



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Posgrado en Ciencias Químicas

**Síntesis y evaluación antiproliferativa de novedosas 1,4-diazinas
esteroidales.**

**Tesis para obtener el título de
Maestría en Ciencias Químicas**

Presenta

Stefany Blanco Rojas

Directores

Dra. Sara Montiel Smith

Dra. Penélope Merino Montiel

Noviembre 2019

El presente trabajo se encuentra conformado por dos capítulos, la síntesis orgánica que se presenta en el primer capítulo se realizó en el laboratorio de Síntesis y Modificación de Productos Naturales de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección de la Dra. Sara Montiel Smith y la Dra. Penélope Merino Montiel. El segundo capítulo, así como las pruebas biológicas y de *Docking Molecular* que complementan el primero, se llevaron a cabo en el Instituto de Bio-Orgánica “Antonio González” (IUBO) perteneciente a la Universidad de la Laguna, Tenerife, España; bajo la dirección del Dr. José Manuel Padrón Carrillo y el apoyo del Dr. Miguel Xavier Fernandes.

Los resultados obtenidos en este proyecto de tesis fueron presentados en el siguiente congreso:

✚ XV Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (AMIPRONAT). San Luis Potosí, mayo 2019.

Póster: “Síntesis de novedosas 1,4-Diazinas esteroidales”

Agradecimientos

A mis directoras de tesis, Dra. Sara Montiel Smith y Dra. Penélope Merino Montiel por su guía y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

A todos los miembros de la comisión revisora, por su dedicación y valiosas contribuciones al escrito de esta tesis.

CONACYT por la beca otorgada.



Beca mixta 2018 por el apoyo para realizar una estancia en la Universidad de La Laguna, Tenerife.



Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado BUAP.



Laboratorio Nacional de Supercómputo del Sureste de México y Laboratorio de Física teórica.



Índice

Siglas y abreviaturas	1
Capítulo 1	3
1. Resumen	4
2. Introducción	7
3. Antecedentes	10
3.1. Formación del núcleo 1,4-diazina	15
3.1.1 Síntesis de Staedel-Rugheimer	15
3.1.2 Síntesis de Gutknecht	15
3.1.3 Tratamiento térmico de aminoácidos y compuestos amino-hidroxicos (aminoalcoholes)	15
3.1.4 Síntesis por etapas de pirazinas espiránicas	16
3.1.4.1 Síntesis de Strecker	16
3.1.4.2 Síntesis "one-pot" multicomponente	17
4 Objetivos	18
5 Discusión de resultados	19
5.1 Ruta sintética A	19
5.1.1 (17 <i>S</i>)-3β-hidroxiestero[5α-androstan-17,3'-dihidroquinoxalin]-2'(3H)-amina. (3)	21
5.1.2 (17 <i>S</i>)-3β-hidroxiestero[5α-androst-5-en-17,3'-dihidroquinoxalin]-2'(3H)- amina. (3a)	24
5.2 Ruta sintética B	30
5.2.1 Primera etapa	30
5.2.1.1 17α-ciano-17β-fenilamino-5α-androstan-3β-ol. (5)	31
5.2.1.2 17α-ciano-17β-fenilamino-5α-androst-5-en-3β-ol. (5a)	34
5.2.2 Segunda etapa	39
5.2.2.1 3β-hidroxi-17β-fenilamino-5α-androstan-17α-carboxamida. (6)	40
5.2.2.2 3β-hidroxi-17β-fenilamino-5α-androst-5-en-17α-carboxamida. (6a)	44
5.2.3 Tercera etapa	44
5.3 Ruta sintética C	45
5.3.1 Primera etapa	45
5.3.1.1 17α-ciano-17β-fenilamino-5α-androstan-3β-ol. (5)	45
5.3.2 Segunda etapa	45

5.3.2. 17(<i>S</i>)-5'-amino-1'-fenil-3 β -hidroxiespiro[5 α -androstan-17,6'-dihidropirazin]-2'(1 <i>H</i>)-ona. (8).....	45
5.4 Actividad biológica.....	49
5.4.1 Método de evaluación antiproliferativa.....	50
5.4.2 Resultados de evaluación antiproliferativa.....	50
5.5 Docking molecular.....	51
5.5.1 Método.....	51
6. Conclusiones.....	56
7. Metodología.....	57
8. Parte experimental.....	59
9. Referencias.....	66
Capítulo 2.....	69
1. Resumen.....	70
2. Introducción.....	72
3. Antecedentes.....	74
4. Obejtivos.....	80
5. Discusión de resultados.....	81
5.1 Obtención de <i>N,N</i> -dibencil- <i>L</i> -fenilalaninato de bencilo (1).....	81
5.2 Obtención de (<i>S</i>)-2- <i>N,N</i> -(dibencilamino)-3-fenilpropan-1-ol (2).....	83
5.3 Obtención de (<i>S</i>)-2- <i>N,N</i> -(dibencilamino)-3-fenilpropanal (3).....	86
5.3.1 Oxidación con clorocromato de piridinio (PCC).....	86
5.3.2 Oxidación de Swern.....	87
5.3.3 Oxidación de Parikh-Doering.....	88
5.4 Obtención de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2- <i>N,N</i> -(dibencilamino)-1-fenildodecan-3-ol (4).....	90
5.5 Obtención de (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-2-amino-1-fenildodecan-3-ol.....	96
6. Conclusiones.....	97
7. Metodología.....	98
8. Parte experimental.....	99
9. Referencias.....	104

Siglas y abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
TCA	Ácido tricloroacético
BnBr	Bromuro de bencilo
Cbz	Carbobenciloxilo
CCR	Carcinoma de células renales
CK1	Caseína quinasa 1
CK2	Caseína quinasa 2
TMSCN	Cianuro de trimetilsilano
PCC	Clorocromato de piridinio
GI ₅₀	Concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
DO	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DCM	Diclorometano
ΔG	Energía libre de Gibbs
FDA	Food and drug administration
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
IR	Infrarrojo
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
NP's	Nanopartículas
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
APIs	Principios activos farmacéuticos
FPP	Producto farmacéutico terminado
RMN	Resonancia magnética nuclear
SRB	Sulforodamina B
t.a	Temperatura ambiente
Boc	Tert-butiloxicarbonilo
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
PPTS	<i>p</i> -toluensulfonato de piridinio
TEA	Trietilamina
BF ₃ ·EtO ₂	Trifluoruro de boro eterato

Capítulo I

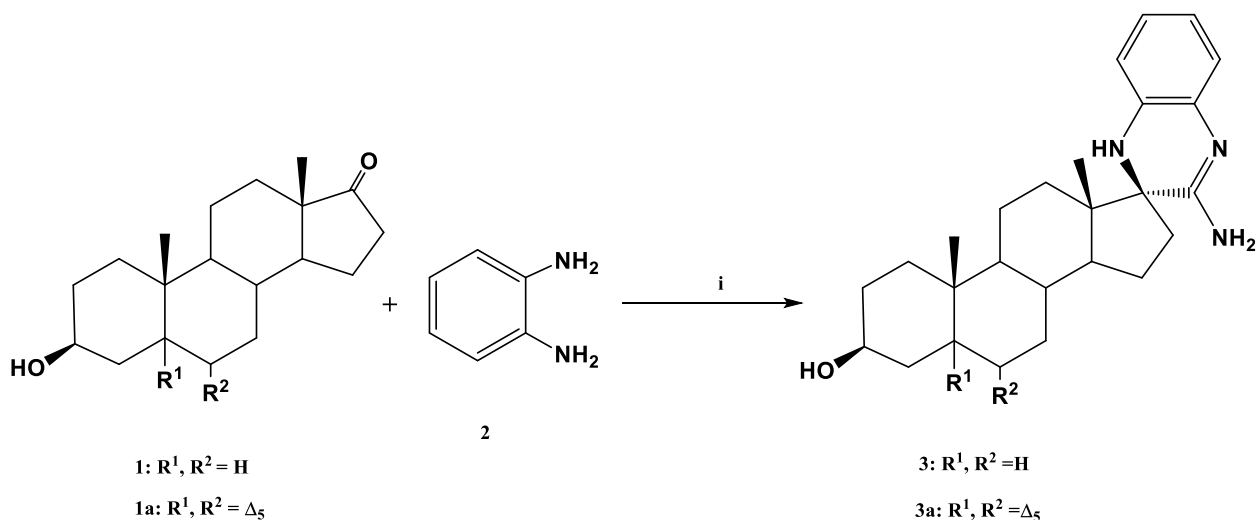


1. Resumen

Se plantearon tres diferentes metodologías para la obtención de derivados espiránicos esteroidales que contienen el núcleo 1,4-diazina.

Ruta Sintética A

Se obtuvieron los espirociclos **3** y **3a** mediante una reacción “one-pot” de tres componentes, a partir de *trans*-Androsterona **1** y *trans*-Dehidroandrosterona **1a** como materia prima, *o*-fenilendiamina **2** e isocianuro de *tert*-butilo como fuente de grupo isocianato. Esta reacción se llevó a cabo con una catálisis ácida con $\text{BF}_3 \cdot \text{EtO}_2$.



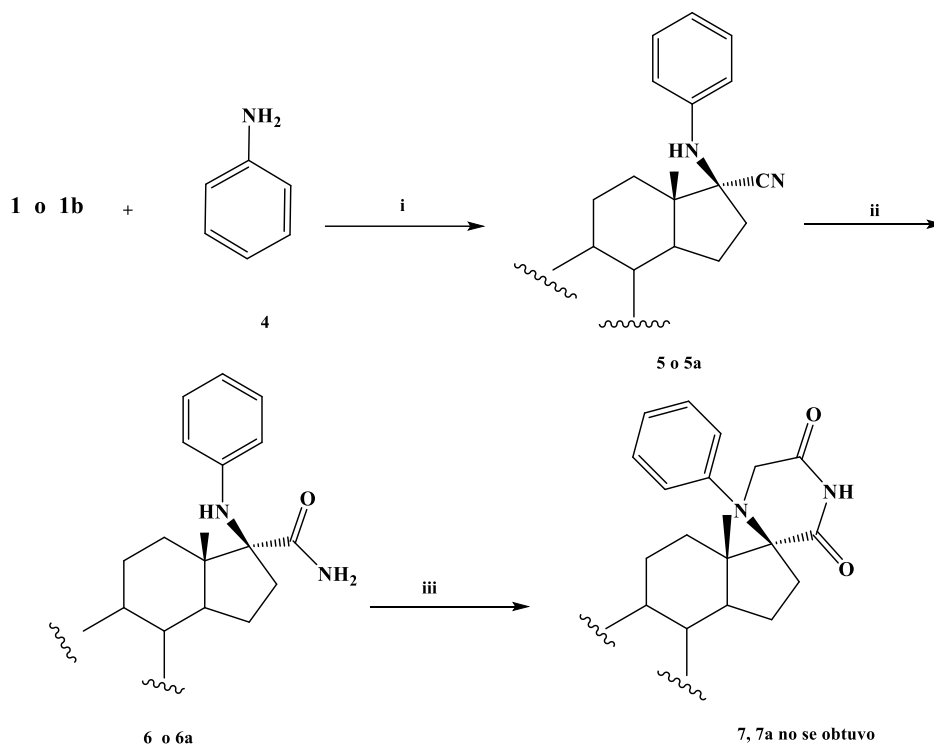
i. Isocianuro de *tert*-butilo, THF/ H_2O , $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$

Esquema 1. Síntesis “one-pot” de derivados espiránicos

Ruta sintética B

En la segunda ruta de síntesis se llevaron a cabo exitosamente dos etapas sobre la *trans*-Androsterona. Se partió de una reacción de Strecker utilizando anilina **4** y TMSCN seguida de la hidrólisis de la amina para obtener la amida **6** y finalmente hacerla reaccionar con bromuro de bromoacetilo para lograr una ciclización y obtener el espirociclo esteroidal **7**. Sin embargo, solo

fue posible la obtención de **5**, **5a**, **6** y **6a**, ya que no se encontraron las condiciones necesarias para la formación de los compuestos **7** y **7a**.

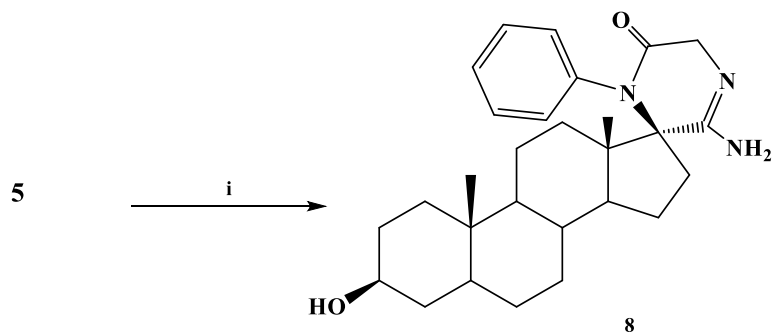


i). TMSCl, CH₂Cl₂, BF₃·OEt₂, t.a; ii). acetaldoxima, cat. Wilkinson, tolueno, reflujo; iii). BrCH₂COBr, nBuOAc, reflujo.

Esquema 2. Segunda ruta sintética de derivados espiránicos

Ruta sintética C

Para la tercera ruta sintética se utilizó como materia prima el α -aminonitrilo **5**, para posteriormente ciclar con etilaminoacetato en presencia de piridina y de esta manera obtener un derivado espirocíclico de la *trans*-Dehidroandrosterona **8**.



i). Etilaminoacetato, DMF, Py, reflujo

Esquema 3. Ruta sintética C para la obtención de derivados espiránicos

Los compuestos obtenidos **3**, **3a**, **5**, **5a**, **6** y **8**, fueron evaluados como agentes antiproliferativos ante un panel de seis líneas celulares pertenecientes a tumores sólidos humanos. Así mismo, los derivados que presentan mayor potencial, fueron sometidos a estudios de *Docking molecular* para observar su interacción con la enzima Topoisomerasa II β .

2. Introducción

A nivel mundial, uno de los principales problemas que tenemos en cuestión de salud, es la falta de tratamientos efectivos y seguros para combatir diversas enfermedades mortales como son los diferentes tipos de cáncer, esta anormal proliferación de células causa alrededor de 550,000 muertes al año y para tratar de erradicar este problema, la ciencia en su labor diaria ha prestado especial atención a la búsqueda de moléculas bioactivas que sean capaces de presentar propiedades potenciales que puedan ser utilizadas para implementar o mejorar métodos de detección o tratamientos contra este y otros padecimientos.¹

Muchas de estas investigaciones se han basado en el estudio de estructura y actividad biológica de compuestos heterocíclicos, es decir, compuestos orgánicos cíclicos que poseen en su estructura al menos un átomo de un elemento distinto a carbono e hidrógeno. Estos heterociclos usualmente poseen una estructura estable y pueden o no ser anillos aromáticos.²

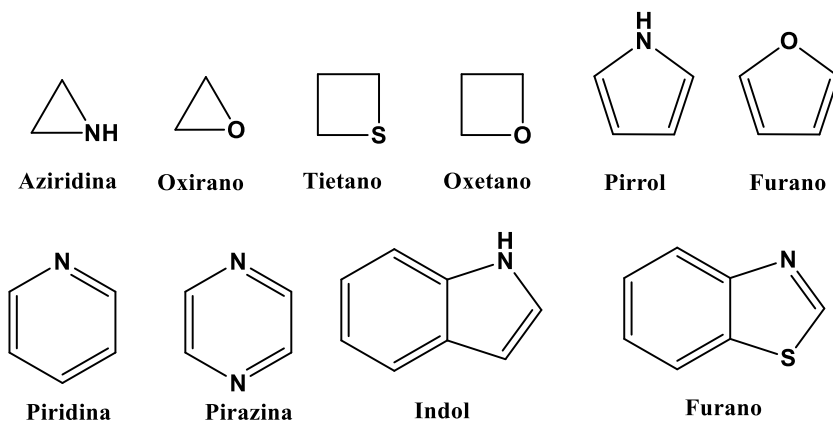


Figura 1. Nombre y estructura de algunos heterociclos comunes

Los compuestos heterocíclicos se encuentran ampliamente en la naturaleza ya sea como hormonas, vitaminas o antibióticos, así mismo son esenciales para la vida puesto que su importancia radica en las funciones reguladoras que llevan a cabo dentro de sistemas biológicos tal como su participación en el metabolismo de todas las células vivas.³

De acuerdo a la literatura, este tipo de estructuras presentan diversas propiedades biológicas como antidepresivos,⁴ antibacterianos,⁵ antiinflamatorios,⁵ antimicrobianos,⁶ como agentes fungicidas,⁷ insecticidas,⁷ e incluso anticancerígenos.⁷ Estas características nos llevan a buscar nuevas rutas

sintéticas efectivas para obtener compuestos novedosos que puedan ser capaces de mejorar esta actividad biológica.

En el área clínica, existen tres grandes clases de sustancias que interactúan con el ADN:

1. Alquiladores: Reaccionan de manera covalente con las bases del ADN.
2. ADN strand breakers: Generan radicales reactivos que producen rupturas en las cadenas de polinucleótidos.
3. Compuestos que interaccionan de manera reversible con ADN: Intercaladores y poliaminas catiónicas que presenten interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno, polarización y fuerzas hidrofóbicas.

Esta intercalación se refiere a la inserción de moléculas entre las bases del ADN, estas estructuras requieren de un tamaño y naturaleza química apropiada para ajustarse y suelen ser policíclicos o aromáticos. Los intercaladores de ADN se utilizan en tratamientos quimioterapéuticos para inhibir la replicación del ADN en células cancerosas de rápido crecimiento.⁸

Los compuestos que contienen heteroátomos como nitrógeno, azufre y oxígeno pueden funcionar como intercaladores puesto que aumentan la fuerza del complejo formando puentes de hidrógeno con el ADN. Además, cuando en la molécula existe más de un heteroátomo, le confiere a la molécula un carácter polarizado lo que genera una interacción óptima y con esto se esperaría una mejor actividad anticancerígena.⁹

Debido a estas características, diversas investigaciones se han enfocado en síntesis de heterociclos ya que son altamente prometedores en la industria farmacéutica. La presencia de estos ciclos en la estructura de un medicamento puede ser de utilidad para manipular la lipofilia, polaridad, capacidad de formar puentes de hidrógeno entre las moléculas, entre otras características que pueden conducir a la obtención de mejores propiedades farmacocinéticas, farmacológicas, toxicológicas y fisicoquímicas de las estructuras candidatas a fármacos.¹⁰

Las propiedades ya anteriormente descritas, son de vital importancia para el compuesto activo de un medicamento, sin embargo, este también debe poseer características lipofílicas para tener la capacidad de penetrar la célula a través de la membrana lipídica. Considerando que los esteroides poseen una estructura lipofílica aunado a que estos compuestos son ya moléculas biológicamente activas, se piensa que un esqueleto esteroideal puede mejorar la biodisponibilidad de un heterociclo que actúa como fármaco, es por ello que en las últimas décadas el desarrollo de nuevos derivados esteroidales heterocíclicos ha sido uno de los principales objetivos de la química de esteroides.

Los esteroides son moléculas hidrocarbonadas cuyo esqueleto se basa en la estructura básica del ciclopentanoperhidrofenantreno, esterano o gonano, mismo que se encuentra formado por la unión de 5 anillos (A, B, C y D) con numeración específica. Son familias de compuestos naturales altamente estudiados por sus diversas actividades fisiológicas, se encuentran presentes en la naturaleza sobre todo en vitaminas y hormonas.¹¹ Algunos de los esqueletos esteroidales más utilizados por los químicos sintéticos son Estrona, *trans*-Androsterona, *trans*-Dehidroandrosterona, Diosgenina, Pregnenolona, entre otros.

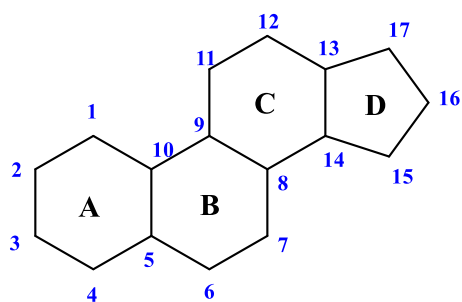


Figura 2. Estructura y numeración del núcleo esteroideal

Dentro de la química de esteroides, un gran número de investigaciones se han centrado en la unión con diferentes sistemas heterocíclicos, particularmente pirazoles, pirazolinas, isoxazolinas, tiadiazoles, piridinas, pirimidinas e imidazoles.

Además de estas modificaciones estructurales, también se han realizado estudios de derivados esteroidales sintéticos o extraídos de productos naturales que demuestran su efectividad inhibiendo la proliferación de células tumorales.¹²

De acuerdo con nuestra búsqueda bibliográfica no se han encontrado derivados espiro sobre C-17 que contengan el núcleo 1,4-diazina, por lo que es nuestro interés sintetizarlos y evaluar su actividad antiproliferativa.

3. Antecedentes

Hasta ahora, en la literatura existen diversos reportes de compuestos N-heterocíclicos que presentan diferentes actividades biológicas, y de manera general, podemos decir que han presentado efectos anticancerígenos a través de la inhibición del crecimiento celular, la inducción de la diferenciación celular y la apoptosis. Sin embargo, aún se tiene la necesidad de desarrollar métodos novedosos, prácticos y eficientes para la obtención de estos compuestos.¹

Un porcentaje considerable de los medicamentos que actualmente se encuentran aprobados por la FDA presentan heterociclos que contienen al menos un átomo de Nitrógeno, algunos ejemplos de estos compuestos son Inlyta, Zydelig y Zytiga.⁴

Axitinib, conocido comercialmente bajo el nombre de Inlyta, es un inhibidor de la tirosina quinasa. Se utiliza en el tratamiento de carcinoma de células renales (CCR), esta es la lesión sólida más frecuente del riñón y común en hombres adultos entre 50 y 70 años de edad.¹³ En el caso de metástasis, se ha demostrado que este inhibidor es capaz de reducir el tamaño de tumores primarios, es por ello que se ha utilizado como neoadyuvante para facilitar la cirugía de tumores que se encuentran en etapas avanzadas de cáncer.^{14,15}

Por otra parte, el Idelalisib o Zydelig inhibe de manera selectiva a la enzima fosfoinositol 3-quinasa δ (PI3K δ), misma que se requiere para la supervivencia y activación de linfocitos. Por este motivo, el medicamento actualmente está aprobado por la FDA para el tratamiento de adultos con leucemia linfocítica crónica.¹⁶

Otro caso es la Zytiga, también llamada Abiraterona que es un claro ejemplo de un heterociclo unido a un esqueleto esteroidal utilizado en pacientes con cáncer de próstata ya que inhibe la biosíntesis de andrógenos, prolongando así su capacidad de supervivencia.¹⁷

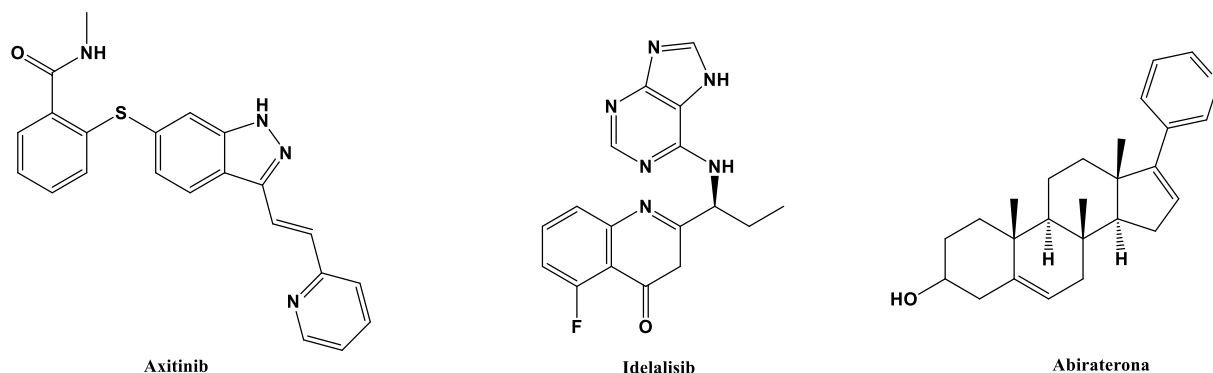


Figura 3. Estructura de los medicamentos aprobados por la FDA

Dentro de los compuestos heterocíclicos nitrogenados, también podemos encontrar una amplia gama de moléculas interesantes biológicamente que contienen el núcleo de 1,4-diazinas tanto de origen natural como sintéticos, tales como la Riboflavina también conocida como vitamina B2, de gran importancia en el crecimiento del cuerpo y de glóbulos rojos,¹⁸ Coelenterazina que es la responsable de la bioluminiscencia de la medusa,¹⁹ Tionazin ampliamente utilizado en insecticidas, fungicidas y nematocidas, 3-Alquil-2-metoxipirazina (MPs) que contribuyen a proporcionar aromas en los alimentos,²⁰ entre muchos otros ejemplos.

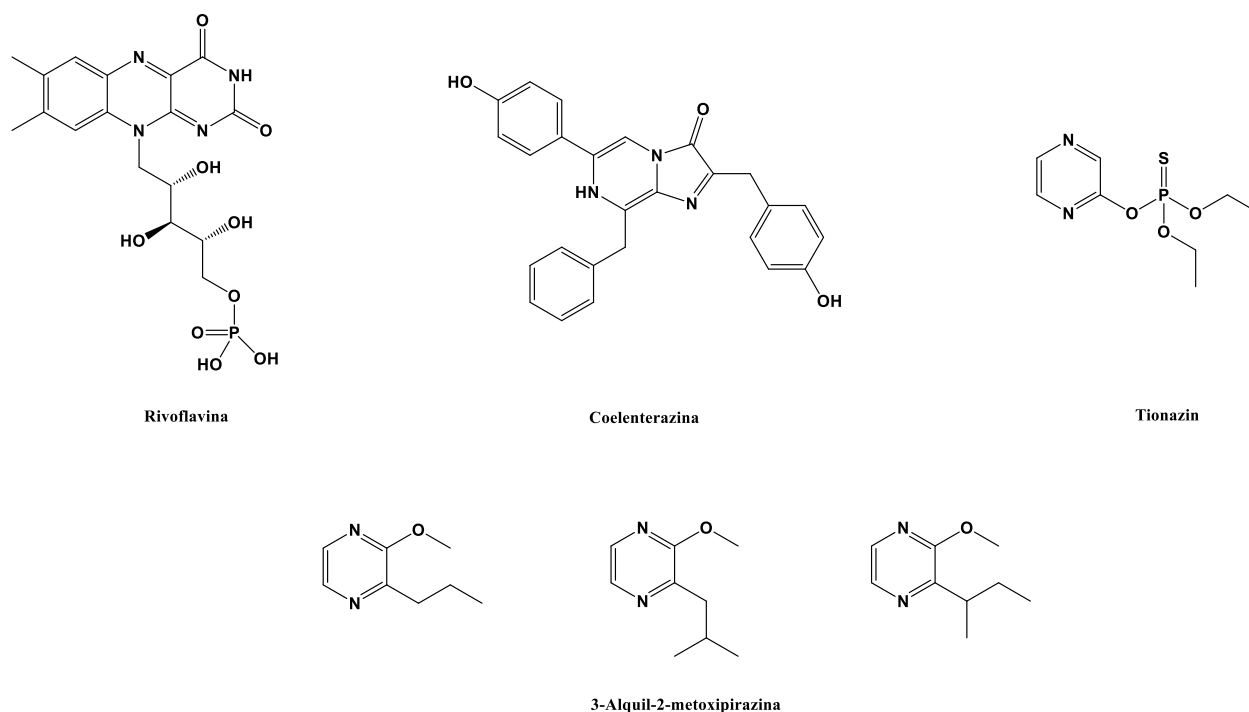


Figura 4. Compuestos naturales con núcleos 1,4-diazinas

Además de estas estructuras presentes en la naturaleza con sus variadas propiedades y usos, también existen estudios de moléculas con núcleos de pirazinas que se han enfocado en explorar sus propiedades como agentes anticancerígenos o posibles fármacos. Ejemplos de ello son los antibióticos pelagiomicinas y los compuestos con actividad antitumoral Botrilazinas A y B quienes presentan un núcleo central de pirazina, con sustituyentes fenólicos.²¹

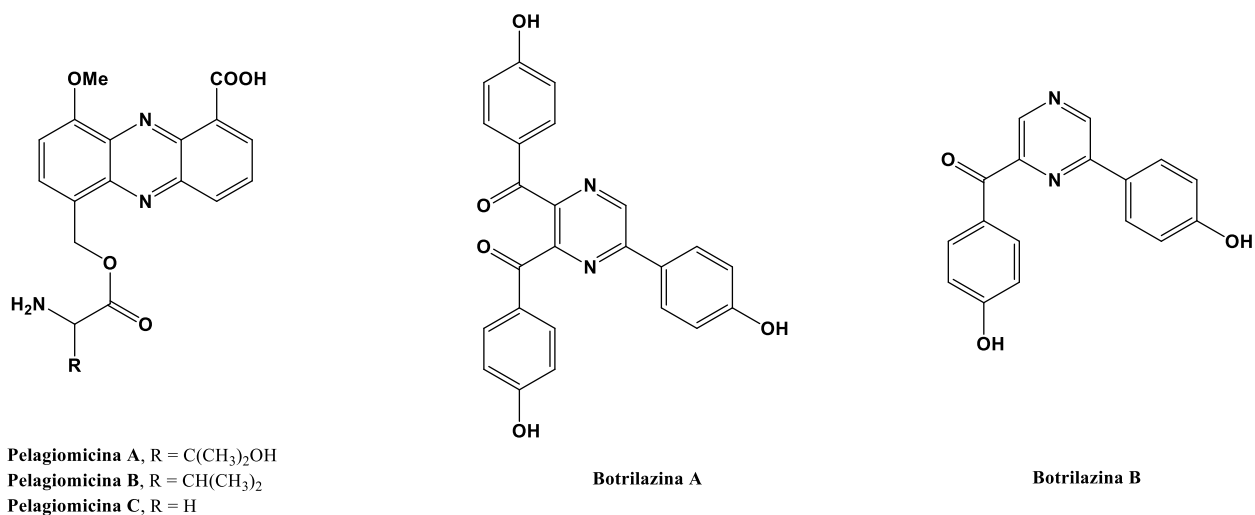


Figura 5. Derivados biológicamente activos de pirazina.

Uno de los bicíclicos más importantes derivado de la pirazina es la quinoxalina. Su importancia radica en su actividad biológica reportada con diferentes aplicaciones en campos de medicina, insecticidas, farmacéutica, etc. Los núcleos de quinoxalina se encuentran presentes en diferentes antibióticos como equinomicina, levomicina y actinoleutina, actúa también como antiviral, antidiabético, antiinflamatorio, inhibidor de diferentes enzimas como topoisomerasa II β y algunas quinasas, anticancerígenos, reguladores de canales iónicos y agentes protozoos.^{22,23} Dos de sus derivados más importantes bien conocidos como inhibidores de topoisomerasa II β y agentes anticancerígenos son el ácido (2-(4-(7-cloroquinoxalin-2-il)-fenoxi]propionico (XK469) y cloroquinoxalina-sulfonamida (CQS).²⁴

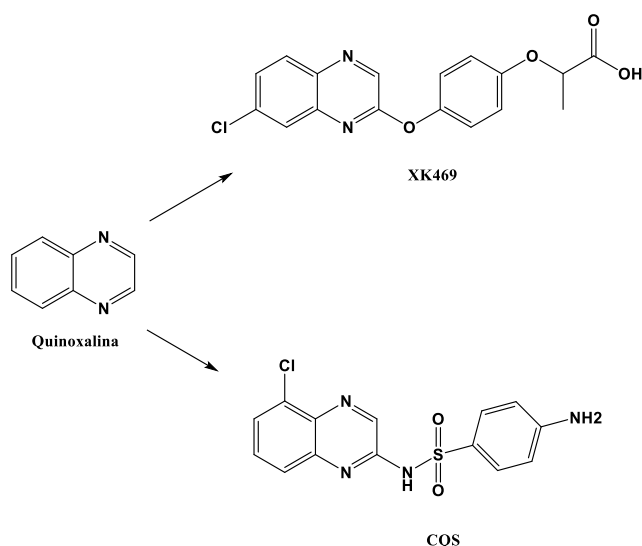
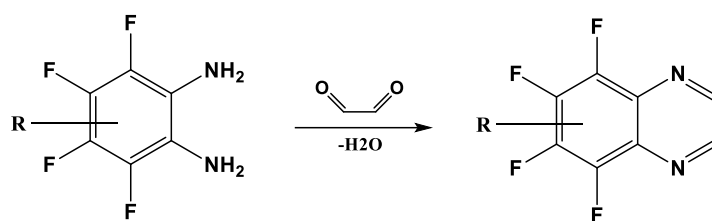


Figura 6. Estructura de quinoxalina y algunos derivados

En 2017, el grupo de investigación de Prima reportó la síntesis de 1,4-diazinas fusionadas a un anillo aromático fluorado (Esquema 4) encontrando que presentan actividad citotóxica frente a células de carcinoma epidermoide de laringe (Hep2) con $IC_{50} = 2.2-26.4 \mu M$ además de inducir la apoptosis en concentraciones de 1-25 μM .^{25,26}



Esquema 4. Trabajo reportado por Prima y colaboradores.

Por otra parte, un estudio realizado en E.U.A se enfocó en derivados espiránicos de pirazinas como posibles inhibidores de canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC). Anteriormente se habían explorado ya moléculas con capacidad inhibitoria, pero carecían de selectividad ante los subtipos de canales, en cambio este tipo de diazinas son capaces de funcionar como inhibidores selectivos para no comprometer la conducción del potencial de acción cardíaco. Permitiendo así, su posible uso en el tratamiento de enfermedades potenciales como la epilepsia y algunos casos de arritmia cardíaca.²⁷

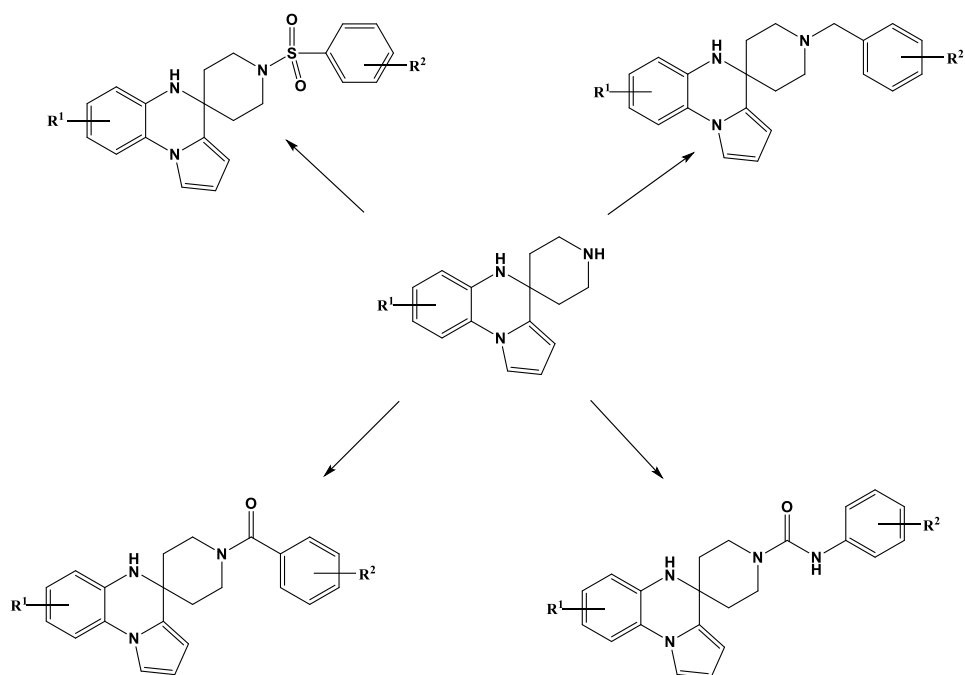


Figura 7. Esqueletos de los derivados probados en inhibición de canales de sodio.

