

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE QUIMICA**



**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**“REDUCCIÓN SELECTIVA DEL PRODUCTO DE ESTERIFICACIÓN DELA  
EPIANDROSTERONA COMO INTERMEDIARIO CLAVE PARA EL  
ACOPLAMIENTO CON AMINOÁCIDOS”**

Trabajo Especial de Grado presentado ante  
la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Br.  
Fernandes G. Victor D. para optar por el Título de  
Licenciado en Química.

Caracas, Mayo 2015

Yo Profesor Cabrera Gustavo, Investigador del Laboratorio o Centro de Investigación De Síntesis Orgánica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“REDUCCIÓN SELECTIVA DEL PRODUCTO DE ESTERIFICACIÓN DE LA  
EPIANDROSTERONA COMO INTERMEDIARIO CLAVE PARA EL  
ACOPLAMIENTO CON AMINOÁCIDOS”**

Que presenta el Br. Fernandes G. Victor D, C.I. 18.536.226 para aspirar al Título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio ó Centro de Investigación de Síntesis Orgánica de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2013 y 2015, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Mayo2015

---

Dr. Gustavo Cabrera

(Tutor)

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado:

**“REDUCCIÓN SELECTIVA DEL PRODUCTO DE ESTERIFICACIÓN DE LA  
EPIANDROSTERONA COMO INTERMEDIARIO CLAVE PARA EL  
ACOPLAMIENTO CON AMINOÁCIDOS”**

Presentado por el Br. Fernandes G. Víctor D, C.I. 18.536.226 certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el Título de Licenciado en Química.

---

Dr. Cabrera Gustavo  
(Director)

---

Dra. María Lupe Márquez  
(Jurado)

---

(Jurado)

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación contempla los métodos de esterificación de la epiandrosterona con diferentes agentes acilantes, empleando como catalizador nucleofílico la DMAP (4-N,N-dimetilaminopiridina), ácido malónico, succínico y anhídrido succínico; con anhídrido succínico se obtuvo 20 % de rendimiento. Una vez obtenido el producto esterificado, se realizó la reducción del grupo carbonilo del ácido carboxílico con diborano ( $B_2H_6$ ) en presencia de un éster, obteniéndose un 82 % de rendimiento. Este producto de reducción actuó como nucleófilo empleando Diciclohexilcarbodiimida como catalizador, en el acoplamiento con la fenilalanina protegida con ácido trifluoroacético, donde se obtuvo un 16% de rendimiento. Las reacciones fueron seguidas mediante el uso de cromatografía de capa fina y los productos obtenidos en cada paso caracterizados mediante técnicas espectroscópicas.

## AGRADECIMIENTOS

Ante todo agradezco a Dios, a la Virgen y María Francia, por haberme dado la fuerza, el empeño de realizar mis estudios y de no desistir ante todas las adversidades, que se convirtieron en experiencias que me fortalecieron cada día más.

Infinitas gracias a mis Padres, Nelía Fernandes y Armindo Fernandes, Hermano, Christian Fernandes, Abuela, Martiña Goncalves y Familia, que de manera tanto material como anímica, siempre me apoyaron y confiaron en mí. Tengo una vida para agradecerles.

Agradezco al Dr. Gustavo Cabrera, Tutor, Profesor y una gran persona. Gracias por haber confiado en mí y por haberme dado la oportunidad de ser guiado en mis estudios por usted.

Agradezco al Profesor Pablo Neacato, por ser guía, compañero de mecánica y por transmitir sus conocimientos en el laboratorio de productos naturales.

Agradezco al Profesor Jairo Bermúdez, por impartirme sus conocimientos y ayudarme en mis estudios de Orgánica II, por ser guía, compañero en el laboratorio de productos naturales y por su disposición a ayudar en todo momento.

Agradezco a la Profesora Lola de Lima, por su disposición y ayuda en la caracterización por espectroscopia Infrarroja de los productos obtenidos, Al Profesor Mauro Martínez, gracias, por su apoyo y disposición a lo largo de la carrera.

Sin dejar atrás a la persona que me llevó a cursar Síntesis Orgánica, que me motivo a aceptar este proyecto, que día a día y en momentos difíciles, fue el apoyo, ayuda, la barrera a no desistir y quien siempre me dijo, LO LOGRARAS. Muchísimas Gracias a la compañera más ordenada de mesón, Daniela Valderrama.

Agradezco a la Universidad Central de Venezuela, a la Facultad de Ciencias, por brindarme todos sus Estudios, por ser mi segunda casa y darme la oportunidad de ser un Profesional de la República Bolivariana de Venezuela. **Ucevista Hoy, Mañana y Siempre.**

## INDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	Pag.1
<b>2. FUNDAMENTO TEORICO</b>	Pag. 2
Terpenos	Pag. 2
Androstanos	Pag. 3
Esteroides como Virales	Pag. 5
Fiebre amarilla	Pag. 7
Dengue	Pag. 7
Catálisis Nucleofílica	Pag. 8
Catálisis mediante 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP)	Pag. 10
<i>N N'</i> -diciclohexilcarbodiimida (DCC)	Pag. 12
Hidroboración	Pag. 14
Reducción con Diborano	Pag. 14
Aminoácidos	Pag. 16
Péptidos	Pag. 19
Acoplamiento	Pag. 20
Grupos protectores de aminoácidos	Pag. 21
Grupos protectores del $\alpha$ -amino	Pag. 22
Grupos protectores del $\alpha$ -carboxilo	Pag. 23
<b>3. ANTECEDENTES</b>	Pag. 25
DMAP y DCC como catalizadores en reacciones de esterificación	Pag. 25
Reacciones catalizadas por DMAP	Pag. 25
Esterificación estereoespecificacon DCC-DMAP	Pag. 27
Esterificación con anhídrido succínico	Pag. 28
Esterificación con Py y DMAP	Pag. 29
Empleo de catalizadores DCC-DMAP obtención de fármacos	Pag. 29
Esterificación con anhídrido ftálico	Pag. 30
Formación de Diborano	Pag. 31
Reducción selectiva de ácidos carboxílicos a alcoholes.	Pag. 32
Reducción Selectiva de ácidos Carboxílicos	Pag. 33
Reducción selectiva con Boranos	Pag. 34

<b>4.OBJETIVOS</b>	Pag. 35
Objetivo General	Pag. 35
Objetivos Específicos	Pag. 35
<b>5.METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b>	Pag. 36
Esterificación de la Epiandrosterona con ácido succínico	Pag. 36
Esterificación de la Epiandrosterona con ácido malónico	Pag. 38
Esterificación de la Epiandrosterona con anhídrido succínico	Pag. 39
Reducción con Diborano	Pag. 41
Protección de la fenilalanina con ácido trifluoroacético	Pag. 42
Acoplamiento con el Aminoácido	Pag. 42
<b>6.METODOLOGIA EXPERIMENTAL Y DISCUSIONES DE RESULTADOS</b>	Pag. 44
<b>7.CONCLUSIONES</b>	Pag. 71
<b>8.RECOMENDACIONES</b>	Pag. 73
<b>9.ESPECTROS Y DECONVOLUCIONES</b>	Pag. 74
<b>10.BIBLIOGRAFIA</b>	Pag. 85

## INDICE DE ESPECTROS Y DECONVOLUCIONES

<b>Espectro Nº 1 :</b> IR, CHCl <sub>3</sub> de la Epiandrosterona (3β-Hidroxi-5α-androstan-17-ona).	Pag. 74
<b>Espectro Nº 2:</b> IR, KBr del producto esterificado con anhídrido Succínico.	Pag. 75
<b>Deconvolución:</b> Señal IR del enlace C=O en el espectro del producto esterificado con anhídrido Succínico.	Pag.76
<b>Espectro Nº 3:</b> IR, KBr del producto de reducción del monoéster succínico de la Epiandrosterona.	Pag.77
<b>Deconvolución:</b> Señal IR del enlace C=O en el espectro del producto de reducción del monoéster succínico de la Epiandrosterona.	Pag.78
<b>Espectro Nº 4:</b> IR, KBr del producto de protección de la fenilalanina.	Pag.79
<b>Deconvolución:</b> Señal IR del enlace C=O en el espectro del producto de protección de la fenilalanina.	Pag.80
<b>Espectro Nº 5:</b> IR, CHCl <sub>3</sub> del acoplamiento entre el alcohol y la fenilalanina protegida.	Pag.81
<b>Deconvolución:</b> Señal IR del enlace C=O en el espectro del producto de acoplamiento.	Pag.82
<b>Espectro Nº 6:</b> <sup>13</sup> C-RMN (CDCl <sub>3</sub> )Acoplamiento entre el alcohol y la fenilalanina protegida.	Pag.83
<b>Espectro Nº 7:</b> DEPT 135 del acoplamiento entre el alcohol y la fenilalanina protegida.	Pag. 84

**INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla N°1.</b> Rendimiento cuantitativo de síntesis de diborano	Pag. 31
<b>Tabla N°2.</b> Reducción selectiva de ácidos carboxílicos.	Pag. 32
<b>Tabla N°3.</b> Reducción de varios grupos funcionales con borano.	Pag. 34
<b>Tabla N°4.</b> Puntos de fusión y R <sub>f</sub> de los productos esterificados.	Pag. 51
<b>Tabla N° 5.</b> Datos espectroscópicos IR del producto de esterificación.	Pag. 52
<b>Tabla N° 6.:</b> Punto de fusión y R <sub>f</sub> del producto de reducción.	Pag. 55
<b>Tabla N°7.</b> Datos espectroscópicos IR del producto de reducción.	Pag. 56
<b>Tabla N° 8.</b> Datos espectroscópicos IR del producto de protección.	Pag. 58
<b>Tabla N° 9.</b> Datos de Solubilidad del producto de protección.	Pag. 59
<b>Tabla N° 10.</b> Valores obtenidos de Punto de Fusión del producto de protección	Pag. 59
<b>Tabla N° 11.</b> Datos espectroscópicos IR del producto de acoplamiento.	Pag. 61
<b>Tabla N° 12.</b> Asignación de los desplazamientos químicos de las señales de <sup>13</sup> C-RMN en CDCl <sub>3</sub> del producto de acoplamiento sintetizado.	Pag. 63

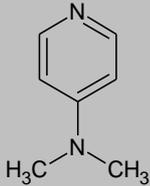
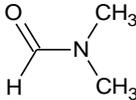
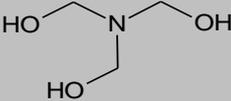
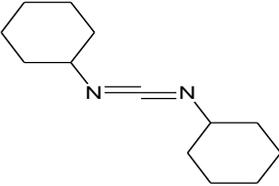
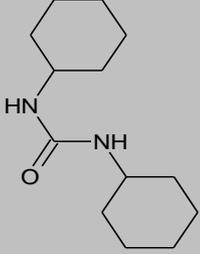
**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura N° 1.</b> Clasificación de los Terpenos.	Pag. 2
<b>Figura N° 2.</b> Clasificación de los Terpenos.	Pag. 3
<b>Figura N° 3.</b> Sistema de anillos tetracíclicos.	Pag. 4
<b>Figura N° 4.</b> Estructura de la Epiandrosterona.	Pag. 5
<b>Figura N° 5.</b> Dehidroepiandrosterona.	Pag. 6
<b>Figura N° 6.</b> Mecanismo de la descomposición del anhídrido acético en piridina	Pag. 9
<b>Figura N° 7.</b> Síntesis de 4-dialquilaminopiridinas.	Pag. 10
<b>Figura N° 8.</b> Posible mecanismo para la síntesis del 4-DMAP.	Pag. 10
<b>Figura N° 9.</b> Protección de alcoholes.	Pag. 11
<b>Figura N° 10.</b> Mecanismo de esterificación de ácidos en presencia de DCC Y 4-DMAP.	Pag. 13
<b>Figura N° 11.</b> Mecanismo de reducción de carbonos carbonílicos a alcoholes.	Pag. 16
<b>Figura N° 12.</b> Estructura general de un $\alpha$ -aminoácido.	Pag. 17
<b>Figura N° 13.</b> Susceptibilidad de los $\alpha$ -aminoácidos a cambios de pH.	Pag. 17
<b>Figura N° 14.</b> Acoplamiento de dos aminoácidos.	Pag. 20
<b>Figura N° 15.</b> Acoplamiento con DCC.	Pag. 20
<b>Figura N°16.</b> Acetoacetilación.	Pag. 25
<b>Figura N° 17.</b> Acetilación de un grupo fenólico.	Pag. 26
<b>Figura N° 18.</b> Acetilación de alcoholes cis-alílicos.	Pag. 26

<b>Figura N° 19.</b> Acetilación de alcoholes utilizando cloruro de acetilo.	Pag.26
<b>Figura N° 20.</b> Acetilación de 1-metilciclohexanol.	Pag. 26
<b>Figura N° 21.</b> Acetilación del mesitol.	Pag. 27
<b>Figura N° 22.</b> Síntesis de un intermediario fundamental para la Pravastatina.	Pag. 27
<b>Figura N° 23.</b> Síntesis de 2,3-dioxo-2,3-dihidrobenzofuranos.	Pag. 27
<b>Figura N° 24.</b> Esterificación estereoespecífica con DCC-DMAP.	Pag. 28
<b>Figura N° 25.</b> Esterificación en presencia de DCC-DMAP.	Pag. 29
<b>Figura N°26.</b> Esterificación en presencia de DCC-DMAP.	Pag. 30
<b>Figura N° 27.</b> Esterificación utilizando catalizadores ácidos sólidos heterogéneos.	Pag. 31
<b>Figura N° 28.</b> Mecanismo de reacción para la reducción de ácidos carboxílicos a alcoholes.	Pag. 33
<b>Figura N° 29.</b> Esterificación entre alcohol y acido en presencia de DCC/DMAP.	Pag. 44
<b>Figura N° 30.</b> Esterificación de la Epiandrosterona con ácido malónico .y succínico.	Pag. 45
<b>Figura N° 31.</b> Mecanismo de reacción de la formación de productos colaterales en ausencia de base auxiliar.	Pag. 46
<b>Figura N° 32.</b> Mecanismo de deshidratación de alcoholes con DCC.	Pag. 47
<b>Figura N° 33.</b> Esterificación de la Epiandrosterona con anhídrido succínico.	Pag. 48
<b>Figura N° 34.</b> Mecanismo de acción de la (TEA) y la (py) como bases auxiliares.	Pag. 49
<b>Figura N° 35.</b> Estructura de la piridina y la Trietilamina.	Pag. 51

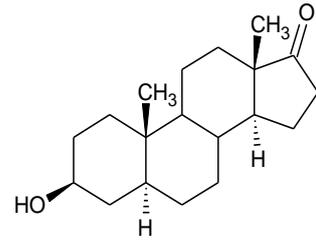
<b>Figura N° 36.</b> Montaje diseñado para la reacción de reducción.	Pag. 53
<b>Figura N° 37.</b> Reacción de Reducción selectiva con Diborano.	Pag. 53
<b>Figura N° 38.</b> Reacción de Reducción con Diborano.	Pag. 54
<b>Figura N° 39.</b> Protección de la Fenilalanina.	Pag. 57
<b>Figura N° 40.</b> Fenilalanina protegida.	Pag. 58
<b>Figura N° 41.</b> Reacción de Acoplamiento entre alcohol y fenilalanina protegida.	Pag. 60
<b>Figura N° 42.</b> Posibles productos de reacción de acoplamiento.	Pag. 62
<b>Figura N° 43.</b> Aminoácido Esteroidal.	Pag. 62
<b>Figura N° 44 y 45.</b> Señal correspondiente al carbono unido al oxígeno del éster en $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.	Pag. 64
<b>Figura N° 46 y 47.</b> Señal correspondiente al carbono unido al oxígeno del alcohol en $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.	Pag. 65
<b>Figura N° 48 y 49.</b> Señales correspondientes a metilos característicos de la estructura del androstano en $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.	Pag. 65
<b>Figura N° 50, 51 y 52.</b> Señales correspondientes a los carbonos carbonílicos en $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.	Pag. 66
<b>Figura N° 53 y 54.</b> Señal correspondiente al carbono unido al nitrógeno en $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.	Pag. 67
<b>Figura N° 55 y 56.</b> Señales correspondientes a los carbonos aromáticos en $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.	Pag. 68
<b>Figura N° 57 y 58.</b> Señales correspondientes a los carbonos $\text{CH}_2$ en $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.	Pag. 69

## LISTADO DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

COMPUESTO	ABREVIATURA	ESTRUCTURA
4-N,N-Dimetilaminopiridina	4-DMAP	
N,N-Dimetilformamida	DMF	
Trietanolamina	TEA	
Diciclohexilcarbodiimida	DCC	
Diciclohexilurea	DCU	

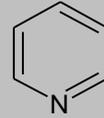
**Epiandrosterona**

EA



**Piridina**

Py



## 1. INTRODUCCIÓN

En el ámbito actual, los procedimientos experimentales para la síntesis de nuevos compuestos tienden, principalmente, a la preparación de fármacos o drogas. En el área de la medicina, esto ha sido de sumo interés con la finalidad de encontrar la cura de enfermedades y por otro lado, en el ámbito deportivo, el aumento del rendimiento físico del atleta.

Los esteroides, tanto naturales como sintéticos, han sido usados para combatir un amplio espectro de enfermedades, incluyendo aquellas producidas por virus, ya que estos se encargan de evitar ya sea la entrada, establecimiento o reproducción del virus en las células del organismo.[1]

Este trabajo de investigación está enmarcado dentro de un proyecto en el que se llevan a cabo modificaciones estructurales en Androstanos de origen comercial, con el fin de generar una serie de compuestos a los que posteriormente se le realizarán ensayos biológicos y estudios de modelaje molecular. Basándose en resultados previamente obtenidos en el trabajo en conjunto entre el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias-UCV y el Instituto de Biomedicina Facultad de Medicina, UCV; sobre el uso de Androstanos como antivirales, específicamente contra el dengue y la fiebre amarilla, se ha planteado realizar modificaciones sobre la Epiandrosterona mediante reacciones de esterificación y posible acoplamiento de aminoácidos, con la intención de estudiar el comportamiento de los productos generados por dichas transformaciones como agentes antivirales.

## 2. FUNDAMENTO TEORICO

### 2.1 Terpenos

Entre las estructuras de esteroides más estudiadas tenemos la de los Androstanos, los cuales son terpenos tetracíclicos.

Los terpenos forman una gran familia que presentan diversas estructuras de productos naturales derivados de las unidades de isopreno, el cual contiene cinco átomos de carbono. La clasificación de los Terpenos, se pueden agrupar de acuerdo al número de unidades de isopreno, en Hemiterpenos (una Unidad); Monoterpenos (dos Unidades); Sesquiterpenos (tres Unidades); Diterpenos (cuatro Unidades); Sesterpenos (cinco Unidades); Triterpenos (seis Unidades); y tetraterpenos (siete Unidades) (figura 1). Dentro de los triterpenos están los tetracíclicos y pentacíclicos. De los primeros hay dos series de compuestos principales que se diferencian en su estereoquímica y en la fusión de los anillos: Protostanos y Apo-eufanos (figura 2). Entre los protostanos se encuentran los esteroides, que es un grupo de sustancias que pueden presentar o no, una cadena lateral en C-17, así como los metilos angulares en C-10 y C-13. Se designa como esteroides entonces a los derivados de pregnano, androstano, estrano y gonano. [2]

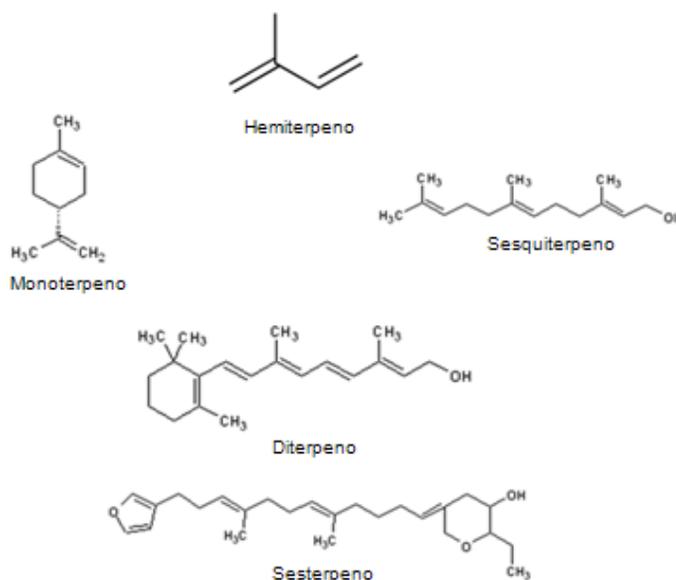


Figura 1: Clasificación de los Terpenos.

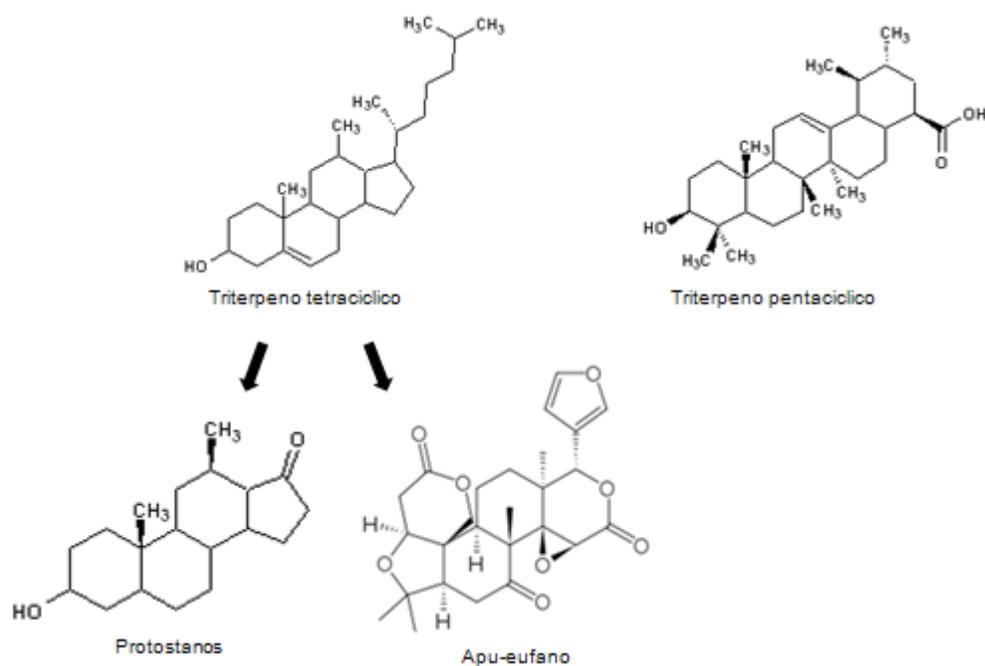


Figura 2: Clasificación de los Terpenos

### 2.1.2 Androstanos

Los Androstanos, constituyen una parte de la familia de los Terpenos, los cuales son un largo y estructuralmente diverso conjunto de productos naturales, derivados de la unidad de isopreno C5. Dentro de los triterpenos, encontramos una serie de compuestos con diversas modificaciones estructurales, los cuales son clasificados como Esteroides, siendo los Androstanos una clase de esteroides, con sistemas de anillos tetracíclicos o ciclopentano-perhidrofenantreno (figura 3), destacándose además otras variedades donde encontramos sustituciones de cadenas alifáticas o metilos principalmente en los carbonos 10, 13 y 17, así como la aromatización de anillos, variedades producidas naturalmente a partir de modificaciones sobre el lanosterol, cuyas modificaciones, especialmente en las cadenas laterales, crean un amplio rango de productos, como por ejemplo, esteroides, saponinas esferoidales, glucósidos cardio-activos,

ácidos biliares, corticosteroides y hormonas sexuales de mamíferos. Dada la actividad biológica conocida de diversos esteroides naturales, los mismos funcionan como base para la obtención de compuestos esteroidales sintéticos o semi-sintéticos empleados en la medicina.

Es posible inferir que la marcada diferencia en la actividad biológica observada entre compuestos que poseen la mismo esqueleto estructural, como por ejemplo, aquellos basados en el esqueleto de Androstanos, son en parte atribuidos a los grupos funcionales encontrados en la estructura, así como a la forma conferida por estos núcleos y la estereoquímica de los anillos fusionados.

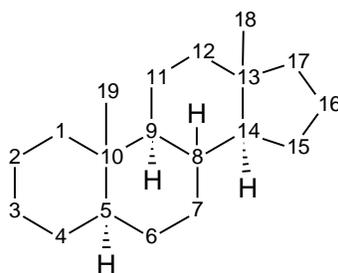


Figura 3: Sistema de anillos tetracíclicos o ciclopentano-perhidrofenantreno.

La estereoquímica observada en la naturaleza es muy específica y cambia según sea el organismo donde se sintetice el esteroide, podemos encontrar en la naturaleza fusiones entre anillos *transycis*, así como diferentes insaturaciones, estas son expresadas como  $\Delta$  y un superíndice indicando el carbono donde comienza dicha insaturación, para el caso de esteroides naturales es común encontrar  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$ .

Podemos mencionar algunas estructuras esteroidales encontradas en la naturaleza y que se destacan por su influencia en el funcionamiento del organismo, por ejemplo, el colesterol es un triterpenoide común y esencial en los animales, producido a partir de modificaciones sobre el lanosterol, este es un constituyente esencial de las membranas celulares; las modificaciones naturales, pueden ser reproducidas en el laboratorio y así como el lanosterol es modificado

por los organismos, otros esteroides pueden ser base para modificaciones sintéticas. **El empleo de materiales de partida de origen natural, disminuye el inconveniente de reproducir la estereoquímica estructural.** [3]

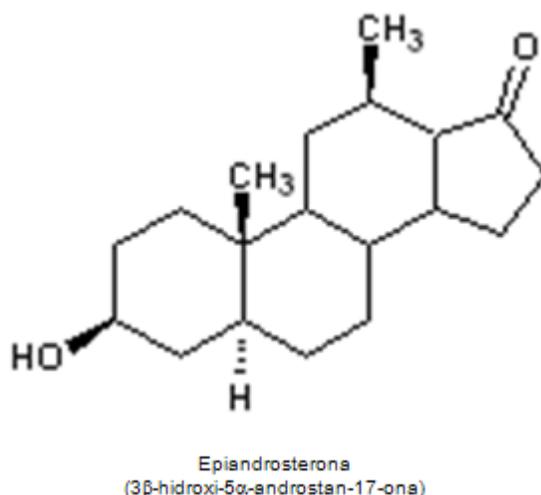


Figura 4

## 2.2 Esteroides como antivirales

Como evidencia de la propiedad antiviral de los compuestos esteroidales, en trabajos previos, donde se realizó estudios *in Vitro*, se ha demostrado que algunos derivados sintéticos de esteroides de origen vegetal (brassinosteroides) presentan actividad frente a diversos virus, entre ellos el virus Junín (JUNV), agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina.

Se ha evaluado también la actividad de esteroides de origen animal y de una serie de derivados obtenidos por síntesis química frente a virus patógenos para el hombre. Estos estudios proponen que la dehidroepiandrosterona (DHEA) (figura 5) actúa en el ciclo de replicación de virus como los de la encefalitis japonesa y el virus de la inmunodeficiencia tipo I (HIV-1). [4]

Al estudiar la replicación del Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) en líneas celulares de neuroblastoma de Murina (N18), se encontró que la

dehidroepiandrosterona (DHEA) suprime los efectos citotóxicos y la apoptosis inducida por el virus, así como su replicación y propagación dependiente de su concentración (a partir de 50  $\mu$ M).

