

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



**“ESTERIFICACION DE LA EPIANDROSTERONA COMO INTERMEDIARIO EN EL
ACOPLAMIENTO DE AMINOÁCIDOS”**

Trabajo Especial de Grado presentado
ante la ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Br. Ismenia Elieth
Jabana Galindez para optar al título de
Licenciado en Química

Caracas, Octubre de 2012

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



**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO:
“ESTERIFICACION DE LA EPIANDROSTERONA COMO INTERMEDIARIO EN EL
ACOPLAMIENTO DE AMINOÁCIDOS”**

Presentado por:

Br. Ismenia Elieth Jabana Galíndez

Tutor:

Dr. Gustavo Cabrera

Caracas, Octubre de 2012

Yo, Profesor Gustavo Cabrera, Investigador del Laboratorio de Productos Naturales, de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela.

Certifico que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“ESTERIFICACION DE LA EPIANDROSTERONA COMO INTERMEDIARIO EN EL
ACOPLAMIENTO DE AMINOÁCIDOS”**

Que presenta la Br. Ismenia Elieth Jabana Galíndez, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el Laboratorio de Productos Naturales, de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2011 y 2012, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Octubre de 2012

Dr. Gustavo Cabrera
(Tutor)

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: **ESTERIFICACION DE LA EPIANDROSTERONA COMO INTERMEDIARIO EN EL ACOPLAMIENTO DE AMINOÁCIDOS**. Presentado por la Br. Ismenia Elieth Jabana Galíndez, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.

Dr. Gustavo Cabrera
(Director)

Dra. María Rodríguez
(Jurado)

Dr. Carlos Chinaea
(Jurado)

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se presenta un método para la preparación de un catalizador nucleofílico (4-N,N-dimetilaminopiridina) a partir de la piridina y cloruro de tionilo en cloroformo con un rendimiento del 35%, la cual se empleó junto con la dicitclohexilcarbodiimida como catalizadores en la esterificación de la epiandrosterona con diferentes agentes acilantes: anhídrido acético con 98% de rendimiento, y anhídrido succínico y ácido succínico con un rendimiento de 40%. Una vez obtenido el producto esterificado se intentó realizar el acoplamiento de la glicina y de una amina empleando dicitclohexilcarbodiimida como catalizador en N,N-dimetilformamida. Las reacciones fueron seguidas mediante el uso de cromatografía de capa fina y los productos obtenidos analizados mediante técnicas espectroscópicas.

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	3
Terpenos- esteroides	4
Androstanos.....	5
Esteroides como antivirales	7
Aminoácidos	9
Peptidos.....	13
Activación y Acoplamiento	14
Grupos protectores para los aminoácidos	16
Grupos protectores del α -amino.....	17
Grupos protectores del α -carboxilo	18
Catálisis nucleofílica	20
Catálisis mediante 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP).....	21
N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC).....	22
ANTECEDENTES	25
OBJETIVOS	29
Objetivo general.....	29
Objetivos específicos.....	29
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	30
Determinación de datos Físicos.....	31
1.- Síntesis del DMAP	32
2.- Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético.....	32
2.1.- En presencia de la 4-DMAPy DCC en cloroformo.	32
2.2.- En presencia de la DCC y cloroformo.	33
3.- Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido succínico.....	33
3.1.- En presencia de la 4-DMAP, DCC y cloroformo.	33

3.2.- En presencia de trietanolamina y dicloroetano.	34
3.3.- En presencia de 4-DMAP y tolueno.	34
4.- Esterificación de la epiandrosterona con ácido succínico.....	35
4.1.- En presencia de 4-DMAP, DCC y cloroformo.	35
4.2.- En presencia de DCC y cloroformo.....	35
4.3.- En presencia de 4-DMAP, DCC y cloroformo.	36
5.- Acoplamiento de la glicina a la epiandrosterona esterificada	36
5.1.- En presencia de DCC en N,N-dimetilformamida.	36
5.2.- En presencia de DCC y N,N-dimetilformamida	37
5.3.- En presencia de DCC y N,N-dimetilformamida.	37
5.4.- En presencia de DCC, N,N-dimetilformamida y agua.	37
6.- Acoplamiento de la N,N-dimetiletildiamina al producto de esterificación.	38
RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
1.- Síntesis de la N,N-4-DMAP	39
2.-Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético.....	43
3.- Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido succínico.	48
4.- Esterificación de la epiandrosterona con ácido succínico.....	48
5.- Acoplamiento del aminoácido	54
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES	60
ESPECTROS	61
Espectro 1. IR, KBr de la 4-DMAP.....	61
Espectro 2. ¹ H-RMN de la 4-DMAP	62
Espectro 3. IR de la epiandrosterona	63
Espectro 4. IR de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético	64
Espectro 5. IR de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico.....	65
Espectro 6. ¹ H-RMN de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico.....	66

Espectro 7. ¹³ C-RMN de la eserificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico.....	67
BIBLIOGRAFIA	68

INTRODUCCIÓN

Los procedimientos experimentales para la síntesis de nuevos compuestos tienden, principalmente, a la preparación de fármacos o drogas con el propósito de aliviar o curar enfermedades que afectan a comunidades enteras como epidemias que se repiten periódicamente. En Venezuela, específicamente, hay enfermedades virales endémicas tales como el dengue y la fiebre amarilla que generan una alerta nacional.

El término antivírico corresponde a un medicamento, sustancia o procedimiento que se utiliza para combatir un virus. Ya refiriéndonos a su concepción dentro de la farmacología, se han clasificado los antivirales según la naturaleza del compuesto, todos estos, de una u otra forma se encargan de evitar ya sea la entrada, establecimiento y reproducción del virus en las células del organismo.

Algunas estructuras esteroidales han sido ampliamente investigadas, tanto sus propiedades físicas como químicas. Dentro de la familia de los esteroides, los androstanos han resultado de gran interés para el hombre, lo que se ha traducido en un importante número de investigaciones en el ámbito de la farmacología.

Este trabajo de investigación está enmarcado dentro de un proyecto en el que se llevan a cabo modificaciones estructurales en androstanos, con el fin de generar una serie de compuestos a los que posteriormente se le realizarán ensayos biológicos y estudios de modelaje molecular. Basándose en resultados previamente obtenidos en el trabajo en conjunto entre el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias-UCV y el Instituto de Biomedicina Facultad de Medicina, UCV; sobre el uso de androstanos como antivirales, específicamente contra el dengue y la fiebre amarilla, se ha planteado realizar modificaciones sobre la epiandrosterona mediante reacciones de

esterificación y posible acoplamiento de aminoácidos, con la intención de estudiar el comportamiento de los productos generados por dichas transformaciones como agentes antivirales.

FUNDAMENTO TEÓRICO

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

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

fundamentalmente a través de seres humanos en fase virémica (con capacidad de transmitir el virus que se está replicando en su sangre) y sigue las principales líneas de transporte urbano. [1]

Terpenos- esteroides

Con el término “esteroides” se denomina a un grupo de sustancias que poseen el núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno, que puede o no presentar una cadena lateral en el C-17, así como los metilos angulares en C-10 y C-13. Se designa como esteroides entonces a los derivados de pregnano, androstano, estrano y gonano.

Algunas estructuras esteroidales han sido ampliamente investigadas, tanto sus propiedades físicas como químicas, además de otras, de interés para el hombre. Los androstanos, son terpenos tetracíclicos, una de las familias más comúnmente investigadas en el ámbito de la farmacología, y de la cual haremos referencia a continuación, nombrando la clasificación de la familia, es decir, los terpenos. Los terpenos son una amplia familia de compuestos, con gran diversidad estructural lo que dificulta resumir sus características más comunes, pues no solamente se trata de la variedad de los grupos funcionales, sino además del número de átomos de carbono que conforman los esqueletos. La unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono y se conoce como isopreno. De manera general, los terpenos obedecen a lo que se conoce como regla del isopreno, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno. Sin embargo, esto no es siempre cierto por cuanto el número de átomos de carbono puede no ser un múltiplo de cinco, pues son frecuentes las reacciones de degradación, o bien suceden rearrreglos esqueletales que conducen a secuencias anormales de la unidad de C5. Entre los Terpenos, se pueden agrupar de

acuerdo al número de unidades de isopreno, en Hemiterpenos (una Unidad); Monoterpenos (dos Unidades); Sesquiterpenos (tres Unidades); Diterpenos (cuatro Unidades); Sesterpenos (cinco Unidades); Triterpenos (seis Unidades); Carotenoides (ocho Unidades) y Politerpenos (Varias unidades de C_5n , $n > 9$).

Dentro de los triterpenos tenemos los tetracíclicos y pentacíclicos. De los primeros hay dos series de compuestos principales que se diferencian en su estereoquímica y en la fusión de los anillos: Protostanos y Apo-eufanos. Entre los protostanos se encuentran los esteroides, que es un grupo de sustancias que poseen el núcleo del ciclopentano-perhidrofenantreno, que pueden presentar o no presentar una cadena lateral en C-17, así como los metilos angulares en C-10 y C-13. Se designa como esteroides a los derivados de pregnano, androstano, estrano y gonano. [2]

Androstanos

Los androstanos, constituyen una parte de la familia de los Terpenos, los cuales son una larga y estructuralmente diverso conjunto de productos naturales, derivados de la unidad de isopreno C_5 . Dentro de los triterpenos, encontramos una serie de compuestos con diversas modificaciones estructurales, los cuales son clasificados como Esteroides, siendo los androstanos una clase de esteroides, con sistemas de anillos tetracíclicos o ciclopentano-perhidrofenantreno (figura N° 1), destacándose además otras variedades donde encontramos sustituciones de cadenas alifáticas o metilos principalmente en los carbonos 10, 13 y 17, así como la aromatización del anillos A, variedades producidas naturalmente a partir de modificaciones sobre el lanosterol, cuyas modificaciones, especialmente en las cadenas laterales, crean un amplio rango de productos, como por ejemplo, esteroides, saponinas esferoidales,

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

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

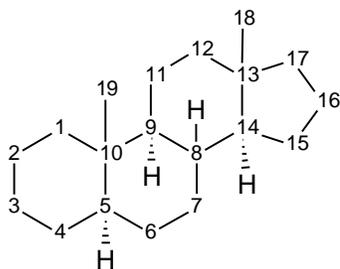


Figura 1

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

Podemos mencionar algunas estructuras esteroidales encontradas en la naturaleza y que se destacan por su influencia en el funcionamiento del organismo, por

ejemplo, el colesterol es un triterpenoide común y esencial en los animales, producido a partir de modificaciones sobre el lanosterol, este es un constituyente esencial de las membranas celulares; las modificaciones naturales, pueden ser reproducidas en el laboratorio y así como el lanosterol es modificado por los organismos, otros esteroides pueden ser base para modificaciones sintéticas. El empleo de materiales de partida de origen natural, disminuye el inconveniente de reproducir la estereoquímica estructural. [2]

Esteroides como antivirales

Como evidencia de la propiedad antiviral de los compuestos esteroidales, en trabajos previos, donde se realizó estudios *in Vitro*, se ha demostrado que algunos derivados sintéticos de esteroides de origen vegetal (brassinosteroides) presentan actividad frente a diversos virus, entre ellos el virus Junín (JUNV), agente etiológico de la fiebre hemorrágica argentina. Se ha evaluado también la actividad de esteroides de origen animal y de una serie de derivados obtenidos por síntesis química frente a virus patógenos para el hombre. Estos estudios proponen que la dehidroepiandrosterona (DHEA) actúa en el ciclo de replicación de virus como los de la encefalitis japonesa y el virus de la inmunodeficiencia tipo I (HIV-1). [3]

Al estudiar la replicación del Virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) en líneas celulares de neuroblastoma de Murina (N18), se encontró que la dehidroepiandrosterona (DHEA) suprime los efectos citotóxicos y la apoptosis inducida por el virus, así como su replicación y propagación dependiente de su concentración (a partir de 50 μM)

Estudios sobre el virus de la inmunodeficiencia HIV y FIV *in vitro* realizados con DHEA, dexametasona o análogos sintéticos, han demostrado que estos compuestos esteroidales tienen propiedades antivirales directas contra el Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH) o el virus de inmunodeficiencia felino (FIV), dependiendo de la dosis. [3]

Ante la presencia de los compuestos se observó una inhibición en la replicación del virus VIH-1 en líneas celulares (medida por la acumulación de la actividad transcriptasa reversa, y por la liberación del antígeno p24 las cuales disminuyen en presencia de los compuestos en cuestión) junto a una interrupción de la fusión celular estimulada por VIH-1. Del mismo modo, se demostró que la actividad antiviral (inhibición de la producción de la transcriptasa reversa) también afecta a células crónicamente infectadas por el Virus de Inmunodeficiencia Felino (FIV); al igual que en la infección con JEV, en donde no se pudo reproducir el efecto antiviral ante el sulfato de DHEA (DHEA-S). [3]

Los estudios acerca de la acción inhibidora de DHEA en la infectividad del virus Junín (JUNV) arrojaron que no ejercía efectos en los diferentes procesos de adsorción e internalización viral; por otro lado, al examinar el efecto del agregado de DHEA o EA (50µg/ml) a distintos tiempos post-infección sobre la expresión de la proteína viral N (proteína de nucleocápside) se apreció un máximo efecto inhibitorio de los compuestos (95% de inhibición) cuando los mismos se encontraban presentes durante las primeras horas de la infección. [3]

Se determinó así que el agregado de los compuestos una vez transcurrida la internalización de las partículas virales (2 horas post-infección) inhibe la síntesis de proteína N producida a lo largo de un único ciclo de replicación viral. [3]

Aminoácidos

Un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y un grupo carboxílico ($-\text{COOH}$; ácido). Los aminoácidos más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas. Dos aminoácidos se combinan en una reacción de condensación que libera agua formando un enlace peptídico. Estos dos "residuos" aminoácidos forman un dipéptido. Si se une un tercer aminoácido se forma un tripéptido y así, sucesivamente, para formar un polipéptido. Esta reacción ocurre de manera natural en los ribosomas, tanto los que están libres en el citosol como los asociados al retículo endoplasmático. [4]

Todos los aminoácidos componentes de las proteínas son alfa-aminoácidos. Por lo tanto, están formados por un carbono alfa unido a un grupo carboxilo, a un grupo amino, a un hidrógeno y a una cadena (habitualmente denominada R) de estructura variable, que determina la identidad y las propiedades de los diferentes aminoácidos; existen cientos de cadenas R por lo que se conocen cientos de aminoácidos diferentes, pero sólo 20 forman parte de las proteínas y tienen codones específicos en el código genético. [4]

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

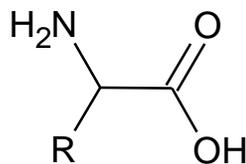


Figura 2.

"R" representa la cadena lateral, específica para cada aminoácido. Técnicamente hablando, se los denomina alfa-aminoácidos, debido a que el grupo amino ($-\text{NH}_2$) se encuentra a un átomo de distancia del grupo carboxilo ($-\text{COOH}$). Como dichos grupos funcionales poseen H en sus estructuras químicas, son grupos susceptibles a los cambios de pH; por eso, al pH de la célula prácticamente ningún aminoácido se encuentra de esa forma, sino que se encuentra ionizado. [4]

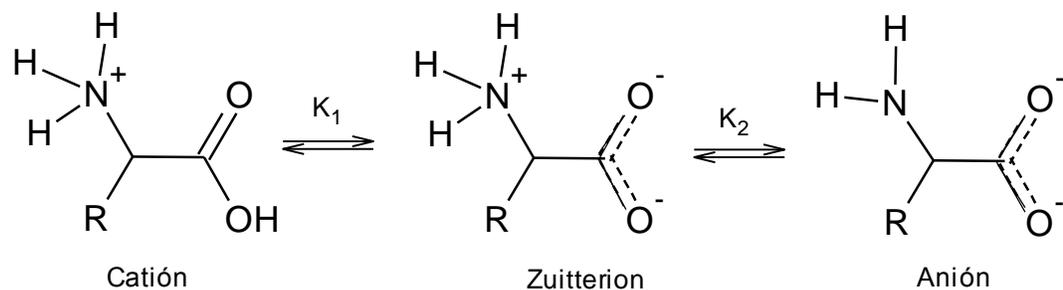


Figura 3.

Los aminoácidos a pH bajo (ácido) se encuentran mayoritariamente en su forma catiónica (con carga positiva), y a pH alto (básico) se encuentran en su forma aniónica (con carga negativa). Sin embargo, existe un pH específico para cada aminoácido, donde la carga positiva y la carga negativa son de la misma magnitud y el conjunto de la molécula es eléctricamente neutro. En este estado se dice que el aminoácido se encuentra en su forma de ion dipolar o zwitterión. [4]

Existen muchas formas de clasificar los aminoácidos; las tres formas que se presentan a continuación son las más comunes.

