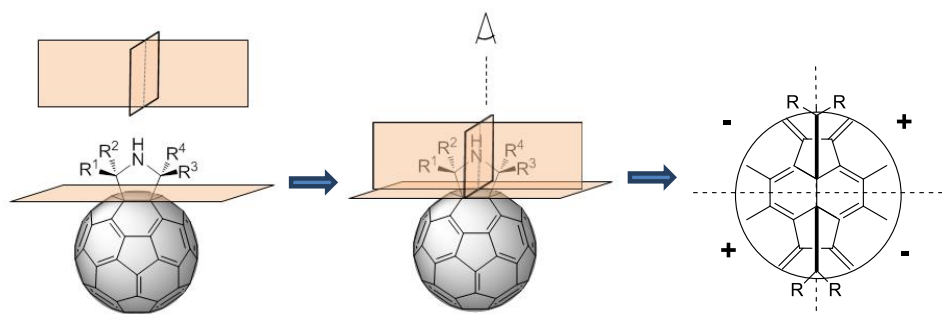
**Figura II.23.** Espectros de DC de a) compuesto **XLII** y b) compuesto **XLIII** en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (conc, 4 × 10<sup>-4</sup> M)

Para asignar la configuración absoluta de los nuevos carbonos estereogénicos, utilizamos la regla del sector desarrollada por Wilson y col.<sup>[257]</sup> propuesta para derivados de fullereno,<sup>[258]</sup> la cual relaciona el efecto Cotton asociado con la banda UV-Vis (430 nm) y los alrededores estereoquímicos en la unión [6,6]. Esta regla consiste en trazar un

<sup>257</sup> Wilson, S.R.; Lu, Q.; Cao, J.; Wu, Y.; Welch, C.J.; Schuster, D.I. Chiral non-racemic C<sub>60</sub> derivatives: A proposed sector rule for fullerene absolute configuration. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5131-5142.

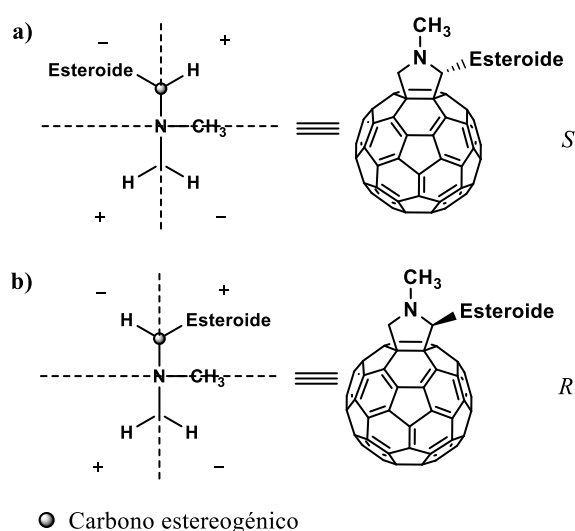
<sup>258</sup> Tan, X.; Schuster, D.I.; Wilson, S.R. Resolution and absolute configuration of a C<sub>2</sub>-symmetric *trans*-2,5-disubstituted fulleropyrrolidine. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4187-4190.

plano tangente a la esfera del  $C_{60}$  que contenga el enlace [6,6] donde se produce el ataque del intermediario 1,3-dipolar. Este plano es a su vez dividido en cuatro sectores por otros dos planos: uno que pasa por el enlace [6,6] y un segundo que lo bisecta, como se muestra en la Figura II.24. Debido a la simetría esférica del fullereno, la regla del sector puede ser fácilmente utilizada en los fullerenos monofuncionalizados.



**Figura II.24.** Regla del sector para derivados de  $C_{60}$ .

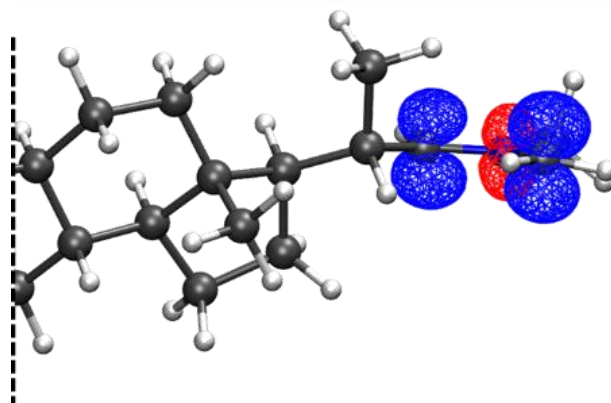
La pirrolidina **XLIII**, que muestra un efecto Cotton negativo a 430 nm (Figura II.23 b) indica que el fragmento esteroideal está en el sector superior izquierdo o inferior derecho, por lo que la configuración absoluta asignada al carbono estereogénico es *S*, aplicando las reglas de secuencia de Cram, Ingold y Prelog (Figura II.25a). Por otra parte, un efecto Cotton positivo para **XLII** (Figura II.23a) es consistente con la configuración que tiene el esteroide situado en el sector superior derecho, o en el inferior izquierdo (Figura II.25b). En este caso, la configuración del centro estereogénico puede ser designada como *R*.



**Figura II.25.** Configuración absoluta asignada al C2 para los compuestos a) **XLIII** y b) **XLII** empleando la regla del sector.

