

Tesis Doctoral

Síntesis de análogos de esteroides sulfatados marinos con actividad citotóxica, antiviral y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa

Richmond, Victoria

2014-03-25

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Richmond, Victoria. (2014-03-25). Síntesis de análogos de esteroides sulfatados marinos con actividad citotóxica, antiviral y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Richmond, Victoria. "Síntesis de análogos de esteroides sulfatados marinos con actividad citotóxica, antiviral y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-03-25.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Orgánica

**Síntesis de análogos de esteroides sulfatados marinos con
actividad citotóxica, antiviral y de inhibición de la enzima
acetilcolinesterasa**

**Tesis presentada para optar por el título de Doctor
de la Universidad de Buenos Aires
Área Química Orgánica**

Victoria Richmond

Director de tesis: **Marta Silvia Maier**

Consejero de Estudios: **Marta Silvia Maier**

Buenos Aires, Febrero 2014

Síntesis de análogos de esteroides sulfatados marinos con actividad citotóxica, antiviral y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa

Resumen:

En este trabajo de tesis se describe la síntesis de diferentes análogos de esteroides sulfatados marinos con el objeto de evaluar su actividad biológica y establecer correlaciones estructura-actividad. Los esteroides sintetizados poseen grupos sulfato en C-2 y C-3 con diferentes configuraciones y funciones oxigenadas en C-6 y fueron obtenidos a partir de la sulfatación de sus análogos hidroxilados. La reacción de sulfatación fue optimizada luego de probar diferentes condiciones, entre ellas, la selección del agente sulfatante, la relación de equivalentes entre el esteroide y el agente sulfatante, el tiempo y la temperatura de reacción y el método de calentamiento. Todos los análogos sintéticos se obtuvieron a partir de un precursor común, la 5 α -colest-2-en-6-ona, que se sintetizó mediante sucesivas reacciones de oxidación y reordenamientos a partir del colesterol.

Se ensayó la actividad de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de los compuestos sulfatados y sus análogos hidroxilados y se observó que el compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato resultó ser el más activo de la serie. Por ello, este compuesto fue el elegido como modelo para el estudio de la cinética de la reacción de inhibición. En base a la cinética de la reacción, se realizó un estudio de *docking* molecular del compuesto y de su análogo desulfatado, el cual no inhibe a la enzima acetilcolinesterasa. Luego se realizaron estudios de dinámica molecular verificándose la estabilidad de los complejos enzima-esteroide obtenidos en el estudio de *docking*. En el caso del análogo inactivo, si bien se comprobó la estabilidad del complejo, se observó la apertura de un canal secundario en la superficie de la enzima que comunica con el sitio activo, lo que explicaría la razón por la que dicho esteroide no inhibe a la enzima.

Debido a los antecedentes de citotoxicidad de los 6E-hidroximino esteroides, se sintetizaron cuatro oximas novedosas a partir de los correspondientes 6-cetoesteroides obtenidos previamente. Se estudió la citotoxicidad de las oximas sintéticas y de algunos esteroides polihidroxilados sulfatados relacionados -para evaluar la influencia de grupos hidroxilo, sulfato y carbonilo en C-6 en la actividad- frente a dos líneas celulares tumorales de cáncer de próstata humano, PC-3 (andrógeno independiente) y LNCaP (andrógeno dependiente). Los resultados indicaron que el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano

trisulfato fue el más activo frente a la línea celular LNCaP y la oxima 2 β ,3 α -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano, frente a PC-3.

Por último, se estudió la actividad antiviral y virucida de los compuestos sulfatados y sus análogos desulfatados frente a los virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y Junín (JV), responsable de la fiebre hemorrágica argentina. La oxima 2 β ,3 α -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano resultó ser el compuesto más activo frente al virus HSV-1, mientras que los compuestos 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato y 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato fueron los más activos frente al virus Junín. Ambos resultados ponen de manifiesto la importancia de los grupos sulfato para la actividad antiviral de estos esteroides.

Palabras claves: Esteroides polihidroxilados sulfatados - 6*E*-Hidroximinoesteroides - Actividad citotóxica - Actividad antiviral - Inhibición de la acetilcolinesterasa.

Synthesis of analogs of marine sulfated steroids with cytotoxic, antiviral and acetylcholinesterase enzyme inhibition activities

Abstract:

In this work we describe the synthesis of analogs of marine sulfated steroids in order to evaluate their biological activities and establish structure-activity correlations. The synthesized steroids depict sulfate groups at C-2 and C-3 with different configurations and oxygenated groups at C-6, and they were obtained by sulfation of their hydroxylated analogs. The sulfation reaction was optimized after selecting the sulfating agent, the relative proportions between steroid and sulfating agent, the reaction time and the heating conditions. The synthetic analogs were prepared from 5 α -cholest-2-en-6-one, which was synthesized from cholesterol by successive oxidation and rearrangement reactions.

The sulfated and desulfated analogs were evaluated for their inhibition activity on the acetylcholinesterase enzyme. Compound 2 β ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestan-6-one disulfate proved to be the more active. Therefore it was selected as a model compound to study the kinetic of the inhibition reaction. Based on the kinetic results, a molecular docking study of the compound and the inactive desulfated analog was performed, together with dynamic molecular studies that confirmed the stability of the enzyme-steroid complexes obtained in the docking study. Although the inactive analog complex was stable, we observed the opening of a secondary channel on the enzyme surface that communicates with the active site. This fact would explain why the desulfated steroid fails to inhibit the enzyme.

Taking into account the cytotoxic activities of 6*E*-hydroximino steroids, we prepared four new oximes of the 6-ketosteroids previously synthesized. We evaluated the cytotoxicity of the synthetic oximes and some related sulfated polyhydroxylated steroids on two human prostate carcinoma cell lines, PC-3 (androgen independent) and LNCaP (androgen dependent) in order to determine the influence of hydroxyl, sulfate and carbonyl groups on C-6 on the activity. Compound 2 β ,3 α ,6 β -trihydroxy-5 α -cholestane trisulfate showed remarkable activity against LNCaP cell line while oxime 2 β ,3 α -dihydroxy-6*E*-hydroximino-5 α -cholestane was the most active against PC-3.

We also studied the antiviral and virucidal activities of the sulfated compounds and their desulfated analogs against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and Junín virus (JV), responsible for the Argentine hemorrhagic fever. The oxime 2 β ,3 α -dihydroxy-6*E*-

hydroxymino-5 α -cholestane disulfate was the most active compound against HSV-1, while compounds 2 β ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestan-6-one disulfate and 2 β ,3 α ,6 β -trihydroxy-5 α -cholestane-2,3-disulfate were the most active against Junín virus. These results highlight the importance of the sulfate groups for the activity of these steroids.

Key words: sulfated polyhydroxylated steroids - 6*E*-Hydroxyminosteroids – Cytotoxic activity
- Antiviral activity – Acetylcholinesterase inhibition.



A Marta, mi guía en este camino...

**Por tu paciencia, por tu confianza
y por tu gran cariño...**

**Por transmitirme tranquilidad
y por tu apoyo continuo.**

**Por todo, todo lo que aprendí de vos....
Gracias por todo, siempre...**

Agradecimientos...

En primer lugar quiero agradecerles a mis papas por enseñarme el valor del esfuerzo y de la educación. Les dedico esta tesis porque sin su esfuerzo y apoyo no hubiera podido llegar hasta acá sola. Pa, Ma... Los quiero con el alma.

A Lolo, mi compañero de la vida... Gracias por acompañarme y apoyarme durante todos estos años...Por incentivarme a seguir siempre y por comprenderme siempre... Te quiero con todo mi corazón, gordito.

A mis hermanos Diego, Alan y Nico que siempre me cuidan y apoyan...Por tantas risas compartidas, por ser tan unidos...Por escucharme siempre, por bancarme en mis momentos malos. Son de lo más especial que hay...Cómo los quiero!!

A mi abuela Angélica por sus consejos de maestra, por siempre sentirse orgullosa de mí...Por quererme tanto!

A mi abuela Hemilce que siempre me alentó y me apoyó durante la tesis. Siempre me preguntó con interés y me escuchó con entusiasmo porque sentía que su sueño se podría cumplir conmigo... Esta tesis es para vos!!

A mi abuelo que fue el que con una simple frase ayudó a que me anime a comenzar esta aventura que fue el doctorado. Gracias, abuelo...Siempre estás en mi corazón...

A mis Coquis...Mis grandes compañeritos...

A mis compañeros de carrera Vero, Mariano y Pepe por compartir conmigo todos estos años.. A Pili, Maru y Hernán también, por compartir juntos tantos momentos especiales...Por la amistad tan linda que creamos. Los quiero mucho, amigos.

A Vale, mi hermana del alma, por el apoyo constante, el gran compañerismo, por todas las charlas compartidas, las risas, las lágrimas, los mates, las cervezas, los viajes...La vida... Te quiero mucho!

A mis amigos Blan, Bren, Mati, Marian y Pau y Pauli, porque los quiero y porque me hacen disfrutar tanto los momentos que compartimos juntos. Son muy muy especiales!! Los quiero muchísimo!!

A Pau porque además de ser un gran amigo, sos un gran compañero de trabajo.. Mi mentor en el loco y misterioso mundo del modelado. Gracias Pau por contestar mis dudas, por tenerme tanta paciencia y, sobre todo, por haberte enganchado tanto en este tema.. Quiero seguir aprendiendo, así que esto sigue!!

A Ale, MMP...Porque siempre me ayudaste en todo, me escuchaste y te preocupaste por mí. Por ser una gran amiga, aun a la distancia!! Ale Loca, te quiero!!

A mis amigas y compañeras del labo hoy... Mis compañeras del día a día, las que me acompañaron durante distintos momentos de la tesis y me hicieron tan ameno el camino...Ire, por siempre ser tan atenta, buena compañera y siempre predispuesta a ayudar a los demás... Euge (Hola Uli!!!) me gustó compartir estos años con vos y poder conocerte, sos terrible pero cómo me haces reír...!! Diani...Hace poquito entraste, pero te ganaste el corazón de todas!! Una gran compañera

(Nunca me voy a olvidar de la ayuda con la villita... Sos una divina!!) y Vale, mi hermana...Chicas, las quiero mucho y las voy a extrañar...Siempre me voy a sentir parte del L8...

A todos los demás compañeros de laboratorio que tuve durante todos estos años en el L8: Farmacéutica Daniela Parera (Gracias Dani por guiar mis primeros pasos en el labo), Dra. Romina Centurión, Bqo. Hernán Di Consoli, Dra. Alejandra Fazio, Lic. Blanca Gómez, Lic. Ivana Cañosa. Por su compañerismo, por las charlas compartidas, los mates, las risas, las preocupaciones... Gracias por todo!!

A Evelyn por ayudarme a poder transitar los momentos más difíciles y de mayor locura durante mi tesis –léase el seminario y la escritura de la misma– con una tranquilidad que me permitió, incluso, disfrutar esos momentos. Tus palabras me sirvieron un montón y las voy a aprovechar siempre... GRACIAS!!!

A Paula (Dra. Paula Murray) que tuve la buena suerte de conocerla.. Gracias por todo, desde los ensayo realizados, a estar predispuesta a contestar mis dudas y por la buenísima onda que siempre hubo mail a mail, SAIQO a SAIQO, me encantó haberlas conocido (A Juli y Belen, las incluyo!), haber conocido el mundo de la ACE que me enamoró!! Acordate que te dije, nuestro contacto sigue!!

A la familia Galagovsky por la ayuda y buena onda de siempre. En especial a Fer y Javi que siempre me brindaron su buena onda, su compañerismo y su amistad... Los quiero un montón, chicos!! Y ahora..... Se viene una nueva etapa y feliz de que sea con ustedes!!

A Adri (Dra. Adriana Cirigliano), por su permanente cariño y compañerismo, siempre mimándonos como una mamá!!

A los Palermo, en especial a Marian (Dra. Marianela Sánchez), Gastón (Dr. Gastón Siless, ex. Palermo, en realidad), Lu (Lic. Lucía Fernández) y Aure (Dra. Aurélie Leverrier)... Por la ayuda, el compañerismo, tanta charla...Son unos grandes vecinos!! A mis otros grandes vecinos, los Burton en especial a Fer (Dr. Fernando Duran) que es una persona tan linda e inteligente, Fer gracias por ayudarme siempre que lo necesité!!...A Virgie y Marito...Por compartir muchos momentos...Los quiero!!

A la Dra. Elsa Damonte y al Dr. Carlos Pujol por su paciencia y buena predisposición siempre... Por permitirme conocer un poquito del mundo de los virus y contestar mis preguntas, en cualquier momento. Por haber sido tan cordiales conmigo...Gracias..

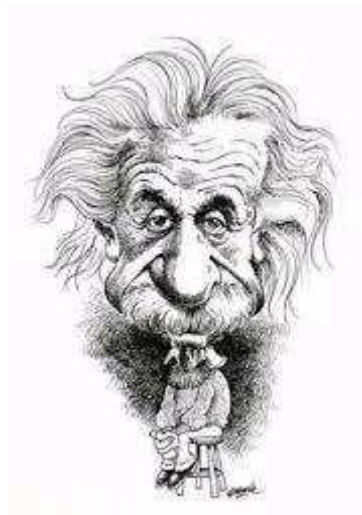
A todo el Departamento de Química Orgánica por tantas charlas de pasillo. A la Sra. María del Carmen Ares: Maripí!! Por tu paciencia y tus consejos sobre los tediosos “papeles” y por ayudarme siempre siempre!! Gracias gigantes!!! Nancy Aguirre por su ayuda y su buena onda, siempre! Y a Mica, también por su buena predisposición!!

Al Sr. Sergio E. Jacobo y demás personal no docente del Departamento por su diaria y amable colaboración.

Y por último pero no menos importante al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires por el financiamiento de este trabajo. Y a UMYMFOR (CONICET–FCEyN) por las determinaciones instrumentales realizadas y a su director, Dr. Gerardo Burton. A todo el personal de UMYMFOR, en especial a la Lic. María de las Mercedes Rivera por los microanálisis realizados, al Sr. Jorge A. Aznárez, al Bioquímico Gabriel Cases, por los espectros de masa, al Lic. Germot Eskuche y al Ingeniero José Gallardo por los espectros de RMN, cuya ayuda fue fundamental para la realización de este trabajo.

El misterio es la cosa más bonita
que podemos experimentar.
Es la fuente de todo arte y ciencia verdaderos...

No tengo talentos especiales..
Pero sí soy profundamente curioso.



Albert Einstein

Capítulo 1	1
1.1 Productos Naturales Marinos	3
1.2 Productos Naturales de Invertebrados Marinos	5
1.2.1 Esteroides polioxigenados de invertebrados marinos	6
1.2.1.1 Esteroides polihidroxilados sulfatados	10
1.3 Referencias Bibliográficas	15
Capítulo 2	19
2.1 Introducción	21
2.2 Síntesis de precursores polihidroxilados de análogos sulfatados	27
2.2.1 Síntesis del compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (43)	28
2.2.1.1 Síntesis del compuesto 3 α ,5 α -ciclocolestano-6 β -ol (56)	30
2.2.1.2 Síntesis del compuesto 5 α -colest-2-en-6-ona (45)	34
2.2.1.2.1 Reordenamiento de la 3 α ,5 α -ciclocolestano-6-ona (57)	38
2.2.1.3 Síntesis del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (44)	41
2.2.1.3.1 Síntesis del compuesto 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestano-6-ona (63)	41
2.2.1.3.2 Apertura nucleofílica del epóxido 63	44
2.2.1.4 Reducción del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (44) con NaBH ₄	47
2.2.1.5 Reducción del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (44) con Na/EtOH	50
2.2.2 Cambio de estrategia para la síntesis del 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (43)	55
2.2.2.1 Síntesis del compuesto 5 α -colest-2-en-6 α -ol (68)	56
2.2.2.2 Síntesis del compuesto 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestano-6 α -ol (69)	59
2.2.2.3 Apertura nucleofílica del epóxido 69	61
2.2.3 Síntesis de los compuestos 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (70) y 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (71)	63
2.3 Síntesis de esteroides polihidroxilados sulfatados	69

2.3.1 Breve introducción a los métodos de sulfatación	69
2.3.2 Sulfatación de esteroides	70
2.3.3 Síntesis de triterpenos sulfatados utilizando $\text{SO}_3 \cdot \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	73
2.3.4 Síntesis de esteroides sulfatados utilizando $\text{SO}_3 \cdot \text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$	75
2.3.4.1 Síntesis de esteroides sulfatados utilizando microondas	76
2.3.5 Síntesis de esteroides sulfatados utilizando $\text{SO}_3 \cdot \text{N}(\text{CH}_3)_3$	79
2.3.5.1 Síntesis del compuesto $2\beta,3\alpha,6\beta$ -trihidroxi- 5α -colestano trisulfato (76)	84
2.3.5.2 Sulfatación del compuestos $2\beta,3\alpha,6\beta$ -trihidroxi- 5α -colestano-2,3-disulfato (77)	87
2.4 Conclusiones	89
2.5 Referencias Bibliográficas	90
Capítulo 3	95
3.1 Introducción a los 6-hidroximino esteroides	97
3.1.1 Oximas esteroidales de origen marino	97
3.1.2 Síntesis de 6-hidroximino esteroides	98
3.2 Síntesis de 6E-hidroximino-colestanos	100
3.2.1 Síntesis del (6E)-hidroximino- 5α -colest-2-eno (90)	101
3.2.2 Síntesis de (6E)-hidroximino-2,3-dihidroxi- 5α -colestanos 91, 92 y 93	104
3.2.3 Síntesis de (6E)-hidroximino- $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi- 5α -colestano-2,3-disulfato (94)	108
3.3 Actividad citotóxica de los 6-hidroximino esteroides frente a líneas tumorales de cáncer de próstata humano (PC-3 y LNCaP)	111
3.3.1 Antecedentes de actividad citotóxica de 6-hidroximino esteroides y análogos sulfatados	111
3.3.2 Resultados de citotoxicidad frente a PC-3 y LNCaP de 6E-hidroximino-2,3-dihidroxi- 5α -colestanos y análogos sulfatados	114
3.4 Conclusiones	116
3.5 Referencias Bibliográficas	117

Capítulo 4	119
4.1 Introducción	121
4.1.1 Antecedentes de esteroides naturales y sintéticos con actividad antiviral	123
4.2 Resultados de la actividad antiviral	128
4.2.1 Actividad citotóxica	128
4.2.2 Actividad antiviral frente a HSV-1	130
4.2.2.1 Índice de selectividad	132
4.2.2.2 Actividad virucida	133
4.2.2.3 Mecanismo de acción	133
4.2.3 Actividad antiviral frente a JV	134
4.2.4 Actividad antiviral frente al virus del dengue	135
4.3 Conclusiones	135
4.4 Referencias Bibliográficas	137
Capítulo 5	141
5.1 Introducción	143
5.1.1 Inhibidores de la ACE	145
5.1.2 Inhibidores esteroidales de la ACE	146
5.1.3 Inhibidores de la ACE sulfatados	146
5.2 Resultados de la actividad inhibitoria de la ACE	149
5.2.1 Selectividad en la inhibición de la ACE respecto de la BCE	152
5.2.2 Tipo de inhibición	154
5.3 Estudios de acoplamiento molecular o <i>docking</i>	155
5.3.1 Descripción del bolsillo de la enzima ACE	155
5.3.2 Enzima y espacio de simulación	156
5.3.3 Inhibidor esteroideal	157
5.3.4 Resultados del estudio de <i>docking</i> de la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona disulfato (72)	157

5.4 Resultados del estudio de dinámica molecular con el complejo enzima-esteroide activo (Compuesto 72)	160
5.5 Resultados del estudio de <i>docking</i> de la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (44)	162
5.6 Resultados del estudio de dinámica molecular con el complejo enzima-esteroide inactivo (Compuesto 44)	163
5.6.1 Estudio de túneles y cavidades	169
5.7 Conclusiones	170
5.8 Referencias Bibliográficas	172
Capítulo 6	177
6.1 Generalidades	179
6.2 Síntesis de compuestos	181
6.2.1 Síntesis del reactivo sulfatante trietilamina-trióxido de azufre SO ₃ .N(CH ₂ CH ₃) ₃	181
6.2.2 Síntesis de esteroides polihidroxilados y sus análogos sulfatados	182
6.2.3 Síntesis de oximas esteroidales (Capítulo 3)	198
6.3 Ensayos biológicos	201
6.3.1 Ensayos de actividad citotóxica (Capítulo 3)	201
6.3.2 Ensayos de actividad antiviral (Capítulo 4)	202
6.3.2.1 Citotoxicidad sobre células Vero	202
6.3.2.2 Ensayo de actividad antiviral	203
6.3.2.3 Ensayo de actividad virucida	203
6.3.2.4 Mecanismo de acción	203
6.3.3 Ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Capítulo 5)	204
6.3.3.1 Determinación gráfica del tipo de inhibición	205
6.3.4 Ensayos de inhibición de la enzima butirilcolinesterasa	205
6.4 Modelado Molecular (Capítulo 5)	205
6.4.1 <i>Docking</i> Molecular	205

6.4.2 Dinámica Molecular	207
6.4.2.1 Túneles y canales	207
6.5 Referencias Bibliográficas	209
Anexo	211
Conclusiones Finales	237

Lista de abreviaturas utilizadas

Å	Angstrom
AC	acetilcolina
ACE	enzima acetilcolinesterasa
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
AD	dihidroxilación asimétrica
BCE	enzima butirilcolinesterasa
CC ₅₀	concentración citotóxica 50%
CCD	cromatografía en capa delgada
COSY	correlación homonuclear ¹ H- ¹ H
d	doblete
d.i.	diámetro interno
da	doblete ancho
DCC	diciclohexilcarbodiimida
dd	doble doblete
ddd	doble doble doblete
DENV	virus del dengue
DMA	N,N-dimetilacetamida
DMF	N,N-dimetilformamida
EMAR-ESI	espectrometría de masa de alta resolución por ionización por electrospray
EtOH	etanol
FT-IR	espectroscopía infrarroja
HCMV	citomegalovirus humano
HIV	virus de inmunodeficiencia humano
HMBC	correlación heteronuclear a varios enlaces
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HPV	virus del papiloma humano
HSQC	correlación heteronuclear a un enlace
HSV	virus herpes simplex
IC ₅₀	concentración inhibitoria 50%
IS	índice de selectividad
<i>J</i>	constante de acoplamiento
JV	virus Junín
m	multiplete
<i>m/z</i>	relación masa/carga
<i>m</i> -CPBA	ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
Me	metilo
MEC	metiletilcetona
MeOH	metanol
MHz	mega hertz

NOESY	correlación homonuclear por efecto nuclear Overhauser
ON	toda la noche
OW	todo el fin de semana
PCC	clorocromato de piridonio
ppm	parte por millón
Py	piridina
q	cuarteto
R _f	relación de frente de solvente
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear ¹³ C
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear ¹ H
RP-C ₁₈	fase reversa (silicagel modificada con octadecilsilano)
s	singulete
sa	singulete ancho
t	tripleto
T.A.	temperatura ambiente
TEA	triethylamina
THF	tetrahidrofurano
VC ₅₀	concentración virucida 50%
VZV	virus herpes zoster
[(DHQ)2-PHAL]	1,4-Bis-(9'-O- dihidroquinil)-ftalazina
[(DHQD)2-PHAL]	4-bis-(9'-O-dihidroquinidil)-ftalazina

Prólogo

A continuación se presenta un resumen extendido de la tesis para facilitar su comprensión. Los principales protagonistas de este trabajo de tesis doctoral pertenecen a la familia de los esteroides y, si no se indica lo contrario, nos referiremos a 5α -esteroides. Cuando se mencionen los 5β -esteroides, las estructuras explicitarán la configuración del H- 5β , tal como se indica en la figura A. De manera análoga, al omitir dicho hidrógeno en la estructura, la unión entre los anillos A y B es *trans*.

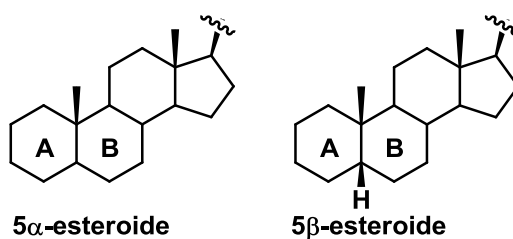


Figura A

En el capítulo N°1 se presenta una introducción a los productos naturales marinos y, en particular, a los esteroides polihidroxilados sulfatados aislados a partir de organismos invertebrados marinos. El objetivo de este capítulo es el de destacar las características estructurales únicas de los productos naturales marinos y la importancia de estos compuestos debido a la diversidad de sus actividades biológicas.

Dada la gran versatilidad de los esteroides polihidroxilados sulfatados, se planteó como objetivo de esta tesis la síntesis de diferentes análogos sulfatados para evaluar sus actividades citotóxica, antiviral y de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa y establecer correlaciones estructura-actividad.

En el capítulo N°2 se presentan los antecedentes relacionados con la síntesis de esteroides sulfatados y se describen los resultados de la síntesis de una serie de esteroides con grupos sulfato en C-2 y C-3, con diferentes configuraciones, y funciones oxigenadas en C-6 (Figura B), los cuales fueron obtenidos a partir de la sulfatación de sus análogos hidroxilados.

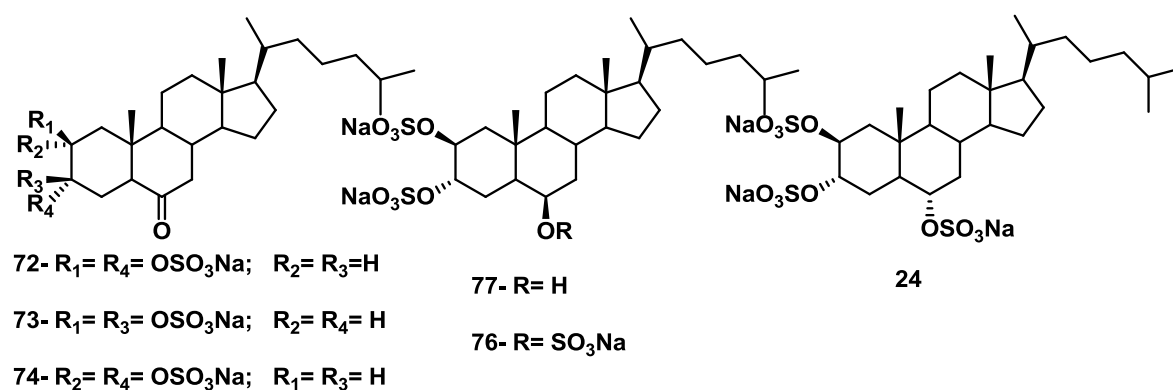


Figura B

Este capítulo está dividido en dos grandes secciones. En la primera sección se detalla la síntesis de los intermediarios de reacción y los diferentes esteroides polihidroxilados (Figura C), precursores de los compuestos sulfatados de la figura B, como así también su análisis espectroscópico. La segunda parte de este capítulo detalla la obtención de los compuestos sulfatados a partir de sus análogos hidroxilados. Se presenta una breve introducción a la reacción de sulfatación y se describen los resultados obtenidos en la optimización de la reacción de sulfatación de los esteroides polihidroxilados, como así también las dificultades que se presentaron y cómo se resolvieron para llegar con éxito a los productos deseados.

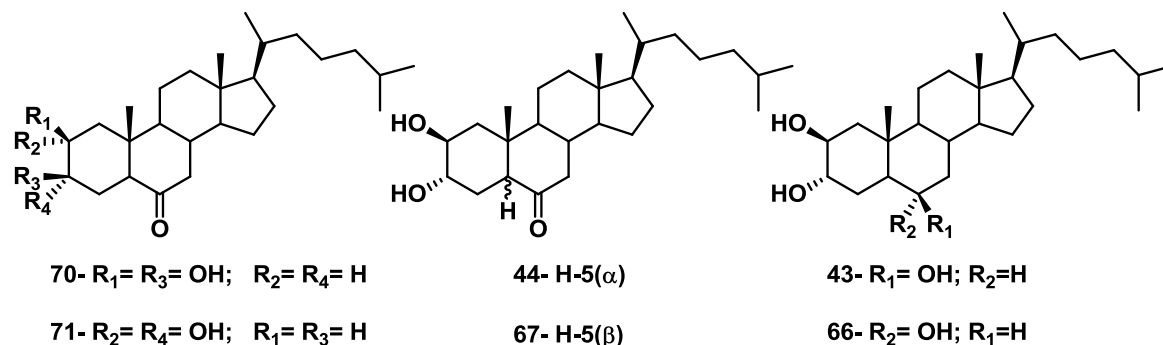


Figura C

El capítulo N°3 se encuentra dividido en dos secciones. En la primera de ellas se describe la síntesis de 6*E*-hidroximino esteroides análogos de esteroides aislados a partir de diferentes esponjas marinas (Figura D), así como su análisis espectroscópico. En la segunda parte se presenta el estudio de su citotoxicidad frente a dos líneas celulares tumorales de cáncer de próstata humano, PC-3 (andrógeno independiente) y LNCaP (andrógeno dependiente). Se comparó la citotoxicidad de las oximas esteroidales con la de algunos esteroides polihidroxilados sulfatados relacionados estructuralmente con el objeto de evaluar la influencia de grupos hidroxilo, sulfato y carbonilo en C-6 en la actividad citotóxica.

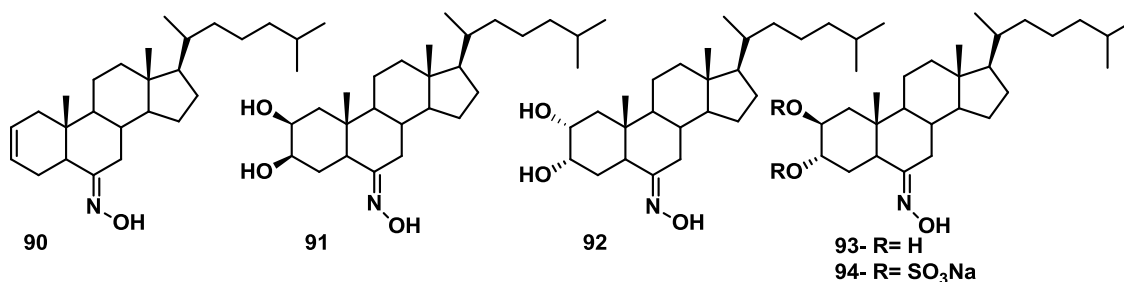


Figura D

En el capítulo N°4 se estudió la actividad antiviral y virucida de los compuestos sulfatados y sus análogos desulfatados frente a los virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus del dengue (DENV) y virus Junín (JV), responsable de la fiebre hemorrágica argentina, enfermedad endémica en nuestro país. Por último, se estudió el mecanismo de acción de los compuestos activos que presentaron un índice de selectividad más alto.

En el capítulo N°5 se estudió la capacidad de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa de los compuestos sulfatados y de sus análogos hidroxilados. Esta enzima es la responsable de la deficiencia selectiva e irreversible de las funciones colinérgicas, lo cual conduce al deterioro en la memoria característico de la enfermedad de Alzheimer. También se estudió la selectividad en la inhibición frente a otra colinesterasa, la enzima butirilcolinesterasa así como la cinética de la reacción de inhibición con uno de los esteroides sulfatados, el cual fue seleccionado como compuesto modelo. De acuerdo a los resultados obtenidos de la cinética de inhibición, se realizó un estudio de *docking* molecular del compuesto más activo y de su análogo desulfatado, el cual no inhibe a la enzima acetilcolinesterasa. Luego se describen los estudios de dinámica molecular llevados a cabo para verificar la estabilidad de los complejos enzima-esteroide que reveló el estudio de *docking*.

Por último, en el capítulo N°6 se presenta la parte experimental de esta tesis que incluye las metodologías utilizadas en la síntesis de los compuestos y la caracterización completa de las estructuras químicas por RMN, espectroscopia infrarroja, espectrometría de masa, microanálisis y puntos de fusión. Se incluyen las metodologías experimentales utilizadas en los ensayos biológicos *in vitro* y en los estudios de *docking* y dinámica molecular.

Si bien en los capítulos N° 2 y 3 se describe la asignación espectroscópica de las señales más relevantes, en el anexo de esta tesis se presenta la asignación de los desplazamientos químicos de ¹H y de ¹³C de los esteroides sintetizados durante este trabajo de tesis. Las asignaciones se realizaron a partir del análisis de los espectros de RMN ¹H y de ¹³C y de los espectros bidimensionales COSY, HSQC, HMBC Y NOESY.

Capítulo 1:

**Introducción a los productos
naturales de invertebrados marinos**

1.1 Productos Naturales Marinos

Los productos naturales son moléculas orgánicas pequeñas ($PM \leq 3000$ Da) producidas por animales, plantas o microorganismos. Generalmente son estructuras complejas y de gran diversidad debido al número de centros asimétricos, grupos funcionales y motivos estructurales que poseen (Kim y Venkatesan 2013; Kinghorn y col. 2009). Sin embargo, su complejidad y diversidad estructural no es lo único que los hace interesantes, sino el hecho de que generalmente poseen interacciones específicas con macromoléculas biológicas y en consecuencia, actividad biológica (Ertl y Schuffenhauer 2008).

En la actualidad, más del 50% de las drogas disponibles son productos naturales o relacionados, ya sea porque son productos naturales modificados o poseen farmacóforos de productos naturales, y sólo el 36% son consideradas exclusivamente sintéticas. Actualmente, el 68% de las drogas anti-infectivas (es decir, antivirales, antiparasitarias, antibióticas) son productos naturales o inspiradas en ellos, mientras que el porcentaje asciende al 79,8% en el caso de los fármacos para el tratamiento del cáncer (Khazirab y col. 2013).

Dentro de los productos naturales es posible distinguir entre metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son responsables, fundamentalmente, del crecimiento, desarrollo y reproducción de los seres vivos. Entre estos se encuentran los aminoácidos, lípidos, carbohidratos, nucleótidos y un gran número de moléculas pequeñas que actúan como cofactores. En cambio, los metabolitos secundarios no están involucrados en los procesos primarios (crecimiento, desarrollo y reproducción) pero pueden tener un rol clave en la supervivencia del organismo que los produce. Estos pueden ser terpenos, policétidos, pequeños péptidos, alcaloides y también metabolitos primarios modificados ya sea por glicosidación, esterificación o por modificación de su estado de oxidación. Por lo tanto, lo que distingue a los metabolitos secundarios de los primarios no es tanto su origen biosintético sino la función que cumplen (Mc Clintock y col. 2013).

En los organismos marinos, los metabolitos secundarios surgen como una adaptación a las amenazas que sufren, en particular, aquellos animales con cuerpos blandos y estilos de vida sedentarios. Estos se vieron forzados a evolucionar desarrollando la habilidad de biosintetizar compuestos tóxicos o de obtenerlos a través de los microorganismos que los colonizan para detener depredadores, alejar competidores e inmovilizar presas (Haefner 2003). Debido a que estos metabolitos son liberados al agua para cumplir su función, en

donde su concentración disminuirá por efecto de la dilución en el medio, deben ser muy potentes para ser efectivos. Además, los organismos marinos han desarrollado mecanismos biológicos complejos exhibiendo actividad cruzada con la biota del *phylum* terrestre (Jimeno y col. 2004). Por ello, los productos naturales marinos han atraído el interés de investigadores involucrados en la búsqueda de fármacos más eficaces y específicos para el tratamiento de muchas enfermedades humanas (Proksch y col. 2002; Mayer y Lehmann 2000).

A pesar de que los océanos comprenden más del 70% de la superficie de la Tierra y son una fuente natural con una enorme biodiversidad, sólo el 16% de los productos naturales reportados en los últimos 25 años son de origen marino (Kong y col. 2010). Esto se debe a que el estudio de los productos naturales marinos comenzó varias décadas después que el estudio de los terrestres. Una de las razones de este retraso está directamente vinculada con la recolección de los organismos marinos, limitada al snorkel antes de que se desarrollara el buceo y, por lo tanto, profundidades de entre 3 y 40 metros fueron accesibles recién en la segunda mitad del siglo XX. Por otra parte, dado que los productos naturales marinos se encuentran generalmente en concentraciones bajas en los organismos productores, recién en la década del '70 el desarrollo de técnicas separativas más eficientes como la cromatografía líquida de alta resolución, facilitó el estudio sistemático del entorno marino (Cragg y Newman 2013, Newman y Cragg 2004). Por otro lado, el desarrollo de los métodos bidimensionales de resonancia magnética nuclear permitió que, a principios de los años '80, esta técnica se convirtiera en una herramienta muy poderosa para la elucidación estructural de productos naturales (Breton y Reynolds 2013; Shoolery 1984). Aun así, el estudio de organismos marinos no resultó una tarea sencilla, ya que a diferencia del entorno terrestre, se disponía de muy poca información etno-medicinal que guiara en la selección de los organismos a estudiar, con excepción del sur de China. Esto se refleja en el hecho de que el 40% de los productos naturales aislados a partir de invertebrados marinos, en los últimos 20 años, provengan de organismos de las regiones marinas que bordean Japón, Taiwán, Corea del Sur y China (Costa Leal y col. 2012a). Actualmente, la búsqueda está guiada por estudios ecológicos relacionados con la defensa química y la supervivencia de los organismos, ya que los metabolitos secundarios responsables de estas estrategias podrían ser drogas potenciales o inspirar la síntesis de otras similares (Pandey 2012).

1.2 Productos Naturales de Invertebrados Marinos

La biodiversidad de los organismos marinos es enorme. Según la clasificación de Margulis y Schwartz (Margulis y Schwartz 1988), de los 33 *phyla* del reino animal sólo uno es exclusivamente terrestre y los 32 restantes poseen especies que pertenecen al ecosistema acuático (Figura 1.1). Dentro de estos últimos, aproximadamente el 60% corresponde a animales invertebrados (Ausubel y col. 2010).

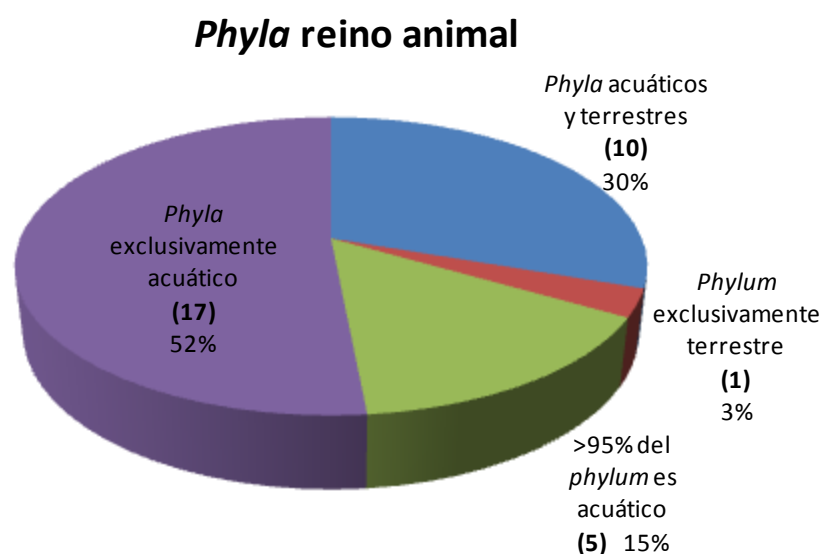


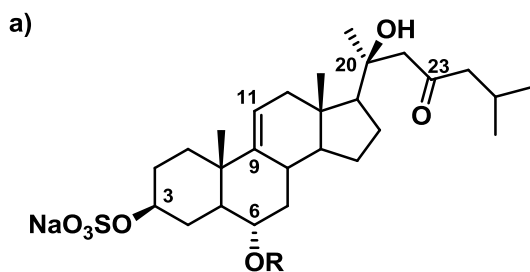
Figura 1.1: Subdivisión básica del reino animal. Entre paréntesis se indica la cantidad de *phylum* que conforman cada sector del gráfico.

Los invertebrados marinos se encuentran entre los grupos de organismos que más han contribuido a la incorporación de compuestos novedosos a bibliotecas de productos naturales, en las últimas décadas (Blunt y col. 2008; Jha y Xu 2004). Estos organismos han sido objeto de intensos estudios destinados a la búsqueda de nuevos metabolitos dado que éstos poseen estructuras químicas muy distintas a los terrestres y sus motivos estructurales son únicos y diversos (Costa Leal y col. 2012b). Considerando que la mayor parte de las investigaciones se han centrado en el estudio de sólo el 1% de las especies que conforman la biodiversidad del grupo de invertebrados marinos (Costa Leal y col. 2012a), éstos constituyen una fuente promisoría de metabolitos con nuevas estructuras químicas (Kong y col. 2010).

1.2.1 Esteroides polioxigenados de invertebrados marinos

Los organismos marinos son extraordinariamente ricos en esteroides con estructuras novedosas y poco convencionales. Sus patrones de oxidación y grado de funcionalización, tanto en el núcleo esteroidal como en la cadena lateral, son poco comunes y no se han encontrado estructuras equivalentes en el resto del reino animal. En particular, los invertebrados marinos constituyen la fuente de esteroides con mayor diversidad estructural (Salvador y col. 2013).

Entre los esteroides de origen marino con estructuras novedosas se destacan las saponinas –oligoglicósidos esteroidales- y los esteroides polioxigenados. Las saponinas son metabolitos secundarios muy comunes en plantas aunque muy raras en el reino animal, excepto en estrellas, pepinos de mar y en algunas especies de esponjas (Tachibana 1988). Las saponinas de estrellas de mar presentan una aglicona esteroidal, a diferencia de las aisladas a partir de pepinos las cuales poseen un núcleo triterpenoidal. El término asterosaponina se utiliza para designar los oligoglicósidos aislados de estrellas de mar, los cuales poseen una aglicona $\Delta^{9(11)}$ - $3\beta,6\alpha$ -dihidroxiesteroidal sulfatada en C-3 y una cadena de 5 ó 6 azúcares unida al C-6 del esteroide (Figura 1.2a) (Maier 2008). En la figura 1.2b se muestran dos ejemplos de asterosaponinas aisladas de distintas especies de estrellas de mar. Estos compuestos son interesantes debido a la variedad de propiedades biológicas que presentan, entre ellas, antifúngica, citotóxica, hemolítica, antiviral, antibacteriana e inmunomoduladora (Kalinin y col. 1996; Verbist 1993).



Tornasterósido A: R= [Fuc-1→2)-Gal-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Xyl-(1→3)-Qui
 Labidiasterósido A R= [Fuc-1→2)-Qui-(1→4)]-[Qui-(1→2)]-Glc-(1→2)-Glc

Figura 1.2: a) Aglicona característica de asterosaponinas. b) Ejemplos de asterosaponinas.

Los esteroides polioxigenados se encuentran ampliamente distribuidos en invertebrados marinos. Derivan del colesterol o algún esteroide relacionado y tienen en común el esqueleto del 1,2-ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano que consta de cuatro anillos fusionados (Figura 1.3a). En la figura 1.3b se representan los esqueletos esteroideales típicos de una gran cantidad de esteroides: (I) 5α -esterano, (II) 5β -esterano y (III) Δ^5 -esterano. Estos metabolitos presentan, principalmente, grupos carbonilo e hidroxilo en diferentes posiciones del esqueleto esteroide y de la cadena lateral. Los grupos hidroxilo a menudo se encuentran glicosidados o sulfatados (Stonik 2001).

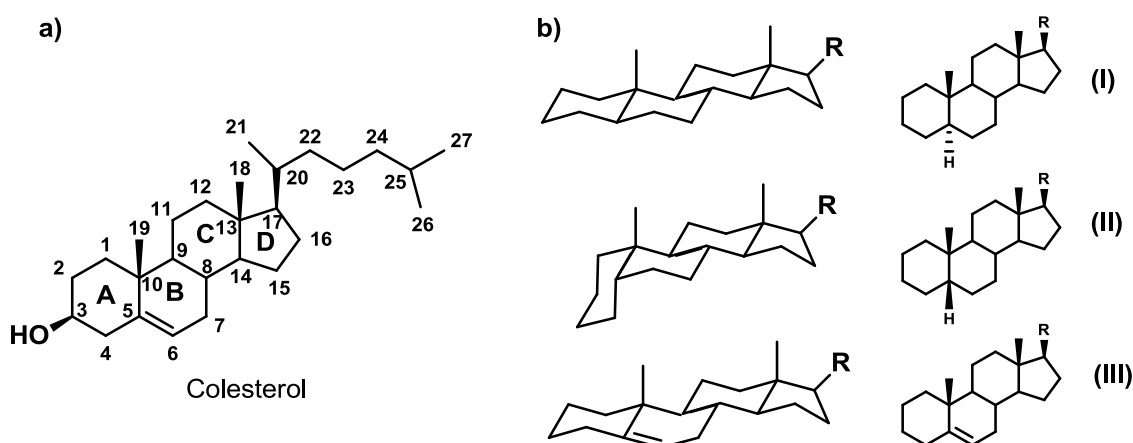


Figura 1.3: a) Estructura del colesterol, numeración de los carbonos y denominación de los distintos anillos. b) (I) 5α -esterano, (II) 5β -esterano y (III) Δ^5 -esterano.

En los invertebrados marinos, estos esteroides pueden actuar como hormonas, por ejemplo los ecdisteroides que son hormonas de la muda en los artrópodos (Figura 1.4, compuesto **1**) o los lincósidos, hormonas de crecimiento en las estrellas de mar (Figura 1.4, compuesto **2**).

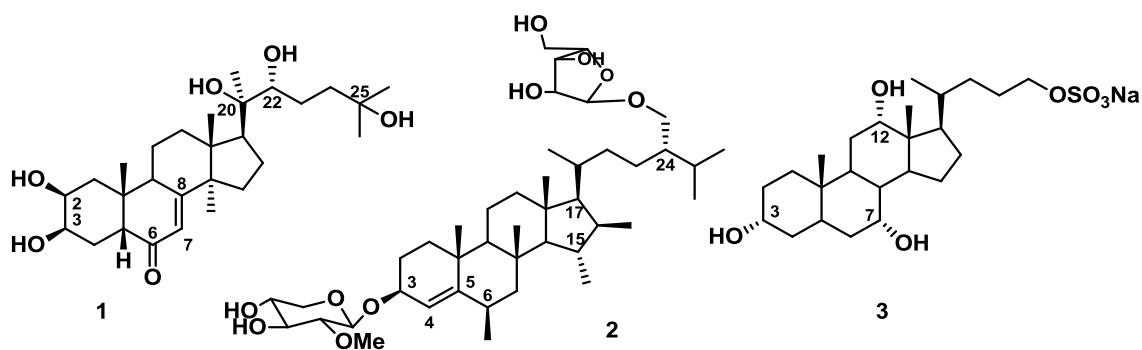


Figura 1.4: Ejemplos de esteroides polioxigenados que actúan como hormonas en invertebrados marinos.

Sin embargo no es su única función ya que pueden actuar como medio de comunicación química inter o intra-especie, como es el caso de las feromonas sexuales de las lampreas marinas (Figura 1.4, compuesto **3**), o como sustancias de alarma o de defensa: algunos esteroides son sustancias antifúngicas, antimicrobianas, antivirales o citotóxicas (D'Auria y col. 1993) que sirven para alejar depredadores, inhibir el crecimiento de microorganismos patogénicos y como protección de la incrustación de otros organismos marinos como algas o moluscos (Stonik 2001).

En el periodo 2000-2009, el 7,5% de los productos naturales novedosos aislados a partir de invertebrados marinos, fueron esteroides (Figura 1.5) (Costa Leal y col. 2012b).

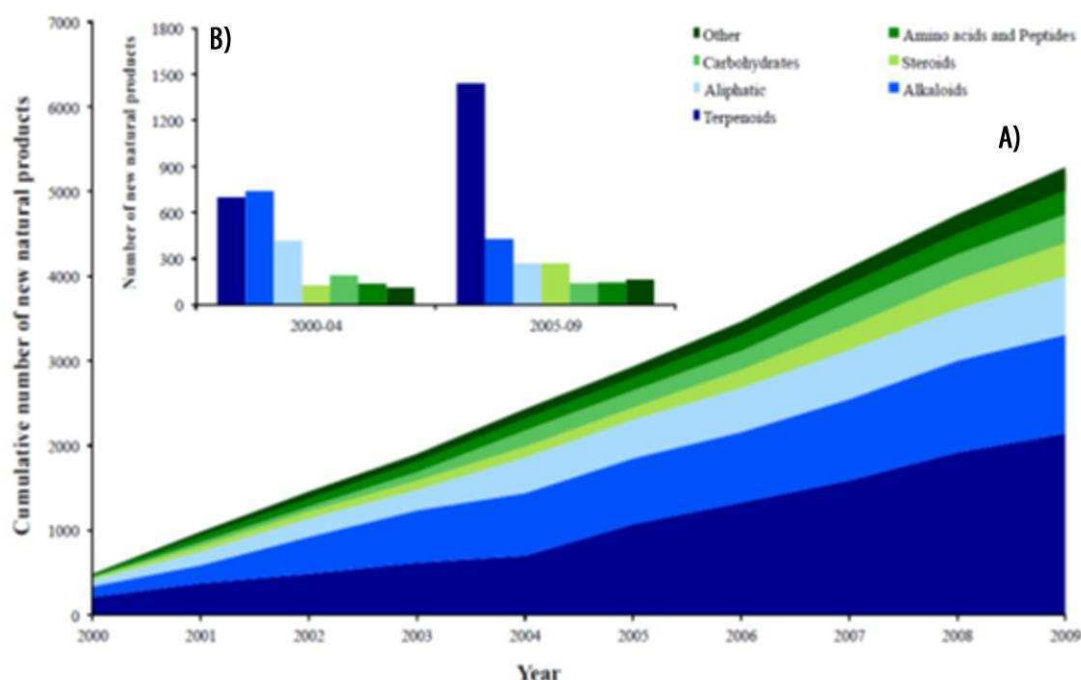


Figura 1.5: Gráfico del número de PN de invertebrados marinos aislados entre los años 2000 y 2009, clasificados según la familia de compuestos a la que pertenecen; y representados (a) de manera acumulativa y (b) promedio año a año (Costa Leal y col. 2012b).

La atención se ha focalizado particularmente en los esteroides polihidroxilados sulfatados y polioxigenados debido a su potente actividad biológica. Estos han sido encontrados en todos los *phyla* de invertebrados marinos. En la figura 1.6 se puede observar que la mayoría de los esteroides fueron aislados a partir de organismos pertenecientes al *phylum* Echinodermata y Cnidaria (Costa Leal y col. 2012b).

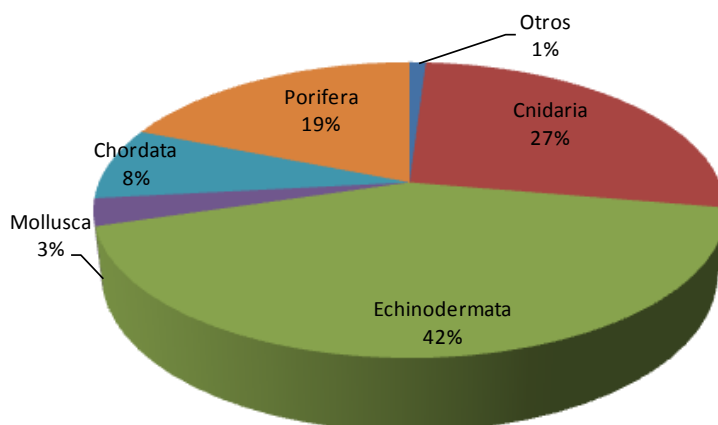


Figura 1.6: Porcentaje de esteroides aislados a partir de invertebrados marinos (agrupados por *phylum*) entre los años 2000 y 2009 (Costa Leal col. 2012b).

Dentro del *phylum* Echinodermata, las estrellas de mar son la mayor fuente de esteroides polioxigenados. Típicamente, estos esteroides poseen grupos hidroxilo en las posiciones 3 β , 6, 8 β , 15, 16 β y 26, siendo los esteroides penta- o hexahidroxisados los más comunes (Stonik 2001). También se han identificado algunos esteroides con 8 ó 9 grupos hidroxilo, como los compuestos **4** y **5** (Figura 1.7), aislados a partir de las estrellas de mar *Protoreaster nodusus* y *Acanthaster typicus*, respectivamente. Estos compuestos mostraron una alta actividad citotóxica frente a células JURCAT de linfoma humano (Anderson y col. 1989).

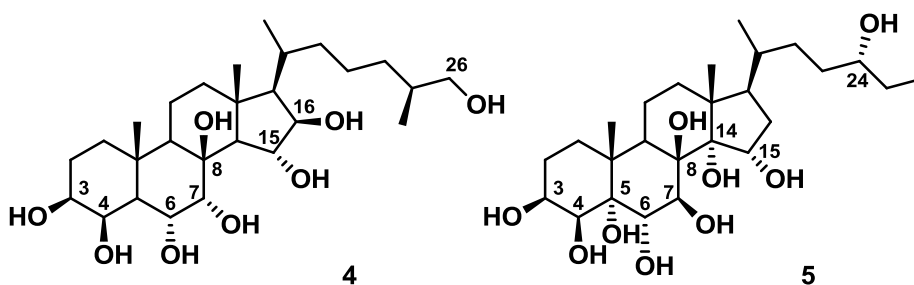


Figura 1.7: Ejemplos de esteroides polihidroxisados naturales

Los polihidroxiesteroides no son comunes en otras especies del *phylum* Echinodermata, con la excepción de sus análogos sulfatados, los cuales se encuentran mayormente en los ofiuros, tal como se comentará más adelante.

En el *phylum* Cnidaria, los polihidroxiesteroides se encuentran especialmente en octocorales y gorgonias. Generalmente, presentan grupos hidroxilo en las posiciones 3, 5, 6,

22 y 25 y también es común la hidroxilación del metilo angular 19 (Stonik, 2001). Por ejemplo, el litosterol, aislado a partir del coral *Litophyton arboreum* (Figura 1.8, compuesto 6) presentó una fuerte actividad antituberculosa por inhibición de *Mycobacterium tuberculosis* en un 90% con una dosis de 3,13 $\mu\text{g/ml}$ (El Sayed y col. 2000). Este hallazgo es importante ya que actualmente continúa la búsqueda de nuevos compuestos antituberculosos dado que la tuberculosis es la segunda causa más común de muerte en el mundo y debido a la resistencia que la bacteria desarrolla frente a múltiples drogas (Kim y Venkatesan 2013).

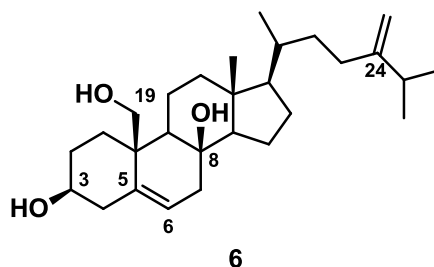


Figura 1.8

1.2.1.1 Esteroides polihidroxilados sulfatados

La sulfatación es una transformación biosintética esencial en la biota marina. Esto está relacionado con la alta concentración de iones sulfato en el océano (es el cuarto ion más abundante después del Cl^- , Na^+ y Mg^{2+}). La sulfatación incrementa la solubilidad de los metabolitos y los torna anfibióticos, lo cual es fundamental para su mecanismo de acción: su carácter hidrofílico garantiza su transporte en el agua y su carácter hidrofóbico facilita su unión a receptores de membrana de los organismos con los que interacciona (Stonik 2001).

Entre los metabolitos sulfatados, los esteroides constituyen uno de los grupos más numerosos. Los esteroides sulfatados están ampliamente distribuidos en los organismos marinos aunque, la mayor parte de ellos han sido aislados a partir de estrellas de mar y ofiuros, dentro del *phylum* Echinodermata, y de algunas especies de esponjas (*phylum* Porífera) (Maier y Murray 2006).

Entre los esteroides sulfatados, los esteroides monosulfatados son los más simples y son usuales en los equinodermos. El colesterol sulfatado es el componente predominante dentro de este grupo de compuestos, pero también son abundantes otros Δ^5 -esteroides sulfatados. Los Δ^5 -esteroides son adquiridos a través de la dieta y son posteriormente sulfatados por el

organismo. Esto se debe a que los holotureos y estrellas de mar poseen glicósidos que pueden formar complejos con el colesterol y otros Δ^5 -esteroides de las membranas dando lugar a la formación de poros en las mismas. Por lo tanto, la sulfatación es un mecanismo de protección de estos organismos contra el deterioro de sus membranas (Stonik 2001).

Sin embargo, es común que los esteroides sulfatados de origen marino presenten grupos hidroxilo libres. Los esteroides polihidroxilados monosulfatados son abundantes en estrellas de mar y generalmente contienen el grupo sulfato en la cadena lateral o en las posiciones 3, 6, 15 ó 16 del núcleo esteroidal (Stonik 2001). Se presume que esteroides sulfatados como el compuesto **7** (Figura 1.9) sean los precursores biosintéticos de las asterosaponinas (Minale y col. 1993; Kicha y col. 1991), las cuales son los metabolitos más característicos y predominantes en las estrellas de mar y los responsables en gran parte de la toxicidad de estos organismos (Maier y Murray 2006).

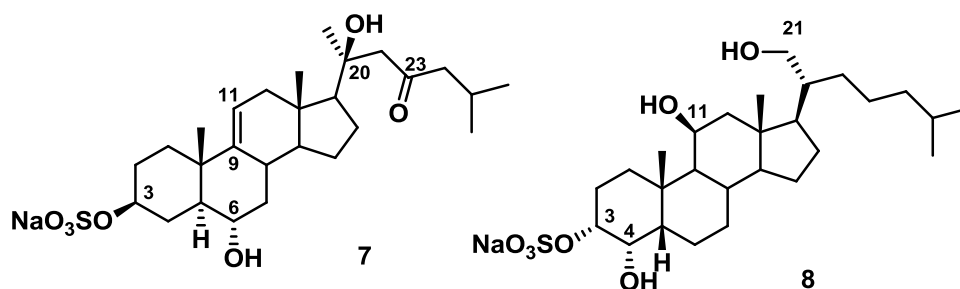


Figura 1.9: Ejemplos de esteroides polihidroxilados monosulfatados naturales

Dentro del *phylum* echinodermata, los ofiuros producen esteroides polihidroxilados monosulfatados que comúnmente poseen un grupo sulfato en posición 3 α (Stonik 2001). Por ejemplo, el compuesto **8** (Figura 1.9), aislado a partir del ofiuro *Ophiarachna incarassata*, es un inhibidor de la quinasa pp 60^{V-src}, la cual es responsable de la regulación del crecimiento celular y la señalización intercelular implicada en algunos tipos de cáncer (Fu y col. 1994; D'Auria y col 1987). Sin embargo, la mayoría de los esteroides sulfatados aislados a partir de ofiuros son disulfatados y poseen un motivo estructural que se repite: un grupo sulfato en posición 3 α y el segundo en el C-21 de la cadena lateral. Es común que presenten un doble enlace Δ^5 e hidroxilos en posición C-2(β) y C-4 (Maier y Murray 2006). En nuestro grupo de investigación se ha realizado un extenso estudio químico de varias especies de ofiuros recolectados en el Mar Argentino y en la zona de las Islas Georgias del Sur, obteniendo como resultado la caracterización de varios esteroides polihidroxilados disulfatados, de los cuales

cuatro resultaron ser novedosos. Los compuestos **9-11** fueron aislados del ofiuero antártico *Astrotoma agassizi* y el compuesto **12**, a partir del ofiuero *Ophioplocus januarii*, recolectado en San Antonio Oeste (Rio Negro) en la costa patagónica argentina (Figura 1.10). Estos esteroides polares presentaron actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos, como el virus sincitial respiratorio, herpes simplex, virus Junín (responsable de la fiebre hemorrágica Argentina) y el virus del dengue (Comin y col. 1999; Roccatagliata y col. 1998; Roccatagliata y col. 1996).

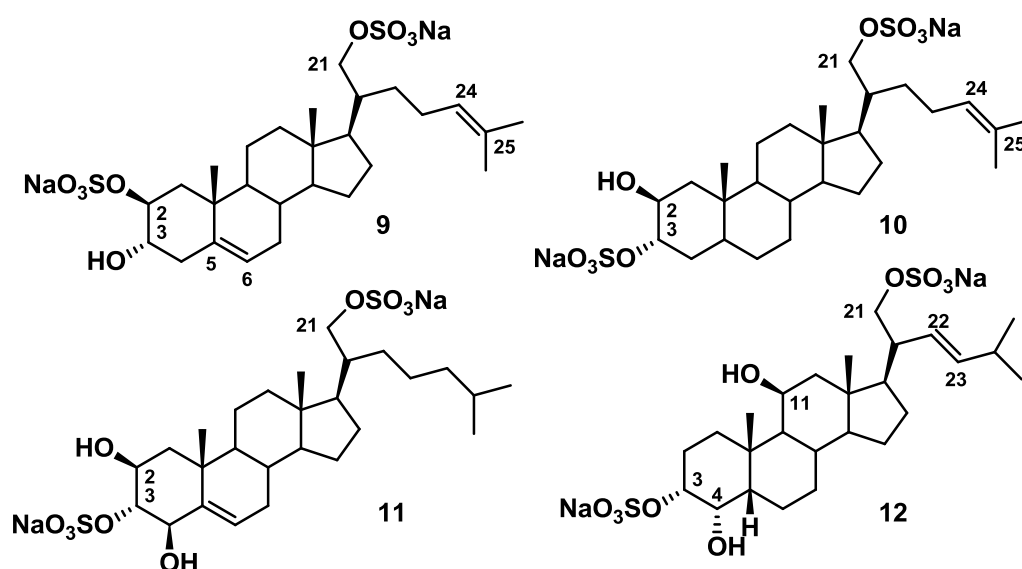


Figura: 1.10: Esteroides polihidroxilados disulfatados nuevos aislados en nuestro laboratorio

En el *phylum* Porifera, los esteroides polihidroxilados monosulfatados se caracterizan por presentar un grupo sulfato en las posiciones 3 β , 2 ó 6. Entre los esteroides polihidroxilados disulfatados de esponjas, varios de ellos poseen grupos sulfato en las posiciones 2 β y 3 α (Figura 1.11). Los compuestos weinbersteroles A (**13**) y B (**14**), aislados a partir de la esponja *Petrosia weinbergi*, presentaron actividad antiviral contra el virus de leucemia felina (Sun y col. 1991) y, el compuesto **15** –aislado a partir de la esponja *Halichondria* sp. (Makar'eva y col. 1985)-, contra el virus de inmunodeficiencia humana. El halistanol B disulfato (**16**) aislado a partir de la esponja *Pachastrella* sp. recolectada en el sur de África, mostró inhibición de la síntesis de la proteína endotelina, cuya función es la de contraer las venas y las arterias y elevar la presión sanguínea. Por lo tanto, este compuesto es útil como modelo para el desarrollo de nuevas drogas antihipertensivas (Patil y col. 1996).

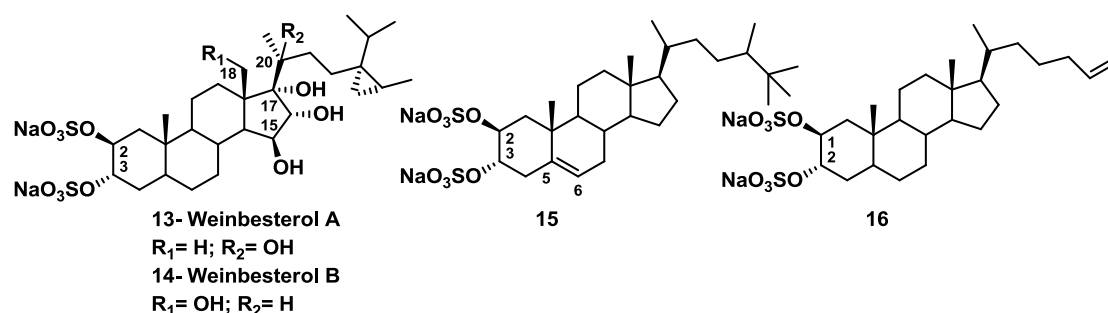


Figura 1.11: Ejemplos de esteroides polihidroxilados disulfatados naturales

Los esteroides polihidroxilados trisulfatados son metabolitos aislados en su mayoría a partir de esponjas y equinodermos (Stonik, 2001). El halistanol trisulfato (**17**) (Figura 1.12) es el esteroide sulfatado más ampliamente distribuido en esponjas. Sus grupos sulfato se encuentran en las posiciones 2β , 3α y 6α . Se han aislado varios compuestos con el mismo núcleo esteroidal y que difieren solamente en su cadena lateral (Figura 1.12, compuesto **18**). Esta serie de compuestos presentan una variedad de actividades biológicas muy interesantes como antibacteriana de amplio espectro (Marinho y col. 2012), hemolítica (Peng y col. 2005), anti HIV (McKee y col. 1994), antitumoral (Jin y col. 2006) y actividad anticoagulante por interacción con el receptor de trombina (Kanazawa y col. 1992).

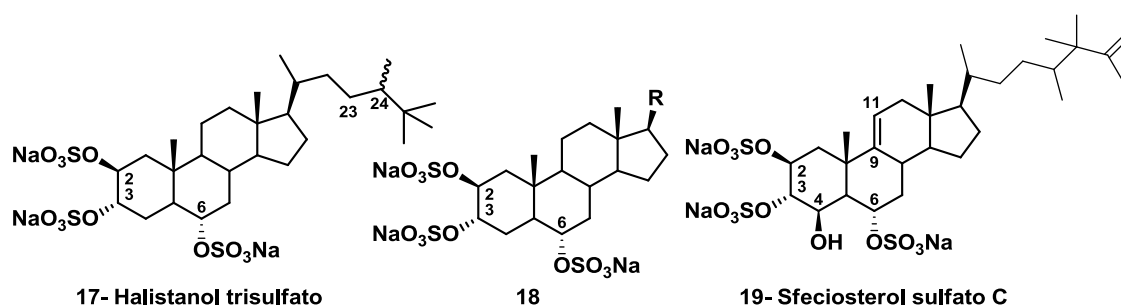


Figura 1.12

Otro ejemplo interesante es el compuesto **19** (Figura 1.12), aislado a partir de la esponja *Spheciospongia sp.*, que resultó ser un potente inhibidor de la quinasa PKC ξ (Whitson y col. 2008), la cual está involucrada en el progreso de diversas enfermedades tales como complicaciones metabólicas o cardiovasculares de la diabetes, disfunciones del sistema nervioso central (por ejemplo, el trastorno bipolar), Alzheimer, degeneraciones neuronales, desórdenes cardiovasculares, arterosclerosis y cáncer. Por esta razón, los inhibidores de esta quinasa son compuestos de interés para el desarrollo de agentes terapéuticos para varias enfermedades (Fields y Gustafson 2003).

Los ejemplos aquí descritos demuestran la gran variedad de actividades biológicas que presentan los esteroides marinos. Por esta razón, los organismos marinos, en particular las esponjas, continúan siendo una fuente de interés poco explorada y potencialmente rica en nuevas drogas (Costa Leal y col. 2012b).

1.3 Referencias Bibliográficas

- Anderson, L; Bohlin, L; Iorizzi, M; Riccio, R; Minale, L; Moreno-Lopez, W. Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars. *Toxicon* **1989**; 27: 179-88.
- Ausubel, J; Crist, DT; Waggoner, PE. First Census of Marine Life (**2010**).
- Blunt, JW; Copp, BR; Hu, WP; Munro, MHG; Northcote, PT; Prinsep, MR. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2008**; 25: 35–94.
- Breton, RC; Reynolds, WF. Using NMR to identify and characterize natural products. *Nat. Prod. Res.* **2013**; 30: 501-24.
- Comin, MJ; Maier, MS; Roccatagliata, AJ; Pujol, CA; Damonte, EB. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs. *Steroids* **1999**; 64: 335-40.
- Costa Leal, M; Puga, J; Serôdio, J; Gomes, NCM; Calado, R. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades - Where and what are we bioprospecting? *Plos One* **2012a**; 7(1).
- Costa Leal, M; Madeira, C; Brandao, CA; Puga, J; Calado, R. Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products - A chemical and zoogeographical perspective. *Molecules* **2012b**; 17: 9842-54.
- Cragg, GM; Newman, DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**; 1830(6): 3670-95.
- D'Auria, MV; Riccio, R; Minale, L; La Barre, S; Pusset, J. Novel marine steroid sulfates from Pacific ophiuroids. *J. Org. Chem.* **1987**; 52: 3947-52.
- D'Auria, MV; Minale, L; Riccio, R. Polyoxygenated steroids of marine origin. *Chem. Rev.* **1993**; 93: 1839-95.
- El Sayed, KA; Bartyzel, P; Shen, X; Perry, TL; Zjawiony, JK; Hamann, MT. Marine natural products as antituberculosis agents. *Tetrahedron* **2000**; 56: 949-53.
- Ertl, P; Schuffenhauer, A. Cheminformatics analysis of natural products: lessons from nature inspiring the design of new drugs. *Prog. Drug Res.* **2008**; 66 (217), 219-35.
- Fields, AP; Gustafson, WC. Protein kinase C in disease: cancer. *Methods in Molecular Biology* **2003**; 233: 519-37.
- Fu, X; Schmitz, FJ; Lee, RH; Papkoff, JS; Slate, DL. Inhibitors of protein tyrosine kinase pp60v-src: sterol sulfates from the brittle star *Ophiarachna incrassate*. *J. Nat. Prod.* **1994**; 57: 1591-4.
- Haefner, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today* **2003**; 8(12): 536-44.
- Jha, RK; Xu, Z. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar. Drugs* **2004**; 2: 123–46.
- Jimeno, J; Faircloth, G; Fernandez Sousa-Faro, JM; Scheuer, P; Rinehart, K. New marine derived anticancer therapeutics – A journey from the sea to clinical trials. *Mar. Drugs* **2004**; 2: 14-29.

- Jin, Y; Fotso, Z; Yongtang, M; Sevvana, H; Laatsch, H; Zhang, W. Halichondria sulfonic acid, a new HIV-1 inhibitory guanidino-sulfonic acid, and halistanol sulfate isolated from the marine sponge *Halichondria rugosa* Ridley & Dendy. *Nat. Prod. Res.* **2006**; 20(12): 1129-35.
- Kalinin, VI; Anisimov, MM; Prokofieva, NG; Avilov, SA; Afiyatullo, SS; Stonik, VA *Echinoderm Studies* Vol. 5. **1996**: pag. 13981. Editoria Balkema: Rotterdam
- Kanazawa, S; Fusetani, N; Matsunaga; S. Halistanol Sulfates A-E, New Steroid Sulfates, from a Marine Sponge, *Epipolasis* sp. *Tetrahedron* **1992**; 48: 5467-72.
- Khazirab, J; Ahmad Mirc, B; Ahmad Mird; Cowan, D. Natural products as lead compounds in drug discovery. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2013**; 15(7): 764-88.
- Kicha, AA; Kalinovskii, AI; Stonik, VA. Steroid sulfates from the starfish *Lethasterias nanimensis chelifera*. *Khim. Prirod. Soedin.* **1991**: 520.
- Kim, S-K; Venkatesan, J. *Marine Biomaterials. Characterization, Isolation and Applications.* **2013**; capítulo 11: pag. 176. Editorial Taylor & Francis Group.
- Kinghorn, AD; Chin, YW; Swanson, SM. Discovery of natural product anticancer agents from biodiverse organisms. *Curr. Opin. Drug Disc.* **2009**; 12(2): 189-96.
- Kong, DX; Jiang, YY; Zhang, HY. Marine natural products as sources of novel scaffolds: achievement and concern. *Drug Discov. Today* **2010**; 15(21-22): 884-6.
- Maier, MS; Murray, AP. *Biomaterials from aquatic and terrestrial organism* **2006**; capítulo 15: pag. 560. Editorial Science Publishers.
- Maier, MS. *Biological activities of sulfated glycosides from echinoderms. Studies in natural products chemistry* Vol. 35. **2008**: pag. 311-53. Editorial Elsevier
- Makar'eva, TN; Shubina, LK; Kalinovskii, AI; Stonik, VA. Steroid compounds of marine sponges. V. 24 ξ ,25-Dimethylcholest-5-ene-2 β ,3 α -diol di(ammonium sulfate) - A new polyhydroxilated steroid from a sponge *Halichondria* sp. *Chem. Nat. Prod.* **1985**; 21(2): 257-8.
- Margulis, L; Schwartz, KV. *Five Kingdoms, an illustrated guide to the phyla of life on earth.* 2da edición **1988**. Editorial Freeman & Co.
- Marinho, PR; Simas, NK; Machado Kuster, R; Silva Duarte, R; Longo Fracalanza, SE; Fernandez Ferreira, D; Villela Romanos, MT; Muricy, G; Giambiagi-DeMarval, M; Silva Laport, M. Antibacterial activity and cytotoxicity analysis of halistanol trisulphate from marine sponge *Petromica citrine*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2012**; 67: 2396-2400.
- Mayer, AMS; Lehmann, VKB. Marine pharmacology in 1998: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. *The Pharmacologist* **2000**; 42: 62-9.
- Mc Clintock, JB; Amsler, CD; Baker, BJ. *Starfish. Biology and Ecology of the Asteroidea.* **2013** Capítulo 8: pag. 81. *Johns Hopkins University Press*
- McKee, TC; Cardellina, JH; Riccio, R; D'Auria, MV; Iorizzi, M; Minale, L; Moran, RA; Gulakowski, RJ; McMahon, JB; Buckheit, RW; Snader KM; Boyd, MR. HIV-inhibitory natural

products. 11. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrates. *J. Med. Chem.* **1994**; 37: 793-7.

-Minale, L; Riccio, R; Zollo, F. *Progress in the chemistry of Organic Natural Products*. Vol. 62. **1993**: pag. 75. Editorial Springer, Nueva York.

-Newman, DJ; Cragg, GM. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.* **2004**; 67: 1216-38.

-Pandey, K. Potent bioactive compounds from the ocean: Some interesting aspects and applications. *Pharmacognosy J.* **2012**; 4(27): 1-5.

-Patil, AD; Freyer, AJ; Breen, A; Carte, B; Johnson, RK. Halistanol disulfate B, a novel sulfated sterol from the sponge *Pachastrella* sp.: inhibitor of endothelin converting enzyme. *J. Nat. Prod.* **1996**; 59: 606-8.

-Peng, XC; Yang, WD; Liu, JS; Peng, ZY; Lu, SH; Ding, WZ. Characterization of the hemolytic properties of an extract from *Phaeocystis globosa* Scherffel. *J. Integr. Plant. Biol.* **2005**; 47(2): 165-71.

-Proksch, P; Edrada, RA; Ebel, R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**; 59: 125-34.

-Roccatagliata, AJ; Maier, MS; Seldes, AM; Pujol, C; Damonte, EB. Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid *Ophioplocus januarii*. *J. Nat. Prod.* **1996**; 59: 887-9.

-Roccatagliata, AJ; Maier, MS; Seldes, AM. New Sulfated Polyhydroxysteroids from the Antarctic Ophiuroid *Astrothoma agassizii*. *J. Nat. Prod.* **1998**; 61: 370-4.

-Salvador, JA; Carvalho, JF; Neves, MA; Silvestre, SM; Leitao, AJ; Sá e Melo, ML. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Nat. Prod. Rep.* **2013**; 30(2): 324-74.

-Sepe, V; Ummarino, R; D'Auria, MV; Lauro, G; Bifulco, G; D'Amore, C; Renga, B; Fiorucci, S; Zampella, A. Modification in the side chain of solomonsterol A: discovery of cholestan disulfate as a potent pregnane-X-receptor agonist. *Org. Biomol. Chem.* **2012**; 10: 6350-62.

-Shoolery, JN. Recent Developments in ¹³C-and Proton-NMR. *J. Nat. Prod.* **1984**; 47: 226-59.

-Stonik, VA. Marine polar steroids. *Russ. Chem. Rev.* **2001**; 70: 673-715.

-Sun, HH; Cross, SS; Gunasekera, M; Koehn, FE. Weinbersterol disulfates A and B, antiviral steroid sulfates from the sponge *petrosia weinbergi*. *Tetrahedron* **1991**; 47: 1185-90.

-Tachibana, K, *Bioorganic Marine Chemistry*. Vol. 2. **1988**: pag. 117-38. Editorial Springer-Verlag, Berlin.

-Verbist, JF. *Echinoderm Studies* Vol. 4. **1993**: pag. 111-186. Editorial Balkema, Rotterdam.

-Whitson, EL; Bugni, TS; Chockalingam, PS; Concepcion, GP; Harper, MK; He, M; Hooper, JNA; Mangalindan, GC; Ritacco, F; Ireland, CM. Spheciosterol Sulfates, PKC ζ Inhibitors from a Philippine Sponge *Spheciospongia* sp. *J. Nat. Prod.* **2008**; 71: 1213-17.

Capítulo 2:

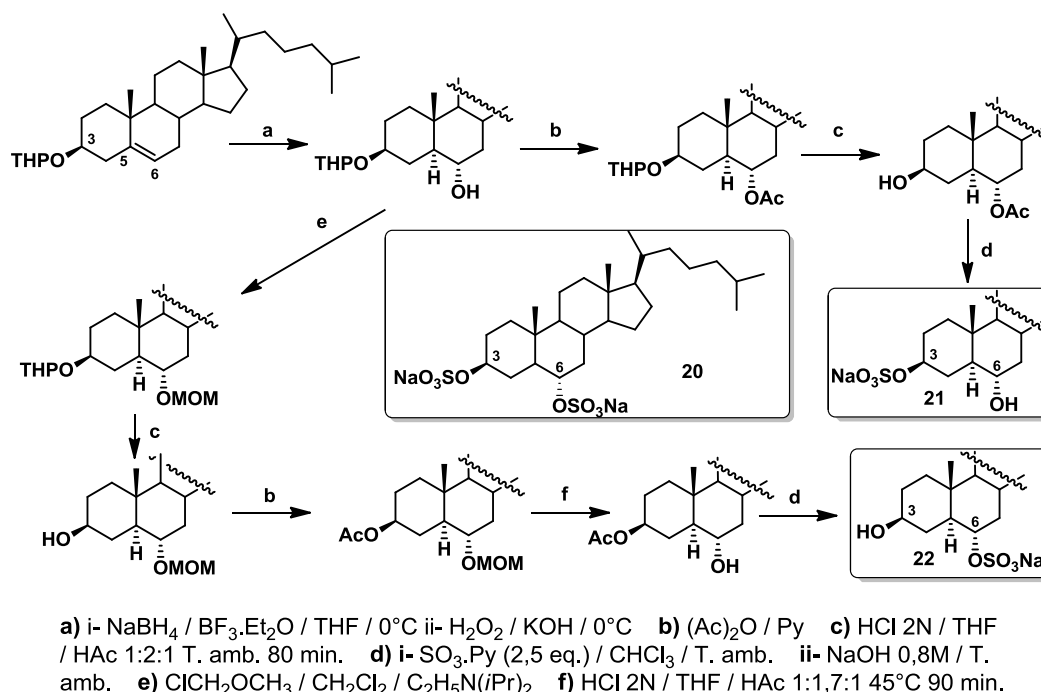
**Síntesis de análogos de
esteroides sulfatados marinos**

2.1 Introducción

Dada la baja concentración en que se encuentran los metabolitos secundarios en los organismos marinos productores, la síntesis química se presenta como un camino alternativo para el desarrollo de compuestos con actividad biológica. Además, debido a la permanente necesidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos, la síntesis es una herramienta de gran utilidad ya que permite obtener compuestos análogos de los naturales para establecer correlaciones entre la estructura química y la actividad biológica. De este modo, es posible identificar la subestructura (farmacóforo) que es esencial para la actividad biológica de un compuesto.

A pesar de las variadas actividades biológicas que presentan los esteroides sulfatados marinos, hay muy pocos trabajos sobre síntesis de estos productos naturales y sus análogos bioactivos en la literatura científica.

En 1992 se publicó la síntesis del 3 β ,6 α -dihidroxi-5 α -colestano disulfato (**20**) por hidroxilación anti-Markovnikov del doble enlace Δ^5 de colesterol y posterior disulfatación del diol utilizando el complejo de Py.SO₃.

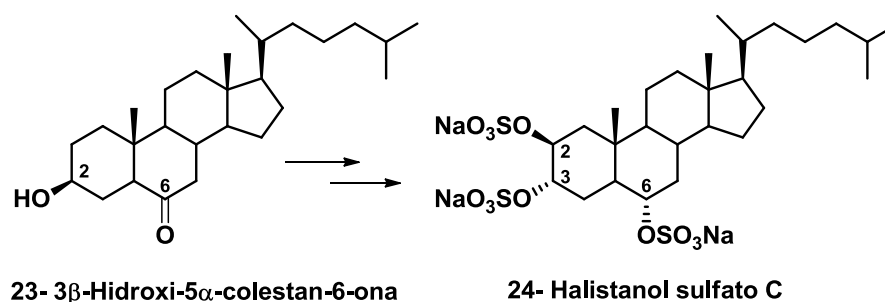


Esquema 2.1

Con el objeto de preparar distintos derivados para evaluar la influencia de los grupos sulfato en la actividad biológica, se sintetizaron los dos análogos monosulfatados, el compuesto 3 β ,6 α -dihidroxi-5 α -colestano-3-sulfato (**21**) y el 6-sulfato (**22**).

Los esteroides monosulfatados se obtuvieron mediante una estrategia de varios pasos de protección y desprotección combinando grupos acetilo, metoximetilo y tetrahidropiraniolo, tal como se observa en el esquema 2.1. (Arnostová y col. 1992).

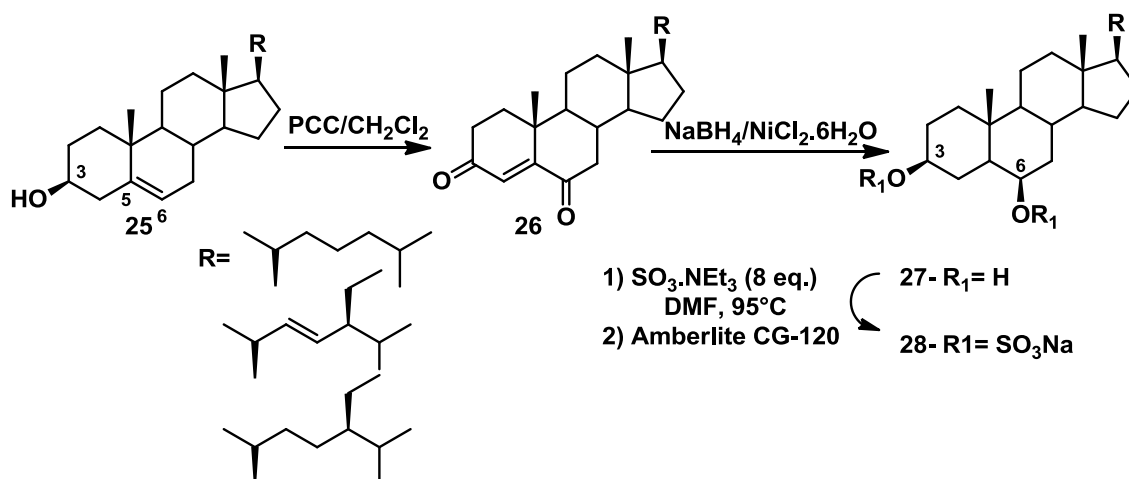
En el año 2006, Murphy y col. realizaron una búsqueda de compuestos con actividad proangiogénica, en una biblioteca de productos naturales y encontraron que el sokotrasterol sulfato (análogo Δ^{23} de **17**, Figura 1.12) era capaz de promover la angiogénesis *in vitro* e *in vivo* y podría ser utilizado potencialmente para promover la neovascularización en pacientes con enfermedades cuya secuela fuera la oclusión de vasos sanguíneos. (Murphy y col. 2006). En base a este antecedente, este mismo grupo desarrolló la síntesis del halistanol sulfato C (Esquema 2.2, compuesto **24**), un compuesto natural aislado de la esponja *Epipolasis sp.* (Kanazawa y col. 1992), a partir de la 3 β -hidroxi-5 α -colestano-6-ona (**23**).



Esquema 2.2

Sin embargo, en este trabajo no se caracterizaron los intermediarios de la síntesis ni el producto final y los rendimientos de los intermediarios se expresaron en base al producto de reacción sin purificar (Murphy y col. 2006).

En el año 2009, se publicó un trabajo cuyo objetivo era la síntesis de análogos sulfatados en los carbonos 3 y 6, posiciones comúnmente sulfatadas en los esteroides aislados de esponjas y ofiuros. Se sintetizaron varios 3 β ,6 β -dihidroxiesteroides disulfatados con diferentes cadenas laterales para evaluar su influencia en la citotoxicidad frente a diversas líneas tumorales.

