



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
POSTGRADO EN QUIMICA**

***SINTESIS DE PEPTIDOS Y PEPTIDOS ESTEROIDALES  
EN FASE SÓLIDA. ACTIVIDAD BIOLÓGICA***

**Tesis Doctoral presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por el Licenciado Manuel Alfredo Fermin García para optar al Título de Doctor en Ciencias, Mención Química.**

**Tutores: Dr. Gustavo Cabrera y Dra. Morella Rodríguez Ortega.**

**Caracas – Venezuela  
Diciembre del 2013**

## AGRADECIMIENTOS

Primordialmente a DIOS por darme el milagro de la vida, por conducir mi vida por el camino del bien y darme toda la fuerza y perseverancia para poder culminar con éxito esta meta en mi vida y por colocar a los padres más maravillosos del mundo en mi camino.

A mi patria, el país más grandioso del mundo **Venezuela** por darme la oportunidad y la facilidad de estudiar en todo momento en sus instituciones públicas, además de otorgarme una beca durante 4 años para mantenerme durante este largo camino transcurrido.

A las dos personas más maravillosas que DIOS puso en mi vida, mis padres a los cuales agradezco y agradeceré por el resto de mi vida, todo el apoyo y paciencia que tuvieron con mi persona durante este largo periodo de tiempo. Gracias a ustedes dos fue posible culminar mi doctorado, este logro realmente es de ustedes. Definitivamente ambos son los mejores padres del mundo.

A ti Mamá, que inculcaste en mi los mejores valores y sentimientos que me han servido para ser lo que soy hoy en día.

A ti Papá, que siempre conté con tu apoyo, ayuda y paciencia en todos los años de mi doctorado.

A mis Hermanos Namar y Julio que siempre estuvieron pendientes de mis triunfos y fracasos, pero que siempre han creído en mí, este logro también es de ustedes hermanitos. Gracias a su infinito apoyo, esto se ha hecho realidad.

A mis sobrinos Luis, Barbará, Héctor, Julio, Orianna y Valeria por inspirarme a seguir adelante y no desistir al ver sus risas y travesuras.

A mi gran amigo Dr. Luis Borrero y Msc. Yulmaris Zambrano por todos los bellos momentos que compartí, cuando viví con ustedes, para mí fue una experiencia inolvidable, muchísimas gracias por soportarme tanto.

A mi tutor Dr. Gustavo Cabrera por apasionarme en el mundo de la Química Orgánica, con su gran destreza en la docencia y al guiarme durante todos estos años.

A mi tutora Dra. Morella Rodríguez por su extraordinaria risa durante todos estos años y tenerme la paciencia suficiente durante tanto tiempo.

A mi generala de corazón Msc. Zaida Carvajal por ayudarme durante los ensayos biológicos.

Al Dr. Fernando Albericio por aceptarme tan gentilmente en su laboratorio y entrenarme en la síntesis de péptidos en fase sólida.

Al Dr. Eduardo Maffud por aceptarme en su laboratorio y poder culminar con éxito la parte experimental de mi tesis.

.

## RESUMEN

En el presente trabajo se reporta, la síntesis en fase sólida y caracterización por espectrometría de masa de diferentes péptidos. Se modificaron químicamente mediante síntesis en solución y en fase sólida los aminoácidos valina y cisteína, al N-metilar los grupos aminos de los respectivos aminoácidos, asimismo se introdujeron diferentes grupos protectores para poder llevar a cabo, la primera síntesis en fase sólida y caracterización por espectrometría de masa del Biciclo Octadepsipéptido Triostin A, mediante la introducción de un concepto novedoso, la protección basada en la “**restricción de la movilidad conformacional**”. Estas nuevas condiciones permitieron obtener 83 mg del péptido Triostin A crudo con un 51 % de pureza, luego de 12 pasos, usando 6 grupos protectores diferentes (Fmoc, Alloc y Boc para los N<sup>α</sup>-Aminoácidos); Trt para el grupo hidroxilo, Acm para el grupo sulfhídrico de la cisteína y p-alcoxibencil para el carboxilo terminal.

Dos de los péptidos uno de cadena corta (T9-1201) y otro de cadena larga (T9-1202) se anclaron a la molécula 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3-ona (Testosterona), a través de un espaciador de ácido succínico, enlazado al grupo hidroxilo (OH) que se encuentra en la posición 17 de la molécula esteroideal. Se evaluó el efecto citotóxico sobre las células Vero de compuestos Esteroidales y la testosterona modificada, este último evidencio un cambio en la actividad citotóxica incrementando el % de viabilidad celular en un 64% para T9-1201 y en 78 % para T9-1202 a 50 $\mu$ g /mL.

## INDICE

	Pág.
1. Introducción.....	1
1.1 Síntesis Orgánica.....	3
1.2 Síntesis en fase sólida.....	5
1.3 Aminoácidos.....	8
1.4 Péptidos.....	14
1.5 Proteínas.....	21
1.6 Triterpenos.....	24
1.7 Esteroides.....	26
1.8 Péptidos Antibióticos.....	30
1.9 Péptidos Antivirales.....	34
1.10 Compuestos Esteroidales como Antivirales.....	36
2. Objetivos.....	39
2.1 Objetivos Generales.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3. Parte Experimental.....	40
3.1 Consideraciones Generales.....	40
3.2 Síntesis del péptido Nle-Lys-Arg-Arg.....	43
3.3 Síntesis del Péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF.....	44
3.4 Síntesis del Péptido Nle-Arg-Lys.....	46
3.5 Síntesis del Péptido Met-Ala-Phe-Gly.....	47
3.6 Síntesis del Péptido Ala-Val-Phe-Ala-Ile.....	48

## II

3.7	Síntesis del $5\alpha$ -Androstan - $3\beta$ Acetil -17 ona.....	50
3.8	Síntesis del Metil Acrilato. (2-Propenoato de metilo).....	50
3.9	Síntesis del Anhídrido Succínico.....	51
3.10	Síntesis del Ácido $\Delta^4$ -Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico.....	52
3.11	Síntesis del péptido Esteroidal Nle-Lys-Arg-Arg.....	53
3.12	Síntesis del péptido Esteroidal FWFTLIKTQAKQPARYRRF.....	54
3.13	Síntesis del péptido Esteroidal Nle-Arg-Lys.....	55
3.14	Síntesis del aminoácido Alloc-NMe-Valina-OH.....	56
3.15	Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Trt)-OH.....	57
3.16	Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH.....	58
3.17	Síntesis del Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH en Fase Sólida.....	59
3.18	Síntesis del Biciclo Octadepsipéptido Triostin A.....	60
	Ensayos Biológicos.....	65
3.19	Curva de crecimiento de Células Vero.....	65
3.20	Determinación de citotoxicidad.....	66
4.	Resultados y Discusión.....	68
4.1	Síntesis de los Péptidos.....	68
4.1.2	Síntesis del péptido Nle-Lys-Arg-Arg.....	74
4.1.3	Síntesis del Péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF.....	77
4.1.4	Síntesis del Péptido Nle-Arg-Lys.....	81
4.1.5	Síntesis del Péptido Met-Ala-Phe-Gly.....	84
4.1.6	Síntesis del Péptido Ala-Val-Phe-Ala-Ile.....	87
4.2	Síntesis del $5\alpha$ -Androstan - $3\beta$ Acetil -17 ona. Acetilación del Androstano .....	91
4.3	Síntesis del Metil Acrilato. (2-Propenoato de metilo).....	95

### III

4.4	Reacciones Ensayadas.....	97
4.5	Síntesis del Anhídrido Succínico.....	100
4.6	Síntesis del Ácido $\Delta^4$ -Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico.....	102
4.7	Síntesis de los péptidos Esteroidales.....	106
4.8	Síntesis del aminoácido Alloc-NMe-Valina-OH.....	111
4.9	Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Trt)-OH.....	114
4.10	Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH.....	117
4.11	Síntesis del Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH en Fase Sólida.....	118
4.12	Síntesis del Biciclo Octadepsipéptido Triostin A.....	124
4.13	Curva de crecimiento de Células Vero.....	149
4.14	Determinación de citotoxicidad.....	150
5.0	Conclusiones.....	158
6.0	Bibliografía.....	160
7.0	Anexos.....	169

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
Nº		
1	Esquema general de un Soporte sólido utilizado en síntesis en fase sólida....	5
2	$\alpha$ -aminoácido y su imagen especular.....	9
3	Equilibrio zwitterionico de un $\alpha$ -aminoácido.....	9
4	Aminoácidos con grupos R no Polares (hidrófobos).....	11
5	Aminoácidos con grupos R Polares.....	12
6	Aminoácidos con grupos R cargados positivamente (basicos).....	12
7	Aminoácidos con grupos R cargados negativamente (ácidos).....	12
8	Aminoácidos poco frecuentes a) 4-hidroxiprolina (b) norleucina.....	13
9	Patrón de enlace a lo largo de una cadena péptida.....	15
10	(a) estructura de resonancia. (b) equilibrio tautomérica.....	16
11	Rotación en torno al eje del enlace péptidico $\phi$ para el enlace N-C $^{\alpha}$ y $\psi$ para el enlace C $^{\alpha}$ -C.....	16
12	Estructura $\alpha$ -helicoidal para un polipéptido.....	18
13	Estructura $\beta$ -laminar paralela para un polipéptido.....	19
14	Estructura $\beta$ -laminar antiparalela para un polipéptido.....	19
15	(a) proteína fibrosa. (b) proteína globular.....	22
16	Unidad de isopreno.....	24
17	Enumeración de los átomos de carbono en los esteroides.....	27
18	Isómeros <i>trans</i> y <i>cis</i> entre los anillos A-B.....	28
19	Diferentes estructuras esteroidales.....	29
20	Péptidos cíclicos.....	33



21	Péptidos antivirales.....	35
22	Inhibidores péptidicos y no-péptidicos.....	35
23	Dehidroepiandrosterona (DHEA).....	36
24	Androstanos con actividad antiviral.....	37
25	Péptido esteroidal.....	38
26	Sistema Dean-Stark utilizado para la síntesis del metil acrilato.....	51
27	Sistema utilizado para la síntesis del anhídrido succínico.....	51
28	Resina Rink Amida (1) y resina 2-Clorotritilo (2).....	68
29	Mecanismo E1cB para la eliminación del grupo Fmoc.....	69
30	Catálisis básica intramolecular del éster de benzotriazol.....	70
31	Reacción general de un aminoácido con la ninhidrina.....	71
32	Reacciones para la síntesis del péptido Nle-Lys-Arg-Arg.....	76
33	Espectro de Masa del péptido Nle-Lys-Arg-Arg.....	76
34	Reacciones para la síntesis del péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF...	80
35	Espectro de Masa del péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF.....	80
36	Reacciones para la síntesis del péptido Nle-Arg-Lys.....	82
37	Espectro de Masa del péptido Nle-Arg-Lys.....	83
38	Esquema sintético para la síntesis del péptido MAFG.....	85
39	Espectro de Masa del péptido MAFG.....	86
40	Esquema sintético para la síntesis del péptido AVFAI.....	89
41	Espectro de Masa del péptido AVFAI.....	89
42	Reacción de protección para el $5\alpha$ -Androstan- $3\beta$ aceto-17 ona.....	91
43	Espectro de absorción infrarroja del $5\alpha$ -Androstan- $3\beta$ aceto-17 ona	92
44	Enumeración de átomos de carbono en el $5\alpha$ -Androstan- $3\beta$ aceto-17 ona.....	93

45	Reacción de esterificación para el ácido acrílico.....	95
46	Reacción ensayada entre el 5 $\alpha$ – Androstan - 3 $\beta$ aceto -17 ona y el formaldehido.....	97
47	Reacciones ensayadas entre el 5 $\alpha$ – Androstan - 3 $\beta$ aceto -17 ona y el ácido acrílico.....	98
48	Reacciones ensayadas para esterificar el ácido acrílico.....	99
49	Reacciones ensayadas para acilar el ácido acrílico.....	99
50	Deshidratación del ácido succínico.....	100
51	Espectro de masa del anhídrido succínico.....	101
52	Resina de Wang.....	102
53	Hibrido de resonancia del N-Succinilpiridonio.....	102
54	Acoplamiento del succinato a la resina de Wang.....	103
55	Formación de intermediarios de O-Acilisourea y Anhídridos simétricos.	104
56	Formación del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico a través de HOAt..	104
57	Desanclaje del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico.....	105
58	Espectro de masa del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico.....	106
59	Síntesis de los péptidos Esteroidales.....	107
60	Desanclaje de los péptidos esteroidales a la resina.....	108
61	Espectro de Masa del péptido Esteroidal Nle-Lys-Arg-Arg.....	109
62	Espectro de masa del Péptido Esteroidal FWFTLIKTQAKQPARYRRF.	110
63	Espectro de masa del Péptido Esteroidal Nle-Arg-Lys.....	111
64	Desprotección del grupo BOC de la N-Me-Valina.....	112
65	Formación del aminoácido Alloc-N-Me-Valina.....	112
66	Espectro de masa del aminoácido Alloc-N-Me-Valina.....	113
67	Reacción ácido-Base entre Boc-Cisteina-(Trt)-OH y el NaH.....	114

## VII

68	Reacciones de descomposición del NaH.....	115
69	Metilación de la Boc-Cisteina-(Trt)-OH.....	115
70	Espectro de masa del aminoácido Boc-Cisteina-(Trt)-OH.....	116
71	Introducción del grupo Acetamidometil (Acm).....	117
72	Introducción del grupo ter-butoxicarbonilo (Boc).....	118
73	Introducción del aminoácido Fmoc-Cisteina(Acm)-OH.....	119
74	Introducción del grupo 2-Nitrobencensulfonil Cloruro.....	119
75	Mecanismo de reacción de Mitsunobu.....	120
76	Mecanismo de Sustitución Nucleofílica aromática.....	122
77	Formación de la Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH en fase sólida.....	123
78	Desanclaje del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH de la resina 2 -Clorotritilo.....	123
79	Anhídrido de Fmoc-Alanina.....	125
80	Formación del ión N-acetilpiridonio.....	126
81	Acoplamiento de la Fmoc-Alanina a la resina de Wang.....	127
82	Eliminación del grupo Fmoc-Alanina.....	128
83	Bloqueo de una cadena péptida por la formación de un N-terminal guanidino péptido.....	128
84	Formación de la especie activa O-acyluronium.....	129
85	Formación del éster OAt.....	129
86	Aminolisis al éster OAt.....	130
87	Eliminación del grupo Fmoc de la D-Serina(Trt)-OH.....	131
88	Formación de la especie activa acyloxifosfonium.....	131
89	Formación del aza-benzoatriazolyl éster.....	132
90	Aminolisis de la D-Serina(Trt) al aza-benzoatriazolyl éster.....	132

## VIII

91	Eliminación del grupo tritilo de la D-Serina.....	133
92	Acoplamiento del aminoácido Alloc-NMe-Valina-OH.....	133
93	Equilibrio de disociación de ligandos del Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> .....	134
94	Ciclo catalítico de la reacción de alquilación alílica.....	136
95	Eliminación del grupo Alloc de la NMe-Valina-OH.....	136
96	Acoplamiento de la Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH.....	138
97	A) Formación de dicetopiperazinas se encuentra favorecida. B) Movilidad restringida debido a la formación del puente disulfuro intercatenario.....	139
98	Mecanismo de reacción propuesto para la oxidación con yodo.....	140
99	Formación del puente disulfuro intercatenario.....	141
100	Clivaje acidolítico de la resina de Wang y eliminación del grupo Boc de la Cisteina.....	142
101	Macro ciclación doble y obtención del Triostin A en solución.....	143
102	Diferentes representaciones del Biciclo Octadepsipéptido Triostin A....	144
103	Espectro de masa del péptido crudo Triostin A.....	145
104	Dímero Crudo.....	146
105	Triostin A Crudo.....	147
106	Conformero p-Triostin A más polar.....	148
107	Conformero n-Triostin A menos polar.....	148
108	Curva de crecimiento de células Vero a t = 0 h.....	149
109	Curva de crecimiento de células vero a t = 120 h.....	149
110	Reacción del MTT.....	152
111	% Viabilidad vs Concentración de los compuestos T9; T9-1201 y T9-1202.....	157

## INDICE DE TABLAS

Tabla Nº		Pág.
1	Condiciones Cromatográficas empleadas en la purificación de material sintetizado.....	42
2	Valores de las bandas de absorción infrarroja para el compuesto 5 $\alpha$ – Androstan - 3 $\beta$ aceto -17 ona.....	92
3	Valores de los desplazamientos químicos de el compuesto 5 $\alpha$ – Androstan - 3 $\beta$ aceto -17 ona.....	94
4	Desplazamientos químicos de RMN - <sup>1</sup> H del compuesto metil metacrilato.....	96
5	Desplazamientos químicos de RMN – <sup>13</sup> C del compuesto metil metacrilato.....	96
6	Código y molécula de los diferentes androstanos evaluados.....	151
7	% Viabilidad, Desviación Estándar (DS) para cada uno de los compuestos ensayados.....	153
8	Dosis Letal 50 (LD <sub>50</sub> ) de los compuestos evaluados.....	154
9	Código y molécula de los diferentes péptidos esteroidales evaluados..	155
10	% Viabilidad, Desviación Estándar (DS) para los compuestos evaluados.....	156

## INTRODUCCIÓN

En la historia de la química orgánica se manifiesta frecuentemente el gran impulso que ha tenido la síntesis, particularmente aquella dirigida a la construcción de moléculas que existen en la naturaleza, las cuales por su complejidad han sido y siempre serán un reto para los químicos.

La obtención de nuevos compuestos ha sido otro de los logros de la química que comenzó a materializarse a principios del siglo XIX, con la síntesis de la urea lograda por Friederich Wöhler en 1829 a partir de reactivos inorgánicos como el cianato de potasio (KOCN) y el cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Por tal sentido el químico sintético se convierte en un arquitecto molecular, debido a que debe combinar arte y ciencia, esto implica ser imaginativo, tener conocimientos sólidos de química y sobre todo ser muy perseverante.

Basados en esta premisa el investigador Bruce Merrifield en el año 1963 diseñó un método novedoso para sintetizar péptidos, anclando los diferentes aminoácidos a un soporte sólido, teniendo este método como ventaja principal rapidez y simplicidad; en la actualidad esta técnica es ampliamente utilizada para sintetizar péptidos complejos de cualquier tamaño, gracias al desarrollo de nuevas resinas, grupos protectores y agentes acoplantes que hacen al proceso más eficiente y a la vez minimizan las reacciones colaterales.

La utilización racional de diferentes grupos protectores permitió sintetizar el Bicyclo Octadepsipéptido Triostin A cumpliendo con uno de los principios de la actividad sintética, al obtener el producto deseado en el menor número de pasos, con un rendimiento mucho mayor, por la vía más económica, en el menor tiempo posible.

La síntesis química proporciona una herramienta interesante, debido a que se pueden sintetizar péptidos y moléculas orgánicas que actúen o presenten algún tipo de actividad biológica. En el siguiente trabajo se presentan algunos avances sintéticos para la obtención de derivados esteroidales, a los cuales se les enlazó distintas cadenas péptidicas, para evaluar los diferentes efectos que pueden presentar ambas moléculas cuando están enlazadas entre sí y valorar su citotoxicidad.

“Una estructura conocida pero aún no sintetizada es equivalente a una montaña no escalada” Robert Burns Woodward.

## 1.1 SÍNTESIS ORGÁNICA

La síntesis química es una herramienta poderosa, para la obtención de nuevas estructuras moleculares, las cuales se generan a partir de la manipulación de arreglos atómicos y moleculares en una variedad infinita de combinaciones. Dicha síntesis, se fundamenta en la ruptura y formación de enlaces covalentes, entre los átomos, de una forma controlada y precisa. Esta rama de la química, se apoya en las propiedades del enlace covalente y en la capacidad para construir moléculas orgánicas más complejas a partir de sus componentes más sencillos, mediante una serie de procedimientos racionales.

La importancia de la síntesis orgánica en la ciencia moderna es indiscutible, en ella se ha fundamentado el desarrollo de la industria química moderna. De la evolución de esta rama de la ciencia ha dependido la creación de medicinas, plásticos, cosméticos, fertilizantes, detergentes y otros tantos productos sin los cuales la sociedad actual no podría desenvolverse<sup>1</sup>.

A lo largo de los años se ha ido desarrollando un gran número de reacciones químicas, las cuales proporcionan las herramientas para la síntesis. El alcance y las limitaciones de estas reacciones se encuentran constantemente bajo estudio y muchas han sido perfeccionadas con gran destreza. Sin embargo, siguen siendo sólo herramientas de trabajo, de manera que un proyecto sintético únicamente puede llevarse a cabo cuando se diseña una utilización racional, por etapas de tales herramientas, por tal sentido el concepto de síntesis orgánica implica el proceso de llegar a un plan apropiado



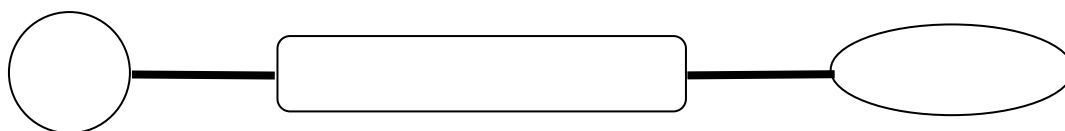
para la interconexión de una serie de reacciones químicas, de modo que se alcance a construir una molécula a partir de otra.

Debemos resaltar que una estrategia de Síntesis Orgánica de cualquier magnitud, implica la utilización del conocimiento y la aplicación de las más modernas técnicas espectroscópicas, para comprobar los diferentes cambios estructurales; el conocimiento de los mecanismos de reacción es imperativo para interpretar las relaciones entre estructura y reactividad en las etapas propuestas; finalmente el conocimiento de la teoría estructural hace posible la evaluación de los resultados en cada cambio particular <sup>2</sup>. El extenso desarrollo de la síntesis orgánica se debe en gran medida a la necesidad de sintetizar productos que la naturaleza nos ofrece en pequeñas proporciones, los cuáles son relativamente escasos en comparación con su alta demanda, pudiendo causar un grave peligro ecológico si son extraídos estos de la naturaleza. Por esto surge la necesidad de diseñar y ensayar diferentes rutas de síntesis de productos para elaborarlos en grandes cantidades. Además de satisfacer la creciente demanda en diferentes productos que reclaman las sociedades modernas en otras áreas como la agricultura, medicina, e industria.

Vale la pena resaltar que el trabajo de síntesis es extremadamente **laborioso** y en ocasiones **frustrante**, pero nunca por ello deja de ser **excitante**; por tal sentido el investigador Ireland R. E expresó que “Una síntesis orgánica, sea cual fuera su magnitud y complejidad es siempre una experiencia total en química orgánica”.

## 1.2 SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA

En el año de 1963 Robert Bruce Merrifield diseñó un método novedoso para la síntesis de péptidos, el cual consiste en unir covalentemente un aminoácido a un polímero sólido, posteriormente adicionar de manera consecutiva (uno a la vez) el resto de los aminoácidos hasta obtener la secuencia deseada <sup>3</sup>, finalmente despegar del soporte sólido el péptido obtenido. Con esta técnica, el producto puede ser filtrado y lavado durante la síntesis, obteniendo altos rendimientos con una elevada pureza <sup>4</sup>. Lo novedoso de este método sintético consiste básicamente en la utilización del soporte sólido el cual generalmente viene acompañado con un espaciador y un grupo funcional como se puede apreciar en la Figura N° 1.



**Soporte sólido**

**Espaciador**

**Grupo Funcional**

**Figura N° 1. Esquema general de un Soporte sólido utilizado en síntesis en fase sólida**

El soporte sólido es la matriz polimérica insoluble, el espaciador es una molécula que mantiene unidos al soporte sólido y al grupo funcional mediante un enlace covalente (el espaciador puede no existir), mientras que el grupo funcional, puede tener las características de un grupo protector o de un grupo reactivo donde se enlaza el aminoácido.

Existen en el mercado muchísimos soportes sólidos disponibles y de gran variedad. La elección del soporte sólido se da por la secuencia péptida a sintetizar y al espaciador más adecuado para la síntesis.

Las resinas que comúnmente se utilizan para la síntesis en fase sólida se basan en un polímero de poliestireno entrecruzado con 1% de divinilbenceno (PS). La distribución de entrecruzamiento se da por tamaños que oscilan de 200-400 mesh (que corresponde a un diámetro aproximado de 38-75 micras) y una sustitución entre 0,5 a 0,8 mmol/g. Estas características garantizan en el polímero buenas propiedades al hincharse o al contraerse en disolventes como DCM y DMF respectivamente, esto ocasiona una buena distribución de los reactivos en toda la zona del polímero, garantizando la accesibilidad de los mismos <sup>5</sup>. Para péptidos de tamaño superior a 25 residuos de aminoácidos o secuencias complejas se requiere un grado de sustitución menor de (0,15-0,3 mmol/g). Resinas a base de poliamida (PA) y polietilenglicol (PEG) son mucho más hidrofílicas que las de Poliestireno (PS), por lo tanto se comportan mejor para secuencias con cierta dificultad <sup>6</sup>.

Cuando Merrifield diseñó la síntesis en fase sólida, se utilizó de manera casi exclusiva para la obtención de péptidos por muchos años, pero en la actualidad, se puede utilizar esta técnica en un gran número de reacciones que conocemos hoy en día, como por ejemplo reacciones Diles-Alder, condensaciones aldólicas, reacción de Ugy, reacción de Wittig, Acilación de Fridel-Crafts por mencionar algunas <sup>7</sup>.

La única diferencia que se necesita para realizar estas reacciones es la resina a utilizar y el reactivo para desanclar el producto de la resina. La síntesis en fase sólida como método sintético presenta ciertas bondades frente a la síntesis en solución como lo son:

- Fácil manipulación y mayor rapidez.
- Evita la purificación de los productos intermediarios
- Se puede utilizar en una gran variedad de reacciones.
- La baja solubilidad de los intermediarios péptido desaparece, durante la síntesis, debido a que el péptido permanece anclado a la resina, hasta que la síntesis haya sido completada

Dentro de las principales limitaciones que presenta la síntesis en fase sólida podemos mencionar las siguientes:

- Adaptar las reacciones en solución a la fase sólida
- El anclaje y desanclaje son adicionales a cualquier síntesis en solución.
- Generalmente se utiliza para preparar cantidades de producto inferior a 100 mg.
- La purificación y aislamiento de varios intermediarios sintéticos es imposible, la caracterización del péptido puede solamente llevarse a cabo al final de la síntesis.

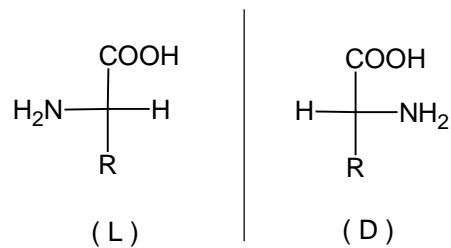
### 1.3 AMINOÁCIDOS

El término aminoácido define a cualquier molécula que contiene un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) y un grupo ácido ( $\text{COOH}$ ), los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés biológico son los denominados  $\alpha$ -aminoácidos, estos tienen el grupo amino y carboxílico unidos al mismo átomo de carbono, llamado carbono alfa ( $\alpha$ ), además de poseer un átomo de hidrógeno y una cadena lateral distintiva denominada grupo R. Otra clase de sustancias con estas características son denominados  $\beta$ -aminoácidos, en los cuales el grupo amino esta unido en el carbono N° 3 de la cadena, es decir en el segundo carbono a continuación del grupo carboxílico .

El carácter único de cada  $\alpha$ -aminoácido se debe a su estructura R, el grupo R puede variar desde un simple átomo de hidrogeno en la glicina (el aminoácido más sencillo) hasta una estructura más compleja, como la guanidina en la arginina. En el caso de la prolina el grupo R forma parte de una estructura amínica secundaria cíclica; por consiguiente la prolina se considera un aminoácido secundario y en ocasiones se le da el nombre de iminoácido.

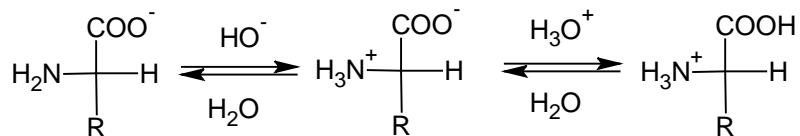
Con excepción de la glicina, el átomo de carbono alfa de los aminoácidos es quiral o asimétrico. Debido a esta disposición, los aminoácidos pueden existir en dos configuraciones estereoisoméricas. Los dos estereoisómeros poseen configuraciones L y D, las cuales representan dos estructuras con imágenes especulares que no se pueden superponer, estas estructuras se denominan enantiómeros <sup>8</sup>.

La importancia biológica de estas configuraciones es que en las proteínas sólo se conoce la existencia de L-aminoácidos. El origen de los D-aminoácidos ha sido objeto de numerosos trabajos, se cree que los L-aminoácidos son sus precursores. La manera de epimerización de C-2 de un aminoácido no está clara todavía, puesto que el nitrógeno del L-aminoácido en el C ( $\alpha$ ) se preserva durante la inversión, por ello se descarta la transaminación como posible ruta<sup>9</sup>.



**Figura N° 2.  $\alpha$ -aminoácido y su imagen especular.**

Quizás la propiedad más prominente de los aminoácidos sea su carácter anfótero. Puede actuar como ácido o como una base. Los aminoácidos existen en realidad en forma de sales internas denominadas especie zwitterionica o ion dipolar; en el que el grupo carboxílico ácido ha transferido su protón al grupo amino básico. Sin embargo en solución acuosa se establece un equilibrio entre esta forma y las formas de anión y catión del aminoácido.



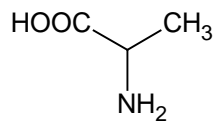
**Figura N° 3. Equilibrio zwitterionico de un  $\alpha$ -aminoácido.**

La posición de equilibrio varía según el aminoácido y según la acidez de la solución. En soluciones fuertemente acídicas, el aminoácido está en gran medida en la forma de catión, mientras en solución fuertemente básica está en gran medida en la forma de anión. La acidez de la solución expresada como pH, a la cual la concentración del ion dipolar es máxima se conoce como el **punto isoeléctrico** del aminoácido y suele designarse como el (pI) del aminoácido. Este punto no suele ser el punto de neutralidad (pH = 7). El punto isoeléctrico depende de la basicidad del grupo amino y de la acidez del grupo carboxílico, que varían con la naturaleza del grupo R, de aquí que sea característico para cada aminoácido <sup>10</sup>.

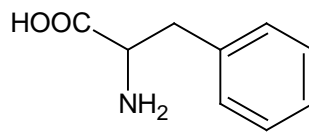
Los seres humanos necesitan ingerir en sus alimentos una cantidad regular de ciertos aminoácidos porque su cuerpo no puede sintetizarlos a partir de otras sustancias. Las consecuencias de la privación continua, de sólo uno o dos de los aminoácidos esenciales pueden comprometer el correcto funcionamiento del organismo en algunos casos pueden ser fatales. Los seres humanos solamente pueden sintetizar 10 aminoácidos, el resto de los aminoácidos denominados aminoácidos esenciales han de ser ingeridos en la dieta alimentaria <sup>8</sup>.

Se han propuesto varios métodos para clasificar los aminoácidos sobre la base de sus grupos R. El más significativo se funda en la polaridad de los grupos R. Existen cuatro clases principales entre las cuales se encuentran: aminoácidos con grupos R no polares o hidrófobos (alanina, fenilalanina, isoleucina, metionina, prolina, triptófano, valina), aminoácidos con grupos R

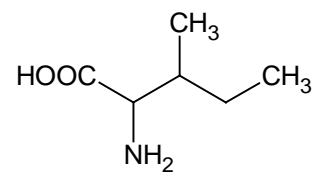
polares sin carga (asparagina, cisteína, glicina, glutamina, serina, tirosina, treonina), aminoácidos con grupos R cargados positivamente (arginina, histidina, lisina) y aminoácidos con grupos R cargados negativamente (ácido aspártico y ácido glutámico)



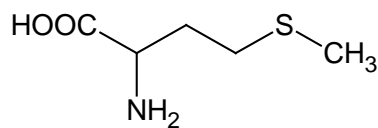
Alanina



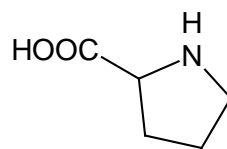
Fenilalanina



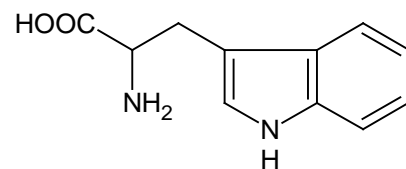
Isoleucina



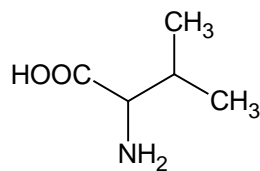
Metionina



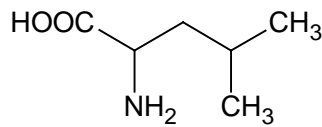
Prolina



Triptofano



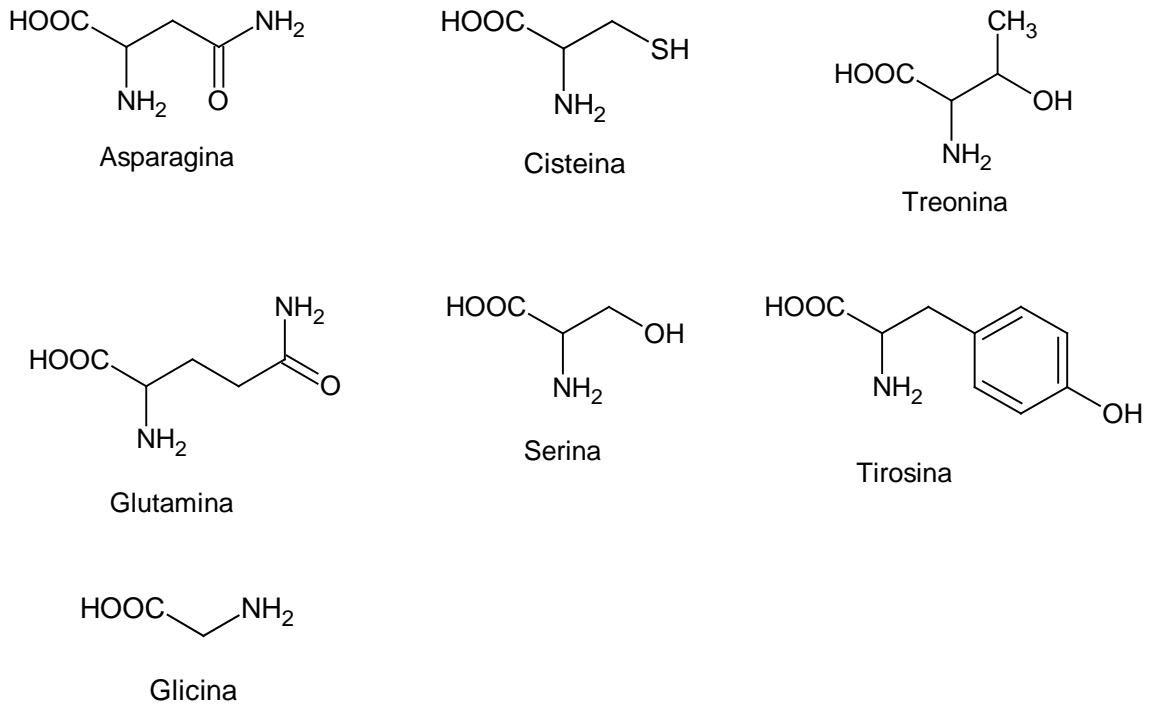
Valina



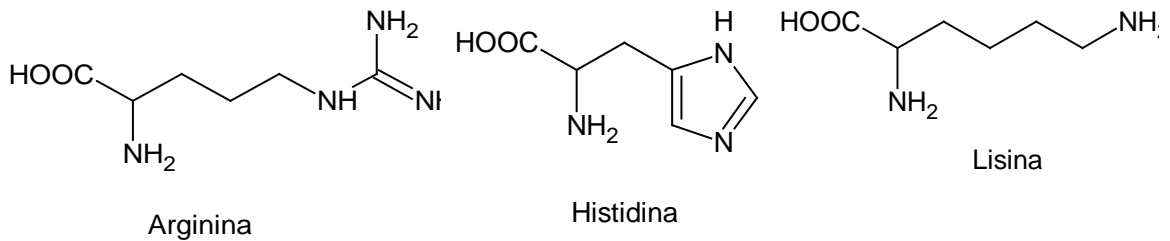
Leucina

**Figura Nº 4. Aminoácidos con grupos R no Polares (hidrófobos)**





**Figura Nº 5. Aminoácidos con grupos R Polares.**

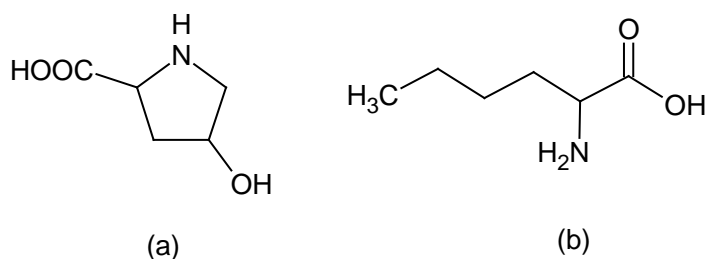


**Figura Nº 6. Aminoácidos con grupos R cargados positivamente (basicos)**



**Figura Nº 7. Aminoácidos con grupos R cargados negativamente (ácidos)**

Se han aislado otros varios aminoácidos poco frecuentes a partir de los hidrolizados de algunos tipos especializados de proteínas, la mayoría derivados de aminoácidos corrientes, entre los cuales se encuentra la 4-hidroxiprolina, derivado de la prolina y la norleucina un derivado de la leucina, sólo por mencionar algunos.



**Figura Nº 8. Aminoácidos poco frecuentes a) 4-hidroxiprolina (b) norleucina**

Además de los 20 aminoácidos corrientes y de varios poco frecuentes, en las proteínas, se conocen unos 150 aminoácidos más que se encuentran en diferentes células y tejidos en forma libre o combinada. Algunos aminoácidos no proteicos, actúan como precursores importantes y/o intermediarios en metabolismos o como agentes químicos para la transmisión de impulsos nerviosos <sup>11</sup>

Tanto las interacciones intermoleculares como intramoleculares entre las funciones ácidas y básicas desempeñan un papel importante en las propiedades físicas y químicas de estos compuestos bifuncionales. Una gran parte del interés depositado en estas moléculas pequeñas se ha dirigido hacia la comprensión de su papel como elementos de construcción de moléculas de mayor tamaño como lo son los péptidos y las proteínas.

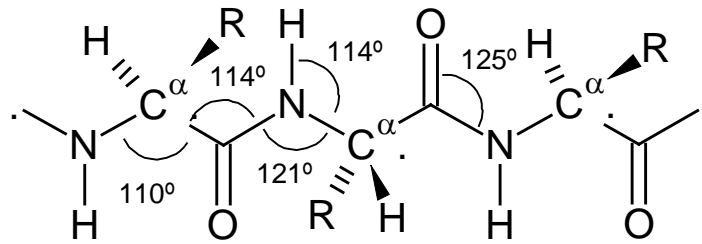
## 1.4 PEPTIDOS

Un aminoácido como tiene un grupo amino y un grupo ácido, es muy apropiado que forme uniones amida. En condiciones adecuadas, el grupo  $\alpha$ -amino de una molécula se condensa con el grupo  $\alpha$ -carboxílico de otra molécula, acompañado por la eliminación de una molécula de agua; el producto que se obtiene es una amida denominada enlace péptido o dipéptido, ya que está formada por dos aminoácidos, por tal sentido a la secuencia de varios aminoácidos enlazados por diferentes uniones amidas se le conoce como péptido.

Un péptido es un polímero de aminoácidos unidos por varios enlaces amidas, a cada unidad de aminoácido del péptido se le denomina residuo. Si el péptido contiene de dos a diez residuos, la sustancia se denomina oligopéptido. A menudo el número de residuos de los oligopéptido se especifica mediante el uso de prefijos griegos como dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, etc. Por lo común a los péptidos de más de diez residuos se conocen como polipéptidos. Aunque existen péptidos cíclicos y ramificados, la mayor parte de ellos consisten en una secuencia lineal de tipo cadena con dos residuos terminales; como el enlace entre residuos sucesivos une los grupos  $\alpha$ -carboxílico y  $\alpha$ -amino de aminoácidos adyacentes, un residuo tendrá un grupo amino libre (N-terminal) y el otro tendrá un grupo carboxílico libre (C-Terminal).

El esqueleto de una cadena polipéptidica consiste generalmente en tres átomos de cada residuo de la cadena; un nitrógeno que forma parte de un enlace péptido, un carbono ( $\alpha$ ) y un carbono que forma parte de otro enlace

péptido., de modo que el patrón N-C<sup>α</sup>-C se repite una y otra vez a lo largo de la cadena. En la figura N° 18 se muestra una representación completamente extendida de este patrón. Los ángulos y longitudes de enlace especificados revelan algunas características importantes del enlace péptido y del esqueleto<sup>8</sup>.



**Figura N° 9. Patrón de enlace a lo largo de una cadena péptida.**

Los cuatro átomos del enlace péptido y los dos átomos de carbono alfa adheridos están en el mismo plano espacial. Los grupos H y R de los carbonos alfa se proyectan hacia fuera del plano. Los dipolos de enlace C=O y N-H están en direcciones opuestas respecto al eje del enlace C-N; esta disposición se llama alineamiento *trans* de los dipolos ya que el átomo de oxígeno tiene una carga parcial negativa ( $\delta^-$ ) y el átomo de nitrógeno tiene una deficiencia parcial de carga positiva ( $\delta^+$ ); además los dos átomos de carbono alfa también tienen alineamiento *trans*. Como consecuencia de la orientación espacial dada la configuración L de cada residuo, los grupos R de cada uno de los átomos de carbono alfa estarán dispuestos de una manera *trans* repetitiva.

La distancia del enlace péptido C-N es de (1,32 Å) es intermedia entre la del enlace covalente doble (1,21 Å) y la del enlace covalente sencillo (1,41 Å). Esto sugiere que el enlace péptido C-N tiene cierto carácter de doble enlace; esta peculiaridad puede explicarse en términos de una estructura de resonancia o una tautomérica <sup>8</sup>.

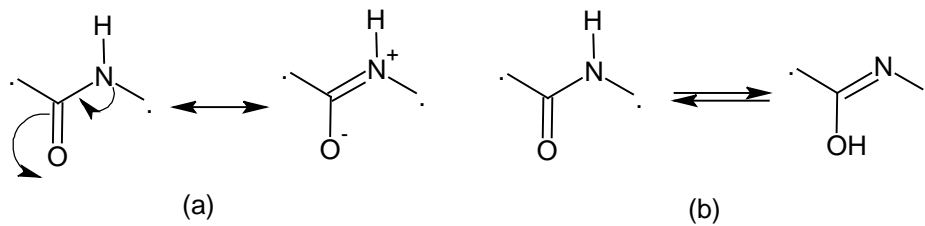


Figura Nº 10. (a) estructura de resonancia. (b) equilibrio tautomérica.

Las cadenas polipeptídicas naturales no permanecen rígidas en la estructura extendida, más bien gracias a una rotación libre alrededor de la mayoría de los enlaces, la cadena puede cambiar con facilidad su orientación. De los tres tipos de enlace que están presentes a lo largo del esqueleto sólo dos exhiben rotación libre:  $C^\alpha-C$  y el  $N-C^\alpha$ . Se utilizan las notaciones  $\phi$  para el enlace  $N-C^\alpha$  y  $\psi$  para el enlace  $C^\alpha-C$  de esta manera se identifican los valores rotacionales específicos de cada enlace.

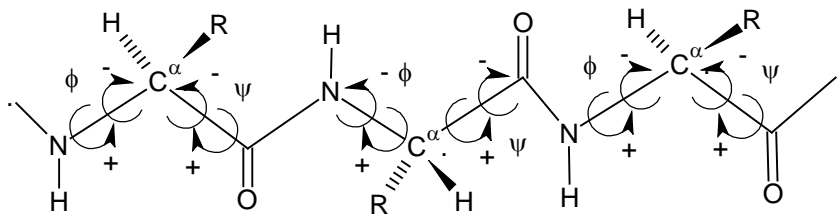


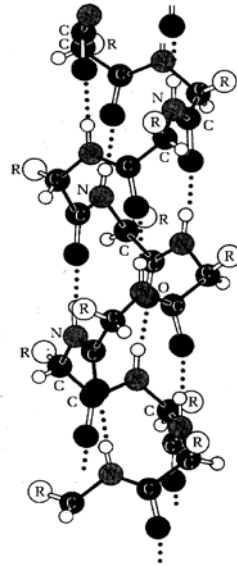
Figura Nº 11. Rotación en torno al eje del enlace péptido  $\phi$  para el enlace  $N-C^\alpha$  y  $\psi$  para el enlace  $C^\alpha-C$ .

En la orientación completamente extendida, los valores  $\phi$  y  $\psi$  se consideran iguales a  $0^\circ$ . Cuando la cadena se ve desde el N-terminal cualquier rotación de menos de  $180^\circ$  en sentido horario recibe el signo positivo y cualquier rotación en sentido antihorario de menos de  $180^\circ$  recibe el signo negativo. El tipo particular de orientación asumido por una cadena polipéptica es resultado del patrón de rotación en torno a los enlaces  $\phi$  y  $\psi$ . En la naturaleza se observan tres tipos principales de orientaciones, conocidas como helicoidales, laminar y aleatoria.

La estructura helicoidal esta formada por aminoácidos L y la orientación helicodal más comun es la alfa-helice-dextrogira, en la que cada  $\phi = -60^\circ$  y cada  $\psi = -57^\circ$ . Esta combinacion especifica de  $\phi$  y  $\psi$ , es especial porque tiene como resultado una disposicion muy estable. La estabilidad obedece a dos razones fundamentales; primero hay poco o ningun apiñamiento de átomos. Segundo, y aún más importante los dipolos C=O y N-H de los enlaces péptidos vecinos tienen orientación óptima (casi coaxial) y eso significa una interacción dipolo-dipolo máxima, lo que produce una trama de puentes de hidrógeno cooperativos intracatenarios (ver figura N° 12)

Las especificaciones características de la geometria  $\alpha$ -helicoidal son las siguientes: la distancia cubierta por cada vuelta es de (5,4 Å), existen 3,6 residuos de aminoácidos por cada vuelta completa (casi 4 enlaces péptidos) y el dipolo N-H está unido por enlaces de hidrógeno al dipo C=O de 4 residuos posteriores. La estructura  $\alpha$ -helicoidal, la presentan algunos péptidos sintéticos

de elevado peso molecular, lo cual indica que se forman espontáneamente, por ende se encuentran en muchos polipéptidos y proteínas de origen natural <sup>12</sup>.



**Figura Nº 12. Estructura  $\alpha$ -helicoidal para un polipéptido.**

Para la estructura lamimar existen dos combinaciones posibles de  $\phi$  y  $\psi$ , que dan origen a estructuras ordenadas no helicodales que se denominan estructuras  $\beta$ -laminares, a pesar de ser distintas a las  $\alpha$ -helices, también adquieren su estabilidad mediante puentes de hidrógeno cooperativos entre los mismos dipolos C=O y N-H. La formación de puentes de hidrógeno en las estructuras laminares pueden ocurrir entre dos o más segmentos diferentes de la misma cadena (lamina intracatenaria) o entre dos o más segmentos de distintas cadenas (lamina intercatenaria). En ambos casos son posibles dos formas laminares, según el alineamiento de las diferentes cadenas o segmentos. Si estos se alinean en la misma dirección de una terminal a otra, la disposición recibe el nombre de  $\beta$ -lamina paralela. Si esta se encuentra en direcciones opuestas, la disposición es una  $\beta$ -lamina antiparalela <sup>8</sup>.

Las estructuras son algo similares, aunque el periodo de repetición es más corto para la conformación paralela (6,5 Å), frente a los (7,0) Å para la antiparalela <sup>11</sup>. Aunque ambas ocurren en la naturaleza, la alineación antiparalela es un poco más estable porque los dipolos C=O y N-H están mejor orientados para una interacción óptima. Si los grupos R son muy voluminosos o poseen cargas, la lamina plegada, no puede existir debido a las interacciones entre los grupos R <sup>11</sup>

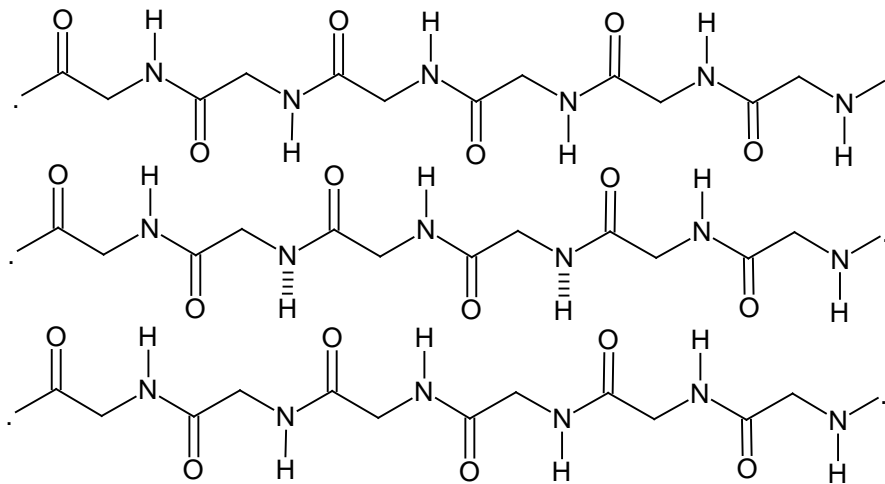


Figura Nº 13. Estructura  $\beta$ -laminar paralela para un polipéptido.

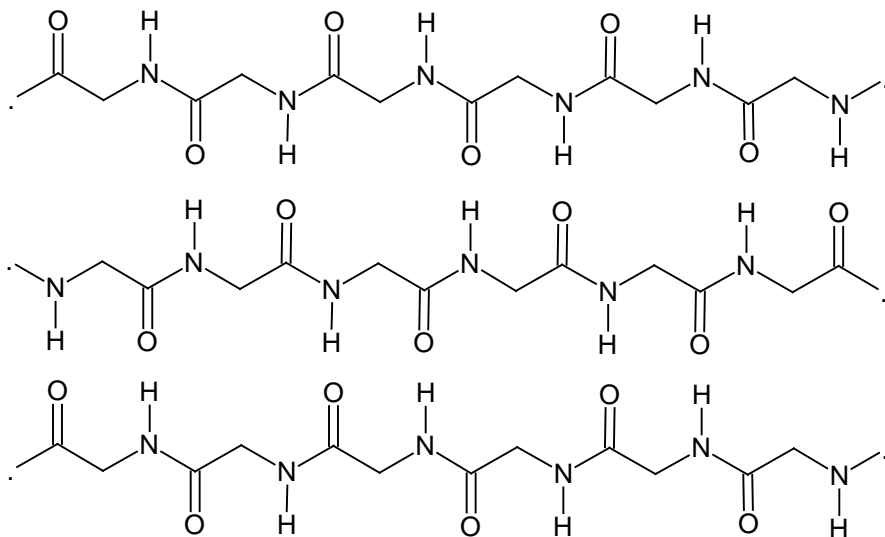


Figura Nº 14. Estructura  $\beta$ -laminar antiparalela para un polipéptido.

**Nota:** Se eliminaron los H y los grupos R del carbono alfa para una mejor visualización.



Cuando un segmento de una cadena polipéptica carece de combinación repetitiva de  $\phi$  y  $\psi$ , la estructura resultante carece de patrón geométrico repetitivo y se dice que es aleatoria. Aunque esta terminología puede parecer confusa, el punto fundamental es que, debido a las interacciones ordenadas en las que intervienen los grupos R, a las limitaciones impuestas por la posible presencia de uno o más puentes de disulfuro y quizás también las interacciones con un cofactor o grupo prostético, se prefiere una disposición aleatoria determinada. Así, dentro del contexto de la conformación natural tan ordenada de un polipeptido, se considera que cualquier segmento no helicoidal o no laminar de la cadena tiene una orientación aleatoria muy ordenada<sup>8</sup>.