Para explicar la diferente proporción en que se obtienen los distereoisómeros se llevó a cabo un estudio teórico. Inicialmente es necesario abordar un análisis conformacional del 1,3-dipolo que da lugar a los correspondientes isómeros. Para ello se empleó una combinación de métodos semiempírico y DFT, estrategia con muy buenos resultados para sistemas similares.<sup>[247]</sup> De los posibles conformeros más estables de las geometrías *S-cis* y *S-trans* que puede adoptar este 1,3-dipolo, se determinó que la conformación *S-trans* es la más estable por 4,1 kcal/mol, siendo la disposición usada para todos los posteriores cálculos que involucren el dipolo.

Una vez realizado este estudio se procedió al análisis del carácter nucleofílico de los átomos de carbono reactivos del 1,3-dipolo, mediante el descriptor dual [ $\Delta f(\mathbf{r})$ ]. Esta herramienta ha demostrado ser útil para obtener información de la regioselectividad y estereoselectividad de las reacciones químicas, incluidas las cicloadiciones 1,3-dipolar.<sup>[259]</sup> En la Figura II.26 muestra los resultados del cálculo de  $\Delta f(\mathbf{r})$  para el conformero más estable del isómero *S-trans*. Como era de esperar, los centros proquirales C2 y C5 muestran un carácter nucleófilo (isosuperficies azules) haciéndolos propensos al ataque electrofílico del C<sub>60</sub>. Sin embargo, desde el punto de vista cualitativo, la orientación espacial del descriptor no muestra una cara prominentemente preferida para el ataque electrofílico. Solo se observa una ligera preferencia en C5 hacia la cara *Si*. Esto sugiere que el carácter nucleofílico de los átomos de carbono que reaccionan en el 1,3-dipolo no es la causa de la proporción diastereomérica experimental.

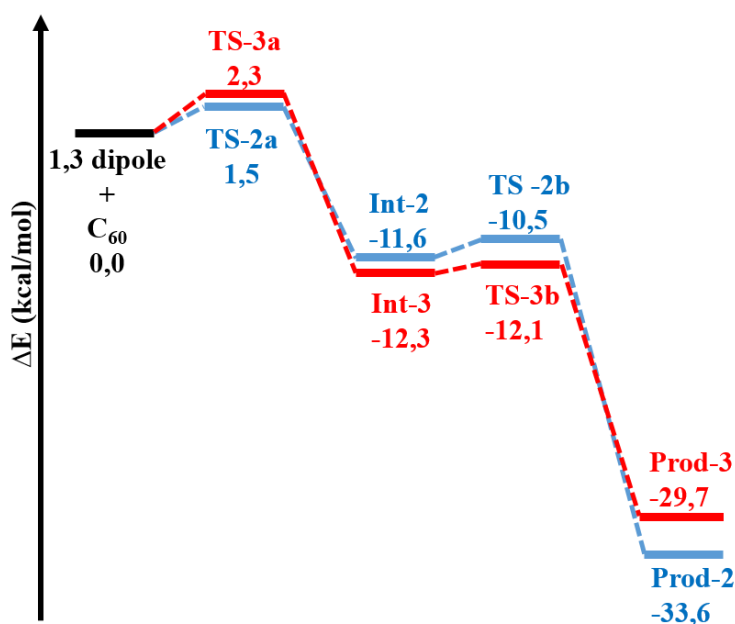


**Figura II.26.** Descriptor dual del 1,3-dipolo calculado a partir de densidades de espín a nivel teórico UB3LYP/6-31G(d). Regiones atómicas nucleofílicas ( $\Delta f(\mathbf{r}) < 0$ ) y electrofílicas ( $\Delta f(\mathbf{r}) > 0$ ) se muestran en azul y rojo, respectivamente.

<sup>259</sup> Martínez González, M.; Hernández-Castillo, D.; Montero-Cabrera, L.A.; Miranda-Quintana, R.A. Geometrical distortions and charge transfer in munchnöne regio-selectivity: A conceptual density functional study. *Int. J. Quantum Chem.* **2017**, *117*, e25444.

Posteriormente, se procedió a calcular el perfil de reacción mediante la localización de los posibles estados de transición (*TS* por sus siglas en inglés), implicados en la formación de los diastereoisómeros. Sin embargo, fue imposible localizar un estado de transición que condujera a una ruta concertada, lo que podría estar dado al considerar el alto impedimento estérico impuesto por el sustituyente metilo presente en C20 del 1,3-dipolo.

La Figura II.27 muestra un posible mecanismo en dos etapas, según los cálculos realizados. En ambos casos, el paso limitante de la velocidad es el primero, con energías de activación de 1.5 kcal/mol y 2.3 kcal/mol ( $\Delta\Delta E^\ddagger = 0.8$  kcal/mol) para la formación de **XLII** y **XLIII**, respectivamente. Este resultado conduce a una relación teórica de 76:24 (considerando una temperatura de reacción de 80 °C), que concuerda con los valores experimentales observados (68:13).



**Figura II.27.** Ruta de reacción calculada que conduce a la formación de **XLII** (línea azul) y **XLIII** (línea roja).