La fusión entre 1,4-diazinas y esqueletos esteroidales existe también en la naturaleza presentes en organismos marinos.²⁸ Las riterazinas y cefalostatinas son dos grandes familias de alcaloides que fueron reportadas desde 1988 por los profesores G. R. Pettit y N. Fusetani. Son moléculas formadas por dos unidades esteroidales enlazadas por el anillo A, a través de un anillo de pirazina y son atractivas hacia la comunidad científica debido a su limitada disponibilidad, compleja estructura y actividad antitumoral que puede presentarse incluso en concentraciones nanomolares.^{29,30}

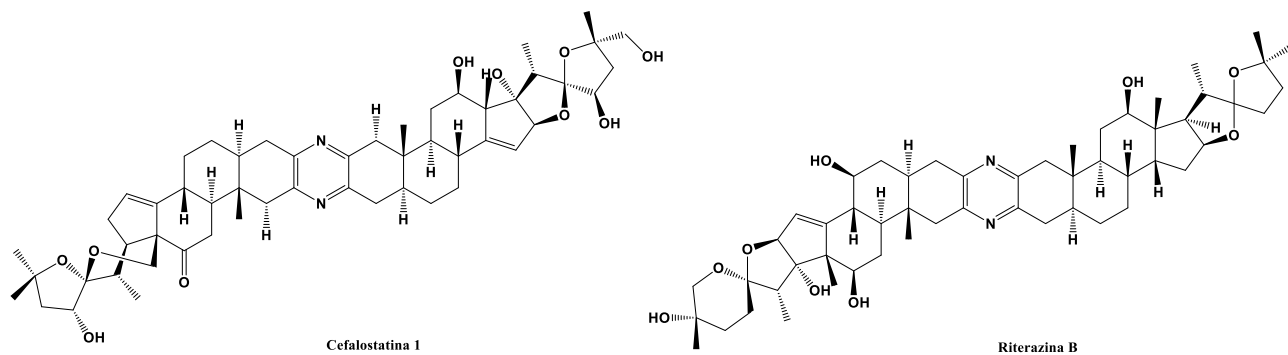


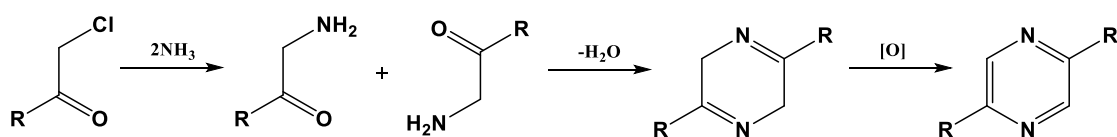
Figura 8. Ejemplos de Cefalostatina y Riterazina

3.1 Formación del núcleo 1,4-diazina

Dado que existen un sinnúmero de trabajos enfocados en la síntesis y evaluación biológica de derivados de la pirazina, se han reportado diferentes metodologías para poder obtener 1,4 diazinas dentro de las cuales, Staedel-Rugheimer y Gutknecht son las más utilizadas.

3.1.1 Síntesis de Staedel-Rugheimer

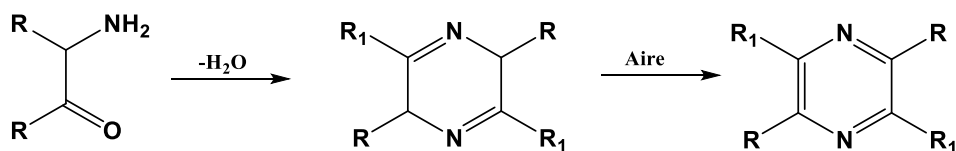
Fue reportada en 1876, para llevarla a cabo se requiere de 2-cloroacetofenona en presencia de amoníaco para obtener la 2-aminoacetona, la cual se condensará posteriormente formando la dihidropirazidina y finalmente se oxidará a la pirazina correspondiente.^{31,32}



Esquema 5. Síntesis de Staedel-Rugheimer

3.1.2 Síntesis de Gutknecht

Reportada en 1879, es una variante de Staedel-Rugheimer la cual se basa también en la autocondensación de una α -aminocetona, con la diferencia de que esta es sintetizada mediante la reducción de isonitroso cetonas, para obtener dihidropirazinas. Estas son posteriormente deshidrogenadas con óxido de mercurio (I) o sulfato de cobre (II), e inclusive puede ocurrir de manera espontánea con oxígeno atmosférico.^{33,34}



Esquema 6. Síntesis de Gutknecht

3.1.3 Tratamiento térmico de aminoácidos y compuestos amino-hidroxicos (aminoalcoholes)

Otra peculiar síntesis de pirazinas que se ha estudiado por diferentes grupos de investigación como los de Shui Wang y Adams, es por tratamiento térmico de diferentes amino ácidos.

Esta técnica es observada comúnmente en la cocción de alimentos ya que es en estas condiciones cuando se alcanza las temperaturas necesarias para que ocurra la síntesis de alquilpirazinas, responsables de diferentes olores y sabores.³⁵

Shui Wang reporta la obtención de pirazinas al someter a calentamiento (120 °C–300 °C) tanto aminoácidos como compuestos amino hidroxilicos, obteniendo mejores resultados con Serina, Treonina, etanolamina, glucosamina, ácido 4-Amino-3-hidroxi-butírico y alanilserina.

Por otra parte, Adams reporta en 2009 una investigación en la que observa que la síntesis de diferentes pirazinas en los alimentos se da por condensación entre aminoácidos y compuestos α -dicarbonílicos provenientes de la degradación de ácido ascórbico que se encuentra usualmente como aditivo, antioxidante, saborizante, etc.^{36,37}

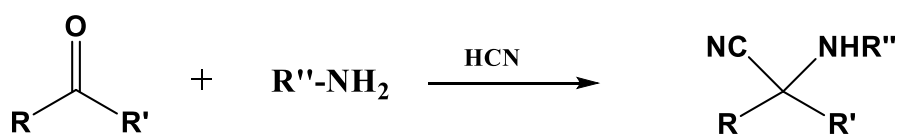
3.1.4 Síntesis por etapas de pirazinas espiránicas

En diferentes artículos se ha reportado también la amplia utilización de la reacción de Strecker para la obtención de aminonitrilos, posteriormente estos compuestos son sometidos a ataques nucleofílicos consecutivos para lograr una ciclización y obtener los núcleos 1,4-diazinas deseados. Las etapas de reacción necesarias y las especies nucleofílicas utilizadas son muy diversas dependiendo del ciclo que se busque obtener.^{38,39}

3.1.4.1 Síntesis de Strecker

Descubierta por Adolph Strecker, es una reacción de tres componentes: aldehídos o cetonas, aminas y HCN, ésta síntesis y sus variantes son las más utilizadas para obtener α -amino nitrilos que funcionan como intermediarios versátiles en síntesis orgánica debido a su reactividad, en especial para la obtención de heterociclos y carbociclos, compuestos importantes en la investigación biológica y farmacológica.⁴⁰

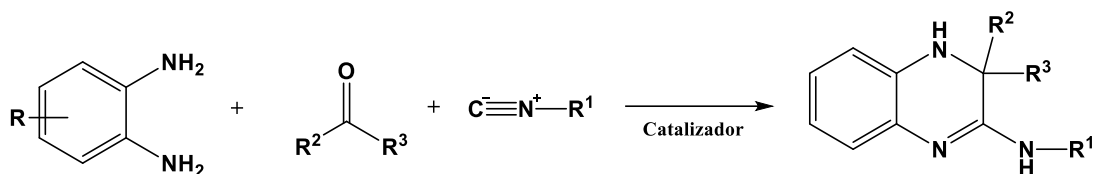
Parte de su importancia reside en su amplia utilización en la síntesis de aminoácidos producto de una hidrólisis del α -amino nitrilo que se obtiene.^{41,42}



Esquema 7. Síntesis de Strecker

3.1.4.2 Síntesis “one-pot” multicomponente

De manera más reciente, en 2014 se ha reportado síntesis de estos núcleos 1,4-diazinas, derivados de quinoxalina, mediante reacciones catalizadas de tres componentes: 1,2-diaminas, aldehídos o cetonas e isocianuros. Esta novedosa metodología, variante de la reacción de Strecker, nos ofrece una manera más eficiente y amigable con el ambiente al ser un tipo de reacción *one-pot* en la que, como su nombre lo indica, la síntesis ocurre en un solo matríz, evitando aislar intermediarios que implicarían utilización de grandes cantidades de disolventes orgánicos durante el tratamiento de cada reacción y purificación.⁴³



Esquema 8. Reacción de tres componentes para la síntesis “one-pot” del núcleo 1,4-diazina

4. *Objetivos*

Objetivo General

- ✚ Desarrollar nuevas rutas de síntesis para obtener nuevos derivados conteniendo heterociclos tipo 1,4-diazinas con una conformación restringida basados en núcleos esteroidales que contengan dichos heterociclos nitrogenados de tipo espiro sobre el anillo D.

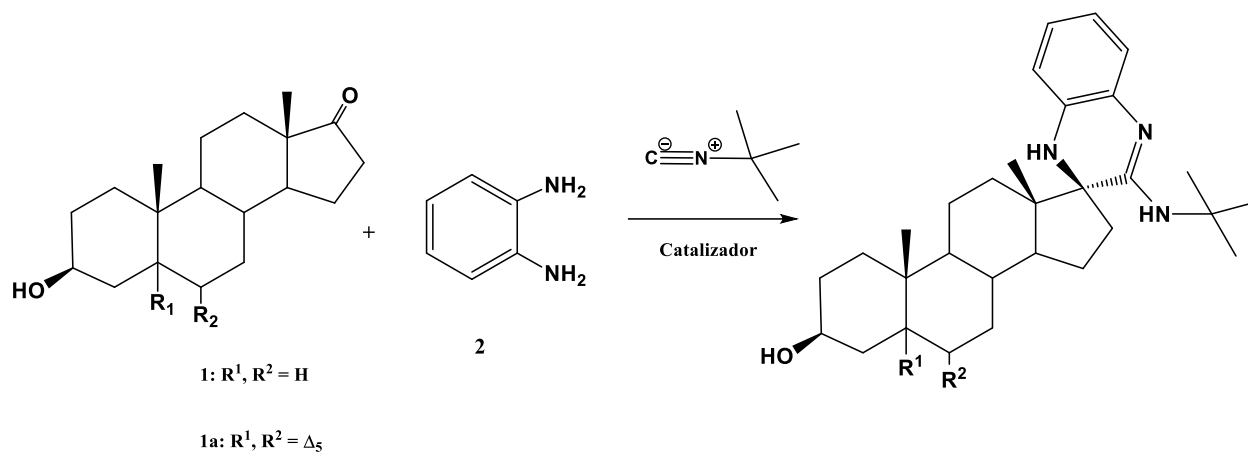
Objetivos Particulares

- ✚ Sintetizar a partir de dos materias primas (*trans*-Androsterona y *trans*-Dehidroandrosterona) y tres rutas sintéticas (A, B y C) nuevos derivados esteroidales tipo 1,4-diazina con modificaciones en el anillo D, específicamente en el C-17.
- ✚ Caracterizar los productos obtenidos mediante métodos físicos y espectroscópicos como resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , espectroscopía de infrarrojo (IR), espectrometría de masas, rotación óptica y punto de ebullición para los compuestos sólidos.
- ✚ Proponer los mecanismos de reacción mediante los cuales se llevó a cabo la formación de los productos obtenidos.
- ✚ Determinar la actividad antiproliferativa de los compuestos obtenidos ante diferentes líneas celulares de tumores cancerosos humanos.
- ✚ Realizar estudios de *docking molecular* de los compuestos con mayor potencial antiproliferativo para probarlos como inhibidores de la enzima topoisomerasa II β

5. Discusión de resultados.

5.1 Ruta sintética A

Se proyectó realizar una síntesis “one-pot” multicomponente para obtener los derivados espiránicos correspondientes, en la que se utilizaría CeO₂-NP's como catalizador, esto con base en el trabajo reportado por Edayadula y Rock Lee en 2014.⁴³



Esquema 9. Ruta A planteada de manera general

Se comenzó a trabajar a partir de la *trans*-Androsoterona **1** probando diferentes condiciones mostradas en la Tabla 1. Como primera opción se ensayó utilizando nanopartículas con un tamaño menor a 50 nm sin embargo no se observó ningún cambio en la materia prima, debido a esto se optó por utilizar partículas del catalizador de 25 nm (comercial), para aumentar el área específica para una masa dada de partículas y favorecer la reacción, sin embargo, a pesar de las diferentes condiciones que fueron probadas, no se logró obtener resultados positivos.

CeO ₂ -NP's	Disolventes	Equivalentes	Temperatura	Tiempo
< 50 nm < 25 nm	DCM Tolueno THF/H ₂ O	Reactivos: 1–4 Catalizador: 5–10 mol%	t.a – 100 °C	2 – 20 h

Tabla 1. Condiciones probadas utilizando CeO₂-NP's

Bajo la hipótesis de que el catalizador utilizado no es lo suficientemente afín para coordinarse al oxígeno del grupo carbonilo en C-17, se buscaron otros catalizadores utilizando desde 1 hasta 2 equivalentes.

Catalizador	Observaciones
Amberlita-15	Se observó gran cantidad de productos
PPTS	Poca reactividad
PTSA	Poca reactividad
EDTA	No se observó reacción
BF₃·EtO₂	Se logró aislar el compuesto puro

Tabla 2. Catalizadores ensayados para obtener el compuesto 3

Como primeros ensayos se continuó con catálisis heterogénea, esta vez utilizando Amberlita-15 sin embargo, se obtuvieron múltiples productos en cantidades pequeñas que hizo imposible su purificación y caracterización.

Posteriormente se intentó una catálisis ácida homogénea con diferentes ácidos de Bronsted como PPTS, PTSA y EDTA no obstante, la reactividad que se tenía de la materia prima era muy poca o nula, debido a estas observaciones se optó por utilizar una catálisis con ácido de Lewis con el cual se obtuvieron los mejores resultados.

Después purificar el crudo de reacción y realizar su caracterización, la información recopilada arroja que los compuestos obtenidos no contienen el grupo *terc*-butilo unido a la molécula, obteniendo así los derivados **3** y **3a**.

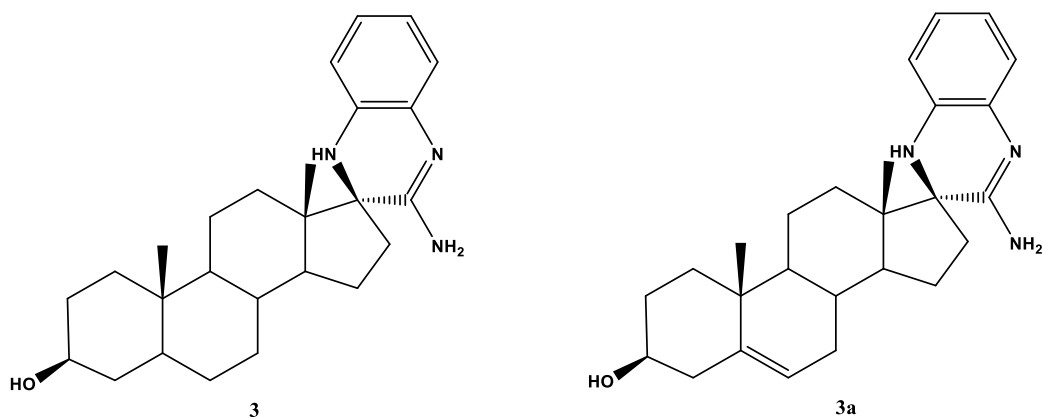
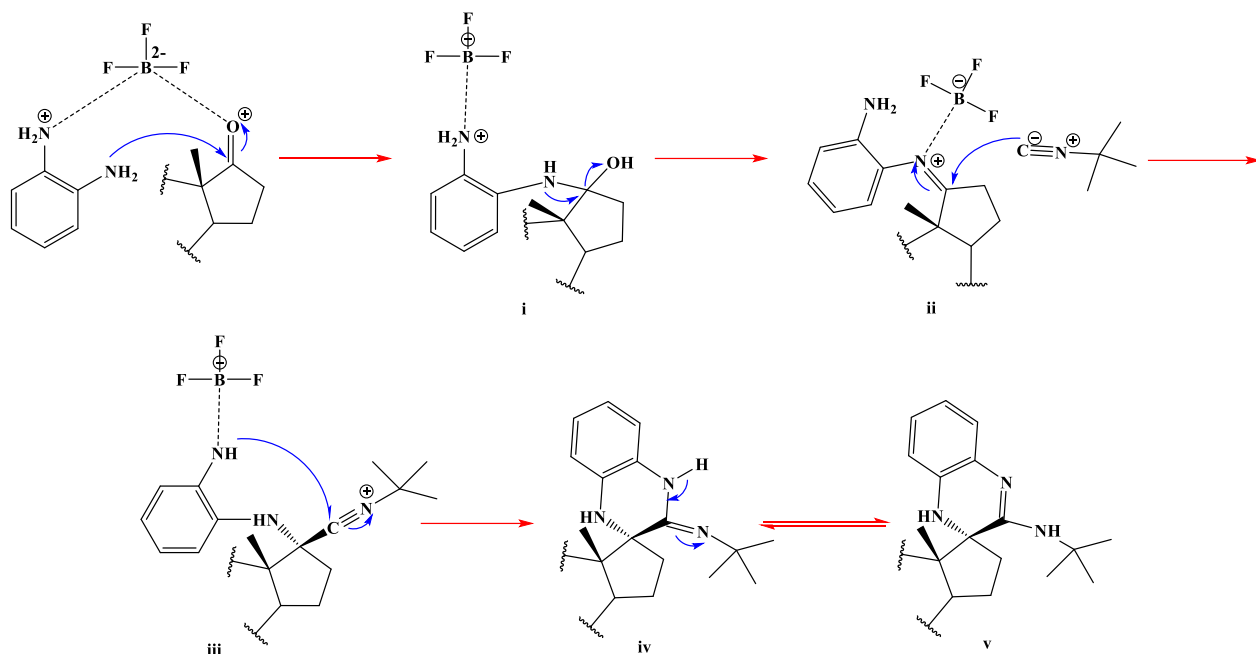


Figura 9. Derivados espiránicos obtenidos

5.1.1 (17*S*)-3β-hidroxiestero[5α-androstan-17,3'-dihidroquinoxalin]-2'(3H)-amina. (3)

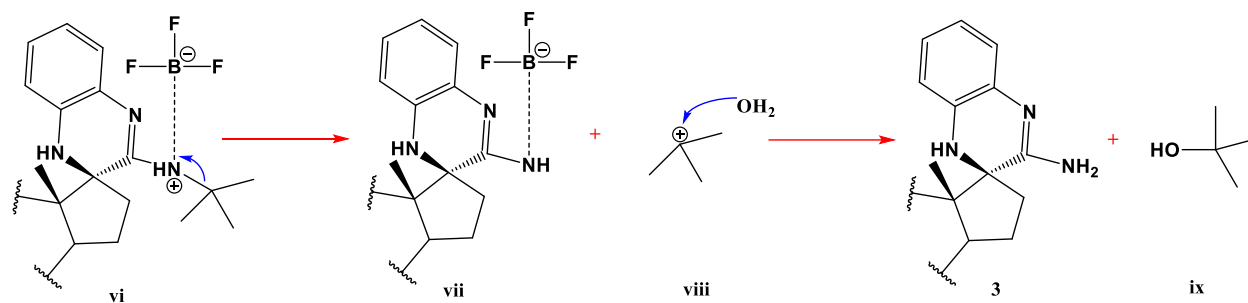
El compuesto **3** fue obtenido finalmente utilizando una mezcla THF/H₂O como disolvente y BF₃·EtO₂ como catalizador, favoreciendo así el ataque de la diamina **2** lo cual conduce a la formación del ion iminio **vii** que posteriormente sufrirá una adición nucleofílica por el ion isocianuro para obtener el intermediario **viii**, el cual llevará a cabo una cicloadición formando **ix**. Finalmente, la isomerización de **ix** nos lleva al producto **v**.

En 2018, Jehbez y Safaei reportan el uso de ácidos de Lewis como catalizadores para reacciones entre cetonas, derivados de *o*-fenilendiaminas e isocianuros para la formación de derivados de 3,4-dihidroquinoxalin-2-aminas.³³ Se propone un mecanismo de reacción para la obtención de productos enantiopuros en el que el metal se coordina tanto al oxígeno del grupo carbonilo como a uno de los nitrógenos de la diamina. Este mecanismo propuesto podría explicar también que se hayan obtenido los mejores resultados con BF₃·EtO₂ puesto que la coordinación promueve que la reacción siga el curso que se desea. Esquema 10



Esquema 10. Mecanismo propuesto

De manera similar a la propuesta de Jiang y colaboradores en 2014,³⁴ se sugiere que la reacción procede mediante el mecanismo propuesto en el esquema 10, sin embargo la molécula formada **v** sufre un cambio posterior, producto de la coordinación entre el ácido de Lewis y el nitrógeno unido al *tert*-butilo, dejando a este con una carga positiva lo que conlleva a la eliminación del grupo alquílico como un carbocatión terciario, que posteriormente sufre un ataque nucleofílico por parte del H₂O que se encuentra en el medio de reacción, formando así *tert*-butanol. Esquema 11

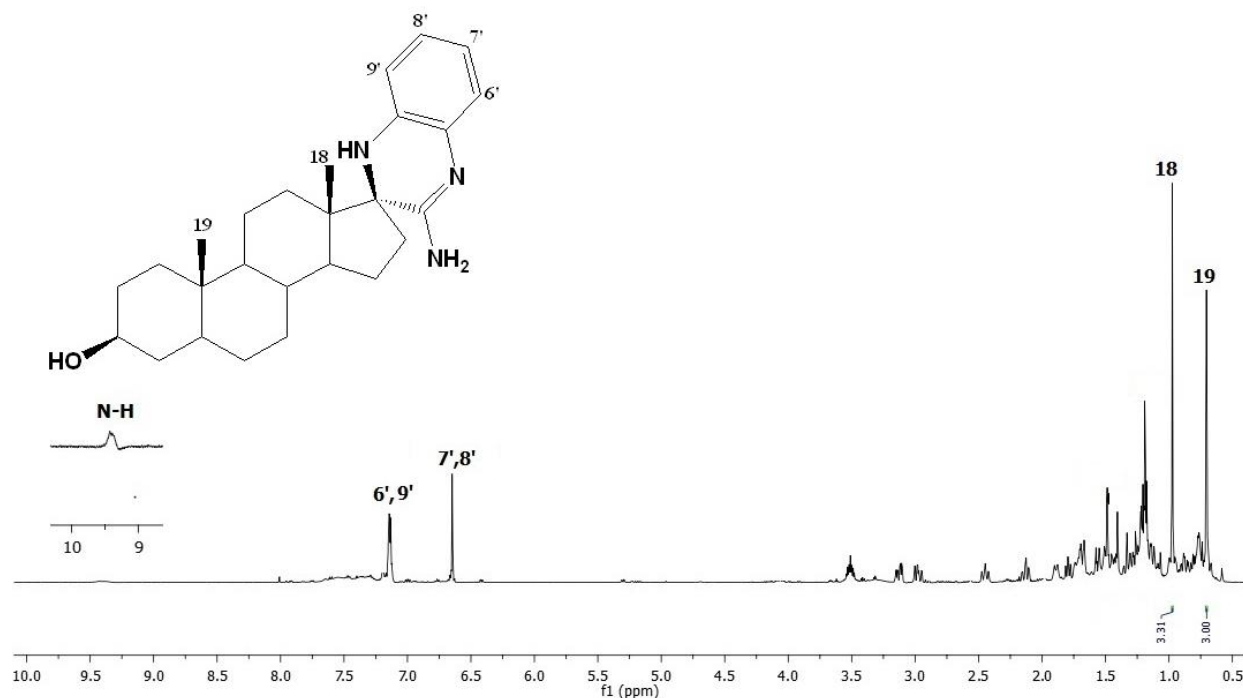


Esquema 11. Mecanismo propuesto para la pérdida del grupo *tert*-butilo

Después de una purificación en columna, el compuesto **3** se obtuvo con un 22% de rendimiento, sin embargo, también se recuperaron algunas fracciones en mezcla con subproductos.

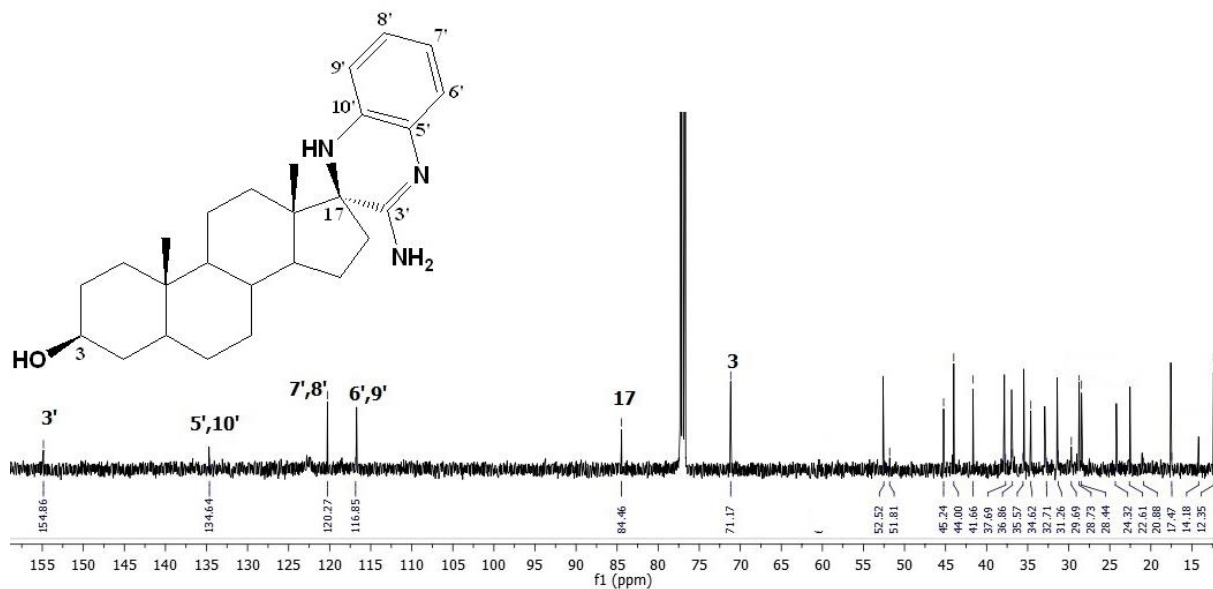
Para comenzar su caracterización, se obtuvo el espectro de RMN ^1H donde observamos nuevas señales en la zona de los aromáticos correspondientes al anillo de la *o*-fenilendiamina. Debido al equilibrio que existe entre el intermediario **iv** y **v**, el ambiente químico en el que se encuentran inmersos los protones H-6' y H-9' es similar, de igual manera que lo es para H-7' y H-8', es por ello que observamos una señal para cada uno de estos pares de protones.

Por otra parte, también son perceptibles las señales características del esqueleto esteroidal como H-3 y los metilos 18 y 19.



Espectro 1. Espectro RMN ^1H 500 MHz del compuesto **3**

Para el espectro de ^{13}C , observamos las señales más importantes para el anillo de quinoxalina que ha sido anexado al esqueleto esteroidal de la *trans*-Androsterona. En cuanto a los carbonos aromáticos, es posible distinguir entre las señales cuasi-equivalentes de C-6', C-9' y las correspondientes a C-7', C-8'; así mismo se observa la señal atribuida a los carbonos aromáticos cuaternarios C-5', C-10'. Una nueva señal en 154.8 ppm correspondiente a C-3' junto con el C-17 desplazado a 84.4 ppm, nos dan la pauta para saber que el anillo ha cerrado y formado un derivado espiránico.

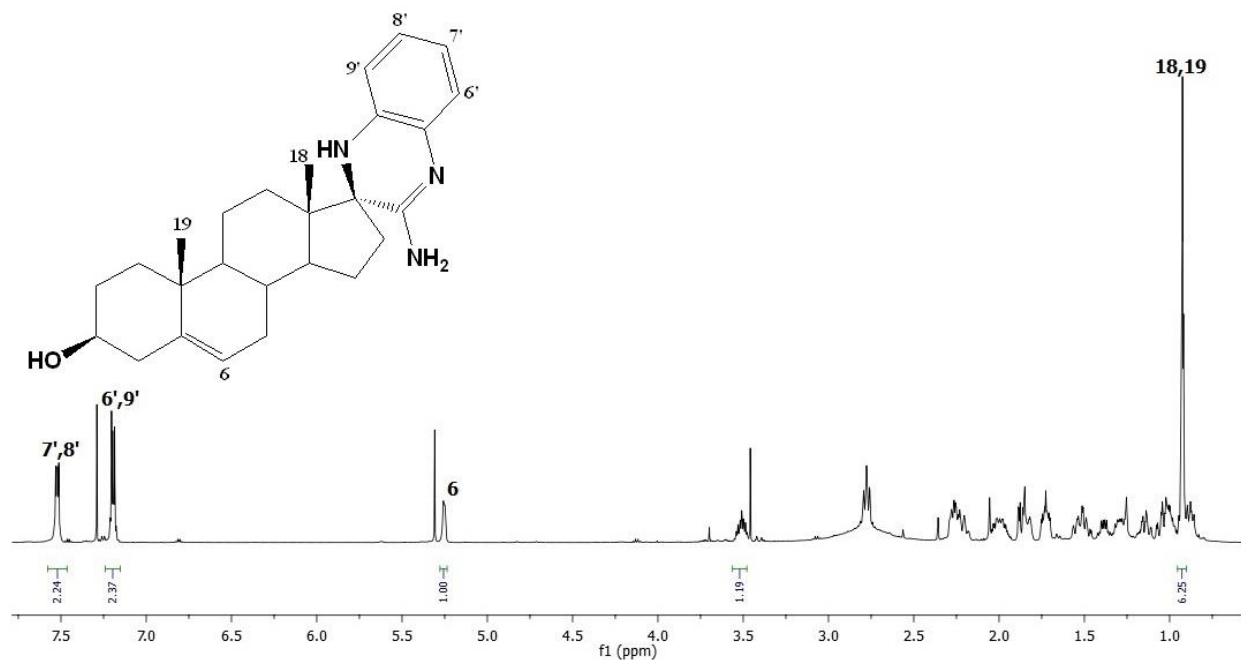


Espectro 2. Espectro RMN ^{13}C 125 MHz del compuesto **3**

5.1.2 (17*S*)-3 β -hidroxiespiro[5 α -androst-5-en-17,3'-dihidroquinoxalin]-2'(3H)-amina. (**3a**)

Para la obtención del derivado de *trans*-Dehidroandrosterona espiránico se optó por seguir la misma metodología ya establecida anteriormente como la óptima para producir el compuesto **3**. De esa manera se colocó la materia prima en presencia de 1 equivalente de $\text{BF}_3 \cdot \text{EtO}_2$, posteriormente se adicionaron 2 equivalentes de *o*-fenilendiamina para la formación de la imina y finalmente agregar el isocianuro de *tert*-butilo para lograr la ciclación.

El compuesto **3a** fue obtenido después de purificar el crudo de reacción mediante cromatografía en columna y posteriormente fue posible realizar su caracterización. En el espectro de RMN ^1H obtenido se observan las señales más representativas, correspondientes a los protones aromáticos del derivado espiránico **3a**. Observamos H-7' y H-8' en una señal equivalente y el mismo caso para H-6' y H-9', esto podría deberse a que la molécula puede presentar cierta simetría en el núcleo de quinoxalina ya que el doble enlace se encuentra en resonancia. Por otra parte, observamos también los hidrógenos de los metilos H-18 y H-19 solapados en una señal en 0.92 ppm, efecto que se presenta también en la materia prima *trans*-Dehidroandrosterona. En este caso, las señales correspondientes a los hidrógenos de grupos amino no se observan, debido a que se empleó como disolvente una mezcla de CDCl_3 y CD_3OD .

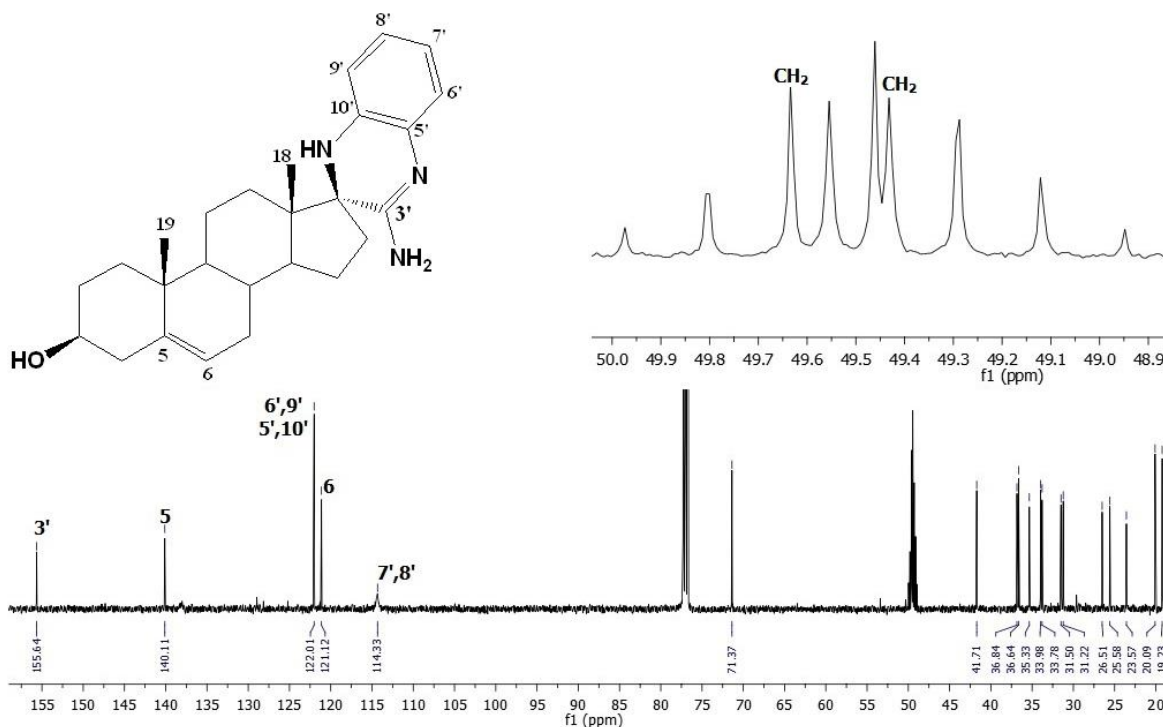


Espectro 3. Espectro RMN ¹H 500 MHz del compuesto 3a

Para el espectro de ¹³C observamos de igual manera las señales correspondientes a los carbonos del anillo aromático, así como los carbonos vinílicos tanto de la insaturación presente en C-5 como C-3' que se encuentra dentro del núcleo 1,4-diazina.