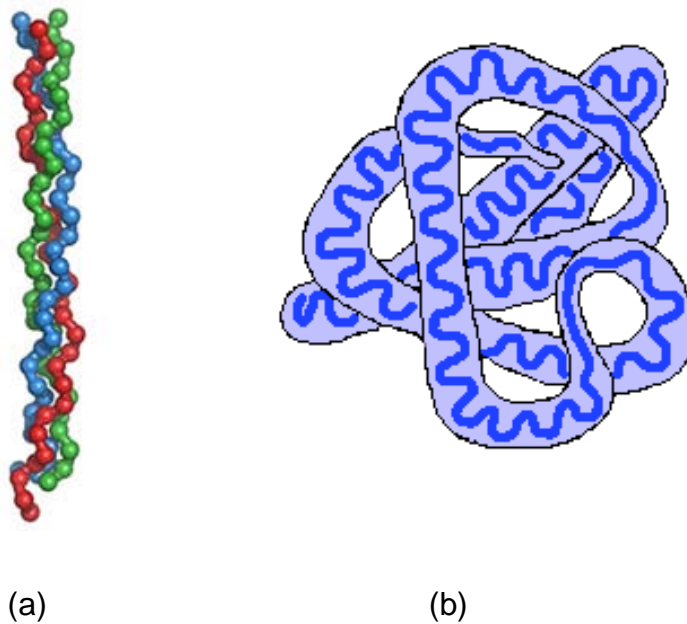
## 1.5 PROTEINAS

Un polipéptido es un péptido que contiene muchos residuos de aminoácidos, pero su masa molecular suele ser inferior de 5000 g/mol, las proteínas contienen muchas unidades de aminoácidos, con masas moleculares comprendidas entre 6000 y 40.000.000 de g/mol <sup>13</sup>. Las proteínas se clasifican como proteínas simples, que por hidrólisis dan sólo  $\alpha$ -aminoácidos y proteínas conjugadas que dan  $\alpha$ -aminoácidos y uno o más grupos de naturaleza no proteica, las proteínas de este último grupo se conocen como grupos prostéticos (del griego *prosthesis*, adición). Las subclases se identifican por el tipo de grupo prostético: glicoproteínas (un carbohidrato), metaloproteínas (un ion metálico), hemoproteínas (un grupo heme), flavoproteínas (una flavina), fosfoproteínas (un fosfato), lipoproteínas (un lípido) y nucleoproteínas (un ácido nucleico). En ocasiones pueden estar presentes dos o más grupos prostéticos idénticos o diferentes <sup>8</sup>

Adicionalmente existen dos categorías cimentadas en las formas y las solubilidades conocidas como proteínas fibrosas y proteínas globulares.

Las proteínas fibrosas tienen formas moleculares muy alargadas, por lo general, varias cadenas polipeptídicas largas están agavilladas o envueltas formando un haz, de modo que integran hilos o filamentos plurimoleculares a lo largo de una sola dimensión; generalmente son insolubles en agua y según la proteína, están caracterizadas por grados altos o bajos de ductilidad, elasticidad, tenacidad y fragilidad, así como por diversas texturas.

Las proteínas globulares tienen una estructura mucho más compacta que las proteínas fibrosas, lo cual se debe a su complejo patrón de dobleces, curvaturas y torcimientos a lo largo de la cadena polipeptídica. El contorno general de estas proteínas va desde estructuras casi esféricas hasta otras con diferentes grados elípticos. En general las proteínas globulares son más solubles que las fibrosas y también son mucho más delicadas, son más abundantes, existiendo en mayor variedad y número<sup>8</sup>



**Figura N° 15. (a) proteína fibrosa. (b) proteína globular.**

Independientemente de que una molécula de proteína sea fibrosa o globular existen cuatro niveles estructurales para cualquier proteína.

La estructura primaria se refiere a la identidad, la cantidad relativa y en última instancia, la secuencia exacta de los aminoácidos presentes en la cadena o cadenas polipeptídicas, junto a cualquier puente disulfuro que pueda existir en la molécula proteica. Si hay algún grupo prostético, también se puede

incluir en este nivel su identidad y su cantidad <sup>8</sup>; por tal sentido esta estructura da a las proteínas su identidad única, un cambio en uno sólo de los aminoácidos puede alterar las características bioquímicas de la proteína <sup>14</sup>.

La estructura secundaria se relaciona con la capacidad del esqueleto de la cadena polipéptica para asumir orientaciones ordenadas y estabilizadas por puentes de hidrogeno cooperativos. Existen, en general dos ordenamientos moleculares de las proteínas gracias a los enlaces de hidrogeno los cuales son el arreglo  $\alpha$ -helicoidal y el arreglo  $\beta$ -laminar (paralelo y antiparalelo).

La estructura terciaria se refiere a la estructura tridimensional completa de la molécula proteínica, incluso la orientación de cualquier grupo prostético asociado con ella. Partes de la proteína pueden tener una estructura  $\alpha$ -helicoidal, mientras que otra parte pueden tener estructura de  $\beta$ -laminar plegada y otras partes pueden tener enrollamientos al azar; la estructura terciaria incluye todas las estructuras secundarias y todos los enrollamientos y pliegues que haya en medio <sup>13</sup>.

La estructura cuaternaria es aplicable a las moléculas proteínicas integradas por dos o más cadenas polipépticas (dímeros, trímeros, tetrámeros, etc) con la estipulación adicional de que el conjunto debe estar unido únicamente por diversas fuerzas intermoleculares de interacción no covalente como (Van der Waals, enlaces de hidrógeno, ion dipolo, etc) entre las cadenas individuales, es decir que exista supramolecularidad entre cada cadena polipéptica.

## 1.6 TRITERPENOS

La denominación terpenos, se asocia a compuestos fragantes de bajo peso molecular, generalmente volátiles que forman parte y son los constituyentes principales de los aceites esenciales, muchos de los cuales son aislados de flores, maderas, hojas, frutos y semillas. Su nombre deriva de la turpentina, un aceite que se obtiene por destilación con arrastre de vapor de la madera, el cual es rico en estas sustancias. En este grupo también existen otras estructuras no volátiles, sólidos cristalinos, como por ejemplo hormonas como la cortisona y la testosterona. En general se reserva el nombre de terpenos a moléculas que solamente tienen H y C, pero la mayoría tienen también oxígeno y otros átomos, a los cuales se les denomina terpenoides<sup>15</sup>.

La gran diversidad estructural de los terpenos dificulta el resumen de las características comunes de estos compuestos, pues no solamente se trata de la variedad en los grupos funcionales, sino también del número de átomos de carbono que conforman los esqueletos. Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) que posee su esqueleto hidrocarbonado, en hemiterpenos (5 carbonos, 1 unidad), monoterpenos (10 carbonos, 2 unidades), sesquiterpenos (15 carbonos, 3 unidades), diterpenos (20 carbonos, 4 unidades), sesterterpenos (25 carbonos, 5 unidades), triterpenos (30 carbonos, 6 unidades) y tetraterpenos (40 carbonos, 8 unidades).

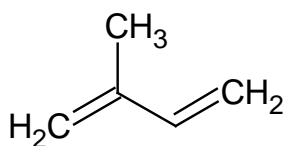


Figura Nº 16. Unidad de isopreno.

Debido a degradaciones o rearrreglos no siempre el número de átomos de carbono es múltiplo de cinco, debido a que se generan secuencias anormales de la unidad de isopreno.

Los triterpenos constituyen el grupo más extenso de terpenoides debido a su gran diversidad estructural y a que se encuentran ampliamente distribuidos tanto en el reino vegetal como en el reino animal en estado libre. Los triterpenos han sido estudiados rigurosamente debido en parte, a su relación con los esteroides, los cuales han llamado poderosamente la atención desde hace tres cuartos de siglos, cuando se conoció que las hormonas sexuales humanas pertenecen a este grupo de compuestos. En las plantas está generalizada su habilidad de sintetizarlos, pero en el reino animal el proceso parece ser más complicado y mucho menos conocido. Por ejemplo los vertebrados sintetizan esteroides a partir de precursores sencillos, pero los insectos sólo pueden acumularlos a partir de los ingeridos en su alimentación<sup>9</sup>.

Los triterpenos se pueden encontrar también en la naturaleza asociados con azúcares o aminoácidos. Aunque la tendencia actual es la de determinar su posible aplicación desde el punto de vista biológico<sup>16,17</sup>, hasta hace poco no habían sido objeto de mucho interés. Sin embargo, debido a su amplia distribución en el reino vegetal es razonable pensar en su interrelación con la vida de las plantas, pero tal como ocurre con otros metabolitos secundarios, sólo se dispone de conjeturas generales. A pesar de su amplia variedad estructural, los triterpenos se originan bajo sistemas muy parecidos, por lo menos en la etapa inicial de su bioformación, el escualeno, aislado por primera

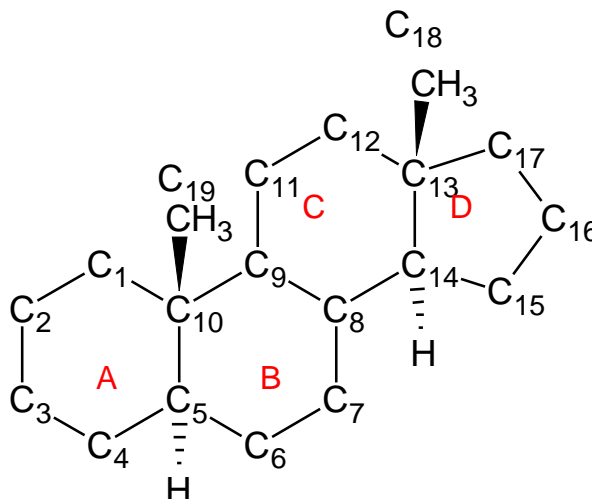
vez del aceite del hígado de tiburón, es el precursor común de todos los triterpenos<sup>9</sup>

## 1.7 ESTEROIDES

Los esteroides son moléculas policíclicas complejas que se encuentran en todas las plantas y animales. Están clasificadas como lípidos simples ya que no experimentan hidrólisis, como las grasas, aceites y ceras. La familia de los esteroides incluye a una gran variedad de compuestos: las hormonas, los emulsionantes y muchos componentes de las membranas. Los esteroides son compuestos cuyas estructuras están basadas en el anillo tetracíclico conocido como esterol, los cuales por degradación producen los esteroides<sup>13</sup>.

Los esteroides son derivados del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano (Figura N° 17), compuesto de carbonos e hidrógenos, formando cuatro anillos (tres hexagonales y uno pentagonal), teniendo diecinueve átomos de carbono. Los sustituyentes se indican como  $\alpha$  debajo del plano de los anillos, en líneas punteadas y  $\beta$  arriba del plano de los anillos en líneas gruesas<sup>18</sup>. El prefijo per se usa para indicar que la molécula está totalmente sustituida por un determinado átomo o grupo de átomos, así que el término perhidro indica hidrogenación total del sistema<sup>15</sup>. En los esteroides ésta estructura básica se ve modificada por la adición de diversos grupos funcionales como carbonilos e hidroxilos o cadenas carbonadas.

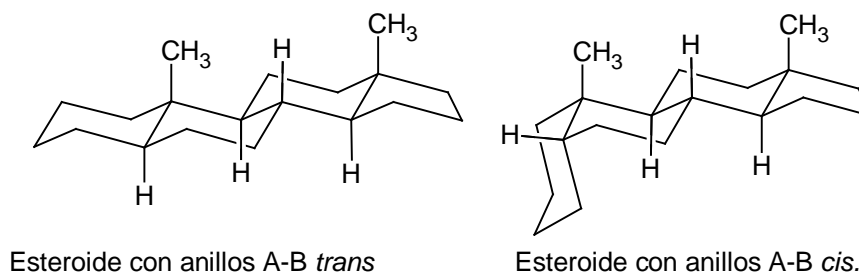
A los cuatro anillos se les designa como A, B, C y D, comenzando por el anillo inferior izquierdo. Los átomos de carbono se enumeran a partir del anillo A y terminando por los grupos metilos axiales.



**Figura N° 17. Enumeración de los átomos de carbono en los esteroides**

Cada una de las uniones de los anillos son *trans* en la estructura de la mayoría de los esteroides, lo que le da lugar a una molécula rígida, casi plana, con los dos grupos metilos axiales perpendiculares al plano. En algunos esteroides, la unión entre los anillos A y B es *cis*, lo que requiere que el anillo se doble hacia abajo por debajo del resto del sistema anular. Las uniones de los anillo B-C y C-D son casi siempre *trans* en los esteroides naturales <sup>13</sup>. También pueden existir 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 insaturaciones en las posiciones  $\Delta^4$  y  $\Delta^{5,18}$ .





**Figura N° 18. Isómeros *trans* y *cis* entre los anillos A-B**

Las hormonas más importantes de los mamíferos son las adrenocorticales y las sexuales. Cada una de ellas tiene su historia en cuanto a su descubrimiento, aislamiento, elucidación estructural y síntesis. La baja proporción de estos compuestos ha dificultado tremendamente su obtención y ha incentivado de manera exhaustiva su estudio, su síntesis<sup>19</sup> y la producción de análogos artificiales a escala comercial.

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 vivos, otros esteroides pueden utilizarse como base para modificaciones sintéticas<sup>20</sup>. El empleo de materiales de partida de origen natural, disminuye el inconveniente de reproducir la estereoquímica estructural

En vista de la complejidad de la química de los esteroides y del gran número de compuestos en el grupo, sólo señalaremos algunos representantes de este tipo de moléculas <sup>10</sup>.

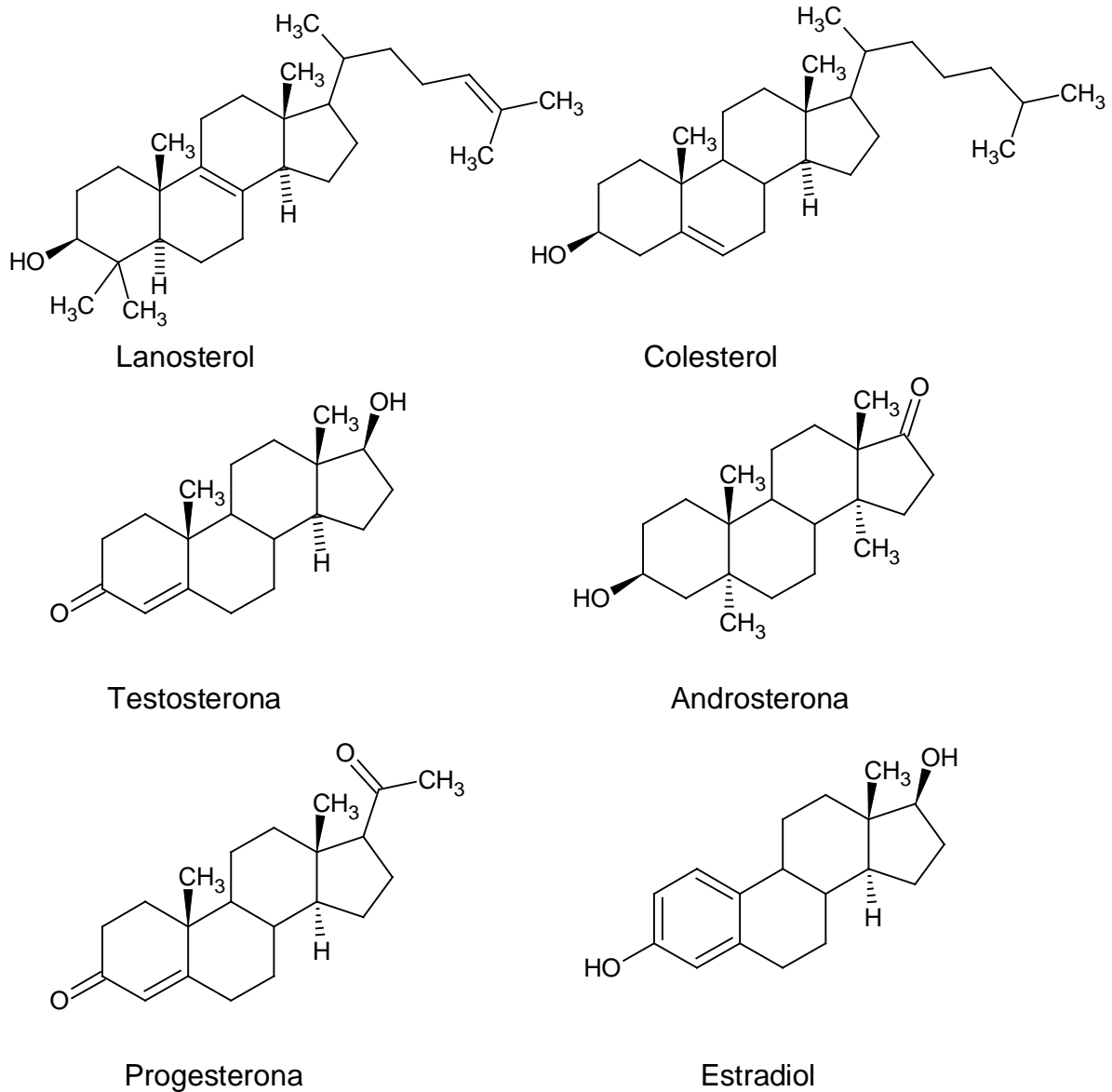


Figura N° 19. Diferentes estructuras esteroidales

## 1.8 PEPTIDOS ANTIBIOTICOS

Desde que en 1980 el grupo del Dr. Hans G. Boman en Suecia, demostró la presencia de péptidos antibióticos en insectos, se han publicado una variedad de artículos relacionados <sup>21</sup>. Desde entonces se han encontrado numerosos péptidos en diferentes especies y se sabe que tanto plantas como animales comparten un mecanismo de defensa efectivo frente a los patógenos invasores. Se han descrito tanto en insectos, como en crustáceos, anfibios, mamíferos y plantas, además de bacterias, hongos y virus. En determinadas circunstancias, ante un proceso inflamatorio o infeccioso, aumenta la presencia de péptidos antibióticos en diferentes animales y también en los humanos. Los péptidos producidos por células eucarióticas pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral o antitumoral.

La mayoría de los péptidos antibióticos descritos, comparten cierto carácter catiónico que favorece su interacción con las membranas celulares, pero difieren en cuanto a la secuencia, estructura secundaria o terciaria, estructura genética y la localización y función dentro del organismo <sup>21</sup>.

Un importante grupo de péptidos lo constituyen moléculas lineales, carentes de puentes disulfuro. Entre éstos, algunos son propensos a formar una  $\alpha$ -hélice; han sido los más estudiados y los que están más definidos estructuralmente. El resto de los péptidos estudiados son antibióticos de estructura cíclica, que contienen cisteína y forman uno o varios puentes disulfuro intramoleculares. Dentro del grupo de los péptidos con estructura cíclica con puentes disulfuro cabe destacar la diversa familia del Triostin <sup>22</sup>.

Algunos péptidos pueden no tener actividad sobre las bacterias, pero presentan efecto sinérgico significativo cuando se asocian con antibióticos hidrofóbicos y anfipáticos<sup>23</sup>.

El principal mecanismo de acción de la mayoría de los péptidos antibióticos consiste en el aumento de la permeabilidad de la membrana<sup>24</sup>. En general, los péptidos tienen en común la hidrofiliidad y las cargas positivas que les permiten presentar un mecanismo de acción similar. Este mecanismo de acción se puede producir en dos etapas: en primer lugar, la unión del péptido a la bicapa lipídica mediante una interacción electrostática, y posteriormente la formación del poro<sup>21</sup>. En algunos casos se produce una translocación del péptido, que se encuentra en la capa externa de la bicapa lipídica, a la capa interna de la bicapa, con lo que consigue penetrar dentro de la célula. Una vez atravesada la membrana externa puede actuar sobre la membrana citoplásmica, que es el objetivo principal.

Hay algunos ejemplos de péptidos aniónicos y parecen ser menos activos que los catiónicos y con diferente mecanismo de acción. Otros péptidos ricos en histidina tienen una carga neta dependiente del pH.

Existen péptidos como la cecropina B, que cuando se añade a concentraciones subinhibitorias a diferentes antibióticos se observa un aumento en la actividad de los fármacos. Posiblemente, sean mucho más activos cuando se les añade cecropina B, porque aumenta la permeabilidad de la membrana externa<sup>25</sup>.

A continuación se presenta las diferentes secuencias que tienen algunos péptidos con estructura de  $\alpha$  – hélice, que presentan actividad antibiótica:

Cecropin A: GWKWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVVGGQATQIAKCONH<sub>2</sub>

Cecropin IA: GWKIGKKIERVGGQHTRDATIQGLGIAQQAANVAATAR

Cecropin B: KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL

Magainin-1: GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS

Parasin: KGRGKQGGKVRKAKTRSS

Indolicidin: ILPWKWPWWPWR

Se ha encontrado que muchas bacterias son susceptibles al ataque de péptidos; algunos de estos péptidos tienen en su estructura aminoácidos no esenciales y otros con estereoquímica absoluta D, en ocasiones pueden tener una cadena de ácido graso enlazada a un aminoácido. Una de las consecuencias de esta inusual arquitectura es que los péptidos no son metabolizados con facilidad; estas moléculas usualmente son solubles en agua y son altamente letales, debido a que se pueden anclar a la membrana de la célula e interferir con su integridad afectando la permeabilidad, de modo que los metabolitos esenciales se escapan hacia fuera, impidiendo la entrada de sustancias hacia el interior de la célula<sup>26</sup>. Otra explicación a su alta eficiencia como antibiótico, se debe a que la estructura cíclica permite mantener en solución la conformación y la geometría molecular, esta conformación está determinada por las asociaciones lipofílicas entre las cadenas no polares de los aminoácidos y por los puentes de hidrógeno de la unión peptídica, formando una topografía particular<sup>9</sup>.

Entre los péptidos antibióticos de estructura cíclica, encontramos la familia del Triostin A <sup>22</sup>, aplidine <sup>27</sup> y el fusaricidin A <sup>28</sup> por mencionar algunos (ver figura N° 20). Todos ellos presentan actividad antibiotica a pesar de tener diferencias estructurales significativas como la presencia del puente disulfuro en el Triostin A o la extensa cadena de metilenos en el fusaricidin A.

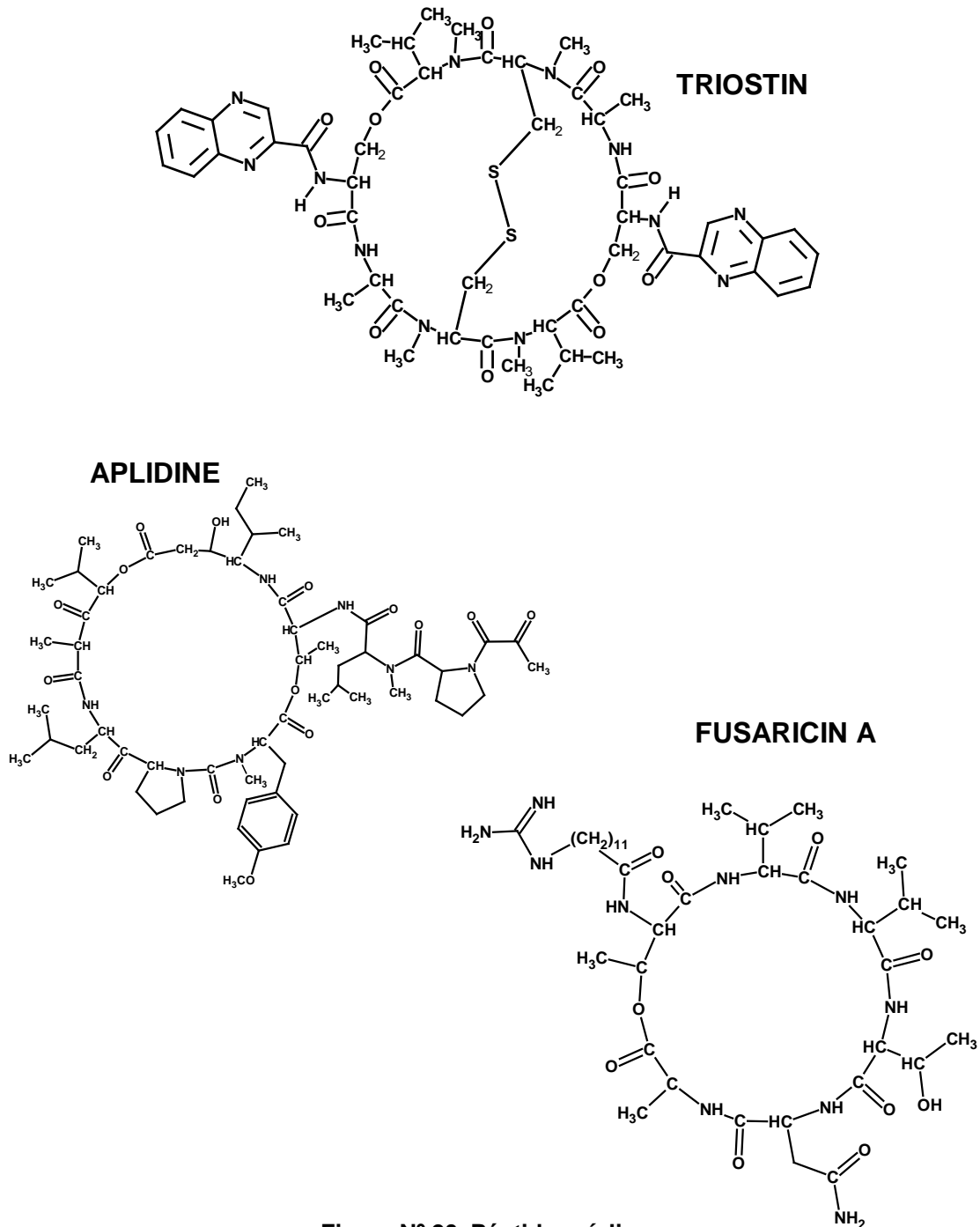


Figura N° 20. Péptidos cíclicos.

## 1.9 PEPTIDOS ANTIVIRALES

En los últimos 50 años se ha desarrollado un gran número de fármacos con actividad terapéutica contra bacterias, hongos y parásitos. El desarrollo de sustancias antivirales ha sido más lento y en la actualidad se dispone de un número creciente, pero todavía limitado de antivirales efectivos en el mercado. Los virus son parásitos intracelulares estrictos y pueden replicarse sólo cuando infectan células, apropiándose de su maquinaria metabólica para producir nuevas partículas virales. Debido a que su ciclo replicativo está íntimamente relacionado con el de la célula que infecta, es difícil afectar la replicación viral sin alterar las funciones celulares. Por ello es necesario encontrar blancos vulnerables particulares de la replicación viral que permitan un ataque selectivo a las proteínas virales. Además hay que considerar que los resultados que se obtienen *in vitro*, no necesariamente se reproducen *in vivo*.

Los avances en el conocimiento del ciclo replicativo de diferentes virus ha permitido definir etapas específicas del ciclo de multiplicación viral, posibilitando el desarrollo de inhibidores selectivos de estas etapas. Los ensayos en el laboratorio, y posteriormente las pruebas clínicas, han confirmado la utilidad de algunos antivirales en el tratamiento de algunas patologías<sup>29,30</sup>.

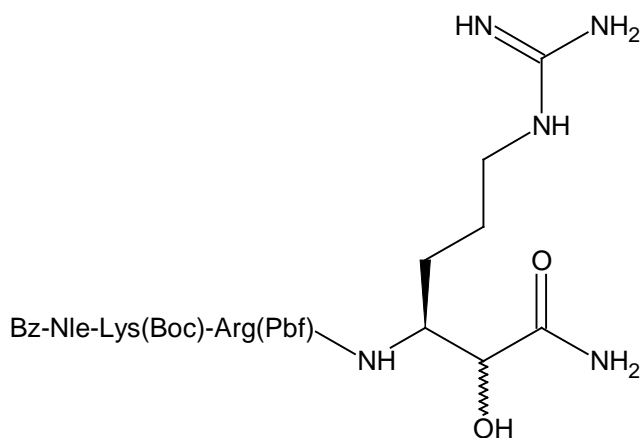
Estos nuevos compuestos han permitido el tratamiento de enfermedades, como la encefalitis, en las cuales, el uso de péptidos sintéticos ha sido capaz de reducir notablemente el porcentaje de mortalidad en ratones, Figura N° 21

DVGCAVDTERMELRCGEG  
 ETLGALASAIKETFEEGTC  
 DKLDPTDYRGGIPSLLKKGKDI  
 RGGIPSLLKKGKDIKV  
 SMIWSVPEAPRLFMVGT

**Figura N° 21. Péptidos antivirales.**

Se han reportado muchísimos péptidos de cadena  $\alpha$ -helicoidal de diferentes tamaños y con secuencias diferentes <sup>29,30,32-35</sup>, así como péptidos con secuencias más pequeñas, enlazados a una molécula no péptidica, los cuales son altamente efectivos contra el virus del dengue <sup>30</sup> y fiebre amarilla <sup>36</sup> respectivamente.

LDFELIKTEAKQPATLRKYC  
 FWFTLIKQAKQPARYRRF  
 QQCFRFPALRKKATYTRFWI  
 NCDVIALLLCHLNT  
 Nle-Arg-Lys  
 Nle-Lys-Arg-Arg



Péptidos inhibidores

Péptido enlazado a un inhibidor no péptidico

**Figura N° 22. Inhibidores péptidicos y no-péptidicos**



Las características que debe cumplir un antiviral para ser utilizados son: Alta especificidad, baja toxicidad, buena solubilidad, buena biodisponibilidad oral, no tener acción mutagénica, teratogénica o carcinogénica, de fácil dosificación y bajo costo.

### 1.10 COMPUESTOS ESTEROIDALES COMO ANTIVIRALES

Existen otro tipo de moléculas con naturaleza y características químicas muy diferente al de los péptidos, que presentan una excelente actividad frente a los virus como los son los compuestos esteroideos. Estos compuestos son moléculas derivadas del colesterol y son sintetizados por el organismo a nivel de la corteza de las glándulas suprarrenales.

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 proponen que la dehidroepiandrosterona (DHEA) (Figura N° 23) actúa en el ciclo de replicación de virus de la encefalitis japonesa, por otro lado se plantean acciones que no afectan al virus como tal si no al sistema inmune mejorando la respuesta de los anticuerpos <sup>37</sup>.

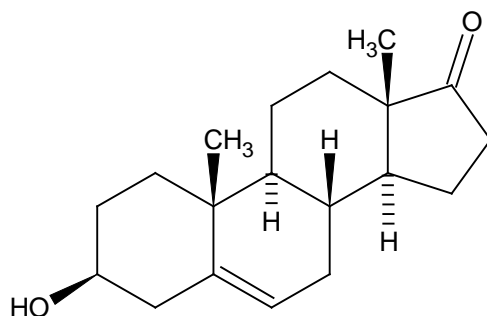
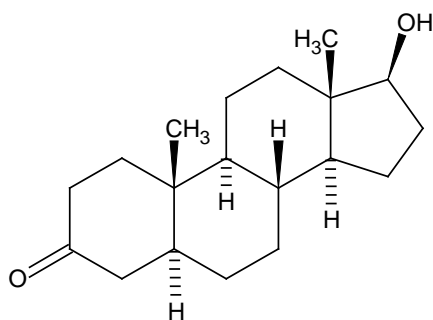


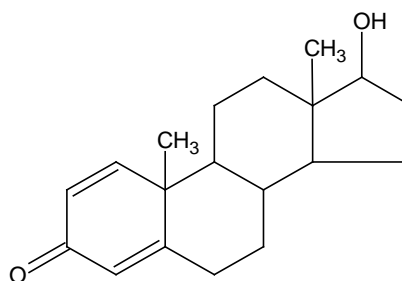
Figura N° 23. Dehidroepiandrosterona (DHEA)

En la actualidad existen numerosos estudios referidos a este tema, pero hasta ahora, no se han podido dilucidar los mecanismos de acción que expliquen el efecto antiviral de los esteroides, encontrándose actualmente en proceso de estudio.

En trabajos recientes se encontró que el colesterol y sus derivados androstanos inhiben la replicación del virus del dengue<sup>38</sup> como el 17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona y el 17 $\beta$ -hidroxiandrostan-1,4-dien-3-ona (Figura N° 24)



17 $\beta$ -hidroxi-5 $\alpha$ -androstan-3-ona



17  $\beta$ -hidroxiandrostan-1,4-dien-3-ona

**Figura N° 24. Androstanos con actividad antiviral**

El primero péptido esteroidal que se sintetizó se reportó en 1994 por los investigadores Nestler y Toshiro<sup>39</sup>, ambos introdujeron este tipo de molécula como un método práctico para moléculas receptoras, en la cual enlazaron los péptidos en la posición 3 y 7 respectivamente, mientras que en la posición 17 anclaron el esteroide a una resina de poliestireno con la utilización del ácido Chólico<sup>39</sup>. (Figura N° 25)

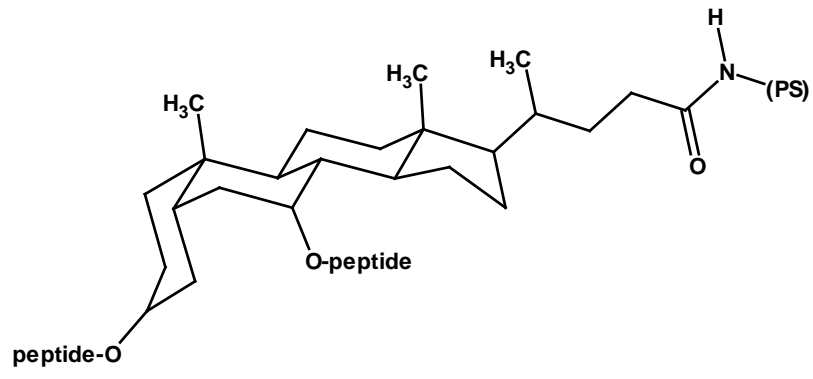


Figura N° 25. Peptido esteroidal.

## OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GENERALES

Sintetizar péptidos y anclarlos a moléculas de interés biológico para su posterior evaluación biológica.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.-) Sintetizar péptidos de diferentes tipos y secuencias mediante la técnica de fase sólida.
- 2.-) Anclar estos péptidos a moléculas esteroidales en diferentes posiciones para evaluar el efecto sinérgico que pueden presentar ambas moléculas cuando están enlazadas entre sí.
- 3.-) Elucidar la estructural de los compuestos sintetizados por IR, RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, EM, UV, HPLC y HPLC-MS.
- 4.-) Evaluar: citotoxicidad de los compuestos sintetizados sobre las Células Vero.

## PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 Consideraciones Generales

- ❖ La Caracterización por Espectroscopia de Infrarrojo (IR) se realizó en un equipo IR-ThermoNicolet Nexos 470 FT EFP, utilizando en KBr desecado. Las absorciones más importantes son reportadas en recíprocos de centímetro ( $\text{cm}^{-1}$ ).
- ❖ La Caracterización por Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protones ( $^1\text{H}$  RMN), y Carbono ( $^{13}\text{C}$  RMN) se realizaron a temperatura ambiente, en espectrómetros del tipo JEOL (270 MHz), BRUKER (300 MHz) y BRUKER (500 MHz). Se utilizó como referencia interna tetrametilsilano (TMS) y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) vienen dados en la escala parte por millón (ppm) hacia campos bajos de la señal del TMS. El numero de protones (calculado por integración), el valor de las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz) para la asignación estructural de las mismas; las abreviaturas empleadas para indicar la multiplicidad de las señales son: singlete (s), singlete ancho (sa), doblete (d), triplete (t), doblete de dobletes (dd), triplete de dobletes (td) y multiplete (m). Los solventes vienen especificados para cada espectro.
- ❖ La Caracterización por Espectrometría de Masas se realizó mediante la técnica de infusión directa en un Espectrómetro marca Bruker, modelo Amazon tipo ion trap. La ionización de las muestras fue a través de ESI (electro spray ionization).

- ❖ Para la Cromatografía Capa Fina (CCF) se utilizó como adsorbente sílica gel Merck DC-60F54, capa de 0,2 mm de espesor en placas de aluminio. El análisis de las placas se llevó a cabo mediante una lámpara UV de 254/365 nm.
- ❖ Para la Cromatografía Preparativa se utilizó placas 20 x 20 de sílica-gel 60G Merck con indicador fluorescente a 254 nm y 0,25 mm de espesor.
- ❖ La Cromatografía de Columna utilizó como soporte sílica-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).
- ❖ El HPLC analítico es de marca Shimatzu con una columna C<sub>18</sub> KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm. Las condiciones cromatográficas utilizadas están descritas en la tabla N° 1
- ❖ La purificación de los productos de las síntesis fue realizada en modo semipreparativa utilizando un HPLC semipreparativo marca ES Beckman con una columna C<sub>18</sub> Phenomenex de 25 x 2,12 cm. Durante la purificación fueron recolectadas fracciones de 6 mL, y la pureza de éstas fue determinada por HPLC analítico con una columna C<sub>18</sub> KROMASIL de 15,0 x 0,46 cm. Los tubos que contenían el material puro fueron juntadas y liofilizadas obteniéndose las fracciones que fueron analizadas en la columna analítica descrita anteriormente. Las condiciones cromatográficas utilizadas están descritas en la tabla N° 1.

**Tabla Nº 1: Condiciones Cromatográficas empleadas en la purificación del material sintetizado.**

Modo	Semi-preparativo	Analítico
Solventes	A: 0,045% TFA en H <sub>2</sub> O B: 0,036% TFA en ACN	A: 0,045% TFA en H <sub>2</sub> O B: 0,036% TFA en ACN
Gradiente	20-60% de solvente B en 90 min	5-95% de solvente B en 30 min
Flujo	5 mL/min	1 mL/min
Longitud de onda	220 nm o 280 nm	220 nm o 280 nm

## Síntesis de Péptidos

### 3.2 Síntesis del péptido Nle-Lys-Arg-Arg

La síntesis del tetrapéptido Nle-Lys-Arg-Arg se realizó mediante la técnica de síntesis en fase sólida. Se utilizó 0,80 gr (0,6 mmol) de la resina Rink Amida<sup>40</sup>, la cual se lavó con diclorometano (DCM) y dimetilformamida (DMF), se dejó reaccionar durante 20 minutos con una solución de piperidina al 20 %, luego de múltiples lavados con DCM y DMF, se le ancló como primer aminoácido, la Fmoc-Arginina(Pbf) 0,78 gr (1,2mmol) en presencia de 0,18 gr (1,2mmol) de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) disueltos ambos en la menor cantidad posible de DMF, posteriormente se le añadieron 186  $\mu$ l (1,2 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y se dejó que reaccionara durante 2 horas. Seguidamente, se procedió a la eliminación del grupo protector Fmoc, del aminoácido, realizando 3 lavados con una solución al 20% de piperidina en DMF. Consecutivamente se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> o prueba de ninhidrina para verificar la completa eliminación del grupo Protector Fmoc.

Posteriormente se procedió a la incorporación de los siguientes aminoácidos para la síntesis del tetrapéptido, Fmoc-Arginina(Pbf); Fmoc-Lisina(Boc) y Fmoc-Norleucina, todos ellos se acoplaron bajo las mismas condiciones. Primero se disolvieron en DMF el aminoácido respectivo junto con 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt). Esta mezcla se adicionó a la resina, luego se agregó la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) dejando que reaccionara durante dos horas. Una vez finalizado este tiempo se realizaron sucesivos lavados con DCM, DMF y DCM nuevamente. Luego se eliminó el grupo protector Fmoc con múltiples



lavados de una solución de piperidina al 20% en DMF. Finalmente se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> para verificar la completa eliminación del grupo protector Fmoc.

El clivaje del péptido de la resina se realizó con una solución de ácido trifluoroacético (TFA), Triisopropilsilano (TIS) y agua (H<sub>2</sub>O) en una proporción 95% TFA; 2,5% TIS; 2,5% H<sub>2</sub>O, por espacio de 2 horas. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron 3 lavados del producto con pequeñas fracciones de éter dimetilico. Se evaporó todo el éter dimetilico de la resina con un flujo de N<sub>2</sub> (g) y posteriormente se extrajo el producto final con múltiples lavados de agua, ligeramente acidificada con algunas gotas de una solución al 0,01 % de Ácido Fórmico. Finalmente se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24-48 horas

### **3.3 Síntesis del Péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF**

La síntesis del polipéptido de 19 residuos FWFTLIKTQAKQPARYRRF se realizó mediante la técnica de síntesis en fase sólida. Se utilizó 0,80 gr (0,6 mmol) de la resina Rink Amida<sup>40</sup>, la cual se procedió a lavar con DCM y DMF, para posteriormente dejar reaccionar durante 20 minutos con una solución de piperidina al 20 %, luego de múltiples lavados con DCM y DMF, se le ancló como primer aminoácido, la Fmoc-Fenilalanina 0,47 gr (1,2mmol) en presencia de 0,18 gr (1,2mmol) de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) disueltos ambos en la menor cantidad posible de DMF, posteriormente se le añadieron 186 µl (1,2 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y se dejó que reaccionara durante 2

horas. Seguidamente, se procedió a la eliminación del grupo protector Fmoc, del aminoácido, realizando 3 lavados con una solución al 20% de piperidina en DMF. Se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> o prueba de ninhidrina para verificar la completa eliminación del grupo Protector Fmoc.

Posteriormente se procedió a la incorporación de los respectivos aminoácidos para la secuencia polipeptídica, FWFTLIKTKQAKQPARYRR, todos ellos se acoplaron bajo las mismas condiciones, primero se mezcló el aminoácido junto con el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) y se disolvieron en DMF, se le añadió esta mezcla a la resina y luego se agregó la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) dejando que reaccionara durante dos horas. Una vez finalizada la reacción se realizaron múltiples lavados con DCM, DMF y nuevamente con DCM. Seguidamente se eliminó el grupo protector Fmoc con múltiples lavados de una solución de piperidina al 20% en DMF. Consecutivamente se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> o prueba de ninhidrina para verificar la completa eliminación del grupo Protector Fmoc.

El clivaje del péptido de la resina se realizó con una solución de ácido trifluoroacético (TFA), Triisopropilsilano (TIS) y agua (H<sub>2</sub>O) en una proporción 95% TFA: 2,5% TIS: 2,5% H<sub>2</sub>O, durante 2 horas. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron 3 lavados del producto con pequeñas fracciones de éter dimetilico, se evaporó todo el éter dimetilico que haya quedado impregnado en la resina con un flujo de N<sub>2</sub> (g) y posteriormente se extrajo el producto final con múltiples lavados de agua, ligeramente acidificada

con algunas gotas de una solución al 0,01 % de Ácido Fórmico. Finalmente se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24-48 horas.

### 3.4 Síntesis del Péptido Nle-Arg-Lys

La síntesis del tripéptido Nle-Arg-Lys se realizó mediante la técnica de síntesis en fase sólida, utilizando 0,80 gr (0,6 mmol) de la resina Rink Amida <sup>40</sup>, la cual se procedió a lavar con DCM y DMF, para posteriormente dejar reaccionar durante 20 minutos con una solución de piperidina al 20 %, luego de múltiples lavados con DCM y DMF, se le ancló como primer aminoácido, la Fmoc-Lisina(Boc) 0,84 gr (1,2 mmol) en presencia de 0,18 gr (1,2 mmol) de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) disueltos ambos en la menor cantidad posible de DMF, posteriormente se le añadieron 186  $\mu$ l (1,2 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y se dejó reaccionar durante 2 horas. Seguidamente, se procedió a la eliminación del grupo protector Fmoc, del aminoácido, realizando 3 lavados con una solución al 20% de piperidina en DMF. Se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup>.

Posteriormente se procedió a la incorporación de los siguientes aminoácidos para la síntesis del tripéptido, Fmoc-Arginina(Pbf); y Fmoc-Norleucina, todos ellos se acoplaron bajo las mismas condiciones, primero se mezcló el aminoácido junto con el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) y se disolvieron en la mínima cantidad posible de DMF, se le añadió esta mezcla a la resina y luego se agregó la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) dejando que reaccionara por espacio de dos horas. Una vez finalizada la reacción se realizaron múltiples

lavados con DCM, DMF y nuevamente con DCM. Seguidamente se eliminó el grupo protector Fmoc con múltiples lavados de una solución de piperidina al 20% en DMF. Se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> .

El clivaje del péptido de la resina se realizó con una solución de ácido trifluoracético (TFA), Triisopropilsilano (TIS) y agua (H<sub>2</sub>O) en una proporción 95% TFA: 2,5% TIS: 2,5% H<sub>2</sub>O, por espacio de 2 horas. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron 3 lavados del producto con pequeñas fracciones de éter dimetilico, se evaporó todo el éter dimetilico que haya quedado impregnado en la resina con un flujo de N<sub>2</sub> (g) y posteriormente se extrajo el producto final con múltiples lavados de agua, ligeramente acidificada con algunas gotas de una solución al 0,01 % de Ácido Fórmico. Finalmente se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24-48 horas

### **3.5 Síntesis del Péptido Met-Ala-Phe-Gly**

La síntesis del tetrapéptido MAFG se realizó mediante la técnica de síntesis en fase sólida, utilizando 0,20 gr (0,31 mmol) de la resina 2-Clorotritilo <sup>42,43</sup> a la cual se le ancló como primer aminoácido, la Fmoc-Glicina 0,092 gr (0,31 mmol) con la ayuda de 529 µl (3,10 mmol) de la base Diisopropiletil-amina (DIEA). A los cincuenta minutos de reacción, se añadieron 160 µL de metanol.

Seguidamente, se procedió a la eliminación del grupo protector Fmoc, realizando 3 lavados con una solución al 20% de piperidina en DMF. Se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup>

Posteriormente se procedió a la incorporación de los siguientes aminoácidos para la síntesis del tetrapéptido, Fmoc-Fenilalanina; Fmoc-Alanina; Fmoc-Metionina, todos ellos se acoplaron bajo las mismas condiciones, primero se mezcló el aminoácido junto con el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) y se disolvieron en la mínima cantidad de DMF posible, se le añadió esta mezcla a la resina y luego se agregó la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) dejando que reaccionara durante una hora. Una vez finalizada la reacción se realizaron múltiples lavados con DMF, Isopropanol y por último con DCM. Seguidamente se eliminó el grupo protector Fmoc con múltiples lavados de una solución de piperidina al 20% en DMF. Consecutivamente se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup>.

Finalmente el desanclaje del péptido de la resina se realizó con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 2 % en DCM. Se eliminó a presión reducida todo el TFA y el DCM, se disolvió el residuo sólido en agua, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24-48 horas.

### **3.6 Síntesis del Péptido Ala-Val-Phe-Ala-Ile**

La síntesis del pentapéptido AVFAI se realizó mediante la técnica de síntesis en fase sólida. Se utilizó 0,20 gr (0,31 mmol) de la resina 2-Clorotritilo <sup>42,43</sup>, a la cual se le ancló como primer aminoácido, la Fmoc-Isoleucina 0,11 gr (0,31 mmol) con la ayuda de 529  $\mu$ l (3,10 mmol) de la base Diisopropiletilamina (DIEA), a los cincuenta minutos de reacción se añadieron 160  $\mu$ L de metanol. Seguidamente, se procedió a la eliminación del grupo protector Fmoc,

realizando 3 lavados con una solución al 20% de piperidina en DMF. Se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup>.

Posteriormente se procedió a la incorporación de los siguientes aminoácidos para la síntesis del pentapeptido, Fmoc-Alanina; Fmoc-Fenilalanina; Fmoc-Valina y Fmoc-Alanina, todos ellos se acoplaron bajo las mismas condiciones, primero se mezcló el aminoácido junto con el 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) y se disolvieron en la mínima cantidad de DMF posible, se le añadió esta mezcla a la resina y luego se agregó la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) dejando que reaccionara por espacio de una hora.

Una vez finalizada la reacción se realizaron múltiples lavados con DMF, Isopropanol y por último con DCM. Seguidamente se eliminó el grupo protector Fmoc con múltiples lavados de una solución de piperidina al 20% en DMF. Consecutivamente se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup>.

Finalmente el desanclaje del péptido de la resina se realizó con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 2 % en DCM. Se eliminó a presión reducida todo el TFA y el DCM, se disolvió el residuo sólido en agua, se congeló en nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24-48 horas.

### 3.7 Síntesis del $5\alpha$ -Androstan- $3\beta$ Acetil-17-ona

Se realizó la esterificación del  $5\alpha$ -Androstan- $3\beta$  ol-17-ona bajo la metodología empleada por Greene, T.W.<sup>44</sup> utilizando un exceso de anhídrido acético como agente acilante en presencia de unas pocas gotas de piridina que este bien seca. Se colocaron 10 g (0,034 moles) del androstano en un balón aforado con un exceso 6,5 mL (0,068 mol) de anhídrido acético y 7 gotas de piridina, se dejó en agitación durante 48 horas. Finalmente se añadió agua fría y se filtró para obtener el producto deseado.

### 3.8 Síntesis del Metil Acrilato. (2-Propenoato de metilo)

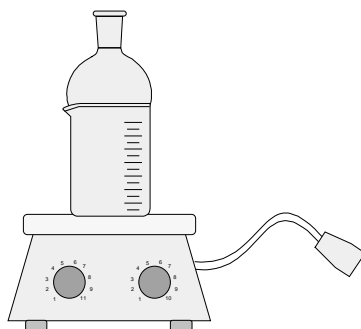
Se realizó esta reacción por el método de la esterificación Azeotrópica<sup>45</sup> y se colocaron 18 g (0,25 mol) de ácido acrílico y 10,12 mL (0,25 mol) de metanol junto con 30 mL de Benceno y 12 - 15 gotas de ácido sulfúrico concentrado en un matraz que se conecto a un separador del tipo Dean-Stark. El Matraz se calentó a 110 °C con una mezcla glicerina-agua, y se recolecto el condensado del refrigerante, el cual cayó al tubo del separador, cuando la capa acuosa no aumento más al cabo de unos 50 minutos se detuvo el calentamiento. Una vez enfriado el matraz se trasvasó la mezcla de agua-Benceno a un embudo de separación, se lavó el contenido del matraz con dos porciones de agua, se unieron las fracciones y se extrajo en el embudo de separación la capa bencénica, se secó con  $MgSO_4$ . Finalmente se destiló el benceno por la técnica de destilación fraccionada y se obtuvo el metil acrilato, como la fracción que destiló a un punto de ebullición de 77 ° C.



**Figura N° 26. Sistema Dean-Stark utilizado para la síntesis del metil acrilato**

### 3.9 Síntesis del Anhídrido Succínico

Para obtener el anhídrido succínico se utilizó un método de deshidratación directa <sup>15,46</sup> colocándose 2 g (16,94 mmol) de ácido succínico en un beacker a 120 °C, cubriendo la parte superior del beacker con un balón de reacción lleno de agua, durante 45 minutos o hasta que sublimó todo el ácido; una vez transcurrido este periodo de tiempo, se retiró todo el anhídrido adherido a la parte posterior del balón de reacción



**Figura N° 27. Sistema utilizado para la síntesis del anhídrido succínico.**



### 3.10 Síntesis del Ácido $\Delta^4$ -Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico

La preparación del, Ácido  $\Delta^4$ -Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico se realizó mediante la técnica en fase sólida, utilizando 0,5 g (0,3 mmol) de la resina de Wang <sup>47</sup>, luego de múltiples lavados con DCM y DMF, se añadieron 0,15 g (1,5 mmol) de anhídrido succínico, junto con 232  $\mu$ l (1,5 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), finalmente se añadieron 0,0183 g (0,15 mmol) de 4-Dimetilamino piridina (DMAP), disueltos en la mínima cantidad de DMF posible, dejando que reaccionara durante 3 horas, este procedimiento se realizó por triplicado.

Luego de realizar los lavados correspondientes con DCM y DMF; se añadieron de manera consecutiva 0,3456 g (1,2mmol) de 4-Androsten-17 $\beta$ -ol-3-ona (Testosterona) ; 0,1632 g (1,2 mmol) de 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt) y 185  $\mu$ l (1,2 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) disueltos en la mínima cantidad de (DMF) posible, para finalmente colocar 0,01464 g (0,12 mmol) de 4-Dimetilamino Piridina (DMAP) disueltos en (DMF), dejando que reaccionara durante 3 horas, este procedimiento se realizó por triplicado.

El procedimiento de clivaje del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico de la resina de Wang, se realizó con una solución al 50% en ácido trifluoracético (TFA); 45% de DCM y 5% de Triisopropilsilano (TIS) durante 1 Hora. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se extrajo el producto con varias fracciones de éter dimetilico, posteriormente se dejó evaporar todo el solvente para obtener el producto deseado. Finalmente se disolvió el producto en una mezcla

70-30 % Agua-Acetonitrilo, se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24-48 horas

### 3.11 Síntesis del péptido Esteroidal Nle-Lys-Arg-Arg

Se tomaron 0,05 g del péptido Nle-Lys-Arg-Arg, anclado a la resina de Rink Amida <sup>40</sup> y se le añadió la mínima cantidad de DCM para hinchar la resina, seguidamente se colocaron 0,00612 g (0,04 mmol) de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt), 0,01552 g (0,04 mmol) de Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico y 6,18  $\mu$ l (0,04 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), se dejó reaccionar por espacio de 2 horas, una vez transcurrido el tiempo de reacción, se realizaron varios lavados con DCM y DMF. Posteriormente se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> ó prueba de ninhidrina para verificar el acoplamiento del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico al péptido.

El procedimiento de clivaje del péptido esteroideal de la resina de Rink Amida, se realizó con una solución al 95 % en ácido trifluoracético (TFA); 2,5% de agua (H<sub>2</sub>O) y 2,5% de Triisopropilsilano (TIS) por espacio de 2 horas. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron 3 lavados del producto con pequeñas fracciones de éter dimetilico, se evaporó todo el éter dimetilico que haya quedado impregnado en la resina con un flujo de N<sub>2</sub> (g) y posteriormente se extrajo el producto final con múltiples lavados de agua, ligeramente acidificada con algunas gotas de una solución al 0,01 % de Ácido Fórmico. Finalmente se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó durante un periodo de 24-48 horas.

### 3.12 Síntesis del péptido Esteroidal FWFTLIKTQAKQPARYRRF

Se tomaron 0,05 g del péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF, anclado a la resina de Rink Amida<sup>40</sup> y se le añadió la mínima cantidad de DCM para hinchar la resina, seguidamente se colocaron 0,00612 g (0,04 mmol) de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt); 0,01552 g (0,04 mmol) de Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico y 6,18  $\mu$ l (0,04 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), se dejó reaccionar durante 2 horas, una vez transcurrido el tiempo de reacción, se realizaron varios lavados con DCM y DMF. Se realizó la prueba de Kaiser<sup>41</sup> o prueba de ninhidrina para verificar el acoplamiento del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico al péptido.