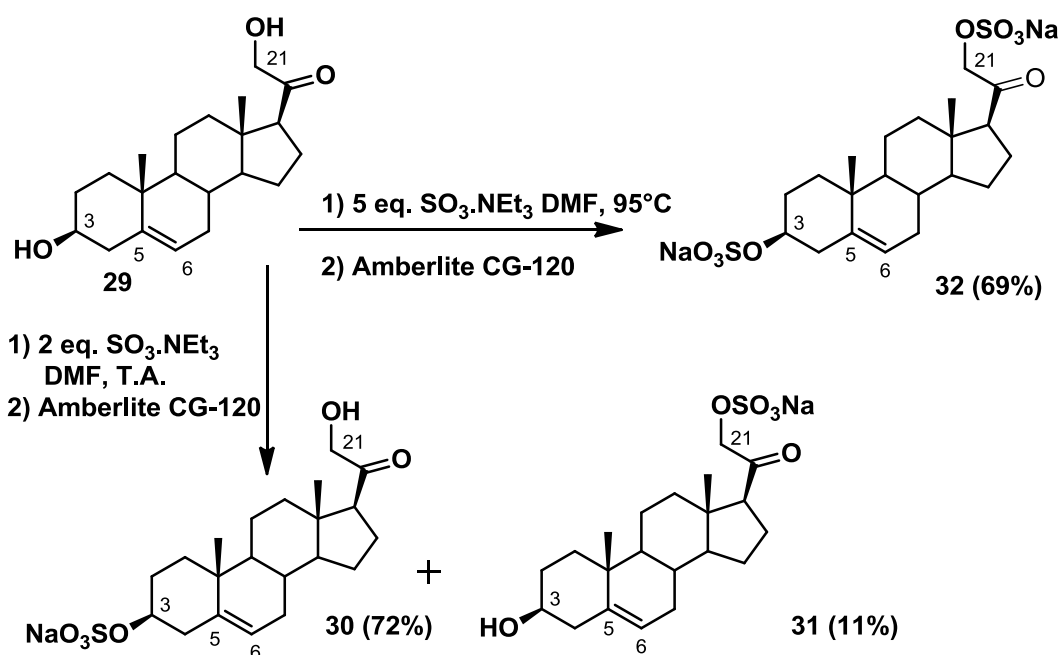


Esquema 2.3

La ruta utilizada (Esquema 2.3) consistió en el tratamiento del esteroide de partida (**25**) con PCC para oxidar el grupo alcohol y luego, por un reordenamiento oxidativo de la cetona β,γ insaturada, se obtuvo la ene-diona **26** (Schlecht 2005, Fieser 1963). Esta al ser tratada con NaBH_4 y $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ durante 20 minutos, dio lugar al esteroide dihidroxilado **27**, el cual fue disulfatado por tratamiento con $\text{SO}_3 \cdot \text{Et}_3\text{N}$ a 95°C y posterior pasaje a través de una resina de intercambio catiónico para dar el compuesto **28**. Los estudios de citotoxicidad de la serie de análogos disulfatados (**28**) demostraron que la presencia de una cadena lateral de tipo colestano era fundamental para que el esteroide fuera activo (Cui y col. 2009).

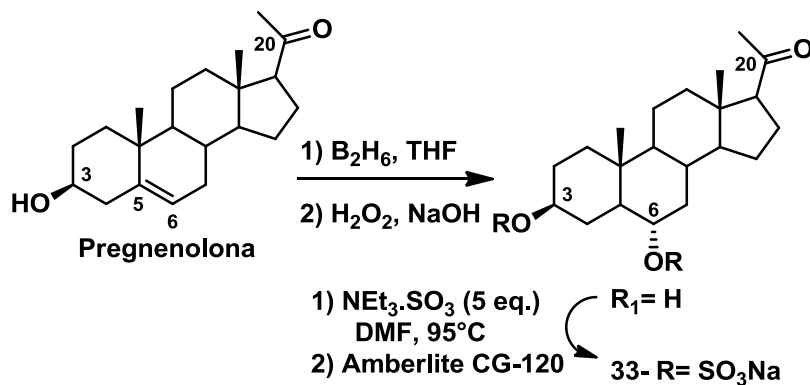
Dados los antecedentes de actividad antiviral de los esteroides sulfatados aislados de los ofiuros *Astrotoma agassizi* y *Ophioplocus januarii* (Roccatagliata y col. 1998; Roccatagliata y col. 1996), se sintetizaron en nuestro laboratorio, diferentes análogos sulfatados en el esqueleto esteroideal y en la cadena lateral con el objeto de establecer correlaciones entre la estructura química y la actividad antiviral.

La síntesis de 20-cetopregnanos sulfatados en C-3 (β) y/o C-21 se muestra en el esquema 2.4. La sulfatación de la 21-hidroxipregnenolona (**29**) a temperatura ambiente utilizando 2 equivalentes del complejo sulfatante dio lugar a la mezcla de los dos compuestos monosulfatados **30** y **31**. Cuando la reacción se realizó utilizando 5 equivalentes del reactivo sulfatante a 95°C , se obtuvo la 3 β ,21-dihidroxipregnenolona disulfato (**32**) (Comin y col. 1999).



Esquema 2.4

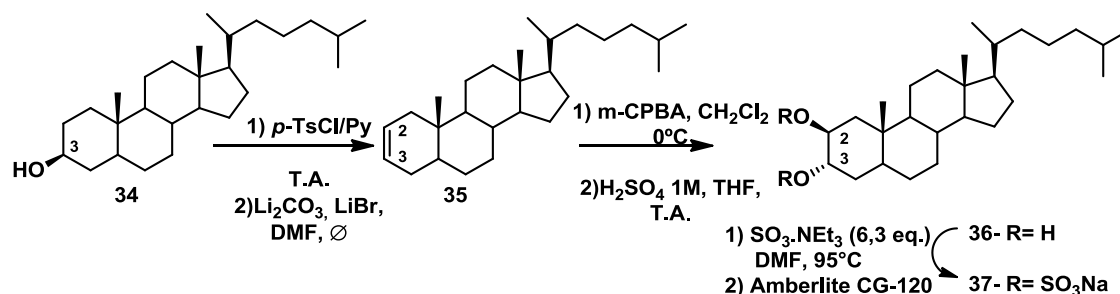
Para la síntesis de 20-cetopregnanos sulfatados en C-3 (β) y C-6 (α), se realizó la reacción de hidroborcación sobre pregnenolona. Luego se sulfató el diol a 95°C utilizando 5 equivalentes de $\text{SO}_3 \cdot \text{Et}_3\text{N}$ como agente sulfatante (Compuesto **33**, Esquema 2.5) (Comin y col. 1999).



Esquema 2.5

Por último, en nuestro laboratorio se sintetizaron una serie de colestanos sulfatados en C-2 (β) y/o C-3 (α) tal como se observa en el esquema 2.6. Para ello se partió del compuesto comercial **34**, el cual mediante las reacciones de tosilación y eliminación rindió el 5α -colest-2-eno (**35**). Luego se epoxidó la olefina Δ^2 y su posterior apertura nucleofílica en medio ácido dio el $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi- 5α -colestano (**36**), el cual se sulfató utilizando 6,3 equivalentes de

SO₃.Et₃N en DMF a 95 °C y por posterior intercambio iónico rindió la sal de sodio del 2β,3α-dihidroxi-5α-colestano disulfato (**37**). También se sintetizaron ambos dioles monosulfatados utilizando diferentes reacciones de protección/desprotección para evaluar el rol de los grupos sulfato en la actividad biológica (Garrido Santos y col. 2003).



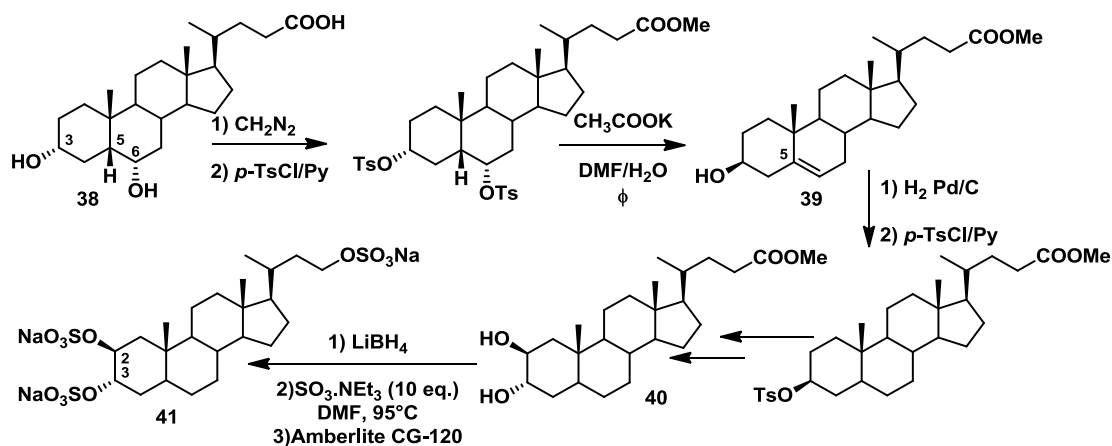
Esquema 2.6

La evaluación de la actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos (sincitial respiratorio, herpes simplex, Junín y dengue) de los esteroides sulfatados naturales y sus análogos sintéticos demostraron la importancia de la presencia de dos grupos sulfato en C-2 (β) y C-3 (α) para la actividad antiviral (Garrido Santos y col. 2003).

En el año 2011 Sepe y col. publicaron la síntesis del solomonsterol A (compuesto **41**, esquema 2.7), un esteroide trisulfatado aislado a partir de la esponja *Theonella swinhoei*, el cual es un agonista del receptor PXR (Festa y col. 2011). La función de este receptor es la de detectar la presencia de sustancias tóxicas o extrañas en el hígado y tracto gastrointestinal y, como respuesta, activar la expresión de proteínas encargadas de la detoxificación y eliminación de dichas sustancias. El agonismo de este receptor puede contribuir a la integridad de la barrera intestinal mediante la regulación del metabolismo de los xenobióticos. Además, dicho receptor posee actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria.

En el primer paso de la síntesis (Esquema 2.7) se obtuvo el metil éster del ácido 3α,6α-dihidroxi-5β-colan-24-oico (**38**), el cual se ditosiló utilizando cloruro de tosilo en piridina. Por tratamiento con acetato de potasio en DMF-H₂O (7:1) a reflujo se obtuvo el doble enlace Δ⁵ por eliminación del tosilo 6α y en el mismo paso, vía S_N2, se invirtió la configuración del C-3 para obtener el intermediario **39** (Iida y col. 1988). Luego de hidrogenar la olefina Δ⁵ del compuesto **39**, se tosilo el alcohol en posición 3β y se eliminó generando un intermediario Δ². A partir de éste, el camino sintético continúa de manera análoga al planteado en el

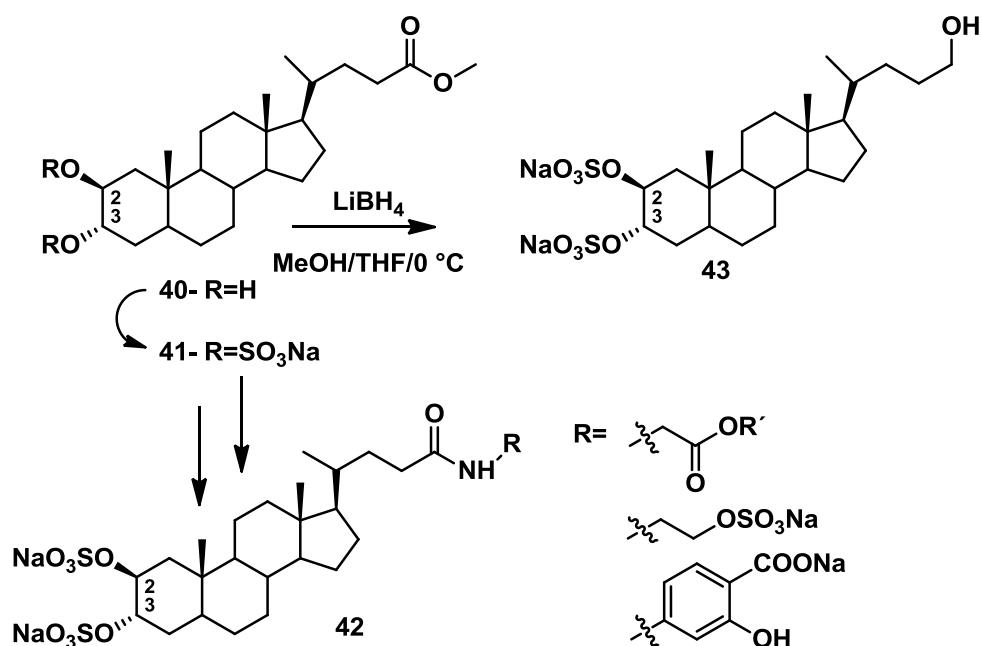
esquema 2.6 hasta obtener el éster metílico **40**, el cual fue reducido utilizando LiBH_4 . Finalmente, el solomonsterol A (**41**) se obtuvo por sulfatación del triol utilizando 10 equivalentes de $\text{SO}_3 \cdot \text{Et}_3\text{N}$ en DMF a 95°C y posterior pasaje a través de Amberlite CG-120 (en la forma sodio) (Sepe y col. 2011).



Esquema 2.7

Nuevos estudios demostraron que el solomonsterol A es capaz de atenuar la inflamación sistémica y disminuir significativamente el desarrollo de artritis reumatoidea en un modelo de ratón (Mencarelli y col. 2014).

En el año 2012, el mismo grupo publicó la síntesis de diferentes análogos del solomonsterol A (**41**). A tal fin, se sintetizaron una variedad de compuestos con el mismo núcleo esteroidal de **41**, es decir, con grupos sulfato en las posiciones 2β y 3α y diferentes cadenas laterales. En el esquema 2.8, se presenta la síntesis de estos análogos que se obtuvieron a partir del compuesto **40**. El primer paso consistió en la sulfatación del éster metílico y posterior transformación del éster al grupo amida (**42**) o mediante su reducción para obtener el alcohol **43**. Además, sintetizaron el compuesto **37** (Esquema 2.6) y probaron su actividad como agonista del receptor PXR. Se encontró que el compuesto **37** resultó ser el más potente de la serie (Sepe y col. 2012). Actualmente se está evaluando la eficacia de dicho compuesto en modelos animales, junto con la determinación de sus propiedades químico-físicas.



Esquema 2.8

2.2 Síntesis de precursores polihidroxilados de análogos sulfatados

En base a los antecedentes de actividad antiviral de los esteroides polihidroxilados sulfatados sintéticos y naturales, aislados a partir de organismos marinos en nuestro grupo de investigación (Roccatagliata y col. 1996; Roccatagliata y col. 1998; Comin y col. 1999; Garrido Santos y col. 2003), se proyectó la síntesis de diferentes esteroides sulfatados en los C-2, C-3 y/o C-6 (Figura 2.1).

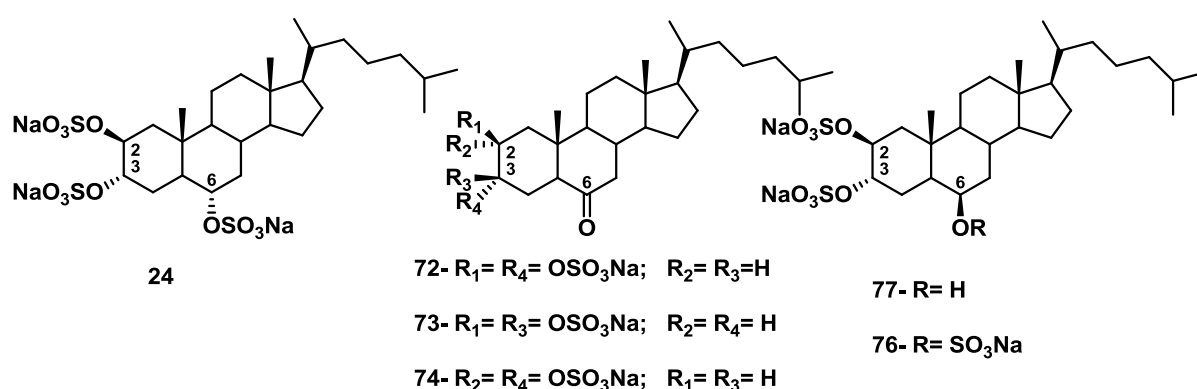
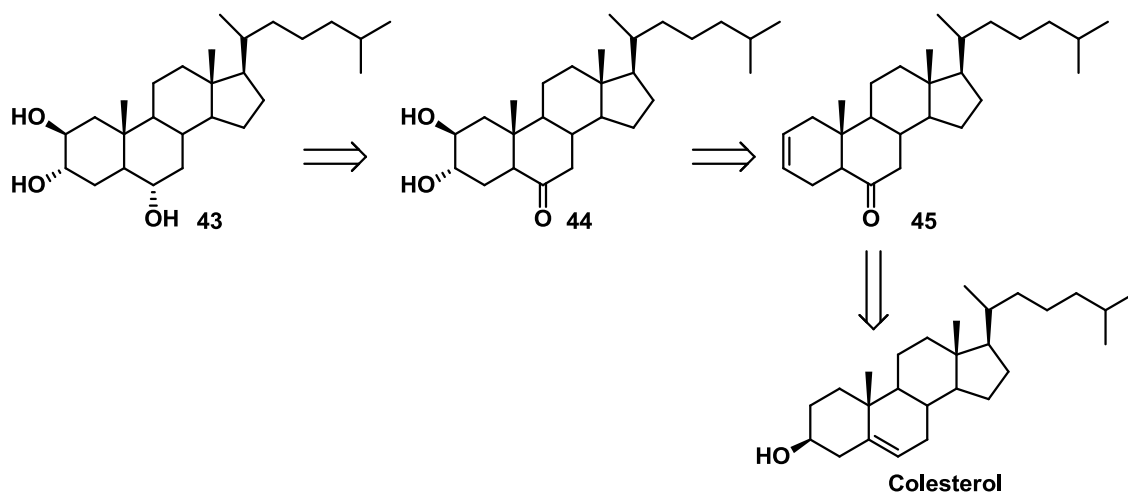


Figura 2.1

A continuación se describirá la síntesis de todos los precursores polihidroxilados de los análogos sulfatados y en la segunda parte del capítulo, las reacciones de sulfatación para dar lugar a los compuestos enumerados en la figura 2.1

2.2.1 Síntesis del compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (43)

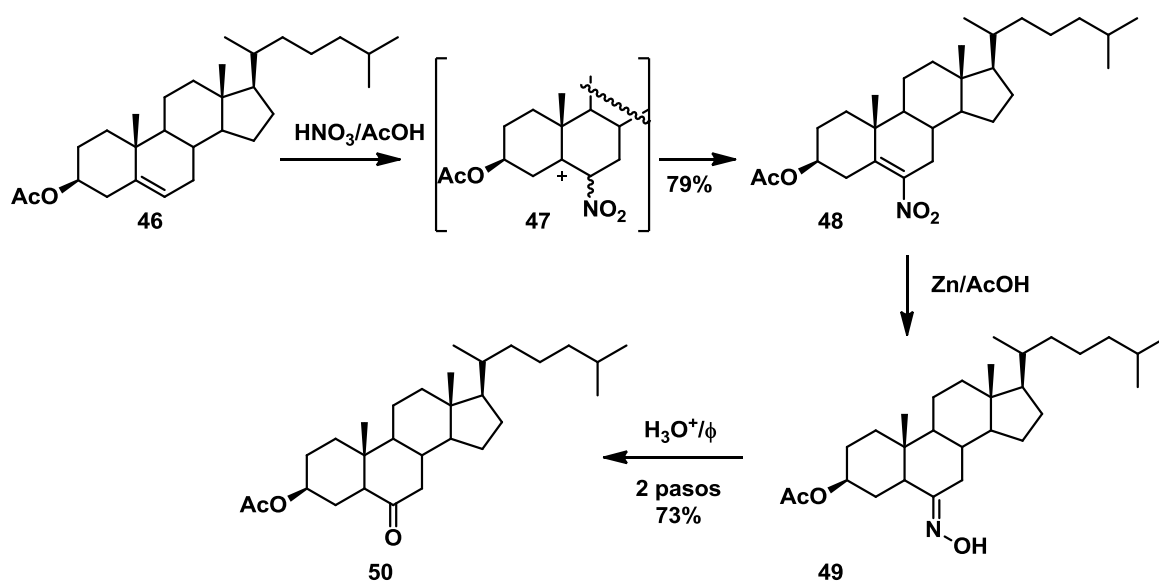
El primer objetivo de este trabajo de tesis fue la obtención del compuesto **24** (Figura 2.1) cuyo precursor es el compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**). Para la obtención de **43** se propuso el camino retrosintético que se presenta en el esquema 2.9.



Esquema 2.9

Se planteó la obtención del compuesto trihidroxilado **43** por reducción del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**), el cual provendría de la epoxidación de la olefina **45** y posterior apertura nucleofílica en medio ácido (Garrido Santos y col. 2003). La enona **45** se puede sintetizar utilizando diferentes estrategias.

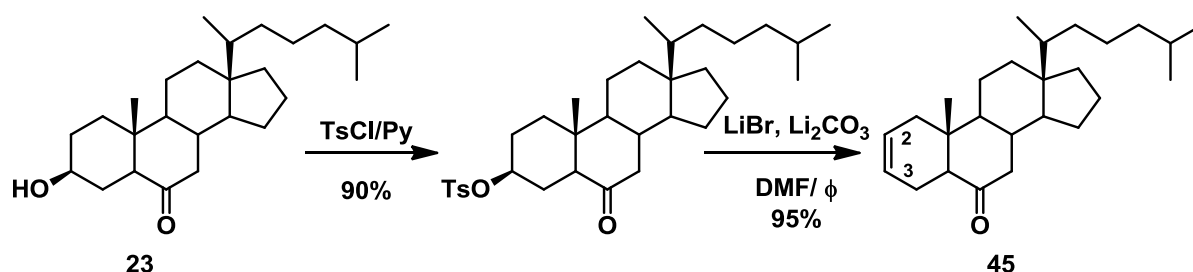
Una de ellas implica la formación del grupo cetona en C-6 mediante la nitración de la olefina Δ^5 del colesterol acetilado (**46**). La secuencia sintética se muestra en el esquema 2.10.



Esquema 2.10

En un primer paso se trata al acetato de colesterol (**46**) con una mezcla de HNO_3/AcOH obteniéndose el intermediario nitrado **48**. El mecanismo se presume que transcurre a través de una adición al doble enlace vía carbocatión (**47**) y posterior eliminación del hidrógeno geminal al grupo nitro (Anagnostopoulos y Fieser 1954). En el segundo paso, se reduce el nitroalqueno **48** con Zn/AcOH y se obtiene la oxima **49**, la cual se hidroliza para obtener la cetona correspondiente (Nightingale y Janes 1944; Dodson y Riegel 1948).

Finalmente, mediante la hidrólisis del compuesto **50** se obtiene la 3 β -hidroxi-5 α -colestán-6-ona (**23**), la cual mediante tosilación y eliminación rinde la enona **45**, tal como se observa en el esquema 2.11 (Murphy y col. 2006; Takatsuto e Ikekawa 1987).

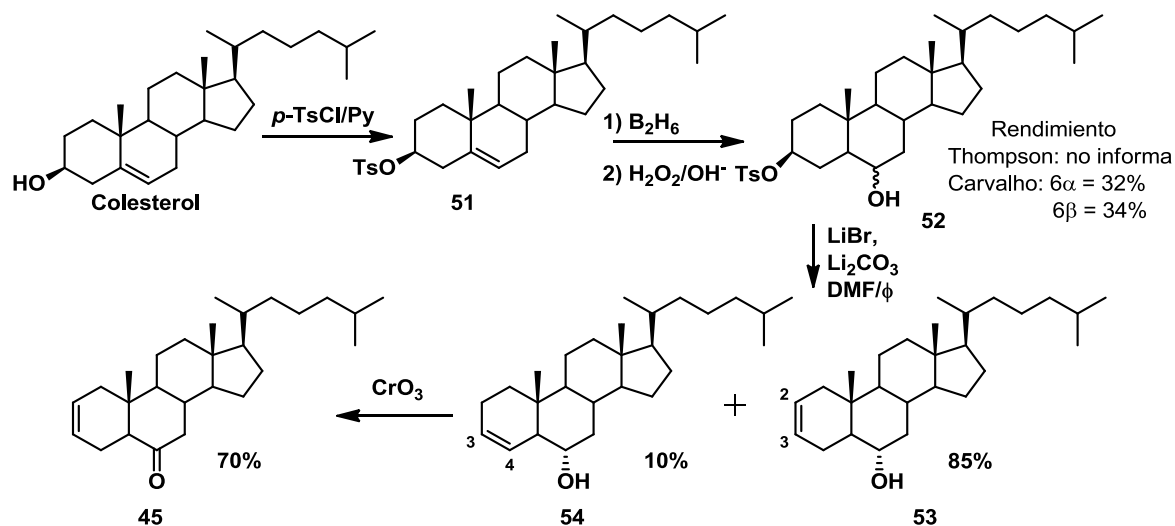


Esquema 2.11

Mediante la ruta descrita es posible obtener el intermediario **45** en cinco pasos con un rendimiento aproximado del 45%. No obstante, la nitración de olefinas con ácido nítrico está en desuso actualmente no sólo por sus rendimientos moderados y por la falta de selectividad en la reacción sino por la descomposición de los alquenos en el medio de reacción (Ono y col. 2001). Sin embargo, es posible obtener **45** evitando dicha reacción ya que el compuesto 3 β -hidroxi-5 α -colestán-6-ona (**50**) es comercial, aunque el costo de este esteroide es tres veces mayor que el del colesterol.

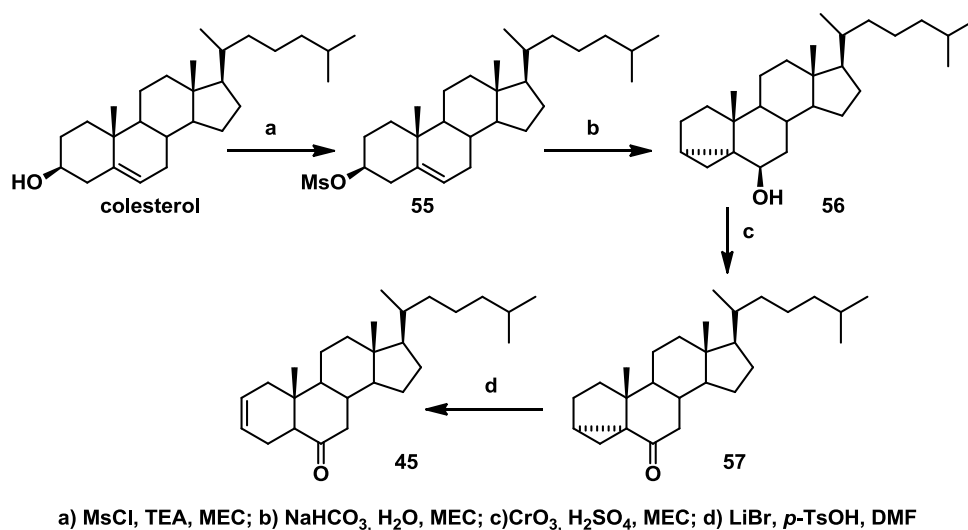
También es factible sintetizar el intermediario **45** a partir del colesterol siguiendo la ruta planteada en el esquema 2.12. Al igual que en la síntesis anterior, la olefina Δ^2 se obtiene por tosilación del hidroxilo 3 β (compuesto **51**) y subsecuente eliminación, aunque se obtiene la mezcla de isómeros Δ^2 y Δ^3 (compuestos **53** y **54**, respectivamente). La formación del carbonilo en C-6, en este caso, se obtiene mediante una hidroboración oxidativa del colesterol tosilado (**51**) que genera el alcohol en posición 6 α (**52**), el cual posteriormente es oxidado (Thompson y col. 1970). En un trabajo realizado por Carvalho y col. se reporta la hidroboración oxidativa del colesterol en condiciones similares, dando lugar a la mezcla de

alcoholes epímeros en C-6 en una relación $\approx 1:1$, con un rendimiento aproximado del 32% para cada isómero (Carvalho y col. 2010). Debido a la baja estereoselectividad de estas reacciones, esta ruta fue descartada.



Esquema 2.12

El método elegido para obtener la olefina **45** a partir de colesterol (Esquema 2.13) es un camino sintético ampliamente utilizado, especialmente en el campo de los brasinoesteroides (Aburatani y col. 1987) (esquema 2.13).



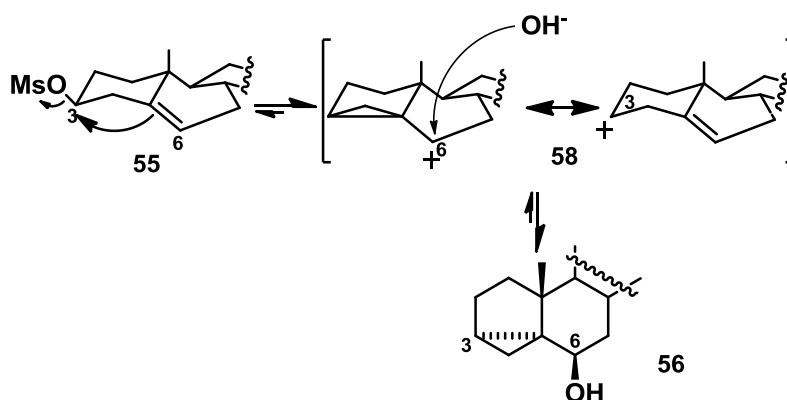
Esquema 2.13

2.2.1.1 Síntesis del compuesto $3\alpha,5\alpha$ -ciclocolestan- 6β -ol (**56**)

En primer lugar se sintetizó el mesil éster del colesterol (Compuesto **55**) para transformar al grupo alcohol en un buen grupo saliente para su posterior reordenamiento. La mesilación del colesterol se realizó utilizando cloruro de mesilo en metiletilcetona, en

presencia de trietilamina para remover el HCl que se generaba en el medio de reacción. El compuesto **55** se obtuvo cuantitativamente.

El tratamiento del mesil éster con una solución acuosa de NaHCO_3 en metiletilcetona a $\approx 90^\circ\text{C}$ produjo, a través de una reacción $\text{S}_{\text{N}}1$ homoalílica, el $3\alpha,5\alpha$ -ciclocolestano-6 β -ol (**56**). El mecanismo de esta reacción (Esquema 2.14) involucra la formación de un carbocatión en C-6 (**58**) mediante la salida del grupo mesilo asistida por el doble enlace Δ^5 y el posterior ataque nucleofílico de un grupo hidroxilo al intermediario **58** (Whitham y Wickramasinghe 1964).



Esquema 2.14

El carbocatión **58** está estabilizado por deslocalización de la carga positiva entre los carbonos 3 y 6 (Hafez y col. 1949; Shoppee y Summers 1952; Sun y col. 2009). En principio, ambas posiciones podrían ser atacadas indistintamente.

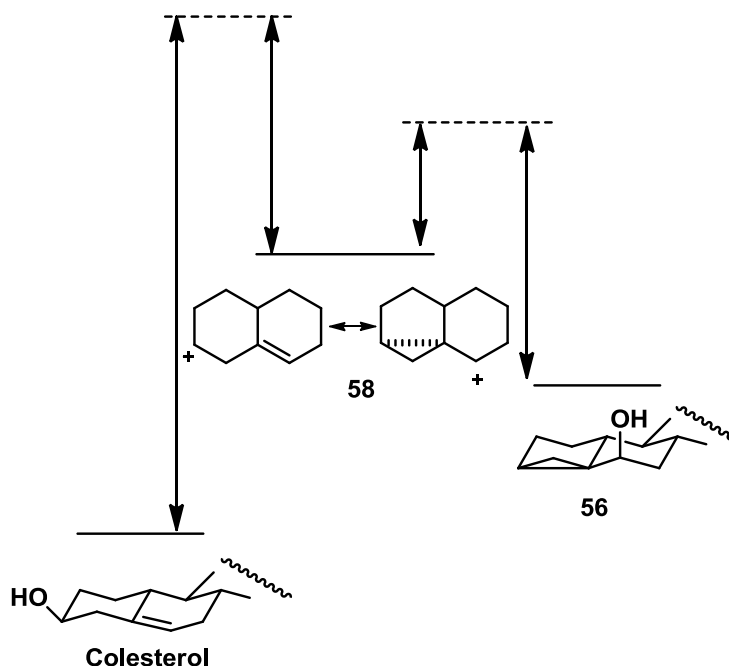


Figura 2.2

Sin embargo, el producto que se obtiene por el ataque nucleofílico al C-3 -producto termodinámico- es minoritario, tal como se observó por CCD. Esto se explica en base a las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción, dado que a $\approx 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ el carbocatión reacciona más rápido para dar el compuesto $3\alpha,5\alpha$ -ciclocolestano-6 β -ol (**56**) –producto cinético- antes que el producto termodinámico (colesterol) debido a la menor barrera energética asociada a la formación de **56** (Figura 2.2) (Hanack y Schneider 1967; Simonetta y Winstein 1954; Hafez y col. 1949).

La reacción es estereoselectiva, ya que el ataque nucleofílico ocurre por la cara β debido a que el coeficiente orbital del orbital vacante en el carbocatión es mayor en dicha cara (Whitham y Wickramasinghe 1964; Dodson y Riegel 1948).

En la figura 2.3 se observa el espectro de RMN ^1H del compuesto $3\alpha,5\alpha$ -ciclocolestano-6 β -ol (**56**) y ampliaciones de las señales asociadas al ciclopropano, al grupo alcohol y a los metilos del esteroide.

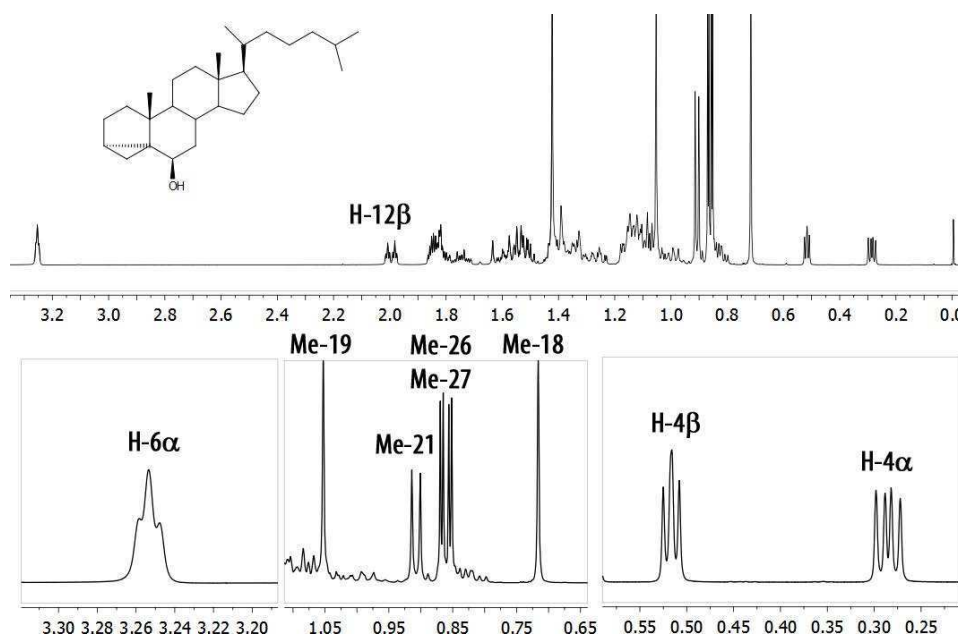


Figura 2.3: Espectro de RMN ^1H del compuesto **56** en CDCl_3

En el espectro de RMN ^1H se observan dos señales a 0,29 y 0,52 ppm, las cuales correlacionan con un carbono a 11,72 ppm en el espectro HSQC. Estos valores de desplazamiento químico son característicos de un metileno perteneciente a un ciclopropano (Aburatani y col. 1987).

La señal correspondiente al H-4 β se asignó en base a la correlación observada entre la señal del Me-19 (1,05 ppm) y la señal a 0,52 ppm en el espectro NOESY (Figura 2.4). Por consiguiente, la señal a 0,29 ppm corresponde al H-4 α .

La señal a 1,06 ppm que correlaciona con un carbono a 24,39 ppm en el espectro HSQC fue asignada al H-3 α del ciclopropano. La estereoquímica de este hidrógeno se asignó a partir de la correlación NOE entre dicha señal y la del H-4 α (Figura 2.4).

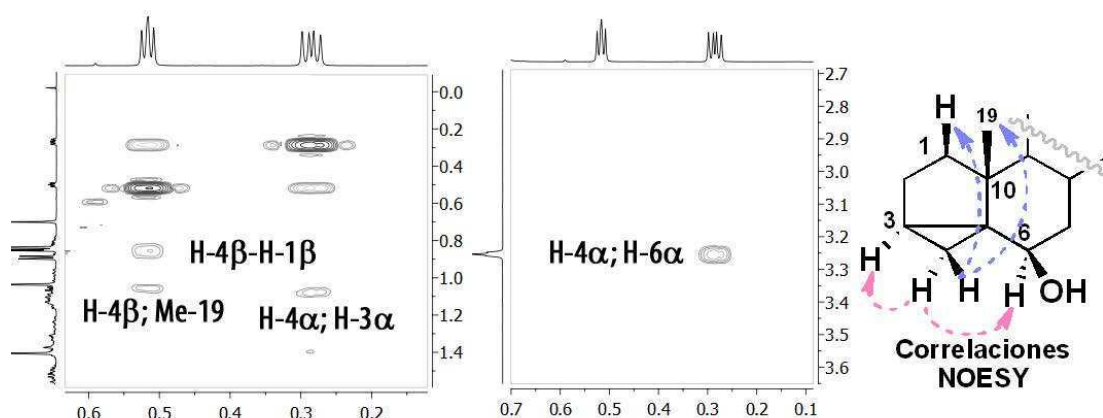


Figura 2.4: Espectros NOESY del compuesto **56** en CDCl₃

Por último, en la figura 2.5, se observan las correlaciones en el espectro HMBC de ambos H-4 que permiten confirmar la posición del ciclopropano en el anillo A del esteroide.

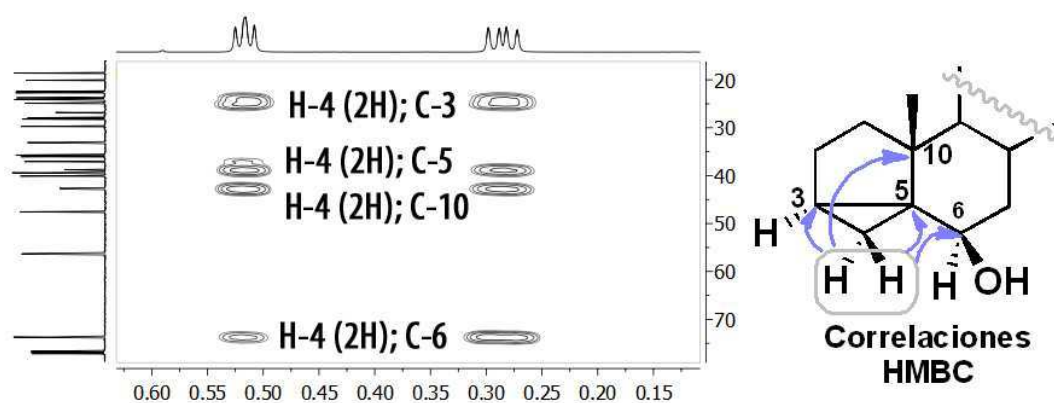


Figura 2.5: Espectro HMBC del compuesto **56** en CDCl₃

La presencia del ciclopropano fue confirmada en el espectro infrarrojo por una banda característica a 3059 cm⁻¹, asociada al estiramiento C-H (Silverstein 1998), y dos bandas a 1024 cm⁻¹ y 884 cm⁻¹ correspondientes a la vibración simétrica y asimétrica, respectivamente, del anillo del ciclopropano (Josien y col. 1951).

La presencia de una señal a 3,25 ppm que correlaciona en el espectro HSQC con un carbono a 73,95 ppm es característica de un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo. La estereoquímica 6 β del grupo hidroxilo se infiere a partir del análisis de la multiplicidad de la señal a 3,25 ppm, la cual es un triplete con $J=2,9$ Hz. El valor de la constante de acoplamiento indica que el H-6 debe estar en posición ecuatorial, lo cual fue corroborado mediante la correlación entre el H-6 α y el H-4 α del ciclopropano, en el espectro NOESY (Figura 2.4).

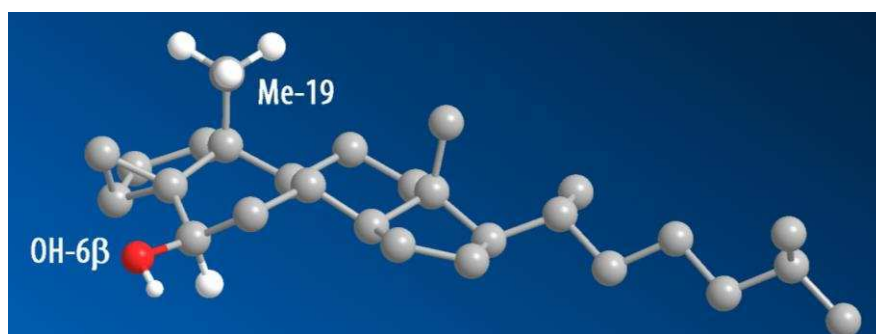
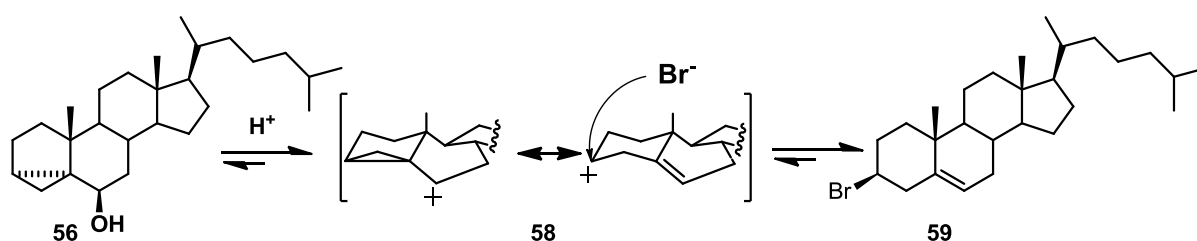


Figura 2.6: Geometría optimizada del compuesto **56** utilizando el método semiempírico AM1

El Me-19 no presenta una interacción 1,3-diaxial con el grupo hidroxilo de C-6 debido a la deformación que genera el ciclopropano en el anillo B (Figura 2.6). Por lo tanto, se puede concluir que el desplazamiento químico del metilo en C-19 es debido, principalmente, al efecto anisotrópico del ciclopropano.

2.2.1.2 Síntesis del compuesto 5 α -colest-2-en-6-ona (45)

Para obtener la olefina Δ^2 es necesario realizar la apertura del ciclopropano en medio ácido. Sin embargo, los 3 α ,5 α -ciclo-esteroides son sensibles a pequeñas cantidades de ácido *p*-toluensulfónico en presencia de un nucleófilo ya que pueden sufrir un retro-reordenamiento para dar el producto Δ^5 , tal como se observa en el esquema 2.15 (Beynon y col. 1937; Ford y Wallis 1937; Heilbron y col. 1936).



Esquema 2.15

En las condiciones de la reacción de apertura del ciclopropano (*p*-TsOH/LiBr 1:2 en DMF a reflujo, 4 hs), el grupo hidroxilo del compuesto **56** podría protonarse, generar el carbocatión **58** y conducir al producto termodinámico, en este caso, el 3 β -bromocolest-5-eno (**59**) (Esquema 2.15). Por esta razón, fue necesario oxidar primero el alcohol **56** para evitar la reversión de la reacción en la condiciones de la apertura del ciclopropano. La oxidación se realizó utilizando el reactivo de Jones y se obtuvo el compuesto 3 α ,5 α -ciclocolest-6-ona (**57**) con un 75% de rendimiento.

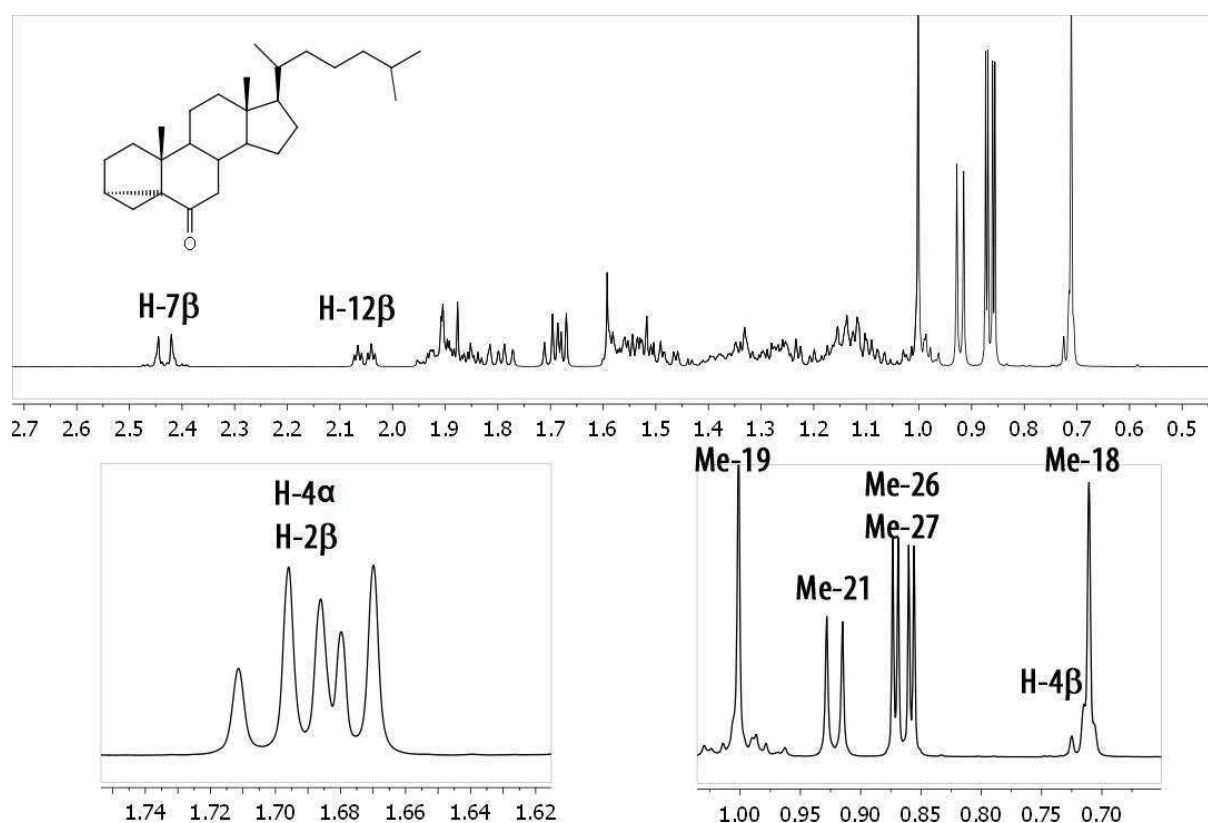


Figura 2.7: Espectro de RMN ^1H del compuesto **57** en CDCl_3

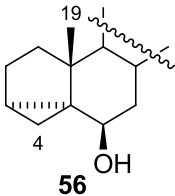
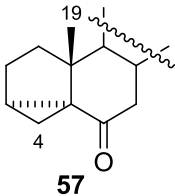
En la figura 2.7 se presenta el espectro de RMN ^1H del compuesto **57**.

En el espectro HSQC se observan dos señales a 0,72 y 1,68 ppm que correlacionan con un carbono a 11,78 ppm y que corresponden a H-4 β , H-4 α y C-4, respectivamente. La asignación de la señal correspondiente al H-4 β se realizó nuevamente en base a la correlación NOESY entre la señal a 0,72 ppm con la correspondiente al Me-19 a 1,00 ppm.

En este caso, las señales del metileno del ciclopropano aparecen desplazadas a δ mayores respecto del compuesto sin oxidar (**56**), como se observa en la tabla 2.1. El incremento marcado en el desplazamiento químico del H-4 α en el compuesto **57** se debe al

efecto anisotrópico del grupo carbonilo, el cual es mucho mayor que en el H-4 β que está más alejado, como se observa en la figura 2.8.

Tabla 2.1: Comparación de señales características entre los compuestos **56** y **57**.

δ (ppm)	 56	 57
H-4 α	0,29 ppm	1,68 ppm
H-4 β	0,52 ppm	0,72 ppm
C-4	11,72 ppm	11,78 ppm
H-19	1,05	1,00
C-19	20,05	19,82

Este efecto no influye apreciablemente en el desplazamiento químico de C-4, ya que, como se observa en la Tabla 2.1, presenta valores similares en ambos compuestos.

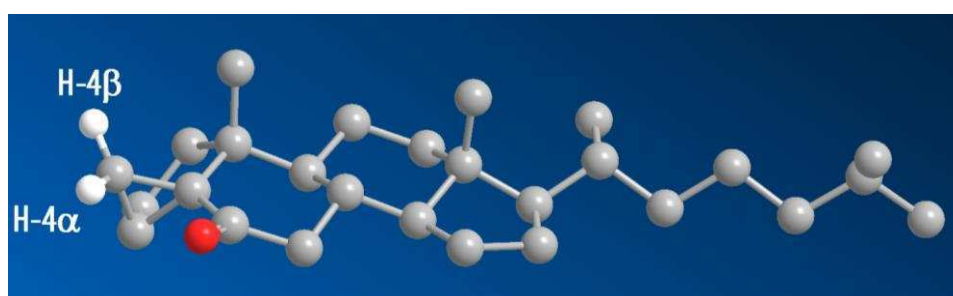


Figura 2.8: Geometría optimizada del compuesto **57** utilizando el método semiempírico AM1

La señal a 1,52 ppm se asignó al H-3 α en base a las correlaciones que posee con ambos H-4 en el espectro COSY. La estereoquímica del H-3 α se confirmó en base a la correlación NOESY con el H-4 α .

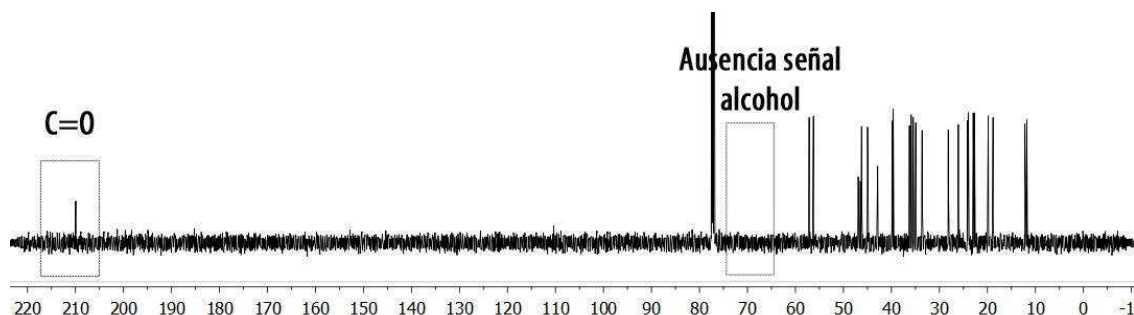


Figura 2.9: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto **57** en CDCl_3

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 2.9) se observa la ausencia de la señal a 73,95 ppm, asociada al carbono unido al grupo hidroxilo, y una nueva señal a 209,95 ppm correspondiente al carbonilo producto de la oxidación del compuesto $3\alpha,5\alpha$ -ciclocolestano- 6β -ol (**56**).

En la figura 2.10 se pueden observar las correlaciones del carbono carbonílico en C-6 con los H-4, H-7 y el H- 3α lo que permite corroborar la posición del grupo carbonilo respecto del ciclopropano en el esteroide.

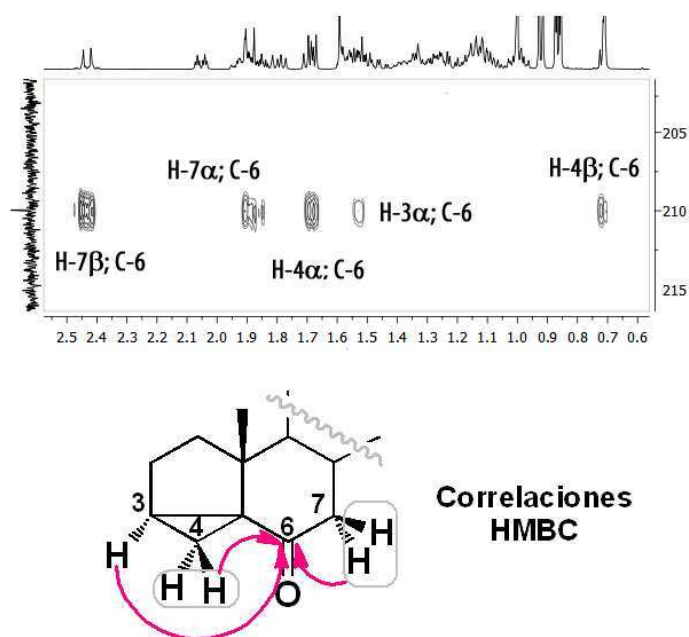


Figura 2.10: Espectro HMBC del compuesto **57** en CDCl_3

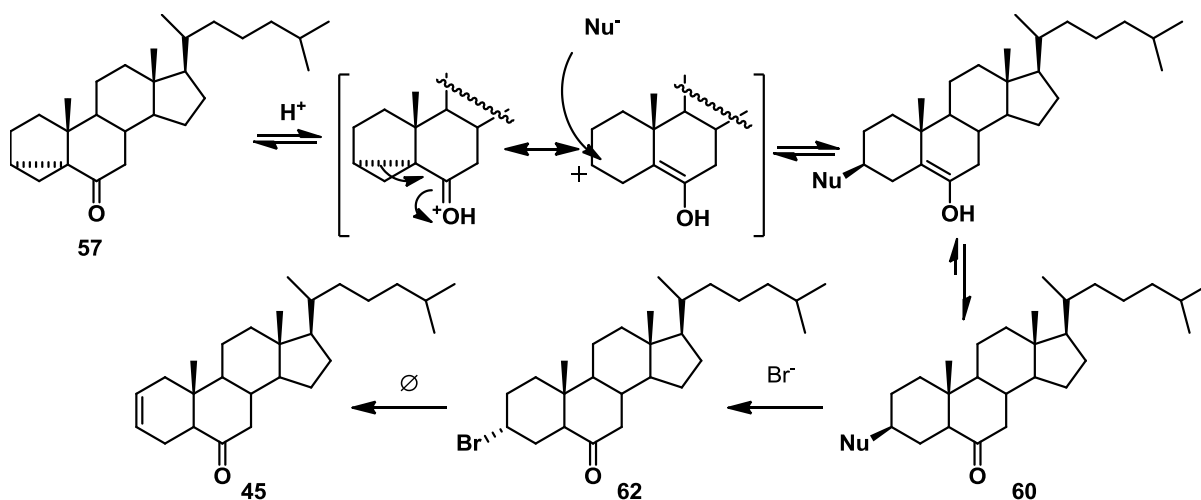
Finalmente, en el espectro IR la banda del grupo carbonilo aparece a 1679 cm^{-1} como consecuencia de la presencia del ciclopropano.

En el espectro RMN ^1H (Figura 2.7) se observa la señal del H- 7β (2,43 ppm) desplazada a campos más bajos que el resto de las señales debido al efecto inductivo del carbonilo adyacente. El H- 7α se encuentra más protegido, a 1,88 ppm, debido a su posición axial en el ciclo.

No se observaron diferencias significativas en los valores de desplazamiento químico de los metilos 19 de los compuestos **56** y **57** (Tabla 2.1), ya que en ambos compuestos predomina el efecto anisotrópico del ciclopropano.

2.2.1.2.1 Reordenamiento de la 3 α ,5 α -ciclocolestan-6-ona (**57**)

Una vez sintetizado **57**, se lo trató con ácido *p*-toluensulfónico y LiBr (1:2) en DMF anhidra, a reflujo. En este medio de reacción el producto 5 α -colest-2-en-6-ona (**45**) se obtiene a través un mecanismo que consta de cuatro pasos (Esquema 2.16).



Esquema 2.16

En el primer paso se protona el compuesto carbonílico **57**, aumentando su carácter electrofílico. El compuesto activado es susceptible al ataque nucleofílico al C-3 por parte del bromuro o, en menor medida por el *p*-toluensulfonato dada su menor nucleofilicidad, para obtener el intermediario 3 β -Nu-5 α -colestan-6-ona (**60**). La estereoselectividad de este paso nuevamente está gobernada por los coeficientes orbitales en el C-3 (Dodson y Riegel 1948). En un segundo paso se sustituye al grupo en posición 3 β mediante una reacción S_N2 por ataque del bromuro, dando a lugar a la 3 α -bromo-5 α -colestan-6-ona (**62**). La reacción de sustitución bimolecular es la clave para la posterior formación de la olefina, ya que el bromo en C-3 se encuentra en posición axial y, en las condiciones de reacción, se elimina vía una reacción E₂, generando el alqueno más estable entre el C-2 y el C-3 (Corey y Sneen 1955; Turner y col. 1957).

La mayor estabilidad de la olefina Δ^2 respecto de la Δ^3 se refleja en la diferencia de 2,1 kcal/mol en los calores de hidrogenación, calculados para el colest-2-eno y colest-3-eno (Turner y col. 1957). Además la presencia de un doble enlace Δ^3 genera una deformación en

la silla del anillo B del esteroide, como consecuencia de la coplanaridad del C-5 con la olefina, que no ocurre en los alquenos Δ^2 (Corey y Sneed 1955).

El rendimiento de esta reacción fue de un 79%. La clave para obtener un buen rendimiento es utilizar DMF anhidra, ya que en presencia de agua sería posible obtener la 3 β -hidroxi-5 α -colestano-6-ona que en las condiciones de reacción no se deshidrataría, ya que para ello requeriría condiciones aún más ácidas.

En la figura 2.11 se observa el espectro de RMN ^1H de la olefina **45** y ampliaciones de las señales características.

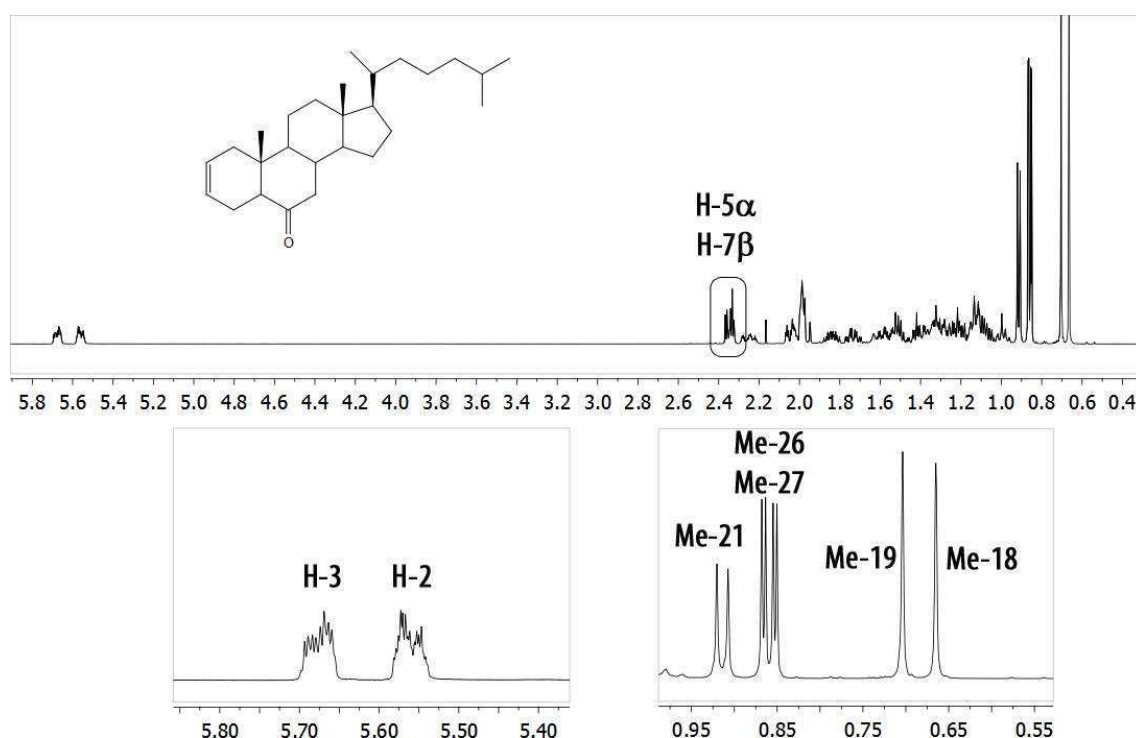


Figura 2.11: Espectro de RMN ^1H del compuesto **45** en CDCl_3

Se observan claramente dos señales a 5,56 y 5,68 ppm que presentan correlación en el espectro HSQC con los carbonos a 124,68 y 125,09 ppm respectivamente, típicas de señales olefínicas. La posición del doble enlace se confirmó mediante el espectro HMBC (Figura 2.12). Ambos protones olefínicos correlacionan con los C-1 y C-4, sin embargo la señal a 5,68 ppm presenta una correlación con un carbono a 54,03 ppm, el cual corresponde al C-5, con lo cual fue asignada al H-3. De manera análoga, la señal a 5,56 ppm correlaciona con una señal a 40,20 ppm que corresponde a C-10, confirmando que esta señal olefínica corresponde al H-2.

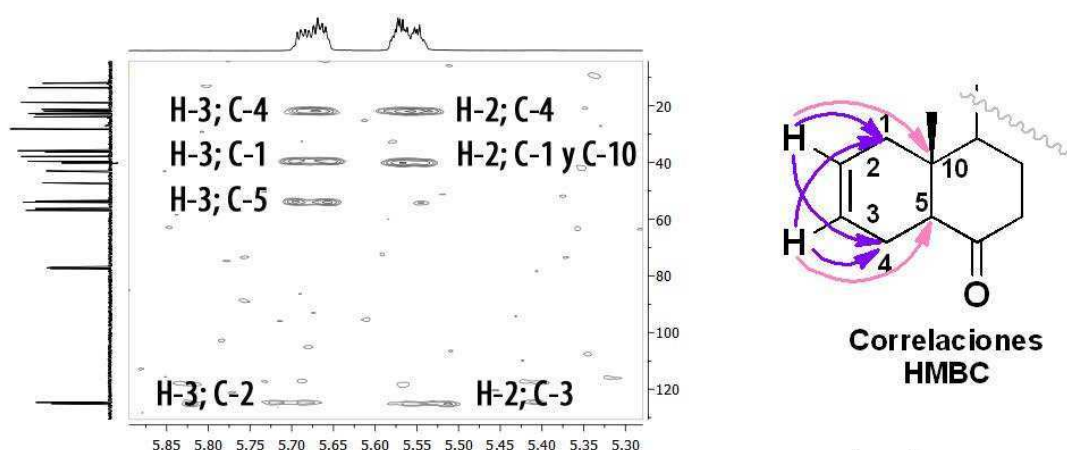
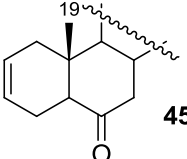
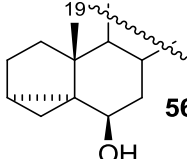
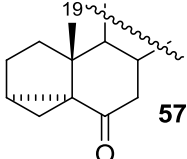


Figura 2.12: Espectro HMBC del compuesto **45** en CDCl_3

En el espectro de RMN ^1H , las señales adyacentes al grupo carbonilo (H-5 α e H-7 β , ambos a 2,35 ppm) se encuentran a campos menores que el resto de las señales de protones unidos a carbonos sp^3 de la molécula, debido a su efecto inductivo. Y lo mismo ocurre, pero en menor medida, con la señal del H-7 α a 1,97 ppm (Figura 2.11).

En el caso del Me-19, las señales de ^1H y ^{13}C se encuentran a campos más altos que para los compuestos **56** y **57**, ambos 3,5-ciclocolestano, lo cual se debe a la ausencia del efecto anisotrópico del ciclopropano sobre el metilo en C-19 (Tabla 2.2). Cabe destacar que el doble enlace Δ^2 se encuentra alejado para ejercer un efecto anisotrópico significativo sobre el Me-19.

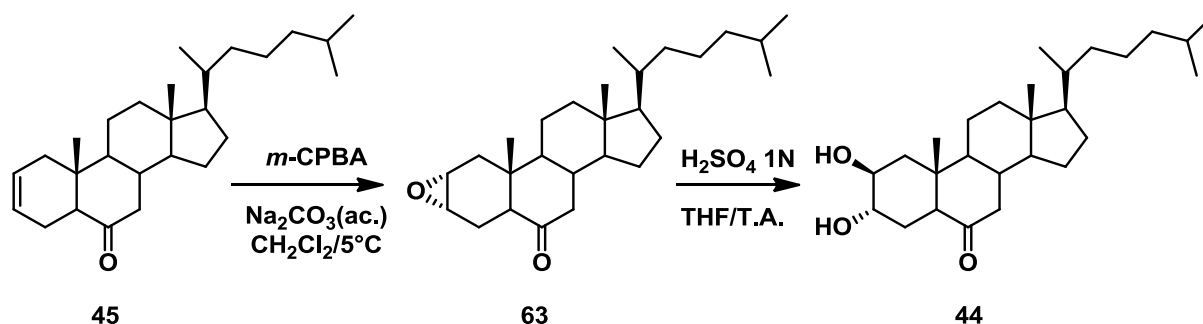
Tabla 2.2: Comparación de señales características del Me-19 en los compuestos **45**, **56** y **57**.

Compuesto			
H-19	0,70 ppm	1,05 ppm	1,00 ppm
C-19	13,66 ppm	20,05 ppm	19,82 ppm

El grupo carbonilo se evidencia mediante la señal a 212,23 ppm en el espectro de RMN ^{13}C y en el espectro de IR por la presencia de una banda a 1710 cm^{-1} debida al estiramiento del grupo carbonilo. A diferencia del compuesto anterior (**57**, $\nu\text{ C=O}$ a 1679 cm^{-1}) en donde el carbonilo se encuentra conjugado con el ciclopropano, esta banda se encuentra a una frecuencia más alta debido a la falta de conjugación.

2.2.1.3 Síntesis del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (44)

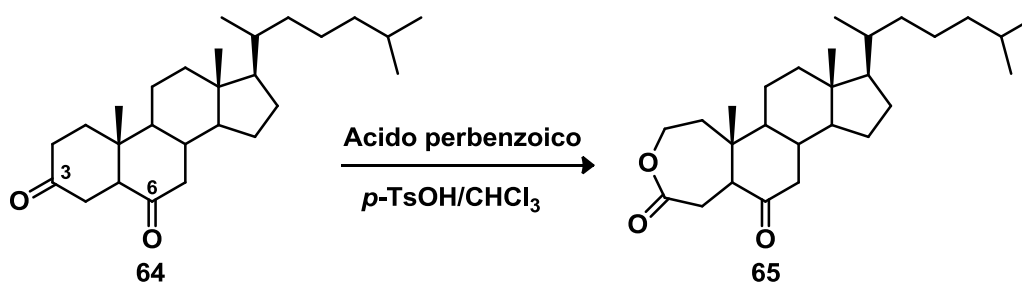
Para obtener el compuesto **44** se epoxidó la olefina del compuesto **45** con posterior apertura nucleofílica del epóxido **63** (Esquema 2.17).



2.2.1.3.1 Síntesis del compuesto 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestano-6-ona (**63**):

La epoxidación se llevó a cabo en medio básico con ácido *m*-cloroperbenzoico como agente epoxidante a 0°C (Garrido Santos y col. 2003). La temperatura baja y el medio básico son fundamentales en esta reacción ya que el grupo carbonilo podría reaccionar con el ácido *m*-cloroperbenzoico para dar una lactona en el anillo B producto de una reacción de Baeyer-Villiger. Por otra parte, la oxidación quimioselectiva del doble enlace en enonas no conjugadas es más rápida que la reacción de formación de la lactona, para la cual se requieren peroxiácidos más reactivos, mayores tiempos de reacción y catálisis ácida (Krow 1993; House 1972a). Por último, como la reacción va generando ácido benzoico, se agregó carbonato de sodio acuoso para neutralizar el medio de reacción y además, desplazar el equilibrio de la misma (Smith 2002).

Aun trabajando en condiciones tales que favorezcan la reacción de formación de la lactona, el carbonilo en posición 6 es poco reactivo. Por ejemplo, el carbonilo en posición 3 de la dicetona **64** (Esquema 2.18) es mucho más susceptible al ataque nucleofílico del peróxido debido al menor impedimento estérico que presenta en comparación con el carbonilo en C-6. Por esta razón, la reacción ocurre sobre el carbonilo de C-3 de manera regioselectiva para dar la lactona **65** con un 63% de rendimiento (Ahmad y Khan 1981). En particular, para obtener el 6-ceto-7-oxa-B-homo-5 α -colestano a partir de un esteroide con un grupo carbonilo en C-6, se requieren 48 hs de reacción utilizando ácido *m*-cloroperbenzoico a 0°C (Gan y col. 2012).



Esquema 2.18

Por lo tanto, con ácido *m*-cloroperbenzoico en medio básico, a baja temperatura y durante un tiempo corto, ocurre selectivamente la oxidación del doble enlace (Baran 1960). En este caso, para obtener el compuesto 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestano-6-ona (**63**) la reacción se llevó a cabo durante 4 horas.

En la figura 2.13 se observa el espectro de RMN ^1H del epóxido **63** y ampliaciones de las señales características.

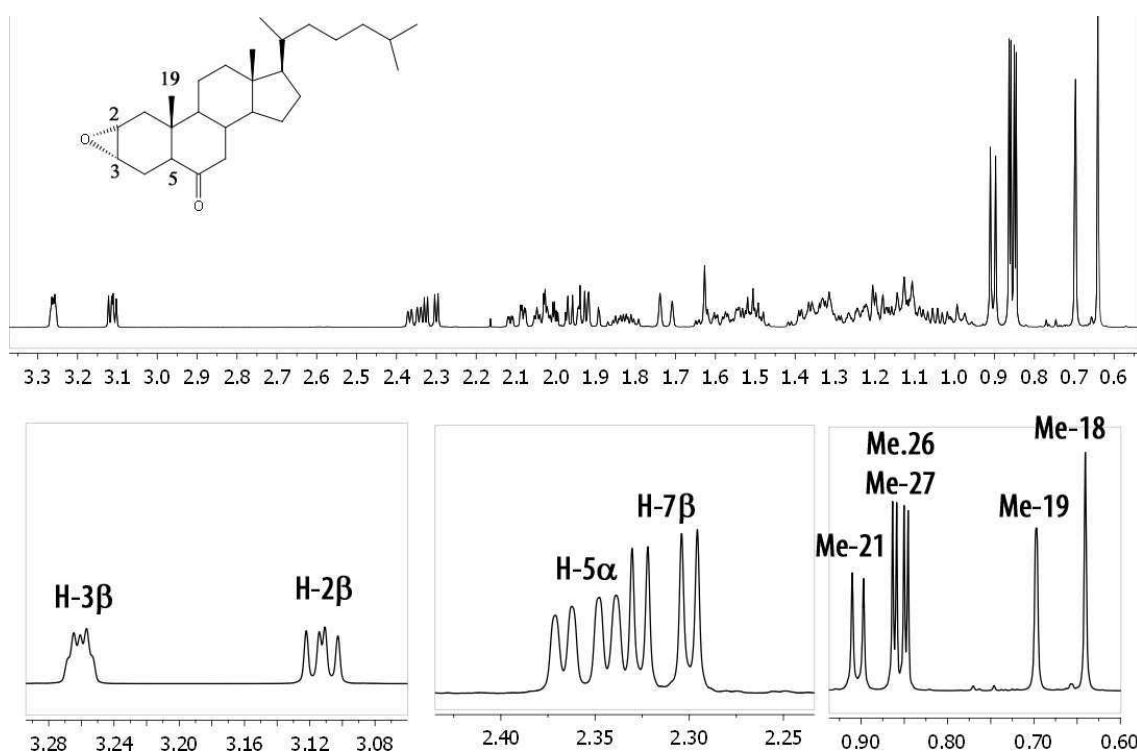


Figura 2.13: Espectro de RMN ^1H del compuesto **63** en CDCl_3

En el espectro de RMN ^1H se observan dos señales a 3,11 y 3,26 ppm, las cuales correlacionan en el espectro HSQC con las señales a 50,04 y 52,53 ppm. En el espectro HMBC, las correlaciones de las señales a 3,11 con la de C-10 (38,59 ppm) y 3,26 ppm con la de C-5 (50,30 ppm) confirmaron su asignación a H-2 β e H-3 β , respectivamente. Finalmente, la correlación de las señales de ambos protones con la del Me-19 (0.70 ppm) en el espectro

NOESY, confirmó que el epóxido se encuentra en la cara α del esteroide, tal como se muestra en la figura 2.14.

La presencia del grupo carbonilo se evidencia con la señal a 211,66 ppm y se corrobora en el espectro IR mediante la presencia de una banda a 1704 cm^{-1} debida al estiramiento del grupo carbonilo.

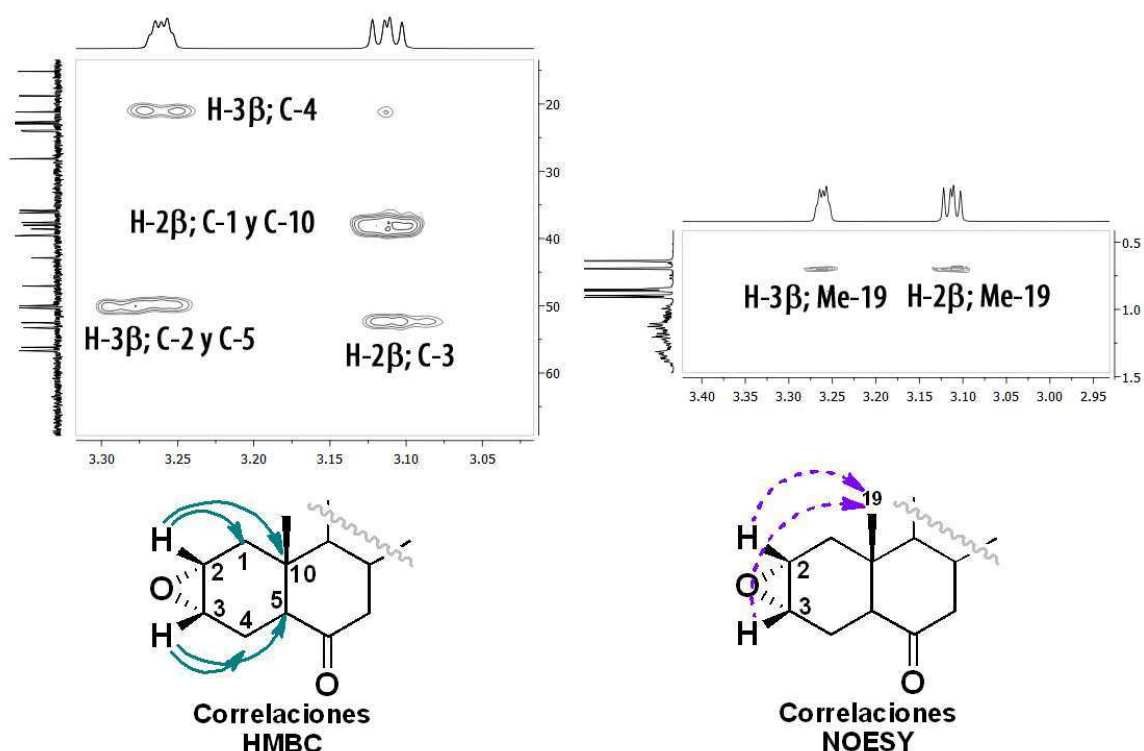


Figura 2.14: Espectros HMBC y NOESY del compuesto **63** en CDCl_3

Diastereoselectividad en la reacción de epoxidación:

La reacción de epoxidación rindió el epóxido en la cara α como producto mayoritario debido a la inducción asimétrica que introduce el Me-19 en la cara β (Barton y Morrison 1961; Fieser y Fieser 1959). El rendimiento moderado del compuesto **63** (66%) se debe a la formación de una cantidad minoritaria de su diastereómero, producto de la epoxidación en la cara β . A pesar de no haber sido aislado, el análisis espectroscópico del producto crudo de la reacción evidenció su presencia. El espectro HSQC presentó dos señales minoritarias a 3,14 (m) ($\text{H-2}\alpha$) y 3,22 (dd) ($\text{H-3}\alpha$) ppm que correlacionaron con carbonos a 52,68 y 50,84 ppm, respectivamente. Además, en el espectro de RMN ^{13}C del producto crudo se observaron dos señales a campos bajos, una a 211,09 ppm, de mucha menor intensidad que la señal a 211.66 ppm correspondiente al carbonilo del epóxido α (**63**). A partir de la

integración de las señales correspondientes al protón a 3,14 ppm en el isómero β y del protón a 3,11 ppm, en el isómero α , se estimó una relación de $\approx 85:15$ para ambos epóxidos lo cual explica el rendimiento moderado de esta reacción.

2.2.1.3.2 Apertura nucleofílica del epóxido **63**

La apertura nucleofílica del epóxido para obtener la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestán-6-ona (**44**) se realizó en medio ácido. La estereoselectividad de la reacción es consistente con una apertura de epóxidos *trans*-diaxial clásica. La reacción es regioselectiva, con el ataque nucleofílico del agua al C-2 del epóxido ya que de este modo se maximiza el solapamiento orbital entre el HOMO del agua (nucleófilo) y el LUMO del epóxido, incluso a pesar de la cercanía del Me-19 (Horváth y col. 2006; Barton 1953, Fürst 1949).

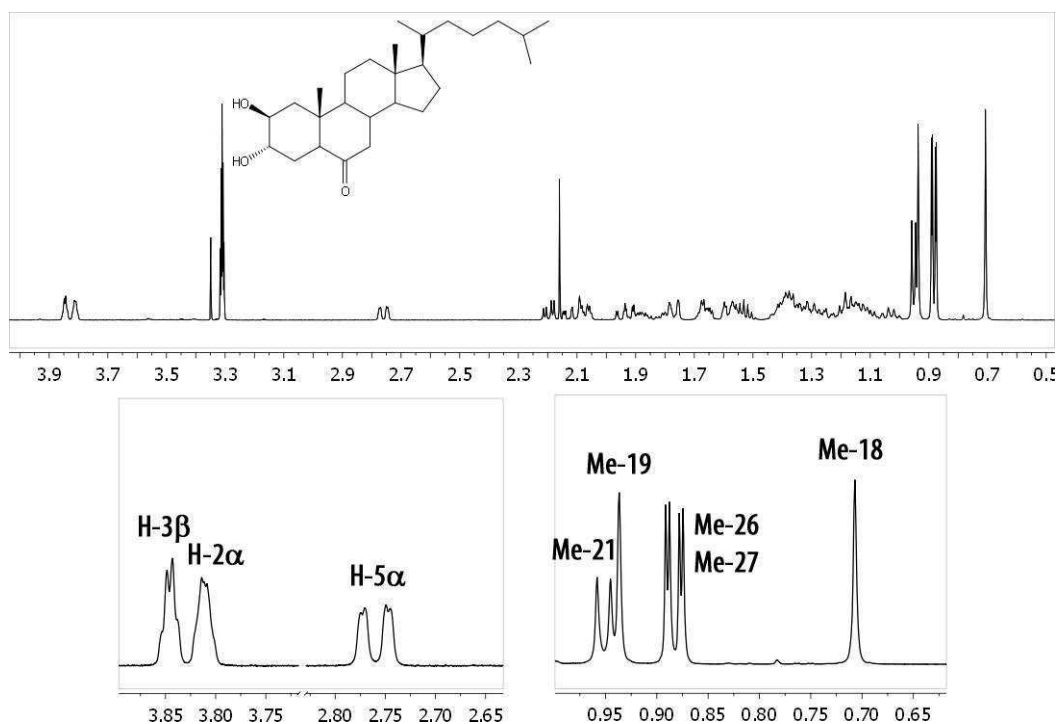


Figura 2.15: Espectro de RMN ^1H del compuesto **44** en CD_3OD

En la figura 2.15 se muestra el espectro de RMN ^1H del diol y ampliaciones de las señales características. Se observan dos señales a 3,81 y 3,85 ppm, pertenecientes a los protones geminales a los grupos hidroxilo, que correlacionan en el espectro HSQC con dos señales a 70,93 y 70,08, respectivamente.

En la figura 2.16 se observan las correlaciones HMBC que permitieron asignar las señales de los H-2(α) e H-3(β). La correlación de la señal a 3,85 ppm con la señal de carbono a 52,76

ppm (C-5) permitió asignar dicha señal al H-3. Del mismo modo, la correlación de la señal a 3,81 ppm con la señal de carbono a 42,15 ppm (C-10) permitió asignar el H-2.

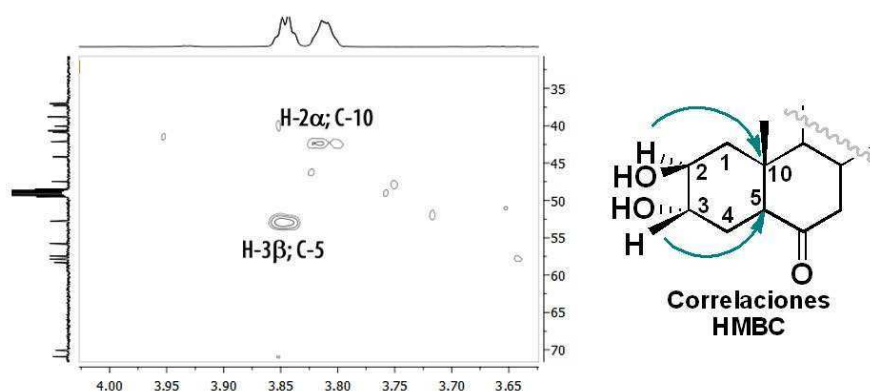


Figura 2.16: Espectro HMBC del compuesto **44** en CD₃OD

La asignación de las señales para H-2(α) e H-3(β) se confirmó con el espectro COSY (Figura 2.17). En la figura 2.17 se pueden observar las correlaciones intensas del H-2α con los protones del C-1 y, de manera análoga, las de los protones de C-4 con el H-3β.

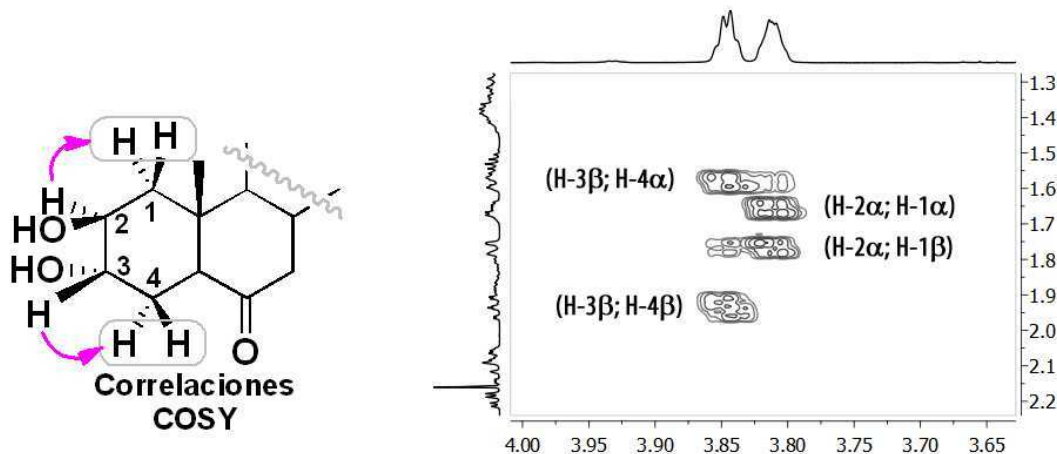


Figura 2.17: Espectro COSY del compuesto **44** en CD₃OD

La configuración de los hidrógenos en C-2 y C-3 se determinó a partir de las multiplicidades de ambas señales y se confirmó con el espectro NOESY. En la figura 2.18 se observa una ampliación de las correlaciones de las señales de H-2 e H-3, las cuales confirman la posición ecuatorial de estos hidrógenos, ya que tanto el H-2 como el H-3 correlacionan con ambos hidrógenos pertenecientes a C-1 y C-4, respectivamente. De acuerdo a esto, para que puedan existir dichas correlaciones, su posición espacial debe ser ecuatorial.