Estudios sobre el virus de la inmunodeficiencia HIV y FIV *in vitro* realizados con DHEA, dexametasona o análogos sintéticos, han demostrado que estos compuestos esteroidales tienen propiedades antivirales directas contra el Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) o el virus de inmunodeficiencia felino (FIV), dependiendo de la dosis. [4]

Los estudios acerca de la acción inhibitoria de DHEA en la inefectividad del virus Junín (JUNV) arrojaron que no ejercía efectos en los diferentes procesos de adsorción e internalización viral; por otro lado, al examinar el efecto del agregado de DHEA o EA (50 $\mu$ g/ml) a distintos tiempos post-infección sobre la expresión de la proteína viral N (proteína de núcleo cápside) se apreció un máximo efecto inhibitorio de los compuestos (95% de inhibición) cuando los mismos se encontraban presentes durante las primeras horas de la infección. Se determinó así que el agregado de los compuestos una vez transcurrida la internalización de las partículas virales (2 h post-infección) inhibe la síntesis de proteína N producida a lo largo de un único ciclo de replicación viral. [4]

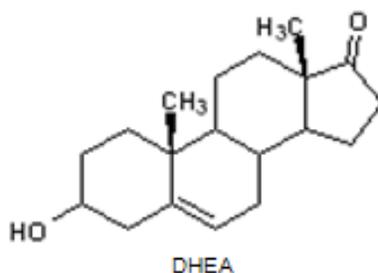


Figura 5: Dehidroepiandrosterona (DHEA)

### 2.2.1 Fiebre amarilla

La fiebre amarilla es una infección viral aguda de gravedad variable, de degradación internacional obligatoria, causada por un arbovirus y transmitida por un mosquito de la familia *Flaviviridae*, se manifiesta en dos formas: la selvática, transmitida por diversas especies de *Haemagogus* y la urbana, transmitida por *Aedes Aegypti*. La fiebre amarilla es una enfermedad infecciosa rara en Occidente. El virus que la produce se presenta en formas epidémicas o endémicas en Suramérica y regiones de África del este, especialmente en Liberia, Ghana, Nigeria y países vecinos. Los seres humanos y otros primates, adquieren la infección por la picadura de mosquitos infectados. Después de un periodo de incubación de 3-5 días, el virus aparece en sangre y sirve como fuente de infección para otros mosquitos. Para que el mosquito sea capaz de transmitir el virus, éste tiene que replicarse en su intestino y pasar a las glándulas salivares. [5]

### 2.2.2 Dengue

El dengue es una enfermedad rara benigna, de origen vírico, que es causada por varios virus transmitidos por artrópodos, del tipo de los arbovirus. Se caracteriza por fiebre bifásica, dolores musculares o en las articulaciones, erupción cutánea de color rojizo, leucopenia y linfadenopatias. Las epidemias por dengue han sido frecuentes hasta principio del siglo XX en las áreas templadas de América, Europa, Australia y Asia. En la actualidad es endémica en Asia tropical, islas del sur del Pacífico, norte de Australia, África tropical, Caribe, Centroamérica y Suramérica. Los brotes de dengue en las áreas urbanas infectadas por *Aedes Aegypti* pueden ser explosivos; pudiendo afectar hasta el 70-80% de la población. Los virus que causan el dengue clásico, son transmitidos por mosquitos de la familia *Stegomyia Aedes Aegypti*, un mosquito que pica durante el día. En la mayoría de las áreas tropicales *Aedes Aegypti* está muy urbanizado y se cría en el agua almacenada para beber o bañarse, o en el agua de lluvia recogida en

cualquier recipiente. La enfermedad se produce sobre todo en los niños mayores y en los adultos. La propagación de una epidemia se produce fundamentalmente a través de seres humanos en fase virémica (con capacidad de transmitir el virus que se está replicando en su sangre) y sigue las principales líneas de transporte urbano. [5]

**Motivación:** En la búsqueda de Androstanos como antivirales, se ha planteado realizar modificaciones sobre la Epiandrosterona mediante reacciones de esterificación y posible acoplamiento de aminoácidos. Estas reacciones se llevan a cabo en presencia de catalizadores nucleofílicos y/o básicos.

### 2.3 Catálisis nucleofílica

La participación de catalizadores nucleofílicos como agentes que facilitan reacciones de acilación, esterificación, acetilación, alquilación, carbodimidación, lactonización, reacción de Baylis-Hillman entre otras, ha tomado un gran auge debido a la necesidad creciente de promover reacciones orgánicas mediante condiciones suaves que además permitan la obtención de un producto de alta pureza. El interés en estas reacciones es la síntesis de moléculas complejas que podrían, entre otras cosas, ayudar a combatir algunas enfermedades. [6]

A mediados del siglo XX se estudió el empleo de piridina como catalizador nucleofílico. Estudios posteriores de sus derivados dieron con que el uso de moléculas del tipo 4-dialquilaminopiridinas generaban en condiciones de reacción suaves, mejores rendimientos, además de productos mucho más limpios.

Como ejemplo de un proceso de catálisis nucleofílica tenemos la descomposición del anhídrido acético en piridina. Se puede proponer la formación de un ión acetilpiridinio como intermediario, seguido por el ataque del agua, que es un mal nucleófilo, por último la salida de la piridina y formación de ácido acético como ilustra la figura 6; donde  $R=H$  ó  $(CH_3)_2N$ .

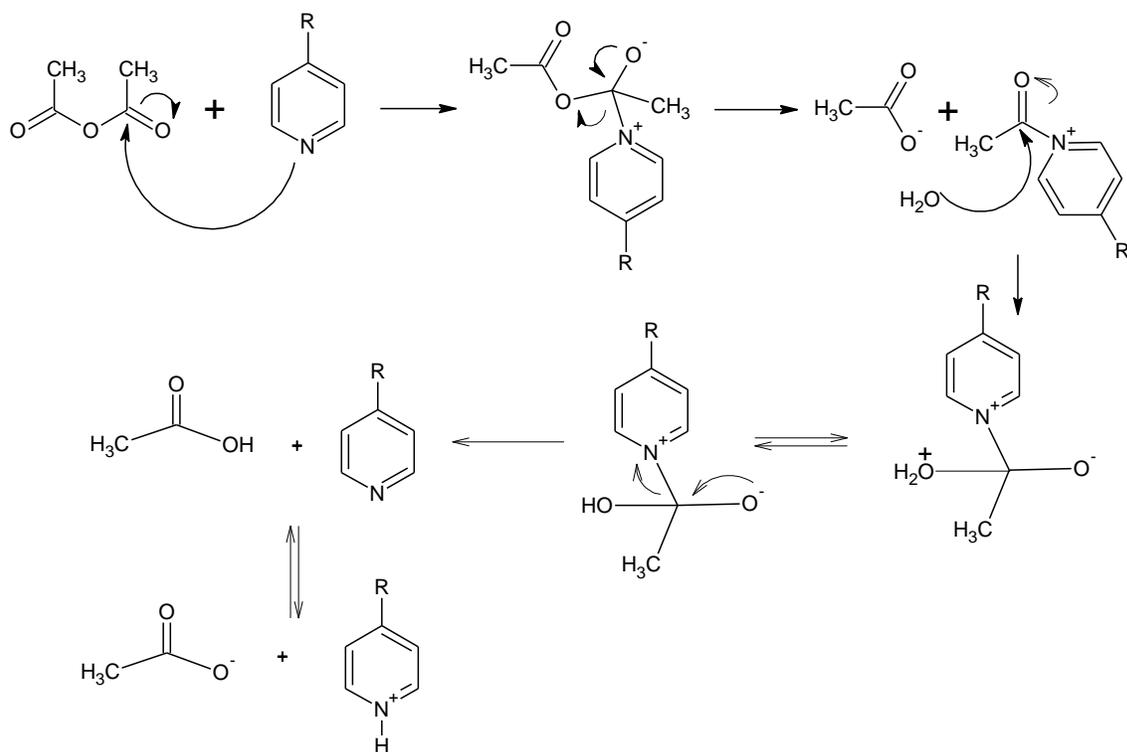


Figura 6: Mecanismo de la descomposición del anhídrido acético en piridina.

A partir de piridina se pueden sintetizar 4-dialquilaminopiridinas en dos pasos [7] (figura 7). Comparados con la piridina, estos derivados son aproximadamente 104 veces más activos cuando se usan como catalizadores de acilaciones. Estos catalizadores están usándose cada vez con mayor frecuencia para reacciones de acilación que no se llevan a cabo usando solo piridina o en el caso que se obtenga, el rendimiento es muy poco. Las 4-dialquilaminopiridinas son los catalizadores útiles especialmente en la acilación de alcoholes impedidos estéricamente y sensibles en condiciones ácidas, proporcionando así una alternativa al procedimiento usual de tratar alcóxidos de sodio o magnesio con cloruros de acilo. [6].

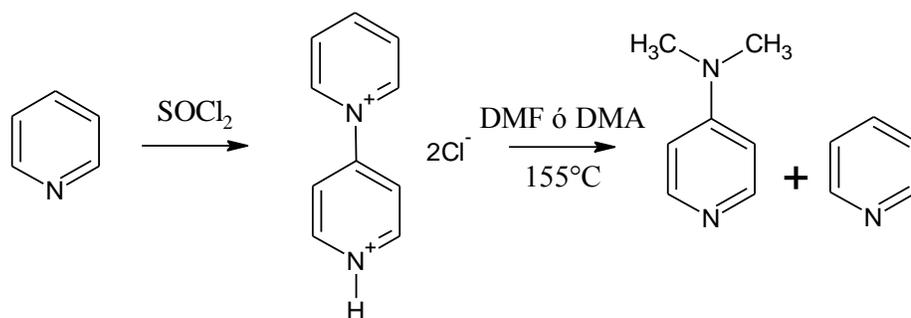


Figura 7: Síntesis de 4-dialquilaminopiridinas

Algunos autores han planteado un posible mecanismo para la síntesis la 4-DMAP como lo ilustra la Figura 8

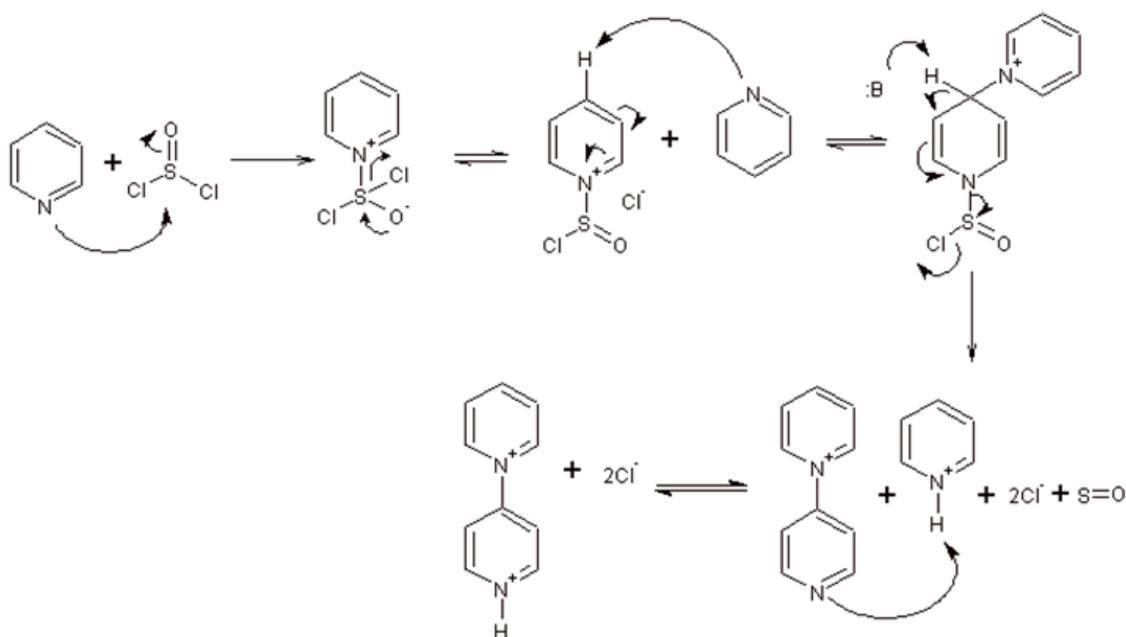
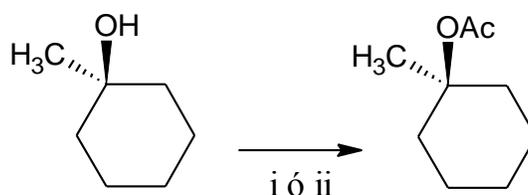


Figura 8: Posible mecanismo para la síntesis del 4-DMAP.

### 2.3.1 Catálisis mediante 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP)

El tratamiento de alcoholes, aminas y fenoles con anhídrido acético en piridina ha sido el método general por excelencia empleado en el último siglo para procesos de acilaciones. Sin embargo, este método ha arrojado resultados

insatisfactorios sobre compuestos desactivados. No fue sino hasta mediados de 1960 que dos grupos por separado prepararon la 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), la cual es muy superior a la piridina como catalizador en la acilaciones difíciles. El 1-metilciclohexanol, a pesar de ser un alcohol estéricamente impedido, es acilado con un 86% de rendimiento cuando se utiliza anhídrido acético en DMAP y un equivalente de TEA (trietanolamina); a diferencia del 5% de rendimiento obtenido mediante procesos convencionales.



- i) Anhídrido acético, piridina, 14h a Temperatura ambiente, 5% de Rendimiento
- ii) Anhídrido acético, DMAP, TEA, 14h a Temperatura ambiente, 86% Rendimiento

Figura 9: Reacción de esterificación de alcoholes.

La preparación del DMAP consiste en un esquema general de preparación de piridinas 4-sustituidas, cuyo proceso puede ser altamente costoso a nivel industrial debido a la naturaleza de los procesos experimentales y los bajos rendimientos. Se plantearon dos procesos factibles para su preparación a nivel industrial, de los cuales, uno de ellos explora la obtención del DMAP a partir de la formación de la sal de piridilpiridinio para luego atacarla con un nucleófilo como la dimetilamina (DMA) o la N,N-dimetilformamida (DMF). [8]

En el caso de la 4-DMAP se puede entonces proponer el mismo esquema de catálisis nucleofílica (considerando que posee pKa mayor a la piridina) ilustrado en figura 6, teniendo éste la ventaja de estabilizar en mayor proporción la carga formada en el estado de transición.

### 2.3.2 *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC)

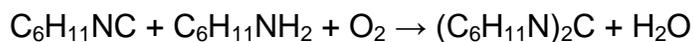
La *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida es un compuesto orgánico con fórmula química  $C_{13}H_{22}N_2$ , cuyo uso principal es acoplar aminoácidos durante la síntesis de péptidos. Bajo condiciones estándar, existe en la forma de cristales blancos con un olor dulce y penetrante. Es muy soluble en diclorometano, tetrahidrofurano, acetonitrilo y dimetilformamida, pero es insoluble en agua. Este compuesto suele ser abreviado como DCC.

El núcleo  $C=N=C=N-C$  de las carbodiimidas no es plano, estando estructuralmente relacionadas con los alenos. Hay tres estructuras de resonancia principales que describen a las carbodiimidas:



Existen diferentes rutas para la síntesis de DCC:

Pri-Baraet y colaboradores usan acetato de paladio, yodo, y oxígeno para acoplar ciclohexilamina e isocianuro de ciclohexilo. Se han conseguido rendimientos de hasta 67% usando este procedimiento: [9]



Reacción. 1

Tang y colaboradores condensaron dos isocianatos usando el catalizador  $ZP(MeNCH_2CH_2)_3N$  con rendimientos del 92%: [10]

El DCC es un agente deshidratante para la preparación de amidas, cetonas, nitrilos. En estas reacciones, el DCC se hidrata para formar N,N-diciclohexilurea(DCU), compuesto que es insoluble en agua. El DCC también puede ser usado para la inversión de la conversión de alcoholes secundarios ópticamente activos.

Las reacciones de esterificación de un conjunto de alcoholes incluyendo algunos alcoholes terciarios, se llevan a cabo usando un ácido carboxílico en presencia de DCC y una cantidad catalítica de DMAP.[11]

DMAP actúa como base auxiliar del DCC para la catálisis nucleofílica, en el mecanismo de esterificación de ácidos. Se sabe que el DCC funciona como un activador de ácidos carboxílicos y es uno de los reactivos de acoplamiento más utilizados en la formación de enlaces peptídicos.[6]

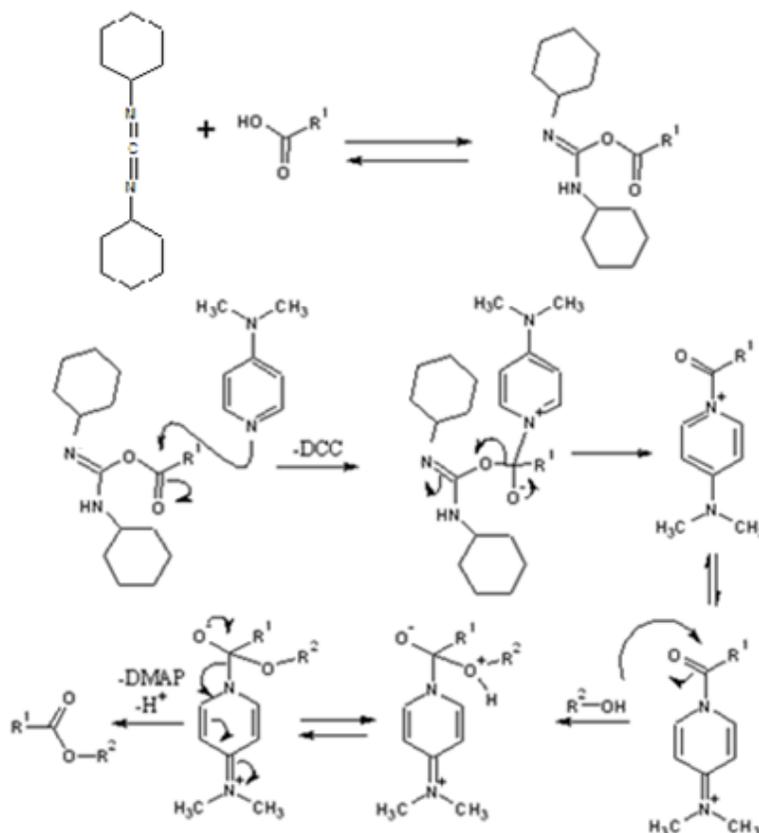


Figura10: Mecanismo de esterificación de ácidos en presencia de DCC Y 4-DMAP.

Finalmente, en las reacciones de copulación de péptidos promovidas por DCC el extremo N-terminal suele ser usado como el punto de unión al que se le agrega los monómeros de aminoácido. Para mejorar la electrofilicidad del grupo carboxilato, el átomo de oxígeno negativamente cargado debe ser activado hacia un mejor grupo saliente. Se usa DCC con este propósito. El átomo de oxígeno cargado negativamente actuará como un nucleófilo, atacando al carbono central en el DCC. El DCC estará temporalmente unido al grupo carboxilato mencionado anteriormente, formando un intermediario altamente electrofílico, que hace el ataque nucleofílico por el grupo amino terminal, sobre el péptido creciente, mucho más eficiente.

## **2.4 Hidroboración**

Las reacciones de Hidroboración- Oxidación fue desarrollada por el profesor Herbert C. Brown y sus colaboradores en la Universidad Purdue como parte de un programa amplio diseñado a la aplicación de reactivos que contienen boro a la síntesis en química orgánica. El número de aplicaciones es tan grande y el trabajo novedoso que Brown recibió en forma conjunta el Premio Nobel de Química en 1979. [12]

### **2.4.1 Reducción con Diborano**

El Diborano es un gas incoloro a temperatura ambiente con un olor dulce desagradable. Se mezcla bien con el aire y fácilmente forma mezclas explosivas. Se enciende espontáneamente en la presencia de aire húmedo a temperatura ambiente.

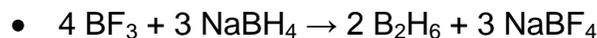
Es usado en propulsores de cohetes, como agente reductor, vulcanizador de caucho, catalizador en la polimerización de hidrocarburos y acelerador de

llamas. También es usado en la industria electrónica para conferir propiedades eléctricas a cristales puros. [13]

El Diborano puede ser generado por la reacción del borohidruro de sodio y eterato de trifluoro borano. El gas puede ser generado externamente y se introduce en el matraz de reacción o puede ser producido en el lugar (*insitu*). El mejor disolvente para la reacción es tetrahidrofurano, pero diglima, éter, benceno, penteno, diclorurodemetileno, cloroformo y disulfuro de carbono también puede ser utilizado. El orden de reactividad de diversos grupos funcionales en condiciones normales (con diborano generado en el exterior, y tetrahidrofurano como solvente) es: epóxido>ácido>alqueno>cetona>nitrilo>éster>cloruro de ácido. El Diborano es usado como un agente reductor complementando la reactividad Borohidruro de sodio. El compuesto reduce fácilmente a los ácidos carboxílicos a los alcoholes correspondientes, mientras que las cetonas reaccionan lentamente.

Tharkar y colaboradores<sup>14</sup> mostraron que las reducciones con diborano dan el mismo resultado, independientemente de si el diborano es generado externamente o en el lugar *in situ* producido por la acción de trifluoruro de boro y NaBH<sub>4</sub> o el cloruro de aluminio. Se encontró que las cetonas alicíclicas o dialquílicas no se reducen más allá del alcohol, incluso en condiciones drásticas, sin embargo, las aril cetonas y las α,β-conjugadas son reducidas con bajos rendimientos, aún en condiciones muy drásticas.[14]

Reacción:



Reacción. 2

El Diborano, es un reductor fuerte que actúa selectivamente sobre el carbono carbonílico de ácidos carboxílicos alifáticos y/o aromáticos aún en

presencia de cualquier otro carbonilo. Como producto de esta reducción se obtiene un alcohol primario.[14]

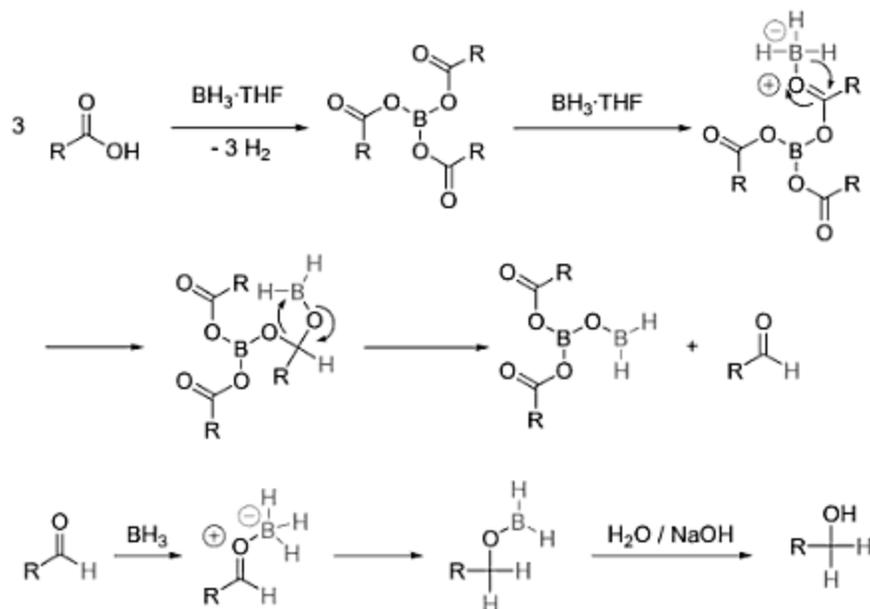


Figura 11: Mecanismo de reducción de carbonos carbonílicos a alcoholes.

## 2.5 Aminoácidos

Un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino ( $-NH_2$ ) y un grupo carboxílico ( $-COOH$ ; ácido). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas. Dos aminoácidos se combinan en una reacción de condensación que libera agua formando un enlace peptídico. Estos dos "residuos" aminoacídicos forman un dipéptido. Si se une un tercer aminoácido se forma un tripéptido y así, sucesivamente, para formar un polipéptido. Esta reacción ocurre de manera natural en los ribosomas, tanto los que están libres en el citosol como los asociados al retículo endoplasmático. [15]

Todos los aminoácidos componentes de las proteínas son alfa-aminoácidos. Por lo tanto, están formados por un carbono alfa unido a un grupo

carboxilo, a un grupo amino, a un hidrógeno y a una cadena (habitualmente denominada R) de estructura variable, que determina la identidad y las propiedades de los diferentes aminoácidos; existen cientos de cadenas R por lo que se conocen cientos de aminoácidos diferentes, pero sólo 20 forman parte de las proteínas y tienen codones específicos en el código genético. [15]

La estructura general de un  $\alpha$ -aminoácido se establece por la presencia de un carbono central alfa unido a: un grupo carboxilo, un grupo amino, un hidrógeno y la cadena lateral (R):

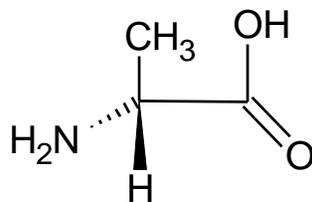


Figura12: Estructura general de un  $\alpha$ -aminoácido

"R" representa la cadena lateral, específica para cada aminoácido. Técnicamente hablando, se los denomina alfa-aminoácidos, debido a que el grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) se encuentra a un átomo de distancia del grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ). Como dichos grupos funcionales poseen protones lábiles en sus estructuras químicas, son grupos susceptibles a los cambios de pH; por eso, al pH de la célula prácticamente ningún aminoácido se encuentra de esa forma, sino que se encuentra ionizado. [15]

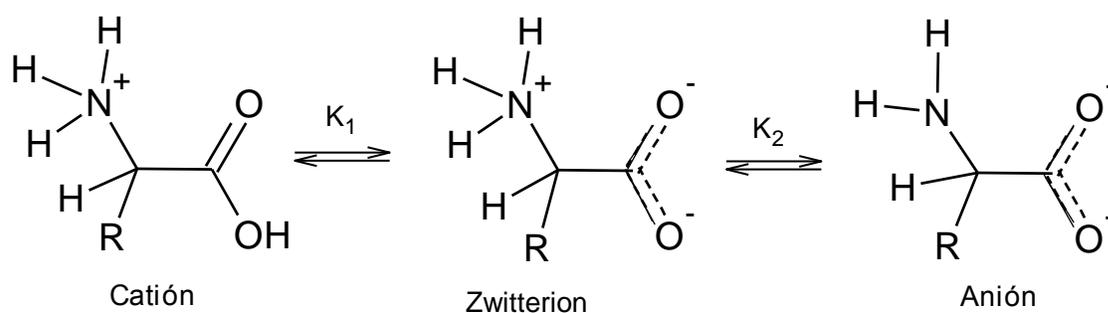


Figura 13: Susceptibilidad de los  $\alpha$ -aminoácidos a cambios de pH

Los aminoácidos a pH bajo (ácido) se encuentran mayoritariamente en su forma catiónica (con carga positiva), y a pH alto (básico) se encuentran en su forma aniónica (con carga negativa). Sin embargo, existe un pH específico para cada aminoácido, donde la carga positiva y la carga negativa son de la misma magnitud y el conjunto de la molécula es eléctricamente neutro. En este estado se dice que el aminoácido se encuentra en su forma de ion dipolar o zwitterión. [15]

Todos los  $\alpha$ -aminoácidos tienen un carbono asimétrico o quiral, con excepción de la glicina, y por lo tanto pueden ocupar diversas orientaciones en el espacio que corresponden a imágenes especulares no superponibles de los centros quirales. Se trata de isómeros ópticamente activos, que hacen girar el plano de la luz polarizada en igual magnitud y sentido contrario (dextrorrotatorio o levorrotatorio). Todos los aminoácidos que forma las proteínas están en su forma levorrotatoria, mientras que los aminoácidos dextrorrotatorios se encuentran en antibióticos, paredes bacterianas o plantas.

Según su obtención, a los aminoácidos que necesitan ser ingeridos por el cuerpo se les llama esenciales; la carencia de estos aminoácidos en la dieta limita el desarrollo del organismo, ya que no es posible reponer las células de los tejidos que mueren o crear tejidos nuevos, en el caso del crecimiento. Para el ser humano, los aminoácidos esenciales son: valina (Val), leucina (Leu), treonina (Thr), lisina (Lys), triptófano (Trp), histidina (His), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), arginina (Arg), metionina (Met). [15]

A los aminoácidos que pueden ser sintetizados por el cuerpo se los conoce como no esenciales y son: alanina (Ala), prolina (Pro), glicina (Gly), serina (Ser), cisteína (Cys), asparagina (Asn), glutamina (Gln), tirosina (Tyr), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu).

