



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

---

---

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Tesis

**Tio(seleno)ureas y triazoles esteroidales. Síntesis y evaluación  
biológica**

Que para obtener el título de  
**Maestra en Ciencias Químicas**

Presenta

**Quím. Laura Leticia Romero Hernández**

Asesoras

**Dra. Sara Montiel Smith    Dra. Penélope Merino Montiel**

Junio 2014

# Índice

---

<b>Abreviaturas y siglas</b>	1
<b>Resumen</b>	4
<b>Capítulo I. Introducción</b>	7
<b>Capítulo II. Antecedentes</b>	
2.1 Derivados esteroidales	9
2.2 Glicoconjugados esteroidales	10
2.3 <i>Click chemistry</i>	13
<b>Capítulo III. Objetivos</b>	16
<b>Capítulo IV. Discusión de resultados</b>	
4.1 Síntesis de nuevos derivados esteroidales.	17
4.1.1 Tioureas esteroidales.	17
4.1.2 Obtención de selenourea esteroideal <b>13</b> .	27
4.1.3 Glicoconjugados esteroidales.	32
4.1.3.1 <i>Click chemistry</i> . Anillo de triazol unido directamente a esqueleto esteroideal.	35
4.1.3.2 <i>Click chemistry</i> . Anillo de triazol unido directamente a carbohidrato.	48
4.2 Pruebas biológicas.	61
4.2.1 Actividad antioxidante.	61
4.2.1.1 Ensayo de capacidad de captación de radicales libres (DPPH).	61
4.2.1.2 Ensayo de actividad mimética de la enzima glutatión peroxidasa (GPx).	62
4.2.2 Actividad citotóxica <i>in vitro</i> .	65

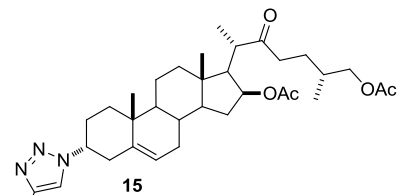
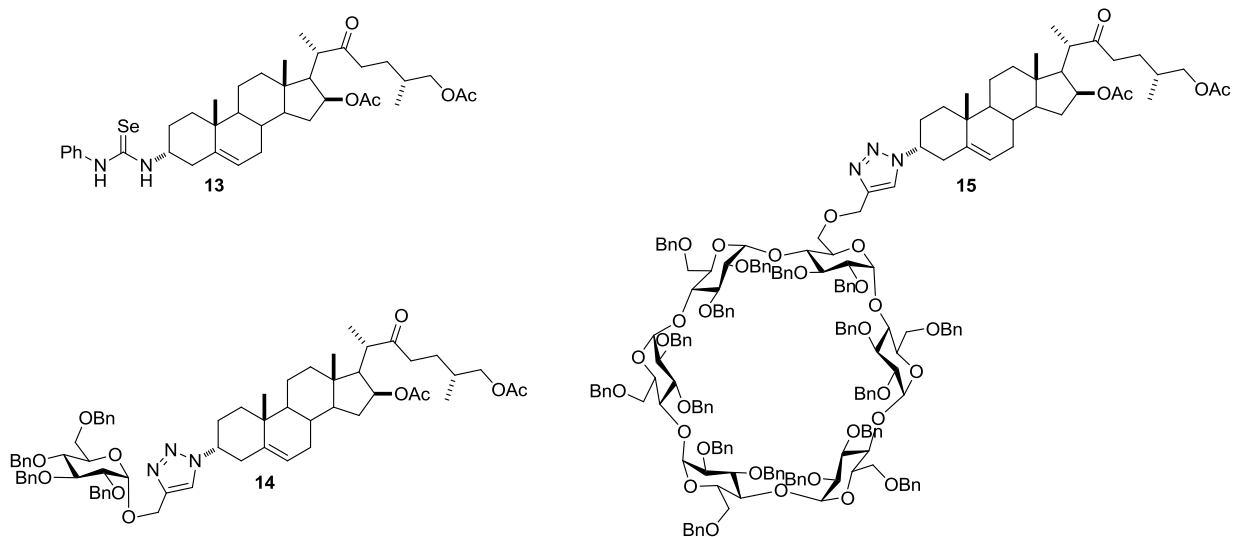
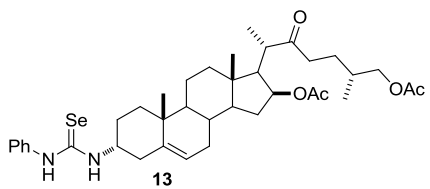
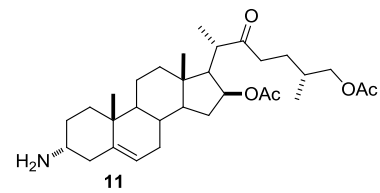
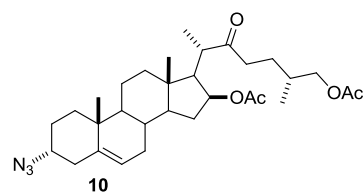
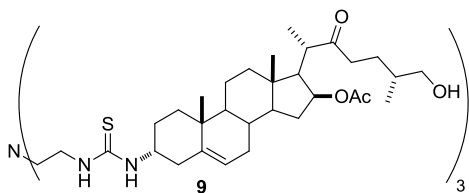
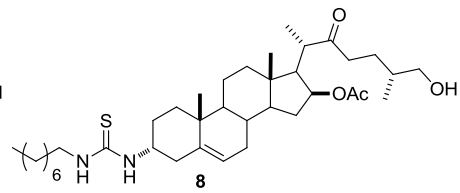
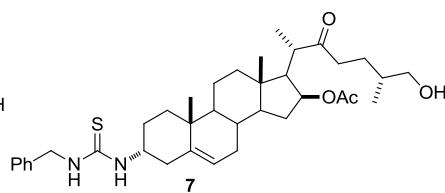
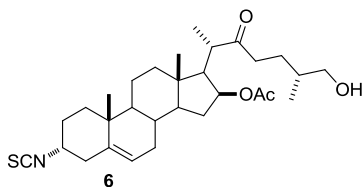
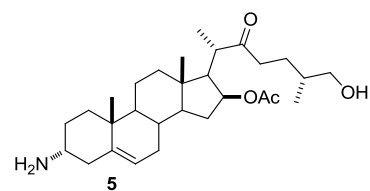
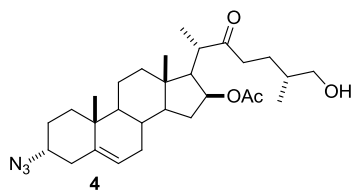
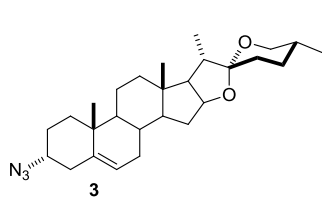
## Capítulo V. Desarrollo experimental

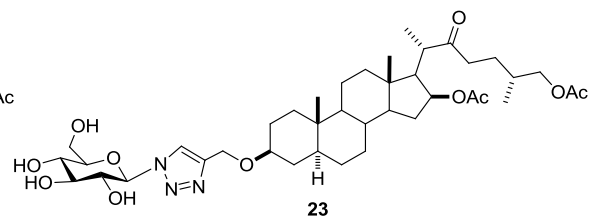
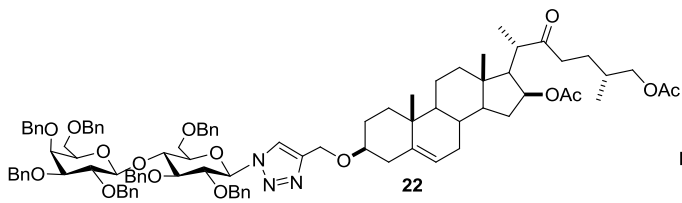
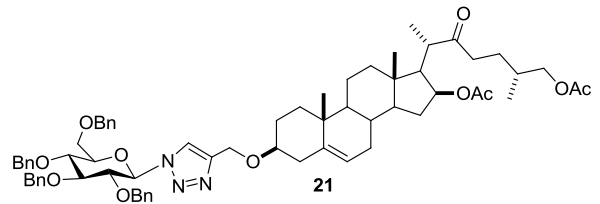
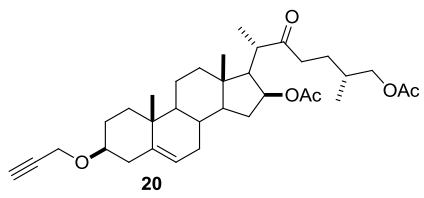
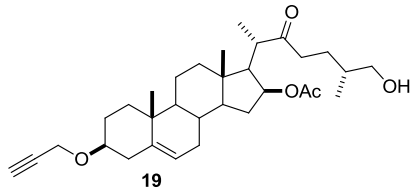
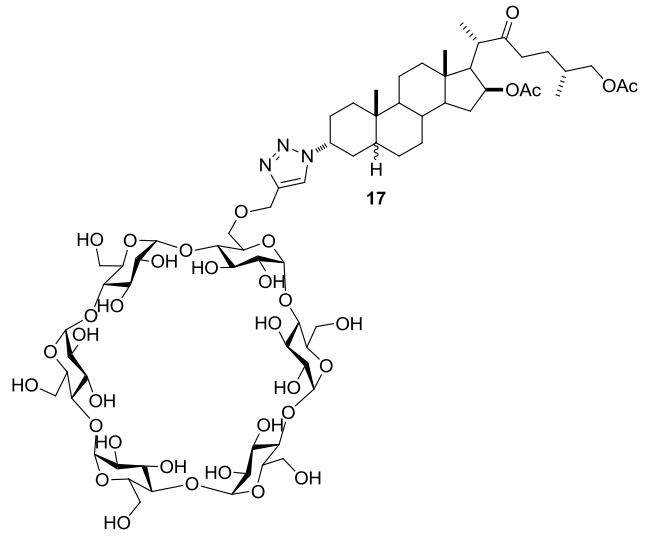
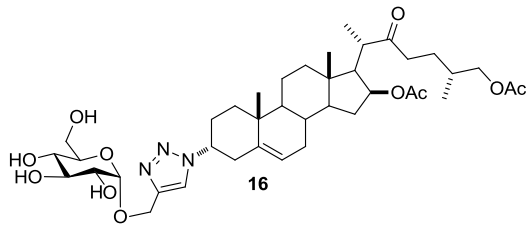
5.1	Síntesis	67
5.1.1	Métodos generales	67
5.1.2	Métodos de síntesis, datos físicos y espectroscópicos de los compuestos obtenidos.	68
5.1.2.1	(25 <i>R</i> )-3β- <i>O</i> -( <i>p</i> -toluensulfonil)espirost-5-eno ( <b>2</b> ).	68
5.1.2.2	(25 <i>R</i> )-3α-azidoespirost-5-eno ( <b>3</b> ).	69
5.1.2.3	Acetato de (25 <i>R</i> )-3α-azido-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo ( <b>4</b> ).	70
5.1.2.4	Acetato de (25 <i>R</i> )-3α-amino-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo ( <b>5</b> ).	71
5.1.2.5	Acetato de (25 <i>R</i> )-3α-isotiocianato-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo ( <b>6</b> ).	72
5.1.2.6	Acetato de (25 <i>R</i> )-3α-( <i>N</i> '-benciltioureido)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo ( <b>7</b> ).	73
5.1.2.7	Acetato de (25 <i>R</i> )-3α-( <i>N</i> '-octiltioureido)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16β-ilo ( <b>8</b> ).	74
5.1.2.8	(25'' <i>R</i> )-Tris-{2-[tioureido-3'-(16''β-acetoxi-26''-hidroxi-22''-oxocolest-5''-en-3''α-il)]etil}amina ( <b>9</b> ).	75
5.1.2.9	Diacetato de (25 <i>R</i> )-3α-azido-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo ( <b>10</b> ).	76
5.1.2.10	Diacetato de (25 <i>R</i> )-3α-amino-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo ( <b>11</b> ).	77
5.1.2.11	Isoselenocianato de fenilo ( <b>12</b> ).	78
5.1.2.12	Diacetato de (25 <i>R</i> )-3α-( <i>N</i> '-fenilselenoureido)-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo ( <b>13</b> ).	78
5.1.2.13	Prop-2-inil D-glucopiranosido ( <b>57</b> ).	79
5.1.2.14	Prop-2'-inil 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -bencil-α-D-glucopiranosido ( <b>58</b> ).	80
5.1.2.15	Diacetato de (25 <i>R</i> )-3α-{4'-[(2'',3'',4'',6''-tetra- <i>O</i> -bencil-α-D-glucopiranosil)- <i>O</i> -metil]-1' <i>H</i> -1',2',3'-triazol-1'-il]-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo ( <b>14</b> ).	80
5.1.2.16	Diacetato de (25 <i>R</i> )-3α-{4'-[(α-D-glucopiranosil)- <i>O</i> -metil]-	

1' <i>H</i> -1',2',3'-triazol-1'-il}-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo (16)	82
5.1.2.17 2 <sup>A-F</sup> , 3 <sup>A-F</sup> , 6 <sup>B-F</sup> -Heptadecaquis- <i>O</i> -bencil-α-ciclodextrina (69)	83
5.1.2.18 2 <sup>A-F</sup> , 3 <sup>A-F</sup> , 6 <sup>B-F</sup> -Heptadecaquis- <i>O</i> -bencil-6 <sup>A</sup> - <i>O</i> -(prop-2'-inil)-α-ciclodextrina (70)	84
5.1.2.19 2 <sup>A-F</sup> , 3 <sup>A-F</sup> , 6 <sup>B-F</sup> -Heptadecaquis- <i>O</i> -bencil-6 <sup>A</sup> - <i>O</i> -{1'[(25'' <i>R</i> )-16''β,26''-diacetoxi-22''-oxocolest-5''-en-3''α-il]-(1' <i>H</i> -1',2',3'-triazol-4'-il)metil}-α-ciclodextrina (15)	85
5.1.2.20 6 <sup>A</sup> - <i>O</i> -{1'[(25'' <i>R</i> )-16''β,26''-Diacetoxi-22''-oxo-5''ξ-colestan-3''α-il]-(1' <i>H</i> -1',2',3'-triazol-4'-il)metil}-α-ciclodextrina (17)	86
5.1.2.21 (25 <i>R</i> )-3β- <i>O</i> -(Prop-2'-inil)espirost-5-eno (18).	87
5.1.2.22 Acetato de (25 <i>R</i> )-26-hidroxi-22-oxo-3β- <i>O</i> -(prop-2'-inil)-colest-5-en-16β-ilo (19).	88
5.1.2.23 Diacetato de (25 <i>R</i> )-22-oxo-3β- <i>O</i> -(prop-2'-inil)-colest-5-eno-16β,26-diilo (20).	89
5.1.2.24 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopiranosil azida (41).	90
5.1.2.25 β-D-Glucopiranosil azida (42).	90
5.1.2.26 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -bencil-β-D-glucopiranosil azida (43).	91
5.1.2.27 Diacetato de (25 <i>R</i> )-3β- <i>O</i> -[1'-(2'',3'',4'',6''-tetra- <i>O</i> -bencil-β-D-glucopiranosil)-1' <i>H</i> -1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo (21)	91
5.1.2.28 Diacetato de (25 <i>R</i> )-3β- <i>O</i> -[1'-(β-D-glucopiranosil)-1' <i>H</i> -1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxo-5α-colestan-16β,26-diilo (23)	93
5.1.2.29 1,2,3,6,2',3',4',6'-Octa- <i>O</i> -acetil lactosa (49).	94
5.1.2.30 2,3,6,2',3',4',6'-Hepta- <i>O</i> -acetil-β-lactosil azida (50).	94
5.1.2.31 β-D-lactosil azida (51).	95
5.1.2.32 2,3,6,2',3',4',6'-Hepta- <i>O</i> -bencil-β-lactosil azida (52).	95
5.1.2.33 Diacetato de (25 <i>R</i> )-3β- <i>O</i> -[1'-(2'',3'',6'',2''',3''',4''',6'''-hepta- <i>O</i> -bencil-β-lactosil)-1' <i>H</i> -1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo (22)	96

5.2	Pruebas biológicas	97
5.2.1	Actividad antioxidante.	97
5.2.1.1	Ensayo de capacidad de captación de radicales libres (DPPH).	97
5.2.1.2	Ensayo de actividad mimética de la enzima glutatión peroxidasa (GPx).	98
5.2.2	Actividad citotóxica <i>in vitro</i> .	98
	<b>Capítulo VI. Conclusiones</b>	99
	<b>Bibliografía</b>	101

# Nuevos compuestos





# Abreviaturas y siglas

---

<i>a</i>	Axial
BHT	Butilhidroxitolueno
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
<i>c</i>	Concentración
ccf	Cromatografía en capa fina
CIMS	<i>Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
$\delta$	Desplazamiento químico
d	Doble
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
2,5-DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo
dq	Doble de cuádruple
DTT	Ditiotreitol
<i>e</i>	Ecuatorial
EC <sub>50</sub>	<i>Half maximal effective concentration</i>
EI	<i>Electron Impact</i>

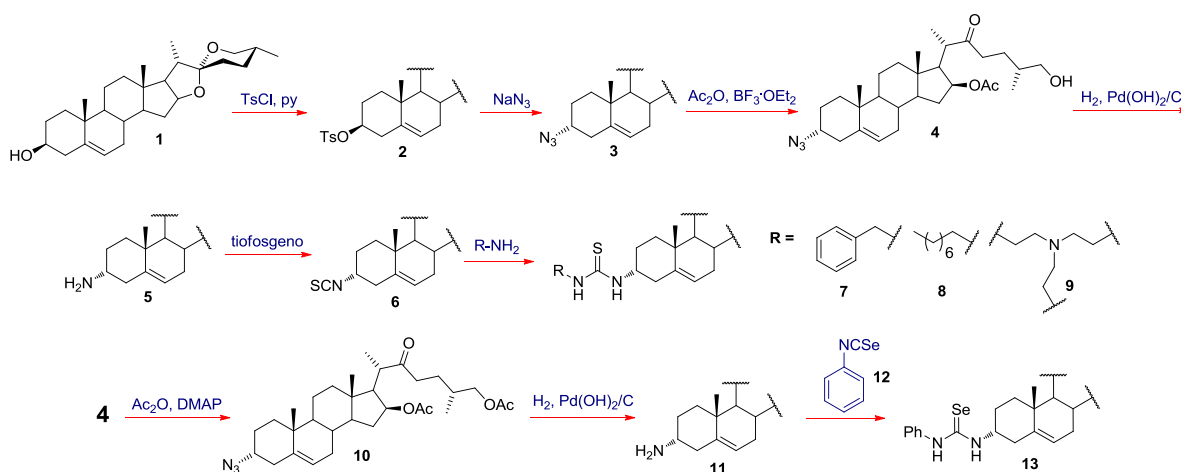
EIMS	<i>Electron Impact Mass Spectrometry</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
HL	<i>Human Leukemia</i>
HMBA-PEGA <sub>800</sub>	Ácido 4-hidroximetilbenzoico sobre resina polietilenglicol-poliacrilamida
HRCIMS	<i>High Resolution Chemical Ionization Mass Spectrometry</i>
HREIMS	<i>High Resolution Electron Impact Mass Spectrometry</i>
HRLSIMS	<i>High Resolution Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LSIMS	<i>Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
<i>m</i>	Múltiple
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>
MHz	Megahertz
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2- <i>H</i> -tetrazolio
Nd-YAG	Granate de itrio y aluminio dopado con neodimio
nM	Nanomolar
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
Pmc	2,2,5,7,8-Pentametil-cromano-6-sulfonilo
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<i>s</i>	Simple
<i>sa</i>	Simple ancha
<i>t</i>	Triple
t.a.	Temperatura ambiente
<i>t</i> -Bu	<i>terc</i> -Butilo

THF	Tetrahidrofurano
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
TMSN <sub>3</sub>	Trimetilsilil azida
Trt	Tritilo
v. g.	Verbigracia

# Resumen

En este trabajo de tesis se realizó la síntesis de nuevos derivados esteroidales procedentes de diosgenina que contienen enlaces de tipo tioureido y selenoureido sobre el C-3; además se obtuvieron nuevos glicoconjugados esteroidales mediante la metodología *click chemistry*. Para la obtención de los nuevos derivados que poseen grupos tioureido (**7-9**) y selenoureido (**13**) se utilizó como compuesto de partida la diosgenina (**1**) la cual mediante una reacción de tosilación sobre el hidroxilo del C-3 condujo al derivado **2**. La sustitución del grupo tosilo con  $\text{NaN}_3$  permitió obtener la azida **3**, posteriormente mediante la reacción de acetólisis utilizando  $\text{Ac}_2\text{O}$  y  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  se obtuvo el derivado 22-oxo-26-hidroxilado **4**. La reducción de la azida con  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  proporcionó la amina **5**. Para la obtención de las tioureas, se trató **5** con tiofosgeno, lo que condujo al isotiocianato **6**, su reacción con tres aminas distintas llevó a la obtención de las nuevas tioureas esteroidales **7-9**.

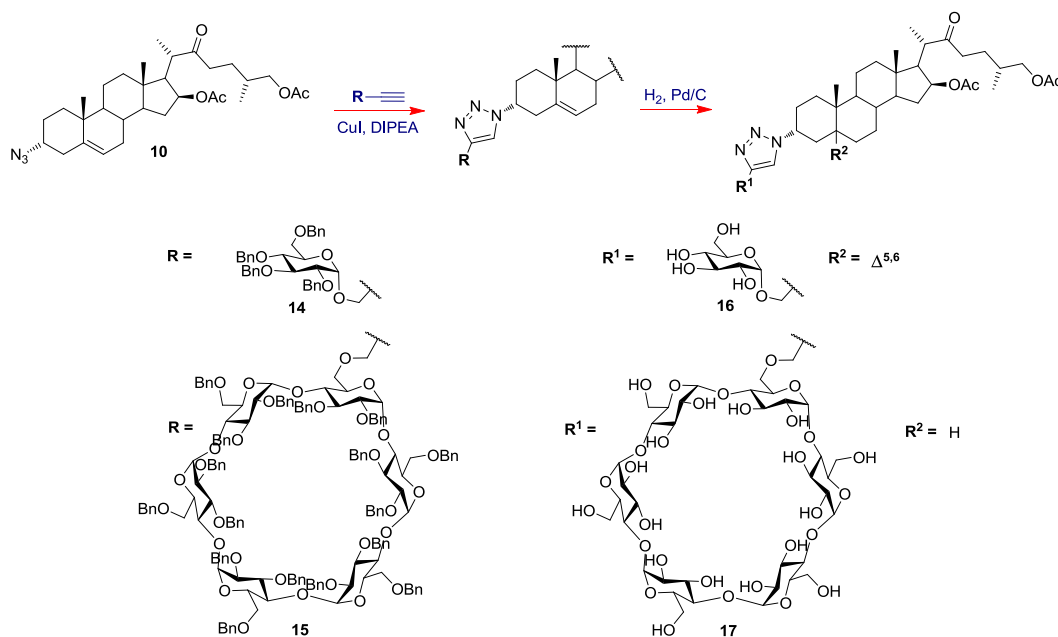
La obtención de la selenourea **13** se llevó a cabo a partir **4** mediante la acetilación del hidroxilo en el C-26 lo que condujo al derivado **10**, a continuación se redujo el grupo azido para obtener la amina **11**, finalmente su acoplamiento con selenocianato de fenilo **12** dio como resultado el derivado **13** (Esquema 1).



Esquema 1. Ruta sintética para obtener las tioureas **7-9** y la selenourea **13**.

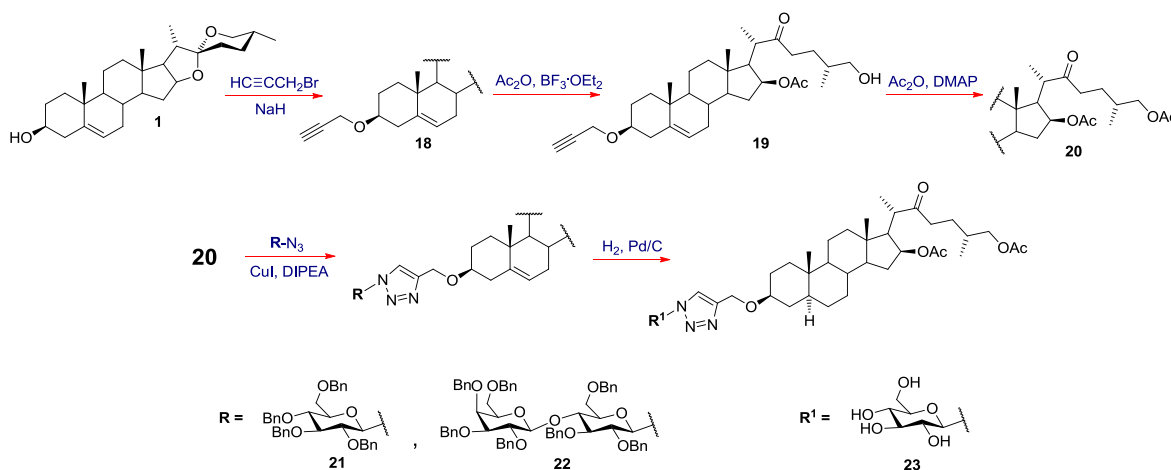
Los glicoconjugados esteroidales se formaron a través de un puente de tipo 1,2,3-triazol mediante la ciclación 1,3-dipolar azido-alquino catalizada por  $\text{Cu}(\text{I})$ , ejemplo más característico de las

reacciones tipo *click chemistry* en lugar del clásico enlace glicosídico. Para la síntesis de los derivados que poseen el anillo de triazol directamente unido al esteroide se utilizó la azida **10**, un propargil glucopiranosido *O*-protegido y un monopropargil derivado de  $\alpha$ -ciclodextrina respectivamente, CuI como catalizador y DIPEA como base. Mediante esta metodología se obtuvieron los derivados **14** y **15**. La posterior desprotección de los hidroxilos de los azúcares condujo a los glicoconjugados finales **16** y **17** (**Esquema 2**).



**Esquema 2.** Ruta sintética para obtener los derivados glicoconjugados **16** y **17**

La formación de los glicoconjugados esteroidales en los que el anillo de triazol está directamente unido al azúcar se llevó a cabo mediante la siguiente metodología.



**Esquema 3.** Ruta sintética para la obtención del derivado **23**.

El hidroxilo en el C-3 de la diosgenina (**1**) se sometió a condiciones de propargilación utilizando bromuro de propargilo para formar el compuesto **18**; una posterior reacción de acetólisis permitió aislar el derivado 22-oxo-26-hidroxiado **19**, la acetilación del hidroxilo libre condujo al derivado **20**, mediante la reacción tipo *click chemistry* utilizando este derivado y las azidas de glucosa y lactosa benciladas respectivamente se obtuvieron los glicoconjugados **21** y **22**. Finalmente la desprotección de los hidroxilos sólo fue posible en el derivado de glucosa **21**; en las condiciones de hidrogenación se redujo asimismo el doble enlace, conduciendo de manera estereoselectiva a la obtención del derivado **23** con configuración  $5\alpha$  (Esquema 3).

# Capítulo I. Introducción

---

Los productos naturales, extraídos de plantas y animales se han ocupado desde cientos de años atrás en las medicinas tradicionales, tales como la ayurveda (india), china, unani (medicina grecoárabe), o la americana, contra distintos padecimientos. La gran variedad de propiedades farmacológicas que muestran, han impulsado el aislamiento y caracterización de los compuestos activos, así como su síntesis a grandes escalas en la industria farmacéutica. Sin embargo, la búsqueda de nuevos y mejores medicamentos para el tratamiento de enfermedades sigue siendo el objetivo principal de muchos grupos de investigación.

En lo que a esto respecta, la síntesis orgánica se ha convertido en una herramienta clave para la síntesis y modificación de productos naturales que tengan mejores características y sean más potentes que aquellos que se encuentran actualmente en el mercado. Dentro de las propiedades más buscadas en estos compuestos se encuentran:

- Disminuir su toxicidad en el organismo.
- Disminuir o eliminar los efectos secundarios.
- Mejorar su eficacia.
- Hacerlos más específicos.
- Mejorar su biodisponibilidad.
- Mejorar su interacción con el receptor.
- Mejorar la solubilidad del fármaco en agua.

Esta última propiedad permitirá disminuir la dosis administrada y con ello su toxicidad al existir un transporte efectivo hacia su sitio activo.<sup>1</sup>

Los esteroides se encuentran dentro de este grupo de compuestos naturales que han sido frecuentemente modificados en un esfuerzo por investigar sus efectos fisiológicos. Aunque muchos de ellos han mostrado propiedades terapéuticas de gran importancia, siendo buenos candidatos para funcionar como fármacos, se han descubierto muchos derivados más activos y poderosos que aquellos obtenidos de fuentes naturales.

De la misma manera muchas investigaciones sobre esteroides han estado orientadas en la búsqueda de nuevos compuestos que puedan funcionar como antibióticos, antivirales y para el tratamiento de enfermedades comunes como el cáncer.

En la actualidad el cáncer representa un problema de salud pública a nivel mundial, con una gran incidencia en personas de todos los niveles socio-económicos; los medicamentos y terapias utilizados hoy en día no son del todo selectivos y presentan muchos efectos secundarios, por lo que siguen siendo estudiados para ser mejorados. En lo que a esto respecta muchos de estos derivados esteroideos sintetizados han sido probados como agentes citotóxicos y antiproliferativos frente a una gran variedad de líneas celulares cancerosas (mama, próstata, cérvix, garganta y colon entre otras) mostrando resultados prometedores; el estudio de este tipo de moléculas continúa siendo un tema de interés actual.

Con la mira puesta en este problema el trabajo de investigación está orientado a la búsqueda de nuevos esteroides que tengan una mayor actividad biológica que la reportada en la literatura y que contribuyan al descubrimiento de nuevos fármacos.

Se presenta la síntesis y caracterización de diversos derivados (glicoconjugados, tioureas y selenourea) que han sido ya probados como agentes citotóxicos y antioxidantes mostrando resultados satisfactorios.

# Capítulo II. Antecedentes

---

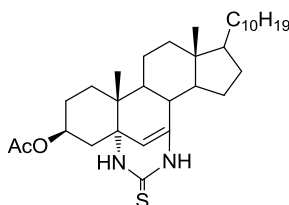
## 2.1 Derivados esteroideos

Los esteroides son un grupo de compuestos naturales presentes en plantas, animales y hongos que desempeñan actividades biológicas importantes. En los mamíferos cumplen funciones reguladoras (ácidos biliares), estructurales (colesterol) y hormonales (corticoesteroides, estrógenos, andrógenos). Además cientos de esteroides extraídos de fuentes naturales han mostrado poseer actividad farmacológica importante<sup>2</sup> y miles de derivados más se han sintetizado en la búsqueda de nuevos y mejores fármacos,<sup>3</sup> permitiendo así su uso como hormonas, diuréticos, agentes antibacterianos y anticancerígenos, entre otros.

En la búsqueda de nuevos derivados con mayor actividad biológica se han realizado modificaciones en la cadena lateral de los esteroides, en los diferentes anillos del sistema tetracíclico y en la transformación o inserción de distintos grupos funcionales. Algunos de estos grupos funcionales poco estudiados en los esteroides son las tioureas y selenoureas.

En la literatura se ha descrito una variedad de compuestos que contienen la función tiourea en su estructura y que han mostrado actividad antiproliferativa y antitumoral en contra de diversas líneas celulares cancerosas;<sup>4</sup> sin embargo a pesar de que tanto diversas tioureas como estructuras esteroideas por sí mismos han presentado actividad biológica importante, son pocos los casos en los que se han sintetizado esteroides con enlaces de tipo tioureido.

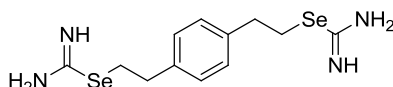
En la **figura 1** se presenta uno de los pocos derivados de este tipo el cual mostró ser un potente agente antibacteriano dando mejores resultados que el antibiótico cloranfenicol.<sup>5</sup>



*Figura 1. Tiourea esteroideal con actividad antibacteriana.*

En cuanto a las selenoureas esteroidales, no se encuentran aún reportes en la literatura que describan la obtención de estos compuestos y son pocos los casos en donde se utiliza el selenio como parte de estas estructuras.<sup>6</sup>

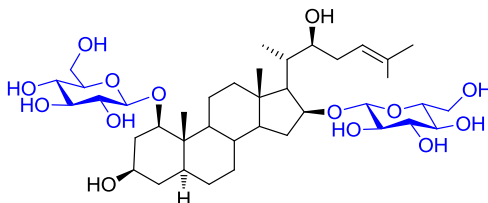
El selenio es un oligoelemento involucrado en diversas funciones fisiológicas en el cuerpo humano que recientemente ha llamado la atención debido a que se le han asociado interesantes propiedades biológicas;<sup>7</sup> de manera natural se encuentra en algunas proteínas como la glutatión peroxidasa (GPx) que actúa como un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo. Además numerosos derivados de selenio han mostrado tener actividad antioxidante<sup>8</sup> y anticancerígena,<sup>9</sup> existiendo numerosos grupos funcionales conteniendo selenio con relevantes propiedades tales como selenuros, diselenuros y selenaheterociclos, entre otros.<sup>10</sup> Algunas isoselenoureas han mostrado también tener actividad biológica importante al actuar como agentes citotóxicos frente a líneas celulares del cáncer de próstata<sup>11</sup> y como inhibidores selectivos de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), responsable de la síntesis del óxido nítrico que contribuye al crecimiento de tumores celulares en el cáncer de colon<sup>12</sup> y en el melanoma<sup>13</sup> (**Figura 2**).



**Figura 2.** Isoselenourea inhibidoras de iNOS.

## 2.2 Glicoconjugados esteroidales

Otros derivados esteroidales de gran importancia y que presentan una gama diversa de propiedades interesantes son las saponinas esteroidales. En general las saponinas constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal. Su estructura consiste en una aglicona (esteroidal o triterpénica) no polar unida a una o más unidades de carbohidratos (**Figura 3**).



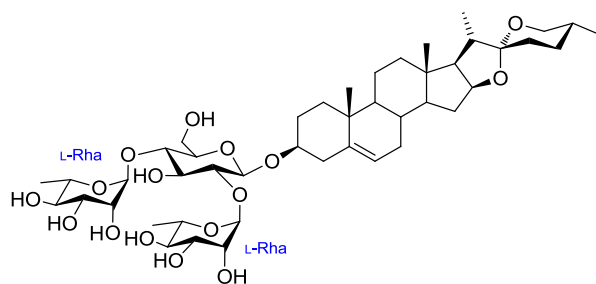
**Figura 3.** Ejemplo de una saponina esteroideal.

La extensa variedad de actividades biológicas que tienen han permitido que las plantas que poseen saponinas se hayan utilizado en la medicina tradicional durante siglos;<sup>14</sup> la presencia de azúcares en estas estructuras tiene un efecto importante en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, lo que repercute en la interacción de las moléculas con los receptores biológicos, facilitando de esta manera su absorción, distribución, metabolismo y excreción.<sup>15</sup>

Entre las actividades terapéuticas que poseen, las saponinas han mostrado actividades como expectorantes, antiinflamatorios, vasoprotectores, antiparasitarios, etc. Incluso, estudios recientes prueban que algunas de ellas podrían actuar como adyuvantes en numerosas vacunas profilácticas y terapéuticas contra el cáncer y diversas infecciones.<sup>16</sup>

A diferencia de las saponinas triterpénicas extraídas principalmente de las plantas dicotiledóneas, las saponinas esteroidales se encuentran usualmente presentes en familias monocotiledóneas, especialmente en la Dioscoreaceae (v.g. *Dioscorea*), la Agavaceae (v.g. *Agave*, *Yucca*) y la Liliaceae (v.g. *Smilax*, *Trillium*). Estos glicósidos esteroidales han mostrado una importante actividad antifúngica,<sup>17</sup> antidiabética,<sup>18</sup> antiinflamatoria,<sup>19</sup> gastroprotectora<sup>20</sup> y anticancerígena,<sup>21</sup> entre otras.<sup>22</sup>

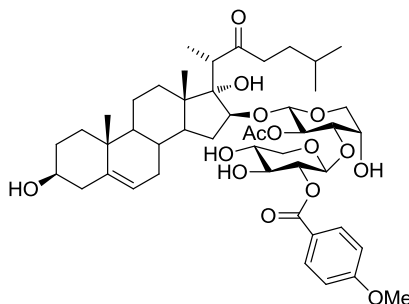
Entre los glicósidos esteroidales más destacados podemos mencionar a la saponina espiroestánica natural dioscina extraída por primera vez en 1937 de los bulbos de *Dioscorea tokoro* y que ha presentado una amplia gama de propiedades terapéuticas, entre las que podemos mencionar la antiviral,<sup>23</sup> antifúngica<sup>24</sup> y anticancerígena: como inductor de apoptosis de células HeLa,<sup>25</sup> frente al cáncer de lengua<sup>26</sup> y contra el glioblastoma multiforme,<sup>27</sup> entre otras (**Figura 4**).



**Figura 4.** Estructura de la saponina espiroestánica dioscina.

Otro ejemplo es la saponina natural OSW-1 (**Figura 5**) que se extrajo por primera vez de los bulbos de *Ornithogalum saundersiae*<sup>28</sup> como componente mayoritario de un pequeño grupo de saponinas colestánicas. Las pruebas biológicas revelaron la potente actividad citostática que presentó sobre diversas líneas celulares cancerosas humanas, incluyendo la línea celular HL-60 (Leucemia

humana) y de adenocarcinoma pulmonar humano, mostrando tener valores de  $IC_{50}$  entre 0.1 y 0.3 nM, una actividad mucho más potente (10 a 100 veces) que algunos de los agentes anticancerígenos actualmente utilizados, tales como mitomicina C, cisplatino, camptotecina, Adriamicina® y Taxol®.<sup>29</sup>

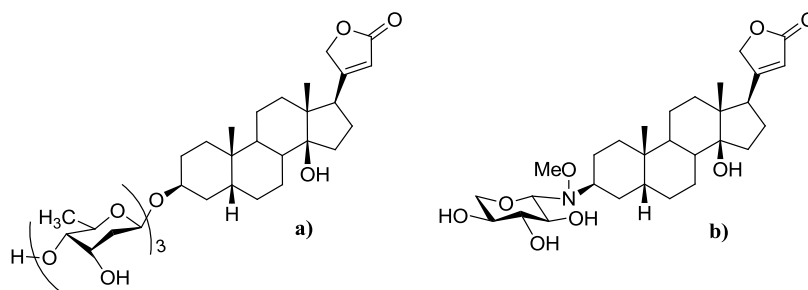


**Figura 5.** Estructura de la saponina colestánica OSW-1.

Sin embargo, la escasa cantidad de saponinas que se obtiene de fuentes naturales ha impulsado el estudio de la síntesis total de estos compuestos,<sup>30</sup> así como de análogos que presenten una mayor actividad terapéutica.<sup>31</sup>

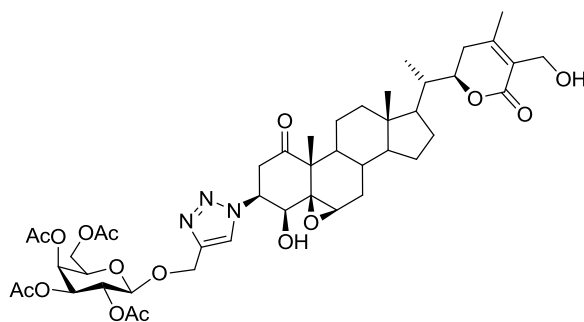
La búsqueda de estos nuevos glicósidos esteroidales con mayor actividad biológica se ha basado frecuentemente en la modificación de la aglicona y/o en las unidades de monosacáridos unidos a ella; sin embargo pocos estudios se han centrado en la conexión entre el carbohidrato y el esteroide. Los enlaces glicosídicos son relativamente lábiles y se hidrolizan fácilmente en el organismo, por lo que una estrategia en la síntesis de estos compuestos es la formación de glicomiméticos; estructuras en donde el enlace glicosídico se ha sustituido por un fragmento isómero o por un conector más robusto. Éstos derivados han presentado una mayor estabilidad frente a las hidrólisis químicas y/o enzimáticas, por ejemplo los aminoglicósidos o los tioglicósidos,<sup>32</sup> incluso algunos de ellos han mostrado incrementar la actividad de los productos naturales análogos y la selectividad en su actividad citotóxica frente a células tumorales.<sup>33</sup>

Recientemente se ha descrito la síntesis de glicósidos esteroidales donde el enlace glicosídico se ha sustituido por otro grupo funcional. Por ejemplo, en la **figura 6b** se muestra un neoglicósido análogo del glucósido cardíaco digitoxina (**Figura 6a**), donde el enlace glicosídico R-O- se sustituyó por un grupo alcoxi-amino (R-NOR'-). Este compuesto mostró una actividad citotóxica similar a la del compuesto natural frente a diversas líneas celulares cancerosas.<sup>34</sup>



**Figura 6.** a) Digitoxina. b) Neoglicósido, análogo de digitoxina.

En esta misma línea de investigación, se han descrito esteroides unidos a azúcares utilizando un puente de tipo 1,2,3-triazol mediante reacciones tipo *click chemistry*.<sup>35</sup> Estos derivados presentan importante actividad citotóxica en contra de distintas líneas celulares cancerosas humanas, un aumento de solubilidad en distintos disolventes incluyendo agua y mayor estabilidad con respecto al glicósido común (**Figura 7**).<sup>36</sup>



**Figura 7.** Glicoconjugado esteroidal con actividad citotóxica.

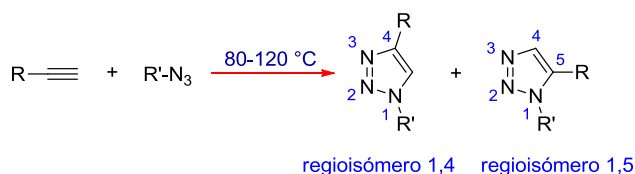
### 2.3 Click chemistry

El término *click chemistry* se utilizó por primera vez en 2001 por Sharpless *et al.* para nombrar a un tipo de reacciones selectivas para la síntesis rápida de nuevos compuestos a través de la formación de enlaces de carbono con heteroátomos (C-X-C). El término asignado implica la síntesis de nuevos compuestos mediante la unión de pequeñas unidades, reacciones en altos rendimientos y estereoespecíficas, la generación de subproductos inofensivos, condiciones de reacción simples, materias primas de fácil acceso y reacciones libres de disolvente o en su defecto el uso de un disolvente benigno o fácil de remover. El producto además debe ser fácil de aislar y estable bajo condiciones fisiológicas.<sup>37</sup>

Dentro de las reacciones con formación de enlaces carbono-heteroátomo podemos encontrar:

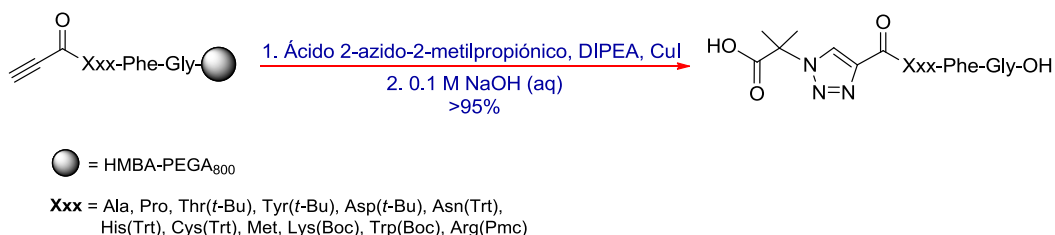
- Cicloadiciones de especies insaturadas: cicloadiciones 1,3-dipolares y reacciones de Diels-Alder.
- Sustituciones nucleofílicas: Reacciones de apertura de anillos de heterociclos electrófilos tensionados como epóxidos, aziridinas, iones aziridinio y episulfonio.
- Química de carbonilos de tipo no aldólica como formación de ureas, tioureas, heterociclos aromáticos, éteres de oxima, hidrazonas y amidas.
- Adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono: epoxidación, dihidroxilación, aziridinación, adición de halogenuros de sulfenilo, adiciones de Michael de reactivos Nu-H.

