

## 21. Química

### Diseño y síntesis de compuestos quirales potencialmente anticancerígenos derivados de levoglucosenona

Tsai, Yi-hsuan; Cicetti, Soledad; Sarotti, Ariel; Spanevello, Rolando; Suárez, Alejandra

tsai@iquir-conicet.gov.ar; sarotti@iquir-conicet.gov.ar;

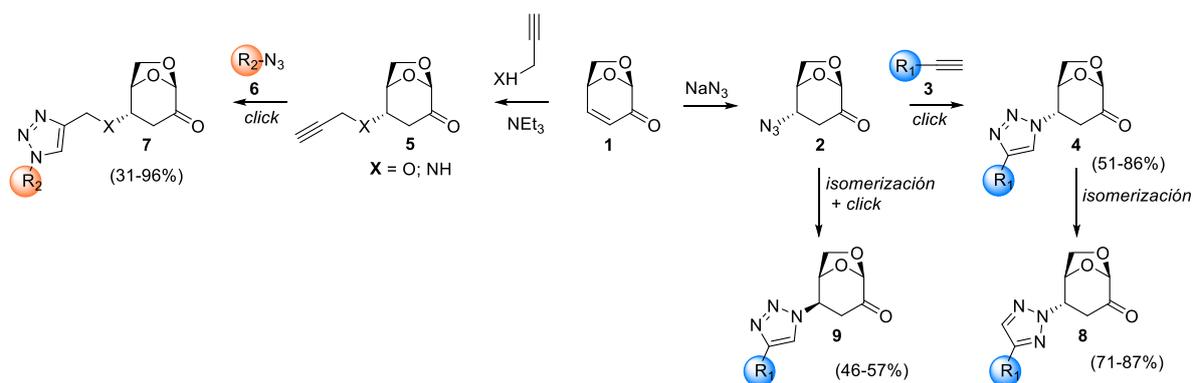
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

#### Resumen

El uso de derivados de biomasa como fuente de materia prima renovable de compuestos orgánicos es una alternativa extensamente explorada gracias a las diversas ventajas que presenta. El tratamiento pirolítico de material celulósico en condiciones ácidas proporciona levoglucosenona (**1**). Debido a su estructura rígida y funcionalidad versátil, ha sido extensamente empleada como material de partida quiral para la generación de diversos compuestos bioactivos con gran potencial farmacológico.

En virtud de lo expuesto, el objetivo del presente proyecto es sintetizar familias de derivados 1,2,3-triazólicos empleando **1** como material de partida y la posterior evaluación de las propiedades anticancerígenas. La quimioteca fue construida empleando una estrategia sintética (Esquema 1) basada en la notable reactividad del sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado de **1** como aceptor de Michael. De este modo se introdujeron selectivamente grupos azidas o alquinos mediante una adición conjugada para luego construir el triazol por reacción *click* catalizada por Cu (I) con alquinos o azidas, respectivamente.



Esquema 1

Además, se estudió exhaustivamente las isomerizaciones del tipo retro-Michael/Michael para ampliar el espacio químico, obteniendo selectivamente los triazoles **8** y **9**.

Muchos de los compuestos sintetizados mostraron una muy promisoriosa actividad anticancerígena frente a células de adenocarcinoma de mama metastásico, observando además una interesante selectividad frente a células con p53 mutante.

**Palabras clave:** levoglucosenona, reacción *click*, triazoles quirales, anticancerígeno.

### Introducción

La búsqueda de nuevas materias primas quirales que sirvan de base para el desarrollo de compuestos químicos con potencial farmacológico resulta una prioridad tanto a nivel académico como industrial. En este marco, resulta vital que las fuentes de quiralidad sean obtenidas de modo ambientalmente benigno y sustentable, fundamentalmente por la creciente rigurosidad de las legislaciones ambientales a nivel global. Una alternativa para lograr sustentabilidad es utilizar fuentes abundantes y renovables de materia prima tales como la celulosa, el principal componente de las plantas.

La pirólisis de papel de desecho o celulosa genera levoglucosenona (**1**), una cetona bicíclica enantioméricamente pura (Figura 1)

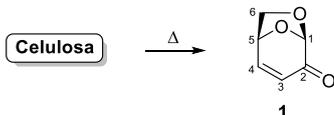


Figura 1

(Sarotti, Zanardi, Spanevello y Suárez, 2012). Existen tres grupos funcionales reactivos en su estructura: unión anhidro glicosídica, grupo cetona y doble enlace. Cada uno de estos grupos puede reaccionar selectivamente dependiendo de las condiciones de reacción empleadas. Estas características estructurales,

sumado a su bajo costo, pureza y fácil obtención, hacen que este material de partida ofrezca ventajas destacables. El sistema bicíclico presente en **1** resulta una estructura privilegiada a juzgar por las interesantes actividades biológicas que manifiestan algunos de sus derivados (Figura 2).