### 2.5.1 Péptidos

La historia de la síntesis de péptidos comienza con Emil Fisher, quien al establecer la química de las proteínas obtuvo la síntesis del dipéptidoglicil-glicina en 1901, comprobando de esta manera su hipótesis de que los aminoácidos estaban unidos entre sí mediante el enlace peptídico. A partir de ahí continuó sintetizando tripéptidos, tetrapéptidos, etc., hasta finalmente alcanzar la síntesis un polipéptido de 18 residuos aminoácidos. Después de esto, la evolución de la técnica fue lenta, los primeros polipéptidos sintetizados fueron homopolímeros ya que se presentaba un problema al momento de combinar aminoácidos: debía protegerse el grupo amino de un tipo para evitar que se uniera con un aminoácido de su misma especie e impedir contaminaciones de péptidos distintos. Encontrar un compuesto químico capaz de bloquear el grupo amino, pero que además fuera removido fácilmente después de la formación del enlace peptídico deseado, no fue logrado hasta 1932 por Max Bergmann y Leonidas Zervas, el grupo carbobenzoilo. A partir de esto los grupos protectores fueron perfeccionándose y en 1953 Vincent du Vigneaud fue capaz de sintetizar el primer polipéptido funcional, la hormona oxitocina, lo que le llevó a ganar el premio Nobel de química en 1955. Sin embargo, aislar y purificar un nuevo péptido significaba invertir muchísimo tiempo para obtener una cantidad ínfima de producto, por lo que Bruce Merrifield pensó que el método podía mejorarse. En 1963 dio a conocer la síntesis del tetrapéptido leucilalanilglicilalanina y en 1969 Merrifield anunció la síntesis de la enzima ribonucleasa pancreática bovina A de 124 residuos en 6 semanas, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, de sus siglas en inglés), técnica por la que recibió el premio Nobel de química en 1984. [16]

La unión entre dos aminoácidos se lleva a cabo por la reacción que se presenta entre el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro formando una amida mediante la pérdida de una molécula de agua. El mecanismo que se sigue para el acoplamiento de dos aminoácidos es aminólisis y se resume en la figura 14. En donde X es cualquier agente activante de naturaleza

electrofílica, el cual debe ser minuciosamente escogido, ya que una mala elección puede llevarnos a racemización. En la figura 14 se muestra en forma general, como se genera el enlace peptídico por aminólisis.  $R_1$  y  $R_2$  hacen referencia al resto de la fórmula del aminoácido. [16]

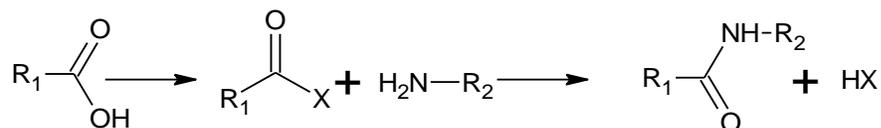


Figura 14: Acoplamiento de dos aminoácidos.

### 2.5.2 Acoplamiento

La dicitclohexilcarbodiimida (DCC) fue introducida por primera vez en la síntesis de péptidos en 1955 por Sheehan y Hess, y ha sido el reactivo más importante para la activación y acoplamiento desde entonces. Reacciona con los acil aminoácidos para dar anhídridos simétricos, ésteres activados o actuar directamente como un agente acoplante. En cualquier caso el primer evento de la activación es la formación de una *O*-acilurea (figura 15)

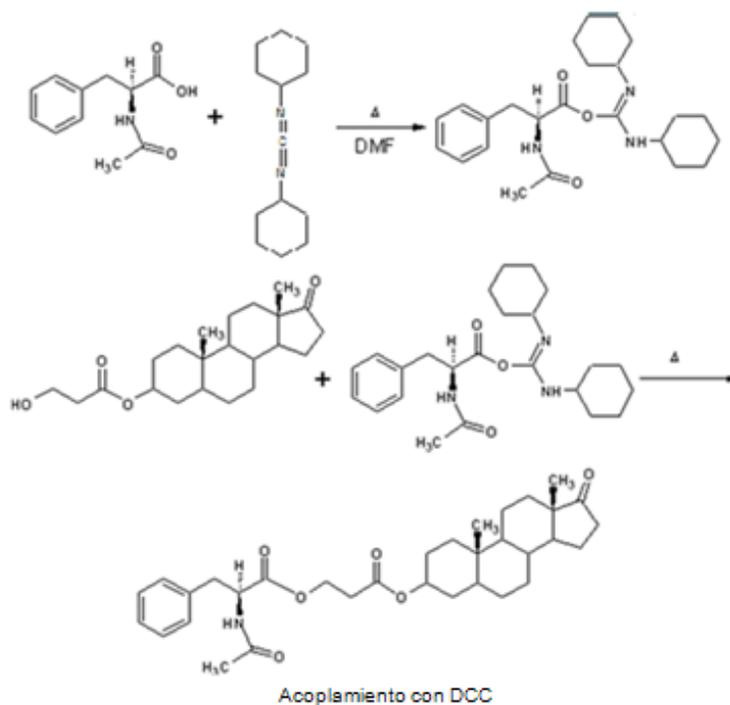


Figura15

En presencia de un exceso de carboxilato, por ejemplo cuando un equivalente de DCC es agregado a dos equivalentes de un acil aminoácido, la O-acilurea es atacada por el anión carboxilato para formar el anhídrido, mientras que en presencia de fenoles u otros compuestos hidroxilados forma los ésteres derivados. La DCC da un coproducto, dicitclohexilurea, el cual es muy poco soluble en la mayoría de los solventes, por lo que la separación de éste del péptido sintetizado es muy fácil en síntesis de péptidos en solución (por diferencia de solubilidades), y es lo suficientemente soluble como para removerlo mediante lavados en la síntesis de péptidos en fase sólida.[16]

### **2.5.3 Grupos protectores de aminoácidos**

Uno de los principales pasos para la síntesis de péptidos es la protección de los grupos funcionales de los aminoácidos, éstos deben protegerse para evitar la formación de un enlace peptídico no deseado, es decir, impedir que el grupo carboxilo de un aminoácido reaccione con el grupo amino de uno de sus análogos. Así mismo, al proteger las cadenas laterales de los aminoácidos también se está evitando que estos reaccionen con los grupos amino o carboxilo de otros aminoácidos, o que den lugar a reacciones secundarias. Los grupos protectores también protegen el carbono alfa de ser susceptible a racemización.

Entre las características que debe tener un grupo protector se encuentran, la de ser químicamente estable en las condiciones en las que se da la síntesis peptídica, y la de ser fácilmente removibles en condiciones suaves que no alteren la formación del enlace peptídico al final o en fases intermediarias de la síntesis. En este sentido, se pueden clasificar a los grupos protectores como permanentes,

los cuales son retenidos hasta que el péptido ha sido completado, o temporales, los cuales se eliminan al final de cada etapa de síntesis.

#### 2.5.4 Grupos protectores del $\alpha$ -amino

El objetivo fundamental que se debe cubrir al proteger al grupo amino es el de suprimir su reactividad nucleofílica, para tal efecto existen una gran variedad de grupos protectores, el problema es encontrar uno que pueda ser removido fácilmente sin afectar la integridad del enlace peptídico formado o sin que el carbono  $\alpha$  corra riesgo de racemización. [16]

Los primeros grupos protectores presentaban estos problemas, ya que se fundamentaban en la formación de una amida al unirse al grupo amino. El gran avance se dio cuando Bergman y Zervas observaron que los derivados de uretano eran particularmente adecuados para la protección del  $\alpha$ -amino. Un factor importante que los ha favorecido para ser ampliamente utilizados es su alto grado de estabilidad óptica, es decir, inhiben la racemización de los centros quirales adyacentes a estos grupos protectores.

Entre los grupos derivados de uretano más usados se encuentran los siguientes:

- Benciloxicarbonilo.
- *t*-Butoxicarbonilo (Boc).
- 2-(4-bifenilil)-isopropoxicarbonilo (Bpoc).
- 9-Fluorenilmetoxicarbonilo (F-moc-Cl).

Existen otros grupos protectores que no son derivados de los uretanos, estos grupos protectores también impiden la racemización y son aplicados en ciertas estrategias de síntesis, entre ellos se encuentran:

- Trifenilmetilo (trityl, Trt).
- 2-Nitrofenilsulfonilo (Nps).
- Ditosuccinilo

### 2.5.5 Grupos protectores del $\alpha$ -carboxilo

La protección del grupo carboxilo no es tan necesaria como la del amino, ya que es menos nucleofílico. No obstante, es conveniente protegerlo, en especial para aumentar la solubilidad del péptido formado en solventes orgánicos. También es importante tener bloqueado el grupo carboxilo que en ese momento no formará parte del enlace peptídico, mientras que el que participará en el enlace se encuentra desprotegido listo para ser activado. Los métodos más comunes para proteger el grupo  $\alpha$ -carboxilo es mediante esterificación. La liberación del aminoácido de este grupo protector es de manera similar a la aquella vista para los derivados del uretano, después de todo, son ésteres de un tipo especial. [16]

- Metil éster ( $-\text{COO}-\text{CH}_3$ ) y Etil éster ( $-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ). Fueron los primeros grupos utilizados para enmascarar el  $\alpha$ -carboxilo. No hay una distinción importante entre estos dos, por lo que se les trata como un mismo grupo protector. Pueden obtenerse haciendo reaccionar al aminoácido con el alcohol correspondiente directamente o por medio de un halogenuro de acilo intermediario.

- Bencil éster (-COO-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). Obtenido a partir de la esterificación del alcohol bencílico, este grupo protector se popularizó por presentar menos problemas para la desprotección que el metil o etil éster, aunque al igual que estos últimos, tienden a formar dicetopiperacinas. Pueden ser eliminados por saponificación, pero también por HBr/AcOH e hidrogenación catalítica, pero no por TFA (al igual que el grupo protector Z para el α-amino), por esta razón se les usa en combinación con un grupo amino protector distinto al Z durante la etapa de síntesis.

- *t*-Butiléster (-COO-C-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>). Estos pueden ser preparados directamente de los aminoácidos pero el procedimiento estándar es indirecto. A diferencia de los grupos anteriores, los dipéptidos de los *t*-Butil ésteres no forman dicetopiperacinas con facilidad. La estabilidad y labilidad de este grupo es semejante a la del grupo Boc, aunque son menos sensibles a acidólisis, por lo que es posible diferenciar entre el rompimiento de un grupo Boc y un *t*-Butil éster. Sin embargo, se recomienda utilizarlo en combinación con un grupo protector diferente al Boc.

- Fenil éster (-COO-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>). Este grupo es completamente estable en medio ácido y en condiciones de hidrogenación catalítica. El rompimiento por acción de un álcali es mucho más rápido que el del metil éster. Para efectuar la desprotección de este grupo se utiliza un tratamiento de peróxido de hidrógeno en DMF a un pH de 10.5 por 15 minutos, esto debido a la susceptibilidad que tienen los fenil ésteres al ataque del ión peróxido. Cadenas laterales sensibles al peróxido (Met, Trp, Cys), aparentemente no representan un gran problema si la desprotección se lleva a cabo con un exceso de dimetil sulfuro. [16]

### 3. ANTECEDENTES

En 1978, **Höfley** colaboradores, propusieron un método coherente e innovador para la preparación de la N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) y aplicaciones de la misma en diversas síntesis. La síntesis del DMAP puede ser racionalizada en dos pasos partiendo de la piridina. Comparada con la piridina, este derivado es  $10^4$  veces más activo cuando es usado como catalizador para acilaciones. Las dialquilaminopiridinas suelen emplearse frecuentemente cuando las reacciones de acilación son incompletas por procesos convencionales en piridina. Los autores realizaron además una revisión de las posibles aplicaciones del DMAP en terpenos, esteroides, carbohidratos y nucleósidos, o bien en la transformación de amino ácidos en  $\alpha$ -acilaminocetonas y la polimerización de isocianatos. Adicionalmente, las sales de 4-dialquilaminopiridinio N-sustituidas pueden ser usadas en transferencias de grupos sensibles a nucleófilos en medios acuosos. [8]

En 2001, **Donald J. Berry, y col.**; exponen una recopilación de varios procedimientos experimentales representativos de los tipos de reacciones más importantes catalizadas por 4-dimetilaminopiridina (DMAP); entre ellas: la acetoacetilación, (Figura 16), acetilación de un grupo fenólico (Figura 17), acetilación de alcoholes cis-alílicos (Figura 18), acetilación de alcoholes utilizando cloruro de acetilo (Figura 21), acetilación de 1-metilciclohexanol (Figura 20), acetilación del mesitol (Figura 22), síntesis de un intermediario fundamental para la Pravastatina (Figura 23), síntesis de 2,3-dioxo-2,3-dihidrobenzofuranos (Figura 24). [17]

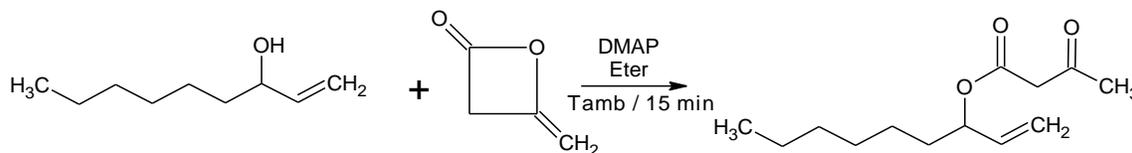


Figura 16: Acetoacetilación.

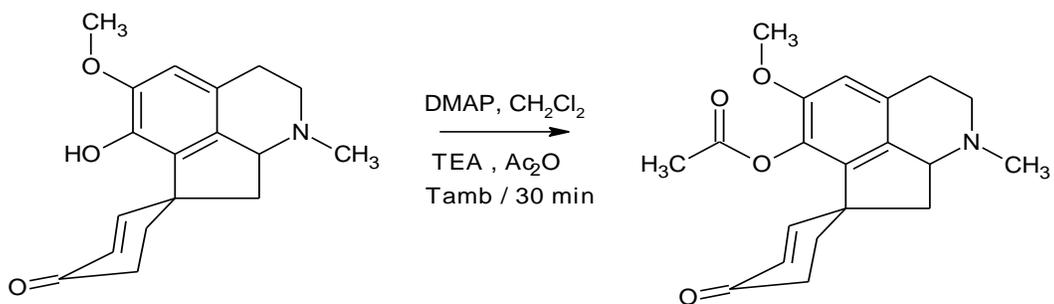


Figura 17: acetilación de un grupo fenólico.

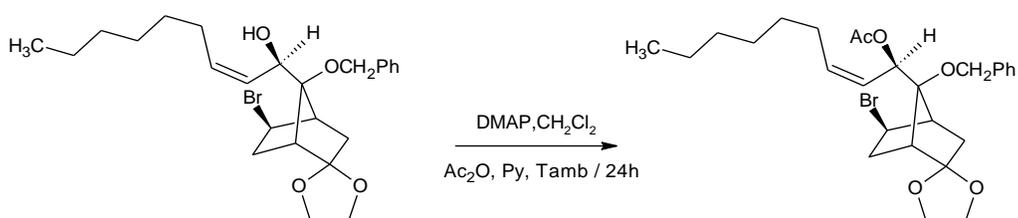


Figura 18: acetilación de alcoholes cis-álílicos.

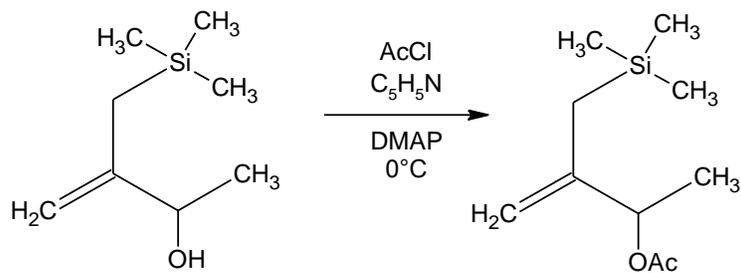


Figura 19: acetilación de alcoholes utilizando cloruro de acetilo.

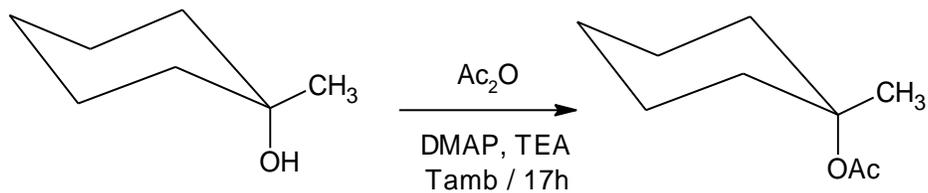


Figura 20: acetilación de 1-metilciclohexanol.

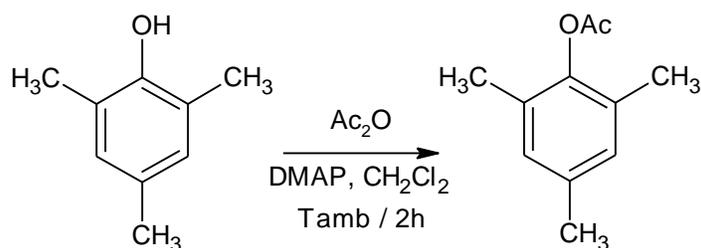


Figura 21: acetilación del mesitol. síntesis de un intermediario fundamental para la Pravastatina.

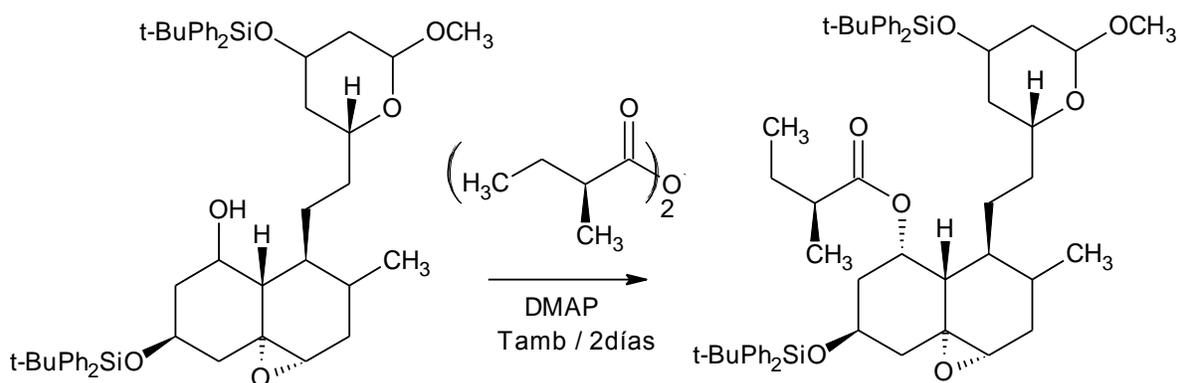


Figura 22: síntesis de un intermediario fundamental para la Pravastatina.

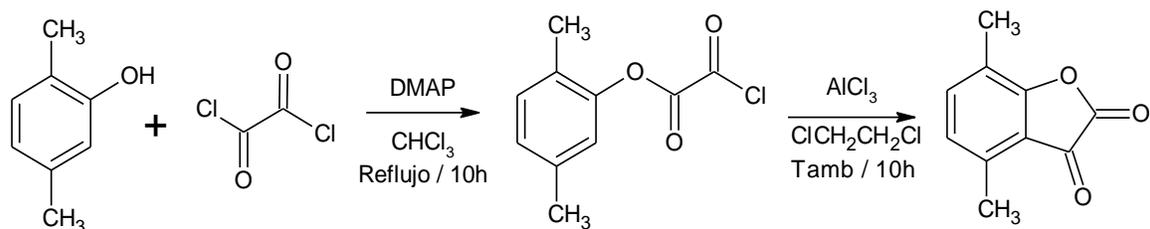


Figura 23: síntesis de 2,3-dioxo-2,3-dihydrobenzofuranos.

En 2003, **Calmes, M. y col.**; el ácido racémico N-trifluoroacetilpípecólico fue convertido en el ácido (S)-N-Boc-pípecólico y el (S)-N-Boc-2-piperidinometanol mediante la esterificación estereoespecífica con DCC-DMAP y (S)- $\alpha$ -metilpantolactona, seguido por la hidrólisis o reducción del éster y protección del grupo amino, ilustrado en la Figura 24.[18]

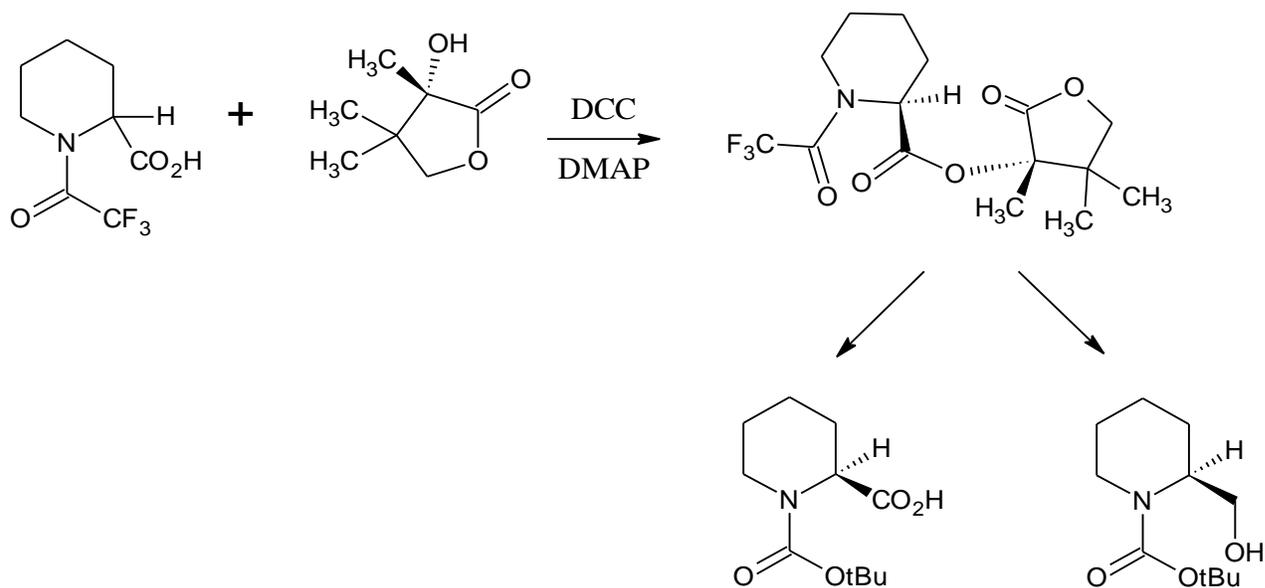


Figura 24: Esterificación estereoespecífica con DCC-DMAP.

Es de importancia mencionar los buenos rendimientos obtenidos empleando tolueno a diferencia de métodos convencionales que emplean cloruro de metileno y la asistencia diastereoselectiva en la esterificación.

En 2007, **Dae-won Chung y col.**; presentaron sus estudios sobre la síntesis y solubilidad de derivados hidrofílicos de  $\beta$ -sitosterol, los cuales son conocidos por su potencial para reducir los niveles de colesterol en sangre. Los procedimientos de esterificación se realizaron con anhídrido succínico, TEA y  $\beta$ -sitosterol. La segunda esterificación se llevó a cabo con un glicol, un agente deshidratante como el DCC y catálisis básica por 4-DMAP.[7]

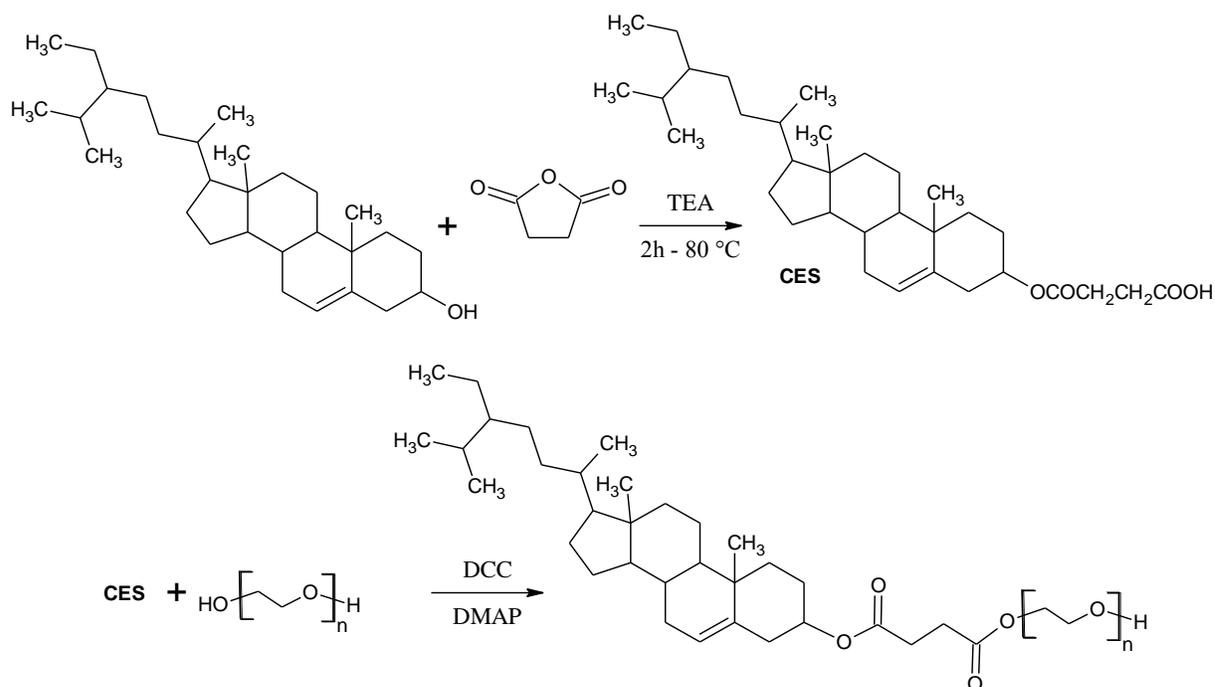


Figura 25: Esterificación en presencia de DCC-DMAP.

En 2009, **Zbigniew P. y col.**; trabajaron en el radiomarcaje de 5-yodo-30-O-(17 $\beta$ -succinil-5 $\alpha$ -androstan-3-ona)-20-desoxiuridina y sus 5'-monofosfatasas para imágenes y terapia de receptores positivos andrógenos del cáncer, tanto en su síntesis como en la evaluación. Desde el punto de vista químico son relevantes los resultados del procedimiento de esterificación, aunque este proceso solo corresponde a un paso intermediario de la síntesis reflejándose buenos rendimientos generales. La 17 $\beta$ -succinato-deshidroandrosterona es sometida a condiciones de esterificación con azúcares, mediante trietilamina, piridina seca y 4-DMAP entre 0°C a temperatura ambiente por un periodo de 6 horas, además al emplearse el ácido 4-oxopentanoico se trata con DCC/DMAP en cloruro de metileno a temperatura ambiente por 3 horas.[19]

En 2010, **Farshori, N. y col.**; estudiaron la bioactividad de ésteres sitosteriles. Se comentó que derivados del  $\beta$ -sitosterol podrían tener actividad antimicrobiana. En vista de la importancia de los ácidos grasos de cadena larga

como potenciales farmacóforos presentaron la síntesis de estudios espectrales de nuevos análogos del  $\beta$ -sitosterol que contenían C11 y C18 ácidos grasos, junto con su evaluación in vitro frente a un panel de Gram-positivas, las cepas de bacterias Gram-negativas de las bacterias y algunas cepas de hongos. Emplearon catalizadores para explorar la probabilidad de obtener farmacóforos importantes de productos naturales con aumento de los rendimientos y en menor tiempo de reacción. Así, para la relación molar de ácidos grasos,  $\beta$ -sitosterol, DCC y 4-DMAP fueron establecidas como condiciones óptimas que suelen ofrecer productos con buenos rendimientos.

La investigación de los datos de detección anti-bacteriano reveló que todos los compuestos probados mostraron de moderada a buena inhibición bacteriana.[20]

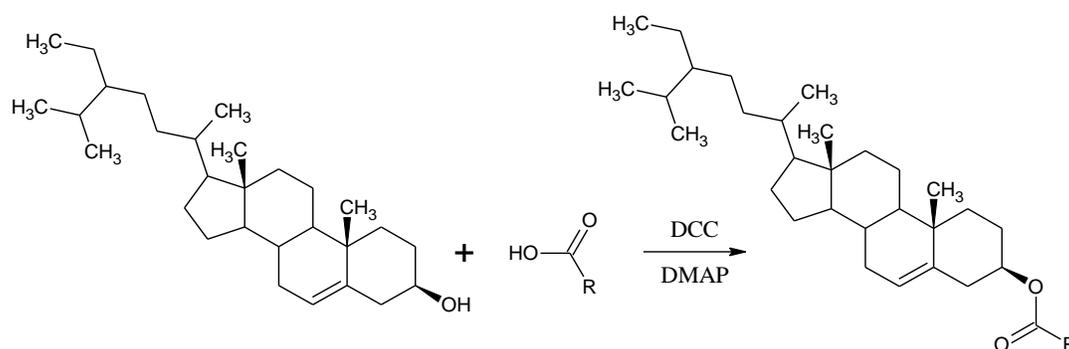


Figura 26: Esterificación en presencia de DCC-DMAP.

En 2005, **Firdovsi, T. y col.**; realizaron reacciones de esterificación utilizando catalizadores ácidos sólidos heterogéneos en condiciones de disolventes menos severas. Se ha investigado la preparación de di-(2-etilhexil)ftalato (DOP), a través de la reacción de esterificación del anhídrido ftálico por 2-etilciclohexanol en presencia de sólidos catalizadores ácidos, como zeolita natural y zeolitas sintéticas.[21]

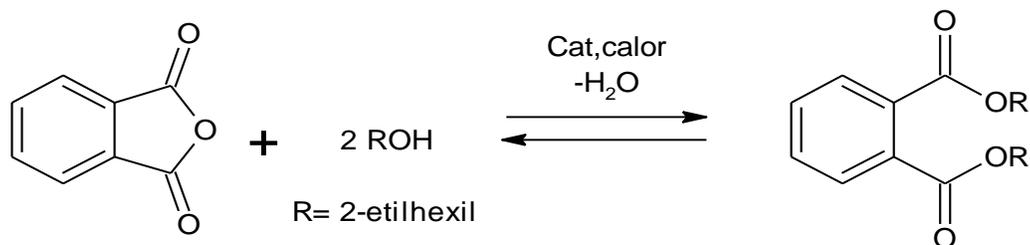
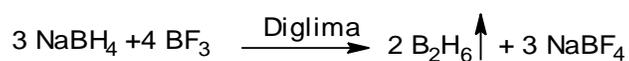


Figura 27: Esterificación utilizando catalizadores ácidos sólidos heterogéneos.

