



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA FUNDAMENTAL

Facultade de Ciencias
Campus da Zapateira, s/n
E-15071 A Coruña, España
Tel.: +34 981 167 000
Fax: +34 981 167 065

**Síntesis de esteroides citotóxicos de origen marino:
6-hidroximino y 5,6-epoxicolestanos,
tioésteres esteroidales y
nuevos análogos de cefalostatinas**

Memoria presentada por Javier Jesús
Poza Soto para optar al grado de Doctor
en Química

A Coruña, 6 de mayo de 2008

Fdo: Jesús José Fernández Sánchez
Director del Departamento de Química Fundamental



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE
QUÍMICA FUNDAMENTAL

Facultade de Ciencias
Campus da Zapateira, s/n
E-15071 A Coruña, España
Tel.: +34 981 167 000
Fax: +34 981 167 065

D. Carlos Jiménez González y D. Jaime Rodríguez González, profesores del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña

CERTIFICAN:

Que la memoria adjunta titulada **”Síntesis de esteroides citotóxicos de origen marino: 6-hidroximino y 5,6-epoxicolestano, tioésteres esteroidales y nuevos análogos de cefalostatinas”**, para optar al Grado de Doctor en Química presentada por D. Javier Jesús Poza Soto, ha sido realizada bajo su dirección en los laboratorios de Química Orgánica del Departamento de Química Fundamental, Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña.

Considerando que constituye un trabajo de Tesis Doctoral, autorizan su presentación en la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste, y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado:

A Coruña, 6 de mayo de 2008.

Fdo: Carlos Jiménez González

Fdo: Jaime Rodríguez González

AGRADECIMIENTOS

A los profesores Dr. Carlos Jiménez González y Dr. Jaime Rodríguez González, directores de este trabajo, por sus valiosas enseñanzas y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación.

A los demás profesores del área de Química Orgánica y de la Facultad de Ciencias por estar siempre dispuestos para cualquier tipo de consulta y ayuda.

A todos mis compañeros de laboratorio por ayudarme siempre que lo he necesitado.

Al personal de los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña, por su colaboración mediante la realización de los espectros de RMN y masas. Al Centro de Apoyo Científico-Tecnológico a la Investigación (CACTI) de la Universidad de Vigo, por la realización de algunos espectros de masas de alta resolución.

A la Universidad de Santiago de Compostela por permitirme la utilización de su sistema de hidrogenación a presión, sin el cual no podría haber finalizado una de las síntesis.

A la empresa PharmaMar por su colaboración en la realización de los análisis farmacológicos y darme la oportunidad de sintetizar tres novedosos esteroides naturales aislados en sus laboratorios.

A Biomar S.A. por su colaboración en la realización de los análisis farmacológicos.

Al Dr. Jerry Pelletier del Departamento de Bioquímica de la Universidad de McGill en Montreal (Cánada) por su colaboración en la realización de los ensayos de inhibidores biosintéticos de proteínas.

A la Xunta de Galicia por haberme concedido una beca predoctoral para llevar a cabo la investigación y por la financiación de los proyectos (PGIDIT05RMA10302PR y PGIDIT06PXIC103118PN).

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología por la financiación de los proyectos (CQT2005-00793 y SAF2002-0733).

A Miriam y a mis padres por su paciencia y comprensión.

A todos los que, de una u otra forma, me han apoyado en la realización de este trabajo.

INDICE

Resumen.	3
Summary.	7
Introducción.	9
1. El cáncer.	11
2. Papel de los Productos Naturales en el mercado farmacológico actual.	13
3. Productos Naturales antitumorales de origen marino.	15
4. Esteroides.	22
4.1. Antecedentes.	22
4.2. Esteroides anticancerosos.	24
4.3. Esteroides citotóxicos de origen marino.	25
Capítulo 1. Síntesis de nuevos análogos de los 6-hidroximoesteroides.	33
1. Antecedentes.	35
1.1. Hidroximinoesteroides de origen natural.	35
1.2. Hidroximinoesteroides sintéticos y aplicaciones.	38
2. Objetivos.	41
3. Síntesis de 6-hidroximoesteroides con posiciones oxigenadas en los anillos A, B y D.	42
3.1. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-1 (anillo A).	42
3.2. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-7 (anillo B).	46
3.3. Síntesis de análogos con un grupo epóxido entre las posiciones C-4/C-5.	52
3.4. Síntesis de análogos con una posición oxigenada en C-16 (anillo D).	56
4. Síntesis de 5-fluoro-6-hidroximoesteroides.	59
4.1. Síntesis de 5-fluoro-6-hidroximoesteroides con una posición oxigenada en C-3.	59

4.2. Síntesis de 2,3-dihidroxi-5-fluoro-6-hidroximinoesteroides.	61
5. Análisis farmacológicos y relaciones estructura-actividad.	64
6. Conclusiones.	68
Capítulo 2. Síntesis de 3β,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos y aplicación de la metodología DFT-RMN.	69
1. Antecedentes.	71
1.1. 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxiesteroides citotóxicos naturales.	71
1.2. Determinación de la configuración relativa mediante RMN y cálculos computacionales.	73
2. Objetivos.	75
3. Síntesis de los 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.	76
3.1. Síntesis de los 3 β ,7 α -dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.	76
3.2. Síntesis de los 3 β ,7 β -dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.	76
4. Determinación de las señales diagnóstico de RMN.	78
5. Aplicación de la metodología DFT-RMN.	80
5.1. Análisis configuracional basado en la comparación de las constantes de acoplamiento (J).	80
5.2. Análisis configuracional basado en la comparación de desplazamientos químicos de ^{13}C .	84
6. Evaluación citotóxica de los 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.	92
7. Conclusiones.	93
Capítulo 3. Síntesis de nuevos tioésteres esteroidales naturales y análogos.	95
1. Antecedentes.	97
1.1. Paratioésteres esteroidales de origen natural.	97
1.2. Antecedentes sintéticos de tiaesteroides.	100
2. Objetivos.	101
3. Síntesis de los nuevos paratioesteroides naturales y de sus análogos.	102

3.1. Síntesis del paratioesteroide A y análogos.	102
3.2. Síntesis del paratioesteroide B y análogos.	105
3.3. Síntesis del paratioesteroide C y análogos.	110
3.4. Síntesis de análogos con el doble enlace entre las posiciones C-4/C-5.	113
4. Análisis farmacológicos y relaciones estructura-actividad.	116
5. Conclusiones.	118
Capítulo 4. Síntesis de nuevos análogos de las cefalostatinas.	119
1. Antecedentes.	121
1.1. Cefalostatinas y riteracinas.	121
1.2. Hipuristanoles de origen natural	127
2. Objetivos.	128
3. Síntesis de análogos de las cefalostatinas.	129
3.1. Síntesis de la bis-hecogenina/22- <i>epi</i> -hipuristan-11-ona pirazina	129
4. Análisis farmacológicos y relaciones estructura-actividad.	133
5. Conclusiones.	134
Capítulo 5. Parte Experimental.	135
Metodología general.	137
Síntesis de nuevos análogos de los 6-hidroximinoesteroides.	140
1. Síntesis de 6-hidroximinoesteroides con posiciones oxigenadas en los anillos A, B y D.	140
1.1. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-1.	140
1.2. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-7.	162
1.3. Síntesis de análogos con un grupo epóxido entre las posiciones C-4/C-5.	196
1.4. Síntesis de análogos con una posición oxigenada en C-16.	222

2. Síntesis de 5-fluoro-6-hidroximinoesteroides.	242
2.1. Síntesis de 5-fluoro-6-hidroximinoesteroides con una posición oxigenada en C-3.	242
2.2. Síntesis de 2,3-dihidroxi-5-fluoro-6-hidroximinoesteroides.	252
Síntesis de 3β,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.	268
3. Síntesis de los 3 β ,7 α -dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.	268
4. Síntesis de los 3 β ,7 β -dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.	268
Síntesis de nuevos tioésteres esteroidales naturales y sus análogos.	285
5. Síntesis del paratioesteroide A y análogos.	285
6. Síntesis del paratioesteroide B y análogos.	300
7. Síntesis del paratioesteroide C y análogos.	328
8. Síntesis de análogos con el doble enlace entre las posiciones C-4/C-5.	352
9. Paratioesteroides A-C naturales.	362
Síntesis de nuevos análogos de las cefalostatinas.	363
10. Síntesis de la bis-hecogenina/22- <i>epi</i> -hipuristan-11-ona pirazina.	363
Análisis farmacológicos.	386

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$[\alpha]_D$	Rotación óptica específica
Ac	Acilo
ac	Acuoso
atm	Atmósfera
A-549	Carcinoma de pulmón humano
B3LYP	DFT de tres parámetros estilo Becke, usando el funcional de correlación de Lee, Yang, Parr
Bn	Bencilo
c	Concentración
°C	Grado Celsius
CoA	Coenzima A
ccf	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
col	Colaboradores
COSY	Espectroscopía de correlación bidimensional homonuclear protón-protón
d	Doblete
dd	Doble doblete
DCC	<i>N,N</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-quinona
DEPT	Amplificación sin distorsión por transferencia de polarización
DFT	Teoría de los funcionales de densidad
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMP	Reactivo de Dess Martin
DMSO	Dimetilsufóxido
dt	Doble triplete
Ed	Editorial
EM	Espectrometría de masas
eq	Equivalente
ESI	Electrospray
eV	Electrón-voltio
FAB	Espectrometría de masas de bombardeo con átomos pesados
Fig.	Figura
g	Gramos
GI ₅₀	Concentración que inhibe un 50% el crecimiento de las células frente a los controles.
h	Hora
HR	Alta resolución
HETLOC	Espectro bidimensional heteronuclear de correlación a larga distancia
HF	Hartree-Fock
HMBC	Espectro bidimensional de correlación protón-carbono a larga distancia
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HSQC	Espectro bidimensional de correlación directa protón-carbono
HCT-116	Adenocarcinoma de colon humano
HT-29	Carcinoma de colon rectal humano
Hz	Hercio

h ν	Radiación ultravioleta
IE	Impacto electrónico
INE	Instituto Nacional de Estadística
I.U.P.A.C.	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>J</i> -HMBC	Experimento de <i>J</i> -resuelta HMBC
LR	Baja resolución
<i>m</i>	Multiplete
<i>M</i>	Concentración Molar
<i>M</i> ⁺	Ión molecular
<i>Mz</i>	Megahertzio
mL	Mililitro
mmol	Milimol
mm	Milímetro
min	Minuto
MAD	Desviación media absoluta
MDA-MB-231	Adenocarcinoma de pecho humano
MEL-28	Melanoma humano
MS-1	Linfoma de ratón
<i>m</i> -CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
<i>m/z</i>	Relación masa/carga del ión
nM	Nanomolar
NAC	<i>N</i> -Acetilcisteamina
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimida
NCI	Instituto Nacional del Cáncer
NOE	Efecto nuclear Overhauser
NOESY	Espectroscopia de aumento nuclear Overhauser
NMO	<i>N</i> -Óxido de <i>N</i> -Metilmorfolina
P	Presión
<i>p</i>	Para
Ph	Fenilo
Py	Piridina
pM	Picomolar
pág	Página
P-388	Linfoma de ratón
PC-3	Carcinoma de próstata humano
PCC	Clorocromato de piridinio
PDC	Dicromato de piridinio
PSN1	Adenocarcinoma de páncreas humano
PPTS	<i>p</i> -Toluensulfonato de piridinio
PTAP	Perbromuro de trimetilfenilamonio
ppm	Partes por millón
R _F	Factor de retención
q	Cuartete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece
RMN de ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
s	Singulete
sa	Singulete ancho

scaief	Factor de escala
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetra- <i>n</i> -butilamonio
TBDMS	<i>terc</i> -Butildimetilsilil
TEMPO	2,2,6,6-tetrametilpiperodinoxil
TOCSY	Espectroscopia de correlación total
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anhídrido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TsCl	Cloruro de Tosilo
TMS	Tetrametilsilano, trimetilsililo
T98G	Glioblastoma humano
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Δ	Calor
δ	Desplazamiento químico (RMN)
δ_{H}	Desplazamiento químico de protón (RMN)
δ_{C}	Desplazamiento químico de carbono (RMN)
ν	Número de onda
λ	Longitud de onda

NOMENCLATURA DE LOS PRODUCTOS PRESENTADOS

La nomenclatura asignada a los productos obtenidos en este trabajo se ha determinado siguiendo las Reglas de Nomenclatura de Esteroides (IUPAC and IUB Joint Comisión on Biochemical Nomenclature: The nomenclature of steroids, *Eur. J. Biochem.* **1989**, *186*, 429. IUPAC-IUB Revised Tentative Rules for Nomenclature of Steroids *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 1517) mientras los productos mantenían similitudes estructurales con sus respectivos esteroides de partida.

RESUMEN

Durante las últimas décadas, la necesidad de buscar nuevos fármacos contra el cáncer viene dada no sólo porque los que existen son insuficientes, sino también por la resistencia que presentan a la medicación ciertos tumores, con el objetivo de reducir la mortandad prolongando y mejorando la esperanza y calidad de vida de los pacientes.

Los esteroides han demostrado ser unos agentes terapéuticos relevantes en este aspecto, por lo que su síntesis continúa siendo un campo muy importante en la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antitumorales.

La presente memoria está estructurada en cuatro capítulos y en ella se ha realizado la síntesis de varios esteroides con diferentes modificaciones estructurales con el fin de evaluar su actividad citotóxica frente a un panel de líneas celulares tumorales, obteniéndose un mapa adicional sobre el potencial farmacológico y ampliando el estudio de las relaciones estructura-actividad en este tipo de compuestos.

En el primer capítulo se ha llevado a cabo eficazmente la síntesis de una nueva serie de análogos de 6-hidroximinoesteroides naturales que habían sido previamente aislados de esponjas pertenecientes al género *Cinachyrella* y que presentaban una actividad citotóxica selectiva. Partiendo de los requerimientos estructurales ya conocidos por nuestro grupo de investigación, se analiza la influencia de la presencia adicional de posiciones oxigenadas en el anillo A, en C-7 y C-16 y de una posición fluorada en C-5. Los resultados de este capítulo revelan la importancia de la presencia de posiciones oxigenadas en el anillo A para un incremento en la actividad citotóxica en este tipo de estructuras y se han publicado en:

“Synthesis and evaluation of new 6-hydroximinosteroid analogs as cytotoxic agents” Poza, J.; Rega, M.; Paz, V.; Alonso, B.; Rodríguez, J.; Salvador, N.; Fernández, A.; Jiménez, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4722-4740.

En el segundo capítulo se describe la síntesis de los cuatro posibles $3\beta,7$ -dihidroxi-5,6-epoxicolestano con el propósito de evaluar la influencia que ejerce en la citotoxicidad, la presencia de un grupo hidroxilo en las posiciones C-3 y C-7, y un epóxido en las posiciones C-5/C-6 en el esqueleto de colestano. Adicionalmente, se lleva a cabo un profundo análisis estructural sobre los compuestos sintetizados con el fin de desarrollar una metodología que ayude a resolver la dificultad inherente en la asignación de la configuración relativa del grupo epóxido en estos sistemas. Así, por una parte, la asignación completa de los datos espectrales de RMN de los cuatro diastereoisómeros mediante experimentos mono y bidimensionales permitió deducir una serie de señales diagnóstico. Además, un exhaustivo análisis configuracional basado en la comparación de las constantes de acoplamiento y desplazamientos químicos de carbono entre los valores experimentales y los calculados mediante estudios computacionales empleando la teoría de funcionales de densidad, permitió demostrar que esta metodología es la más adecuada en la identificación de cada diastereoisómero. Los resultados de este capítulo han dado lugar a la publicación recientemente aceptada en *Eur. J. Org. Chem.*:

“*J*-Based Analysis and DFT-NMR Assignments of Natural Complex Molecules: Application to $3\beta,7$ -Dihydroxy-5,6-epoxycholestanes” Poza, J.; Jiménez, C.; Rodríguez, J.

En el tercer capítulo se realizó la síntesis de tres nuevos tioésteres esteroidales citotóxicos que habían sido aislados del cnidario *Paragorgia* sp. por la empresa PharmaMar con lo que se pudo confirmar sus estructuras y elucidar sus configuraciones absolutas. Con el fin de deducir algunas relaciones de estructura-actividad sobre este tipo de compuestos, se prepararon diversos análogos con diferentes átomos en la cadena lateral y distintos grados de oxidación en el anillo A. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de esta novedosa cadena lateral es condición necesaria para que estos esteroides sean activos y que una disminución del grado de oxidación del anillo A trae consigo un incremento de la actividad citotóxica. Fruto de este estudio se ha enviado para su publicación el siguiente manuscrito:

“Isolation, Biological Significance, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of New Natural and Synthetic Parathiosteroids A-C, from the soft coral *Paragorgia* sp” Poza, J; Fernández, R.; Reyes, F. Rodríguez, J.; Jiménez, C.

En el cuarto capítulo se preparó un bis-esteroide asimétrico pirazínico que constituye un nuevo análogo de los potentes agentes antitumorales cefalostatinas. En la síntesis de la denominada zona norte, se empleó el esteroide citotóxico natural 22-*epi*-hipuristanol, un producto natural que presenta un grupo espirocetal en la posición C-22 y que fue aislado de la gorgonia *Isis hippuris* por nuestro grupo de investigación. Para la síntesis de la zona sur se utilizó como material de partida la hecogenina acetilada comercial. Los resultados obtenidos mostraron que el nuevo análogo era más activo que el 22-*epi*-hipuristanol pero no alcanzó la actividad citotóxica presente en las cefalostatinas y darán lugar a otra publicación que será enviada próximamente.

SUMMARY

The reach and development of some effective anticancer agents available today is not enough. For that reason, it is necessary to look for new anticancer drugs in order to reduce the deaths and to improve life expectancy.

Steroids have shown to be important antitumor agents so that their synthesis continue to be a challenge in developing novel anticancer drugs.

This memory is divided in four chapters describing the synthesis of several steroids with different structural motifs to evaluate their cytotoxicity against cultured tumor cell lines in order to expand the study of the structure-activity relationships for this type of compounds.

The preparation of new analogs of the cytotoxic natural 6-hydroximinosteroids isolated from sponge *Cinachyrella* is described in the first chapter. They were prepared taking into account the structural requirements for cytotoxicity and studied *in vitro* against several tumor cells in order to obtain further information on the potential pharmacophoric core of this kind of compounds. The influence of an additional oxygenated position in the A ring, the presence of oxygenated positions at C-7 and C-16 and a fluorinated position at C-5 were considered in order to study the structure-activity relationships. The results of this chapter reveal the importance of oxygenated positions in the A ring for an increase in cytotoxicity in this type of compounds and they have been published in:

“Synthesis and evaluation of new 6-hydroximinosteroid analogs as cytotoxic agents” Poza, J.; Rega, M.; Paz, V.; Alonso, B.; Rodríguez, J.; Salvador, N.; Fernández, A.; Jiménez, C. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4722-4740.

In the second chapter, the synthesis and biological evaluation of the four possible $3\beta,7$ -dihydroxy-5,6-epoxycholestane diastereoisomers is described in order to evaluate the influence in the cytotoxic activity of the presence of an epoxy functionality at C-5/C-6 and a hydroxyl group at C-3 and C-7 on a cholestane framework. Taking into account that the planar disposition of the proton attached to the epoxy group makes it very difficult to assign the correct stereochemistry of such a functional group by NOE correlations or by inspection of the proton coupling constants, a methodology is developed. The complete ^1H and ^{13}C NMR assignment by 1D and 2D experiments allowed the identification of some diagnostic signals. On the other hand, the use of an exhaustive QM-*J*-based analysis to reproduce the stereochemical dispositions of the epoxy and hydroxyl functionalities at these three chiral centers was the best tool to identify each diastereoisomer. The results obtained were published in the following manuscript which was accepted in *Eur. J. Org. Chem.*

“*J*-Based Analysis and DFT-NMR Assignments of Natural Complex Molecules: Application to $3\beta,7$ -Dihydroxy-5,6-epoxycholestanes” Poza, J.; Jiménez, C.; Rodríguez, J.

In the third chapter, the structures of three new unusual steroid thioesters, parathiosteroids A–C with significant cytotoxic activity, isolated by PharmaMar from the soft coral *Paragorgia* sp., were confirmed by synthesis and their absolute configurations were elucidated. In order to study the structure/activity relationships in this type of steroids, several analogs with different oxidation degrees in the ring A and different heteroatoms in the side chain were prepared from commercially available starting materials. The biological results showed that the novel side chain is essential for the antiproliferative activity and a low degree of oxidation on A ring results in higher bioactivity. Results from this chapter have been submitted:

“Isolation, Biological Significance, Synthesis, and Cytotoxic Evaluation of New Natural and Synthetic Parathiosteroids A-C, from the soft coral *Paragorgia* sp” Poza, J; Fernández, R.; Reyes, F. Rodríguez, J.; Jiménez, C.

In the fourth chapter, a new bis-steroid pyrazine dimer, analog of cephalostatins, was prepared. The natural cytotoxic steroid, 22-*epi*-hippuristanol, isolated from the gorgonian *Isis hippuris*, was used in the synthesis of its northern part. The commercial available hecogenin acetate was employed in the preparation of the southern part. Although the new analog showed higher cytotoxic activity than the 22-*epi*-hippuristanol, it was lower than cephalostatins.

INTRODUCCIÓN

1. El cáncer

Estudios recientes realizados por el Instituto Nacional contra el Cáncer y el Instituto Nacional de Estadística¹ demuestran que el cáncer es la segunda causa de mortalidad en los países desarrollados, solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, estas últimas están experimentando una clara disminución, mientras que las muertes por cáncer siguen aumentando año tras año. Se estima que a lo largo del siglo XXI el cáncer será la primera causa de mortalidad en los países desarrollados y, aproximadamente, tres de cada cinco personas estarán afectadas de una u otra forma por esta enfermedad. Estos datos reflejan la imperiosa necesidad de promover la investigación científica en este campo.

Según la concepción celular de Virchow “toda célula proviene de otra célula”, el cáncer es un proceso lógico coordinado en el que una célula o un grupo de células, sufre cambios especiales diferentes de las células normales. De esta forma cuando una célula normal se lesiona o envejece, ésta muere por apoptosis, mientras que las células cancerosas evitan el suicidio celular. En otras palabras, el cáncer es una enfermedad con un denominador común: la transformación de la célula normal en otra que se comporta de manera perjudicial para el cuerpo humano.

Actualmente se conocen más de cien tipos de cáncer. Los que provocan mayor mortandad por orden de importancia son el de pulmón, colon-rectal, pecho, próstata y páncreas.

Las causas que lo provocan son desconocidas por el momento, aunque se conocen algunos factores de riesgo que lo precipitan. La principal causa es la edad ó el envejecimiento pero como factores que desembocan en la formación de tumores se pueden añadir el tabaquismo, la dieta, la exposición solar y otros estilos de vida. El origen no es debido a una única causa, sino que es el resultado final de una interacción de múltiples factores entre los que se incluyen el medio ambiente, los hábitos dietéticos y la herencia genética. En la actualidad, se están realizando continuamente estudios epidemiológicos que tratan de buscar asociaciones de toda índole con el cáncer.²

Los grandes avances experimentados en los últimos años en el tratamiento del cáncer se fundamentan en tres pilares básicos: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Además existe un cuarto pilar denominado *terapia biológica*, que incluye la hormonoterapia, la inmunoterapia y nuevas dianas terapéuticas no citotóxicas.³

La quimioterapia consiste en la administración de sustancias químicas (fármacos), también llamados citostáticos o citotóxicos. El mecanismo de acción general consiste en provocar una alteración celular, ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos y/ó proteínas, ó en la división celular. Hasta el momento se encuentran en el mercado más de 100 fármacos anticancerosos aprobados por los organismos sanitarios oficiales que son capaces de aumentar la esperanza y calidad de vida en más de trece cánceres mortales.

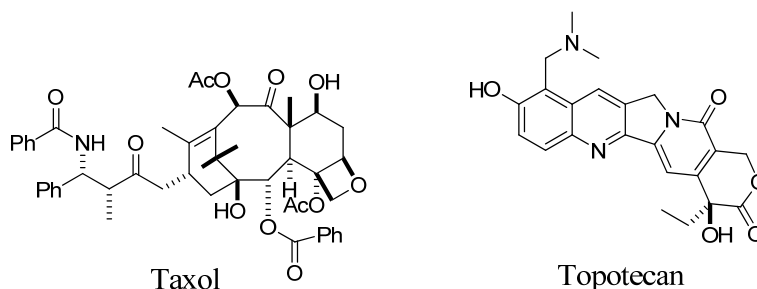
¹ <http://www.ine.es> y <http://www.cancer.gov>.

² <http://www.todocancer.com> y <http://www.interscience.wiley.com>.

³ <http://www.dsahud.com>.

A pesar del gran arsenal de productos que se utilizan en quimioterapia, es cuestión prioritaria la de seguir buscando nuevas sustancias con distintos mecanismos de acción contra el cáncer, sobre todo porque se han detectado resistencias de ciertos tumores a la medicación con algunos fármacos que se utilizan en la actualidad.

Es importante hacer hincapié en el hecho de que la mayoría de los fármacos utilizados proceden de fuentes naturales ya sea directamente o por su derivatización.⁴ Entre los casos más espectaculares de productos naturales con aplicaciones a la quimioterapia podemos citar el del **taxol**⁵, un compuesto aislado del árbol *Taxus brevifolia*, que se utiliza en cánceres de pecho y ovario, el de la **camphotecina CPT-11**⁶ aislada de *Camptotheca acuminata* y su derivado sintético **topotecan**,⁷ que se emplea en cánceres de colon-rectal.



⁴ a) Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022. b) Ireland, C. M.; Aalbersberg, W.; Andersen, R. J.; Bernan, V.; Poruchynsky, M. S.; Zask, A. *Pharmaceutical Biology* **2003**, *41*, 15. c) Henkel, T.; Brunne, R. M.; Müller, H.; Reichel, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 643. d) Shu, Y.-Z. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053. e) Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52. f) Williams, D. H.; Stone, M. J.; Hauck, P. R.; Rahman, S. K. *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1189.

⁵ a) Horiguchi, T.; Rithner, C. D.; Croteau, R.; Williams R. M. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 267. b) Rubenstein, S. M.; Williams, R. M. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7215. c) Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. *Science* **1993**, *260*, 214. d) Fleming, P. E.; Mocek, U.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 805. e) Schiff, P. B.; Fant, J.; Horwitz, S. B. *Nature* **1979**, *277*, 665.

⁶ a) Thomas, C. J.; Rahier, N. J.; Hecht, S. M. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 1585. b) Slichenmeyer, W. J.; Von Hoff, D. D. *J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *30*, 770. d) Stork, G.; Schultz, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4074.

⁷ a) Garcia-Carbonero, R.; Supko, J. G. *Clinical Cancer Res.* **2002**, *8*, 641. b) Ulukan, H.; Swaan, P. W. *Drugs* **2002**, *62*, 2039.

2. Papel de los Productos Naturales en el mercado farmacológico actual

Los productos naturales representan una fuente esencial e inagotable de compuestos biológicamente activos con un amplio espectro de propiedades farmacológicas. El estudio ha constituido un estímulo y un desafío continuo, no solo para la Química Orgánica, sino también para la Bioquímica, la Biología y la Farmacología. Su interés como fuente de agentes terapéuticos se debe al papel importante que han tenido desde un principio en el desarrollo de la Medicina. Diferentes fármacos de origen vegetal que contienen compuestos activos como la efedrina, fueron usados en China hace 5.000 años,⁸ y otros muchos como la quinina, la morfina, la aspirina y la digitoxina siguen prestando enormes servicios en la salud de los hombres y mujeres de todo el mundo.

Tal como se observa en la figura 1⁹ esta influencia no solo se refiere al pasado, ya que de las 1010 nuevas entidades químicas de moléculas de bajo peso molecular aprobadas como fármacos durante el período comprendido entre 1981 y 2006, el 5% son productos naturales intactos (N), el 23% son derivados directos de un producto natural (ND), el 15% son productos sintéticos basados en la estructura de un producto natural (S*) y el 41% son exclusivamente sintéticos (S).

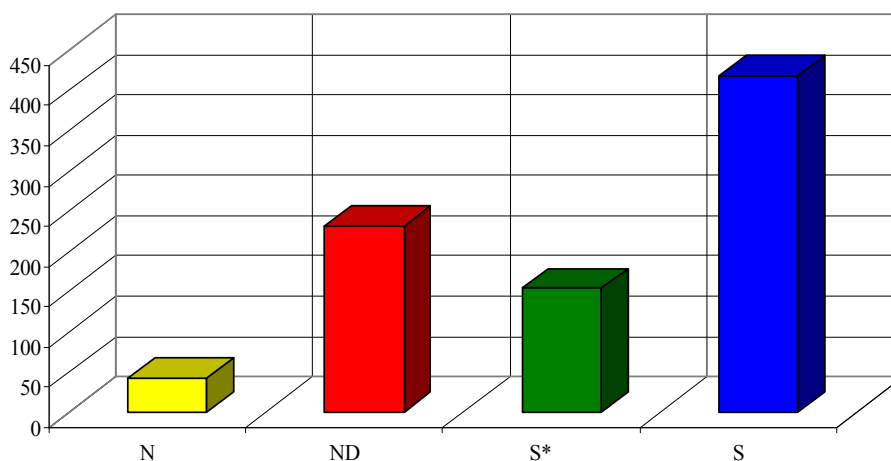


Figura 1. Número total de fármacos incorporados al mercado entre los años 1981-2006.

⁸ <http://www.drugdiscoverytoday.com> y <http://www.trainermed.com>

⁹ Newmann, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461.

El potencial farmacológico de los productos naturales como agentes anticancerosos no fue reconocido hasta la década de los 50 por el National Cancer Institute (NCI) de EE.UU., bajo la dirección y supervisión del Dr. Jonathan Hartwell.¹⁰ Un reciente estudio muestra que de los 140 fármacos anticancerosos aprobados en el período 1940-2006,⁹ el 74% tienen su origen en la estructura de un producto natural.

Esto confirma el concepto de que los productos naturales son importantes puntos de partida en el diseño de colecciones de moléculas bioactivas de calidad, y que por tanto, pueden ser considerados como estructuras privilegiadas en la búsqueda de nuevos fármacos.¹¹

Frente a los gigantes de la industria farmacéutica como Bayer, Merck y Wieth han aparecido otras pequeñas compañías, cuyo pilar central son precisamente los productos naturales. Éste es el caso de PharmaMar.

PharmaMar,¹² filial farmacéutica de la empresa española con capital gallego, Zeltia S.A., se ha especializado en el descubrimiento y desarrollo de compuestos antitumorales de origen marino. Recientemente, la EMEA ha aprobado la comercialización de uno de sus compuestos, Yondelis, que se utilizará en el tratamiento de sarcoma de tejido blando (STB). Además, cuenta con otros en diferentes fases clínicas, como la aplidina y el kahalalido F, en fase II y zalypsis y PM02374 que están en la fase I. Más de 6.000 pacientes con cáncer han recibido tratamiento en aproximadamente 200 hospitales de Europa y Estados Unidos, con alguno de los productos de la cartera de PharmaMar.¹³

Otros ejemplos a nivel mundial de pequeñas compañías cuyo pilar central son los productos naturales son la compañía farmacéutica Mera, en Hawai (EEUU), interesada en cianobacterias; Cerylid, en Richmond (Australia), que dispone de una amplia colección de plantas, invertebrados marinos y microorganismos y la compañía australiana Entocosc, que centra su estudio en la química relacionada con insectos y otros invertebrados terrestres.

¹⁰ Cragg, G. M.; Kingston, D. G. I.; Newman, D. J., *Anticancer agents from Natural Products*, Ed. Taylor & Francis Group, Boca Ratón: **2005**.

¹¹ Rouhi, A. M. *Chemical & Eng. News* **2003**, *13*, 77.

¹² a) <http://www.pharmamar.com>. b) Haefener B. *Discov. Today* **2003**, *8*, 536.

¹³ <http://www.uicc.ch> y <http://www.ecpc-online.org>.

3. Productos Naturales antitumorales de organismos marinos

La investigación de productos naturales de origen marino comenzó en el ecuador del siglo pasado, con el trabajo pionero de Werner Bergman, de la Universidad de Yale.¹⁴ Pero su auge se alcanzaría decenios más tarde, y no fue hasta mediados de los 70 cuando se vio el gran potencial que tenía el mar como fuente de productos naturales. Las aportaciones de John Faulkner, de la Universidad de California, Paul J. Scheuer, de la Universidad de Hawai, Kenneth L. Rinehart, de la Universidad de Illinois y Murray H. G. Munro, de la Universidad neozelandesa de Canterbury hicieron que el campo de los productos marinos fuera más y más conocido.

El estudio químico de los organismos marinos ha crecido rápidamente como lo atestiguan el gran número de publicaciones aparecidas en los últimos veinte años.¹⁵ Las razones por las que los organismos marinos nos han proporcionado compuestos biológicamente activos con inesperadas estructuras químicas las podemos encontrar en la gran diferencia de las condiciones de vida de estos respecto a los organismos terrestres: altas presiones, ausencia de luz, y bajas temperaturas, entre otros muchos factores. En este momento se conocen más de trece mil compuestos de fuentes marinas con una gran variedad estructural.¹⁶

La distribución de los productos naturales marinos aislados en 2005 se pueden observar en la figura 2. Alguno de esos nuevos metabolitos han mostrado actividades citotóxicas antitumorales importantes y otros se encuentran en fases clínicas ó preclínicas avanzadas.

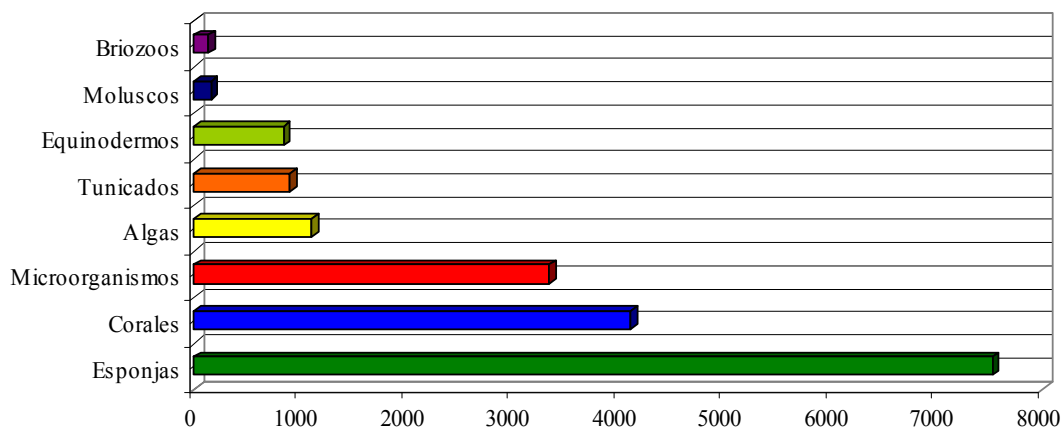


Figura 2. Distribución de los productos naturales de origen marino aislados hasta 2005.

¹⁴ Bergmann, W.; Feeney, R. J. *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981.

¹⁵ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2008**, *25*, 35.

¹⁶ La base de datos MarinLit dispone de todos los compuestos aislados de fuentes marinas clasificadas por géneros, especies, etc. Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. MarinLit, versiones para PC y Macintosh, University of Canterbury, Nueva Zelanda. <http://www.chem.canterbury.ac.nz/research/marinlit.htm>.

En una revisión bibliográfica publicada en 2006¹⁷ se muestran las estructuras de 150 productos naturales de origen marino que han presentado importantes actividades citotóxicas frente a diversas líneas celulares tumorales. En la Tabla 1 se describen aquellos productos naturales marinos de los que se ha logrado identificar su mecanismo de acción.

Tabla 1. Productos naturales marinos antitumorales de los que se conoce su mecanismo de acción.

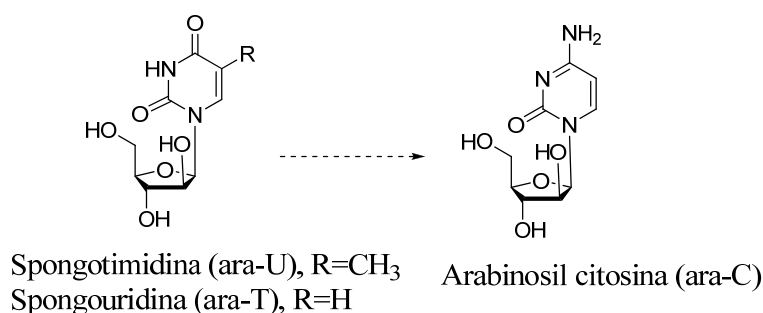
Compuesto	Organismo	Tipo de estructura
Aeroplisinina 1	Esponja	Alcaloide
Agosterol A	Esponja	Esteroides
Aplidina	Tunicado	Depsipeptido
Ascididemina	Esponja	Alcaloide
Briostatina-1	Briozoo	Macrólido
Cambrescicina 800	Esponja	Alcaloide
Cefalostatina	Gusano marino	Esteroides
Chondropsina A	Esponja	Macrólido
Deshidrotrisiferol	Alga	Triterpeno
Diazonamida A	Tunicado	Péptido
Dictiostatina	Esponja	Policétido
Didemmina B	Tunicado	Depsipeptido
Dideoxipetrosinol A	Esponja	Acido
Dihidromotuporamina C	Esponja	Alcaloide
Dolastina 10	Molusco	Péptido
Discodermolida	Esponja	Policétido
Dolastina 11	Molusco	Péptido
Dolastina 15	Sintético	Péptido
Ecteinasicina-743	Tunicado	Alcaloide
GA3 polisacárido	Alga	Polisacárido
Girolina	Esponja	Alcaloide
Halicondrina B	Esponja	Macrólido
Hemiasterlina (análogo)	Esponja	Triterpeno
Isogranultimida	Tunicado	Alcaloide
Kahalido F	Molusco	Depsipeptido
Lamellarina D	Molusco	Alcaloide
Laurenditerpenol	Alga	Diterpeno
Lissoclinólido	Tunicado	Acido
Neoamfimedina	Esponja	Alcaloide
Pelorusida A	Esponja	Macrólido
Psammaphisina	Esponja	Alcaloide
Smenospongorina	Esponja	Sesquiterpeno

Entre las fuentes naturales marinas y los productos naturales con actividad antitumoral aislados de ellas podemos destacar las siguientes:

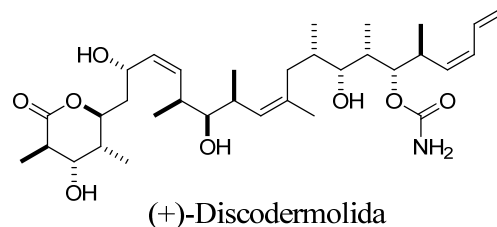
¹⁷ Mayer, A. M. S.; Gustafson, K. R. *Eur. J. Cancer* **2006**, *42*, 2241.

Esponjas

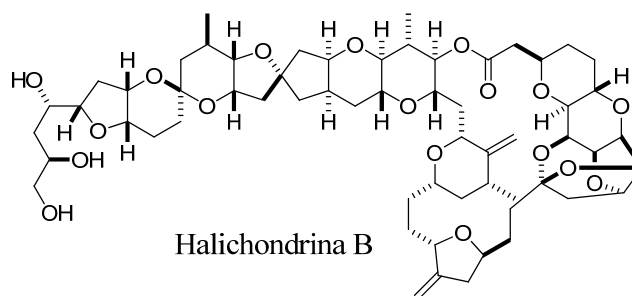
El compuesto anticanceroso **arabinosil citosina** (Ara-C) se obtuvo a partir de los derivados de dos compuestos aislados de la esponja *Tethya cripta*, **spongotimidina** y **spongouridina**, es comercializado en la actualidad por *Pharmacia & Upjohn Company*.¹⁸ Además, la estructura de estos productos naturales de origen marino fueron la base del estudio y desarrollo de nuevos nucleósidos usados como fármacos antitumorales y antivirales entre los que hay que destacar el AZT, uno de los antivirales más potentes que se conocen frente al virus del VIH. Este ejemplo refleja claramente como se puede desarrollar nuevos fármacos a partir de las estructuras de productos naturales bioactivos de origen marino.



La **discodermolida**, aislada de la esponja marina *Discodermia dissoluta* es un agente antitumoral muy potente, con un mecanismo de acción similar al taxol o la epotilona.¹⁹



La **halichondrina B**,²⁰ un macrólido aislado de una especie perteneciente al género *Halichondria* muestra una respuesta importante frente al cáncer de próstata y otros linfomas.²¹



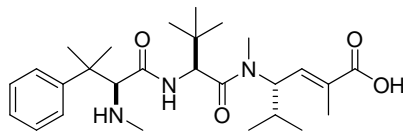
¹⁸ Geller, R. B.; Saral, R.; Karp, J. E.; Santos, G. W. *Leukemia* **1990**, *4*, 313.

¹⁹ a) Gunasekera, S. P.; Mickel, S. J.; Daeffler, R.; Niederer, D.; Wright, A. E.; Linley, P.; Pitts, T. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 749. b) Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Longley, R. E.; Schulte, G. K. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912.

²⁰ Uemura, D.; Takahashi, D.; Yamamoto, T.; Katayama, C.; Tanaka, J.; Okumura, Y.; Hirata, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4796.

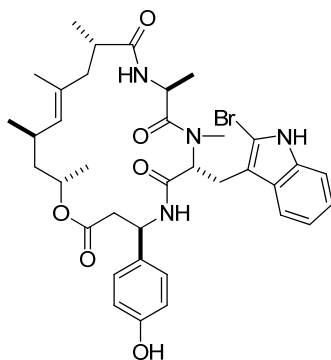
²¹ Kuznetsov, G.; Towle, M.J.; Cheng, H. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5760.

El tripéptido natural **hemiasterlina**, aislado por Kashman y col. de la esponja marina *Hemiasterella minor*,²² y la **milnamida A**,²³ aislada al mismo tiempo por Crews y col. de la esponja *Auleta cf. constricta*, han permitido sintetizar uno de los fármacos más potentes, el **HTI-286**, alcanzando valores de nM en 18 paneles de células tumorales. En la actualidad se encuentra en fase II de cáncer de pulmón.²⁴



HTI-286

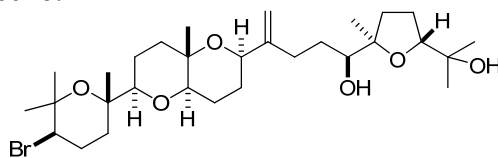
La **jasplakinolida** aislada de la esponja *Jaspis johnstoni* de las islas Fiji, y posteriormente de la esponja *Auleta cf. constricta* en Papua-Nueva Guinea.²⁵ Su interés radica en su efectividad contra el cáncer de próstata y ser activo frente al cáncer de piel, riñón y pulmón, además de sus propiedades antihelmínticas, insecticidas y funguicidas.



Jasplakinolida

Algas

De este tipo de organismos marinos podemos citar el **deshidrotrisiferol (DT)**,²⁶ un poliéter triterpenoide aislado por Pec y col. de la colección de algas rojas *Laurencia viridis* de las islas Canarias. El estudio citotóxico mostró la inducción de la apoptosis en diferentes cánceres de pecho.



Deshidrotrisiferol

²² Talpir, R. Benayahu, Y.; Kashman, Y.; Pannell, L.; Schleyer, M. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4453.

²³ Crews, P.; Farias, J. J.; Enrich, R.; Keifer, P. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2523.

²⁴ a) Loganzo, F.; Discafani, C. M.; Annable, T. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1838. b) Reddy, R.; Jaquith, J. B.; Neelagiri, V. R.; Saleh-Hanna, S.; Durst, T. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 695.

²⁵ a) Crews, P.; Manes, L. V.; Boehler, M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *27*, 2797. b) Zabriskie, T. M.; Klocke, J. A.; Ireland, C. M.; Marcus, A. H.; Molinski, T. F.; Faulkner, D. J.; Xu, C.; Clardy, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3123.

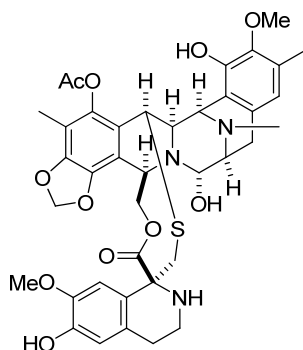
²⁶ Pec, M. H.; Aguirre, A.; Moser-Thier, K. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1451.

Tunicados

De entre los ejemplos más representativos de metabolitos secundarios obtenidos a partir de este tipo de organismos podemos citar los siguientes:

La **ecteinascidina 743** (ET-743) es la más importante de una serie de ecteinascidinas aisladas del tunicado procedente del Caribe *Ecteinascidia turbinata*,²⁷ se obtiene con un 0.0001% del peso total del organismo.

Yondelis, nombre comercial del compuesto, fue designado medicamento huérfano para el tratamiento del sarcoma de tejidos blandos por la Comisión Europea en 2001 y por la FDA en 2004. Así mismo, ostenta el estatus de medicamento huérfano para el tratamiento del cáncer de ovario en la Unión Europea desde el 2003 y desde el 2005 en EEUU. En septiembre de 2007, dos meses después de que la EMEA diera su aprobación, PharmaMar recibió la autorización de comercialización por parte de la Comisión Europea.²⁸ Yondelis es un producto pionero y se ha convertido en el primer fármaco antitumoral desarrollado y producido por una empresa española siendo el primero que se va a comercializar para el STB en las últimas tres décadas. Más concretamente, se utilizará en aquellos pacientes que no hayan respondido al tratamiento con antraciclinas y a la ifosfamida. Además, se encuentra en fase III para tratar cánceres de ovario, al mismo tiempo que se están realizando ensayos para cáncer de mama, de próstata y de fase I para tumores pediátricos.



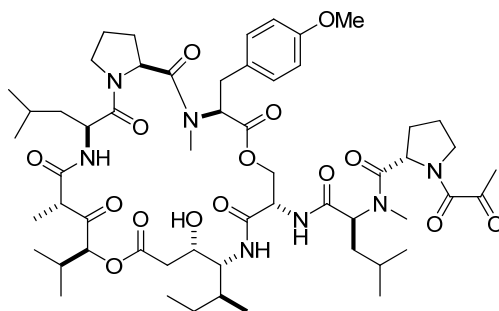
Ecteinascidina 743 (Yondelis)
ET-743

La **aplidina** ha sido patentada por la compañía española PharmaMar, siendo aislada del tunicado *Aplidium albinas* recogido en el mar Mediterráneo. Es un deshidroderivado de la didemnina B, un depsipéptido aislado de *Trididemnum solidum*. La aplidina se encuentra en la fase II como anticanceroso y los resultados obtenidos de los análisis clínicos en fase I tanto la evolución del perfil de seguridad del producto, como el análisis del tiempo de infusión y frecuencia ideal de administración, han

²⁷ a) D'Incali, M.; Colombo, T.; Ubezio, P. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 1920. b) Twelves, C.; Hoekman, K.; Bowman, A. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 1842. c) Donald, S.; Verschoyle, R. D.; Greaves, P. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 5902. d) Simoens, C.; Korst, A. E.; De Pooter, C. M. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 2305. e) Shao, L.; Kasanov, J.; Hornicek, F. J.; Morii, T. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 2381. f) Erba, E.; Bergamashi, D.; Bassano, L.; Faircloth, G. T.; D'Incali, M. *Eur. J. Cancer* **2001**, *37*, 97. g) Rinehardt, K. L.; Holdt, T.G.; Fregeau, N. L.; Stroh, J. G. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512.

²⁸ <http://www.elmundo.es> (07/06/2006) y <http://www.elpais.es> (27/05/2001).

demostrado su actividad en pacientes adultos con cánceres renales, linfomas y colon-rectales resistentes ante otro tipo de agentes convencionales.²⁹

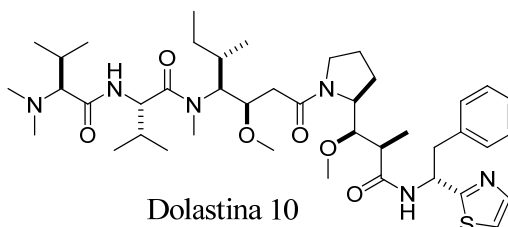


Aplidina

Moluscos

Dentro de los moluscos podemos citar los siguientes compuestos:

Las dolastinas, una familia de péptidos aislados en pequeñas cantidades de la liebre de mar *Dollabella auricularia*. De todas ellas, la **dolastina 10** y la **dolastina 15** son sin duda las que han presentado mejores resultados tras su estudio citotóxico. Se encuentran en fase II de ensayos clínicos, bajo la tutela del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de EE.UU., en pacientes con linfomas y leucemias crónicas.³⁰



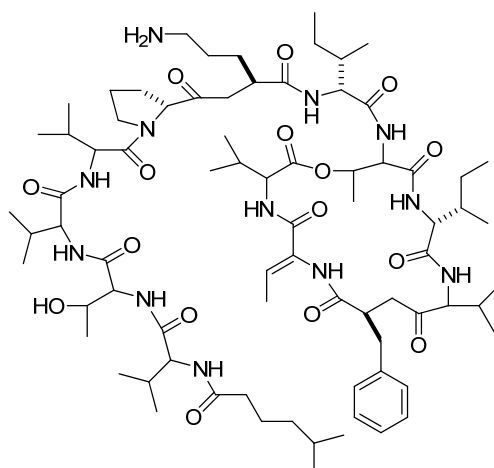
Dolastina 10

El compuesto **ω -conotoxina MVIIA (SNX-III)** es un péptido de 25 aminoácidos que se encuentra en el veneno del molusco *Conus magnus*. Ha completado la fase III de ensayos clínicos como tranquilizante de dolor en enfermos de cáncer o SIDA, y actualmente se encuentra en el mercado desde el año 2000 bajo el nombre comercial de Ziconotide.^{12a}

²⁹ a) Gutierrez, M.; Cardenas, F.; Giralt, E. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5700. b) Losada, A.; López-Oliva, J. M.; Sánchez-Puelles, J. M.; García-Fernández, L. F. *Br. J. Cancer.* **2004**, *91*, 1405. c) Taraboletti, G.; Poli, M.; Dosi, R. *Br. J. Cancer.* **2004**, *90*, 2418. d) Bresters, D.; Broekhuizen, A. J.; Kaaijk, P. *Leukemia* **2003**, *17*, 1338. e) Cuadrado, A.; García-Fernández, L. F.; González, L. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 241. f) Gajate, C.; An, F.; Mollinedo, F. *Clinic. Cancer Res.* **2003**, *9*, 1535. g) Piers, A. C.; Britton, R.; Andersen, R. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 530.

³⁰ a) Bai, R.; Covell, D. G.; Taylor, G. F. **2004**, 279, 30731. b) Aherne, G. W.; Hardcastle, A.; Valenti, M. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1996**, *38*, 225. c) Petit, G. R.; Singh, S. B.; Hogan, F.; Lloyd-Williams, P.; Herald, D. L.; Burkett, D. D.; Clewlow, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5463.

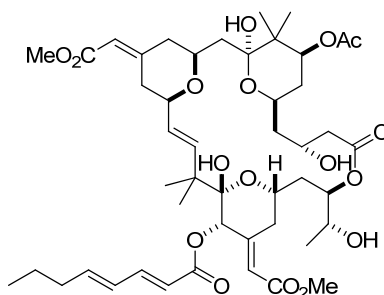
El **kahalalido F** es un ciclodepsipéptido aislado del molusco *Elysia rufescen* patentado por la empresa PharmaMar. Su síntesis total garantiza el suministro del compuesto para una posible comercialización.³¹



Kalahido F

Briozoos

Dentro de los productos naturales aislados de briozoos, la **briostatina I** ha sido objeto de un mayor número de estudios clínicos. Esta macrociclolactona aislada del briozoo *Bugula neritina* en el Pacífico, presentó actividad contra células tumorales de colon, pecho, piel, pulmón y sistema linfático.³²



Briostatina 1

³¹ a) Lopez-Macia, A.; Jimenez, J. C.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11398. b) Hamman, M. T.; Scheuer, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5825.

³² a) Ali, S.; Aranha, O.; Li, Y.; Petit, G. R.; Sarkar, F. H.; Philip, P. A. *Chemoter. Pharmacol.* **2003**, *52*, 235. b) De Lorenzo, M. S.; Yamaguchi, K.; Subbaramaiah, K.; Dannenberg, A. *J. Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 5036. c) Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Doubek, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846.

4. Esteroides

4.1 Antecedentes

Los esteroides son una de las estructuras orgánicas más abundantes en la naturaleza y presentan una gran variedad de propiedades farmacológicas como lo demuestran numerosos estudios realizados por químicos, biólogos, farmacólogos y demás áreas científicas.³³

Su esqueleto base es un perhidrociclopenta[α]fenantreno siendo la estructura de colestano una de las más comunes. La numeración de átomos de carbono y la nomenclatura de los anillos del esqueleto de colestano se indica en la figura 3.³⁴

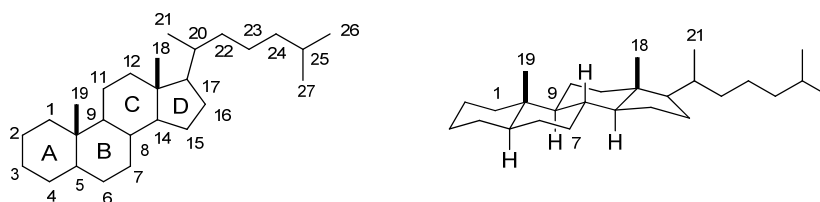


Figura 3. Numeración y nomenclatura del esqueleto de colestano

Cabe mencionar las siguientes características estructurales:

- Habitualmente presentan un grupo hidroxilo en la posición C-3.
- Los sustituyentes que se encuentran por debajo del hipotético plano que forma el esqueleto esteroideal se dice que poseen disposición α , mientras que si se encuentra por encima del plano se indica como β .
- La fusión de los anillos A y B puede ser *cis* ó *trans* (Fig. 4). Por el contrario la fusión entre los anillos B y C es siempre *trans* mientras que los anillos C y D pueden encontrarse fusionados en *cis* ó *trans*.
- Los carbonos asimétricos más representativos suelen ser el C-8, C-9, C-10, C-13, C-14 y C-17.
- Las posiciones C-18 y C-19 correspondientes a dos grupos metilos son muy característicos y fácilmente identificables por RMN.
- Los más abundantes en la naturaleza son los que presentan en su estructura 27 carbonos. Aparecen mayoritariamente en artrópodos, moluscos, equinodermos, y crustáceos. También podemos encontrar mezclas complejas de esteroides con 26, 28, 29 y 30 átomos de carbono en esponjas, tunicados y algas.
- El doble enlace puede aparecer en las posiciones Δ^4 , Δ^5 , Δ^7 , Δ^8 , Δ^{22} y Δ^{24} de manera más o menos habitual, pero también pueden existir en otras posiciones.

³³ Furniss, B. S.; Hannaford, A. J.; Smith, P. W. G.; Tatchell, A. R. Textbook of Practical Organic Chemistry, Ed. 5th Longmann Scientific & Technical, New York: 1988.

³⁴ Goad, L.; Akihisa, T.; Analysis of Sterols, Ed. Chapman & Hall, London: 1997.

- Las fuentes de origen de esteroides en los organismos marinos son tres:

a) La biosíntesis realizada por el propio organismo a partir del acetyl-CoA, vía ácido mevalónico y escualeno. La enzima reguladora es la hidroximetilglutaril-CoA (HMGA-CoA) reductasa.

b) Mediante la absorción-asimilación en la propia dieta del organismo, con la posterior modificación durante el metabolismo de los mismos.

c) El intercambio simbiótico, desde algas u organismos asociados como bacterias y hongos.

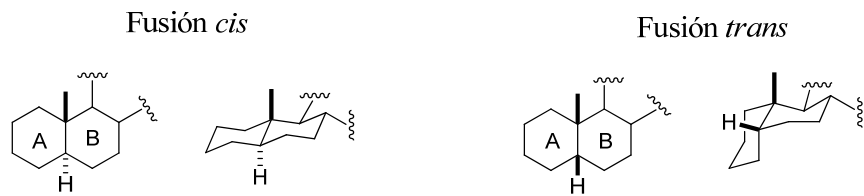
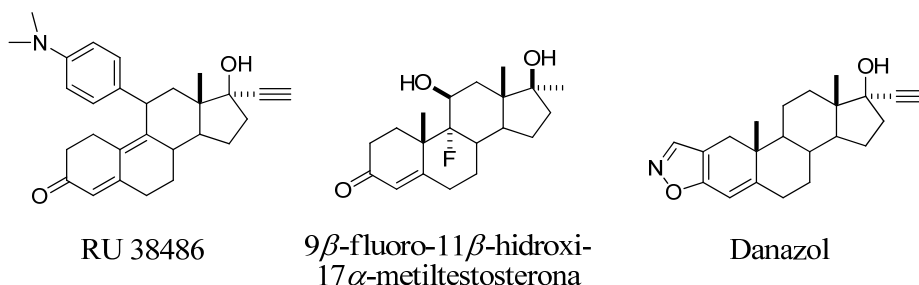


Figura 4. Estructuras parciales de los anillos A y B sobre el plano y en perspectiva.

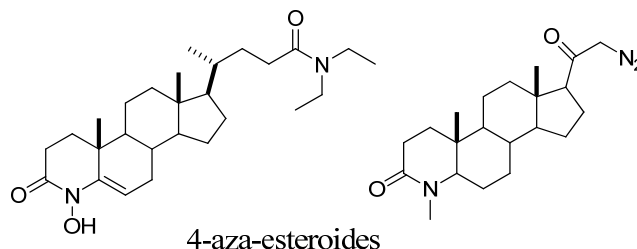
4.2. Esteroides anticancerosos

Algunos de los ejemplos más representativos de esteroides empleados como fármacos en el tratamiento del cáncer son los siguientes:³⁵

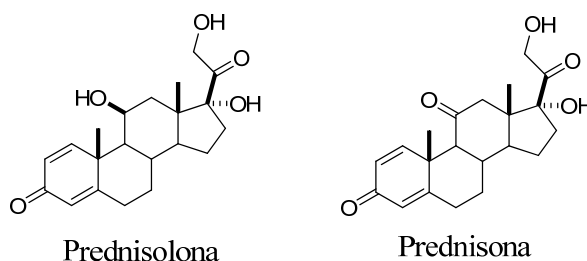
Los andrógenos y derivados de androstanos como el **danazol** ó el **RU 38486** han mostrado ser efectivos frente a diferentes tipos de cáncer de pecho. El danazol mostró una respuesta positiva en el 17% de los pacientes que presentaban estados muy avanzados de cáncer de pecho.³⁶ También el **9 α -fluoro-11 β -hidroxi-17 α -metiltestosterona** presentó una elevada inhibición del tumor de Dunning y una reducción del 22% de los tumores en los pacientes que presentaban cáncer de pecho muy desarrollado.



Numerosos estudios sobre la 5 α -reductasa han mostrado que los **4-aza esteroides**, tanto derivados de los ácidos biliares como de los pregnanos, resultaron ser unos inhibidores potentes de esta enzima.



Los corticosteroides como la **prednisolona** ó la **prednisona** son fármacos muy empleados por sus propiedades antineoplásicas específicas tanto en el tratamiento del cáncer como de otras patologías.



³⁵ a) Blickenstaff R. T. Antitumor Steroids, Ed. Academic Press, San Diego: 1992. b) Zeelen, F. J. Medicinal Chemistry of Steroids, Ed. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam: 1990.

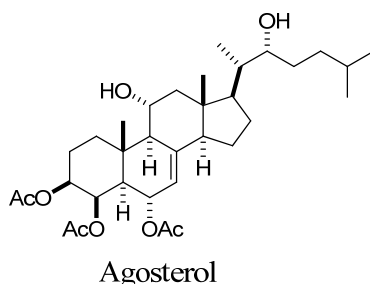
³⁶ Coombes, R. C.; Pérez, D.; Gazet, J.-C.; Ford, H. T.; Nash, A. G.; Powles, T. J. *Cancer Treat. Rep.* **1980**, *64*, 1073.

4.3. Esteroides citotóxicos de origen marino

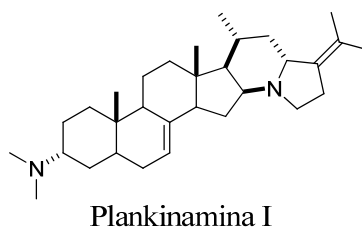
Dentro de esta enorme variedad y diversidad de esteroides podemos citar los siguientes ejemplos de esteroides citotóxicos naturales clasificados en función del tipo de organismo:³⁷

Espojas

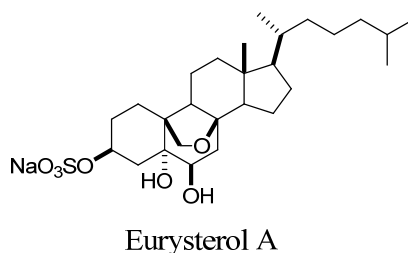
Mitsuo y col. lograron aislar un esteroide polihidroxiado, el **agosterol A**,³⁸ de una esponja del género *Spongia*, que presentó la capacidad de revertir la resistencia que generan ciertos tumores en ensayos preclínicos.



La plankinamina A³⁹ aislada de una esponja del género *Plakina*. El estudio de esta familia de esponjas permitió el aislamiento de otras **plankinaminas I-K**,⁴⁰ que resultaron ser citotóxicas frente a las células tumorales de colon humano (H-116).



A partir de la esponja del género *Euryspongia*, se aislaron los **eurysteroles A y B** que resultaron ser citotóxicos frente a las células tumorales H-116.⁴¹



³⁷ a) Cordell, A. G. *The Alkaloids, Chemistry and Biology*, Ed. Academic Press, San Diego: 1999. b) Yuexian, L.; Dias, J. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 283. c) D'Auria, M. V.; Minale, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1839.

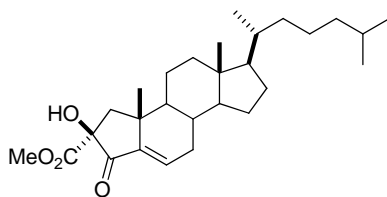
³⁸ a) Mitsuo, M.; Noguchi, T.; Nacajima, Y. *Oncol. Res.* **2003**, *14*, 39. b) Ren, Q. Q.; Furukawa, T.; Aoki, S. *J. Pharmacol.* **2003**, *138*, 1553. c) Murakami, N.; Sugimoto, M.; Murita, M.; Kobayashi, M. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 2663.

³⁹ Roser, R. M.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 5157.

⁴⁰ Ridley, C. P.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1536.

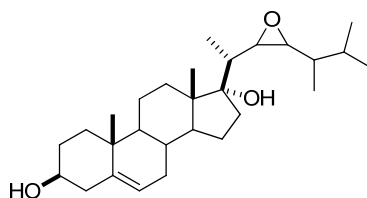
⁴¹ Boonlarpradab, C.; Faulkner, D. J. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 846.

De las esponjas caribeñas de la especie *Phorbas amaranthus* se lograron aislar cuatro esteroides denominados **phorbasterones** A-D,⁴² mostrando moderada citotoxicidad frente al panel celular de cáncer de colon HT-116.



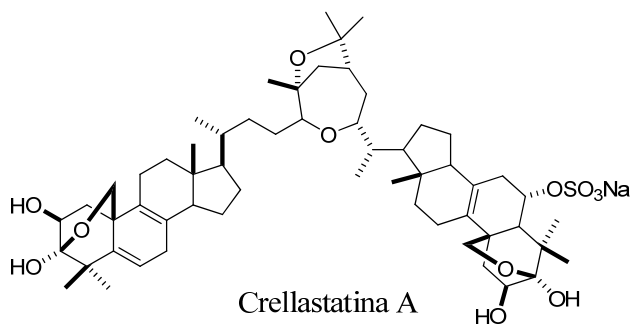
Phorbasteron D

Los ensayos farmacológicos realizados por la empresa PharmaMar en cuatro nuevos esteroides aislados de la esponja *Axinilla* cf. *bidderi*, mostraron actividad citotóxica frente a un panel de cinco líneas celulares tumorales.⁴³ Aquellos que tenían un grupo epóxido en la posición C-22/C-23 de su cadena lateral resultaron ser los más activos.



Epoxiesteroide aislado de
Axinilla cf. *bidderi*

A partir de la esponja *Crella* sp. se aislaron las **crellastatinas** A-M,⁴⁴ esteroides bis-nosimétricos de la crellastatina A que mostraron valores de IC₅₀ de 1 a 10 µg/ml frente a diversos paneles celulares tumorales.



Crellastatina A

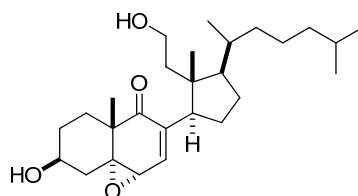
⁴² Masuno, M. N.; Pawlik, J. R.; Molinsky, T. F. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 231.

⁴³ Funel, C.; Berrué, F.; Roussakis, C.; Amade, P. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 491.

⁴⁴ D'Auria, M V.; Giannini, C.; Zampella, A.; Minale, L.; Debitus, C.; Roussakis, C. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7382.

Tunicados

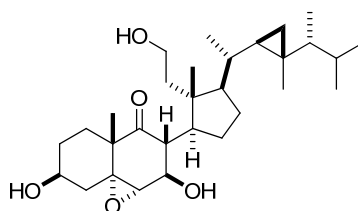
Muchos esteroides citotóxicos han sido aislados en diversas especies de tunicados. Como ejemplo representativo se puede citar el esteroide aislado de la especie *Ascidia nigra*, un esteroide citotóxico que tiene el anillo C abierto y un grupo epóxido en las posiciones C-5/C-6.⁴⁵



Secoesteroide aislado de *Ascidia nigra*

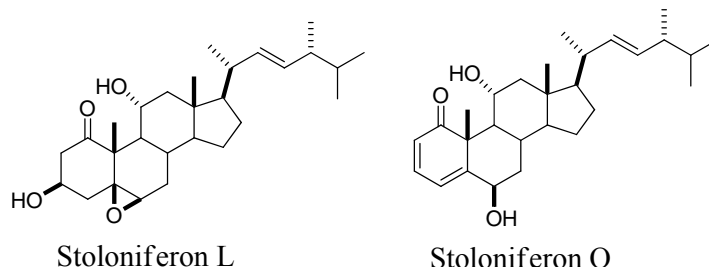
Cnidarios

Podemos incluir dentro de los gorgosteroles, muy abundantes en Cnidarios (corales blandos y gorgonias), el aislado del coral *Lobophytum* sp.⁴⁶ Se trata de un secoesterol polihidroxigenado con un epóxido en las posiciones C-5/C-6 y tres grupos hidroxilo en C-3, C-7 y C-11. Además en los ensayos farmacológicos mostró actividad frente a la línea tumoral A-2780 (carcinoma de ovario humano) y K-562 (un tipo de leucemia humana), con valores de 6.3 y 7.2 μM , respectivamente.



Secoesterol aislado de *Lobophytum* sp.

Algunos ejemplos de esteroides citotóxicos aislados a partir de octocorales son los **stoloniferones**,⁴⁷ extraídos de *Clavularia viridis* han mostrado citotoxicidades de 2.9 a 0.2 μM frente a la línea tumoral de cáncer de colon HT-29.



Stoloniferon L

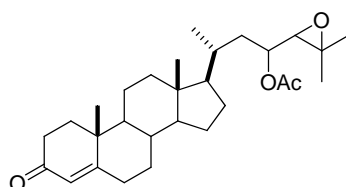
Stoloniferon O

⁴⁵ Aiello, A.; Esposito, G.; Fattoruso, E.; Luciano, P.; Menna, M. A. *Steroids* **2003**, *68*, 719.

⁴⁶ Morris, L. A.; Christie, E. M.; Jaspars, M.; Ofwegen, L. P. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 538.

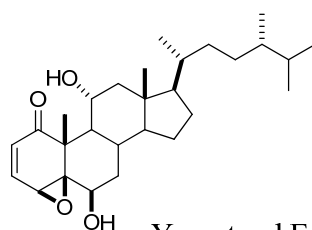
⁴⁷ Duh, C. Y.; Lo, I. W.; Wang, S. K.; Dai, C. F. *Steroids* **2007**, *72*, 573.

A partir de otro octocoral de *Dasystemella acanthina* recolectado en la Antártida, se lograron aislar siete esteroides polioxigenados.⁴⁸ Todos mostraron actividad citotóxica importante frente a tres líneas celulares tumorales.



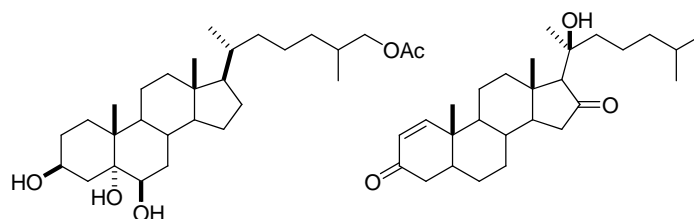
Polihidroxiesteroide aislado de *Dasystemella* sp.

Los **yonarasteroles**,⁴⁹ aislados del octocoral *Clavularia viridis*, son otros ejemplos representativos de esteroides citotóxicos procedentes de organismos marinos. Yonasterol E mostró una elevada citotoxicidad frente al panel celular de adenocarcinoma de colon rectal humano.



Yonasterol E

Las **riseinas** A-B se aislaron del octocoral *Carijoa riisei*⁵⁰ y el (20*S*)-20-hidroxicolest-1-en-3,16-diona aislado de *Leptogorgia sarmentosa*,⁵¹ recolectado en Cádiz, mostraron citotoxicidad frente a diferentes líneas celulares tumorales.



Riseina A

Esteroides aislado de *Leptogorgia sarmentosa*

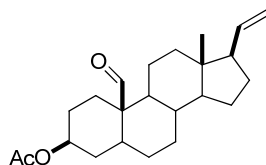
⁴⁸ Mellado, G. G.; Zubía, E.; Ortega, M. J.; López, P. J. *Steroids* **2004**, *69*, 291.

⁴⁹ Iwashima, M.; Nara, K.; Nakamichi, Y.; Iguchi, K. *Steroids* **2001**, *66*, 25.

⁵⁰ Maia, L. F.; Epifanio, R. A.; Fenical, W. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1427.

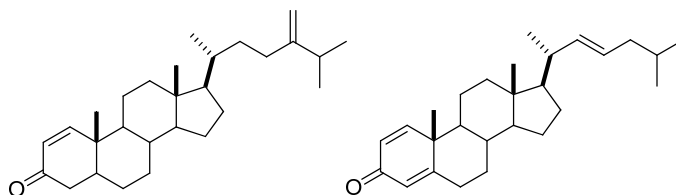
⁵¹ Garrido, L.; Zubía, E.; Ortega, M. J.; Salvá, J. *Steroids* **2000**, *65*, 85.

Los **stereonesteroides** A-I,⁵² aislados de un coral blando de la especie *Stereonephtya crystalliana*, mostraron también actividad citotóxica ED₅₀ 3 - 11 µg/mL frente a varias líneas tumorales. De todos ellos, el stereonesteroide B, con un grupo acetato en la posición C-3, resultó ser el más citotóxico mostrando valores de 1 µg/mL.



Stereonesteroide B

El género de corales blandos *Lemnalina cervicorni* y *Dendronephtya gigantea*, rindió una serie de cuatro esteroides, los **dendronesteroides**,⁵³ que mostraron actividad frente a las líneas tumorales A-549 y HT-29.

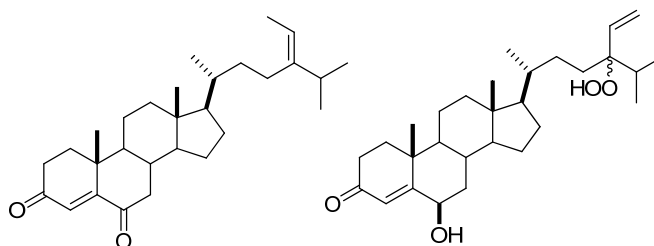


Dendronesteron B

Dendronesteron C

Algas

Dentro de los esteroides citotóxicos naturales aislados de algas se pueden mencionar los **fucosteroles**⁵⁴ aislados del alga parda *Turbinaria conoides*. Los fucosteroles F e I presentaron valores de ED₅₀ 0.5 - 2 µg/mL frente a tres paneles tumorales.



Fucosterol F

Fucosterol I

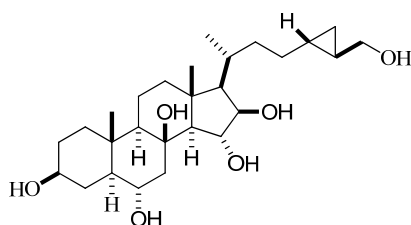
⁵² Wang, S. K. Dai, C. F.; Duh, C. Y. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 103.

⁵³ Duh, C. Y.; El-Gamal, A. H.; Song, P. Y.; Dai, C. F. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1650.

⁵⁴ Sheu, J. H.; Wang, G. H.; Sung, P. J.; Duh, C. Y. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 224.

Equinodermos

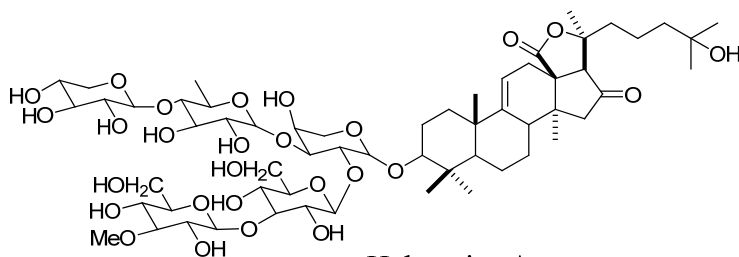
Un ejemplo ilustrativo de esteroides aislados de un equinodermo puede ser el **prigiasterol 1**, aislado de la estrella de mar de la especie *Hyppasteria phrygiana*.⁵⁵ Su importancia farmacológica reside en la capacidad de inhibición del crecimiento del carcinoma de Ehrlich.



Prigiasterol 1

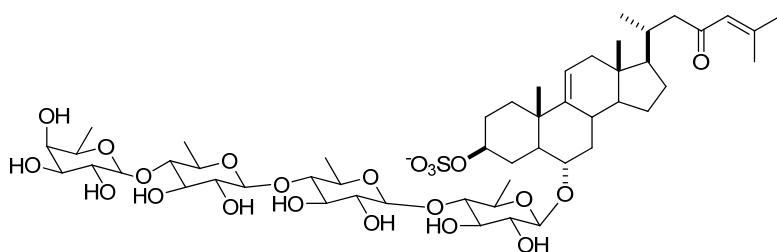
Dentro de este filo se presentan dos tipos de **saponinas**, las holoturinas y las asterosaponinas.⁵⁶

Las holoturinas son los compuestos más activos y responsables de la toxicidad de los pepinos de mar estando formados por una unidad oligosacárida y por otra esterooidal (aglicón). Un ejemplo es la holotoxina A, aislada de *Stichopus japonicus*.



Holotoxina A

Las asterosaponinas son glicosidos esteroidales aislados de las estrellas de mar. Estos compuestos esteroidales tóxicos son utilizados por este filo para repeler a sus depredadores. La producción de sustancia varía según la estación del año, concentrándose en el estómago y gónadas del animal. Este es el caso de la asterosaponina A aislada de *Asteria amurensis*.



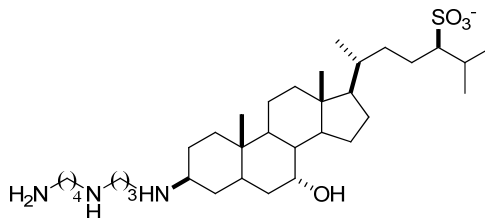
Asterosaponina A

⁵⁵ Levina, E. V.; Kalinovskiy, A. I.; Stonik, V.A. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1541.

⁵⁶ Scheuer, P. J. *Marine Natural Products*, 2, Academic Press, Inc., **1978**, 139.

Esteroides en vertebrados marinos.

Dentro de los vertebrados marinos es importante destacar el aislamiento de la **escualamina**,⁵⁷ un potente inhibidor de la angiogénesis, de *Squalus acanthias* un tiburón muy abundante y de pequeño tamaño.



Escualamina

⁵⁷ Moriarty, R. M.; Enache, L. A.; Kinney, W. A.; Guo, L. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 5139.

1

Síntesis de nuevos
análogos de los
6-
hidroximinoesteroide
s

1. Antecedentes

1.1. Hidroximinoesteroides de origen natural.

El equipo de investigación de Productos Naturales Marinos de la Universidad de A Coruña del área de Química Orgánica, lleva realizando desde hace varios años un estudio centrado en la búsqueda de nuevos antitumorales a partir de organismos marinos. En 1995, de dos especies de esponjas, *Cinachyrella alloclada* y *apion*, recolectadas en la playa de Pituba, Salvador de Bahía (Brasil) se lograron aislar y caracterizar dos nuevos esteroides (**1** y **2**),⁵⁸ que constituyeron los primeros compuestos aislados de organismos marinos que poseían un esqueleto esterooidal con un grupo oxima. La actividad citotóxica selectiva que mostró el compuesto **1** frente a las líneas tumorales P-388, A-549 y MEL-28, permitió considerarlo como un nuevo “cabeza de serie” en la búsqueda de agentes antitumorales (Fig. 5).

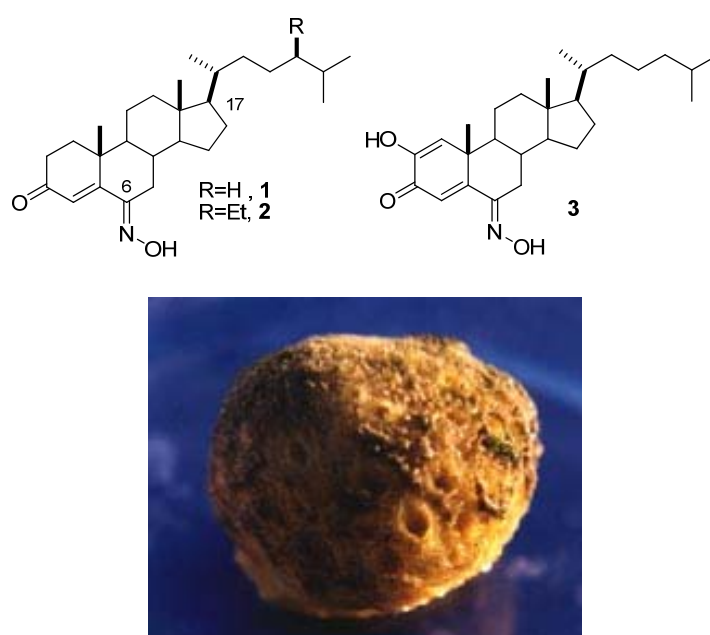
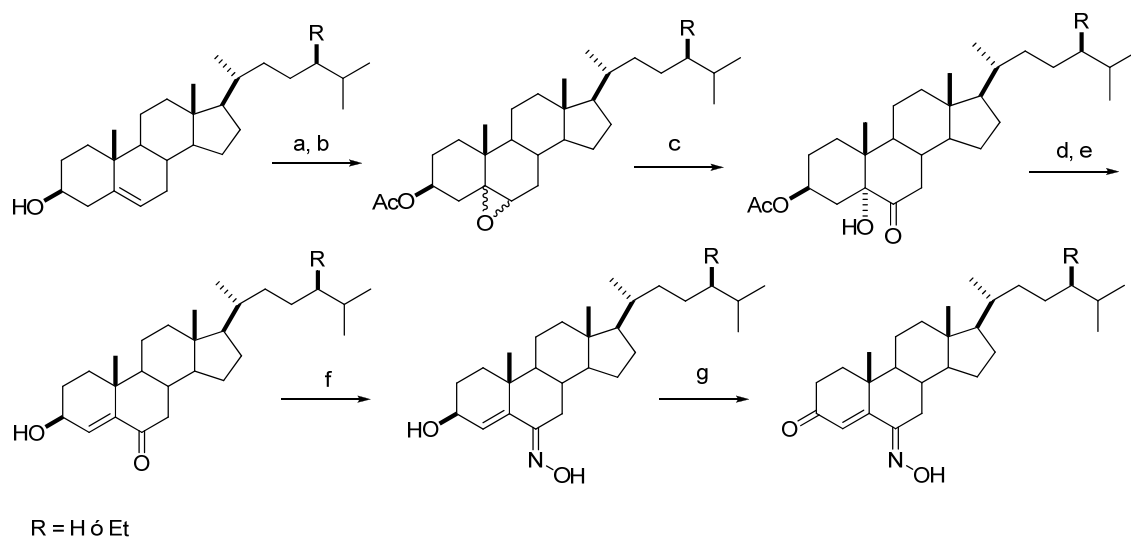


Figura 5. 6E-hidroximinoesteroides naturales (**1** y **2**) y sintético (**3**) y fotografía de la esponja *Cinachyrella* sp.

La estructura de los productos **1** y **2**, incluyendo su configuración absoluta, fue confirmada mediante su síntesis a partir de colesterol y β -sitosterol, respectivamente, lo que permitió desarrollar una estrategia sintética para obtener este tipo de compuestos (esquema 1).

⁵⁸ Rodríguez, J.; Nuñez, L.; Peixinho, S., Jiménez, C. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 1833.



Esquema 1. *Reactivos y condiciones:* (a) $\text{Ac}_2\text{O}:\text{Py}$ (1:1) (99%); (b) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 (97%); (c) CrO_3 , H_2O (90%); (d) SOCl_2 , Py (92%); (e) 5% KOH, MeOH (82%); (f) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py (95%); (g) CrO_3 , Py (70%).

Con el fin de explorar las relaciones estructura-actividad para este tipo de compuestos como agentes citotóxicos e incrementar su actividad frente a las líneas tumorales descritas anteriormente, utilizando la mencionada estrategia sintética, el grupo de investigación preparó una serie de análogos variando tanto la estructura de la cadena lateral como el grado de oxidación del anillo A. Los resultados obtenidos⁵⁹ mostraron que estos esteroides disponen de una estructura adecuada para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales, tanto por su elevada actividad citotóxica, como por su selectividad.

De los análogos obtenidos en esta primera fase, se encontró uno, el compuesto **3** que presentó una actividad citotóxica elevada y selectiva frente a las células tumorales A-549 y MEL 28, (IC_{50} 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por lo que fue seleccionado y enviado al NCI (Instituto Nacional del Cáncer de EE.UU.), para que fuese analizado frente a un panel de 60 células tumorales. Los ensayos farmacológicos obtenidos en el NCI confirmaron su alta citotoxicidad y selectividad, pero no fue lo suficientemente elevada para que el compuesto **3** fuera seleccionado para los posteriores ensayos.

La síntesis de derivados de 6*E*-hidroximinoesteroides naturales con variaciones en la cadena lateral y con diversos grados de oxidación en el anillo A permitió deducir diversas relaciones estructura-actividad. Así, se dedujeron tres requisitos estructurales para la existencia de actividad citotóxica selectiva: la presencia de una cadena lateral de colesterol, la de una posición oxigenada en C-3 y que posea un elevado grado de oxidación en el anillo A (Fig. 6).

⁵⁹ Deive, N.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2612.

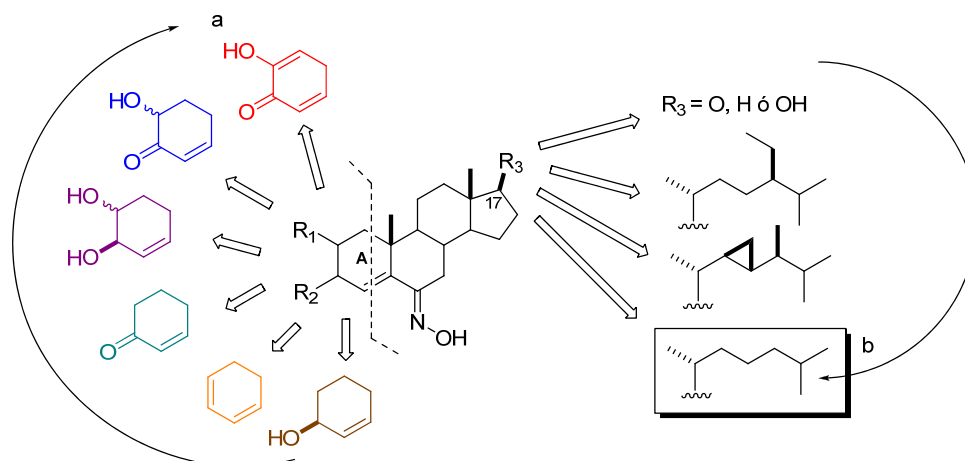


Figura 6. Modelo de citotoxicidad selectiva de los 6E-hidroximino-4-en esteroides: (a) Un elevado grado de oxidación en el anillo A trae consigo un aumento de actividad citotóxica. (b) Cadena lateral requerida para que presenten actividad.

Dado el gran potencial de estos compuestos como nuevos agentes antitumorales, se protegieron bajo las patentes “Nuevos 6E-hidroximinoesteroides. Procedimiento de Obtención mediante síntesis a partir de esteroides comerciales y su aplicación como agentes citotóxicos” Oficina Española de Patentes y Marcas, N° solicitud: P200101747 y “Nuevos 2-hidroxi-6E-hidroximinoesteroides. Procedimiento de Obtención y su aplicación como agentes citotóxicos” Oficina Española de Patentes y Marcas, N° de solicitud: P200300931.⁶⁰

⁶⁰ Boletín Oficial de Propiedad Industrial, 1 de febrero de 2005, pág. 523. Boletín Oficial de Propiedad Industrial, 1 de octubre de 2005, pág. 14480-14481.

1.2. Hidroximinoesteroides sintéticos y aplicaciones

En la bibliografía se han descrito varios ejemplos sobre la síntesis de hidroximinoesteroides que presentan un grupo oxima en las posiciones C-1, C-2, C-3, C-4, ó C-7 (Fig. 7).⁶¹

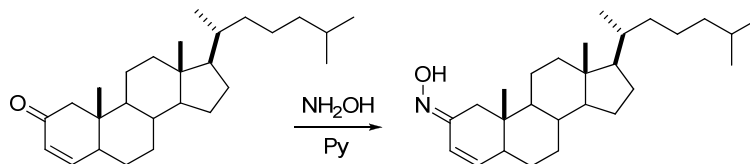


Figura 7.

Diversos grupos de investigación han realizado aproximaciones sintéticas para la obtención de los 6-hidroximinoesteroides⁶² no solo por su importancia sintética sino también por tratarse de candidatos potencialmente citotóxicos.⁶³ Dentro de estos, podemos destacar a la 6E-hidroximino-17-hidroxiandrost-4-en-3-ona. Esta molécula actúa como inhibidora de la enzima aromatasa presente en la placenta humana (Fig. 8).⁶⁴ Además, su importancia mostrada en el tratamiento del cáncer de pecho refuerza el interés en la síntesis de este tipo de compuestos.⁶⁵

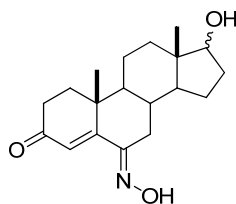


Figura 8. El 6E-hidroximino-17-hidroxiandrost-4-en-3-ona.

Los hidroximinoesteroides también han sido usados en reacciones de transposición de Beckman para la formación de lactamas,⁶⁶ ya que la introducción de un heteroátomo o la sustitución de uno o más átomos de carbono por un heteroátomo en el esqueleto esteroideal afecta a las propiedades químicas y en ciertas ocasiones produce alteraciones en su actividad biológica.

⁶¹ a) Sohár, P.; Bodor, A.; Schwart, R. *Steroids* **1999**, *64*, 246. b) Suginome, H.; Ohsima, K. Ohue, Y.; Ohki, T.; Senboku, H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 3239. c) Catsoulacos, P.; Catsoulacos, D. *J. Heterocyclic Chem.* **1993**, *30*, 1.

⁶² a) Ren, X. R.; Ou, W. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8445. b) Rizzardo, E.; Smith, G. C. *Aust. J. Chem.* **1978**, *31*, 97.

⁶³ a) Garbuz, N. I.; Solovei, L. P.; Kovganko, N. V.; Chernov, Y. G. *J. Appl. Spectroscopy* **2002**, *69*, 58. b) Zolotar', R. M.; Bykhovets, A. I.; Kashkan, Z. N.; Chernov, Y. G.; Kovganko, N. V. *Chem. Nat. Comp.* **2002**, *38*, 167. c) Kovanko, N. B.; Chernov, Y. G. *Chem. Nat. Comp.* **2000**, *36*, 189.

⁶⁴ Holland, H. L.; Kumaresan, S.; Njar, V. C. O. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, 585.

⁶⁵ Gervais, M.; Tan, L. *Anticancer Res.* **1993**, *13*, 383.

⁶⁶ a) Peng, J.; Deng, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 403. b) Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 227. c) Dolle, R. E.; Allaudeen, H. S.; Kruse, L. I. **1990**, *33*, 877. c. d) Anastasia, M.; Allevi, P.; Ciuffreda, P. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 2123.

Recientemente⁶⁷ se ha publicado la síntesis de varios esteroides con un grupo oxima en su estructura, con el fin de evaluar la actividad antineoplásica como inhibidores de la citocromo aromatasas P-450.⁶⁸ Esta es la enzima clave en la biosíntesis de los estrógenos responsables en el carcinoma de pecho humano. Más concretamente, se sintetizaron los (*Z*)- y (*E*)- 6-hidroximino-4-eno así como la 7-aza- β -homocolest-4-en-3-ona, producto de la transposición de Beckmann de la oxima *Z* y la 6-aza- β -homocolest-4-en-3-ona, obtenida a partir de la oxima *E* (Fig. 9).

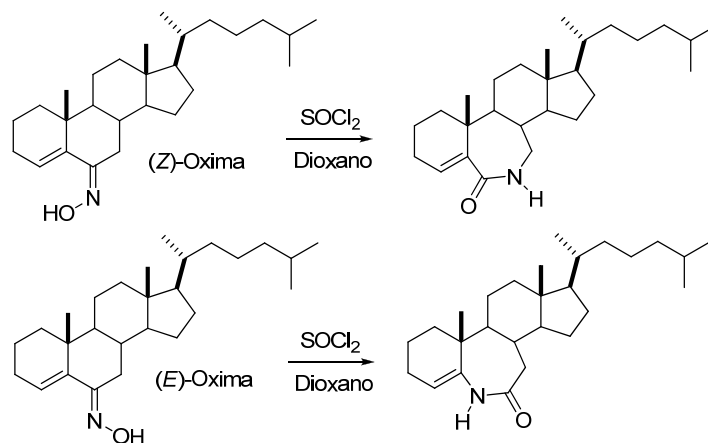


Figura 9.

La dimerización o la polimerización son un punto interesante en la búsqueda de esqueletos esteroidales con diversidad estructural. Se sabe que numerosos esqueletos diméricos y oligoméricos actúan como ligandos en proteínas,⁶⁹ o presentan un comportamiento como micelas⁷⁰ o cristales líquidos.⁷¹ En este sentido los dímeros pueden dirigir procesos celulares,⁷² o promover la afinidad de determinados ligandos al generar puntos extra de anclaje en determinados centros activos.⁷³

⁶⁷ a) Krstić, N. M.; Bjelakovic, M. S.; Zizak, Z.; Paulovic, M. D.; Juranic, Z. D.; Paulovic, V. D. *Steroids* **2007**, *72*, 406. b) Wang, C.; Jiang, X.; Haijian, S.; Lu, J.; Hu, Y.; Hu, H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4579.

⁶⁸ Jindal, D. P.; Chattopadhyay, R.; Guler, S.; Gupta, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 1025.

⁶⁹ Clemons, P. A. *Curr. Opin. Chem.* **1999**, *3*, 112.

⁷⁰ McKenna, J.; McKenna, J. M. Thornthwaite, D. W. *J. Chem. Soc. Comm.* **1977**, 809.

⁷¹ Hoffmann, S.; Kumpf, W. *Chem.* **1986**, *8*, 293.

⁷² Diver, S. T.; Schreiber, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5106.

⁷³ Nicolau, K. C.; Hughes, R.; Cho, S.-Y.; Wissinger, N.; Smethurst, C.; Labischinski, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3823.

El primer precedente de estructuras diméricas de hidroximinoesteroides data de 1992, cuando se realizó una hidrólisis con hidróxido sódico en metanol sobre un $3\beta,5\beta$ -diacetoxi-6-hidroximinocolestano. Fruto de este proceso, se obtuvieron varios productos, de entre los que destacaron por su novedosa estructura una serie de oximas diméricas esteroidales (Fig. 10).⁷⁴

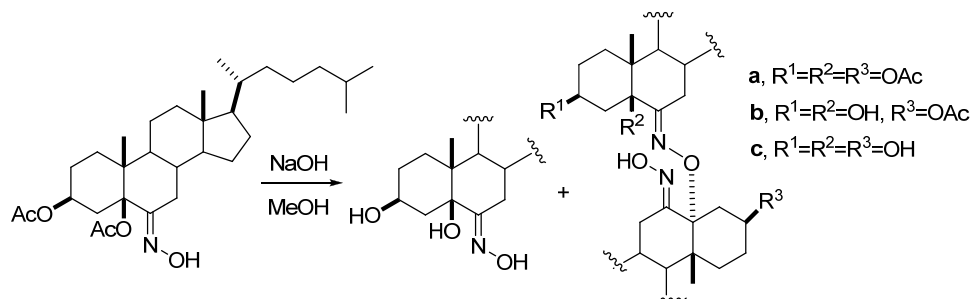


Figura 10. Dímeros de los $6E$ -hidroximinoesteroides obtenidos por hidrólisis básica.

⁷⁴ Duddeck, H.; Frelek, J.; Snatzke, G.; Szczepek, W. J.; Wagner, P. *Liebigs Ann. Chem.* **1992**, 715.

2. Objetivos

Teniendo en cuenta estos antecedentes nos planteamos como objetivo de este capítulo la síntesis de una nueva serie de análogos de los 6-hidroximinoesteroides utilizando los requerimientos estructurales necesarios para que este tipo de compuestos presenten actividad citotóxica. Con la evaluación citotóxica de estos análogos podremos tener un mapa adicional sobre el potencial farmacológico y ampliar las relaciones estructura-actividad.

Para alcanzar este objetivo se planteó la preparación de los siguientes análogos:

A) Síntesis de 6-hidroximinoesteroides con una posición oxigenada adicional en el anillo A, B y D.

Con el fin de evaluar la influencia de la posición oxigenada en los anillos A, B y D en la actividad citotóxica se propone la obtención de cuatro análogos: **14**, con un grupo hidroxilo en la posición C-1; **25**, con un grupo hidroxilo en la posición C-7; **31**, con un epóxido entre las posiciones C-4/C-5 y **49**, con un grupo acetato en C-16 (Fig. 11a).

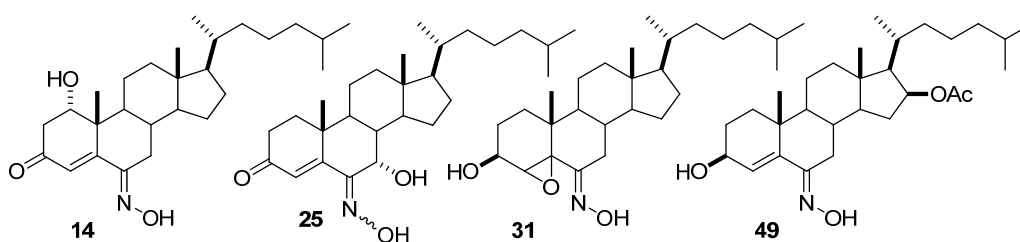


Figura 11a. 6-Hidroximinoesteroides con una posición adicional en el anillo A, B y D.

B) Síntesis de 6-hidroximinoesteroides con un átomo de flúor en la posición C-5.

Con el propósito de estudiar la influencia de un átomo de flúor en la posición C-5 en la actividad citotóxica se propone la obtención de otros tres análogos: **54**, con un grupo carbonilo en C-3 y los diastereoisómeros **58a** y **58b**, con grupos hidroxilos en C-2 y C-3 (Fig. 11b).

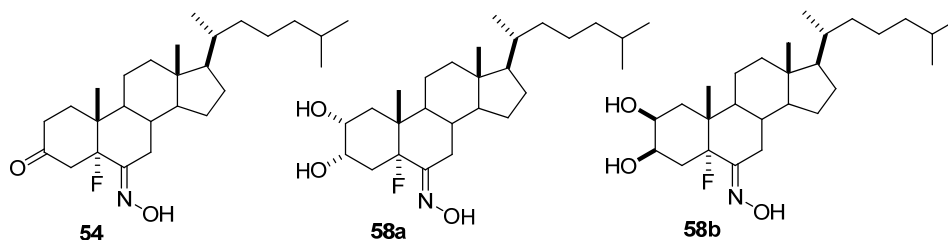
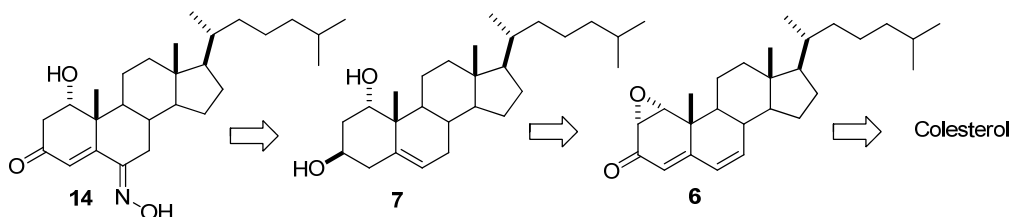


Figura 11b. 6-Hidroximinoesteroides con un átomo de flúor en la posición C-5.

3. Síntesis de 6-hidroxiesteroideos con posiciones oxigenadas en los anillos A, B y D

3.1. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-1 (anillo A)

En el análisis retrosintético diseñado para el compuesto **14** (esquema 2), se planteó aplicar la estrategia general del esquema 1 sobre el diol **7**, el cual se obtendría a partir del epóxido **6** y éste a su vez de colesterol (**4**) mediante la estrategia empleada por Fürst y col.⁷⁵



Esquema 2. Análisis retrosintético del 1 α -hidroxi-6E-hidroxiiminocolest-4-en-3-ona (**14**).

La síntesis del hidroximinoesteroide **14** (esquema 3), comenzó con la oxidación de colesterol (**4**) empleando DDQ en dioxano, para dar el esteroide con una cetona $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada **5**. La presencia en el espectro de RMN de ^1H del compuesto obtenido de las señales a δ_{H} 7.05 y 6.0 - 6.3, y en el de RMN de ^{13}C de una señal a 186.3 ppm y 6 señales a (162.8, 153.0, 138.8, 128.0, 127.5 y 123.6 ppm), indicaron la existencia de un grupo cetona conjugado con tres dobles enlaces confirmando, por tanto la obtención de **5**.

La epoxidación de **5** con agua oxigenada en medio básico dio lugar a **6** de forma quimio y estereoselectiva. Según la bibliografía,⁷⁶ sólo el epóxido **6** con configuración α daría el diol **7** requerido mediante su reducción. En el espectro RMN de ^1H se observó la aparición de un doblete ($J = 4.0$ Hz) a 3.59 ppm y un doblete ($J = 2.0, 0.5$ Hz) a 3.45 ppm, correspondientes a los protones del grupo epóxido, mientras que en el RMN de ^{13}C se observó la desaparición de las dos señales del doble enlace entre las posiciones C-1/C-2 a 153.0 ppm y 128.0 ppm.

La reducción de **6** con Li/NH_3 a -78°C ,⁷⁷ permitió obtener el diol **7** cuyo espectro de RMN de ^1H mostró una señal a 5.59 ppm, que corresponde al protón olefínico H-5 y dos señales a 3.96 ppm y 3.84 ppm asignadas a los dos protones oximetínicos H-1 β y H-3 α . Además su espectro de RMN de ^{13}C mostró la presencia del doble enlace entre las posiciones C-5/C-6 al aparecer dos señales a 137.3 ppm y 125.5 ppm y los carbonos C-1 y C-3 hidroxilados a 66.3 ppm y 72.9 ppm, respectivamente.

El tratamiento del diol **7** con anhídrido acético y piridina (1:1) rindió el compuesto diacetilado **8**. Esta protección de los dos alcoholes secundarios evita cualquier posible oxidación o eliminación no deseada. Es de destacar que la reacción a temperatura ambiente sólo evolucionaba hacia un compuesto monoacetilado por lo que se tuvo que calentar hasta 60°C . Esto es probablemente debido al impedimento estérico

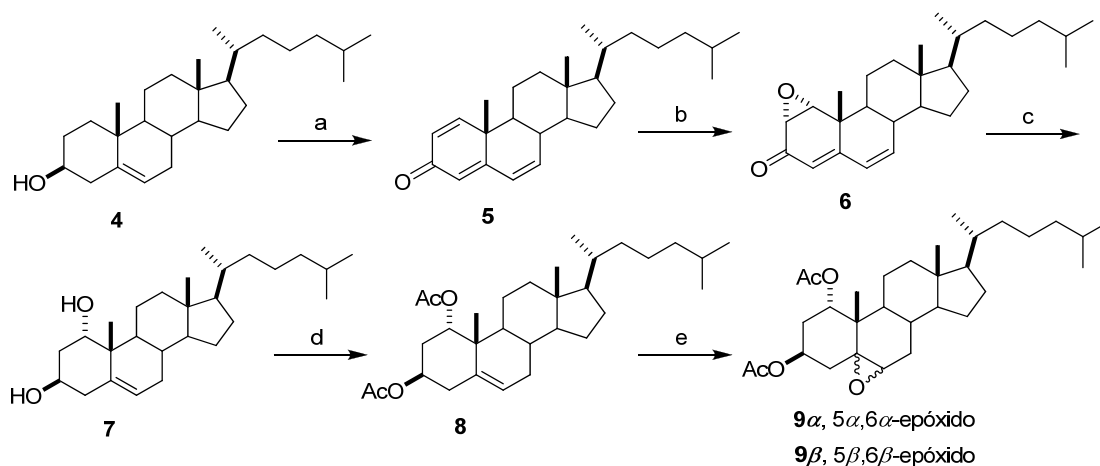
⁷⁵ Fürst, A.; Ludvik, L.; Meier, W. *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 1870.

⁷⁶ Meizheng, L.; Biao, Y.; Xiangyang, W.; Yongheng, H. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 745.

⁷⁷ Rabinowitz, M. H.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 304.

del grupo hidroxilo en C-1 que se encuentra en disposición axial. El espectro de RMN de ^1H mostró el desplazamiento de las dos señales de H-1 β y H-3 α a más frecuencia, apareciendo a 5.07 ppm y 4.92 ppm, respectivamente, junto con dos singuletes a 2.05 ppm y 2.01 ppm, pertenecientes a los dos grupos acetato. El espectro de RMN de ^{13}C confirmó la presencia de los dos grupos acetato al observarse los carbonilos a δ_{C} 170.4 y 170.3 y los dos metilos de los grupos acetato a 23.2 ppm y 22.4 ppm.

Para la formación de los epóxidos **9 α** y **9 β** a partir de esteroide diacetilado **8** se utilizó el ácido *m*-cloroperbenzoico en CHCl_3 .⁷⁸ Los dos isómeros se obtuvieron en una proporción (1:2) tal como se deduce de su espectro de RMN de ^1H .

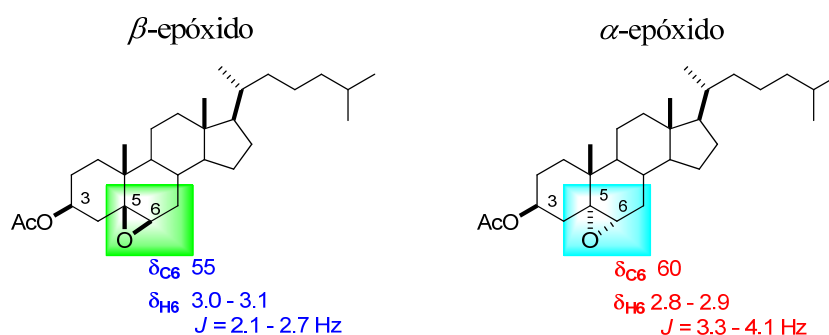


Esquema 3. *Reactivos y condiciones:* (a) DDQ, dioxano (45%); (b) 35% H_2O_2 , H_2O , 10% NaOH , MeOH (70%); (c) (1) Li , NH_3 , THF , (2) NH_4Cl (40%); (d) $\text{Ac}_2\text{O}:\text{Py}$ (1:1) (99%); (e) *m*-CPBA, CHCl_3 (97%).

De acuerdo con los datos bibliográficos para esteroides que presentan un grupo epóxido entre los carbonos C-5 y C-6,⁷⁹ los desplazamientos químicos de los protones y carbonos de esas posiciones son indicativos de la disposición α ó β del grupo epóxido. Cuando éste posee una disposición α , el protón H-6 β aparece como un doblete entre 2.8 - 2.9 ppm con un intervalo de $J = 3.3 - 4.1$ Hz, mientras que el carbono C-6 resuena entorno a 60 ppm. Por el contrario, cuando el mencionado epóxido posee una disposición β , el protón H-6 α aparece a más frecuencia (entre 3.0 - 3.1 ppm) como doblete, con un valor de J más pequeño (entre 2.1 - 2.7 Hz), mientras que C-6 tiene un valor aproximado de δ_{C} 55 (esquema 4).

⁷⁸ Bisogno, F. R.; Orden, A. A.; Pranzo, C. A.; Cifuentes, D. A.; Giordano, O. S.; Sanz, M. K. *Steroids* **2007**, *72*, 643.

⁷⁹ a) Jayaprasadam, B.; Muraleedharan, G. N. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 841. b) Anta, C.; González, N.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1357. c) Kovganko, N.; Chernov, Y. *Chem. Nat. Commun.* **2001**, *4*, 351. d) Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Kiran, I. *J. Chem. Res.* **1999**, 198. e) Kesavan, V.; Chandrasekaran, S. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6999. f) Lopp, A.; Koljak, R. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 179. g) Venkateswarlu, Y.; Rao, R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 876. h) Over, D.; Bardet, M.; Marchon, J.-C. *Magn. Reson. Chem.* **1995**, *33*, 224. i) Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Liman, M. D. *J. Chem. Res. Synop.* **1995**, 220. j) Dabovic, M.; Bjelakovic, M.; Andrejevic, V.; Lorenc, L.; Mihailovic, M. L. *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 1833. k) Galagovsky, L.; Gros, E. D. *J. Chem. Res.* **1993**, 137. l) Syamala, M. S.; Das, J.; Baskaran, S. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1928. m) Flaih, N.; Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1991**, 1085. n) Morrison, G. A.; Wilkinson, J. B. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1989**, 2003. o) Hanson, J. R.; Truneh, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* **1988**, 2001. p) Molander, G.; Hahn, G. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2596.



Esquema 4. Señales diagnóstico de RMN de los 3 β -acetoxi-5,6-epoxicolestanos.

En el isómero **9 α** , el protón H-6 β se mostró como un doblete ($J = 3.0$ Hz) a 2.80 ppm, mientras que los protones H-3 α y H-1 β se observaron como un multiplete a 5.21 ppm y un doble triplete a 5.02 ppm ($J = 4.0, 2.0$ Hz), respectivamente. En sus espectros de RMN de ^{13}C , el carbono C-6 apareció a 61.7 ppm. Estos datos nos permitieron asignar una disposición α del grupo epóxido. De igual forma, la disposición β del epóxido en el isómero **9 β** se pudo asignar a partir del desplazamiento químico del protón H-6 α ($J = 1.9$ Hz) a 3.14 ppm y del carbono C-6 a 56.3 ppm.

La obtención de la α -hidroxicetona **10** mediante la apertura de los epóxidos **9 α** y **9 β** fue un paso clave en la síntesis de **14**. Con este fin, se realizaron numerosos intentos sobre ambos epóxidos, utilizando para ello diversos reactivos como CrO_3 en H_2O , $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en CH_3CN ,⁸⁰ NBS en dioxano⁸¹ y HClO_4 en dioxano,⁸² dando todos ellos resultados infructuosos. Finalmente, el tratamiento del isómero mayoritario **9 β** con el reactivo de Jones⁸³ permitió la apertura del epóxido para dar **10** en un 72%. El epóxido **9 α** no reacciona porque no puede seguir el principio general de apertura de un epóxido en un anillo de ciclohexano, según el cual tiene que originar un producto intermedio con los sustituyentes en posición diaxial.⁸⁴

En el espectro de RMN de ^1H de **10**, se observó la desaparición de la señal del doblete a 3.14 ppm correspondiente a H-6 α en **9 β** y la aparición de un doble doblete ($J = 12.5, 12.2$ Hz) a 2.83 ppm que se asignó al protón H-7 β . La obtención de la α -hidroxicetona **10** se confirmó por RMN de ^{13}C al mostrar un carbono cuaternario a 209.2 ppm, que se asignó al grupo ceto en la posición C-6, y la desaparición del carbono cuaternario a 81.5 ppm de la posición C-5. La disposición α del grupo hidroxilo en C-5 se dedujo por comparación de los datos que aparecen en la bibliografía para esteroides similares,⁵⁹ lo cual indicó que la reacción transcurrió con inversión de configuración.

La ruta sintética continuó con la aplicación de las etapas (d) – (g) del esquema 1 sobre la α -hidroxicetona diacetilada **10** para llegar al 6 E -hidroximinoesteroide requerido **14** con un grupo hidroxilo en C-1 (esquema 5).

⁸⁰ Sabita, G.; Satheesh, B.; Rajkumar, M. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3955.

⁸¹ Tenleton, J.; Sashi Kumar, V. P. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1987**, 1361.

⁸² Ramírez, J.; Osvaldo, M.; Centurión, T.; Gros, E.; Galagovsky, L. *Steroids* **2000**, *65*, 329.

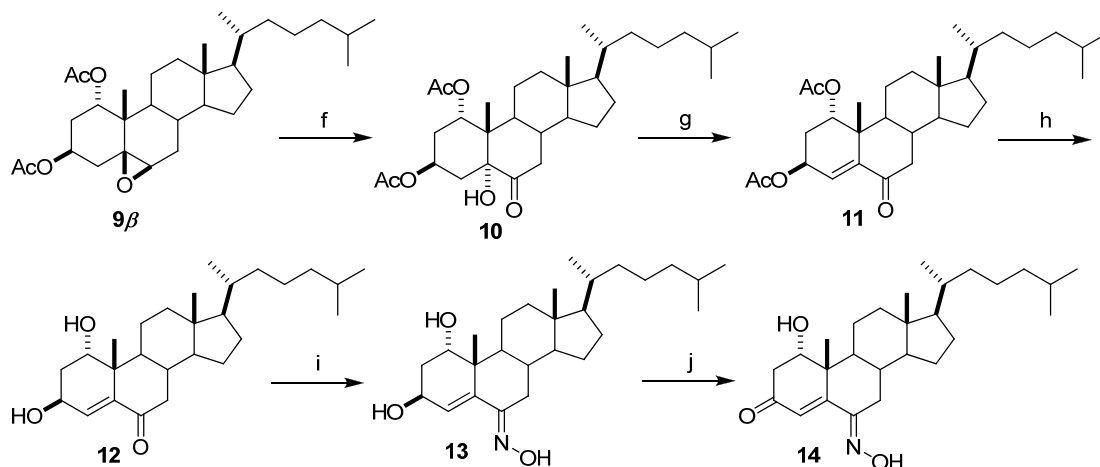
⁸³ Ramírez, J.; Gros, E.; Galagovsky, L. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6171.

⁸⁴ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P. *Organic Chemistry*, Ed. Oxford University Press, New York: 2001, pág 469-470.

La deshidratación del alcohol terciario de la posición C-5 del compuesto **10**, se llevó a cabo mediante el empleo de cloruro de tionilo en piridina, obteniéndose la cetona α,β -insaturada **11** con un 92% de rendimiento. Su espectro de RMN de ^1H confirmó la obtención del producto de eliminación al mostrar una señal a 6.26 ppm asignada al protón H-4. Adicionalmente, su espectro de RMN de ^{13}C confirmó la presencia del doble enlace al aparecer la señal de un carbono cuaternario a 144.4 ppm y la de un carbono terciario a 128.6 ppm correspondientes al Δ^4 .

La obtención del diol **12** se llevó a cabo por desprotección de los alcoholes secundarios de las posiciones C-1 y C-3. Así, para la desacetilación de la cetona α,β -insaturada diacetilada **11**, se empleó una disolución de hidróxido potásico en metanol al 5% dando el diol **12** con un rendimiento del 75%. El RMN de ^1H confirmó la obtención del producto desacetilado al observarse el desplazamiento a menos frecuencia de los protones H-1 β y H-3 α (δ_{H} 3.95 y 4.55, respectivamente), y la desaparición de los singletes a 2.08 ppm y 2.06 ppm correspondientes a los metilos de los grupos acetato.

La introducción del grupo hidroximino en la cetona α,β -insaturada dihidroxilada **12** en la posición C-6, se realizó empleando cloruro de hidroxilamonio en piridina, obteniéndose **13** con un rendimiento del 90%. El desplazamiento a menos frecuencia en el espectro de RMN de ^1H del singlete correspondiente al protón H-4 de 6.36 ppm en **12** a 5.76 ppm en **13**, confirmó la introducción del grupo hidroximino. Además, el desplazamiento químico a más frecuencia del doblete ($J = 12.5$ Hz), a 3.33 ppm correspondiente al protón H-7 β , indicó la formación de una oxima con configuración *E*.⁵⁸ Este desplazamiento tan peculiar es debido al efecto provocado por la proximidad del grupo hidroxilo de la oxima a ese protón. En su espectro de RMN de ^{13}C la presencia de un carbono cuaternario a 159.4 ppm confirmó nuevamente, la existencia del grupo hidroximino en **13**.



Esquema 5. Reactivos y condiciones: (f) Jones, Ac_2O (72%); (g) SOCl_2 , Py (92%); (h) 5% KOH, MeOH (75%); (i) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py (90%); (j) MnO_2 , CHCl_3 (75%) ó CrO_3 , Py (60%).

La oxidación del grupo hidroxilo en la posición C-3 del diol **13** se llevó a cabo de dos formas diferentes. Mediante CrO_3 en piridina, lográndose un rendimiento del 60%, mientras que con dióxido de manganeso en cloroformo, la reacción fue más lenta pero se logró mejorar el rendimiento (75%). El producto **14** fue purificado por HPLC en fase reversa.

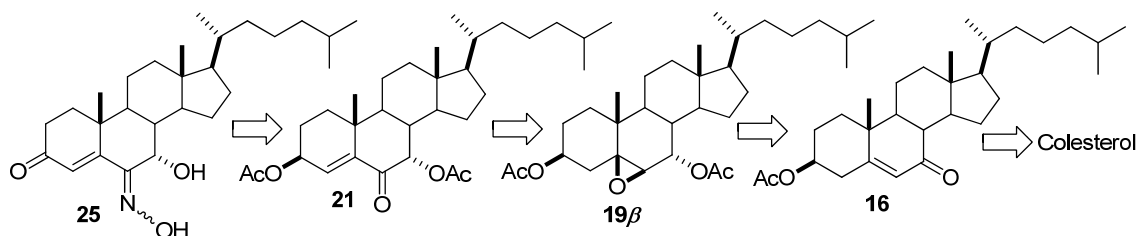
La estructura de **14**, se confirmó utilizando técnicas monodimensionales de RMN ^1H , ^{13}C y DEPT-135, junto con experimentos 2D-RMN: ^1H - ^1H COSY, HSQC y HMBC. El espectro de RMN de ^1H mostró la oxidación selectiva del grupo hidroxilo alílico en C-3 al observarse la desaparición de la señal a 4.38 ppm del protón oximetínico de esa posición, manteniéndose la señal a 4.12 ppm indicando que el grupo hidroxilo en C-1 no se había oxidado. Su espectro de RMN de ^{13}C confirmó la presencia de un único grupo cetona al aparecer la señal de un carbono cuaternario a 200.3 ppm y la permanencia del grupo hidroxilo en C-1 con la señal del carbono oximetínico a 72.2 ppm.

De esta manera **14** se sintetizó en diez etapas a partir de colesterol con un rendimiento global del 5%.

3.2. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-7 (anillo B)

Con el fin de determinar la influencia en la actividad citotóxica que ejerce la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-7 manteniendo la presencia de un grupo ceto en la posición C-3, el doble enlace Δ^4 y la cadena lateral de colesterol, se planteó la síntesis de la 7α -hidroxi- $6E/Z$ -hidroximinocolest-4-en-3-ona (**25**).

En el análisis retrosintético diseñado (esquema 6) para el hidroximinoesteroide **25**, se planteó aplicar la estrategia general del esquema 1 sobre la cetona α,β -insaturada diacetilada **21**. Este compuesto se prepararía usando el epóxido **19 β** que se obtendría de la cetona α,β -insaturada acetilada **16**, obtenida a su vez de la oxidación de la posición C-7 del acetato de colesterol.



Esquema 6. Análisis retrosintético del 7α -hidroxi- $6E/Z$ -hidroximinocolest-4-en-3-ona (**25**).

La ruta sintética del hidroximinoesteroide **25** (esquema 7), comenzó con la protección del grupo hidroxilo en C-3 de colesterol (**4**) con el fin de evitar su oxidación en el siguiente paso. Para ello, se utilizó una mezcla equimolecular de anhídrido acético y piridina, obteniéndose acetato de colesterol (**15**) con un rendimiento del 99%.

La oxidación alílica del compuesto **15** se realizó utilizando hidroperóxido de *tert*-butilo y una cantidad catalítica de ioduro de cobre (I) en benceno, con lo que se consiguió obtener una posición oxigenada en C-7.⁸⁵ Se realizaron diversas pruebas para optimizar el rendimiento de la reacción y evitar el uso de benceno, pero desafortunadamente no se logró mejorar el rendimiento encontrado en la bibliografía (40%). La obtención de la cetona α,β -insaturada acetilada **16** se confirmó por RMN de ^1H al observarse la aparición de un multiplete a 2.53 ppm, que se asignó al protón H-8,

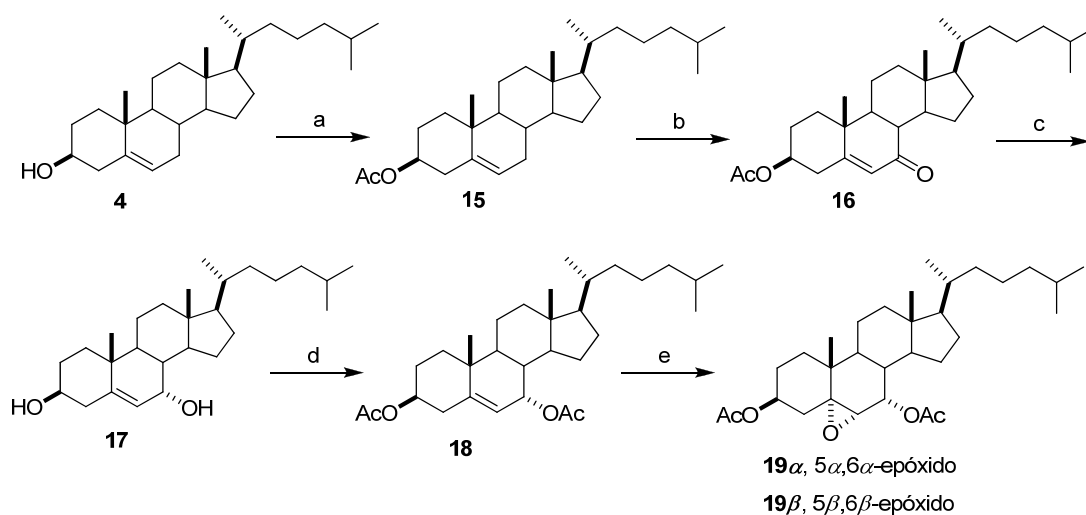
⁸⁵ Salvador, J. A.; Melo, S.; Campos Neves, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 119.

y en el RMN de ^{13}C la presencia de un nuevo carbono cuaternario a 203.2 ppm correspondiente al carbono C-7.

La reducción quimio y estereoselectiva de la cetona en la posición C-7 de **16** se realizó empleando L-Selectride⁸⁶ en THF, a -78°C con un rendimiento del 95%. En el espectro de RMN de ^1H del producto obtenido se observó la aparición de un multiplete a 3.84 ppm que se asignó al H-7 β , y la desaparición del singulete a 2.06 ppm correspondiente al metilo del acetato. En su espectro de RMN de ^{13}C se observó la aparición de dos señales a 71.3 ppm y 65.3 ppm, de los carbonos terciarios C-3 y C-7 respectivamente, así como la desaparición de las señales a 210.9 ppm y 170.2 ppm de los carbonilos del grupo ceto y acetato presentes en **16**. Estos datos confirmaron la obtención del diol **17**, comprobándose que en estas condiciones también se produce la desprotección del grupo hidroxilo de la posición C-3.

La protección de los dos grupos hidroxilos se realizó de nuevo de una manera similar a las acetilaciones anteriormente descritas, obteniéndose el intermedio diacetilado **18** de manera cuantitativa.

La epoxidación de **18** con ácido *m*-cloroperbenzoico en CHCl_3 , dio lugar a los epóxidos **19 α** y **19 β** , en una relación 2:1, después de su purificación y aislamiento por cromatografía en columna. En los espectros de RMN de ^1H de **19 α** y **19 β** , se observó la desaparición del doblete ($J = 4.8$ Hz) correspondiente al protón olefínico H-6 a 5.59 ppm y la aparición del doblete característico del protón H-6 de un grupo epóxido. El isómero mayoritario **19 α** mostró ese doblete a 3.29 ppm con una $J = 4.4$ Hz, mientras que en el isómero minoritario **19 β** , el protón H-6 α ($J = 2.9$ Hz) aparece como un doblete con un desplazamiento químico a 3.08 ppm. En los espectros de RMN de ^{13}C la señal del carbono C-6 resuena a 62.1 ppm en el isómero **19 α** mientras que en el **19 β** aparece a 59.6 ppm.



Esquema 7. *Reactivos y condiciones:* (a) $\text{Ac}_2\text{O}:\text{Py}$ (1:1) (99%); (b) *t*-BuOOH, CuI, C_6H_6 (40%); (c) L-Selectride, THF (95%); (d) $\text{Ac}_2\text{O}:\text{Py}$ (1:1) (99%); (e) *m*-CPBA, CHCl_3 (85%).

En este caso, la presencia de un grupo acetato en C-7 impidió determinar la disposición del grupo epóxido a partir de los desplazamientos químicos de H-6 y C-6

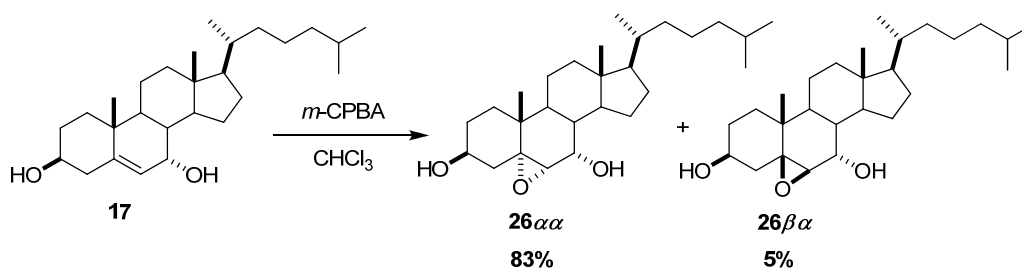
⁸⁶ Dansu, L.; Spencer, L. *Steroids*, **2000**, *65*, 529.

mediante la aplicación de las reglas mencionadas anteriormente en la asignación de la estereoquímica de los epoxiesteroides **9 α** y **9 β** .

Por otra parte, la comparación de los datos de los dos epóxidos obtenidos (**19 α** y **19 β**) con los recogidos en numerosos trabajos bibliográficos con estructuras similares tampoco nos permitió asignar la configuración α ó β .⁸⁷

Se decidió abordar este problema mediante la realización de diversas reacciones químicas teniendo en cuenta para ello que la epoxidación de un doble enlace con un grupo hidroxilo en posición alílica induce la formación del epóxido mayoritariamente por la misma cara en la que se encuentre ese grupo.

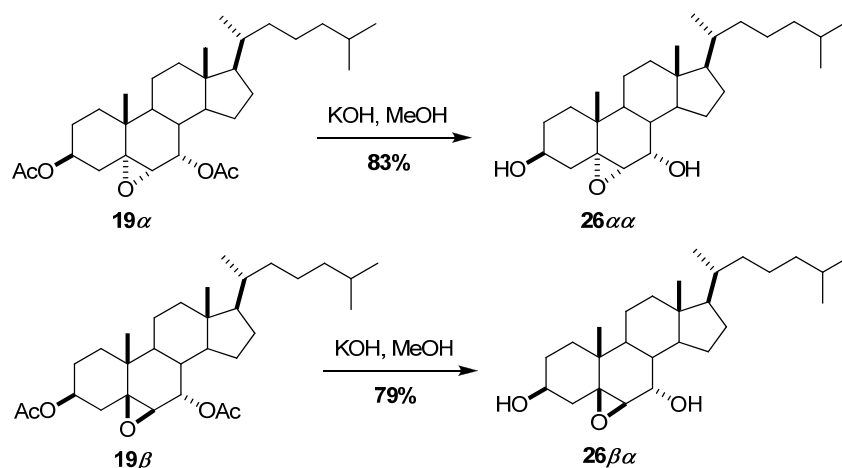
De este modo, la epoxidación del diol **17** con ácido *m*-cloroperbenzoico en CHCl₃, originó con elevada estereoselectividad el α -epoxiesteroide **26 $\alpha\alpha$** (83%) (esquema 8). El compuesto obtenido se identificó, tras su aislamiento y purificación por cromatografía en columna, mediante sus datos espectroscópicos de RMN de ¹H, a partir del desplazamiento a menos frecuencia de las señales de los protones H-7 β y H-3 α a 3.87 ppm y 3.92 ppm y del doblete ($J = 4.8$ Hz) correspondiente al protón H-6 β a 3.24 ppm, por el contrario el isómero **26 $\beta\alpha$** se obtuvo minoritariamente con un rendimiento del 5%.



Esquema 8. Epoxidación del 3 β ,7 α -dihidroxicolest-5-eno (**17**).

Una vez que se identificó el α -epoxiesteroide **26 $\alpha\alpha$** , el siguiente paso consistió en saber cuál de los dos epoxiesteroides diacetilados **19 α** y **19 β** se convertiría en **26 $\alpha\alpha$** bajo condiciones de hidrólisis básica. Así, la desprotección con hidróxido potásico al 5% en metanol de ambos epoxiesteroides diacetilados rindieron los correspondientes dioles con unos rendimientos del 83% y 79%, respectivamente (esquema 9). La comparación de los datos espectroscópicos del producto obtenido por hidrólisis básica de **19 α** coincidió con los obtenidos anteriormente del α -epoxiesteroide **26 $\alpha\alpha$** , asignándose así una disposición α para el epóxido de este compuesto. Por tanto, el epóxido del esteroide diacetilado **19 β** poseía una disposición β . La estructura de **26 $\beta\alpha$** se confirmó por RMN de ¹H a partir del desplazamiento de las señales 4.07 ppm y 3.74 ppm que se asignaron a los protones H-7 β y H-3 α , y del doblete ($J = 2.8$ Hz) a 3.11 ppm del protón H-6 α .

⁸⁷ a) Sven, G.; Dietz, R. J.; Regitz, M. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6259. b) Armes, P.; Reddy, V. L. N.; Reddy, N. S.; Venkasterwalu, Y. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1420. c) Lopp, A.; Koljak, R. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 179. d) Venkateswarlu, Y.; Rao, R. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 876. e) Isaacs, S.; Berman, R.; Kashman, Y. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 83.



Esquema 9. Hidrólisis básica de los epoxiesteroides diacetilados **19 α** y **19 β** .

Un estudio más profundo sobre este tipo de epoxiesteroides se presenta en el siguiente capítulo de esta memoria.

Con el fin de obtener el intermedio **20**, la apertura de los epóxidos **19 α** y **19 β** fue un paso clave en la síntesis de **25**. Para ello, ambos epóxidos fueron tratados con diferentes tipos de oxidantes como CrO_3 en H_2O , HClO_4 en dioxano, LiI en THF, Al_2O_3 en dioxano, $\text{LiCl}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en THF. Pero en todos los casos se originaron mezclas complejas de productos de difícil separación e identificación.

Finalmente, el tratamiento del isómero minoritario **19 β** con $\text{CeCl}_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en CH_3CN ⁸⁸ nos condujo al compuesto diacetilado **20** con un rendimiento del 99%. En estas condiciones, probablemente el par electrónico del oxígeno del epóxido quedó albergado en un orbital vacío del cerio (III) que actúa como un ácido de Lewis. Así, se produciría la liberación de un anión cloruro que sería el responsable de la apertura del epóxido mediante un ataque nucleófilo a la posición más sustituida (C-5), seguido de una deshidrocloración para dar lugar al doble enlace Δ^4 , obteniéndose **20**. Un posible mecanismo de apertura del epóxido en **19 β** podría explicarse mediante la adición del cloruro al epóxido β por la cara α , para dar lugar a un intermedio en el que el Cl en C-5 y el OH en C-6 se encontrarán en disposición 1,2-*trans* diaxial. La posterior eliminación antiperiplanar del Cl mediante una deshidrohalogenación, trae consigo la formación del doble enlace Δ^4 (esquema 10).

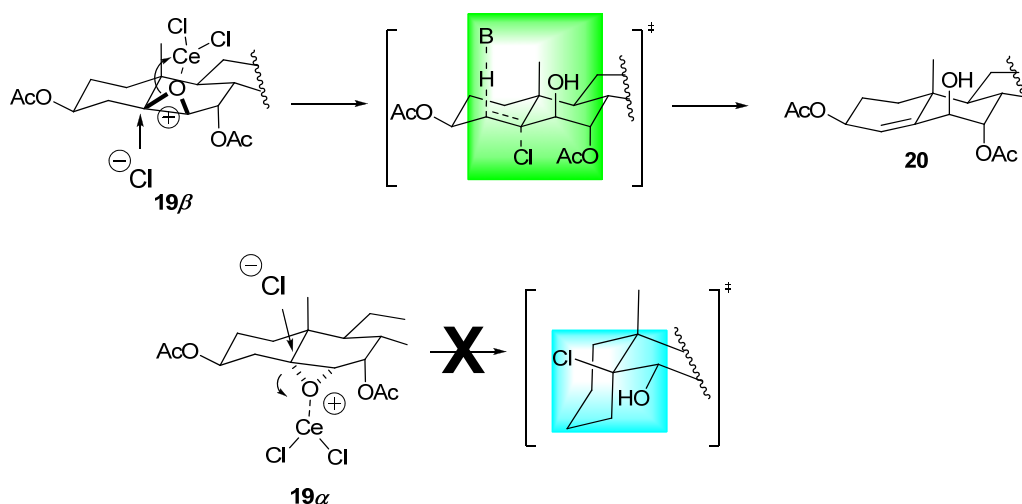
Nuevamente, el isómero mayoritario **19 α** resultó ser inerte frente al tratamiento con $\text{CeCl}_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ya que implicaría la formación de un producto intermedio en el que el Cl y el OH se encontrarían en posición *trans*-ecuatorial (esquema 10).⁸⁴

La obtención del producto de apertura del epóxido y posterior formación del doble enlace entre las posiciones C-4/C-5 fue deducida por comparación de los datos de RMN recogidos en la bibliografía.⁸⁹ Así, la aparición de un singulete ancho en el espectro de RMN de ^1H de **20** a 5.46 ppm, que se asignó al protón olefínico H-4, sugirió la formación del Δ^4 . Adicionalmente, las señales correspondientes a los protones

⁸⁸ Gowravaram, S.; Satheesh, B.; Rajkumar, C. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3955.