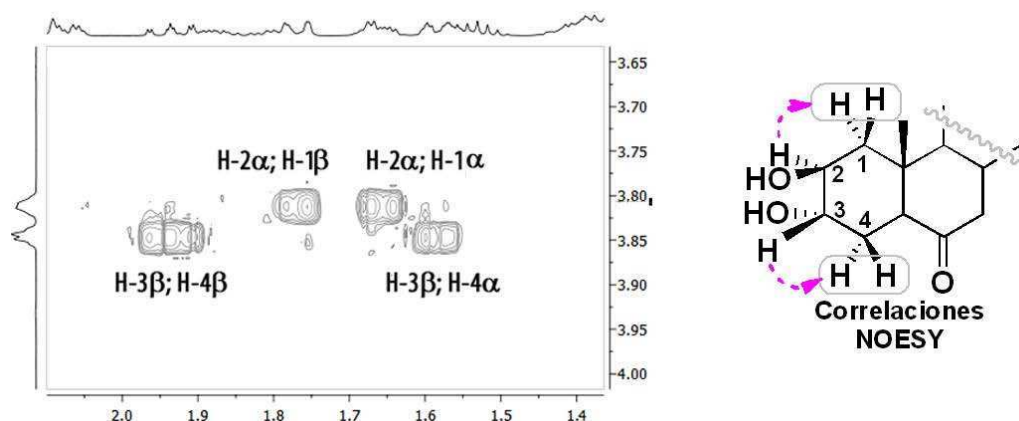


Figura 2.18: Espectro NOESY del compuesto **44** en CD₃OD

En cuanto al Me-19 (0,94 ppm; 15,57 ppm), éste presenta una interacción 1,3 diaxial con el grupo hidroxilo en C-2(β) (Figura 2.19), lo que explica el mayor desplazamiento químico del Me-19 respecto del epóxido de partida (0,70 ppm; 15,20).

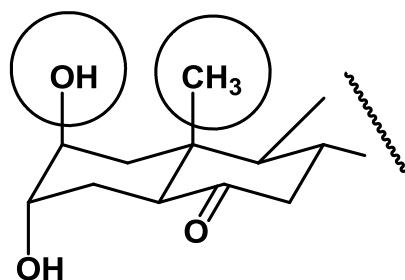
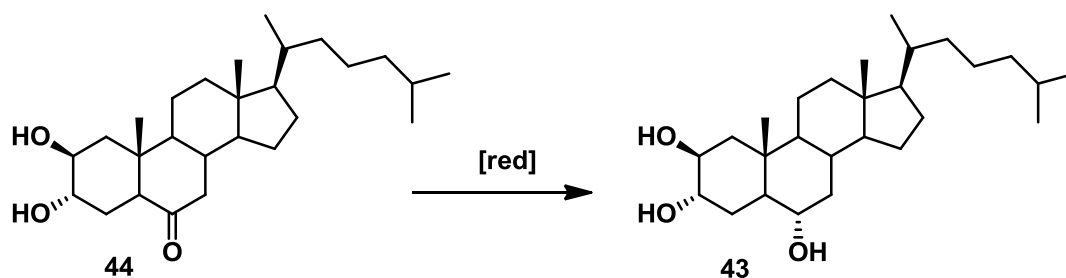


Figura 2.19

2.2.1.4 Reducción del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**) con NaBH₄



Esquema 2.19

Para la obtención del compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**) se planteó la reducción del diol **44**, tal como se muestra en el esquema 2.19. En primer lugar se probó su reducción con NaBH₄ en metanol y se obtuvo un producto con un 87% de rendimiento.

El espectro de RMN ¹³C (Figura 2.20) presentó tres señales de carbonos unidos a oxígenos a 72,21, 71,44 y 72,92 ppm que correlacionaron, en el espectro HSQC, con señales a 3,79, 3,86 y 3,72 ppm, respectivamente. De acuerdo a estas tres señales y a la ausencia de la señal del grupo carbonilo, se confirmó la obtención de un triol.

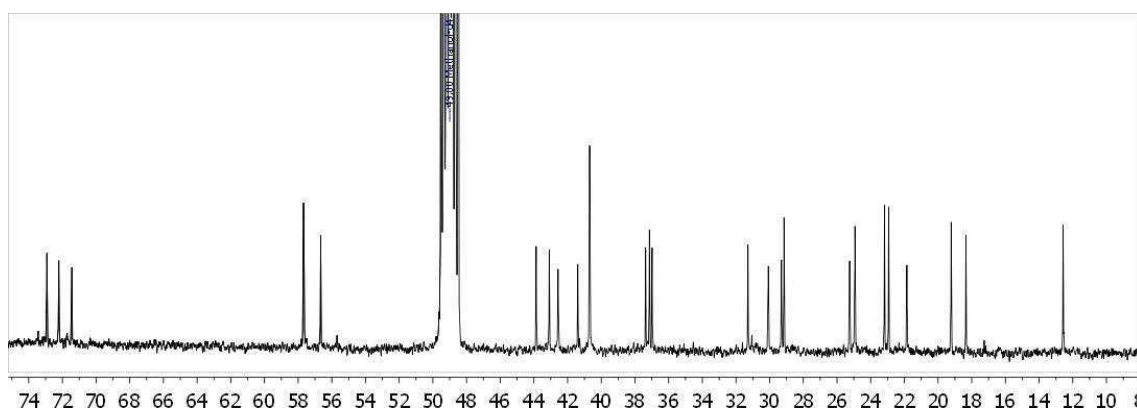


Figura 2.20: Espectro de RMN ¹³C del producto de reducción con NaBH₄ de **44** en CD₃OD

En la figura 2.21 se presenta el espectro de RMN ¹H del triol. Sin embargo, la multiplicidad de la nueva señal a 3,71 ppm debida a la reducción del grupo carbonilo no coincidía con la esperada para un hidrógeno geminal a un hidroxilo en C-6(α).

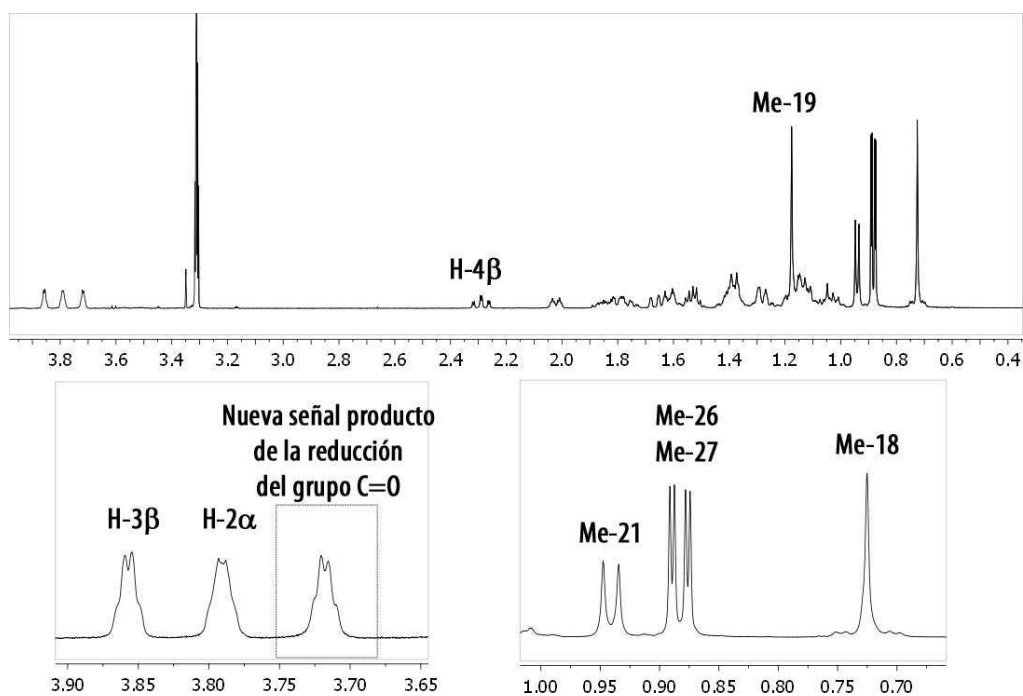


Figura 2.21: Espectro de RMN ^1H del producto de reducción con NaBH_4 de **44** (CD_3OD)

Como se observa en la figura 2.22, el H-6 del compuesto esperado **43** se encuentra en posición axial, con lo cual la multiplicidad de dicha señal debería ser un ddd con dos $J_{\text{ax-ax}}$ (acoplamiento con el H-5 α y con el H-7 α) y una $J_{\text{ax-ec}}$ (acoplamiento con el H-7 β). En el espectro de RMN ^1H se observa claramente que la señal a 3,71 ppm no presenta dicha multiplicidad.

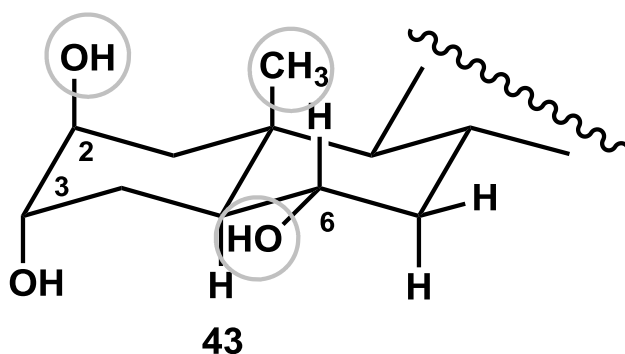


Figura 2.22

De acuerdo a esto, se concluyó que el compuesto obtenido no fue **43** sino su diastereómero, el triol 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (Figura 2.23, compuesto **66**).

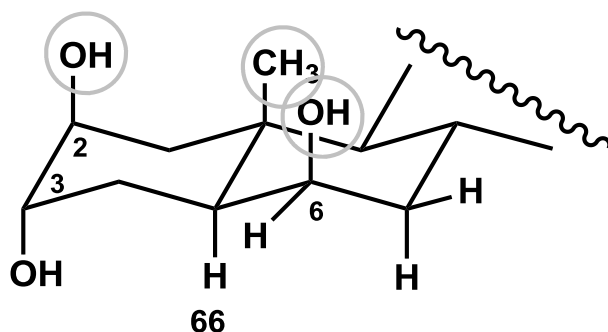


Figura 2.23

Esto se confirmó a través de la correlación entre el H-5(α) (1,62 ppm) y el H-6 (3,72 ppm) en el espectro NOESY. La estereoselectividad de la reacción de reducción del compuesto **44** con NaBH₄ se debería a la inducción asimétrica que genera el Me-19 (Dauben y col. 1956a; Dauben y col. 1956b; Barton y Morrison 1961) que determina que el reductor ataque por la cara opuesta al metilo, dando lugar al hidroxilo con configuración β .

La asignación de las tres señales de los protones geminales a los grupos hidroxilo se realizó a partir de las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 2.24). La señal a 3,79 ppm se asignó al H-2 y la de 3,86 ppm al H-3 de acuerdo con sus correlaciones con los C-10 (36,98 ppm) y C-5 (43,09 ppm), respectivamente. Por lo tanto, la señal a 3,71 ppm correspondía al H-6. Esta asignación se comprobó de acuerdo a la correlación entre dicho protón y los C-8 (31,29 ppm) y C-10 (36,98 ppm) del esteroide.

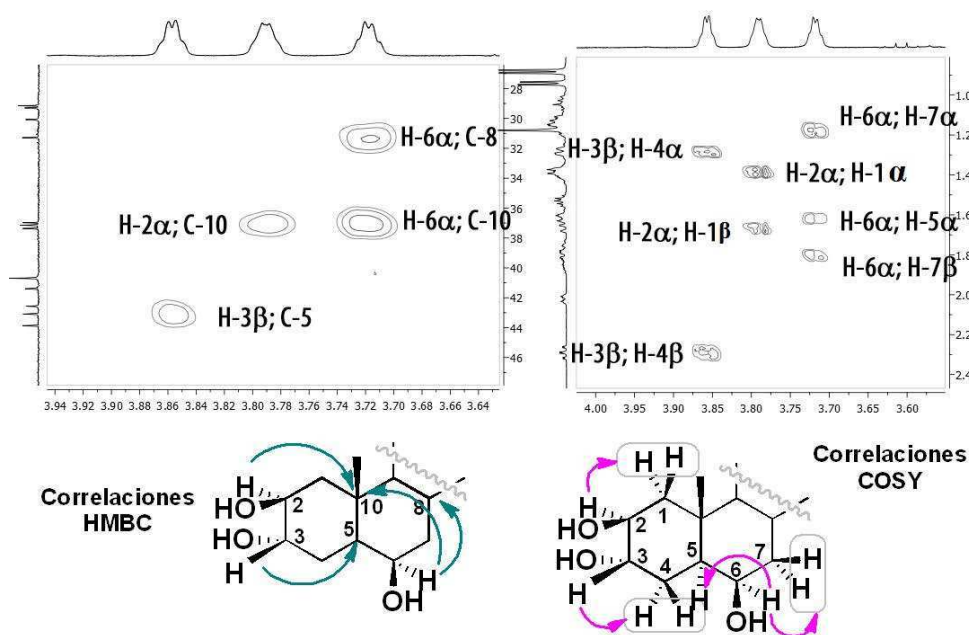


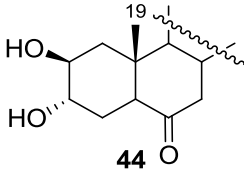
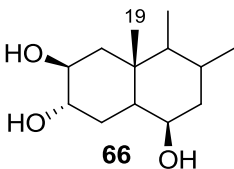
Figura 2.24: Espectros HMBC y COSY del compuesto **66** en CD₃OD

La asignación de las tres señales de H-2, H-3 e H-6 se corroboraron también en el espectro COSY a partir de las correlaciones correspondientes con los hidrógenos metilénicos en C-2, C-4 y C-7 (Figura 2.24).

La configuración de los hidroxilos en C-2(β), C-3(α) y C-6(β) se determinó a partir de las correlaciones de los respectivos protones, en el espectro NOESY. Cada uno de ellos correlaciona con ambos hidrógenos de su metileno adyacente, lo cual indica que se encuentran en posición ecuatorial.

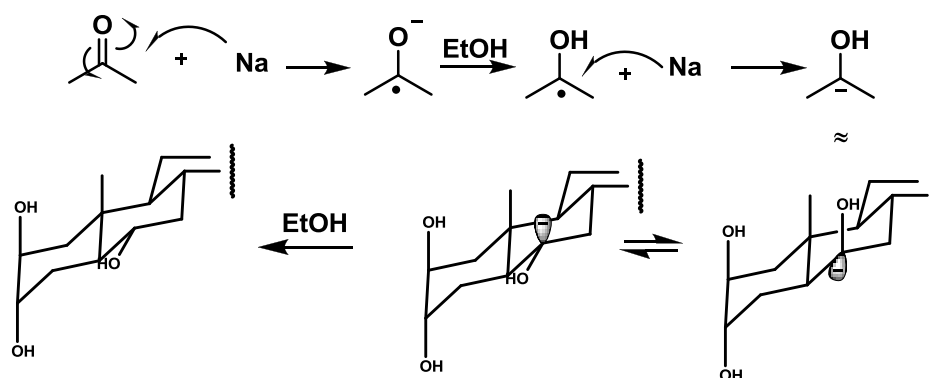
La señal del Me-19 a 1,11 ppm está desplazada a campos menores que en el compuesto carbonílico **44** (Tabla 2.3) debido a la existencia de una interacción 1,3-diaxial con el hidroxilo en C-6(β), además de la interacción 1,3-diaxial entre el Me-19 y el hidroxilo en C-2(β), presente en ambos compuestos (Figura 2.23).

Tabla 2.3: Comparación de señales características del Me-19 en los compuestos **44** y **66**.

δ (ppm)		
H-19	0,94	1,18
C-19	15,57	18.33

2.2.1.5 Reducción del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**) con sodio/etanol

En vista de los resultados obtenidos en la reducción de la cetona **44** con NaBH₄ en MeOH, se realizó la reacción con Na en EtOH a reflujo en base a los antecedentes de literatura (Tschesche 1932; Wagner y Wallis 1952; Murphy y col. 2006; Ramirez y col. 2005). Esta reacción posee un mecanismo (Esquema 2.20; House 1972b) con un primer paso en donde se oxida el metal para formar un anión radical el cual, luego de sucesivos pasos de protonación y abstracción de un electrón a un segundo átomo de sodio, genera un carbanión. La carga negativa puede estar en posición axial o ecuatorial (fácilmente interconvertible por inversión del carbono), sin embargo el intermediario más estable es aquel que presenta el hidroxilo en posición ecuatorial, dejando a la carga negativa en la posición axial (Barton y Morrison 1961; Shoppee y Summers 1952).



Esquema 2.20

Por lo tanto, la reducción de la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestán-6-ona (**44**) debería dar el producto más estable, es decir, el triol buscado (**43**). Sin embargo, la reacción dio dos productos. Luego de purificar el producto mayoritario (81% de rendimiento), se observó en el espectro de RMN ^1H que el producto no era un esteroide trihidroxilado (Figura 2.25). En particular se observan dos señales a 3,43 y 3,65 ppm que corresponden a protones geminales a hidroxilos con multiplicidades diferentes a las de los protones geminales a los hidroxilos en C-2 y C-3 del diol de partida. Esto se observa en la ampliación de la figura 2.25.

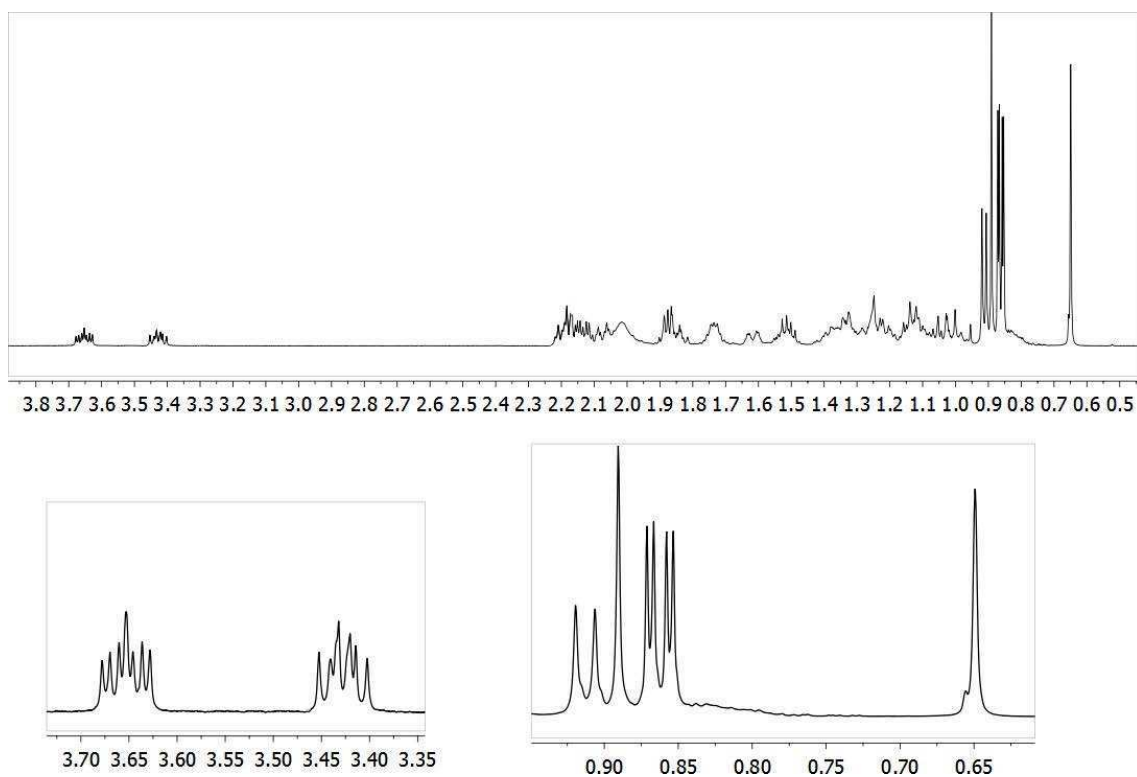


Figura 2.25: Espectro de RMN ^1H del producto de reducción con Na de **44** en CDCl_3

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 2.26) se puede corroborar la presencia de dos grupos hidroxilos que dan a lugar a dos señales a 70,88 y 75,67 ppm y también se observa la señal del grupo carbonilo a 213,30 ppm, lo cual demuestra que el compuesto dihidroxilado no se redujo en las condiciones mencionadas.

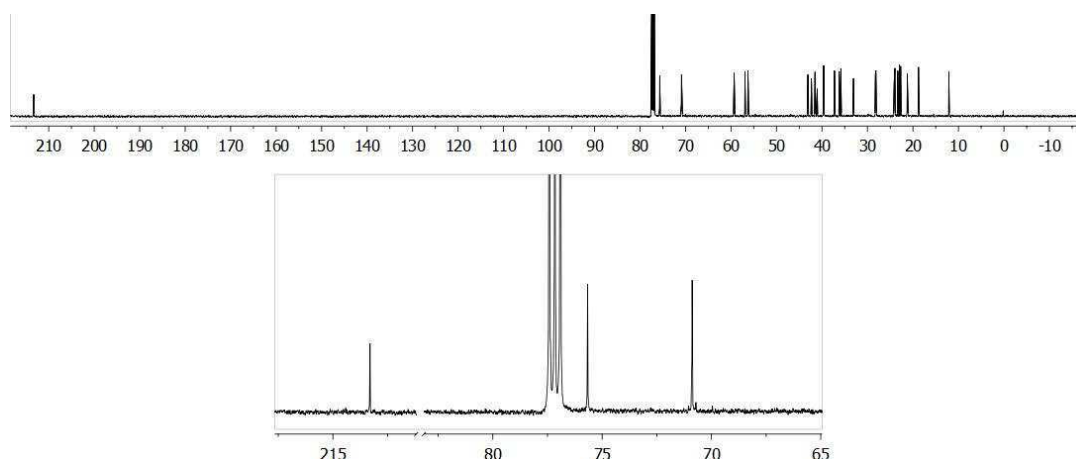
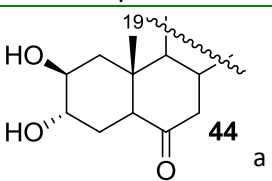
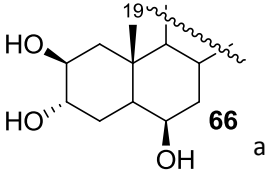


Figura 2.26: Espectro de RMN ^{13}C del producto de reducción con Na de **44** en CDCl_3

Además, el desplazamiento químico de la señal de ^{13}C que se asignó al carbono del Me-19 -en el espectro HSQC- aparecía a un δ mucho mayor al esperado. En la tabla 2.4 se pueden observar los valores de ^{13}C y ^1H del Me-19 para la cetona de partida: el 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**), el triol obtenido por reducción con NaBH_4 (**66**) y el producto obtenido por reducción con sodio (**67**).

Tabla 2.4: Comparación de señales del Me-19 en los compuestos **44**, **66** y **67**.

Compuesto	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
 44 ^a	15,57	0,94
 66 ^a	18,33	1,18
Producto 67 ^b	23,35	0,89

a- CD_3OD b- CDCl_3

En particular, se esperaba que el valor del desplazamiento de ^{13}C del Me-19 fuera menor al del compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (**66**) ya que éste posee dos interacciones

1-3 diaxial con los hidroxilos en posición 2 β y 6 β (Figura 2.27a), mientras que el compuesto esperado **43** (2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano) presenta sólo una (Figura 2.27b).

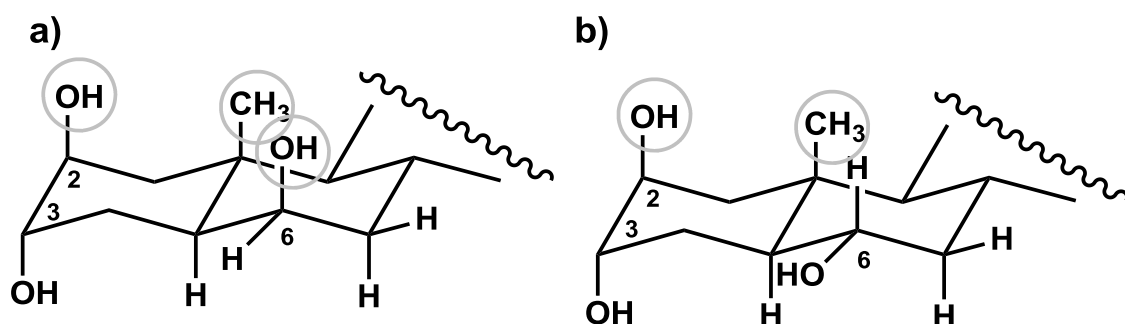


Figura 2.27

Por comparación con datos de literatura se concluyó que un valor de $\delta=23$ ppm para el Me-19 es típico de esteroides con los anillos A y B en configuración *cis* (Goad y Akihisa 1997). Esto pudo corroborarse con el espectro NOESY, en particular a partir de las correlaciones del H-5 β con el H-3 β y el Me-19, como se puede observar en la figura 2.28.

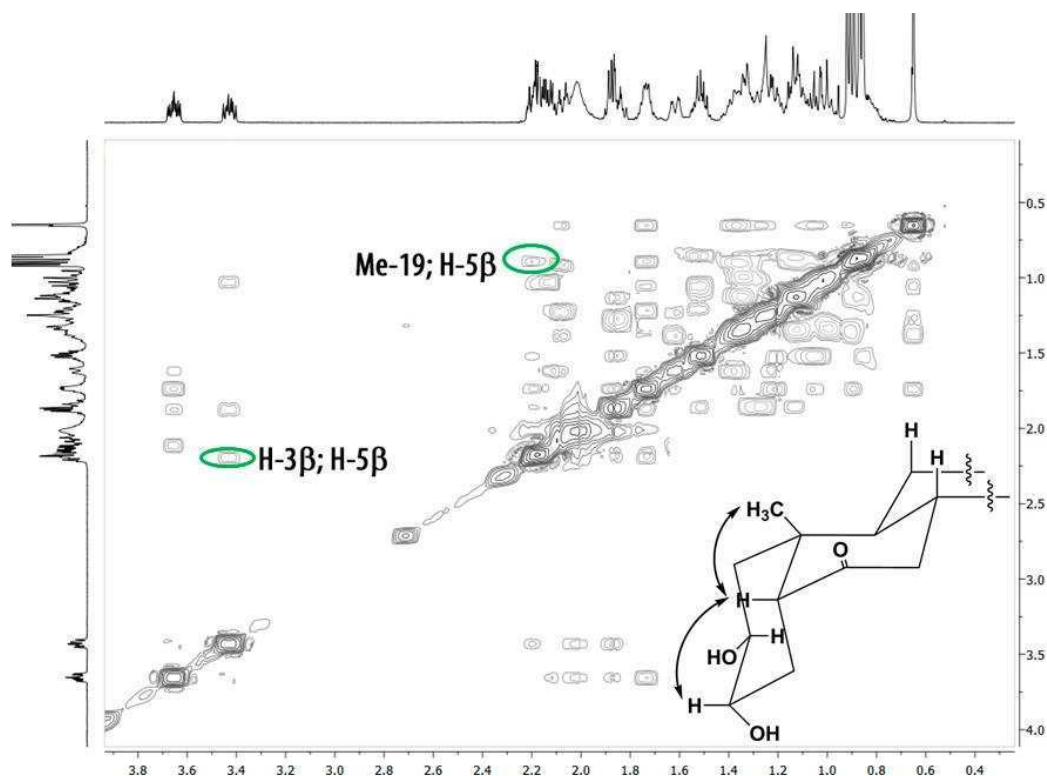


Figura 2.28: Espectro NOESY del compuesto **67** en CDCl₃

Esta nueva configuración para el H-5 trae como consecuencia que los grupos hidroxilo pasen de la posición axial a una pseudoecuatorial y, por lo tanto, los H-2 β e H-3 α estén en posición axial. Esto explica el cambio en la multiplicidad para ambos protones.

La asignación de los H-2 e H-3 se realizó en base a las correlaciones de cada protón con los respectivos metilenos vecinales de C-1 y C-2 en el espectro COSY (Figura 2.29).

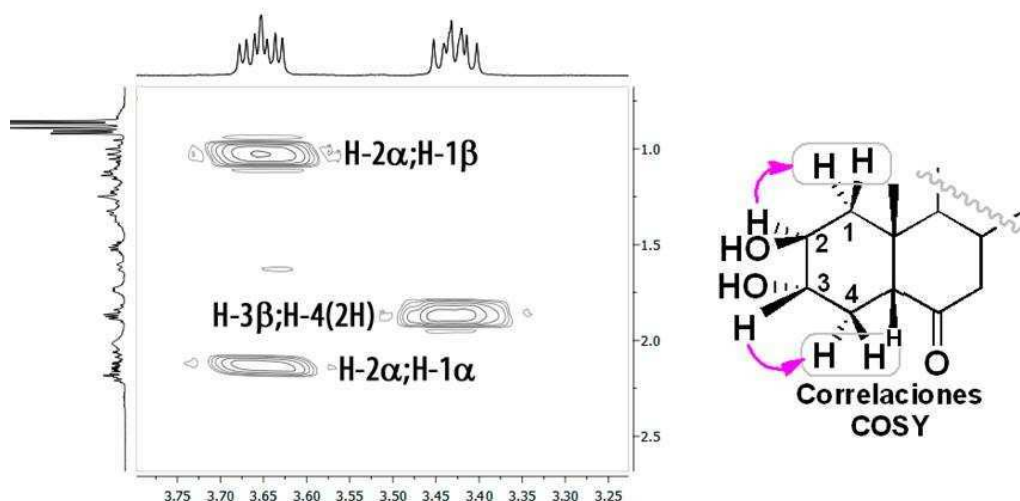
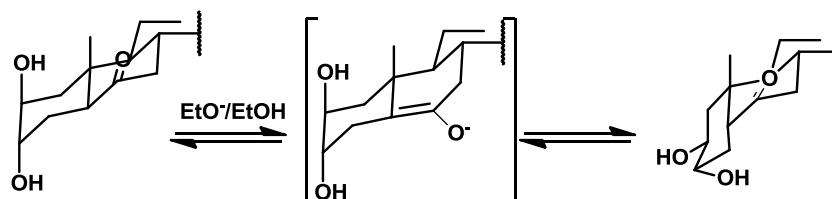


Figura 2.29: Espectro COSY del compuesto **67** en CDCl_3

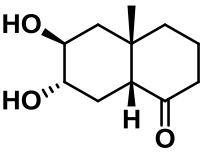
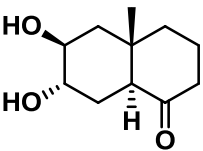
Es evidente que en el medio alcalino la epimerización en C-5 se ve favorecida frente a la reacción de reducción del carbonilo de C-6. El resultado de la reacción se puede explicar mediante la formación de un enolato por abstracción del protón de C-5 debido al aumento del pH del medio por reacción entre el sodio y el etanol. La protonación del enolato genera el diol epímero en C-5, el cual presenta una mayor estabilidad que el diol de partida. Esto se debe a que en el compuesto **44** (5 α -colestano) el grupo hidroxilo 2 β presenta una fuerte interacción 1-3 diaxial con el Me-19 y, en menor medida entre el hidroxilo 3 α y el H-5 α . Al epimerizar el H-5, la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 β -colestano-6-ona (**67**) presenta ambos hidroxilos en posiciones pseudoecuatoriales (Esquema 2.21) y por lo tanto, no presentan interacciones 1-3 diaxiales desfavorables (Velgová y col. 1971; Velgová y col. 1969, Rezabkova y col. 1968).



Esquema 2.21

Por último, se comprobó la estabilidad extra que confiere el H-5 β a la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 β -colestano-6-ona (**67**) mediante un cálculo computacional de un modelo simplificado. En particular, se calcularon las energías de las decalinas *cis* y *trans* con hidroxilos en posición 2 β y 3 α . El nivel de teoría utilizado fue HF 6-31G++. En la tabla 2.5 se observan los resultados obtenidos.

Tabla 2.5: Análisis de estabilidad de dos modelos simplificados de esteroides 5 α (decalina *trans*) y 5 β (decalina *cis*).

	E (Hartree)*	$\Delta E (-E_{cis}+E_{trans})$ (KJ/mol)	N_{cis}/N_{trans} (25°C)
 Decalina <i>cis</i>	-651,3614051		
		2,594	2,85
 Decalina <i>trans</i>	-651,3604171		

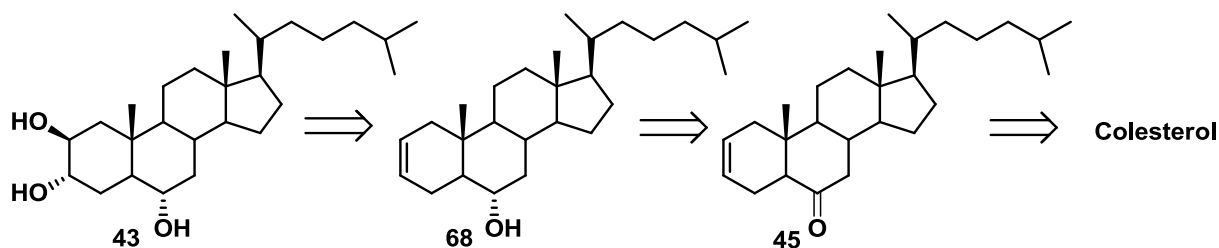
* HF 6-31G++

Teniendo en cuenta la relación poblacional de Boltzmann a 25°C, el 74% de la población se encuentra en la configuración *cis* y el 26% en la configuración *trans*. Sin embargo el isómero *trans* no se aisló de la mezcla de reacción. Pero sí se aisló el producto de su reducción, es decir, el triol **43**, como producto minoritario.

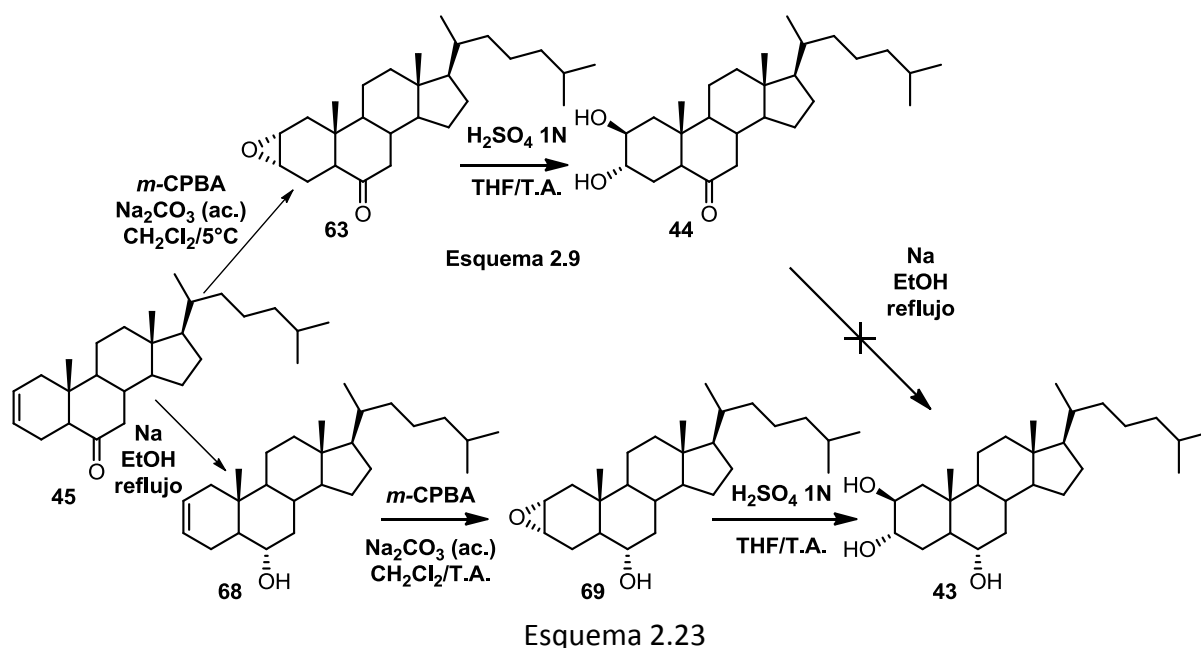
Este triol era el producto que inicialmente se esperaba en la reducción del diol **44**, sin embargo esta reacción no es útil para obtener dicho compuesto ya que se obtuvo con un 17.5% de rendimiento. Su estructura se corroboró posteriormente por comparación de sus espectros de RMN ^1H y ^{13}C con los del compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**), cuya síntesis se describe a continuación.

2.2.2 Cambio de estrategia para la síntesis del compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**)

Debido a que no fue posible obtener con buen rendimiento el triol 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**), se decidió cambiar la estrategia de síntesis a través de una ruta, cuya retrosíntesis se observa en el esquema 2.22.



El compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**) se obtendría por epoxidación de la olefina 5 α -colest-2-en-6 α -ol (**68**) y posterior apertura nucleofílica del epóxido en medio ácido (Garrido Santos y col. 2003). La olefina **68** se obtendría por reducción de la 5 α -colest-2-en-6-ona (**45**), cuya síntesis ya fue descrita en este capítulo. Esta ruta difiere de la planteada en el esquema 2.9 en que el hidroxilo en posición 6 α se obtiene por reducción del carbonilo de la olefina 5 α -colest-2-en-6-ona (**45**) tal como se observa en el esquema 2.23.



2.2.2.1 Síntesis del compuesto 5 α -colest-2-en-6 α -ol (**68**)

El grupo hidroxilo en posición 6 α se obtuvo por reducción con sodio de la 5 α -colest-2-en-6-ona (**45**). Como se comentó anteriormente, esta reducción al ser radicalaria (mecanismo descrito en el esquema 2.20) genera el producto termodinámicamente más estable (Shoppee y Summers 1952), es decir aquel que posee el grupo hidroxilo en posición ecuatorial y por lo tanto, con configuración 6 α .

En esta reacción, la elección del solvente fue importante. Cuando se utilizó etanol, los rendimientos no superaban el 50%, en cambio con *n*-propanol los resultados mejoraron notablemente (90% de rendimiento). Esto probablemente se deba a su mayor punto de ebullición.

En la figura 2.30, se observa el espectro de RMN ^1H de **68**, con ampliaciones de las señales diagnósticas.

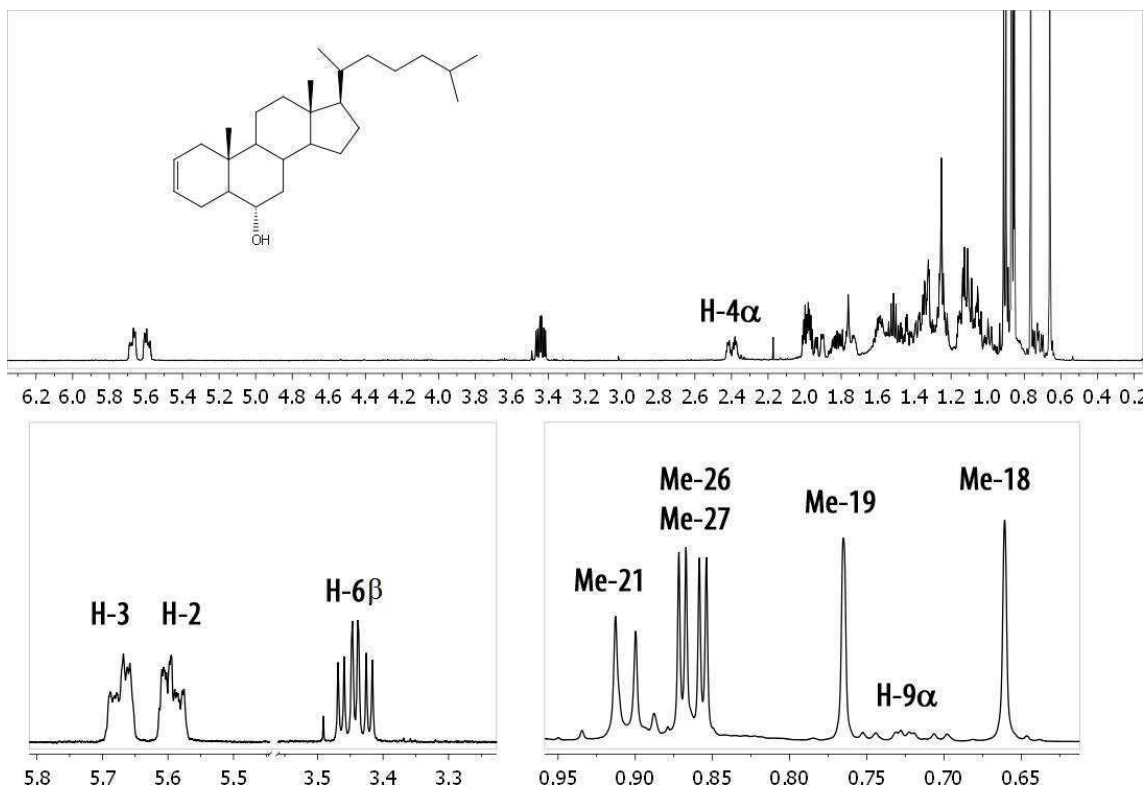


Figura 2.30: Espectro de RMN ^1H del compuesto **68** en CDCl_3

En la ampliación del espectro se observan las señales olefínicas correspondientes a los H-2 e H-3 que presentan los mismos valores de desplazamiento químico que en el compuesto carbonílico de partida. Esto se confirmó mediante las correlaciones en el espectro HMBC de los H-2 e H-3 con los C-10 (35,59 ppm) y C-5 (48,79 ppm), respectivamente (Figura 2.31).

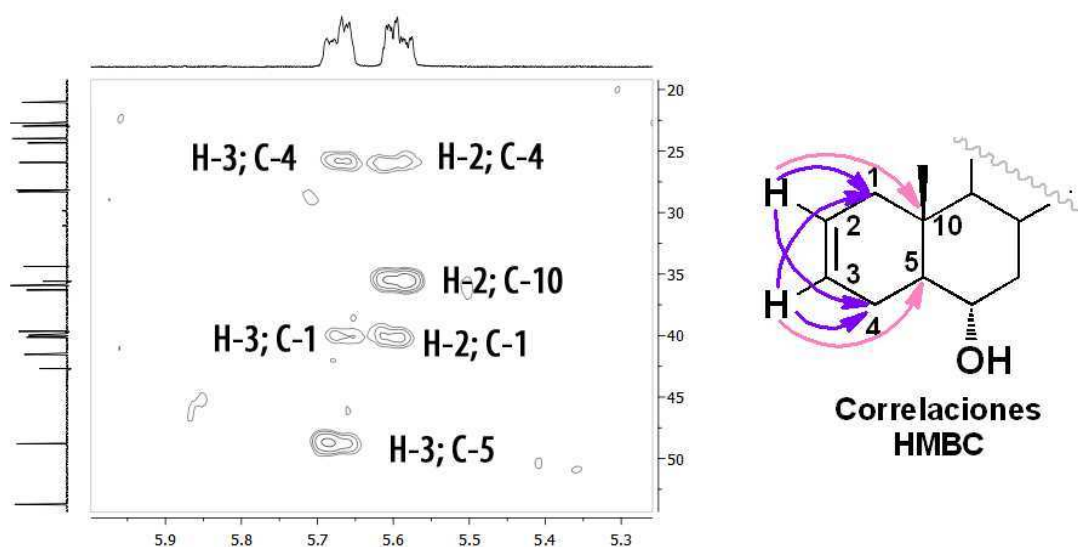


Figura 2.31: Espectro HMBC del compuesto **68** en CDCl_3

Estas correlaciones fueron claves para la asignación ya que en el espectro COSY (Figura 2.32) ambos H-2 e H-3 presentan correlaciones con los protones correspondientes a los metilenos en C-1 y C-4.

La ausencia de la señal de ^{13}C a 212,23 ppm correspondiente a la cetona de partida y la presencia de una nueva señal a 71,76 ppm que correlaciona con un protón a 3,44 ppm en el espectro HSQC, confirmaron la reducción del compuesto **45**.

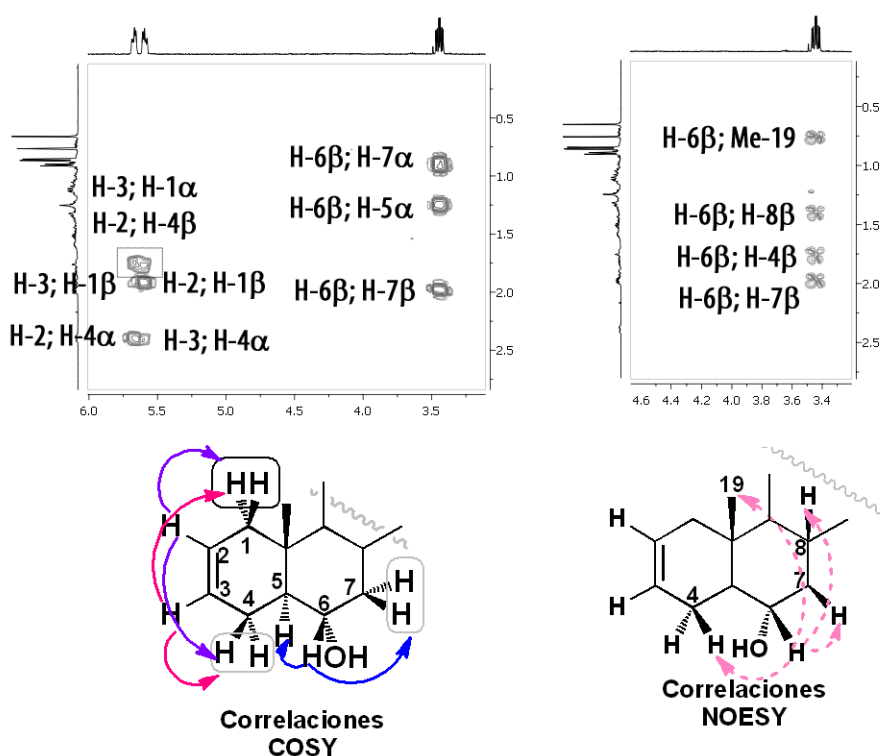
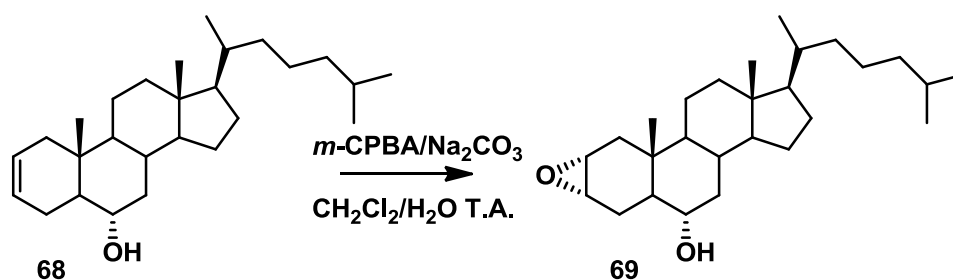


Figura 2.32: Espectros COSY y NOESY del compuesto **68** en CDCl_3

En cuanto a la configuración del grupo hidroxilo en C-6, la multiplicidad de la señal del hidrógeno geminal en el espectro de RMN ^1H (Figura 2.30) *-ddd* con $J=4,6$; $10,3$ y $11,2$ Hz-, indica que su posición debe ser axial, y por tanto, el grupo hidroxilo, ecuatorial (configuración α). Se confirmó la ubicación del grupo hidroxilo en la cara α del esteroide mediante las correlaciones NOE entre el H-6 ($3,44$ ppm) y los hidrógenos del Me-19 ($0,76$ ppm) y el H-8(β) a $1,40$ ppm (Figura 2.32).

2.2.2.2 Síntesis del compuesto $2\alpha,3\alpha$ -epoxi- 5α -colestan- 6α -ol (**69**)

Para obtener este triol con dioles vecinales *trans* en C-2 y C-3, se epoxidó la olefina 5α -colest-2-en- 6α -ol (**68**) (Esquema 2.24). En este caso la reacción fue similar a la de epoxidación de la 5α -colest-2-en-6-ona (**45**), con la diferencia de que la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente ya que en este caso, debido a la ausencia del grupo ceto no existía competencia con la reacción de Baeyer-Villiger.



Esquema 2.24

En la figura 2.33 se presenta el espectro de RMN ^1H del producto de la epoxidación y ampliación de las señales características.

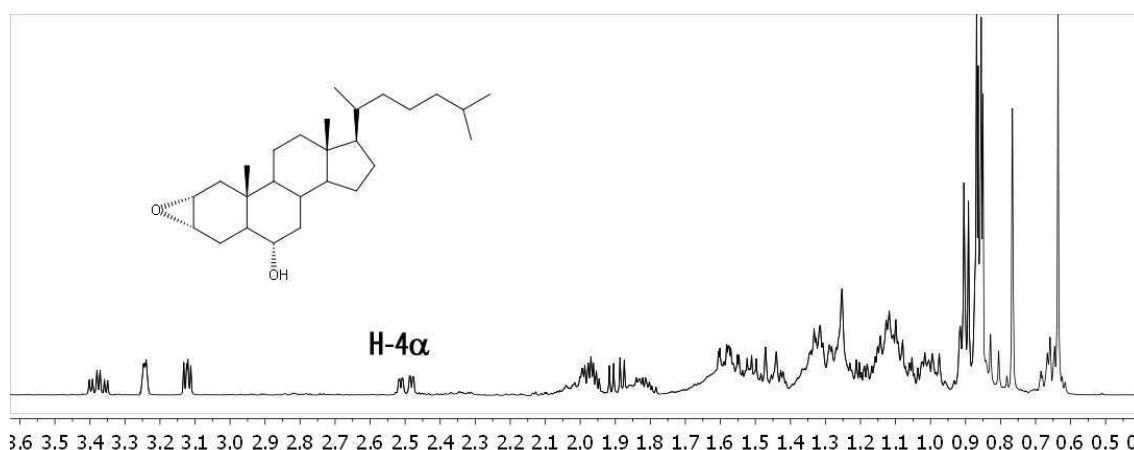


Figura 2.33: Espectro de RMN ^1H del compuesto **69** en CDCl_3

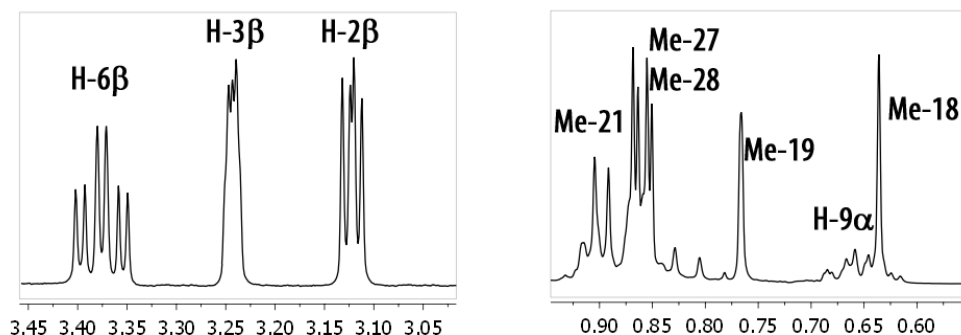


Figura 2.33: Espectro de RMN ^1H del compuesto **69** en CDCl_3

Se puede notar la ausencia de las señales olefínicas y dos señales nuevas a 3,12 y 3,24 ppm que correlacionan con carbonos a 50,69 y 52,39 ppm en el espectro HSQC, debidas al grupo epóxido. La asignación de las señales a 3,12 ppm al H-2(β) y 3,24 ppm al H-3(β) se realizó en base a las correlaciones en los espectros COSY y HMBC, tal como se observa en la figura 2.34.

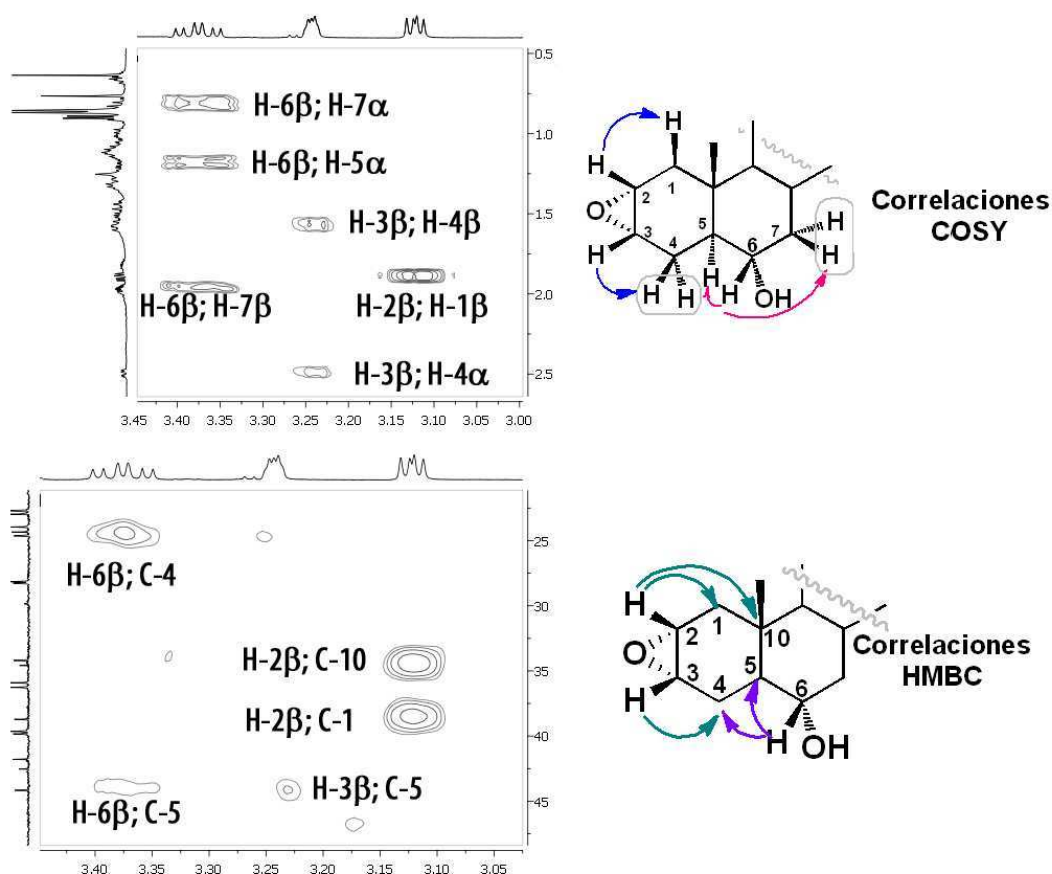


Figura 2.34: Espectros COSY y HMBC del compuesto **69** en CDCl_3

De acuerdo con la estereoselectividad de la reacción, se obtuvo el epóxido en la cara α debido a la inducción asimétrica que introduce el Me-19 (Barton y Morrison 1961; Fieser y Fieser 1959).

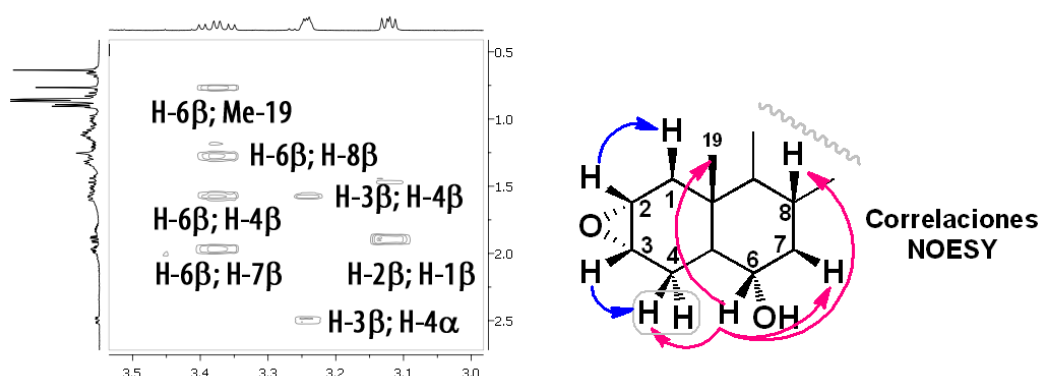


Figura 2.35: Espectro NOESY del compuesto **69** en CDCl_3

A partir de las correlaciones entre el H-3 y ambos H-4 en el espectro NOESY, se comprueba que el H-3 debe ser ecuatorial para poder estar espacialmente cerca de los dos hidrógenos en C-4 y por lo tanto, presentar configuración β (Figura 2.35). Con lo cual, el H-2 al estar también ubicado en la cara β del esteroide se encuentra en posición axial. Esto explica que exista una única correlación entre el H-2 y el H-1 ecuatorial a 1,90 ppm en el espectro NOESY (Figura 2.36).

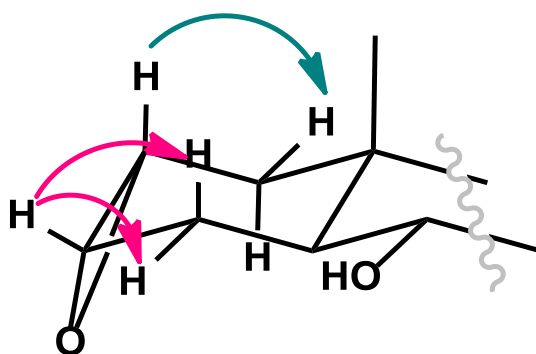
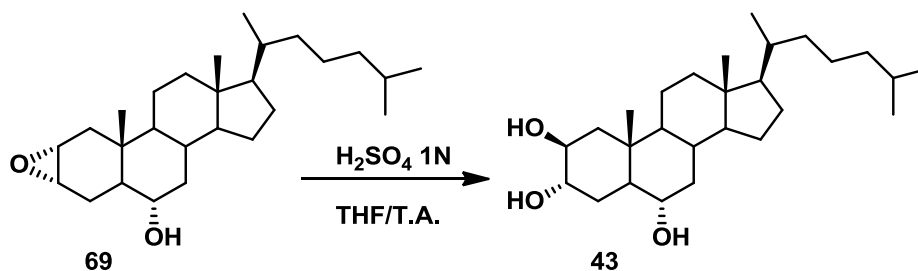


Figura 2.36

2.2.2.3 Apertura nucleofílica del epóxido **69**

A continuación se realizó la apertura nucleofílica en medio ácido del 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestano-6 α -ol (**69**) (Esquema 2.25). La estereoselectividad de la reacción es consistente con

una apertura de epóxidos *trans*-diaxial clásica con el ataque nucleofílico del agua al C-2 del epóxido, como se explicó anteriormente.



Esquema 2.25

En la figura 3.37 se presenta el espectro de RMN ^1H del triol **43**, en donde se observan dos multipletes a 3,81 y 3,84 ppm y el doble triplete a 3,38 ppm del hidrogeno geminal al hidroxilo en C-6(α). Estas tres señales correlacionan con las señales de ^{13}C a 70,47; 69,93 y 69,29 ppm, respectivamente en el espectro HSQC.

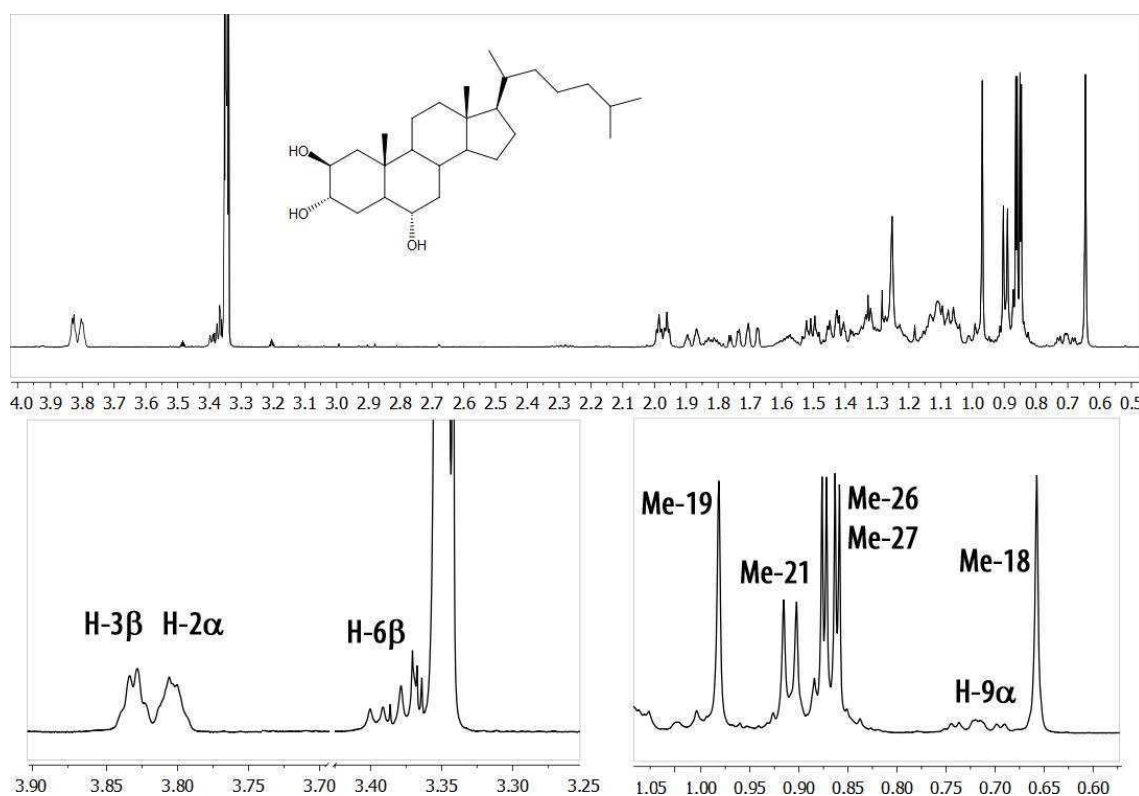


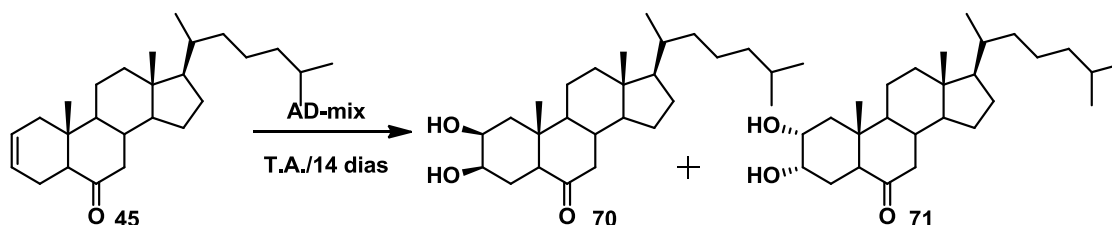
Figura 2.37: Espectro de RMN ^1H del compuesto **43** en CD_3OD

La asignación de las señales de H-2 e H-3 se determinó a partir de las correlaciones entre el H-2 (3,81 ppm) y el C-10 (36,72 ppm) y el H-3 (3,84) y el C-5 (45,92 ppm), en el espectro HMBC, tal como se comentó en las asignaciones de los compuestos anteriores con idéntica funcionalidad en C-2 y C-3.

En cuanto a la configuración de los nuevos grupos hidroxilos, al igual que en la apertura del compuesto 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestano-6-ona (**63**), debido a la regio- y estereoselectividad del ataque nucleofílico al epóxido, se obtuvieron los grupos hidroxilos en las posiciones C-2(β) y C-3(α). Esta configuración implica, posiciones axiales para ambos hidroxilos lo cual se corrobora a partir de la multiplicidad y constantes de acoplamiento de las señales a 3,81 y 3,84 ppm. Además, en el espectro NOESY cada uno de estos protones correlaciona con ambos hidrógenos pertenecientes a los metilenos adyacentes, es decir que el H-2 correlaciona con ambos H-1 y el H-3, con los dos H-4. Para que ocurran estas correlaciones, los H-2 y H-3 deben ser ecuatoriales, confirmando las configuraciones en C-2(β) y C-3(α) para los dos hidroxilos.

2.2.3 Síntesis de los compuestos 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**70**) y 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**71**)

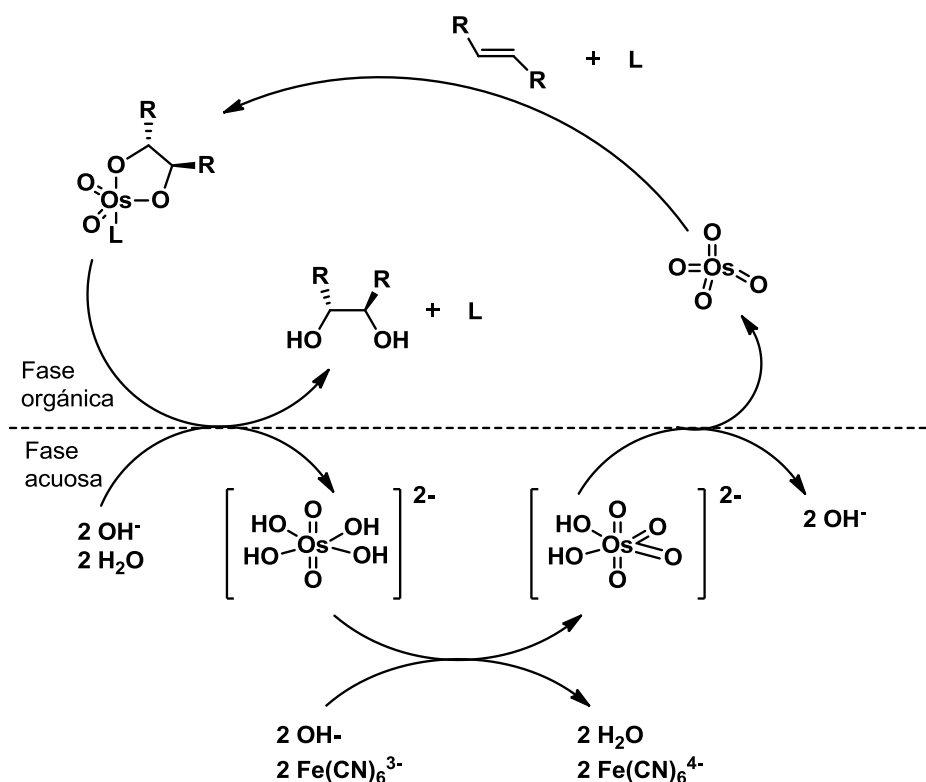
Para la obtención de cada uno de estos compuestos se realizó una dihidroxilación asimétrica de Sharpless (Becker y col. 1995) en la cual se adiciona OsO₄ al doble enlace de la colest-2-en-6-ona (**45**).



Esquema 2.26

La reacción fue llevada a cabo utilizando las mezclas comerciales AD-mix- α y AD-mix- β . La mezcla contiene Os (VIII) en forma de K₂OsO₄(OH)₂ en cantidades catalíticas y K[Fe(CN)₆]₃ el cual, en el medio básico generado por el K₂CO₃ de la mezcla, reoxida al Os (VI) luego de la reacción de dihidroxilación.

Las mezclas AD-mix α y AD-mix β se diferencian en el ligando (L) que induce la asimetría en la reacción de dihidroxilación: 1,4-Bis-(9'-O- dihidroquinil)-ftalazina [(DHQ)2-PHAL] (AD-MIX- α) y 4-bis-(9'-O-dihidroquinidil)-ftalazina [(DHQD)2-PHAL] (AD-mix- β). Por último, se agrega metanosulfonamida al medio de reacción para acelerar la hidrólisis del éster de osmio (VI).



Esquema 2.27

Esta reacción se realiza en fase heterogénea (Esquema 2.27) utilizando una mezcla de *t*-butanol/ H_2O (1:1) para aumentar la diastereoselectividad de la reacción. Esto se debe a que la hidrólisis del éster de osmio (VI) y la consecuente liberación del diol y el ligando ocurren en la fase orgánica y la reoxidación del Os (VI) en la fase acuosa. De esta forma se evita la oxidación del Os (VI) a Os (VIII) en la fase orgánica lo cual podría conducir a la formación de un complejo de Os (VIII) carente de ligando que podría adicionarse a otro doble enlace y, por lo tanto, dihidroxilarlo sin la inducción asimétrica del ligando.

Al utilizarse la mezcla AD-MIX- α , se obtuvo un 65% del diol con configuración $2\beta,3\beta$ (**70**) y un 35% del diastereómero $2\alpha,3\alpha$ (**71**), mientras que utilizando la mezcla AD-mix- β , la diastereoselectividad se invierte obteniéndose un 57% del diol con configuración $2\alpha,3\alpha$ (**71**) y un 31% del $2\beta,3\beta$ (**70**), además de recuperar un 12% de alqueno **45** que no reaccionó. En ambos casos el exceso diastereomérico es de un $\approx 30\%$ y es típico para dioles *cis* disustituídos (Ramírez y col. 2000; Jeong y col. 1992). Es importante aclarar que para la dihidroxilación asimétrica de Sharpless de alquenos *cis* disustituídos, se sugiere la utilización del ligando DHQ-IND o DHQD-IND (IND: indolin-1-carboxilato) cuya inducción asimétrica conduce a

selectividades de entre 20 y 80% de exceso diastereomérico (Wang y Sharpless 1992; Wang y col. 1994). Sin embargo, en el caso de la síntesis de los esteroides dihidroxilados, a pesar de haber obtenido un exceso diastereomérico bajo, esto no fue un problema ya que era de interés obtener ambos diastereómeros para realizar posteriores estudios de correlación estructura/actividad.

En la figura 2.38 se observan los espectros de RMN ^1H de ambos compuestos dihidroxilados puros. Se pueden observar dos diferencias significativas que, de manera sencilla, permitieron determinar a qué compuesto correspondía cada espectro. Los desplazamientos químicos de las señales del H-5 α y el Me-19 de ambas moléculas poseen la información suficiente para la asignación. Tal como se ve en la figura 2.39, en el isómero 2 β ,3 β , el Me-19 (0,98 ppm) presenta una interacción 1,3-diaxial con el hidroxilo en C-2(β), lo que no ocurre en el otro diastereómero (Me-19 a 0,74 ppm). Sin embargo, el isómero 2 α ,3 α presenta un desplazamiento químico para el H-5(α) mucho mayor al del isómero 2 β ,3 β debido a la interacción 1,3-diaxial entre el H-5(α) y el grupo hidroxilo en C-3(α) (2,67 ppm vs. 2,21 ppm).

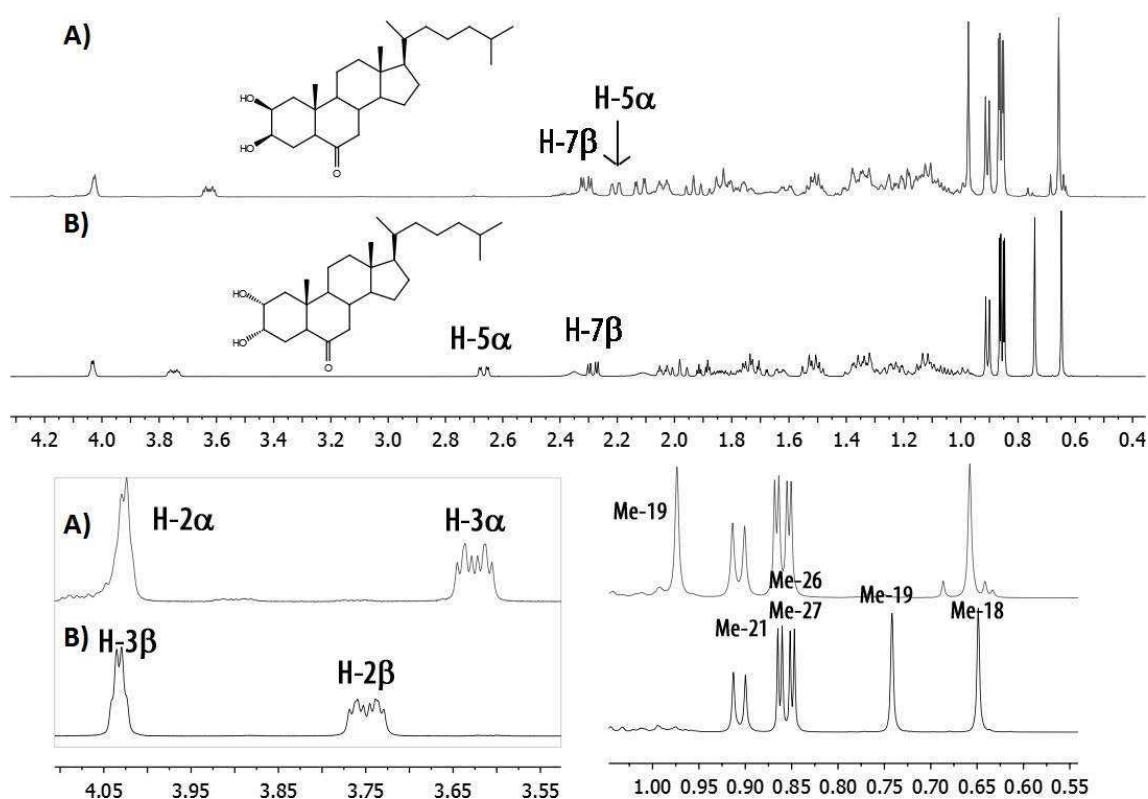


Figura 2.38: Espectros de RMN ^1H de los compuestos **70** (A) y **71** (B) en CDCl_3

La asignación de los espectros de RMN ^1H a cada diastereómero se confirmó con los espectros NOESY (Figura 2.39). Las correlaciones más importantes que determinaron la configuración de los dioles *cis* fueron las siguientes: la correlación entre el H-3 (3,63 ppm) y el H-5(α) (2,21 ppm) determinó que dicho espectro correspondía al diol $2\beta,3\beta$ y, de manera análoga la correlación entre el H-2 (3,75 ppm) con el Me-19 (0,74 ppm), al diol $2\alpha,3\alpha$.

Una vez asignados los espectros a cada diastereómero, la asignación de las señales de los H-2 e H-3 se realizó fácilmente en base a la multiplicidad de las mismas. En el caso del isómero $2\beta,3\beta$, los H-2(α) e H-3(α) están en posición ecuatorial y axial, respectivamente (Figura 2.39) y, por el contrario, en el isómero $2\alpha,3\alpha$, el H-2(β) es axial y el H-3(β), ecuatorial. De este modo, las señales que presentan un doble triplete corresponden a los protones axiales y los multipletes, a los ecuatoriales.

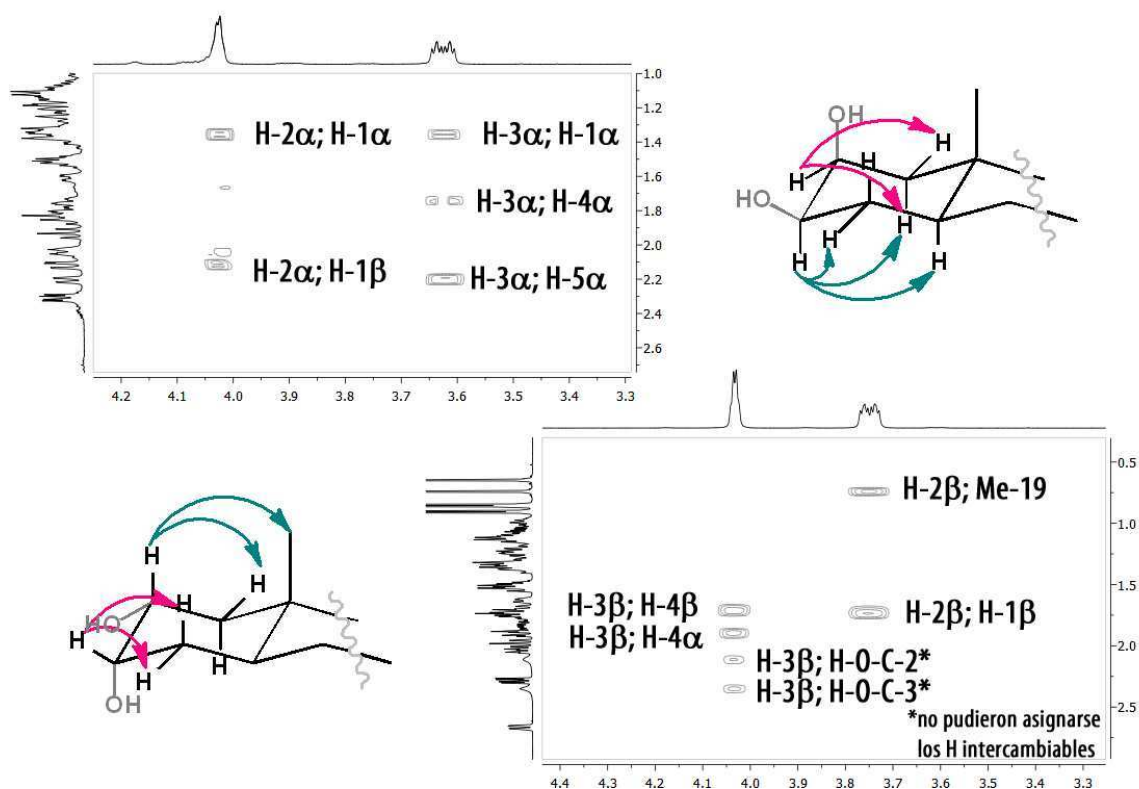


Figura 2.39: Espectros NOESY los compuestos **70** y **71** en CDCl_3

Esta asignación pudo corroborarse en base a correlaciones HMBC (Figura 2.40).

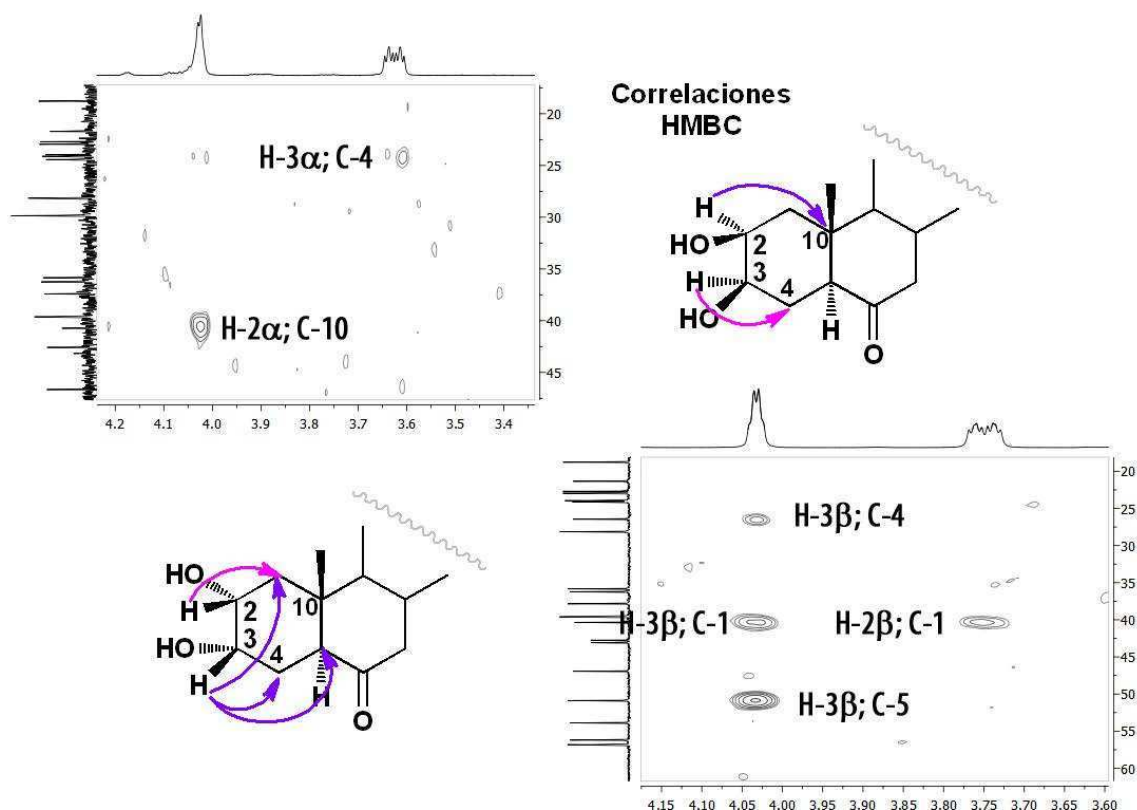


Figura 2.40: Espectros HMBC los compuestos **70** y **71** en CDCl_3

Por último, es interesante notar que la diferencia en los valores de los desplazamientos químicos de los H-2 e H-3 en los dioles *cis* es mucho mayor que en el diol *trans* (**44**) (Tabla 2.6). Esto se debe al efecto anisotrópico que ejercen los enlaces C-C en las moléculas. De acuerdo a los conos de protección y desprotección magnética de dichos enlaces (Figura 2.41), los protones en posición axial se encuentran protegidos (δ^-) y, por lo contrario, los protones ecuatoriales, desprotegidos (δ^+) (Balci 2005).

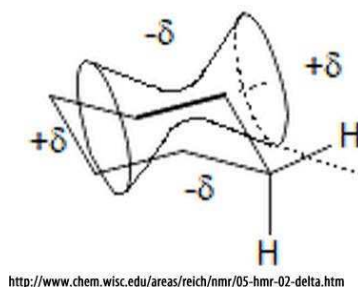
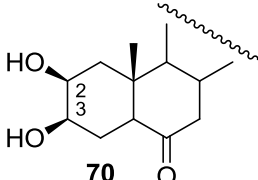
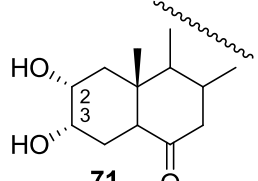
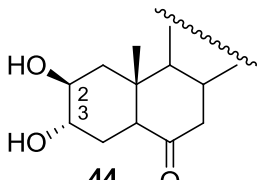


Figura 2.41

En los isómeros *cis*, uno de los grupos hidroxilo está en posición axial y el otro es ecuatorial, mientras que en el diol *trans* ambos hidroxilos están en posición axial y por tanto,

ambos hidrógenos geminales (ecuatoriales) presentan δ muy parecidos como se puede observar en la tabla 2.6.

Tabla 2.6: Comparación de los H-2 e H-3 de los diastereómeros **44**, **70** y **71**.

	H-2 (ppm) ^a	H-3 (ppm) ^a	$\Delta\delta$ (ppm) ^b
 70	4,03 (ec)	3,63 (ax)	0,40
 71	3,75 (ax)	4,03 (ec)	0,38
 44	3,81 (ec)	3,85 (ec)	0,04

a-CDCl₃ b-CD₃OD

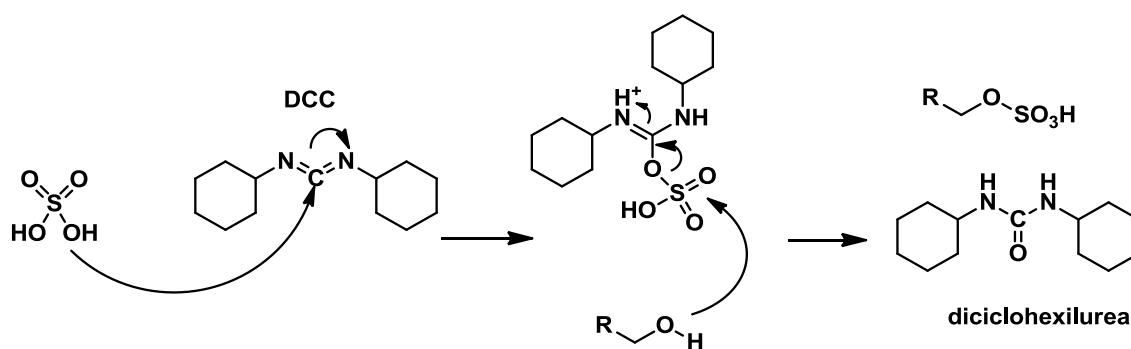
2.3 Síntesis de esteroides polihidroxilados sulfatados

La reacción de sulfatación es una transformación simple que ocurre en un solo paso. Sin embargo, es un desafío sulfatar moléculas de PM medio o bajo ya que la introducción de un grupo sulfato altera drásticamente las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. La mayor parte de los compuestos sulfatados son solubles en agua, con lo cual se dificulta su aislamiento y un problema muy común es que estén impurificadas con sales inorgánicas (Raghuraman y col. 2007). Por otro lado, la labilidad de los grupos sulfato en medio ácido y calor dificulta las transformaciones en presencia de dicho grupo (Jandik y col. 1996; Liang y col. 2009). De acuerdo con esto, la introducción de los grupos sulfato es generalmente el último paso en una ruta sintética y de este modo fue planteado en este trabajo de tesis.

A continuación se presentará una breve introducción acerca de la reacción de sulfatación. Luego, se detallarán los resultados obtenidos en la búsqueda de la optimización de la sulfatación de los esteroides polihidroxilados, como también las dificultades que se presentaron y cómo se resolvieron para llegar con éxito a los productos deseados.

2.3.1 Breve introducción a los métodos de sulfatación

A principios del siglo XX, la obtención de compuestos sulfatados se realizaba por adición de H_2SO_4 al doble enlace de olefinas (Gilbert 1962). En el año 1966, Mumma reportó la primera sulfatación de un alcohol alifático utilizando diciclohexilcarbodiimida (DCC) y H_2SO_4 (Esquema 2.28, Mumma 1966).