En 1958 **H.C. Brown** y colaboradores observaron mediante experimentos realizados que, el borohidruro de sodio en diglima reacciona fácilmente con trifluoruro de boro, ya sea en cantidades estequiométricas o en exceso para liberar diborano cuantitativamente.



Reacción. 3

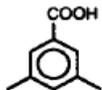
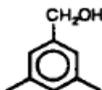
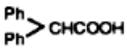
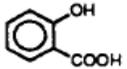
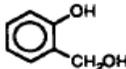
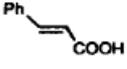
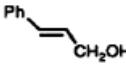
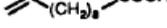
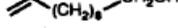
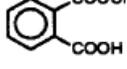
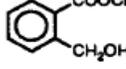
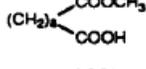
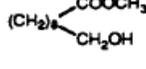
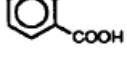
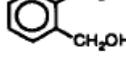
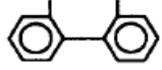
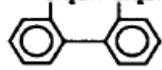
Mediante la siguiente tabla demostró que un rendimiento cuantitativo de síntesis de diborano puede llevarse a cabo sin problemas de acuerdo a la cantidad exacta de borohidruro de sodio que se agrega a la solución.

mmoles de $\text{NaBH}_4$	mmoles producidos de diborano	
	Experimental	Calculado
0,60	0,38	0,40
1,20	0,81	0,80
1,80	1,19	1,20
2,40	1,61	1,60

El procedimiento utilizado en este estudio consistió en dejar caer una solución de borohidruro de sodio en diglima en un ligero exceso de eterato de etiltrifluoroborano en el mismo disolvente.[22]

En 1991, **J.V. Bhaskar Kant y Maria ppan Periasamy**, observaron mediante estudios realizados, que los ácidos carboxílicos pueden ser reducidos directamente a alcoholes con unas selectividades interesantes por adición sucesiva  $\text{NaBH}_4$  y  $\text{I}_2$  al ácido carboxílico y ácido carboxílico a una solución de  $\text{NaBH}_4$  en THF seguido por adición de  $\text{I}_2$ .

A través de la siguiente tabla se observa la reducción selectiva de ácidos carboxílicos a sus alcoholes correspondientes, con rendimientos bastante elevados.

no.	substrate	product	temp, °C	yield, %
1	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OH}$	rt	93
2	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{COOH}$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	rt	98
3	<i>p</i> - $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{COOH}$	<i>p</i> - $\text{ClC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OH}$	rt	98
4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CH}_2\text{OH}$	rt	95
5			rt	92
6			rt	96
7			rt	92
8			0	97
9			0	89
10			0	82
11			0	89
12			rt	86
13			rt	87

Esta reducción selectiva se llevó a cabo a través del siguiente procedimiento: El RCOOH en THF es agregado lentamente a una suspensión de NaBH<sub>4</sub> en THF y la mezcla se agita hasta que cesa el desprendimiento de gas. I<sub>2</sub> en THF es agregado lentamente a la temperatura mencionada en la tabla (2) y esto es agitado por una hora a la misma temperatura, obteniéndose el alcohol con los rendimientos expresados en la misma tabla. [23]

Mecanismo de reacción para la reducción de ácidos carboxílicos a alcoholes.

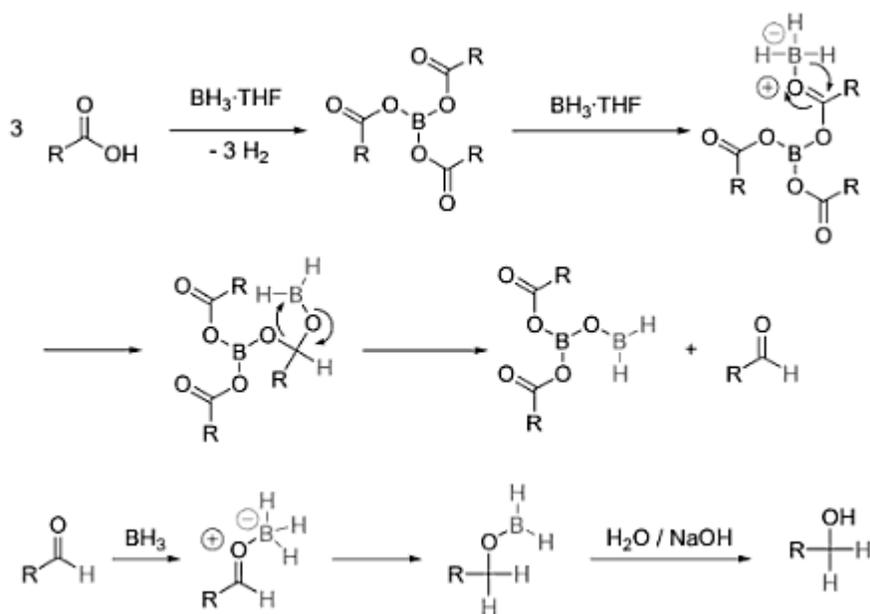


Figura 28: Mecanismo de reacción para la reducción de ácidos carboxílicos a alcoholes.

En 1960 **H.C. Brown** y colaboradores observaron mediante experimentos de reducción con Diborano, de un número representativo de compuestos orgánicos, que el orden decreciente en la tasa de reacción es el siguiente: ácidos carboxílicos, olefinas, cetonas, nitrilos epóxidos y ésteres. Determinando que la reducción con Diborano, es selectiva debido a la fácil reducción de ácidos carboxílicos en presencia de otros grupos funcionales como cetonas y ésteres. [24]

En 1972 **Brown, H.C** realizó estudios con boranos, con el fin de encontrar las condiciones bajo las cuales un determinado grupo sería reducido quimioselectivamente.[25]

En la siguiente tabla se presenta la reducción de varios grupos funcionales con borano.

Substrate <sup>a</sup>	Product	
RCOOH	RCH <sub>2</sub> OH	Easiest
RCH=CHR	(RCH <sub>2</sub> CHR) <sub>3</sub> B	
RCOR	RCHOHR	
RCN	RCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	
$  \begin{array}{c}  \text{H} \quad \text{H} \\  \diagdown \quad / \\  \text{C} = \text{C} \\  / \quad \diagdown \\  \text{R} \quad \text{O} \quad \text{R}  \end{array}  $	RCH <sub>2</sub> CHOHR	
RCOOR'	RCH <sub>2</sub> OH + R'OH	Most difficult
RCOCl		Inert

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Esterificar y realizar una reducción selectiva del producto de esterificación de la epiandrosterona.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar la esterificación en el OH del carbono 3 de la Epiandrosterona, utilizando los sistemas: anhídrido succínico/ DCC/ DMAP/ Py y ácido malónico/ DCC/ Py.
- Realizar la reducción selectiva de ácido carboxílico presente en la Epiandrosterona esterificada, utilizando  $\text{NaBH}_4/\text{BF}_3$ .
- Llevar a cabo la protección de la fenilalanina y realizar el acoplamiento al producto obtenido de la reacción de reducción.
- Caracterizar e identificar compuestos sintetizados en cada paso mediante métodos espectroscópicos.

## 5. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

- Los solventes y reactivos empleados provienen de Sigma-Aldrich Co., Ltd, Grado HPLC y Síntesis respectivamente.
- Los Espectros Infrarrojo (IR) fueron registrados en un equipo IR-Thermo Nicolet Nexos 470 FT EFP.
- Para la Cromatografía Capa Fina (CCF) se utilizó como adsorbente silica gel Merck DC-60F54, capa de 0,2 mm de espesor en placas de aluminio.
- Para la Cromatografía Preparativa se utilizó placas 20 x 20 de silica-gel 60G Merck con indicador fluorescente a 254 nm y 0,25 mm de espesor.
- Los Espectros de Resonancia Magnética de carbonos  $^{13}\text{C}$ -RMN, se registraron en los instrumentos JEOL (270 MHz), BRUKER (300 MHz) y BRUKER (500 MHz). Se utilizó como referencia interna tetrametilsilano (TMS) y los desplazamientos químicos vienen dados en ppm hacia campos bajos de la señal del TMS. Los solventes vienen especificados en cada espectro.
- La Cromatografía de Columna utilizó como soporte silica-gel de Aldrich, 60 Å, con un área de superficie de 500 m<sup>2</sup> /g y un volumen de 0,75 cm<sup>3</sup> /g (70-230 MESH ASTM).

### 5.1 Esterificación del grupo hidroxilo presente en la Epiandrosterona(3β-Hidroxi-5α-androst-17-ona).

#### 5.1.1 Ácido Succínico/ DMAP/ DCC/ Agitación.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en agitación por 3 horas, (0,25361 ± 0,00001g; 2,536mmol) de ácido succínico, (0,53952 ± 0,00001g; 2,614mmol) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en (20,0 ± 0,1) ml de cloroformo. Luego se agregó (0,70039 ± 0,00001g;2,411mmol) de 3β-hidroxi-5α-androst-17-ona y 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina(DMAP) (2,493mmol). Se mantuvo en agitación durante 5 días. La reacción se siguió por

cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.2 Ácido Succínico/ DMAP/ DCC/ Reflujo.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en reflujo por 3 horas, ( $0,24754 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,475\text{mmol}$ ) de ácido succínico, ( $0,52156 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,527\text{mmol}$ ) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en ( $20,0 \pm 0,1$ ) ml de cloroformo. Luego se agregó ( $0,71425 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,459\text{mmol}$ ) de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona y 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) ( $2,531\text{ mmol}$ ). Se mantuvo en reflujo durante 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.3 Ácido Succínico/ DMAP/ DCC/TEA.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en reflujo por 3 horas, ( $0,25398 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,539\text{mmol}$ ) de ácido succínico, ( $0,50023 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,424\text{mmol}$ ) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en ( $20,0 \pm 0,1$ ) ml de cloroformo. Luego se agregó ( $0,69923 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,401\text{mmol}$ ) de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona y 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina(DMAP) ( $2,641\text{mmol}$ ) y 2 EQ de Trietilamina ( $5,32\text{mmol}$ ). Se mantuvo en reflujo durante 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.4 Ácido Succínico/ DMAP/ DCC/ TEA.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en reflujo por 3 horas, ( $0,24854 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,485\text{mmol}$ ) de ácido succínico, ( $0,53283 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,58\text{mmol}$ ) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en ( $20,0 \pm 0,1$ ) ml de tolueno. Luego se agregó ( $0,72134 \pm 0,00001\text{g}$ ;  $2,483\text{mmol}$ ) de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona y 1

Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina(DMAP) (2,631mmol) y 2 EQ de Trietilamina (5,651mmol). Se mantuvo en reflujo durante 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.5 Ácido malónico/ DMAP/ DCC/ Agitación.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en agitación por 3 horas, (0,25417  $\pm$  0,00001g; 2.881mmol) de ácido malónico, (0,53165  $\pm$  0,00001g; 2,576mmol) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en (20,0  $\pm$  0,1) ml de cloroformo. Luego se agregó (0,74389  $\pm$  0,00001g; 2,561mmol) de 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androst-17-ona y 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (2,541mmol). Se mantuvo en agitación durante 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.6 Ácido malónico/ DMAP/ DCC/ Reflujo.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en reflujo por 3 horas, (0,24671  $\pm$  0,00001g; 2,803mmol) de ácido malónico, (0,50214  $\pm$  0,00001g; 2,433mmol) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en (20,0  $\pm$  0,1) ml de cloroformo. Luego se agregó (0,72413  $\pm$  0,00001g; 2,491mmol) de 3 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androst-17-ona y 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (2,821mmol). Se mantuvo en reflujo durante 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.7 Ácido malónico/ DMAP/ DCC/TEA.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en reflujo por 3 horas, (0,26216  $\pm$  0,00001g; 2,979mmol) de ácido malónico, (0,56351  $\pm$  0,00001g;

2,731mmol) Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en  $(20,0 \pm 0,1)$  ml de cloroformo. Luego se agregó  $(0,72572 \pm 0,00001\text{g}; 2,498\text{mmol})$  de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona y 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (2,852mmol) y 2 EQ de Trietilamina (5,859mmol). Se mantuvo en reflujo durante 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.8 Ácido malónico/ DMAP/ DCC/ TEA.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron en reflujo por 3 horas,  $(0,23752 \pm 0,00001\text{g}; 2,699\text{mmol})$  de ácido malónico,  $(0,52468 \pm 0,00001\text{g}; 2,542\text{mmol})$  Diciclohexilcarbodiimida (DCC) en  $(20,0 \pm 0,1)$  ml de tolueno. Luego se agregó  $(0,73271 \pm 0,00001\text{g}; 2,522\text{mmol})$  de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona y 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina(DMAP) (2,467mmol) y 2 EQ de Trietilamina (6,013mmol). Se mantuvo en reflujo durante 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

#### 5.1.9 Anhídrido succínico/ DMAP/ $\text{CHCl}_3$ / Trietilamina (TEA).

Para la preparación del producto esterificado se colocaron  $(1,53650 \pm 0,00001\text{g}; 5,289 \text{ mmol})$  de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona, junto con  $(0,56345 \pm 0,00001\text{g}; 5,634 \text{ mmol})$  de anhídrido succínico, 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina(DMAP) (5,260 mmol) y 1,4 EQ de Trietilamina (7,174 mmol) en  $(20,0 \pm 0,1)$  ml cloroformo. Se mantuvo en condiciones de reflujo por 5 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó que se mantiene el material de partida.

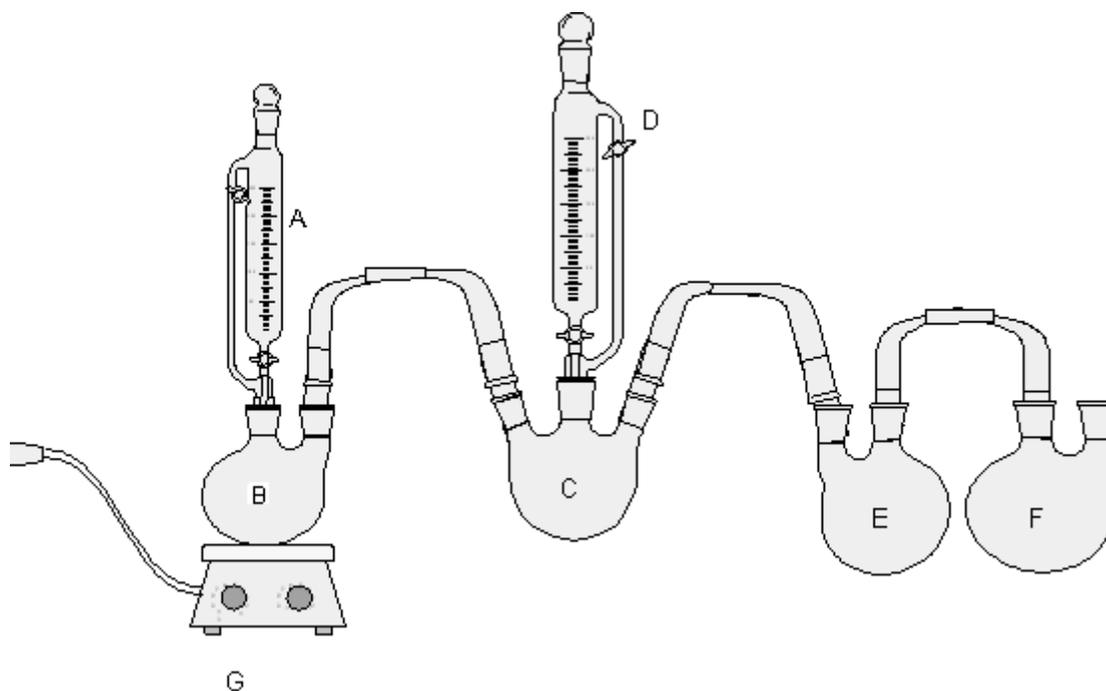
#### 5.1.10 Anhídrido succínico/ DMAP/ Trietilamina (TEA).

Para la preparación del producto esterificado se colocaron ( $1,50444 \pm 0,00001$ g; 5,179 mmol) de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona, junto con ( $0,57450 \pm 0,00001$ g; 5,745 mmol) de anhídrido succínico, 1 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (5,260 mmol) en ( $20,0 \pm 0,1$ ) ml de Trietilamina. Se mantuvo en condiciones de reflujo por 6 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó la aparición de un nuevo producto de mayor polaridad. Se le realizaron lavados con una solución de HCl al 10 % para eliminar el exceso de TEA. La purificación del compuesto se realizó empleando placas preparativas con una mezcla de solventes tolueno/acetona 95/5 v/v. Se obtuvieron ( $0,39851 \pm 0,00001$ ) g y un rendimiento del 20 %.

#### 5.1.11 Anhídrido succínico/ DMAP/ Py.

Para la preparación del producto esterificado se colocaron ( $1,04287 \pm 0,00001$ g; 3,590 mmol) de  $3\beta$ -hidroxi- $5\alpha$ -androst-17-ona, junto con ( $0,69147 \pm 0,00001$ g; 6,914 mmol) de anhídrido succínico, 2 Equivalente (EQ) de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (6,908 mmol) en ( $20,0 \pm 0,1$ ) ml de Piridina. Se mantuvo en condiciones de reflujo por 6 días. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó la aparición de un nuevo producto de mayor polaridad. Se le realizaron lavados con una solución de HCl al 10 % para eliminar el exceso de Py. La purificación del compuesto se realizó empleando placas preparativas con una mezcla de solventes tolueno/acetona 95/5 v/v. Se obtuvieron ( $0,12963 \pm 0,00001$ ) g y un rendimiento del 11 %.

## 5.2 Reducción selectiva con diborano.



### 5.2.1 Reducción del esteroide esterificado con anhídrido succínico.

En un balón aforado de dos bocas (B) se añadió 100 g de bicarbonato de sodio y mediante un embudo de adición (A) se agregó gota a gota ácido clorhídrico al 20 %, el dióxido de carbono generado en (B) se hace pasar al balón generador (C) de diborano, el cual contenía  $(1,56381 \pm 0,00001; 41,337 \text{ mmol})$  borohidruro de sodio en constante agitación, por medio de un embudo de adición (D) se goteaba lentamente éterato de trifluoruro de boro. El gas producido (diborano) reacciona con  $(0,16324 \pm 0,00001 \text{ g}; 0,4180 \text{ mmol})$  del esteroide esterificado que se encuentra disuelto en una mezcla dioxano/tetrahidrofurano en un tercer balón (E), finalmente el hidrogeno sin reaccionar es disuelto en una trampa de peróxido de hidrogeno (F), el proceso de reacción se llevó a cabo durante un periodo de una (24) horas. Transcurrido el tiempo de reacción se dejó reposar el alquilborano durante un periodo de una (1) hora, se

añadió ( $25,0 \pm 0,1$ ) de una solución de NaOH 5% y ( $15,0 \pm 0,1$ ) de una solución de peróxido de hidrógeno 30% gota a gota con agitación durante una (1) hora, para completar la oxidación del exceso del agente reductor. Se separó la capa acuosa de la capa orgánica y esta se dejó secar. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó la desaparición del material de partida y aparición de un solo producto de menor polaridad. Se obtuvieron ( $0,12921 \pm 0,00001$  g;  $0,3431$ mmol) y un rendimiento del 82 %.

### 5.3 Protección de la fenilalanina

Se colocó en un balón ( $15,0 \pm 0,1$ ) ml ácido trifluoracético ( $2,03561 \pm 0,00001$ g;  $12,33$ mmol) fenilalanina y cantidades catalíticas de piridina seca. La mezcla se colocó a temperatura de reflujo por 9 horas. Se siguió por cromatografía de capa fina utilizando como revelador nihindrina. La solución en el balón de reflujo se disolvió en agua y se le realizaron extracciones con diclorometano, se secó la capa orgánica con sulfato de magnesio. Se evaporó el solvente y el producto se recristalizó en agua caliente. Se obtuvieron ( $0,4405 \pm 0,0001$  g;  $1,692$  mmol) y un rendimiento del 14 % con un punto de fusión de 91-92 °C.

### 5.4 Acoplamiento de aminoácido al producto obtenido de la reacción de reducción.

#### 5.4.1 En presencia de DCC en N,N-dimetilformamida.

Para el acoplamiento se colocó ( $0,3229 \pm 0,0001$  g;  $1,236$  mmol) aminoácido protegido, se agregó ( $0,20133 \pm 0,00001$  g;  $0,975$  mmol) DCC en suficiente dimetilformamida, se colocó en reflujo durante 3 horas, para lograr la reacción del DCC con el grupo ácido del aminoácido. Luego se agregó ( $0,10388 \pm 0,00001$  g;  $0,275$ mmol) de producto de la reducción de la Epiandrosterona esterificada con

anhídrido succínico. Después de 72 horas de reflujo se evaporó a presión reducida la dimetilformamida y se disolvió en diclorometano. Se le realizaron lavados con base (NaOH 10 %), la capa orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se dejó evaporar el solvente. La reacción se siguió por cromatografía de capa fina (CCF), utilizando anisaldehído-ácido sulfúrico como revelado. Se observó la aparición de nuevos productos. Esta se purificó por cromatografía de columna con una mezcla Diclorometano/acetona, se obtuvo ( $0,0244 \pm 0,0001$  g; 0,046 mmol) y un rendimiento del 16 %

## 6. METODOLOGIA EXPERIMENTAL Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 6.1 Esterificación del grupo hidroxilo presente en la Epiandrosterona.

#### 6.1.1 Síntesis del Ácido 3-(17-oxo-3β-il-5α-androstan)carbonilmetanoico y Ácido 3-(17-oxo-3β-il-5α-androstan)carboniletanoico.

Para realizar procedimientos de esterificación, entre alcoholes y ácidos, específicamente entre la Epiandrosterona y ácido succínico o malónico, debido a la baja reactividad de los ácidos carboxílicos, se empleó un agente activante, Diciclohexilcarbodimida (DCC). Ya que este reacciona inicialmente con el ácido, de manera de aumentar su carácter electrofílico y posteriormente ser atacado por el alcohol. Además se utilizó como catalizador para la reacción de esterificación Dimetilaminopiridina (DMAP). El mecanismo de reacción de esterificación se muestra en la figura 29.

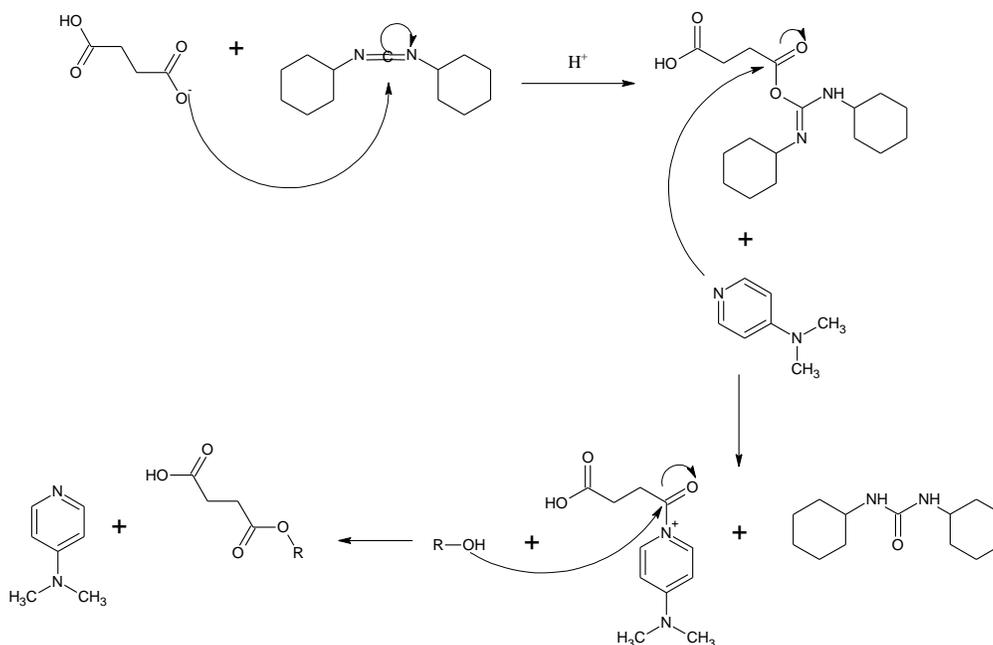


Figura 29: Esterificación entre alcohol y ácido en presencia de DCC/DMAP.

En la Figura 30 se plantean todos los procedimientos realizados para la esterificación entre la Epiandrosterona y el ácido Succínico / ácido malónico.

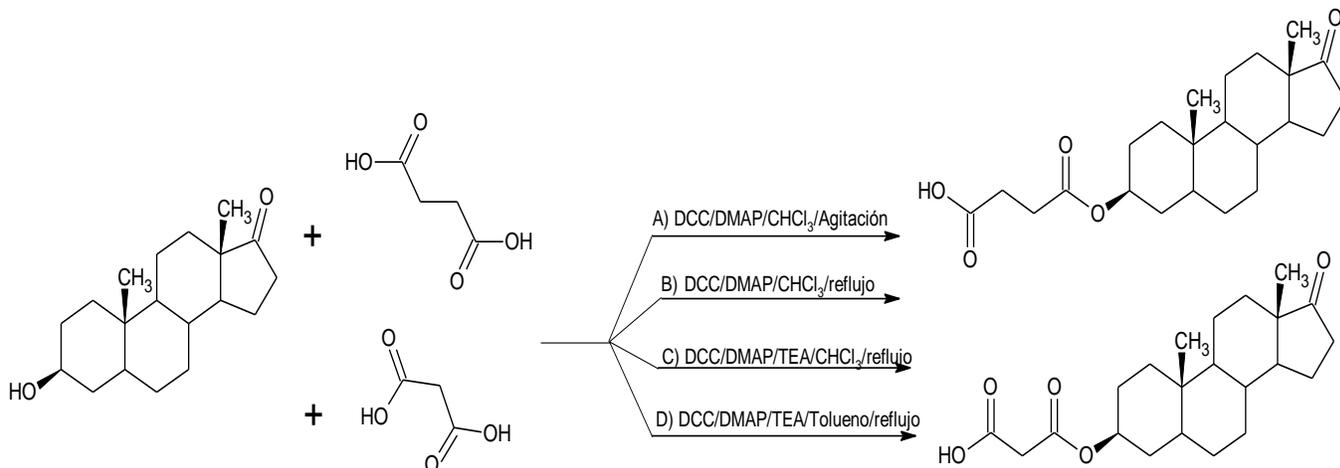


Figura 30: Esterificación de la Epiandrosterona con ácido malónico .y succínico.

En el 2001 *Berry y col.* [17] estudiaron las condiciones en las cuales el DMAP mejora rendimientos en reacciones de esterificación, utilizando el sistema DCC/DMAP a temperatura ambiente y en un lapso de tiempo reducido, obteniendo resultados satisfactorios. Sin embargo, en el procedimiento A se dejó en agitación durante cinco (5) días y no se observó formación de productos. De acuerdo a esto se planteó el procedimiento B, colocando la mezcla en cloroformo, a temperatura de reflujo (61,2 °C) con el fin de favorecer la transformación de reactantes a productos, obteniéndose el mismo resultado del procedimiento A. Estos resultados fueron atribuidos a que, al trabajar con diácidos, la acción catalítica de la DMAP puede ser inhibida por la reacción ácido base entre este último y el centro ácido del intermediario O-monosuccildiciclohexilurea, generándose un ataque nucleofílico intramolecular del ion carboxilato, formando el anhídrido y diciclohexilurea. (Ver figura 31).