⁸⁹ a) Mitote, H.; Shirato, N. *Steroids* **2005**, *70*, 63. b) Musumeci, D.; Sica, D. *Steroids* **2004**, *69*, 173.

H-3 α y H-7 β en **20** se desplazaron a más frecuencia a 5.28 y 4.83 ppm, respectivamente, en relación con las del epóxido **19 β** . En el espectro de RMN de ^{13}C se observó la presencia de un doble enlace por la aparición de las señales de dos carbonos olefinicos a 146.0 ppm y 127.6 ppm, por el desplazamiento a más frecuencia del carbono C-3 a 74.3 ppm, y por el desplazamiento químico de los carbonos C-7 y C-6 a 73.8 ppm y 70.4 ppm, respectivamente. La estereoquímica del grupo hidroxilo en la posición C-6 se asignó como β debido a la presencia del doblete ($J = 2.4$ Hz) a δ_{H} 3.99 ppm correspondiente H-6.



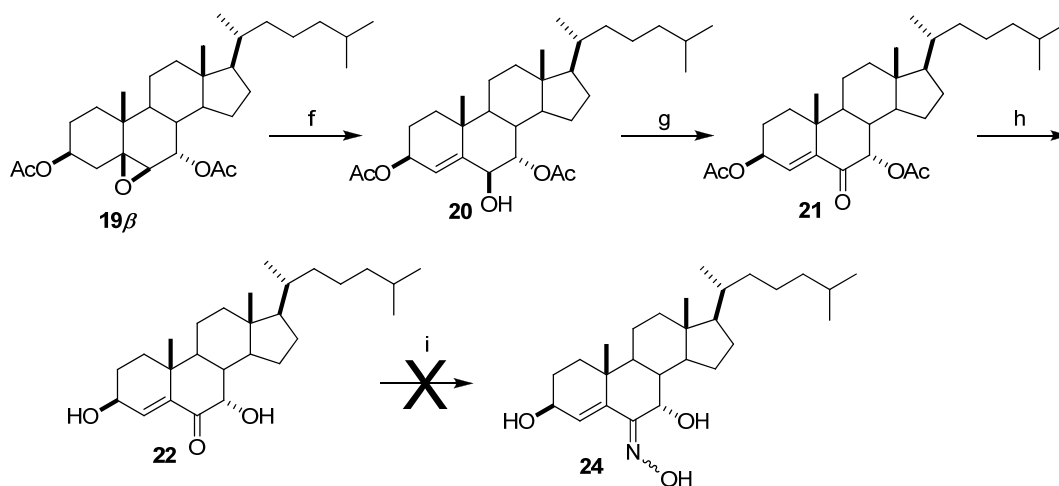
Esquema 10. Mecanismo de reacción propuesto en la formación de **20**.

La oxidación de la posición C-6 del alcohol alílico **20** condujo a **21** en un 82% de rendimiento utilizando el reactivo de Dess-Martin.⁹⁰ En el espectro de RMN de ^1H de la cetona α,β -insaturada **21** se observó la desaparición del doblete ($J = 2.4$ Hz) correspondiente al protón oximetínico H-6 α a 3.99 ppm, mientras que su espectro de RMN de ^{13}C mostró una señal a 198.2 ppm que confirmó la presencia de una cetona α,β -insaturada.

La síntesis continuó con el intento de introducción del grupo oxima en la posición C-6 en el esteroide dihidroxilado **22**. Para ello, se realizó primero, la reacción de desprotección de la cetona α,β -insaturada **21** empleando una disolución de hidróxido potásico en metanol, obteniéndose el compuesto **22** con un rendimiento del 99%. El desplazamiento a menos frecuencia del doblete ($J = 2.4$ Hz) a 4.63 ppm del protón H-7 β y del multiplete a 3.51 ppm, correspondiente al protón H-3 α , junto con la desaparición de las señales a 2.06 ppm en el espectro de RMN de ^1H de **22**, indicaron la desacetilación del compuesto de partida.

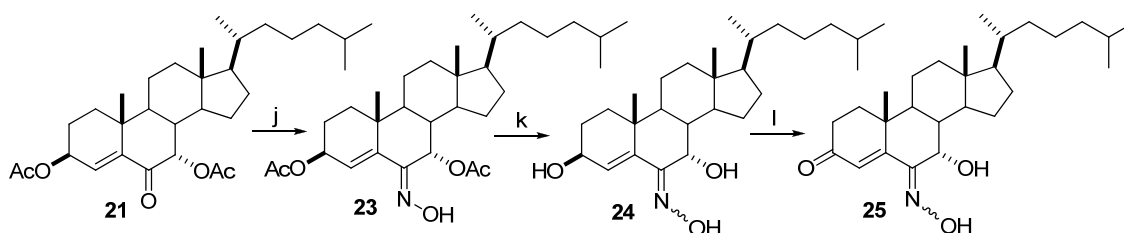
El intento posterior de introducción del grupo hidroximino en la cetona α,β -insaturada dihidroxilada **22** no condujo a la oxima **24** (esquema 11).

⁹⁰ Dess, D.; Martin, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7277.



Esquema 11. *Reactivos y condiciones:* (f) $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CH_3CN (99%); (g) Dess-Martin, CH_2Cl_2 (82%); (h) 5% KOH , MeOH (99%); (i) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, Py .

Por este motivo, se realizó una variación en la estrategia sintética invirtiendo los pasos sintéticos, es decir, primero se introduciría el grupo hidroximino en **21** para dar la oxima diacetilada **23**, y a continuación, se desprotegería obteniéndose el compuesto **24** que por oxidación daría finalmente el hidroximinoesteroide requerido **25** (esquema 12).



Esquema 12. *Reactivos y condiciones:* (j) 5% KOH , MeOH (99%); (k) $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$, Py (90%); (l) CrO_3 , Py (61%).

La introducción del grupo hidroximino sobre el compuesto **21**, se realizó con cloruro de hidroxilamonio en piridina, obteniéndose el compuesto **23** con un rendimiento del 90%. El espectro de RMN de ^1H del producto obtenido indicó la introducción del grupo hidroximino con la aparición de un singulete ancho a 7.97 ppm ($=\text{N}-\text{OH}$) y por el desplazamiento a más frecuencia del doblete ($J = 2.4$ Hz) correspondiente a H-4 que se observó a 6.05 ppm. Su espectro de RMN de ^{13}C confirmó la presencia del grupo hidroximino al aparecer un carbono cuaternario a 156.1 ppm. La configuración *Z* del grupo oxima se dedujo a partir del desplazamiento a más frecuencia de la señal correspondiente al protón H-7 β de 4.99 ppm en **21** a 5.61 ppm en **23**.

La reacción de desprotección del hidroximinoesteroide diacetilado **23** se realizó empleando una disolución de hidróxido potásico en metanol, obteniéndose el diol **24** con un 99% de rendimiento. El desplazamiento a menos frecuencia en su espectro de RMN de ^1H de las señales correspondientes a H-7 β y H-3 α a 5.01 y 4.14 ppm, respectivamente, y la desaparición de los singuletes a 2.05 ppm, conjuntamente con la desaparición de las señales a 170.9 y 169.8 ppm en su espectro de RMN de ^{13}C , confirmaron la desacetilación del compuesto.

La duplicación de algunas señales en sus espectros tanto de carbono como de protón sugirió que en este caso se obtiene una mezcla de oximas *E/Z* en una relación similar según se deduce de su espectro de RMN de ^1H .

Finalmente, el tratamiento del hidroximinoesteroide dihidroxilado **24** con CrO_3 en piridina, condujo a la oxidación quimioselectiva del grupo hidroxilo alílico de la posición C-3. El producto obtenido fue purificado por cromatografía en una columna de gel de sílice eluída con mezclas de hexano/acetato de etilo (7:3), obteniéndose el hidroximinoesteroide **25**, también como una mezcla de oximas *E/Z*, con un rendimiento del 61%.

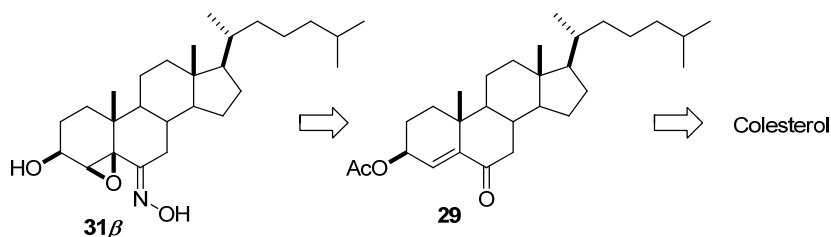
El espectro de RMN de ^1H mostró la oxidación del grupo hidroxilo alílico de la posición C-3 por la desaparición del multiplete correspondiente a 4.14 ppm y el desplazamiento a más frecuencia del protón H-4 a 6.01 ppm. Por otra parte, la presencia de un singulete a 5.13 ppm, que fue asignado al protón H-7 β , indicó que el grupo hidroxilo en C-7 no se había oxidado en estas condiciones. El espectro de RMN de ^{13}C confirmó la presencia de un grupo cetona en C-3 al aparecer un carbono cuaternario a 201.6 ppm y del grupo hidroxilo en C-7 por la señal de un carbono oximetínico a 61.7 ppm.

Después de diez etapas, el compuesto **25** se obtuvo a partir de colesterol con un rendimiento global del 6%.

3.3. Síntesis de análogos con un grupo epóxido entre las posiciones C-4/C-5

Con el fin de determinar la influencia en la actividad citotóxica que ejerce la presencia de un epóxido se planteó la síntesis de derivados del 6-hidroximinoesteroide con este grupo funcional entre las posiciones C-4 y C-5, concretamente el 4,5-epoxi-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolestano (**31**).

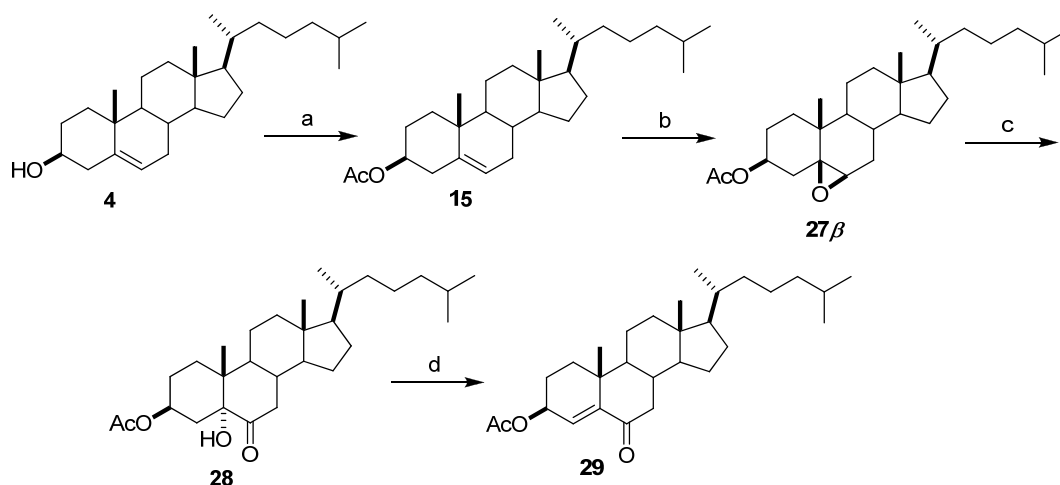
En el análisis retrosintético (esquema 13), para obtener el hidroximinoesteroide **31 β** , se preparó el intermedio clave **29** descrito en el esquema 1.



Esquema 13. Análisis retrosintético del 4 β ,5 β -epoxi-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolestano (**31 β**).

La síntesis de **31 β** (esquema 14) comenzó con la epoxidación del acetato de colesterol (**15**) y su posterior epoxidación para obtener **27 β** estereoselectivamente.⁹¹ La oxidación del epóxido **27 β** se realizó con CrO_3 para dar la α -hidroxicetona **28** con un rendimiento del 90%. La deshidratación del grupo 5 α -hidroxilo en **28** se llevó a cabo con cloruro de tionilo en piridina, obteniéndose la cetona α,β -insaturada **29** con un 95% de rendimiento.

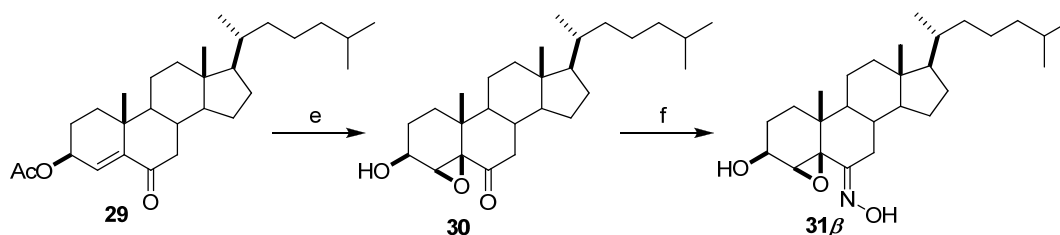
⁹¹ Salvador, J.; Melo, S. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 687.



Esquema 14. *Reactivos y condiciones:* (a) Ac₂O:Py (1:1) (99%); (b) KMnO₄, Fe₂(SO₄)₃, CH₂Cl₂ (65%); (c) CrO₃, H₂O (90%); (d) SOCl₂, Py (95%).

La epoxidación estereoselectiva de la cetona α,β -insaturada acetilada **29** con H₂O₂ en una disolución de NaOH en MeOH, produciéndose al mismo tiempo la desacetilación del grupo hidroxilo en la posición C-3, dio lugar al epóxido **30**, cuya estructura se confirmó por RMN de ¹H y ¹³C, y espectrometría de masas por comparación con los datos descritos en la bibliografía para este mismo compuesto.⁹²

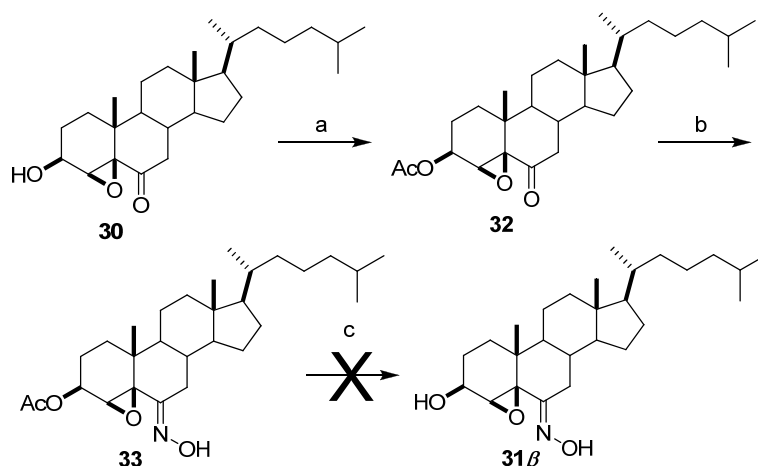
La introducción del grupo hidroximino en la cetona esteroideal 4,5-epoxidada **30**, se realizó empleando cloruro de hidroxilamonio en piridina, obteniendo el hidroximinoesteroide **31 β** con un rendimiento del 99%. El espectro de RMN de ¹H indicó la introducción del grupo hidroximino al observarse el desplazamiento a más frecuencia del doblete ($J = 3.1$ Hz) a 3.23 ppm, correspondiente al protón H-4 α . Adicionalmente, la configuración de *E* de la oxima formada se dedujo a partir del desplazamiento químico del protón H-7 β a 3.43 ppm. El espectro de RMN de ¹³C confirmó también la presencia del grupo hidroximino al aparecer un carbono cuaternario a 155.6 ppm (esquema 15). Este compuesto resultó ser muy inestable descomponiéndose rápidamente en disolución, sobre todo en disolventes halogenados.



Esquema 15. *Reactivos y condiciones:* (e) 35% H₂O₂, H₂O, 10% NaOH, MeOH (88%); (f) NH₂OH-HCl, Py (99%).

⁹² a) Glotter, E.; Mendelovici, M. *J. Chem. Res. Miniprint.* **1991**, 2201. b) Numazawa, M.; Hoshi, K.; Oshibe, M. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **1991**, 39, 959.

Con el fin de obtener un análogo de los 6-hidroxiesteroideos estable con una función epóxido entre las posiciones C-4/C-5 (esquema 16) se acetiló el epóxido **30** dando **32**, introduciéndose a continuación la oxima en la posición C-6 (compuesto **33**).



Esquema 16. *Reactivos y condiciones:* (a) $\text{Ac}_2\text{O}:\text{Py}$ (1:1) (99%); (b) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py (80%); (c) K_2CO_3 , MeOH.

El espectro de RMN de ^1H de **33** confirmó la presencia del grupo hidroximino al observarse el desplazamiento del doble doblete correspondiente al protón H-7 β a 3.38 ppm. El espectro de RMN de ^{13}C también mostró la presencia de la oxima al aparecer un carbono cuaternario a 157.3 ppm.

La desacetilación de **33** se realizó empleando K_2CO_3 en MeOH, con el fin de evitar que con una base más fuerte como KOH ó NaOH, originase algún tipo de transformación no deseada principalmente sobre el grupo epóxido. Sin embargo, se obtuvo una mezcla compleja de productos.

Mediante otra ruta (esquema 17) se trató de sintetizar otro análogo de los 6-hidroxiesteroideos, pero con un epóxido en disposición α entre las posiciones C-4/C-5 (compuesto **31 α**). Para ello se realizó la desacetilación y posterior bencilación de **29** con BrBn y K_2CO_3 en un sólo paso para dar **34**,⁹³ cuya estructura se confirmó por RMN de ^1H al observarse la aparición de las señales a 7.36-7.34 ppm (protones aromáticos) y a 4.02 ppm correspondiente al protón H-3. A continuación, se trató de realizar la epoxidación del doble enlace en la posición Δ^4 de **34**. Se probaron diferentes métodos de epoxidación (H_2O_2 ó KMnO_4), pero con ninguno de ellos se obtuvo la 4,5-epoxicetona deseada.

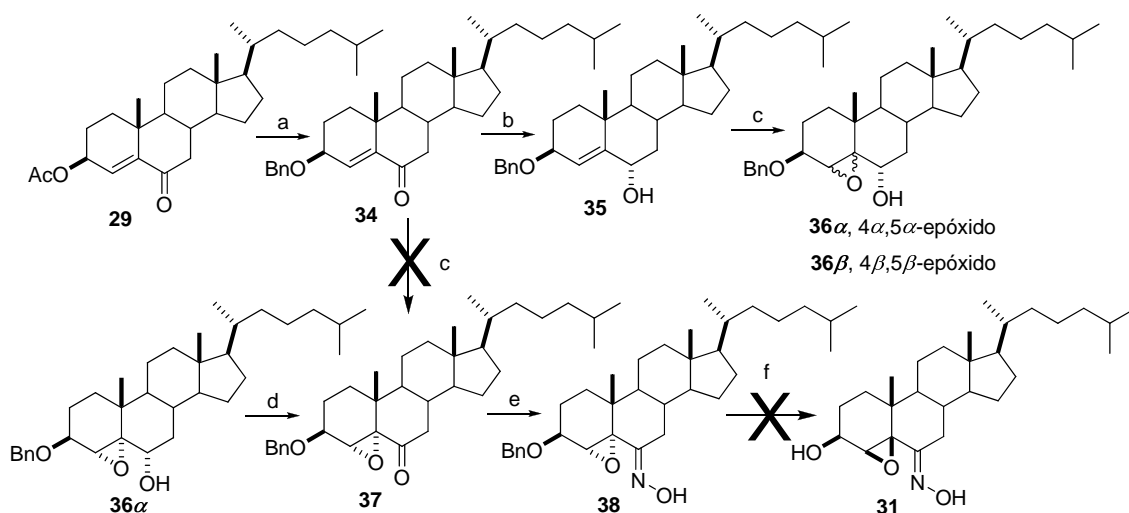
Por esta razón, se pensó en realizar primero la reducción de la cetona **34**, epoxidar Δ^4 y reoxidar la posición C-6 con el fin de obtener la 4,5-epoxicetona **37**. Se realizó la reducción de la cetona **34**, con NaBH_4 y $\text{CeCl}_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ obteniéndose de manera estereoselectiva el alcohol alílico **35** en un 85% de rendimiento.

⁹³ a) Ciobanu, L.; Poirier, D. *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 429. b) Tapolsanyi, P.; Wölfling, J.; Minicorics, R.; Schneider, G. *Steroids* **2002**, *67*, 371. c) Prokai, L.; Su-Min, O.; Abboud, K. A.; Simpkins, J. W. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 110. d) Page, P.; McKenzie, M.; Gallagher, J. A. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3704. e) Page, P.; Moore, J.; McKenzie, M.; Bowler, W.; Gallagher, J. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 1837. f) Tedesco, R.; Fiaschi, R.; Napolitano, E. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5316. g) French, A.; Wilson, S. R.; Welch, M.; Katzenellenbogen, J. A. *Steroids*, **1993**, *58*, 157.

La epoxidación de **35** se realizó con ácido *m*-cloroperbenzoico, en CHCl₃, para obtener los epóxidos **36α** y **36β** en relación (2:1) tras su purificación por cromatografía en columna. Partiendo de la base de que la interacción por enlace hidrógeno entre el perácido y el grupo hidroxilo en posición alílica induce la formación del epóxido mayoritario por la cara donde se encuentra el grupo hidroxilo, se asignó como *α* al epóxido mayoritario **36α**. De la misma manera al isómero **36β** se le asignó la estereoquímica *β*. En los espectros de RMN de ¹H de ambos compuestos se observó la desaparición del singlete a 5.78 ppm correspondiente al protón olefínico del doble enlace Δ⁴ de **35**. En el isómero **36α**, el protón H-4β se mostró como un doblete (*J* = 4.6 Hz) a 3.65 ppm, mientras que los protones H-3α y H-6β se observaron como un doblete (*J* = 12.0, 4.6 Hz) a 4.04 ppm y un doblete a 3.81 ppm (*J* = 3.6 Hz), respectivamente. En el isómero **36β** se pudo asignar a partir del desplazamiento químico del protón H-4α al aparecer un singlete a 3.56 ppm, mientras que los protones H-3α y H-6β se observaron como doble triplete (*J* = 11.5, 4.6 Hz) a 3.94 ppm y triplete a 3.71 ppm (*J* = 7.6 Hz), respectivamente.

La oxidación del grupo hidroxilo en la posición C-6 se realizó por separado para cada uno de los epóxidos **36α** y **36β** con el reactivo de Dess-Martin. Pero solo a partir del isómero **36α** se logró obtener la epoxicetona **37**, con un 22% de rendimiento. El tratamiento de **36β** con PDC, PCC, reactivo de Jones y Swern no condujo a la oxidación del hidroxilo en C-6. La estructura de **37** se confirmó por RMN de ¹H al observarse la aparición a 2.39 ppm del protón H-7β y por RMN de ¹³C con la aparición a 206.3 ppm de un carbono cuaternario asignado a la cetona en C-6.

A continuación, se realizó la introducción del grupo hidroximino en la posición C-6 de **37**, mediante el método habitual para obtener el 6*E*-hidroximinoepoxiesteroide **38**, con un rendimiento del 99%. El desplazamiento a más frecuencia en el espectro de RMN de ¹H de H-7β a 3.25 ppm confirmó la presencia de una oxima con configuración *E* y su espectro de RMN de ¹³C corroboró este hecho al observarse la aparición de un carbono cuaternario a 159.4 ppm.



Esquema 17. Reactivos y condiciones: (a) BrBn, K₂CO₃, THF (99%); (b) NaBH₄, CeCl₃·7H₂O, THF (85%); (c) *m*-CPBA, CHCl₃ (90%); (d) Dess-Martin, CH₂Cl₂ (22%); (e) NH₂OH·HCl, Py (89%); (f) H₂, Pd/C, MeOH.

Para la eliminación del grupo bencilo en **38**, se realizó una hidrogenación catalítica, pero se obtuvo una mezcla compleja de productos inseparables por HPLC.

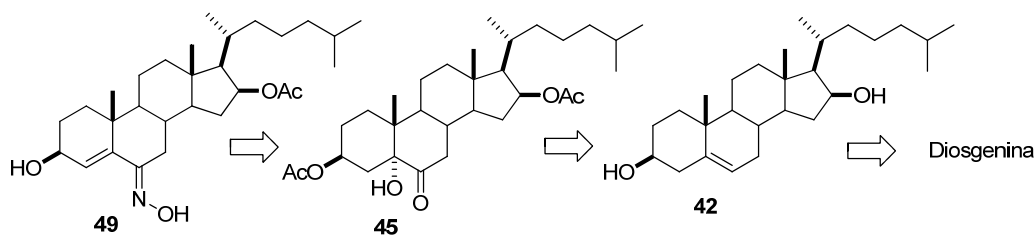
De todo esto se concluye que el hidroximino **31** debe ser un compuesto muy inestable ya que el empleo de diferentes rutas sintéticas, su almacenamiento bajo argón, a temperaturas por debajo de 0°C, y en ausencia de luz y humedad no impidieron su descomposición.

3.4. Síntesis de análogos con una posición oxigenada en C-16 (anillo D)

La presencia de un grupo acetato en la posición C-16 (anillo D), en diferentes esteroides aislados del coral blando *Nephthea bayeri*,⁹⁴ o en los esteroides sintéticos NGA0187⁹⁵ y NRRL5646,⁹⁶ fue determinante para que mostrasen actividad citotóxica frente a una serie de líneas celulares tumorales.

Teniendo presente estos antecedentes se planteó la síntesis 16β-acetoxi-3β-hidroxi-6E-hidroximino-4-eno (**49**) para evaluar la influencia en la actividad citotóxica que ejerce la presencia de un grupo acetato en la posición C-16 del anillo D.

El análisis retrosintético diseñado (esquema 18) para la preparación de **49** propone obtener la α-hidroxicetona **45** aplicando la metodología del esquema 1 sobre el diol **42**, que se obtendría a su vez de la diosgenina.



Esquema 18. Análisis retrosintético del 16β-acetoxi-3β-hidroxi-6E-hidroximino-4-eno (**49**).

La ruta sintética comenzó siguiendo la metodología descrita en la bibliografía para obtener el diol **42**.⁹⁷ De este modo la reducción de Clemmensen de la diosgenina (esquema 19) utilizando Zn/HCl en EtOH dio lugar al triol **40** en un 90% de rendimiento, sobre el que se realizó una tosilación selectiva del hidroxilo en C-26 con cloruro de tosilo en piridina para dar **41**, en un 79% de rendimiento. La reducción de **41** con LiAlH₄ en Et₂O dio lugar a la formación del diol **42**, en un 70% de rendimiento.

La acetilación de **42** empleando la misma metodología en los casos descritos anteriormente rindió **43** cuya estructura se confirmó a partir de un espectro de RMN de ¹H al observarse el desplazamiento de los protones H-3α y H-16α a más frecuencia.

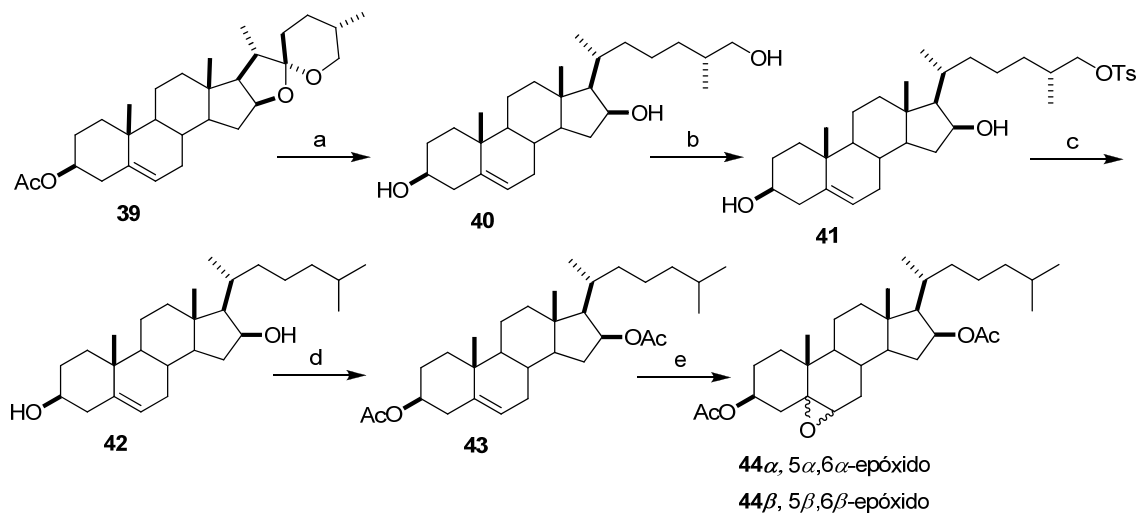
⁹⁴ Shao, Z.-T.; Zhu, D.-Y.; Guo, Y.-W. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1675.

⁹⁵ Hua, Z.; Carcache, D. A.; Tian, Y.; Li, Y.-M.; Danishefsky, S. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9849.

⁹⁶ Zhang, J.; Sun, Y.; Liu, J.-H.; Yu, B.-Y.; Xu, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6062.

⁹⁷ a) Williams, J. R.; Gong, H.; Hoff, N.; Olubodun, O. I.; Carroll, P. J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 269. b) Williams, J. R.; Chai, D.; Bloxton, J. D.; Gong, H.; Solvibile, W. R. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3183. c) Xu, Q.-H.; Peng, X. W.; Tian, W.-S. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9375. d) Williams, J. R.; Chai, D.; Wright, D. *Steroids*, **2002**, *67*, 1041. e) Murray, A.; Grondahl, C.; Ottensen, J. L.; Faarup, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 715. f) Ni, Y.; Kim, H.-S.; Wilson, W. K.; Kistic, A.; Schroepfer, G. J. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3687. g) Kim, H.-S.; Oh, S. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 1339.

La epoxidación de **43** se realizó con ácido *m*-cloroperbenzoico (73%) ó usando KMnO_4 y $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (38%) para dar en ambos casos mezclas inseparables de los isómeros **44 α** y **44 β** . La configuración relativa de los epóxidos se dedujo aplicando las señales diagnóstico de RMN descritas en el esquema 4, lo que permitió asignar una disposición α para el epóxido **44 α** y una disposición β para el compuesto **44 β** .

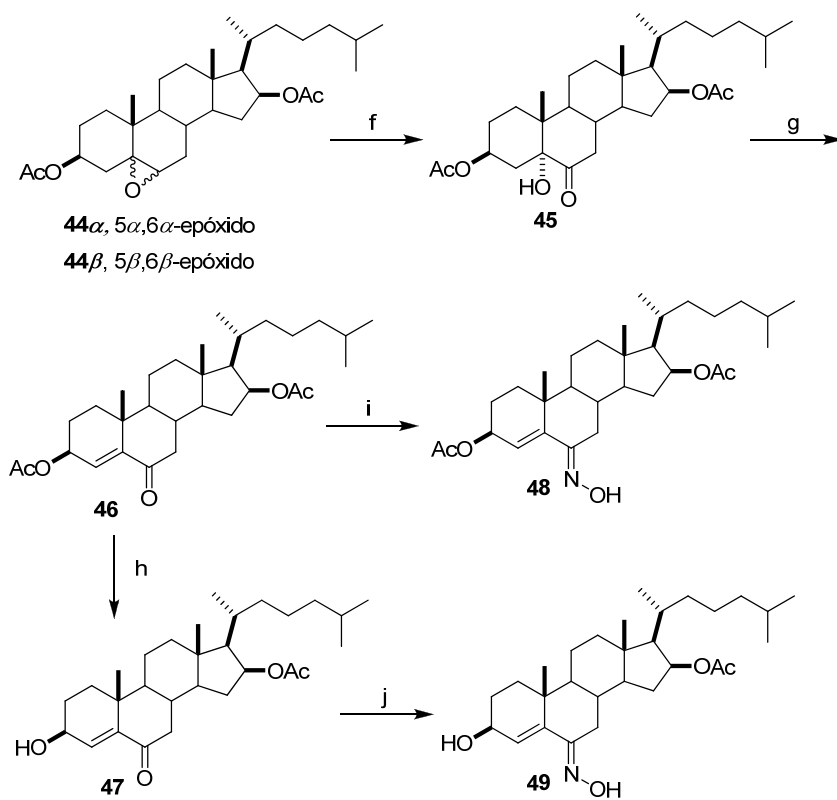


Esquema 19. Reactivos y condiciones: (a) Zn, HCl, EtOH (90%); (b) TsCl, Py (79%); (c) LiAlH_4 , Et_2O (70%); (d) $\text{Ac}_2\text{O}:\text{Py}$ (1:1) (99%); (e) *m*-CPBA, CHCl_3 (73%) ó $\text{KMnO}_4/\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, CH_2Cl_2 (38%).

La oxidación de la mezcla de **44 α** y **44 β** con el reactivo de Jones condujo a la α -hidroxicetona **45**, con un 72% de rendimiento, sin embargo el epóxido **44 α** no evolucionó bajo estas condiciones. La estructura de **45** se confirmó por RMN de ^1H , con la aparición del triplete ($J = 12.0$ Hz) a 2.73 ppm, correspondiente al protón H-7 β , y la desaparición de la señal del epóxido **44 β** a 3.05 ppm. La disposición α del grupo hidroxilo en C-5 se dedujo por comparación de los datos de RMN que aparecen en la bibliografía para compuestos similares.⁵⁹

La eliminación del alcohol terciario en la posición C-5 del compuesto **45** con cloruro de tionilo en piridina rindió la cetona α,β -insaturada **46** en un 75% de rendimiento. La introducción del grupo hidroximino en la cetona α,β -insaturada diacetilada **46** dio la oxima **48** con un rendimiento del 60% (esquema 20).

La obtención de **47**, se llevó a cabo realizando una desprotección selectiva del alcohol secundario en la posición C-3, que presenta un menor impedimento estérico que el alcohol secundario en la posición C-16. Controlando las condiciones de reacción, a partir de la cetona α,β -insaturada diacetilada **46** y usando una disolución de hidróxido potásico en metanol al 1%, se obtuvo **47** con un rendimiento del 50%. La introducción del grupo hidroximino se realizó, como en **48**, empleando cloruro de hidroxilamonio y piridina, obteniéndose la oxima **49** con un rendimiento del 16%. El desplazamiento químico a más frecuencia del doblete ($J = 11.5, 4.2$ Hz) a 3.32 ppm, correspondiente al protón H-7 β , indicó la formación de una oxima con configuración *E*, que también se confirmó con la presencia de un carbono cuaternario a 164.4 ppm.



Esquema 20. *Reactivos y condiciones* (f) Jones, Ac_2O (72%); (g) SOCl_2 , Py (75%); (h) 1% KOH, MeOH (50%); (i) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py (60%); (j) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, Py (16%).

Después de nueve etapas sintéticas se obtuvo **49** a partir de la diosgenina con un rendimiento global del 12%.

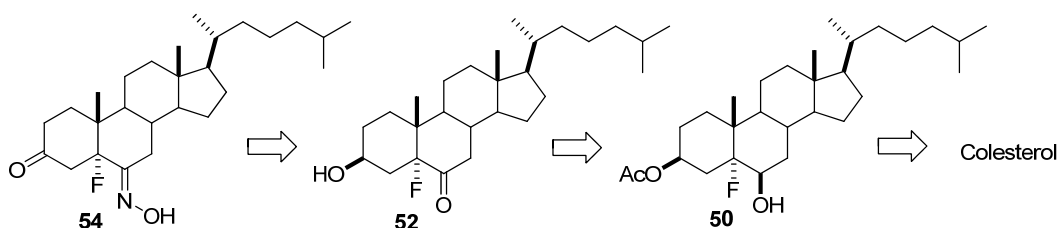
4. Síntesis de 5-fluoro-6E-hidroximoesteroides

Existe un creciente interés en la obtención de derivados fluorados biológicamente activos por los efectos particulares que presenta el átomo de flúor. Su similitud estérica al hidrógeno pero mayor electronegatividad le confiere a estos compuestos unas particularidades especiales en su modo de acción farmacológica.

Con estos antecedentes en mente y con el fin de determinar la influencia que ejerce la presencia de un átomo de flúor en C-5 en la actividad citotóxica en los hidroximoesteroides, se diseñó la síntesis de tres análogos fluorados: 5 α -fluoro-6E-hidroximo-colestan-3-ona (**54**), 5 α -fluoro-6E-hidroximo-2 α ,3 α -dihidroxicolestano (**58a**) y 5 α -fluoro-6E-hidroximo-2 β ,3 β -dihidroxicolestano (**58b**).

En el análisis retrosintético propuesto para los hidroximoesteroides fluorados **54**, **58a** y **58b** se planteó aplicar la metodología de Galagovsky y col.⁹⁸ para la introducción del átomo de flúor (esquemas 21 y 23). Una vez obtenidos los compuestos con el flúor en la posición C-5,⁹⁹ se aplicaría la metodología descrita en el esquema 1.

4.1. Síntesis de 5-fluoro-6-hidroximoesteroides con una posición oxigenada C-3



Esquema 21. Análisis retrosintético del 5 α -fluoro-6E-hidroxicolestan-3-ona (**54**).

Esta secuencia de reacciones (esquema 22), comenzó con la epoxidación del acetato de colesterol para obtenerse **27 β** estereoselectivamente. La apertura del epóxido **27 β** e introducción del átomo de flúor se consiguió mediante el tratamiento con BF₃·Et₂O en Et₂O, para dar el esteroide fluorado **50** con un rendimiento del 93%.

En el espectro de RMN de ¹H de **50** se observó la desaparición del doblete a 3.15 ppm apareciendo en su lugar un doble triplete ($J = 4.5, 2.3$ Hz) a 3.74 ppm correspondiente al protón H-6 α . Su espectro de RMN de ¹³C mostró una señal a 98.6 ppm con una ¹ J (¹³C,¹⁹F) de 166.9 Hz, que fue asignada al C-5 unido a un átomo de flúor, la señal de C-6 apareció a δ_C 73.0 con una ² J (¹³C,¹⁹F) de 35.3 Hz. El desdoblamiento y las constantes de acoplamiento de las señales de los carbonos C-3, C-4, C-5, C-6, C-10 y C-19 son coherentes con la presencia de un átomo de flúor en C-5. El espectro de RMN de ¹⁹F de **50** corroboró la presencia de un átomo de flúor al observarse la señal a δ_F -156.4. La configuración α del átomo de flúor en esa posición y la β del grupo hidroxilo en C-6 fue deducida a partir del mecanismo de apertura propuesto para esta reacción. El epóxido de configuración β favorece el ataque del anión fluoruro a la posición más sustituida C-5 con inversión de configuración.

⁹⁸ Ramírez, J. A.; Gros, E. G.; Galagovsky, L. R. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6171.

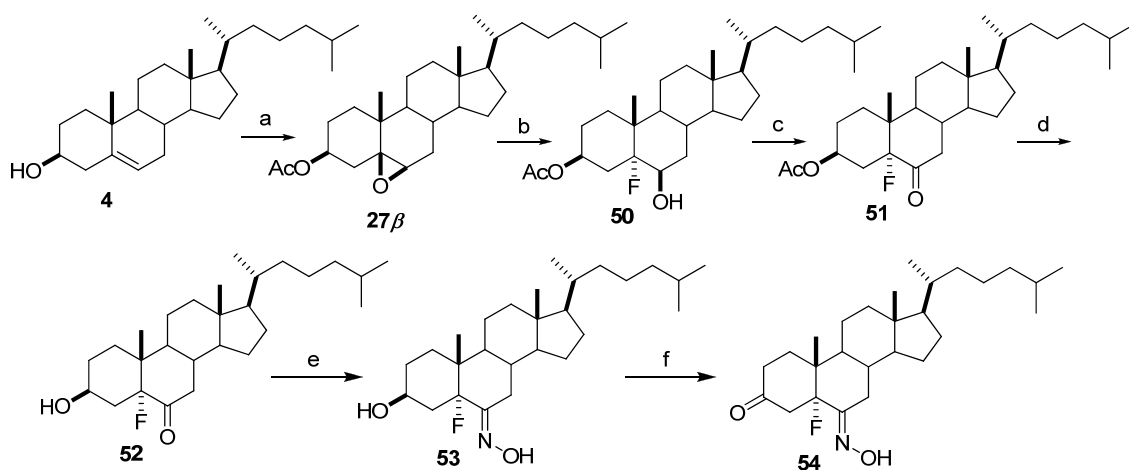
⁹⁹ Hudlicky, M. Chemistry of Organic Fluoride "A Laboratory Manual Comprehensive Literature Coverage", Ed. 2nd Simon & Sister International, New York: 1992

La oxidación del grupo hidroxilo en C-6 del compuesto **51** se realizó utilizando el reactivo de Dess-Martin en CH₂Cl₂, con un buen rendimiento. En el espectro de RMN de ¹H de **51** se observó la desaparición del doble triplete a 3.74 ppm del protón H-6 α y el desplazamiento a más frecuencia del doble doblete a 2.59 ($J = 12.6, 12.3$ Hz) correspondiente al protón H-7 β .

La desacetilación de **51** se realizó utilizando una disolución de bicarbonato potásico en metanol con un rendimiento del 84%. En su espectro de RMN de ¹H se observó el desplazamiento a menos frecuencia del multiplete correspondiente al protón H-3 α a 3.92 ppm, así como la desaparición de las señales correspondientes al grupo acetato tanto del espectro de protón como de carbono. La señal correspondiente al flúor apareció en el espectro de RMN de ¹⁹F a -157.2 ppm.

La introducción del grupo hidroximino en el compuesto **52**, se realizó con cloruro de hidroxilamonio en piridina, obteniéndose **53** con un rendimiento del 96%. Finalmente, la oxidación del grupo hidroxilo de la posición C-3 de **53** para dar el hidroximinoesteroide fluorado **54**, se realizó utilizando el reactivo de Jones obteniéndose con un rendimiento del 56%, y con CrO₃ (75%). El espectro de RMN de ¹H del compuesto obtenido confirmó la obtención del producto de oxidación al observarse la desaparición del protón oximetínico H-3 α a 4.01 ppm del compuesto **53**. El espectro de RMN de ¹³C del hidroximinoesteroide fluorado **54** confirmó la presencia de un grupo ceto al mostrar la señal del carbono cuaternario C-3 a 209.3 ppm. La señal del flúor en su espectro de RMN de ¹⁹F apareció a -158.2 ppm.

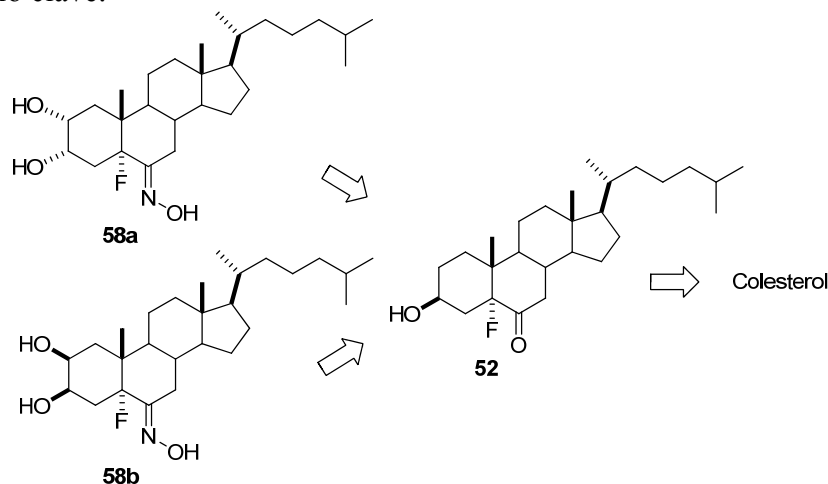
La síntesis de **54** se completó en siete etapas a partir de colesterol con un rendimiento global del 30%.



Esquema 22. *Reactivos y condiciones:* (a) (1) Ac₂O:Py (1:1) (99%); (2) KMnO₄, Fe₂(SO₄)₃, CH₂Cl₂ (65%); (b) BF₃·Et₂O, Et₂O (93%); (c) Dess-Martin, CH₂Cl₂ (91%); (d) K₂CO₃, MeOH (84%); (e) NH₂OH·HCl, Py (96%); (f) CrO₃, Py (75%) ó Jones, C₆H₆ (56%).

4.2. Síntesis de 2,3-dihidroxi-5-fluoro-6-hidroximinoesteroides

Para la obtención de los hidroximinoesteroides fluorados **58a** y **58b** se utilizó el análisis retrosintético mostrado en el esquema 23, en el que el esteroide fluorado **52** es el intermedio clave.



Esquema 23. Análisis retrosintético de los 5 α -fluoro-6E-hidroximino-2,3-dihidroxicolestanos (**58a-58b**).

La ruta sintética diseñada para obtener los hidroximinoesteroides fluorados **58a** y **58b** (esquema 24), comenzó a partir del esteroide fluorado **52**, obtenido anteriormente en la síntesis de **54**.

Para introducir los grupos hidroxilos en las posiciones C-2 y C-3 la mejor alternativa es partir de un doble enlace entre estas posiciones. Éste sería fácilmente obtenible por conversión del hidroxilo en C-3 en un buen grupo saliente y posterior eliminación. Con este fin se introdujo un grupo mesilato en la posición C-3 del esteroide fluorado **52** con cloruro de metanosulfonilo (MsCl) en piridina obteniéndose el compuesto **55** con un rendimiento cuantitativo. El espectro de RMN de ^1H confirmó la introducción del grupo mesilato por el desplazamiento del multiplete correspondiente a H-3 α a más frecuencia (4.91 ppm) y la aparición de un singulete a 3.01 ppm del metilo del grupo metanosulfonilo.

La reacción de eliminación del grupo OMs con bromuro de litio en DMF rindió una mezcla de cuatro productos. Se obtuvo mayoritariamente el esteroide requerido **56a** junto con **56b**, producto de desplazamiento nucleófilo del bromuro por el mesilato. Adicionalmente, se obtuvo la cetona fluorada **56c**, producto de eliminación por la posición C-4, y la cetona conjugada **56d**. Las estructuras de estos compuestos fueron determinadas por RMN y espectrometría de masas. Así, el espectro de RMN de ^1H de la mezcla inseparable de los compuestos **56a** y **56b** en relación (2:1), mostró la aparición de un multiplete a 5.62 ppm, que se asignó a los dos protones olefinicos del doble enlace de **56a**, y del multiplete a 4.20 ppm correspondiente a H-3 β de **56b**. El espectro de masas de ionización electrónica (EIMS) de la mezcla de los compuestos **56a** y **56b** mostró además del ión molecular de **56a** a m/z 402 un grupo isotópico a m/z 482 y 484 (relación 1:1) que confirmó la presencia de un átomo de bromo en el compuesto **56b**.

De igual forma, la aparición de un multiplete a 5.18 ppm, asignado a los protones olefinicos H-3 y H-4 en el espectro de RMN de ^1H de **56c**, confirmó la formación del doble enlace entre las posiciones C-2 y C-3, cuyos carbonos olefinicos aparecieron en su espectro de RMN de ^{13}C a 134.5 ppm y 120.6 ppm. El compuesto **56d** se identificó por comparación con los datos espectroscópicos publicados para esta misma estructura.⁵⁹

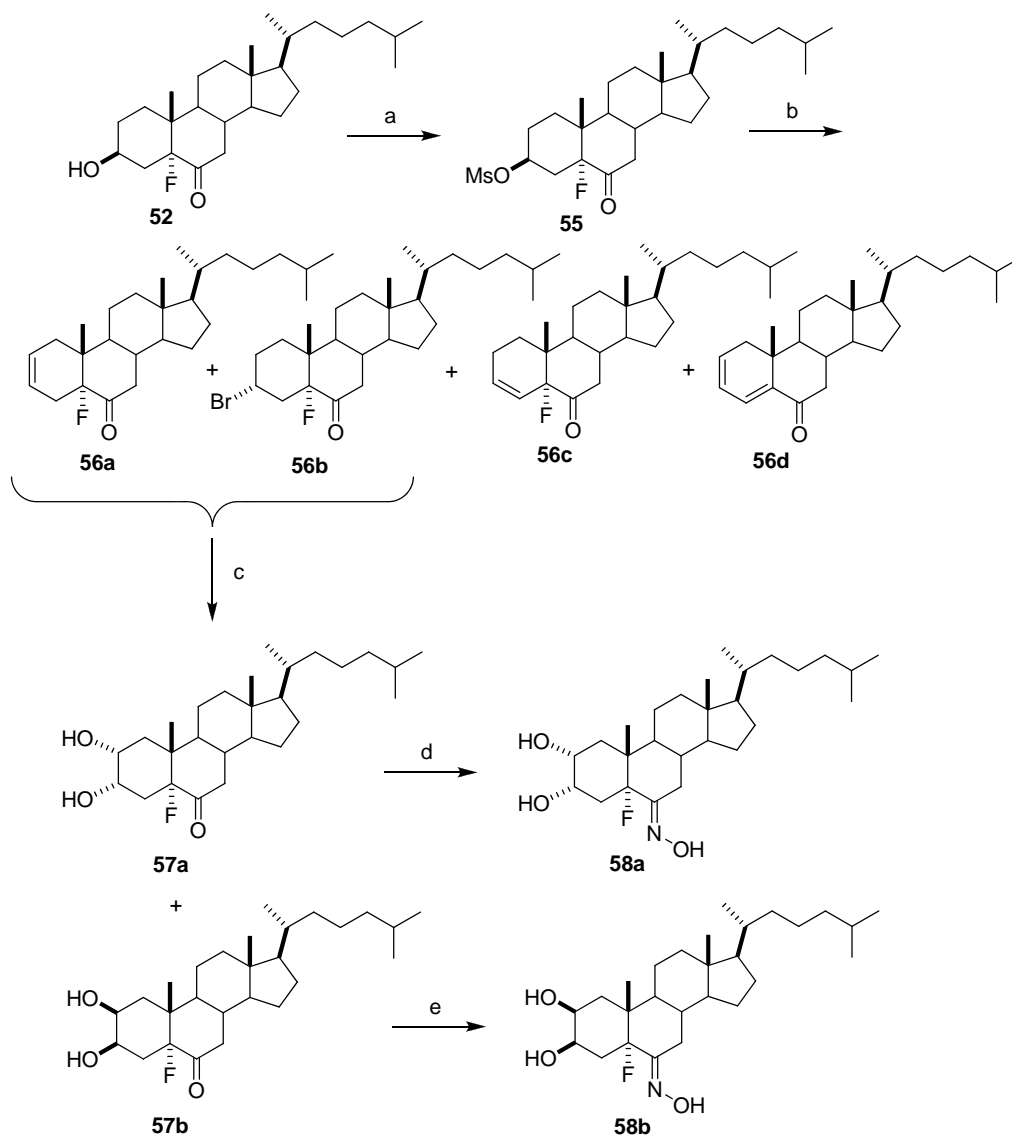
Debido a la dificultad de la separación de los compuestos **56a** y **56b**, se decidió realizar la reacción de dihidroxilación sobre la mezcla de ambos y proceder a su separación a continuación. Así, la dihidroxilación del doble enlace en el esteroide fluorado **56a**, empleando tetróxido de osmio y NMO, dio lugar a la formación del par de isómeros **57a** y **57b** en una relación 1:1.¹⁰⁰

El espectro de RMN de ^1H de **57a** con los dos grupos hidroxilo en disposición α mostró la aparición a 4.04 ppm de un doble doblete ($J = 6.0, 3.0$ Hz) y de un multiplete a 3.75 ppm que fueron asignados a los protones H-3 y H-2, respectivamente. La señal del flúor en su espectro de RMN de ^{19}F resonó a -154.9 ppm. La disposición α de los grupos hidroxilo se determinó por comparación de los anteriores datos espectroscópicos con los del compuesto (22*R*,23*R*)-5 α -fluoro-2 α ,3 α ,22,23-tetrahidroxiestigmastan-6-ona, obtenido en la síntesis de diversos derivados fluorados de brasinosteroide.⁹⁸

En el espectro de RMN de ^1H de **57b** con los dos grupos hidroxilo en disposición β , los protones H-3 y H-2 resonaron como un singulete ancho a 4.06 ppm y un multiplete a 3.97 ppm, respectivamente. De nuevo, estos datos espectroscópicos fueron concordantes con una disposición β de los grupos hidroxilo por comparación con (22*R*,23*R*)-5 α -fluoro-2 β ,3 β ,22,23-tetrahidroxiestigmastan-6-ona.⁹⁸

La introducción del grupo hidroximino en el esteroide fluorado **57a**, se realizó de igual forma que en los casos anteriores, obteniéndose el hidroximinoesteroide fluorado **58a** con un rendimiento del 88%. De la misma forma, se realizó la introducción del grupo hidroximino en el esteroide fluorado **57b**, para dar el hidroximinoesteroide fluorado **58b** con un rendimiento del 92%.

¹⁰⁰ Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 386.



Esquema 24. *Reactivos y condiciones:* (a) MsCl, Py (99%); (b) LiBr, DMF (90%); (c) OsO₄, NMO, separación cromatográfica (30%); (d) NH₂OH-HCl, Py (88%); (e) NH₂OH-HCl, Py (90%).

Tras ocho etapas de síntesis, se obtuvieron **58a** y **58b** a partir de colesterol con rendimientos globales del 18% y el 16%, respectivamente.

5. Análisis farmacológicos y relaciones estructura-actividad

Los análisis de citotoxicidad de los análogos de los 6-hidroximoesteroides obtenidos fueron realizados por PharmaMar frente a un panel de tres células tumorales: MDA-MB-231 (adenocarcinoma de pecho humano), A-549 (carcinoma de pulmón humano) y HT-29 (carcinoma de colon humano).

Los resultados que se pueden observar en la Tabla 2 se expresan en unidades de μM para sus GI_{50} .

Para poder comparar los niveles de actividad se obtuvieron también los valores citotóxicos del esteroide natural, el 6*E*-hidroximino-4-colesten-3-ona (**1**) y del compuesto sintético 6*E*-hidroximino-2-hidroxi-1,4-colestadien-3-ona (**3**), análogo que había presentado mayor actividad hasta la fecha.

Los compuestos sintetizados y evaluados se pueden dividir en dos grupos:

A) *Nuevos derivados de hidroximinoesteroides con diferentes posiciones oxigenadas adicionales en los anillos A, B y D:*

La Tabla 2 muestra los resultados de actividad citotóxica obtenidos para los hidroximinoesteroides con posiciones oxigenadas, además de C-3, en C-1 (compuestos **13** y **14**), en C-7 (compuestos **24** y **25**), con una funcionalidad de epóxido entre C-4/C-5 (compuestos **33** y **38**), y en C-16 (compuestos **48** y **49**). Con el fin de comparar estos valores de citotoxicidad, se incluyeron en esta tabla los valores obtenidos en estos ensayos farmacológicos para el hidroximinino natural **1** y para el derivado sintético más activo obtenido hasta el momento, compuesto **3**.

Se puede observar que los compuestos **14**, **24** y **38** resultaron ser inactivos en las células tumorales ensayadas mientras que los compuestos **13**, **25**, **33**, **48** y **49** resultaron ser activos. En el caso del compuesto **25** resultó ser selectivo frente a la línea tumoral HT-29. Aunque la actividad citotóxica de **13**, **25**, **33**, **48** y **49** es superior a la del hidroximinino natural **1**, no se llegó a superar los valores de citotoxicidad que presentó el compuesto **3**.

De todos estos datos se puede concluir que la presencia de una posición oxigenada en los carbonos C-1, C-7 y C-16 no trae consigo un incremento importante de la actividad citotóxica en este tipo de estructuras. El compuesto **33** que posee un grupo epóxido en las posiciones C-4/C-5 resultó ser el más activo de este grupo.

B) *Nuevos derivados de hidroximinoesteroides con un átomo de flúor en C-5:*

En la Tabla 2 se muestran también, los resultados de actividad citotóxica obtenidos para los hidroximinoesteroides con un átomo de flúor en la posición C-5 y posiciones oxigenadas en C-3 (**53** y **54**) y en C-2 (**58a** y **58b**).

Se puede observar que todos los compuestos resultaron ser activos, a excepción del **53**. Lo más destacable de este grupo de nuevos 6-hidroximinoesteroides, es que el compuesto **58a** mostró una elevada actividad citotóxica frente a la línea tumoral A-549 (GI₅₀ de 9.9 μ M). Aunque la actividad citotóxica de **54**, **58a** y **58b** es superior a la del hidroximinino natural **1**, esos valores son inferiores a los obtenidos con el compuesto de referencia **3**.

Estos datos confirman de nuevo la importancia de aumentar el grado de oxidación en el anillo A con el fin de incrementar la actividad citotóxica, ya que los compuestos **58a** y **58b**, con las posiciones oxigenadas en C-2 y C-3 resultaron ser más activos que **53** y **54**. Además, el isómero **58a** que posee los dos grupos hidroxilos en C-2/C-3 con una disposición α es el que presenta mayor actividad e incluso una cierta selectividad con respecto a la línea tumoral A-549.

Tabla 2. Actividad citotóxica (GI₅₀ en μ M) de los 6-hidroximinoesteroides con diferentes posiciones oxigenadas en los anillos A, B, D y un átomo de flúor en la posición C-5.

	Compuesto	MDA-MB-231	A-549	HT-29
Compuestos referencia	1	19.6	20.3	20.5
	3	3.3	3.5	3.0
Compuestos con grupos hidroxilo en los anillos A, B y D	13	18.8	18.5	11.6
	14	-	-	-
	24	-	-	-
	25	-	-	13.3
	33	6.7	8.8	6.3
	38	-	-	-
	48	18.5	18.7	11.2
Compuestos fluorados en C-5	49	18.5	18.3	18.6
	53	-	-	-
	54	18.9	18.9	18.7
	58a	18.4	9.9	21
	58b	20.8	17.6	-

Paralelamente a estos ensayos se realizaron en BIOMAR otros análisis citotóxicos de los mismos análogos de los 6-hidroximoesteroides frente a un panel de cuatro células tumorales: A-549 (carcinoma de pulmón humano), HCT-116 (adenocarcinoma de colon humano), PSN1 (adenocarcinoma de páncreas humano) y T98G (glioblastoma humano).

Los resultados que se pueden observar en la Tabla 3 se expresan en unidades de μM para sus GI_{50} y revelan de nuevo la importancia de la presencia de posiciones oxigenadas en el anillo A para un incremento en la actividad citotóxica en este tipo de estructuras. De todos ellos, el esteroide **33** resultó ser el más activo de este grupo, además de mostrar cierta selectividad frente a la línea tumoral HCT-116.

Tabla 3. Actividad citotóxica (GI_{50} en μM) de los 6-hidroximoesteroides con diferentes posiciones oxigenadas en los anillos A, B, D y un átomo de flúor en la posición C-5.

	Compuesto	A-549	HCT-116	PSN1	T98G
Compuestos referencia	1	12.1	12.1	12.1	24.2
	3	2.3	0.2	1.1	2.3
Compuestos con grupos hidroxilo en los anillos A, B y D	13	11.6	2.3	2.3	23.2
	14	>25	>25	>25	25
	24	>25	>25	>25	>25
	25	>25	>25	>25	>25
	33	1.0	0.2	1.0	1.0
	48	19.4	1.9	19.4	19.4
	49	21.1	21.1	21.1	>25
Compuestos fluorados en C-5	53	23	23	23	>25
	54	11.5	11.5	11.5	11.5
	58a	2.2	2.2	2.2	2.2
	58b	>25	>25	>25	>25

Además de la evaluación de la actividad citotóxica, objetivo principal de este trabajo, los hidroximinoesteroides fueron evaluados como inhibidores en la biosíntesis de proteínas (Fig. 12).¹⁰¹ El empleo de pequeños inhibidores moleculares en los procesos celulares es una herramienta poderosa para el descubrimiento de diferentes procesos genéticos, como la biosíntesis de proteínas o procesos de generación y proliferación de diferentes tipos de cánceres. El estudio de estos inhibidores moleculares puede tener nuevas aplicaciones en medicina.

La mayoría de los inhibidores conocidos de la biosíntesis de proteínas se enlazan a los ribosomas, algunos de ellos estableciendo contactos clave con el ARN. La habilidad de estos pequeños inhibidores moleculares reside en el hecho de que son capaces de interactuar con el ARN y prevenir la expresión genética.

El estudio de esta actividad en nuestro grupo de investigación, surgió a partir de una nueva colaboración con el Dr. Jerry Pelletier del Departamento de Bioquímica de la Universidad de McGill en Montreal (Cánada). Concretamente se ensayaron los hidroximinoesteroides con una posición oxigenada en C-1, C-7, y un átomo de flúor en C-5 frente a dos enzimas luciferasa que están implicadas en el proceso de biosíntesis de proteínas: Firefly luciferasa y Renilla luciferasa. Desafortunadamente, ninguno de los hidroximinoesteroides ensayados resultó ser activo.

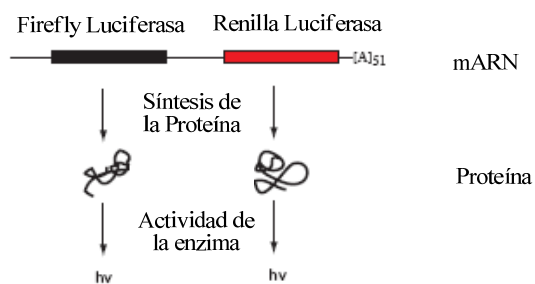


Figura 12. Esquema de la actuación de las dos enzimas luciferasa: Firefly luciferasa y Renilla luciferasa, implicadas en el proceso de biosíntesis de proteínas.

¹⁰¹ Nova, O.; Pelletier, J. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 902.

6. Conclusiones

- Con el fin de estudiar la influencia en la actividad citotóxica que ejerce la presencia de distintas posiciones oxigenadas en los anillos A, B, D y fluoradas en la posición C-5, se sintetizaron los siguientes 6-hidroximinoesteroides:

- 1 α -hidroxi-6*E*-hidroximino-4-colesten-3-ona (**14**), con un grupo hidroxilo en la posición C-1 (anillo A).
- 7 α -hidroxi-6*E/Z*-hidroximino-4-colesten-3-ona (**25**), con un grupo hidroxilo en la posición C-7 (anillo B).
- 3 β -acetoxi-4 β ,5 β -epoxi-6*E*-hidroximinocolestano (**33**), con un epóxido entre las posiciones C-4 y C-5 (anillo A/B).
- 16 β -acetoxi-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-en-3-ona (**49**), con un grupo acetato en la posición C-16 (anillo D)
- 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-colestan-3-ona (**54**), con un átomo de flúor en la posición C-5 y un grupo cetona en la posición C-3.
- 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-2 α ,3 α -dihidroxicolestano (**58a**) y 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-2 β ,3 β -dihidroxicolestano (**58b**), con un átomo de flúor en la posición C-5 y un hidroxilo en las posiciones C-2 y C-3.

- Se realizó la evaluación de la actividad citotóxica de la mayoría de los compuestos sintetizados frente a un panel de células tumorales: MDA-MB-231, A-549, HT-29, HCT-116, PSN1 y T98G.

- De los valores de citotoxicidad obtenidos de las estructuras esteroidales con el grupo hidroximino, se dedujo que:

- La presencia de un grupo epóxido entre las posiciones C-4 y C-5 trajo consigo un aumento de la actividad citotóxica en este tipo de estructuras (compuesto **33**).
- La existencia de una posición oxigenada adicional en los anillos A, B y D no produjo un aumento de la citotoxicidad, aunque si se observó cierta selectividad frente a la línea tumoral HT-29.
- La presencia de un átomo de flúor en la posición C-5 tampoco trajo consigo un incremento en la actividad citotóxica, aunque en el caso de **58a** se observó una cierta selectividad frente a la línea tumoral A-549.

2

Síntesis de $3\beta,7$ -
dihidroxi-5,6-
epoxicolestano
y aplicación de la
metodología DFT-
NMR

1. Antecedentes

1.1. 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxiesteroides citotóxicos naturales

En la búsqueda de nuevos esteroides bioactivos a partir de organismos marinos, el equipo de investigación de Productos Naturales Marinos de la Universidad de A Coruña del área de Química Orgánica logró aislar y caracterizar de la esponja *Polymastia tenax* recolectada en Colombia, dos nuevos esteroides citotóxicos (Fig. 13),¹⁰² que presentaban grupos hidroxilo en C-3 y C-7 junto con un grupo epóxido entre las posiciones C-5/C-6. Los compuestos mostraron actividad citotóxica frente a las líneas tumorales A-549, HT-29, HCT-116, PC-3 y MS-1, en un intervalo de 0.5 - 10 $\mu\text{g/mL}$.

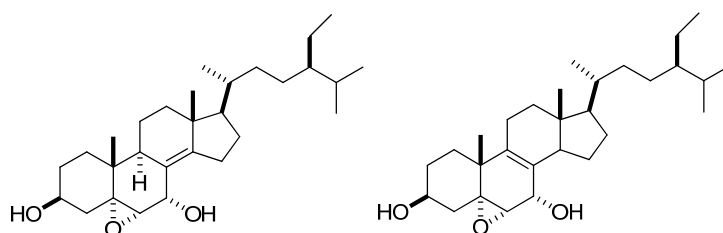


Figura 13. Esteroides polihidroxigenados citotóxicos aislados de *Polymastia tenax*.

Estas funcionalidades en las mismas posiciones están presentes en otros esteroides naturales que han mostrado interesantes actividades citotóxicas. Algunos ejemplos que pueden encontrarse en la bibliografía son el 12 β -acetoxi-3 β ,7 α ,11 α -trihidroxi-5 β ,6 β -epoxigorgostano aislado de la gorgonia *Isis hippuris*, que posee actividad citotóxica frente a células cancerosas resistentes a fármacos que expresan la P-glicoproteína;¹⁰³ el 3 β ,7 β -dihidroxi-5 β ,6 β -epoxicolest-24-eno que fue aislado del coral blando *Gersemia fruticosa* y mostró actividad citotóxica a nivel μM e indujo apoptosis frente al panel celular K-562;¹⁰⁴ y el 3 β ,7 β -dihidroxi-5 β ,6 β -epoxi ergost-24(28)-eno aislado de la gorgonia *Plexaurella grisea* que mostró selectividad citotóxica frente al panel de células tumorales de colon rectal humano HT-29¹⁰⁵ (Fig. 14).

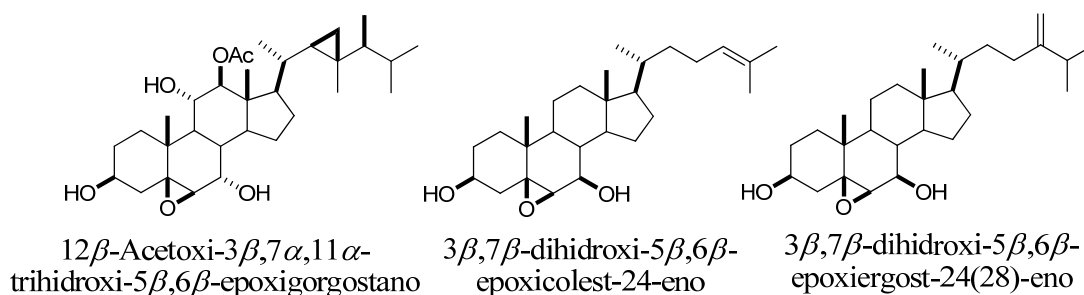


Figura 14. Esteroides citotóxicos con un epóxido en C-5/C-6 y un hidroxilo en C-3 y C-7.

¹⁰² Santafé, G.; Paz, V.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1161.

¹⁰³ Tanaka, J.; Trianto, A.; Musman, M.; Issa, H. H.; Ohtani, I. I.; Ichiba, T.; Higa, T.; Wesley, T.; Yoshida, Y.; Scheuer, P. J. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6259.

¹⁰⁴ Koljak, R.; Lopp, A.; Pehk, T.; Varvas, K.; Müürisepp, A.-M.; Järving, I.; Samel, N. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 179.

¹⁰⁵ Rueda, A.; Zubía, E.; Ortega, M. J.; Salvá, J. *Steroids* **2001**, *66*, 897.

La determinación de la configuración relativa del grupo epóxido entre las posiciones C-5/C-6 en esteroides resulta problemática debido a la disposición planar del protón H-6, lo cual dificulta la asignación correcta de su estereoquímica mediante correlación NOE ó mediante el estudio de las constantes de acoplamiento protón-protón.¹⁰⁶ En la mayoría de los casos de esteroides que contienen 5,6-epoxi-7-hidroxi funcionalidades la asignación de la estereoquímica se realizó mediante comparación de los datos 1D-RMN con los compuestos similares aislados hace tiempo.

La importancia de la correcta determinación de la configuración relativa también radica en que la introducción de un grupo epóxido entre las posiciones C-5/C-6 abre las puertas a la introducción de otras funcionalidades en esas posiciones, ya que son intermedios clave en la síntesis de esteroides.¹⁰⁷

¹⁰⁶ Somu, R. V.; Boshoff, H; Qiao, C.; Bennett, E. M.; Barry III, C. E.; Aldrich, C. C. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 31

¹⁰⁷ a) D'Auria, M. V.; Minale, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1839. b) Lopp, A.; Koljak, R. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 179.

1.2. Determinación de la configuración relativa mediante RMN y cálculos computacionales

La determinación de la configuración relativa es un paso crucial en la elucidación estructural de un compuesto. La técnica más empleada y versátil en estudios configuracionales es la espectroscopia de RMN al poderse utilizar en compuestos no cristalinos. Las diferencias que producen los entornos químicos entre varios diastereoisómeros hacen que sus desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento sean determinantes para discernir su estereoquímica.

Existen diferentes estrategias para determinar la configuración relativa por RMN como son la comparación de los desplazamientos químicos con compuestos similares, la predicción de valores a través de software especializado, o por comparación con “bases de datos universales de RMN”. Sin embargo, la ausencia de modelos apropiados para realizar dichas comparaciones y el limitado número de bases de datos específicas como puede ser la *Base de Datos Universal de RMN*,¹⁰⁸ desarrollada por Kishi y col, que requieren una enorme variedad de modelos estructurales para realizar el análisis configuracional, justifica el interés de desarrollar otras herramientas para realizar estas asignaciones.

En 1999¹⁰⁹ se desarrolló una nueva metodología de RMN conocida como análisis configuracional basado en las constantes de acoplamiento que permite determinar configuraciones relativas en sistemas flexibles 1,2 y 1,3 disustituidos basándose en los valores experimentales de las constantes de acoplamiento homo y heteronucleares.

Por otra parte, en los diez últimos años se han publicado un gran número de artículos sobre cálculos teóricos de desplazamientos químicos y de medidas de constantes de acoplamiento empleando métodos basados en la teoría de funcionales de densidad (DFT).¹¹⁰ Este hecho pone de manifiesto que los métodos computacionales están siendo cada vez más utilizados para la determinación de configuraciones relativas,¹¹¹ y poco a poco, se va abriendo un hueco como técnica adecuada y muy accesible para predecir la estructura de un compuesto y sus propiedades moleculares y espectrales.¹¹² Así, se pueden realizar estudios comparativos de constantes de acoplamiento y desplazamientos químicos entre los valores obtenidos experimentalmente con los calculados mediante química computacional que permiten verificar y corroborar la estereoquímica relativa de un compuesto.

¹⁰⁸ a) Kobayashi Y.; Tan C. H.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2076. b) Kobayashi, Y.; Lee, J.; Tezuka, K.; Kishi Y. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 2177.

¹⁰⁹ a) Bifulco, G.; Dambruoso, P.; Gómez-Paloma, L.; Riccio, R. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3744. b) Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 866.

¹¹⁰ a) Bagno, A.; Saielli, G. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 603. c) Bagno, A.; Rastrelli, F.; Saielli, G. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 5514. c) Colombo, D.; Ferraboshi, P.; Ronchetti, F.; Toma L. *Mag. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 581.

¹¹¹ a) Ardá, A.; Jiménez, C.; Rodríguez, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 3645. b) Ardá, A.; Rodríguez, J.; Nieto, R. M.; Bassarello, B.; Gomez-Paloma, L.; Bifulco, G.; Jiménez, C. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10093.

¹¹² a) Dunkel; R.; Wu, X. *J. Mag. Reson.* **2007**, *188*, 97. b) Jaspars, M. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 241.

La química computacional estudia la caracterización junto con la predicción de la estructura y estabilidad de los sistemas químicos. Los principales tipos de métodos usados en los cálculos son la *mecánica molecular* y la *teoría de estructura electrónica*.¹¹³

La mecánica molecular utiliza aproximaciones clásicas con ecuaciones que varían en función del tipo de campo de fuerzas que utilicen. A pesar de que los cálculos son poco costosos esta área no suele emplearse demasiado en los estudios computacionales debido a que cada campo de fuerza que se utiliza, da poca información para un limitado número de moléculas y no se tratan a los electrones explícitamente, por lo que no se pueden emplear en problemas donde predominen los efectos electrónicos.

Por el contrario, la teoría de estructura electrónica utiliza las leyes de la mecánica cuántica como base de los cálculos, pudiéndose obtener diversas propiedades moleculares como la energía si se resuelve su ecuación de Schrödinger. Como su resolución de forma exacta no es posible se recurre a diferentes aproximaciones: métodos *semiempíricos* que utilizan parámetros experimentales, los métodos *ab initio* que no utilizan parámetros experimentales pero si aproximaciones como la teoría de Hartree-Fock (HF) ó los métodos de funcionales de densidad (DFT), en los que se incluyen los *efectos de correlación de los electrones*.

En la química computacional se utilizan modelos teóricos (semiempírico, *ab initio*, DFT) y dentro de estos varios niveles de profundidad: MP2, MP4, B3LYP, MP1PW91, etc... con diferentes conjuntos base. Actualmente el problema de la calidad del conjunto base está en fase de investigación, aunque los métodos DFT con conjuntos base Gaussian de alta calidad proporcionan buenos cálculos de J a un coste computacional moderado. Ésta es la razón por la que la química computacional se puede emplear en el cálculo de desplazamientos químicos para diferentes núcleos y en la predicción de constantes de acoplamiento espín-espín.

Para moléculas rígidas, como los esteroides, la optimización de la geometría con DFT funcionales B3LYP y el conjunto base 6-311G(d,p) es adecuada, ya que mantiene un buen compromiso entre el coste computacional y su exactitud.¹¹⁴

¹¹³ a) Foreman, J. B.; Frisch, A. E. Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods, Ed. 2th Gaussian Inc., Pittsburgh: 1996.

¹¹⁴ Bagno, A. *Chem. Eur. J.* **2001**, 7, 1652.

2. Objetivos

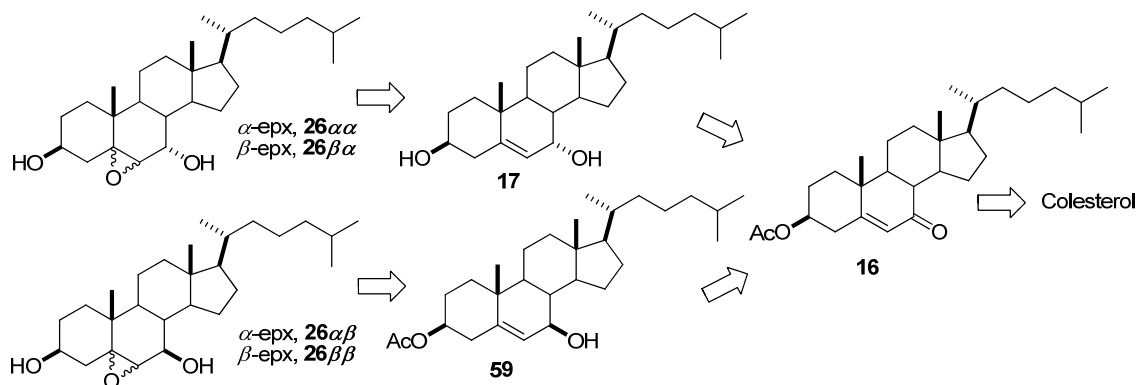
Teniendo en cuenta estos antecedentes se plantea como objetivo de este capítulo la síntesis de los cuatro posibles $3\beta,7$ -dihidroxi-5,6-epoxicolestanos con el propósito de evaluar la influencia que ejerce en la citotoxicidad, la presencia de un grupo epóxido en las posiciones C-5/C-6 y un grupo hidroxilo en C-3 y C-7 en un esqueleto de colestano.

Por otro lado, se llevará a cabo un análisis estructural sobre los compuestos sintetizados con el fin de desarrollar una metodología que ayude a resolver la dificultad inherente en la asignación de la configuración relativa del grupo epóxido en estos sistemas debido a la disposición planar del protón H-6.

Para alcanzar este objetivo se realizará primero la asignación completa por RMN de ^1H y ^{13}C de los cuatro diastereoisómeros mediante experimentos mono y bidimensionales con el propósito de estudiar una serie de señales características que puedan ser consideradas “señales diagnóstico” para deducir la estereoquímica relativa de los grupos epóxido e hidroxilo presentes en el esqueleto de colestano. Posteriormente, se plantea llevar a cabo un exhaustivo análisis configuracional basado en la comparación de las constantes de acoplamiento y desplazamientos químicos de carbono entre los valores experimentales y los calculados mediante estudios computacionales empleando la teoría de funcionales de densidad, con el propósito de demostrar que la metodología DFT-RMN es la más adecuada en la identificación de cada diastereoisómero.

3. Síntesis de los 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestano

En el análisis retrosintético diseñado (esquema 25), se planteó aplicar una estrategia utilizando como intermedio clave la cetona α,β -insaturada **16** que sería fácilmente obtenible a partir de colesterol. La reducción estereoselectiva de **16** daría los alcoholes **17** ó **59** que por epoxidación originarán los cuatro posibles diastereoisómeros con estructura de **26**.



Esquema 25. Análisis retrosintético de los 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestano.

3.1. Síntesis de los 3 β ,7 α -dihidroxi-5,6-epoxicolestano

La ruta sintética desarrollada para la obtención de los 3 β ,7 α -dihidroxi-5,6-epoxicolestano **26 $\alpha\alpha$** y **26 $\beta\alpha$** se describe en el capítulo 1 y se resume en esquema 26.

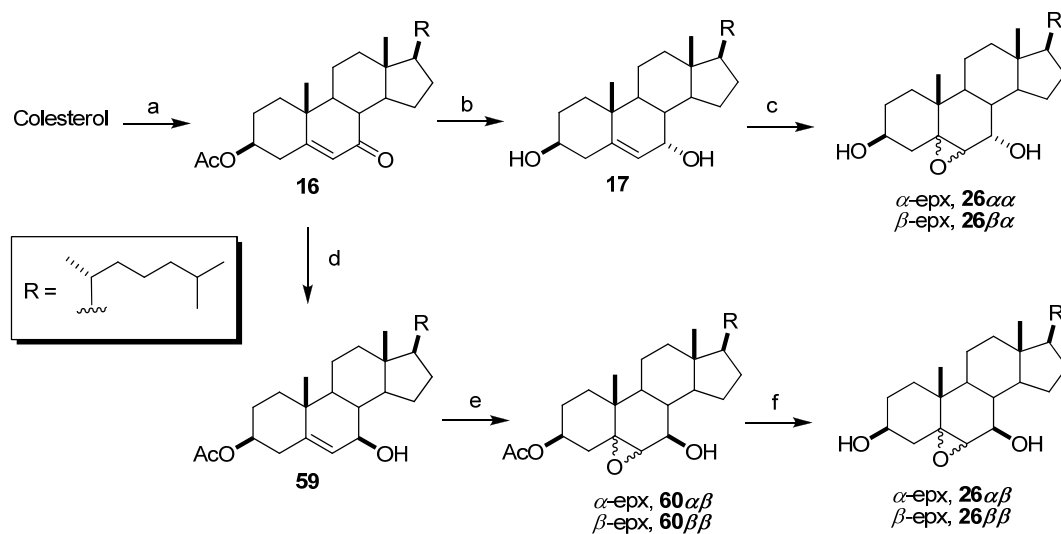
3.2. Síntesis de los 3 β ,7 β -dihidroxi-5,6-epoxicolestano

La síntesis del otro par de diastereoisómeros **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** (esquema 26) comenzó por la reacción de Luche de **16**.¹¹⁵ Así, la reducción quimio y estereoselectiva del grupo carbonilo de la cetona α,β -insaturada **16** con NaBH₄, CeCl₃·7H₂O rindió el alcohol alílico **59** con un rendimiento del 90%. En el espectro de RMN de ¹H se observó la aparición de un doblete ($J = 8.0$ Hz) a 3.86 ppm (H-7 α) que confirmó la obtención del alcohol alílico **59** con el grupo hidroxilo en C-7. La epoxidación de **59** se realizó con ácido *m*-cloroperbenzoico. La interacción por enlace hidrógeno entre el perácido y el grupo hidroxilo en posición alílica induce la formación del epóxido mayoritario por la cara donde se encuentra el grupo hidroxilo, mientras que la epoxidación por la otra cara da lugar al epóxido minoritario. El espectro de RMN de ¹H mostró la presencia de los pares de dobletes de los dos epóxidos a 3.14 ppm y a 2.88 ppm, así como la desaparición del singulete a 5.31 ppm correspondiente al H-6 del doble enlace Δ^5 de **59**.

El tratamiento de la mezcla de los 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5,6-epoxicolestano (**60 $\alpha\beta$** y **60 $\beta\beta$**) con KOH:MeOH al 5% trajo consigo la desprotección de los grupos hidroxilo en C-3 que tras su purificación por HPLC en fase reversa y utilizando como

¹¹⁵ a) Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1342. b) Stephen, E.; Brossat, M.; Lecomte, V.; Bouit, P. A. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3052. c) Gu, Q.; Zheng, Y. H.; Li, T. C. *Synthesis* **2006**, 975. d) Eliu, M.; Yu, B.; Hui, Y. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 415. e) Amann, A.; Quriison, G.; Luu, B. *Comm.* **1987**, 1002.

fase móvil MeOH:H₂O (96:4) se obtuvieron los dos 3 β ,7 β -dihidroxi-5,6-epoxicolestanos **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** en relación (1:2).



Esquema 26. *Reactivos y condiciones:* (a) (1) Ac₂O:Py (1:1) (99%); (2) *t*-BuOOH, CuI, C₆H₆ (60%); (b) L-Selectride, THF (95%); (c) (1) *m*-CPBA, CHCl₃ (88%); (2) Los esteroides **26 $\alpha\alpha$** y **26 $\beta\alpha$** fueron separados y purificados mediante cromatografía en gel de sílice con Hexano/EtOAc (9:1); (d) NaBH₄, CeCl₃·7H₂O, THF:MeOH (1:1) (90%); (e) *m*-CPBA, CHCl₃ (82%); (f) (1) 5% KOH:MeOH (90%); (2) Los esteroides **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** fueron separados y purificados por HPLC en fase reversa con MeOH:H₂O (96:4).

4. Determinación de señales diagnóstico de RMN

Una vez obtenidos los cuatro posibles diastereoisómeros (**26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$**) y conociendo su estereoquímica relativa se realizó la asignación completa de todos los protones y carbonos empleando técnicas de 1D-RMN: ^1H , ^{13}C y DEPT-135; y de experimentos 2D-RMN: ^1H - ^1H COSY; TOCSY, HSQC editado, HSQC-TOCSY y HMBC (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Datos de RMN ^1H (δ_{H} , mult, J en Hz) a 500 MHz en CDCl_3 de los compuestos **26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** .

Protón	26$\alpha\alpha$	26$\beta\alpha$	26$\alpha\beta$	26$\beta\beta$
1a	1.71, m	1.96, m	1.45, m	2.03, m
1b	1.37, m	1.34, m	0.92, m	1.23, m
2a	1.95, m	1.82, m	2.06, m	1.42, m
2b	1.62, m	1.32, m	1.61, m	1.84, m
3	3.92, m	3.74, m	3.92, m	3.76, m
4a	2.11, t, $J = 12.4$ Hz	2.08, m	1.99, m	2.06, m
4b	1.38, m	1.45, m	1.11, m	1.48, m
5	-----	-----	-----	-----
6	3.24, d, $J = 4.8$ Hz	3.11, d, $J = 2.8$ Hz	2.91, s, $J = 0$ Hz	3.16, d, $J = 1.5$ Hz
7	3.87, d, $J = 4.8$ Hz	4.07, d, $J = 2.8$ Hz	3.72, $J = 6.8$ Hz	3.54, t, $J = 8.0$ Hz
8	2.05, m	1.57, m	1.29, m	1.42, m
9	1.24, m	1.13, m	1.10, m	0.74, m
10	-----	-----	-----	-----
11a	1.40, m	1.42, m	1.45, m	1.43, m
11b	1.29, m	0.89, m	1.24, m	0.89, m
12a	2.12, m	1.97, m	1.96, m	2.00, m
12b	1.40, m	1.13, m	1.13, m	1.15, m
13	-----	-----	-----	-----
14	1.36, m	1.24, m	1.06, m	1.06, m
15a	1.81, m	1.63, m	1.76, m	1.94, m
15b	1.07, m	1.14, m	0.97, m	1.39, m
16a	1.88, m	1.87, m	1.93, m	1.88, m
16b	1.25, m	1.30, m	1.25, m	1.30, m
17	1.11, m	1.13, m	1.03, m	1.05, m
18	0.64, s	0.67, s	0.67, s	0.67, s
19	1.09, s	1.01, s	1.13, s	1.01, s
20	1.36, m	1.57, m	1.28, m	1.35, m
21	0.92, d, $J = 6.5$ Hz	0.91, d, $J = 6.5$ Hz	0.92, d, $J = 6.5$ Hz	0.92, d, $J = 6.5$ Hz
22a	1.34, m	1.96, m	1.45, m	1.36, m
22b	1.01, m	1.36, m	0.96, m	1.24, m
23	1.29, m	1.34, m	1.32, m	2.01, m
24	1.11, m	1.12, m	1.17, m	1.07, m
25	1.34, m	1.53, m	1.28, m	1.53, m
26/27	0.88, d, $J = 6.5$ Hz	0.87, d, $J = 6.5$ Hz	0.88, d, $J = 6.5$ Hz	0.88, d, $J = 6.5$ Hz

Tabla 5. Datos de RMN ^{13}C (δ_{C}) a 125 MHz en CDCl_3 de los compuestos **26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** .

Carbono	mult.	26 $\alpha\alpha$	26 $\beta\alpha$	26 $\alpha\beta$	26 $\beta\beta$
1	CH ₂	32.5	36.8	32.4	36.9
2	CH ₂	31.0	30.8	31.0	31.0
3	CH	68.7	69.2	68.7	69.1
4	CH ₂	39.5	41.8	39.2	41.8
5	C	69.3	63.9	66.0	67.2
6	CH	62.7	65.0	62.6	67.5
7	CH	64.9	67.4	70.5	74.8
8	CH	37.1	34.4	40.3	38.4
9	CH	36.9	42.0	39.7	49.7
10	C	35.4	42.2	34.9	34.2
11	CH ₂	20.4	21.9	20.5	22.0
12	CH ₂	38.7	39.5	39.5	39.6
13	C	41.9	39.4	42.7	43.0
14	CH	48.8	49.4	55.6	55.3
15	CH ₂	24.4	23.7	25.2	27.3
16	CH ₂	28.1	28.2	28.3	28.6
17	CH	55.6	56.1	55.8	55.4
18	CH ₃	11.7	11.6	11.8	11.7
19	CH ₃	16.0	17.2	16.2	16.8
20	CH	35.7	34.4	32.4	35.7
21	CH ₃	18.7	18.6	18.7	18.8
22	CH ₂	36.1	36.9	36.2	37.0
23	CH ₂	23.7	23.6	23.8	23.8
24	CH ₂	39.5	39.4	39.4	39.5
25	CH	28.0	28.0	28.0	28.0
26/27	CH ₃	22.8/22.6	22.8/22.6	22.8/22.6	22.8/22.6

A partir de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C de los compuestos **26** se pudieron deducir algunas señales diagnósticas que pueden ser útiles en el establecimiento de la configuración relativa de los sistemas 5,6-epoxi-7-hidroxicolestanos:

- El desplazamiento químico del protón H-3 en el espectro de RMN resultó ser un buen indicador de la disposición del epóxido. En los α -epóxidos este protón aparece a más frecuencia (3.92 ppm), mientras que en los β -epóxidos aparece a menos frecuencia (3.75 ppm).
- Los valores de las constantes de acoplamiento $^3J(\text{H6-H7})$ y $^3J(\text{H7-H8})$ no son útiles en la determinación de la configuración relativa del epóxido en C-5/C-6, aunque suministran información acerca de la configuración relativa del grupo hidroxilo en C-7. Los isómeros **26 $\alpha\alpha$** y **26 $\beta\alpha$** , que poseen ese hidroxilo en disposición α , presentan valores medianos ó pequeños de $^3J(\text{H6-H7})$ y $^3J(\text{H7-H8})$ (4.8 Hz y 2.8 Hz); mientras que los isómeros **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** , con dicho grupo en disposición β , presentan valores pequeños o grandes de $^3J(\text{H6-H7})$ y $^3J(\text{H7-H8})$ (0 Hz, 1.5 Hz, 6.8 Hz y 8.0 Hz).
- El desplazamiento químico de C-1 en el RMN ^{13}C es indicativo de la configuración α ó β del epóxido. En los α -epóxidos, ese carbono aparece a menos frecuencia (32.5 ppm), mientras que en los β -epóxidos aparece a más frecuencia (36.8 ppm).

- El desplazamiento químico de C-7 en el espectro de RMN ^{13}C es indicativo de la configuración α ó β del grupo hidroxilo. Ese carbono resuena a menor frecuencia (64.9 ppm y 67.4 ppm) en aquellos isómeros que poseen los grupos hidroxilos en C-7 con disposición α , mientras que los que poseen los grupos hidroxilo con disposición β aparecen a más frecuencia (70.5 ppm y 74.8 ppm).

5. Aplicación de la metodología DFT-RMN

5.1 Análisis configuracional basado en la comparación de las constantes de acoplamiento (J)

El análisis configuracional basado en la comparación de las constantes de acoplamiento carbono-protón y protón-protón se está convirtiendo en una aproximación muy empleada en la determinación estructural. Se basa en el hecho de que alrededor de un enlace con estereoquímica desconocida, el conjunto de constantes de acoplamiento homonucleares y heteronucleares de los átomos involucrados en el mismo es indicativo de esa estereoquímica. Si el análisis se apoya además en una aproximación mecanocuántica, el modelo es mucho más preciso y adecuado. El estudio completo, denominado análisis configuracional QM- J ,¹¹⁶ consiste en los siguientes pasos:

a) Cálculos de las constantes de acoplamiento experimentales. Las constantes heteronucleares se determinan mediante experimentos bidimensionales basados en bloques TOCSY ó HMBC. El HETLOC es el experimento que más se utiliza entre los primeros, mientras que el J -HMBC es el más empleado de los segundos.

b) Cálculo de las constantes de acoplamiento teóricas. En primer lugar se minimiza un modelo simplificado de la molécula de estudio con un nivel de cálculo semiempírico utilizando aproximaciones AM1, PM3, etc... Sobre la geometría estructural obtenida se realiza una segunda minimización empleando la teoría de funcionales de densidad DFT. Los niveles de cálculo utilizados son B3LYP/6-311G; B3LYP/6-31G, MWPW1PW/6-31G ó 6-311G. A partir de las geometrías minimizadas se obtienen finalmente los parámetros de RMN, entre los que se encuentran las constantes de acoplamiento.

c) Comparación entre los valores experimentales y computacionales calculados. El modelo que presente una desviación menor entre esos valores nos indicará la estereoquímica del compuesto.

En nuestro caso teniendo en cuenta que los centros quirales a determinar se encuentran en los anillos A y B, se eligió como modelo simplificado un esqueleto de androstano que no posee cadena lateral (modelos **61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$**) (Fig. 15), ya que el incluir sistemas flexibles con un grado de libertad elevado incrementaría el coste computacional sin mejorar la exactitud de las medidas.

¹¹⁶ a) Bassarello, C.; Cimino, P.; Gomez-Paloma, L.; Riccio, R.; Bifulco, G. *Recent Research Developments in Organic Chemistry* **2003**, 7, 219. b) Cimino, P.; Bifulco, G.; Evidente, A.; Abouzeid, M.; Riccio, R.; Gomez-Paloma, L. *Org. Lett.* **2002**, 4, 2779.

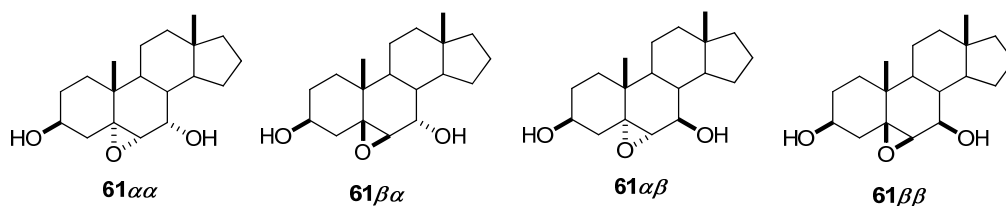


Figura 15. Modelos de 3β,7-dihidroxi-5,6-epoxiandrostanos utilizados para los estudios computacionales.

Los 3β,7-dihidroxi-5,6-epoxiandrostanos (**61αα**, **61βα**, **61αβ** y **61ββ**) fueron objeto de un estudio conformacional utilizando el programa PCModel y su módulo de búsqueda GMMX. De esta manera, se logró encontrar una única conformación empleando el método de campo de fuerza MMX con una ventana de búsqueda de 3.5 Kcal/mol. Después de encontrar este conformero se realizó una optimización de la estructura a un nivel de cálculo semiempírico AM1 para pasar a continuación a un nivel DFT B3LYP/6-31G(d) utilizando el programa Gaussian 03¹¹⁷ (Fig. 16). A partir de los modelos minimizados, se obtuvieron los valores de constantes de acoplamiento ¹H-¹H y ¹³C-¹H, así como los desplazamientos químicos de ¹³C, con los funcionales DFT GIAO-B3LYP ó DFT PW1PW91 utilizando en ambos casos el conjunto base 6-311G(d,p).

El parámetro empleado para juzgar la calidad de los cálculos fue la media de la desviación estándar en valor absoluto (MAD) definido como $\Sigma [^n J_{\text{EXPERIMENTALES}} - ^n J_{\text{CALCULADAS}}] / \text{número de comparaciones}$.¹¹⁸

La Tabla 6 muestra las comparaciones entre las constantes de acoplamiento teóricas y experimentales para cada uno de los cuatro diastereoisómeros. En el primer caso, la comparación del 3β,7α-dihidroxi-5α,6α-epoxicolestano (**26αα**) con los cuatro modelos teóricos calculados **61αα**, **61βα**, **61αβ** y **61ββ**, utilizando 10 valores, indica que la pareja **26αα-61αα**, mostraba la menor desviación media absoluta con un valor de 0.9.

El estudio se completó para los otros tres isómeros. La comparación de 10 valores para el 3β,7α-dihidroxi-5β,6β-epoxicolestano (**26βα**) indica que la menor desviación absoluta de 1.1 corresponde al modelo **61βα**. De forma similar, para el **26αβ** resultó ser el **61αβ** con un MAD de 0.5 el que mostró la menor desviación absoluta utilizando 12 medidas. Finalmente la comparación de 10 medidas del 3β,7β-dihidroxi-

¹¹⁷ Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, Jr. J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2004.

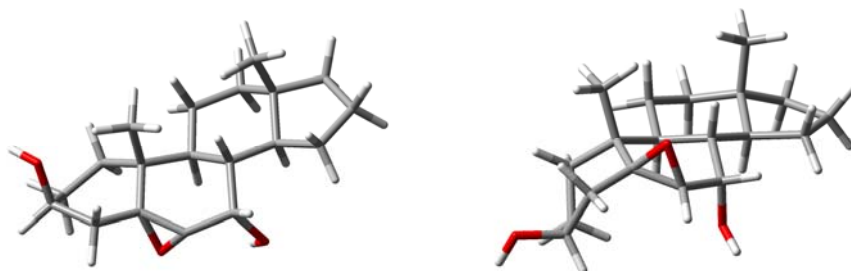
¹¹⁸ a) Cossi, M.; Barone, V.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *286*, 253. b) Cancès, M.; Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 3032. c) Mennucci, B.; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 515.

5 β ,6 β -epoxicolestano (**26 $\beta\beta$**) y el **61 $\beta\beta$** , mostró un valor de 1.2. De esta manera, con estas comparaciones se pudo verificar que la estereoquímica relativa prevista fue la correcta para cada uno de los cuatro modelos.

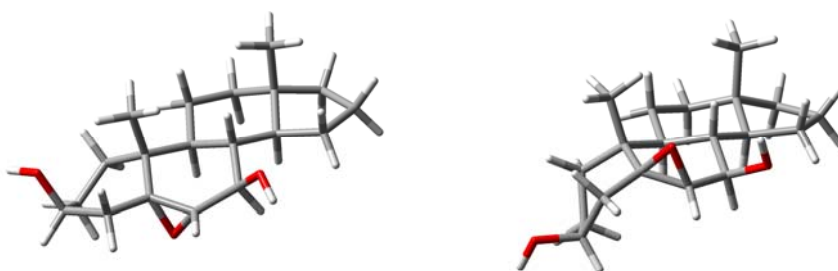
Debido a que las medidas de RMN se realizaron en cloroformo, se pasó a determinar la influencia de los efectos del disolvente en los cálculos computacionales, tanto en los funcionales B3LYP como en los MPW1PW91, empleándose el modelo IEF-PCM (Integral Equation- Formalism Polarizable Continuum Model). La similitud de los datos obtenidos con y sin disolvente reflejó que la contribución del disolvente era casi nula y por tanto se pueden obviar a efectos de cálculos.

Adicionalmente, se observaron una serie de diferencias en las constantes de acoplamiento de proton-carbono a dos y tres enlaces (Tabla 6).

- La $^2J(\text{C7-H6})$ en los β -epóxidos es mayor (4.1 Hz y 4.7 Hz), que en los α -epóxidos (3.1 Hz y 3.4 Hz).
- El valor de la $^2J(\text{C5-H4a})$ es grande (-7.2 Hz y -7.5 Hz) en los β -epóxidos, mientras que en los α -epóxidos (-0.5 Hz y -1.0 Hz) es pequeño. Estas diferencias pueden explicarse porque los α -epóxidos presentan una conformación de semisilla ó semibote en el anillo A.



3 β ,7 α -dihidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**61 $\alpha\alpha$**) 3 β ,7 α -dihidroxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**61 $\beta\alpha$**)



3 β ,7 β -dihidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**61 $\alpha\beta$**) 3 β ,7 β -dihidroxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**61 $\beta\beta$**)

Figura 16. Modelos DFT utilizados para los estudios de optimización B3LYP/6-311G(d) y los cálculos de RMN B3LYP/6-311G(d,p).

Tabla 6. Comparación de los valores experimentales de las J para los compuestos $26\alpha\alpha$, $26\beta\alpha$, $26\alpha\beta$ y $26\beta\beta$ con los valores teóricos calculados en los modelos DFT $61\alpha\alpha$, $61\beta\alpha$, $61\alpha\beta$ y $61\beta\beta$.

	Exp- $26\alpha\alpha$	DFT $61\alpha\alpha$	DFT $61\beta\alpha$	DFT $61\alpha\beta$	DFT $61\beta\beta$	$\Delta_{26\alpha\alpha, DFT61\alpha\alpha}$	$\Delta_{26\alpha\alpha, DFT61\beta\alpha}$	$\Delta_{26\alpha\alpha, DFT61\alpha\beta}$	$\Delta_{26\alpha\alpha, DFT61\beta\beta}$
3J (H6-H7)	4.8	4.8	2.7	0.6	2.3	0.0	2.1	4.2	2.5
3J (H7-H8)	4.8	5.6	3.3	6.0	7.1	0.8	1.5	1.2	2.3
2J (C5-H4a)	-0.5	-0.8	-6.2	-1.0	-6.3	0.3	5.7	0.5	5.8
2J (C5-H6)	0.5	-0.6	-0.7	-1.1	-0.6	1.1	1.2	1.6	1.1
3J (C5-H19)	5.2	5.3	3.9	5.3	3.9	0.1	1.3	0.1	1.3
2J (C6-H7)	0.7	0.6	-1.4	-3.5	1.8	0.1	2.1	4.2	1.1
3J (C6-H8)	2.9	0.1	0.5	0.3	1.0	2.8	2.4	2.6	1.9
2J (C7-H6)	4.7	4.7	4.4	2.7	3.4	0.0	0.3	2.0	1.3
2J (C7-H8)	-3.2	0.1	-0.5	-5.9	-5.0	3.3	2.7	2.7	1.8
3J (C8-H6)	4.5	4.3	3.7	3.5	3.8	0.2	0.8	1.0	0.7
Σ						8.7	20.0	20.2	19.7
<i>MAD</i>						0.9	2.0	2.0	2.0

	Exp- $26\beta\alpha$	DFT $61\alpha\alpha$	DFT $61\beta\alpha$	DFT $61\alpha\beta$	DFT $61\beta\beta$	$\Delta_{26\beta\alpha, DFT61\alpha\alpha}$	$\Delta_{26\beta\alpha, DFT61\beta\alpha}$	$\Delta_{26\beta\alpha, DFT61\alpha\beta}$	$\Delta_{26\beta\alpha, DFT61\beta\beta}$
3J (H6-H7)	2.8	4.8	2.7	0.6	2.3	2.0	0.1	2.2	0.5
3J (H7-H8)	2.8	5.6	3.3	6.0	7.1	2.8	0.5	3.2	4.3
2J (C5-H4a)	-7.5	-0.8	-6.2	-1.0	-6.3	6.7	1.3	6.5	1.2
2J (C5-H6)	0.0	-0.6	-0.7	-1.1	-0.6	0.6	0.7	1.1	0.6
3J (C5-H7)	6.8	0.5	4.7	5.6	-0.1	6.4	2.1	1.2	6.9
2J (C6-H7)	-4.0	0.6	-1.4	-3.5	1.8	4.6	2.6	0.5	5.8
2J (C7-H6)	3.4	4.7	4.4	2.7	3.4	1.3	1.0	0.7	0.0
2J (C7-H8)	-1.0	0.1	-0.5	-5.9	-5.0	1.1	0.5	4.9	4.0
3J (C8-H6)	4.2	4.3	3.7	3.5	3.8	0.1	0.5	0.7	0.4
3J (C9-H7)	5.7	5.8	4.2	0.1	0.4	0.0	1.5	5.6	5.3
Σ						25.6	10.8	26.6	29.0
<i>MAD</i>						2.6	1.1	2.7	2.9

	Exp- $26\alpha\beta$	DFT $61\alpha\alpha$	DFT $61\beta\alpha$	DFT $61\alpha\beta$	DFT $61\beta\beta$	$\Delta_{26\alpha\beta, DFT61\alpha\alpha}$	$\Delta_{26\alpha\beta, DFT61\beta\alpha}$	$\Delta_{26\alpha\beta, DFT61\alpha\beta}$	$\Delta_{26\alpha\beta, DFT61\beta\beta}$
3J (H6-H7)	0.0	4.8	2.7	0.0	2.3	4.8	2.7	0.0	2.3
3J (H7-H8)	6.3	5.6	3.3	6.0	7.1	0.7	3.0	0.3	0.8
2J (C5-H4a)	-1.0	-0.8	-6.2	-1.0	-6.3	0.2	5.2	0.0	5.3
2J (C5-H6)	-1.6	-0.6	-0.7	-1.1	-0.6	1.0	0.9	0.5	1.1
3J (C5-H7)	5.8	0.5	4.7	5.6	-0.1	5.4	1.1	0.2	5.9
3J (C5-H19)	5.3	5.3	3.9	5.3	3.9	0.0	1.4	0.0	1.4
2J (C6-H7)	-5.2	0.6	-1.4	-3.5	1.8	5.8	3.8	1.7	7.0
2J (C7-H6)	4.1	4.7	4.4	2.7	3.4	0.6	0.3	1.4	0.7
2J (C7-H8)	-5.9	0.1	-0.5	-5.9	-5.0	6.0	5.4	0.0	0.9
3J (C8-H6)	4.0	4.3	3.7	3.5	3.8	0.3	0.3	0.5	0.2
3J (C9-H7)	0.5	5.8	4.2	0.1	0.4	5.3	3.7	0.4	0.1
3J (C14-H7)	6.5	0.6	1.5	5.3	4.1	5.9	5.0	1.2	2.5
Σ						35.9	32.6	6.2	28.0
<i>MAD</i>						3.0	2.7	0.5	2.3

	Exp- $26\beta\beta$	DFT $61\alpha\alpha$	DFT $61\beta\alpha$	DFT $61\alpha\beta$	DFT $61\beta\beta$	$\Delta_{26\beta\beta, DFT61\alpha\alpha}$	$\Delta_{26\beta\beta, DFT61\beta\alpha}$	$\Delta_{26\beta\beta, DFT61\alpha\beta}$	$\Delta_{26\beta\beta, DFT61\beta\beta}$
3J (H6-H7)	1.5	4.8	2.7	0.6	2.3	3.3	1.2	0.9	0.8
3J (H7-H8)	8.0	5.6	3.3	6.0	7.1	2.4	4.7	2.0	0.9
2J (C5-H4a)	-7.2	-0.8	-6.2	-1.0	-6.3	6.4	1.0	6.2	0.9
2J (C5-H6)	0.0	-0.6	-0.7	-1.1	-0.6	0.6	0.7	1.1	0.6
2J (C6-H7)	-1.5	0.6	-1.4	-3.5	1.8	2.1	0.1	2.0	3.3
3J (C6-H19)	4.0	-0.1	0.0	-0.3	0.4	4.1	4.0	4.3	3.7
2J (C7-H6)	3.1	4.7	4.4	2.7	3.4	1.6	1.3	0.4	0.3
2J (C7-H8)	-5.9	0.1	-0.5	-5.9	-5.0	6.0	5.4	0.0	0.9
3J (C8-H6)	4.6	4.3	3.7	3.5	3.8	0.3	0.9	1.1	0.8
3J (C7-H9)	3.7	2.2	2.7	1.6	3.4	1.5	1.0	2.1	0.3
Σ						28.2	20.3	20.0	12.4
<i>MAD</i>						2.8	2.0	2.0	1.2

5.2. Análisis configuracional basado en la comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C

Los desplazamientos químicos pueden predecirse con la suficiente precisión como para poder discriminar estereoestructuras que hayan sido previamente optimizadas. Estos estudios se han aplicado en la bibliografía incluso en la realización de aproximaciones computacionales de biomoléculas como proteínas ó ácidos nucleicos.¹¹⁹

Para realizar el análisis correctamente es necesario que la determinación de los desplazamientos químicos de ^{13}C y la optimización geométrica se hagan al mismo nivel de cálculo. También se suele realizar un estudio de los δ_{C} correspondientes para cada uno de los conformeros predominantes y expresar el valor obtenido en función del promedio de la distribución de Boltzmann.

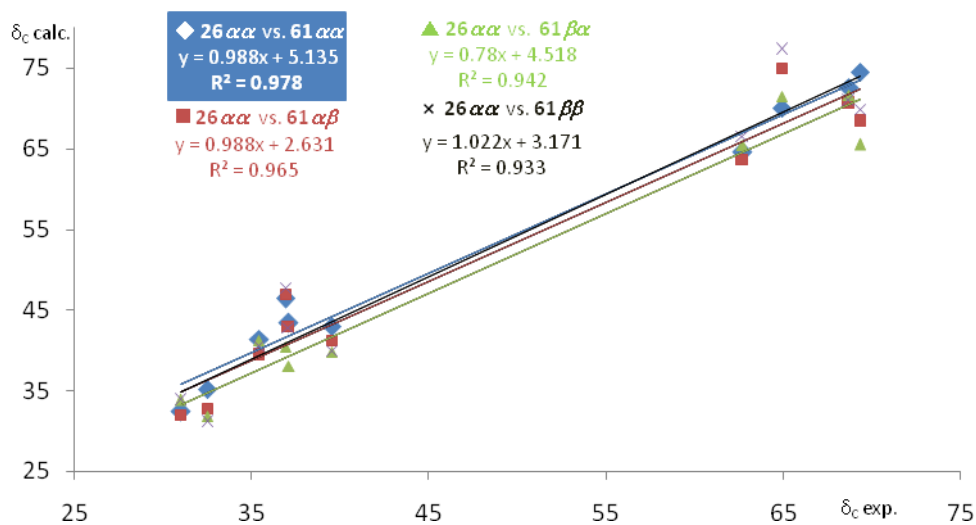
Con estas condiciones en mente se empleó un conjunto de tensores para cada una de las geometrías minimizadas por métodos DFT usando el funcional B3LYP/6-311G(d,p), lo que permitió realizar la comparación de los δ_{C} calculados con los δ_{C} experimentales. Nuevamente, en los cálculos computacionales no se incluyó la cadena lateral de colesterol ya que su flexibilidad incrementa el coste computacional, sin mejorar la exactitud de las medidas alrededor de los anillos A, B, C y D. Por el mismo motivo, en las comparaciones de δ_{C} , se obviaron los anillos C y D ya que los tres centros quirales, objeto de estudio se encuentran en los anillos A y B.

Los estudios comparativos de los δ_{C} se realizaron entre los compuestos **26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** y los modelos **61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$** , centrándose en los anillos A y B del esteroide. En el primer estudio se comparó directamente los carbonos C1-C10 del esqueleto esteroideal (Fig. 17 y 18). En el segundo se examinaron las diferencias de los desplazamientos químicos en las posiciones cercanas a los carbonos oxigenados (Tabla 7).

La comparación directa de δ_{C} experimentales para cada uno de los cuatro diastereoisómeros con los modelos teóricos fue concluyente. Los coeficientes de correlación lineal R^2 , que mostraban la relación entre los valores experimentales y los teóricos, variaban de 0.984 a 0.967. Así, se comparó el compuesto **26 $\alpha\alpha$** con cada uno de los modelos teóricos (**61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$**). Como se esperaba, el valor más alto de R^2 correspondió al modelo **61 $\alpha\alpha$** . Los coeficientes de R^2 más altos para los otros tres diastereoisómeros resultaron de las comparaciones entre las parejas **26 $\beta\alpha$ -61 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$ -61 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$ -61 $\beta\beta$** (Fig. 17 y 18).

¹¹⁹ a) Moro, G.; Bonati, L.; Bruschi, M.; Cosentino, U.; Gioia, L.; Fantucci, P. C.; Pandini, A.; Papaleo, E.; Pitea, D.; Saracino, G. A. A.; Zampella, G. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *117*, 723. b) Carloni, P. *Quan. Struct.-Act. Relat.* **2002**, *21*, 166.

Comparación de δ_c (C1-C10) de **26 $\alpha\alpha$** vs. modelos DFT-B3LYP/6-311G(d,p)



Comparación de δ_c (C1-C10) de **26 $\beta\alpha$** vs. modelos DFT-B3LYP/6-311G(d,p)

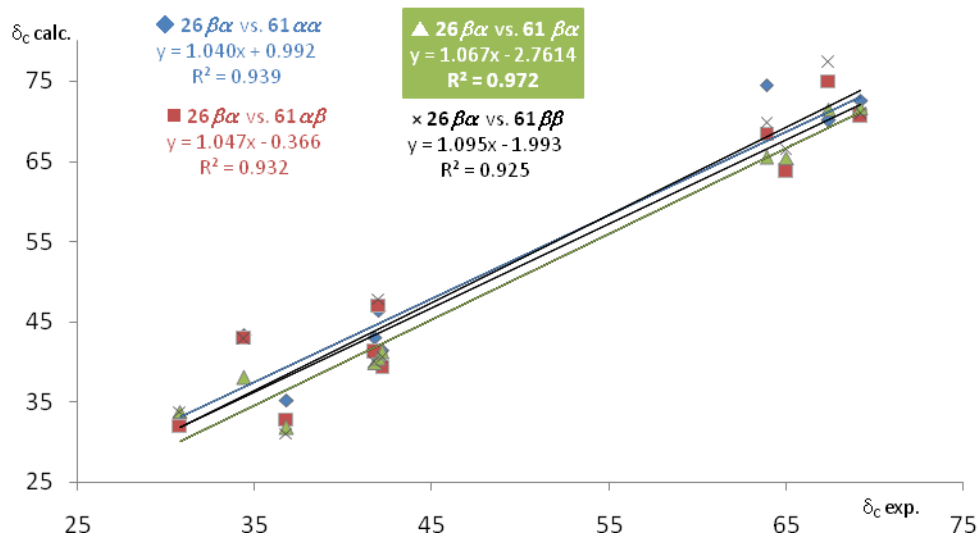
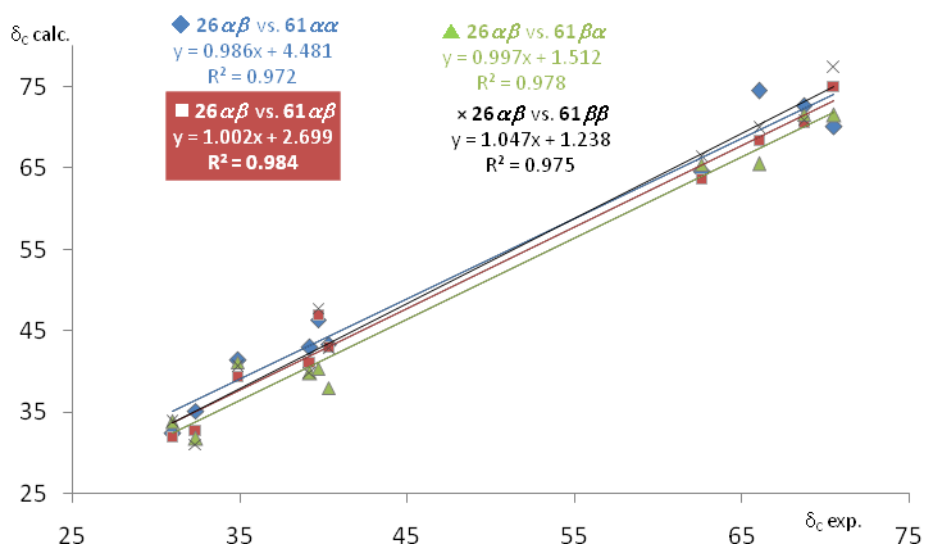


Figura 17. Rectas de regresión donde se comparan los desplazamientos químicos de ^{13}C de los compuestos **26 $\alpha\alpha$** y **26 $\beta\alpha$** con los de los modelos minimizados **61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$** , empleando DFT-B3LYP/6-311G(d,p).

Comparación de δ_c (C1-C10) de **26 $\alpha\beta$** vs modelos DFT-B3LYP/6-311G(d,p)



Comparación de δ_c (C1-C10) de **26 $\beta\beta$** vs. modelos DFT-B3LYP/6311G(d,p)

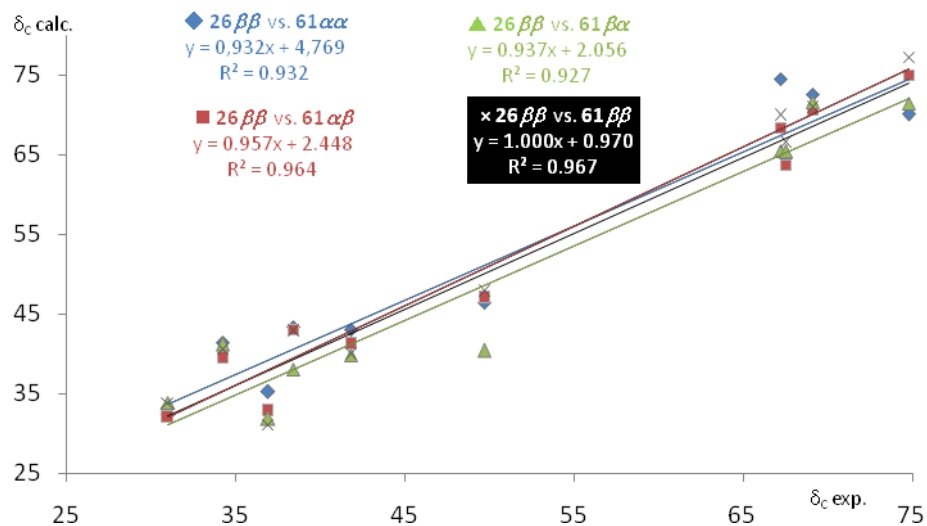


Figura 18. Rectas de regresión donde se comparan los desplazamientos químicos de ^{13}C de los compuestos **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** con los de los modelos minimizados **61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$** , empleando DFT-B3LYP/6-311G(d,p).

En un segundo estudio se tuvieron en cuenta sólo aquellas posiciones que presentaban una posición oxigenada. Esto se realizó con el propósito de eliminar posibles errores acarreados en los cálculos realizados en DFT por lo que se obtuvieron las diferencias entre los desplazamientos químicos de los carbonos oxigenados C3, C5, C6 y C7. Los valores absolutos de las diferencias entre C3-C5, C3-C6, C3-C7, C5-C6, C5-C7 y C6-C7 realizadas para los compuestos sintéticos **26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** ($\Delta^{26\alpha\alpha}$, $\Delta^{26\beta\alpha}$, $\Delta^{26\alpha\beta}$, $\Delta^{26\beta\beta}$), se compararon con las mismas diferencias en valores absolutos de los modelos **61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$** ($\Delta^{61\alpha\alpha}$, $\Delta^{61\beta\alpha}$, $\Delta^{61\alpha\beta}$, $\Delta^{61\beta\beta}$) calculados mediante la teoría de funcionales DFT-B3LYP/6-311G(d,p).

Los resultados mostrados en la Tabla 7 indican la media de las desviaciones estándar en valores absolutos entre las diferencias teóricas y experimentales ($|\Delta^{26} - \Delta^{61}|$) para cada uno de los cuatro diastereoisómeros (6 comparaciones). Estas comparaciones mostraron nuevamente la relación entre las parejas **26 $\alpha\alpha$ -61 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$ -61 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$ -61 $\alpha\beta$** , **26 $\beta\beta$ -61 $\beta\beta$** , confirmándose que la predicción de RMN ^{13}C GIAO de desplazamientos químicos en geometrías DFT es un método válido para realizar el análisis configuracional para este tipo de sistemas.

La modelización en el nivel B3LYP/6311G(d,p) incorporando el efecto del disolvente (cloroformo) mostró resultados idénticos que los realizados en vacío.

Los resultados obtenidos tanto en la comparación de las constantes de acoplamiento como de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C demuestran las importantes aplicaciones de los métodos computacionales correctamente utilizados en la predicción de propiedades magnéticas para la determinación de la configuración relativa de moléculas orgánicas.

Tabla 7. Diferencias de los desplazamientos químicos de los carbonos C-3, C-5, C-6 y C-7 en los compuestos sintéticos (**26**)* y en los modelos (**61**)**

	$26\alpha\alpha^*$	$26\beta\alpha^*$	$26\alpha\beta^*$	$26\beta\beta^*$	$61\alpha\alpha^{**}$	$61\beta\alpha^{**}$	$61\alpha\beta^{**}$	$61\beta\beta^{**}$
C3	68.7	69.2	68.7	69.1	72.6	71.6	70.6	70.9
C5	69.3	63.9	66.0	67.2	74.5	65.5	68.4	69.9
C6	62.7	65.0	62.6	67.5	64.6	65.4	63.7	66.5
C7	64.9	67.4	70.5	74.8	70.1	71.5	75.0	77.3

	$\Delta^{26\alpha\alpha^*}$	$\Delta^{26\beta\alpha^*}$	$\Delta^{26\alpha\beta^*}$	$\Delta^{26\beta\beta^*}$	$\Delta^{61\alpha\alpha^{**}}$	$\Delta^{61\beta\alpha^{**}}$	$\Delta^{61\alpha\beta^{**}}$	$\Delta^{61\beta\beta^{**}}$
C3-C5	-0.6	5.3	2.7	1.9	-1.9	2.2	6.1	1.0
C3-C6	6.0	4.2	6.1	1.6	8.0	6.9	6.2	4.4
C3-C7	3.8	1.8	-1.8	-5.7	2.5	-4.4	0.1	-6.4
C5-C6	6.6	-1.1	3.4	-0.3	9.9	4.7	0.1	3.4
C5-C7	4.4	-3.5	-4.5	-7.6	4.4	-6.6	-6.0	-7.4
C6-C7	-2.2	-2.4	-7.9	-7.3	-5.5	-11.3	-6.1	-10.8

	$\Delta^{26\alpha\alpha^*} - \Delta^{61\alpha\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\beta\alpha^*} - \Delta^{61\beta\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\alpha\beta^*} - \Delta^{61\alpha\beta^{**}}$	$\Delta^{26\beta\beta^*} - \Delta^{61\beta\beta^{**}}$
C3-C5	1.3	6.7	2.8	1.6
C3-C6	2.0	0.2	0.9	1.6
C3-C7	1.3	3.7	8.2	10.2
C5-C6	3.3	6.5	1.9	3.2
C5-C7	0.0	10.4	11.0	11.8
C6-C7	3.3	3.9	9.1	8.6
Σ	11.2	31.4	33.9	37.0
MAD	1.9	5.2	5.6	6.2

	$\Delta^{26\beta\alpha^*} - \Delta^{61\alpha\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\beta\alpha^*} - \Delta^{61\beta\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\beta\alpha^*} - \Delta^{61\alpha\beta^{**}}$	$\Delta^{26\beta\alpha^*} - \Delta^{61\beta\beta^{**}}$
C3-C5	7.2	0.8	3.1	4.3
C3-C6	3.8	2.0	2.7	0.2
C3-C7	0.7	1.7	6.2	8.2
C5-C6	11.0	1.2	5.8	4.5
C5-C7	7.9	2.5	3.1	3.9
C6-C7	3.1	3.7	8.9	8.4
Σ	33.7	11.9	29.8	29.5
MAD	5.6	2.0	5.0	4.9

	$\Delta^{26\alpha\beta^*} - \Delta^{61\alpha\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\alpha\beta^*} - \Delta^{61\beta\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\alpha\beta^*} - \Delta^{61\alpha\beta^{**}}$	$\Delta^{26\alpha\beta^*} - \Delta^{61\beta\beta^{**}}$
C3-C5	4.6	3.4	0.5	1.7
C3-C6	1.9	0.1	0.8	1.7
C3-C7	4.3	1.9	2.6	4.6
C5-C6	6.5	3.3	1.3	0.0
C5-C7	8.9	1.5	2.1	2.9
C6-C7	2.4	1.8	3.4	2.9
Σ	28.6	12.0	10.7	13.8
MAD	4.8	2.0	1.8	2.3

	$\Delta^{26\beta\beta^*} - \Delta^{61\alpha\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\beta\beta^*} - \Delta^{61\beta\alpha^{**}}$	$\Delta^{26\beta\beta^*} - \Delta^{61\alpha\beta^{**}}$	$\Delta^{26\beta\beta^*} - \Delta^{61\beta\beta^{**}}$
C3-C5	3.8	0.3	4.2	0.9
C3-C6	6.4	5.3	4.6	2.8
C3-C7	8.2	1.3	5.8	0.7
C5-C6	10.2	5.0	0.4	3.7
C5-C7	12.0	1.0	1.6	0.2
C6-C7	1.8	4.0	1.2	3.5
Σ	42.4	16.9	17.8	11.8
MAD	7.1	2.8	3.0	2.0

* Desplazamientos químicos de carbono 13 experimentales.

** Desplazamientos químicos calculados en DFT 6-311G(d,p).

MAD (Desviación de Valor Absoluto) = $\Sigma / 6$

Aplicación de la metodología DFT-RMN sobre el 1 α ,3 β -dihidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano **62**

Con el propósito de confirmar que el método basado en la comparación de los desplazamientos químicos de ^{13}C es adecuado para determinar la configuración relativa en los 5,6-epoxiesteroideos se realizó un estudio adicional sobre un 5,6-epoxicolestano que presentaba en su estructura un grupo hidroxilo en la posición C-1 y C-3 (compuesto **62**).

En este estudio se siguió la metodología descrita anteriormente. Primero se obtuvo **62** realizando una hidrólisis básica con KOH:MeOH al 5% sobre el epóxido **9 α** . A continuación, se realizó la asignación de los carbonos C-1/C-10 de **62** utilizando técnicas mono y bidimensionales de RMN (Tabla 8). Seguidamente se realizó la modelización de los cuatro posibles 1,3 β -dihidroxi-5,6-epoxiandrostanos (**62 $\alpha\alpha$** , **62 $\beta\alpha$** , **62 $\alpha\beta$** y **62 $\beta\beta$**) (Fig. 19), calculando los δ_{C} correspondientes para cada uno de los conformeros predominantes. La optimización y minimización de las geometrías se realizó utilizando DFT usando el funcional B3LYP/6-311G(d) y el cálculo de desplazamientos con el mismo funcional pero con un conjunto base 6-311G(d,p). Por último, se llevó a cabo la comparación de los δ_{C} calculados con los δ_{C} experimentales. Como se explicó anteriormente en los cálculos computacionales no se incluyó la cadena lateral de colesterol ya que su flexibilidad dificultaba los mismos sin mejorar la exactitud de las medidas.

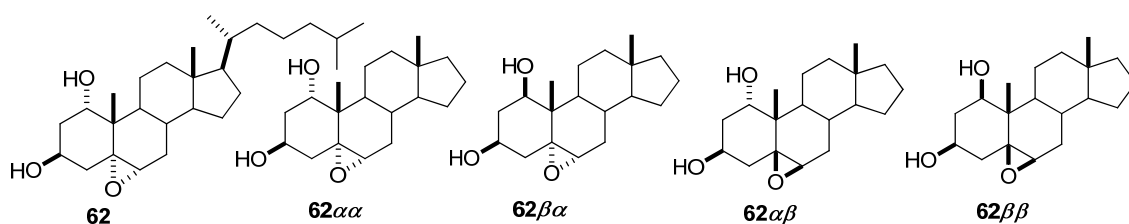


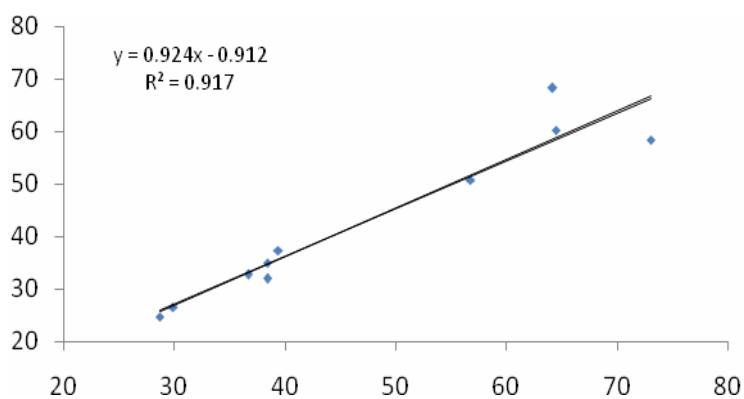
Figura 19. El 1 α ,3 β -dihidroxi-5,6-epoxicolestano (**62**) y los modelos de 1,3 β -dihidroxi-5,6-epoxiandrostanos (**62 $\alpha\alpha$** , **62 $\beta\alpha$** , **62 $\alpha\beta$** y **62 $\beta\beta$**) utilizados para los estudios computacionales.

La comparación directa de δ_{C} experimentales de **62** con los cuatro posibles modelos teóricos **62 $\alpha\alpha$** , **62 $\beta\alpha$** , **62 $\alpha\beta$** y **62 $\beta\beta$** mostró que la pareja **62-62 $\alpha\alpha$** , era la que presentaba un coeficiente de correlación lineal R^2 más alto (Fig. 20 y 21). De esta manera se puede concluir que este estudio es adecuado para la determinación de la configuración relativa para este tipo de estructuras.

Tabla 8. Datos de RMN ^{13}C (δ_{C}) a 125 MHz en CDCl_3 para **62** y desplazamientos químicos calculados mediante DFT-RMN para **62 $\alpha\alpha$** , **62 $\beta\alpha$** , **62 $\alpha\beta$** y **62 $\beta\beta$**

Carbono	mult	62	62 $\alpha\alpha$	62 $\beta\alpha$	62 $\alpha\beta$	62 $\beta\beta$
1	CH	64.2	68.2	79.4	73.4	68.8
2	CH ₂	35.6	34.9	41.6	34.6	36.5
3	CH	73.1	58.4	70.5	58.9	60.1
4	CH ₂	38.4	31.9	47.6	38.1	37.3
5	C	64.5	60.1	66.2	55.4	59.4
6	CH	56.8	50.7	68.7	55.6	52.0
7	CH ₂	28.7	24.7	36.8	27.1	25.9
8	CH	29.9	26.5	35.4	26.7	28.1
9	CH	36.7	32.7	46.1	47.7	39.9
10	C	39.4	37.2	47.4	39.1	39.1

Comparación de δ_{C} (C1-C10) de **62** vs **62 $\alpha\alpha$** modelo DFT-B3LYP/6-311G(d,p)



Comparación de δ_{C} (C1-C10) de **62** vs **62 $\beta\alpha$** modelo DFT-B3LYP/6-311G(d,p)

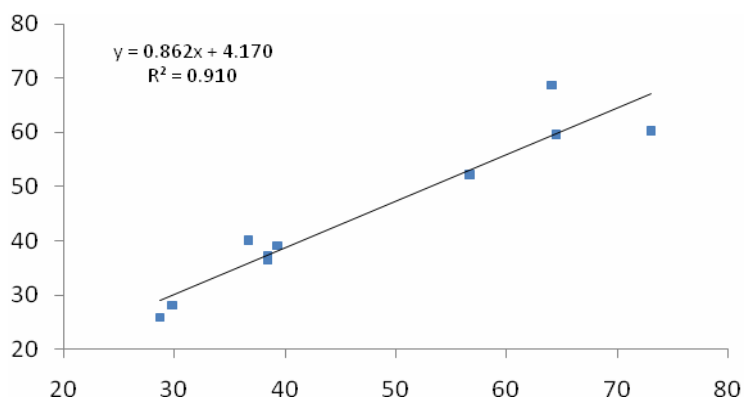
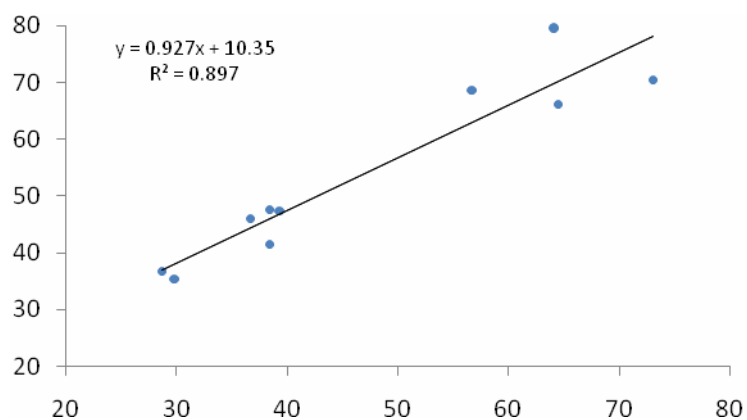


Figura 20. Rectas de regresión donde se comparan los desplazamientos químicos de ^{13}C del compuesto **62** con los de los modelos minimizados **62 $\alpha\alpha$** y **62 $\beta\alpha$** empleando DFT-B3LYP/6-311G(d,p).