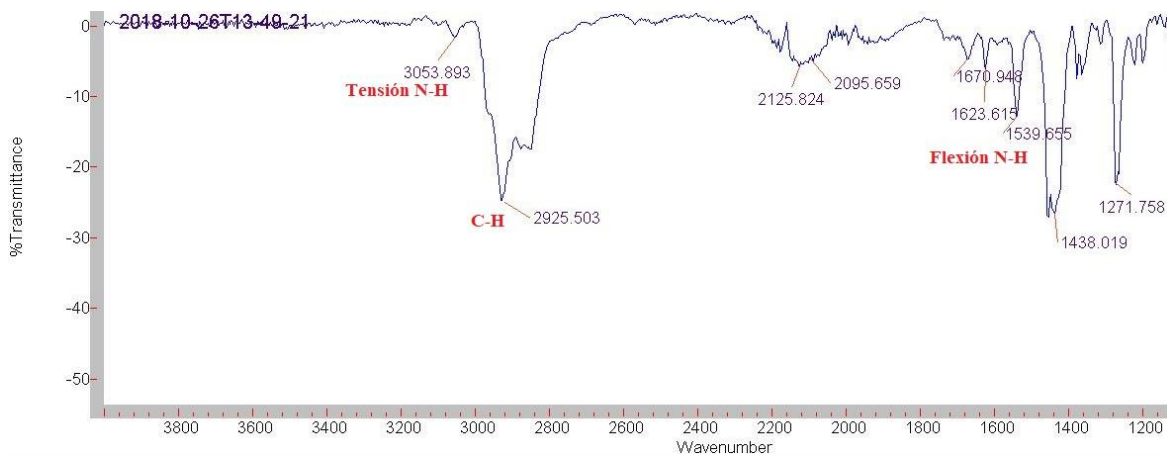
Lamentablemente el carbono espiro C-17 no es visible en espectro, al ser un carbono cuaternario y tener un tiempo de relajación lento, es posible que el tiempo de adquisición del experimento no haya sido suficiente para lograr ver esta señal.

Debido a la presencia del CD₃OD observamos el septuplete característico alrededor de 49 ppm, sin embargo, al expandir la señal es posible reconocer 9 señales ya que existe un solapamiento con dos de ellas que pertenecen a carbonos que forman parte del esqueleto esteroideal.



Espectro 4. Espectro RMN ^{13}C 125 MHz del compuesto **3a**

Finalmente, en el espectro de IR observamos la desaparición de la banda correspondiente al grupo carbonilo de la *trans*-Dehidroandrosterona en 1728 cm^{-1} y la aparición de las bandas correspondientes a la vibración de tensión y flexión de aminas primarias en 3053 cm^{-1} y 1539 cm^{-1} respectivamente. Así mismo son visibles las bandas características de tensión para C-sp³ entre 3000 y 2700 cm^{-1} .



Espectro 5. Espectro IR del compuesto **3a**

De acuerdo al mecanismo de reacción, se sabe que al atacar el par de electrones de la diamina sobre el grupo carbonilo, se da la formación de una imina. Al ser plano este intermediario, el ataque nucleofílico por parte del isocianuro puede ser por la cara *Si* o por la cara *Re* generando los enantiómeros *R* o *S*, respectivamente.

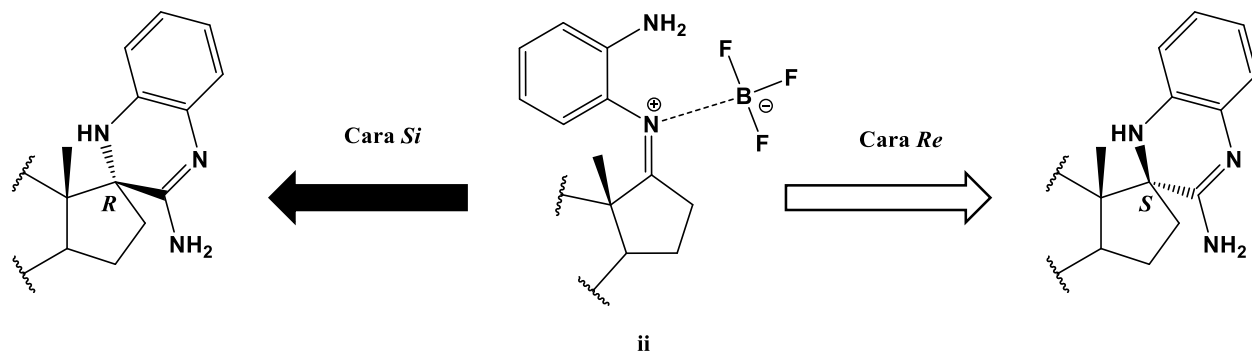


Figura 10. Diastereoisómeros posiblemente obtenidos

De acuerdo a Knochel y Molander,⁴⁴ es posible utilizar modelos teóricos como para poder predecir la posición del ataque nucleofílico que dependerá en gran medida tanto del sustrato quiral como de la especie que se adiciona. Utilizando el modelo de Felkin-Ahn, podemos observar que el ataque se encuentra favorecido por la cara *Re* debido a que existe un menor impedimento estérico; de esta manera, se propone que el diastereoisómero obtenido es el *S*.

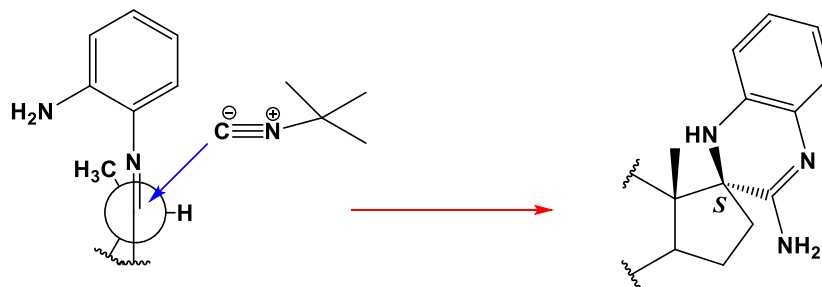


Figura 11. Modelo predictivo Felkin-Ahn.

Esta predicción se encuentra apoyada también, por cálculos teóricos computacionales con los cuales se busca determinar la estabilidad energética y la preferencia conformacional que es calculada usando la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés) con el funcional B3LYP y el conjunto de base 6-31+G(d,p) en fase gas. De esta manera, La energía final

para todas las estructuras optimizadas son calculadas usando el nivel de teoría B3LYP/6-31+G(d,p).⁴⁵

Por otra parte, también se realizó un cálculo de frecuencias al mismo nivel de teoría para asegurar que cada diastereoisómero se encuentra en el mínimo de la superficie de potencial de cada molécula estudiada como se puede observar en la Tabla 3

Precursor	Compuesto	Configuración	Energía (Kcal/mol)
<i>trans</i> -Androsterona	3	Diastereoisómero R	-786042
		Diastereoisómero S	-786044
<i>trans</i> -Dehidroandrosterona	3a	Diastereoisómero R	-751287.31

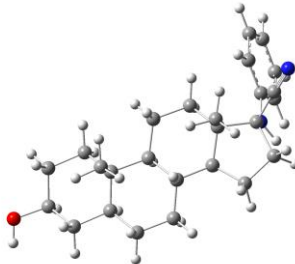
		Diastereoisómero S	-751287.85
			

Tabla 3. Energías obtenidas para diastereoisómeros

De acuerdo a los datos que se muestran, las energías de los diaestereoisómeros *S* fueron insignificamente más bajas que los correspondientes a los diastereoisómeros *R* calculados en fase gas, esto es debido seguramente a la formación de un puente hidrógeno entre el par de electrones libres del átomo de nitrógeno del grupo Ph-NH y un átomo de hidrógeno del grupo CH₃-18.

Con los cálculos de las frecuencias se obtuvieron las poblaciones a partir de las energías libres de Gibbs de todos los isómeros para saber cuál de los diastereoisómeros está mayormente poblado. Como se puede observar en la tabla 4, el análisis poblacional usando la ΔG muestra que los diaestereoisómeros *S* mayormente poblados son predominantes y cuyos ángulos diedros entre C-15–C-16–C-17–NH se encuentran en valores cercanos a 143°.

Precursor	Compuesto	Configuración	Poblaciones (%)	Ángulo diedro
<i>trans</i> -Androsterona	3	Diastereoisómero R	16.25	-99.58
		Diastereoisómero S	83.75	143.62°
<i>trans</i> -Dehidroandrosterona	3a	Diastereoisómero R	19.45	-99.68
		Diastereoisómero S	80.55	143.53°

Tabla 4. Distribución de equilibrio y los correspondientes valores de los ángulos diedros de los diferentes diaestereoisómeros

Finalmente, otro argumento teórico que fue tomado a consideración son los cálculos de los desplazamientos químicos de RMN ¹³C de C-17 que fueron comparados con los obtenidos experimentalmente en la caracterización del compuesto **3**. Los desplazamientos químicos son calculados usando el método Gauge-Including Atomic Orbital (GIAO)⁴⁶ usando el mismo nivel de

teoría. Dichos desplazamientos químicos son calculados de las constantes de apantallamiento de los carbonos espiro con respecto al valor del TMS como valor de referencia.

Precursor	Compuesto	$\delta^{13}\text{C}_{\text{exp.}}$	Configuración	$\delta^{13}\text{C}_{\text{teórico}}$	$\Delta\delta$
<i>trans</i> -Androsterona	3	84.46 ppm	R	69.62 ppm	14.83 ppm
			S	71.72 ppm	12.73 ppm

Tabla 5. Desplazamientos químicos $\delta^{13}\text{C}$ teóricos y el obtenido experimentalmente para el compuesto 3

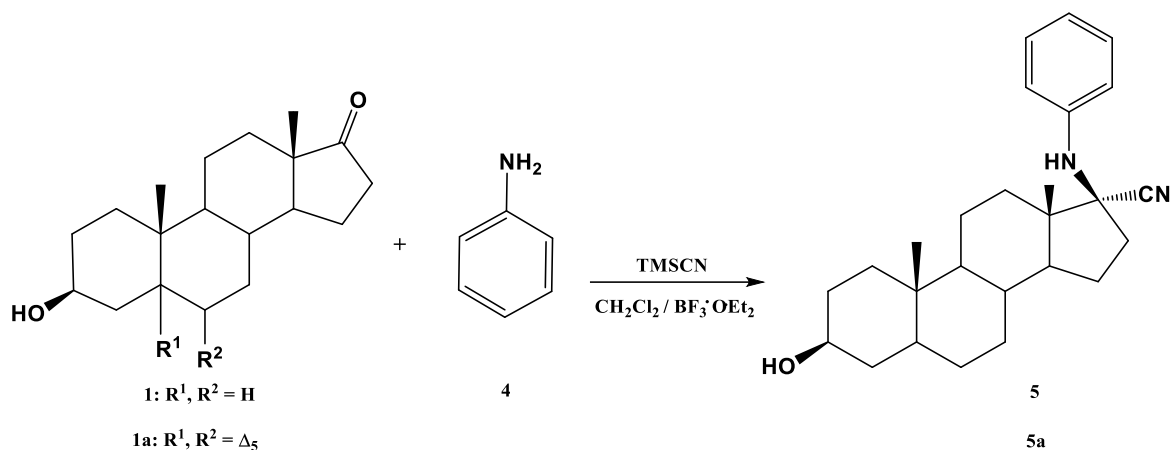
De acuerdo a los datos observados en la tabla 5, el valor del desplazamiento químico obtenido para C-17 en el compuesto **3**, se encuentra más cercano al valor teórico del diastereoisómero S concordando de esta manera los resultados obtenidos tanto en el análisis de poblaciones como de estabilidad energética y el modelo teórico de Felkin-Anh. Tomando en consideración estos datos recolectados, se decide proponer como S la configuración de C-17 en los compuestos **3** y **3a**.

Cabe mencionar que, todos los cálculos se realizaron usando el programa computacional Gaussian16⁴⁷ y con los recursos computacionales del Laboratorio Nacional de Súper Cómputo del Sureste de México de la BUAP (LNS-BUAP).

5.2 Ruta sintética B

5.2.1 Primera atapa.

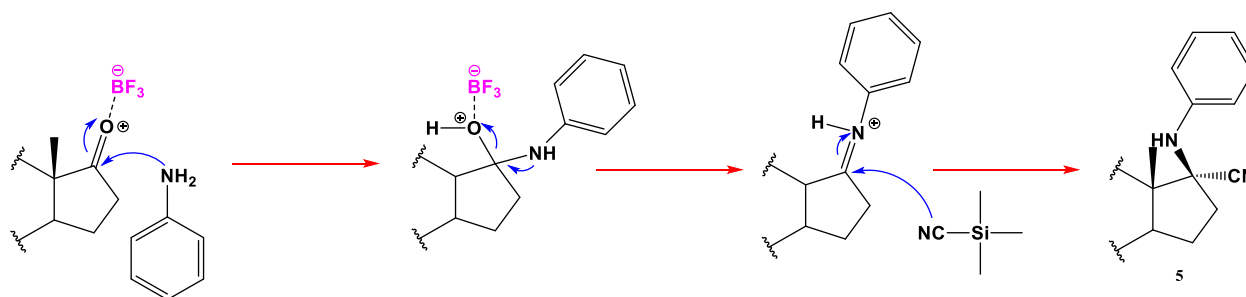
Como primera etapa de síntesis, se plateó realizar una reacción de Strecker de tipo “one-pot” para obtener el compuesto **5**. Durante los primeros ensayos se intentó nuevamente emplear como catalizador CeO₂-NP’s, sin embargo, una vez más los resultados obtenidos no fueron favorables. Debido a que en la ruta sintética A se encontró que el catalizador con mejor desempeño fue BF₃•OEt₂, se decide utilizarlo nuevamente en la misma proporción para facilitar de esta manera el ataque nucleofílico del par de electrones libre de la anilina **4** al carbonilo en C-17 del esqueleto esteroideal para la posterior adición del grupo ciano.



Esquema 12. Primera etapa de la ruta sintética B

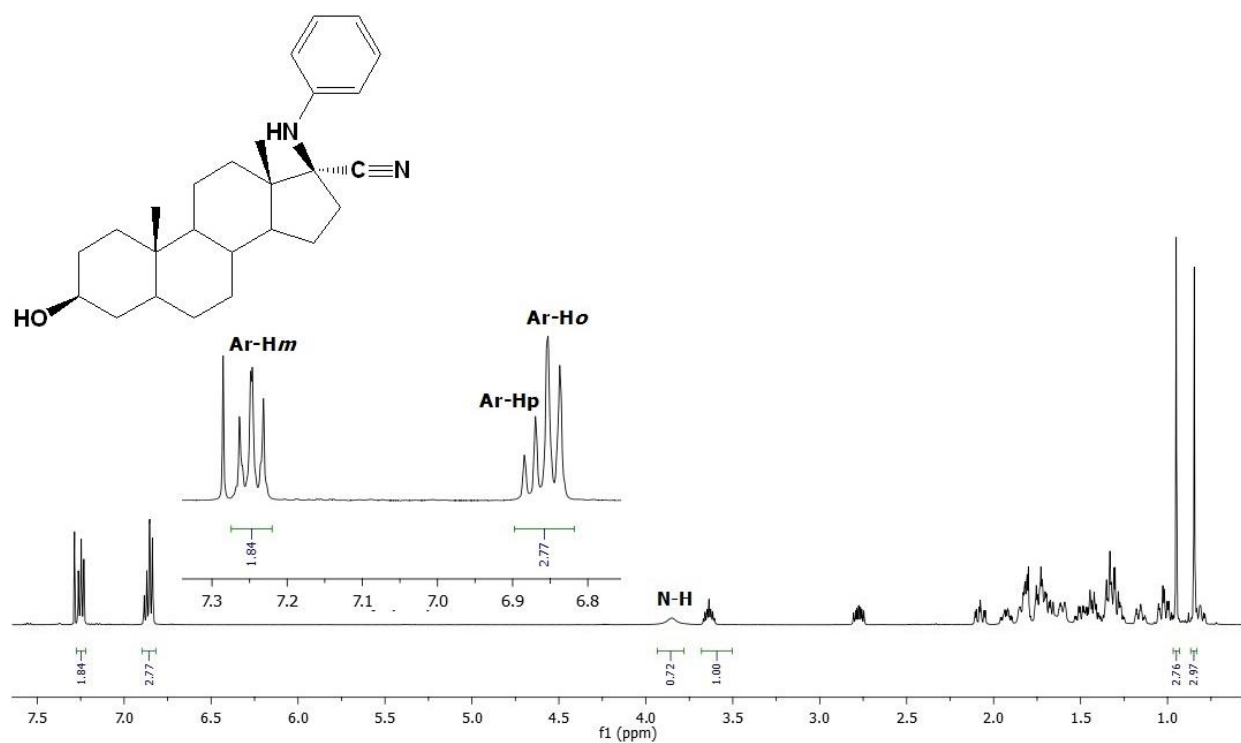
5.2.1.1 17 β -ciano-17 α -fenilamino-5 α -androstan-3 β -ol. (5)

El α -amino nitrilo **5** fue obtenido con un rendimiento de reacción del 84% después de purificación en columna con un sistema 9/1 (Hexano/AcOEt) y utilizando gel de sílice como fase estacionaria. El mecanismo que sigue esta reacción se ilustra en el siguiente esquema 13.



Esquema 13. Mecanismo de reacción para la formación del α -aminonitrilo

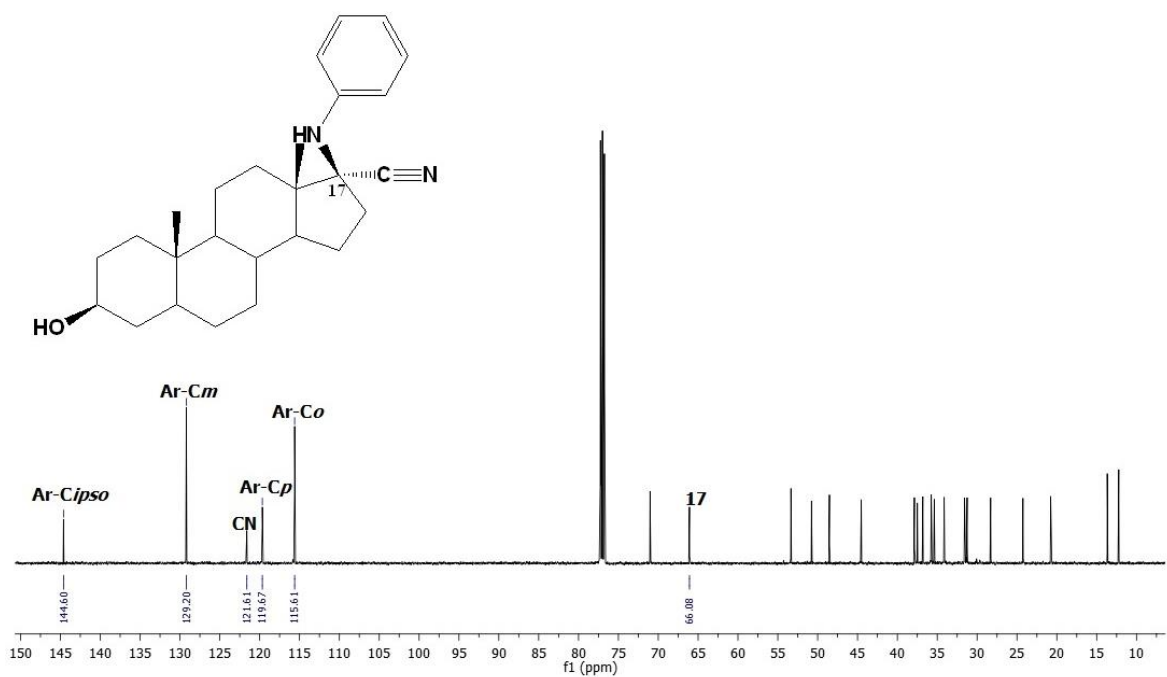
La caracterización del compuesto obtenido comenzó con el espectro de RMN 1H en el que se puede apreciar el protón correspondiente a la amina secundaria presente en la molécula, así como las señales del anillo aromático. Observamos un triplete para los protones equivalentes Ar-H m , mientras que a frecuencias más altas se aprecia otro triplete para Ar-H o que se encuentra solapado con la señal de Ar-H p (Espectro 9).



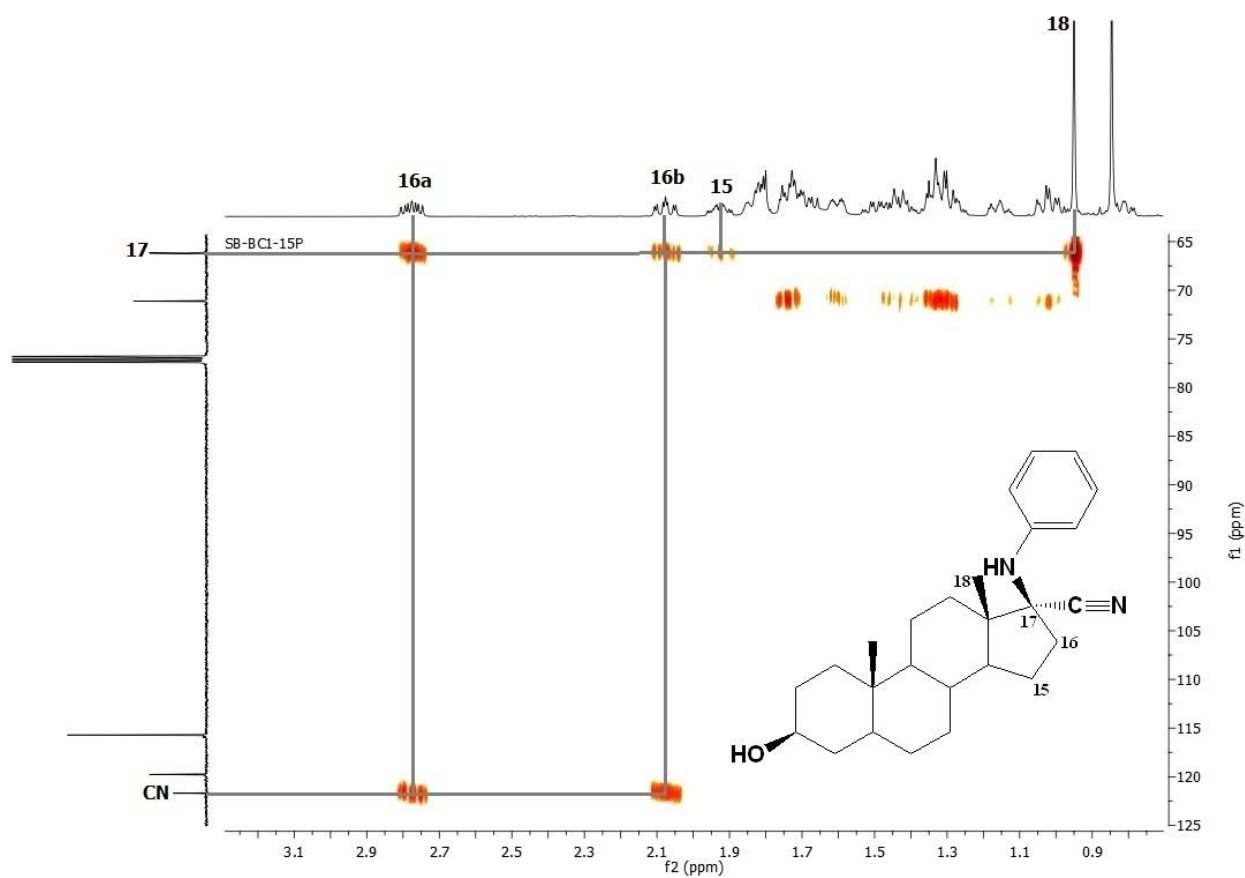
Espectro 6. Espectro RMN ^1H 500 MHz del compuesto 5

En el caso de RMN ^{13}C observamos entre 110 y 150 ppm las cuatro señales correspondientes a los carbonos aromáticos y una en 121.7 ppm atribuida al grupo ciano que se ha unido a la molécula. Así mismo es perceptible el desplazamiento de C-17 a 66.1 ppm resultado de la apertura del carbonilo para la formación del α -aminonitrilo. (Espectro 10)

Para la determinación de la señal del nitrilo, fue de gran ayuda el análisis del experimento HMBC en el cual se puede observar la correlación heteronuclear a larga distancia de este carbono con los protones cercanos H-16. Así mismo fue posible asignar C-17 observando su correlación con H-15, H-16a, H-16b y H-18. En el caso de H-16, se aprecian dos señales multipletes con diferentes desplazamientos, debido a que estos protones son diastereotópicos. (Espectro 11)

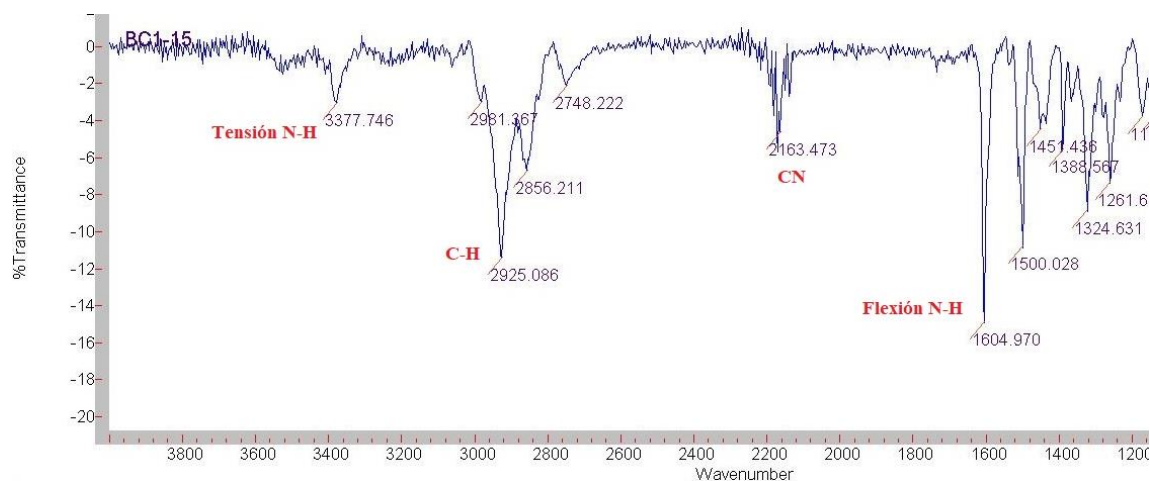


Espectro 7. Espectro RMN ^{13}C 125 MHz del compuesto 5



Espectro 8. Fragmento del espectro HMBC del compuesto 5

Por último, para concretar la caracterización del productos se obtuvo un espectro IR donde podemos observar la banda correspondiente al grupo nitrilo alrededor de 2100 cm^{-1} , además de las bandas atribuidas a la amina secundaria y a los enlaces C-H.

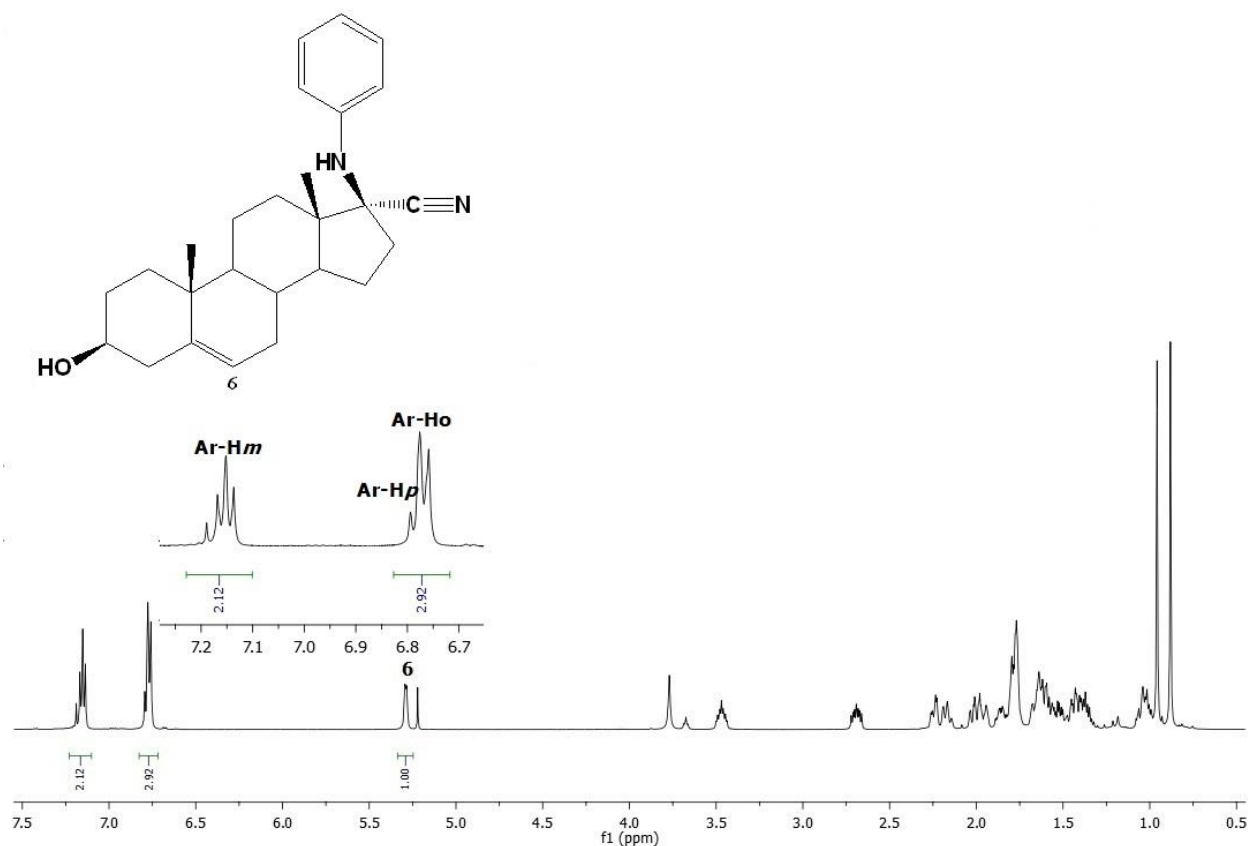


Espectro 9. Espectro IR del compuesto 5

5.2.1.2 17 α -ciano-17 β -fenilamino-5 α -androst-5-en-3 β -ol. (5a)

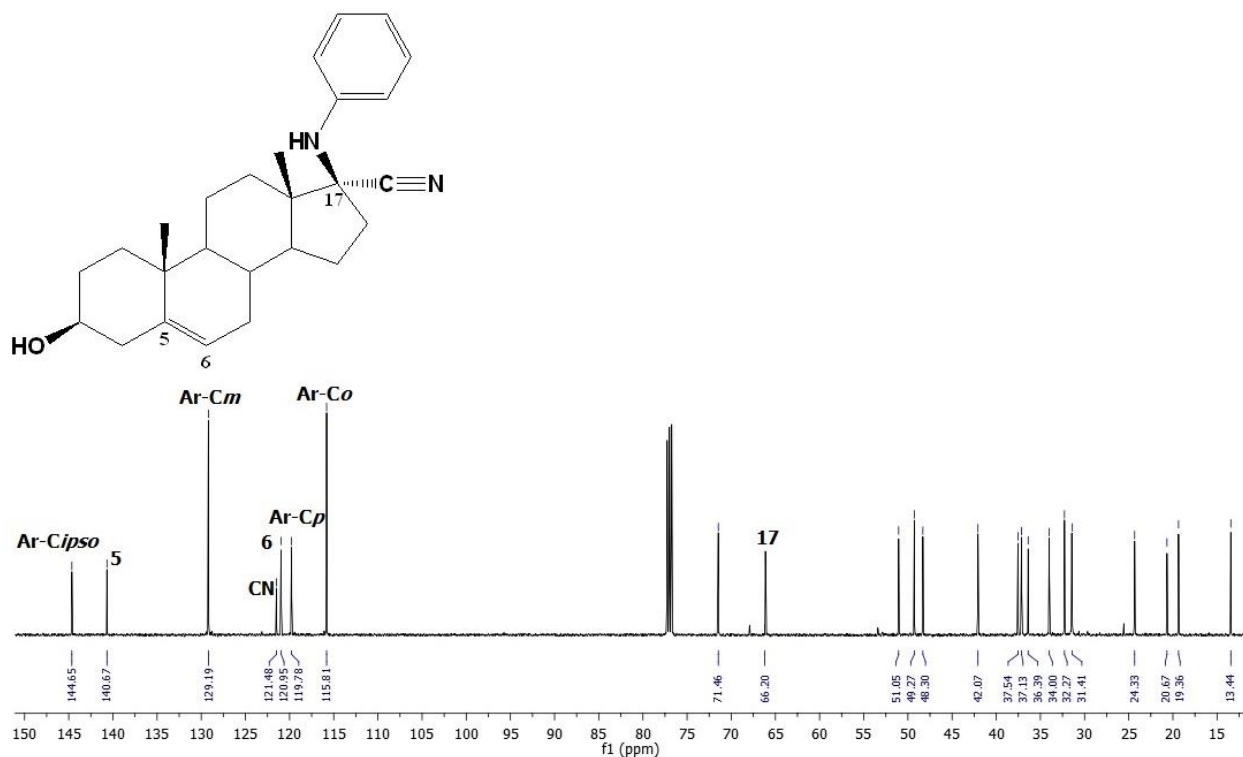
Para la obtención del compuesto **5a** se llevó a cabo la misma metodología utilizando como materia prima *trans*-Dehidroandrosterona, lo que nos condujo a obtener la molécula deseada en un rendimiento del 86% después de purificación en columna con gel de sílice y un sistema 9/1 (Hexano/AcOEt). El mecanismo de reacción propuesto es el mismo que se indica para el ensayo con *trans*-Androsterona. (Esquema 13)

Una vez aislado el compuesto puro, se obtuvo el espectro RMN ^1H que se aprecia de una manera muy similar al obtenido para el compuesto **5**, incluyendo el patrón de señales para el anillo aromático. En esta ocasión, la diferencia más notable es una señal característica en 5.25 ppm correspondiente al protón alílico H-6.