La reacción de cicloadición dipolar de Huisgen de azidas y alquinos para formar 1,2,3-triazoles ha sido considerada por Sharpless como la mejor de todas las reacciones *click chemistry* debido a la estabilidad de las azidas hacia la dimerización, hidrólisis y a una variedad de condiciones de reacción estándar en síntesis orgánica; sin embargo la reacción involucra temperaturas altas y una nula regioselectividad dando una mezcla 1:1 de derivados 4- y 5- sustituidos (**Esquema 4**).<sup>38</sup>



**Esquema 4.** Cicloadición dipolar de Huisgen.

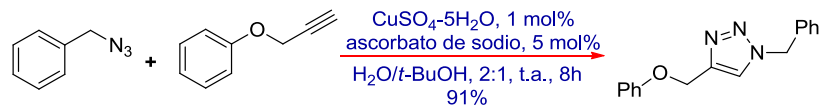
Variaciones de esta reacción utilizando cobre(I) como catalizador han brindado mejores resultados dando como único regioisómero el 1,2,3-triazol 1,4-disustituido. En el 2002 el grupo de Meldal reportó la síntesis de triazoles 1,4-disustituidos entre azidas y acetilenos terminales sobre un soporte sólido catalizada con cobre.<sup>39</sup> La metodología descrita involucra CuI y DIPEA como base obteniendo buenos rendimientos experimentales (**Esquema 5**).



**Esquema 5.** Cicloadición catalizada con sales de cobre(I).

En el mismo año el grupo de Sharpless reportó la formación *in situ* de Cu(I) mediante la reducción de sales de cobre(II) más baratas y generalmente más puras que las sales de Cu(I). El procedimiento

ocupado involucra como reductor ácido ascórbico y/o ascorbato de sodio; la reacción se llevó a cabo a t.a. en una variedad de disolventes sin observarse subproductos tales como diacetilenos primarios, bis-triazoles y 5-hidroxitriazoles (**Esquema 6**).<sup>40</sup>



**Esquema 6.** Formación de 1,2,3-triazoles 1,4-disustituidos utilizando Cu(I) *in situ* como catalizador.

Aunque existen actualmente numerosas variantes, estas son las condiciones más ampliamente utilizadas en las cicloadiciones 1,3-dipolares azido-alquino catalizadas por Cu(I).

# Capítulo III. Objetivos

---

## Objetivo general

- Funcionalizar la posición 3 del esqueleto esterooidal de diosgenina a partir de derivados 22-oxocolestánicos mediante la introducción de funciones tipo tio(seleno)ureido y 1,2,3-triazolilo.

## Objetivos particulares

- Sintetizar nuevos glicoconjugados esteroidales.
- Sintetizar distintos derivados que contengan en su estructura enlaces de tipo tioureido y selenoureido.
- Encontrar las condiciones óptimas de reacción para obtener tiempos de reacción cortos y buenos rendimientos químicos para sintetizar los nuevos derivados.
- Caracterizar los nuevos productos obtenidos mediante métodos físicos y espectroscópicos.
- Realizar distintas pruebas de antioxidación del derivado que contenga selenio en su estructura.
- Realizar pruebas de citotoxicidad en contra de distintas líneas celulares cancerosas a los derivados finales obtenidos.

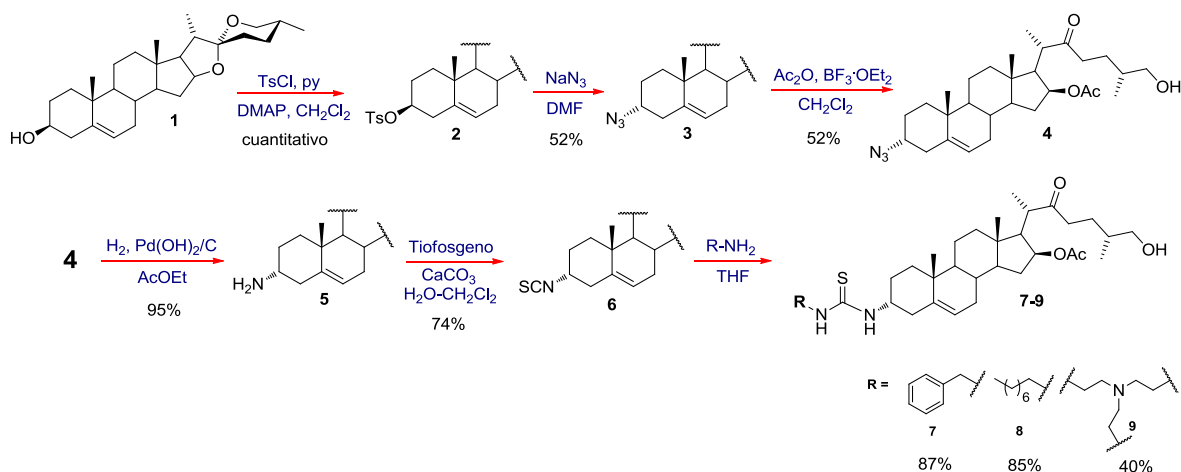
# Capítulo IV. Discusión de resultados

## 4.1 Síntesis de nuevos derivados esteroidales

La síntesis de los nuevos derivados con enlaces tioureido, selenoureido y los glicoconjugados esteroidales se llevó a cabo partiendo de la sapogenina espiroestánica diosgenina (**1**) comercialmente disponible.

### 4.1.1 Tioureas esteroidales

La síntesis de las tioureas esteroidales se realizó de acuerdo a la siguiente metodología (**Esquema 7**).



*Esquema 7.* Síntesis de tioureas 7-9.

- **(25R)-3 $\beta$ -O-(p-toluensulfonil)espirost-5-eno (2)**

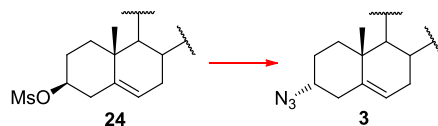
La formación del derivado tosilado **2** reportado ya en la bibliografía<sup>41</sup> se llevó a cabo utilizando TsCl, piridina y DMAP bajo condiciones anhidras, pues se debe evitar la hidrólisis del TsCl muy sensible a la humedad. El derivado obtenido es bastante inestable debido al doble enlace homoalílico presente en la estructura, por lo que la reacción se llevó a cabo a 0 °C, además el

procesado de la reacción se realizó utilizando disoluciones frías y realizando los lavados rápidamente. La purificación del compuesto utilizando gel de sílice no fue posible pues se observa la descomposición del derivado, por lo que la siguiente reacción se llevó a cabo inmediatamente sin purificar.

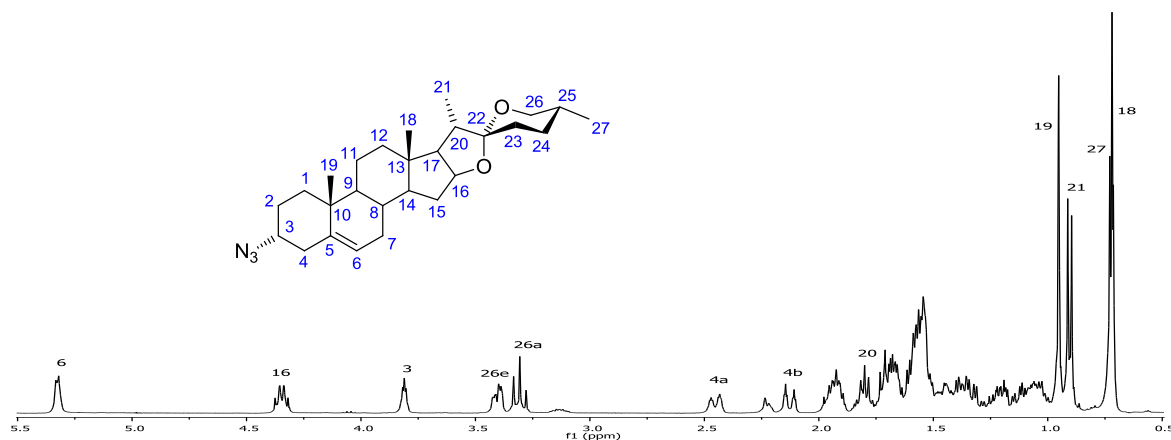
- **(25R)-3 $\alpha$ -azidoestero-5-eno (3)**

El desplazamiento del grupo tosilo en **2** por la azida, se realizó utilizando  $\text{NaN}_3$  y DMF anhidra.<sup>42</sup> La reacción de sustitución se llevó a cabo mediante un mecanismo  $\text{S}_{\text{N}}2$  que presentó inversión de la configuración, por lo que la azida en C-3 se encuentra ahora en posición  $\alpha$ . El producto **3** se obtuvo en un rendimiento moderado debido a que se observó la formación de muchos subproductos de reacción. Se realizaron diversos ensayos para mejorar el rendimiento de la reacción que incluyeron aumentar la relación de  $\text{NaN}_3$  con respecto al esteroide, la eliminación de agua del medio y la variación en la temperatura; sin embargo se observó que al trabajar a una temperatura menor de 60 °C la reacción se vuelve muy lenta, por el contrario cuando se aumenta la temperatura hasta 75 °C surgen más subproductos de reacción con lo que disminuye el rendimiento de **3**.

El compuesto **3** también se intentó sintetizar a partir del derivado mesilado **24** sin obtener mejores resultados (**Esquema 8**). Cabe mencionar que todos los productos formados, los cuales no fueron identificados, tienen un  $R_f$  muy parecido y son bastante apolares.



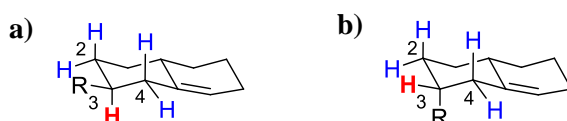
**Esquema 8.** Formación de **3** a partir de **24**.



**Figura 8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **3**.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa como cambio más significativo, con respecto a la diosgenina (**1**), el desplazamiento de H-3 (3.52 ppm en **1** frente a 3.86 ppm en **3**) (**Figura 8**).

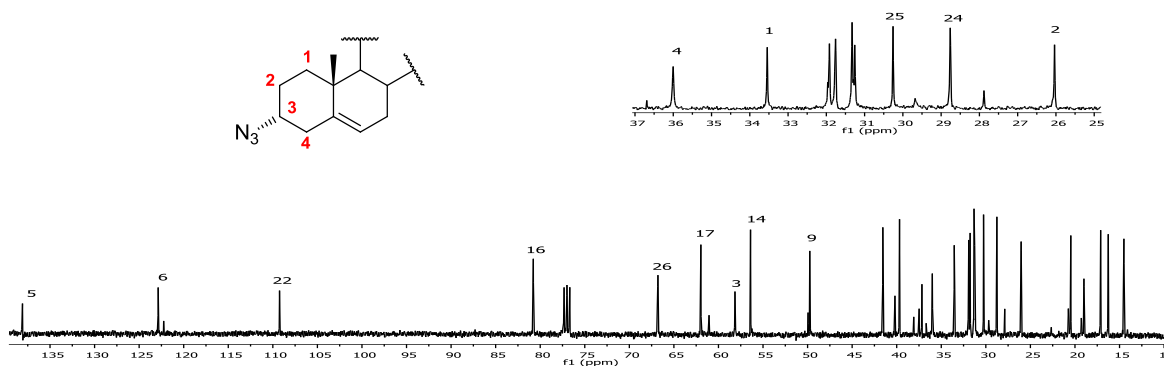
El cambio en la forma de la señal de H-3 también es evidente. El ancho del pico a la mitad de su altura ( $W_{1/2} = 8.3$  Hz) fue indicativo de su orientación  $\beta$ . Aquellos derivados con un sustituyente R en C-3 en posición  $\beta$  tienen señales más anchas, debido a las interacciones entre  $\text{H}_3\text{-H}_2$  y  $\text{H}_3\text{-H}_4$  las cuales producen dos  $J$  grandes correspondientes a la interacción con los hidrógenos axiales ( $a$ ) vecinos y dos  $J$  moderadas generadas por la interacción con los hidrógenos vecinos ecuatoriales ( $e$ ) (**Figura 9, a**). Por el contrario, cuando el sustituyente R se encuentra en posición  $\alpha$  como el caso del compuesto **3**, la señal se vuelve más angosta al tener dos interacciones  $e,a$  con  $J$  moderadas y dos  $e,e$  con  $J$  pequeñas (**Figura 9, b**).



**Figura 9.** Representación de los anillos A y B del esteroide. Se omite el metilo en C-10 para una mejor visualización.

Los desplazamientos de las señales en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  son también muy similares a los del espectro de **1**,<sup>43</sup> aquellas señales que muestran un cambio más drástico son el C-3 que se desplaza a frecuencias más bajas (58.2) ppm y aquellos carbonos cercanos a éste (C-1, C-2 y C-4) (**Figura 10**). Los  $\delta$  de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la diosgenina (**1**) y el derivado **3** se muestran en la **tabla 1**.

La demostración del cambio en la configuración del C-3 debido a la reacción de sustitución  $\text{S}_{\text{N}}2$  se discutirá más adelante (Sección 4.1.3.1).



**Figura 10.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **3**.

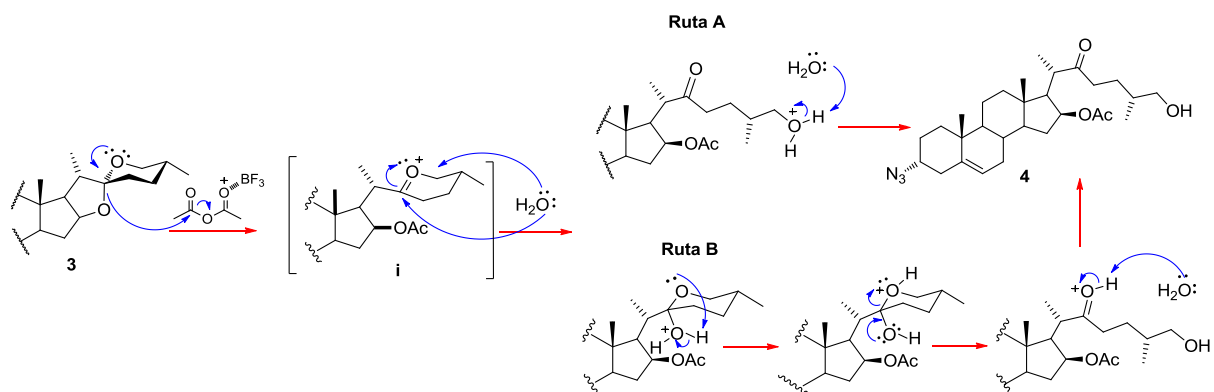
Posición	<b>1</b> <sup>43</sup>		<b>3</b>	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C*	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C**
1		36.7		33.5
2		31.7		26.0
3	3.52 (m)	71.8	3.86 (m)	58.2
4		42.3	2.45 (m), 2.13 (m)	36.0
5		140.8		138.1
6	5.42 (m)	121.4	5.37 (m)	122.9
7		33.7		31.9
8		31.5		31.3
9		50.1		49.8
10		37.2		37.2
11		21.1		20.5
12		39.8		39.7
13		40.3		40.2
14		56.5		56.5
15		31.6		31.8
16	4.41 (m)	80.8	4.39 (m)	80.8
17		62.1		62.0
18	0.79 (s)	16.5	0.76 (s)	16.3
19	1.02 (s)	19.4	1.0 (s)	19.0
20		41.6	1.8 (m)	41.6
21	0.97 (d)	14.5	0.95 (d)	14.5
22		109.3		109.3
23	1.81 (ax)	31.4		31.3
24		28.8		28.8
25		30.3		30.3
26	3.37 (ax), 3.46 (ec)	66.9	3.35 (dd, ax), 3.45 (ddd, ec)	66.8
27	0.79 (d)	17.1	0.77 (d)	17.1

**Tabla 1.** Desplazamientos de RMN ( $\delta$ , ppm) de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) y <sup>13</sup>C (\*125 MHz, \*\*100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **1** y **3**.

- **Acetato de (25R)-3 $\alpha$ -azido-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (4)**

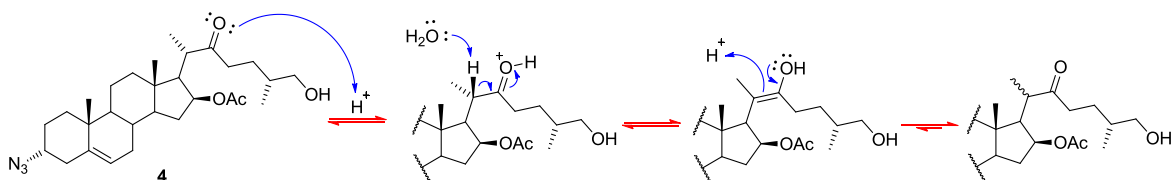
La síntesis del derivado **4** se llevó a cabo mediante las condiciones de acetólisis ya descritas en nuestro grupo de investigación.<sup>44</sup> El control del tiempo de reacción y la temperatura es crucial para la obtención del derivado 26-hidroxilado, un aumento en el tiempo de reacción proporciona el derivado acetilado más difícil de purificar. Además, la formación de otros subproductos

furostánicos y epicolestánicos descritos ya en la bibliografía<sup>45</sup> disminuyen el rendimiento de la reacción. Los mecanismos posibles de esta reacción se muestran en el **esquema 9**. Como primer paso se produce el ataque del par de electrones del oxígeno en el anillo F hacia el C-22, la apertura del anillo E propicia el ataque del par electrónico del enlace C-O hacia el carbonilo de una molécula de Ac<sub>2</sub>O activada por BF<sub>3</sub>, lo que permite la acetilación del C-16 y la formación del ion oxocarbenio en el intermedio (**i**); el posterior ataque de una molécula de agua ya sea sobre el C-26 (Ruta A) o sobre el C-22 (Ruta B) permite obtener el derivado hidroxilado **4**.



**Esquema 9.** Mecanismo para la formación de **4**.

La ccf de la reacción mostró la formación, en pequeñas cantidades, de otro derivado con  $R_f$  muy cercano a **4**. El trabajo que se ha realizado en nuestro grupo de investigación nos permitió saber que se trataba del epímero en C-21; su formación es posible debido a la presencia de AcOH (formado en el tratamiento de la reacción por la hidrólisis del Ac<sub>2</sub>O) y/o de BF<sub>3</sub> en el medio de reacción, los cuales catalizan la formación del enol. El mecanismo de reacción para la formación del epímero se muestra en el **esquema 10** y se describe a continuación. El oxígeno de la cetona en C-22 se protona con el ácido del medio, una posterior eliminación del protón  $\alpha$  al carbonilo da lugar a la formación del enol, finalmente la tautomerización a la forma cetónica más estable conduce a la epimerización del C-21.



**Esquema 10.** Mecanismo de epimerización en C-21 de **4**.

La purificación cuidadosa por cromatografía en columna permitió obtener el derivado **4** de manera pura, sin observarse señales del epímero en los espectros de RMN. Por otra parte, los cambios en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H que evidencian la apertura selectiva de los anillos E y F y la formación de

la cadena lateral 22-oxocolestánica es el desplazamiento a frecuencias más altas de H-16 debido al efecto electrotractor del grupo acetato en C-16 (4.96 ppm); también se observa el desplazamiento a frecuencias más altas del H-20 en aproximadamente 1.1 ppm, el cual pasó de estar adyacente a un espiroacetal a estar vecino a un grupo carbonilo de cetona y de H-21 (en aproximadamente 0.17 ppm) que aparece ahora en 1.12 ppm. Otro cambio importante en el espectro de  $^1\text{H}$  de **4** con respecto a la materia prima, es la señal de los hidrógenos 26 que en esta estructura forman parte de una cadena de libre giro y no del anillo tetrahidropiránico F de **3**. La señal de H-26 aparece como doble que integra para dos hidrógenos; cabe resaltar que a pesar de continuar siendo hidrógenos diastereotópicos su desplazamiento es accidentalmente el mismo. Finalmente la aparición de la señal simple en 1.94 ppm correspondiente al metilo del acetato en C-16 corrobora la estructura **4** (Figura 11).

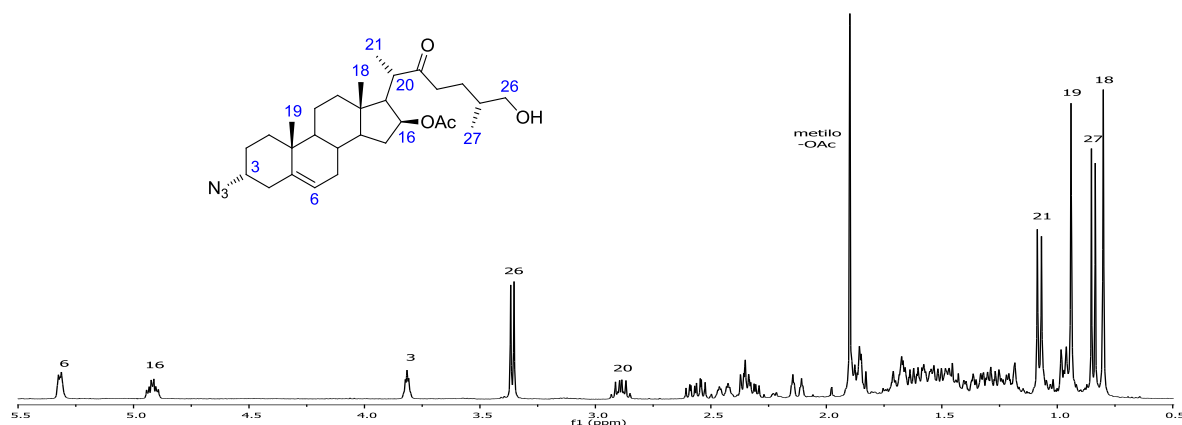


Figura 11. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **4**.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  los cambios más significativos son los de las señales de los carbonos que formaban parte de los anillos E y F mostradas en la figura 12, además de la aparición de las señales a frecuencias altas correspondientes a la nueva cetona formada en C-22 (213.7 ppm) y del carbonilo del acetato sobre C-16 en 169.9 ppm.

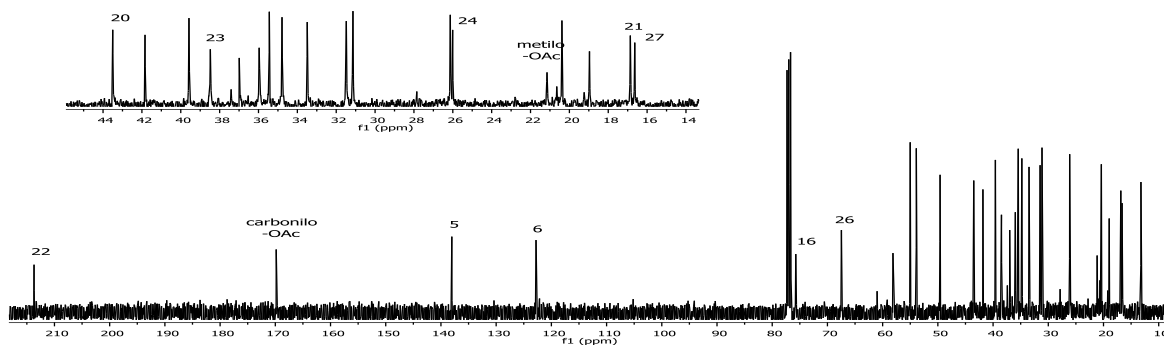
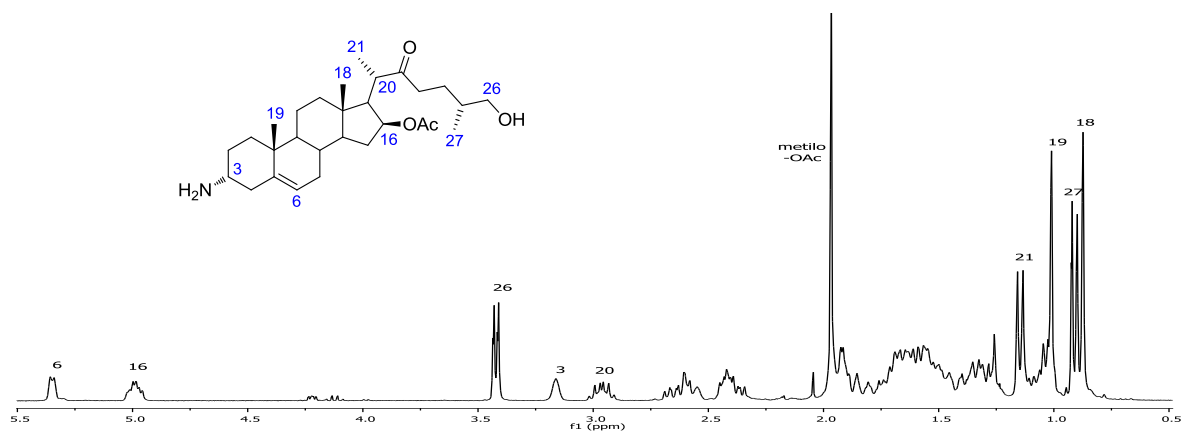


Figura 12. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **4**.

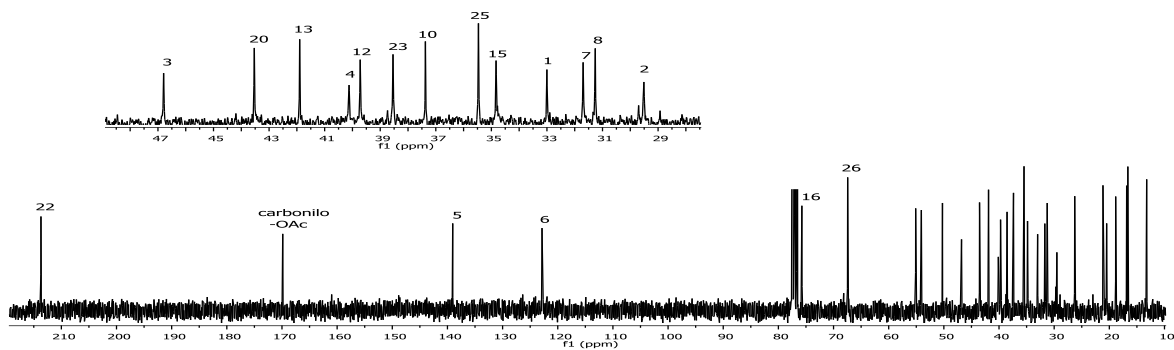
- **Acetato de (25R)-3 $\alpha$ -amino-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (5)**

La formación de la amina en C-3 se realizó mediante hidrogenación catalítica de **4** con Pd(OH)<sub>2</sub>/C como catalizador. La reacción es bastante limpia, por lo que no es necesario purificar el compuesto **5** por cromatografía en columna, además de ser una reacción rápida y que da excelentes rendimientos.



**Figura 13.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **5**.

Los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C muestran señales con desplazamientos químicos muy parecidos a los del derivado **4** y solamente se observan cambios significativos en aquellos hidrógenos o carbonos cercanos al carbono C-3 donde se realizó la transformación. Por ejemplo, en el espectro de <sup>1</sup>H se observa el cambio de H-3 de 3.86 a 3.16 ppm (**Figura 13**), mientras que en el espectro de <sup>13</sup>C el cambio en el desplazamiento del C-3 de 58.1 a 46.8 ppm es el más evidente, seguido del C-2 (de 26.1 a 29.5 ppm) y el C-4 (de 36.0 a 40.1 ppm) (**Figura 14**).



**Figura 14.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **5**.

- Acetato de (25R)-3 $\alpha$ -isotiocianato-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (6)

La síntesis del isotiocianato **6**, compuesto clave para obtener las tioureas esteroidales, se realizó mediante el tratamiento de **5** con tiofosgeno. La reacción es muy rápida y limpia, sin embargo el compuesto es bastante inestable, por lo que la cromatografía en columna con gel de sílice debe realizarse rápidamente.

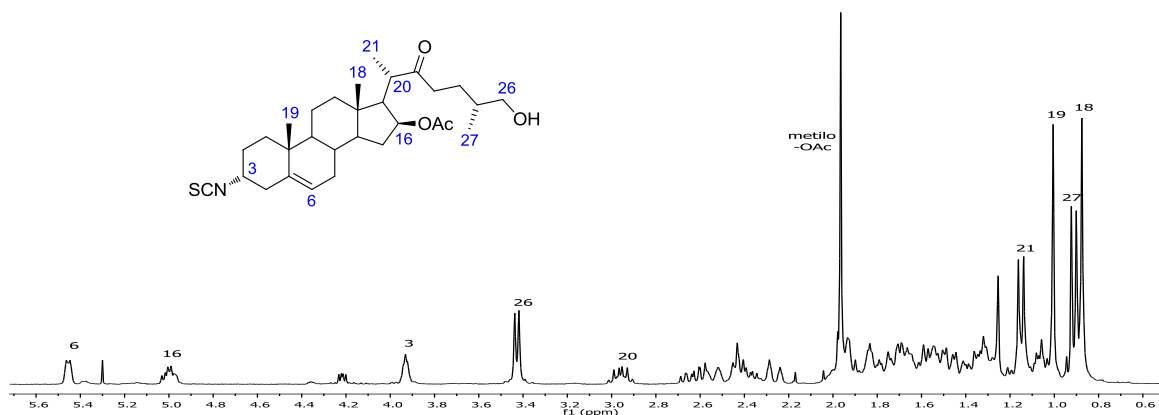


Figura 15. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **6**.

Nuevamente el cambio más significativo que se observa en el espectro de  $^1\text{H}$  es el desplazamiento de H-3 que ahora se encuentra en 3.93 ppm. Los desplazamientos de las demás señales son muy similares a los de la materia prima **5** (Figura 15).

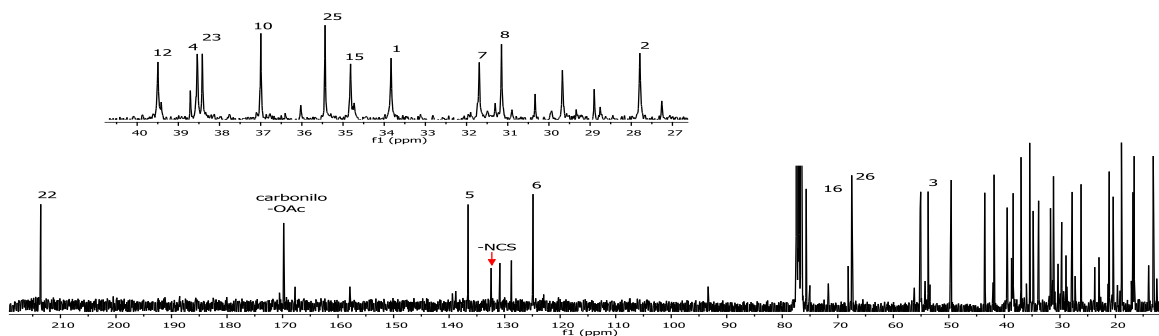


Figura 16. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **6**.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observan con mayor claridad otras señales más pequeñas correspondientes al nuevo compuesto formado por la descomposición de **6**, aun así es posible apreciar la formación del nuevo derivado y los desplazamientos de los carbonos de la molécula de interés. Se puede observar la aparición de una señal en 132.4 ppm correspondiente al grupo

-N=C=S y el cambio en el desplazamiento químico de C-3 hacia frecuencias más altas (55.1 ppm para **6**, 46.8 ppm para **5**). Los carbonos cercanos a C-3 muestran un cambio ligero en sus desplazamientos químicos, con una variación de aproximadamente 2 ppm con respecto al derivado **5** (Figura 16).

- **Obtención de las tioureas (7-9)**

La síntesis de la tioureas esteroidales se realizó mediante la reacción del isotiocianato **6** con las aminas correspondientes para dar los derivados **7**, **8** y **9** (Figura 17). La reacción es bastante rápida para los dos primeros casos y más lenta para la triamina.

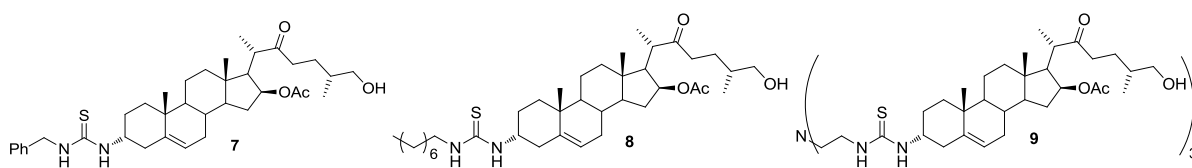


Figura 17. Tioureas sintetizadas.

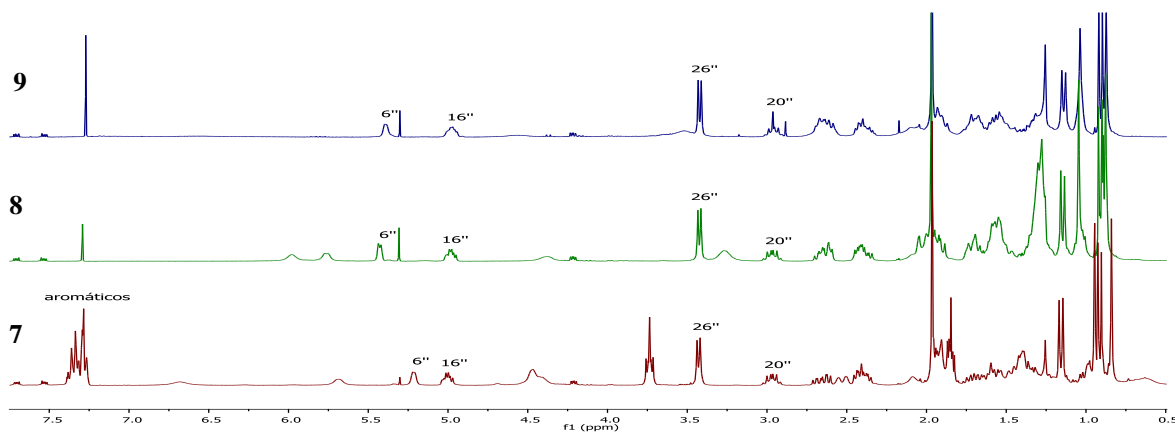
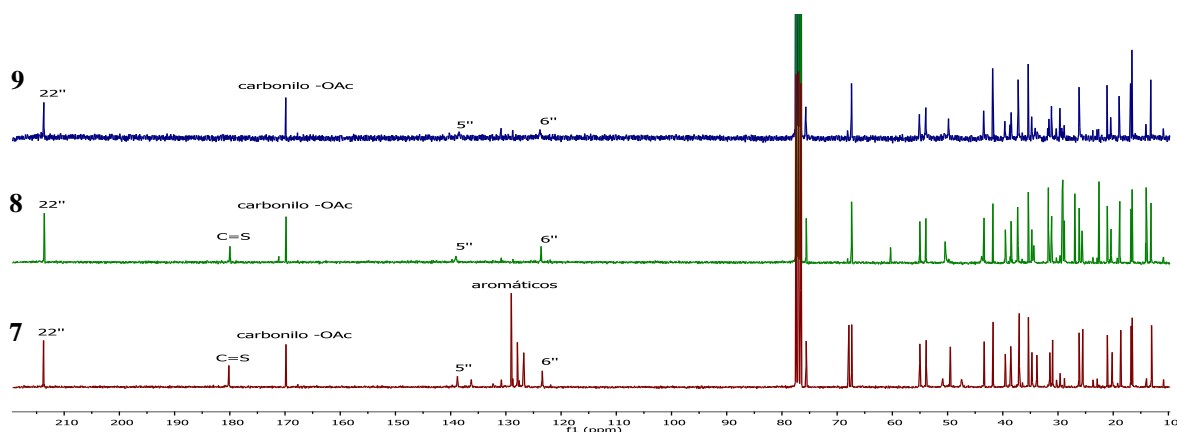


Figura 18. Comparación de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de las tioureas **7-9**.

Los espectros de <sup>1</sup>H de las tioureas se muestran en la figura 18. En el espectro del derivado **7** se pueden observar las señales de los hidrógenos aromáticos entre 7.0 y 7.5 ppm, la señal de los hidrógenos bencílicos en 3.74 ppm y las señales anchas debidas a los hidrógenos de la tiourea -NH en 6.68 y 5.68 ppm. Los espectros de **8** y **9** son muy similares entre sí; la única diferencia que se observa es que en el espectro de **8** hay una mayor cantidad de señales en la región de 1.0 a 2.0 ppm debido a los metilenos de la cadena alifática, se observan además las señales de los hidrógenos -NH a diferentes desplazamientos químicos en 5.98 y 5.76 ppm. Por otra parte a pesar de tener el

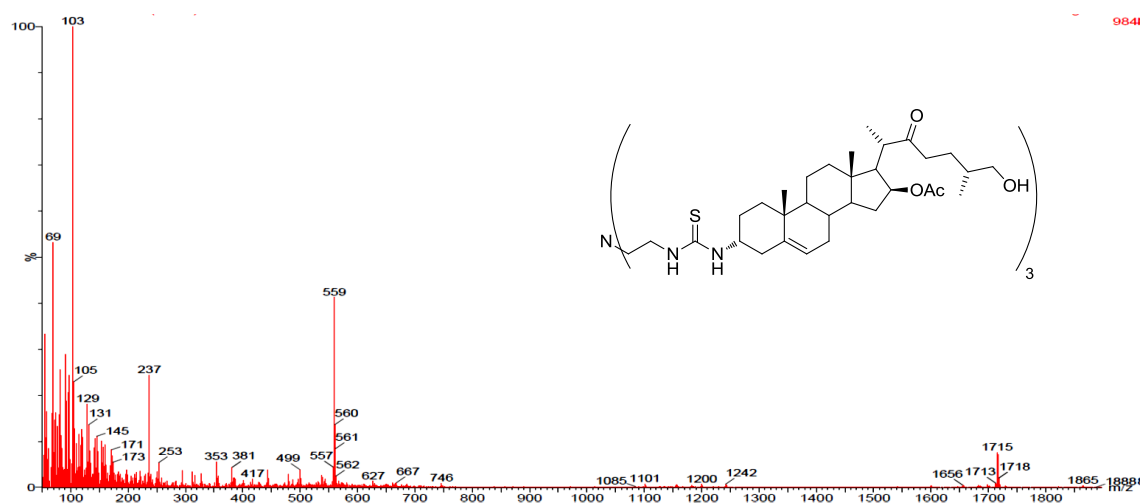
compuesto **9** tres estructuras de esteroide unidas a la amina terciaria, la simetría de la molécula permite que solamente se observen las señales correspondientes a un esqueleto esteroidal.

En los espectros de  $^{13}\text{C}$  se puede observar la aparición de una señal a 180.0 ppm correspondiente al  $\text{C}=\text{S}$ , excepto en el espectro de **9** que por ser la señal tan pequeña no se llega a apreciar, lo mismo ocurre con los carbonos vinílicos C-5 y C-6 en 138.5 y 123.8 ppm respectivamente. En el espectro del derivado **7** podemos observar además las señales de los carbonos aromáticos de 136.2 a 126.8 ppm (**Figura 19**).



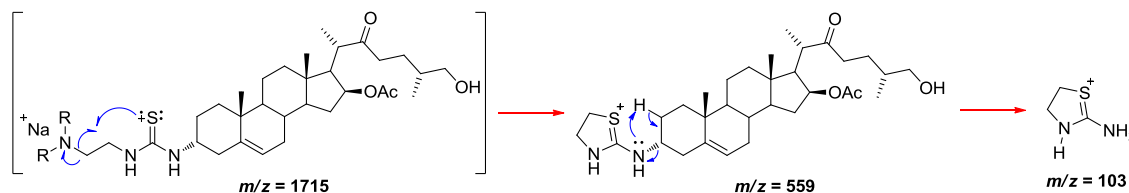
**Figura 19.** Comparación de los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de las tioureas **7-9**.

La espectrometría de masas nos permitió evidenciar que en el caso de la tiourea **9**, la amina formada esta sustituida por tres fragmentos esteroidales. En la **figura 20** se muestra el espectro de la tiourea **9** realizado mediante la técnica FAB en el que podemos observar el pico  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  a  $m/z = 1715$ .