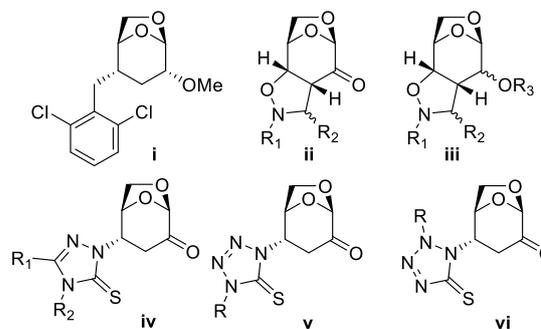


Figura 2

Por ejemplo, se encontró que el compuesto **i** posee importante actividad herbicida y de regulación en el crecimiento de plantas (Henzell, Furneaux y Tyler, 1990). Por otro lado, las isoxazolidinas del tipo **ii-iii** han mostrado ser potentes inhibidores de Ras, con promisoriosa actividad anticancerígena en varias líneas celulares humanas (Muller, et al., 2009). De particular importancia se destacan los compuestos **iv-vi**, que mostraron una muy alentadora propiedad antitumoral ligada al restablecimiento de la función de p53 (Westman, 2007).

Brevemente, la proteína p53 es un factor de transcripción que actúa como un eficiente supresor tumoral capaz de eliminar células sometidas a señales oncogénicas persistentes. En particular, ha sido descrita su participación en un sistema bien orquestado de detección y control del daño celular. Sin embargo, la actividad de esta proteína se puede ver deteriorada fruto de mutaciones en el gen p53. Cuando esto ocurre, la proteína p53 mutante se pliega de un modo diferente y pierde su función como supresor tumoral. De hecho, alrededor del 50% de tumores poseen mutaciones en el gen de p53, transformándose consecuentemente en uno de los blancos más fervientemente estudiados en terapias oncogénicas. Una de las líneas contempla el estudio de pequeñas moléculas capaces de interactuar con la p53 mutante y devolverla a su plegamiento original, reestableciendo por consiguiente su actividad antitumoral. Las drogas MIRA-1 y PRIMA-1, descubiertas por Wiman y colaboradores, han logrado reactivar la actividad de p53, logrando promisorios resultados al demostrar que dichos compuestos son capaces de inducir la muerte celular específicamente en células que expresan p53 mutante (Wiman, 2010).

Analizando los compuestos reportados (Figura 2), se advierte que a pesar de una marcada presencia de sistemas heterocíclicos de 5 miembros conteniendo

2 a 4 átomos de nitrógeno en la posición 4 de levoglucosenona, los derivados 1,2,3-triazólicos se han mantenido inexplorados.

La observación anterior sumado a las ventajas que presenta la levoglucosenona, (versatilidad, bajo costo, pureza, fácil obtención y su presencia en compuestos bioactivos), ha despertado nuestro interés hacia la exploración de sus derivados triazólicos que posean potencial actividad anticancerígena.

### **Objetivos**

Este proyecto de investigación tiene por objetivo la síntesis de novedosos compuestos quirales con potencial actividad biológica. Se contempla la síntesis de 1,2,3-triazoles estructuralmente diversos a partir de levoglucosenona (**1**). Los compuestos sintetizados serán luego evaluados como anticancerígenos frente a células de adenocarcinoma de mama metastásico MDA-MB-231 (que expresa exclusivamente p53 mutante). De esta manera, se propone brindar una alternativa sustentable, económica y ambientalmente benigna para la generación de compuestos bioactivos.

### **Materiales y Métodos**

Todos los reactivos químicos empleados fueron adquiridos de fuentes comerciales, por lo que se han empleado sin purificación previa, a no ser que se indique lo contrario.

Las reacciones en atmósfera inerte se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón o nitrógeno seco.

Las soluciones fueron evaporadas a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio, seguida de bomba de vacío, para eliminar el resto de solvente remanente.

El avance de las reacciones fue monitoreado mediante cromatografía en capa delgada (CCD) y los productos obtenidos fueron purificados por cromatografía en columna o a través de la técnica de recristalización.

La estructura de los compuestos obtenidos fue elucidada a través de los datos de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC, IR y HMRS.

Los espectros de RMN fueron realizados en un espectrómetro marca Bruker modelo Avance II a 300 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  y a 75 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ . Las mediciones se realizaron con la muestra disuelta en  $\text{CDCl}_3$ .

Los espectros de IR se realizaron en un espectrómetro Shimadzu Prestige 21. Las muestras sólidas se midieron como dispersiones en pastillas de KBr. Los aceites se determinaron formando una delgada película soportada en pastilla de NaCl.

Los espectros de HMRS fueron efectuados utilizando un espectrómetro de masas Bruker micrOTOF-Q II equipado con fuente de ionización por Electrospray (ESI).