Comparación de δ_C (C1-C10) de **62** vs **62 $\alpha\beta$** modelo DFT-B3LYP/6-311G(d,p)



Comparación de δ_C (C1-C10) de **62** vs **62 $\beta\beta$** modelo DFT-B3LYP/6-311G(d,p)

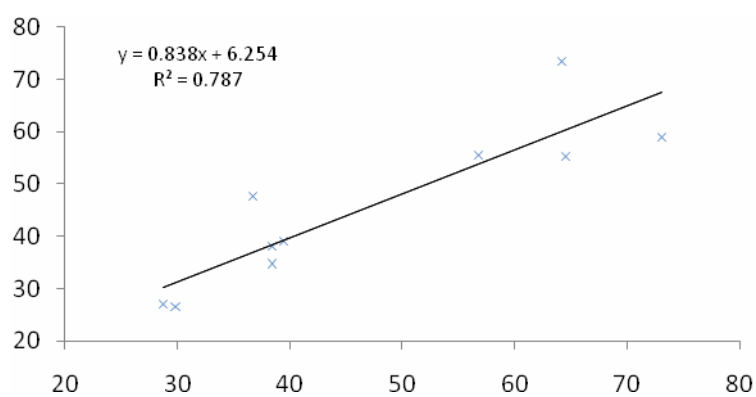


Figura 21. Rectas de regresión donde se comparan los desplazamientos químicos de ^{13}C del compuesto **62** con los de los modelos minimizados **62 $\alpha\beta$** y **62 $\beta\beta$** empleando DFT-B3LYP/6-311G(d,p).

6. Evaluación citotóxica de los 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos

Los análisis farmacológicos de citotoxicidad (GI₅₀ μ M) de los 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos, fueron realizados en PharmaMar, frente a un panel de tres células tumorales: MDA-MB-231, A-549 y HT-29. Como se puede observar en la Tabla 9 los cuatro diásteroisómeros resultaron ser activos frente a las tres líneas celulares tumorales

Los resultados muestran claramente que la presencia de un grupo epóxido entre las posiciones C-5/C-6 y un grupo hidroxilo en C-3 y C-7 induce actividad citotóxica en el esqueleto de colestano.

También se puede observar que el par de 5,6-epoxicolestanos, con el grupo hidroxilo en C-7 con disposición β resultaron ser más activos que los que presentan esta misma funcionalidad con disposición α , siendo el compuesto **26 $\beta\beta$** el más activo con valores de GI₅₀ entre 0.9 - 2.1 μ M.

Tabla 9. Actividad citotóxica (GI₅₀ en μ M) de los cuatro 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos.

Compuesto	MDA-MB-231	A-549	HT-29
26$\alpha\alpha$	19.1	18.6	11.9
26$\beta\alpha$	20.1	20.3	11.5
26$\alpha\beta$	5.9	5.5	4.8
26$\beta\beta$	2.1	1.2	0.9

7. Conclusiones

- Con el fin de estudiar la influencia en la actividad citotóxica que ejerce la presencia de un grupo epóxido entre las posiciones C-5/C-6 y un hidroxilo en C-3 y C-7 en un esqueleto de colestano se sintetizaron los cuatro posibles 3 β ,7-dihidroxi-5,6-epoxicolestanos (**26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$**).
- La evaluación de la actividad citotóxica frente a un panel de tres células tumorales de los compuestos seleccionados confirma la importancia de la presencia de un grupo epóxido en la posición C-5/C-6 y de un hidroxilo en C-3 y C-7, para que este tipo de estructuras muestren citotoxicidad.
- Los compuestos **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** con un grupo hidroxilo en C-7 con disposición β poseen una actividad citotóxica mayor que compuestos **26 $\alpha\alpha$** y **26 $\beta\alpha$** con un hidroxilo en C-7 con disposición α , siendo el **26 $\beta\beta$** el más activo de todos.
- Se realizó la asignación completa de RMN de ^1H y ^{13}C para **26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** , utilizando técnicas de mono y bidimensionales y de lectura de constantes de acoplamiento homo y heteronucleares.
- El análisis conformacional, la optimización y minimización de los modelos **61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$** , el cálculo de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento mediante una metodología DFT-RMN permitió reproducir los mismos valores de los cuatro diastereoisómeros.
- La asignación correcta de la configuración relativa se confirmó para cada uno de los cuatro diastereoisómeros **26 $\alpha\alpha$** , **26 $\beta\alpha$** , **26 $\alpha\beta$** y **26 $\beta\beta$** , comparando los valores experimentales de constantes de acoplamiento y desplazamiento químico de ^{13}C con los valores teóricos de los modelos **61 $\alpha\alpha$** , **61 $\beta\alpha$** , **61 $\alpha\beta$** y **61 $\beta\beta$** . En todos los casos, la estereoquímica relativa en los tres centros quirales C-5, C-6 y C-7 de los compuestos sintetizados coincidió con su homólogo modelo teórico, que presentó una menor desviación media (MAD) ó un mejor valor de correlación R^2 .
- La utilización de esta metodología basada en la comparación de las constantes de acoplamiento y desplazamiento químicos de ^{13}C es la mejor herramienta para la identificación de la estereoquímica relativa en sistemas esteroidales con un grupo epóxido entre las posiciones C-5/C-6.

3

Síntesis de nuevos
tioésteres
esteroidales
naturales y análogos

1. Antecedentes

1.1. Paratioésteres esteroidales de origen natural

Como ya se expuso en la introducción, los cnidarios son una de las fuentes más ricas y variadas de nuevos metabolitos secundarios. Su principal interés radica en las actividades farmacológicas que han mostrado muchos de ellos. Hasta el momento se conocen más de 1.300 compuestos aislados de corales blandos durante los últimos 30 años.¹⁶

Los únicos estudios previos que se han publicado sobre especies del género *Paragorgia*, describen varios xeniolidos de los extractos de *Paragorgia arborea*.¹²⁰

La empresa PharmaMar aisló del coral blando *Paragorgia* sp. recolectado en Madagascar, tres nuevos tioésteres esteroidales a los que se han denominado paratioesteroides A-C (**63-65**) (Fig 22). Estos compuestos presentan diferentes grados de oxidación en el anillo A y la particularidad de la presencia en su cadena lateral de los grupos tioéster y acetoamida, elementos estructurales novedosos sin precedentes en ningún otro producto natural de origen marino descrito hasta la fecha.

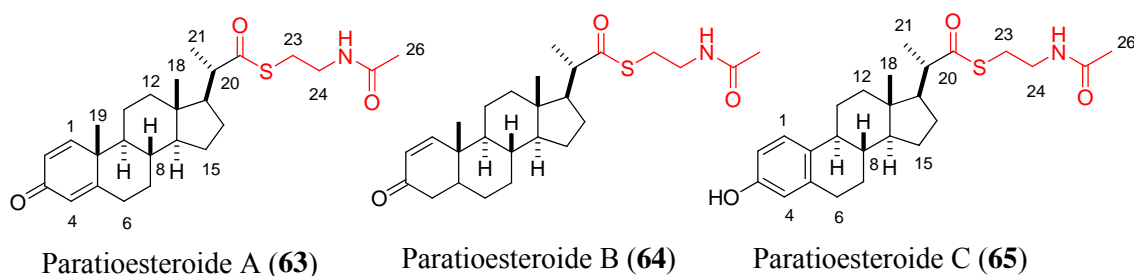


Figura 22. Paratioesteroides naturales A-C aislados por PharmaMar del coral blando *Paragorgia* sp.

La elucidación estructural de los tres tioésteres esteroidales naturales fue realizada por PharmaMar utilizando principalmente técnicas de 1D-RMN: ¹H, ¹³C y DEPT y de experimentos 2D-RMN: ¹H-¹H COSY, HSQC editado y HMBC (Tablas 12 y 13), conjuntamente con espectrometría de masas FAB e infrarrojo (IR).

Los diferentes grados de oxidación en el anillo A de cada uno de los tres nuevos tioésteres esteroidales han sido encontrados en otros esteroides ya descritos anteriormente en la bibliografía. Así, el anillo A de los paratioesteroides A y B (**63** y **64**) también se encuentran en esteroides aislados de los corales blandos *Dendronephthya gigantea* y *Lemnalia cercorvi*,¹²¹ *Eleutherobia* sp.,¹²² y del octocoral *Anthomastus bathyproctus*,¹²³ mientras que el anillo aromático del paratioesteroide C (**65**) se encuentra presente en geodisterol, un esteroide polioxigenado aislado de la esponja

¹²⁰ a) Stonik, V. A.; Makareva, T. N.; Dmitrenok, A. S. *Khim. Prir. Soedin.* **1990**, 125. b) D'Ambrosio, M.; Guerriero, A.; Pietra, F. *Z. Naturforsch.* **1984**, 39, 1180.

¹²¹ Duh, C. Y.; El-Gamal, A. H.; Song, P. Y.; Dai, C. F. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1650.

¹²² Lievens, S. C.; Hope, H.; Molinski, T. F. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 2130.

¹²³ Mellado, G. G.; Zubía, E.; Ortega, M. J.; López-González, P. J. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1111.

tropical marina del género *Geodia*¹²⁴ y en dos derivados de 19-norpregnanos obtenidos de muestras de corales blandos del género *Capnella*.¹²⁵

Por otra parte, el grupo cisteamina presente en los paratioesteroides se encuentra también en compuestos descritos que están implicados en una enorme variedad de procesos biológicos. Algunos ejemplos son los derivados de la *N*-acil-1,3-tiazolidina que actúan como agentes antitusivos en estudios relacionados con la bronquitis o el asma,¹²⁶ ó la *N*-(*N*-acetil-*L*-cisteinil)-*S*-acetilcisteamina que actúa como un potente oxidante e inhibidor del VIH.¹²⁷ También forman parte de los intermedios clave¹²⁸ en la preparación de antibióticos como la novobiocina, la clorobiocina, la coumermicina A₁ y la simociclinona todas ellas con un esqueleto de cumarina,¹²⁹ un potente inhibidor del ADN girasa bacterial (Fig 23).¹³⁰

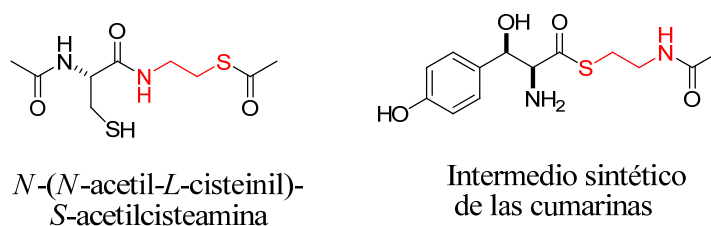


Figura 23. Compuestos con un grupo cisteamina.

Biogenéticamente la cadena lateral de los paratioesteroides podrían originarse mediante una ruta degradativa a través de la activación con CoA y oxidaciones en β . Esta ruta metabólica ha sido propuesta en algunas especies de bacterias en las que la eliminación de la cadena lateral del esteroide tiene lugar mediante un proceso consecutivo de oxidaciones en β en la que se originan progresivamente ácidos carboxílicos más cortos. Recientemente una investigación bioquímica y genética sobre un proceso de degradación aeróbica del ácido cólico en una especie de *Pseudomonas* sp.¹³¹ propuso un mecanismo que comprendía diferentes procesos de oxidación del anillo A, activación con la CoA y oxidaciones en β de la cadena lateral acíclica (Fig. 24). En dicho estudio se logró aislar e identificar por RMN el 7 α ,12 α -dihidroxi-3-oxopregna-1,4-dien-20-carboxilato (DHOPDC) como uno de los intermedios. Aunque el intermedio de la activación del DHOPDC con la CoA fue detectado por LC-MS/MS no pudo ser aislado. La semejanza entre la cadena lateral de los compuestos aislados **63-65** y la del DHOPDC-CoA (Fig. 25) nos hace pensar que podrían ser intermedios de este proceso de degradación de la cadena lateral esteroideal, en cuyo caso serían los

¹²⁴ Sheng, G.-Y.-S.; Crews, P. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8145.

¹²⁵ Blackman, A. J.; Heaton, A.; Skelton, B. W.; White, A. H. *Aust. J. Chem.* **1985**, 38, 565.

¹²⁶ Gandolfi, C. A.; Di Domenico, R.; Spinelli, S.; Gallico, L.; Fiocchi, L.; Lotto, A.; Menta, E.; Borghi, A.; Dalla Rosa, C.; Tognella, S. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 508.

¹²⁷ Oiry, J.; Mialocq, P.; Puy, J.-Y.; Fretier, P.; Dereuddre-Bosquet, N.; Dormont, D.; Imbach, J.-L.; Clayette, P. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 1789.

¹²⁸ a) Carroll, B. J.; Moss, S. J.; Bai, L.; Floss, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 4176. b) Higashide, E.; Asai, M.; Ootsu, K.; Tanida, S.; Kozai, Y.; Hasegawa, T.; Kishi, T.; Sugino, Y.; Yoneda, M. *Nature* **1977**, 270, 721.

¹²⁹ Tao, J.; Hu, S.; Pacholec, M.; Walsh, C. T. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3233.

¹³⁰ a) Maxwell, A. *Trends Microbiol.* **1997**, 5, 102. b) Calia, H.; Hoerman, L.; Schultz, P.; Lebeau, L.; Mallouh, V.; Wigley, D. B.; Wang, J. C.; Mioskowski, C.; Oudet, P. *J. Mol. Biol.* **1994**, 236, 618.

¹³¹ Birkenmaier, A.; Holert, J.; Henrike E.; M. Moeller, H.; Friemel, A.; Schoenenberger, R.; Suter, M. J.-F.; Klebensberger, J.; Philipp, B. *J. Bacteriol.* **2007**, 189, 7165.

primeros ejemplos de esteroides naturales que contienen un fragmento del tioéster esteroide-CoA.

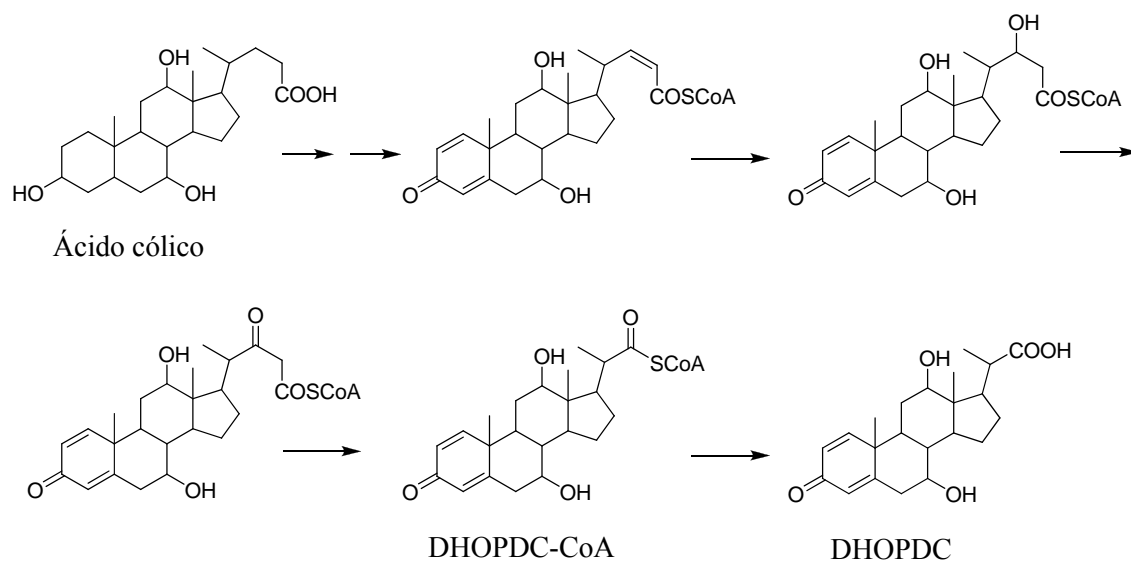


Figura 24. Ruta metabólica de degradación del ácido cólico en *Pseudomonas* sp.

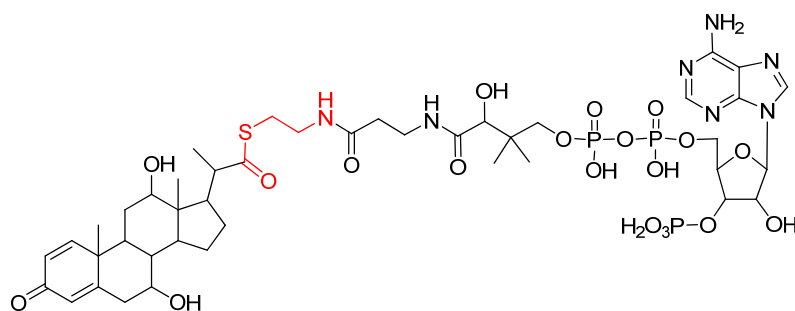


Figura 25. Estructura del DHOPDC-CoA.

El interés de PharmaMar por los nuevos compuestos aislados **63-65** surgió de la actividad citotóxica que presentaron frente a un panel de varias células tumorales.

1.2. Antecedentes sintéticos de tiaesteroides

Los cambios en las actividades farmacológicas que provoca la introducción de un heteroátomo en el esqueleto esteroideal ha sido estudiado por diferentes grupos de investigación. Algunos de estos “esteroides modificados” presentan actividades como antivirales,¹³² antitúxicos,¹³³ analgésicos ó inhibidores del virus VIH.¹³⁴

En la bibliografía aparecen numerosos ejemplos sintéticos que muestran la influencia que ejerce la sustitución de un átomo de carbono por un azufre en diferentes posiciones del esqueleto esteroideal,¹³⁵ como la 4-oxa-androst-1-en-3-ona,¹³⁶ sintetizada por Bakshi y col., la 3 β -acetoxi-17 α -tia-*D*-homo-1,3,5(10)-estratrien-17-ona¹³⁷ sintetizada por Siddiqui y col. y finalmente la serie de 15-tiaestronas y 15-tiaandrostranos descritas por Tolstikov y col.¹³⁸ (Fig 26).

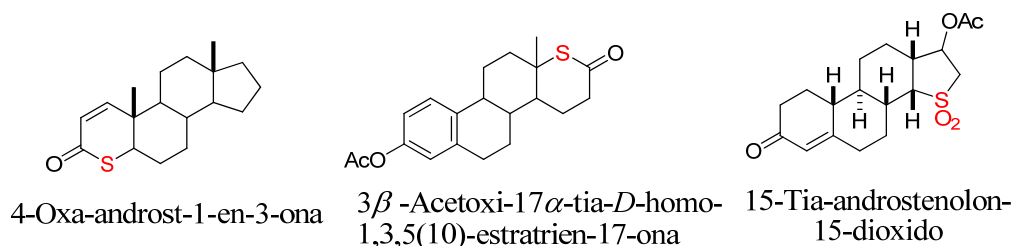


Figura 26. Ejemplos de tiaesteroides sintetizados.

¹³² Chorvat, R. J.; Pappo, R. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 2864.

¹³³ Gandolfi, C. A.; Domenisco, R.; Spinelli, S.; Lotto, A.; Tognella, S. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 508.

¹³⁴ a) Oiry, J.; Mialocq, P.; Puy, J. Y.; Fretier, P.; Imbach, J. L.; Clayette, P. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1789. b) Ehmann, D. E.; Trauger, J. W.; Stachelhaus, T.; Walsh, C. T. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 765.

¹³⁵ Ouali, M. I.; Santelli, M. *Steroids* **2006**, *71*, 1025.

¹³⁶ Bakshi, R. K.; Patel, G. F.; Rasmusson, G. H; Tolman, R. L. USXXAM US 5, 777, 134; 1998:23 pp.

¹³⁷ Siddiqui, A. U.; Satyanarayana, Y.; Ahmed, I.; Siddiqui, A. H. *Steroids* **1996**, *61*, 302.

¹³⁸ Tolstikov, G. A.; Schults, E. E.; Struchkov, Y. T.; Yufit, D. S.; Lindeman, S. V. *Zhurnal Organicheskoi Khimii* **1986**, *22*, 121.

2. Objetivos

Teniendo en cuenta estos antecedentes y fruto de la colaboración entre PharmaMar y nuestro grupo de investigación se planteó como objetivo de este capítulo la síntesis de los tres nuevos tioésteres esteroidales (**63**, **64** y **65**) con el fin de confirmar sus estructuras y determinar sus configuraciones absolutas.

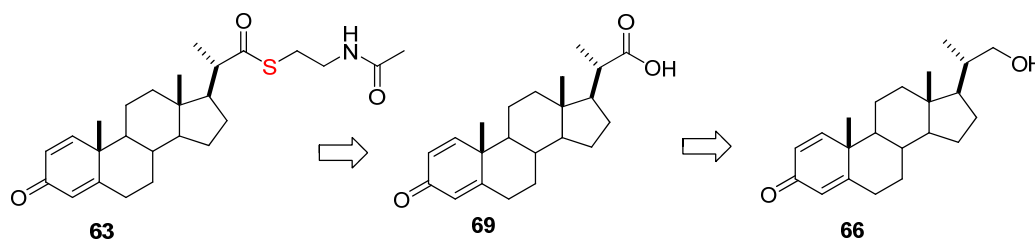
Además se propone la preparación de diversos análogos para realizar un estudio de las relaciones estructura-actividad. Los puntos a analizar en este estudio serán:

- Determinar la influencia que ejerce la presencia de la nueva cadena lateral en este tipo de estructuras.
- Cuantificar la variación de la citotoxicidad cuando se sustituye el átomo de azufre por un oxígeno ó un nitrógeno.
- Valorar el incremento o disminución de la citotoxicidad según el grado de oxidación que presente el anillo A.

3. Síntesis de los nuevos paratioesteroides naturales y de sus análogos

3.1. Síntesis del paratioesteroide A y análogos

En el análisis retrosintético diseñado para el compuesto **63** (esquema 27), se planteó realizar el acoplamiento de la *N*-acetilcisteamina sobre el ácido **69**, que se obtendría a partir de la oxidación del alcohol comercial 20*S*-hidroximetilpregnan-1,4-dien-3-ona (**66**).

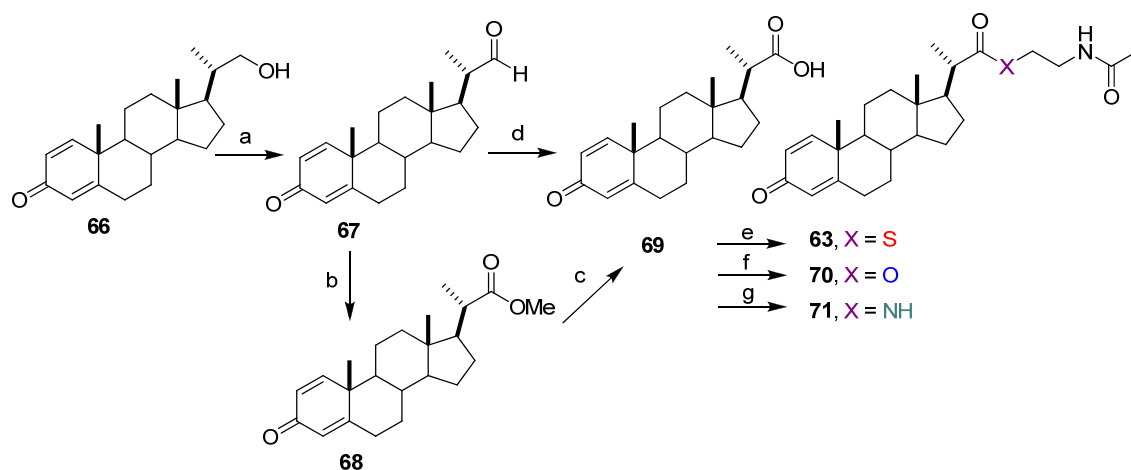


Esquema 27. Análisis retrosintético del paratioesteroide A (**63**).

La ruta sintética del paratioesteroide A (**63**) (esquema 28) comenzó con la oxidación de la posición C-22 de **66** con el fin de obtener el ácido **69**. Sin embargo, el tratamiento de **66** con una serie de oxidantes, PDC en DMF (99%), PCC en DMF (78%), el reactivo de Dess-Martin en CH₂Cl₂ (56%), el reactivo de Jones en Ac₂O (47%), CrO₃ en THF (34%)¹³⁹ condujeron al aldehído **67**. Sólo en el caso de la oxidación con PDC en DMF, dejando la reacción 3 días con un exceso de equivalentes de oxidante, se logró obtener el ácido **69** directamente a partir del alcohol de partida **66** con un bajo rendimiento. Esto es debido al gran impedimento estérico presente en la posición C-22.¹⁴⁰ La obtención del aldehído **67** se confirmó por RMN de ¹H al observarse la aparición de un doblete ($J = 3.0$ Hz) a 9.55 ppm correspondiente al protón H-22, y por RMN de ¹³C al observarse la aparición de un carbono terciario a 204.3 ppm que se asignó a la posición C-22.

¹³⁹ a) Tojo, G.; Fernández, M. Oxidation of Alcohols to Aldehydes and Ketones “A Guide to Current Common Practice” Ed. Springer Science and Business Media, New York: 2006. b) Anthonchick, A. P.; Schneides, B.; Zhabinskii, V. N.; Khripach, V. A. *Steroids* **2004**, *69*, 617. c) Gacem, B.; Jenner, G. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1391. d) Gavagnin, M.; Ungur, N.; Mollo, E.; Templado, J.; Cimino, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 1500. e) Dansu, L.; Spencer, T. *Steroids* **2000**, *65*, 529. f) Bhattarai, K. M.; Davis, A. P.; Perry, J. J.; Walter, C. J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8463. g) Burke, S.; Danheiser, R. L. Handbook of Reagents for Organic Synthesis-Oxidizing and Reducing Agents, Ed. John Wiley & Sons, New York: 1996. h) Prencipe, T.; Curci, R. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 2182. i) Rasmusson, G. H.; Reynolds, G. F.; Brooks, J. R.; Berman, C. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2298. j) Counsell, R. E.; Klimstra, P. D.; Colten, F. B. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 248.

¹⁴⁰ a) Duvold, T.; Jorgensen, A.; Andersen, N. R.; Nenriksen, A. S. Sorensen, M. D.; Björkling, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 3569. b) Duvold, T.; Sorensen, M. D.; Björkling, F.; Henriksen, A. S.; Andersen, N. R. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3125.



Esquema 28. *Reactivos y condiciones:* (a) PDC, DMF (99%); (b) NIS, K₂CO₃, MeOH (81%); (c) Ba(OH)₂, THF:H₂O, 45°C (80%) ó LiOH, THF:H₂O, 45°C (20%); (d) TEMPO, NaClO₂, NaClO, CH₃CN (pH=6.5) (75%); (e) *N*-metilimidazol, TsCl, CH₃CN, *N*-acetilcisteamina, Δ (65%); (f) *N*-metilimidazol, TsCl, CH₃CN, *N*-acetiletanolamina, Δ (55%); (g) *N*-metilimidazol, TsCl, CH₃CN, *N*-(2-aminoetil)acetamida, Δ (35%).

El tratamiento del aldehído **67** con la serie de oxidantes descrita anteriormente tampoco rindió el ácido **69**. Se propuso utilizar como ruta alternativa la obtención del éster metílico **68** a partir del aldehído **67**, para posteriormente hidrolizarlo y obtener de esta forma el ácido **69**. Así, la reacción de **67** con *N*-iodosuccinimida en MeOH dio lugar al éster metílico **68**, con un 81% de rendimiento.¹⁴¹

La formación del éster metílico se confirmó por RMN de ¹H al aparecer un singulete a 3.63 ppm de la señal de grupo metoxi y la desaparición del doblete ($J = 3.0$ Hz) a 9.55 ppm correspondiente al aldehído. La hidrólisis básica¹⁴² de **68**, empleando Ba(OH)₂ ó LiOH, dio el ácido esperado **69**, con un 80% y 20% de rendimiento respectivamente. La obtención de **69** se confirmó por RMN de ¹H al observarse el desplazamiento a más frecuencia (de 1.17 ppm a 1.24 ppm) del doblete correspondiente al metilo C-21. En el RMN de ¹³C se observó la aparición de un carbono cuaternario a 181.7 ppm que indicó claramente la presencia de un grupo ácido en la posición C-22.

En un último estudio de oxidación realizado sobre el aldehído **67** se logró transformar éste en el ácido **69** en un solo paso utilizando TEMPO a pH=6.5, con un rendimiento del 75%.¹⁴³

Finalmente se obtuvo el tioesteroide **63** con un buen rendimiento por tratamiento del ácido **69** y *N*-acetilcisteamina (NAC) empleando *N*-metilimidazol y cloruro de tosilo siguiendo la metodología desarrollada por Tanabe.¹⁴⁴ Los datos de RMN de **63** (Tablas 12 y 13) coincidieron con los obtenidos para el producto natural. Además, su rotación óptica específica permitió determinar su configuración absoluta

¹⁴¹ a) Meijere, A.; Bagutski, V.; Zeuner, F.; Fisher, U. K.; Rheinberger, V.; Moszner, N. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 3699. b) Taber, D. F.; Xu, M.; Harnett, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13121. c) Mc Donald, C.; Holcomb, H.; Kennedy, K.; Leathers, T.; Venemon, P. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 1213.

¹⁴² a) Schward, J. B.; Gibbons, S. E.; Taylor, C. P.; Wustrow, D. J. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 3026. b) Kraus, G. A.; Choudhury, P. K. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2193.

¹⁴³ Zhao, M. M.; Li, J.; Mano, E.; Song, Z. J.; Tschaeen, D. M. *Org. Synth.* **2005**, *81*, 195.

¹⁴⁴ Wakasugi, K.; Iida, A.; Misaki, T.; Nishii, Y.; Tanabe, Y. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1209.

(8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*,20*S*) y la espectrometría de masas de alta resolución confirmó la obtención de **63**. (+)-HRESIMS: m/z 444.2550 $[M + H]^+$ (calcd. para C₂₆H₃₈NO₃S, 444.2566), m/z 466.2373 $[M + Na]^+$ (calcd. para C₂₆H₃₇NO₃SNa, 466.2386).

El empleo de otros agentes acoplantes como el DCC,¹⁴⁵ el EDC,¹⁴⁶ (PhO)₂P(O)(N₃),¹⁴⁷ cloroformiato de etilo,¹⁴⁸ cloruro de oxalilo¹⁴⁹ y cloruro de tionilo¹⁵⁰ resultaron ser infructuosos. De nuevo el problema de la reacción de acoplamiento fue el impedimento estérico del ácido.¹⁵¹

Después de tres etapas sintéticas, **63** se obtuvo en un 44% de rendimiento global a partir del alcohol comercial **66**.

Con el fin de estudiar la influencia de los heteroátomos en la cadena lateral se realizó la síntesis de dos análogos de **66**, sustituyendo el átomo de azufre de la cadena lateral por un átomo de oxígeno (**70**) ó de nitrógeno (**71**). Se empleó como producto de partida el ácido **69** y la *N*-acetiletanolamina en la síntesis de **70**, que se obtuvo en un 55% de rendimiento, y la *N*-(2-aminoetil)acetamida en la síntesis de **71**, con un 35% de rendimiento, empleando las mismas condiciones de reacción que las utilizadas en la preparación de **63**.

La obtención de **70** se confirmó en RMN de ¹H al observarse la aparición de un multiplete a δ_H 3.51 correspondiente a los dos protones H-24; el multiplete a δ_H 4.16 correspondientes a los dos protones H-23 y el singulete a δ_H 1.99 que se asignó a los tres protones H-26. En el RMN de ¹³C se observó la aparición de dos carbonos cuaternarios a 176.4 ppm y 169.7 ppm que confirmaron la presencia de un éster y una amida en las posiciones C-22 y C-25, respectivamente.

La obtención de **71** se confirmó en RMN de ¹H al observarse la aparición del multiplete a δ_H 3.37, que se asignó a los cuatro protones de H-23 y H-24, y el singulete a δ_H 1.97 correspondiente a los tres protones H-26. En el RMN de ¹³C se observó también la aparición de dos carbonos cuaternarios a 177.8 ppm y 171.4 ppm correspondientes a dos carbonilos de amidas en las posiciones C-22 y C-25 respectivamente.

¹⁴⁵ a) Lee, S. H.; Qi, X. Lee, Y. S. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2777. b) Iimura, S.; Manabe, K.; Kobayashi, S. *Chem. Comm.* **2002**, 94. c) Oiry, J.; Pue, J. Y.; Imbach, J. L.; Fatome, M.; Lion, C. C. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 2217.

¹⁴⁶ a) Aldrich, C. C.; Lakshmanan, V.; Sherman, D. H.; Fecik, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8910. b) Sulikowski, G. A.; Agnelli, F.; Koomen, J. M.; Russel, D. H. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1447. c) Brobst, S. W.; Townsend, C. A. *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 200.

¹⁴⁷ a) Cheung, K. M.; Coles, S. J.; Hursthouse, M. B.; Jonson, N. I.; Schooling, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1198. b) Hirschmann, R.; Yager, K. M.; Taylor, C. M.; Moore, W.; Smith, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8177. c) Block, M. H.; Cane, D. E. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4923. d) Ane, D. E.; Yang, C. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1255. e) Schwab, J. M.; Habib, A.; Klassen, J. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5304.

¹⁴⁸ Mitsukura, K.; Yoshida, T.; Nagasawa, T. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1615.

¹⁴⁹ a) Sinkai, H.; Maeda, K.; Yamasaki, T.; Okamoto, H.; Uchida, I. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3566. b) Senokuchi, K.; Nakai, H.; Nagao, Y.; Sakai, Y.; Katsube, N.; Kawamura, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 441. c) Wissner, A.; Grudzinskas, C. V. C. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3972.

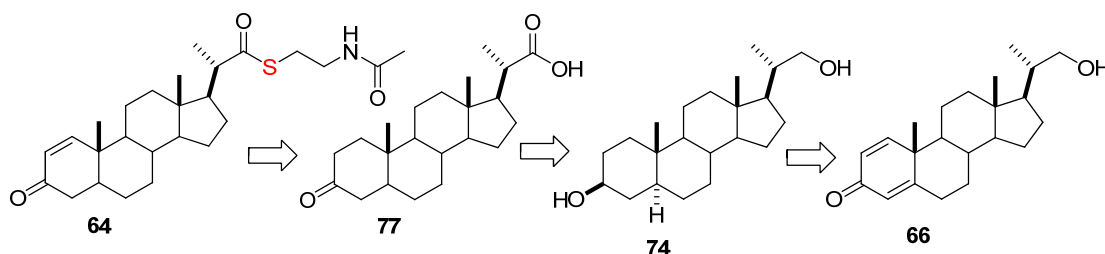
¹⁵⁰ a) Zhang, L.-H.; Chung, J. C.; Costello, T. D.; Valvis, I.; Ward, R. C. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 2466.

b) Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Tien, J.-H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3732.

¹⁵¹ Woo, J. C. S.; Fenster, E.; Dake, G. R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8984.

3.2. Síntesis del paratioesteroide B y análogos

En el análisis retrosintético diseñado para la preparación de **64** (esquema 29) se planteó la formación del doble enlace en C-1/C-2, y posterior acoplamiento con la *N*-acetilcisteamina, mediante bromación y deshidrobromación del ácido **77**, que se obtendría a su vez del compuesto comercial **66**.

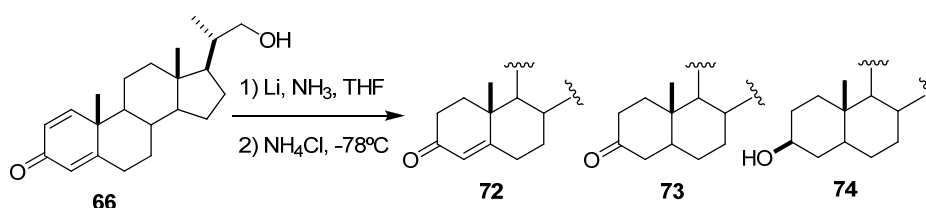


Esquema 29. Análisis retrosintético del paratioesteroide B (**64**).

La ruta sintética de paratioesteroide B (**64**) (esquema 30) comenzó con la reducción de Birch⁷⁷ del reactivo comercial **66** usando Li/NH₃ a -78°C. Según los equivalentes de litio y el tiempo de reacción se lograron obtener tres productos de reducción de **66**. Si la reducción se dejaba 20 min, empleando 1.5 equivalentes de litio, se obtenía el compuesto **72**, con un rendimiento del 85%. Usando 4 equivalentes de litio durante 1 h se obtenía **73** en un 89% de rendimiento, mientras que si se usaban 7 equivalentes durante 3 h se lograba obtener el diol **74**, con un 99% de rendimiento (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones para la reducción de **66**

Compuesto	Equiv. Li	t reacción (min)	Rendimiento (%)
72	1.5	20	85
73	4	60	89
74	7	180	99



Esquema 30. Reducción de Birch de **66**.

Los tres productos de reducción se confirmaron por RMN de ¹H y ¹³C, y espectrometría de masas cuando se compararon con los descritos en la bibliografía.¹⁵²

La posterior oxidación de **74** empleando PDC en DMF (82%), PCC en DMF (25%) ó IBX en DMSO (40%) dio el aldehído **75** en vez del ácido **77**. La obtención del

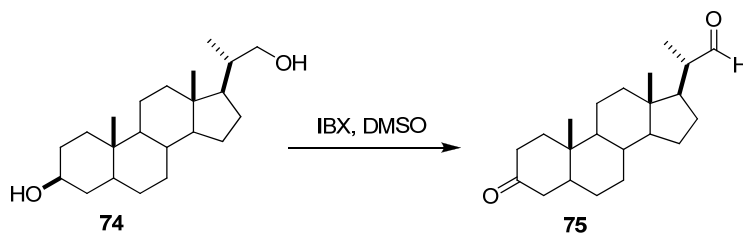
¹⁵² a) Avallone, E.; Izzo, I.; Tecilla, P.; De Riccardis, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6121. b) Kim, H.-S.; Choi, B.-S.; Kwon, K.-C.; Lee, S.-O.; Kwak, H. J.; Lee, C. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 2059. c) Kim, H.-S.; Kwon, K.-C.; Kim, K. S.; Lee, C. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 3065.

aldehído **75** se confirmó por RMN de ^1H al observarse la aparición del doblete ($J = 3.3$ Hz) a 9.57 ppm. En el RMN de ^{13}C se observó la aparición de un carbono cuaternario a 211.5 ppm asignado al grupo ceto en la posición C-3 y de un carbono a 204.6 ppm perteneciente al grupo aldehído en la posición C-22.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos de esteroides en los que se introduce un doble enlace entre las posiciones C-1/C-2 utilizando IBX,¹⁵³ se probaron una serie de reacciones sobre el diol **74** tal como se muestra en la Tabla 11. Desafortunadamente después de ensayar diferentes tipos de condiciones no se logró introducir el doble enlace en la posición C-1 obteniéndose siempre **75** (esquema 31).

Tabla 11. Diferentes oxidaciones del diol **74** utilizando IBX en DMSO.

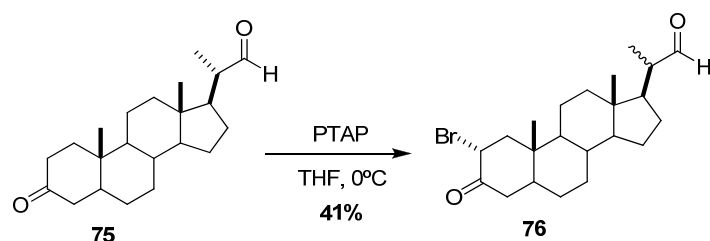
IBX (equiv)	tiempo (h)	T (°C)
1.5	24	70
3	24	70
5	24	70
7.5	24	70
10	24	70
4	24	85
4	24	100
4	48	70
4	72	70
4	96	70



Esquema 31. Oxidaciones del diol **74** empleando IBX.

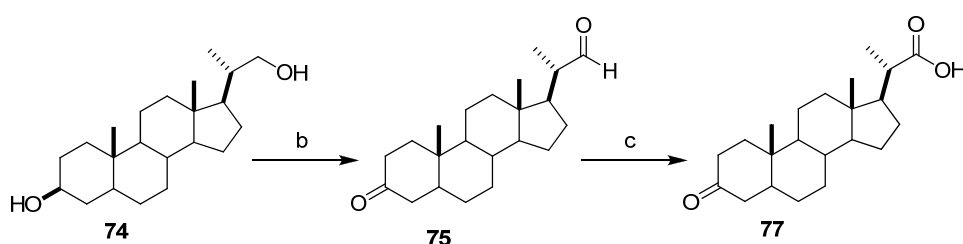
La bromación quimio, regio y estereoselectiva en la posición C-2 del aldehído **75**, utilizando PTAP (esquema 32) dio el compuesto bromado **76**. La presencia de un átomo de bromo en **76** se confirmó al aparecer un doble doblete ($J = 13.2, 6.3$ Hz) a 4.74 ppm que correspondía al protón H-2 β y por espectrometría de masas. Desafortunadamente, las condiciones básicas de la reacción originaron epimerización en C-20 debido a la presencia del aldehído de la posición C-22. La presencia de los dos epímeros se dedujo a partir de la duplicación de la señal del doblete del aldehído (9.56/9.52 ppm); así como de las señales de los metilos H-18 (0.73/0.70 ppm), H-19 (1.09/1.08 ppm) y H-21 (1.12/1.03 ppm).

¹⁵³ a) Chikara, B. S.; Chandra, R.; Tandom, V. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7585. b) Nicolau, K. C.; Montagnon, T.; Baran, P. S.; Zhong, Y.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2245. c) Nicolau, K. C.; Zhong, Y.-L.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7596.



Esquema 32. Epimerización del aldehído **75**.

Esta epimerización en la posición C-20 nos hizo plantear una estrategia alternativa que consistió en realizar primero el acoplamiento entre el ácido **77** y la *N*-acetilcisteamina, para a continuación, introducir el doble enlace entre las posiciones C-1/C-2. El ácido **77** se obtuvo de la oxidación del aldehído **75** empleando TEMPO, con un rendimiento del 78% (esquema 33).



Esquema 33. Reactivos y condiciones: (b) PDC, DMF (82%); (c) TEMPO, NaClO₂, NaClO, CH₃CN (pH=6.5) (78%).

Para la obtención del análogo **78** se realizó el acoplamiento entre el ácido **77** y la *N*-acetilcisteamina utilizando las condiciones descritas anteriormente para la síntesis de **63**.

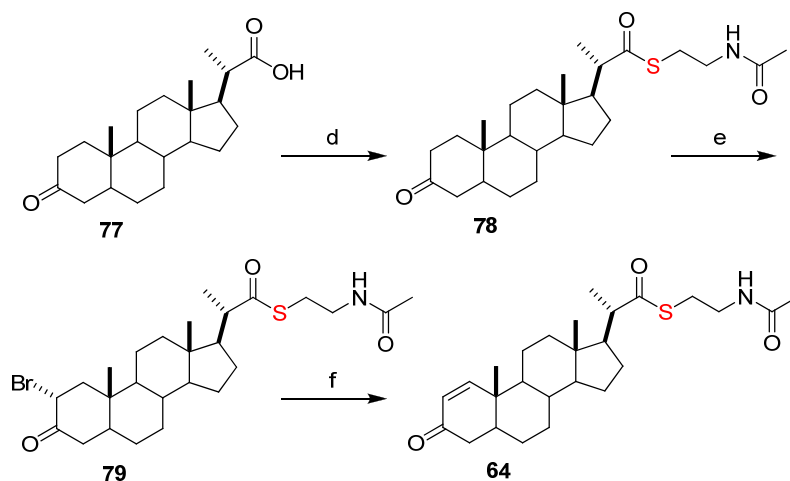
A continuación, la introducción estereoselectiva de un átomo de bromo con disposición α en la posición C-2,¹⁵⁴ (esquema 34) se realizó mediante el tratamiento de **78** con PTAP para dar el 2α -bromoesteroide **79**, con un 62% de rendimiento. La disposición 2α del bromo es necesaria para que transcurra la eliminación posterior y ésta se confirmó por RMN de ¹H con la aparición de un doble doblete ($J = 13.1, 6.3$ Hz) a 4.73 ppm asignado al protón H-2. En el RMN de ¹³C se observó la aparición de un carbono terciario a 51.8 ppm que correspondía al carbono C-2.

Por último, la reacción de deshidrobromación de **79** con Li₂CO₃ y LiBr en DMF originó **64** en un 54% de rendimiento.¹⁵⁵ Los datos de RMN de **64** (Tablas 12 y 13) coincidieron con los obtenidos para el producto natural. Además, su rotación óptica específica nos permitió determinar su configuración absoluta ($8S,9S,10R,13S,14S,17R,20S$).

Después de seis etapas sintéticas se obtuvo **64** con un rendimiento global del 20% a partir del alcohol comercial **66**.

¹⁵⁴ Drögemüller, M.; Flessner, T.; Jautelat, R.; Scholz, U.; Winterfeldt, E. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2811.

¹⁵⁵ a) Ferraboschi, P.; Colombo, D.; Prestileo, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2781. b) Khripach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; Konstantinova, O. V.; Antonchick, A. P.; Schneider, B. *Steroids* **2002**, *67*, 587. c) Abul-Hajj, Y. J. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 3380.



Esquema 34. *Reactivos y condiciones:* (d) *N*-metilimidazol, TsCl, CH₃CN, *N*-acetilcisteamina, Δ (56%); (e) PTAP, THF, 0°C (62%); (f) LiBr, Li₂CO₃, DMF (54%).

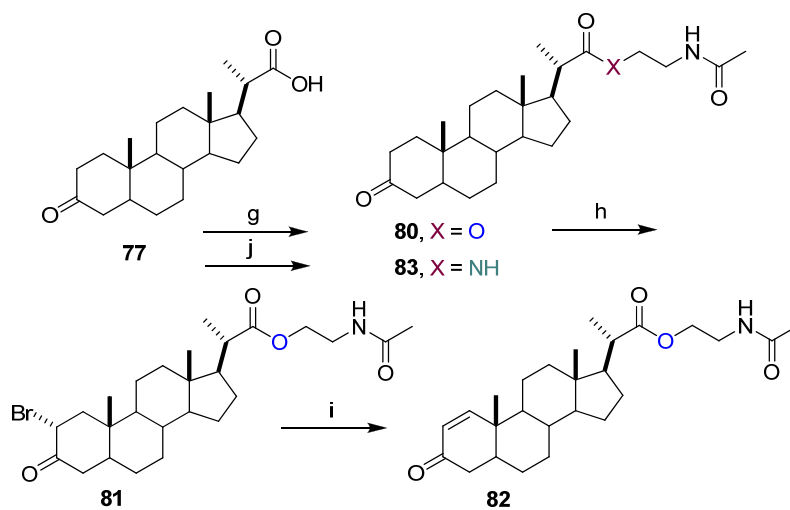
Para realizar un estudio de la relación estructura actividad se prepararon los análogos **80**, **81**, **82** y **83** (esquema 35). Para la síntesis de los análogos **80** y **83** se utilizó como producto de partida el ácido **77**, y la *N*-acetiletanolamina para la obtención de **80**, en un 53% de rendimiento, y la *N*-(2-aminoetil)acetamida para la síntesis de **83**, en un 49% de rendimiento, siguiendo la misma metodología empleada en la preparación de **70** y **71**.

La obtención de **80** se confirmó en RMN de ¹H al observarse la aparición de las señales a 4.16 ppm, 3.53 ppm y 2.01 ppm correspondientes a los protones H-23, H-24 y H-26, respectivamente, y en RMN de ¹³C al aparecer dos carbonos cuaternarios a 177.1 ppm y 170.2 ppm, correspondientes a dos grupos carbonilo en las posiciones C-22 y C-25.

La obtención de **83**, se confirmó en RMN de ¹H al observarse la aparición de las señales a 3.40 ppm correspondientes a los cuatro protones de H-23 y H-24 y el singulete a 2.00 ppm del protón H-26. En el RMN de ¹³C se observó la aparición de dos carbonos cuaternarios a 178.2 ppm y 171.3 ppm que confirmaron la presencia de dos grupos amida.

De nuevo, la bromación quimio, regio y estereoselectiva de **80** se realizó utilizando las mismas condiciones descritas para la síntesis del 2α-bromotioesteroide **79**, obteniéndose así el esteroide **81**, en un 58% de rendimiento.

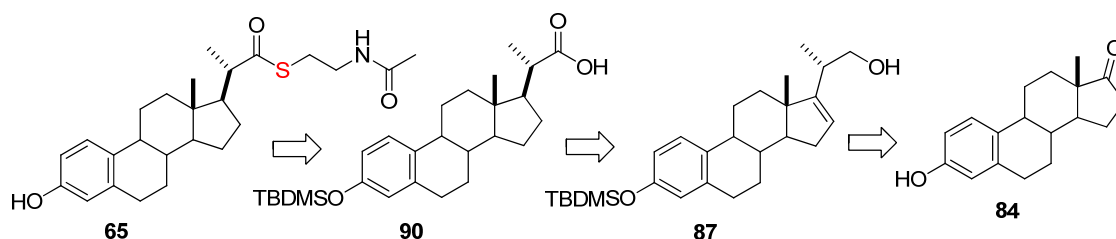
La reacción de deshidrobromación se realizó en las mismas condiciones que **64** para dar el análogo **82** en un 52% de rendimiento. En su espectro de RMN de ¹H se observó la aparición de dos dobletes (*J* = 10.2 Hz) a 7.15 ppm y a 5.88 ppm, que indicaron la formación del doble enlace entre las posiciones C-1/C-2. El RMN de ¹³C mostró los carbonos C-1 y C-2 a 158.3 ppm y 127.5 ppm, respectivamente, que confirmaron la formación de Δ¹.



Esquema 35. *Reactivos y condiciones:* (g) *N*-metilimidazol, TsCl, CH₃CN, *N*-acetiletanolamina, Δ (53%); (h) PTAP, THF, 0°C (58%); (i) LiBr, Li₂CO₃, DMF (52%); (j) *N*-metilimidazol, TsCl, CH₃CN, *N*-(2-aminoetil)acetamida, Δ (49%).

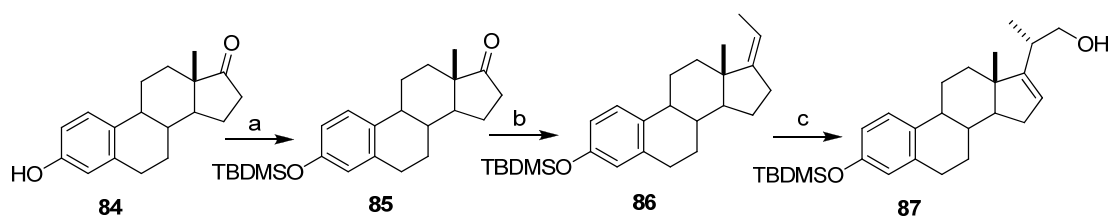
3.3. Síntesis del paratioesteroide C y análogos

En el análisis retrosintético diseñado para el compuesto **65** (esquema 36), se planteó realizar el acoplamiento sobre el ácido **90**, que se obtendría de la hidrogenación y oxidación del alcohol **87**. El alcohol homoalílico **87** se prepararía a su vez siguiendo la estrategia sintética descrita por Nemoto¹⁵⁶ a partir de la (+)-estrona (**84**).



Esquema 36. Análisis retrosintético del paratioesteroide C (**65**).

Comenzamos la síntesis del paratioesteroide C (**65**) (esquema 37) con la preparación del alcohol homoalílico **87** descrito en la bibliografía. De esta manera se realizó la protección del grupo hidroxilo de la (+)-estrona, empleando TBSCl e imidazol para dar el silil-éter **85**, en un 99% de rendimiento. La reacción de Wittig¹⁵⁷ de **85** con etilidientrifetilfosforano y *t*-BuOK dio estereoselectivamente la (*Z*)-olefina **86**, con un 99% de rendimiento. La posterior introducción de un grupo hidroximetilo y la formación de un nuevo centro quiral de forma estereoselectiva en la cadena lateral, se realizó empleando la reacción de Prins-Kriewitz,¹⁵⁸ mediante una reacción énica con AlMe_2Cl , CH_2O en CH_2Cl_2 a -78°C para dar el alcohol homoalílico **87**, en un 73% de rendimiento. El tiempo de reacción y la temperatura fueron determinantes para obtener un resultado satisfactorio, ya que la hidroximetilación aromática en el anillo A empieza a competir con el mecanismo de la reacción énica, cuando la reacción se deja más de 30 minutos ó se utiliza una temperatura mayor de -60°C . La estructura de **87** se confirmó por comparación con el mismo compuesto publicado en la bibliografía.¹⁵⁶



Esquema 37. Reactivos y condiciones: (a) TBDMSCl, Imidazol, DMF, 0°C (99%); (b) EtPPh_3Br , *t*BuOK, THF, 85°C (99%); (c) CH_2O , AlMe_2Cl , CH_2Cl_2 , -78°C (73%).

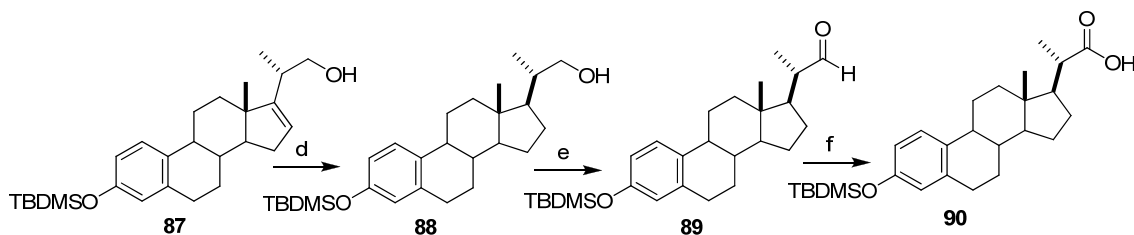
¹⁵⁶ Matsuya, Y.; Masuda, S.; Ohsawa, N.; Adam, S.; Eustache, J.; Sukenaga, Y. Kamoshita, K.; Nemoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 803.

¹⁵⁷ a) Hua, Z.; Carcache, D.; Tian Y.; Li, Y.; Danishefsky, S. J. *Tetrahedron* **2005**, *70*, 9849. b) Shen, Y.; Burgoyne, D. L. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3908. c) Node, M.; Kumar, K.; Nishide, K.; Miyamoto, T. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9207. d) Bruttomesso, A. C.; Doller, D.; Gros, G. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 943. e) Agyin, J. K.; Timberlake, L.; Morrison, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7945.

¹⁵⁸ a) Avallone, E.; Izzo, I.; De Riccardis, F. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10689. b) Izzo, I.; Avallone, E.; Della Monica, C.; Casapullo, A.; Amigo, M.; De Riccardis, F. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5587. c) Izzo, I.; Della Monica, C.; Bifulco, G.; De Riccardis, F. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5577. d) Deng, L.; Wu, H.; Yu, B.; Jiang, M.; Wu, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2781. e) Di Filippo, M.; Izzo, I.; De Riccardis, F. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 1711. f) Izzo, I.; Pironi, V.; Monica, C.; Sodano, G.; De Riccardis, F. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 8977. g) Izzo, I.; Di Filippo, M.; Napolitano, R.; De Riccardis, F. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3505. h) Deng, S.; Yu, B.; Lou, Y.; Hui, Y. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 202.

La hidrogenación del doble enlace Δ^{16} se realizó a una presión de 8 atm durante 10 horas debido al fuerte impedimento estérico¹⁵⁹ (esquema 38). Así, el producto de reducción **88** se confirmó por RMN de ^1H y ^{13}C al observarse la desaparición de la señal del protón H-16 a 5.48 ppm y las de los carbonos a 157.7 ppm y 122.8 ppm.

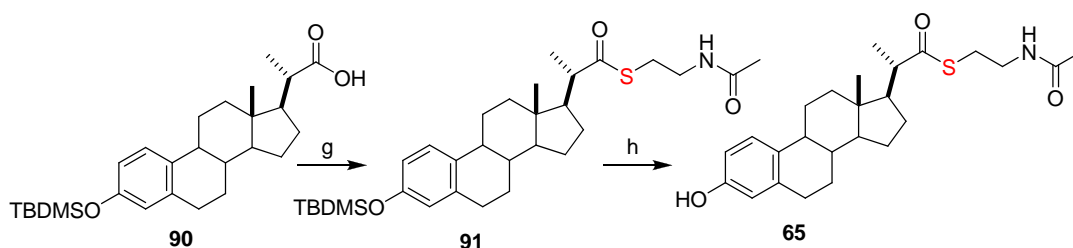
Las posteriores oxidaciones de la posición C-22 del alcohol **88** se realizaron con PDC y TEMPO obteniéndose primero el aldehído **89** y después el ácido **90**, cuyas estructuras fueron confirmadas por los desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C , así como por espectrometría de masas de alta resolución.



Esquema 38. *Reactivos y condiciones:* (d) H_2 (8 atm), Pd/C, MeOH (80%); (e) PDC, DMF (82%); (f) TEMPO, NaClO_2 , NaClO, CH_3CN (pH=6.5) (79%).

La introducción de la *N*-acetilcisteamina en el ácido **90** empleando *N*-metilimidazol y cloruro de tosilo en CH_3CN dio el compuesto **91**, con un 54% de rendimiento (esquema 39).

La desprotección de **91** empleando TBAF¹⁶⁰ a pH 5 nos condujo al paratioesteroide C (**65**) en un 51% de rendimiento. Su estructura se confirmó por comparación de los datos de RMN (Tablas 12 y 13) con los obtenidos para el producto natural lo que conjuntamente con el valor de rotación óptica nos permitió determinar su configuración absoluta (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*,20*S*). La espectrometría de masas de alta resolución confirmó también la obtención de **65**. HREIMS: m/z 429.2329 $[\text{M}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_3\text{S}$, 429.2332). El rendimiento global de la síntesis de **65** tras ocho etapas a partir de la estrona fue del 9%.

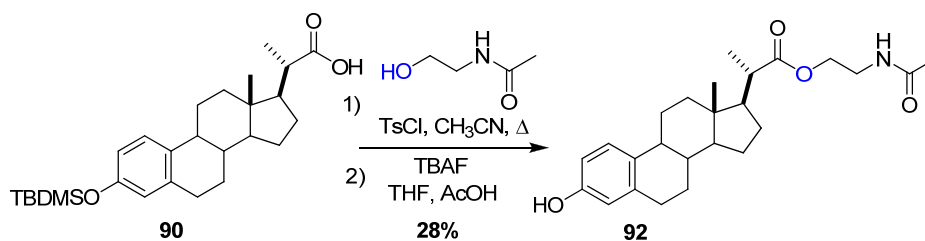


Esquema 39. *Reactivos y condiciones:* (g) *N*-metilimidazol, TsCl, CH_3CN , *N*-acetilcisteamina, Δ (54%); (h) TBAF, AcOH, THF (51%).

¹⁵⁹ a) Katona, B. W.; Rath, N. P.; Anant, S.; Stenson, W. F.; Covey, D. F. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9298. b) Williams, J. R.; Gong, H.; Hoff, N.; Olubodun, O. I. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10732. c) Williams, J. R.; Gong, H.; Hoff, N.; Olubodun, O. I.; Carroll, P. J. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 269.

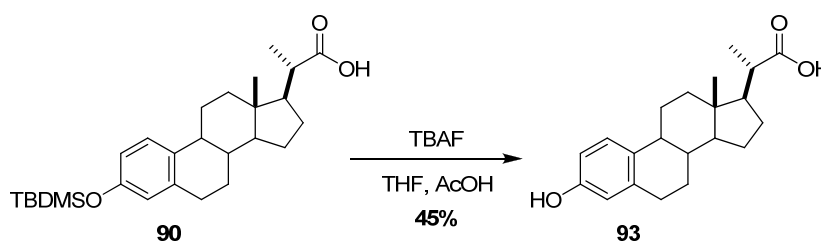
¹⁶⁰ a) Li, W.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2849. c) Campbell, J. E.; Englund, E. E.; Burke, S. D. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2273.

De igual forma que en **63** se preparó el análogo **92** para determinar la influencia en la actividad citotóxica de la presencia de un átomo de oxígeno en la cadena lateral (esquema 40). La obtención de **92** se realizó introduciendo primero el grupo *N*-acetiletanolamina en el ácido **90** para después realizar la desprotección empleando TBAF en un 28% de rendimiento en los dos pasos. La obtención de **92** se confirmó por RMN y espectrometría de masas de alta resolución.



Esquema 40. Síntesis del análogo **92**.

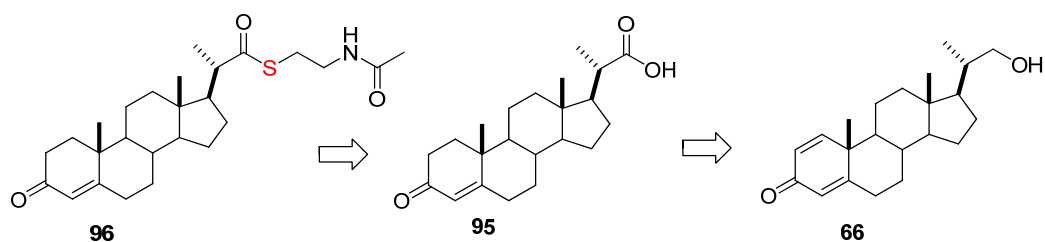
Para evaluar la presencia de las cadenas laterales en la actividad citotóxica con este núcleo esteroidal se preparó el compuesto **93**, que se obtuvo de la desprotección con TBAF de **90** (esquema 41).



Esquema 41. Obtención del ácido **93**.

3.4. Síntesis de análogos con el doble enlace entre las posiciones C-4/C-5

El intermedio clave en el análisis retrosintético diseñado para el compuesto **96** y análogos (esquema 42) fue el ácido **95** obtenido a partir del reactivo comercial **66**.

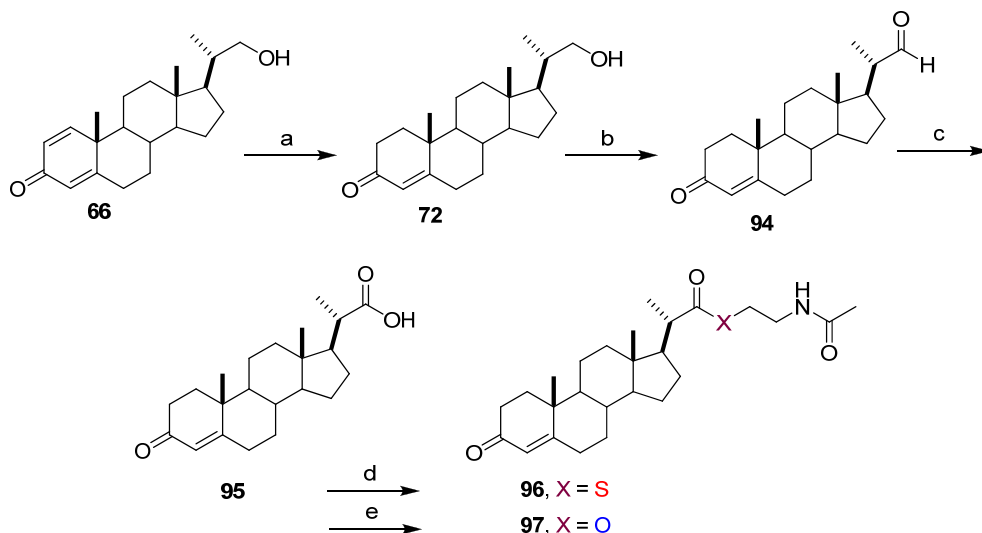


Esquema 42. Análisis retrosintético del análogo con el doble enlace en C-4/C-5.

La ruta sintética del análogo **96** (esquema 43) comenzó con el producto de semireducción **72** ya descrito anteriormente, que por oxidación con PDC en DMF (73%) originó el aldehído **94**.

La oxidación del aldehído **94** con TEMPO dio el ácido **95** con un rendimiento del 69%, que fue acoplado con la *N*-acetilcisteamina para obtener **96**, en un 67% de rendimiento, y con la *N*-acetiletanolamina para dar **97**, con un rendimiento del 44%. Las condiciones de reacción empleadas fueron las mismas que en la síntesis de **63**.

La obtención de **96** se confirmó en RMN de 1H al observarse las señales a 3.43 ppm, 3.00 ppm y 1.96 ppm correspondientes a los protones H-24, H-23 y H-26, respectivamente, mientras que la obtención de **97** se confirmó también por RMN de 1H al observarse las señales a 4.17 ppm, 3.53 ppm y 2.00 ppm correspondientes a los protones H-24, H-23 y H-26, respectivamente.



Esquema 43. Reactivos y condiciones: (a) (1) Li, NH_3 , THF, (2) NH_4Cl , $-78^\circ C$ (85%); (b) PDC, DMF (73%); (c) TEMPO, $NaClO_2$, $NaClO$, CH_3CN (pH=6.5) (69%); (d) *N*-metilimidazol, $TsCl$, CH_3CN , *N*-acetilcisteamina, Δ (67%); (e) *N*-metilimidazol, $TsCl$, CH_3CN , *N*-acetiletanolamina, Δ (44%).

Tabla 12. Datos de RMN ^1H (δ_{H} , mult, J en Hz) a 500 MHz de los paratioesteroides A-C (**63-65**).

Protón	63 ^a	64 ^b	65 ^b
1	7.05, d, 10.1	7.31, d, 10.2	7.10, d, 8.5
2	6.24, dd, 10.1, 1.9	5.85, dd, 10.1, 1.0	6.59, dd, 8.5, 2.7
3			
4	6.08, d, 1.9	2.43, dd, 17.8, 14.0 2.18, ddd, 17.8, 4.0, 1.0	6.51, d, 2.7
5		1.95, m	
6	2.47, td, 13.3, 5.1 2.36, ddd, 13.3, 3.7, 2.7	1.47, m	2.79, m
7	1.95, m, 1.04, m	1.76, m, 1.04, m	1.87, m 1.32, m
8	1.64, m	1.56, m	1.36, m
9	1.07, m	1.07, m	2.18, m
10			
11	1.71, m	1.85, ddd, 13.5, 6.9, 3.5 1.53, m	2.27, m; 1.47, m
12	1.97, m 1.28, m	2.03, ddd, 13.0, 3.5, 3.5 1.34, ddd, 13.0, 13.0, 4.0	2.07, dd, 8.8, 2.5 1.50, m
13			
14	1.04, m	1.16, m	1.27, m
15	1.61, m 1.18, m	1.64, m 1.16, m	1.72, m 1.21, m
16	1.74, m 1.37, m	1.74, m 1.42, m	1.76, m 1.40, m
17	1.68, m	1.67, dd, 9.8, 8.8	1.74, m
18	0.76, s	0.78, s	0.75, s
19	1.25, s	1.07, s	
20	2.63, dc, 10.1, 6.8	2.65, dc, 10.5, 6.8	2.67, dc, 10.2, 6.8
21	1.22, d, 6.8	1.22, d, 6.8	1.24, d, 6.8
22			
23	3.01, ddd, 6.5, 5.6, 0.9	2.99, td, 6.7, 1.5	3.00, ddd, 7.2, 6.9, 0.7
24	3.43, ddd, 6.5, 5.7, 2.7	3.33 ^c	3.33 ^c
25			
26	1.97, s	1.94, s	1.95, s
NH	6.01, sa	5.78, sa.	5.87, sa

^a En CDCl_3 .^b En CD_3OD .^c Señal solapada con el disolvente.

Tabla 13. Datos de RMN ^{13}C (δ_{C}) a 125 MHz de los paratioesteroides A-C (**63-65**).

Carbono	63 ^a	64 ^b	65 ^b
1	155.7, CH	159.3, CH	126.0, CH
2	127.4, CH	125.2, CH	112.4, CH
3	186.3, C	200.7, C	154.1, C
4	123.8, CH	39.9, CH ₂	114.9, CH
5	169.1, C	44.2, CH ₂	137.5, C
6	32.7, CH ₂	26.5, CH	29.7, CH ₂
7	33.5, CH ₂	30.5, CH ₂	28.5, CH ₂
8	35.4, CH	35.0, CH	38.8, CH
9	52.1, CH	49.5, CH	43.6, CH
10	43.5, C	38.2, C	131.6, C
11	22.7, CH ₂	20.2, CH ₂	26.5, CH ₂
12	39.1, CH ₂	39.0, CH ₂	40.0, CH ₂
13	42.9, C	42.3, C	42.9, C
14	54.8, CH	55.3, CH	54.8, CH
15	24.4, CH ₂	24.0, CH ₂	23.8, CH ₂
16	27.1, CH ₂	26.3, CH ₂	27.0, CH ₂
17	52.5, CH	52.4, CH	52.9, CH
18	12.2, CH ₃	10.7, CH ₃	11.7, CH ₃
19	18.6, CH ₃	11.8, CH ₃	
20	51.7, CH	51.1, CH	51.8, CH
21	17.7, CH ₃	16.7, CH ₃	17.4, CH ₃
22	203.7, C	202.2, C	203.7, C
23	28.1, CH ₂	27.0, CH ₂	27.6, CH ₂
24	39.8, CH ₂	38.6, CH ₂	39.9, CH ₂
25	170.3, C	171.2, C	172.0, C
26	23.2, CH ₃	21.0, CH ₃	21.8, CH ₃

^a En CDCl₃.^b En CD₃OD.

4. Análisis farmacológicos y relaciones estructura-actividad.

Los análisis farmacológicos de citotoxicidad de los esteroides sintetizados medidos como valores de sus GI_{50} fueron realizados en PharmaMar, frente a un panel de tres células tumorales MDA-MB-231, A-549 y HT-29 (Tabla 14).

Los compuestos sintetizados se dividieron en cuatro grupos con el fin de poder establecer las relaciones estructura-actividad:

A) *Paratioesteroides A-C (63-65) y otros análogos con la misma cadena lateral con diferentes grados de oxidación en el anillo A (78, 79 y 96).*

El paratioesteroide B (**64**), con un doble enlace Δ^1 y el análogo **78** que no posee doble enlace C-C en el anillo A presentaron la mayor actividad citotóxica, siendo además selectivos frente a la línea tumoral HT-29 (GI_{50} de 6.5 y 6.9 μ M, respectivamente).

De estos resultados se concluye que una disminución de la oxidación en el anillo A trae consigo un incremento de la citotoxicidad cuando poseen un tioéster C-22 en la cadena lateral (Fig. 27).

B) *Análogos con un grupo éster C-22 en la cadena lateral con diferentes grados de oxidación en el anillo A (70, 80, 81, 82, 92 y 97).*

El análogo **80** que no posee doble enlace C-C en el anillo A resultó ser el más activo en este grupo ($GI_{50} = 3 \mu$ M frente a HT-29).

De nuevo un menor grado de oxidación en el anillo A en los análogos que poseen un grupo éster C-22 en la cadena lateral trae consigo un aumento en la actividad citotóxica (Fig. 27).

C) *Análogos con un grupo amida C-22 en la cadena lateral con diferentes grados de oxidación en el anillo A (71 y 83).*

Estos compuestos presentan actividad citotóxica menor que sus análogos con un grupo tioéster ó éster en la posición C-22 de la cadena lateral, pudiéndose concluir que la sustitución de un átomo de azufre de la cadena lateral por un átomo de nitrógeno produce un descenso de la actividad citotóxica en este tipo de estructuras.

D) *Análogos con un ácido carboxílico C-22 (69, 77, 93 y 95).*

La ausencia de actividad citotóxica en estos compuestos indica que la presencia de una cadena lateral de este tipo es una condición necesaria para que estos compuestos sean activos.

Tabla 14. Actividad citotóxica (GI₅₀ en μM) de los paratioesteroides naturales y análogos.

Compuesto	MDA-MB-231	A-549	HT-29
63	47	38	31
64	13	14	6.5
65	88	-	-
78	19	20	6.9
79	62	57	60
96	33	-	14
70	15	15	10
80	4.6	4.6	3.0
81	17	29	25
82	13	15	10
92	-	-	-
97	62	53	37
71	70	90	38
83	39	79	72
69	-	-	-
77	-	-	-
93	-	-	-
95	-	-	-

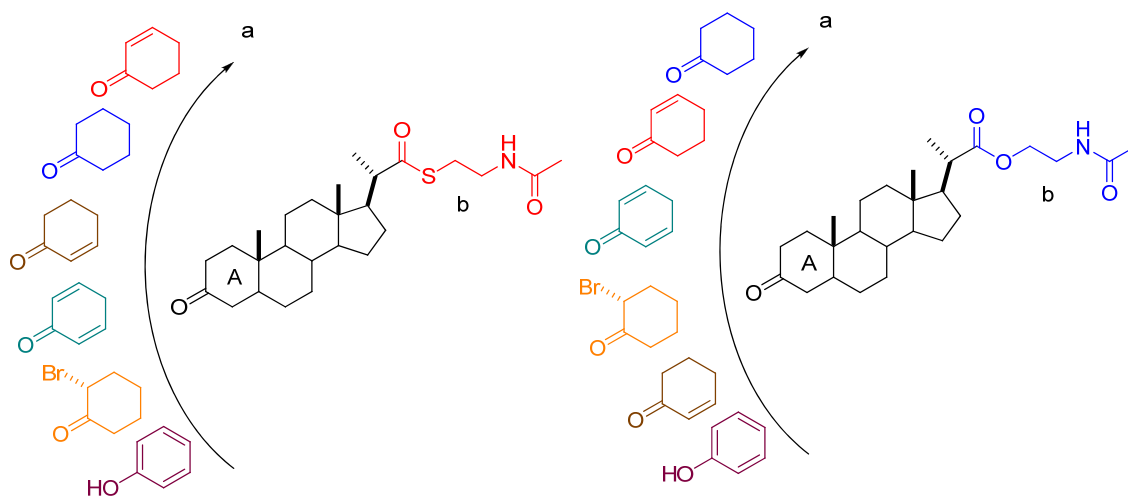


Figura 27. Modelo de citotoxicidad selectiva de los paratioesteroides A-C y análogos: (a) El anillo A debe tener únicamente el doble enlace Δ^1 ó no tener doble enlace para mostrar elevada citotoxicidad. (b) Es necesaria una cadena lateral de este tipo para que presenten actividad.

5. Conclusiones

- La síntesis de los paratioesteroides A-C (**63-65**), compuestos aislados del coral blando *Paragorgia* sp. confirmó las estructuras propuestas mediante estudios de RMN y espectrometría de masas. Estas síntesis nos permitieron determinar también sus estereoquímicas absolutas que resultaron ser para los tres esteroides (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*,20*S*).
- Con el fin de realizar un profundo estudio de las relaciones estructura-actividad se prepararon una serie de análogos con diferentes grados de oxidación en el anillo A y sustituciones en la cadena lateral (**70, 71, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 92, 96 y 97**).
- La evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados frente a un panel de tres células tumorales MDA-MB 231, A-549 y HT-29 nos condujo a deducir que:
 - Una disminución del grado de oxidación del anillo A trae consigo un aumento de la actividad citotóxica.
 - La presencia de un grupo tioéster ó éster en C-22 de la cadena lateral muestra una mayor citotoxicidad que si presenta un grupo amida en la misma posición.
 - La existencia de una cadena lateral de este tipo es condición necesaria para que estos esteroides sean activos.

4

Síntesis de nuevos
análogos de las
cefalostatinas

1. Antecedentes

1.1. Cefalostatinas y riteracinas

La síntesis de productos naturales¹⁶¹ continúa ocupando una posición central en la química orgánica, no sólo porque la naturaleza nos brinda la oportunidad de sintetizar novedosas moléculas a través de rutas y metodologías que el hombre no se habría planteado antes, sino también por su importante contribución en la obtención de nuevas moléculas que pueden ser utilizadas en el tratamiento de una amplia abanico de enfermedades.

Uno de los ejemplos más representativos son las cefalostatinas y las riteracinas, unos dímeros esteroidales que han despertado enorme interés dentro de la comunidad científica por presentar actividades citotóxicas muy elevadas frente a una serie de líneas celulares tumorales.

Las cefalostatinas poseen un esqueleto de trisdecaciclo bis-esteroide pirazínico y fueron descubiertas por Pettit y col.¹⁶² cuando aisló la cefalostatina 1 del *Cephalodiscus gilchristi*,¹⁶³ un gusano marino de 5 mm de longitud. La mayoría de las 19 cefalostatinas naturales aisladas entre 1988 y 1998 mostraron valores citotóxicos elevados, siendo las cefalostatinas 1, 2, 3 y 4 las más activas con valores entre 0.1 a 0.0001 pM frente al panel celular tumoral P-388 (linfoma de ratón). Particularmente la cefalostatina 1 (Fig. 28) se considera como uno de los agentes antitumorales más potentes que se conocen mostrando valores de subnanomolar a picomolar frente al panel de 60 líneas tumorales del Instituto Nacional de Cáncer (NCI),¹⁶⁴ siendo incluso más activo *in vitro* que paclitaxel.¹⁶⁵ Su novedosa y compleja estructura, junto con su potencial como un posible fármaco ha impulsado a muchos grupos de investigación a realizar estudios tanto farmacológicos como sintéticos sobre este esteroide dimérico y sus homólogos naturales. Desafortunadamente, las cefalostatinas no han dado en estudios posteriores realizados *in vivo* un resultado tan bueno como se esperaba.

El mecanismo de acción de la cefalostatina 1 se ha asociado a un nuevo modo de apoptosis celular.¹⁶⁶

¹⁶¹ Hale, K. J. *The Chemical Synthesis of Natural Products*, Ed. Sheffield Academic Press, Sheffield: 2000.

¹⁶² Pettit, G. R.; Inoue, M.; Kamano, Y.; Herald, D. L.; Arm, C.; Dufrense, C.; Christie, N. D.; Schmidt, J. M.; Doubek, D. L.; Krups, T. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2006.

¹⁶³ a) Pettit, G. R.; Tan, R.; Xu, J.-P.; Ichihara, Y.; Williams, M. D.; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 955. b) Pettit, G. R.; Xu, J.-P.; Williams, M. D.; Christie, N. D.; Doubek, D. L.; Schmidt, J. M. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 52.

¹⁶⁴ a) Lacour, T. G.; Guo, C. X.; Ma, S. H.; Jeong, J. U.; Boyd, M. R.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Fuchs, P. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2587. b) Longley, R. E.; McConell, O. L.; Essich, E.; Harmody, D. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 915. c) Grever, M. R.; Schepartz, S. A.; Chabner, B. A. *Semin. Oncol.* **1992**, *19*, 622. d) <http://www.dtp.nci.nih.gov>.

¹⁶⁵ Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; MxPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325.

¹⁶⁶ Dirsh, V. M.; Muller, I. M.; Eichhorst, S. T.; Kamano, Y.; Inoue, M.; Xu, J. P.; Ichihara, Y.; Wanner, G.; Vollmar, A. M. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 8869.

Entre el período de 1994 a 1997, el grupo de Fusetani y col. de la Universidad de Tokio aislaron del tunicado marino *Ritterella tokioka* una serie de 26 compuestos similares a los que se denominó riteracinas A-Z.¹⁶⁷ La riteracina A presentó valores citotóxicos elevados ($ED_{50} = 4.2$ nM) frente al panel celular tumoral P-388. De las 25 riteracinas restantes,¹⁶⁸ la riteracina B (Fig. 28), fue la que presentó la actividad más potente ($IC_{50} = 0.17$ nM) frente a la misma línea tumoral seguidas de las riteracinas F y G ($IC_{50} = 0.81$ nM), la E ($IC_{50} = 3.8$ nM) y la Y ($IC_{50} = 4$ nM). Pero como había ocurrido en los estudios realizados *in vivo* con las cefalostatinas tampoco alcanzaron muy buenos resultados.

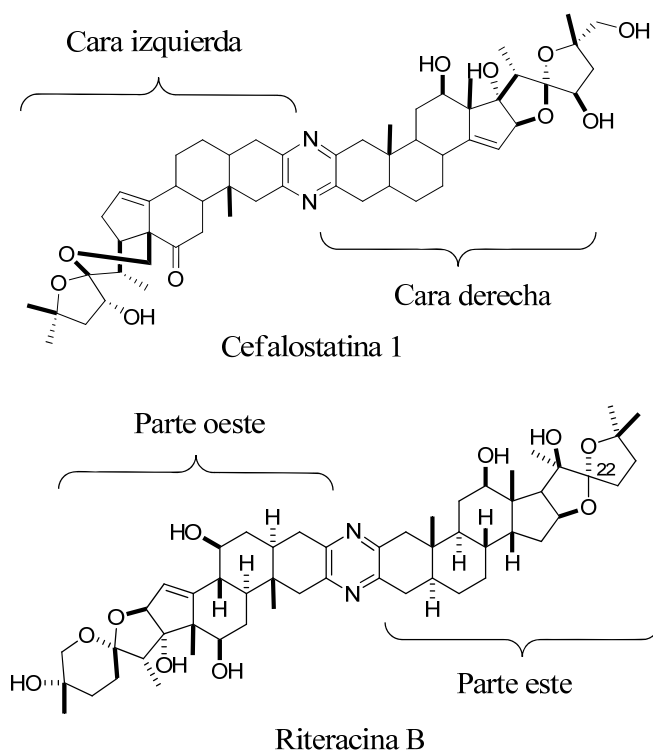


Figura 28.

El Dr. Pettit y col. nombraron a las dos mitades de las cefalostatinas como “cara derecha” y “cara izquierda”, mientras que el Dr. Fusetani y col. establecieron en las riteracinas la nomenclatura “parte este” y “parte oeste”. Finalmente, el Dr. Fuchs adoptó en estas estructuras diméricas la terminología “zona norte” y “zona sur” (Fig. 29).

¹⁶⁷ a) Fukuzawa, S.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6164. b) <http://www.ucmp.berkeley.edu/chordata/urochordata.html>.

¹⁶⁸ a) Fukuzawa, S.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4484. b) Fukuzawa, S.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1447. c) Fukuzawa, S.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 608. d) Fukuzawa, S.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6707.

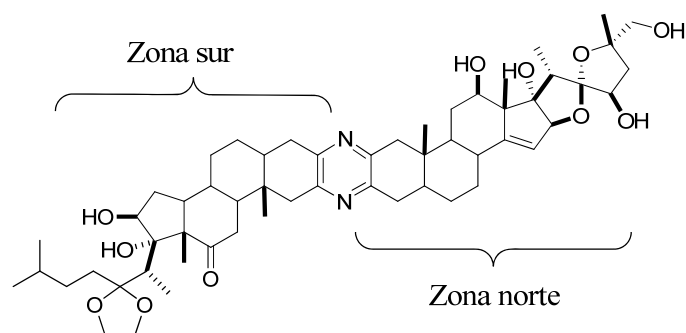


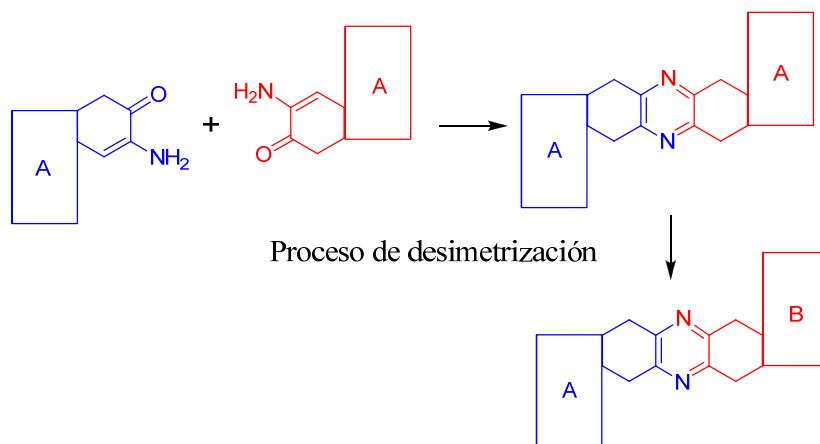
Figura 29. Asignación de los bis-esteroides pirazínicos realizada por el Dr. Fuchs.

Aproximaciones sintéticas de las cefalostatinas y las riteracinas

La baja biodisponibilidad de este tipo de compuestos las ha convertido en un tema central en la química orgánica sintética.¹⁶⁹

Las aproximaciones sintéticas se pueden englobar dentro de dos metodologías:¹⁷⁰

a) *La ruta simétrica del “método de Winterfeldt”*. La ventaja de esta ruta es que se accede regioselectivamente a las bis-pirazinas esteroidales asimétricas a partir de la hecogenina acetilada, un compuesto barato y comercial, empleando una secuencia corta con altos rendimientos. La reducción de una enaminocetona dimerizará para dar una pirazina con un plano de simetría C_2 (esquema 44). La desimetrización se puede realizar mediante diferentes reducciones diastereoselectivas, empleando tris(*sec*-butil)hidroborato de litio, tetrahidroborato sódico, borohidruro sódico ó introduciendo selectivamente otros grupos funcionales.¹⁵⁴

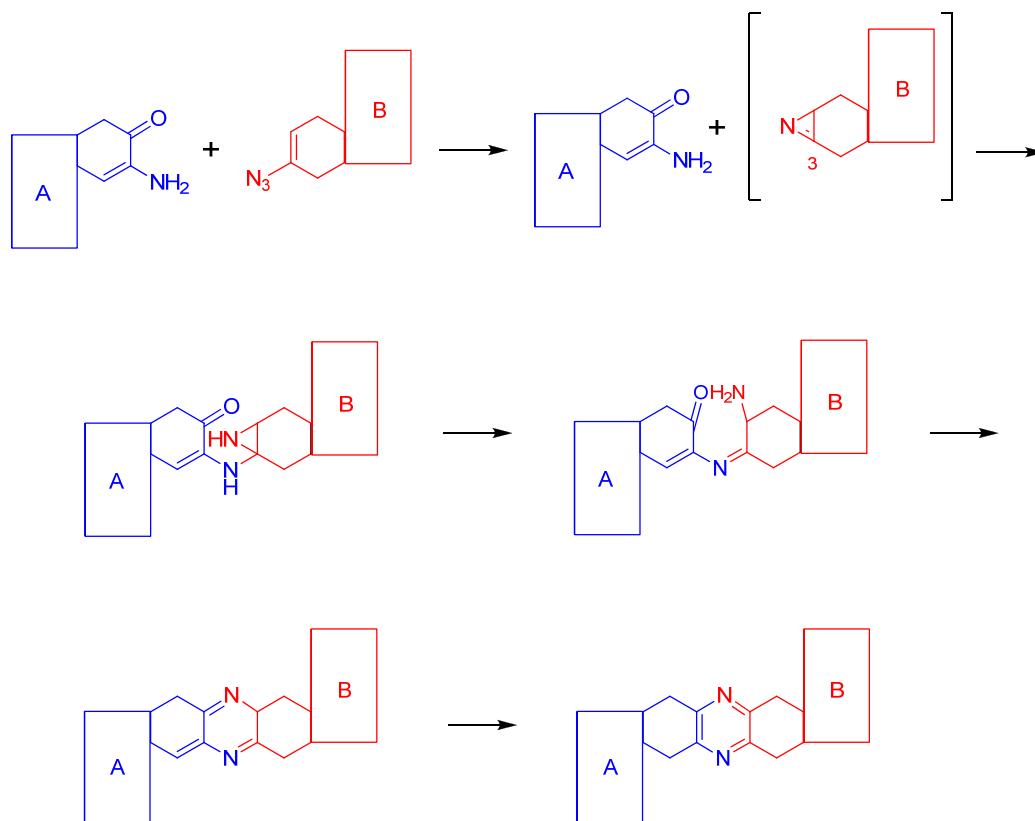


Esquema 44. Ruta simétrica: Reducción químico, regioselectiva de las enaminocetonas y su posterior desimetrización.

¹⁶⁹ Li, Y.; Días, J. R. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 283.

¹⁷⁰ a) Nawasreh, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 255. b) Gryszkiewicz-Wojtkielewicz, A.; Jastrzebska, I.; Morzycki, J. W.; Romanowska, D. B. *Curr. Org. Chem.* **2003**, 7, 1257.

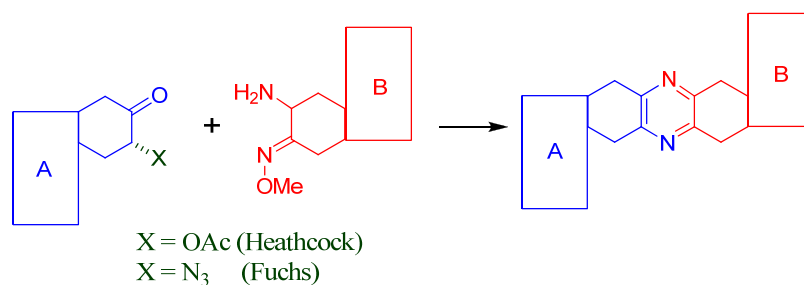
b) La ruta *no-simétrica* del “*método de Winterfeldt*” es más compleja y con más pasos que la ruta simétrica, pero permite obtener mayor número de dímeros asimétricos. La metodología que sigue es la de la preparación de vinilazidas utilizando el procedimiento de Zbiral.¹⁷¹ Tras una secuencia de varios pasos se llega al acoplamiento de la vinilazida y la enaminoacetona como aparece en el esquema 45. Otra ventaja de esta ruta es que no se forman homodímeros, ya que el ataque nucleófilo de la enaminoacetona solo puede tener lugar sobre la posición C-3 de la azirina, generando un intermedio de aziridina, que se abrirá a través de un desplazamiento intramolecular de protón. La condensación del grupo amino resultante con el grupo ceto seguida de una isomerización conducirá a la pirazina deseada.



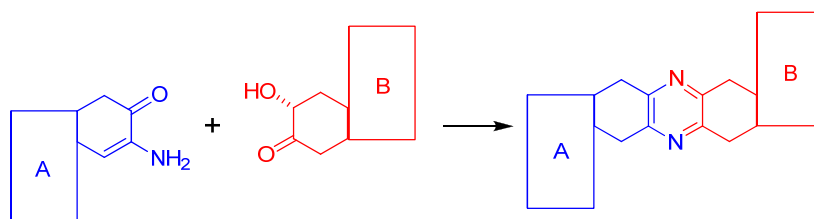
Esquema 45. Ruta *no-simétrica*: condensación regioselectiva de enaminoacetonas y vinilazidas.

¹⁷¹ Schweng, J.; Zbiral, E. *Liebigs Ann. Chem.* **1978**, 1089.

Entre algunos de los autores más destacados por su enorme contribución en el campo de la química sintética de las cefalostatinas y riteracinas tenemos que citar a Heathcock y Smith,¹⁷² por ser los pioneros en el desarrollo de la primera ruta para sintetizar bis esteroides pirazínicos, mediante la condensación de una α -acetoxicetona y α -aminooxima (esquema 46). También hay que citar a Fuchs¹⁷³ por su enorme contribución en el campo de la síntesis de las cefalostatinas al modificar el protocolo anterior, utilizando para la condensación de la pirazina una α -azidocetona en lugar de la α -acetoxicetona (esquema 46). Winterfeldt¹⁷⁴ desarrolló una variante de la metodología de Heathcock y Fuchs en la preparación de pirazinas no-simétricas mediante la condensación de una enaminocetona y de una α -hidroxicetona¹⁷⁵ empleando acetato amónico (esquema 47). Otros autores que han contribuido en este campo son Suárez¹⁷⁶ y Tietze.¹⁷⁷



Esquema 46. *Rutas no-simétricas de Heathcock y Fuchs de síntesis de pirazinas.*



Esquema 47. *Ruta no-simétrica de Winterfeldt de síntesis de pirazinas.*

¹⁷² a) Heathcock, C. H.; Smith, S. C. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6641. b) Heathcock, C. H.; Smith, S. C. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 6828. b) Smith, S. C.; Heathcock, C. H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6379.

¹⁷³ a) Lee, J. S.; Fuchs, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13122. b) Li, W.; LaCour, T. G.; Fuchs, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4548. c) Lee, S.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 317. d) Lee, S.; Lacour, T. G.; Lantrip, D.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 313. e) Lacour, T. G.; Guo, C.; Boyd, M. R.; Fuchs, P. L. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 33. f) Lacour, T. G.; Fuchs, P. L. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4655. g) Kim, S.; Sutton, S. C.; Guo, C.; Lacour, T. G.; Fuchs, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2056. h) Lacour, T. G.; Guo, C.; Bhandaru, S.; Boyd, M. R.; Fuchs, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 692. i) Guo, C.; Bhandaru, S.; Boyd, M. R.; Fuchs, P. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10672.

¹⁷⁴ a) Yunus, U.; Iqbal, R.; Winterfeldt, E. *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, *42*, 1079. b) Haak, E.; Winterfeldt, E. *Synlett* **2004**, *8*, 1414. c) Nawasreh, M.; Winterfeldt, E. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 649. d) Flessner, T.; Ludwig, V.; Siebeneicher, H.; Winterfeldt, E. *Synthesis* **2002**, 1373. e) Bäsler, S.; Brunck, A.; Jautelat, R.; Winterfeldt, E. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 1854. f) Drögemüller, M.; Jautelat, R.; Winterfeldt, E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1572. g) Jautelat, R.; Winterfeldt, E. *J. Prakt. Chem.* **1996**, 338, 695.

¹⁷⁵ Khrupach, V. A.; Zhabinskii, V. N.; Konstantinova, O. V.; Antonchick, A. P.; Schneider, B. *Steroids* **2002**, *67*, 587.

¹⁷⁶ a) Betancor, C.; Freire, R.; Pérez-Martín, I.; Prangé, T.; Suárez, E. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 2803. b) Betancor, C.; Freire, R.; Pérez-Martín, I.; Prangé, T.; Suárez, E. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1295.

¹⁷⁷ a) Tietze, L.; Krahnert, W. R. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2116. b) Tietze, L.; Krahnert, W. F. *Synlett* **2001**, 560.

Estudio de las relaciones estructura-actividad en las cefalostatinas y las riteracinas

En los últimos años¹⁷⁸ se han realizado numerosos estudios sobre los mecanismos de reacción y evaluación de las relaciones estructura-actividad de las cefalostatinas y las riteracinas, deduciéndose las siguientes conclusiones:

- El factor estructural determinante es la presencia o ausencia de simetría en la molécula. Si el dímero tiene un plano de simetría C_2 supone reducir hasta 100 veces su citotoxicidad.¹⁷⁹
- En las cefalostatinas la zona norte es la más oxigenada y la principal responsable de la actividad citotóxica de la molécula.¹⁸⁰
- Fuchs y col.¹⁸¹ realizaron estudios en la zona sur de las cefalostatinas de los que se concluyó que el Δ^{14} no influye en que este tipo de estructuras presenten mayor o menor actividad citotóxica.
- Las riteracinas son menos activas *in vitro* que las cefalostatinas, pero en los ensayos *in vivo* han mostrado resultados similares.

¹⁷⁸ a) Moser, B. R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 487. b) Rudy, A.; López-Antón, N.; Dirsch, V. M.; Vollmar, A. *M. J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 482. c) Shawakfeh, K. Q.; Al-Said, N. H.; Al-Zoubi, R. M. *Steroids* **2008**, *73*, 579. d) Phillips, S. T.; Shair, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6589. d) Taber, D. F.; Taluskie, K. V. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2797

¹⁷⁹ Drögemüller, M.; Jautelat, R.; Winterfeldt, E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1572.

¹⁸⁰ Urban, S.; Hickford, S. J. H.; Blunt, J. W.; Munro, M. H. G. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4*, 765.

¹⁸¹ Boyd, M. R.; Paull, K. D. *Drug Dev. Res.* **1995**, *34*, 91.

1.2. Hipuristanoles de origen natural

El equipo de investigación de Productos Naturales Marinos de la Universidad de A Coruña del área de Química Orgánica, en su búsqueda de nuevos esteroides bioactivos¹⁸² a partir de organismos marinos logró aislar de los extractos de MeOH de la gorgonia *Isis hippuris*, recolectada a lo largo de la costa de Sulawesi (Indonesia), una serie de esteroides polioxigenados. En función de las estructuras de sus cadenas laterales, se dividieron en cuatro grupos: ocho que presentaban un espirocetal formado por dos anillos de 5 carbonos cada uno (Fig. 30); tres que tenían un anillo ortoéster, seis que poseían un grupo epóxido y los dos restantes, que mostraron una cadena lateral acíclica.¹⁸³ Del estudio citotóxico frente a un panel de cuatro células tumorales (P-388, MEL-28, A-549 y HT-29) al que fueron sometidos se observó que los más citotóxicos eran aquellos que tenían un espirocetal o un epóxido en su cadena lateral.

De todos ellos, el 22-*epi*-hipuristanol (**98**) resultó ser el más activo ($IC_{50} = 0.1 \mu\text{g/mL}$) frente a las cuatro líneas tumorales y además de mayoritario, lográndose obtener 133 mg a partir de 1 Kg de la gorgonia.

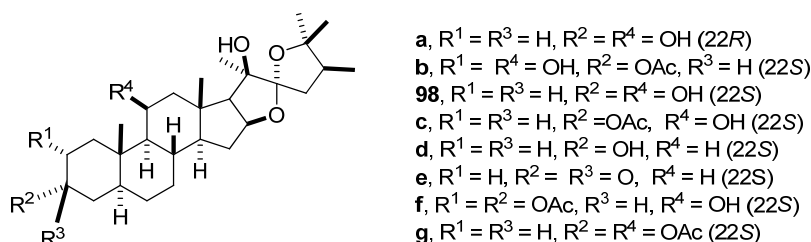


Figura 30. Esteroides espirocetálicos aislados de la gorgonia *Isis hippuris*.

¹⁸² García, M.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 257.

¹⁸³ González, N.; Barral, M. A.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3487.

2. Objetivos

Teniendo en cuenta estos antecedentes y dada la similitud estructural del esteroide citotóxico *22-epi*-hipuristanol con los monómeros esteroidales de las cefalostatinas se plantearon como objetivos de este capítulo la síntesis de un bis-esteroide asimétrico pirazínico **108** (Fig 31) y de diferentes análogos del *22-epi*-hipuristanol con los que se pretende evaluar:

- La actividad citotóxica del bis-esteroide pirazínico **108**, en relación con la del esteroide espiroacetálico natural.
- La influencia en la actividad citotóxica de las nuevas funcionalidades introducidas en el *22-epi*-hipuristanol natural.

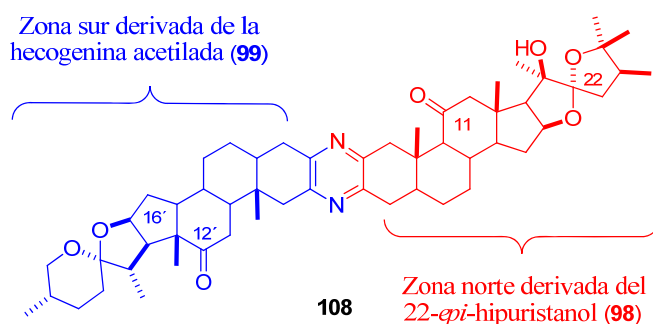
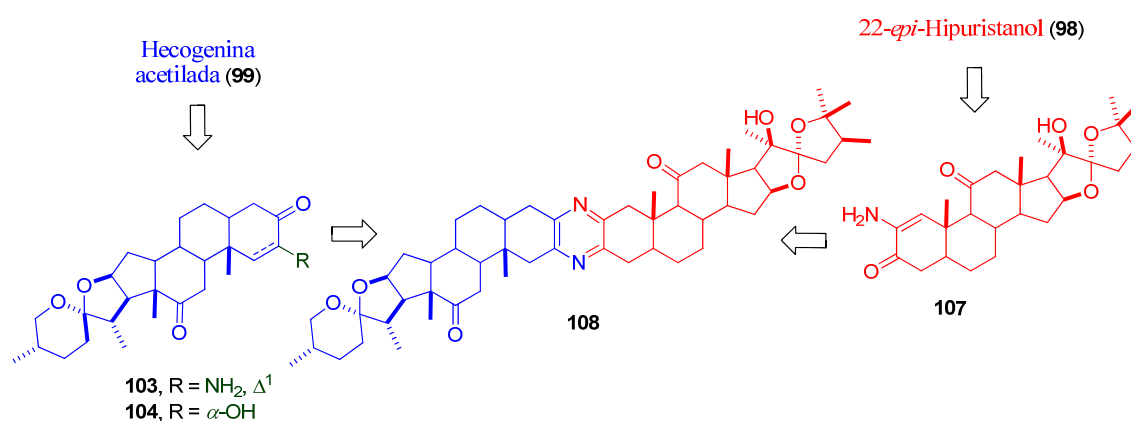


Figura 31. La trisdecacyclo bis-esteroide pirazina **108**.

3. Síntesis de análogos de las cefalostatinas

3.1 Síntesis de la bis-hecogenina/22-*epi*-hipuristan-11-ona pirazina

En el análisis retrosintético diseñado para el compuesto **108** (esquema 48), se planteó aplicar *las rutas simétrica y no-simétrica de Winterfeldt*, descritas anteriormente. A partir del 22-*epi*-hipuristanol **98** se prepararía la enaminocetona **107** y a partir de la hecogenina acetilada (**99**) se obtendría la enaminocetona **103** y la α -hidroxicetona **104**. A continuación, la dimerización a través de una reducción regioselectiva entre las enaminocetonas **103** y **107**, y la condensación regioselectiva de la enaminocetona **107** con la α -hidroxicetona **104** daría lugar el bis-esteroide **108** en ambos casos, y la bis-hecogenina pirazina **109**, como subproducto de reacción en el primero de los casos.



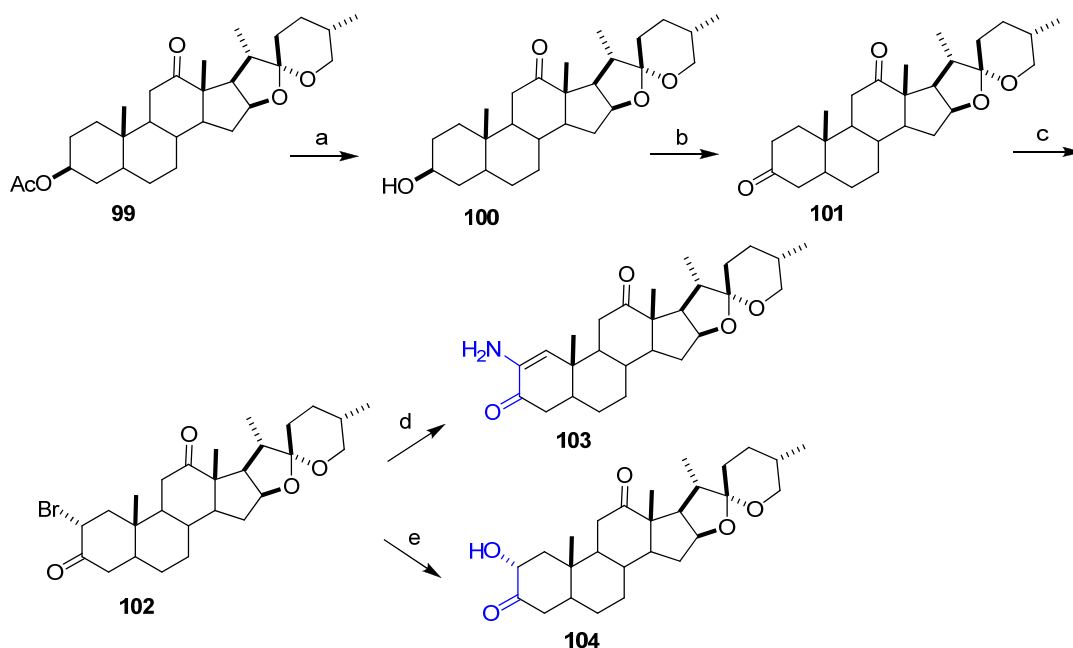
Esquema 48. Análisis retrosintético del bis-esteroide pirazínico **108**.

La ruta simétrica del bis-esteroide **108** comenzó con la síntesis de la zona sur (esquema 49), con la preparación de **103** siguiendo un procedimiento similar al empleado en la bibliografía.¹⁵⁷ La desacetilación del hidroxilo de la posición C-3 de la hecogenina acetilada, utilizando una disolución de hidróxido potásico, fue seguida por la oxidación del alcohol resultante. Con el propósito de evaluar que método de oxidación ofrecía un mejor rendimiento, para aplicarlo posteriormente al producto natural **98**, se probaron varios oxidantes como el PDC en DMF (99%), el PCC en DMF (79%), el reactivo de Dess-Martin en CH₂Cl₂ (75%), el reactivo de Jones en Ac₂O (72%) ó el CrO₃ en THF (65%), encontrándose que era el PDC el que originaba un mayor rendimiento.

El siguiente paso de la secuencia sintética fue la introducción quimio, regio, y estereoselectiva de un átomo de bromo en disposición α en la posición C-2 del anillo A, utilizando PTAP para obtener la 2 α -bromo-3,12-dicetona **102**. El tratamiento de **102** con NaN₃ en DMF dio la enaminocetona **103**.

Para llevar a cabo la ruta no-simétrica se sintetizó la α -hidroxicetona **104** que se obtuvo a partir de una reacción de sustitución nucleófila sobre la 2 α -bromo-3,12-dicetona **102** con K₂CO₃ en H₂O:MeOH (1:1). La obtención estereoselectiva de la α -hidroxicetona **104**, se confirmó por RMN de ¹H a través de la desaparición del doble doblete a 4.70 ppm y la aparición a 4.28 ppm del doble doblete ($J = 12.0, 7.0$ Hz)

correspondiente a la señal del protón H-2 β .¹⁵⁵ Así mismo, el RMN de ¹³C mostró la aparición de un carbono terciario a 72.5 ppm correspondiente a C-2.

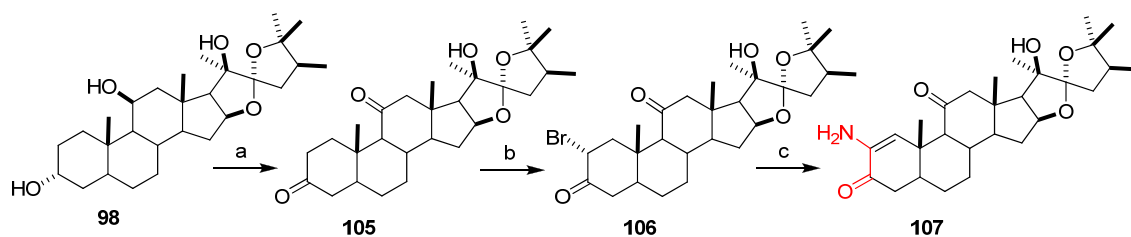


Esquema 49. *Reactivos y condiciones:* (a) 5% KOH, MeOH (99%); (b) PDC, DMF (99%); (c) PTAP, THF, 0°C (90%); (d) NaI, NaN₃, DMF, 50°C (90%); (e) K₂CO₃, H₂O:MeOH (1:1), 45°C (78%).

Por otra parte, la síntesis de la zona norte (esquema 50) comenzó con la oxidación del 22-*epi*-hipuristanol con PDC para dar la dicetona **105** en un 95% de rendimiento. La obtención de **105** se confirmó por RMN de ¹H, observándose la desaparición de las señales a 4.32 ppm y 4.05 ppm correspondientes a los protones H-11 α y H-3 β , respectivamente, y por RMN de ¹³C, con la aparición de dos carbonos carbonílicos a 211.4 ppm y 210.4 ppm.

La introducción quimio, regio, y estereoselectiva de un átomo de bromo en disposición α en la posición C-2 del anillo A de **105** se realizó de nuevo con PTAP, obteniéndose la 2 α -bromo-3,11-dicetona **106**, con un rendimiento del 81%. La introducción del átomo de bromo se confirmó por RMN de ¹H con la aparición a 4.78 ppm de un doble doblete ($J = 13.2, 6.4$ Hz), que correspondía al protón H-2 β y por espectrometría de masas.

El tratamiento de la 2 α -bromo-3,11-dicetona **106**, con NaN₃ y una cantidad catalítica de NaI en DMF, dio lugar a la formación de la enaminocetona **107** en un 85% de rendimiento, que se confirmó por RMN de ¹H al aparecer un singulete a 6.57 ppm correspondiente a la señal de protón H-1.



Esquema 50. *Reactivos y condiciones:* (a) PDC, DMF (95%); (b) PTAP, THF, 0°C (81%); (c) NaI, NaN₃, DMF, 50°C (85%).

La dimerización (esquema 51) de las enaminocetonas **103** y **107**, siguiendo la ruta simétrica, se realizó mediante una hidrogenación en medio ligeramente ácido para dar el bis-esteroide **108** y los subproductos de autocondensación de las respectivas enaminocetonas de partida. La separación por HPLC en fase normal de la mezcla de reacción permitió aislar el dímero **108** y el bis-esteroide **109**, producto de la autocodensación de la enamina **103** (esquema 52), cuyos datos espectroscópicos coincidieron con los descritos en la bibliografía.¹⁵⁴

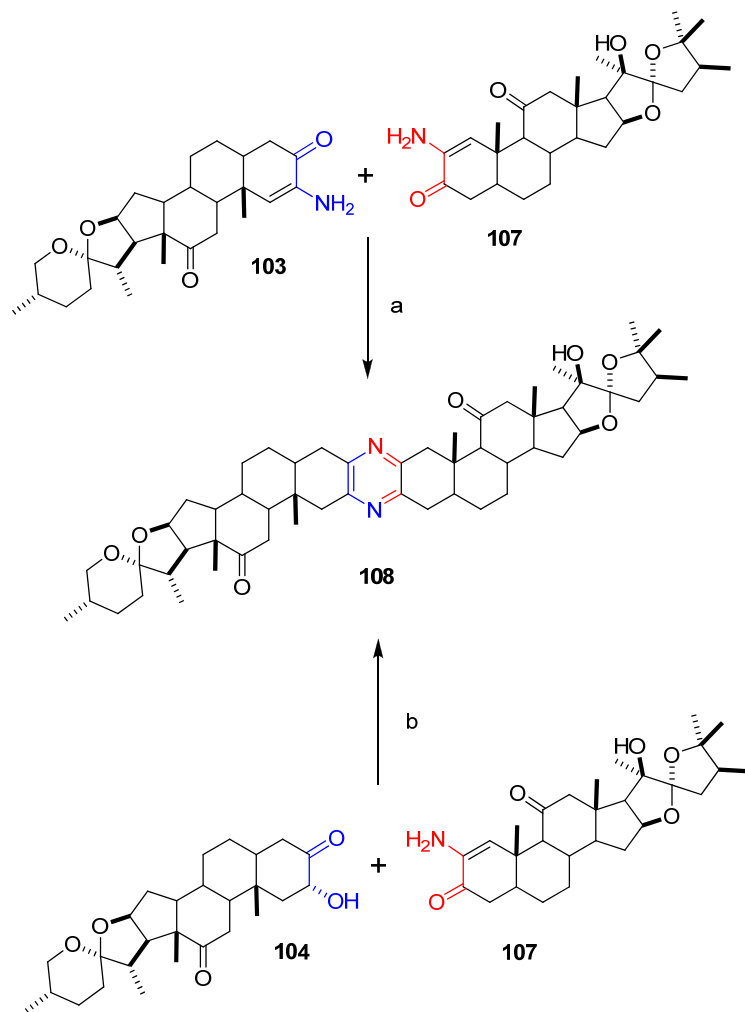
Después de cuatro pasos sintéticos se obtuvo el dímero **108** con un rendimiento global del 20%.

La estructura del análogo de la cefalostatina **108** se confirmó utilizando técnicas de 1D-RMN: ¹H, ¹³C y DEPT-135; y de experimentos 2D-RMN: ¹H-¹H COSY; HSQC y HMBC y espectrometría de masas de alta resolución HREIMS (70eV, *m/z* %): 878.5771 [*M*⁺] (calcd. para C₅₅H₇₈N₂O₇, 878.5804).

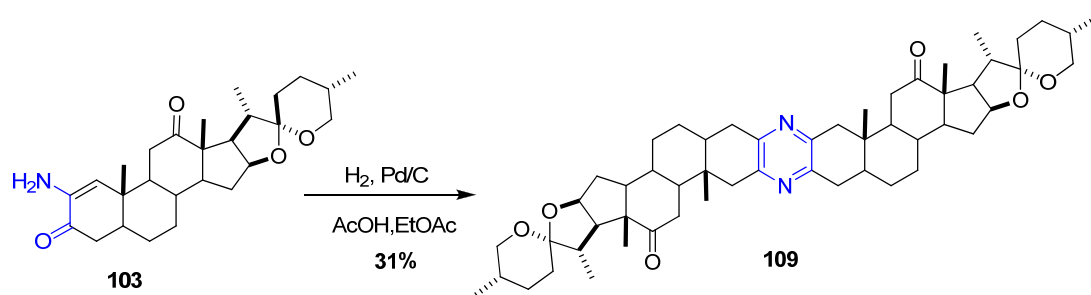
En el RMN de ¹H se observó la desaparición de dos singuletes a 6.57 ppm y 5.87 ppm correspondientes a los protones H-1 de las enaminocetonas **103** y **107**, también se observó la presencia de los protones H-16 α , H-16' α , H-26b' y H-26a' correspondientes a las señales a 4.54 ppm, 4.40 ppm, 3.54 ppm y 3.40 ppm, respectivamente. Así mismo, el RMN de ¹³C mostró la aparición de las señales a 213.0 ppm y 204.5 que indicaban la presencia de dos grupos ceto en las posiciones C-12' y C-11 respectivamente; las señales a 148.5 ppm y 148.3 ppm, que se asignaron a los carbonos C-2, C-2', C-3 y C-3' e indicaban la formación de la pirazina, y las señales a 117.2 ppm y 109.4 ppm, correspondientes a los carbonos C-22 y C-22' que mostraban la presencia de dos espirocetales.

De forma paralela se empleó la ruta no-simétrica en la obtención de la pirazina **108**. En este caso, la condensación se llevó a cabo utilizando la enaminocetona **107** y la α -hidroxicetona **104**, con NH₄OAc en MeOH obteniéndose regioselectivamente sin subproductos de autocondensación, la pirazina **108**.

Mediante esta ruta se obtuvo el compuesto **108** en cuatro etapas con un rendimiento global del 30%.



Esquema 51. Reactivos y condiciones: (a) H_2 , EtOAc, MeOH, AcOH, Pd/C (5%) (25%); (b) NH_4OAc , MeOH, CH_2Cl_2 , $50^\circ C$ (30%).



Esquema 52. Autocondensación de la enaminocetona 103 para dar el bis-esteroide 109.

4 Análisis farmacológicos y relaciones estructura-actividad

Los análisis farmacológicos de citotoxicidad (GI_{50} μ M) fueron realizados en PharmaMar frente a un panel de tres células tumorales: MDA-MB-231, A-549 y HT-29 y se muestran en la Tabla 15.

Como se puede observar en la Tabla 15, aunque el nuevo bis-esteroide pirazínico **108** resultó ser más activo que el 22-*epi*-hipuristanol no alcanzó la elevada actividad citotóxica presente en las cefalostatinas.

Por otra parte los compuestos **105**, **106** y **107**, resultaron ser inactivos frente al panel celular a los que se enfrentaron.

Tabla 15. Actividad citotóxica (GI_{50} en μ M) del nuevo bis-esteroide pirazínico y de los esteroides derivados del 22-*epi*-hipuristanol

Compuesto	MDA-MB-231	A-549	HT-29
98	5.6	3.2	4.5
105	-	-	-
106	-	-	-
107	-	-	-
108	2.0	1.6	1.6
109	2.6	1.7	2.1

5. Conclusiones

- Teniendo en cuenta la similitud estructural del 22-*epi*-hipuristanol, esteroide mayoritario de la gorgonia *Isis hippuris*, con los monomeros esteroidales de las cefalostatinas y riteracinas se diseñó la síntesis de un nuevo análogo de este tipo de compuestos.
- Para realizar la síntesis del bis-esteroide pirazínico **108**, se empleó el 22-*epi*-hipuristanol natural citotóxico para la zona norte y la hecogenina acetilada para obtener la zona sur del dímero, utilizando las rutas simétrica y no simétrica de Winterfeldt.
- La evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados frente a un panel de tres células tumorales MDA-MB-231, A-549 y HT-29, mostró que el bis-esteroide asimétrico **108** resultó ser más activo que el 22-*epi*-hipuristanol natural, pero no alcanzó la elevada actividad citotóxica de las cefalostatinas, mientras que los nuevos análogos del 22-*epi*-hipuristanol natural (**105**, **106** y **107**) resultaron ser inactivos.

5

Parte Experimental

Metodología General

Las reacciones en disolventes apróticos se realizaron bajo atmósfera de argón desoxigenado seco (Argon C-50) con agitación magnética y a temperatura ambiente, salvo que se indique lo contrario.

Las reacciones a baja temperatura se realizaron empleando baños de hielo/agua para alcanzar 0°C, o baños de N₂ líquido con un disolvente apropiado, o empleando una sonda de refrigeración Cryocool-Immersion Cooler CC-100 II de Neslab, para alcanzar temperaturas más bajas (-78°C).

Las reacciones de hidrogenación se realizaron empleando disolventes apróticos bajo atmósfera de hidrógeno (H₂ Premier X50S) con agitación magnética a temperatura ambiente y una leve presión de hidrógeno. La hidrogenación a presión se realizó en las instalaciones de la Facultad de Químicas de la Universidad de Santiago de Compostela.

Los disolventes utilizados se purificaron y secaron según los procedimientos descritos,¹⁸⁴ y se destilaron inmediatamente antes de su uso por calentamiento a reflujo en atmósfera de argón sobre un agente desecante adecuado. Los agentes desecantes utilizados fueron: Na/benzofenona para THF, Et₂O, y 1,4-dioxano; CaH₂ para CH₂Cl₂, CHCl₃, EtOAc, CH₃CN, benceno, y tolueno; Mg/I₂ para MeOH y EtOH; KOH para piridina y K₂CO₃ para acetona. La DMF y el DMSO se guardaron sobre tamices moleculares Sieves 4Å, y se desoxigenaron usando una atmósfera de argón, antes de su uso.

El material de vidrio empleado en las operaciones que exigieron condiciones anhidras se secó por calentamiento a 120°C durante 12 h. Adicionalmente, los matraces de reacción se secaron y a continuación, se enfriaron bajo corriente de argón seco. Las transferencias de los disolventes anhidros se efectuaron utilizando jeringas o cánulas que se secaron previamente y que se guardaron en un desecador con KOH.

Salvo indicación contraria, los demás reactivos y disolventes son comerciales y se utilizaron sin purificar.

La cromatografía en columna se realizó en columna de vidrio, según las indicaciones de Still,¹⁸⁵ utilizando como fase estacionaria gel de sílice Merck 60 (230–400 mesh) con disolventes previamente destilados. Para la cromatografía en capa fina (ccf) se utilizó gel de sílice Merck 60 F₂₅₄, las manchas se visualizaron bajo luz UV (254 nm) o por revelado al calor tras la inmersión de la capa fina en una disolución de ácido fosfomolibdico [6.05 g de H₃Mo₁₂O₄₀P.H₂O en MeOH (100 mL, 95%)] , de *p*-anisaldehído [(4.2 mL) en AcOH (3.75 mL, conc.), EtOH (338 mL, 95%) y H₂SO₄ (12.5 mL, conc.)], de molibdato cérico amónico o de ninhidrina.¹⁸⁶

¹⁸⁴ Perrin, D.D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, Ed. Pergamon Press. Oxford:1988.

¹⁸⁵ Still, W. C.; Hahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923.

¹⁸⁶ Harwood, L. M.; Moody, C. J.; Percy, J. M. *Experimental Organic Chemistry*, Ed. Blackwell Science, Oxford: 1999.

Las separaciones mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) se realizaron empleando los siguientes equipos:

- Cromatógrafo Waters de HPLC, modelo 510 equipado con un detector de índice de refracción modelo 410.
- Cromatógrafo Hewlett Packard serie 1100 con un detector de índice de refracción modelo HP 1047A.

Las columnas de HPLC utilizadas fueron las siguientes:

- Columna Sharlau Nucleosil C-18 B25Y78 (300 mm x 8 mm) y Whatman 100 Partisil 100DS-3 para fase reversa.
- Columna Sharlau Nucleosil B25Y61 (300 mm x 8 mm) para la fase normal.

Las fases móviles se filtraron y se desoxigenaron previamente mediante corriente de argón y los disolventes empleados eran de calidad HPLC de Merck y Panreac.

Los productos finales de las síntesis se purificaron por cromatografía HPLC en fase normal o reversa, salvo indicación contraria, para su posterior envío a ensayos farmacológicos.

Los ensayos de citotoxicidad de los compuestos descritos en los capítulos 1, 2, 3 y 4 fueron realizados por la empresa PharmaMar frente a un panel de tres líneas celulares tumorales: MDA-MB-231 (carcinoma de pecho), A-549 (carcinoma de pulmón humano) y HT-29 (carcinoma de colon humano). Adicionalmente, se realizaron en la empresa BIOMAR otros análisis citotóxicos de los análogos descritos en el capítulo 1 frente a un panel de cuatro células tumorales: A-549 (carcinoma de pulmón humano), HCT-116 (adenocarcinoma de colon humano), PSN1 (adenocarcinoma de páncreas humano) y T98G (glioblastoma humano).

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro digital JASCO DIP-1000, con lámpara y filtro de sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$), con una celda de 100 mm y realizando integrales de 20 segundos en 3 ciclos con un intervalo de 30 segundos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizaron en los *Servicios de Apoyo á Investigación* de la Universidade da Coruña (SAI) y se registraron en los espectrómetros Bruker AC200F (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C), Bruker AC 300 F (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C), Bruker AMX 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C) equipado con una criosonda. Los disolventes deuterados utilizados fueron los siguientes: CDCl_3 (99.8%), CD_3OD (99.8%) y C_6D_6 (99.5%).

Los desplazamientos químicos fueron determinados en la escala δ en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hz. Las multiplicidades de las señales de ^{13}C fueron determinadas mediante experimentos DEPT-135.

Los experimentos *J*-HMBC se adquirieron con 16 scans con 100 ó 200 incrementos y 2K puntos en F2, y fueron transformados mediante “zero filling” en F1 (2K) y ventana sinusoidal en ambas dimensiones.

Los experimentos HETLOC se adquirieron con 32 scans con 256 incrementos usando 4K puntos en F2 y usando un tiempo de mezcla de 40-75 ms. Fueron transformados mediante doble “zero filling” en F1 (4K), y aplicación de ventana sinusoidal en ambas dimensiones.

Los espectros de masas de ionización electrónica (IE) se obtuvieron a 70 eV. Los espectros con bombardeo de átomos de cesio (FAB positivo) se realizaron en matriz de tioglicerol ó 3-NBA en un espectrómetro Fison VG-Quattro. Los espectros de masas electrospray (ESI) fueron realizados en un equipo Qstar-QqTOF Tandem Hybrid System con fuente de ESI de Applied BioSystems. Los primeros espectros de masas de alta resolución, hasta febrero de 2005, se realizaron en el *Centro de Apoyo Científico-Tecnológico* (CACTI) de la Universidad de Vigo en un espectrómetro VG Autospec M.

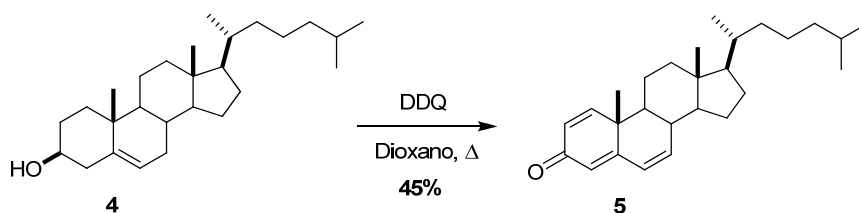
Las geometrías de los modelos computacionales fueron obtenidas empleando la teoría de funcionales de densidad (DFT). Inicialmente los modelos fueron objeto de un estudio conformacional GMMX a través del programa PCModel. En todos los casos, solo presentaban una conformación representativa, que sería preoptimizada a un nivel de cálculo AM1, y posteriormente optimizada a un nivel B3LYP/6-31G(d) utilizando el programa Gaussian 03 V.3.0. Posteriormente, los valores de constantes de acoplamiento ^1H - ^1H y ^{13}C - ^1H , y de desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C serían calculados en vacío con los funcionales GIAO-B3LYP o PW1PW91 utilizando en ambos casos el conjunto base 6-311G(d,p). Los valores de δ_{C} en los diferentes modelos se ajustaron utilizando δ_{C} del TMS al mismo nivel de cálculo. Para determinar los efectos del disolvente se empleó el método IEF-PCM (Integral Equation-Formalism Polarizable Continuum Model).

Síntesis de nuevos análogos de los 6-hidroximoesteroides

1. Síntesis de 6-hidroximoesteroides con posiciones oxigenadas en los anillos A, B y D

1.1. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-1

1.1.1. Síntesis de colest-1,4,6-trien-3-ona (5)



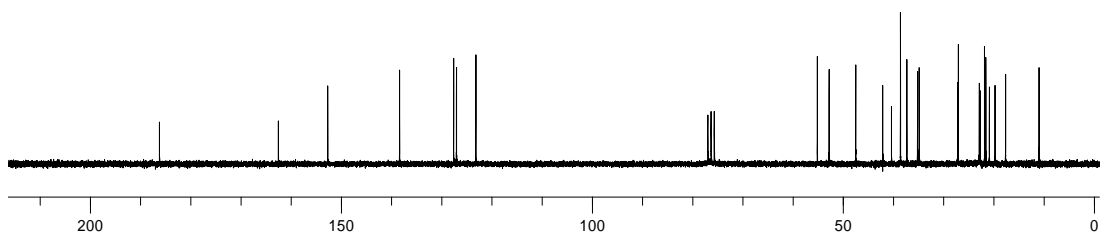
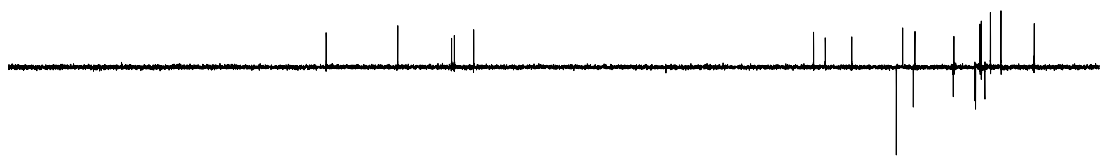
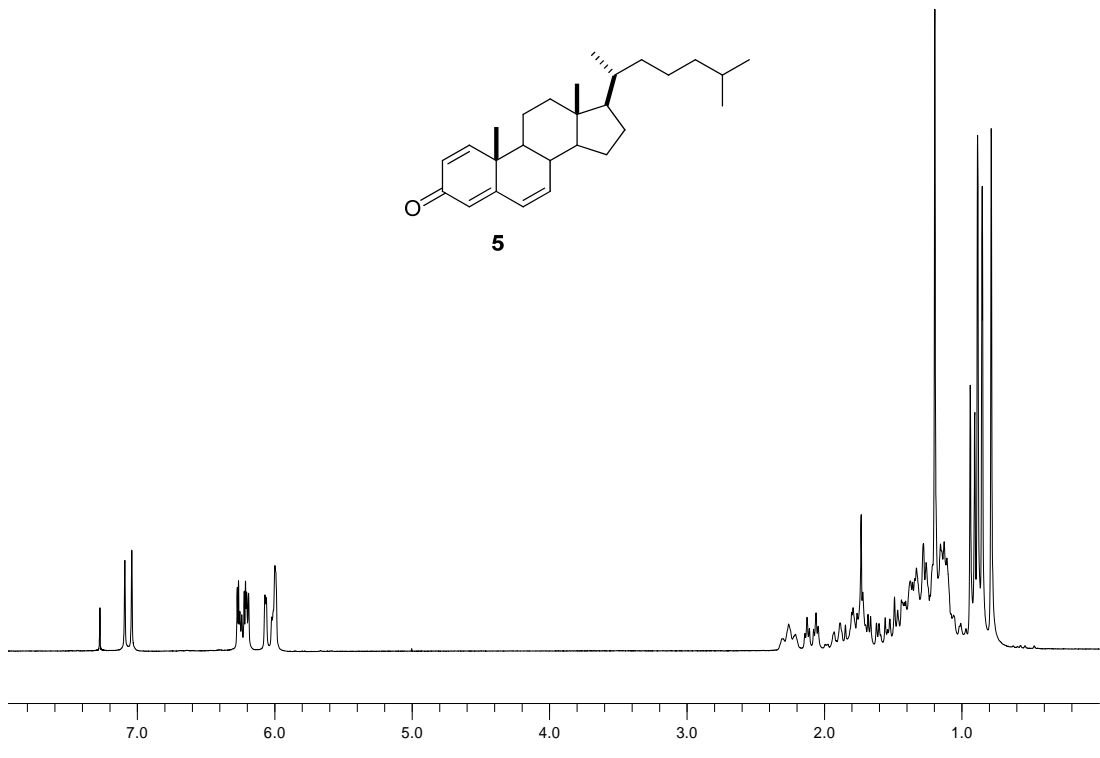
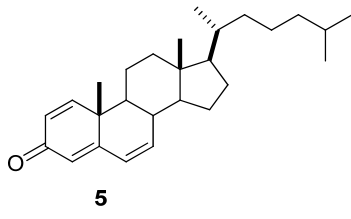
Sobre una disolución de colesterol (**4**) (5.0 g, 13.0 mmol), en dioxano seco (20 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de DDQ (12.5 g, 55.1 mmol) en dioxano (40 mL) y a continuación, se calentó a 115°C durante 5h. Se filtró el residuo sólido, se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió con Et₂O (50 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con Na₂SO₃ al 38% (30 mL), NaOH al 10% (20 mL), HCl al 5% (20 mL), agua y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogándose 2.3 g de colest-1,4,6-trien-3-ona (**5**), semisólido blanco, 45%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.05 (H1, 1H, d, *J* = 10.1 Hz); 6.3-6.0 (H2, H4, H6, H7, 4H, m); 1.01 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, *J* = 6.2 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, *J* = 7.0 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

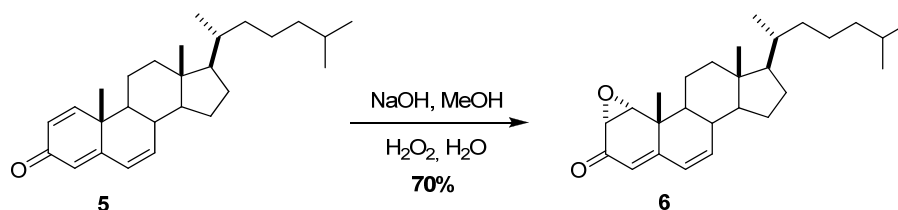
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 186.3 (C3, s); 162.8 (C5, s); 153.0 (C1, d); 138.8 (C7, d); 128.0 (C2, d); 127.5 (C6, d); 123.6 (C4, d); 55.9; 52.5; 48.3; 42.9; 41.2; 38.2; 36.9; 36.5; 36.0; 35.7; 30.2; 28.0; 27.9; 23.8; 23.6; 22.7; 21.8; 20.6; 18.6 (C19); 11.9 (C18).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 380 (M⁺, 6); 84 (100).