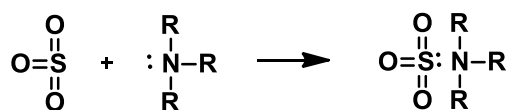


Esquema 2.28

Pese a que la sulfatación mediada por DCC posee buenos rendimientos para la síntesis de monoalquil sulfatos, tiene como inconveniente la formación de diciclohexilurea como subproducto, la cual es difícil de separar del producto sulfatado (Mumma y col. 1970).

Además, el método de sulfatación utilizando DCC/H₂SO₄ no puede aplicarse a moléculas sensibles al medio ácido.

Existen otros reactivos sulfatantes, entre ellos, el SO₃ (líquido o gaseoso), H₂SO₄ fumante, ácido clorosulfónico y ácido sulfámico, los cuales son muy reactivos y por ello pueden dar lugar a productos secundarios y pérdida de regioselectividad en las reacciones. Por ejemplo, el SO₃ puede, incluso, reaccionar con hidrocarburos alifáticos para dar sulfonas, así como productos de eliminación y oxidación, además de derivados sulfatados, sultonas, sulfonatos de éster y ácidos sulfónicos. Por lo tanto, la dificultad en su manipulación y su altísima reactividad condujo a que no se lo utilizara más como tal, sino en forma de complejos que se obtienen por reacción del SO₃ con una base de Lewis, la cual puede ser una amina, amida o un éter (Esquema 2.29)(Gilbert 1962). Estos aductos, fáciles de sintetizar, son sólidos a temperatura ambiente y estables a altas temperaturas; son menos reactivos que el SO₃ y por lo tanto mucho más selectivos, lo cual permite controlar las condiciones de reacción para obtener los productos deseados.



Esquema 2.29

2.3.2 Sulfatación de esteroides

-Monosulfatación

Inicialmente, la sulfatación de esteroides se llevaba a cabo utilizando el complejo de trióxido de azufre-piridina (SO₃.Py) como agente sulfatante, en cloroformo (Gilbert 1962). En estas condiciones, la reacción se realizaba a temperatura ambiente, con tiempos de reacción variables según el esteroide. Por ejemplo el colesterol y su análogo hidrogenado se sulfatan en dos horas (McKenna y Norymberski 1957), mientras que el estradiol-3-benzoato necesita de 68 horas de reacción en dichas condiciones (Holden y col. 1950). A fin de disminuir los tiempos de reacción, se comenzó a trabajar a reflujo. A modo de ejemplo, los compuestos 7 α - y 7 β -hidroxi-5 α -colestano reaccionan cuantitativamente en sólo 2 horas en las condiciones mencionadas (Apotheker y col. 1954).

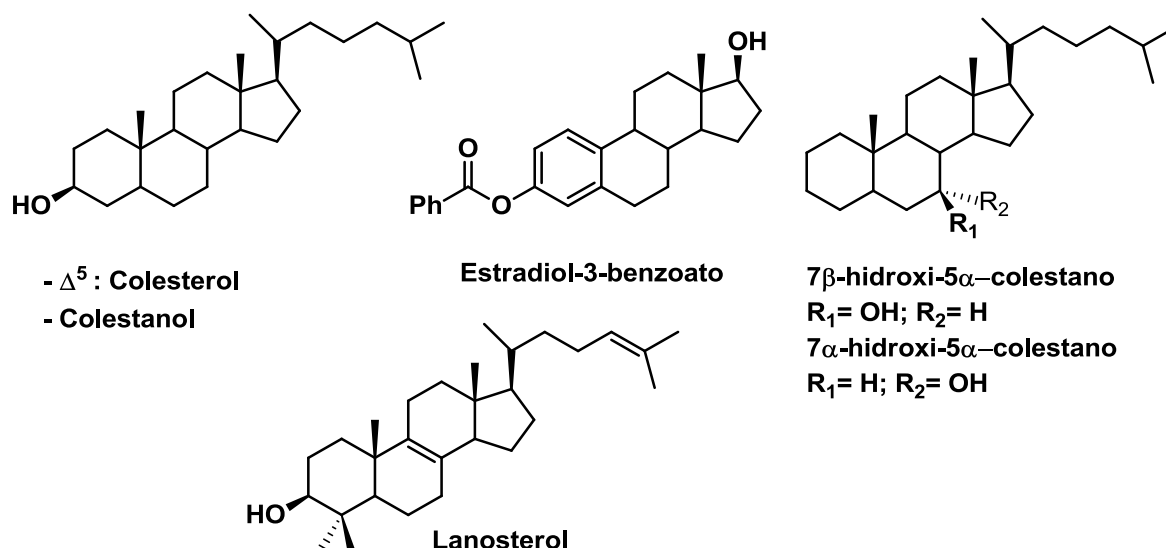


Figura 2.42: Ejemplos de esteroides cuya monosulfatación ha sido reportada

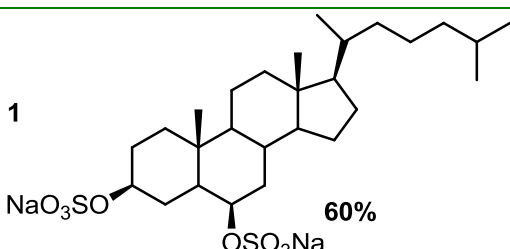
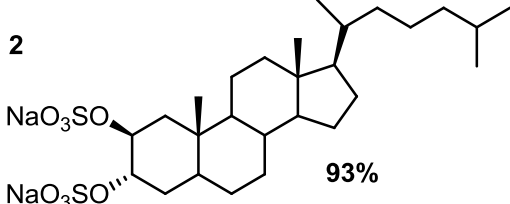
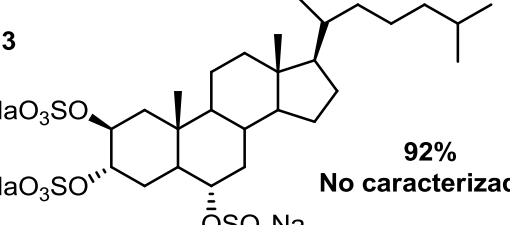
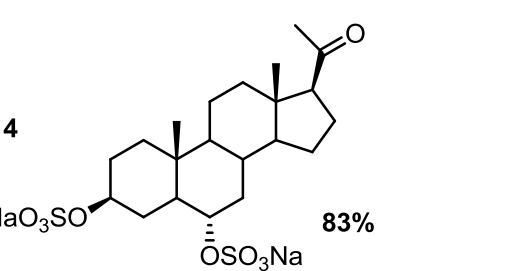
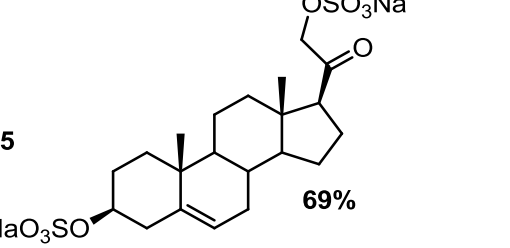
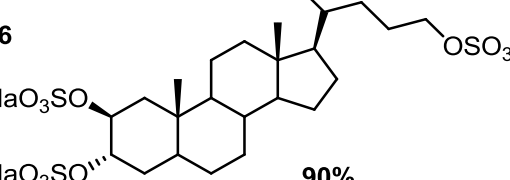
También se observó que los tiempos de reacción disminuyen al trabajar con solventes ternarios. Se ha reportado la sulfatación cuantitativa del colesterol y el lanosterol en sólo 20 minutos de reacción, utilizando $SO_3 \cdot Py$ en una mezcla de benceno, piridina y anhídrido acético entre 50 y 60°C (Sobel y Spoerri 1941). Actualmente se utilizan complejos de trióxido de azufre con aminas en solventes altamente polares, como DMF o DMA, que permitan trabajar a temperaturas más altas (Raghuraman y col. 2007).

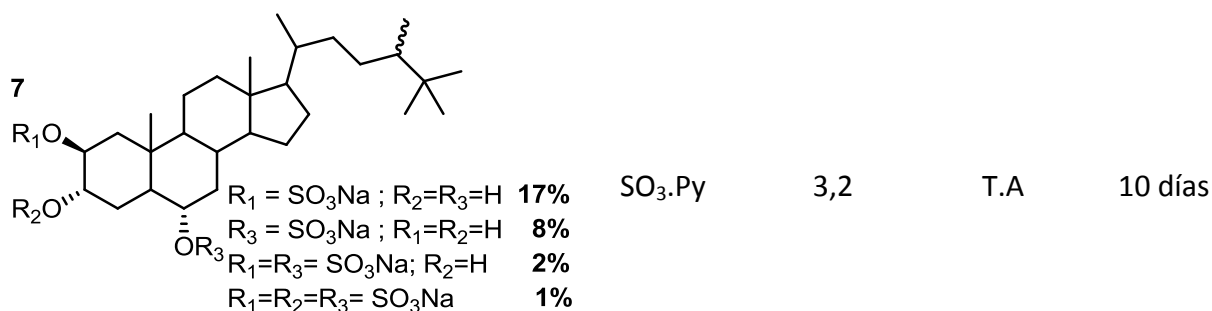
-Polisulfatación:

Cuando el objetivo es la síntesis de compuestos altamente sulfatados, en teoría la sulfatación podría ser llevada a cabo aplicando las condiciones de la reacción de monosulfatación y aumentando la proporción del agente sulfatante. Sin embargo, en la práctica, la obtención de un compuesto polisulfatado es más difícil debido al carácter negativo que adopta la molécula por cada sulfato presente en la misma. Incluso trabajando a temperaturas altas, los tiempos de reacción son largos aún en presencia de un exceso del agente sulfatante tal como se puede observar en la tabla 2.7. En los ejemplos mencionados se trabaja a 95 °C con excepción de las entradas N° 3 y N° 7, cuyos compuestos se sintetizaron a temperatura ambiente. El ejemplo de la entrada N° 7 refleja la dificultad en la polisulfatación ya que en las condiciones ensayadas, se obtuvo un 25% de productos monosulfatados y sólo un 2% y 1% de los productos di- y trisulfatados, respectivamente (Makar'eva y col. 1987).

Capítulo 2: Síntesis de análogos de esteroides sulfatados

Tabla 2.7: Polisulfatación de esteroides polihidroxilados: condiciones y rendimientos

Producto de sulfatación/% Rto.	Reactivo sulfatante	Equiv. utilizados	T (°C)	Tiempo
1  NaO₃SO OSO₃Na 60%	SO ₃ .N(Et) ₃	8	95	3 hs
2  NaO₃SO NaO₃SO 93%	SO ₃ .N(Et) ₃	6,3	95	13 hs
3  NaO₃SO NaO₃SO OSO₃Na 92% No caracterizado.	SO ₃ .Py	6	T.A ¹	ON ²
4  NaO₃SO OSO₃Na 83%	SO ₃ .N(Et) ₃	5	95	3 hs
5  NaO₃SO OSO₃Na 69%	SO ₃ .N(Et) ₃	5	95	8 hs
6  NaO₃SO NaO₃SO OSO₃Na 90%	SO ₃ .N(Et) ₃	10	95	OW ³



1-TA=Temperatura ambiente, 2-ON=Toda la noche, 3-OW=Todo el fin de semana

Esto demuestra que para obtener mejores rendimientos es necesario utilizar un exceso de reactivo sulfatante y, generalmente, altas temperaturas. Por último, los tiempos de reacción son variables y van desde las 3 horas hasta los diez días: las reacciones de trisulfatación son las que requieren tiempos más largos para completar la reacción (Cui y col. 2009: entrada N° 1; Garrido Santos y col. 2003: entrada N° 2; Murphy y col. 2006: entrada N° 3; Comin y col. 1999: entradas N° 4 y 5; Sepe y col. 2011: entrada N° 6, Makar'eva y col. 1987: entrada N° 7).

2.3.3 Síntesis de triterpenos sulfatados utilizando $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$

Los primeros compuestos que se intentaron sulfatar durante este trabajo de tesis fueron varios triterpenos pentacíclicos hidroxilados naturales (Figura 2.43) aislados a partir del arbusto *Chuquiraga erinacea* S. Don. Subsp. *erinacea* (Asteraceae). El objetivo de su sulfatación era aumentar su solubilidad en agua para evaluar su actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa. Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. A.P. Murray del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Nacional del Sur.

La reacción de sulfatación se llevó a cabo en DMF y se utilizó el complejo sintético de trióxido de azufre-TEA ($\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$) sintetizado en nuestro laboratorio (Descripción en el capítulo 6: Parte experimental). En la tabla 2.8 se detallan las condiciones de reacción para cada uno de los compuestos monohidroxilados y los rendimientos obtenidos de las correspondientes sales de Na^+ . Estas fueron obtenidas por elución de las sales de trietilamonio a través de una resina de intercambio catiónico en la forma sódica.

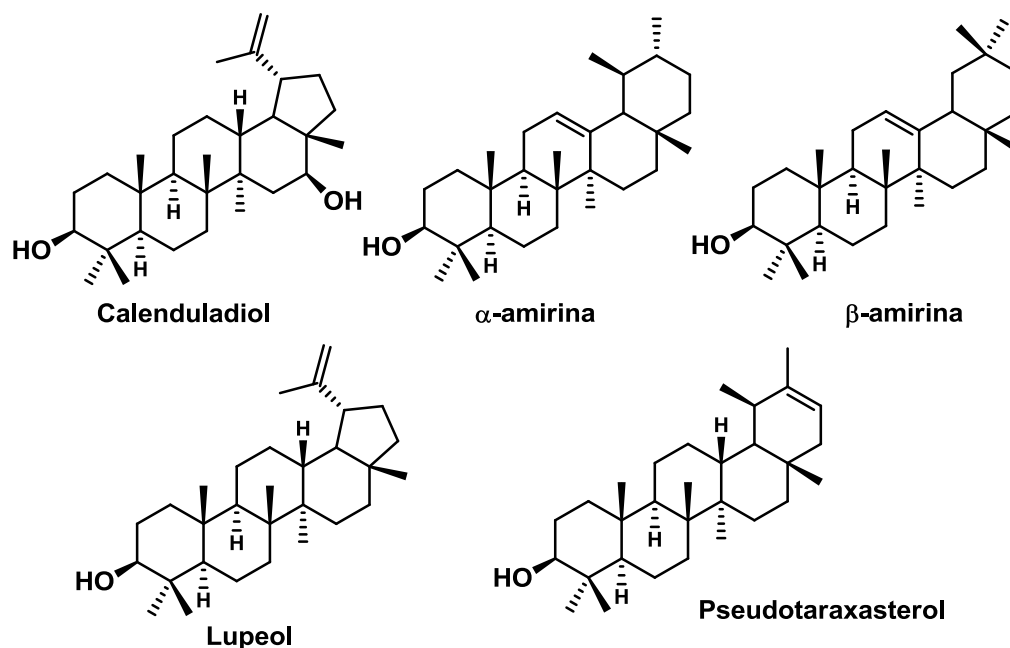


Figura 2.43

Tabla 2.8: Condiciones utilizadas y rendimientos de la sulfatación de los triterpenos naturales monohidroxilados.

Compuesto	Lupeol	Pseudotaraxasterol	α/β amirina
mmoles triterp:mmoles SO ₃ .N(Et) ₃	1: 6,5	1: 6	1: 6
Temperatura (°C)	60	60-63	60
Tiempo (horas)	51	5	3
Rendimiento	13%	28.6%	42.5%

El lupeol fue el primer triterpeno con el que se probó la reacción de sulfatación. En un principio, se hizo reaccionar al compuesto con una relación triterpeno/reactivo sulfatante (2:1). Se siguió el curso de la reacción por CCD cada 30 minutos. El resultado siempre indicaba que la sulfatación no se había completado. Por esta razón, se agregó más reactivo sulfatante hasta una relación final de 1:6.5. Finalmente, luego de 51 hs la reacción tampoco se completó.

En las reacciones de sulfatación del pseudotaraxasterol y la mezcla de α/β amirina, se procedió a sulfatarlas utilizando 6 equivalentes de reactivo sulfatante, desde el comienzo de la reacción durante 5 y 3 horas, respectivamente, pero en ambos casos se observó que la reacción tampoco se completaba.

En la tabla 2.9 se muestran los resultados para la sulfatación del calenduladiol, triterpeno dihidroxilado. En este caso dado que se debía disulfatar, se calentó a 65 °C. No se trabajó a

una temperatura mayor porque al contar sólo con unos pocos mg de muestra, era preferible no completar la reacción y evitar la descomposición del producto. Nuevamente los rendimientos obtenidos no fueron buenos. Por RMN ^1H se comprobó que el triterpeno monosulfatado era una mezcla de los compuestos monosulfatados en posición 3β y 16β .

Tabla 2.9: Condiciones utilizadas y rendimientos de la sulfatación del triterpeno natural dihidroxilado calenduladiol.

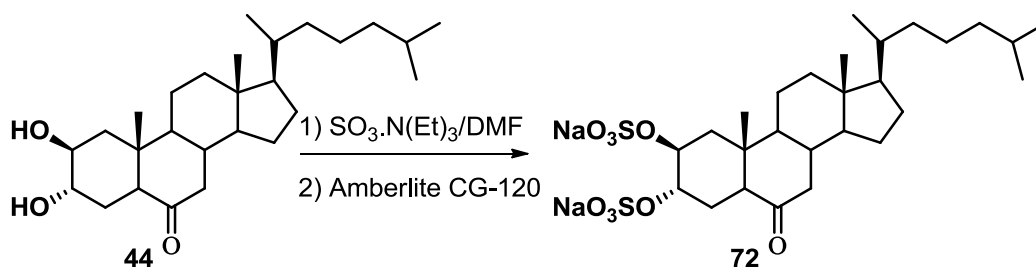
Compuesto	Calenduladiol
mmoles triterp:mmoles $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{Et})_3$	1: 6
Temperatura ($^\circ\text{C}$)	65
Tiempo (horas)	2
Rendimiento	21%
	monosulfatados
	10.3% disulfatado

Los cuatro triterpenos naturales poseen un hidroxilo en posición 3β y dos grupos metilos en C-4. El bajo rendimiento de las reacciones de sulfatación podría atribuirse al impedimento estérico de los metilos en el carbono adyacente. La presencia de éstos podría afectar a la reactividad del hidroxilo ya que el grupo sulfato es muy voluminoso, comparable a un grupo *t*-butilo (Bordwell y Osborne 1959). Posiblemente en todos los casos, trabajando a temperaturas más altas, los rendimientos hubieran mejorado. Sin embargo, por temor a que elimine el sulfato en la posición 3 para dar el correspondiente triterpeno Δ^2 y debido a que se contaba con poca masa, no se continuó con la optimización de las reacciones.

Posteriormente, en el laboratorio de la Dra. A.P. Murray se utilizó el complejo comercial $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$ para sulfatar el calenduladiol. Utilizando 6 equivalentes del complejo a 90°C durante 18 horas, se obtuvo el compuesto disulfatado con un 90% de rendimiento (Vela Gurovic y col. 2010). Este resultado nos impulsaría, más adelante, a utilizar dicho reactivo para sulfatar los esteroides polihidroxilados.

2.3.4 Síntesis de esteroides sulfatados utilizando $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$

En un principio, se utilizó el reactivo sintetizado en nuestro laboratorio para obtener el compuesto $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi- 5α -colestán-6-ona disulfato (**72**) a partir de la $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi- 5α -colestán-6-ona (**44**) (Esquema 2.30).



Esquema 2.30

Se utilizaron las mismas condiciones que las reportadas para el compuesto 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona (**37**) (Tabla 2.7, entrada N° 2, Garrido Santos y col. 2003). Las condiciones de reacción y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2.10.

Tabla 2.10: Condiciones utilizadas y rendimientos de la sulfatación del compuesto **44**.

Esteroides utilizados: 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona (44)	
Sulfatación N° 1	
Relación diol: $\text{SO}_3 \cdot \text{N}(\text{Et})_3$	1: 6,8
Temperatura (°C)	95-98
Tiempo (horas)	32
Calentamiento	Convencional
Rendimiento	30,3% diol
	42% monosulfatados
	15% disulfatado

Como se puede observar en la tabla, los rendimientos obtenidos no fueron satisfactorios, obteniéndose la mezcla de monosulfatados como productos principales. Por lo tanto, como alternativa para mejorar el rendimiento de la reacción es que se decidió probar el calentamiento mediante microondas.

2.3.4.1 Síntesis de esteroides sulfatados utilizando microondas

Si bien los métodos de calentamiento tradicional (baños y mantas calefactoras) son los más utilizados en síntesis orgánica, el calentamiento se produce lentamente y, en consecuencia, pueden generarse gradientes de temperatura dentro del balón de reacción o incluso sobrecalentamientos locales que pueden dar lugar a descomposición de los reactivos y/o productos. Por el contrario, en un reactor de microondas la temperatura aumenta uniformemente ya que la radiación atraviesa las paredes del tubo de reacción. Este calentamiento se produce de manera rápida y es posible reproducir perfiles de

calentamiento que no son fáciles de obtener mediante el calentamiento convencional. Incluso, en tubos de reacción sellados es posible trabajar a altas presiones y acceder a temperaturas mayores que la temperatura de ebullición del solvente a presión atmosférica (Lidström y col. 2001).

En muchos ejemplos de literatura, se observa que en las reacciones que involucran calentamiento por microondas disminuye drásticamente el tiempo de reacción. Simultáneamente, aumenta el rendimiento de la reacción por una disminución en la formación de productos secundarios no deseados, en comparación con los métodos de calentamiento convencionales (Kappe y Dallinger 2009).

En particular, en la síntesis de compuestos polisulfatados, Desai y col. postularon que los intermediarios iónicos sulfatados, además, pueden acoplarse con el campo eléctrico de la radiación de microondas, dando a lugar a un aumento significativo en la velocidad de reacción (Raghuraman y col. 2007).

La primera vez que se probó esta reacción se utilizó un microondas doméstico. Las condiciones se encuentran detalladas en la tabla 2.11. En la sulfatación N° 2 la reacción se llevó a cabo en dos etapas. Entre la primera etapa (10 equivalentes de reactivo sulfatante, 30 minutos a potencia máxima) y la segunda (8,7 equivalentes de reactivo sulfatante, 15 minutos a potencia máxima), la reacción fue finalizada para observar los resultados obtenidos por CCD. Dado que en la primera etapa la reacción no se había completado, se procedió a continuar en una segunda etapa. Los resultados obtenidos luego de la segunda etapa fueron alentadores ya que, si bien el compuesto disulfatado se obtuvo con un rendimiento moderado, fue el producto mayoritario a diferencia de la sulfatación N° 1. Al realizar el calentamiento con un microondas doméstico no era posible controlar de manera precisa las condiciones de reacción ni tampoco conocer la temperatura de reacción. Por ello, se probó la sulfatación en un reactor de microondas (Sulfatación N° 3) en las condiciones que se observan en la tabla. Sin embargo, el rendimiento del producto disulfatado fue muy bajo (23%). La diferencia entre los rendimientos de las sulfataciones N° 2 y N° 3 probablemente se deba a que en la N° 2 se trabajó con un exceso mayor de reactivo sulfatante para verificar si era posible completar la reacción. Mientras que al utilizar el microondas para síntesis, se utilizaron las cantidades reportadas previamente (Garrido Santos y col. 2003).

Tabla 2.11: Condiciones utilizadas y rendimientos de la sulfatación del compuesto **44** utilizando microondas.

Esteroides utilizados: 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona (44)		
	Sulfatación N°2	Sulfatación N°3
Rel. diol: SO ₃ .N(Et) ₃	1°) 1: 10 2°) 1: 8,7	1:7,1
Temperatura (°C)	no medida	160-165
Tiempo	1°) 30 min potencia máxima 2°) 15 min potencia máxima	35 minutos
Calentamiento	Microondas ^a	Microondas ^b
Rendimiento	8.1% diol 25,7% monosulfatados 65,0% disulfatado	Nd Nd 23,2% disulfatado

^a Microondas doméstico. ^b Microondas para síntesis. nd: no se determinó

Con estos resultados, era necesario continuar optimizando la reacción de sulfatación. Con el objeto de mejorar el rendimiento de esta reacción, se probaron diferentes condiciones de síntesis en el reactor de microondas. Para esto se utilizó el diol 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona (**37**) (Garrido Santos y col. 2003) como esteroide modelo. El seguimiento de la reacción de sulfatación se realizó por CCD. Las condiciones probadas se presentan en la tabla 2.12.

Tabla 2.12: Optimización de la reacción de sulfatación utilizando microondas y el esteroide modelo **37**.^a

Esteroides utilizados: 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona (36)					
	Sulfatación N° 4	Sulfatación N° 5	Sulfatación N° 6	Sulfatación N° 7	Sulfatación N° 8
Rel. diol: SO ₃ .N(Et) ₃	1:6	1:6	1:6	1:6	1:10
Temperatura (°C)	190	150	150	160	150
Tiempo (min.)	5	5	7	5	7

^a En todos los casos, el calentamiento fue en un microondas para síntesis

La reacción llevada a cabo a 190 °C (Sulfatación N° 4) no se completó y se obtuvo sólo de manera minoritaria el diol **37** y la mezcla de compuestos monosulfatados. Además, por CCD se observó una mancha muy intensa en el punto de siembra. De aquí se concluye que 190 °C es una temperatura muy alta que conduce a la descomposición del producto.

Las CCD de las sulfataciones N° 5 y 6, realizadas ambas a 150 °C y con diferentes tiempos de reacción, revelaron sólo los productos mono- y disulfatado. En la N° 5 se observaron por CCD ambos productos en relación $\approx 1:1$ pero en la N° 6, que cuenta con 2 minutos más de reacción, se observó mayoritariamente el producto disulfatado.

Por último, se probó aumentar en 10 °C la temperatura de reacción (Sulfatación N° 7) y la relación entre el reactivo sulfatante y el esteroide (Sulfatación N° 8) respecto de la N° 6, para verificar si la reacción se completaba. Efectivamente, esto se observó con el aumento del reactivo sulfatante, rindiendo exclusivamente el producto disulfatado.

Por lo tanto, se probaron las condiciones de la sulfatación N° 8 con el compuesto $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**). Sin embargo, el rendimiento fue de un 55%. Este rendimiento, si bien es moderado, nos alentó a cambiar el reactivo sulfatante a fin de obtener mejores resultados.

2.3.5 Síntesis de esteroides sulfatados utilizando $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$

Dado el antecedente en la mejora del rendimiento de la sulfatación de los triterpenos pentacíclicos con el complejo comercial $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$, se decidió utilizar dicho reactivo para la sulfatación de los esteroides. En la tabla 2.13 se presentan las condiciones de reacción con calentamiento convencional (Sulfatación N° 9) y con microondas (Sulfatación N° 10).

Tabla 2.13: Condiciones utilizadas y rendimientos de la sulfatación del compuesto **44** utilizando el reactivo comercial $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$.

Esteroides utilizados: $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona		
	Sulfatación N°9	Sulfatación N°10
Relación diol: $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{Me})_3$	1: 6,5	1:8
Temperatura (°C)	95-100	150
Calentamiento	Convencional	Microondas ^a
Tiempo de reacción	15 hs	7 minutos
Observaciones	monosulfatados mayoritarios diol y disulfatado minoritarios	92% disulfatado

^a Microondas para síntesis

En la sulfatación N° 9 se utilizaron las condiciones reportadas para la síntesis del compuesto $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi-5 α -colestano disulfato (**37**) (Garrido Santos y col. 2003) pero se observó por CCD que los compuestos monosulfatados eran los mayoritarios (Sulfatación N°9). En la sulfatación N° 10 se utilizó el calentamiento con microondas en las condiciones

previamente optimizadas en la Sulfatación N°8 (Tabla 2.12). En este caso, como se esperaban mejores resultados con el $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{Me})_3$, se decidió bajar la relación de equivalentes entre el esteroide y el reactivo sulfatante de 1:10 a 1:8. En estas condiciones (Sulfatación 10, tabla 2.13) finalmente fue posible obtener el compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestán-6-ona-2,3-disulfato (**72**) con un excelente rendimiento (92%).

En la figura 2.44 se presenta el espectro de RMN ^1H del compuesto **72** y el de su análogo desulfatado (**44**). Ambos espectros son similares y las únicas señales que varían significativamente son las de los hidrógenos geminales a los grupos sulfato. También se observan variaciones en los desplazamientos químicos de los metilenos en C-1 y C-4, como se puede observar en el anexo de la tesis. En cuanto a las demás señales, incluso las correspondientes al Me-19 y al H-5 α , no presentan variaciones significativas. Por último, la asignación del compuesto **72** se realizó de manera análoga a la comentada para el compuesto **44**.

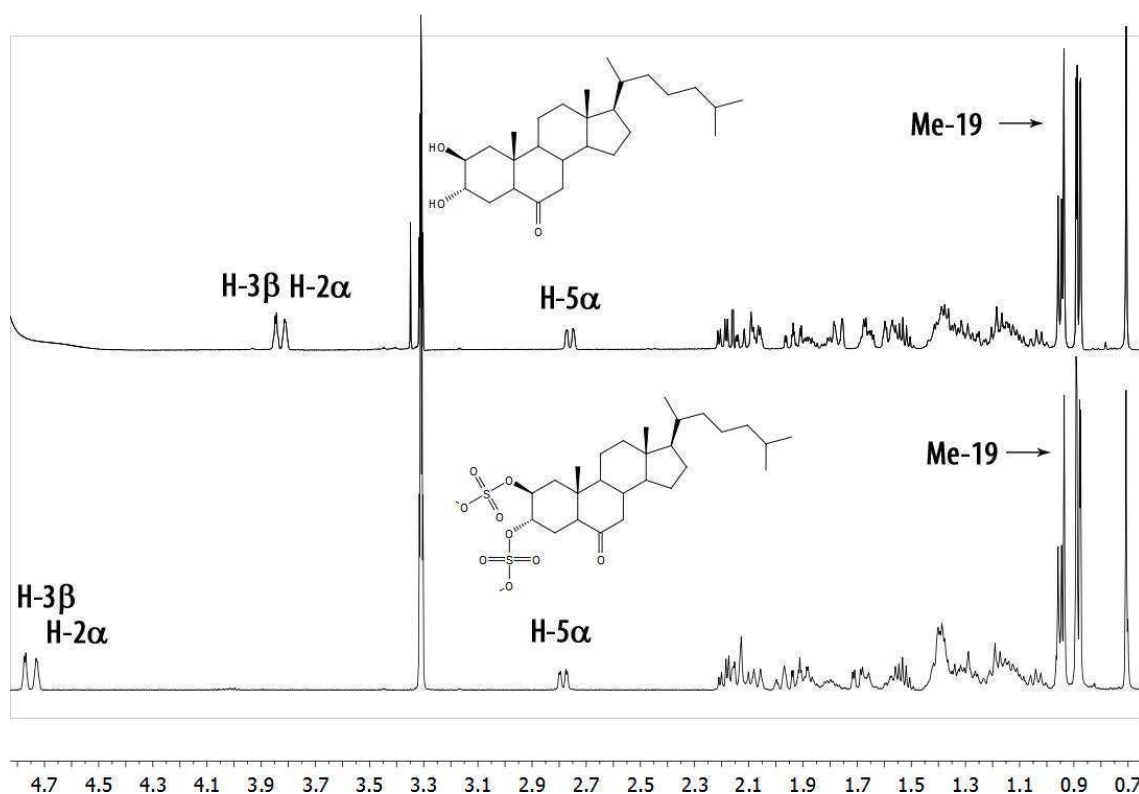


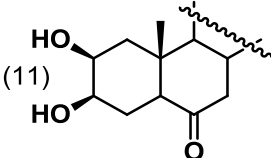
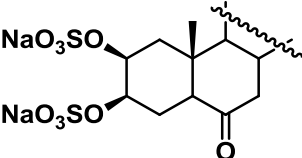
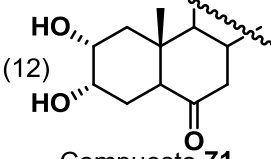
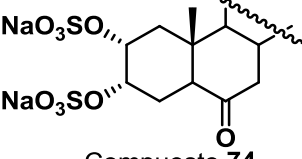
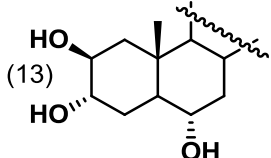
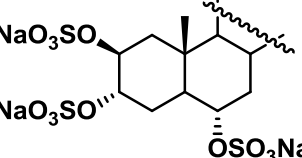
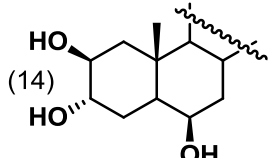
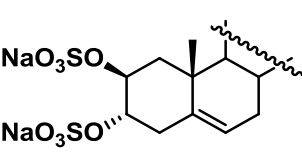
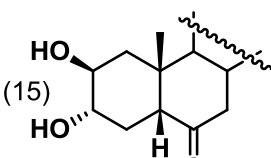
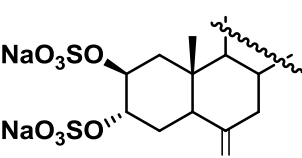
Figura 2.44: Espectro de RMN ^1H de los compuestos **44** y **72** en CD_3OD

Utilizando las condiciones de la sulfatación N° 10 se obtuvieron los esteroides disulfatados **73** y **74** a partir de los correspondientes alcoholes **70** y **71**. En las entradas N° 11

Capítulo 2: Síntesis de análogos de esteroides sulfatados

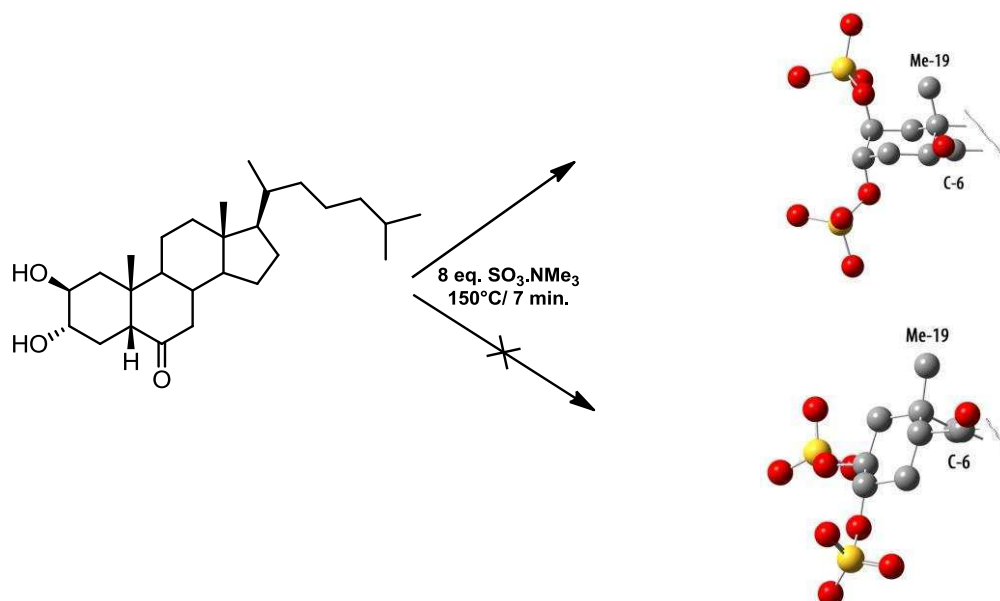
y N° 12 de tabla 2.14, se detallan las condiciones de reacción y los rendimientos para cada uno de ellos.

Tabla 2.13: Condiciones utilizadas y rendimientos de la sulfatación de los compuestos polihidroxilados sintetizados durante este trabajo de tesis.

Esteroides de partida (Sulfatación N°)	Producto de la sulfatación ^a	esteroide/ SO ₃ .N(CH ₃) ₃ (mmoles)	Tiempo (min)	Temp (°C)	% Rto
(11)  Compuesto 70	 Compuesto 73	1:8	7	150	79,5
(12)  Compuesto 71	 Compuesto 74	1:8	7	150	77,6
(13)  Compuesto 43	 Compuesto 24	1:15	9	150	76
(14)  Compuesto 66	 Compuesto 75	1:20	7	150	38
(15)  Compuesto 67	 Compuesto 72	1:8	7	150	84

^aLas sales de amonio se convirtieron a las correspondientes sales de sodio por pasaje a través de una resina de intercambio catiónico en la forma sodio.

Cabe destacar que la sulfatación de la 2β,3α-dihidroxi-5β-colestan-6-ona (**67**) no rindió el diol sulfatado correspondiente (**72'**) sino que se obtuvo la 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona disulfato(**72**) con un 88% de rendimiento, tal como se observa en el esquema 2.31.



Esquema 2.31

Es decir, la reacción de sulfatación estuvo acompañada por la epimerización del H-5. Esto podría deberse a que en el isómero con el H-5 α (**72**) la distancia entre los dos grupos sulfato en posición axial es mayor que la que hay cuando ambos grupos se encuentran en posición pseudoecuatorial, disposición que tendrían en isómero **72'**.

En el caso de las trisulfataciones (Sulfatación N° 13 y 14) se aumentó la cantidad de reactivo sulfatante de 1:8 a 1:15 y 1:20, respectivamente, dado que era necesario sulfatar tres grupos hidroxilo. Se utilizó una mayor relación para la sulfatación del compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (**66**) (Sulfatación N° 14) debido a que se esperaba que la trisulfatación se viera dificultada dado que el Me-19 del producto **76** posee dos interacciones 1,3-diaxial con los grupos sulfato en C-2(β) y C-6(β) (Figura 2.45).

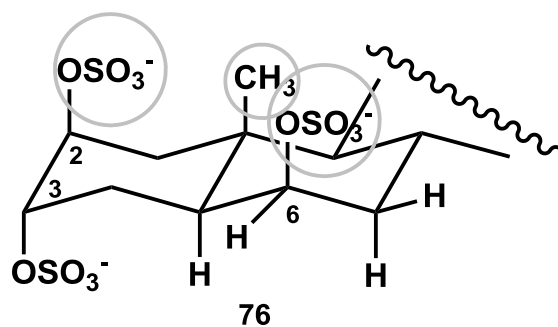


Figura 2.45

Sin embargo, en el caso particular del compuesto $2\beta,3\alpha,6\beta$ -trihidroxi- 5α -colestano (**66**), al intentar sulfatarlo en las condiciones que se indican en la tabla (Sulfatación N° 14), se obtuvo una mezcla de productos en donde el mayoritario era el $2\beta,3\alpha$ -dihidroxicolest-5-eno disulfato (**75**), producto de la eliminación del grupo sulfato axial en posición 6. En la figura 2.46 se presenta el espectro HSQC del producto de eliminación. Se observan las señales de los protones geminales a los grupos sulfato en C-2(β) (4,78 ppm) y C-3(α) (4,72 ppm) que correlacionan con las señales de los carbonos a 75,86 y 76,13 ppm, respectivamente. Así mismo, se observa una correlación entre un ^1H a 5,35 ppm y un ^{13}C a 123,61 ppm de la olefina. En el espectro de RMN ^{13}C se evidencian ambos carbonos olefínicos, siendo la señal a 138,86 ppm la correspondiente al C-5.

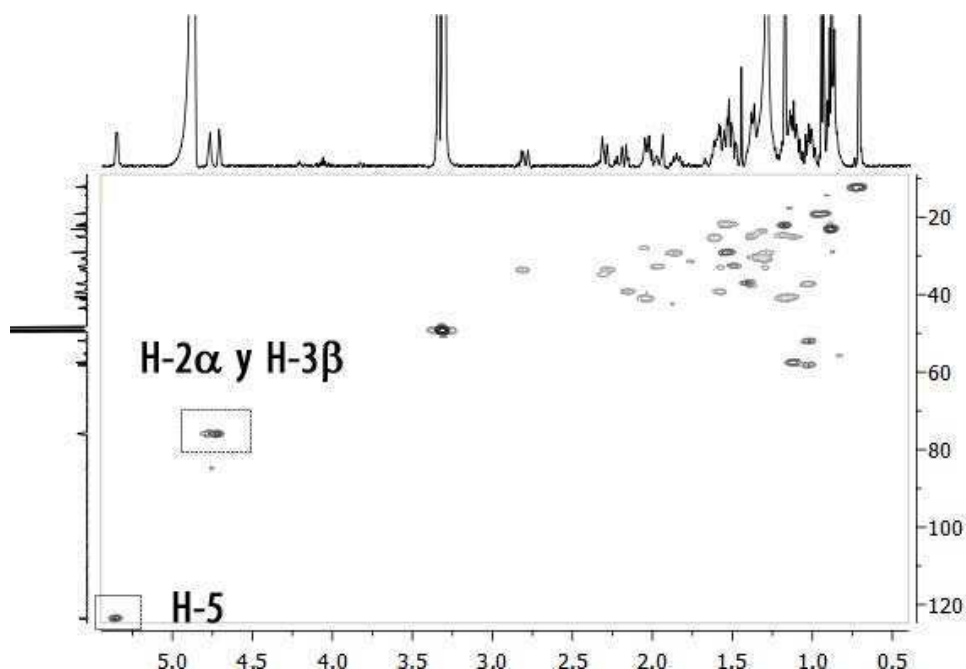


Figura 2.46: Espectro HSQC del compuestos **75** en CD_3OD

La olefina Δ^5 se asignó en base a correlaciones en el espectro HMBC (Figura 2.47). Se observa que los protones correspondientes al Me-19 (1,17 ppm), al H- 3β y al H- 1β (2,15 ppm) correlacionan con el C-5 a 138,86 ppm, mientras que el H- 4α , con el C-6 a 123,61 ppm. Estas correlaciones permitieron determinar la posición del doble enlace entre los C-5 y C-6. Por último, la eliminación del sulfato en C-6 para dar la olefina en posición 5,6 es coherente con los datos de estabilidad de olefinas esteroideas que indican que las Δ^5 son las más estables (Turner y col. 1957).

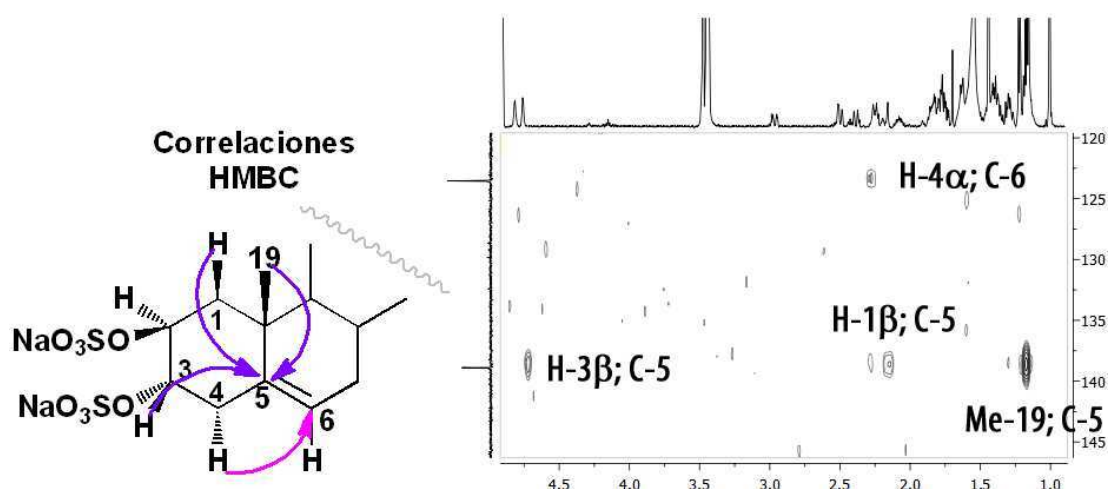


Figura 2.47: Espectro HMBC del compuesto **75** en CD_3OD

La asignación de los protones geminales a los grupos sulfato se realizó en base a correlaciones en el espectro COSY (Figura 2.48). El H-2(α) presentó correlaciones con ambos H-1 (1,57 y 2,15 ppm) y, análogamente, el H-3(β), con ambos hidrógenos correspondientes a C-4 (2,28 y 2,80 ppm).

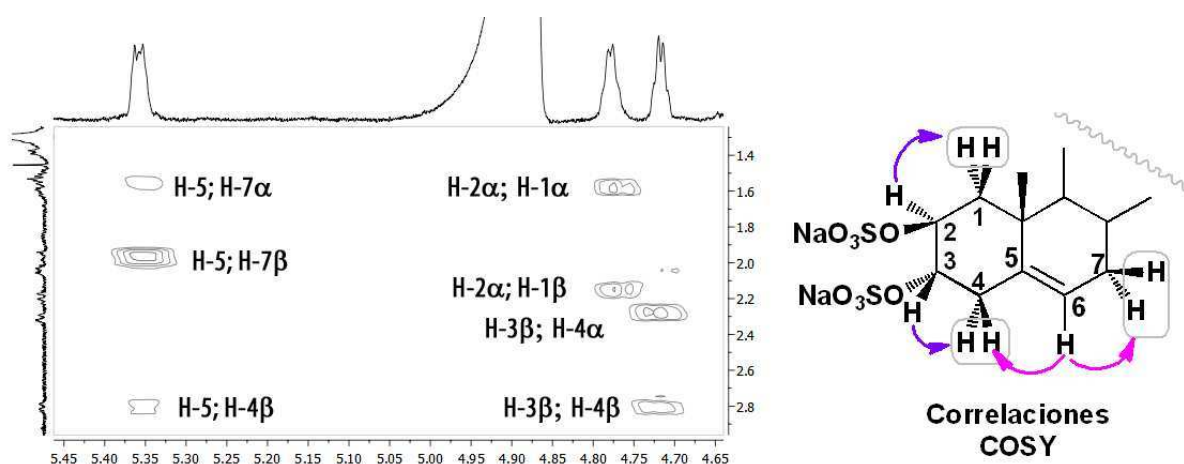
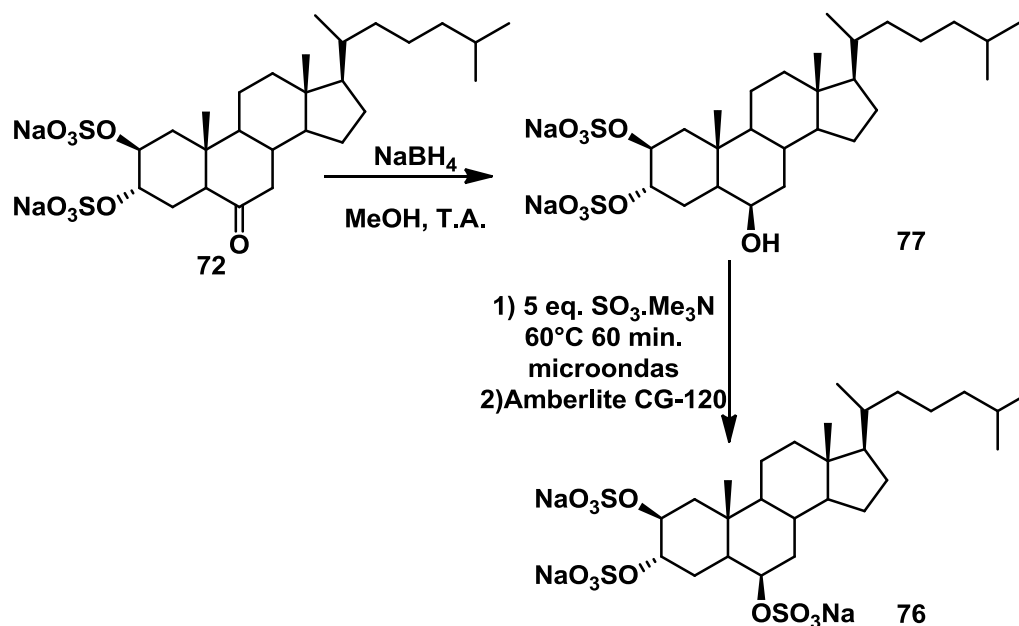


Figura 2.48: Espectro COSY del compuesto **75** en CD_3OD

2.3.5.1 Síntesis del compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**):

Con el objeto de evitar la eliminación del grupo sulfato axial en C-6, se desarrolló una nueva estrategia partiendo del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**72**). La clave residía en partir del compuesto carbonílico disulfatado **72**, el cual se obtiene en condiciones de sulfatación enérgicas (150 °C) y luego, sulfatar el hidroxilo 6 β en condiciones más suaves. La síntesis propuesta se muestra en el esquema 2.32. Comprende la reducción del compuesto disulfatado **72** con NaBH_4 en metanol, para dar el 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -

colestano-2,3-disulfato (**77**) y luego sulfatar el grupo hidroxilo en C-6(β), para obtener el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**).



Esquema 2.32

En principio, la reducción del carbonilo del esteroide disulfatado **72** se realizó mediante el agregado de una solución metanólica de NaBH_4 a la solución del esteroide. Sin embargo, no se observó reacción utilizando la cantidad de miliequivalentes de NaBH_4 necesarios para la reducción del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**) (Tabla 2.15). Realizando agregados adicionales de la solución de NaBH_4 en metanol, la reacción tampoco se completaba.

Tabla 2.15: Comparación de condiciones utilizadas y rendimientos de la reducción de los compuestos carbonílicos **44** y **72** con NaBH_4 .

Compuesto carbonílico	meq NaBH_4	% Rendimiento
44	1,3	87
72	1,3	0
	$\approx 2,6$	97

T.A.

Finalmente, se logró la reducción de la cetona del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestán-6-ona disulfato (**72**) trabajando con un exceso del reductor mediante el agregado de NaBH₄ sólido a la solución del esteroide disulfatado (Tabla 2.15).

La explicación de la baja reactividad del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestán-6-ona disulfato (**72**) frente al reductor podría atribuirse a la repulsión electrostática entre el BH₄⁻ y el esteroide que posee dos cargas negativas debido a los grupos sulfato. En particular, el sulfato 3 α se encuentra en la misma cara por la que se acerca el BH₄⁻, dada la inducción asimétrica del Me-19 (Dauben y col. 1956a, Dauben y col. 1956b, Barton y Morrison 1961).

Si bien el producto de reducción se obtuvo con excelente rendimiento (97%), el aislamiento del compuesto **77** presentó cierta dificultad. Las primeras veces que se realizó esta reducción, al finalizar la reacción y destruir de manera clásica el exceso de NaBH₄ (medio ácido y exceso de metanol), se observaba la desulfatación parcial de los grupos sulfato en C-2(β) y C-3(α) durante su purificación. Por lo tanto, para obtener el compuesto **77** con buen rendimiento se requirió un cuidadoso control del pH del medio durante su aislamiento.

El producto de la reducción, el alcohol **77**, mostró en el espectro de RMN ¹H la presencia de un nuevo multiplete a 3,53 ppm que correlacionaba en el espectro HSQC (Figura 2.49) con una nueva señal a 69,74 ppm, típica de un carbono unido a un grupo alcohol.

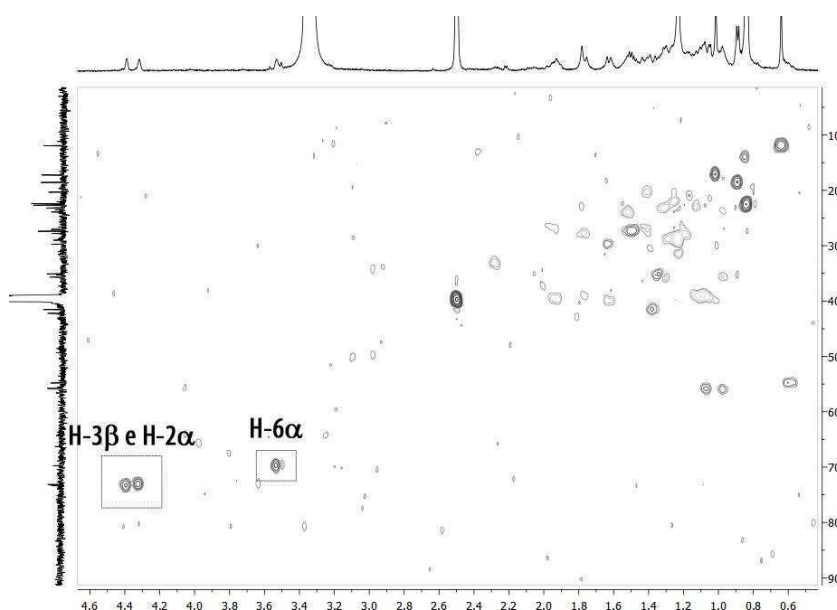


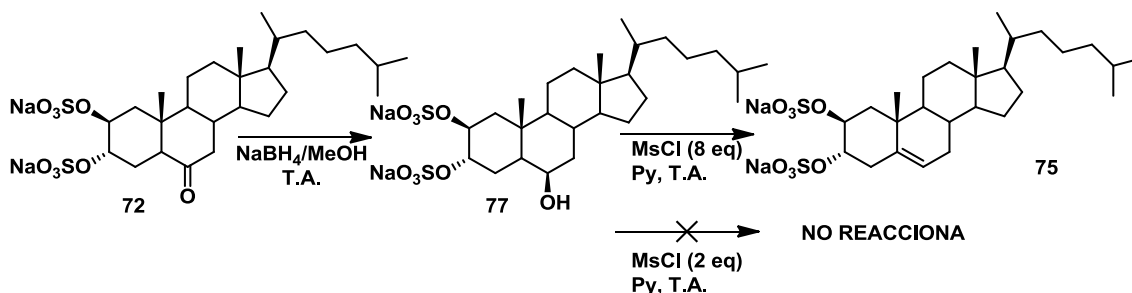
Figura 2.49: Espectro HSQC del compuestos **77** en DMSO-*d*₆

Además, se observaron dos multipletes a 4,30 y 4,37 ppm que correlacionaban con los carbonos a 73,16 y 76,38 ppm correspondientes a C-2(β) y C-3(α). Por otro lado, se confirmó la reducción del carbonilo por la ausencia de la señal a aproximadamente 210 ppm en el espectro de RMN ^{13}C .

La configuración β del grupo alcohol se confirmó a partir de la correlación entre las señales correspondiente al H-6 (3,53 ppm) y el H-4 α (1,44 ppm), en el espectro NOESY.

2.3.5.2 Sulfatación del 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (**77**)

El próximo paso consistía en la sulfatación del compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (**77**). Es necesario realizar este paso en condiciones muy suaves ya que el grupo sulfato en C-6(β) se elimina fácilmente para dar la olefina entre los C-5 y C-6. De hecho, un sustituyente en posición 6 β (axial), que pueda actuar como buen grupo saliente, es muy susceptible a la eliminación para dar un doble enlace Δ^5 . Este comportamiento también se observó al intentar sintetizar el compuesto 6 β -mesiloxi-2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano disulfato a partir de **77**. Aún a temperatura ambiente se obtuvo el esteroide Δ^5 como producto final de la reacción (Esquema 2.33).



Esquema 2.33

En la literatura hay antecedentes de sulfatación de grupos hidroxilo en C-6(β) realizados a 95 °C durante 3 hs, con rendimientos de alrededor del 60% (Tabla 2.7, entrada N° 1, Cui y col. 2009). En nuestro caso, se decidió trabajar a una temperatura menor a la reportada por Cui y col. para minimizar la reacción de eliminación y obtener mejores rendimientos. De acuerdo a esto, la reacción se llevó a cabo utilizando 5 equivalentes del complejo $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$ y calentando a 60°C durante 1 hora en un reactor de microondas. El tiempo de reacción fue mucho mayor al que se utilizó en las sulfataciones anteriores (7 minutos) debido a la menor temperatura de reacción. Una vez obtenido el producto de la sulfatación, se lo transformó en la correspondiente sal de sodio utilizando una resina de intercambio

catiónico. En estas condiciones, se obtuvo el compuesto trisulfatado **76** con muy buen rendimiento, según se observó por CCD. Sin embargo, luego de su purificación por cromatografía en fase normal, el rendimiento fue de un 42% y se obtuvo aproximadamente un 50% de un compuesto o mezcla de compuestos con el mismo R_f que el del compuesto de partida 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (**77**).

Es factible que el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**) se haya desulfatado en contacto con la sílica, debido a su carácter ácido (Liang y col. 2009). Por esta razón se repitió la reacción y se purificó el producto por HPLC utilizando sílica de fase reversa (columna AQUA 5 μ C18 125A de Phenomenex). De este modo, fue posible obtener satisfactoriamente el compuesto **76**, con un rendimiento del 88 %.

En la Figura 2.50 se muestra el espectro de RMN ^1H del compuesto trisulfatado **76**. En una de las ampliaciones del espectro se observan las señales de los hidrógenos geminales a los grupos sulfatos, todas con la misma multiplicidad debido a su posición ecuatorial. Su asignación se realizó de manera análoga a la descrita para el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (**66**)

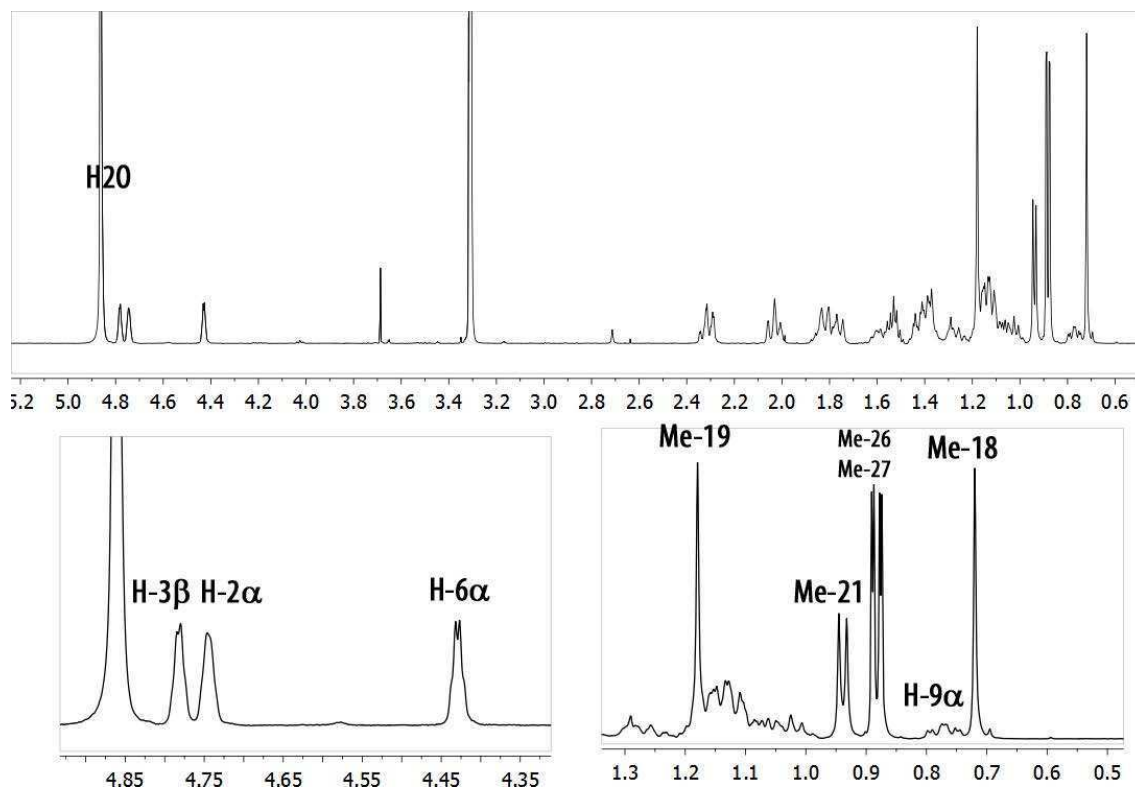


Figura 2.50: Espectro de RMN ^1H del compuestos **76** en CD_3OD

2.4 Conclusiones

Si bien la síntesis de los compuestos sulfatados presentó dificultades, una vez que se conoce y comprende la sensibilidad de los grupos sulfato al medio ácido, la labilidad de un buen grupo saliente en C-6(β) y la capacidad de epimerización del H-5 de acuerdo a la configuración de los grupos en C-2 y C-3, este tipo de compuestos se pueden obtener de manera sencilla, utilizando reactivos muy accesibles. Por otra parte, la optimización del calentamiento con microondas redujo drásticamente los tiempos de reacción (7-9 minutos vs. 3 hs a 10 días).

Entre los compuestos polihidroxilados, esta es la primera vez que se reportó la síntesis de los compuestos 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**), su análogo disulfatado **72** y su epímero en C-5: el diol 2 β ,3 α -dihidroxi-5 β -colestano-6-ona (**67**) (Richmond y col. 2013; Richmond y col. 2011), así como la síntesis del compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (**66**) y sus análogos di- y trisulfatados (compuestos **77** y **76**, respectivamente) (Richmond y col. 2013). Por último, si bien el compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**24**) había sido sintetizado previamente, su estructura no fue caracterizada por métodos espectroscópicos (Murphy y col. 2006). Durante este trabajo de tesis se caracterizaron por primera vez todos los intermediarios de su síntesis y el producto final **24** (Richmond y col. 2013).

Si bien la síntesis de los dioles 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**70**) y 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**71**) ya se encontraba reportada (Thompson y col. 1982; Wiechert y col. 1966), durante este trabajo de tesis se sintetizaron por primera vez sus análogos sulfatados (**73** y **74**) (Richmond y col. 2013).

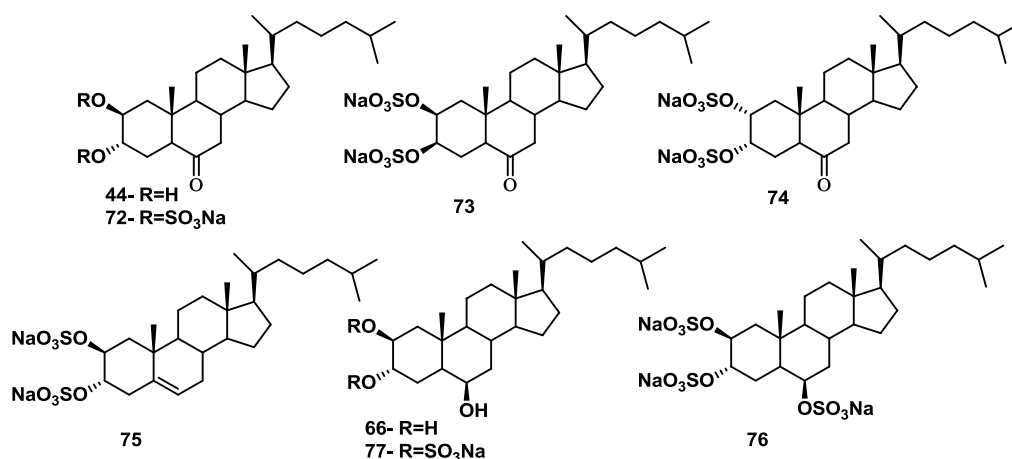


Figura 2.51: Compuestos nuevos sintetizados durante el trabajo de tesis.

2.5 Referências Bibliográficas

- Aburatani, M; Takeuchi, T; Mori, K. A simple synthesis of steroidal 3 α ,5-cyclo-6-ones and their efficient transformation to steroidal 2-en-6-ones. *Synthesis* **1987**; 2: 181-3.
- Ahmad, MS; Khan, IA. The Baeyer-Villiger oxidation of 5 α -cholestane-3,6-dione. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **1981**; 106: 111
- Anagnostopoulos, CE; Fieser, LF. Nitration of unsaturated steroids. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**; 76(2): 532-6.
- Apotheker, D; Owades, JL; Sobel, AE. The influence of the 5,6-double bond on the pyridine 7-sulfates of cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**; 76: 3684-6.
- Arnostová, LM; Pouzar, V; Drasar, P. Synthesis of the sulphates derived from 5 α -cholestane-3 β ,6 α -diol. *Steroids* **1992**; 57: 233-5.
- Balci, M. *Basic ¹H and ¹³-NMR spectroscopy*. **2005**: pag. 70-1. Editorial Elsevier.
- Barton, DHR. The stereochemistry of cyclohexane derivatives. *J. Chem. Soc.* **1953**: 1027-40.
- Baran, JS. Notes- method for the cleavage of osmate esters. *J. Org. Chem.* **1960**; 25: 257-7.
- Barton, DHR; Morrison, GA. Conformational analysis of steroids and related natural products. *Prog. Ch. Org. Nat. Prod.* **1961**; 19: 165-241.
- Becker H, Soler MA, Sharpless KB. Selective asymmetric dihydroxylation of polyenes. *Tetrahedron* **1995**; 51: 1345-76.
- Beynon, IM; Heilbron, JH; Springs, FS. Studies in the sterol group. Part XXIX. The constitution of the isomeric ethers of cholesterol. *J. Chem. Soc.* **1937**; 406-9.
- Bordwell, FG; Osborne, CE. Sulfonation of olefins. viii. formation of unsaturated sulfonic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**; 81: 1995-2000.
- Carvalho, JFS; Cruz Silva, MM; Moreira, JN; Simoes, S; Sá e Melo, ML. Sterols as anticancer agents: synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. *J. Med. Chem.* **2010**; 53: 7632-8.
- Comin, MJ; Maier, MS; Roccatagliata, AJ; Pujol, CA; Damonte, EB. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs. *Steroids* **1999**; 64: 335-40.
- Corey, EJ; Sreen, RA. Calculation of molecular geometry by vector analysis. Application to six-membered alicyclic rings. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**; 77(9): 2505-9.
- Cui, J; Wang, H; Huang, Y; Zhou, A. Synthesis and cytotoxic analysis of some disodium 3 β ,6 β -dihydroxysterol disulfates. *Steroids* **2009**; 74: 1057-60.
- Dauben, WG, Blanz, GE; Jiu, J; Micheli, RA. The Stereochemistry of the hydride reduction of some steroidal ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1956a**; 78: 3752-5
- Dauben, WG; Fonken, GJ; Noyce, DS.: The Stereochemistry of hydride reductions. *J. Am. Chem. Soc.* **1956b**; 78: 2579-82.
- Dodson, RM; Riegel, B. The stereochemistry of the *i*-steroids and their transformation products. *J. Org. Chem.* **1948**; 13(3): 424-37.

- Festa, C; De Marino, S; D'Auria, MV; Bifulco, G; Renga, B; Fiorucci, S; Petek, S; Zampella, A. Solomonsterols A and B from *Theonella swinhoei*. The first example of C-24 and C-23 sulfated sterols from marine source endowed with a PXR agonistic activity. *J. Med. Chem.* **2011**; 54: 401-5.
- Fieser, LF; Fieser, M. *Steroids*. Reinhold Publ. Corp. **1959**. Nueva York
- Fieser, L. Δ^4 -Cholesten-3,6-dione. *Org. Synth. Coll.* **1963**; Vol.4: 189-90.
- Ford, EG; Wallis, ES. Molecular rearrangements in the sterols. ii.the constitution of the isomeric ethers of cholesterol. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**; 59 (8): 1415-6
- Furst A, Plattner PA. Uber sterioide und sexualhormone $2\alpha,3\alpha$ - und $2\beta,3\beta$ -Oxido-cholestane; Konfiguration der 2-oxy-cholestane. *Helv. Chim. Acta* **1949**; 32: 275-83.
- Gan, C; Cui, J; Huang, Y; Jia, L; Wei, W. Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal lactone compounds. *Steroids* **2012**; 77: 255-9.
- Garrido Santos, GA; Murray, AP; Pujol, CA; Damonte, EB; Maier, MS. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of $2\beta,3\alpha$ -dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids* **2003**; 68: 125-32.
- Gilbert, EE. The reactions of sulfur trioxide, and its adducts, with organic compounds. *Chem. Rev.* **1962**; 62(6): 549-89.
- Goad, LJ; Akihisa, T. *Analysis of sterols* **1997**. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, Cornwall.
- Hafez, MM; Halsey, Jr. G; Wallis, ES. Molecular rearrangements in the sterols; the mechanism of formation of *i*-cholesterol. *Science* **1949**; 110: 474-6.
- Hanack, M; Schneider, HJ. Neighboring-group effects and rearrangements in reactions of cyclopropylmethyl, cyclobutyl and homoallyl systems. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **1967**; 6 (8): 666-77.
- Heilbron, JH; Beynon, IM; Springs, FS. Studies in the sterol group. Part XXV. An investigation of some reactions of the isomeric ethers of cholesterol. *J. Chem. Soc.* **1936**; 907-10.
- Holden, GW; Levi, I; Bromley, R. Sodium testosterone sulfate. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**; 71: 3844.
- Horváth, A; Skoda-Földes, R; Mahó, S; Berente, Z; Kollár, L. Facile ring opening of 2,3-epoxy-steroids with aromatic amines in ionic liquids. *Steroids* **2006**; 71: 706-11.
- House, HO. *Modern synthetic Reactions, 2da edición* **1972a**. Benjamin, Menlo Park, CA: pag. 321.
- House, HO. *Modern synthetic Reactions, 2da edición* **1972b**. Benjamin, Menlo Park, CA: Capítulo 3.
- Iida, T; Momose, T; Tamura, T; Matsumoto, T; Chang, F; Goto, J; Nambara, T. Potential bile acid metabolites. 13. Improved routes to $3\beta,6\beta$ - and $3\beta,6\alpha$ -dihydroxy-5 β -cholanoic acids. *J. Lipid Res.* **1988**; 29: 165-71.
- Jandik, KA; Kruep, D; Cartier, M; Linhardt, RJ. Accelerated stability studies of heparin. *J. Pharm. Sci.* **1996**; 85: 45-51.

- Jeong, KS; Sjö, P; Sharpless, KB. Asymmetric dihydroxylation of enynes. *Tetrahedron Lett.* **1992**; 33: 3833-6.
- Josien, Fuson, and Cary, Infrared spectroscopy of compounds having biological interest. I. A comparative study of normal and *i*-steroids. *J. Am. Chem Soc.* **1951**; 73: 4445-9.
- Kanazawa, S; Fusetani, N; Matsunaga, S. Halistanol sulfates A-E, new steroid sulfates, from a marine sponge, *Epipolasis* sp. *Tetrahedron* **1992**; 48(26): 5467-72.
- Kappe, CO; Dallinger, D. Controlled microwave heating in modern organic synthesis: highlights from the 2004–2008 literature. *Mol. Divers.* **2009**; 13: 71–193.
- Krow, GR. *The Baeyer Villiger oxidation of ketones and aldehydes. Organic Reactions* Vol. 43. **1993**; capítulo 3. Editorial John Wiley & Sons.
- Liang, A; Thakkar, JN; Desai, UR. Study of physico-chemical properties of novel highly sulfated, aromatic, mimetics of heparin and heparan sulfate. *J. Pharm. Sci.* **2009**; 99(3): 1207-16.
- Lidström, P; Tierney, J; Wathey, B; Westman, J. Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron* **2001**; 57: 9225-83.
- MacKenna, J; Norymberski, JK. Steroid sulphates. Part I. Some solvotic reactions of the salts of steroids sulphates. *J. Chem. Soc.* **1957**: 3889-93.
- Makar'eva, TN; Gorshkova, IA; Gorshkov, BA; Kalinovskii, AI; Stonik, VA. Steroids compounds of marine sponges. VII. Preparation of derivatives of sokotrasterol and halistanol sulfates and struture-activity interrelationships among these compounds. *Chem. Nat. Prod.* **1986**; 22(4): 411-5.
- Mencarelli, A; D'Amore, C; Renga, B; Cipriani, S; Carino, A; Sepe, V; Perissutti, E; D'Auria, MV; Zampella, A; Distrutti, E; Fiorucci, S. Solomonsterol a, a marine pregnane-X-receptor agonist, attenuates inflammation and immune dysfunction in a mouse model of arthritis. *Marine Drugs* **2014**; 12: 36-53.
- Mumma, RO. Preparation of sulfate esters. *Lipids* **1966**; 1: 221-3.
- Mumma, RO; Fijitani, K; Hoiberg, CP. Dicyclohexylcarbodiimide-mediated sulfation of alkanethiols. New method for preparation of organic thiosulfates. *J. Chem. Eng. Data* **1970**; 15: 358-9.
- Murphy M., Larrivée B., Pollet I., Craig KS., Williams DE. et al. Identification of sokotrasterol sulfate as a novel proangiogenic steroid. *Circ. Res.* **2006**; 99: 257-65.
- Nightingale, D; Janes, JR. Mechanism of alkaline hydrolysis of cyclic and acyclic sulfates: an ab initio study with solvation correction. *J. Am. Chem. Soc.* **1944**; 66: 352-4.
- Ono, N. *The nitro group in organic synthesis.* **2001**; capítulo 3: pag. 38. Editorial Wiley-VCH.
- Raghuraman, A; Riaz, A; Hindle, M; Desai, UR. Rapid and efficient microwave-assisted synthesis of highly sulfated organic scaffolds. *Tetrahedron Lett.* **2007**; 48: 6754-8.
- Ramirez, JA; Gros, EG; Galagovsky, LR. Effects on bioactivity due to C-5 heteroatom substituents on synthetic 28-homobrassinosteroid analogs. *Tetrahedron* **2000**; 56: 6171-80.
- Ramirez, J; Brosa, C; Galagovsky, LR. Synthesis and bioactivity of C-29 brassinosteroid analogues with different functional groups at C-6. *Phytochemistry* **2005**; 66: 581–7.

- Rezabkova, B; Hora, J; Landa, V; Cerny, Y; Sorm F. On steroids. CXIII. Sterilizing effect of some 6-ketosteroids on housefly/*Musca domestica* L. *Steroids* **1968**; 11: 475-96.
- Richmond, V; Murray, AP; Maier, MS. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of polyhydroxylated sulfated steroids: structure/activity studies *Steroids* **2013**; 78(11): 1141-7.
- Richmond, V; Garrido Santos, G; Murray, AP; Maier, MS. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of 2 β ,3 α -disulfoxy-5 α -cholestan-6-one. *Steroids* **2011**; 76: 1160–5.
- Roccatagliata, AJ; Maier, MS; Seldes, AM; Pujol, C; Damonte, EB. . Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid *Ophioplocus januarii*. *J. Nat. Prod.* **1996**; 59: 887-9
- Roccatagliata, AJ; Maier, MS; Seldes, AM. New Sulfated Polyhydroxysteroids from the Antarctic Ophiuroid *Astrotoma agassizii*. *J. Nat. Prod.* **1998**; 61: 370-4.
- Schlecht, M. *Comprehensive Organic Chemistry* 5th Edition **2005**. Elsevier.
- Sepe, V; Ummarino, R; D'Auria, MV; Mencarelli, A; D'Amore, C; Renga, B; Zampella, A; Fiorucci, S. Total synthesis and pharmacological characterization of solomonsterol A, a potent marine pregnane-X-receptor agonist endowed with anti-inflammatory activity. *J. Med. Chem.* **2011**; 54: 4590-99.
- Shoppee, WC; Summers, HR. Steroids and walden inversion. Part VII. The stereochemistry and the mechanism of the *i*-steroid rearrangement. *J. Chem. Soc.* **1952**: 3361-74
- Silverstein, R; Webster, F. *Spectrometric identification of Organic Compounds*. 6th Edition **1998**. Editorial Wiley
- Simonetta, M; Winstein, S. Neighboring carbón and hydrogen. XVI. 1,3-Interactions and homoallylic resonance. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**; 76(1): 18-21.
- Smith, MB. *Organic Synthesis*. 2da edición **2002**: pag. 235. Editorial Mc Graw-Hill.
- Sobel, AE; Spoerri, PE. Steryl sulfates. I. Preparation and properties. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**; 63: 1259.
- Sun, Q; Cai, S; Peterson, BR. Practical synthesis of 3 β -amino-5-cholestene and related 3 β -halides involving *i*-steroids rearrangements. *Org. Lett.* **2009**; 11(3): 567-70.
- Takatsuto, S; Ikekawa, N. Synthesis of 5 α -cholestan-6-one derivatives with some substituents at the c-1, c-2, or c-3 position. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**; 35(3): 986-95.
- Thompson, MJ; Robbins, WE; Kaplanis, JN; Cohen, CF; Lancaster, SM. Synthesis of analogs of α -ecdysone. A simplified synthesis of 2 β ,3 β ,14 α -trihydroxy-7-en-6-one-5 β -steroids. *Steroids* **1970**; 16(1): 85-104.
- Thompson, MJ; Meudt, WJ; Mandava, B; Dutky, SR; Lusby, WR; Spaulding, DW. Synthesis of brassinosteroids and relationship of structure plant growth-promoting effects. *Steroids* **1982**; 39(1): 89-105.
- Tschesche, R. Zur isomerie der ketone im ring B des cholesterin-ringsystems. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. A/B* **1932**; 65: 1842–5.
- Turner, RB; Meador, WR; Winkler, RE. Heats of hydrogenation. II. Heats of hydrogenation and the acid-catalyzed isomerization of some unsaturated steroids. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**; 79 (15): 4122-7

- Vela Gurovic, MS; Castro, MJ; Richmond, V; Faraoni, MB; Maier, MS; Murray, AP. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chuquiraga erinacea* d. don. subsp. *erinacea* (asteraceae). *Planta Med.* **2010**;76(6): 607-610.
- Velgova, H; Cerny, V; Sorm, F; Slama, K. On steroids. CXXVI. Further compounds with antisclerotization effect on *Pyrrhocoris apterus* L. larvae; Structure and activity correlations. *Collect. Czech. Chem. C.* **1969**; 34: 3354-75.
- Velgova, H; Cerny, V; Sorm, F. On steroids. CXXXVI. Effect of 17-substituent in base-catalyzed equilibration of steroidal 2 β ,3 β -disubstituted 6-ketones. *Collect. Czech. Chem. C.* **1972**; 37: 1015-34.
- Wagner, AF; Wallis, ES. Molecular rearrangements in the sterols. VI. The preparation of epi-i-cholesterol and its acid rearrangement products. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**; 72(2): 1047-8.
- Wang, L; Sharpless, KB. Catalytic asymmetric dihydroxylation of *cis*-disubstituted olefins. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**; 114: 7568-70.
- Wang, ZM; Kakiuchi, K; Sharpless, B. Osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation of cyclic *cis*-disubstituted olefins. *J. Org. Chem.* **1994**; 59: 6895-7.
- Whitham, GH; Wickramasinghe, JAF. Solvolysis of the toluene-*p*-sulphonates of 3 β - and 3 α -hydroxymethyl-A-norcholest-5-ene. *J. Chem. Soc.* **1964**; 1655-62.
- Wiechert, R; Kerb, U; Hocks, P; Furlenmeier, A; Fürst, A; Langemann, A; Waldvogel, G. Zur synthese des ecdysons. *Helv. Chim. Acta* **1966**; 49(5): 1581-90.

Capítulo 3:

Síntesis de análogos de
6-hidroxi η inos esteroides marinos
y actividad citotóxica

3.1 Introducción a los 6-hidroximino esteroides

3.1.1 Oximas esteroidales de origen marino

Si bien un gran número de esteroides con estructuras inusuales e interesantes han sido aislados de organismos terrestres y marinos, recién en el año 1997 se aislaron por primera vez dos oximas esteroidales a partir de un organismo marino (Rodríguez y col. 1997). Ambos compuestos, (24*R*,6*E*)-24-etilcolest-6-hidroximino-4-en-3-ona (**78**) y 6*E*-colest-6-hidroximino-4-en-3-ona (**79**) (Figura 3.1), se obtuvieron a partir de esponjas marinas de las especies *Cinachyrella* (*C. alloclada* y *C. apion*) pertenecientes a la familia Tetillidae (subclase Tetractinomorpha, orden Spirophorida), y presentaban la funcionalidad 6-hidroximino-4-en-3-ona.

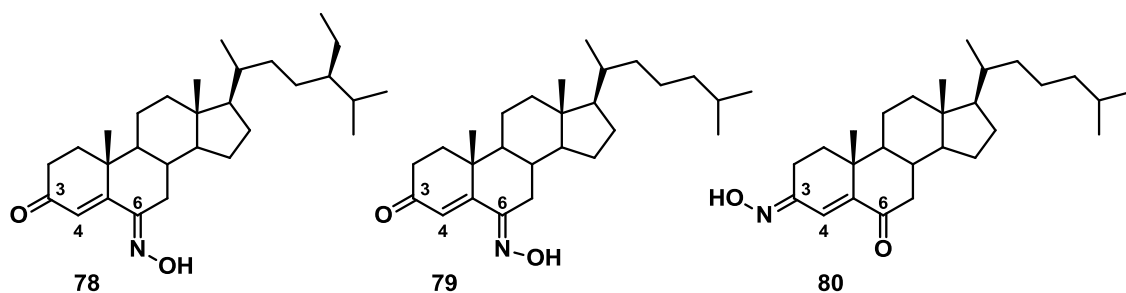


Figura 3.1: Oximas esteroidales aisladas a partir de esponjas marinas.

Cabe destacar que, si bien anteriormente se habían aislado varias colest-4-en-3,6-dionas a partir de distintas esponjas (Figura 3.2) (Aiello y col. 1993), estas especies carecen de la capacidad de biosintetizar selectivamente una oxima en posición 6, como ocurre en el caso de las especies *C. alloclada* y *C. apion* (Rodríguez y col. 1997).

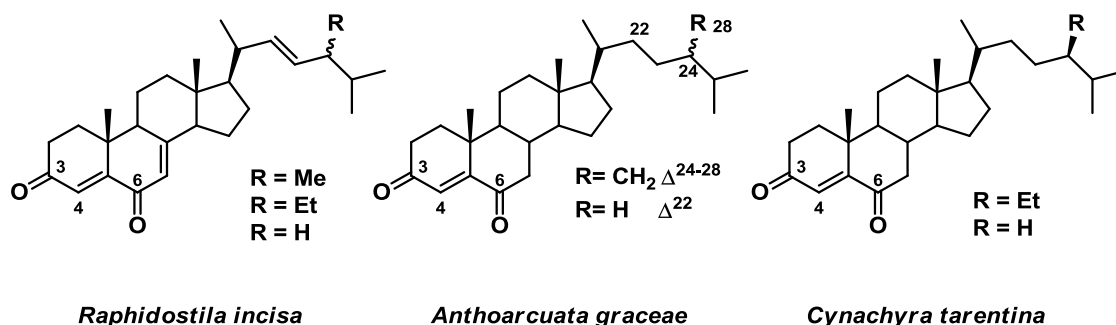


Figura 3.2: Colest-4-en-3,6-dionas aisladas a partir de esponjas marinas.

En el año 2005 se aisló una tercer oxima a partir de un organismo marino, sin embargo dicha funcionalidad se encontró en la posición 3. El compuesto (3*E*)-colest-3-hidroximino-4-

en-6-ona (compuesto **80**, figura 3.1) se aisló a partir de la esponja marina *Cinachyrella australiensis* recolectada en el mar de China Meridional (Xiao y col. 2005).

Las estructuras de las tres oximas esteroidales naturales fueron elucidadas en base a datos espectroscópicos de RMN, IR y espectrometría de masa y posteriormente, la estructura de **78** fue confirmada mediante síntesis química, tal como se mencionará más adelante.

La evaluación de la actividad citotóxica de las oximas de origen natural frente a diferentes líneas celulares condujo a resultados interesantes: el compuesto **78** no mostró citotoxicidad frente a las líneas celulares tumorales P-388 (leucemia humana), A-549 (pulmón humano), HT-29 (colon humano) y MEL-28 (melanoma humano), mientras que el compuesto **79** presentó una IC₅₀ de 3,0 µM frente a las líneas tumorales P-388, A-549 y HT-29 y de 6,1 µM frente a la línea tumoral MEL-28. Como ambos compuestos se diferencian sólo en la cadena lateral, esto indicaría que una cadena lateral de tipo colestano es fundamental para la actividad citotóxica (Rodríguez y col. 1997).

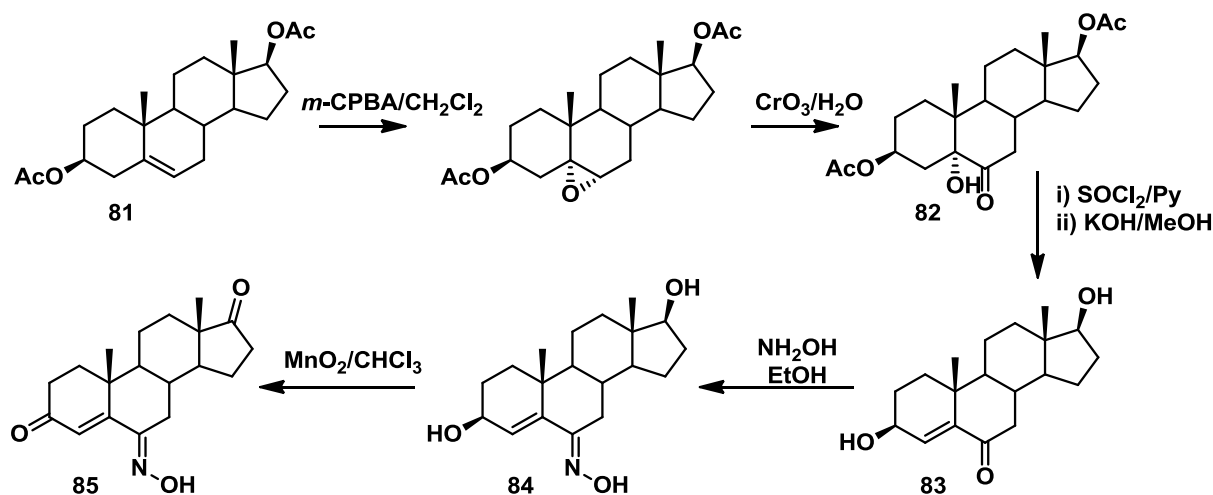
3.1.2 Síntesis de 6-hidroxiimino esteroides

Inicialmente los 6-hidroxiimino esteroides fueron sintetizados como derivados cristalinos de cetonas esteroidales en C-6 para caracterizarlas por su punto de fusión (Windaus 1920; Vanghelovici y Visiliu 1935). Luego se sintetizaron derivados de 6-hidroxiimino estigmastanos como precursores de aza análogos de homobrasinólidos (Okada y Mori 1983; Anastasia y col. 1986) y años más tarde, se sintetizaron derivados de 6-hidroxiimino androstanos por su capacidad de inhibir competitivamente la enzima aromatasa de placenta humana, responsable de la biosíntesis de estrógenos, clave para el control de cáncer de mama (Holland y col. 1992).