Según las propiedades de su cadena. Los aminoácidos se clasifican habitualmente según las propiedades de su cadena lateral:

- Neutros polares, polares o hidrófilos: Serina (Ser, S), Treonina (Thr, T), Cisteína (Cys, C), Asparagina (Asn, N), Glutamina (Gln, Q) y Tirosina (Tyr, Y).
- Neutros no polares, apolares o hidrófobos: Glicina (Gly, G), Alanina (Ala, A), Valina (Val, V), Leucina (Leu, L), Isoleucina (Ile, I), Metionina (Met, M), Prolina (Pro, P), Fenilalanina (Phe, F) y Triptófano (Trp, W).
- Con carga negativa, o ácidos: Ácido aspártico (Asp, D) y Ácido glutámico (Glu, E).
- Con carga positiva, o básicos: Lisina (Lys, K), Arginina (Arg, R) e Histidina (His, H).
- Aromáticos: Fenilalanina (Phe, F), Tirosina (Tyr, Y) y Triptófano (Trp, W) (ya incluidos en los grupos neutros polares y neutros no polares).

Según su obtención, a los aminoácidos que necesitan ser ingeridos por el cuerpo se les llama esenciales; la carencia de estos aminoácidos en la dieta limita el desarrollo del organismo, ya que no es posible reponer las células de los tejidos que mueren o crear tejidos nuevos, en el caso del crecimiento. Para el ser humano, los aminoácidos esenciales son: valina (Val), leucina (Leu), treonina (Thr), lisina (Lys), triptófano (Trp), histidina (His), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), arginina (Arg), metionina (Met). [4]

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

Las propiedades de los aminoácidos son las siguientes:

- Ácido-base: comportamiento de un aminoácido cuando se ioniza. Cualquier aminoácido puede comportarse como ácido y como base y se denominan sustancias anfóteras. Cuando una molécula presenta carga neta cero está en su punto isoeléctrico. Si un aminoácido tiene un punto isoeléctrico de 6,1 su carga neta será cero cuando el pH sea 6,1. Los aminoácidos y las proteínas se comportan como sustancias tampón.

- Ópticas: todos los aminoácidos excepto la glicina tienen el carbono alfa asimétrico, lo que les confiere actividad óptica; esto es, sus disoluciones desvían el plano de polarización cuando un rayo de luz polarizada las atraviesa. Si el desvío del plano de polarización es hacia la derecha (en sentido horario), el compuesto se denomina dextrógiro, mientras que si se desvía a la izquierda (sentido antihorario) se denomina levógiro. Un aminoácido puede en principio existir en sus dos formas enantioméricas (una dextrógira y otra levógira), pero en la naturaleza lo habitual es encontrar sólo una de ellas. Estructuralmente, las dos posibles formas enantioméricas de cada aminoácido se denominan configuración D o L dependiendo de la orientación relativa en el espacio de los 4 grupos distintos unidos al carbono alfa. El hecho de que sea dextrógiro no quiere decir que tenga configuración D. Todos los aminoácidos proteicos son L-aminoácidos.

- Químicas: las que afectan al grupo carboxilo, como la descarboxilación, etc.; las que afectan al grupo amino, como la desaminación; y las que afectan al grupo R.[4]

Peptidos

La historia de la síntesis de péptidos comienza con Emil Fisher, quien al establecer la química de las proteínas obtuvo la síntesis del dipéptido glicil-glicina en 1901, comprobando de esta manera su hipótesis de que los aminoácidos estaban unidos entre sí mediante el enlace peptídico. A partir de ahí continuó sintetizando tripéptidos, tetrapéptidos, etc., hasta finalmente alcanzar la síntesis un polipéptido de 18 residuos aminoacídicos. Después de esto, la evolución de la técnica fue lenta, los primeros polipéptidos sintetizados fueron homopolímeros ya que se presentaba un

problema al momento de combinar aminoácidos: debía protegerse el grupo amino de un tipo para evitar que se uniera con un aminoácido de su misma especie e impedir contaminaciones de péptidos distintos. Encontrar un compuesto químico capaz de bloquear el grupo amino, pero que además fuera removido fácilmente después de la formación del enlace peptídico deseado, no fue logrado hasta 1932 por Max Bergmann y Leonidas Zervas, el grupo carbobenzoxilo. A partir de esto los grupos protectores fueron perfeccionándose y en 1953 Vincent du Vigneaud fue capaz de sintetizar el primer polipéptido funcional, la hormona oxitocina, lo que le llevó a ganar el premio Nobel de química en 1955. Sin embargo, aislar y purificar un nuevo péptido significaba invertir muchísimo tiempo para obtener una cantidad ínfima de producto, por lo que Bruce Merrifield pensó que el método podía mejorarse. En 1963 dio a conocer la síntesis del tetrapéptido leucilalanilglicilalanina y en 1969 Merrifield anunció la síntesis de la enzima ribonucleasa pancreática bovina A de 124 residuos en 6 semanas, mediante la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS, de sus siglas en inglés), técnica por la que recibió el premio Nobel de química en 1984. [21]

Enlace Peptídico.

La unión entre dos aminoácidos se lleva a cabo por la reacción que se presenta entre el grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de otro formando una amida mediante la pérdida de una molécula de agua. Esta unión covalente es a lo que se denomina enlace peptídico, el cual tiene una geometría planar y características de doble enlace, debido a la resonancia existente. [21]

Activación y Acoplamiento

La formación del enlace peptídico es una reacción endérgica, una simple adición de un ácido carboxílico con una amina dará como resultado la obtención de la sal orgánica correspondiente, por lo que, si lo que buscamos es la formación de una amida, el grupo carboxilo debe ser activado. El mecanismo que se sigue para el acoplamiento de dos aminoácidos es aminólisis y se resume en la figura 4. En donde X es cualquier agente activante de naturaleza electrofílica, el cual debe ser minuciosamente escogido, ya que una mala elección puede llevarnos a racemización. En la figura 4 se muestra como se genera el enlace peptídico por aminólisis. R_1 y R_2 hacen referencia al resto de la fórmula del aminoácido. [21]

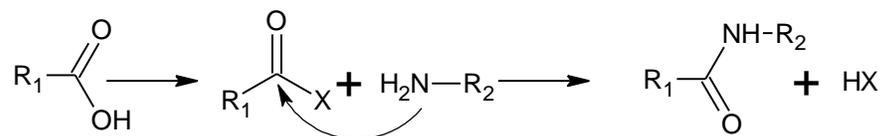


Figura 4.

A continuación se mencionan algunos:

- Cloruros y fluoruros de acilo.
- Acil azidas.
- Anhídridos.
- Ésteres activados.
- Carbodiimidas. La dicitohexilcarbodiimida (DCC) fue introducida por primera vez en la síntesis de péptidos en 1955 por Sheehan y Hess, y ha sido el reactivo más importante para la activación y acoplamiento desde entonces. Reacciona

con los acil aminoácidos para dar anhídridos simétricos, ésteres activados o actuar directamente como un agente acoplante. En cualquier caso el primer evento de la activación es la formación de una *O*-acilurea (figura 5)

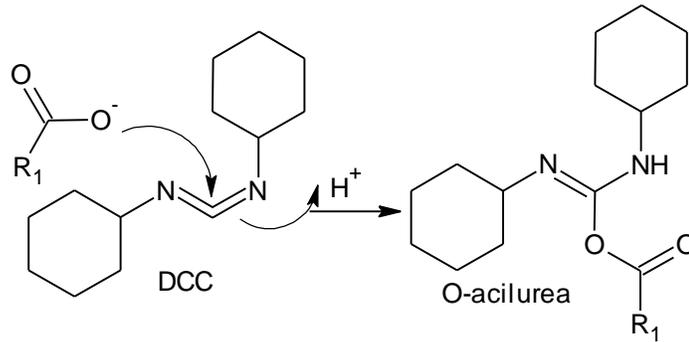


Figura 5

En presencia de un exceso de carboxilato, por ejemplo cuando un equivalente de DCC es agregado a dos equivalentes de un acil aminoácido, la *O*-acilurea es atacada por el anión carboxilato para formar el anhídrido, mientras que en presencia de fenoles u otros compuestos hidroxilados forma los ésteres derivados. La DCC da un coproducto, dicitlohexilurea, el cual es muy poco soluble en la mayoría de los solventes, por lo que la separación de éste del péptido sintetizado es muy fácil en síntesis de péptidos en solución (por diferencia de solubilidades), y es lo suficientemente soluble como para removerlo mediante lavados en la síntesis de péptidos en fase sólida. Por otro lado, en ausencia del reactivo nucleofílico, la *O*-acilurea se rearregla lentamente en *N*-acilurea, la cual no sólo reduce la producción, sino que también da problemas de purificación, esto puede prevenirse agregando el reactivo nucleofílico adecuado, antes que las reacciones secundarias se den. [21]

- Sales de fosfonio

Grupos protectores para los aminoácidos

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

Entre las características que debe tener un grupo protector se encuentran, la de ser químicamente estable en las condiciones en las que se da la síntesis peptídica, y la de ser fácilmente removibles en condiciones suaves que no alteren la formación del enlace peptídico al final o en fases intermediarias de la síntesis. En este sentido, se pueden clasificar a los grupos protectores como permanentes, los cuales son retenidos hasta que el péptido ha sido completado, o temporales, los cuales se eliminan al final de cada etapa de síntesis.

Grupos protectores del α -amino

El objetivo fundamental que se debe cubrir al proteger al grupo amino es el de suprimir su reactividad nucleofílica, para tal efecto existen una gran variedad de grupos protectores, el problema es encontrar uno que pueda ser removido fácilmente sin afectar la integridad del enlace peptídico formado o sin que el carbono α corra riesgo de racemización. [21]

Los primeros grupos protectores presentaban estos problemas, ya que se fundamentaban en la formación de una amida al unirse al grupo amino. El gran avance se dio cuando Bergman y Zervas observaron que los derivados de uretano eran

particularmente adecuados para la protección del α -amino. Un factor importante que los ha favorecido para ser ampliamente utilizados es su alto grado de estabilidad óptica, es decir, inhiben la racemización de los centros quirales adyacentes a estos grupos protectores.

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

- Benciloxycarbonil.
- *t*-Butoxicarbonil (Boc).
- 2-(4-bifenilil)-isopropoxycarbonil (Bpoc).
- Fluorenil-9-metoxycarbonil (Fmoc).

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

- Trifenilmetil (trityl, Trt).
- 2-Nitrofenilsulfonil (Nps).
- Ditosuccinil

Grupos protectores del α -carboxilo

La protección del grupo carboxilo no es tan necesaria como la del amino, ya que es menos nucleofílico. No obstante, es conveniente protegerlo, en especial para aumentar la solubilidad del péptido formado en solventes orgánicos. También es importante tener bloqueado el grupo carboxilo que en ese momento no formará parte del enlace peptídico, mientras que el que participará en el enlace se encuentra desprotegido listo para ser activado. Los métodos más comunes para proteger el grupo α -carboxilo es mediante esterificación. La liberación del aminoácido de este grupo

protector es de manera similar a la aquella vista para los derivados del uretano, después de todo, son ésteres de un tipo especial. [21]

- Metil éster (-COO-CH₃) y Etil éster (-COO-CH₂-CH₃). Fueron los primeros grupos utilizados para enmascarar el α-carboxilo. No hay una distinción importante entre estos dos, por lo que se les trata como un mismo grupo protector. Pueden obtenerse haciendo reaccionar al aminoácido con el alcohol correspondiente directamente o por medio de un halogenuro de acilo intermediario.

- Bencil éster (-COO-CH₂C₆H₅). Obtenido a partir de la esterificación del alcohol bencílico, este grupo protector se popularizó por presentar menos problemas para la desprotección que el metil o etil éster, aunque al igual que estos últimos, tienden a formar dicetopiperacinas. Pueden ser eliminados por saponificación, pero también por HBr/AcOH e hidrogenación catalítica, pero no por TFA (al igual que el grupo protector Z para el α-amino), por esta razón se les usa en combinación con un grupo amino protector distinto al Z durante la etapa de síntesis.

- *t*-Butil éster (-COO-C-(CH₃)₃). Estos pueden ser preparados directamente de los aminoácidos pero el procedimiento estándar es indirecto. A diferencia de los grupos anteriores, los dipéptidos de los *t*-Butil ésteres no forman dicetopiperacinas con facilidad. La estabilidad y labilidad de este grupo es semejante a la del grupo Boc, aunque son menos sensibles a acidólisis, por lo que es posible diferenciar entre el rompimiento de un grupo Boc y un *t*-Butil éster. Sin embargo, se recomienda utilizarlo en combinación con un grupo protector diferente al Boc.

- Fenil éster (-COO-C₆H₅). Este grupo es completamente estable en medio ácido y en condiciones de hidrogenación catalítica. El rompimiento por acción de un álcali es mucho más rápido que el del metil éster. Para efectuar la desprotección de este grupo se utiliza un tratamiento de peróxido de hidrógeno en DMF a un pH de 10.5

por 15 minutos, esto debido a la susceptibilidad que tienen los fenil ésteres al ataque del ión peróxido. Cadenas laterales sensibles al peróxido (Met, Trp, Cys), aparentemente no representan un gran problema si la desprotección se lleva a cabo con un exceso de dimetil sulfuro. [21]

Catálisis nucleofílica

La participación de catalizadores nucleofílicos como agentes que facilitan reacciones de acilación, esterificación, acetilación, alquilación, carbodimidación, lactonización, reacción de Baylis-Hillman entre otras, ha tomado un gran auge debido a la necesidad creciente de promover reacciones orgánicas mediante condiciones suaves que además permitan la obtención de un producto de alta pureza. El interés en estas reacciones es la síntesis de moléculas complejas que podrían, entre otras cosas, ayudar a combatir algunas enfermedades. [5]

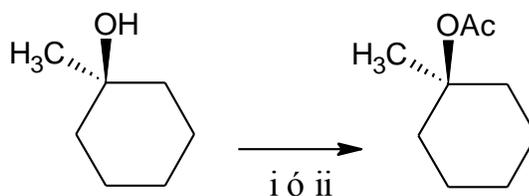
A mediados del siglo XX se estudió el empleo de piridina como catalizador nucleofílico. Estudios posteriores de sus derivados dieron con que el uso de moléculas del tipo 4-dialquilaminopiridinas generaban en condiciones de reacción suaves, mejores rendimientos, además de productos mucho más limpios.

A partir de piridina se pueden sintetizar 4-dialquilaminopiridinas en dos pasos [9]. Comparados con la piridina, estos derivados son aproximadamente 104 veces más activos cuando se usan como catalizadores de acilaciones. Estos catalizadores están usándose cada vez con mayor frecuencia para reacciones de acilación que no se llevan a cabo usando solo piridina o en el caso que se obtenga, el rendimiento es muy poco. Las 4-dialquilaminopiridinas son los catalizadores útiles especialmente en la acilación de alcoholes impedidos estéricamente y sensibles en condiciones ácidas,

proporcionando así una alternativa al procedimiento usual de tratar alcóxidos de sodio o magnesio con cloruros de acilos. [5].

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

El tratamiento de alcoholes, aminas y fenoles con anhídrido acético en piridina ha sido el método general por excelencia empleado en el último siglo para procesos de acilaciones. Sin embargo, este método ha arrojado resultados insatisfactorios sobre compuestos desactivados. Esto no fue sino hasta mediados de 1960 en que dos grupos por separado prepararon la 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP), la cual es muy superior a la piridina como catalizador en la acilaciones difíciles. El 1-metilciclohexanol, a pesar de ser un alcohol estéricamente impedido, es acilado con un 86% de rendimiento cuando se utiliza anhídrido acético en DMAP y un equivalente de TEA (trietanolamina); a diferencia del 5% de rendimiento obtenido mediante procesos convencionales.



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

Figura 6

La preparación del DMAP consiste en un esquema general de preparación de piridinas 4-sustituidas, cuyo proceso puede ser altamente costoso a nivel industrial debido a la naturaleza de los procesos experimentales y los bajos rendimientos. Se

plantearon dos procesos factibles para su preparación a nivel industrial, de los cuales, uno de ellos exploran la obtención del DMAP a partir de la formación de la sal de piridilpiridinio para luego atacarla con un nucleófilo como la dimetilamina (DMA) o la N,N-dimetilformamida (DMF). [6]

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

La *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida es un compuesto orgánico con fórmula química $C_{13}H_{22}N_2$, cuyo uso principal es acoplar aminoácidos durante la síntesis de péptidos. Bajo condiciones estándar, existe en la forma de cristales blancos con un olor dulce y penetrante. Es muy soluble en diclorometano, tetrahidrofurano, acetonitrilo y dimetilformamida, pero es insoluble en agua. Este compuesto suele ser abreviado como DCC. [7]

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



Existen diferentes rutas para la síntesis de DCC:

Pri-Baraet y colaboradores⁷ usan acetato de paladio, yodo, y oxígeno para acoplar ciclohexilamina e isocianuro de ciclohexilo. Se han conseguido rendimientos de hasta 67% usando este procedimiento:



Tang y colaboradores⁷ condensaron dos isocianatos usando el catalizador $\text{ZP}(\text{MeNCH}_2\text{CH}_2)_3\text{N}$ con rendimientos del 92%: [7]

Usos sintéticos del DCC:

El DCC es un agente deshidratante para la preparación de amidas, cetonas, nitrilos. En estas reacciones, el DCC se hidrata para formar dicitclohexilurea (DCU), compuesto que es insoluble en agua. El DCC también puede ser usado para la inversión de la conversión de alcoholes secundarios ópticamente activos. [7]

Oxidación de Moffatt. Una solución de DCC y dimetilsulfóxido (DMSO) da origen a la denominada oxidación de Pfitzner-Moffatt. Este procedimiento es utilizado para la oxidación de alcoholes a aldehídos y cetonas. A diferencia de las oxidaciones mediadas por metales, las condiciones de reacción son suficientemente suaves para impedir la sobre oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos. Generalmente, se permite que reacciones tres equivalentes de DCC y 0,5 equivalentes de una fuente de protones en DMSO durante toda una noche a temperatura ambiente. La reacción es llevada a cabo con ácido. La oxidación de alcoholes primarios y de alcoholes secundarios procede de una forma similar. [7]

La deshidratación de alcoholes también se realiza usando DCC. Esta reacción procede produciendo la O-acilurea y el alqueno correspondiente:



También es empleada en la inversión de configuración de alcoholes secundarios por formación de un éster de formilo, seguido de saponificación. El alcohol secundario es mezclado directamente con DCC, formaldehído, y una base fuerte como el metóxido de sodio.