El procedimiento de clivaje del péptido esteroideal de la resina de Rink Amida, se realizó con una solución al 95 % en ácido trifluoracético (TFA); 2,5% de agua (H<sub>2</sub>O) y 2,5% de Triisopropilsilano (TIS) por espacio de 2 horas. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron 3 lavados del producto con pequeñas fracciones de éter dimetilico, se evaporó todo el éter dimetilico de la resina con un flujo de N<sub>2</sub> (g) y posteriormente se extrajo el producto final con múltiples lavados de agua, ligeramente acidificada con algunas gotas de una solución al 0,01 % de Ácido Fórmico. Finalmente se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó durante un periodo de 24-48 horas.

### 3.13 Síntesis del péptido Esteroidal Nle-Arg-Lys

Se tomaron 0,05 g del péptido Nle-Arg-Lys, anclado a la resina de Rink Amida <sup>40</sup> y se le añadió la mínima cantidad de DCM posible para hinchar la resina, seguidamente se colocaron 0,00612 g (0,04 mmol) de 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt); 0,01552 g (0,04 mmol) de Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico y 6,18  $\mu$ l (0,04 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), se dejó reaccionar durante 2 horas, una vez transcurrido el tiempo de reacción, se realizaron varios lavados con DCM y DMF. Se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> ó prueba de ninhidrina para verificar el acoplamiento del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico al péptido.

El procedimiento de clivaje del péptido esteroideal de la resina de Rink Amida, se realizó con una solución al 95 % en ácido trifluoracético (TFA); 2,5% de agua (H<sub>2</sub>O) y 2,5% de Triisopropilsilano (TIS) durante 2 horas. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se realizaron 3 lavados del producto con pequeñas fracciones de éter dimetilico, se evaporó todo el éter dimetilico de la resina con un flujo de N<sub>2</sub> (g) y posteriormente se extrajo el producto final con múltiples lavados de agua, ligeramente acidificada con algunas gotas de una solución al 0,01 % de Ácido Fórmico. Finalmente se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó durante un periodo de 24-48 horas.

### 3.14 Síntesis del aminoácido Alloc-NMe-Valina-OH

Se colocó 1g (4,3 mmol) de Boc-L-MeVal-OH en 20 mL de una solución de ácido trifluoracético y DCM (1:1) durante 2 horas, luego se eliminó a presión reducida toda la solución, se añadieron 10 mL de 1,4-Dioxano y 10 mL de una solución de NaHCO<sub>3</sub> al 10%, seguidamente se ajustó el pH a 8-9 añadiendo gota a gota una solución de NaOH al 10%.

Posteriormente, se colocaron 598 µl (5,62 mmol) de alil cloroformato ClCOOCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, disueltos en 5 mL de 1,4-Dioxano y se ajustó el pH entre 8-9 añadiendo gota a gota una solución de NaOH al 10%. Se trasvasó la solución a un embudo de separación y se extrajo con Metil-terbutil-eter (MTBE), se descartaron los lavados con MTBE. Se acidificó la fase acuosa con una solución de HCl al 10% hasta obtener un pH = 2 y finalmente se realizaron extractos con acetato de etilo (AcOEt), se secó la fase orgánica con MgSO<sub>4</sub> y se eliminó a presión reducida todo el AcOEt, hasta obtener un sólido cristalino.

### 3.15 Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Trt)-OH

Se disolvieron 0,4975 g (20,73 mmol) de NaH en un balón de reacción con THF seco, en un baño frío, se colocó un tapón de goma para cerrar el balón y se inyectó un flujo de N<sub>2</sub> (g), para desplazar todo el aire que se encontraba dentro del balón y realizar la reacción en atmósfera inerte, luego se disolvieron 4 g (8,64 mmol) del aminoácido Boc-Cisteina-(Trt)-OH en THF seco y se añadió lentamente al balón que contenía la solución de NaH con una jeringa.

Seguidamente se adicionaron 1,79 mL (28,46 mmol) de CH<sub>3</sub>I con una jeringa y se dejó reaccionar toda la noche durante 17 horas en un cuarto frío a 4 °C.

Posteriormente, se añadió un buffer de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / NaHCO<sub>3</sub>/ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 10% para mantener el pH 6-7. Seguidamente se eliminó a presión reducida todo el THF y se trasvasó a un embudo de separación la fase acuosa del buffer, se realizaron 3 lavados con Hexano. Se colocó en un embudo de separación la fase acuosa y se realizaron 3 extracciones con AcOEt, se lavó la fase orgánica con una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl y una solución saturada de NaCl una sola vez respectivamente. Finalmente se secó la fase Orgánica con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a presión reducida todo el AcOEt, hasta obtener un producto sólido que es el Boc-NMe-Cisteina-(Trt)-OH.

### 3.16 Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH

Se colocaron 0,15 g (0,3144 mmol) de Boc-NMe-Cisteina-(Trt)-OH en una jeringa previamente sellada con un filtro poroso de polipropileno y se realizaron 5 lavados de 30 segundos con una solución de 2% TFA; 2,5% TIS y 95,5% DCM, seguidamente se disolvió el aminoácido en la mínima cantidad de H<sub>2</sub>O posible y se colocó en un recipiente bajo atmosfera inerte de Ar (g) sumergido en un baño de agua fría. A continuación se adicionaron 0,047 g (0,5280 mmol) de acetamidometanol (OH)-CH<sub>2</sub>-NH-CO-CH<sub>3</sub> disueltos en 18 mL de una solución al 95% TFA, 5% CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H ácido trifluorometanosulfónico y se dejó que la reacción transcurriera durante 2 horas en un cuarto frío. Se eliminó a presión reducida toda la solución de TFA y ácido trifluorometanosulfónico.

Seguidamente, se disolvió el aminoácido en 10 mL de H<sub>2</sub>O y 20 mL THF; el pH de la solución se ajustó a 9-10 por adición gota a gota, de una solución acuosa de NaOH al 50%. Posteriormente se adicionaron 0,088 g (0,4036 mmol) de di-Terbutil Dicarbonato (Boc<sub>2</sub>O). La reacción se mantuvo a temperatura ambiente y a las 48 horas, se adicionaron 0,088 g (0,4036 mmol) más de di-Terbutil Dicarbonato (Boc<sub>2</sub>O), dejando que reaccionara durante 72 horas más, hasta que se observó la total conversión del producto de partida. Se eliminó el THF a presión reducida, se trasvasó la fase acuosa a un embudo de separación y se realizaron 3 lavados con metil-terbutil-eter (MTBE). Finalmente, se acidificó la fase acuosa añadiendo unas pocas gotas, de una solución de HCl al 10 % hasta ajustar el pH= 3-4. Se trasvasó la solución acuosa a un embudo de separación y se extrajo el producto final con AcOEt. La fase

orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se eliminó todo el AcOEt a presión reducida hasta obtener un sólido cristalino.

### 3.17 Síntesis del Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH en Fase Sólida.

Se colocaron 1,5 g de la resina 2-Clorotritilo <sup>42,43</sup>, en una jeringa, previamente sellada con un filtro poroso de polipropileno; se colocó la mínima cantidad de DCM posible y se añadieron 0,96 g (2,32 mmol) del aminoácido, Fmoc-Cisteina(Acm)-OH, junto con 3,97 mL (23,2 mmol) de la base Diisopropiletilamina (DIEA), a los cincuenta minutos de reacción se añadieron 1200  $\mu\text{L}$  de metanol. Seguidamente, se procedió a la eliminación del grupo protector Fmoc, realizando 3 lavados con una solución al 20% de piperidina en DMF. Consecutivamente se realizó la prueba de Kaiser <sup>(2)</sup> o prueba de ninhidrina para verificar la completa eliminación del grupo Protector Fmoc. Se realizaron múltiples lavados con DCM y DMF para posteriormente añadir 2,05 g (9,28 mmol) de 2-Nitrobencensulfonil Cloruro, junto con 2,37 mL (13,92 mmol) de la base Diisopropiletilamina (DIEA), se dejó reaccionar por espacio de una hora y se observó que la resina cambio de color a un amarillo muy intenso.

Una vez realizados los lavados correspondientes con DCM y DMF, se realizó la reacción de Mitsunobu <sup>48</sup>, añadiendo 3,04 g (11,6 mmol) de trifenilfosfina  $\text{P}(\text{Ph})_3$ ; junto con 938  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{OH}$  (23,2 mmol) y 2,28 mL (11,6 mmol) de di-isopropil-azadicarbonato (DIAD), se dejó que la reacción transcurriera durante 30 minutos. Se realizaron los respectivos lavados con DCM y DMF, para posteriormente sellar la jeringa con un tapón de goma en la



parte superior y colocarlo en atmosfera inerte, bajo un flujo de  $N_2$  (g); se añadieron 1,51 mL (23,2 mmol) de mercaptoetanol  $HS-CH_2-CH_2-OH$ , junto con 1,73 mL (11,6 mmol) de la base 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undecen-7-eno, esta reacción se llevó a cabo hasta que desapareció el color amarillo en la resina. Se realizaron múltiples lavados con DCM y DMF, se añadieron 7,58 g (34,77 mmol) de di-Terbutil Dicarbonato ( $Boc_2O$ ), junto con 5,94 mL (34,77 mmol) de Diisopropiletilamina (DIEA); se dejó reaccionar durante 12 horas.

Finalmente el desanclaje del producto de la resina, se realizó con una solución de TFA al 2 % en DCM.

### **3.18 Síntesis del Biciclo Octadepsipéptido Triostin A.**

Para la obtención de la Triostin A, se realizó mediante la técnica en fase sólida, utilizando 0,2 g (0,164 mmol) de la resina de Wang <sup>47</sup> la cual se colocó en una jeringa, previamente sellada con un filtro poroso de polipropileno; se procedió a realizar lavados múltiples con abundante DCM y DMF, luego se añadieron 0,4084 g (1,312 mmol) de Fmoc-Alanina, junto con 101,5  $\mu$ l (0,656 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), finalmente se añadieron 0,008 g (0,066 mmol) de 4-Dimetilamino piridina (DMAP), disueltos en la mínima cantidad de DMF posible, dejando que reaccionara durante 3 horas, este procedimiento se realizó por duplicado. Luego de realizar los lavados correspondientes con DCM y DMF; consecutivamente se añadieron 77,30  $\mu$ l de anhídrido acético y 141  $\mu$ l de diisopropil-etil-amina (DIEA) en DMF durante 30 minutos. Se realizaron 3 lavados con piperidina al 20 % durante 5 minutos para

eliminar el grupo Fmoc y se recolectan estos lavados para calcular la carga de la resina obteniéndose un 99,1 % de carga de la resina. Consecutivamente se realizaron múltiples lavados a la resina con DCM, DMF y se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> o prueba de ninhidrina para verificar la completa eliminación del grupo Protector Fmoc.

Como segundo aminoácido se introdujo 0,2803 g (0,492 mmol) de Fmoc-D-Serina(Trt)-OH y 0,1870 g (0,492 mmol) del agente acoplante Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazalo-[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanamina (HATU), junto con 0,067 g (0,492 mmol) de 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt), disueltos en la mínima cantidad de (DMF) posible y 168  $\mu$ l (0,984 mmol) de diisopropil-etil-amina (DIEA) durante de 1 hora, finalmente se eliminó el grupo Fmoc con 3 lavados de piperidina al 20 % durante 5 minutos. Consecutivamente se realizaron múltiples lavados a la resina con DCM, DMF y se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup>

Se colocaron posteriormente 0,043 g (0,246 mmol) del ácido-2-quinoxalina Carboxílico (Qxc), junto con 0,1132 g (0,246 mmol) de 1H-benzotriazol-1-yloxy-tris (pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), 0,033 g (0,246 mmol) de 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt) disueltos en la mínima cantidad de (DMF) posible y 84  $\mu$ l (0,492 mmol) de diisopropil-etil-amina (DIEA) durante 1 hora, inmediatamente se lavo con abundante DCM y DMF. Se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup> para verificar si hubo un acoplamiento total del ácido-2-quinoxalina Carboxílico (Qxc), con un resultado negativo de la prueba de káiser.

Se eliminó el grupo Tritilo (Trt) proveniente del aminoácido D-Serina(Trt)-OH con 5 lavados de 30 segundos, de una solución al 95,5 % DCM, 2,5 % de Triisopropilsilano (TIS) y 2% de TFA, para finalmente lavarlo con abundante DCM; hasta obtener lavados incoloros.

Como paso consecutivo fue necesario introducir el aminoácido no esencial Alloc-NMe-Valina-OH, sintetizado previamente en la sección 3.13; se colocaron 0,35 g (1,64 mmol) de Alloc-NMe-Valina-OH, junto con 253  $\mu$ l (1,64 mmol) de Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y 0,020 g (0,164 mmol) de 4-Dimetilamino piridina (DMAP), disueltos en la mínima cantidad de DMF, dejando que reaccionara toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante.

Se procedió a eliminar el grupo protector Alloc, añadiendo 101  $\mu$ l (0,82 mmol) de fenilsilano junto con 0,0095 g (0,0082 mmol) de tetrakis(trifenilfosfina)Paladio [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] previamente disueltos en la mínima cantidad de DCM posible <sup>49,50</sup>; se dejó reaccionar durante 15 minutos, este procedimiento se realizó por triplicado. Consecutivamente se realizaron múltiples lavados a la resina con DCM, DMF y se realizó la prueba de Kaiser <sup>41</sup>.

Se introdujo el aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH, sintetizado en la sección 3.15; se colocaron 0,1955 g (0,41 mmol) del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH, luego se añadió 0,1558 g (0,41 mmol) de los agentes acoplantes Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanamina (HATU), junto con 0,0557 g (0,41 mmol) de 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt), disueltos en la mínima cantidad

de una mezcla DMF-DCM (1:1) y finalmente se añadió 137  $\mu\text{l}$  (0,82 mmol) de diisopropil-etil-amina (DIEA) dejando que reaccionara durante 90 minutos, este acoplamiento es realizado por duplicado y sin pre-activación del aminoácido.

Se procedió a realizar el puente disulfuro intercatenario para de esta manera introducir un nuevo concepto "**restricción de la movilidad conformacional**"<sup>51</sup>, se disolvieron 0,1040 g (0,41 mmol) de  $\text{I}_2$  en la mínima cantidad de DMF posible y se dejó reaccionar durante 10 minutos, este procedimiento se realizó por duplicado.

Finalmente se clivó el octadepsipéptido de la resina con una solución al 25% en ácido trifluoracético (TFA); 70% de DCM y 5% de  $\text{H}_2\text{O}$  durante 1 Hora. Una vez transcurrido ese periodo de tiempo, se eliminó a presión reducida toda la solución de TFA, DCM y  $\text{H}_2\text{O}$ . Finalmente se disolvió el producto en una mezcla 1:1  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ ; se congeló y se liofilizó durante un periodo de 24-48 horas.

La clausura del octadepsipéptido se realizó en una solución  $0,5 \times 10^{-3}$  M del octadepsipéptido, se colocaron 0,01 g (0,008896 mmol) del producto, desanclado anteriormente en un balón aforado y se disolvieron en 16,79 mL de una solución de DCM y 1 mL de DMF; se añadieron 0,0092 g (0,0176 mmol) de Hexafluorofosfato de 7-aza-benzotriazol-1iloxi-tris(pirrolidin)fosfonio (PyAOP), junto con 0,0012 g (0,0088 mmol) de 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt) y 6,1  $\mu\text{l}$  (0,0035mmol) de diisopropil-etil-amina (DIEA) durante 4 horas. Se trasvasó todo la solución a un embudo de separación y se realizaron 3 lavados con una

solución al 5% de  $\text{NaHCO}_3$ , 3 lavados con una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se secó con  $\text{MgSO}_4$ . Finalmente se eliminó a presión reducida todo el DCM y se disolvió el producto final en una mezcla 70-30 %  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ , se congeló y se liofilizó durante un periodo de 24-48 horas.

## ENSAYOS BIOLÓGICOS

### 3.19 Curva de crecimiento de Células Vero

Para conocer el número de células a utilizar en los ensayos de citotoxicidad, se realizó una curva de crecimiento de células Vero. Se utilizó el ensayo colorimétrico con 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromuro (MTT) esta es una sal de tetrazolio, la cual es procesada en las células viables. El producto formado es un cristal de formazan, de color azul oscuro que posteriormente en el ensayo es solubilizado al agregarle el buffer de lisis, siendo el color desarrollado proporcional al número de células viables, este método fue desarrollado por Tim Mosmann <sup>52,53</sup>.

En placas de 96 pozos, fondo plano, se sembraron  $20 \times 10^6$  células/mL. A partir de allí, se realizaron diluciones seriadas con MEM al 8 %. Las células fueron incubadas a 37 °C y se adiciono 10  $\mu$ L/pozo de MTT (10 mg/mL) a cada placa correspondiente a los tiempos evaluados (0, 24, 48 y 72 horas). Luego se incubo de nuevo en las condiciones antes mencionadas, durante 3 horas. Al cabo de este tiempo, se agregó buffer de lisis, se incubo de nuevo por 18 horas y finalmente se leyó a 570 nm (Multiskan EX). Este procedimiento se efectuó a cada tiempo ensayado.

### 3.20 Determinación de citotoxicidad

Para determinar el efecto de los compuestos ensayados sobre las células Vero, se realizó una modificación del ensayo del MTT <sup>54</sup>. Se sembró en una placa de 96 pozos fondo plano, 100  $\mu$ l/pozo de una suspensión de células Vero ( $2,2 \times 10^5$  cel/ml) en medio de crecimiento y se incubó durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, el medio se descartó y se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo de medio de mantenimiento y 100  $\mu$ l/pozo de las diluciones, en base dos, de los compuestos a ensayar (desde 25  $\mu$ g/ml hasta 1,56  $\mu$ g/ml).

Se establecieron dos controles: 100% y 0% de crecimiento; uno con medio de mantenimiento y al segundo se le agregó Igepal al 10% para lisar las células.

Las placas se incubaron por 24, y 120 horas bajo las condiciones anteriores y posteriormente se adicionará 0,1 mg/pozo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Se incubaron nuevamente por 3 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y finalmente se agregó 100  $\mu$ l/pozo de buffer de lisis (20% SDS, 50% N,N-dimetil formamida, 30% H<sub>2</sub>O destilada) para solubilizar los cristales de formazan; luego de incubar durante 18 horas a 37°C, se realizó la lectura de la placa a 570 nm (Multiskan EX); una vez conocidos los valores de absorbancia, se procedió a construir una curva de viabilidad celular empleando la siguiente fórmula para calcular los porcentajes de viabilidad:

$$\% \text{ Viabilidad} = 100 - \left\{ \left[ \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{comp}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right] \times 100 \right\}$$

$\text{DO}_{\text{control}}$  = Absorbancia control (100% crecimiento)

$\text{DO}_{\text{comp}}$  = Absorbancia de cada concentración



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Síntesis de los péptidos

Para la síntesis de los péptidos se utilizó la técnica de Síntesis en Fase Sólida, debido a su rapidez sintética y fácil manipulación; empleándose las resinas Rink Amida para la síntesis de los péptidos Nle-KRR; FWFTLIKTQAKQPARYRRF; Nle-RK y la resina 2-Clorotritilo como soporte sólido, para los péptidos MAFG y AVFAL debido a lo lábil de esta última resina para la unión del primer aminoácido, lo voluminosa para inhibir la formación de dicetopiperazinas<sup>55</sup> y lo fácil de clivar una vez sintetizado el péptido. Todos los aminoácidos empleados se encuentran protegidos con el grupo F-moc, para evitar el anclaje del grupo amino presente en el aminoácido, dejando libre el grupo carboxílico para que este se ancle a la resina por dicho grupo.

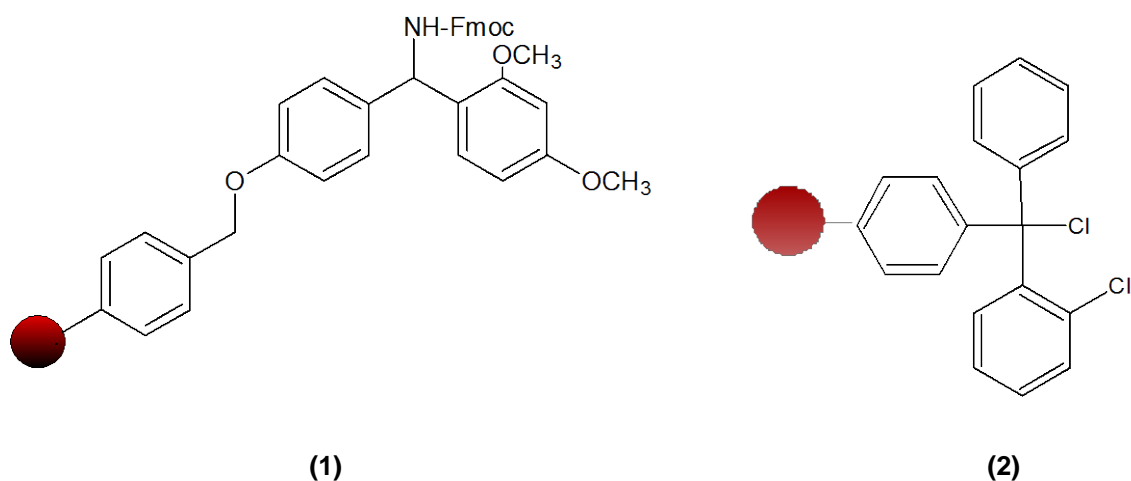
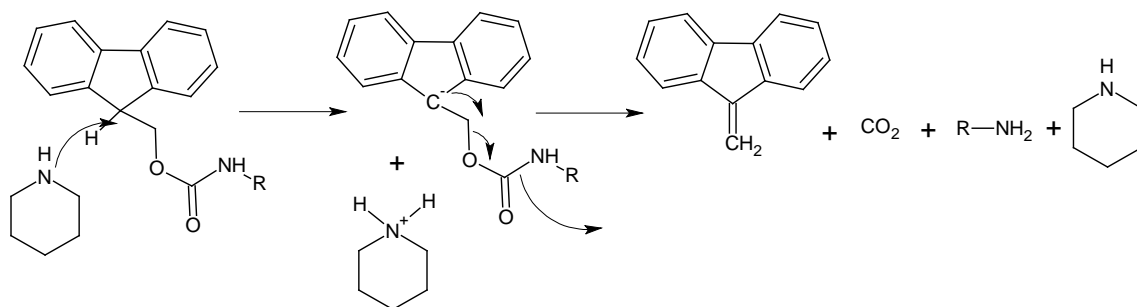


Figura N° 28. Resina Rink Amida (1) y resina 2-Clorotritilo (2)

Para la síntesis de los péptidos con la resina de Rink Amida, fue necesario desproteger la amina del grupo F-moc, con una solución de piperidina al 20% en DMF durante 20 minutos. La desprotección sigue un mecanismo de

eliminación E1cB (*mecanismo unimolecular de la base conjugada*)<sup>56</sup>, donde el paso clave es la desprotonación inicial del anillo de fluoreno para generar un intermediario anionico del tipo aromático, sumamente estable como la dibenzociclopentadienida, el cual por eliminación de CO<sub>2</sub> da lugar al dibenzofulveno<sup>57</sup>.



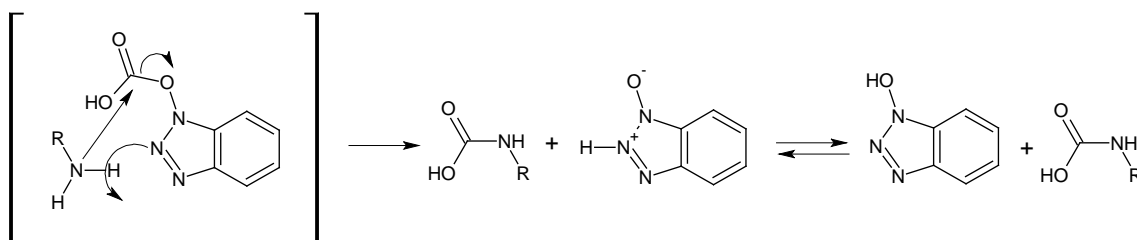
**Figura N° 29. Mecanismo E1cB para la eliminación del grupo Fmoc**

Luego de realizar múltiples lavados a la resina con DCM y DMF, que garantiza la completa eliminación de la piperidina, se colocó el primer aminoácido-Fmoc, junto con el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) y la base Diisopropiletilamina, para evitar la protonación del grupo amino de la resina y de esta manera hacerlo mejor nucleófilo, lo que garantiza su enlace al grupo carboxílico del aminoácido-Fmoc. Una vez anclado el primer aminoácido el protocolo es repetido, para los aminoácidos subsecuentes.

Para la síntesis de los péptidos en la resina 2-Clorotritilo, se añadió el primer aminoácido-Fmoc, junto con la base Diisopropiletilamina, para eliminar el protón ácido del aminoácido y hacerlo mejor nucleófilo, garantizando de esta manera su enlace al grupo tritilo en la resina 2-Clorotritilo. Una vez anclado el primer aminoácido y luego de haber dejado la reacción durante cincuenta minutos, se añadieron los 160  $\mu$ L de metanol, para bloquear las posiciones

donde no hubo anclaje del aminoácido y evitar el anclaje de los posteriores aminoácidos a la resina.

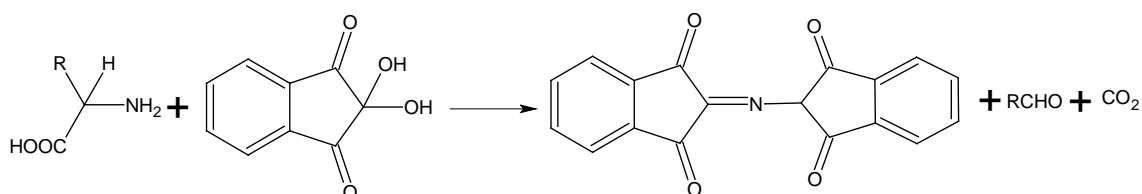
Para el resto de las secuencias pépticas, tanto para la resina Rink Amida como para la resina 2-Clorotritilo, se añadió el residuo del aminoácido junto con el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), posteriormente se le añadió la diisopropilcarbodiimida con la finalidad, de evitar la racemización de los aminoácidos y las reacciones colaterales que ocurren cuando se utiliza solamente carbodiimidas<sup>58</sup>, el HOBt suprime la racemización porque intercepta la alta reactividad de las O-acylisoureas y anhídridos simétricos que se forman como intermediarios, creando un agente acilante de baja reactividad para la formación de reacciones colaterales, el cual es lo suficientemente potente para permitir una rápida formación del enlace amídico; esta inusual reactividad de los éster de benzotriazol, es atribuida a una catálisis básica intramolecular, que opera a través de un estado de transición cíclico de seis miembros<sup>59</sup>.



**Figura N° 30. Catálisis básica intramolecular del éster de benzotriazol**

La función secundaria del aditivo HOBt, con la presencia del grupo hidroxilo, es la de proveer una fuente importante de protones, que puedan neutralizar cualquier exceso de base en el medio de reacción producto de la adición de la diisopropilcarbodiimida<sup>59</sup>.

La prueba de káiser consiste en la utilización de ninhidrina como indicador para lograr un compuesto cromóforo de color purpura, que se obtiene como producto de la reacción del grupo amino de un aminoácido <sup>41</sup>, esta prueba fue realizada sobre pequeñas muestras de resinas tomadas de la reacción.



**Figura N° 31. Reacción general de un aminoácido con la ninhidrina**

Una vez incorporados los respectivos aminoácidos N-prottegidos, se observa completamente incolora la prueba y un color purpura una vez desprottegido el aminoácido con la solución de piperidina al 20%, teniendo como resultado final un acoplamiento efectivo.

Esta prueba tiene una alta sensibilidad colorimétrica para muestras que contienen menos de 0,5% de grupos aminos sin reaccionar. Una versión modificada de la prueba permite un análisis cualitativo <sup>60</sup>. La desventaja principal de esta prueba es el consumo irreversible o destructivo de la muestra y puede llegar a consumir cantidades significativas del péptido anclado a la resina, afectando el rendimiento de la misma si es llevado a cabo después de cada acoplamiento en una síntesis muy larga; este inconveniente se ve disminuido, por lo simple y rápido de la prueba, además puede proveer una información útil durante la síntesis en fase sólida.

El clivaje del péptido al soporte polimérico, generalmente representa el último paso en una síntesis en Fase Sólida. Como el grupo anclado, usualmente es seleccionado para ser compatible con la operación sintética del péptido, el clivaje selectivo del grupo C terminal del péptido al soporte sólido, ocurre bajo tratamientos con reactivos concomitante, que pueden tener un efecto parcial o una desprotección completa de las cadenas laterales del péptido; para la mayoría de los casos, el método del clivaje acidolítico es ampliamente utilizado.

La liberación de los péptidos anclados a la resina de Rink amida son generalmente llevados a cabo por tratamiento con TFA al 95 % durante 2 horas. Bajo estas condiciones los grupos protectores (t-butil) para los aminoácidos treonina y tirosina, (Pbf) para la arginina, (Boc) para los aminoácidos lisina, triptófano, y (Trt) para la glutamina; son eliminados respectivamente de sus cadenas laterales y al mismo tiempo se separa la cadena péptidica del soporte sólido. Durante este proceso, especies cationicas altamente reactivas son generadas por los grupos protectores, las cuales pueden atrapar o reaccionar con aminoácidos que contengan grupos funcionales ricos en electrones; por esta razón varios agentes nucleofílicos son adicionados a la mezcla de reacción, estas especies nucleofílicas reciben el nombre de “scavengers” (limpiadores, captadores o secuestrantes) y son adicionadas para reaccionar con estos iones formados durante el proceso de clivaje <sup>61</sup>.

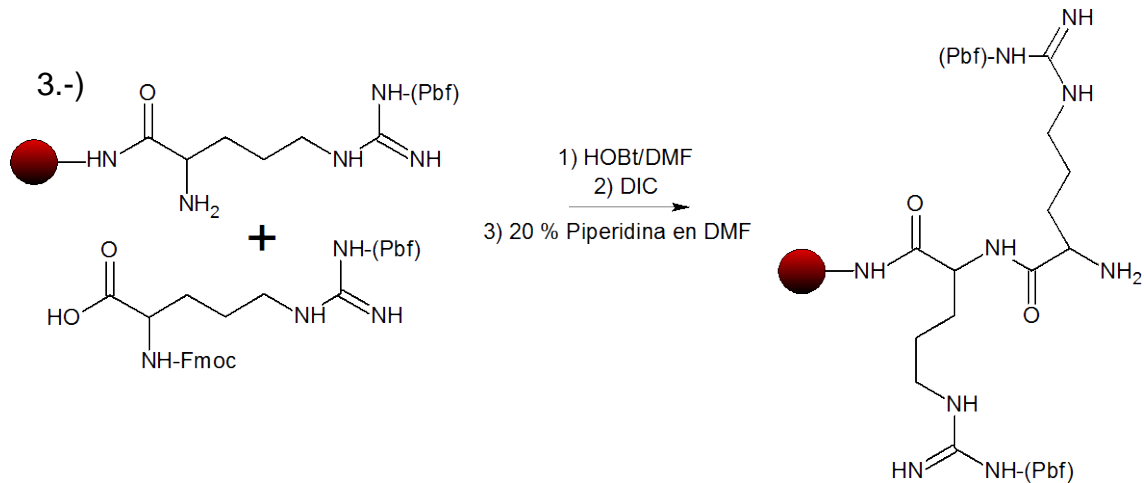
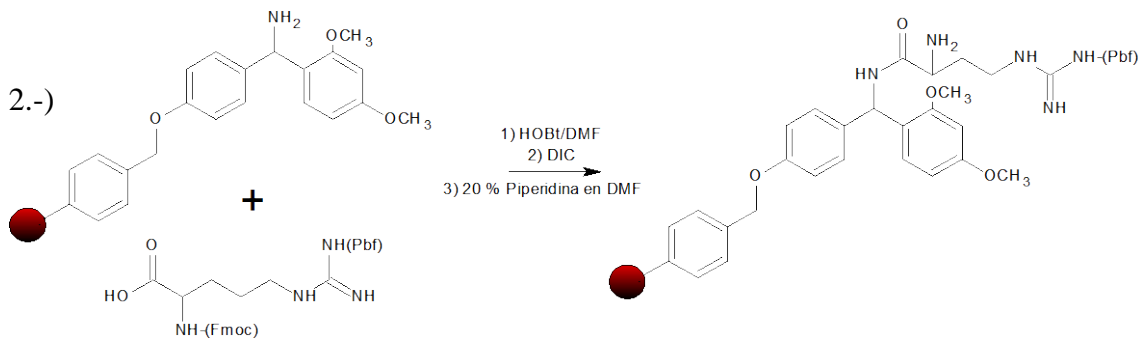
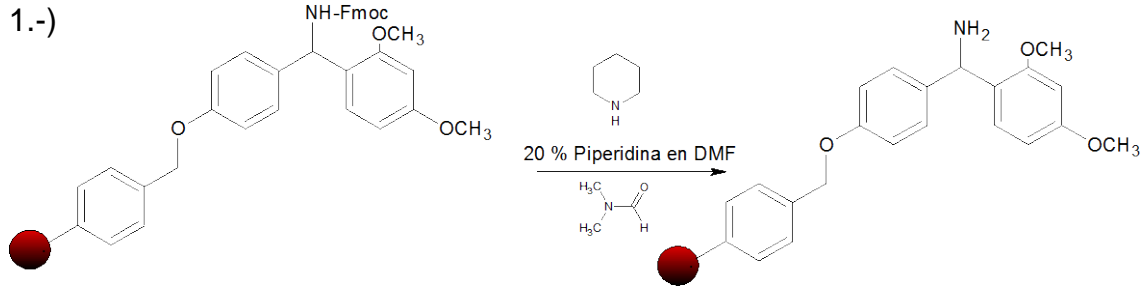
Uno de los captadores (scavengers) ampliamente utilizados, es el agua, debido a su abundancia y bajo costo, además de ser muy efectivo para aminorar los carbocationes t-butilo y Tritilo. El Triisopropilsilano <sup>62</sup> (TIS) ha demostrado tener una efectividad superior al agua y es usado ampliamente para mitigar los grupos (Pbf) y (Boc), así como también los grupos mencionados anteriormente. No se debe exceder del 2,5% de Triisopropilsilano (TIS) ya que se ha reportado previamente que grandes cantidades de este captador en medio ácido reduce el anillo indol del aminoácido Triptófano <sup>63</sup>.

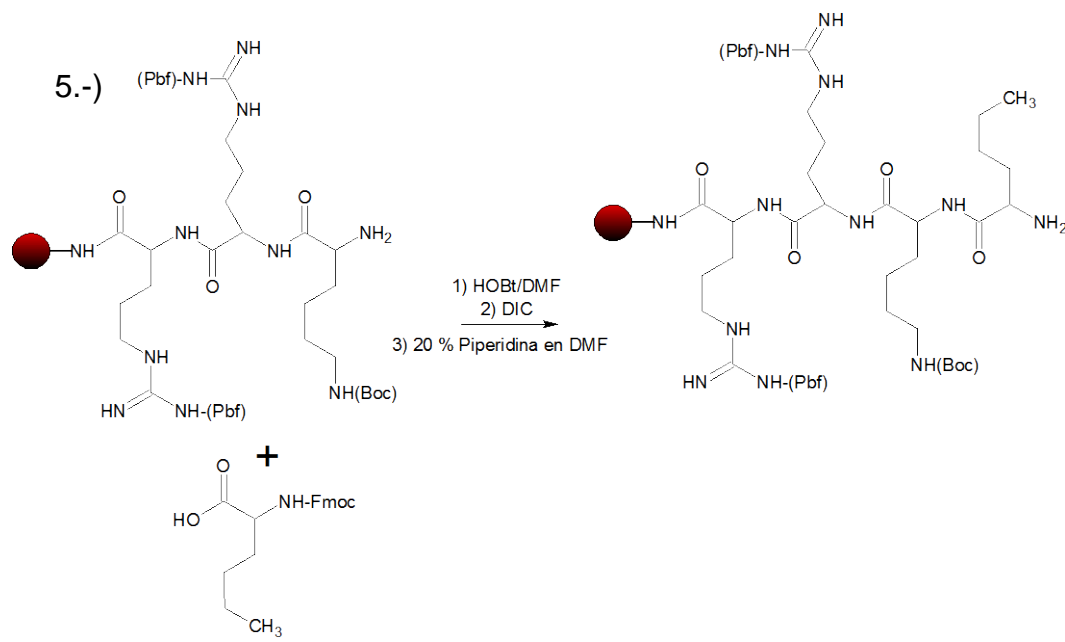
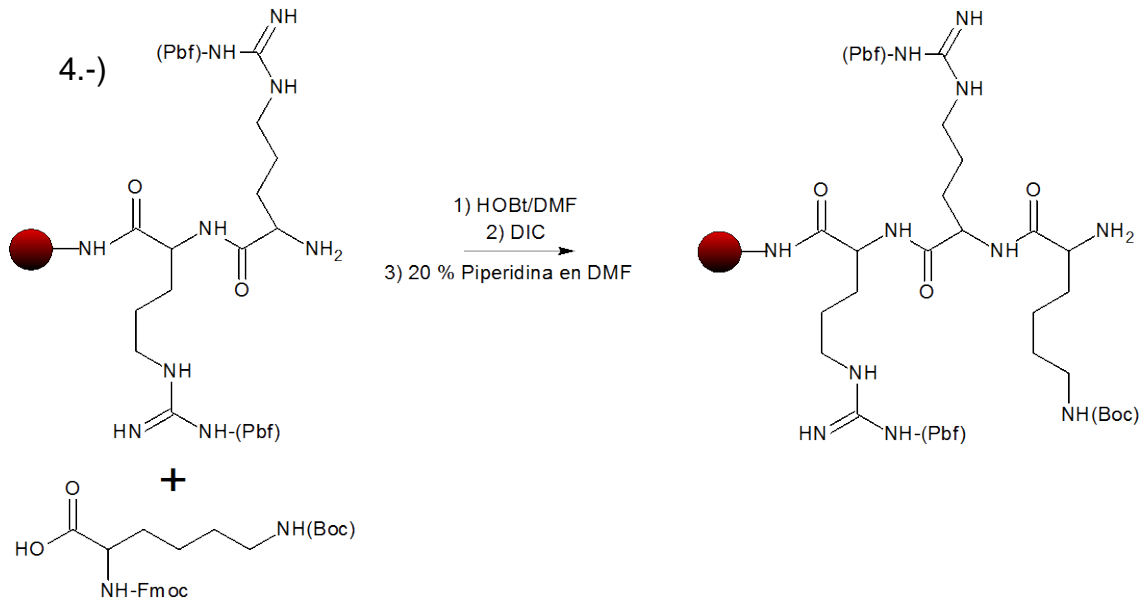
El desanclaje de los péptidos unidos al soporte sólido 2-Clorotritilo, se realizan en una solución al 2% de TFA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> debido a lo lábil de la resina. Esto es debido, a que el carbocatión generado es estabilizado por resonancia del grupo tritilo de la resina y no es necesario adicionar ningún secuestrante adicional, ya que los aminoácidos enlazados en la cadena péptidica, no poseen cadenas laterales, con grupos funcionales que se encontraran protegidos.

El residuo metionina puede ser alquilado por la generación de cationes provenientes de un grupo bencilo durante la reacción de clivaje con TFA, permitiendo el reanclaje del péptido al soporte sólido con una correspondiente reducción en el rendimiento. Esta reacción colateral se ve drásticamente minimizada cuando resinas tritilo son utilizadas, este hecho se atribuye a la voluminoso del grupo tritilo <sup>61</sup>.

## Síntesis de los Péptidos

### 4.1.2 Síntesis del Péptido Nle-Lys-Arg-Arg







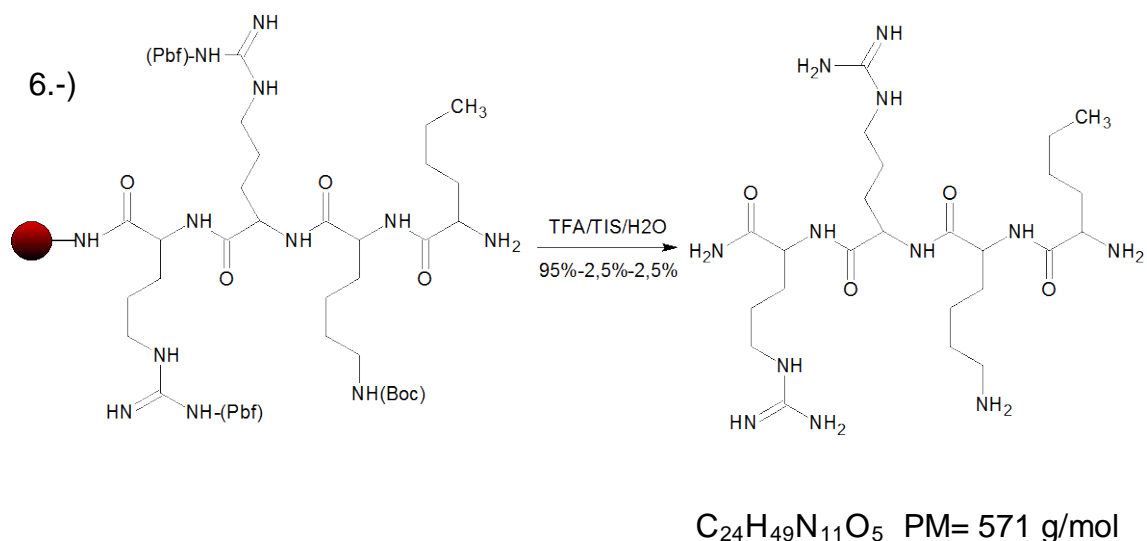


Figura N° 32. Reacciones para la síntesis del péptido Nle-Lys-Arg-Arg

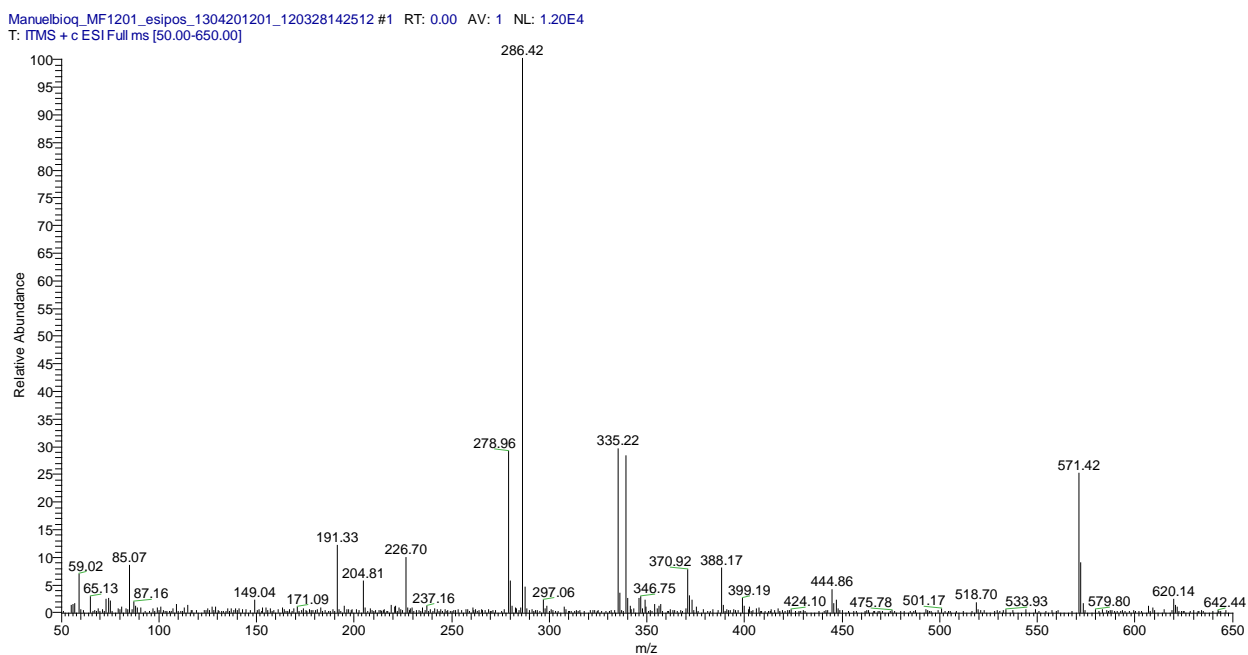
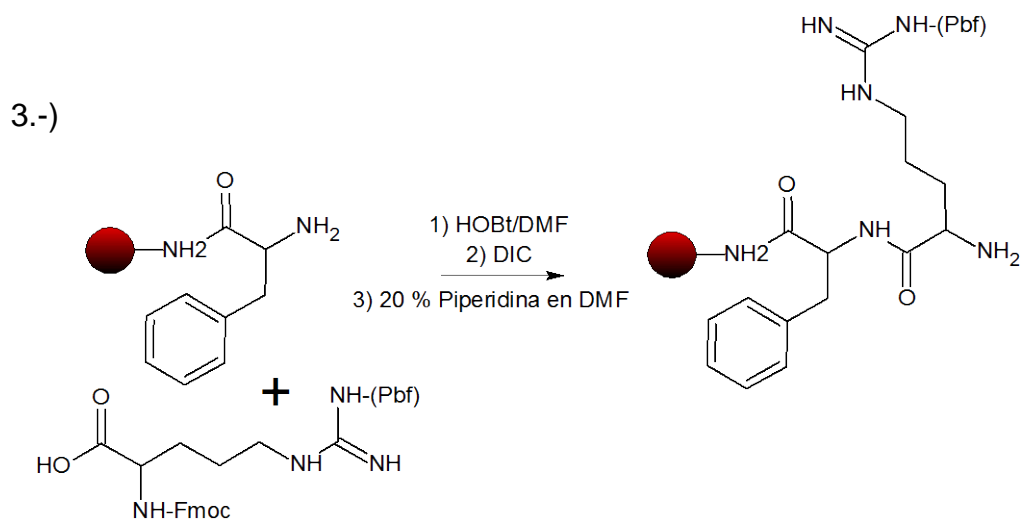
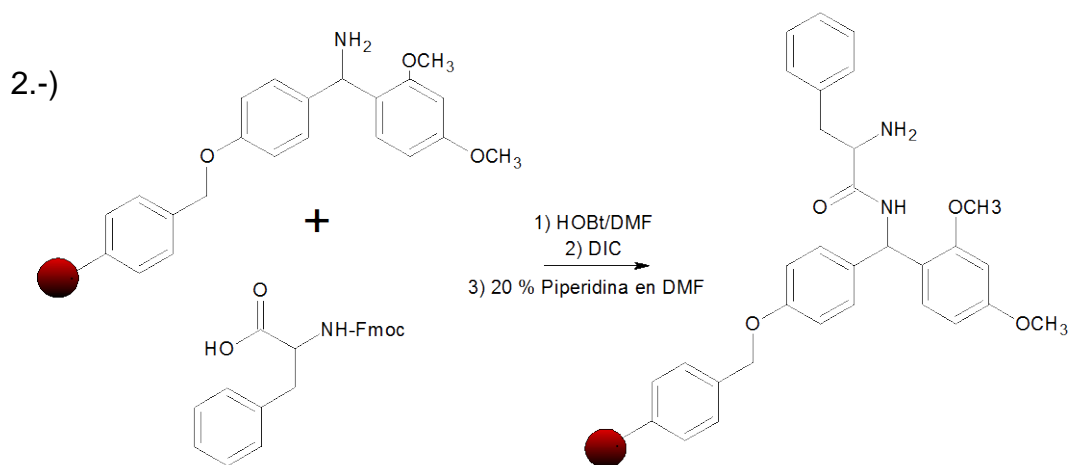
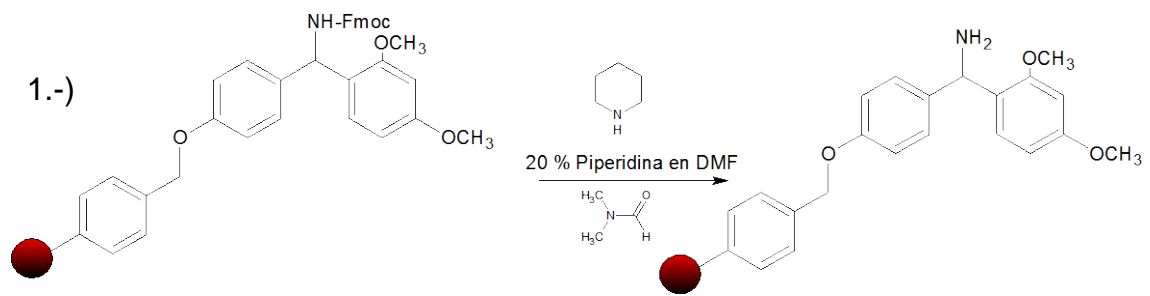
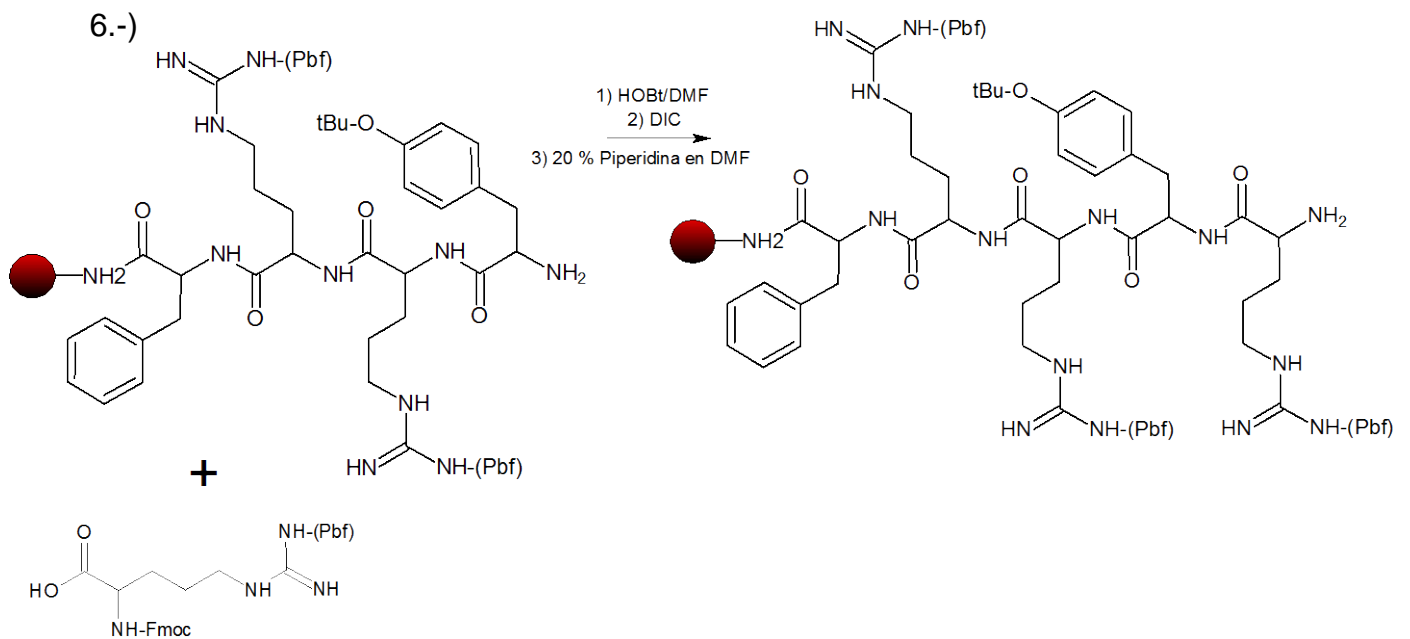
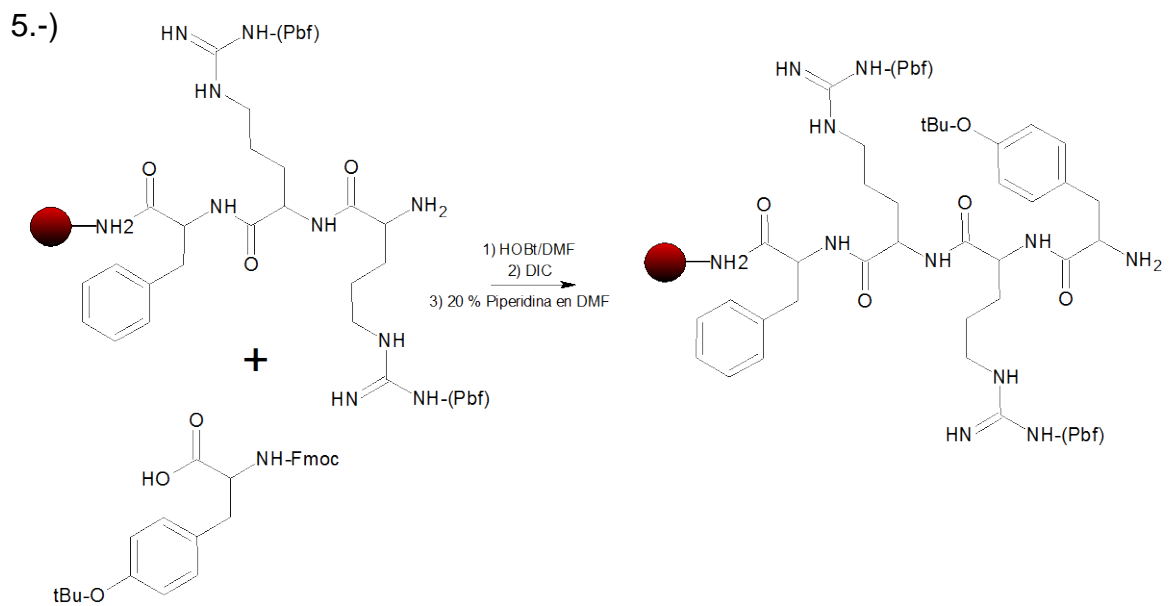
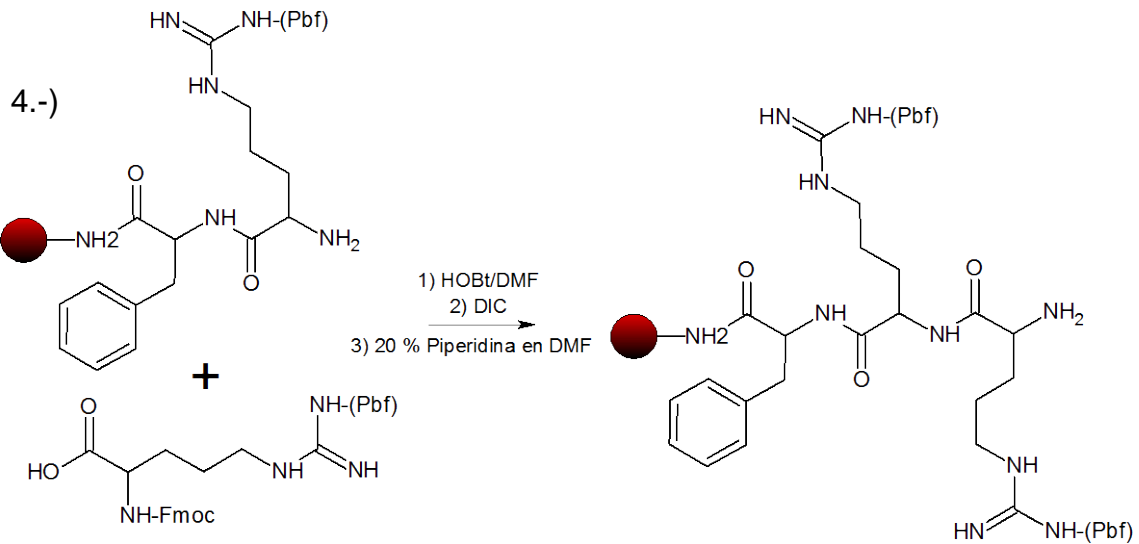


Figura N° 33. Espectro de Masa del péptido Nle-Lys-Arg-Arg

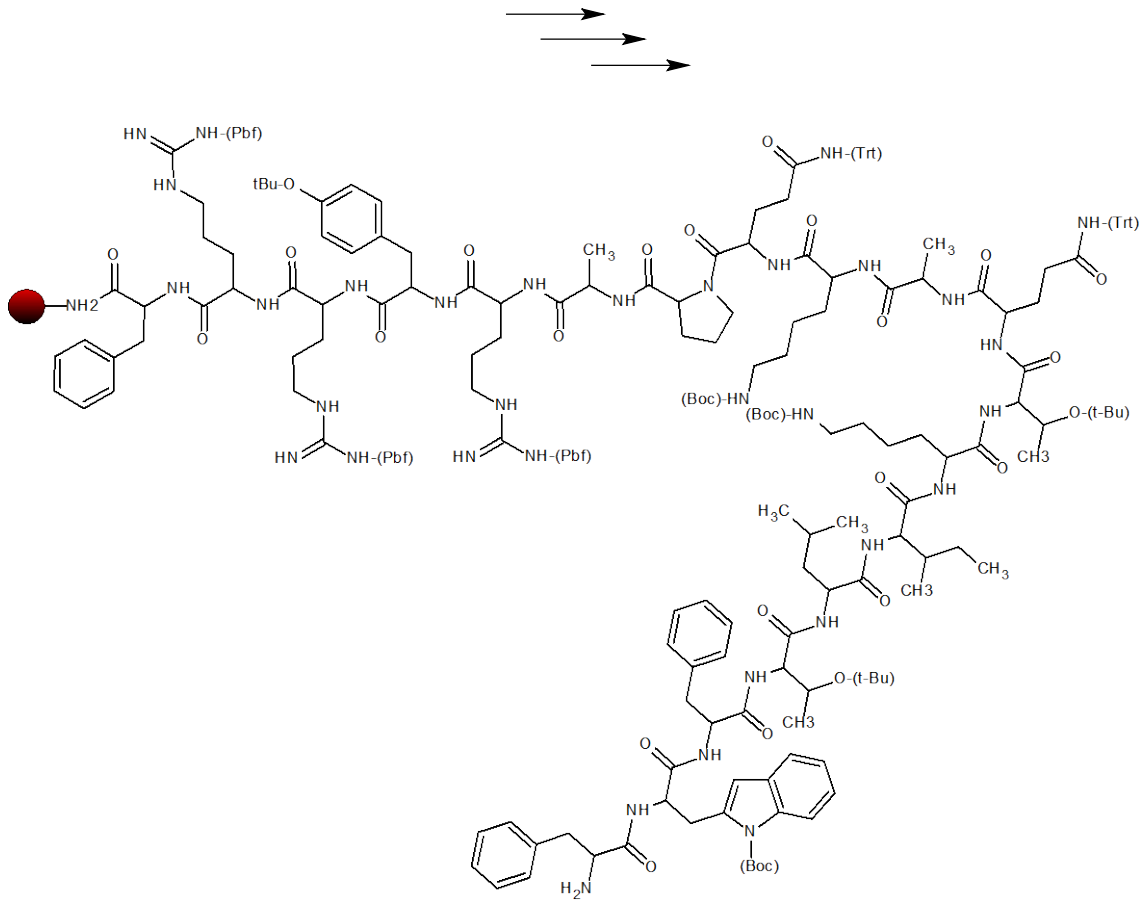
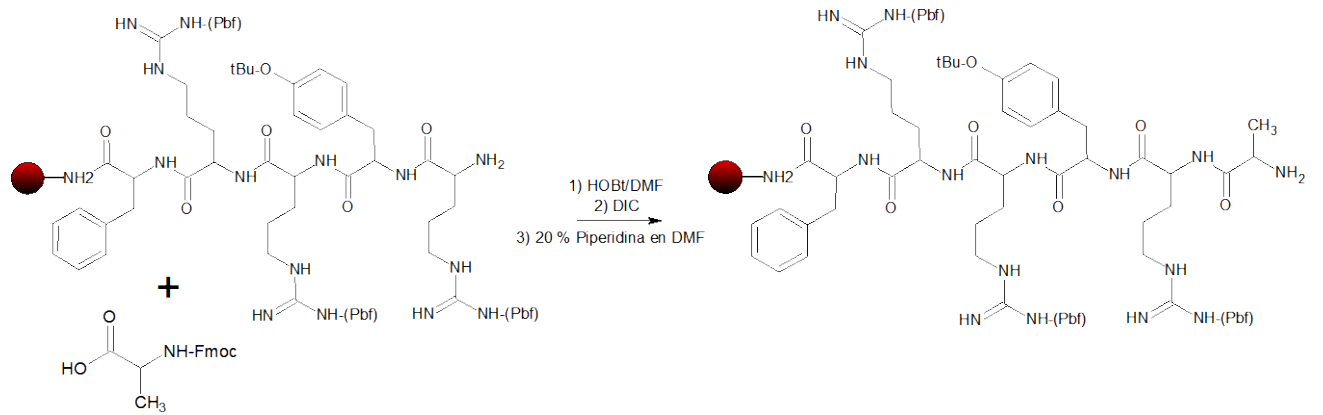
En dicho espectro se puede apreciar el pico a 571 m/z y un pico más intenso donde se representa una fragmentación del péptido  $(M+2) / 2 = 286,42$  m/z. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido.