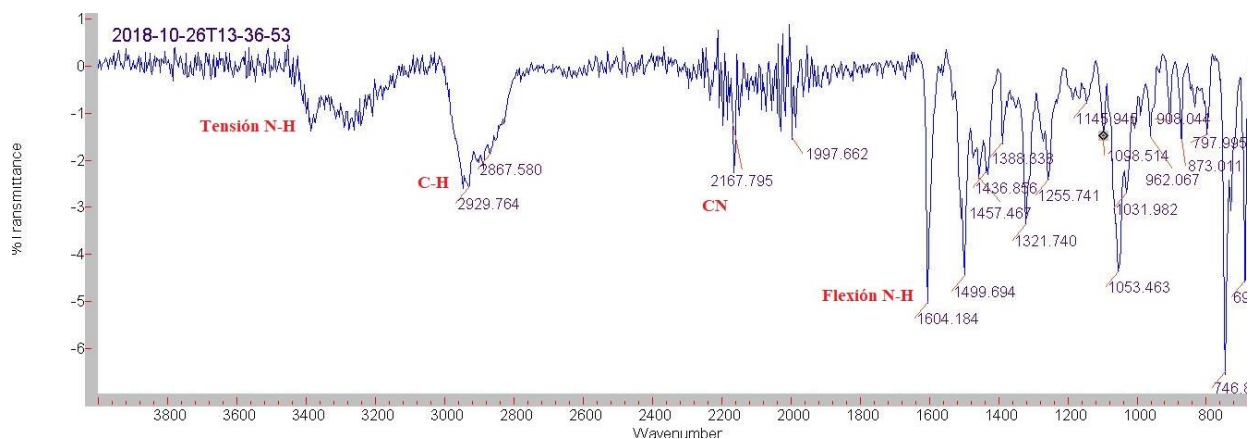
Espetro 10. *Espetro RMN ^1H 500 MHz del compuesto 5a*

El espectro de RMN ^{13}C , de igual manera, se observa similar al del compuesto **5**, en la zona comprendida entre 115 y 145 ppm encontramos cuatro señales correspondientes a los carbonos aromáticos, así como la señal del nitrilo en 121.4 ppm y las señales de los carbonos vinílicos C-5 y C-6. Así mismo se percibe la señal de C-17 desplazada a frecuencias más bajas.



Espectro 11. Espectro RMN ^{13}C 125 MHz del compuesto **5a**

Para el caso del espectro de IR, se observan nuevamente las bandas más características del compuesto obtenido **5a** atribuidas al grupo amino en 3400 cm^{-1} para tensión del enlace N-H un poco solapada con una banda ancha en 3300 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H, en 1604 cm^{-1} se encuentra la banda provocada por la flexión del enlace N-H, para el grupo nitrilo en 2167 cm^{-1} y enlaces C-H para C sp^3 en 2929 cm^{-1} , finalizando así la caracterización de la molécula.



Espectro 12. Espectro IR del compuesto **5a**

Debido a que durante el mecanismo de reacción se tiene la formación del intermediario plano ión iminio, el ataque nucleofílico por parte del TMSCN puede darse por la cara *Si* o por la cara *Re*, generando dos enantiómeros posibles para el producto obtenido.

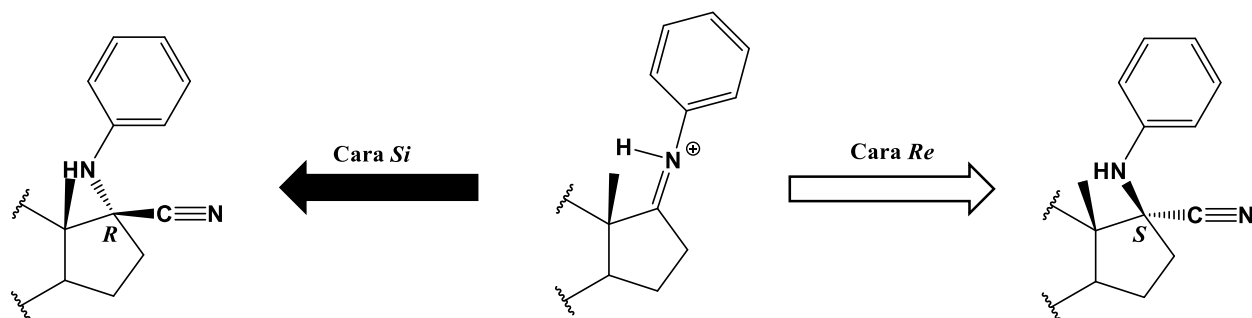


Figura 12. Diastereoisómeros posiblemente obtenidos.

Nuevamente, se hizo uso de herramientas computacionales con el programa Gaussian y del modelo teórico Felkin-Ahn, por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos, se propone la configuración del carbono quiral C-17 tanto de **5** como de **5a**.

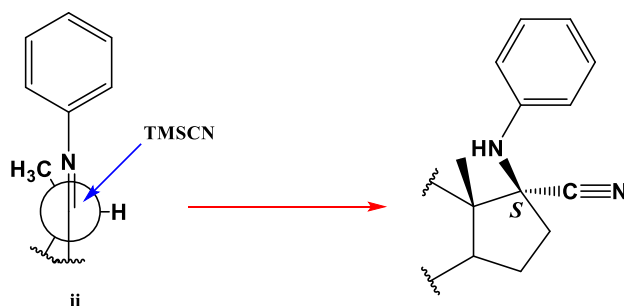


Figura 13. Modelo predictivo Felkin-Ahn.

El modelo predictivo de Felkin-Ahn muestra una inclinación hacia el isómero S, ya que esto implicaría el ataque nucleofílico del TMSCN por la cara menos impedida de la imina intermediaria ii.

Por otra parte, se realizaron también los cálculos de energía correspondiente mostrados a continuación:

Precursor	Compuesto	Configuración	Energía (Kcal/mol)
<i>trans</i> -Androsterona	5	R	-751287.31
		S	-751287.85
<i>trans</i> -Dehidroandrosterona	5a	R	-750517.85
		S	-750518.38

Tabla 6. Mínimas energías de diastereoisómeros

Como se observa en la tabla 6, las energías muestran una diferencia muy pequeña entre los diastereoisómeros. Sin embargo, en el estudio poblacional es posible apreciar una diferencia mucho más notable con altos porcentajes para el isómero S.

Precursor	Compuesto	Configuración	Poblaciones (%)	Ángulo diedro
trans-Androsterona	5	Diastereoisómero R	21.87	-94.65°
		Diastereoisómero S	78.13	148.08°
trans-Dehidroandrosterona	5a	Diastereoisómero R	24.14	-94.76
		Diastereoisómero S	75.86	147.93°

Tabla 7. Distribución de equilibrio y los correspondientes valores de los ángulos diedros de los diferentes diastereoisómeros

Finalmente, se realizó la comparación entre los desplazamientos químicos de C-17 teóricos y experimentales tanto del compuesto **5** como **5a**, encontrando una mayor afinidad con los diastereoisómeros *S*.

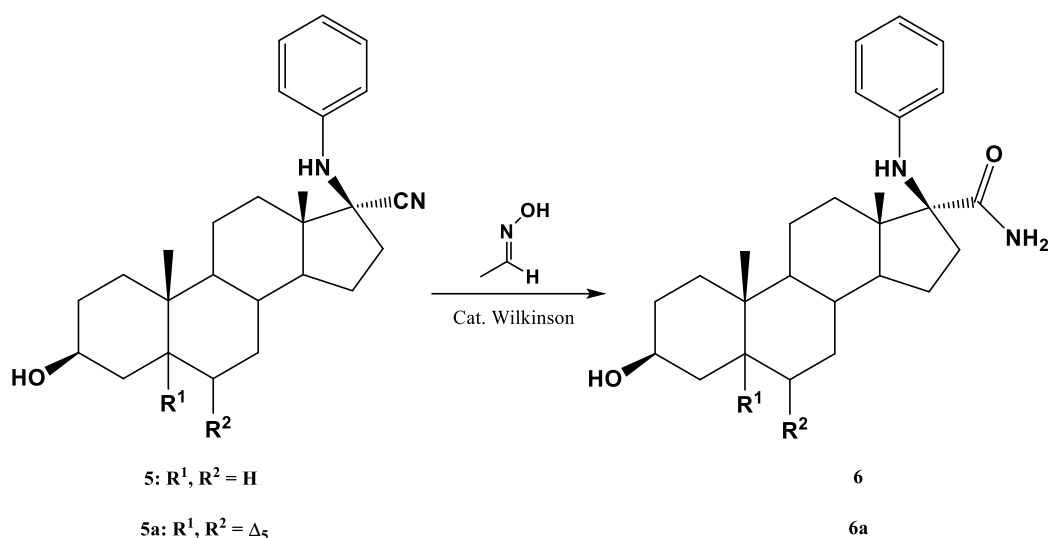
Precursor	Compuesto	$\delta^{13}\text{C}_{\text{exp.}}$	Configuración	$\delta^{13}\text{C}_{\text{teórico}}$	$\Delta\delta$
trans-Androsterona	5	66.08 ppm	R	68.02 ppm	1.94 ppm
			S	66.8 ppm	0.8 ppm
trans-Dehidroandrosterona	5a	66.20 ppm	R	68.04 ppm	1.84 ppm
			S	66.83 ppm	0.63 ppm

Tabla 8. Comparación de desplazamientos químicos $\delta^{13}\text{C}$ teóricos y experimentales

De acuerdo a los datos recopilados, se observa que el producto más estable será aquel en el que C-17 tenga la configuración *S*, es decir, que el grupo nitrilo se ha adicionado por la cara *Si* y se encuentra de forma *anti* a C-18 tanto en el compuesto **5** como en **5a**.

5.2.2 Segunda etapa

Para la segunda etapa de reacción se busca realizar una hidrólisis sobre el grupo nitrilo presente en los compuestos **5** y **5a** para obtener las amidas correspondientes generando los derivados **6** y **6a**.



Esquema 14. Segunda etapa de reacción de la ruta sintética B

5.2.2.1 3 β -hidroxi-17 β -fenilamino-5 α -androstan-17 α -carboxamida. (6)

Partiendo de *trans*-Androsterona como materia prima, se realizaron ensayos para llevar a cabo la hidrólisis utilizando condiciones ácidas con H₂SO₄ o HCl de acuerdo a lo reportado por Aboul-Eneil,³⁸ El-Latif⁴⁸ y Stefane,⁴⁹ respectivamente.

Reactivo	Volumen (ml)	Tiempo (h)	Temperatura (°C)
H ₂ SO ₄ 98%	1 - 4	20 - 90	t.a - 50
H ₂ SO ₄ 0.5 M	10 - 15	5 - 20	50
HCl 37%	2 - 6	24 - 48	t.a

Tabla 9. Condiciones ácidas probadas para hidrólisis de nitrilo (100 mg)

Sin obtener resultados positivos, se pensó en probar condiciones básicas utilizando NaOH, sin embargo, este ensayo tampoco arrojó buenos resultados.

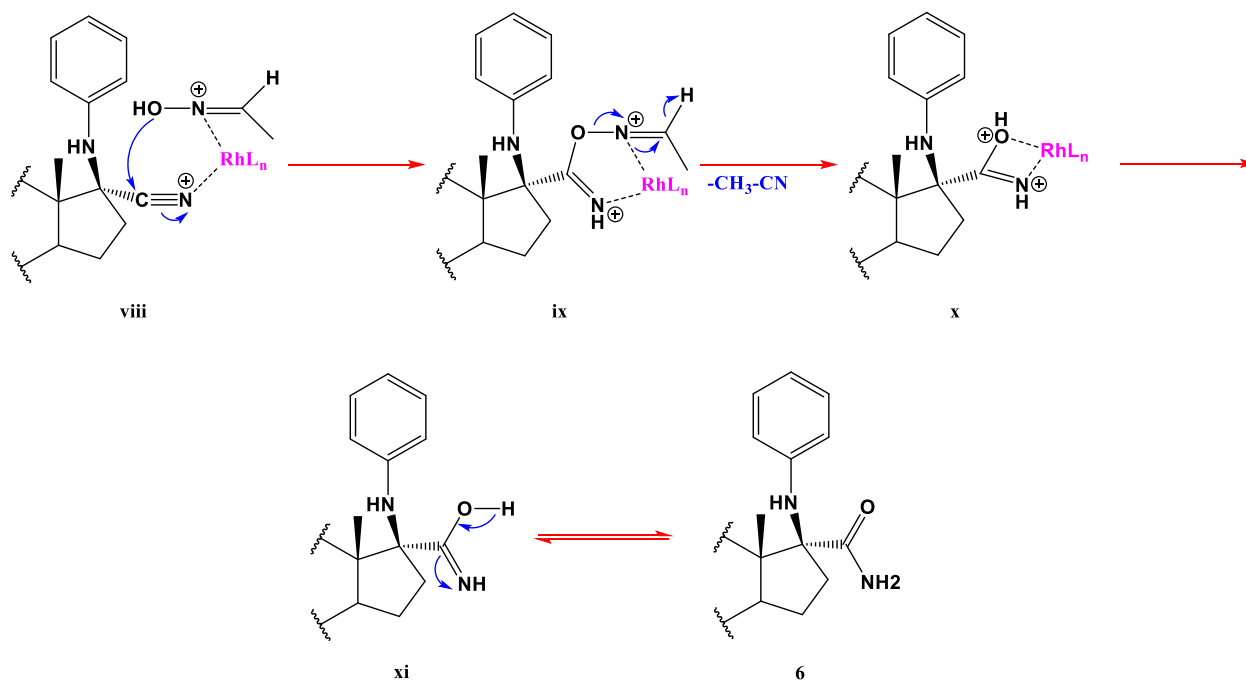
Reactivo	Equivalentes	Tiempo (h)	Temperatura
NaOH 1M	0.5 - 1	20 - 30	t.a - 50 °C

Tabla 10. Condiciones básicas probadas para hidrólisis de nitrilo

Como se observa en las tablas 5 y 6, a pesar de haber modificado variables como el número de equivalentes, tiempo y temperatura, no se logró obtener la amida bajo condiciones ácidas o básicas.

Debido a esto se tomó la decisión de probar una metodología anteriormente utilizada en nuestro grupo de investigación sobre un sustrato esteroidal y reportada por Lee en el 2009.⁵⁰ Esta técnica se refiere a una hidrólisis anhidra utilizando acetaldoxima como fuente de agua en presencia de un catalizador de Rodio $\text{RhCl}(\text{Ph}_3)_3$ y es de especial utilidad cuando se ensaya sobre moléculas que contienen grupos sensibles a condiciones ácidas o básicas.

El mecanismo propuesto de la reacción implica una coordinación entre el Rodio del catalizador con los nitrógenos del grupo ciano y de la acetaldoxima generando el complejo **viii**, esto conlleva a un ataque nucleofílico por parte del oxígeno de la oxima ilustrado en **ix**. Tras un reordenamiento, se pierde una molécula de acetonitrilo para formar el intermediario **x** y finalmente al descoordinarse del centro metálico obtenemos **xi**, quien al tautomerizarse genera el derivado **6**.

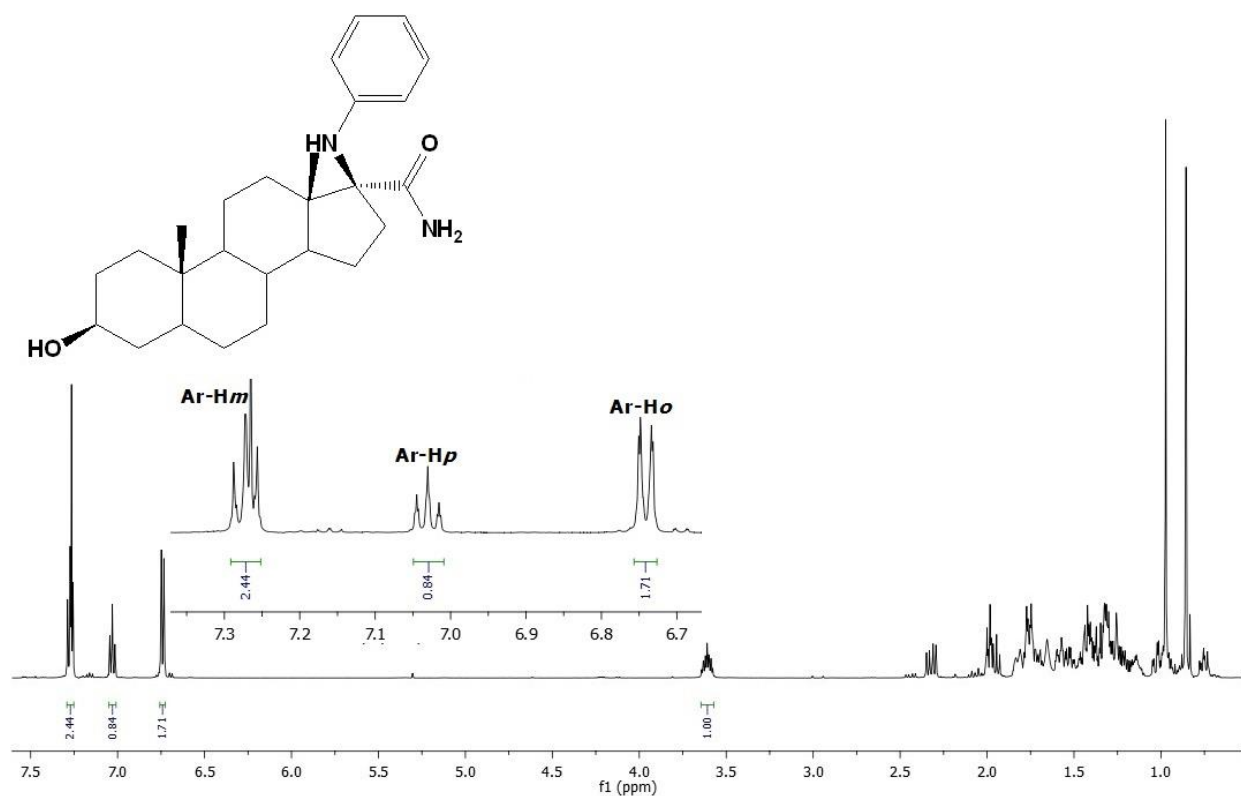


Esquema 15. Mecanismo de acción propuesto para la hidrólisis de nitrilo

El compuesto **6** se obtuvo en un rendimiento del 40% después de purificar en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y un sistema 7/3 (Hexano/Acetato) como fase móvil. Sin

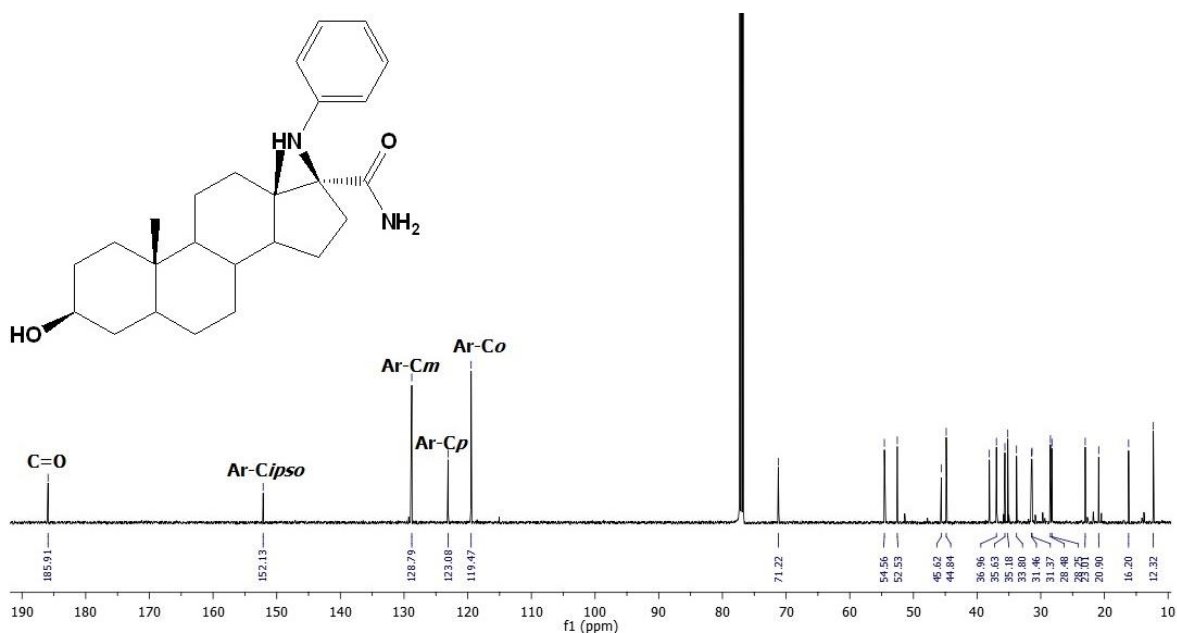
embargo, se recuperaron fracciones en las que se obtuvo mezcla del producto con materia prima sin poder aislar las moléculas debido a la similitud entre los Rf.

Una vez que se contó con el derivado purificado, se procedió a realizar su caracterización, en el espectro RMN ^1H se identifican claramente los protones aromáticos como una señal en 7.3 ppm para Ar-H m , otra en 7.0 ppm para Ar-H p y una más a menores frecuencias en 6.75 ppm para Ar-H o .



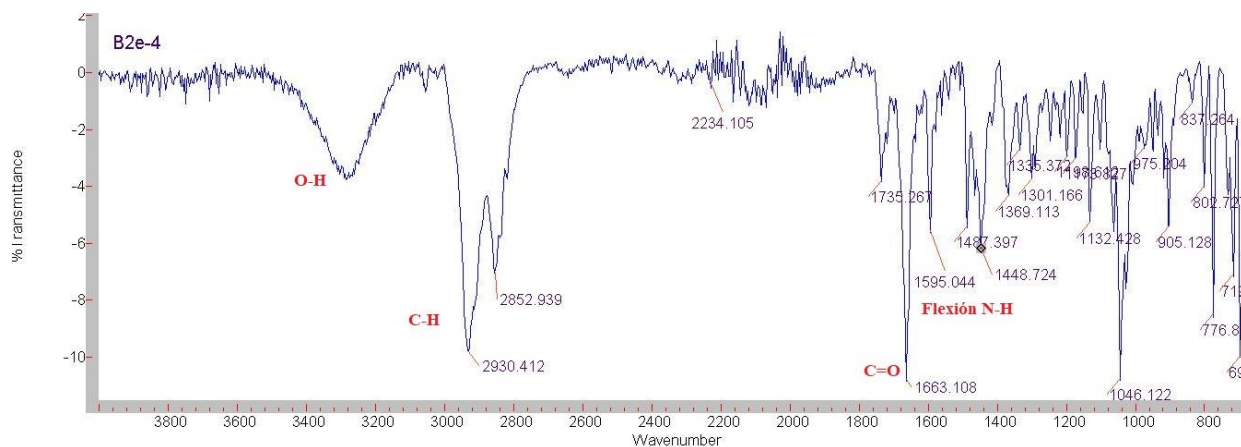
Espectro 13. Espectro RMN ^1H 500 MHz del compuesto 6

Para el caso de RMN ^{13}C observamos nuevamente las cuatro señales de carbonos aromáticos ya que Ar-C o son equivalentes de igual manera que Ar-C m , además observamos también una señal en 185 ppm correspondiente al carbonilo del grupo amida, con lo que podemos corroborar su presencia.



Espectro 14. Espectro RMN ^{13}C 500 MHz del compuesto 6

En el espectro de IR se observa una banda a 1663 cm^{-1} que corresponde al carbonilo de la amida, confirmando una vez más la presencia de este grupo funcional. Por otra parte, seguimos observando las bandas atribuidas a las interacciones de los enlaces C-H y a números de onda más altos, las bandas de tensión N-H se solapan con una banda ancha que abarca una región desde 3500 cm^{-1} hasta 3100 cm^{-1} atribuida a la fuerte absorción del enlace O-H del grupo hidroxilo presente en la molécula, así mismo en 1595 cm^{-1} encontramos la banda de flexión correspondiente a aminas y amidas primarias



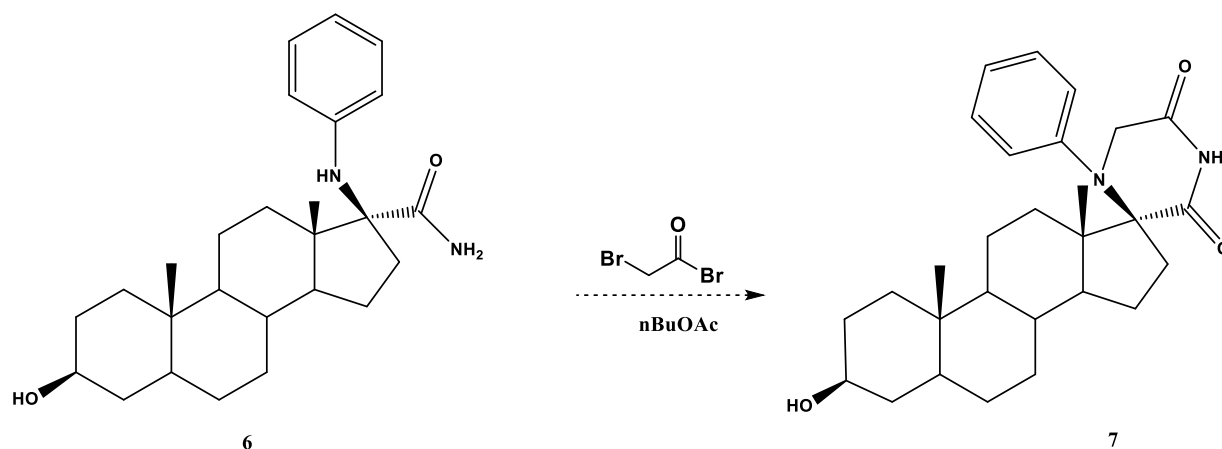
Espectro 15. Espectro IR del compuesto 6

5.2.2.2 3 β -hidroxi-17 β -fenilamino-5 α -androst-5-en-17 α -carboxamida. (6a)

La metodología utilizando acetaldoxima fue probada de igual manera con el intermediario **5a**. En la mezcla de reacción, por CCF se observaban dos compuestos mayoritarios, de los cuales uno de ellos correspondía a la materia prima. Los R_f de ambos compuestos son similares, por lo que no fue posible aislar el compuesto **6a**. Sin embargo, en RMN 300 MHz, se observa la presencia del grupo amida, lo que nos sugiere que la reacción se llevó a cabo, aunque no se consumió el 100 % de la molécula de partida.

5.2.3 Tercera etapa

Como última etapa para formar el derivado espiránico, la ruta plantea una ciclación utilizando bromuro de bromoacetilo. De esta manera, al sufrir ataques nucleofílicos por el par de electrones del nitrógeno del grupo amina y amida al carbonilo y carbono α , respectivamente, se desplazará cada uno de los átomos de bromo presentes en la molécula, y finalmente se obtendría el compuesto espiro **7**.



Esquema 16. Tercera etapa de la ruta sintética B

Esta ciclación fue ensayada únicamente partiendo del derivado de *trans*-Androsterona **6**. En el crudo de reacción monitoreado a través de TLC, se observa que la materia prima se consume por completo formando nuevos productos, sin embargo lamentablemente por falta de tiempo ya no fue posible purificar ni caracterizar los compuestos obtenidos.

5.3 Ruta sintética C

5.3.1 Primera etapa

5.3.1.1 17 α -ciano-17 β -fenilamino-5 α -androstan-3 β -ol. (5)

Para la tercera ruta de síntesis, como primera etapa se propone obtener α -aminonitrilos, es por ello que se utiliza la metodología que se ha reportado en la ruta sintética B en la que se hace uso de la reacción de Stecker para la síntesis de los derivados **5** y **5a**.

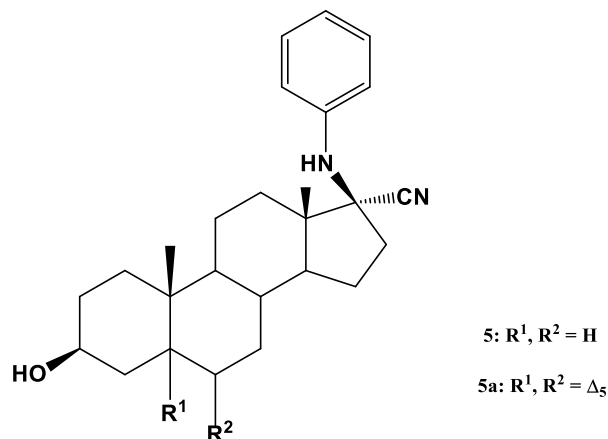
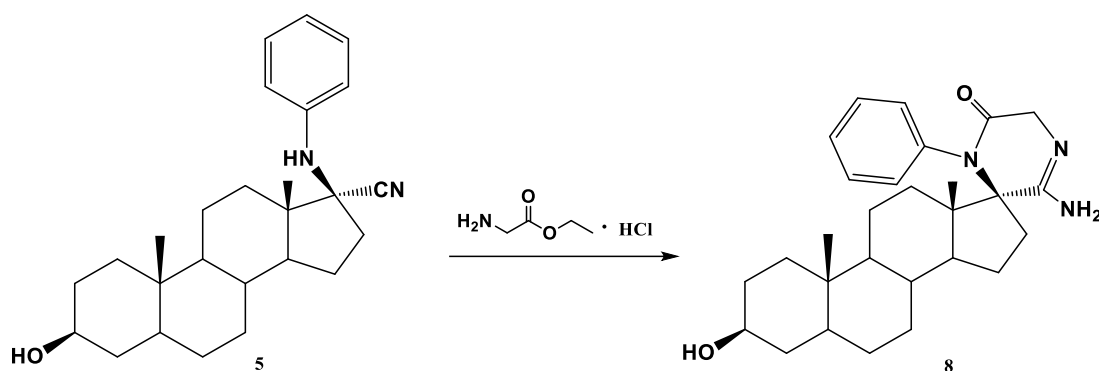


Figura 14. Estructura de los derivado 5 y 5a

5.3.2 Segunda etapa

5.3.2.1 17(S)-5'-amino-1'-fenil-3 β -hidroxiespiro[5 α -androstan-17,6'-dihidropirazin]-2'(1H)-ona. (8)

Para el segundo paso de síntesis, se utiliza como materia prima únicamente el compuesto **5**, mismo que se coloca en presencia de base para posteriormente agregar etilaminoacetato en su forma de clorhidrato para llevar a cabo la ciclización requerida y así obtener el derivado espiránico **8**.



Esquema 17. Esquema general de la segunda etapa de la ruta sintética C

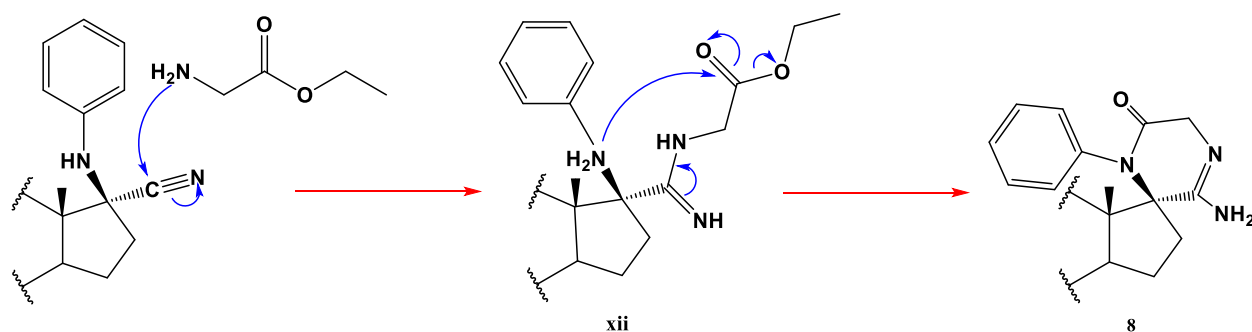
Debido a que el nucleófilo que se utiliza en esta reacción se encuentra en forma de sal, es necesario utilizar una base para que este reactivo pueda ser capaz de llevar a cabo el ataque nucleofílico correspondiente. Para ello, fueron ensayadas diferentes bases y de esta manera se evaluaron las condiciones óptimas de reacción. Tabla 7.

Base	pKa	Observaciones	Rendimiento
Piperidina	11	Se obtuvo el compuesto 8 , materia prima y otros subproductos	NA
TEA	10.75	Se obtuvieron gran cantidad de productos y materia prima	NA
Imidazol	6.95	Se obtuvo el compuesto 8 y materia prima	42 %
Piridina	5.17	Se obtuvo el compuesto 8 y materia prima	51 %

Tabla 11. Bases ensayadas en la etapa 2 de la ruta sintética C

De acuerdo a los valores de pKa de las bases utilizadas es posible observar que a mayor fuerza de la misma, como TEA y piperidina se observan subproductos no deseables que hacen que la reacción proceda con un rendimiento menor y su purificación sea más complicada. Debido a esto, se decidió realizar ensayos con bases más débiles como son imidazol y piridina observando que con ambos reactivos la reacción procede de mejor manera y se obtiene el derivado espiránico deseado, sin embargo en ninguno de los dos casos se logra consumir el total de la materia prima; aun así se encuentra que el rendimiento de reacción es ligeramente más elevado con el uso de piridina que corresponde a la base ensayada con el valor de pKa más bajo.