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

Finalmente, en las reacciones de copulación de péptidos promovidas por DCC el extremo N-terminal suele ser usado como el punto de unión al que se le agrega los monómeros de aminoácido. Para mejorar la electrofilicidad del grupo carboxilato, el átomo de oxígeno negativamente cargado debe ser activado hacia un mejor grupo saliente. Se usa DCC con este propósito. El átomo de oxígeno cargado negativamente actuará como un nucleófilo, atacando al carbono central en el DCC. El DCC estará temporalmente unido al grupo carboxilato mencionado anteriormente, formando un intermediario altamente electrofílico, que hace el ataque nucleofílico por el grupo amino terminal, sobre el péptido creciente, mucho más eficiente.[7]

ANTECEDENTES

En 1978, **Höfle** y colaboradores⁶, propusieron un método coherente e innovador para la preparación de la N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) y aplicaciones de la misma en diversas síntesis. La síntesis del DMAP puede ser racionalizada en dos pasos partiendo de la piridina. Comparada con la piridina, este derivado es 10^4 veces más activo cuando es usado como catalizador para acilaciones. Las dialquilaminopiridinas suelen emplearse frecuentemente cuando las reacciones de acilación son incompletas por procesos convencionales en piridina. Los autores realizaron además una revisión de las posibles aplicaciones del DMAP en terpenos, esteroides, carbohidratos y nucleósidos, o bien en la transformación de amino ácidos en α -acilaminocetonas y la polimerización de isocianatos. Adicionalmente, las sales de 4-dialquilaminopiridinio N-sustituidas pueden ser usadas en transferencias de grupos sensibles a nucleófilos en medios acuosos. [6]

En 2003, **Calmes** y colaboradores⁸, prepararon el ácido (S)-N-Boc-pipecólico y el (S)-N-Boc-2-piperidinometanol mediante la esterificación estereoespecífica inducida por DCC y DMAP con (S)- α -metil pantolactona, seguido por la saponificación y reacción de reducción de protector N-Boc. [8]

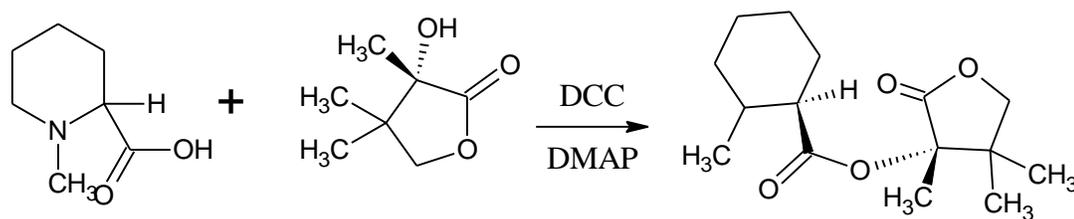


Figura 7

Es de importancia mencionar los buenos rendimientos obtenidos empleando tolueno a diferencia de métodos convencionales que emplean cloruro de metileno y la asistencia diastereoselectiva en la esterificación.[8]

En 2007, **Chung** y colaboradores⁹, presentaron su estudio sobre la síntesis y solubilidad de derivados hidrofílicos de β -sitosterol, los cual son conocido por su potencial para reducir los niveles de colesterol en sangre. Los procedimientos de esterificaciones se realizaron con polietilenglicol (PEG) y β -sitosterol con funcionalización carboxílica en presencia de un agente deshidratante, como el DCC y catálisis básica por DMAP.[9]

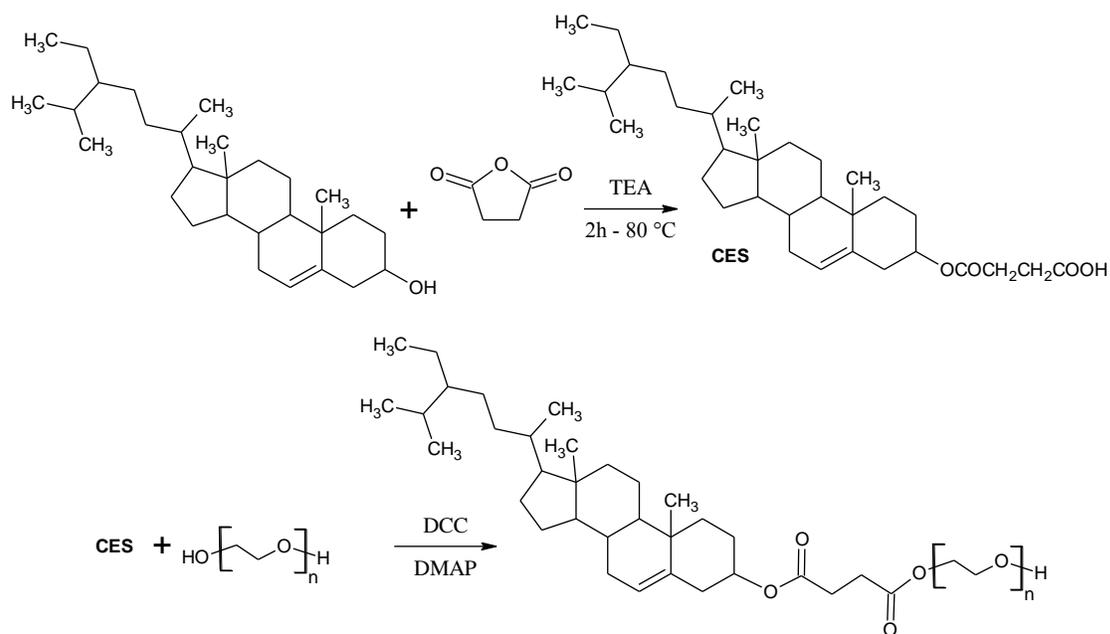


Figura 8

En el 2009, **Ko** y colaboradores¹⁰, presentaron un estudio sobre un protocolo general y eficiente para la reacción de adición de Michael de β -cetoesteres en agua

pura. Las reacciones fueron catalizadas exitosamente por el nuevo DMAP y los deseados aductos de Michael fueron obtenidos en altos rendimientos. [10]

En 2010, **Farshori** y colaboradores¹², reportaron un estudio con respecto a la esterificación mediante DCC/DMAP de ácidos grasos olefinicos con grupos hidroxí y sin ellos con β -sitosterol, así como su estudio de actividad antimicrobial *in vitro*. [12]

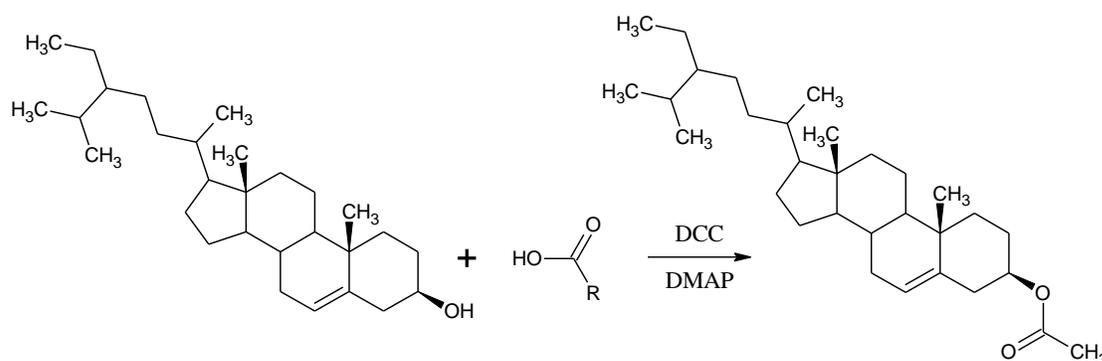


Figura 9

En 1990, **Neises** y colaboradores trabajaron en la esterificación de ácidos carboxílicos con diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-N,N-dimetilaminopiridina (4-DMAP) como catalizadores y encontraron rendimientos de reacción alrededor de 60-80 %. Los autores del trabajo generalizaron que a medida que el grupo R del ácido carboxílico era más ramificado, el rendimiento disminuía considerablemente. Si se trataban de ácidos carboxílicos aromáticos, cuando en el anillo se encontraban grupos dadores de densidad electrónica, el rendimiento se veía igualmente disminuido. El esquema 5 muestra un ejemplo de la reacción con DMAP y DCC: [11]

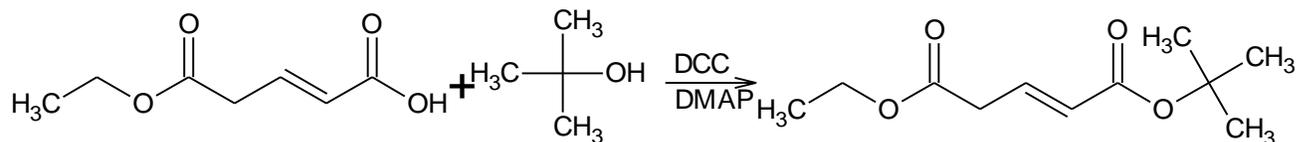


Figura 10

Esta reacción de esterificación es conocida como la Esterificación de Steglich y es una reacción que permite la fácil conversión de sustratos estéricamente impedidos y de sustratos sensibles a medio ácido, a sus ésteres correspondientes. También resultó ser un método conveniente y novedoso en cuanto al empleo de DCC y 4-DMAP como catalizadores simultáneos de reacciones de esterificación, más aún, para la formación de ésteres de *tert*-butilo ya que el *tert*-BuOH tiende a formar carbocationes e isobuteno luego de una eliminación subsecuente bajo las condiciones empleadas en la Esterificación Fischer. El mecanismo de la esterificación de Steglich inicia con una reacción entre la DCC y el ácido carboxílico, formando entonces una *O*-acilisoúrea intermediaria, la cual posee una reactividad similar al anhídrido del ácido correspondiente: [11]

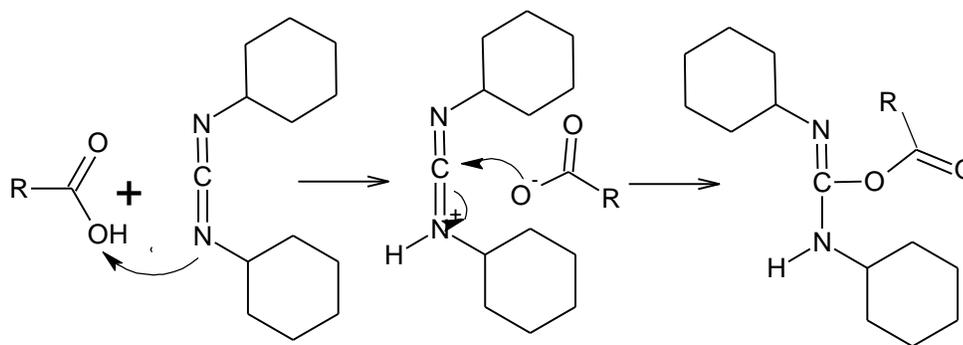


Figura 11

OBJETIVOS

Objetivo general

Esterificar la epiandrosterona como intermediario para el acoplamiento de la glicina.

Objetivos específicos

- Sintetizar la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) para su utilización como catalizador nucleofílico en la reacción de esterificación de la epiandrosterona.
- Esterificar la epiandrosterona con los sistemas: ácido succínico/DCC/DMAP y anhídrido succínico/DMAP.
- Acoplar la glicina a la epiandrosterona esterificada.
- Identificar los productos obtenidos, una vez purificados, por técnicas espectroscópicas.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Reactivos

- HCl Riedel-de Haën
- $MgSO_4$
- HNO_3
- Epiandrosterona
- Anisaldehido
- Ninhidrina
- Anhidrido acético
- Anhidrido succinico
- Acido succinico
- Glicina
- N,N-dimetiletildiamina
- Fenilalanina
- Lisina
- Cloruro de tionilo
- Hidroxido de potasio (KOH)
- Cloruro de sódio (NaCl)

Solventes

- Hexano
- Cloroformo
- Diclorometano *
- Etanol *
- N,N-dimetilformamida
- Metanol
- Tolueno

- Piridina

(*): Destilado

Determinación de datos Físicos

Punto de Fusión (Pf)

Se determinaron empleando el método con un tubo thiele.

Espectros Infrarrojo (IR)

Fueron registrados en un equipo IR-Thermo Nicolet Nexus 470 FT EFP, utilizando una pastilla de KBr.

Espectros de Resonancia Magnética de Protones (RMN¹H)

- BRUKER (300 MHz)

Se utilizó como referencia interna tetrametilsilano (TMS) y los desplazamientos químicos vienen dados en ppm hacia campos bajos de la señal del TMS. Los solventes vienen especificados en cada espectro.

Cromatografía Capa Fina (ccf)

Se utilizó como adsorbente silica gel Merck DC-60F₅₄, capa de 0,2 mm de espesor en placas de aluminio.

Cromatografía de Columna (cc)

Se utilizó como soporte silica-gel de Aldrich, 60 Å, con un área de superficie de 500 m²/g y un volumen de 0,75 cm³/g (70-230 MESH ASTM).

1.- Síntesis del DMAP

Se colocaron (10±1)mL de piridina en (50±1)mL de cloroformo, se dejó gotear aproximadamente (5±1)mL de cloruro de tionilo lentamente durante 15 minutos en condiciones de reflujo hasta que se observó la formación de cristales amarillos en las paredes del recipiente, los cuales correspondieron a la sal de cloruro de piridinpiridinio la cual es sensible a la humedad. Se procedió a destilar la piridina, el cloruro de tionilo y el cloroformo. Al producto se le colocaron (15±1) mL de N,N-dimetilformamida, manteniéndose en reflujo a 155 °C aproximadamente durante 3 horas. Se añadió hidróxido de potasio al 20% asegurándose de mantener un pH básico, manteniéndose con agitación y calor. La solución obtenida fue de color rojo oscuro y muy viscosa, y se dejó reposar durante un día. La mezcla de reacción se extrajo con benceno. Los extractos se unieron, fueron secados con sulfato de sodio y filtrado. Se evaporó a presión reducida. El producto se purificó mediante cromatografía de columna con una mezcla de solventes cloroformo/hexano (1:1). Todas las reacciones fueron seguidas por CCF. Se obtuvieron (5,32452±0,00001)g (43,58mmol). El punto de fusión del producto obtenido fue de (110-114)°C. El rendimiento de esta reacción fue de 35%.

2.- Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético.

2.1.- En presencia de la 4-DMAPy DCC en cloroformo.

Se agregaron (10,0±0,1)mL de anhídrido acético, (0,71003±0,00001)g (3,670mmol) de dicitclohexilcarbodiimida, (1,04255±0,00001)g (3,590mmol) de epiandrosterona y cantidades catalíticas de la 4-DMAP en suficiente cloroformo. Se formó una mezcla heterogénea de color amarillento. Luego de 3 horas se realizó CCF para comprobar la formación de un producto. Se filtró para separar los productos colaterales formados (dicitclohexilurea y DCC sin reaccionar). Se recrystalizó con agua/ácido acético. Se obtuvieron (1,12042±0,00001)g (3,37mmol). El rendimiento de esta reacción fue de 94%.

2.2.- En presencia de la DCC y cloroformo.

Se agregaron (10±1)mL de anhídrido acético, (0,71339±0,00001)g (3,677mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y (1,02633±0,00001)g (3,533mmol) de epiandrosterona en suficiente cloroformo. Se formó una solución de color blanco homogénea. Se agregó cloroformo para homogeneizar la mezcla. Luego de 3 horas se realizó CCF y se observó la formación de un producto. Se filtró para separar los productos colaterales formados (dicitclohexilurea y DCC sin reaccionar). El producto se recrystalizó con agua/ácido acético, se filtró y se dejó secar. Se obtuvieron (1,15404±0,00001)g (3,47mmol). El rendimiento fue de 98%.

3.- Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido succínico.

3.1.- En presencia de la 4-DMAP, DCC y cloroformo.