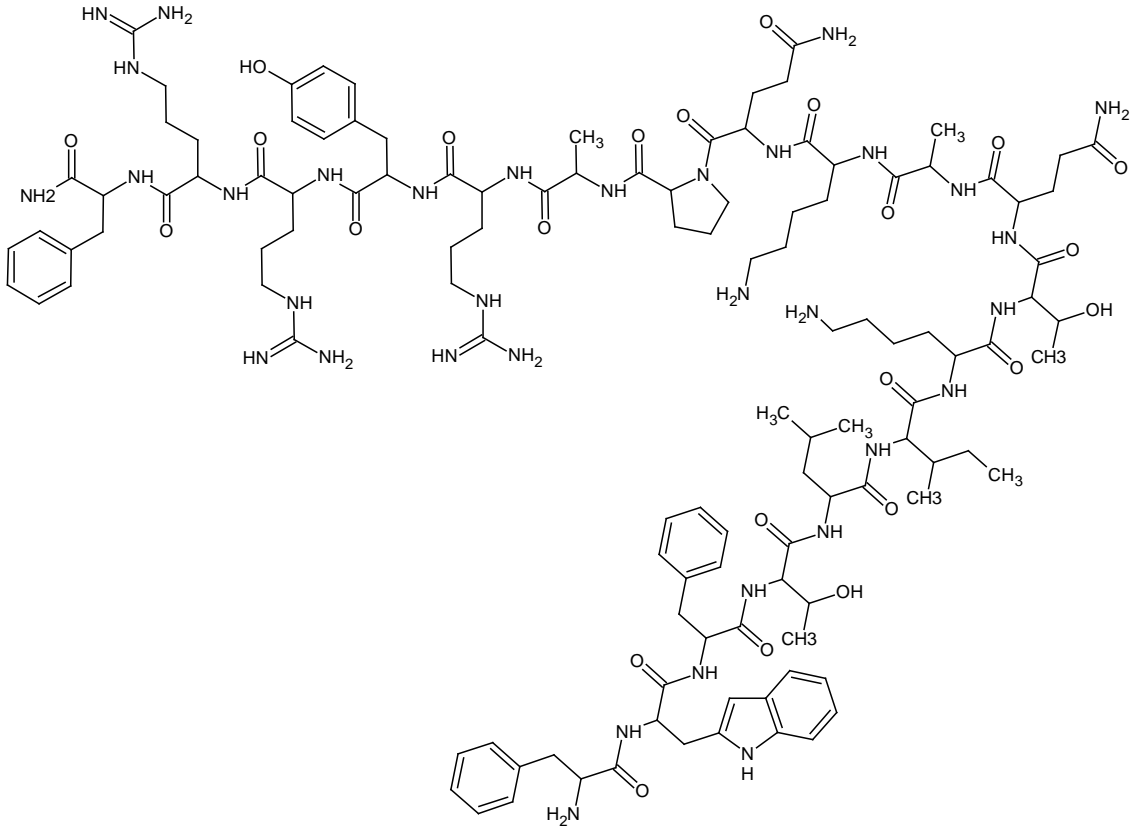
## 4.1.3 Síntesis del Péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF





7.-)





$C_{118}H_{178}N_{33}O_{25}$  PM= 2458 g/mol

Figura N° 34. Reacciones para la síntesis del péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF.

Manuelbioq\_MF1202\_esipos\_2304201201\_120328142512 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 9.98E2  
T: ITMS + c ESI Full ms [110.00-2000.00]

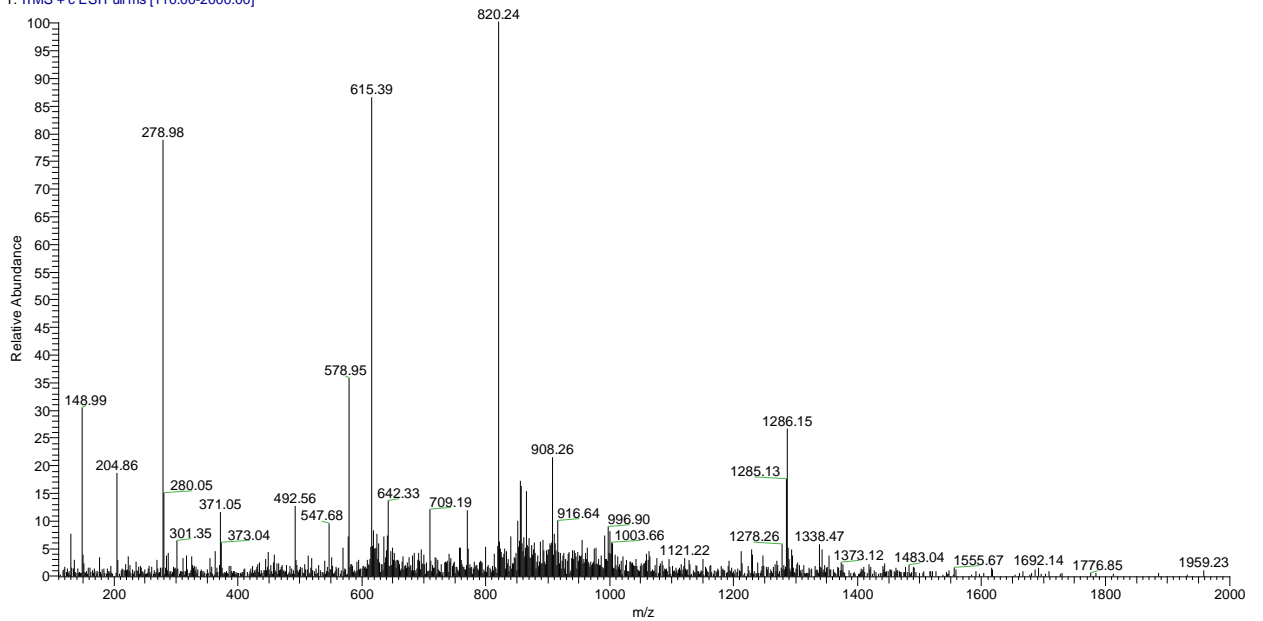
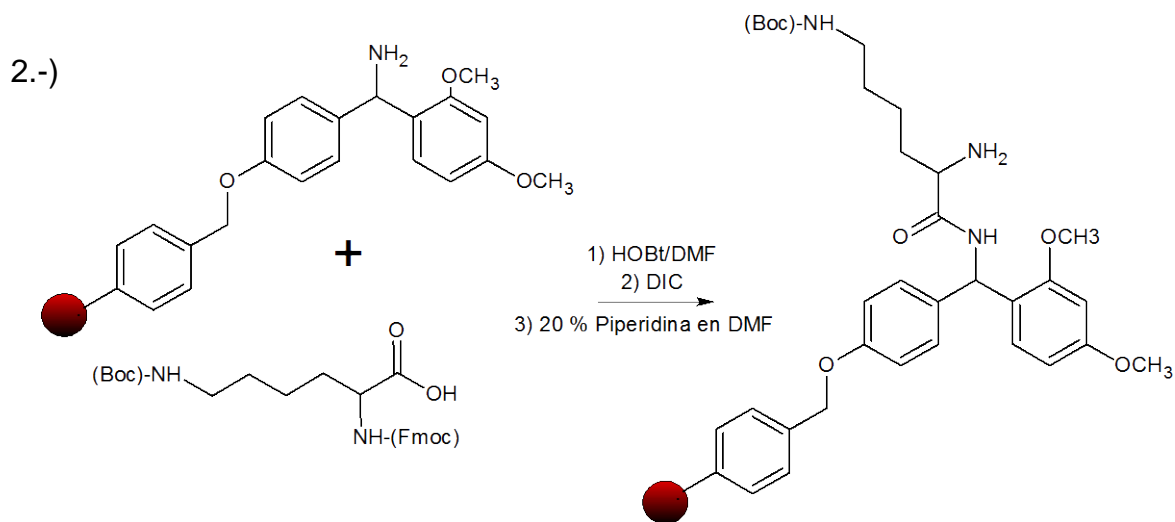
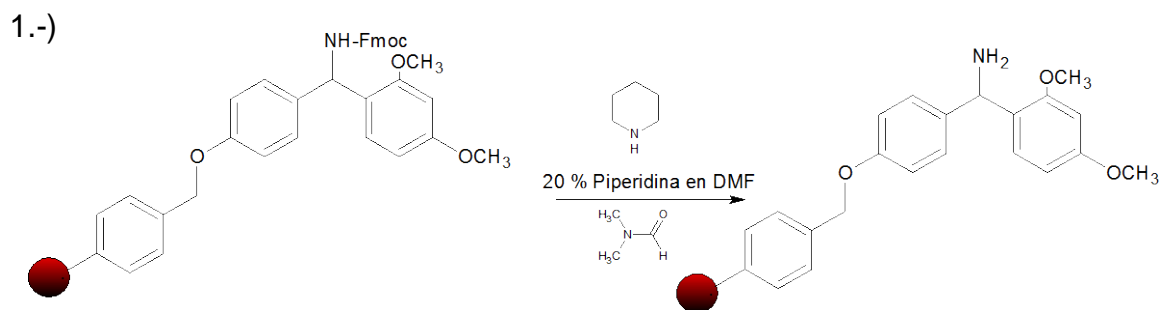


Figura N° 35. Espectro de Masa del péptido FWFTLIKTQAKQPARYRRF

En dicho espectro se pueden apreciar diferentes fragmentaciones del péptido, el pico más intenso  $(M+3) / 3 = 820,24$  m/z; seguido del  $(M+4) / 4 = 615,39$  m/z y un pico poco intenso  $(M+5) / 5 = 492,56$  m/z. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido.

#### 4.1.4 Síntesis del Péptido Nle-Arg-Lys



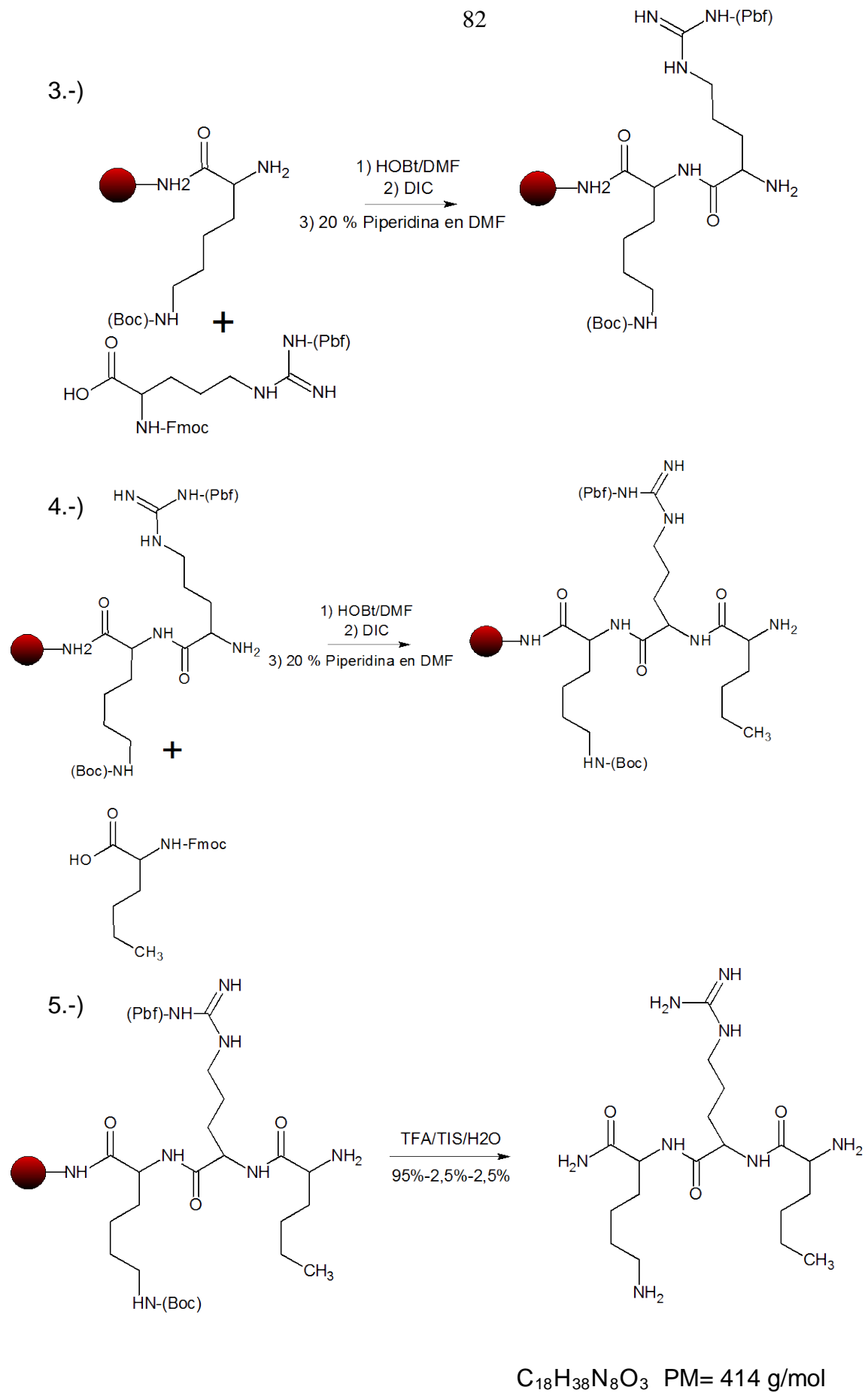
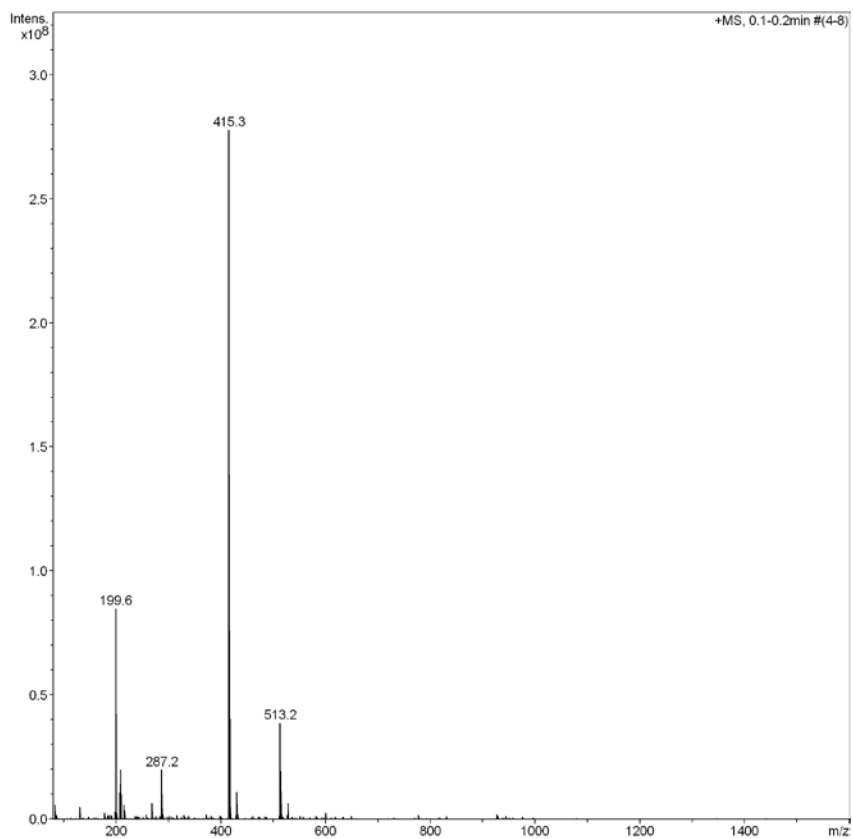


Figura N° 36. Reacciones para la síntesis del péptido Nle-Arg-Lys



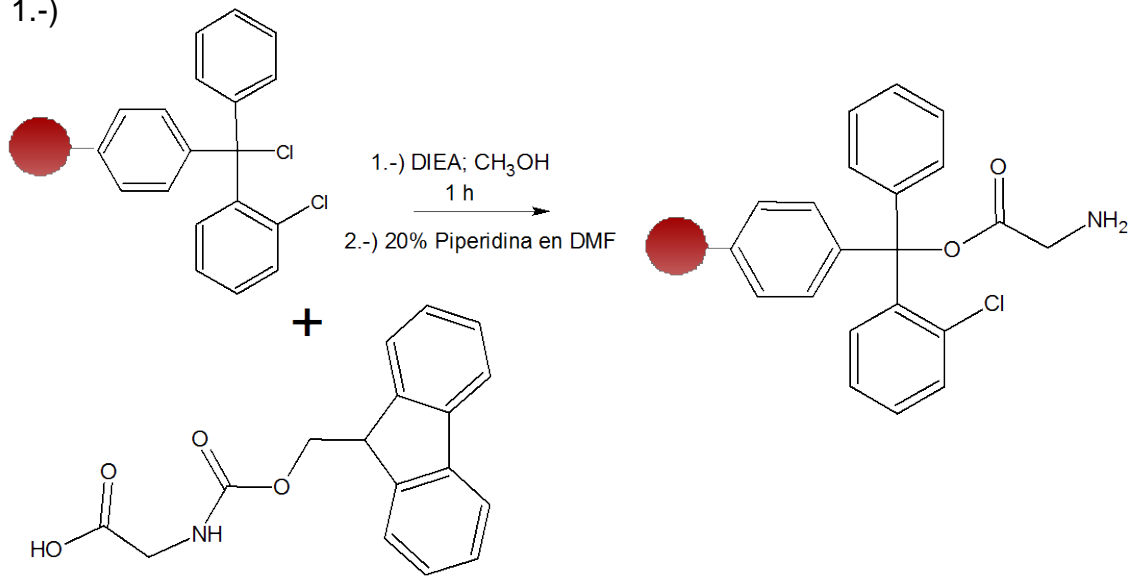
**Figura Nº 37. Espectro de Masa del péptido Nle-Arg-Lys**

En dicho espectro se puede apreciar un pico de mayor intensidad (M+1) / 1 = 415,3 m/z, que corresponde al péptido Nle-Arg-Lys. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido.

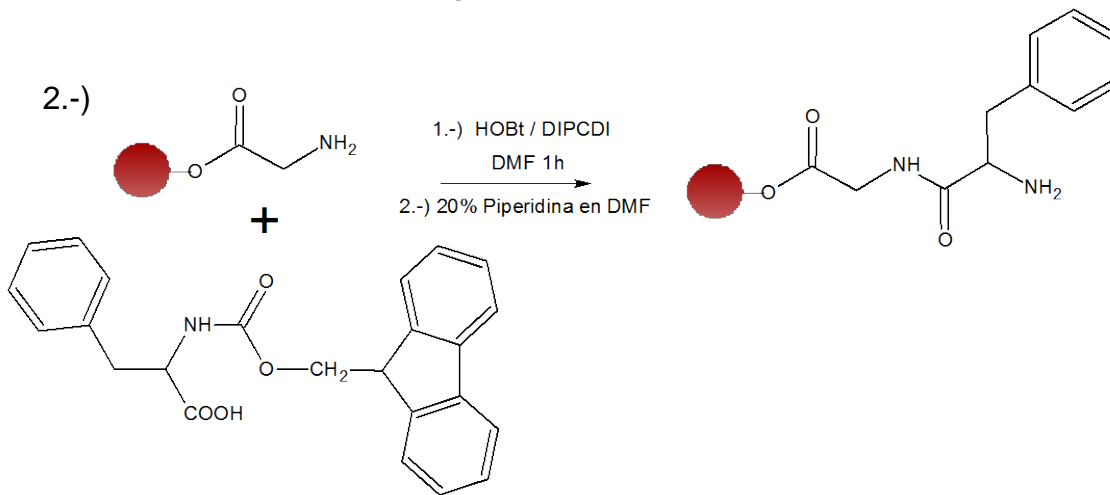


### 4.1.5 Síntesis del Péptido Met-Ala-Phe-Gly

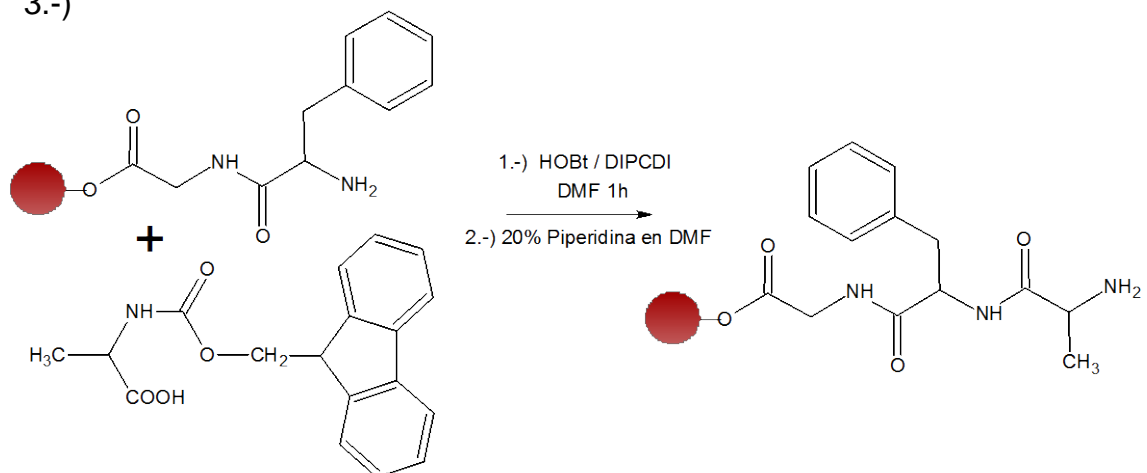
1.-)



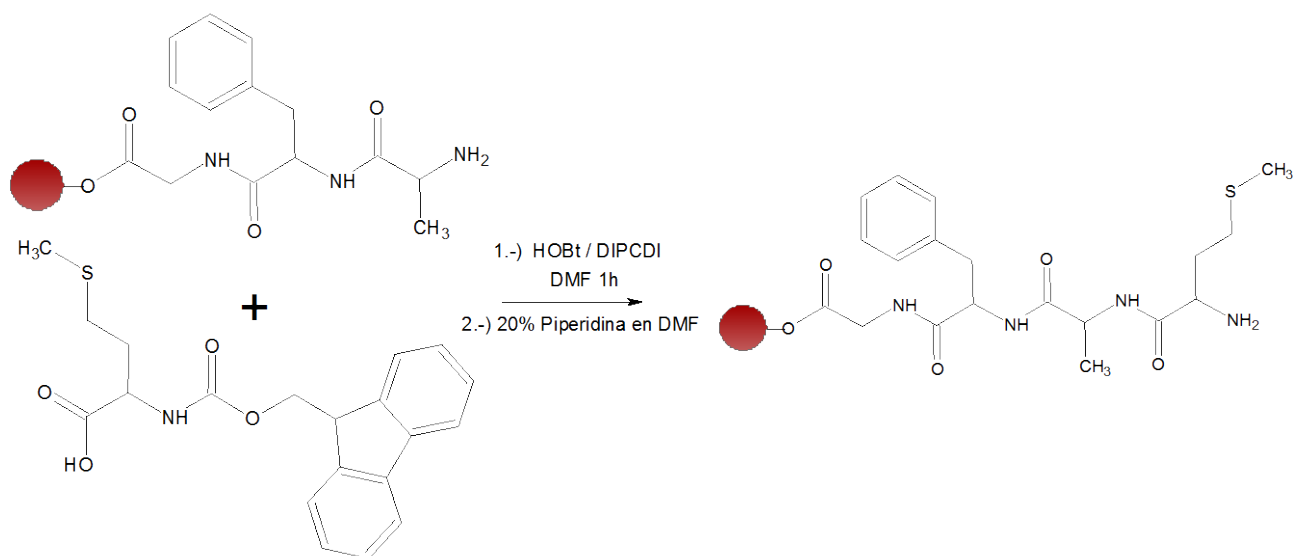
2.-)



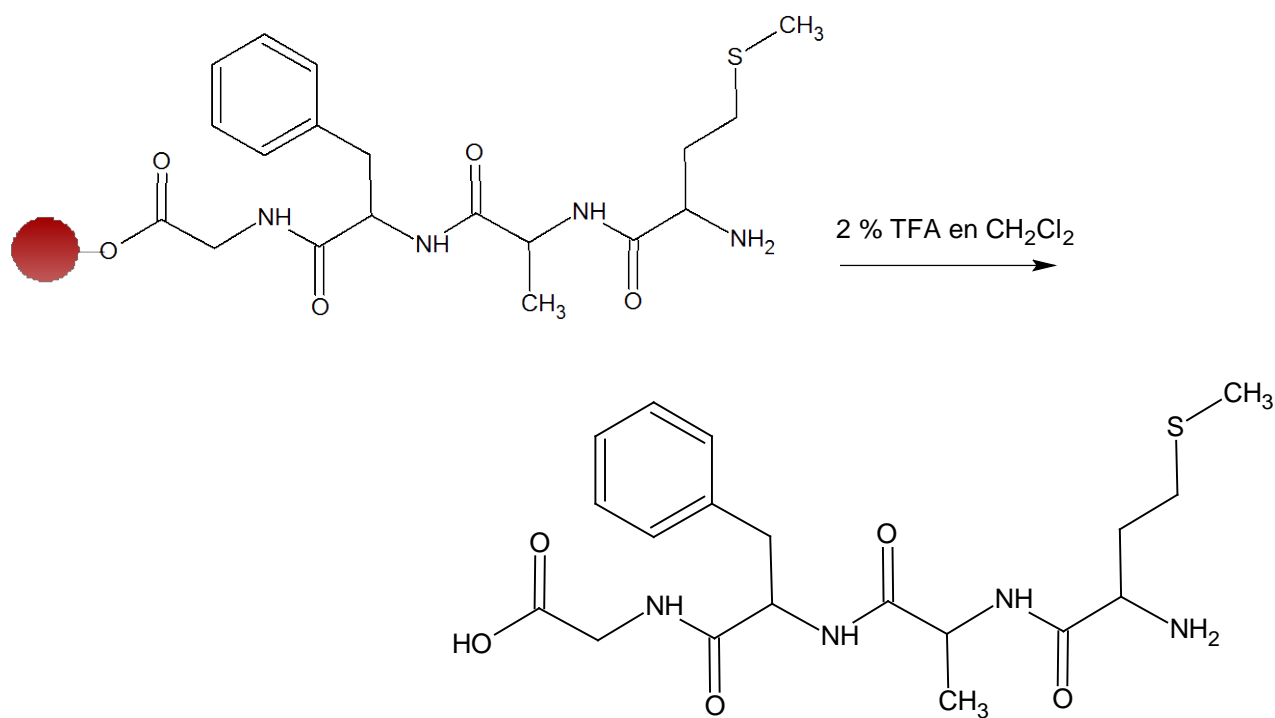
3.-)



4.-)



5.-)



$$\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_4\text{O}_5\text{S} \quad \text{PM} = 425 \text{ g/mol}$$

Figura N° 38. Esquema sintético para la síntesis del péptido MAFG

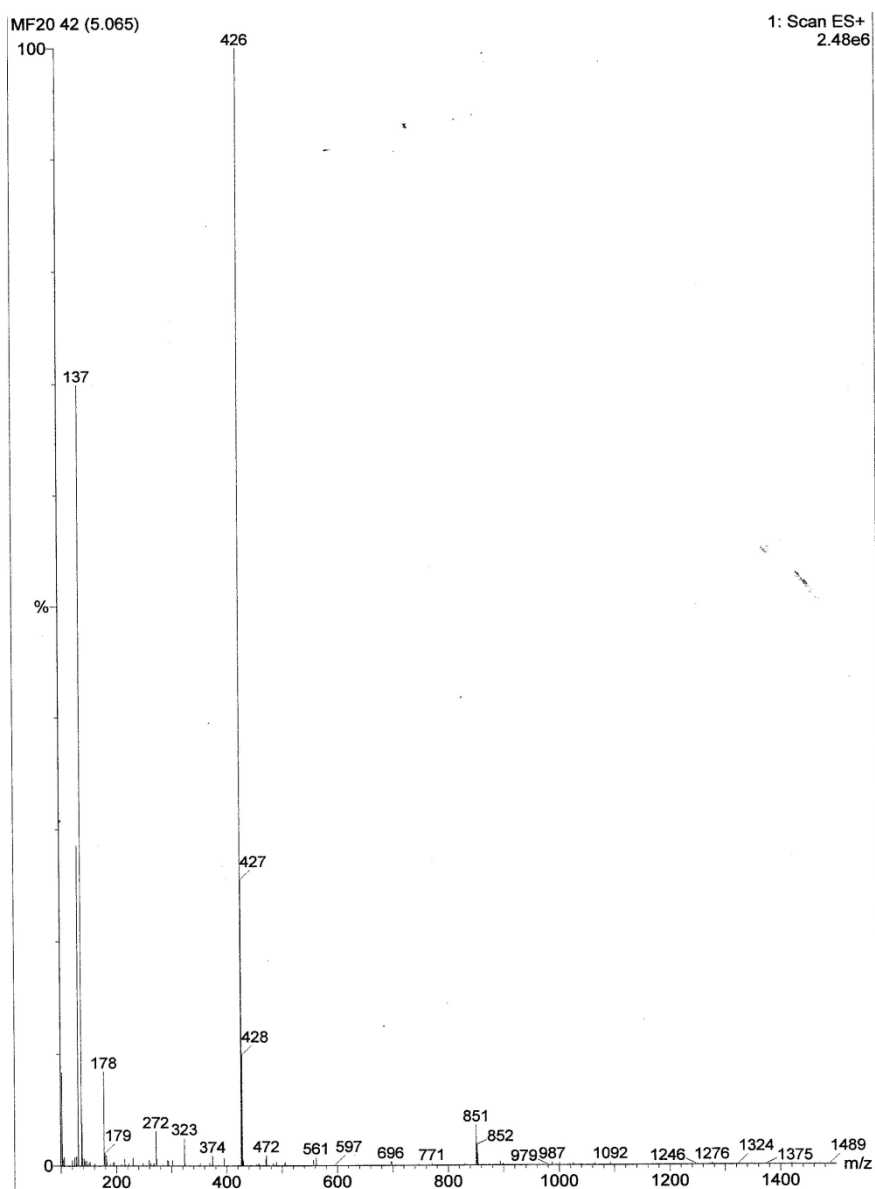
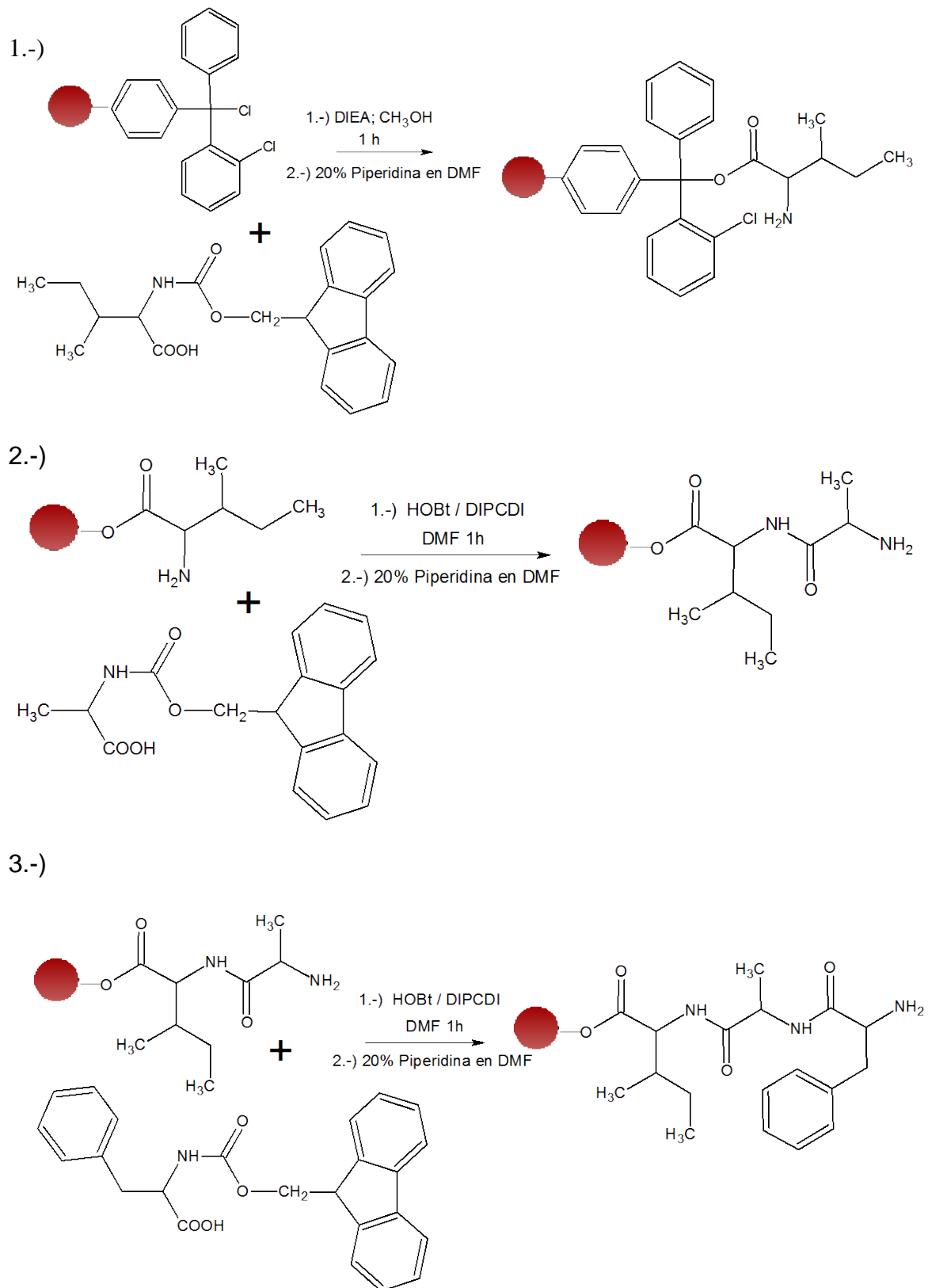


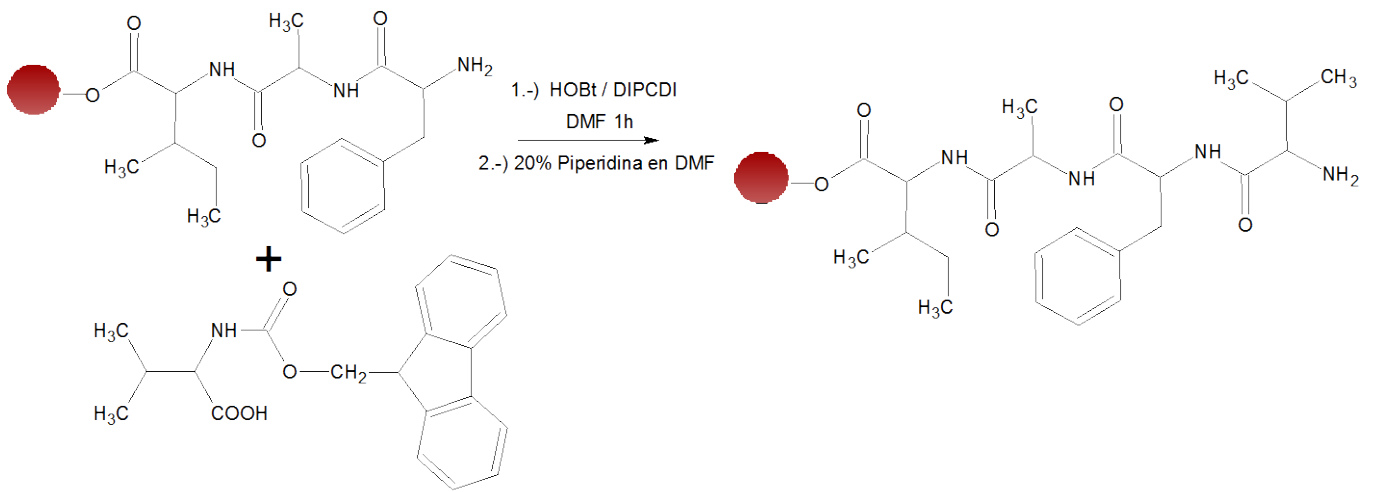
Figura Nº 39. Espectro de Masa del péptido MAFG

En dicho espectro se puede apreciar el pico más intenso  $(M+1) / 1 = 426$  m/z, que corresponde al péptido MAFG. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido.

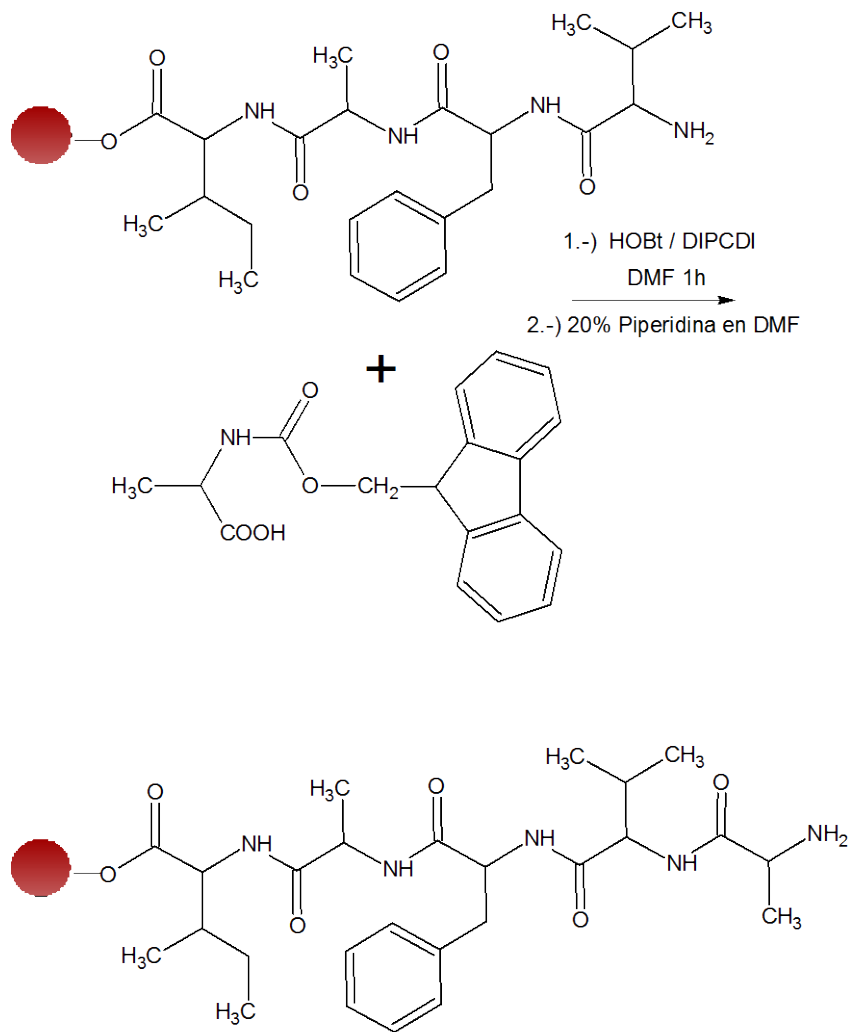
#### 4.1.6 Síntesis del Péptido Ala-Val-Phe-Ala-Ile.



4.-)



5.-)



6.-)

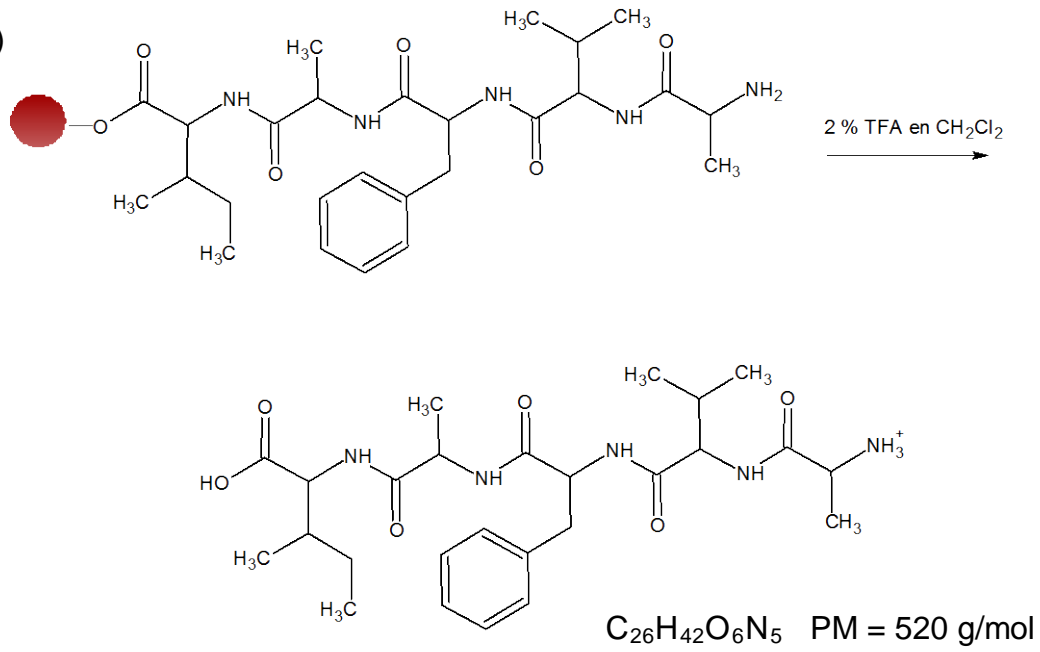


Figura N° 40. Esquema sintético para la síntesis del péptido AVFAI

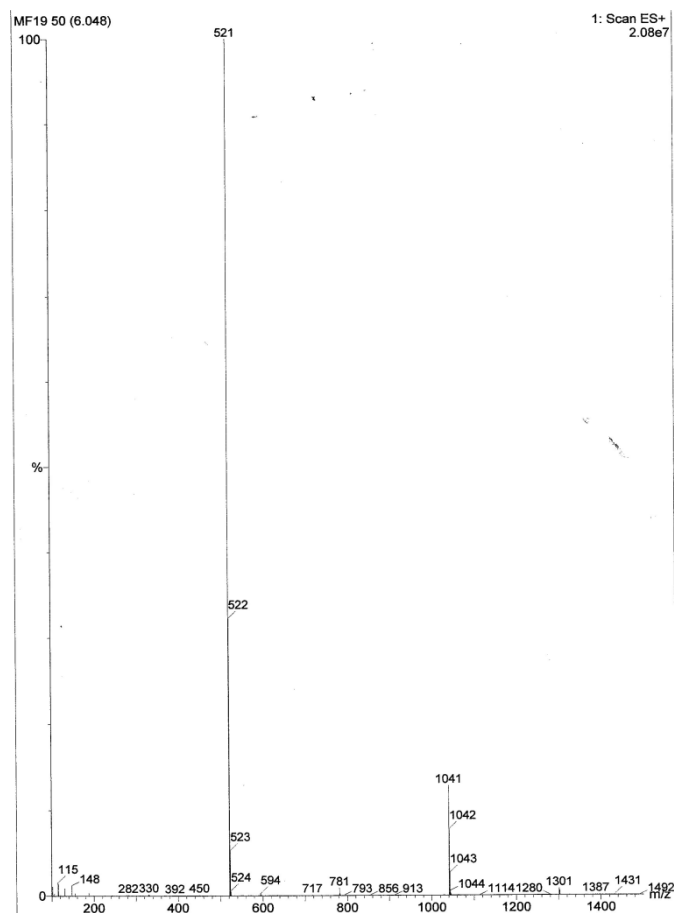


Figura N° 41. Espectro de Masa del péptido AVFAI

La caracterización del péptido se realizó mediante la técnica HPLC-MS y se obtuvo un pico máximo  $(M+1)/1 = 521$  m/z para el péptido AVFAI. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido.

Una vez sintetizados los péptidos, el próximo paso era acoplarlos al anillo D del esteroide. Este acoplamiento se lleva a cabo a través de un espaciador. Se desarrollaron dos estrategias diferentes, dependiendo del sustrato esteroideal, para acoplar el espaciador.

Si el androstano era del tipo 17-ona, se aprovecharía el carácter nucleofílico de C-16 para introducir el espaciador a través de una condensación. Para introducir el espaciador en la posición 16, fue necesario proteger el OH en la posición 3.

Si el androstano era del tipo 17- $\beta$ -OI, se utilizaría la capacidad nucleofílica del alcohol para introducir el espaciador.

## Introducción del espaciador en C-16

Como se mencionó anteriormente, el primer paso fue la protección del grupo hidroxilo en C-3, para ello se acetiló con anhídrido acético.

### 4.2 Síntesis del 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ Acetil-17 ona. Acetilación del Androstano

Para la acetilación de este compuesto se añadió un exceso de anhídrido Acético, para garantizar su total acetilación; conjuntamente se añadieron unas gotas de piridina que se utilizan como catalizador nucleofílico para formar el ión acetilpiridonio, el cual es mucho más electrofílico que el anhídrido <sup>64</sup>. Esta reacción es directamente proporcional a la cantidad de piridina libre en la solución <sup>65</sup>, es decir, que no se encuentre protonada, de allí la importancia que la piridina este completamente seca; de esta manera se obtuvieron 10,23 g de 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$  aceto-17 ona para dar un rendimiento en la reacción de 91%.