[α]_D = -16.9° [*c* = 1, Hex:Et₂O (1:1)].



1.1.2. Síntesis de 1 α ,2 α -epoxicolest-4,6-dien-3-ona (6)



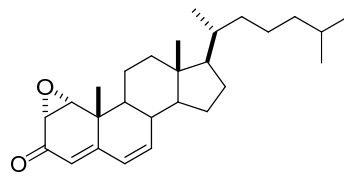
Sobre una disolución de colest-1,4,6-trien-3-ona (**5**) (3.0 g, 7.8 mmol), en MeOH (25 mL), se adicionó una disolución de NaOH/MeOH al 10% (20 mL). Tras 10 minutos se añadió, gota a gota, un disolución de H₂O₂/H₂O al 35% (12 mL). Se dejó reaccionando durante 5 h, después de las cuales se paró la reacción con agua (100 mL), con agitación 15 min. Se vertió la reacción sobre un baño de agua-hielo, se extrajo con EtOAc (2 x 35 mL) se lavó con NaCl (20 mL), NaHCO₃ (20 mL), agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogándose 2.5 g de 1 α ,2 α -epoxicolest-4,6-dien-3-ona (**6**), semisólido blanco, 70%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.08 (H6, H7, 2H, s); 5.65 (H4, 1H, dd, $J = 2.0, 0.5$ Hz); 3.59 (H1 β , 1H, d, $J = 4.0$ Hz); 3.45 (H2 β , 1H, dd, $J = 2.0, 0.5$ Hz); 1.19 (H19, 3H, s); 0.94 (H21, 3H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.78 (H18, 3H, s).

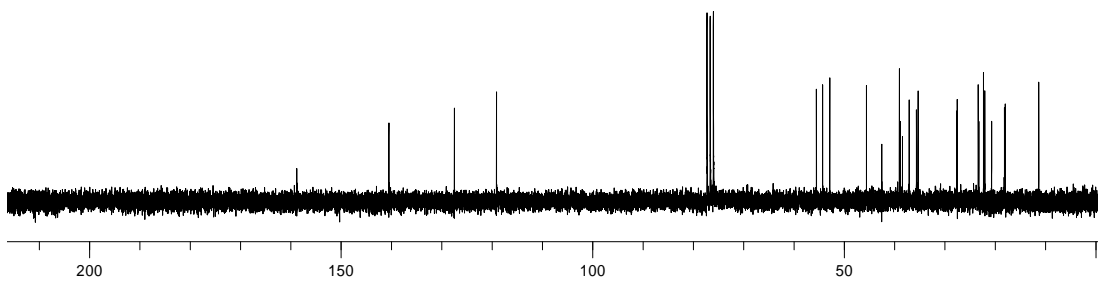
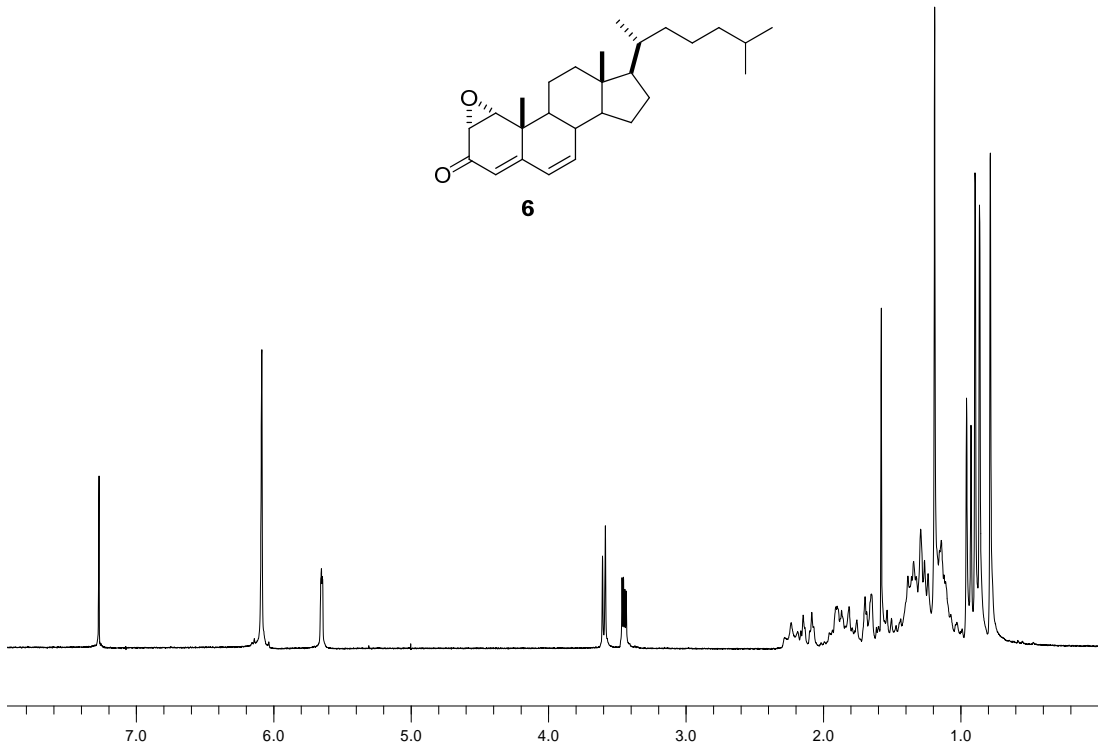
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 185.4 (C3); 158.9 (C5); 140.6 (C7); 127.6 (C6); 119.3 (C4); 59.4; 55.9; 54.6; 53.2; 45.9; 42.9; 39.4; 39.2; 38.8; 37.5; 36.0; 35.7; 28.0; 27.9; 23.8; 23.7; 22.7; 22.5; 21.1; 18.6; 18.4 (C19); 11.8 (C18).

LREIMS (70 eV, m/z %): 396 (M⁺, 5); 95 (100).

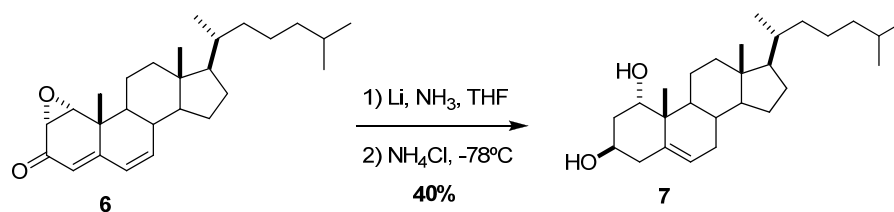
$[\alpha]_D = +182.5^\circ$ [c = 1, Hex:Et₂O (1:1)].



6



1.1.3. Síntesis de 1 α ,3 β -dihidroxicolest-5-eno (7)



Se disolvió litio (0.36 g, 8 cm, 7 equiv.) en THF seco (20 mL), que contenía un exceso de amoníaco líquido¹⁸⁷ anhidro a -78°C originando una disolución que presentó un color azul oscuro. A continuación, se adicionó, gota a gota, 1 α ,2 α -epoxicolest-4,6-dien-3-ona (**6**) (0.5 g, 1.5 mmol), disueltos en THF (5 mL) a -78°C. Tras 15 min, se realizó un aumento gradual de la temperatura desde -78°C a -40°C, durante 20 minutos. Después se eliminó el exceso de amoníaco y se adicionó durante 2 h, NH₄Cl seco, obteniéndose una disolución que presentó un aspecto blanquecino. Se extrajo con Et₂O (30mL), se lavó con NaCl (20 mL) y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)]; recogiendo 0.18 g de 1 α ,3 β -dihidroxicolest-5-eno (**7**), semisólido blanco; 40%.

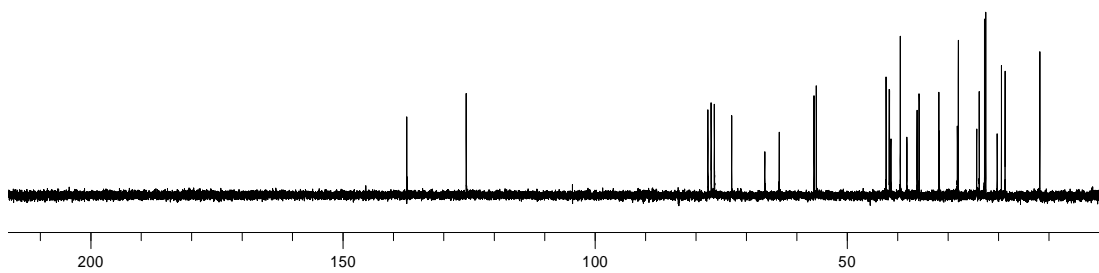
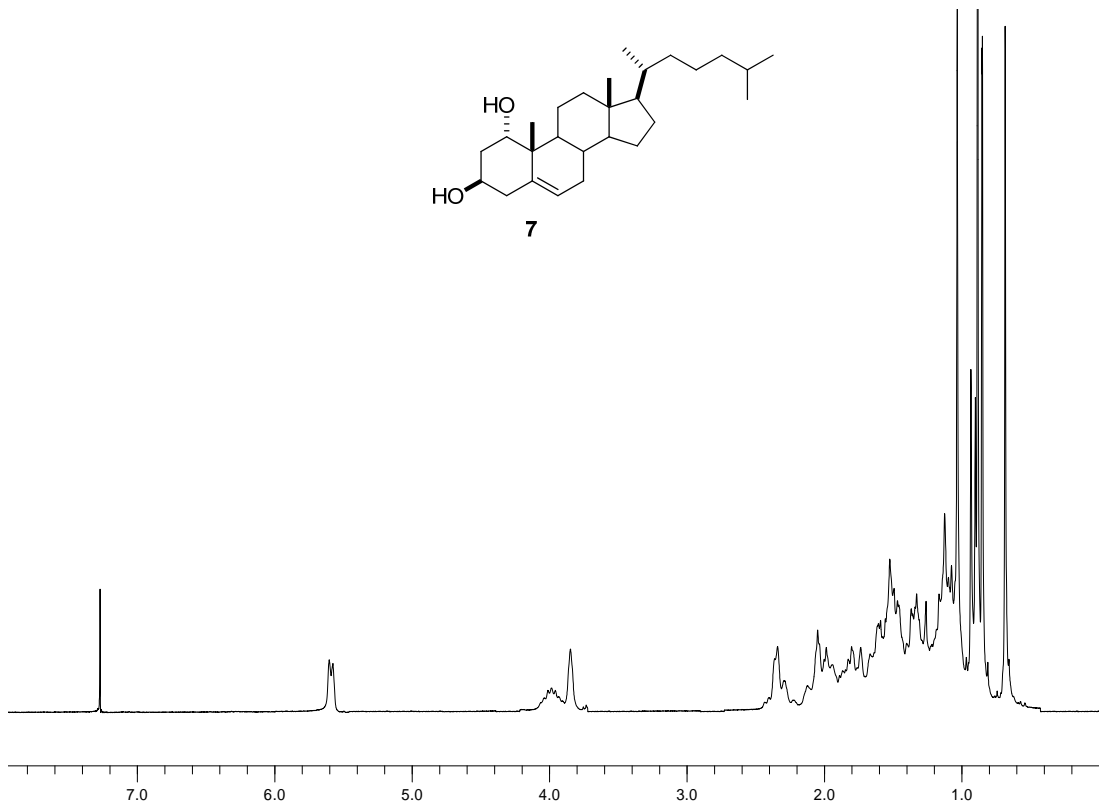
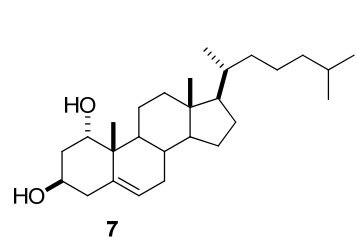
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.59 (H6, 1H, d, J = 4.5 Hz); 3.96 (H3 α , 1H, m); 3.84 (H1 β , 1H, sa); 1.03 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, J = 6.4 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 137.3 (C5, s); 125.5 (C6, d); 72.9 (C3, d); 66.3 (C1, d); 56.6; 56.1; 42.3; 41.6; 41.3; 40.2; 38.2; 37.2; 36.2; 35.7; 31.8; 31.7; 30.7; 28.2; 27.9; 24.3; 23.8; 22.7; 22.5; 20.2; 19.4; 18.7 (C19, q); 11.8 (C18, q).

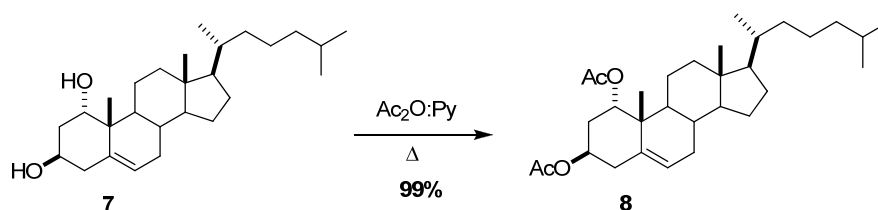
LREIMS (70 eV, m/z %): 402 (M⁺, 52); 105 (100).

[α]_D = -9.9° [c = 0.5, Hex:Et₂O (9:1)].

¹⁸⁷ En el montaje para condensar el amoníaco fue necesario el empleo de un dedo frío manteniendo una temperatura de -33°C con un baño de Acetona/N₂ líquido y un baño de MeOH/N₂ líquido para mantener la reacción a -78°C, mientras se pasaba el suficiente amoníaco para disolver el litio.



1.1.4. Síntesis de $1\alpha,3\beta$ -diacetoxicolest-5-eno (**8**)



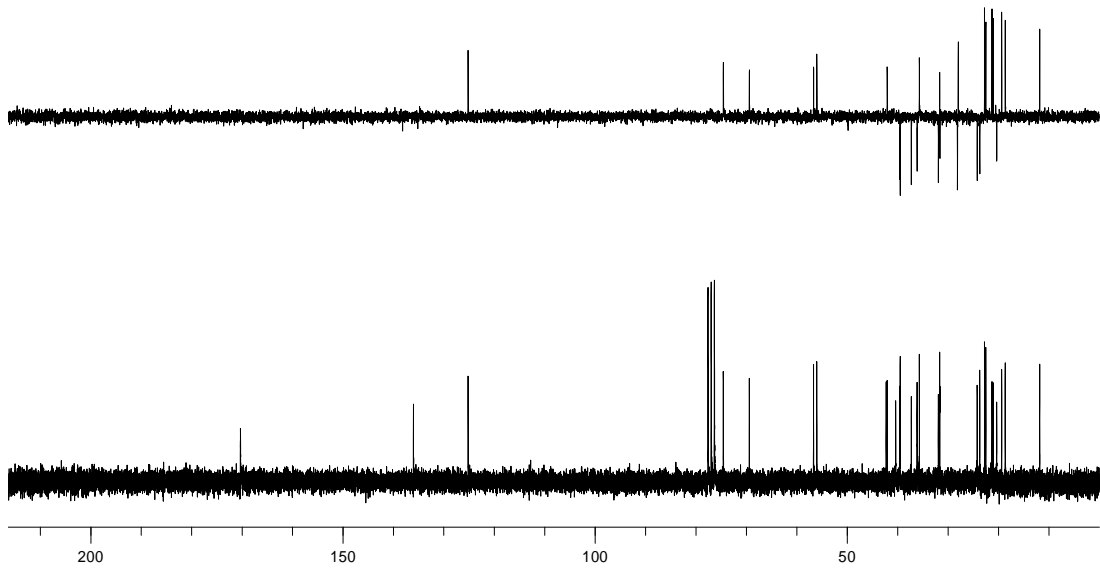
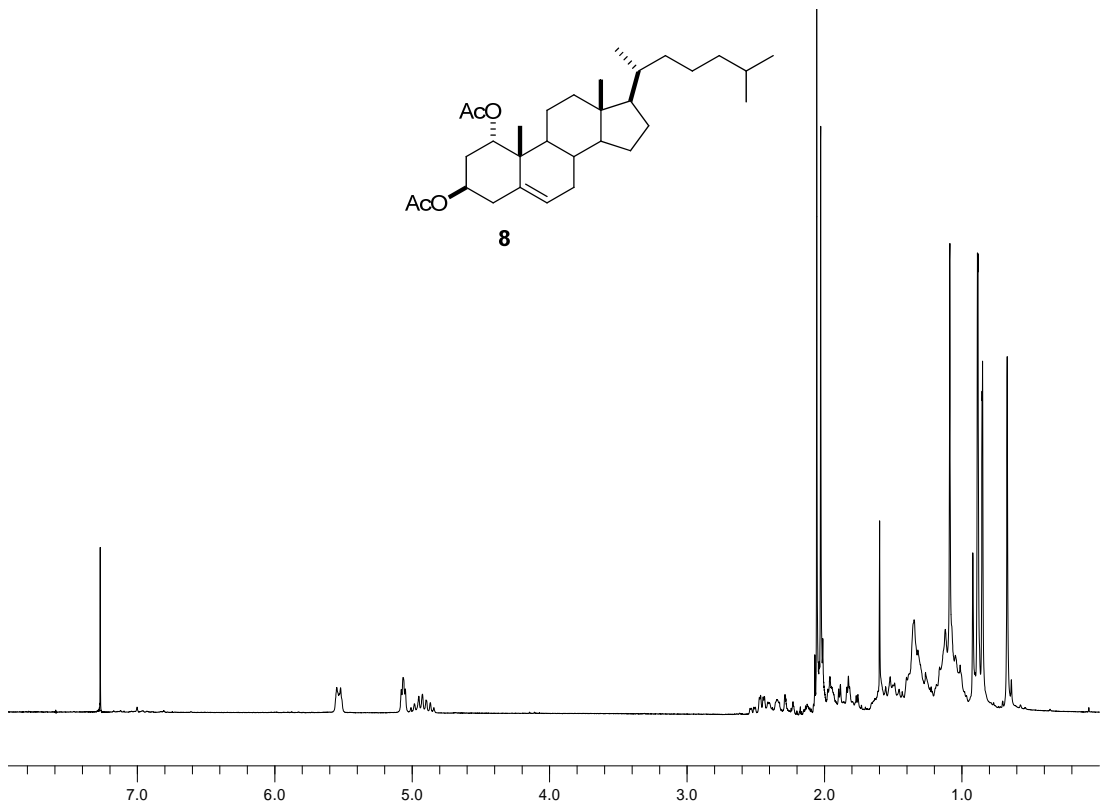
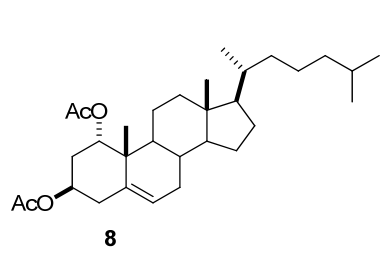
Se disolvió $1\alpha,3\beta$ -dihidroxicolest-5-eno (**7**) (1.2 g, 3.0 mmol), en una mezcla (1:1) de $\text{Ac}_2\text{O:Py}$ (20 mL) y se dejó reaccionando durante 22 h, a t.a. A continuación se calentó a 60°C durante 2 h. Se eliminó a presión reducida el disolvente y el sólido resultante se redisolvió con EtOAc (30 mL), se lavó con NaHCO_3 (25 mL), HCl al 5% (25 mL) y se secó sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogién dose 1.2 g de $1\alpha,3\beta$ -diacetoxicolest-5-eno (**8**), semisólido blanco, 99%.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.53 (H6, 1H, d, $J = 5.4$ Hz); 5.07 (H1 β , 1H, t, $J = 5.8, 2.9$ Hz); 4.92 (H3 α , 1H, m); 2.05 (OAc, 3H, s); 2.01 (OAc, 3H, s); 1.08 (H19, 3H, s); 0.90 (H21, 3H, d, $J = 6.2$ Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.67 (H18, 3H, s).

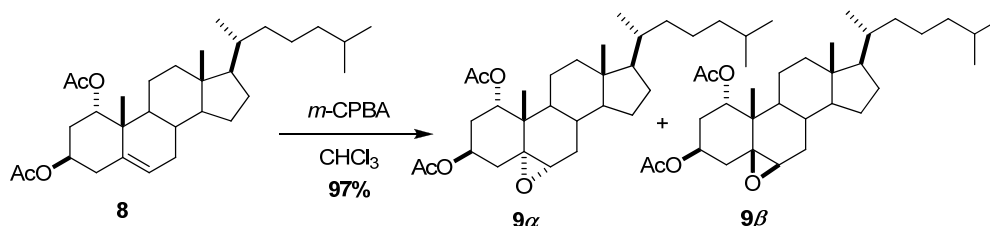
RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.4 (OAc, s); 170.3 (OAc, s); 136.0 (C5, s); 125.2 (C6, d); 74.6 (C3, d); 69.4 (C1, d); 56.6; 56.0; 42.2; 42.0; 40.4; 39.5; 38.1; 37.3; 36.1; 35.7; 31.9; 31.6; 28.1; 27.9; 25.2; 24.2; 23.2; 22.7; 22.4; 21.3; 21.0; 20.4; 19.4; 18.6 (C19, q); 11.8 (C18, q).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 486 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 7); 365 (100).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ = -150.7° [$c = 0.25, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



1.1.5. Síntesis de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**9 α**) y de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**9 β**)



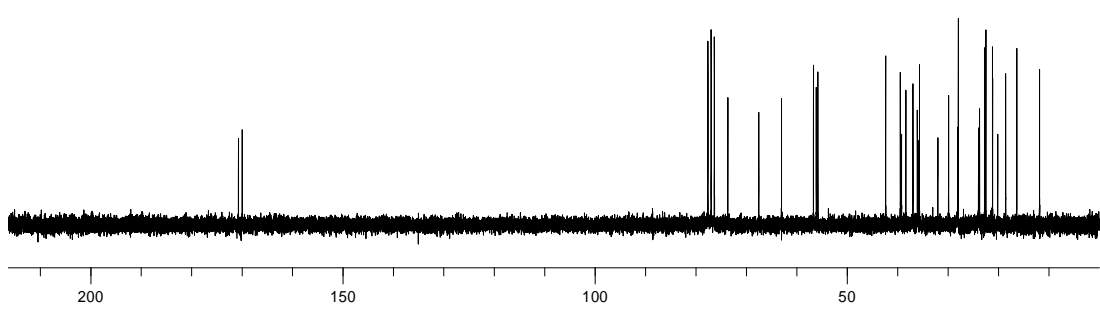
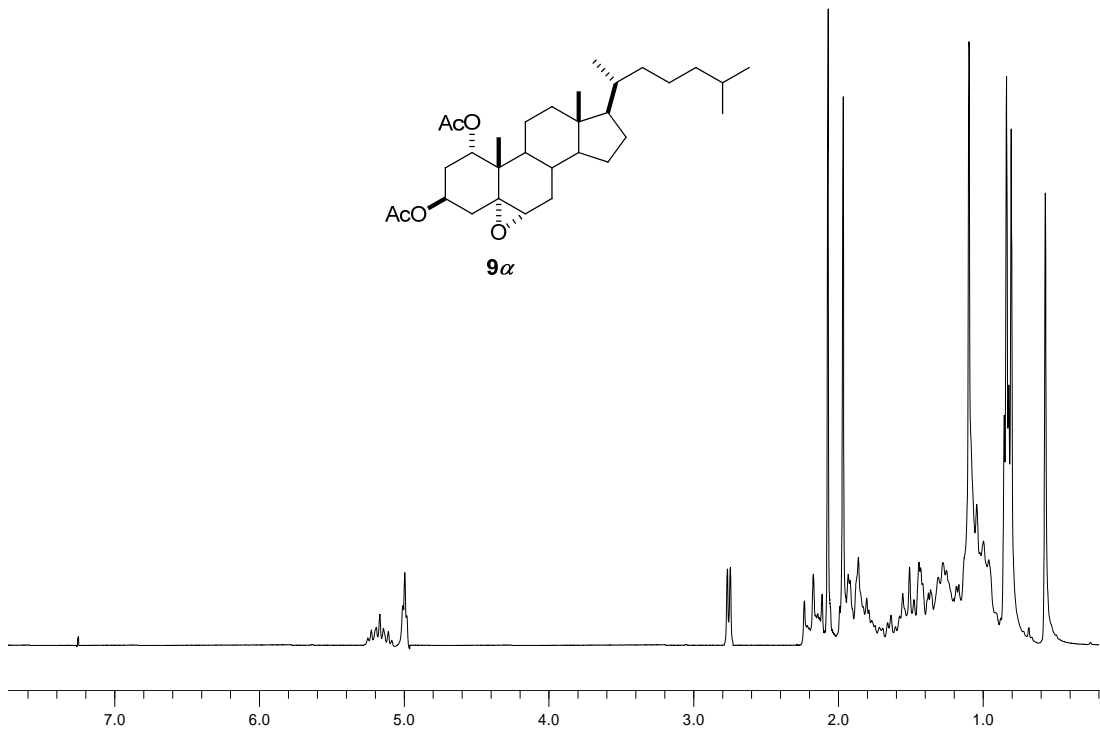
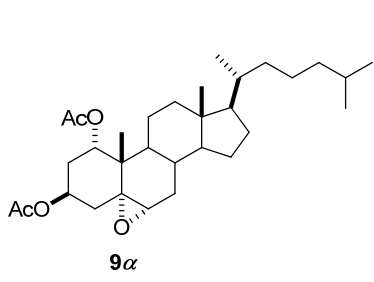
Sobre una disolución de ácido *m*-cloroperbenzoico (0.4 g, 2.0 mmol) a 0°C en CHCl_3 (20 mL), se añadió, gota a gota, 1 α ,3 β -diacetoxicolest-5-eno (**8**) (0.4 g, 0.7 mmol), disueltos en CHCl_3 (20 mL). Concluida la adición se llevó la reacción a t.a., durante 20 h., después de las cuales se vertió en una disolución de Na_2SO_3 al 5% (100 mL), a 0°C, durante 6 h. Se extrajo con CHCl_3 (2 x 25 mL), se lavó con agua (50 mL) y se secó sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 0.15 g de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**9 α**) en un 32% y 0.25 g de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**9 β**), 65%, ambos semisólidos blancos en relación (1:2), con un rendimiento global del 97%.

9 α : RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.21 (H3 α , 1H, m); 5.02 (H1 β , 1H, dt, $J = 4.0, 2.0$ Hz); 2.80 (H6 β , 1H, d, $J = 3.0$ Hz); 2.07 (OAc, 3H, s); 1.96 (OAc, 3H, s); 1.09 (H19, 3H, s); 0.84 (H21, 3H, d, $J = 3.4$ Hz); 0.80 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.57 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.7 (OAc, s); 169.9 (OAc, s); 73.6 (C3, d); 67.1 (C1, d); 63.3 (C5, s); 61.7 (C6, d); 56.3; 56.0; 42.4; 42.2; 39.6; 39.4; 38.9; 37.2; 36.5; 36.0; 35.6; 32.2; 29.0; 28.0; 27.9; 24.1; 23.6; 22.8; 22.5; 21.3; 21.2; 21.0; 18.6; 16.5 (C19, q); 11.7 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 502 (M^+ , 8); 105 (100).

$[\alpha]_D = +16.8^\circ$ [$c = 0.1, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].

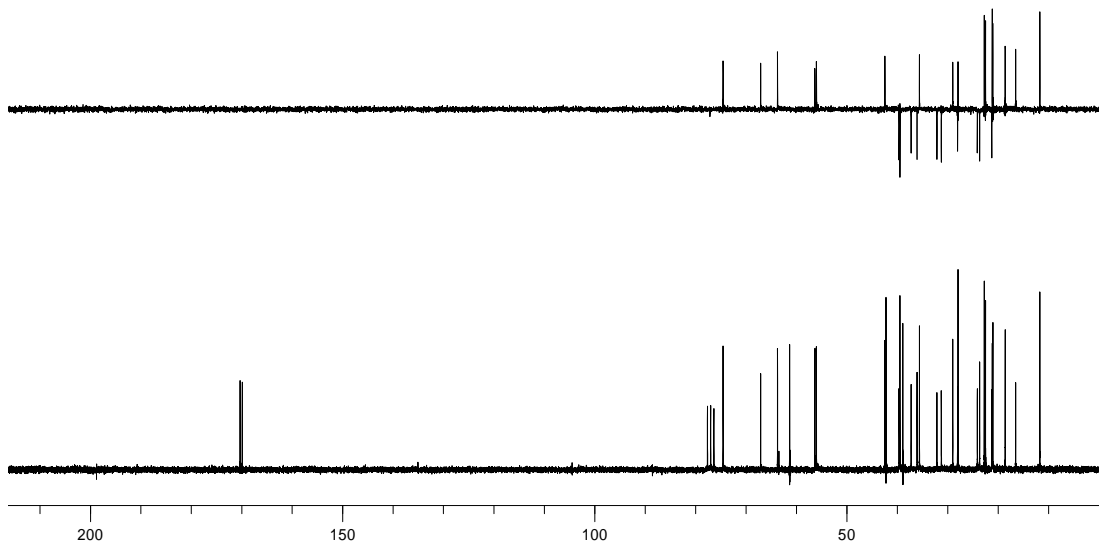
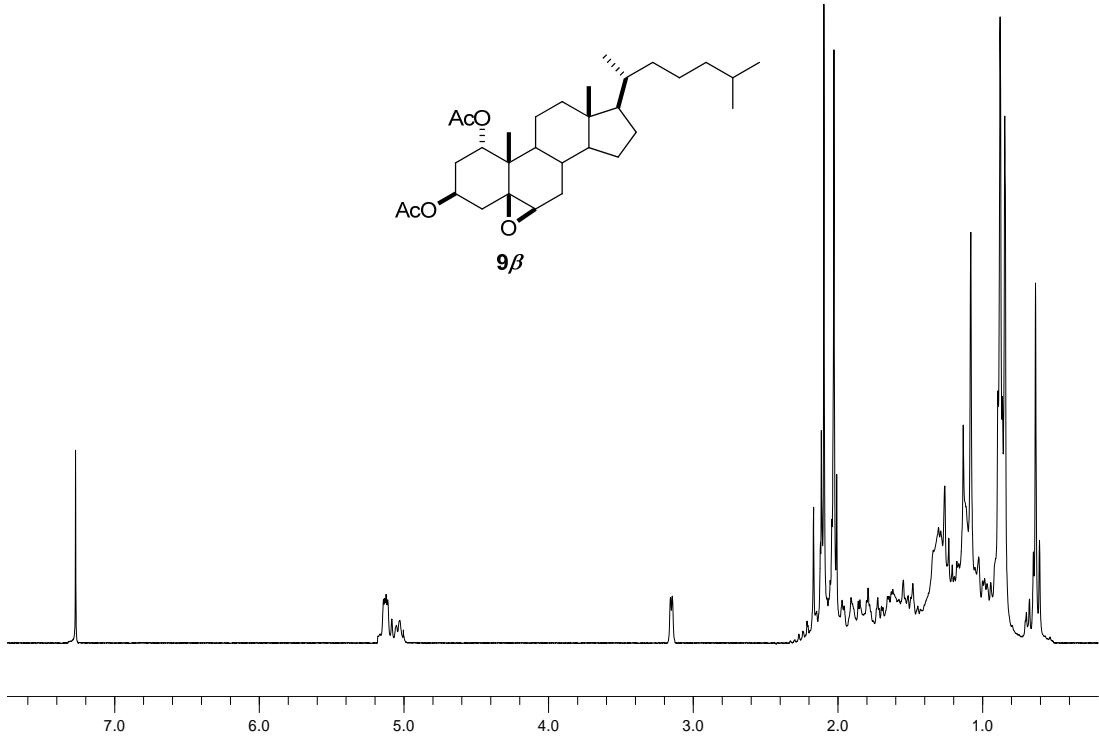
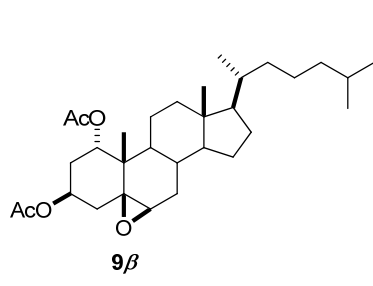


9 β : RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.12 (H1 β , 1H, dt, J = 3.9, 2.0 Hz); 5.05 (H3 α , 1H, m); 3.14 (H6 α , 1H, d, J = 1.9 Hz); 2.12 (OAc, 3H, s); 2.04 (OAc, 3H, s); 1.10 (H19, 3H, s); 0.85 (H21, 3H, d, J = 4 Hz); 0.81 (H26, H27, 6H, d, J = 5.2 Hz); 0.59 (H18, 3H, s).

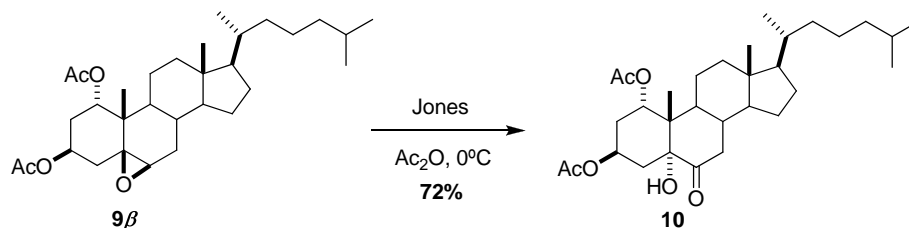
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.3 (OAc, s); 169.8 (OAc, s); 74.5 (C3, d); 67.1 (C1,d); 63.0 (C5, s); 56.3 (C6, d); 56.1; 55.5; 42.3; 42.0; 39.1; 39.0; 38.6; 37.1; 36.8; 36.8; 35.3; 32.8; 29.4; 28.2; 27.2; 24.6; 23.4; 22.8; 22.5; 21.8; 21.6; 21.3; 18.2; 16.0 (C19, q); 11.4 (C18, q).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 525 ([M + Na]⁺, 100); 503 ([M + H]⁺, 12).

$[\alpha]_D = -15.2^\circ$ [c = 0.3, CH₂Cl₂].



1.1.6. Síntesis de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 α -hidroxicolestan-6-ona (10)



Sobre una disolución de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**9 β**) (0.25 g, 0.5 mmol) a 0°C en Ac_2O (12 mL), se adicionó, gota a gota, el reactivo de Jones¹⁸⁸ (2.5 mL) preparado *in situ*, dejándolo reaccionar 6 h, a 0°C . Se paró la reacción con MeOH (6 mL). Se extrajo con Et_2O (2 x 20 mL), se lavó con NaHCO_3 (2 x 20 mL), NaCl (15 mL) y se secó sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogándose 0.18 g de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 α -hidroxicolestan-6-ona (**10**), semisólido blanco, 72%.

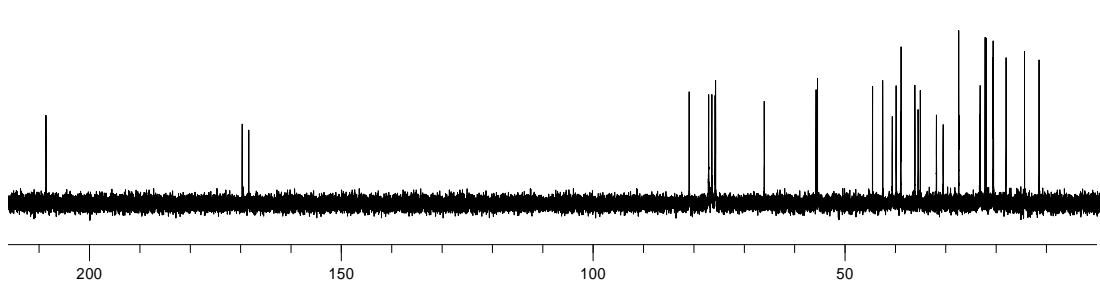
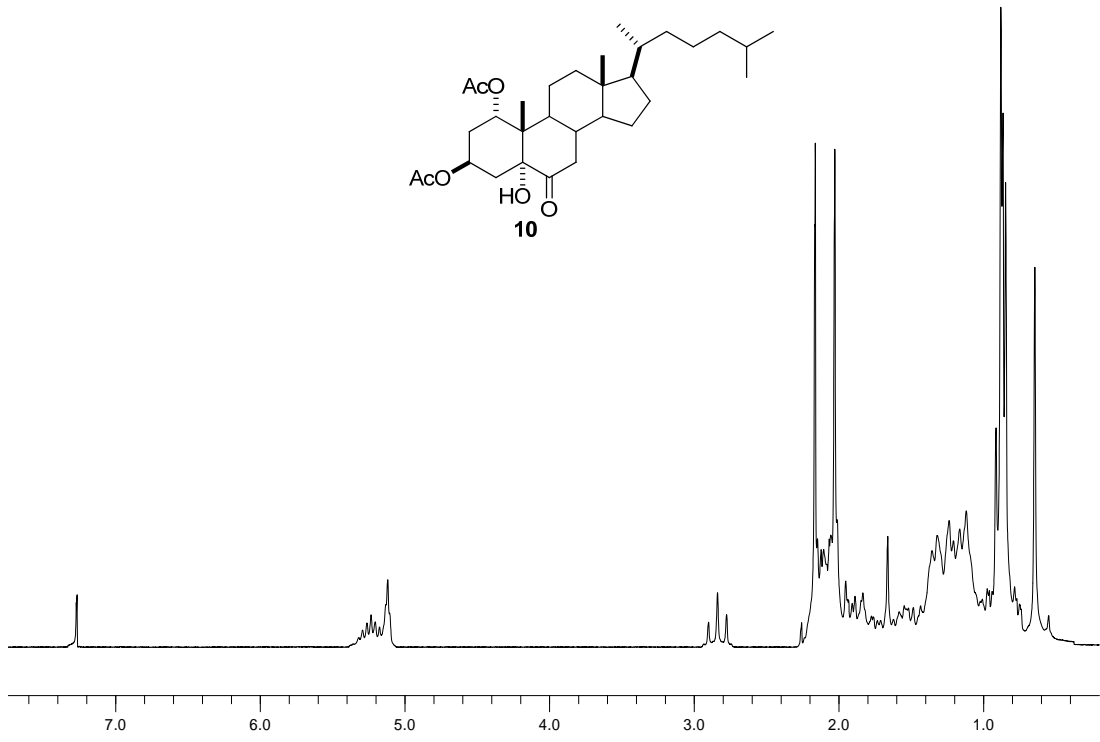
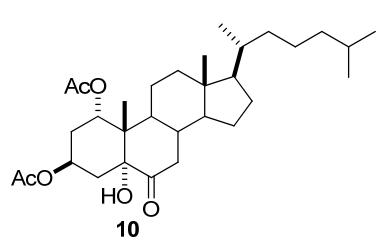
RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.24 (H3 α , 1H, m); 5.12 (H1 β , 1H, t, $J = 2.1$ Hz, 0.5 Hz); 2.83 (H7 β , 1H, t, $J = 12.5, 12.2$ Hz); 2.16 (OAc, 3H, s); 2.03 (OAc, 3H, s); 0.93 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, $J = 5.8$ Hz); 0.64 (H18, 3H, s).

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 209.2 (C6, s); 170.2 (OAc, s); 168.9 (OAc, s); 81.5 (C5, s); 76.2 (C3, d); 66.6 (C1,d); 63.0; 56.6; 56.1; 55.8; 42.4; 39.4; 39.2; 38.3; 36.9; 36.0; 35.8; 35.6; 32.0; 29.8; 28.0; 27.9; 23.9; 23.7; 22.7; 22.5; 21.1; 20.1; 18.6; 16.3 (C19, q); 11.9 (C18, q).

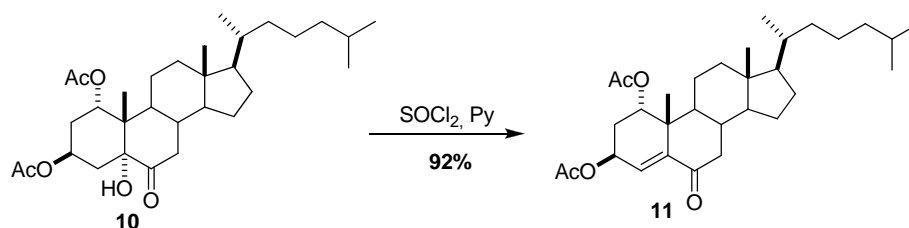
(+)-LRFABMS, m/z (%): 541 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 52); 399 (100).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +5.2° [$c = 0.1$, CH_2Cl_2].

¹⁸⁸ El reactivo de Jones se preparó a 0°C , con 1g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ disuelto en 5 ml de H_2O , al que se añadió gota a gota 1 ml de H_2SO_4 al 96%, y después de 2 min de agitación se volvió a añadir 1.5 ml de H_2O . Se filtró y se mantuvo a 0°C hasta su uso.



1.1.7. Síntesis de 1 α ,3 β -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**11**)



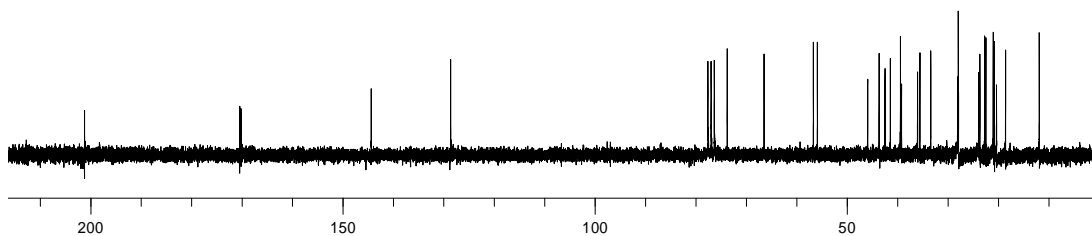
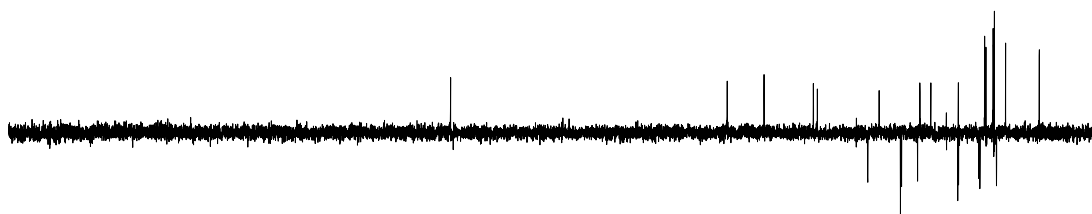
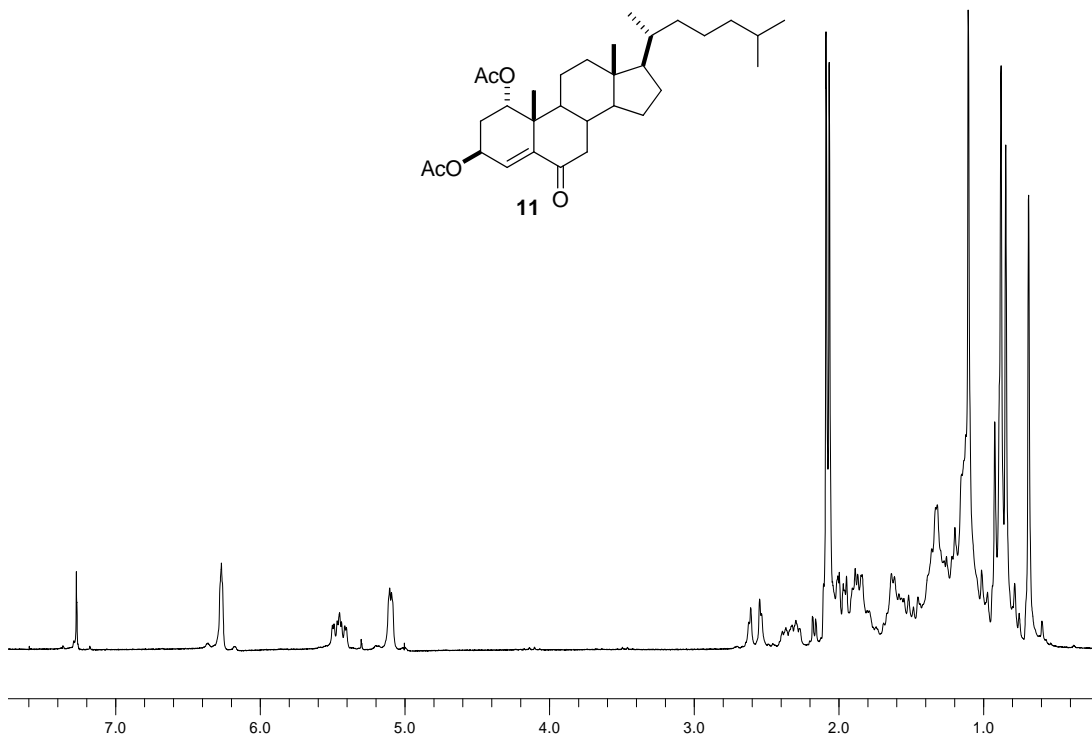
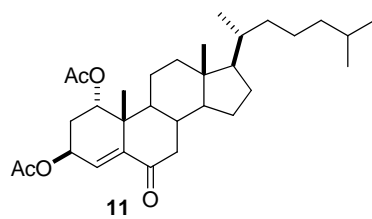
Sobre una disolución de 1 α ,3 β -diacetoxi-5 α -hidroxicolest-6-ona (**10**) (0.16 g, 0.3 mmol), a 0°C en piridina (5 mL), se adicionó, gota a gota, SOCl₂ (0.2 mL, 2.6 mmol) y se dejó reaccionando 1 h. Se vertió la reacción sobre un baño de agua hielo (aprox. 20 g), se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL), se lavó con HCl al 5% (3 x 20 mL), NaCl (20 mL) y se secó con MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.14 g de 1 α ,3 β -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**11**), semisólido blanco, 92%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.26 (H4, 1H, s); 5.45 (H3 α , 1H, dt, J = 14.6, 7.3 Hz); 5.09 (H1 β , 1H, d, J = 2.4 Hz); 2.58 (H7 β , 1H, d, J = 12.6 Hz); 2.08 (OAc, 3H, s); 2.06 (OAc, 3H, s); 1.10 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, J = 6.8 Hz); 0.69 (H18, 3H, s).

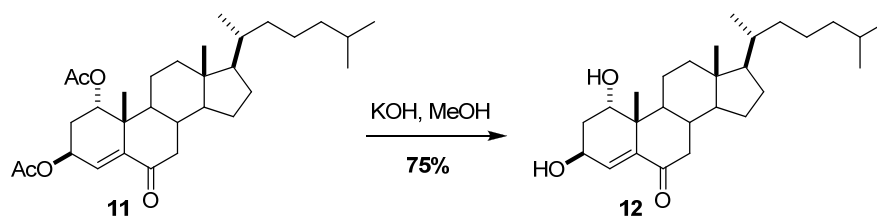
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 201.2 (C6, s); 170.4 (OAc, s); 170.2 (OAc, s); 144.4 (C5, s); 128.6 (C4, d); 73.8 (C3, d); 66.5 (C1, d); 56.7; 56.0; 55.9; 45.9; 44.7; 43.6; 42.5; 41.4; 39.4; 39.2; 36.0; 35.6; 33.4; 28.0; 27.9; 26.4; 23.9; 22.9; 21.0; 20.9; 20.8; 20.4; 18.6 (C19, q); 11.9 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 500 (M⁺, 2); 84 (100).

$[\alpha]_D$ = -28.6° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



1.1.8. Síntesis de 1 α ,3 β -dihidroxicolest-4-en-6-ona (12)



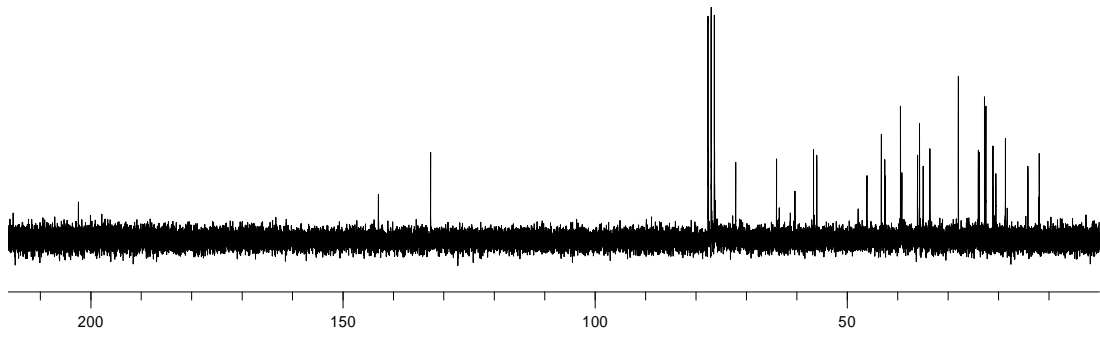
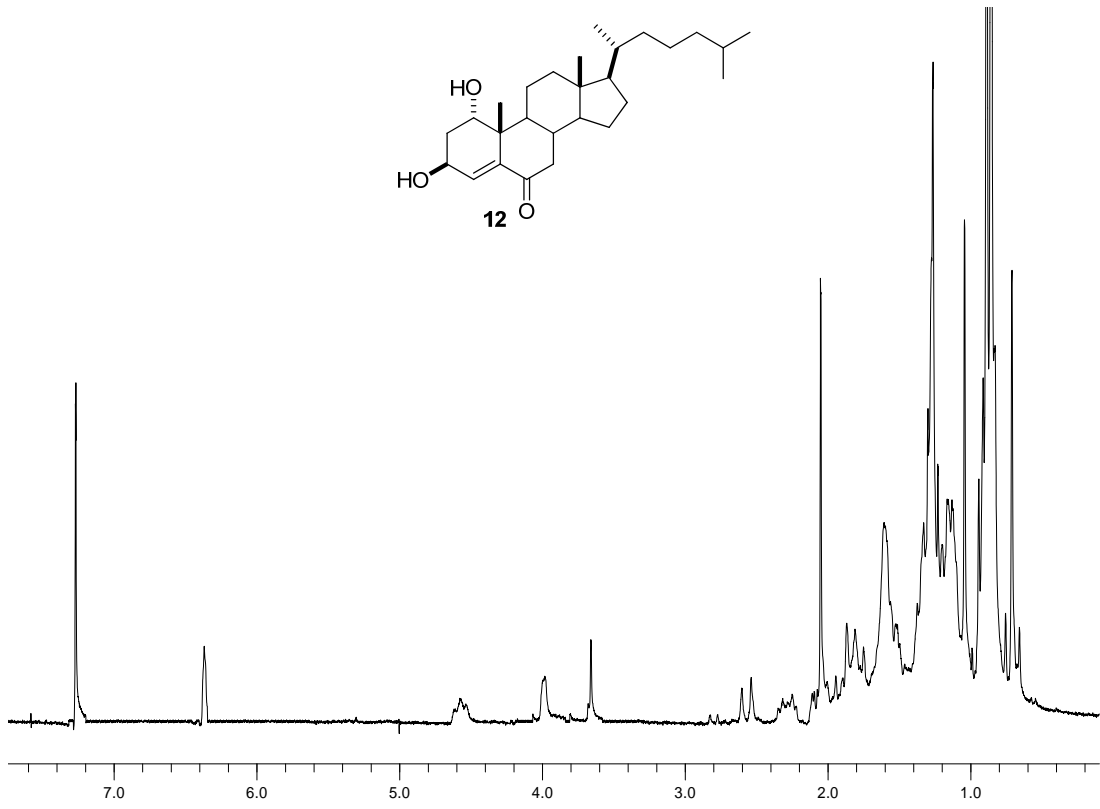
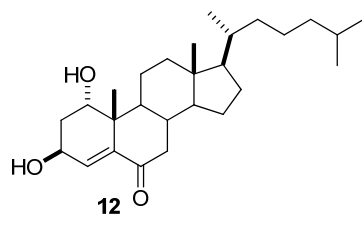
Se disolvió 1 α ,3 β -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**11**) (0.2 g, 0.4 mmol), en una disolución KOH:MeOH al 5% (15 mL) y se dejó reaccionando 1 h. Se vertió la reacción sobre un baño de agua hielo (aprox. 30 g), formándose un precipitado que se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL), se lavó con NaCl (20 mL) y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 0.15 g de 1 α ,3 β -dihidroxicolest-4-en-6-ona (**12**), semisólido blanco, 75%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.36 (H4, 1H, s); 4.55 (H3 α , 1H, m); 3.95 (H1 β , 1H, s); 3.65 (OH, 1H, sa); 2.58 (H7 β , 1H, d, J = 12.7 Hz); 1.04 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.3 Hz); 0.72 (H18, 3H, s).

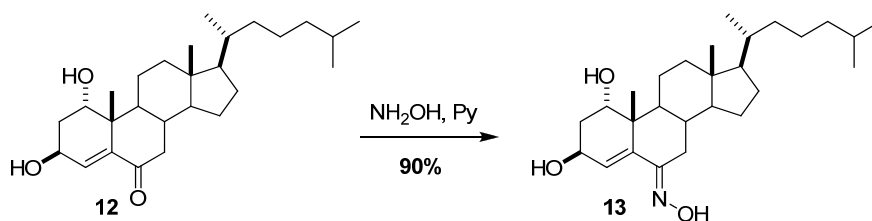
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 202.4 (C6, s); 142.9 (C5, s); 132.6 (C4, d); 72.1 (C3, d); 64.0 (C1, d); 60.4; 56.6; 56.0; 46.0; 43.2; 42.5; 43.4; 39.2; 36.0; 35.6; 34.9; 33.6; 27.9; 23.9; 23.7; 22.7; 21.1; 21.0; 20.5; 18.6; 14.1 (C19, q); 11.9 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 416 (M⁺, 9); 84 (100).

[α]_D = +5.5° [c = 0.4, CH₂Cl₂].



1.1.9. Síntesis de 1 α ,3 β -dihidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-eno (**13**)



Se disolvió 1 α ,3 β -dihidroxicolest-4-en-6-ona (**12**) (0.10 g, 0.24 mmol), y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.12 g, 1.7 mmol) en piridina (10 mL) y se dejó reaccionando 22 h. Se eliminó la piridina a presión reducida y se extrajo con EtOAc (2 x 30 mL), se lavó con agua y se secó con MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (6:4)], recogiendo 90 mg de 1 α ,3 β -dihidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-eno (**13**), semisólido blanco, 90%.

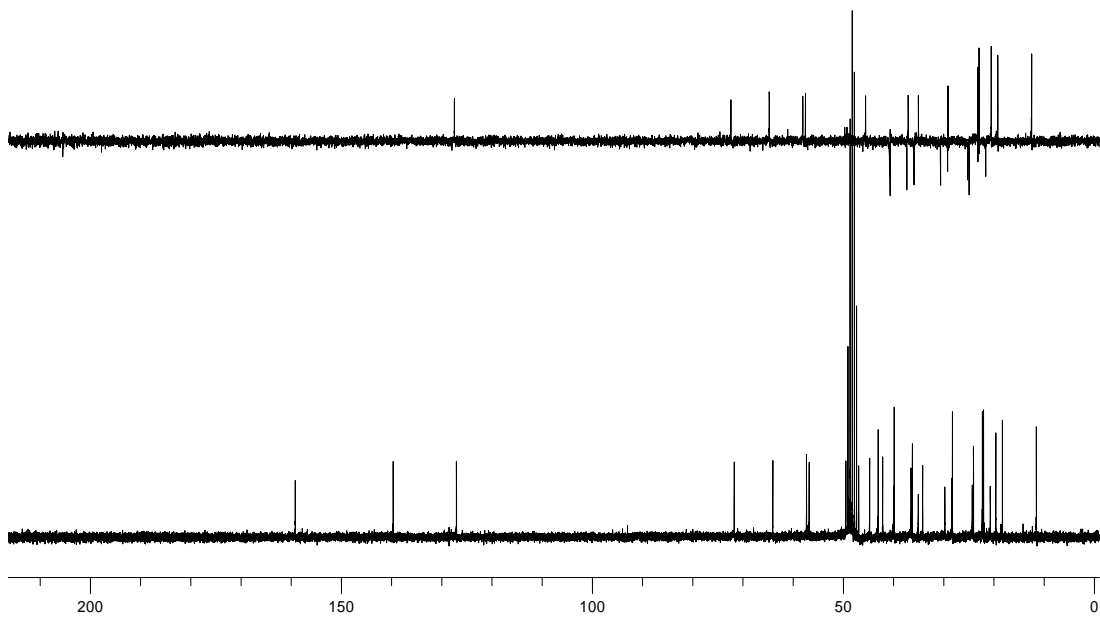
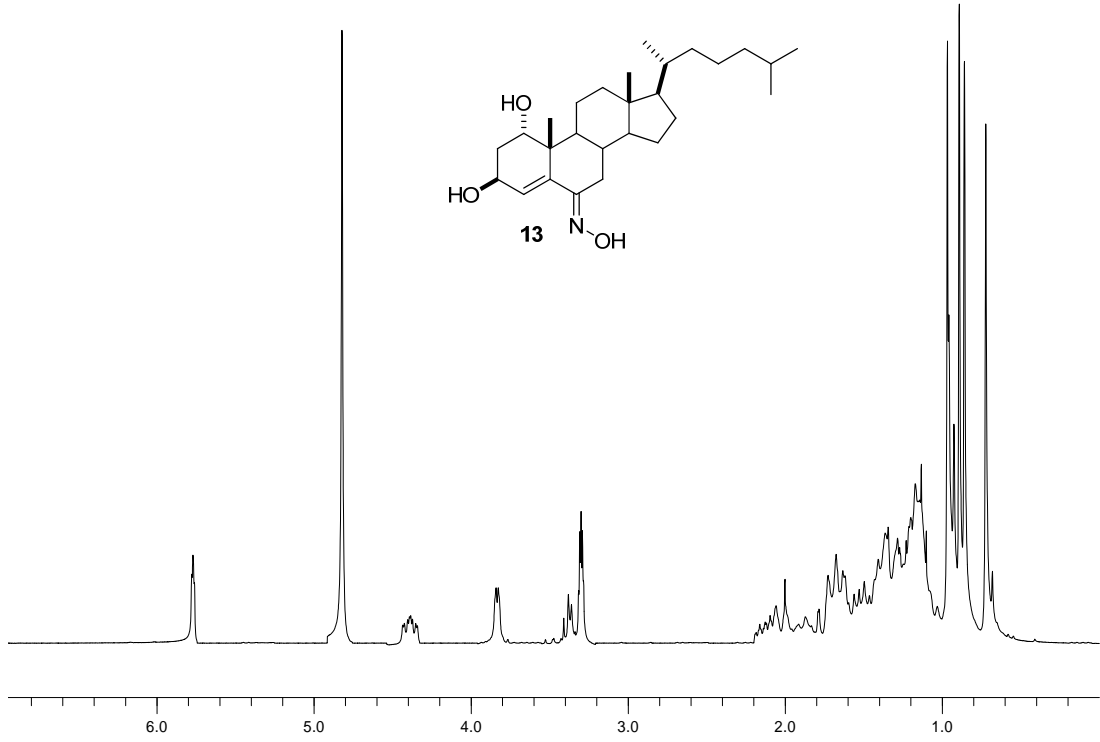
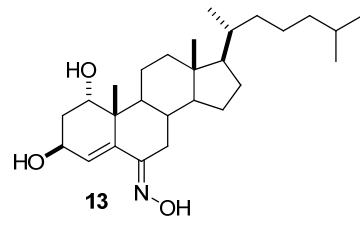
RMN-¹H (200 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 5.76 (H4, 1H, s); 4.38 (H3 α , 1H, dt, $J = 16.1, 8.3$ Hz); 3.83 (H1 β , 1H, d, $J = 2.9$ Hz); 3.33 (H7 β , 1H, d, $J = 12.5$ Hz); 0.97 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 5.2$ Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.4$ Hz); 0.72 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 159.4 (C6, s); 140.0 (C5, s); 127.4 (C4, d); 72.4 (C3, d); 64.7 (C1, d); 58.0; 57.7; 45.6; 43.3; 42.6; 40.8; 40.7; 37.3; 37.0; 35.9; 35.8; 30.6; 29.2; 29.1; 25.2; 24.9; 23.2; 22.9; 21.6; 20.5; 19.2 (C19, q); 12.4 (C18, q).

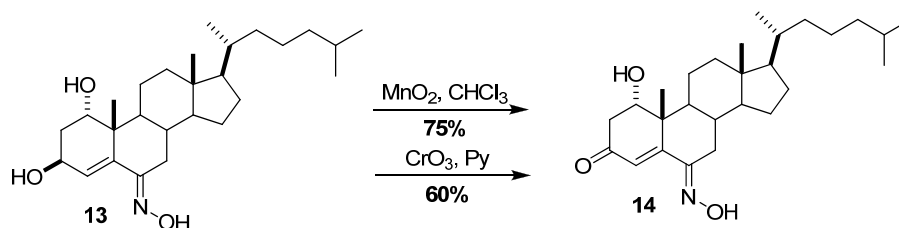
LREIMS (70 eV, m/z %): 431 (M^+ , 6); 414 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 432.3459 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{NO}_3$ 432.3472).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +64.6° [$c = 0.1$, MeOH].



1.1.10. Síntesis de 1 α -hidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-en-3-ona (14)



Procedimiento A: Se disolvió 1 α ,3 β -dihidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-eno (**13**) (0.1 g, 0.2 mmol) y MnO₂ (0.4 g, 4.5 mmol) en CHCl₃ (25 mL) dejando reaccionar la mezcla durante 17 h. Transcurrido ese tiempo se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (1:1)], recogiendo 75 mg de 1 α -hidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-en-3-ona (**14**), semisólido blanco, 75%, que fue repurificado mediante HPLC en fase reversa usando MeOH: H₂O (9:1).

Procedimiento B: Sobre una disolución de CrO₃ (60 mg), a 0°C, en piridina. (2 mL), se adicionó, gota a gota, otra disolución de 1 α ,3 β -dihidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-eno (**13**) (20 mg), en piridina (2 mL). Se dejó evolucionar a t.a. durante 75 min. Se vertió EtOAc (15 mL), se filtró el residuo sólido y los extractos orgánicos se lavaron con HCl al 10% (5 mL), NaHCO₃ (5 mL) y NaCl (5 mL); secándose finalmente sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (1:1)], recogiendo 12 mg de 1 α -hidroxi-6*E*-hidroximinocolest-4-en-3-ona (**14**), semisólido blanco, 60%.

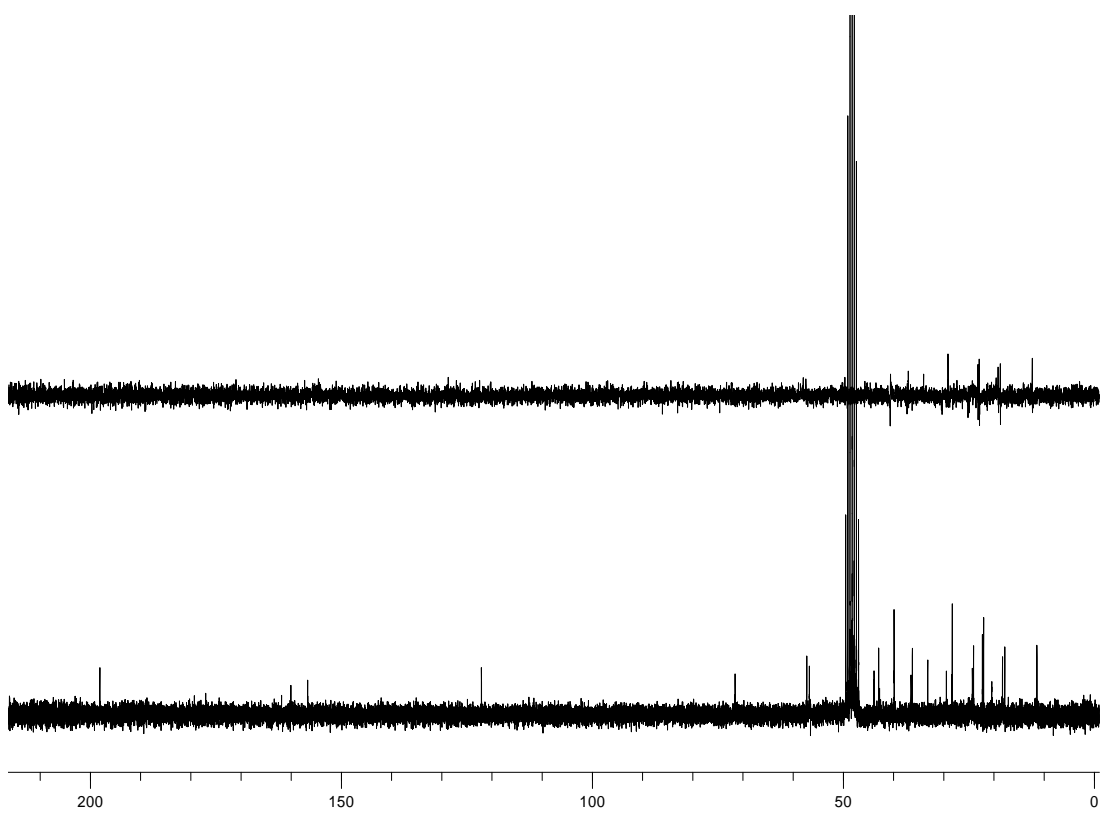
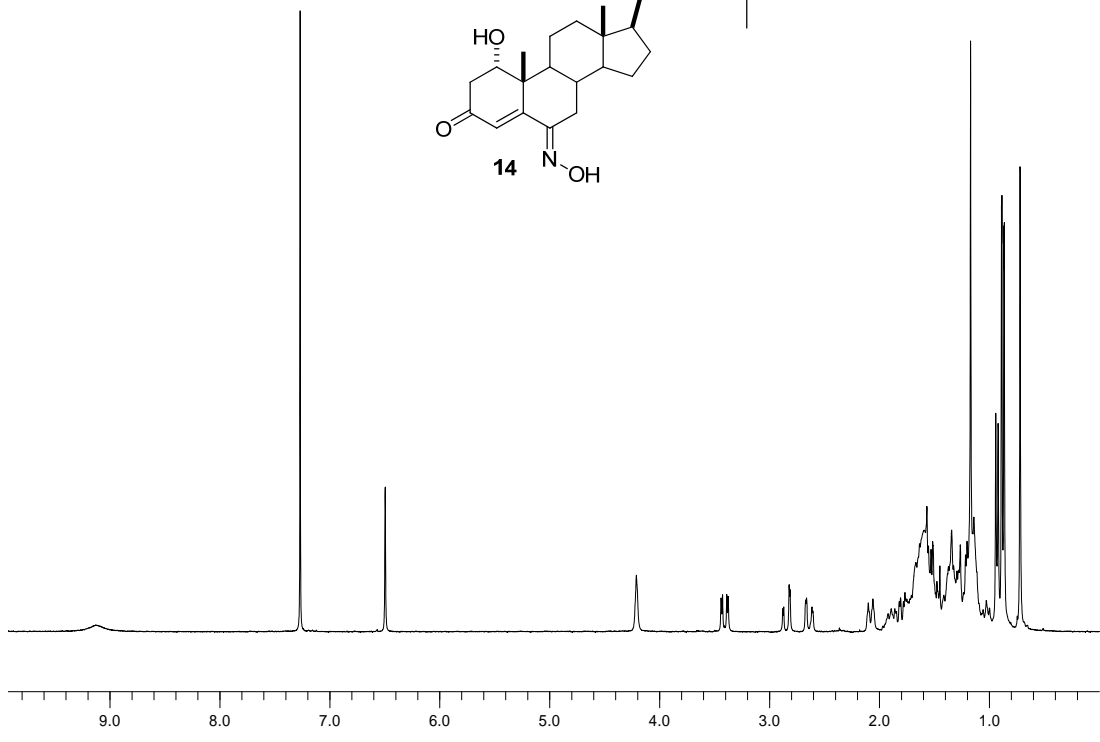
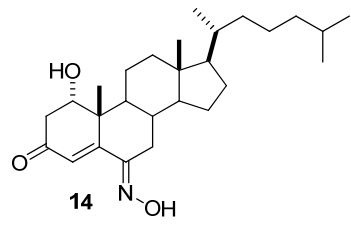
RMN-¹H (500 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 6.12 (H4, 1H, s); 4.12 (H1 β , 1H, s); 3.43 (H7 β , 1H, dd, $J = 12.2, 4.4$ Hz); 2.75 (H2, 2H, dd, $J = 6.1, 5.8$ Hz); 1.16 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.4$ Hz); 0.72 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (125 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 200.3 (C3, s); 156.8 (C6, s); 136.7 (C5, s); 128.6 (C4, d); 72.2 (C1, d); 57.9 (C14, s); 57.4 (C17, d); 51.0 (C9, d); 44.67 (C13, s); 44.6 (C24, t); 43.7 (C12, t); 43.5 (C10, s); 40.6 (C22, t); 37.2 (C20, d); 37.0 (C2, t); 33.9 (C8, d); 30.2 (C7, q); 29.2 (C16, t); 29.1 (C25, q); 25.1 (C15, t); 24.9 (C23, t); 23.2 (C26, q); 22.9 (C27, q); 21.3 (C11, t); 19.2 (C21, q); 18.7 (C19, q); 12.3 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 429 (M⁺, 6); 172 (100).

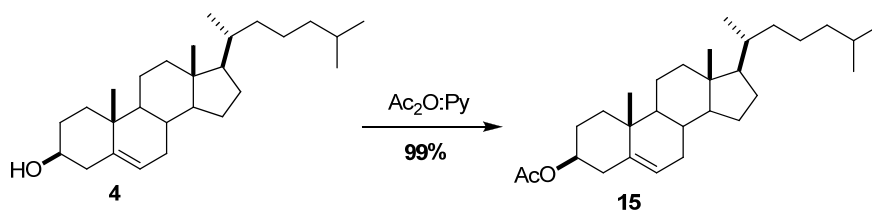
(+)-HRESIMS: m/z 430.3300 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₄NO₃, 430.3316).

[α]_D = +199.8° [c = 0.1, MeOH].



1.2. Síntesis de análogos con un grupo hidroxilo en la posición C-7.

1.2.1. Síntesis de 3 β -acetoxicolest-5-eno (**15**)



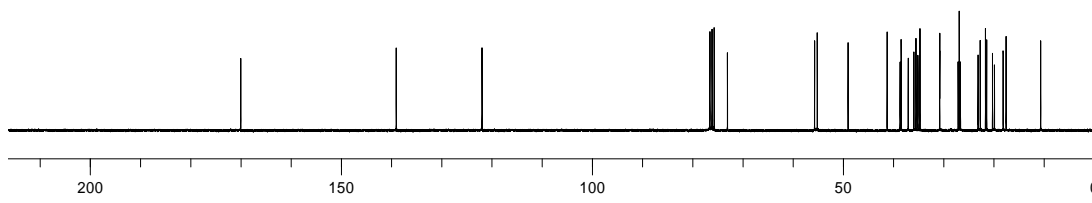
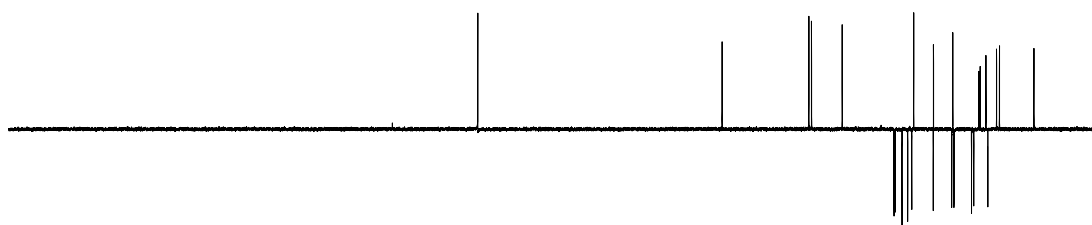
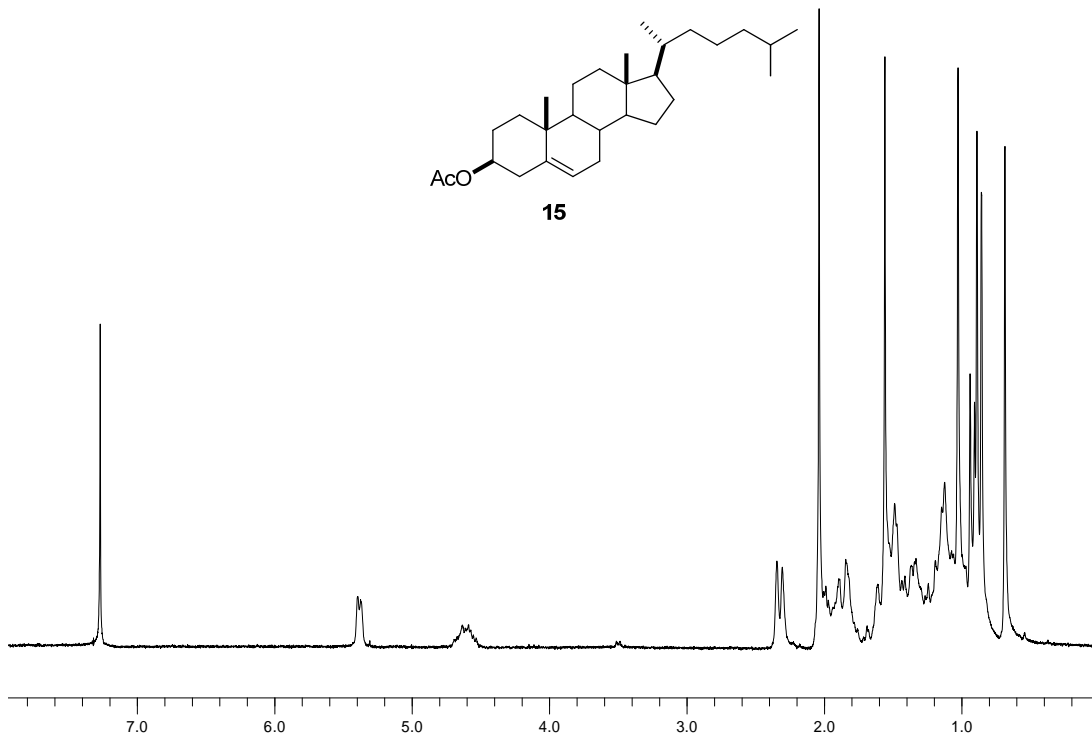
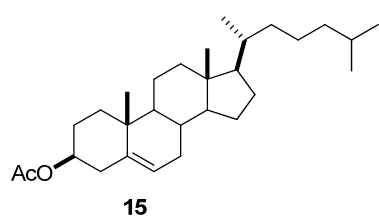
Se disolvió colesterol (**4**) (5.0 g, 3.0 mmol), en una mezcla (1:1) de Ac₂O:Py (50 mL) y se dejó reaccionando 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **8** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogándose 4.9 g de 3 β -acetoxicolest-5-eno (**15**), semisólido blanco, 99%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.38 (H6, 1H, d, $J = 4.9$ Hz); 4.63 (H3, 1H, m); 2.32 (H7 β , 2H, d, $J = 7.8$ Hz); 2.04 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

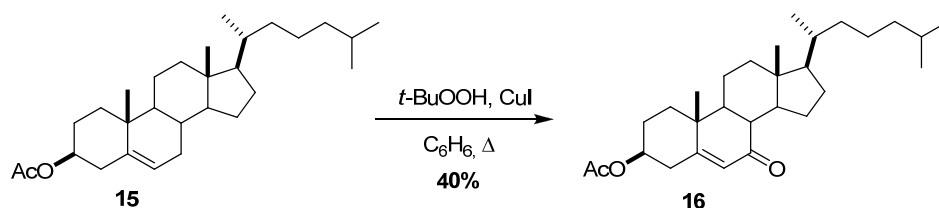
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.6 (OAc, s); 140.0 (C5, s); 122.7 (C6,d); 73.8 (C3, d); 56.8; 56.0; 50.2; 42.2; 39.6; 39.4; 36.8; 36.2; 35.7; 32.0; 31.6; 28.5; 27.9; 27.7; 25.8; 23.1; 24.2; 22.7; 22.5; 21.7; 21.3; 20.6; 20.3; 17.2 (C19, q); 11.9 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 428 (M⁺, 2); 302 (100).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -35.2° [$c = 1$, CH₂Cl₂].



1.2.2. Síntesis de 3 β -acetoxicolest-5-en-7-ona (**16**)



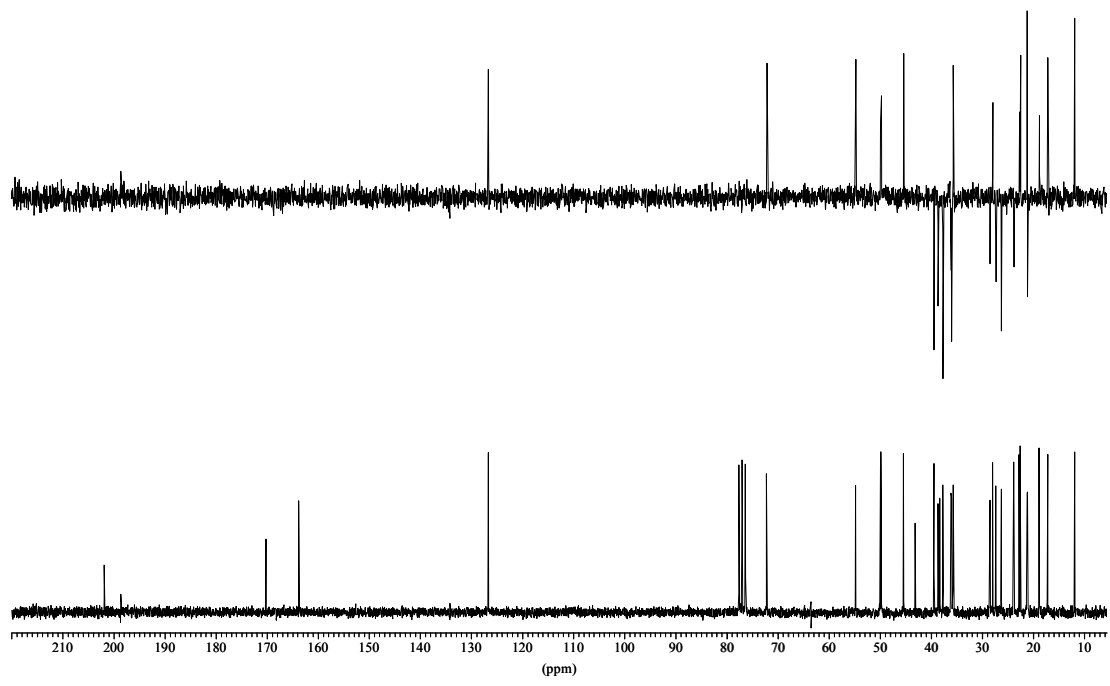
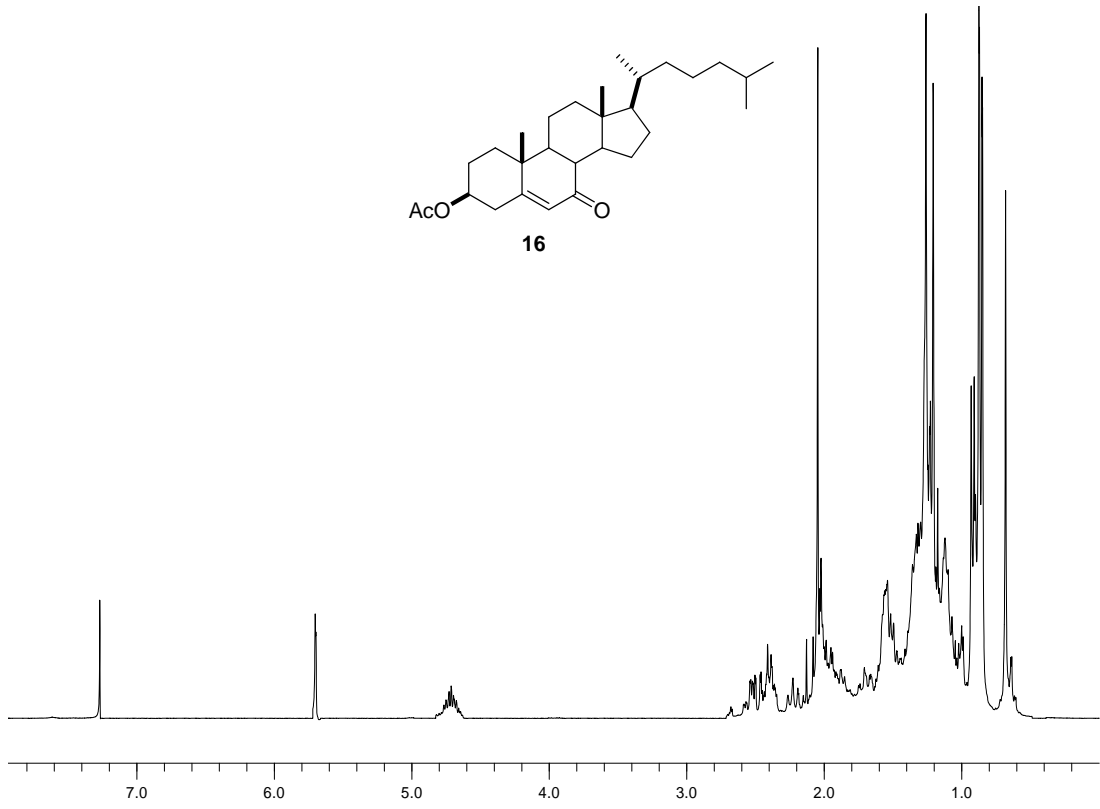
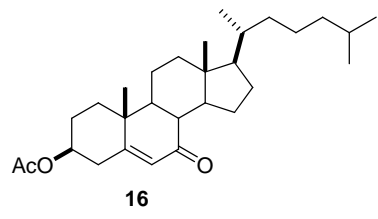
Sobre una disolución de 3 β -acetoxicolest-5-eno (**15**) (5.5 g, 12.8 mmol), y CuI (62.7 mg, 0.33 mmol) en benceno (75 mL), se adicionó t -BuOOH (15.4 mL) y la reacción se calentó hasta 90°C durante 24 h. Se vertió la reacción sobre una disolución de Na₂SO₃ (30 mL), se extrajo con Et₂O (2 x 100 mL), se lavó con NaHCO₃ (50 mL), NaCl (50 mL) y H₂O, se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 2.1 g de 3 β -acetoxicolest-5-en-7-ona (**16**), semisólido blanco, 40%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.70 (H6, 1H, s); 4.72 (H3 α , 1H, m); 2.53 (H8, 1H, m); 2.06 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.93 (H21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.6 Hz); 0.67 (H18, 3H, s).

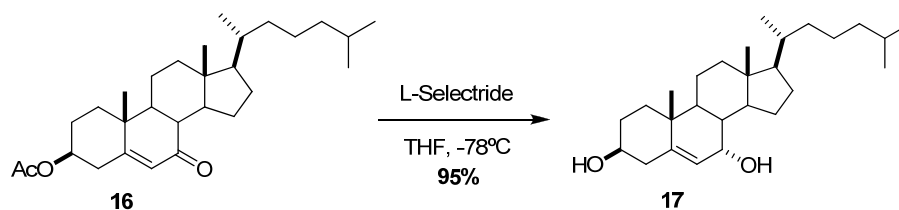
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 203.2 (C7, s); 170.2 (OAc, s); 163.8 (C5, s); 126.6 (C6, d); 72.1 (C3, d); 56.8; 56.0; 50.2; 42.2; 39.6; 39.4; 36.8; 36.2; 35.9; 35.7; 32.0; 31.6; 27.9; 27.7; 25.8; 24.2; 22.7; 22.5; 21.7; 21.3; 20.6; 20.3; 17.2 (C19, q); 11.9 (C18, q).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 465 ([M + Na]⁺, 5); 399 (100).

$[\alpha]_D$ = -78.1° [c = 1, CH₂Cl₂].



1.2.3. Síntesis de 3 β ,7 α -dihidroxicolest-5-eno (**17**)



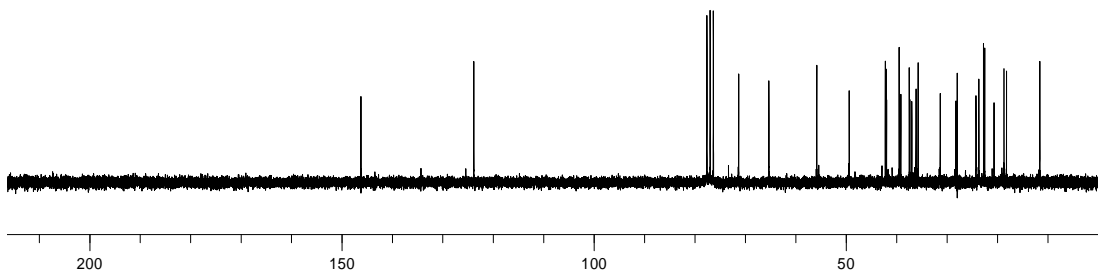
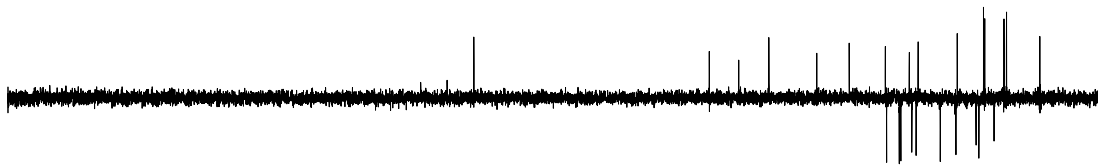
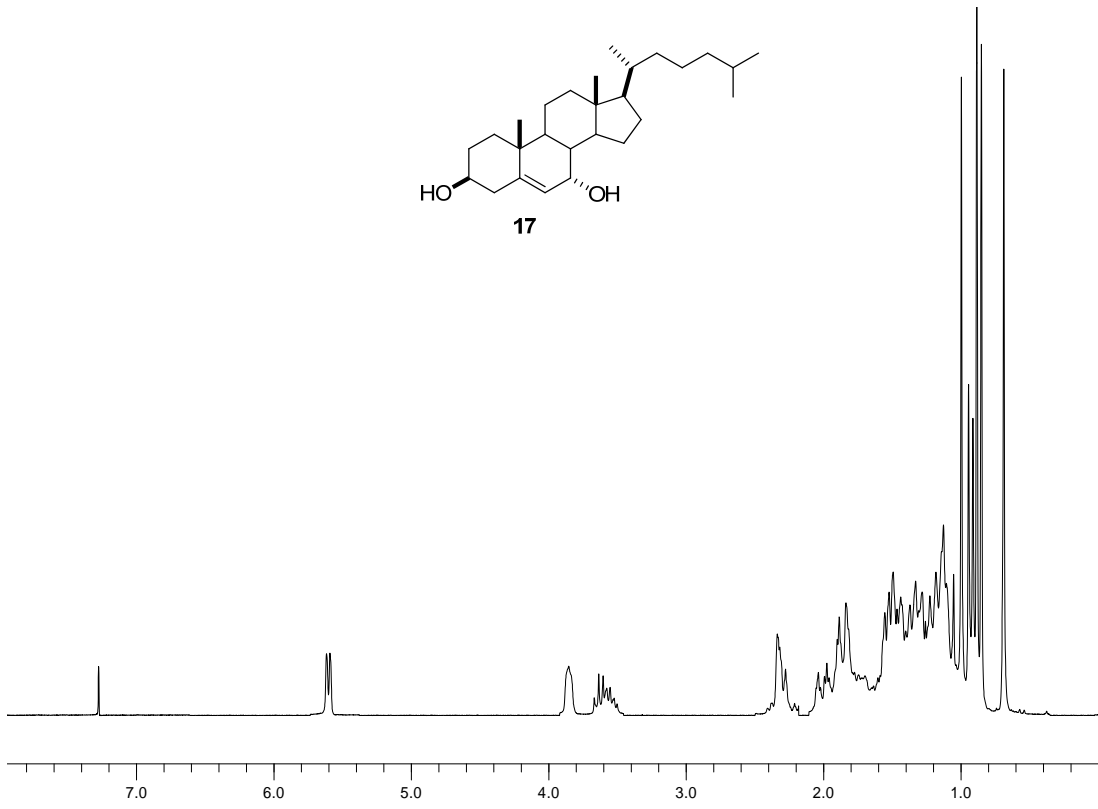
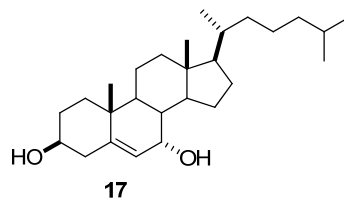
Sobre una disolución de 3 β -acetoxicolest-5-en-7-ona (**16**) (1.9 g, 4.40 mmol), en THF (50 mL), a -78°C , se añadió, gota a gota, L-Selectride (14 mL) durante 15 min y se dejó reaccionando durante 1 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y a continuación se extrajo con CH_2Cl_2 (50 mL), se lavó con HCl al 5% (50 mL), agua y se secó sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiénose 1.8 g de 3 β ,7 α -dihidroxicolest-5-eno (**17**), semisólido blanco, 95%.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.59 (H6, 1H, d, $J = 4.8$ Hz); 3.84 (H7 β , 1H, m); 3.58 (H3 α , 1H, m); 0.99 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 6.2$ Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.6$ Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

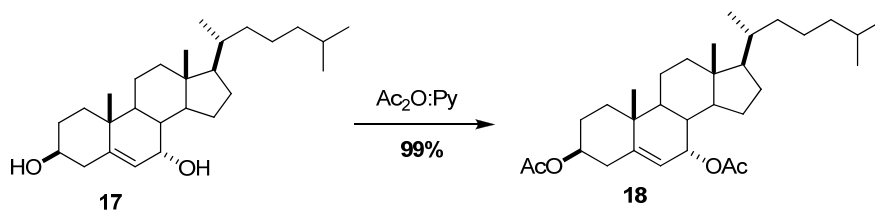
RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 146.2 (C5, s); 123.8 (C6, d); 71.3 (C3, d); 65.3 (C7, d); 56.2; 48.6; 42.3; 39.4; 39.2; 37.2; 36.0; 35.8; 35.6; 34.7; 33.3; 31.2; 30.7; 28.0; 27.9; 24.5; 23.7; 22.7; 22.5; 21.4; 20.6; 18.2 (C19, q); 11.6 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 402 (M^+ , 4); 237 (100).

$[\alpha]_{\text{D}} = -130.2^{\circ}$ [$c = 1$, CH_2Cl_2].



1.2.4. Síntesis de 3 β ,7 α -diacetoxicolest-5-eno (**18**)



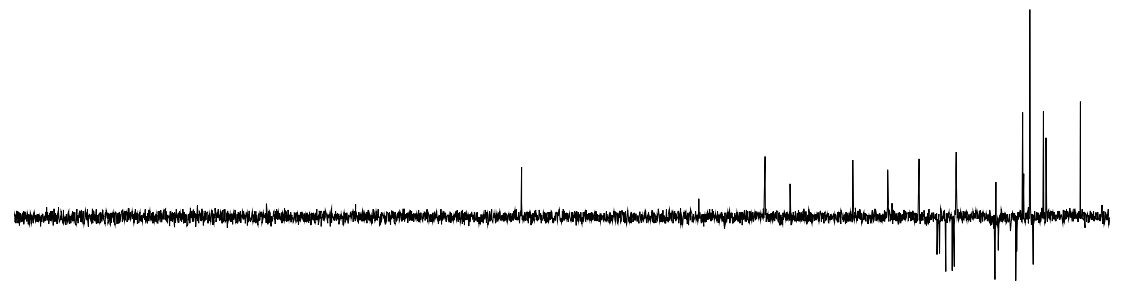
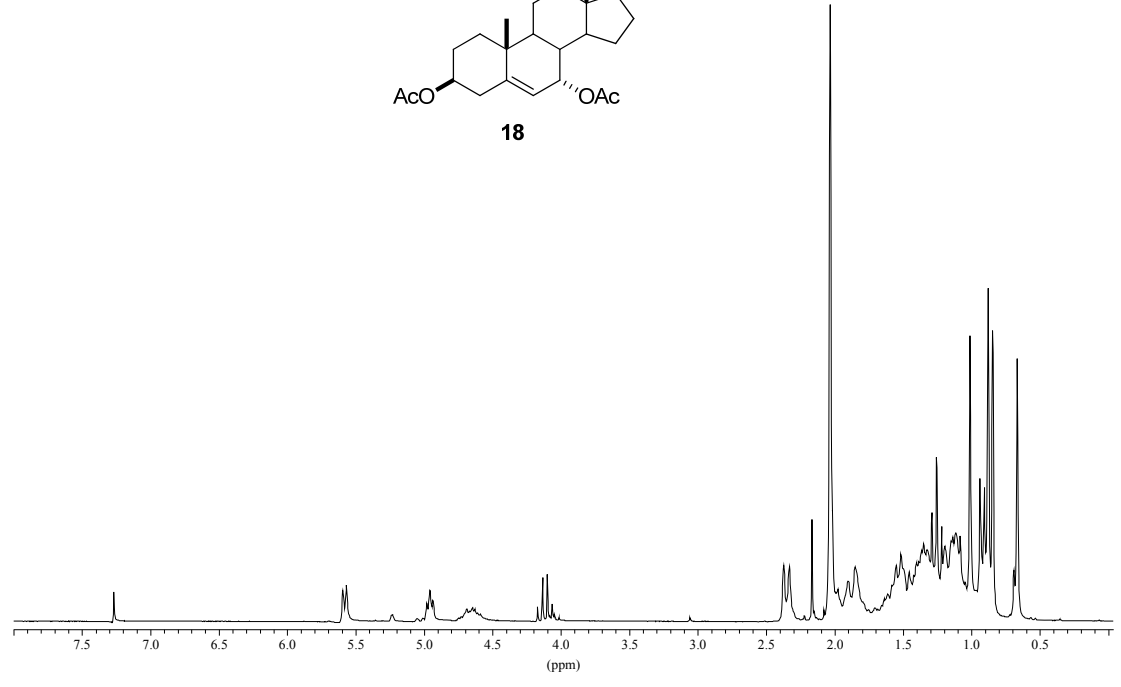
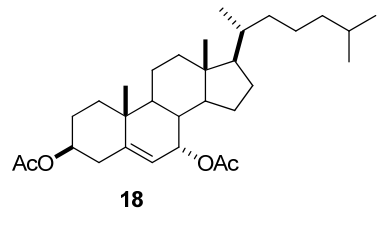
Se disolvió 3 β ,7 α -dihidroxi-5-colesteno (**17**) (3.0 g, 7.4 mmol), en una mezcla (1:1) de Ac₂O:Py (50 mL) y se dejó reaccionando 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **8** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiénose 3.0 g de 3 β ,7 α -diacetoxicolest-5-eno (**18**), semisólido blanco, 99%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.59 (H6, 1H, d, J = 4.8 Hz); 4.96 (H7 β , 1H, dd, J = 8.7, 4.4 Hz); 4.64 (H3 α , 1H, m); 2.35 (H4, 2H, d, J = 7.8 Hz); 2.04 (OAc, 3H, s); 2.02 (OAc, 3H, s); 1.01 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, J = 6.7 Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, J = 6.2 Hz); 0.66 (H18, 3H, s).

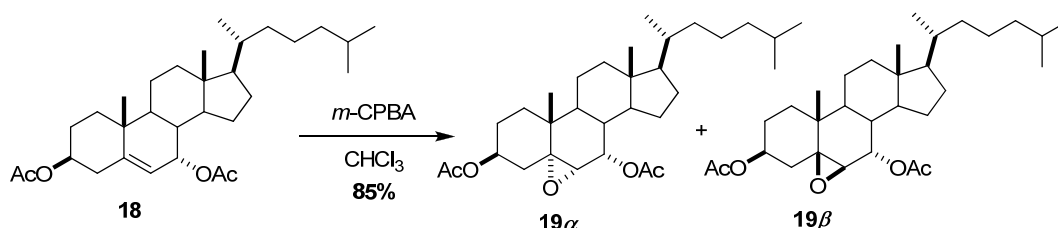
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.7 (OAc, s); 170.4 (OAc, s); 146.4 (C5, s); 120.8 (C6, d); 73.1 (C3, d); 68.2 (C7, d); 56.2; 55.2; 48.9; 45.5; 42.3; 39.5; 37.4; 36.0; 35.5; 34.3; 33.3; 31.6; 29.7; 29.0; 28.0; 27.9; 24.4; 24.0; 23.7; 22.7; 22.5; 21.4; 20.4; 18.1 (C19, q); 11.4 (C18, q).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 509 ([M+ Na]⁺, 16); 367 (100).

$[\alpha]_D$ = -40.9° [c = 0.25, CH₂Cl₂].



1.2.5. Síntesis de 3 β ,7 α -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**19 α**) y 3 β ,7 α -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**19 β**)



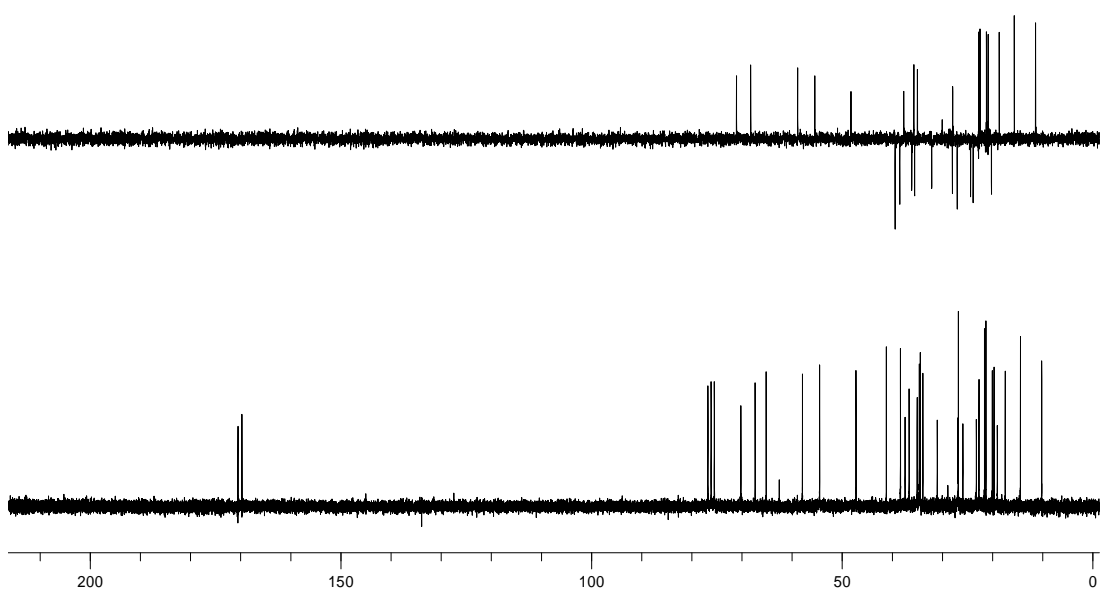
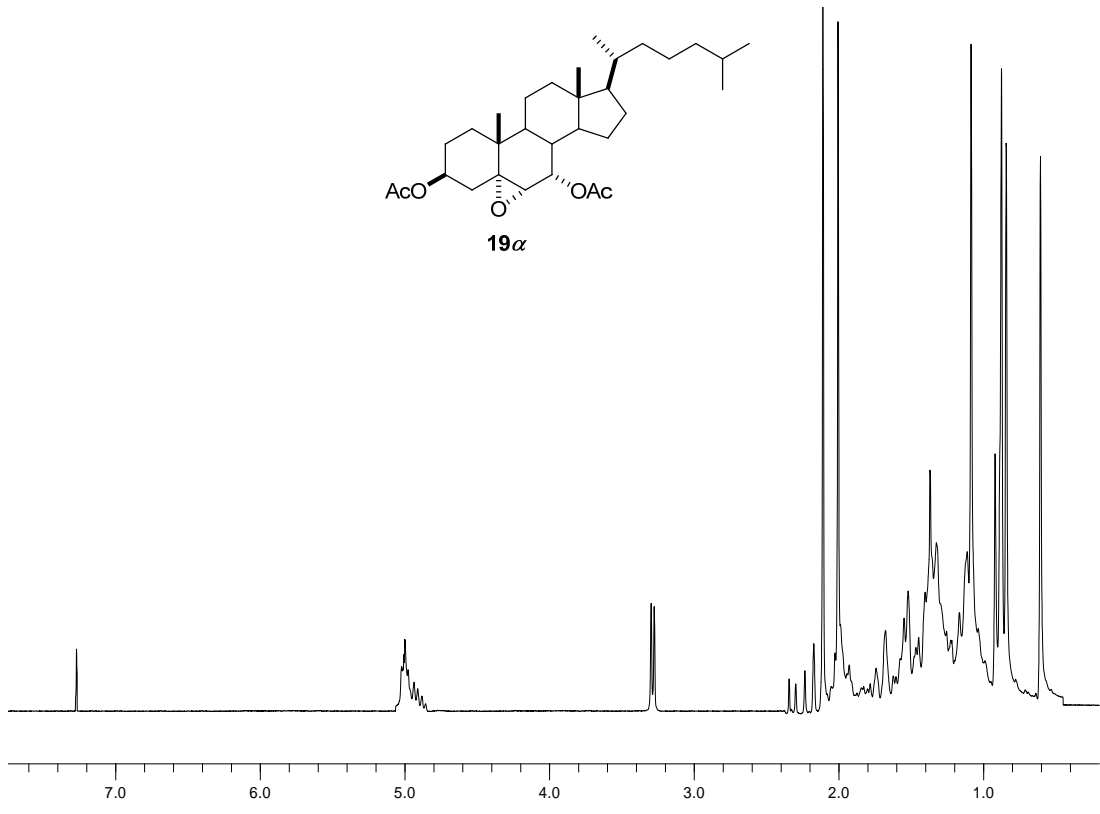
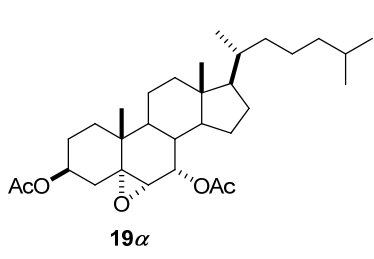
Sobre una disolución de ácido *m*-cloroperbenzoico (3.0 g, 17.3 mmol) a 0°C en CHCl₃ (30 mL), se añadió, gota a gota, 3 β ,7 α -diacetoxicolest-5-eno (**18**) (2.8 g, 5.7 mmol), disueltos en CHCl₃ (30 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para los epóxidos **9 α** y **9 β** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc [(9:1), (8:2)]] recogiendo 1.65 g de 3 β ,7 α -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxi-colestano (**19 α**), en un 57% y 0.82 g de 3 β ,7 α -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**19 β**), 28%, ambos semisólidos blancos en relación (2:1), con un rendimiento global del 85%.

19 α : RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.98 (H7 β , 1H, d, J = 4.7, 1.8 Hz); 4.89 (H3 α , 1H, m); 3.29 (H6 β , 1H, d, J = 4.4 Hz); 2.12 (OAc, 3H, s); 1.98 (OAc, 3H, s); 1.04 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, J = 6.9 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.59 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.6 (OAc, s); 170.5 (OAc, s); 71.4 (C7, d); 70.1. (C3, d); 63.3 (C5, s); 62.1 (C6, d); 56.0; 43.4; 42.4; 39.8; 37.8; 37.0; 36.5; 35.4; 34.8; 33.2; 32.5; 32.1; 30.7; 29.4; 28.0; 27.6; 25.4; 23.2; 22.7; 22.3; 21.0; 20.7; 20.5; 18.1 (C19, q); 11.8 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 502 (M⁺, 3); 382 (100).

$[\alpha]_D = -109.1^\circ$ [c = 1, CH₂Cl₂].

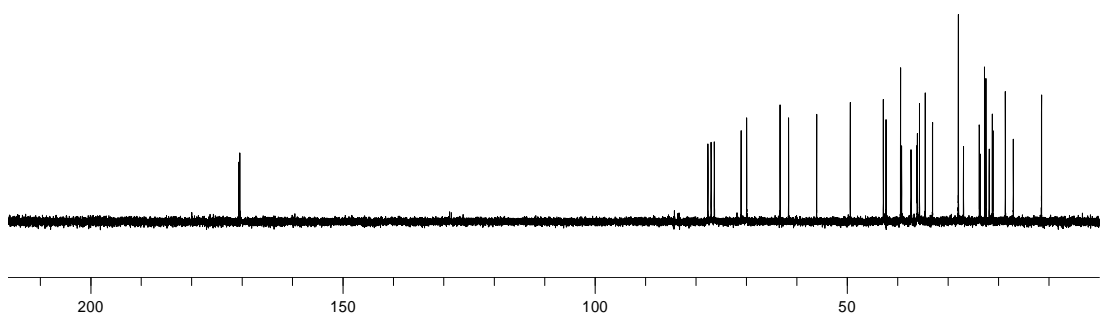
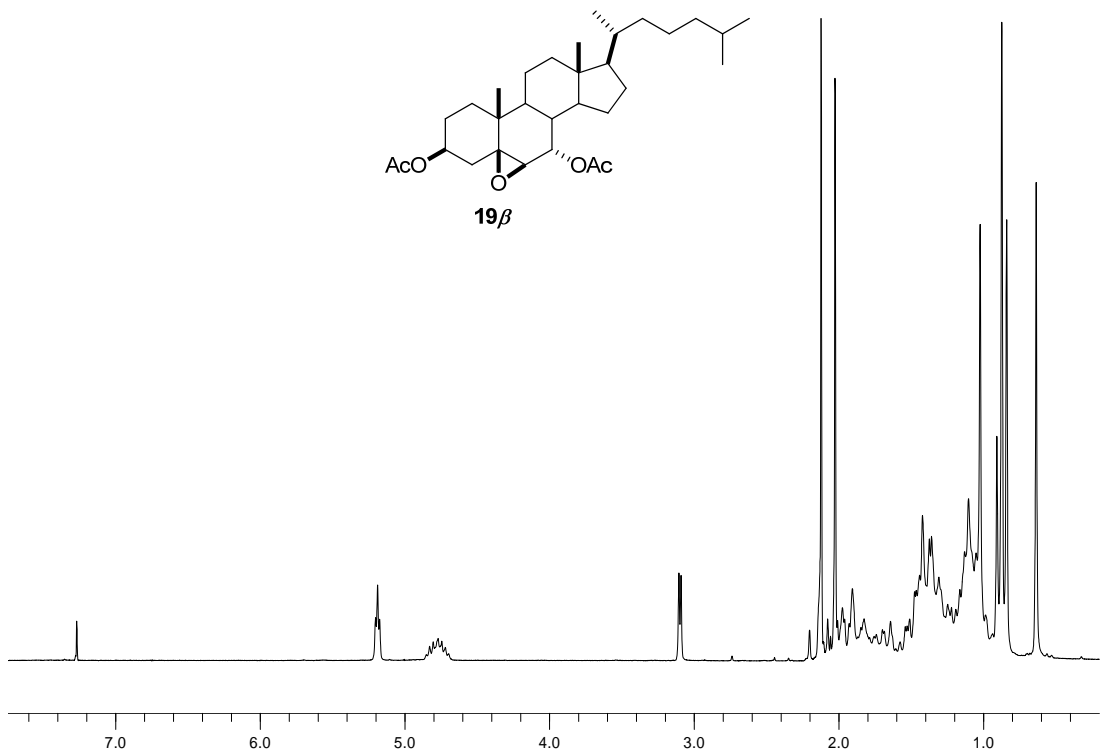
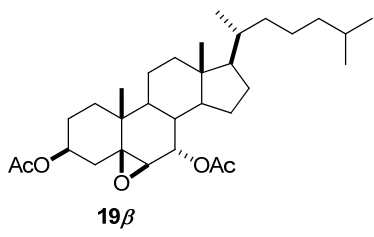


19 β : RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.17 (H7 β , 1H, d, J = 4.9, 1.8 Hz); 4.75 (H3 α , 1H, m); 3.08 (H6 α , 1H, d, J = 2.9 Hz); 2.10 (OAc, 3H, s); 2.04 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, J = 6.2 Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, J = 6.6 Hz); 0.60 (H18, 3H, s).

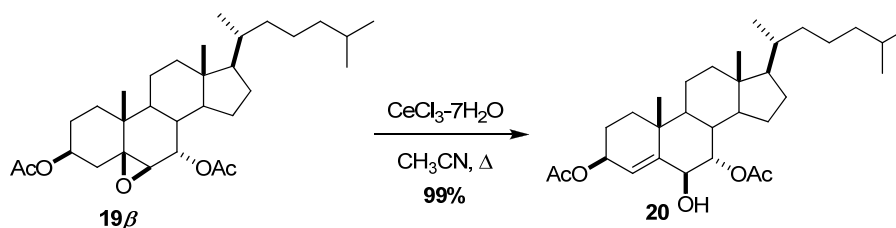
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.6 (OAc, s); 170.4 (OAc, s); 71.0 (C7, d); 69.9 (C3, d); 63.3 (C5, s); 59.6 (C6, d); 56.7; 48.7; 43.7; 37.9; 37.5; 36.8; 35.4; 35.3; 35.0; 33.9; 33.1; 26.5; 24.7; 23.7; 23.2; 23.0; 22.7; 22.5; 21.6; 21.3; 20.8; 18.4; 17.0 (C19, q); 15.4; 11.4 (C18, q).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 525 ([M+ Na]⁺, 70); 501 ([M + H]⁺, 3); 383 (100).

$[\alpha]_D = -19.2^\circ$ [c = 1, CH₂Cl₂].



1.2.6. Síntesis de 3 β ,7 α -diacetoxi-6 β -hidroxicolest-4-eno (**20**)



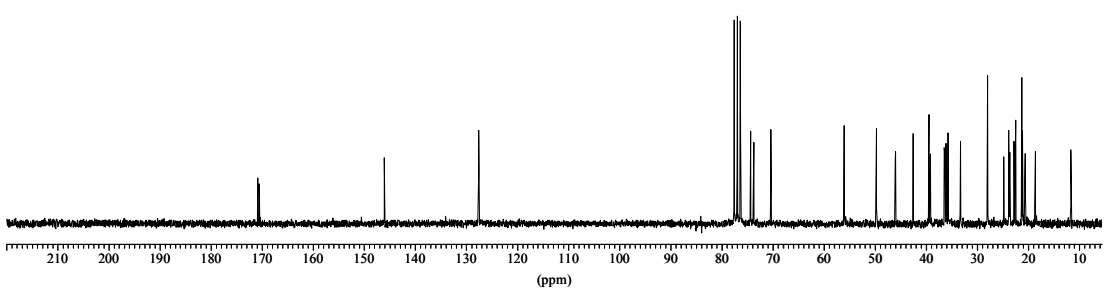
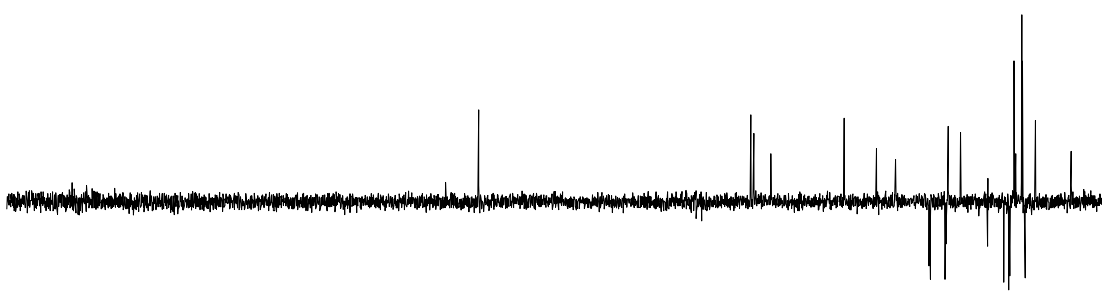
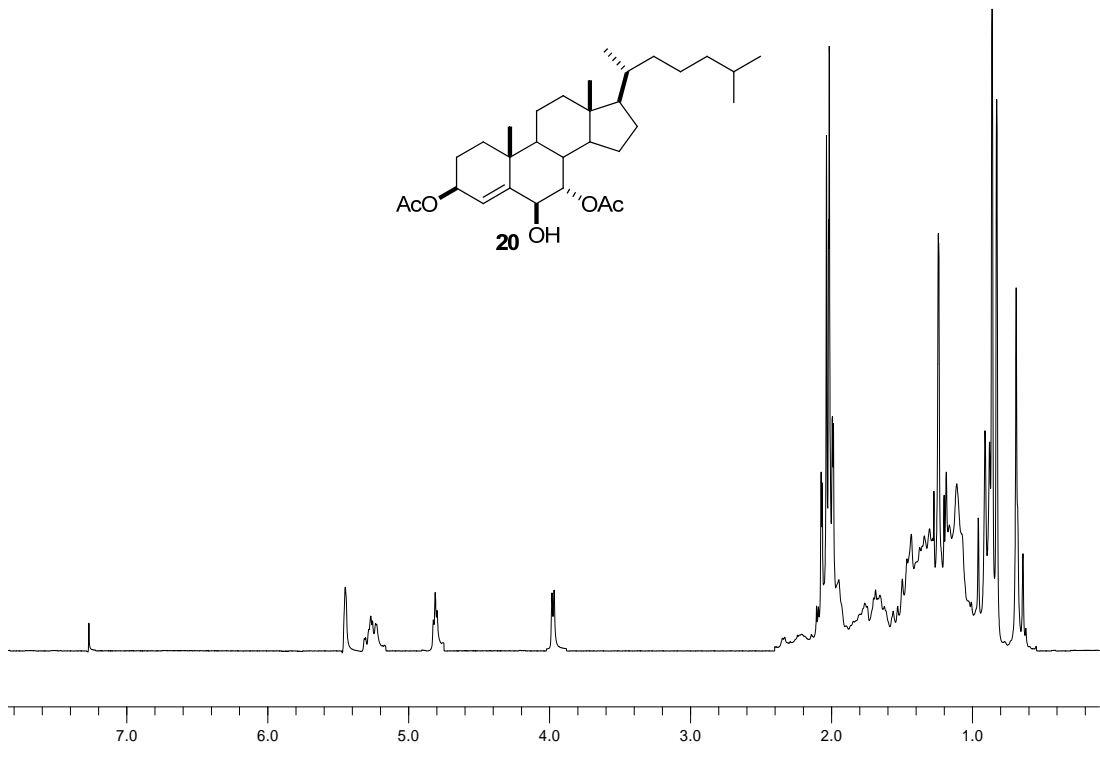
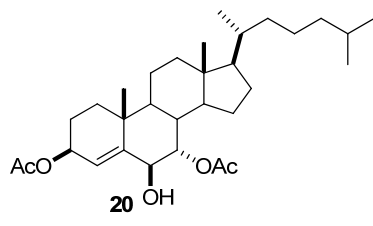
Sobre una disolución de $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5 g, 4.2 mmol), en CH_3CN (30 mL), se adicionó, gota a gota, 3 β ,7 α -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**19 β**) (4.2 g, 8.3 mmol), disueltos en una mezcla (2:1) $\text{CH}_3\text{CN}:\text{THF}$ (30 mL) a 85°C durante 15 h. Se eliminó a presión reducida el disolvente y el sólido resultante se redisolvió con EtOAc (30 mL), se lavó con NaCl (30 mL), agua y se secó sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogándose 4.2 g de 3 β ,7 α -diacetoxi-6 β -hidroxicolest-4-eno (**20**), semisólido blanco, 99%.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.46 (H4, 1H, s); 5.28 (H3 α , 1H, m); 4.83 (H7 β , 1H, dd, $J = 4.8, 2.4$ Hz); 3.99 (H6 α , 1H, d, $J = 2.4$ Hz); 2.04 (OAc, 3H, s); 2.03 (OAc, 3H, s); 0.98 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, $J = 6.4$ Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.5$ Hz); 0.69 (H18, 3H, s).

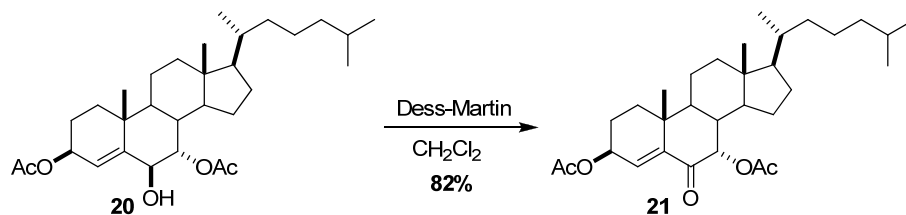
RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.8 (OAc, s); 170.5 (OAc, s); 146.0 (C5, s); 127.6 (C4, d); 74.3 (C3, d); 73.8 (C7, d); 70.4 (C6, d); 56.0; 49.8; 46.7; 43.2; 39.8; 39.7; 38.9; 35.7; 35.5; 34.7; 33.1; 26.7; 24.6; 24.2; 23.5; 22.7; 22.4; 22.1; 21.5; 21.0; 20.9; 19.4; 18.6 (C19, q).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 525 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -66.5° [$c = 0.25, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



1.2.7. Síntesis de 3β,7α-diacetoxicolest-4-en-6-ona (21)



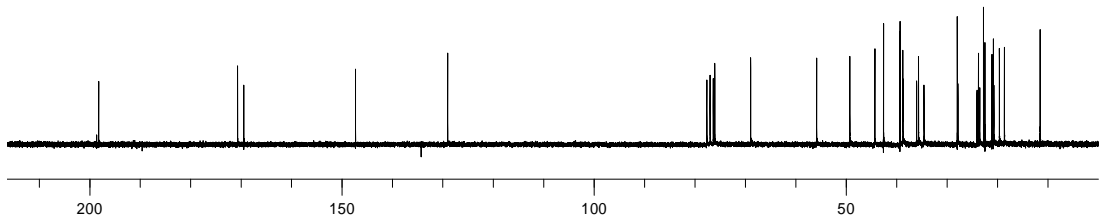
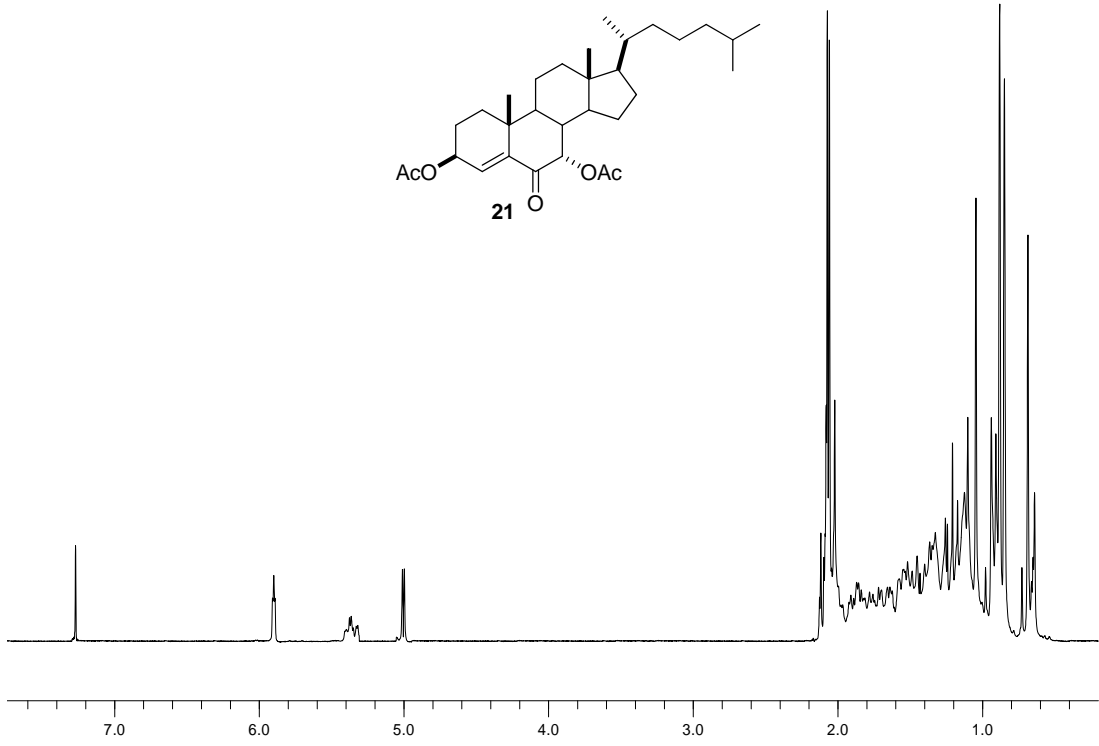
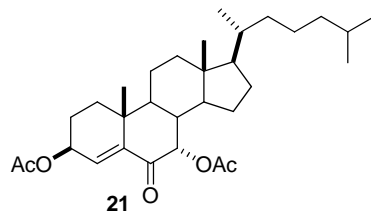
Sobre una disolución del reactivo de Dess-Martin (1.5 g, 3.2 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL), se adicionó, gota a gota, 3β,7α-diacetoxi-6β-hidroxicolest-4-eno (**20**) (1.5 g, 2.7 mmol), en CH₂Cl₂ (30 mL). Se dejó reaccionando 30 min. y a continuación se adicionó una disolución de Na₂S₂O₃·5H₂O (100 mL) durante 15 min. Se extrajo con Et₂O (100 mL), se lavó con NaHCO₃ (50 mL), agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 1.2 g de 3β,7α-diacetoxicolest-4-en-6-ona (**21**), semisólido blanco, 82%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.89 (H4, 1H, s); 5.32 (H3α, 1H, m); 4.99 (H7β, 1H, d, *J* = 2.3 Hz); 2.06 (OAc, 6H, s); 1.11 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, *J* = 6.4 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.6 Hz); 0.67 (H18, 3H, s).

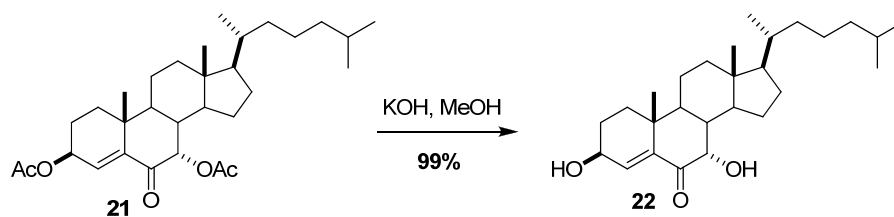
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 198.2 (C6, s); 170.6 (OAc, s); 169.4 (OAc, s); 147.2 (C5, s); 129.0 (C4, d); 76.7 (C7, d); 68.9 (C3, d); 56.8; 48.9; 44.3; 42.6; 38.9; 38.1; 36.6; 36.1; 35.8; 35.7; 28.7; 25.4; 24.9; 24.4; 23.9; 23.2; 22.7; 22.1; 21.6; 21.5; 20.7; 20.6; 18.6 (C19, q); 11.5 (C18, q).

(+)-LRFABMS, *m/z* (%): 524 (100); 523 ([M + Na]⁺, 7); 500 ([M + H]⁺, 4).

[α]_D = -36.3° [*c* = 0.1, CH₂Cl₂].



1.2.8. Síntesis de 3 β ,7 α -dihidroxicolest-4-en-6-ona (**22**)



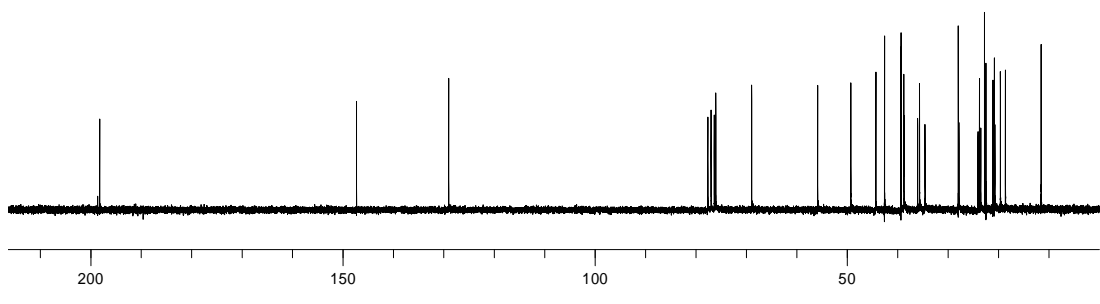
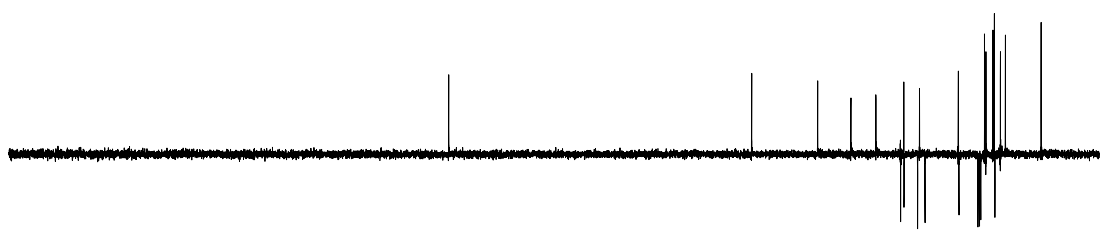
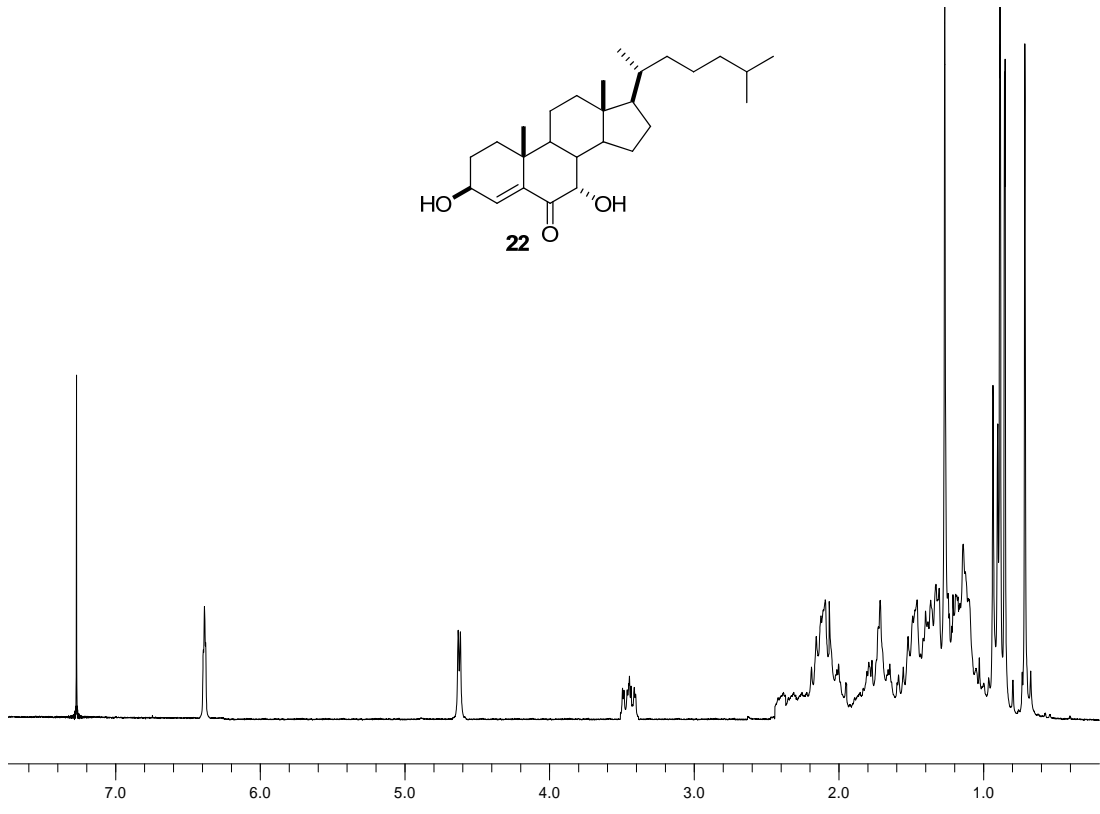
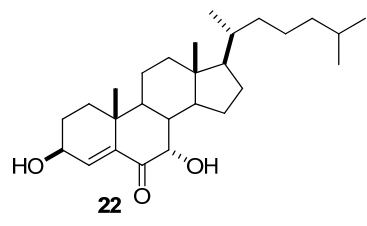
Se disolvió 3 β ,7 α -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**21**) (0.1 g, 0.2 mmol), en una disolución de KOH:MeOH al 5% (10 mL) y se dejó reaccionando 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 0.1 g de 3 β ,7 α -dihidroxicolest-4-en-6-ona (**22**), semisólido blanco, 99%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.39 (H4, 1H, s); 4.63 (H7 β , 1H, d, J = 2.4 Hz); 3.51 (H3 α , 1H, m); 1.13 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.66 (H18, 3H, s).

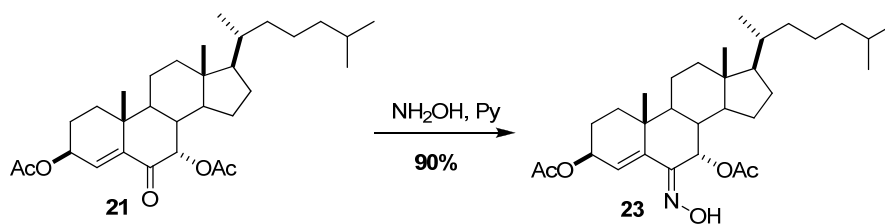
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 196.3 (C6, s); 141.7 (C5, s); 131.0 (C4, d); 68.7 (C7, d); 63.3 (C3, d); 55.3; 48.7; 46.7; 44.5; 42.4; 39.5; 38.6; 37.9; 36.6; 34.4; 27.9; 26.8; 24.7; 23.3; 23.1; 22.8; 22.6; 22.1; 20.8; 20.2; 17.1 (C19, q); 11.2 (C18, q).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 439 ($[M + Na]^+$, 100); 399 (100).