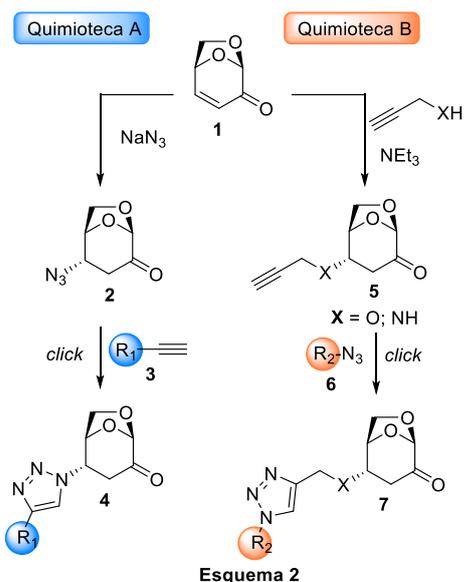
La caracterización de cada producto se completó con la medición de su poder rotatorio y la determinación de su punto de fusión (en caso de tratarse de un compuesto sólido a temperatura ambiente).

Los poderes rotatorios  $[\alpha]_D$  fueron determinados a la longitud de la línea D del sodio (589 nm) empleando un fotopolarímetro electrónico marca Jasco modelo DIP-1000.

Los puntos de fusión fueron determinados en un microscopio con platina calefactora marca Ernst Leitz Wetzlar modelo 350.

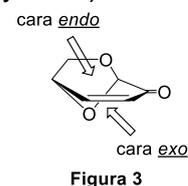
## Resultados y Discusión

Con el objetivo de funcionalizar la posición C-4 de levoglucosenona con derivados triazólicos, se diseñó una estrategia general basada en la notable reactividad del sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado de **1** como aceptor de Michael (Esquema 2).



Se plantearon dos rutas sintéticas, ambas empleando las mismas secuencias de reacciones: adición hetero-Michael seguida de cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos terminales catalizada por Cu(I). De este modo, la Quimioteca A se construiría a partir de la reacción de **1** con azida sódica formando **2**, cuyo posterior tratamiento con diversos alquinos terminales **3** en presencia de Cu(I), daría lugar a la formación de familias de triazoles **4**. Por otra parte, para generar los compuestos de la Quimioteca B se propuso sintetizar los derivados propargílicos **5** mediante tratamiento de **1** con alcohol propargílico o propargilamina. Una posterior reacción entre **5** y las azidas **6** bajo catálisis de Cu(I), posibilitaría el acceso a bibliotecas de triazoles **7** estructuralmente variados dependiendo de la naturaleza de la azida empleada.

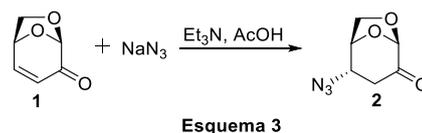
Se esperaban obtener elevados niveles de estereoselectividad en las etapas de adición 1,4 (reacciones **1**→**2** y **1**→**5**) dada la sabida función del puente 1,6-anhidro para bloquear la cara  $\beta$  (*endo*) de la molécula (Figura 3).



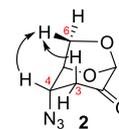
## 1. Quimioteca A

### 1.1 Síntesis de C-4- $\alpha$ -1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos derivados de levoglucosenona.

El primer paso de nuestra estrategia sintética fue la obtención de la azida **2**. Luego de probar diferentes protocolos para la  $\beta$ -azidación de enonas, logramos un excelente nivel de conversión (~100%) (Esquema 3) al emplear AcOH como solvente en tan solo 10 minutos de reacción (3,4 eq. NaN<sub>3</sub>, AcOH, 0,14 eq. Et<sub>3</sub>N, 10 min).



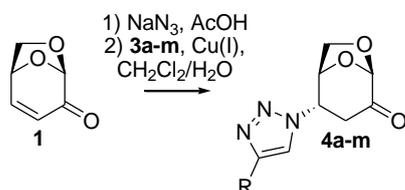
La estereoquímica en C-4 fue determinada por análisis de las constantes de acoplamiento entre H-3<sub>ax</sub>/H-4 (6,6 Hz) y H-3<sub>eq</sub>/H-4 (~0 Hz), indicando relaciones axial-ecuatorial y diecuatorial, respectivamente, y confirmado por la correlación NOE entre H-4 y H-6<sub>endo</sub> (Figura 4). Es importante destacar que la adición de Michael procedió con excelente nivel de selectividad facial, sugiriendo el efecto



estérico del puente 1,6-anhidro en dirigir el ataque exclusivo del nucleófilo por la cara  $\alpha$  de la molécula.

Una vez optimizada la síntesis de **2**, procedimos a explorar la cicloadición 1,3-dipolar con alquinos terminales para obtener los correspondientes triazoles **4**. Dada la imposibilidad de purificar **2** por su descomposición en sistemas cromatográficos, la etapa *click* fue evaluada sobre el crudo de reacción empleando un protocolo modificado del desarrollado por Kim y colaboradores (1,3 eq. alquino, 14 mol% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 40 mol % ascorbato de sodio) (Lee, Park, Jeon y Kim, 2006). De esta manera se elaboró una quimioteca empleando distintos alquinos terminales conteniendo diversidad de sustituyentes alquilo, vinilo y arilo, con diferentes patrones de sustitución y heteroátomos. Como se muestra en la Tabla 1, en todos los casos se lograron rendimientos buenos a muy buenos.