Se agregaron (1,00890±0,00001)g (3,47358mmol) de epiandrosterona, (0,33756±0,00001)g (3,44244mmol) de anhídrido succínico, DMAP en cantidades catalíticas y (0,71000±0,00001)g (3,44660mmol) de Dicitclohexilcarbodiimida (DCC), en

(20±)mL de cloroformo. Se mantuvo en condiciones de reflujo durante 5 horas, momento en el cual se observó la formación de cristales disueltos en una solución de color naranja. Se realizó una extracción con cloroformo y se recristalizó con ácido acético/agua, se filtró y se dejó secar. La purificación del compuesto se realizó empleando cromatografía en columna con una mezcla de solventes de cloroformo/Metanol en 8:2. Se obtuvieron (0,96654±0,00001)g y un rendimiento del 47%

3.2.- En presencia de trietanolamina y dicloroetano.

Se agregaron (1,33987±0,00001)g (4,61308mmol) de epiandrosterona, (0,81809±0,00001)g (8,34288mmol) de anhídrido succínico, (0,5±)mL de trietanolamina en (40±)mL de 1,2-dicloroetano. Se dejó reaccionar en reflujo y agitación durante 5 días sin obtener algún producto (la reacción fue seguida por CCF), Se agregó entonces un exceso de (0,80505±0,00001)g (8,2099mmol) de anhídrido succínico y pasado 1 día no se observó la formación de algún producto.

3.3.- En presencia de 4-DMAP y tolueno.

Se agregaron (1,42994±0,00001)g (14,58253mmol) de anhídrido succínico, (1,00000±0,00001)g (3,44293mmol) de epiandrosterona, cantidades catalíticas de 4-N,N-dimetilaminopiridina (4-DMAP) en suficiente tolueno. Después de aproximadamente 1 semana en condiciones de reflujo se observó mediante CCF la formación de un producto más polar que puede corresponder al producto de esterificación. Se filtró para separar la solución de los sólidos que quedaron sin reaccionar y productos colaterales y se purificó en una placa preparativa. Se obtuvieron (1,06917±0,00001)g del producto de esterificación con un rendimiento del 44%.

4.- Esterificación de la epiandrosterona con ácido succínico.

4.1.- En presencia de 4-DMAP, DCC y cloroformo.

Se agregaron 5g (17,21467mmol) de epiandrosterona, (2,04573±0,00001)g (9,38408mmol) de ácido succínico, (3,56465±0,00001)g (17,30413mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) en cantidades catalíticas en suficiente cloroformo. La reacción se llevó a cabo con agitación a temperatura ambiente. En esta reacción se obtuvieron varios productos colaterales y reactivos sin reaccionar, entre estos la dicitclohexilurea, DCC sin reaccionar, ácido succínico sin reaccionar y un sólido blanco con un punto de fusión de 162-165°C, el cual no corresponde con ninguno de los reactivos que quedaron sin reaccionar. Debido a la complejidad de la purificación por las polaridades tan similares entre ambos compuestos no se pudo determinar el rendimiento de la reacción.

4.2.- En presencia de DCC y cloroformo.

Se agregaron (1,64272±0,00001)g (13,92136mmol) de ácido succínico, (0,97020±0,00001)g (3,34033mmol) de epiandrosterona y (0,67031±0,00001)g (3,25393mmol) de dicitclohexilcarbodiimida en suficiente cloroformo. Después de 1 día, en condiciones de reflujo y agitación, se observó mediante CCF la formación de un producto más polar que corresponde a la epiandrosterona esterificada. El producto esterificado se purificó utilizando una placa preparativa empleando una mezcla diclorometano/etanol 50:0,4 mL, obteniéndose (1,31329±0,00001)g con un rendimiento del 40%.

4.3.- En presencia de 4-DMAP, DCC y cloroformo.

Se agregaron $(0,56412 \pm 0,00001)$ g $(1,94223\text{mmol})$ de epiandrosterona, $(0,99477 \pm 0,00001)$ g $(0,84303\text{mmol})$ de ácido succínico, $(1,02854 \pm 0,00001)$ g $(4,99291\text{mmol})$ de dicitclohexilcarbodiimida y 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) en cantidades catalíticas en suficiente cloroformo. Después de 1 día de reacción en condiciones de agitación a temperatura ambiente se observó, mediante CCF, la formación de un producto más polar correspondiente a la esterificación de la epiandrosterona. Este producto se filtró para eliminar productos colaterales sólidos, se purificó empleando una placa preparativa en una mezcla de solventes cloroformo/etanol 50:0,2 mL. Se obtuvieron $(1,11259 \pm 0,00001)$ g con un rendimiento del 43%.

5.- Acoplamiento de la glicina a la epiandrosterona esterificada

5.1.- En presencia de DCC en N,N-dimetilformamida.

Se agregaron $(0,03897 \pm 0,00001)$ g $(0,09979\text{mmol})$ del producto de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido succínico obtenidos en la tercera reacción con $(0,02448 \pm 0,00001)$ g $(0,11883\text{mmol})$ de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) en suficiente dimetilformamida durante 4 horas para lograr la reacción de la DCC con el grupo ácido del producto de esterificación. Luego se procedió a agregar $(0,02365 \pm 0,00001)$ g $(0,31533\text{mmol})$ de glicina. Después de 2 horas se observó un cambio en la coloración de la solución pasando de ser amarilla a anaranjada. Se agregó agua para extraer la N,N-dimetilformamida y la glicina que haya quedado sin reaccionar del medio de reacción. El producto obtenido se reextrajo con cloroformo y se seco con sulfato de magnesio, se filtró, se dejó evaporar y se obtuvieron $(0,05046 \pm 0,00001)$ g.

Este producto tuvo un punto de fusión de (145-150)°C. El sólido formado fue de color anaranjado oscuro.

5.2.- En presencia de DCC y N,N-dimetilformamida

Se emplearon (0,28802±0,00001)g del producto de esterificación obtenido en la reacción 4.3 el cual contenía trazas de epiandrosterona que quedaron sin reaccionar. Se agregaron (0,05216±0,00001)g (0,25281mmol) de DCC en suficiente N,N-dimetilformamida, luego de 3 horas se adicionaron (0,01964±0,00001)g (0,26163mmol) de glicina. Luego de 5 horas de reacción en condiciones de reflujo se observó la formación de un producto menos polar que el compuesto esterificado mediante CCF. Se purificó empleando una placa preparativa en la que se obtuvieron (0,00247±0,00001)g con un rendimiento del 1%.

5.3.- En presencia de DCC y N,N-dimetilformamida.

Se empleó en esta reacción de igual forma que en la reacción 5.2 el producto de esterificación obtenido en la reacción 4.3 el cual contenía trazas de epiandrosterona que quedó sin reaccionar. Se agregaron entonces (0,35432±0,00001)g. Se agregó un exceso de DCC en suficiente N,N-dimetilformamida. Después de 3 horas de reacción en condiciones de reflujo se agregó un exceso de glicina y luego de 5 horas de reacción se observó mediante CCF la formación de un producto de polaridad ligeramente diferente a los materiales de partida

5.4.- En presencia de DCC, N,N-dimetilformamida y agua.

Se emplearon $(0,03897 \pm 0,00001)$ g $(0,01047$ mmol) del producto de esterificación obtenido en la reacción 3.3 y cantidades catalíticas de DCC en una mezcla 50:50 de agua/DMF. Luego de 3 horas se agregó un exceso de glicina y se dejó reaccionar durante 5 horas. Se observó la formación de un sólido blanco el cual fue insoluble en cloroformo y metanol cuyo punto de fusión fue de 230°C aproximadamente ya que a esta temperatura se fundió y ennegreció. Mediante CCF no se observó la formación de algún producto de interés.

6.- Acoplamiento de la N,N-dimetiletilendiamina al producto de esterificación.

Se agregaron $(0,00902 \pm 0,00001)$ g $(0,02309$ mmol) de producto de esterificación de la reacción 4.3, un exceso de DCC, $(2,00 \pm 0,01)$ mL de N,N-dimetiletilendiamina en suficiente DMF. Se dejó reaccionar durante 1 día con agitación a temperatura ambiente y mediante CCF se observó la formación de un producto de mayor polaridad que los materiales de partida. Se purificó empleando una placa preparativa con metanol como fase móvil. Se obtuvieron $(0,01671 \pm 0,00001)$ g de un producto que no se encontraba completamente puro.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1.- Síntesis de la N,N-4-DMAP

Para la síntesis de la 4-*N,N*-dimetilaminopiridina se empleó una modificación del método reportado en 1978 por Höfley y col.⁶, quienes realizaron la síntesis a escala industrial, empleando SOCl₂, piridina y DMF. El siguiente esquema muestra los pasos usados para dicho proceso:

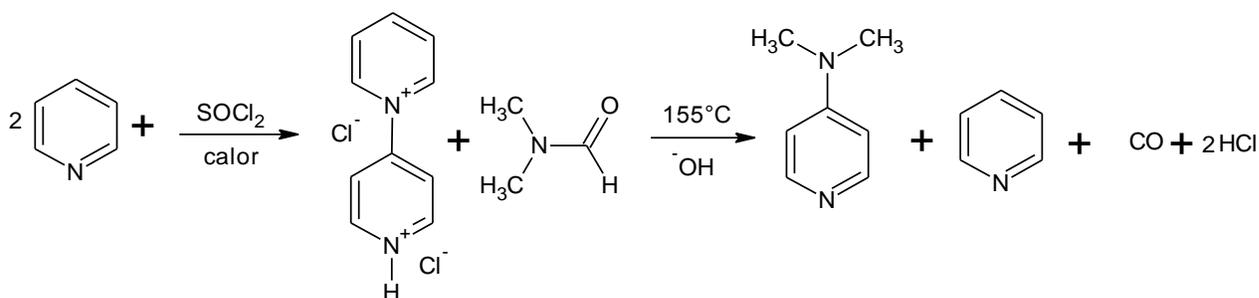


Figura 12

Para poder llevar a cabo esta reacción a una escala menor, el primer paso consistió en estudiar las posibles causas del bajo rendimiento de la misma, entre un 15%-20%. Una posible causa, podría ser el aislamiento del intermediario cloruro de *N*-[4-piridilo]piridinio, ya que dicho compuesto es deliquescente¹³. Por esta razón se realizó la preparación de la 4-DMAP a través de una secuencia de reacciones sin purificar el intermediario.

En el procedimiento empleado para preparar la 4-DMAP (reacción 1), se pudo apreciar la rápida formación de un sólido negrozco al momento de mezclar la piridina con el Cloruro de tionilo (SOCl₂), además del calentamiento espontáneo de dicha

mezcla (reacción exotérmica). Finalmente, luego de someter esta mezcla a reacción con DMF y de todo el tratamiento de purificación, no se apreció la formación del producto sólido esperado. Este resultado puede atribuirse a la posible descomposición de la sal cloruro de *N*-[4-piridilo]piridinio o a la no formación de esta.

En 1960, McElvain y col.¹³, al emplear Br₂/piridina para formar el intermediario bromuro hidrobromuro de *N*-[4-piridilo]piridinio descubrieron que la obtención del sólido negro e insoluble durante la síntesis es debido a una polimerización de la piridina como consecuencia de la activación de las posiciones 2 y 4 del anillo piridínico cuya reactividad se ve asistida por efecto de la temperatura. Por esta razón, considerando las premisas de los estudios de McElvain y col.¹³, la temperatura de reacción fue controlada con la finalidad de disminuir la formación del polímero de la piridina favoreciendo así la síntesis de la sal intermediaria cloruro de *N*-[4-piridilo]piridinio. Efectivamente, luego de este control térmico, la adición de la DMF, reflujo, hidrólisis con KOH al 20% y todo el tratamiento de purificación, se logró obtener el producto esperado con un rendimiento de 35%, rendimiento que fue mucho mayor al reportado en 2004 por Kumary col.¹⁴. Aunque el mecanismo no ha sido bien establecido^{15,16}, los resultados indican que la temperatura es un factor importante en el curso de la reacción. Algunos autores han planteado una posible ruta como mecanismo de la síntesis del intermediario cloruro de *N*-[4-piridilo]piridinio desde piridina y SOCl₂¹⁷. Se puede apreciar el posible mecanismo de esta reacción en la siguiente figura:

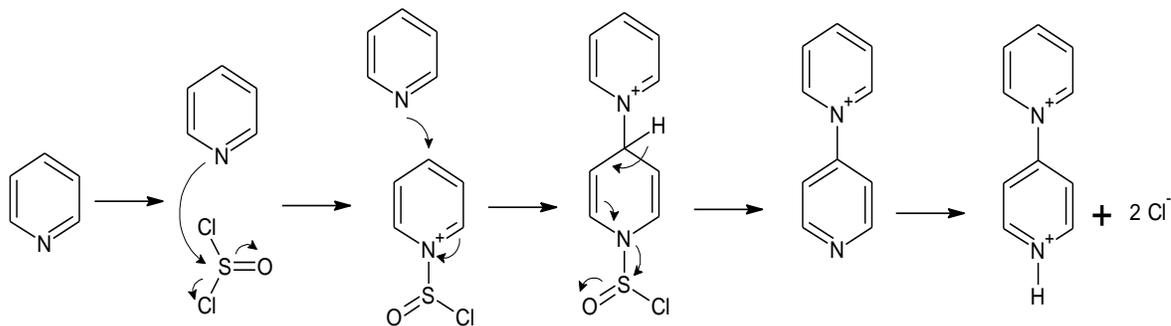


Figura 13

Algunas de las propiedades físicas medidas para la 4-N,N-Dimetilaminopiridina (4-DMAP) son mostradas en la siguiente tabla:

Tabla 1. Propiedades físicas de la 4-N,N-DMAP

Punto de fusión (°C)	Aspecto	Solubilidad en algunos solventes	
112-114	Sólido en forma de pequeñas agujas de color amarillo-rojizo	Agua	Soluble
		Hexano	Soluble
		Benceno	Soluble
		Diclorometano	Soluble
110-112		Acetona	Soluble
		Cloroformo	Soluble
		Acido acético	Soluble
		Metanol	Soluble

Para ratificar que el compuesto sintetizado se trataba del producto esperado, se realizó su caracterización mediante análisis espectroscópicos, empleando las técnicas de Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear de Protones (^1H -RMN). Se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 2. Señales importantes del espectro 1 de IR de la 4-DMAP

v [cm-1]	Intensidad y forma	Asignación
2922,74	Intensa y aguda	C sp ³
1735,94	Intensa y poco aguda	C sp ²
1445,01	Intensa y poco aguda	C=C
1103,48	Intensa y aguda	C-N

En el espectro de IR de la 4-DMAP (Espectro 1, KBr), se observa una banda aguda e intensa a 2922,74 cm⁻¹ propia de las vibraciones de tipo tensión de los enlaces Csp³-H de los grupos metilos localizados sobre el nitrógeno de la posición 4 de la piridina; a 2853,93 cm⁻¹ se observa nuevamente una banda aguda e intensa que corresponde a los estiramientos Csp³-H de los grupos metilos; a 1735,94 cm⁻¹ se aprecia una banda aguda de intensidad baja que podría pertenecer a impurezas de DMF, mientras que a 1445,01 cm⁻¹ se observa una señal aguda de baja intensidad que pertenece a la vibración de flexión de los enlaces C-C sp² de la piridina. Posteriormente, se observa una señal media a 1103,48 cm⁻¹ que podría corresponder a la tensión del enlace C-N en la posición 4 del anillo piridínico¹⁸.

Tabla 3. Señales reportadas y señales experimentales del espectro 2 de ¹H-RMN de la 4-DMAP.

δ teórico (ppm)	δ experimental (ppm)	Multiplicidad	Asignación
8,44	8,2	Doblete de doblete	H unidos a los C del anillo piridinico
6.64	6,47	Doblete de doblete	H unidos a los C del anillo

			piridinico
2,78	2,98	Singlete	H unidos a los C de los metilos

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Espectro 2, CDCl_3) se pueden observar tres señales, la señal a 8,20 ppm con una integración relativa a un protón, se asigna a los protones H-2 y H-6 de la piridina; la señal a 6,47 ppm con una integral relativa a un protón, es asignada a los protones H-3 y H-5 de la piridina (menos apantallados que H-2 y H-6), y la señal a 2,98 ppm con una integral relativa a 3 protones, se asigna a los protones metílicos del grupo amino en la posición 4 del anillo piridínico, en total aparecen 5 tipos de protones. Cabe enfatizar que el par de protones H-2 y H-6, al igual que H-3y H-5, así como también los protones de los grupos $-\text{CH}_3$ son química y magnéticamente equivalentes, por lo tanto sólo se aprecian tres singletes en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de la 4-DMAP.

2.-Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético.