También, al analizar más de cerca al 1,3-dipolo en los primeros estados de transición, se observó una mayor distorsión en el TS-3a (**XLIII**) que en el TS-2a (**XLII**) con respecto a la conformación inicial del 1,3-dipolo aislado (ver Figura II.22); destacando el efecto estérico impuesto por el grupo metilo de C20 como la causa principal en la relación de productos obtenidas, como fue inicialmente analizado. Además, la formación de Prod-2 (**XLII**) se favorece termodinámicamente, al ser 3.9 kcal/mol más exotérmica que la ruta que conduce al Prod-3 (**XLIII**), como se ilustra en la Figura II.27.

Estos resultados son consistentes con el análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés) de ambos diastereoisómeros. En los termogramas se observa la mayor estabilidad de **XLII**. Mientras que **XLIII** presenta una primera pérdida de masa notable a 249 °C, el isómero **XLII** experimenta una descomposición más leve y tiene una masa remanente mayor, incluso a 600 °C.

Por otra parte, las predicciones computacionales de las estructuras de los diastereoisómeros están respaldadas por los resultados experimentales de los espectros NOE y NOESY. De las estructuras optimizadas, H2 está próximo de H5 (3.8 Å), H20' (2.3 Å [diastereómero **XLIII**] 2.5 Å [diastereómero **XLII**]), CH<sub>3</sub>-N (2.3 Å), H17' (2.9 Å [diastereómero **XLII**] y 3.1 Å [diastereómero **XLIII**]) y ambos H16' (2.2 Å). Por lo tanto, el protón de C2 del anillo de pirrolidina se irradió para ambos isómeros.

En la Figura II.28 se representan, a modo de ejemplo, los espectros ROESY de ambos diastereómeros. Para el compuesto **XLII**, los experimentos de NOE y NOESY muestran que el H2 asignado a  $\delta$  3.98 presentó acoplamiento dipolar con  $\delta$  4.12 (H5),  $\delta$  3.08 (H20'),  $\delta$  2.98 (CH<sub>3</sub>-N),  $\delta$  2.04 (H17'), y H16' ( $\delta$  2.38,  $\delta$  1.51). En el caso del compuesto **XLIII**, H2 ( $\delta$  3.87) tiene una proximidad espacial con  $\delta$  4.07 (H5),  $\delta$  2.82 (CH<sub>3</sub>-N),  $\delta$  2.63 (H17', H20') y H16' ( $\delta$  2.12,  $\delta$  1.73). Estos resultados son consistentes con las estructuras predichas

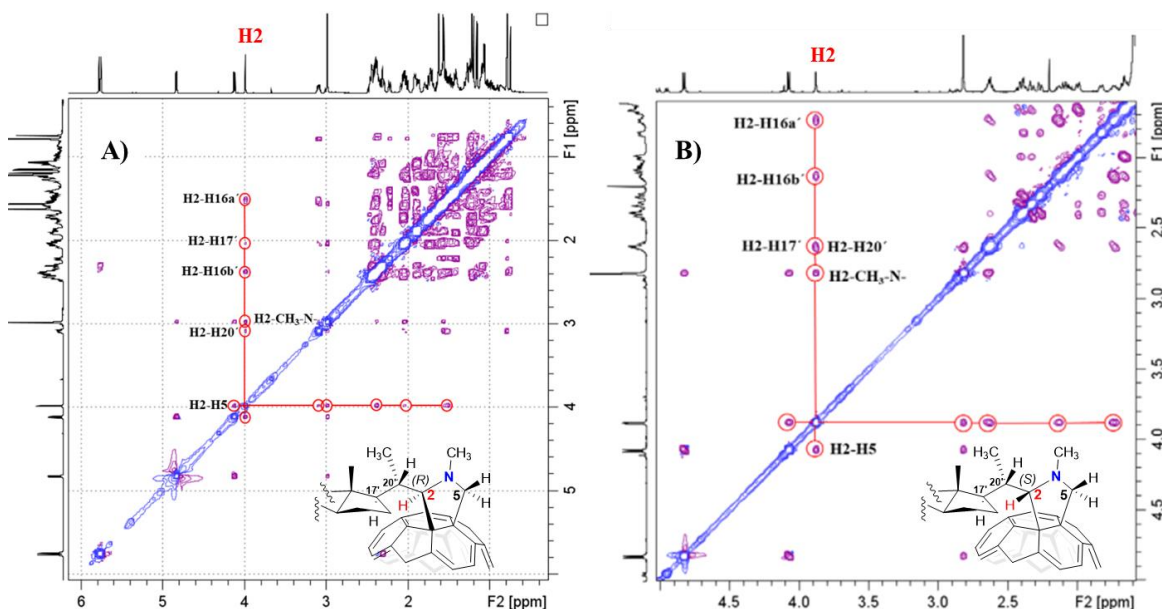


Figura II.28. Espectros ROESY de los diastereómeros A) **XLII** y B) **XLIII**.

### **II.2.4.3- Estudio de anclaje molecular de los conjugados esteroide-fullereno.**

Con el objetivo de determinar la potencial aplicación de los conjugados esteroide-C<sub>60</sub> en biomedicina, se realizó un estudio de Anclaje (o *Docking*) Molecular. Se seleccionaron los metano[60]fullereno **XXXVII** y **XXXVIII**, así como los diastereómeros de fulleropirrolidinas **XLII** y **XLIII**, y se evaluaron las energías y los modos de unión de estos ligandos a la proteasa del VIH-1 (receptor).

