

DISEÑO DE NUEVAS MOLÉCULAS HÍBRIDAS UTILIZANDO COMO PLATAFORMA EL [60] FULLERENO.

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: ^aLaboratorio de Síntesis Orgánica. Departamento de Química Orgánica: Facultad de Química. Universidad de La Habana.

AUTORES PRINCIPALES: Prof. Dra. Ma. Margarita Suárez Navarro,^a Prof. Dra Julieta Coro Bermello,^a

OTROS AUTORES: Dr. Nazario Martín León,^b MC. Luis Almagro Rodríguez,^a Dr. Alberto Ruiz Reyes,^a Dra. Hortensia Rodríguez Cabrera,^a Dra. Cercis Morera Boado,^a Lic. Orlando Ortiz Rodríguez,^a Dr. Salvatore Filippone,^b Dr. Roberto Martínez Álvarez,^b Dayana Alonso Palacio.^a

COLABORADORES: Lic. William Cáceres Hernández,^a Dr. Enrique Maroto Martínez,^b Dra. Dolores Molero Vilchez,^b Dra. Maria Angeles Herranz,^b Dr. José A. Ruiz García,^a Dr. Abel de Cozar,^b Dr. Fernando P. Cossio,^b Dr. Daniel García Rivera,^a Lic. Marco Martínez González,^a Dr. Ramon A. Miranda-Quintana,^a Dr. Jose. M. García de la Vega,^c Dr. Fernando Abericio Palomera.^d Karen Tarrau Pita.^a

OTRA ENTIDAD PARTICIPANTE: ^bGrupo de Materiales Orgánicos, Departamento de Química Orgánica I. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.

AUTORA PARA LA CORRESPONDENCIA:

Prof. Dra. Ma. Margarita Suárez Navarro,

Laboratorio de Síntesis Orgánica. Departamento de Química Orgánica. Facultad de Química, Universidad de La Habana, Zapata y G, 10400, La Habana.

Tel: 8781398.

E-mail: msuarez@fq.uh.cu.

RESUMEN

Antecedentes.

Desde 2005 el grupo de investigación que presenta esta propuesta realiza trabajos en la Química de los Fullerenos. En el año 2013 el trabajo *Aporte a la Química de los Fullerenos Quirales* recibió el Premio Anual de la Academia de Ciencias. En él se reportaron resultados inéditos en la química estereoselectiva de fullerenos, describiéndose las primeras síntesis de derivados fullerénicos quirales. (Ver revista Anales de la Academia de Ciencias de Cuba, 204, Vol. 4, No. 2, 1-16).

En la presente Propuesta de Premio se diseñan nuevas rutas sintéticas para la obtención de novedosos híbridos del tipo esteroide-metano[60]fullerenos y esteroide-[60]fulleropirrolidinas, los que son debidamente caracterizados por técnicas modernas de análisis. Además, se estudian las propiedades electroquímicas de estos híbridos, sus propiedades criópticas y de agregación en agua y se realizan estudios acerca de los mecanismos de las reacciones. También, se dan resultados preliminares de evaluaciones realizadas a algunos compuestos para su potencial aplicación como antioxidantes en la química médica.

Este trabajo científico aporta nuevos conocimientos a la novedosa Química de los Fullerenos, ya que se reportan resultados inéditos que dan lugar a la obtención y determinación de propiedades de nuevas nanoformas de carbono.