Los procedimientos experimentales planteados para la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético, la DCC y cloroformo en presencia o no de la 4-DMAP en las reacciones 2.1 y 2.2, mostraron altos rendimientos lo cual afirma que a pesar del impedimento estérico del alcohol (epiandrosterona), el anhídrido acético por ser tan pequeño y reactivo es un buen nucleófilo capaz de reaccionar con esta y generar un producto de esterificación con rendimientos alrededor del 95%. Las reacciones fueron seguidas mediante cromatografía de capa fina para observar la formación de los productos. En general la reacción fue la siguiente:

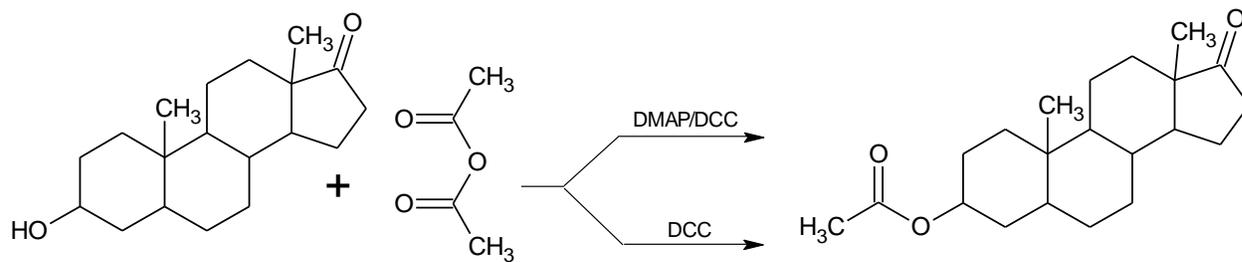


Figura 14.

A continuación en la figura 15 se muestra el posible mecanismo a través del cual ocurre la reacción 2.1

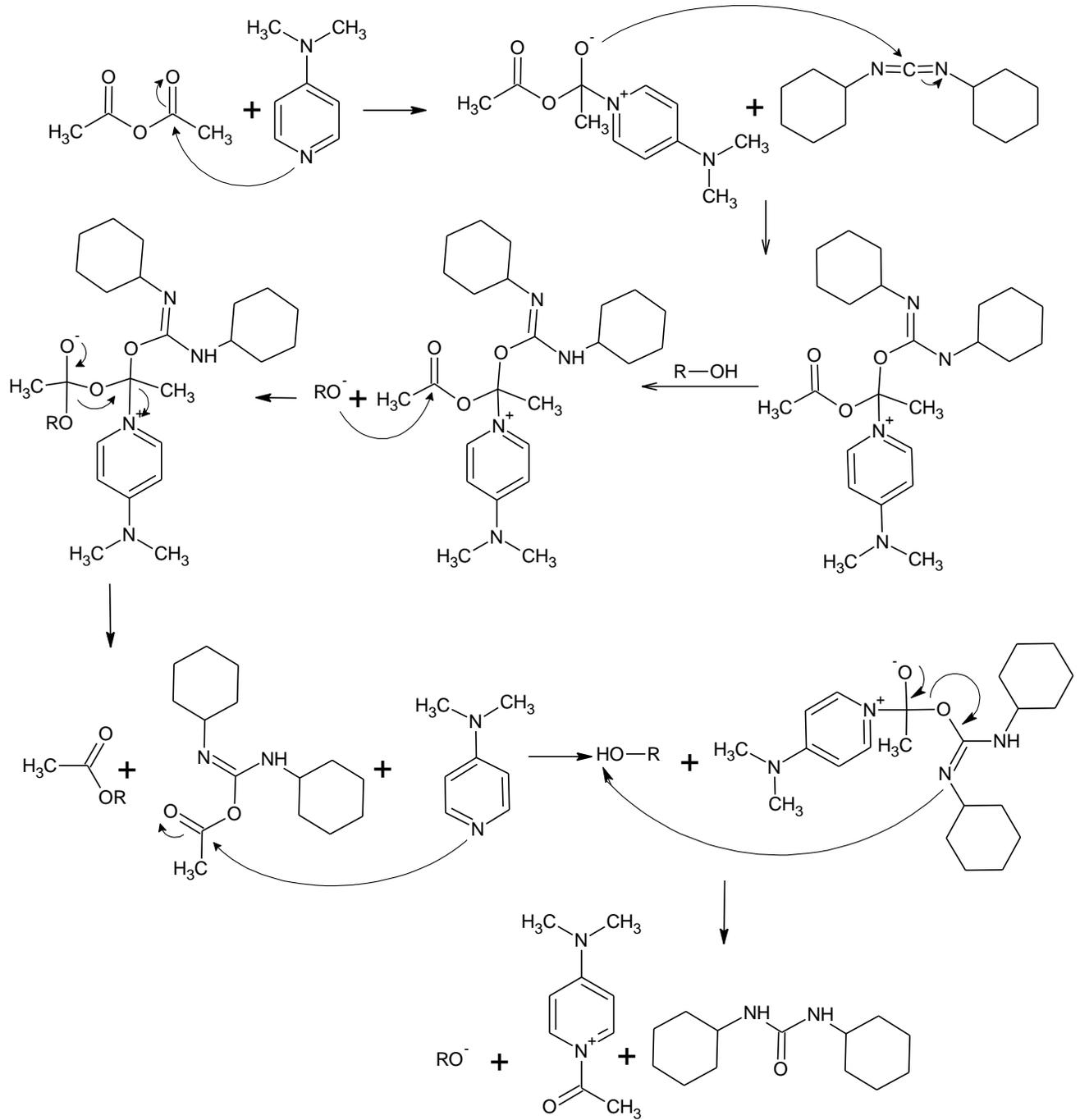


Figura 15.

El mecanismo que puede justificar la reacción 2.2 es el siguiente.

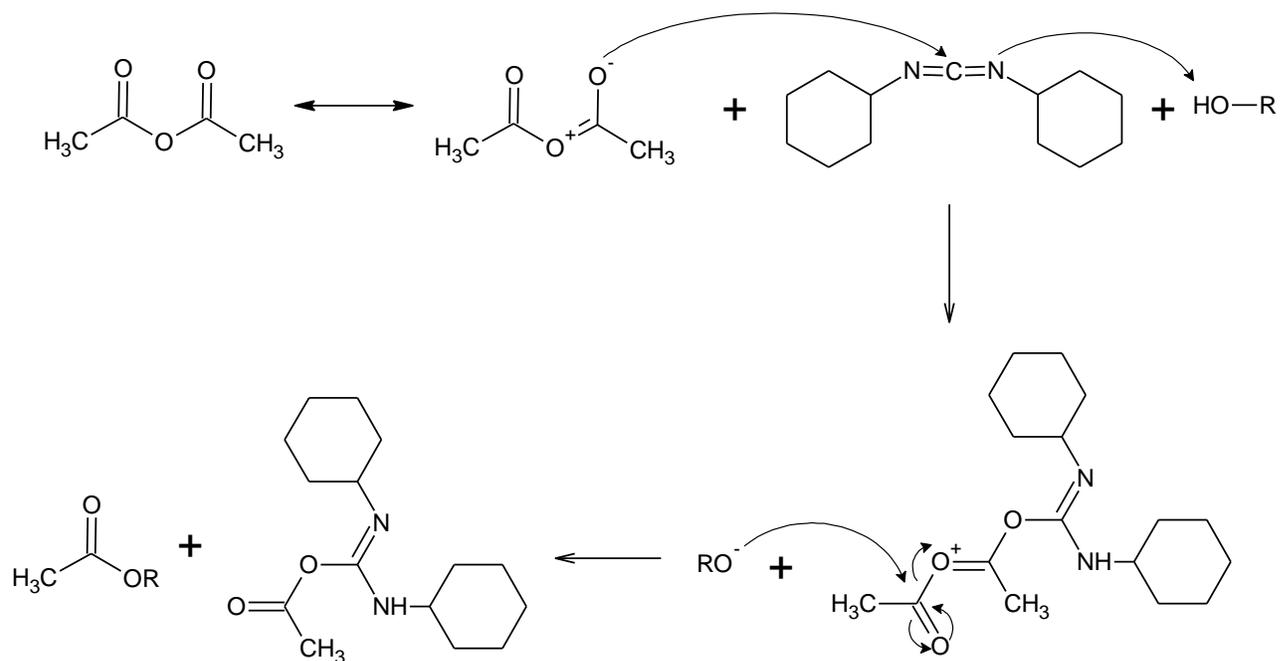


Figura 16.

Para confirmar que el compuesto sintetizado se trataba del producto esperado, se realizó su caracterización mediante análisis espectroscópicos, recurriendo a las técnicas de Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear de Protones (^1H -RMN). Se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 4. Señales importantes del espectro 4 IR de la 3 β -acetoxi-5 α -androst-17-ona

v [cm-1]	Intensidad y forma	Asignación
2930,6	Intensa y aguda	C sp ³
1735,6	Muy intensa y aguda	C=O (Carbonilo C17)
1716,9	Muy intensa y aguda	C=O (acetilo)
1374,5	Baja intensidad y aguda	CH ₃
1247,6	Intensa y aguda	O-C(O)-C
1029,3	Baja intensidad y aguda	C-O

En el espectro (Espectro 4, KBr) de infrarrojo del producto de esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético se observó una banda intensa y aguda en 2930,6 cm⁻¹ correspondiente a enlaces C-H correspondientes a vibraciones de tensión de enlaces en alcanos. En 1735,6 cm⁻¹ también se observó una banda pero de mayor intensidad y aguda la cual se pudo asignar a las vibraciones de tensión en el grupo C=O del ester formado. La señal de 1716,9 cm⁻¹ fue muy intensa y aguda pero pudo corresponder a las vibraciones de tensión de enlace del C=O del acetilo. La señal de 1374,5 cm⁻¹ de baja intensidad también, fue asignada a la deformación en los CH₃. La señal en 1247,6 cm⁻¹ aguda e intensa fue asignada a las vibraciones de tensión en O-C(O)-C. Finalmente la señal de 1029,3 cm⁻¹ de baja intensidad correspondía con vibraciones de enlace del C-O que forma parte del grupo ester. Cabe destacar también que la señal del grupo O-H de la epiandrosterona no apareció en este espectro lo que confirma que se llevó a cabo la esterificación.

3.- Esterificación de la epiandrosterona con anhídrido succínico.

El procedimiento experimental planteado mostraba la esterificación de el anillo A de la epiandrosterona en la posición 3 donde se encuentra el grupo –OH. Se emplearon entonces varios métodos de esterificación cada uno e diferentes condiciones como se mostró en las reacciones 3.1, 3.2 y 3.3. Las reacciones se siguieron empleando cromatografía de capa fina y empleando como solvente cloroformo. Los compuestos fueron purificados empleando placas preparativas y diclorometano/etanol como fase móvil.

Los procedimientos experimentales empleados fueron los siguientes:

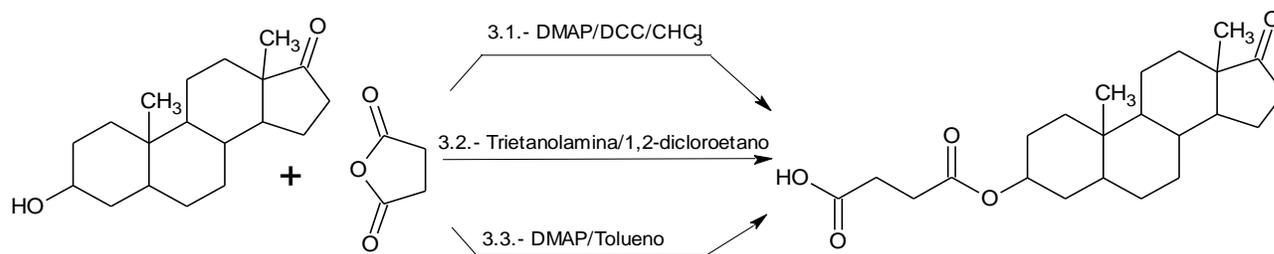


Figura 17.

Los procedimientos 3.1 y 3.3 permitieron la formación del producto esterificado con rendimientos del 47 y 44% respectivamente mientras que en el procedimiento 3.2 no se observó la formación de ningún producto.

4.- Esterificación de la epiandrosterona con ácido succínico

Se planteó para la esterificación de la epiandrosterona en el carbono 3 de su esqueleto, un método con ácido succínico mostrado en la siguiente figura:

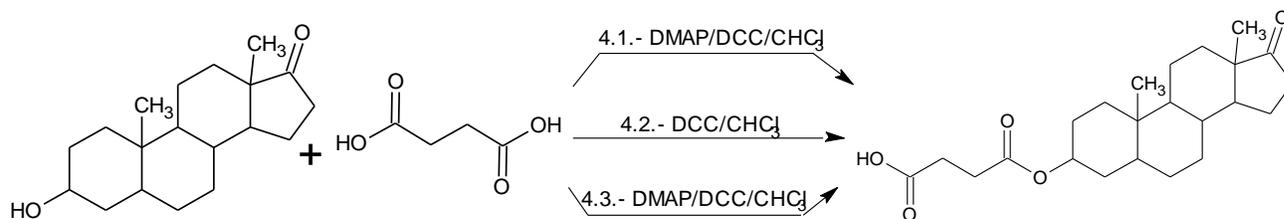


Figura 18.

En las condiciones 4.2 y 4.3 se obtuvo un producto con 40 y 43% respectivamente, mientras que en la reacción 4.1 debido a problemas por la similitud entre las polaridades del producto esterificado y la epiandrosterona, no se pudo aislar para su caracterización.

Para confirmar que el compuesto sintetizado tanto en las reacciones del apartado 3 y 4 se trataba del producto esperado, se realizó su caracterización mediante análisis espectroscópicos, recurriendo a las técnicas de Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear de Protones (¹H-RMN) y de Carbonos (¹³C-RMN). Se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla 5. Señales importantes del espectro 5 de IR de la epiandrosterona esterificada con anhídrido y ácido succínico.

v [cm⁻¹]	Intensidad y forma	Asignación
2925,5	Intensa y aguda	C sp ³
2854,5	Baja intensidad y aguda	C sp ³
1726,6	Intensa y aguda	C=O
1365	Muy intensa y aguda	O-C(O)-C

Las señales en 2925 cm⁻¹ intensa y aguda, y 2854,5 cm⁻¹ de menor intensidad y aguda, fueron asignadas a las reacciones de tensión de los grupos -CH₃ de la epiandrosterona. La señal en 1726,6 cm⁻¹ correspondió con las vibraciones de tensión del grupo C=O del ester formado. Finalmente la señal en 1365 cm⁻¹ la cual es aguda y muy intensa, corresponde al O-C(O)-C del ester. No se observó la señal del grupo -OH lo cual indica que ocurrió una reacción sobre este grupo; además se apreció que existe una banda de -OH pero correspondiente a un ácido carboxílico que se encuentra en el extremo opuesto de la cadena acoplada a la epiandrosterona.

Tabla 6. Señales características del espectro de ¹H-RMN para la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico

δ teórico (ppm)	δ experimental (ppm)
4,88	4,13
2,51	2,6
0,9	0,88

A continuación se presenta la numeración asignada a los carbonos en la estructura de la epiandrosterona esterificada con anhídrido y ácido succínico

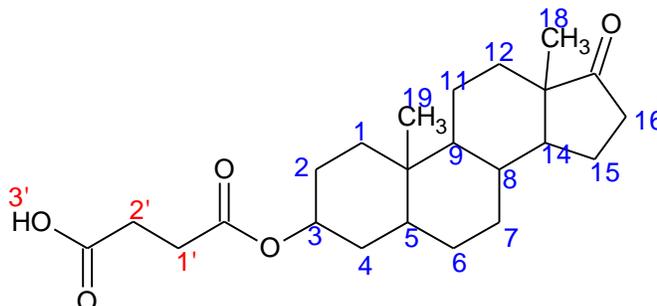


Figura 19

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ (Espectro 6, CDCl_3) se pueden observar tres señales, la señal a 4,70 ppm con una integración relativa a un protón, se asigna al protón del C3 de la epiandrosterona; la señal a 2,62 ppm es asignada a los protones del C1' y C2' del anhídrido succínico o ácido succínico añadido a la epiandrosterona, y la señal a 0,88 ppm con una integral relativa a 6 protones, se asigna a los protones metílicos de los C18 y C19 de la epiandrosterona.

En el espectro de $^{13}\text{C-RMN}$ (Espectro 7, CDCl_3) se observaron 7 señales características para la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico.

Tabla 7. Señales características del espectro 7 de $^{13}\text{C-RMN}$ para la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido succínico y ácido succínico

Desplazamiento teórico (ppm)	Desplazamiento experimental (ppm)
220,9	220
171,85	177
171,23	172
74,16	74

29,45	30
17,59	20
13,82	13

A continuación se muestra la numeración empleada para la molécula para el análisis del espectro de carbonos.

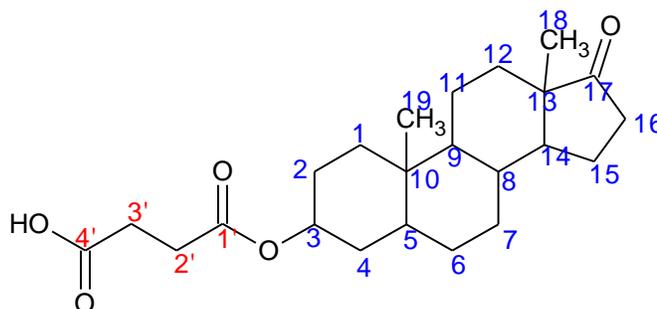


Figura 20.