**Figura 20.** Espectro de masas de la tiourea **9**.

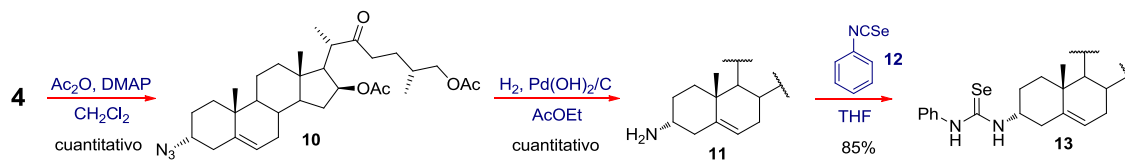
Además en el **esquema 11** se muestra el mecanismo propuesto para la formación de los fragmentos  $m/z = 559$  y del pico base  $m/z = 103$ .



**Esquema 11.** Mecanismo de formación de los principales fragmentos del compuesto **9**.

#### 4.1.2 Obtención de la selenourea esteroidal **13**

Los siguientes derivados sintetizados en este trabajo se intentaron obtener utilizando los derivados **4** y **5** como materias primas, estos compuestos tienen el hidroxilo libre en el C-26 y los productos obtenidos mostraron ser más inestables que las tioureas descritas anteriormente al descomponerse rápidamente, por lo que el derivado **4** se sometió a condiciones de acetilación (**Esquema 12**).



**Esquema 12.** Síntesis de la selenourea **13**.

- **Diacetato de (25R)-3 $\alpha$ -azido-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (**10**)**

La formación del derivado acetilado **10** se llevó a cabo utilizando  $\text{Ac}_2\text{O}$  y DMAP como catalizador. De nuevo, al igual que lo observado para **4**, la presencia de  $\text{AcOH}$  generado en el procesado, condujo a la existencia de un derivado con  $R_f$  muy cercano a **10**, con lo que la elección del sistema de disolventes utilizado como eluyente en la cromatografía en columna fue esencial para aislar completamente el derivado de interés.

En lo concerniente a la caracterización de **10**, se observa en el espectro de  $^1\text{H}$  un cambio drástico en el desplazamiento de H-26 comparado con el de **4** hacia frecuencias más altas (3.89 ppm), además la aparición de otra señal simple en 2.0 ppm corrobora la acetilación del hidroxilo en C-26 (**Figura 21**).

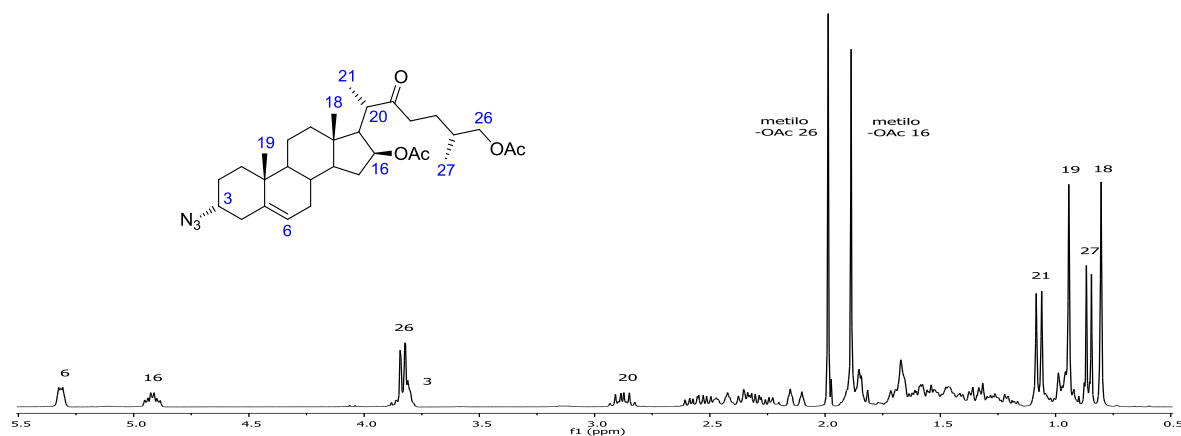


Figura 21. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **10**.

En el espectro de  $^{13}\text{C}$  se observan dos nuevas señales que indican la presencia de un nuevo acetato: una señal a frecuencias altas (171.1 ppm) correspondiente al carbonilo del grupo, así como la señal a 20.9 ppm perteneciente al metilo del grupo acetato. El desplazamiento de C-26 sin embargo es análogo al del compuesto **4** (Figura 22).

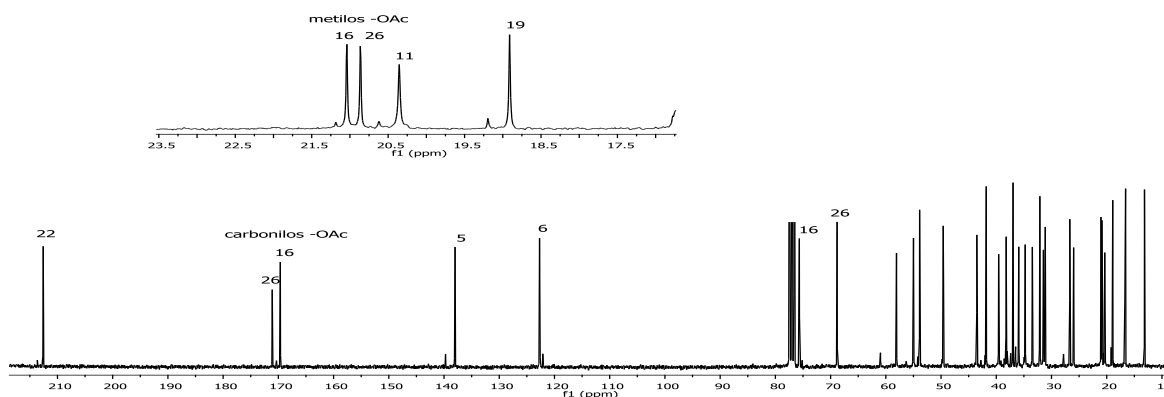


Figura 22. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **10**.

- **Diacetato de (25R)-3 $\alpha$ -amino-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (11)**

La obtención de **11** se realizó mediante la reducción de la azida en C-3 de **10** con  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ . Nuevamente la reacción fue muy rápida y limpia, sin necesidad de purificar el producto por cromatografía en columna. El cambio más evidente en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  con respecto a la materia prima **10** es el desplazamiento de H-3 a frecuencias más bajas (3.16 ppm); las demás señales muestran un desplazamiento semejante al de la materia prima **10** (Figura 23).

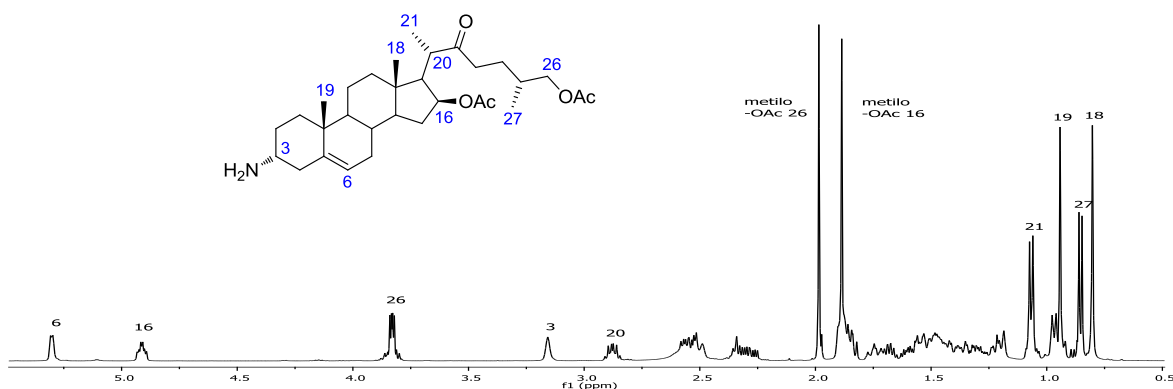


Figura 23. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **11**.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  muestra de igual manera un cambio significativo en C-3 al desplazarse hacia frecuencias más bajas a 47.0 ppm. Los desplazamientos de los carbonos cercanos donde se llevó a cabo la transformación C-2 y C-4 también muestran cambios en sus desplazamientos en aproximadamente 3 ppm; las demás señales muestran desplazamientos prácticamente iguales a los del compuesto de partida **10** (Figura 24).

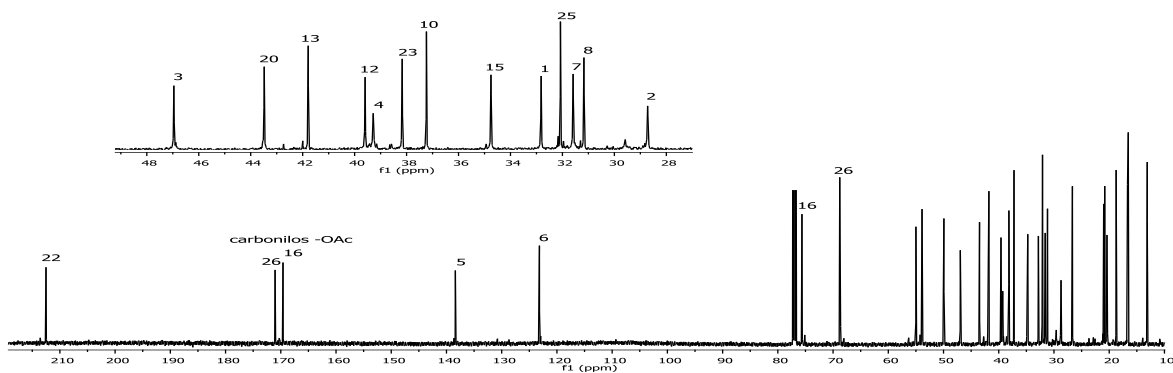
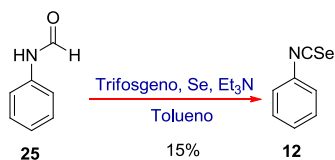


Figura 24. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **11**.

- **Diacetato de (25R)-3 $\alpha$ -(N'-fenilselenoureido)-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (13)**

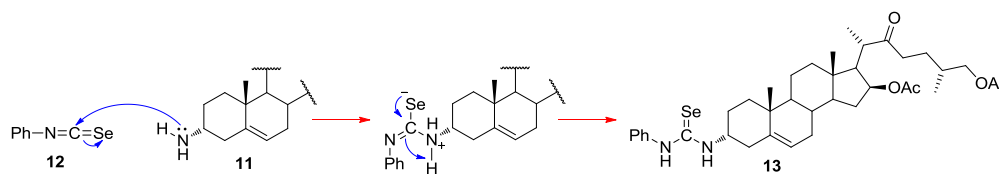
La síntesis del isoselenocianato de fenilo (**12**) utilizado en la reacción se realizó a partir de *N*-fenilformamida comercial (**25**) siguiendo el método descrito por Fernández-Bolaños *et al.*<sup>46</sup> En esta metodología se utiliza trifosgeno como reactivo sustituto del fosgeno por ser más seguro de usar;

este reactivo actúa como un agente deshidratante para formar un isonitrilo (no aislado), el cual reacciona con selenio elemental dando lugar al isoselenocianato **12** (**Esquema 13**).



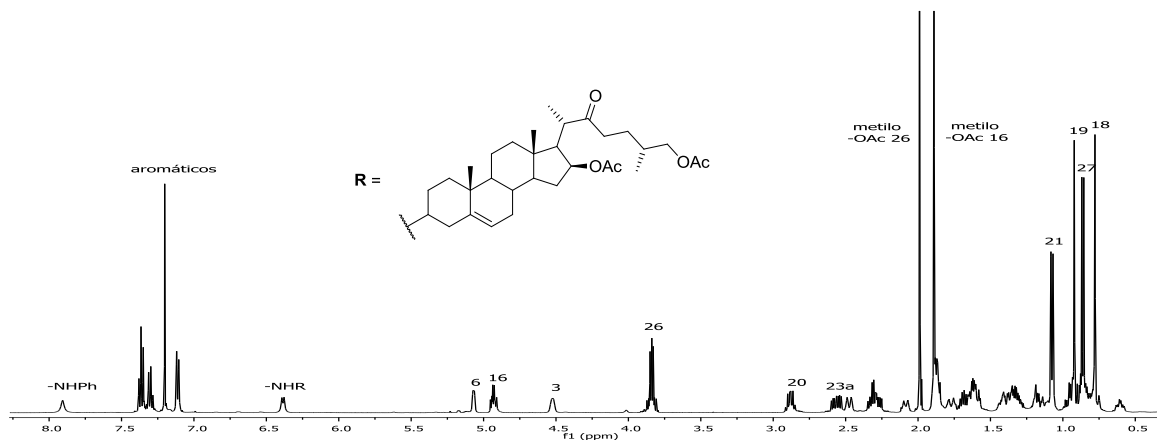
**Esquema 13.** Síntesis del isoselenocianato de fenilo (**12**).

Una vez formado el derivado **12** la síntesis de la selenourea **13** al igual que las tioureas se llevó a cabo de manera rápida y sin necesidad de ningún tipo de catalizador. El mecanismo de formación de **13** (**Esquema 14**) consiste en el ataque nucleofílico por parte de la amina sobre el carbono del isoselenocianato; la posterior desprotonación del grupo amino condujo a la formación de la selenourea deseada.



**Esquema 14.** Mecanismo para la formación de **13**.

La reacción y purificación del compuesto **13** se llevó a cabo en la oscuridad pues los derivados de selenio son fotosensibles y se descomponen para formar selenio rojo elemental.<sup>47</sup> El espectro de RMN de <sup>1</sup>H muestra varios cambios con respecto a la materia prima.

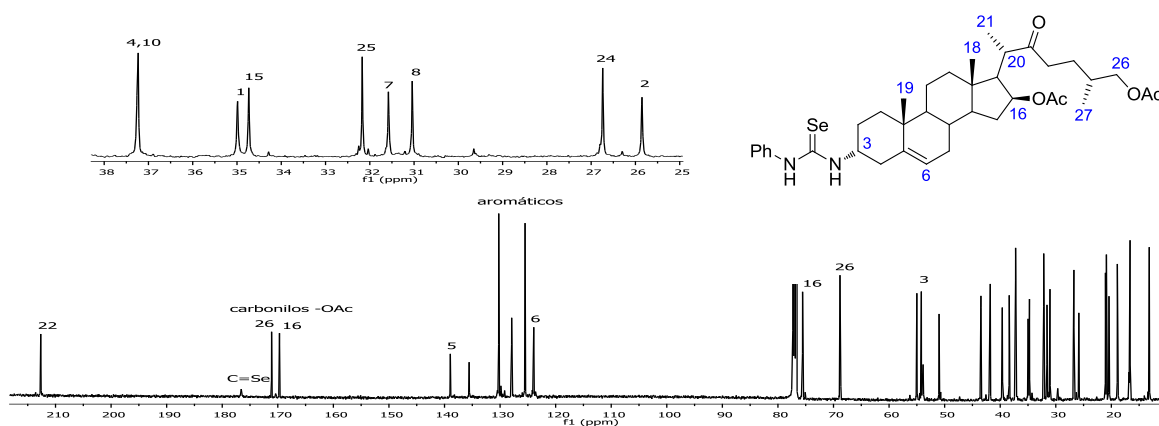


**Figura 25.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **13**.

El desplazamiento de H-3 a frecuencias más altas hacia 4.52 ppm muestra la desprotección de este hidrógeno al reemplazar una amina por un grupo selenoureido. Otros cambios evidentes son la

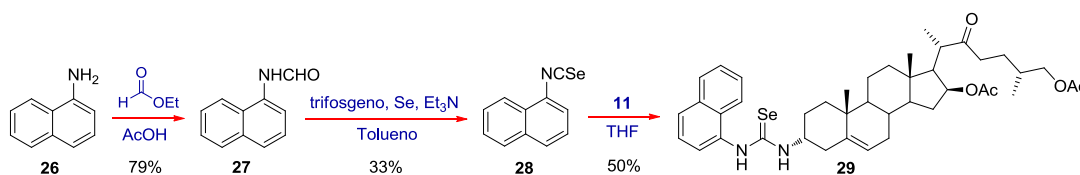
aparición de las señales de los hidrógenos aromáticos entre 7.36 y 7.10 ppm y las nuevas señales pertenecientes a los grupos NH. La asignación de los -NH se realizó con ayuda del experimento de RMN de 2D HMBC y al analizar la multiplicidad de cada señal. El hidrógeno a 7.90 ppm aparece como una señal simple ancha y a pesar de estar cercano al carbono *ipso* del grupo fenilo no se observa una correlación en HMBC; por el contrario el hidrógeno a 6.38 ppm si presenta un acoplamiento con la señal del C-3 y se observa como una señal doble con  $J = 7.5$  Hz como resultado del acoplamiento vecinal con H-3 (**Figura 25**).

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestra la aparición de una señal a frecuencias altas hacia 176.6 ppm correspondiente a la formación del enlace C=Se, además las señales entre 135.6 y 125.5 ppm corroboran la presencia del grupo fenilo presente en la estructura. Finalmente los cambios de desplazamiento más evidentes son los del C-3 hacia 54.2 ppm y de los carbonos adyacentes a este centro C-1, C-2 y C-4 con un cambio de aproximadamente 3 ppm (**Figura 26**).



**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **13**.

También nos propusimos la preparación del derivado organoselénico **29** partiendo de la  $\alpha$ -naftilamina (**26**). El compuesto **26** se hizo reaccionar con formiato de etilo y AcOH para obtener la formamida **27**, posteriormente el derivado se trató con Se negro y trifosgeno para obtener el isoselenocianato **28**,<sup>46</sup> finalmente su tratamiento con la amina esteroidal **11** condujo a la selenourea **29** (**Esquema 15**).

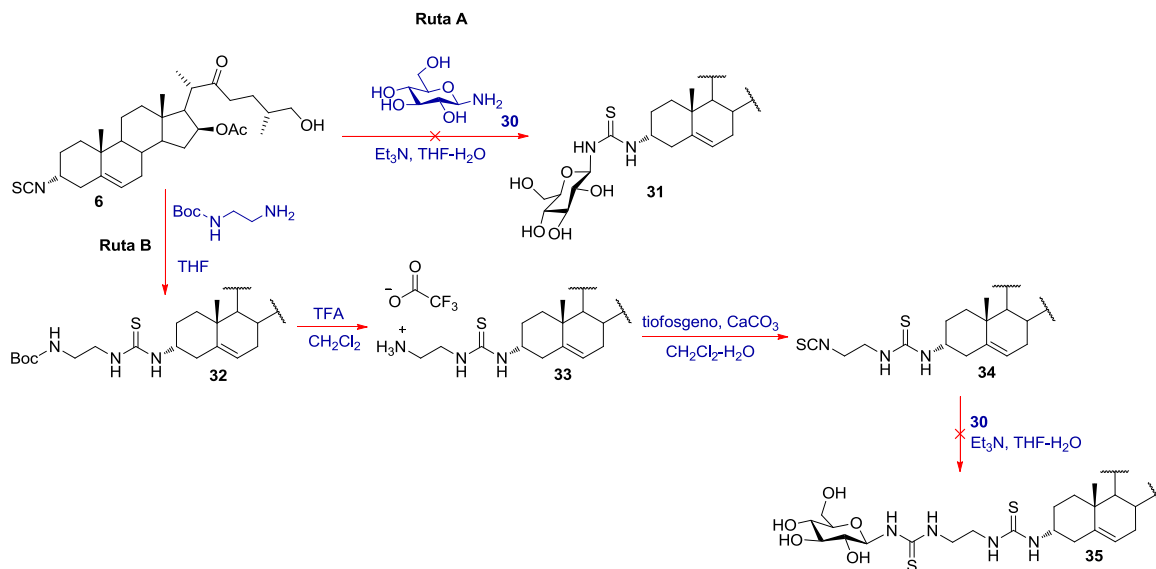


**Esquema 15.** Síntesis de la selenourea **29**.

Este compuesto, sin embargo, resultó ser bastante inestable debido probablemente a la mayor conjugación con respecto a la *N*-fenilformamida y por lo tanto susceptible a una mayor absorción de luz, y dado que los derivados de selenio son fotosensibles y se oxidan fácilmente, **29** presentó rápida descomposición con depósito de selenio rojo en el tubo de RMN por lo que no pudo ser caracterizado.

### 4.1.3 Glicoconjugados esteroidales

Para la síntesis de estos glicoconjugados se planteó en primer lugar el acoplamiento azúcar-esteroide mediante un enlace de tipo tioureido, por lo que se siguieron las siguientes metodologías para obtenerlos (**Esquema 16**). Para ambas secuencias se utilizó como materia prima el isotiocianato **6**. En la ruta A se intentó realizar el acoplamiento directo con el azúcar utilizando para ello la  $\beta$ -D-glucopiranosilamina (**30**), sin embargo a pesar de mantener a reflujo la reacción por varias horas no se observó cambio alguno para obtener **31** salvo la descomposición de la materia prima.



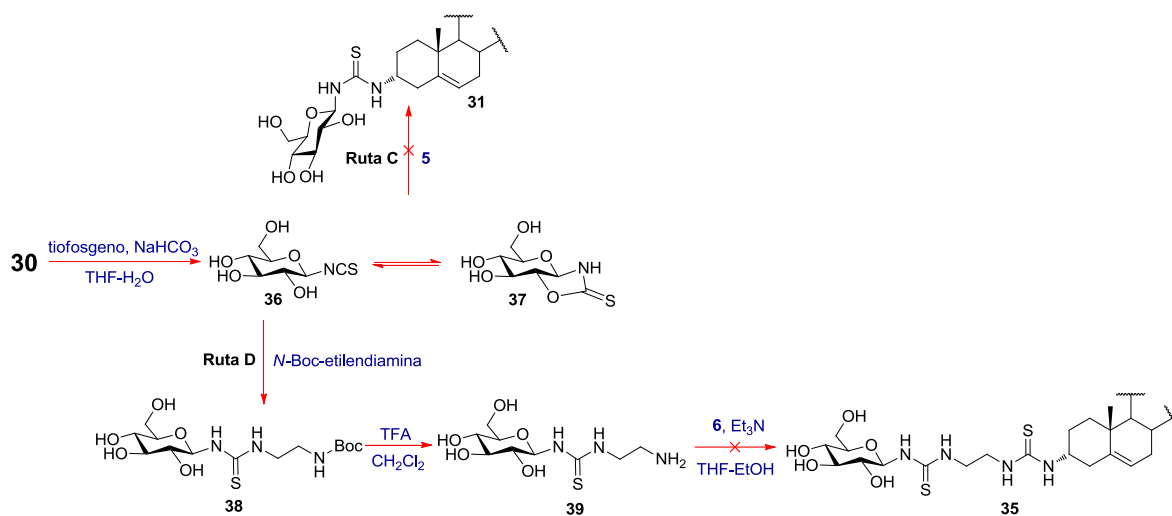
**Esquema 16.** Metodologías para obtener los glicoconjugados esteroidales con enlaces tioureido a partir del esteroide **6**.

Pensamos que la reacción no fue factible debido al impedimento estérico del esteroide para poderse realizar el acoplamiento, por lo que en la ruta B decidimos introducir el grupo tioureido con un espaciador que permitiera que el acoplamiento entre el azúcar y el esteroide no presentara ese impedimento por encontrarse más separados. En primer lugar se formó un enlace tioureido del isotiocianato **6** con la *N*-Boc-etilendiamina para obtener el derivado **32**, posteriormente la

desprotección del grupo amino utilizando TFA condujo al compuesto **33**, la reacción con tiofosgeno derivó en la obtención del isotiocianato **34**, finalmente este derivado se trató con las condiciones de la ruta A sin obtener un resultado favorable.

Con estos resultados nos planteamos una nueva ruta para obtener el glicoconjugado glucosa-esteroide, esta vez formando un isotiocianato en el azúcar y haciéndolo reaccionar con la amina del esteroide (Ruta C, **esquema 17**). En primer lugar se realizó la reacción del azúcar **30** con tiofosgeno lo que dio una mezcla en equilibrio del isotiocianato **36** y del tiocarbamato **37** reportada ya en la literatura.<sup>48</sup> El derivado **37** se obtiene por una ciclación espontánea del grupo hidroxilo en C-2 del azúcar sobre el heterocumuleno, y actúa como isotiocianato latente en la preparación de tioureas.

La mezcla de compuestos **36** y **37** se hizo reaccionar con la amina **5** sin obtener el glicoconjugado esperado **31**, por lo que procedimos a introducir una cadena en el azúcar de la misma manera que lo hicimos con el esteroide (Ruta D). En primer lugar se hizo reaccionar el isotiocianato **36** con la *N*-Boc-etilendiamina para dar el derivado **38**, la desprotección de la amina con TFA condujo al azúcar **39** el cual se hizo reaccionar con el isotiocianato esteroidal **6**, sin embargo tampoco obtuvimos el glicoconjugado esperado **35** (**Esquema 17**).



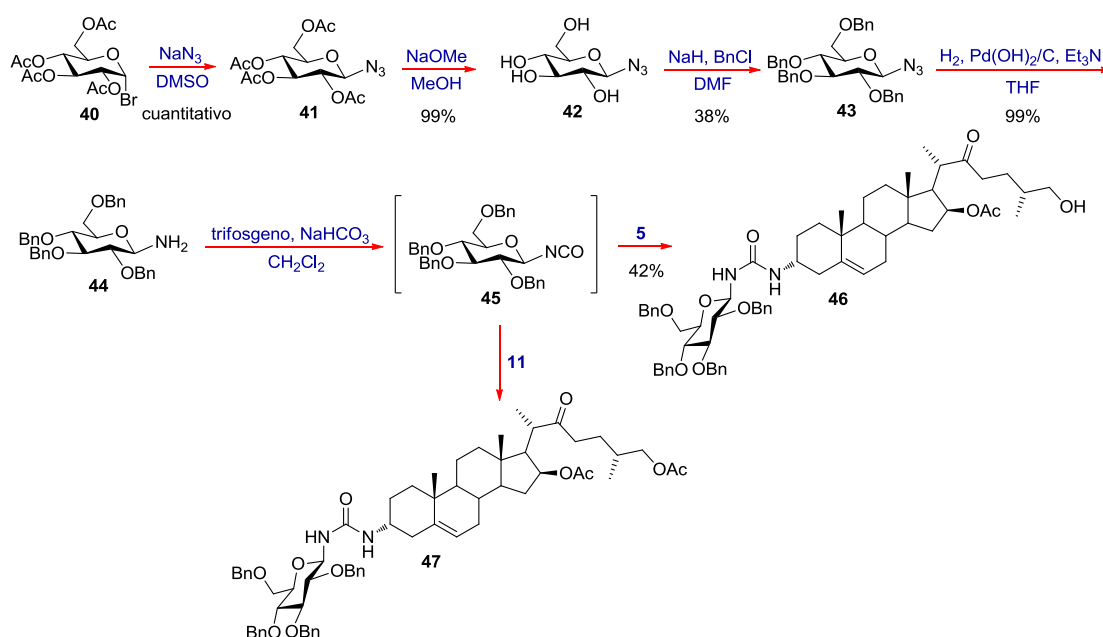
**Esquema 17.** Metodologías para obtener los glicoconjugados esteroideos con enlaces tioureido a partir del azúcar **30**.

Comparando estos resultados con las tioureas formadas anteriormente (**7-9**) pensamos que los disolventes polares ( $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{EtOH}$ ) utilizados en la formación de estos glicoconjugados (y necesarios para la solubilidad de la glucosa), podrían impedir que el esteroide hidrofóbico interaccionara con el azúcar, al formarse micelas o suspensiones coloidales del derivado esterooidal. De esta manera, decidimos introducir el azúcar protegido por grupos bencilo lo que le permitiría ser soluble en un disolvente menos polar.

Como nuestro objetivo final era darle una mayor solubilidad al derivado esteroidal mediante el uso de azúcares, era necesaria una desprotección de los hidroxilos después de realizar el acoplamiento. Sin embargo, el paladio utilizado en la eliminación de los grupos bencilo es envenenado por numerosos compuestos organosulfurados como las tioureas, por lo que decidimos utilizar esta vez una urea como conector.

En primer lugar se hizo reaccionar el bromuro de glicosilo per-*O*-acetilado **40** con  $\text{NaN}_3$  para obtener la azida **41**,<sup>49</sup> la posterior metanólisis de los acetatos con NaOMe condujo al azúcar **42**, este compuesto se protegió con grupos bencilo utilizando NaH y BnCl dando como resultado el derivado **43**. La reducción de la azida **43** con  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  nos permitió obtener la amina **44** sin hidrogenar los grupos bencilo, posteriormente se trató con trifosgeno para obtener el isocianato de glucosa<sup>50</sup> **45**. La reacción de acoplamiento entre este compuesto con la amina esteroidal **5** dio como resultado la urea **46**; sin embargo el glicoconjugado obtenido mostró una rápida descomposición debido probablemente al hidroxilo libre de la cadena esteroidal, además se observó por ccf un compuesto con  $R_f$  muy parecido a **46**, por lo que su aislamiento resultó imposible.

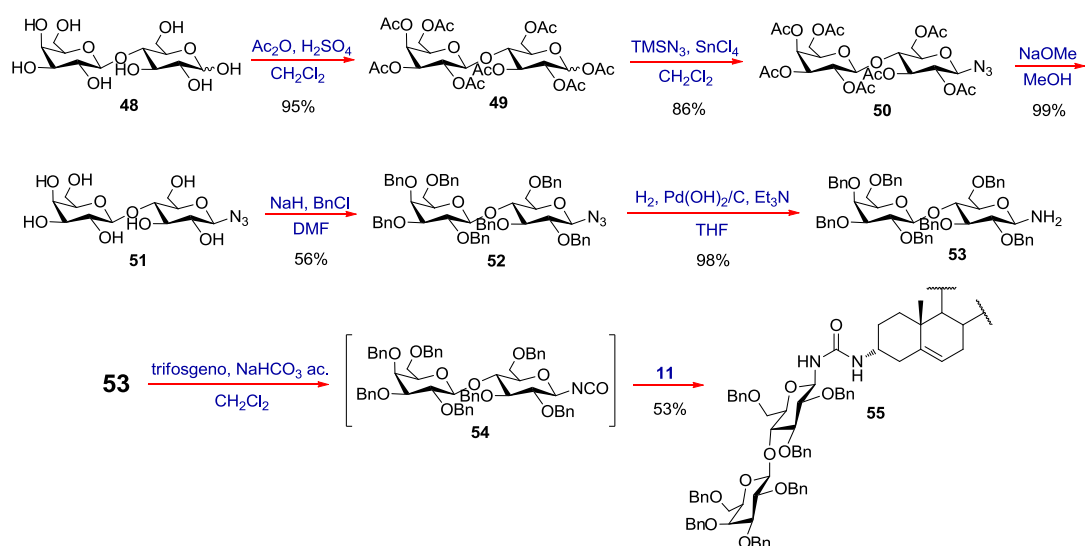
De esta manera, procedimos a realizar el acoplamiento del isocianato **45** con la amina **11** acetilada en C-26 obteniendo nuevamente el acoplamiento deseado **47**, observando su formación por RMN de  $^{13}\text{C}$  (C=O de urea en torno a 160 ppm) y a pesar de no observar alguna descomposición del derivado obtenido tampoco se pudo aislar completamente puro (**Esquema 18**).



**Esquema 18.** Obtención de glicoconjugados **46** y **47** mediante enlaces ureido.

Una metodología similar se utilizó para obtener el derivado de lactosa **55**. El procedimiento se muestra en el **esquema 19** y se describe a continuación.

La lactosa (**48**) se sometió a condiciones de acetilación utilizando  $\text{Ac}_2\text{O}$  y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  para obtener lactosa peracetilada **49**, utilizando este azúcar y el método descrito por Cagnoni *et al.*<sup>51</sup> que consiste en utilizar  $\text{TMSN}_3$  y  $\text{SnCl}_4$  como ácido de Lewis, se obtuvo la azida **50** como único producto, una desprotección de los hidroxilos mediante el tratamiento con  $\text{NaOMe}$  y su posterior bencilación dio como resultado el azúcar **52**. Posteriormente la reducción de la azida utilizando  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  en presencia de  $\text{Et}_3\text{N}$  permitió obtener la amina **53**, cuyo tratamiento con trifosgeno condujo al isocianato<sup>50</sup> **54**. Finalmente la reacción *in situ* de este derivado con la amina esteroidal **11** llevó a la obtención del glicoconjugado **55** que de manera análoga a los derivados de glucosa obtenidos anteriormente (**46** y **47**) no pudo obtenerse como producto puro por existir una mezcla de compuestos (**Esquema 19**).



**Esquema 19.** Obtención del glicoconjugado **55** mediante un enlace ureido.

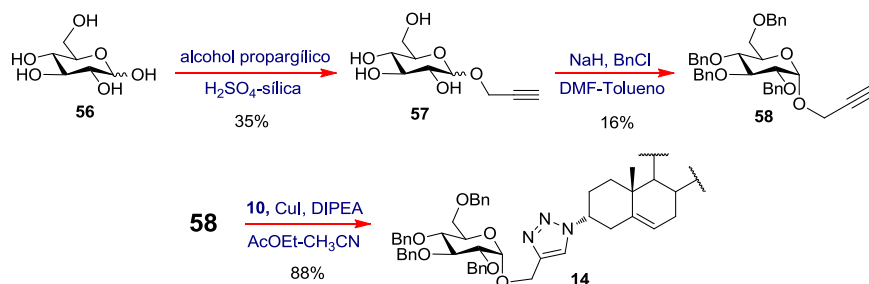
#### 4.1.3.1 Click chemistry. Anillo de triazol unido directamente a esqueleto esteroidal.

Con la finalidad de diversificar la naturaleza del glicomimético, y dada la imposibilidad de obtener los glicoconjugados basados en tio(ureas), se ha ensayado la formación de un *linker* de tipo 1,2,3-triazol. Este heterociclo tiene grandes ventajas en su uso, por ejemplo: es un grupo inerte, compatible con una amplia variedad de grupos funcionales y está presente en numerosos compuestos sintéticos con actividad biológica. Como primera prueba se realizaron los acoplamiento mediante el anillo de triazol utilizando el propargil  $\alpha$ -D-glucósido **58** y el

monopropargilo derivado de  $\alpha$ -ciclodextrina **70** acoplados a la azida esteroidal **4** pero los productos obtenidos mostraron una rápida descomposición en el tubo de RMN, por lo que se utilizó la azida **10** con el hidroxilo de C-26 protegido por un grupo acetato.

- **Diacetato de (25R)-3 $\alpha$ -{4'-[(2'',3'',4'',6''-tetra-O-bencil- $\alpha$ -D-glucopiranosil)-O-metil]-1'H-1',2',3'-triazol-1'-il}-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (**14**)**

En primer lugar se sintetizó el azúcar que actuaría como dipolarófilo en esta cicloadición 1,3. La metodología que se siguió se muestra en el **esquema 20** y se describe a continuación. El hidroxilo anomérico de la glucosa (**56**) se hizo reaccionar con alcohol propargílico y un catalizador de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-gel de sílice obteniendo el propargil glucósido **57** el cual se sometió a condiciones de bencilación mediante el tratamiento con NaH y BnCl y se aisló el anómero mayoritario  $\alpha$  para obtener el derivado **58**, la reacción *click chemistry* de este azúcar y la azida esteroidal **10** en presencia de CuI y DIPEA dio lugar al producto **14** en un tiempo de 2.5 h y en un rendimiento del 88%.



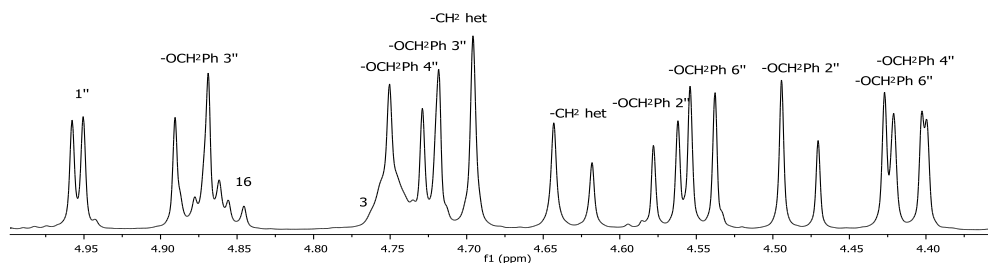
**Esquema 20.** Obtención del glicoconjugado **14** mediante una reacción de tipo *click chemistry*.

El mecanismo de cicloadición 1,3 de un alquino terminal a una azida catalizada con sales de Cu(I) no ha sido estudiado completamente, pero el aceptado es el que se describe en el **esquema 21**. Se sabe que el cobre(I) **59** sustituye al hidrógeno del alquino **60** en presencia de una base tal como ocurre en la reacción de Sonogashira.<sup>52</sup>

El mecanismo de sustitución implica un complejo de cobre  $\pi$ -alquino (**61**) que hace que el valor de  $pK_a$  del alquino disminuya y pueda ser desprotonado, lo que permite la formación del alquino de cobre(I) **62**.<sup>53</sup> La formación del enlace C-N clave **62** en la formación del anillo de triazol tiene lugar entre el carbono nucleofílico  $\beta$  del alquino de cobre(I) **62** y el nitrógeno terminal de la azida **63** para dar el intermediario **64** el cual cicla intramolecularmente para formar el 5-triazolil-Cu(I) **65**; la protonación de este derivado conduce al triazol 1,4-disustituido **66** de manera regioselectiva y a la regeneración del catalizador de cobre **59** (**Esquema 21**).<sup>40,54</sup>



diasterotópicos H-6'' aparece como una señal doble de doble de dobles. Finalmente los hidrógenos diasterotópicos H-6'' presentan cada uno señales doble de dobles a diferentes  $\delta$  (**Figura 27**).

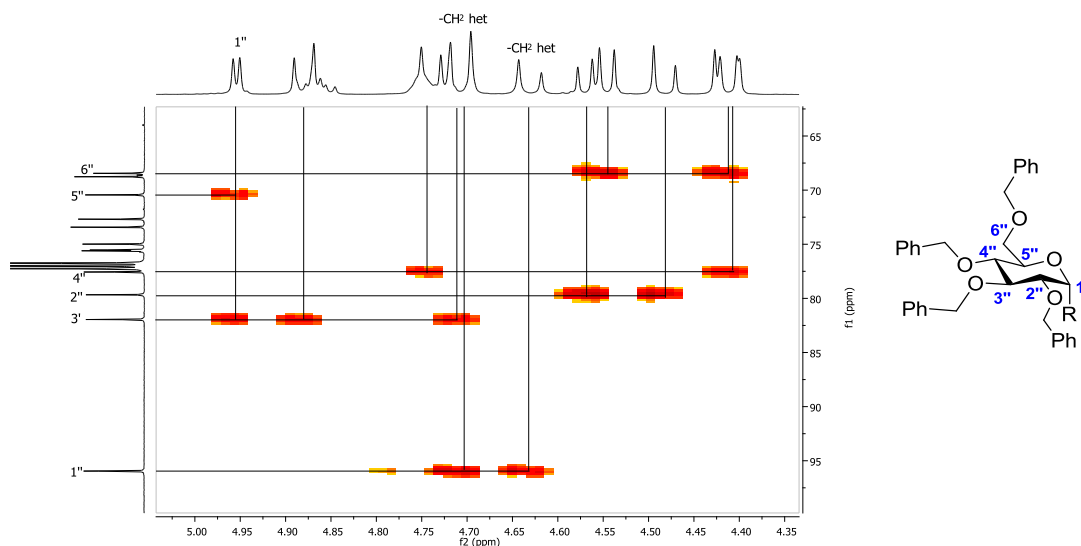


**Figura 28.** Asignación de hidrógenos bencílicos del compuesto **14**.

Finalmente la influencia del heterociclo aromático sobre H-3 es evidente al observar el cambio en su desplazamiento químico hacia frecuencias más altas (4.74 ppm) con respecto a la materia prima **10** (**Figura 28**).

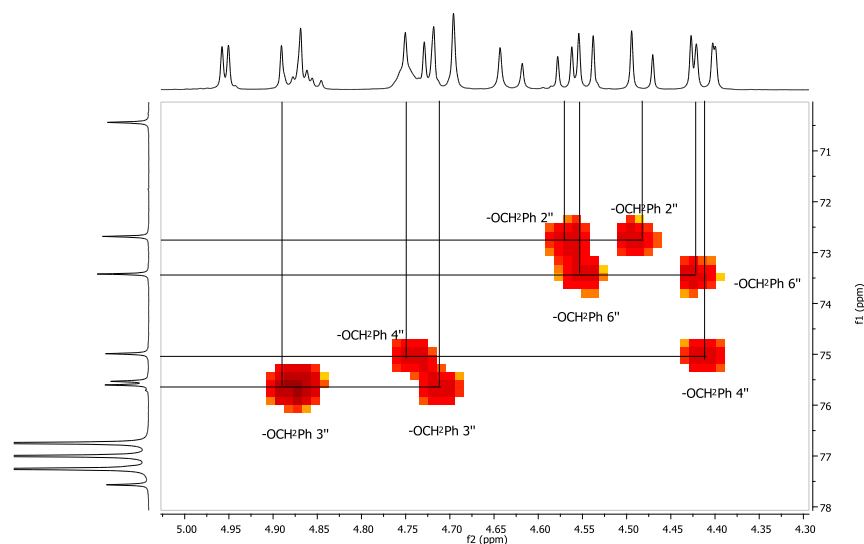
La asignación de los hidrógenos pertenecientes al grupo bencilo se realizó con ayuda de espectros de RMN de 2D tales como COSY, HSQC y HMBC, así como del análisis de las constantes de acoplamiento.

Mediante el acoplamiento observado a tres enlaces en el espectro de HMBC de los carbonos del azúcar con los hidrógenos bencílicos, se pudieron asignar las señales correspondientes a estos  $\text{-OCH}_2\text{Ph}$  (**Figura 29**).