Los resultados han sido divulgados en diferentes eventos en Cuba y en el extranjero (España, Estados Unidos de América y Brasil). Adicionalmente, esta investigación realiza una importante contribución a la formación de profesionales, lo que se evidencia en una Tesis Doctoral en Química, una de Maestría en Química Orgánica y tres Tesis de Diploma, todas ya defendidas.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

El descubrimiento del [60]fullereno¹ y su preparación en gran escala² permitió la funcionalización de estas esferas de carbono y el desarrollo de nuevas y sofisticadas estructuras sin precedentes.³ Entre las múltiples aplicaciones potenciales de los derivados del [60]fullereno, su uso en la química médica es una de las más prometedoras. En este sentido, se ha demostrado que estos compuestos tienen diferentes tipos de actividades biológicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, por lo que es importante la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades biomédicas.⁴

La estructura esférica que presenta este alótropo del carbono le permite ser utilizado como plataforma para la obtención de sistemas híbridos. Estas entidades moleculares, también conocidas como conjugados o quimeras, están constituidas por diferentes estructuras moleculares, naturales o sintéticas, que al ensamblarse dan lugar a una entidad funcional,

en la cual las características de sus componentes son modificadas, amplificadas, u originan nuevas propiedades con relación a sus precursores.⁵

Por otra parte, es bien conocido que los esteroides son moléculas con relevantes propiedades biológicas,⁶ por lo que su unión covalente al [60]fullereno no solo modulará las propiedades de cada una de las subunidades conjugadas, sino que también generará entidades moleculares con nuevas propiedades y funciones.

Los métodos sintéticos reportados que pueden utilizarse para preparar híbridos esteroide-fullerenos están basados en el carácter electrofílico del C₆₀, siendo las reacciones de cicloadición las más comúnmente empleadas. Por ejemplo, la reacción de cicloadición 1,3-7

dipolar [3+ 2] de iluros de azometino al da lugar a las fulleropirrolidinas y la reacción C₆₀

de ciclopropanación [2 +1] genera metanofullerenos.⁸

Como parte de nuestros estudios en la búsqueda de nanoestructuras de carbono con potenciales propiedades bioactivas, este trabajo tiene como objetivo diseñar metodologías para la obtención de nuevos híbridos que contengan unidades de esteroides conjugadas al C₆₀.

Resultados y Discusión.

Debido a que las reacciones de cicloadición sobre moléculas esféricas no es una cuestión trivial, es necesario diseñar metodologías que permitan la obtención de los monoadductos del fullereno con buenos rendimientos, evitando la cicloadición de más de un adendo con la consiguiente formación de poliadductos. Por lo tanto, a partir de los métodos establecidos para la funcionalización de los fullerenos se diseñaron los protocolos para la obtención de una variedad de híbridos del tipo esteroide-metanofullereno y esteroide-fulleropirrolidinas. Para ambas familias, los esteroides naturales utilizados en este trabajo fueron la epiandrosterona (**1**), el colesterol (**2**), el β -sitosterol (**3**), el ergosterol (**4**), la hecogenina (**5**) el pregnancarboxaldehído (**6**), la dihidrotestosterona (**7**) y la pregnenolona (**8**), los que fueron seleccionados basándose no solo en sus propiedades biológicas, sino también en la presencia de grupos funcionales en diferentes posiciones del esqueleto esteroide, que pueden ser transformados químicamente (ver Figura 1).

¹ H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature*, **1985**, 318, 162.

² W. Krätschmer, L. Lamb, K. Fostiropoulos, D. Huffman, *Nature*, **1990**, 347, 354.

³ A. Hirsch, M. Brettreich, *The Chemistry of Fullerene*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2005**.

⁴ M. Bjelakovic, T. Kop, R. Baosic, M. Zlatovic, M.; Zekic, D.Milic, *Monatsh. Chem.* **2014**, 145, 1715

⁵ G. Mehta, V. Singh, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, 31, 324.

⁶ D. Salunke, B. Hazra, V. Pore, *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 813.

⁷ T. Ros, M. Prato, *Chem. Commun.* **1999**, 663.

⁸ C. Bingel, *Chem. Ber.* **1993**, 126, 1957.