Dado el potencial de estos compuestos como agentes antitumorales (Zeelen 1990), se han sintetizado una gran cantidad de oximas para evaluar su actividad biológica.

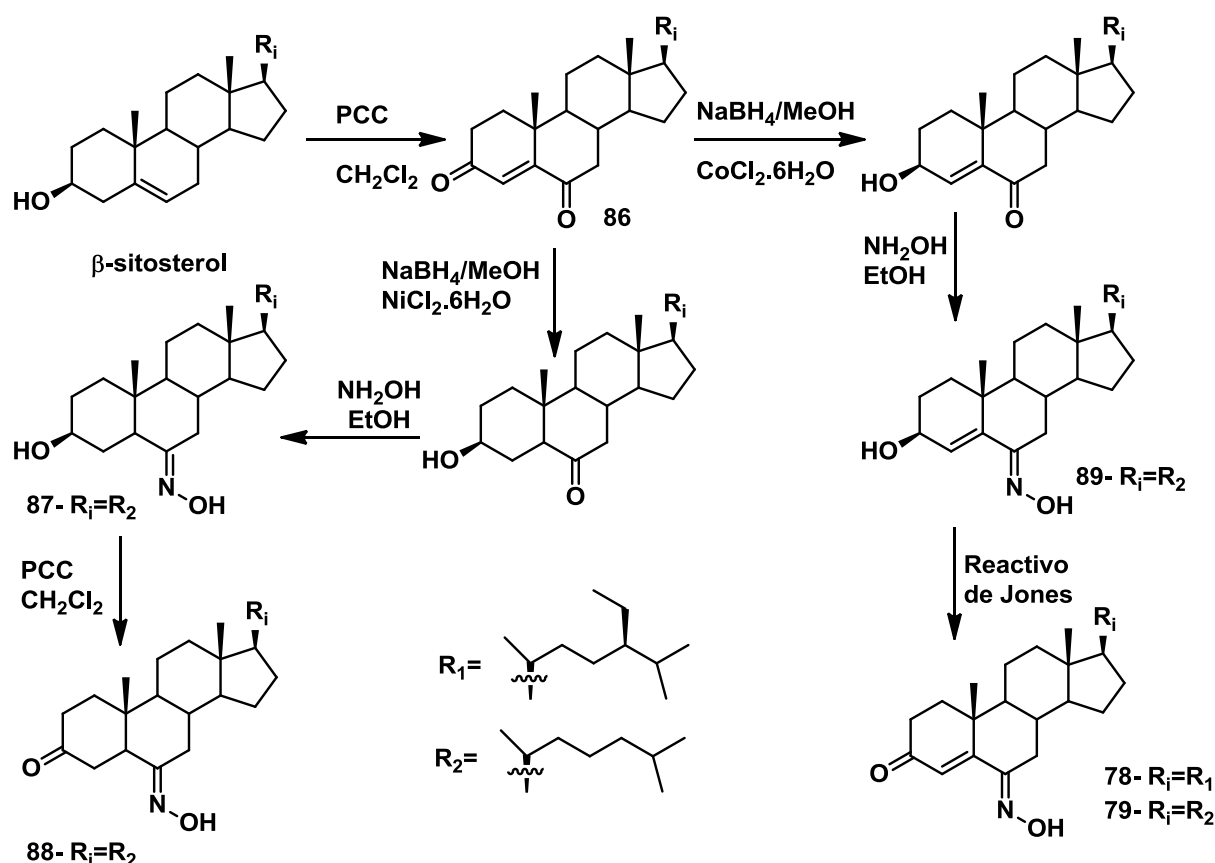
Entre los trabajos de síntesis publicados, es importante destacar el trabajo de Holland (Holland y col. 1992) ya que, al haber sido el primero en sintetizar esteroides con la funcionalidad 6-hidroxiimino-4-en-3-ona, inspiró la síntesis de muchas otras oximas esteroidales en posición 6 mediante algunas variaciones en su camino sintético (Deive y col. 2001; Poza y col. 2007). La síntesis de Holland (Esquema 3.1) consistía en epoxidar el

compuesto 3 β ,17 β -diacetoxi-androst-5-eno (**81**) y luego oxidarlo para obtener una α -hidroxicetona (compuesto **82**). El tratamiento con cloruro de tionilo del alcohol **82** rendía un cloruro intermediario que luego era eliminado para generar la cetona α,β -insaturada **83**. El tratamiento con hidroxilamina condujo a la oxima en posición 6 con configuración *E* (compuesto **84**) y finalmente la oxidación de la posición alílica con MnO₂ rendía la 6*E*-hidroximino-androst-4-en-3-ona (**85**).



En base a esta ruta sintética se sintetizó el producto natural **78** a partir de β -sitosterol. Los datos espectroscópicos y cromatográficos del producto sintético coincidieron con los del compuesto de origen natural. De este modo pudo corroborarse su estructura, la cual era inusual entre los metabolitos de origen natural aislados hasta ese momento (Rodríguez y col. 1997).

En el año 2008, el grupo de Cui desarrolló una nueva ruta sintética para obtener el compuesto **78** (Esquema 3.2), la cual era más corta y presentaba mejores rendimientos que las desarrolladas hasta entonces (Cui y col. 2009, Cui y col. 2008). Por otra parte, esta ruta sintética resultaba versátil para la síntesis de una variedad de oximas a las cuales nos referiremos más adelante. El paso clave de esta ruta consistía en oxidar el grupo alcohol del β -sitosterol con PCC y mediante un reordenamiento oxidativo obtener como producto una 4-en-3,6-diona (compuesto **86**) (Fieser 1963; Schlecht 2005). La reducción de esta diona con NaBH₄ en presencia de diferentes ácidos de Lewis permitía obtener cetonas en C-6 con distintos grupos oxigenados en C-3 y/o un doble enlace Δ^4 , las cuales por tratamiento con hidroxilamina, generaron diferentes oximas (Compuestos **78-79** y **87-89**).



Esquema 3.2

Recientemente, se han sintetizado varias oximas esteroidales para evaluar su citotoxicidad *in vitro* frente a diversas líneas tumorales humanas (Deive y col. 2001; Poza y col. 2007; Huang y col. 2013). Estos estudios revelaron la importancia de la presencia de sustituyentes oxigenados en el anillo A y de una cadena lateral de tipo colestano para incrementar la actividad citotóxica de los compuestos.

3.2 Síntesis de 6E-hidroxiesteroideos

En base a los antecedentes mencionados, en este trabajo de tesis se sintetizaron 6E-hidroxiesteroides con diferentes grupos funcionales en el anillo A con el objeto de evaluar la citotoxicidad de las mismas. Las oximas sintetizadas (Figura 3.3) se obtuvieron a partir de las cetonas correspondientes, cuya síntesis se encuentra detallada en el capítulo 2. Todos las oximas se sintetizaron utilizando la misma técnica (Cui y col. 2008), tal como se detalla en el capítulo 6.

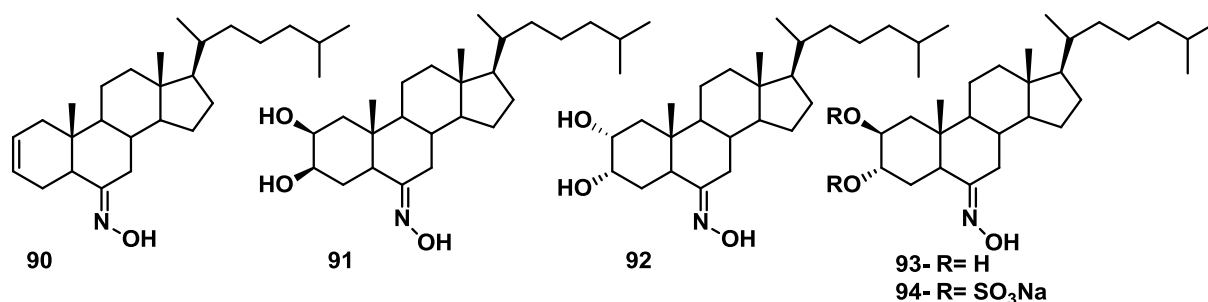
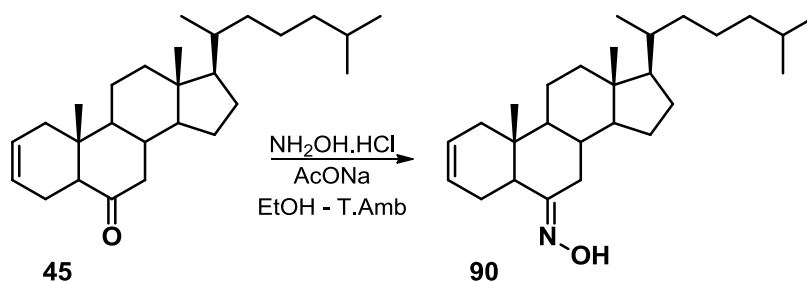


Figura 3.3: Oximas esteroidales sintetizadas durante este trabajo de tesis

3.2.1 Síntesis del 6*E*-hidroximino-5α-colest-2-eno (90)

La primera oxima sintetizada fue el 6*E*-hidroximino-5α-colest-2-eno (**90**) a partir del compuesto carbonílico 5α-colest-2-en-6-ona (**45**). El compuesto carbonílico **45** fue elegido como modelo para probar las condiciones de la reacción. En las condiciones ensayadas (NH₂OH.HCl/ NaAcO en etanol a temperatura ambiente) la cetona **45** rindió la oxima **90** con un 98% de rendimiento.



Esquema 3.3

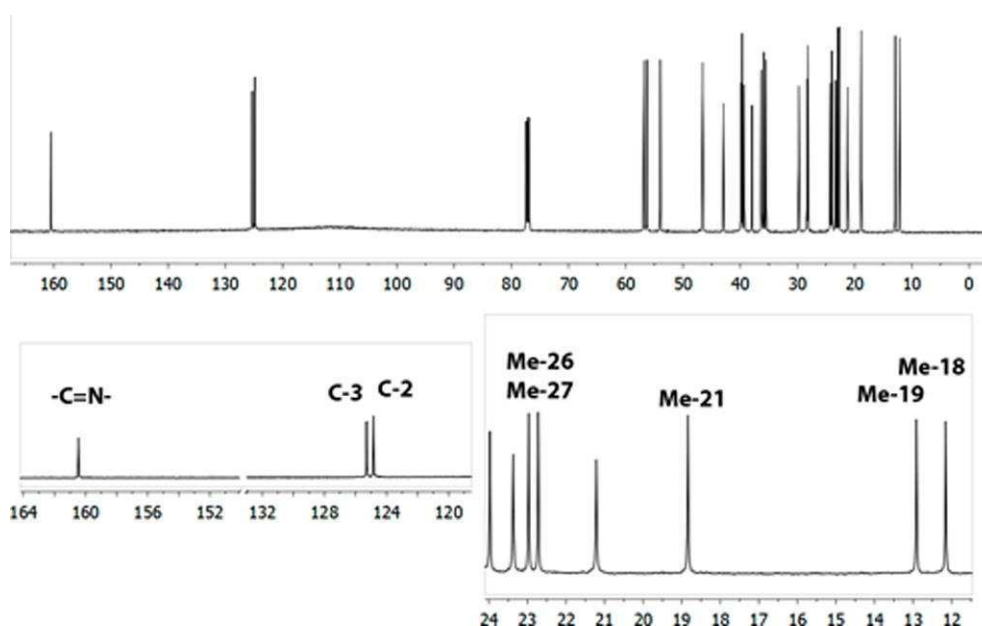


Figura 3.4: Espectro de RMN ¹³C de la oxima **90** en CDCl₃

La presencia del grupo hidroximino se confirmó por RMN ^{13}C a partir de la señal a 160,46 ppm, característica del carbono cuaternario de la oxima (Figura 3.4).

En la figura 3.5 se observa el espectro de RMN ^1H del compuesto **90** y ampliaciones de las zonas más significativas del espectro.

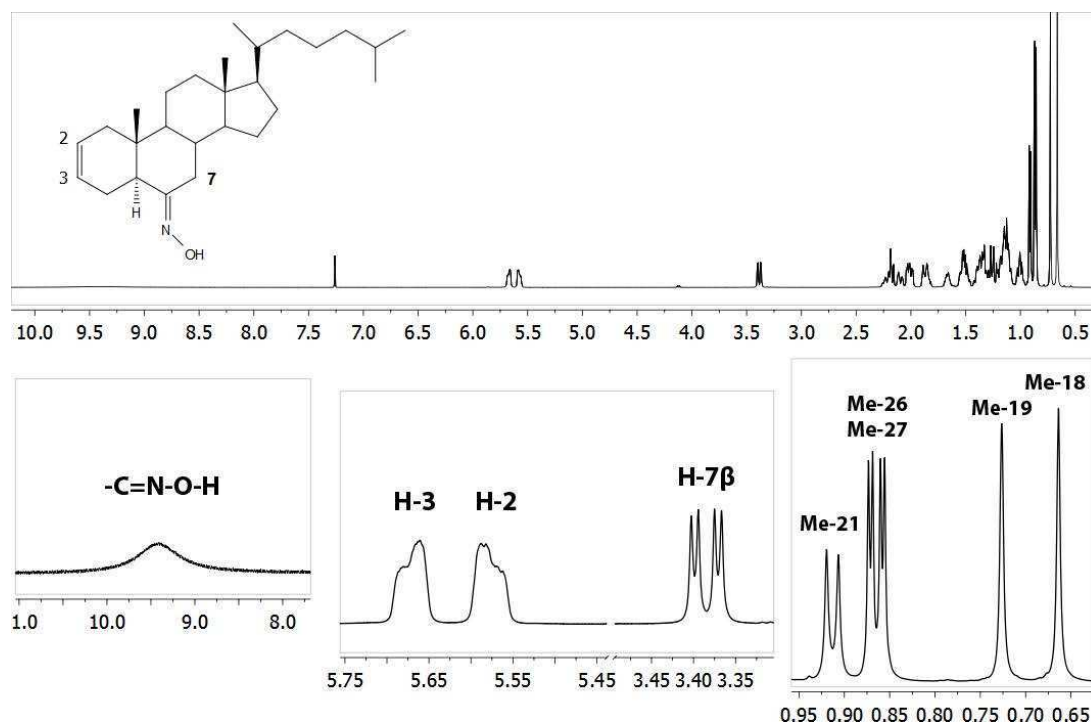
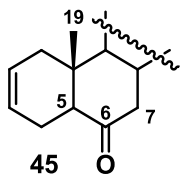
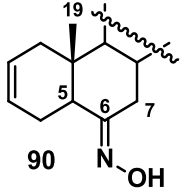


Figura 3.5: Espectro de RMN ^1H de la oxima **90** en CDCl_3

Alrededor de 9,50 ppm se observa un singlete ancho característico del protón intercambiable de la hidroximina (Silverstein, 1998). Los valores de desplazamiento químico de las señales olefínicas de H-2 (5,57 ppm) e H-3 (5,67 ppm) no presentan diferencias significativas respecto de los correspondientes hidrógenos en el compuesto carbonílico. En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.4) se observan ampliadas las señales de los carbonos olefínicos, las cuales tampoco difieren en sus desplazamientos químicos de las correspondientes al compuesto de partida.

Con respecto al desplazamiento químico del metilo 19, se puede concluir que el grupo hidroximino no ejerce efectos electrónicos diferentes al de un grupo carbonilo en esa posición ya que dicha señal, tanto para ^1H como para ^{13}C , presenta valores de desplazamiento químico similares a los del compuesto 5α -colest-2-en-6-ona (**45**), tal como se observa en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Comparación de señales características en los compuestos **45** y **90**.

δ (ppm)		
C-6	212,23	160,46
H-7 α	1,97	1,25
H-7 β	2,35	3,38
C-7	47,17	29,75
H-5 α	2,35	2,18
H-19	0,70	0,73
C-19	13,66	12,91

La configuración de la oxima se determinó a partir del análisis de las señales de los protones adyacentes al grupo hidroximino en el espectro de RMN ^1H . En este caso se observa un doble doblete a 3,38 ppm que corresponde al H-7 β . La asignación de esta señal fue confirmada mediante su correlación con el carbono cuaternario de la oxima (C-6) en el espectro HMBC y su correlación con el Me-19 en el espectro NOESY.

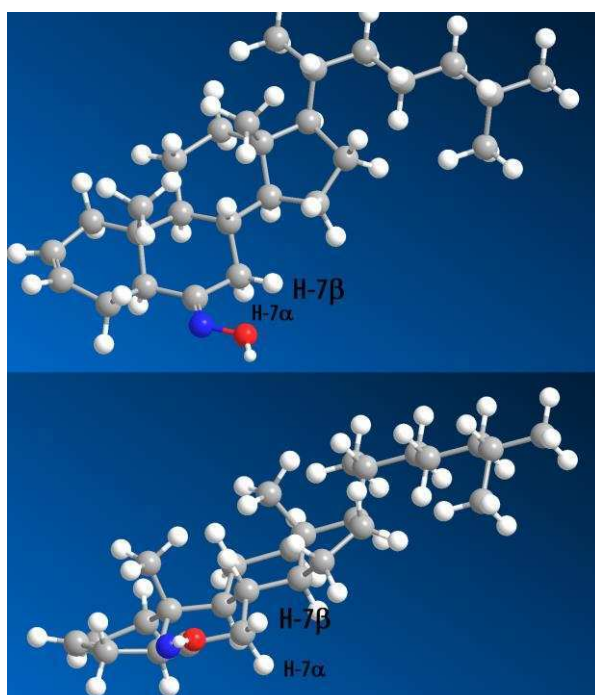


Figura 3.6: Geometría optimizada de la oxima **90** utilizando el método semiempírico AM1.

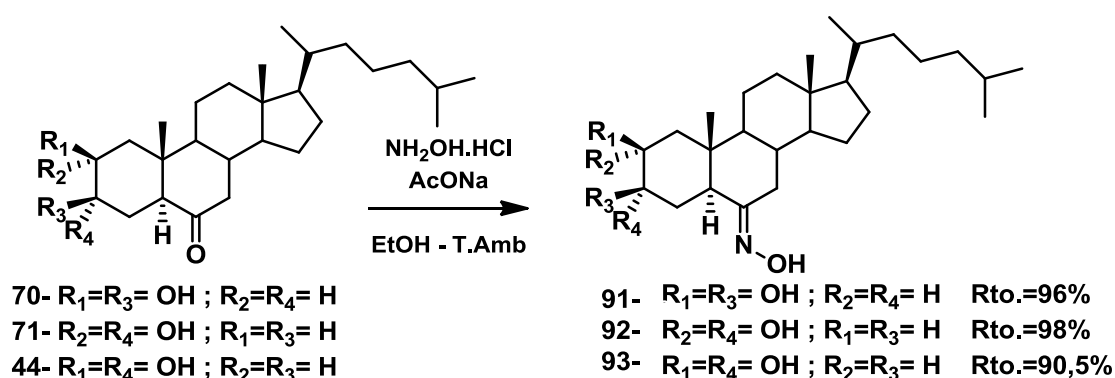
La desprotección del H-7 β indica que la configuración de la oxima es *E*. Esta desprotección es debida al efecto electrónico que ejerce la proximidad del oxígeno de la oxima sobre dicho protón. En la figura 3.6 se puede observar la posición del hidroxilo de la oxima respecto del H-7 β y del H-7 α .

Además, tal como se observa en la tabla 3.1, el H-5 α se encuentra más protegido en la oxima debido al menor efecto inductivo que ejerce este grupo respecto del grupo carbonilo.

Por último, el espectro FT-IR del compuesto **90** presentó una señal a 1666 cm⁻¹ debida al estiramiento C=N, característico del grupo funcional oxima.

3.2.2 Síntesis de 2,3-dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestanos **91**, **92** y **93**.

A continuación se presentan las síntesis de tres 2,3-dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestanos nuevos obtenidos con el fin de evaluar la influencia de grupos hidroxilo en C-2 y C-3 y de su stereoquímica en la citotoxicidad de los compuestos. Las oximas se sintetizaron a partir de las cetonas correspondientes con rendimientos excelentes, tal como se muestra en el esquema 3.4.



Esquema 3.4

En todos los casos, el producto de la reacción reveló una única mancha por CCD. Luego de su purificación cromatográfica se obtuvo exclusivamente la oxima con configuración *E*, con excepción del 2 α ,3 α -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (**92**), el cual estaba impurificado con su isómero *Z* en cantidades minoritarias. Esto se dedujo a partir del espectro de RMN ¹³C, ya que al ampliar la región entre 65 y 160 ppm aparecían duplicadas las señales correspondientes a C-2, C-3 y C-6 (Figura 3.7).

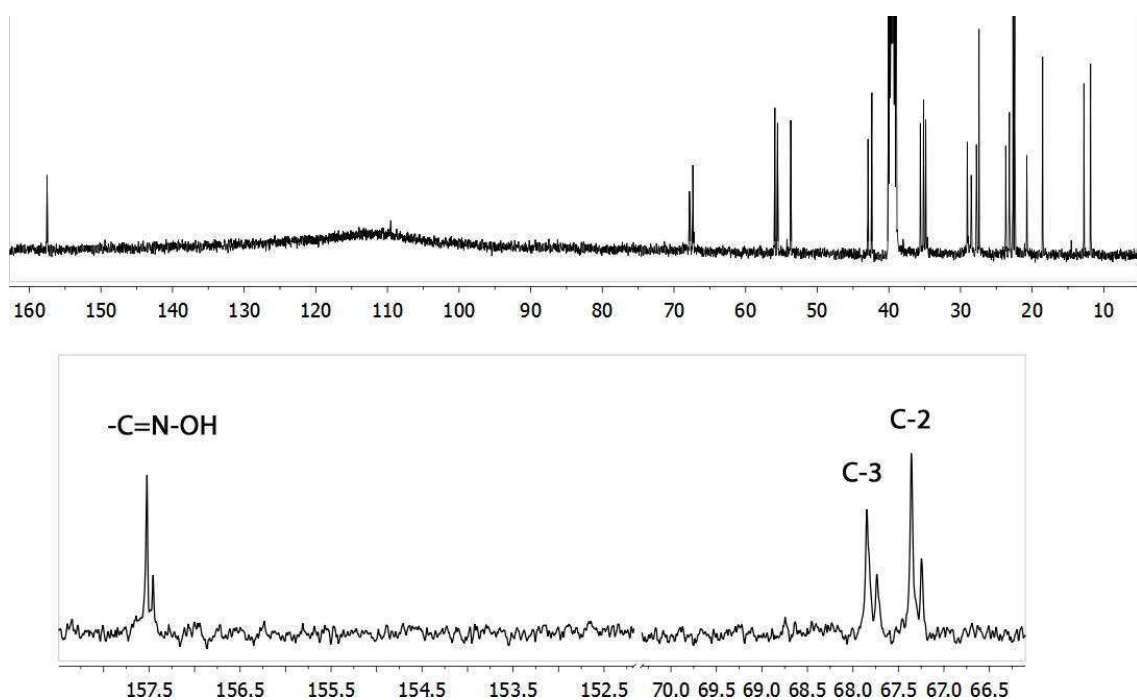


Figura 3.7: Espectro de RMN ^{13}C de la mezcla de isómeros *E* y *Z* del compuesto **92** en $\text{DMSO-}d_6$

En el espectro de RMN ^1H de la mezcla de ambos isómeros (Figura 3.8) sólo se observó una señal duplicada a alrededor de 10 ppm, correspondiente al protón del hidroxilo de la oxima. Si bien estas señales son potencialmente intercambiables, al realizar el espectro en $\text{DMSO-}d_6$, esto no se observó. La integración relativa de estas dos señales permitió estimar que ambos isómeros se encontraban en una relación $\approx 98,3:1,7$. La recrystalización de la mezcla rindió el isómero *E* puro, el cual fue caracterizado por RMN.

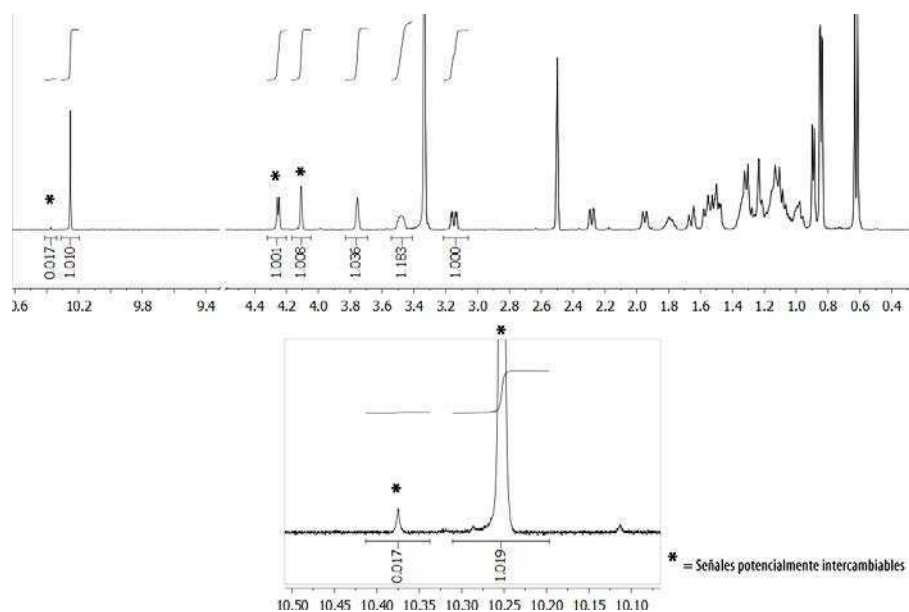


Figura 3.8: Espectro de RMN ^1H de la mezcla de isómeros *E* y *Z* del compuesto **92** en $\text{DMSO-}d_6$

-Comparación de los espectros de RMN ^1H de las oximas dihidroxiladas:

En la figura 3.9 se muestran los espectros de RMN ^1H correspondientes a los tres isómeros de las oximas dihidroxiladas: $2\beta,3\beta$ (compuesto **91**), $2\alpha,3\alpha$ (compuesto **92**), y $2\beta,3\alpha$ (compuesto **93**). Se observa el singulete característico del protón de la hidroximina (Silverstein, 1998) y el doble doblete que corresponde al H-7 β a $\approx 3,2$ ppm. En el espectro del compuesto $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (**93**), no se observa el hidrógeno intercambiable de la oxima ya que el espectro fue realizado en CD_3OD , a diferencia de los otros dos que fueron realizados en $\text{DMSO}-d_6$.

Las mayores diferencias en los espectros de RMN ^1H de los tres isómeros se observan en el desplazamiento químico del Me-19 y en las multiplicidades y desplazamientos químicos de los hidrógenos geminales a los grupos hidroxilo debido a las distintas configuraciones de C-2 y C-3. El desplazamiento químico del H-5 α en los isómeros $2\beta,3\alpha$ (2,43 ppm) y $2\alpha,3\alpha$ (2,29 ppm) es mayor que en isómero $2\beta,3\beta$ (1,92 ppm). Esto se debe a que el H-5 α presenta una interacción 1,3 diaxial con el hidroxilo en C-3(α) en los isómeros $2\beta,3\alpha$ y $2\alpha,3\alpha$, la cual no existe en el isómero $2\beta,3\beta$.

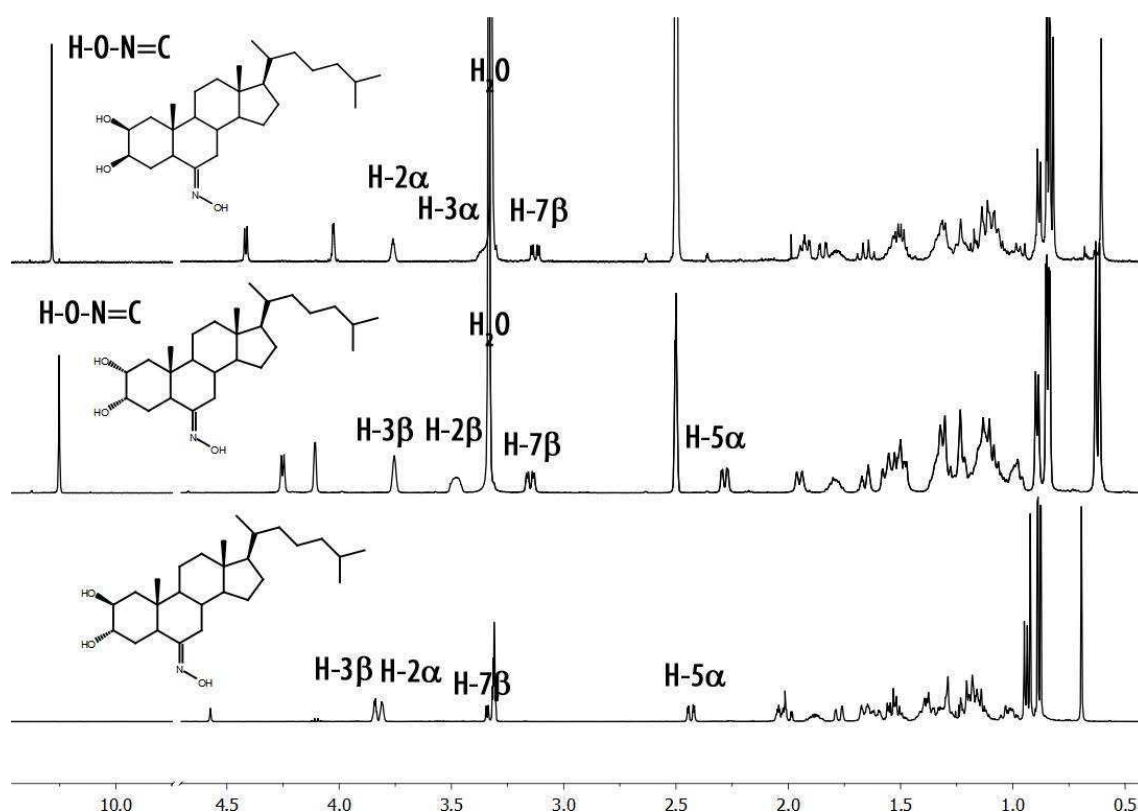


Figura 3.9: Espectros de RMN ^1H de los compuesto **91** y **92** en $\text{DMSO}-d_6$ y del compuesto **93** en CD_3OD

De manera similar, el valor de desplazamiento químico del Me-19 es mayor en los isómeros $2\beta,3\beta$ (0,82 ppm, compuesto **91**) y $2\beta,3\alpha$ (0,92 ppm, compuesto **93**) que en el isómero $2\alpha,3\alpha$ (compuesto **92**), cuyo valor es de 0,63 ppm. Esto se debe a la interacción 1,3 diaxial que existe entre el Me-19 y el grupo hidroxilo en C-2(β), presente en los isómeros **91** y **93**.

En los espectros de los compuestos $2\beta,3\beta$ -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (**91**) y $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (**92**) se observaron además las señales de los protones de los hidroxilos de C-2 y C-3, (una señal a 4,42 ppm correspondiente al H-O-C(2) y a 4,03 ppm, correspondiente al H-O-C(3), en el compuesto **91** y a 4,25 ppm y 4,11 ppm, en el compuesto **92**) los cuales fueron asignados a partir de las correlaciones con los protones geminales a los grupos OH, en el espectro COSY. A modo de ejemplo se muestra la asignación en el compuesto $2\alpha,3\alpha$ -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (**92**) de acuerdo a las correlaciones COSY (Figura 3.10). Las señales de los protones a 4,25 ppm y 4,11 ppm se asignaron a partir de sus respectivas correlaciones con las señales a 3,48 y 3,76 ppm. Estas señales, correspondientes a los H-2(β) (3,48 ppm) e H-3(β) (3,76 ppm), fueron previamente asignadas en base a su correlación con los protones pertenecientes al C-1 (1,49 y 1,30 ppm) y C-4 (1,66 y 1,55 ppm), respectivamente.

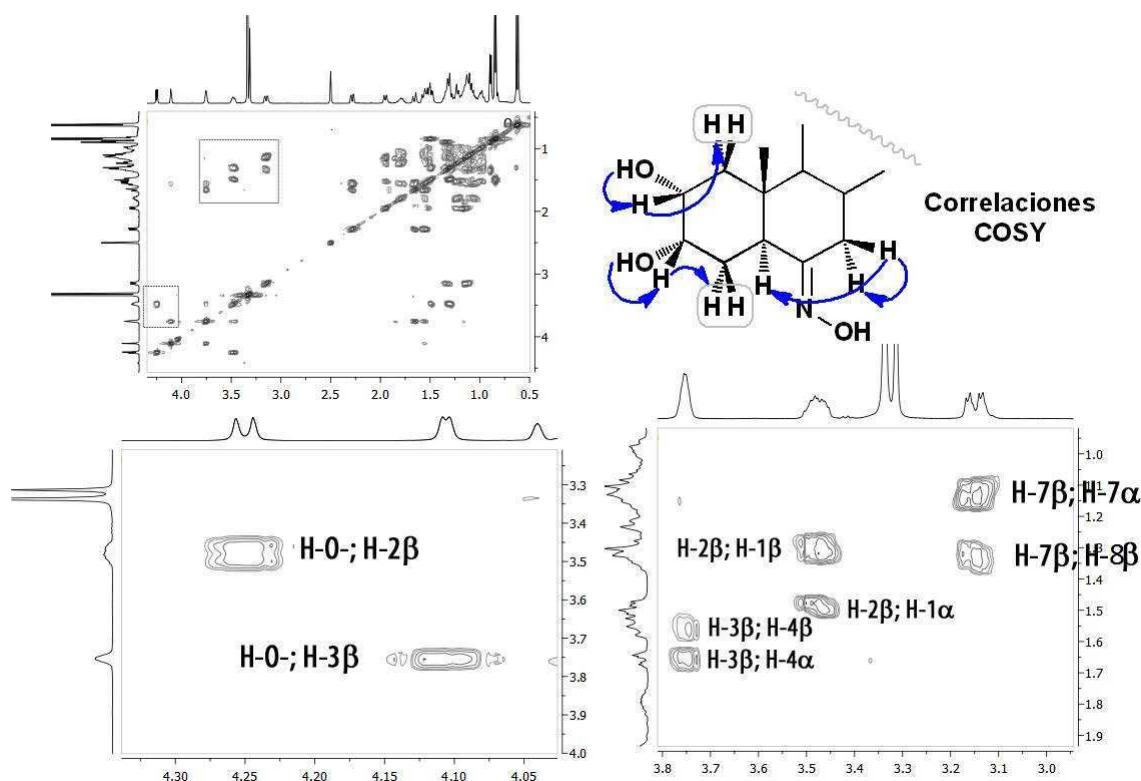


Figura 3.10: Espectros de COSY del compuesto **92** en DMSO- d_6

La posición de la oxima se confirmó a partir de las correlaciones de C-6 (157,54 ppm) con los protones adyacentes, H-5 α (2,29 ppm) y ambos H-7 (3,15 y 1,13 ppm), en el espectro HMBC (Figura 3.11).

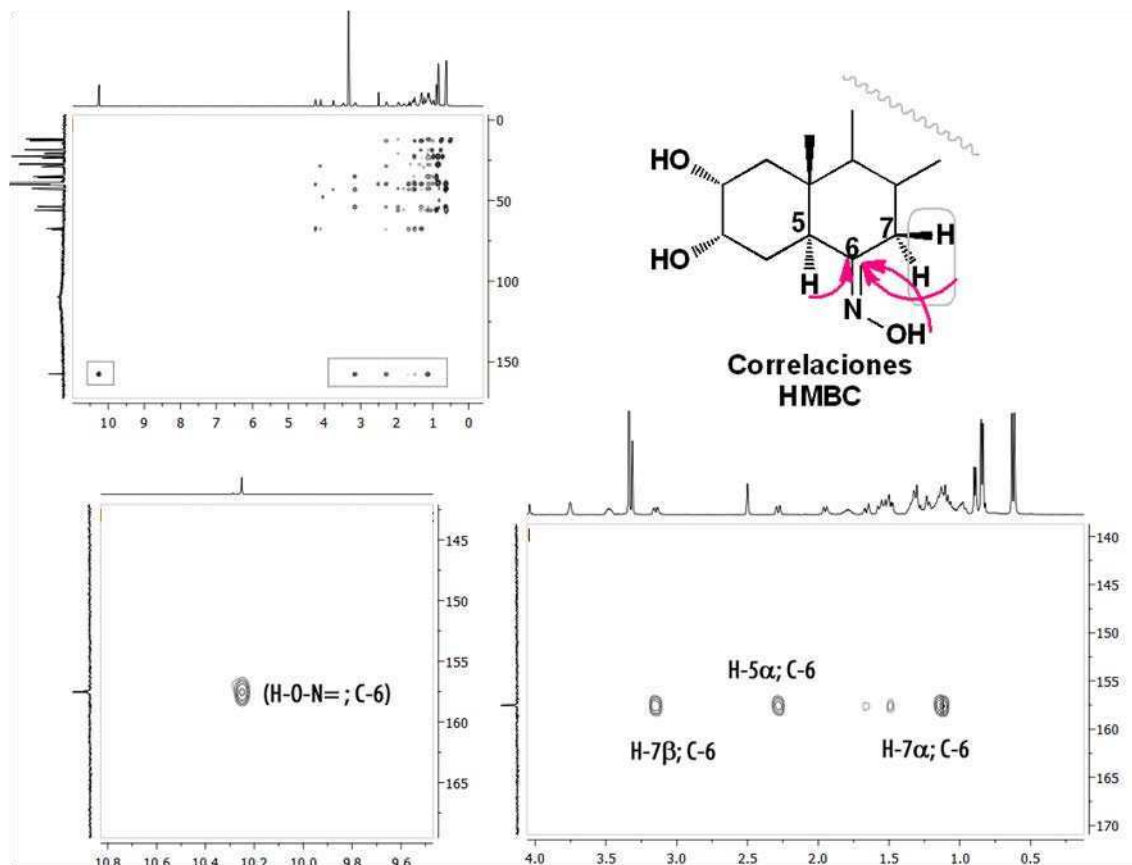
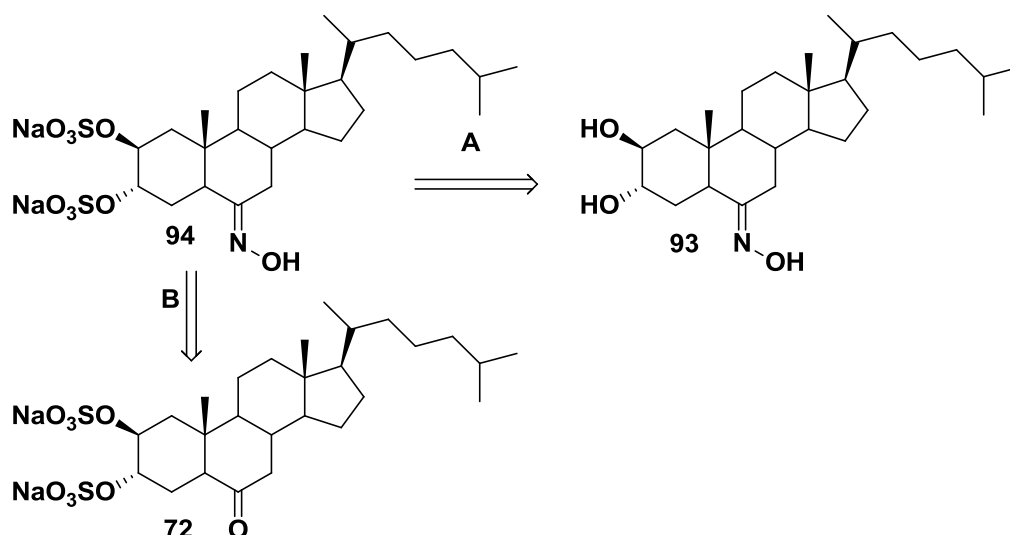


Figura 3.11: Espectro HMBC de la oxima **92** en $\text{DMSO-}d_6$

3.2.3 Síntesis de 2 β ,3 α -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano-2,3-disulfato (**94**)

Se sintetizó el análogo disulfatado del compuesto **93** a fin de determinar la influencia de los grupos sulfato en la actividad citotóxica. Para la obtención de esta oxima es posible plantear dos caminos retrosintéticos (Esquema 3.5).

El camino retrosintético A, en el cual se sulfata directamente el diol, no es viable ya que el grupo hidroxilo de la oxima podría atacar nucleofílicamente al agente sulfatante (Hoiberg y Mumma 1969; Al-Horani y Desai 2010) e incluso revertir al grupo carbonilo en las condiciones de la reacción de sulfatación, tal como ha sido descrito en la literatura (Huang y col. 2013). Por lo tanto fue necesario partir de la cetona disulfatada **72** para obtener la oxima **94**.



Esquema 3.5

Para la síntesis de **94** se probaron las condiciones experimentales utilizadas para la obtención de las otras oximas previendo la posibilidad de que los grupos sulfato no resistiesen el medio levemente ácido y se hidrolizaran. Sin embargo, esto no ocurrió posiblemente porque la reacción se llevó a cabo en 2 horas y a temperatura ambiente. La oxima sulfatada se obtuvo con un rendimiento del 98 %.

En la figura 3.12 se observa el espectro de RMN ^1H y ampliaciones de las señales diagnósticas del compuesto **94**.

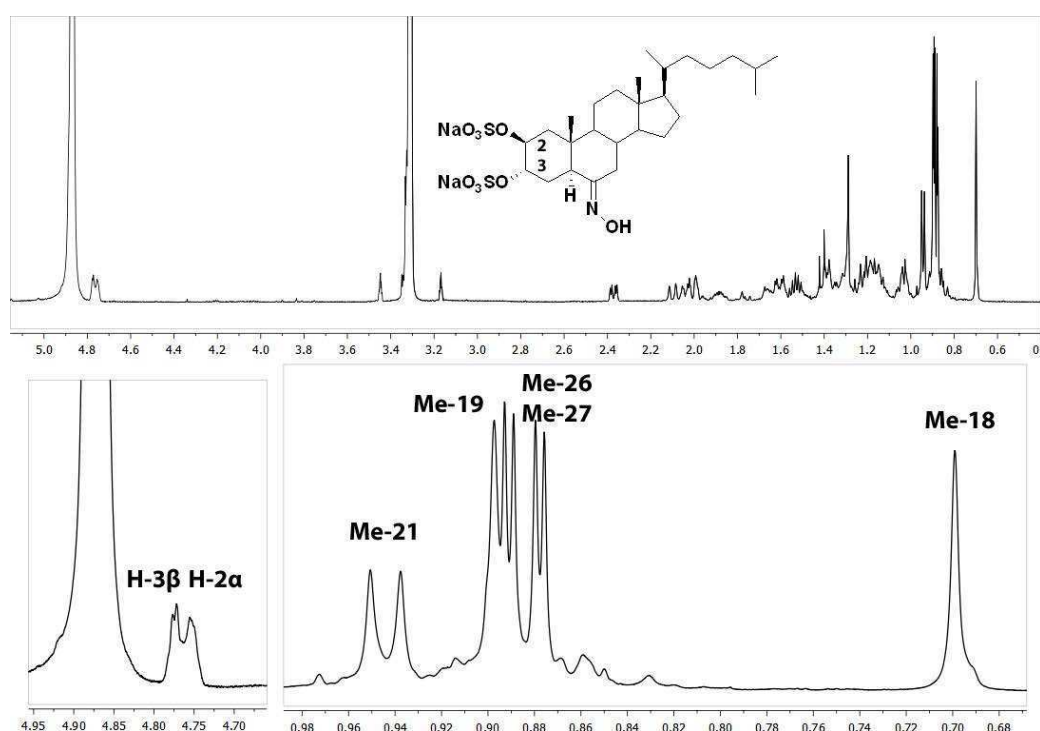


Figura 3.12: Espectro de RMN ^1H de la oxima sulfatada **94** en CD_3OD

No se observa la señal típica del H-7 β ya que ésta se encuentra superpuesta con la señal del solvente deuterado (CD₃OD). La asignación de la misma se realizó a partir del espectro HSQC, tal como se muestra en la figura 3.13.

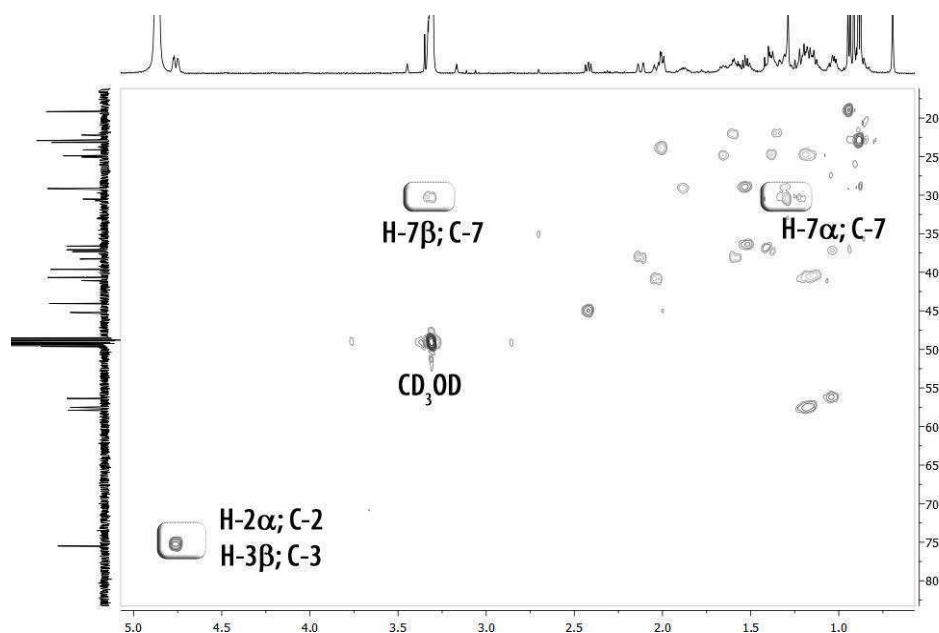


Figura 3.13: Ampliación del espectro HSQC de la oxima **94** en CD₃OD.

En el espectro HSQC, la señal a 3,32 ppm correlaciona con el C-7 a 30,41 ppm, el cual a su vez correlaciona con la señal a 1,29 ppm, correspondiente al H-7 α .

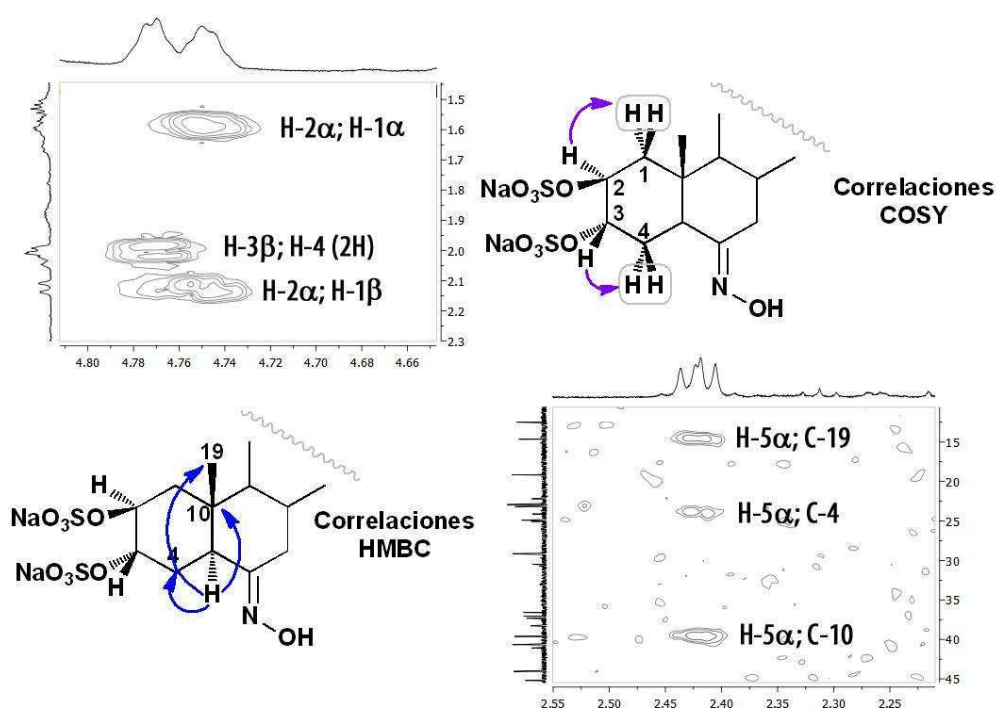


Figura 3.14: Ampliaciones de los espectros COSY y HMBC de la oxima **94** en CD₃OD

En este caso no se pudieron utilizar las correlaciones HMBC para asignar los H-2 α e H-3 β ya que las señales de C-2 y C-3 se encuentran superpuestas a 75,49 ppm. Sin embargo, en el espectro HMBC se observó la correlación entre el H-5 α (2,42 ppm) y el C-4 (24,11 ppm) (Figura 3.14), cuyos protones correlacionan en el espectro COSY con la señal a 4,77 ppm, permitiendo asignarlo al H-3(β). También, los H-1 β (2,12 ppm) e H-1 α (1,59 ppm) permitieron asignar al H-2 α (4,75 ppm), por su correlación en el espectro COSY (Figura 3.14).

3.3 Actividad citotóxica de los 6-hidroxiimino esteroides frente a líneas tumorales de cáncer de próstata humano (PC-3 y LNCaP)

En Argentina, el cáncer constituye la primera causa de muerte de adultos entre 35 y 64 años y la segunda en los niños y jóvenes de 5 a 34 años y los mayores de 64 años de edad. En particular, el cáncer de próstata es el segundo de mayor incidencia en nuestro país, luego del cáncer de pulmón -en varones- y causó 3937 muertes durante el año 2010 según los datos arrojados por el Ministerio de Salud de la Nación. Esta es la razón por la que es importante continuar con la búsqueda de nuevos compuestos citotóxicos frente a líneas de cáncer de próstata.

En este trabajo de tesis se evaluó la citotoxicidad de las oximas y de algunos de los esteroides sulfatados sintetizados frente a las líneas tumorales de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP, las cuales se diferencian en que LNCaP es una línea andrógeno dependiente, mientras que PC-3 no lo es. Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Juan Carlos Calvo (IBYME-CONICET).

3.3.1 Antecedentes de actividad citotóxica de 6-hidroxiimino esteroides y análogos sulfatados

Actualmente, no existen antecedentes de citotoxicidad de 6*E*-hidroximino esteroides frente a la línea LNCaP.

A partir de los estudios de citotoxicidad realizados con 6*E*-hidroximino esteroides frente a la línea celular de cáncer de próstata humano PC-3, se determinó que el tipo de cadena lateral es importante para la inhibición (Tabla 3.2). Una cadena de tipo colestano (**79**) es más activa que una del tipo estigmastano (**95**), y ésta a su vez es más activa que una del tipo del sitosterol (**78**) (Figura 3.15) (Cui y col. 2008):

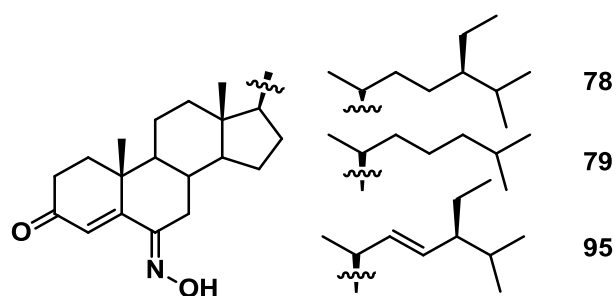


Figura 3.15

Tabla 3.2: Influencia de la cadena lateral en la actividad citotóxica frente a PC-3

Actividad citotóxica <i>in vitro</i> frente a PC-3	
Compuesto	IC ₅₀ μM ^{a,b}
78	≥180
79	84,6
95	100,1

^a Método de MTS – ^b Cui y col. 2008

Por otra parte, se estudió la influencia de un doble enlace Δ^4 y un grupo oxigenado en posición 3 (Cui y col. 2009a, Cui y col. 2009b). En la tabla 3.3 se observan los IC₅₀ para los compuestos sintéticos **79** y **87-89** (Figura 3.16), los cuales poseen la cadena lateral de colestano y se diferencian en las funcionalidades del anillo A. Su síntesis se detalló en el esquema 3.2.

A partir de estos dos trabajos se concluye que en presencia de un doble enlace Δ^4 , el estado de oxidación de la función oxigenada en C-3, sea un carbonilo (compuesto **79**) o un hidroxilo con configuración β (compuesto **89**), no influye en la citotoxicidad del compuesto, ya que ambos presentan IC₅₀ similares. En ausencia del doble enlace, el compuesto pierde actividad si posee un grupo carbonilo en posición 3 (compuesto **88**), mientras que en su forma reducida (hidroxilo en posición 3 β) (compuesto **87**) aumenta su citotoxicidad, incluso respecto de su análogo con un doble enlace Δ^4 (compuesto **89**).

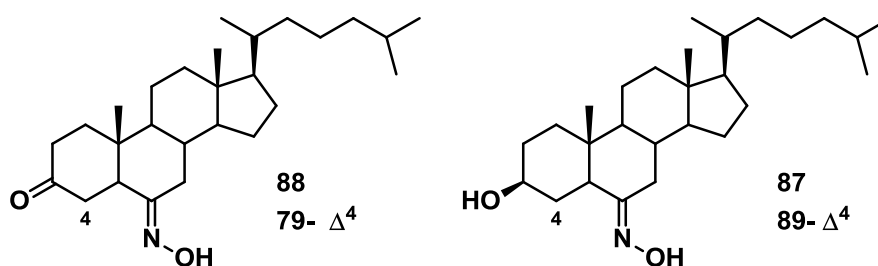


Figura 3.16

Tabla 3.3: Influencia de un doble enlace Δ^4 y un grupo oxigenado en C-3 en la citotoxicidad frente a PC-3.

Actividad citotóxica <i>in vitro</i> frente a PC-3	
Compuesto	IC ₅₀ $\mu\text{M}^{\text{a,b}}$
88	≥ 190
79	84,6
87	49,8
89	78,2

^a Método de MTS – ^b Cui y col. 2009a; Cui y col. 2009b

Por otro lado, se estudió la citotoxicidad de distintas oximas sintéticas con un grupo sulfato en C-3 β o C-6 β (compuestos **95-97**), las cuales resultaron activas frente a distintas líneas celulares. Los resultados indicaron que las oximas eran ligeramente más activas cuando el grupo hidroximino se encontraba en C-6 (compuesto **96**) que cuando se encontraba en C-3 (compuesto **95**). Además, las células son menos sensibles a las oximas cuando éstas poseen un doble enlace Δ^4 (compuesto **97**) (Figura 3.17, Huang y col. 2013).

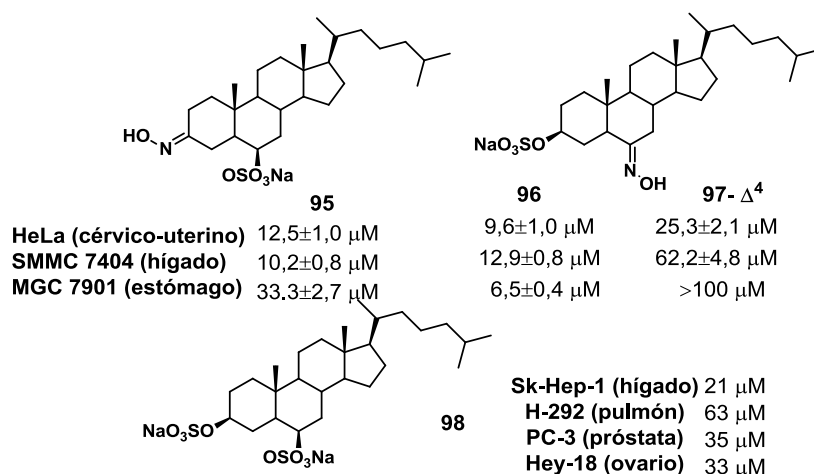


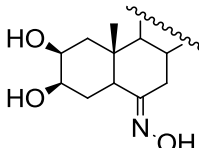
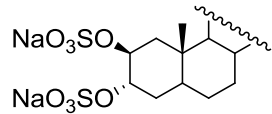
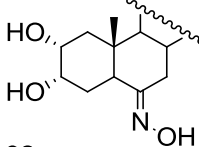
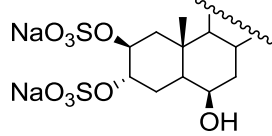
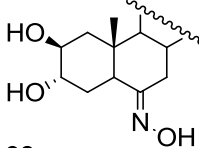
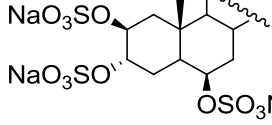
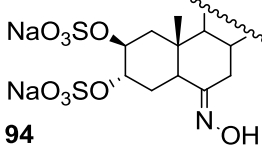
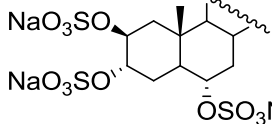
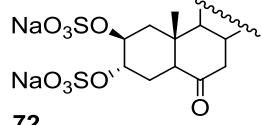
Figura 3.17: Actividad citotóxica de esteroides sulfatados sintéticos, frente a líneas celulares tumorales

En cuanto a la citotoxicidad de esteroides sulfatados frente a la línea celular de cáncer de próstata PC-3, Cui y col. sintetizaron tres esteroides disulfatados en C-3(β) y C-6(β) con diferentes cadenas laterales y determinaron que el compuesto 3 β ,6 β -dihidroxi-5 α -colestano disulfato (**98**) presentó actividad citotóxica frente a la línea PC-3, entre otras líneas tumorales (Cui y col. 2009c). Los resultados se pueden observar en la figura 3.17.

3.3.2 Resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad frente a PC-3 y LNCaP de 2,3-dihidroxi-6E-hidroximino-5 α -colestanos y análogos sulfatados

Se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de los 2,3-dihidroxi-6E-hidroximino esteroides **91**, **92** y **93** con el objeto de determinar el efecto de los grupos hidroxilo en C-2 y C-3 y sus configuraciones, en la actividad citotóxica frente a las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP.

Tabla 3.4: Citotoxicidad de 2,3-dihidroxi-6E-hidroximino esteroides y análogos sulfatados frente a PC-3 y LNCaP.

Compuesto	IC ₅₀ (μ M) ^a		Compuesto	IC ₅₀ (μ M) ^a	
	PC-3	LNCaP		PC-3	LNCaP
 91	39,3 $\pm$ 2,6	>100	 37	21,2 $\pm$ 1,7	20,7 $\pm$ 1,8
 92	31,0 $\pm$ 2,4	26,2 $\pm$ 2,4	 77	>100	35,1 $\pm$ 1,7
 93	10,8 $\pm$ 2,6	44,8 $\pm$ 2,6	 76	15,7 $\pm$ 1,4	7,9 $\pm$ 1,6
 94	12,9 $\pm$ 1,7	13,9 $\pm$ 1,8	 24	20,3 $\pm$ 1,4	21,8 $\pm$ 1,5
 72	16,7 $\pm$ 1,7	20,3 $\pm$ 1,8			

^aMétodo de MTS

De acuerdo con los datos de la tabla 3.4, las oximas **91**, **92** y **93** resultaron activas frente a PC-3. Sin embargo, los *cis* hidroximino esteroides **91** y **92** fueron menos activos que el isómero *trans* (compuesto **93**), poniendo en evidencia la importancia de la configuración de los grupos hidroxilo en C-2 y C-3 en la actividad citotóxica frente a esta línea tumoral.

La sustitución con grupos hidroxilo en C2(β) y C-3(α) determina un marcado incremento en la citotoxicidad frente a la línea PC-3, en comparación con los antecedentes mencionados de 6E-hidroximino-colestanos con un grupo hidroxilo o cetona en C-3 (compuestos **87** y **88**, figura 3.16). Mientras los valores de IC₅₀ de los compuestos **87** y **88** son 49,8 y ≥ 190 μ M, respectivamente (Tabla 3.2, Cui y col. 2009a, Cui y col. 2009b), el 2 β ,3 α -dihidroxi-6E-hidroximino-5 α -colestano (**93**) posee un valor de 10,8 μ M.

La sulfatación de los grupos hidroxilo (compuesto **94**) no influye de manera significativa en el grado de citotoxicidad frente a la línea tumoral PC-3, ya que los compuestos **93** y **94** poseen IC₅₀ similares (10,8 μ M y 12,9 μ M, respectivamente). Sin embargo, la oxima disulfatada (**94**) presenta una mayor citotoxicidad que su análogo dihidroxilado (**93**) frente a la línea LNCaP. Estos resultados son consistentes con los antecedentes de citotoxicidad de hidroximino esteroides sulfatados frente a diversas líneas celulares (Huang y col. 2013).

El antecedente que indicaba que el compuesto 3 β ,6 β -dihidroxi-5 α -colestano disulfato (compuesto **98**, figura 3.17) posee actividad citotóxica frente a la línea PC-3, entre otras líneas tumorales (Cui y col. 2009c), nos impulsó a comparar la actividad citotóxica del 6E-hidroximino esteroide sulfatado **94** con los esteroides **24**, **37**, **72**, **76** y **77** que poseen grupos sulfato en C-2 y C-3 y diferentes funcionalidades en C-6. A partir de los resultados de la tabla 3.4, se observa que los compuestos **24**, **37**, **72** y **76** fueron activos frente a ambas líneas tumorales, mientras que el compuesto **77**, que posee un grupo hidroxilo en C-6(β), fue inactivo frente a PC-3 (IC₅₀>100 μ M) y moderadamente activo frente a LNCaP (IC₅₀=35,1 μ M).

Por último el compuesto **76** que posee tres grupos sulfato en C-2(β), C-3(α) y C6(β) presentó una actividad citotóxica mayor que los compuestos **24**, **37** y **72** frente a la línea tumoral LNCaP (IC₅₀= 7,9 μ M). Sin embargo, la actividad citotóxica frente a PC-3 no tuvo diferencias significativas entre los análogos **24**, **37**, **72** y **76**.

3.4 Conclusiones

Se sintetizaron cuatro 6*E*-hidroximinas esteroidales nuevas a partir de las correspondientes cetonas en C-6, con muy buenos rendimientos. La evaluación de la citotoxicidad de cuatro 2,3-dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestanos y cinco esteroides sulfatados en C-2(β) y C-3(α) nos permitió establecer algunas correlaciones entre las estructuras químicas y la actividad citotóxica.

Respecto de la citotoxicidad de los 6*E*-hidroximinosteroides evaluados frente a PC-3, los compuestos 2 β ,3 α -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (**93**) y su análogo disulfatado (**94**) resultaron 5 veces más potentes que la oxima esteroideal más activa reportada hasta el momento (Compuesto **87**, figura 3.16) (Cui y col. 2009b). Por otra parte, el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**) resultó ser 2,2 veces más activo frente a PC-3 que los esteroides sulfatados reportados en la literatura (Huang y col. 2013). En cuanto a la línea LNCaP, estos son los primeros datos sobre actividad de 6*E*-hidroximino y esteroides polihidroxilados sulfatados, siendo el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**) el más activo de la serie.

Si bien en la literatura se informa la actividad citotóxica de oximas esteroidales con grupos sulfato (Huang y col. 2013), nuestro trabajo es el primero en donde se evalúa la influencia del grupo sulfato en un 6*E*-hidroximinosteroide sulfatado en comparación con su análogo hidroxilado (Compuesto **93** y **94**). Los resultados indicaron que los grupos sulfato son importantes para que los compuestos presenten una mayor citotoxicidad frente a la línea tumoral LNCaP.

3.5 Referencias Bibliográficas

- Aiello, A; Fattorusso, E; Magno, S; Menna, M; Pansini, M. Steroids of the marine sponge *Cinachyra tarentina*: isolation of cholest-4-ene-3,6-dione and (24r)-24-ethylcholest-4-ene-3,6-dione. *J. Nat. Prod.* **1993**; 54: 281-5.
- Al-Horani, RA; Desai, UR. Chemical sulfation of small molecules - advances and challenges. *Tetrahedron* **2010**; 66(16): 2907-18.
- Anastasia, M; Allevi, P; Ciuffreda, P; Fiecchi, A. Beckmann rearrangement of Δ^4 -6-hydroxyimino steroids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**; 2123-6.
- Cui, J; Huang, L; Fan, L; Zhou, A. A facile and efficient synthesis of some (6E)-hydroximino-4-en-3-one steroids, steroidal oximes from *Cinachyrella* spp. sponges. *Steroids* **2008**; 73: 252-6.
- Cui, J; Fan, L; Huang, L; Liu, H; Zhou, A. Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: Structure/activity studies (I). *Steroids* **2009a**; 74: 62-72.
- Cui, J; Fan, L; Huang, L; Xin, Y; Zhou, A. Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: Structure/activity studies (II). *Steroids* **2009b**; 74: 989-95.
- Cui, J; Wang, H; Huang, Y; Xin, Y; Zhou, A. Synthesis and cytotoxic analysis of some disodium 3 β ,6 β -dihydroxysterol disulfates. *Steroids* **2009c**; 74: 1057-60.
- Deive, N; Rodríguez, J; Jiménez, C. Synthesis of cytotoxic 6E-hydroximino-4-ene steroids: Structure/activity studies.. *J. Med. Chem.* **2001**; 44: 2612-8.
- Fieser, L. Δ^4 -Cholesten-3,6-dione. *Org. Synth. Coll. Vol. 4* **1963**: 189-190.
- Hoiberg, CP; Mumma, RO. Preparation of sulfate esters. Reactions of various alcohols, phenols, amines, mercaptans, and oximes with sulfuric acid and dicyclohexylcarbodiimide. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**; 91: 4273-8.
- Holland, HL; Kumaresan, S; Tan, L; Njar, VCO. Synthesis of 6-hydroximino-3-oxo steroids, a new class of aromatase inhibitor. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1992**; 585-7
- Huang, Y; Cui, J; Li, Y; Fan, L; Jiao, Y. Syntheses and antiproliferative activity of some sulfated hydroximinosterols. *Med. Chem. Res.* **2013**; 22: 409-14.
- Okada, K; Mori, K. Synthesis of brassinolide analogs and their plant growth-promoting activity. *Agric. Biol. Chem.* **1983**; 47 (1): 89-95.
- Poza, J; Rega, M; Paz, V; Alonso, B.; Rodríguez, J; Salvador, N; Fernández, A; Jiménez, C. Synthesis and evaluation of new 6-hydroximinosteroid analogs as cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**; 15: 4722-40.
- Rodríguez, J; Nuñez, L; Peixinho, S; Jiménez, C. Isolation and synthesis of the first natural 6-hydroximino 4-en-3-one- steroids from the sponges *Cinachyrella* spp. *Tetrahedron Lett.* **1997**; 38 (10): 1833-6.
- Schlecht, M. *Comprehensive Organic Chemistry* 5th Edition **2005**. Editorial Elsevier.
- Silverstein, R; Webster, F. *Spectrometric identification of Organic Compounds*. 6th Edition **1998**. Editorial Wiley.
- Vanghelovici, M; Visiliu, G. *Bull. Soc. Chim. Romania* **1935**; 17: 249-65.

-Windaus, a. Über einige umwandlungsprodukte des cholestens und pseudo-cholestens und über den nachweis einer der doppelbindung benachbarten methylengruppe im cholesterin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft B* **1920**; 53B: 488-97.

-Xiao, DJ; Peng, XD; Deng, SZ. Structure elucidation of (3*E*)-cholest-4-en-3,6-dione-3-oxime in marine sponge *Cinachyrella australiensis* from the south china sea. *Chin. J. Org. Chem.* **2005**; 25 (12): 1606-9.

-Zeelen, FJ. *Phannacochemistry Library*. 15: *Medicinal Chemistry of Steroids*. **1990** Editorial Elsevier, Amsterdam.

Capítulo 4:

**Actividad antiviral de análogos
sintéticos de esteroides
polihidroxilados sulfatados**

4.1 Introducción

El tratamiento con vacunas ha logrado erradicar el virus de la viruela y controlar importantes virus patógenos como los de la poliomielitis, el sarampión, las paperas y la rubeola. Sin embargo, otras enfermedades virales que no pueden ser tratadas con vacunas requieren del uso de drogas para su tratamiento. Este es el caso del síndrome de inmunodeficiencia humano (HIV), la hepatitis C, la mayoría de los virus respiratorios, las diferentes variedades de virus herpes así como los virus que producen fiebres hemorrágicas. Por esta razón es necesaria la búsqueda de drogas más efectivas y selectivas frente a estos virus (De Clercq 2002). Por otra parte, los pacientes infectados con HIV son muy sensibles a infecciones generadas por virus oportunistas pertenecientes a la familia *Herpesviridae* como herpes simplex (HSV), citomegalovirus humano (HCMV), virus de Epstein-Barr, herpes zoster (VZV) y el virus del papiloma humano (HPV). El aumento en la frecuencia y gravedad de las infecciones generadas por estos virus en personas infectadas con HIV se debe a la disfunción en la respuesta inmunológica a estos patógenos (Tugizov y col. 2011). Por esta razón es que paralelamente a la búsqueda de compuestos antivirales frente al virus HIV, es necesario buscar compuestos inhibidores de los virus patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, cuyo número está en aumento dada cantidad de quimioterapias agresivas, el aumento en el número de trasplantes de órganos y de pacientes infectados con HIV (Abad Martinez y col. 2008).

El virus HSV, además de ser uno de los típicos virus oportunistas en pacientes infectados por HIV (Abad Martinez y col. 2008), es uno de los virus patogénicos más comunes. HSV-1 afecta al 40-80% de la población mundial y, aproximadamente, al 90% de las personas de entre 20 y 40 años, mientras que el serotipo 2 afecta al 8-40% de la población (Gupta y col. 2007). La mayoría de los tratamientos contra el virus herpes simplex están basados en análogos del nucleósido guanina, como el aciclovir. Sin embargo, su uso prolongado genera resistencia en el virus. Por esta razón es muy importante desarrollar nuevas drogas antivirales que actúen por un mecanismo diferente al del aciclovir (Lopes y col. 2013)

Una enfermedad endémica en nuestro país es la fiebre hemorrágica argentina, la cual es causada por el virus Junín (JV), que es transmitido por el roedor *Calomys musculus*. Esta enfermedad afecta generalmente a personas que viven o trabajan en zonas fértiles de la pampa húmeda que comprende parte de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y La Pampa

(Figura 4.1). La enfermedad comienza con síntomas similares a los de una gripe pero, en ausencia de tratamiento, pueden surgir complicaciones tales como manifestaciones hemorrágicas, neurológicas, tendencia a infecciones bacteriológicas y, en casos terminales, problemas renales. La mortalidad, en ausencia del tratamiento, es del 15-30% pero si se trata a tiempo, este porcentaje desciende al 1% (Enria y col. 2008). El tratamiento consiste en el suministro de plasma inmune en dosis que se encuentran estandarizadas de acuerdo a la cantidad de gamma globulinas presentes. Sin embargo este tratamiento es eficaz cuando la transfusión se realiza durante la primera semana de la enfermedad (Enria y Maiztegui 1994).



Figura 4.1: Regiones de Argentina en donde la población está afectada por la fiebre hemorrágica argentina

Aun así, el tratamiento con plasma requiere disponer de stock suficiente y conlleva la posibilidad de contraer alguna enfermedad debido a la transfusión. Además, es necesario encontrar un tratamiento que pueda aplicarse en los casos de pacientes en estadios más avanzados de la enfermedad (Enria y col. 2008). Por estas razones, es imprescindible continuar con la búsqueda de nuevas drogas antivirales frente a este virus.

4.1.1 Antecedentes de esteroides naturales y sintéticos con actividad antiviral

Dentro del amplio espectro de actividades biológicas que poseen los esteroides polihidroxilados y polisulfatados de origen natural, hay varios antecedentes en la literatura de esteroides activos frente al virus de inmunodeficiencia humana, HIV (Akihisa y col. 2001; Rudi y col. 2001; Bifulco y col. 1994; McKee y col. 1993; Sun y col. 1991). Un estudio de inhibición sobre HIV-1 y HIV-2 realizado con más de 20 esteroides polisulfatados aislados a partir de esponjas marinas, ofiuros y estrellas de mar demostró que los esteroides con grupos sulfato en las posiciones 2, 3 y/o 6 resultaron ser los más activos, a diferencia de aquéllos con grupos sulfato en el anillo D (McKee y col. 1994). El compuesto halistanol trisulfato F (compuesto **17**, figura 4.2) es un ejemplo de este tipo de compuestos.

En el año 2011, se probó la actividad inhibitoria de varios polihidroxiesteroides aislados del octocoral *Isis hippuris*, frente al citomegalovirus humano (HCMV), causante de la mononucleosis infecciosa, determinándose que el compuesto **99** era el más activo (Chen y col. 2011). Por otra parte, el compuesto dihidroxilado **100**, aislado a partir de la planta *Euphorbia chamaesyce*, posee un potente efecto inhibitorio del virus de Epstein-Barr, causante de la mononucleosis infecciosa aguda (Tanaka y col. 2000).

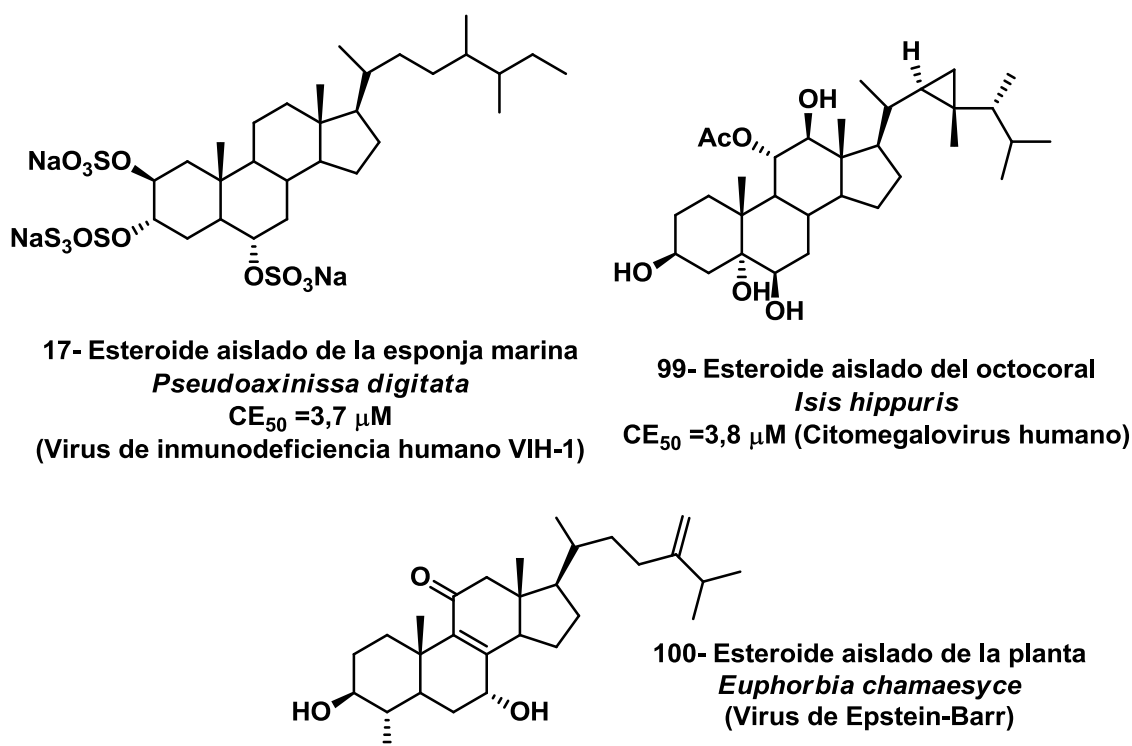


Figura 4.2: Ejemplos de esteroides polioxigenados con actividad antiviral frente a diferentes virus

La mayoría de los estudios de actividad antiviral de esteroides naturales y sus derivados frente a virus de la familia *Herpesviridae* se realizaron con el virus del herpes simplex (HSV-1 y HSV-2). Los estudios de actividad antiviral de derivados de brasinosteroides (compuesto 101, figura 4.3) frente a HSV-1 han demostrado que el mecanismo por el cual actúan no involucra la inactivación directa del virus sino que podrían afectar un paso tardío de su multiplicación (Michellini y col. 2004; Wachsmann y col. 2004, Wachsmann y col. 2000). En la figura 4.3 se muestran otros ejemplos (compuestos **102-104**) de esteroides polihidroxilados naturales con marcada actividad frente al virus HSV (Niedermeyer y col. 2005; Peng y col. 2010).

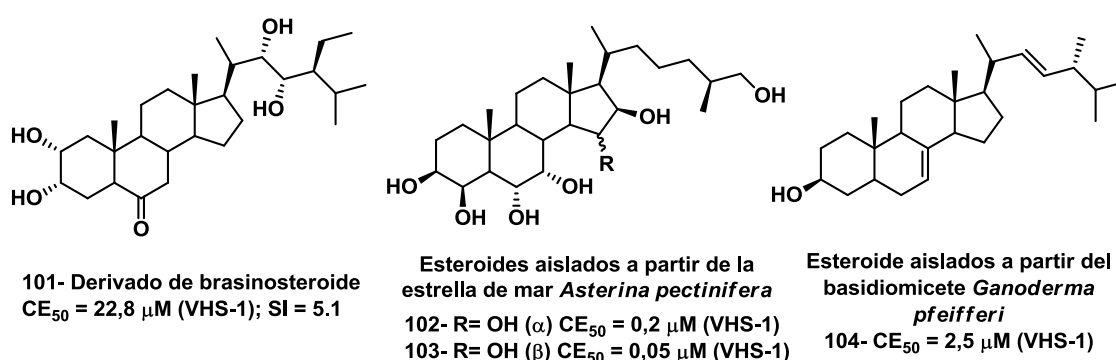


Figura 4.3: Ejemplos de esteroides polioxigenados con actividad antiviral frente a HSV

Los esteroides sulfatados también presentan actividad antiviral frente a HSV. En nuestro laboratorio se realizó un extenso estudio químico de varias especies de ofiuros recolectados en el Mar Argentino y en la zona de las Islas Georgias del Sur, obteniendo como resultado el aislamiento y la caracterización de varios esteroides polihidroxilados sulfatados (Roccatagliata y col. 1998, Roccatagliata y col. 1996, Roccatagliata y col. 1995), los cuales fueron evaluados frente a diferentes virus.

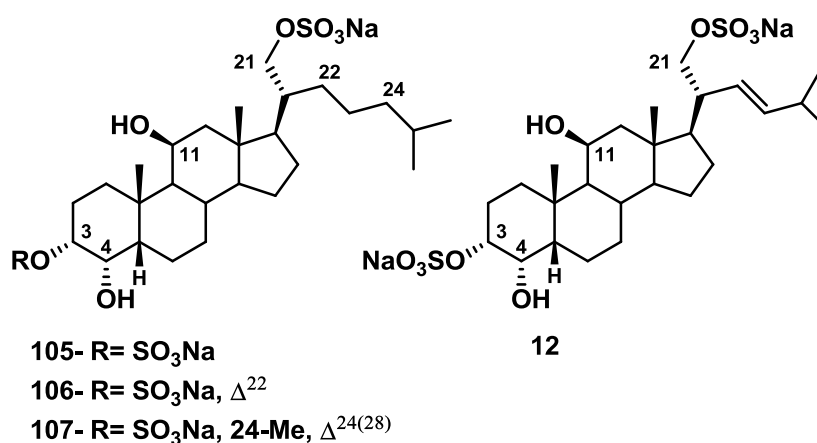


Figura 4.4: Esteroides polihidroxilados disulfatados aislados a partir del ofiuro *O. januarii*

Los esteroides disulfatados (Figura 4.4), aislados a partir del ofiuro *Ophioplocus januarii*, resultaron poco activos frente a HSV-1 a las concentraciones ensayadas ($CE_{50} > 40 \mu\text{g/ml}$) (Roccatagliata y col. 1996).

También se ensayó la actividad antiviral frente a HSV-2 de tres esteroides polihidroxilados disulfatados aislados a partir del ofiuro antártico *Astrotoma agassizii* (compuestos **9**, **10** y **110**) y dos derivados del compuesto disulfatado **9** obtenidos por acetilación o solvólisis (Compuestos **108** y **109**) (Figura 4.5). Los compuestos resultaron activos frente al virus, a diferencia de los encontrados en *O. januarii*. Una de las diferencias con los esteroides sulfatados de *O. januarii* se encuentra en la estereoquímica del H-5. Por lo tanto, estos resultados indicaron que la presencia de un doble enlace Δ^5 o la configuración *trans* de los anillos A/B es una característica favorable para la actividad. Por otra parte, los esteroides sulfatados en C-21 y C-2(β) (compuestos **9**, **108** y **110**) o C-3(α) (compuesto **10**) con grupos hidroxilos adicionales en el anillo A en C-2(β) o C-3(α) fueron los más efectivos frente a HSV-2 (Comin y col. 1999; Roccatagliata y col. 1998).

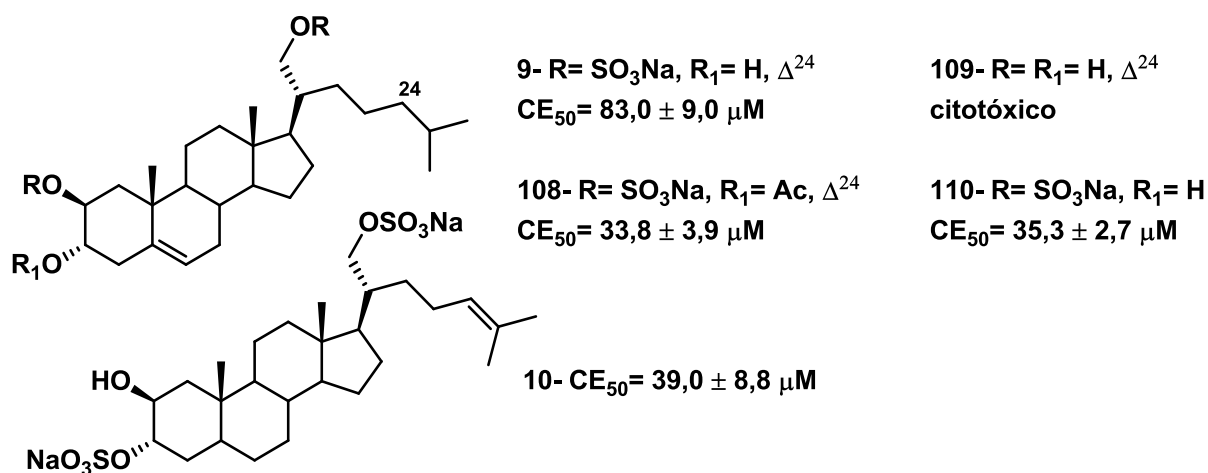


Figura 4.5: Esteroides polihidroxilados disulfatados aislados a partir del ofiuro *O. agassizii*, derivados semisintéticos y su actividad antiviral frente a HSV-2

También se ensayó la actividad frente a HSV de una serie de 20-cetopregnanos sintéticos (compuestos **30-33**), análogos de esteroides marinos (Figura 4.6). Los resultados demostraron que los compuestos con esqueletos tipo pregnano no fueron activos a las concentraciones ensayadas ($CE_{50} > 80 \mu\text{g/ml}$) (Comin y col. 1999).

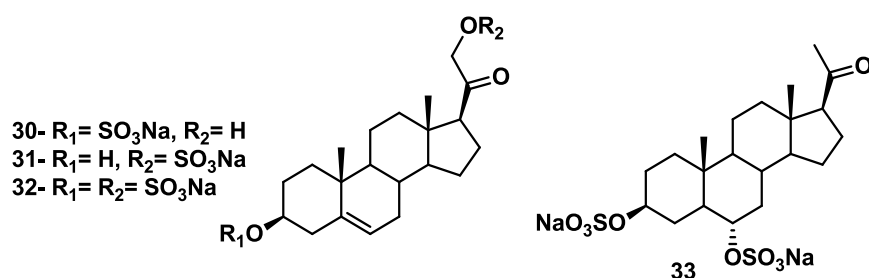


Figura 4.6: 20-ceto pregnanos sintéticos inactivos frente a HSV.