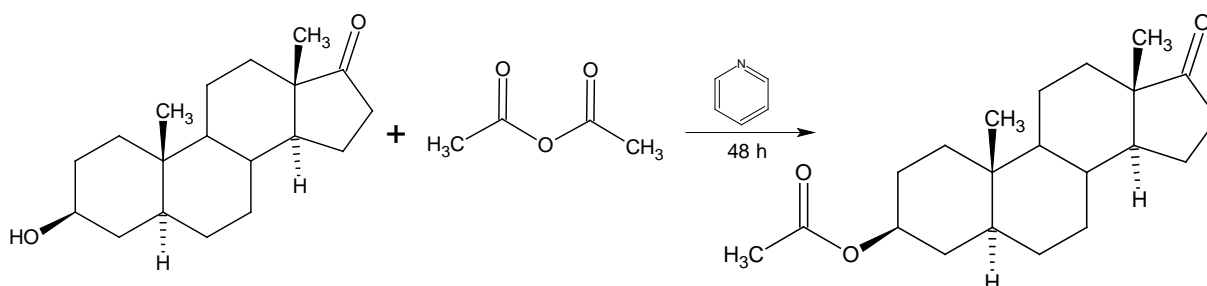


Figura N° 42. Reacción de protección para el 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$  aceto-17 ona

El compuesto obtenido 5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$  aceto-17 ona se caracterizó mediante espectroscopia de IR y RMN-<sup>13</sup>C. En la Figura N° 43 se muestra el



espectro infrarrojo tomado en KBr, mientras que en la tabla N° 2 se resumen, los valores de las bandas más relevantes seleccionadas del espectro infrarrojo.

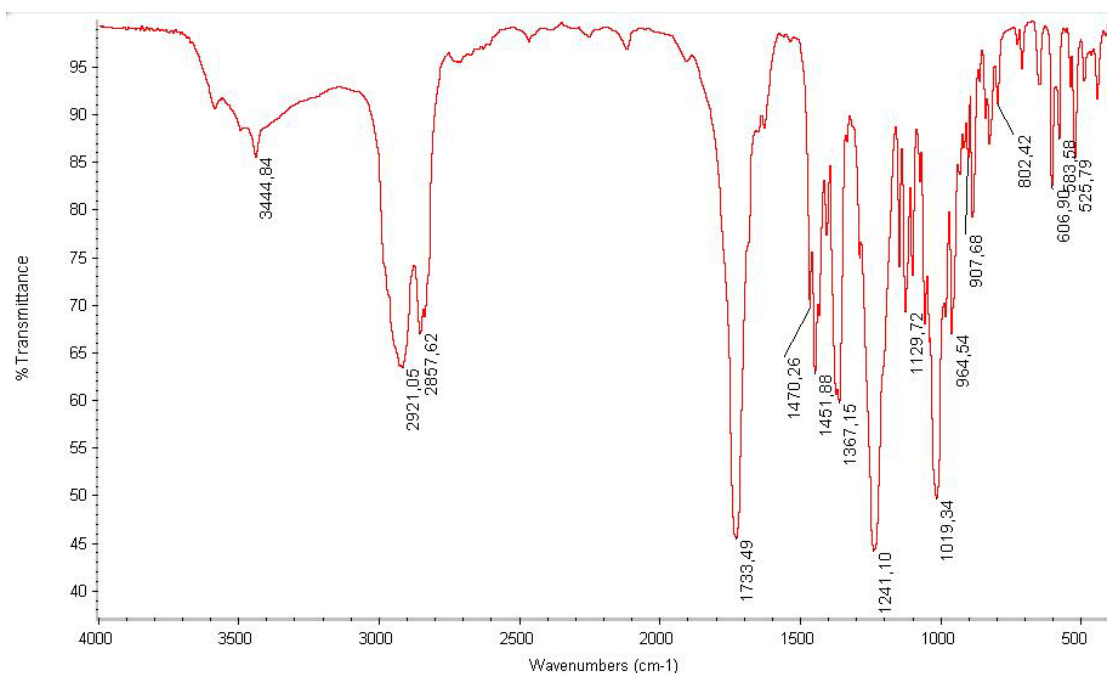


Figura N° 43. Espectro de absorción infrarroja del 5 $\alpha$  – Androstan - 3 $\beta$  aceto -17 ona

Tabla N°2. Valores de las bandas de absorción infrarroja para el compuesto 5 $\alpha$  – Androstan - 3 $\beta$  aceto -17 ona

Modo de vibración	Frecuencia de Vibración (cm <sup>-1</sup> )
Estiramiento C-H	2921,05 ; 2857,62
Alargamiento asimétrico C=O	1733,49

En el espectro de IR se pueden apreciar algunas bandas características para la acetilación del androstano, debido a que desaparece el pico agudo característico del grupo OH que se observa en el producto de partida (ver anexo), esta desaparición se atribuye a la protección del grupo OH en la posición 3; seguidamente podemos notar la presencia de dos bandas a

2921,05 y 2857,62  $\text{cm}^{-1}$ , característica de la tensión de enlace Carbono-Hidrogeno  $\text{sp}^3$  es decir todos los carbonos metílicos y metilénicos presente en la estructura de la hormona y un pico muy estrecho a 1733,49  $\text{cm}^{-1}$ , el cual se puede asignar a la frecuencia de vibración del enlace  $\text{C}=\text{O}$  de la cetona o del grupo acetato de la protección, estando solapada una banda con la otra. Las demás bandas que se observan a frecuencias más altas, pertenecen a la zona de la huella dactilar de la molécula y son difíciles de atribuir a un enlace en particular.

En el apéndice, podemos ver el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , donde se puede visualizar claramente desplazamientos químicos característicos de este compuesto. Los valores reportados colocados en la tabla N° 3 son tomados de la literatura<sup>66-68</sup>

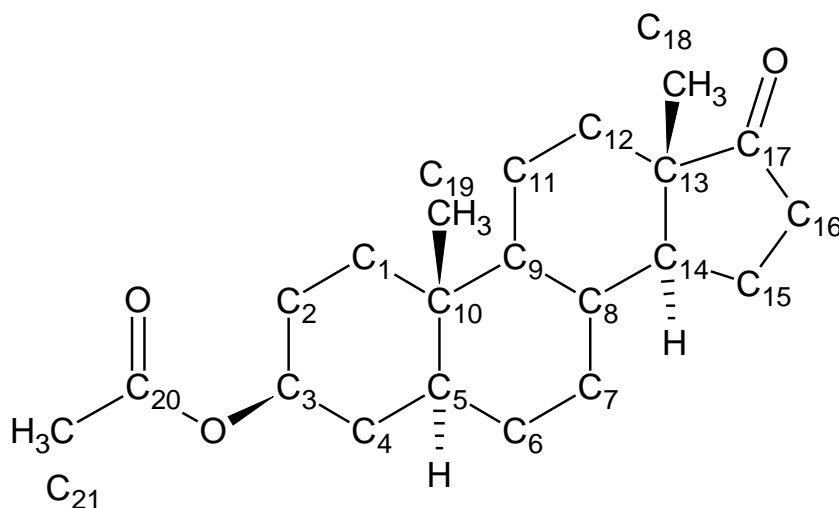


Figura N° 44. Enumeración de átomos de carbono en el 5 $\alpha$ - Androstan - 3 $\beta$  aceto -17 ona

Tabla N°3. Valores de los desplazamientos químicos de el compuesto 5 $\alpha$  – Androstan - 3 $\beta$  aceto -17 ona

N° de Carbono	Asignación	$\delta$ (ppm) Reportados	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm) DEPT-135
1	CH <sub>2</sub>	36,9	31,71	32,17
2	CH <sub>2</sub>	27,7	27,51	27,97
3	CH	73,8	73,13	73,63
4	CH <sub>2</sub>	37,2	34,84	34,51
5	CH	44,3	44,44	44,91
6	CH <sub>2</sub>	28,7	28,28	28,74
7	CH <sub>2</sub>	32,0	30,75	31,21
8	CH	32,2	35,59	35,31
9	CH	49,8-53,6	54,03	54,50
10	C	35,5	34,05	-
11	CH <sub>2</sub>	20,2-20,9	20,44	20,90
12	CH <sub>2</sub>	40,8-41,2	36,51	36,98
13	C	37,3-38,0	47,45	-
14	CH	49,8	51,02	51,43
15	CH <sub>2</sub>	25,8-26,0	21,74	22,20
16	CH <sub>2</sub>	35,7	35,66	36,13
17	C	211,8	220	-
18	CH <sub>3</sub>	17,8	13,82	14,28
19	CH <sub>3</sub>	12,3	12,27	12,70
20	C	170,0	170,13	-
21	CH <sub>3</sub>	21,0	21,45	21,91

C = 4  
 CH = 5  
 CH<sub>2</sub> = 9  
 CH<sub>3</sub> = 3

Solvente utilizado: Dimetil Sulfoxido (DMSO)

### 4.3 Síntesis del Metil Acrilato. (2-Propenoato de metilo)

Se sintetizó esta molécula como espaciador, para introducirla en la posición 16 a través de una condensación aldólica. Se realizó esta reacción por el método de la esterificación Azeotrópica, utilizando benceno como agente para la eliminación Azeotrópica del agua formando un punto de ebullición mínimo entre el agua y el benceno. De esta manera se elimina agua de la reacción y se desplaza el equilibrio por Le Chatelier <sup>14</sup> hacia la formación de productos, aumentando la cantidad de metil acrilato formado, e incrementando el rendimiento de la reacción. En esta reacción se obtuvieron 0,82 g de metil acrilato, lo que representa un rendimiento del 4 % en la reacción.

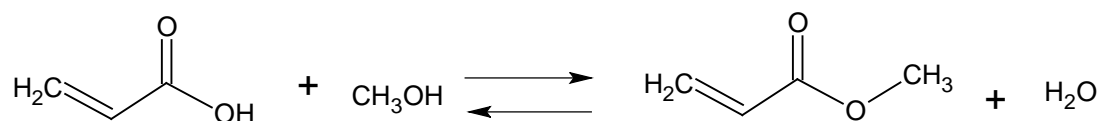


Figura N° 45. Reacción de esterificación para el ácido acrílico

Se realizó el espectro de RMN- <sup>1</sup>H y RMN -<sup>13</sup>C (ver apéndice), donde se pueden apreciar los desplazamientos químicos característicos de este compuesto y en las tablas N° 4 y N° 5 los valores característicos para este compuesto.

**Tabla N° 4. Desplazamientos químicos de RMN - <sup>1</sup>H del compuesto metil metacrilato**

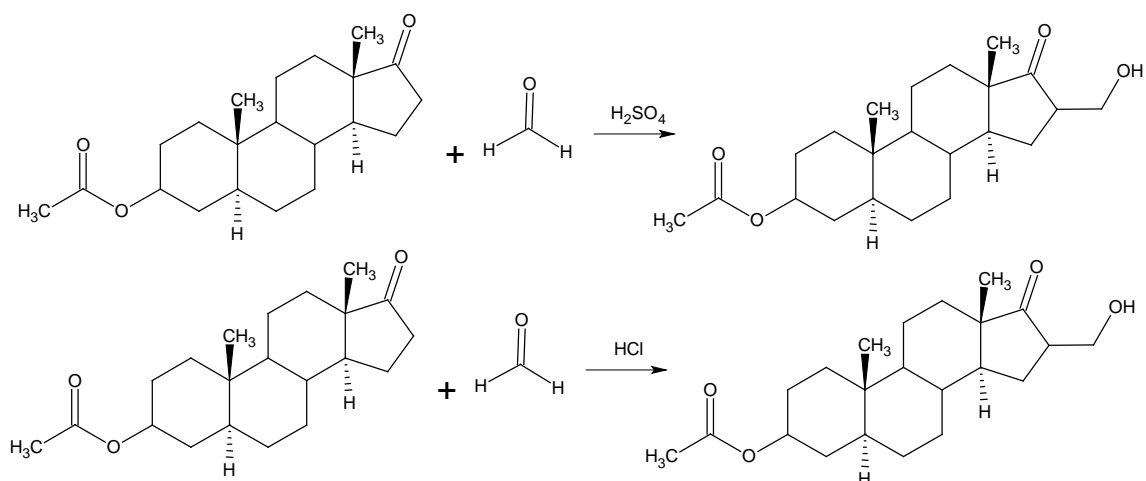
<b>δ (ppm)</b>	<b>Multiplicidad</b>	<b>Integración Relativa</b>	<b>Asignación</b>	<b>Acoplamiento J (Hz)</b>
3,883	Singlete	3H	OCH <sub>3</sub>	-
5,90	Doblete	1H	H <sub>CIS</sub>	10,53
6,31	Doblete/doblete	1H	H	-
6,6	Doblete	1H	H <sub>TRANS</sub>	17,28

**Tabla N° 5. Desplazamientos químicos de RMN – <sup>13</sup>C del compuesto metil metacrilato.**

<b>δ (ppm)</b>	<b>Asignación</b>
50,61	CH <sub>3</sub>
127,86	CH <sub>2</sub>
129,76	CH
165,73	C=O

#### 4.4 Reacciones Ensayadas

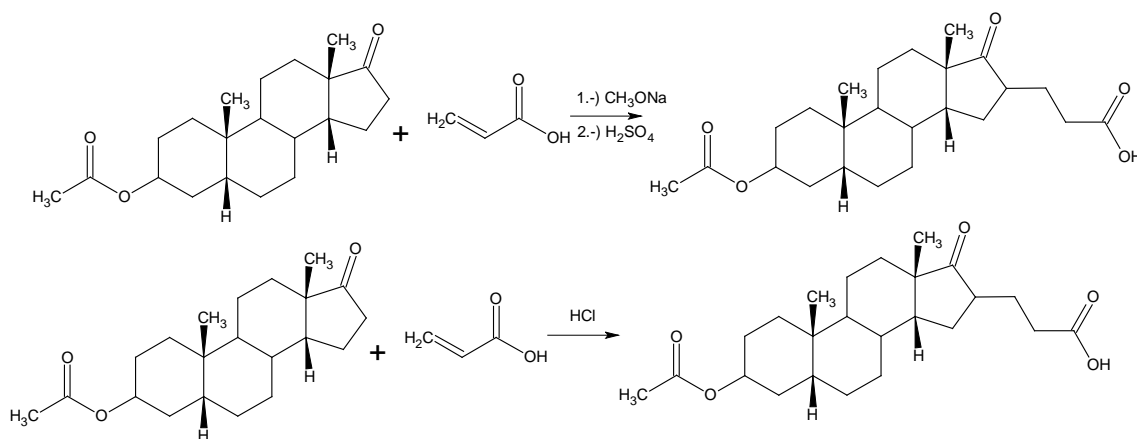
A continuación se muestran algunas reacciones ensayas para obtener los productos deseados, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios.



**Figura N° 46. Reaccion ensayada entre el 5 $\alpha$  – Androstan - 3 $\beta$  aceto -17 ona y el formaldehido**

Al realizar la reacción entre el formaldehido y las diferentes moléculas de androstano, no se pudo obtener la condensación aldólica deseada en la posición 16 del androstano y el formaldehido. Se ensayó a través de la utilización de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y  $\text{HCl}$  para formar el aldol correspondiente a través de un equilibrio ceto-enolico y no se obtuvieron resultados satisfactorios. En todos los casos anterior se siguió la reacción a través del ensayo colorimétrico entre el ácido cromotrópico (ácido 4,5 dihidroxi- 2,7 naftalendisulfónico) y el formaldehido<sup>69</sup>.

Se decidió realizar la condensación aldólica directa entre el ácido acrílico y los diferentes androstanos tanto en medio ácido, como en básico y no se obtuvo resultado ya que se obtenía una mezcla compleja, producto de la polimerización del ácido acrílico.



**Figura N° 47. Reacciones ensayadas entre el 5  $\alpha$  – Androstan - 3 $\beta$  aceto -17 ona y el ácido acrílico.**

Luego de la utilización directa del ácido acrílico se decidió proteger el ácido, para formar el éster y de esta manera minimizar la polimerización del ácido y favorecer de alguna manera el ataque aldólico. Se probaron diferentes reacciones de esterificación en condiciones muy suaves <sup>70,71</sup>, sin obtener resultados satisfactorios, en algunos casos se obtuvo el polímero acrilato.

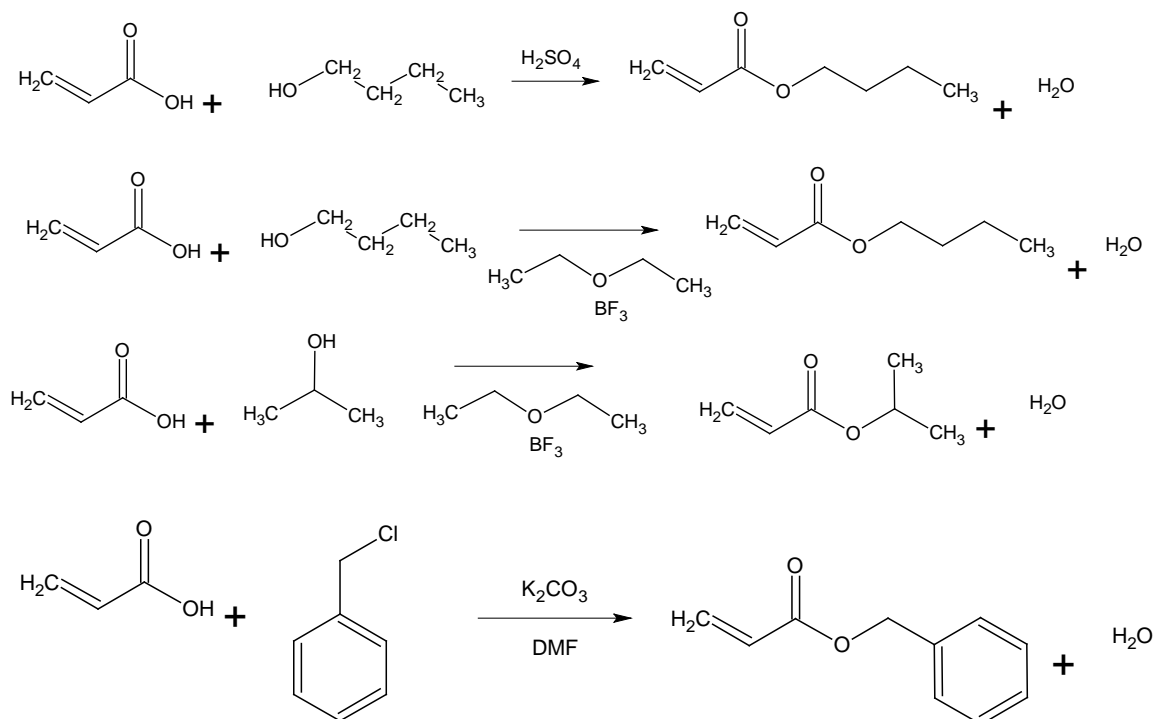


Figura N° 48. Reacciones ensayadas para esterificar el ácido acrílico

Se decidió acilar el ácido acrílico <sup>45,72,73</sup>, para garantizar un ataque directo sobre la posición deseada para lograr la esterificación y tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios.

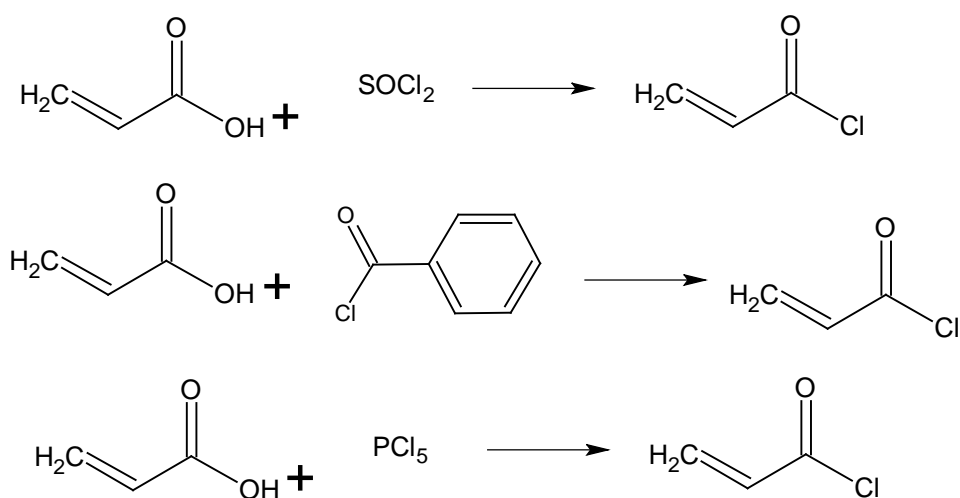


Figura N° 49. Reacciones ensayadas para acilar el ácido acrílico



Por tal sentido, se decidió sustituir este sustrato como espaciador para el anclaje de péptidos y se utilizó el ácido succínico como espaciador en la posición 17 de los esqueletos de Androstanos.

### Introducción del espaciador en 17- $\beta$ -OI

#### 4.5 Síntesis del Anhídrido Succínico.

La deshidratación directa es un método general para la preparación de anhídridos cíclicos de cinco y seis miembros <sup>74</sup>, dado que estos compuestos constan formalmente de dos grupos carboxílicos, los cuales a través de una reacción intramolecular, elimina una molécula de agua. Esta eliminación de agua es la fuerza motriz de la reacción ya que incrementa la entropía del sistema <sup>75</sup>.

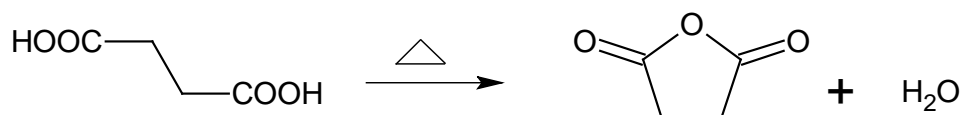
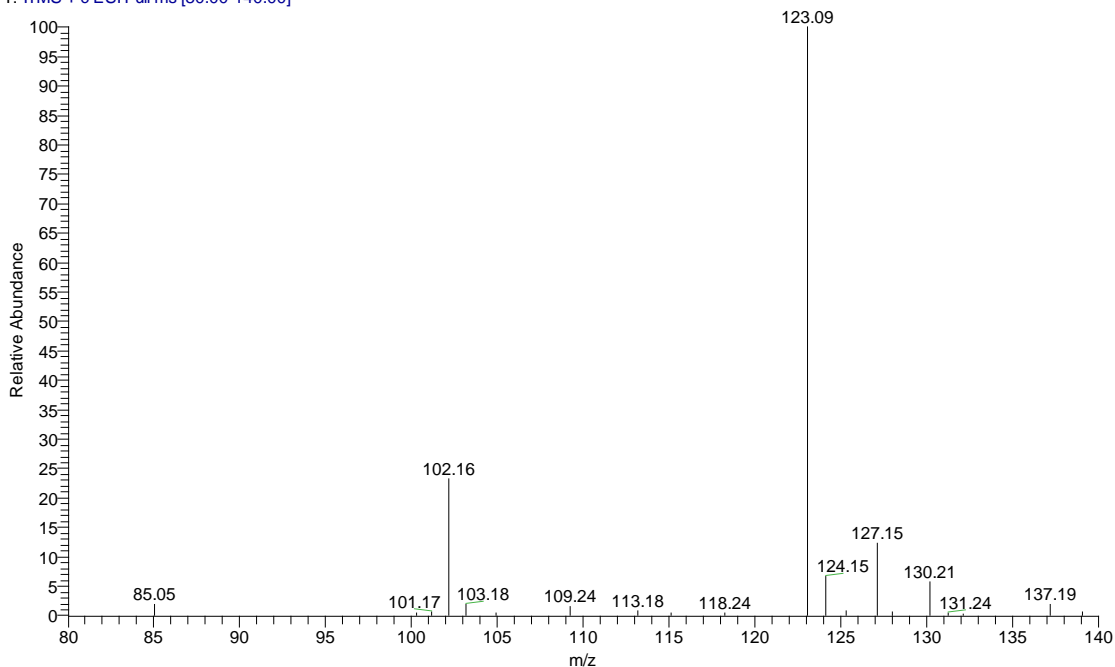


Figura N° 50. Deshidratación del ácido succínico

manuelbioq\_anhidrido\_esipos\_0805201201\_120503144112 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.79E4  
T: ITMS + c ESI Full ms [80.00-140.00]



**Figura N° 51. Espectro de masa del anhídrido succínico.**

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en dicho espectro se pueden apreciar dos picos; el pico menos intenso corresponde al  $(M+2) / 1 = 102 \text{ m/z}$ , pertenece al anhídrido succínico. El pico más intenso  $(M+1) / 1 = 123 \text{ m/z}$  puede ser un átomo de sodio (proveniente del envase vidrio donde se tomó la muestra) coordinado a un átomo de oxígeno o a una fragmentación de la molécula que se coordinó con cualquiera de los átomos de oxígeno presentes en la molécula.

#### 4.6 Ácido $\Delta^4$ -Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico

Para obtener el Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico se utilizó la resina de Wang <sup>47</sup>, (ver figura N° 52) con la finalidad de anclar el anhídrido succínico al soporte como un éster y en el otro extremo de la molécula tener un grupo carboxilato. Para ello fue necesario añadir la diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), la cual garantiza un medio relativamente básico y la 4-Dimetilamino piridina (DMAP), que se utiliza ampliamente como catalizador para las reacciones de esterificación <sup>76</sup> por ser extremadamente eficiente; ya que forma de manera mucho más rápida el ion N-succinilpiridonio, estabilizándolo por resonancia, al deslocalizar el par de electrones de la dimetilamina en la posición 4.

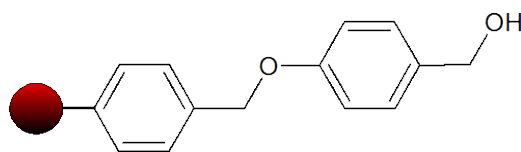


Figura N° 52. Resina de Wang

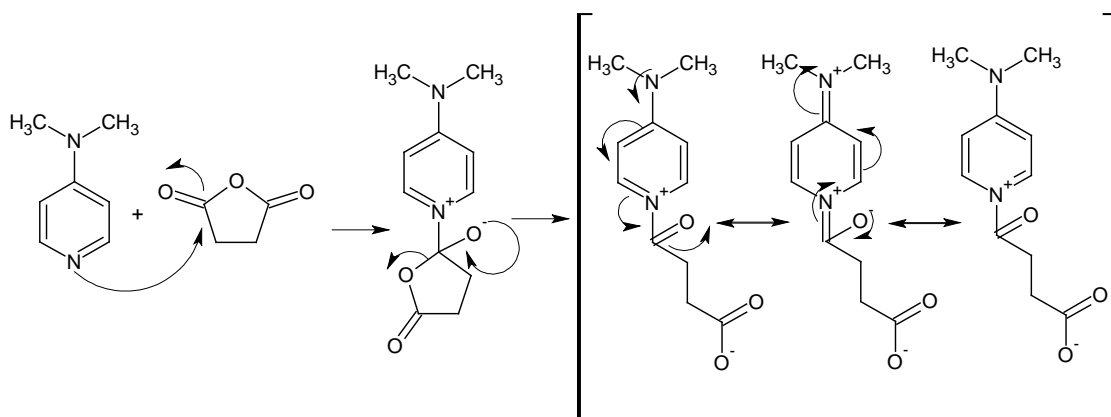
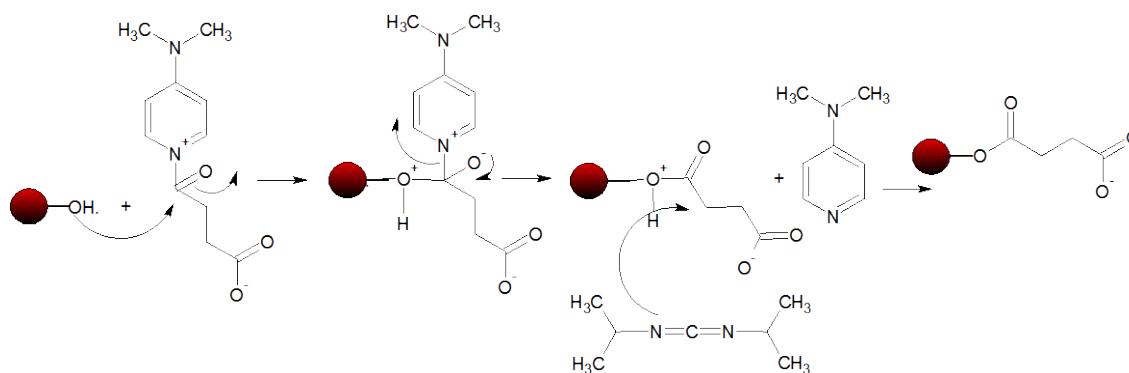


Figura N° 53. Hibrido de resonancia del N-Succinilpiridonio

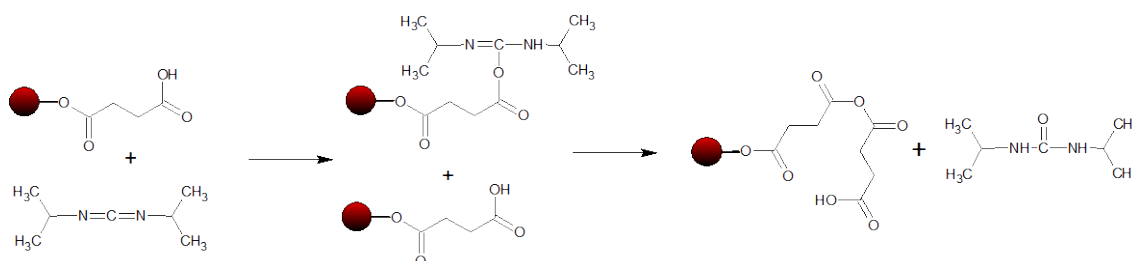
El N-acetilpiridonio existe como un par iónico suelto, en solventes no polares, los cuales facilitan el ataque nucleofílico al grupo acilo por parte del grupo OH de la resina de Wang. Este paso está sujeto a catálisis básica general por el contra ion; bajo estas condiciones son mejores agentes acilantes los anhídridos, por tal sentido una base auxiliar como (DIPCDI), es a menudo empleada para incrementar la velocidad del segundo paso y generalmente se emplea en cantidades estequiométricas, para prevenir una protonación de las cantidades catalíticas del DMAP por algún ácido formado durante la reacción<sup>77</sup>.



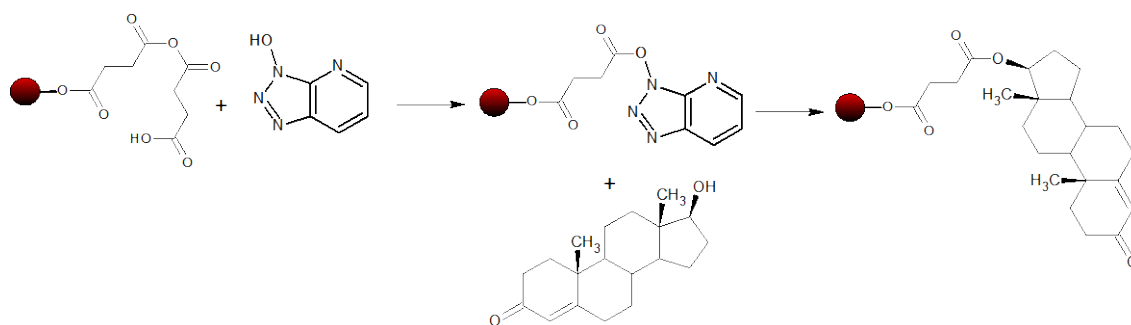
**Figura N° 54. Acoplamiento del succinato a la resina de Wang**

Para realizar el acoplamiento de la Testosterona con el extremo carboxílico del succinato que se encuentra anclado a la resina de Wang, fue necesario tener condiciones de reacción muy parecidas a la anterior, con la ligera diferencia de incluir el agente acoplante (HOAt) al medio de reacción, para potenciar la esterificación de la hormona e incrementar sustancialmente el rendimiento de la reacción, debido a lo voluminosos de la testosterona.

La diisopropilcarbodiimida (DIPCDI), es un poderoso agente deshidratante comúnmente utilizado para preparar ésteres o anhídridos. Generalmente la formación de ésteres procede a través de la formación de O-acilisourea o anhídridos simétricos como intermediarios y se ven favorecidos por la presencia de un catalizador nucleofílico como el DMAP <sup>78</sup>. La adición del 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt) es un agente acilante de altísima reactividad, el cual es lo suficientemente potente para permitir una rápida formación del enlace éster, al disminuir la formación de N-Acilurea.



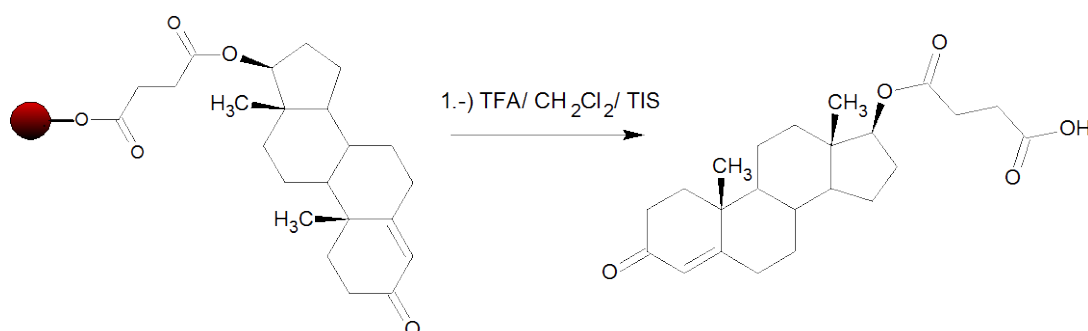
**Figura N° 55. Formación de intermediarios de O-Acilisourea y Anhídridos simétricos**



**Figura N° 56. Formación del Ácido 4-Androsten-3-ona-17-β-Succínico a través de HOAt**

Como una consecuencia de estas características, las esterificaciones en presencia de DMAP son usualmente llevadas a cabo, utilizando anhídridos, cantidades catalíticas de DMAP entre un (5-20 % mol) y cantidades estequiométricas de una base auxiliar, en presencia de solventes no polares<sup>77</sup>.

El desanclaje del Ácido 4-Androsten-3-ona-17-β-Succínico, de la resina de Wang se realiza bajo condiciones moderadas de acidez, con una solución que contenía 50 % de ácido trifluoroacético, estas condiciones son ideales para desanclar el producto de la columna sin hidrolizar el éster formado entre el ácido succínico y la testosterona.



**Figura N° 57. Desanclaje del Ácido 4-Androsten-3-ona-17-β-Succínico**

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en el espectro se puede apreciar un pico de mayor intensidad  $(M+1) / 1 = 389$  m/z; correspondiente al Ácido 4-Androsten-3-ona-17-β-Succínico.

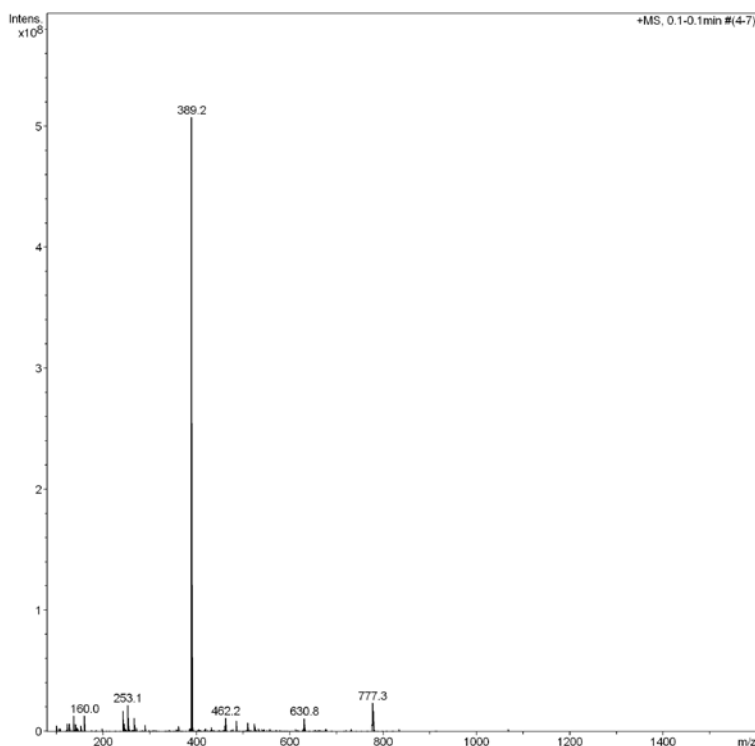
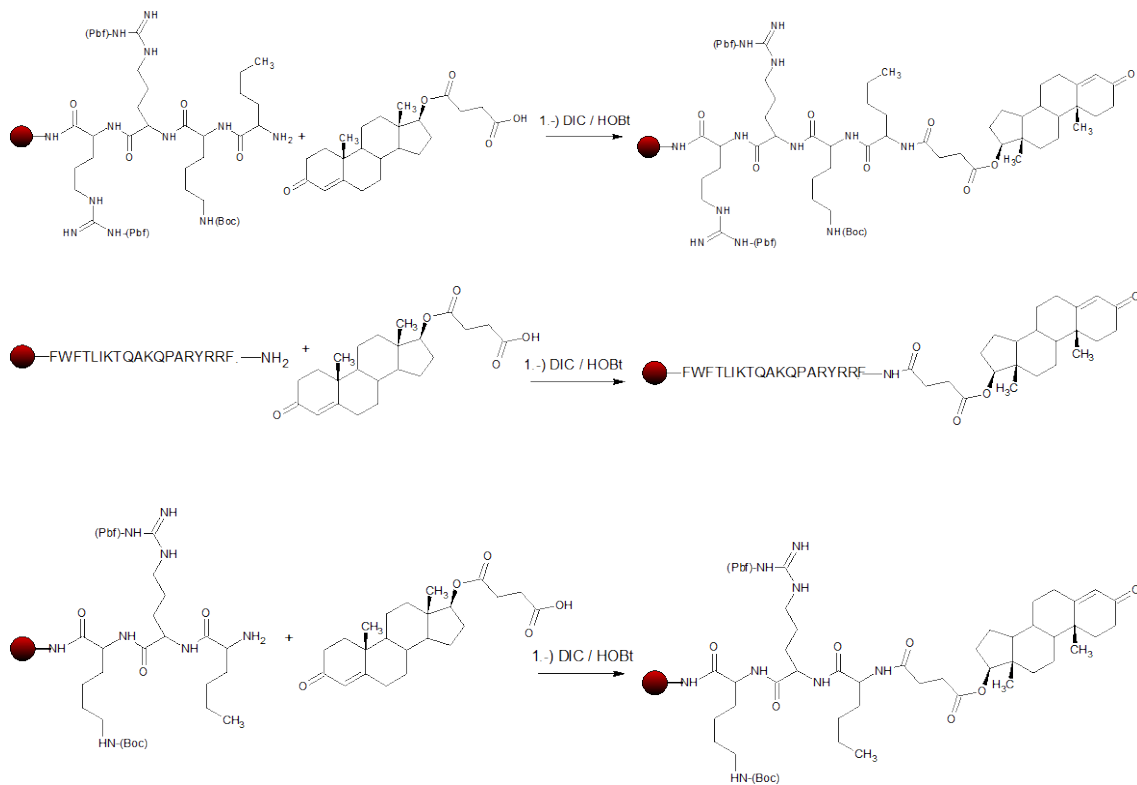


Figura Nº 58. Espectro de masa del Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico.

#### 4.7 Síntesis de los Péptidos Esteroidales

La obtención de todos los péptidos esteroidales se realizaron bajo las mismas condiciones de reacción; se realizó el acoplamiento entre el Ácido 4-Androsten-3-ona-17- $\beta$ -Succínico y cada uno de los péptidos sintetizados como si se introdujera un aminoácido más a la secuencia péptidica de cada uno de ellos, la función de añadir 1-Hidroxibenzotriazol (HOBt) como agente acoplante, y de la Diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) es de permitir el ataque del succinato a la DIPCDI, para formar una especie, acilante de baja reactividad que inhiba la formación de reacciones colaterales, como lo son la O-acylisoureas.

Esta especie, aún no ha conseguido ser aislada, pero su existencia se ha postulado por la estrecha analogía a compuestos estables de este tipo <sup>79</sup> y es lo suficientemente potente para reaccionar con el componente aminoácido para producir el péptido esteroidal y obtener como sub-producto un derivado de isourea que es muy soluble en DMF <sup>61</sup> y se elimina fácilmente al realizar los lavados correspondientes.



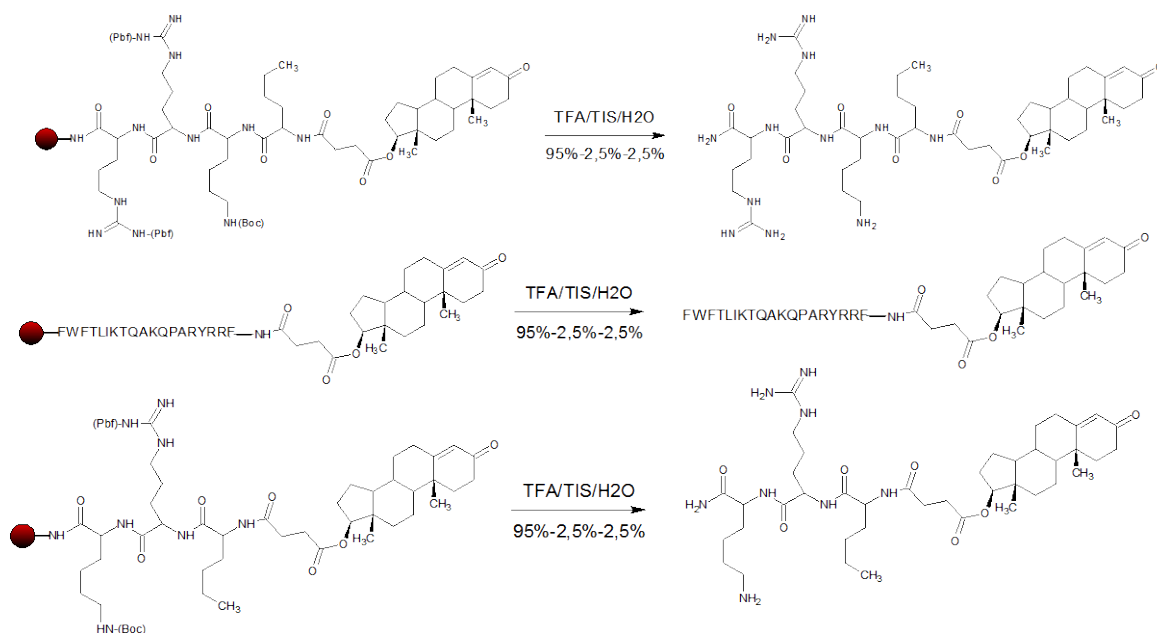
**Figura Nº 59. Síntesis de los péptidos Esteroidales**

El desanclaje de los péptidos esteroidales a la resina de Rink amida son realizados por tratamiento con TFA al 95 % por espacio de 2 horas. Bajo estas condiciones los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos son eliminados y al mismo tiempo se separa la cadena péptida esteroidal del soporte sólido. Bajo estas condiciones extremas de acidez, se hidroliza parte del éster succínico, por tal sentido se obtuvo un bajo rendimiento en las reacciones realizadas

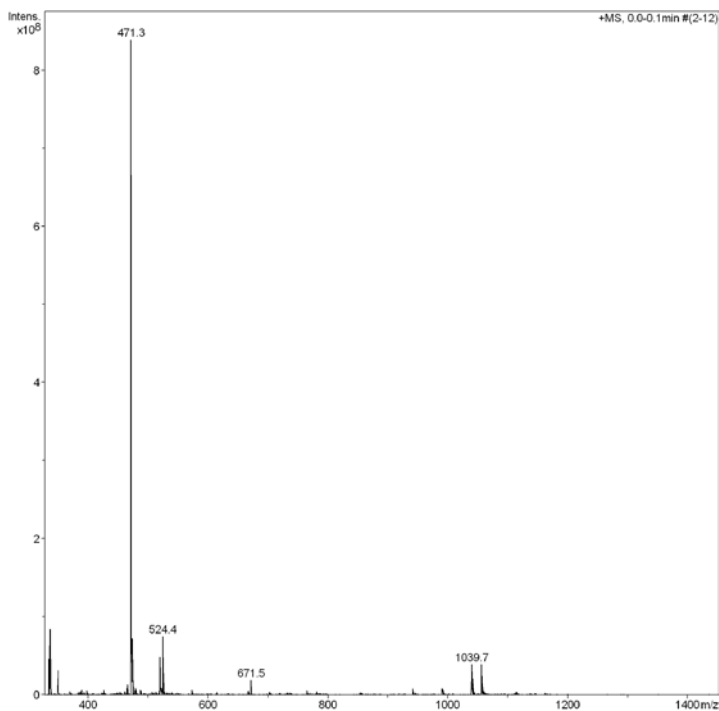


Durante este proceso, especies cationicas altamente reactivas son generadas por los grupos protectores, las cuales pueden atrapar o reaccionar con aminoácidos que contengan grupos funcionales ricos en electrones; por esta razón varios agentes nucleofílicos son adicionados a la mezcla de reacción, estas especies nucleofílicas reciben el nombre de “scavengers” (limpiadores, secuestrantes) y son adicionadas para reaccionar con estos iones formados durante el proceso de clivaje <sup>61</sup>.

Uno de los secuestrantes (scavengers) ampliamente utilizados, es el agua, debido a su abundancia y bajo costo, además de ser muy efectivo para mitigar los carbocationes t-butilo y Tritilo. El Triisopropilsilano <sup>62</sup> (TIS) ha demostrado tener una efectividad superior al agua y es usado ampliamente para mitigar los grupos Pbf y Boc, así como también los grupos mencionados anteriormente. No se debe exceder del 2,5% de TIS ya que se ha reportado previamente que grandes cantidades de este secuestrante en medio ácido reduce el anillo indólico del aminoácido Triptófano <sup>63</sup>.

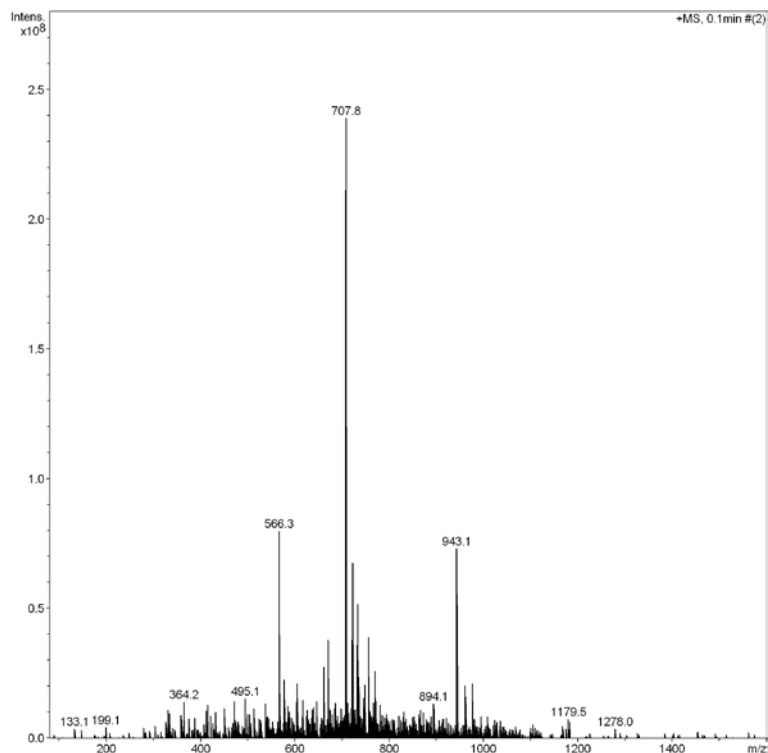


**Figura N° 60. Desanclaje de los péptidos esteroidales a la resina.**



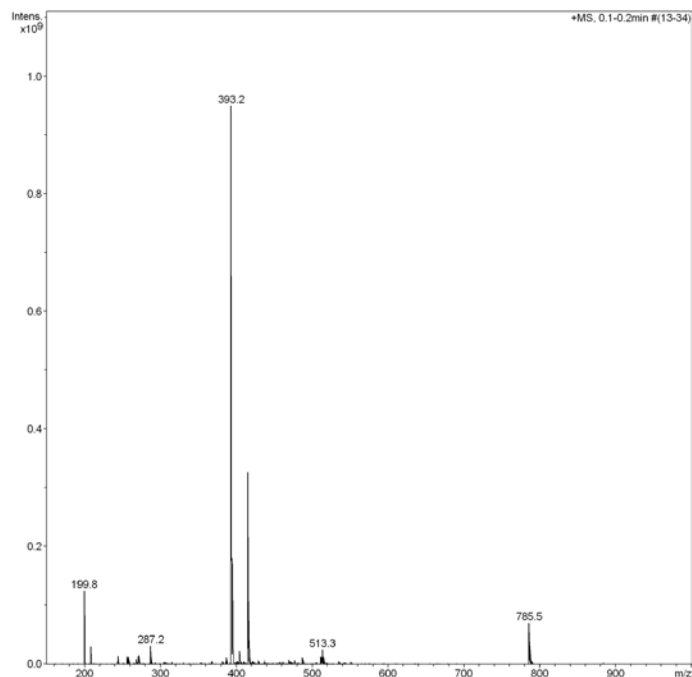
**Figura N° 61 Espectro de Masa del péptido Esteroidal Nle-Lys-Arg-Arg**

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en dicho espectro se puede apreciar el pico más intenso  $(M+2) / 2 = 471,3$  m/z. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido esteroidal.



**Figura N° 62. Espectro de masa del Péptido Esteroidal FWFTLIKTQAKQPARYRRF**

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en dicho espectro se puede apreciar el pico más intenso  $(M+4) / 4 = 708$  m/z; seguido de diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido esteroidal  $(M+5) / 5 = 566,3$  m/z y un pico de intensidad similar a  $(M+3) / 3 = 943,1$  m/z. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido esteroidal.



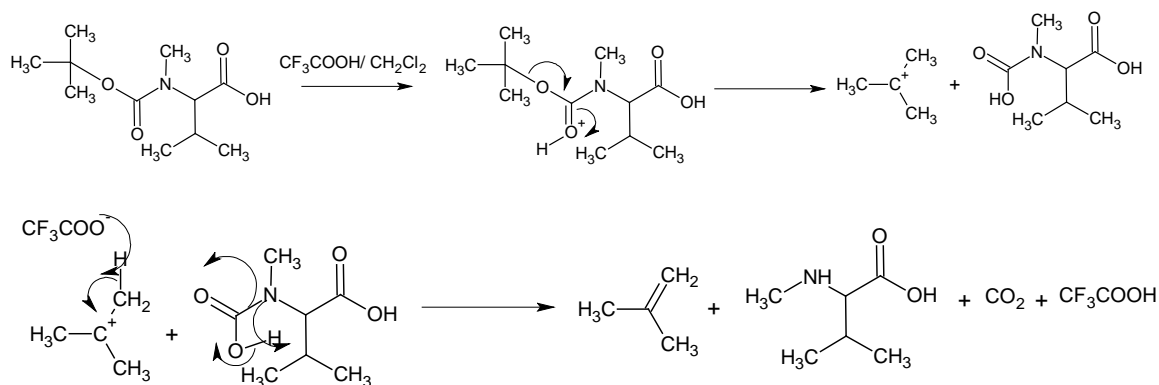
**Figura Nº 63. Espectro de masa del Péptido Esteroidal Nle-Arg-Lys**

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en dicho espectro se pueden apreciar dos picos; el pico menos intenso corresponde al  $(M+1) / 1 = 785,5$  m/z. El pico más intenso corresponde a una fragmentación  $(M+2) / 2 = 393,2$  m/z. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el péptido esteroidal.

#### **4.8 Síntesis del aminoácido Alloc-NMe-Valina-OH**

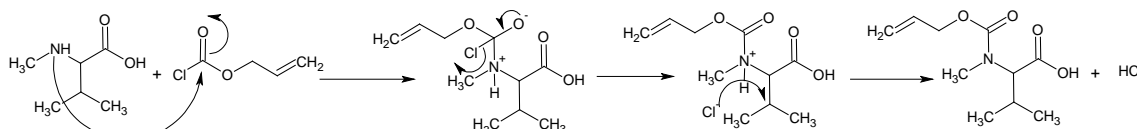
Como primer paso para la obtención de este aminoácido fue necesario eliminar el grupo protector (Boc), el cual se rompe fácilmente mediante un ligero tratamiento con  $\text{CF}_3\text{COOH}$  y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) durante de 2 horas. La pérdida de un catión ter-butilo, relativamente estable, del éster protonado da lugar a un ácido carbámico inestable.

La descarboxilación del ácido carbámico da lugar al grupo amino desprotegido del aminoácido y la pérdida de un protón del catión ter-butilo da lugar a una molécula de isobutileno <sup>13</sup>.



**Figura N° 64. Desprotección del grupo BOC de la N-Me-Valina**

Seguidamente se añadió NaHCO<sub>3</sub> y luego NaOH para neutralizar todo el exceso de CF<sub>3</sub>COOH añadido y dejar el pH entre 10-11, ya que bajo estas condiciones se favorece considerablemente la incorporación del grupo Alloc <sup>80</sup>. Posteriormente se añadió alil clorofornato, el cual es susceptible al ataque del grupo N-Metil amino del aminoácido, debido a que el átomo de cloro y de oxígeno sustraen densidad electrónica del carbono carbonílico, formando un intermediario tetraédrico, que rápidamente elimina al ion cloruro para obtener el N<sup>α</sup>-allyloxycarbonil. Finalmente se añade NaOH para neutralizar todo el HCl liberado durante la reacción y tener un medio lo suficientemente básico para que se lleve a cabo la reacción <sup>80</sup>.