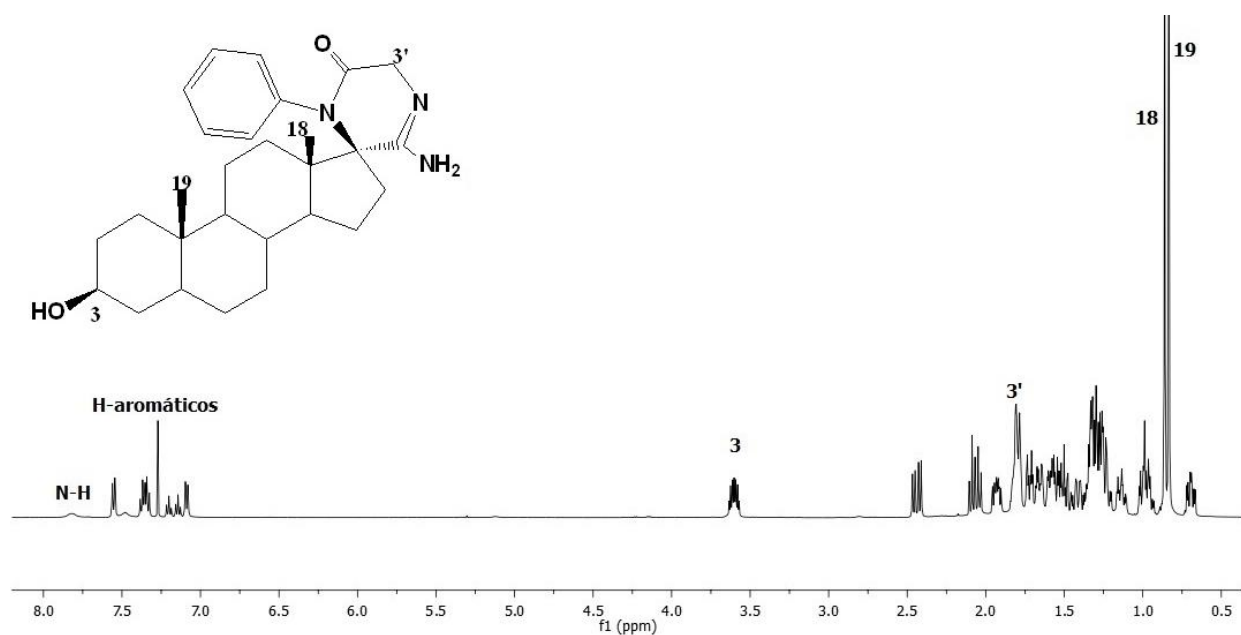
Con base en las observaciones experimentales, se decide utilizar piridina para llevar a cabo la reacción de interés, proponiendo como mecanismo el mostrado en el esquema 18 en el cual el par de electrones del etilaminoacetato atacará de manera nucleofílica al carbono del grupo nitrilo formando el intermediario **xii** quien posteriormente cerrará el anillo al ciclar de manera intramolecular mediante un ataque nucleofílico del par de electrones de la anilina hacia el carbonilo para finalmente obtener el espirociclo **8**.



Esquema 18. Mecanismo propuesto para la segunda etapa de la ruta sintética C

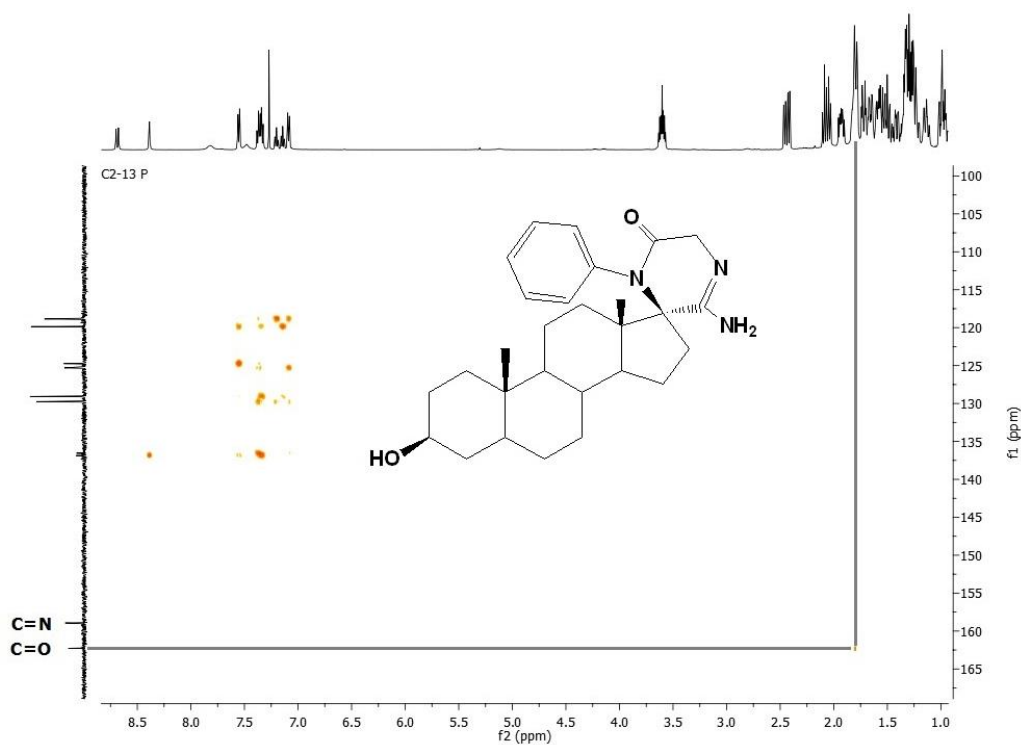
Después de una purificación en columna, fue posible retirar de la muestra la mayor cantidad de materia prima sobrante, y de esta forma comenzar la caracterización del compuesto **8**.

En primera instancia, se obtuvo el espectro de RMN ^1H , en el cual son apreciables las señales correspondientes al anillo aromático en un rango de 7.7 a 7.0 ppm, así como las características del esqueleto esteroidal como H-3 en 3.59 ppm y los metilos H-18 y H-19. Los protones alfa a carbonilo H-3' se localizan en un desplazamiento menor al esperado provocado por el efecto anisotrópico que se genera debido a la presencia del anillo aromático, de manera similar a los reportes que presentan Klod y Kleinpeter.⁵¹



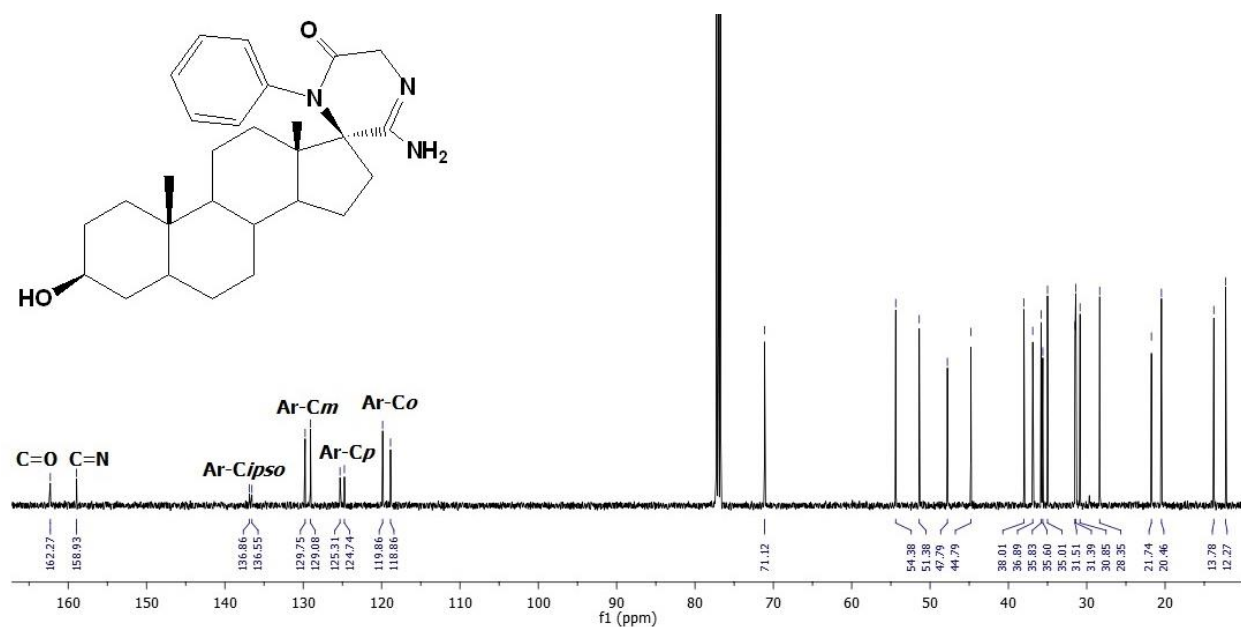
Espectro 16. Espectro RMN ^1H 500 MHz del compuesto 8

El experimento bidimensional HMBC fue de gran ayuda para determinar H-3' puesto que se alcanza a observar una correlación con la señal que corresponde al grupo carbonilo.



Espectro 17. Fragmento del espectro HMBC del compuesto 8

En este caso, el espectro RMN ^{13}C puede mostrar un poco más de información debido a que se observan de manera evidente las señales correspondientes al grupo carbonilo $\text{C}=\text{O}$ y al carbono de tipo imina $\text{C}=\text{N}$ en 162.27 y 158.93 ppm respectivamente. Las señales del anillo aromático se perciben dobleteadas, esto debido a que el grupo fenilo presenta rotación lo que conlleva a que el equipo de RMN detecte a los átomos de carbono como diferentes.



Espectro 18. Espectro RMN ^{13}C 125 MHz del compuesto 8

5.4 Actividad biológica

Tal y como marcan los objetivos de este trabajo, no sólo se busca sintetizar derivados esteroidales sino también evaluar la actividad biológica de ellos. Para lograr nuestro cometido hemos recibido el apoyo del Dr. José Manuel Padrón Carrillo, investigador perteneciente al Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” de la Universidad de la Laguna, Tenerife, España.

Bajo la dirección del Dr. Padrón, se realizó la evaluación antiproliferativa *in vitro* de todos los compuestos obtenidos, sometiéndolos a 48 h de exposición ante seis líneas celulares de tumores sólidos humanos: A549 (pulmón), HBL-100 (mama), HeLa (cérvix), SW1573 (pulmón), T-47D (mama), WiDr (colon).

5.4.1 Método de evaluación antiproliferativa

El ensayo empleado fue el de sulforodamina B (SRB) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos, el cual nos ayuda a determinar la inhibición del crecimiento celular mediante un análisis colorimétrico.

Se emplea una placa de siembra de 96 pocillos que se incuba a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO₂ durante toda la noche para que las células se adhieran a la superficie de los pocillos.

Los compuestos a ensayar secos y puros son disueltos en DMSO mientras que células de control también son expuestas a una concentración equivalente de DMSO, cada fracción es probada a tres diluciones diferentes a una concentración máxima de 250 µg/ml.

El tratamiento farmacológico inicia 24 h después de haber sembrado y tiene una duración de 48 h, una vez concluido el tiempo las células son precipitadas con ácido tricloroacético TCA y fijadas durante 60 min. Posteriormente se tiñen con SRB, que es un colorante aniónico que se une electrostáticamente a los aminoácidos de las proteínas de las células que han sido fijadas previamente.

Tras la solubilización de los complejos SRB-proteínas con un buffer (Tris), se mide la densidad óptica mediante espectrofotometría. Esta medida será directamente proporcional al número de células presentes en cada pocillo.

El porcentaje de crecimiento se calcula en función de la diferencia en DO de los puntos de inicio y fin de la exposición de la muestra. Finalmente, los resultados obtenidos se expresan como la concentración del compuesto necesaria para causar una reducción del 50% en la proliferación de células cancerosas (GI₅₀).

5.4.2 Resultados de evaluación antiproliferativa

Se realizó el *screening* de seis derivados esteroidales, obteniendo los resultados de GI₅₀ que se aprecian en la tabla 8.

Compuesto	GI ₅₀ (μM)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
3	15 ± 4.3	18 ± 4.8	12 ± 2.0	17 ± 3.7	24 ± 7.2	17 ± 4.9
3a	5,1 ± 1.6	16 ± 3.5	12 ± 2.3	5,5 ± 2.1	9,4 ± 2.8	10 ± 2.6
5	25 ± 7.8	49 ± 6.9	28 ± 8.7	32 ± 4.9	18 ± 1.8	29 ± 7.3
5a	94 ± 8.7	100	37 ± 1.2	24 ± 1.0	17 ± 3.9	37 ± 8.6
6	24 ± 6.7	20 ± 4.0	16 ± 3.3	21 ± 2.3	25 ± 5.0	20 ± 2.2
8	100	100	100	100	100	100

Tabla 12. Valores de GI₅₀ obtenidos ante células de tumores humanos

Al comparar los resultados obtenidos, observamos que los compuestos con mayor potencial para inhibir el crecimiento celular de este panel de líneas son los derivados espiránicos **3** y **3a**. Recordando las estructuras de dichos compuestos, en su estructura se percibe la presencia de un núcleo de quinoxalina, el cual ha sido ya reportado por presentar interesantes actividades biológicas.

5.5 Docking molecular

El Docking molecular o acoplamiento molecular es una técnica computacional ampliamente utilizada para el desarrollo de nuevos fármacos, esta herramienta nos ayuda a estudiar la interacción de podría existir entre un compuesto y su posible receptor, mediante el análisis de energías de enlace entre ambas moléculas.⁵²

Existen diferentes vías que un compuesto puede seguir para inhibir la proliferación de células, sin embargo, de acuerdo al reporte de Edayadulla y Lee en 2014,⁴³ diversos derivados de la quinoxalina pueden desempeñarse como inhibidores de la enzima topoisomerasa IIβ. Es por ello que como complemento a este trabajo se decidió realizar un estudio de *Docking* molecular para predecir el comportamiento del complejo proteína-ligando tanto con el núcleo de quinoxalina aislado como con los compuestos **3** y **3a**.

5.5.1 Método

Esta técnica de acoplamiento molecular, fue realizada también con el apoyo del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” de la Universidad de la Laguna, Tenerife, España y bajo la dirección del Dr. Miguel Xavier Fernandes.

Como primer paso para realizar estas predicciones es necesario dibujar los derivados a ensayar incluyendo las configuraciones de los centros quirales presentes en la estructura y de esta manera optimizar las moléculas para poder utilizarlas en los cálculos de acoplamiento. Posteriormente, la estructura de la tomoisomerasa II β se obtiene de una base de datos y es preparada para su empleo mediante la eliminación de componentes que no forman parte de la propia proteína. Una vez cubiertos estos pasos se ejecuta el programa que irá cambiando la posición espacial de nuestra molécula para encontrar la conformación óptima en la que pueda interactuar con la proteína que se ha elegido para el ensayo.

El software que se utiliza arroja valores de energía para cada compuesto probado, esta energía pertenece a cada complejo proteína-ligando formado, de esta manera podemos interpretar que a menor energía, será más favorable la interacción entre las moléculas que forman el complejo.

Ligando	Energía (Kcal/mol)
Quinoxalina	-6.3
Derivado 3	-5.9
Derivado 3a	-4.0

Tabla 13. Energías obtenidas para los complejos ligando-proteína

Como se aprecia en la tabla 9, la menor energía obtenida corresponde a la quinoxalina, es decir que no se logra mejorar su interacción, sin embargo, la variación no es tan grande por lo que no se descarta la posibilidad de que los compuestos **3** y **3a** puedan ser un tanto inhibidores de esta enzima.

De igual manera, es posible visualizar las interacciones que tienen lugar en el complejo lo que nos ayuda a observar cómo se encuentra la molécula dentro del sitio activo y las interacciones que se generan. Las ligeras sombras de color gris sobre algunos átomos, nos indican que esa zona marcada se encuentra fuera del sitio activo.

Para nuestro caso, la enzima fue ensayada con ADN acoplado, por tanto observamos las interacciones con nucleótidos del mismo.

En la figura 15 se percibe la quinoxalina que interactúa con desoxiadenilato (DA), desoxiguanilato (DG), desoxicitidilato (DC) y desoxitimidilato (DT) y parte del anillo aromático se encuentra fuera del sitio activo de la enzima.

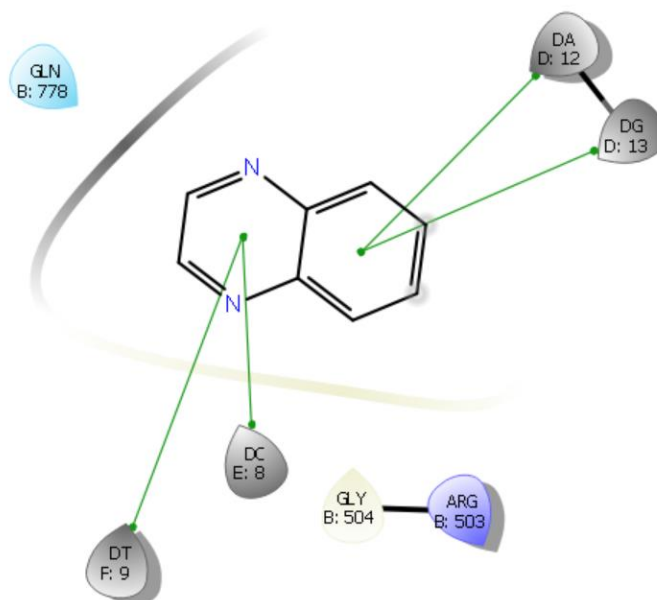


Figura 15. Interacciones topoisomerasa II β - Quinoxalina

En el compuesto **3** se observan las interacciones de dos de los heteroátomos presentes en la estructura con desoxiguanilato (DG) y desoxiadenilato (DA), así mismo podemos contemplar que la zona del hidroxilo se encuentra ligeramente fuera del sitio activo de la topoisomerasa II β . Figura 16

Finalmente en el complejo formado con el compuesto **3a** observamos una interacción por parte del grupo amino secundario con desoxiadenilato (DA) y por parte del hidroxilo con el residuo aminoacídico de Arginina (ARG). En este caso podemos percibir quien se encuentra fuera del sitio activo es el anillo aromático perteneciente al núcleo de la quinoxalina. Figura 17

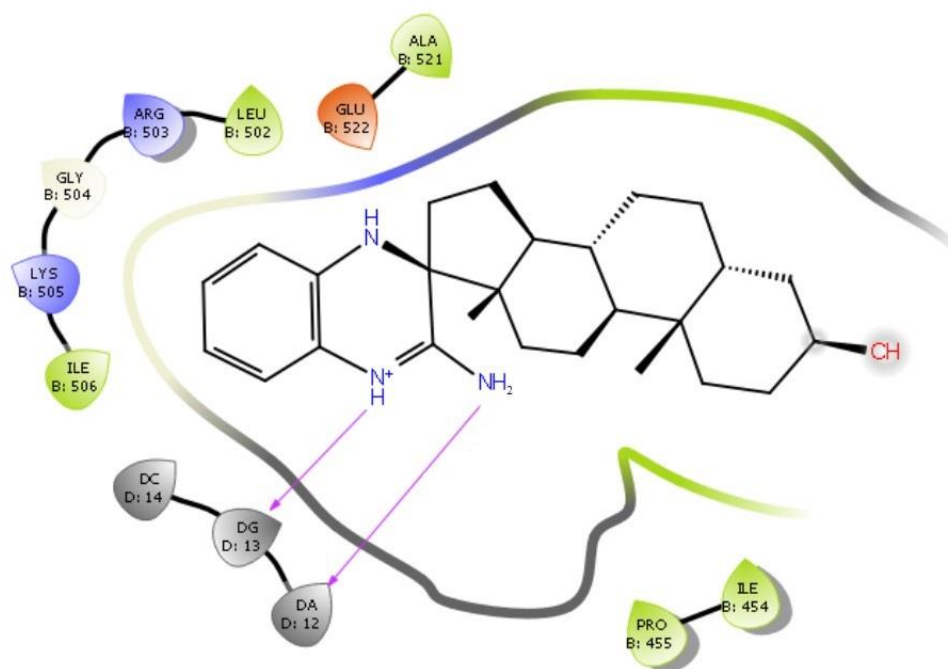


Figura 16. Interacciones topoisomerasa II β – Compuesto 3

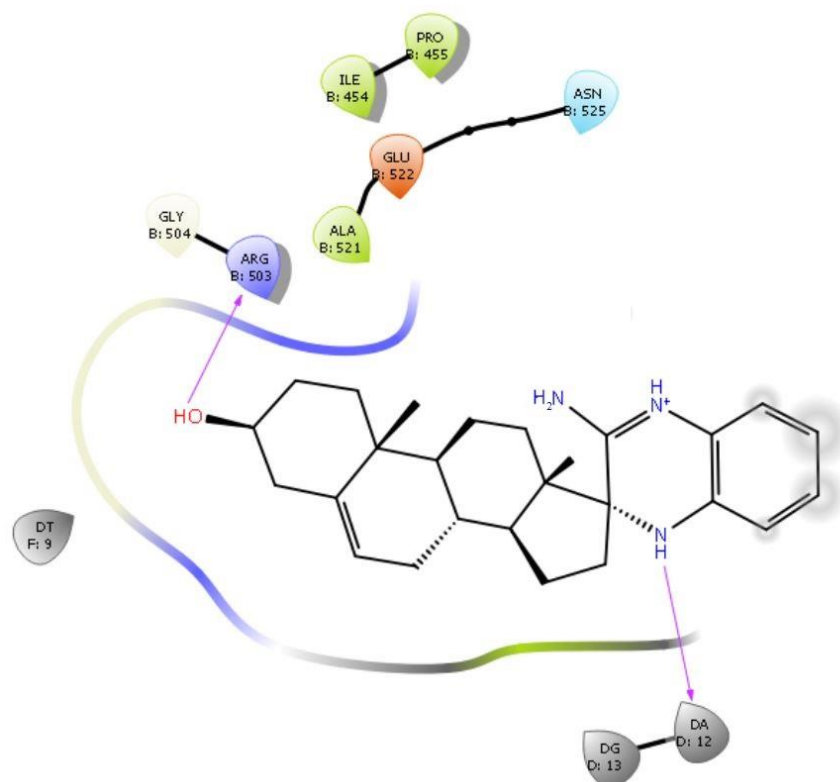


Figura 17. Interacciones topoisomerasa II β – Compuesto 3a

Con todos los datos obtenidos se plantea que los compuestos **3** y **3a** presentan un potencial como agentes antiproliferativos de células de tumores cancerosos debido a que podrían poseer un cierto nivel de inhibición de la enzima topoisomerasa II β quien se encuentra implicada en el proceso de replicación del ADN, esta enzima se encarga de cortar las hebras de ADN para que este pueda perder tensión, desenrollarse y comenzar la transcripción genética, por tanto al ser inhibida estamos afectando la proliferación celular.

6. Conclusiones

- ✚ Se desarrollaron nuevas rutas de síntesis para obtener derivados espiránicos esteroidales con núcleos 1,4-diazinas.
- ✚ Se pusieron en práctica técnicas *one-pot*, contribuyendo a la reducción de etapas y facilidad para obtener compuestos de cierta complejidad.
- ✚ Se obtuvieron dos compuestos espiránicos derivados de *trans*-Androsterona y un derivado *trans*-Dehidroandrosterona, además de cuatro intermediarios de reacción.
- ✚ Métodos espectroscópicos y físicos como RMN, IR, espectrometría de masas, punto de fusión y rotación óptica, fueron de ayuda para corroborar las estructuras de los compuestos obtenidos, así como realizar su correcta caracterización.
- ✚ Se evaluó la actividad antiproliferativa tanto de los derivados espiránicos como de los intermediarios de reacción ante un panel de seis líneas celulares obteniendo los mejores resultados para los compuestos **3** y **3a**.
- ✚ Los compuestos con mayor potencial como agentes inhibidores de crecimiento celular **3** y **3a** fueron sometidos a estudios de *docking molecular* simulando la formación de un complejo con la enzima topoisomerasa II β .
- ✚ Se propone que los compuestos **3** y **3a** presenten un cierto nivel de inhibición de la enzima topoisomerasa II β y como resultado se afecte la proliferación celular.

7. Metodología

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN aquí reportados, fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker Ascend a 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . Como disolvente se utilizó cloroformo deuterado (CDCl_3) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. En caso de haber utilizado un disolvente diferente, se indicará en el espectro correspondiente.

Los desplazamientos químicos se indican en ppm (δ), las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz) y la multiplicidad de las señales para los espectros de ^1H se expresan de la siguiente manera: s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), c (señal cuádruple), dd (señal doble de doble), sa (señal simple y ancha) y m (señal múltiple).

Cromatografía

Para la purificación de todos los compuestos obtenidos durante la síntesis, se utilizó la técnica de cromatografía en columna (CC) en la cual se empleó, en la mayoría de los casos, como fase estacionaria gel de sílice 60 Merk (230-240 mallas) y un sistema de eluyentes hexano / acetato de etilo. De igual forma, en caso de ser un espectro excepcional a estas condiciones, se reportará en el experimento correspondiente.

En el caso de la cromatografía en capa fina (CCF) fueron utilizadas placas comerciales de gel de sílice grado 60 con un espesor de capa 0.25 mm el cual contiene un indicador de fluorescencia (F_{254}), como fase móvil se emplearon sistemas de disolventes hexano / acetato de etilo. Finalmente, para su revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm) emitida por una lámpara de UVG-54, o diferentes reveladores como H_2SO_4 al 5% o vainillina los cuales se sometían posteriormente a calcinación.

Espectroscopía de infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron mediante un espectrofotómetro Agilent Cary 630 FTIR, los datos obtenidos se encuentran expresados en número de onda $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}), y la interfaz utilizada fue de reflectancia total atenuada (ATR) con punta diamante.

Puntos de fusión

El punto de fusión de los compuestos obtenidos fue medido mediante un equipo Melt-Temp, el cual presenta una escala en grados Celsius. La técnica utilizada fue la de capilar abierto.

Polarimetría

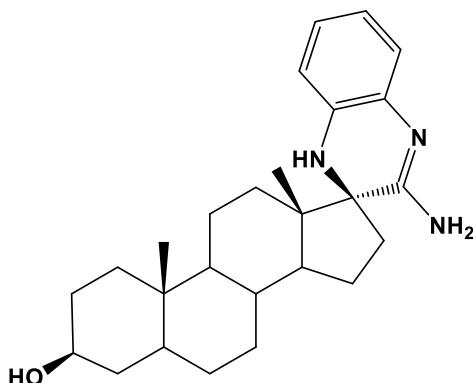
Las rotaciones específicas de los compuestos quirales obtenidos, se midieron con un polarímetro Perkin Elmer 341, a temperatura ambiente y con una radiación proporcionada por una lámpara de sodio de 589 nm.

Disolventes y materias primas

Los reactivos utilizados fueron de calidad grado analítico y los disolventes empleados se purificaron de acuerdo a técnicas que se encuentran ya descritas en la literatura.

8. Parte experimental

Síntesis de (17S)-3β-hidroxiestero[5α-androstan-17,3'-dihidroquinoxalin]-2'(3H)-amina. (3)



100 mg de trans-Androsterona (0.34 mmol) se disuelven en una mezcla 1:1 H₂O/THF, se adicionan 0.04 ml (0.34 mmol) de BF₃·EtO₂ y la mezcla de reacción de deja durante 30 min en agitación. Posteriormente se adicionan lentamente 73.4 mg (0.68 mmol) de *o*-Fenilendiamina continuando la agitación durante 2 horas, finalmente se agrega gota a gota 0.7 ml (0.68 mmol) de isocianuro de *tert*-butilo y la reacción continúa hasta que, mediante monitoreo por CCF, se observe que la reacción ya no avanza más.

La mezcla de reacción se extrae con DCM, la fase orgánica obtenida se seca con MgSO₄ y se concentra a presión reducida. El crudo de reacción es purificado mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice basificada con TEA y un sistema 6/4 (Hexano/AcOEt). De esta manera, con un 22% se rendimiento se obtienen el compuesto **5** como un aceite café.

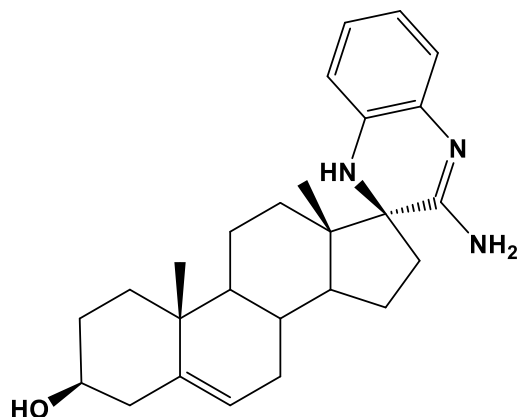
[α]_D²⁵: +5.01 (c 1.0, CH₂Cl₂)

IR (cm⁻¹): 3300 (νO-H), 2925 (νC-H), 1540 (νN-H)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 6.66 - 6.63 (m, 4H, H-6'-9'), 3.51 (m, 1H, H-3) 3.13 (ddd, 1H, J_{16a-16b} = 17.0, J_{16a-15b} = 6.8, J_{16a-15a} = 2.8 Hz, H-16a), 2.98 (ddd, 1H, J_{16b-16a} = 17.0, J_{16b-15a} = 6.8, J_{16b-15b} = 2.8 Hz, H-16b), 2.45 (m, 1H, H-15a), 2.13 (t, 2H, J₁₂₋₁₁ = 13.4 Hz, H-12) 1.80 (m, 1H, H-14), 1.76 - 1.65 (m, 4H, H-1,H-2), 1.44 (m, 1H, H-15b), 1.29 (m, 1H, H-8), 1.23-1.16 (m, 4H, H-4, H-7), 0.97 (s, 3H, CH₃-18), 0.92 - 0.72 (m, 5H, H-5,H-6, H-11), 0.70 (s, 3H, CH₃-19), 0.67 (t, J = 3.8 Hz, 1H, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 154.86 (C=N), 134.64 (C-5',10'), 120.27 (C-7',8'), 116.85 (C-6',9'), 84.46 (C-17), 71.17 (C-3), 52.52 (C-9), 45.24 (C-14), 44.00 (C-5), 41.66 (C-8), 37.69 (C-4), 36.86 (C-11), 35.57 (C-10), 34.62 (C-12), 32.71 (C-13), 31.26 (C-1), 29.69 (C-7), 28.73, 28.44 (C-16), 24.32 (C-15), 22.61 (C-2), 20.88 (C-6), 17.47 (C-18), 12.35 (C-19) ppm.

Síntesis de (17S)-3β-hidroxiestero[androst-5-en-17,3'-dihidroquinoxalin]-2'(3H)-amina. (3b)



La metodología seguida fue la misma que para el compuesto **3**, así como las cantidades de materia prima, reactivos y sistemas de elución para la purificación del crudo de reacción. En este caso fue obtenido un aceite oscuro con un rendimiento del 37%.

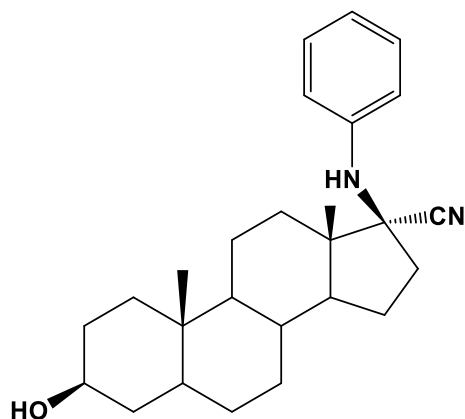
[α]_D²⁵: +14.42 (c 1.0, CHCl₃)

IR (cm⁻¹): 3053 (νN-H), 2925 (νC-H), 1539 (νN-H)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.52 (dd, 1H, *J*_{7'-8'} = 5.9, *J*_{7'-9'} = 3.1 Hz, H-7',H-8'), 7.19 (dd, 1H, *J*_{6'-7'} = 6.0 Hz, *J*_{6'-8'} = 3.1 Hz, H-6', H-9'), 5.25 (t, 1H, *J*₆₋₇ = 2.5 Hz, H-6), 3.50 (m, 1H, H-3), 2.78 (m, 2H, H-11), 2.27 (m, 1H, H-14), 2.25 (m, 2H, H-12), 1.99 (m, 2H, H-2), 1.85 (ddd, 1H, *J*_{16a-16b} = 14.4 Hz, *J*_{16a-15b} = 5.8 Hz, *J*_{16a-15a} = 2.4 Hz, H-16a), 1.75 (m, 2H, H-1), 1.72 (m, 1H, H-15a), 1.51 (m, 1H, H-16b), 1.38 (m, 2H, H-7), 1.28 (m, 1H, H-8), 1.15 (m, 1H, H-15b), 1.02 (m, 2H, H-4) 0.92 - 0.91 (m, 6H, CH₃-18, CH₃-19), 0.88 (t, 1H, *J*₉₋₁₁ = 9 Hz, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 155.64 (C=N), 140.11 (C-5), 122.01 (C-6',9',5',10'), 121.12 (C-6), 114.33 (C-7',8'), 71.37 (C-3), 49.63 (C-13), 49.52 (C-9), 41.71 (C-14), 36.84 (C-4), 36.64 (C-10), 35.33 (C-1), 33.98 (C-8), 33.78 (C-7), 31.50 (C-12), 31.22 (C-16), 26.51 (C-2), 25.58 (C-15), 23.57 (C-11), 20.09 (C-18), 19.23 (C-19) ppm.

Síntesis de 17 α -ciano-17 β -fenilamino-5 α -androstan-3 β -ol. (5)



En un matraz de 50 ml se colocan bajo atmósfera inerte 100 mg de *trans*-Androsterona y se disuelven en DCM anhidro. Se coloca en agitación y se agrega gota a gota un equivalente del catalizador BF₃EtO₂ (0.04 ml, 0.4 mmol). Dos horas más tarde son adicionados 0.1 ml (1.2 mmol) de anilina y continúa la agitación durante 21 horas, al término del tiempo se añaden 0.21 ml (1.6 mmol) de TMSCN continuando la reacción por 4 horas más.

Una vez concluido el tiempo se adicionan 5 ml HCl 1M y se deja agitar 10 min más para después extraer con DCM, secar la fase orgánica con MgSO₄ y concentrar a presión reducida. La purificación en columna se realizó con una mezcla de disolventes 9/1 (hexano/acetato de etilo) para obtener el compuesto **5** en forma de sólido blanco con un rendimiento de reacción del 84%.

Pf: 178 – 182 °C

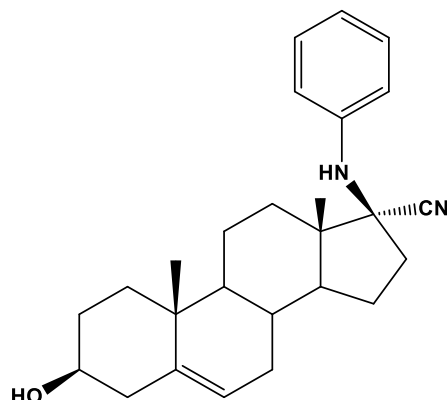
[α]_D²⁵: -42.21 (*c* 0.4, CH₂Cl₂)

IR (cm⁻¹): 3377 (vN-H), 2925 (vC-H), 2163 (vC≡N) 1604 (vN-H)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ : 7.25 (dd, 2H, $J_{m-o} = 8.5$ Hz, $J_{m-p} = 7.5$ Hz, Ar-H m), 6.90 - 6.82 (m, 3H, Ar-H m , Ar-H p), 3.85 (sa, 1H, NH), 3.63 (m, 1H, H-3), 2.78 (ddd, 1H, $J_{16a-16b} = 14.3$ Hz, $J_{16a-15b} = 9.7$ Hz, $J_{16a-15a} = 5.9$ Hz, H-16a), 2.08 (m, 1H, H-16b), 1.93 (m, 1H, H-15a), 1.87 – 1.78 (m, 4H, H-11, H-12), 1.77 – 1.69 (m, 3H, H-5, H-7), 1.67 (dd, 1H, $J_{14-15a} = 7.8$ Hz, $J_{14-15b} = 4.3$ Hz, H-14), 1.61 (m, 1H, H-2), 1.51 (m, 1H, H-1), 1.43 (m, 1H, H-15b), 1.31 (m, 1H, H-4), 1.16 (m, 2H, H-6), 1.02 (td, 1H, $J_{8-14} = 12.7$ Hz, $J_{8-7} = 3.8$ Hz, H-8), 0.95 (s, 3H, CH₃-18), 0.85 (s, 3H, CH₃-19), 0.80 (1H, $J_{9-12} = 11.6$ Hz, $J_{9-11} = 3.0$ Hz, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 144.60 (Ar-Cipso), 129.20 (Ar-Cm), 121.61 (C≡N), 119.67 (Ar-Cp), 115.61 (Ar-Co), 71.03 (C-3), 66.08 (C-17), 53.35 (C-9), 50.78 (C-14), 48.52 (C-13), 44.53 (C-6), 37.86 (C-2), 37.49 (C-16), 36.81 (C-8), 35.75 (C-1), 35.37 (C-10), 34.13 (C-11), 31.57 (C-7), 31.25 (C-12), 28.30 (C-4), 24.25 (C-15), 20.77 (C-5), 13.67 (C-18), 12.23 (C-19) ppm.