El primer paso del estudio implica la preparación de los ligandos y la proteína. Para la optimización de los ligandos se emplearon las estructuras de las conformaciones de menor energía obtenidas del análisis conformacional previo, mediante los métodos de cálculo DFT. La estructura 3D de la proteasa del VIH-1, resuelta por difracción de rayos-X, se extrae del Protein Data Bank (PDB), y se selecciona la ubicación y el tamaño de la caja de simulación para representar el centro activo de la proteína. El espacio de búsqueda se definió considerando el tamaño de los híbridos, y el centro de la caja de simulación se hizo coincidir con el centro del sitio activo de la enzima. Esta proteasa es una proteína homodimérica, formados por dos cadenas nombradas A y B. Presenta su sitio activo en la cavidad hidrofóbica de la enzima con un diámetro de 1 nm, y cuenta con residuos catalíticos como ASP25,25', THR26,26' y GLY27,27', los cuales no son afectados por mutaciones. La capacidad de permanecer sin variación los residuos catalíticos hacen de la proteasa del VIH-1 una adecuada diana para estudiar la inhibición viral.<sup>[260]</sup>

Una vez preparada la enzima y los ligandos se procede a la simulación del anclaje molecular rígido, utilizando el programa Autodock 4.2. Para predecir si los ligandos se unen a la enzima se analizan los valores de energía libre de unión (afinidad), expresada en kcal/mol, de los clústeres más representativos obtenidos para cada híbrido.

En el estudio realizado, la afinidad de los complejos ligando-enzima obtenidos resultó negativa en todos los clústeres, lo que indica que está favorecida la unión ligando-enzima. En la Tabla II.4 se muestran los resultados obtenidos del Anclaje Molecular para los híbridos **XXXVII**, **XXXVIII**, **XLII** y **XLIII**.

Como se puede analizar, cada uno de los conjugados poseen dos modos de unión representativos (clúster 1 y 2), con similar afinidad por la proteasa, aunque el patrón de interacción con el receptor es diferente (ver Figura II.29).

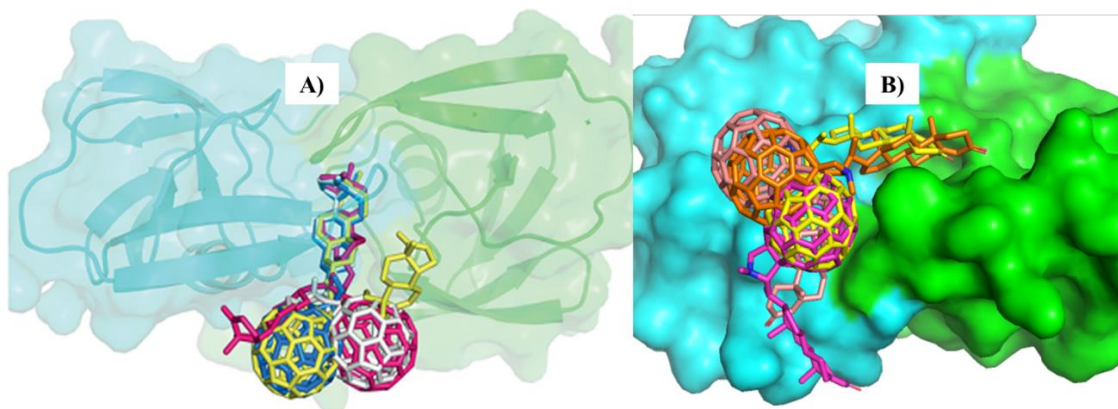
---

<sup>260</sup> Ibrahim, M.; Saleh, N.A.; Elshemey, W.M.; Elsayed, A.A. Fullerene Derivative as Anti-HIV Protease Inhibitor: Molecular Modeling and QSAR Approaches. *J. Med. Chem.* **2012**, 12, 447–451.

**Tabla II.4.** Valores de afinidad de los híbridos esteroide-fullereno con la proteasa del VIH-1

Compuesto	Clúster	Afinidad (kcal/mol)
<b>XXXVII</b>	1	-11.7
	2	-11.1
<b>XXXVIII</b>	1	-14.4
	2	-13.6
<b>XLII</b>	1	-5.96
	2	-5.95
<b>XLIII</b>	1	-6.49
	2	-5.64

El bis-esteroide-metanofullereno **XXXVIII**, muestra de toda la serie los valores de energía de unión más bajos, debido a la presencia de los dos fragmentos esteroídicos, que aumentan las interacciones de van der Waals en la cavidad hidrofóbica, como se supone por el alto valor de logP calculado. El núcleo de fullereno por su geometría esférica bloquea la entrada del sitio activo de la proteasa, y el esteroide interactúa con los residuos de la cavidad hidrófoba. En el caso de **XXXVIII**, solo una unidad de esteroide ocluye el sitio activo, la otra interactúa con los residuos superficiales. El fragmento de DHEA tiene conformaciones similares para todos los grupos de los híbridos tipo-Bingel, por lo que interactúa con residuos comunes (Figura II.29A). Las fulleropirrolidinas **XLII** y **XLIII**, interactúan también con algunos residuos expuestos en la superficie del receptor, donde la unidad de pregnano está orientada al sitio activo (Figura II.29B).