$[\alpha]_D$ = -25.2° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



1.2.9. Síntesis de 3 β ,7 α -diacetoxi-6Z-hidroxiimino-4-colesteno (**23**)



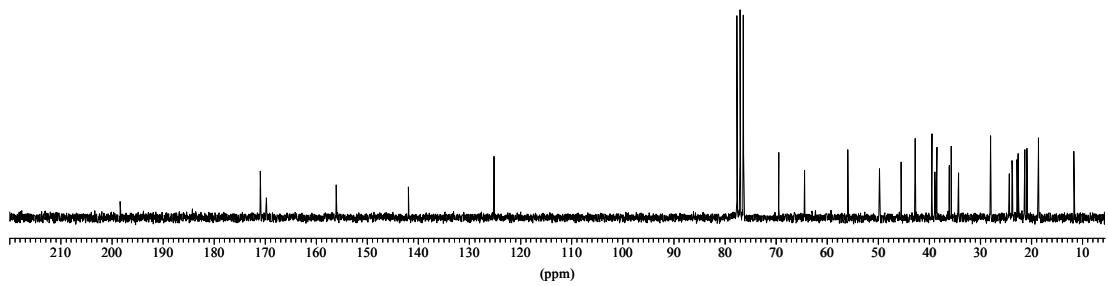
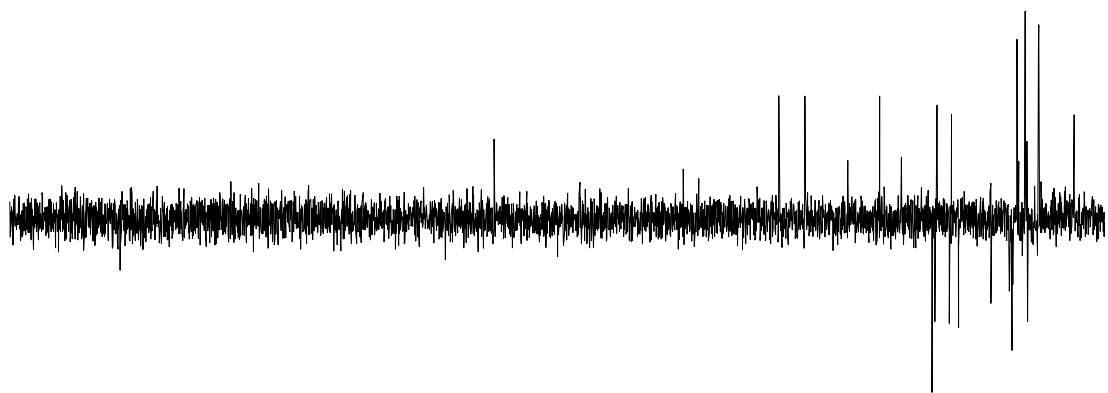
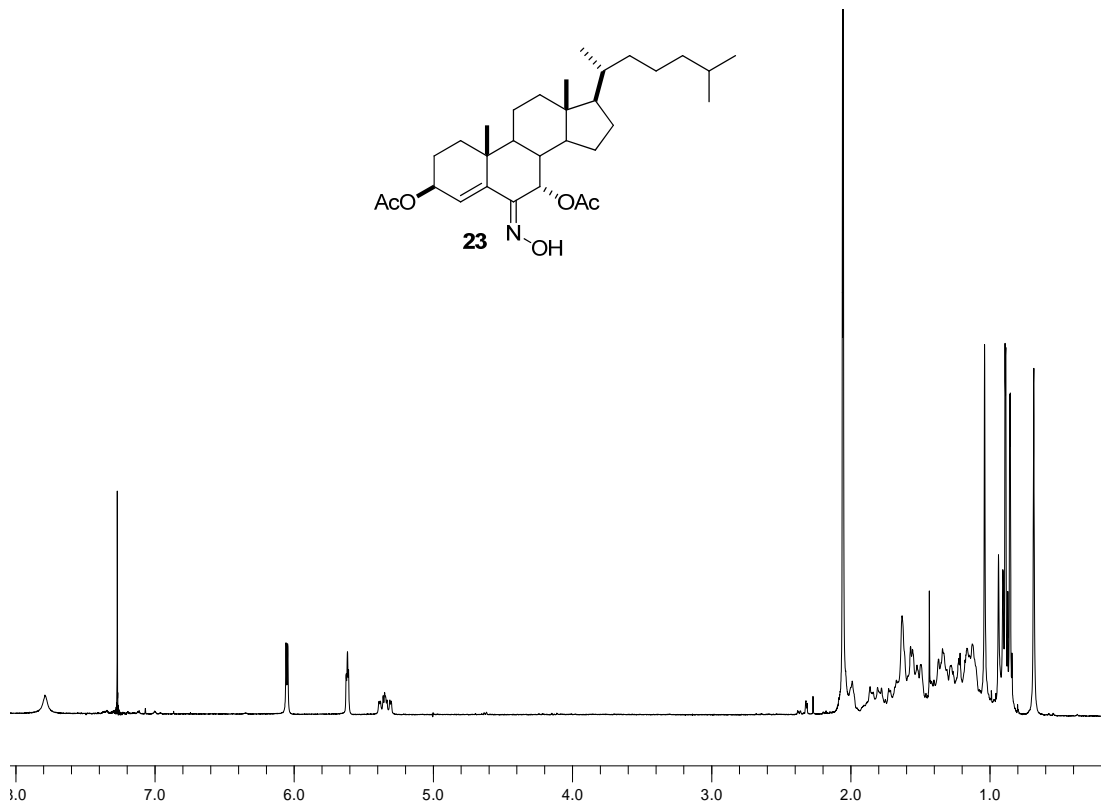
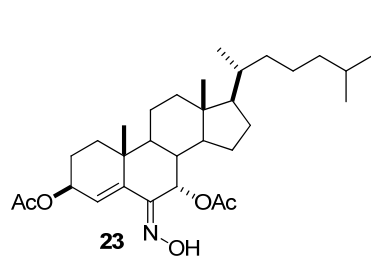
Se disolvió 3 β ,7 α -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**21**) (0.82 g, 2.1 mmol), y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (1.05 g, 15.0 mmol) en piridina (20 mL) y se dejó reaccionando a t.a. durante 4 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 0.74 g de 3 β ,7 α -diacetoxi-6Z-hidroxiimino-colest-4-eno (**23**), semisólido blanco, 90%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.97 (OH, 1H, sa); 6.05 (H4, 1H, d, $J = 2.4$ Hz); 5.61 (H7 β , 1H, s); 5.34 (H3 α , 1H, m); 2.05 (OAc, 6H, s); 1.03 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.5$ Hz); 0.67 (H18, 3H, s).

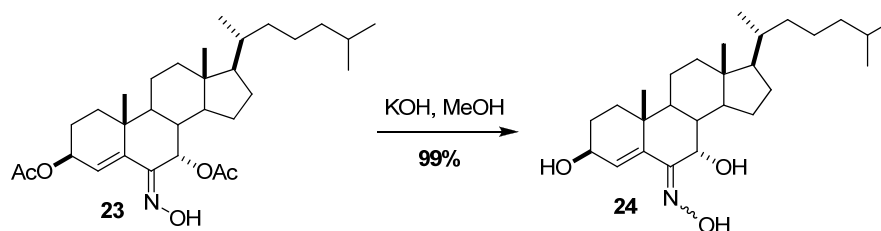
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.9 (OAc, s); 169.8 (OAc, s); 156.1 (C6, s); 141.9 (C5, s); 125.1 (C4, d); 69.4 (C7, d); 64.3 (C3, d); 56.4; 50.2; 46.7; 43.4; 38.6; 38.0; 37.8; 36.7; 36.1; 35.8; 35.6; 34.3; 27.9; 24.6; 24.6; 23.9; 23.7; 23.5; 22.5; 21.5; 20.5; 19.8; 18.6 (C19, q);

LREIMS (70 eV, m/z %): 515 (M^+ , 2); 55 (100).

$[\alpha]_D$ = +27.6° [$c = 0.1$, CH_2Cl_2].



1.2.10. Síntesis de 3 β ,7 α -dihidroxi-6E/Z-hidroximinoolest-4-eno (**24**)



Se disolvió 3 β ,7 α -diacetoxi-6Z-hidroximinoolest-4-eno (**23**) (0.11 g, 0.2 mmol), en una disolución de KOH:MeOH al 5% (10 mL) y se dejó reaccionando a t.a. durante 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogándose 0.1 g de 3 β ,7 α -dihidroxi-6E/Z-hidroximinoolest-4-eno (**24**), semisólido blanco, 99%.

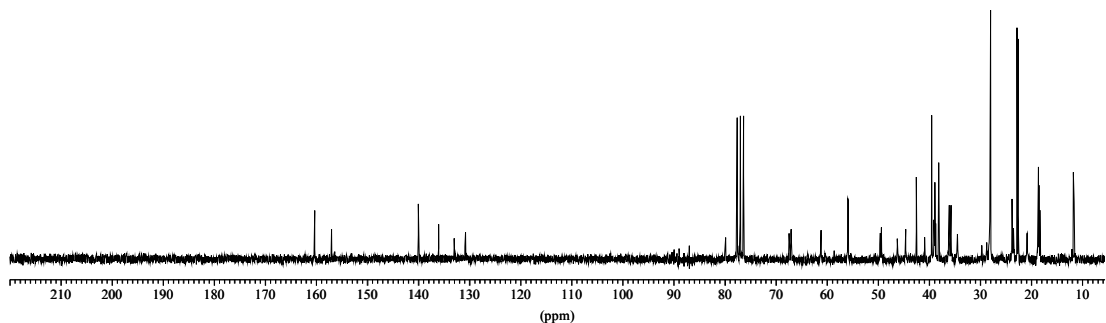
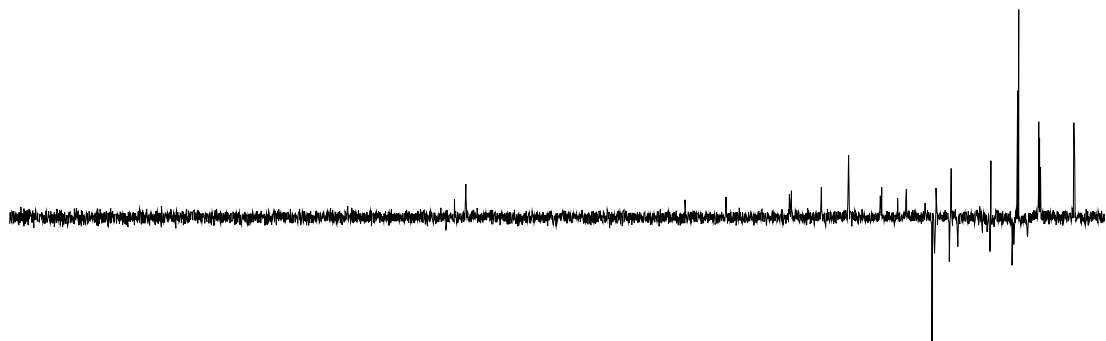
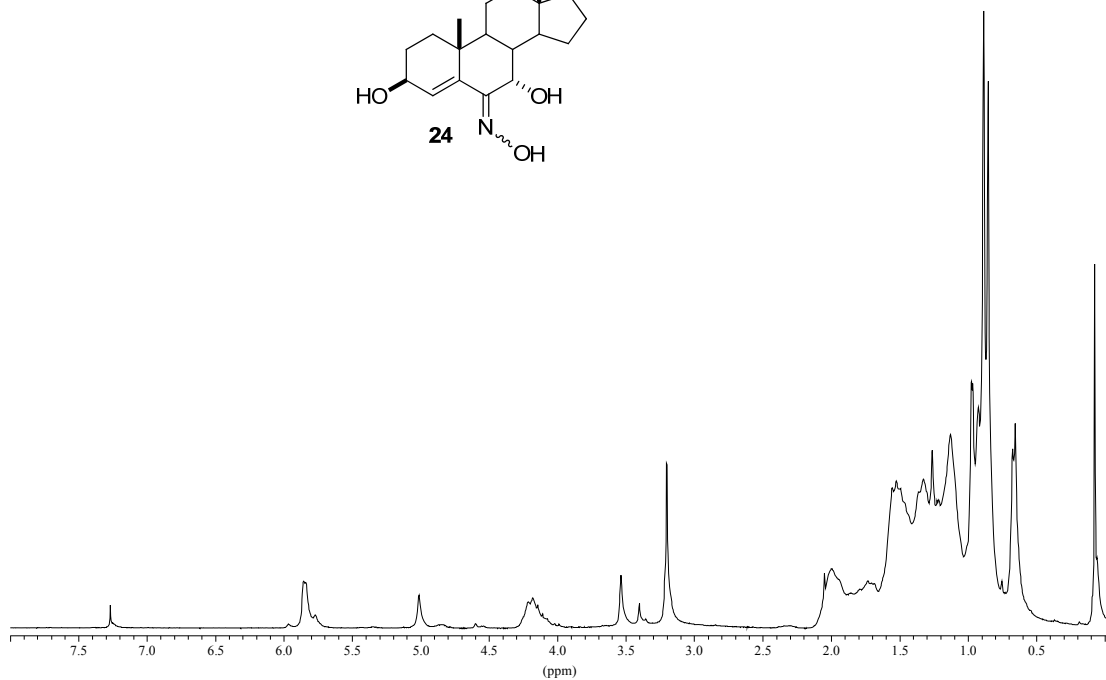
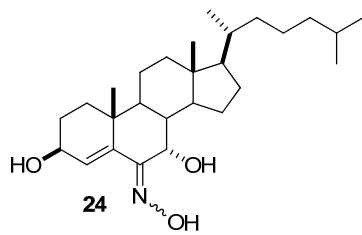
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.85/5.74 (H4, 1H, sa); 5.01 (H7 β , 1H, s); 4.14 (H3 α , 1H, m); 0.98 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, $J = 6.4$ Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.1$ Hz); 0.64 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 160.3/157.6 (C6, s); 139.9/137.6 (C5, s); 136.0/131.1 (C4, d); 79.8 (C7, d); 61.2 (C3, d); 57.2; 45.5; 44.3; 42.5; 40.8; 39.9; 39.4; 39.0; 38.7; 38.2; 37.8; 36.5; 36.4; 35.5; 28.7; 28.4; 23.7; 23.3; 21.3; 20.2; 18.4 (C19, q); 11.7 (C18, q).

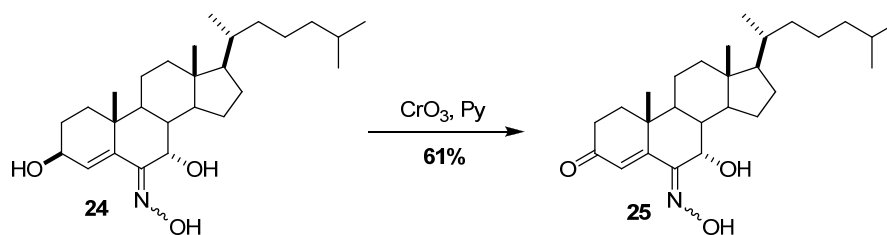
(+)-LRFABMS, m/z (%): 454 ($[M + Na]^+$, 12); 414 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 432.3453 $[M + H]^+$ (calcd. para C₂₇H₄₆NO₃, 432.3472).

$[\alpha]_D$ = +19.2° [$c = 0.1$, CH₂Cl₂].



1.2.11. Síntesis de 7 α -hidroxi-6*E/Z*-hidroximinocolest-4-en-3-ona (25)



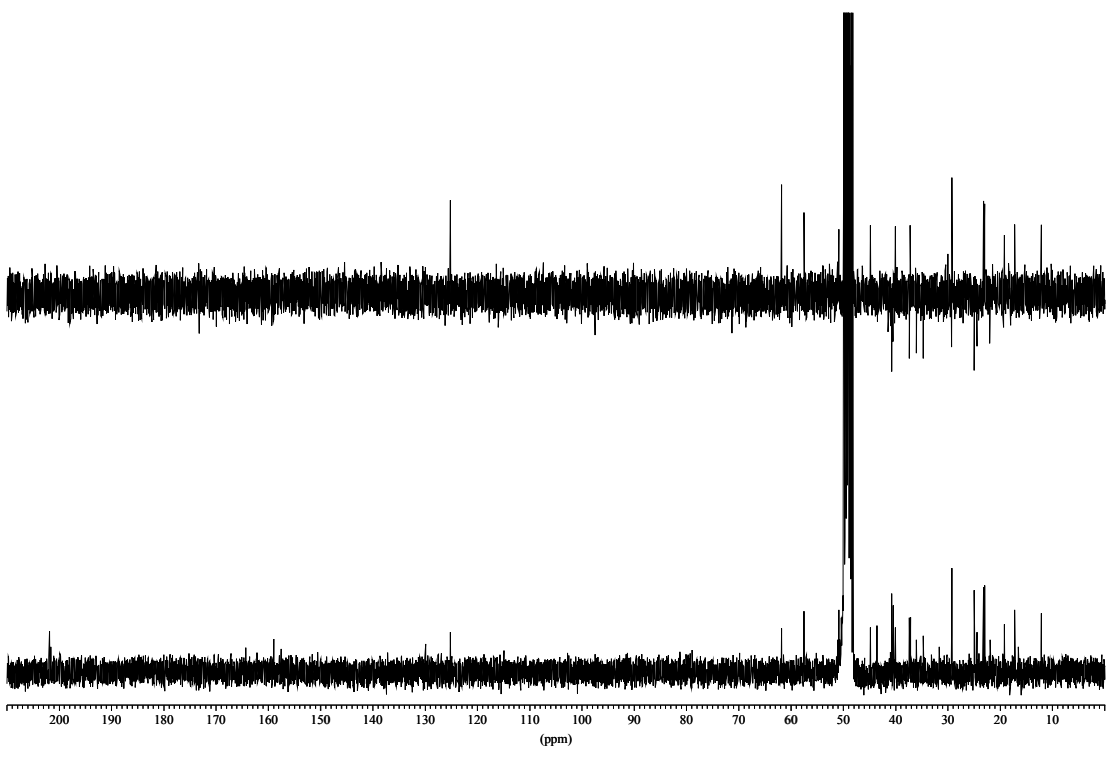
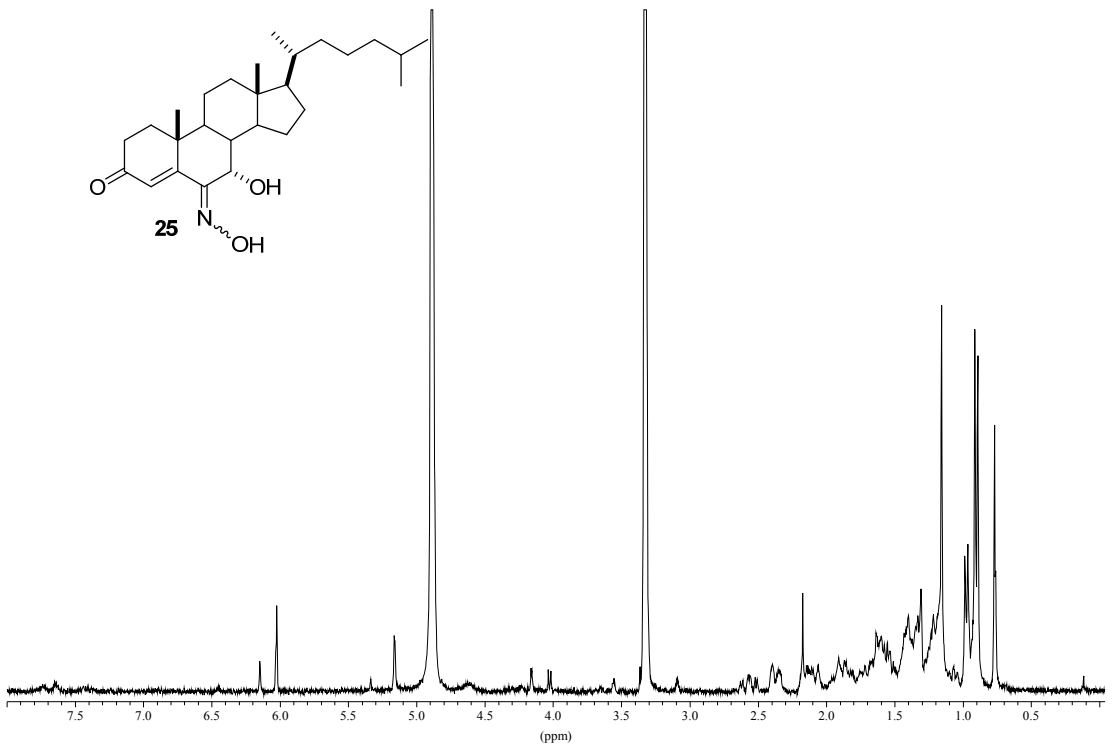
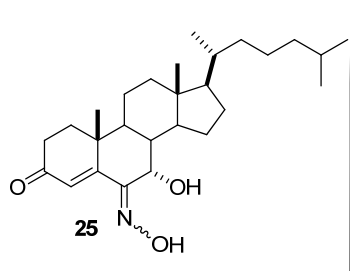
Sobre una disolución de CrO₃ (0.15 g, 0.3 mmol) en piridina. (2 mL) a 0°C se adicionó otra disolución de 3 β ,7 α -dihidroxi-6*E/Z*-hidroximinocolest-4-eno (**24**) (15 mg), en piridina (2 mL). Se dejó evolucionar a t.a. durante 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **14** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)] y fue repurificado por HPLC en fase reversa, empleando MeOH:H₂O (9:1) como fase móvil, obteniéndose 6 mg del 7 α -hidroxi-6*E/Z*-hidroximinocolest-4-en-3-ona (**25**), semisólido blanco, 61%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 6.15/6.01 (H4, 1H, s); 5.13 (H7 β , 1H, s); 2.57 (H2, 2H, dt, $J = 16.4, 5.2$ Hz); 1.15 (H19, 3H, s); 0.98 (H21, 3H, d, $J = 6.6$ Hz); 0.90 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.6$ Hz); 0.77 (H18, 3H, s).

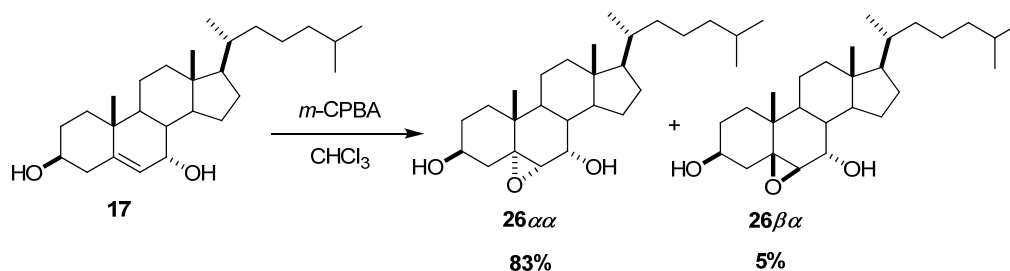
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 201.8/201.6 (C3, s); 164.3 (C6, s); 158.9/157.6 (C5, s); 129.8/125.1 (C4, d); 61.7 (C7, d); 57.4 (C14, d); 50.8 (C17, d); 50.2 (C9, d); 48.6 (C13, d); 48.1 (C24, t); 44.8 (C12, t); 43.5 (C10, s); 40.6 (C22, t); 39.9 (C20, d); 37.1 (C1, t); 35.9 (C2, t); 34.9 (C8, d); 29.2 (C16, t); 29.1 (C25, q); 24.9 (C15, t); 24.4 (C23, t); 23.1 (C26, q); 22.9 (C27, q); 21.8 (C11, t); 19.2 (C21, q); 17.2 (C19, q); 12.1 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 429 (M⁺, 5); 149 (100).

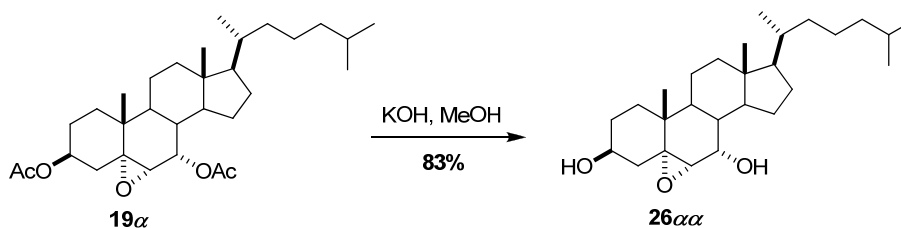
$[\alpha]_D = +6.2^\circ$ [$c = 0.1, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



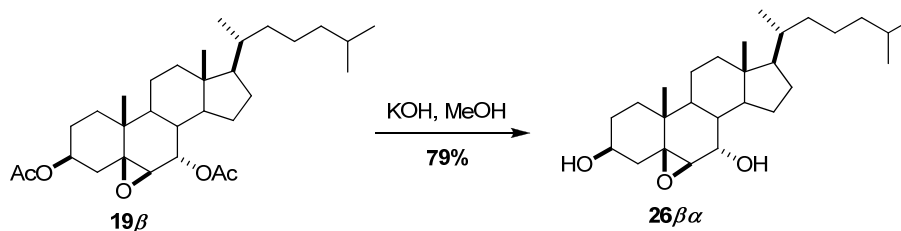
1.2.12. Síntesis de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano ($26\alpha\alpha$) y $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano ($26\beta\alpha$)



A partir del $3\beta,7\alpha$ -dihidroxicolest-5-eno (**17**) (0.3 g, 1.2 mmol) disuelto en CHCl_3 (10 mL) se adicionó gota a gota una disolución de m -CPBA (0.3 g, 1.8 mmol) a 0°C en CHCl_3 (10 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para los epóxidos **9 α** y **9 β** se obtuvo el crudo de reacción que purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiendo 0.25 g de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**26 $\alpha\alpha$**) con un 83% y 15 mg de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano (**26 $\beta\alpha$**), 5%, ambos semisólidos blancos con un rendimiento global del 88%.



Se disolvió $3\beta,7\alpha$ -diacetoxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**19 α**) (0.1 g, 0.2 mmol), en una disolución de KOH:MeOH al 5% (8 mL) y se dejó reaccionando 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiendo 83 mg de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**26 $\alpha\alpha$**), semisólido blanco, 83%.



Se disolvió $3\beta,7\alpha$ -diacetoxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano (**19 β**) (0.1 g, 0.2 mmol), en una disolución de KOH:MeOH al 5% (8 mL) y se dejó reaccionando 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiendo 79 mg de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano (**26 $\beta\alpha$**), semisólido blanco, 79%.

26 α : RMN-¹H y RMN-¹³C: ver Tablas 4 y 5.

LREIMS (70 eV, m/z %): 418 (M^+ , 3); 95 (100).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 419 ($[M + H]^+$, 7); 401 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 419.3530 $[M + H]^+$ (calcd. para C₂₇H₄₇O₃, 419.3519), m/z 441.3353 $[M + Na]^+$ (calcd. para C₂₇H₄₆O₃Na, 441.3339).

$[\alpha]_D$ = -57.4° [c = 0.5, CH₂Cl₂].

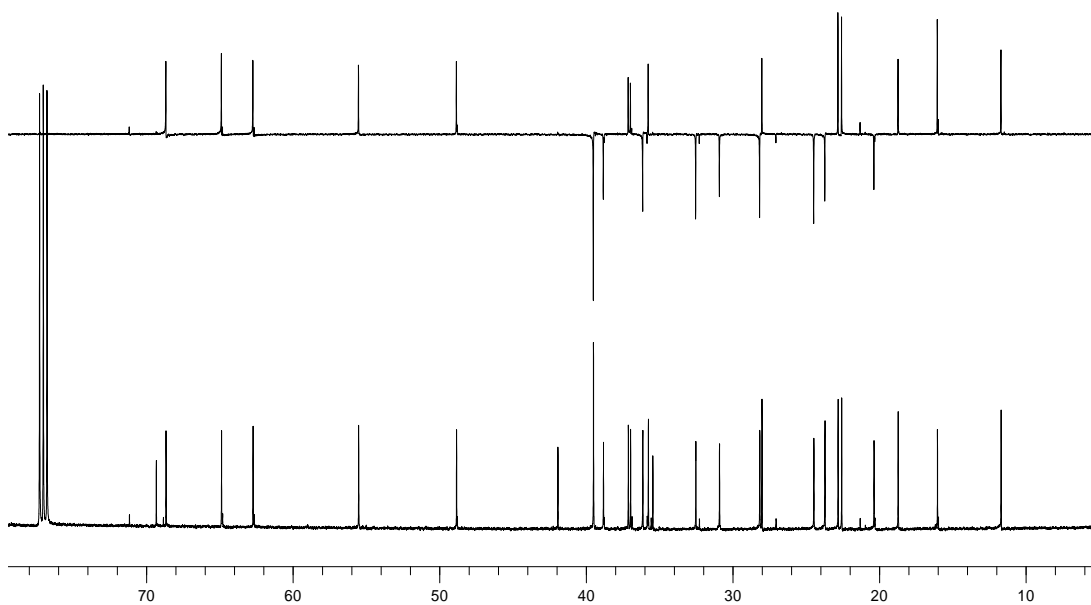
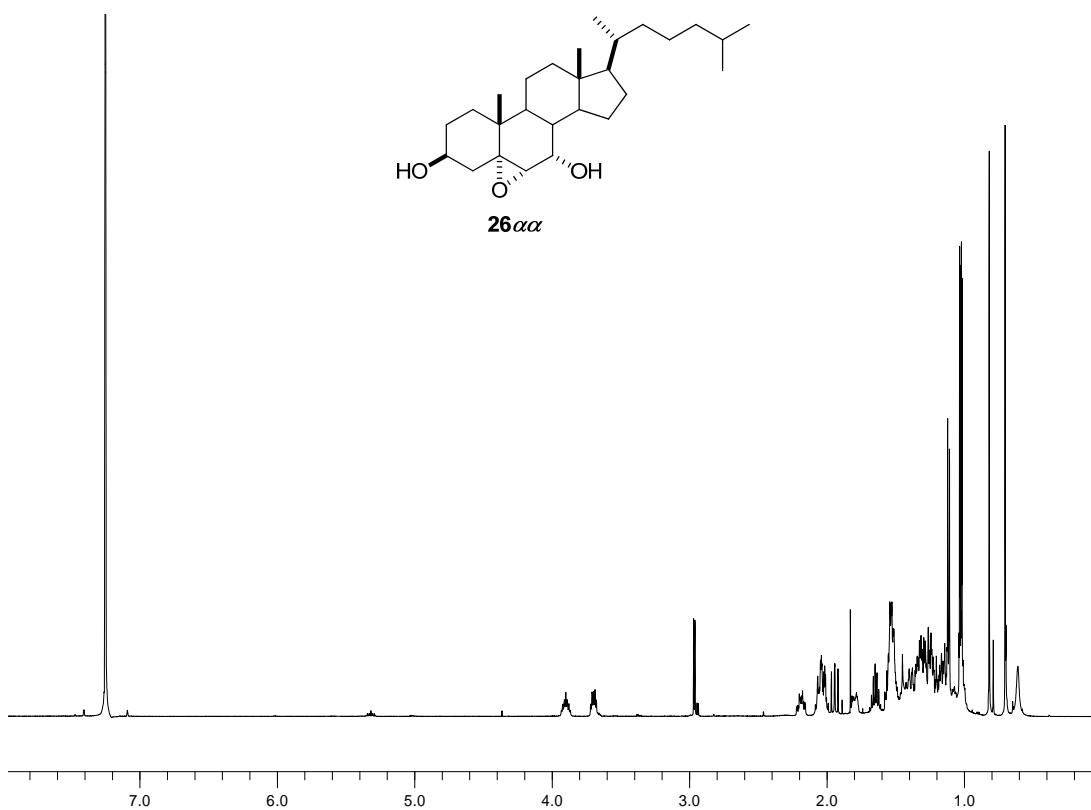
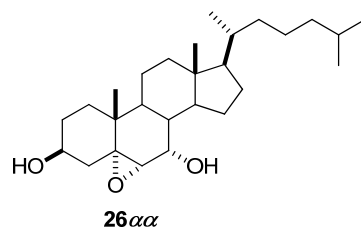
26 β : RMN-¹H y RMN-¹³C: ver Tablas 4 y 5.

LREIMS (70 eV, m/z %): 400 ($M^+ - H_2O$, 8); 95 (100).

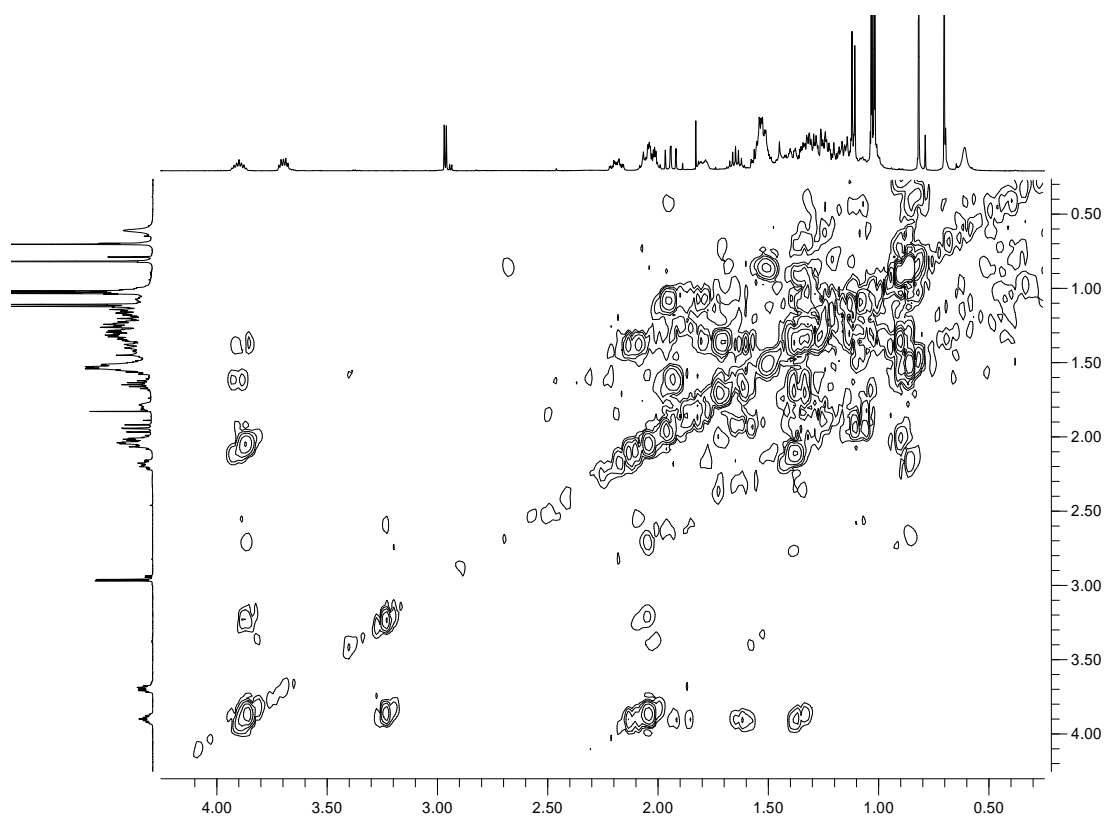
(+)-LRFABMS, m/z (%): 431 ($[M + Na]^+$, 7); 401 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 419.3532 $[M + H]^+$ (calcd. para C₂₇H₄₇O₃, 419.3519), m/z 441.3351 $[M + Na]^+$ (calcd. para C₂₇H₄₆O₃Na, 441.3339).

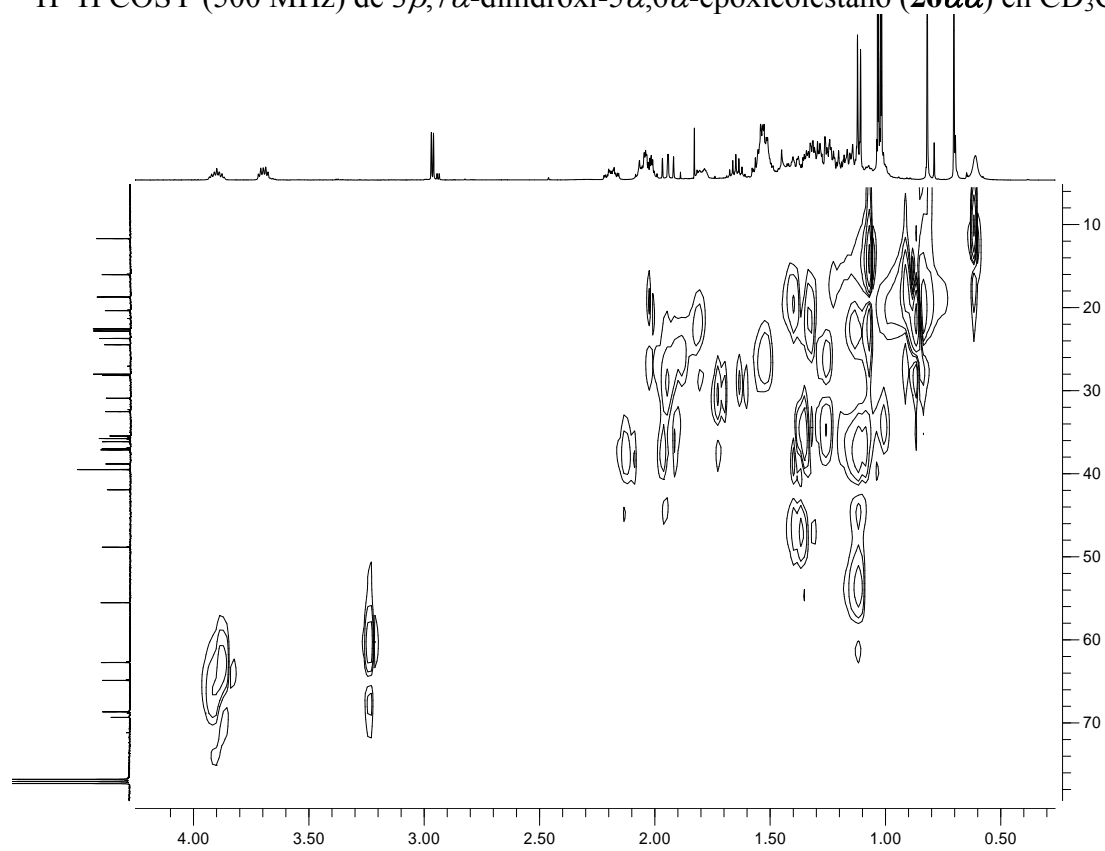
$[\alpha]_D$ = -9.4° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



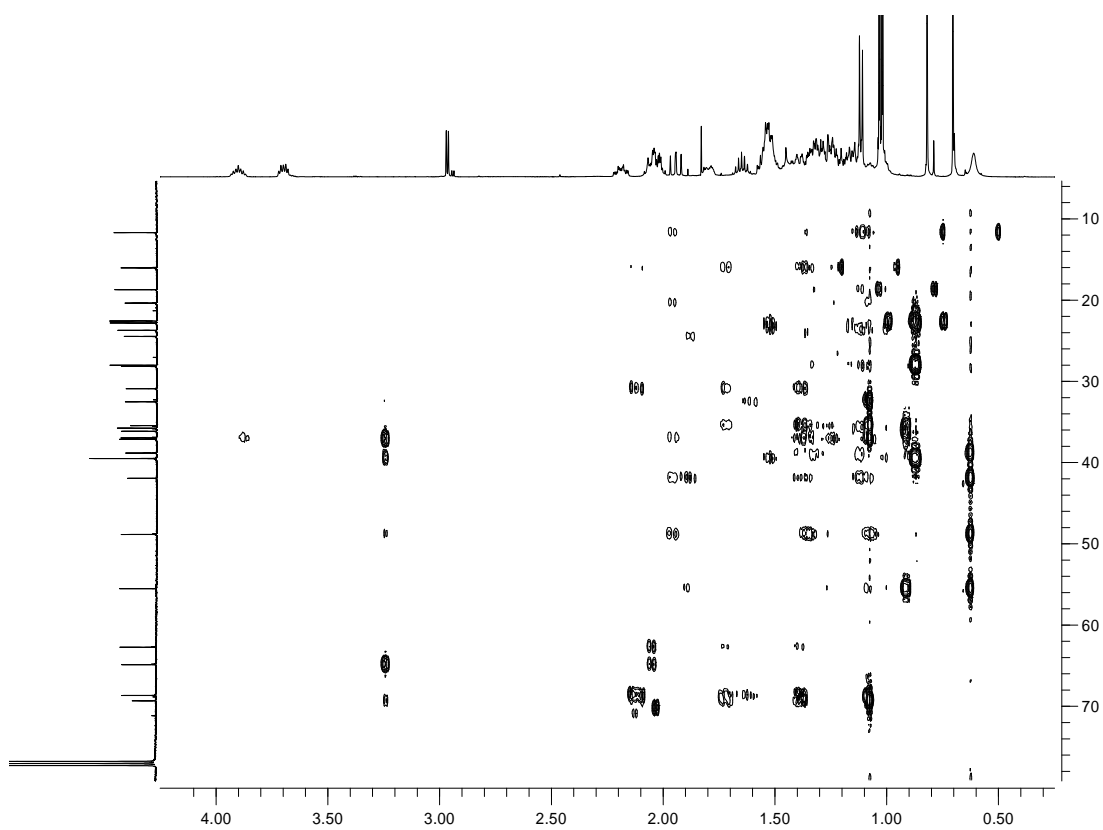
RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**26 α**) en CD_3Cl .



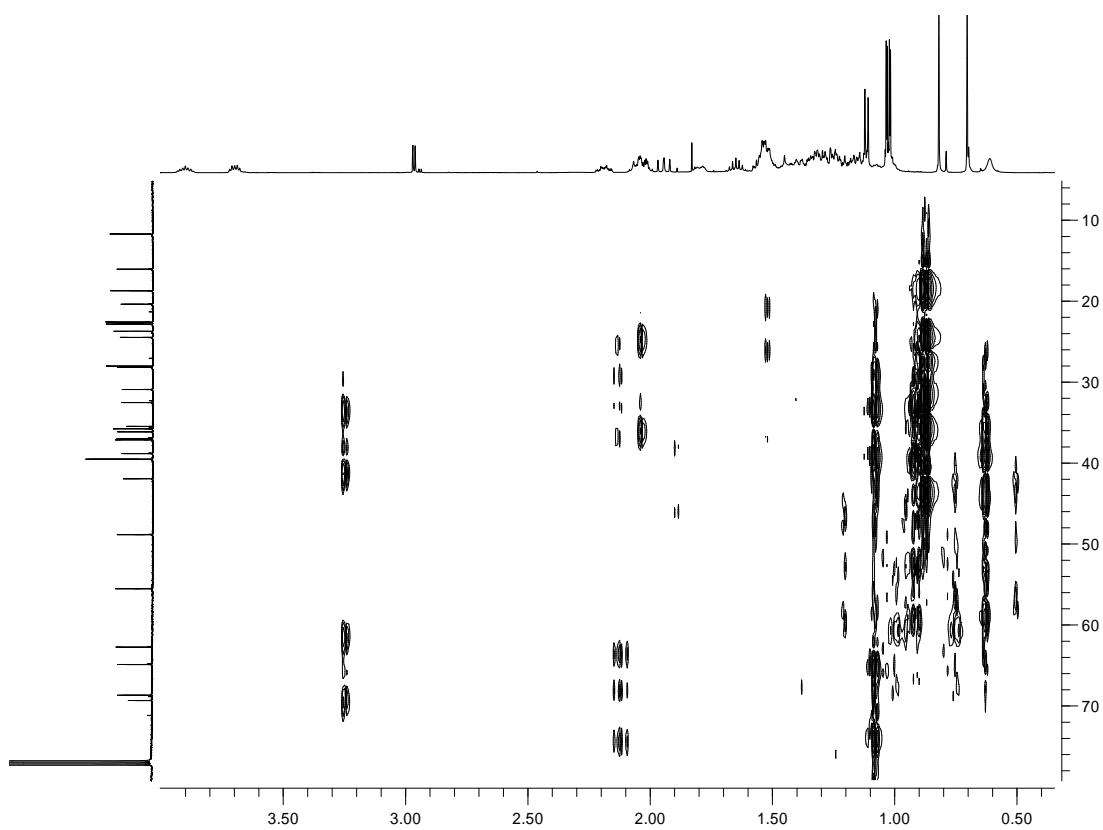
^1H ^1H COSY (500 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**26 $\alpha\alpha$**) en CD_3Cl .



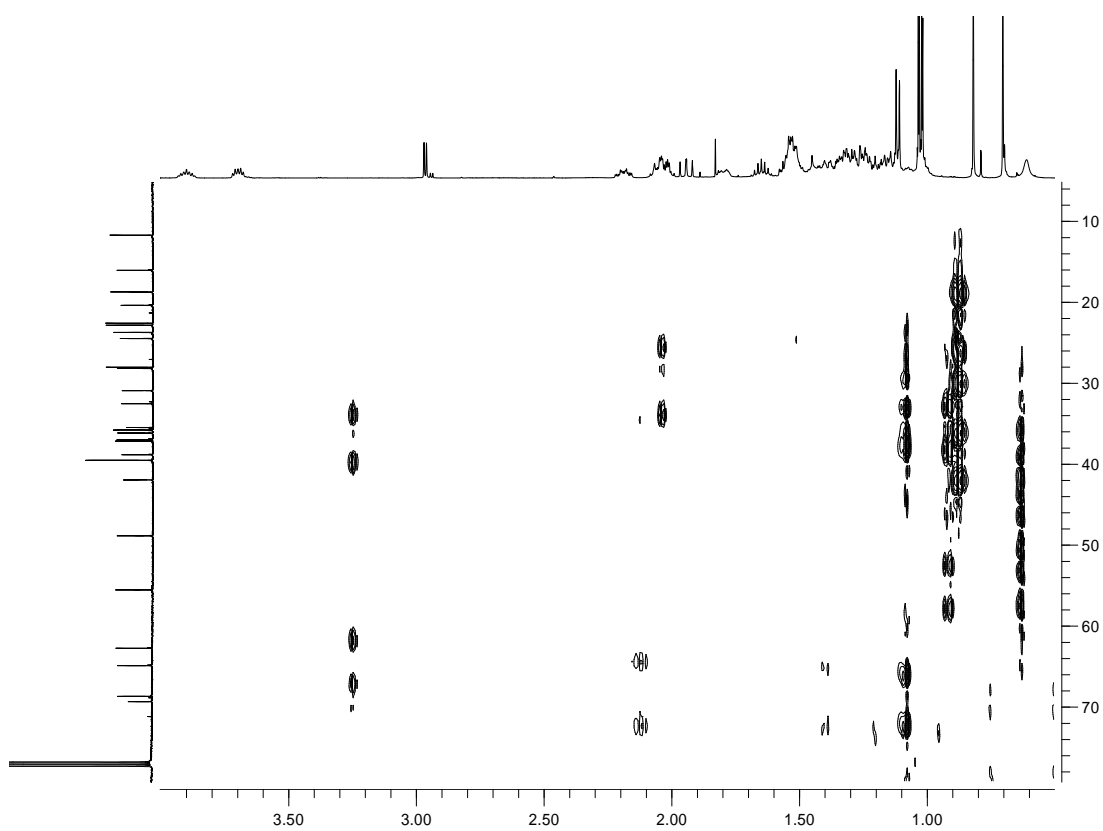
HSQC (500 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**26 $\alpha\alpha$**) en CD_3Cl .



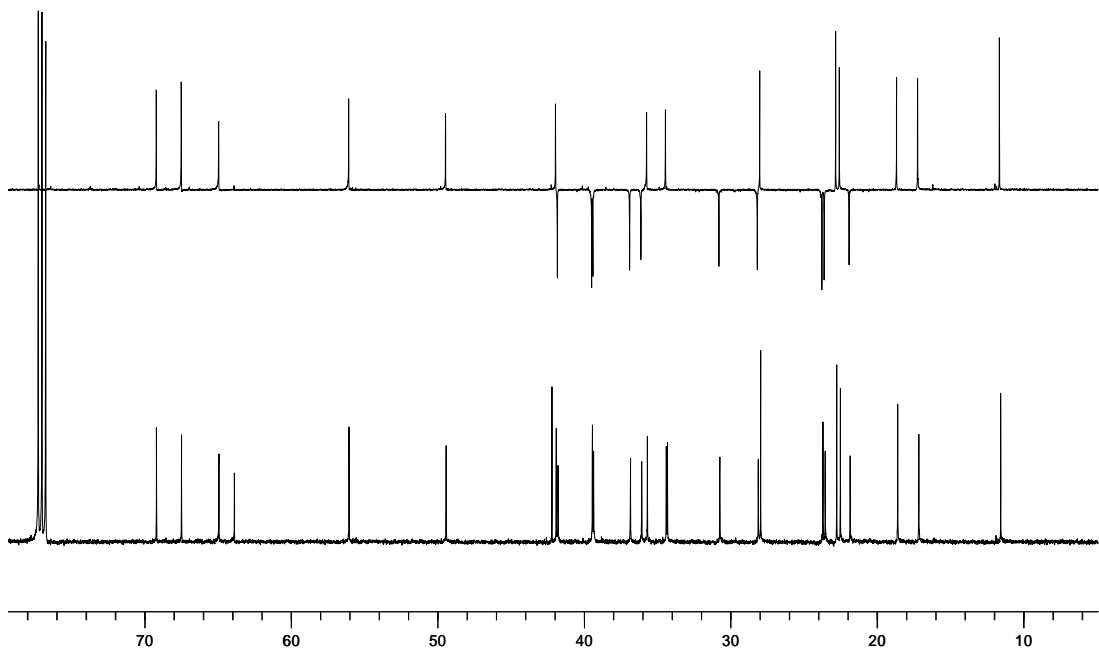
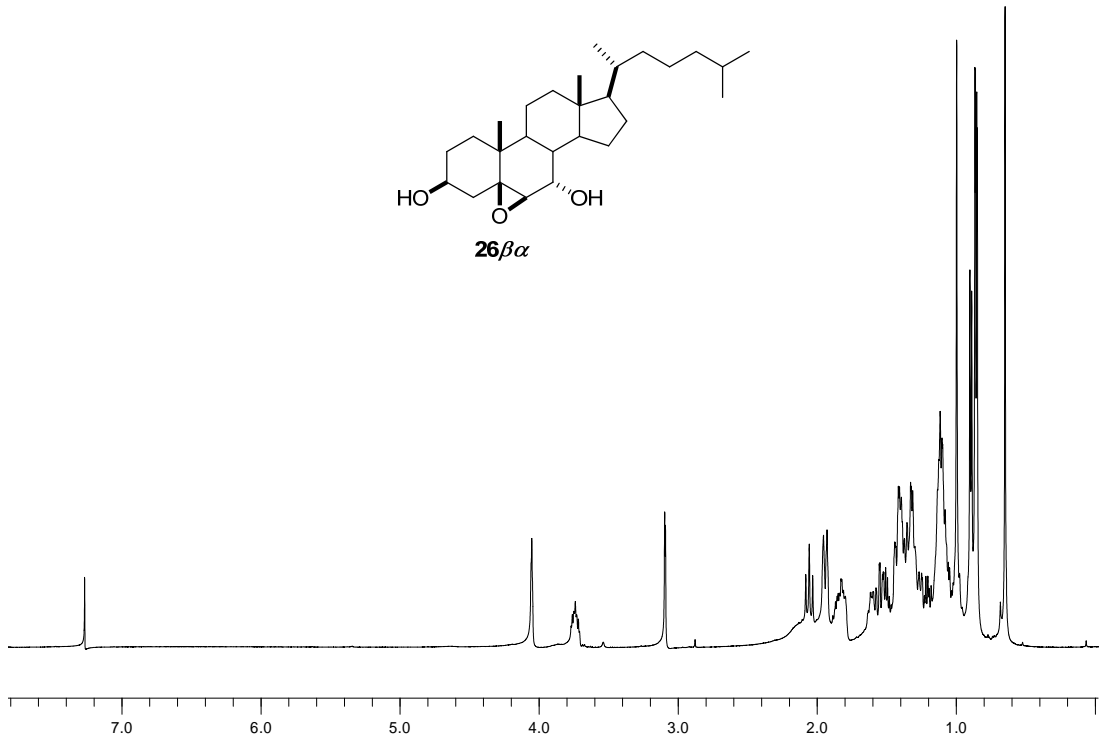
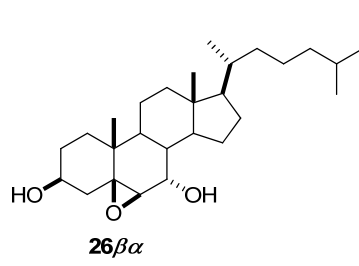
HMBC (500 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano ($26\alpha\alpha$) en CD_3Cl .



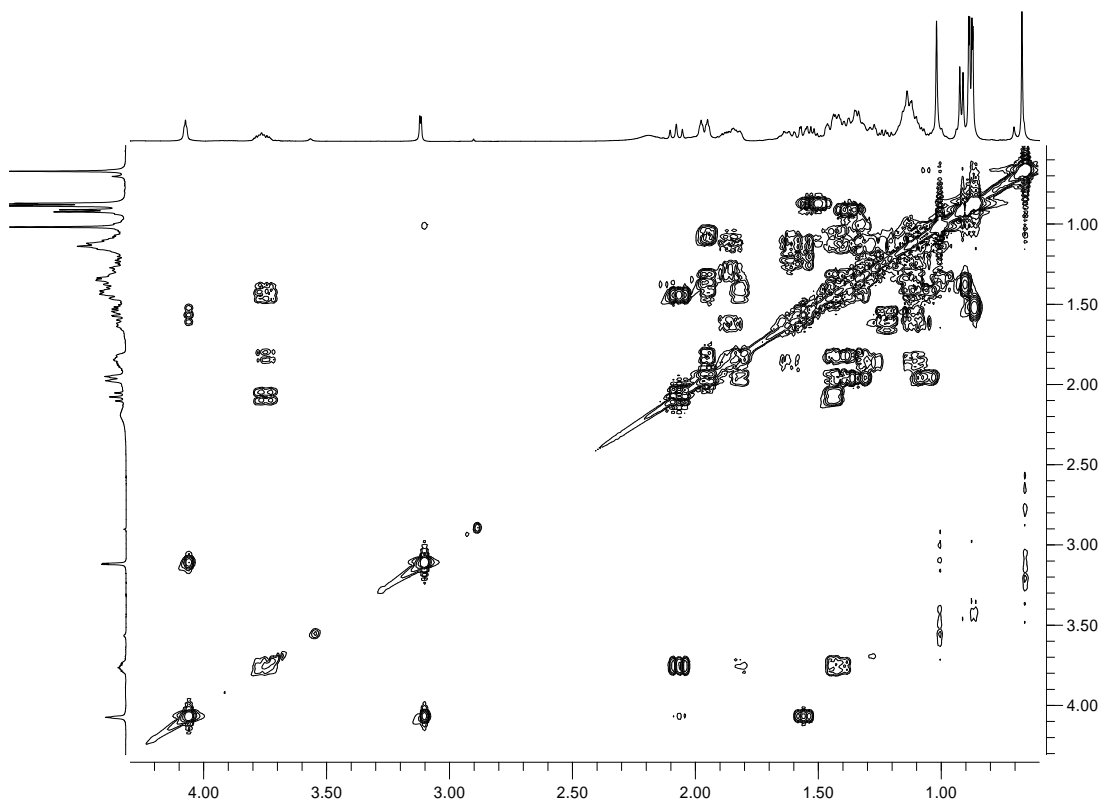
J-HMBC (scaleff 206, 500 MHz) del compuesto **26αα** en CD₃Cl.



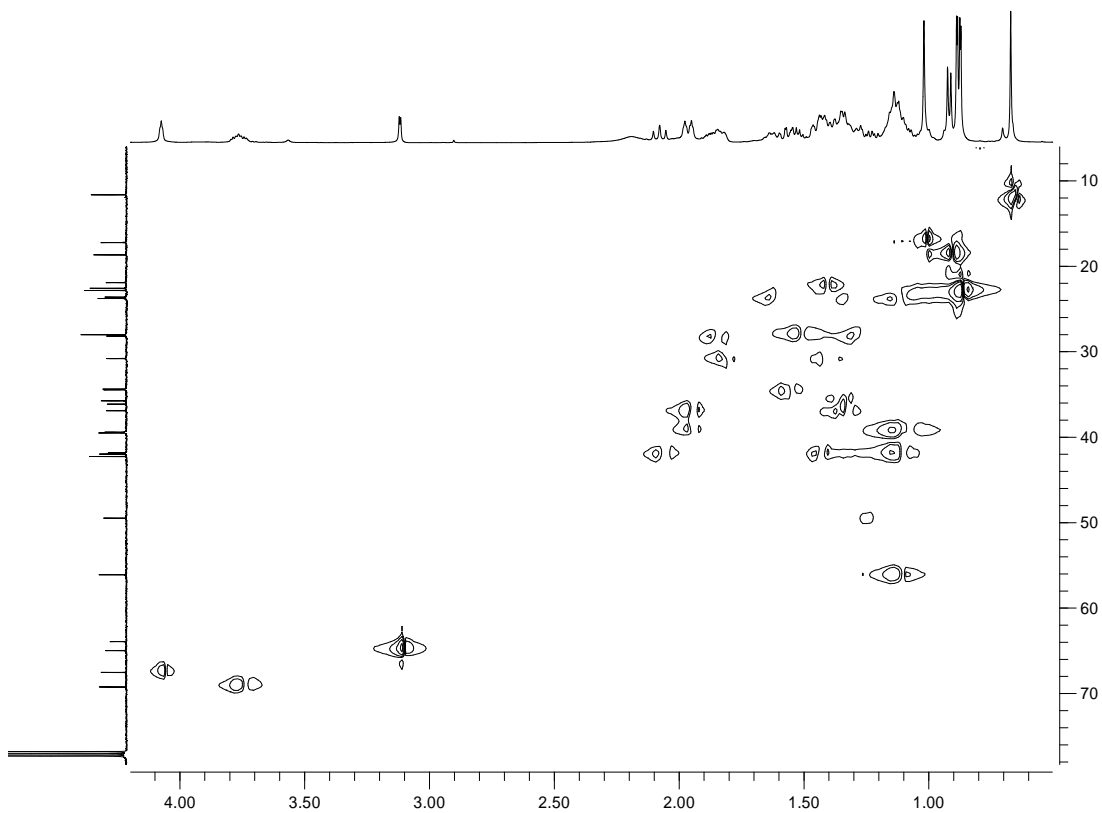
J-HMBC (scaleff 132, 500 MHz) del compuesto **26αα** en CD₃Cl.



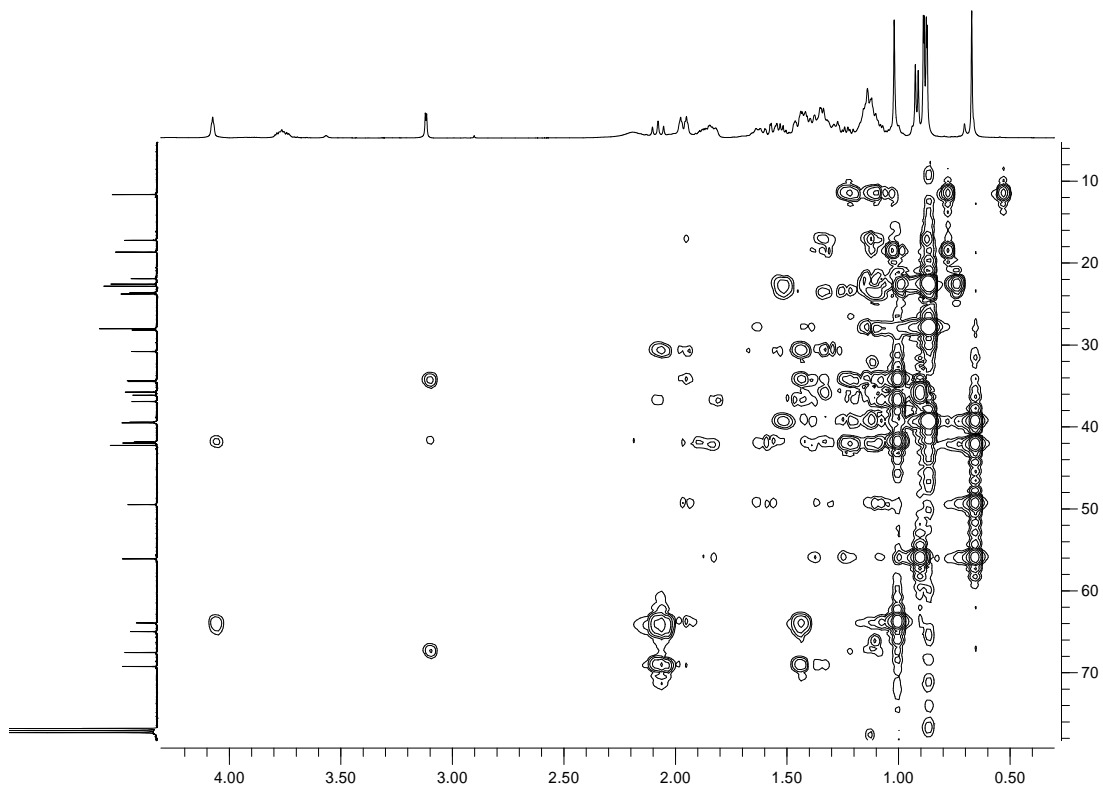
RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano (**26 β**) en CD_3Cl .



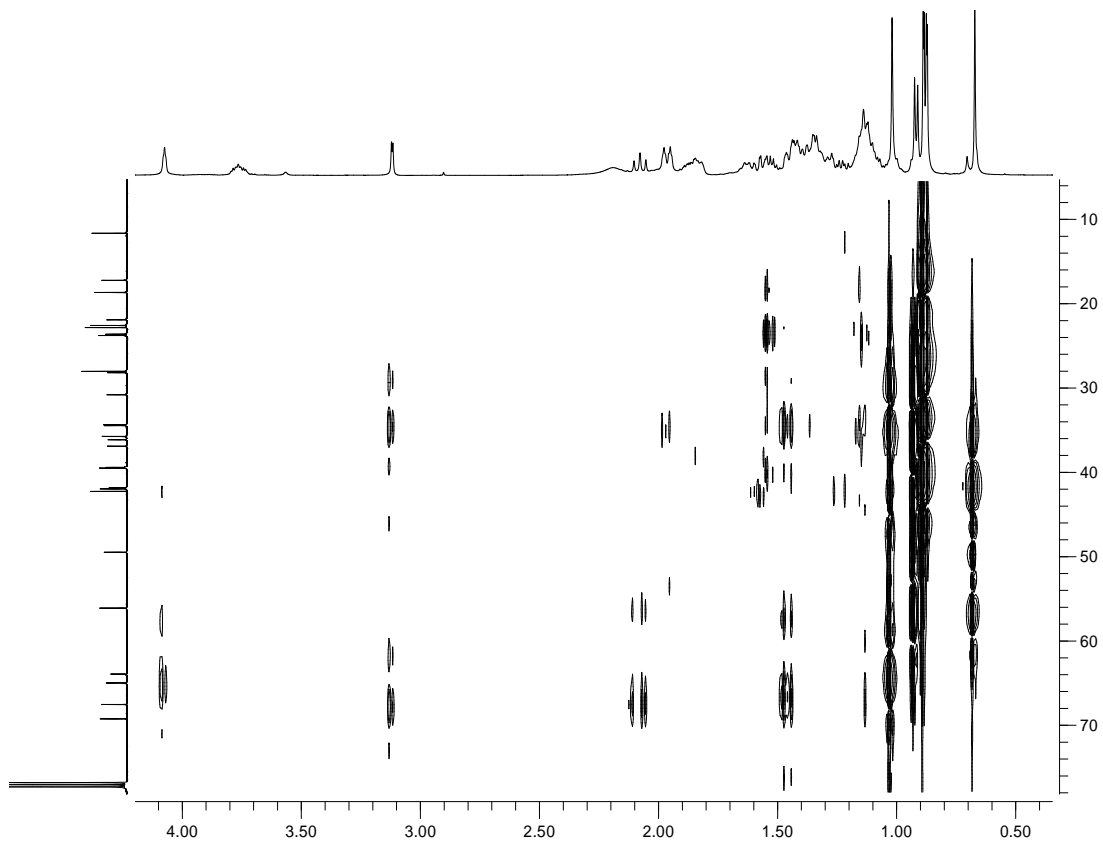
^1H ^1H COSY (500 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano ($26\beta\alpha$) en CD_3Cl .



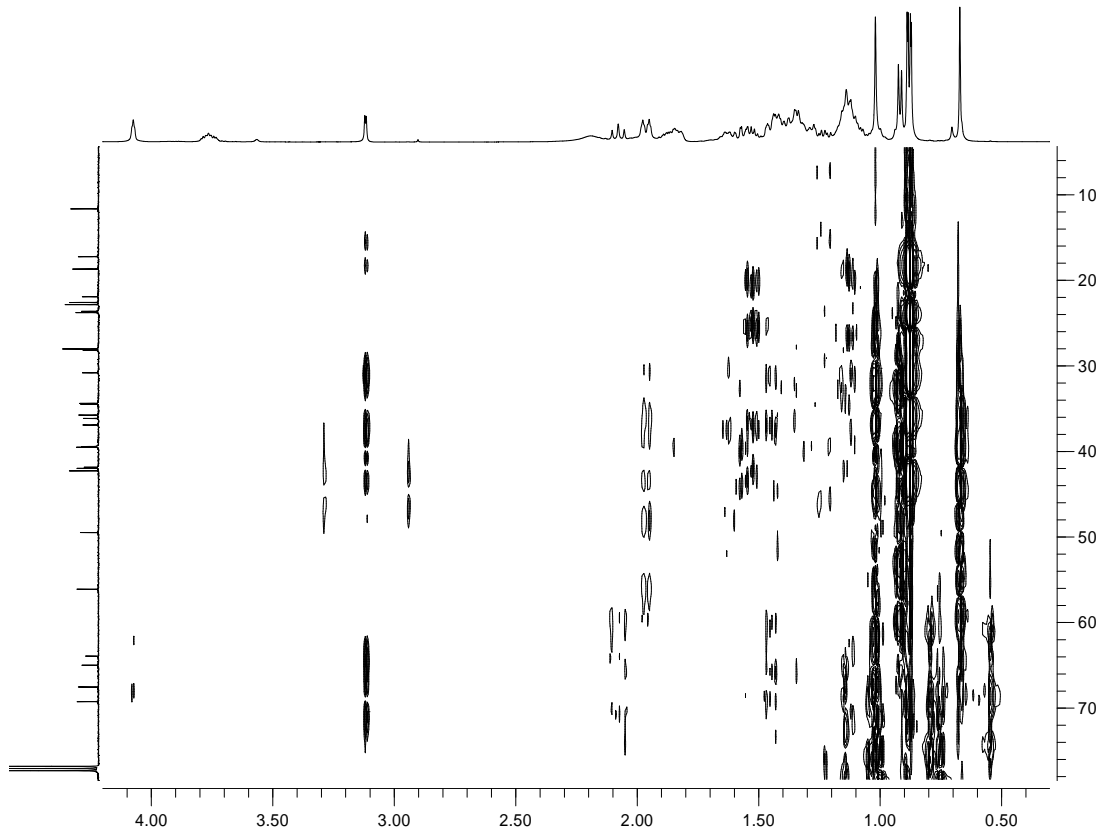
HSQC (500 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano ($26\beta\alpha$) en CD_3Cl .



HMBC (500 MHz) de $3\beta,7\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano (**26 $\beta\alpha$**) en CD_3Cl .



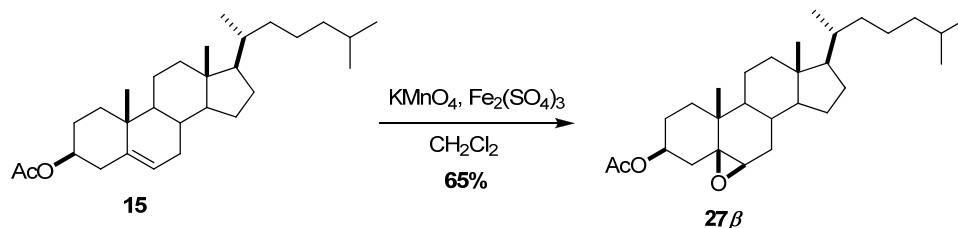
J-HMBC (scaleff 188, 500 MHz) del compuesto **26βα** en CD₃Cl.



J-HMBC (scaleff 185, 500 MHz) del compuesto **26βα** en CD₃Cl.

1.3. Síntesis de análogos con un grupo epóxido entre las posiciones C-4/C-5.

1.3.1 Síntesis de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (27 β)



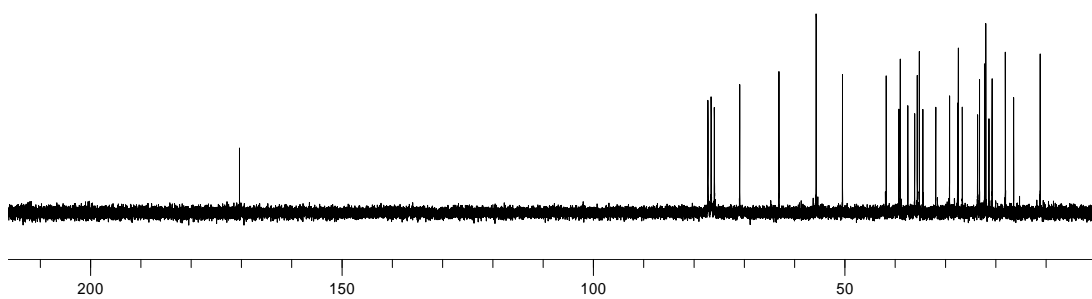
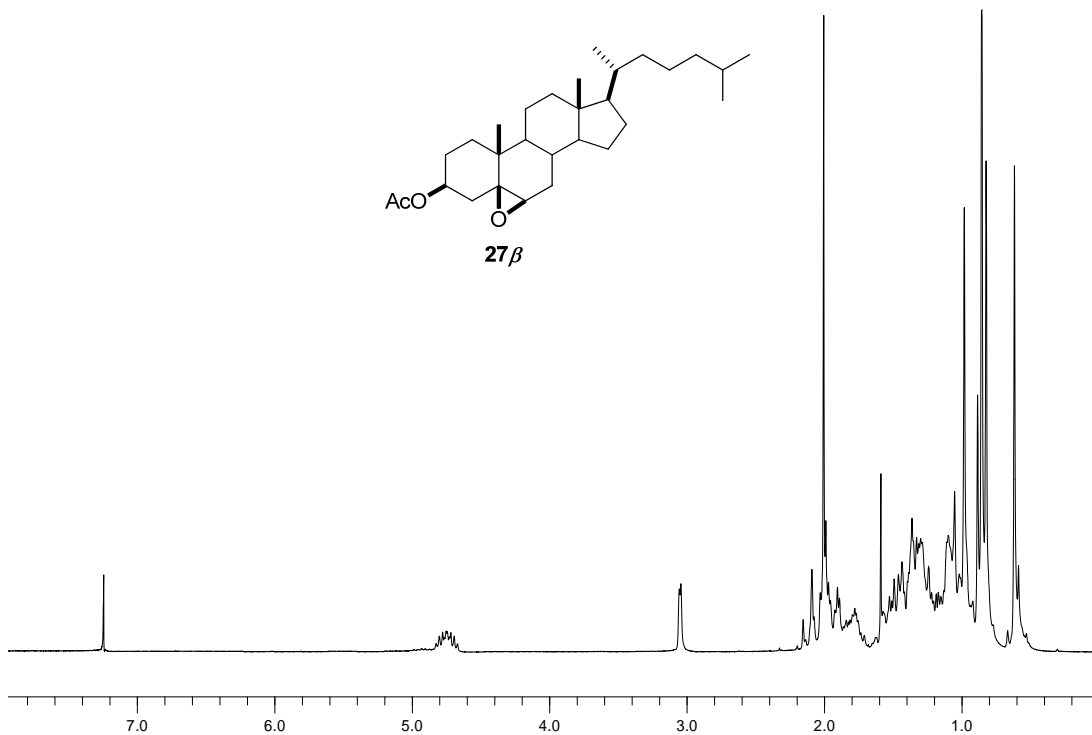
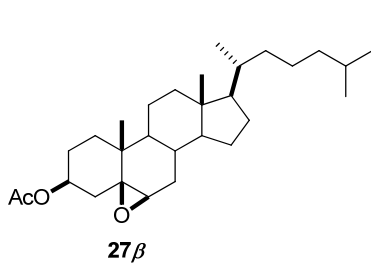
Sobre una suspensión de KMnO_4 (24 g, 3.8 mmol), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (12.0 g, 16.3 mmol) y agua (1.2 mL) en CH_2Cl_2 (50 mL), se adicionó 3 β -acetoxicolest-5-eno (**15**) (5.0, 11.7 mmol) y se dejó reaccionando durante 3 h. Al cabo de este tiempo el producto se separó del residuo inorgánico adicionando Et_2O (100 mL) y filtrando con celita. El filtrado se lavó con agua y se secó sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 3.25 g de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**27 β**), semisólido blanco, 65%.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4.78 (H3 α , 1H, m); 3.08 (H6 α , 1H, d, $J = 1.5$ Hz); 2.01 (OAc, 3H, s); 1.08 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 5.4$ Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, $J = 5.9$ Hz); 0.61 (H18, 3H, s).

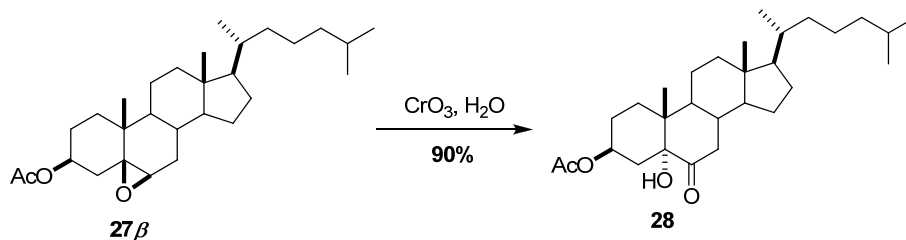
RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.5 (OAc, s); 71.3 (C3, d); 63.5 (C6, d); 56.8; 56.0; 50.2; 42.2; 39.6; 39.4; 36.8; 36.2; 35.7; 32.0; 31.6; 29.2; 28.3; 27.9; 27.7; 25.8; 25.6; 24.2; 22.7; 22.5; 21.7; 21.3; 20.6; 20.3; 16.9 (C19, q); 11.7 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 444 (M^+ , 2); 84 (100).

$[\alpha]_{\text{D}} = -0.8^\circ$ [$c = 0.5$, CH_2Cl_2].



1.3.2. Síntesis de 3 β -acetoxi-5 α -hidroxicolestan-6-ona (**28**)



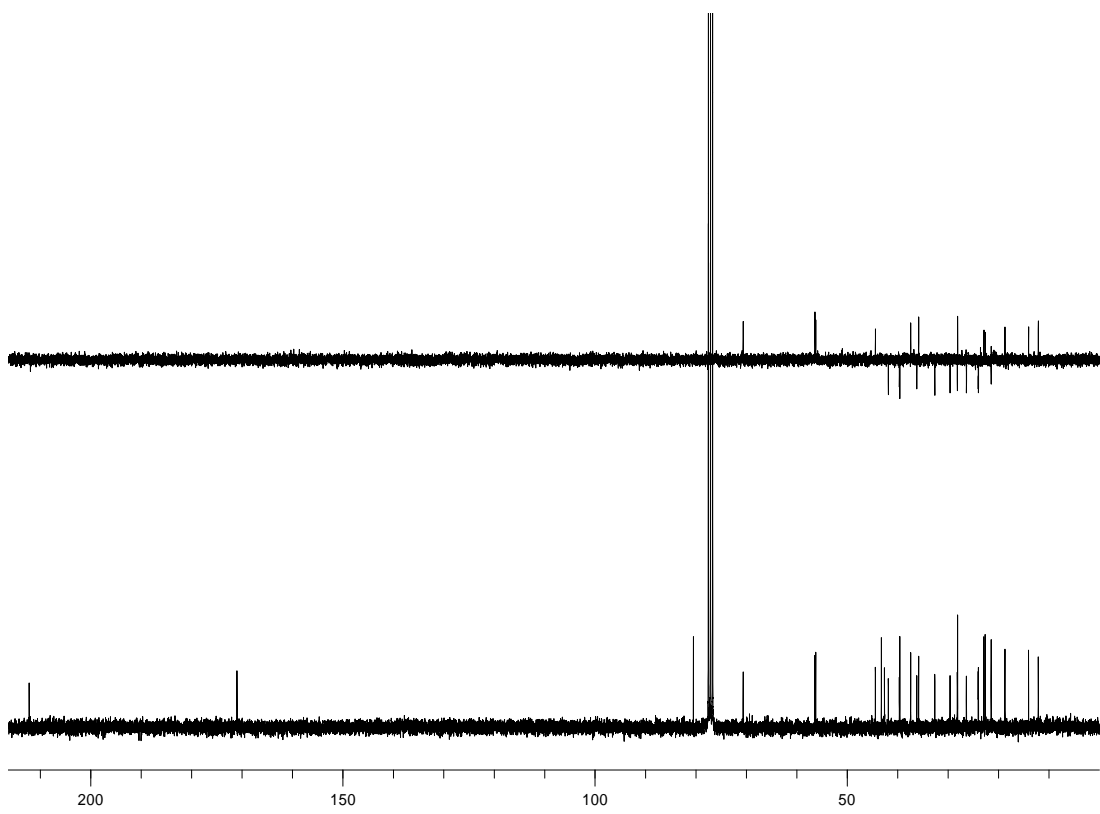
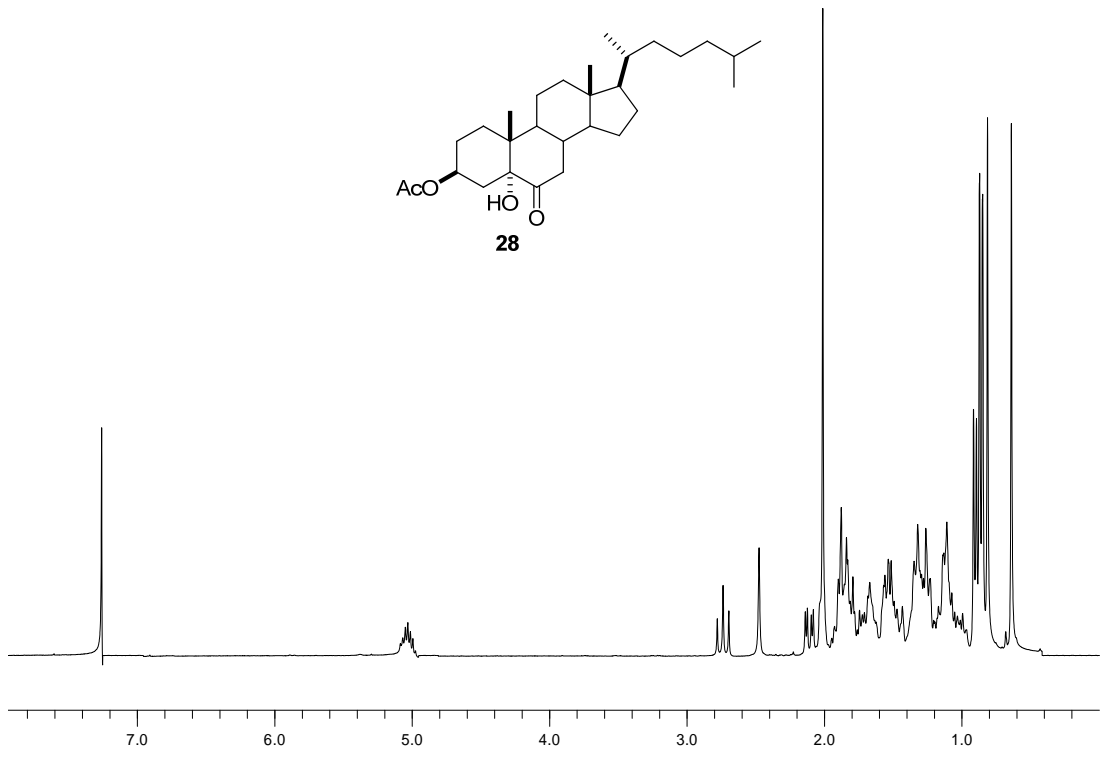
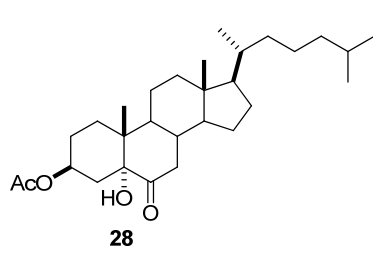
Sobre una disolución de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**27 β**) (2.5 g, 5.75 mmol), en agua (100 mL) a 0°C, se adicionó gota a gota CrO₃ (2.1 g, 20.0 mmol) en agua (6 mL). Transcuridos 10 min. se llevó la reacción a t.a. En estas condiciones, se repitió otra adición igual a la anterior y al cabo de 1 h, se vertió la reacción en agua (400 mL), se eliminó el disolvente a presión reducida y el precipitado formado se extrajo con EtOAc (2 x 40 mL), se lavó con agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiendo 2.25 g de 3 β -acetoxi-5 α -hidroxicolestan-6-ona (**28**), semisólido blanco, 90%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.04 (H3 α , 1H, m); 2.75 (H7 β , 1H, t, J = 12.2 Hz); 2.02 (OAc, 3H, s); 1.05 (H19, 3H, s); 0.94 (H21, 3H, d, J = 5.9 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.64 (H18, 3H, s).

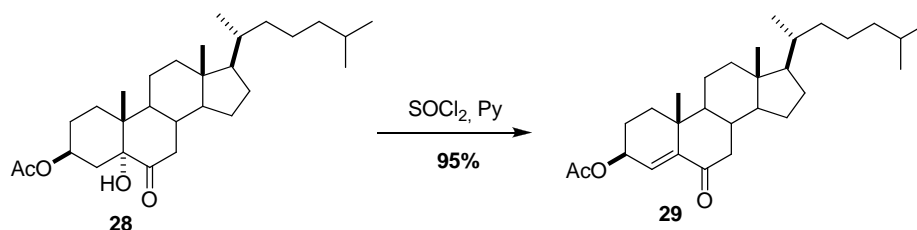
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 210.0 (C6, s); 171.1 (OAc, s); 81.3 (C5, s); 71.7 (C3, d); 56.8; 56.0; 50.2; 42.2; 39.6; 39.4; 36.8; 36.2; 35.7; 34.3; 32.0; 31.6; 27.9; 27.7; 25.8; 25.6; 24.2; 22.7; 22.5; 21.7; 21.3; 20.6; 20.3; 17.6 (C19, q); 12.4 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 460 (M⁺, 2); 92 (100).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -50.8° [c = 0.25, CH₂Cl₂].



1.3.3. Síntesis de 3β-acetoxicolest-4-en-6-ona (29)



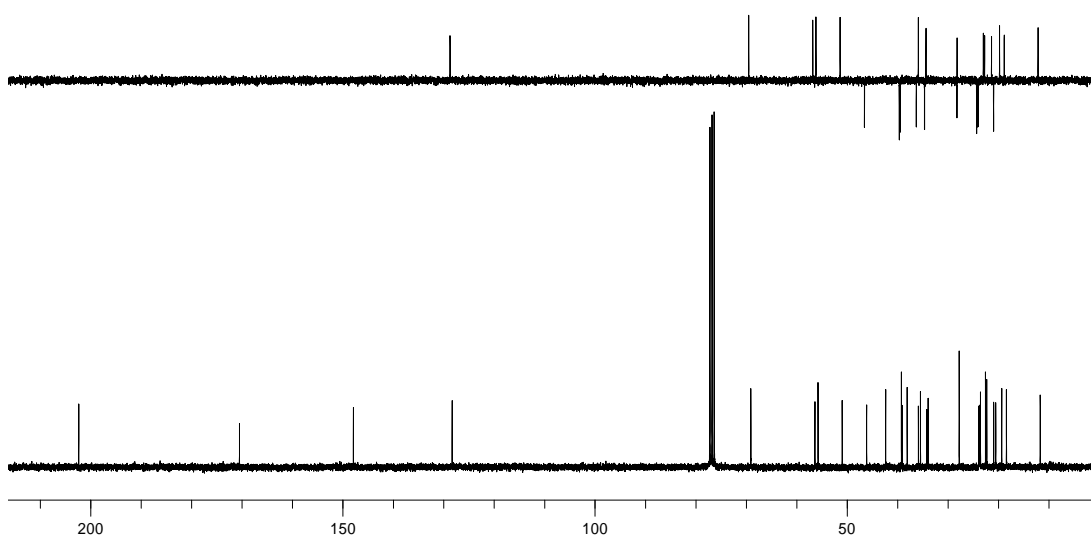
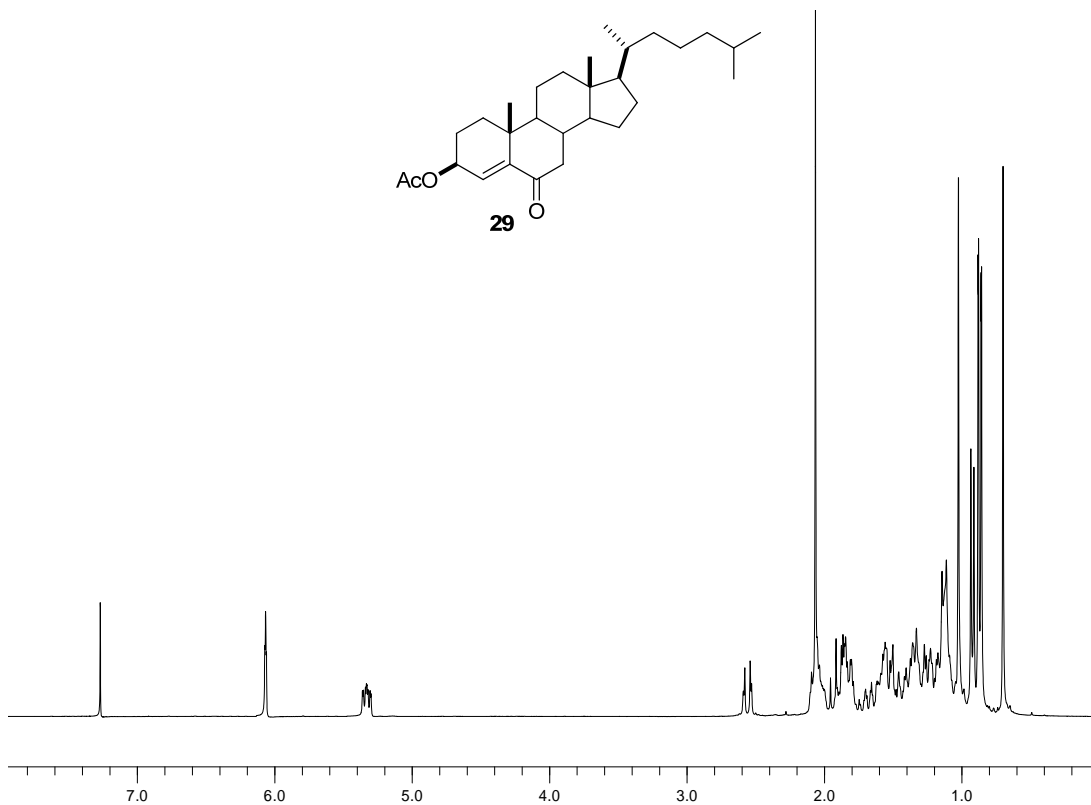
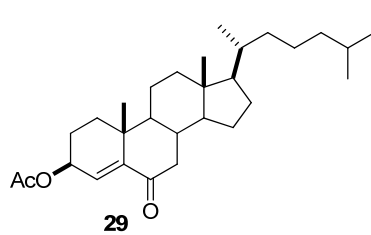
Sobre una disolución de 3β-acetoxi-5α-hidroxicolestan-6-ona (**28**) (2.0 g, 4.34 mmol), a 0°C en piridina (30 mL), se adicionó, gota a gota, SOCl₂ (1.6 mL, 6.1 mmol) y se dejó reaccionando a 0°C durante 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **11** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 1.9 g de 3β-acetoxicolest-4-en-6-ona (**29**), semisólido blanco, 95 %.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.07 (H4, 1H, s); 5.34 (H3α, 1H, m); 2.56 (H7β, 1H, dd, *J* = 11.7, 0.4 Hz); 2.08 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, *J* = 6.4 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.70 (H18, 3H, s).

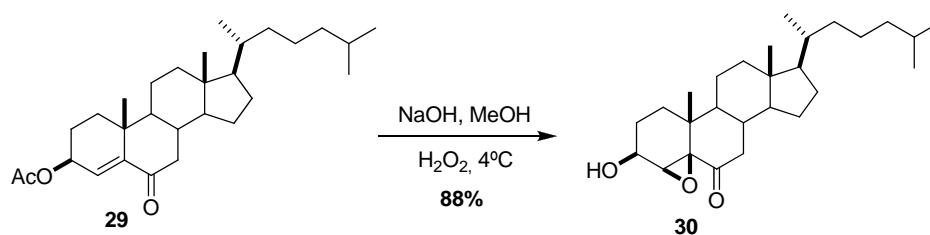
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 203.0 (C6, s); 171.5 (OAc, s); 148.4 (C5, s); 128.6 (C4, d); 71.4 (C3, d); 56.8; 56.0; 50.2; 42.2; 39.6; 39.4; 36.8; 36.2; 35.7; 34.3; 32.0; 31.6; 27.9; 25.8; 25.6; 24.2; 22.7; 22.5; 21.7; 21.3; 20.6; 20.3; 18.3 (C19, q); 12.6 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 442 (M⁺, 36); 400 (100).

[α]_D = -152.5° [*c* = 0.25, CH₂Cl₂].



1.3.4. Síntesis de 4 β ,5 β -epoxi-3 β -hidroxicolestan-6-ona (30)



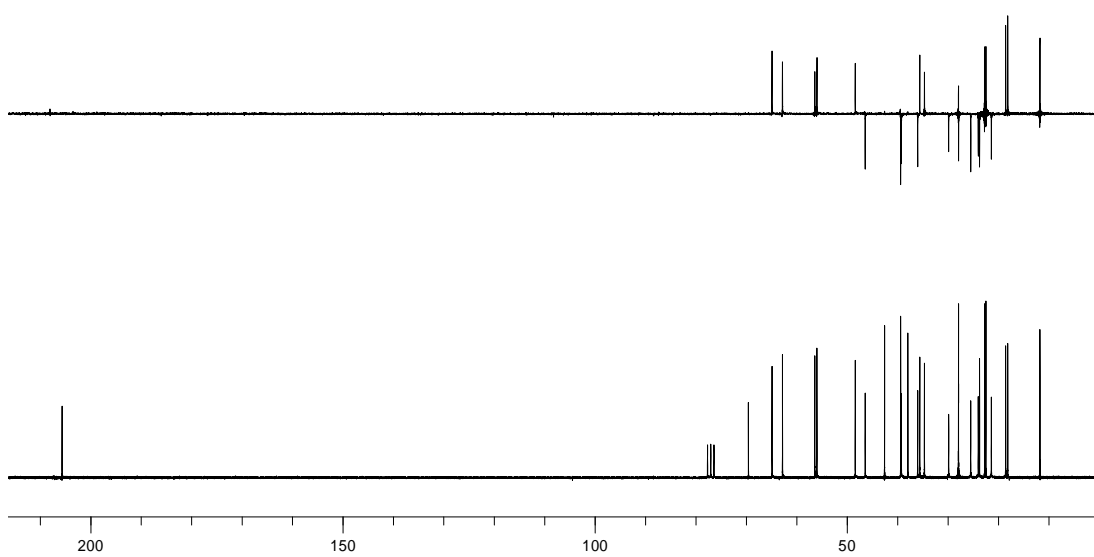
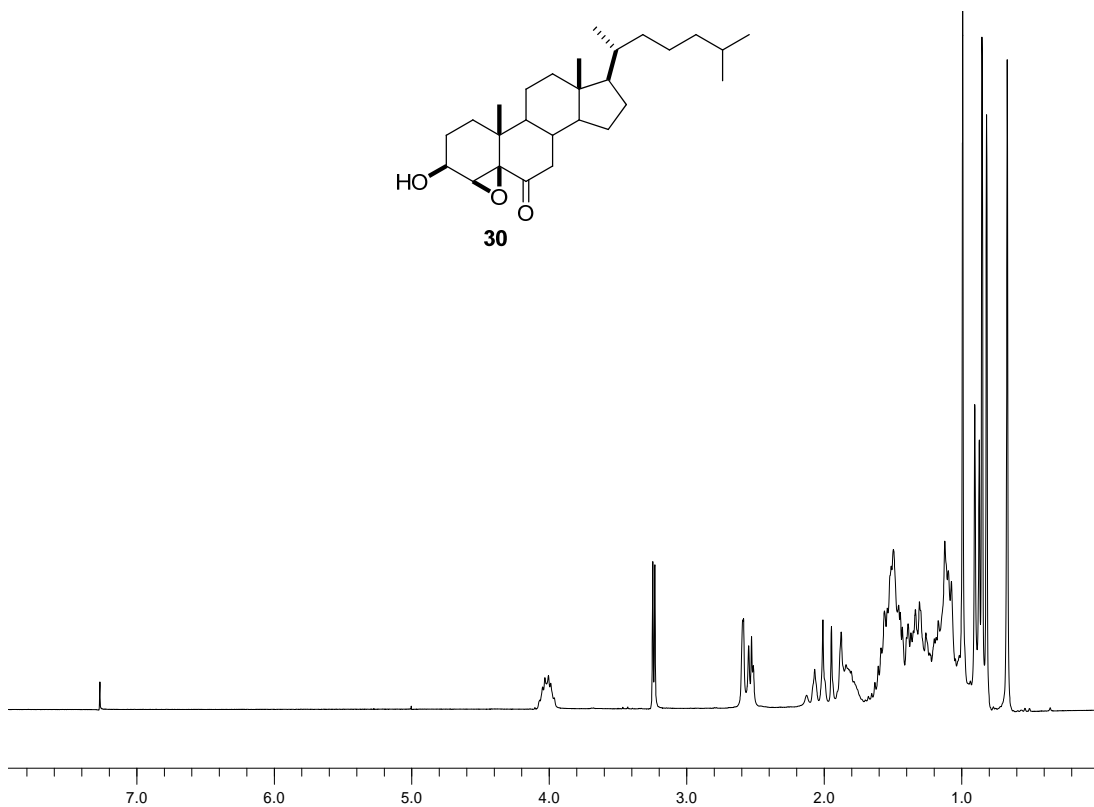
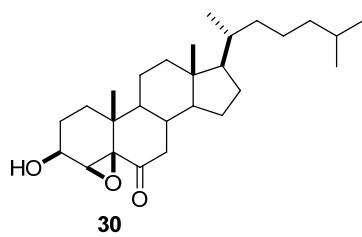
Sobre una disolución de 3 β -acetoxicolest-4-en-6-ona (**29**) (1.0 g, 2.25 mmol), en MeOH (20 mL), a 0°C, se adicionó, gota a gota, primero NaOH:MeOH al 10% (1.4 mL) y después H₂O₂:H₂O al 35% (5 mL). La mezcla de reacción se dejó reaccionando a 0°C durante 20 h. Se vertió la reacción sobre una disolución NaCl (200 mL), se extrajo con EtOAc (100 mL), se lavó con NaHCO₃ (50 mL), agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogándose 0.88 g de 4 β ,5 β -epoxi-3 β -hidroxicolestan-6-ona (**30**), semisólido blanco, 88%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.03 (H3 α , 1H, d, J = 3.4 Hz); 3.28 (H4 α , 1H, d, J = 4.1 Hz); 2.61 (H7 β , 1H, dd, J = 11.2, 0.2 Hz); 1.04 (H19, 3H, s); 0.94 (H21, 3H, d, J = 6.2 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.8 Hz); 0.71 (H18, 3H, s).

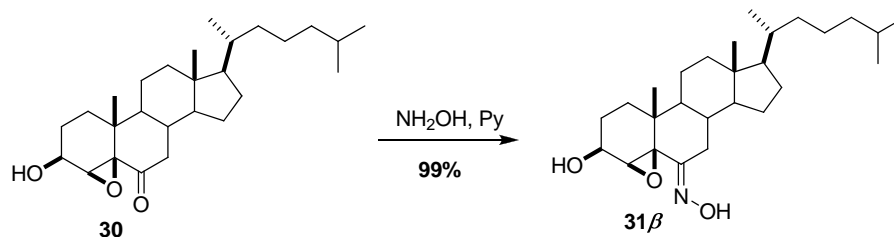
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 209.6 (C6, s); 67.9 (C3, s); 66.5 (C5, s); 61.2 (C4, d); 58.3; 55.1; 55.0; 48.6; 46.3; 42.3; 39.9; 38.5; 36.5; 36.1; 35.2, 35.1; 30.2; 28.2; 26.5; 25.5; 24.2; 23.3; 22.7; 21.6; 18.8; 17.4 (C19, q); 13.5 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 416 (M⁺, 14); 84 (100).

$[\alpha]_D$ = -15.6° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



1.3.5. Síntesis de 4 β ,5 β -epoxi-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolestano (31 β)



Se disolvió 4 β ,5 β -epoxi-3 β -hidroxicolestan-6-ona (**30**) (0.25 g, 0.6 mmol), y NH₂OH-HCl (0.3 g, 4.2 mmol) en piridina (20 mL) y se dejó reaccionando 16 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (6:4)], recogiénose 0.25 g de 4 β ,5 β -epoxi-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolestano (**31 β**), semisólido blanco, 99%.

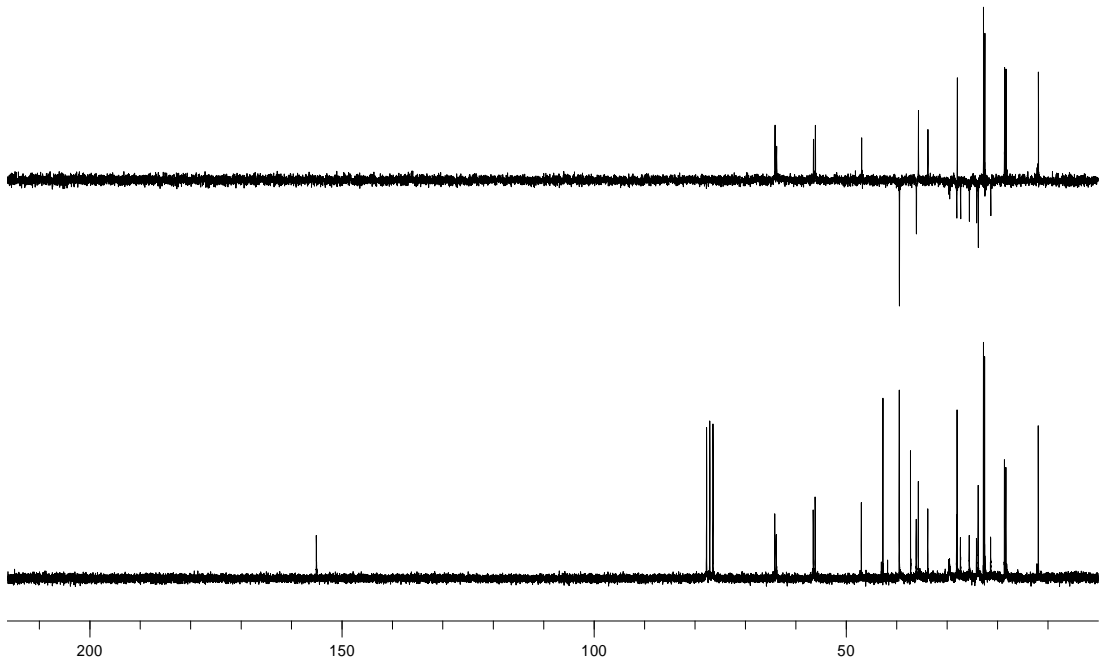
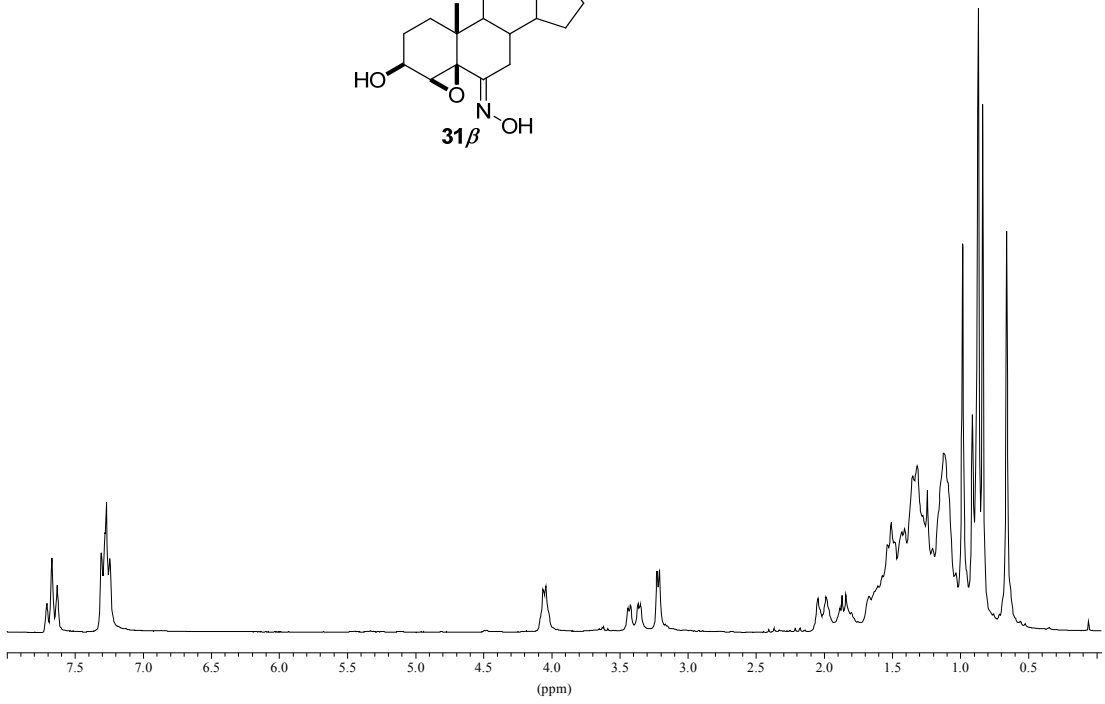
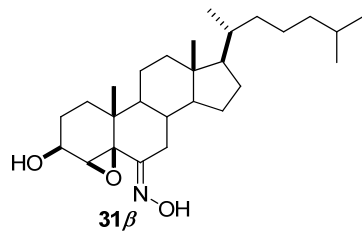
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.15 (H3 α , 1H, m); 3.43 (H7 β , 1H, dd, J = 4.4, 3.9 Hz); 3.23 (H4 α , 1H, d, J = 3.1 Hz); 1.12 (H19, 3H, s); 0.94 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, J = 6.8 Hz); 0.69 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 155.6 (C6, s); 77.6 (C5, s); 64.9 (C3, d); 55.4 (C4, d); 55.2; 48.6; 44.8; 43.6; 39.7; 36.6; 36.2; 35.4; 34.4; 34.0; 33.8; 32.6; 37.4; 36.4; 27.1; 26.5; 25.2; 24.6; 23.3; 22.1; 21.3 (C19, q); 20.6, 12.2 (C18, q).

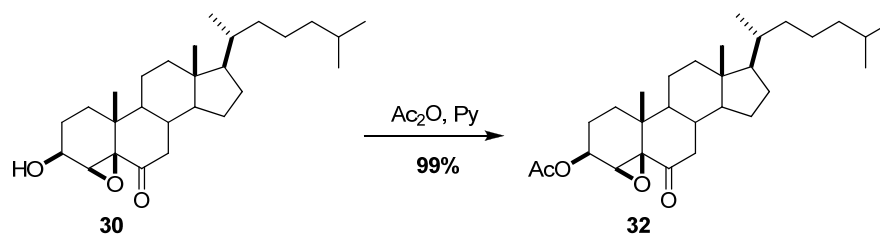
LREIMS (70 eV, m/z %): 432 (M⁺, 100).

(+)-HRESIMS: m/z 432.3452 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₆NO₃, 432.3472).

$[\alpha]_D$ = -4.9° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



1.3.6. Síntesis de la 3 β -acetoxi-4 β ,5 β -epoxicolestan-6-ona (32)



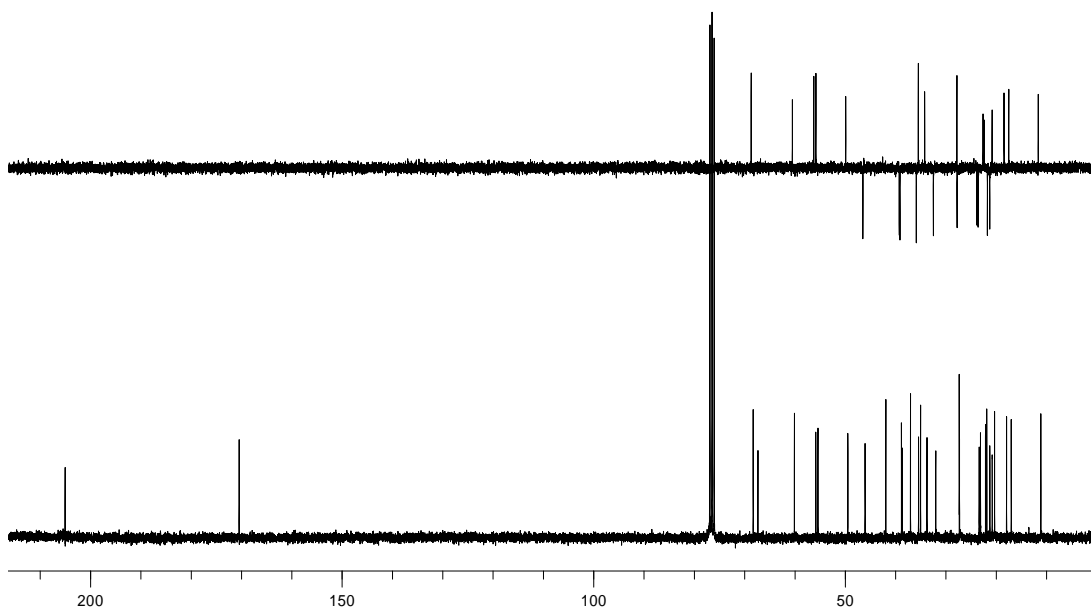
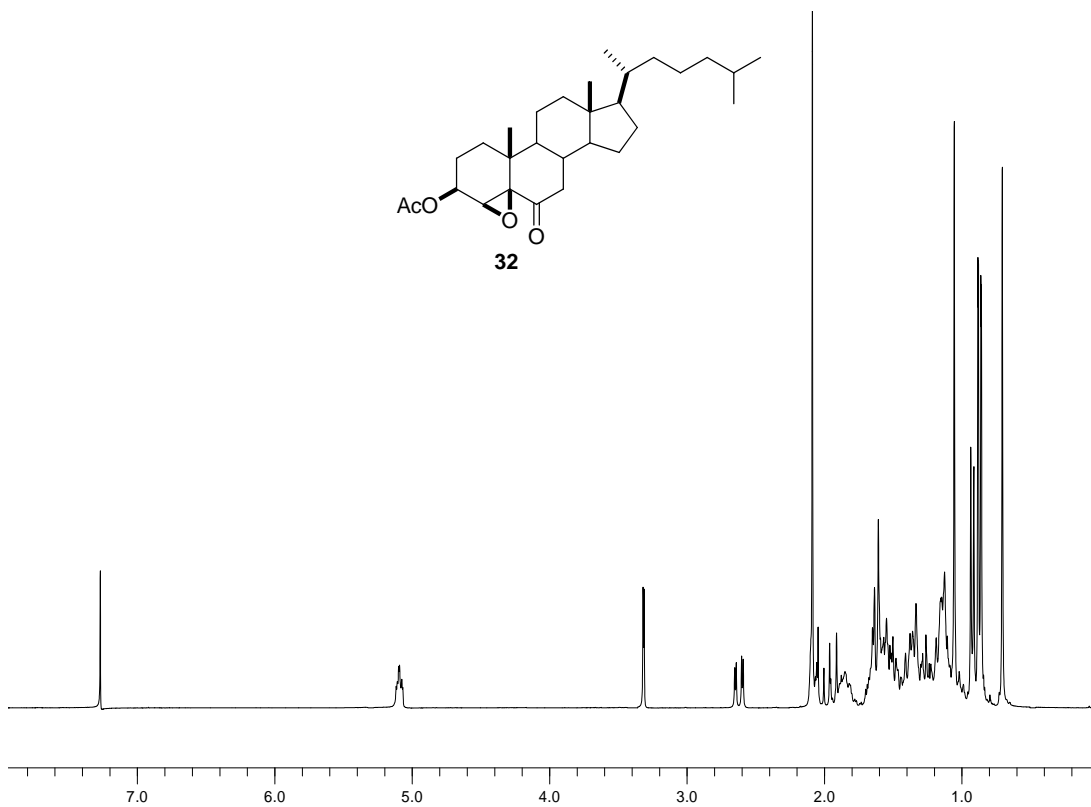
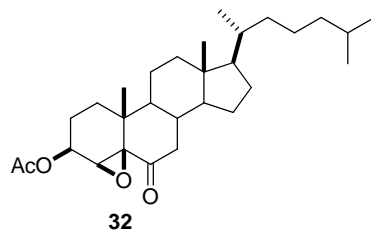
Se disolvió 4 β ,5 β -epoxi-3 β -hidroxicolestan-6-ona (**30**) (0.3 g, 0.72 mmol), en una mezcla (1:1) de Ac₂O:Py (6 mL) y se dejó reaccionando 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **8** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiénose 0.3 g de 3 β -acetoxi-4 β ,5 β -epoxicolestan-6-ona (**32**), semisólido blanco, 99%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.11 (H3 α , 1H, m); 3.32 (H4 α , 1H, d, J = 3.0 Hz); 2.61 (H7 β , 2H, dd, J = 6.2, 0.5 Hz); 2.11 (OAc, 3H, s); 1.08 (H19, 3H, s); 0.98 (H21, 3H, d, J = 6.9 Hz); 0.89 (H26, H27, 6H, d, J = 6.8 Hz); 0.72 (H18, 3H, s).

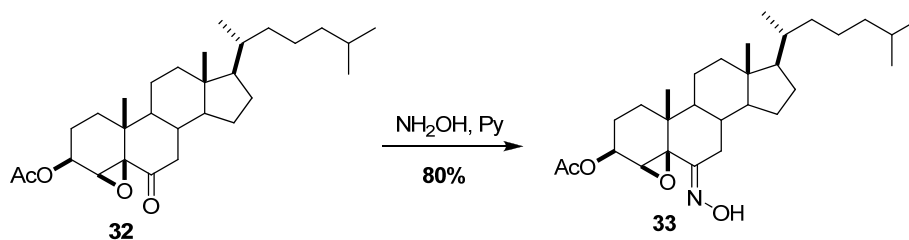
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 206.5 (C6, s); 170.1 (OAc, s); 68.2 (C3, d); 66.7 (C5, s); 61.2 (C4, d); 55.9; 55.5; 49.6; 46.2; 42.2; 39.0; 38.8; 37.2; 35.6; 35.2; 34.3; 33.2; 32.2; 27.9; 27.5; 23.3; 22.3; 22.0; 21.4; 21.0; 20.5; 18.2; 17.2 (C19, q); 11.3 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 458 (M⁺, 5); 83 (100).

$[\alpha]_D$ = -9.7° [c = 1, CH₂Cl₂].



1.3.7. Síntesis de 3 β -acetoxi-4 β ,5 β -epoxi-6 E -hidroximinocolestano (**33**)



Se disolvió 3 β -acetoxi-4 β ,5 β -epoxicolestan-6-ona (**32**) (0.2 g, 0.35 mmol), y NH₂OH-HCl (0.7 g, 2.1 mmol) en piridina (4 mL) y se dejó reaccionando durante 20 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiénose 0.16 g de 3 β -acetoxi-4 β ,5 β -epoxi-6 E -hidroximinocolestano (**33**), semisólido blanco, 80%.

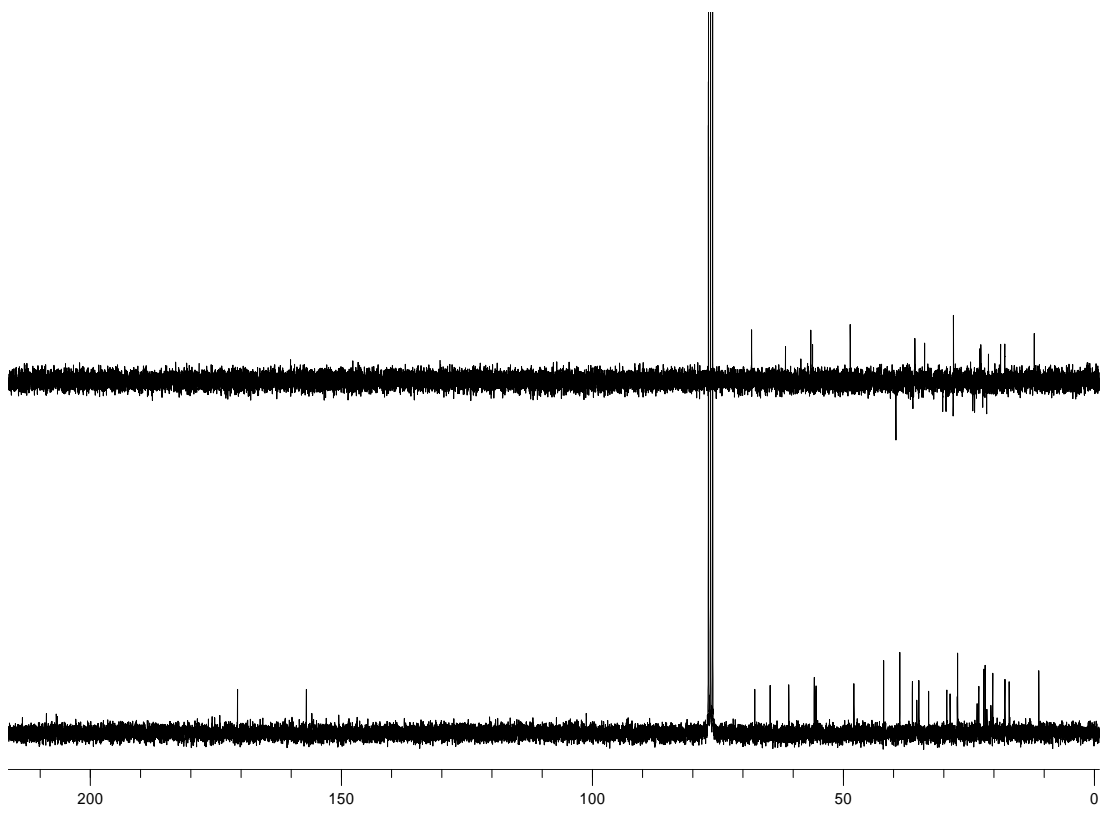
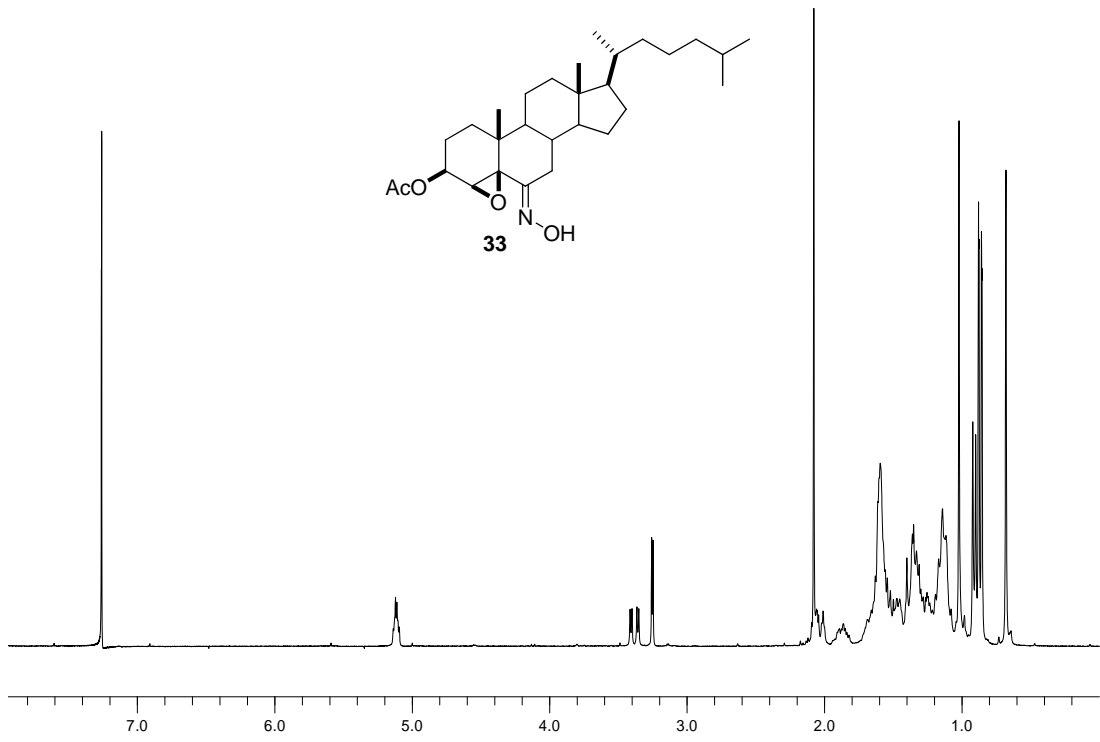
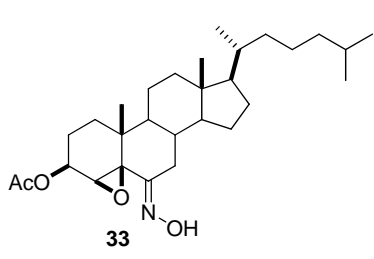
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.14 (H3 α , 1H, m); 3.38 (H7 β , 1H, dd, J = 6.8, 1.2 Hz); 3.28 (H4 α , 1H, d, J = 2.0 Hz); 2.03 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.93 (H21, 3H, d, J = 6.7 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, J = 6.9 Hz); 0.66 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.6 (OAc, s); 157.3 (C6, s); 67.1 (C3, d); 64.4 (C5, s); 60.8 (C4, d); 55.9; 55.6; 48.1; 42.2; 39.0; 36.5; 35.6; 35.2; 33.3; 32.6; 29.7; 29.0; 27.6; 27.5; 25.5; 24.3; 23.7; 23.5; 22.5; 22.3; 22.1; 21.3; 17.2 (C19, q); 12.6 (C18, q).

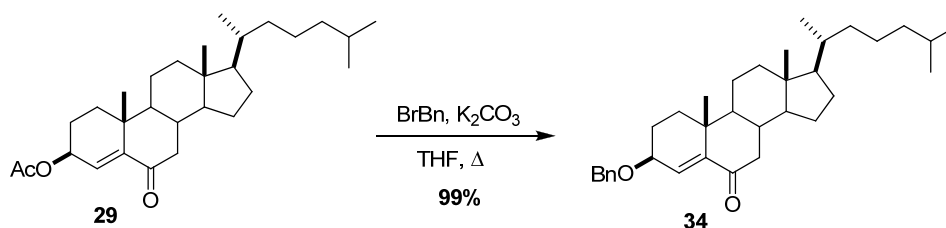
LREIMS (70 eV, m/z %): 473 (M⁺, 10); 83 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 474.3569 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₉H₄₈NO₄, 474.3578); m/z 496.3387 [M + Na]⁺ (calcd. para C₂₉H₄₇NNaO₄, 496.3397).

$[\alpha]_D$ = -0.2° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



1.3.8. Síntesis de la 3 β -benciloxicolest-4-en-6-ona (34)



Sobre una disolución de 3 β -acetoxicolest-4-en-6-ona (**29**) (0.27 g, 0.1 mmol) en THF se añadió K₂CO₃ (0.5 g, 1.5 mmol) y se dejó agitando 10 h. Transcurrido ese tiempo se adicionó BrBn (0.3 mL, 2.5 mmol) y la mezcla se dejó reaccionando a 85°C durante otras 3 h. Al cabo de ese período se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió con EtOAc (15 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃, NaCl, agua y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogándose 0.26 g del 3 β -benciloxicolest-4-en-6-ona (**34**), semisólido blanco, 99%.

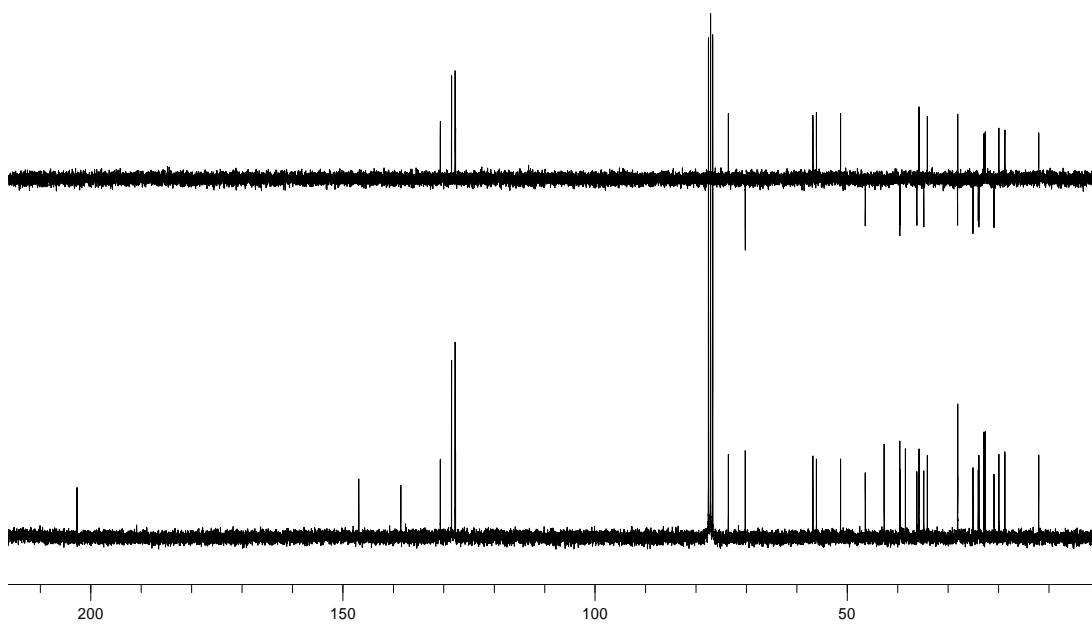
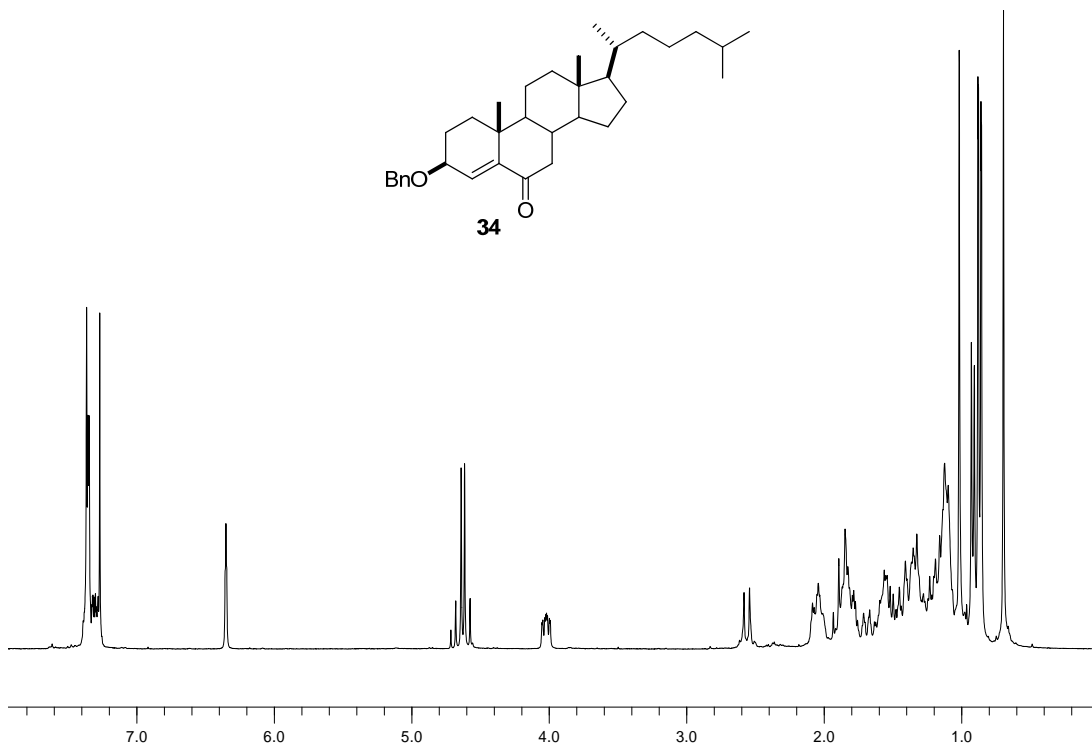
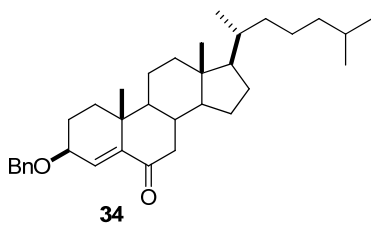
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36-7.34 (OBn, 5H, m); 6.34 (H₄, 1H, s); 4.62 (CH₂Bn, 2H); 4.02 (H_{3 α} , 1H, t, J = 8.2 Hz); 2.56 (H_{7 β} , 1H, dd, J = 12.1, 0.6 Hz); 1.02 (H₁₉, 3H, s); 0.89 (H₂₁, 3H, d, J = 6.4 Hz); 0.86 (H₂₆, H₂₇, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.65 (H₁₈, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 202.6 (C₆, s); 146.7 (C₅, s); 138.4 (C₄, d); 130.6; 128.4; 128.4; 127.6; 127.5; 127.5; 73.5 (C₃, d); 70.1; 56.7; 56.0; 51.2; 46.3; 42.6; 39.4; 39.3; 38.3; 36.1; 35.6; 34.7; 34.0; 28.0; 27.9; 24.9; 23.9; 23.7; 22.7; 22.5; 20.8; 19.8; 18.6 (C₁₉, q); 11.9 (C₁₈, q).

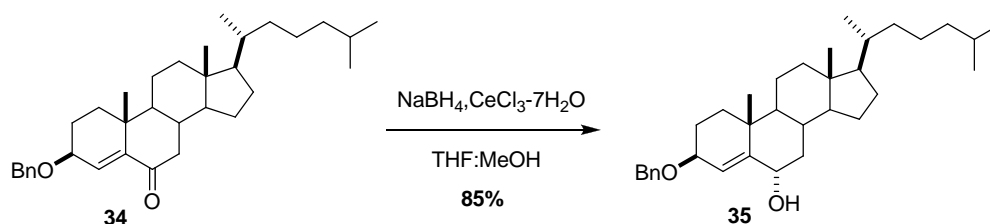
LREIMS (70 eV, m/z %): 490 (M⁺, 4); 91 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 491.3883 [M + H]⁺ (calcd. para C₃₄H₅₀O₂, 491.3884).

$[\alpha]_D^{25}$ = -136.4° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



1.3.9. Síntesis del 3β-benciloxi-6α-hidroxicolest-4-eno (35)



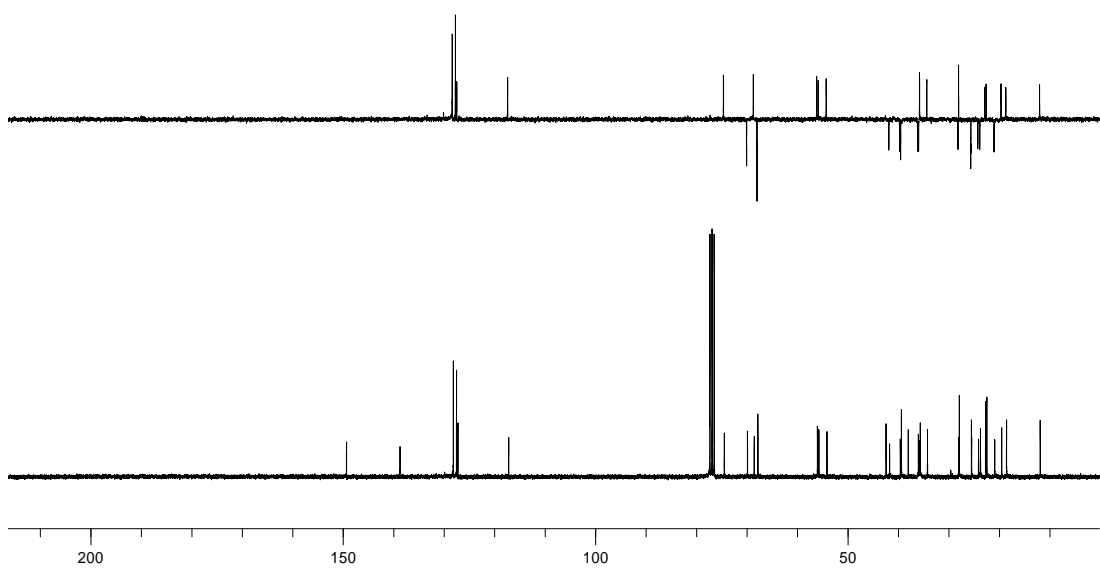
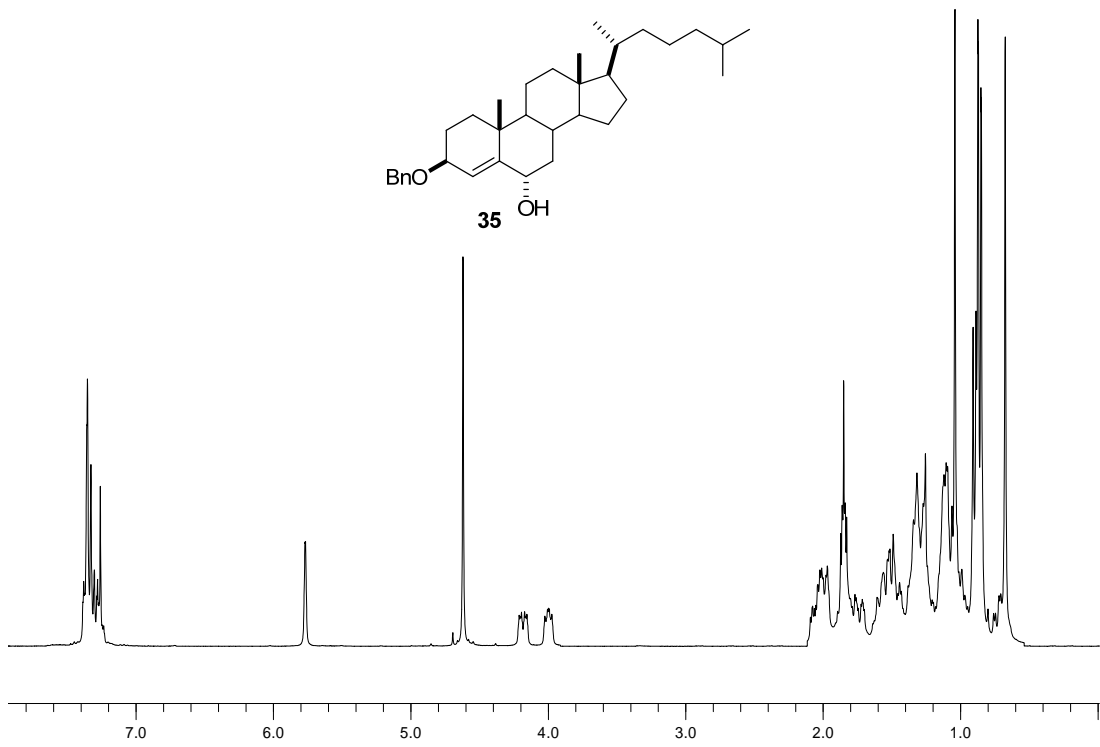
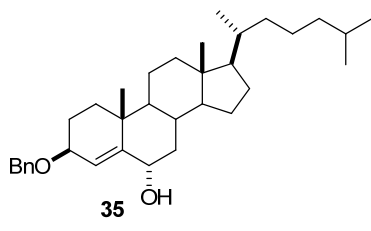
Sobre una disolución de 3β-benciloxi-6α-hidroxicolest-4-en-6-ona (**34**) (0.1 g, 0.25 mmol) y CeCl₃·7H₂O (86 mg, 0.23 mmol) en THF:MeOH (1:1) (5 mL) se adicionó NaBH₄ (17 mg, 0.06 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 1 h. Al cabo de ese tiempo se añadió agua, y el producto se extrajo con CH₂Cl₂ (10 mL). La fase orgánica se lavó con 5% HCl y NaCl, se secó con MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 85 mg de 3β-benciloxi-6α-hidroxicolest-4-eno (**35**), semisólido blanco, 85%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36-7.31 (OBn, 5H, m); 5.78 (H4, 1H, s); 4.63 (CH₂Bn, 2H); 4.19 (H6β, 1H, d, *J* = 6.8 Hz); 4.00 (H3α, 1H, t, *J* = 6.6 Hz); 1.03 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, *J* = 6.2 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.2 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

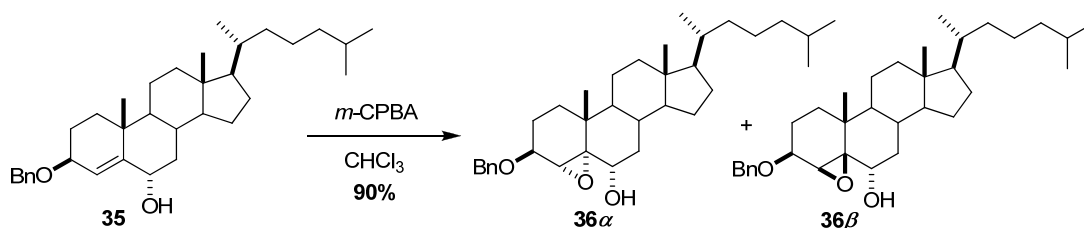
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 149.5 (C5, s); 138.9; 128.3; 127.7; 127.7; 127.4; 127.4; 117.4 (C4, d); 74.5 (C3, d); 69.9; 68.6 (C6, d); 67.9; 56.1; 55.8; 54.2; 42.5; 41.8; 39.6; 39.4; 38.1; 36.1; 35.9; 34.3; 28.1; 27.9; 25.5; 24.2; 23.8; 22.8; 22.5; 20.9; 19.6; 18.6 (C19, q); 11.9 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 492 (M⁺, 6); 82 (100).