Se observaron las señales de los grupos metilos del esqueleto de la epiandrosterona los cuales son el C18 y C19. El C3 se encuentra desplazado a campo bajo con respecto a la epiandrosterona ya que aparece en 74 ppm y aparecía en 68 ppm, lo cual es un indicador de una modificación estructural sobre este carbono. Los carbonos C2' y C3' aparecieron en 30 ppm y alrededor de este valor se encuentran también los Csp² del resto de la estructura del androstano. También se considera la aparición de nuevas señales en 172 y 177 ppm las cuales fueron asignadas a los C1' y C4' de la cadena añadida. Los análisis demuestran que si se pudo haber realizado la esterificación.

El producto de esterificación sobre la epiandrosterona se obtuvo con un moderado rendimiento. En todos los casos se recuperó material de partida. Los moderados rendimientos se pueden atribuir a las siguientes causas:

- Debido a que el éster que se forma posee un grupo ácido carboxílico que podría, a través de una reacción ácido base, mantener al catalizador de la reacción en su forma protonada afectando su acción catalítica y por consiguiente el rendimiento de la reacción.

- Otra posibilidad de reacción colateral es que, debido a que la acción de la 4-DMAP está inhibida por el ácido succínico, el carboxilato de este ácido podría reaccionar con la DCC para formar la *N*-succinildiciclohexilúrea

- Debido a la cecania del carboxilato succínico al acilo en los intermediarios, *O*-monosuccinildiciclohexilisoúrea y *N*-monosuccinildimetilaminopiridinio puede competir nucleofilicamente con el ataque de la 4-DMAP.

- Las reacciones de esterificación reportadas se realizan con ácidos monocarboxílicos por lo que no existen posibilidades de reacciones de ciclación intramolecular, mientras que en el caso del ácido succínico si hay cabida a esta posibilidad lo cual disminuye el rendimiento.

- Las esterificaciones para ácidos dicarboxílicos están reportadas para alcoholes primarios de terpenos mientras que en nuestra esterificación se trata de un alcohol secundario el cual presenta impedimento estérico. [23]

El mecanismo de reacción propuesto para esta esterificación con ácido succínico es el siguiente:

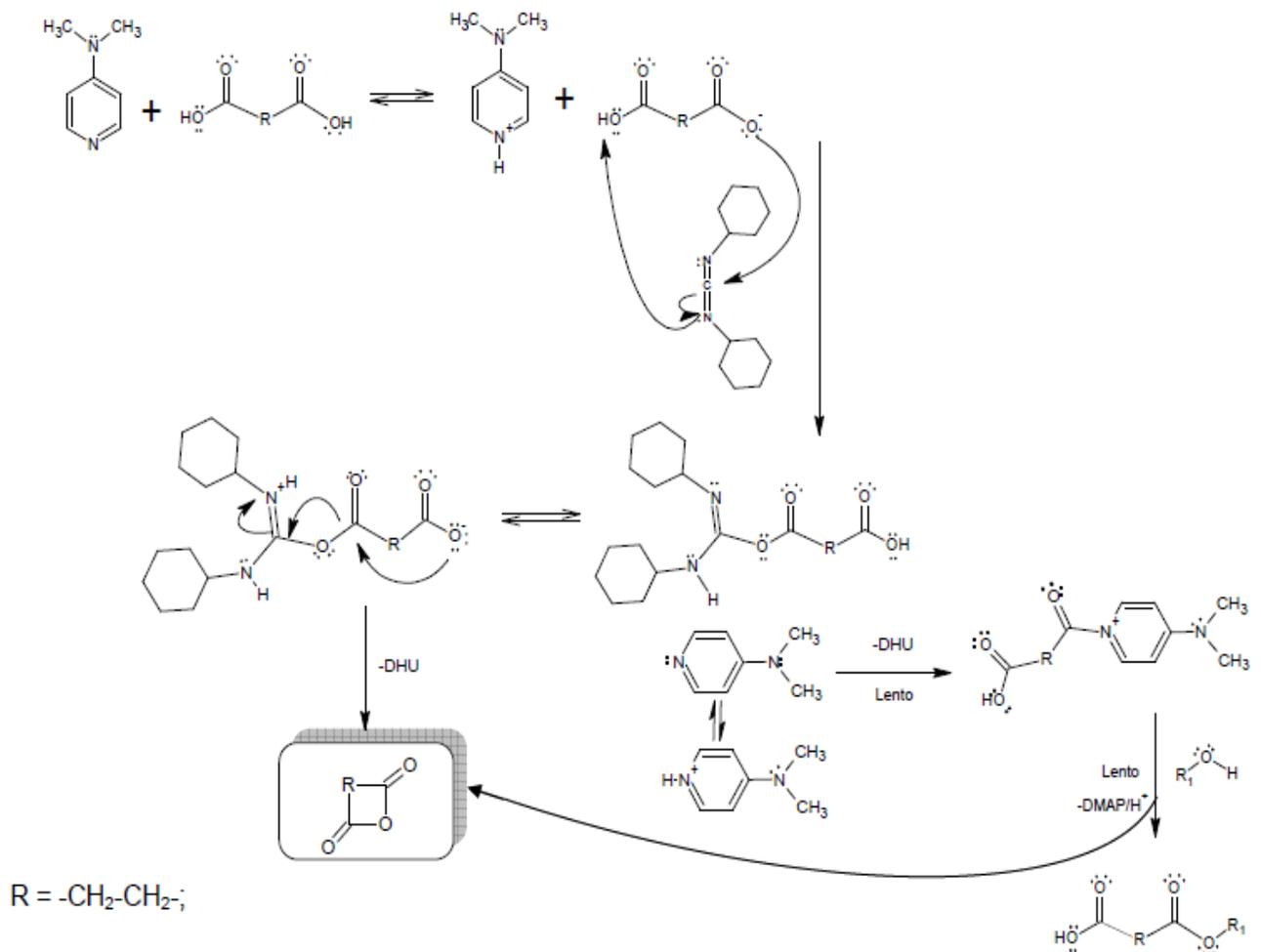
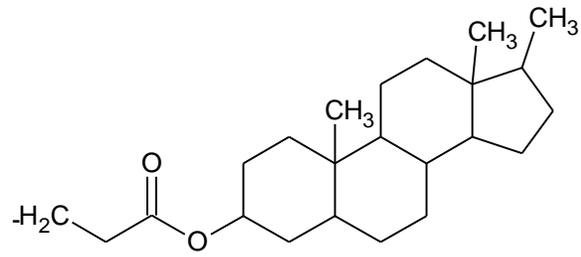


Figura 18

5.- Acoplamiento del aminoácido

La propuesta para el acoplamiento de la glicina a la epiandrosterona esterificada establecía la posibilidad de acoplar un aminoácido no protegido al grupo del ácido carboxílico del producto de esterificación en presencia de DCC y en DMF. Se empleó la DCC, como agente acoplante del ácido carboxílico del éster y para liberar la amina como se muestra a continuación en la figura 18:

Donde R es:



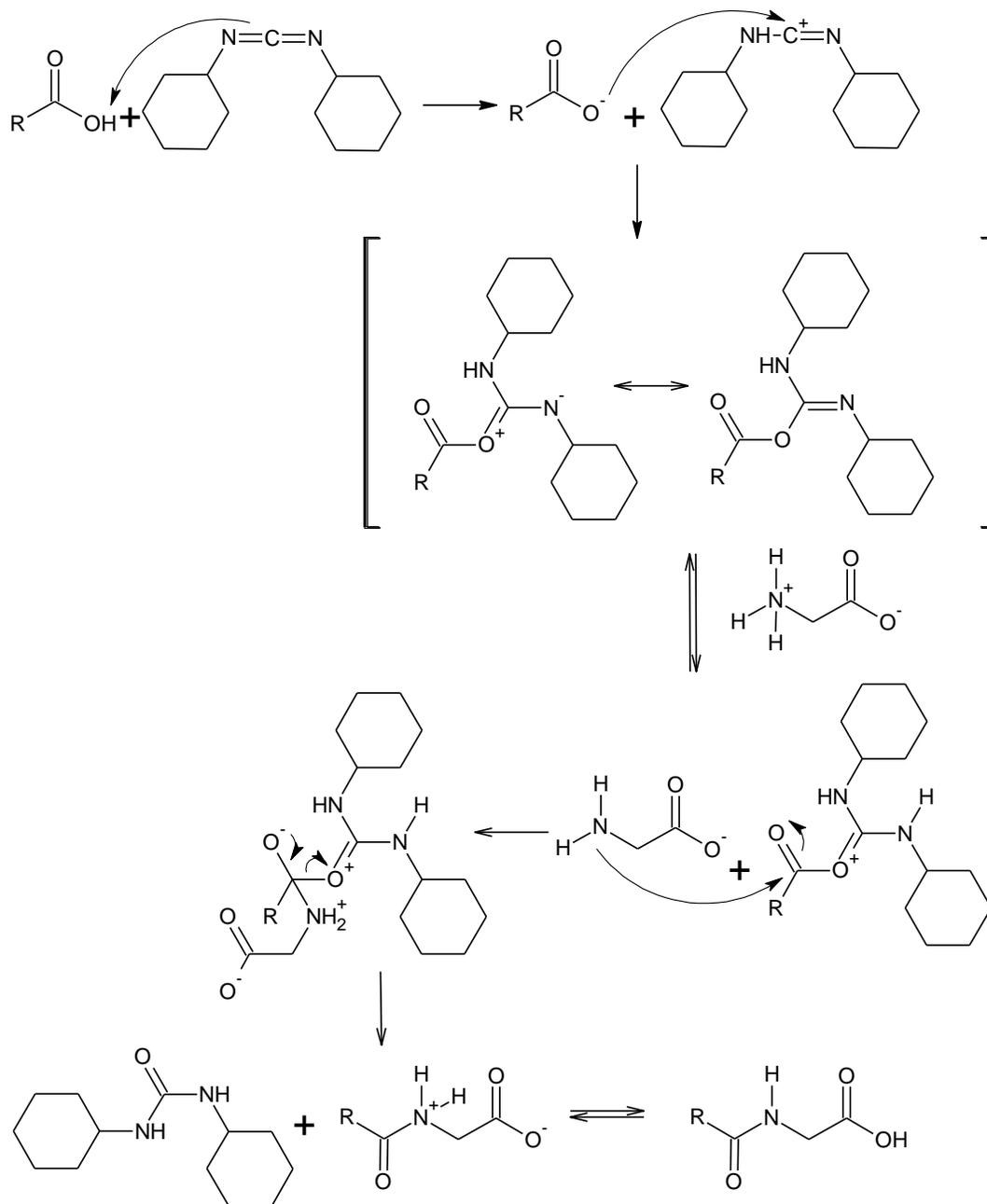


Figura 19

La utilización de la glicina para esta reacción obedeció al hecho de que es un aminoácido que no posee centros quirales por lo que no existía riesgo de epimerización.

Los resultados experimentales parecen indicar que la DCC sola, en ausencia de una base auxiliar, no promueve la reacción propuesta. Ni siquiera cuando ésta se llevó a cabo en condiciones de reflujo y por tiempos prolongados.

Otra posibilidad para realizar el acoplamiento era llevar a cabo la reacción a un pH por encima de 9,6. Más allá de este valor la glicina se encuentra en su forma aniónica. Ver figura 19. Sin embargo, a estas condiciones podría ocurrir la hidrólisis del éster, por tal razón no se trabajó en condiciones básicas. [22]

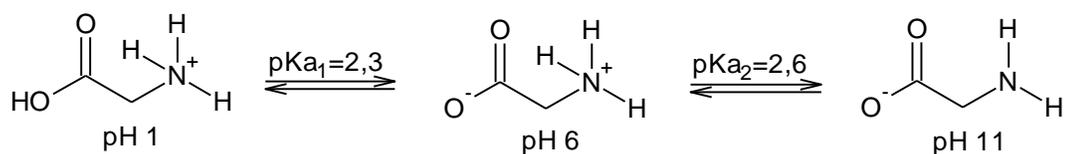


Figura 20.

Un problema adicional que se presentó fue que la glicina era insoluble en el solvente empleado (DMF), lo cual pudo disminuir el rendimiento de la reacción. En los solventes en los que si se pudo disolver la glicina no se pudieron disolver la epiandrosterona esterificada ni la DCC. Aunque se realizaron pruebas de solubilidad para otros aminoácidos cuyas propiedades físicas eran diferentes a las de la glicina el resultado fue similar. Ver tabla 6

Tabla 6. Solubilidades de algunos aminoácidos y aminos en diferentes solventes

Compuesto	Solvente			
	DMF en frío	DMF en caliente	CHCl ₃ en frío	CHCl ₃ en caliente
Glicina	Insoluble	Poco soluble	Insoluble	Insoluble
Fenilalanina	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Lisina	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble

Una manera de solventar el problema que se nos presentaba con de la solubilidad de estos compuestos en solventes orgánicos era disminuir su característica de sal interna. Para lograr esto, se puede proteger o bien el grupo amino o el grupo ácido. En nuestro caso en particular nos interesaba tener libre el grupo amino, ya que este era el nucleófilo. Sin embargo, la protección del grupo ácido, lo cual generalmente es a través de la formación de un éster tampoco parecía una buena opción ya que al desprotegerlo con los reactivos a nuestra disposición podríamos hidrolizar el éster de la epiandrosterona.

CONCLUSIONES

- Se sintetizó el catalizador 4-N,N-dimetilaminopiridina con un 35% de rendimiento.
- Se esterificó la epiandrosterona con anhídrido acético con los siguientes sistemas: en DCC/DMAP/Cloroformo y en DCC/Cloroformo con un 94 y 98% de rendimiento.
- Se esterificó la epiandrosterona con anhídrido succínico con las siguientes condiciones: en DMAP/DCC/Cloroformo y con DMAP/Tolueno con rendimientos de 27 y 34% respectivamente.
- Se esterificó la epiandrosterona con ácido succínico en las siguientes condiciones: DMAP/DCC/Cloroformo y DCC/Cloroformo con rendimientos del 13 y 20% respectivamente.
- Se acopló la N,N-dimetiletildiamina al producto de esterificación con ácido succínico generando un producto.
- Se intentó acoplar la glicina a los productos de esterificación de la epiandrosterona sin éxito debido a problemas de solubilidad, disponibilidad del par de electrones de la amina, pH de la solución y a la deficiencia de la DCC tanto como catalizador como agente acoplante.

RECOMENDACIONES

- Para que la DCC funcione de una manera más eficiente se requiere del uso de una base auxiliar como se muestra en el siguiente procedimiento:

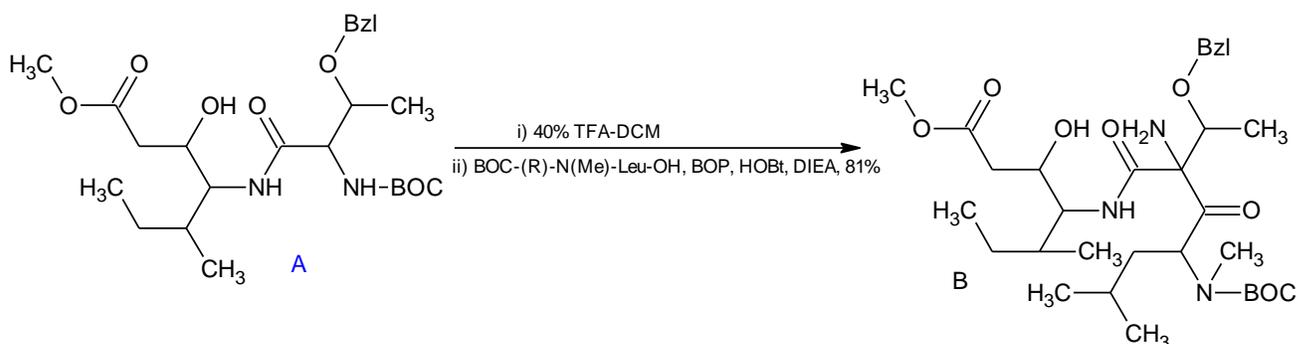


Figura 21

Una solución de HCl en dioxano fue añadida a "A" en dioxano y después de 50 minutos el solvente fue removido con Et₂O. El sólido obtenido se disolvió en DMF y añadido a una solución de BOC-R-N(Me)-Leu-OH en DMF a 0°C. HOBT, BOP y DIEA fueron añadidos sucesivamente y esta mezcla fue agitada por 24 horas. El solvente fue removido y el residuo secado en AcOEt. Esta solución fue lavada con KHSO₄, NaHCO₃ y solución saturada de NaCl. El secado y filtrado seguidos por remoción del solvente dio un aceite que se purificó por cromatografía dando el producto "B". [19]

Una base auxiliar en este caso pudo haber sido la 4-DMAP sintetizada pero debido a que fue utilizada para las reacciones previas de esterificación no se disponía de esta.