**Figura II.29.** Imagen superpuesta de los modos de unión obtenidos para los complejos A) metanofullereno-proteasa: **XXXVII**[1] (blanco), **XXXVII**[2] (azul), **XXXVIII**[1] (amarillo), **XXXVIII**[2] (rozado), y B) fulleropirrolidina-proteasa: **XLII**[1] (anaranjado), **XLII**[2] (rozado), **XLIII**[1] (amarillo), **XLIII**[2] (magenta). Las superficies de las cadenas A y B del receptor se representan en verde y cian, respectivamente. Los ligandos se representan en bastones.

Para particularizar como interactúan los ligandos con la proteasa, en la Tabla II.5 se presentan las principales interacciones de los modos de unión analizados anteriormente.

El anclaje molecular muestra que los residuos ARG8, GLY49, ILE50, ILE84, ASP25', MET46', GLY48', GLY49', ILE50' y PHE53' son los principales aminoácidos que interactúan con los metanofullerenos **XXXVII** y **XXXVIII**. Estas interacciones han demostrado ser claves para la inhibición de la actividad de la proteasa del VIH-1, tanto por experimentos *in-silico* e *in-vitro*.<sup>[261]</sup> En el caso de los híbridos **XLII** y **XLIII**, los contactos más frecuentes con la cadena A son PHE53, GLY51, GLY52 e ILE50, mientras con la cadena B las interacciones principales son con PRO79', THR80' y PRO81'. Otras interacciones complementarias se relacionan en la Tabla II.5.

**Tabla II.5.** Interacciones principales de los híbridos con la proteasa del VIH-1.

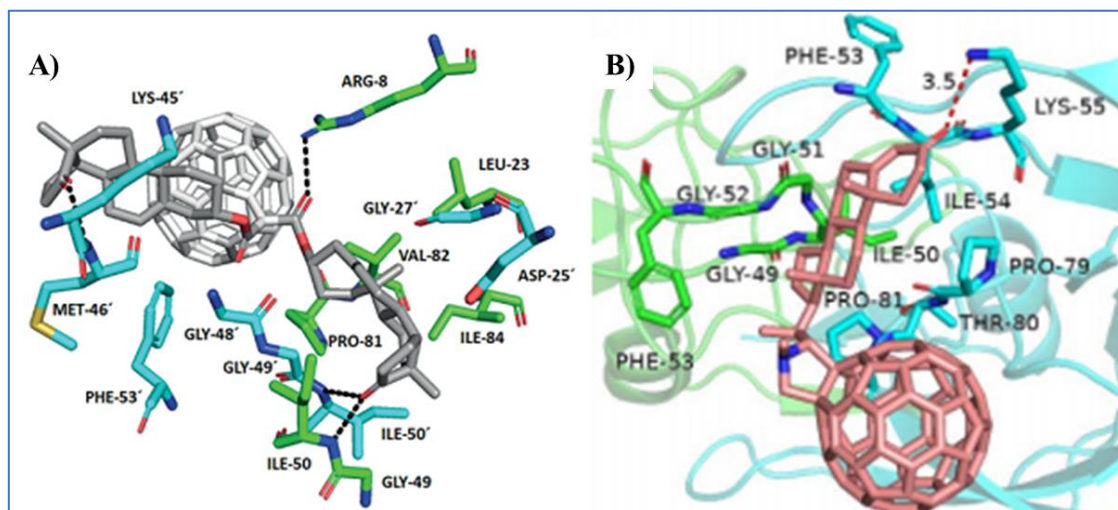
Compuesto	Clúster	Residuos que interactúan ( $a < 4\text{Å}$ ) <sup>[a]</sup>	
		Cadena A	Cadena B
<b>XXXVII</b>	1	<b>ARG8</b> , GLY27, GLY49, <b>ILE50</b> , ILE84.	ASP25', GLY27', ALA28', ASP29', ASP30', MET46', ILE47', <b>GLY48'</b> , GLY49', <b>ILE50'</b> , PHE53'.
	2	<b>ARG8</b> , GLY49, <b>ILE50</b> , LEU53, VAL82, ILE84.	ASP25', ALA28', LYS45', MET46', <b>GLY48'</b> , GLY49', <b>ILE50'</b> , PHE53'.
<b>XXXVIII</b>	1	<b>ARG8</b> , LUE23, LYS45, GLY49, <b>ILE50</b> , PRO81, VAL82, ILE84.	<b>ASP25'</b> , GLY27', MET46', GLY48', GLY49', <b>ILE50'</b> , PHE53'
	2	<b>ARG8</b> , LUE23, GLY49, <b>ILE50</b> , PRO81, VAL82, ILE84.	ASP25', GLY27', LYS45', <b>MET46'</b> , GLY48', GLY49', <b>ILE50'</b> , PHE53'.
<b>XLII</b>	1	GLY49, ILE50, GLY51, GLY52, PHE53.	ILE54', <b>LYS55'</b> , PRO79', THR80', PRO81'.
	2	MET46, ILE47, GLY48, PHE53.	PRO79', THR80', PRO81'.
<b>XLIII</b>	1	ILE47, GLY48, GLY49, ILE50, GLY51, GLY52, PHE53.	ARG8', PRO81', PRO79'.
	2	ILE50, GLY51, GLY52, PHE53.	MET46', PHE53', LYS55', PRO79', PRO81'.