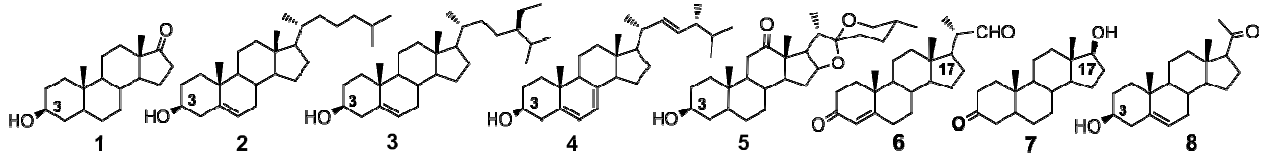
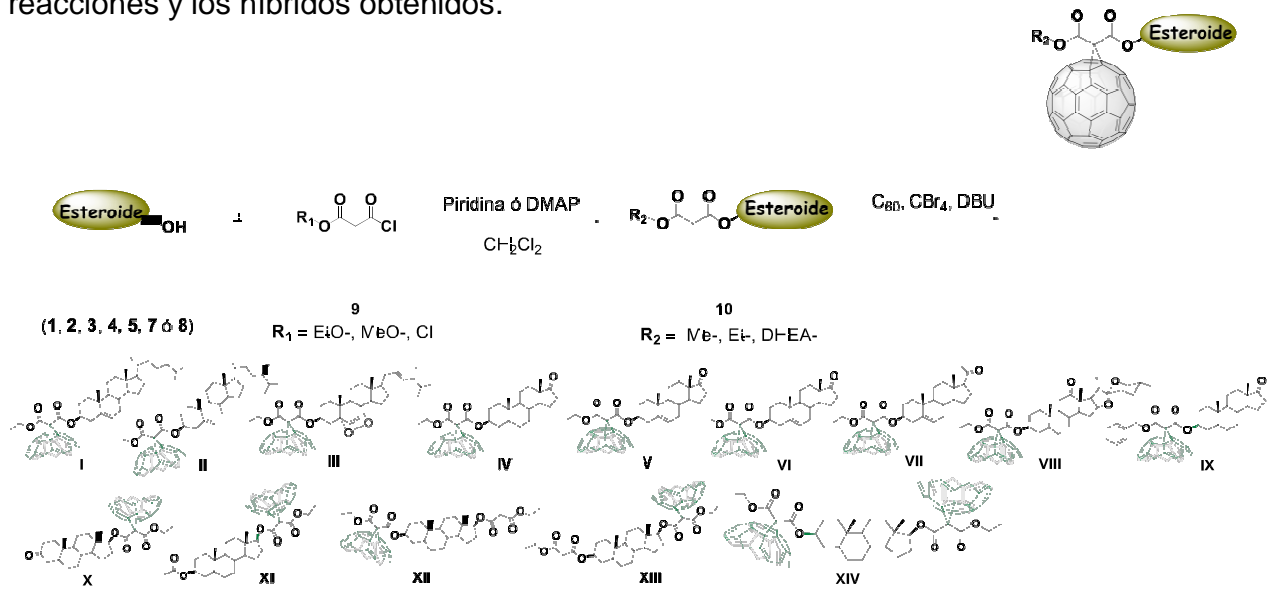
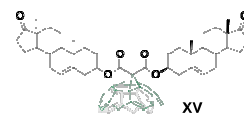


Figura 1. Esteroides utilizados para la obtención de los híbridos esteroide-[60]fullerenos.

Síntesis de esteroides metano[60]fullerenos.

Para la obtención de nuevas entidades moleculares del tipo esteroide-metano[60]fullereno se diseñó una estrategia de síntesis en dos etapas basada en la reacción de ciclopropanación entre diferentes malonatos esteroidales y el [60]fullereno. Como primer paso, los esteroides (1-5, 7 y 8) fueron tratados con los cloruros de alcoxycarbonilos (9) en presencia de una base orgánica, en diclorometano como disolvente a 0°C, obteniendo los malonatos esteroidales (10) con rendimientos entre 75-85%. Como segundo paso sintético se realizó la unión covalente de los esteroides malonil-sustituídos (10) con el C60 mediante la reacción de ciclopropanación en presencia de CBr4 y DBU. La formación de los monoadductos (I-XV) ocurre después de dos horas de reacción. Es importante controlar la reacción por HPLC, utilizado una columna *Buckyprep*, para evitar la poliadición con la formación de bisaductos no deseados. En el Esquema 1 se muestra toda la secuencia de reacciones y los híbridos obtenidos.