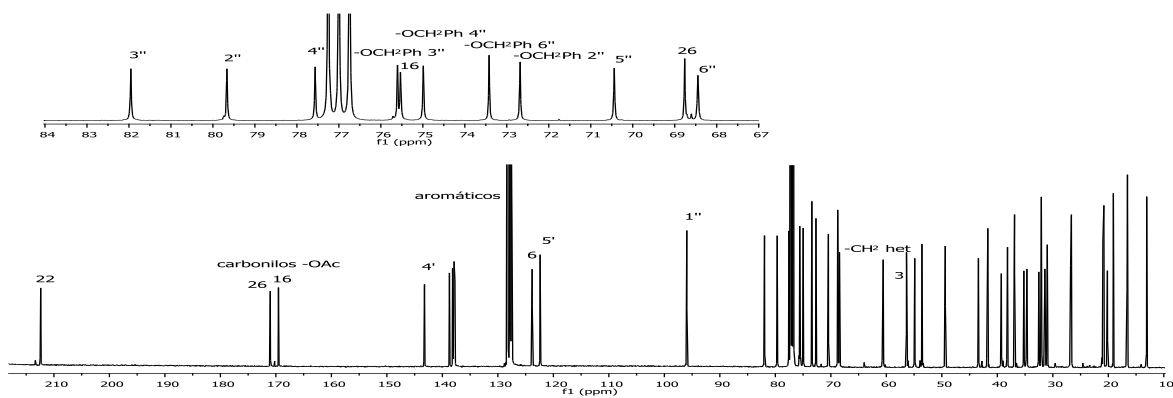
**Figura 29.** HMBC del compuesto **14**. Acoplamiento de los carbonos del azúcar con los hidrógenos bencílicos.

Conociendo cada uno de los hidrógenos bencílicos se pudo asignar el carbono correspondiente ayudándonos de un espectro de HSQC en donde se comprobó que cada carbono bencílico se relacionaba con los dos hidrógenos enlazados a él (**Figura 30**).



**Figura 30.** HSQC del compuesto **14**. Asignación de protones bencílicos.

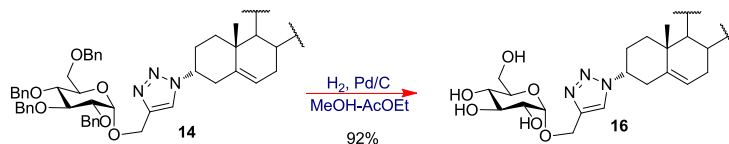
El espectro de RMN de <sup>13</sup>C muestra también los carbonos correspondientes al heterociclo, el C-4' en 143.2 ppm y el C-5' en 122.4 ppm; se observa además el -CH<sub>2</sub> unido al heterociclo hacia 60.6 ppm. En cuanto a la presencia del azúcar podemos observar las señales pertenecientes a los carbonos de la glucosa entre 82.0 ppm y 68.4 ppm excepto por el carbono anomérico C-1'' localizado en 96.0 ppm, en esta misma región aparecen las señales de los carbonos bencílicos. Las señales de los carbonos aromáticos se aprecian entre 138.7 y 127.5 ppm. Finalmente no se observa un cambio considerable en el desplazamiento de C-3 con respecto a la materia prima **10** (**Figura 31**).



**Figura 31.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **14**.

- **Diacetato de (25R)-3 $\alpha$ -{4'-[( $\alpha$ -D-glucopiranosil)-O-metil]-1'H-1',2',3'-triazol-1'-il}-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (16)**

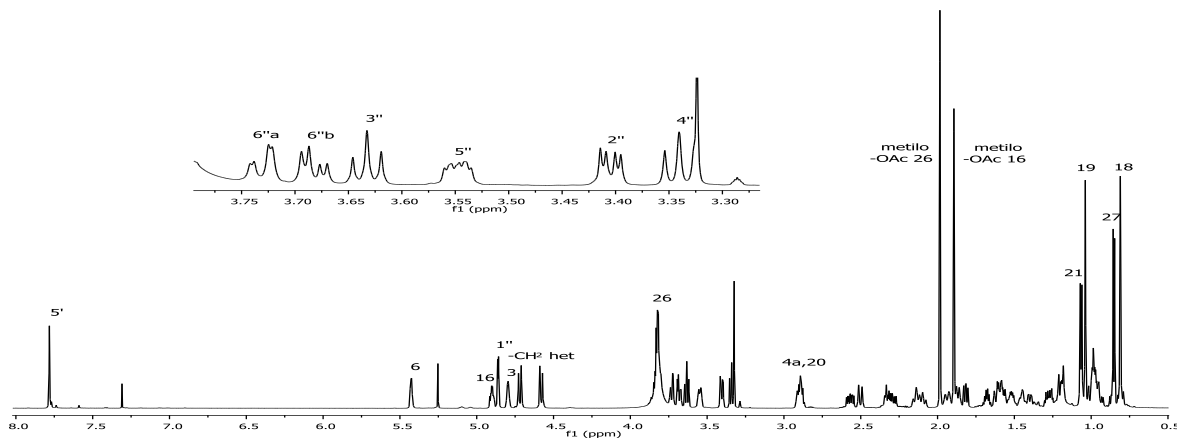
La desprotección de los hidroxilos de la glucosa se realizó utilizando H<sub>2</sub> y Pd/C como catalizador durante 7 horas (**Esquema 22**), los espectros de RMN comprobaron que durante este tiempo de reacción no se eliminó el doble enlace localizado en el C-5 de la molécula, en cambio la eliminación de los grupos bencilo se llevó a cabo de manera completa.



**Esquema 22.** Desprotección del glicoconjugado **14** para obtener el derivado **16**.

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H se puede apreciar la desaparición de las señales de los hidrógenos aromáticos así como de los hidrógenos bencilícos.

Se observa además un cambio en el desplazamiento de los hidrógenos pertenecientes al azúcar hacia frecuencias ligeramente más bajas. Además podemos corroborar la presencia del doble enlace al observar la señal en 5.42 ppm perteneciente al H-6 (**Figura 32**).



**Figura 32.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD) del compuesto **16**.

En el espectro de RMN de <sup>13</sup>C se observa también la desaparición de los carbonos aromáticos que se ubicaban alrededor de 130 ppm, así como de los carbonos bencilícos entre 75 y 72 ppm. Se observa además la permanencia de los carbonos de alqueno C-5 y C-6 en 137.9 y 123.8 ppm respectivamente.

El cambio en el desplazamiento de los carbonos del azúcar es más evidente en este espectro, se observan cambios de aproximadamente 8 ppm para cada carbono, excepto para C-5'' que no sufrió ningún cambio químico cercano. Los demás carbonos presentan un desplazamiento similar al de la materia prima **14** (Figura 33).

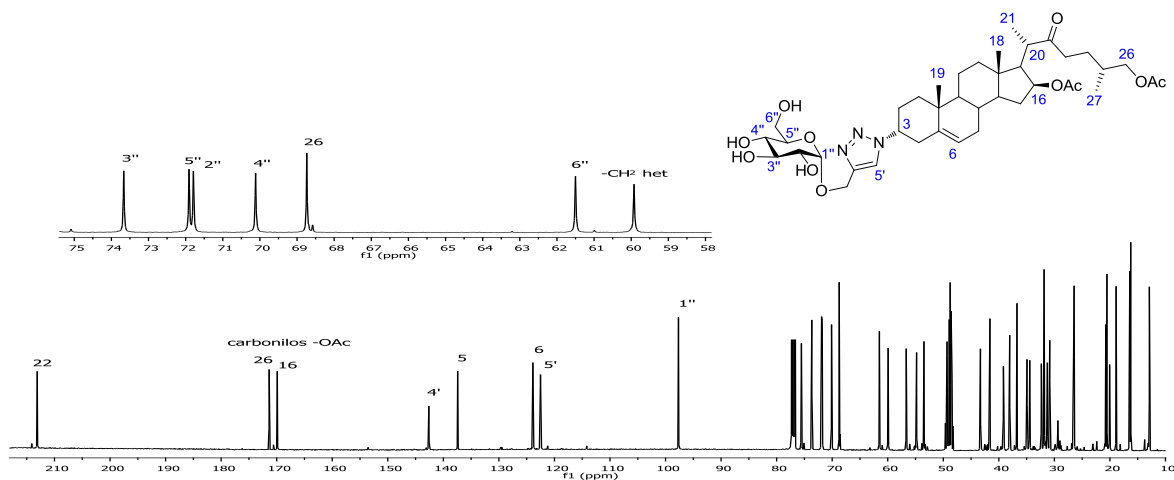


Figura 33. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto **16**.

El cambio en la configuración del C-3 que ocurrió por la reacción de sustitución  $\text{S}_{\text{N}}2$  en el compuesto **3** se corroboró en este derivado **16**. Mediante un experimento de RMN NOESY-1D se irradió selectivamente el H-3 en 4.79 ppm observando un efecto NOE en 5 señales. Las señales que mostraron un incremento en su intensidad fueron los hidrógenos H-4a en 2.90 ppm, H-4b en 2.50 ppm, H-2a en 2.15 ppm, H-2b en 2.10 ppm y los hidrógenos  $\text{CH}_3\text{-19}$  en 1.04 ppm (Figura 34).

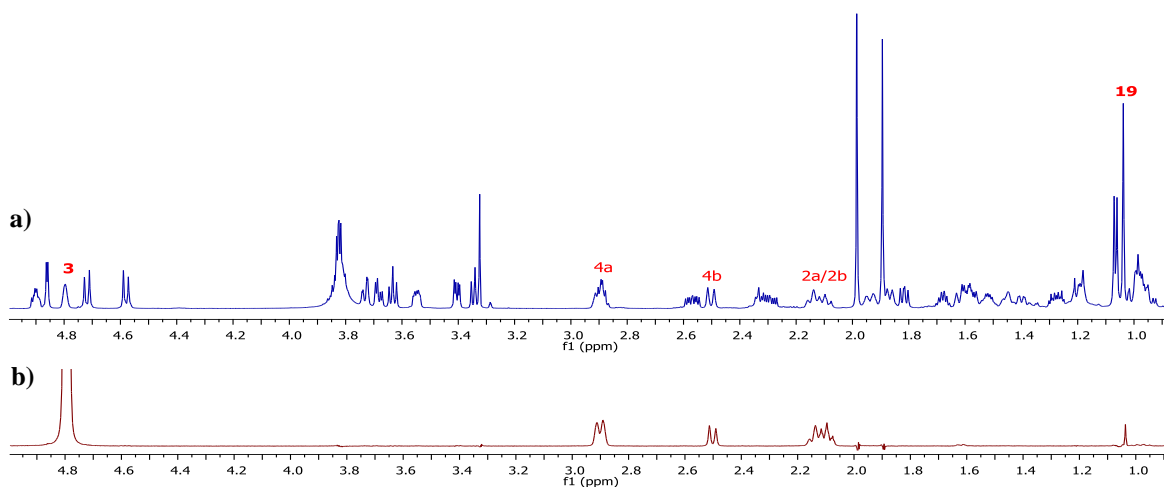


Figura 34. a) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **16**. b) Espectro de RMN NOESY-1D del compuesto **16**.

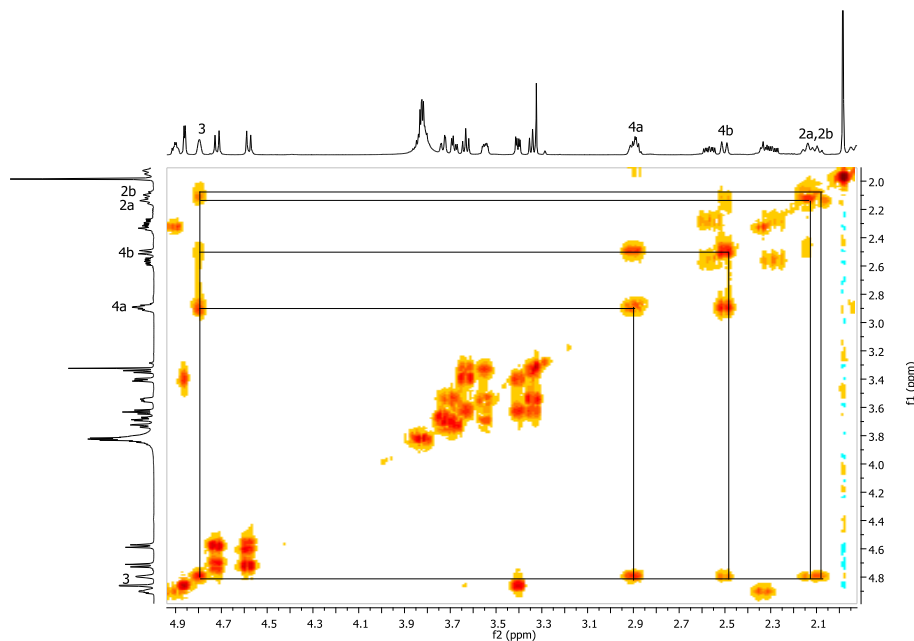


Figura 35. a) Espectro de 2D COSY del compuesto **16**.

Ya que los hidrógenos H-2 y H-4 se encuentran a 3 enlaces de distancia de H-3 se observó también su acoplamiento espín-espín mediante el experimento homonuclear de 2D COSY. Debido a que los cuatro hidrógenos vecinales a H-3 (H-2 y H-4) tuvieron un efecto NOE al irradiar esta señal, ninguno de ellos pudo darnos información acerca de la ubicación en el espacio de H-3 (**Figura 35**).

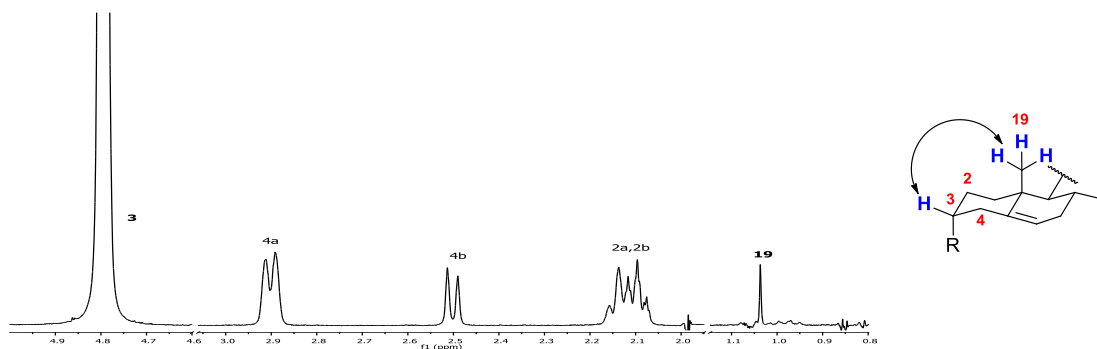
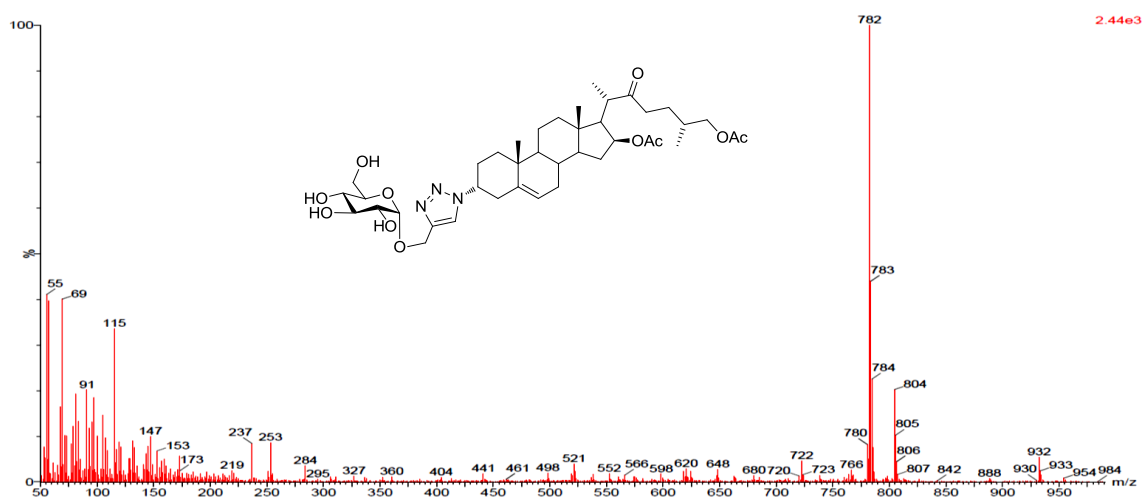


Figura 36. Ampliación del espectro de RMN NOESY-1D del compuesto **16**.

Sin embargo pudimos observar que la irradiación de H-3 tenía un efecto también en los hidrógenos CH<sub>3</sub>-19 indicando la cercanía de estos núcleos en el espacio. En el espectro NOESY-1D (**Figura 36**) podemos observar de manera más clara el incremento de cada una de las señales mencionadas, corroborando la posición  $\beta$  de H-3 y con ello la inversión de la configuración en **3**.

En la **figura 37** podemos observar el espectro FAB del compuesto **16** en donde se observa el pico  $[M+Na]^+$   $m/z = 782$  que al tener la mayor abundancia también es el pico base.

Se puede apreciar el pico isotópico  $[M+Na+1]^+$   $m/z = 783$  con una intensidad de aproximadamente 45% con respecto al pico  $[M+Na]^+$  y que se debe a la contribución de cada isótopo (número de átomos y de su abundancia en la naturaleza).

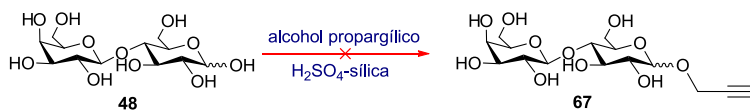


**Figura 37.** Espectro de masas del compuesto **16**.

Ya que la fórmula del compuesto es  $C_{40}H_{61}N_3O_{11}Na$  la contribución isotópica es calculada de la siguiente manera:

$$\text{Contribución isotópica} = 40(1.12) + 61(0.015) + 3(0.366) + 11(0.037) = 47.2\%$$

Por otra parte, se empleó la misma metodología descrita para obtener el derivado de glucosa **16** (**Esquema 20**) para obtener un glicoconjugado derivado de lactosa, sin embargo en el primer paso que consistía en la propargilación del hidroxilo anomérico de la lactosa (**48**) se observó el producto de hidrólisis confirmado por espectros de RMN y espectrometría de masas y no el azúcar **67** deseado (**Esquema 23**).



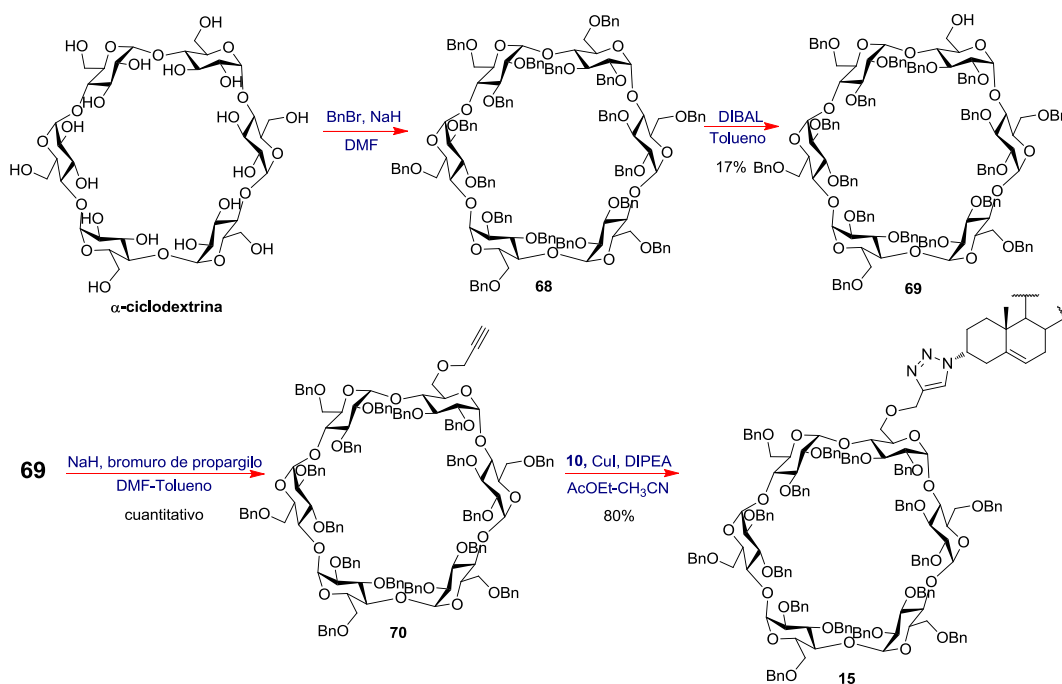
**Esquema 23.** Propargilación de lactosa (**48**).

- **2<sup>A-F</sup>, 3<sup>A-F</sup>, 6<sup>B-F</sup>-Heptadecaquis-O-bencil-6<sup>A</sup>-O-{1'[(25''R)-16''β,26''-diacetoxi-22''-oxocolest-5''-en-3''α-il]-(1'H-1',2',3'-triazol-4'-il)metil}-α-ciclodextrina (15)**

La síntesis del glicoconjugado que tiene como glicona una α-ciclodextrina se realizó mediante la siguiente metodología.

La α-ciclodextrina perbencilada **68** se trató con DIBAL-H, el cual se ha empleado en la bibliografía para la desbencilación regioselectiva de carbohidratos y muy particularmente de ciclodextrinas, obteniendo derivados mono hidroxilados o di-hidroxilados en las posiciones relativas 6<sup>A,D</sup>; de esta manera se obtuvo como producto minoritario el monoalcohol **69**.<sup>55</sup> El posterior tratamiento de este derivado con NaH y bromuro de propargilo permitió obtener la propargil-α-ciclodextrina **70**.

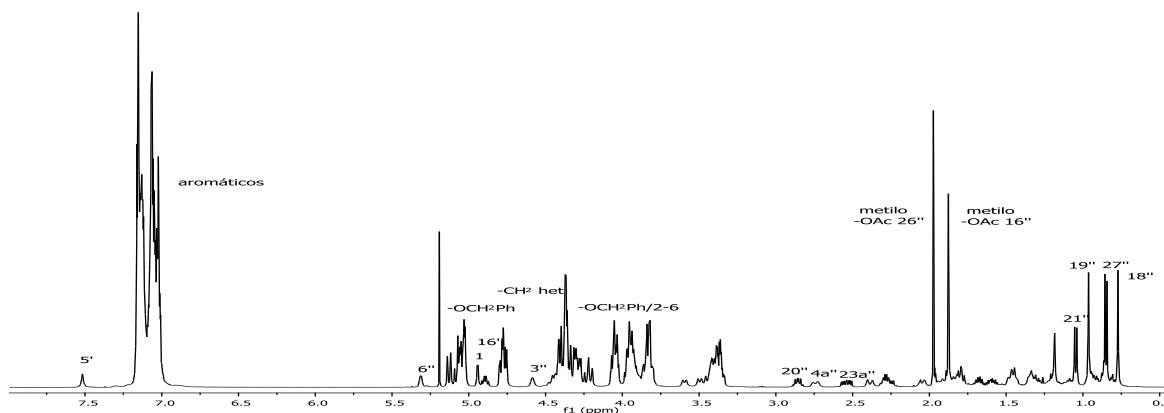
Finalmente se llevó a cabo el acoplamiento del derivado **70** con la azida esteroidal **10** en presencia de CuI y DIPEA, lo que condujo a la obtención del glicoconjugado **15**; a diferencia del glicoconjugado derivado de glucosa **14**, el derivado **15** necesitó casi 2 días para reaccionar completamente debido al impedimento estérico generado por la ciclodextrina (**Esquema 24**).



**Esquema 24.** Obtención del glicoconjugado **15**.

En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H del derivado **15** se puede observar la presencia de ambas partes que forman el glicoconjugado. La presencia del azúcar la corroboramos por las señales de los

hidrógenos aromáticos entre 7.16 y 7.01 ppm, los hidrógenos bencílicos que aparecen de 5.13 a 4.20 ppm y los hidrógenos del azúcar que se encuentran entre 4.07 y 3.34 ppm. Se observa el hidrógeno anomérico del azúcar unido al triazol en 4.94 ppm mientras que los demás hidrógenos anoméricos aparecen entre 5.13 y 5.02 ppm.



**Figura 38.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **15**.

Por otro lado las señales del esteroide se aprecian con mucho menor intensidad y se pueden observar algunos cambios en los desplazamientos de los hidrógenos, principalmente de H-3'' hacia frecuencias más altas en 3.87 ppm. Se observa además la presencia del nuevo heterociclo formado, en 4.45 ppm la señal correspondiente al metileno unido al triazol y más evidente la señal del hidrógeno del heterociclo H-5' en 7.52 ppm (**Figura 38**).

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestra las señales del azúcar entre 81 y 69 ppm excepto los carbonos anoméricos localizados entre 98.7 y 98.5 ppm. Los carbonos bencílicos se localizan entre 72 y 76 ppm. Las señales de los carbonos pertenecientes al heterociclo se encuentran en 143.7 y 122.0 ppm para C-4' y C-5' respectivamente y el metileno unido al triazol aparece en 64.7 ppm. El C-3'' en este caso no muestra un cambio en su desplazamiento a diferencia del espectro de hidrógeno.

Las demás señales correspondientes al esteroide presentan desplazamientos muy similares al de la materia prima **10** (**Figura 39**).

Los espectros de 2D homo y heteronucleares tales como COSY, HSQC y HMBC fueron muy útiles en la asignación de las señales del compuesto.

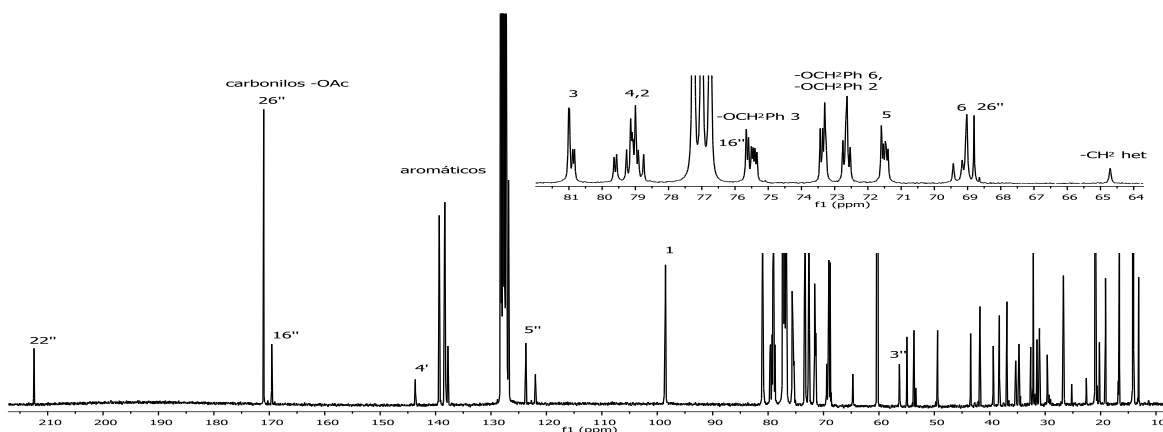
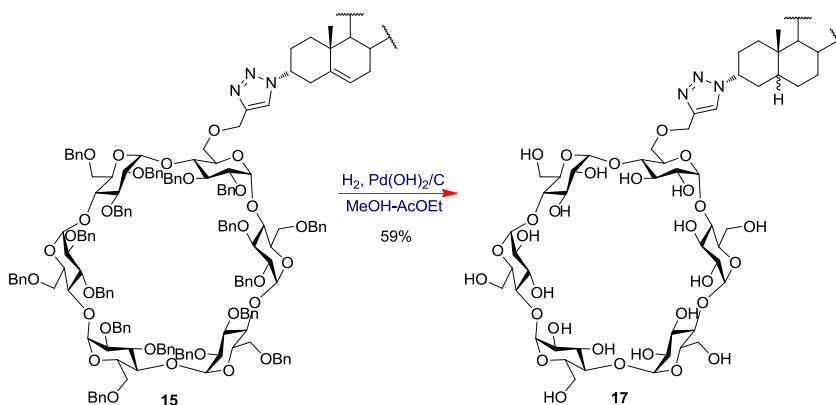


Figura 39. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **15**.

- **6<sup>A</sup>-O-{1'[(25''R)-16''β,26''-Diacetoxi-22''-oxo-5''ξ-colestan-3''α-il]-(1'H-1',2',3'-triazol-4'-il)metil}-α-ciclodextrina (17)**

La desprotección de los hidroxilos de la α-ciclodextrina se realizó utilizando  $\text{H}_2$  e  $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  como catalizador (**Esquema 25**); sin embargo ya que el compuesto necesitó de 4 días bajo estas condiciones para que los bencilos se eliminaran completamente, el doble enlace ubicado en el C-5'' se hidrogenó también.



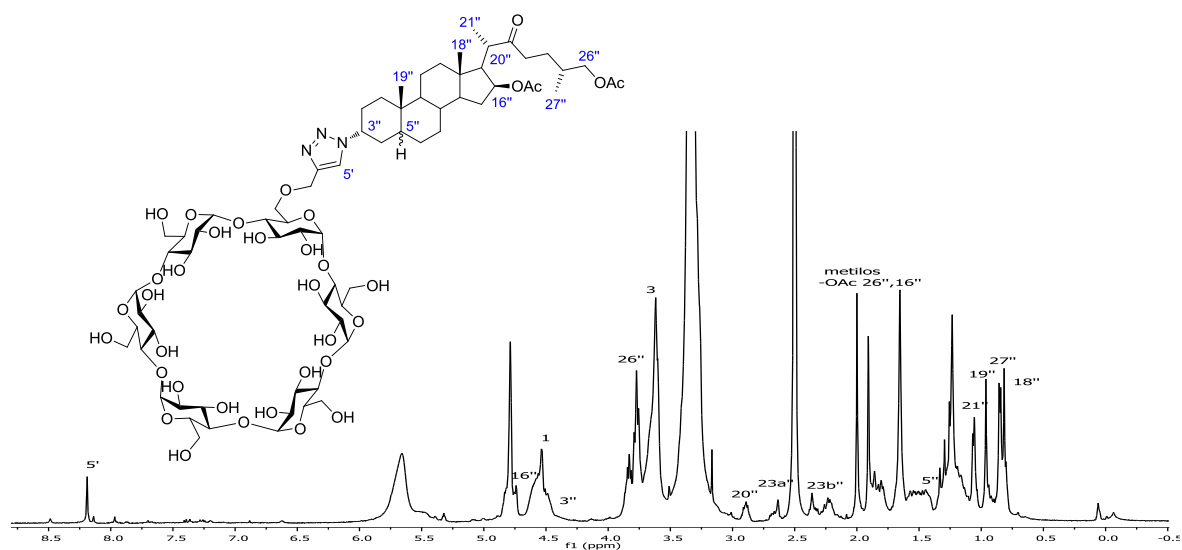
Esquema 25. Desprotección del derivado **15** para obtener el glicoconjugado **17**.

La desprotección de los 17 hidroxilos hizo que la solubilidad de la molécula se viera afectada por lo que solamente fue posible solubilizarla en DMSO. De igual manera la espectroscopia de RMN se realizó utilizando  $\text{DMSO}-d_6$  como disolvente.

En la **figura 38** se muestra el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en el que se observa un espectro más complejo debido a que en DMSO se observa el acoplamiento con los grupos CH-OH.

El espectro muestra la ausencia de las señales pertenecientes a los hidrógenos bencílicos, así como la desaparición de los hidrógenos aromáticos. Se observan también señales presentes entre 3.86 y 3.23 ppm que corresponden a los hidrógenos de la ciclodextrina.

La configuración del nuevo carbono quiral C-5'' formado por la hidrogenación del doble enlace no pudo ser determinada debido a que H-5'' en 1.45 ppm no aparece como una señal aislada, sino que se encuentra inmersa en una gran cantidad de señales; un experimento NOESY de la muestra no daría resultados fiables y ya que no se obtuvieron cristales de **17** tampoco se pudo realizar la difracción de rayos X (**Figura 40**).



**Figura 40.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ) del compuesto **17**.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  podemos observar también la desaparición de las señales pertenecientes a los carbonos aromáticos y bencílicos, además se observa un cambio en el desplazamiento de los carbonos correspondientes a la ciclodextrina, excepto para los C-5.

Se puede apreciar también en el espectro la desaparición de C-5'' y C-6'' de la región de los carbonos vinílicos confirmando la hidrogenación del doble enlace (**Figura 41**).

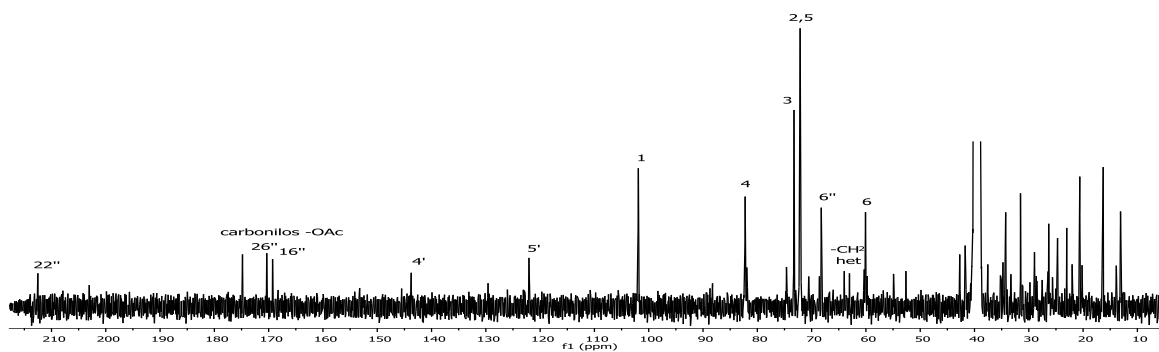


Figura 41. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ) del compuesto **17**.

En el espectro de masas del compuesto **17** se puede observar el pico  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  con  $m/z = 1577$  y el pico base  $m/z = 57$  (Figura 42).

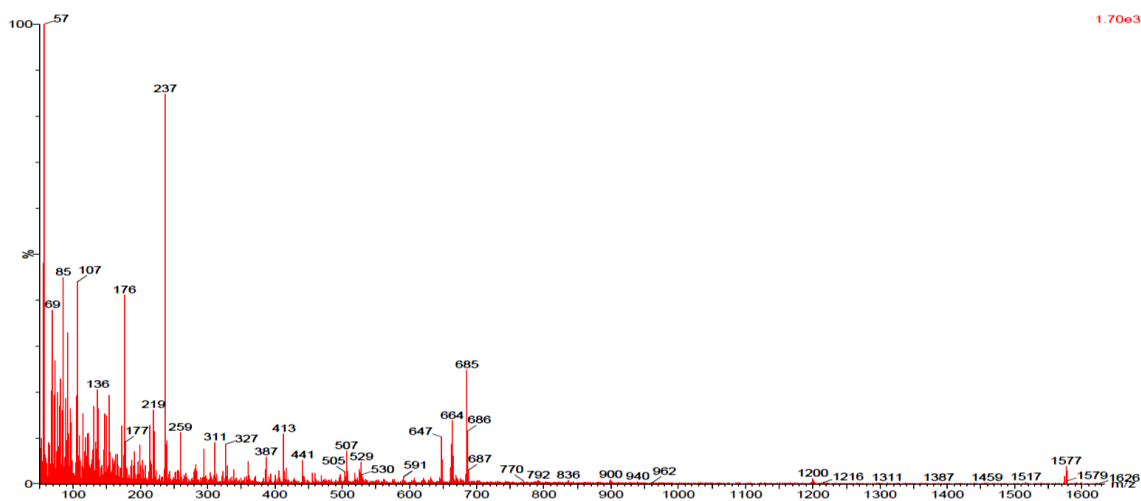
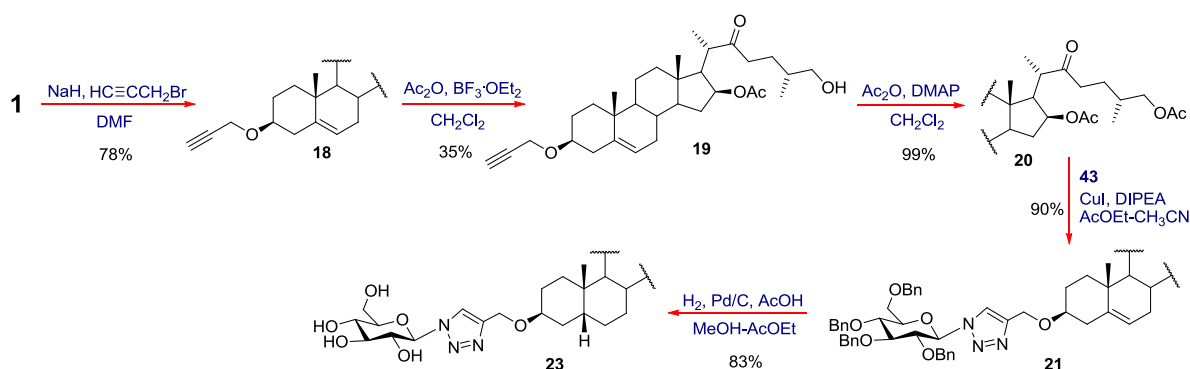


Figura 42. Espectro de masas del compuesto **17**.

#### 4.1.3.2 Click chemistry. Anillo de triazol unido directamente a carbohidrato.

Se ha observado que pequeños cambios en la conectividad de la molécula pueden generar un cambio brusco en la actividad biológica de ésta, así pues, decidimos realizar el acoplamiento mediante el anillo de triazol en donde el dipolarófilo se encontrara en el esteroide y el dipolo 1,3 (azida) en el azúcar. Con esta metodología se obtuvieron glicoconjugados (derivados de glucosa y lactosa) en donde el anillo de triazol se encuentra directamente unido al carbohidrato, además ya que no se realiza ningún cambio en la estereoquímica del C-3 del esteroide la configuración en los

derivados permanece  $\beta$ . En primer lugar se sintetizó el glicoconjugado derivado de glucosa **23**. La metodología para su obtención se muestra en el **esquema 26**.



**Esquema 26.** Obtención del glicoconjugado **23**.

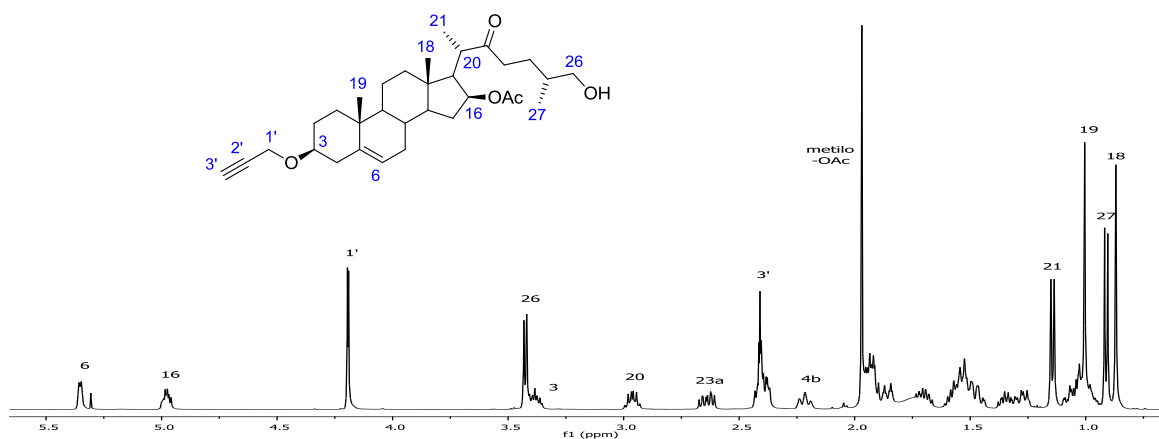
- **(25R)-3β-O-(Prop-2'-inil)espirost-5-eno (18)**

La síntesis de este compuesto se realizó siguiendo la metodología de Pérez-Labrada *et al.*<sup>35b</sup> En primer lugar se llevó a cabo la formación del derivado **18** utilizando NaH y bromuro de propargilo bajo condiciones anhidras e inertes. Se observó que la reacción es muy sensible a estas condiciones y a pesar de realizar cambios en el tiempo de reacción y aumentar la relación molar de los reactivos con respecto a la materia prima, la diosgenina (**1**) nunca se consumió por completo; sin embargo se obtuvo un rendimiento similar al reportado en la literatura (74%).

- **Acetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxo-3β-O-(prop-2'-inil)-colest-5-en-16β-ilo (19)**

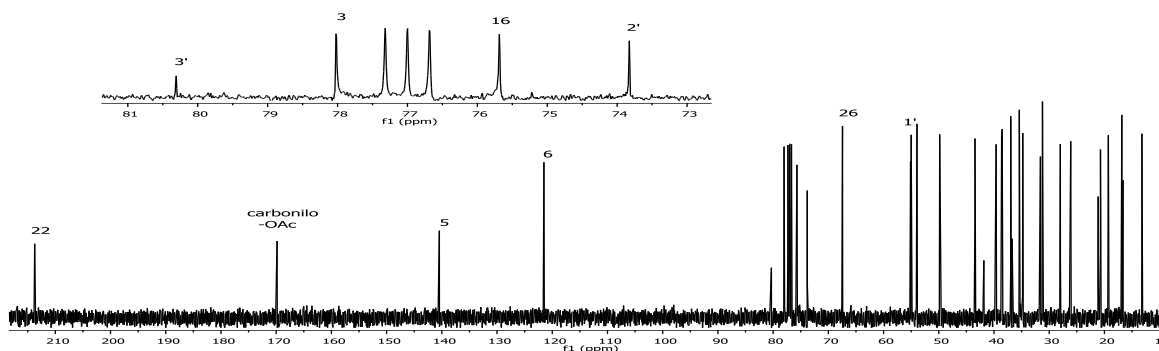
La síntesis del derivado **19** se realizó de manera análoga al derivado **4** utilizando  $\text{Ac}_2\text{O}$  y  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , sin embargo el rendimiento experimental obtenido fue mucho menor que **4** al obtenerse una mayor cantidad de los subproductos de reacción. El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  muestra la apertura selectiva de los anillos E y F; se puede observar el desplazamiento de H-16 hacia frecuencias más altas con respecto a la materia prima **18**, así como el cambio notable de los hidrógenos diasterotópicos H-26 que al igual que en el derivado **4** aparecen como una señal doble con una  $J$  vecinal con H-25 de 5.8 Hz y una  $J_{\text{gem}} = 0$ . Se aprecian además los hidrógenos pertenecientes al grupo *O*-propargilo en C-3, los hidrógenos H-1' se observan como una señal doble con  $J$  pequeña igual a 2.4 Hz que surge del

acoplamiento de largo alcance con H-3' que a su vez se muestra como una señal triple (**Figura 43**). Para una mejor comparación, los  $\delta$  de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los derivados **4**, **18** y **19** se muestran en la **tabla 2**.