Tabla 1. Síntesis de triazoles **4a-m**

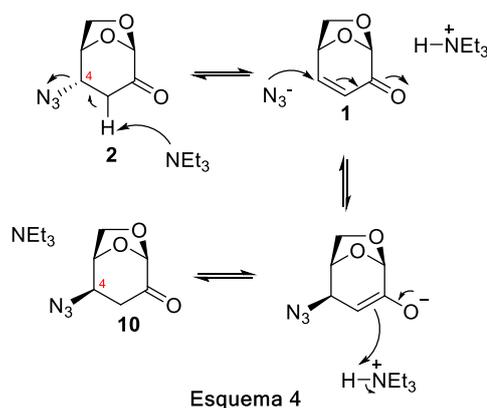


Entrada	R	Alquino	Rendimiento (2 etapas) <sup>a,b</sup>
1	-Ph	<b>3a</b>	86%
2	-CO <sub>2</sub> Me	<b>3b</b>	76%
3	-4-OMe-Ph	<b>3c</b>	83%
4	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	<b>3d</b>	77%
5	-CH <sub>2</sub> OH	<b>3e</b>	64%
6	-CH=CHCH <sub>2</sub> OH	<b>3f</b>	65%
7	-C(OH)Ph	<b>3g</b>	71%
8	-CH <sub>2</sub> OPh	<b>3h</b>	65%
9	-CH <sub>2</sub> SPh	<b>3i</b>	87%
10	-CH <sub>2</sub> NHPh	<b>3j</b>	51%
11	-CH <sub>2</sub> -O-4-OMe-Ph	<b>3k</b>	82%
12	-CH <sub>2</sub> -O-2-NO <sub>2</sub> -Ph	<b>3l</b>	84%

13	-CH <sub>2</sub> -S-4-Me-Ph	<b>3m</b>	70%
<sup>a</sup> Etapa 1: NaN <sub>3</sub> (3.4 eq.), NEt <sub>3</sub> (0.14 eq.), AcOH. Etapa 2: <b>3a-m</b> (1.3 eq.), CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (14 mol%), ascorbato de sodio (40 mol%), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O.			
<sup>b</sup> Rendimientos correspondientes a los compuestos aislados por cromatografía en columna.			

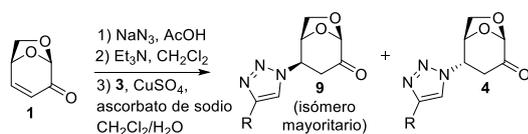
## 1.2 Síntesis de C-4- $\beta$ -1,2,3-triazoles-1,4-disustituídos derivados de levoglucosenona

Curiosamente, durante nuestra optimización preliminar de la reacción entre **2** y **3a**, notamos en algunos casos la formación de un isómero minoritario **9a** (Esquema 5). Un análisis exhaustivo de su espectro de <sup>1</sup>H-RMN acompañado de predicciones computacionales y difracción de rayos X, permitió reconocer que **9a** era epímero de **4a** en C-4. Un estudio detallado reveló que **9a** se forma al emplear un crudo de reacción de **2** que contiene a su vez a su epímero en C-4 (**10**), el cual proviene de un proceso retro-Michael/Michael (Esquema 4).



El seguimiento de esta reacción por <sup>1</sup>H-RMN empleando Et<sub>3</sub>N como catalizador básico permitió observar que la reacción de retro-Michael cursa en una etapa temprana, aumentando significativamente la concentración de **1**, para luego

mantenerse prácticamente constante. Asimismo, la fracción molar de **2** disminuye considerablemente con el consecuente aumento en la concentración de **10** hasta alcanzar finalmente el equilibrio a las 2 horas. La relación final **10/2** fue 70/30, consistente con la mayor estabilidad calculada para **10** al nivel de teoría B3LYP/6-31G\*. En base a lo anteriormente expuesto, desarrollamos una metodología alternativa para generación preferencial de los triazoles **9** que se muestra en el Esquema 5. Una vez obtenida la azida **2**, se promueve la epimerización en C-4 empleando catálisis de Et<sub>3</sub>N hasta alcanzar el equilibrio, para luego realizar la reacción *click* en las condiciones preestablecidas empleando diferentes alquinos terminales estructuralmente variados. En todos los casos, los productos deseados **9** fueron obtenidos con buenos rendimientos globales, y selectividades en concordancia con la relación **2/10** hallada por <sup>1</sup>H-RMN.