Esquema 1. Síntesis de los monoadductos **I-XV** mediante la reacción de ciclopropanación.

De esta forma se obtuvieron 15 nuevos híbridos (**I-XV**) del tipo esteroide-metano[60]fullerenos con variadas estructuras y buenos rendimientos, donde la unidad malonato-C60 está unida tanto por las posiciones C3 (compuestos **I-IX** y **XII**) como a la C17 (compuestos **X**, **XI** y **XIII**) del esteroide.

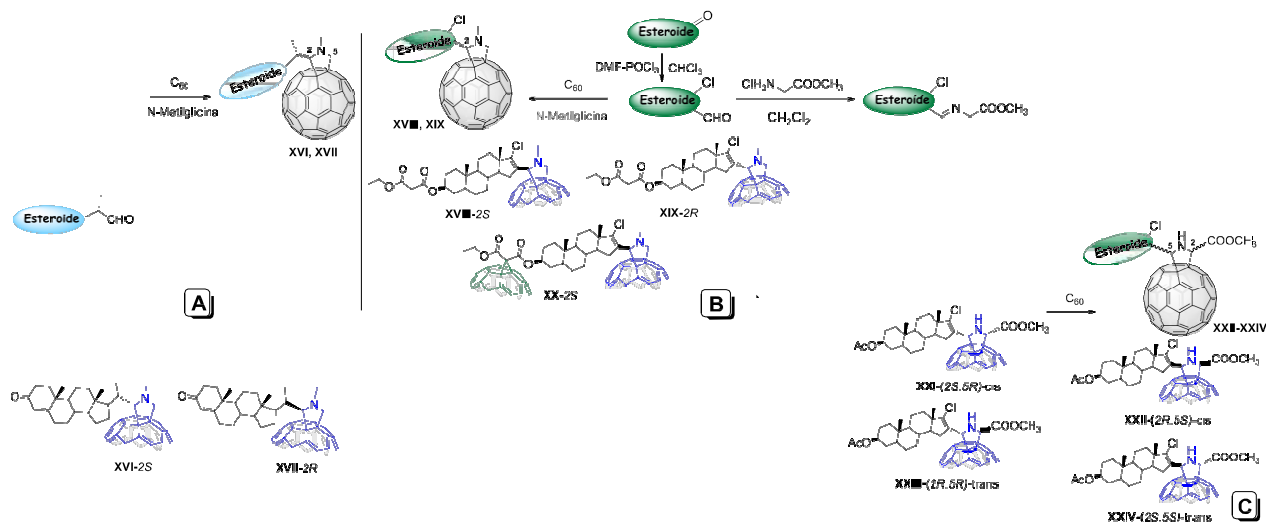
De los 15 nuevos compuestos es de resaltar la síntesis de moléculas con estructuras atractivas como el híbrido diesteroidal (**XV**), que asemeja una mariposa, y aquella en que se empleó un dimalonato esteroidal que permitió la obtención de un novedoso e interesante derivado difullerénico tipo mancuerna (**XIV**). Es de destacar que en el caso de la reacción del derivado androstano malonildisustituido con C60, conjuntamente con la

mancuerna **XIV** se obtienen los monoadductos **XII** y **XIII** en los que solo está presente una unidad de fullereno. Los rendimientos de los híbridos una vez purificados (58-82%), son muy buenos, lo cual demuestra la utilidad y eficiencia de esta metodología en el acoplamiento de esqueletos esteroidales al [60]fullereno.⁹

⁹ a) J. Coro, H. Rodríguez, D. G. Rivera, M. Suárez, D. Molero, M.A. Herranz, R. Martínez, S. Filippone, N. Martín. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 4810. b) L. E. Almagro, Tesis de Maestría, **2015**. c) William Cáceres, Tesis de Diploma, **2016**.