<sup>[a]</sup> Los residuos que establecen enlaces de hidrógeno se resaltan en negro.

<sup>261</sup> Ghosh, A.K.; Rao, K.V.; Nyalapatla, P.R.; Osswald, H.L.; Martyr, C.D.; Aoki, M.; Hayashi, H.; Agniswamy, J.; Wang, Y.F.; Bulut, H.; Das, D.; Weber, I.T.; Mitsuya, H. Design and Development of Highly Potent HIV-1 Protease Inhibitors with a Crown-Like Oxotricyclic Core as the P2-Ligand To Combat Multidrug-Resistant HIV Variants. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, 60, 4267–4278.

Como se puede apreciar, los conjugados tipo Bingel **XXXVII** y **XXXVIII**, interaccionan con un mayor número de residuos de la enzima, a diferencia de los diastereómeros **XLII** y **XLIII**. Este hecho podría explicar las diferencias encontradas en las energías de unión para ambos tipos de compuestos, donde una mayor cantidad de contactos favorece la estabilidad de los complejos metanofullereno-proteasa, siendo estos los de mayor afinidad. Entre las interacciones encontramos la que establece los ligandos **XXXVII** y **XXXVIII** con la ASP25', residuo catalítico clave reportado para esta aspartil-proteasa.<sup>[261]</sup> Además, en estos complejos se observó una mayor cantidad de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilos presentes en los ligandos con algunos aminoácidos de la cavidad (ver Figura II.30 A). Resultados similares encontraron Ahmed y col.<sup>[262]</sup> en la evaluación de diferentes derivados de fullereno, donde describen la formación de enlaces-H entre la proteasa del VIH-1 y grupos carbonilo de los ligandos.

Por el contrario, para los complejos fulleropirrolidina-proteasa solo se observó un enlace-H, interacción que se establece entre la LYS55' y el grupo carbonilo de C3 en el clúster **XLII**[1] (Figura II.30 B). Sin embargo, aunque en menor medida, en algunos clústeres de esta serie, se observan contactos con GLY48, GLY49 y ILE50, los que constituyen residuos necesarios para la inhibición, según describen algunos autores.<sup>[263]</sup>



**Figura II.30.** Estructura de los clústeres: A) **XXXVIII**[2] y B) **XLII**[1]. Los residuos interactuantes son representados en bastones verdes o cian, y los enlaces-H con líneas discontinuas.

<sup>262</sup> Ahmed, L.; Rasulev, B.; Turabekova, M.; Leszczynska, D.; Leszczynski, J. Receptor- and ligand-based study of fullerene analogues: comprehensive computational approach including quantum-chemical, QSAR and molecular docking simulations. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 5798–5808.

<sup>263</sup> Barzegar, A.; Naghizadeh, E.; Zakariazadeh, M.; Azamat, J. Molecular Dynamics Simulation Study of the HIV-1 Protease Inhibitor Using Fullerene and New Fullerene Derivatives of Carbon Nanostructures. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2017**, 17, 633–647.

Por último, también se detectaron en todos los clúster contactos entre el grupo fenilo de la PHE53 con la jaula de fullereno, a través de interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  y en forma de T, las que contribuyen a la estabilidad de los complejos con derivados fullerénicos.<sup>[263]</sup>

Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos predecir que ambos grupos de híbridos esteroide-fullereno pueden ser empleados como potenciales inhibidores de la proteasa del VIH-1, siendo más prometedores los conjugados metanofullerenos **XXXVII** y **XXXVIII**.



## **II.3. CONCLUSIONES**



De los resultados alcanzados en la consecución de los objetivos planteados en la segunda parte de esta Memoria, se concluye lo siguiente:

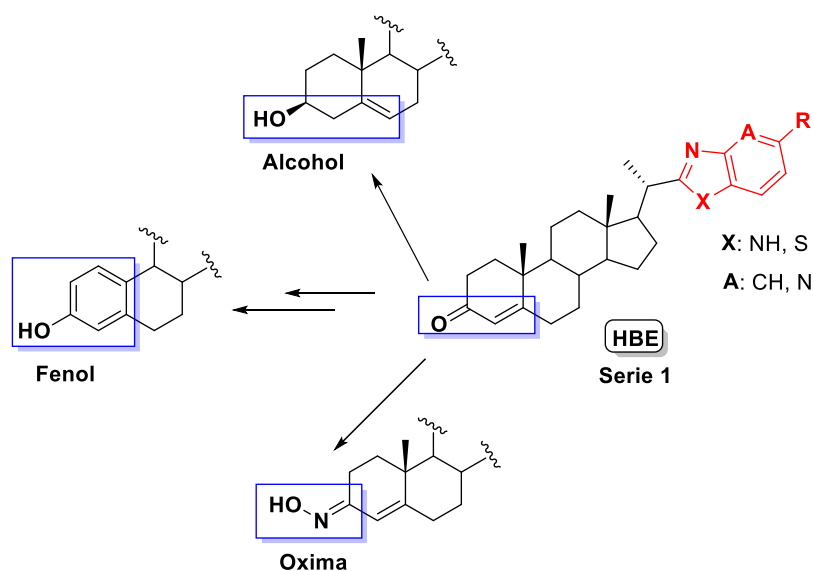
1. Se obtuvieron cinco nuevos esteroides malonil-sustituídos **XXX - XXXIV** con rendimientos 72 – 82 %, mediante reacción de varios esteroides con cloruros de ácidos, y son caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y espectrometría de masas.
2. Se sintetizaron cuatro híbridos esteroide-metano[60]fullereno (**XXXV – XXXVIII**) a través de la ciclopropanación de Bingel-Hirsch. Estos compuestos son aislados como sólidos amorfos estables y con buenos rendimientos, los que son debidamente caracterizados por RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C y espectrometría de masas.
3. Se obtuvo el híbrido esteroide-fullereno tipo mancuerna **XXXIX** como producto principal en la reacción del derivado androstánico dimalonil-sustituído **XXXII** bajo las condiciones de ciclopropanación del [60]fullereno. En el transcurso de la síntesis son aislados y caracterizados los cicloaductos **XL** y **XLI**, que se corresponden con los productos de adición al C<sub>60</sub> por el grupo malonato presente en el anillo A o en el anillo D del esteroide, respectivamente.
4. Se obtuvieron dos conjugados tipo *N*-metil-pregnenpirrolidin[3',4':1,2][60]fullereno como parejas de diastereoisómeros **XLII** y **XLIII** mediante la reacción de Prato, con rendimientos de 68 % y 13 %, respectivamente. Se determinó que la formación de estos cicloaductos procede con preferencia por la cara *Re* del 1,3-dipolo generado, como predicen los cálculos teóricos.
5. Se determinó que el fragmento esteroide de los metanofullerenos sintetizados no influyen de manera significativa sobre las propiedades electroquímicas de la molécula de fullereno conjugada. De todos los cicloaductos de Bingel el híbrido tipo mancuerna **XXXIX** presenta las mejores habilidades electroceptoras, mientras el derivado bis-esteroide **XXXVIII** una mayor resistencia a la reducción.
6. Se estudiaron las propiedades de agregación en agua de los metanofullerenos **XXXVII** y **XXXVIII**. La caracterización morfológica mostró que son sistemas polidispersos y que forman vesículas esféricas de tamaño nanométrico. Se observó una distribución de tamaño más homogénea para el derivado con dos unidades esteroidales y una tendencia a auto-ensamblarse en estructuras supramoleculares más organizadas.

7. Se realizó la determinación de parámetros estructurales y electrónicos de las conformaciones más estables de los cicloaductos esteroide-fullereno tipo Bingel, mediante cálculos teóricos. Los resultados obtenidos permitieron respaldar los datos experimentales.
8. Se predice que los metanofullerenos **XXXVII** y **XXXVIII** son los más prometedores como potenciales inhibidores de la proteasa de VIH-1, respecto al resto de conjugados esteroide-C<sub>60</sub> evaluados mediante la herramienta de Anclaje Molecular.

## **PERSPECTIVAS**

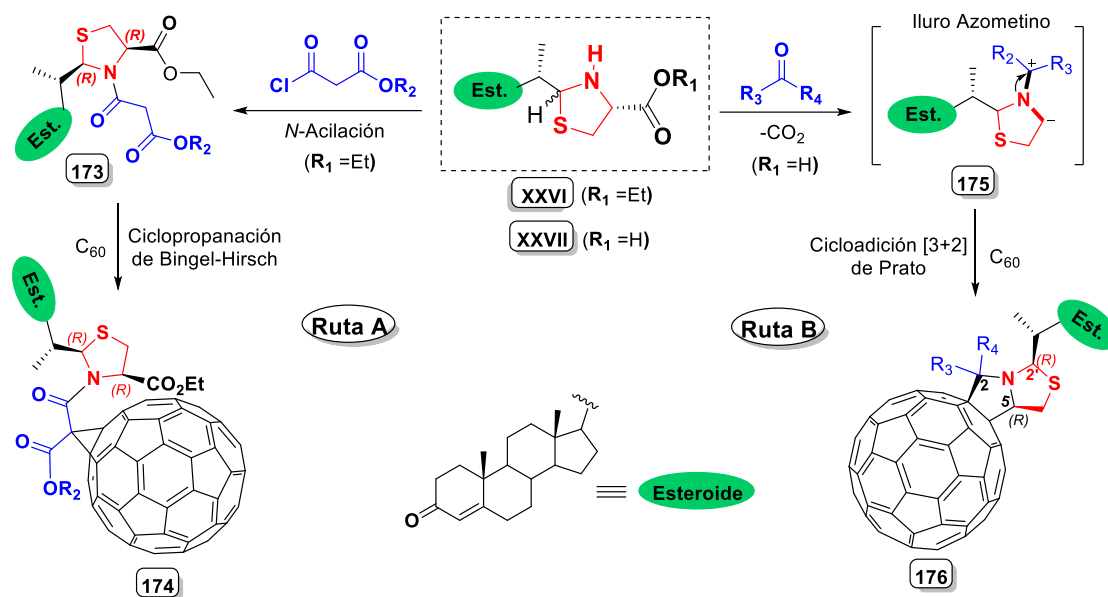


- 1- Completar los ensayos biológicos de inhibición de la enzimas CYP17A1 y CYP21A2 para los híbridos benzazol-esteroide HBE (Serie 1), y correlacionar los resultados con la predicción de los estudios computacionales. Sobre la base de esos resultados se propone realizar modificaciones estructurales en el esqueleto esteroideal (Esquema 2), que podrían dar lugar a derivados con una actividad inhibitoria mejorada.