Esquema 5

Tabla 2. Síntesis preferencial de triazoles **9**

Entrada	R	Alquino	Rend. (3 etapas)	Relación 9/4
1	-Ph	<b>3a</b>	88%	65:35
2	-CO <sub>2</sub> Me	<b>3b</b>	82%	71:29
3	-4-OMe-Ph	<b>3c</b>	80%	75:25
4	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	<b>3d</b>	80%	71:29
5	-C(OH)Ph	<b>3g</b>	70%	65:35

### 1.3 Síntesis de C-4- $\alpha$ -1,2,3-triazoles-2,4-disustituídos derivados de levoglucosenona

Otro hallazgo importante se logró durante los estudios preliminares para racionalizar la formación de **9**, que inicialmente pensamos podía provenir de **4** a través de una epimerización en C-4. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis, tratamos una muestra de **4a** en medio básico durante 7 días. Para nuestra sorpresa, no sólo no observamos trazas de **9a**, sino tampoco recuperamos material de partida **4a**. En su lugar, pudimos aislar un nuevo compuesto **8a** (Esquema 5), cuyo espectro de <sup>1</sup>H-RMN y constantes de acoplamiento eran similares a los observados para **4a**, sugiriendo la presencia de un derivado de levoglucosenona C-4- $\alpha$ . En base a los desplazamientos químicos en <sup>13</sup>C-RMN, datos extraídos de la bibliografía y cálculos computacionales del tipo DFT, pudimos proponer la estructura de **8a** como el derivado triazólico 2,4-disustituído de **4a**, posteriormente corroborado por estudios de difracción de rayos X. Este fortuito descubrimiento resultó en el desarrollo de una estrategia sintética novedosa para la preparación de 1,2,3-triazoles-2,4-disustituídos, además de posibilitar una mejor exploración del espacio químico de este tipo de compuestos potencialmente bioactivos. Si bien, la transformación de 1,2,3-triazoles-N1-monosustituídos a sus

contrapartes N2-sustituídos ya fue explorada por el grupo de Sharpless (Kwok, Hein, Fokin y Sharpless, 2008), la ausencia de reportes de esta isomerización sobre triazoles disustituídos nos motivó para realizar un estudio más detallado del sistema. Luego de una ardua exploración de las condiciones de reacción, evaluando diferentes solventes, aditivos y temperaturas, encontramos las condiciones óptimas para promover la transformación de **4** en **8** (70 °C, CHCl<sub>3</sub>, 1 eq. Et<sub>3</sub>N, 12 h). Este protocolo optimizado (Esquema 6) fue posteriormente evaluado empleando diversos triazoles **4** de partida, obteniendo en todos los casos los correspondientes productos en muy buenos rendimientos.

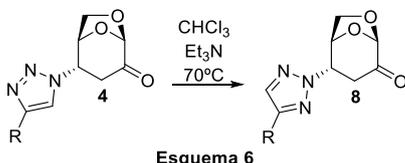


Tabla 3. Isomerización de **4** a **8** catalizada por Et<sub>3</sub>N

Entrada	R	Producto	Rendimiento (%)
1	-Ph	<b>8a</b>	86%
2	-CO <sub>2</sub> Me	<b>8b</b>	87%
3	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	<b>8d</b>	71%
4	-C(OH)Ph	<b>8g</b>	83%
5	-CH <sub>2</sub> -O-4-OMe-Ph	<b>8k</b>	71%

#### 1.4 Evaluación de actividad anticancerígena de la Quimioteca A

Se evaluaron todos los compuestos sintetizados frente a células de adenocarcinoma de mama metastásico MDA-MB-231 (que expresa exclusivamente p53 mutante) mediante

ensayos de coloración vital (MTT) con incubación de 48 horas.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de los productos a una concentración de 50 μM en DMSO para hacer una diferenciación inicial entre los compuestos potencialmente bioactivos de los que no lo son.

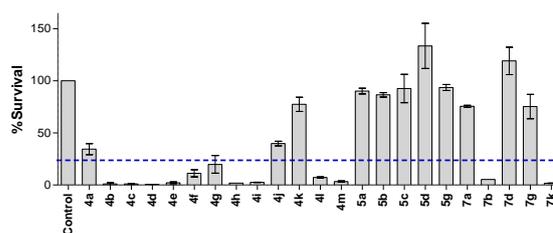


Figura 5

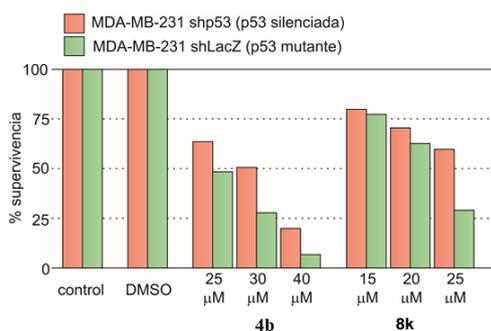
Fijando un límite arbitrario de 30% de supervivencia, separamos 12 compuestos para estudios posteriores de cálculo de coeficiente de inhibición del 50% (IC<sub>50</sub>) (Tabla 4) y selectividad hacia células con p53 mutante. De esta manera, detectamos que dos de los compuestos ensayados presentan una interesante selectividad hacia la proteína p53 mutante, ya que los valores de IC<sub>50</sub> son menores en las células con p53 mutante que en las células con p53 silenciada (Tabla 5). Además, cabe destacar que estos valores de IC<sub>50</sub> son comparables con los obtenidos para PRIMA-1 (15-20 μM), uno de los compuestos más fervientemente estudiados en procesos de restitución de p53.