**Figura 43.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **19**.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observan las señales que corroboran la apertura de los anillos y la mono-acetilación en C-16. Se aprecia la nueva señal del carbonilo de la cetona en C-22 ubicada en 213.7 ppm así como la única señal de carbonilo de acetato en el C-16 hacia 170 ppm.



**Figura 44.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **19**.

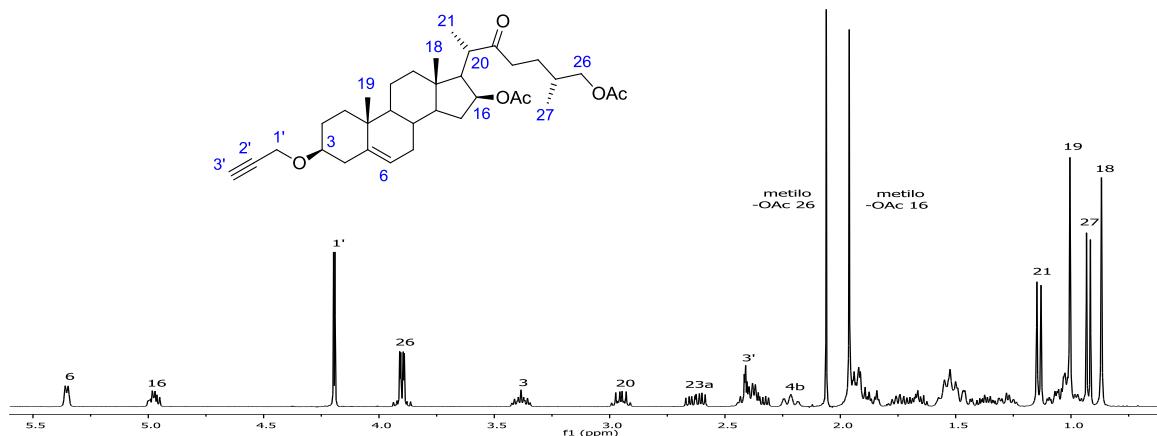
El C-26 no muestra un cambio significativo en su desplazamiento con respecto a **18** aunque las señales cercanas a C-26 si lo tienen, especialmente C-23 cercano a la nueva cetona formada en C-22 que tiene un cambio en su desplazamiento de 7 ppm hacia frecuencias más altas. Se observan además las señales del grupo *O*-propargilo en C-3; el metino C-3' en 80.3 ppm, el carbono cuaternario C-2' en 73.8 ppm y el metileno C-1' en 55.1 ppm (**Figura 44**).

Posición	4*		18 <sup>35b,*</sup>		19**	
	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1		33.5		37.0	1.86 (m)	37.0
2		26.1		28.1		28.0
3	3.86 (m)	58.1	3.39 (m)	78.1	3.40 (m)	78.0
4	2.44 (m), 2.13 (m)	36.0		38.7	2.38 (m), 2.21 (m)	38.6
5		138.0		140.4		140.4
6	5.36 (m)	122.8	5.35 (m)	121.5	5.35 (m)	121.5
7		31.5		32.1		31.6
8		31.1		31.4		31.2
9		49.6		50.1		49.8
10		37.0		37.1		36.7
11		20.4		20.9		20.7
12		39.6		39.8	1.28 (m)	39.6
13		41.8		40.3		41.8
14		53.9		56.5		53.9
15	2.35 (m)	34.8		31.9	2.40 (m)	34.8
16	4.96 (ddd)	75.7	4.40 (m)	80.8	4.98 (ddd)	75.7
17		55.0		62.0		55.0
18	0.84 (s)	13.2	0.79 (s)	16.4	0.87 (s)	13.2
19	0.98 (s)	19.0	1.01 (s)	19.4	1.0 (s)	19.3
20	2.93 (dq)	43.5		41.6	2.96 (dq)	43.4
21	1.12 (d)	16.8	0.97 (d)	14.6	1.14 (d)	16.8
22		213.7		109.2		213.7
23	2.60 (ddd), 2.33 (ddd)	38.5		31.5	2.64 (ddd), 2.40 (m)	38.5
24		26.0		28.8	1.70 (m), 1.34 (m)	26.1
25		35.4		30.3		35.4
26	3.40 (d)	67.5	3.36 (t, <i>ax</i> ), 3.47 (dd, <i>ec</i> )	66.8	3.42 (d)	67.4
27	0.89 (d)	16.6	0.78 (d)	17.2	0.91 (d)	16.6

**Tabla 2.** Desplazamientos de RMN ( $\delta$ , ppm) de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, \*400 MHz, \*\*500 MHz) y <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, \*100 MHz, \*\*125 MHz) de los derivados **4**, **18** y **19**.

- **Diacetato de (25R)-22-oxo-3 $\beta$ -O-(prop-2'-inil)-colest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (20)**

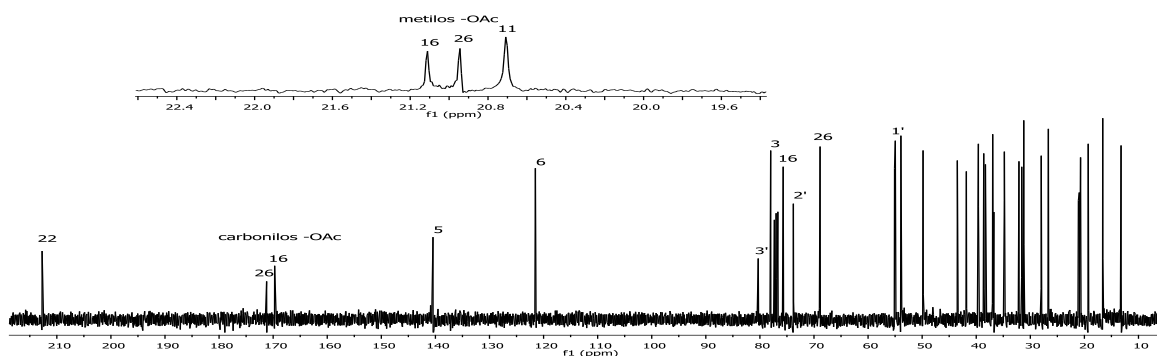
Con la finalidad de aumentar la estabilidad del compuesto **19**, se realizó la acetilación del C-26 utilizando Ac<sub>2</sub>O y DMAP.



**Figura 45.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **20**.

La reacción se llevó a cabo de manera rápida y con un rendimiento prácticamente cuantitativo (99%). El espectro de RMN de <sup>1</sup>H muestra como señales más evidentes la nueva señal en 2.06 ppm que pertenece al nuevo metilo del acetato formado en C-26 así como un cambio en el  $\delta$  de H-26 hacia frecuencias más altas en aproximadamente 0.5 ppm con respecto al compuesto **19** (**Figura 45**).

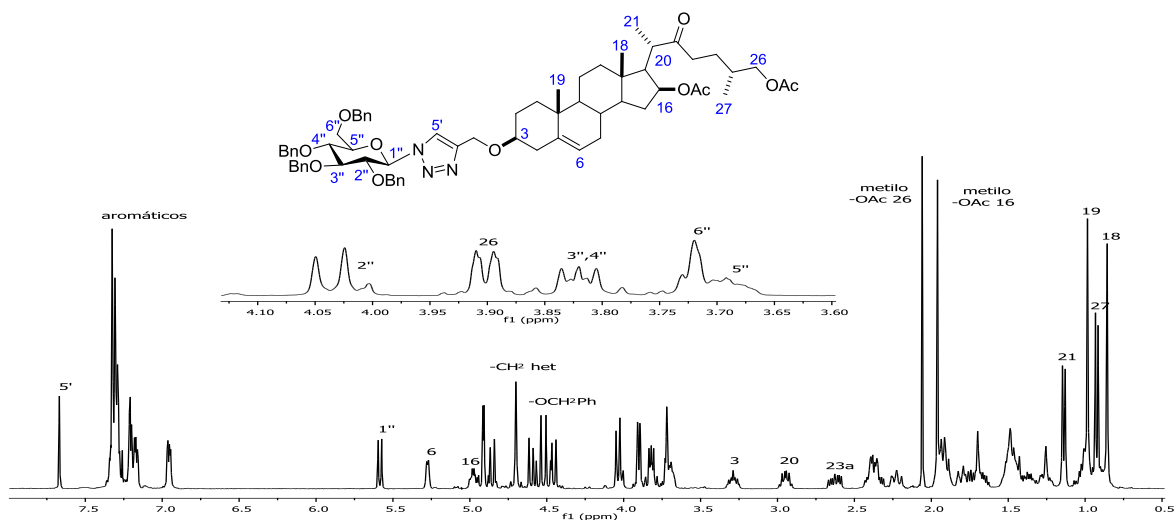
El espectro de RMN de <sup>13</sup>C no muestra muchos cambios con respecto a la materia prima **19**, pero se puede apreciar la aparición de dos nuevas señales que pertenecen al grupo acetato formado en el C-26, hacia 171.2 ppm se encuentra el carbonilo del éster y en 20.9 ppm el metilo del acetato (**Figura 46**).



**Figura 46.** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **20**.

- **Diacetato de (25R)-3 $\beta$ -O-[1'-(2'',3'',4'',6''-tetra-O-bencil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (21)**

La síntesis del glicoconjugado esteroidal derivado de glucosa se llevó a cabo realizando el acoplamiento del derivado **20** y el azúcar **43**, utilizando CuI como catalizador y DIPEA como base para dar una reacción de cicloadición 3+2 tipo *click chemistry*. El producto se obtuvo de manera rápida y en un buen rendimiento experimental (90%). Además, al igual que en los demás derivados de triazol sintetizados solamente se obtuvo el derivado 1,4-disustituido. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se puede observar la parte glicosídica y la parte esteroidal del compuesto, así mismo se aprecian las señales que muestran la formación del anillo de triazol. En primer lugar observamos una señal simple hacia frecuencias altas que corresponde al hidrógeno aromático del anillo de triazol H-5', así mismo se observan los hidrógenos diasterotópicos del metileno unido al heterociclo en 4.70 ppm como una señal simple. Se aprecia también la presencia de los hidrógenos del azúcar entre 3.6 y 4.0 ppm aproximadamente excepto por el hidrógeno anomérico H-1'' localizado en 5.58 ppm con una  $J = 9.1$  ppm correspondiente al anómero  $\beta$ ; se puede ver además los metilenos de los grupos bencilo entre 4.93 y 4.04 ppm y los hidrógenos aromáticos hacia 7.0 ppm aproximadamente. Finalmente las señales pertenecientes al esteroide no muestran cambios significativos en su desplazamiento al no existir transformaciones químicas cercanas al esqueleto esteroidal (**Figura 47**).



**Figura 47.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **21**.

La asignación de los hidrógenos pertenecientes a los metilenos de los grupos bencilo fue posible mediante la ayuda de experimentos de 2D tales como COSY, HSQC y HMBC, así como del estudio de las constantes de acoplamiento geminales (**Figura 48**).

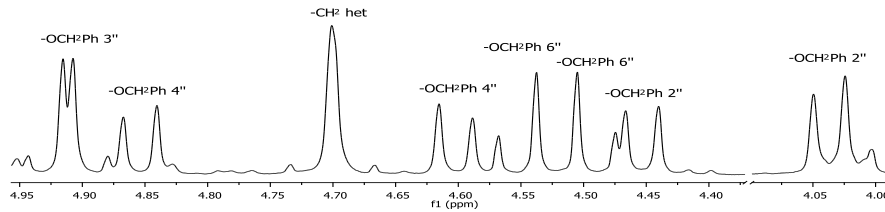


Figura 48. Asignación de hidrógenos bencílicos del compuesto **21**.

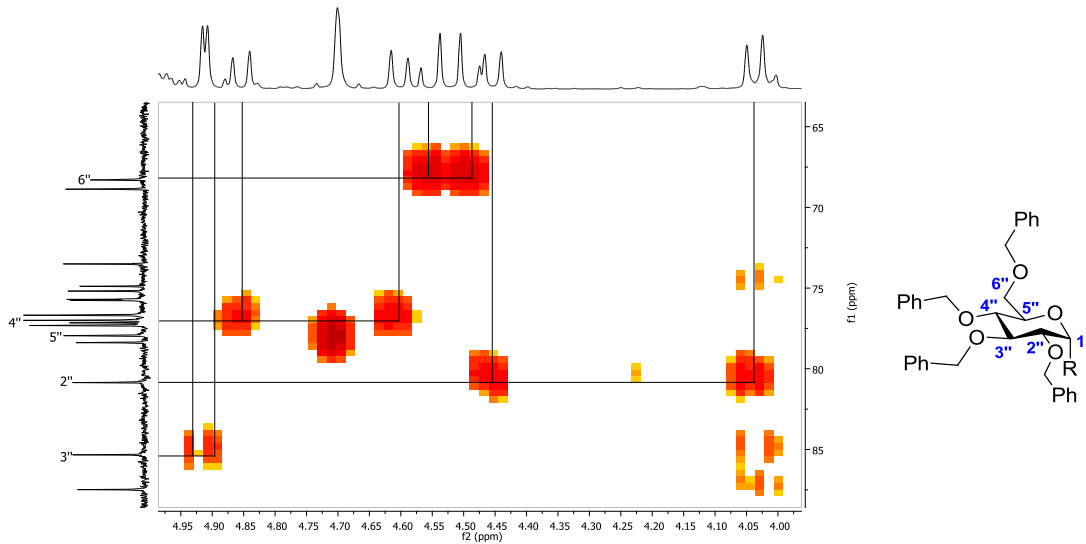


Figura 49. HMBC del compuesto **21**. Acoplamiento de los carbonos del azúcar con los hidrógenos bencílicos.

Mediante el experimento de 2D heteronuclear HMBC fue posible correlacionar los carbonos del azúcar con los hidrógenos  $\text{-OCH}_2\text{Ph}$ . Se puede observar cómo cada uno de los carbonos se correlaciona mediante tres enlaces con dos hidrógenos diastereotópicos de cada grupo bencilo (Figura 49).

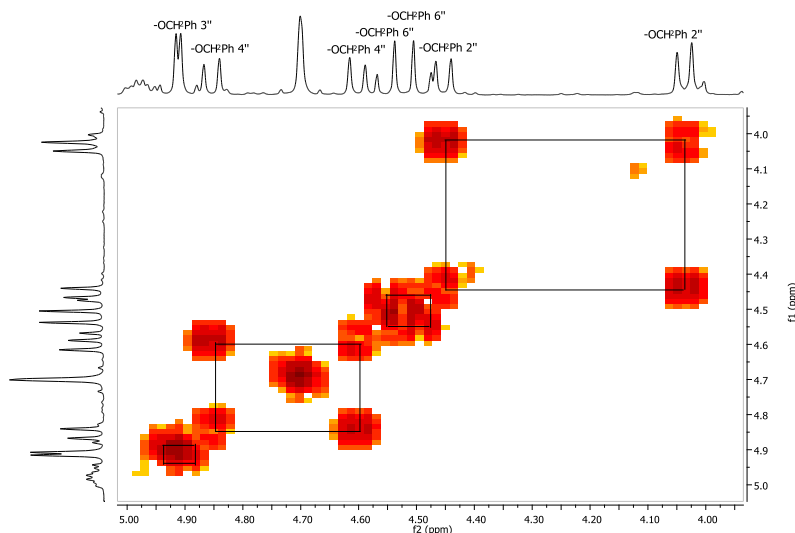
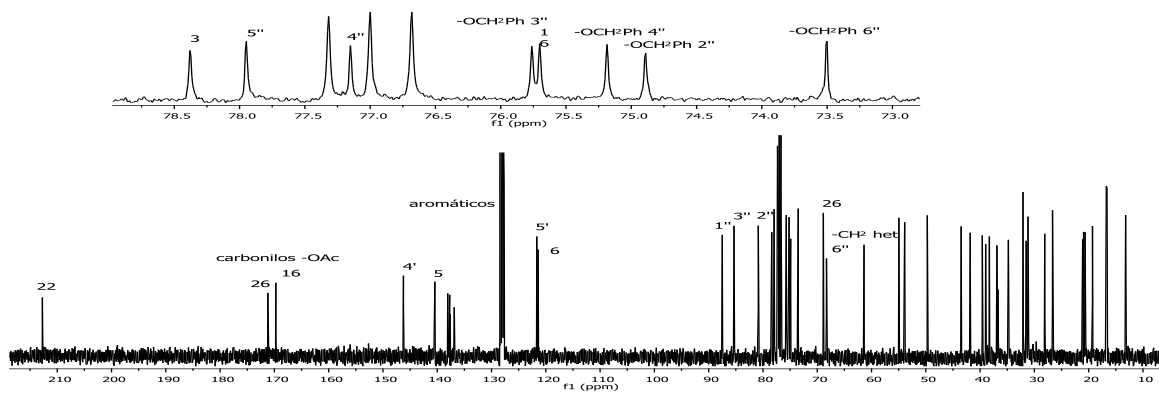


Figura 50. COSY del compuesto **21**. Acoplamiento geminal de los hidrógenos bencílicos.

Mediante el experimento de 2D homonuclear COSY pudimos comprobar que estos dos hidrógenos bencílicos que correlacionaban con cada carbono del azúcar se acoplaban entre sí, con lo que pudimos asignar estos hidrógenos geminales correctamente (**Figura 50**).



**Figura 51.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **21**.

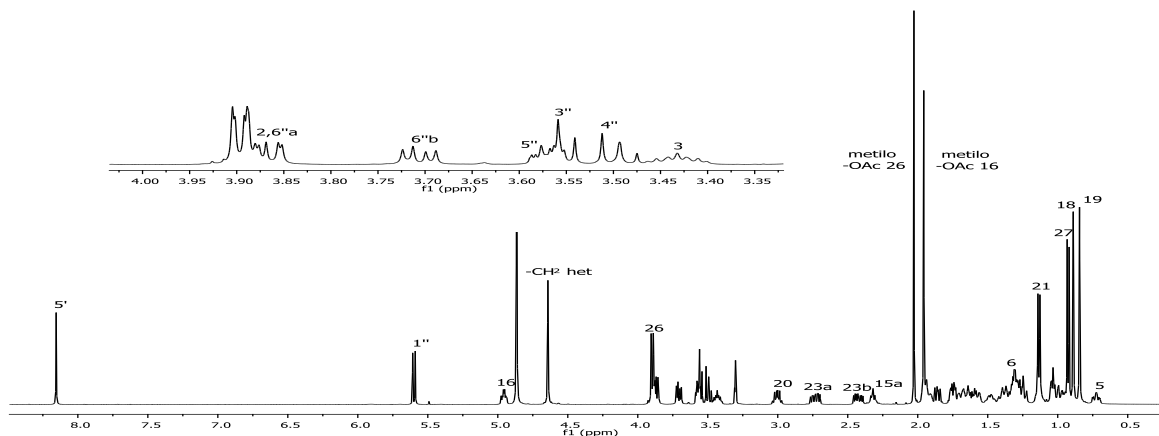
El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestra los carbonos pertenecientes al anillo de triazol C-4' y C-5' en 146.2 y 121.7 ppm respectivamente. Se observa además el carbono del  $-\text{CH}_2$  unido al heterociclo en 61.4 ppm y los carbonos del azúcar bencilado entre 87.5 y 68.3 ppm. Las demás señales pertenecientes al esqueleto esteroidal no muestran un cambio significativo en su desplazamiento (**Figura 51**).

- **Diacetato de (25R)-3 $\beta$ -O-[1'-( $\beta$ -D-glucopiranosil)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxo-5 $\alpha$ -colestano-16 $\beta$ ,26-diilo (**23**)**

La desprotección de los hidroxilos del azúcar se realizó utilizando  $\text{H}_2$  y Pd/C como catalizador en presencia de AcOH, ya que el débil carácter básico del triazol podría ralentizar la hidrogenación de los grupos bencilo. A diferencia del isómero **16**, la eliminación de los grupos bencilo del azúcar requirió un tiempo largo de reacción, lo que trajo como consecuencia la eliminación del doble enlace presente en C-5.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observa la desaparición de los hidrógenos aromáticos, así como de los hidrógenos bencílicos. Podemos apreciar también un cambio en el desplazamiento de los hidrógenos pertenecientes al azúcar hacia frecuencias más bajas, así como del hidrógeno del heterociclo hacia frecuencias más altas.

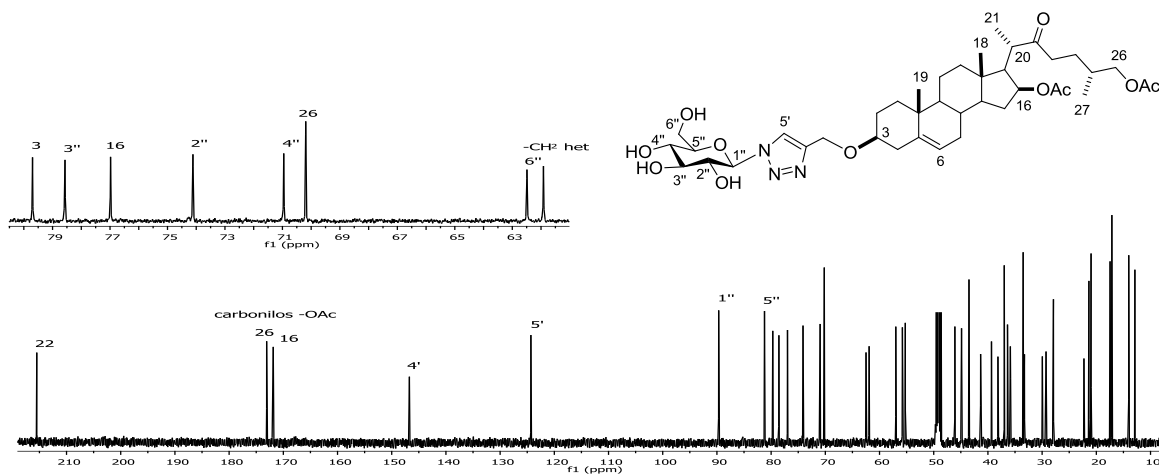
Finalmente se observa el cambio en el desplazamiento de los hidrógenos H-6 en aproximadamente 4 ppm hacia frecuencias más bajas con respecto al compuesto **21**, así como la aparición de una nueva señal hacia frecuencias bajas en 0.72 ppm que corresponde al hidrógeno del nuevo metino formado H-5, lo que corroboró la eliminación del doble enlace en la estructura (**Figura 52**).



**Figura 52.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **23**.

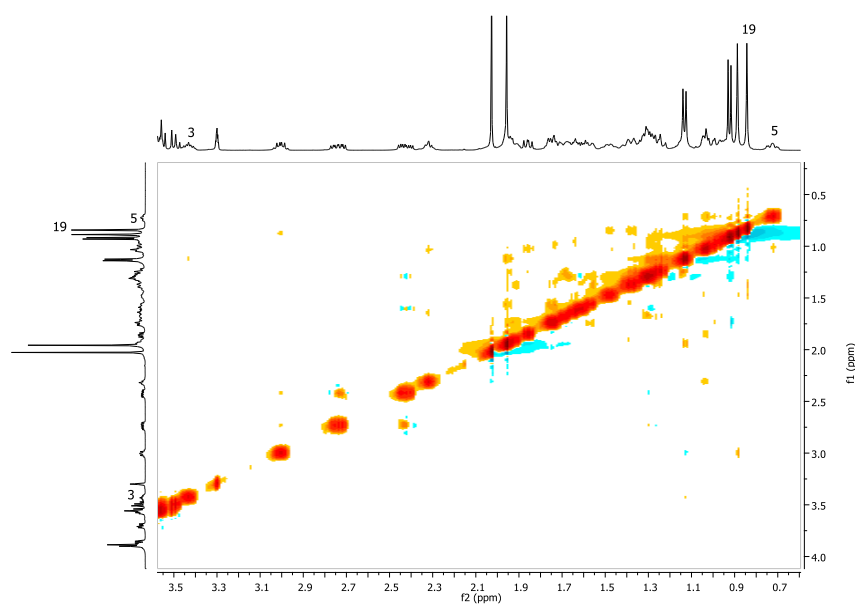
El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestra también la eliminación de los grupos bencilo, se observa la desaparición de los carbonos aromáticos así como de los carbonos bencílicos. Se aprecia al igual que en el espectro de  $^1\text{H}$  un cambio en el desplazamiento de los carbonos pertenecientes al azúcar de aproximadamente 5 ppm hacia frecuencias más bajas.

Finalmente el cambio evidente en el desplazamiento del C-5 y C-6 hacia 55.6 y 29.8 ppm respectivamente demuestra nuevamente la hidrogenación del doble enlace (**Figura 53**).



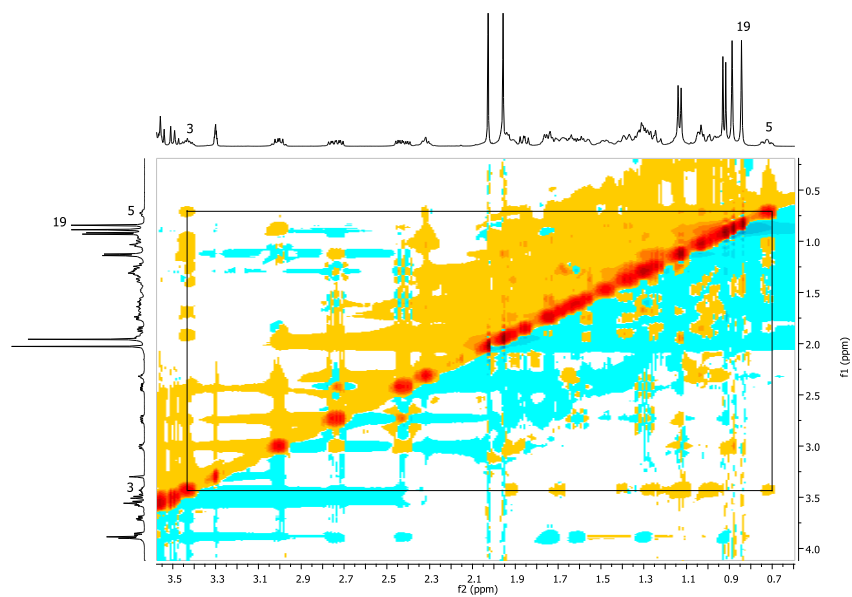
**Figura 53.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **23**.

Para determinar la configuración del nuevo centro quiral formado C-5 se llevó a cabo un experimento NOESY de 2D (**Figura 54**).



**Figura 54.** NOESY del compuesto **23**. No se observa acoplamiento en el espacio entre H-5 y H-19.

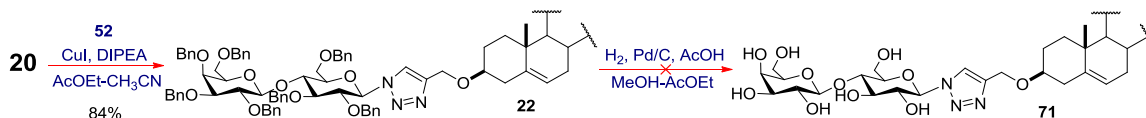
Para comprobar la configuración  $5\alpha$  del esteroide se buscó alguna correlación entre H-5 y algún hidrógeno ubicado en la parte posterior de la molécula; esta correlación pudo observarse con H-3, lo que confirma la posición de este hidrógeno en el espacio (**Figura 55**).



**Figura 55.** NOESY del compuesto **23**. Se observa un acoplamiento en el espacio entre H-5 y H-3.

- **Diacetato de (25R)-3β-O-[1'-(2'',3'',6'',2''',3''',4''',6''')-hepta-O-bencil-β-lactosil)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo (22)**

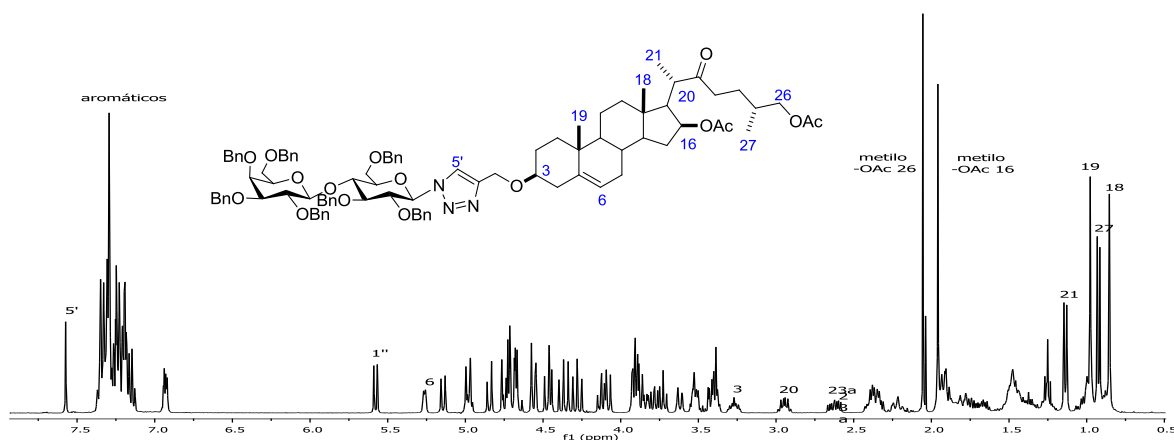
Para la obtención del glicoconjugado derivado de lactosa se siguió una metodología análoga a la utilizada para la formación del derivado **21** a partir del esteroide **20** y la azida de lactosa bencilada **52** empleando CuI y DIPEA. El derivado **22** se obtuvo en un tiempo corto de reacción (2.5 h) y en un rendimiento del 84%. Sin embargo, al intentar desproteger el azúcar no se logró la eliminación de todos los bencilos de la molécula a pesar de emplearse las mismas condiciones de desprotección utilizadas anteriormente para los demás derivados (**Esquema 27**).



*Esquema 27.* Obtención del glicoconjugado **22**.

A diferencia de los glicoconjugados sintetizados que poseen el anillo de triazol directamente unido al esteroide se observó que los derivados **21** y **22** reaccionan muy lentamente a las condiciones de hidrogenación debido probablemente a la diferencia en la configuración de C-3 y en la posición del heterociclo que influyen en la conformación que adopta la molécula.

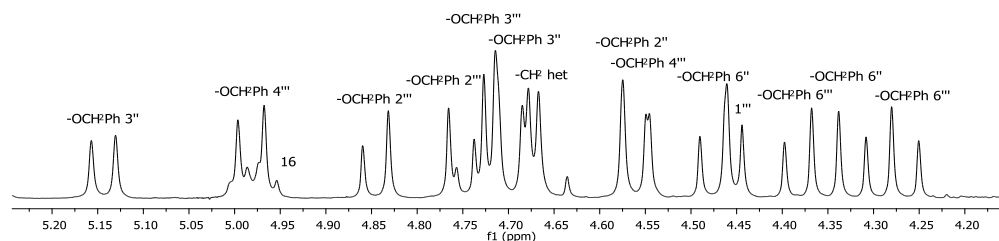
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del derivado bencilado **22** podemos observar las señales que muestran la presencia de la lactosa en la molécula, entre 4.12 y 3.38 ppm se observan los hidrógenos del azúcar excepto los anoméricos.



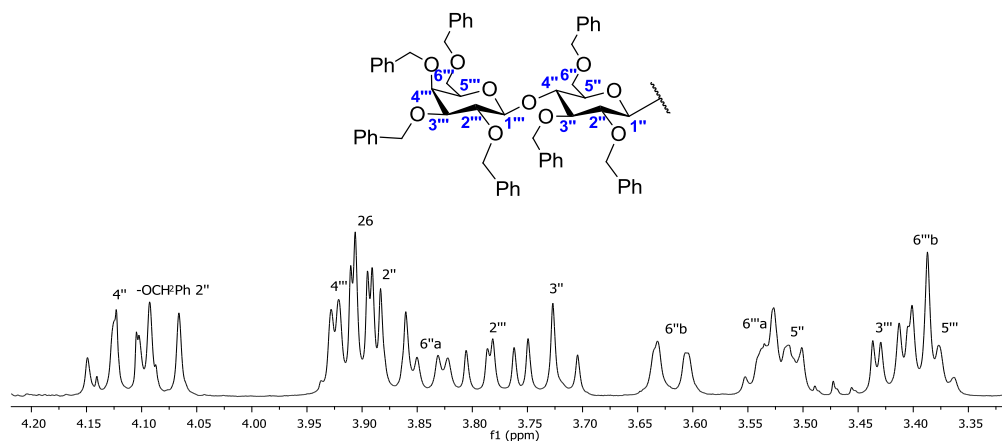
*Figura 56.* Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **22**.

El H-1'' cercano al heterociclo aromático, se localiza a frecuencias altas a 5.58 ppm con una  $J_{1'',2''} = 9.1$  Hz y pertenece a la unidad mosocarídica glucosa, H-1''' por el contrario se ubica a frecuencias más bajas hacia 4.45 ppm con una  $J_{1''',2'''} = 7.8$  Hz y corresponde a la unidad de galactosa. Se observa además la región entre 7.35 y 6.92 ppm que corresponde a los hidrógenos aromáticos de los grupos bencilo del azúcar, así como los metilenos del grupo ubicados entre 5.14 y 4.08 ppm. La señal H-5' que pertenece al nuevo heterociclo formado se ubica en 7.57 ppm y el metileno unido al triazol aparece como dos señales dobles en 4.69 y 4.65 ppm. Finalmente las señales que pertenecen al esqueleto esteroidal no muestran un cambio significativo en su desplazamiento químico (**Figura 56**).

La correcta asignación de las señales pertenecientes a los metilenos de los bencilos  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  así como de los hidrógenos de la lactosa fue posible mediante el estudio de los experimentos de RMN de 1D y 2D tales como DEPT, COSY, HSQC y HMBC. En la **figuras 57 y 58** se muestran expansiones de la región de 5.20 a 3.30 ppm en donde se muestra la asignación de los hidrógenos antes mencionados.



**Figura 57.** Expansión del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **22**. Región de los metilenos bencílicos.



**Figura 58.** Expansión de la región de la lactosa del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **22**.

El espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  muestra también las señales que evidencian el acoplamiento azúcar-esteroide. Se observan las señales de los carbonos de la lactosa entre 83.6 y 67.6 ppm excepto por los carbonos anoméricos ubicados en 102.6 ppm y en 87.4 ppm. Se observa que a diferencia de los hidrógenos anoméricos C-1'' se encuentra desplazado a frecuencias más bajas que C-1'''; en el caso del hidrógeno anomérico H-1'' éste se encuentra a frecuencias más altas que H-1''' al estar cercano al heterociclo aromático y dentro del cono desapantallante del anillo. Sin embargo en el caso del carbono, éste se ve más afectado por la electronegatividad de los átomos unidos a él. Podemos darnos cuenta entonces que C-1''' al estar unido a dos átomos electronegativos de oxígeno estará más desprotegido y aparecerá a frecuencias más altas que C-1''.

Se aprecian además las señales correspondientes a los carbonos aromáticos y bencílicos. Los carbonos pertenecientes al anillo de triazol aparecen en 146.1 y 121.1 ppm para C-4' y C-5' respectivamente. Finalmente las señales correspondientes al esteroide tienen desplazamientos similares al de la materia prima **20** (Figura 59).

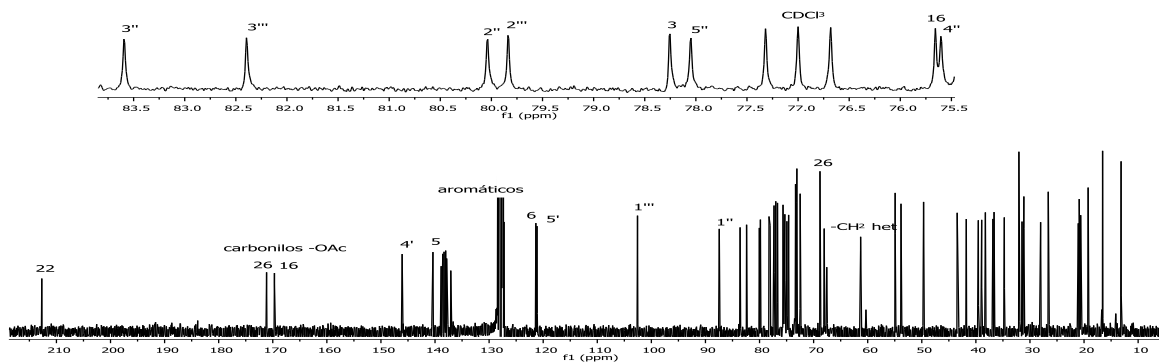


Figura 59. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto **22**.

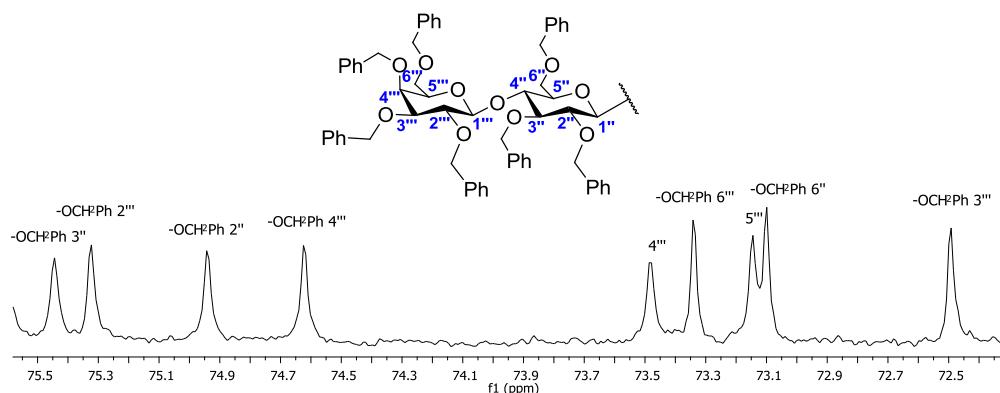


Figura 60. Expansión del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **22**. Región de los carbonos bencílicos.

Al igual que en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , los carbonos que pertenecen a la lactosa así como los carbonos bencílicos  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  se asignaron con ayuda de espectros de RMN de 1D y 2D. En la **figura 60** se muestra una expansión del espectro de  $^{13}\text{C}$  para apreciar la asignación de los carbonos bencílicos del disacárido.

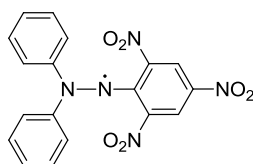
## 4.2 Pruebas biológicas

### 4.2.1 Actividad antioxidante

Ya que distintos derivados de selenio reportados en la literatura han mostrado una actividad antioxidante importante,<sup>56,8</sup> la selenourea **13** se sometió a cinco distintas pruebas de antioxidación: capacidad de captación de radicales libres, captación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , protección frente a la peroxidación de lípidos y captación de óxido nítrico usando métodos colorimétricos; sin embargo, solamente mostró actividad importante en la primera prueba. Su actividad como posible imitador de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) fue estudiada también mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ .

#### 4.2.1.1 Ensayo de capacidad de captación de radicales libres (DPPH)

La actividad antirradicalaria de la selenourea **13** se midió utilizando el compuesto comercial 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (**Figura 61**), un radical libre estable que ha sido ampliamente utilizado para estudiar la actividad antirradicalaria de diversos antioxidantes.<sup>57</sup>

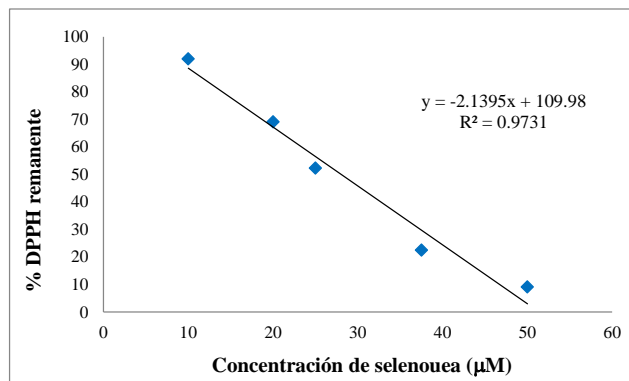


**Figura 61.** Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).

Este ensayo estudia la disminución de la absorbancia a concentraciones crecientes del antioxidante. El radical DPPH en disolución exhibe una fuerte coloración morada al tener una fuerte absorción a 515 nm, pero cuando el radical es reducido por un agente antioxidante se obtiene una disolución amarilla, de manera que existe una relación inversa entre la concentración del DPPH y la actividad del antioxidante estudiado.