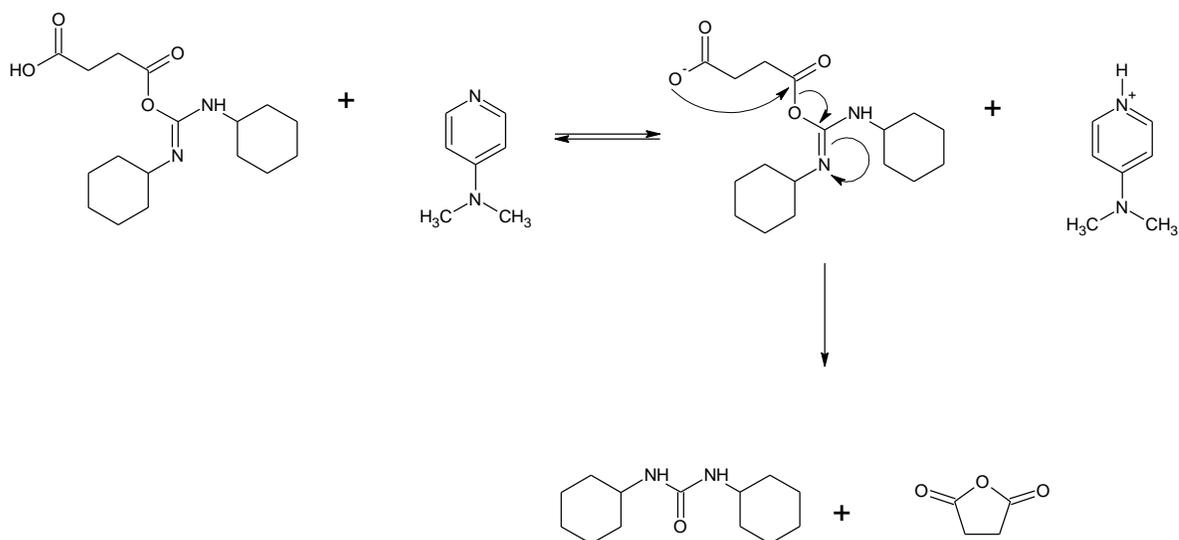


Figura 31: mecanismo de reacción de la formación de productos colaterales en ausencia de base auxiliar.

En el procedimiento C se utilizó como base auxiliar la trietilamina, no se observó la formación de productos. En el procedimiento D se cambió el solvente a tolueno, el cual presenta un punto de ebullición de 110,16°C, ya que probablemente la temperatura alcanzada al utilizar como solvente cloroformo, era insuficiente para la conversión de reactantes a productos. Se observó la formación de 2 productos, uno más polar que la epiandrosterona, posible monoéster succínico; y un producto menos polar que ésta, que posiblemente se trataba del producto de deshidratación del anillo A. Un aumento de la temperatura de reacción favorece la formación de productos colaterales, posiblemente producto de deshidratación, por encima del producto de esterificación. Esto se le puede atribuir a que, el DCC es un agente deshidratante de alcoholes. (Ver figura 32). El rendimiento de la reacción fue insuficiente para la caracterización de los productos.

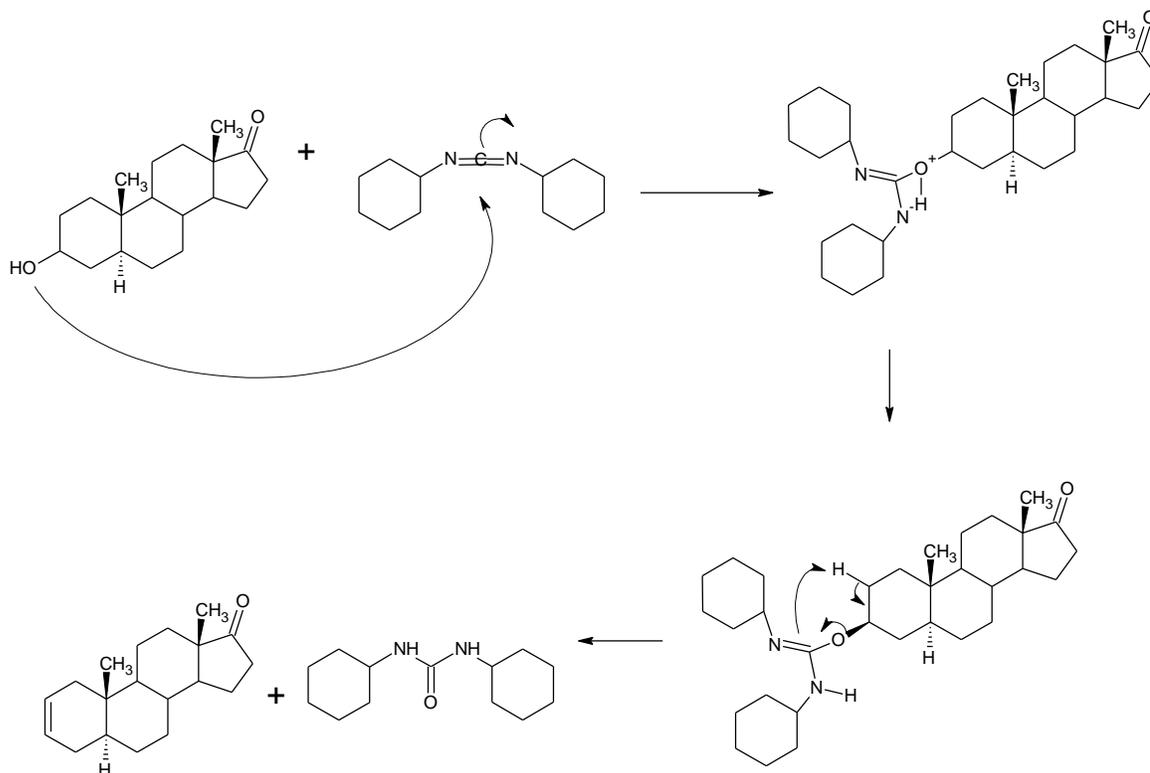


Figura 32: mecanismo de deshidratación de alcoholes con DCC.

### 6.1.2 Síntesis del Ácido 3-(17-oxo-3 $\beta$ -il-5 $\alpha$ -androstan)carbonilpropanoico.

La esterificación es la reacción entre ácidos carboxílicos o sus anhídridos y alcoholes para formar ésteres y puede estar catalizada por ácidos o bases, según la reactividad y los requerimientos de los sustratos. Entre los catalizadores básicos más empleados tenemos la piridina, el DCC y más recientemente el DMAP.

En 2007, **Dae-won Chung y col.**; presentaron estudios sobre procedimientos de esterificación, en un caso con anhídrido succínico, TEA y  $\beta$ -sitosterol y otro caso con un glicol, un agente deshidratante como el DCC y catálisis básica por 4-DMAP. [7] Por otro lado en 2012, **Jabana, Ismenia** realizó la Esterificación de la Epiandrosterona como intermediario en el acoplamiento de

aminoácidos. [26] A partir de esto, se plantearon diferentes condiciones de reacción, con el fin de obtener con un mayor rendimiento el producto de interés.

En la figura 33 se muestran las condiciones de reacción planteadas para la obtención del monoéster succínico de la Epiandrosterona:

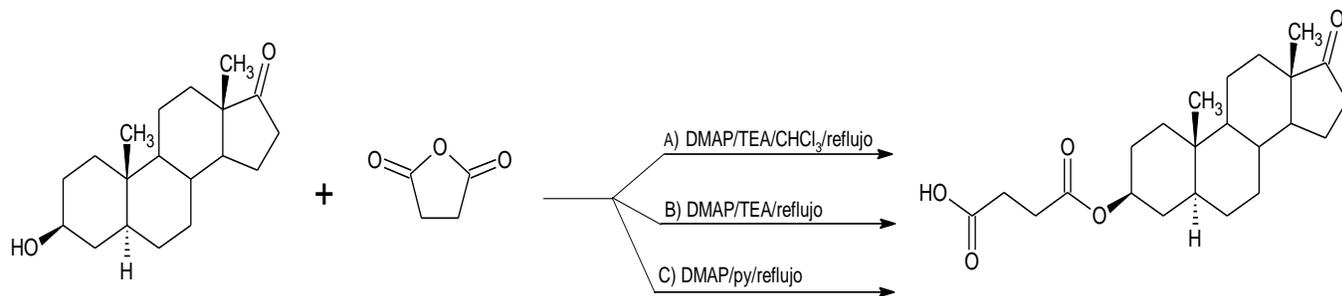


Figura 33: Esterificación de la Epiandrosterona con anhídrido succínico.

Nuestra atención estuvo centrada en la optimización de la esterificación con anhídridos cíclicos, ya que una vez logrado exitosamente esta reacción, el nuevo producto permitirá el acoplamiento de otras moléculas de interés biológico.

De tres procedimientos realizados A, B y C, en sólo dos de ellos se obtuvo el producto de interés, procedimientos B y C. En el procedimiento A, se utilizó como medio de reacción cloroformo, éste presenta un punto de ebullición de 61,2 °C, la cual no fue suficiente para favorecer la formación de producto.

Por el principio de Le Chatelier, si un sistema es perturbado por un cambio de temperatura, presión o concentración, este desplazará su posición de equilibrio de modo que se contrarreste dicho efecto, es decir, se debía aumentar la temperatura de reacción utilizando otro solvente.

Cuando se aumenta la temperatura en un sistema de equilibrio, este se desplazará en el sentido que absorba el calor aplicado. Siendo dicha reacción endotérmica, el aumento de temperatura favorece a la formación de los productos. Por esta razón para los procedimientos B y C, se usó como solvente trietilamina

(TEA) y piridina (py) respectivamente, ya que sus temperaturas de ebullición son 90 °C (TEA) y 115,2 °C (py), además que actúan como base auxiliar de la 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), impidiendo que el grupo ácido que se forma durante la esterificación, inhiba la acción catalítica de esta última a través de la reacción ácido base entre el catalizador y el grupo ácido (figura 34).

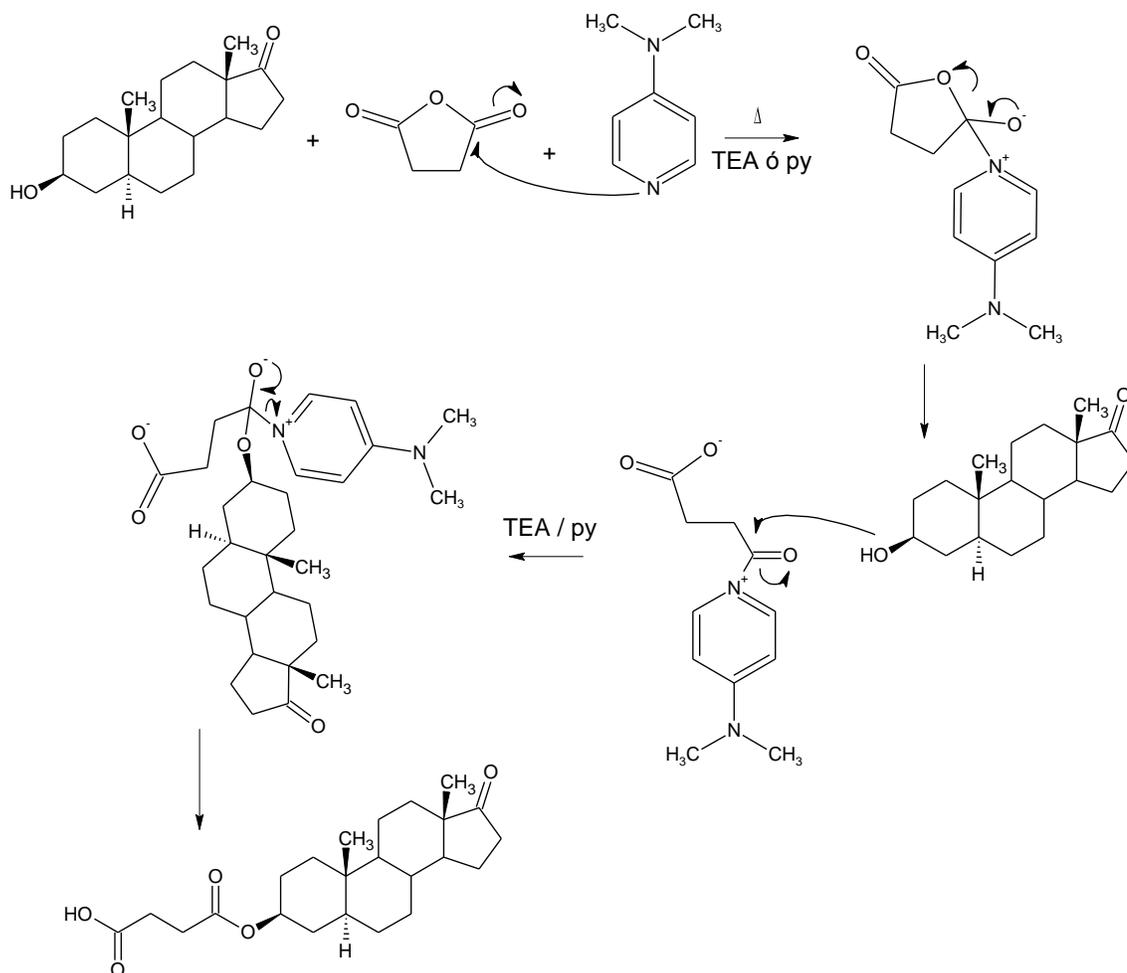


Figura 34: Mecanismo de acción de la TEA y la py como bases auxiliares.

Los porcentajes de rendimiento de los procedimientos experimentales B y C se muestran en el siguiente gráfico:

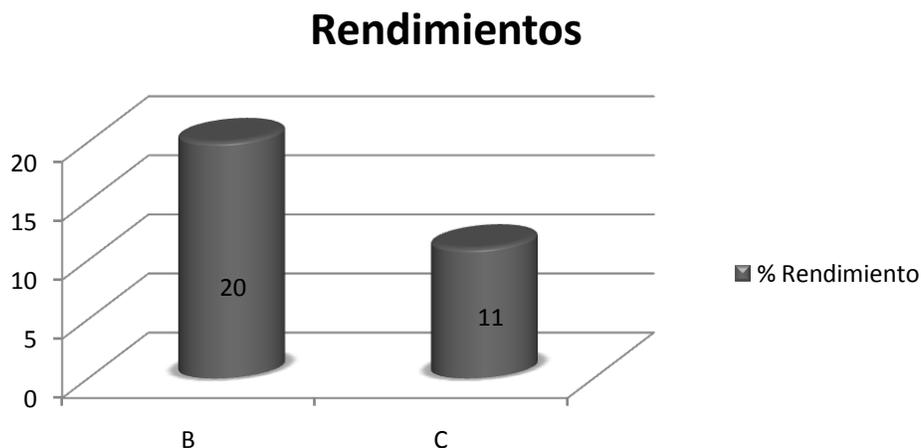


Gráfico 1: Rendimientos de producto esterificado obtenidos usando los procedimientos B y C.

Al observar el gráfico 1, donde se compara los porcentajes de rendimientos de producto esterificado de los procedimientos B y C, se logra ver que existe una diferencia de 9 % entre ellos. Al mantener todas las variables idénticas en ambos procedimientos y solo variar el medio de reacción, éste sería nuestra variable. Tanto en el procedimiento B como en el C se utilizó como medio de reacción bases orgánicas, Trietilamina y Piridina respectivamente, entre ellas existe diferencias estructurales a las que se le atribuye esta diferencia en rendimientos (ver figura 35). Los átomos tienen mayor electronegatividad a medida que aumenta el carácter  $s$  de la hibridación. Por tanto los átomos con hibridación ( $sp^3$ ) son menos electronegativos que los ( $sp^2$ ). En la piridina el átomo de nitrógeno tiene una hibridación  $sp^2$ , mientras que en la trietilamina el átomo de nitrógeno tiene hibridación  $sp^3$ , lo que hace que el par de electrones en el átomo de nitrógeno de la trietilamina estén más disponibles que en el caso de la piridina; además esto se evidencia en los valores de  $Pk_b$  de ambas bases, los cuales son 8.70 para la piridina y 3.28 para la trietilamina, lo que corrobora el hecho de que la trietilamina tiene un carácter básico mayor al de la piridina.

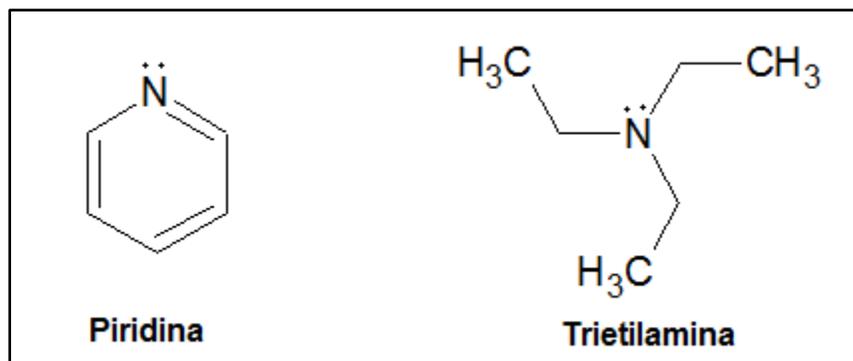


Figura 35: Estructura de la piridina y la Trietilamina.

El proceso de purificación del producto obtenido en ambos procedimientos, se realizó mediante placas preparativas. Este proceso pudo afectar aleatoriamente el rendimiento en los procedimientos B y C, debido a que al ser raspada la sílica de interés, esto se realiza solo en la zona media donde se logra ver el producto, por lo cual parte de éste pudo haber quedado retenido en la sílica excedente en la placa.

Una vez purificados los productos obtenidos, a estos se les determinó el factor de retención y el punto de fusión ver tabla 4:

Tabla N° 4: Puntos de fusión y R<sub>f</sub> de los productos obtenidos en los procedimientos B y C:

Producto	R <sub>f</sub> en acetona (100%)	R <sub>f</sub> en etanol (100%)	Pto. De fusión (°C)
B	0,71	0,80	220 – 222 220 - 221
C	0,71	0,80	218 – 220 219 - 220

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que ambos productos, tanto del procedimiento B como en el C, son iguales. Estos fueron unidos y se les realizó un espectro IR, en CHCl<sub>3</sub>, observándose una señal ancha que va entre

3500 y 2500 $\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace O-H en ácidos carboxílicos, una señal 2936,7 $\text{cm}^{-1}$  y 2854,7  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a la frecuencia del enlace C-H, una señal en 1731,5 $\text{cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace C=O de grupos carbonilos y dos señales, una en 1296,5 $\text{cm}^{-1}$  y 1015,1 $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la frecuencia del enlace C-O ambas características de los éster.

**Tabla N° 5.** Datos espectroscópicos IR, en KBr, del producto de esterificación sintetizado (Espectro 2).

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad y Forma	Asignación
3500 - 2500	Media y poco aguda	O-H
2936,7 / 2854,7	Intensa y poco aguda	C $\text{sp}^3$ -H
1731,59	Intensa y aguda	C=O
1296,5	Media y aguda	C-O asim
1015,1	Media y aguda	C-O sim

También se realizó la deconvolución de la región del espectro IR, donde se observa que la señal en 1731,5  $\text{cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace C=O de grupos carbonilos. Dicha señal está compuesta por tres señales, las cuales son 1710,7  $\text{cm}^{-1}$ , 1729,2  $\text{cm}^{-1}$  y 1741,7  $\text{cm}^{-1}$ , estas corresponden a la frecuencia del enlace C=O de ácido Carboxílico, éster y cetona cíclicas de 5 miembros respectivamente. (ver deconvolución 1)

Los siguientes datos fueron comparados con respecto a las señales del espectro IR del material de partida, Epiandrosterona (ver espectro 1), observándose el ensanchamiento de la señal entre 3500 – 2500  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la frecuencia de enlace O-H de ácidos carboxílicos, la aparición de dos señales correspondientes a las frecuencias de los enlace C=O, asignadas en 1710,7  $\text{cm}^{-1}$  al ácido carboxílico y en 1729,2  $\text{cm}^{-1}$  al éster.

## 6.2 Reducción selectiva con Diborano.

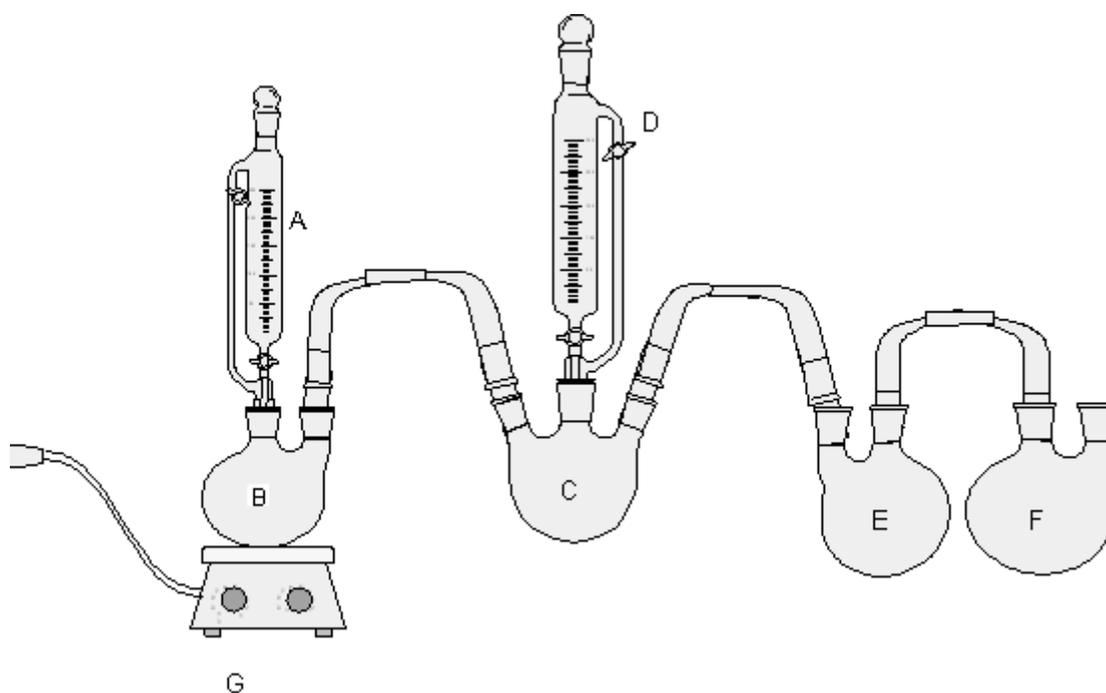


Figura 36: Montaje diseñado para la reacción de reducción.

La síntesis de los alcoholes que se citan a continuación, fueron realizadas a través del montaje que se muestra en la figura 36.

### 6.2.1 Síntesis del alcohol 3-(17-ol-3 $\beta$ -il-5 $\alpha$ -androstan)carbonilpropanol.

En la figura 37 se muestran las condiciones de reacción planteadas para la obtención del alcohol de interés:

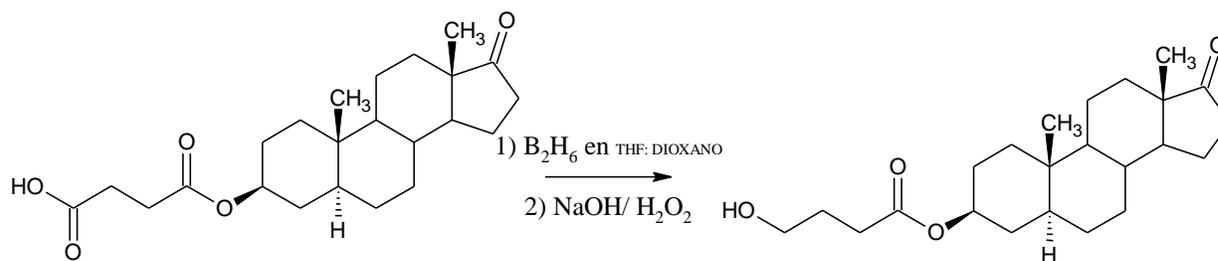


Figura 37: Reacción de Reducción selectiva con Diborano.

De acuerdo con **H.C. Brown** y colaboradores, el borohidruro de sodio reacciona fácilmente con trifluoruro de boro, ya sea en cantidades estequiométricas o en exceso para liberar diborano cuantitativamente. [22]



Reacción 5.

En base a estudios realizados en 1960 por **H.C. Brown** y colaboradores, donde observaron mediante experimentos de reducción con diborano de un número representativo de compuestos orgánicos, que el orden decreciente en la tasa de reacción era el siguiente: ácidos carboxílicos, olefinas, cetonas, nitrilos epóxidos y ésteres. [24] Por esta razón se intentó la reducción selectiva del grupo carbonilo del ácido carboxílico del monoéster succínico de la Epiandrosterona en presencia de grupos funcionales como éster y cetona.

Sin embargo, al analizar el producto de reacción se encontró el producto de reducción tanto del grupo carbonilo del ácido carboxílico como de la cetona pentacíclica del anillo D (ver figura 38), con un rendimiento del 82%. Esto se puede atribuir al exceso de diborano utilizado. La reducción de la cetona en el anillo D puede ser explicada en términos de la liberación de tensión angular cuando se pasa de un anillo de cinco miembros con un carbono  $\text{sp}^2$  a un anillo de 5 miembros con carbonos  $\text{sp}^3$ .

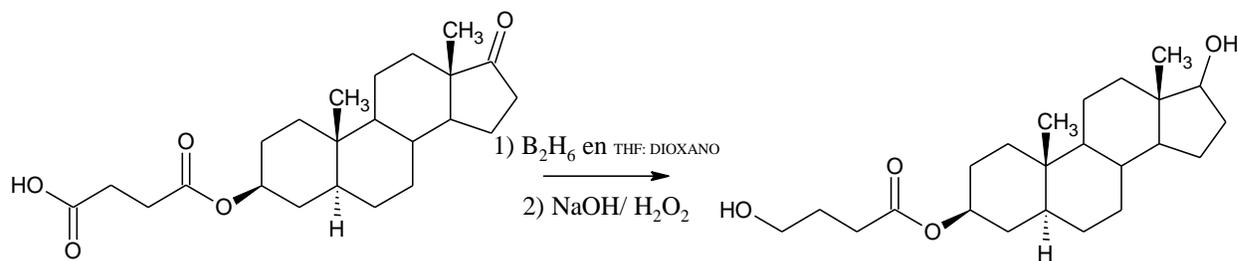


Figura 38: Reacción de Reducción con Diborano.

De igual forma con la finalidad de que el proceso de reducción fuese más efectivo, se colocó una piedra porosa en la salida del gas del balón E (ver figura 36) de manera de que un mayor burbujeo aumenta la superficie de contacto del gas con la solución.

Una vez purificado el producto obtenido, a éste se le determinó el factor de retención y el punto de fusión ver tabla 6:

**Tabla N° 6:** Punto de fusión y Rf del producto obtenido en el procedimiento de reducción del monoéster succínico e la Epiandrosterona:

Producto	Rf en Diclorometano/acetona (95/5)%	Rf en Tolueno/acetona (95/5)%	Pto. De fusión (°C)
Alcohol	0,42	0,17	146 - 147 144 - 145

De acuerdo a los resultados obtenidos en el espectro infrarrojo (IR) en  $\text{CHCl}_3$  del producto, se observa una señal en  $3469,3\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace O-H, una señal en  $2929,7\text{cm}^{-1}$  y  $2860,7\text{cm}^{-1}$  que corresponden a la frecuencia del enlace C-H, una señal en  $1729,9\text{cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace C=O del grupo carbonilo del éster, una señal en  $1129,6\text{cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace CH-OH del alcohol secundario, una señal en  $1080,1\text{cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace  $\text{CH}_2\text{-OH}$  del alcohol primario y dos señales, una en  $1300,9\text{cm}^{-1}$  y  $1047,0\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la frecuencia del enlace C-O ambas características de los esteres.

**Tabla N° 7.** Datos espectroscópicos IR, en  $\text{CHCl}_3$ , del producto de reducción sintetizado (Espectro 3).

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Intensidad y Forma	Asignación
3469,3	Media y poco aguda	O-H
2929,7 / 2860,7	Media y poco aguda	C $\text{sp}^3$ -H
1729,9	Intensa y aguda	C=O
1129,6	Intensa y aguda	CH-OH
1080,1	Intensa y aguda	$\text{CH}_2$ -OH
1300,9	Intensa y aguda	C-O asim
1047,0	Intensa y aguda	C-O sim

También se realizó la deconvolución de dicho espectro IR, de la región donde aparece la banda C=O, donde se observa que la señal en  $1729,9 \text{ cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace C=O de grupos carbonilos, está compuesta por una sola señal, lo que corresponde a la presencia de un solo grupo carbonilo en el espectro. (Ver deconvolución 2)

Los siguientes datos fueron comparados con respecto a las señales del espectro IR del material de partida, monoéster succínico e la Epiandrosterona (ver espectro 2), observándose una señal más estrecha en  $3469,3 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la frecuencia del enlace O-H de alcoholes, la desaparición de dos señales correspondientes a las frecuencias de los enlace C=O, observándose sólo una señal  $1729,9 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde al éster.