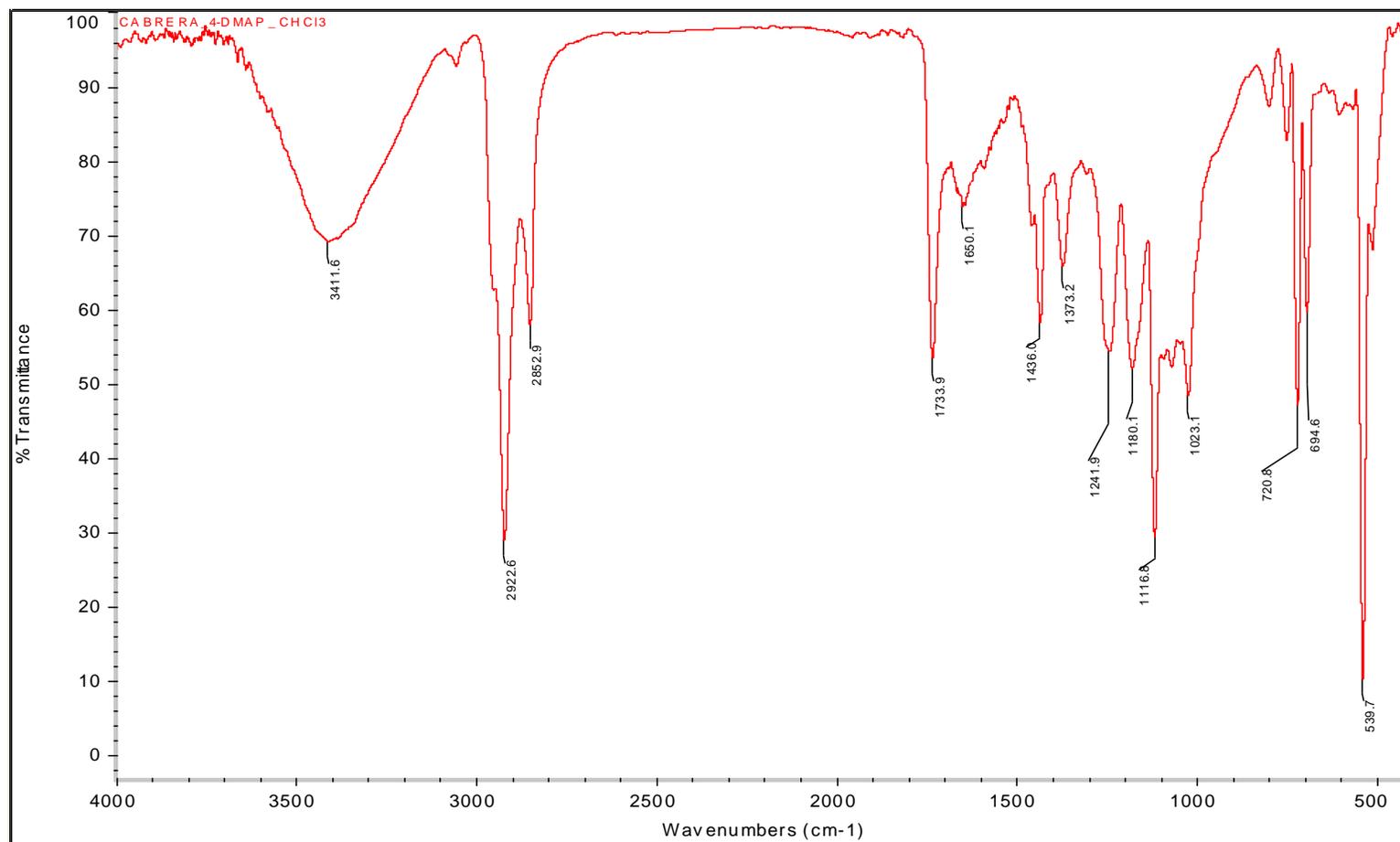
- Esta reacción de acoplamiento del aminoácido se podría llevar a cabo de una manera mas eficiente protegiendo el grupo acido o el grupo amino del aminoácido para

evitar problemas de solubilidad empleando condiciones similares de reacción como lo son DCC, DMAP en DMF/CH₂Cl₂ en proporción 1:4. [20]

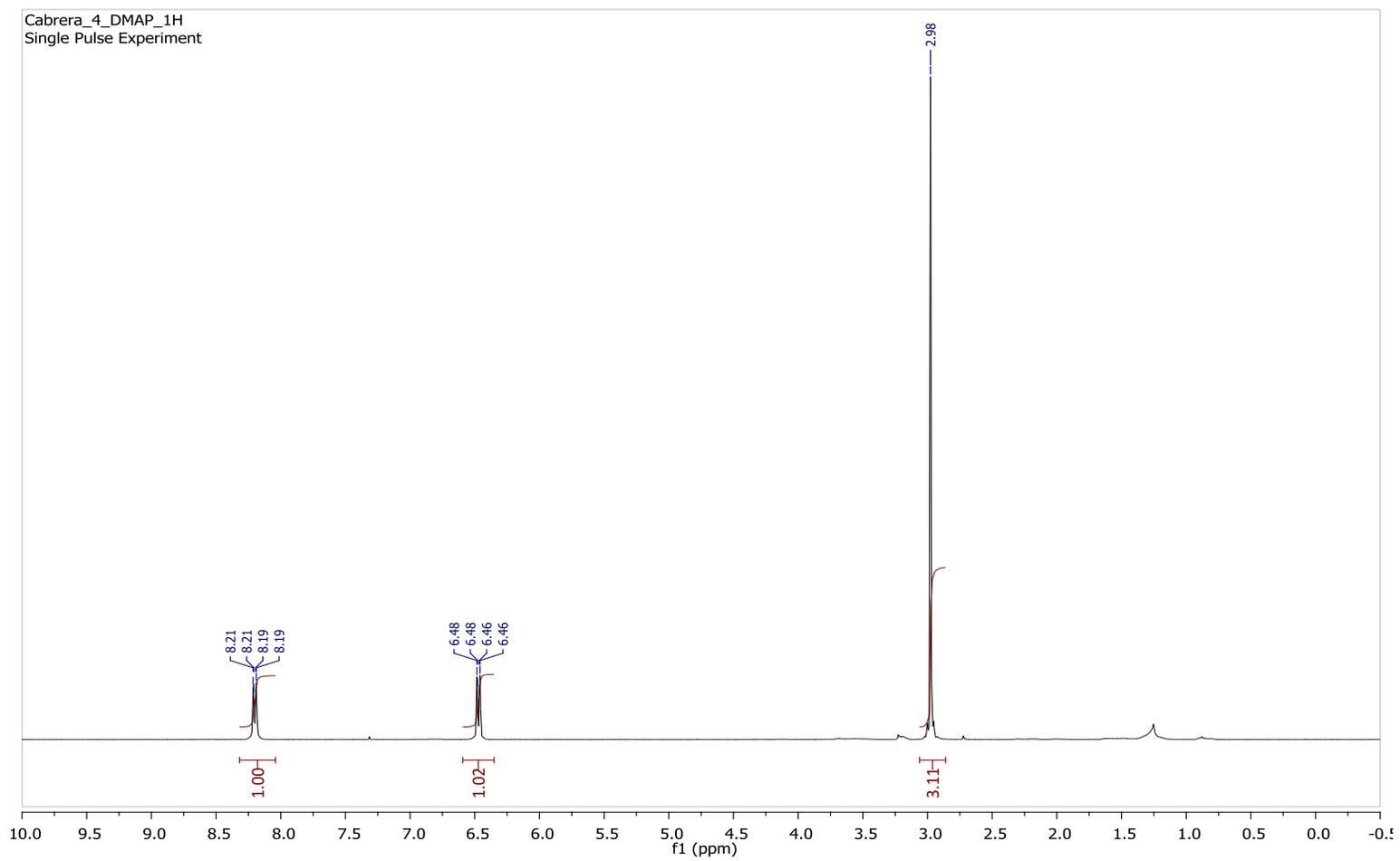
- La racemización en la etapa del acoplamiento de síntesis de péptidos es debido a la formación del carbanion del centro disimétrico y esto puede ser causado por la misma amina actuando como base o por la presencia de un exceso de amina terciaria, añadida en orden para liberar el componente amino de su sal.

ESPECTROS

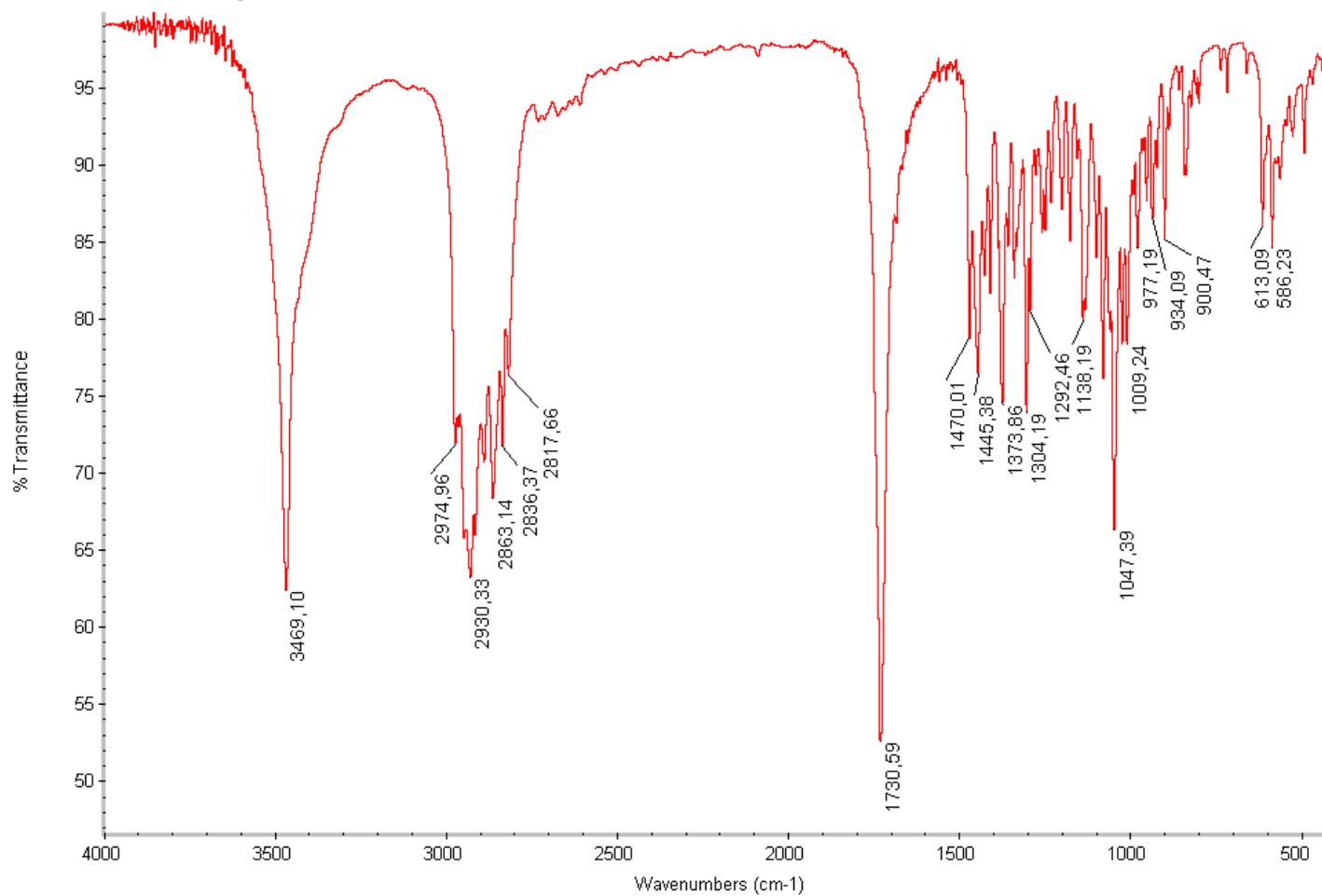
Espectro 1. IR, KBr de la 4-DMAP.