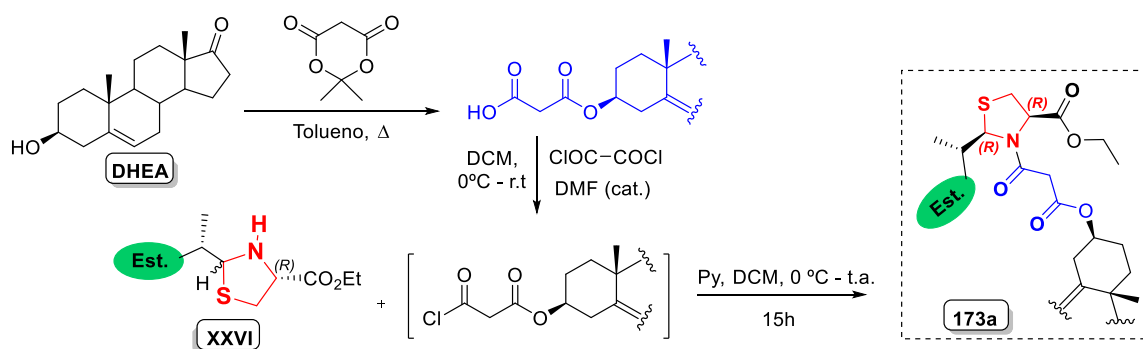
**Esquema 2.** Rutas de síntesis alternativa para nuevos derivados de HBE (Serie 1)

- 2- Teniendo en cuenta los excelentes resultados de resolución diastereomérica a partir de las reacciones de *N*-acilación y cicloadición a que se someten las tiazolinias esteroidales **XXVI** y **XXVI**; y con el objetivo de obtener derivados fullerénicos quirales para su potencial aplicación en sistemas biológicos, se propone dos estrategias de síntesis para vincular la química de los dos sistemas (ver Esquema 3). La Ruta A involucraría la reacción de cloruros de ácido con la tiazolidina **XXVI** ( $R_1 = Et$ ) para producir *N*-malonil-tiazolidinas **173**, que posteriormente se harían reaccionar bajo las condiciones de la ciclopropanación de Bingel-Hirsch, generando nuevos derivados metano[60]fullerenos quirales **174**. En el caso de la Ruta B se emplearía el protocolo de Prato para formar iluros de azometino **175** *in situ* por reacción de la tiazolidina **XXVII** ( $R_1 = H$ ) con compuestos carbonílicos. La posterior cicloadición del  $C_{60}$  produciría híbridos tipo esteroide fullero-tiazolopirrolidinas **176**.



**Esquema 3.** Nuevas rutas para la síntesis de futuros derivados fullerénicos quirales.

Como parte del desarrollo de la Ruta A, se ha obtenido de forma preliminar el malonato **173a**, el cual presenta en su estructura dos fragmentos esteroidales. Para su síntesis se utilizó una ruta representada en el Esquema 4. Este se obtiene con un 38 % de rendimiento y fue caracterizado por RMN y espectrometría de masas (no incluidos en la discusión de esta Memoria). Los experimentos NOESY indicaron que corresponde al diastereómero [2*R*, 4*R*], resultado que está en correspondencia a lo observado para la *N*-benzoil-tiazolidina **XXVIII**.



**Esquema 4.** Síntesis diastereoselectiva del malonato bis-esteroide-tiazolidina **173a**.

## **ANEXOS**



Los Anexos se encuentran en formato electrónico y aparecen divididos de la siguiente forma:

**Anexo 1:** Espectros representativos de híbridos benzazol-esteroide (Serie 1).

**Anexo 2:** Espectros representativos de la imina intermediaria (II).

**Anexo 3:** Resultados del análisis *in silico* (Docking y Dinámica Moleculares).

**Anexo 4:** Espectros representativos de los  $\beta$ -cloro enaldehydos esteroidales.

**Anexo 5:** Espectros representativos de híbridos heterociclo-esteroide (Serie 2).

**Anexo 6:** Espectros representativos de híbridos heterociclo-esteroide (Serie 3 y 4).

**Anexo 7:** Espectros representativos de híbridos heterociclo-esteroide (Serie 5).

**Anexo 8:** Ensayos de actividad antiproliferativa de respuesta a una dosis.

**Anexo 9:** Datos y parámetros cristalográficos obtenidos por DRX.

Acceso:

<https://drive.google.com/drive/folders/12DijGFdZqbxTaUaxgDGP46NFfqIYpXHj?usp=sharing>