### 6.3 Protección de la fenilalanina

#### 6.3.1 Síntesis del ácido 2-trifluorocarbonilamino-3-fenilpropanoico.

El producto de protección observado en la figura 39 se logró sintetizar con éxito en las condiciones de reacción ilustrada a continuación:

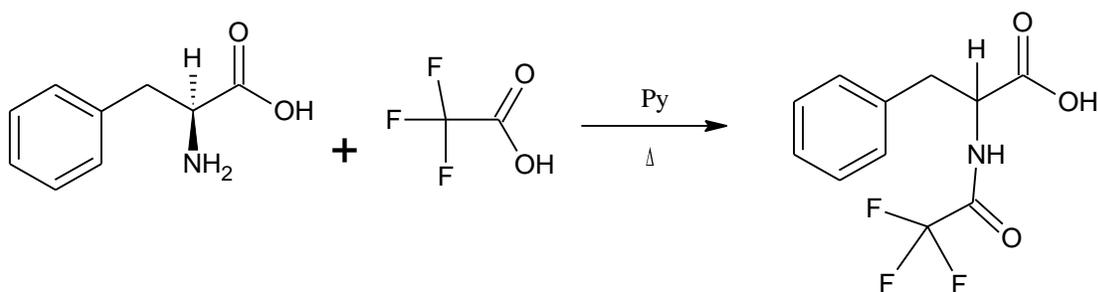


Figura 39: Protección de la Fenilalanina.

En dicha reacción se utilizó la piridina (py) como catalizador para la formación de la correspondiente amida. Al producto se le realizaron lavados con una solución de HCl al 10 % a fin de eliminar el exceso de piridina.

El grupo trifluoroacetyl es utilizado en la protección del grupo  $\alpha$ -amino presente en aminoácidos, debido a que es fácilmente removible en condiciones débilmente básica.<sup>29</sup> Es conocido que el uso de ácido trifluoroacético así como anhídrido trifluoroacético en el proceso de protección favorece la racemización de los productos obtenidos<sup>29,30</sup>. De igual forma, se utilizó ácido trifluoroacético para la protección del grupo  $\alpha$ -amino de la fenilalanina debido a su disponibilidad y a que el interés principal, era estudiar el posible acoplamiento del producto protegido al androstano estructuralmente modificado.

De acuerdo al espectro infrarrojo (IR) en  $\text{CHCl}_3$ , se observa una señal en  $3319,6\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace N-H en amida, una señal que va entre  $3500 - 2500\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace O-H en ácidos carboxílicos, una señal en  $3030,9\text{cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia de enlace  $\text{Csp}^2\text{-H}$  de aromático y una señal en  $2931,3$  atribuida a la frecuencia de enlace  $\text{Csp}^3\text{-H}$ , una señal en  $1711,1\text{cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace  $\text{C=O}$  del grupo carbonilo, una señal ancha que va entre  $1200 - 1100\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace  $\text{C-F}_3$ , dos señales, una en  $756,6\text{cm}^{-1}$  y  $700,9\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la frecuencia del enlace C-H ambas características del benceno monosustituido.

**Tabla N° 8.** Datos espectroscópicos IR, en CHCl<sub>3</sub>, del producto de protección sintetizado (Ver Espectro 4).

$\nu$ (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad y Forma	Asignación
3319,6	baja y poco aguda	N-H
3500 – 2500	ancha	O-H
3030,9	Baja y poco aguda	Csp <sup>2</sup> -H (tensión)
2931,3	Baja y poco aguda	Csp <sup>3</sup> -H
1711,1	Alta y aguda	C=O
1200 – 1100	Alta y ancha	C sp <sup>3</sup> -F <sub>3</sub>
756,6	Intensa y aguda	C sp <sup>2</sup> -H (deformación)
700,9		

También se realizó la deconvolución de dicho espectro IR, donde se observa que la señal en 1711,1 cm<sup>-1</sup> atribuida a la frecuencia del enlace C=O de grupos carbonilos. Dicha señal está compuesta por dos señales, las cuales son 1710,7 cm<sup>-1</sup>, 1731,2 cm<sup>-1</sup>, estas corresponden a la frecuencia del enlace C=O de amida y ácido Carboxílico respectivamente. Dichas asignaciones corresponden a que la fenilalanina protegida forma puentes de hidrogeno intramoleculares (ver figura 40), lo cual afecta la tensión de enlace, debido a la interacción entre los pares de electrones del heteroátomo con hidrogeno. (Ver deconvolución 3)

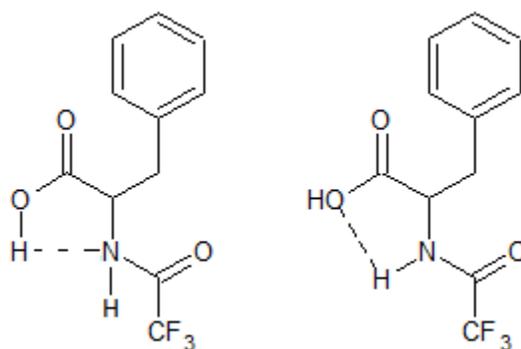


Figura 40: Fenilalanina protegida.

**Tabla N° 9.**Datos de Solubilidad del producto de protección sintetizado.

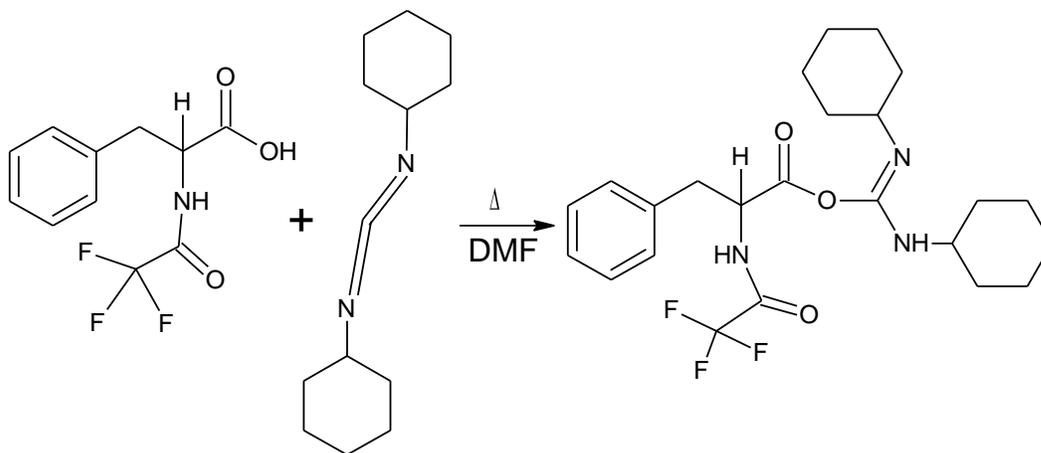
	Diclorometano	Acetona	Etanol	Agua
T. Ambiente	soluble	soluble	Parcial	insoluble
T. Ebullición	soluble	soluble	Soluble	soluble

**Tabla N° 10.**Datos de Punto de Fusión del producto de protección sintetizado.

Replica	Pto. De Fusión (°C)
1	90-94
2	91-95

#### 6.4 Acoplamiento de aminoácido al producto obtenido de la reacción de reducción.

En la figura 41 se logra ver las condiciones de reacción, para la obtención del producto de acoplamiento esperado:



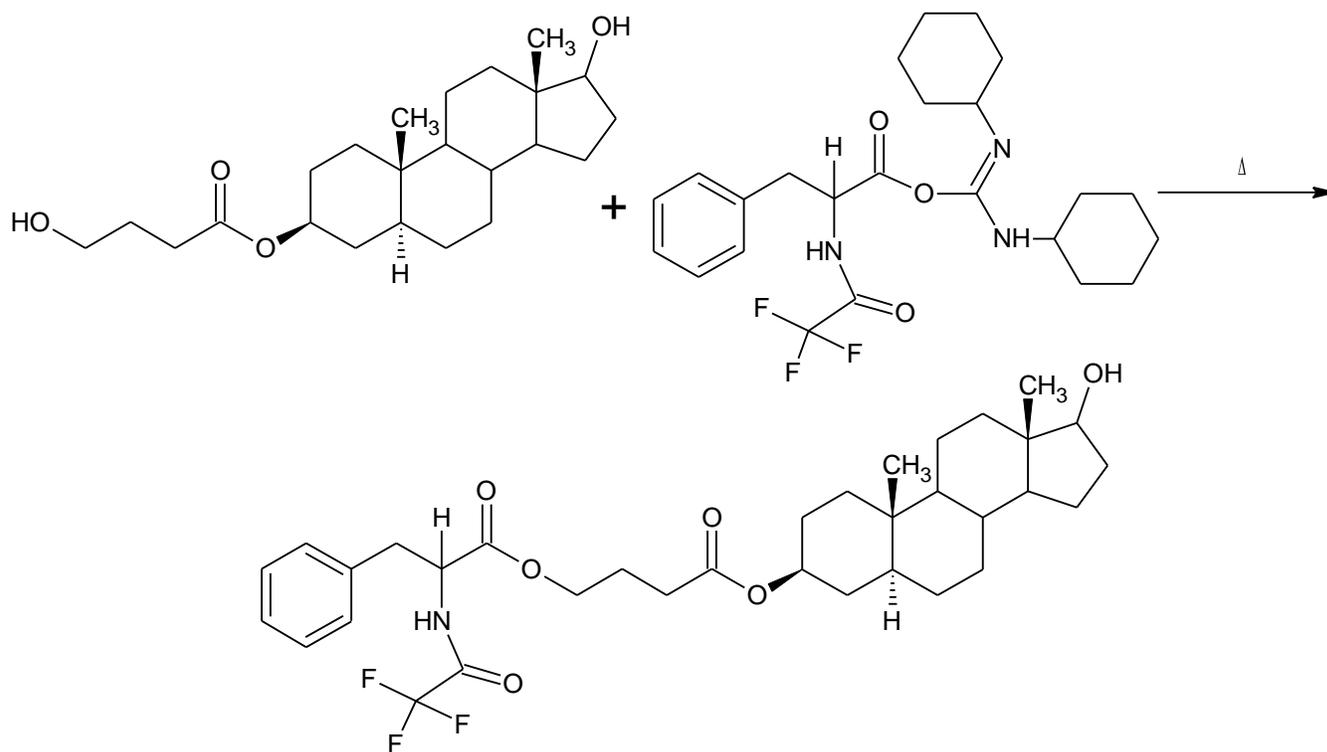


Figura 41: Reacción de Acoplamiento.

Al aminoácido protegido, se agregó DCC en suficiente dimetilformamida, se calentó a temperatura de reflujo durante 3 horas, para lograr la reacción de la DCC con el grupo ácido del aminoácido. Luego se agregó el producto de la reducción de la Epiandrosterona esterificada. Después de 72 horas de reflujo se dejó evaporar la dimetilformamida, se disolvió en Diclorometano y se realizaron lavados con NaOH 10 % con la finalidad de eliminar cualquier resto de aminoácido protegido. Se secó con sulfato de magnesio. Se filtró y se dejó evaporar el solvente. La purificación se realizó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de solvente diclorometano / acetona.

De acuerdo al espectro infrarrojo (IR) en  $\text{CHCl}_3$ , se observa una señal en  $3299,5\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace O-H en alcoholes, una señal en  $3053,7\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace C  $\text{sp}^2$ -H en aromáticos,

dos señales, una en  $2929,4 \text{ cm}^{-1}$  y  $2854,5 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde a la frecuencia del enlace  $\text{C sp}^3\text{-H}$ , una señal en  $1724,1 \text{ cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace  $\text{C=O}$  del grupo carbonilo, una señal en  $1667,0 \text{ cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace  $\text{C=O}$  del grupo carbonilo, una señal en  $1536,7 \text{ cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace  $\text{N-H}$ , una señal en  $1450,6 \text{ cm}^{-1}$  atribuida a la frecuencia del enlace  $\text{C-N}$ , una señal ancha que va entre  $1200 - 1100 \text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a la frecuencia del enlace  $\text{C-F}_3$ .

**Tabla N° 11.** Datos espectroscópicos IR, en  $\text{CHCl}_3$ , del producto de acoplamiento sintetizado ( ver Espectro 5).

$\nu \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Intensidad y Forma	Asignación
3299,5	Media y poco aguda	O-H
3053,7	baja y poco aguda	$\text{C sp}^2\text{-H}$ (tensión)
2929,4 /2854,5	Alta y aguda	$\text{C sp}^3\text{-H}$
1724,0	media y ancha	$\text{C=O}$
1667,0	Alta y ancha	$\text{C=O}$
1536,7	Alta y aguda	N-H
1450,6	Media y aguda	$\text{C-N}$ (deformación)
1155,0/ 1217,1	Baja y ancha	$\text{C sp}^3\text{-F}_3$ , $\text{C-O}$ .

Los datos suministrados a partir de la elucidación del espectro IR, no son suficientes para garantizar la obtención del producto esperado en el acoplamiento, debido a que las señales que corresponden a la frecuencia de enlace  $\text{C=O}$  están corridas, por lo cual no coinciden con las señales de los  $\text{C=O}$  de éster y/o amida. Por lo cual se plantea la posibilidad de múltiples estructuras, las cuales se muestran en la figura 42.



**Tabla N° 12.** Asignación de señales de  $^{13}\text{C}$ -RMN en  $\text{CDCl}_3$  del producto de acoplamiento sintetizado (Espectro 6).

<b>Carbono</b>	<b>Teórico(ppm)</b>	<b>Experimental(ppm)</b>
3	74,20 $\pm$ 4,30	71,11
17	81,33 $\pm$ 2,20	77,42
18	12,56 $\pm$ 5,50	12,29
19	19,64 $\pm$ 6,70	14,17
20	175,93 $\pm$ 3,10	169,43
21	32,07 $\pm$ 5,60	33,04
23	64,54 $\pm$ 0,20	68,15
24	172,56 $\pm$ 5,70	157,82
25	54,60 $\pm$ 13,8	54,47
27	138,00 $\pm$ 2,20	135,02
28-29	129,78 $\pm$ 1,80	129,27-129,03
30-31	128,73 $\pm$ 1,00	128,77-128,62
32	127,52 $\pm$ 5,90	127,46

De acuerdo a los datos espectroscópicos del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN en ( $\text{CDCl}_3$ ), se logra observar una señal en 71,11 ppm que se le atribuye al carbono 3, corresponde al carbono unido al oxígeno del ester, que confirma que ocurrió el primer paso de la ruta sintética planteada, la esterificación con anhídrido succínico. Observando el DEPT, la señal no desaparece ya que no es un carbono cuaternario.

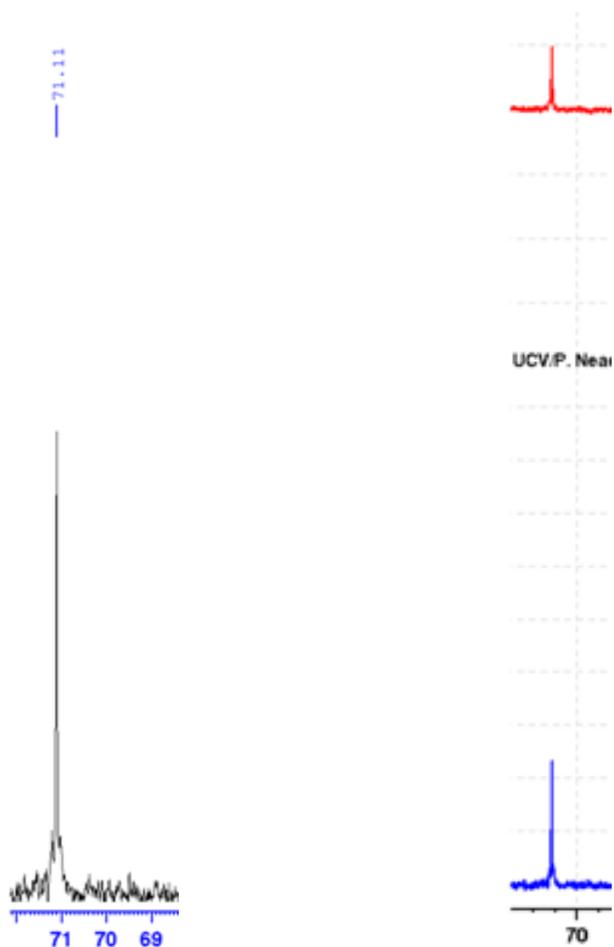


Figura 44 y 45: Señal correspondiente al carbono unido al oxígeno del ester en  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.

Se logra observar una señal, en 77,42 ppm que se le atribuye al carbono 17, corresponde al carbono unido al oxígeno, que confirma la presencia de alcoholes. Observando el DEPT, la señal no desaparece ya que no es un carbono cuaternario, solo desaparece la señal del solvente  $\text{CDCl}_3$ .

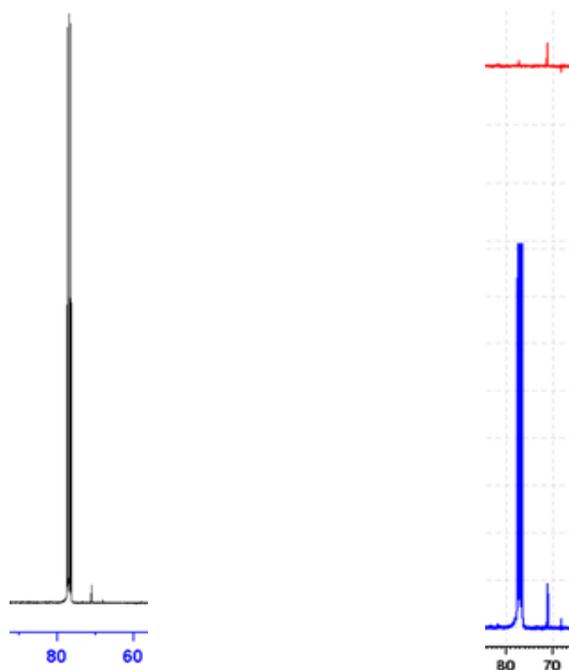


Figura 46 y 47: Señal correspondiente al carbono unido al oxígeno del alcohol en  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.

Se logra observar dos señales, una en 12,29 ppm y 14,17 ppm que se le atribuyen a los carbonos 18 y 19 respectivamente, corresponden a los metilos característicos de la estructura del androstano. Observando el DEPT, la señal no desaparece ya que no es un carbono cuaternario.

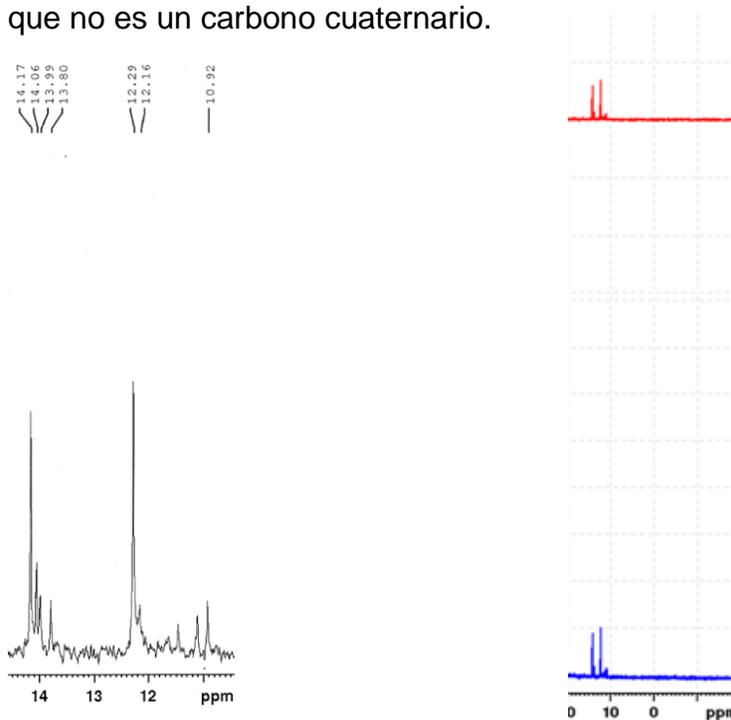


Figura 48 y 49: señales correspondientes a metilos característicos de la estructura del androstano en  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.

Se logra observar dos señales, una en 157,82 ppm y 169,43 ppm que se le atribuyen a los carbonos 24 y 20 respectivamente, corresponden a los carbonos carbonílicos, que confirma que ocurrió el primer y el último paso de la ruta sintética planteada, La esterificación y el acoplamiento del aminoácido. Observando el DEPT, la señal desaparece ya que son carbonos cuaternarios.

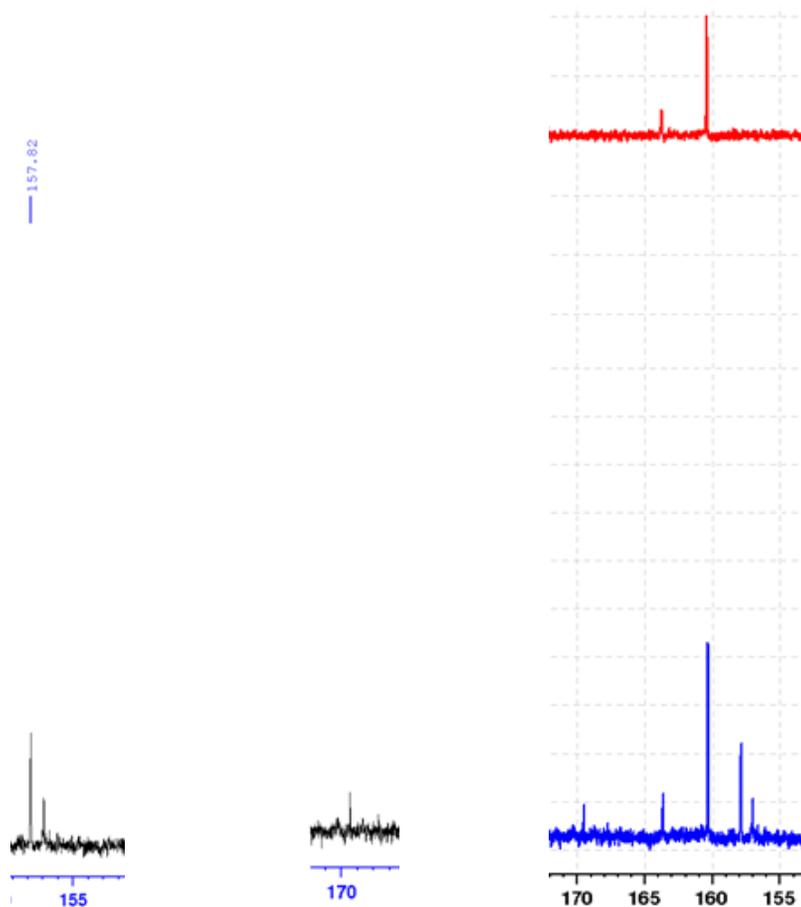


Figura 50, 51 y 52: señales correspondientes a los carbonos carbonílicos en  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.

Se logra observar una señal, en 54,47 ppm que se le atribuye al carbono 25, corresponden al carbono unido al nitrógeno, la cual confirma la presencia de la estructura del aminoácido. Observando el DEPT, la señal no desaparece ya que no es un carbono cuaternario.

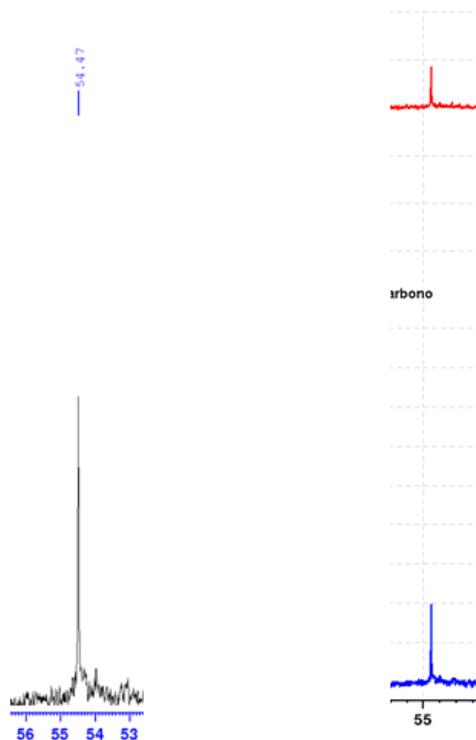


Figura 53 y 54: Señal correspondiente al carbono unido al nitrógeno en  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.

Se logra observar múltiples señales, en 129,27-129,03 ppm, 128,77-128,62 ppm, 127,46 ppm y 135,02 ppm que se le atribuye a los carbonos 28, 29, 30, 31, 32 y 27 correspondientes a los carbonos del anillo aromático, lo cual garantiza la presencia de la estructura del aminoácido. Observando el DEPT, las señales no desaparecen ya que no es un carbono cuaternario, solo desaparece la señal del carbono 27 (135,02 ppm) ya que es cuaternaria.

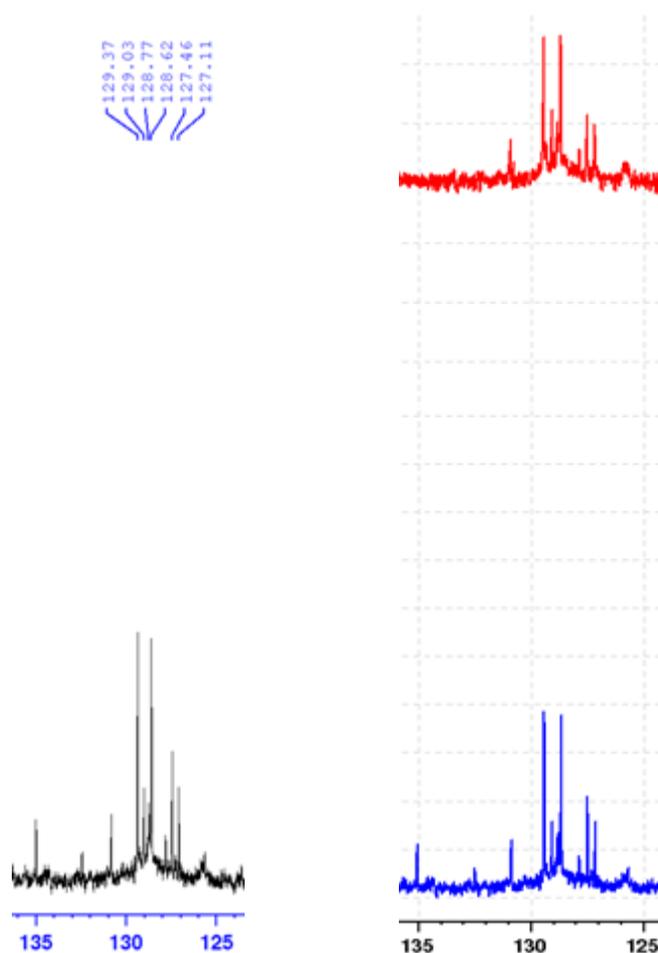


Figura 55y 56: Señales correspondientes a los carbonos aromáticos en  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.

Por último, se logra observar dos señales, una en 33,04 ppm y 68,15 ppm que se le atribuyen a los carbonos 21 y 23 respectivamente, corresponden a los carbonos ( $\text{CH}_2$ ), que confirma que ocurrió el primer paso de la ruta sintética planteada, La esterificación con anhídrido succínico. Observando el DEPT, las señales se invierten, lo que corrobora que son  $\text{CH}_2$ .