En la **figura 62** se presenta una de las gráficas de los tres ensayos realizados para este compuesto donde se representa la variación de la concentración del DPPH remanente frente a la concentración

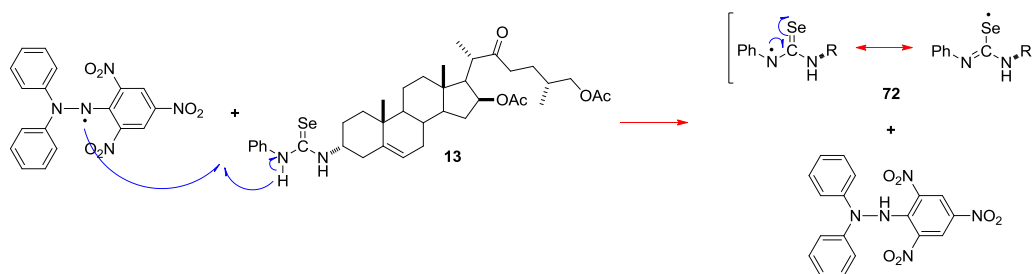
del antioxidante utilizado. A partir de la gráfica de regresión lineal se interpoló el valor de  $EC_{50}$ , es decir, la concentración del antioxidante necesario para reducir la concentración del DPPH al 50% de su valor inicial.



**Figura 62.** Representación del % DPPH remanente frente a la concentración de la selenourea **13** utilizada ( $\mu\text{M}$ ).

El derivado **13** mostró un  $EC_{50} = 31.82 \pm 9.99 \mu\text{M}$ , una actividad similar o incluso mejor que los antioxidantes conocidos tales como ácido ascórbico ( $13 \pm 3 \mu\text{M}$ ), trolox ( $14 \pm 5 \mu\text{M}$ ) o BHT ( $70 \pm 9 \mu\text{M}$ ).<sup>8</sup>

El mecanismo propuesto por Merino-Montiel *et al.*<sup>8</sup> que justifica la actividad antirradicalaria de este tipo de derivados se presenta en el **esquema 28**, en donde se muestra la donación de un hidrógeno del grupo -NH de la selenourea al DPPH dando como resultado el radical libre **72** estabilizado por resonancia hacia el grupo selenoxo, o bien, hacia el grupo fenilo.



**Esquema 28.** Mecanismo de captación de radicales libres del derivado **13**.

#### 4.2.1.2 Ensayo de actividad mimética de la enzima glutatión peroxidasa (GPx)

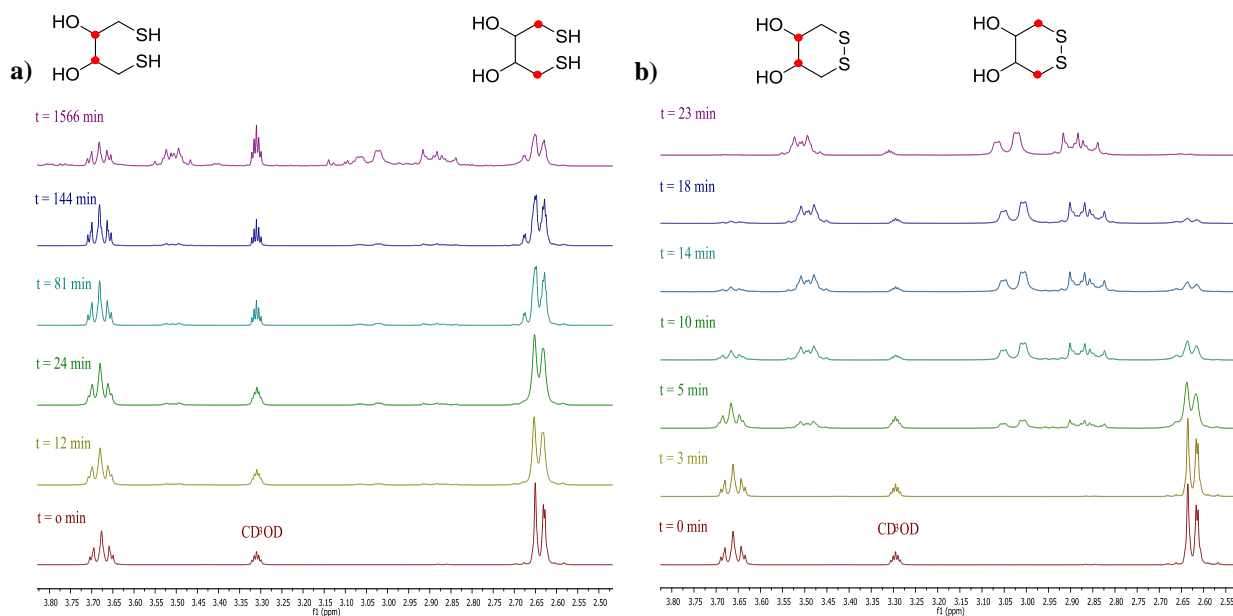
En el cuerpo, la GPx natural cataliza la reducción de peróxidos hasta agua, con la ayuda de grupos -SH (procedentes del glutatión) como cofactores. El derivado **13** mostró ser un buen imitador de la

enzima GPx al catalizar la reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en presencia de ditioneitol ( $\text{DTT}^{\text{red}}$ ) para dar  $\text{H}_2\text{O}$  y el correspondiente disulfuro cíclico ( $\text{DTT}^{\text{ox}}$ ).

En este ensayo, el derivado organoselenínico que actúa imitando a la enzima GPx se añadió en cantidades subestequiométricas (1% molar) mientras que el DTT actuó como el cofactor enzimático.

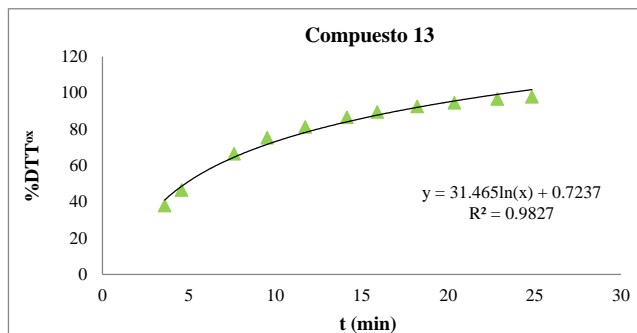
En la **figura 63a** se presenta el experimento control en el que podemos observar que después de 144 minutos de reacción la cantidad formada de  $\text{DTT}^{\text{ox}}$  es mínima, se observan únicamente las señales en 2.64 ppm correspondientes a los hidrógenos vecinos a los grupos tiol y en 3.68 ppm las señales de los hidrógenos cercanos a los hidroxilos pertenecientes al  $\text{DTT}^{\text{red}}$ . Al monitorear la reacción a los 1566 min se observó una proporción de aproximadamente 50% del  $\text{DTT}^{\text{ox}}$  formado.

Por el contrario el experimento catalizado por la selenourea **13** (**figura 63b**) muestra un cambio evidente en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Se aprecia la desaparición completa de las señales correspondientes al  $\text{DTT}^{\text{red}}$  después de 23 minutos, así como la aparición de las señales pertenecientes al  $\text{DTT}^{\text{ox}}$  (hidrógenos cercanos a los hidroxilo en 3.50 ppm y los hidrógenos diasterotópicos unidos al azufre en 2.88 ppm y 3.04 ppm).



**Figura 63.** Monitoreo por RMN de  $^1\text{H}$  de la oxidación de  $\text{DTT}^{\text{red}}$  a  $\text{DTT}^{\text{ox}}$ . a) Experimento control. b) Con selenourea **13**.

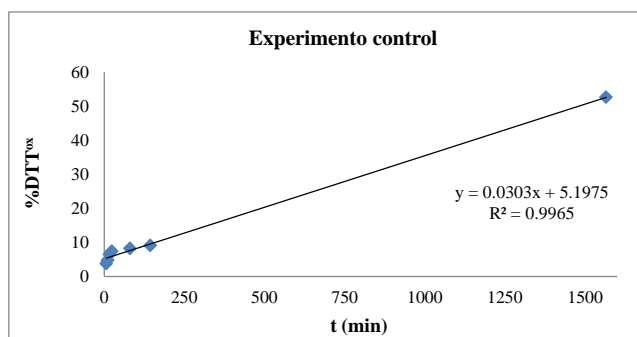
En estos espectros se puede observar que la reacción es muy lenta en ausencia de catalizador, pero al añadir un 1% del derivado de selenio **13** la transformación ocurre rápidamente, demostrando que este compuesto se comporta como un excelente mimético de GPx.



**Figura 64.** Representación del % DTT<sup>ox</sup> contra tiempo en ensayo de actividad como imitador de GPx del compuesto **13**.

La gráfica del porcentaje de conversión del DTT<sup>ox</sup> así como la regresión logarítmica se muestra en la **figura 64**. El  $t_{1/2}$  se obtuvo mediante la interpolación de la gráfica dando un valor de 4.8 min.

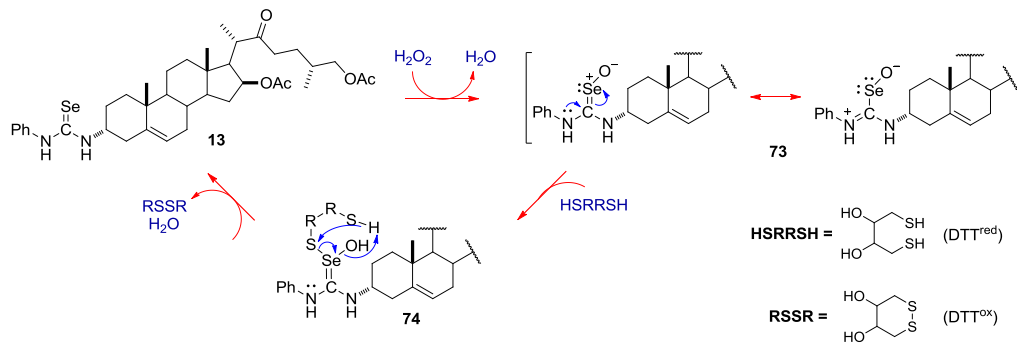
En contraste se muestra la gráfica de conversión del DTT<sup>ox</sup> en el experimento control, en donde el  $t_{1/2}$  tuvo un valor de 24.6 horas (**figura 65**).



**Figura 65.** Representación del % DTT<sup>ox</sup> contra tiempo. Experimento control.

El mecanismo propuesto en la bibliografía<sup>8</sup> para la actividad de compuestos organoselénicos con grupos selenoxo como imitadores de la enzima GPx se muestra en el **esquema 29**.

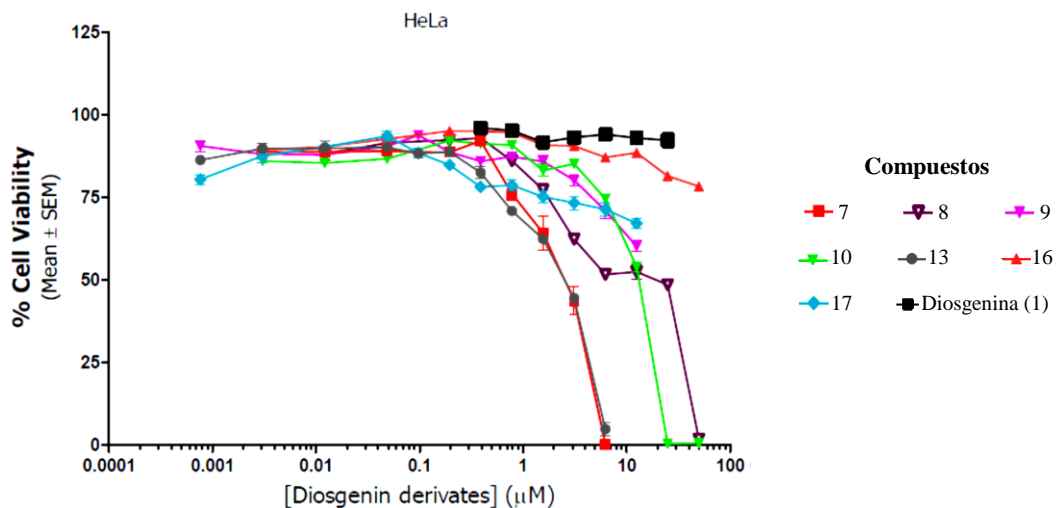
La selenourea **13** se oxida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para dar el derivado tipo selenóxido **73** estabilizado por resonancia, el cual reacciona con una molécula de ditiotreitól (HSRRSH) dando el aducto selenil-sulfuro **74**. La reacción intramolecular indicada para **74** permite la formación del disulfuro cíclico (RSSR), con pérdida de H<sub>2</sub>O y la regeneración del compuesto **13**, el cual puede volver a participar en el ciclo catalítico.



Esquema 29. Mecanismo del derivado **13** como imitador de la GPx.

#### 4.2.2 Actividad citotóxica *in vitro*

Los compuestos sintetizados se probaron como agentes citotóxicos contra células de cáncer cervicouterino HeLa. La curva de dosis-respuesta así como los valores de  $\text{IC}_{50}$  se muestran en la **figura 66** y la **tabla 3** respectivamente. Aquellos derivados que obtuvieron un  $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$  son los derivados **7** ( $2.22 \pm 0.85 \mu\text{M}$ ), **8** ( $5.03 \pm 2.45 \mu\text{M}$ ), **19** ( $9.74 \pm 0.24 \mu\text{M}$ ) y **20** ( $7.62 \pm 1.03 \mu\text{M}$ ) mostrando como valor más bajo el del derivado **13** ( $1.92 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ), todos estos derivados mostraron una actividad mucho mayor que la diosgenina (**1**,  $28.8 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) tomada como referencia. Sorprendentemente los glicoconjugados derivados de glucosa (**16** y **23**) y ciclodextrina (**17**) no mostraron tener actividad importante en contra de esta línea celular.



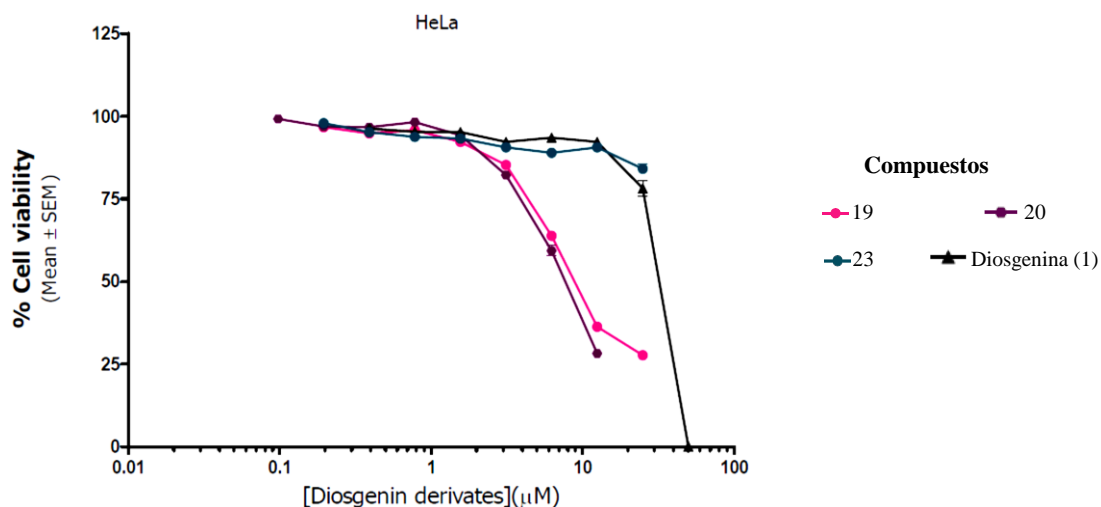


Figura 66. Viabilidad celular de la línea celular HeLa tras 72 horas de exposición a los distintos derivados esteroidales.

Compuesto	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
7	$2.22 \pm 0.85$
8	$5.03 \pm 2.45$
9	> 12.5
10	$11.8 \pm 0.94$
<b>13</b>	<b><math>1.92 \pm 0.60</math></b>
16	> 50
17	> 12.5
19	$9.74 \pm 0.24$
20	$7.62 \pm 1.03$
23	ND
Diosgenina	$28.8 \pm 0.02$

Tabla 3. Valores de  $\text{IC}_{50}$  en células HeLa.

Los compuestos que mostraron tener un  $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$  están actualmente siendo evaluados en las siguientes líneas celulares: OVCAR-3 (cáncer de ovario), MCF-7 (cáncer de mama, con receptor de estrógenos) y MDA-MB-231 (cáncer de mama sin receptor de estrógenos).

# Capítulo V. Desarrollo experimental

---

## 5.1 Síntesis

### 5.1.1 Métodos generales

Los puntos de fusión se determinaron por la técnica de capilar abierto en un aparato de punto de fusión Melt-temp y no se corrigieron.

Los espectros de RMN de 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT) y 2D (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) se obtuvieron a 25 °C en equipos Varian Mercury 400 MHz, Bruker Avance 300 MHz, Bruker Avance III 500 MHz equipado con una sonda de gradiente TCI de 5 mm enfriada criogénicamente y Bruker Avance III 700 MHz equipado con una sonda de gradiente QCI de 5 mm enfriada criogénicamente. Para el espectro 1D NOESY se utilizó la secuencia estándar de Bruker (*selnpgp*) haciendo uso de un pulso selectivo gaussiano truncado al 1% de 80 milisegundos.

Los valores de los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm utilizando TMS como referencia interna y los valores de los picos residuales de cada disolvente utilizado (7.27 y 77.0 ppm para  $\text{CDCl}_3$ , 3.30 y 49.0 ppm para  $\text{CD}_3\text{OD}$  y 2.49 y 39.5 ppm para  $\text{DMSO-}d_6$ , para RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  respectivamente). Los valores de las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se expresan en Hz.

Los espectros de masas (EI, CI y FAB) se obtuvieron utilizando los espectrómetros Hewlett Packard 5989 A acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5990 serie II y Micromass AutoSpec-Q con una resolución de 1000 o 10,000 (10% de definición del valle). Para los espectros de FAB, se usó la fuente de ionización LSIMS y un cañón de cesio (para formar iones  $\text{Cs}^+$ ), 1-tioglicerol como matriz y NaI como aditivo.

El espectro de masas MALDI se realizó en el laboratorio de espectrometría de masas de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla, España). Se utilizó un espectrómetro Bruker MALDI-TOF: UltrafleXtreme, con un láser de Nd-YAG (longitud de onda 355 nm) operando en modo positivo. La muestra se preparó mediante el método Thin Layer, usando como matriz 2,5-DHB (1  $\mu\text{L}$ ), 0.5  $\mu\text{L}$  de muestra y secado al aire. Los datos se expresan en relación  $m/z$ .

Las rotaciones ópticas se midieron en los polarímetros Perkin-Elmer 241 MC y Jasco P-2000, utilizando la línea de emisión del Na ( $\lambda$  598 nm).

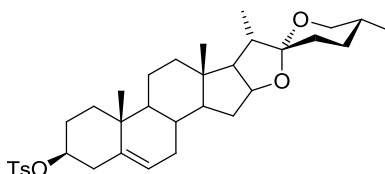
La ccf se realizó utilizando placas comerciales de gel de sílice grado 60 con indicador de fluorescencia UV<sub>254</sub>. Para el revelado de las placas se utilizó la radiación con luz ultravioleta de onda corta de 254 nm utilizando una lámpara modelo UVG-54, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso al 10% y una solución de vainillina (1.5% en EtOH en presencia de 1% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La cromatografía flash se llevó a cabo utilizando gel de sílice 60.

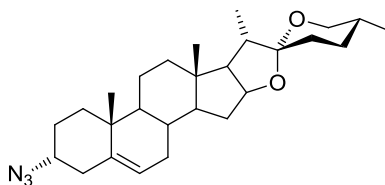
Todos los disolventes utilizados se purificaron y secaron de acuerdo a los métodos reportados en la literatura.<sup>58</sup> Los reactivos utilizados se adquirieron de Aldrich y se utilizaron sin mayor purificación.

## 5.1.2 Métodos de síntesis, datos físicos y espectroscópicos de los compuestos obtenidos

### 5.1.2.1 (25R)-3 $\beta$ -O-(*p*-toluensulfonil)espirost-5-eno (**2**)



A una solución de diosgenina (**1**) (0.5 g, 1.20 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (7 mL) se añadió TsCl (1.05 g, 5.51 mmol), piridina anhidra (0.95 mL, 11.77 mmol) y cantidades catalíticas de DMAP bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se mantuvo sin agitación y en oscuridad a 4 °C por 24 horas. Después de este tiempo el crudo de reacción se lavó con una solución fría de HCl al 5% (2×20 mL) y con una solución saturada fría de NaHCO<sub>3</sub> (20 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvo el compuesto **2** como un aceite amarillo en un rendimiento cuantitativo. El compuesto se descompone rápidamente por lo que se utilizó para la siguiente reacción sin mayor purificación y sin obtener sus datos espectroscópicos.

5.1.2.2 (25*R*)-3α-azidoespirost-5-eno (**3**)

A una solución del derivado tosilado **2** (4.12 g, 7.24 mmol) en DMF anhidra (40 mL) se añadió  $\text{NaN}_3$  (3.14 g, 48.3 mmol) bajo atmósfera inerte y se mantuvo en agitación a 60 °C por 22 h. La mezcla de reacción se diluyó con AcOEt (20 mL) y se lavó con salmuera (3×20 mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El compuesto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente heptano y posteriormente una mezcla de disolventes 1500:1 Heptano:AcOEt. Se obtuvieron 1.66 g del compuesto **3** como un sólido amorfo blanco. Rendimiento experimental: 52%.

**Punto de fusión:** 156-158 °C

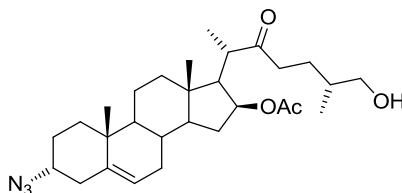
$[\alpha]_D^{25}$ : -88 (*c* 0.1,  $\text{CHCl}_3$ )

**RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ : 5.37 (m, 1H, H-6), 4.39 (m, 1H, H-16), 3.86 (m, 1H, H-3), 3.45 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 10.8$  Hz,  $J_{26ec,25} = 4.2$  Hz,  $J_{26ec,24ec} = 1.8$  Hz, H-26ec), 3.35 (dd, 1H,  $J_{gem} = J_{26ax,25} = 10.8$  Hz, H-26ax), 2.45 (m, 1H, H-4a), 2.13 (m, 1H, H-4b), 1.8 (m, 1H, H-20), 1.0 (s, 3H, H-19), 0.95 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.2$  Hz, H-21), 0.77 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.0$  Hz, H-27), 0.76 (s, 3H, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ : 138.1 (C-5), 122.9 (C-6), 109.3 (C-22), 80.8 (C-16), 66.8 (C-26), 62.0 (C-17), 58.2 (C-3), 56.5 (C-14), 49.8 (C-9), 41.6 (C-20), 40.2 (C-13), 39.7 (C-12), 37.2 (C-10), 36.0 (C-4), 33.5 (C-1), 31.9 (C-7), 31.8 (C-15), 31.3 (C-8), 31.3 (C-23), 30.3 (C-25), 28.8 (C-24), 26.0 (C-2), 20.5 (C-11), 19.0 (C-19), 17.1 (C-27), 16.3 (C-18), 14.5 (C-21).

**EIMS (*m/z*):**  $[\text{M}]^+$  439 (7%), 411 (36%), 297 (24%), 139 (67%), 18 (100%).

**HREIMS (*m/z*):** calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}]^+$ : 439.3199, observado: 439.3194.

5.1.2.3 Acetato de (25*R*)-3 $\alpha$ -azido-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (4)

A una solución de la azida **3** (40 mg, 0.091 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (0.4 mL) se añadió Ac<sub>2</sub>O (0.15 mL, 1.59 mmol) y BF<sub>3</sub>·OEt (0.12 mL, 0.97 mmol) lentamente, a 0 °C y bajo atmósfera inerte. La reacción se mantuvo en agitación constante a 0 °C por 9 minutos. Posteriormente se vertió en hielo y se mantuvo en agitación toda la noche. El producto se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (4×10 mL) y salmuera (2×10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El compuesto se purificó mediante cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 4:1 Heptano:AcOEt. Se obtuvieron 24 mg del compuesto **4** como una espuma blanca. Rendimiento experimental: 52%.

**Punto de fusión:** 155-156 °C

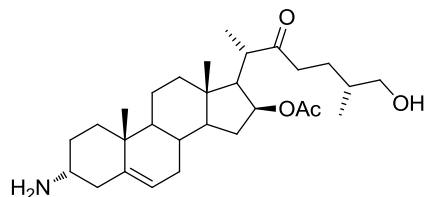
$[\alpha]_D^{25}$ : +47 (c 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 5.36 (m, 1H, H-6), 4.96 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.0$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.8$  Hz, H-16), 3.86 (m, 1H, H-3), 3.40 (d, 2H,  $J_{26,25} = 6.0$  Hz, H-26), 2.93 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 11.0$  Hz,  $J_{20,21} = 6.8$  Hz, H-20), 2.60 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23a,24a} = 8.8$  Hz,  $J_{23a,24b} = 6.8$  Hz, H-23a), 2.44 (m, 1H, H-4a), 2.35 (m, 1H, H-15a), 2.33 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23b,24b} = 8.4$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.2$  Hz, H-23b), 2.13 (m, 1H, H-4b), 1.94 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.12 (d, 3H,  $J_{21,20} = 6.8$  Hz, H-21), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.89 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.4$  Hz, H-27), 0.84 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 213.7 (C-22), 169.9 (-OCOCH<sub>3</sub>), 138.0 (C-5), 122.8 (C-6), 75.7 (C-16), 67.5 (C-26), 58.1 (C-3), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.6 (C-9), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 38.5 (C-23), 37.0 (C-10), 36.0 (C-4), 35.4 (C-25), 34.8 (C-15), 33.5 (C-1), 31.5 (C-7), 31.1 (C-8), 26.1 (C-2), 26.0 (C-24), 21.1 (-OCOCH<sub>3</sub>), 20.4 (C-11), 19.0 (C-19), 16.8 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**EIMS (m/z):** [M]<sup>+</sup> 499 (<1%), [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (82%), 421 (100%), 43 (98%), 124 (86%).

**HREIMS (m/z):** calculado para C<sub>29</sub>H<sub>45</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [M]<sup>+</sup>: 499.3410, observado: 499.3399.

5.1.2.4 Acetato de (25R)-3 $\alpha$ -amino-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (5)

A una solución del derivado **4** (0.27 g, 0.55 mmol) en AcOEt (16 mL) se añadió Pd(OH)<sub>2</sub>/C al 20% (105 mg). La reacción se mantuvo en agitación constante a t.a., bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) por 2 horas. El crudo de reacción se filtró al vacío sobre celita y el compuesto se concentró al vacío. Se obtuvieron 0.25 g del compuesto **5** como un sirupo amarillo. Rendimiento experimental: 95%.

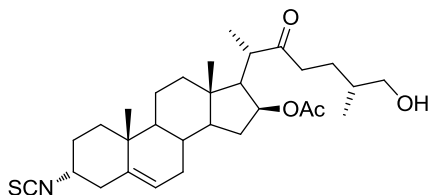
$[\alpha]_D^{26}$ : +21 (c 1.1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 5.35 (m, 1H, H-6), 4.99 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.1$  Hz,  $J_{16,15b} = 3.9$  Hz, H-16), 3.42 (d, 2H,  $J_{26,25} = 5.8$  Hz, H-26), 3.16 (sa, 1H, H-3), 2.96 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 14.1$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.63 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.9$  Hz,  $J_{23a,24a} = 8.6$  Hz,  $J_{23a,24b} = 6.7$  Hz, H-23a), 2.58 (m, 1H, H-4a), 2.42 (m, 1H, H-15a), 2.39 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.9$  Hz,  $J_{23b,24b} = 8.6$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.8$  Hz, H-23b), 1.96 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.14 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 1.01 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.87 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 213.7 (C-22), 169.9 (-OCOCH<sub>3</sub>), 139.1 (C-5), 122.8 (C-6), 75.7 (C-16), 67.5 (C-26), 55.1 (C-17), 54.1 (C-14), 50.3 (C-9), 46.8 (C-3), 43.5 (C-20), 41.9 (C-13), 40.1 (C-4), 39.7 (C-12), 38.5 (C-23), 37.4 (C-10), 35.5 (C-25), 34.8 (C-15), 33.0 (C-1), 31.7 (C-7), 31.3 (C-8), 29.5 (C-2), 26.3 (C-24), 21.2 (-OCOCH<sub>3</sub>), 20.5 (C-11), 18.8 (C-19), 16.9 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**CIMS (m/z)**: [M+H]<sup>+</sup> 474 (20%), [M]<sup>+</sup> 473 (10%), 270 (68%), 56 (100%).

**HRCIMS (m/z)**: calculado para C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>NO<sub>4</sub> [M+ H]<sup>+</sup>: 474.3583, observado: 474.3567.

5.1.2.5 Acetato de (25R)-3 $\alpha$ -isotiocianato-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (6)

A una solución de la amina **5** (0.22 g, 0.46 mmol) en una mezcla 1:1 H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) se añadió CaCO<sub>3</sub> (0.14 g, 1.38 mmol) y tiosfogeno (50  $\mu$ L, 0.69 mmol). La mezcla se mantuvo en agitación a t.a. por 1 hora. El crudo de reacción se filtró y se separó la fase orgánica de la acuosa, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 4:1 y 3:2 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.18 g del derivado **6** como un sólido amorfo blanco. Rendimiento experimental: 74%. El compuesto presentó rápida descomposición por lo que se utilizó de manera inmediata en la siguiente reacción y sólo se obtuvieron algunos datos espectroscópicos.

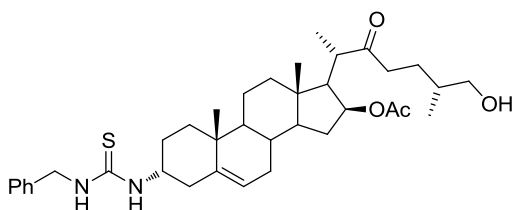
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 5.46 (m, 1H, H-6), 5.0 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.0$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.6$  Hz, H-16), 3.93 (m, 1H, H-3), 3.43 (d, 2H,  $J_{26,25} = 5.7$  Hz, H-26), 2.96 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 11.0$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.63 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23a,24a} = 8.4$  Hz,  $J_{23a,24b} = 6.7$  Hz, H-23a), 2.54 (m, 1H, H-4a), 2.42 (m, 1H, H-15a), 2.40 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23b,24b} = 8.6$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.9$  Hz, H-23b), 2.26 (m, 1H, H-4b), 1.97 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.15 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 1.01 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 213.6 (C-22), 169.8 (-OCOCH<sub>3</sub>), 136.6 (C-5), 132.4 (-NCS), 124.9 (C-6), 75.7 (C-16), 67.5 (C-26), 55.2 (C-17), 55.1 (C-3), 53.7 (C-14), 49.6 (C-9), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.5 (C-12), 38.5 (C-4), 38.4 (C-23), 37.0 (C-10), 35.4 (C-25), 34.8 (C-15), 33.8 (C-1), 31.7 (C-7), 31.1 (C-8), 27.8 (C-2), 26.2 (C-24), 21.1 (-OCOCH<sub>3</sub>), 20.4 (C-11), 18.9 (C-19), 16.8 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**LSIMS ( $m/z$ ):** [M+Na]<sup>+</sup> 538 (22%), 149 (100%), 105 (56%), 91 (65%), 69 (84%), 57 (88%).

**HRLSIMS ( $m/z$ ):** calculado para C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>NNaO<sub>4</sub>S [M+Na]<sup>+</sup>: 538.2967, observado: 538.2985.

### 5.1.2.6 Acetato de (25*R*)-3 $\alpha$ -(*N'*-benciltioureido)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (7)



A una solución del isotiocianato **6** (40 mg, 0.08 mmol) en THF (1.6 mL) se añadió bencilamina (10  $\mu$ L, 0.09 mmol). La reacción se agitó a t.a. por 1.5 horas. El crudo de reacción se concentró al vacío y se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 3:2 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 42 mg del producto **7** como un aceite incoloro. Rendimiento experimental: 87%.

$[\alpha]_D^{24}$ : -13 (*c* 1.3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

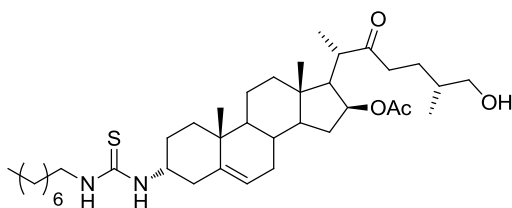
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 7.39-7.27 (m, 5H, H-Ar), 6.68 (sa, 1H, -NHR), 5.68 (sa, 1H, -NHR), 5.21 (m, 1H, H-6), 5.0 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.1$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.7$  Hz, H-16), 4.47 (sa, 1H), 4.42 (sa, 1H), 3.43 (d, 2H,  $J_{26,25} = 5.7$  Hz, H-26), 2.97 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 11.0$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.66 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23a,24a} = 8.5$  Hz,  $J_{23a,24b} = 6.7$  Hz, H-23a), 2.53 (m, 1H, H-4a), 2.41 (m, 1H, H-15a), 2.40 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23b,24b} = 8.6$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.7$  Hz, H-23b), 1.96 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.16 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 0.95 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.84 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 213.7 (C-22), 180.2 (C=S), 169.8 (-OCOCH<sub>3</sub>), 138.8 (C-5), 136.2-126.8 (C-Ar), 123.4 (C-6), 75.6 (C-16), 67.4 (C-26), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 50.9 (ancha), 49.5 (C-9), 47.5 (ancha), 43.4 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 38.6 (C-23), 37.1 (C-4), 37.0 (C-10), 35.4 (C-25), 34.7 (C-15), 33.9 (C-1), 31.5 (C-7), 31.0 (C-8), 26.2 (C-24), 25.6 (C-2), 21.1 (-OCOCH<sub>3</sub>), 20.2 (C-11), 18.6 (C-19), 16.8 (C-21), 16.6 (C-27), 13.1 (C-18).

**LSIMS (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> 645 (37%), [M+1]<sup>+</sup> 623 (35%), 149 (69%), 91 (68%), 71 (73%), 57 (100%).

**HRLSIMS (*m/z*):** calculado para C<sub>37</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S [M+Na]<sup>+</sup>: 645.3702, observado: 645.3698.

### 5.1.2.7 Acetato de (25*R*)-3 $\alpha$ -(*N*'-octiltioureido)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-en-16 $\beta$ -ilo (**8**)



A una solución del isotiocianato **6** (51 mg, 0.1 mmol) en THF (2 mL) se añadió octilamina (20  $\mu$ L, 0.12 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a t.a. por 1 hora. El producto se llevó a sequedad y se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes 7:3 y 3:2 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 54 mg del compuesto **8** como un aceite incoloro. Rendimiento experimental: 85%.

$[\alpha]_D^{25}$ : -8 (*c* 0.8, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

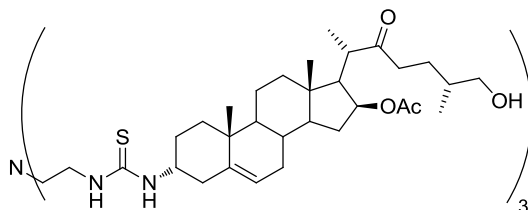
**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 5.98 (sa, 1H), 5.76 (sa, 1H), 5.43 (m, 1H, H-6), 4.98 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.0$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.6$  Hz, H-16), 4.37 (sa, 1H), 3.42 (d, 2H,  $J_{26,25} = 5.7$  Hz, H-26), 3.27 (sa, 2H), 2.97 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 10.9$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.65 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23a,24a} = 8.5$  Hz,  $J_{23a,24b} = 6.5$  Hz, H-23a), 2.63 (m, 1H, H-4a), 2.42 (m, 1H, H-15a), 2.40 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.0$  Hz,  $J_{23b,24b} = 8.6$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.8$  Hz, H-23b), 1.97 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.15 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 1.06 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.88 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 213.6 (C-22), 180.0 (C=S), 169.8 (-OCOCH<sub>3</sub>), 139.0 (C-5), 123.6 (C-6), 75.6 (C-16), 67.4 (C-26), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 50.4 (C-9), 50.3 (ancha), 43.8 (ancha), 43.4 (C-20), 41.8 (C-13), 39.5 (C-12), 38.5 (C-23), 37.3 (C-4), 37.2 (C-10), 35.4 (C-25), 34.7 (C-15), 34.4 (C-1), 31.7 (-CH<sub>2</sub>-), 31.7 (C-7), 31.2 (C-8), 29.2 (-CH<sub>2</sub>-), 29.1 (-CH<sub>2</sub>-), 28.9 (-CH<sub>2</sub>-), 27.0 (-CH<sub>2</sub>-), 26.2 (C-24), 25.6 (C-2), 22.6 (-CH<sub>2</sub>-), 21.1 (-OCOCH<sub>3</sub>), 20.4 (C-11), 18.8 (C-19), 16.8 (C-21), 16.6 (C-27), 14.0 (C-8'), 13.1 (C-18).

**CIMS (*m/z*):** [M+ H]<sup>+</sup> 645 (<1%), 312 (100%), 270 (90%), 115 (45%), 56 (80%).

**HRCIMS (*m/z*):** calculado para C<sub>38</sub>H<sub>65</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S [M+ H]<sup>+</sup>: 645.4665, observado: 645.4666.

**5.1.2.8 (25''R)-Tris-{2-[tioureido-3'-(16''β-acetoxi-26''-hidroxi-22''-oxocolest-5''-en-3''α-il)]etil}amina (9)**



A una solución del isotiocianato **6** (71 mg, 0.14 mmol) en THF (2 ml) se añadió tris(2-aminoetil)amina (8  $\mu$ L, 0.05 mmol). La reacción se mantuvo en agitación constante a t.a. por una noche. El producto se llevó a sequedad y se purificó utilizando cromatografía flash y como eluyente un sistema de disolventes 60:1, 40:1 y 20:1  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH. Se obtuvieron 31 mg del derivado **9** como un aceite incoloro. Rendimiento experimental: 40%.

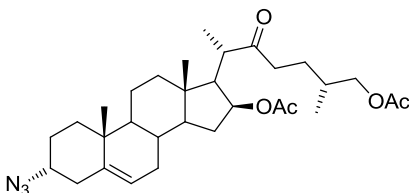
$[\alpha]_D^{26}$ : -7 (*c* 1.0,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

**RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ : 6.54 (sa, 1H), 5.40 (m, 1H, H-6''), 4.98 (ddd, 1H,  $J_{16'',15a''} = J_{16'',17''} = 7.5$  Hz,  $J_{16'',15b''} = 3.8$  Hz, H-16''), 4.55 (sa, 1H), 3.52 (sa, 1H), 3.42 (d, 2H,  $J_{26'',25''} = 5.8$  Hz, H-26''), 2.96 (dq, 1H,  $J_{20'',17''} = 10.5$  Hz,  $J_{20'',21''} = 7.1$  Hz, H-20''), 2.64 (m, 1H, H-23a''), 2.64 (m, 1H, H-4a''), 2.40 (m, 1H, H-15a''), 2.38 (m, 1H, H-23b''), 1.97 (s, 3H,  $-\text{OCOCH}_3$ ), 1.14 (d, 3H,  $J_{21'',20''} = 7.1$  Hz, H-21''), 1.04 (s, 3H, H-19''), 0.91 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.8$  Hz, H-27''), 0.87 (s, 3H, H-18'').

**RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )**  $\delta$ : 213.7 (C-22''), 169.9 ( $-\text{OCOCH}_3$ ), 138.5 (C-5''), 123.8 (C-6''), 75.7 (C-16''), 67.4 (C-26''), 55.1 (C-17''), 53.9 (C-14''), 49.8 (C-9''), 43.5 (C-20''), 41.8 (C-13''), 39.6 (C-12''), 38.7 (C-4''), 38.5 (C-23''), 37.2 (C-10''), 35.4 (C-25''), 34.8 (C-15''), 34.1 (C-1''), 31.6 (C-7''), 31.2 (C-8''), 29.7 (C-2''), 26.2 (C-24''), 21.1 ( $-\text{OCOCH}_3$ ), 20.5 (C-11''), 18.9 (C-19''), 16.9 (C-21''), 16.6 (C-27''), 13.2 (C-18'').

**LSIMS (*m/z*):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1715 (7%), 559 (42%), 103 (100%), 69 (53%).

**HRLSIMS (*m/z*):** calculado para  $\text{C}_{96}\text{H}_{153}\text{N}_7\text{NaO}_{12}\text{S}_3$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1715.0637, observado: 1715.0612.

5.1.2.9 Diacetato de (25*R*)-3 $\alpha$ -azido-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (10)

A una solución de la azida **4** (0.2 g, 0.4 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 mL) se añadió Ac<sub>2</sub>O (0.4 mL, 4.27 mmol) y cantidades catalíticas de DMAP. Se mantuvo en agitación constante a t.a. por 10 minutos. La mezcla de reacción se lavó con salmuera (2×10 mL). La fase orgánica se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2×10 mL), secó con MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El compuesto se purificó utilizando cromatografía flash y como eluyente un sistema de disolventes 95:5 y 85:15 Hexano:AcOEt. Se obtuvo el compuesto **10** como un sólido amorfo blanco en un rendimiento cuantitativo.

**Punto de fusión:** 127-128 °C

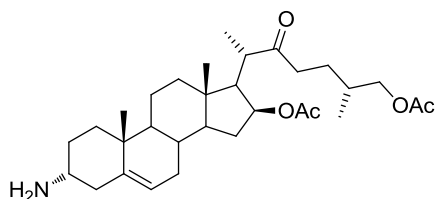
$[\alpha]_D^{29}$ : +40 (c 1.04, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 5.37 (m, 1H, H-6), 4.98 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.0$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.6$  Hz, H-16), 3.89 (dd, 2H,  $J_{26,25} = 6.2$  Hz,  $J_{gem} = 0.9$  Hz, H-26), 3.87 (m, 1H, H-3), 2.94 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 11.0$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.61 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.7$  Hz,  $J_{23a,24a} = 10.1$  Hz,  $J_{23a,24b} = 5.9$  Hz, H-23a), 2.51 (m, 1H, H-4a), 2.41 (m, 1H, H-15a), 2.34 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.7$  Hz,  $J_{23b,24b} = 9.9$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.2$  Hz, H-23b), 2.18 (m, 1H, H-4b), 2.04 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26), 1.95 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16), 1.13 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 1.0 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.86 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 212.6 (C-22), 171.1 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 169.6 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 138.0 (C-5), 122.7 (C-6), 75.7 (C-16), 68.8 (C-26), 58.1 (C-3), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.6 (C-9), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 38.2 (C-23), 37.0 (C-10), 35.9 (C-4), 34.8 (C-15), 33.5 (C-1), 32.1 (C-25), 31.5 (C-7), 31.1 (C-8), 26.7 (C-2), 26.0 (C-24), 21.0 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 20.9 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 20.4 (C-11), 18.9 (C-19), 16.7 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**LSIMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> 564 (100%), 115 (30%).