Como parte de estudios previos de correlación estructura-actividad, se sintetizaron 5 α -colestanos funcionalizados en C-2 (β) y C-3 (α) con el fin de evaluar la influencia de grupos hidroxilo, sulfato y acetato en la actividad antiviral (Garrido Santos y col. 2003). En la tabla 4.1 se presentan los resultados obtenidos en este estudio. Se observa que la presencia de un grupo acetato en C-2 (compuesto **113**) o C-3 (compuesto **111**) disminuye la actividad del compuesto. Por otro lado, la actividad del compuesto disulfatado **37** no presenta diferencias significativas a la del monosulfatado en C-2 (compuesto **112**), mientras que el análogo monosulfatado en C-3 (compuesto **114**) no es activo en las concentraciones ensayadas ($\text{CE}_{50} > 25 \mu\text{g/ml}$).

Tabla 4.1: Evaluación de la actividad antiviral frente a HSV-2 de diferentes colestanos sintéticos

Compuesto (Nro.)	Vero		HSV-2		Compuesto	Vero		HSV-2	
	(CC ₅₀)		(CE ₅₀)			(CC ₅₀)		(CE ₅₀)	
(37) $R_1 = R_2 = \text{SO}_3\text{Na}$	>100		39,3 $\pm$ 2,5		(36) $R_1 = R_2 = \text{H}$	>100		>100	
(111) $R_1 = \text{SO}_3\text{Na}$ $R_2 = \text{Ac}$	>100		>100		(113) $R_1 = \text{Ac}$ $R_2 = \text{SO}_3\text{Na}$	71,1		>45,6	
(112) $R_1 = \text{SO}_3\text{Na}$ $R_2 = \text{H}$	59,2		38,1 $\pm$ 5,7		(114) $R_1 = \text{H}$ $R_2 = \text{SO}_3\text{Na}$	75,0		>49,3	

CC₅₀ e CE₅₀ expresados en μM

A partir de estos resultados se podría concluir que la sulfatación del C-3 no es esencial para la actividad. Sin embargo, hay que destacar que el índice de selectividad ($\text{CC}_{50}/\text{CE}_{50}$) del compuesto **112** es igual a 1,6, con lo cual la reducción en el número de placas virales también está asociada a la citotoxicidad del compuesto monosulfatado. Con lo cual, el sulfato en C-3, si bien no mejora la actividad antiviral del compuesto disulfatado **37**,

disminuye su citotoxicidad. De este modo, se puede concluir que la presencia de ambos grupos sulfato es importante para que el esteroide sea activo y selectivo frente al virus.

En cuanto a los antecedentes de esteroides sulfatados con actividad antiviral frente al virus Junín (JV), se evaluó la actividad antiviral de un grupo de compuestos naturales y sintéticos. Los resultados se observan en la figura 4.7.

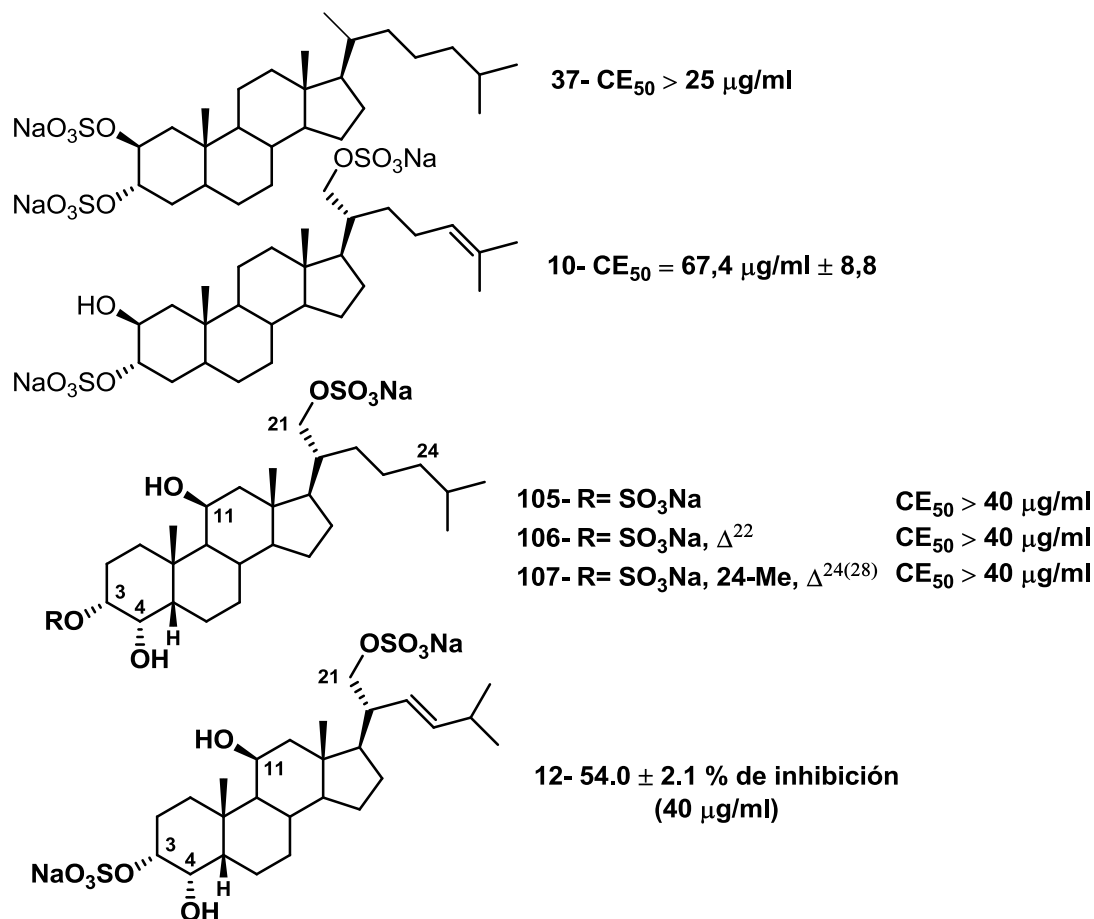


Figura 4.7: Esteroides naturales y sintéticos y su actividad antiviral frente a JV.

En todos los casos, con excepción del compuesto **12**, al comparar con los datos de actividad obtenidos frente a HSV, se observa que el virus JV es menos susceptible a los esteroides sulfatados, que el virus HSV.

Por último, una serie de dehidroepiandrosteronas y epiandrosteronas sintéticas resultaron activas frente a JV. En la figura 4.8 se muestran dos ejemplos de epiandrosteronas activas (Compuestos **115** y **116**) (Acosta y col. 2008). También hay antecedentes de brasinosteroides que inhiben dicho virus, tal como el compuesto **117**, el cual presenta una actividad importante y un alto índice de selectividad. El compuesto actúa por interferencia

en la maduración de la partícula viral, sin intervenir en la etapa de adsorción y penetración en la célula hospedadora (Castilla y col. 2005).

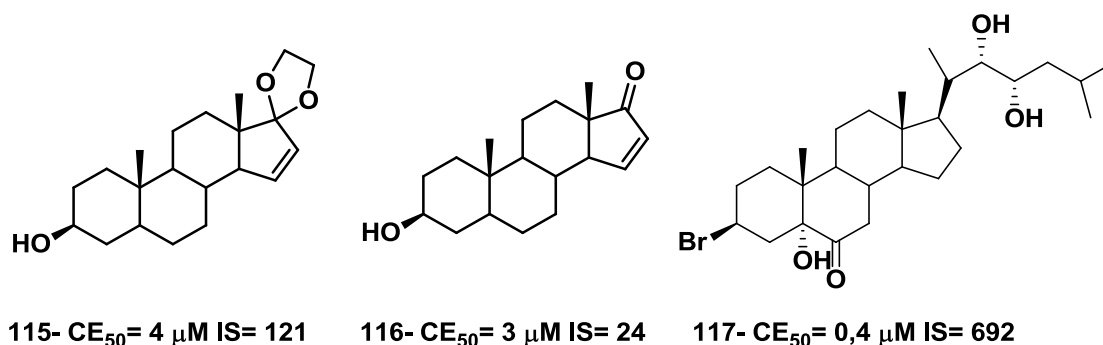


Figura 4.8: Ejemplos de epiandrosteronas y brasinosteroides con actividad antiviral frente a JV. IS=índice de selectividad

4.2 Resultados de la actividad antiviral de los compuestos sintetizados en esta tesis

Dados los antecedentes que revelaron la importancia de los grupos sulfato en C-2(β) y C-3(α) para la actividad antiviral de colestanos, en este trabajo de tesis se estudió el efecto de la modificación de la configuración de ambos grupos sulfato así como la influencia de un sustituyente (hidroxilo, sulfato, cetona u oxima) en C-6, en la actividad antiviral frente a HSV-1. Los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes a los esteroides desulfatados. Este trabajo se realizó en colaboración con la Dra. Elsa Damonte del Departamento de Química Biológica (FCEN, UBA).

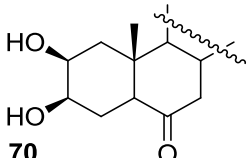
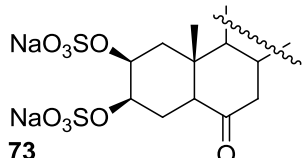
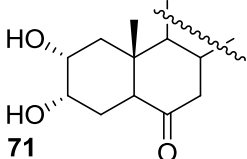
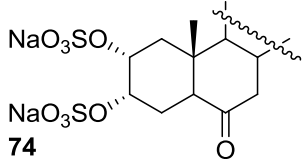
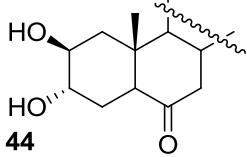
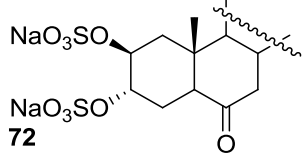
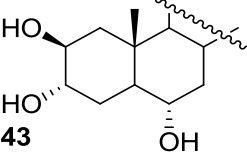
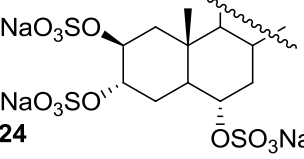
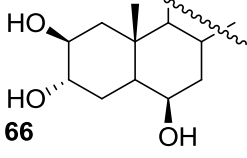
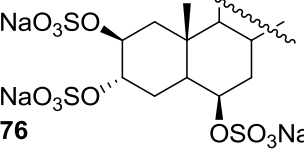
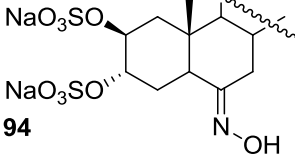
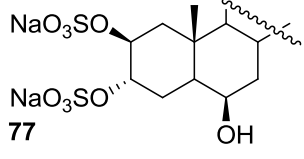
4.2.1 Actividad citotóxica

En primer lugar se estudió la citotoxicidad de los compuestos en células normales (células Vero) en ausencia del virus. Para ello, se midió la concentración citotóxica 50% (CC_{50}), definida como la concentración de esteroide necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50%. En la tabla 4.2 se presentan los valores de CC_{50} frente a células Vero.

A partir de los datos de la tabla 4.2, se puede observar que los esteroides presentan una baja citotoxicidad ya que sus CC_{50} son cercanas o mayores a $100 \mu M$. Hay dos excepciones y corresponden a los compuestos **43** y **70**, ambos hidroxilados, siendo el triol 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**) el más citotóxico de la serie con una CC_{50} de $17,5 \mu M$. Es interesante destacar que el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (**66**), epímero en C-

6 del compuesto **43**, no presenta citotoxicidad a las concentraciones evaluadas. Por lo tanto, el hidroxilo en C-6(α) juega un papel muy importante en la citotoxicidad.

Tabla 4.2: Evaluación de la citotoxicidad en células Vero de los esteroides sintetizados durante este trabajo de tesis.

Compuesto	Vero (CC ₅₀)	Compuesto	Vero (CC ₅₀)
 70	37,7±2,3	 73	94,6±3,3
 71	125,8±0,4	 74	98,7±3,0
 44	81,4±24,1	 72	104,4±2,5
 43	17,5±0,5	 24	>137,6
 66	>237,7	 76	>137,6
 94	>156,8	 77	109,2±1,4

CC₅₀ expresados en μ M

Por otra parte, es notorio que en la mayoría de los casos, la sulfatación de los compuestos disminuye su citotoxicidad. Esto se observa para los pares de compuesto **70** y **73**; **44** y **72**; **43** y **24**; **76** y **77**. En los únicos casos en los que no se observa esta tendencia es en los pares de compuestos 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**71**) y su análogo disulfatado (compuesto **74**) y para el compuesto trisulfatado **76** y el triol **66**, todos ellos muy poco citotóxicos (CC₅₀ $\geq$ 100 μ M).

Las 2,3-dihidroxi-5 α -colestano-6-onas (compuestos **44**, **70** y **71**) poseen valores de CC₅₀ diferentes, dependiendo de la configuración de los hidroxilos, mientras que sus análogos disulfatados (compuestos **72**, **73** y **74**) presentan valores de CC₅₀ similares. El compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (**77**) también posee una CC₅₀ similar al de los demás análogos disulfatados.

Se observa que los esteroides trisulfatados (compuestos **24** y **76**) poseen citotoxicidades aún más bajas (CC₅₀>137 μ M) que las de los compuestos disulfatados, cuyo valor está alrededor de 100 μ M.

La oxima **94** no mostró citotoxicidad a las concentraciones ensayadas (CC₅₀> 157 μ M) presumiblemente debido a los grupos sulfato en posición 3 β ,3 α y al grupo hidroximino en C-6, ya que su análogo con un grupo ceto en C-6 (compuesto **72**) presenta una mayor citotoxicidad (CC₅₀= 94,5 μ M).

4.2.2 Actividad antiviral frente a HSV-1:

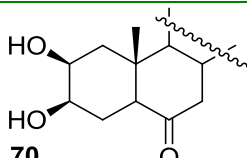
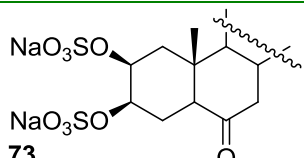
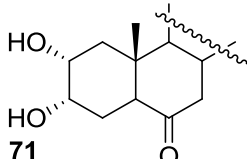
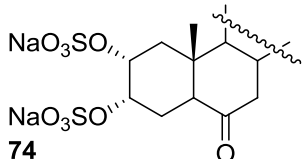
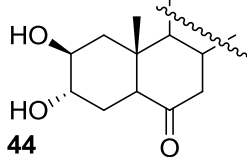
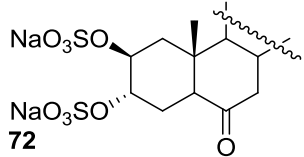
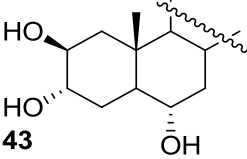
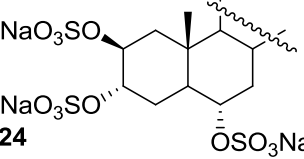
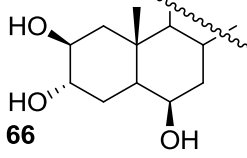
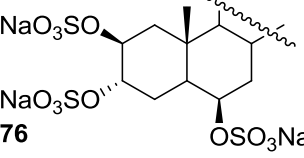
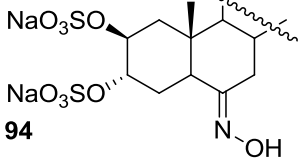
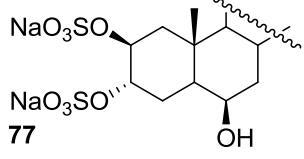
Para la evaluación de la actividad antiviral de los diferentes esteroides, la concentración más alta ensayada fue igual a su CC₅₀/4. Esta cota se fijó para evidenciar la reducción en el número de placas debido a la actividad antiviral y no por disminución en la viabilidad celular generada por la citotoxicidad del compuesto. La actividad antiviral se expresó como la concentración efectiva 50% (CE₅₀) definida como la concentración de esteroide necesaria para reducir el número de placas virales en un 50%. En la tabla 4.3 se presentan los resultados del ensayo de actividad antiviral.

A partir de la tabla se concluye que una condición necesaria para la actividad antiviral es la presencia de grupos sulfato en C-2(β) y C-3(α), como en los compuestos activos **72**, **76**, **77** y **94**. Por el contrario, se observa que los compuestos **73** y **74** que presentan los grupos sulfato en C-2 y C-3 en configuración *cis*, son inactivos frente a HSV-1 en las concentraciones ensayadas. Por último, es evidente que la presencia de grupos sulfato en posición C-2(β) y C-3(α) no es suficiente para que un compuesto sea activo ya que el compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**24**) no muestra actividad a las concentraciones ensayadas. Esto demuestra la influencia de la sustitución en C-6.

En cuanto a los compuestos funcionalizados en C-6, se observa que son activos los que presentan la función oxigenada en la cara β (compuestos **76** y **77**) o un grupo carbonilo

(compuesto **72**) u oxima (compuesto **94**). En todos los casos los valores de CE_{50} son similares, teniendo en cuenta el error de la medición.

Tabla 4.3: Evaluación de la actividad antiviral de los esteroides sintetizados durante este trabajo de tesis.

Compuesto	HSV-1 (CE_{50})	Compuesto	HSV-1 (CE_{50})
 70	>7,5	 73	>20,1
 71	>29,5	 74	>20,1
 44	>29,9	 72	29,7±1,7
 43	>7,4	 24	>34,4
 66	>59,4	 76	27,1±10,5
 94	26,0±2,3	 77	31,0±3,9

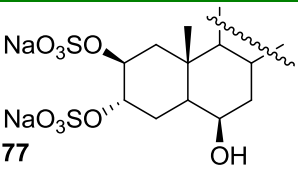
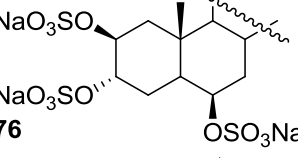
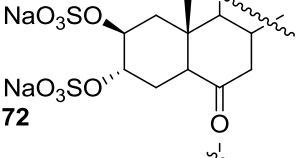
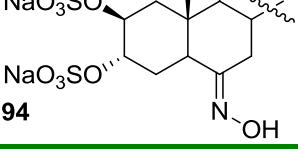
CE_{50} expresados en μM

Sin embargo, el análogo disulfatado con un metileno en la posición 6 (compuesto **37**, tabla 4.1, Garrido Santos y col. 2003) es ligeramente menos activo que los compuestos **72**, **76**, **77** y **94**, lo que indicaría un pequeño incremento en la actividad en presencia de grupos polares en C-6.

4.2.2.1 Índice de selectividad

En la quimioterapia antiviral es clave la selectividad del compuesto frente al virus ya que es necesario inhibir la replicación viral sin afectar el normal funcionamiento de la célula huésped. A pesar de la íntima relación entre la replicación viral y el metabolismo celular, existen varios eventos en el ciclo de replicación viral que no ocurren en las células sin infectar (como la adsorción, penetración y desnudamiento del virus) o que son controlados por enzimas codificadas por los virus que difieren estructural y funcionalmente de las correspondientes enzimas celulares del huésped (Andrei y col. 2006). Por lo tanto es posible ejercer un efecto antiviral sin afectar a la célula.

Tabla 4.4: Índice de selectividad (IS) y evaluación de la actividad virucida de los compuestos **72**, **76**, **77** y **94**.

Compuesto	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)	VC ₅₀ (μM)
 77	3,5	72,8± 1,3
 76	>5,0	56,3 ± 4,0
 72	3,5	85,4 ± 0,8
 94	>6,0	106,8± 13,0

A partir de los datos de CC₅₀ e CE₅₀ es posible calcular el índice de selectividad (IS) de un compuesto. El IS se define como el cociente entre e CC₅₀ y la CE₅₀. Este valor determina en qué medida la reducción del número de placas virales es el resultado de la disminución en la muerte celular debido la acción antiviral del compuesto, respecto de su citotoxicidad. Idealmente, el IS debe ser alto de manera tal de generar un máximo de actividad antiviral sin que el compuesto posea efectos tóxicos sobre las células. De este modo, de los cuatro

compuestos activos presentados en la tabla 4.3, que presentan CE_{50} similares, se destacan los compuestos **76** y **94** los cuales poseen índices de selectividad mayores que 5 y 6, respectivamente (Tabla 4.4).

4.2.2.2 Actividad virucida

Con el objeto de establecer si la actividad antiviral observada es debida a la inactivación del virus previo a la entrada en la célula, se evaluó la actividad virucida de los compuestos activos (compuestos **72**, **76**, **77** y **94**). Se determinó la concentración virucida 50% (VC_{50}) definida como la concentración de esteroide necesaria para inactivar al virus en un 50%. Los resultados se presentan en la tabla 4.4.

De acuerdo a los datos de la tabla, se puede observar que los VC_{50} de los compuestos son entre 2 y 4 veces mayores que sus CE_{50} , es decir que son menos activos como virucidas que como antivirales. Por lo tanto, el efecto que prevalece en los experimentos de actividad es el antiviral.

4.2.2.3 Mecanismo de acción

Para estudiar el mecanismo de acción, se seleccionaron los compuestos con mayor índice de selectividad, es decir, el 2 β ,3 α -dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano disulfato (**94**) y 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**). Este estudio permitió establecer cuál es la etapa del ciclo de multiplicación viral que es bloqueada por éstos. Para ello, cada compuesto fue agregado a una concentración mayor a la CE_{50} (25 μ g/ml) para observar la reducción total en el número de placas virales y que el efecto antiviral se evidencie claramente en los distintos experimentos.

Los experimentos se realizaron según tres modalidades diferentes: 1) el compuesto presente durante todo el ensayo, 2) durante la adsorción del virus y 3) después de la adsorción. Se observó la reducción total de placas virales cuando el compuesto estuvo presente durante todo el experimento y cuando se agregó luego de la adsorción del virus. No se observó efecto alguno (número de placas virales similares a las del control) cuando el compuesto estuvo presente únicamente durante la adsorción y penetración del virus en la célula.

Los resultados de los experimentos indicaron que los compuestos sulfatados actúan en una etapa posterior al ingreso y penetración del virus a la célula. A su vez, esto demuestra la

capacidad del esteroide sulfatado de ingresar a la célula. Este resultado es interesante ya que el proceso de adsorción de muchos virus, entre ellos el HSV (Shukla y col. 1999), se debe a su interacción con el heparán sulfato -polisacárido lineal sulfatado perteneciente a un proteinglicano-, que se encuentra expuesto en la superficie de la célula (De Clercq 2002). Por esta razón, numerosos compuestos polianiónicos (polisulfatos, policarboxilatos, polioxometalatos y albúminas cargadas negativamente) inhiben la adsorción del virus en la célula por interacción electrostática entre los residuos cargados positivamente de la cápside de los virus envueltos (como lisina y arginina) y las cargas negativas del compuesto polianiónico (Olson y Björk 1991; Olson y col. 1991). De hecho, la utilización de compuestos polisulfatados como miméticos de los sitios de unión de los virus en la superficie celular, es una estrategia promisorio para el tratamiento antiviral (De Clercq 2002). Es probable que los compuestos **76** y **94** no inhiban este paso ya que, si bien poseen dos grupos sulfato, la densidad de carga –clave para dicha inhibición (Ghosh y col. 2009)- no es suficiente para que haya una fuerte interacción entre el virus y el esteroide.

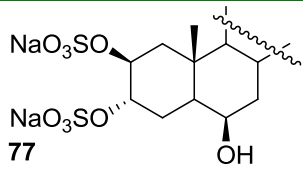
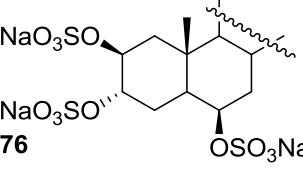
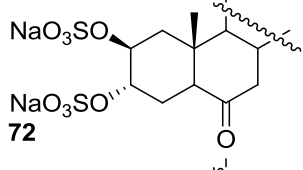
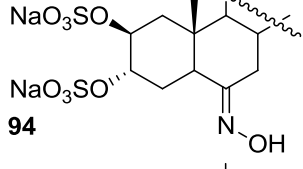
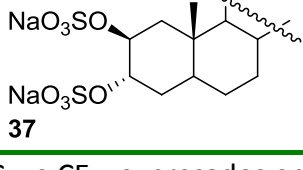
4.2.3 Actividad antiviral frente a JV

Se evaluó la actividad antiviral de los compuestos sulfatados sintéticos **72**, **76**, **77** y **94** frente al virus Junín. Los compuestos fueron seleccionados de acuerdo con su actividad antiviral frente a HSV. Este criterio se basa en que a menudo los compuestos antivirales de amplio espectro poseen blancos que son comunes para una gran variedad de virus (Wolf y col. 2010). Es decir, el mecanismo de acción de la droga antiviral es el mismo en diferentes virus y por lo tanto, dicho mecanismo está relacionado con algún evento en el ciclo de replicación de los virus que es general para varios de ellos.

De acuerdo a lo anterior se probó la actividad de los cuatro compuestos activos frente a HSV, los cuales presentan grupos sulfato en C-2(β) y C-3 (α) y difieren en la sustitución en C-6. Nuevamente, la máxima concentración ensayada fue igual a $CC_{50}/4$. Los resultados se muestran en la tabla 4.5.

De estos resultados se puede inferir que la presencia de un grupo hidroxilo (compuesto **77**) o carbonilo (compuesto **72**) en C-6 favorece la actividad de inhibición del virus Junín, a diferencia de un grupo sulfato, oxima o metileno (compuestos **76**, **94** y **37**, respectivamente).

Tabla 4.5: Evaluación de la actividad antiviral de los esteroides **72**, **76**, **77**, **94** y **37** frente a JV.

Compuesto	Vero (CC ₅₀)	JV (CE ₅₀)	IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)
 77	109,2±1,4	34,7±1,1	3,1
 76	>137,6	>34,4	-
 72	104,4±2,5	34,5±3,7	3,0
 94	>156,8	>39,2	-
 37	108,4*	>41,1*	-

CC₅₀ e CE₅₀ expresados en μM. *Garrido Santos y col. 2003

4.2.4 Actividad antiviral frente al virus del dengue

Los compuestos sulfatados **72**, **76**, **77** y **94** también fueron evaluados como antivirales del virus del dengue, pero todos ellos presentaron un CE₅₀ > 25 μg/ml. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se había determinado que el compuesto 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan disulfato (**37**) presentaba actividad antiviral frente al virus del dengue (CE₅₀=16,9±0,2 μg/ml) (Garrido Santos y col. 2003). Esto indicaría que la presencia de un grupo polar en C-6 reduce la actividad inhibitoria.

4.3 Conclusiones

Los cuatro compuestos activos frente a HSV fueron el 2β,3α,6β-trihidroxi-5α-colestan trisulfato (**76**), el 2β,3α,6β-trihidroxi-5α-colestan-2,3-disulfato (**77**), el 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona disulfato (**72**) y el 2β,3α-dihidroxi-6E-hidroximino-5α-colestan disulfato (**94**), de los cuales los compuestos **76** y **94** son los que poseen mayor selectividad. El estudio

del mecanismo de acción de estos dos compuestos reveló que no actúan en una etapa temprana, sino que lo hacen luego de que el virus penetra en la célula.

Los compuestos 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (**77**) y 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**72**) fueron los únicos activos frente a JV. De acuerdo a los valores de CE₅₀, este estudio mostró que la presencia de un grupo alcohol o cetona en posición 6 es importante para que los compuestos presenten actividad antiviral frente a JV. La tendencia opuesta se observa frente al virus de dengue, ya que al sustituir el C-6 del esteroide, éste no muestra actividad antiviral en las condiciones ensayadas.

En comparación con los datos de actividad obtenidos frente a HSV, se observa que los compuestos son menos selectivos frente al virus Junín, mientras que el virus dengue no es susceptible a los esteroides sulfatados que se ensayaron en este trabajo de tesis.

La evaluación de la actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos (herpes simplex, Junín y dengue) de los esteroides sulfatados sintetizados nos permitió profundizar los estudios de correlación estructura/actividad realizados anteriormente en nuestro laboratorio.

4.4 Referencias Bibliográficas

- Abad Martinez, MJ; Bedoya del Alma, LM; Bermejo Benito, P. Natural marine antiviral products. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2008**; 35: 101-34.
- Acosta, EG; Bruttomesso, AC; Bisceglia, JA; Whachsman, MB; Galagovsky, LR; Castilla, V. Dehydroepiandrosterone, epiandrosterone and synthetic derivatives inhibit Junin virus replication in vitro. *Virus Res.* **2008**; 135: 203-12.
- Akihisa, T; Ogihara, J; Kato, J; Yasukawa, K; Ukiya, M; Yamanouchi, S; Oishi, K. Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Lipids* **2001**; 36(5): 507-12.
- Andrei, GM; de Clercq, E; Coto, CE. *Quimioterapia de las infecciones virales*. En: *Microbiología biomedical*. **2006**: p. 772. Editorial Atlante, Buenos Aires.
- Bifulco, G; Bruno, I; Minale, L; Riccio, R. Novel HIV-inhibitory halistanol sulfates F-H from a marine sponge, *Pseudoaxinissa digitata*. *J Nat. Prod.* **1994**; 57: 164-7.
- Castilla, V; Larzabal, M; Sgalippa, NA; Whachsman, MB; Coto, CE. Antiviral mode of action of a synthetic brassinosteroid against Junin virus replication. *Antivir. Res.* **2005**; 68: 88-95.
- Chen, WH; Wang, SK; Duh, CY. Polyhydroxylated steroids from the octocoral *Isis hippuris*. *Tetrahedron* **2011**; 67: 8116-9.
- Comin, MJ; Maier, MS; Roccatagliata, AJ; Pujol, CA; Damonte, EB. Evaluation of the antiviral activity of natural sulfated polyhydroxysteroids and their synthetic derivatives and analogs. *Steroids* **1999**; 64: 335-40.
- De Clercq, E. Strategies in the design of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov.* **2002**; 1(1): 13-25.
- Enria, DA; Maiztegui, JI. Antiviral Treatment of argentine hemorrhagic fever. *Antivir. Res.* **1994**; 23: 23-31.
- Enria, DA; Briggiler, AM; Sanchez, Z. Treatment of argentine hemorrhagic fever. *Antivir. Res.* **2008**; 78: 132-9.
- Garrido Santos, GA; Murray, AP; Pujol, CA; Damonte, EB; Maier, MS. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 β ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids* **2003**; 68: 125-132.
- Ghosh, T; Chattopadhyay, K; Marschall, M; Karnakar, P; Mandal, P; Ray, B. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* **2009**; 19: 2-15.
- Gupta, R; Warren, T; Wald, A. Genital herpes. *The Lancet* **2007**; 370: 2127-37.
- Lopes, N; Faccin-Galhardi, LC; Fernandes Espada, S; Cunha Pacheco, A; Pontes Silva Ricardo, NM; Carvalho Linhares, RE; Nozawa, C. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**; 60: 93-9.
- McKee, TC; Cardellina, JH; Tischler, M; Snader, KM; Boyd, MR. Ibisterol sulfate, a novel HIV-inhibitory sulfated sterol from the deep water sponge *Topsentia* sp. *Tetrahedron Lett.* **1993**; 34(3): 389-92.

- McKee, TC; Cardellina, JH 2nd; Riccio, R; D'Auria, MV; Iorizzi, M; Minale, L; Moran, RA; Gulakowski, RJ; McMahon, JB; Buckheit, RW. HIV-inhibitory natural products. 11. Comparative studies of sulfated sterols from marine invertebrate. *J Med. Chem.* **1994**; 37: 793-7.
- Michelini, FM; Ramirez, JA; Berra, A; Galagovsky, LR; Alché, LE. *In vitro* and *in vivo* antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroids analogues. *Steroids* **2004**; 69: 713-20.
- Niedermeyer, THJ; Lindequist, U; Mentel, R; Gordes, D; Schmidt, E; Thurow, K; Lalak, M. Antiviral terpenoid constituents of *Ganoderma pfeifferi*. *J. Nat. Prod.* **2005**; 68: 1728-31.
- Olson, ST; Björk, I. Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction. Elucidation from salt concentration effects. *J. Biol. Chem.* **1991**; 266: 6353-64.
- Olson, ST; Halvorson, HR, Björk, I. Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models. *J. Biol. Chem.* **1991**; 266: 6342-52.
- Peng, Y; Zheng, J; Huang, R; Wang, Y; Xu, T; Zhou, X; Liu, Q; Zeng, F; Ju, H; Yang, X; Liu, Y. Polyhydroxy steroids and saponins from China Sea starfish *Asterina pectinifera* and their biological activity. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**; 58(6): 856-8.
- Roccatagliata, AJ; Maier, MS; Seldes, AM. A novel marine steroidal sulfate from the starfish *Luidia Ludwigi*. *J. Nat. Prod.* **1995**; 58(12): 1941-4.
- Roccatagliata, AJ; Maier, MS; Seldes, AM; Pujol, CA; Damonte, EB. Antiviral sulfated steroids from the ophiuroid *Ophioplocus januarii*. *J. Nat. Prod.* **1996**; 59: 887-9.
- Roccatagliata, AJ; Maier, MS; Seldes, AM. New sulfated polyhydroxysteroids from the antarctic ophiuroid *Astrotoma Agassizii*. *J. Nat. Prod.* **1998**; 61(3): 370-4.
- Rudi, A; Yosief, T; Loya, S; Hizi, A; Schleyer, M; Kashman, Y. Clathsterol, a novel anti-HIV-1 RT sulfated sterol from the sponge *Clathria* Species. *J. Nat. Prod.* **2001**; 64: 1451-3.
- Shukla, D; Liu, J; Blaiklock, P; Shworak, NW; Bai, X; Esko, JD; Cohen, GH; Eisenberg, RJ; Rosenberg, RD; Spear, PG. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **1999**; 99: 13-22.
- Sun, HH; Gross, SS; Gunasekera, M; Kohen, FE. Weinbersterol disulfates A and B, antiviral steroid sulfates from the sponge *petrosia weinbergi*. *Tetrahedron* **1991**; 47(7): 1185-90.
- Tanaka, R; Kasabuchi, K; Kita, S; Tokuda, H; Nishino, H; Matsunaga, S. Bioactive steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. *J. Nat. Prod.* **2000**; 63: 99-103.
- Tugizov, SM; Webster-Cyriaque, JY; Syrianen, S; Chattopadyay, A; Sroussi, H; Zhang, L; Kaushal, A. Mechanism of viral infections associated with HIV: workshop 2B. *Adv. Dent. Res.* **2001**; 23(1): 130-6.
- Wachsman, MB; Lopez, EMF; Ramirez, JA; Galagovsky, LR; Coto, CE. Antiviral effect of brassinosteroids against herpes virus and arenaviruses. *Antivir. Chem. Chemoth.* **2000**; 11: 71-7.
- Wachsman, MB; Ramirez, JA; Talarico, LB; Galagovsky, LR; Coto, CE. Antiviral activity of natural and synthetic brassinosteroids. *Curr. Med. Chem. – Anti-infective agents* **2004**; 3(2): 163-79.

-Wolf, MC; Freiberg, AN; Zhang, T; Akyol-Ataman, Z; Grock, A; et. al. A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**; 107(7): 3157-62.

Capítulo 5:

Inhibición de la enzima
acetilcolinesterasa: ensayos *in vitro*
y estudio computacional

5.1 Introducción

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo progresivo que se manifiesta en el deterioro cognitivo, la pérdida de memoria a corto plazo (preservando la de largo plazo), la alteración en el lenguaje y trastornos conductuales (Goedert y Spillantini 2006). Se caracteriza por una degradación pronunciada del sistema colinérgico –cuyo rol es fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria-y por alteraciones en otros sistemas de neurotransmisión pertenecientes al sistema nervioso central, como el glutamatérgico y el serotoninérgico (Swerdlow 2007). En esta enfermedad, se observa que los niveles de acetilcolina (AC) –neurotransmisor presente en el sistema nervioso periférico y en el central- están disminuidos debido a que ésta es hidrolizada muy rápidamente por acción de la enzima acetilcolinesterasa (ACE) (Ladner y Lee 1998). También se observa la deposición de agregados fibrilares irregulares (llamados placas seniles) en el cerebro, compuestos principalmente por un péptido llamado β amiloide (Anand y Singh 2013). Sin embargo, a pesar del enorme esfuerzo realizado, muchos aspectos de la etiología de la enfermedad no son claros y por ello varias hipótesis se han formulado para intentar explicar la causa de este trastorno. Una de ellas es la *hipótesis colinérgica*. De acuerdo a ésta, la deficiencia selectiva e irreversible de las funciones colinérgicas conduce a la pérdida de memoria en la enfermedad de Alzheimer (Parle y col. 2004). Otra hipótesis vinculada con la recién mencionada es la *hipótesis amiloide*. Esta teoría también involucra a la ACE pero hace hincapié en una función secundaria de la enzima que es la de promover la deposición de las placas seniles en el cerebro, en las personas afectadas por Alzheimer (Bartolini y col. 2003; Rees y col. 2003; Selkoe 2002; Castro y Martinez 2001). De hecho, se considera que dicha deposición juega un papel muy importante en la iniciación y en la progresión de la enfermedad (Rees y col. 2003).

De acuerdo con la *hipótesis colinérgica*, la estrategia para mejorar las funciones cognitivas alteradas por la enfermedad, es la de aumentar la concentración de AC en la hendidura sináptica. A tal fin se desarrollaron diferentes tratamientos, pero para comprenderlos de una manera más clara es necesario explicar el modo de acción de la AC (Figura 5.1).

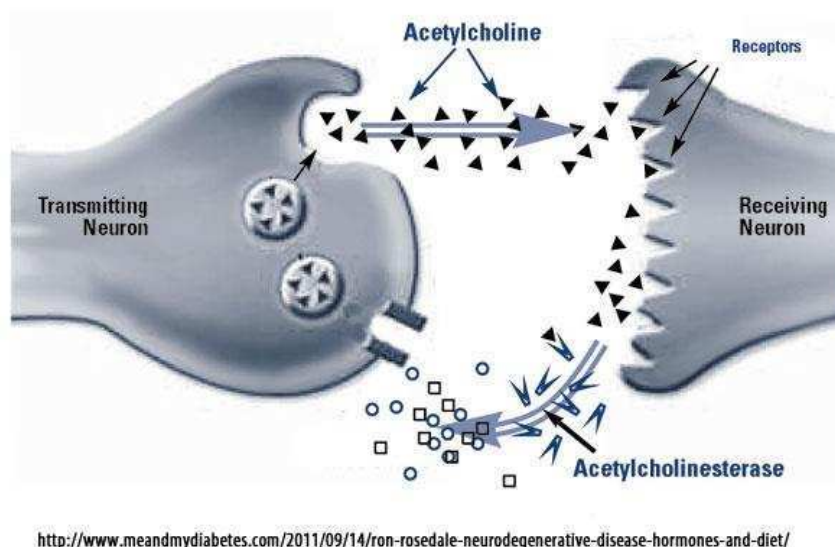


Figura 5.1: Esquema del modo de acción de la AC y ACE.

De manera simplificada, luego de que la acetilcolina es liberada a la hendidura sináptica, difunde hacia la célula nerviosa post sináptica, en donde es reconocida por los receptores colinérgicos, transmitiendo el impulso nervioso. Por último, la acción de la AC finaliza cuando la enzima ACE, presente en la hendidura sináptica, la hidroliza liberando colina y acetato al medio.

De acuerdo al mecanismo de acción, para incrementar la concentración de la AC en la hendidura, se trató a los pacientes con precursores del neurotransmisor o con agonistas colinérgicos. Sin embargo este tratamiento no fue efectivo o sus efectos secundarios eran severos. Por lo tanto, la atención se focalizó en la acetilcolinesterasa. La estrategia se basó en el suministro de compuestos inhibidores de dicha enzima con el consecuente aumento de la AC, disminuida en la enfermedad de Alzheimer (Prado-Prado y col. 2013; Rosenberry 1975). Sin dudas, esta estrategia ha dado lugar a la mayoría de las drogas para su tratamiento (Sivaprakasam 2006), las cuales son sólo sintomáticas ya que no cambian el curso de la enfermedad (Cummings 2007).

Sin embargo es imprescindible continuar con la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más efectivos para el tratamiento de esta enfermedad. Esto se debe a que la demencia (causada principalmente por la enfermedad Alzheimer) afecta a más de 35 millones de personas en el mundo y, debido al aumento en la expectativa de vida, se estima que en el año 2030 el número de personas afectadas se duplicará y en el año 2050

ascenderá a 115 millones, según el reporte del año 2013 de la organización internacional Alzheimer's Disease International (ADI). Es por esto que esta enfermedad se ha convertido en un problema importante de salud pública a nivel mundial (Wortmann y Flatcher 2013; Noetzli y Eap 2013) y es necesaria la búsqueda de nuevos inhibidores de la ACE (Anand y Singh 2013).

5.1.1 Inhibidores de la ACE

En un principio, los inhibidores de la ACE que se utilizaron fueron la tacrina (**118**) – primera droga aprobada contra el Alzheimer- y la fisostigmina (**119**) (ambas representadas en la figura 5.2) aunque sólo causaban modestas mejorías en las funciones cognitivas cuando se administraban a pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, estas drogas fueron descartadas pues demostraron escasa actividad en su administración oral, además de la baja penetración de la fisostigmina en el cerebro y la gran hepatotoxicidad de la tacrina. Luego, los estudios se enfocaron en la búsqueda de drogas que superaran los inconvenientes que se observaron con estos dos compuestos (Sugimoto y col. 2000). Actualmente, las cuatro drogas comúnmente utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad son los alcaloides donepezilo (compuesto **121**, derivado sintético encontrado casualmente en los laboratorios ingleses Eisai durante la búsqueda infructuosa de derivados de tacrina no tóxicos), galantamina (compuesto **123**, derivado natural aislado a partir de la planta del género *Galanthus* spp.), rivastigmina (compuesto **122**, derivado sintético de la fisostigmina) y memantina (**120**), siendo los tres primeros inhibidores de la ACE (Figura 5.2).

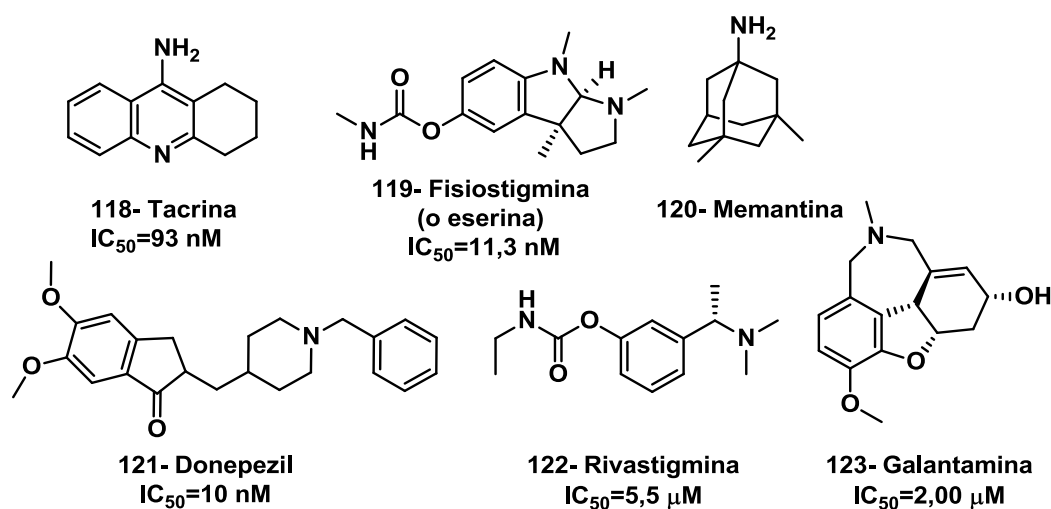


Figura 5.2: Drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer

Entre los inhibidores de la ACE hay una gran variedad de origen natural y sintético. Entre los compuestos de origen natural, la mayoría de los inhibidores de la ACE son alcaloides aislados a partir de plantas, hongos y organismos marinos. Algunos ejemplos se pueden observar en la figura 5.3. Estos son derivados de indoles (compuesto **124**, Alper y col. 2012), isoquinolinas (compuesto **125**, Hung y col. 2008), piperidinas (compuesto **127**, Danuello y col. 2002), cumarinas alcaloidales, alcaloides esteroidales y quinolizidinas como la huperzina A (compuesto **129**, Bai y col. 2000), aislada a partir de la planta *Huperzia spp.*, que se utiliza como suplemento dietario para la memoria y para el tratamiento de Alzheimer en China. También hay, en menor medida, inhibidores que no pertenecen al grupo de los alcaloides, entre ellos terpenoides, flavanoides y otros compuestos fenólicos (Murray y col. 2013).

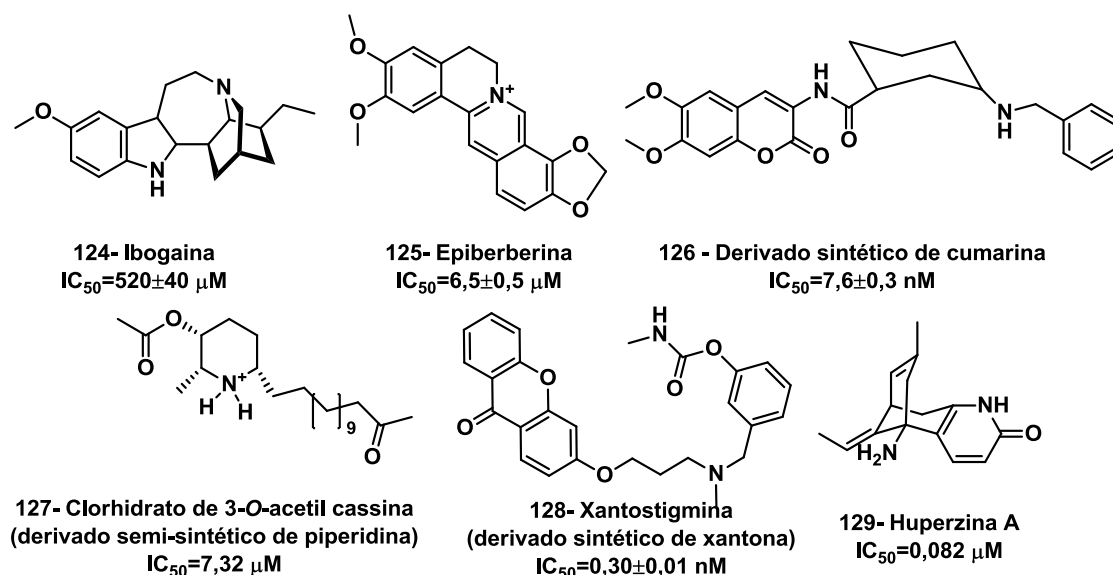


Figura 5.3: Ejemplos de inhibidores naturales y sintéticos no esteroidales de la enzima ACE

En cuanto a los inhibidores de origen sintético se incluyen los derivados de las drogas comerciales mencionadas anteriormente y también de la tacrina (Figura 5.2). También existen potentes inhibidores de la ACE derivados de la xantostigmina (compuesto **128**, figura 5.3), del ácido aminobenzoico y de cumarinas (compuesto **126**, Catto y col. 2013) y flavonoides, muchos de los cuales poseen sustituyentes con grupos amino (Anand y Singh 2013).

5.1.2 Inhibidores esteroidales de la ACE

Se han encontrado inhibidores esteroidales de la enzima ACE y en su mayoría se trata de alcaloides esteroidales con estructuras variadas (Figura 5.4) aunque también se han

reportado algunos esteroides no alcaloidales (Figura 5.5). Todos ellos fueron aislados en pequeñas cantidades a partir de plantas o arbustos -con excepción de dos que fueron aislados a partir de la esponja marina *Xetospongia testudinaria* (compuestos **137** y **138**, Zhou y col. 2011)- y poseen una potente actividad inhibitoria frente a la ACE, tal como se detalla en la figura 5.5.

La familia de plantas Buxaceae es conocida por su toxicidad, la que se debe en mayor medida a la presencia de alcaloides esteroidales. Varios estudios se han realizado con plantas del género *Sarcococca* -pertenecientes a esta familia- a partir de las cuales fue posible aislar una gran variedad de alcaloides esteroidales. Este género produce pregnanos alcaloidales con uno o dos grupos amino en la posición 3 y/o 20 (Khalid y col. 2004). Estos alcaloides inhiben la enzima ACE con valores de IC_{50} que van desde los 250 a 0,5 μM (Konrath y col. 2013). En la figura 5.4 se observan los alcaloides más activos aislados de las plantas *S. saligna* y *S. hookeriana* (compuestos **130-131** y **133-136**).

Se han estudiado algunas especies de plantas pertenecientes al género *Fritillaria* (familia Liliaceae) debido a los antecedentes de su uso en la medicina tradicional china. A partir de ellas se aislaron una variedad de alcaloides esteroidales que inhibían la ACE. Generalmente estos compuestos poseen 27 carbonos que forman 5 ó 6 ciclos, entre los cuales pueden encontrarse heterociclos nitrogenados, como puede observarse en el compuesto **132** de la figura 5.4 (Rahman y col. 2002; Lin y col. 2006).

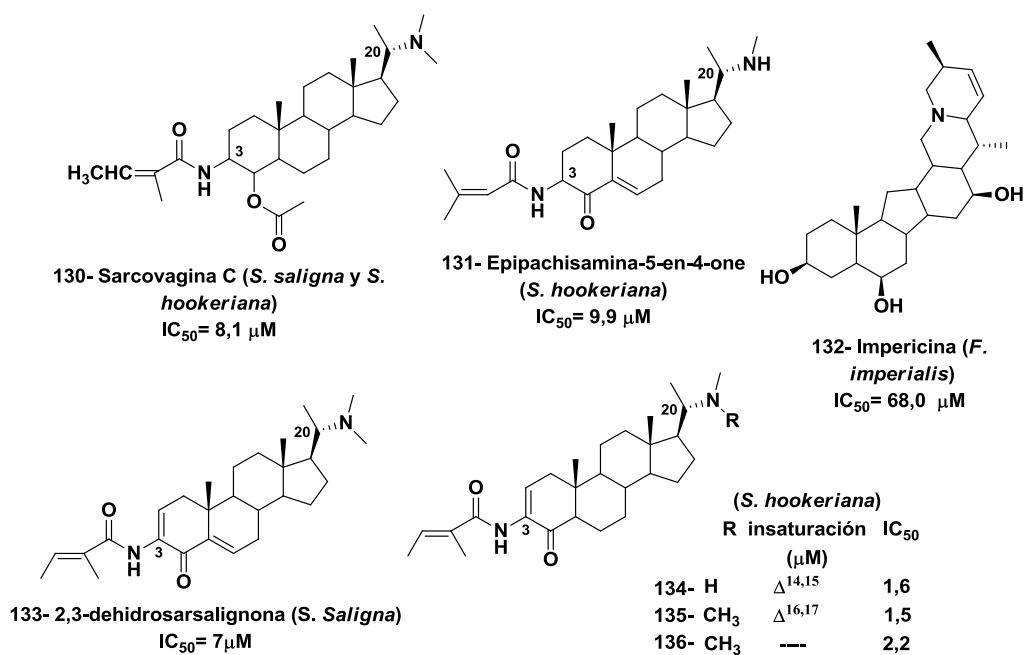


Figura 5.4: Ejemplos de alcaloides esteroidales inhibidores de la ACE

La familia Solanaceae es un gran exponente entre las familias de plantas con alcaloides esteroidales. Las partes verdes de las plantas del género *Solanum* presentan toxicidad, lo que se atribuye a los altos niveles de alcaloides esteroidales que son capaces de inhibir la ACE, de manera moderada a fuerte (Wierenga y Hollingworth 1992). Otra planta perteneciente a esta familia es la *Withania somnifera* (conocida como ginseng indio), cuyas raíces son utilizadas hace casi 4000 años como tratamiento para el deterioro cognitivo. Esta planta contiene varios tipos de triterpenos y esteroides que son capaces de inhibir la ACE. Lo interesante es que entre estos compuestos también se han aislado esteroides no alcaloides activos. En la figura 5.5 se encuentran representados los esteroides no alcaloides inhibidores de la ACE más efectivos (compuestos **139** y **140**), aislados a partir de esta planta (Wierenga y Hollingworth 1992).

También es interesante mencionar a la planta *Haloxylon recurvum*, utilizada en Pakistán para el tratamiento de algunos desórdenes neuronales, la cual produce esteroides no alcaloides (compuestos **141-144**, figura 5.5) que son inhibidores muy potentes de la ACE (Ahmed y col. 2006)

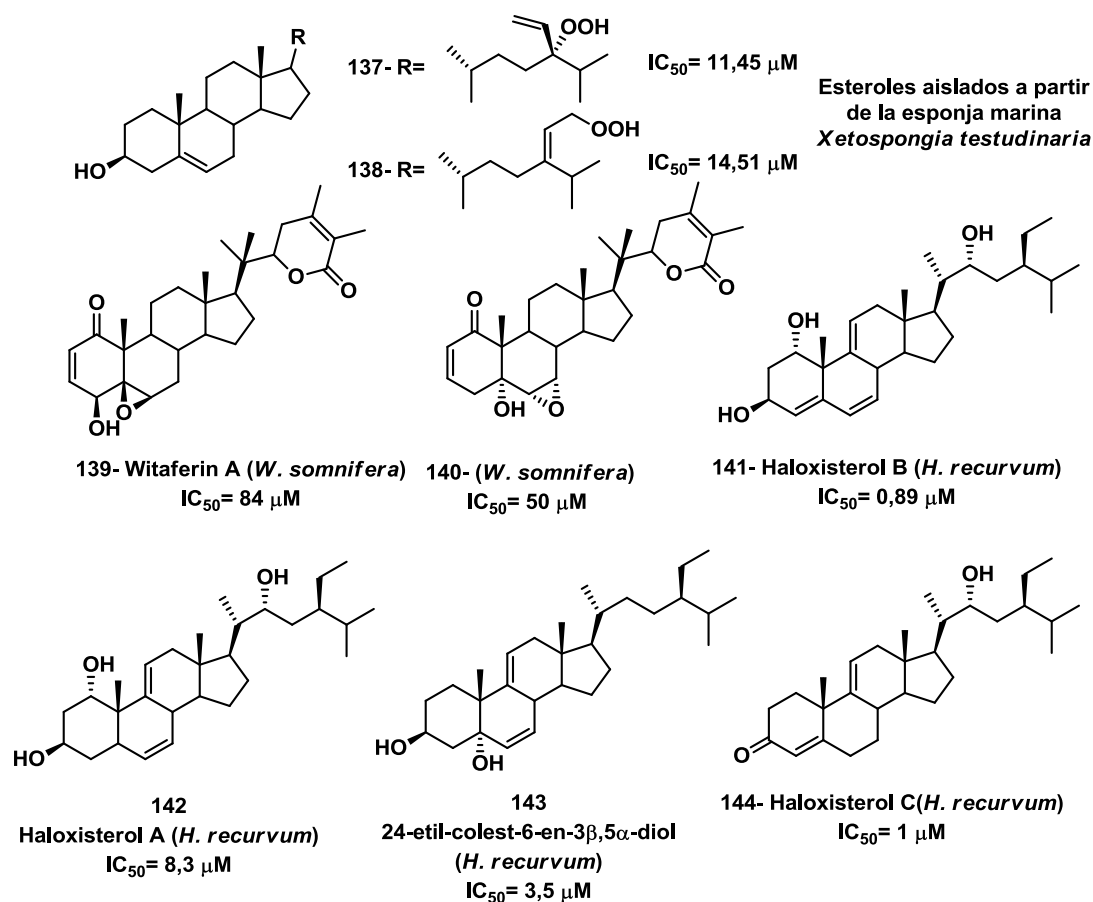


Figura 5.5: Ejemplos de esteroides no alcaloides inhibidores de la ACE

5.1.3 Inhibidores sulfatados de la ACE

Si bien no se encontró en la literatura ningún compuesto sulfatado que inhibiera la enzima ACE, el antecedente que nos motivó a estudiar la actividad inhibitoria de los compuestos sulfatados sintetizados en este trabajo de tesis, surgió a partir de una colaboración con el grupo de la Dra. A.P. Murray del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Nacional del Sur. En el trabajo en colaboración se sulfataron una serie de triterpenos pentacíclicos hidroxilados naturales, aislados a partir de hojas del arbusto *Chuquiraga erinacea* S. Don. Subsp. *erinacea* (Asteraceae) con el fin de aumentar su solubilidad en agua y facilitar la medición de la actividad inhibitoria de la ACE. Los resultados indicaron que el calenduladiol disulfato (Figura 5.6) incrementó su actividad inhibitoria, respecto de su análogo desulfatado, disminuyendo su IC_{50} hasta 0,190 mM (Vela Gurovic y col. 2009). Cabe destacar que aunque la actividad del calenduladiol disulfato es moderada, éste fue el primer compuesto sulfatado informado como inhibidor de ACE.

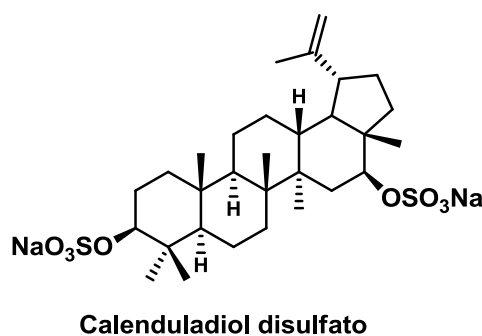


Figura 5.6: Derivado sulfatado de triterpenos pentacíclico natural con actividad inhibitoria moderada de la enzima AC

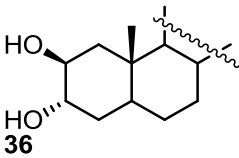
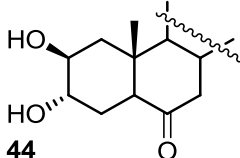
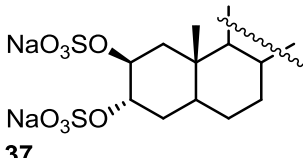
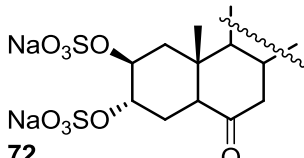
5.2 Resultados de la actividad inhibitoria de la ACE de los compuestos sintetizados

De acuerdo a los antecedentes mencionados, se decidió evaluar la actividad inhibitoria de la ACE del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**) y su análogo sulfatado **72** - sintetizados durante este trabajo de tesis- y de los compuestos **36** y **37**, sintetizados con anterioridad en el laboratorio (Garrido Santos y col. 2003; Richmond y col. 2011).

La evaluación de la actividad inhibitoria fue realizada por la Dra. A.P. Murray de la Universidad Nacional del Sur y se utilizó el método de Ellman modificado (Ellman y col. 1961, Ver Capítulo 6: Parte experimental). En el ensayo se utiliza la ACE aislada a partir de la raya

eléctrica *Torpedo californica* ya que es una fuente muy abundante de la enzima de alta pureza (Nachmansohn y Wilson 1951) y es estructuralmente homóloga a la ACE presente en nervios y músculos de los vertebrados (Bon y col. 1979). En la tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5.1: Evaluación de la inhibición de la ACE de los compuestos **36**, **44** y sus análogos sulfatados **37** y **72**.

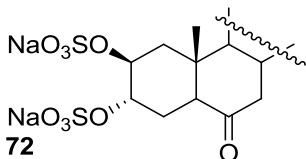
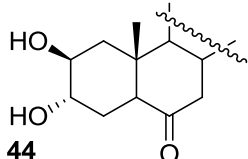
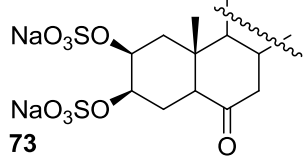
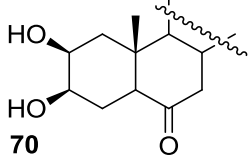
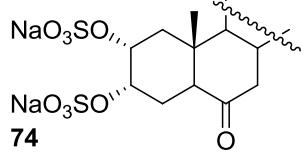
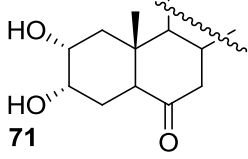
Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Compuesto	IC ₅₀ (μM)
 36	>200	 44	>200
 37	59,65 ± 2,30	 72	14,59 ± 0,88
Eserina IC ₅₀ = 11,27 ± 1,05nM			

Se observa que sólo los compuestos sulfatados resultaron activos -poniendo de manifiesto la importancia de los grupos sulfato en el anillo A-, mientras que sus análogos desulfatados no lo son. Esto es consistente con los resultados publicados por Ismail y colaboradores que reportaron la inactividad frente a la ACE de una variedad de 23-ceto-colestanos con grupos hidroxilo en los anillos A y B (Wah y col. 2013). Si bien en la introducción de este capítulo se mencionaron varios compuestos polioxigenados efectivos en la inhibición de la ACE (Figura 5.5), sus esqueletos carbonados presentan cadenas laterales diferentes a los colestanos y, por lo tanto, no son comparables.

Además, los resultados sugieren que un grupo carbonilo en la posición 6 incrementa la actividad inhibitoria ya que el IC₅₀ del 6-ceto esteroide **72** es 4 veces menor que el de su análogo con un metileno en posición 6 (compuesto **37**).

En base a estos resultados, resultó interesante estudiar la influencia de la configuración de los grupos sulfato en C-2 y C-3 en la actividad inhibitoria. Tal como se observa en la tabla 5.2 los grupos sulfato cumplen un rol fundamental en la inhibición de la ACE ya que sus análogos hidroxilados, nuevamente, no inhiben a la enzima.

Tabla 5.2: Evaluación de la influencia de la configuración de los grupos sulfato en C-2 y C-3 en la inhibición de la ACE.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Compuesto	IC ₅₀ (μM)
 72	14,59 ± 0,88	 44	>200
 73	40,94 ± 8,62	 70	>200
 74	30,66 ± 6,91	 71	>200

Eserina IC₅₀ = 11,27 ± 1,05nM

En cuanto a la configuración de los grupos sulfato, ambos esteroides *cis* disulfatados (compuestos **73** y **74**) resultaron menos activos que su análogo con configuración 2β,3α (compuesto **72**), indicando la importancia de la configuración de los grupos sulfato de C-2 y C-3 en la actividad inhibitoria. La disminución en la actividad del compuesto 2β,3β-dihidroxi-5α-colestan-6-ona disulfato (**73**), respecto del análogo *trans* (**72**), es más marcada que la del análogo 2α,3α (**74**). Esto indicaría que el sulfato en C-3 y con configuración α ejerce una influencia mayor en la actividad respecto del sulfato en posición 2β.

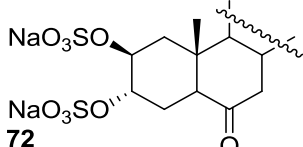
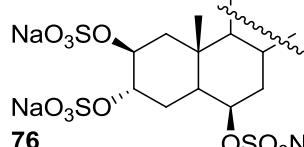
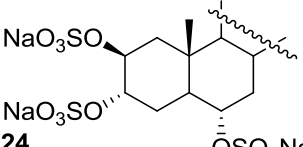
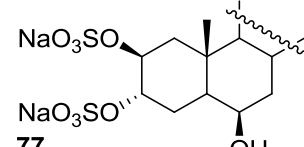
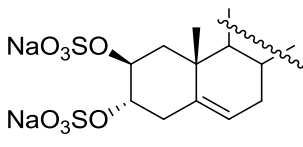
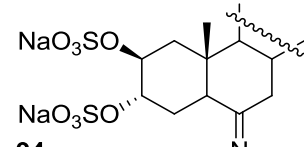
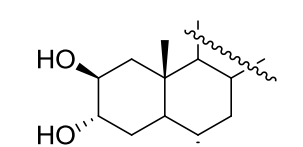
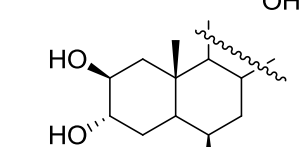
Finalmente, dado que la mejor actividad se observó con el isómero 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona disulfato (**72**), se evaluaron análogos con diferentes funcionalidades en C-6. Se observó la influencia de grupos hidroxilo, oxima, sulfato y carbonilo en dicha posición. Los resultados de actividad obtenidos para los distintos compuestos sulfatados y sus análogos desulfatados se presentan en la tabla 5.3.

De los datos de la tabla, nuevamente se confirma que los compuestos hidroxilados carecen de actividad.

El compuesto 2β,3α,6α-trihidroxi-5α-colestan-6-ona trisulfato (**24**) resultó ser el más activo de la serie con una actividad inhibitoria comparable a la de su análogo con un grupo carbonilo en posición 6 (**72**). Sin embargo, los compuestos sulfatados son menos activos cuando la función oxigenada en C-6, hidroxilo e incluso sulfato, se encuentra en la cara β del esteroide

(compuestos **76** y **77**). Lo mismo ocurre cuando el esteroide posee un doble enlace Δ^5 o un grupo oxima en C-6 (compuestos **75** y **94**).

Tabla 5.3: Evaluación de la influencia de la sustitución en C-6 en la inhibición de la ACE.

Compuesto	IC ₅₀ (μM)	Compuesto	IC ₅₀ (μM)
 72	14,59 ± 0,88	 76	>200
 24	15,48 ± 0,88	 77	>200
 75	>200	 94	>200
 43	>200	 66	>200

Eserina IC₅₀ = 11,27 ± 1,05nM

Estas observaciones indicarían que si bien los grupos sulfato en C-2(β) y C-3(α) son necesarios para que los compuestos sean activos, no son condición suficiente ya que la rigidez adicional de un doble enlace Δ^5 o la presencia de un grupo oxigenado en C-6(β) los vuelve inactivos.

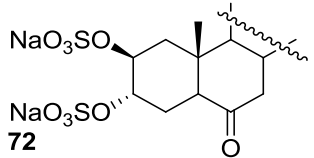
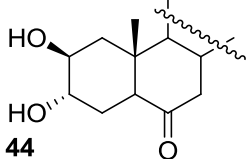
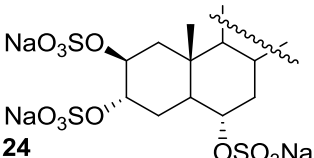
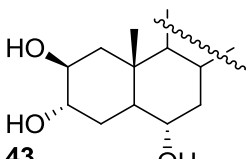
En conclusión, el estudio de los compuestos **36-37**, **43-44**, **70-77** y **94** reveló que la actividad no sólo depende de la posición de los grupos sulfato en el esteroide sino también de su configuración. En particular, la presencia de grupos sulfato en configuración *trans* diaxial 2β,3α junto con un grupo carbonilo o sulfato en configuración α en C- 6 incrementan la actividad inhibitoria.

5.2.1 Selectividad en la inhibición de la ACE respecto de la BCE

Al igual que la ACE, la butirilcolinesterasa (BCE) actúa como co-reguladora de la transmisión colinérgica mediante la hidrólisis de la AC (Mesulman y col. 2002) y difiere de la primera en su distribución -principalmente en los tejidos periféricos y en pequeña cantidad

en el cerebro- y en su sensibilidad a sustratos e inhibidores. La proporción relativa de estas enzimas depende de la región del cerebro y del grado de avance de la enfermedad de Alzheimer (Dvir y col. 2010). La proporción de BCE aumenta a medida que progresa la enfermedad, en particular en los últimos estadios, lo que sugiere que esta enzima también ejerce una influencia en la disfunción colinérgica típica en el mal de Alzheimer. Por esta razón, la administración de inhibidores con diferente selectividad ACE/BCE es muy útil a medida que la enfermedad avanza (Peng y col. 2012). Por último, la inhibición selectiva de la ACE frente a la BCE disminuye los efectos colaterales tales como calambres, al evitar la inhibición periférica de la colinesterasa (Anand y Singh 2012).

Tabla 5.4: Evaluación de la inhibición de la BCE de los compuestos **24**, **43**, **44** y **72**.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) BCE	IC ₅₀ (μM) ACE	IC ₅₀ BCE/ACE
 72	>200	14,59 ± 0,88	>13,7
 44	Agonista ¹	>200	---
 24	176,10 ± 1,29	15,48 ± 0,88	11,4
 43	31,67 ± 1,17	>200	0,16

¹ A 100 μM la velocidad es un 21,32% mayor y a 200 μM aumenta en un 51,08%

Eserina IC₅₀ = 14,29 ± 1,27nM

Con el fin de determinar la selectividad ACE/BCE de los compuestos más activos (**24** y **72**) y sus análogos desulfatados (**43** y **44**), se evaluaron sus actividades inhibitorias frente a la BCE (Tabla 5.4).

De los resultados de la tabla se observa que los compuestos que inhiben a la ACE tienen IC₅₀ muy bajos en comparación con los valores de IC₅₀ de la BCE. En particular, los valores de IC₅₀ frente a la BCE de los compuestos sulfatados es un orden de magnitud mayor que la

actividad frente a la ACE, demostrando su selectividad. Este resultado es interesante ya que la BCE posee la habilidad de retrasar el inicio y disminuir la velocidad de formación de agregados de placas seniles *in vitro*, evento central en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Podoly y col. 2008; Diamant y col. 2006).

Por último, hay que destacar que el compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**44**), aumenta la velocidad de la reacción de hidrólisis que cataliza la enzima.

5.2.2 Tipo de inhibición

A fin de conocer el mecanismo de inhibición de estos compuestos, se estudió la cinética de inhibición del compuesto **72**, el más activo de la serie de esteroides sulfatados. Este trabajo fue realizado en colaboración con la Dra. A.P. Murray del Departamento de Química Orgánica de la Universidad Nacional del Sur. Para ello se evaluó la actividad enzimática a diferentes concentraciones fijas del inhibidor conforme se incrementaba la concentración del sustrato, ioduro de acetiltiocolina (S).

Las curvas del gráfico 5.1 son la representación de la inversa de la velocidad inicial de la reacción que cataliza la enzima ($1/v$) en función de la inversa de la concentración del sustrato de la reacción ($1/[S]$), a diferentes concentraciones fijas del inhibidor($[I]$).

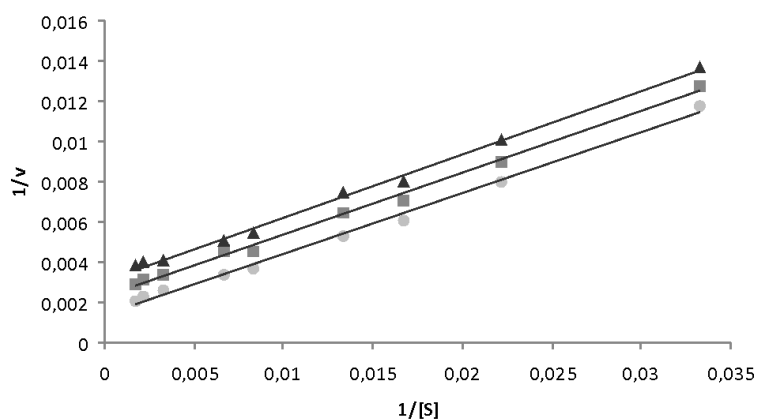


Gráfico 5.1. Gráfico de Lineweaver-Burk de inhibición de la ACE por el compuesto **72**
Referencias: Inhibidor (I)= compuesto **72**, sustrato (S)= acetiltiocolina.

$[I]$: círculo (●): 0 μM ; cuadrado (■): 52 μM ; triángulo (▲): 104 μM .

Regresiones lineales: $y = 0,3004x + 0,0014$ ($R^2=0,9953$); $y = 0,3066x + 0,0023$ ($R^2=0,9959$); $y = 0,3142x + 0,0031$ ($R^2=0,9963$) para 0, 52 y 104 μM , respectivamente.

Los resultados ponen de manifiesto que los valores de K_M y V_{max} - K_M =constante de Michaelis-Menten es la $[S]$ tal que se observa una $V=V_{max}/2$ y V_{max} =velocidad máxima de la reacción enzimática- aumentan con el incremento de la concentración del inhibidor, pero la relación entre ellos (K_M/V_{max}) es constante. La relación K_M/V_{max} determina la pendiente de la recta, con lo cual, dado que las pendientes de las curvas son independientes de la concentración del inhibidor se puede afirmar que el esteroide 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona-disulfato (**72**) es un inhibidor acompetitivo de la enzima. Esto implica que el esteroide no se une a la enzima libre sino que se une de manera reversible al complejo enzima-sustrato. Este tipo de inhibición es un ejemplo de la unión secuencial de dos ligandos a la enzima en un orden determinado, ya que es necesaria la unión del sustrato de la enzima para que el inhibidor **72** sea afín a la misma (Khalid y col. 2004).

El resultado de la cinética de inhibición obtenido para el compuesto modelo, en principio podría extrapolarse al resto de los compuestos sulfatados activos ya que son un grupo de moléculas relacionadas entre sí. Sin embargo, es interesante notar que incluso dentro de los esteroides, diferentes familias pueden actuar por mecanismos distintos. Por ejemplo, una serie de pregnanos alcaloidales aislados a partir de *Sarcococca saligna*, actúan por un mecanismo no competitivo, uniéndose al sitio periférico aromático de la enzima (Khalid y col. 2004), mientras que en el caso del compuesto disulfatado **72** el mecanismo es acompetitivo.

5.3 Estudios de acoplamiento molecular o *docking*

Con el objetivo de complementar los estudios cinéticos realizados acerca del mecanismo de acción del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona disulfato (**72**), se realizó un análisis computacional de *docking* molecular. Este estudio permite identificar el modo de unión del inhibidor a la enzima y determinar la conformación que adopta el esteroide dentro de la misma.

5.3.1 Descripción del bolsillo de la enzima ACE

Para poder comprender el espacio de simulación y los resultados del estudio de *docking* presentados más adelante, es necesario realizar una pequeña descripción del bolsillo de la enzima. Este bolsillo posee 20 Å de profundidad y 5 Å de ancho y en el fondo del mismo se encuentra el sitio activo donde ocurre la hidrólisis de la AC. El bolsillo presenta 14 residuos

aromáticos (Tyr67, Trp81, Trp117, Tyr118, Tyr127, Trp230, Trp276, Phe285, Phe287, Phe327, Phe328, Tyr331, Trp429 y Tyr439), los cuales cumplen un rol importante en la difusión de la AC hacia el sitio activo mediante interacciones π -catión con la carga positiva del neurotransmisor (Sussman y col. 1991).



Figura 5.7: Esquema del sitio periférico y sitio activo de la ACE

En la entrada del bolsillo de la enzima se encuentra el sitio aromático periférico, situado aproximadamente a 14 Å del sitio activo. Aquí se encuentran una gran cantidad de aminoácidos aromáticos -Tyr67, Tyr118, y Trp276- que dirigen al neurotransmisor hacia el sitio activo. Entre el sitio periférico y el sitio activo, los residuos Phe327 y Tyr118 forman un “cuello de botella” que dificulta el acceso al interior del bolsillo en donde se localiza el sitio activo.

El sitio activo está conformado por dos subsitios: el sitio aniónico catalítico y la triada catalítica. El primero posee los aminoácidos Trp81 y Phe327 que pueden interaccionar con la carga positiva de la acetilcolina de manera que quede perfectamente ubicada para que sea hidrolizada. La triada catalítica está formada por los aminoácidos Glu324, His437 y Ser197, cuyo grupo hidroxilo es el que ataca nucleofílicamente al éster del neurotransmisor, liberando colina al medio (Figura 5.7).

5.3.2 Enzima y espacio de simulación

Dado que el compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**72**) presentó un mecanismo de inhibición acompetitivo, los estudios de *docking* se llevaron a cabo con el complejo ACE-AC. La enzima utilizada para el modelado molecular fue la estructura cristalográfica de la ACE de *Torpedo californica* complejada con la acetilcolina (Entrada 2ACE DOI:10.2210/pdb2ace/pdb, Protein Data Bank). Se utiliza la ACE de la raya eléctrica *Torpedo californica* debido a que fue la utilizada en el estudio *in vitro*.

Para realizar el estudio de *docking* fue necesario definir el espacio de simulación. Este espacio fue determinado por una caja de dimensiones 21,28 Å x 31,24 Å x 20,37 Å que incluye el sitio activo y periférico de la ACE (Figura 5.7). La energía dentro del espacio de simulación fue calculada en puntos equidistantes espaciados por 0,375 Å.

5.3.3 Inhibidor esteroidal

Se optimizó la geometría del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**72**) mediante una primera aproximación utilizando el método semiempírico AM1 (Dewar y col. 1985) y luego utilizando el método *ab initio* de Hartree-Fock (Roothaan 1951), ambos incorporados en el programa Gaussian 03 (Frisch y col. 2004).

Durante el estudio de *docking* se permitió rotar libremente aquellos enlaces que no presentan restricciones rotacionales, con excepción de la cadena lateral. Se restringió su libertad conformacional, con excepción del enlace que une el anillo D con la cadena alifática (enlace marcado con un círculo en la figura 5.8). Si bien en solución acuosa es probable que el esteroide tenga la cadena lateral plegada debido a su carácter hidrofóbico, durante el *docking* se la mantuvo extendida (Figura 5.8) de manera de favorecer las interacciones hidrofóbicas entre el esteroide y el sitio de unión en la proteína, el cual posee una gran cantidad de residuos hidrofóbicos. En la figura 5.8 se encuentran marcados con círculos aquellos enlaces a los cuales se les permitió rotar libremente.

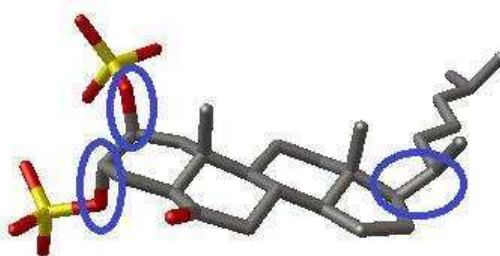


Figura 5.8: Compuesto **72**. En color azul se encuentran marcados los enlaces que rotaron libremente.

5.3.4 Resultados del estudio de *docking* de la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**72**)

Los cálculos computacionales de *docking* fueron llevados a cabo utilizando el programa AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute, Department of Molecular Biology, MB-5, La

Jolla, CA, 2007). Se realizaron 256 evaluaciones de *docking* con el compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona disulfato (**72**), las cuales generaron 256 conformeros que fueron hallados utilizando el algoritmo genético lamarkiano como algoritmo de búsqueda.

Este es un algoritmo híbrido ya que la búsqueda es realizada a nivel global y local. Es decir, de acuerdo a la función que vincula la energía de interacción entre la enzima y el esteroide con las coordenadas del esteroide, es posible hallar de manera aproximada (global) las conformaciones más adecuadas para la interacción esteroide-enzima. Posteriormente, de un modo más preciso, se realiza una búsqueda del mínimo de energía para aquellas conformaciones halladas (local) (Morris y col. 1998).

Cada conformación encontrada posee coordenadas diferentes en cuanto a la translación y rotación del esteroide -relativas a la enzima- como así también, diferentes ángulos diedros de los enlaces que pueden rotar libremente.

Como se verá, los 256 conformeros se agrupan en *clusters* y a su vez, los *clusters* se ordenan dando lugar a un ranking. Este orden queda determinado por la estabilidad de los complejos enzima-inhibidor, dentro de cada *cluster*. A continuación se describe el criterio de agrupación de los conformeros y cómo se determina el ranking de los *clusters*.

La agrupación de los 256 conformeros en *clusters* se realiza de acuerdo a la similitud en la conformación adoptada dentro de la enzima. El criterio utilizado para evaluar dicha semejanza es la desviación de la raíz cuadrática media de los residuos (RMSD). Los residuos se obtienen mediante la diferencia entre las coordenadas de los átomos de un dado conformero respecto al conformero más estable del *cluster* al que pertenece. Cada *cluster* agrupa conformeros que poseen una RMSD no mayor a 2,0 Å.

El orden obtenido para los diferentes *clusters* es de acuerdo a la energía del conformero más estable dentro de cada grupo: el ranking queda determinado al ordenar por estabilidad creciente al conformero de menor energía de cada *cluster*. Estos resultados comúnmente se grafican en forma de histogramas, cuyas barras representan a los diferentes *clusters*.

En la figura 5.9 se observan los 6 *clusters* generados a partir de las conformaciones obtenidas de las 256 evaluaciones de docking, representados en forma de histograma.

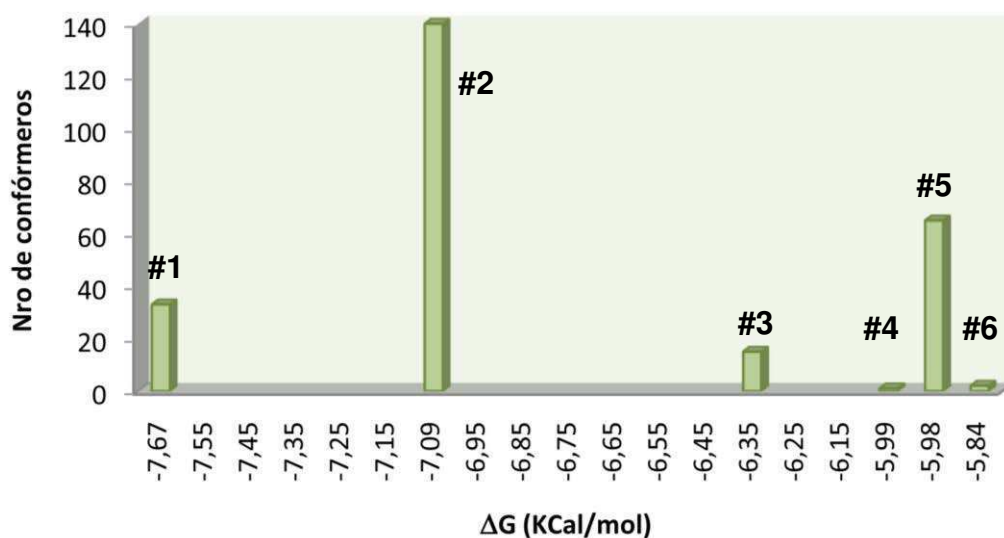


Figura 5.9: Histograma obtenido de la evaluación de *docking* del compuesto **72**.

A partir de los datos del histograma se puede observar que el *cluster* que posee los conformeros de menor energía (*cluster* N°1) y el *cluster* con los conformeros que se obtuvieron con mayor frecuencia (*cluster* N°2), no coinciden. Diferentes estudios revelaron que las conformaciones más probables (pertenecientes al *cluster* más poblado), generalmente corresponden a las conformaciones que se observan experimentalmente en los complejos ligando-enzima. Esto se debe a la falta de precisión en el cálculo de energía de interacción entre el ligando y la proteína. Los campos de fuerza utilizados estiman la energía libre utilizando una sola conformación del complejo enzima-ligando, de forma que no se tiene en cuenta la entropía conformacional del sistema. Finalmente, diferentes estudios indicaron que los *clusters* más poblados son los que poseen una entropía favorable para la formación del complejo enzima-ligando. Consecuentemente, las conformaciones adoptadas en dichos *clusters* coinciden con los modos de unión observados experimentalmente en la mayoría de los casos (Cosconati y col. 2010, Chang y col. 2008, Bottegoni y col. 2006).

En la figura 5.10 se observan superpuestas las conformaciones adoptadas en los *clusters* N°1 (esteroide en verde) y N°2 (esteroide en rosa). En ambos casos los conformeros ingresan al sitio aromático periférico a través de la cadena lateral del esteroide, quedando el anillo A en la entrada del bolsillo (delimitada en color violeta). Es posible que el esteroide ingrese de este modo debido al carácter hidrofóbico de la cadena lateral en comparación con la alta

polaridad de los sustituyentes del anillo A. Se cree que la hidrofobicidad del esqueleto esteroideal asiste a su difusión dentro del sitio periférico de la ACE (Choudhary y col. 2005).