**Figura N° 65. Formación del aminoácido Alloc-N-Me-Valina**

Se realizan múltiples lavados con metiliterbutileter y finalmente se acidifica la fase acuosa para obtener la especie zwitterionica del Alloc-NMe-Valina-OH con un rendimiento del 78 %

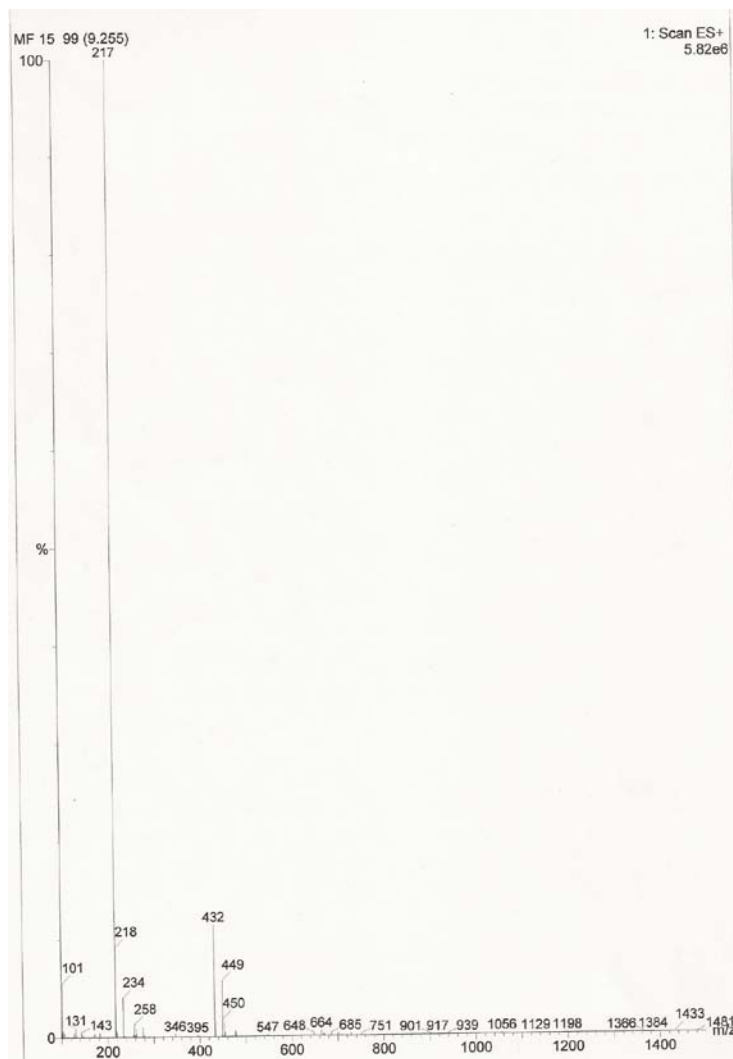


Figura Nº 66. Espectro de masa del aminoácido Alloc-N-Me-Valina.

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en dicho espectro se pueden apreciar un pico muy intenso; que corresponde al  $(M+1) / 1 = 217$  m/z correspondiente al aminoácido alloc-N-Me-Valina. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones que ocurren en el aminoácido y/o dímeros que se puedan forman.

#### 4.9 Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Trt)-OH

Para la obtención de este aminoácido fue necesario utilizar NaH como base extremadamente fuerte y no nucleofílica, la cual puede sustraer el protón del nitrógeno del carbamato, ya que la nucleofilicidad de este carbamato se ve reducida por la deslocalización del par de electrones del nitrógeno al grupo carbonílico del carbamato.

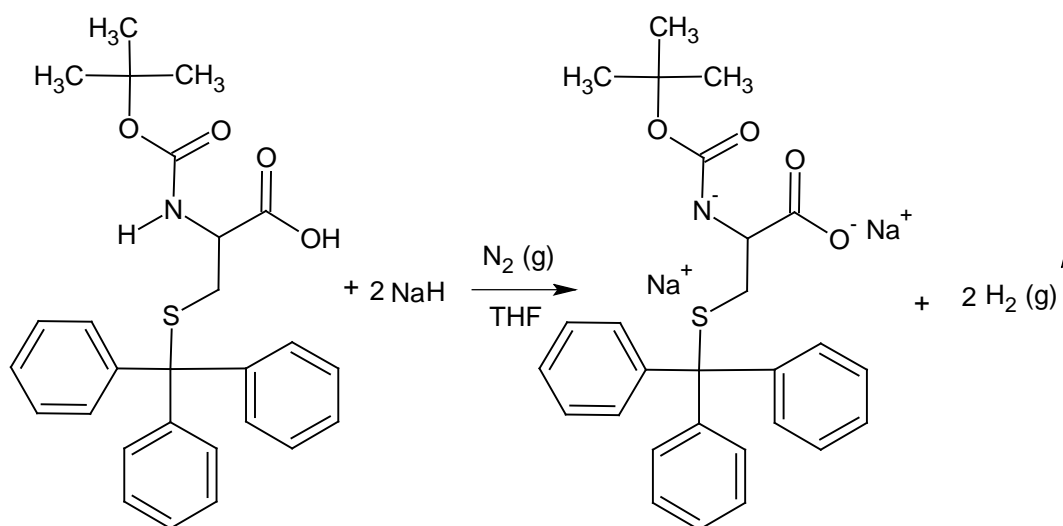
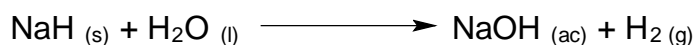
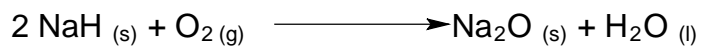


Figura N° 67. Reacción ácido-Base entre Boc-Cisteina-(Trt)-OH y el NaH

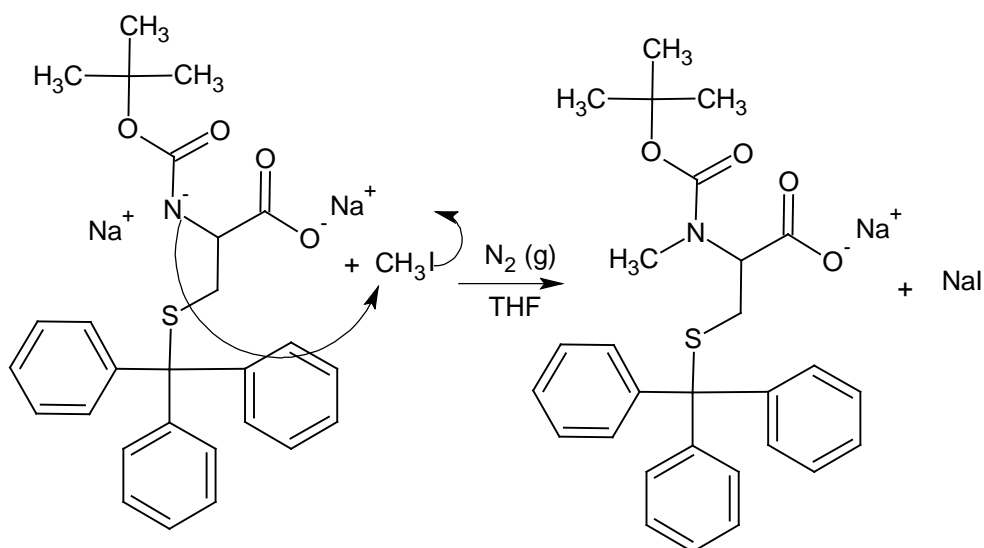
Como el NaH es un excelente agente reductor, fue necesario llevar a cabo la reacción en ausencia de solventes proticos y atmosfera inerte de N<sub>2</sub>(g) para evitar la reducción del O<sub>2</sub>(g) del medio ambiente y obtener agua como sub-producto, la cual puede reaccionar con el NaH<sub>(s)</sub> y descomponerlo en NaOH<sub>(ac)</sub>; disminuyendo drásticamente el rendimiento de la reacción<sup>14,81</sup>.



**Figura N° 68. Reacciones de descomposición del NaH**

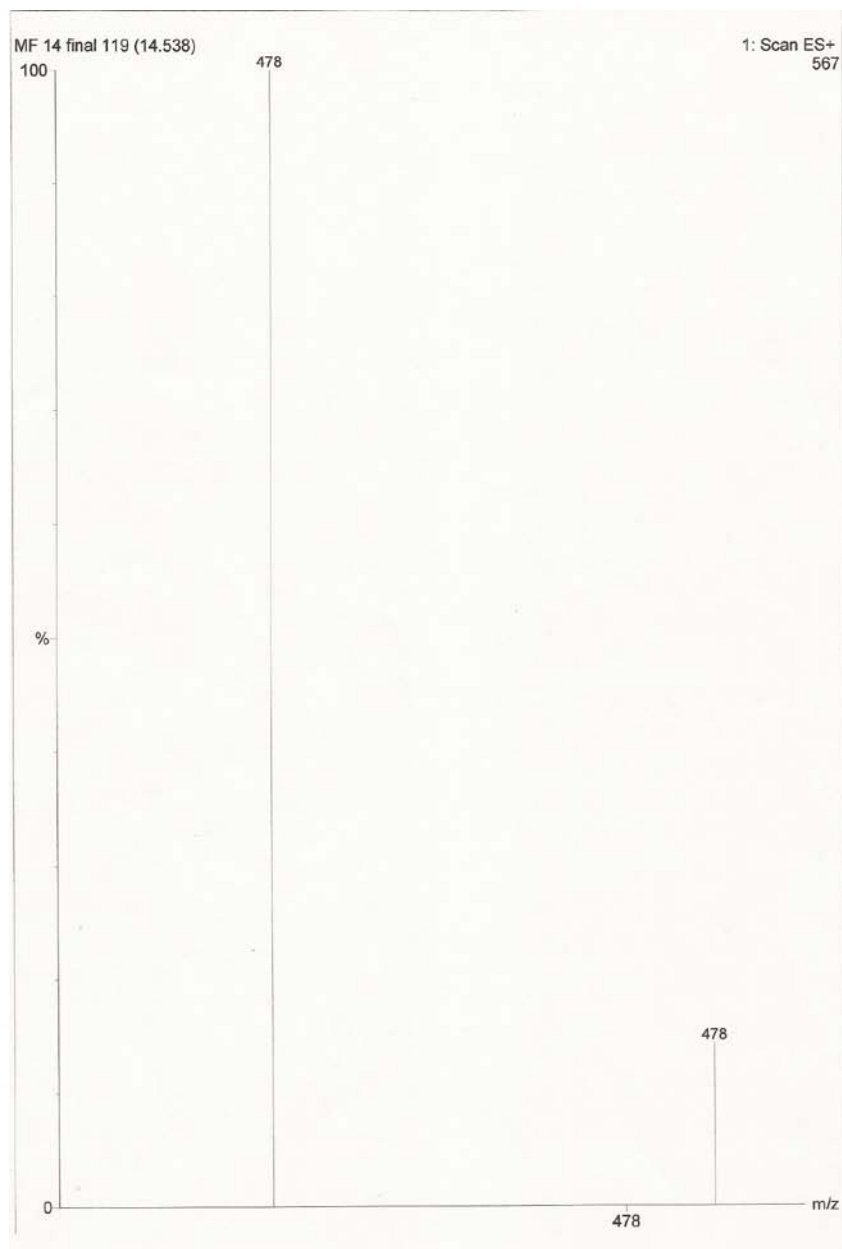
Seguidamente, se agregó el  $\text{CH}_3\text{I}$  y éste reacciona con el carbamato a través de una Sustitución Nucleofílica Bimolecular ( $\text{S}_{\text{N}}^2$ )<sup>82</sup>, ocurriendo la monometilación del nitrógeno del carbamato. Fue necesario realizar esta reacción a  $4^\circ\text{C}$  ya que es muy exotérmica y se debe tener control de la temperatura para evitar una degradación de la cisteína.

Finalmente, se añadió una solución buffer de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 / \text{NaHCO}_3 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$  al 10% para mantener el pH 6-7 y eliminar todo el exceso de NaH, además de evitar la eliminación del carbamato. Con este procedimiento se obtuvo un 70% en el rendimiento de la reacción.



**Figura N° 69. Metilación de la Boc-Cisteina-(Trt)-OH**





**Figura N° 70. Espectro de masa del aminoácido Boc-Cisteina-(Trt)-OH.**

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en dicho espectro se puede apreciar un pico único, muy intenso; que corresponde al  $(M+1) / 1 = 478$  m/z correspondiente al aminoácido Boc-Cisteina-(Trt)-OH.

#### 4.10 Síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteína-(Acm)-OH

Para la obtención de la Boc-NMe-Cisteína-(Acm)-OH; se partió de la Boc-NMe-Cisteína-(Trt)-OH sintetizada anteriormente, como primer paso se eliminó el grupo tritilo (Trt) del átomo de azufre de la cisteína, con múltiples lavados de una solución que contiene una baja concentración de ácido trifluoracético, para evitar hidrolizar el grupo Boc que está protegiendo al nitrógeno de la cisteína.

Consecutivamente se añadió acetamidometanol, en una solución fuertemente ácida de TFA y ácido trifluorometanosulfónico, para garantizar la deshidratación del acetamidometanol <sup>83</sup> y posterior ataque nucleofílico del átomo de azufre de la cisteína, al grupo acetamidometil; bajo estas condiciones fuertemente ácidas, también se hidroliza el grupo protector Boc del grupo amino de la cisteína.

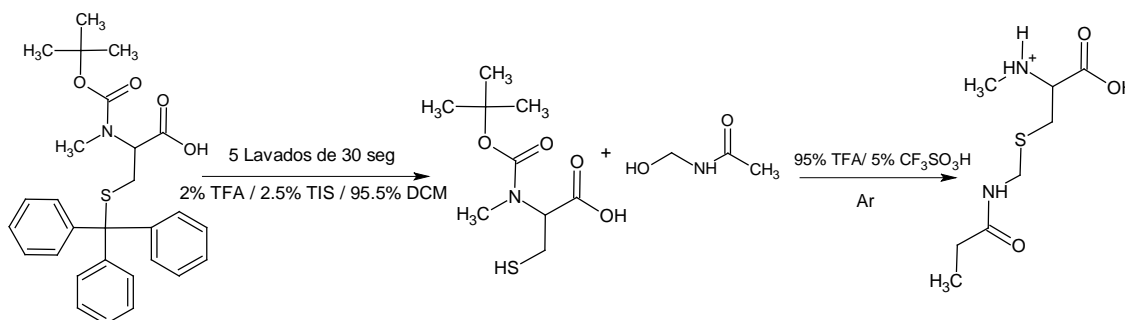
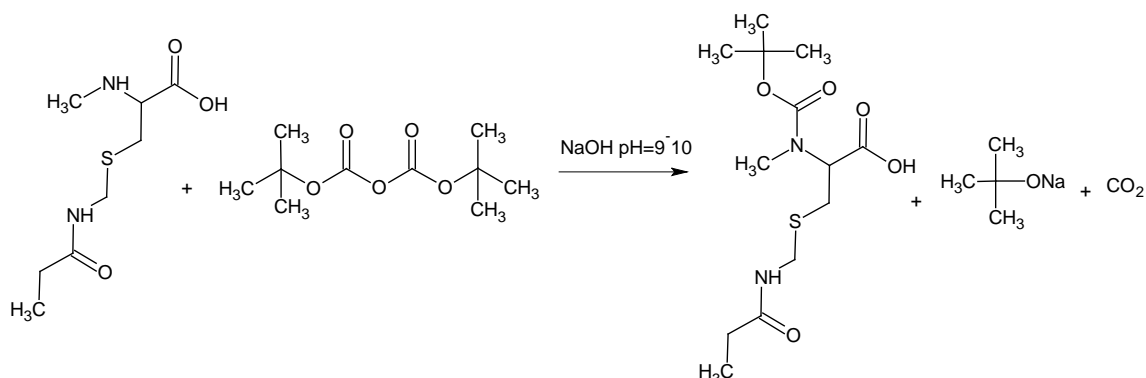


Figura N° 71. Introducción del grupo Acetamidometil (Acm)

Posteriormente se añade una solución de NaOH para neutralizar el exceso de ácido y regenerar la nucleofilicidad del grupo amino para que ataque nucleofílicamente al carbonato de di-*t*-butilo y regenere el grupo protector Boc del N<sup>α</sup>-aminoácido <sup>84</sup>. El carbonato de di-*t*-butilo reacciona muy bien con sales de aminoácidos disueltas en mezclas de H<sub>2</sub>O/THF en presencia de una base

terciaria como la DIEA o bajo un estricto control del pH 9-10 con soluciones de NaOH <sup>79</sup>.



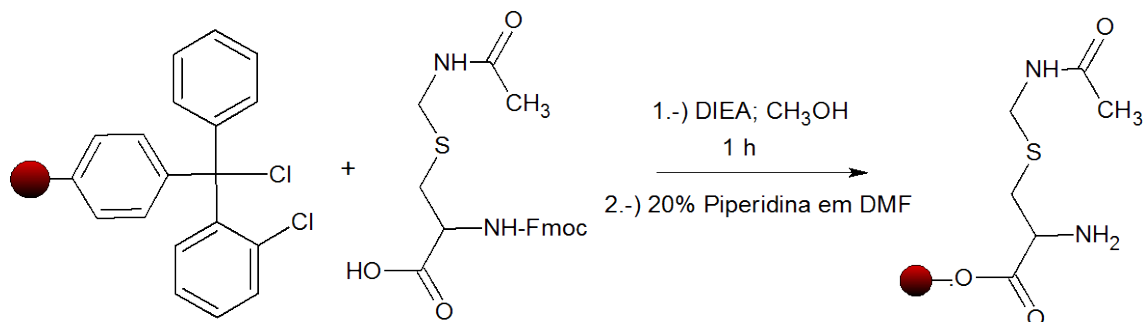
**Figura N° 72. Introducción del grupo ter-butoxicarbonilo (Boc)**

Bajo estas condiciones se obtuvo un rendimiento muy bajo en la reacción cercano al 12 %, por tal sentido se realizó la síntesis del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH por la técnica de Síntesis en Fase Sólida.

#### 4.11 Síntesis del Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH en Fase Sólida

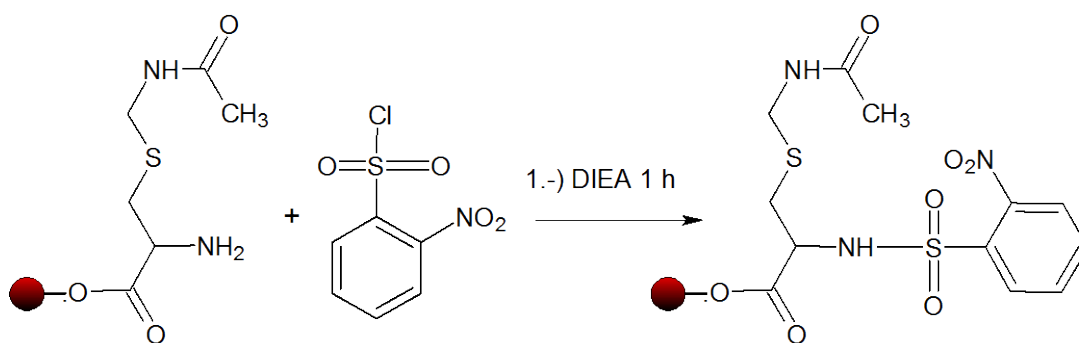
Como primer paso para la síntesis del aminoácido, fue necesario anclar la Fmoc-Cisteina(Acm)-OH a la resina 2-Clorotritilo, añadiendo la base Diisopropiletilamina, para eliminar el protón ácido del aminoácido y hacerlo mejor nucleófilo, garantizando de esta manera su enlace al grupo tritilo en la resina 2-Clorotritilo. Una vez anclado el aminoácido y luego de haber dejado la reacción por espacio de cincuenta minutos, se añadieron los 1200  $\mu$ L de metanol, para bloquear las posiciones donde no hubo anclaje del aminoácido y evitar el anclaje de sustratos posteriores ó reacciones colaterales con los reactivos posteriores que se adicionaron. Seguidamente se procedió a eliminar el grupo protector F-moc, el cual viene como grupo protector para el grupo NH<sub>2</sub>

del aminoácido, este se elimina, con una solución de piperidina al 20% en DMF por espacio de 20 minutos, a través de un mecanismo de eliminación E1cB (*mecanismo unimolecular de la base conjugada*) como se explicó anteriormente.



**Figura Nº 73. Introducción del aminoácido Fmoc-Cisteina(Acm)-OH**

Se procedió a realizar la reacción de Fukuyama-Mitsunobu <sup>85,86</sup>, la cual es una modificación de la reacción de Mitsunobu <sup>48,87</sup> al introducir el grupo cloruro de 2-Nitrobencensulfonil, junto con la base Diisopropiletilamina (DIEA), para formar la N-alquil 2-nitrobencenosulfonamida correspondiente. Vale la pena resaltar que debido a la presencia del grupo Nitro en la posición orto del anillo aromático, este torna de color amarillo a la resina y sirve a su vez como indicador de la presencia del grupo 2-nitrobencensulfonilo.



**Figura Nº 74. Introducción del grupo 2-Nitrobencensulfonil Cloruro**

Esta N-alquil 2-nitrobenzenosulfonamida es mucho menos básica y por lo tanto menos nucleofílica que el grupo amino del aminoácido <sup>64</sup>. De esta manera se garantiza la mono-metilación de la N-alquil 2-nitrobenzenosulfonamida, la cual ocurre bajo condiciones muy suaves, a través de las condiciones de reacción de Mitsunobu <sup>48,87</sup> para dar la N,N-dialquil 2-nitrobenzenosulfonamida con un excelente rendimiento <sup>88</sup>. Se han reportado selectivas N-metilación de péptidos en fase sólida bajo estas condiciones de reacción <sup>89,90</sup>.

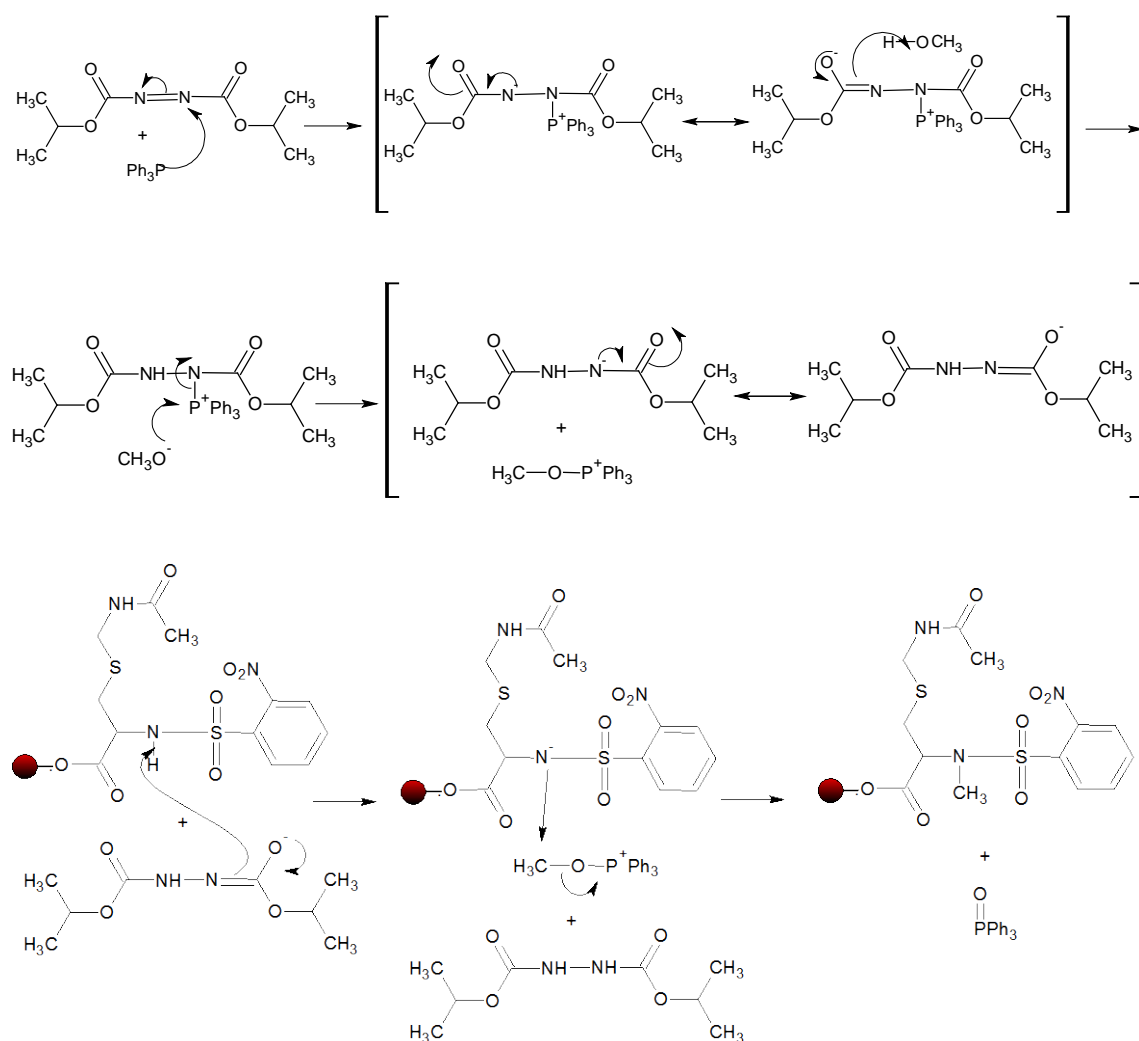


Figura N° 75. Mecanismo de reacción de Mitsunobu

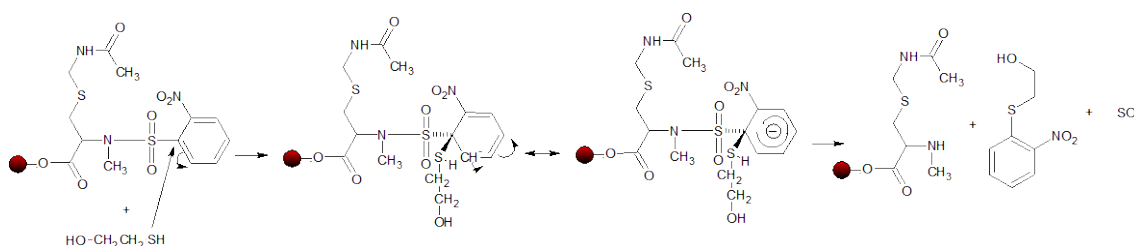
A pesar que la reacción de Mitsunobu es ampliamente utilizada en síntesis orgánica los detalles del mecanismo de reacción y particularmente algunos intermediarios se encuentran todavía sujetos a intensos debates y a estudios mucho más profundos <sup>91</sup>.

El mecanismo de mayor aceptación hasta el momento, sostiene como primer paso la formación irreversible del intermediario Morrison-Brunn-Huisgen (MBH) llamado Betaina <sup>91,92</sup>; como segundo paso la betaina desprotona al metanol para formar la especie iónica metóxido, que posteriormente ataca nucleofílicamente al átomo de fósforo de la betaina para formar una especie cationica de metoxitriphenilfosfonium y la hidracina correspondiente al tomar un protón de la N-alquil 2-nitrobenzenosulfonamida.

Seguidamente el metoxitriphenilfosfonium es atacado nucleofílicamente por la base conjugada de la N-alquil 2-nitrobenzenosulfonamida a través de una Sustitución Nucleofílica Bimolecular ( $S_N^2$ ) <sup>82</sup>, para obtener la N,N-dialquil 2-nitrobenzenosulfonamida y el óxido de triphenilfosfina  $Ph_3P=O$  respectivamente.

La desprotección de la sulfonamida ocurre bajo condiciones muy suaves cuando se añadió mercaptoetanol y 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]-undecen-7-eno (DBU), es necesario que esta desprotección se realice bajo atmósfera inerte para evitar la oxidación del mercaptoetanol con el oxígeno del medio ambiente.

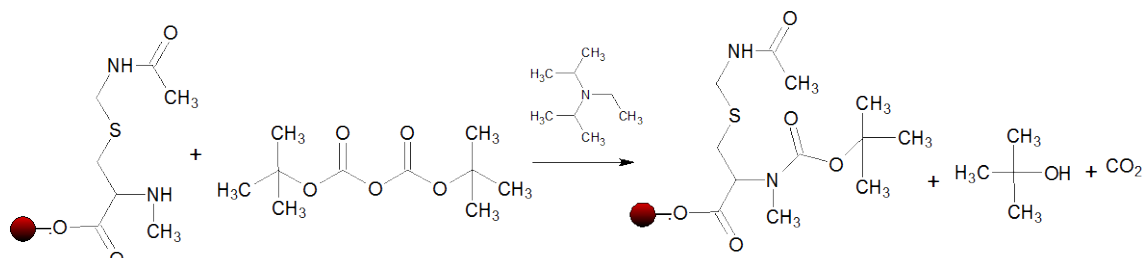
Es imperante la utilización de una base fuerte no nucleofílica como el DBU para que no compita con el mercaptoetanol en la formación del complejo de Meisenheimer <sup>88</sup> ya que la eliminación de la sulfonamida ocurre a través de una Sustitución Nucleofílica Aromática (SNA), mediante el mecanismo adición-eliminación <sup>56</sup> ; cuyo intermediario el complejo Meisenheimer, se estabiliza por la deslocalización de la carga negativa, por todo el anillo aromático. Esta reacción se encuentra favorecida por la existencia del grupo nitro en la posición orto del anillo, el cual estabiliza la densidad electrónica del anillo aromático tanto por el efecto inductivo del átomo de nitrógeno cargado positivamente y por ser este un grupo que atrae densidad electrónica por resonancia.



**Figura N° 76. Mecanismo de Sustitución Nucleofílica aromática.**

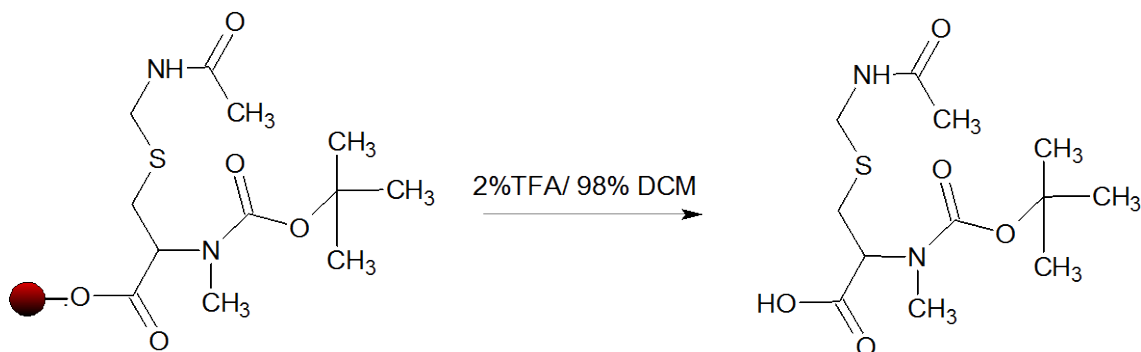
Vale la pena resaltar que se pudo apreciar la total desprotección de la sulfonamida ya que el color amarillo de la resina desapareció por completo.

Luego de realizar múltiples lavados con DCM y DMF para garantizar que la resina quedó completamente limpia, se agregó dicarbonato de di-terbutilo  $\text{Boc}_2\text{O}$ , el cual es un excelente agente acilante <sup>93</sup>, este compuesto reacciona muy bien en presencia de bases terciarias como la Diisopropiletilamina <sup>79</sup>.



**Figura N° 77. Formación de la Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH en fase sólida.**

El grupo protector Boc es compatible con muchos métodos de acoplamiento en síntesis de péptidos y puede ser clivado bajo condiciones ácidolíticas muy suaves, por tal sentido para clivar el aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH, es necesario realizarlo bajo condiciones extremadamente suaves, 2% de TFA en DCM durante 20 minutos por tal sentido se escogió la resina 2-Clorotritilo por ser muy lábil en condiciones extremadamente suaves. Bajo condiciones de síntesis en fase sólida se obtuvo un 90% de rendimiento en la reacción.



**Figura N° 78. Desanclaje del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH de la resina 2-Clorotritilo.**



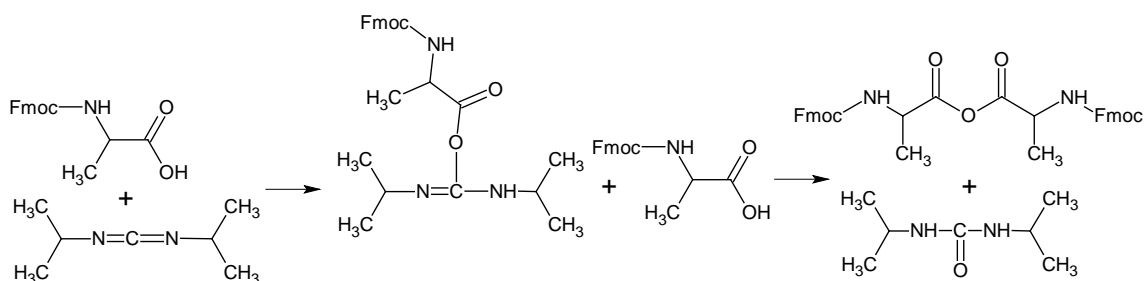
#### 4.12 Síntesis del Biciclo Octadepsipéptido Triostin A

El Triostin A pertenece a una familia de péptidos antibióticos conocidos como antibióticos quinoxalínicos; producidos por una bacteria marina, la cual se pudo aislar en el año 1961 de una sepa llamada *Streptomyces aureus*<sup>94</sup>. El Triostin A fue sintetizado por primera vez en el año de 1977 por Olsen<sup>95</sup> y colaboradores; luego fue sintetizado por Shin<sup>96,97</sup> y colaboradores en el año 1984, ambas síntesis fueron realizadas en solución y con rendimientos muy bajos, ya que se necesitó la purificación de cada intermediario a lo largo de toda la síntesis.

El Triostin A es un biciclo octadepsipéptido simétrico compuesto por dos unidades de cada uno de los siguientes aminoácidos: D-serina; L-alanina; N-metil-L-Cisteína y N-metil-L-Valina. El enlace depsipéptido ocurre entre el grupo hidroxílico de la D-serina y el grupo carboxílico de la N-metil-L-Valina. Mientras que existe un puente disulfuro entre los dos residuos de N-metil-L-Cisteína, adicionalmente los residuos del ácido-2-Quinoxalina Carboxílico se encuentran enlazados al grupo amino de la D-serina.

Esta clase de antibióticos quinoxalínicos, poseen actividad antibacteriana y actividad citotóxica<sup>98</sup>; se conoce que este tipo de moléculas se enlaza a las moléculas de ADN como un agente de intercalación bifuncional y así inhibir la síntesis del ARN<sup>99</sup>, de allí su importancia sintética como potencial fármaco.

La síntesis del Triostin A se realizó mediante la técnica en fase sólida, utilizando la resina de Wang <sup>47</sup>; en lugar de la resina 2-Clorotritilo, (ver figura N° 28 y N° 52) la cual es ampliamente utilizada para minimizar la formación de dicetopiperazinas <sup>55</sup>, pero esta última resina es incompatible con la protección de grupos tritilo. Se introdujo como primer aminoácido la Fmoc-Alanina, junto con la Diisopropilcarbodiimida, para garantizar un medio relativamente básico, además de ser un poderoso agente deshidratante comúnmente utilizado para preparar ésteres o anhídridos.



**Figura N° 79. Anhídrido de Fmoc-Alanina**

Generalmente la formación de ésteres procede a través de la formación de O-acylisourea o anhídridos simétricos como intermediarios y se ven favorecidos por la presencia de un catalizador nucleofílico como el DMAP <sup>77</sup>, este último se utiliza ampliamente como catalizador para las reacciones de esterificación <sup>76</sup> por ser muy eficiente; ya que forma de manera mucho más rápida el ion N-acetilpiridonio, estabilizándolo por resonancia, al deslocalizar el par de electrones de la dimetilamina en la posición 4.

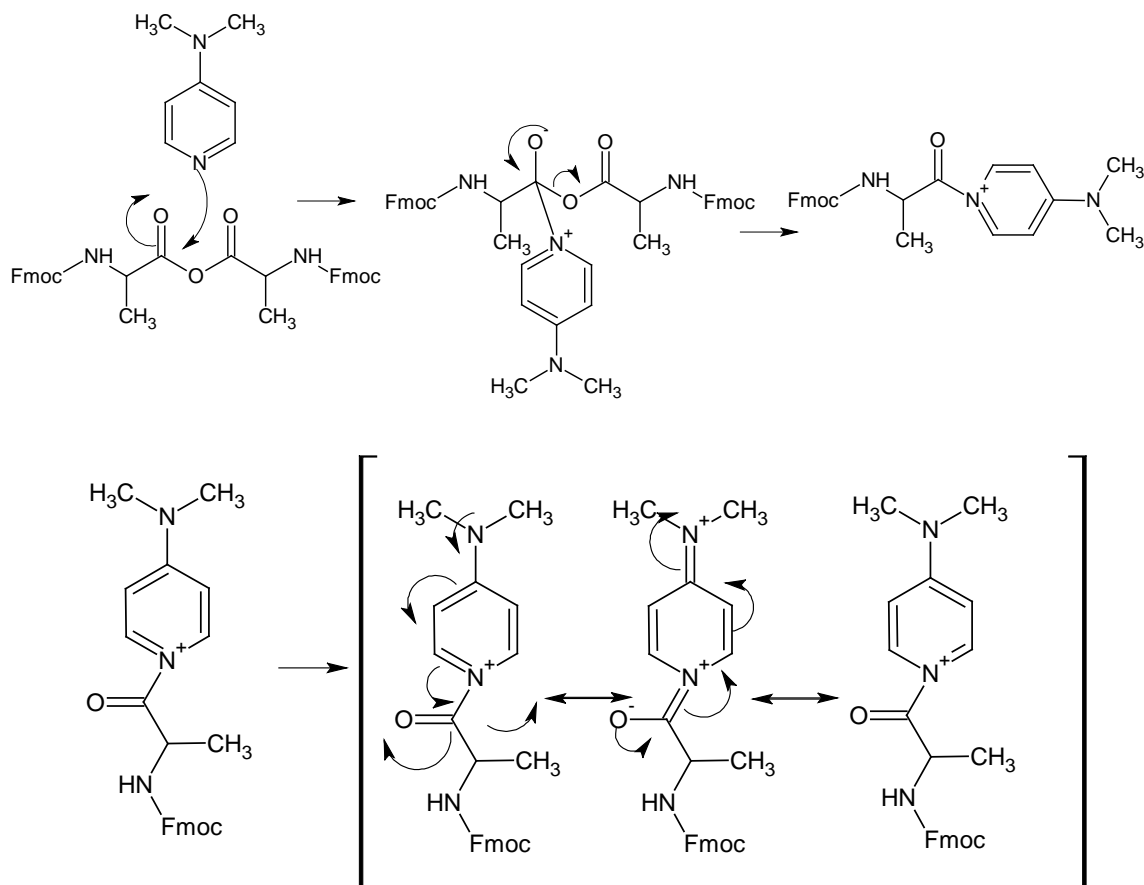
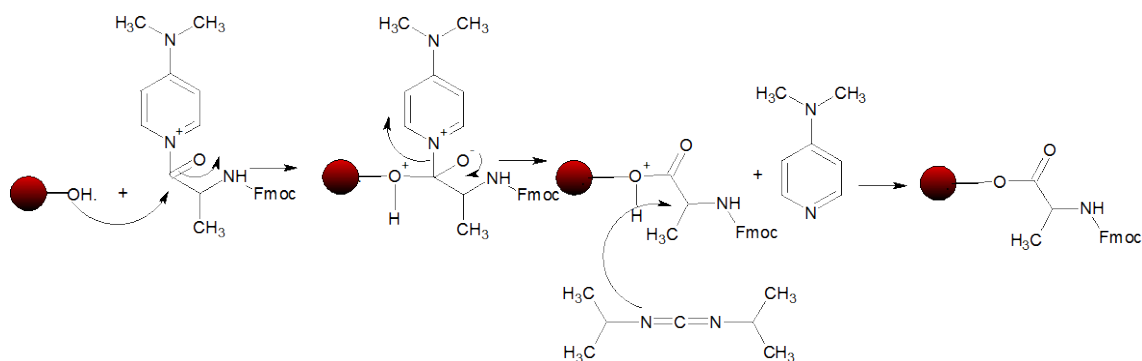


Figura N° 80. Formación del ión N-acetilpiridonio

El N-acetilpiridonio existe como un par iónico suelto, en solventes no polares, los cuales facilitan el ataque nucleofílico al grupo acilo por parte del grupo OH de la resina de Wang. Este paso está sujeto a catálisis básica general por el contra ion; bajo estas condiciones son mejores agentes acilantes los anhídridos, por tal sentido una base auxiliar como (DIPCDI), es a menudo empleada para incrementar la velocidad del segundo paso y generalmente se emplea en cantidades estequiométricas, para prevenir una protonación de las cantidades catalíticas del DMAP por algún ácido formado durante la reacción<sup>77</sup>.

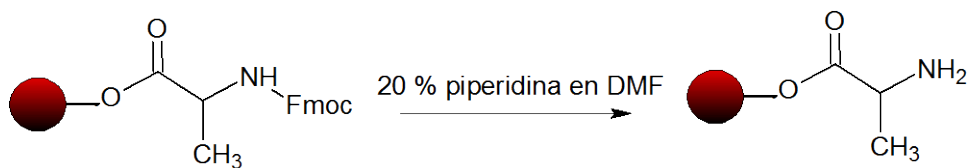


**Figura Nº 81. Acoplamiento de la Fmoc-Alanina a la resina de Wang**

Para evitar la racemización de la Fmoc-Alanina fue necesario utilizar cantidades estequiométricas de DMAP cercanas al 0,1 % y disueltas en la menor cantidad de DMF <sup>100</sup> posible, de esta manera se evita la formación de dipeptidos, debido al prematuro clivaje que puede experimentar la Fmoc-Alanina, debido al carácter básico del DMAP <sup>101</sup>.

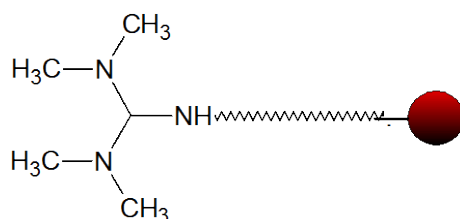
Luego de múltiples lavados con DCM y DMF para eliminar cualquier residuo o impureza de la reacción anterior en la resina, se añadió el anhídrido acético, junto con la base DIEA, para acetilar y de esta manera bloquear, las posiciones donde no hubo anclaje del aminoácido, garantizando de esta manera, que no queden OH libres que puedan reaccionar con otros sustratos o evitar el anclaje de los posteriores aminoácidos a la resina durante la síntesis del Triostin A.

Se eliminó el grupo protector Fmoc de la alanina con una solución de piperidina al 20% en DMF durante 20 minutos como se explicó anteriormente y se realizó la prueba de Kaiser para verificar la completa eliminación del grupo Fmoc del aminoácido.



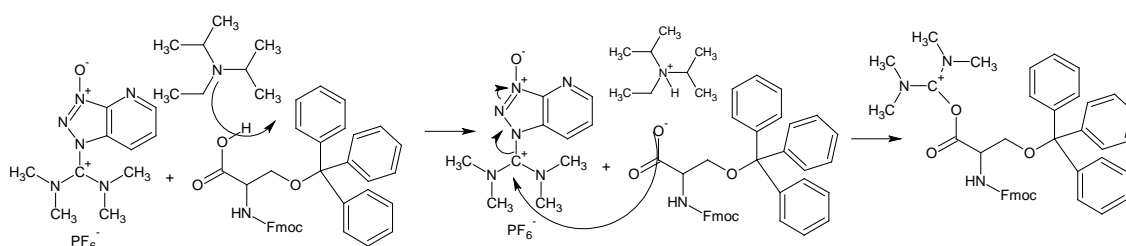
**Figura Nº 82. Eliminación del grupo Fmoc-Alanina**

Como segundo aminoácido se introdujo el aminoácido no esencial Fmoc-D-Serina(Trt)-OH, disolviendo este último, junto con una mezcla equimolar de los agentes acoplantes Hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(dimetilamino)-1H-1,2,3-triazalo-[4,5-b]piridin-1-il-metilen]-N-metilmetanamina (HATU); 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt), en la mínima cantidad de DMF posible y la base terciaria DIEA; para formar el aminoácido pre-activo y así evitar la guanidación con el HATU. Los derivados guanidino son ampliamente conocidos por bloquear la cadena péptida terminando su elongación. Tales reacciones secundarias no son frecuentes durante los acoplamientos en fase sólida de aminoácidos individuales, ya que a menudo se produce la etapa de activación, al mezclar primero el aminoácido, junto con los agentes acoplantes y la base en la menor cantidad de DMF, para luego ser añadidos a la resina que generalmente tiene anclado el péptido con el grupo amino libre<sup>102</sup>.



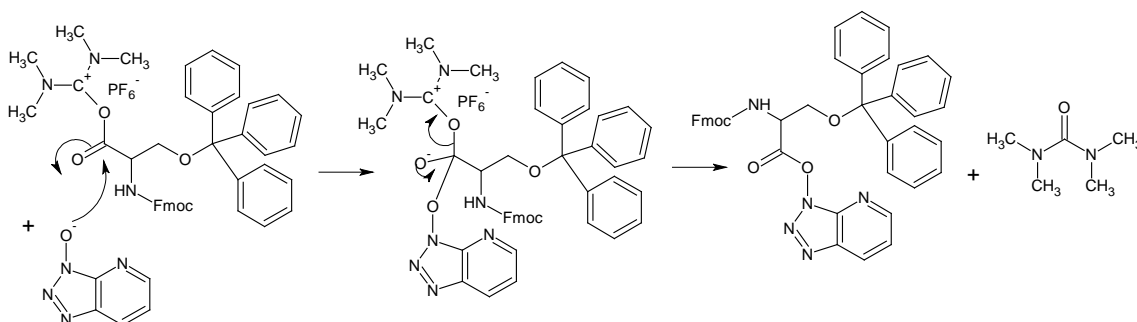
**Figura Nº 83. Bloqueo de una cadena péptida por la formación de un N-terminal guanidino péptido.**

Para una activación significativa es necesario que el anión carboxilato esté presente, esto se logra con la adición de la base DIEA, por tal sentido el uso de la base es obligatorio <sup>102</sup>. Una vez ocurrida la reacción ácido-base entre la DIEA y el aminoácido se forma el ion carboxilato. El ataque nucleofílico del carboxilato sobre el HATU resulta en una especie activa de O-acyluronium.

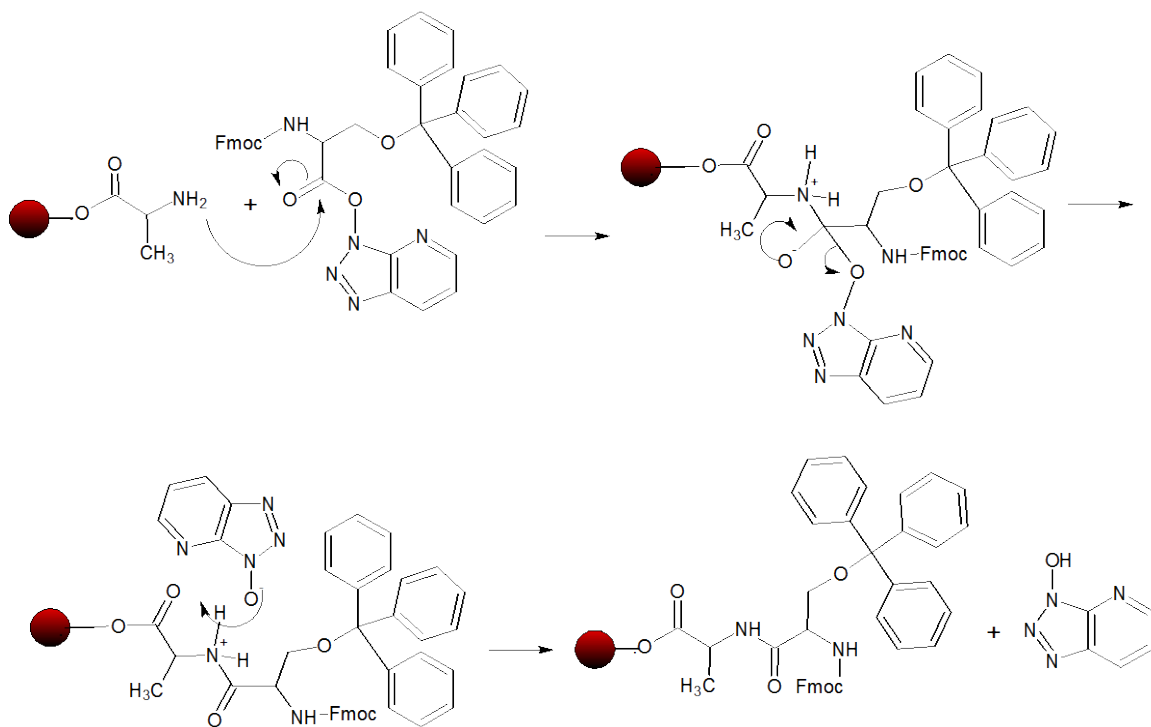


**Figura N° 84. Formación de la especie activa O-acyluronium.**

La especie activa O-acyluronium rápidamente reacciona para dar el éster activo OAt, el cual sufre aminólisis por parte del grupo amino de la alanina que se encuentra anclado a la resina para dar lugar al enlace péptico correspondiente.



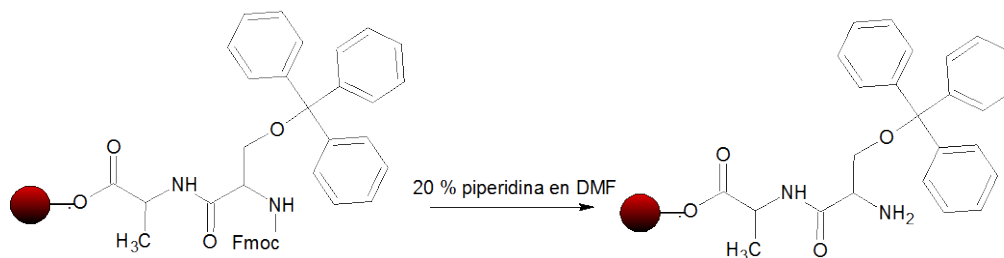
**Figura N° 85. Formación del éster OAt.**



**Figura N° 86. Aminolisis al éster OAt.**

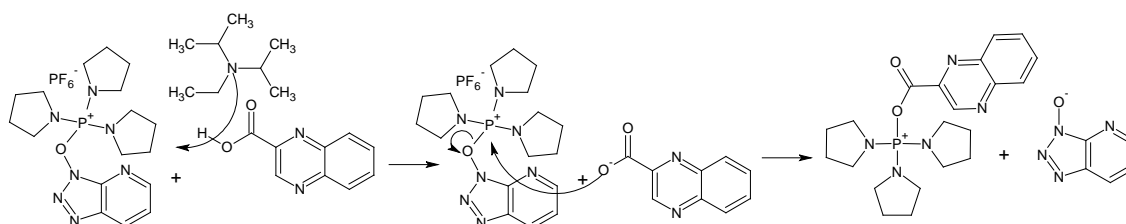
Como agente acoplante auxiliar se coloca el HOAt, por ser el aditivo más eficiente en la actualidad, ya que es un análogo 7-aza del HOBt, comúnmente referido como 1-hidroxi-7-azabenzotriazol. Este combina las características del HOBt y una base terciaria en la misma molécula, esta molécula es ampliamente conocida por acelerar considerablemente la velocidad de reacción, así como proveer excelentes rendimientos en los acoplamientos y minimizar la racemización de los aminoácidos <sup>79</sup>. Vale la pena resaltar que lo voluminoso del grupo tritilo, inhibe la abstracción del protón alfa del aminoácido por parte de la base, haciendo mucho más complejo la racemización del aminoácido <sup>103</sup>.

Finalmente se adiciona piperidina al 20% en DMF durante 5 minutos para eliminar el grupo Fmoc; se realizó la prueba de Kaiser para verificar la completa eliminación del grupo Fmoc del aminoácido y se lavó con abundante DCM y DMF para limpiar la resina de cualquier impureza.



**Figura N° 87. Eliminación del grupo Fmoc de la D-Serina(Trt)-OH.**

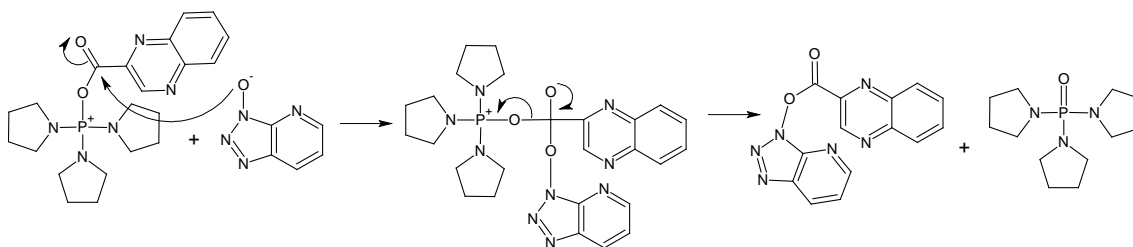
Seguidamente se disuelve el ácido-2-Quinoxalina Carboxílico (Qxc), junto con los agentes acoplantes 1H-benzotriazol-1-yloxy-tris (pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate (PyBOP), 1-Hidroxi-7-Azabenzotriazol (HOAt) en la mínima cantidad de DMF posible y la base DIEA, para formar la especie activa. El mecanismo de reacción con el PyBOP es muy similar a los mecanismos anteriormente descritos, como primer paso ocurre la reacción ácido-base entre el ácido-2-Quinoxalina Carboxílico y la base DIEA, para formar el ión carboxílico, que ataca nucleofílicamente a la sal de fosonio PyBOP, para dar lugar a la especie activa de acyloxifosfonio.