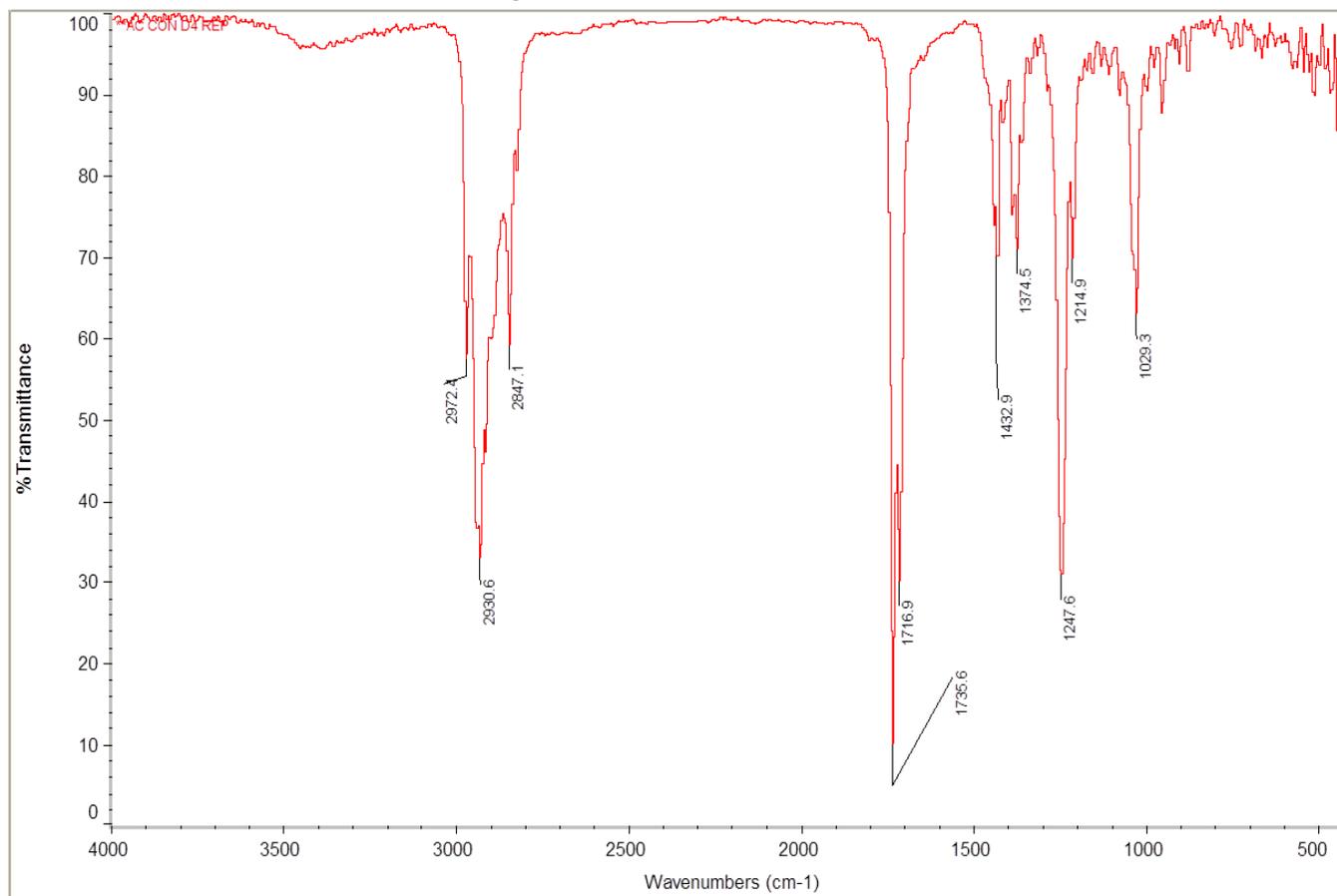
Espectro 2. ^1H -RMN de la 4-DMAP

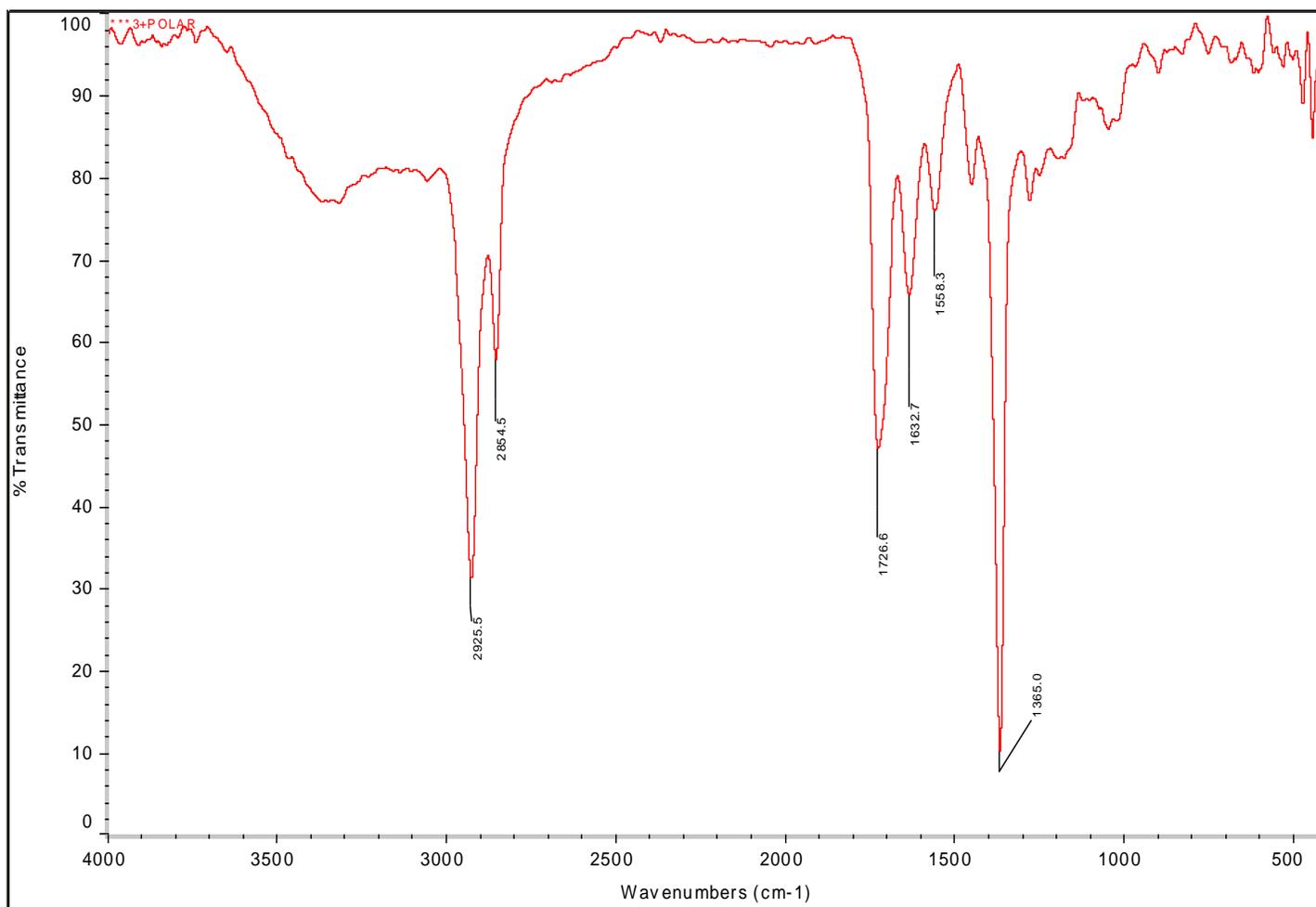


Espectro 3. IR de la epiandrosterona

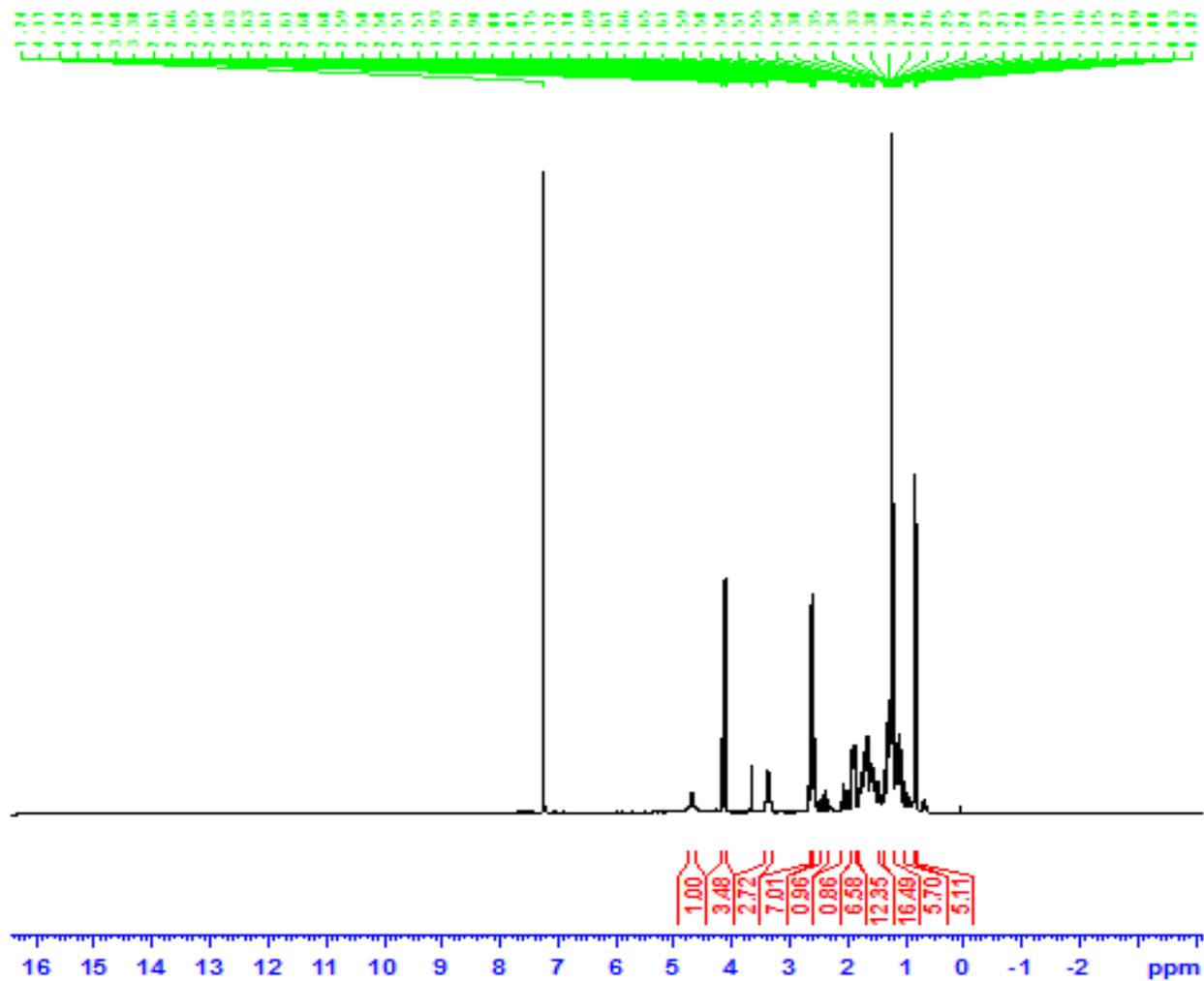


Espectro 4. IR de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido acético

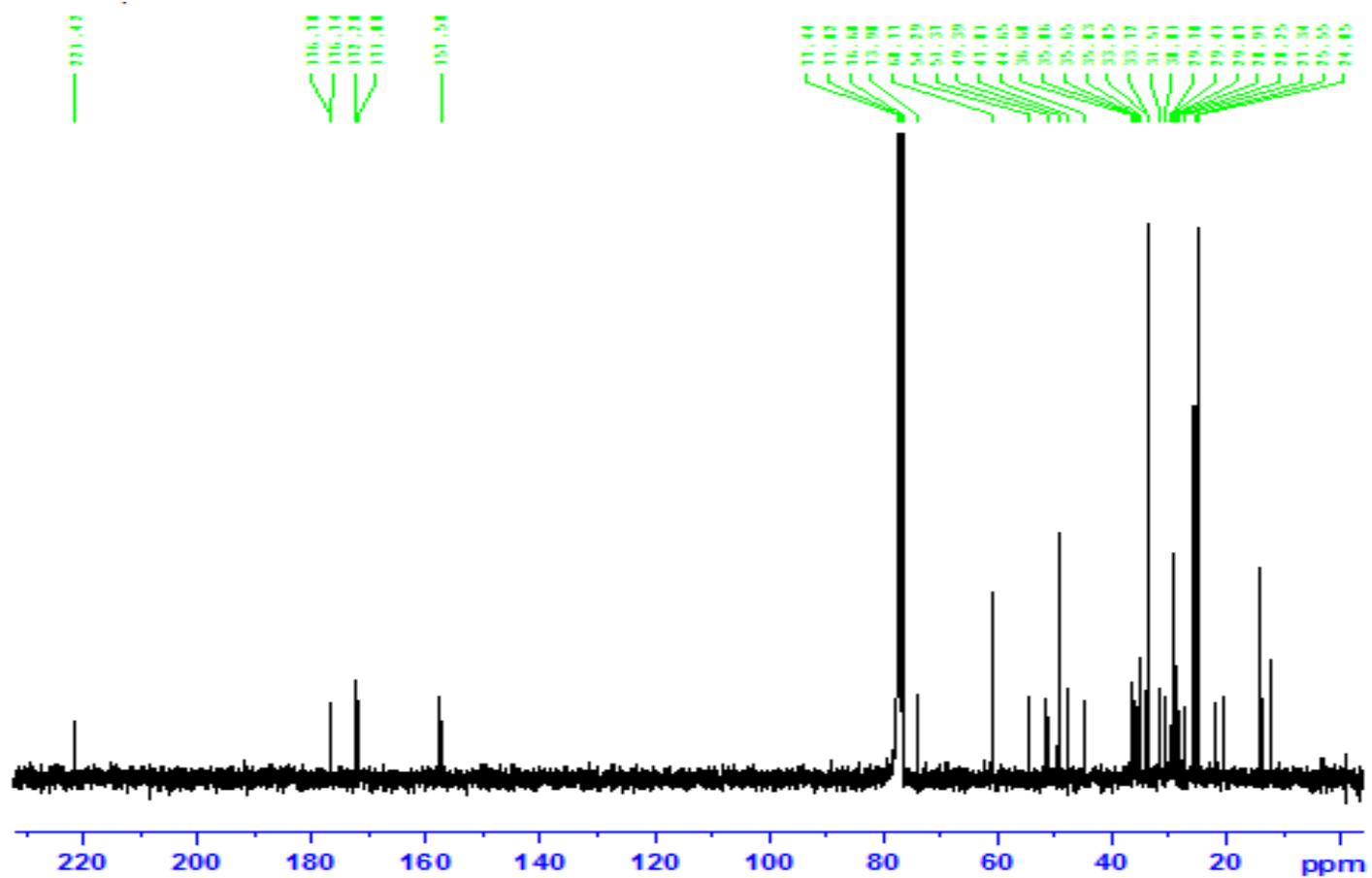


Espectro 5. IR de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico

Espectro 6. ^1H -RMN de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico



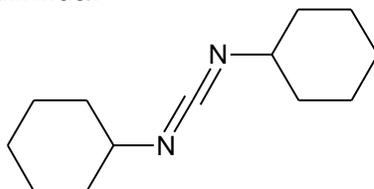
Espectro 7. ^{13}C -RMN de la esterificación de la epiandrosterona con anhídrido y ácido succínico



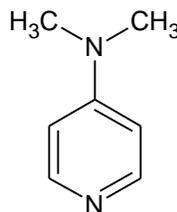
APENDICE

Abreviaturas empleadas

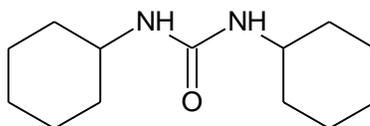
- DCC: Diciclohexilcarbodiimida.



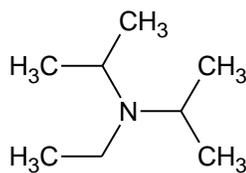
- DMAP: 4-N,N-dimetilaminopiridina



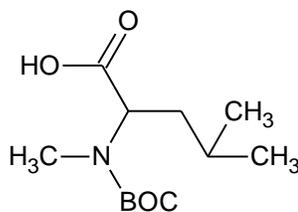
- DCU: Diciclohexilurea



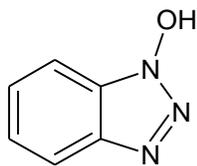
- DIEA: Diisopropiletilamina



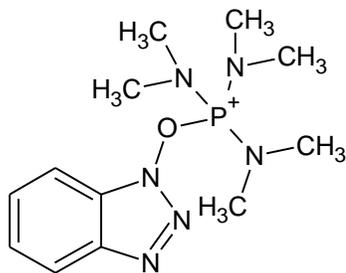
- BOC-(R)-N(Me)-Leu-OH



- HOBt



- BOP



BIBLIOGRAFIA

[1] **Martínez, M y Avellaneda A.** Enfermedades Raras, un enfoque práctico. 1era Edición. España (2004). 23-27

[2] **Marcano, D y Hasegawa, M.** Fitoquímica Orgánica. 2° Edición. UCV. (2002). Cap. 6 265-374, Cap. 7 375-422.

[3] **Neacato, P.** Síntesis de derivados de androstanos como posibles agentes antivirales. TEG.UCV. Junio 2007.

[4] <http://es.wikipedia.org/wiki/Aminoácido> 27/05/2011.

[5] **Gerhard Höfle y Wolfgang Steglich,** Síntesis. 1972. 619-621.

[6] **Gerhard Höfle, Wolfgang Steglich y Helmut Volbrüggen.** 4-Dialquilaminopiridinas comocatalizadores acilantes altamente activos. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1978.17,569-583

[7] <http://es.wikipedia.org/wiki/N,N%27-diciclohexilcarbodiimida> 27/05/2011

[8] **Monique Calmes, Françoise Escale, Marc Rolland y Jean Martinez.** Esterificación diastereoselectiva de ácido (±)-N-trifluoroacetopipécolico usando (S)-metil

pantolactona: síntesis de ácido(S)-N-Bocpipercolico y (S)-N-Boc-2-piperidinametanol. Laboratorio de Aminoácidos, Peptidos y Proteínas, UMR-CNRS 810.(2003).

[9] **Dae-won Chung† y Young Tai ChoiJ.** Síntesis y solubilidad de derivados hidrofílicos de β - Sitosterol. Eng. Chem. 2007, Vol. 13, No. 3, 367-372.

[10] **KyungminKo, KeijiNakano, ShigeruWatanabe, Yoshiyasulchikawa, HiyoshizoKotsuki.** Desarrollo de un nuevo DMAP relacionado con organocatalizadores para ser usados en reacciones de adición de Michael de β -cetoésteres en agua. Japon, 2009.

[11] **Neises, B. y Steglich, W.** "Esterificación de Ácidos carboxílicos con Diciclohexilcarbodiimida/4-N,N-Dimetilaminopiridina: Tert-Butil Etil Fumarato". Org. Synth. 1990; Coll. Vol. 7. 93.

[12] **Nida N. Farshori, Mudasir R. Banday, Zeeshan Zahoor, Abdul Rauf.** DCC/DMAP como mediadores en la esterificación de ácidos grasos hidroxilados y no-hidroxilados con β -sitosterol: Actividad antimicrobiana *In vitro*. India. 2009

[13] **McElvain, S. M. & Goese, M. A.** "The Halogenation of Pyridine". **Laboratory of Organic Chemistry of the University of Wisconsin.** Nov. 1943, Vol 65, pag 2227-2233.

[14] **Kumar, M. et. al.** "Process for Producing 4-dimethylaminopyridine (DMAP)". European Patent Office EP1424328A1. Jubilant Organosys. June 2004.

[15] **Klingsberg, E.** *Pyridines and Its Derivatives part 2.* Interscience Publishers, Inc., New York. 1961; pag 305.

- [16] **KATRITZKY, A.** *Advances in HETEROCYCLIC CHEMISTRY. Editorial Advisory Board.* ACADEMIC PRESS, INC. University of Florida. Gainesville, Florida. Vol. 49; 1990, pag 132.
- [17] **Wyatt, P.** *Organic Synthesis: Strategy and Control.* John Wiley & Sons Ltd, University of Bristol, UK, 2007, pag 765.
- [18] **Pretsch, E.; Clerc, T.; Seibl, J.; Simon W.;** *Tablas Para La Elucidación Estructural De Compuestos Orgánicos Por Métodos Espectroscópicos,* Editorial ALMAMBRA, S.A, 1^{ra} Edición Española, 1980.
- [19] **Gemma Jou, Isabel Gonzalez, Fernando Albericio, Paul Lloid-Williams and Ernest Giralt.** *Total synthesis of dehydroadidemin B. Use of Uronium and phosphonium salt coupling reagents in peptide synthesis in solution.* Journal Organic Chemistry. 1997. 62(2) 354-361
- [20] **M. Mergler, R. Tanner, J. Gasteli, P. Grogg.** *Peptide synthesis methods I: A new very acid-labile anchor group for the solid phase synthesis of fully protected fragments.* Tetrahedron letters 29, (32), 1988. 4005-4008.
- [21] **Carlos A. Rius Alonso.** *Aminoácidos, péptidos y proteínas.* Departamento de química orgánica. Facultad de Química UNAM. 2008
- [22] **SUTTIE J.,** *Fundamentos de bioquímica.* 1976. Cap 5.
- [23] **I-Chen Sun, Hui-Kang Wang, Yoshiki Kashiwada, Jing-Kang Shen, L. Mark Consentino, Chin-Ho Chen, Li-Ming Yang, and Kuo-Hsiung Lee.** *Synthesis and*

Structure-Activity Relationships of Betulin Derivates as Anti-HIV Agents. Journal of Medical Chemistry, 1998, Vol. 41, No. 23. 4651. Anti-AIDS Agents.