Síntesis de 17α-ciano-17β-fenilamino-androst-5-en-3β-ol. (5a)



Para la obtención de este compuesto se utilizó la misma metodología que se plantea para el derivado **5**. De igual manera, la purificación en columna procedió bajo las mismas condiciones y de esta manera se obtuvo un sólido blanco con 86% de rendimiento.

Pf: 165 – 170 °C

[α]_D²⁵: -92.96 (c 0.6, CH₂Cl₂)

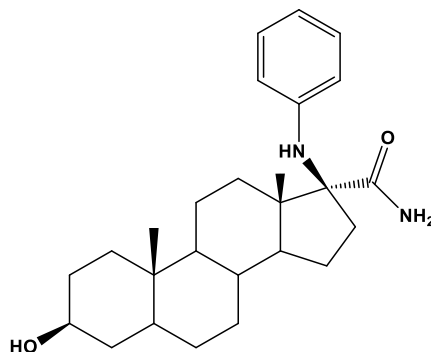
IR (cm⁻¹): 3400 (νN-H), 3250 (νO-H), 2929 (νC-H), 2167 (νC≡N) 1604 (νN-H)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.15 (t, 2H, *J*_{o-m} = 7.8 Hz, Ar-H_o), 6.78 (m, 3H, Ar-H_m, Ar, H_p), 5.29 (t, 1H, *J*₆₋₇ = 3.0 Hz, H-6), 3.47 (m, 1H, H-3), 2.69 (m, 1H, H-16a), 2.21 (m, 2H, H-4), 2.01 (ddd, 1H, *J*_{16gem} = 14.3 Hz, *J*_{16b-15a} = 9.7 Hz, *J*_{16b-15b} = 5.9 Hz, H-16b), 1.86 (m, 1H, H-15b), 1.82 – 1.75 (m, 6H, H-1, H-7, H-12), 1.69 – 1.54 (m, 3H, H-2, H-14), 1.52 (dd, 1H, , *J*₈₋₇ = 10.4 Hz, *J*₈₋₁₄ = 4.7 Hz, H-8), 1.39 (m, 1H, H-15a), 1.03 (m, 1H, H-9), 0.96 (s, 3H, CH₃-19), 0.88 (s, 3H, CH₃-18) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 144.65 (Ar-Cipso), 140.67 (C-5), 129.19 (Ar-Cm), 121.48 (C≡N), 120.95 (C-6), 119.78 (Ar-Cp), 115.81 (Ar-Co), 71.46 (C-3), 66.20 (C-17), 51.05 (C-14), 49.27 (C-

9), 48.30 (C-13), 42.07 (C-4), 37.54 (C-16), 37.13 (C-1), 36.39 (C-10), 34.00 (C-12), 32.27 (C-8), 31.41 (C-7), 24.33 (C-15), 20.67 (C-2), 19.36 (C-19), 13.44 (C-18) ppm.

Síntesis de 3β-hidroxi-17β-fenilamino-5α-androstan-17α-carboxamida. (6)



El aminonitrilo correspondiente (0.3 mmol) es disuelto en tolueno y se mezcla con 4mg del catalizador de Wilkinson y 0.1 ml (1.95) mmol de la acetaldoxima. La mezcla de reacción se deja a reflujo durante 4 horas. Una vez concluido el tiempo, se deja enfriar a t.a para después evaporar el tolueno a presión reducida. Finalmente, el producto obtenido se purifica mediante cromatografía en columna con un sistema 7/3 (Hexano/Acetato de etilo) aislando el producto deseado con un rendimiento del 40% como un sólido blanco.

Pf: 136 – 140 °C

[α]_D²⁵: +19.66 (c 0.7, CH₂Cl₂)

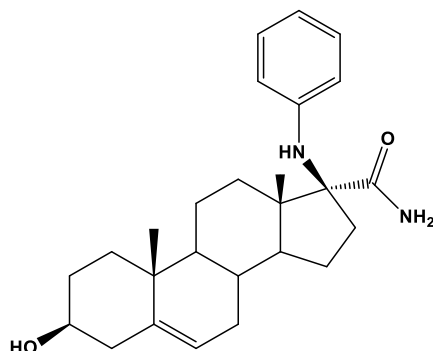
IR (cm⁻¹): 3250 (νO-H), 2930 (νC-H), 1663 (νC=O) 1595 (νN-H)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.27 (dd, 2H, *J*_{m-o} = 8.2 Hz, *J*_{m-p} = 7.5 Hz, Ar-H_m), 7.03 (tt, 1H, *J*_{p-m} = 7.3 Hz, *J*_{p-o} = 1.3 Hz, Ar-H_p), 6.74 (dd, 2H, *J*_{o-m} = 8.4 Hz, *J*_{o-p} = 1.4 Hz, Ar-H_o), 3.61 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-16a), 2.02 - 1.97 (m, 2H, H-16b, H-8), 1.85 - 1.82 (m, 1H, H-5), 1.78 – 1.73 (m, 4H, H-4, H-15), 1.70 (dd, 1H, *J*₁₁₋₉ = 12.1 Hz, *J*₁₁₋₁₂ = 5.1 Hz, H-11), 1.58 (m, 2H, H-2), 1.53, (dd, 2H, *J*₇₋₆ = 12.1 Hz, *J*₇₋₈ = 5.1 Hz, H-7), 1.43 (m, 2H, H-12), 1.31 (m, 2H, H-1), 1.21 (m, 1H, H-14), 1.14 (m, 2H, H-6), 0.97 (s, 3H, CH₃-18), 0.86 (s, 3H, CH₃-19), 0.75 (td, 1H, *J*₉₋₁₁ = 11.5 Hz, *J*₉₋₁₂ = 3.9 Hz, H-9) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 185.91 (C=O), 152.13 (Ar-C_{ipso}), 128.79 (Ar-C_m), 123.08 (Ar-C_p), 119.47 (Ar-C_o), 71.22 (C-3), 54.56 (C-9), 52.53 (C-14), 45.62 (C-13), 44.84 (C-6), 38.08 (C-

2), 36.96 (C-4), 35.63 (C-10), 35.18 (C-7), 33.80 (C-8), 31.46 (C-12), 31.37 (C-5), 28.48 (C-1), 28.25 (C-16), 23.01 (C-15), 20.90 (C-11), 16.20 (C-18), 12.32 (C-19) ppm.

Síntesis de 3 β -hidroxi-17 β -fenilamino-androst-5-en-17 α -carboxamida. (6a)

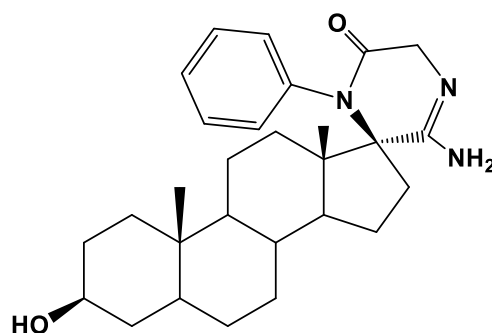


Se empleó la misma metodología con la cual se obtuvo el compuesto **6**, sin embargo por falta de tiempo ya no fue posible purificar exitosamente el crudo de reacción. Aún con este inconveniente es posible observar en los espectros conseguidos las señales más representativas que nos indican la presencia de la amida **6a**.

IR (cm⁻¹): 3350 (νO-H), 2925 (νC-H), 1668 (νC=O) 1590 (νN-H)

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ: 186.13 (C=O), 151.60 (Ar-C_{ipso}), 141.07 (C-5), 128.69 (Ar-C_m), 123.17 (Ar-C_p), 120.68 (C-6), 119.42 (Ar-C_o), 71.20 (C-3) ppm.

Síntesis de 17(S)-5'-amino-1'-fenil-3 β -hidroxiespiro[5 α -androstano-17,6'-dihidropirazin]-2'(1H)-ona. (8)



Una mezcla equimolar del derivado **5** y el clorhidrato de etilaminoacetato (0.5 mmol) fue disuelta en DMF, se trata con 1.2 equivalentes de piridina y la mezcla de reacción se coloca a reflujo durante 5 horas. Una vez completado el tiempo, se deja enfriar a t.a y se extrae con AcOEt y H₂O. La fase orgánica resultante es secada con MgSO₄ y concentrada en rotavapor a presión reducida. El crudo de reacción es purificado en columna utilizando como fase estacionaria alúmina básica y un sistema 9/1 (Hexano/Acetato de etilo).

[α]_D²⁵: +55.24 (*c* 1.0, CHCl₃)

IR (cm⁻¹): 3528, 3467 (νN-H), 2928 (νC-H), 1681 (νC=O) 1601, 1559 (νN-H)

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: (d, 1H, *J*_{o-m} = 7.7 Hz, Ar-Ho), 7.35 (m, 2H, Hm), 7.14 (t, 1H, *J*_{p-m} = 7.4 Hz, Ar-Hp), 7.09 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, Ar-Ho), 3.65 – 3.56 (m, 1H, H-3), 2.44 (dd, 1H, *J*_{16a-16b} = 19.3, *J*_{16a-15} = 8.4 Hz, H-16a), 2.12 – 2.02 (m, 1H, H-16b), 1.97 – 1.88 (m, 1H, H-15), 1.84 – 1.76 (m, 4H, H-7, H-28), 1.72 (m, 2H, H-2), 1.61 – 1.55 (m, 3H, H-6, H-8), 1.44 – 1.38 (m, 2H, H-12), 1.35 – 1.22 (m, 5H, H-4, H-11, H-14), 1.17 – 1.12 (m, 1H, H-5), 1.01 – 0.97 (m, 2H, H-1), 0.86 (s, 3H, CH₃-18), 0.83 (s, 3H, CH₃-19), 0.72 – 0.66 (m, 1H, H-9) ppm.

RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ: 162.27 (C=O), 158.93 (C=N), 136.86 (Ar-Cipso), 136.55 (Ar-Cipso), 129.75(Ar-Cm), 129.08 (Ar-Cm), 125.31 (Ar-Cp), 124.74 (Ar-Cp), 119.86 (Ar-Co), 118.86 (Ar-Co), 71.12 (C-3), 54.38 (C-9), 51.38 (C-14), 47.79 (C-13), 44.79 (C-5), 38.01 (C-6), 36.89 (C-1, C-2), 35.83 (C-16), 35.60 (C-10), 35.01 (C-8), 31.51 (C-28), 31.39 (C-12), 30.85 (C-7), 28.35 (C-4), 21.74 (C-15), 20.46 (C-11), 13.78 (C-18), 12.27 (C-19) ppm.

9. Referencias

-
- ¹ Akhtar, J; Khan, A; Ali, Z; Haider, R; Yar, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 143-189.
- ² Ghandi, D; Kalal, P; Agarwal, S. *J. Chem. Biol. Interfaces.* **2017**, *7*, 2, 79-101.
- ³ Gribble G. *Heterocyclic Scaffolds II: Reactions and Applications of Indoles.* Springer. **2010**.
- ⁴ Siddiqui, N. A; Bawa, S; Ali, R; Afzal, O; Akhtar, M.J; Azad, B; Kumar, R. *J. Pharm. Bioall Sci*, **2011**, *3*, 194-212.
- ⁵ Sondhi, S; Dinodia, M; Singh, J; Rani, R. *Curr. Bioact. Compd.* **2007**, *3*, 91-108.
- ⁶ Gupta, M. *Inter. J. Phys. Chem. Mathem. Sci.* **2015**, *4*, 21-24.
- ⁷ Dua, R; Shrivastava, S; Sonwane, S.K; Srivastava, S.K. *Advances Bio. Res.* **2011**, *5*, 120 - 144.
- ⁸ Karikas. G; Schulpis, K; Reclos, G; Kokotos, G. *Clin Biochem.* **1998**, *31*, 405-407.
- ⁹ Oskay, Y; Isikdag, I; Incesu, Z; Akalin, G. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3320-3328.
- ¹⁰ Romero-Hernández, L.L.; Merino-Montiel, P.; Meza-Reyes, S.; Vega-Baez, J. L.; López, Ó.; Padrón, M. J.; Montiel-Smith, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 21-32
- ¹¹ Bonilla, A; *Elementos.* **1958**, *1*, 15 – 19.
- ¹² Thilina, J; Won Woo, L; Shanuara, F; Asanka, S; Lei, W; Tee Gee, L; Young, P; Chang-ik, K; You-Jin, J. *J Oceanol Limnol.* **2019**, 2523.
- ¹³ Keating, G. M. *Drugs.* **2015**, *75*, 1903.
- ¹⁴ Mongiardi, M.P; Radice, G; Piras, M; Stagni, V; Pacioni, S; Re, A; Putti, S; Ferré, F; Farsetti, A. *Oncogene.* **2019**, 1476.
- ¹⁵ Lebacle, C; Bensalah, K; Bernhard, J; Albiges, L. Laguerre, B. *BJU International.* **2018**, *123*, 5.
- ¹⁶ JaeSang, K; Ji-Young, K; Eun, L; Sook, Y. *IOVS.* **2018**, *59*, 4477-7785.
- ¹⁷ Bono, J; Molina, A; Fizazi, K; Chu, L; Goodman, B; Saad, F; *N Engl J Med.* **2011**, *364*, 1995-2005.
- ¹⁸ Delgadillo, J; Ayala, G. *An Fac med.* **2009**, *70*, 19-27.
- ¹⁹ Inouye, S; Tomabechi, Y; Hosoya, T; Sekine, S; Shirouzu, M. *J. Biochem.* **2018**, *164*, 247-255.
- ²⁰ Vallarino, J; López, X; Dunlevy, J; Boss, P; Gonzalez, F; Moreno, Y. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *569*, 7310-7316.
- ²¹ Irfan, A; Sabeeh, I; Umer, M; Zahra, A. *World J. Pharm. Res.* **2017**, *6*, 47-68.

-
- ²² Gao, H; Yamasaki, K; Chan, L; Snapka, R. *Mol.Pharmacol.* **2003**, 63, 1382.
- ²³ Shoemaker, R; *Cancer Treat. Rep.* **1986**, 70, 9.
- ²⁴ Valeriote,F; Corbett, T; Edelstein, M; Baker, L. *Cancer Invest.* **1996**, 14, 124.
- ²⁵ Prima,D; Baev, D; Vorontsova, E; Frolova, T; Bagryanskaya, Y; Slizhov, Y. *AIP Conf Proc.* **2017**, 1882, 20057.
- ²⁶ Prima, D; Vorontsova, E; Makarov, A; Makarov, A; Bagryanskaya, Y. *Mendeleev Commun.* **2017**, 27, 439-442.
- ²⁷ Ho, G; Tulshian, D; Bercovici, A; Tan, Z; Hanisak, J; Brumfield, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 4110-4113.
- ²⁸ Iglesias, M; Morzycki, J. *The Alkaloids Chemistry and Biology.* **2013**, 72, 153-279.
- ²⁹ Gryszkiewicz, A; Jastrzebska, I; Morzycki, J; Romanowska, D. *Curr. Org. Chem.* **2003**, 7, 1-22.
- ³⁰ Moser, B. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 487-491.
- ³¹ Staedel, W; Rügheimer, L. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 9, 563-564.
- ³² Tiwari, A; Kumar, A. *Int. j. zool. stud.* **2018**, 3, 112-117.
- ³³ Gilchrist, T.L. *Heterocyclic chemistry.* Pearson. **1997**.
- ³⁴ Wright, S. *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry II.* John Wiley & Sons. Nueva Jersey. **2011**.
- ³⁵ Chi-Kuen S. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4332-4335.
- ³⁶ Shui Wang, P; Odell, G. *J. Agr. Food Chem.* **1973**, 21, 868-870.
- ³⁷ Adams. A; De Kimpe, N. *Food Chem.* **2009**, 115, 1417-1423.
- ³⁸ Aboul, M; Attia, M; Ragab, F. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 16911-16935.
- ³⁹ Soliman, M; Sultan, A. *Synth. Commun.* **2010**, 25, 3211-3217.
- ⁴⁰ Brahmachari, G; Banerjee, B; *Asian J. Org. Chem.* **2012**, 251 - 258.
- ⁴¹ Grundke, C; Opatz, T. *Green Chem.* **2019**, DOI: 10.1039/C9GC00720B.
- ⁴² Kouznetsov, V; Puerto, C. *Tetrahedron.* **2018**, 74, 773-810.
- ⁴³ Edayadulla, N; Rok Lee, Y. *RSC Adv.* **2014**, 4, 11459-11468.
- ⁴⁴ Knochel, P; Molander, G. *Comprehensive Organic Synthesis.* University of North Carolina, USA. ELSEVIER. **2014**.
- ⁴⁵ Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648-5652.
- ⁴⁶ Wolinski, K.; Hinton, J.F.; Pulay, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 8251-8260.

-
- ⁴⁷ Gaussian 16, Revision B.01, Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; *et al.* Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016
- ⁴⁸ El-Latif, N; Abdulla, M. *Acta Pharm.* **2008**, 58, 43–59.
- ⁴⁹ Stefane, B; Brozic, P; Vehovc. M; Gobec, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, 44, 2563-2571.
- ⁵⁰ Lee, J; Kim, M; Chang, S; Lee, H. **2009**, 11, 5598-5601.
- ⁵¹ Klod, S; Kleinpeter, E. *J. Chem. Soc.* **2001**, 2, 1893–1898.
- ⁵² Font, M., C. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. Junio 2017.

Capítulo II

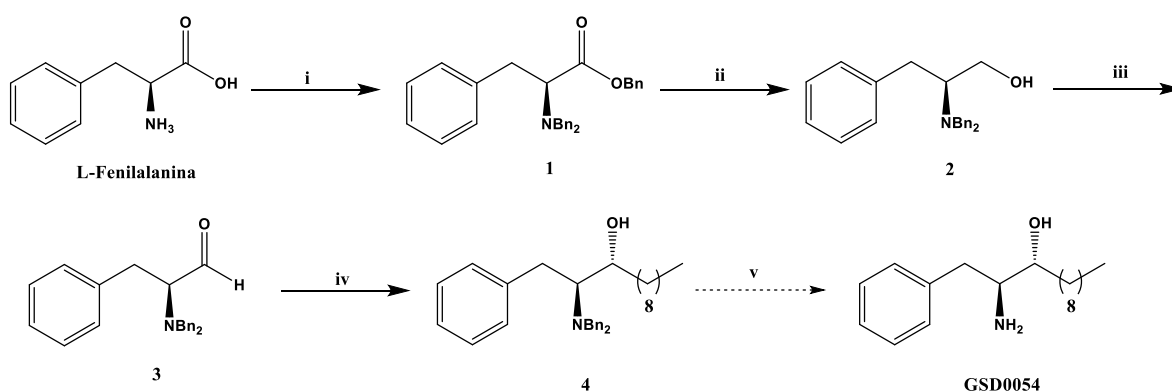


Síntesis de inhibidores selectivos de CK1 ϵ

1. Resumen

Se llevó a cabo la optimización de la síntesis del inhibidor **GSD0054** a partir del aminoácido L-fenilalanina.

Para iniciar fue necesario realizar la perbencilación del aminoácido obteniendo el éster **1**, posteriormente se efectúa una reducción al alcohol correspondiente **2** para después realizar una oxidación de tipo Parikh-Doering consiguiendo el aldehído **3** y finalmente adicionar el magnesiano. Como última etapa se lleva a cabo una hidrogenación catalizada por paladio para obtener el *anti*- β -amino alcohol **GSD0054**.



i. BnBr, K₂CO₃, NaOH, H₂O; ii. LiAlH₄, THF, 0 °C; iii. DCM, DMSO, TEA, SO₃ Py; iv. CH₃(CH₂)₈MgBr, THF, -78 °C. v. H₂, Pd(OH)₂C

Esquema 1. Síntesis del inhibidor GSD0054

Para llevar a cabo la etapa número cuatro, fue necesario preparar el bromuro de nonilmagnesio a partir de 1-nonanol. En primer lugar, se realizó una bromación con HBr al 48% generando **6** y posteriormente se consiguió el reactivo de Grignard **7** al poner a reaccionar con virutas de magnesio.



vi. HBr, reflujo; vii. Mg, I, THF.

Esquema 2. Síntesis del reactivo de bromuro de nonilmagnesio

2. Introducción

Los β -amino alcoholes han sido el centro de atención de diversas investigaciones por su gran utilidad como auxiliares quirales en síntesis asimétrica y en organocatálisis,¹ sin embargo, existen también múltiples estudios que revelan que este tipo de compuestos han presentado diversas actividades biológicas interesantes tales como agentes antibacterianos, tuberculostáticos, antibióticos, e incluso algunos de ellos se han utilizado como principios activos farmacéuticos (APIs) que, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) podemos definir como “*cualquier sustancia utilizada en un producto farmacéutico terminado (FPP), que lleve como objetivo final el de desarrollar una actividad farmacológica o generar algún efecto directo en el diagnóstico, tratamiento o prevención de una enfermedad en el paciente*”.^{2,3} Algunos ejemplos de APIs pueden ser los agonistas α y/o β adrenérgicos,^{4,5} inhibidores de la proteasa del VIH⁶ y anti-hipertensivos.^{7,8}

Dentro de esta categoría de amino alcoholes, encontramos los llamados esfingolípidos que son aquellos que, de manera característica, presentan en su esqueleto una cadena larga.⁹ Estos compuestos, en conjunto con los glicerofosfolípidos y los esteroides, forman la bicapa lipídica de las células eucariotas y se trata de moléculas biológicamente activas. Algunos de estos esfingolípidos están involucrados en la regulación de la muerte celular, tal es el caso de la ceramida y la esfingosina, conocidas por ser moléculas pro-apoptóticas.¹⁰

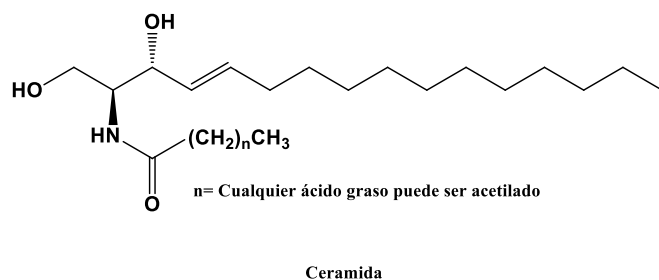
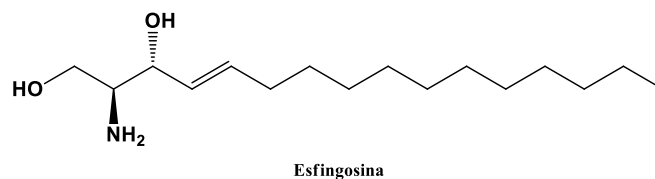


Figura 1. Estructuras de esfingosina y ceramida

Tal y como se observa en la figura 1, ambos esfingolípidos son *anti*- β -amino alcoholes, esto concuerda con los reportes existentes en los que se presentan evidencias de que los aminoalcoholes *anti* han sobresalido por actividad como compuestos citotóxicos y antitumorales sobre los isómeros *syn*.¹¹

Dentro de la regulación de mecanismos celulares, encontramos involucradas las proteínas quinasas, que son de vital importancia en estos procesos de tal manera que, si existen irregularidades en su actividad, estas pueden ser causantes de diversas enfermedades tales como cáncer. En la familia de estas proteínas podemos encontrar 7 elementos, dentro de las cuales se encuentran la caseína quinasa 1 (CK1) y caseína quinasa 2 (CK2).¹²

De manera general, contar con inhibidores para CK1 y CK2 sería una herramienta de gran ayuda para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratamientos contra el cáncer y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, no solo se requieren moléculas bioactivas que puedan inhibir estas enzimas, sino que además sean selectivas.

En la familia de caseína quinasa 1 (CK1) encontramos siete isoformas (α , β , γ 1, γ 2, γ 3, δ , ϵ), quienes están involucradas en diversos procesos celulares que incluyen el tráfico de membranas, el ritmo circadiano, la progresión del ciclo celular, la segregación de cromosomas, la apoptosis y diferenciación celular.¹³ Sin embargo, quien presenta una mayor

relevancia farmacológica es CK1ε, ya que si se altera su expresión o sufre algún tipo de mutación, puede desencadenar diferentes tipos de cáncer como de colon, mama, ovario, próstata, tumores de cerebro, leucemia, entre otros.¹⁴ Es por ello, que su inhibición podría ser una estrategia para desarrollar tratamientos efectivos.¹⁵

3. Antecedentes

Existen reportes en los que hay evidencias de diferentes actividades biológicas que han presentado los *anti*- β -amino alcoholes incluyendo altos potenciales como agentes citotóxicos, tal es el caso de los compuestos mostrados en la figura 2 quienes han sido evaluados ante las líneas celulares SKBr3 y MCF-7/ADR correspondientes a cáncer de mama.¹⁶

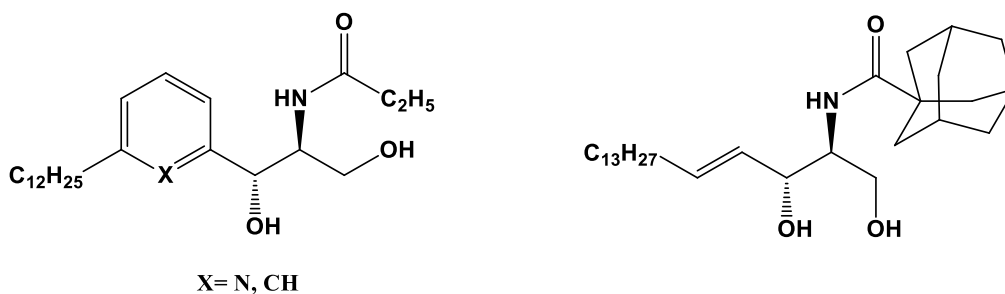


Figura 2. *anti*- β -Amino alcoholes con actividad citotóxica

De igual manera, muchos de ellos han sido reportados como inhibidores de diferentes enzimas que se encuentran involucradas en el metabolismo de los esfingolípidos. Algunos de ellos han sido sintetizados y algunos otros se han aislado de fuentes naturales, principalmente de hongos y organismos marinos.¹⁷ Ejemplos de ellos son la miriocina, antibiótico e inhibidor de la enzima SPT, esfingofungina E y F que son capaces de bloquear la síntesis de esfingolípidos induciendo a la apoptosis, derivado del ciclopreno GT11 quien es inhibidor de la enzima DCD a bajas concentraciones y D-MAPP que ha sido reportado con actividad inhibitoria ante células de cáncer de colón al ser un inhibidor de CDasa.¹⁸

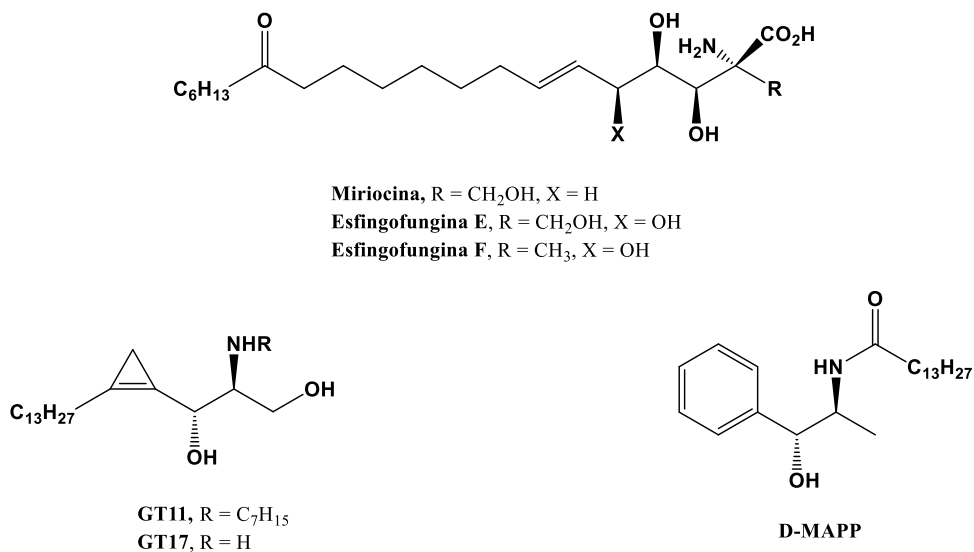
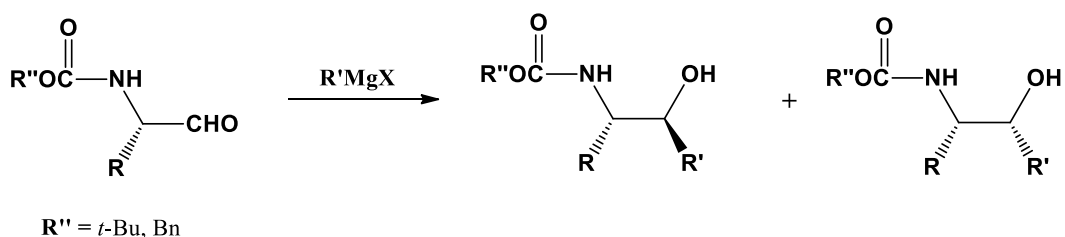


Figura 3. anti-β-amino alcoholes inhibidores de enzimas

Debido a la importancia de estos compuestos, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de implementar rutas sintéticas para la obtención de β-amino alcoholes sin embargo muchas de estas reacciones no reportan un control acerca de la estereoquímica.

Una primera visión de cómo generar estas moléculas la muestra Reetz en 1999 donde utiliza como fuentes de quiralidad α-aminoácidos, de esta manera es posible realizar reducciones, formando los correspondientes alcoholes primarios, sin caer en la racemización. Sin embargo, existe un gran reto al tratar de obtener el aldehído correspondiente del α-aminoácido debido a su baja estabilidad, para esto es necesario proteger el grupo amino presente en la molécula.¹⁹ Hasta hace algunos años, se utilizaban como grupos protectores *tert*-butiloxicarbonilo (Boc) o carbobenciloxilo (Cbz). No obstante, a pesar de que estos α-amino aldehídos podían ser manejados a bajas temperaturas sin apreciable racemización, al momento de estar frente a reactivos de tipo Grignard, enolatos de litio o iluros de azufre, los productos obtenidos eran mezclas de diastereoisómeros.²⁰



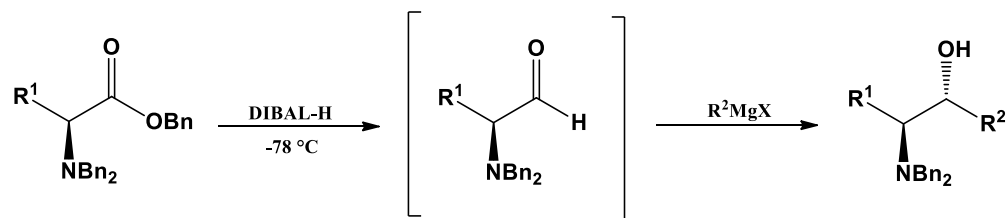
Esquema 3. *Uso de Boc y Cbz como grupos protectores*

Como solución a este conflicto se ha reportado como protector dos grupos bencilo sobre la posición del amino, permitiendo así direccionar la diastereoselectividad y el manejo a temperatura ambiente de los *N,N*-dibencilamino aldehídos.²¹ De esta manera, Reetz propone en otro de sus estudios, una ruta para obtener este tipo de aldehídos a partir de α -aminoácidos en tres pasos: bencilación, reducción y oxidación.²²



Esquema 4. *Síntesis de *N,N*-Dibencilamino aldehídos propuesto por Reetz*

El grupo de investigación de Padrón, se ha dado a la tarea de generar y optimizar síntesis estereoselectivas que puedan dar acceso de una manera eficaz y enantiopura a los *anti*- β -amino alcoholes. En el 2014, reportan una metodología en la cual utilizan ésteres α -(*N,N*-dibencilamino)bencilo ópticamente puros obtenidos a partir de α -aminoácidos, seguida de una reducción con DIBAL-H a -78°C para la obtención del aldehído y adición *in situ* de reactivos de Grignard. Estos ensayos se realizaron empleando como sustratos diferentes aminoácidos como L-alanina, L-fenilalanina, L-serina y L-treonina obteniendo una estereoselectividad mayor al 95%.²³



$R^1 = \text{Me, Bn, CH}_2\text{OH, (R)-CH(CH}_3\text{)OH}$

$R^2 = \text{Et, CH=CH}_2, \text{C}\equiv\text{CH}$

Esquema 5. Metodología reportada por Padrón y colaboradores

Siguiendo una metodología similar, en 2015 Padrón y colaboradores se dieron a la tarea de sintetizar diferentes *anti*- β -amino alcoholes buscando un inhibidor selectivo de CK1 ϵ ya que hasta ese momento el único compuesto que se ha reportado capaz de distinguir entre CK1 δ y CK1 ϵ es **PF-4800567**. No obstante, este compuesto no presenta buenos resultados para inhibir células cancerosas a bajos valores de GI₅₀.