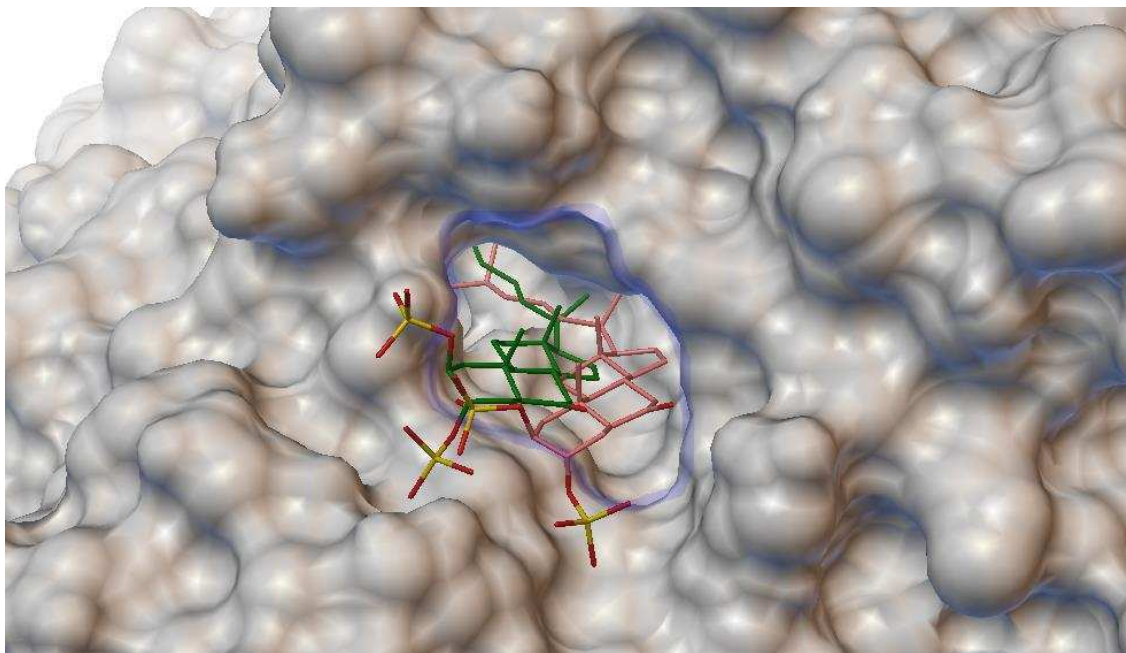


Figura 5.10: Conformación adoptada por el compuesto **72** en el cluster N°1 (verde) y N°2 (rosa)

Estos resultados son consistentes con estudios de modelado molecular realizados con alcaloides esteroidales aislados a partir de la planta *Sarcococca saligna*. Tal como ocurre con el esteroide disulfatado, los alcaloides esteroidales ingresan al bolsillo aromático a través de los anillos que poseen mayor carácter hidrofóbico (Khalid y col. 2004; Zaheer-ul-haq y col. 2003).

5.4 Resultados del estudio de dinámica molecular con el complejo enzima-esteroide activo (Compuesto 72)

Estudios subsecuentes de dinámica molecular fueron necesarios para chequear la estabilidad de la unión enzima-inhibidor y para verificar si la unión del inhibidor generaba cambios conformacionales en la enzima. Este trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. Pau Arroyo Mañez (UMYMFOR-CONICET).

A partir de los resultados del *docking*, se eligió la conformación adoptada en el *cluster* más poblado (N°2) y a partir de ésta, se realizaron estudios preliminares de dinámica molecular de 50 ns.

Los resultados indicaron que el complejo enzima-esteroide es estable, ya que se mantiene unido en el tiempo. En las figuras 5.11 y 5.12, correspondientes a una captura instantánea de la dinámica, se pueden observar las interacciones que hay entre el compuesto disulfatado (**72**) y la enzima. Esta es una foto representativa que fue tomada una vez estabilizada la unión ACE-esteroide (a los 40 ns). En particular, la figura 5.11 muestra que las principales interacciones hidrofóbicas ocurren entre los anillos C y D del esqueleto hidrocarbonado y la cadena lateral del esteroide con los residuos TYR 67, TRP 81, TYR 118, TRP 276, LEU 279, PHE 327, PHE 328 y TYR 331 de la enzima.

Además, los resultados del *docking* muestran que la afinidad del inhibidor por el complejo enzima-sustrato se encuentra favorecida por interacciones de enlace de hidrógeno (Figura 5.12).

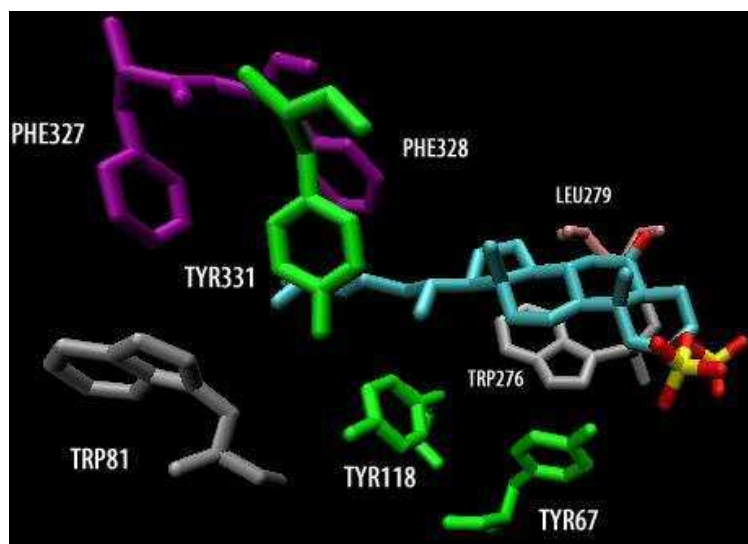


Figura 5.11 Interacciones hidrofóbicas que presenta el compuesto **72**. Los residuos de color verde corresponden a tirosinas; violeta a fenilalaninas; gris a triptófanos y la leucina en color rosa.

En la figura puede observarse que un átomo de oxígeno del sulfato en C-3(α) se encuentra a 2,19 Å del hidrógeno correspondiente al nitrógeno de la unión peptídica del residuo ASN 277. Este resultado podría explicar la influencia observada en la modificación de la configuración de los grupos sulfato en C-2 y C-3 en la inhibición de la ACE (Tabla 5.2). Los resultados de la inhibición *in vitro* habían puesto de manifiesto una mayor influencia del grupo sulfato 3 α en la actividad inhibitoria. Este resultado puede explicarse en base a al enlace de hidrógeno que hay entre el ligando disulfatado **72** y la ACE. Tal como se mencionó anteriormente, el único enlace de hidrógeno que se observa es el que involucra al sulfato en

posición 3α y por esta razón la inversión de dicho centro asimétrico en el isómero *trans* (para dar a lugar al isómero $2\beta,3\beta$) genera una disminución mayor en la actividad, que la disminución que provoca la inversión del sulfato en C-2.

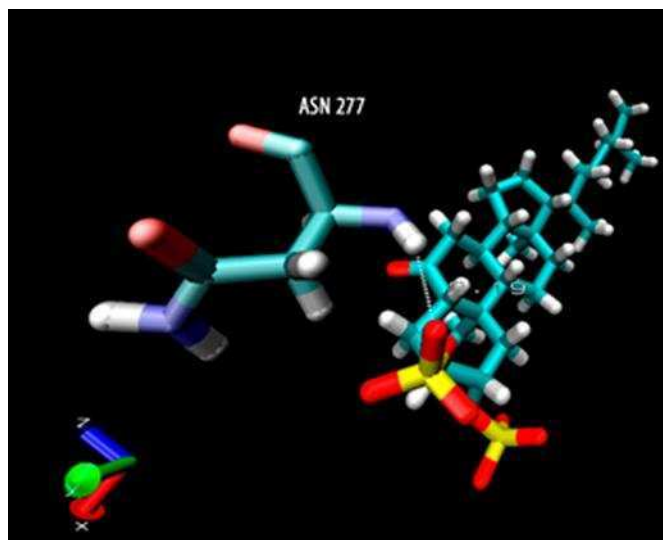


Figura 5.12: Interacciones de enlace de hidrógeno que presenta el compuesto **72**.

5.5 Resultados del estudio de *docking* de la $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi- 5α -coleston-6-ona (**44**)

De manera análoga a la descrita para el compuesto disulfatado **72** se realizó un estudio de *docking* de su análogo desulfatado **44**, el cual no inhibe a la ACE en las concentraciones ensayadas, de acuerdo a los estudios *in vitro*. Previamente fue necesario optimizar la geometría de la $2\beta,3\alpha$ -dihidroxi- 5α -coleston-6-ona (**44**) utilizando el método semiempírico AM1 en primer lugar (Dewar y col. 1985) y luego utilizando el método *ab initio* de Hartree-Fock (Roothaan 1951), ambos incorporados en el programa Gaussian 03 (Frisch y col. 2004).

Durante el estudio de *docking* se permitió rotar libremente a aquellos enlaces que no presentan restricciones rotacionales, con excepción de la cadena lateral, del mismo modo en que se trabajó con el compuesto disulfatado **72**.

En el histograma que se presenta en la figura 5.13 se resumen los resultados obtenidos en el *docking*. Las 256 evaluaciones dieron a lugar a 3 *clusters* de confórmeros.

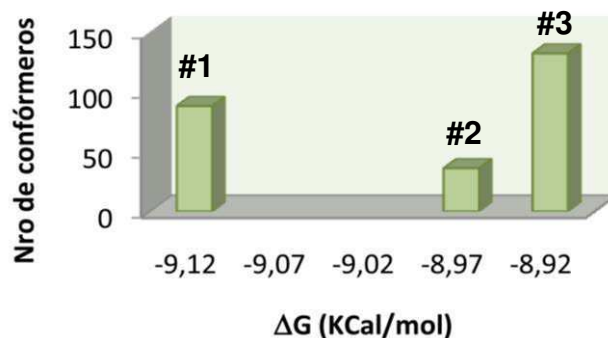


Figura 5.13: Histograma obtenido de la evaluación de *docking* del compuesto **44**.

Nuevamente se observa que el *cluster* con los conformeros de menor energía (*cluster* N°1) y el *cluster* con los conformeros obtenidos con mayor frecuencia (*cluster* N°3), no coinciden. En ambos *clusters* los conformeros ingresan al sitio aromático periférico a través de la cadena lateral del esteroide. Sin embargo, se esperaba que dicha unión no fuera estable dada la evidencia experimental.

5.6 Resultados del estudio de dinámica molecular con el complejo enzima-esteroide inactivo (Compuesto **44**)

Para verificar los resultados obtenidos en el estudio de *docking* con el análogo dihidroxilado, se llevó a cabo una dinámica molecular preliminar de 50 ns. Se observó que el complejo enzima-esteroide era estable. Si bien se mantiene unido en el tiempo, el diol **44** se desprende parcialmente de la enzima y se ubica más afuera de lo que se encontraba inicialmente, aunque no se observa que se separe totalmente de la enzima (Figura 5.14). Este resultado fue desalentador ya que no concordaba con los datos experimentales, los cuales indicaban que el diol 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**44**) no inhibía a la ACE.

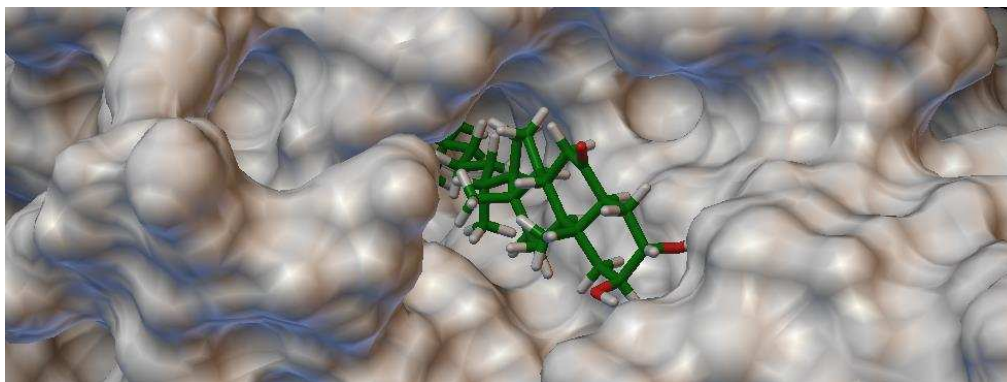


Figura 5.14: Conformación adoptada por el compuesto **44** en la dinámica molecular

Un análisis más detallado de la dinámica obtenida a partir del complejo enzima-diols, reveló un cambio conformacional en la enzima que dio a lugar a la apertura de un canal secundario que se conecta con el sitio activo de la enzima. De manera simplificada, en la figura 5.15 se grafica una sección de la ACE en la que el canal lateral no está conectado con el sitio activo (1) y en la que se encuentra conectado (2). Esta entrada secundaria se encuentra reportada en la literatura y es la que permite explicar el gran poder catalítico de la ACE. Estudios de modelado molecular sugieren que tanto la acetilcolina y el agua (sustratos de la enzima) como la colina y el acetato (productos) podrían ingresar o salir del sitio activo a través de esta puerta lateral, aumentando la eficacia de la enzima (Gilson y col. 1994, Sanson y col. 2011).

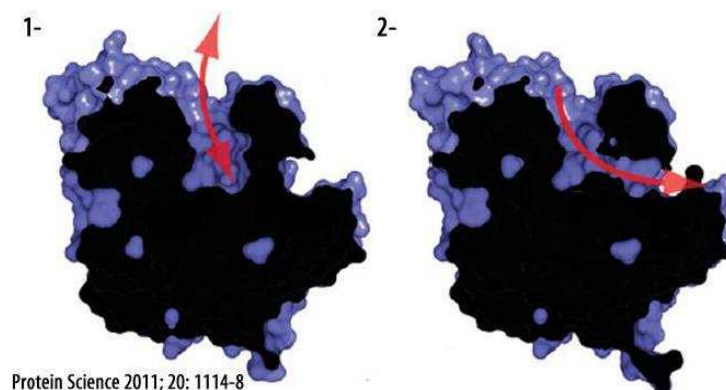


Figura 5.15: La flecha roja indica el sentido en el que se mueven los sustratos (AC y agua) y los productos (colina y acetato) en la enzima cuando la puerta lateral se encuentra 1) cerrada o 2) abierta.

Para entender el mecanismo por el cual se abre el canal lateral en presencia del diol **44**, se presentarán una serie de figuras obtenidas a partir de las dinámicas moleculares realizadas con el compuesto disulfatado **72** y el diol **44**. Cabe destacar que en el análisis de los residuos involucrados en la apertura de la puerta lateral, al hablar de la disposición que los residuos adoptan en la enzima cuando la puerta lateral se encuentra abierta o cerrada, se trata de la conformación obtenida a partir de las dinámicas realizadas con el esteroide dihidroxilado o disulfatado, respectivamente. El siguiente análisis se realizará en base a una foto representativa de cada una de las dos dinámicas moleculares (50 ns) realizadas.

En las figuras 5.16A y 5.16B se representa la superficie de la conformación adoptada por la ACE cuando está unida al compuesto disulfatado (Figura 5.16A) y al diol (Figura 5.16B). En ambas se marca con un círculo la zona de la puerta lateral: mientras que en la figura 5.16A, se encuentra cerrada, en 5.16B su entrada se encuentra abierta.

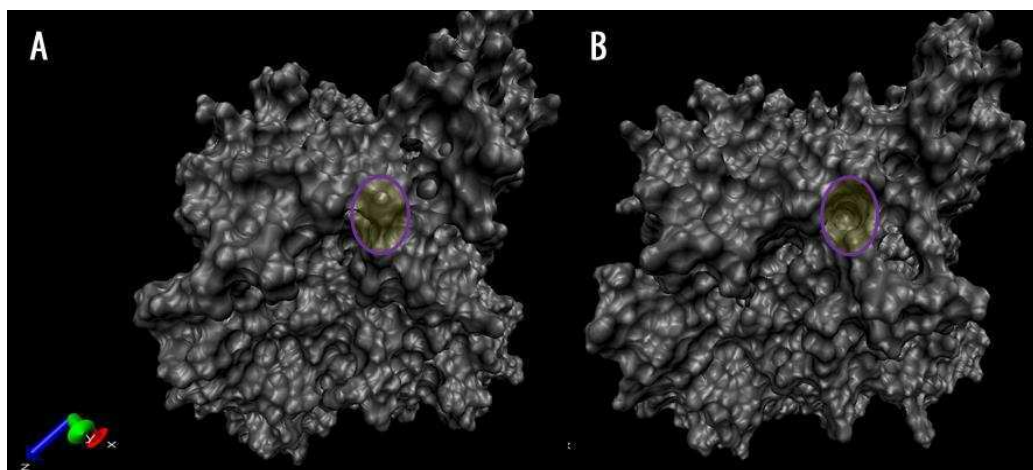


Figura 5.16: Representación de la superficie de la ACE cuando adopta la conformación que posee la puerta lateral A) cerrada o B) abierta.

En primer lugar, se observó que entre los residuos involucrados en la apertura de la entrada lateral, se encuentran la VAL428 (verde) y el TRP429 (azul), representados en la figura 5.17.

En las imágenes siguientes (Figura 5.17) se presentan las conformaciones adoptadas por estos residuos cuando la puerta lateral se encuentra cerrada (Figura 5.17A) y cuando se encuentra abierta (Figura 5.17B). En ambos casos, los residuos se encuentran superpuestos sobre la representación de la superficie de la conformación adoptada cuando la enzima posee la puerta lateral abierta. En la figura 5.17A se puede observar cómo ambos residuos bloquean la entrada lateral mientras que en la figura 5.17B, ambos residuos adoptan una conformación diferente de manera que permiten la apertura del canal.

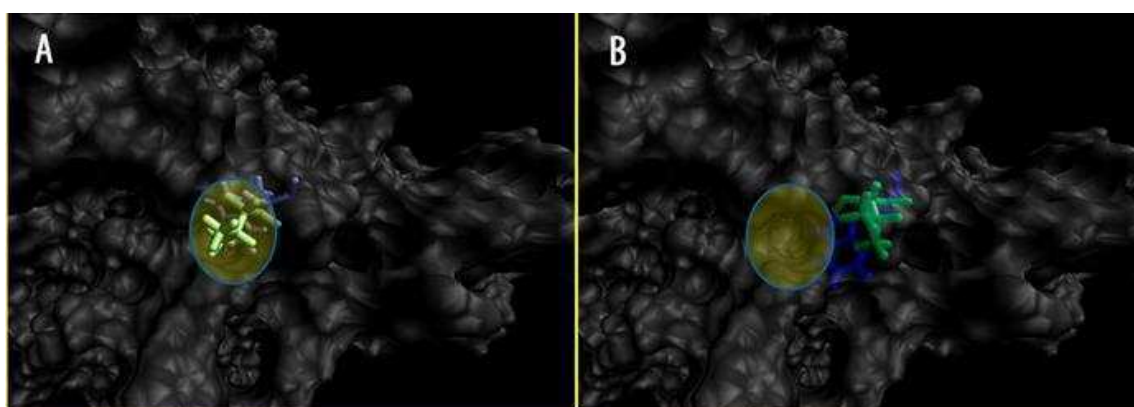


Figura 5.17: Disposición de los residuos VAL428 (verde) y TRP429 (azul) cuando la enzima posee la puerta lateral A) cerrada y B) abierta. En ambos casos, los residuos se graficaron sobre la representación de la superficie de la conformación adoptada cuando la puerta lateral está abierta.

A partir de un análisis más profundo, en la figura 5.18A se pueden observar las estructuras secundarias que adoptan algunos de los residuos involucrados en la apertura de la puerta lateral, representados con líneas finas (espiral aleatoria o *random coil*). La línea de color verde representa la estructura secundaria adoptada por los residuos cuando la entrada lateral se encuentra bloqueada y en rojo, los mismos residuos cuando la puerta lateral se encuentra abierta.

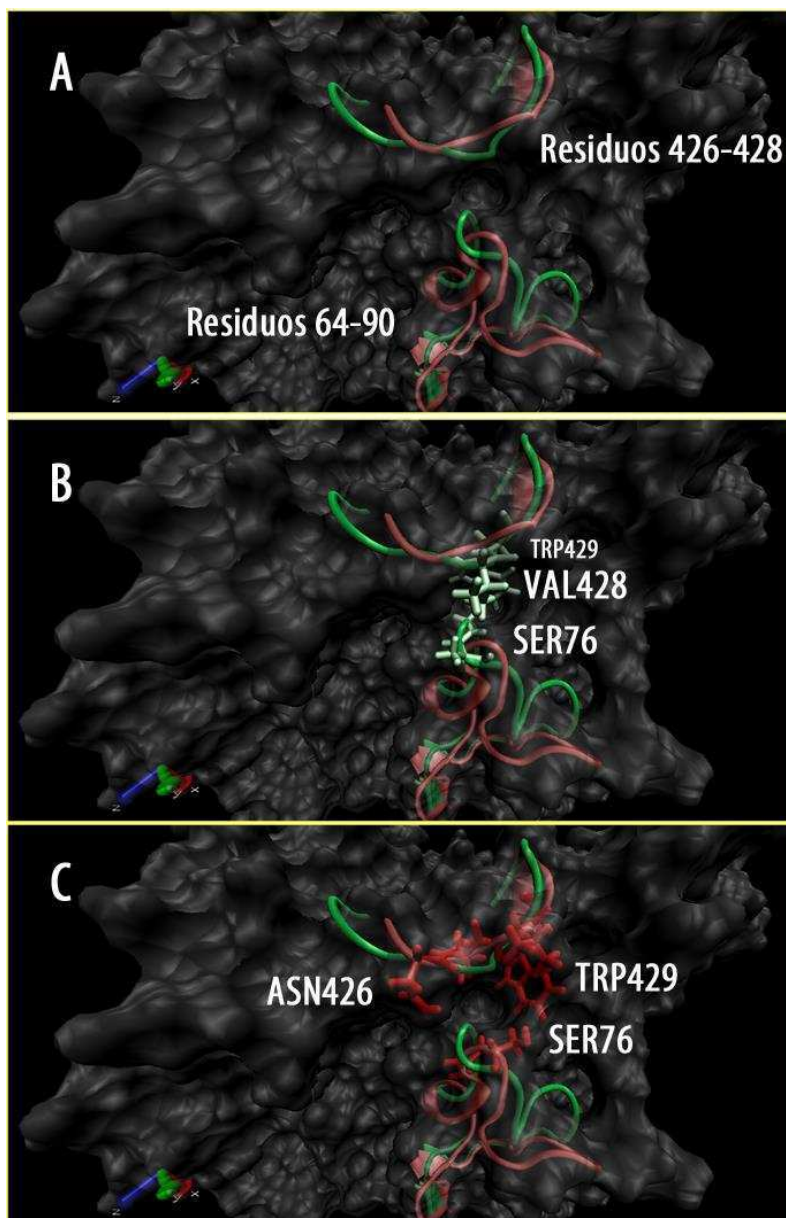


Figura 5.18 A: Estructura secundaria que adoptan los residuos que se encuentran en la zona de la puerta lateral. B: Conformación adoptada por los residuos que bloquean la puerta lateral. C: Conformación adoptada por los residuos que permite la apertura de la puerta lateral.

En las figuras 5.18B y 5.18C, además, se pueden observar las conformaciones de algunos de los residuos que pertenecen a dichas líneas (espiral aleatoria o random coil). En la figura 5.18B, se observa cómo dichos residuos bloquean la entrada lateral, mientras que en la figura 5.18C, se puede ver cómo se disponen de manera que la puerta lateral quede abierta.

La variación en las estructuras secundarias de la enzima representadas en la figura 5.18 se debe, en parte, a la ruptura del enlace de hidrogeno entre los aminoácidos TYR439 y TRP429 cuando la enzima adopta la conformación con la puerta lateral abierta (Figura 5.19B), resultado acorde al reportado en la literatura por Sanson y colaboradores (Sanson y col. 2011). En la figura 5.19A se presentan los dos aminoácidos con la conformación adoptada cuando la puerta lateral se encuentra cerrada, los cuales interaccionan mediante un enlace de hidrógeno. En la figura 5.19C se presentan de manera superpuesta las dos conformaciones adoptadas por estos residuos cuando la puerta lateral se encuentra abierta (rojo) y cerrada (verde), para poder observar de manera más claras las diferencias comentadas.

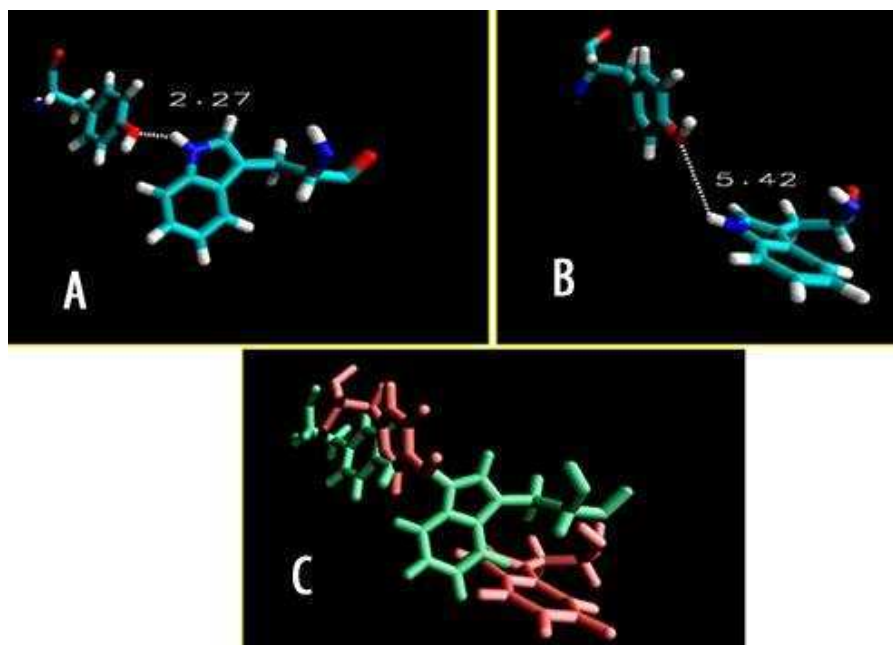


Figura 5.19: Conformación de los aminoácidos TYR439 y TRP429 A) cuando la puerta lateral se encuentra cerrada o B) abierta. C) Superposición de ambas conformaciones: en color rojo, la conformación cuando la puerta lateral se encuentra abierta y en verde, cerrada.

Esta ruptura hace que se desplace el residuo ALA424 y, consecuentemente, se desplacen los residuos 426-428, tal como se evidenciaba en la figura 5.18A (Sanson y col. 2011). También se observó que dicha ruptura hace que haya un cambio conformacional en los

residuos 64-90 (Figura 5.18A). Además, la ruptura del enlace de hidrógeno entre TYR439 y TRP429 podría afectar la conformación de otros residuos aromáticos como TYR331y los mismos TRP429 y TYR439 (Xu y col. 2008). En la figura 5.20, se muestran los residuos mencionados de manera superpuesta tal que pueda observarse su cambio conformacional. En color rojo están representados los residuos obtenidos a partir de la dinámica realizada con el compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**44**) y en color verde, a partir de la realizada con su análogo disulfatado (**72**).

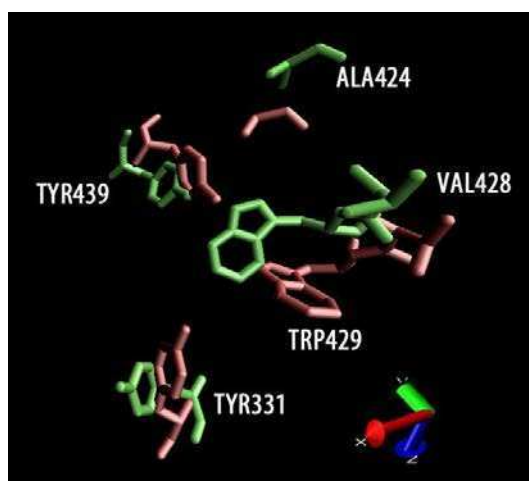


Figura 5.20: Conformación de los residuos más flexibles que permiten la apertura de la puerta lateral. En color rojo, la conformación cuando la puerta lateral se encuentra abierta y en verde, cerrada.

De acuerdo a las figuras anteriores, se deduce que estos residuos poseen una gran flexibilidad lo que permite mediante su movimiento la apertura de la puerta lateral. Esto se refleja en los datos de la tabla 5.5 que presenta los valores de la desviación de la raíz cuadrática media de los residuos (RMSD) involucrados en la apertura del canal lateral. Los altos valores de RMSD son un indicativo de la flexibilidad de estos residuos.

Tabla 5.5 RMSD de algunos residuos involucrados en la apertura de la puerta lateral.

Residuo	RMSD (Å)
VAL428	3,53
TRP429	3,81
TYR331	3,21
ALA424	3,65
Residuos 75-78	3,72
Residuos 64-90	4,07
Residuos 426-428	4,13

5.6.1 Estudio de túneles y cavidades

Es claro que lo expuesto anteriormente, no demuestra que la abertura que se observa desde la superficie sea un canal y mucho menos, que dicho canal se comuniqué con el sitio activo de la enzima. Para demostrar la existencia de este túnel, se realizó un estudio de ILS (Implicit ligand sampling), el cual permite determinar la presencia de cavidades y túneles. Para ello se analizaron 2000 fotos obtenidas a lo largo de la dinámica realizada con la ACE y el compuesto dihidroxilado **44**. En las figuras 5.21 y 5.22 se pueden ver en color azul las isosuperficies que se obtienen cuando una sonda de O_2 genera una perturbación de 2 Kcal/mol en el sistema. En otras palabras, las superficies en azul representan aquellas zonas en donde la sonda no genera perturbaciones estéricas, es decir, los túneles y cavidades presentes en la enzima. Comúnmente se utilizan moléculas diatómicas como sondas, ya que es necesario que las sondas sean pequeñas para medir de manera más precisa las perturbaciones y además, se necesita que sea una molécula apolar para que no existan otras interacciones.

En la figura 5.21 se destaca en violeta la isosuperficie que delimita la entrada lateral. En la misma figura se observa que el túnel desemboca directamente en el sitio activo en donde está ubicada la acetilcolina. También se puede observar la presencia del diol **44** ubicado en el sitio aromático periférico.

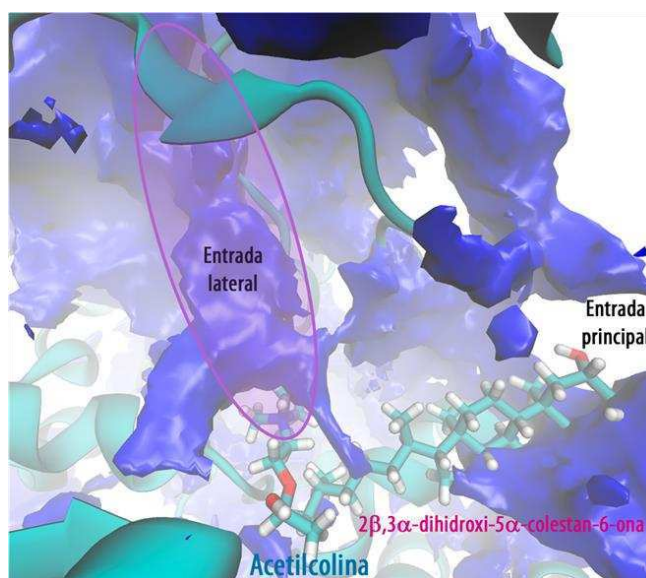


Figura 5.21: Isosuperficie que delimita el túnel lateral

En la figura 5.22 se puede observar la superficie de la enzima y en violeta se destaca la entrada del canal lateral.

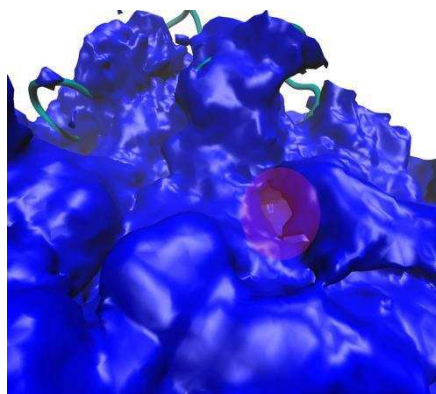


Figura 5.22: Superficie de la enzima desde donde se observa la entrada del canal lateral.

De acuerdo al estudio de ILS fue posible comprobar la existencia del canal de la enzima y permitió comprobar que el canal comunica la superficie de la enzima con el sitio activo, permitiendo la actividad catalítica de la enzima aún cuando ésta se encuentra unida al compuesto **44**.

5.7 Conclusiones

A partir de los datos de inhibición de la enzima ACE *in vitro*, se determinó que el compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona disulfato (**72**) resultó ser el más activo de la serie, junto con el compuesto 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**24**), el cual es ligeramente menos activo. Por lo tanto, dada su mayor actividad inhibitoria, el compuesto **72** fue elegido como modelo para los estudios de modelado molecular y de la cinética de inhibición.

Los estudios de *docking* molecular nos permitieron establecer el modo de unión del esteroide 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona-disulfato (**72**) en el complejo enzima-sustrato y obtener la configuración que adopta el diol **44** dentro de la enzima. Si bien hay antecedentes de estudios de *docking* realizados con la enzima ACE y varios alcaloides esteroideos (Sauvatre y col. 2007, Zaheer 2003; Yang y col. 2012), el trabajo realizado durante esta tesis resulta diferente. Esto se debe a que en los trabajos mencionados se trabajó con pregnanos alcaloides, los cuales poseen el grupo amino protonado a pH fisiológico, a diferencia del compuesto disulfatado **72**, el cual es un colestano con dos cargas negativas correspondientes a los dos grupos sulfato.

Las conformaciones obtenidas a partir de los estudios de *docking* fueron necesarias como punto de partida para los estudios de dinámica molecular. Las dinámicas moleculares

verificaron la estabilidad de los complejos enzima-ligando obtenidos mediante los estudios de *docking* y, a su vez, revelaron las interacciones hidrofóbicas que hay dentro del bolsillo aromático como así también las interacciones de enlace de hidrógeno, las cuales son los factores estabilizantes en la interacción inhibidor-enzima. También permitieron localizar el canal lateral de la enzima y algunos de los residuos responsables de la apertura, lo que explica la actividad que presenta la ACE aún en presencia del compuesto dihidroxilado **44**.

Finalmente, cabe destacar que los compuestos 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona disulfato (**72**) y 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**24**) son una nueva clase de inhibidores esteroidales de la ACE. Teniendo en cuenta los resultados de modelado molecular, su actividad inhibitoria y su baja citotoxicidad ($CC_{50} > 100 \mu M$ —Capítulo 4—), el compuesto **72** es un buen modelo para el diseño racional de nuevos análogos bioactivos.

5.8 Referencias Bibliográficas

- Ahmed, E; Nawaz, SA; Malik, A; Choudhary, MI. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**; 16: 573-80.
- Alper, K; Reith, MEA; Sershen, H. Ibogaine and the inhibition of acetylcholinesterase. *J. Ethnopharmacol.* **2012**; 139: 879-82.
- Anand, P; Singh, B. Synthesis and evaluation of novel 4-[(3H,3aH,6aH)-3-phenyl]-4,6-dioxo-2-phenyldihydro-2H-pyrrolo[3,4-d]isoxazol-(3H,6H,6aH)-yl]benzoic acid derivatives as potent acetylcholinesterase inhibitors and anti-amnestic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**; 20: 521–30.
- Anand, P; Singh, B. A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer 's disease. *Arch. Pharm. Res.* **2013**; 36(4): 375-99.
- Bai, DL; Tang, XC; He, XC. Huperzine A, a potential therapeutic agent for treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2000**; 7: 355-74.
- Bartolini, M, Bertucci, C; Cavrini, V; Andrisano, V. Beta-amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem. Pharmacol.* **2003**; 65: 407–16.
- Bon, S; Vigny, M; Massoulie, J. Asymmetric and globular forms of acetylcholinesterase in mammals and birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**; 76: 2546-50.
- Bottegoni, G; Cavalli, A; Recanatini, M. A comparative study on the application of hierarchical-agglomerative clustering approaches to organize outputs of reiterated docking runs. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**; 46: 852-62.
- Castro, A; Martinez, A.. Peripheral and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors: implications in treatment of Alzheimer's disease. *Mini Reviews in Med. Chem.* **2001**; 1: 267–72.
- Catto, M; Pisani, L; Leonetti, F; Nicolotti, O; Pesce, P; StefanACi, A; Cellamare, S; Carotti, A. Design, synthesis and biological evaluation of coumarin alkylamines as potent and selective dual binding site inhibitors of acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**; 21: 146-52.
- Chang, M; Belew, RK; Carroll, KS; Olson, AJ; Goodsell, DS. Empirical entropic contributions in computational docking: evaluation in APS reductase complexes. *J. Comput. Chem.* **2008**; 29(11): 1753-61.
- Choudhary, MI; Devkota, SA; Nawaz, R; Rahman, A. Cholinesterase inhibitory pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Steroids* 2005; 70: 295-303.
- Cosconati, S; Forli, S; Perryman, A; Harris, R; Goodsell, DS; Olson, A. Virtual screening with Autodock: theory and practice. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**; 5(6): 597-607.
- Cummings, JL. Treatment of Alzheimer's disease: the role of symptomatic agents in an era of disease-modifying therapies. *Rev. Neurol. Dis.* **2007**; 4 (2): 57 -62.
- Danuello, A; Romeiro, NC; Giesel, GM; Pivatto, M; Viegas, C. Jr.; Verli, H; Barreiro, EJ; Fraga, CAM; Castro, NG; Bolzani, VS. Molecular docking and molecular dynamic studies of semi-synthetic piperidine alkaloids as acetylcholinesterase inhibitors. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**; 23(1): 163-70.

- Dewar, MJS; Zoebisch, EG; Healy, EF; Stewart, JJP. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**; 107: 3902–9.
- Diamant, S; Podoly, E; Friedler, A; Ligumsky, H; Livnah, O. et al. Butyrylcholinesterase attenuates amyloid fibril formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, 103: 8628-33.
- Dvir, H; Silman, I; Harel, M; Rosenberry, TL; Sussman, JL. Acetylcholinesterase: From 3D structure to function. *Chem. Biol. Interact.* **2010**; 187: 10-22.
- Ellman, GL; Courtney, KD; Andres, V Jr; Featherstone, RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**; 7: 88-95.
- Frisch, MJ; Trucks, GW; Schlegel, HB; Scuseria, GE; Robb, M; Cheeseman, JR. et al. Gaussian 03, Revision C.01 Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
- Garrido Santos, GA; Murray, AP; Pujol, CA; Damonte, EB; Maier, MS. Synthesis and antiviral activity of sulfated and acetylated derivatives of 2 β ,3 α -dihydroxy-5 α -cholestane. *Steroids* **2003**; 68: 125-32.
- Gilson, MK; Traatsma, TP; McCammon, JA; Ripoll, DR; Faerman, CH; Axelsen, PH; Silman, I; Sussman, JL. Open “back door” in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* **1994**; 263(5151): 1276-8.
- Goedert, M; Spillantini, MG. A century of Alzheimer’s Disease. *Science* **2006**; 314: 777-81.
- Hung, TM; Na, M; Dat, NT; Ngoc, TM; Youn, U; Kim, HJ; Min, BS; Lee, J; Bae, K. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. *J. Ethnopharmacol.* **2008**; 119: 74-80.
- Khalid, A; Zaheer, uH; Anjum, S; Khan, MR; Atta-ur-Rahman; Choudhary, MI. Kinetics and structure-activity relationship studies on pregnane-type steroidal alkaloids that inhibit cholinesterases. *Bioorg Med Chem* **2004**; 12: 1995–2003.
- Konrath, EL; dos Santos Passos, C; Klein-Júnior, LC; Henriques, AT. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer’s disease. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**; 65(12): 1701-25.
- Ladner, CJ; Lee, JM.. Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: The cholinergic hypothesis revisited. *J. Neuropath. Exp. Neur.* **1998**; 57: 719–31.
- Lin, BQ; Ji, H; Li, P; Fang, W; Jiang, Y. Inhibitors of acetylcholine esterase in vitro-screening of steroidal alkaloids from *Fritillaria* species. *Planta Med.* **2006**; 72(9): 814-8.
- Mesulman, MM; Guillozet, A; Shaw, P; Levey, A; Duyssen, EG; Lockridge, O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* **2002**; 110: 627-39.
- Morris, GM; Goodsell, DS; Halliday, RS; Huey, R; Hart, WE; Belew, RK; Olson, AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **1998**; 19: 1639-62.
- Murray, AP; Faraoni, MB; Castro, MJ; Alza, NP; Cavallaro, V. Natural ACE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer’s disease therapy. *Curr. Neuropharmacology* **2013**; 11: 388-413.
- Nachmansohn, D; Wilson, IB. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv. Enzymol.* **1951**; 12: 259-339.

- Noetzli, M; Eap, CB. Pharmacodynamic, pharmacokinetic and pharmacogenetic aspects of drugs used in the treatment of alzheimer's disease. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**; 52(4): 225-41.
- Parle, M; Dhingra, D; Kulkarni, SK. Neuromodulators of learning and memory. *Asia Pac. J. Pharmacol.* **2004**; 16: 89-99.
- Peng D-Y, Sun Q, Zhu X-L, Lin H-Y, Chen Q et. al. Design, synthesis and bioevaluation of benzamides: Novel ACE inhibitors with multi-functions on BCE, A β aggregations and β -secretase. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**; 20: 6739-50.
- Podoly, E; Bruck, T; Diamant, S; Melamed-Book, N; Weiss, A. et al. Human recombinant butyrylcholinesterase purified from the milk of transgenic goats interacts with beta-amyloid fibrils and suppresses their formation in vitro. *Neurodegener. Dis.* **2008**, 5: 232-6.
- Prado-Prado, FJ; Escobar, M; Garcia-Mera X. Review of Bioinformatics and theoretical studies of acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Bioinformatics* **2013**; 8(4): 496-510.
- Rahman, AU; Akhtar, N; Choudhary, MI; Tsuda, Y; Sener, B; Khalid, A; Parvez, M. New steroidal alkaloids from *Fritillaria imperialis* and their cholinesterase inhibiting activities. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**; 50(8): 1013-16.
- Rees, T, Hammond, PI; Soreq, H; Younkin, S; Brimijoin, S. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* **2003**; 24: 777-87.
- Richmond, V; Garrido Santos, G; Murray, AP; Maier, MS. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of 2 β ,3 α -disulfoxy-5 α -cholestan-6-one. *Steroids* **2011**; 76:1160-5.
- Roothaan, CCJ. New developments in molecular orbital theory. *Rev. Mod. Phys* **1951**; 23: 69-89.
- Rosenberry, TL. Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1975**; 43: 103-218.
- Sanson, B; Colletier, JP; Xu, Y; Lang, PT; Jiang, h; Silman, I; Sussman, JL; Weik, M. Backdoor opening mechanism in acetylcholinesterase based on X-ray crystallography and molecular dynamics simulations. *Protein Sci.* **2011**; 20: 1114-8.
- Sauvatre, T; Barlier, M; Herlem, D; Gresh, N; Chiaroni, A; Guenard, D; Guillou, C. New potent acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene serie. *J. Med. Chem.* **2007**; 50: 5311-23.
- Selkoe, DJ.. Deciphering the genesis and fate of amyloid betaprotein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* **2002**; 110: 1375-81.
- Sivaprakasam, K. Towards a unifying hypothesis of Alzheimer's disease: cholinergic system linked to plaques, tangles and neuroinflammation. *Curr. Med. Chem.* **2006**; 13 (18): 2179 - 88.
- Sugimoto, H; Yamanishi, Y; Iimura, Y; Kawakami, Y. Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2000**; 7: 303-39.
- Sussman, JL; Harel, M; Frolow, F; Oefner, C; Goldman, A; Toker, L; Silman, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **1991**; 253:872-9.

- Swerdlow, RH. Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging? *Neurobiol Aging* . **2007**; 28 (10): 1465 -80.
- Vela Gurovic, MS; Castro, MJ; Richmond, V; Faraoni, MB; Maier, MS; Murray, AP. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae). *Planta Med.* **2009**; 75: 1-4.
- Wah, LK; Abas, F; Cordell, GA; Ito, H; Ismail, IS. Steroids from *Dysoxylum grande* (Meliaceae) leaves. *Steroids* **2013**; 78: 210-9.
- Wierenga, JM; Hollingworth, RM. Inhibition of insect acetylcholinesterase by the potato glycoalkaloid alpha-chaconine. *Nat. Toxins* **1992**; 1: 96-9.
- Wortmann, M; Fletcher, S. World Alzheimer Report 2013. Alzheimer's Disease International. Londres.
- Xu, Y; Colletier, JP; Weik, M; Jiang, H; Moulton, J; Silman, I; Sussman, JL. Flexibility of aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase: X-ray versus molecular dynamics. *Biophys. J.* **2008**; 95: 2500-11.
- Yang, ZD; Duan, DZ; Xue, WW; Yao, XJ; Li, S. Steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica* as acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure-activity relationships. *Life Sci.* **2012**; 90: 929-33.
- Zaheer-ul-haq, Wellenzohn, B; Liedl, KR; Rode, BM. Molecular docking studies of natural cholinesterase-inhibiting steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna*. *J. Med. Chem.* **2003**; 46: 5087-90.
- Zhou, X; Lu, X; Lin, X; Yang, B; Yang, X; Liu, Y. Brominated aliphatic hydrocarbons and sterols from the sponge *Xestospongia testudinaria* with their activity. *Chem. Phys. Lip.* **2011**; 164: 703-6.

Capítulo 6:

Parte experimental

6.1 Generalidades

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros IR se determinaron en discos de NaBr o pastillas de KBr en un espectrofotómetro Nicolet Magna 550. En este capítulo se detallan las bandas de absorción más importantes y características para cada compuesto.

Los espectros de IR-ATR se determinaron colocando la muestra sobre un cristal de ZnSe en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 400 con un accesorio para ATR.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C) fueron realizados a 500,13 y 125,77 MHz, respectivamente en un espectrómetro Bruker AM-500, empleando como solventes deuterados los especificados en cada caso, en tubos de 5 mm de diámetro. Los desplazamientos químicos se expresan en la escala δ , en partes por millón (ppm) respecto de la resonancia del tetrametilsilano (TMS), utilizado como referencia interna (0,00 ppm), o en su defecto la señal correspondiente al solvente utilizado. Por ejemplo, el pico central del multiplete del metanol (CD_3OD) a 3,31 ppm y 49,0 ppm (RMN ^1H y RMN ^{13}C , respectivamente) o el pico central del multiplete del DMSO- d_6 a 2,50 ppm y 39,52 ppm (RMN ^1H y RMN ^{13}C , respectivamente). Las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hz. La multiplicidad de las señales se indica en cada caso como singulete (s), singulete ancho (sa), doblete (d), doblete ancho (da), triplete (t), cuarteto (c), doble doblete (dd) y multiplete (m). Los datos de RMN de los compuestos descriptos en este capítulo se encuentran detallados en el apéndice (I). La asignación completa de los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C de los compuestos descriptos en este capítulo se realizó utilizando una combinación de técnicas mono (^1H y ^{13}C) y bidimensionales (HSQC-dept, HMBC, COSY, NOESY). Los experimentos de RMN-2D fueron adquiridos utilizando secuencias de pulsos estándar.

Los espectros de masa de alta resolución con ionización por electrospray (EMAR-ESI) fueron realizados en un equipo Bruker MicroOTOF QII, (Billerica, USA), (UMYMFOR, CONICET, FCEN-UBA).

Las cromatografías analíticas en capa delgada (CCD) se realizaron utilizando placas con soporte de aluminio (Silicagel 60 F_{254} , Merck). La detección se realizó por inmersión de las placas en una solución acuosa de H_2SO_4 10% y posterior calentamiento en estufa a 110 °C.

Las cromatografías en capa preparativa de muestras de hasta 25 mg se realizaron en placas para CCD con soporte de aluminio (Silicagel 60 F254, Merck).

Las cromatografías en columna fueron realizadas en columnas de vidrio de diferentes longitudes y diámetros internos: 80 cm x 5 cm; 50 cm x 3 cm ó 40 cm x 1,5 cm. La selección de las columnas cromatográficas dependió de la cantidad de sustancia a purificar y de la cantidad de fase estacionaria requerida. Se utilizaron como fases estacionarias:

- Sílica gel 60 (230-400 mesh, Merck) para cromatografía en columna *flash* realizadas con presión utilizando aire comprimido. Sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) para cromatografía en columna
- Resina de intercambio Amberlite CG-120 (catiónica fuerte, forma Na⁺, Sigma). Se regenera su forma sódica por tratamiento con 50 ml de una solución acuosa de NaCl 8%, 50 ml de H₂O y 100 ml de metanol. Los compuestos se eluyeron utilizando metanol.

Las cromatografías *flash* en columna seca se realizaron empleando embudos con placa filtrante de vidrio sinterizado. La fase móvil –indicada en cada caso- eluyó mediante presión negativa. La fase estacionaria utilizada fue Silicagel 60G (Merck) (Harwood 1985).

Se utilizaron cartuchos de sílica gel (55 µm, Phenomenex) para las separaciones por extracción en fase sólida de 500 mg de sílica para separar hasta 25 mg de muestra y de 1000 mg, para separar hasta 50 mg.

Todos los solventes utilizados para las separaciones cromatográficas (ciclohexano, acetato de etilo, diclorometano, metanol) se purificaron mediante destilación fraccionada.

Las separaciones y purificaciones de algunos compuestos dihidroxilados y sulfatados se realizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Spectra Physics equipado con una bomba Spectra Series P100 y un inyector manual Rheodyne. Los compuestos fueron detectados mediante un detector de índice de refracción Shodex RI-71 y un detector U.V. Micromeritics modelo 787. Las columnas utilizadas fueron:

- Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 10 µm (longitud 30 cm x 7,8 mm d.i.) con precolumna Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 10 µm (longitud 5 cm x 7,8 mm d.i.).

- AQUA C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 5 µm (longitud 25 cm x 10 mm d.i.) con precolumna Bondclone C-18 (Phenomenex) tamaño de partícula 5 µm (longitud 5 cm x 10 mm d.i.).

Los solventes utilizados en todos los casos fueron calidad HPLC, filtrados al vacío antes de su utilización y desgasificados. Se utilizaron soluciones acuosas con distintos porcentajes de MeOH según se especifica en cada caso.

Los solventes utilizados para las reacciones fueron de calidad “para análisis” o superior y se purificaron según métodos descritos en bibliografía (Perrin y Amarego 1988)

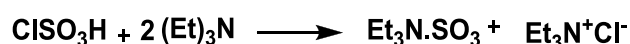
Los microanálisis fueron realizados en un equipo EAI Exeter Analytical, Inc. CE-440. Las muestras para microanálisis fueron secadas en vacío durante 12 hs.

Las reacciones asistidas por microondas se llevaron a cabo en un equipo reactor CEM Discover.

6.2 Síntesis de compuestos

Las secciones siguientes describen la preparación de los compuestos sintetizados y de todos los intermediarios de reacción y también la síntesis del reactivo sulfatante que inicialmente se utilizó en este trabajo de tesis:

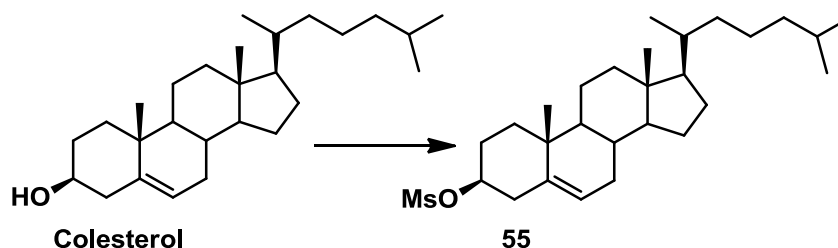
6.2.1 Síntesis del reactivo sulfatante trietilamina-trióxido de azufre $\text{SO}_3\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$



A una solución de trietilamina (21,1 ml) en 50 ml de diclorometano enfriada en baño de hielo, se le agregó gota a gota una solución de ácido clorosulfónico (5 ml) en 25 ml de diclorometano. Se dejó reaccionar durante 3 horas. El producto precipitó, se filtró con vacío y lavó con agua hasta neutralidad de las aguas de lavado. Se obtuvo el complejo sulfatante con un 67,4% de rendimiento. Pf: 90-91°C (Lit. 91,5 °C, Beilstein y Wiegand 1883)

6.2.2 Síntesis de esteroides polihidroxiados y sus análogos sulfatados (Capítulo II)

3 β -mesiloxicolest-5-eno (55)



Sobre una solución de colesterol (3,8683 g, 10 mmol) y trietilamina (2,8 ml) en 70 ml de metiletilcetona a 5°C, se agregó gota a gota y durante 30 minutos cloruro de metanosulfonilo (1,16 ml, 15 mmoles) en 30 ml de metiletilcetona. Se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución orgánica se lavó sucesivamente con una solución acuosa de NaCl 15%, una solución saturada de NaHCO₃ y una solución acuosa de NaCl 15%. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida para obtener 4,51 g de 3 β -mesiloxicolest-5-eno (**55**) (97%).

RMN ¹H y ¹³C: Ver anexo.

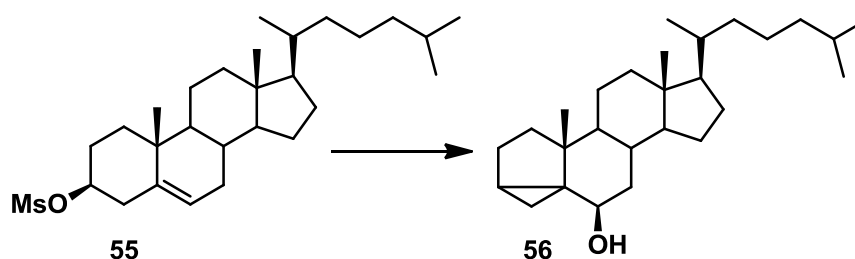
EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para C₂₈H₅₂NO₃S [M + NH₄]⁺: 482,3662, encontrado *m/z* = 482,3679.

FT-IR: $\nu_{\max}$ (film NaBr, cm⁻¹) 3050 (ν C=C-H), 1665 (ν C=C), 1465 (δ_{as} CH₃), 1352 (δ_s CH₃), 1177 (δ_s O=S=O).

Punto de fusión: 120 °C (acetona-H₂O). (Lit. 118-119 °C, Sun y col. 2009)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo CH₂Cl₂. R_f: 0,68

3 α ,5 α -ciclocolestan-6 β -ol (56)



Se agregaron 12,1 ml de una solución acuosa de NaHCO₃ 50,8 % sobre una solución del mesil éster (**55**) (3,02 gr, 6,49 mmol) en 30 ml de metiletilcetona. Se agitó vigorosamente y

se calentó a reflujo a 85-95 °C durante 7 horas. Luego, se agregó una mezcla de AcOEt y H₂O (1:1), la fase orgánica se separó y se lavó con solución saturada de NaCl. Se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado utilizando cromatografía flash en columna seca de sílica gel. El producto fue eluido utilizando una mezcla de ciclohexano/AcOEt (97:3) para dar 1,83 g de 3 α ,5 α -ciclocolestano-6 β -ol (**56**) (73 %)

RMN ¹H y ¹³C: En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para C₂₇H₄₆NaO [M + Na]⁺: 409,3441, encontrado *m/z*= 409,3427

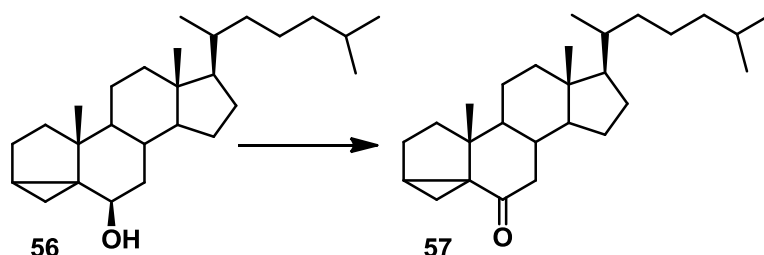
Microanálisis: calculado para C₂₇H₄₆O, %C: 83,87, %H: 11,99, %O: 4,14, encontrado: %C: 83,61, %H: 11,83

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm⁻¹) 3431 (ν O-H), 1493 (δ_{as} CH₃), 1377 (δ_{s} CH₃).

Punto de fusión: 75-76 °C (acetona-H₂O) (Lit. 74-75 °C, Wallis y col. 1937)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (98:2). R_f: 0,55

3 α ,5 α -ciclocolestano-6-ona (**57**)



Se agregó gota a gota 4 ml de Reactivo de Jones (7 gr de CrO₃ en 40 ml de H₂SO₄ acuoso al 75%) sobre una solución agitada y enfriada en baño de hielo de 3 α ,5 α -ciclocolestano-6 β -ol (**56**) (1,83 g, 4,73 mmol) en 46 ml de metiletilcetona hasta que la solución permaneció de color roja. Luego se agregó una solución acuosa de NaHSO₃ diluido hasta que la solución se tornó de color verde. Posteriormente, la solución orgánica se lavó sucesivamente con una solución acuosa de NaCl 15%, se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía *flash* en columna seca de sílica gel. El producto fue eluido utilizando una mezcla de ciclohexano/AcOEt (95:5) para dar 1,36 g de 3 α ,5 α -ciclocolestano-6-ona (**57**) (75 %)

RMN ¹H y ¹³C: En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $C_{27}H_{44}NaO$ $[M + Na]^+$: 407,3284, encontrado m/z = 407,3283

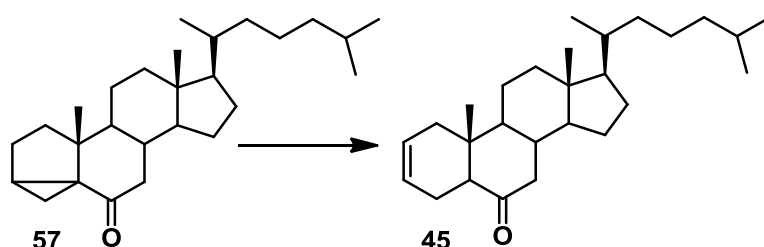
Microanálisis: calculado para $C_{27}H_{44}O$, %C: 84,31, %H: 11,53, %O: 4,16, encontrado: %C: 84,51, %H: 11,36

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 1679 (ν C=O), 1443 (δ_{as} CH₃), 1363 (δ_s CH₃)

Punto de fusión: 96,5-97 °C (acetona-H₂O) (Lit. 97 °C, Heilbron y col. 1938)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (8:2). Rf: 0,53

5 α -Colest-2-en-6-ona (45)



Se agregó ácido p-toluensulfónico (146,7 mg) y NaBr (172,6 mg) a una solución de 3 α ,5 α -ciclocolestan-6-ona (**57**) (1,31 g, 3,41 mmol) en 14 ml de DMF anhidra. La mezcla se agitó y calentó a reflujo durante 4 horas. Luego, se agregaron 40 ml de AcOEt y 40 ml de agua a la mezcla de reacción enfriada. La fase orgánica se separó y se lavó con agua (3 x 40 ml). Se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía *flash* en columna seca de sílica gel. El producto fue eluido utilizando una mezcla de ciclohexano/AcOEt (96:4) para dar 1,04 g de 5 α -colest-2-en-6-ona (**45**) (79 %)

RMN ¹H y ¹³C: En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $C_{27}H_{44}NaO$ $[M + Na]^+$: 407,3284, encontrado m/z = 407,3286

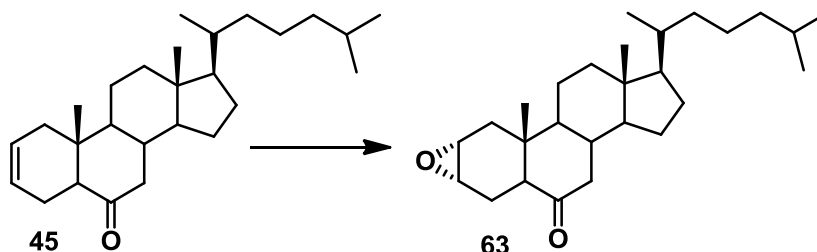
Microanálisis: calculado para $C_{27}H_{44}O$, %C: 84,31, %H: 11,53, %O: 4,16, encontrado: %C: 84,37, %H: 11,61

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 3025 (ν C=C-H), 1710 (ν C=O), 1657 (ν C=C), 1459 (δ_{as} CH₃), 1380 (δ_s CH₃)

Punto de fusión: 99,5-100,5 °C (acetona-H₂O) (Lit. 101-102 °C, Kondo y col. 1983)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo tolueno/AcOEt (95:5). Rf: 0,78

2 α ,3 α -Epoxi-5 α -colestán-6-ona (63)



Se mezcló una solución de 5 α -colest-2-en-6-ona (**45**) (246 mg, 0,64 mmol) en 8,6 ml de CH₂Cl₂ con 9,8 ml de una solución acuosa de Na₂CO₃ 10%. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente y se agregó ácido *m*-cloroperbenzoico (359 mg, 2,08 mmol) en 3,7 ml de CH₂Cl₂ gota a gota a 5 °C. La mezcla se agitó durante 4 horas a 5 °C. Se separó la fase orgánica y se lavó sucesivamente con una solución acuosa de Na₂SO₃ 5 %, solución saturada de NaHCO₃ y agua. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía *flash* en columna seca de sílica gel. El producto fue eluido utilizando una mezcla de ciclohexano/AcOEt (95:5) para dar 169,2 mg de 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestán-6-ona (**63**) (66 %)

RMN ¹H y ¹³C: En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para C₂₇H₄₄NaO₂ [M + Na]⁺: 423,32335, encontrado *m/z* = 423,32413

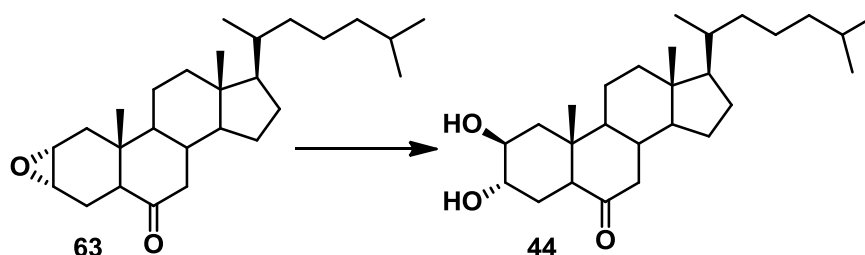
Microanálisis: calculado para C₂₇H₄₄O₂·½H₂O, %C: 79,16, %H: 11,07, %O: 9,77, encontrado: %C: 78,88, %H: 10,71

FT-IR: $\nu_{\max}$ (film NaBr, cm⁻¹) 1704 (ν C=O), 1469 (δ_{as} CH₃), 1382 (δ_{s} CH₃), 1254 (ν_{s} C-O-C), 802 (ν_{as} C-O-C).

Punto de fusión: 141-142 °C (acetona) (Lit. 141-142 °C, Shoppee y Summers 1952)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (7:3). R_f: 0,72

2 β ,3 α -Dihidroxi-5 α -colestán-6-ona (44)



A una solución del epóxido (**63**) (85,7 g, 0,21 mmol) en 4 ml de THF se agregó 0,20 ml de una solución acuosa de H₂SO₄ 1N. La mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se neutralizó con una solución saturada de NaHCO₃ y se evaporó el solvente hasta 1/5 del volumen inicial. Se agregó agua y se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna de sílica gel. El producto fue eluido utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para dar 66,8 mg de 2β,3α-dihidroxicolestan-6-ona (**44**) (76 %).

RMN ¹H y ¹³C: En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para C₂₇H₄₇O₃ [M + H⁺]: 419,3520, encontrado: *m/z* = 419,3517

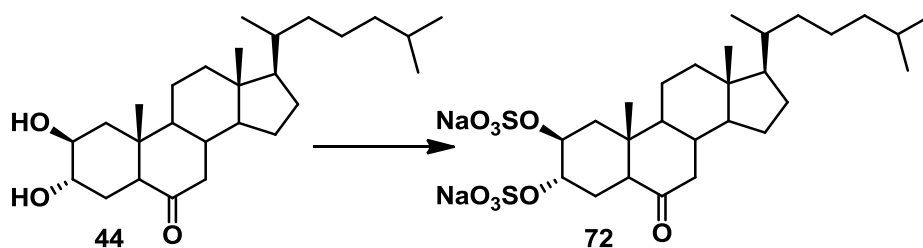
Microanálisis: calculado para C₂₇H₄₆O₃·½H₂O, %C: 75,83, %H: 11,07, %O: 13,10, encontrado: %C: 75,72, %H: 11,07

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm⁻¹) 3431 (ν O-H), 1690 (ν C=O), 1450 (δ_{as} CH₃)

Punto de fusión: 181-182 °C (acetona-H₂O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (2:8). R_f: 0,34

2β,3α-Dihidroxi-5α-colestan-6-ona disulfato (**72**)



Se agregó SO₃.N(CH₃)₃ (36 mg, 0,26 mmol) a una solución de 2β,3α-dihidroxi-5α-colestan-6-ona (**44**) (14 mg, 0,033 mmol) en 0,45 ml de DMF. La reacción se llevó a cabo en un tubo sellado, con calentamiento en microondas. Se irradió durante 7 minutos a 150 °C con agitación. Se finalizó la reacción por agregado de agua (0,5 ml) y luego, se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo. El producto de la reacción fue eluido a través de una columna de intercambio catiónico (forma sodio) con metanol. Se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo y se purificó utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El compuesto fue eluido utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (85:15) para obtener 14,9 mg de 2β,3α-dihidroxicolestan-6-ona-2,3-disulfato (**72**) (92 %).

RMN ^1H y ^{13}C : En anexo.

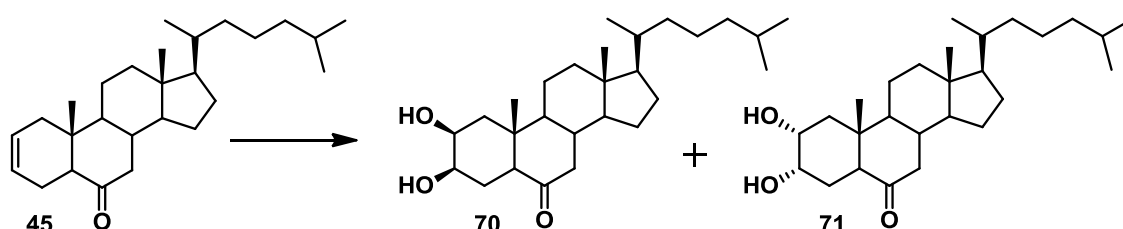
EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NaO}_9\text{S}_2$ $[\text{M} - 2\text{H} + \text{Na}]^-$: 599,23299, encontrado $m/z = 599,23265$

FT-IR: ν_{max} (KBr, cm^{-1}) 1699 ($\nu \text{C=O}$), 1463 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1382 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1254 y 1221 ($\delta_{\text{s}} \text{S=O}$)

Punto de fusión: 184,5-185 °C (descompone)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo *n*-BuOH/AcOH/AcOEt (12:3:5). Rf: 0,51

2 β ,3 β -Dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**70**)



Se preparó una solución del alqueno (**45**) (50 mg, 0,13 mmol) en 2 ml de *t*-butanol. Esta solución se agregó a una solución de 181,7 mg de AD-mix- α (composición: 0,0016 moles de $(\text{DQH})_2\text{PHAL}$, 0,4988 moles de K_2CO_3 , 0,4988 moles de $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ y 0,0007 moles de $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Aldrich) en 2 ml de agua. La mezcla se agitó durante algunos minutos a temperatura ambiente hasta que se observó claramente la separación de dos fases. Luego, se agregó metanosulfonamida (12,5 mg, 0,13 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 semanas a temperatura ambiente. Para finalizar la reacción, se enfrió la mezcla en baño de hielo y se agregaron 1,7 ml de una solución saturada de NaHSO_3 . La suspensión se agitó durante media hora y luego se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml), se juntaron los extractos orgánicos y se lavaron sucesivamente con una solución acuosa de KOH 2N (3 x 5 ml) y agua. Se secó la fase orgánica con Na_2SO_4 y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó por cromatografía en columna *flash* de sílica gel y se eluyeron los productos de la dihidroxilación con ciclohexano/AcOEt (60:40 v/v). Se obtuvieron 35,4 mg de 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**70**) (65 %) y 19 mg de 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**71**) (35%)

Caracterización para el isómero 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**70**):

RMN ^1H y ^{13}C : En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $C_{27}H_{46}NaO_3$ [$M + Na^+$]: 441,33392, encontrado: $m/z = 441,33216$.

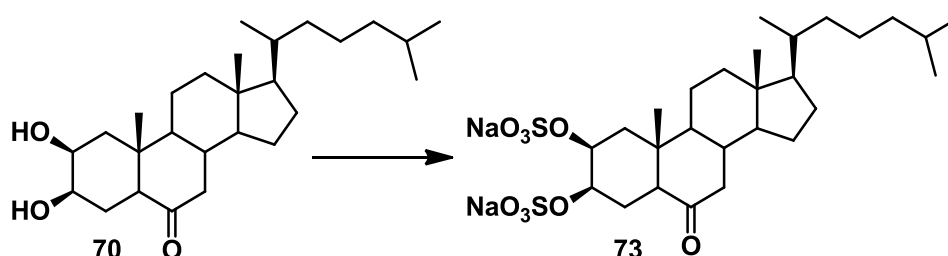
Microanálisis: calculado para $C_{27}H_{46}O_3 \cdot \frac{1}{2}H_2O$, %C: 75,82, %H: 11,08, %O: 13,10, encontrado: %C: 75,46, %H: 11,29

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 3525, 3464 (ν O-H), 1696 (ν C=O), 1454 (δ_{as} CH₃), 1363 (δ_s CH₃)

Punto de fusión: 203-204 °C (acetona-H₂O) (Lit. 204-207 °C, Mori y col. 1967)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (2:8). Rf: 0,35

2 β ,3 β -Dihidroxi-5 α -colestán-6-ona disulfato (73)



Se agregó $SO_3 \cdot N(CH_3)_3$ (25,7 mg, 0,19 mmol) a una solución de 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -colestán-6-ona (**70**) (10 mg, 0,024 mmol) en 0,35 ml de DMF. La reacción se llevó a cabo en un tubo sellado, con calentamiento en microondas. Se irradió durante 7 minutos a 150 °C con agitación. Se finalizó la reacción por agregado de agua (0,5 ml) y luego, se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo. El producto de la reacción fue eluido a través de una columna de intercambio catiónico (forma sodio) con metanol. Se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo y se purificó utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El compuesto fue eluido utilizando una mezcla de CH_2Cl_2 /MeOH (85:15) para obtener 11,8 mg de 2 β ,3 β -dihidroxicolestan-6-ona-2,3-disulfato (**73**) (79,4 %).

RMN 1H y ^{13}C : En anexo.

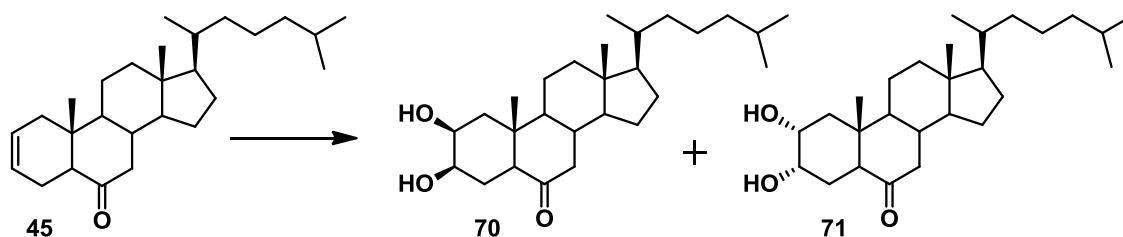
EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $C_{27}H_{44}NaO_9S_2$ [$M - Na$]: 599,2330, encontrado: $m/z = 599,2355$

ATR FT-IR: ν_{max} (ZnSe cm^{-1}) 1699 (ν C=O), 1463(δ_{as} CH₃), 1376 (δ_s CH₃), 1220 (banda ancha, δ_s S=O)

Punto de fusión: 210-215 °C (funde y descompone)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo *n*-BuOH/AcOH/AcOEt (12:3:5). Rf: 0,48

2 α ,3 α -Dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (71)



Se preparó una solución del alqueno (**45**) (50 mg, 0,52 mmol) en 2 ml de *t*-butanol. Esta solución se agregó a una solución de 732 mg de AD-mix- β (composición: 0,0016 moles de (DHQD)₂PHAL, 0,4988 moles de K₂CO₃, 0,4988 moles de K[Fe(CN)₆]₃ y 0,0007 moles de K₂OsO₄·2H₂O, Aldrich) en 5,8 ml de agua. La mezcla se agitó durante algunos minutos a temperatura ambiente hasta que se observó claramente la separación de dos fases. Luego, se agregó metanosulfonamida (49,3 mg, 0,51 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante 2 semanas a temperatura ambiente. Para finalizar la reacción, se enfrió la mezcla en baño de hielo y se agregaron 1,7 ml de una solución saturada de NaHSO₃. La suspensión se agitó durante media hora y luego se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml), se juntaron los extractos orgánicos y se lavaron sucesivamente con una solución acuosa de KOH 2N (3 x 5 ml) y agua. Se secó la fase orgánica con Na₂SO₄ y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción se purificó utilizando cromatografía en columna *flash* de sílica gel y los productos de la dihidroxilación se eluyeron con ciclohexano/AcOEt (60:40 v/v). El solvente se evaporó a presión reducida y se obtuvieron 123,4 mg de 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**71**) (65 %) y 35,4 mg de 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (**70**) (18,6 %). Se recuperaron 6 mg del alqueno **45** sin reaccionar.

Caracterización para el isómero 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -coleston-6-ona (X):

RMN ¹H y ¹³C: En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para C₂₇H₄₆NaO₃ [M + Na⁺]: 441,3339, encontrado *m/z* = 441,3323

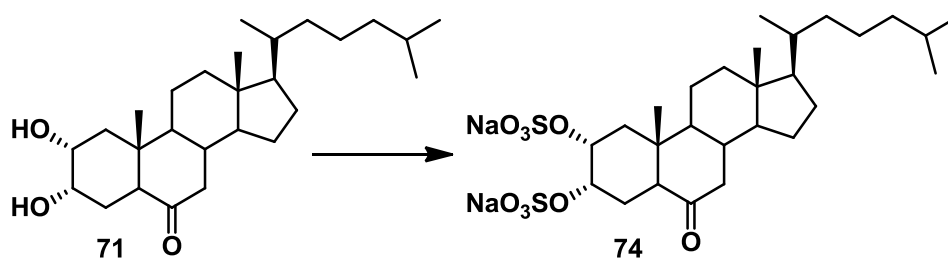
Microanálisis: calculado para C₂₇H₄₆O₃·½H₂O, %C: 75,83, %H: 11,07, %O: 13,10, encontrado: %C: 75,86, %H: 11,14

FT-IR: $\nu_{\max}$ (film NaBr, cm⁻¹) 3348, 3523 (ν O-H), 1710 (ν C=O), 1463 (δ_{as} CH₃), 1380 (δ_{s} CH₃)

Punto de fusión: 199-200 °C (acetona-H₂O) (Lit. 202-204 °C, Hazra y col. 2001)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (2:8). R_f: 0,40

2 α ,3 α -Dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**74**)



Se agregó $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (25,7 mg, 0,19 mmol) a una solución de 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**71**) (10 mg, 0,024 mmol) en 0,35 ml DMF. La reacción se llevó a cabo en un tubo sellado, con calentamiento en microondas. Se irradió durante 7 minutos a 150 °C con agitación. Se finalizó la reacción por agregado de agua (0,5 ml) y luego, se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo. El producto de la reacción fue eluido a través de una columna de intercambio catiónico (forma sodio) con metanol. Se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo y se purificó utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El compuesto fue eluido con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85:15) para obtener 11,6 mg de 2 α ,3 α -dihidroxicolestan-6-ona-2,3-disulfato (**74**) (77,6%).

RMN ^1H y ^{13}C : En anexo.

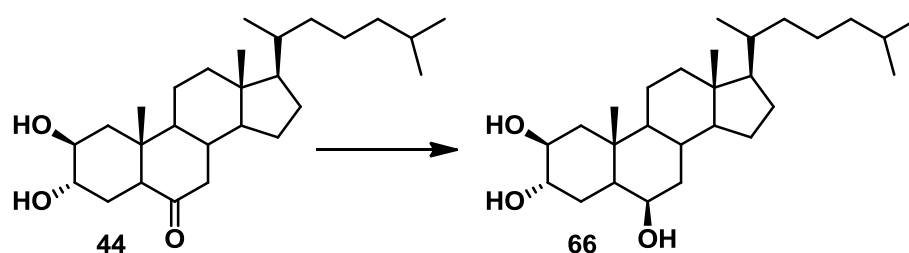
EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NaO}_9\text{S}_2$ $[\text{M} - \text{Na}]^-$: 599,2330, encontrado: $m/z = 599,2349$

ATR FT-IR: ν_{max} (ZnSe cm^{-1}) 1702 ($\nu \text{ C=O}$), 1463 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1379 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1218 banda ancha ($\delta_{\text{s}} \text{S=O}$)

Punto de fusión: 195-208 °C (funde y descompone)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{AcOEt}$ (12:3:5). R_f : 0,51

2 β ,3 α ,6 β -Trihidroxi-5 α -colestano (**66**)



Tres alícuotas de 0,5 ml de una solución de NaBH_4 (4,5 mg/ml en metanol) se agregaron a una solución de 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**) (19,5 mg, 0,046 mmol) en 1,25 ml de metanol a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 24 hs. Se acidificó el medio de reacción con una solución acuosa de HCl 0,5M y se agregó un exceso de metanol para destruir y eliminar el exceso de NaBH_4 en forma de B(OMe)_3 en el evaporador rotatorio. Se agregó agua y se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El producto fue eluido con una mezcla de ciclohexano/AcOEt (70:30) para dar 16,8 mg de 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (**66**) (87 %).

RMN ^1H y ^{13}C : En anexo.

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{NaO}_3$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 443,3496, encontrado m/z = 443,3479

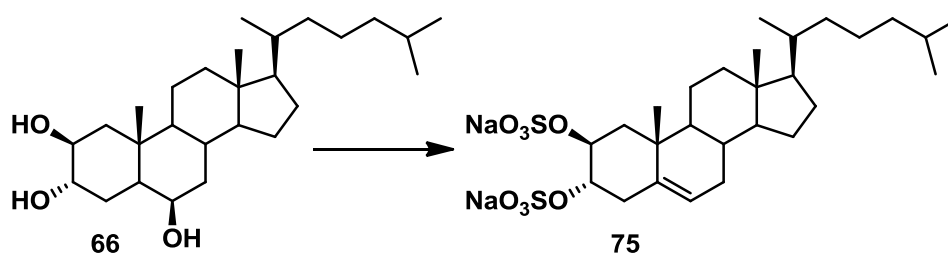
Microanálisis: calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_3 \cdot 3/4 \text{H}_2\text{O}$, %C: 74,69, %H: 11,49, %O: 13,82, encontrado: %C: 74,26, %H: 11,58

ATR FT-IR: ν_{max} (ZnSe cm^{-1}) 3302 ($\nu \text{ O-H}$), 1463 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1379 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$).

Punto de fusión: >250 °C (acetona- H_2O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (1:9). R_f : 0,33

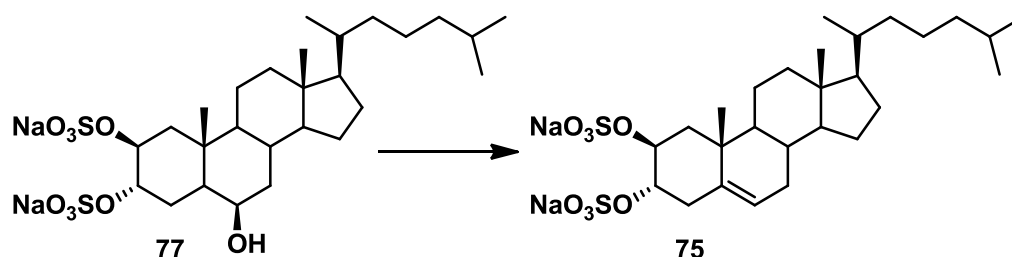
2 β ,3 α -Dihidroxicolest-5-eno disulfato (**75**)



Se agregó $\text{SO}_3 \cdot \text{N(CH}_3)_3$ (52,6 mg, 0,38 mmol) a una solución de 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano (**66**) (7,8 mg, 0,019 mmol) en 0,4 ml DMF. La reacción se llevó a cabo en un tubo sellado, con calentamiento en microondas. Se irradió durante 7 minutos a 150 °C con agitación. Se finalizó la reacción por agregado de agua (0,5 ml) y luego, se evaporó el solvente en el evaporador centrífugo. Fue eluido el producto de la reacción a través de una columna de intercambio catiónico (forma sodio) con metanol. Se evaporó el solvente en un

evaporador centrífugo y se purificó utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El compuesto fue eluido utilizando una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85:15) para obtener 4,4 mg de 2 β ,3 α -dihidroxicolest-5-eno disulfato (**75**) (34 %).

-Otra metodología:



Se agregaron lentamente 20 μL de MsCl (0.258mmol) a una solución de **77** (96 mg, 0.154mmol) en 325 μL de piridina enfriada a 5 $^{\circ}\text{C}$ y se dejó la reaccionar durante 24 h a temperatura ambiente. A la solución obtenida se la agregó H_2O , se lavó con AcOEt , y se pasó a través de una columna de Amberlite CG-120 (forma sódica) con MeOH . Finalmente, se evaporó el solvente a presión reducida. El sólido obtenido se purificó con una columna cromatográfica de sílica gel, eluido con $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (90:10 v/v) para obtener 90,6 mg de 2 β ,3 α -dihidroxicolest-5-eno disulfato (**75**) (97 %).

RMN ^1H y ^{13}C : En anexo.

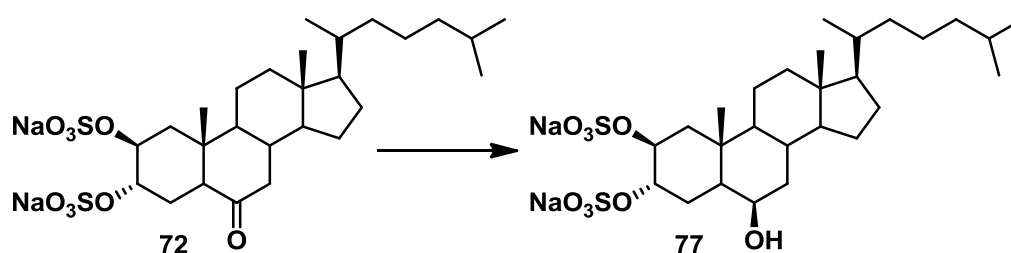
EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NaO}_8\text{S}_2$ $[\text{M} - \text{Na}]^-$: 583,2381, encontrado: m/z = 583,2361

ATR FT-IR: ν_{max} (KBr, cm^{-1}) 1467 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1377 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1236 broad band ($\delta_{\text{s}} \text{S=O}$)

Punto de fusión: > 250 $^{\circ}\text{C}$

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{AcOEt}$ (12:3:5). R_f : 0,55

2 β , 3 α , 6 β -Trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (**77**)



Se agregaron 7 mg de NaBH_4 a una solución del compuesto 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona-2 β ,3 α -disulfato (**72**) (8,6 mg, 0,014 mmol) en 0,4 ml de metanol a temperatura ambiente y dos horas después, se agregaron 7 mg más del reductor. La reacción finalizó a las 4 horas. Se acidificó levemente el medio de reacción con una solución acuosa de HCl 0,5M y se agregó un exceso de metanol para destruir y eliminar el exceso de NaBH_4 en forma de B(OMe)_3 en el evaporador rotatorio. Se agregó agua y se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado utilizando cartucho de sílica gel, fase normal. El producto fue eluido utilizando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85:15) para dar 8,4 mg de 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2 β ,3 α -disulfato (**77**) (97%).

RMN ^1H y ^{13}C : En anexo.

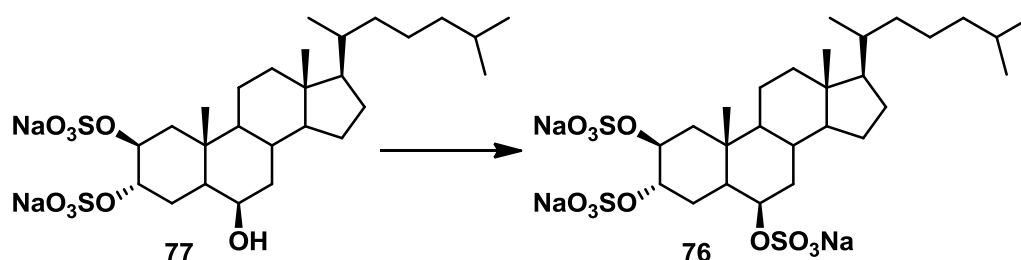
EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{NaO}_9\text{S}_2$ $[\text{M} - \text{Na}]^-$: 601,2486, encontrado $m/z = 601,2486$

ATR FT-IR: ν_{max} (ZnSe cm^{-1}) 3317(ν O-H), 1462 (δ_{as} CH_3), 1373 (δ_{s} CH_3), 1212 (banda ancha, δ_{s} O=S=O).