Síntesis de fulleropirrolidinas esteroideas

La síntesis de las fulleropirrolidinas se lleva a cabo mediante una cicloadición 1,3-dipolar entre el C₆₀ y un iluro de azometino generado *in situ* mediante la reacción de un aldehído y un aminoácido (ver Esquema 2).



Esquema 2. Estrategias de conjugación utilizadas para la obtención de esteroides fulleropirrolidinas y compuestos obtenidos.

Dependiendo del esteroide utilizado se siguieron diferentes estrategias para la obtención de estos derivados. En el caso del esteroide **6** (ver Figura 1), la presencia de un grupo formilo en la cadena lateral unida al C17, permitió su empleo directamente. La reacción se realiza mezclando el correspondiente esteroide formil-sustituido **6**, con el C₆₀ y la sarcosina (*N*-metilglicina), calentando a reflujo en tolueno bajo atmósfera de argón por 6 h como se muestra en el Esquema 2A. Al ocurrir la ciclización en el proceso de formación del anillo pirrolidínico tiene lugar la generación de un centro estereogénico en el C2 del anillo de cinco miembros. Como el esteroide de partida **6** es un enantiómero puro y no cambian su configuración en el transcurso de la reacción, se obtiene una mezcla de diastereoisómeros, los híbridos **2S-XVI** y el **2R-XVII**.¹⁰

De interés fue la obtención de un esteroide-fullereno asimétrico tipo mancuerna, para lo que se estableció un protocolo donde se siguió una secuencia de reacciones con el objetivo de transformar el esteroide **1**, introduciéndole un grupo formilo en el C16 y un grupo malonato en C3 (ver Esquema 2B). Inicialmente se realizó una reacción de cicloadición 1,3-dipolar donde se generó un centro estereogénico en el C2 dando lugar a la formación de los diastereoisómeros **2S-XVIII** y **2R-XIX**. A partir del estereoisómero **2S-XVIII** por reacción de ciclopropanación, se obtuvo la mancuerna **2S-XX**.¹¹

Para determinar la configuración absoluta de los nuevos centros estereogénicos formados

en el C2 del anillo de pirrolidina en los estereoisómeros **2S-XVI**, **2R-XVII**, **2S-XVIII**, **2R-XIX** y **2S-XX**, se utiliza la regla del sector,¹² propuesta para derivados de fullerenos, haciendo uso del efecto Cotton, determinado en los espectros de dicroísmo circular.¹³

En la búsqueda de compuestos diastereomericamente puros, se llevó a cabo por primera vez la síntesis diastereoselectiva de fulleropirrolidinas esteroidales por reacción del iluro de azometino esteroideal N-metalado (cobre o plata) y ligandos quirales con C₆₀.¹⁴

¹⁰ Dayana Alonso, Tesis de Diploma, **2017**.

¹¹ A. Ruiz, C. Morera, L. Almagro, J. Coro, E. E. Maroto, M. Herranz, S. Filippone, R. Martínez, D. Molero, J. García, M. Suárez, N. Martín, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3473.

¹² S. Wilson, Q. Lu, J. Cao, Y. Wu, C. Welch, D. Schuster, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 5131.

¹³ A. Ruiz, J. Coro, L. Almagro, J. A. Ruiz, D. Molero, E. E. Maroto, S. Filippone, M. Herranz, R. Martínez, M. Suárez, N. Martín. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 2819.

¹⁴ M. Suárez, A. Ruiz, L. Almagro, J. Coro, E. Maroto, S. Filippone, D. Molero, R. Martínez, N. Martín. *J. Org. Chem.*

2017, *82*, 4654.