Tabla 4

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>4b</b>	24,69
<b>4c</b>	28,30

4d	23,25
4e	27,67
4f	30,32
4g	32,81
4h	29,99
4i	28,71
4l	31,81
4m	30,26
8b	22,76
8k	25,88

Tabla 5. Prueba de selectividad hacia p53 mutante



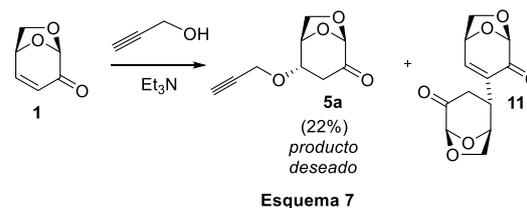
Compuesto	IC <sub>50</sub> shLacZ	IC <sub>50</sub> shp53
4b	24,69 μM	29,22 μM
7b	22,76 μM	27,24 μM

## 2. Quimioteca B

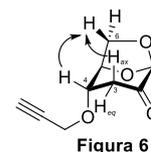
Motivados por los resultados promisorios de actividad anticancerígena de la Quimioteca A, nos propusimos indagar el efecto de la distancia entre el núcleo triazólico y el núcleo de levoglucosenona en su actividad. Para ello siguiendo la estrategia mostrada en el Esquema 2, preparamos en primera instancia los compuestos **5a** y **5b** por adición de Michael del alcohol propargílico y la propargilamina a **1**, respectivamente. Debido a la distinta nucleofilia de ambas especies, serán analizados por separado.

Si bien la reacción oxa-Michael para la formación de **5a** puede ser llevada a cabo

tanto por asistencia de un ácido o una base, se optó por este último pues el alcohol propargílico en presencia de un ácido podría formar un cetal con el grupo cetona de levoglucosenona, proceso que competiría con la reacción de adición. Inicialmente, se evaluó el uso de carbonato de potasio como catalizador. Sin embargo, al cabo de 5 días la CCD mostró materiales de descomposición y ausencia de **1**. En consecuencia, se decidió emplear una base más suave como promotor. Para ello, estudiamos el uso de Et<sub>3</sub>N en diversas condiciones experimentales. Varios experimentos empleando este catalizador básico nos permitió obtener el producto deseado **5a** en bajos rendimientos conjuntamente con cantidades variables del dímero **11** (Esquema 7). Afortunadamente, ambos compuestos pudieron separarse fácilmente por cromatografía en columna para una completa caracterización espectroscópica.

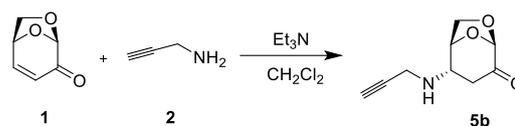


Nuevamente, la estereoquímica en C-4 de **5a** fue confirmado por los experimentos ENO entre H-4 y H-6<sub>endo</sub> (Figura 6).



Ante la dificultad de obtener el producto deseado con buenos rendimientos se propuso ensayar la reacción oxa-Michael bajo catálisis ácida.

En este caso, la reacción no se ve favorecida por la formación de un mejor nucleófilo, sino por la activación de todo el sistema carbonílico  $\alpha,\beta$ -insaturado por la protonación del átomo de oxígeno del grupo carbonilo, logrando un mejor electrófilo. En la práctica se probó la reacción de adición del alcohol propargílico (añadidos en exceso) a **1** variando los catalizadores y sus concentraciones.



Esquema 8

La dificultad de purificar **5b** por cromatografía en columna debido a procesos de descomposición nos condujo a derivatizar el aducto **5b** mediante su transformación en la acetamida correspondiente **5c** a fin de lograr un compuesto estable (Esquema 9). Nuevamente, el análisis de los valores de las constantes de acoplamiento  $J$  entre los protones unidos al C-3 y C-4 permitió definir la estereoquímica de este último carbono.

Tabla 6. Síntesis de **5a** en medio ácido

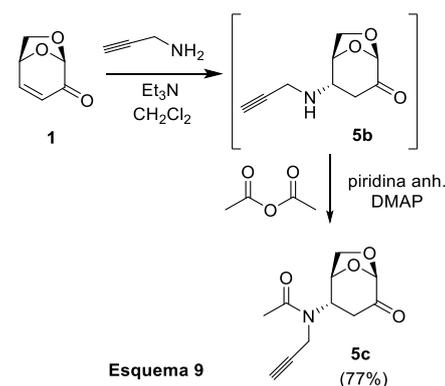
Entrada <sup>a</sup>	Condiciones		Rend (5a)
	Cat. Ácido <sup>b</sup>	t	
1	0,2 eq. TFA	4 hs	Descomposición
2	0,4 eq. CSA	12hs	30%
3	0,7 eq. HCl <sub>cc</sub>	12 hs	44%
4	0,2 eq. HCl <sub>cc</sub>	12 hs	35%
5	0,2 eq. HCl 6N	12 hs	43%

<sup>a</sup> todas las reacciones fueron llevadas a cabo usando el alcohol propargílico como solvente.