[α]_D = +194.1° [*c* = 0.1, CH₂Cl₂].



1.3.10. Síntesis de 3 β -benciloxi-4 α ,5 α -epoxi-6 α -hidroxicolestano (**36 α**) y de 3 β -benciloxi-4 β ,5 β -epoxi-6 α -hidroxicolestano (**36 β**)



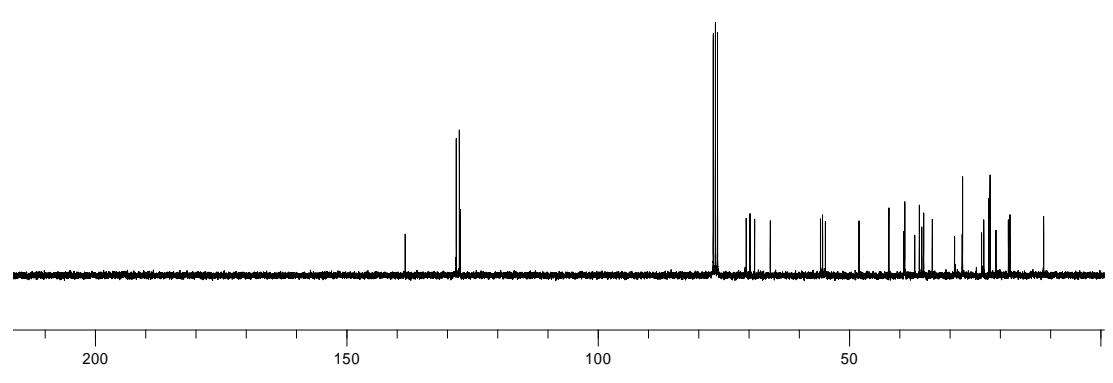
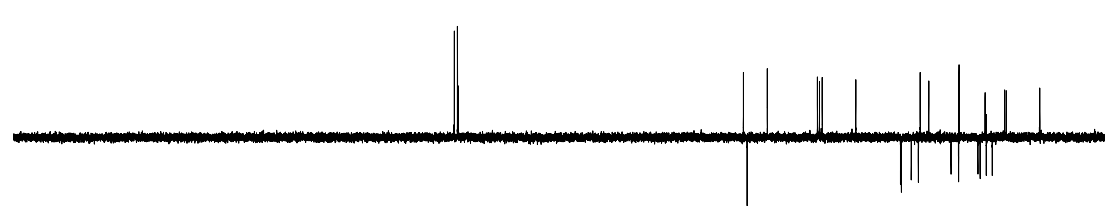
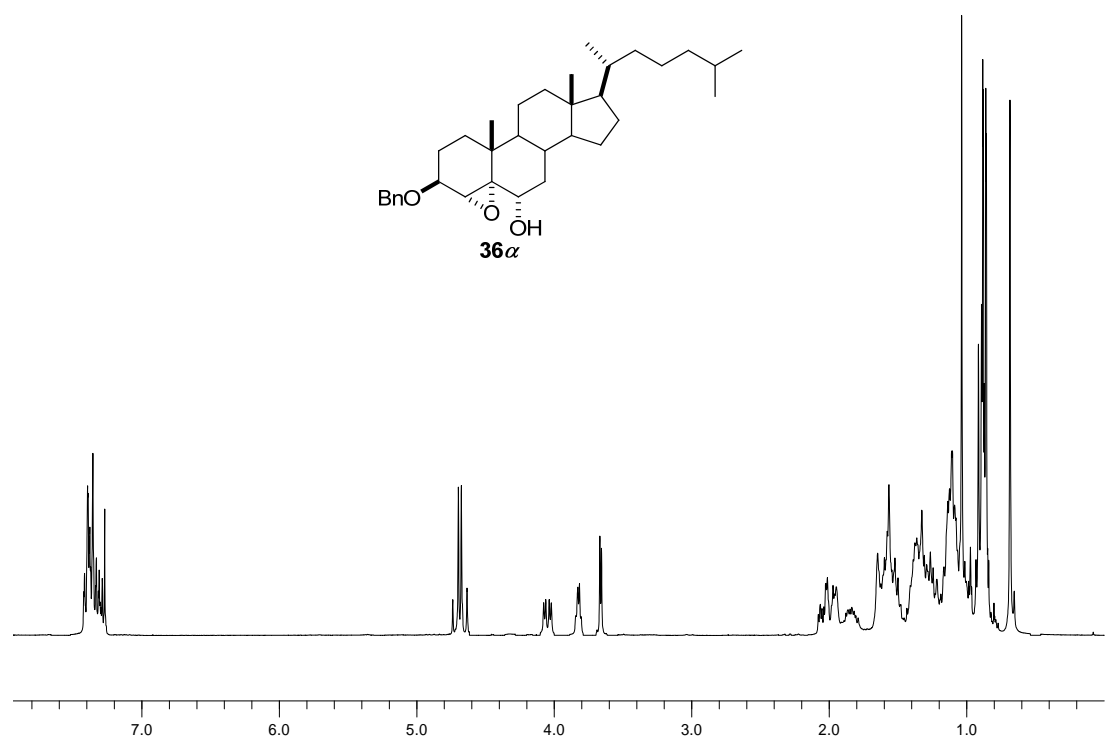
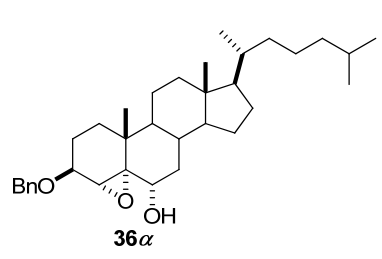
Sobre una disolución de ácido *m*-cloroperbenzoico (0.1 g, 0.5 mmol) a 0°C en CHCl₃ (10 mL), se añadió, gota a gota, 3 β -benciloxi-6 α -hidroxicolest-4-eno (**35**) (0.1 g, 0.2 mmol), disueltos en CHCl₃ (10 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para los epóxidos **9 α** y **9 β** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 60 mg de 3 β -benciloxi-4 α ,5 α -epoxi-6 α -hidroxicolestano (**36 α**), en un 60%, y 30 mg de 3 β -benciloxi-4 β ,5 β -epoxi-6 α -hidroxicolestano (**36 β**), con un 30%, ambos como semisólidos blancos en relación (2:1), con un rendimiento global del 90%.

36 α : RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.37-7.35 (OBn, 5H, m); 4.68 (CH₂Bn, 2H); 4.04 (H3 α , 1H, dd, *J* = 12.1, 4.6 Hz); 3.81 (H6 β , 1H, d, *J* = 3.6 Hz); 3.65 (H4 β , 1H, d, *J* = 4.6 Hz); 1.03 (H19, 3H, s); 0.88 (H21, 3H, d, *J* = 6.2 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.2 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 138.5; 128.4; 128.4; 127.7; 127.7; 127.6; 70.9 (C5, s); 70.2; 69.2 (C3, d); 66.1 (C6, d); 56.1; 55.7 (C4, d); 55.2; 48.5; 42.6; 39.6; 39.4; 37.5; 36.5; 36.2; 36.0; 35.7; 34.0; 29.5; 28.0; 27.9; 24.2; 23.8; 22.8; 22.5; 21.4; 18.9; 18.6 (C19, q); 11.9 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 508 (M⁺, 2); 82 (100).

[α]_D = -25.0° [c = 0.1, CH₂Cl₂].

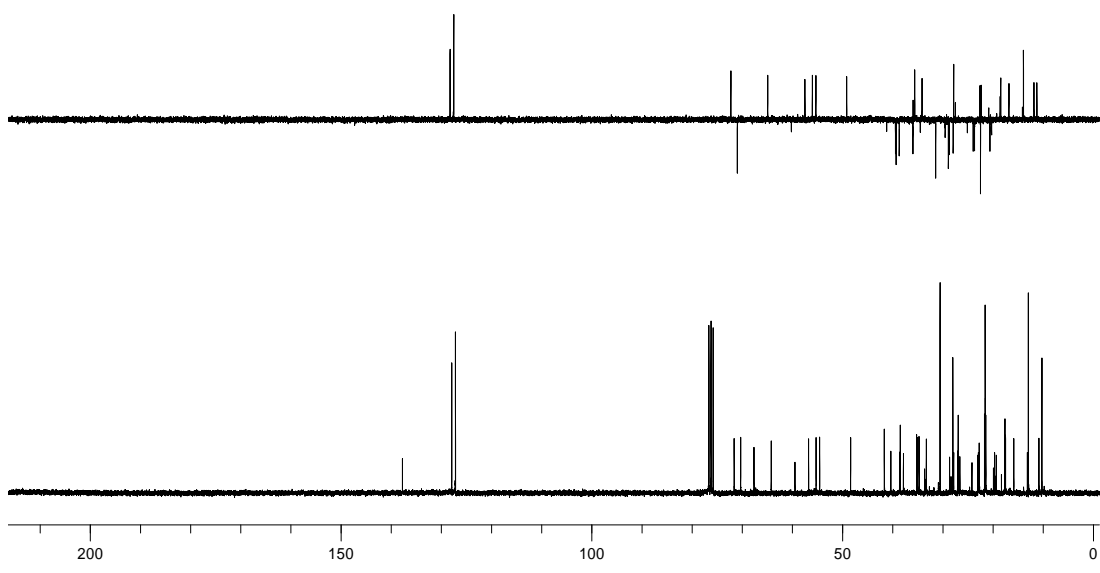
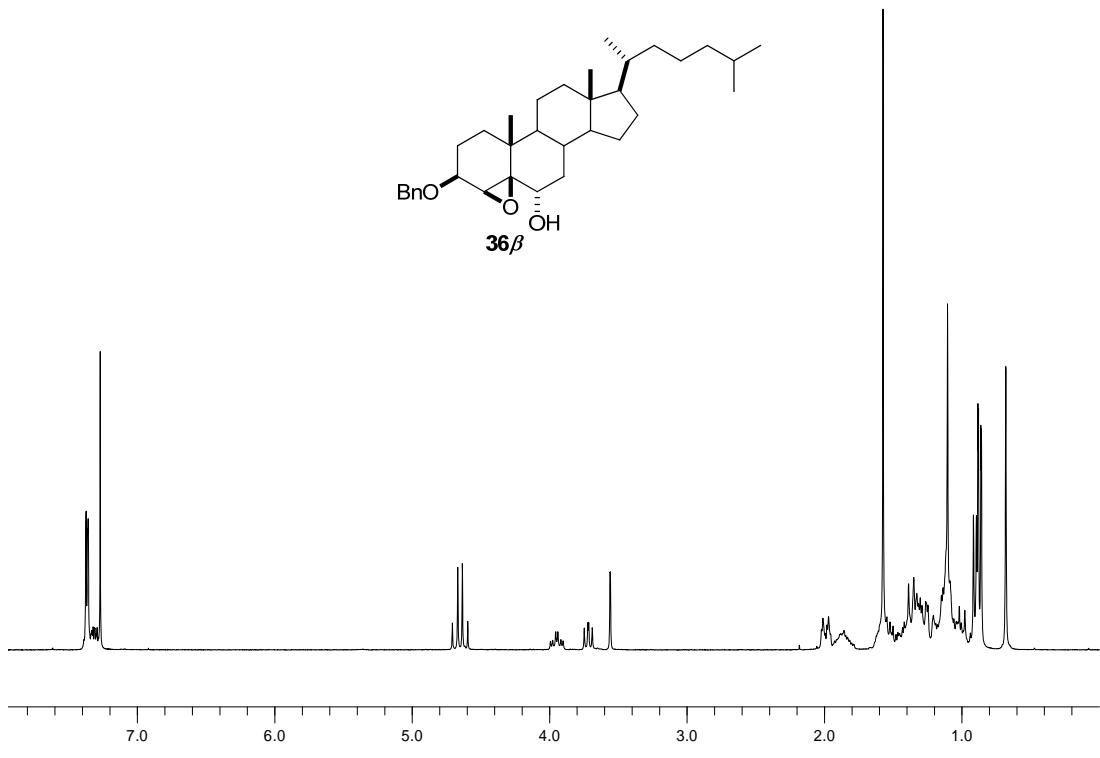
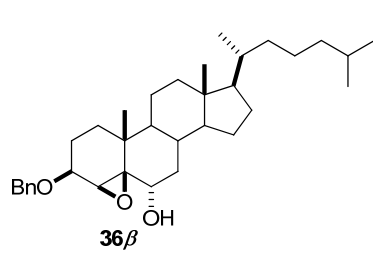


36 β : RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.37-7.35 (OBn, 5H, m); 4.65 (CH_2Bn , 2H); 3.94 ($\text{H}3\alpha$, 1H, dt, $J = 11.5, 4.6$ Hz); 3.71 ($\text{H}6\beta$, 1H, d, $J = 7.6$ Hz); 3.56 ($\text{H}4\alpha$, 1H, s); 1.04 ($\text{H}19$, 3H, s); 0.87 ($\text{H}21$, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.85 ($\text{H}26, \text{H}27$, 6H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.68 ($\text{H}18$, 3H, s).

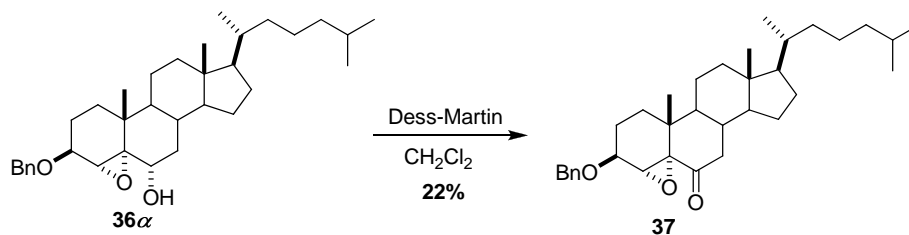
RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 138.4; 128.4; 128.4; 127.7; 127.7; 127.6; 72.4 ($\text{C}5$, s); 71.1; 68.5 ($\text{C}3$, d); 65.0 ($\text{C}6$, d); 57.6; 56.1; 55.4 ($\text{C}4$, d); 49.2; 42.6; 39.6; 39.4; 38.8; 36.2; 36.0; 35.7; 34.2; 28.8; 28.1; 27.9; 24.1; 23.9; 23.8; 22.8; 22.5; 20.7; 18.6; 16.9 ($\text{C}19$, q); 11.9 ($\text{C}18$, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 508 (M^+ , 8); 82 (100).

$[\alpha]_{\text{D}} = -44.0^\circ$ [$c = 0.1, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



1.3.11. Síntesis de 3β-benciloxi-4α,5α-epoxi-6α-hidroxicolestano (37)



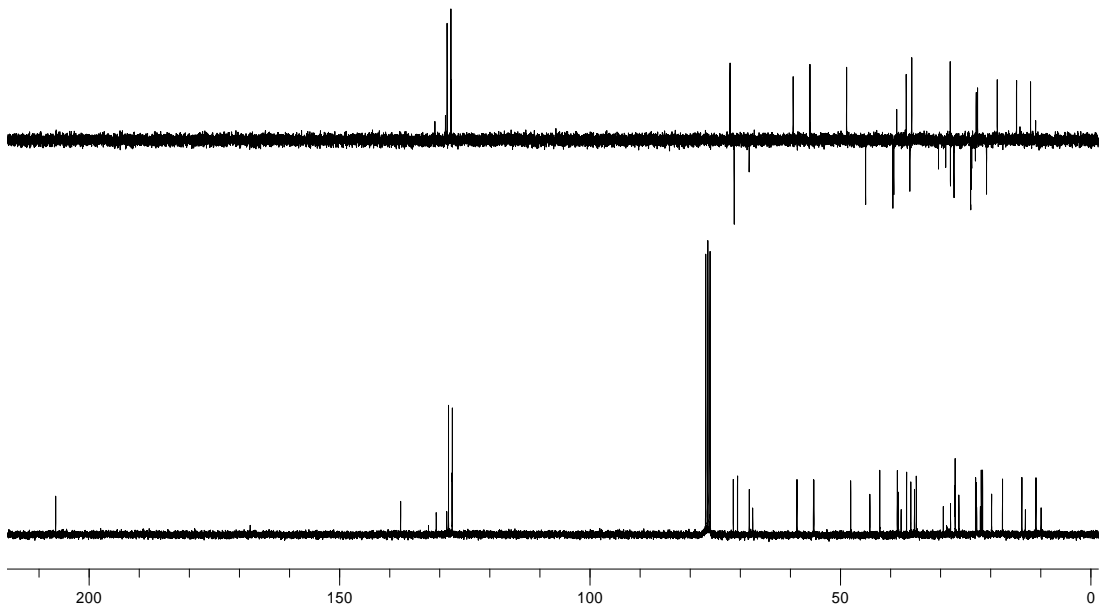
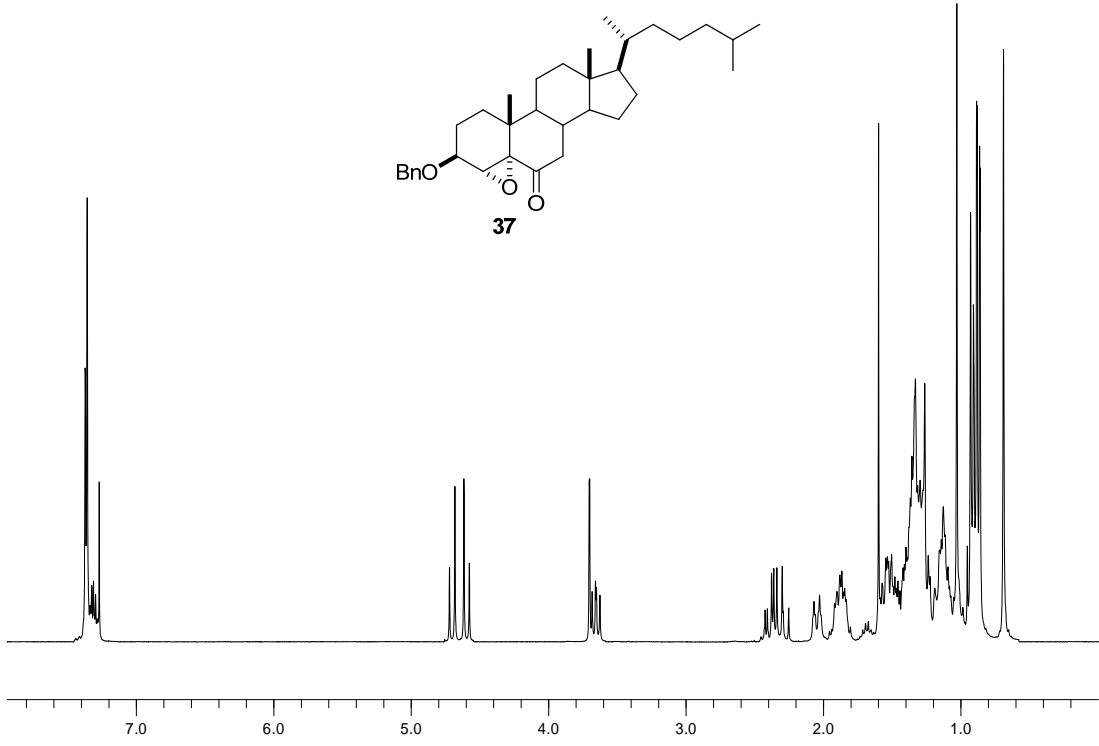
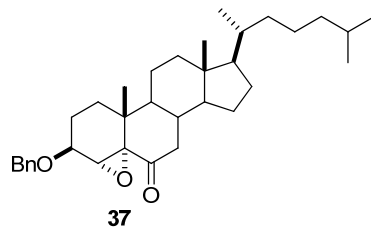
Sobre una disolución reactivo de Dess-Martin (0.3 g, 0.8 mmol) en CH₂Cl₂ (5 mL), se adicionó, gota a gota, 30 mg de 3β-benciloxi-4α,5α-epoxi-6α-hidroxicolestano (**36α**) (0.3 g, 0.7 mmol), en CH₂Cl₂ (5 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **21** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiénose 60 mg de 3β-benciloxi-4α,5α-epoxi-6α-hidroxicolestano (**37**), semisólido blanco, 22%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.37-7.35 (OBn, 5H, m); 4.64 (CH₂Bn, 2H); 3.70-3.65 (H4β, H3α, 2H, m); 2.39 (H7β, 1H, m); 1.03 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.69 (H18, 3H, s).

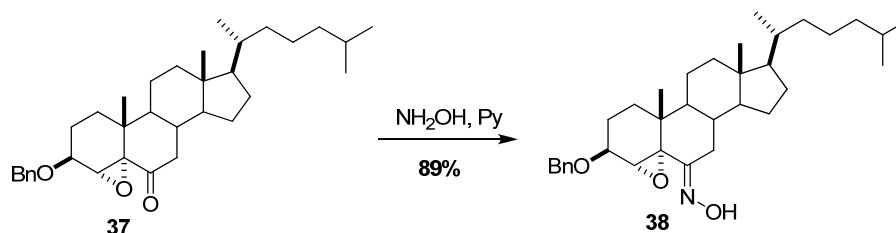
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 206.3 (C6, s); 137.5; 128.7; 127.9; 127.8; 127.4; 127.4; 72.6 (C5, d); 72.4; 70.8; 67.8 (C3, d); 58.6 (C4, d); 58.3; 55.9; 55.4; 48.6; 43.6; 39.9; 37.4; 37.1; 36.5; 36.1; 35.8; 28.2; 28.1; 27.4; 27.3; 25.8; 24.6; 23.2; 23.2; 22.0; 20.7 (C19, q); 19.4 (C18, q).

(+)-LRFABMS, *m/z* (%): 507 ([M+H]⁺, 2); 149 (100).

[α]_D = +94.2° [*c* = 0.1, CH₂Cl₂].



1.3.12. Síntesis de 3β-benciloxi-4α,5α-epoxi-6E-hidroxiiminocolestano (38)



Se disolvió 3β-benciloxi-4α,5α-epoxi-6α-hidroxicolestano (**37**) (0.10 g, 0.24 mmol), y NH₂OH-HCl (0.12 g, 1.7 mmol) en piridina (10 mL) y se dejó reaccionando 22 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 12 min y fase móvil MeOH/H₂O, 9:1) obteniéndose 89 mg del 3β-benciloxi-4α,5α-epoxi-6E-hidroxiiminocolestano (**38**), semisólido blanco, 89%.

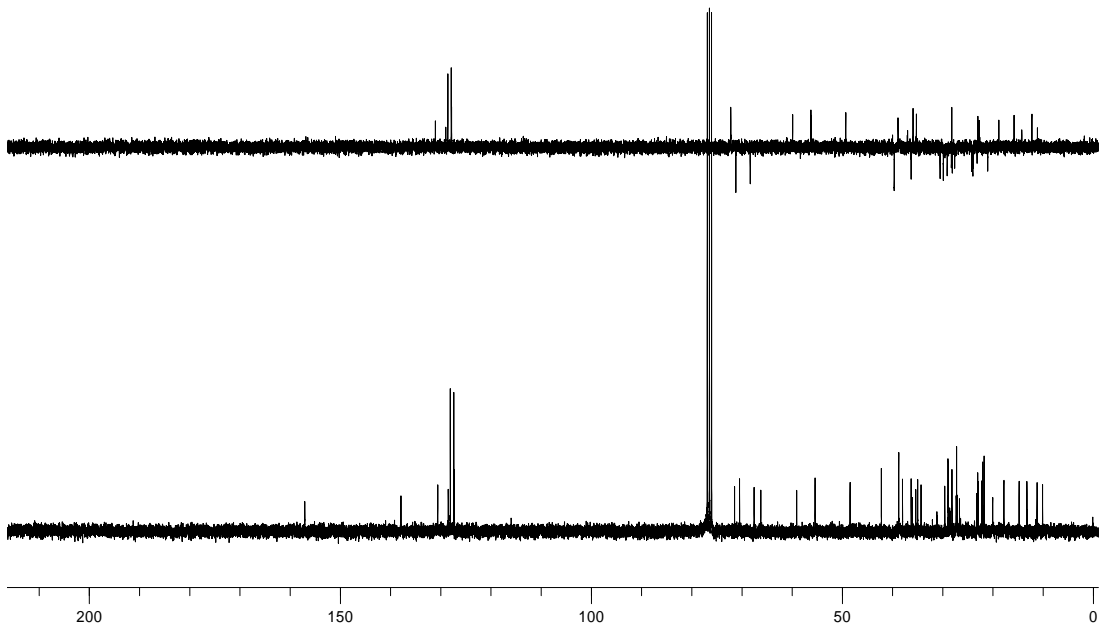
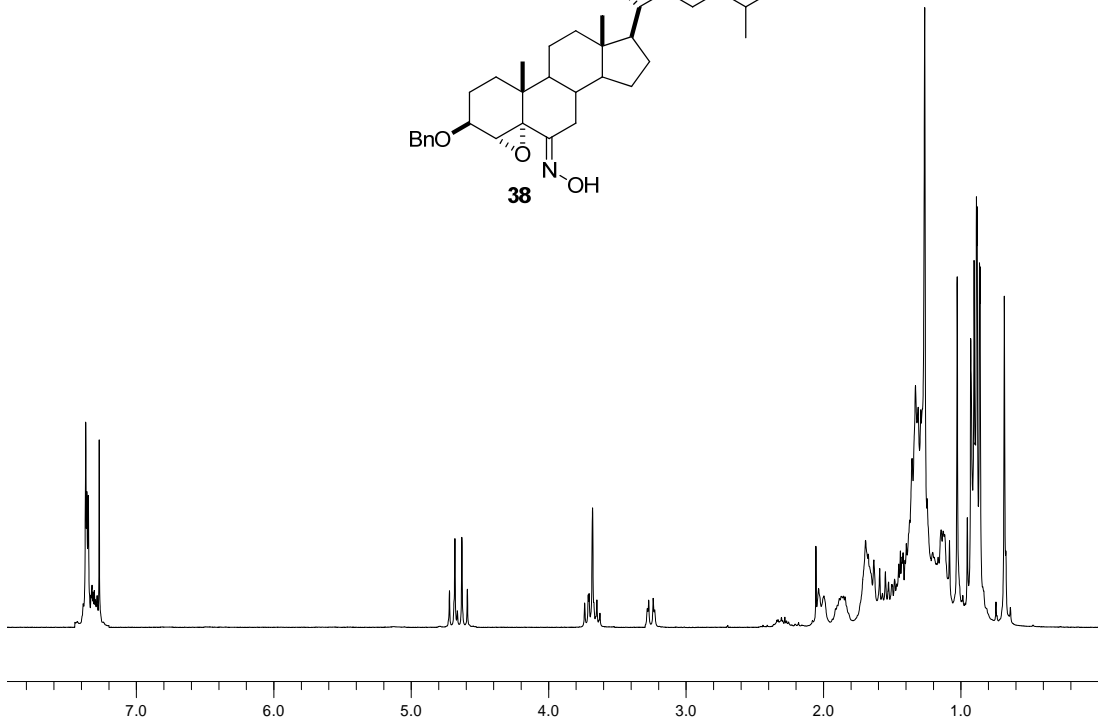
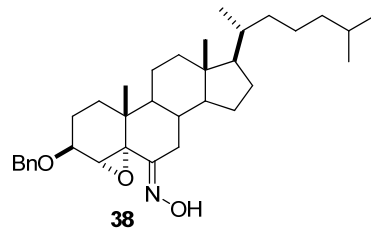
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.36-7.34 (OBn, 5H, m); 4.66 (CH₂Bn, 2H); 3.73-3.62 (H4β, H3α, 2H, m); 3.25 (H7β, 1H, dd, *J* = 9.8, 0.5 Hz); 1.02 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, *J* = 6.9 Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, *J* = 69.8 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159.4 (C6, s); 138.1; 130.8; 128.8; 128.4; 127.7; 127.6; 72.0 (C3, d); 71.0; 68.1; 66.8 (C5, s); 59.7 (C4, d); 56.0; 49.1; 42.9; 39.4; 38.7; 36.9; 36.7; 35.7; 29.6; 28.8; 27.5; 24.0; 23.8; 23.7; 22.5; 21.5; 20.8; 18.6; 15.6; 14.0; 12.0 (C19, q); 10.9 (C18, q).

(+)-LRFABMS, *m/z* (%): 522 ([M + H]⁺, 24); 149(100).

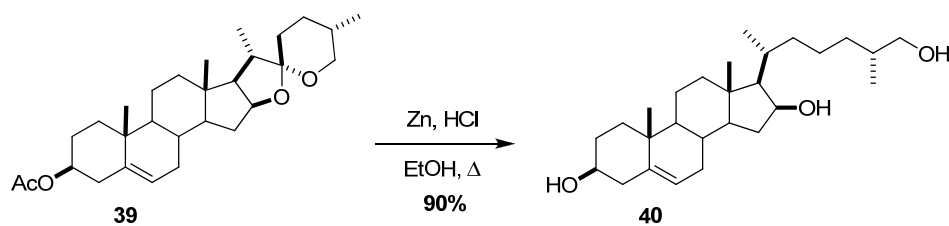
(+)-LRESIMS, *m/z* (%): 522 ([M + H]⁺, 8); 413 (100).

[α]_D = -118.0° [*c* = 0.1, CH₂Cl₂].



1.4. Síntesis de análogos con una posición oxigenada en C-16

1.4.1. Síntesis de (25*R*)-3β,16β,26-trihidroxicolest-5-eno (40)



En un balón de 250 mL se disolvió diosgenina (**39**) (2.0 g, 4.8 mmol), zinc en polvo (40.0 g, 67.5 mmol) y EtOH (100 mL). La mezcla se calentó a 90°C durante 1 h, mientras se añadía, gota a gota, HCl (40 mL). Concluida la adición, la mezcla se dejó agitando a t.a. durante 30 min. Se filtró el zinc y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (6:4)] obteniéndose 1.8 g del (25*R*)-3β,16β,26-trihidroxicolest-5-eno (**40**), semisólido blanco, 90%.

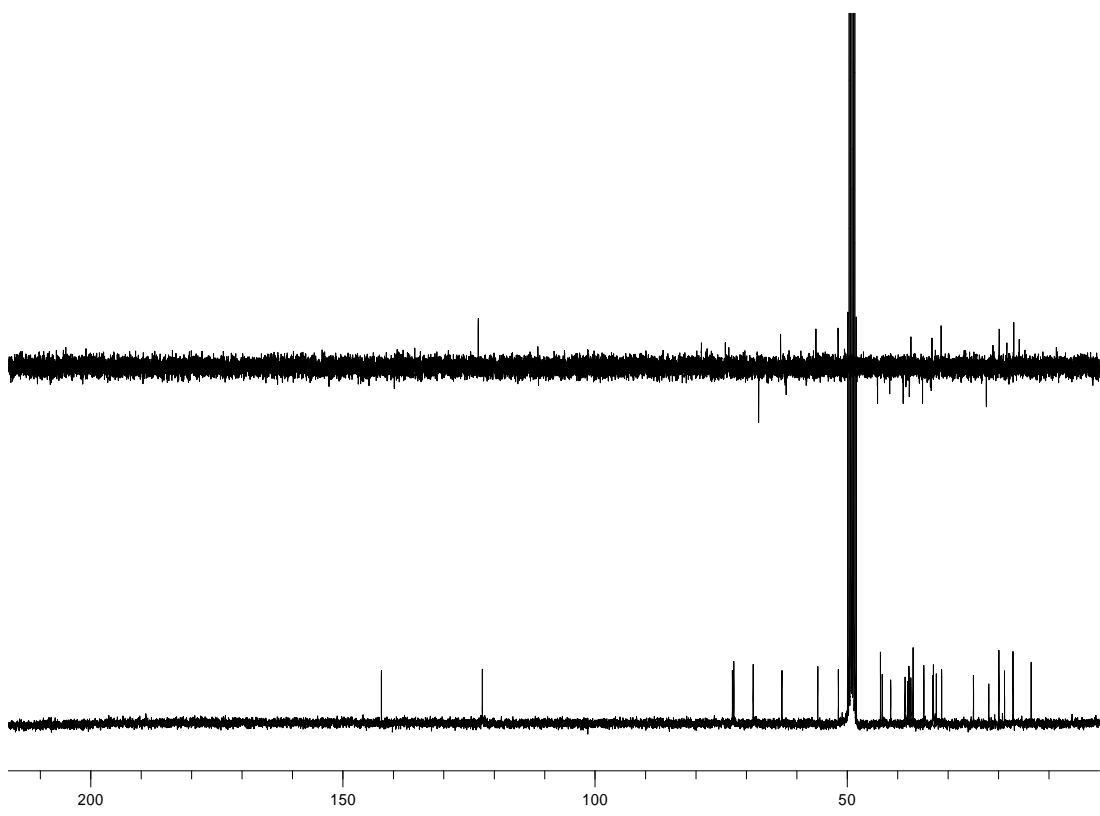
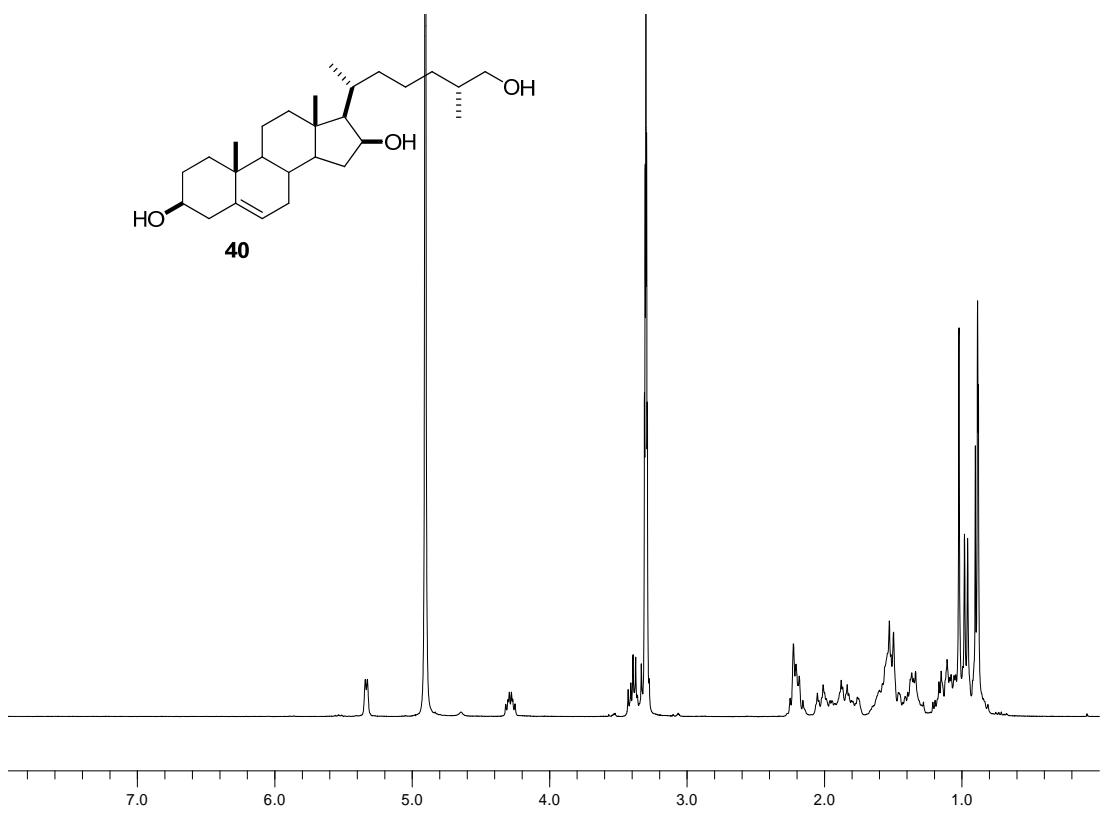
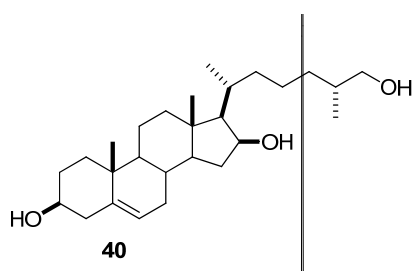
RMN-¹H (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 5.28 (H6, 1H, d, *J* = 5.0 Hz); 4.35 (H16α, 1H, m); 3.56-3.33 (H26, H3α, 3H, m); 0.95 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, *J* = 6.5 Hz); 0.83 (H26, 3H, d, *J* = 7.0 Hz); 0.81 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 141.5 (C5, s); 121.8 (C6, d); 72.5; 71.7; 68.2; 62.0; 61.9; 55.0; 50.6; 42.7; 42.3; 40.4; 37.8; 37.1; 37.0; 36.4; 36.0; 32.4; 32.0; 30.3; 26.5; 24.0; 21.3; 19.8; 18.6; 17.0; 13.4.

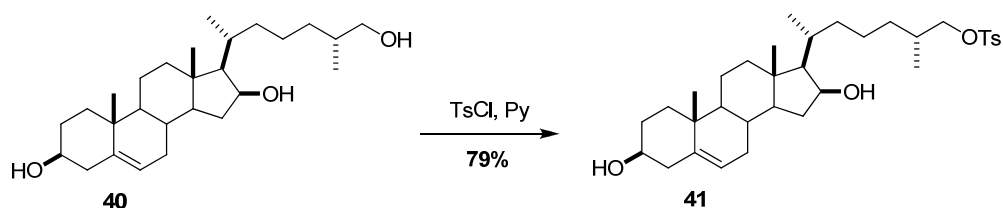
LREIMS (70 eV, *m/z* %): 418 (M⁺, 5); 271 (100).

(+)-LRFABMS, *m/z* (%): 419 ([M + H]⁺, 12); 105(100).

[α]_D = -2.2° [c = 0.5, MeOH].



1.4.2. Síntesis de (25*R*)-3β,16β-dihidroxi-26-tosilcolest-5-eno (**41**)



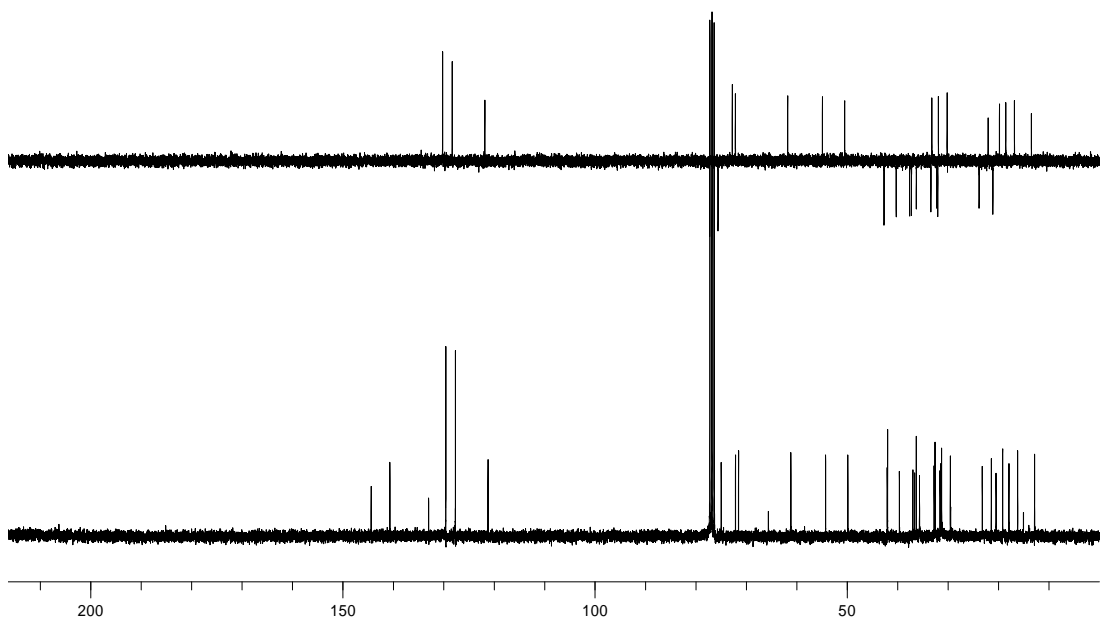
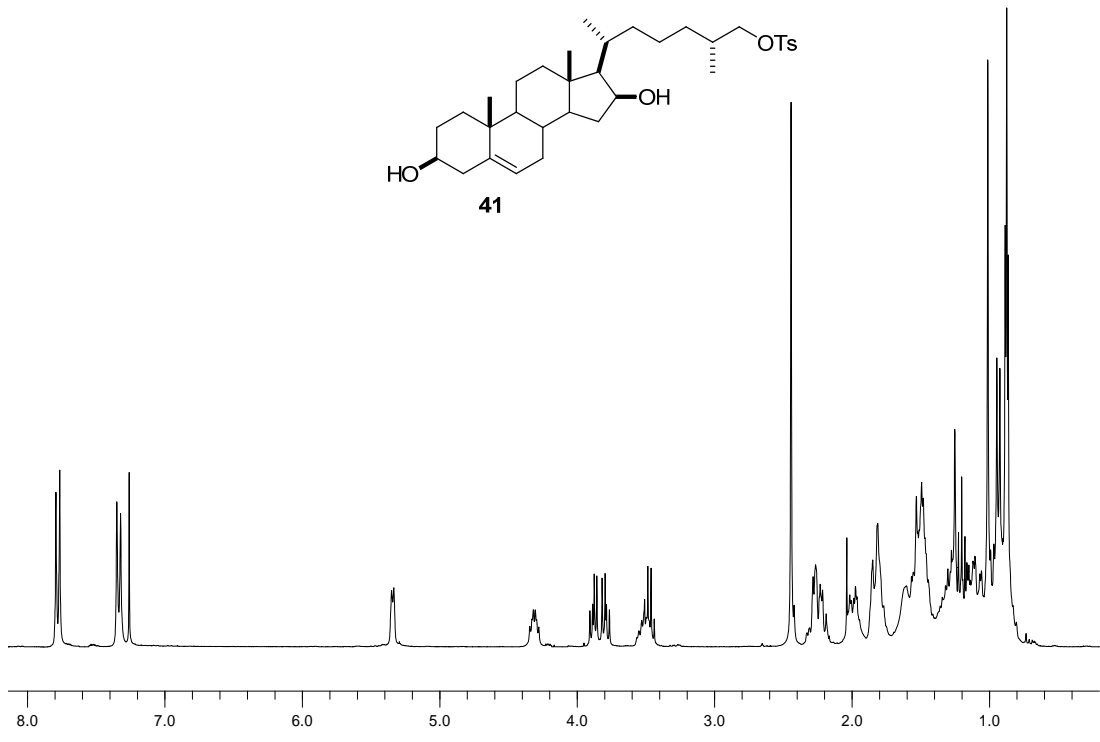
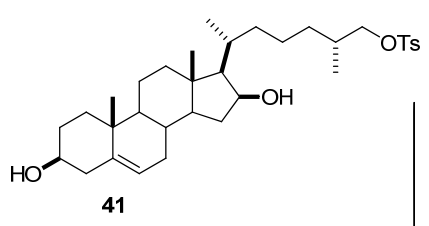
Sobre una disolución de (25*R*)-3β,16β,26-trihidroxicolest-5-eno (**40**) (0.5 g, 1.2 mmol) en 5 mL de piridina a 0°C, se añadió TsCl (1.4 g, 7 mmol) en 5 mL de piridina. La mezcla se dejó agitando a t.a. durante 2 h. Al cabo de ese tiempo se añadió agua y el producto se extrajo con Et₂O. La fase orgánica se lavó con NaCl, agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)] obteniéndose 0.39 g del (25*R*)-3β,16β-dihidroxi-26-tosilcolest-5-eno (**41**), semisólidos blancos, 79%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 7.78 (aril-H, 2H, d, *J* = 8.0 Hz); 7.31 (aril-H, 2H, d, *J* = 8.0 Hz); 5.35 (H6, 1H, m); 4.33 (H16α, 1H, m); 3.72 (H26, 2H, m); 3.6–3.3 (H3α, 1H, m); 2.43 (aril-CH₃, 3H, s); 0.91 (H19, 3H, s); 0.78 (H18, 3H, s).

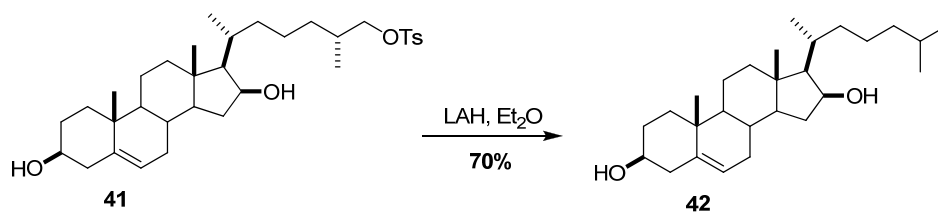
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 144.3; 140.8 (C5, s); 136.4; 128.5; 128.5; 127.2; 127.2; 121.8 (C6, d); 74.7 (C16, d); 71.6 (C3, d); 65.4; 62.5; 55.4; 49.8; 42.5; 39.5; 36.5; 35.5; 35.4; 35.2; 33.6; 32.4; 31.8; 30.7; 29.5; 29.4; 28.9; 23.2; 22.8; 22.1; 21.3; 20.7; 20.4; 19.7; 18.4; 17.3; 16.5; 13.3.

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 572 (M⁺, 3); 91 (100).

[α]_D = -6.6° [*c* = 0.1, MeOH].



1.4.3. Síntesis de (25*R*)-3β,16β-dihidroxi-26-tosilcolest-5-eno (41)



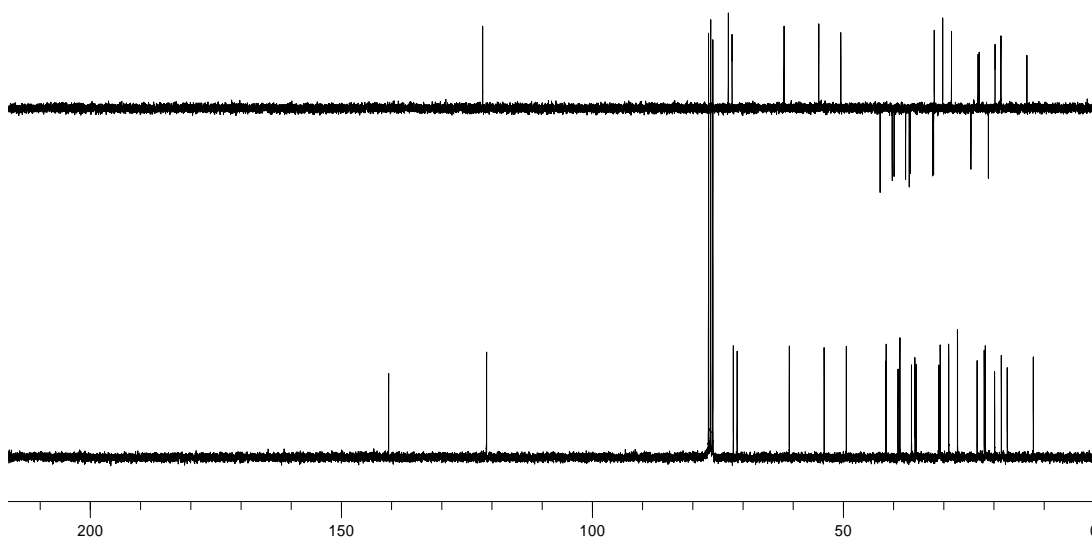
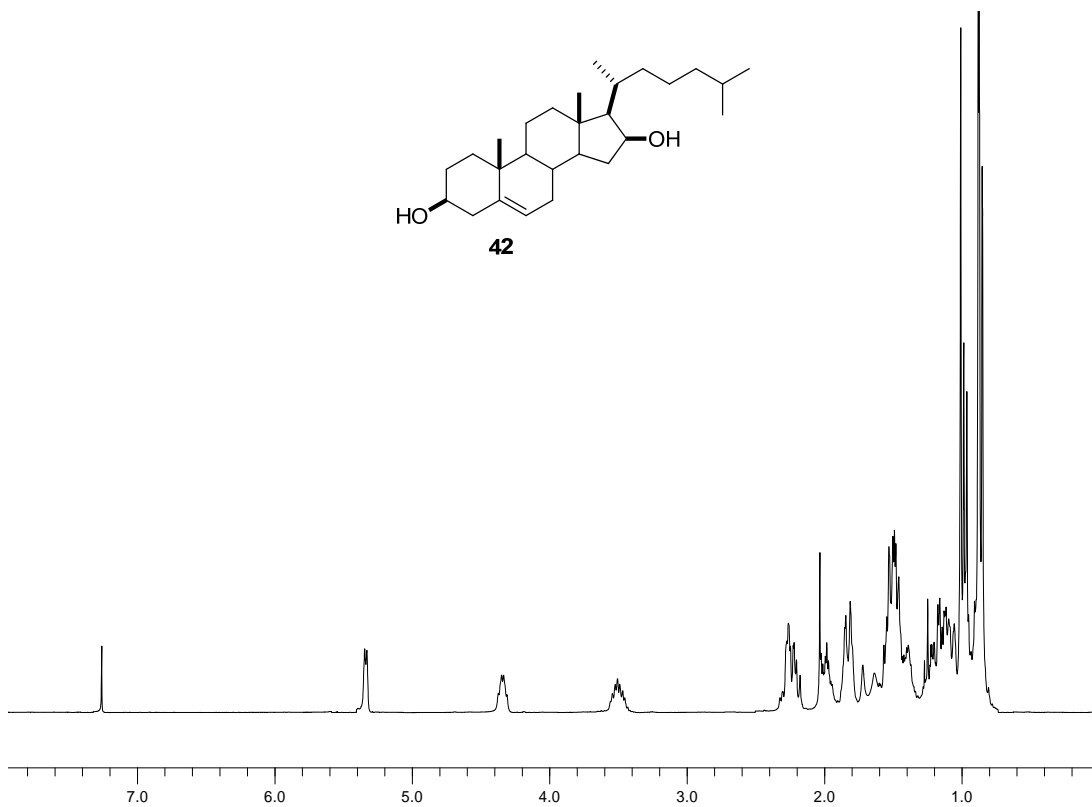
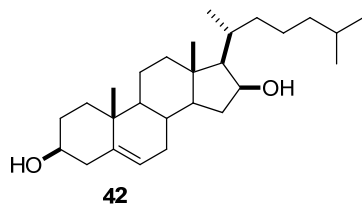
Sobre una disolución de (25*R*)-3β,16β-dihidroxi-26-tosilcolest-5-eno (**41**) (0.5 g, 0.85 mmol) en 10 mL de Et₂O a 0°C, se añadió LiAlH₄ (0.3 g, 8 mmol) disuelto en 10 mL de Et₂O. La mezcla se dejó agitando a t.a. durante 20 h. Al cabo de ese tiempo se añadió agua y el producto se extrajo con Et₂O. La fase orgánica se lavó con HCl al 5%, NaCl, agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] obteniéndose 0.35 g de (25*R*)-3β,16β-dihidroxi-26-tosilcolest-5-eno (**42**), semisólido blanco, 70%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 5.35 (H6, 1H, d, *J* = 5.2 Hz); 4.35 (H16α, 1H, m); 3.51 (H3α, 1H, m); 1.02 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, *J* = 6.3 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.3 Hz); 0.86 (H18, 3H, s).

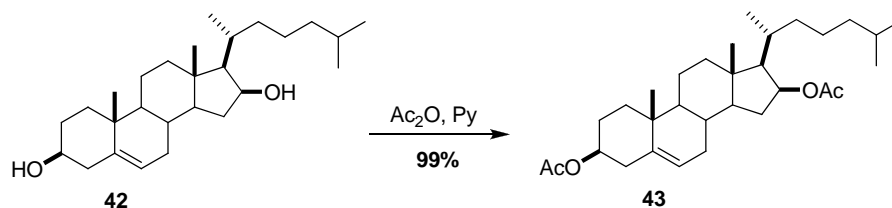
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 140.8 (C5, s); 121.4 (C6, d); 72.5 (C16, d); 71.7 (C3, d); 61.4; 54.5; 50.1; 42.3; 42.2; 39.8; 39.5; 37.2; 36.6; 36.4; 36.2; 31.7; 31.6; 31.4; 29.8; 28.1; 24.1; 22.8; 22.5; 20.6; 19.3; 18.2; 13.1.

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 402 (M⁺, 24); 105 (100).

[α]_D = +6.0° [*c* = 0.1, MeOH].



1.4.4. Síntesis de 3 β ,16 β -diacetoxicolest-5-eno (**43**)



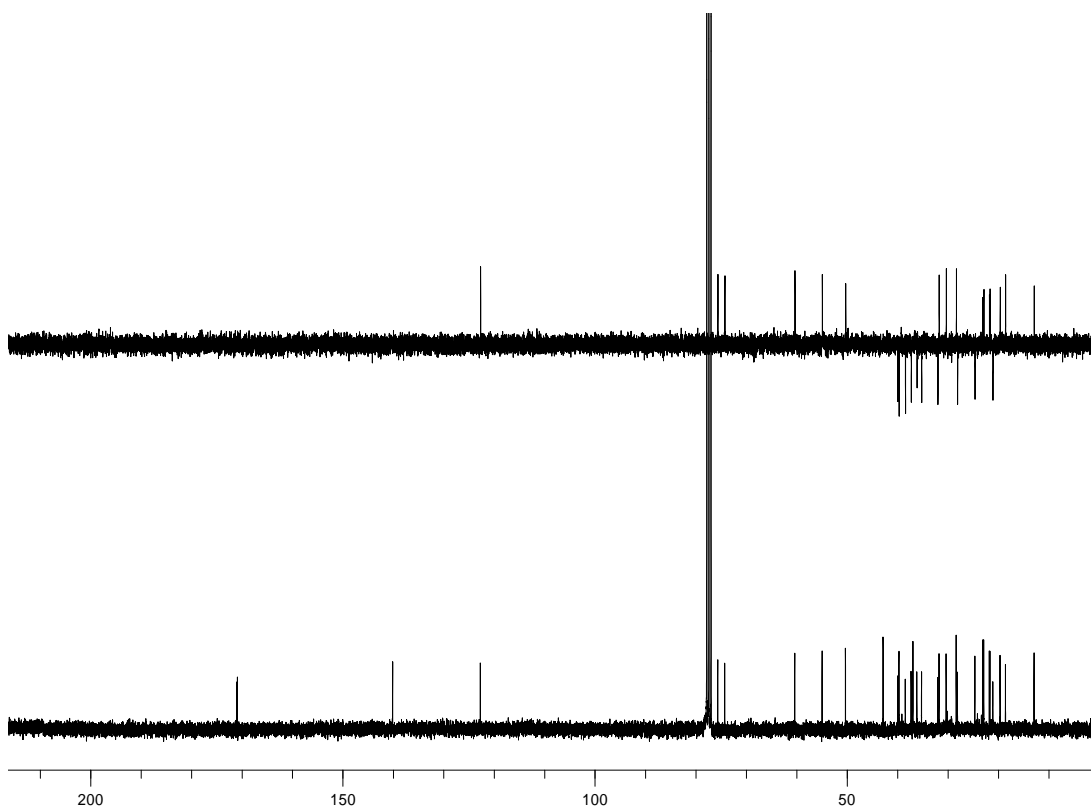
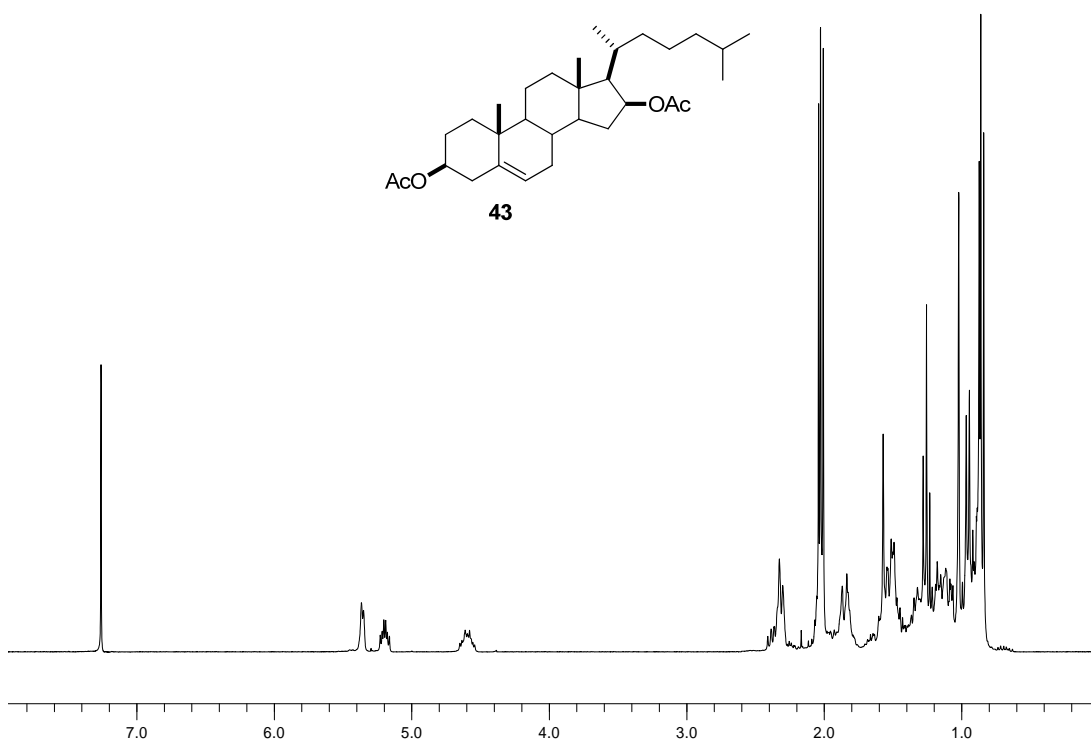
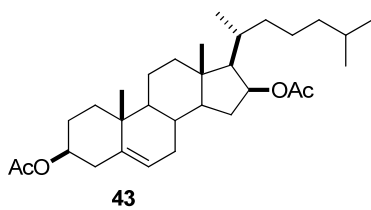
Se disolvió (25*R*)-3 β ,16 β -dihidroxicolest-5-eno (**42**) (0.6 g 1.5 mmol), en una mezcla (1:1) de Ac₂O:Py (20 mL) y se dejó reaccionando a t.a. durante 22 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **8** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogándose 0.6 g de 3 β ,16 β -diacetoxicolest-5-eno (**43**), semisólido blanco, 99%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 5.37 (H6, 1H, d, $J = 4.5$ Hz); 5.20 (H16 α , 1H, m); 4.60 (H3 α , 1H, m); 2.03 (OAc, 3H, s); 2.01 (OAc, 3H, s); 1.03 (H19, 3H, s); 0.96 (H21, 3H, d, $J = 5.9$ Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, $J = 5.9$ Hz); 0.84 (H18, 3H, s).

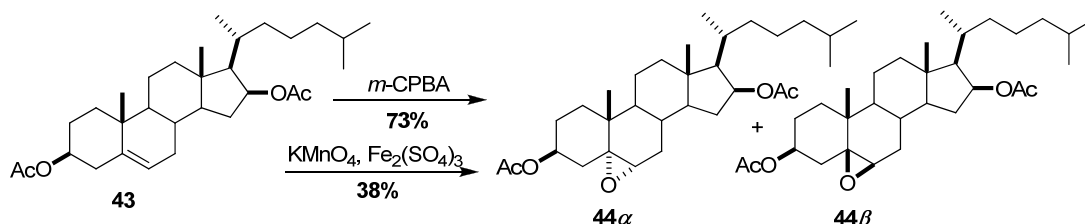
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 170.2 (OAc, s); 170.1 (OAc, s); 139.3 (C5, s); 121.9 (C6, d); 74.8 (C16, d); 73.4 (C3, d); 59.5; 54.1; 49.5; 42.0; 39.8; 38.8; 37.6; 36.4; 36.1; 35.3; 34.4; 31.2; 30.9; 29.5; 27.5; 27.3; 24.1; 23.8; 22.3; 20.9; 20.5; 18.8; 18.6; 17.7; 12.7.

LREIMS (70 eV, m/z %): 486 (M⁺, 2); 84 (100).

$[\alpha]_D = -10.2^\circ$ [$c = 0.1$, CHCl₃].



1.4.5. Síntesis de 3 β ,16 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**44 α**) y 3 β ,16 β -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**44 β**)



Procedimiento A: Sobre una disolución de ácido *m*-cloroperbenzoico (0.4 g, 2.0 mmol) a 0°C en CHCl₃ (20 mL), se añadió, gota a gota, 3 β ,16 β -diacetoxicolest-5-eno (**43**) (0.4 g, 0.7 mmol), disueltos en CHCl₃ (20 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para los epóxidos **9 α** y **9 β** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.28 g de una mezcla inseparable de los dos epóxidos 3 β ,16 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**44 α**) y 3 β ,16 β -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**44 β**), en relación (1:2) ambos semisólidos blancos, 73%.

Procedimiento B: Sobre una suspensión de KMnO₄ (0.2 g, 1.3 mmol), Fe₂(SO₄)₃ (0.1 g) y agua (10 μ L) en CH₂Cl₂ (5 mL), se adicionó 3 β ,16 β -diacetoxicolest-5-eno (**43**) (60 mg, 1 mmol) y se dejó reaccionando durante 3 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **27 β** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.28 g de una mezcla inseparable de los dos epóxidos 3 β ,16 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**44 α**) y 3 β ,16 β -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**44 β**), ambos semisólidos blancos, en relación (1:4), 38%.

44 α : RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 5.21 (H16 α , 1H, m); 4.96 (H3 α , 1H, m); 2.88 (H6 β , 1H, d, *J* = 4.4 Hz); 2.01 (OAc, 3H, s); 2.00 (OAc, 3H, s); 1.01 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, *J* = 6.4 Hz); 0.84 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.4 Hz); 0.80 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 170.2 (OAc, s); 170.0 (OAc, s); 74.6 (C16, d); 70.8 (C3, d); 63.3; 62.8; 58.7; 58.4; 53.1; 49.2; 42.2; 40.0; 39.7; 37.4; 36.7; 35.2; 34.7; 34.3; 34.2; 31.6; 29.6; 28.7; 27.3; 25.4; 24.7; 23.3; 21.9; 21.6; 20.8; 15.7; 11.9.

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 502 (M⁺, 8); 84 (100).

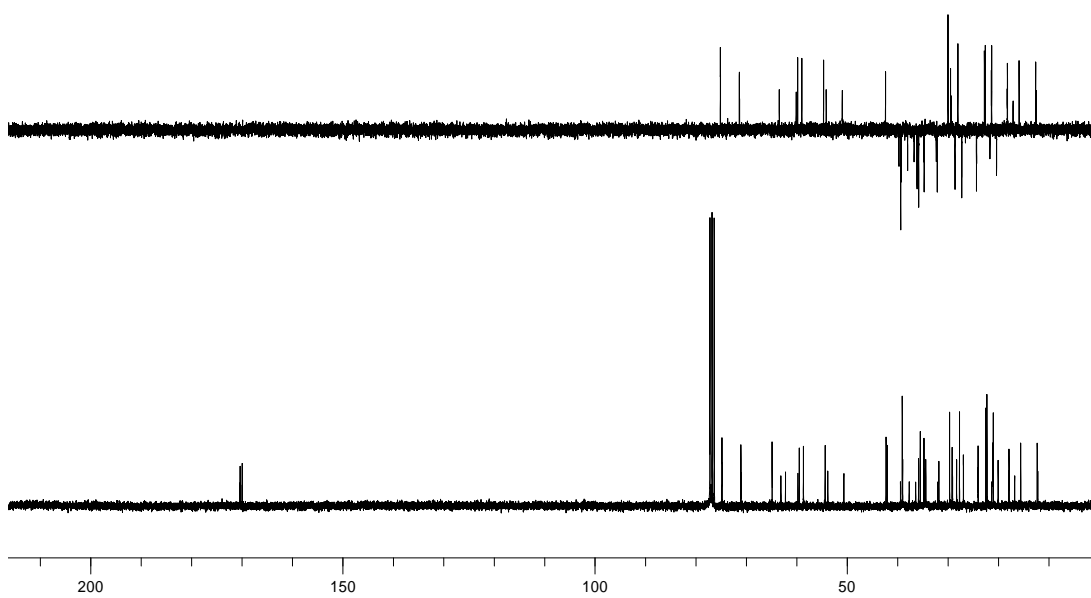
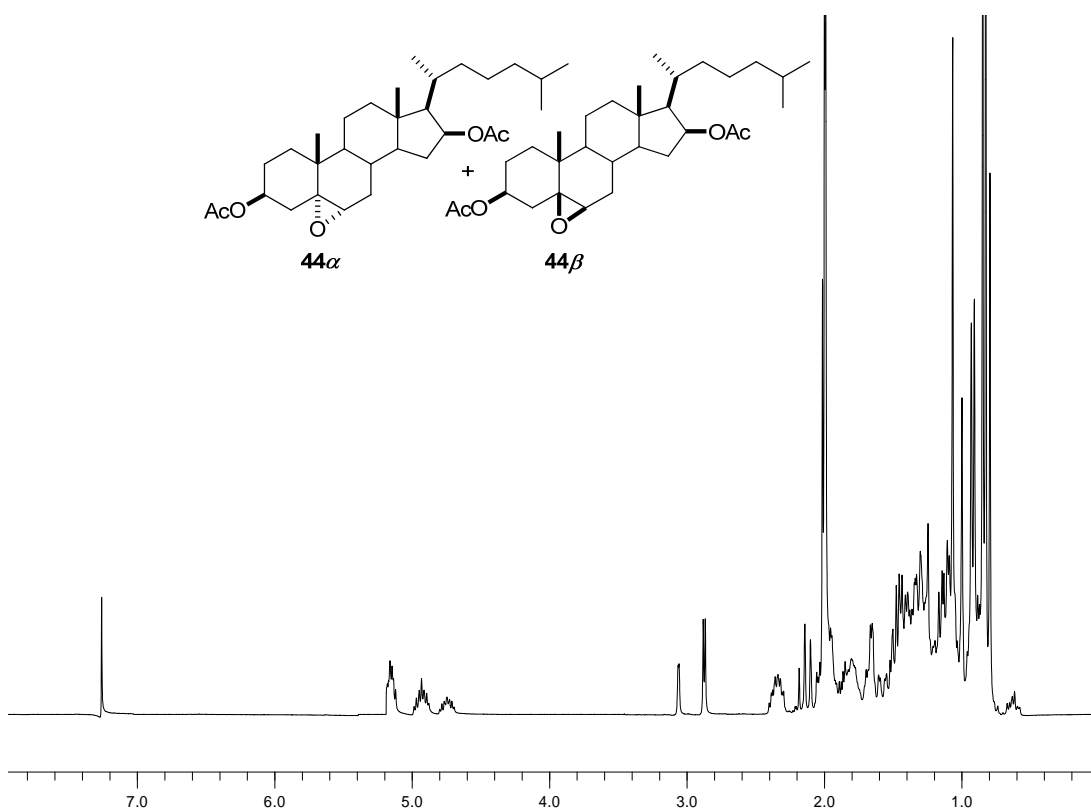
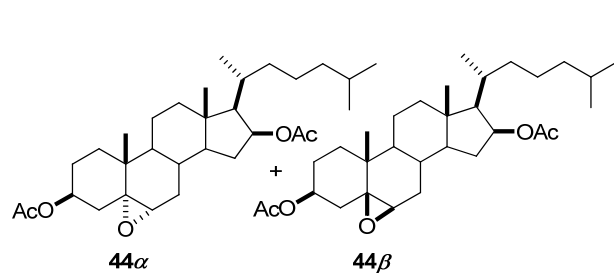
[α]_D = +26.3° [*c* = 0.1, CH₂Cl₂].

44 β : RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 5.20 (H16 α , 1H, m); 4.78 (H3 α , 1H, m); 3.05 (H6 α , 1H, d, *J* = 1.9 Hz); 2.02 (OAc, 3H, s); 2.01 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.93 (H21, 3H, d, *J* = 6.6 Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.6 Hz); 0.81 (H18, 3H, s).

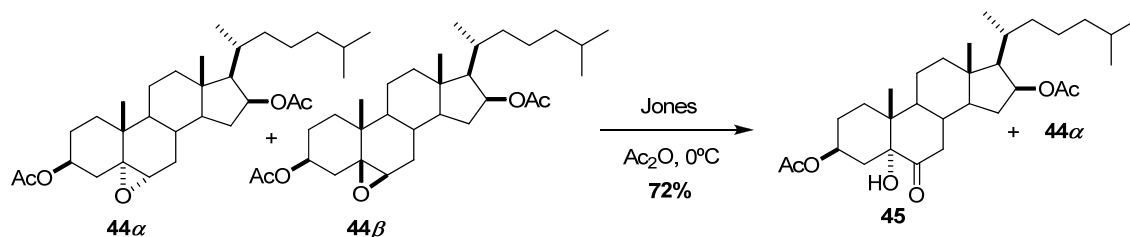
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 170.1 (OAc, s); 169.9 (OAc, s); 76.8 (C16, d); 70.8 (C3, d); 64.6; 62.9; 59.7; 59.4; 54.4; 50.2; 42.0; 41.9; 41.8; 39.4; 37.7; 35.5; 34.9; 34.7; 31.8; 29.1; 28.7; 26.3; 25.4; 23.7; 23.3; 22.4; 21.9; 19.9; 17.7; 16.6; 12.1.

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 502 (M⁺, 8); 84 (100).

$[\alpha]_D = +27.4^\circ$ [$c = 0.1$, CH_2Cl_2].



1.4.6. Síntesis de 3 β ,16 β -diacetoxi-5 α -hidroxicolestan-6-ona (**45**)



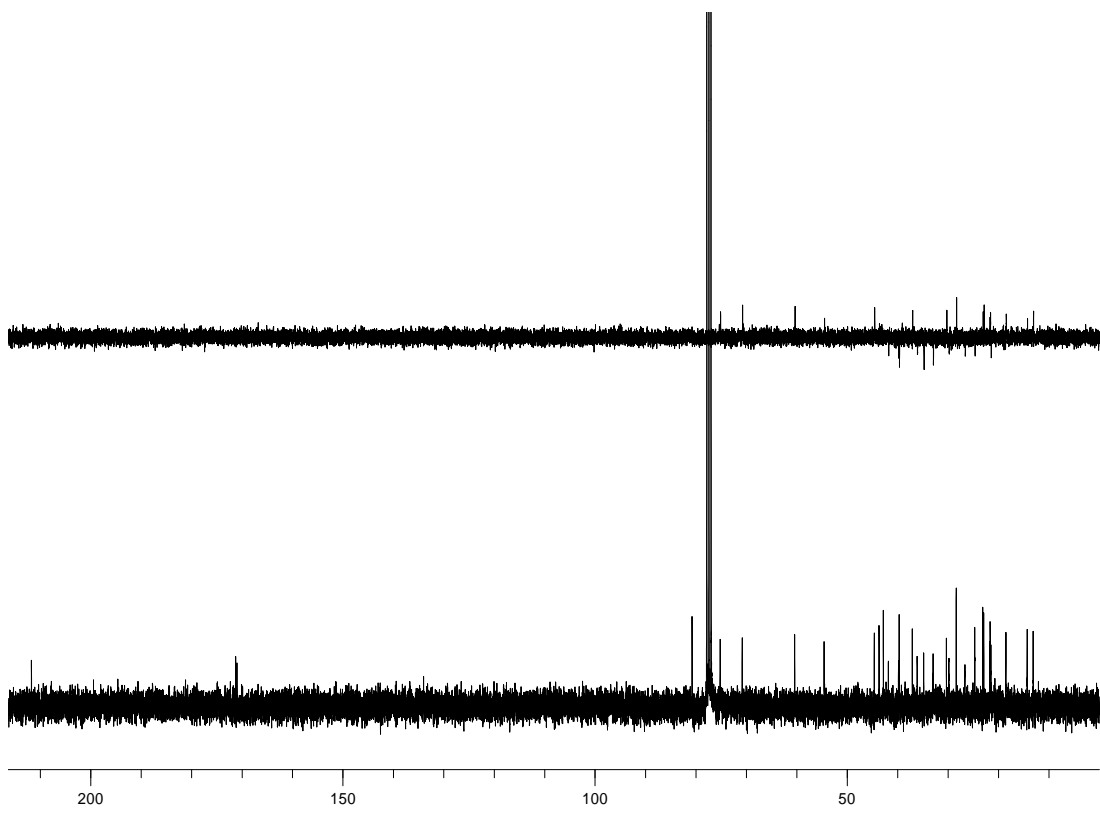
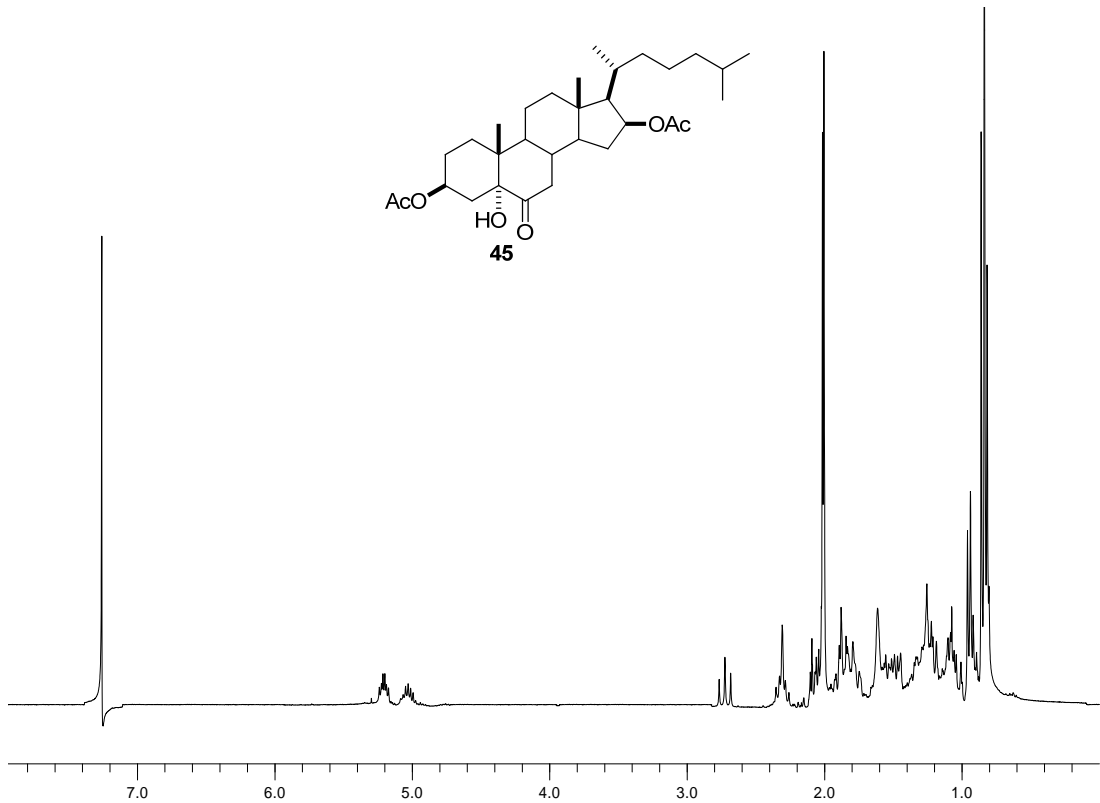
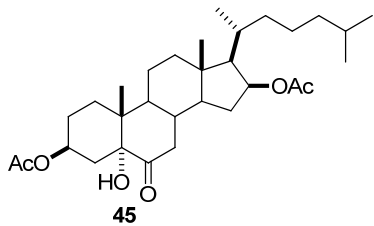
Sobre una disolución de la mezcla inseparable de 3 β ,16 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**44 α**) y 3 β ,16 β -diacetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**44 β**), en relación (1:2) (0.1 g, 0.2 mmol) a 0°C en Ac₂O (12 mL), se adicionó, gota a gota, el reactivo de Jones (4 mL) preparado *in situ*, dejándolo reaccionar a 0°C durante 6 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **10** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 72 mg de 3 β ,16 β -diacetoxi-5 α -hidroxicolestan-6-ona (**45**), semisólido blanco, 72%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 5.21 (H16 α , 1H, m); 5.03 (H3 α , 1H, m); 2.73 (H7 β , 1H, t, J = 12.0 Hz); 2.03 (OAc, 3H, s); 2.01 (OAc, 3H, s); 1.03 (H19, 3H, s); 0.95 (H21, 3H, d, J = 6.4 Hz); 0.90 (H18, 3H, s); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.7 Hz).

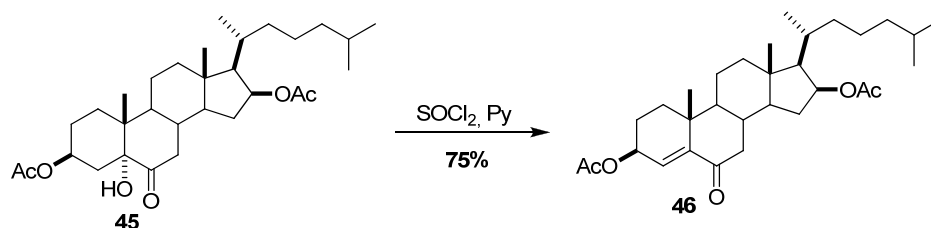
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 210.9 (C6, s); 170.4 (OAc, s); 170.2 (OAc, s); 79.9 (C5, s); 76.7 (C16, d); 76.4 (C3, d); 74.3; 69.9; 59.6; 53.7; 43.4; 42.8; 41.9; 40.9; 38.9; 38.8; 36.2; 35.2; 33.9; 32.1; 29.4; 28.9; 27.5; 25.8; 23.8; 22.2; 21.9; 21.3; 17.6; 13.4; 12.3.

LREIMS (70 eV, m/z %): 518 (M⁺, 5); 83 (100).

$[\alpha]_D$ = -18.6° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



1.4.7. Síntesis de 3 β ,16 β -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**46**)



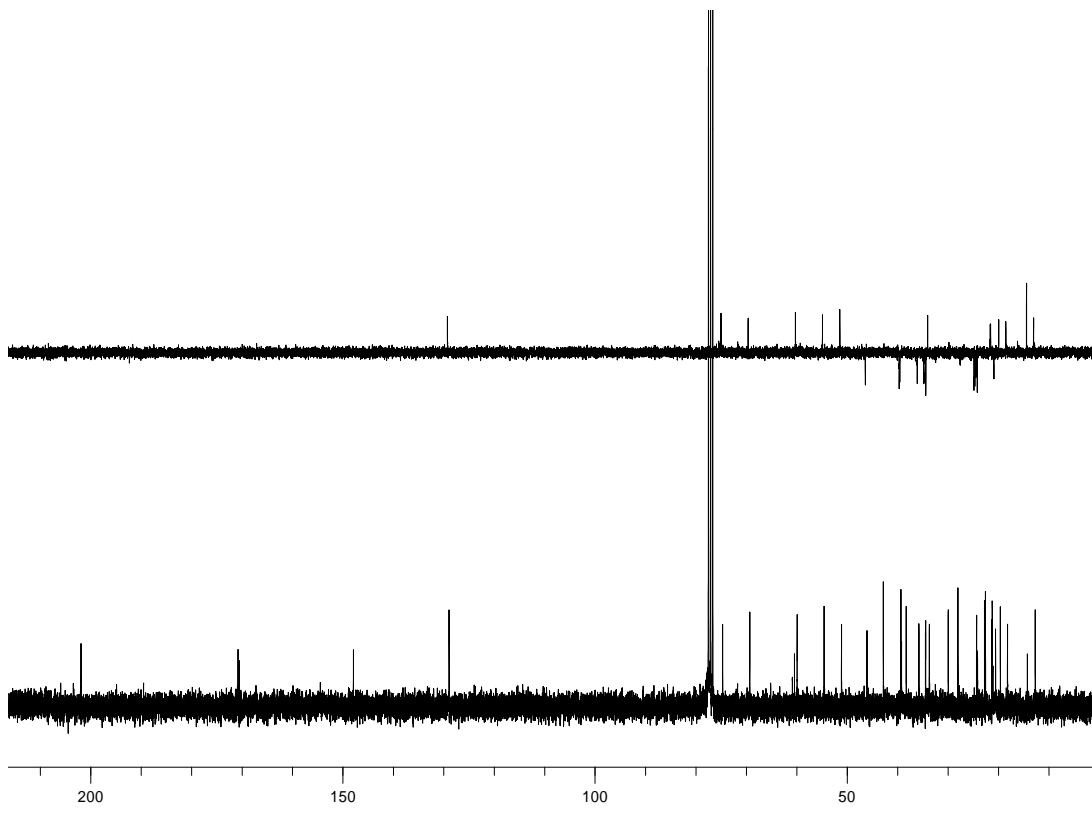
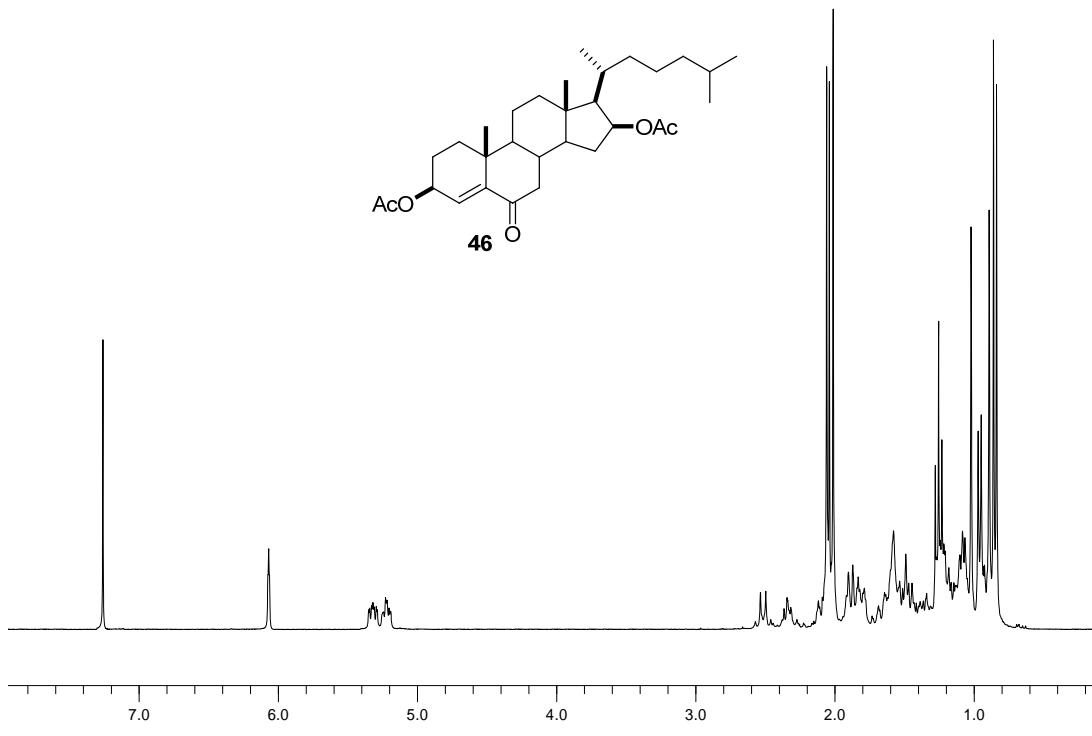
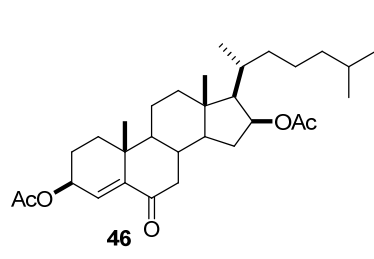
Sobre una disolución de 3 β ,16 β -diacetoxi-5 α -hidroxicolestan-6-ona (**45**) (0.1 g, 0.15 mmol), a 0°C en piridina (4 mL) se adicionó gota a gota SOCl₂ (0.1 mL, 1.2 mmol) y la mezcla se dejó reaccionando 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **11** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 75 mg de 3 β ,16 β -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**46**), semisólido blanco, 75%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 6.07 (H4, 1H, s); 5.32 (H16 α , 1H, m); 5.23 (H3 α , 1H, m); 2.52 (H7 β , 1H, d, $J = 12.0$ Hz); 2.06 (OAc, 3H, s); 2.01 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.84 (H18, 3H, s).

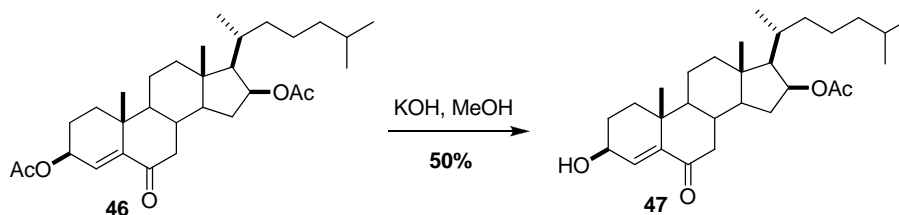
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 201.8 (C6, s); 170.6 (OAc, s); 170.4 (OAc, s); 147.8 (C5, s); 132.4 (C4, d); 69.2 (C16, d); 68.1 (C3, d); 66.8; 59.8; 54.4; 51.0; 45.9; 42.7; 39.2; 39.1; 38.7; 35.7; 34.6; 33.9; 33.6; 30.4; 29.6; 24.7; 24.2; 22.9; 22.6; 22.2; 21.7; 20.4; 12.6; 10.9.

LREIMS (70 eV, m/z %): 500 (M⁺, 5); 83 (100).

$[\alpha]_D$ = -6.6° [$c = 0.1$, CH₂Cl₂].



1.4.8. Síntesis de 16 β -acetoxi-3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona (47)



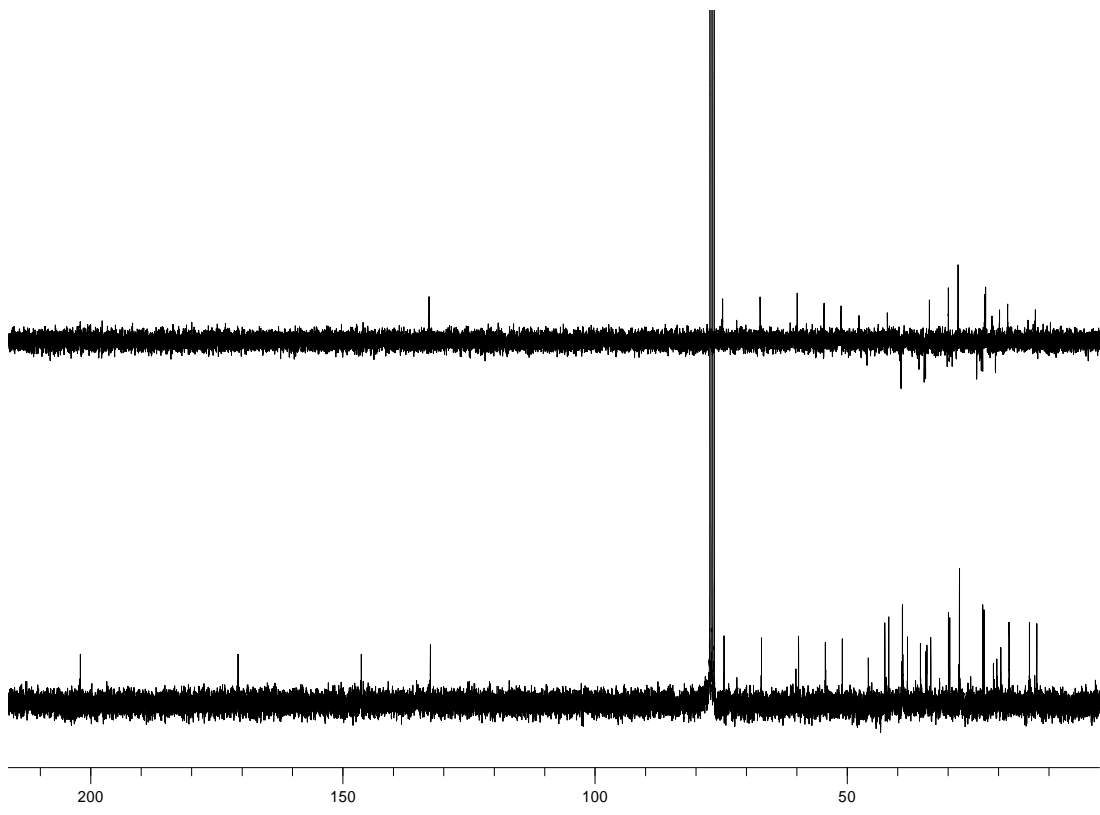
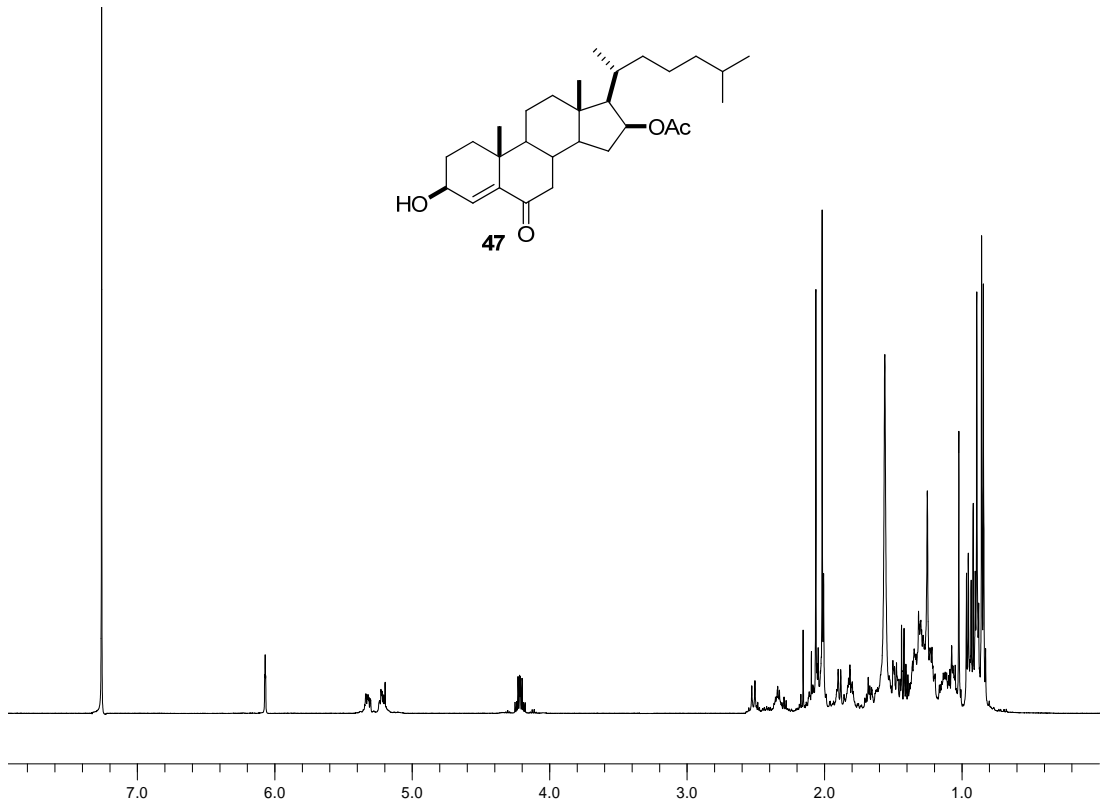
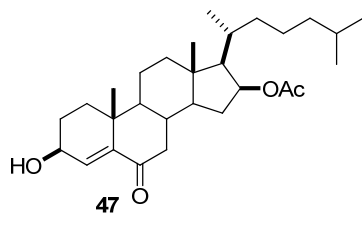
Se disolvió 3 β ,16 β -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**46**) (15 mg, 0.1 mmol), en una disolución KOH:MeOH al 1% (15 mL) y se dejó reaccionando 1 h Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 7.5 mg de 16 β -acetoxi-3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona (**47**), semisólido blanco, 50%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 6.16 (H4, 1H, s); 5.21 (H16 α , 1H, m); 4.15 (H3 α , 1H, m); 2.52 (H7 β , 1H, d, J = 12.0 Hz); 2.02 (OAc, 3H, s); 1.02 (H19, 3H, s); 0.97 (H21, 3H, d, J = 6.6 Hz); 0.90 (H18, 3H, s); 0.86 (H26, H27, 6H, d, J = 6.6 Hz)

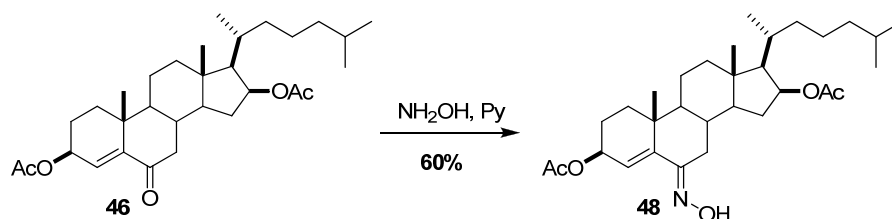
RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 202.0 (C6, s); 170.1 (OAc, s); 146.1 (C5, s); 132.4 (C4, d); 74.2 (C16, d); 66.8 (C3, d); 59.4; 54.1; 51.2; 42.7; 42.0; 39.2; 38.2; 35.7; 34.6; 34.4; 33.6; 29.7; 28.7; 27.5; 22.9; 22.6; 22.3; 22.1; 20.8; 19.3; 17.7; 13.6; 12.2.

(+)-LRFABMS, m/z (%): 459 ([M + H]⁺, 67); 133 (100).

$[\alpha]_D^{25}$ = +5.7° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



1.4.9. Síntesis de 3 β ,16 β -diacetoxi-6*E*-hidroximinocolest-4-eno (**48**)



Se disolvió 3 β ,16 β -diacetoxicolest-4-en-6-ona (**46**) (12 mg, 0.1 mmol), y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (20 mg, 0.02 mmol) en piridina (2 mL) y se dejó reaccionando 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 54 min y fase móvil MeOH/H₂O, 95:5), obteniéndose 6 mg del 3 β ,16 β -diacetoxi-6*E*-hidroximinocolest-4-eno (**48**), semisólido blanco, 60%.

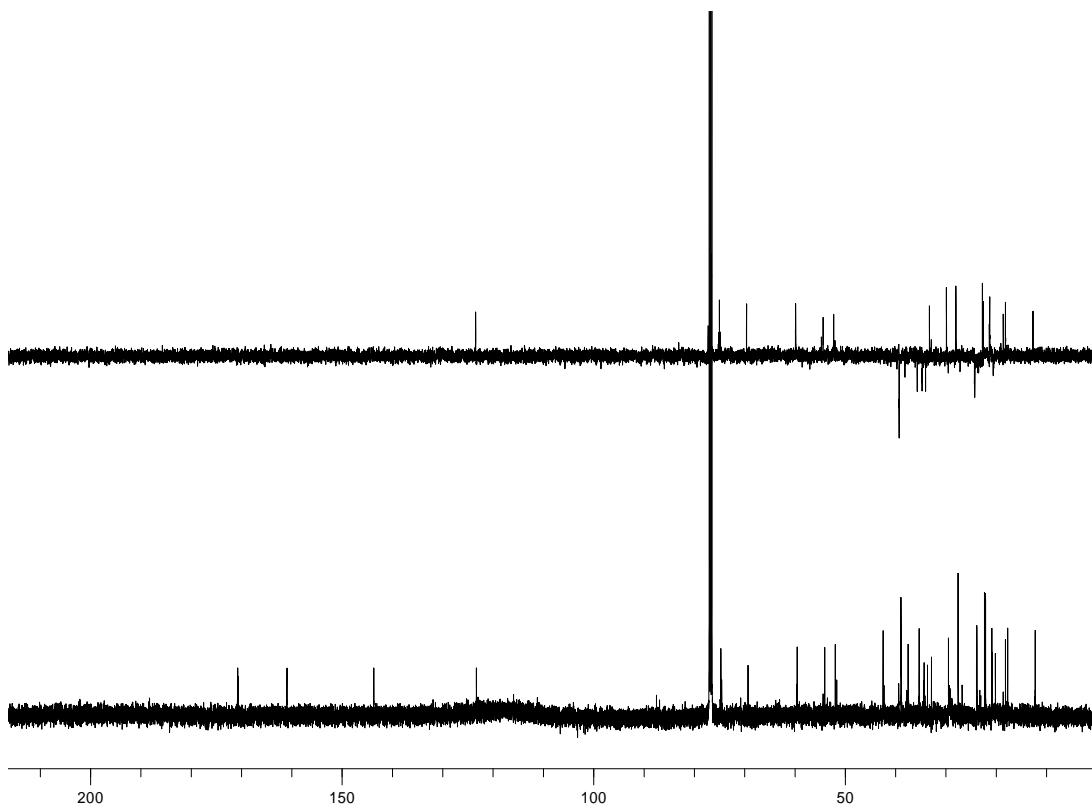
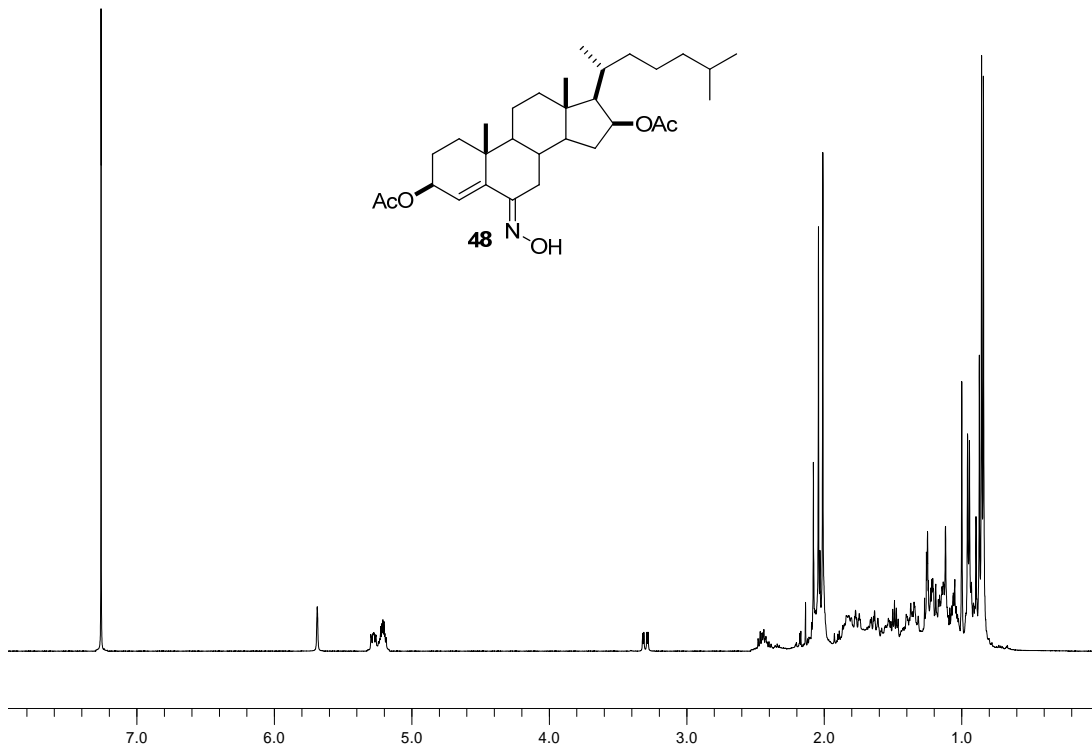
RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 5.70 (H4, 1H, s); 5.26 (H16 α , 1H, m); 5.22 (H3 α , 1H, m); 3.31 (H7 β , 1H, dd, $J = 12.5, 4.4$ Hz); 2.05 (OAc, 3H, s); 2.01 (OAc, 3H, s); 1.01 (H19, 3H, s); 0.96 (H21, 3H, d, $J = 6.5$ Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.5$ Hz); 0.87 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 170.9 (OAc, s); 170.6 (OAc, s); 161.7 (C6, s); 143.7 (C5, s); 123.4 (C4, d); 74.9 (C16, d); 74.8 (C3, d); 69.6; 59.8; 54.4; 52.3; 42.8; 42.6; 39.7; 39.3; 37.8; 35.7; 34.6; 34.0; 33.2; 29.8; 27.9; 24.2; 22.7; 22.5; 21.3; 21.2; 20.6; 18.6; 18.2; 12.6.

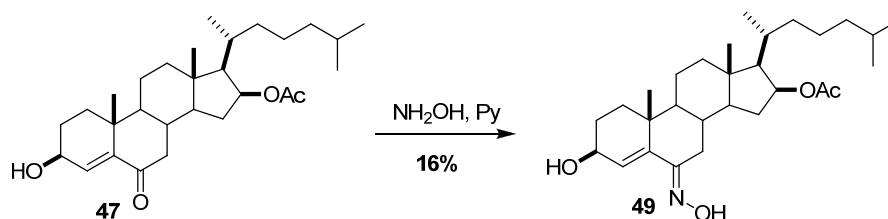
LREIMS (70 eV, m/z %): 515 (M^+ , 15); 308 (100).

(+)-HRESIMS, m/z (%): 516.3685 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (calcd. para C₃₁H₅₀NNaO₅, 516.3684); m/z 538.3510 [$\text{M} + \text{Na}$]⁺ (calcd. para C₃₁H₄₉NNaO₅, 538.3503);

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +27.5° [$c = 0.05$, CHCl₃].



1.4.10. Síntesis de 16 β -acetoxi-3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona (47)



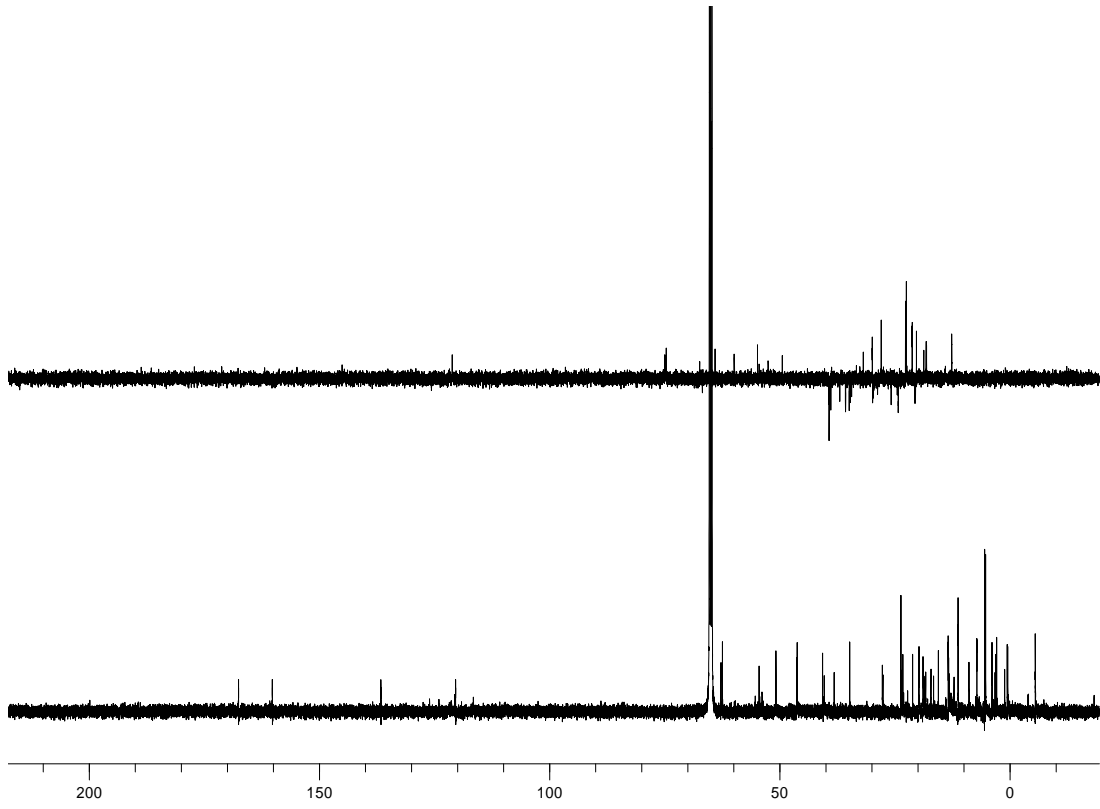
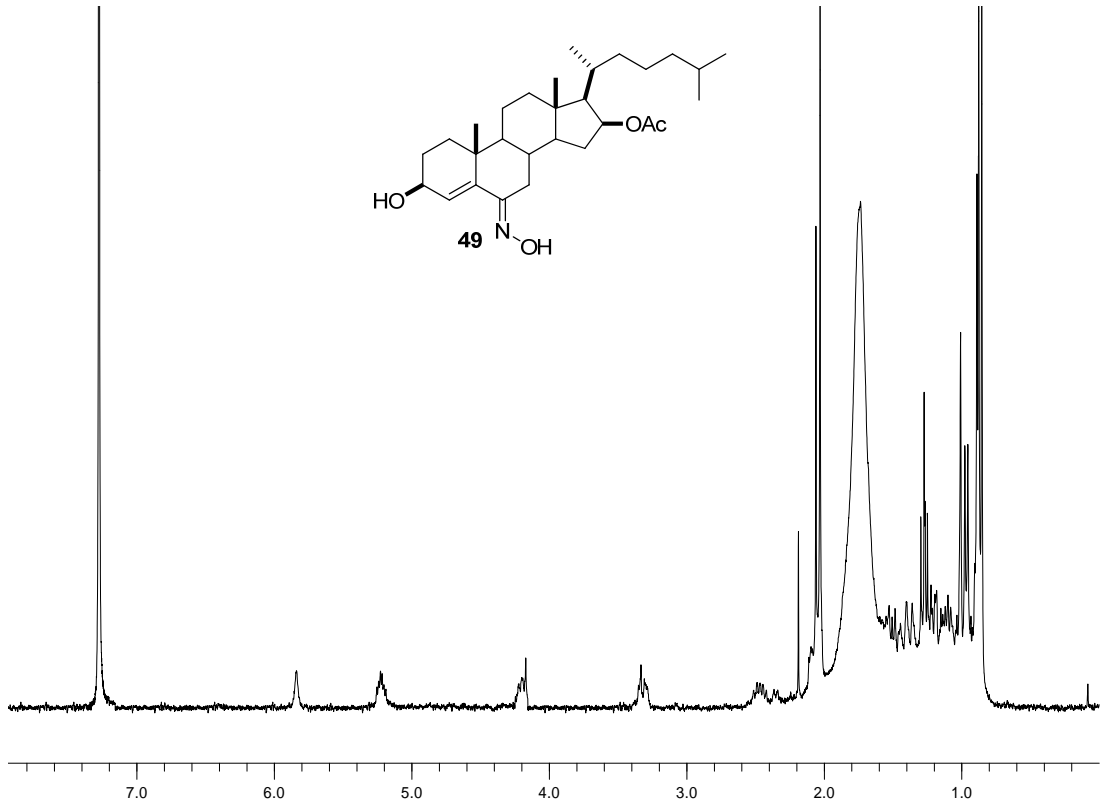
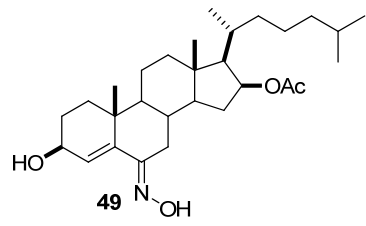
Se disolvió 16 β -acetoxi-3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona (**47**) (12 mg, 0.1 mmol), y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (15 mg, 0.01 mmol) en piridina (2 mL) y se dejó reaccionando 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 62 min y fase móvil MeOH/H₂O, 9:1) obteniéndose 2 mg del 16 β -acetoxi-3 β -hidroxicolest-4-en-6-ona (**49**), semisólido blanco, 16%.

RMN-¹H (300 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 5.82 (H4, 1H, s); 5.21 (H16 α , 1H, m); 4.19 (H3 α , 1H, m); 3.32 (H7 β , 1H, dd, $J = 11.5, 4.2$ Hz); 2.02 (OAc, 3H, s); 1.0 (H19, 3H, s); 0.96 (H21, 3H, d, $J = 6.6$ Hz); 0.89 (H18, 3H, s); 0.86 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.6$ Hz).

RMN-¹³C (75 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 170.6 (OAc, s); 164.4 (C6, s); 142.4 (C5, s); 127.5 (C4, d); 74.9 (C16, d); 74.6 (C3, d); 69.5; 59.6; 54.8; 52.9; 42.6; 42.3; 39.8; 39.3; 37.9; 35.6; 34.5; 33.3; 29.7; 27.4; 24.1; 22.7; 22.2; 21.6; 21.3 (OAc, s); 20.5; 18.7; 17.9; 12.8.

LREIMS (70 eV, m/z %): 473 (M^+ , 5); 91 (100).

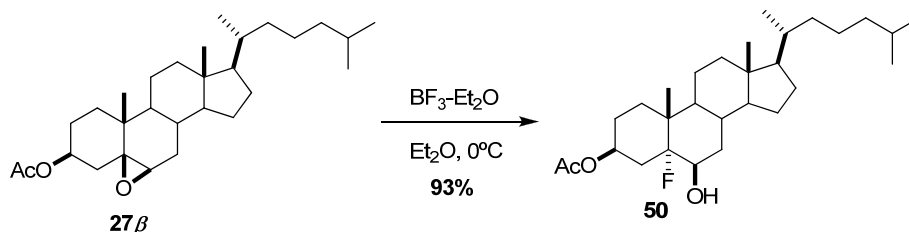
$[\alpha]_D$ = +72.6° [$c = 0.05, \text{CHCl}_3$].



2. Síntesis de 5-fluoro-6-hidroxiesteroideos

2.1. Síntesis de 5-fluoro-6-hidroxiesteroideos con una posición oxigenada C-3.

2.1.1. Síntesis de 3 β -acetoxi-5 α -fluoro-6 β -hidroxicolestano (**50**)



Sobre una disolución de 3 β -acetoxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**27 β**) (2.5 g, 5.6 mmol), en Et₂O (40 mL), a 0°C, se adicionó, gota a gota, BF₃·Et₂O (2.8 mL) dejándola reaccionar a 0°C durante 5 h. Al cabo de este tiempo, se añadió NaHCO₃ (30 mL) y se extrajo con EtOAc (2 x 50 mL). Los extractos se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogién dose 2.28 g de 3 β -acetoxi-5 α -fluoro-6 β -hidroxicolestano (**50**), semisólido blanco, 93%.

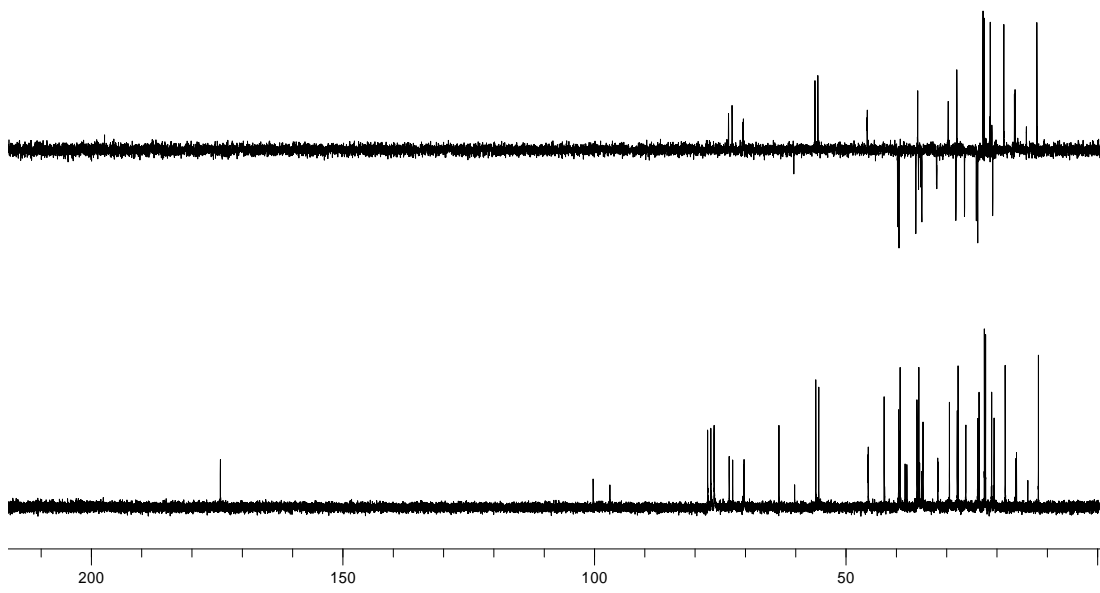
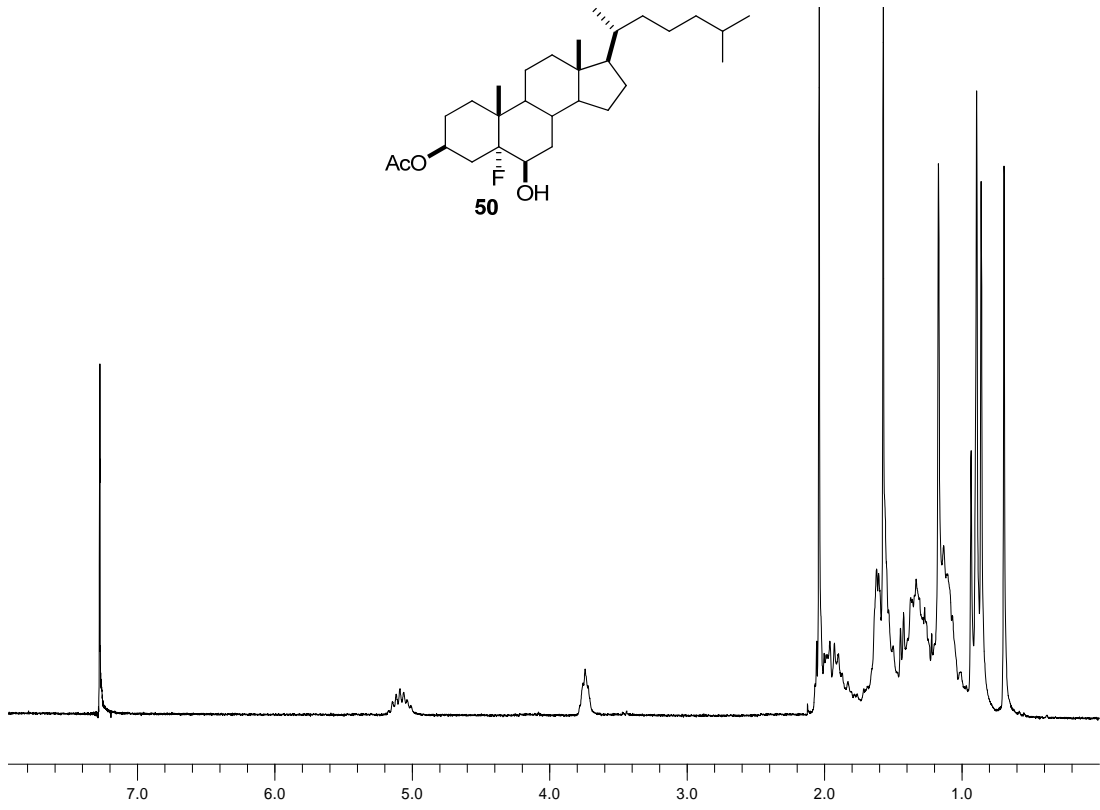
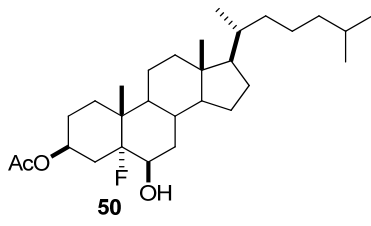
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.09 (H3 α , 1H, m); 3.74 (H6 α , 1H, dt, J = 4.5, 2.3 Hz); 2.02 (OAc, 3H, s); 1.15 (H19, 3H, s); 0.94 (H21, 3H, d, J = 6.5 Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, J = 6.5 Hz); 0.67 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.4 (OAc, s); 98.6 (C5, s, J_{CF} = 166.9 Hz); 73.0 (C6, s, J_{CF} = 35.3 Hz); 72.6; 70.4 (C3, d, J_{CF} = 3.5 Hz); 63.5; 56.2; 55.6; 45.8; 42.6; 39.5 (C10, s, J_{CF} = 14.1 Hz); 38.4; 38.1; 35.7; 35.6; 35.2; 34.9; 32.0; 31.9; 29.6; 28.1; 27.9; 26.4; 24.1; 21.3; 20.8; 18.7; 16.4 (C19, q, J_{CF} = 5.2 Hz); 14.2 (C18, q).

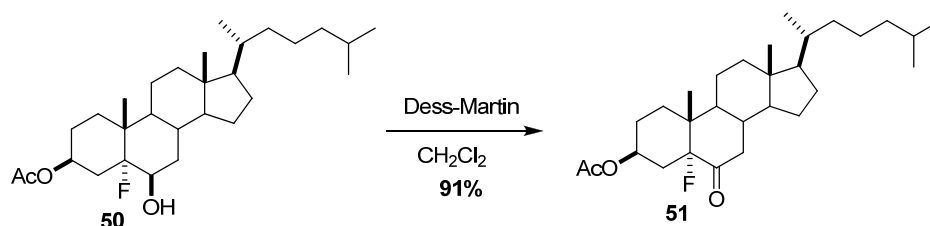
RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -156.4 ppm.

LREIMS (70 eV, m/z %): 464 (M⁺, 18); 309 (100).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -6.3° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



2.1.2. Síntesis de 3 β -acetoxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (**51**)



Sobre una disolución del reactivo de Dess-Martin (2.75 g, 6.5 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL), se adicionó, gota a gota, 3 β -acetoxi-5 α -fluoro-6 β -hidroxicolestano (**50**) (2.5 g, 5.55 mmol), en CH₂Cl₂ (15 mL) dejándolo reaccionar durante 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **21** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 2.31 g de 3 β -acetoxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (**51**), semisólido blanco, 91%.

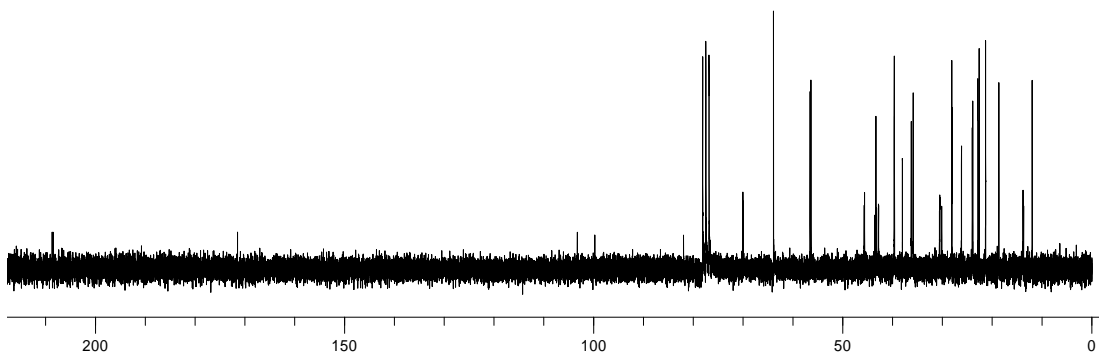
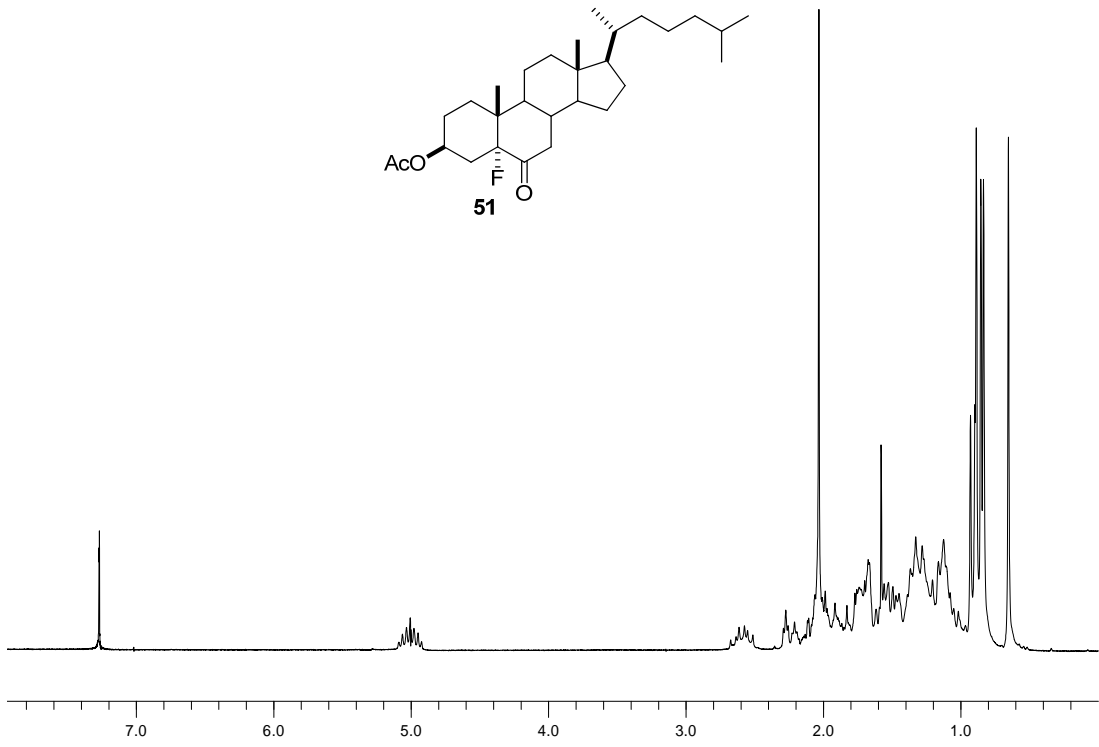
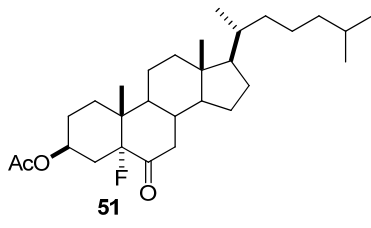
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.03 (H3 α , 1H, m); 2.59 (H7 β , 1H, dd, J = 12.6, 12.3 Hz); 2.02 (OAc, 3H, s); 1.08 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, J = 6.1 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.67 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 207.2 (C6, s, J_{CF} = 26.8 Hz); 170.3 (OAc, s); 100.8 (C5, s, J_{CF} = 174.8 Hz); 87.6; 69.6 (C3, d, J_{CF} = 2.1 Hz); 69.5; 63.4; 56.2; 56.0; 45.4; 43.2 (C10, s, J_{CF} = 12.7 Hz); 42.6; 39.4; 37.8; 36.0; 35.6; 30.4; 30.3; 29.9; 27.9; 26.0; 23.8; 23.7; 22.7; 22.5; 21.2; 18.5; 13.6 (C19, q, J_{CF} = 5.1 Hz); 11.9 (C18, q).

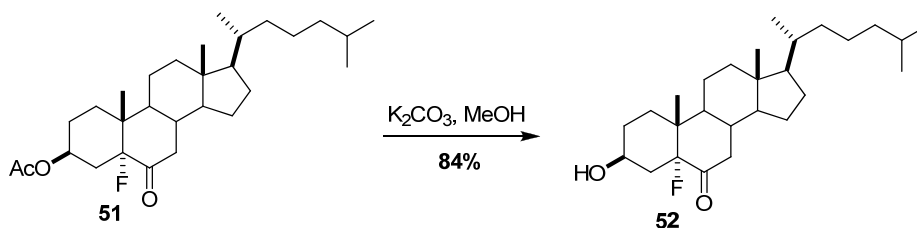
RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -156.8 ppm.

LREIMS (70 eV, m/z %): 462 (M⁺, 16); 93 (100).

$[\alpha]_D$ = +0.3° [c = 0.25, CH₂Cl₂].



2.1.3. Síntesis de 5 α -fluoro-3 β -hidroxi-colestan-6-ona (**52**)



Sobre una disolución de 3 β -acetoxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (**51**) (2.2 g, 4.8 mmol), en MeOH (50 mL), se adicionó K₂CO₃ (0.45 g, 3.26 mmol) y se dejó reaccionando durante 6 h. Al cabo de este tiempo, se adicionó una disolución saturada de NH₄Cl (10 mL) con agitación durante 15 min. Se eliminó el MeOH a presión reducida, se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 50 mL) y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogién dose 1.8 g de 5 α -fluoro-3 β -hidroxi-colestan-6-ona (**52**), semisólido blanco, 84%.

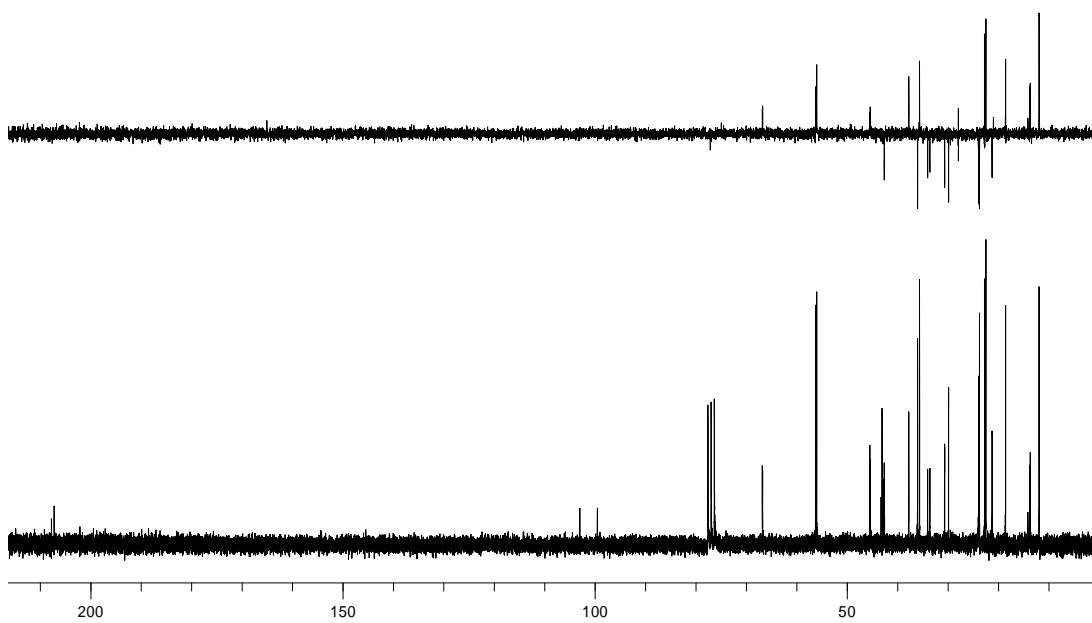
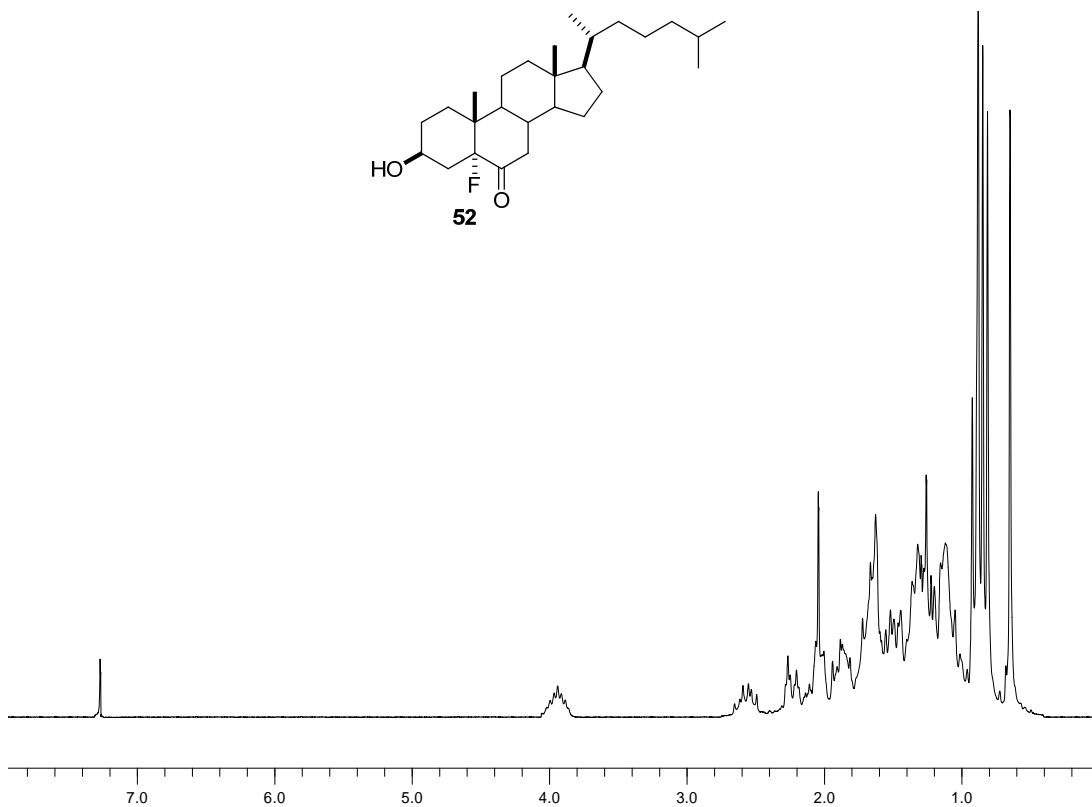
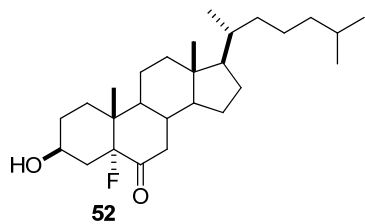
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.92 (H3 α , 1H, m); 2.58 (H7 β , 1H, dd, J = 12.6, 1.3 Hz); 0.92 (H19, 3H, s); 0.87 (H21, 3H, d, J = 6.1 Hz); 0.83 (H26, H27, 6H, d, J = 6.3 Hz); 0.62 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 207.5 (C6, s, J_{CF} = 26.8 Hz); 101.2 (C5, s, J_{CF} = 174.5 Hz); 66.8 (C3, d, J_{CF} = 1.2 Hz); 56.2; 56.0; 43.1 (C10, s, J_{CF} = 15.1 Hz); 42.8; 42.6; 42.5; 39.4; 37.8; 36.0; 35.6; 34.0; 33.6; 30.6; 29.8; 23.8; 23.7; 23.0; 22.8; 22.5; 21.3; 18.6; 13.8; 13.7 (C19, q, J_{CF} = 5.2 Hz); 11.9 (C18, q).