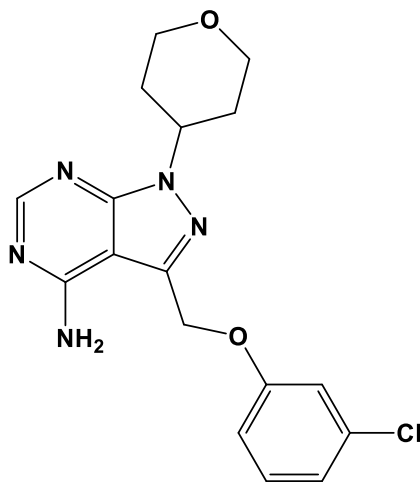


Figura 4. Estructura del inhibidor PF-4800567

Después de múltiples ensayos en los que se utilizaron como precursores diferentes α -aminoácidos y realizando modificaciones en longitudes de cadena y grado de insaturación de los reactivos de Grignard, se encontró que la estructura **GSD0054** no solo se comporta como inhibidor selectivo de CK1 ϵ , sino que, además, inhibe el crecimiento de cinco líneas celulares correspondientes a tumores sólidos humanos: HBL-100, HeLa, SW1573, T-47D y WiDr.²⁴

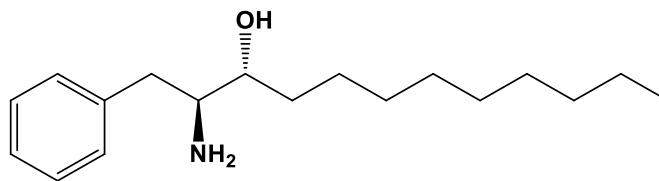
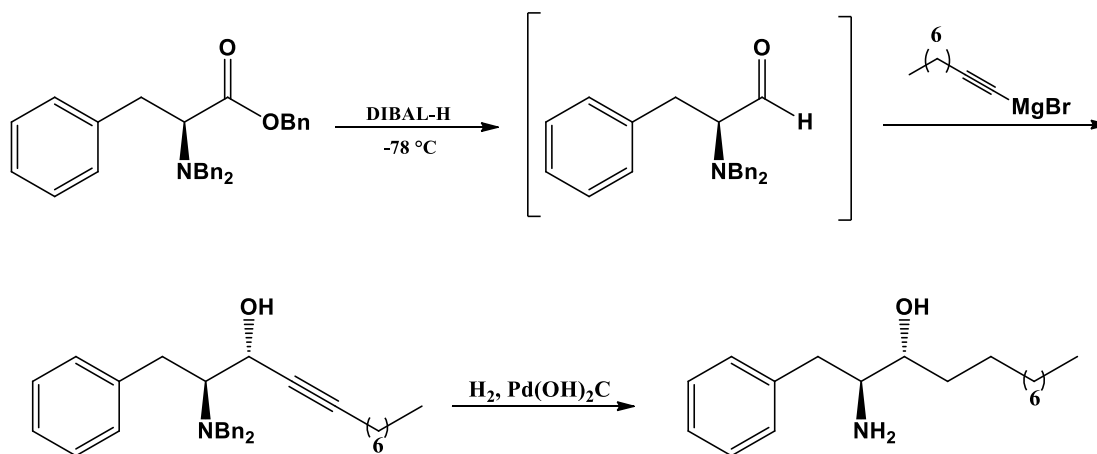


Figura 5. Estructura del inhibidor GSD0054

La metodología reportada para la síntesis de este inhibidor implica la ruta sintética descrita en el esquema 3, utilizando como materia prima L-Fenilalanina y sumando un último paso de hidrogenación para llevar a cabo la desprotección del grupo amino y la completa saturación de la cadena hidrocarbonada. Esquema 4



Esquema 6. Síntesis de GSD0054

Uno de los primeros estudios que se realizaron para observar la interacción entre el inhibidor y la enzima CK1 ϵ fueron análisis de *docking molecular* en los cuales, se observa una afinidad por esta isoforma y su favorable interacción. De acuerdo a la figura, podemos observar como los grupos polares que presenta la estructura interaccionan formando puentes de hidrógeno con residuos de aminoácidos presentes en la enzima, así como la conformación de adopta la molécula dentro del sitio activo.

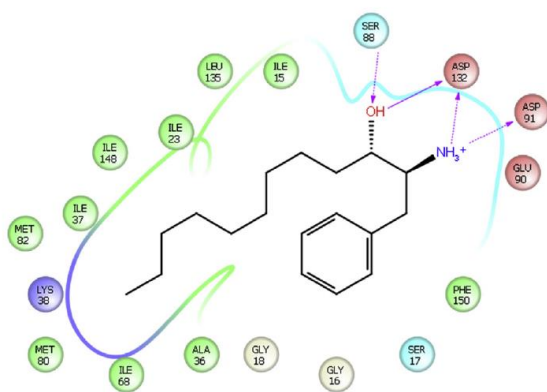
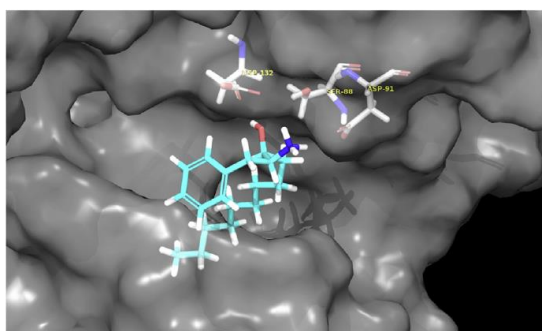


Figura 6. Interacciones del complejo GSD0054 – CK1ε

4. *Objetivos*

Objetivo general

- ✚ Desarrollar una nueva ruta sintética para la obtención del inhibidor selectivo de CK1ε **GSD0054** para poder recabar más evidencias de su alta eficacia tanto como de su poder inhibidor como antiproliferativo.

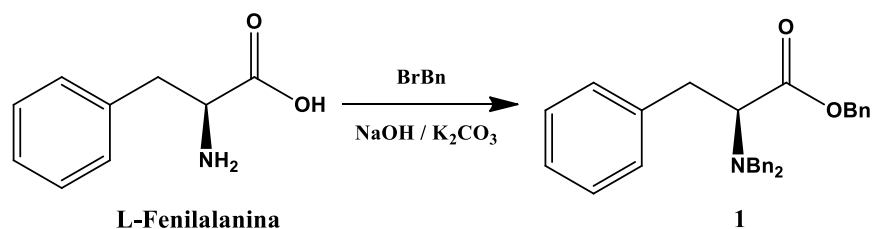
Objetivos particulares

- ✚ Realizar modificaciones sobre la síntesis de **GSD0054** ya establecida con el fin de optimizar su obtención.
- ✚ Poner en práctica diferentes métodos de oxidación para poder realizar comparaciones y optar por el método más efectivo.
- ✚ Ensayar sobre sustratos similares las reacciones propuestas para evaluar su efectividad.
- ✚ Purificar y caracterizar cada uno de los intermediarios obtenidos mediante resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C .

5. Discusión de resultados

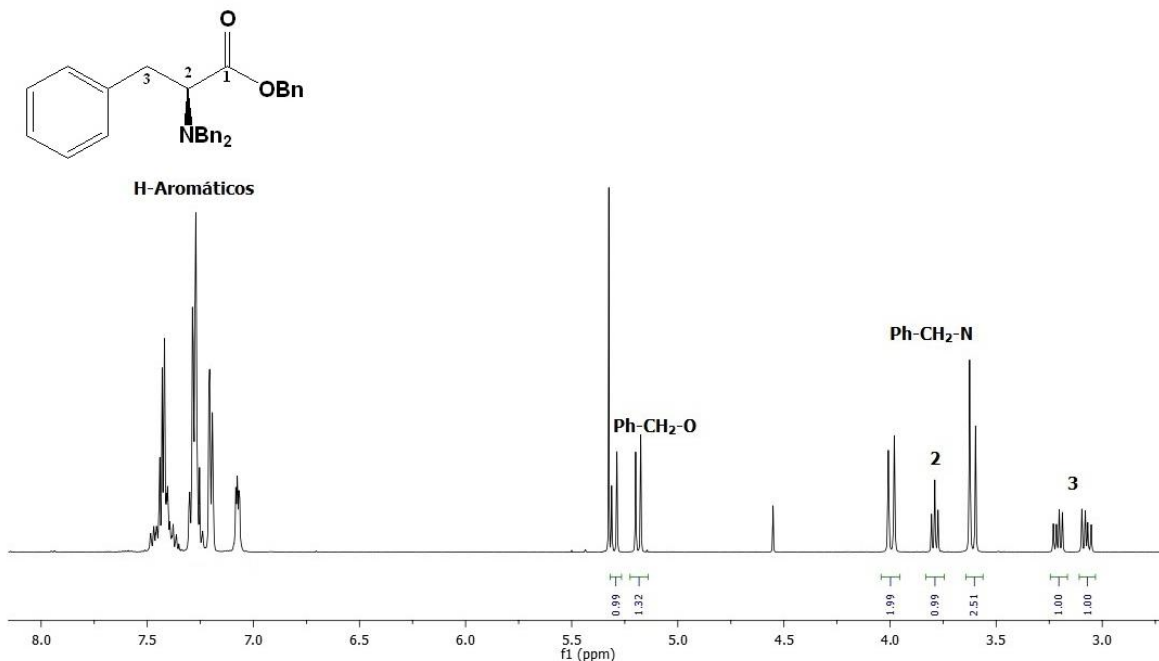
5.1 Obtención de *N,N*-dibencil-L-fenilalaninato de bencilo (1)

Como primer paso de síntesis fue necesario proteger los grupos amino e hidroxilo presentes en la materia prima. Esto se consiguió al perbencilar la L-fenilalanina con bromuro de bencilo en presencia de K_2CO_3 y NaOH para obtener el correspondiente éster. La reacción se lleva a cabo de manera cuantitativa y es necesario purificar el compuesto obtenido.



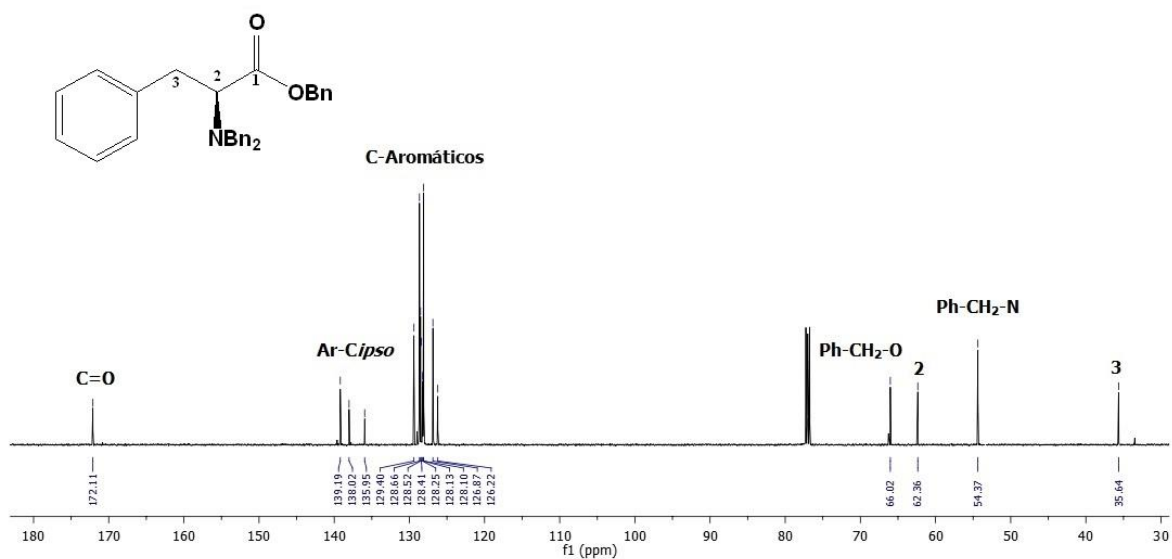
Esquema 7. Formación del éster derivado de L-Fenilalanina

Para comenzar la caracterización del compuesto obtenido, se realizó un experimento de RMN 1H en el cual se aprecian las señales correspondientes a H-3 quienes aparecen como dobles de dobles, al ser protones diastereotópicos por efecto de la presencia del centro quiral en el C-2, también es posible observar dos señales dobles en 3.6 ppm y 4 ppm para los metilenos que se encuentran unidos al nitrógeno (Ph-CH₂-N), una señal triple en 3.77 ppm como se espera para la posición alfa a carbonilo H-2. A frecuencias más altas encontramos dos señales dobles que indicarán la presencia del metileno unido a oxígeno y se observan de esta manera debido a que cada uno se encuentra en un ambiente químicos diferente. Finalmente es posible visualizar las señales características de los protones aromáticos en un rango de 7 – 7.5 ppm.



Espectro 1. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 1

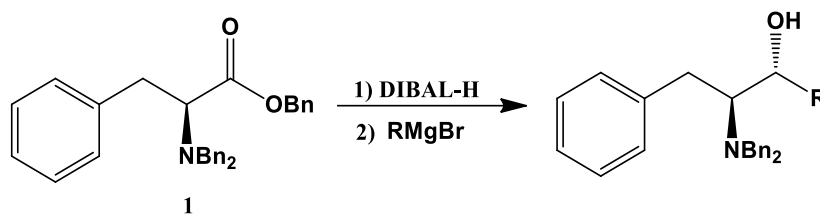
Para el caso del espectro de RMN ^{13}C , a menores frecuencias se observa la señal que corresponde a C-3, en 54.3 ppm se aprecia una sola señal que concuerda con los dos metilenos unidos a nitrógeno, posteriormente en 62.3 ppm encontramos la señal alfa a carbonilo del éster y finalmente el metileno unido a oxígeno en 66 ppm. A frecuencias más altas son percibidas las señales correspondientes a los carbonos aromáticos y los tres carbonos *ipso*, considerando que los bencilos unidos al nitrógeno muestran estas señales de manera equivalente. Como última señal característica, a una frecuencia de 172.1 ppm se aprecia el carbonilo del grupo éster.



Espectro 2. Espectro RMN ^{13}C 125 MHz del compuesto 1

5.2 Obtención de (S)-2-N,N-(dibencilamino)-3-fenilpropan-1-ol (2)

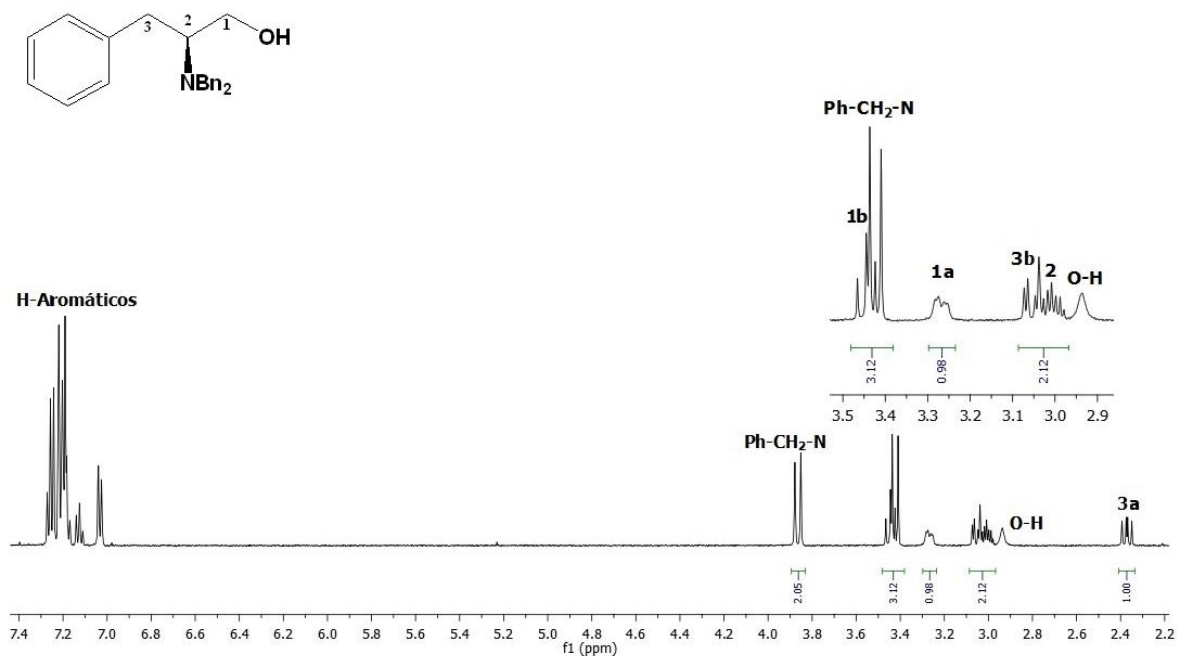
Para continuar la metodología de síntesis, inicialmente se planteaba realizar una reacción de tipo *one-pot* para formar el aldehído correspondiente reduciendo con DIBAL-H y posteriormente adicionar el reactivo de Grignard para realizar la adición a carbonilo, tal y como se muestra en el esquema 6.



Esquema 8. Reacción de tipo one-pot

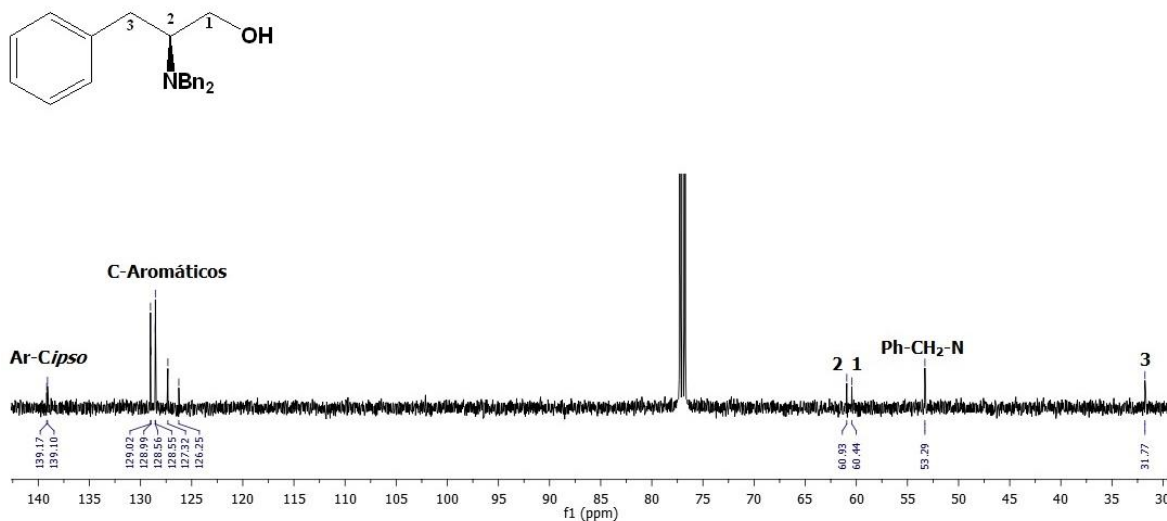
Sin embargo, se tuvieron diversas dificultades en este procedimiento debido a que a pesar de haber realizado numerosos ensayos modificando agentes reductores, número de equivalentes, disolvente, temperatura, tiempos de reacción, velocidad de adición, etc., siempre se obtuvo el producto completamente reducido al alcohol correspondiente. Tabla 1

diastereotópicos, en frecuencias de 3.27 y 3.45 ppm. Finalmente, en un rango de 6.90 a 7.30 ppm se encuentran las señales correspondientes a los protones de los tres anillos aromáticos presentes en la molécula.



Espectro 3. Espectro RMN^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto 2

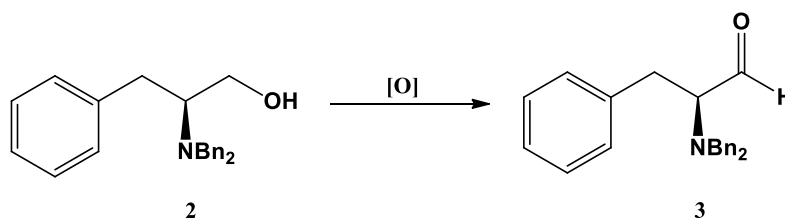
En el espectro de RMN de ^{13}C , principalmente se observa la ausencia de la señal correspondiente al grupo carbonilo que se encontraba presente en la materia prima y en cambio, se localiza una señal en frecuencias similares a C-2 que se atribuye a C-1 ya que ahora corresponde a un carbono unido de manera directa al grupo hidroxilo. De igual manera, en la zona de frecuencias altas se continúan observando las señales de los carbonos presentes en los anillos aromáticos de la estructura.



Espectro 4. Espectro RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del compuesto 2

5.3 Obtención de (S)-2-N,N-(dibencilamino)-3-fenilpropanal (3)

Se pusieron en práctica tres diferentes métodos de oxidación para obtener el N,N-dibencilamino aldehído:



Esquema 10. Reacción general de oxidación

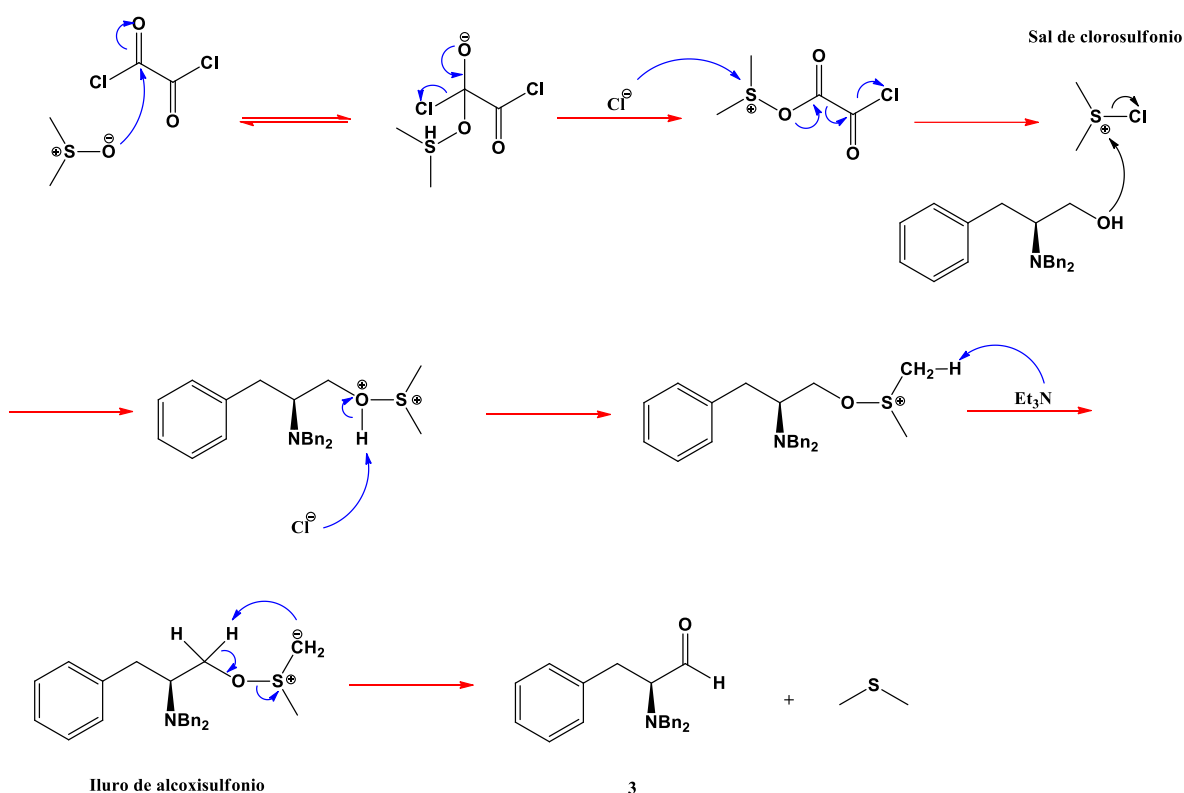
5.3.1 Oxidación con clorocromato de piridinio (PCC)

El alcohol fue disuelto en DCM en presencia de PCC, poco tiempo después el aldehído deseado se obtuvo de manera cuantitativa y sin complicaciones. Sin embargo, a pesar de su alta eficacia, el uso de PCC como agente oxidante cuenta con la gran desventaja de utilizar Cr que es una amenaza latente para compuestos que se busca tengan alguna actividad biológica, puesto que, si llegaran a permanecer trazas de este metal en las moléculas, podría presentarse un problema de toxicidad.

5.3.2 Oxidación de Swern

Para esta reacción, el agente oxidante es preparado *in situ* mediante la activación de dimetilsulfóxido por cloruro de oxalilo. Una vez formada la sal del clorosulfonio, el par de electrones del oxígeno realiza un ataque nucleofílico sobre el azufre de la sal, de esta manera se libera un ión cloruro quien desprotonará al oxígeno para formar HCl (esquema 9). Como último paso, la trietilamina extrae un protón de uno de los metilos y de esta manera generar el intermediario iluro de alcoxisulfonio, quien después de un reordenamiento formará el aldehído correspondiente **3** y un tioéter como subproducto.

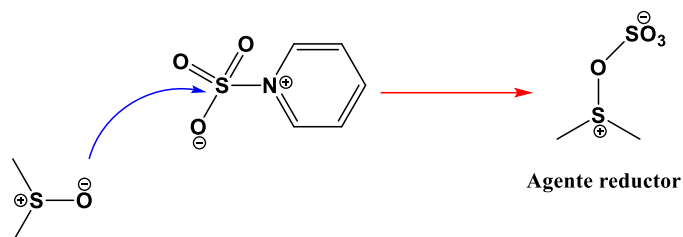
Es importante recalcar que, debido a la inestabilidad de los intermediarios, esta metodología de reacción se lleva a cabo a una temperatura de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, el aldehído **3** fue obtenido en un 88% de rendimiento sin requerir purificación en columna.



Esquema 11. Mecanismo de oxidación de Swern

5.3.3 Oxidación de Parikh-Doering

De manera similar a la oxidación de Swern, en este método el dimetilsulfóxido será activado, esta vez por un complejo $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$. El resto del mecanismo de reacción, transcurre mediante etapas análogas a las descritas anteriormente.

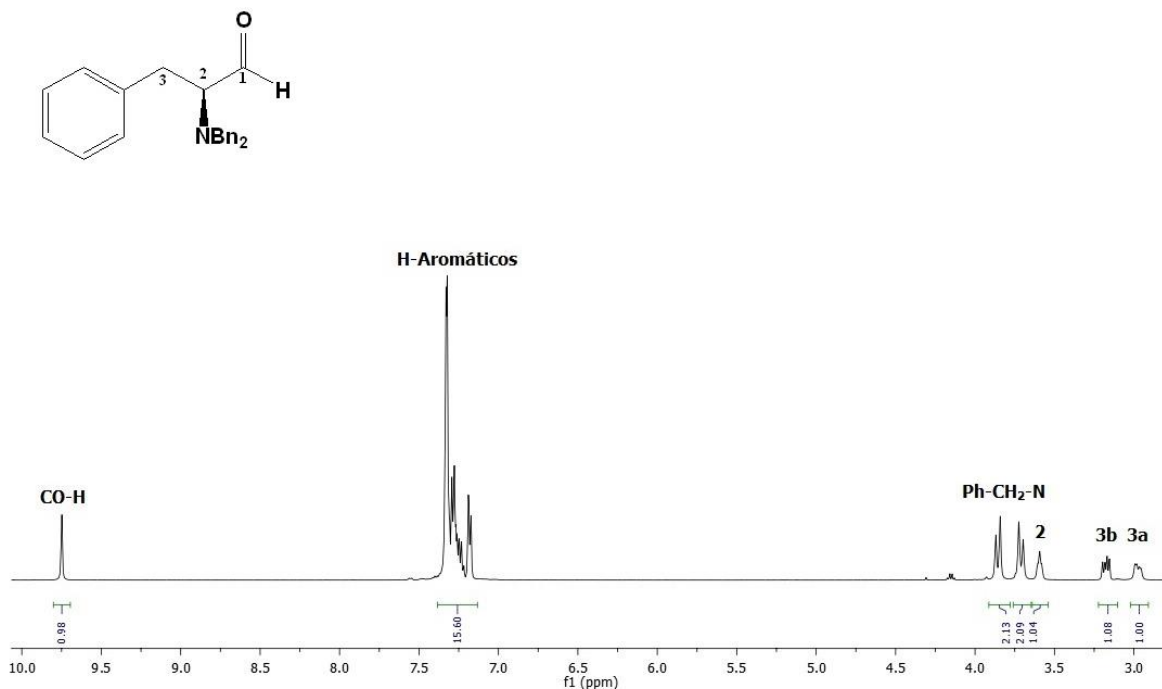


Esquema 12. Formación del agente reductor para oxidación Parikh-Doering

La metodología de esta reacción se realiza a temperatura ambiente, lo que muestra una ventaja sobre la oxidación de Swern, sin embargo, en este caso el aldehído obtenido requiere de purificación en columna antes de la siguiente etapa de síntesis. El *N,N*-dibencilamino aldehído se recupera en un rendimiento del 70% como un aceite amarillo.

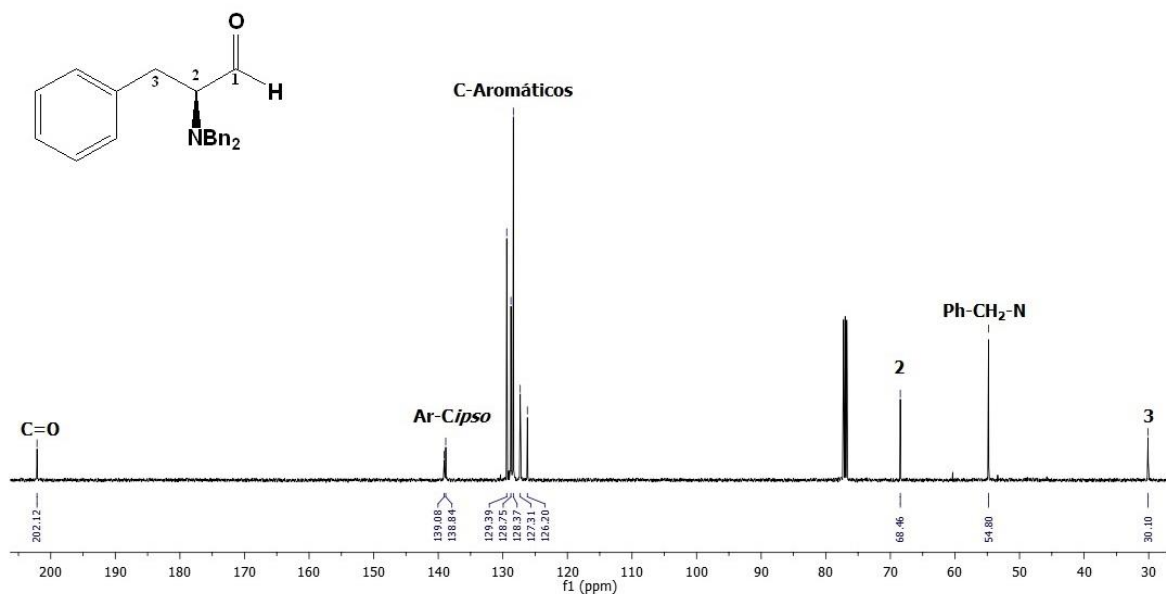
El producto obtenido con cada una de las metodologías probadas, fue caracterizado mediante RMN, concluyendo así que en todos los casos se trata del compuesto **3**.

En el espectro de ^1H se perciben nuevamente los protones diastereotópicos H-3a y H-3b a frecuencias de 3.00 y 3.20 ppm respectivamente, a campos más bajos encontramos la señal correspondiente a H-2 seguida de dos señales dobles que indican la presencia de los bencilos unidos a nitrógeno ($\text{Ph-CH}_2\text{-N}$). En un rango de 7.00 a 7.45 ppm se localizan los 15 protones aromáticos presentes en la molécula y como señal característica en 9.75 ppm encontramos el protón del grupo aldehído.



Espectro 5. Espectro RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) del compuesto **3**

Para el caso del espectro de RMN ^{13}C encontramos a menores frecuencias la señal de C-3, posteriormente los carbonos de los grupos bencilo ($\text{Ph-CH}_2\text{-N}$) en 54.80 ppm y un poco más desplazada, la señal correspondiente a C-2. A frecuencias mayores se localizan las señales aromáticas en un rango de 126.2 a 129.3 ppm, seguidas de los dos carbonos ipso en 138.8 y 139.0 ppm. Finalmente, a frecuencias mucho mayores observamos en 202.12 ppm la señal que corresponde al carbonilo del nuevo grupo aldehído que se ha formado.



Espectro 6. Espectro RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) del compuesto **3**

5.4 Obtención de (2*S*,3*R*)-2-*N,N*-(dibencilamino)-1-fenildodecan-3-ol (**4**)

Para estudiar las condiciones óptimas de la adición de Grignard a carbonilo, se realizaron ensayos preliminares utilizando los *N,N*-dibencilamino aldehídos derivados de L-leucina y L-fenilalanina y como reactivo de Grignard se empleó EtMgBr. La tabla 1 muestra las condiciones que fueron probadas.

Equivalentes EtMgBr	Disolvente	Temperatura (°C)	Tiempo
1.5 - 6	Et ₂ O THF Tolueno	-86 hasta -70	15 - 120 h

Tabla 2. Condiciones ensayadas de adición de Grignard a carbonilo

Una vez obtenidos los correspondientes *N,N*-dibencilamino alcoholes, se concluye que las mejores condiciones de reacción son utilizar 3 equivalentes de reactivo de Grignard empleando THF como disolvente, realizar la adición a una temperatura de -78 °C y dejar que la reacción evolucione durante 24 h sin dejar que la temperatura sobrepase los -20 °C.

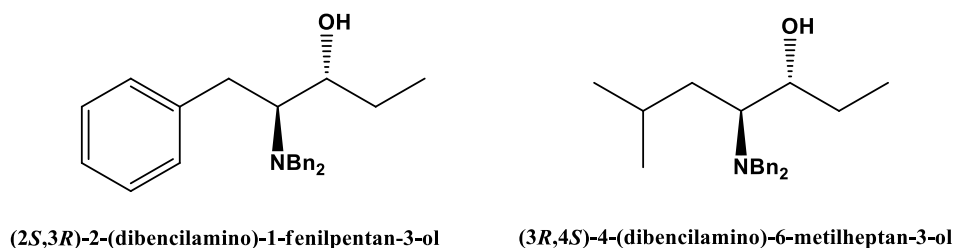
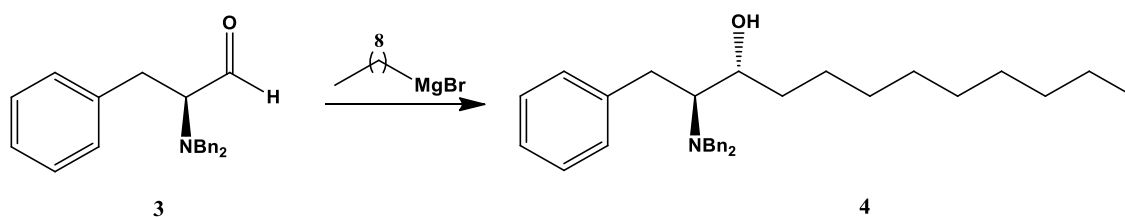
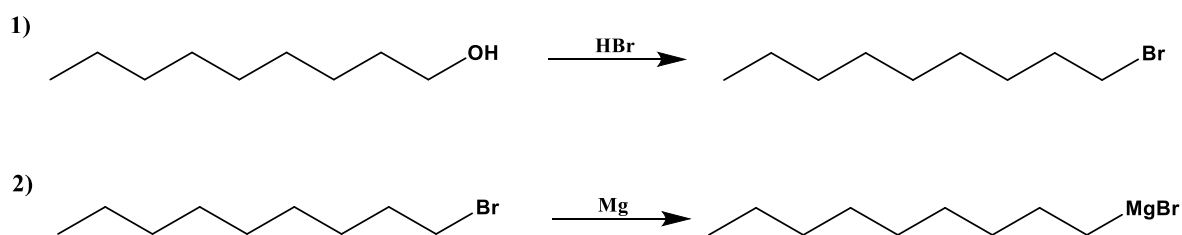


Figura 8. N,N-Dibencilamino alcoholes obtenidos

Seguindo estas condiciones, se procedió a llevar a cabo la síntesis de compuesto **4** (Esquema 12). Para ello fue necesario sintetizar el compuesto organometálico previamente, esto se logró mediante dos etapas de síntesis partiendo de 1-nonanol, tal y como se muestra en el esquema 13. Como primer paso se realizó una bromación con HBr, una vez obtenida la molécula bromada, se colocó en presencia de magnesio para obtener el reactivo deseado.