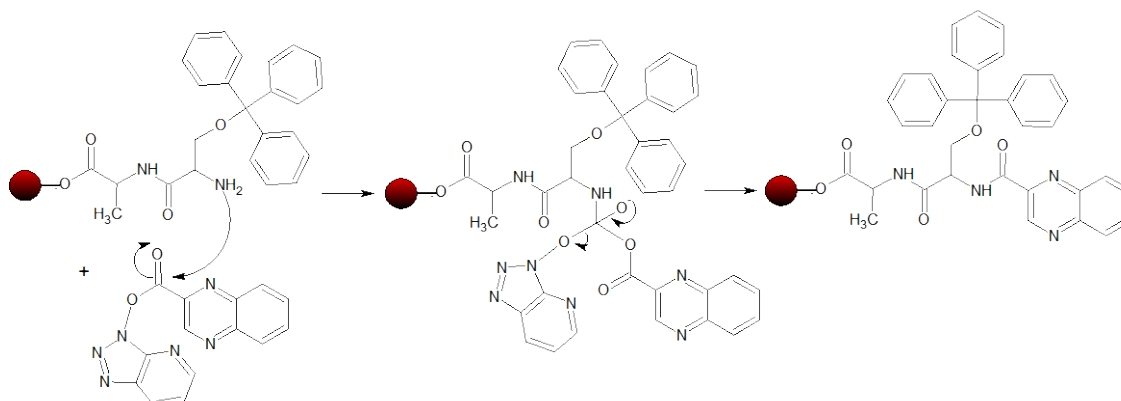
**Figura N° 88. Formación de la especie activa acyloxifosfonio.**



La sal de acyloxifosfonio es extremadamente reactiva y es atacada nucleofílicamente por el oxianión de la especie 7-azabenzotriazol, formando el éster de azabenzotriazol <sup>59</sup>. Esta especie es susceptible a la aminólisis por parte del grupo amino de la D-Serina(Trt) que se encuentra anclado a la resina para dar lugar al enlace péptido correspondiente.



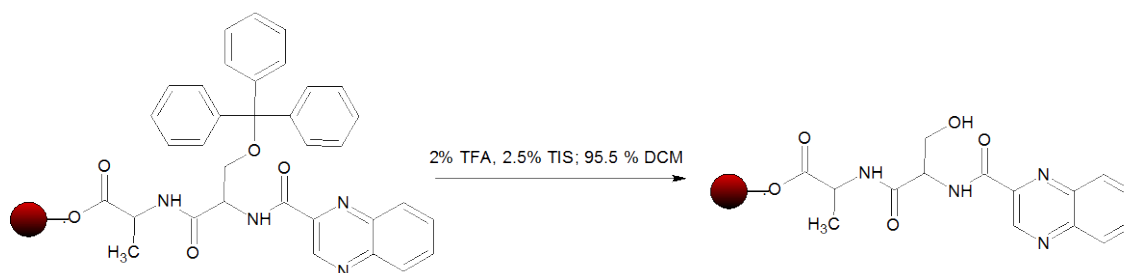
**Figura Nº 89. Formación del aza-benzoatriazolyl éster.**



**Figura Nº 90. Aminólisis de la D-Serina(Trt) al aza-benzoatriazolyl éster.**

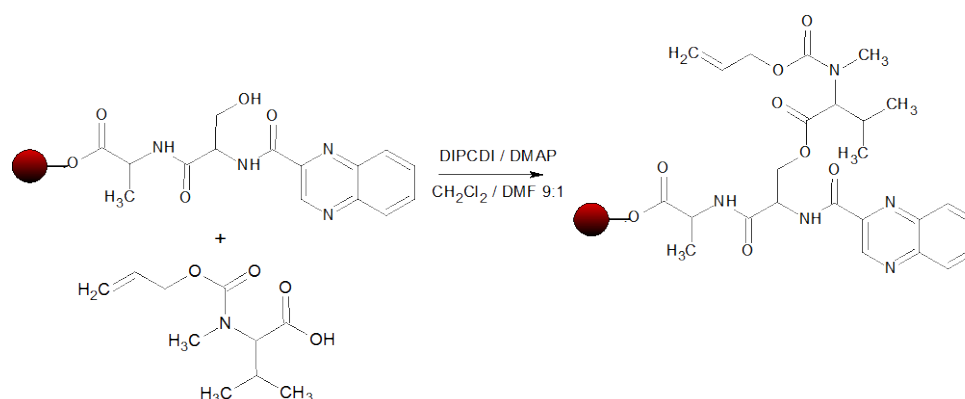
Seguidamente se realizaron 5 lavados de 30 segundos con una solución al 2% de TFA y 2,5 % de TIS para eliminar el grupo tritilo de la cadena lateral del aminoácido D-serina, el grupo tritilo es muy lábil bajo condiciones suaves de acidez, por tal sentido se añadió TIS como scavenger, para mitigar el carbocatión que se forma en medio ácido, evitando un posible reacoplamiento del mismo, con algún grupo que posea un par de electrones libres, presente en

la cadena péptida. Consecutivamente se lavo con abundante DCM y DMF para limpiar la resina de cualquier impureza.



**Figura N° 91. Eliminación del grupo tritilo de la D-Serina.**

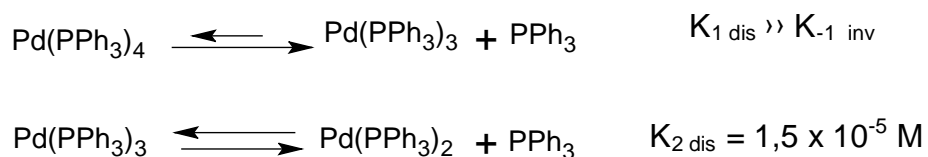
Como paso consecutivo se introdujo, el aminoácido no esencial Alloc-NMe-Valina-OH, sintetizado previamente en la sección 3.13, junto con DIPCDI y DMAP, disueltos en la mínima cantidad de DMF, dejando que reaccionara toda la noche a temperatura ambiente con agitación constante, ya que no existen problemas de racemización por parte del aminoácido en la formación de un enlace éster. Las ventajas de utilizar DIPCDI y DMAP son las mismas a las explicadas anteriormente. El uso de base adicional se evita para minimizar el riesgo potencial de epimerización y/o deshidratación del residuo D-Serina <sup>104</sup>



**Figura N° 92. Acoplamiento del aminoácido Alloc-NMe-Valina-OH.**

Se procedió a la eliminación del grupo protector alloc, añadiendo tetrakis(trifenilfosfina) Paladio  $[Pd(PPh_3)_4]$  previamente disuelto en la mínima cantidad de DCM posible, junto con fenilsilano como fuente de hidruros. Para garantizar la completa eliminación del grupo alloc, este proceso se realizó por triplicado.

El mecanismo de la reacción de sustitución alílico, catalizada por paladio es conocida como la reacción de Tsuji-Trost, la cual consiste en un ciclo catalítico que comienza con la disociación del  $Pd(PPh_3)_4$  tetrakis(trifenilfosfina) Paladio para formar una especie coordinativamente insaturada de valencia cero,  $Pd(PPh_3)_2$  Bis(trifenilfosfina) Paladio, la cual es la especie catalítica activa. La disociación de los ligandos de trifenilfosfina del complejo de paladio coordinativamente saturado  $Pd(PPh_3)_4$ , según estudios cinéticos y voltamperométricos <sup>105</sup>, obedecen a que el primer equilibrio contribuye en gran medida a favor de la especie tricoordinada, mientras que la disociación del  $Pd(PPh_3)_3$  a  $Pd(PPh_3)_2$ , por el contrario, se produce en un grado muy pequeño <sup>106</sup>, pero se encuentra ampliamente favorecido, por el incremento entrópico del sistema.



**Figura Nº 93. Equilibrio de disociación de ligandos del  $Pd(PPh_3)_4$**

Una vez formada la especie catalítica activa  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$ , se inicia el ciclo catalítico ( ver figura N° 94), ya que es una especie deficiente en electrones y coordina el doble enlace alílico de la Alloc-NMe-Valina-OH al átomo de Paladio, seguidamente ocurre una adición oxidativa cuando el  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$  desplaza al dióxido de carbono como grupo saliente, a través de una descarboxilación, liberando un complejo  $\pi$ -alílico muy estable que se mantiene coordinado al centro metálico; posteriormente ocurre una eliminación reductiva con la adición del fenilsilano, ya que esta especie libera hidruros, los cuales atacan nucleofílicamente al sistema alílico, para dar una molécula de propeno y regenerar la especie catalítica activa  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2$  en su estado inicial de valencia cero <sup>106</sup>.

Se cree que las especies como los hidruros, debido a su pequeño tamaño y excelente nucleofilicidad, tienden a coordinarse primero con el Paladio permitiendo un complejo neutro  $\pi$ -alilo o  $\sigma$ -alilo. La eliminación reductiva entonces ocurre a través de un desplazamiento interno de la entidad nucleofílica, desde el Paladio hacia el carbono <sup>106</sup>; hasta la fecha esta vía alterna de reacción está sujeta a profundos debates.

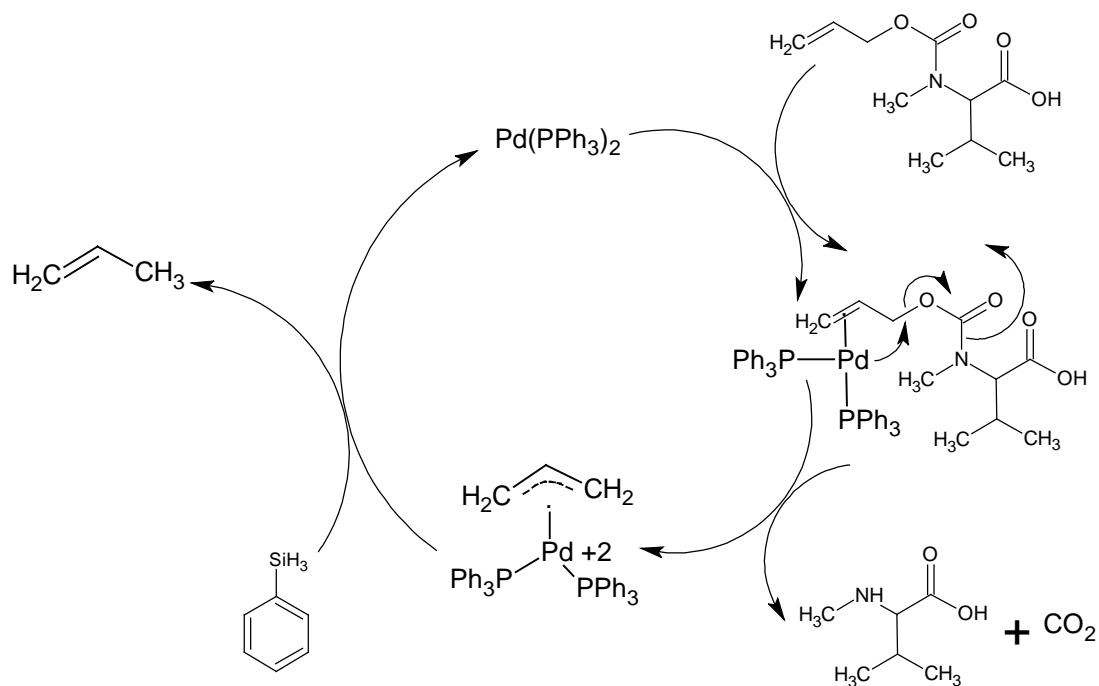


Figura N° 94. Ciclo catalítico de la reacción de alquilación alílica.

Finalmente se lavó con abundante DCM y DMF, se realizó la prueba de kaiser para comprobar la total eliminación del grupo alloc y se continuó con el próximo acoplamiento.

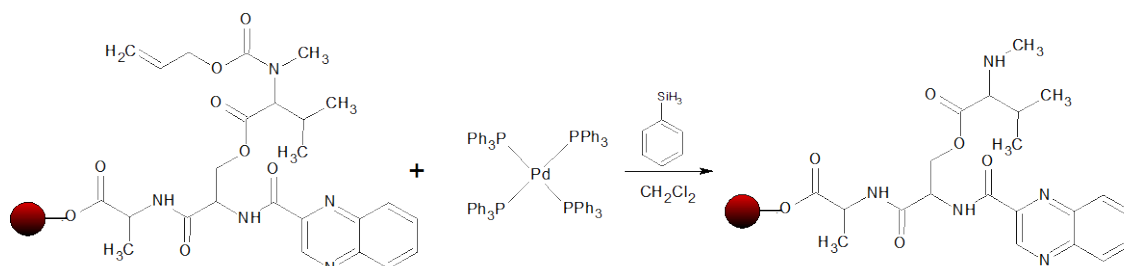


Figura N° 95. Eliminación del grupo Alloc de la NMe-Valina-OH.

Consecutivamente se introdujo la Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH, sintetizada en la sección 3.15; luego se añaden los agentes acoplantes HATU, HOAt, disueltos en la mínima cantidad de DMF-DCM (1:1) posible y la base DIEA por espacio de 90 minutos, el acoplamiento de este segundo consecutivo N-metil aminoácido fue particularmente difícil por tal sentido se realizó por duplicado.

Las ventajas de utilizar HATU, HOAt son las mismas a las explicadas anteriormente, sólo que para este acoplamiento en particular, fue necesario tener precaución al introducir primero el aminoácido, luego añadir los agentes acoplantes, para finalmente añadir la base, de esta manera se mitiga la racemización de la Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH, no se debe pre-activar el aminoácido (colocar el aminoácido junto con los agentes acoplantes y la base, durante 5 minutos, para luego ser añadidos en la resina), ya que una vez formada la especie activa es rápidamente acilada por una amina<sup>107</sup>.

Se conoce ampliamente que el proceso de racemización, es una competencia entre: a) la activación, b) reordenamiento de las especies activadas a una 5(4H)-oxazolona, c) la abstracción catalizada por base de un protón (enolización) de cualquiera de las especies activadas directamente o desde la 5(4H)-oxazolona y d) la aminólisis de las especies activas y/o de oxazolona con una amina como nucleófilo entrante, la cual también actúa como base. Las especies más activas se acoplan rápidamente, pero también son mucho más propensas a racemizar. La presencia de una bases produce efectos duales que son opuestos, porque mientras la base cataliza la acilación, al mismo tiempo conduce más rápido a la epimerización<sup>107</sup>.

Es imperante realizar esta reacción en una mezcla DMF-DCM (1:1) ya que existen evidencias publicadas que bajo estas condiciones se minimiza la racemización de la cisteína <sup>107</sup>.

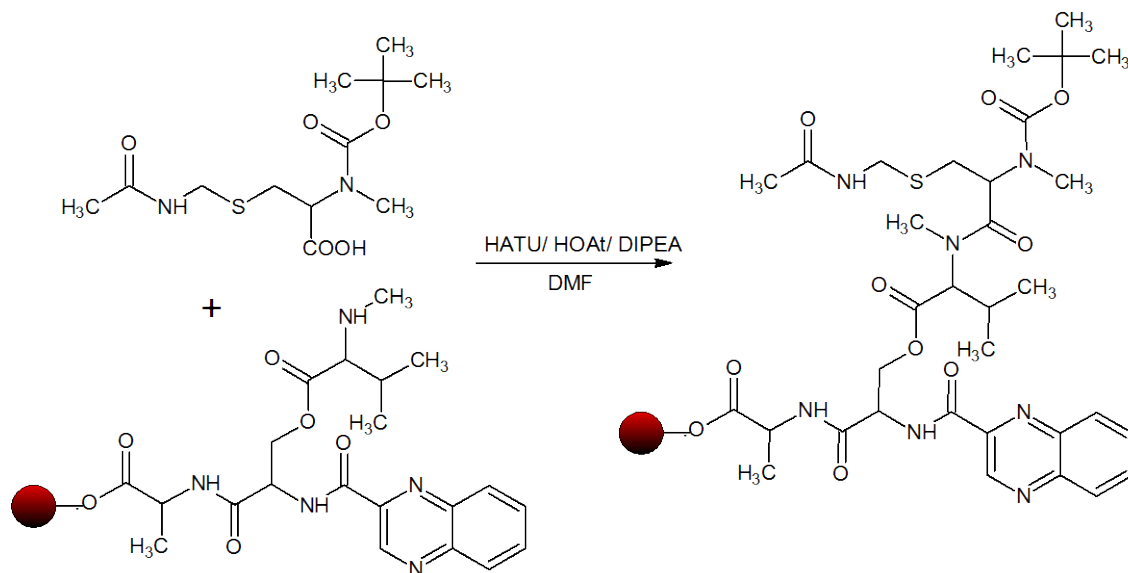
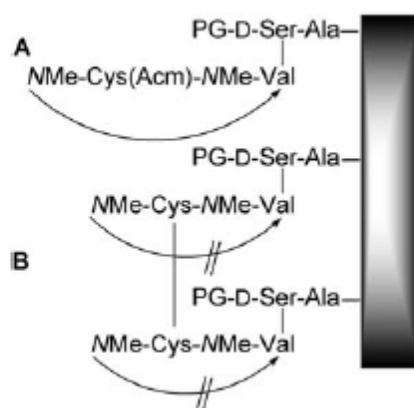


Figura N° 96. Acoplamiento de la Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH

Es este punto de la síntesis es importante minimizar la formación de dicetopiperazinas <sup>55,108</sup> (dipéptidos cíclicos), debido a la existencia de dos aminoácidos N-Metilados <sup>55</sup> consecutivos NMe-Val y NMe-Cys. La presencia de los grupos N-Metil incrementa la configuración *cis* entre los dipéptidos, haciéndolo mucho más propenso a la formación de dicetopiperazinas. Por tal sentido, se introdujo un concepto novedoso, la protección basada en la “**restricción de la movilidad conformacional**” <sup>51</sup>.

En síntesis previas de análogos, la remoción de grupos protectores de N-Metil aminoácidos independientemente del grupo protector utilizado, fue acompañado por la inmediata formación de dicetopiperazinas, la formación de estas dicetopiperazinas fue extensiva y en muchos casos cuantitativas <sup>51</sup>. En este punto nosotros consideramos, que la única solución para solventar este

problema, fue restringir la movilidad de la cadena péptida; haciendo incapaz al grupo amino de la NMe-Cys alcanzar al grupo carboxílico de la NMe-Valina. Para este caso, esto se llevo a cabo por la formación de un puente disulfuro intercatenario, el cual restringe la movilidad de la cadena péptida y así efectivamente previene la formación de dicetopiperazinas entre estos dos aminoácidos N-Metilados.

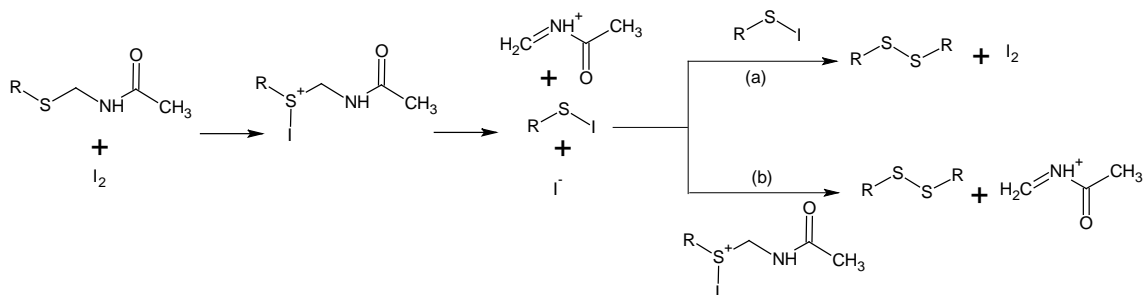


**Figura Nº 97. A) Formación de dicetopiperazinas se encuentra favorecida. B) Movilidad restringida debido a la formación del puente disulfuro intercatenario.**

Para la formación del puente disulfuro intercatenario, se adiciono  $I_2$  disuelto en DMF, para oxidar el azufre de la NMe-Cisteína-(Acm). Un razonable mecanismo para la oxidación del S-acetamidometil, consiste en la interacción entre el yodo y un átomo de azufre divalente, para la formación de un complejo de transferencia de carga (no hay formación de enlaces iónicos o covalentes y surge de la interacción ácido- base de lewis), siendo el átomo de azufre el donante y el átomo de yodo el aceptor. La separación de cargas conduce a la formación del ion yodosulfonio, el cual libera al ion iminium  $[CH_3-CO-NH=CH_2]^+$ , para posteriormente obtener el yoduro de sulfenilo, se cree que esta especie es el verdadero intermediario en las reacciones de oxidación con yodo de tioles a sulfuros. La subsecuente formación del enlace disulfuro puede

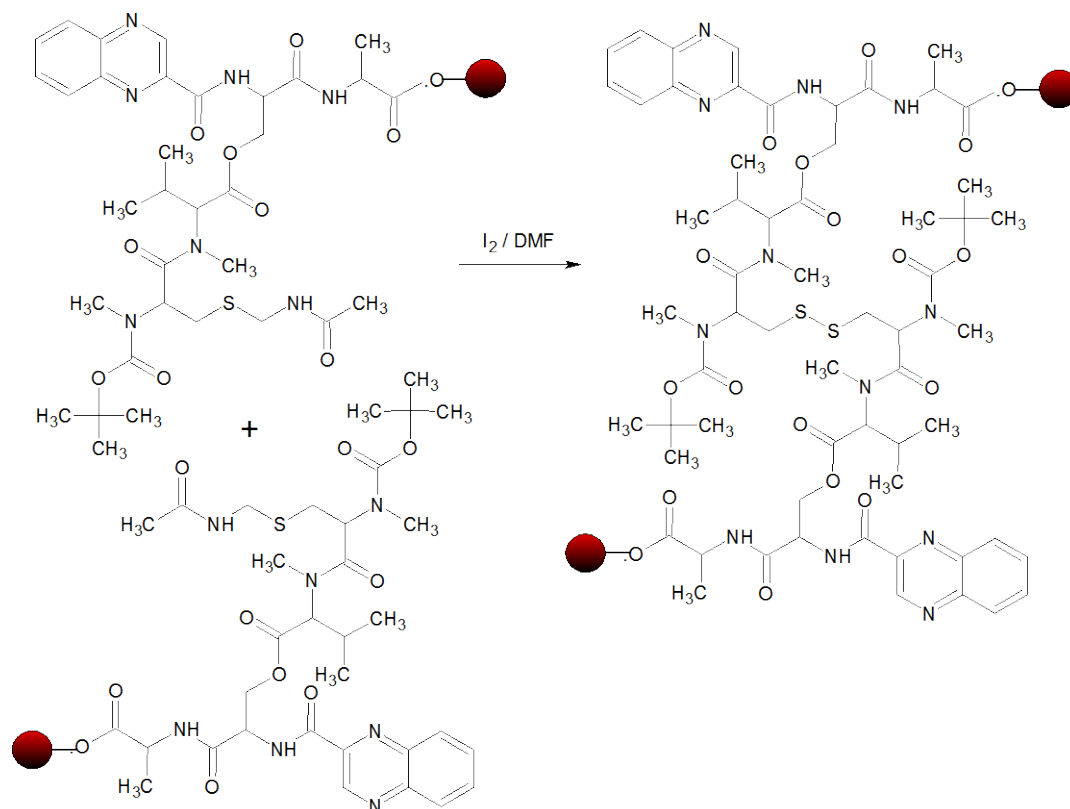


ocurrir de dos maneras: a) dos yoduro de sulfenilo se desproporcionan para dar el enlace disulfuro y yodo molecular o b) el yoduro de sulfenilo ataca al átomo electródeficiente de azufre del ion yodosulfonio, para dar el enlace disulfuro y liberar el ion iminium <sup>109</sup>.



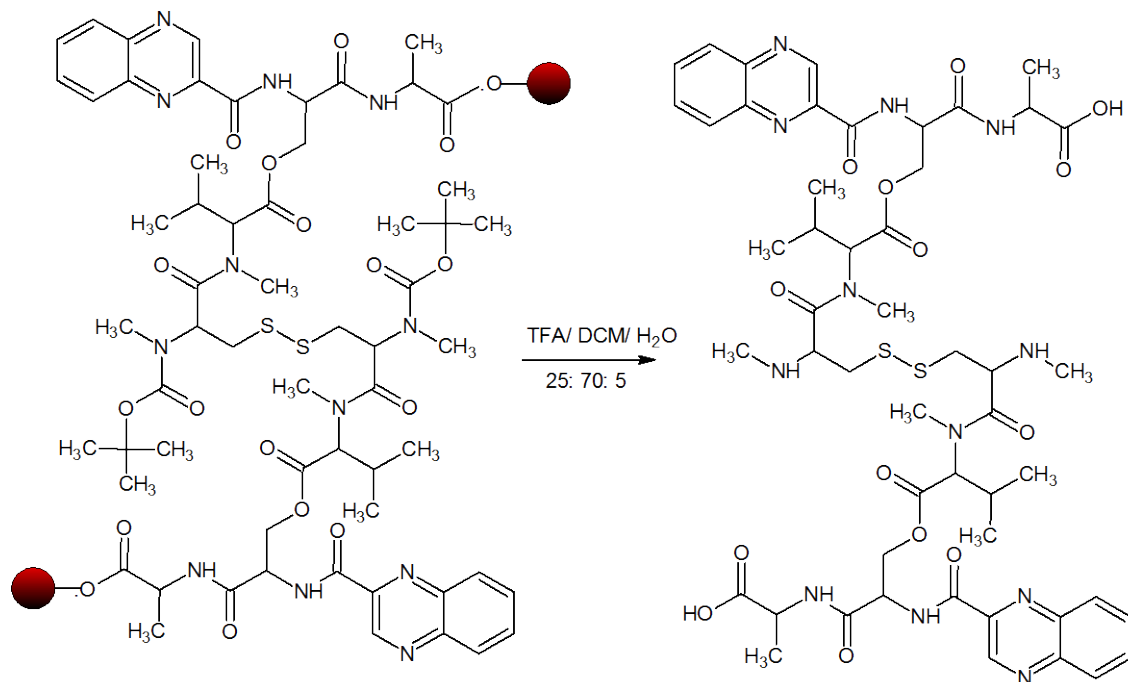
**Figura N° 98. Mecanismo de reacción propuesto para la oxidación con yodo.**

La principal precaución al realizar la oxidación con yodo, es evitar la sobre oxidación del grupo tiol al correspondiente ácido sulfónico, así como también prevenir o minimizar modificaciones que pueden ocurrir en otros aminoácidos presentes en la cadena péptida <sup>61</sup>, por tal sentido se realizó la oxidación durante 10 minutos de la NMe-Cisteína-(Acm) en DMF, ya que la reacción en este solvente se lleva a cabo en pocos segundos <sup>109</sup>, de esta manera se reduce el tiempo de oxidación y se evita la sobre oxidación.



**Figura N° 99. Formación del puente disulfuro intercatenario.**

Finalmente se clivó el octadepsipéptido de la resina con una solución de TFA/DCM/ $H_2O$ , por espacio de una hora, la baja concentración de TFA se debe a que la resina de Wang es lábil bajo estas condiciones de acidez, al mismo tiempo la desprotección del grupo Boc en la cisteína es llevado a cabo por completo, por tal sentido se escogió el método del clivaje acidolítico. Bajó estas condiciones se utilizó  $H_2O$  como “scavengers”, para evitar que la especie cationica ter-butilo, pueda atrapar o reaccionar con algún aminoácido que contengan grupos funcionales ricos en electrones.



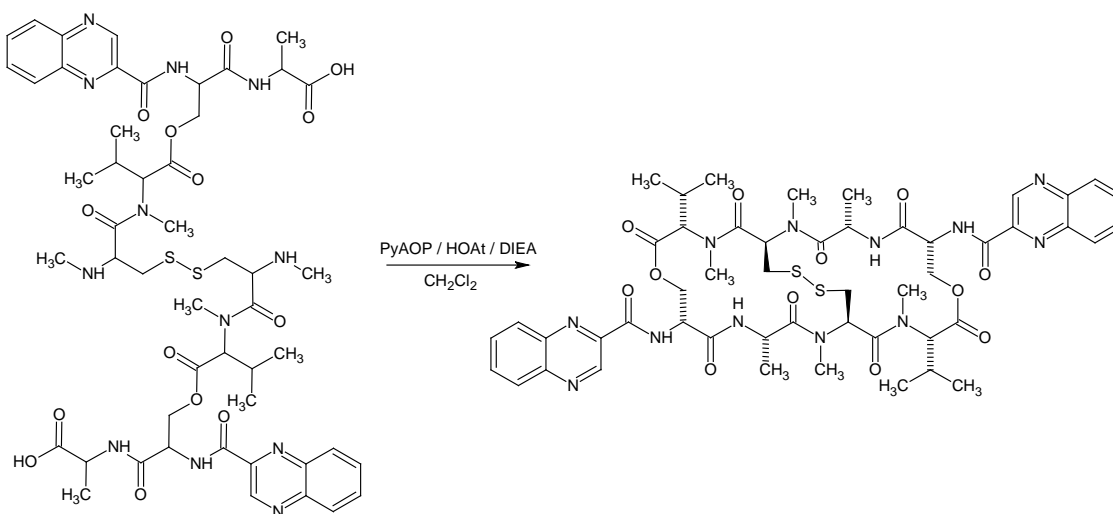
**Figura N° 100. Clivaje acidolítico de la resina de Wang y eliminación del grupo Boc de la Cisteína.**

Para obtener el péptido cíclico, se realizó una macrociclación doble con un NMe aminoácido como nucleófilo, en una solución muy diluida  $0,5 \times 10^{-3}$  M del octadepsipéptido en DCM, con la finalidad de favorecer la reacción intramolecular (ciclación del péptido) entre la Alanina y la NMe-Cisteína ya que al aumentar considerablemente la concentración del péptido se favorecen los acoplamiento intermoleculares de las cadenas péptidicas.

Se coloca en la mayor cantidad de DCM, para evitar favorecer las reacciones colaterales como racemización o la formación de N-Acilurea, por tal sentido se coloca una minúscula cantidad de DMF, solamente para solubilizar los agentes acoplantes PyAOP y HOAt. Vale la pena resaltar que en solventes como DMF de alta pureza, existe a muy bajas concentraciones dimetilamina libre, la cual favorece la N-Acil migración para formar N-Acil urea <sup>79</sup>.

Las condiciones de reacción del PyAOP y HOAt son exactamente iguales a las mencionadas anteriormente con PyBOP y HOAt, con la única diferencia que el PyAOP es ligeramente más reactivo, por la presencia del átomo de nitrógeno situado en la posición 7 del grupo (7-azabenzotriazol-1-yloxy), el cual proporciona un doble efecto. En primer lugar la influencia de electrones en un átomo de nitrógeno, mejora la calidad del grupo saliente, lo que conduce a una mayor reactividad. En segundo lugar, la colocación de este átomo de nitrógeno específicamente en la posición 7 hace que sea posible lograr un efecto clásico de grupo vecino, lo que aumenta considerablemente su reactividad y reduce la pérdida de la integridad configuracional <sup>79</sup>.

La Principal ventaja al utilizar este tipo de reactivos en una macrociclación, es que no reacciona con los grupos amino, por lo tanto, puede añadirse directamente a una mezcla amino, que contenga a su vez, al grupo carboxílico libre para ser acoplados. De esta manera se evita la terminación o bloqueo del grupo amino para formar un derivado guanidino. Esto es relevante en el acoplamiento de fragmentos péptidicos y para la ciclación de péptidos <sup>102,110</sup>.



**Figura N° 101. Macrociclación doble y obtención del Triostin A A en solución.**

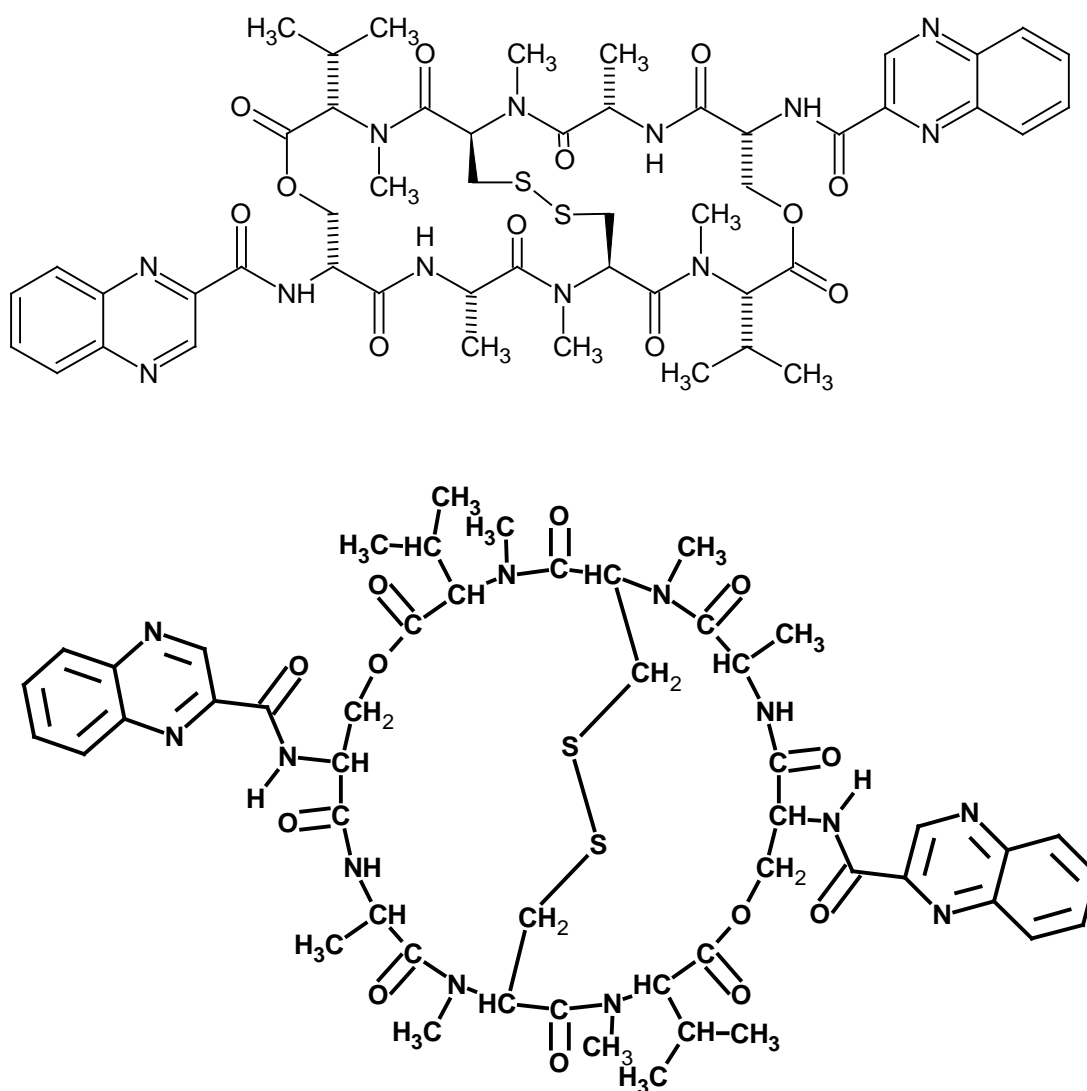
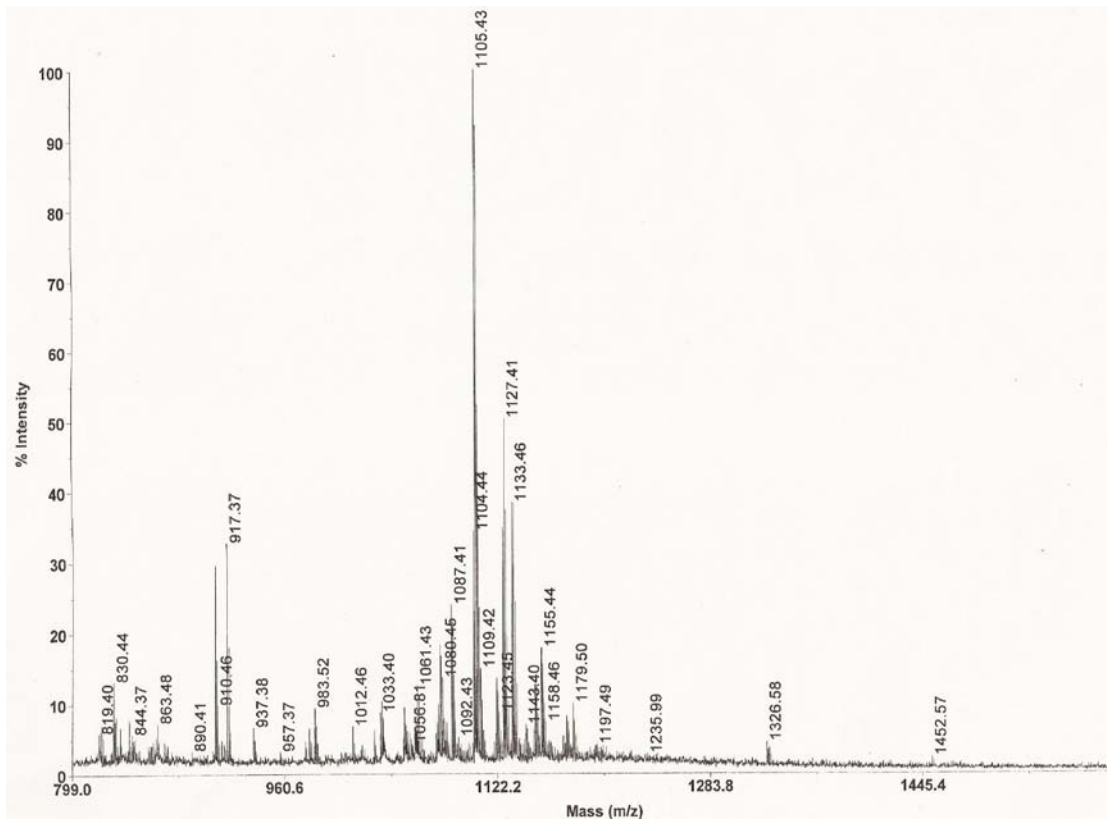


Figura N° 102. Diferentes representaciones del Bicyclo Octadepsipéptido Triostin A.



**Figura N° 103. Espectro de masa del péptido crudo Triostin A.**

Este Compuesto se caracterizó por Espectrometría de Masa; en dicho espectro se pueden apreciar una gran cantidad de picos de diferentes intensidades; el pico de baja intensidad que corresponde al  $(M+1) / 1 = 1087,41$  m/z corresponde al Biciclo Octadepsipéptido Triostin A. Los otros picos que se observan en el espectro se deben a diferentes fragmentaciones del péptido y subproductos que se obtuvieron durante la síntesis del Triostin A.

Luego del trabajo de extracción del péptido de la solución, se obtuvieron 83 mg del péptido Triostin A crudo con un 51 % de pureza (ver figura N° 105) para un péptido crudo luego de 12 pasos, usando 6 grupos protectores diferentes (Fmoc, Alloc y Boc para los  $N^{\alpha}$ -Aminoácidos); Trt para el grupo hidroxilo, Acm

para el grupo sulfhídrico de la cisteína y p-alcoxibencil para el carboxilo terminal.

El HPLC Analítico y el HPLC-MS revelaron la presencia de dos picos con la misma masa en una proporción 65:35, la cual fue separada por HPLC semi-preparativo en fase reversa con un rendimiento del 17 %. La presencia de dos confórmeros discretos del Triostin A son lentamente intercambiables, los cuales se ha reportado que pueden ser separados cromatográficamente <sup>111</sup>. Donde la NMe-Valina adopta una conformación trans y la presencia de los dos confórmeros es el resultado de la isomerización *Cis/Trans* <sup>97</sup> de los N-Metil grupos de la Cisteína <sup>51</sup>. Esta lenta interconversión es debido a los efectos cooperativos por la presencia del anillo de quinoxalina <sup>112</sup>.

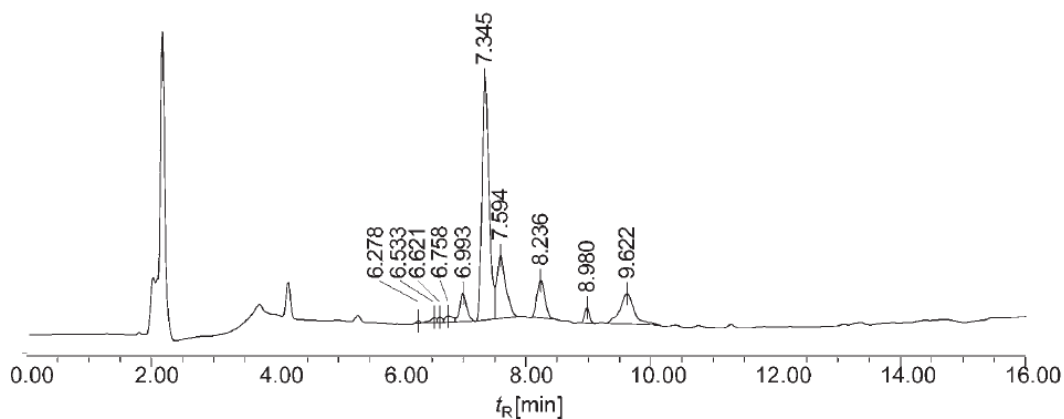
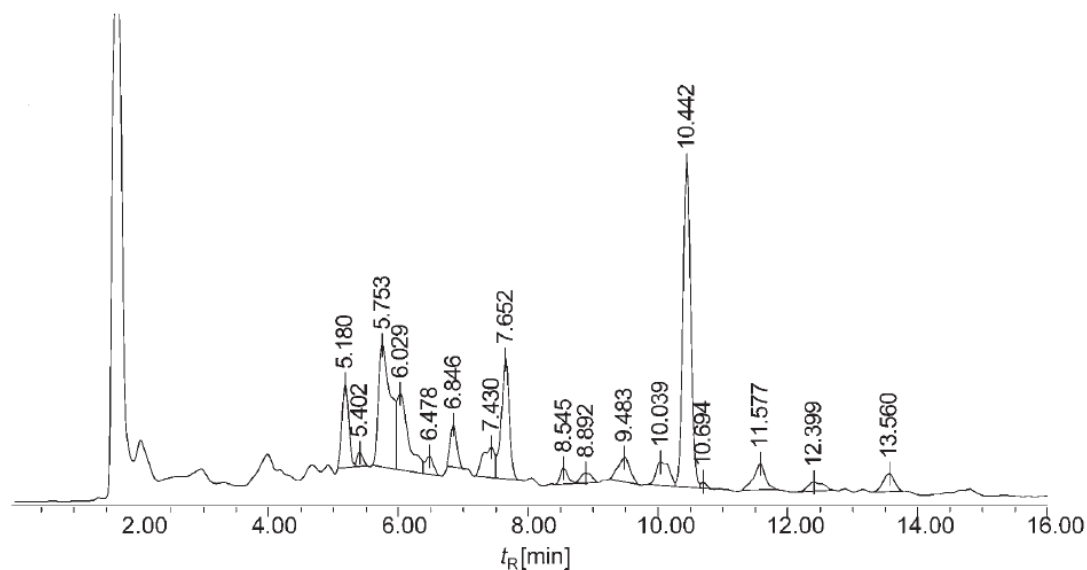


Figura N° 104. Dímero Crudo



**Figura N° 105. Triostin A Crudo**

Recientes estudios han determinado que el Triostin A existe en una solución de cloroformo deuterado como dos confórmers simétricos, separados por una barrera energética de 22 Kcal/mol<sup>111,112</sup>. Basados sobre efectos del disolvente sobre equilibrios conformacionales, donde un confórmero se encuentra favorecido en solventes polares, mientras que el otro está favorecido en solventes no-polares. Blake y colaboradores<sup>113</sup>, designan al confórmero predominante en solventes polares como p-Triostin A y el confórmero predominante en solventes no-polares como n-Triostin A, ellos percibieron que en solventes no-polares, predomina en mayor proporción el confórmero no-polar, pero existen ambas conformaciones como n-Triostin A y p-Triostin A, es decir ambos coexisten; pero en solventes polares, solamente se encuentra el confórmero p-Triostin A, el que predomina en solventes polares<sup>111</sup>.



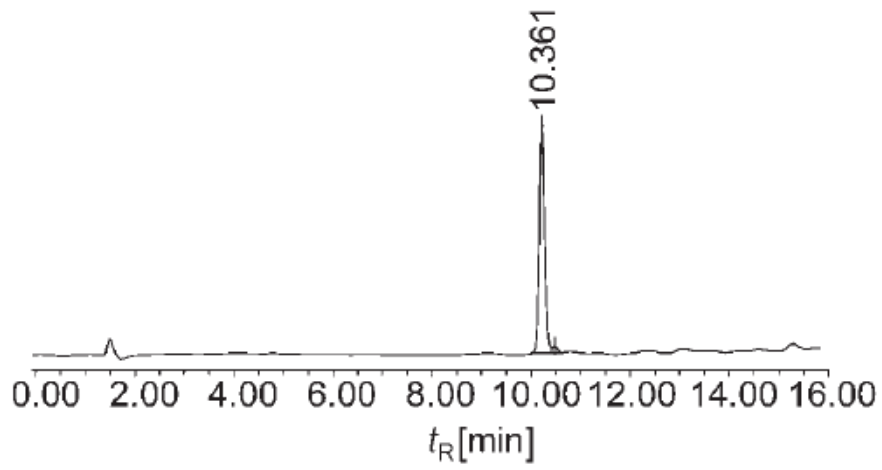


Figura N° 106. Conformero p-Triostin A más polar

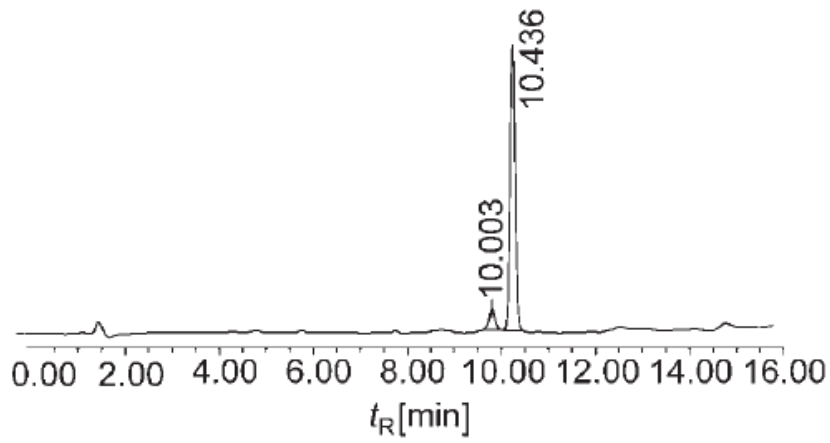


Figura N° 107. Conformero n-Triostin A menos polar.

#### 4.13 Curva de crecimiento de células Vero.

En la Figura N° 108 se puede apreciar el crecimiento de las células Vero a tiempo 0 y en la Figura N° 109 se observa el crecimiento de las células a un tiempo de 120 h, a este tiempo, se seleccionó  $2,2 \times 10^5$  cels/mL como la cantidad de células a utilizar para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad

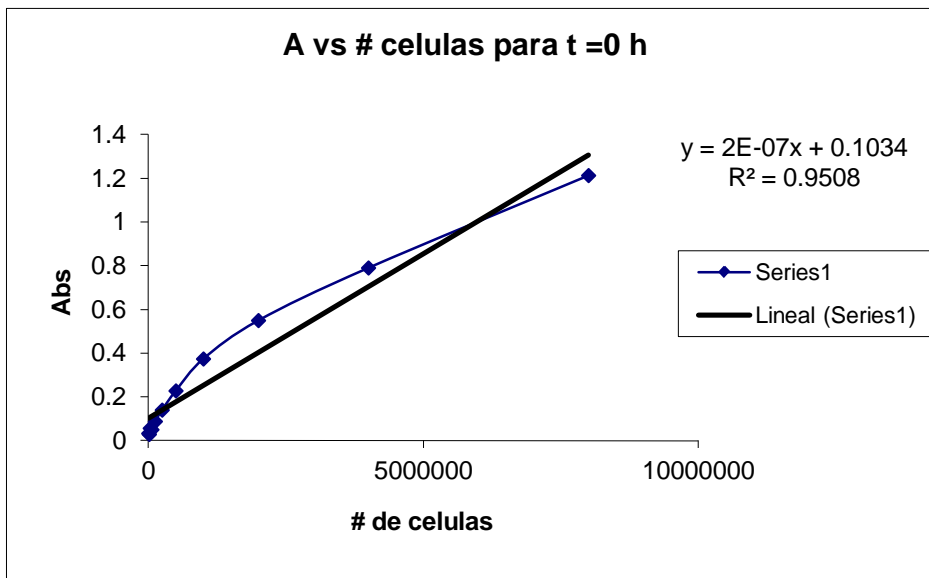


Figura N° 108. Curva de crecimiento de células Vero a t = 0 h

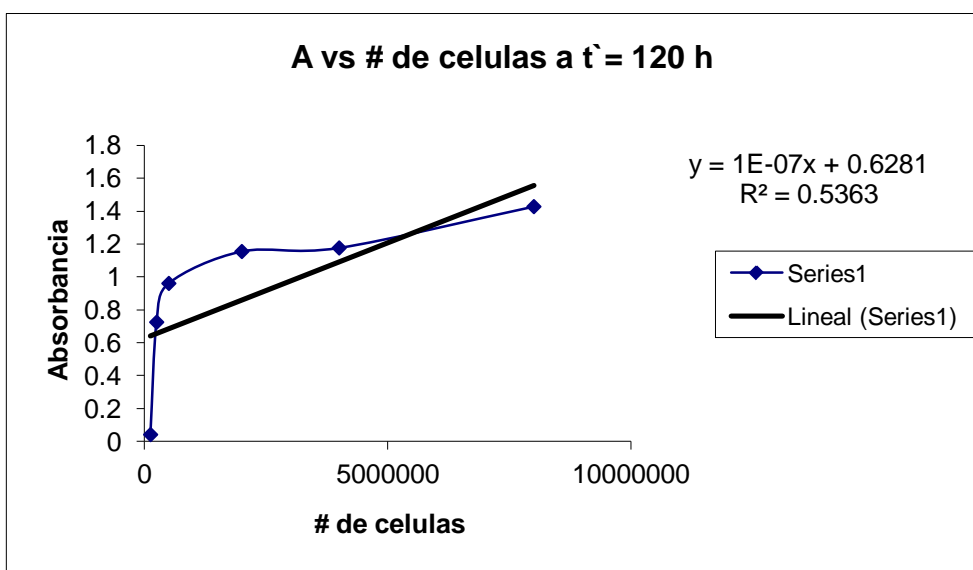


Figura N° 109. Curva de crecimiento de células vero a t = 120 h

#### 4.14 Determinación de citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de varios compuestos que poseen el esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno graficando el % de viabilidad versus la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) y se pudo calcular a partir de la ecuación de la recta, la dosis letal ( $DL_{50}$ ) para cada uno de los compuestos evaluados. Las graficas para cada uno de estos ensayos se pueden apreciar en el anexo A. En la tabla N° 6 se pueden observar la estructura, nombre y código asignado de los compuestos utilizados. En la tabla N° 7 podemos apreciar los diferentes efectos de los compuestos a distintas concentraciones.

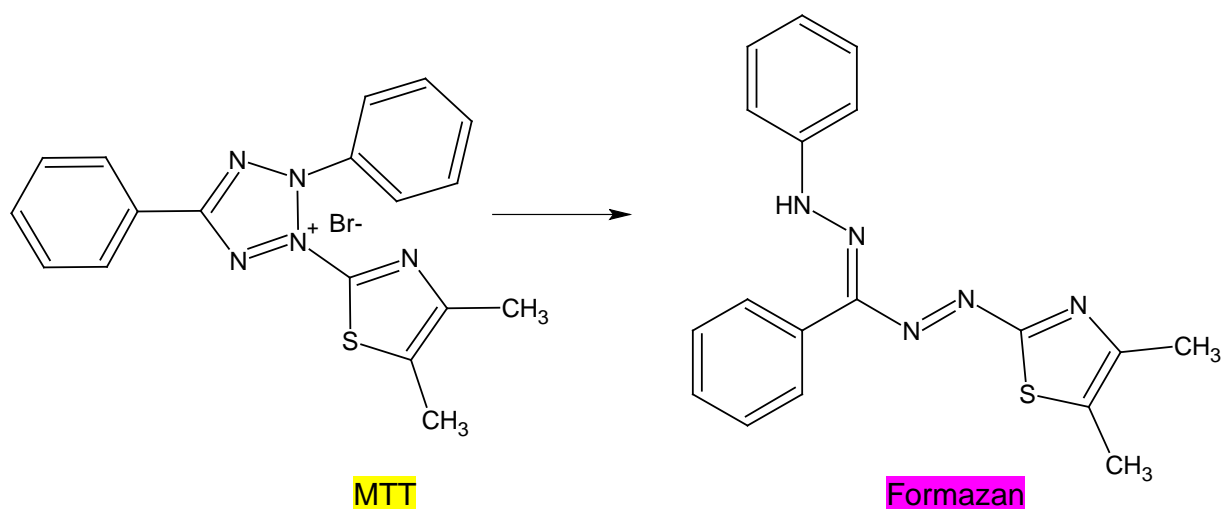
Se determino el porcentaje de viabilidad celular en presencia de los compuestos indicados en la (tabla N° 6) comparando la absorbancia del control celular con las absorbancias obtenidas para cada concentración. Los valores que se encuentren dentro del rango de 80% de viabilidad y 120% de viabilidad se consideran inocuos, aquellos valores que superen el 120% de viabilidad se consideran proliferativos y aquellos que estén por debajo de 80% se consideran citotóxicos <sup>54</sup>.