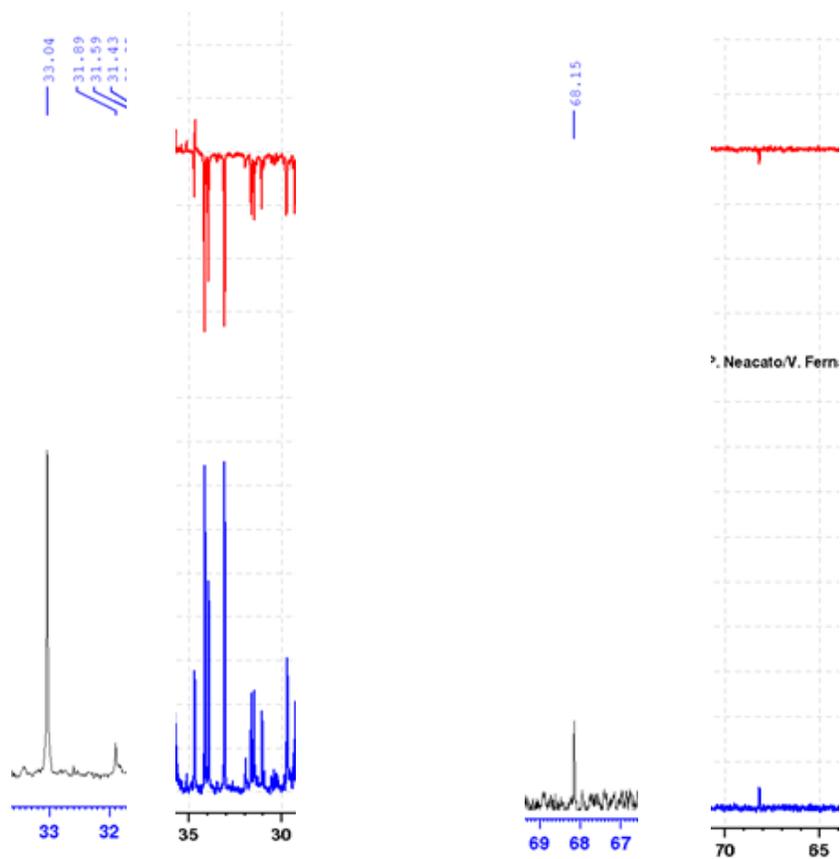
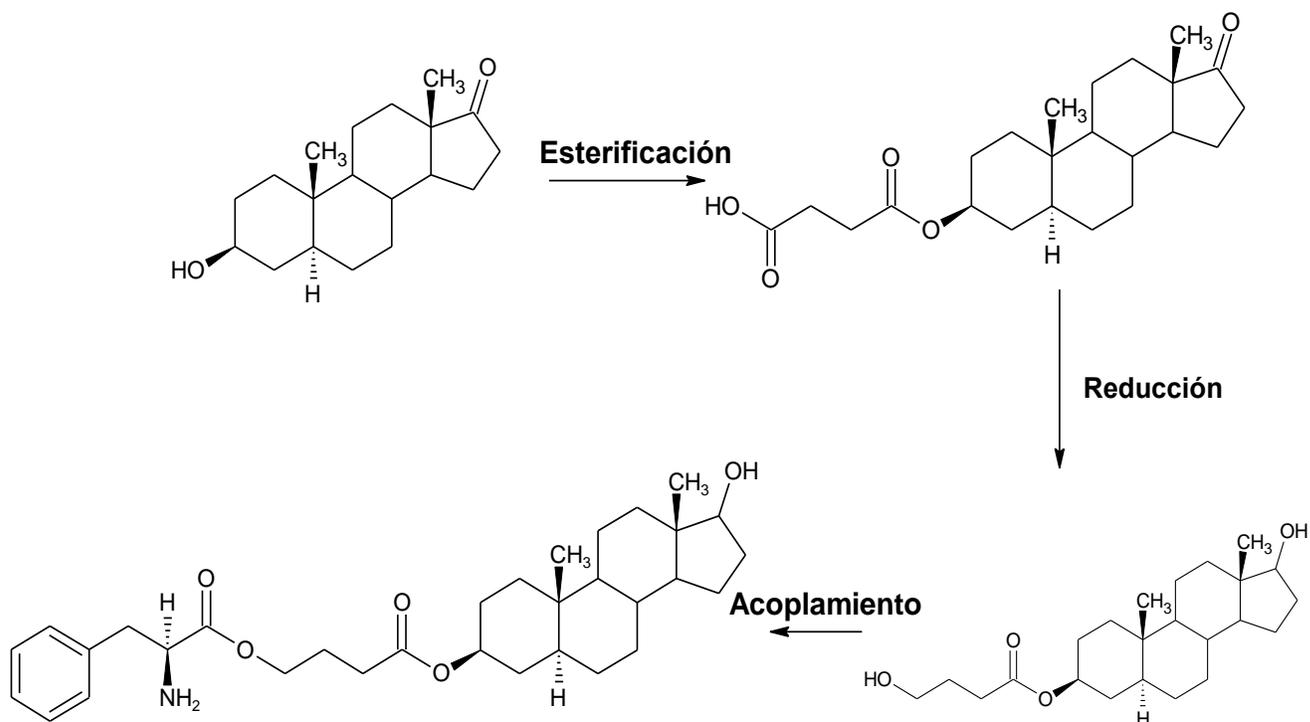


Figura 57y 58: Señales correspondientes a los carbonos  $\text{CH}_2$  en  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\text{CDCl}_3$ ) y DEPT.

## 6.5 Ruta sintética planteada en el trabajo de investigación



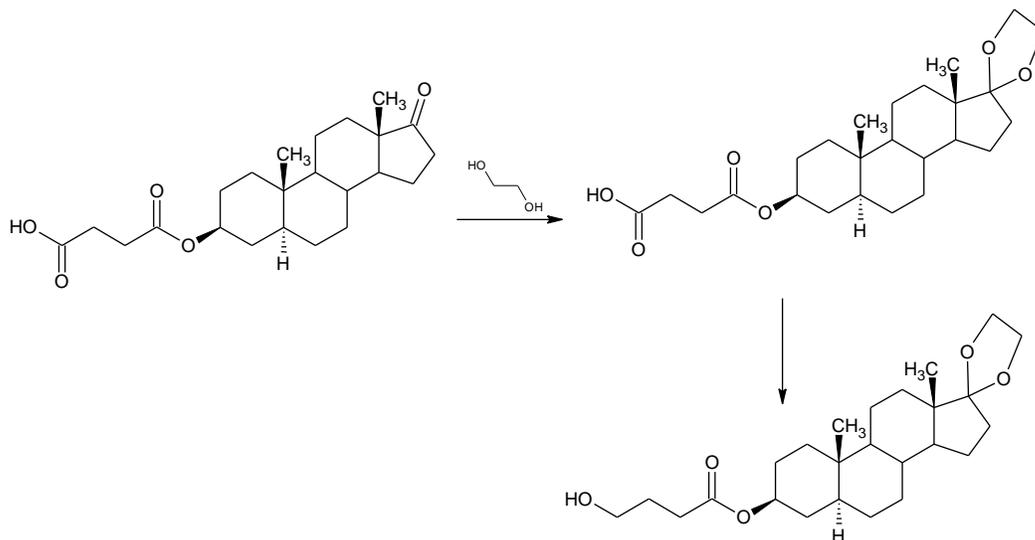
## 7. CONCLUSIONES

- Se intentó esterificar la epiandrosterona con ácido malónico y succínico bajo diferentes procedimientos, sin éxito, esto se le atribuye a que, la acción catalítica de la DMAP puede ser inhibida por la reacción ácido base entre éste y el centro ácido del intermediario O-monosuccinildiciclohexilurea.
- Un aumento de la temperatura de reacción favorece la formación de productos colaterales, posiblemente producto de deshidratación, por encima del producto de esterificación. debido a que, el DCC es un agente deshidratante de alcoholes.
- Se esterificó la epiandrosterona con anhídrido succínico en las siguientes condiciones: DMAP/TEA/Reflujo y DMAP/Py/Reflujo con rendimientos del 20% y 11% respectivamente.
- Se realizó la reducción del grupo AC. Carboxílico y de la cetona cíclica en el monoéster succínico de la epiandrosterona con anhídrido succínico en las siguientes condiciones: 1)  $B_2H_6$  en THF/ Dioxano 2) NaOH/ $H_2O_2$  con un rendimiento del 82 %.
- Un tiempo prolongado de reacción y un exceso de diborano en la reducción, no garantiza la selectividad de reacción entre ácidos carboxílicos y cetonas.
- Se realizó la protección de la fenilalanina con ácidotrifluoroacético en las siguientes condiciones: Py/ $\Delta$  con un rendimiento del 14 %.
- El producto del acoplamiento de la fenilalanina protegida con el alcohol obtenido en el producto de reducción no se logró elucidar con éxito, utilizando solo un espectro IR.

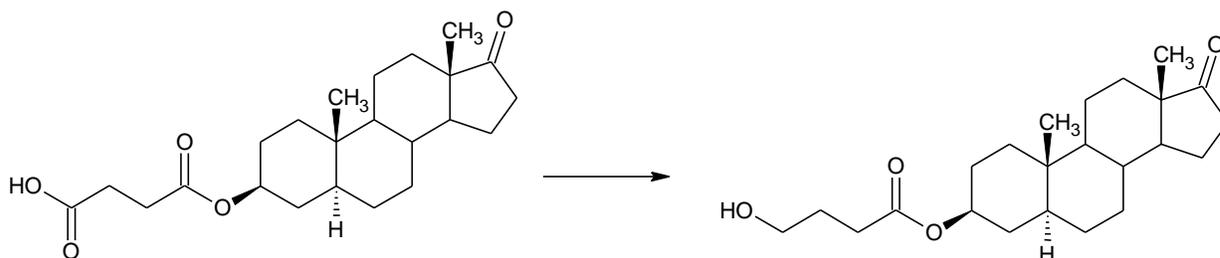
- Se observó por  $^{13}\text{C}$ -RMN en ( $\text{CDCl}_3$ ) que, el producto del acoplamiento no está puro y se logró caracterizar el compuesto, obteniéndose el aminoácido esteroidal.

## 8. RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos biológicos y estudios de modelaje molecular, con el fin de determinar si presentan características antivirales, específicamente contra el dengue y la fiebre amarilla.
- Realizar la protección de la cetona en el C-17,

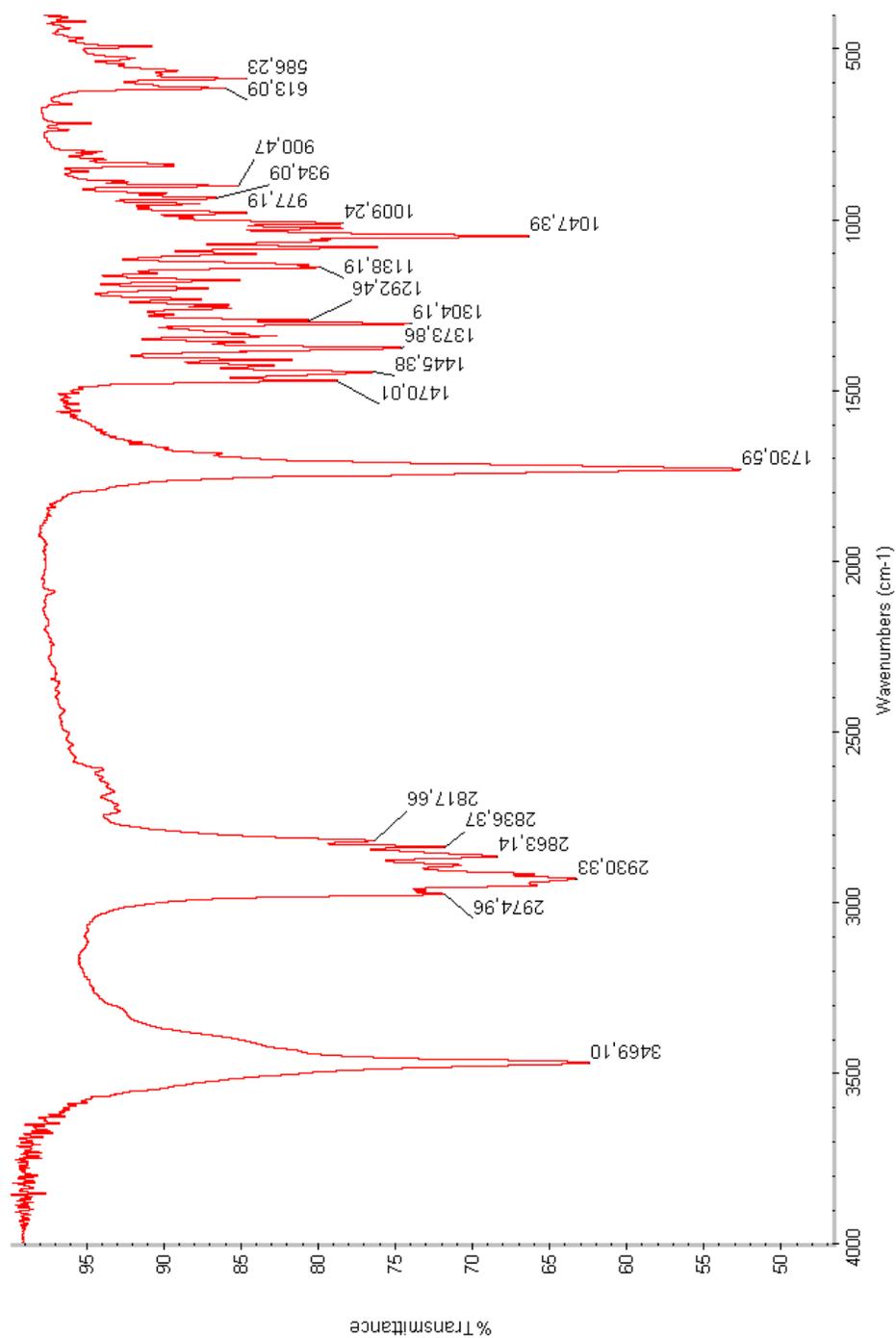


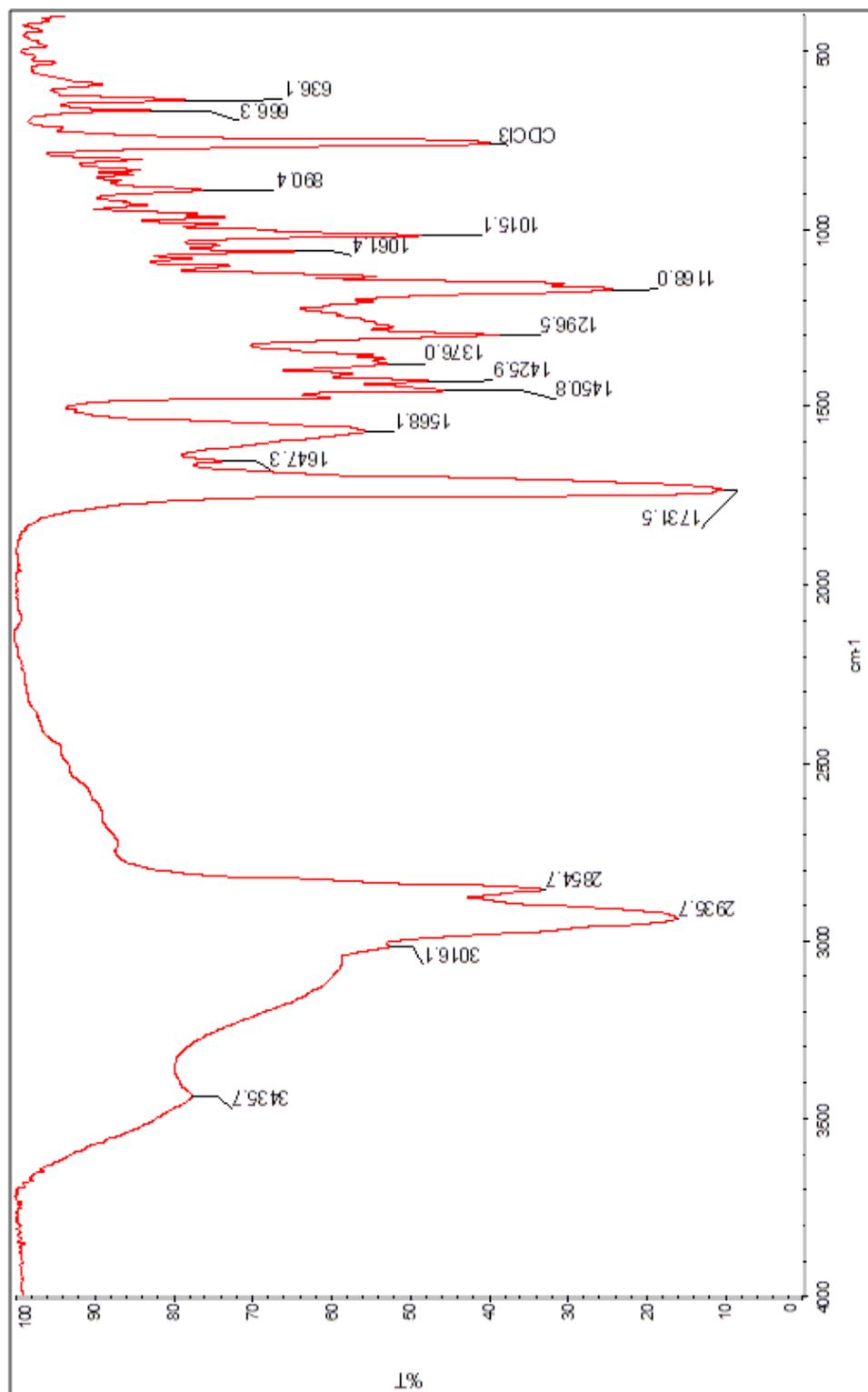
de manera de poder realizar la reducción selectiva de ácidos carboxílicos en presencia de éster.



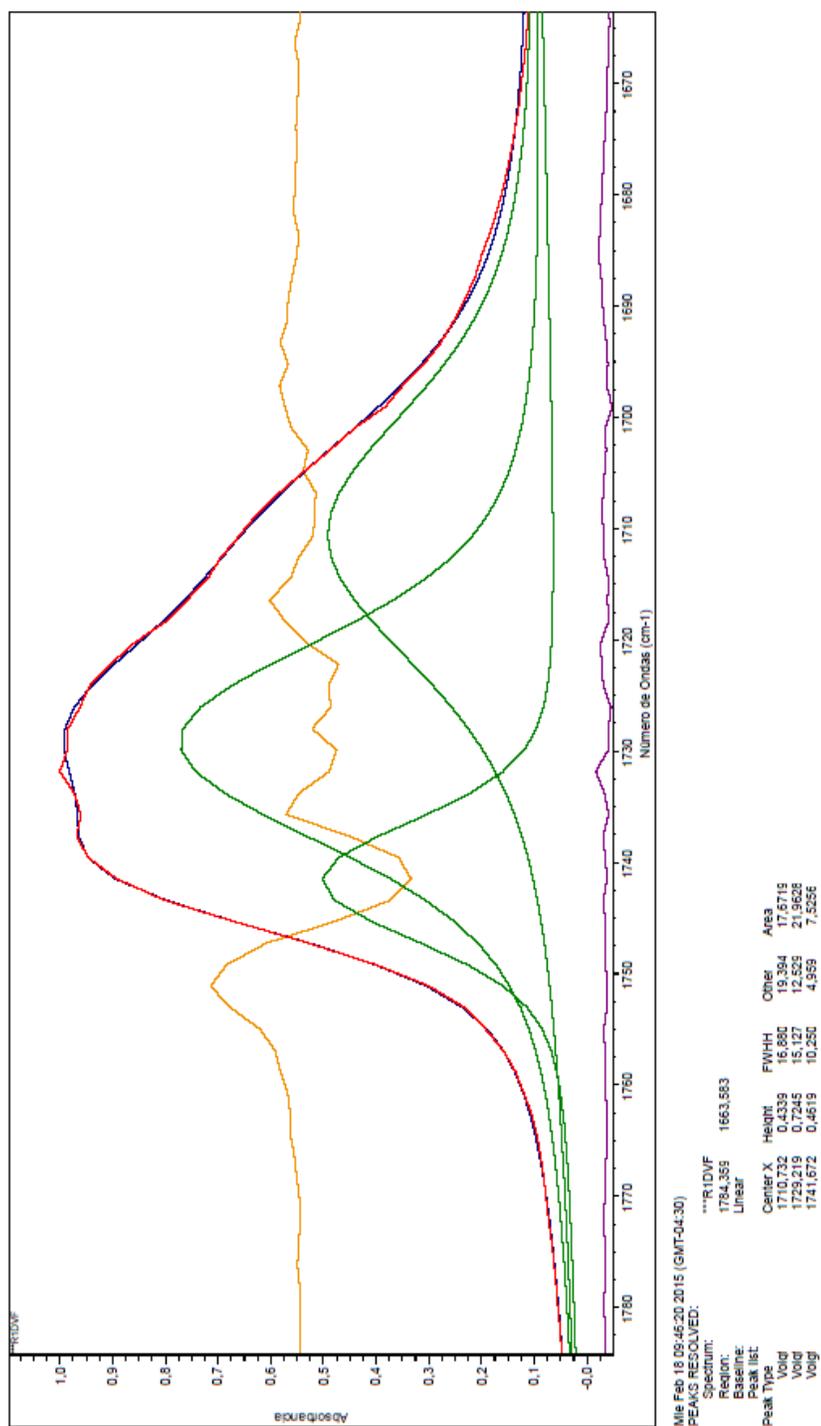
- Al montaje del procedimiento de reducción, en la salida de gas del balón (E), reemplazar la piedra porosa por un bulbo de vidrio con múltiples orificios, de manera de formar un burbujeo disperso y aumentar la superficie de contacto entre el gas y la solución.

## 9. ESPECTROS Y DECONVOLUCIONES

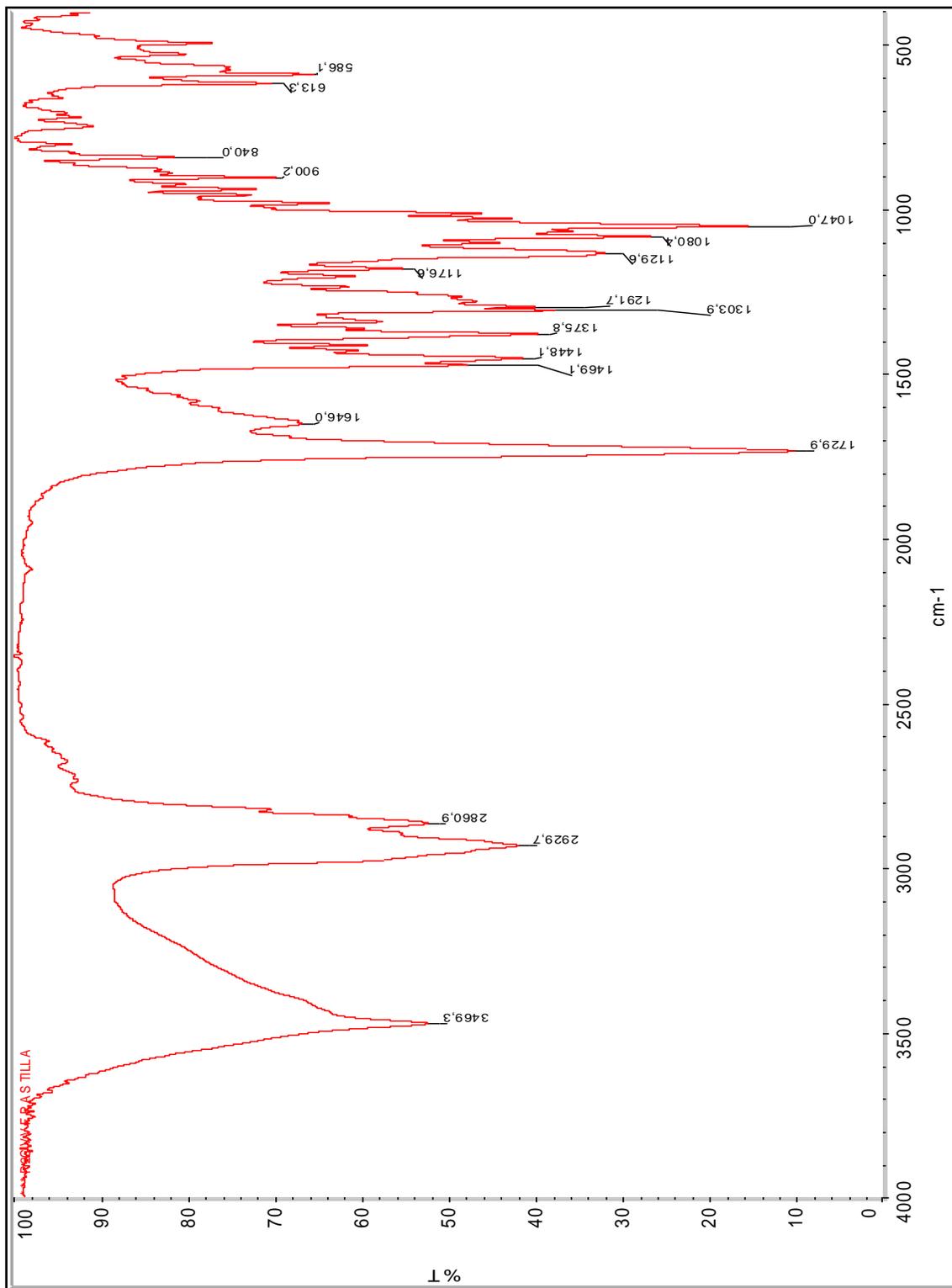
Espectro 1: Epiandrosterona(3 $\beta$ -Hidroxi-5 $\alpha$ -androst-17-ona).

**Espectro 2: Epiandrosterona esterificada con anhídrido succínico.**Ácido 3-(17-oxo-3 $\beta$ -il-5 $\alpha$ -androstan)carbonilpropanoico.

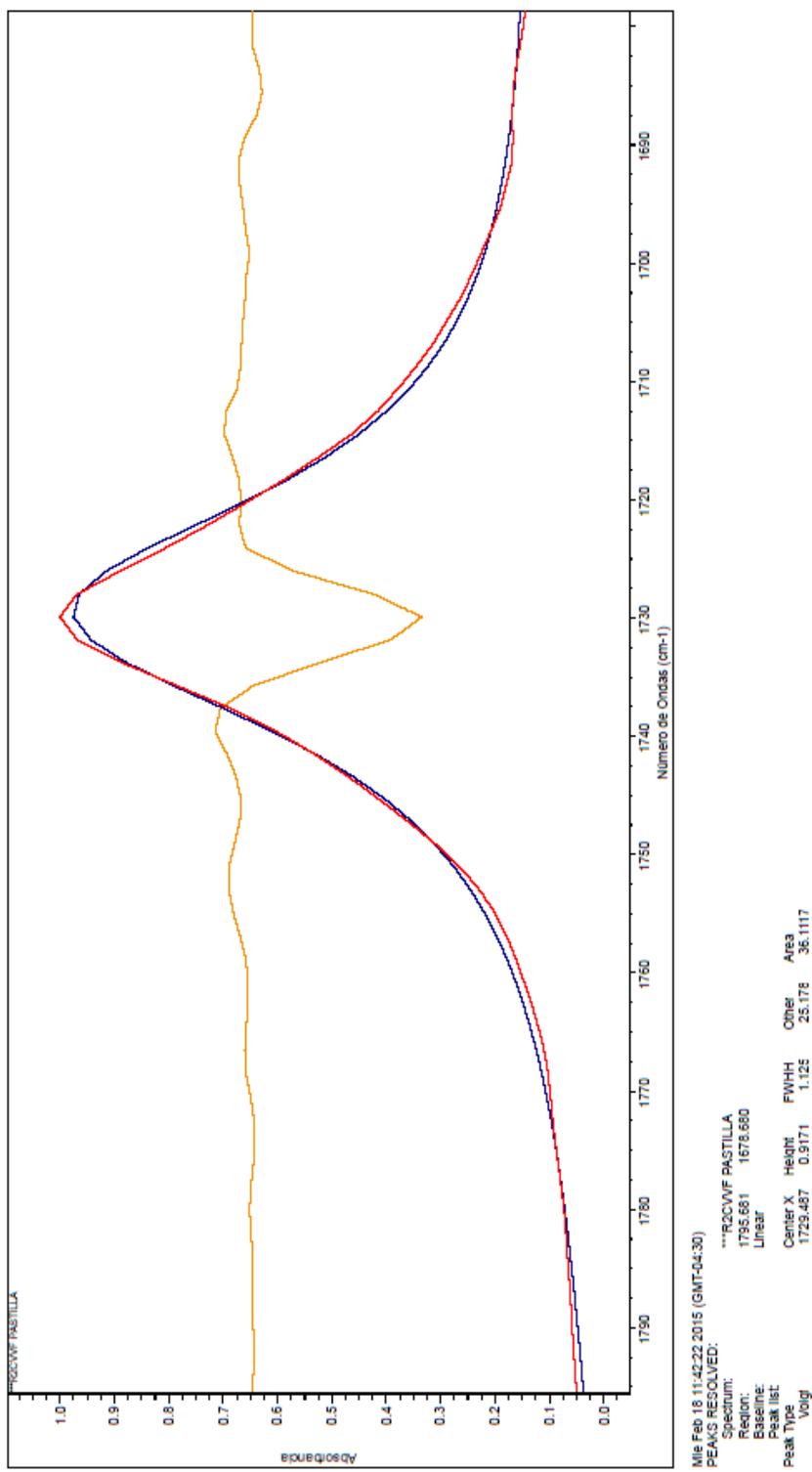
## Deconvolución 1 de la banda correspondiente al enlace C=O



**Espectro 3: Reducción del monoéster succínico de la Epiandrosterona.**  
alcohol3-(17-ol-3 $\beta$ -il-5 $\alpha$ -androstan)carbonilpropanol.