<sup>b</sup> los equivalentes fueron calculados en relación a los mmoles de **1** utilizados.

Como puede apreciarse en la Tabla 6, las entradas 2-4 mostraron rendimientos similares, no pudiéndose definir una condición óptima de reacción. Sin embargo, cabe destacar la entrada 5, ya que si bien su rendimiento no fue mejor que los anteriores, la ausencia del cetal en el crudo de reacción resultó una ventaja importante al simplificar la purificación de **5a**.

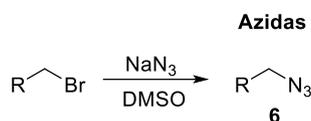
Por otra parte, para la formación del aducto **5b** se empleó la reacción aza-Michael entre la propargilamina y **1**, con catálisis básica (Esquema 8)



Esquema 9

Una vez sintetizados los alquinos **5a** y **5c**, se prepararon las azidas **6** a partir de los correspondientes bromuros siguiendo el mismo protocolo estándar tipo  $S_N2$  (Esquema 10). Todas las reacciones se hicieron con exceso de azida sódica, a temperatura ambiente, en atmósfera inerte y tiempos de reacción de 12 horas, a excepción de la que parte de Br-CH<sub>2</sub>-CO-Ph, la cual sólo requirió 15 minutos debido a una descomposición sufrida por la azida correspondiente observada en tiempo de

reacción más prolongado. Tal como lo indica la Tabla 7, las azidas orgánicas pudieron ser obtenidas con rendimientos moderados a excelentes.

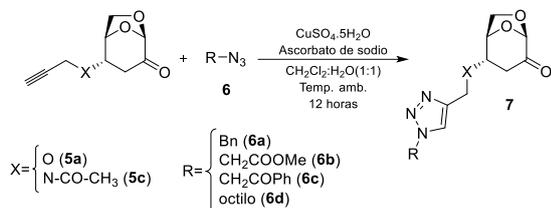


Esquema 10

Tabla 7.

Compuesto	R	Rendimiento
6a	-Ph	71%
6b	-COOMe	47%
6c	-COPh	90%
6d	-Octilo	~100%

Posteriormente, se efectuó la reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre los alquinos **5a** y **5c** con las diversas azidas **6** para formar los compuestos **7** con rendimientos variables (Esquema 11).



Esquema 11

Tabla 8. Rendimiento de los triazoles sintetizados a partir de **5a** y **6a-6d**

Compuesto	R	Rendimiento
7a1	-Bn	78%
7a2	-CH <sub>2</sub> COOMe	58%
7a3	-CH <sub>2</sub> COPh	31%
7a4	-Octilo	85%

Tabla 9. Rendimiento de los triazoles sintetizados a partir de **5c** y **6a-6d**

Compuesto	R	Rendimiento
7c1	-Bn	37%
7c2	-CH <sub>2</sub> COOMe	77%
7c3	-CH <sub>2</sub> COPh	76%
7c4	-Octilo	91%

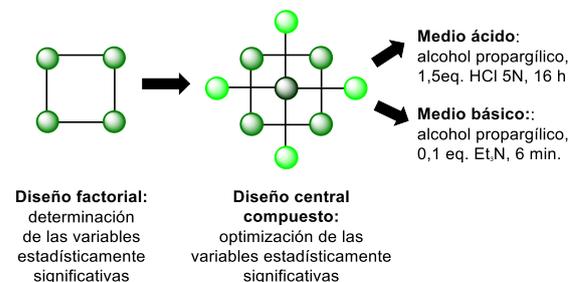
Sintetizada esta pequeña familia de compuestos, se evaluó la actividad anticancerígena de los mismos, identificándose **7a2** y **7a3** con IC<sub>50</sub>

relevante y selectividad notable hacia p53 mutante (Tabla 10).

Tabla 10.

Compuesto	IC <sub>50</sub> shLacZ	IC <sub>50</sub> shp53
7a2	24 μM	27 μM
7a3	26 μM	34 μM

Dado que ninguno de los compuestos **7c** mostró actividad relevante, nos propusimos ampliar la biblioteca de compuestos **7a** introduciendo mayor variedad estructural en la azida. Para ello, consideramos necesaria la optimización de la adición oxa-Michael entre el alcohol propargílico y **1**. Esta reacción ha sido extensamente estudiada ya que es de común conocimiento los inconvenientes que presenta tales como la facilidad de la reacción retro-Michael, la dimerización del aceptor de Michael, entre otros. Con la ayuda de un diseño estadístico de experimentos, pudimos encontrar las condiciones experimentales óptimas del proceso, tanto en medio ácido como básico, empleando un número reducido de experimentos (Esquema 12). Mediante un diseño factorial, determinamos las variables estadísticamente significativas que fueron posteriormente evaluadas en un diseño central compuesto.