**HRLSIMS (m/z):** calculado para C<sub>31</sub>H<sub>47</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 564.3413, observado: 564.3407.

5.1.2.10 Diacetato de (25*R*)-3 $\alpha$ -amino-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (11)

A una solución del compuesto **10** (0.26 g, 0.48 mmol) en AcOEt (10 mL) se añadió Pd(OH)<sub>2</sub>/C al 20% (125 mg) y se colocó en agitación bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) por 3 horas. El crudo de reacción se filtró al vacío sobre celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. El compuesto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 20:1 y 15:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. Se obtuvo el derivado **11** como un sólido blanco en un rendimiento cuantitativo.

$[\alpha]_D^{27}$ : +5 (*c* 1.0, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

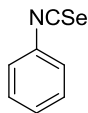
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 5.30 (m, 1H, H-6), 4.91 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.1$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.5$  Hz, H-16), 3.83 (dd, 2H,  $J_{26,25} = 6.1$  Hz,  $J_{gem} = 3.6$  Hz, H-26), 3.16 (sa, 1H, H-3), 2.88 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 11.0$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.55 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.5$  Hz,  $J_{23a,24a} = 10.0$  Hz,  $J_{23a,24b} = 5.8$  Hz, H-23a), 2.50 (m, 1H, H-4a), 2.34 (m, 1H, H-15a), 2.28 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.6$  Hz,  $J_{23b,24b} = 10.0$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.2$  Hz, H-23b), 1.98 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26), 1.89 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16), 1.68 (m, 1H, H-25), 1.07 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 0.94 (s, 3H, H-19), 0.85 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.80 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 212.5 (C-22), 171.0 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 169.6 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 138.4 (C-5), 123.2 (C-6), 75.6 (C-16), 68.8 (C-26), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.9 (C-9), 47.0 (C-3), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 39.3 (C-4), 38.2 (C-23), 37.2 (C-10), 34.7 (C-15), 32.8 (C-1), 32.1 (C-25), 31.6 (C-7), 31.2 (C-8), 28.7 (C-2), 26.7 (C-24), 21.0 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 20.8 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 20.4 (C-11), 18.7 (C-19), 16.7 (C-21), 16.5 (C-27), 13.1 (C-18).

**LSIMS (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> 538 (38%), [M+1]<sup>+</sup> 516 (23%), 115 (78%), 73 (80%), 57 (100%).

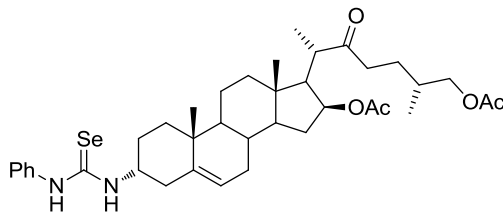
**HRLSIMS (*m/z*):** calculado para C<sub>31</sub>H<sub>49</sub>NNaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 538.3508, observado: 538.3515.

### 5.1.2.11 Isoselenocianato de fenilo (**12**)



Se preparó de acuerdo al método descrito por Fernández-Bolaños *et al.*<sup>46</sup> Una solución de trifosgeno (3.2 g, 10.7 mmol) en tolueno anhidro (100 mL) se añadió por un periodo de 30 minutos a una solución de *N*-fenilformamida (2.0 g, 16 mmol), Se negro (2.53 g, 32 mmol) y Et<sub>3</sub>N (8.9 mL, 64 mmol) en tolueno (150 mL) enfriada a 0 °C y bajo atmósfera inerte. Finalizada la adición la mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas en oscuridad. Posteriormente se filtró sobre celita y se llevó a sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna, en oscuridad, utilizando como eluyente un gradiente de disolventes Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.45 g del isoselenocianato **12** como un aceite amarillo. Rendimiento experimental: 15%.

### 5.1.2.12 Diacetato de (25*R*)-3α-(*N'*-fenilselenoureido)-22-oxocolest-5-eno-16β,26-diilo (**13**)



A una solución de la amina **11** (40 mg, 0.08 mmol) en THF (1.6 mL) se añadió el isoselenocianato de fenilo (**12**) (17 mg, 0.09 mmol). La reacción se mantuvo en agitación a t.a., bajo atmósfera inerte y en la oscuridad por 3 horas. El disolvente se evaporó y el compuesto se purificó en oscuridad mediante cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes 75:35 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 46 mg del derivado **13** como un aceite amarillo. Rendimiento experimental: 85%.

$[\alpha]_D^{26}$ : +4 (*c* 1.2, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 7.90 (sa, 1H, -NHPh), 7.36-7.10 (m, 5H, H-Ar), 6.38 (d, 1H, *J*<sub>NH,3</sub> = 7.5 Hz, -NHR), 5.07 (m, 1H, H-6), 4.93 (ddd, 1H, *J*<sub>16,15a</sub> = *J*<sub>16,17</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>16,15b</sub> = 5.2, H-16), 4.52 (sa, 1H, H-3), 3.84 (dd, 2H, *J*<sub>26,25</sub> = 6.1 Hz, *J*<sub>gem</sub> = 4.5 Hz, H-26), 2.88 (dq, 1H, *J*<sub>20,17</sub> = 11.0 Hz, *J*<sub>20,21</sub> = 7.1 Hz, H-20), 2.56 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 17.7 Hz, *J*<sub>23a,24a</sub> = 10.0 Hz, *J*<sub>23a,24b</sub> = 5.8 Hz, H-23a), 2.47 (m,

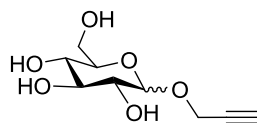
1H, H-4a), 2.32 (m, 1H, H-15a), 2.28 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.7$  Hz,  $J_{23b,24b} = 10.0$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.1$  Hz, H-23b), 2.08 (m, 1H, H-2a), 1.99 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26), 1.89 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16), 1.77 (m, 1H, H-7a), 1.69 (m, 1H, H-25), 1.07 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 0.92 (s, 3H, H-19), 0.86 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.78 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 212.7 (C-22), 176.6 (C=Se), 171.1 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 169.7 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 139.0 (C-5), 135.6-125.5 (C-Ar), 123.9 (C-6), 75.6 (C-16), 68.8 (C-26), 55.0 (C-17), 54.2 (C-3), 53.9 (C-14), 51.0 (C-9), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 38.4 (C-23), 37.2 (C-4), 37.2 (C-10), 35.0 (C-1), 34.7 (C-15), 32.2 (C-25), 31.6 (C-7), 31.0 (C-8), 26.7 (C-24), 25.9 (C-2), 21.1 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 20.9 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 20.4 (C-11), 18.9 (C-19), 16.7 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**LSIMS (m/z):** [M+H]<sup>+</sup> 699 (14%), 133 (68%), 115 (64%), 91 (63%), 73 (69%), 57 (100%).

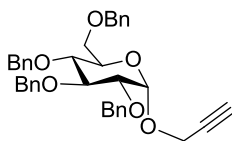
**HRLSIMS (m/z):** calculado para C<sub>38</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Se [M+H]<sup>+</sup>: 699.3276, observado: 699.3277.

### 5.1.2.13 Prop-2-inil D-glucopiranosido (57)

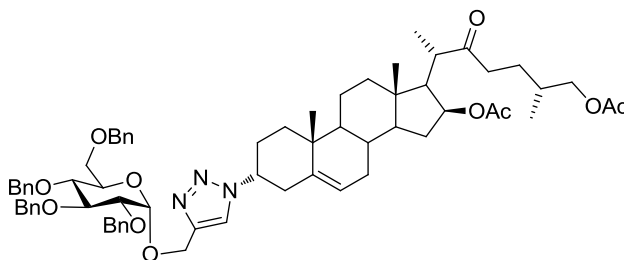


Se preparó de acuerdo al método descrito por Roy y Mukhopadhyay.<sup>59</sup> A una suspensión de glucosa (**56**) (0.2 g, 1.11 mmol) en alcohol propargílico (0.3 mL, 5.4 mmol) agitada a 65 °C por 10 minutos se agregó el catalizador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sílica (10 mg) y se mantuvo en agitación a esa temperatura por 2.5 horas, tiempo en el cual todos los sólidos ya se habían disueltos. Se dejó enfriar a t.a. y se mantuvo en agitación constante por 14 horas. El producto se llevó a sequedad y se purificó por columna cromatográfica, se eluyeron 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para eliminar el exceso de alcohol propargílico y posteriormente se utilizó un sistema de disolventes 15:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. Se obtuvieron 85 mg de la mezcla de anómeros **57** como un sólido amorfo blanco. Rendimiento experimental: 35%.

El catalizador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sílica se preparó de la siguiente manera: A una suspensión de gel de sílice (1 g, malla de 200-400) en éter etílico anhidro (5 mL) se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (0.3 mL) y se mantuvo en agitación por 5 minutos. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se secó a 110 °C por 3 horas.

5.1.2.14 Prop-2'-inil 2,3,4,6-tetra-*O*-bencil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (**58**)

A una solución de la mezcla de anómeros **57** (0.14 g, 0.66 mmol) en una mezcla de disolventes anhidros 2:1 DMF:Tolueno (3 mL) se añadió NaH (60% en aceite mineral, 0.26 g, 6.5 mmol) a 0 °C, la suspensión se mantuvo en agitación a t.a., bajo atmósfera inerte por 10 minutos, posteriormente se agregó BnCl (0.6 mL, 5.32 mmol) y se mantuvo a 80 °C por 2 horas. Al finalizar la reacción se adicionó MeOH, Et<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O (5 mL) a 0 °C, la mezcla se diluyó con AcOEt (15 mL) y se lavó con salmuera (2×10 mL). El producto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 9:1 y 4:1 Hexano:Et<sub>2</sub>O. Se obtuvieron 60 mg del anómero  $\alpha$  **58**. Rendimiento experimental: 16%.

5.1.2.15 Diacetato de (25*R*)-3 $\alpha$ -{4'-[(2'',3'',4'',6'')-tetra-*O*-bencil- $\alpha$ -D-glucopiranosil)-*O*-metil]-1'*H*-1',2',3'-triazol-1'-il}-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (**14**)

A una solución del azúcar **58** (0.33 g, 0.57 mmol) en una mezcla de disolventes 1:3 AcOEt:CH<sub>3</sub>CN (16 mL) se añadió el esteroide **10** (0.15 g, 0.28 mmol), CuI (0.03 g, 0.14 mmol) y DIPEA (30  $\mu$ L, 0.18 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a t.a. por 2.5 horas. El disolvente se evaporó y el compuesto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 7:3 y 6.5:3.5 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.28 g del derivado **14** como un aceite incoloro. Rendimiento experimental: 88%.

$[\alpha]_D^{26}$ : -0 (*c* 0.9, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 7.68 (s, 1H, H-5'), 7.26-7.05 (m, 20H, H-Ar), 5.32 (m, 1H, H-6), 4.95 (d, 1H,  $J_{1',2''} = 3.6$  Hz, H-1'), 4.88 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.8$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 3''), 4.87 (ddd, 1H,  $J_{16,15a}$

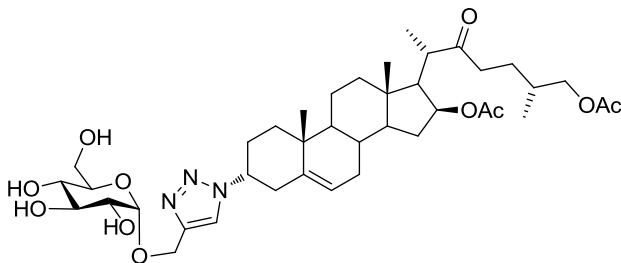
=  $J_{16,17} = 8.1$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.08$  Hz, H-16), 4.74 (m, 1H, H-3), 4.74 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.8$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  4''), 4.71 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.8$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  3''), 4.70 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.5$  Hz,  $-\text{CH}_2$  het), 4.63 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.5$  Hz,  $-\text{CH}_2$  het), 4.57 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  2''), 4.55 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  6''), 4.48 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  2''), 4.42 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  6''), 4.41 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.8$  Hz,  $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  4''), 3.91 (dd, 1H,  $J_{3'',2''} = 9.6$  Hz,  $J_{3'',4''} = 9.3$  Hz, H-3''), 3.82 (dd, 2H,  $J_{26,25} = 6.0$  Hz,  $J_{gem} = 3.6$  Hz, H-26), 3.79 (ddd, 1H,  $J_{5'',4''} = 10.0$  Hz,  $J_{5'',6''b} = 3.8$  Hz,  $J_{5'',6''a} = 3.6$  Hz, H-5''), 3.67 (dd, 1H,  $J_{gem} = 10.7$  Hz,  $J_{6''a,5''} = 3.6$  Hz, H-6''a), 3.60 (dd, 1H,  $J_{gem} = 10.7$  Hz,  $J_{6''b,5''} = 3.8$  Hz, H-6''b), 3.59 (dd, 1H,  $J_{4'',5''} = 10.0$  Hz,  $J_{4'',3''} = 9.3$  Hz, H-4''), 3.50 (dd, 1H,  $J_{2'',3''} = 9.6$  Hz,  $J_{2'',1''} = 3.6$  Hz, H-2''), 2.84 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 10.9$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.83 (m, 1H, H-4a), 2.53 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.6$  Hz,  $J_{23a,24a} = 10.0$  Hz,  $J_{23a,24b} = 5.8$  Hz, H-23a), 2.40 (m, 1H, H-4b), 2.27 (m, 1H, H-15a), 2.26 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.6$  Hz,  $J_{23b,24b} = 10.0$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.2$  Hz, H-23b), 2.2 (m, 1H, H-2a), 2.04 (m, 1H, H-2b), 1.97 (s, 3H,  $-\text{OCOCH}_3$  C-26), 1.87 (s, 3H,  $-\text{OCOCH}_3$  C-16), 1.81 (m, 1H, H-12a), 1.75 (dd, 1H,  $J_{17,20} = 10.9$  Hz,  $J_{17,16} = 8.1$  Hz, H-17), 1.67 (m, 1H, H-25), 1.03 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 1.0 (s, 3H, H-19), 0.85 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.6$  Hz, H-27), 0.77 (s, 3H, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 212.4 (C-22), 171.0 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-26), 169.5 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-16), 143.2 (C-4'), 138.7-127.5 (C-Ar), 137.9 (C-5), 123.8 (C-6), 122.4 (C-5'), 96.0 (C-1''), 82.0 (C-3''), 79.7 (C-2''), 77.6 (C-4''), 75.6 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  3''), 75.5 (C-16), 75.0 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  4''), 73.4 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  6''), 72.7 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  2''), 70.4 (5''), 68.8 (C-26), 68.4 (C-6''), 60.6 ( $-\text{CH}_2$  het), 56.4 (C-3), 54.9 (C-17), 53.6 (C-14), 49.4 (C-9), 43.4 (C-20), 41.7 (C-13), 39.3 (C-12), 38.2 (C-23), 36.9 (C-10), 35.2 (C-4), 34.7 (C-15), 32.5 (C-1), 32.1 (C-25), 31.4 (C-7), 31.0 (C-8), 26.8 (C-2), 26.7 (C-24), 21.0 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-16), 20.8 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-26), 20.2 (C-11), 19.1 (C-19), 16.6 (C-21), 16.5 (C-27), 13.1 (C-18).

**LSIMS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1142 (<1%), 181 (11%), 115 (13%), 91 (100%), 69 (9%).

**HRLSIMS ( $m/z$ ):** calculado para  $\text{C}_{68}\text{H}_{85}\text{N}_3\text{NaO}_{11}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1142.6082, observado: 1142.6104.

**5.1.2.16 Diacetato de (25R)-3 $\alpha$ -{4'-[( $\alpha$ -D-glucopiranosil)-O-metil]-1'H-1',2',3'-triazol-1'-il]-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (16)**



A una solución del derivado **14** (0.17 g, 0.15 mmol) en una mezcla de disolventes 7:3 MeOH:AcOEt (10 mL) se añadió Pd/C al 10% (130 mg). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a t.a. bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) por 7 horas. El crudo de reacción se filtró al vacío sobre celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. El compuesto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 20:1 y 15:1 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. Se obtuvieron 0.1 g del derivado **16** como un sólido amorfo blanco. Rendimiento experimental: 92%.

$[\alpha]_D^{28}$ : +53 (c 1.2, acetona)

**RMN <sup>1</sup>H (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$ : 7.78 (s, 1H, H-5'), 5.42 (m, 1H, H-6), 4.91 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.1$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.6$  Hz, H-16), 4.86 (d, 1H,  $J_{1'',2''} = 3.7$  Hz, H-1''), 4.79 (m, 1H, H-3), 4.72 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.4$  Hz, -CH<sub>2</sub> het), 4.58 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.4$  Hz, -CH<sub>2</sub> het), 3.82 (dd, 2H,  $J_{26,25} = 6.0$  Hz,  $J_{gem} = 3.6$  Hz, H-26), 3.73 (dd, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz,  $J_{6'',a,5''} = 2.5$  Hz, H-6''a), 3.68 (dd, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz,  $J_{6'',b,5''} = 4.9$  Hz, H-6''b), 3.63 (dd, 1H,  $J_{3'',2''} = 9.6$  Hz,  $J_{3'',4''} = 9.3$  Hz, H-3''), 3.55 (ddd, 1H,  $J_{5'',4''} = 9.4$  Hz,  $J_{5'',6b''} = 4.9$  Hz,  $J_{5'',6a''} = 2.5$  Hz, H-5''), 3.40 (dd, 1H,  $J_{2'',3''} = 9.6$  Hz,  $J_{2'',1''} = 3.7$  Hz, H-2''), 3.34 (dd, 1H,  $J_{4'',5''} = 9.4$  Hz,  $J_{4'',3''} = 9.3$  Hz, H-4''), 2.90 (m, 1H, H-4a), 2.89 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 10.8$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.57 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.6$  Hz,  $J_{23a,24a} = 10.0$  Hz,  $J_{23a,24b} = 5.9$  Hz, H-23a), 2.50 (m, 1H, H-4b), 2.33 (m, 1H, H-15a), 2.29 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.6$  Hz,  $J_{23b,24b} = 10.1$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.1$  Hz, H-23b), 2.15 (m, 1H, H-2a), 2.10 (m, 1H, 2b), 1.98 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26), 1.94 (m, 1H, 7a), 1.89 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16), 1.87 (m, 1H, H-12a), 1.82 (dd, 1H,  $J_{17,20} = 10.8$  Hz,  $J_{17,16} = 8.1$  Hz, H-17), 1.68 (m, 1H, H-25), 1.44 (m, 1H, 11a), 1.40 (m, 1H, 11b), 1.06 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 1.04 (s, 3H, H-19), 0.85 (d, 3H,  $J_{27,25} = 7.05$  Hz, H-27), 0.81 (s, 3H, H-18).

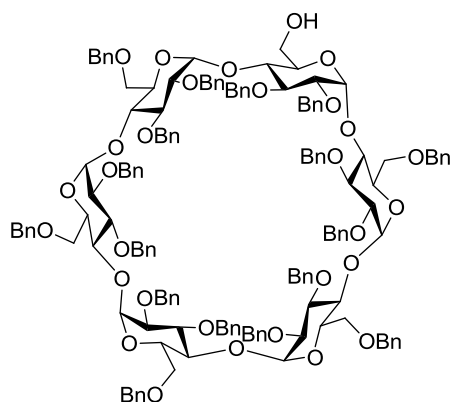
**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>-CD<sub>3</sub>OD)**  $\delta$ : 213.1 (C-22), 171.4 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 169.9 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 142.6 (C-4'), 137.4 (C-5), 123.9 (C-6), 122.5 (C-5'), 97.7 (C-1''), 75.5 (C-16), 73.7 (C-3''),

71.9 (C-5''), 71.8 (C-2''), 70.1 (C-4''), 68.7 (C-26), 61.5 (C-6''), 59.9 (-CH<sub>2</sub> het), 56.7 (C-3), 54.8 (C-17), 53.5 (C-14), 49.3 (C-9), 43.3 (C-20), 41.6 (C-13), 39.2 (C-12), 38.0 (C-23), 36.7 (C-10), 34.9 (C-4), 34.4 (C-15), 32.3 (C-1), 31.8 (C-25), 31.3 (C-7), 30.8 (C-8), 26.6 (C-2), 26.4 (C-24), 20.7 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 20.5 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 20.1 (C-11), 18.9 (C-19), 16.4 (C-21), 16.3 (C-27), 12.9 (C-18).

**LSIMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> 782 (100%), 115 (35%), 69 (40%), 55 (41%).

**HRLSIMS (m/z):** calculado para C<sub>40</sub>H<sub>61</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>11</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 782.4204, observado: 782.4193.

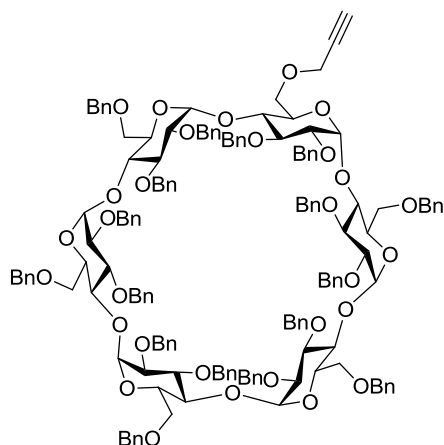
### 5.1.2.17 2<sup>A-F</sup>, 3<sup>A-F</sup>, 6<sup>B-F</sup>-Heptadecaquis-*O*-bencil- $\alpha$ -ciclodextrina (**69**)



Se preparó siguiendo una modificación del método descrito por Pearce y Sinaý.<sup>55</sup> A una solución de  $\alpha$ -ciclodextrina perbencilada (**68**, 3.1 g, 1.2 mmol) en tolueno (140 mL) sobre tamiz molecular de 4 Å, se añadió DIBAL-H 1M (36 mL, 36 mmol) lentamente y bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación 40 h, posteriormente se enfrió en baño de hielo y se eliminó el exceso de DIBAL añadiendo agua lentamente (50 mL). La mezcla se filtró al vacío, se diluyó con AcOEt (150 mL) y se lavó con salmuera (3×70 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna utilizando como eluyente hexano y un sistema de disolventes AcOEt:Hexano 1:2 para separar el producto di-A,D-desbencilado, mayoritario, del minoritario, mono-desbencilado. Se obtuvieron 0.52 g del compuesto **69** como una espuma blanca. Rendimiento experimental monoalcohol: 17%.

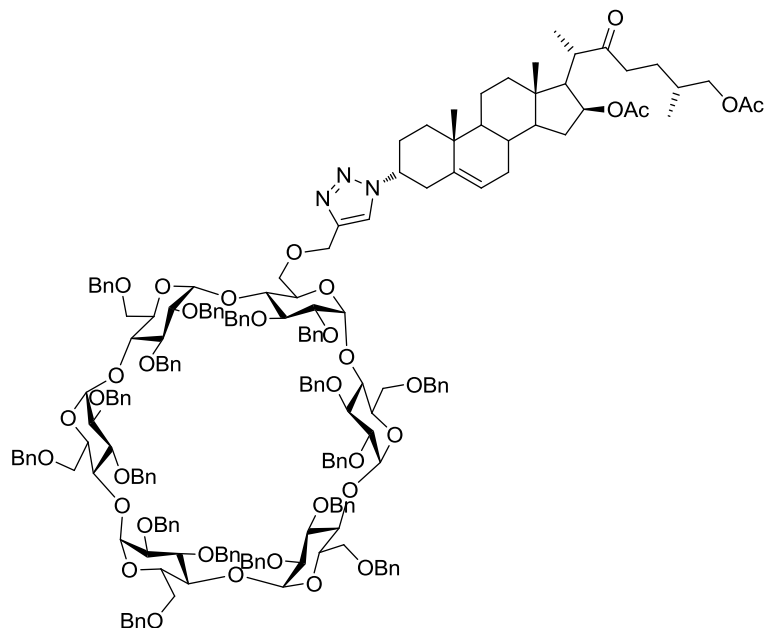
5.1.2.18 2<sup>A-F</sup>, 3<sup>A-F</sup>, 6<sup>B-F</sup>-Heptadecaquis-*O*-bencil-6<sup>A</sup>-*O*-(prop-2'-inil)- $\alpha$ -ciclodextrina

(70)



A una solución de la ciclodextrina **69** (0.14 g, 0.06 mmol) en una mezcla de disolventes anhidros 2:1 DMF:tolueno (3 mL) se añadió a 0 °C y bajo atmósfera inerte NaH (60% en aceite mineral, 56 mg, 0.12 mmol), se mantuvo en agitación a t.a. por 10 minutos y se añadió bromuro de propargilo (80% en tolueno, 12  $\mu$ L, 0.12 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación toda la noche, pasado ese tiempo se añadió a 0 °C MeOH y éter etílico (5 mL), se diluyó con AcOEt (10 mL), se lavó con salmuera (2 $\times$ 10 mL), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El bromuro de propargilo en exceso se eliminó al vacío. Se obtuvo el derivado **70** como un aceite amarillo en un rendimiento cuantitativo. El compuesto se utilizó para la siguiente reacción sin mayor purificación.

**5.1.2.19** 2<sup>A-F</sup>, 3<sup>A-F</sup>, 6<sup>B-F</sup>-Heptadecaquis-*O*-bencil-6<sup>A</sup>-*O*-{1'[(25''*R*)-16''β,26''-diacetoxi-22''-oxocolest-5''-en-3''α-il]-(1'*H*-1',2',3'-triazol-4'-il)metil}-α-ciclodextrina (**15**)



A una solución de la ciclodextrina **70** (0.15 g, 0.06 mmol) en una mezcla de disolventes 1:3 AcOEt:CH<sub>3</sub>CN (12 mL) se añadió el esteroide **10** (62 mg, 0.11 mmol), CuI (7.5 mg, 0.04 mmol) y DIPEA (9 μL, 0.05 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a t.a. por 44 horas. Posteriormente el disolvente se evaporó a presión reducida y el compuesto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 3:1 y 7:3 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.14 g del compuesto **15** como un aceite incoloro. Rendimiento experimental: 80%.

$[\alpha]_D^{30}$ : +32 (*c* 0.6, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

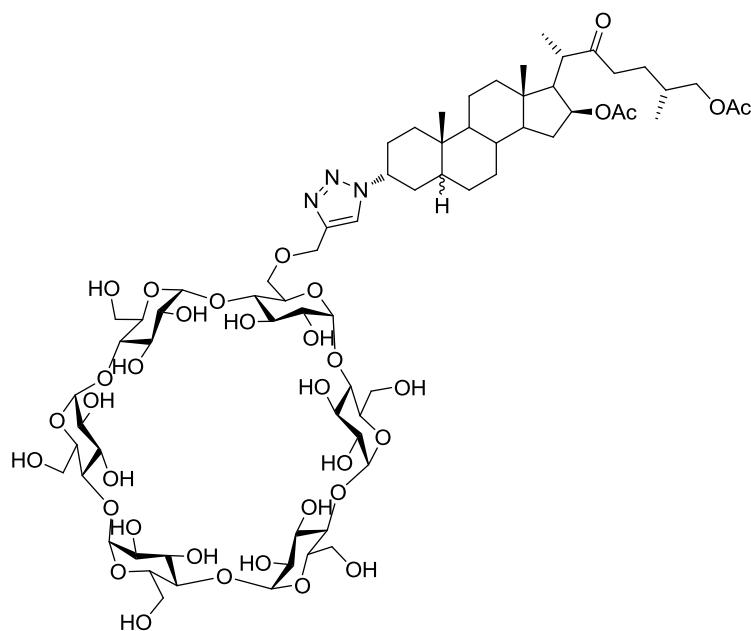
**RMN** <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.52 (s, 1H, H-5''), 7.16-7.01 (m, 85H, H-Ar), 5.31 (m, 1H, H-6''), 5.13-5.02 (m, 11H, -OCH<sub>2</sub>Ph 3, H-1), 4.94 (d, 1H, *J*<sub>1,2</sub> = 3.2 Hz, H-1), 4.89 (ddd, 1H, *J*<sub>16'',15a''</sub> = *J*<sub>16'',17''</sub> = 7.7 Hz, *J*<sub>16'',15b''</sub> = 4.9 Hz, H-16''), 4.79-4.75 (m, 6H, -OCH<sub>2</sub>Ph 3), 4.58 (sa, 1H, H-3''), 4.45 (m, 2H, -CH<sub>2</sub> het), 4.41-4.34 (m, 12H, -OCH<sub>2</sub>Ph 2), 4.41-4.20 (m, 10H, -OCH<sub>2</sub>Ph 6), 4.07-4.02 (m, 7H, H-3, H-4, H-6), 3.98-3.92 (m, 10H, H-3, H-4, H-5, H-6), 3.86-3.81 (m, 7H, H-2, H-5), 3.82 (m, 2H, H-26''), 3.60-3.34 (m, 12H, H-2, H-6), 2.86 (dq, 1H, *J*<sub>20'',17''</sub> = 10.8 Hz, *J*<sub>20'',21''</sub> = 7.3 Hz, H-20''), 2.74 (m, 1H, H-4a''), 2.54 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 17.6 Hz, *J*<sub>23a'',24a''</sub> = 10.1 Hz, *J*<sub>23a'',24b''</sub> = 5.9 Hz, H-23a''), 2.39 (m, 1H, H-4b''), 2.29 (m, 1H, H-15a''), 2.26 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 17.6 Hz, *J*<sub>23b'',24b''</sub> = 10.0 Hz, *J*<sub>23b'',24a''</sub> = 5.0 Hz, H-23b''), 2.05 (m, 1H, H-2a''), 1.97 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26''), 1.93

(m, 1H, H-2b''), 1.88 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16''), 1.68 (m, 1H, H-25''), 1.05 (d, 3H,  $J_{21'',20''} = 7.1$  Hz, H-21''), 0.96 (s, 3H, H-19''), 0.85 (d, 3H,  $J_{27'',25''} = 6.8$  Hz, H-27''), 0.77 (s, 3H, H-18'').

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 212.5 (C-22''), 171.1 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26''), 169.6 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16''), 143.7 (C-4'), 139.4-126.8 (C-Ar), 137.8 (C-5''), 123.7 (C-6''), 122.0 (C-5'), 98.7-98.5 (C-1), 81.0-80.8 (C-3), 79.0-79.6 (C-4), 79.1-78.9 (C-2), 75.7 (C-16''), 75.7-75.3 (-OCH<sub>2</sub>Ph 3), 73.5-73.3 (-OCH<sub>2</sub>Ph 6), 72.8-72.5 (-OCH<sub>2</sub>Ph 2), 71.6-71.4 (C-5), 69.4-69.0 (C-6), 68.8 (C-26''), 64.7 (-CH<sub>2</sub> het), 56.3 (C-3''), 54.9 (C-17''), 53.7 (C-14''), 49.4 (C-9''), 43.5 (C-20''), 41.8 (C-13''), 39.4 (C-12''), 38.3 (C-23''), 36.9 (C-10''), 35.3 (C-4''), 34.7 (C-15''), 32.6 (C-1''), 32.1 (C-25''), 31.5 (C-7''), 31.0 (C-8''), 26.7 (C-24''), 26.6 (C-2''), 21.0 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16''), 20.8 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26''), 20.2 (C-11''), 19.1 (C-19''), 16.7 (C-21''), 16.6 (C-27''), 13.1 (C-18'').

**MALDI-HRMS (m/z)**: calculado para C<sub>189</sub>H<sub>211</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>35</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 3105.471, observado: 3105.411.

#### 5.1.2.20 6<sup>A</sup>-O-{1'[(25''R)-16''β,26''-Diacetoxi-22''-oxo-5''ξ-colestan-3''α-il)-(1'H-1',2',3'-triazol-4'-il)metil}-α-ciclodextrina (17)



A una solución del derivado **15** (54 mg, 0.02 mmol) en una mezcla de disolventes 1:1 AcOEt:MeOH (5 ml) se añadió Pd(OH)<sub>2</sub>/C al 20% (0.12 g) y se colocó en agitación bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) por 4 días. El compuesto se filtró al vacío sobre celita y el disolvente se evaporó a

presión reducida. Se obtuvieron 16 mg del derivado **17** como un sólido amorfo blanco. Rendimiento experimental: 59%.

$[\alpha]_D^{26}$ : +50 (*c* 1.0, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

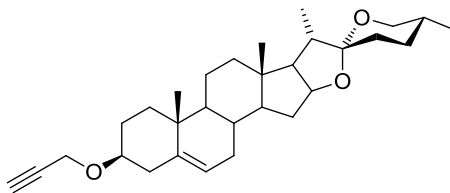
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$ : 8.19 (s, 1H, H-5'), 4.82 (m, 1H, H-16''), 4.82-4.74 (m, 6H, H-1), 4.49 (m, 1H, H-3''), 3.86-3.82 (m, 3H, H-26'', H-3), 3.79-3.75 (m, 5H, H-3), 3.70-3.57 (m, 14H, H-4, H-5, H-6), 3.43-3.23 (m, H-2, H-4, H-5), 2.89 (m, 1H, H-20''), 2.67 (m, 1H, H-23a''), 2.35 (m, 1H, 23b''), 2.22 (m, 1H, H-15a''), 2.0 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26''), 1.91 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16''), 1.06 (d, 3H,  $J_{21'',20''} = 6.7$  Hz, H-21''), 0.96 (s, 3H, H-19''), 0.85 (d, 3H,  $J_{27'',25''} = 6.4$  Hz, H-27''), 0.82 (s, 3H, H-18').

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)**  $\delta$ : 212.5 (C-22''), 170.4 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26''), 169.3 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16''), 143.8 (C-4'), 122.1 (C-5'), 102.1-101.9 (C-1), 82.4-81.9 (C-4), 74.6 (C-16''), 73.3 (C-3), 72.3-72.0 (C-2, C-5), 70.5 (CH), 68.6 (C-6), 68.2 (C-26''), 64.0 (-CH<sub>2</sub> het), 63.0 (CH<sub>2</sub>), 60.4-60.1 (C-6), 59.8 (C-3''), 54.9 (C-17''), 52.6 (C-14''), 42.7 (C-20''), 41.8 (C-9''), 41.7 (C-13''), 39.4 (C-12''), 37.6 (C-23''), 35.2 (C-4''), 35.1 (C-10''), 34.8 (C-5''), 34.3 (C-15''), 33.3 (CH<sub>2</sub>), 31.5 (C-25''), 27.6 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (C-24''), 25.6 (C-2''), 24.7 (C-8''), 23.0 (C-19''), 20.7 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16''), 20.6 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26''), 20.2 (C-11''), 16.4 (C-21''), 16.3 (C-27''), 13.1 (C-18').

**LSIMS (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> 1576 (<1%), 685 (25%), 237 (85%), 57 (100%).

**HRLSIMS (*m/z*):** calculado para C<sub>70</sub>H<sub>111</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>35</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1576.6896, observado: 1576.6892.

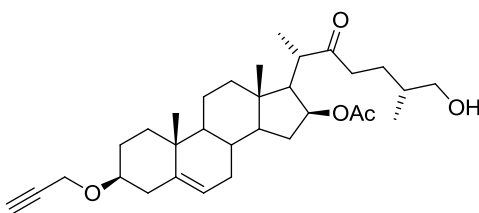
#### 5.1.2.21 (25*R*)-3 $\beta$ -*O*-(Prop-2'-inil)espirost-5-eno (**18**)



Se preparó de acuerdo al método descrito por Pérez-Labrada *et al.*<sup>35b</sup> A una solución de diosgenina (**1**) (0.1 g, 0.24 mmol) en DMF anhidra (4 ml) sobre tamiz molecular de 4 Å, se agregó NaH (60% en aceite mineral, 30 mg, 0.72 mmol) a 0 °C y bajo atmósfera inerte, se mantuvo en agitación constante a t.a. por 10 minutos y finalmente se agregó bromuro de propargilo (50% en tolueno, 0.13 mL, 0.72 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 1 noche, posteriormente se

añadió MeOH, Et<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O (5 mL) a 0 °C, la mezcla se diluyó con AcOEt (15 mL) y se lavó con salmuera (2×10 mL). El producto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 9:1 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 85 mg del derivado **18** como un sólido amorfo blanco. Rendimiento experimental: 78%. Los datos físicos y espectroscópicos se compararon con los reportados en la bibliografía.<sup>35b</sup>

#### 5.1.2.2 Acetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxo-3β-*O*-(prop-2'-inil)-colest-5-en-16β-ilo (**19**)



A una solución del derivado **18** (1.68 g, 3.71 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (18 mL) se añadió Ac<sub>2</sub>O (6 mL, 63.9 mmol) y BF<sub>3</sub>•Et<sub>2</sub>O (4.9 mL, 38.4 mmol) lentamente, a 0 °C y bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a 0 °C por 9 min, posteriormente se vertió en hielo y se mantuvo en agitación toda la noche. El producto se lavó con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3×10 mL) y salmuera (2×10 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El compuesto se purificó utilizando cromatografía flash y como eluyente un sistema de disolventes 4:1 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.66 g del compuesto **19** como una espuma ligeramente amarilla. Rendimiento experimental: 35%.

[α]<sub>D</sub><sup>24</sup>: +2 (c 0.22, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 5.35 (m, 1H, H-6), 4.98 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.0$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.9$  Hz, H-16), 4.19 (d, 2H,  $J_{1',3'} = 2.4$  Hz, H-1'), 3.42 (d, 2H,  $J_{26,25} = 5.8$  Hz, H-26), 3.40 (m, 1H, H-3), 2.96 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 11.0$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.64 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.1$  Hz,  $J_{23a,24a} = 8.4$  Hz,  $J_{23a,24b} = 6.7$  Hz, H-23a), 2.41 (t, 1H,  $J_{3',1'} = 2.4$  Hz, H-3'), 2.40 (m, 1H, H-23b), 2.40 (m, 1H, H-15a), 2.38 (m, 1H, H-4a), 2.21 (m, 1H, H-4b), 1.97 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>), 1.86 (m, 1H, H-1a), 1.70 (m, 1H, H-24a), 1.34 (m, 1H, H-24b), 1.28 (m, 1H, H-12b), 1.14 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 1.0 (s, 3H, H-19), 0.91 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.8$  Hz, H-27), 0.87 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 213.7 (C-22), 169.8 (-OCOCH<sub>3</sub>), 140.4 (C-5), 121.5 (C-6), 80.3 (C-3'), 78.0 (C-3), 75.7 (C-16), 73.8 (C-2'), 67.4 (C-26), 55.1 (C-1'), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.8

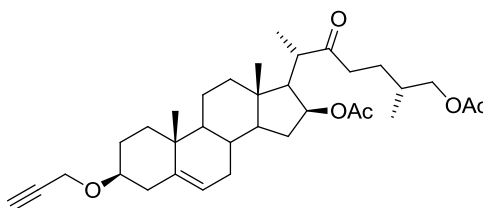
(C-9), 43.4 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 38.6 (C-4), 38.5 (C-23), 37.0 (C-1), 36.7 (C-10), 35.4 (C-25), 34.8 (C-15), 31.6 (C-7), 31.2 (C-8), 28.0 (C-2), 26.1 (C-24), 21.1(-OCOCH<sub>3</sub>), 20.7 (C-11), 19.3 (C-19), 16.8 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**LSIMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> 535 (50%), 237 (100%), 105 (57%), 91 (86%), 73 (56%), 69 (74%).

**HRLSIMS (m/z):** calculado para C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>NaO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 535.3399, observado: 535.3403.

### 5.1.2.23 Diacetato de (25R)-22-oxo-3β-O-(prop-2'-inil)-colest-5-eno-16β,26-diilo

(20)



A una solución del derivado **19** (0.13 g, 0.26 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) se añadió Ac<sub>2</sub>O (0.3 mL, 2.8 mmol) y cantidades catalíticas de DMAP. La reacción se mantuvo en agitación por 10 minutos, se lavó con salmuera (2×10 mL) y la fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó utilizando cromatografía flash y un sistema de disolventes 9:1 y 4:1 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.14 g del derivado **20** como un sólido cristalino blanco. Rendimiento experimental: 99%.

[α]<sub>D</sub><sup>25</sup>: +9 (c 0.57, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

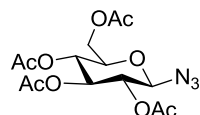
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 5.35 (m, 1H, H-6), 4.98 (ddd, 1H, *J*<sub>16,15a</sub> = *J*<sub>16,17</sub> = 8.0 Hz, *J*<sub>16,15b</sub> = 4.8 Hz, H-16), 4.19 (d, 2H, *J*<sub>1',3'</sub> = 2.4 Hz, H-1'), 3.90 (dd, 2H, *J*<sub>26,25</sub> = 6.1 Hz, *J*<sub>gem</sub> = 1.8 Hz, H-26), 3.38 (m, 1H, H-3), 2.95 (dq, 1H, *J*<sub>20,17</sub> = 11.1 Hz, *J*<sub>20,21</sub> = 7.2 Hz, H-20), 2.63 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 17.8 Hz, *J*<sub>23a,24a</sub> = 10.1 Hz, *J*<sub>23a,24b</sub> = 5.8 Hz, H-23a), 2.42 (m, 1H, H-15a), 2.41 (t, 1H, *J*<sub>3',1'</sub> = 2.4 Hz, H-3'), 2.37 (m, 1H, H-4a), 2.34 (ddd, 1H, *J*<sub>gem</sub> = 17.8 Hz, *J*<sub>23b,24b</sub> = 10.0 Hz, *J*<sub>23b,24a</sub> = 5.1 Hz, H-23b), 2.21 (m, 1H, H-4b), 2.06 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26), 1.96 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16), 1.86 (m, 1H, H-1a), 1.74 (m, 1H, H-25), 1.69 (m, 1H, H-24a), 1.37 (m, 1H, H-24b), 1.27 (m, 1H, H-12b), 1.14 (d, 3H, *J*<sub>21,20</sub> = 7.2 Hz, H-21), 1.0 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, 3H, *J*<sub>27,25</sub> = 6.7 Hz, H-27), 0.87 (s, 3H, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 212.7 (C-22), 171.2 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-26), 169.7 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-16), 140.4 (C-5), 121.5 (C-6), 80.3 (C-3'), 78.0 (C-3), 75.7 (C-16), 73.8 (C-2'), 68.9 (C-26), 55.1 (C-1'), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.8 (C-9), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 38.6 (C-4), 38.3 (C-23), 37.0 (C-1), 36.7 (C-10), 34.8 (C-15), 32.1 (C-25), 31.6 (C-7), 31.2 (C-8), 28.0 (C-2), 26.7 (C-24), 21.1 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-16), 20.9 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-26), 20.7 (C-11), 19.3 (C-19), 16.8 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**LSIMS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  577 (100%), 237 (91%), 115 (85%), 91 (66%), 73 (51%), 69 (48%).