(Esquema 2C). Dependiendo del par ligando quiral/metal se obtienen los pares de diastereoisómeros *cis* (**2S,5R-XXI** y **2R,5S-XXII**) y los *trans* (**2R,5R-XXIII** y **2S,5S-XXIV**) con buenos excesos diastereoméricos. La configuración de los centros estereogénicos generados en el C2 y el C5 del anillo de pirrolidina fueron asignados con el uso combinado de la regla del sector y el signo de la señal dicroica. El protocolo estereodivergente establecido muestra la eficiencia para la preparación de derivados diastereoselectivos de una manera controlada permitiendo la obtención de una gran variedad de derivados fullerenicos ópticamente activos.

La estructura de todos los compuestos intermedios e híbridos sinterizados fue determinada exhaustivamente mediante espectroscopia de RMN-¹H y RMN-¹³C, DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC, IR, UV-vis y espectrometría de masas empleando las técnicas HRMS-MALDI ó HRMS-ESI, realizando una asignación inequívoca de cada señal y determinado los caminos de fragmentación.^{9,10,13,14,15} De esta manera se dispone de una amplia base de datos que permite la fácil caracterización de nuevos compuestos que están por obtener.

Se estudiaron las propiedades de agregación de los metanofullerenos **I-XV** y las fulleropirrolidinas **XVI-XX** en medio acuoso mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y por Dispersión Dinámica de Luz (DDL). En general, los resultados indican que son sistemas polidispersos, formando vesículas fundamentalmente esféricas de tamaño nanométrico con ligeras características angulares. En todos los casos se encuentra una tendencia a formar enrejados moleculares alargados con un tamaño que varía entre 80-600 nm. Esto se debe a las interacciones no covalentes presentes en estos compuestos, La tendencia a la agregación de estos híbridos se asocia con la naturaleza hidrofóbica del C60 como fuerza de atracción principal.¹⁶

El estudio por voltametría cíclica de los híbridos sintetizados mostró que la presencia del esteroide en estas moléculas no influye en las propiedades electroquímicas de metanofullerenos y fulleropirrolidinas, manteniéndose en ellas las características electrónicas del C60.

Se realizaron estudios mediante cálculos teóricos que permitieron proponer un mecanismo plausible de cicloadición y retrocicloadición. Este se ha generalizado para derivados de fulleropirrolidinas, lo que permite conocer con mayor profundidad las cicloadiciones 1,3-dipolares, una de las reacciones más empleadas en la química orgánica actual.^{17,18}

Finalmente un estudio preliminar de las propiedades antioxidantes de estos híbridos muestra que tienen potencial actividad como antioxidantes.¹⁹

CONCLUSIONES

En este trabajo se ha demostrado que las estrategias utilizadas para la obtención de metanofullerenos y fulleropirrolidinas que contengan unidades de esteroides son eficientes para la obtención de una gran variedad de compuestos utilizando como plataforma el

fullereno. Es de destacar la metodología establecida para la obtención de fulleropirrolidinas esteroideas con un alto exceso diastereomérico. Además, el estudio químico-físico de los compuestos sintetizados, así como los resultados obtenidos como potenciales agentes oxidantes, los hacen ser candidatos con perspectiva para su uso en química médica.

15 a) M. Suárez, E. Maroto, S. Filippone, N. Martín, R. Martínez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2015**, 29, 497.

16 a) A. Ruiz, M. Suárez, N. Martín, F. Albericio, H. Rodríguez. *Beilstein J. Nanotech.* **2014**, 5, 374. b) Alberto Ruiz, Tesis

Doctoral, **2014**. c) Orlando Ortiz, Tesis de Diploma, **2015**.

17 E. Maroto, S. Filippone, M. Suárez, R. Martínez, a. Cozar, F. Cossio, N. Martín, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 705

18 C. Morera, M. Martínez, R. Miranda, M. Suárez, R. Martínez, N. Martín, J. García. *J. Phys. Chem. A* **2016**, 120, 8830.

19 J. Coro, H. Rodríguez, M. Suárez, Propiedades antioxidante de conjugados covalente esteroides-fullerenos. Informe de estancia. Uniiversidad de Barcelona. **2014**.