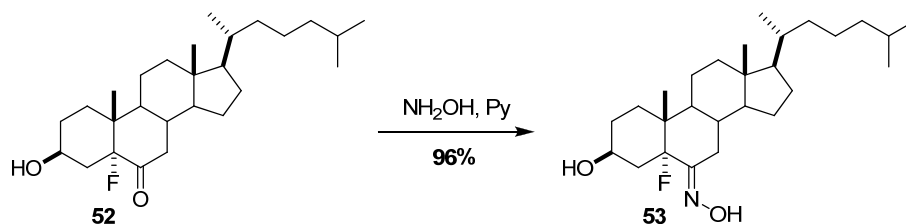
RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -157.2 ppm.

LREIMS (70 eV, m/z %): 420 (M⁺, 38); 265 (100).

$[\alpha]_D$ = -6.8° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



2.1.4. Síntesis de 5 α -fluoro-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolestano (**53**)



Se disolvió 5 α -fluoro-3 β -hidroxicolestan-6-ona (**52**) (0.1 g, 0.24 mmol), y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (0.12 g, 1.7 mmol) en piridina (6 mL) y se dejó reaccionando 2 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 96 mg de 5 α -fluoro-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximino-colestano (**53**), semisólido blanco, 96%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.01 (H3 α , 1H, m); 3.18 (H7 β , 1H, d, J = 11.2 Hz); 1.26 (H19, 3H, s); 0.90 (H21, 3H, d, J = 6.4 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, J = 5.9 Hz); 0.65 (H18, 3H, s).

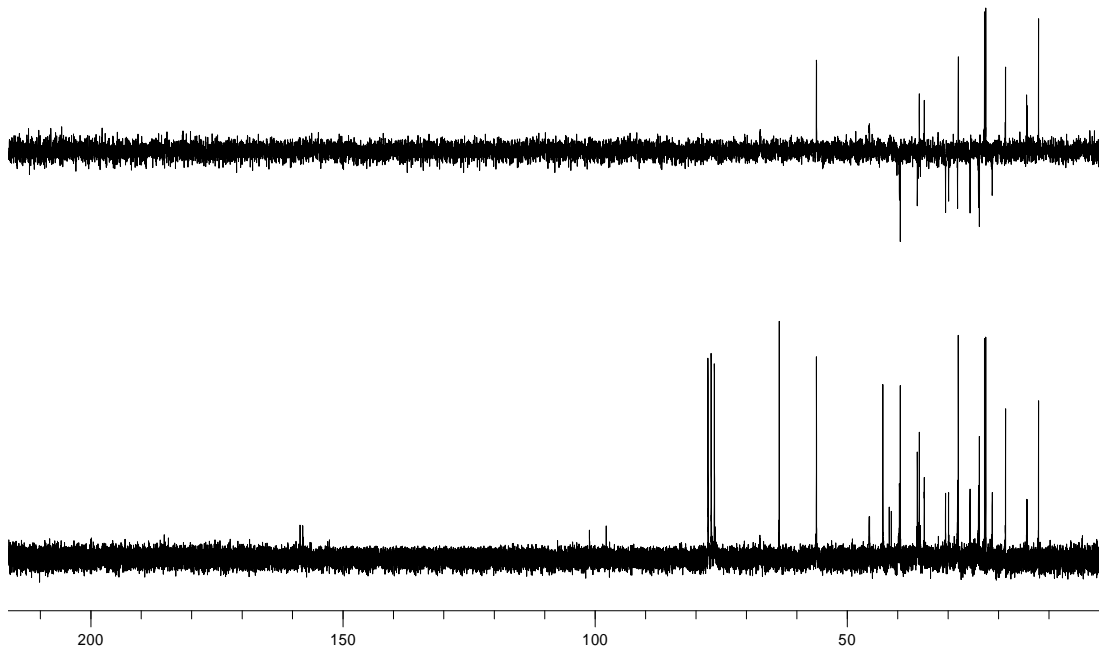
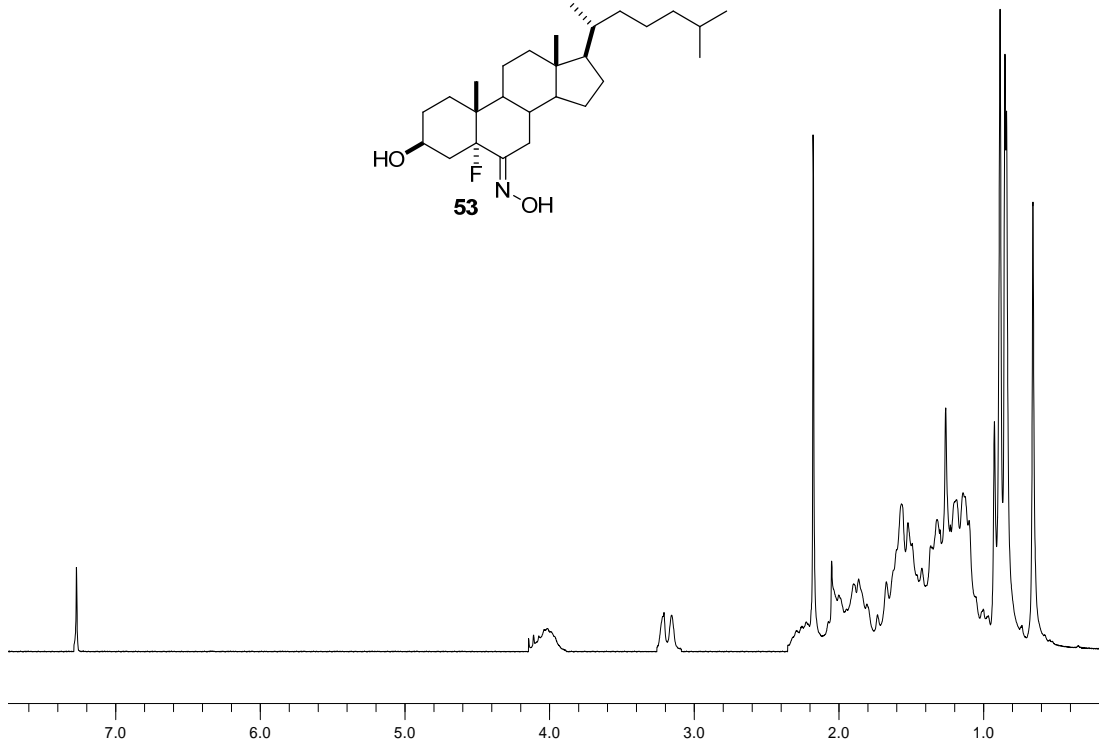
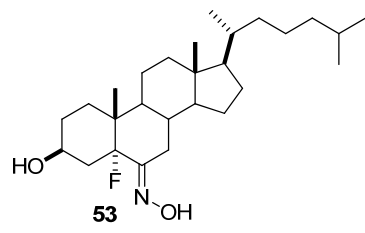
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.2 (C6, s, J_{CF} = 26.1 Hz); 99.4 (C5, s, J_{CF} = 166.5 Hz); 67.3 (C3, d); 63.5; 56.0; 45.2 (C10, s, J_{CF} = 13.2 Hz); 42.2; 39.6; 39.5; 38.4; 37.5; 36.0; 35.7; 34.7; 28.1; 25.6; 23.9; 23.8; 23.7; 22.9; 22.7; 22.5; 21.2; 20.6; 18.6; 14.4 (C19, q, J_{CF} = 5.4 Hz); 12.0 (C18, q).

RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -158.7 ppm.

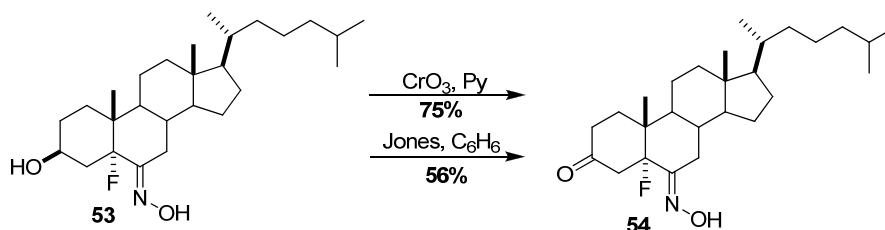
(+)-LRFABMS, m/z (%): 436 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100).

(+)-HRESIMS: m/z 436.3573 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{FNO}_2$, 436.3585).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -18.8° [c = 1, CH_2Cl_2].



2.1.5. Síntesis de 5 α -fluoro-6*E*-hidroximinocolestan-3-ona (**54**)



Procedimiento A: Sobre una disolución de CrO_3 (0.15 g, 1.5 mmol), a 0°C , en piridina. (3 mL), se adicionó, gota a gota, otra disolución de 5 α -fluoro-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolestano (**53**) (50 mg), en piridina (2 mL) y se dejó evolucionar a t.a. durante 2 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **14** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y se repurificó por HPLC en fase normal utilizando como fase móvil [Hexano:EtOAc (1:1)] recogiendo 38 mg de 5 α -fluoro-6*E*-hidroximinocolestan-3-ona (**54**), semisólido blanco, 75%.

Procedimiento B: Sobre una disolución de 5 α -fluoro-3 β -hidroxi-6*E*-hidroximinocolestano (**53**) (60 mg), en C_6H_6 (6 mL), a 0°C , se adicionó, gota a gota, el reactivo de Jones (1.5 mL) dejándolo reaccionar 5 h. Al cabo de ese tiempo, se paró la reacción con MeOH (6 mL), se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL), se lavó con NaHCO_3 (2 x 20 mL) y NaCl (15 mL), se secó finalmente sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 33 mg 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-colestan-3-ona (**54**), semisólido blanco, 56%.

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.51 (OH, sa); 3.22 (H7 β , 1H, d, $J = 15.6$ Hz); 2.99 (H4, 1H, d, $J = 16.6$ Hz); 2.58 (H2, 2H, dd, $J = 11.9, 6.3$ Hz); 1.04 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 6.2$ Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.4$ Hz); 0.69 (H18, 3H, s).

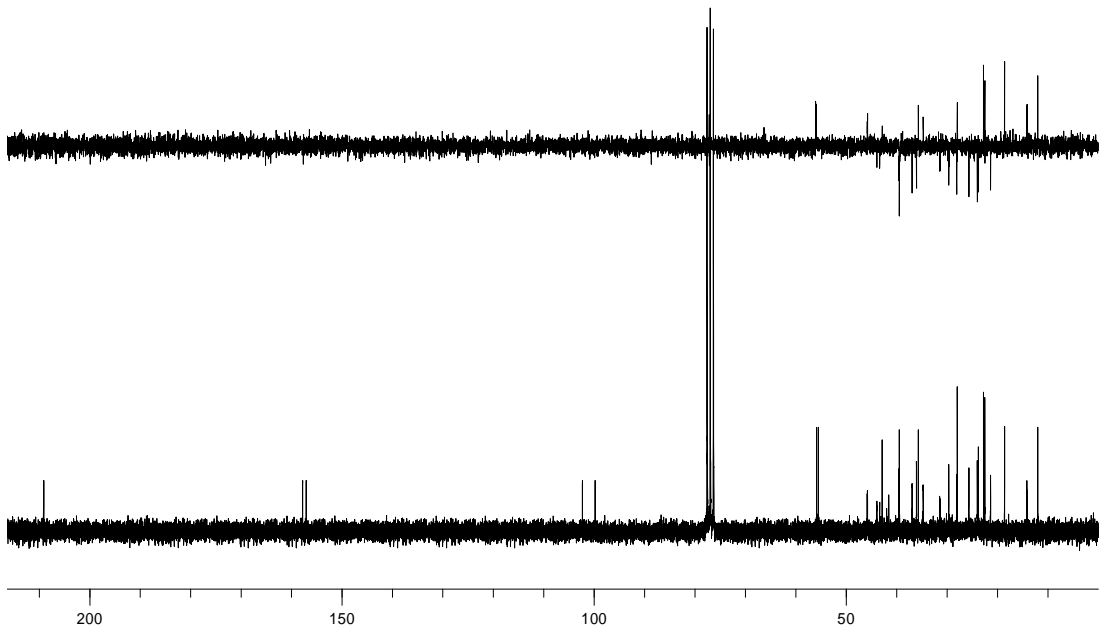
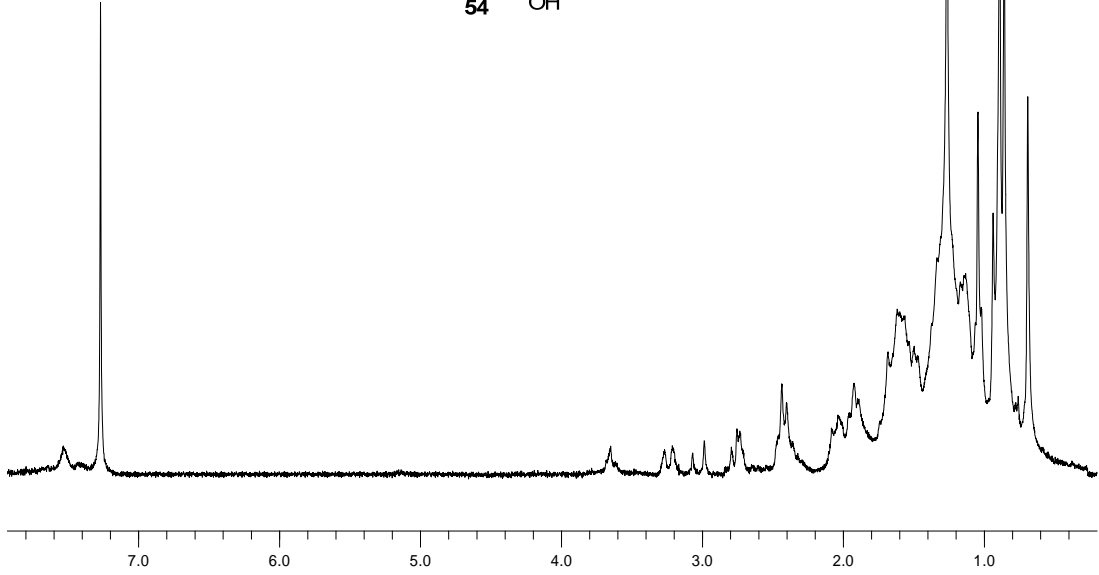
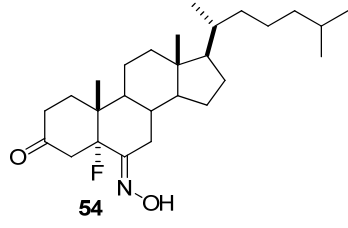
RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 209.3 (C3, s); 157.0 (C6, s, $J_{\text{CF}} = 25.4$ Hz); 100.5 (C5, s, $J_{\text{CF}} = 167.8$ Hz); 56.0 (C14, d); 55.9 (C17, d); 45.8 (C9, d, $J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz); 43.9 (C13, s); 43.6 (C10, s, $J_{\text{CF}} = 13.4$ Hz); 43.1 (C24, t); 39.4 (C12, t); 36.9 (C22, t); 36.5 (C20, d); 36.0 (C1, t); 35.0 (C2, t); 34.7 (C8, d); 31.4 (C4, t, $J_{\text{CF}} = 19.4$ Hz); 30.4 (C7, t); 30.1 (C16, t); 27.9 (C25, d); 25.6 (C15, t); 23.7 (C23, t); 22.7 (C26, q); 22.5 (C27, q); 21.3 (C11, t); 18.5 (C21, q); 14.0 (C19, q, $J_{\text{CF}} = 5.3$ Hz); 12.0 (C18, q).

RMN- ^{19}F (CDCl_3) δ (ppm): -158.2 ppm.

(+)-LRFABMS, m/z (%): 456 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 11); 414 (100).

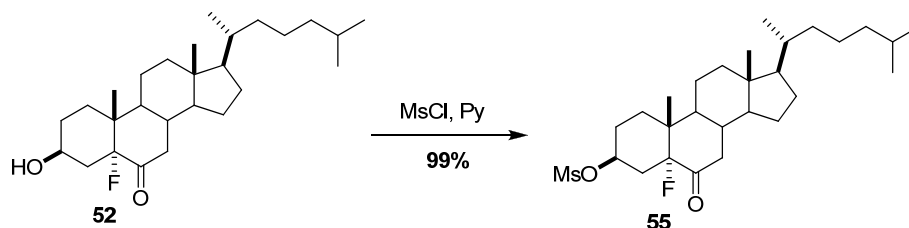
(+)-HRESIMS: m/z 414.3368 $[\text{M} - \text{FH} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{NO}_2$, 414.3367).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +115.4° [$c = 0.1, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



2.2. Síntesis de 2,3-dihidroxi-5-fluoro-6-hidroximoesteroides

2.2.1. Síntesis de 5 α -fluoro-3 β -mesiloxilcolestan-6-ona (55)



Sobre una disolución de 5 α -fluoro-3 β -hidroxicolest-6-ona (**52**) (0.25 g, 0.6mmol), en piridina (10 mL), a 0°C, se adicionó, gota a gota, MsCl (0.6 mL) y se dejó reaccionando a t.a. durante 4 h. Se vertió la reacción en una disolución de NaHCO₃ al 5% (30 mL), formándose un precipitado blanco que se filtró a vacío, se lavó con agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 0.25 g de 5 α -fluoro-3 β -mesiloxicolest-6-ona (**55**), semisólido blanco, 99%.

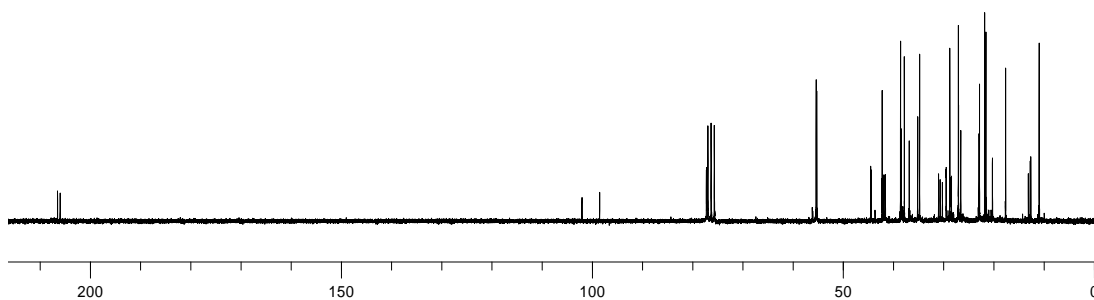
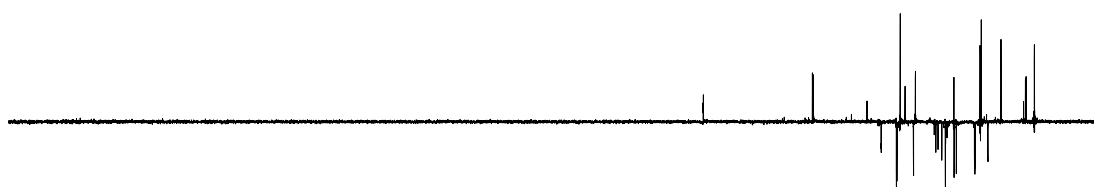
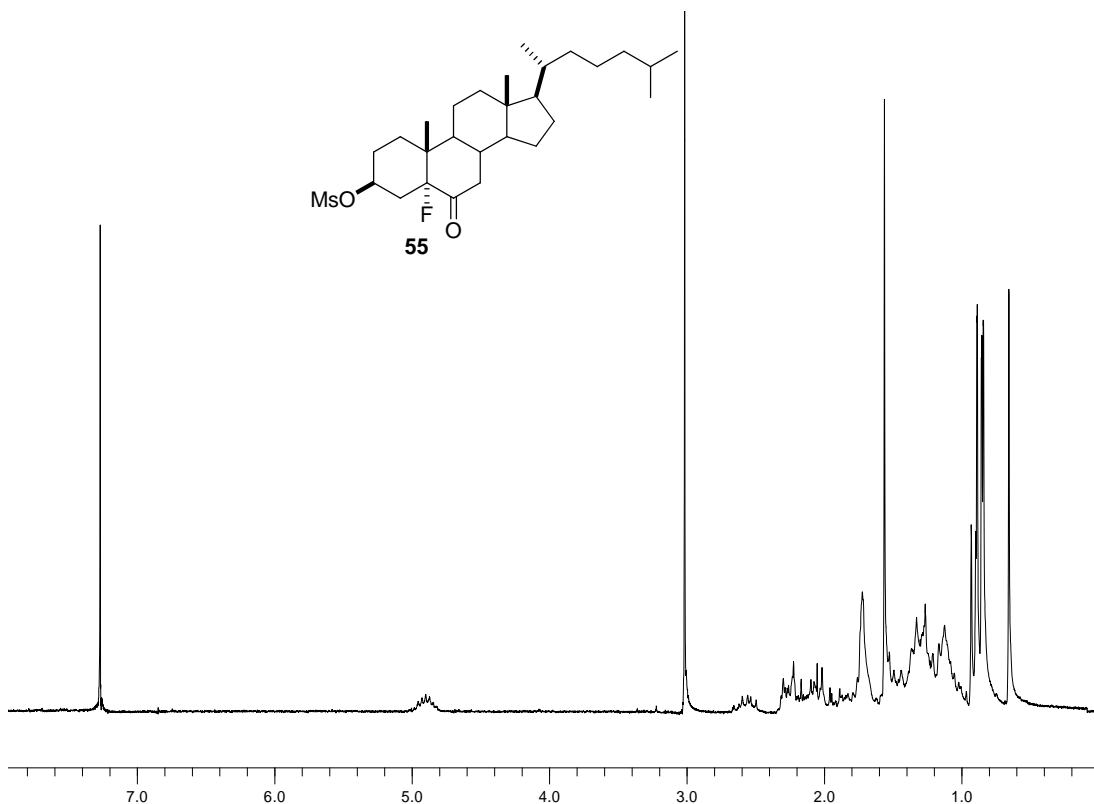
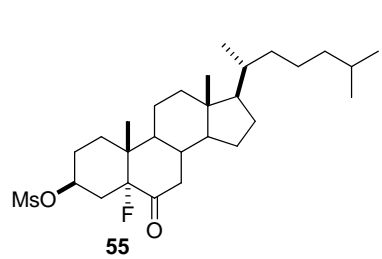
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.91 (H3 α , 1H, m); 3.01 (CH₃SO₃⁻, 3H, s); 2.57 (H7 β , 1H, dd, J = 12.4, 2.3 Hz); 1.56 (H19, 3H, s); 0.90 (H21, 3H, d, J = 6.7 Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.65 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 206.3 (C6, s, J_{CF} = 26.1 Hz); 100.8 (C5, s, J_{CF} = 175.6 Hz); 77.9 (C3, d, J_{CF} = 1 Hz); 56.1; 56.0; 45.4; 45.3; 43.1 (C9, d, J_{CF} = 14.2 Hz); 42.7; 42.5; 42.4; 39.4; 38.6 (MeSO₃); 37.7; 36.0; 35.4; 31.7 (C4, J_{CF} = 19.8 Hz); 30.4; 27.8; 27.5; 23.8; 23.7; 22.2; 21.4; 21.2; 18.9; 13.7 (C19, q, J_{CF} = 5.6 Hz); 11.9 (C18, q).

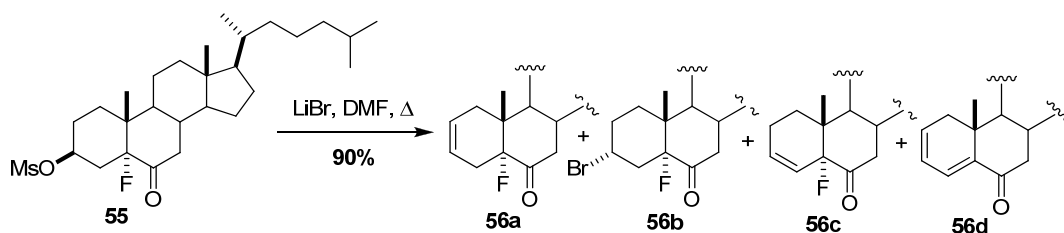
RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -159.6 ppm.

(+)-LRFABMS, m/z (%): 533 (100); 499 ([M + Na]⁺, 6).

$[\alpha]_D^{20}$ = -10.2° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



2.2.2. Síntesis de 5 α -fluorocolest-2-en-6-ona (56a)



Se disolvió 5 α -fluoro-3 β -mesiloxy-colestan-6-ona (**55**) (0.25 g, 0.5 mmol) y LiBr (0.18 g, 2 mmol), en DMF (8 mL), en ausencia de luz, calentando a 165°C durante 3 h. Se vertió la reacción en agua (50 mL), formándose un precipitado que se extrajo con EtOAc (2 x 25 mL), se lavó con HCl al 5% (15 mL), NaHCO₃ (15 mL), agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo cuatro compuestos: 0.22 g de la mezcla de 5 α -fluorocolest-2-en-6-ona (**56a**) y 3 β -bromo-5 α -fluoro-colestan-6-ona (**56b**), en relación (2:1), semisólido blanco, 90%, 10 mg de 5 α -fluorocolest-3-en-6-ona (**56c**), semisólido blanco, 3% y 20 mg de colest-2,4-dien-6-ona (**56d**), aceite amarillo, 8%

56a: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.62 (H2, H3, 2H, m); 2.67 (H7 β , 1H, m); 0.92 (H21, 3H, d, J = 6.1 Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.72 (H19, 3H, s); 0.62 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 207.6 (C6, s, J = 26.1 Hz); 124.4 (C2, d); 121.4 (C3, d); 100.7 (C5, s, J_{CF} = 177.3 Hz); 56.4; 56.0; 45.9; 45.6; 43.1; 42.9; 39.4; 37.9; 36.0; 34.7; 34.6; 32.9; 29.6; 27.6; 27.0; 26.7 (C4, J_{CF} = 23.5 Hz); 23.8; 22.7; 22.5; 21.7; 18.4; 14.0 (C19, q, J_{CF} = 6.5 Hz), 12.0 (C18, q).

RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -158.2 ppm.

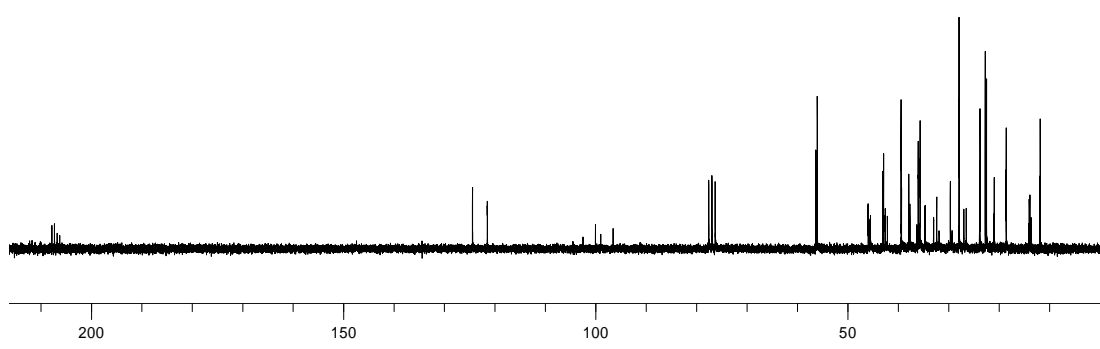
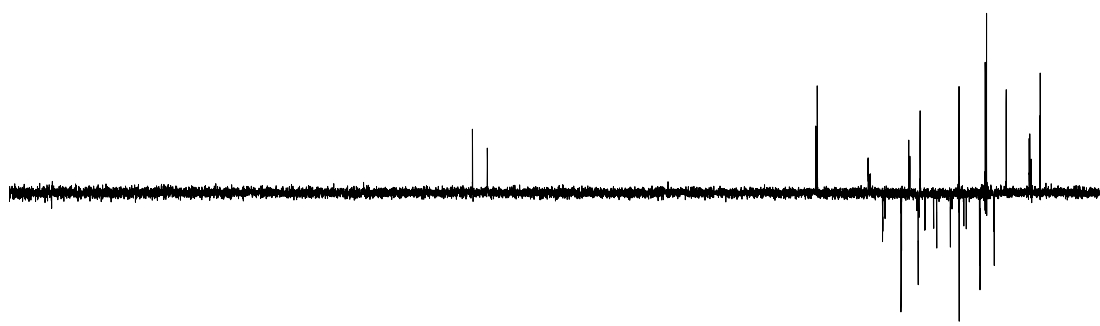
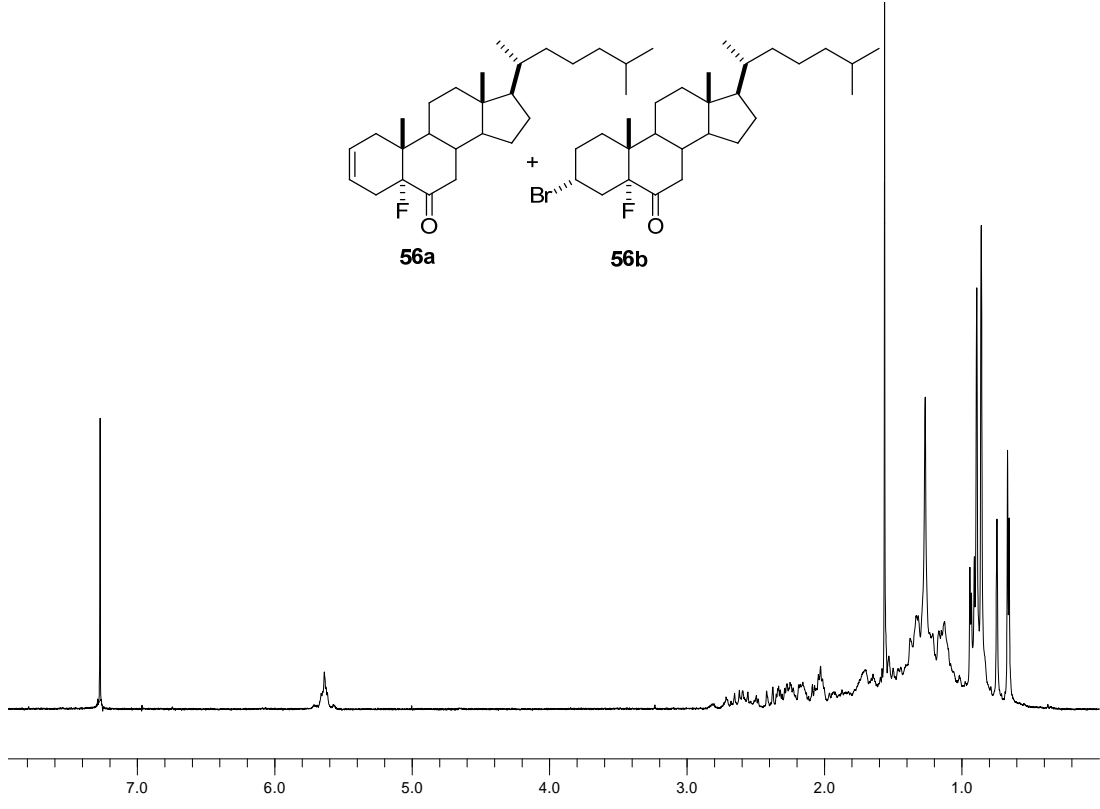
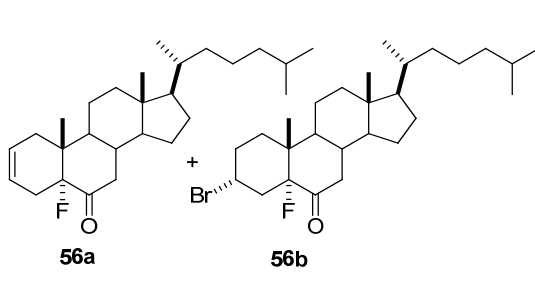
LREIMS (70 eV, m/z %): 402 (M^+ , 4); 84 (100).

56b: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.20 (H3, 1H, m); 2.67 (H7 β , 1H, m); 0.92 (H21, 3H, d, J = 6.1 Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.71 (H19, 3H, s); 0.59 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 206.1 (C6, s, J_{CF} = 25.7 Hz); 121.3 (C2, d); 120.2 (C3, d); 99.2 (C5, J_{CF} = 170.4 Hz). 56.8; 56.2; 45.9; 45.4; 44.1; 43.9; 40.4; 38.9; 37.0; 35.7; 35.0; 34.9; 32.6; 29.6; 28.0; 27.2; 25.8; 23.7; 21.5; 20.7; 18.9; 14.5 (C19, q); 13.2 (C18, q).

RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -158.2 ppm.

LREIMS (70 eV, m/z %): 482/484 (M^+ , 7); 84 (100).

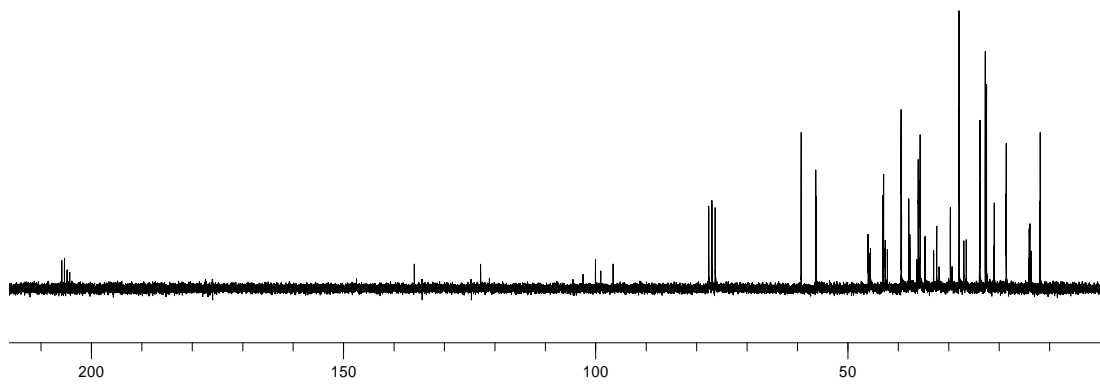
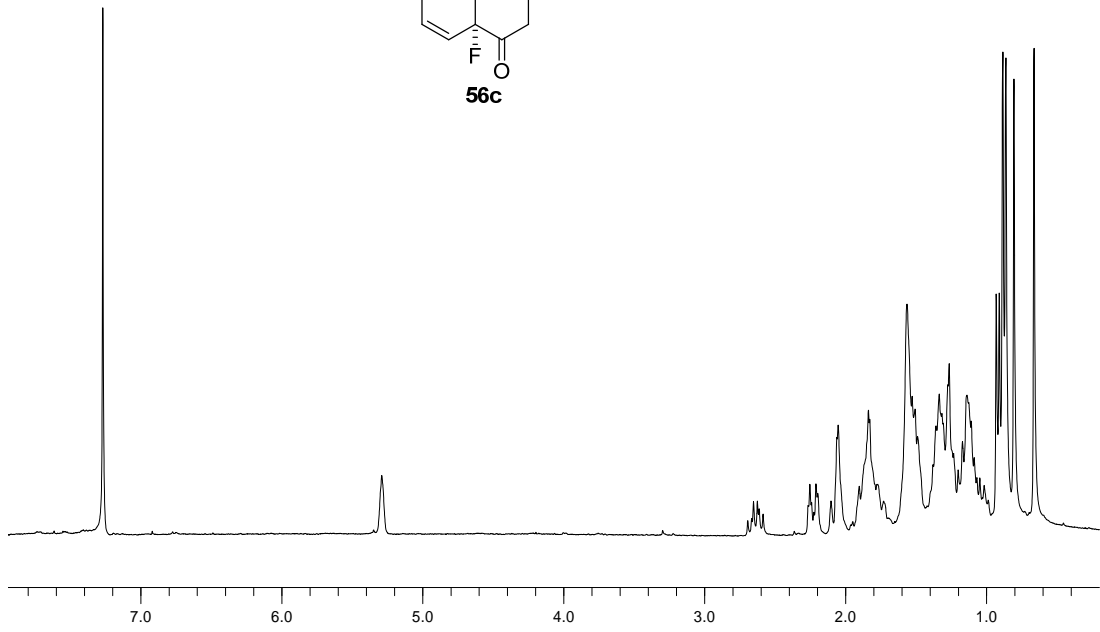
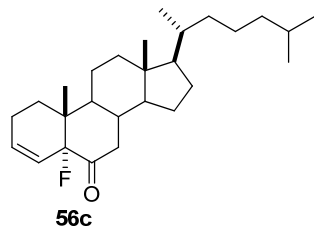


56c: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.18 (H3, H4, 2H, m); 2.62 (H7β, 1H, m); 0.91 (H21, 3H, d, *J* = 5.7 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.4 Hz); 1.18 (H19, 3H, s); 0.66 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 204.2 (C6, s); 134.5 (C4, d); 120.6 (C3, d); 99.3 (C5, s); 59.2; 55.6; 45.7; 45.1; 43.8; 42.4; 39.8; 37.2; 36.6; 34.2; 34.8; 32.5; 28.5; 27.1; 27.0; 26.7; 23.4; 21.7; 21.5; 21.0; 17.4; 15.0 (C19, q); 12.8 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 402 (M⁺, 4); 83 (100).

[α]_D = +6.5° [*c* = 0.3, CH₂Cl₂].

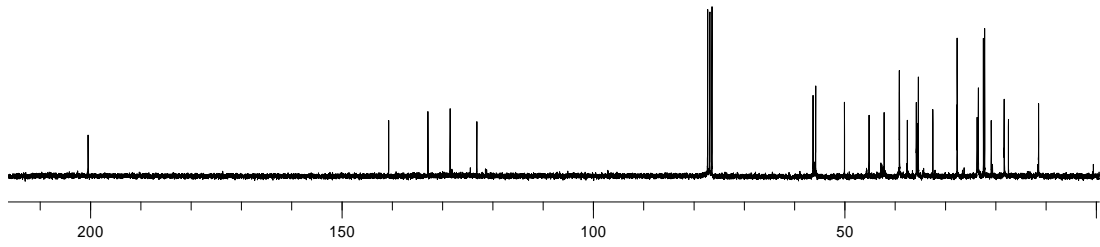
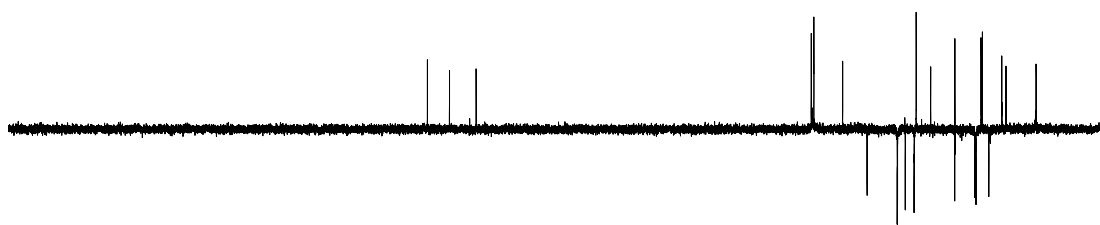
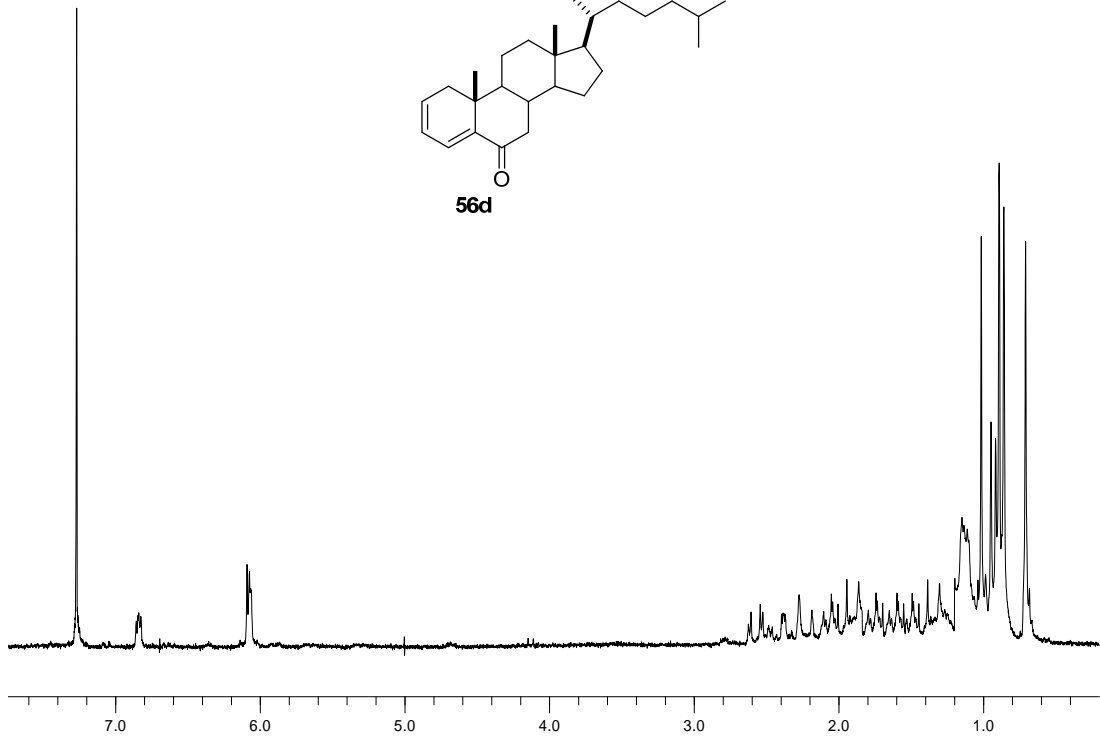
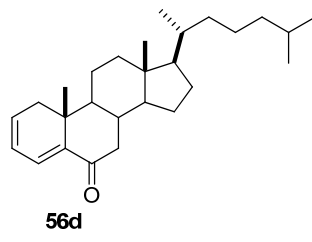


56d: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.84 (H4, 1H,m); 6.07 (H3, H2, 2H, m); 2.57 (H7β, 2H, dd, *J* = 12.7, 3.4 Hz), 0.92 (H21, 3H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.3 Hz); 1.02 (H19, 3H, s); 0.70 (H18, 3H, s).

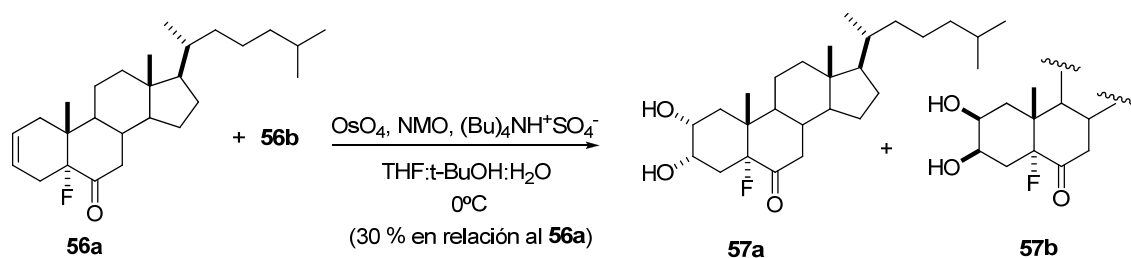
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 202.4 (C6, s); 130.8 (C5, s); 124.6 (C4, d); 123.5 (C3, d); 119.1 (C2, d); 56.2; 55.6; 45.7; 45.1; 43.8; 42.4; 39.8; 37.2; 36.6; 34.2; 34.8; 32.5; 28.5; 27.1; 27.0; 26.7; 23.4; 21.7; 21.5; 21.0; 17.4; 15.0 (C19, q); 11.8 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 382 (M⁺, 3); 86 (100).

[α]_D = +15.3° [*c* = 0.5, CH₂Cl₂].



2.2.3. Síntesis de 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (57a) y 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (57b).



Se disolvió NMO (4.1 g, 34.2 mmol) y (Bu)₄NH⁺SO₄⁻ (2.0 g, 6.0 mmol), en la siguiente mezcla de disolventes *t*-BuOH:THF:agua en proporción (5:4:1) (40 mL), a 0°C y en ausencia de luz se adicionó OsO₄ (0.1 g, 0.4 mmol) y a continuación gota a gota la mezcla compuesta de 5 α -fluorocolest-2-en-6-ona (56a) y 3 β -bromo-5 α -fluorocolestan-6-ona (56b) (0.4 g, 1.1 mmol), en THF (10 mL). Después de reaccionar durante 80 h, se vertió sobre una disolución de Na₂S₂O₃ al 5% (150 mL), que se agitó a t.a. durante 1 h. Al cabo de ese tiempo se extrajo con CH₂Cl₂ (2 x 50 mL), se concentró a sequedad, los extractos se redisolvieron en EtOAc (100 mL) se lavaron con las siguientes disoluciones: H₂SO₄ al 5%, NaHCO₃ (sat), NaCl (sat) y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc [(7:3),(1:1)]], recogándose 50 mg de una mezcla de diastereoisómeros 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (57a) y 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (57b) en relación (1:1), ambos semisólidos blancos, 30%.

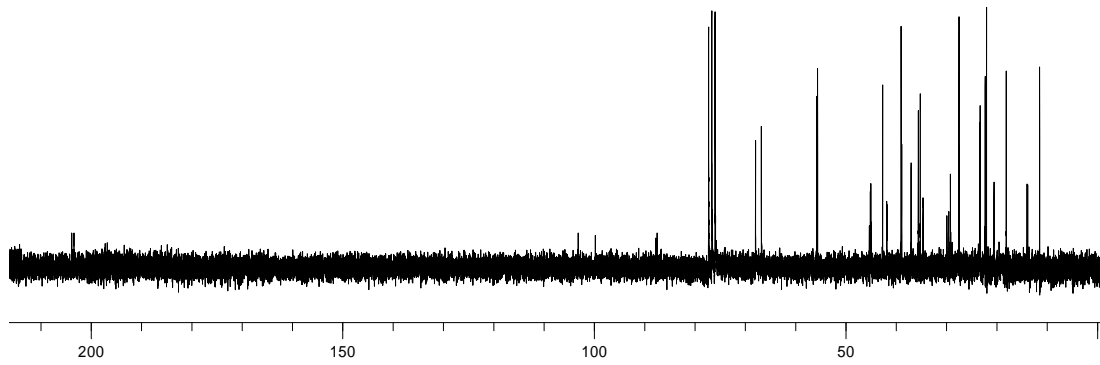
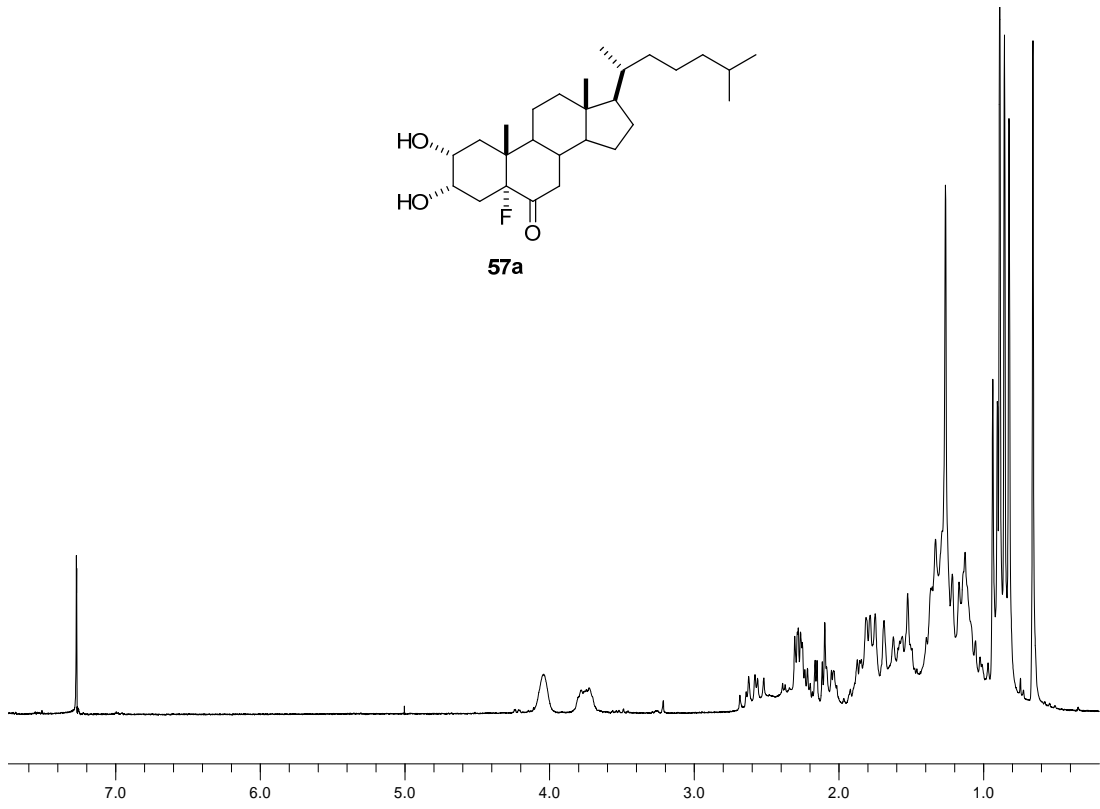
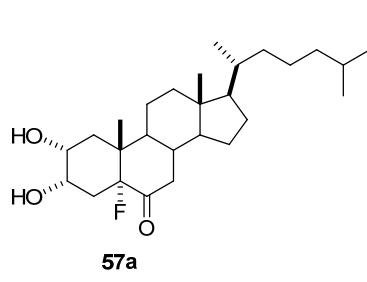
57a: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.04 (H3 β , 1H, dd, J = 6.0, 3.0 Hz); 3.75 (H2 β , 1H, m); 2.63 (H7 β , 1H, m), 0.92 (H19, 3H, s); 0.87 (H21, 3H, d, J = 6.4 Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, J = 6.5 Hz); 0.63 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 206.7 (C6, s, J_{CF} = 26.1 Hz); 101.7 (C5, s, J_{CF} = 170.6 Hz); 68.3 (C2, d); 67.2 (C3, d); 56.2; 55.9; 45.4 (C9, d, J_{CF} = 3.9 Hz); 43.0; 42.8 (C10, s, J_{CF} = 24.8 Hz); 39.4; 39.3; 37.4; 36.0; 35.6; 35.0; 30.3; 29.9; 27.9; 27.7; 23.8; 22.7; 22.5; 21.2; 18.5; 14.4 (C19, q, J_{CF} = 5.1 Hz); 14.3; 11.9 (C18, q).

RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -154.9 ppm.

LREIMS (70 eV, m/z %): 436 (M⁺, 13); 95 (100).

[α]_D = +10.2° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



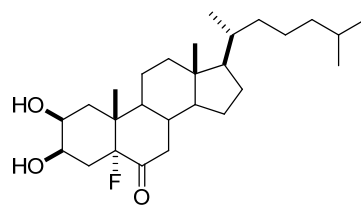
57b: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.06 (H3 α , 1H, sa); 3.97 (H2 α , 1H, m); 2.62 (H7 β , 2H, m); 1.03 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, $J = 6.2$ Hz); 0.85 (H26, H27, 6H, d, $J = 6.3$ Hz); 0.64 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 207.3 (C6, s, $J_{CF} = 26.8$ Hz); 101.5 (C5, s, $J_{CF} = 173.7$ Hz); 68.6 (C2, d); 67.9 (C3, d); 63.4; 56.1; 46.0 (C9, d, $J_{CF} = 3.7$ Hz); 45.2; 42.4 (C10, s, $J_{CF} = 25.2$ Hz); 39.8; 39.3; 37.8; 37.0; 36.6; 35.5; 30.3; 29.5; 28.9; 27.9; 25.8; 24.3; 22.8; 22.2; 21.7; 18.5; 15.8 (C19, q, $J_{CF} = 5.2$ Hz); 12.0 (C18, q).

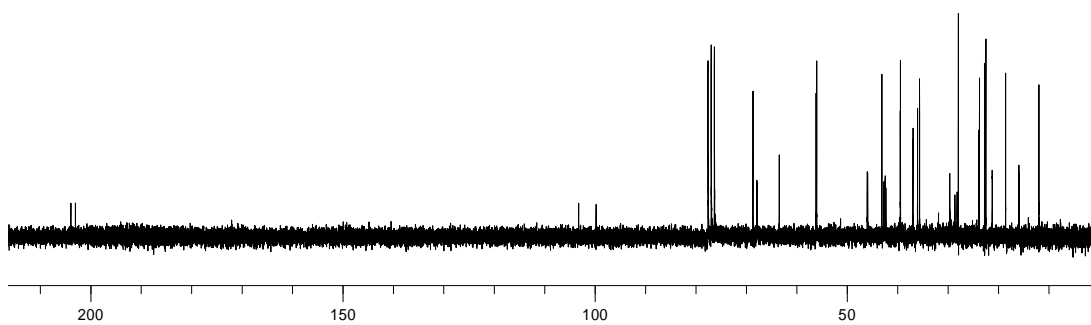
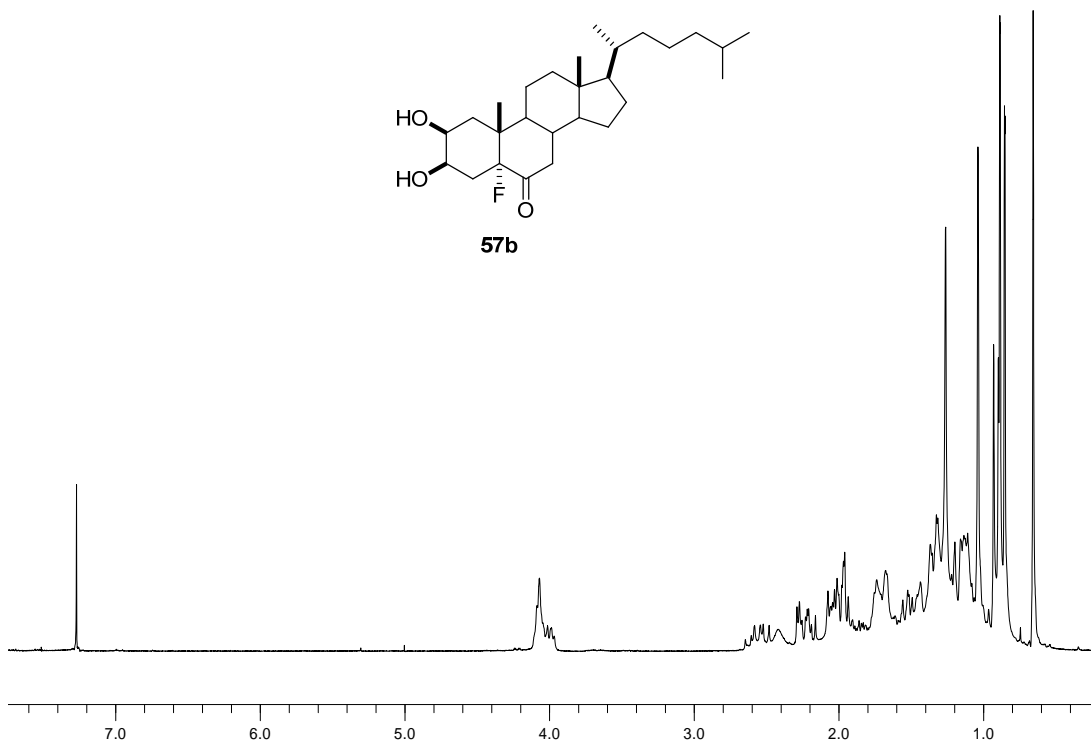
RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -160.1 ppm.

LREIMS (70 eV, m/z %): 436 (M⁺, 4); 84 (100).

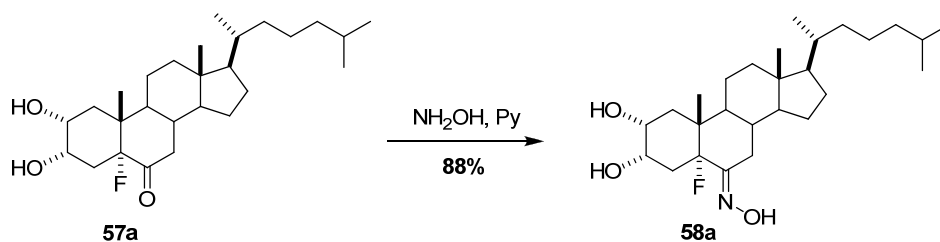
[α]_D = +9.2° [$c = 0.1$, CH₂Cl₂].



57b



2.2.4. Síntesis de 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-2 α ,3 α -dihidroxicolestano (**58a**)



Se disolvió 2 α ,3 α -dihidroxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (**57a**) (20 mg) y NH₂OH-HCl (22 mg) en piridina (3 mL) y se dejó reaccionando 18 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiendo 17.6 mg de 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-2 α ,3 α -dihidroxicolestano (**58a**), semisólido blanco, 88%.

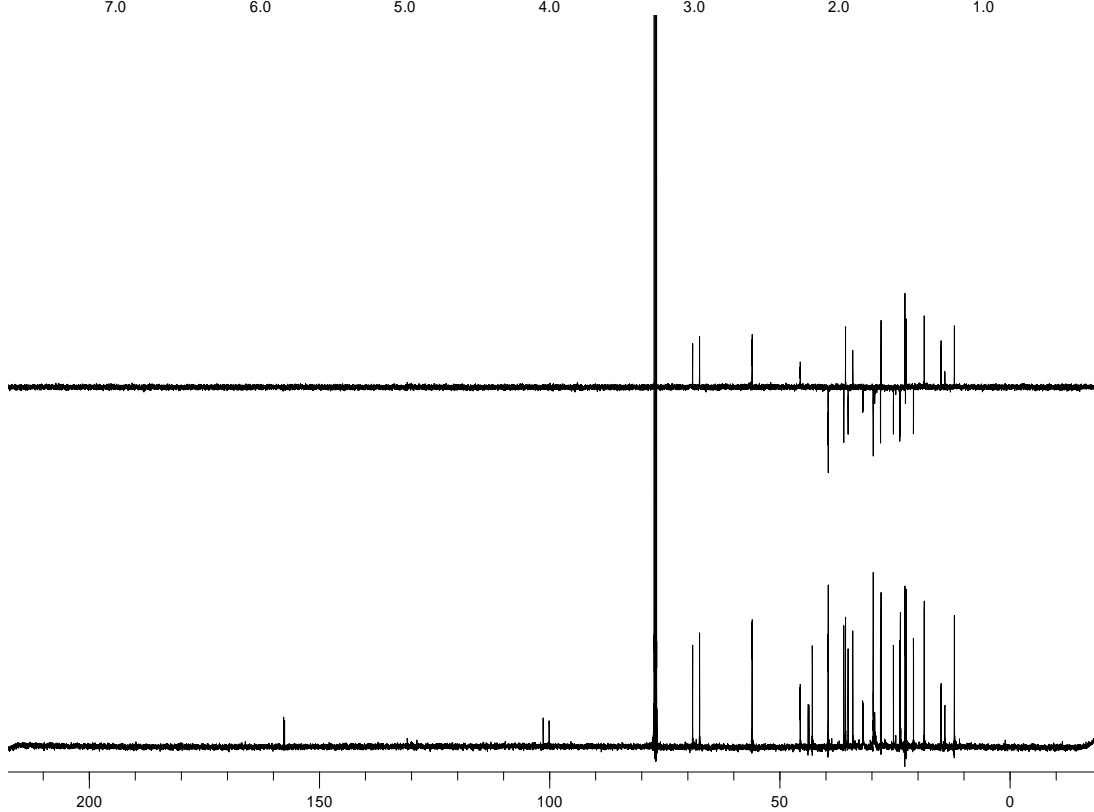
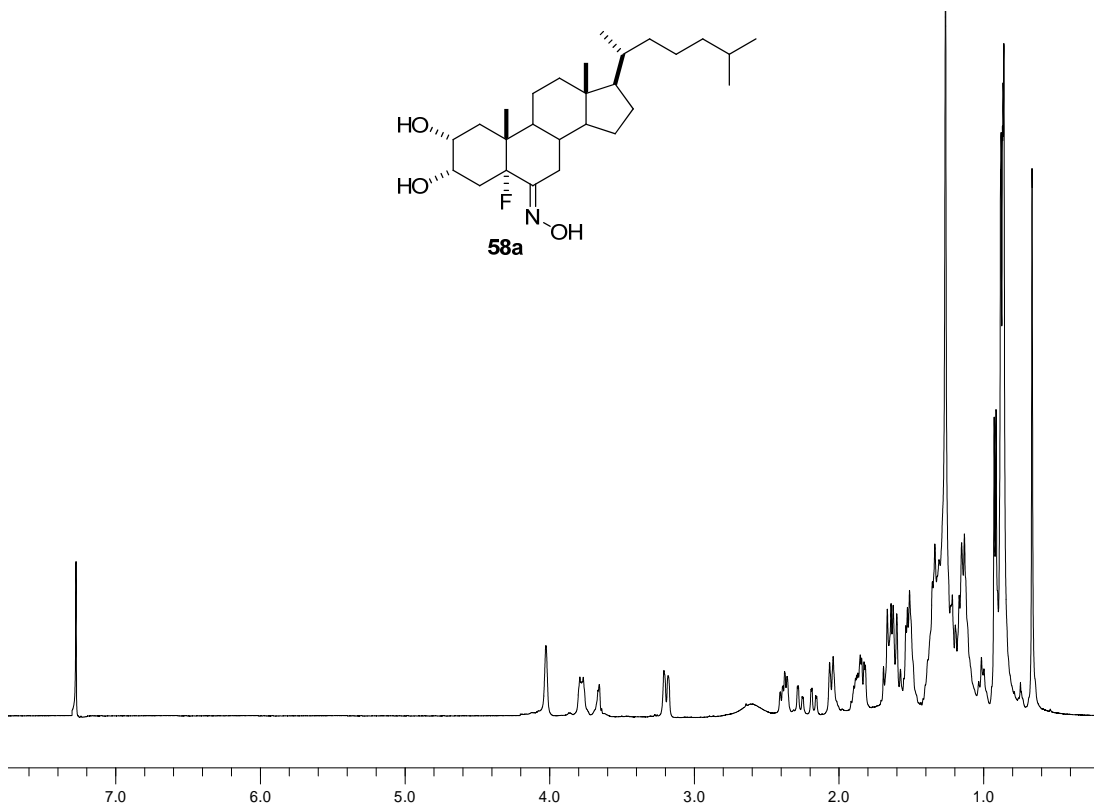
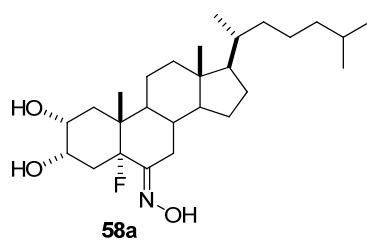
RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.04 (H3 β , 1H, s); 3.77 (H2 β , 1H, dt, J = 11.1, 6.9, 4.1 Hz); 3.21 (H7 β , 1H, dd, J = 5.8, 2.1 Hz), 0.96 (H19, 3H, s); 0.92 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, J = 6.3 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 157.7 (C6, s, J_{CF} = 26.3 Hz); 100.7 (C5, s, J_{CF} = 161.3 Hz); 68.9 (C2, d); 67.4 (C3, d); 56.6; 55.3; 53.2; 46.8; 45.3 (C17); 42.8 (C9, J_{CF} = 3.2 Hz); 43.2; 40.9 (C10, s, J_{CF} = 24.1 Hz); 39.8; 39.5; 36.1; 35.7; 33.9; 31.9; 29.7; 28.1; 25.5; 23.9; 22.8; 21.3; 18.9; 16.2 (C19, q, J_{CF} = 5 Hz); 13.1 (C18, q).

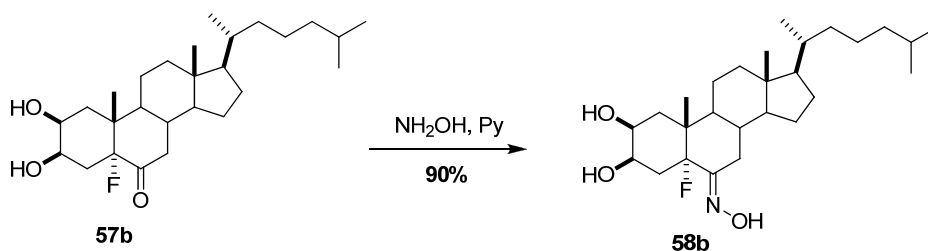
RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -158.7 ppm.

(+)-LRFABMS, m/z (%): 452 ([M + H]⁺, 100).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -17.2° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



2.2.5. Síntesis de 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-2 β ,3 β -dihidroxicolestano (**58b**)



Se disolvió 2 β ,3 β -dihidroxi-5 α -fluorocolestan-6-ona (**57b**) (20 mg) y NH₂OH·HCl (22 mg) en piridina (3 mL) y se dejó reaccionando 18 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **13** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiénose 18.4 mg de 5 α -fluoro-6*E*-hidroximino-2 β ,3 β -dihidroxicolestano (**58b**), semisólido blanco, 90%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.12 (H3 α , H2 α , 2H, sa); 3.22 (H7 β , 1H, dd, J = 12.1, 4.0 Hz); 1.08 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, J = 6.4 Hz); 0.88 (H26, H27, 6H, d, J = 6.5 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.4 (C6, J_{CF} = 26.9 Hz); 99.1 (C5, J_{CF} = 166.4 Hz); 68.9 (C2); 68.1 (C3); 58.4; 56.7; 56.1 (C14); 46.1 (C17); 43.0 (C9, J_{CF} = 2.9 Hz); 42.9 (C10, J_{CF} = 22 Hz); 39.5; 39.4; 36.1; 31.9; 29.7; 29.5; 28.1; 27.9; 23.8; 22.6; 22.5; 21.7; 18.4; 16.3; 15.3 (C19, J_{CF} = 4.7 Hz); 13.1; 12.8 (C18).

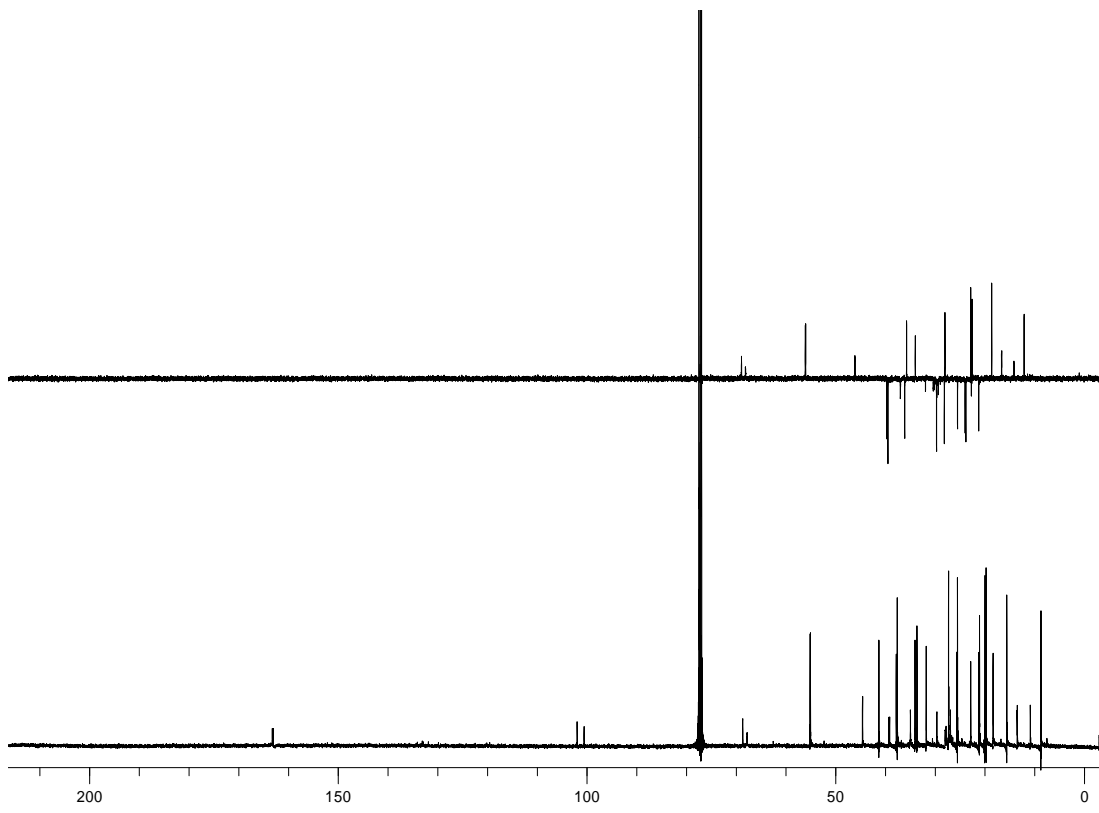
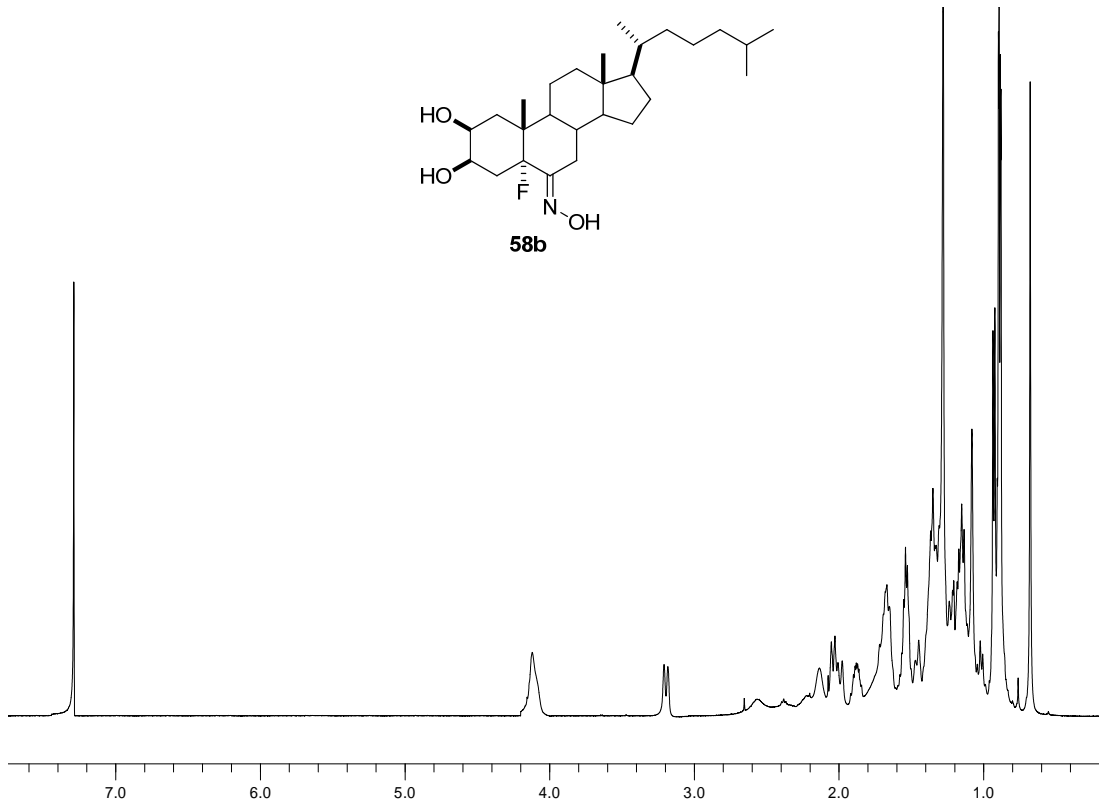
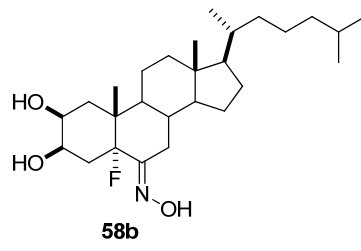
RMN-¹⁹F (CDCl₃) δ (ppm): -160.1 ppm.

LREIMS (70 eV, m/z %): 451 (M⁺, 4); 84 (100).

(+)-LRFABMS, m/z (%): 452 ([M + H]⁺, 68). 432 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 452.3516 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₇FNO₃, 452.3535); m/z 474.3334 [M + Na]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₆FNNaO₃, 474.3354).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -32.6° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



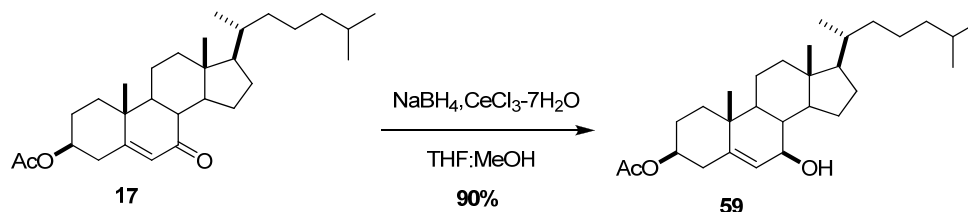
Síntesis de 3 β ,7-hidroxi-5,6-epoxicolestanos.

3. Síntesis de 3 β ,7 α -hidroxi-5,6-epoxicolestanos (26 $\alpha\alpha$) y (26 $\beta\alpha$)

La síntesis de los epóxidos 26 $\alpha\alpha$ y 26 $\beta\alpha$ se describieron anteriormente.

4. Síntesis de 3 β ,7 β -hidroxi-5,6-epoxicolestanos (26 $\alpha\beta$) y (26 $\beta\beta$)

4.1. Síntesis de 3 β -acetoxi-7 β -hidroxicolest-5-eno (59)



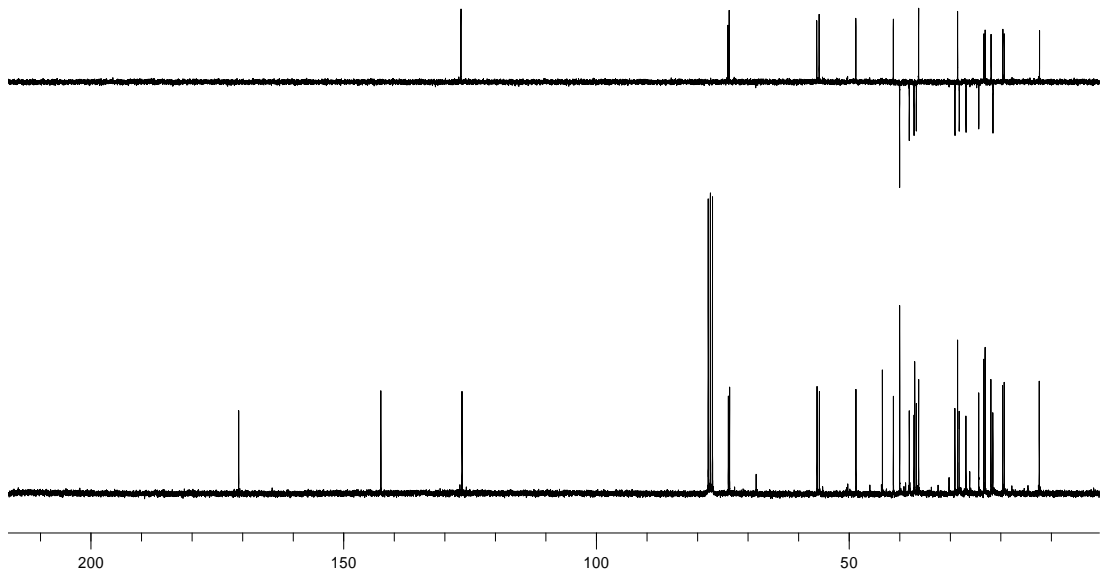
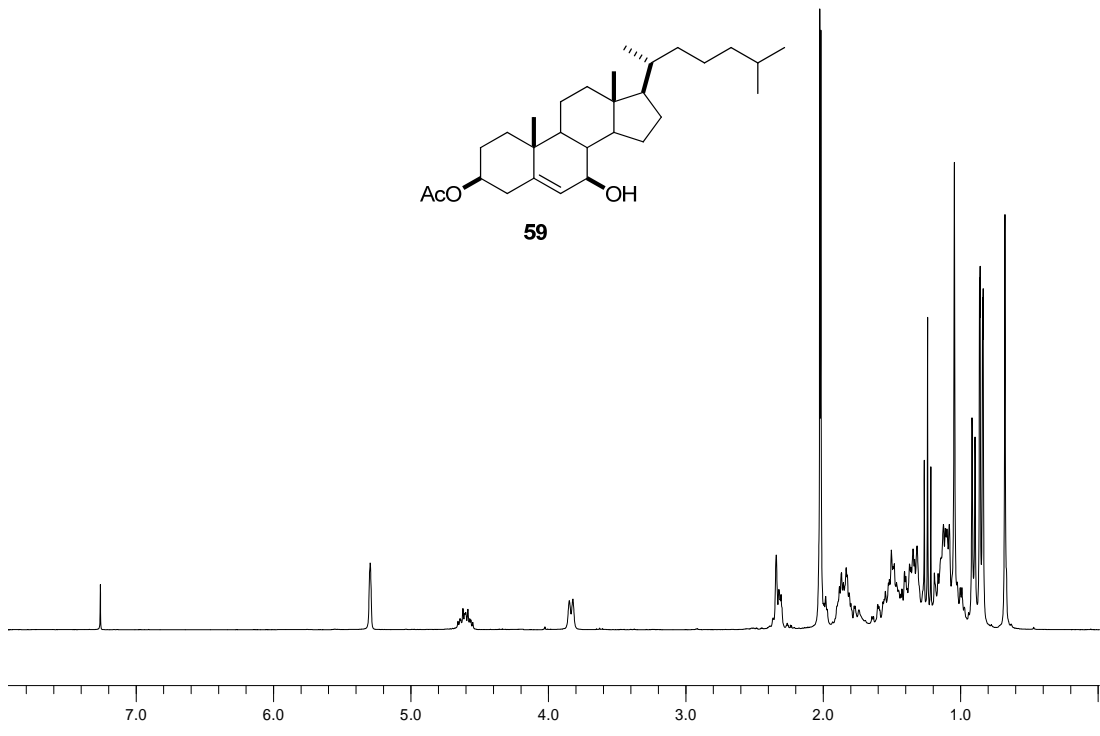
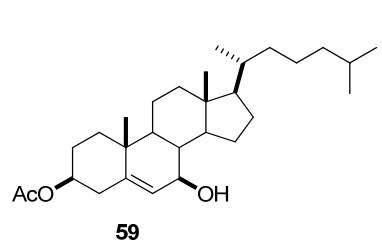
Sobre una disolución de 3 β -acetoxicolest-5-en-7-ona (**17**) (0.1 g, 0.25 mmol) y $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (86 mg, 0.23 mmol) en THF:MeOH (1:1) (5 mL) se adicionó NaBH_4 (17 mg, 0.06 mmol). La mezcla se agitó a t.a. durante 1 h. Al cabo de ese tiempo se añadió agua, y el producto se extrajo con CH_2Cl_2 (10 mL). La fase orgánica se lavó con HCl al 5% y NaCl, se secó con MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 90 mg de 3 β -acetoxi-7 β -hidroxicolest-5-eno (**59**), semisólido blanco, 90%.

RMN-¹H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.31 (H6, 1H, s); 4.61 (H3 α , 1H, m); 3.86 (H7 α , 1H, d, J = 8.0 Hz); 2.03 (OAc, 3H, s); 1.06 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, J = 6.3 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, J = 6.6 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

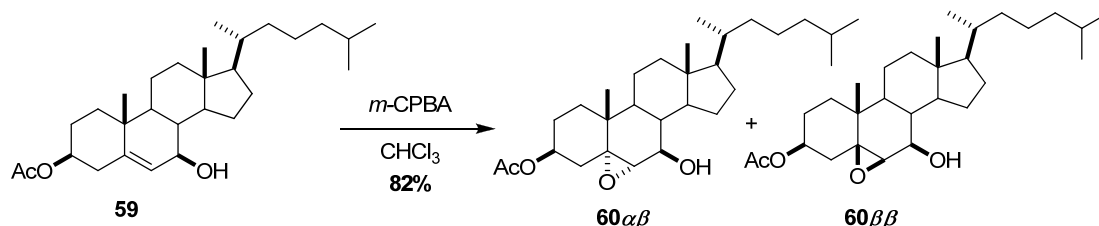
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 170.5 (OAc, s); 142.3 (C5, s); 126.2 (C6, d); 73.4 (C3, d); 73.1 (C7, d); 55.8; 55.3; 48.1; 42.8; 40.7; 39.4; 37.5; 36.6; 36.4; 35.7; 35.2; 28.0; 27.5; 27.2; 24.5; 23.8; 23.1; 22.7; 22.5; 21.3; 20.5; 18.6; 18.3 (C19, q); 11.3 (C18, q).

LREIMS (70 eV, m/z %): 444 (M^+ , 4); 384 (100).

$[\alpha]_{\text{D}} = -132.6^\circ$ [$c = 0.1, \text{CHCl}_3$].



4.2. Síntesis de 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (60 $\alpha\beta$) y 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (60 $\beta\beta$)



Sobre una disolución de ácido *m*-cloroperbenzoico (0.1 g, 0.7 mmol) a 0°C en CHCl₃ (30 mL), se añadió, gota a gota, 3 β -acetoxi-7 β -hidroxicolest-5-eno (**59**) (0.1 g, 0.23 mmol), disueltos en CHCl₃ (10 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para los epóxidos **9 α** y **9 β** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], obteniéndose 82 mg de una mezcla inseparable de los dos isómeros: 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**60 $\alpha\beta$**) y 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**60 $\beta\beta$**), ambos semisólidos blancos, 82%.

60 $\alpha\beta$: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.75 (H3 α , 1H, m); 3.52 (H7 α , 1H, m); 2.88 (H6 β , 1H, s); 2.03 (OAc, 3H, s); 1.01 (H19, 3H, s); 0.90 (H21, 3H, d, *J* = 6.2 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.2 Hz); 0.64 (H18, 3H, s).

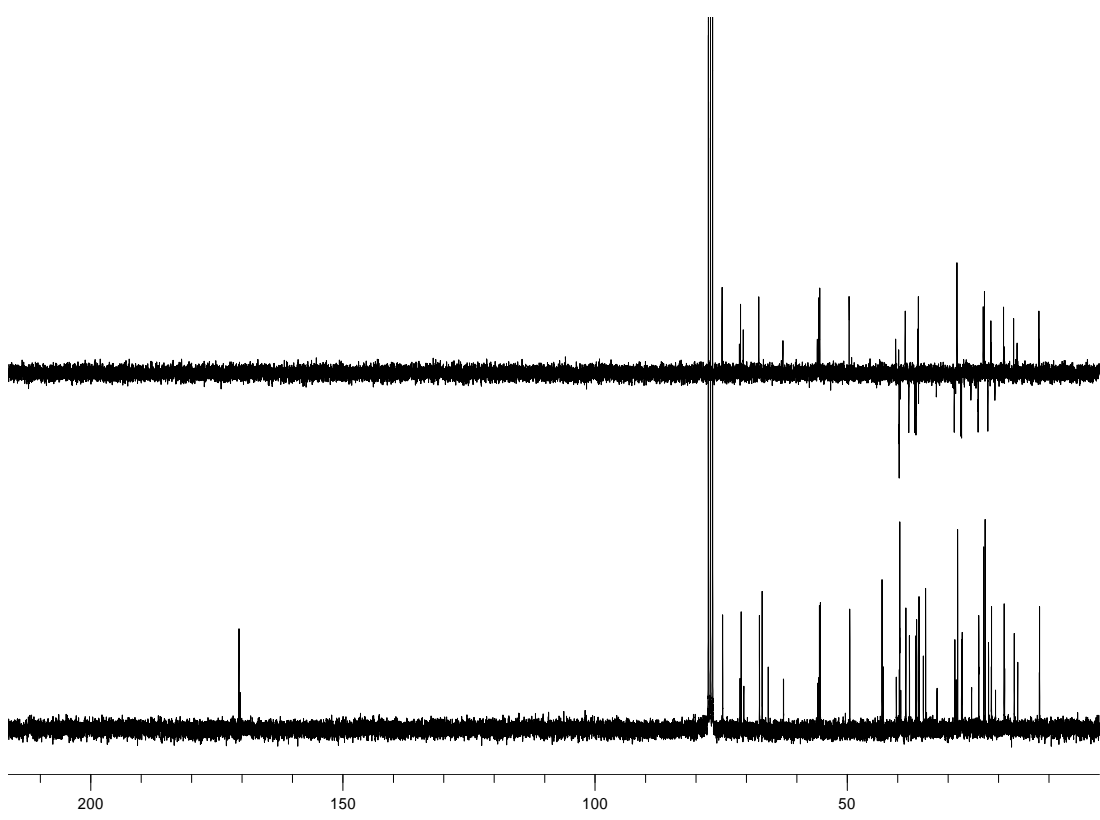
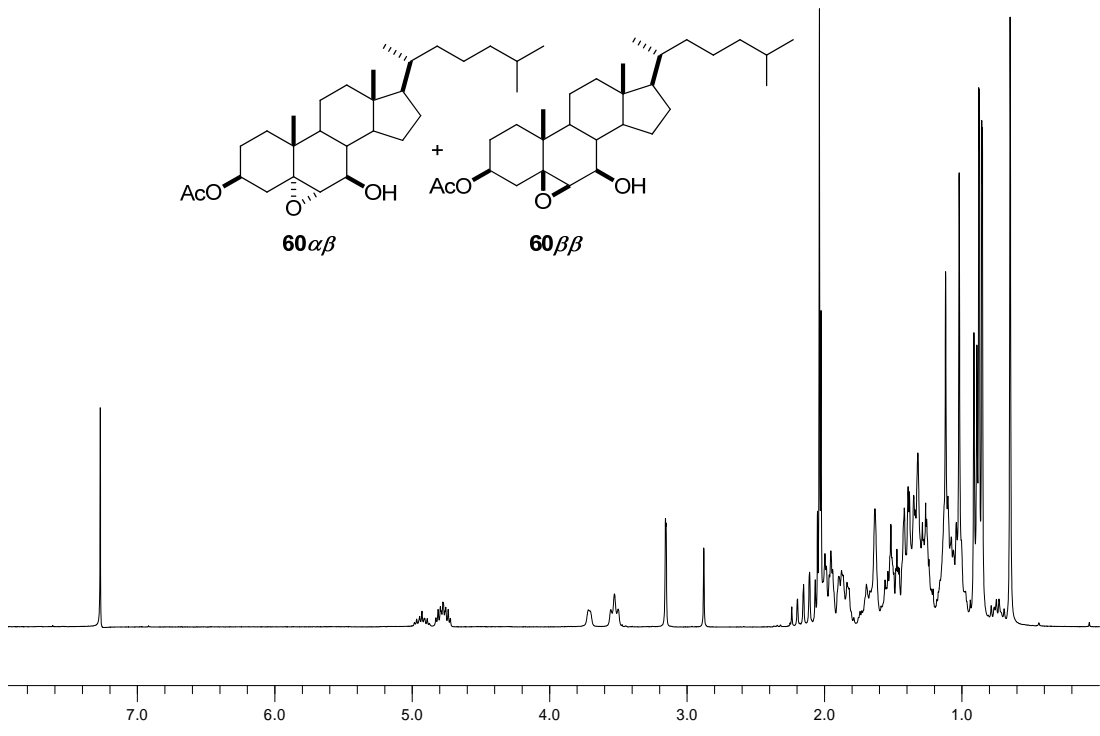
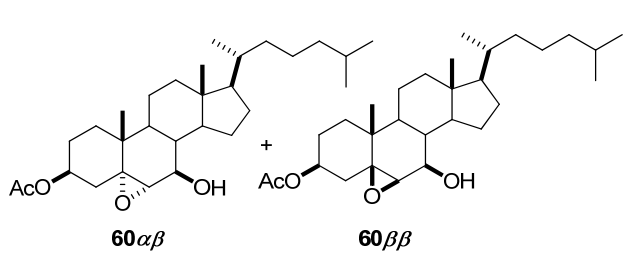
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.0 (OAc, s); 74.2 (C7, d); 70.4 (C3, d); 66.8 (C5, s); 66.3 (C6, d); 54.9; 54.7; 48.9; 42.5; 39.1; 39.0; 27.8; 37.1; 35.8; 35.6; 35.2; 34.3; 33.2; 28.2; 27.6; 26.7; 23.4; 22.2; 22.1; 21.4; 20.8; 18.7; 16.2 (C19, q); 11.3 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 460 (M⁺, 4); 84 (100).

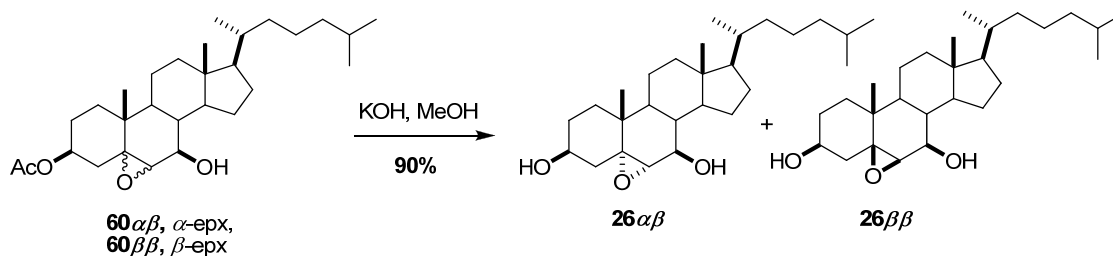
60 $\beta\beta$: RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.86 (H3 α , 1H, m); 3.71 (H7 α , 1H, m); 3.14 (H6 α , 1H, s); 2.02 (OAc, 3H, s); 1.01 (H19, 3H, s); 0.89 (H21, 3H, d, *J* = 6.4 Hz); 0.87 (H26, H27, 6H, d, *J* = 6.4 Hz); 0.65 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 170.0 (OAc, s); 74.2 (C7, d); 70.4 (C3, d); 66.8 (C5, s); 66.3 (C6, d); 54.9; 54.7; 48.9; 42.5; 39.1; 39.0; 27.8; 37.1; 35.8; 35.6; 35.2; 34.3; 33.2; 28.2; 27.6; 26.7; 23.4; 22.2; 22.1; 21.4; 20.8; 18.7; 16.2 (C19, q); 11.3 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 460 (M⁺, 4); 84 (100).



4.3. Síntesis de 3 β ,7 β -dihidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (26 $\alpha\beta$) y 3 β ,7 β -dihidroxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (26 $\beta\beta$)



Se disolvió la mezcla de los isómeros 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**60 $\alpha\beta$**) y 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**60 $\beta\beta$**) (0.1 g, 0.2 mmol), en una disolución de KOH:MeOH al 5% (10 mL) y se dejó reaccionando 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 31-34 min (**26 $\beta\beta$**) y 35-37 min (**26 $\alpha\beta$**), fase móvil MeOH/H₂O, 94:6) obteniéndose 30 mg de 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**26 α**) y 60 mg de 3 β -acetoxi-7 β -hidroxi-5 β ,6 β -epoxicolestano (**26 $\beta\beta$**), ambos semisólidos blancos en relación (1:2).

26 $\alpha\beta$: RMN-¹H y RMN-¹³C: ver Tablas 4 y 5.

(+)-LRFABMS, *m/z* (%): 419 ([M + H]⁺, 8); 154 (100). 419 ([M + H]⁺, 7); 401 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 419.3513 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₇O₃, 419.3519), *m/z* 441.3330 [M + Na]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₆O₃Na, 441.3339).

[α]_D = -26.2° [c = 0.02, CHCl₃].

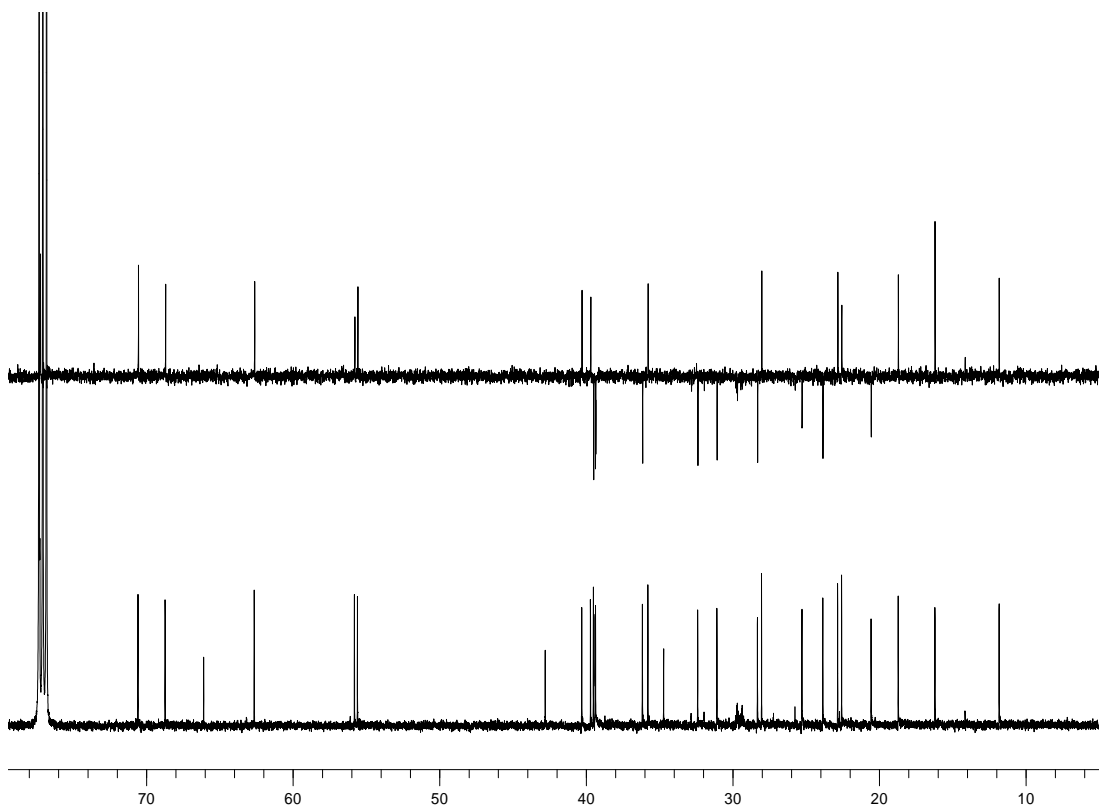
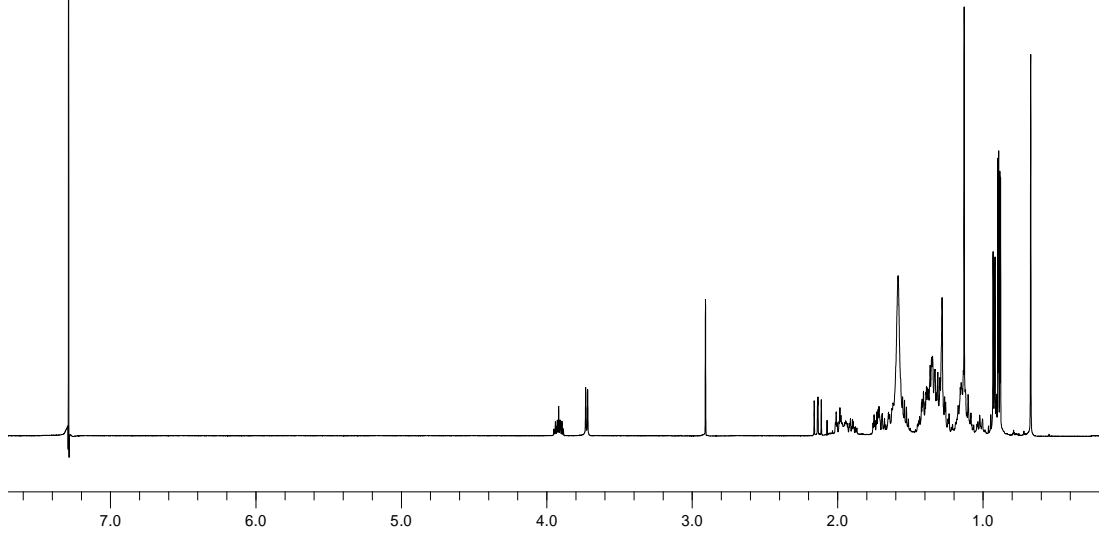
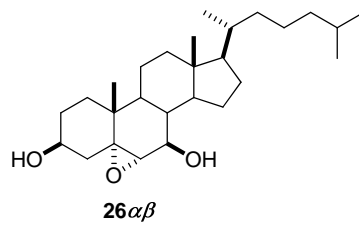
26 $\beta\beta$: RMN-¹H y RMN-¹³C: ver Tablas 4 y 5.

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 418 (M⁺, 3); 84 (100)

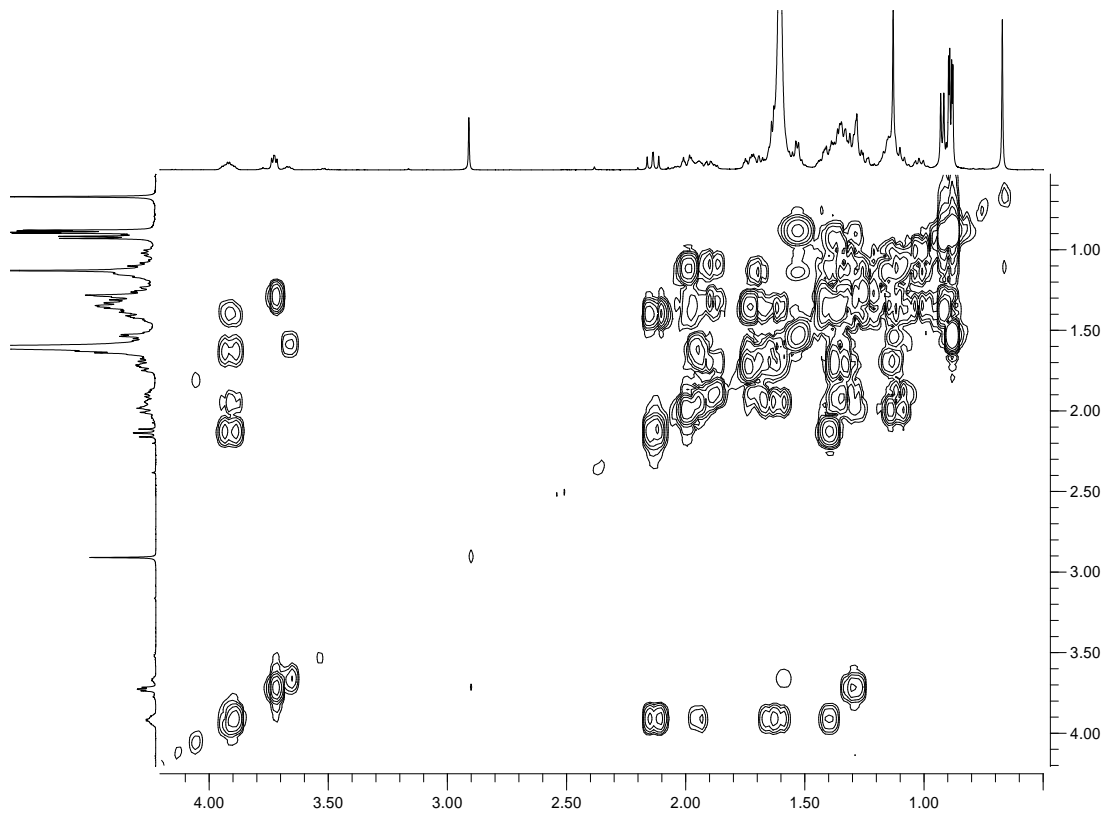
(+)-LRFABMS, *m/z* (%): 419 ([M + H]⁺, 23); 401 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 419.3514 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₇O₃, 419.3519), *m/z* 441.3331 [M + Na]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₆O₃Na, 441.3339).

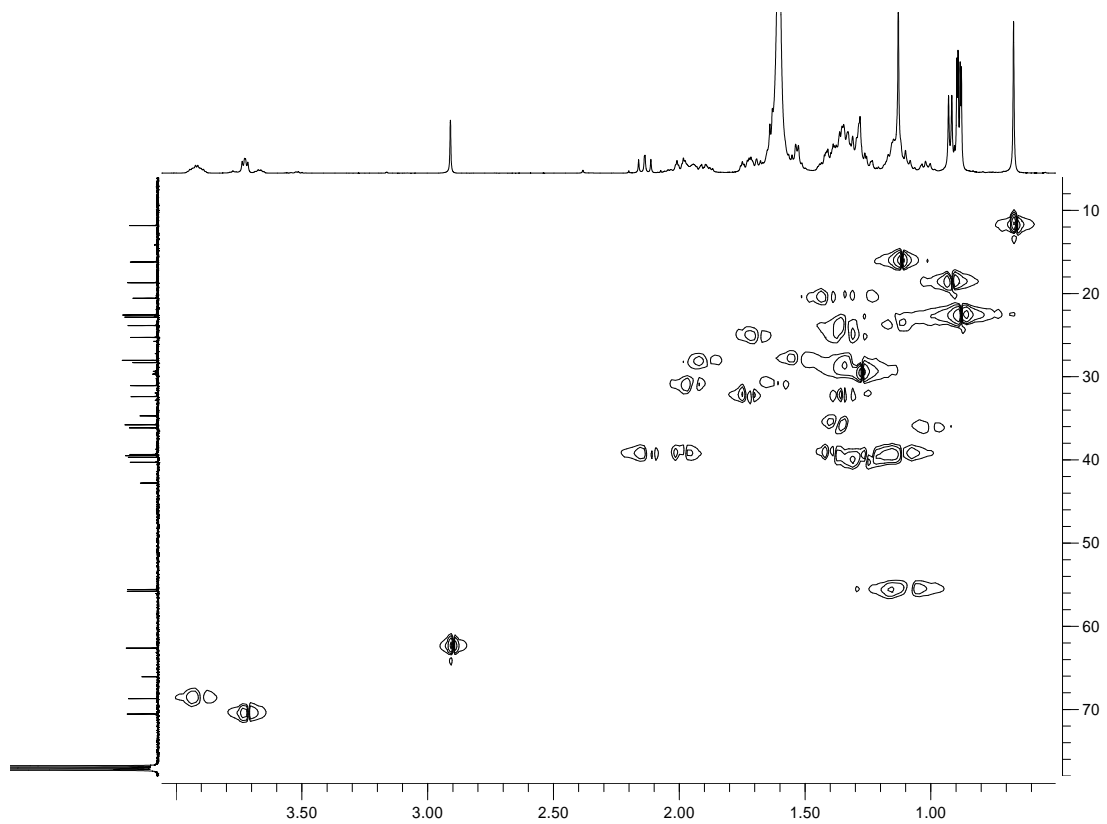
[α]_D = +15.7° [c = 0.02, CHCl₃].



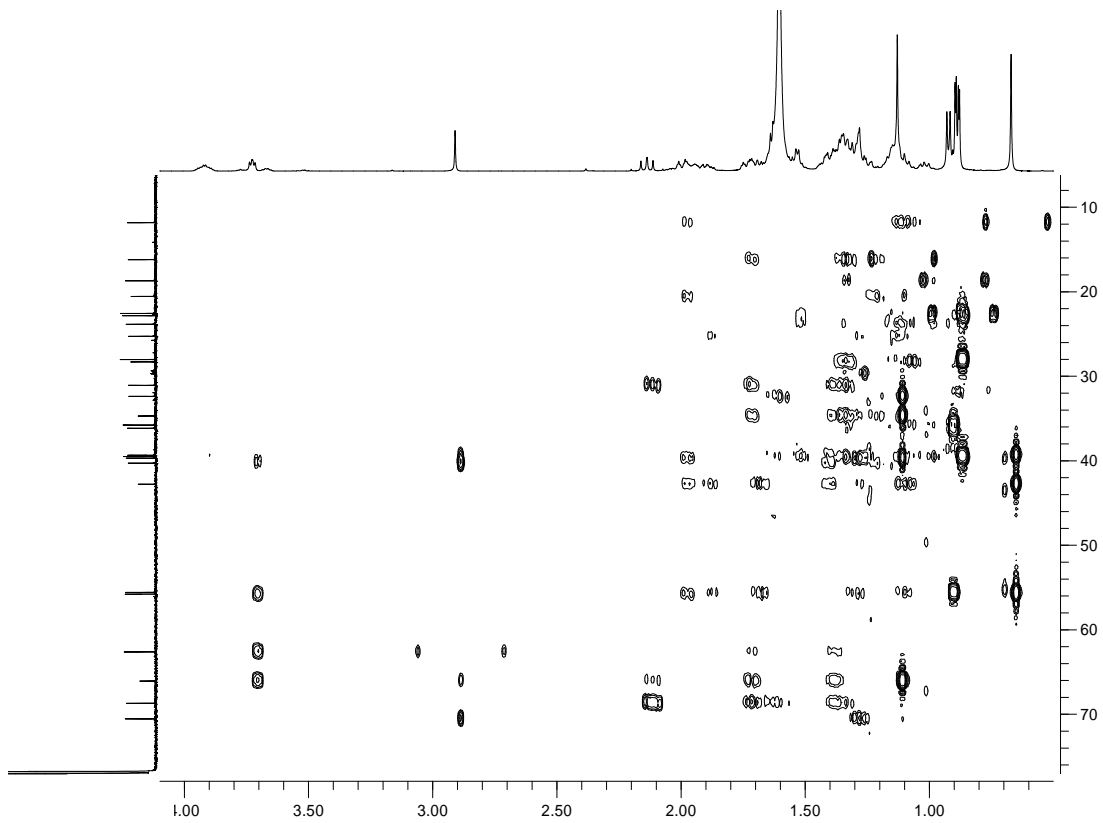
RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del 3 β ,7 β -dihidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**26 $\alpha\beta$**) en CD_3Cl



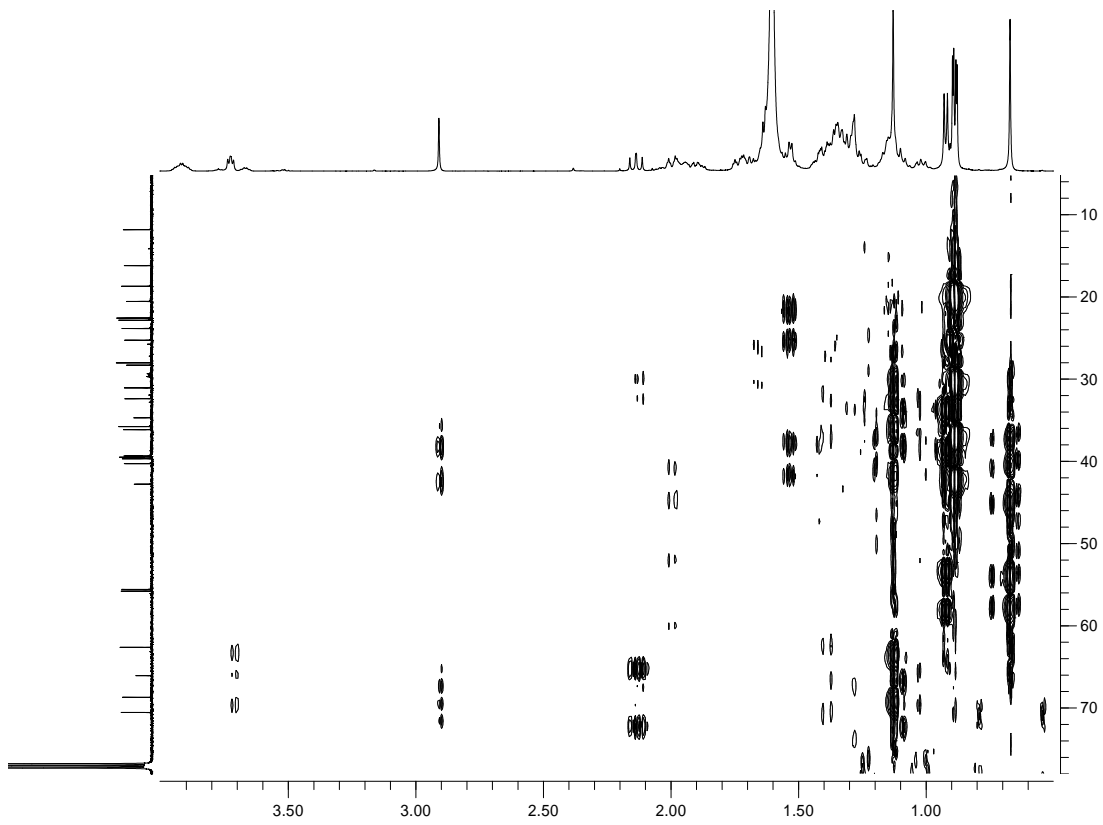
^1H ^1H COSY (500 MHz) de $3\beta,7\beta$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**26 $\alpha\beta$**) en CD_3Cl .



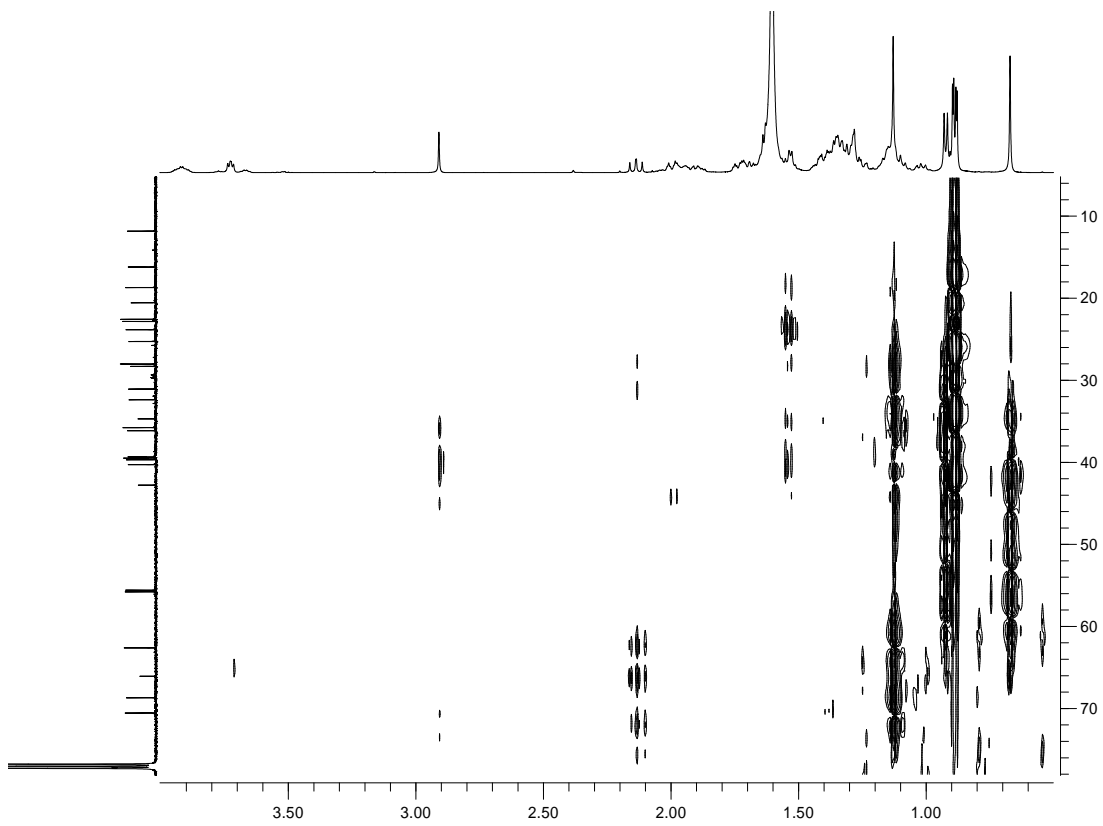
HSQC (500 MHz) de $3\beta,7\beta$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**26 $\alpha\beta$**) en CD_3Cl .



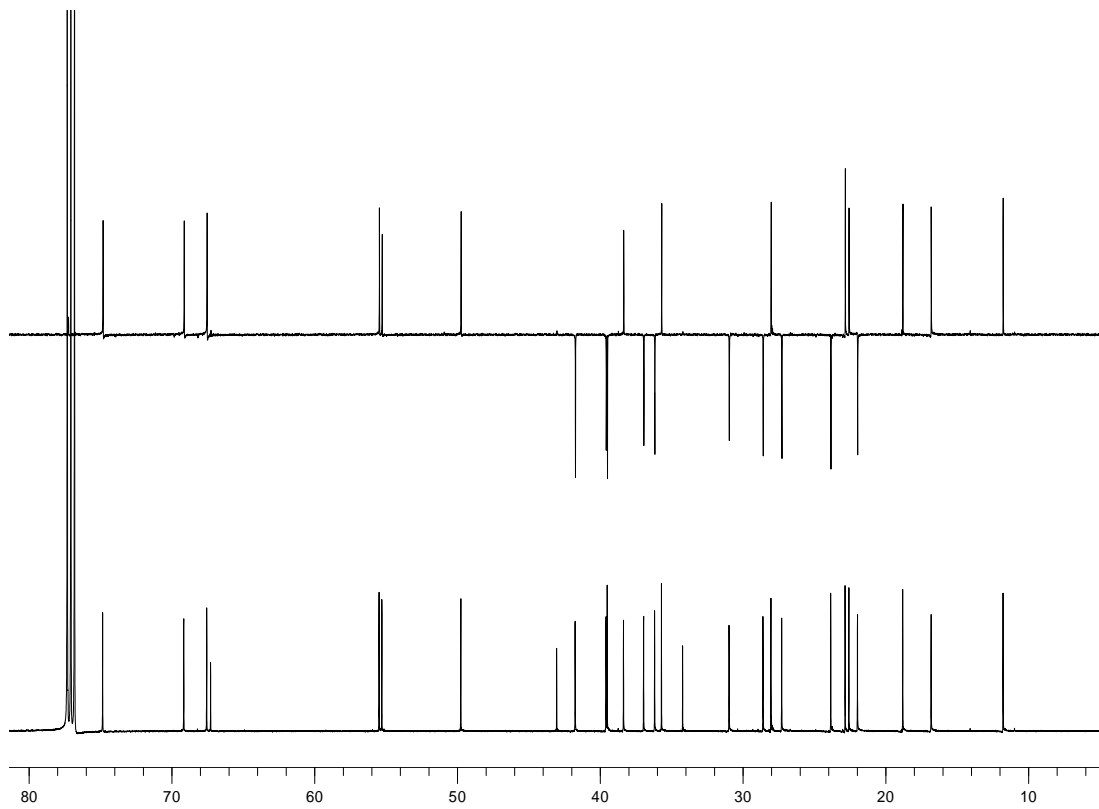
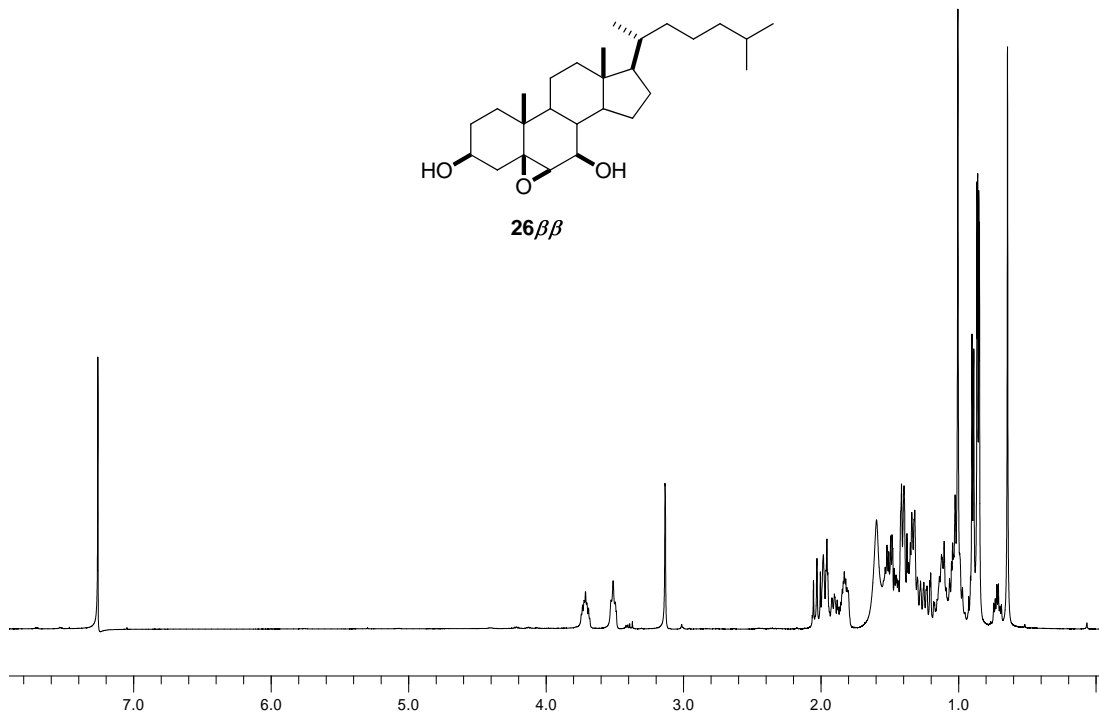
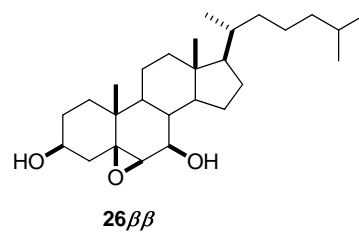
HMBC (500 MHz) de $3\beta,7\beta$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epicolestano ($26\alpha\beta$) en CD_3Cl .



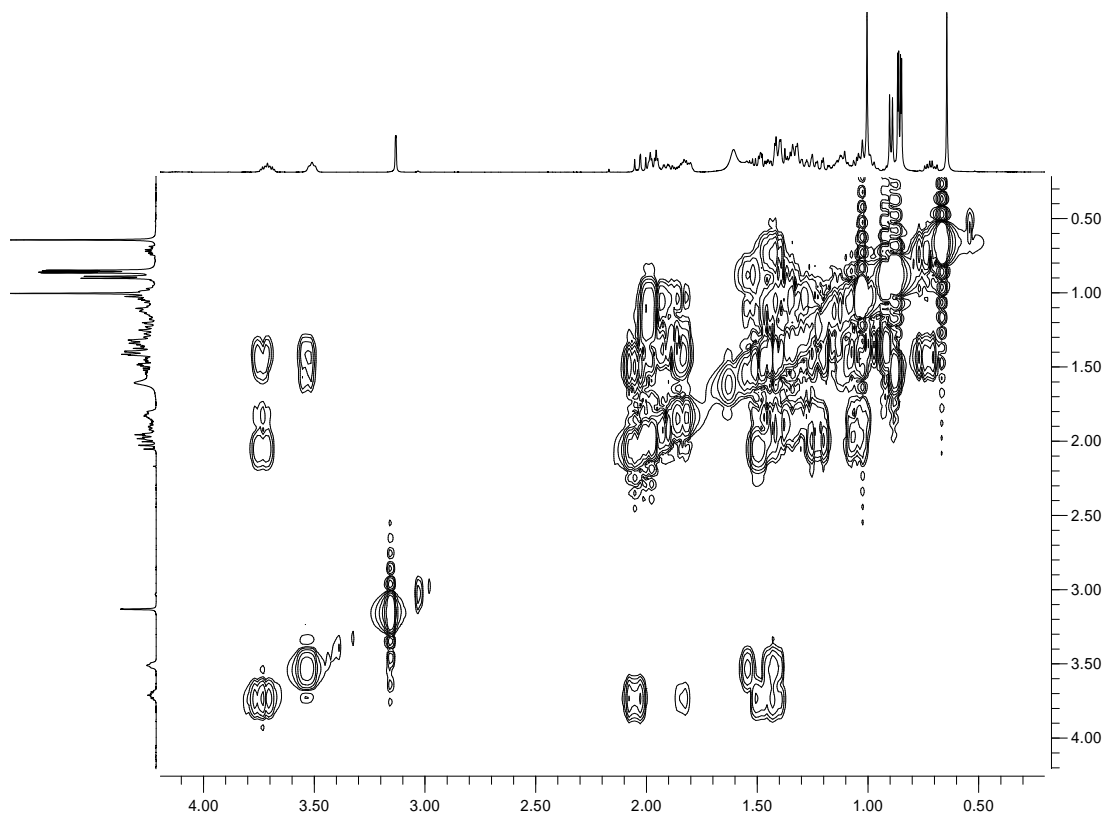
J-HMBC (scaleff 188, 500 MHz) del compuesto **26 $\alpha\beta$** en CD₃Cl.



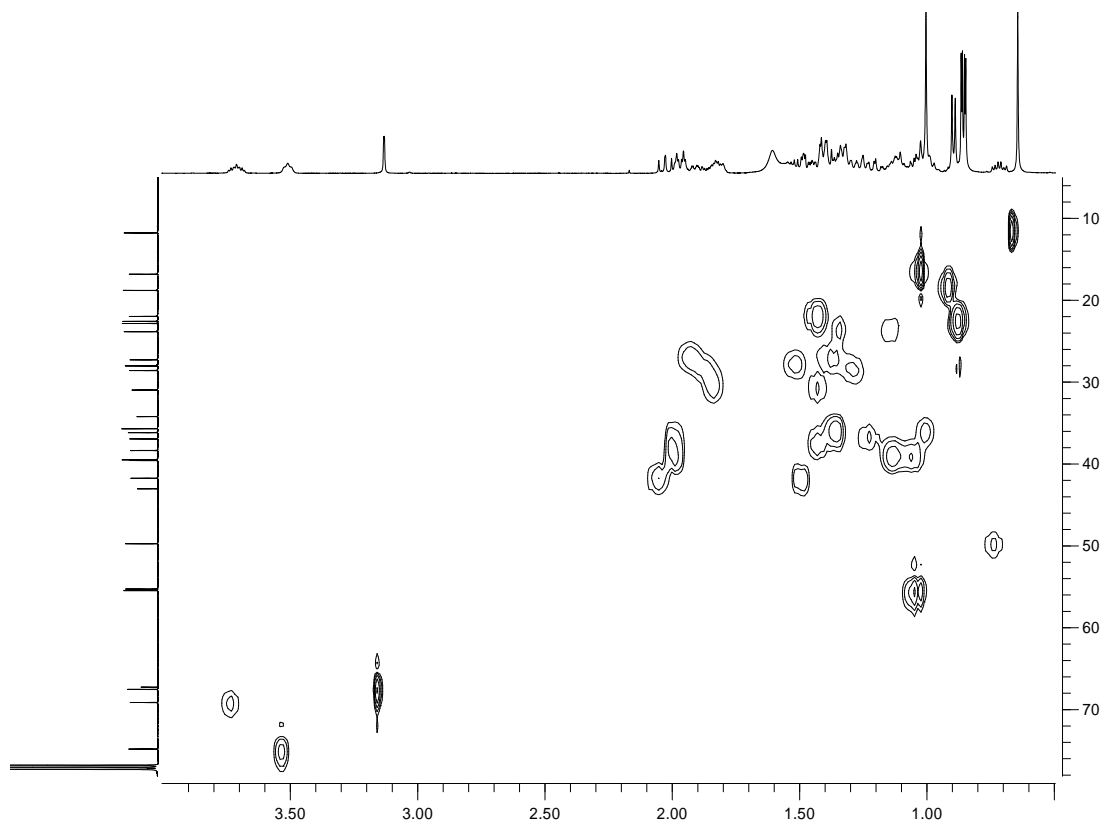
J-HMBC (scaleff 138, 500 MHz) del compuesto **26 $\alpha\beta$** en CD₃Cl.



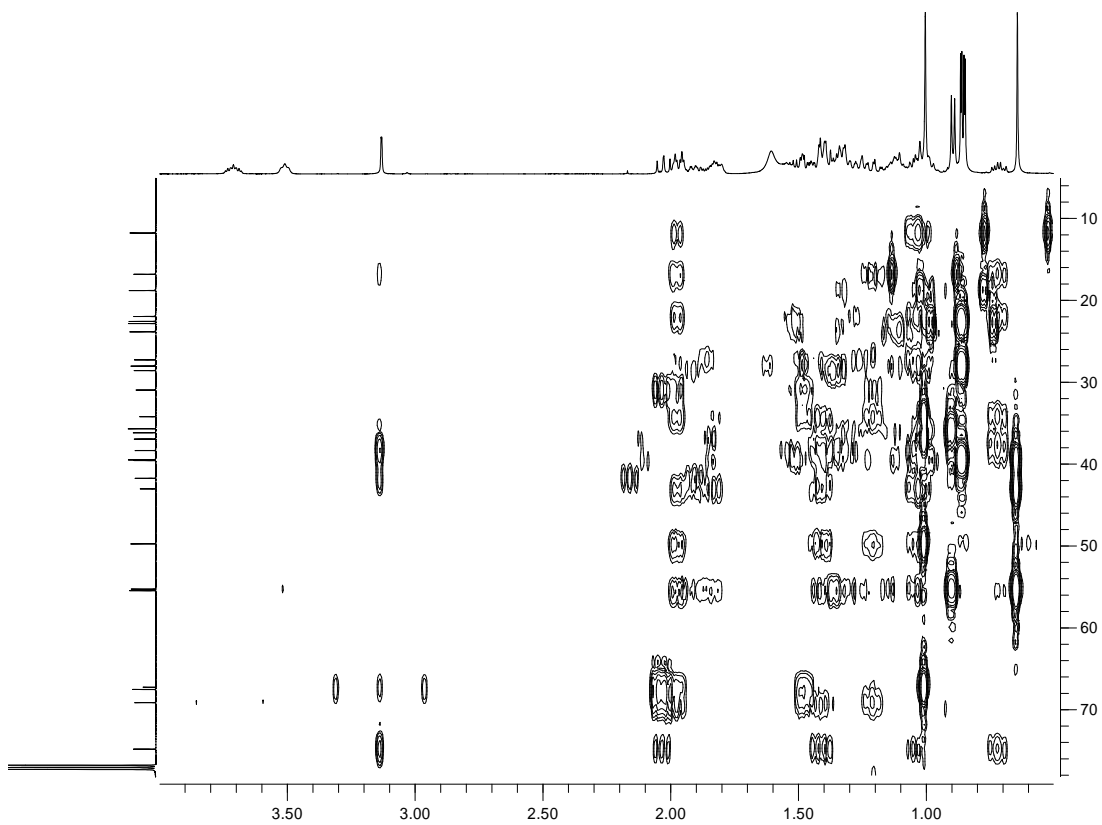
RMN de ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) de 3β,7β-dihidroxi-5β,6β-epoxicolestano (**26ββ**) en CD₃Cl.



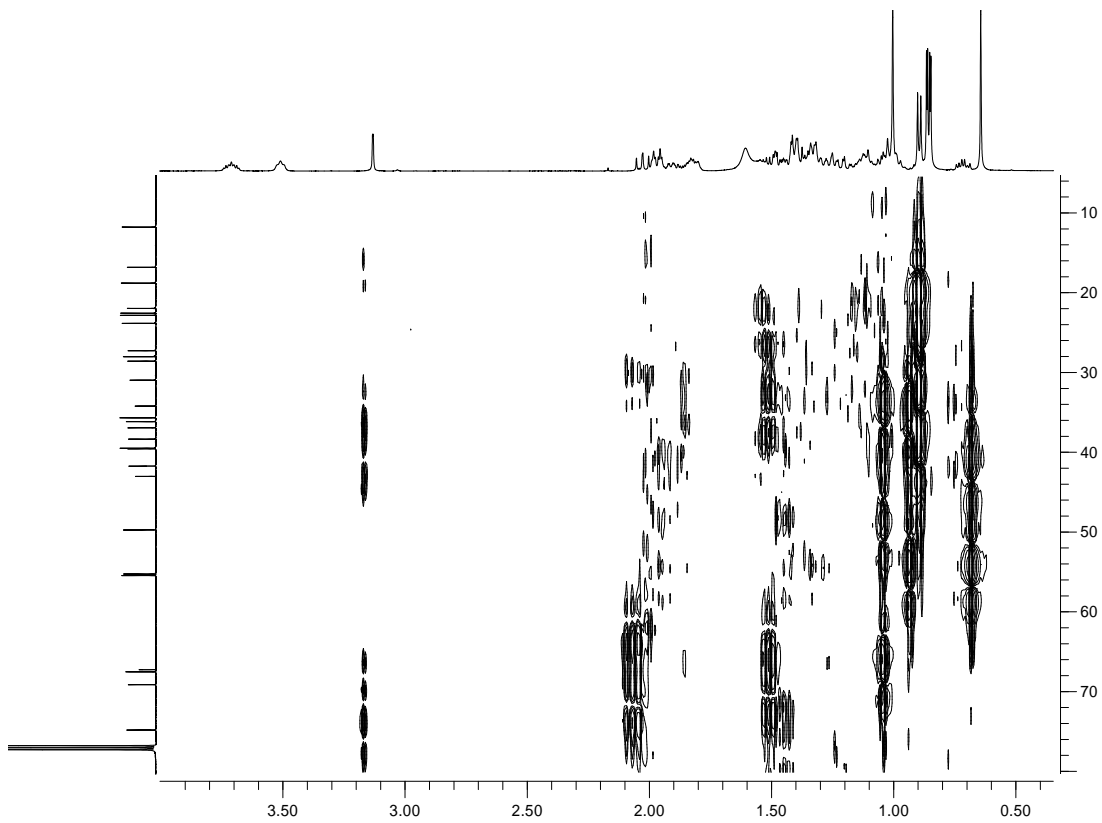
^1H ^1H COSY (500 MHz) de $3\beta,7\beta$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano ($26\beta\beta$) en CD_3Cl .