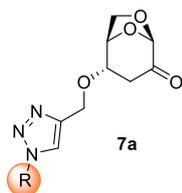
Esquema 12

Cabe destacar que en todos los

experimentos realizados, la conversión fue determinada por integración de las señales de RMN-1H del crudo de reacción, correspondientes a la levoglucosenona de partida, al alquino **5a** y al cetal (en medio ácido) o dímero **11** (en medio básico). Las condiciones óptimas encontradas con catálisis ácida fueron 1,5 eq. de ácido clorhídrico 5N empleando el alcohol propargílico directamente como solvente durante 16 horas, logrando una conversión del 90%. Por otro lado, en medio básico la mayor conversión (87%) se logró al emplear 0,1 eq. de Et<sub>3</sub>N, alcohol propargílico en exceso, durante 6 minutos. Comparando ambos resultados y haciendo un balance entre rendimiento y tiempo de reacción, decidimos continuar trabajando en las condiciones establecidas para el medio básico.

Como se mencionó anteriormente, esta optimización se realizó en miras de ampliar la serie de compuestos **7a** de la quimioteca B. Por lo tanto, a continuación sintetizamos más triazoles empleando diversas azidas abarcando mayor variedad estructural (Tabla 11).

Tabla 11. Rendimiento de los triazoles **7a**



Compuesto	R	Rendimiento
<b>7a5</b>	-4-NO <sub>2</sub> Ph	81%
<b>7a6</b>	-4-ClPh	77%
<b>7a7</b>	-Ph	70%
<b>7a8</b>	-4-FPh	78%
<b>7a9</b>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	49%
<b>7a10</b>	-CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	74%

<b>7a11</b>	-2-ClPh	43%
<b>7a12</b>	-2-BrPh	79%
<b>7a13</b>	-4-COOHPh	75%
<b>7a14</b>	-naftil	96%

Una vez extendido el espacio químico de estos derivados triazólicos, se espera que las evaluaciones de actividad biológica nos permita realizar un análisis global de estructura-actividad en conjunto con los resultados preliminares.

Además, se propone sintetizar análogos de los triazoles **7a** con otro heterociclo de 5 miembros tales como pirazoles o isoxazoles a fin de estudiar el efecto de estos núcleos sobre su actividad biológica.

## Conclusiones

Empleando levoglucosenona como material de partida, se sintetizaron de modo simple y eficiente novedosos triazoles quirales, que mostraron promisorio actividad anticancerígena con interesante selectividad hacia p53 mutante. Estos hallazgos motivan la realización de un estudio más profundo para encontrar relaciones estructura/actividad que posibiliten el descubrimiento de nuevos y más poderosos análogos.

Cabe destacar que en el presente trabajo empleamos los cálculos computacionales como un complemento eficiente y confiable para la elucidación estructural. Por otra parte, el diseño estadístico de experimentos nos permitió encontrar rápidamente las condiciones óptimas para la reacción oxa-Michael la

cual ha sido objeto de estudio de varios grupos de investigación dados los inconvenientes que presenta.

## Bibliografía

Henzell, R.F., Furneaux, R.H. y Tyler, P.C. (1990). An evaluation of the herbicidal and plant growth regulatory activity of a novel class of carbohydrate-derived 6,8-dioxabicyclo[3.2.1]octanes. *Pest. Sci.*, 30, 59-66.

Kwok, S. W., Hein, J. E., Fokin, V. V. y Sharpless, K. B. (2008). Regioselective Synthesis of Either 1*H*- or 2*H*-1,2,3-Triazoles *via* Michael Addition to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Ketones. *Heterocycles*, 76 (2), 1141-1154.

Lee, B. Y., Park, S. R., Jeon, H. B. y Kim, K. S. (2006). A new solvent system for efficient synthesis of 1,2,3-triazoles. *Tetrahedron Lett.*, 47(29), 5105-5019.

Muller, C., Gómez-Zurita Frau, M.A, Ballinari, D., Colombo, S., Bitto, A., Martegani, E., Airoldi, C., van Neuren, A.S., Stein, J., Weiser, J., Battistini, C. y Peri, F. (2009). Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Levoglucosenone - Derived Ras Activation Inhibitors. *Chem. Med. Chem.*, 4, 524-528.

Sarotti, A.M., Zanardi, M.M., Spanevello, R.A. y Suárez, A.G. (2012). Recent Applications of Levoglucosenone as Chiral Synthons. *Curr. Org. Synth.*, 9, 439-459.

Westman, J., Wiman, K y Mohell, N. (2007). *WO2007139497 A1*.

Wiman, K.G. (2010). Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene* 29, 4245-4252.

## Agradecimientos

CONICET – ANPyCT - UNR