Punto de fusión: >250 $^\circ\text{C}$ (descompone) (acetona- H_2O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{AcOEt}$ (12:3:5). R_f : 0,48

2 β , 3 α , 6 β -Trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**)



Se agregó $\text{SO}_3\cdot\text{N(CH}_3)_3$ (13,5 mg, 0,097 mmol) a una solución de 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2 β ,3 α -disulfato (**77**) (12,5 mg, 0,020 mmol) en 0,25 ml DMF. La reacción se llevó a cabo en un tubo sellado, con calentamiento en microondas. Se irradió durante una hora a 60 $^\circ\text{C}$ con agitación. Se finalizó la reacción por agregado de agua (0,5 ml) y luego, se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo. El producto de la reacción fue eluido a través de una columna de intercambio catiónico (forma sodio) con metanol. Se evaporó el solvente en un

evaporador centrífugo y se purificó utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El compuesto fue eluido con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (80:20) para dar 12,5 mg de 2 β ,3 α ,6 β -dihidroxicolestano-2 β ,3 α ,6 β -trisulfato (**76**) (88 %).

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

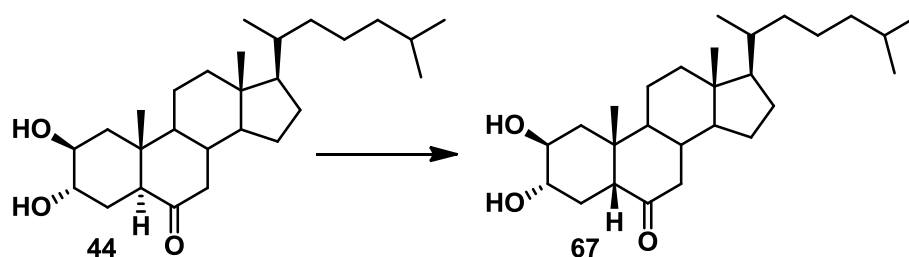
EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_3$ $[\text{M} - \text{Na}]^-$: 703,1874, encontrado m/z = 703,1894.

ATR FT-IR: ν_{max} (ZnSe cm^{-1}) 1463 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1382 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$), 1203 broad band ($\delta_{\text{s}} \text{S=O}$).

Punto de fusión: >250°C (comienza a descomponer a 85°C)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo $n\text{-BuOH}/\text{AcOH}/\text{AcOEt}$ (12:3:5). Rf: 0,46

2 β , 3 α -Dihidroxi-5 β -colestano-6-ona (**67**)



Se agregaron pequeñas porciones de sodio a una solución de 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**) (8,1 mg, 0,019 mmol) en 1,7 ml de etanol a reflujo. Los agregados se realizaron hasta que por CCD se observó que el diol **44** había reaccionado completamente. Luego se agregaron 10 ml de una solución acuosa de NaCl 15% y se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El producto fue eluido con una mezcla de ciclohexano/AcOEt (60:40) para dar 8 mg de 2 β ,3 α -dihidroxi-5 β -colestano (**67**) (81,5%).

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{NaO}_3$ $[\text{M} + \text{Na}^+]$: 441,3339, encontrado m/z = 441,3340

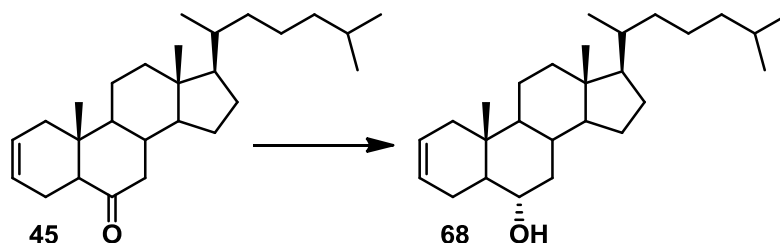
Microanálisis: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}_3 \cdot 1/4 \text{H}_2\text{O}$, %C: 76,64, %H: 11,07, %O: 12,29. Encontrado, %C: 76,38, %H: 10,58

ATR FT-IR: ν_{max} (ZnSe cm^{-1}) 3454, 3376 ($\nu \text{O-H}$), 1690 ($\nu \text{C=O}$), 1457 ($\delta_{\text{as}} \text{CH}_3$), 1376 ($\delta_{\text{s}} \text{CH}_3$).

Punto de fusión: 157-158 °C (acetona-H₂O).

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (1:9). Rf: 0,33

5 α -Colest-2-en-6 α -ol (**68**)



Se agregaron pequeñas porciones de sodio sobre una solución de 5 α -colest-2-en-6-ona (**45**) (79,9 mg, 0,21 mmol) en 16,5 ml de *n*-propanol a reflujo. Los agregados se realizaron hasta que por CCD se observó que el alqueno **45** había reaccionado completamente. Luego se agregaron 10 ml de una solución acuosa de NaCl 15% y se extrajo con AcOEt (3 x 20 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado por cromatografía *flash* en columna seca de sílica gel. El producto fue eluido utilizando una mezcla de ciclohexano/AcOEt (98:2) para dar 72,3 mg de 5 α -colest-2-en-6 α -ol (**68**) (90 %).

RMN ¹H y ¹³C: En el anexo, página X

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para C₂₇H₄₆NaO [M + Na]⁺: 409,3441, encontrado *m/z* = 409,3442.

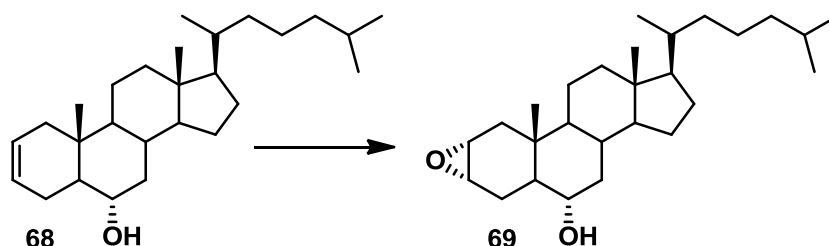
Microanálisis: calculado para C₂₇H₄₆O, %C: 83,87, %H: 11,99, %O: 4,14. Encontrado, %C: 83,50, %H: 12,27.

FT-IR: $\nu_{\max}$ (film NaBr, cm⁻¹) 3270 (ν O-H), 3017 (ν C=C-H), 1468 (δ_{as} CH₃), 1382 (δ_{s} CH₃).

Punto de fusión: 120-121 °C (acetona-H₂O) (119-121 °C, Thompson y col. 1970)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (8:2). Rf: 0,54

2 α , 3 α -Epoxi-5 α -colestano-6 α -ol (69)



Se mezcló una solución de 5 α -colest-2-en-6 α -ol (**68**) (51,2 mg, 0,13 mmol) en 1,8 ml de CH₂Cl₂ con 2,02 ml de una solución acuosa de Na₂CO₃ 10%. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente y se agregó ácido *m*-cloroperbenzoico (74,3 mg, 0,43 mmol) en 0,8 ml de CH₂Cl₂, gota a gota a 5 °C. La mezcla se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego, se extrajo el producto de reacción con CH₂Cl₂ (3 x 10 ml). Se juntaron los extractos orgánicos y se lavaron sucesivamente con una solución acuosa de Na₂SO₃ 5%, solución saturada de NaHCO₃ y agua. Se secó sobre MgSO₄ anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El producto fue eluido con una mezcla de ciclohexano/AcOEt (9:1) para dar 37,2 mg de 2 α ,3 α -epoxi-5 α -colestano-6-ona (**69**) (71 %).

RMN ¹H y ¹³C: En el anexo, página X

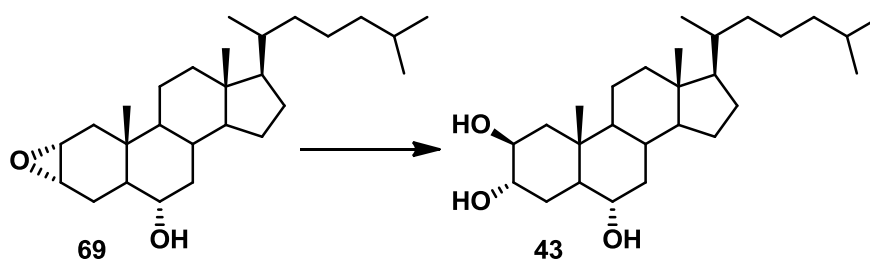
EMAR-ESI: (modo positivo) Calculado para C₂₇H₄₆NaO₂ [M + Na]⁺: 425,3390, encontrado *m/z* = 425,3396.

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm⁻¹) 3406 (ν O-H), 1469 (δ_{as} CH₃), 1377 (δ_{s} CH₃), 1255 (ν_{s} C-O-C), 808 (ν_{as} C-O-C).

Punto de fusión: no se pudo medir ya que se obtuvo en forma de jarabe incoloro.

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (6:4). R_f: 0,43

2 β , 3 α , 6 α -Trihidroxi-5 α -colestano (43)



Una solución del epóxido **69** (34,8 mg, 0,086 mmol) se trató con 0,05 ml de una solución acuosa de H_2SO_4 1N en 1,77 ml de THF. La mezcla se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Se neutralizó con una solución saturada de NaHCO_3 y se evaporó el solvente hasta 1/5 del volumen inicial. Se agregó agua y se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se evaporó el solvente a presión reducida. El producto de reacción fue purificado utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El producto fue eluido con una mezcla de ciclohexano/ AcOEt (4:6) para dar 35,6 mg de 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**) (98 %).

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{NaO}_3$ [$\text{M} + \text{Na}^+$]: 443,34957, encontrado m/z = 443,34941

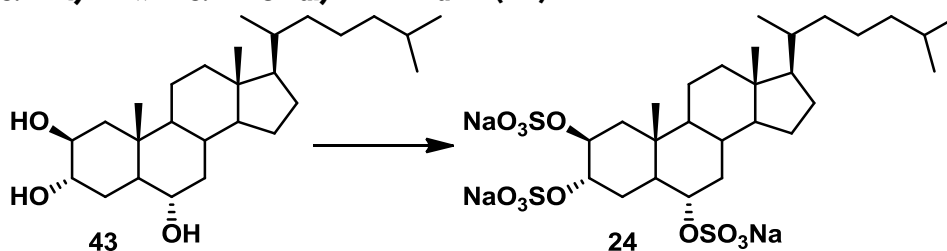
Microanálisis: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_3$, %C: 77,09, %H: 11,50, %O: 11,41. Encontrado, %C: 77,34, %H: 11,95.

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 3262 (ν O-H), 1460 (δ_{as} CH_3), 1377 (δ_{s} CH_3).

Punto de fusión: 249-250°C (acetona- H_2O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/ AcOEt (2:8). Rf: 0,24

2 β , 3 α , 6 α -Trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**24**)



Se agregó $\text{SO}_3\cdot\text{N}(\text{CH}_3)_3$ (23,8 mg, 0,17 mmol) a una solución de 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano (**43**) (7,2mg, 0,017 mmol) en 0,61 ml de DMF. La reacción se llevó a cabo en un tubo sellado, con calentamiento en microondas. Se irradió durante 9 minutos a 150 °C con agitación. Se finalizó la reacción por agregado de agua (0,5 ml) y luego, se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo. El producto de la reacción fue eluido a través de una columna de intercambio catiónico (forma sodio) con metanol. Se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo y se purificó utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal. El compuesto fue eluido utilizando una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (85:15) para obtener 9,4 mg de 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**24**) (76 %).

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{Na}_2\text{O}_{12}\text{S}_3$ $[\text{M} - \text{Na}]^-$: 703,1874, encontrado $m/z = 703,1865$.

ATR FT-IR: ν_{max} (ZnSe cm^{-1}) 1485 (δ_{as} CH_3), 1380 (δ_{s} CH_3), 1210 broad band (δ_{s} $\text{S}=\text{O}$).

Punto de fusión: 189-192 °C (funde y descompone).

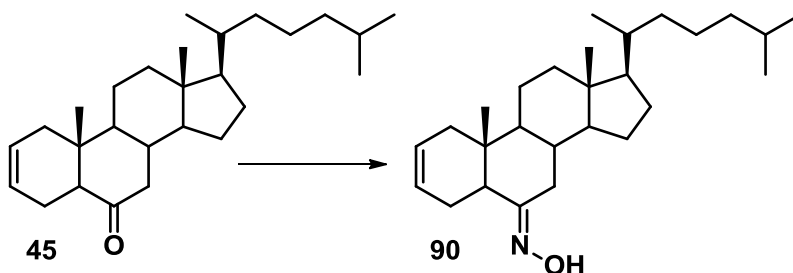
Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo *n*-BuOH/AcOH/AcOEt (12:3:5). R_f : 0,41

6.2.3 Síntesis de oximas esteroidales (Capítulo 3)

Procedimiento general para la síntesis de oximas:

A una solución del esteroide (0,10 mmol) en etanol 95% (4,95 ml) se agregó clorhidrato de hidroxilamina (10,9 mg) y acetato de sodio (16,5 mg). Se dejó reaccionar con agitación a temperatura ambiente hasta que por CCD no se observó compuesto carbonílico. Se evaporó el solvente en un evaporador centrífugo y se purificó utilizando un cartucho de sílica gel, fase normal.

6*E*-Hidroximino-5 α -colest-2-eno (90)



Masa de esteroide de partida (compuesto **45**): 50 mg; 0,13 mmoles

% Rto: 98%

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}^+]$: 400,3574, encontrado; $m/z = 400,3575$

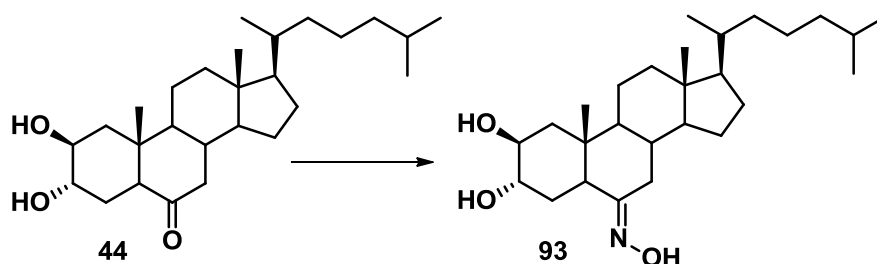
Microanálisis: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{NO}$, %C: 81,14, %H: 11,35, %O: 4,00, %N: 3,50. Encontrado, %C: 80,70, %H: 11,40., %N: 3,88

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 3278 (ν O-H), 1470 (δ_{as} CH_3), 1383 (δ_{s} CH_3), 1666 (ν C=N).

Punto de fusión: 191-192 °C (acetona- H_2O) (Lit. 187,5-190 °C, Dodson y Riegel 1948)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo ciclohexano/AcOEt (9:1). R_f : 0,57

2 β ,3 α -Dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (93)



Masa de esteroide de partida (compuesto **44**): 11 mg; 0,036 mmoles

% Rto: 90,5%

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

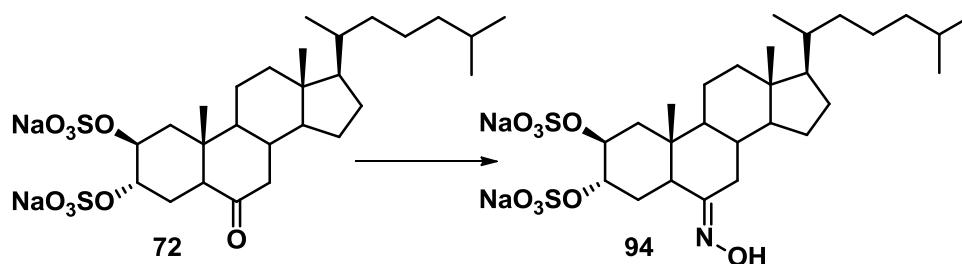
EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 434,3629, encontrado m/z = 434,3608

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 3364 (ν O-H), 1455 (δ_{as} CH_3), 1374 (δ_{s} CH_3), 1723 (ν C=N).

Punto de fusión: 230 $^{\circ}\text{C}$ descompone y funde (acetona- H_2O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo AcOEt. Rf: 0,35

2 β ,3 α -Dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano-2,3-disulfato (94)



Masa de esteroide de partida (compuesto **72**): 28,6 mg; 0,045 mmoles

% Rto: 98%

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

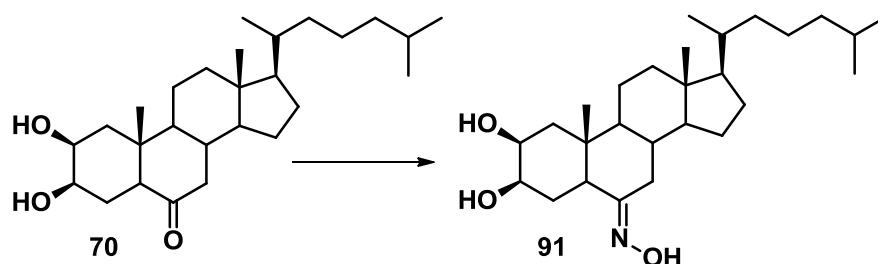
EMAR-ESI: (modo negativo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{NNaO}_9\text{S}_2$ $[\text{M} - \text{Na}]^-$: 614,2439, encontrado m/z = 614,2421

FT-IR: ν_{max} (KBr, cm^{-1}) 3448 (ν O-H), 1402 (δ_{s} CH_3), 1652 (ν C=N), 1227 (δ_{s} S=O).

Punto de fusión: 210 $^{\circ}\text{C}$ comienza a descomponer. Funde a una temperatura mayor de 250 $^{\circ}\text{C}$ (acetona- H_2O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo *n*-BuOH/AcOH/AcOEt (12:3:5). Rf: 0,52

2 β ,3 β -Dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (91)



Masa de esteroide (compuesto **70**): 4,3 mg; 0,045 mmoles

% Rto: 96%

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

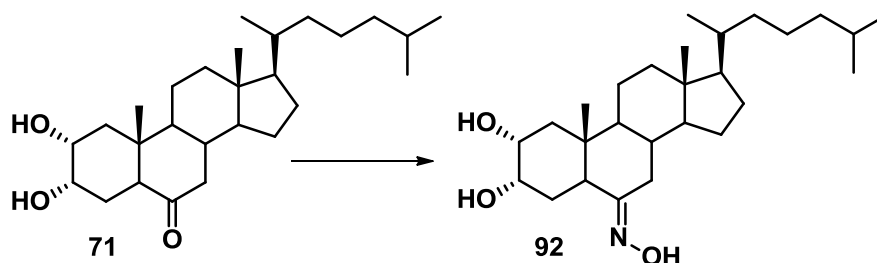
EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 434,3629, encontrado m/z = 434,3626.

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 3376 (ν O-H), 1463 (δ_{as} CH_3), 1374 (δ_{s} CH_3), 1651 (ν C=N).

Punto de fusión: 190 $^{\circ}\text{C}$ comienza a descomponer. 210 $^{\circ}\text{C}$ comienza a fundir. (acetona- H_2O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo AcOEt. Rf: 0,30

2 α ,3 α -Dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (92)



Masa de esteroide de partida (compuesto **71**): 5,2 mg; 0,012 mmoles

% Rto: 98% de La mezcla de isómeros *E* y *Z* (relación 98,3:1,7 calculado por RMN ^1H). Por recristalización se obtuvo El isómero *E* puro.

RMN ^1H y ^{13}C : En el anexo, página X

EMAR-ESI: (modo positivo) calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{NO}_3$ $[\text{M} + \text{H}]^+$: 434,3629, encontrado m/z = 434,3627

FT-IR: ν_{max} (film NaBr, cm^{-1}) 3322 (ν O-H), 3342 (ν O-H), 1454 (δ_{as} CH_3), 1374 (δ_{s} CH_3), 1657 (ν C=N).

Punto de fusión: 200 $^{\circ}\text{C}$ comienza a descomponer. 225-228 $^{\circ}\text{C}$ funde (acetona- H_2O)

Control por CCD: Soporte sílica gel. Solvente de desarrollo AcOEt. Rf: 0,39

6.3 Ensayos biológicos:

6.3.1 Ensayos de actividad citotóxica (Capítulo 3)

Para los ensayos de actividad biológica, se utilizaron dos líneas celulares tumorales con distinta sensibilidad a andrógenos:

-PC3: línea establecida a partir de metástasis de médula ósea, proveniente de adenocarcinoma de próstata humano. No expresa receptor de andrógenos. Esta línea se utilizó como modelo del fenotipo andrógeno independiente.

-LNCaP: proveniente de adenocarcinoma de próstata humano, respondedor a andrógenos, de un paciente con diagnóstico confirmado de metástasis de próstata. Expresa receptor de andrógenos. Esta línea se utilizó como modelo de fenotipo andrógeno dependiente.

Ambas líneas se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Las células crecieron en forma de monocapa hasta confluencia, cultivadas en medio RPMI-1640 con un suplemento de 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina y 25 mM de buffer HEPES (EMEVE Medios, Lab MicroVet SRL, CABA, Argentina) a 37°C en una incubadora con 5% CO₂.

Citotoxicidad sobre células tumorales:

Se determinó la citotoxicidad de las células utilizando en ensayo de MTS para células vivientes.

Se sembraron, 1×10^4 células LNCaP ó 7×10^3 células PC3 en 100 µL en medio de cultivo celular, en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos. Luego de 24 horas de incubación, el medio fue removido y las células se trataron con distintas concentraciones de los esteroides (por triplicado) diluidos en medio RPMI-1640 sin SFB. Se utilizaron pocillos con medio sin suero como control negativo. Las células con los distintos tratamientos se incubaron durante 24 horas, en estufa a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂.

Al cabo de ese tiempo, la viabilidad celular fue determinada mediante el ensayo colorimétrico del MTS utilizando el kit Cell Titer 96 AQueous One Solution Proliferation Assay Sistem (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Rápidamente, se agregaron 20 µl de reactivo MTS a cada pocillo, y las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C.

Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector de microplatos (Devices). Los datos fueron procesados con el programa Origin Pro 8, de manera de obtener gráficos de Absorbancia vs Concentración, relativizando los resultados al control (tomándolo como 100% de células vivas). Luego, se calculó la concentración inhibitoria 50% (CC₅₀) definida como la dosis del compuesto para reducir el número de células viables en un 50%.

6.3.2 Ensayos de actividad antiviral (Capítulo 4)

En el capítulo 4 se estudió la actividad antiviral de los esteroides polihidroxilados y sus análogos sulfatados contra tres virus patógenos en humanos: virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), virus Junín (JV) y virus dengue (DENV-2). Las cepas utilizadas fueron las siguientes:

- HSV-1 (cepa F) obtenidas de la *American Type Culture Collection* (Rockville, USA)

- JV (cepa IV 5545) obtenidas del Instituto de Virología, Universidad de Córdoba, Argentina.

- DENV-2 (cepa NG) obtenidas del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. J. Maiztegui (INEVH), Pergamino, Argentina.

Los ensayos se realizaron sobre monocapas de células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus sp.*) crecidas en microplacas de 24 pocillos en medio de cultivo Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) conteniendo 5% de suero bovino. El medio de mantenimiento (MM) consiste en MEM con 1,5% de suero bovino. Los stocks de HSV-1, JV y DENV se obtuvieron y titularon empleando células Vero.

Se prepararon soluciones stock de los compuestos ensayados de concentración 10 mg/ml en DMSO y se esterilizaron por filtración. Las soluciones fueron conservadas a -20°C hasta el momento del ensayo.

6.3.2.1 Citotoxicidad sobre células Vero

Se determinó la citotoxicidad utilizando el ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol; Sigma-Aldrich). Se incubaron monocapas de células Vero con diferentes concentraciones de los esteroides por triplicado en una microplaca de 96 pocillos. Luego de una incubación de 48 hs a 37°C se agregan 10 µL (5 mg/ml) de MTT a cada pocillo. Se incubaron durante 2 hs a 37°C y se removió el sobrenadante. Posteriormente se agregó 200 µL de etanol en cada pocillo para solubilizar los cristales de formazan. Luego de agitación vigorosa, se midió la absorbancia en un lector de

microplatos a 595 nm. Las concentraciones utilizadas en los ensayos de actividad antiviral y virucida están por debajo de la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) definida como la dosis del compuesto que reduce el número de células viables en un 50%.

Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

6.3.2.2 Ensayo de actividad antiviral

Se evaluó por disminución del número de placas virales. Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplaca de 24 pocillos con aproximadamente 50 unidades formadoras de placa (UFP) de virus, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los compuestos ensayados. Luego de 1 hora de adsorción, el inóculo residual se reemplazó por MM conteniendo un 0,7% de metilcelulosa en concentración final y la correspondiente dosis de compuesto. Luego de 48 hs para HSV y 6 días para JV y DENV, la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) fue calculada como la concentración del compuesto requerida para reducir el número de placas en un 50%.

Todas las determinaciones fueron realizadas dos veces y por duplicado.

6.3.2.3 Ensayo de actividad virucida

Se incubó una suspensión de 4×10^5 PFU de cada virus con un volumen equivalente de MM en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los compuestos ensayados, durante 1 hora a 37°C. Luego, las muestras fueron diluidas en MM frío para determinar el virus remanente mediante formación de placas.

El fármaco debe ser diluido al menos 100 veces para evaluar que la reducción de título sólo sea debido a la inactivación del virión en el sistema libre de células.

La concentración virucida 50 (VC₅₀) fue calculada como la concentración del compuesto requerida para inactivar los viriones en un 50%.

6.3.2.4 Mecanismo de acción

Estudio del modo de acción, a fin de establecer la etapa del ciclo de multiplicación viral que es bloqueada por los compuestos. Para ello, los compuestos serán agregados siguiendo tres modalidades diferentes: 1) presentes durante todo el ensayo 2) durante la adsorción solamente o 3) después de la adsorción.

Se infectaron monocapas de células Vero con 50 UFP de HSV-1 (F) aplicando 4 tratamientos diferentes:

-Tratamiento 1: Las células fueron infectadas en presencia de los compuestos y luego de 1 hora de adsorción a 4 °C los mismos fueron removidos junto al virus no adsorbido. Las monocapas se cubrieron con medio de plaqueo (MP) conteniendo la misma concentración de compuesto empleada en la adsorción.

-Tratamiento 2: Los compuestos estuvieron presentes solamente en la adsorción, ya que luego se agregó MP sin los compuestos.

-Tratamiento 3: Se infectaron las monocapas celulares en ausencia de los compuestos, los cuales fueron agregados luego de la adsorción junto con el MP.

-Tratamiento Control: Los compuestos estuvieron ausentes tanto en la adsorción como en el MP.

En todos los casos, luego de la adsorción, los cultivos fueron incubados por 48 horas a 37 °C en estufa con 4 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó el porcentaje de inhibición respecto del control.

6.3.3 Ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (Capítulo 5)

En el capítulo 5 se midió la actividad de inhibición de la ACE (de la anguila eléctrica *Torpedo californica*, SIGMA) *in vitro* mediante el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman (Ellman y col. 1961) con pequeñas modificaciones (López y col. 2002).

Para el ensayo se mezclaron 300 µL de la solución de la enzima y 300 µL de la solución del esteroide en un tubo de ensayo y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregaron 600 µL de una solución acuosa del sustrato de la enzima (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB, Sigma) 0,5 mM, ioduro de acetiltiocolina (ATCI, Sigma) 0,6 mM, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 7,5) y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro JASCO V-630BIO a 405 nm durante 180 segundos a 27 °C y se calculó la actividad enzimática. Los ensayos se realizaron por triplicad y, posteriormente, los valores de IC₅₀ fueron determinados utilizando el programa GraphPad Prism 5.

Se utilizó eserina (99%, Sigma) como inhibidor de referencia de la ACE.

-Solución de la enzima: Una suspensión de 5 U/ml de la enzima liofilizada en buffer A (K_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 2,3 mM) se diluyó con buffer B (K_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 2,3 mM, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%, pH 7,6) hasta obtener una solución de la enzima de 0,126 U/mL.

-Solución del esteroide: Los esteroides ensayados fueron disueltos en buffer B, algunos de ellos requirieron 2,5% de metanol como cosolvente.

6.3.3.1 Determinación gráfica del tipo de inhibición

La reacción colorimétrica de Ellman se llevó a cabo a 3 concentraciones fijas (0, 52 y 104 μM) del inhibidor (compuesto **72**). En cada caso se midió la velocidad inicial, variando la concentración del sustrato (ioduro de acetiltiocolina, S) de la enzima y se graficó la inversa de la velocidad inicial ($1/v$) en función de la recíproca de la concentración del sustrato ($[S]$). Los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5.

6.3.4 Ensayos de inhibición de la enzima butirilcolinesterasa (Capítulo 5)

Se midió *in vitro* la actividad de inhibición de la BCE (de suero de caballo, MP Biomedicals) utilizando el mismo procedimiento que el descrito para la ACE, variando sólo las concentraciones para la enzima y el tiempo de incubación de la enzima con las muestras esteroidales. En el ensayo se mezclaron 300 μL de la solución de la enzima y 300 μL de la solución del esteroide en un tubo de ensayo y se incubó durante 120 minutos a temperatura ambiente. El procedimiento continúa como se describe en la sección anterior.

-Solución de la enzima: Una suspensión de 3 U/ml de la enzima liofilizada en buffer A (K_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 2,3 mM) se diluyó con buffer B (K_2HPO_4 8 mM, NaH_2PO_4 2,3 mM, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%, pH 7,6) hasta obtener una solución de la enzima de 0,06 U/mL.

-Solución del esteroide: Los esteroides fueron disueltos en buffer B, algunos de ellos requirieron 2,5 % de metanol como cosolvente.

6.4 Modelado Molecular (Capítulo 5)

6.4.1 Docking Molecular

La enzima utilizada en las simulaciones fue la estructura cristalográfica de la ACE de *Torpedo californica* complejada con acetilcolina (entrada 2ACE de la base de datos Protein

Data Bank DOI:10.2210/pdb2ace/pdb, Reves y col. 1997). Tanto la 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (**44**) y su análogo disulfatado (**72**) fueron optimizados mediante una primera aproximación utilizando el método semiempírico AM1 (Dewar y col. 1985) y luego utilizando el método *ab initio* de Hartree-Fock utilizando la base 6-31+G(d) (Roothaan 1951) ambos incorporados en el programa Gaussian 03 (Frisch y col. 2004). Las cargas del compuesto disulfatado se realizaron mediante el cálculo cargas RESP (Cornell y col 1993)

Los cálculos computacionales de *docking* fueron llevados a cabo utilizando el programa AutoDock 4.2 (The Scripps Research Institute, Department of Molecular Biology, MB-5, La Jolla, CA, 2007). Se utilizó el programa AutoDock Tools para preparar, iniciar y analizar los resultados de *docking*.

El espacio de simulación fue determinado por una caja de dimensiones 21,28 Å x 31,24 Å x 20,37 Å que incluye el sitio activo y periférico de la ACE. Para disminuir el tiempo de cálculo en el Autodock, el programa auxiliar AutoGrid 4 es el encargado de hacer un pre-cálculo de energía dentro del espacio de simulación. Este programa mide la energía de interacción entre una sonda y la macromolécula en puntos equidistantes espaciados por 0,375 Å, lo que determina una grilla tridimensional. Las sondas utilizadas varían según los diferentes tipos de átomos presente en los ligandos. Por lo tanto, se generan tantas grillas como tipos atómicos presentes en el ligando. Finalmente, estos mapas de interacción son los que utilizará AutoDock para determinar la energía total de interacción entre la enzima y el ligando durante la evaluación de *Docking*. El programa Autodock 4.2 utiliza un campo de fuerza empírico que fue calibrado utilizando 188 complejos enzima-ligando. Incluye un potencial de interacción por fuerzas de dispersión, enlaces de hidrógeno, potencial electrostático, potencial de desolvatación y un término asociado a la pérdida de entropía torsional al formarse el complejo enzima-ligando (Huey y col. **2007**).

Durante el estudio de *docking*, se permitió rotar libremente aquellos enlaces que no presentan restricciones rotacionales con excepción de los de la cadena lateral.

En cada evaluación de docking, la posición inicial del esteroide fue al azar. Se realizaron 256 evaluaciones de *docking* con ambos esteroides, las cuales generaron 256 conformeros utilizando el algoritmo genético lamarkiano como algoritmo de búsqueda. Los parámetros utilizados en el algoritmo fueron los establecidos por default en el programa AutoDock 4.0 (población inicial de 150, posición y conformación inicial al azar, translaciones de a 2 Å, velocidad de mutación de 0,02, velocidad de entrecruzamiento de 0,8, velocidad de

búsqueda local de 0,6 y 2,500,000 evaluaciones de energía). Los 256 confórmeros obtenidos de las 256 evaluaciones, fueron agrupados de acuerdo a la desviación de la raíz cuadrática media de los residuos (RMSD) respecto del confórmero más estable dentro del *cluster*. El orden obtenido para los diferentes *clusters* se determinó de acuerdo a la energía del confórmero más estable dentro de cada grupo.

6.4.2 Dinámica Molecular

La enzima utilizada en las simulaciones fue la estructura cristalográfica de la ACE de *Torpedo californica* complejada con acetilcolina (entrada 2ACE de la base de datos Protein Data Bank DOI:10.2210/pdb2ace/pdb, Reyes y col. 1997).

Las estructuras de partida se introdujeron en una caja octaédrica de moléculas de agua TIP3P pre-equilibrada (Jorgensen y col. 1983). Todas las simulaciones se realizaron a presión y temperatura constante (1 atm y 300 K, respectivamente) que se ajustaron haciendo uso del barostato y termostato de Berendsen implementado en Amber, y utilizando condiciones periódicas de contorno. Se empleó un radio de corte de 9 Å para la etapa de optimización y de 12 Å para las etapas de equilibración y simulación, a temperatura constante.

Se utilizó el campo de fuerza parm99 (Hornak y col. 2006) para los residuos de la proteína y los ligandos, junto con el algoritmo SHAKE (Ryckaert y col. 1977) para mantener las distancias de los enlaces que involucran átomos de hidrógenos a las longitudes de equilibrio. El intervalo de tiempo utilizado para la integración de las ecuaciones de Newton fue de 2 fs.

Todas las simulaciones se llevaron a cabo con el módulo PMEMD perteneciente al programa AMBER9 (Wang y col. 2006). Los protocolos para equilibrar los sistemas consistieron en una primera optimización de la estructura inicial seguido de un calentamiento lento hasta la temperatura deseada (300 K) y, posteriormente, se realizaron una serie de simulaciones de 50 ns en presencia de los diferentes ligandos.

6.4.2.1 Túneles y canales

Para verificar la existencia de la entrada lateral, se realizó un estudio de ILS (Implicit ligand sampling, Cohen y col. 2006), el cual permite determinar la presencia de cavidades y túneles. Para ello se generó una grilla tridimensional que abarca la enzima completa con una resolución de 0,5 Å. Se utilizó una molécula de O₂ como sonda y se probaron 20

orientaciones diferentes por cada punto de la grilla. La energía libre de cada punto de la grilla se calculó en base a las 2000 fotos tomadas a partir del quinto nanosegundo (5 ns), tomado como periodo de relajación del sistema, cada 20 ps. Las isosuperficies obtenidas de perturbaciones de hasta 2 Kcal/mol que la sonda de O₂ generó en el sistema, permitieron identificar los túneles dentro de la enzima.

6.5 Referencias Bibliográficas:

- Beilstein, F; Wiegand, E. Ueber Alkylsulfaminsäuren. *Ver. Deut. Chem. Ges.* **1883**; 16: 1264-8.
- Cohen, J; Arkhipov, A; Braun, R; Schulten, K. Imaging the migration pathways for O₂, CO, NO and Xe inside myoglobin. *Biophys. J.* **2006**; 91: 1844-57.
- Cornell, WD; Cieplak, P; Bayly, CI; Kollman, PA. Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**; 115: 9620-31.
- Dewar, MJS; Ziegler, EG; Healy, EF; Stewart, JJP. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**; 107: 3902-9.
- Dodson, RM; Riegel, B. The stereochemistry of the i-steroids and their transformation products. *J. Org. Chem.* **1948**; 13(3): 424-37.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**; 7: 88-95.
- Frisch, MJ; Trucks, GW; Schlegel, HB; Scuseria, GE; Robb, M; Cheeseman, JR. et al. Gaussian 03, Revision C.01 Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
- Harwood LM. Dry-column flash chromatography *Aldr. Chim. Acta.* **1985**; 18: 25-7.
- Hazra, BG; Pore, VS; Chordia, MD; Bahule, BB; Basu, S. *J. Chem. Research (S)* **2001**: 500-2.
- Heilbron, IM; Hodges, J; Spring, FS. Studies in the sterol group. Part XXXVI. The oxidation of i-cholesterol and its derivatives. *J. Chem. Soc.* **1938**: 759-60.
- Hornak, V; Abel, R; Okur, A; Strockbine, B; Roitberg, A; Simmerling, C. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **2006**; 65: 712-25.
- Huey, R; Morris, GM; Olson, AJ; Goodsell, DS. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J. Comput. Chem.* **2007**; 28(6): 1145-52.
- Jorgensen, W; Chandrasekhar, J; Madura, J; Impey, R; Klein, M. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **1983**; 79: 926-35.
- Kondo, M; Mori, K. Synthesis of brassinolide analogs with or without the steroidal side chain. *Agric. Biol. Chem.* **1983**; 47(1): 97-102.
- López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life Sciences* **2002**; 71: 2521-2529.
- Mori, H; Tsuneda, K; Shibata, K; Sawai, M. Synthesis of ecdysone II. Synthesis of and stereochemistry of 2 β ,3 β -dihydroxycholestan-6-ones and their derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1967**; 15(4): 466-73.
- Perrin D, Amarego W. *Purification of laboratory chemicals* 3rd edition. **1988**. Pergamon Press, UK.
- Reves, ML; Harel, M; Pang, YP; Silman, I; Kozikowski, AP; Sussman, JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A. *Nat. Struct. Biol.* **1997**; 4: 57-63.

- Roothaan, CCJ. New developments in molecular orbital theory. *Rev. Mod. Phys* **1951**; 23: 69-89.
- Ryckaert, J-P; Ciccotti, G; Berendsen, H J C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**; 23: 327-41.
- Shoppee, CW; Summers, GHR. Steroids. Part II. The preparation of *epicholesteryl* chloride and bromide. *J. Chem. Soc.* **1952**: 1790-95.
- Sun, Q; Cai, S; Peterson, BR. Practical synthesis of 3 β -amino-5-cholestene and related 3 β -halides involving *i*-steroids and retro *i*-steroid rearrangement. *Org. Lett.* **2009**; 11(3): 567-70.
- Thompson, MJ; Robbins, WE; Kaplanis, JN; Cohen, CF; Lancaster, SM. Synthesis of analogs of α -ecdysone. A simplified synthesis of 2 β ,3 β ,14 α -trihydroxy-7-en-6-one-5 β -steroids. *Steroids* **1970**; 16(1): 85-104.
- Wallis, ES; Fernholz, E; Gephart, FT. Molecular rearrangements in sterols. I. The action of anhydrous potassium acetate on cholesteryl *p*-toluensulfonate in acetic anhydride solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**; 59(1): 137-40.
- Wang, J; Duke, RE; Luo, R; Merz, KM; Pearlman, DA; Crowley, M; Walker, RC; Zhang, W; Wang, B; Hayik, S; Roitberg, A; Seabra, G; Wong, KF; Paesani, F; Wu, X; Brozell, S; Tsui, V; Gohlke, H; Yang, L; Tan, C; Mongan, J; Hornak, V; Cui, G; Beroza, P; Mathews, DH; Schafmeister, C; Ross, WS; Kollman, PA. AMBER, version 9; University of California: San Francisco, CA, **2006**.

Anexo

Asignaciones espectroscópicas de los esteroides sintetizados

2 β ,3 α ,6 α -Trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (24) (DMSO- d_6)

Carbono	^1H	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	multiplicidad	$J_{\text{H-H}}$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1	1 α	1,88	---	---	37,54
	1 β	1,14	---	---	
2	2 α	4,45	sa	---	72,39
3	3 β	4,37	sa	---	72,29
4	4 α	1,36	---	---	23,73
	4 β	1,94	---	---	
5	5 α	1,31	---	---	43,82
6	6 β	3,32	dt	3,5; 10,7	73,97
7	7 α	0,80	---	---	38,94
	7 β	2,14	m	---	
8	8 β	1,33	---	---	33,40
9	9 α	0,59	---	---	54,14
10	---	---	---	---	35,88
11	11 α	1,17	---	---	20,39
	11 β	1,42	m	---	
12	12 α	1,08	---	---	39,54
	12 β	1,93	---	---	
13	---	---	---	---	42,17
14	14 α	1,02	---	---	55,92
15	15 α	1,51	---	---	23,84
	15 β	1,01	---	---	
16	16 α	1,78	m	---	27,29
	16 β	1,20	---	---	
17	17 α	1,07	---	---	55,57
18	18	0,62	s	---	11,86
19	19	0,87	s	---	14,68
20	20	1,33	---	---	35,18
21	21	0,88	d	6,6	18,50
22	22	0,97 ; 1,30	---	---	35,62
23	23	1,13 ; 1,30	---	---	23,24
24	24	1,09 ; 1,14	---	---	38,80
25	25	1,51	---	---	27,39
26	26	0,84	d	6,6	22,42
27	27	0,84	d	6,7	22,69

2β,3α,6α-Trihidroxi-5α-colestaño (43) (CDCl₃+CD₃OD ≈4:1)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,65	---	---	40,37
	1β	1,40	---	---	
2	2α	3,76	sa	---	70,47
3	3β	3,79	sa	---	69,93
4	4α	1,85	da	14,2	25,40
	4β	1,70	m	---	
5	5α	1,37	---	---	45,92
6	6β	3,33	dt	4,5 ; 11,0	69,29
7	7α	0,83	---	---	41,73
	7β	1,93	---	---	
8	8β	1,41	---	---	34,02
9	9α	0,67	ddd	4,0;11,9;12,1	54,86
10	---	---	---	---	36,72
11	11α	1,23	---	---	20,98
	11β	1,47	---	---	
12	12α	1,06	---	---	40,13
	12β	1,94	---	---	
13	---	---	---	---	42,83
14	14α	0,97	---	---	56,09
15	15α	1,54	---	---	24,34
	15β	1,02	---	---	
16	16α	1,78	m	---	28,37
	16β	1,21	---	---	
17	17α	1,03	---	---	56,09
18	18	0,61	s	---	12,17
19	19	0,93	s	---	15,22
20	20	1,33	---	---	36,02
21	21	0,86	d	6,5	18,78
22	22	0,94 ; 1,28	---	---	36,37
23	23	1,09 ; 1,29	---	---	24,02
24	24	1,05 ; 1,09	---	---	39,72
25	25	1,47	---	---	28,21
26	26	0,81	d	6,5	22,63
27	27	0,82	d	6,7	22,89

2β,3α-Dihidroxi-5α-colestan-6-ona (44) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,67	---	---	40,07
	1β	1,77	---	---	
2	2α	3,81	sa	---	70,93
3	3α	3,85	sa	---	70,08
4	4α	1,58	---	---	23,98
	4β	1,94	ddd	2,7;12,8;15,2	
5	5α	2,76	dd	3,0 ; 12,9	52,76
6	---	---	---	---	215,63
7	7α	2,10	---	---	47,47
	7β	2,20	dd	4,8 ; 13,2	
8	8β	1,79	---	---	38,80
9	9α	1,35	---	---	55,77
10	---	---	---	---	42,15
11	11α	1,67	---	---	22,29
	11β	1,39	---	---	
12	12α	1,26	m	---	40,89
	12β	2,07	---	---	
13	---	---	---	---	44,17
14	14α	1,32	---	---	57,88
15	15α	1,57	---	---	24,94
	15β	1,11	---	---	
16	16α	1,88	m	---	29,14
	16β	1,30	---	---	
17	17α	1,18	---	---	57,45
18	18	0,71	s	---	12,44
19	19	0,94	s	---	15,57
20	20	1,42	---	---	37,03
21	21	0,95	d	6,5	19,16
22	22	1,02 ; 1,37	---	---	37,27
23	23	1,16 ; 1,39	---	---	24,92
24	24	1,12 ; 1,15	---	---	40,66
25	25	1,53	m	---	29,14
26	26	0,88	d	6,6	22,96
27	27	0,88	d	6,6	23,21

5 α -Colest-2-en-6-on (45) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	2,00*	---	---	39,61*
	1 β	1,99*	---	---	
2	2	5,56	m	---	124,68
3	3	5,68	m	---	125,09
4	4 α	2,01	---	---	21,88
	4 β	2,25	m	---	
5	5 α	2,35	---	---	54,03
6	---	---	---	---	212,23
7	7 α	1,97	---	---	47,17
	7 β	2,35	---	---	
8	8 β	1,73	m	---	37,88
9	9 α	1,29	---	---	53,61
10	---	---	---	---	40,20
11	11 α	1,59	---	---	21,28
	11 β	1,42	---	---	
12	12 α	1,21	---	---	39,52*
	12 β	2,05	ddd	2,9; 3,3;12,8	
13	---	---	---	---	43,00
14	14 α	1,21	---	---	56,90
15	15 α	1,54	---	---	24,11*
	15 β	1,07	---	---	
16	16 α	1,84	m	---	28,15*
	16 β	1,27	---	---	
17	17 α	1,12	---	---	56,26
18	18	0,67	s	---	12,11
19	19	0,70	s	---	13,66
20	20	1,39	---	---	35,85
21	21	0,91	d	6,5	18,81
22	22	0,99 ; 1,33	---	---	36,24
23	23	1,13 ; 1,33	---	---	23,94*
24	24	1,09 ; 1,14	---	---	39,65*
25	25	1,51	---	---	28,16*
26	26	0,86	d	6,6	22,70
27	27	0,86	d	6,6	22,95

*señales intercambiables

3 α ,5 α -ciclocolestan-6 β -ol (56) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H} (Hz)	δ ¹³ C
1	1 α	1,54	---	---	33,34
	1 β	0,85	---	---	
2	2 α	1,75	m	---	25,18
	2 β	1,54	---	---	
3	3 α	1,06	---	---	24,39*
4	4 α	0,29	dd	4,8 ; 8,1	11,72
	4 β	0,52	dd	3,7 ; 4,8	
5	---	---	---	---	39,04
6	6 α	3,25	t	2,86	73,95
7	7 α	1,16	---	---	33,30
	7 β	1,84	---	---	
8	8 β	1,83	---	---	30,02
9	9 α	0,83	---	---	47,80
10	---	---	---	---	43,03*
11	11 α	1,40	---	---	22,85*
	11 β	1,37	---	---	
12	12 α	1,21	---	---	40,38
	12 β	1,99	dt	12,6; 3,4	
13	---	---	---	---	42,87*
14	14 α	1,06	---	---	56,64
15	15 α	1,59	---	---	24,36*
	15 β	1,13	---	---	
16	16 α	1,82	---	---	28,44
	16 β	1,26	---	---	
17	17 α	1,13	---	---	56,49
18	18	0,72	s	---	12,31
19	19	1,05	s	---	20,05
20	20	1,37	---	---	35,90
21	21	0,91	d	6,5	18,92
22	22	0,99 ; 1,33	---	---	36,32
23	23	1,15 ; 1,33	---	---	24,04
24	24	1,09 ; 1,16	---	---	39,61
25	25	1,51	---	---	28,19
26	26	0,86	d	6,6	22,72*
27	27	0,86	d	6,6	22,97*

*señales intercambiables

3 α ,5 α -ciclocolestan-6-ona (57) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H} (Hz)	δ ¹³ C
1	1 α	1,79	dd	8,0 ; 13,8	33,59
	1 β	0,98	---	---	
2	2 α	1,90	---	---	26,05
	2 β	1,68	---	---	
3	3 α	1,52	---	---	35,46
4	4 α	1,68	---	---	11,78
	4 β	0,72	---	---	
5	---	---	---	---	46,47
6	---	---	---	---	209,95
7	7 α	1,88	---	---	44,97
	7 β	2,43	m	---	
8	8 β	1,90	---	---	34,93
9	9 α	1,26	---	---	46,22
10	---	---	---	---	46,91
11	11 α	1,57	m	---	23,02*
	11 β	1,47	---	---	
12	12 α	1,22	---	---	39,63*
	12 β	2,05	dt	12,7; 3,5	
13	---	---	---	---	42,82
14	14 α	1,17	---	---	57,15
15	15 α	1,56	---	---	24,20
	15 β	1,10	---	---	
16	16 α	1,86	---	---	28,28
	16 β	1,28	---	---	
17	17 α	1,12	---	---	56,26
18	18	0,71	s	---	12,19
19	19	1,00	s	---	19,82
20	20	1,39	---	---	35,74
21	21	0,92	d	6,5	18,84
22	22	0,99; 1,33	---	---	36,25
23	23	1,14 ; 1,33	---	---	23,96
24	24	1,09 ; ,1,16	---	---	39,60*
25	25	1,50	---	---	28,14
26	26	0,86	d	6,6	22,70*
27	27	0,87	d	6,6	22,96*

*señales intercambiables

2α,3α-Epoxi-5α-colestan-6-οηα (63) (CDCl₃)

Carbano	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,95	---	---	38,00
	1β	1,72	d	15,2	
2	2β	3,11	dd	4,0 ; 5,7	50,04
3	3β	3,26	m		52,53
4	4α	2,09	ddd	1,8;4,7;15,8	21,16
	4β	2,01	---	---	
5	5α	2,35	dd	4,6 ; 11,5	50,30
6	---	---	---	---	211,66
7	7α	1,92	---	---	47,05
	7β	2,31	dd	4,1 ; 12,2	
8	8β	1,62	m	---	37,65
9	9α	1,20	---	---	53,26
10	---	---	---	---	38,59
11	11α	1,56	---	---	21,16
	11β	1,38	---	---	
12	12α	1,20	---	---	39,51*
	12β	2,04	---	---	
13	---	---	---	---	42,88
14	14α	1,16	---	---	56,67
15	15α	1,52	---	---	24,07
	15β	1,03	---	---	
16	16α	1,83	m	---	28,12
	16β	1,26	---	---	
17	17α	1,12	---	---	56,16
18	18	0,64	s	---	12,06
19	19	0,70	s	---	15,20
20	20	1,37	---	---	35,82
21	21	0,90	d	6,5	18,80
22	22	0,99 ; 1,32	---	---	36,19
23	23	1,14 ; 1,32	---	---	23,92
24	24	1,09 ; 1,12	---	---	39,59*
25	25	1,51	---	---	28,12
26	26	0,85	d	6,6	22,69
27	27	0,86	d	6,6	22,94

*señales intercambiables

2β,3α,6β-Trihidroxi-5α-colestaño (66) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,39	---	---	42,56
	1β	1,67	da	13,8	
2	2α	3,79	sa	---	72,21
3	3β	3,86	sa	---	71,44
4	4α	1,28	da	13,7	30,09
	4β	2,29	dt	2,9 ; 13,8	
5	5α	1,62	---	---	43,09
6	6α	3,72	sa	---	72,92
7	7α	1,16	---	---	40,68*
	7β	1,80	---	---	
8	8β	1,76	m	---	31,29
9	9α	0,72	m	---	57,67*
10	---	---	---	---	36,98
11	11α	1,54	---	---	22,76
	11β	1,40	---	---	
12	12α	1,15	---	---	41,41
	12β	2,02	dt	12,5; 3,4	
13	---	---	---	---	43,87
14	14α	1,04	---	---	57,66*
15	15α	1,61	---	---	25,26
	15β	1,14	---	---	
16	16α	1,85	m	---	29,32
	16β	1,28	da	12,8	
17	17α	1,11	---	---	57,69*
18	18	0,72	s	---	12,58
19	19	1,18	s	---	18,33
20	20	1,42	---	---	36,99
21	21	0,94	d	6,5	19,22
22	22	1,02 ; 1,37	---	---	37,36
23	23	1,18 ; 1,38	---	---	24,92
24	24	1,14 ; 1,16	---	---	40,68*
25	25	1,53	---	---	29,15
26	26	0,88	d	6,6	22,93
27	27	0,88	d	6,7	23,18

*señales intercambiables

2β,3α-Dihidroxi-5β-colestan-6-ona (67) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	2,13	---	---	42,32
	1β	1,02	---	---	
2	2α	3,65	ddd	11,9;8,8;4,0	70,88
3	3β	3,43	m		75,67
4	4α	1,85	---	---	33,05
	4β	1,87	---	---	
5	5β	2,19	---	---	59,31
6	---	---	---	---	213,30
7	7α	2,14*	---	---	43,07
	7β	2,19*	---	---	
8	8β	1,74	---	---	37,27
9	9α	1,74	---	---	41,52
10	---	---	---	---	41,05
11	11α	1,62	da	13,3	21,25
	11β	1,39	---	---	
12	12α	1,23	---	---	39,70
	12β	2,08	dt	12,8 ; 3,2	
13	---	---	---	---	43,18
14	14α	1,22	---	---	56,94
15	15α	1,52	---	---	24,10
	15β	1,06	---	---	
16	16α	1,85	---	---	28,24
	16β	1,27	---	---	
17	17α	1,13	---	---	56,27
18	18	0,64	s	---	12,11
19	19	0,89	s	---	23,35
20	20	1,37	---	---	35,84
21	21	0,91	d	6,5	18,79
22	22	0,99 ; 1,33	---	---	36,22
23	23	1,14 ; 1,33	---	---	23,97
24	24	1,09 ; 1,12	---	---	39,61
25	25	1,51	---	---	28,15
26	26	0,86	d	6,7	22,70
27	27	0,86	d	6,7	22,96

5 α -Colest-2-en-6 α -ol (68) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,78	---	---	39,97*
	1 β	1,92	---	---	
2	2	5,59	m	---	125,66
3	3	5,67	m	---	125,30
4	4 α	2,40	m	---	25,93
	4 β	1,77	---	---	
5	5 α	1,25	---	---	48,79
6	6 β	3,44	ddd	4,6;10,3;11,2	71,76
7	7 α	0,90	---	---	41,53
	7 β	1,98	---	---	
8	8 β	1,40	---	---	34,38
9	9 α	0,72	m	---	53,72
10	---	---	---	---	35,59
11	11 α	1,32	---	---	21,03
	11 β	1,46	---	---	
12	12 α	1,12	---	---	39,97*
	12 β	1,99	---	---	
13	---	---	---	---	42,68
14	14 α	1,02	---	---	56,28
15	15 α	1,59	m	---	23,98
	15 β	1,05	---	---	
16	16 α	1,83	---	---	28,31
	16 β	1,25	---	---	
17	17 α	1,12	---	---	56,38
18	18	0,66	s	---	12,11
19	19	0,76	s	---	13,17
20	20	1,36	---	---	35,93
21	21	0,91	d	6,4	18,84
22	22	0,99 ; 1,33	---	---	36,30
23	23	1,13 ; 1,33	---	---	23,96
24	24	1,09 ; 1,14	---	---	39,65
25	25	1,51	---	---	28,17
26	26	0,86	d	6,6	22,72
27	27	0,86	d	6,6	22,95

*señales intercambiables

2 α ,3 α -Epoxi-5 α -colestano-6 α -ol (69) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,46	---	---	38,74
	1 β	1,90	dd	15,2 ; 6,0	
2	2 β	3,12	dd	4,0 ; 5,9	50,69
3	3 β	3,24	sa	---	52,39
4	4 α	2,50	ddd	1,5;4,6;15,2	24,62
	4 β	1,58	---	---	
5	5 α	1,19	---	---	44,14
6	6 β	3,38	dt	4,7 ; 10,9	71,10
7	7 α	0,82	---	---	41,77
	7 β	1,97	---	---	
8	8 β	1,28	---	---	34,20
9	9 α	0,65	---	---	53,41
10	---	---	---	---	34,57
11	11 α	1,30	---	---	20,92
	11 β	1,44	---	---	
12	12 α	1,12	---	---	39,82
	12 β	1,99	---	---	
13	---	---	---	---	42,52
14	14 α	1,02	---	---	56,09
15	15 α	1,58	---	---	24,32
	15 β	1,05	---	---	
16	16 α	1,83	m	---	28,25
	16 β	1,25	---	---	
17	17 α	1,10	---	---	56,28
18	18	0,64	s	---	12,03
19	19	0,77	s	---	14,45
20	20	1,36			35,91
21	21	0,90	d	6,5	18,80
22	22	0,99 ; 1,33	---	---	36,26
23	23	1,14 ; 1,33	---	---	23,93
24	24	1,09 ; 1,12	---	---	39,63
25	25	1,52	---	---	28,15
26	26	0,86	d	6,6	22,69
27	27	0,86	d	6,6	22,95

2β,3β-Dihidroxi-5α-colestan-6-ona (70) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,37	---	---	42,57
	1β	2,13	dd	2,9 ; 14,6	
2	2α	4,03	sa	---	69,28
3	3α	3,63	dt	11,6 ; 4,3	72,00
4	4α	1,76	m	---	24,43
	4β	1,85	---	---	
5	5α	2,21	dd	2,4 ; 12,1	57,28
6	---	---	---	---	210,69
7	7α	1,94	ta	12,7	46,67
	7β	2,31	dd	4,5 ; 13,3	
8	8β	1,79	---	---	37,43
9	9α	1,18	---	---	54,89
10	---	---	---	---	40,73
11	11α	1,61	---	---	21,72
	11β	1,41	---	---	
12	12α	1,19	---	---	39,61*
	12β	2,05	dt	13,0 ; 3,2	
13	---	---	---	---	43,17
14	14α	1,23	---	---	56,85
15	15α	1,07	---	---	24,12
	15β	1,53	---	---	
16	16α	1,84	---	---	28,18*
	16β	1,27	---	---	
17	17α	1,12	---	---	56,30
18	18	0,66	s	---	12,20
19	19	0,98	s	---	15,39
20	20	1,38	---	---	35,85
21	21	0,91	d	6,5	18,78
22	22	1,00 ; 1,32	---	---	36,21
23	23	1,15 ; 1,33	---	---	23,97
24	24	1,09 ; 1,16	---	---	39,69*
25	25	1,51	---	---	28,16*
26	26	0,86	d	6,6	22,71
27	27	0,86	d	6,6	22,95

*señales intercambiables

2 α ,3 α -Dihidroxi-5 α -colestano-6-ona (71) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,54	---	---	40,34
	1 β	1,75	---	---	
2	2 α	3,75	ddd	3,3;4,7;11,6	68,43
3	3 α	4,03	sa	---	68,54
4	4 α	1,90	dt	15,0; 3,3	26,45
	4 β	1,71	---	---	
5	5 α	2,67	ddd	1,2;3,4;12,7	50,88
6	---	---	---	---	212,44
7	7 α	1,98	dt	1,0 ; 12,8	46,94
	7 β	2,28	dd	4,6 ; 13,0	
8	8 β	1,77	---	---	37,83
9	9 α	1,36	---	---	53,89
10	---	---	---	---	42,71
11	11 α	1,63	m	---	21,35
	11 β	1,34	---	---	
12	12 α	1,21	---	---	39,61*
	12 β	2,04	dt	12,7; 3,0	
13	---	---	---	---	43,08
14	14 α	1,23	---	---	56,82
15	15 α	1,51	---	---	24,07*
	15 β	1,06	---	---	
16	16 α	1,84	m	---	28,13*
	16 β	1,25	---	---	
17	17 α	1,13	---	---	56,21
18	18	0,65	s	---	1217
19	19	0,74	s	---	13,70
20	20	1,39	---	---	35,84
21	21	0,91	d	6,6	18,81
22	22	0,98 ; 1,31	---	---	36,22
23	23	1,12 ; 1,32	---	---	23,96*
24	24	1,08 ; 1,11	---	---	39,551*
25	25	1,51	---	---	28,13*
26	26	0,85	d	6,6	22,69
27	27	0,86	d	6,6	22,95

*señales intercambiables

2β,3α-Dihidroxi-5α-colestan-6-ona disulfato (72) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,70	dd	14,8; 3,8	38,35
	1β	2,14	---	---	
2	2α	4,73	sa	---	75,17
3	3α	4,77	sa	---	75,10
4	4α	1,98	---	---	22,45
	4β	1,92	---	---	
5	5α	2,79	dd	3,0 ; 12,9	52,65
6	---	---	---	---	214,83
7	7α	2,12	---	---	47,47
	7β	2,19	---	---	
8	8β	1,81	---	---	38,89
9	9α	1,40	---	---	55,63
10	---	---	---	---	41,81
11	11α	1,67	---	---	22,25
	11β	1,39	---	---	
12	12α	1,26	---	---	40,84
	12β	2,07	---	---	
13	---	---	---	---	44,16
14	14α	1,34	---	---	57,82
15	15α	1,57	---	---	24,93
	15β	1,13	---	---	
16	16α	1,90	---	---	29,14
	16β	1,30	---	---	
17	17α	1,19	---	---	57,42
18	18	0,71	s	---	12,43
19	19	0,93	s	---	15,24
20	20	1,42	---	---	37,03
21	21	0,95	d	6,7	19,14
22	22	1,04 ; 1,37	---	---	37,29
23	23	1,20 ; 1,38	---	---	24,88
24	24	1,12 ; 1,15	---	---	40,66
25	25	1,53	m	---	29,14
26	26	0,88	d	6,6	22,92
27	27	0,89	d	6,6	23,17

2β,3β-Dihidroxi-5α-colestan-6-ona disulfato (73) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,43	---	---	41,70
	1β	2,61	dd	3,04 ; 14,45	
2	2α	4,84	sa	---	76,47
3	3α	4,31	ddd	4,2;4,2;12,0	78,30
4	4α	1,97	---	---	23,57
	4β	1,93	---	---	
5	5α	2,51	dd	1,96 ; 11,6	58,28
6	---	---	---	---	213,13
7	7α	2,12	m	---	47,10
	7β	2,19	dd	5,0 ; 13,2	
8	8β	1,81	---	---	38,84
9	9α	1,20	---	---	56,04
10	---	---	---	---	42,01
11	11α	1,43	---	---	22,72
	11β	1,65	---	---	
12	12α	1,15	---	---	40,86
	12β	2,06	---	---	
13	---	---	---	---	44,23
14	14α	1,56	---	---	56,28
15	15α	1,30	---	---	24,91
	15β	1,13	---	---	
16	16α	1,87	---	---	29,17
	16β	1,29	---	---	
17	17α	1,18	---	---	55,70
18	18	0,71	s	---	12,43
19	19	1,00	s	---	15,60
20	20	1,41	---	---	37,06
21	21	0,95	d	6,5	19,13
22	22	1,03 ; 1,37	---	---	37,30
23	23	1,17 ; 1,38	---	---	24,96
24	24	1,10 ; 1,15	---	---	40,67
25	25	1,53	---	---	29,15
26	26	0,88	d	6,6	22,93
27	27	0,88	d	6,6	23,17

2 α ,3 α -Dihidroxi-5 α -colestan-6-ona disulfato (74) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,75	t	11,6	39,58
	1 β	2,03	dd	12,2 ; 4,7	
2	2 β	4,44	ddd	12,3;4,7:2,9	75,44
3	3 β	4,86	sa	---	76,40
4	4 α	2,34	dt	15,2 ; 3,5	25,88
	4 β	1,66	---	---	
5	5 α	2,86	dd	2,3 ; 12,3	52,29
6	---	---	---	---	214,29
7	7 α	2,14	t	12,7	47,41
	7 β	2,19	dd	4,9 ; 13,0	
8	8 β	1,80	---	---	39,21
9	9 α	1,51	m	---	54,95
10	---	---	---	---	43,38
11	11 α	1,67	---	---	22,38
	11 β	1,38	---	---	
12	12 α	1,26	---	---	40,77
	12 β	2,08	dt	12,6 ; 3,4	
13	---	---	---	---	44,16
14	14 α	1,33	---	---	57,84
15	15 α	1,56	---	---	24,95
	15 β	1,10	---	---	
16	16 α	1,88	m	---	29,15
	16 β	1,28	---	---	
17	17 α	1,17	---	---	57,42
18	18	0,69	s	---	12,40
19	19	0,82	s	---	13,99
20	20	1,39			37,04
21	21	0,93	d	6,5	19,14
22	22	1,01 ; 1,36	---	---	37,29
23	23	1,17 ; 1,35	---	---	24,90
24	24	1,12 ; 1,15	---	---	40,67
25	25	1,51	---	---	29,15
26	26	0,86	d	6,6	22,92
27	27	0,87	d	6,6	23,17

2β,3α-Dihidroxicolest-5-eno disulfato (75) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,57	---	---	39,22
	1β	2,15	da	15,29	
2	2α	4,78	sa	---	75,86
3	3β	4,72	sa	---	76,13
4	4α	2,28	da	13,0	33,70
	4β	2,80	da	12,9	
5	---	---	---	---	138,86
6	6	5,35	sa	---	123,61
7	7α	1,56	---	---	29,14
	7β	1,97	m	---	
8	8β	1,49	---	---	32,56
9	9α	1,02	---	---	52,06
10	---	---	---	---	37,32
11	11α	1,56	---	---	21,83
	11β	1,46	---	---	
12	12α	1,17	---	---	41,10
	12β	2,02	m	3,4 ; 12,5	
13	---	---	---	---	41,12
14	14α	1,02	---	---	57,48
15	15α	1,62	---	---	25,31
	15β	1,11	---	---	
16	16α	1,86	m	---	29,13
	16β	1,29	---	---	
17	17α	1,11	---	---	58,15
18	18	0,71	s	---	12,35
19	19	1,17	s	---	22,10
20	20	1,41	---	---	37,00
21	21	0,94	d	6,5	19,19
22	22	1,02 ; 1,37	---	---	37,28
23	23	1,19 ; 1,37	---	---	24,94
24	24	1,13 ; 1,18	---	---	40,60
25	25	1,53	---	---	29,13
26	26	0,88	d	6,6	22,91
27	27	0,88	d	6,6	23,16

2 β ,3 α ,6 β -Trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (76) (DMSO- d_6)

Carbono	^1H	$\delta \text{ } ^1\text{H}$	multiplicidad	$J_{\text{H-H}}$	$\delta \text{ } ^{13}\text{C}$
1	1 α	1,06	da	11,8	38,93
	1 β	1,79	---	---	
2	2 α	4,30	---	---	72,97
3	3 β	4,37	---	---	73,19
4	4 α	1,53	---	---	26,70
	4 β	1,85	---	---	
5	5 α	1,45	---	---	41,18
6	6 α	4,06	---	---	75,61
7	7 α	1,07	---	---	36,59
	7 β	1,79	---	---	
8	8 β	1,55	---	---	29,98
9	9 α	0,59	m	---	54,51
10	---	---	---	---	34,95
11	11 α	1,41	---	---	20,33
	11 β	1,26	---	---	
12	12 α	1,08	---	---	39,77
	12 β	1,92	da	12,9	
13	---	---	---	---	42,20
14	14 α	0,97	---	---	55,92
15	15 α	1,51	---	---	23,88
	15 β	0,99	---	---	
16	16 α	1,76	m	---	27,78
	16 β	1,21	---	---	
17	17 α	1,06	---	---	55,68
18	18	0,65	s	---	12,00
19	19	0,95	s	---	16,85
20	20	1,34	---	---	35,17
21	21	0,89	d	6,4	18,58
22	22	0,98 ; 1,31	---	---	35,65
23	23	1,13 ; 1,31	---	---	23,14
24	24	1,08 ; 1,12	---	---	38,80
25	25	1,49	---	---	27,38
26	26	0,84	d	6,6	22,41
27	27	0,84	d	6,7	22,67

2 β ,3 α ,6 β -Trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (77) (DMSO-*d*₆)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,78	---	---	38,97
	1 β	1,07	---	---	
2	2 α	4,30	sa	---	73,16
3	3 β	4,37	sa	---	73,38
4	4 α	1,44	---	---	27,04
	4 β	1,92	---	---	
5	5 α	1,38	---	---	41,54
6	6 α	3,53	---	---	69,74
7	7 α	1,02*	---	---	39,86
	7 β	1,62*	---	---	
8	8 β	1,63	---	---	29,74
9	9 α	0,60	m	---	54,81
10	---	---	---	---	35,08
11	11 α	1,41	---	---	20,34
	11 β	1,26	---	---	
12	12 α	1,08	---	---	39,59
	12 β	1,93	---	---	
13	---	---	---	---	42,21
14	14 α	0,97	---	---	55,89
15	15 α	1,52	---	---	23,91
	15 β	0,98	---	---	
16	16 α	1,77	---	---	27,77
	16 β	1,20	---	---	
17	17 α	1,06	---	---	55,72
18	18	0,64	s	---	11,94
19	19	1,03	s	---	17,22
20	20	1,33	---	---	35,23
21	21	0,89	d	6,6	18,57
22	22	0,97 ; 1,31	---	---	35,66
23	23	1,14 ; 1,31	---	---	23,18
24	24	1,08 ; 1,12	---	---	38,80
25	25	1,50	---	---	27,39
26	26	0,83	d	6,6	22,41
27	27	0,83	d	6,6	22,68

6E-Hidroxiimino-5 α -colest-2-eno (90) (CDCl₃)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,87	---	---	39,31
	1 β	2,01	m	---	
2	2	5,57	m	---	124,85
3	3	5,67	m	---	125,28
4	4 α	2,10	da	16,0	23,37
	4 β	2,22	---	---	
5	5 α	2,18	---	---	46,57
6	---	---	---	---	160,46
7	7 α	1,25	---	---	29,75
	7 β	3,38	dd	4,2 ; 13,9	
8	8 β	1,49	---	---	35,50
9	9 α	1,01	---	---	53,99
10	---	---	---	---	37,93
11	11 α	1,54	---	---	21,21
	11 β	1,38	---	---	
12	12 α	1,18	---	---	39,85
	12 β	2,02	m	---	
13	---	---	---	---	42,92
14	14 α	1,15	---	---	56,87
15	15 α	1,66	m	---	24,23
	15 β	1,17	---	---	
16	16 α	1,85	---	---	28,30
	16 β	1,27	---	---	
17	17 α	1,11	---	---	56,33
18	18	0,66	s	---	12,16
19	19	0,73	s	---	12,91
20	20	1,40	---	---	35,89
21	21	0,91	d	6,4	18,84
22	22	1,00 ; 1,33	---	---	36,30
23	23	1,13 ; 1,33	---	---	23,97
24	24	1,10 ; 1,15	---	---	39,66
25	25	1,51	---	---	28,17
26	26	0,86	d	6,6	22,72
27	27	0,87	d	6,6	22,97

2β,3β-Dihidroxi-6*E*-hidroximiño-5α-colestaño (91) (DMSO-*d*₆)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,16	---	---	42,39
	1β	1,83	dd	14,2 ; 2,9	
2	2α	3,77	sa	---	68,73
3	3α	3,37	m	---	71,33
4	4α	1,52	---	---	25,98
	4β	1,65	ddd	12,6;12,6;12,6	
5	5α	1,92	---	---	49,51
6	6	---	---	---	157,13
7	7α	1,11	---	---	28,89
	7β	3,13	dd	13,5 ; 4,5	
8	8β	1,32	---	---	34,61
9	9α	0,86	---	---	54,17
10	---	---	---	---	34,85
11	11α	1,24	---	---	21,02
	11β	1,50	---	---	
12	12α	1,12	---	---	39,52
	12β	1,92	---	---	
13	---	---	---	---	42,20
14	14α	1,12	---	---	55,88
15	15α	1,55	---	---	23,68
	15β	1,04	---	---	
16	16α	1,79	m	---	27,75
	16β	1,22	---	---	
17	17α	1,07	---	---	55,59
18	18	0,62	s	---	11,83
19	19	0,82	s	---	14,53
20	20	1,37	---	---	35,13
21	21	0,89	d	6,3	18,49
22	22	0,99 ; 1,31	---	---	35,59
23	23	1,14 ; 1,31	---	---	23,16
24	24	1,04 ; 1,11	---	---	38,90
25	25	1,50	---	---	27,37
26	26	0,84	d	6,6	22,40
27	27	0,84	d	6,6	22,67

2 α ,3 α -Dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (92) (DMSO-*d*₆)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,49	---	---	39,89
	1 β	1,30	---	---	
2	2 β	3,48	m	---	67,36
3	3 β	3,76	sa	---	67,84
4	4 α	1,66	dt	14,6 ; 3,1	28,51
	4 β	1,55	---	---	
5	5 α	2,29	dd	12,4 ; 3,2	42,92
6	6	---	---	---	157,54
7	7 α	1,13	---	---	29,06
	7 β	3,15	dd	13,5 ; 4,3	
8	8 β	1,36	---	---	35,63
9	9 α	0,98	---	---	53,69
10	---	---	---	---	34,85
11	11 α	1,23	---	---	20,70
	11 β	1,52	---	---	
12	12 α	1,14	---	---	39,24
	12 β	1,95	d	12,0	
13	---	---	---	---	42,38
14	14 α	1,13	---	---	55,92
15	15 α	1,55	---	---	23,69
	15 β	1,05	---	---	
16	16 α	1,79	m	---	27,78
	16 β	1,23	---	---	
17	17 α	1,09	---	---	55,54
18	18	0,61	s	---	11,84
19	19	0,63	s	---	12,79
20	20	1,36	---	---	35,16
21	21	0,89	d	6,3	18,53
22	22	0,99 ; 1,31	---	---	35,62
23	23	1,13 ; 1,31	---	---	23,16
24	24	1,04 ; 1,14	---	---	38,94
25	25	1,50	---	---	27,43
26	26	0,84	d	6,6	22,42
27	27	0,84	d	6,6	22,69

2 β ,3 α -Dihidroxi-6*E*-hidroximino-5 α -colestano (93) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	<i>J</i> _{H-H}	δ ¹³ C
1	1 α	1,54	---	---	39,95*
	1 β	1,77	dd	1,4; 14,2	
2	2 α	3,81	sa	---	71,25
3	3 β	3,84	sa	---	70,48
4	4 α	1,66	m	---	25,53
	4 β	2,01	---	---	
5	5 α	2,43	dd	2,8 ; 12,9	45,17
6	---	---	---	---	161,83
7	7 α	1,21	---	---	30,63
	7 β	3,33	dd	4,4 ; 13,4	
8	8 β	1,50	---	---	36,55
9	9 α	1,00	---	---	56,49
10	---	---	---	---	40,03*
11	11 α	1,61	m	---	22,21
	11 β	1,33	---	---	
12	12 α	1,20	---	---	41,11
	12 β	2,03	---	---	
13	---	---	---	---	44,05
14	14 α	1,18	---	---	57,91
15	15 α	1,65	---	---	25,06
	15 β	1,17	---	---	
16	16 α	1,88	m	---	29,22*
	16 β	1,30	---	---	
17	17 α	1,15	---	---	57,53
18	18	0,69	s	---	12,52
19	19	0,92	s	---	15,04
20	20	1,40	---	---	37,05
21	21	0,94	d	6,5	19,19
22	22	1,03 ; 1,38	---	---	37,31
23	23	1,16 ; 1,38	---	---	24,91
24	24	1,12 ; 1,15	---	---	40,66
25	25	1,53	---	---	29,13*
26	26	0,88	d	6,6	22,94
27	27	0,89	d	6,6	23,19

*señales intercambiables

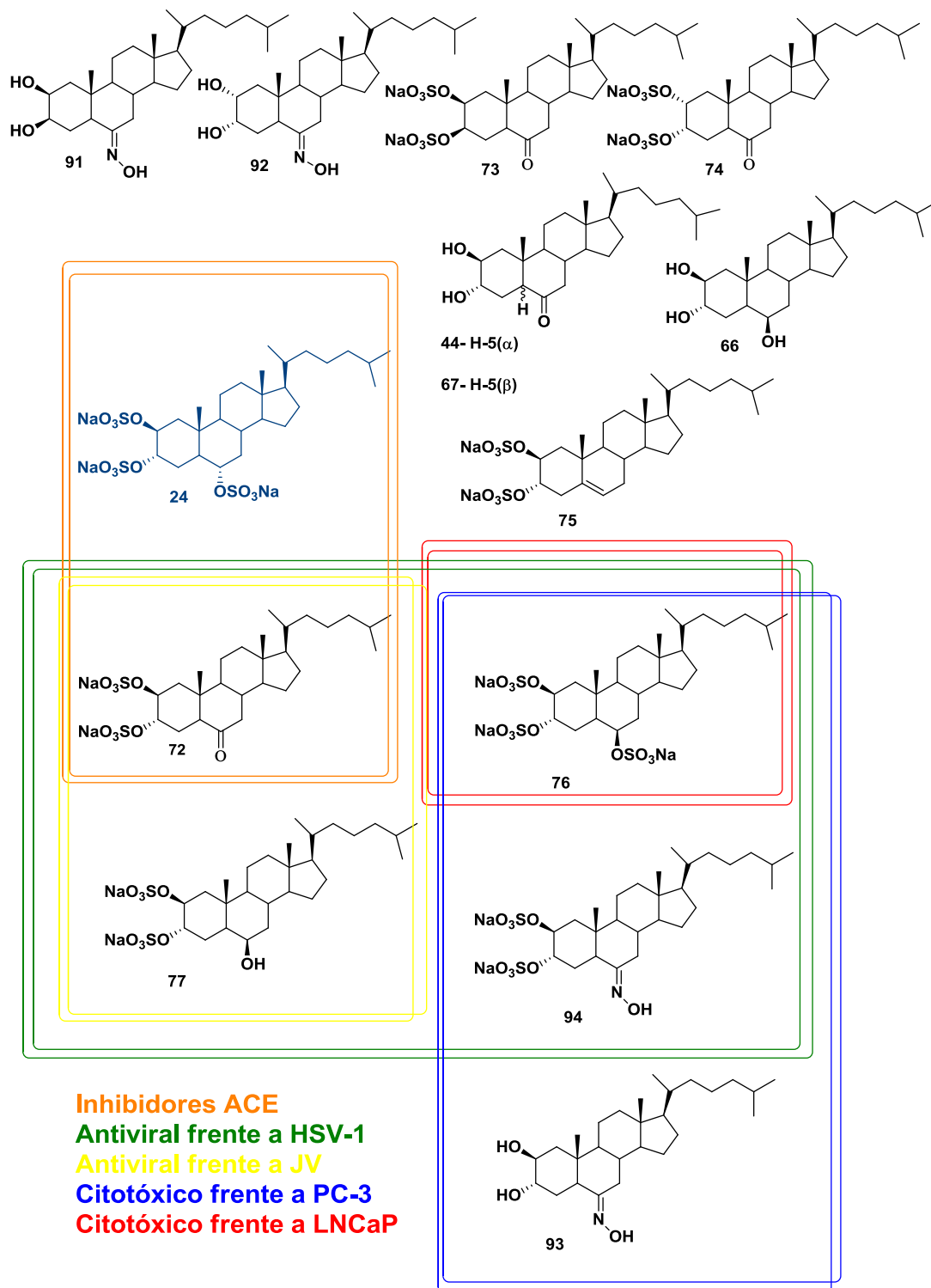
2β,3α-Dihidroxi-6E-hidroxiino-5α-colestaño disulfato (94) (CD₃OD)

Carbono	¹ H	δ ¹ H	multiplicidad	J _{H-H}	δ ¹³ C
1	1α	1,59	---	---	38,28
	1β	2,12	da	14,7	
2	2α	4,75	sa	---	75,51
3	3β	4,77	sa	---	75,50
4	4α	2,01	---	---	24,11
	4β	2,01	---	---	
5	5α	2,42	dd	6,5 ; 9,0	45,20
6	---	---	---	---	160,10
7	7α	1,22	---	---	30,50
	7β	3,32	*	*	
8	8β	1,52	---	---	36,60
9	9α	1,04	---	---	56,36
10	---	---	---	---	39,62
11	11α	1,60	---	---	22,20
	11β	1,35	---	---	
12	12α	1,20	---	---	41,08
	12β	2,03	---	---	
13	---	---	---	---	44,05
14	14α	1,19	---	---	57,88
15	15α	1,66	m	---	25,06
	15β	1,18	---	---	
16	16α	1,88	m	---	29,23
	16β	1,30	---	---	
17	17α	1,15	---	---	57,52
18	18	0,69	s	---	12,50
19	19	0,91	s	---	14,64
20	20	1,41	---	---	37,07
21	21	0,94	d	6,4	19,16
22	22	1,03 ; 1,37	---	---	37,32
23	23	1,20 ; 1,38	---	---	24,90
24	24	1,12 ; 1,15	---	---	40,66
25	25	1,53	---	---	29,14
26	26	0,88	d	6,6	22,92
27	27	0,88	d	6,6	23,18

*debajo del solvente deuterado

Conclusiones finales

En este trabajo de tesis se sintetizaron seis esteroides polihidroxilados (compuestos **44**, **66**, **67**, **91**, **92** y **93**) y ocho esteroides polihidroxilados sulfatados (compuestos **24**, **72**, **73**, **74**, **75**, **76**, **77** y **94**), cuyas estructuras se muestran en la figura siguiente:



Todos los compuestos, salvo el 2 β ,3 α ,6 α -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**24**) (dibujado en azul), son nuevos y fueron completamente caracterizados por RMN, espectrometría de masa e espectroscopia infrarrojo. Además, se caracterizó por primera vez por métodos espectroscópicos el compuesto trisulfatado **24** y todos los intermediarios de su síntesis. Las oximas **91**, **92** y **94** son ejemplos novedosos de análogos de productos naturales marinos poco frecuentes.

Las síntesis realizadas parten de compuestos comercialmente asequibles, son sencillas y con muy buenos rendimientos. Las reacciones de sulfatación fueron optimizadas, reduciendo los tiempos de reacción gracias a la implementación del calentamiento en microondas.

En cuanto a las actividades biológicas de los compuestos sintetizados, se obtuvieron resultados muy interesantes: en primer lugar, los compuestos **24** y **72** (recuadro naranja) constituyen una nueva clase de inhibidores esteroidales de la enzima acetilcolinesterasa. De acuerdo con los resultados de modelado molecular realizados en este trabajo de tesis, su actividad inhibitoria y su baja citotoxicidad, el compuesto **72** es un buen modelo para el diseño racional de nuevos análogos bioactivos.

Dentro del recuadro azul se encuentran representados los compuestos 2 β ,3 α -dihidroxi-6 E -hidroximino-5 α -colestano (**93**) y su análogo disulfatado (**94**), los cuales resultaron 5 veces más citotóxicos que la oxima esteroideal más activa reportada hasta el momento, frente a la línea tumoral PC-3. También dentro de un recuadro azul está representado el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**) que resultó ser 2,2 veces más activo frente a la línea celular de cáncer de próstata PC-3 que los esteroides sulfatados reportados hasta el 2013, en la literatura. En el recuadro rojo, el compuesto 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**) resultó ser el más activo de la serie frente a la línea celular de cáncer de próstata LNCaP. Esta es la primera vez que se informa la actividad citotóxica de 6 E -hidroximino y esteroides polihidroxilados sulfatados frente a la línea LNCap.

La evaluación de la actividad antiviral frente a virus patógenos en humanos (herpes simplex, Junín y dengue) de los esteroides sulfatados sintetizados nos permitió profundizar los estudios de correlación estructura/actividad realizados anteriormente en nuestro laboratorio. Los cuatro compuestos activos frente a HSV (recuadro verde) fueron el 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano trisulfato (**76**), 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-

disulfato (**77**), 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**72**) y 2 β ,3 α -dihidroxi-6E-hidroximino-5 α -colestano disulfato (**94**), de los cuales los compuestos **77** y **94** los que poseen mayor selectividad. El estudio del mecanismo de acción de estos dos compuestos reveló que no actúan en una etapa temprana sino luego de que el virus penetre en la célula. Las modificaciones introducidas en C-6 lograron incrementar la actividad de los compuestos frente al virus herpes simples (HSV), en comparación con la serie de esteroides sulfatados naturales y sintéticos evaluados con anterioridad en nuestro laboratorio. Por otro lado, los compuestos disulfatados 2 β ,3 α ,6 β -trihidroxi-5 α -colestano-2,3-disulfato (**77**) y 2 β ,3 α -dihidroxi-5 α -colestano-6-ona disulfato (**72**), dentro del recuadro amarillo, fueron los únicos activos frente al virus Junin (JV), responsable de la fiebre hemorrágica argentina. De acuerdo a los valores de IC₅₀, este estudio mostró que la presencia de un grupo alcohol o cetona en posición 6 es fundamental para que los compuestos presenten actividad antiviral frente a JV. La tendencia opuesta se observa frente al virus de dengue, ya que al sustituir el C-6 del esteroide, éste no muestra actividad antiviral en las condiciones ensayadas.

Por último, este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

-Richmond, V; Careaga, VP; Sacca, P; Calvo, JC; Maier, MS. Synthesis of cytotoxic 6E-hydroximinosteroids. Structure/activity studies and comparison with polyhydroxylated sulfated analogs (en revisión).

-Richmond, V; Murray, AP; Maier, MS. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of polyhydroxylated sulfated steroids: structure/activity studies *Steroids* **2013**; 78: 1141-7.

-Richmond, V; Garrido Santos, G; Murray, AP; Maier, MS. Synthesis and acetylcholinesterase inhibitory activity of 2 β ,3 α -disulfoxy-5 α -cholestan-6-one. *Steroids* **2011**; 76: 1160–5.

-Vela Gurovic, MS; Castro, MJ; Richmond, V; Faraoni, MB; Maier, MS; Murray, AP. Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (asteraceae). *Planta Med.* **2010**; 76: 607-610.