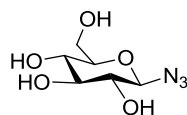
**HRLSIMS ( $m/z$ ):** calculado para  $\text{C}_{34}\text{H}_{50}\text{NaO}_6$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 577.3505, observado: 577.3497.

#### 5.1.2.24 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil azida (**41**)



Se preparó de acuerdo al método descrito por Kumar *et al.*<sup>49</sup> A una solución de bromuro de 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosilo (**40**) (0.35 g, 0.85 mmol) en DMSO anhidro (4 mL) se añadió  $\text{NaN}_3$  (66 mg, 1.0 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla se colocó en agitación constante y a t.a. por 10 minutos. Posteriormente se diluyó con agua (10 mL) y el producto se lavó extrajo con  $\text{AcOEt}$  ( $3 \times 10$  mL). La fase orgánica se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se llevó a sequedad. El producto se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación. Se obtuvo el azúcar **41** como un sólido amorfo amarillo en un rendimiento cuantitativo.

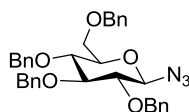
#### 5.1.2.25 $\beta$ -D-Glucopiranosil azida (**42**)



A una solución del derivado **41** (2.78 g, 7.45 mmol) en  $\text{MeOH}$  anhidro (35 mL) se añadió una solución de  $\text{NaOMe}$  0.5 M (14.8 mL, 7.45 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante y a t.a. por 1 hora. Posteriormente se agregó Amberlita IR-120 ( $\text{H}^+$ ), previamente lavada con  $\text{MeOH}$ , hasta alcanzar un pH neutro. La solución se filtró y el disolvente se

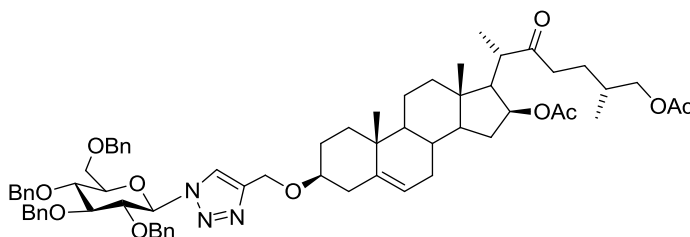
evaporó a presión reducida. El producto obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación. Se obtuvieron 1.51 g del derivado **42** como un sólido amorfo amarillo. Rendimiento experimental: 99%.

#### 5.1.2.26 2,3,4,6-Tetra-*O*-bencil- $\beta$ -D-glucopiranosil azida (**43**)



A una solución del azúcar **42** (1.51 g, 7.35 mmol) en DMF anhidro (50 mL) se añadió NaH (60% en aceite mineral, 2.83 g, 70.7 mmol) a 0 °C y bajo atmósfera inerte, la mezcla se mantuvo en agitación por 10 minutos a t.a., finalmente se añadió BnCl (6.8 mL, 59.1 mmol) y se mantuvo en agitación constante por 1 noche. Al finalizar la reacción se agregó MeOH, Et<sub>2</sub>O y H<sub>2</sub>O destilada (10 mL) a 0 °C, la mezcla se diluyó con AcOEt (40 mL) y se lavó con salmuera (2×50 mL). La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía flash utilizando un sistema de disolventes 95:5 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 1.56 g del derivado **43** como un aceite amarillo. Rendimiento experimental: 38%.

#### 5.1.2.27 Diacetato de (25*R*)-3 $\beta$ -*O*-[1'-(2'',3'',4'',6''-tetra-*O*-bencil- $\beta$ -D-glucopiranosil)-1'*H*-1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (**21**)



A una solución del azúcar **43** (0.21 g, 0.37 mmol) en una mezcla de disolventes 1:3 AcOEt:CH<sub>3</sub>CN (12 mL) se añadió el esteroide **20** (0.1 g, 0.18 mmol), CuI (18 mg, 0.09 mmol) y DIPEA (20  $\mu$ L, 0.11 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante y a t.a. por 2 horas, tiempo en el cual se observó la desaparición de la materia prima. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía flash utilizando un sistema de disolventes 9:2

Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.18 g del derivado **21** como una espuma blanca. Rendimiento experimental: 90%.

$[\alpha]_D^{25}$ : +7 (*c* 1.15, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

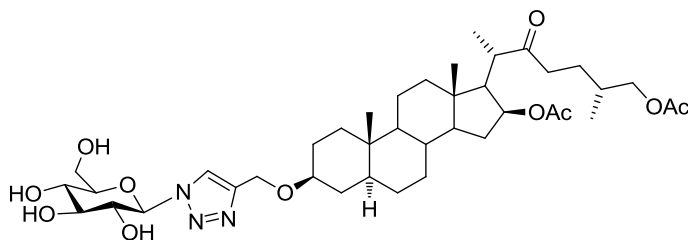
**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 7.67 (s, 1H, H-5'), 7.33-6.94 (m, 20H, H-Ar), 5.58 (d, 1H,  $J_{1',2''} = 9.1$  Hz, H-1''), 5.27 (m, 1H, H-6), 4.98 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.0$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.8$  Hz, H-16), 4.93 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.1$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 3''), 4.89 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.1$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 3''), 4.85 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.7$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 4''), 4.70 (s, 2H, -CH<sub>2</sub> het), 4.60 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.7$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 4''), 4.55 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 6''), 4.49 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.1$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 6''), 4.45 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.5$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 2''), 4.04 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.5$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 2''), 4.03 (m, 1H, H-2''), 3.90 (d, 2H,  $J_{26,25} = 6.1$  Hz, H-26), 3.84 (m, 1H, H-3''), 3.80 (m, 1H, H-4''), 3.72 (m, 2H, H-6''), 3.69 (m, 1H, H-5''), 3.29 (m, 1H, H-3), 2.95 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 10.9$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.63 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.7$  Hz,  $J_{23a,24a} = 10.1$  Hz,  $J_{23a,24b} = 5.7$  Hz, H-23a), 2.40 (m, 1H, H-15a), 2.37 (m, 1H, H-4a), 2.35 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.8$  Hz,  $J_{23b,24b} = 9.9$  Hz,  $J_{23b,24a} = 4.9$  Hz, H-23b), 2.23 (m, 1H, H-4b), 2.06 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26), 1.96 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16), 1.81 (m, 1H, H-1a), 1.74 (m, 1H, H-25), 1.65 (m, 1H, H-24a), 1.36 (m, 1H, H-24b), 1.14 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.86 (s, 3H, H-18).

**RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)** δ: 212.7 (C-22), 171.2 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 169.7 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 146.2 (C-4'), 140.4 (C-5), 138.1-127.7 (C-Ar), 121.7 (C-5'), 121.4 (C-6), 87.5 (C-1''), 85.3 (C-3''), 80.9 (C-2''), 78.4 (C-3), 77.9 (C-5''), 77.2 (C-4''), 75.8 (-OCH<sub>2</sub>Ph 3''), 75.7 (C-16), 75.2 (-OCH<sub>2</sub>Ph 4''), 74.9 (-OCH<sub>2</sub>Ph 2''), 73.5 (-OCH<sub>2</sub>Ph 6''), 68.9 (C-26), 68.3 (C-6''), 61.4 (-CH<sub>2</sub> het), 55.0 (C-17), 53.9 (C-14), 49.7 (C-9), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.6 (C-12), 39.0 (C-4), 38.3 (C-23), 36.9 (C-1), 36.7 (C-10), 34.8 (C-15), 32.1 (C-25), 31.5 (C-7), 31.2 (C-8), 28.1 (C-2), 26.7 (C-24), 21.1 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 20.9 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 20.7 (C-11), 19.3 (C-19), 16.8 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**LSIMS (*m/z*):** [M+Na]<sup>+</sup> 1142 (4%), 181 (11%), 91 (100%).

**HRLSIMS (*m/z*):** calculado para C<sub>68</sub>H<sub>85</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>11</sub> [M+Na]<sup>+</sup>: 1142.6082, observado: 1142.6124.

**5.1.2.28 Diacetato de (25R)-3β-O-[1'-(β-D-glucopiranosil)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxo-5α-colestano-16β,26-diilo (23)**



A una solución del derivado **21** (0.37 g, 0.33 mmol) en una mezcla de disolventes 7:3 MeOH:AcOEt (20 mL) se añadió Pd/C al 10% (0.44 g) y AcOH (1.5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante por 4 días bajo atmósfera de H<sub>2</sub>. El crudo de reacción se filtró al vacío sobre una cama de sílice y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH 15:1. Se obtuvieron 0.21 g del derivado **23** como un sólido blanco amorfo. Rendimiento experimental: 83%.

$[\alpha]_D^{25}$ : +25 (c 0.62, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

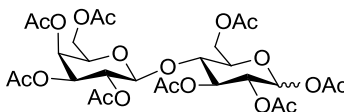
**RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ: 8.15 (s, 1H, H-5''), 5.60 (d, 1H,  $J_{1'',2''} = 9.2$  Hz, H-1''), 4.96 (ddd, 1H,  $J_{16,15a} = J_{16,17} = 8.0$  Hz,  $J_{16,15b} = 4.5$  Hz, H-16), 4.64 (s, 2H, -CH<sub>2</sub> het), 3.90 (dd, 2H,  $J_{26,25} = 6.2$  Hz,  $J_{gem} = 1.2$  Hz, H-26), 3.88 (m, 1H, H-2''), 3.87 (dd, 1H,  $J_{gem} = 12.2$  Hz,  $J_{6'',a,5''} = 1.95$  Hz, H-6''a), 3.71 (dd, 1H,  $J_{gem} = 12.2$  Hz,  $J_{6'',b,5''} = 5.5$  Hz, H-6''b), 3.57 (m, 1H, H-5''), 3.56 (dd, 1H,  $J_{3'',2''} = J_{3'',4''} = 8.9$  Hz, H-3''), 3.49 (dd, 1H,  $J_{4'',5''} = 9.3$  Hz,  $J_{4'',3''} = 8.9$  Hz, H-4''), 3.43 (m, 1H, H-3), 3.0 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 10.9$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.73 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.1$  Hz,  $J_{23a,24a} = 9.5$  Hz,  $J_{23a,24b} = 6.1$  Hz, H-23a), 2.42 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 18.1$  Hz,  $J_{23b,24b} = 9.6$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.4$  Hz, H-23b), 2.32 (m, 1H, H-15a), 2.03 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-26), 1.96 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub> C-16), 1.86 (dd, 1H,  $J_{17,20} = 10.9$  Hz,  $J_{17,16} = 8.0$  Hz, H-17), 1.13 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 0.92 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.8$  Hz, H-27), 0.89 (s, 3H, H-18), 0.84 (s, 3H, H-19), 0.72 (m, 1H, H-5).

**RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)** δ: 215.3 (C-22), 172.9 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 171.7 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 146.6 (C-4'), 124.2 (C-5'), 89.5 (C-1''), 81.1 (C-5''), 79.5 (C-3), 78.4 (C-3''), 76.8 (C-16), 74.0 (C-2''), 70.8 (C-4''), 70.0 (C-26), 62.3 (C-6''), 61.8 (-CH<sub>2</sub> het), 56.8 (C-17), 55.6 (C-5), 55.1 (C-14), 46.0 (C-9), 44.7 (C-20), 43.3 (C-13), 41.2 (C-12), 39.2 (C-23), 38.0 (C-4), 36.8 (C-10), 36.2 (C-8), 35.7 (C-1), 35.7 (C-15), 33.3 (C-25), 33.1 (C-7), 29.8 (C-6), 29.1 (C-2), 27.8 (C-24), 22.1 (C-11), 21.2 (-OCOCH<sub>3</sub> C-16), 20.8 (-OCOCH<sub>3</sub> C-26), 17.3 (C-21), 17.0 (C-27), 13.9 (C-18), 12.7 (C-19).

**LSIMS (m/z):** [M+Na]<sup>+</sup> 784 (37%), 115 (98%), 91 (66%), 69 (100%), 55 (73%).

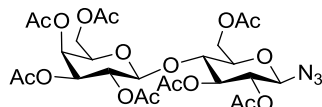
**HRLSIMS ( $m/z$ ):** calculado para  $C_{40}H_{63}N_3NaO_{11}$   $[M+Na]^+$ : 784.4360, observado: 784.4337.

#### 5.1.2.29 1,2,3,6,2',3',4',6'-Octa-*O*-acetil lactosa (49)

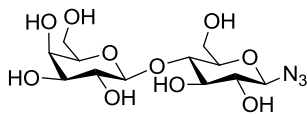


A una solución de lactosa (**48**) (2 g, 5.8 mmol) en  $Ac_2O$  (5.4 mL, 57.1 mmol) agitada durante 5 minutos, se añadieron 2 gotas de  $H_2SO_4$  concentrado con lo que la temperatura de la reacción aumentó. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante hasta que la reacción se enfrió, se añadió  $CH_2Cl_2$  (10 mL) y se mantuvo 10 minutos más en agitación. Finalmente el crudo de reacción se lavó con una solución saturada de  $NaHCO_3$  ( $2 \times 10$  mL) y salmuera ( $2 \times 10$  mL). La fase orgánica se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se llevó a sequedad. El producto obtenido se utilizó para la siguiente reacción sin mayor purificación. Se obtuvieron 3.7 g del azúcar **49** como un sólido blanco. Rendimiento experimental: 95%.

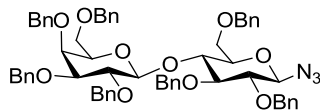
#### 5.1.2.30 2,3,6,2',3',4',6'-Hepta-*O*-acetil- $\beta$ -lactosil azida (**50**)



Se preparó de acuerdo al método descrito por Cagnoni *et al.*<sup>51</sup> A una solución de lactosa peracetilada **49** (3.3 g, 4.9 mmol) en  $CH_2Cl_2$  anhidro (40 mL) se añadió  $TMSN_3$  (1.3 mL, 9.7 mmol) y  $SnCl_4$  (0.35 mL, 3 mmol) en agitación y bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante por 3 días, se lavó con salmuera ( $2 \times 20$  mL), se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y se llevó a sequedad. El producto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 3:2 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 2.8 g del azúcar **50** como una espuma blanca. Rendimiento experimental: 86%.

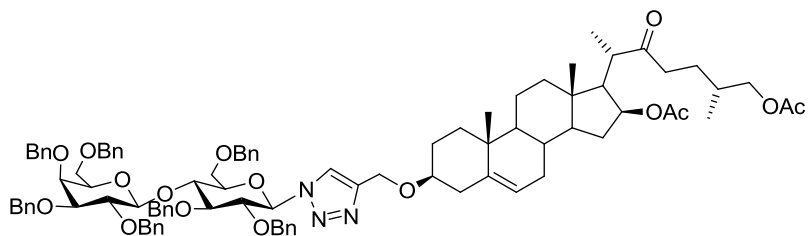
5.1.2.31  $\beta$ -D-lactosil azida (**51**)

A una solución del azúcar **50** (2.8 g, 4.22 mmol) en MeOH anhidro (25 mL) se añadió una solución de NaOMe 0.5 M (14.5 mL, 7.25 mmol) bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante y a t.a. por 1.5 horas. Posteriormente se agregó Amberlita IR-120 ( $H^+$ ), previamente lavada con MeOH, hasta alcanzar un pH neutro. El crudo de reacción se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El producto obtenido se utilizó en la siguiente reacción sin mayor purificación. Se obtuvo el azúcar **51** como una espuma blanca y en un rendimiento cuantitativo.

5.1.2.32 2,3,6,2',3',4',6'-Hepta-*O*-bencil- $\beta$ -lactosil azida (**52**)

A una solución del azúcar **51** (1.5 g, 4.08 mmol) en DMF anhidro (33 mL) se agregó NaH (60% en aceite mineral, 2.4 g, 61 mmol) a 0 °C y bajo atmósfera de argón. Después de 10 minutos en agitación a t.a. se añadió BnCl (7.0 mL, 61 mmol) y se agitó por 1 día. Finalizada la reacción se añadió MeOH, éter etílico y  $H_2O$  destilada (10 mL) a 0 °C, se diluyó con AcOEt (30 mL) y se lavó con salmuera (2x25 mL). EL producto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 95:5 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 2.3 g del azúcar **52** como un sólido amorfo amarillo. Rendimiento experimental: 56%.

**5.1.2.33 Diacetato de (25R)-3 $\beta$ -O-[1'-(2'',3'',6'',2''',3''',4''',6''')-hepta-O-bencil- $\beta$ -lactosil)-1'H-1',2',3'-triazol-4'-il]metil-22-oxocolest-5-eno-16 $\beta$ ,26-diilo (22)**



A una solución del azúcar **52** (0.3 g, 0.3 mmol) en una mezcla de disolventes 1:3 AcOEt:CH<sub>3</sub>CN (10 mL) se añadió el esteroide **20** (82 mg, 0.15 mmol), CuI (14 mg, 0.07 mmol) y DIPEA (16  $\mu$ L, 0.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a t.a por 2.5 horas. El disolvente se evaporó a presión reducida y el producto se purificó por cromatografía flash utilizando como eluyente un sistema de disolventes 3:1 y 2.5:1 Hexano:AcOEt. Se obtuvieron 0.19 g del derivado **22** como un aceite incoloro. Rendimiento experimental: 84%.

$[\alpha]_D^{25}$ : -3 (c 0.89, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)

**RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)**  $\delta$ : 7.57 (s, 1H, H-5'), 7.35-6.92 (m, 35H, H-Ar), 5.58 (d, 1H,  $J_{1',2''} = 9.1$  Hz, H-1''), 5.26 (m, 1H, H-6), 5.14 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.6$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 3''), 4.98 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.5$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 4'''), 4.98 (m, 1H, H-16), 4.84 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.2$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 2''), 4.75 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.2$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 2'''), 4.74 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 3'''), 4.70 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 3'''), 4.69 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.6$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 3''), 4.69 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.6$  Hz, -CH<sub>2</sub> het), 4.65 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.6$  Hz, -CH<sub>2</sub> het), 4.56 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.6$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 2''), 4.56 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.5$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 4'''), 4.48 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 6''), 4.45 (d, 1H,  $J_{1'',2'''} = 7.8$  Hz, H-1'''), 4.38 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.9$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 6'''), 4.32 (d, 1H,  $J_{gem} = 12.0$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 6''), 4.26 (d, 1H,  $J_{gem} = 11.9$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 6'''), 4.12 (m, 1H, H-4''), 4.08 (d, 1H,  $J_{gem} = 10.6$  Hz, -OCH<sub>2</sub>Ph 2''), 3.92 (m, 1H, H-4'''), 3.90 (dd, 2H,  $J_{26,25} = 6.1$  Hz,  $J_{gem} = 1.6$  Hz, H-26), 3.88 (dd, 1H,  $J_{2'',1''} = 9.1$  Hz,  $J_{2'',3''} = 9.0$  Hz, H-2''), 3.84 (dd, 1H,  $J_{gem} = 11.2$  Hz,  $J_{6'',5''} = 3.5$  Hz, H-6''a), 3.78 (dd, 1H,  $J_{2''',3'''} = 9.7$  Hz,  $J_{2''',1'''} = 7.8$  Hz, H-2'''), 3.73 (dd, 1H,  $J_{3'',2''} = J_{3'',4''} = 9$  Hz, H-3''), 3.62 (dd, 1H,  $J_{gem} = 11.2$  Hz,  $J_{6'',b,5''} = 0.9$  Hz, H-6''b), 3.53 (m, 1H, H-6''')a), 3.51 (m, 1H, H-5''), 3.42 (dd, 1H,  $J_{3''',2'''} = 9.7$  Hz,  $J_{3''',4'''} = 2.9$  Hz, H-3'''), 3.38 (m, 1H, H-6''')b), 3.38 (m, 1H, H-5'''), 3.27 (m, 1H, H-3), 2.95 (dq, 1H,  $J_{20,17} = 11.0$  Hz,  $J_{20,21} = 7.1$  Hz, H-20), 2.62 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.8$  Hz,  $J_{23a,24a} = 10.1$  Hz,  $J_{23a,24b} = 5.8$  Hz, H-23a), 2.40 (m, 1H, H-15a), 2.36 (m, 1H, H-4a), 2.35 (ddd, 1H,  $J_{gem} = 17.8$  Hz,  $J_{23b,24b} = 10$  Hz,  $J_{23b,24a} = 5.2$  Hz, H-23b), 2.22 (m, 1H, H-4b), 2.05 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>, C-26), 1.96 (s, 3H, -OCOCH<sub>3</sub>, C-16), 1.91 (dd, 1H,  $J_{17,20} = 11.0$  Hz,  $J_{17,16} = 8.2$  Hz,

H-17), 1.80 (m, 1H, H-1a), 1.75 (m, 1H, H-25), 1.66 (m, 1H, H-24a), 1.14 (d, 3H,  $J_{21,20} = 7.1$  Hz, H-21), 0.98 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, 3H,  $J_{27,25} = 6.7$  Hz, H-27), 0.85 (s, 3H, H-18).

**RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ :** 212.7 (C-22), 171.1 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-26), 169.7 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-16), 146.1 (C-4'), 140.4 (C-5), 138.6-127.6 (C-Ar), 121.4 (C-6), 121.1 (C-5'), 102.6 (C-1'''), 87.4 (C-1''), 83.6 (C-3''), 82.4 (C-3'''), 80.0 (C-2''), 79.8 (C-2'''), 78.3 (C-3), 78.0 (C-5''), 75.7 (C-16), 75.6 (C-4''), 75.4 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  3''), 75.3 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  2''), 74.9 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  2''), 74.6 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  4'''), 73.5 (C-4'''), 73.3 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  6''), 73.1 (C-5'''), 73.1 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  6''), 72.5 ( $-\text{OCH}_2\text{Ph}$  3'''), 68.8 (C-26), 68.0 (C-6'''), 67.6 (C-6''), 61.3 ( $-\text{CH}_2$  het), 54.9 (C-17), 53.8 (C-14), 49.7 (C-9), 43.5 (C-20), 41.8 (C-13), 39.5 (C-12), 38.9 (C-4), 38.2 (C-23), 36.9 (C-1), 36.6 (C-10), 34.7 (C-15), 32.0 (C-25), 31.5 (C-7), 31.1 (C-8), 28.0 (C-2), 26.6 (C-24), 21.1 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-16), 20.9 ( $-\text{OCOCH}_3$  C-26), 20.6 (C-11), 19.2 (C-19), 16.7 (C-21), 16.6 (C-27), 13.2 (C-18).

**LSIMS ( $m/z$ ):**  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  1574 (<1%), 181 (13%), 91 (100%).

**HRLSIMS ( $m/z$ ):** calculado para  $\text{C}_{95}\text{H}_{113}\text{N}_3\text{NaO}_{16}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ : 1574.8019, observado: 1574.8041.

## 5.2 Pruebas biológicas

### 5.2.1 Actividad antioxidante

#### 5.2.1.1 Ensayo de capacidad de captación de radicales libres (DPPH)

La capacidad de captación de radicales libres se midió utilizando el método del DPPH siguiendo la metodología de Prior *et. al.*<sup>60</sup> en un espectrofotómetro Hitachi U-2900 utilizando cubetas de poliestireno. El procedimiento utilizado fue el siguiente, a una disolución de DPPH (60  $\mu\text{M}$ ) en MeOH grado HPLC (1.17 mL) se añadió una disolución metanólica de la selenourea **13** (30  $\mu\text{L}$ ) usando 6 concentraciones distintas, o bien MeOH puro (30  $\mu\text{L}$ ) para el caso de la muestra control. Las muestras se mantuvieron en oscuridad a t.a. por 30 min y posteriormente se midió la disminución de la absorbancia a 515 nm frente al blanco de MeOH. Todas las medidas se realizaron por triplicado. La concentración remanente de DPPH se calculó utilizando la expresión:

$$\% \text{ DPPH remanente} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$  y  $A_{\text{control}}$  corresponden a las absorbancias a 515 nm del radical libre en las disoluciones de la muestra y la disolución control respectivamente.

Se representa gráficamente el DPPH remanente frente a la concentración de antioxidante en la cubeta y a partir de la gráfica se interpola el valor de  $EC_{50}$  (*Effective Concentration*), esto es, la concentración del antioxidante necesario para reducir la concentración del DPPH al 50% de su valor inicial. El experimento se llevó a cabo por triplicado. El valor está expresado como el intervalo de confianza, el cual fue calculado para  $n = 3$  y  $P = 0.95$  empleando la distribución  $t$  de *Student*.

### 5.2.1.2 Ensayo de actividad mimética de la enzima Glutación peroxidasa (GPx)

La actividad mimética del derivado **13** se midió siguiendo la metodología descrita por Iwaoka *et al.*<sup>61</sup> basada en la reducción del  $H_2O_2$  en presencia de ditioneitol ( $DTT^{red}$ ).

El experimento realizado fue el siguiente,  $DTT^{red}$  (22.0 mg, 0.14 mmol) y la selenourea **13** (1.0 mg, 1.4  $\mu$ mol) se disolvieron en  $CD_3OD$  (0.6 mL). La reacción dio inicio al adicionar  $H_2O_2$  al 30% (14.3  $\mu$ L, 0.14 mmol) y el proceso catalítico se monitoreó por espectroscopía de RMN de  $^1H$ , siguiendo la desaparición de las señales asociadas al  $DTT^{red}$  ( $\delta = 2.64$  ppm y 3.68 ppm) y la aparición de las señales del  $DTT^{ox}$  ( $\delta = 2.88$  pm, 3.04 ppm y 3.50 ppm) a diferentes intervalos de tiempo. Un experimento control (sin el catalizador de selenio) también se llevó a cabo con el objeto de comparar la velocidad de la reacción en ausencia de antioxidante. La eficiencia del compuesto **13** como imitador de la GPx se evaluó midiendo  $t_{1/2}$ . El  $t_{1/2}$  es el tiempo necesario para la conversión del 50% del  $DTT^{red}$  inicial al correspondiente disulfuro cíclico ( $DTT^{ox}$ ) y fue calculado mediante la integración de las señales del  $DTT^{red}$  con respecto al  $DTT^{ox}$ .

### 5.2.2 Actividad citotóxica *in vitro*

La actividad citotóxica de los derivados sintetizados se midió en el Centro de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular para Nanomedicina (CIBBIM-Nanomedicina) del Hospital Universitario de Vall d' Hebron (Barcelona, España), en el grupo del Profesor Schwartz.

Los compuestos (**7**, **8**, **9**, **10**, **13**, **16**, **17**, **19**, **20** y **23**) se disolvieron en DMSO y se probaron a diferentes concentraciones frente a células de cáncer cervicouterino HeLa mediante el método de MTT.<sup>62</sup> Se realizaron cuatro ensayos, haciendo seis réplicas en cada ensayo de cada punto de concentración y compuesto. Los valores de  $IC_{50}$  se determinaron después de 72 h de exposición a los derivados. Estos valores se refieren a la concentración necesaria del compuesto prueba para inhibir el 50% de la función biológica *in vitro*.

# Capítulo VI. Conclusiones

---

A partir de diosgenina (**1**) se llevó a cabo la funcionalización regioselectiva de la posición 3 del esqueleto esteroideal. Mediante la metodología desarrollada por nuestro grupo de investigación se llevó a cabo la apertura de los anillos E y F de la sapogenina originando una estructura 22-oxocolestánica.

Se sintetizaron una serie de novedosos glicoconjugados esteroidales en donde el enlace glicosídico se sustituyó por un anillo de tipo 1,2,3-triazol 1,4-disustituido. Se formaron también compuestos con enlaces tioureido y selenoureido.

La introducción de un átomo de nitrógeno sobre el C-3 de la diosgenina (**1**) ocurrió de manera estereoselectiva mediante una reacción de tipo  $S_N2$ . La inversión de la configuración en este carbono se comprobó en el derivado **16** mediante un experimento de RMN NOESY-1D.

El nuevo grupo azido introducido en la molécula resultó ser estable bajo las condiciones de apertura de la cadena lateral de la sapogenina, así pues se obtuvieron los derivados 3-azido-22-oxocolestánicos.

La eliminación de los grupos bencilo del derivado **14** se logró sin afectar el doble enlace en el C-5. Sin embargo, en el derivado **22** la desprotección de los grupos hidroxilo condujo a la hidrogenación del doble enlace y al derivado de configuración  $5\alpha$  (**23**) la cual se corroboró mediante un experimento de RMN NOESY-2D; no así en el derivado **17** en donde el doble enlace se hidrogenó sin poder conocer la configuración del nuevo centro quiral formado.

Los productos obtenidos se sometieron a diversas pruebas biológicas. La selenourea **13** se probó como agente antioxidante mostrando una capacidad importante para captar radicales libres obteniendo un valor de  $EC_{50} = 31.82 \pm 9.99 \mu\text{M}$ ; además mostró ser un buen imitador de la enzima glutatión peroxidasa al obtener un valor de  $t_{1/2} = 4.8 \text{ min}$ .

La actividad de los derivados sintetizados como agentes citotóxicos frente a la línea celular cancerosa HeLa también se evaluó midiendo los valores de  $IC_{50}$ . La selenourea **13** fue nuevamente el compuesto que mostró una mayor actividad citotóxica obteniendo un valor de  $IC_{50} = 1.92 \pm 0.6 \mu\text{M}$ , seguida por las tioureas **7** ( $2.22 \pm 0.85 \mu\text{M}$ ), **8** ( $5.03 \pm 2.45 \mu\text{M}$ ) y los derivados **19** ( $9.74 \pm$

0.24  $\mu\text{M}$ ) y **20** ( $7.62 \pm 1.03 \mu\text{M}$ ), todos ellos resultando ser potentes agentes antiproliferativos frente a la línea celular ensayada. La tiourea triple **9**, el compuesto **10** y el glicoconjugado derivado de ciclodextrina **17** mostraron valores superiores a 10  $\mu\text{M}$ . Mientras que los glicoconjugados derivados de glucosa **16** y **23**, al igual que la diosgenina (**1**) utilizada como referencia no mostraron valores importantes.

# Bibliografía

---

1. Liang, X. T.; Fang, W. S. *Medicinal Chemistry of bioactive natural products*. John Wiley & Sons, Ltd. New Jersey **2006**.
2. Shishodia, S.; Aggarwal, B. B. *Oncogene* **2006**, *25*, 1463-1473.
3. Quan, H. J.; Koyanagi, J.; Komada, F.; Saito, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 662-673.
4. a) Yao, J.; He, Z.; Chen, J.; Chen, D.; Sun, W.; Xu, W. *Chin. J. Chem.* **2012**, *30*, 2423-2430. b) Yao, J.; Chen, J.; He, Z.; Sun, W.; Xu, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2923-2929. c) Ryu, B. J.; Hwang, M. -K.; Park, M.; Lee, K.; Kim, S. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3862-3865.
5. Khan, S. A.; Singh, N.; Saleem, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2272-2277.
6. a) Segaloff, A.; Gabbard, R. B. *Steroids* **1965**, *5*, 219-240. b) Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Sánchez-Sánchez, L.; López-Muñoz, H.; Escobar Sánchez, M. L. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 451-460.
7. a) Naithani, R. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 657-668. b) Akbaraly, N. T.; Arnaud, J.; Hininger-Favier, I.; Gourlet, V.; Roussel, A. M.; Berr, C. *Clin. Chem.* **2005**, *51*, 2117-2123.
8. Merino-Montiel, P.; Maza, S.; Martos, S.; López, Ó.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, *48*, 582-592.
9. a) Lee, J. H.; Shin, S. H.; Kang, S.; Lee, Y. -S.; Bae, S. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *21*, 91-97. b) Rooprai, H. K.; Kyriazis, I.; Nuttall, R. K.; Edwards, D. R.; Zicha, D.; Aubyn, D.; Davies, D.; Gullan, R.; Pilkington, G. J. *Int. J. Oncol.* **2007**, *30*, 1263-1271.
10. Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T. *Arch.Toxicol.* **2011**, *85*, 1313-1359.
11. Plano, D.; Sanmartín, C.; Moreno, E.; Prior, C.; Calvo, A.; Palop, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6853-6859.
12. Desai, D.; Madhunapantula, S. V.; Gowdahalli, K.; Sharma, A.; Chandagaludoreswamy, R.; El-Bayoumy, K.; Robertson, G. P.; Amin, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2038-2043.
13. Madhunapantula, S. V.; Desai, D.; Sharma, A.; Huh, S. J.; Amin, S.; Robertson, G. P. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1297-1308.
14. a) Yoshikawa, M.; Morikawa, T.; Yashiro, K.; Murakami, T.; Matsuda, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1452-1456. b) Kamel, M. S.; Ohtani, K.; Kurokawa, T.; Assaf, M. H.; El-Shanawany, M. A.; Ali, A. A.; Kasai, R.; Ishibashi, S.; Tanaka, O. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**,

- 39, 1229-1233. c) Miyamura, M.; Nakano, K.; Nohara, T.; Tomimatsu, T.; Kawasaki, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 712-718.
15. Davis, B. G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 3215-3237.
  16. Adams, M. M.; Damani, P.; Perl, N. R.; Won, A.; Hong, F.; Livingston, P. O.; Ragupathi, G.; Gin, D. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1939-1945.
  17. Yang, C. -R.; Zhang, Y.; Jacob, M. R.; Khan, S. I.; Zhang, Y. -J.; Li, X. -C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1710-1714.
  18. Nakashima, N.; Kimura, I.; Kimura, M.; Matsuura, H. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 345-350.
  19. Da Silva, B. P.; de Sousa, A. C.; Silva, G. M.; Mendes, T. P.; Parente, J. P. *Z. Naturforsch.* **2002**, *57c*, 423-428.
  20. Matsuda, H.; Pongpiriyadacha, Y.; Morikawa, T.; Kishi, A.; Kataoka, S.; Yoshikawa, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1101-1106.
  21. a) Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Kameyama, A.; Sashida, Y.; Hirano, T.; Oka, K.; Dobashi, A.; Koike, K.; Nikaido, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2635-2638. b) Ding, X.; Zhu, F. S.; Li, M.; Gao, S. G. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139*, 599-604.
  22. a) Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243. b) Podolak, I.; Galanty, A.; Sobolewska, D. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 425-474.
  23. Liu, C.; Wang, Y.; Wu, C.; Pei, R.; Song, J.; Chen, S.; Chen, X. *Virus Res.* **2013**, *172*, 9-14.
  24. Cho, J.; Choi, H.; Lee, J.; Kim, M. -S.; Sohn, H. -Y.; Lee, D. G. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1828*, 1153-1158.
  25. Cai, J.; Liu, M.; Wang, Z.; Ju, Y. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 193-196.
  26. Wei, Y.; Xu, Y.; Han, X.; Qi, Y.; Xu, L.; Xu, Y.; Yin, L.; Sun, H.; Liu, K.; Peng, J. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *59*, 118-128.
  27. Lv, L.; Zheng, L.; Dong, D.; Xu, L.; Yin, L.; Xu, Y.; Qi, Y.; Han, X.; Peng, J. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *59*, 657-669.
  28. Kubo, S.; Mimaki, Y.; Terao, M.; Sashida, Y.; Nikaida, T.; Ohmato, T. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3969-3973.
  29. Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Kameyama, A.; Sashida, Y.; Hirano, T.; Oka, K.; Maekawa, R.; Wada, T.; Sugita, K.; Beutler, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 633-636.
  30. a) Xu, Q. -H.; Peng, X. -W.; Tian, W. -S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9375-9377. b) Cheng, M. S.; Wang, Q. L.; Tian, Q.; Song, H. Y.; Liu, Y. X.; Li, Q.; Xu, X.; Miao, H. D.; Yao, X. S.; Yang, Z. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3658-3662.
  31. a) Fernández-Herrera, M. A.; Mohan, S.; López-Muñoz, H.; Hernández-Vázquez, J. M. V.; Pérez-Cervantes, E.; Escobar-Sánchez, M. L.; Sánchez-Sánchez, L.; Regla, I.; Pinto, B. M.;

- Sandoval-Ramírez, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4827-4837. b) Tschamber, T.; Adam, S.; Matsuya, Y.; Masuda, S.; Ohsawa, N.; Maruyama, S.; Kamoshita, K.; Nemoto, H.; Eustache, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5101-5106. c) Li, M.; Yu, B. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2679-2682.
- 32.** Zhu, X.; Dere, R. T.; Jiang, J.; Zhang, L.; Wang, X. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10187-10197.
- 33.** Langenhan, J. M.; Engle, J. M.; Slevin, L. K.; Fay, L. R.; Luckner, R. W.; Smith, K. R.; Endo, M. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 670-673.
- 34.** Langenhan, J. M.; Endo, M. M.; Engle, J. M.; Fukumoto, L. L.; Rogalsky, D. R.; Slevin, L. K.; Fay, L. R.; Luckner, R. W.; Rohlfing, J. R.; Smith, K. R.; Tjaden, A. E.; Werner, H. M. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 2663-2676.
- 35.** a) Deobald, A. M.; Camargo, L. R. S.; Alves, D.; Zukerman-Schpector, J.; Corrêa, A. G.; Paixão, M. W. *Synthesis* **2011**, *24*, 4003-4010. b) Pérez-Labrada, K.; Brouard, I.; Morera, C.; Estévez, F.; Bermejo, J.; Rivera, D. G. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7713-7727. c) Kumar, D.; Mishra, K. B.; Mishra, B. B.; Mondal, S.; Tiwari, V. K. *Steroids* **2014**, *80*, 71-79.
- 36.** a) Yousuf, S. K.; Majeed, R.; Ahmad, M.; Sangwan, P. I.; Purnima, B.; Saxsena, A. K.; Suri, K. A.; Mukherjee, D.; Taneja, S. C. *Steroids* **2011**, *76*, 1213-1222. b) Zhang, J.; Garrossian, M.; Gardner, D.; Garrossian, A.; Chang, Y. T.; Kim, Y. K.; Chang, C. W. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1359-1363.
- 37.** Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- 38.** Gil, M. V.; Arévalo, M. J.; López, Ó. *Synthesis* **2007**, *11*, 1589-1620.
- 39.** Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- 40.** Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- 41.** Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; López-Muñoz, H.; Sánchez-Sánchez, L. *Arkivoc* **2009**, 170-184.
- 42.** a) Zhang, G. P.; Shen, S. D.; Lei, M.; Hu, L. H. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5894-5896. b) Kou, Y.; Koag, M. C.; Cheun, Y.; Shin, A.; Lee, S. *Steroids* **2012**, *77*, 1069-1074.
- 43.** a) Meza-Reyes, S.; Sandoval-Ramírez, J.; Montiel-Smith, S.; Hernández-Linares, G.; Viñas-Bravo, O.; Martínez-Pascual, R.; Fernández-Herrera, M. A.; Vega-Báez, J. L.; Merino-Montiel, P.; Santillán, R. L.; Farfán, N.; Rincón, S.; Del Río, R. E. *Arkivoc* **2005**, 307-320. b) Wang, F. Q.; Zhang, C. G.; Li, B.; Wei, D. Z.; Tong, W. Y. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 5967-5974.
- 44.** Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, *53*, 126-130.

45. Rincón, S.; del Río, R. E.; Sandoval-Ramírez, J.; Meza-Reyes, S.; Montiel-Smith, S.; Fernández, M. A.; Farfán, N.; Santillán, R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 2594-2602.
46. Fernández-Bolaños, J. G.; López, Ó.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fuentes, J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 4081-4084.
47. López, Ó.; Maza, S.; Ulgar, V.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2556-2566.
48. López, Ó.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 61-72.
49. Kumar, R.; Maulik, P. R.; Misra, A. K. *Glycoconj. J.* **2008**, *25*, 595-602.
50. López, Ó.; Maza, S.; Maya, I.; Fuentes, J.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9058-9069.
51. Cagnoni, A. J.; Varela, O.; Gouin, S. G.; Kovensky, J.; Uhrig, M. L. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3064-3077.
52. Sonogashira, K.; Tohda, Y.; Hagihara, N. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 4467-4470.
53. Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5084-5121.
54. a) Fernández-Bolaños, J. G.; López, Ó. *Topics in Heterocyclic Chemistry*. Springer, **2007**, Vol. 7, pp. 31-66. b) Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302-1315.
55. Pearce, A. J.; Sinaÿ, P. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610-3612.
56. Merino-Montiel, P.; López, Ó.; Fernández-Bolaños, J. G. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3591-3595.
57. Sharma, O. P.; Bhat, T. K. *Food Chem.* **2009**, *113*, 1202-1205.
58. Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*. Butterworth Heinemann: Oxford, 4<sup>a</sup> ed. **1996**.
59. Roy, B.; Mukhopadhyay, B. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3783-3787.
60. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290-4302.
61. Iwakowa, M.; Kumakura, F.; *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2008**, *183*, 1009-1017.
62. Rodríguez-Berna, G.; Díaz-Cabañas, M. J.; Mangas-Sanjuán, V.; Gonzalez-Alvarez, M.; Gonzalez-Alvarez, I.; Abasolo, I.; Schwartz, S. Jr.; Bermejo, M.; Corma, A. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 651-655. Información suplementaria.