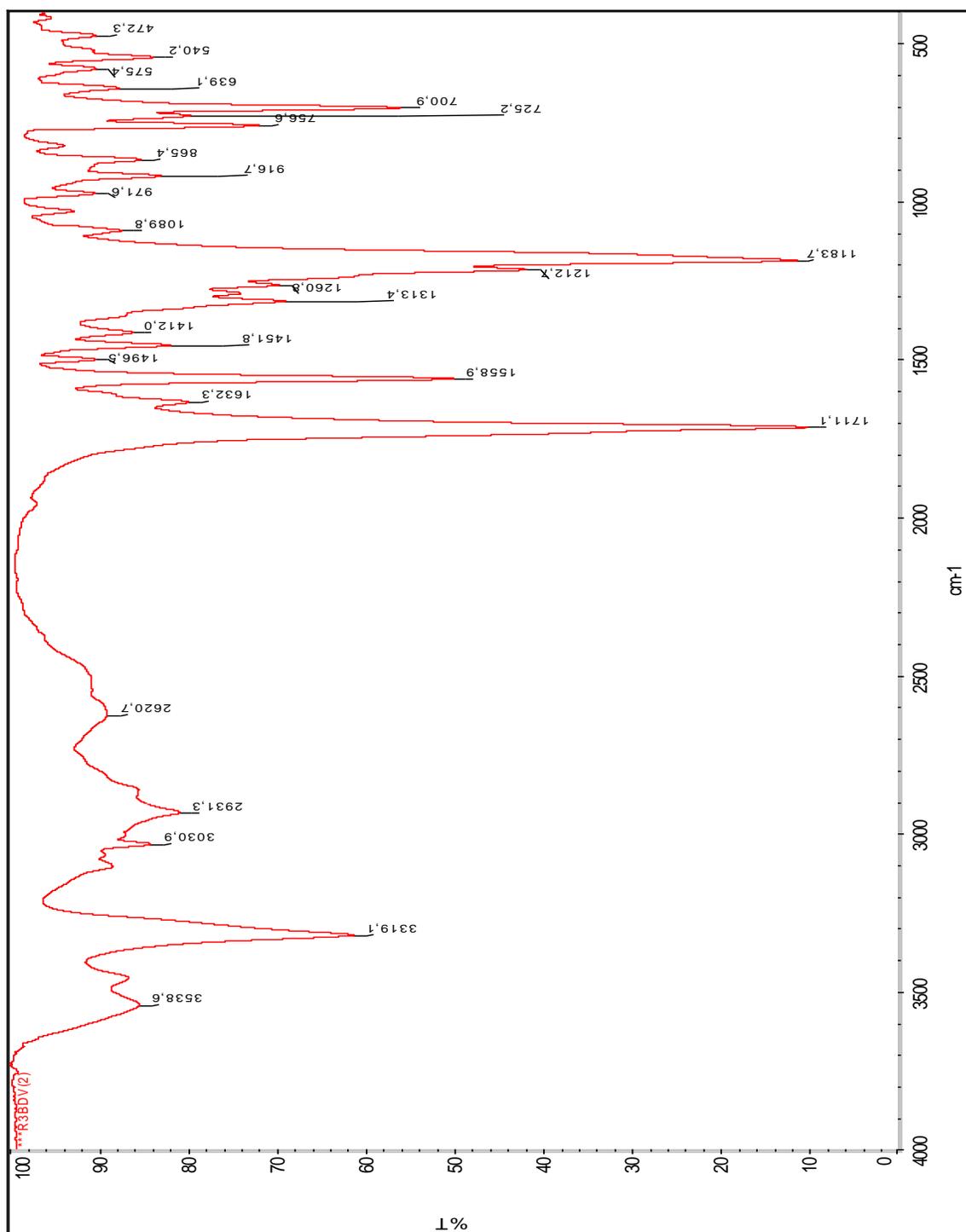


## Deconvolución 2 de la banda correspondiente al enlace C=O

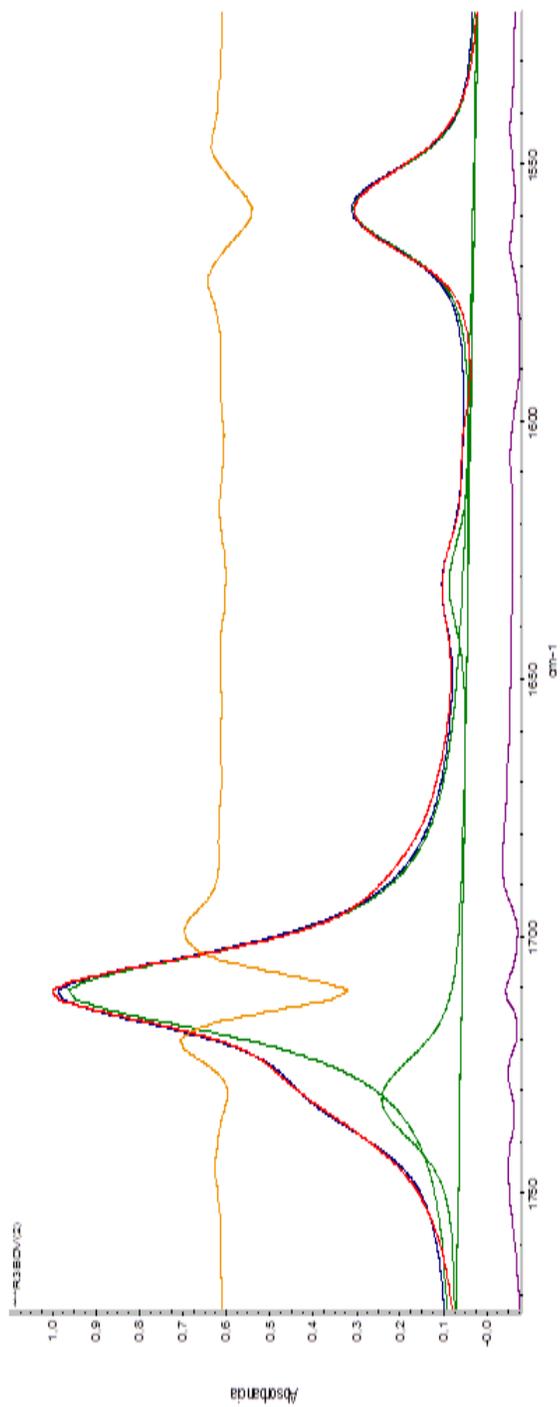


**Espectro 4: Fenilalanina Protegida.**

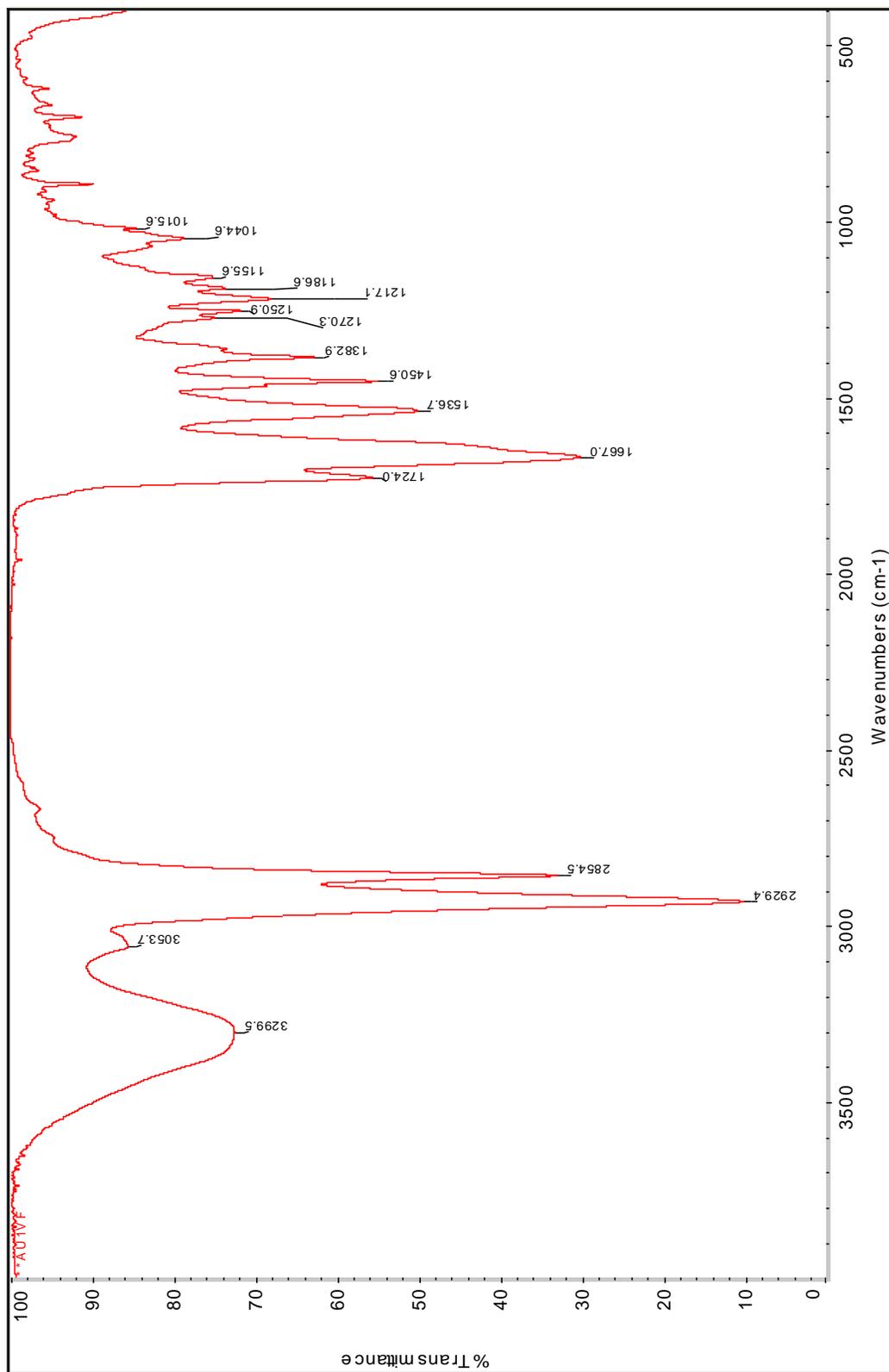
ácido 2-trifluorocarbonilamido-3-fenilpropanoico.



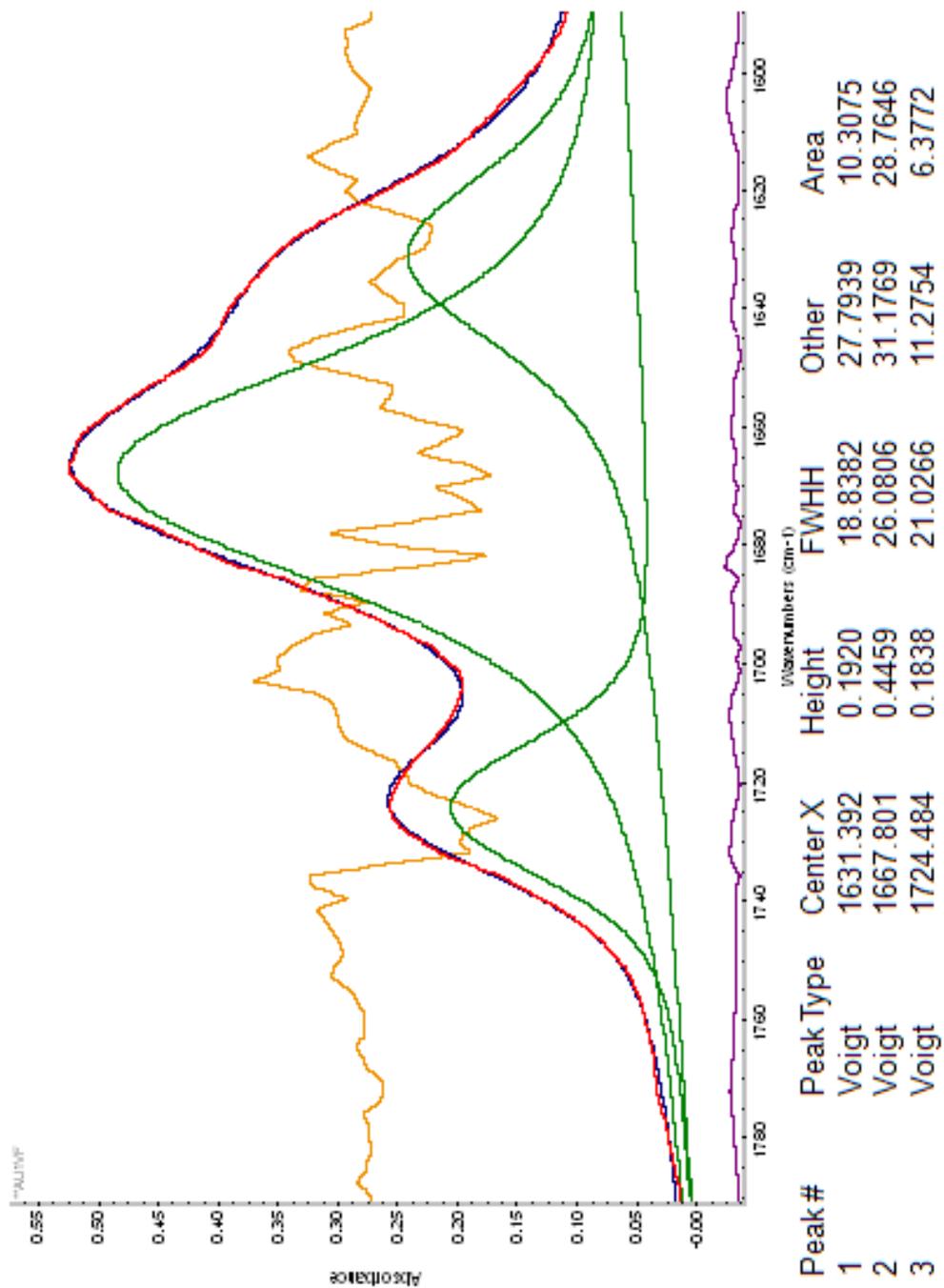
### Deconvolución 3 de la banda correspondiente al enlace C=O



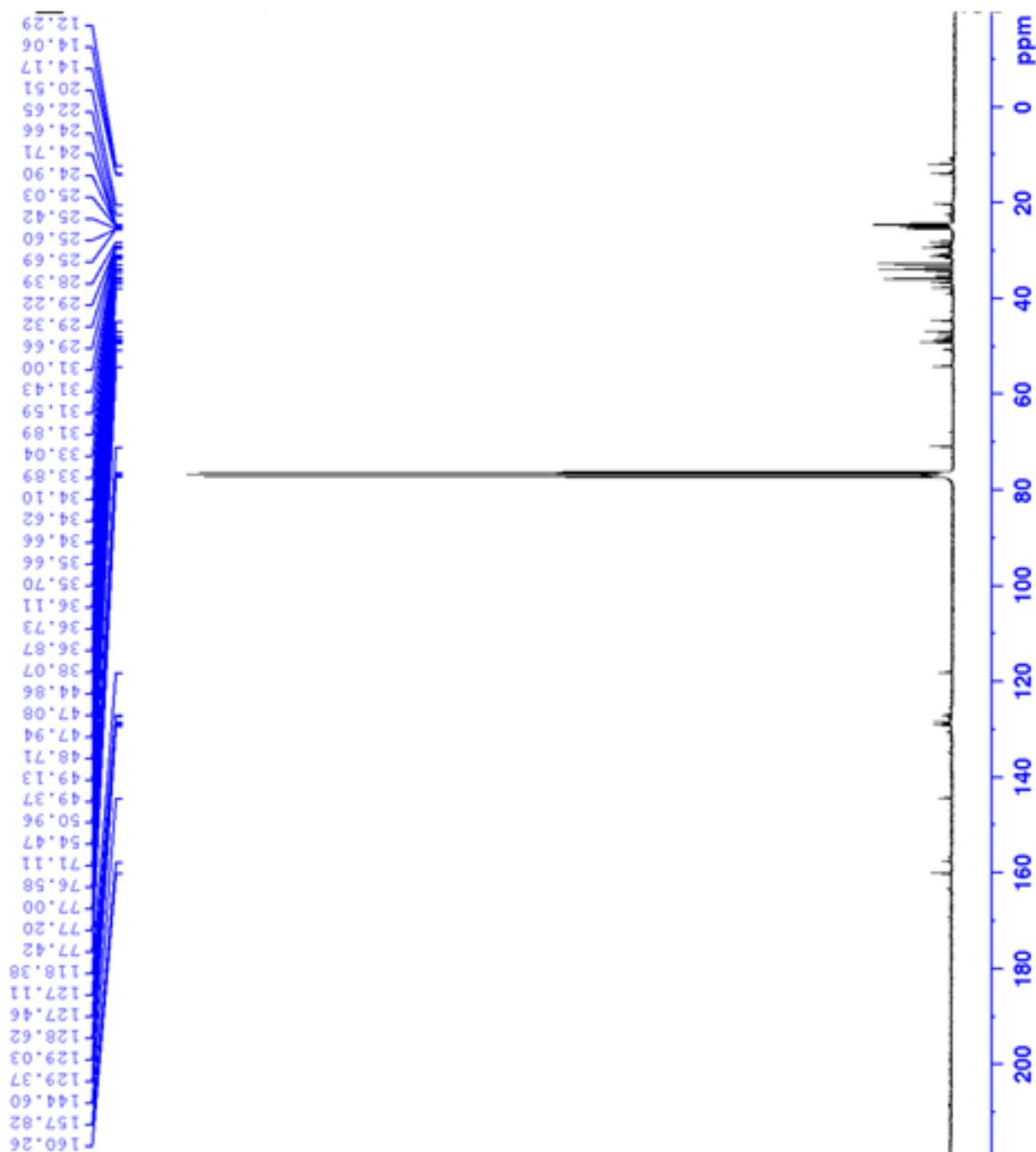
Peak Type	Center X	Height	FWHH	Other	Area
Voigt	1558,534	0,2802	12,9595	10,3102	7,1263
Voigt	1631,434	0,0450	12,2216	12,4020	1,2324
Voigt	1710,987	0,9088	3,5654	19,5829	28,4612
Voigt	1731,708	0,1816	12,3770	12,1803	4,9438

**Espectro 5: Acoplamiento entre el alcohol y la fenilalanina protegida.**

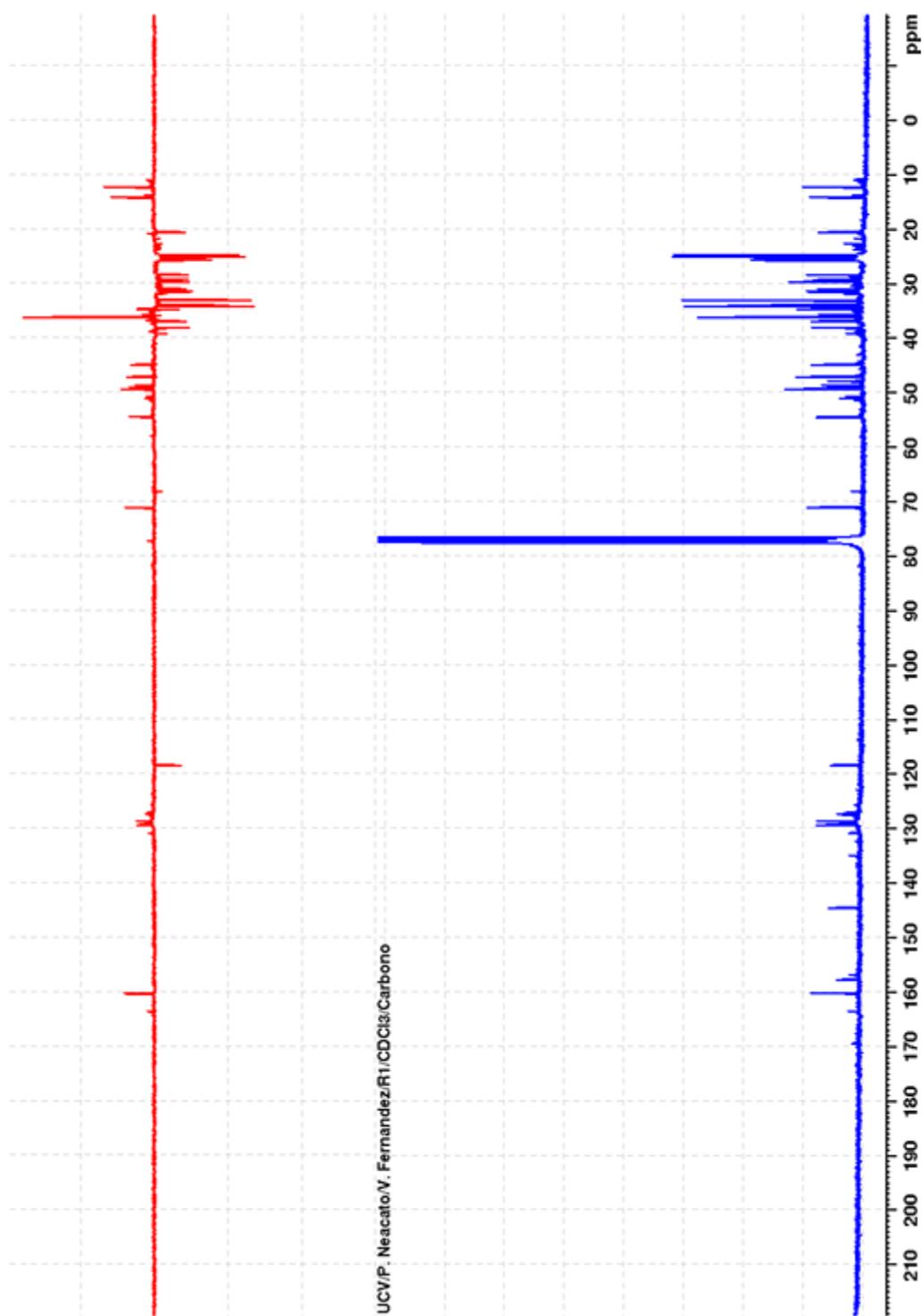
### Deconvolución 4 de la banda correspondiente al enlace C=O



**Espectro 6: RMN 13C del producto del Acoplamiento entre el alcohol y la fenilalanina protegida.**



Espectro 7: DEPT 135 del acoplamiento entre el alcohol y la fenilalanina protegida.



## 10. BIBLIOGRAFIA

- [1]. **Romanutti C. Bruttomeso A. Castilla V. Galagovsky L. Wachsman M.** (2009). Anti-Adenovirus Activity of Epiandrosterone and Dehydroepiandrosterone Derivates. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 56, 158–165.
- [2]. **Dewick. Paul M.** (2002). Medicinal Natural Product. Inglaterra, 167-284, 2<sup>da</sup> Edición.
- [3] **Marcano, D y Hasegawa, M.** (2002) Fitoquímica Orgánica. UCV. Cap. 6 265-374, Cap. 7 375-422. 2<sup>da</sup> Edición.
- [4] **Neacato, Pablo.** (2007) Síntesis de derivados de androstanos como posibles agentes antivirales. Trabajo Especial de Grado, Facultad de Ciencias, UCV.
- [5] **Martínez, M y Avellaneda A.** (2004) Enfermedades Raras, un enfoque práctico. España. 23-271<sup>era</sup> Edición.
- [6] **Gerhard Höfle y Wolfgang Steglich.** (1972) 4-Dialkylaminopyridines as Acylation Catalysts; Acylation of Sterically Hindered Alcohols, *Synthesis*. 11, 619-621.
- [7] **Dae-won Chung† y Young Tai Choi J.** (2007) Synthesis and solubility of hydrophilic derivatives of  $\beta$ -sitosterol. *Eng. Chem.* 13, 3, 367-372.

[8] **Gerhard Höfle, Wolfgang Steglich y Helmut Volbrüggen.** (1978) 4-dialkylaminopyridines as a catalyst highly active acylating. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 17, 569-583

[9] **Ilan Pri-Bara and Jeffrey Schwartz.** (1997) «N,N-Dialkylcarbodiimide synthesis by palladium-catalysed coupling of amines with isocyanides». *Chem. Commun.* 4, 347

[10] **Jiansheng Tang, Thyagarajan Mohan, John G. Verkade** (1994). Selective and Efficient Syntheses of Perhydro-1, 3, 5-triazine-2, 4, 6-triones and Carbodiimides from Isocyanates Using ZP(MeNCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N Catalysts. *J. Org. Chem.* 59, 4931–4938

[11] **B. Neises, W. Steglich** (1990). "Esterification of Carboxylic Acids with Dicyclohexylcarbodiimide/4-Dimethylaminopyridine: Tert-Butyl Ethyl Fumarate". *Org. Synth.; Coll.* 7: 93

[12] **Carey, Francia A.** (2006) *Química Orgánica*. México. 2576<sup>ta</sup> edición.

[13] Diborano. Pag Web: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts181.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts181.html). Consultado el 27 de Mayo de 2013.

[14] **Fried, Edwards.** (1972) *Organic reactions in steroid Chemistry*, Van Nostrand Reinhold company; 1, 103-105,

[15] **Pacheco L. Daniel.** (2001) *Bioquímica estructural y aplicada a la medicina*. Capítulo 3. 1<sup>ra</sup> edición.

[16] **Carlos A. Rius Alonso.** (2008) *Aminoácidos, péptidos y proteínas*. Departamento de química orgánica. Facultad de Química UNAM.

[17] **Donald J. Berry, Charles V. Di Giovanna, Stephanie S. Metrick, and Ramiah Murugan.** (2001) Catalysis by 4-dialkylaminopyridines. *ARKIVOC*, 201-226.

[18] **Monique Calmes, Françoise Escale, Marc Rolland y Jean Martinez;** (2003) Diastereoselective esterification of ( $\pm$ )-N-trifluoroacetyl-pipecolic acid using (S)- $\alpha$ -methylpantolactone: synthesis of (S)-N-Boc-pipecolic acid and (S)-N-Boc-2-piperidinemethanol. *Tetrahedron, Asymmetry* 14.

[19] **Zbigniew P. Kortylewicz, Jessica Nearman y Janina Baranowska-Kortylewicz;** (2009) Radiolabeled 5-Iodo-3 $\beta$ -O-(17 $\beta$ -succinyl-5 $\alpha$ -androstano)-20-deoxyuridine and its 5'-Monophosphate for Imaging and Therapy of Androgen Receptor-Positive Cancers: Synthesis and Biological Evaluation. *J. Med. Chem.* 52, 5124-5143.

[20] **Nida N. Farshori, Mudasir R. Banday, Zeeshan Zahoor y Abdul Rauf,** (2010). DCC/DMAP mediated esterification of hydroxy and non-hydroxy olefinic fatty acids with  $\beta$ -sitosterol: In vitro antimicrobial activity. *Chinese Chemical Letters* 21, 646–650.

[21] **Firdovsi Tataroglu, Sejidov, Yagoub Mansoori, Nadereh Goodarzi;** (2005) Esterification reaction using solid heterogeneous acid catalysts under solvent-less condition. *Journal of molecular catalysis*. 240, 186 – 190.

[22] **H.C. Brown y P.A Tierney.** (1958) The reaction of Lewis acids of boron with sodium hydride and borohydride, *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 1552.

[23] **J.V .Bhaskar Kant y Mariappan Periasamy.** (1991) The reduction of carboxylic acids into alcohols using NaBH<sub>4</sub> Y I<sub>2</sub>, *J. Org. Chem.* 56, 5964-5965.

[24] **H.C. Brown y W. Korytnyk.**(1960) A Study of the Relative Reactivities of Representative Functional Groups Toward Diborano, *J. Amer. Chem. Soc.* 82,3866.

[25] **Brown, H.C.** (1972) Boranes in Organic Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, NY, 232.

[26] **Jabana, Ismenia.** (2012) Esterificación de la Epiandrosterona como intermediario en el acoplamiento de aminoácidos. Trabajo Especial de Grado, Facultad de Ciencias, UCV.

[27] **Paz, Dayana.** (2012) Estudio de catalizadores en reacciones de esterificación de androstanos como intermediarios claves en la incorporación de cadenas laterales. Trabajo Especial de Grado, Facultad de Ciencias, UCV.

[28] **A. I. Koutsourea et al.**(2008) Rational design, synthesis, and in vivo evaluation of the antileukemic activity of six new alkylating steroidal esters. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5207 – 5215.

[29] **JASS, Paul A.** *Use of N-trifluoroacetyl-protected amino acid chlorides in peptide coupling reactions with virtually complete preservation of stereochemistry.* Tetrahedron. Vol. 59. 9019-9029. (2003)

[30] **FREIDINGER y G. Büchi** Trifluoroacetylation of amines and amino acids under neutral, mild conditions: *N-Trifluoroacetanilide and N-Trifluoroacetyl-L-tyrosine.* Organic Syntheses, Coll. Vol. 6, p.1004 (1988).

[31] **ERIN, Elliot. C. Scott Hartley, Jeffrey S. Moore.** *Covalent Ladder Formation Becomes Kinetically Trapped Beyond Four Rungs.* The Royal Society of Chemistry. (2011).