Tabla Nº 6. Código y molécula de los diferentes androstanos evaluados

Código	Compuesto	Estructura
T1	3,17 dihidroxi – 5 $\alpha$ – Androstano	
T2	3- $\beta$ -hidroxi- 5 $\alpha$ – Androstan- 17ona	
T3	17- $\beta$ -hidroxi- 5 $\alpha$ – Androstan-3- ona (Dihidrotosterona)	
T4	3- $\beta$ – Hidroxi- colestano	
T9	17- $\beta$ -hidroxi- 4 – Androsten-3-ona (Testosterona)	
T10	17- $\beta$ -acetil- 4 – Androsten-3-ona (Testosterona Acetilada)	

Para determinar el efecto citotóxico de los compuestos anteriormente mencionados, se utilizó una modificación del ensayo colorimétrico del MTT <sup>53</sup>.

El MTT (color amarillo) es clivado a nivel de mitocondria por la enzima succinato deshidrogenasa, produciendo unos cristales de coloración azul-violeta (formazan) cuya cantidad es directamente proporcional al número de mitocondrias funcionales presentes en la célula (ver figura N° 110).



3-(4,5- dimetilthiazol-2-yl)-2,5- difenil tetrazolium bromuro

**Figura N° 110. Reacción del MTT**

Los compuestos ensayados resultaron ser inocuos en células Vero en un amplio rango de concentraciones siendo inocuos a partir de la concentración de 12,5 µg/mL, únicamente T1 y T2 presentaron inocuidad a 50 µg/mL y T4 resultó citotóxico a 25 µg/mL. Todos los compuestos evaluados son citotóxicos a 100 µg/mL (ver tabla N° 7)

**Tabla Nº 7 % Viabilidad, Desviación Estándar (DS) para cada uno de los compuestos ensayados**

	T1	T2	T3	T4	T9	T10
( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$						
0,0001	%V $\pm$ DS	%V $\pm$ DS	%V $\pm$ DS	%V $\pm$ DS	%V $\pm$ DS	%V $\pm$ DS
100	72 $\pm$ 10,6	40,2 $\pm$ 9,9	57,6 $\pm$ 19,2	30,6 $\pm$ 2,8	28,6 $\pm$ 10,9	21,6 $\pm$ 17,8
50	96,8 $\pm$ 8,7	105,6 $\pm$ 38,2	69,4 $\pm$ 24,9	42,9 $\pm$ 3,7	60,6 $\pm$ 19,3	58,6 $\pm$ 25,8
25	107,2 $\pm$ 10,5	118,2 $\pm$ 39,1	84,4 $\pm$ 5,6	76,9 $\pm$ 15,3	85,9 $\pm$ 21,9	79 $\pm$ 29,3
12,5	109,4 $\pm$ 13,2	123,9 $\pm$ 17,1	92,6 $\pm$ 5,8	87,5 $\pm$ 2,3	82,3 $\pm$ 7,7	88,8 $\pm$ 23,8
6,25	113,2 $\pm$ 25,5	121,1 $\pm$ 12,8	98,3 $\pm$ 7,9	94,7 $\pm$ 3,6	91,6 $\pm$ 17,1	98,2 $\pm$ 14,6
3,125	107,5 $\pm$ 17,3	118,6 $\pm$ 22,2	96,4 $\pm$ 9,9	90,8 $\pm$ 6,0	95,2 $\pm$ 14,1	94,5 $\pm$ 10,7
1,5625	111,6 $\pm$ 21,8	116,5 $\pm$ 19,9	93 $\pm$ 6,9	91,4 $\pm$ 2,6	90,8 $\pm$ 11,4	90,2 $\pm$ 10,3
0,7812	123,1 $\pm$ 22,7	124 $\pm$ 10,4	94,8 $\pm$ 10,2	96,8 $\pm$ 2,2	93,4 $\pm$ 18,1	94,9 $\pm$ 18,0
0,3906	144,5 $\pm$ 18,9	113,7 $\pm$ 15,5	112,9 $\pm$ 15,2	99,9 $\pm$ 1,9	99,3 $\pm$ 19,6	99,3 $\pm$ 13,9
0,1953	91,9 $\pm$ 19,5	98,1 $\pm$ 28,32	111,7 $\pm$ 9,5	104,4 $\pm$ 10,3	94,7 $\pm$ 11,3	98,6 $\pm$ 13,0

Una vez obtenidos los % de viabilidad se calcularon los valores para la dosis letal 50 ( $LD_{50}$ ), despejando el valor de (x), en la ecuación de la recta que se encuentra en todas las graficas de % Viabilidad vs Concentración, cuando el valor de (y) es igual a 50; estos parámetros permiten interpretar la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.(ver tabla N° 8).

**Tabla N° 8 Dosis Letal 50 ( $LD_{50}$ ) de los compuestos evaluados**

	T1	T2	T3	T4	T9	T10
$LD_{50}$	167,5	105,9	105,3	62,6	68,4	62,6

La presencia del esqueleto de ciclopentanoperhidrofenantreno es común para todos los compuestos evaluados, encontrando diferencias significativas en el tipo de sustituyente y la posición del mismo. En nuestro estudio el efecto de los Androstanos sustituidos sobre la viabilidad celular fue variable.

La marcada analogía entre T1 y T2, cuya única diferencia es la reducción del grupo carbonilo (C=O) a un grupo hidroxilo (OH) en la posición 17, puede explicar la similitud en sus valores de inocuidad a 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Los compuestos T1, T2 y T3 resultaron ser inocuos en todas las concentraciones evaluadas, teniendo todos en común la ausencia de grupos voluminosos en alguna de sus posiciones, presentando solamente diferencias en el estado de oxidación en las posiciones 3 y 17.

Podemos decir que la adición de un grupo acetyl en el OH de la posición 17 incrementa la citotoxicidad del compuesto, mientras que el compuesto T4 posee un sustituyente alifático (1,5-dimetil- hexil) en la posición 17, lo cual nos señala que sustituyentes voluminosos para este posición hacen al compuesto citotóxico para concentraciones superiores a 25  $\mu\text{g/mL}$ . Los compuestos T9 y T10 resultaron tener el mismo efecto citotóxico ( $60,6 \pm 19,3$  y  $58,6 \pm 25,8$ ) para concentraciones de 50  $\mu\text{g/mL}$  (tabla N° 7), esto puede atribuirse a que son estructuralmente similares.

Se determinó el efecto citotóxico de la testosterona cuando se le ancló un péptido en la posición 17. Los péptidos anclados son Nle-Lys-Arg-Arg y FWFTLIKTQAKQPARYRRF. En la tabla N° 9 se pueden observar la estructura, nombre y código asignado de los compuestos utilizados.

**Tabla N° 9 Código y molécula de los diferentes péptidos esteroidales evaluados.**

Código	Estructura
T9-1201	
T9-1202	



**Tabla N° 10 % Viabilidad, Desviación Estándar (DS) para los compuestos evaluados**

	T9	T9-1201	T9-1202
( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ 0,0001	%V $\pm$ DS	%V $\pm$ DS	%V $\pm$ DS
50	60,6 $\pm$ 19,3	99,13 $\pm$ 0,08	108,08 $\pm$ 0,02
25	85,9 $\pm$ 21,9	96,36 $\pm$ 0,07	107,15 $\pm$ 0,09
12,5	82,3 $\pm$ 7,7	95,90 $\pm$ 0,06	107,40 $\pm$ 0,11
6,25	91,6 $\pm$ 17,1	93,02 $\pm$ 0,01	103,31 $\pm$ 0,07
3,125	95,2 $\pm$ 14,1	88,02 $\pm$ 0,06	99,70 $\pm$ 0,08
1,5625	90,8 $\pm$ 11,4	88,81 $\pm$ 0,05	102,72 $\pm$ 0,19
0,7812	93,4 $\pm$ 18,1	90,25 $\pm$ 0,01	103,56 $\pm$ 0,17
0,3906	99,3 $\pm$ 19,6	93,47 $\pm$ 0,08	102,92 $\pm$ 0,14
0,1953	94,7 $\pm$ 11,3	94,29 $\pm$ 0,07	102,95 $\pm$ 0,17
0,0076	-	94,62 $\pm$ 0,17	100,01 $\pm$ 0,19

Con la incorporación de los péptidos en la posición 17 ocurre un incremento considerable en el % de viabilidad a las concentraciones de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  hasta 50  $\mu\text{g/mL}$ , lo que implica una disminución en la citotoxicidad de la testosterona modificada (tabla N° 10). El incremento del % de viabilidad celular fue de un 64% para T9-1201 y 78 % para T9-1202 a la concentración más alta utilizada. En la figura N° 111 se observa que a partir de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  al incrementar la concentración de los compuestos T9-1201 y T9-1202, el % viabilidad tiende a incrementarse hacia la inocuidad con tendencia proliferativa, por la pendiente positiva de la curva

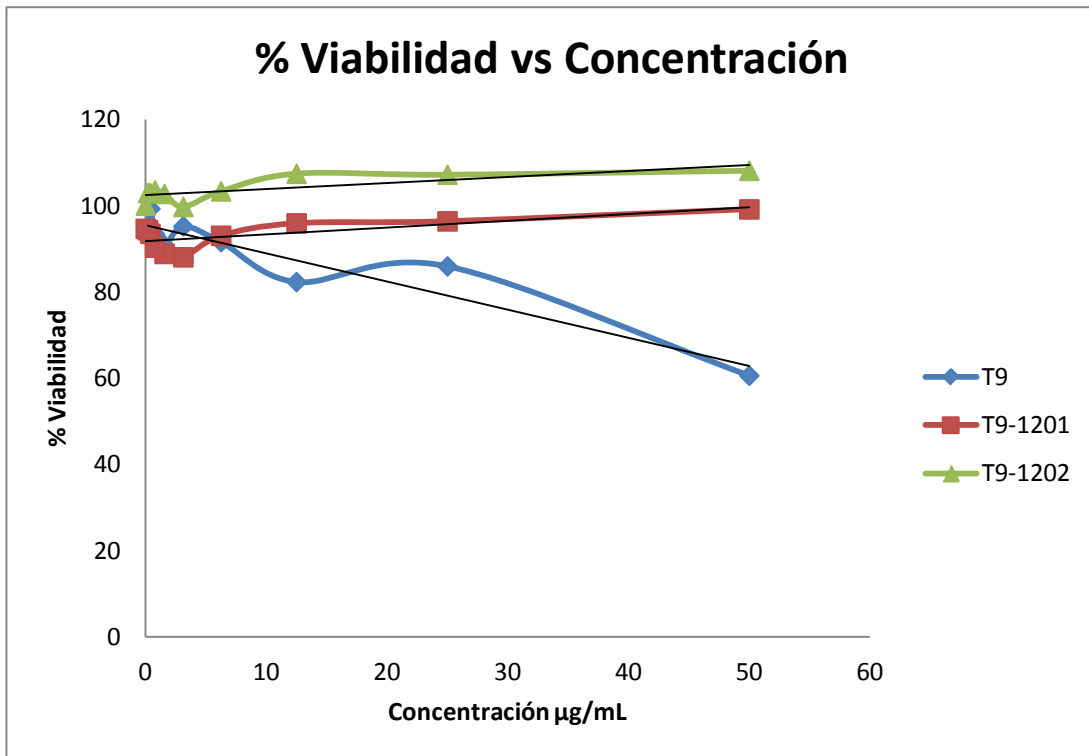


Figura Nº 111. % Viabilidad vs Concentración de los compuestos T9; T9-1201 y T9-1202

## CONCLUSIONES

- ❖ La síntesis de los péptidos se realizó en Fase sólida con excelentes rendimientos utilizando las resinas de Rink Amida y 2-Clorotritilo.
- ❖ La síntesis del  $5\alpha$  – Androstan -  $3\beta$  aceto -17 ona se obtuvo con un rendimiento elevado del 91 %
- ❖ La esterificación del ácido acrílico bajo métodos clásicos de síntesis como la esterificación azeotrópica se obtiene con rendimientos muy bajos y bajo condiciones más suaves de reacción no se pudo obtener el metil acrilato ya que el ácido acrílico tiende a polimerizar.
- ❖ Se realizaron múltiples intentos por colocar al formaldehído y el ácido 2-propenoico (ácido acrílico), como espaciadores en la posición 16 del esqueleto de  $5\alpha$  – Androstan -  $3\beta$  ol -17 ona sin obtener resultados satisfactorios.
- ❖ El ácido succínico es un excelente espaciador para anclar péptidos al grupo hidroxilo de la posición 17 de la molécula de testosterona.
- ❖ El bajo rendimiento en los péptidos esteroideos obtenidos se debe a que las condiciones de clivaje son muy ácidas (95% de ácido trifluoroacético), las cuales hidrolizan parte del éster succinato.

- ❖ La obtención del aminoácido Boc-NMe-Cisteina-(Acm)-OH, bajo métodos clásicos de síntesis en solución se obtuvo con un rendimiento muy bajo del 12% debido a los múltiples pasos. Mientras que la síntesis realizada en fase sólida se obtuvo con un rendimiento elevado del 90% en menor cantidad de pasos.
  
- ❖ Hemos demostrado que un enfoque sintético optimizado debería permitir la síntesis de cualquier producto natural como las dos Triostin A.
  
- ❖ El nuevo concepto de la movilidad conformacional restringida puede ser clave para la síntesis de otros péptidos, así como también para otros productos naturales complejos.
  
- ❖ La incorporación de los péptidos en la testosterona induce un cambio en la actividad citotóxica sobre las células Vero, observándose un incremento del % de viabilidad celular de un 64% para T9-1201 y de 78 % para T9-1202 a 50µg /mL.

**BIBLIOGRAFIA**

1. A.K. Banerjee. *Concepto Básico de la Síntesis Orgánica*. (Editorial Unidad de información y publicaciones del Centro de Estudios Avanzados del IVIC (U.I.P), 1994).
2. Ireland, R. E. *Procesos sintéticos en química orgánica*. (Editorial Alhambra, 1976).
3. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **85**, 2149–2154 (1963).
4. Merrifield, R. B. Automated Synthesis of Peptides. *Science* **150**, 178–185 (1965).
5. Sarin, V. K., Kent, S. B. H. & Merrifield, R. B. Properties of swollen polymer networks. Solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **102**, 5463–5470 (1980).
6. Zalipsky, S., Chang, J. L., Albericio, F. & Barany, G. Preparation and applications of polyethylene glycol-polystyrene graft resin supports for solid-phase peptide synthesis. *Reactive Polymers* **22**, 243–258 (1994).
7. Beth A, Lorsbach and Mark J, K. Carbon-carbon bond-forming solid-phase reactions. *Chemical reviews* **99**, 1549–1581 (1999).
8. Bohinski, R. *Bioquímica*. (Addison-wesley Iberoamericana, 1991).
9. M. Hasegawa, D. M. *Fitoquímica Orgánica*. (Editorial Torino, 2002).
10. Noller, C. R. *Química Orgánica*. (Editorial Interamericana, 1968).
11. D. Nelson, M. C. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (2004).
12. Karlson, P. *Manual de Bioquímica*. 47 (Editorial Marin, 1967).
13. Wade, L. G. *Química Orgánica*. 1147;1171–1172 (Editorial Prentice Hall, 2007).
14. T.Brown, E. LeMay, B. B. *Química la Ciencia Central*. (Prentice Hall Hispanoamericana S.A, 1993).
15. D. Marcano, L. C. *Fundamentos de Química Orgánica*. (Ediciones Vicerrectorado Académico-UCV, 1998).

16. Reyes-Moreno, M. *et al.* Synthesis and anabolic/androgenic evaluation of novel 9 $\alpha$ -fluorosteroids. *European journal of medicinal chemistry* **44**, 4567–4571 (2009).
17. Valverde, L. F., Cedillo, F. D., Reyes, G. C. & Ramos, M. L. Synthesis and Antibacterial Activity of Pregnenolone-Vitamin B1 Conjugate. *Journal of Mexican Chemical Society* **52**, 130–135 (2008).
18. Verkade, P. E. & Hoffmann-Ostenhof, O. IUPAC-IUB revised tentative rules for nomenclature of steroids. *The Journal of Organic Chemistry* **34**, 1517–1532 (1969).
19. Ricco, C., Revial, G., Ferroud, C., Hennebert, O. & Morfin, R. Synthesis of 7 $\beta$ -hydroxy-epiandrosterone. *Steroids* **76**, 28–30 (2011).
20. Czajkowska, D. & Morzycki, J. W. Synthesis of cholaphanes by ring closing metathesis. *Tetrahedron Letters* **48**, 2851–2855 (2007).
21. M. Lopez ; T. Alarcon. Péptidos de origen eucariótico con actividad antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* **12**, (1999).
22. Ciardelli, T. L., Chakravarty, P. K. & Olsen, R. K. Des-N-tetramethyltrioistin A and bis-L-seryldes-N-tetramethyltrioistin A, synthetic analogs of the quinoxaline antibiotics. *Journal of the American Chemical Society* **100**, 7684–7690 (1978).
23. Vaara, M. & Porro, M. Group of peptides that act synergistically with hydrophobic antibiotics against gram-negative enteric bacteria . These include : Group of Peptides That Act Synergistically with Hydrophobic Antibiotics against Gram-Negative Enteric Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 1801–1805 (1996).
24. Hancock, R. E. W. & Chapple, D. S. Peptide Antibiotics Minireview. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317–1323 (1999).
25. Moore, A. J., Beazley, W. D., Bibby, M. C. & Devine, D. a. Antimicrobial activity of cecropins. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**, 1077–1089 (1996).
26. T. Lemke, D. W. *Foye´s Principles of medicinal chemistry*. 861–864 (Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
27. Waterval, J. C. *et al.* Degradation kinetics of aplidine, a new marine antitumoural cyclic peptide, in aqueous solution. *Journal of chromatography. B* **754**, 161–168 (2001).
28. Stawikowski, M. & Cudic, P. A novel strategy for the solid-phase synthesis of cyclic lipodepsipeptides. *Tetrahedron letters* **47**, 8587–8590 (2006).

29. Knox, J. E. *et al.* Peptide inhibitors of West Nile NS3 protease: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **49**, 6585–6590 (2006).
30. Yin, Z. *et al.* Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1: Warhead. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **16**, 36–39 (2006).
31. Volpina, O. M. *et al.* A synthetic peptide based on the NS1 non-structural protein of tick-borne encephalitis virus induces a protective immune response against fatal encephalitis in an experimental animal model. *Virus research* **112**, 95–99 (2005).
32. Hrobowski, Y. M., Garry, R. F. & Michael, S. F. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. *Virology journal* **2**, 49 (2005).
33. Yin, Z. *et al.* Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **16**, 40–43 (2006).
34. Costin, J. M. *et al.* Structural optimization and de novo design of dengue virus entry inhibitory peptides. *PLoS neglected tropical diseases* **4**, e721 (2010).
35. Nitsche, C., Behnam, M. a M., Steuer, C. & Klein, C. D. Retro peptide-hybrids as selective inhibitors of the Dengue virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral research* **94**, 72–79 (2012).
36. Ganesh, V. K. *et al.* Identification and characterization of nonsubstrate based inhibitors of the essential dengue and West Nile virus proteases. *Bioorganic & medicinal chemistry* **13**, 257–264 (2005).
37. Loria, R. M., Inge, T. H., Cook, S. S., Szakal, A. K. & Regelson, W. Protection against acute lethal viral infections with the native steroid dehydroepiandrosterone (DHEA). *Journal of Medical Virology* **26**, 301–314 (1988).
38. G. Cabrera, M. R. Efecto del colesterol y sus derivados en la replicación del virus dengue. in *LVI Convención anual de asovac 203* (2006).
39. Boyce, R., Li, G., Nestler, H. P., Suenaga, T. & Still, W. C. Peptidosteroidal Receptors for Opioid Peptides. Sequence-Selective Binding Using a Synthetic Receptor Library. *Journal of the American chemical society* **116**, 7955–7956 (1994).
40. Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters* **28**, 3787–3790 (1987).

41. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Analytical Biochemistry* **34**, 595–598 (1970).
42. Barlos, K. *et al.* Darstellung geschützter peptid-fragmente unter einatz substituierter triphenylmethyl-harze. *Tetrahedron Letters* **30**, 3943–3946 (1989).
43. Barlos, K. *et al.* Veresterung von partiell geschützten peptid-fragmenten mit harzen. Einsatz von 2-chlortritylchlorid zur synthese von Leu15 - gastrin I. *Tetrahedron Letters* **30**, 3947–3950 (1989).
44. Greene, T. W., & Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis, Third Edition*. **9**, 0–471 (1999).
45. R. Brewster, C. Vanderwerf, W. M. *Curso practico de Química orgánica*. 121–125 (Editorial Alhambra, 1972).
46. Requena, L. *Vamos a Estudiar Química Orgánica*. 257 (Editorial Logos, 1994).
47. Wang, S. p -Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p -Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *Journal of the American Chemical Society* **95**, 1328–1333 (1973).
48. S. Warren, J. C. N. G. P. W. *Organic Chemistry*. 429–431 (Editorial Oxford University Press, 2001).
49. Tsuji, J. New synthetic reactions catalyzed by palladium complexes. *Pure and Applied Chemistry* **58**, 869–878 (1986).
50. Dangles, O., Guibe, F., Balavoine, G., Lavielle, S. & Marquet, A. Selective cleavage of the allyl and (allyloxy)carbonyl groups through palladium-catalyzed hydrostannolysis with tributyltin hydride. Application to the selective protection-deprotection of amino acid derivatives and in peptide synthesis. *The Journal of Organic Chemistry* **52**, 4984–4993 (1987).
51. Tulla-Puche, J., Marcucci, E., Fermin, M., Bayó-Puxan, N. & Albericio, F. Protection by conformationally restricted mobility: first solid-phase synthesis of triostin A. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **14**, 4475–4478 (2008).
52. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* **65**, 55–63 (1983).
53. Denizot, F. & Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved



- sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods* **89**, 271–277 (1986).
54. Paredes, A., Alzuru, M., Mendez, J. & Rodríguez-Ortega, M. Anti-Sindbis activity of flavanones hesperetin and naringenin. *Biological & pharmaceutical bulletin* **26**, 108–109 (2003).
55. Khosla, M. C., Smeby, R. R. & Bumpus, F. M. Failure sequence in solid-phase peptide synthesis due to the presence of an N-alkylamino acid. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 4721–4724 (1972).
56. D. Marcano, L. C. *Química Orgánica*. 481; 508–510 (Ediciones del Vicerrectorado Académico CODEPRE-ULA, 2004).
57. G. Cabrera, D. M. *Principios de Síntesis Orgánica*. 239 (Vicerrectorado Académico- UCV, 2001).
58. Detar, D. F., Silversteid, R. & Silverstein, R. Reactions of Carbodiimides. II. The Reactions of Dicyclohexylcarbodiimide with Carboxylic Acids in the presence of Amines and Phenols. *Journal of the American chemical society* **88**, 1020–1023 (1966).
59. P. Willians, F. Albericio, E. G. *Approches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. (Editorial CRC Press, 1997).
60. V. Sarin, S. Kent, J. Tam, R. B. M. Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Analytical Biochemistry* **117**, 147–157 (1981).
61. W.Chan, P. W. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis a practical approach*. (Oxford University Press, 2000).
62. Pearson, D. A., Blanchette, M., Baker, M. Lou & Guindon, C. A. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **30**, 2739–2742 (1989).
63. Lanzilotti, A. E., Littell, R., Fanshawe, W. J., McKenzie, T. C. & Lovell, F. M. Stereoselective reduction of some indoles with triethylsilane-trifluoroacetic acid. *The Journal of Organic Chemistry* **44**, 4809–4813 (1979).
64. J. March, M. S. *Advance Organic Chemistry reactions, mechanisms and structure*. 469 ; 577 (Wiley-interscience Publication, 2001).
65. Butler, A. R. & Gold, V. The hydrolysis of acetic anhydride. Part VII. Catalysis by pyridine and methylpyridines in acetate buffers. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* 4362–4367 (1961).

66. Marcano, D., Rojas, A., Méndez, B. & De Méndez, J. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of D-homoandrosterone derivatives. *Organic Magnetic Resonance* **16**, 205–208 (1981).
67. Marcano, D., De Méndez, J., Ortiz, A. C. & Salinas, M. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of some heterocyclic D-homoandrosterones. *Organic Magnetic Resonance* **22**, 736–738 (1984).
68. D. Marcano, J. M. D-Homoesteroides heterocíclicos desplazamientos químicos de los protones metílicos. *Acta Científica Venezolana* **32**, 296–298 (1981).
69. Georghiou, P. E. & Ho, C. K. (Jimmy). The chemistry of the chromotropic acid method for the analysis of formaldehyde. *Canadian Journal of Chemistry* **67**, 871–876 (1989).
70. KADABA, P. K. A Convenient Method of Esterification of Unsaturated Organic Acids Using a Boron Trifluoride Etherate-Alcohol Reagent. *Synthesis* **1971**, 316–317 (1971).
71. Krishnamoorthy, K. *et al.* Dendronized electrochromic polymer based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene). *Polymer* **43**, 6465–6470 (2002).
72. Brown, H. C. A Convenient Preparation of Volatile Acid Chlorides. *Journal of the American chemical society* **60**, 1325–1328 (1938).
73. Rezaei, Z., Khabnadideh, S., Zarshenas, M. M. & Jafari, M. R. Esterification of tertiary alcohols in steroids under different conditions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **276**, 57–61 (2007).
74. Pine, S; Hendrickson, J; Craw, D; Hammond, G. *Química Organica*. 330 (Editorial McGraw-Hill, 1991).
75. R.Almeida, W. Olivares, B. Scharikfer, L. Cortes, C. B. *Monografías de Química Energía Entropía y Dinámica Química*. (Editorial Miro, 1992).
76. Hassner, A., Krepski, L. R. & Alexanian, V. Aminopyridines as acylation catalysts for tertiary alcohols. *Tetrahedron* **34**, 2069–2076 (1978).
77. Scriven, E. F. V. 4-Dialkylaminopyridines: super acylation and alkylation catalysts. *Chemical Society Reviews* **12**, 129 (1983).
78. Chung, D. & Choi, Y. T. Synthesis and Solubility of Hydrophilic Derivatives of  $\beta$ - Sitosterol. *J.Ind.Eng.Chem* **13**, 367–372 (2007).
79. H. Jakubke, N. S. *Peptides: Chemistry and Biology*. 149; 196 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2002).
80. Kunz, H. & Unverzagt, C. The Allyloxycarbonyl (Aloc) Moiety Conversion of an Unsuitable into a Valuable Amino Protecting Group for Peptide

- Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English* **23**, 436–437 (1984).
81. F. Cotton, G. W. *Química Inorgánica Avanzada*. 310 (Editorial Limusa, 1997).
  82. Sykes, P. *Mecanismos de Reacción en Química Orgánica*. 68; 87 (Ediciones Martínez Roca, 1961).
  83. Veber, D., Milkowski, J., Varga, S., Denkwalter, R. & Hirschmann, R. Acetamidomethyl. A Novel Thiol Protecting Group for Cysteine. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 5456–5461 (1972).
  84. McKay, F. C. & Albertson, N. F. New Amine-masking Groups for Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **79**, 4686–4690 (1957).
  85. Fukuyama, T., Jow, C.-K. & Cheung, M. 2- and 4-Nitrobenzenesulfonamides: Exceptionally versatile means for preparation of secondary amines and protection of amines. *Tetrahedron Letters* **36**, 6373–6374 (1995).
  86. Fukuyama, T., Cheung, M., Jow, C.-K., Hidai, Y. & Kan, T. 2,4-Dinitrobenzenesulfonamides: A simple and practical method for the preparation of a variety of secondary amines and diamines. *Tetrahedron Letters* **38**, 5831–5834 (1997).
  87. Varasi, M., Walker, K. A. M. & Maddox, M. L. A revised mechanism for the Mitsunobu reaction. *The Journal of Organic Chemistry* **52**, 4235–4238 (1987).
  88. Kan, T. & Fukuyama, T. New strategies: a highly versatile synthetic method for amines. *Chemical communications (Cambridge, England)* 353–359 (2004).
  89. Miller, S. C. & Scanlan, T. S. Site-Selective N-Methylation of Peptides on Solid Support. *Journal of the American Chemical Society* **119**, 2301–2302 (1997).
  90. Miller, S. C. & Scanlan, T. S. oNBS–SPPS: A New Method for Solid-Phase Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **120**, 2690–2691 (1998).
  91. Swamy, K. C. K., Kumar, N. N. B., Balaraman, E. & Kumar, K. V. P. Mitsunobu and related reactions: advances and applications. *Chemical reviews* **109**, 2551–2651 (2009).
  92. Grochowski, E., Hilton, B. D., Kupper, R. J. & Michejda, C. J. Mechanism of the triphenylphosphine and diethyl azodicarboxylate induced dehydration reactions (Mitsunobu reaction). The central role of

- pentavalent phosphorus intermediates. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 6876–6877 (1982).
93. D. Stanley Tarbell, Yutaka. Yamamoto, and B. M. P. New Method to Prepare N-t-Butoxycarbonyl Derivatives and the Corresponding Sulfur Analogs from di-t-Butyl Dicarbonate and Amino Acids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 730–732 (1972).
  94. Katagiri, J. S. K. Studies on quinoxaline antibiotics. II. New antibiotics, triostins A, B and C. *Journal Antibiot Serie A* **14**, 335–339 (1961).
  95. Chakravarty, P. K. & Olsen, R. K. Synthesis of triostin A. *Tetrahedron Letters* **19**, 1613–1616 (1978).
  96. Shin, M., Inouye, K. & Otsuka, H. Synthetic studies on quinoxaline antibiotics. II. Synthesis of triostin A. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **57**, 2203–2210 (1984).
  97. Shin, M., Inouye, K., Higuchi, N. & Kyogoku, Y. Synthetic studies on quinoxaline antibiotics. III. Synthesis of nortriostin A, a triostin A analog lacking N-methyl groups on the cystine and valine residues. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **57**, 2211–2215 (1984).
  98. Matsuura, S. Studies on quinoxaline antibiotics IV. Selective antitumor activity of each quinoxaline antibiotic. *Journal Antibiot Serie A* **18**, 43–46 (1965).
  99. Wakelin, S. P. & Waring, M. J. The binding of echinomycin to deoxyribonucleic acid. *Biochemical journal* **157**, 721–740 (1976).
  100. Atherton, E., Benoiton, N. L., Brown, E., Sheppard, R. C. & Williams, B. J. Racemisation of activated, urethane-protected amino-acids by p-dimethylaminopyridine. Significance in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **5**, 336–337 (1981).
  101. Sieber, P. An improved method for anchoring of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-amino acids to 4-alkoxybenzyl alcohol resins. *Tetrahedron Letters* **28**, 6147–6150 (1987).
  102. Albericio, F., Bofill, J. M., El-Faham, A. & Kates, S. A. Use of Onium Salt-Based Coupling Reagents in Peptide Synthesis 1. *The Journal of Organic Chemistry* **63**, 9678–9683 (1998).
  103. Isidro-Llobet, A., Alvarez, M. & Albericio, F. Amino acid-protecting groups. *Chemical reviews* **109**, 2455–2504 (2009).
  104. Malkinson, J. P. *et al.* Efficient solid-phase-based total synthesis of the bisintercalator TANDEM. *The Journal of organic chemistry* **70**, 7654–7661 (2005).

105. Amatore, C. & Pfluger, F. Mechanism of oxidative addition of palladium(0) with aromatic iodides in toluene, monitored at ultramicroelectrodes. *Organometallics* **9**, 2276–2282 (1990).
106. Guibé, F. Allylic protecting groups and their use in a complex environment part II: Allylic protecting groups and their removal through catalytic palladium  $\pi$ -allyl methodology. *Tetrahedron* **54**, 2967–3042 (1998).
107. Han, Y., Albericio, F. & Barany, G. Occurrence and Minimization of Cysteine Racemization during Stepwise Solid-Phase Peptide Synthesis. *The Journal of organic chemistry* **62**, 4307–4312 (1997).
108. Gisin, B. F. & Merrifield, R. B. Carboxyl-catalyzed intramolecular aminolysis. Side reaction in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 3102–3106 (1972).
109. Kamber, B. *et al.* The Synthesis of Cystine Peptides by Iodine Oxidation of S-Tryl-cysteine and S-Acetamidomethyl-cysteine Peptides. *Helvetica Chimica Acta* **63**, 899–915 (1980).
110. El-Faham, A. & Albericio, F. Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chemical reviews* **111**, 6557–6602 (2011).
111. Alfredson, T. V, Maki, a H., Adaskaveg, M. E., Excoffier, J. L. & Waring, M. J. Liquid chromatographic investigation of quinoxaline antibiotics and their analogues by means of ultraviolet diode-array detection. *Journal of chromatography* **507**, 277–92 (1990).
112. Kyogoku, Y., Higuchi, N., Watanabe, M. & Kawano, K. Conformer equilibria of triostin A and its conformer-specific interaction with nucleic acid bases. *Biopolymers* **20**, 1959–1970 (1981).
113. Blake, T. J., Kalman, J. R. & Williams, D. H. Two Symmetrical Conformations of the Triostin Antibiotics in Solution. *Tetrahedron Letters* **18**, 2621–2624 (1977).

## ANEXO A

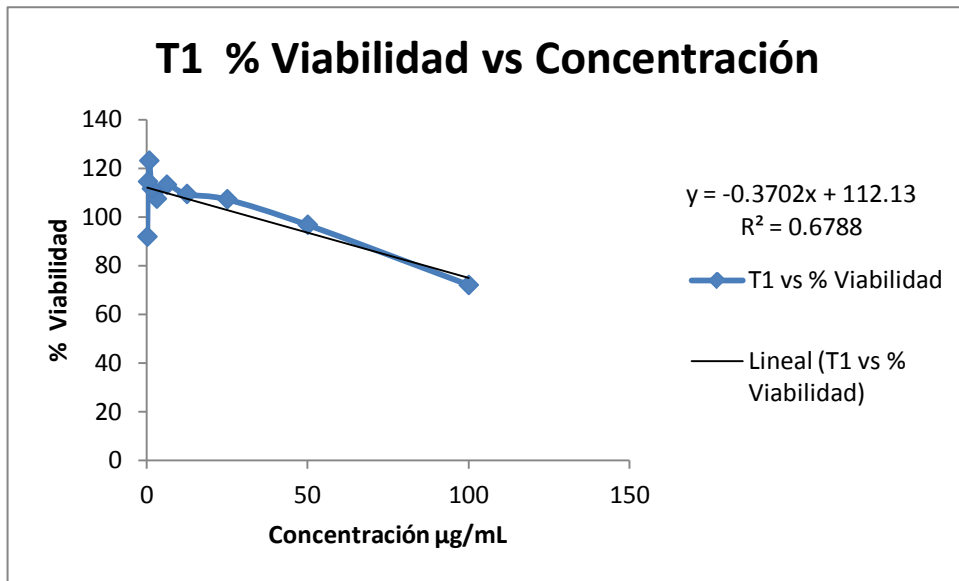


Grafico Nº 1. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T1

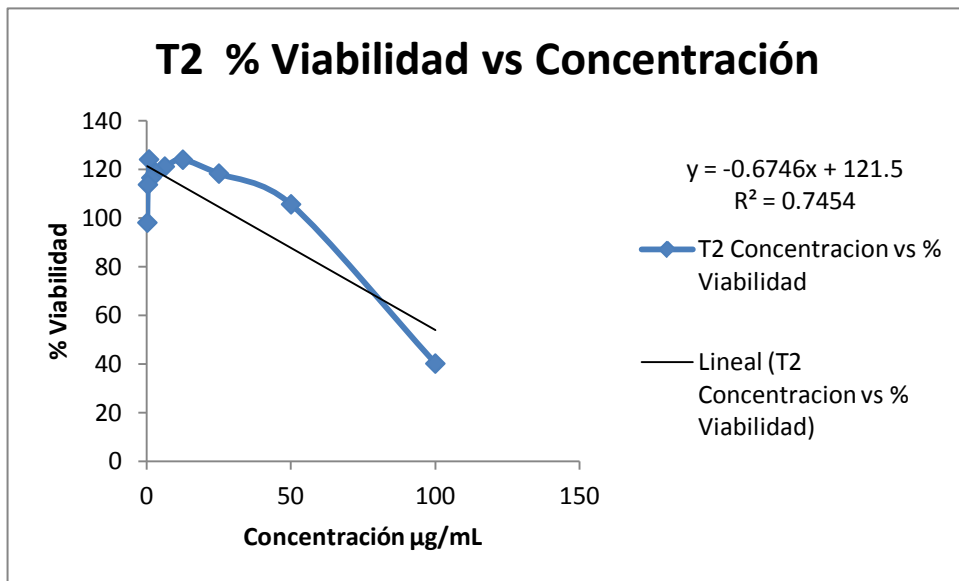
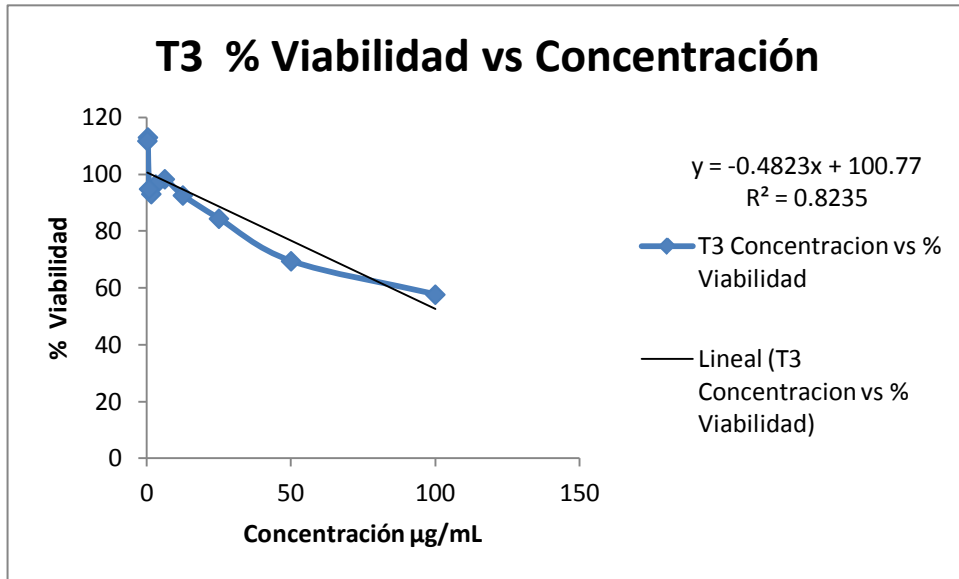
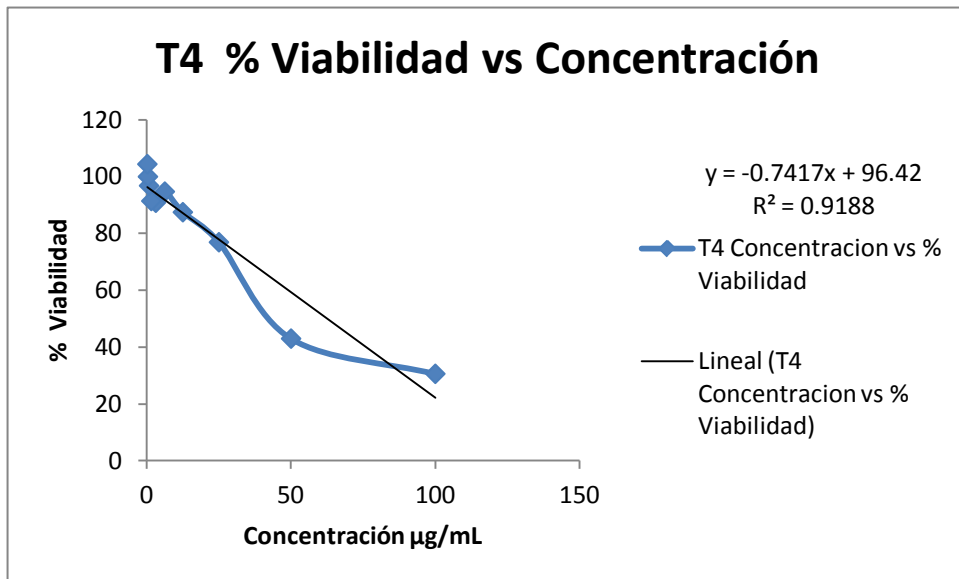


Grafico Nº 2. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T2



**Grafico Nº 3. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T3**



**Grafico Nº 4. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T4**

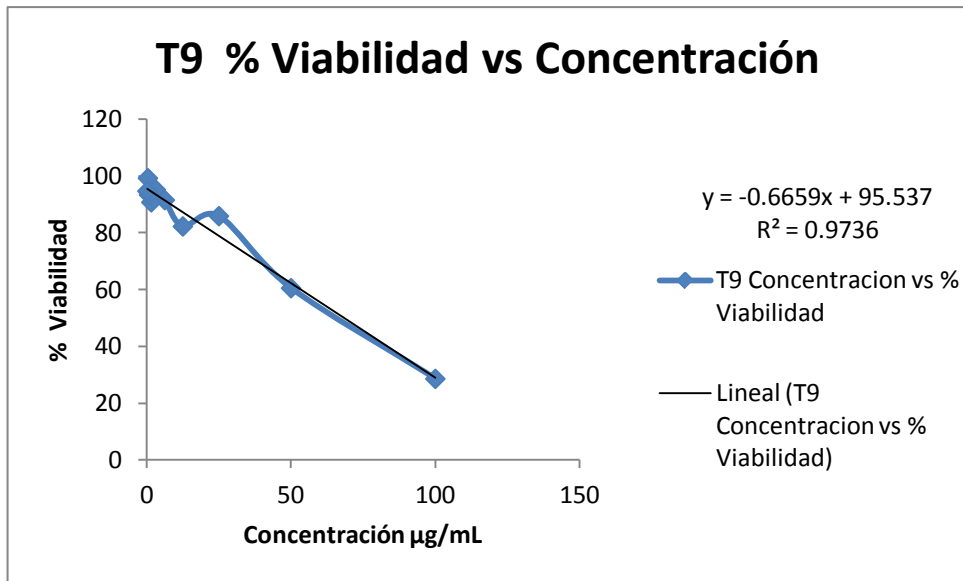


Grafico Nº 5. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T9

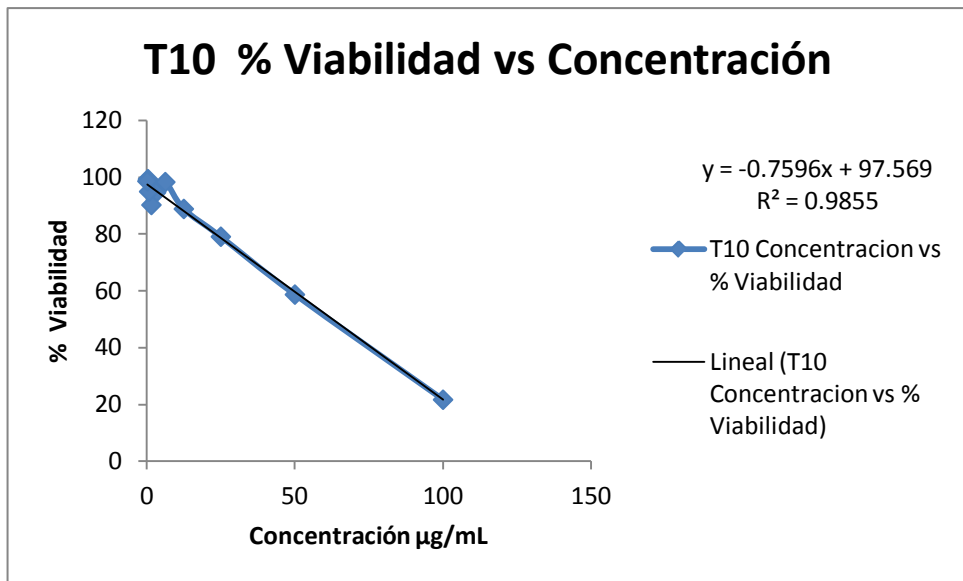
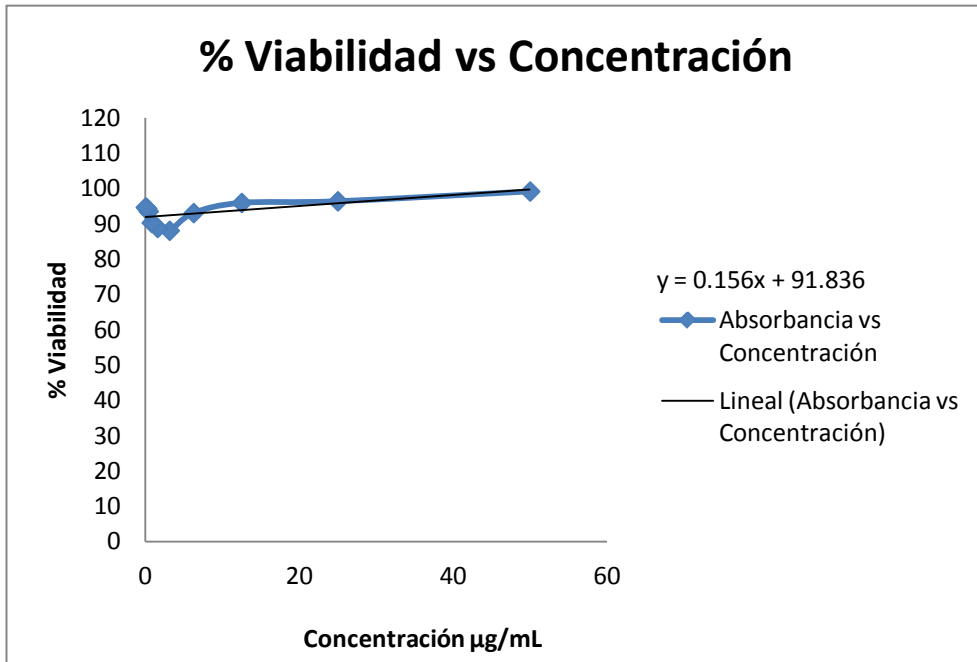
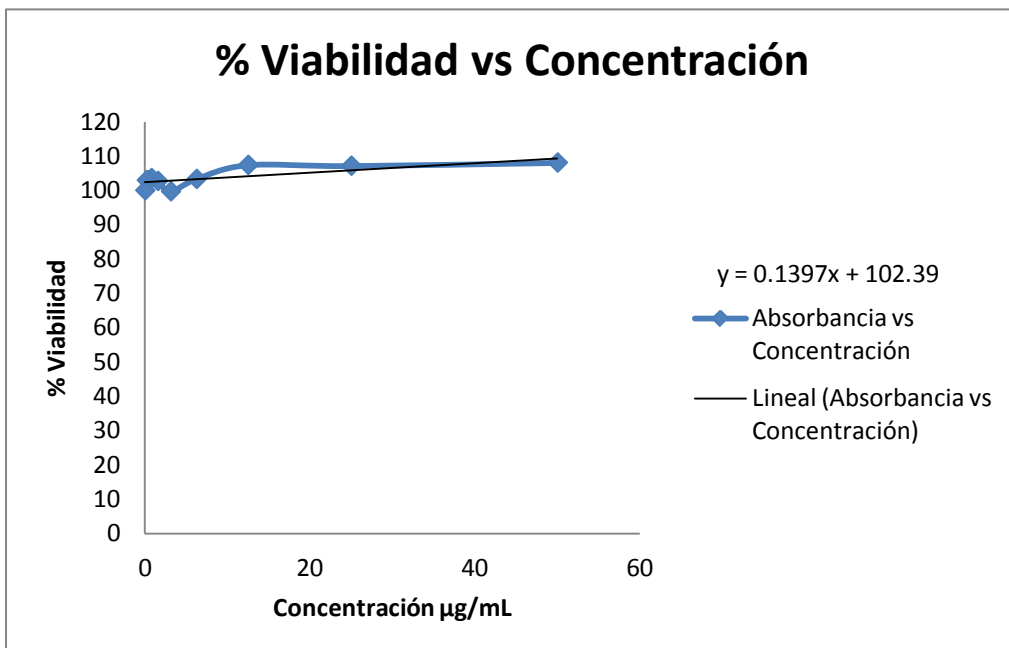


Grafico Nº 6. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T10



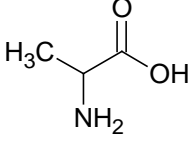
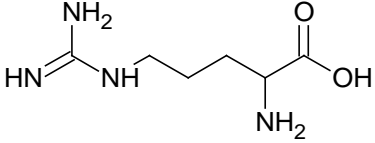
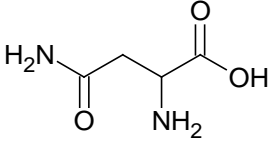
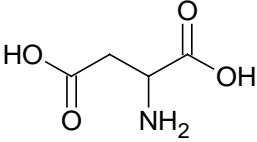
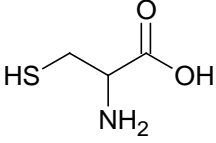
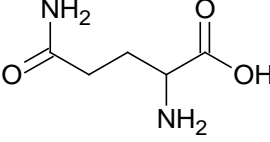
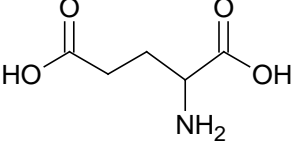
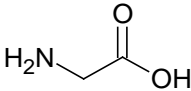


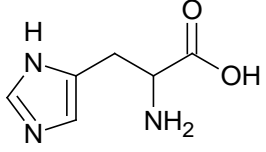
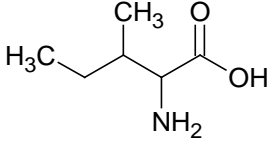
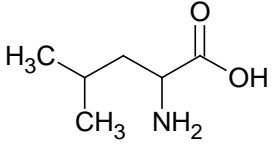
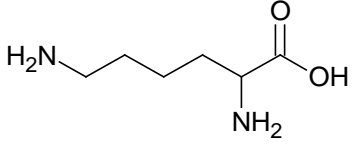
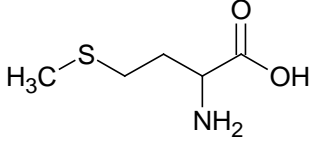
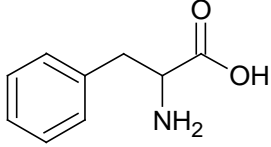
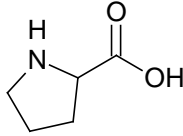
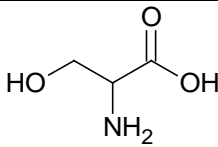
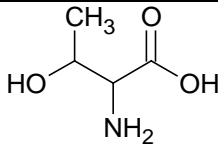
**Grafico N° 7. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T9-1201 con el péptido Nle-Lys-Arg-Arg**

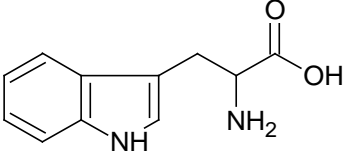
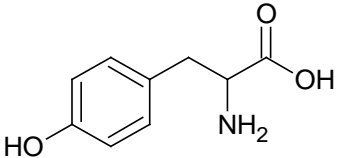
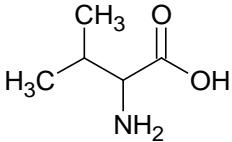
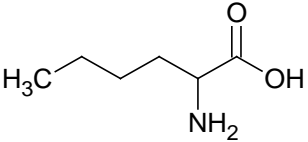


**Grafico N° 8. % Viabilidad vs Concentración para el compuesto T9-1202**

## ANEXO B

Aminoácido	Abreviación	Estructura
Alanina	Ala; A	
Arginina	Arg; R	
Asparagina	Asn; N	
Ácido Aspartico	Asp; D	
Cisteína	Cys; C	
Glutamina	Gln; Q	
Ácido Glutámico	Glu; E	
Glicina	Gly; G	

Histidina	Hys; H	
Isoleucina	Ile; I	
Leucina	Leu; L	
Lisina	Lys; K	
Metionina	Met; M	
Fenilalanina	Phe; F	
Prolina	Pro; P	
Serina	Ser; S	
Treonina	Thr; T	

Triptofano	Trp; W	
Tirosina	Tyr; Y	
Valina	Val; V	
Norleucina	Nle	

**ANEXO C**

**Espectro de RMN -  $^1\text{H}$  del compuesto metil metacrilato**

**ANEXO D**

**Espectros de RMN –  $^{13}\text{C}$  del compuesto metil metacrilato**







**ANEXO E**

**Espectros de RMN –  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $5\alpha$ - Androstan -  $3\beta$  aceto -17 ona**