Esquema 13. Reacción general para la obtención del compuesto 4



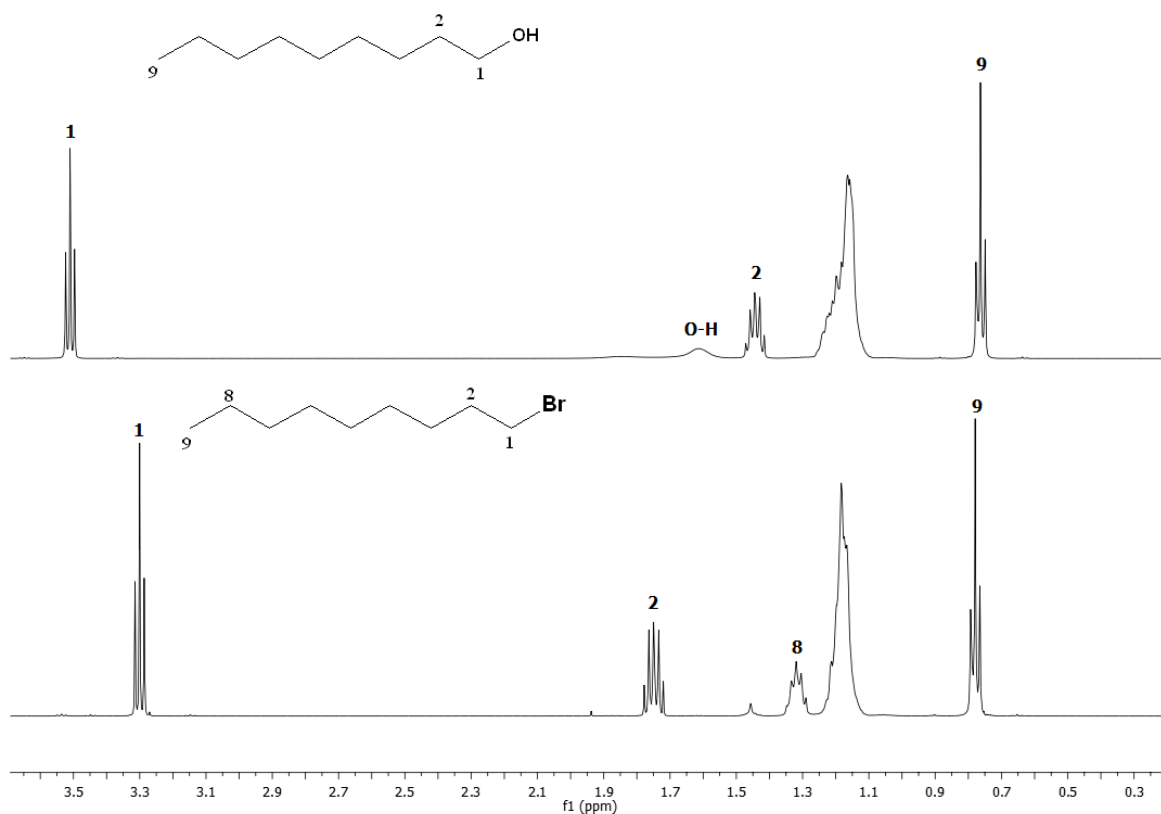
Esquema 14. 1) Bromación del alcohol. 2) Formación del magnesiano

La formación del bromado fue corroborada mediante RMN antes de colocarlo en presencia de magnesio.

En el espectro de ^1H , para el caso del compuesto bromado se observa el desplazamiento a campos más altos de la señal atribuida a H-1, esta se muestra como un triplete en 3.52 ppm

para el caso del alcohol y en 3.28 ppm para el producto de la bromación. Este desplazamiento es debido a la comparación entre las electronegatividades de oxígeno y bromo, al ser este último menos electronegativo, es de esperarse que esta señal se encuentre desplazada a menores frecuencias.

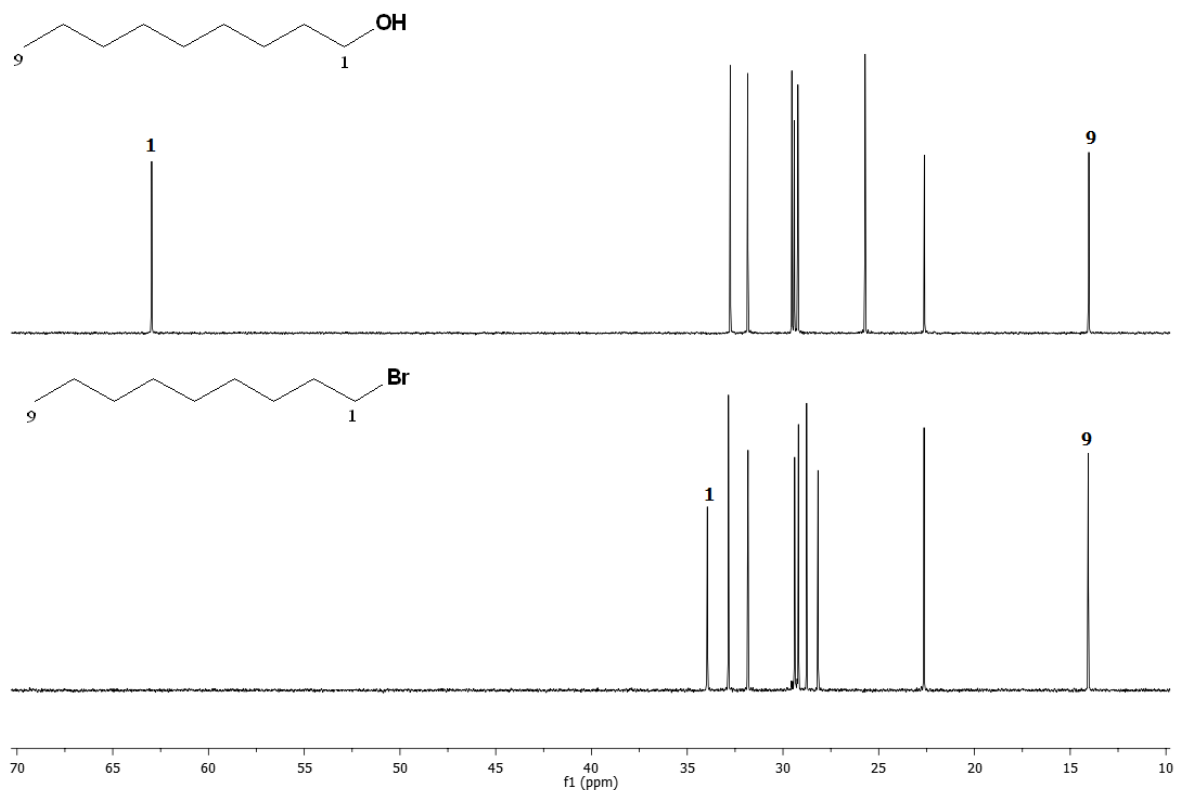
De igual manera, es posible visualizar en 0.77 ppm otro triplete correspondiente al metilo, un quintuplete atribuido a H-2 resultado del acoplamiento con H-1 y H-2, los metilenos restantes se observan en un rango de 1.10 a 1.20 ppm. Para el caso de 1-nonanol es apreciable también en 1.6 ppm una señal ancha que indica la presencia del O-H en la molécula.



Espectro 7. Comparación de los espectros RMN ^1H 500 MHz de 1-nonanol y 1-bromononano

De acuerdo al espectro de RMN de ^{13}C , la señal que nos da la pauta para saber que la bromación se ha llevado a cabo es la correspondiente a C-1 ya que, de igual manera que sucede en el espectro ^1H , observaremos un desplazamiento a menores frecuencias.

En el caso de 1-nonanol se muestra esta señal en una frecuencia de 62.97 ppm debido a que este carbono se encuentra formando un enlace directo a un oxígeno, mientras que en el 1-bromononano este carbono se encuentra unido a un bromo, lo que se refleja en el desplazamiento de la señal a una frecuencia de 33.95 ppm.

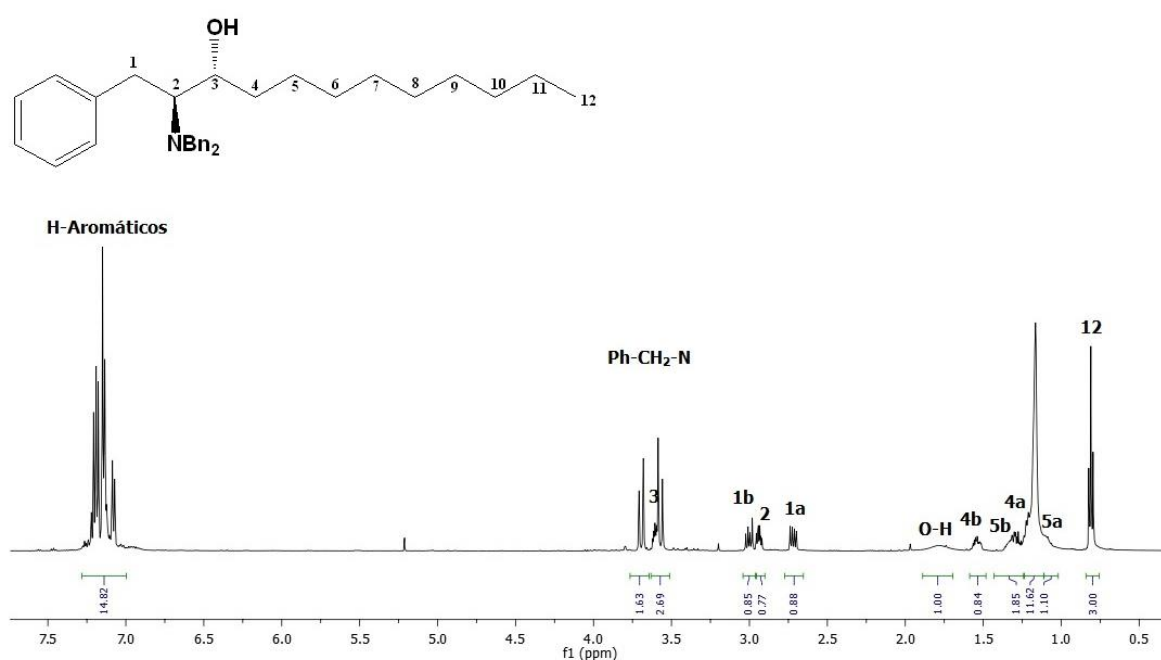


Espectro 7. Comparación de los espectros RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de 1-nonanol y 1-

Una vez que se corroboró la presencia del producto de bromación, se llevó a cabo la formación del reactivo de Grignard, para posteriormente adicionarse al *N,N*-Dibencilamino aldehído **3** y de esta manera se obtuvo el alcohol **4** después de realizar purificación en columna.

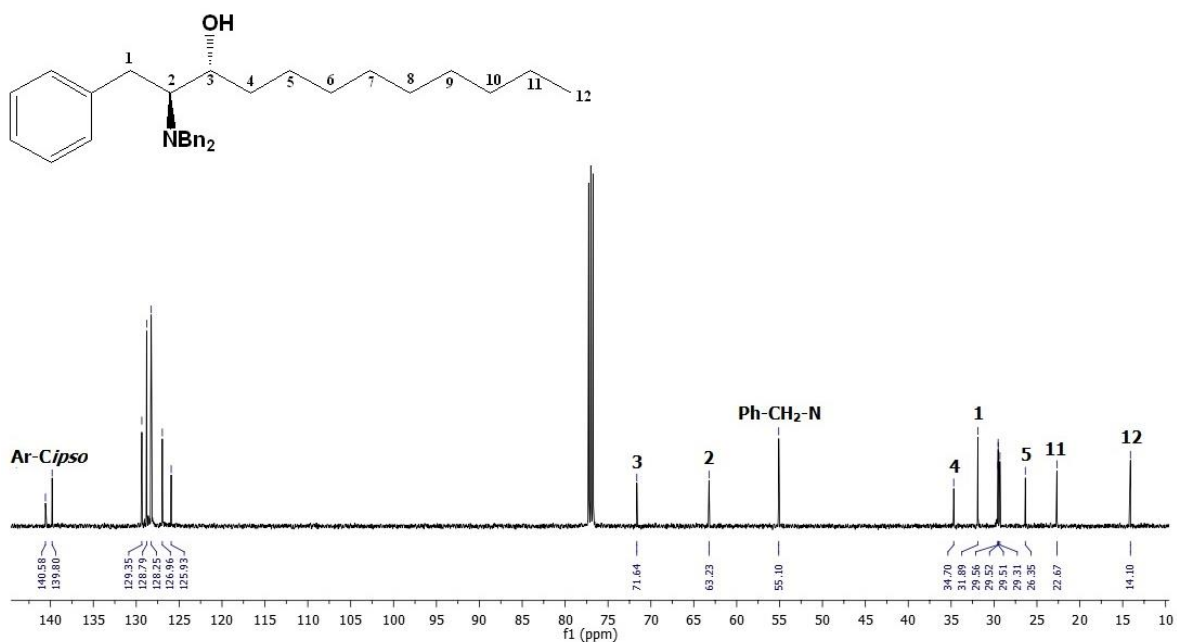
Para comenzar con la caracterización de este producto se obtuvo el espectro de RMN ¹H en el cual se observa como señal característica, un triplete en 0.76 ppm correspondiente al metilo de la cadena alifática que se ha acoplado, de igual manera es posible reconocer los protones

diastereotópicos H-4a, H-4b, H-5a y H-5b, sin embargo, el resto de metilenos presentes en la cadena alifática se observan como un multiplete que integra para 12 protones en un rango de 1.12 a 1.20 ppm. También se encuentran presentes los metilenos unidos a nitrógeno (Ph-CH₂-N) como dos señales dobles donde una de ellas se encuentra un poco traslapada con un multiplete correspondiente a H-3. Finalmente, los protones pertenecientes a anillos aromáticos se encuentran en un rango de 7.04 a 7.35 ppm como un multiplete que integra para 15 protones.



Espectro 8. Espectro RMN ¹H 500 MHz del alcohol 4

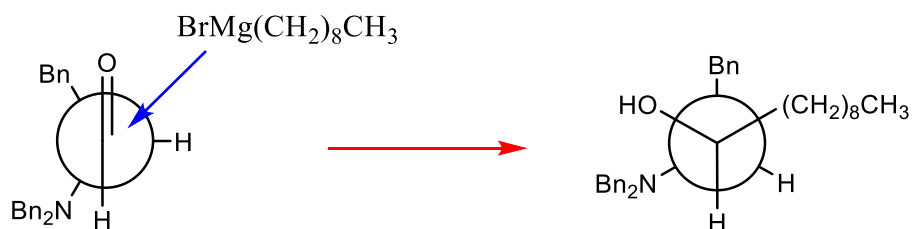
En cuanto al espectro de ¹³C observamos a bajas frecuencias las señales correspondientes a la cadena lipofílica desde C-4 hasta C-12, a frecuencias un poco más altas encontramos el metileno bencílico (Ph-CH₂-N) en 55.1 ppm seguido de los metinos C-2 y C-3 en 63.2 y 71.6 ppm respectivamente. Posteriormente son perceptibles las señales de carbonos aromáticos en un rango de 125.9 a 129.3 ppm y finalmente los dos C-ipso diferentes presentes en la molécula se encuentran en 139.8 y 140.5 ppm.



Espectro 9. Espectro RMN ^{13}C 125 MHz del alcohol **4**

La estructura propuesta para el compuesto **5** se corroboró con espectrometría de masas de alta resolución donde la fórmula molecular observada coincide con la esperada. Encontrando una $m/z = 458$.

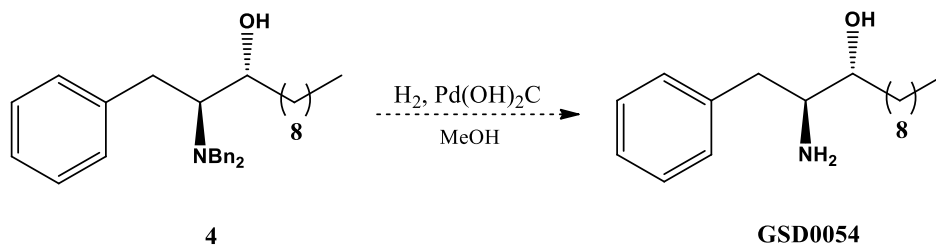
Por otra parte, es sabido que una adición nucleofílica a grupos carbonilo en moléculas quirales, implica un ataque con preferencia hacia una de las caras del carbono en cuestión. El diastereoisómero que se obtendrá como mayoritario se puede predecir mediante modelos teóricos como el propuesto por Felkin-Ahn, el cual apoya la aproximación del nucleófilo por la cara del enlace C-O menos impedida. Debido a que, al igual que los ensayos similares que se han realizado en el grupo de investigación, la adición del reactivo de Grignard obedece a un modelo Felkin-Ahn, la configuración del centro quiral del producto obtenido se determinó como *R*.



Esquema 15. Modelo Felkin-Ahn propuesto para la formación del alcohol 4

5.5 Obtención de (2*S*,3*R*)-2-amino-1-fenildodecan-3-ol

El último paso de la ruta sintética involucra una hidrogenación catalítica para remover los grupos bencilos y obtener la amina libre.



Esquema 16. Esquema de la última etapa de reacción

Esta reacción se ensayó disolviendo el alcohol **5** en metanol seco, en presencia de Pd(OH)₂C. Se dejó reaccionar durante 24 h, sin embargo, la reacción no se logró completar, es por ello que no se logró obtener una completa caracterización del producto obtenido **GSD0054**.

6. Conclusiones

- ✚ Se desarrolló una nueva técnica para la obtención del inhibidor selectivo de CK1ε GS0054 mediante una síntesis de 5 etapas.
- ✚ Se llevaron a cabo de manera exitosa 4 etapas de reacción obteniendo un rendimiento global de reacción de 45%
- ✚ En la nueva ruta sintética propuesta es posible mejorar las condiciones drásticas de reacción y evitar el uso de reactivos de costos elevados.
- ✚ Todos los intermediarios obtenidos fueron debidamente purificados y caracterizados mediante RMN tanto de ^1H como ^{13}C .

7. Metodología

Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN que se reportan en este trabajo, fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker a 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . En todos los casos, se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente.

Los desplazamientos químicos son indicados en ppm (δ), mientras que las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz) y la multiplicidad de las señales para los espectros de ^1H se expresan de la siguiente manera: s (señal simple), d (señal doble), t (señal triple), c (señal cuádruple), dd (señal doble de doble), ddd (señal doble de doble de dobles), sa (señal simple y ancha) y m (señal múltiple).

Cromatografía

Para la purificación de todos los compuestos obtenidos durante la síntesis, se utilizó la técnica de cromatografía en columna (CC) en la cual se empleó como fase estacionaria gel de sílice 60 Merk (230-240 mallas) y una mezcla de eluyentes hexano / acetato de etilo.

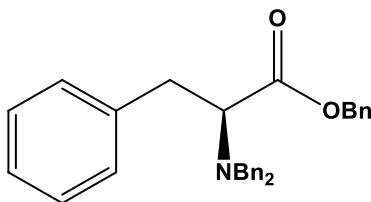
Para el caso de la cromatografía en capa fina (CCF) fueron utilizadas placas comerciales de gel de sílice grado 60 con un espesor de capa 0.25 mm el cual contiene un indicador de fluorescencia (F_{254}). Para la fase móvil se emplearon sistemas de disolventes mezclando hexano / acetato de etilo y para el revelado de estas placas se llevó a cabo mediante el uso de luz ultravioleta de onda corta (254 nm) emitida por una lámpara de UVG-54 o bien, empleando diferentes reveladores como H_2SO_4 al 5% o vainillina para llevar a cabo la correspondiente calcinación.

Disolventes y materias primas

Los reactivos utilizados fueron de calidad grado analítico y los disolventes empleados se purificaron de acuerdo a técnicas que se encuentran ya descritas en la literatura.

8. Parte experimental

N,N-dibencil-L-fenilalaninato de bencilo (1)

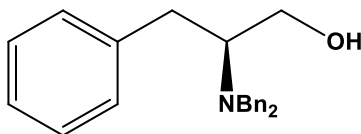


Se coloca en un matraz 10 g L-Fenilalanina (0.06 mol) disuelto en acetonitrilo (120 ml), se agregan 2.3 equivalentes de NaOH (5.5 g, 0.13 mol), 2.3 equivalentes de K₂CO₃ (18 g, 0.13 mol) y 3 equivalentes de bromuro de bencilo (30 ml, 0.18 mol). La mezcla de reacción se coloca a reflujo durante una noche. El crudo de reacción se lava con una solución saturada de NaCl y se seca con MgSO₄ para posteriormente concentrar en rotavapor. Finalmente se realiza una purificación en columna utilizando un eluyente 98/2 (Hexano/AcOEt) para obtener el compuesto **2** como un aceite ligeramente amarillo en un rendimiento de 95%.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.49 – 7.34 (m, 5H, H-aromáticos), 7.31 – 7.23 (m, 9H, H-aromáticos), 7.22 – 7.18 (m, 4H, H-aromáticos), 7.10 – 7.05 (m, 2H, H-aromáticos), 5.30 (d, *J* = 12.2 Hz, 1H, **CH_{2a}-O**), 5.19 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, **CH_{2b}-O**), 3.99 (d, *J* = 14.0 Hz, 2H, **CH_{2a}-N**), 3.79 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-2), 3.61 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H, **CH_{2b}-N**), 3.21 (dd, *J*_{3a-3b} = 14.0 Hz, *J*_{3b-2} = 7.4 Hz, 1H, H-3b), 3.07 (dd, *J*_{3a-3b} = 14.0 Hz, *J*_{3a-2} = 8.1 Hz, 1H, H-3a) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 172.1 (C=O), 139.1 (Ar-C_{ipso}-CH₂-O), 138.0 (Ar-C_{ipso}-CH₂-N), 135.9 (Ar-C_{ipso}-CH₂), 129.4, 128.6, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.1, 126.8, 126.2 (C-aromáticos), 66.0 (Ph-CH₂-O), 62.3 (C-2), 54.3 (Ph-CH₂-N), 35.6 (C-3) ppm.

(S)-2-N,N-(dibencilamino)-3-fenilpropan-1-ol (2)

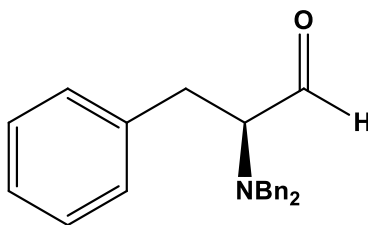


En un matraz se pesan 500 mg (1.14 mmol) del éster derivado de L-Fenilalanina y son disueltos en 15 ml THF anhidro, la mezcla se coloca bajo atmósfera inerte y en un baño de acetona fría. Una vez que la temperatura alcanza los 0 °C se adiciona 1 equivalente de LiAlH₄ (1.14 ml, 1.14 mmol) en solución 1M en éter. Después de 30 min la reacción es tratada con H₂O y una solución de NaOH al 20%. Finalmente se seca con NaSO₄ y se filtra sobre zeolita eluyendo con acetato de etilo. El producto obtenido es purificado mediante cromatografía en columna (CC) con una mezcla de sistema 9/1 (Hexano/AcOEt) y se obtiene un sólido blanco cristalino en un rendimiento de 93%.

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: 7.28 – 7.16 (m, 12H, H-aromáticos), 7.15 – 7.10 (m, 1H, H-aromáticos), 7.05 – 7.00 (m, 1H, H-aromáticos), 3.86 (d, *J* = 13.3 Hz, 2H, Ph-CH₂-N), 3.48 – 3.39 (m, 3H, H-1a, Ph-CH₂-N), 3.29 – 3.23 (m, 1H, H-1b), 3.06 (dd, *J*_{3a-3b} = 13.0 Hz, *J*_{3a-2} = 4.4 Hz, 1H, H-3a), 3.03 – 2.97 (m, 1H, H-2), 2.94 (sa, 1H, O-H), 2.37 (dd, *J*_{3a-3b} = 12.9 Hz, *J*_{3b-2} = 9.5 Hz, 1H, H-3b) ppm.

RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ: 139.1 (Ar-C_{ipso}-CH₂-N), 139.1 (Ar-C_{ipso}-CH₂), 129.0, 128.9, 128.5, 128.5, 127.3, 126.2 (C-aromáticos), 60.9 (C-2), 60.4 (C-1), 53.2 (Ph-CH₂-N), 31.7 (C-3) ppm.

(S)-2-N,N-(dibencilamino)-3-fenilpropanal (3)

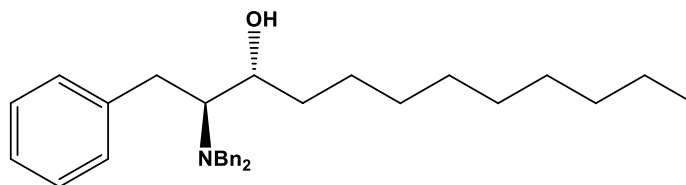


En un matr az de 25 ml se coloca 1 ml de DCM an hido para disolver 100 mg del alcohol (0.3 mmol), la mezcla se coloca bajo atmósfera inerte. Posteriormente se añaden 11.4 equivalentes de DMSO (3.42 mmol, 0.25 ml) y 4 equivalentes $\text{SO}_3 \cdot \text{Py}$ (0.2 mmol, 0.2 g). Finalmente, a la mezcla de reacción se agregan 6 equivalentes de Et_3N (1.8 mmol, 0.25 ml) y se deja en agitación durante dos horas para después lavar con HCl 5% y extraer con DCM. El crudo de reacción obtenido es purificado con una mezcla de disolventes 9/1 (Hexano/AcOEt). De esta manera se obtiene un aceite amarillo con un rendimiento del 83%.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 9.75 (s, 1H, CO-H), 7.35 – 7.30 (m, 8H, H-aromáticos), 7.30 – 7.21 (m, 5H, H-aromáticos), 7.21 – 7.16 (m, 2H, H-aromáticos), 3.86 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H, Ph- CH_2 -N), 3.71 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H, Ph- CH_2 -N), 3.59 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, H-2), 3.18 (dd, $J_{3a-3b} = 13.8$ Hz, $J_{3b-2} = 7.3$ Hz, 1H, H-3b), 2.97 (dd, $J_{3a-3b} = 13.5$ Hz, $J_{3a-2} = 5.3$ Hz, 1H, H-3a) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 202.1 (C=O), 139.0 (Ar- $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-CH}_2\text{-N}$), 138.8 (Ar- $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-CH}_2$), 129.3, 128.7, 128.3, 127.3, 126.2 (C-arom ticos), 68.4 (C-2), 54.8 (Ph- $\text{CH}_2\text{-N}$), 30.1 (C-3) ppm.

(2*S*,3*R*)-2-*N,N*-(dibencilamino)-1-fenildodecan-3-ol (4)

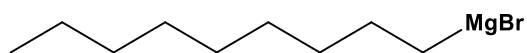


Se pesan 100 mg del aldehído obtenido **3** y se colocan en un matraz para después disolver en 3 ml de THF anhidro, la reacción se coloca bajo atmósfera inerte y se coloca en un baño de acetona que se enfría con nitrógeno líquido hasta llegar a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, en este momento se adicionan gota a gota 3 equivalentes (0.9 mmol, 0.20 g) del correspondiente reactivo de Grignard previamente preparado $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{MgBr}$. Una vez completada la adición, se deja en agitación en el baño de acetona. La reacción se monitorea mediante CCF hasta dejar de observar evolución. Para llevar a cabo el *work up* se agrega una solución concentrada de NH_4Cl , para posteriormente extraer con Et_2O y finalmente lavar la fase orgánica con salmuera. Después de concentrar a presión reducida, el crudo de reacción se somete a una purificación en columna utilizando como eluyente un sistema 95/5 (Hexano/AcOEt) obteniendo finalmente un aceite ligeramente amarillo con un rendimiento del 62%.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ : 7.23 – 7.17 (m, 6H, H-aromáticos), 7.16 – 7.11 (m, 7H, H-aromáticos), 7.11 – 7.06 (m, 2H, H-aromáticos), 3.69 (d, $J = 13.8\text{ Hz}$, 2H, Ph- $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.64 – 3.59 (m, 1H, H-3), 3.57 (d, $J = 13.8\text{ Hz}$, 2H, Ph- $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.00 (dd, $J_{1a-1b} = 13.5\text{ Hz}$, $J_{1a-2} = 7.2\text{ Hz}$, 1H, H-1b), 2.96 – 2.91 (m, 1H, H-2), 2.72 (dd, $J_{1a-1b} = 13.5\text{ Hz}$, $J_{1a-2} = 6.6\text{ Hz}$, 1H, H-1a), 1.78 (sa, 1H, O-H), 1.59 – 1.49 (m, 1H, H-4b), 1.42 – 1.26 (m, 2H, H-5b), 1.25 – 1.20 (m, 1H, H-4a), 1.15 (m, 12H), 1.12 – 1.03 (m, 1H, H-5a), 0.81 (t, $J = 7.0\text{ Hz}$, 3H, H-12) ppm.

RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ : 140.5 (Ar- $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-CH}_2$), 139.8 (Ar- $\text{C}_{\text{ipso}}\text{-CH}_2\text{-N}$), 129.3, 128.7, 128.2, 126.9, 125.9 (C-aromáticos), 71.6 (C-3), 63.2 (C-2), 55.1 (Ph- $\text{CH}_2\text{-N}$), 34.7 (C-4), 31.8 (C-1), 29.5 (C-10), 29.5 (C-9), 29.5 (C-6), 29.3 (C-7), 26.3 (C-5), 22.6 (C-11), 14.1 (C-12) ppm.

Bromuro de nonilmagnesio



Para la preparación del reactivo de Grignard es necesario realizar como primer paso una bromación sobre el 1-nonanol. Se comenzó disolviendo 0.15 ml del alcohol (0.9 mmol) en 9 ml H₂O, posteriormente se adicionan 6 ml de una solución de HBr al 48% (0.11 mol). La mezcla de reacción se coloca a reflujo durante una noche para posteriormente dejar enfriar a temperatura ambiente. El *work up* se realiza con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, posteriormente se extrae con acetato de etilo y la fase orgánica obtenida se lava con salmuera. Finalmente, la fase orgánica se seca con NaSO₄ y se concentra en rotavapor para obtener de manera cuantitativa un aceite amarillento.

Como segundo paso, se prepara un sistema completamente anhidro en el cual el 1-bromononano obtenido se disuelve en 3.6 ml de THF anhidro. Se adicionan 3 equivalentes de magnesio (2.7 mmol, 65.6 mg) y algunos cristales de yodo. Posteriormente se proporciona un poco de calor y se deja en agitación hasta observar la desaparición de las virutas de magnesio, una mezcla incolora y un precipitado blanco. Se deja enfriar a temperatura ambiente para después adicionar al aldehído.

9. Referencias

-
- ¹ Anaya de Parrodi, C.; Juaristi, E. *Synlett*. **2006**, 17, 2699-2715.
 - ² Jimenez, C.; Crews, P. *Tetrahedron*. **1991**, 47, 2097-2102.
 - ³ Mardani, Z.; Kazemshoar, R.; Moeini, K.; Warren, C.; Slawin, A.; Woollins, D. *RSC Adv*. **2018**, 8,28810-28824.
 - ⁴ Declerck , B.; Himpens , G.; Droogmans, R. *Pflugers Arch.*, **1990**, **417** , 117 -119.
 - ⁵ Weinberger, M. *Pediatr. Clin. North Am.*, **1975**, **22**, 121 -127.
 - ⁶ Kwon, S.; Ko, S. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, **43**, 639-641.
 - ⁷ Frishman, W. *Circulation*, **2003**, **107**, e117-e119.
 - ⁸ Nash, D. *Clin. Cardiol.*, **1990**, **13**, 764 -772.
 - ⁹ Pruet, S. H.; Busheney, A.; Hagedor, K.; Adiga, M.; Haynes, C. A; Sullards, M. C.; Liota, D. N. J. *Lipid. Res*. **2008**, 49, 1621.
 - ¹⁰ Speziale, N.; Leocata, F. *Química Viva*, **2007**, 6, 112-138.
 - ¹¹ Padrón, J. M. *Curr. Med. Chem*. **2006**, 13, 755-770.
 - ¹² Cozza, G.; Pinna, L. *Expert Opin. Biol*. **2016**, 20, 319-340.
 - ¹³ Knippschild, U.; Wolff, S.; Giamas, G.; Brockschmidt, C.; Wittau, M.; Würfl, P.; Stöter, M. *Onkologi*, **2005**, 28, 508-514.
 - ¹⁴ Chircop, M.; Speidel, D. *Molecular mechanisms of celular stress responses in cáncer and their therapeutic implications. Frontiers media*. **2015**.
 - ¹⁵ Cheong, J. K. *Biomechem. Biol*. **2011**, 43, 465.
 - ¹⁶ Crawford, K.; Bittman, R.; Chun, J.; Byun, H.; Bowen, W. *Cell. Mol. Biol*. **2003**, 49, 1017–1023.
 - ¹⁷ Hanada, K.; Nishijima, M.; Fujita, T.; Kobayashi, S. *Biochem. Pharmacol*. **2000**, 59, 1211-1216.
 - ¹⁸ Selzner, M.; Bielawska, A.; Morse, M.; Rüdiger, H.; Sindram, D.; Hannun, Y.; Clavien, P. *Cancer Res*. **2001**, 61, 1233-1240.
 - ¹⁹ Reetz, M. T. *Chem. Rev*. **1999**, 99, 1121-1162.
 - ²⁰ Jurczak, J.; Golebiowski, A. *Chem. Rev*. **1989**, 89, 149-164.
 - ²¹ Reetz, M. T. *Pure Appl. Chem*. **1992**, 64, 351-359.
 - ²² Reetz, M. T.; Drewes, M. W; Schmitz, A. *Angew. Chem*. **1987**, 99, 1186-1188.

²³ Silverira, G.; Donadel, O.J.; Martín, V.S.; Padrón, J.M. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 6775-6782.

²⁴ Silveira-G.; Sausa, I. J.; Fernandes, M. X.; Martín, V. S.; Padrón, J. M. *J. Med. Chem.* **2015**, 96, 308-317.