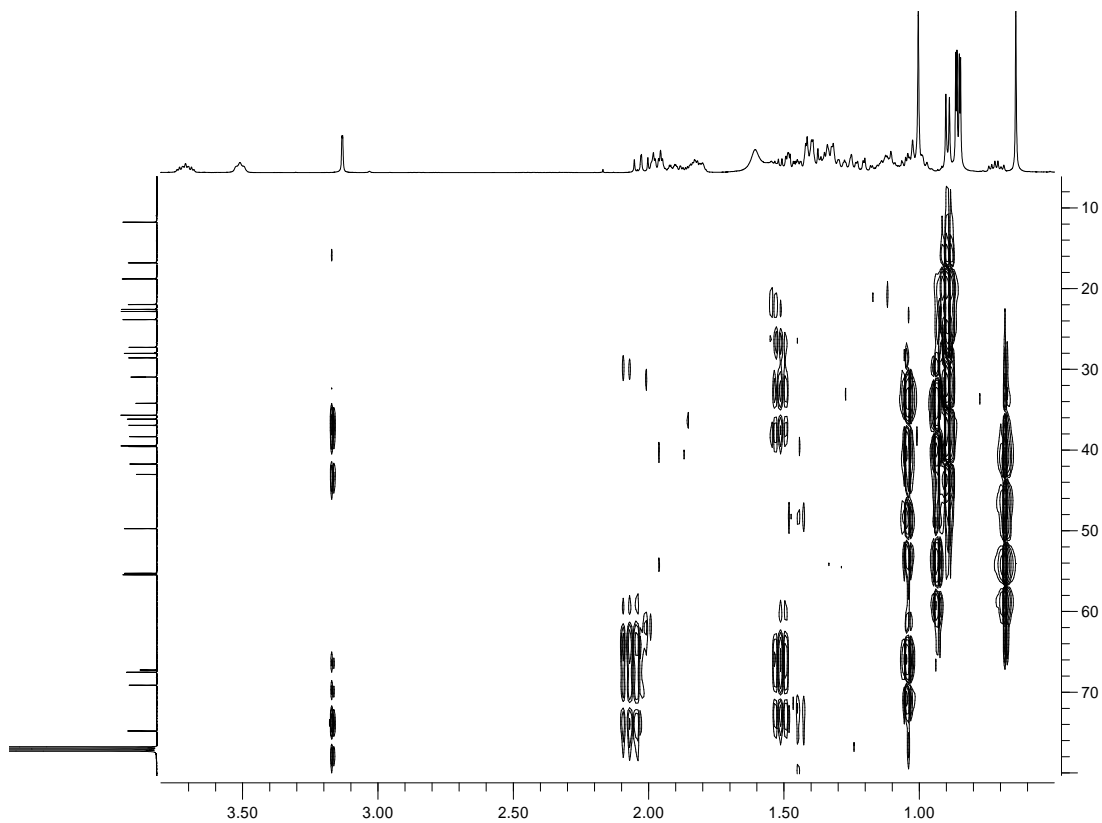
HSQC (500 MHz) de $3\beta,7\beta$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano ($26\beta\beta$) en CD_3Cl .



HMBC (500 MHz) de $3\beta,7\beta$ -dihidroxi- $5\beta,6\beta$ -epoxicolestano ($26\beta\beta$) en CD_3Cl .

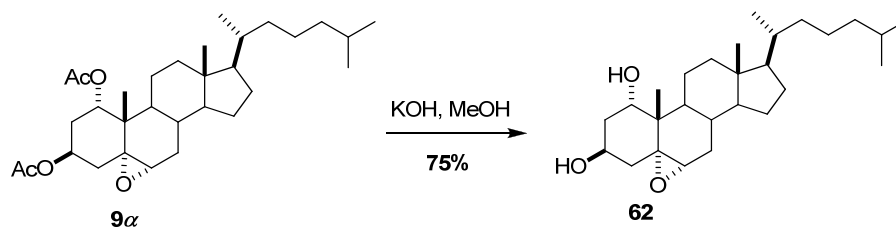


J-HMBC (scaleff 142, 500 MHz) del compuesto **26ββ** en CD₃Cl.



J-HMBC (scaleff 139, 500 MHz) del compuesto **26ββ** en CD₃Cl.

4.4. Síntesis del 1 α ,3 β -dihidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**62**)



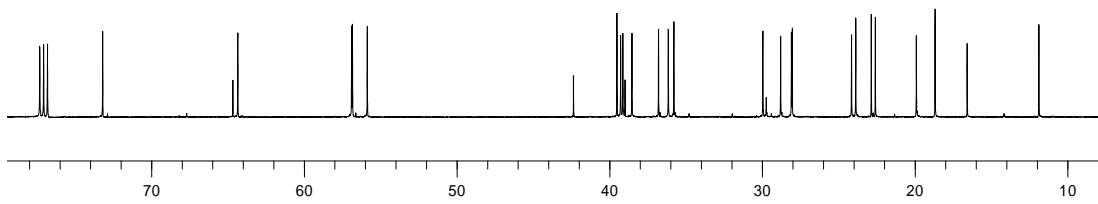
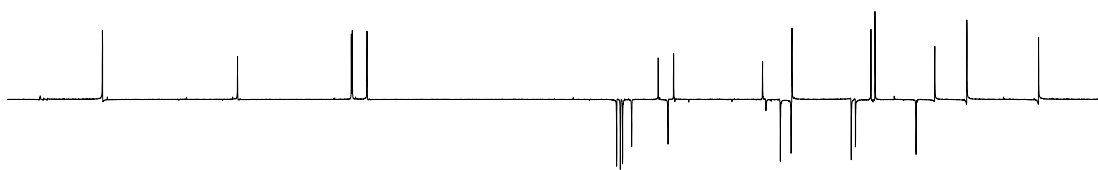
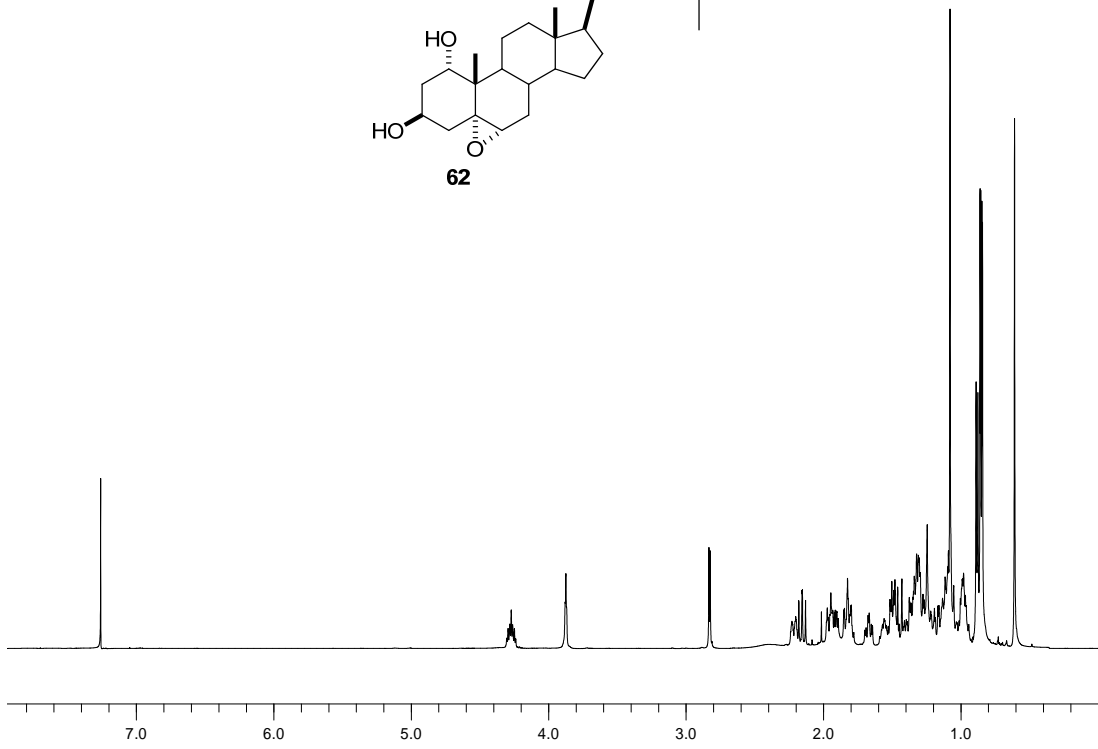
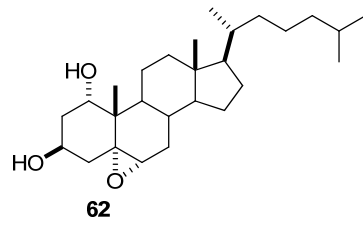
Se disolvió 1 α ,3 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**9 α**) (0.2 g, 0.4 mmol), en una disolución de KOH:MeOH al 5% (10 mL) y se dejó reaccionando 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiendo 0.15 g de 1 α ,3 β -dihidroxi-5 α ,6 α -epoxicolestano (**62**), semisólido blanco, 75%.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.20 (H1 β , 1H, m); 3.86 (H3 α , 1H, sa); 2.83 (H6 β , 1H, d, J = 4.4 Hz); 1.08 (H19, 3H, s); 0.91 (H21, 3H, d, J = 6.0 Hz); 0.86 (H26, H27, 6H, d, J = 6.4 Hz); 0.62 (H18, 3H, s).

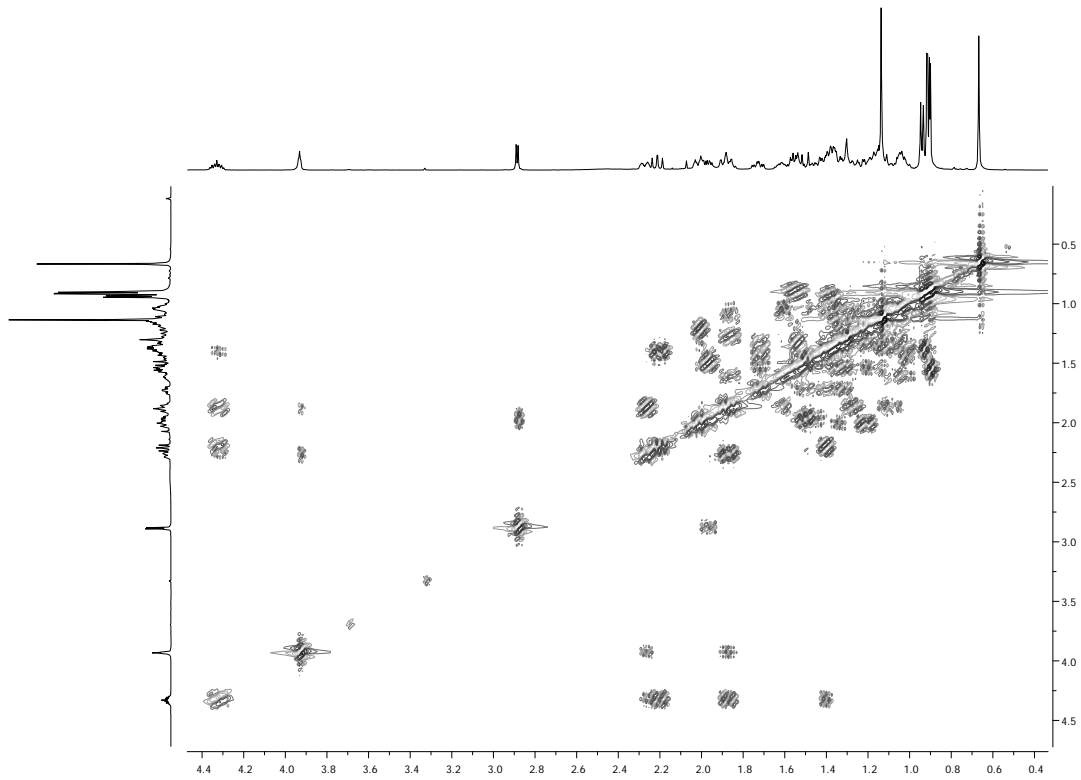
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): ver Tabla 8.

LREIMS (70 eV, m/z %): 418 (M^+ , 24); 95 (100).

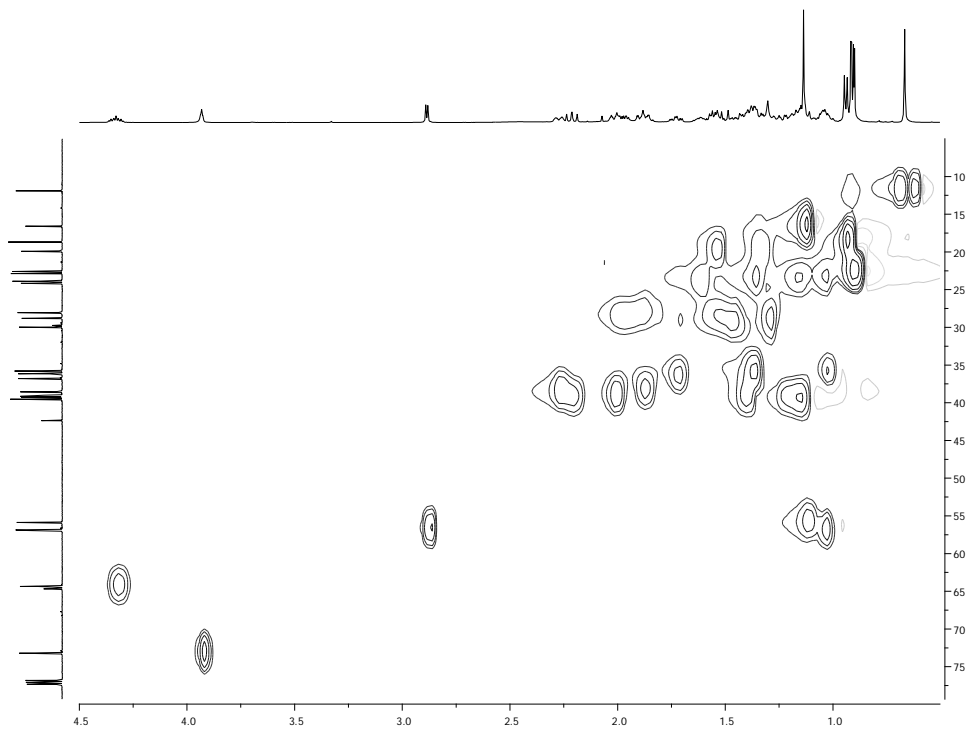
$[\alpha]_D$ = -33.0° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



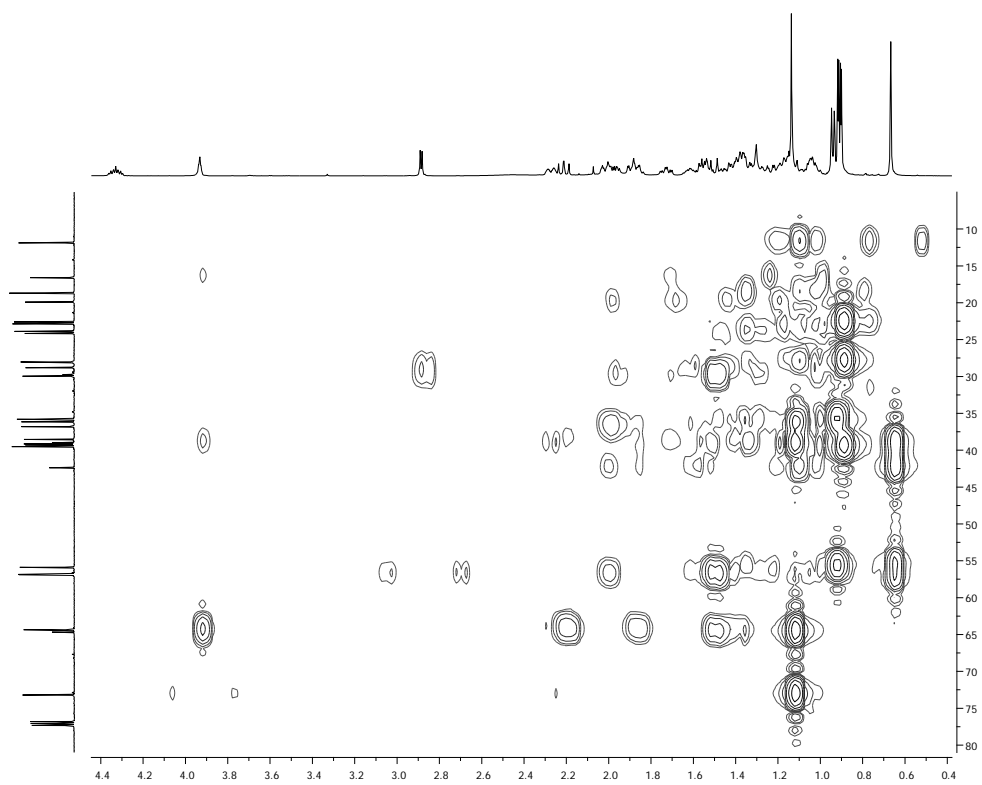
RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de $1\alpha,3\beta$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano
(62) en CD_3Cl .



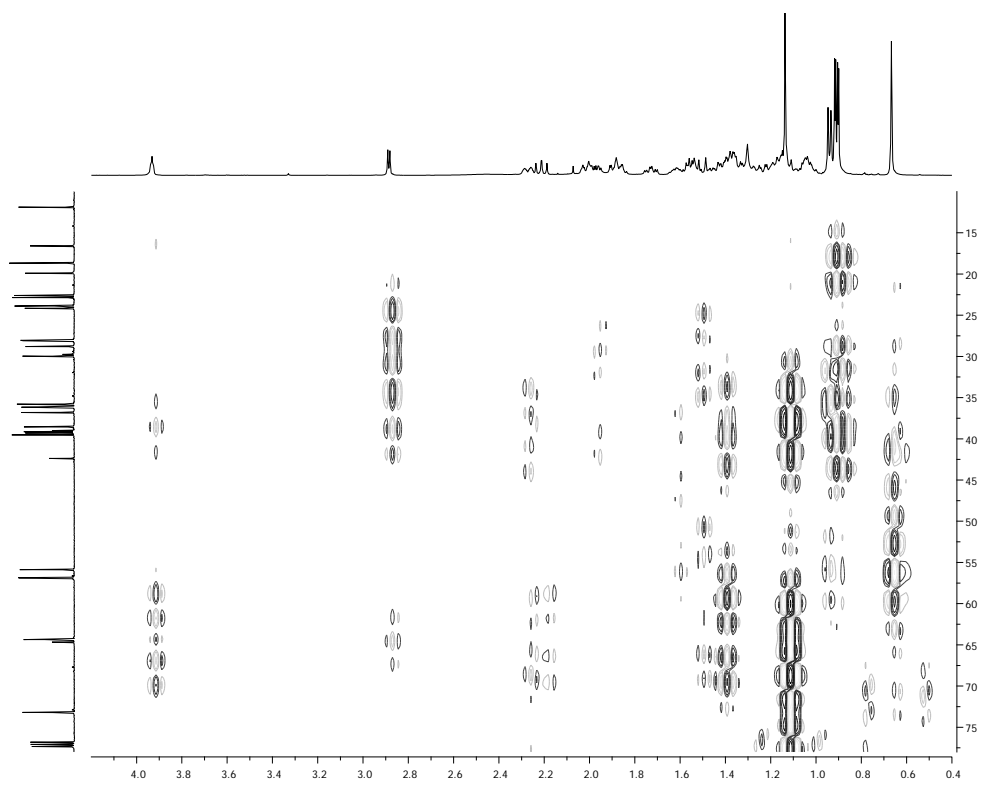
^1H ^1H COSY (500 MHz) de $1\alpha,3\beta$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**62**) en CD_3Cl .



HSQC (500 MHz) de $1\alpha,3\beta$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**62**) en CD_3Cl .



HMBC (500 MHz) de $1\alpha,3\beta$ -dihidroxi- $5\alpha,6\alpha$ -epoxicolestano (**62**) en CD₃Cl.

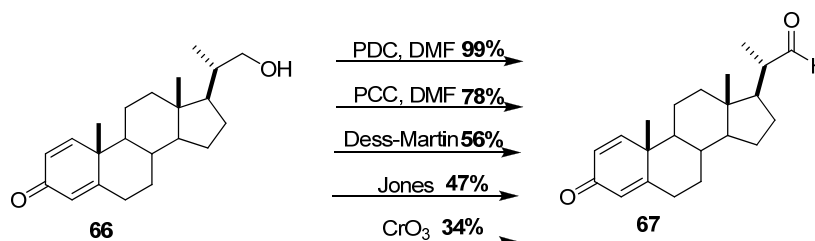


J-HMBC (scaleff 140, 500 MHz) del compuesto **62** en CD₃Cl.

Síntesis de nuevos tioésteres esteroidales naturales y sus análogos

5. Síntesis del paratioesteroide A y análogos

5.1. Síntesis de (20S)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (67)



Procedimiento A: Sobre una disolución de 20S-hidroximetilpregna-1,4-dien-3-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol), en DMF (20 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de PDC (4.0 g, 10.0 mmol) en DMF (30 mL), se dejó agitando a t.a durante 5 h. Se filtró el residuo sólido, se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió con EtOAc (50 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃, NaCl, agua y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.99 g de (20S)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (**67**), semisólido blanco, 99%.

Procedimiento B: Sobre una disolución de 20S-hidroximetilpregna-1,4-dien-3-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol), en DMF (20 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de PCC (4.0 g, 10.0 mmol) en DMF (30 mL), se dejó agitando a t.a durante 5 h. Se filtró el residuo sólido, se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió con EtOAc (50 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃, NaCl, agua y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.78 g de (20S)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (**67**), semisólido blanco, 78%.

Procedimiento C: Sobre una disolución de reactivo de Dess-Martin (1.1 g, 5 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL), se adicionó, gota a gota 20S-hidroximetilpregna-1,4-dien-3-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol), en CH₂Cl₂ (30 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **21** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.56 g de (20S)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (**67**), semisólido blanco, 56%.

Procedimiento D: Sobre una disolución de 20S-hidroximetilpregna-1,4-dien-3-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol), a 0°C en Ac₂O (12 mL), se adicionó, gota a gota, el reactivo de Jones (5 mL) preparado *in situ*, dejándolo reaccionar a 0°C durante 6 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **10** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.47 g de (20S)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (**67**), semisólido blanco, 47%.

Procedimiento E: Sobre una disolución de CrO₃ (3.0 g, 18.0 mmol), a 0°C, en THF (20 mL), se adicionó, gota a gota, otra disolución de 20S-hidroximetilpregna-1,4-dien-3-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol), en THF (20 mL). Se dejó evolucionar a t.a. durante 75 min. Se vertió EtOAc (25 mL), se filtró el residuo sólido y los extractos orgánicos se lavaron con HCl al 10% (25 mL), NaHCO₃ (5 mL) y NaCl (5 mL); secándose

finalmente sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.34 g de (20*S*)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (**67**), semisólido blanco, 34%.

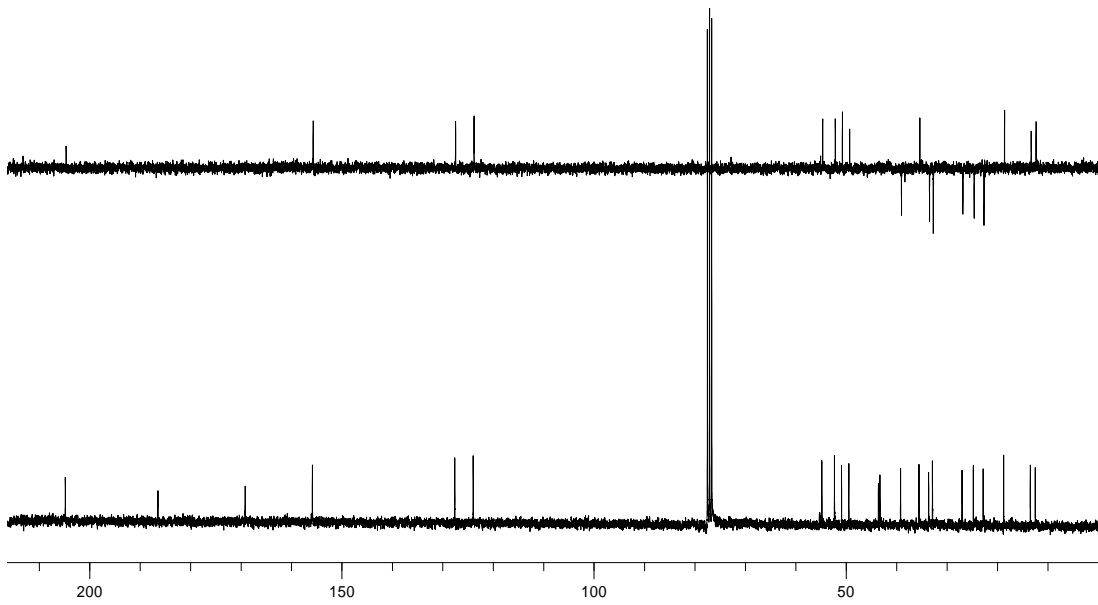
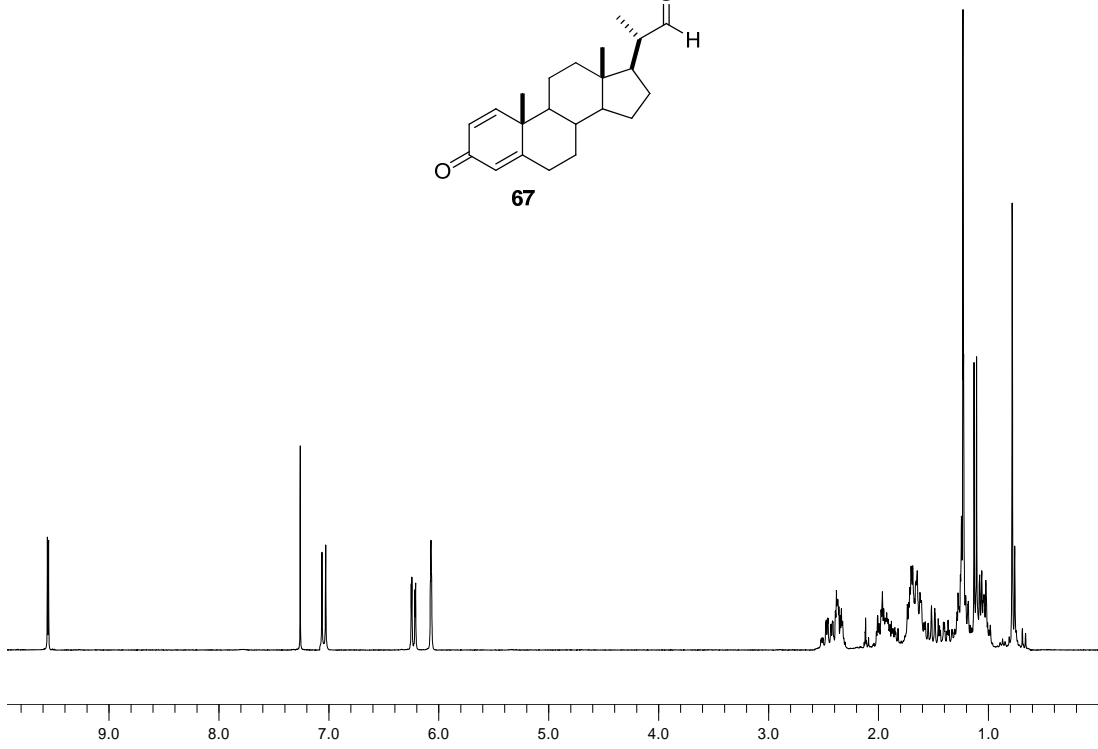
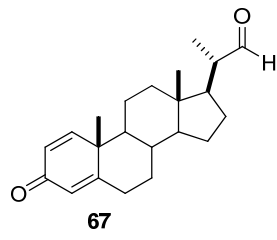
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.55 (H22, 1H, d, *J* = 3.0 Hz); 7.04 (H1, 1H, d, *J* = 10.1 Hz); 6.23 (H2, 1H, dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz); 6.07 (H4, 1H, d, *J* = 1.7 Hz); 1.24 (H19, 3H, s); 1.12 (H21, 3H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.78 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 204.3 (C22, d); 186.0 (C3, s); 168.7 (C5, s); 155.4 (C1, d); 127.0 (C2, d); 123.4 (C4, d); 54.3 (C14, d); 51.8 (C17, d); 50.4; 48.9; 43.1; 42.8; 38.6; 35.0; 33.1; 32.3; 26.4; 24.2; 22.3; 18.2; 12.9 (C19, q); 12.0 (C18, q).

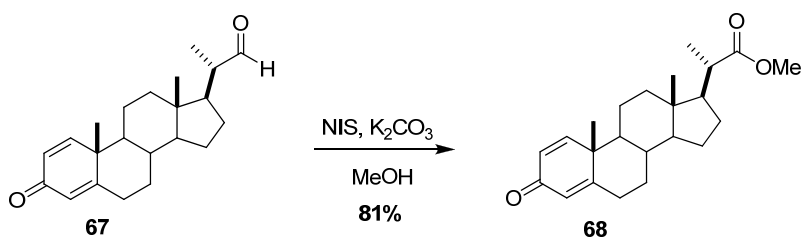
LREIMS (70 eV, *m/z* %): 326 (M⁺, 6); 122 (100).

(+)-LRFABMS *m/z* (%): 327 ([M + H]⁺, 72); 121 (100).

[α]_D = +13.8° [*c* = 1.4, CH₂Cl₂].



5.2. Síntesis de (20*S*)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-metiléster (68)



Sobre una disolución del (20*S*)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (**67**) (0.4 g, 1.2 mmol) en MeOH (12 mL) se adicionó *N*-Iodosuccinimida (0.7 g, 3.1 mmol) y K₂CO₃ (0.4 g, 3.1 mmol). La mezcla resultante se dejó reaccionando a t.a. durante 3 h. Se adicionó Na₂S₂O₃·5H₂O (100 mL), con agitación durante 15 min. Se extrajo con EtOAc (3 x 25 mL), se lavó con NaCl, agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiendo 0.32 g de (20*S*)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-metiléster (**68**), semisólido blanco, 81%.

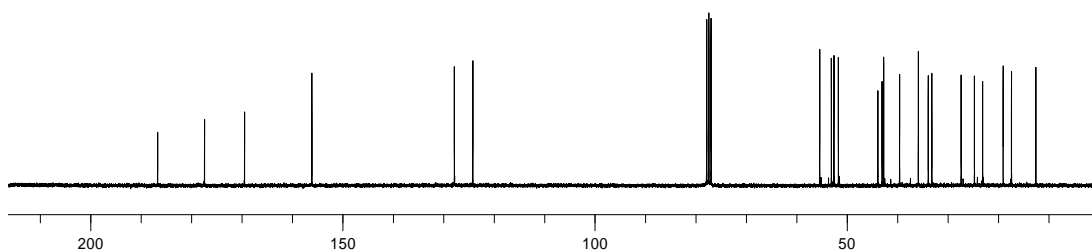
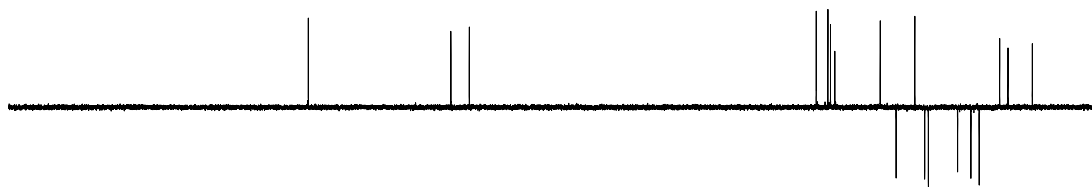
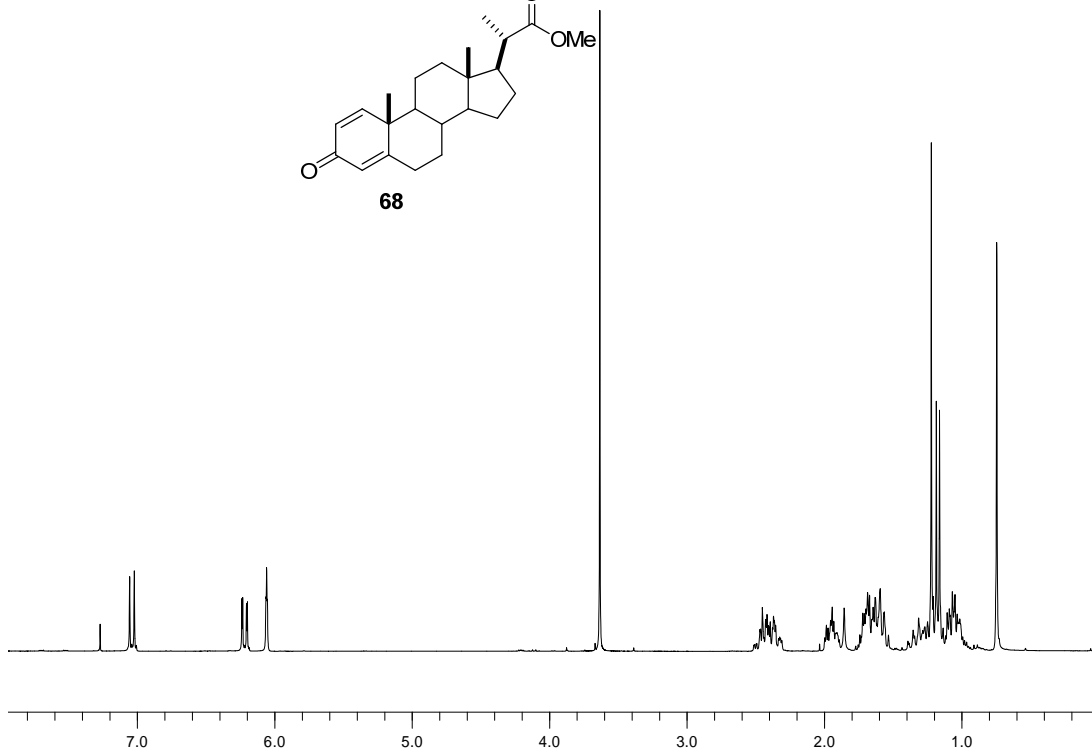
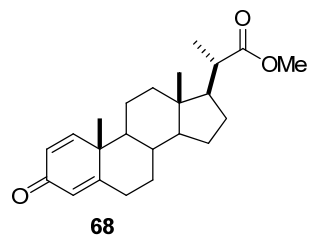
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.03 (H1, 1H, d, *J* = 10.1 Hz); 6.21 (H2, 1H, dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz); 6.05 (H4, 1H, s); 3.63 (H23, 3H, s); 1.22 (H19, 3H, s); 1.17 (H21, 3H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.74 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 185.9 (C3, s); 176.6 (C22, s); 168.6 (C5, s); 155.3 (C1, d); 127.0 (C2, d); 123.4 (C4, d); 54.6 (C14, d); 52.3 (C17, d); 51.7; 50.9; 43.0; 42.2; 41.9 (C23, q); 38.8; 35.1; 33.0; 32.3; 26.5; 23.9; 22.2 (C11, t); 18.2; 16.5 (C19, q); 11.7 (C18, q).

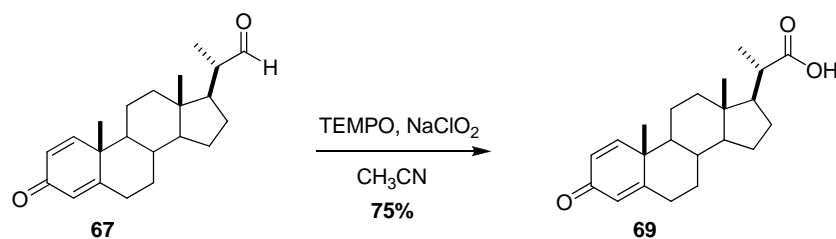
LREIMS (70 eV, *m/z* %): 356 (M⁺, 4); 122 (100).

(+)-LRFABMS *m/z* (%): 357 ([M + H]⁺, 100).

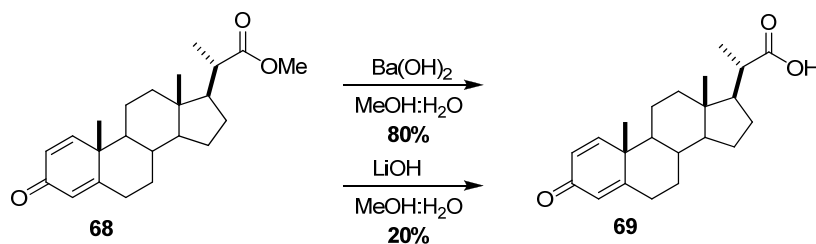
[α]_D = +4.8° [*c* = 1, CH₂Cl₂].



5.3. Síntesis de (20*S*)-ácido 3-oxopregna-1,4-dien-20-oico (**69**)



Procedimiento A: El (20*S*)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-carboxaldehído (**67**) (0.5 g, 1.5 mmol) se disolvió en 10 mL de una mezcla de CH₃CN y disolución tampón a pH 6.5 en relación (1.3:1). A continuación, se añadió TEMPO (0.13 g, 0.7 mmol), NaClO₂ (0.3 g, 0.12 mmol) y NaClO (2 mL) y la mezcla se dejó reaccionando a t.a durante 24 h. Se adicionó Na₂SO₃ (25 mL), con agitación durante 15 min. El pH se llevó hasta 3 mediante la adición controlada de una disolución 2 N de HCl. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 30 mL), se lavó con NaCl, agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 0.37 g del (20*S*)-ácido 3-oxopregna-1,4-dien-20-oico (**69**), semisólido blanco, 75%.



Procedimiento B: Sobre una disolución del (20*S*)-3-oxopregna-1,4-dieno-20-metiléster (**68**) (0.25 g, 0.7 mmol) en MeOH:H₂O (2:1) (10 mL) se adicionó Ba(OH)₂ monohidratado (0.08 g, 2 mmol). La mezcla se calentó a 45°C durante 72 h. A continuación, la reacción se vertió sobre un baño de agua/hielo y la mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 30 mL) lavandose con NaCl y secándose sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 0.2 g del (20*S*)-ácido 3-oxopregna-1,4-dien-20-oico (**69**), semisólido blanco, 80%.

Procedimiento C: Sobre una disolución de **68** (0.2 g, 0.5 mmol) en MeOH:H₂O (2:1) (10 mL) se adicionó LiOH (0.7 g, 2 mmol). Siguiendo el procedimiento B se obtuvieron 40 mg de **69**, 20%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.05 (H1, 1H, d, *J* = 10.1 Hz); 6.24 (H2, 1H, dd, *J* = 10.1, 1.9 Hz); 6.08 (H4, 1H, d, *J* = 1.4 Hz); 1.24 (H21, 3H, d, *J* = 6.6 Hz); 1.23 (H19, 3H, s); 0.78 (H18, 3H, s).

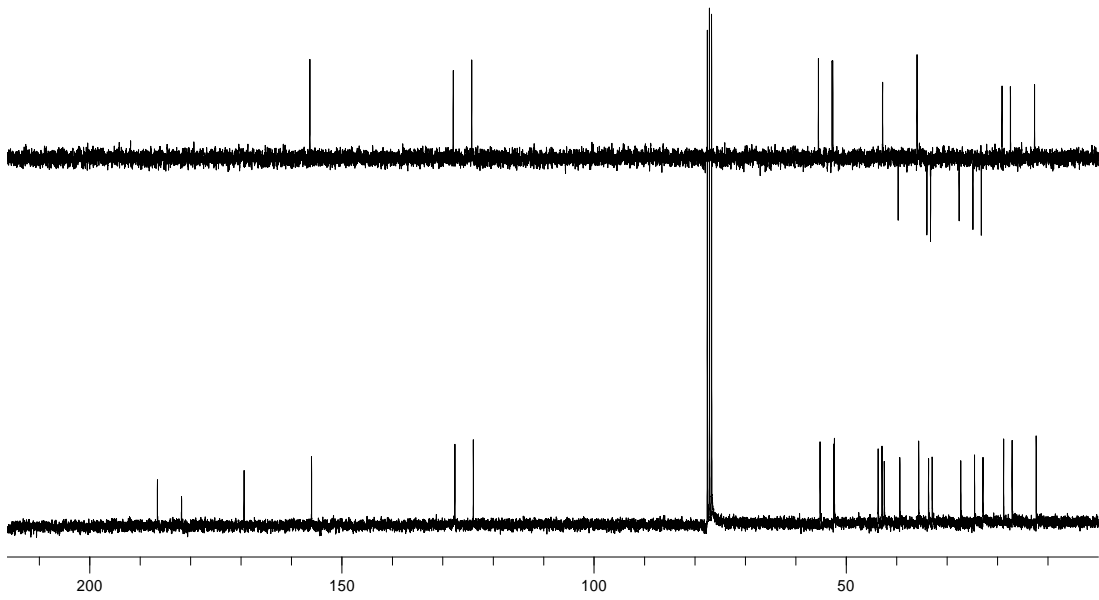
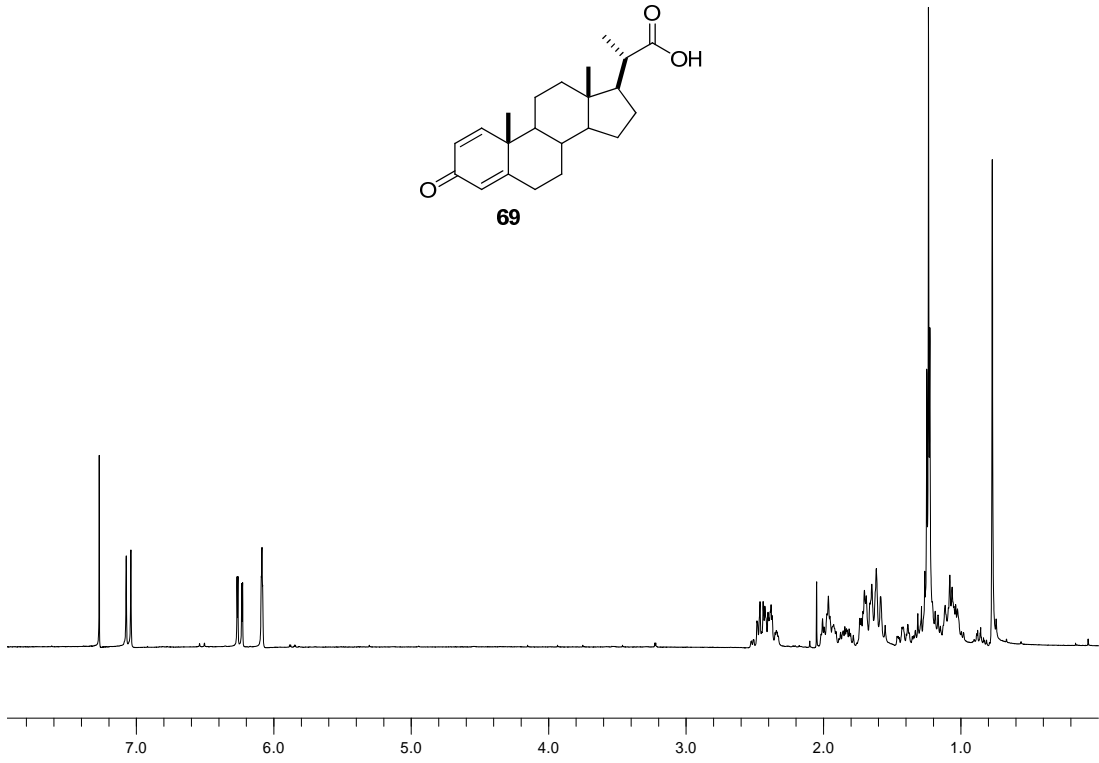
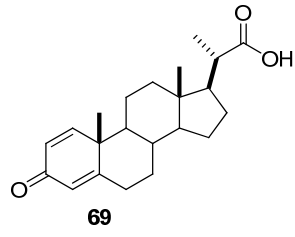
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 186.5 (C3, s); 181.7 (C22, s); 169.3 (C5, s); 155.9 (C1, d); 127.5 (C2, d); 123.8 (C4, d); 55.0 (C14, d); 52.3 (C17, d); 52.2; 43.5; 42.7; 42.3; 39.3; 35.5; 33.5; 32.8; 27.2; 24.4; 22.8; 18.6; 16.9 (C19, q); 12.2 (C18, q).

LREIMS (70 eV, *m/z* %): 342 (M⁺, 4); 84 (100).

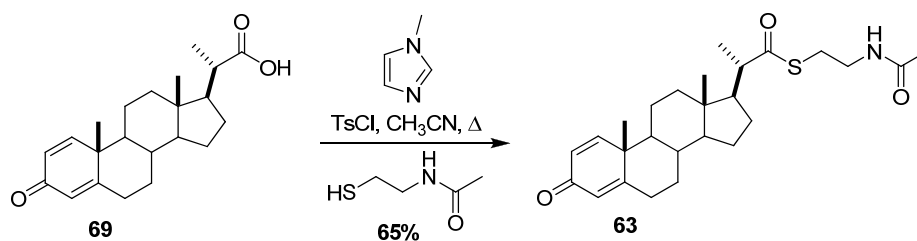
(+)-LRFABMS *m/z* (%): 343 ([M + H]⁺, 15); 137 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 343.2283 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₂H₃₁O₃, 343.2267).

[α]_D = -18.8° [c = 1, CH₂Cl₂].



5.4. Síntesis de paratioesteroide A (63)



Sobre una disolución del (20*S*)-ácido 3-oxopregna-1,4-dien-20-oico (**69**) (50 mg, 0.15 mmol) y *N*-metilimidazol (35 μ L, 0.44 mmol) en CH₃CN (3 mL) se añadió TsCl (36 mg, 0.18 mmol) disuelto en CH₃CN (3 mL) y se dejó reaccionar a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió sobre la mezcla *N*-acetilcisteamina (16 μ L, 0.14 mmol) y se dejó a 85°C durante 24 h. La mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 20 mL), se lavó con NaCl, agua y se secó sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 34 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 32 mg del paratioesteroide A (**63**), semisólido blanco, 65%.

63: RMN-¹H y RMN-¹³C: ver Tablas 12 y 13.

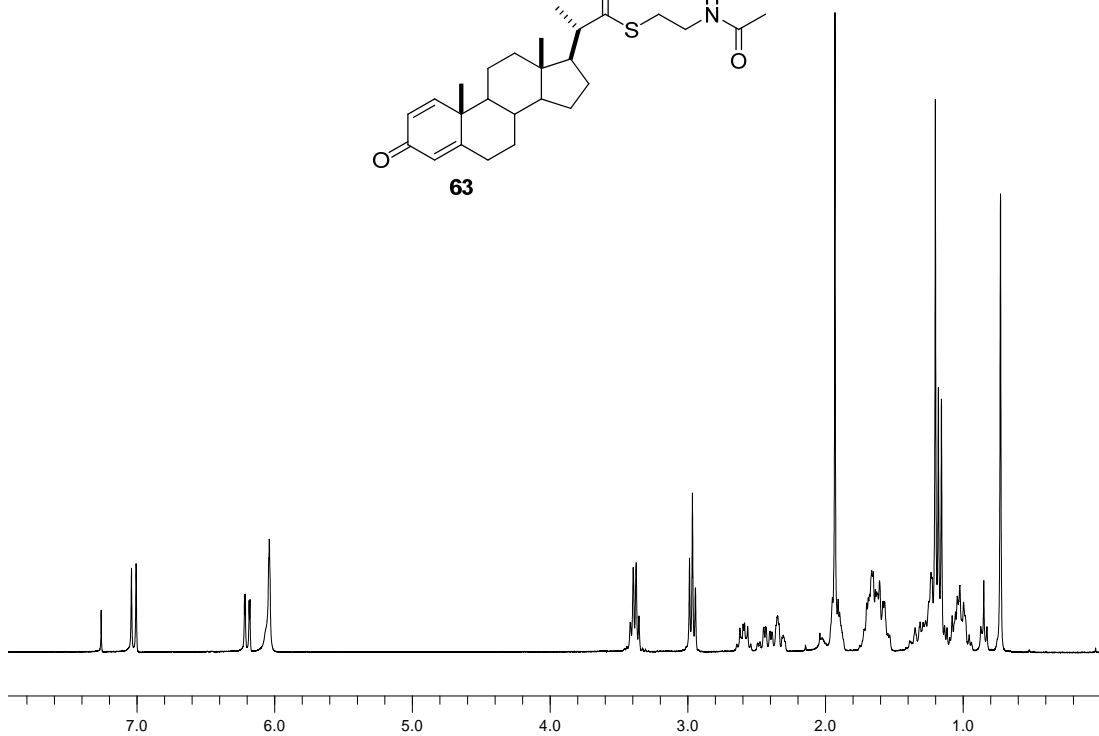
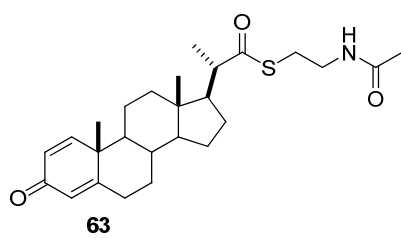
LREIMS (70 eV, *m/z* %): 443 (M⁺, 8); 82 (100).

(+)-LRFABMS, *m/z* (%): 466 ([M + Na]⁺, 8); 444 ([M + H]⁺, 38); 121 (100).

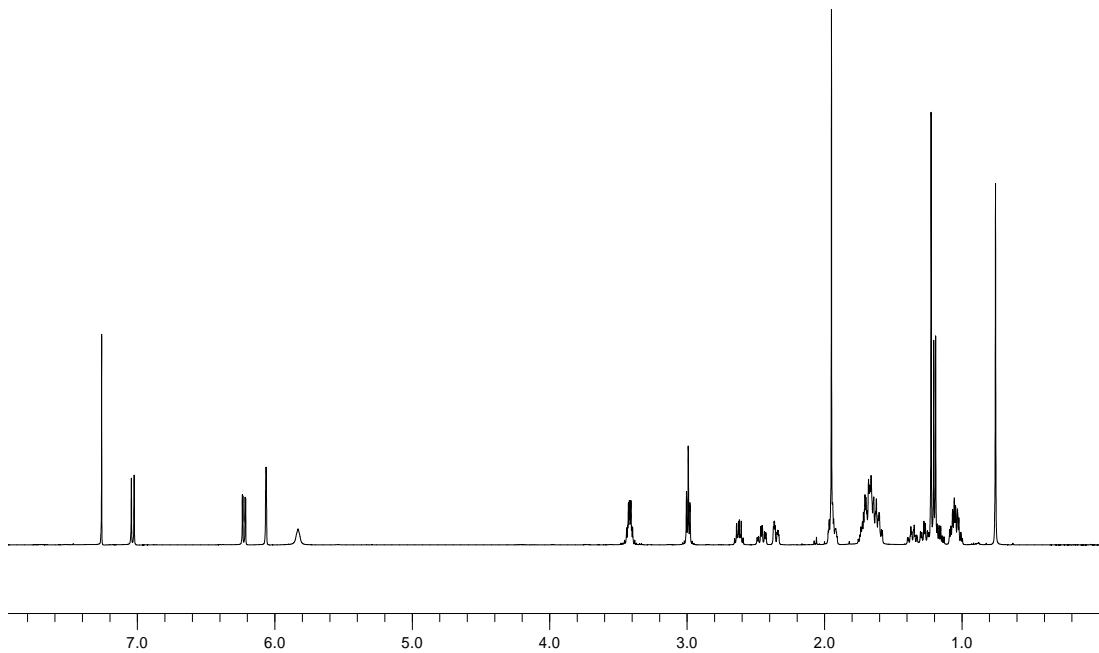
(+)-HRESIMS: *m/z* 444.2550 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₃₈NO₃S, 444.2566),

m/z 466.2373 [M + Na]⁺ (calcd. para C₂₆H₃₇NO₃SNa, 466.2386).

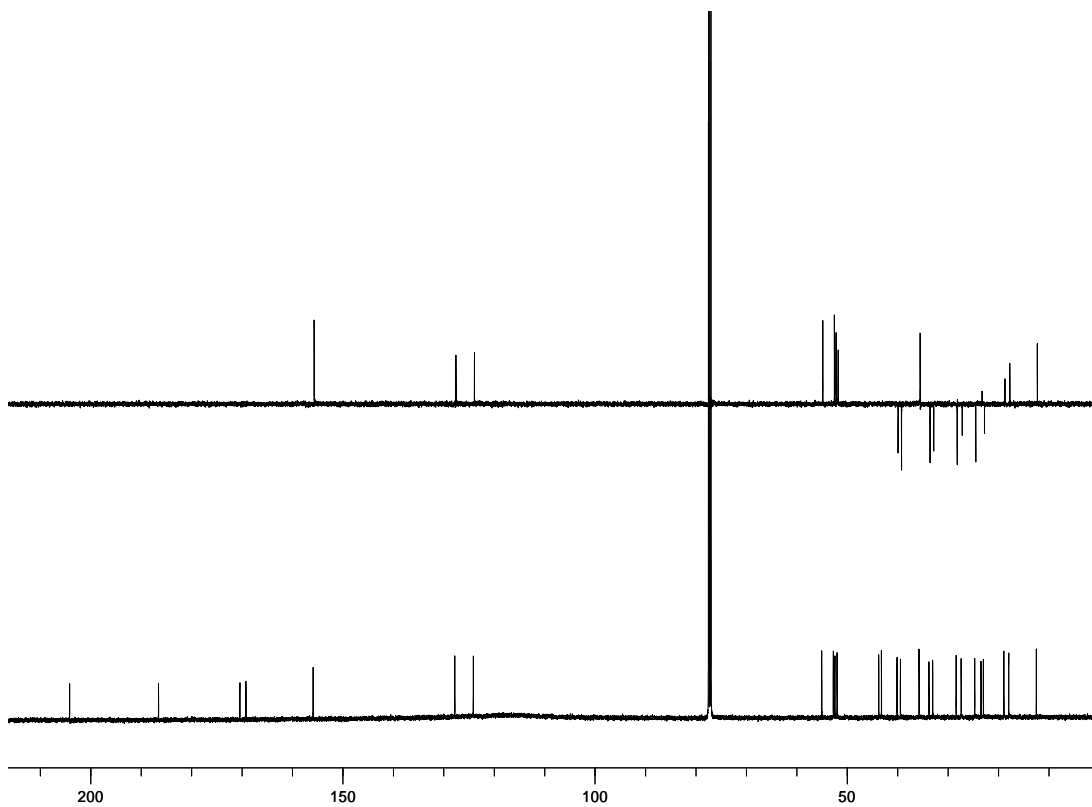
[α]_D = +6.8° [c = 0.2, MeOH].



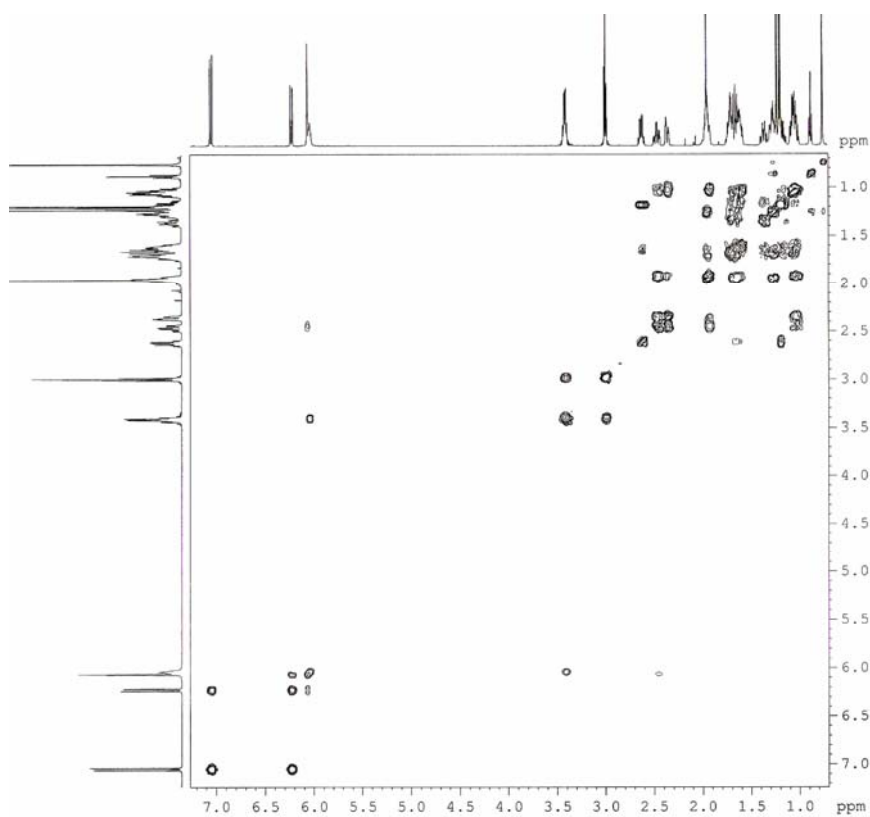
RMN de ^1H (500 MHz) del paratioesteroide A natural (**63**) en CD_3Cl .



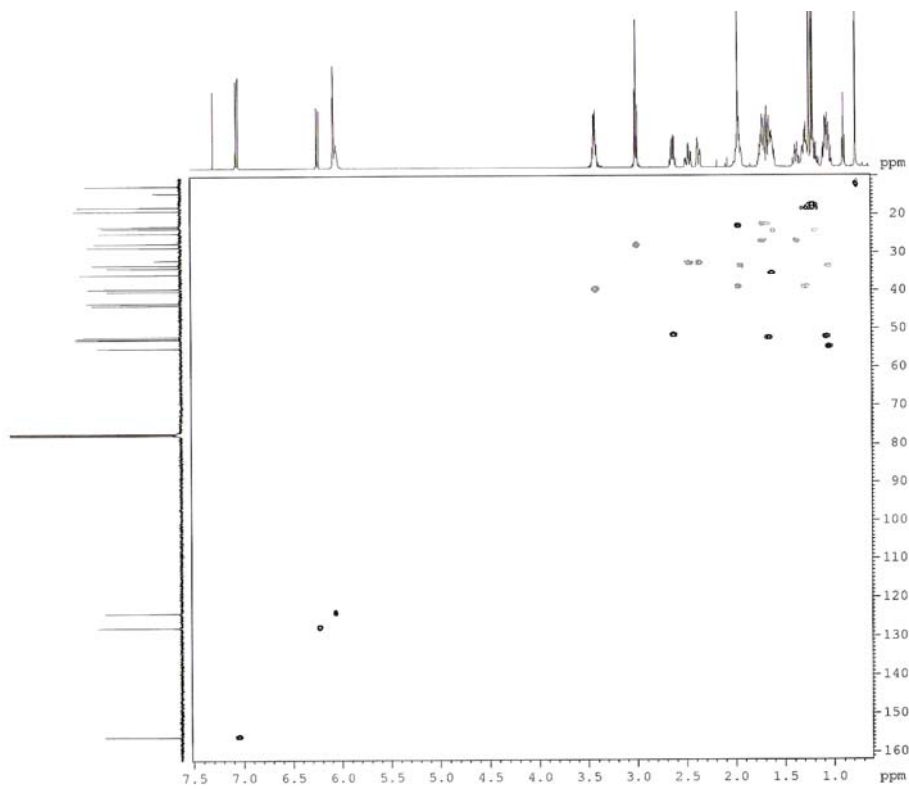
RMN de ^1H (500 MHz) del paratioesteroide A sintético (**63**) en CD_3Cl .



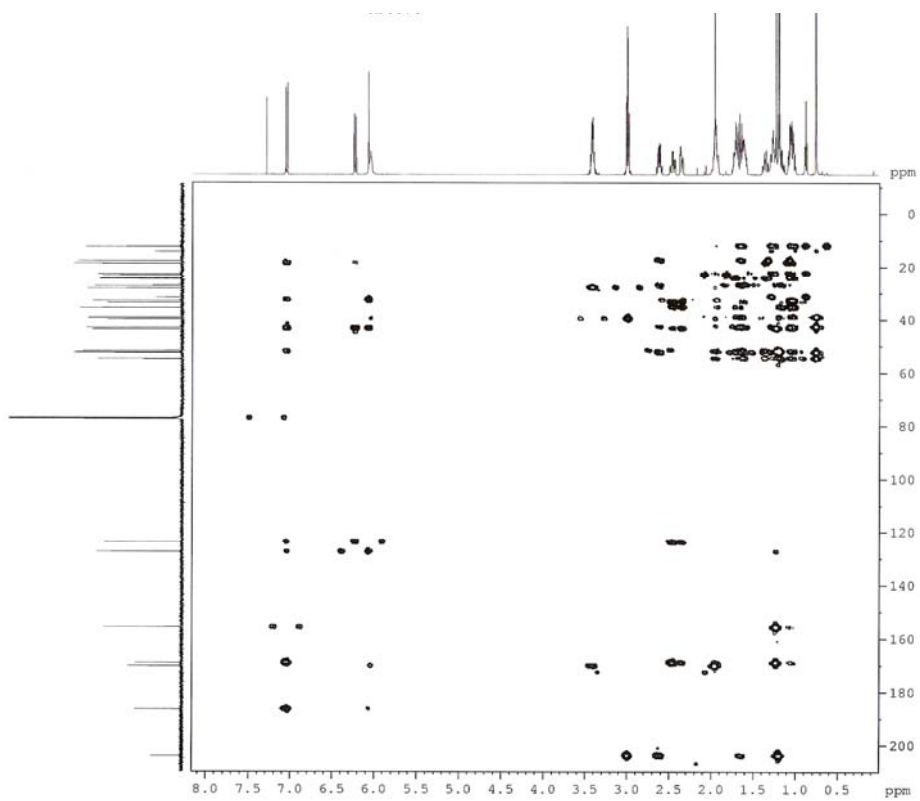
RMN de ^{13}C (125 MHz) del paratioesteroide A (**63**) en CD_3Cl .



^1H ^1H COSY (500 MHz) del paratioesteroide A (**63**) en CD_3Cl .

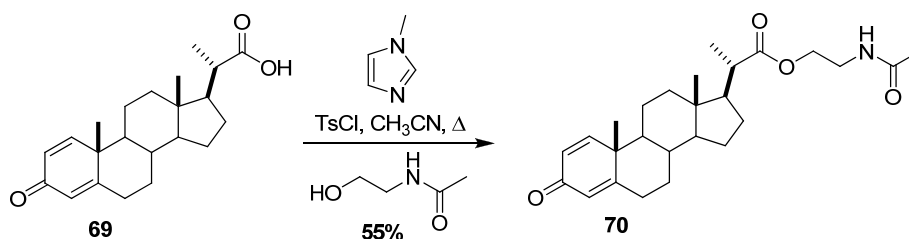


HSQC (500 MHz) del paratioesteroide A (**63**) en CD₃Cl.



HMBC (500 MHz) del paratioesteroide A (**63**) en CD₃Cl.

5.5. Síntesis de análogo 70



Sobre una disolución del (20*S*)-ácido 3-oxopregna-1,4-dien-20-oico (**69**) (50 mg, 0.15 mmol) y *N*-metilimidazol (35 μL , 0.44 mmol) en CH_3CN (3 mL) se añadió TsCl (36 mg, 0.18 mmol) disuelto en CH_3CN (3 mL) y se dejó refluendo a 85°C durante 1 h. A continuación se añadió sobre la mezcla *N*-acetiletanolamina (19 μL , 0.14 mmol) y se dejó a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 24 min y fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 7:3) obteniéndose 27 mg del análogo **70**, semisólido blanco, 55%.

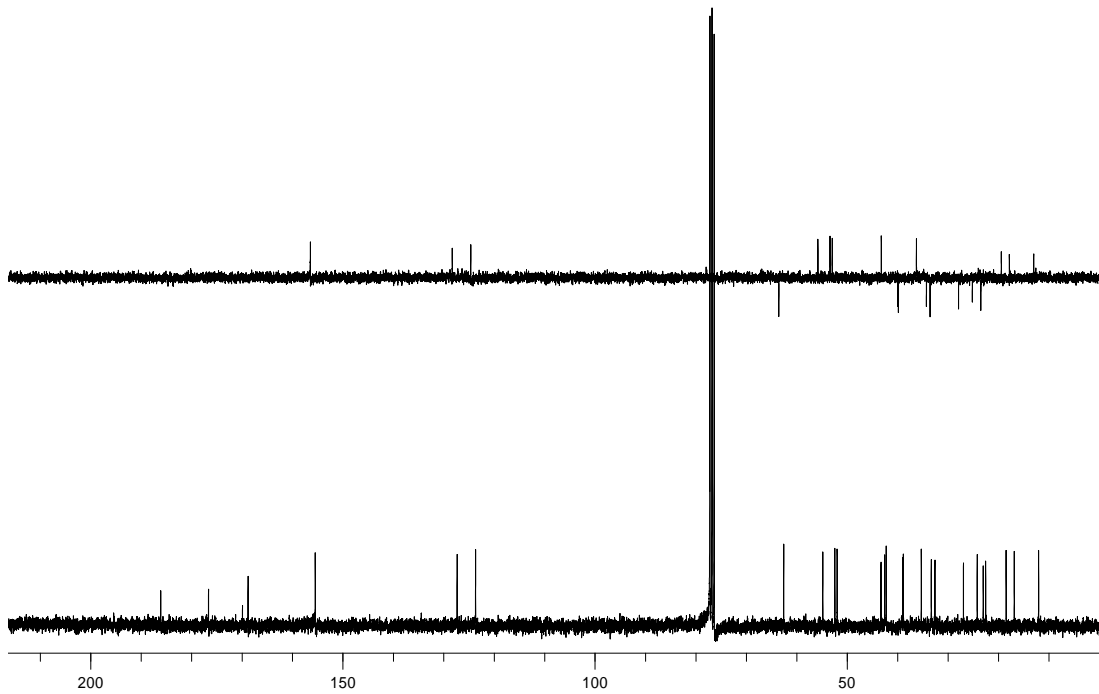
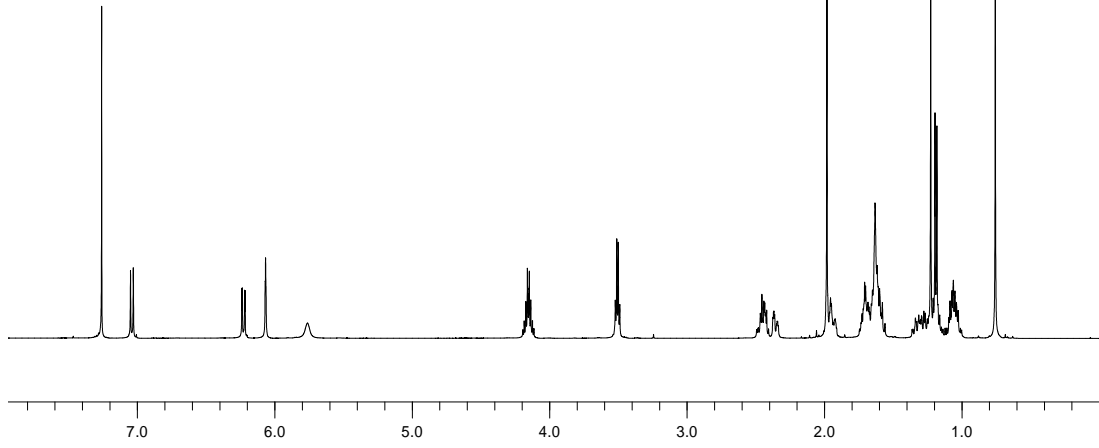
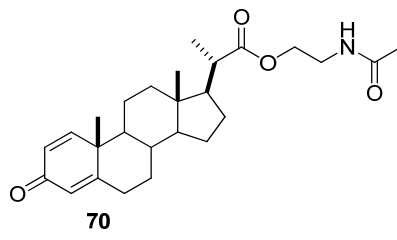
RMN-¹H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.05 (H1, 1H, d, $J = 10.1$ Hz); 6.23 (H2, 1H, dd, $J = 10.1, 1.9$ Hz); 6.07 (H4, 1H, d, $J = 1.9$ Hz); 5.76 (NH, 1H, sa); 4.16 (H23, 2H, m); 3.51 (H24, 2H, m); 1.99 (H26, 3H, s); 1.24 (H19, 3H, s); 1.20 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.77 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 185.9 (C3, s); 176.4 (C22, s); 169.7 (C25, s); 168.6 (C5, s); 155.2 (C1, d); 127.1 (C2, d); 123.4 (C4, d); 62.4 (C23, t); 54.6 (C14, d); 52.2 (C17, d); 51.7 (C9, d); 43.0 (C13, s); 42.3 (C20, d); 42.0 (C10, s); 38.8 (C12, t); 38.7 (C24, t); 35.0 (C8, d); 33.1 (C7, t); 32.4 (C6, t); 26.7 (C16, t); 24.0 (C15, t); 22.8 (C26, q); 22.3 (C11, t); 18.2 (C19, q); 16.6 (C21, q); 11.8 (C18, q).

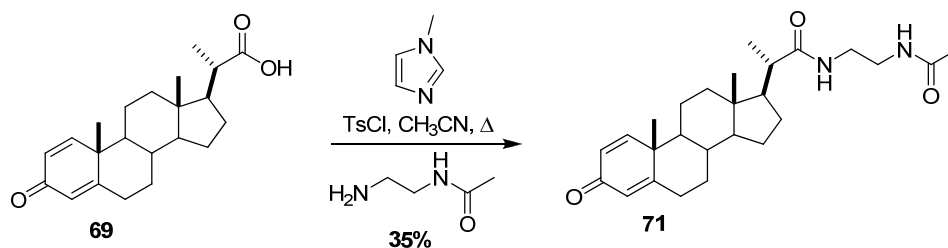
LREIMS (70 eV, m/z %): 427 (M^+ , 28); 86 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 428.2811 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (calcd para $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{NO}_4$, 428.2795).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = -32.6° [$c = 0.02$, CH_2Cl_2].



5.6. Síntesis de análogo 71



Sobre una disolución del (20*S*)-ácido 3-oxopregna-1,4-dien-20-oico (**69**) (50 mg, 0.15 mmol) y *N*-metilimidazol (35 μ L, 0.44 mmol) en CH₃CN (3 mL) se añadió TsCl (36 mg, 0.18 mmol) disuelto en CH₃CN (3 mL) y se dejó reaccionando a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió sobre la mezcla *N*-(2-aminoetil)acetamina (18 μ L, 0.14 mmol) y se dejó a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 14 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 15 mg del análogo **71**, semisólido amarillo, 35%.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.05 (H1, 1H, d, J = 10.1 Hz); 6.38 (NH, 1H, sa); 6.23 (H2, 1H, dd, J = 10.1, 1.9 Hz); 6.06 (H4, 1H, d, J = 1.9 Hz); 3.37 (H23, H24, 4H, m); 1.97 (H26, 3H, s); 1.23 (H19, 3H, s); 1.16 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 0.75 (H18, 3H, s).

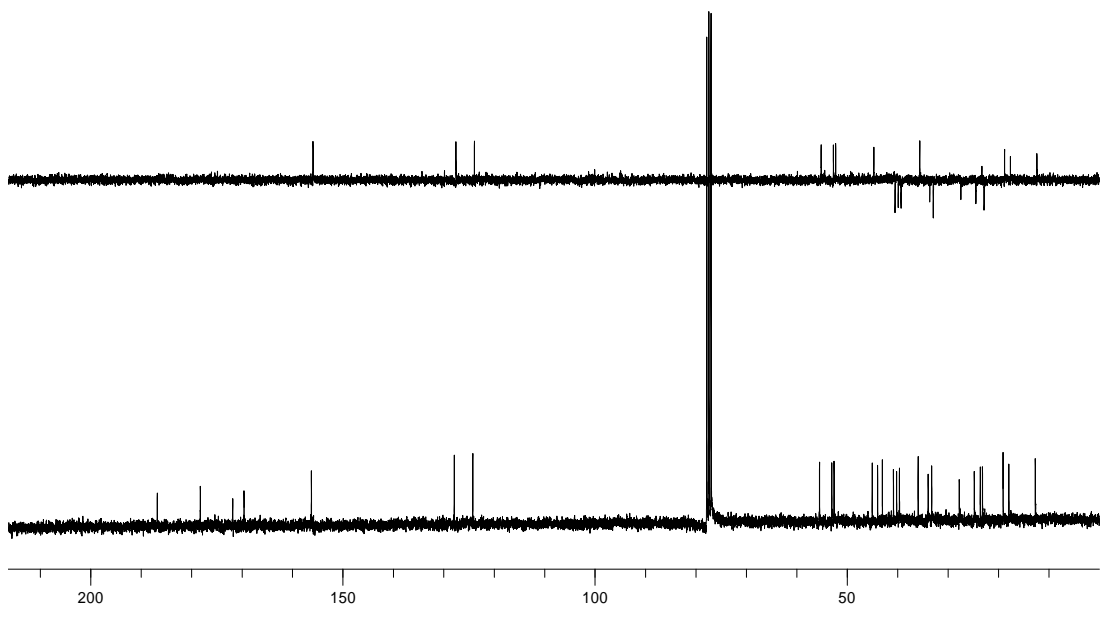
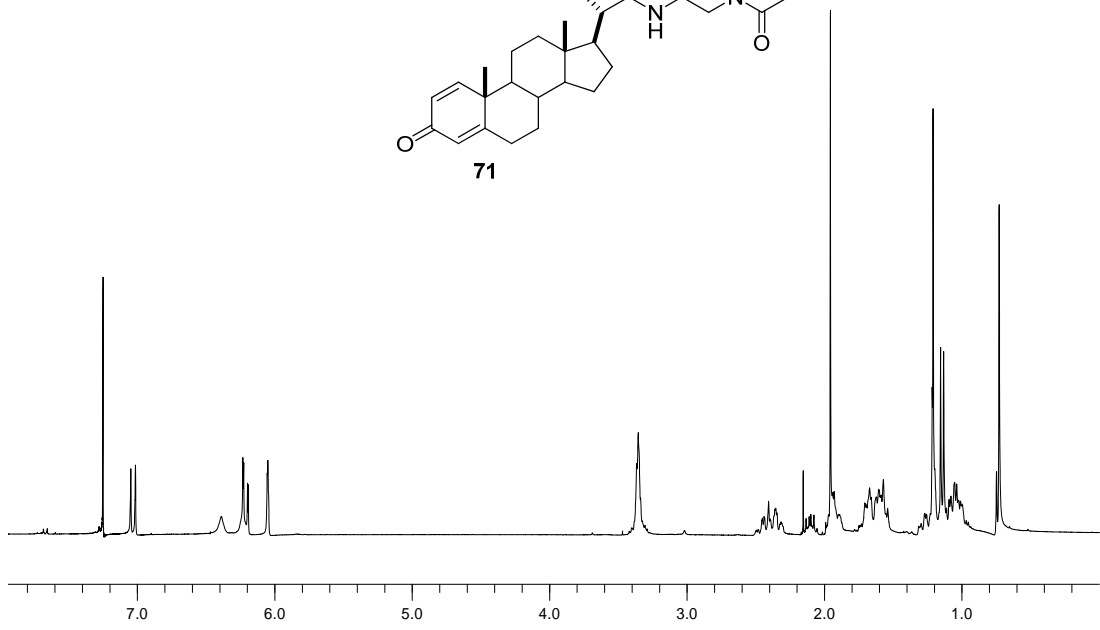
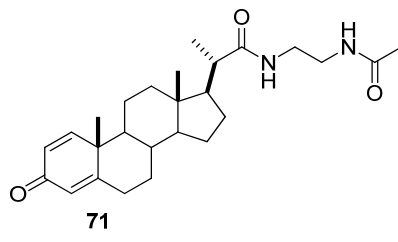
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 186.4 (C3, s); 177.8 (C22, s); 171.4 (C25, s); 169.2 (C5, s); 155.8 (C1, d); 127.5 (C2, d); 123.8 (C4, d); 55.1 (C14, d); 52.6 (C17, d); 52.2 (C9, d); 44.6 (C13, s); 43.5 (C20, d); 42.6 (C10, s); 40.4 (C12, t); 39.8 (C23, t); 39.2 (C24, t); 35.5 (C8, d); 33.5 (C7, t); 32.8 (C6, t); 27.4 (C16, t); 24.4 (C15, t); 23.2 (C26, q); 22.7 (C11, t); 18.6 (C19, q); 17.7 (C21, q); 12.2 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 426 (M⁺, 78); 158 (100).

(+)-**LRESIMS:** m/z 449 ([M + Na]⁺, 10); 427 ([M + H]⁺, 100).

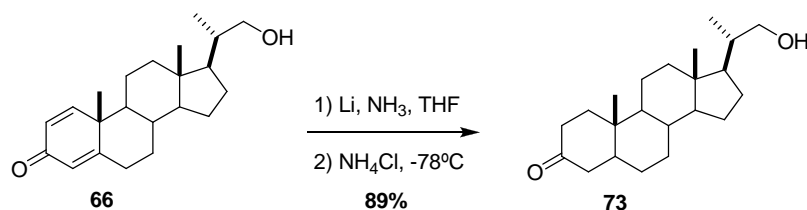
(+)-**HRESIMS:** m/z 427.2949 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₃₉N₂O₃, 427.2955).

$[\alpha]_D^{25}$ = -126.0° [c = 0.01, CH₂Cl₂].



6. Síntesis de paratioesteroide B y análogos

6.1. Síntesis de (5 α ,20S)-20-metil-3-oxo-pregnan-21-ol (73)



Se disolvió litio (0.18 g, 3.5 cm, 4 equiv.) en THF (20 mL), que contenía un exceso de amoníaco líquido anhidro a -78°C originando una disolución que presentó un color azul oscuro. A continuación, se adicionó la 20S-hidroxiometilpregna-1,4-dien-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol) disuelta en THF (5 mL) a -78°C y se dejó reaccionando a esa temperatura durante 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **7** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)]; recogíendose 0.89 g de (5 α ,20S)-20-metil-3-oxo-pregnan-21-ol (**73**), semisólido blanco; 89%.

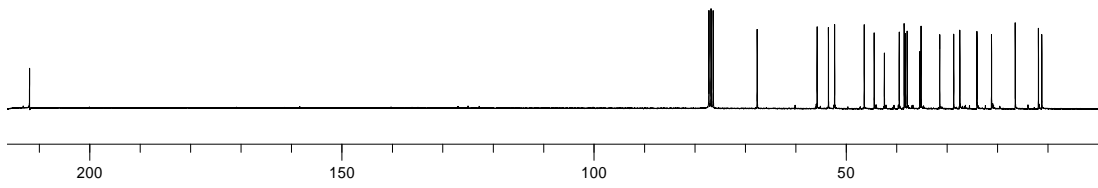
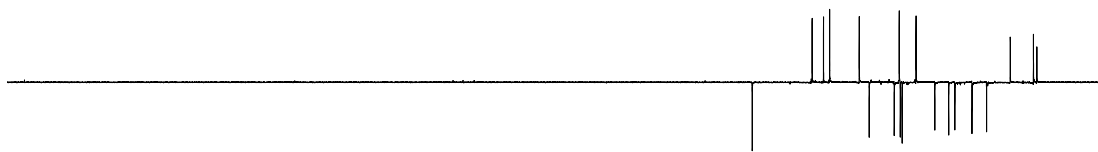
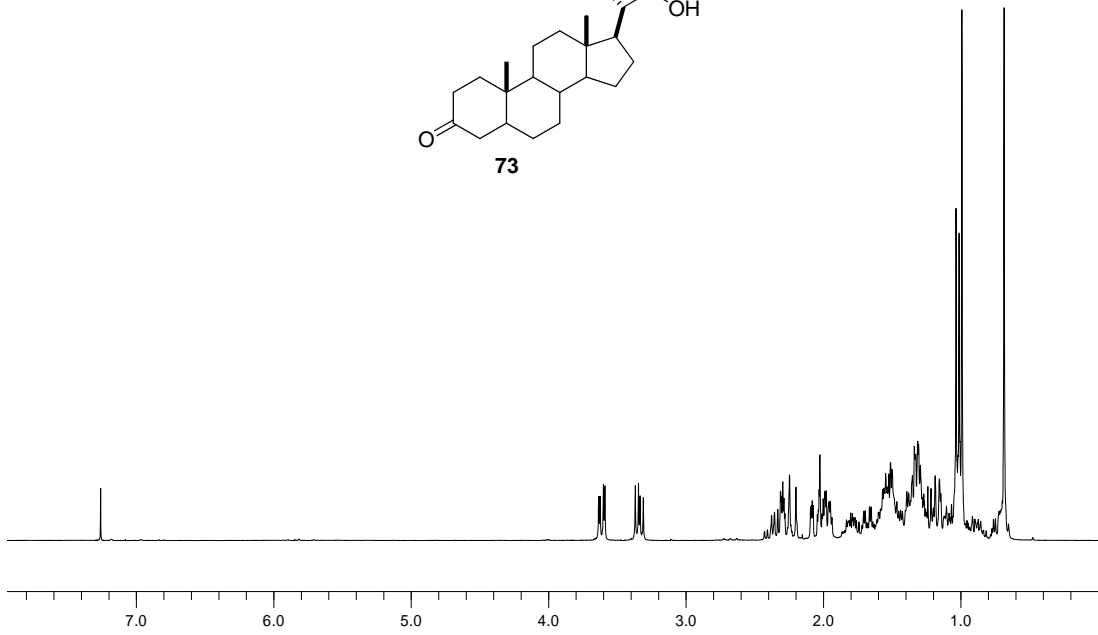
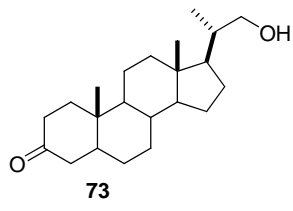
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.64-3.32 (H22, H22', 2H, m); 1.03 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 1.00 (H19, 3H, s); 0.69 (H18, 3H).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212.2 (C3, s); 67.8 (C22, t); 56.0 (C14, d); 53.7 (C17, d); 52.5; 46.6; 44.6; 42.6; 39.6; 38.7; 38.5; 38.1; 35.6; 35.4; 31.6; 28.8; 27.6; 24.2; 21.8 (C11, t); 16.4 (C21, q); 12.5 (C19, q); 11.8 (C18, q).

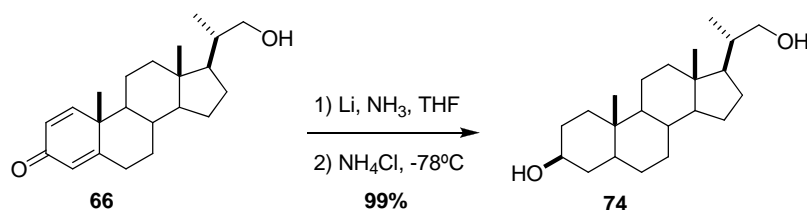
LREIMS (70eV, m/z %): 332 (M⁺, 22); 83 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 333.2803 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₂H₃₇O₂, 333.2788).

[α]_D = +4.5° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



6.2. Síntesis de (3 β ,5 α ,20*S*)-20-metilpregnan-3,21-diol (74)



Se disolvió litio (0.36 g, 8 cm, 7 equiv.) en THF (20 mL), que contenía un exceso de amoníaco líquido anhidro a -78°C originando una disolución que presentó un color azul oscuro. A continuación, se adicionó la 20*S*-hidroximetilpregna-1,4-dien-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol) disuelta en THF (5 mL) a -78°C y se dejó reaccionando a esa temperatura durante 3 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **7** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)]; recogíendose 0.99 g de (3 β ,5 α ,20*S*)-20-metilpregnan-3,21-diol (**74**), semisólido blanco; 99%.

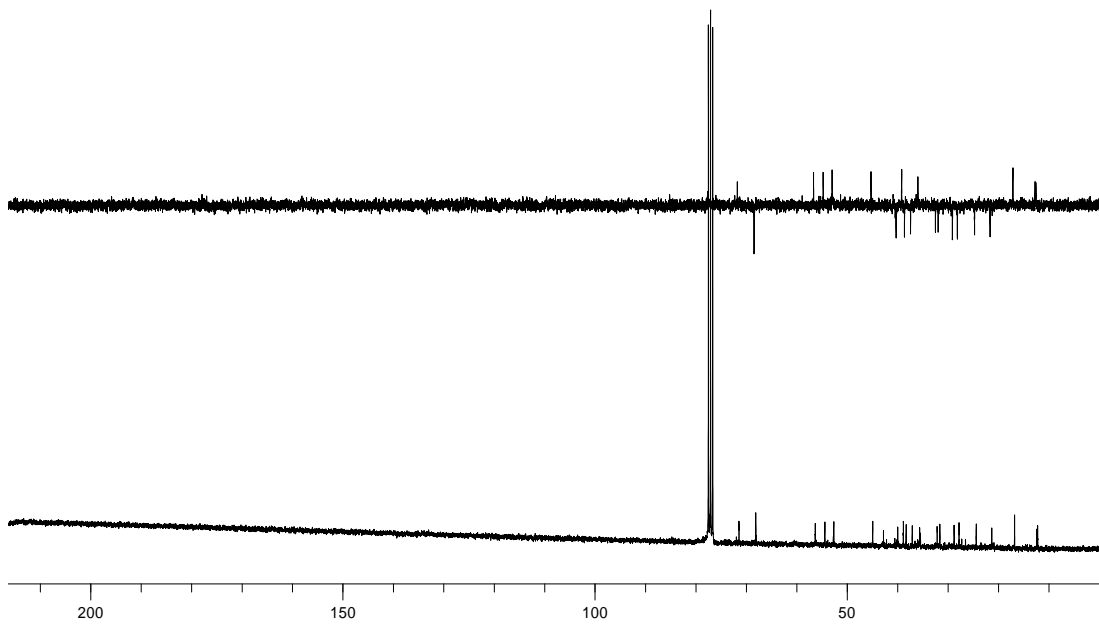
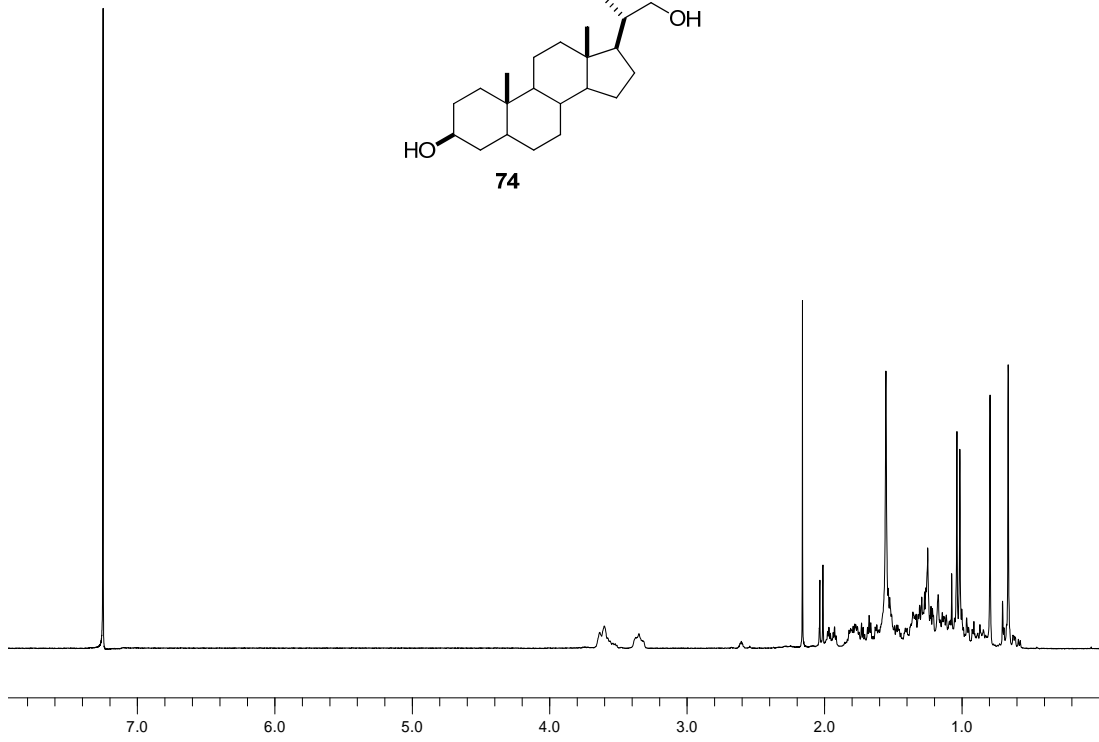
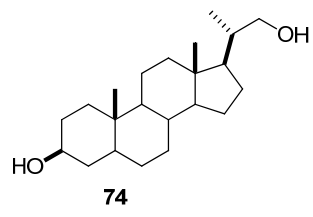
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.75-3.33 (H22, H22', 2H, m); 3.39–3.33 (H3 α , 1H, m); 1.26 (H19, 3H, s); 1.04 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 0.68 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 70.9 (C3, d); 67.6 (C22, t); 55.8 (C14, d); 53.9 (C17, d); 52.1; 44.4; 42.2; 39.4; 38.3; 37.7; 36.5; 35.1; 35.0; 31.6; 31.1; 28.2; 27.3; 23.8; 20.8 (C11, t); 16.2 (C21, q); 11.8 (C19, q); 11.8 (C18, q).

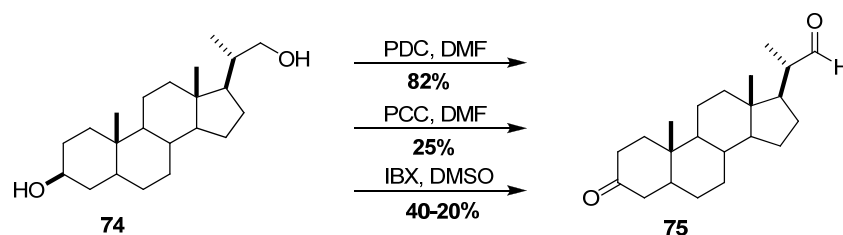
LREIMS (70eV, m/z %): 334 (M⁺, 78); 84 (100).

(-)-HRESIMS: m/z 333.2894 [M - H]⁺ (calcd. para C₂₂H₃₇O₂, 333.2788).

[α]_D = +6.6° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



6.3. Síntesis de (5 α ,20*S*)-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (75)



Procedimiento A: Sobre una disolución de (3 β ,5 α ,20*S*)-20-metilpregnan-3,21-diol (**74**) (0.5 g, 1.5 mmol), en DMF (10 mL) se añadió gota a gota otra disolución de PDC (2.0 g, 5.0 mmol) en DMF (10 mL) y se dejó agitando a t.a. durante 5 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogién dose 0.4 g de (5 α ,20*S*)-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (**75**), semisólido blanco, 82%.

Procedimiento B: Sobre una disolución de (3 β ,5 α ,20*S*)-20-metilpregnan-3,21-diol (**74**) (0.5 g, 1.5 mmol), en DMF (10 mL) se añadió gota a gota otra disolución de PCC (2.0 g, 5.0 mmol) en DMF (10 mL) y se dejó agitando a t.a. durante 5 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogién dose 0.12 g de (5 α ,20*S*)-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (**75**), semisólido blanco, 25%.

Procedimiento C: Sobre una disolución de (3 β ,5 α ,20*S*)-20-metilpregnan-3,21-diol (**74**) (0.1 g, 1.5 mmol), en DMSO (10 mL) se añadió IBX y se dejó reaccionando (ver Tabla 10). Se filtró el residuo sólido, se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió con EtOAc (20 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃, NaCl, agua y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogién dose 40 mg de (5 α ,20*S*)-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (**75**), semisólido blanco, 40-20%.

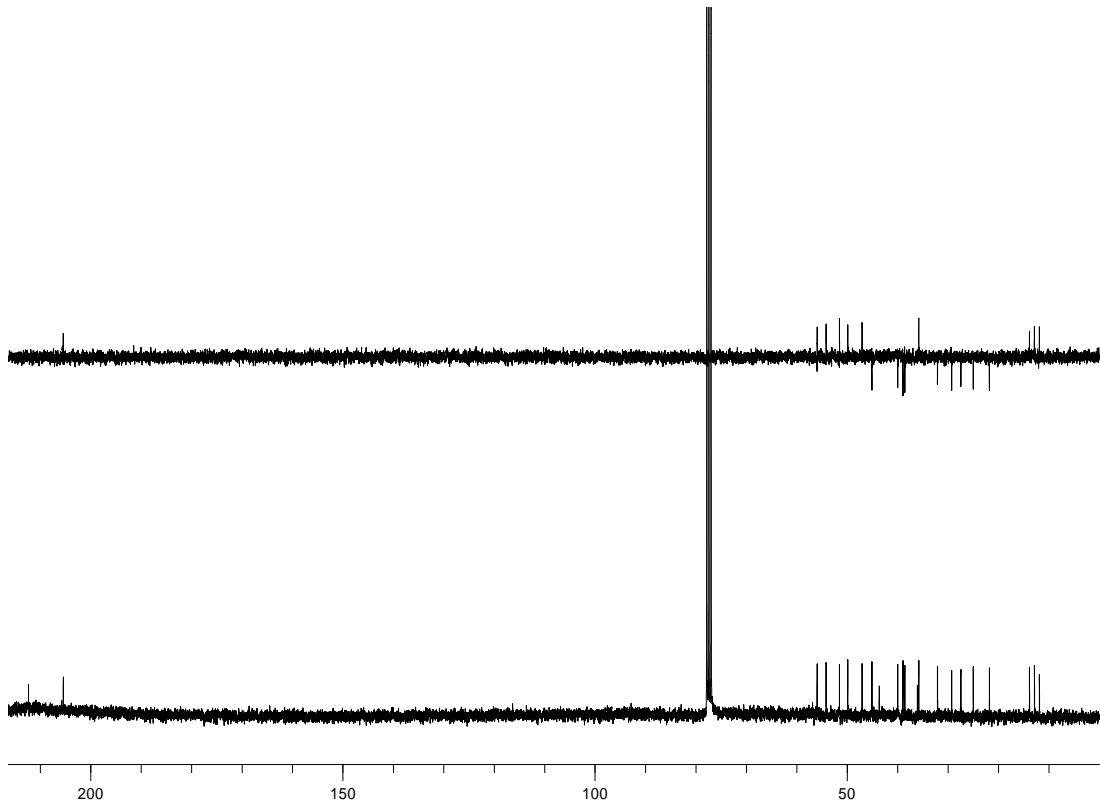
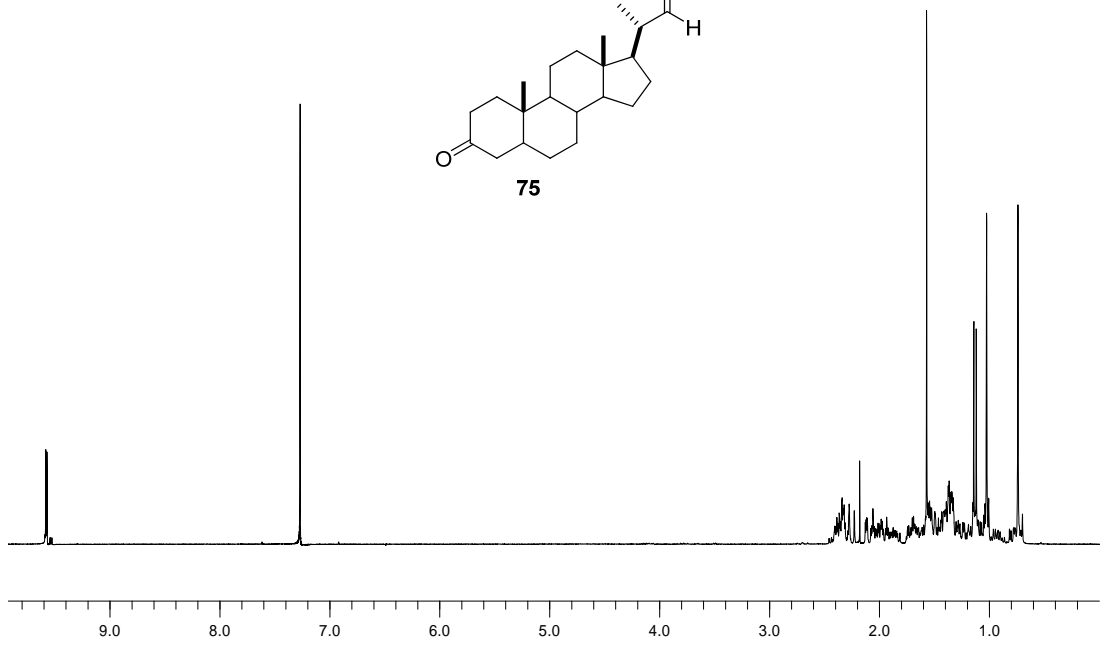
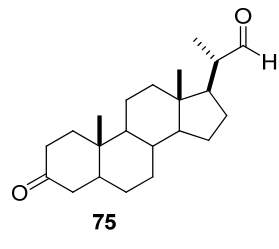
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.57 (H22, 1H, d, $J = 3.3$ Hz); 1.13 (H21, 3H, d, $J = 6.6$ Hz); 1.02 (H19, 3H, s); 0.74 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211.5 (C3, s); 204.6 (C22, d); 55.1 (C14, d); 53.4 (C17, d); 50.6; 49.0; 46.2; 44.2; 42.7; 39.1; 38.0; 37.7; 35.2; 34.9; 31.2; 28.4; 26.6; 24.1; 20.9 (C11, t); 13.0 (C21, q); 12.0 (C19, q); 11.0 (C18, q).

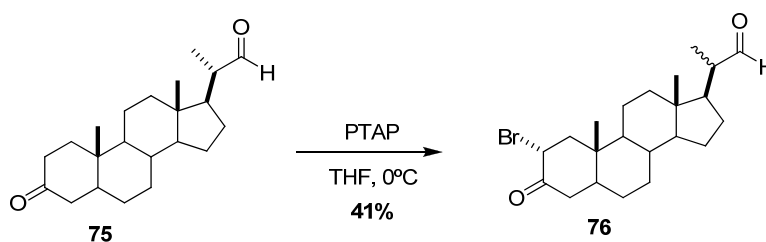
LREIMS (70eV, m/z %): 330 (M⁺, 8); 83 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 331.2643 [M + H]⁺ (calcd para C₂₂H₃₅O₂, 331.2631).

$[\alpha]_D = +20.8^\circ$ [c = 0.1, CH₂Cl₂].



6.4. Síntesis de (5 α ,20*R/S*)-2 α -bromo-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (**76**)



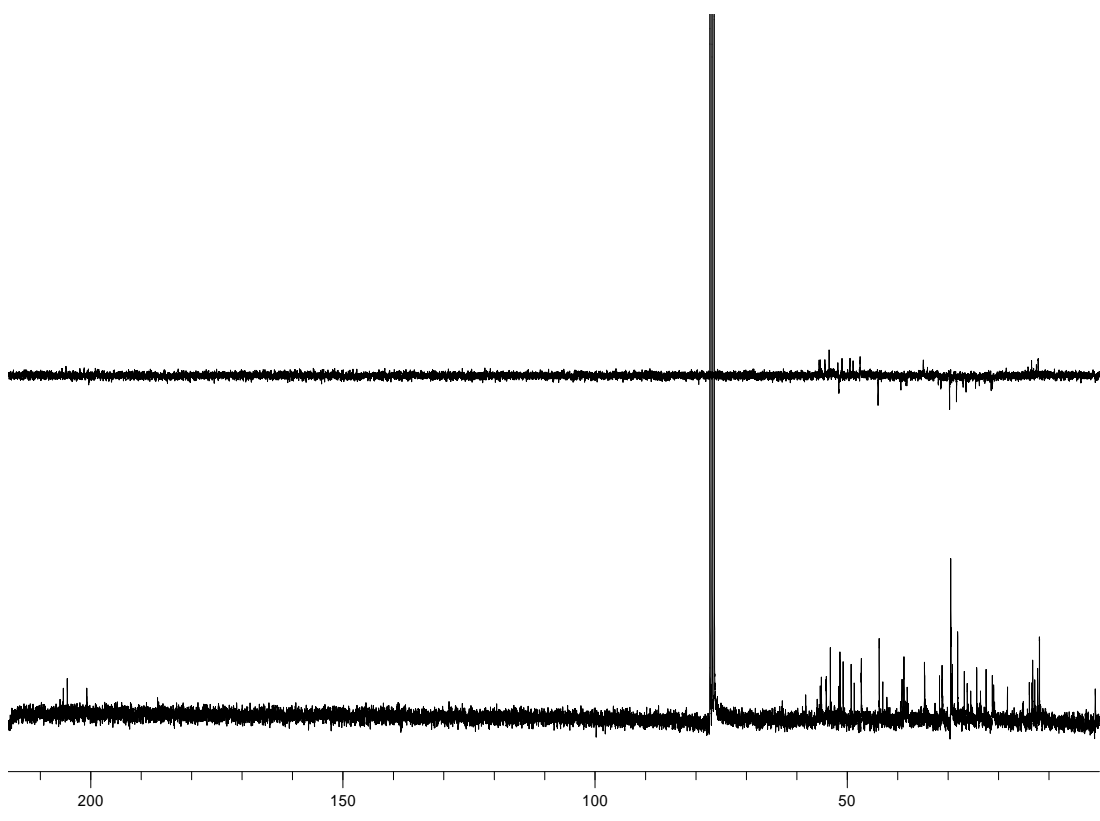
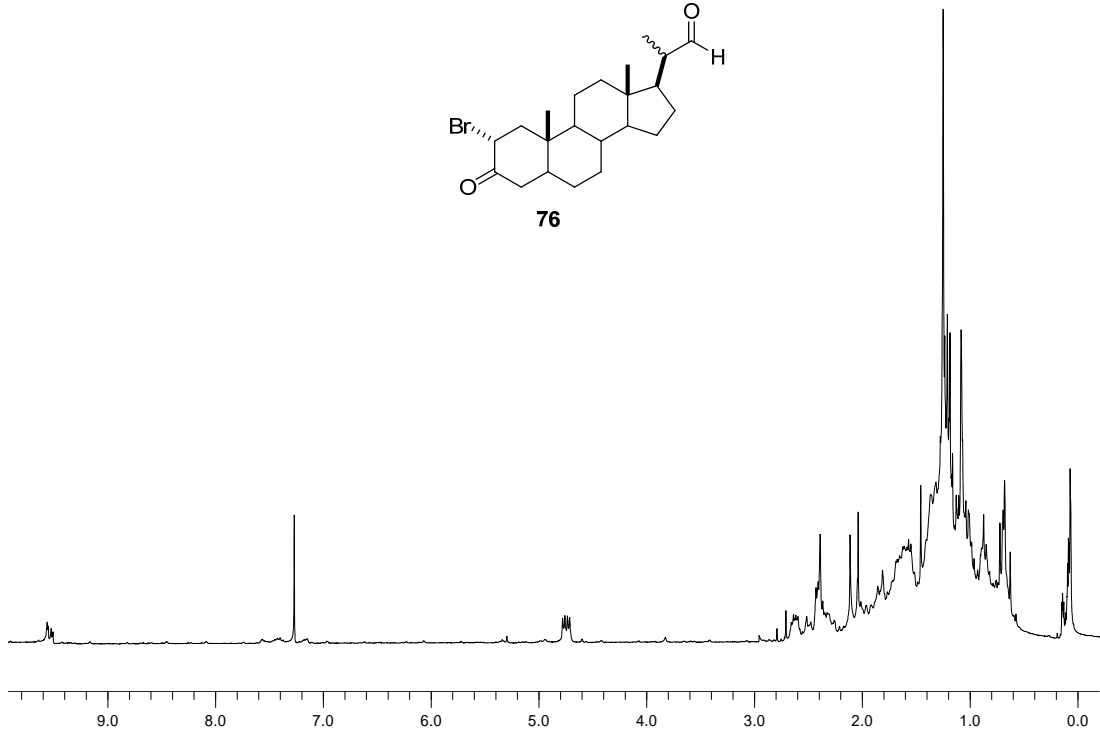
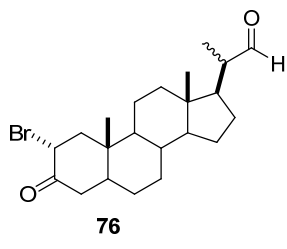
A una disolución de PTAP (25 mg, 0.42 mmol) a 0°C disuelta en THF (3 mL) se le añadió una disolución de (5 α ,20*S*)-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (**75**) (30 mg, 0.6 mmol) en THF (4 mL). Se dejó reaccionando a 0°C durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se añadió una disolución saturada de NaHCO₃ (20 mL), para filtrarse a continuación. El disolvente se eliminó a presión reducida obteniéndose 11 mg del (5 α ,20*R/S*)-2 α -bromo-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (**76**), semisólido, 41%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.56/9.52 (H22, 1H, d, $J = 3.2$ Hz); 4.74 (H2 β , 2H, dd, $J = 13.2, 6.3$ Hz); 2.66-2.58 (H1b, 1H, m); 1.12/1.03 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 1.09/1.08 (H19, 3H, s); 0.73/0.70 (H18, 3H, s).

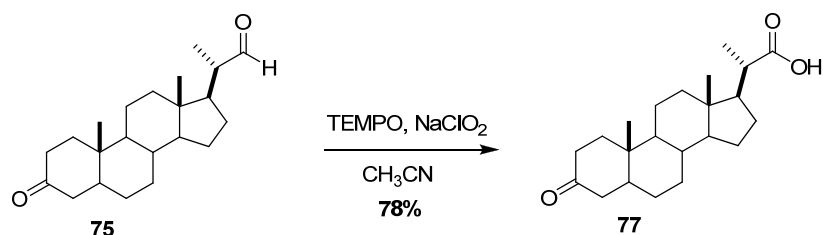
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 204.5 (C3, s); 200.6 (C22, d); 55.1 (C14, d); 54.8 (C17, d); 51.2; 48.3; 46.2; 42.7; 39.1; 38.0; 35.2; 34.9; 31.2; 28.4; 25.5; 24.1; 22.2; 21.0; 18.0 (C11, t); 13.3 (C21, q); 12.0 (C19, q); 11.6 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 410/408 (M⁺, 8); 84 (100).

$[\alpha]_D$ = +60.8° [$c = 0.1, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



6.5. Síntesis de (5 α ,20S)-ácido 3-oxopregnan-20-oico (77)



El (5 α ,20S)-3-oxopregnano-20-carboxaldehído (**75**) (0.18 g, 0.54 mmol) se disolvió en 10 mL de una mezcla de CH₃CN y disolución tampón a pH 6.5 en relación (1.3:1). A continuación, se añadieron TEMPO (0.13 g, 0.7 mmol), NaClO₂ (0.3 g, 0.12 mmol) y NaClO (2 mL) y la mezcla se dejó reaccionando a t.a durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **69** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogándose 0.15 g de (5 α ,20S)-ácido 3-oxopregnan-20-oico (**77**), semisólido blanco, 78%.

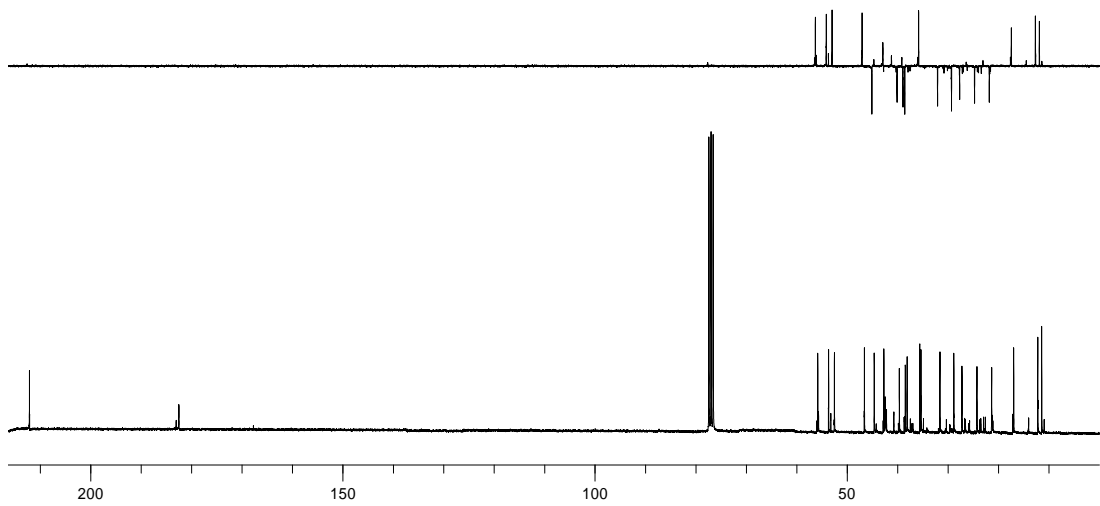
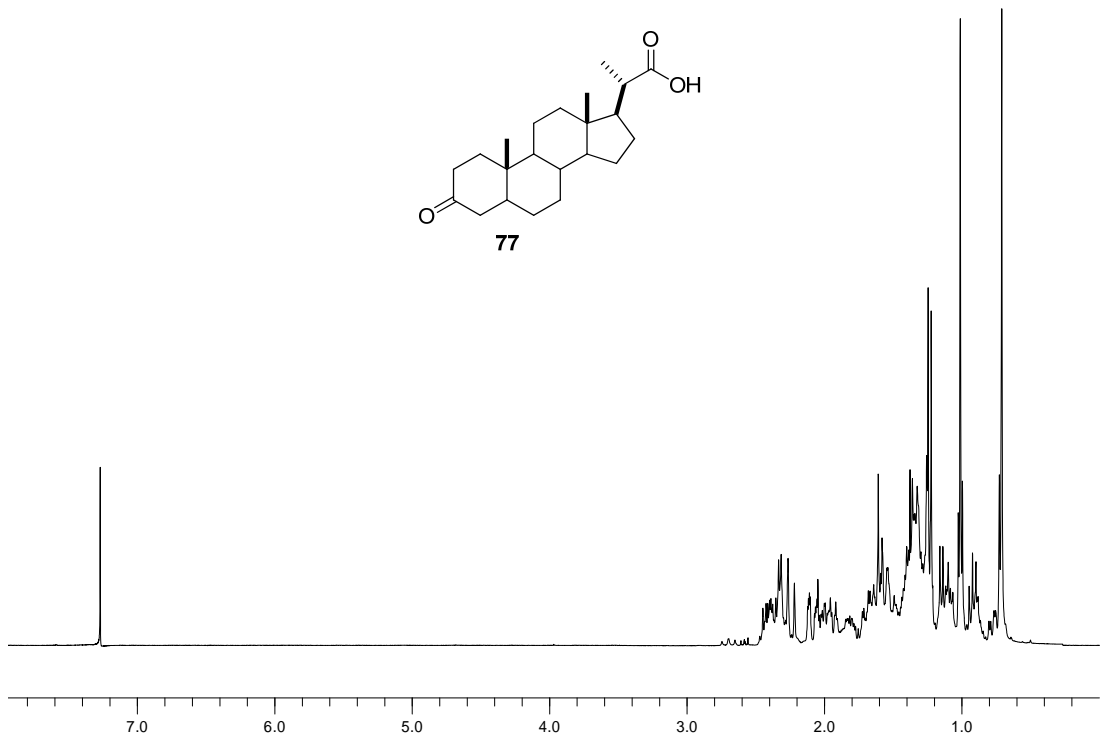
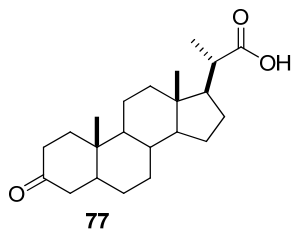
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.23 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 1.01 (H19, 3H, s); 0.71 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212.1 (C3, s); 181.9 (C22, s); 55.8 (C14, d); 53.6 (C17, d); 52.5; 46.6; 44.6; 43.1; 43.0; 39.6; 38.4; 38.1; 35.4; 34.8; 31.6; 28.8; 27.2; 24.2; 21.3 (C11, t); 17.0 (C21, q); 12.2 (C19, q); 11.4 (C18, q).

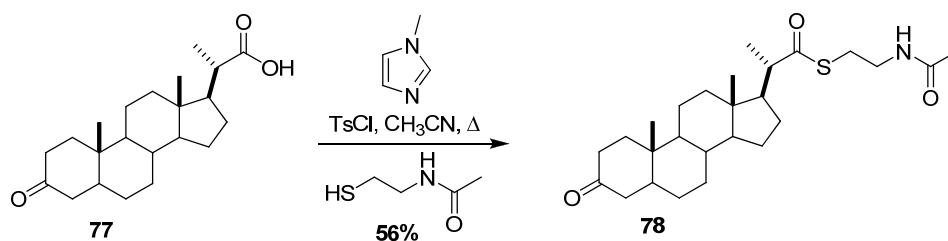
LREIMS (70eV, m/z %): 347 ([M + H]⁺, 14); 149 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 347.2589 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₂H₃₅O₃, 337.2580).

$[\alpha]_D$ = +14.2° [c = 0.05, CH₂Cl₂].



6.6. Síntesis de análogo 78



Sobre una disolución de (5 α ,20*S*)-ácido 3-oxopregnan-20-oico (**77**) (50 mg, 0.15 mmol) y *N*-metilimidazol (35 μ L, 0.44 mmol) en CH₃CN (3 mL) se añadió TsCl (36 mg, 0.18 mmol) disuelto en CH₃CN (3 mL) y se dejó reaccionando a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió sobre la mezcla *N*-acetilcisteamina (16 μ L, 0.14 mmol) dejándose reaccionar a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 64 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 28 mg del análogo **78**, semisólido blanco, 56%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.84 (NH, 1H, sa); 3.43 (H24, 2H, m); 2.98 (H23, 2H, m); 1.96 (H26, 3H, s); 1.21 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 1.01 (H19, 3H, s); 0.70 (H18, 3H, s).

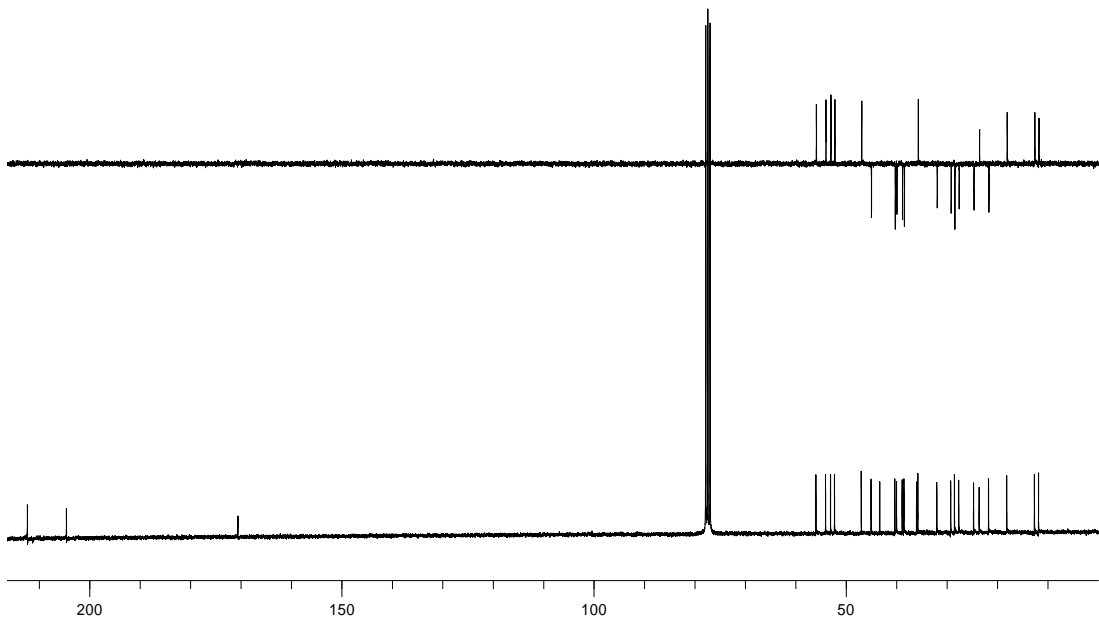
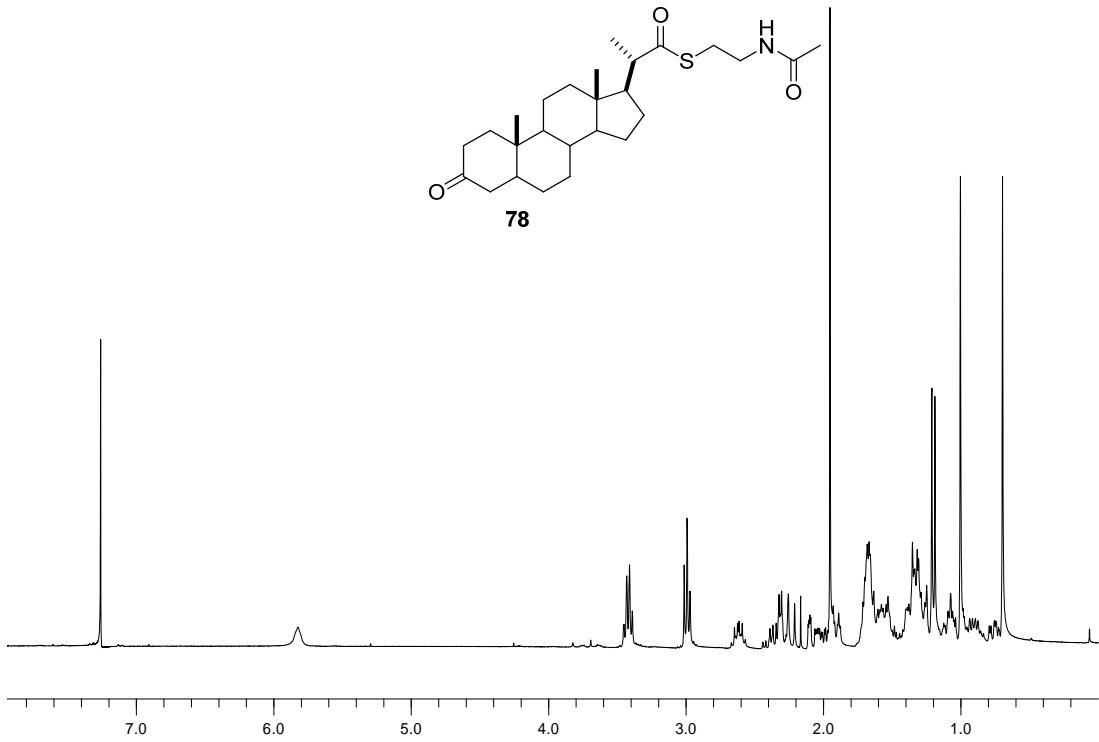
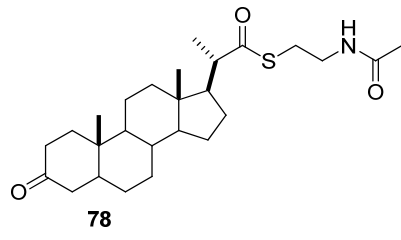
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211.9 (C3, s); 204.2 (C22, s); 170.2 (C25, s); 55.5 (C14, d); 53.6 (C17, d); 52.6 (C20, d); 51.8; 46.6; 44.6; 42.9; 39.9; 39.5 (C24, t); 38.4; 38.1; 35.6; 35.3; 31.6; 28.8; 28.3 (C23, t); 27.2; 24.3; 23.2 (C26, q); 21.3 (C11, t); 17.7 (C21, q); 12.2 (C19, q); 11.4 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 447 (M^+ , 6); 301 (100).

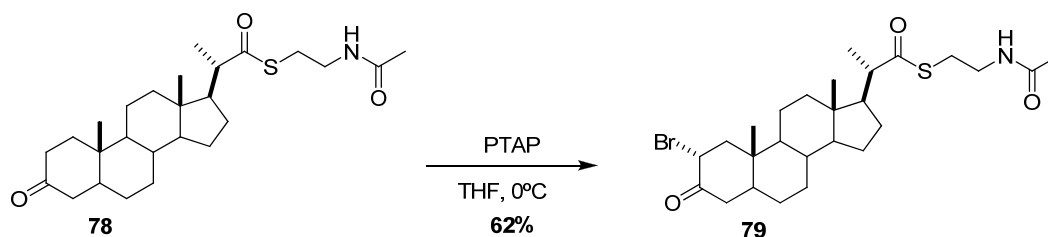
(+)-LRFABMS m/z (%): 448 ($[M + H]^+$, 14); 154 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 448.2898 $[M + H]^+$ (calcd. para C₂₆H₄₂NO₃S, 448.2879).

$[\alpha]_D = +138.8^\circ$ [$c = 0.1$, CH₂Cl₂].



6.7. Síntesis de análogo 79



Sobre una disolución de PTAP (25 mg, 0.65 mmol) a 0°C disuelta en THF (3 mL) se añadió, gota a gota, una disolución del tioesteroide **78** (30 mg, 0.6 mmol) en THF (4 mL). Se dejó reaccionando a 0°C durante 4 h. Transcurrido ese tiempo se añadió una disolución saturada de NaHCO₃ (20 mL), filtrándose a continuación. El disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 74 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 21 mg del análogo **79**, semisólido blanco, 62%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.78 (NH, 1H, sa); 4.73 (H2β, 1H, dd, *J* = 13.1, 6.3 Hz); 3.43 (H24, 2H, m); 2.99 (H23, 2H, m); 2.65 (H4a, 1H, m); 2.42 (H1a, 1H, m); 1.96 (H26, 3H, s); 1.21 (H21, 3H, d, *J* = 6.8 Hz); 1.09 (H19, 3H, s); 0.71 (H18, 3H, s).

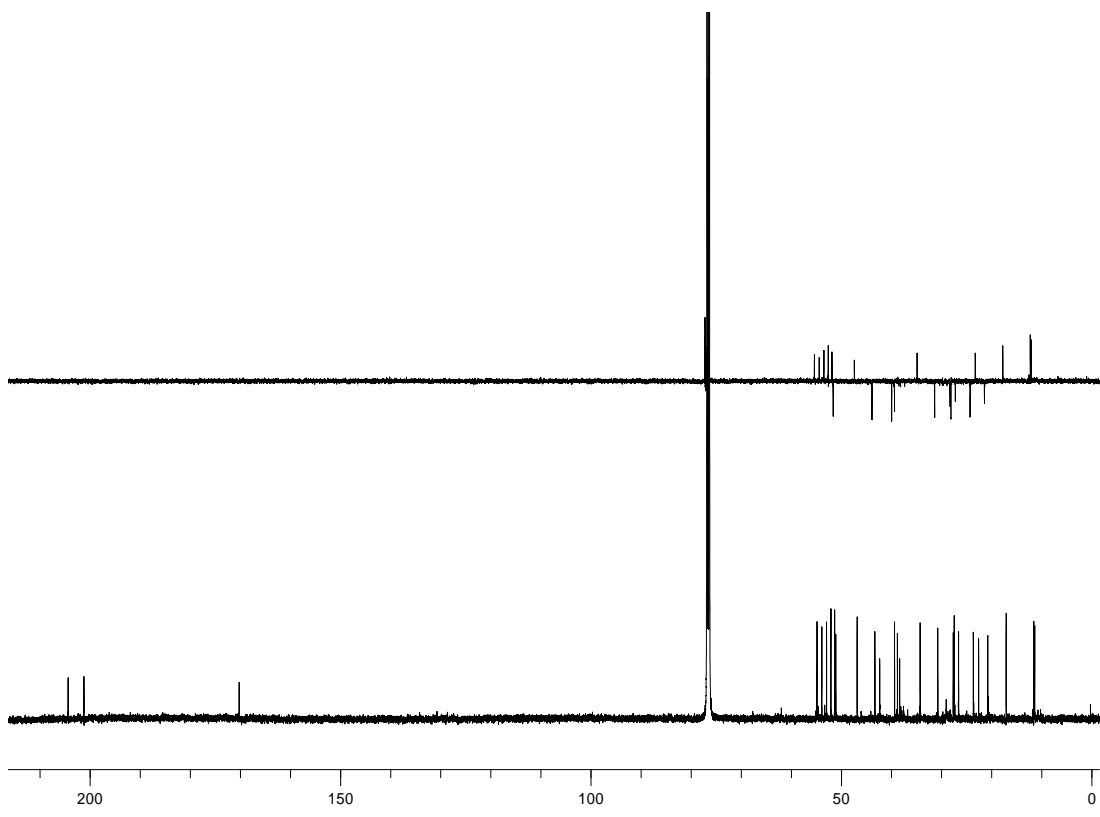
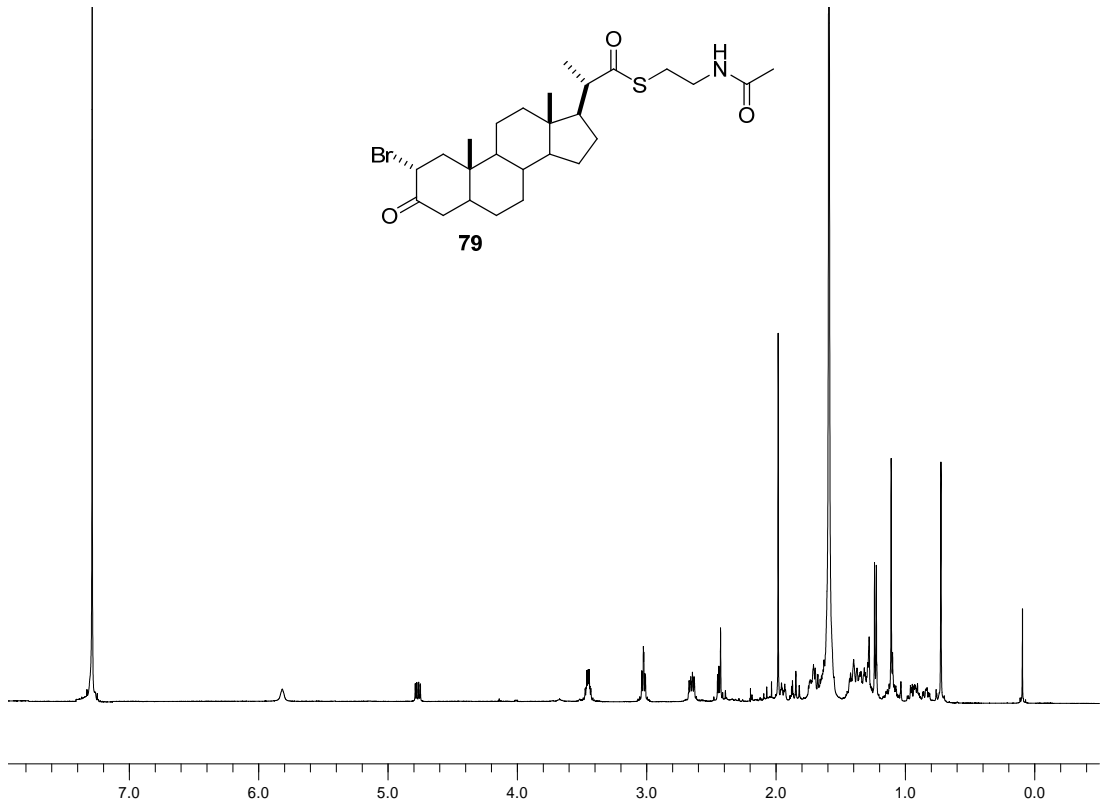
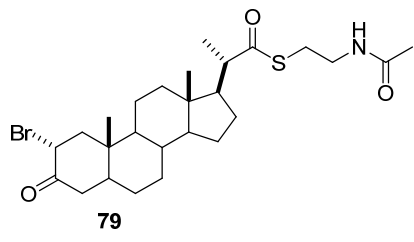
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 204.2 (C22, s); 201.1 (C3, s); 170.2 (C25, s); 55.6 (C14, d); 54.4 (C17, d); 53.5 (C20, d); 52.6 (C9, d); 51.8 (C2, d); 51.6 (C12, t); 47.4 (C5, d); 43.9 (C13, s); 42.9 (C4, t); 40.0 (C1, t); 39.4 (C24, t); 39.0 (C10, s); 34.9 (C8, d); 31.4; 28.3 (C23, t); 28.1; 27.3; 24.3; 23.3 (C26, q); 21.4 (C11, t); 17.8 (C21, q); 12.3 (C19, q); 12.1 (C18, q).

LREIMS (70eV, *m/z* %): 525 (M⁺, 5); 117 (100).

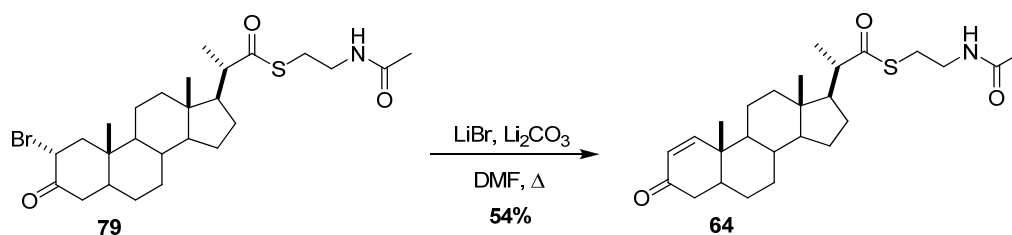
(+)-LRFABMS *m/z* (%): 526 ([M + H]⁺, 6); 154 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 526.1992 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₄₁NO₃SBr, 526.1985).

[α]_D = +190.0° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



6.8. Síntesis de paratioesteroide B (64)



A una disolución del 2 α -bromotioesteroide **79** (30 mg, 0.06 mmol) en DMF (3 mL), se añadió LiBr (34 mg, 0.34 mmol) y Li₂CO₃ (30 mg, 0.32 mmol). Se dejó reaccionando a 165°C durante 2 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y el crudo se redisolvió con EtOAc, se lavó con NaCl y agua y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 61 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 17 mg del paratioesteroide B (**64**), semisólido blanco, 54%.

64: RMN-¹H y RMN-¹³C: ver Tablas 12 y 13.

RMN-¹H (500 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 7.31 (H1, 1H, d, J = 10.2 Hz); 5.85 (H2, 1H, dd, J = 10.1, 1.0 Hz); 3.44 (H24, 2H, m); 3.01 (H23, 2H, dt, J = 6.7, 1.5 Hz); 2.65 (H20, 1H, dq, J = 10.5, 6.8 Hz); 2.43 (H4b, 1H, dd, J = 17.8, 14.2 Hz); 1.96 (H26, 3H, s); 1.22 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 1.02 (H19, 3H, s); 0.73 (H18, 3H, s).

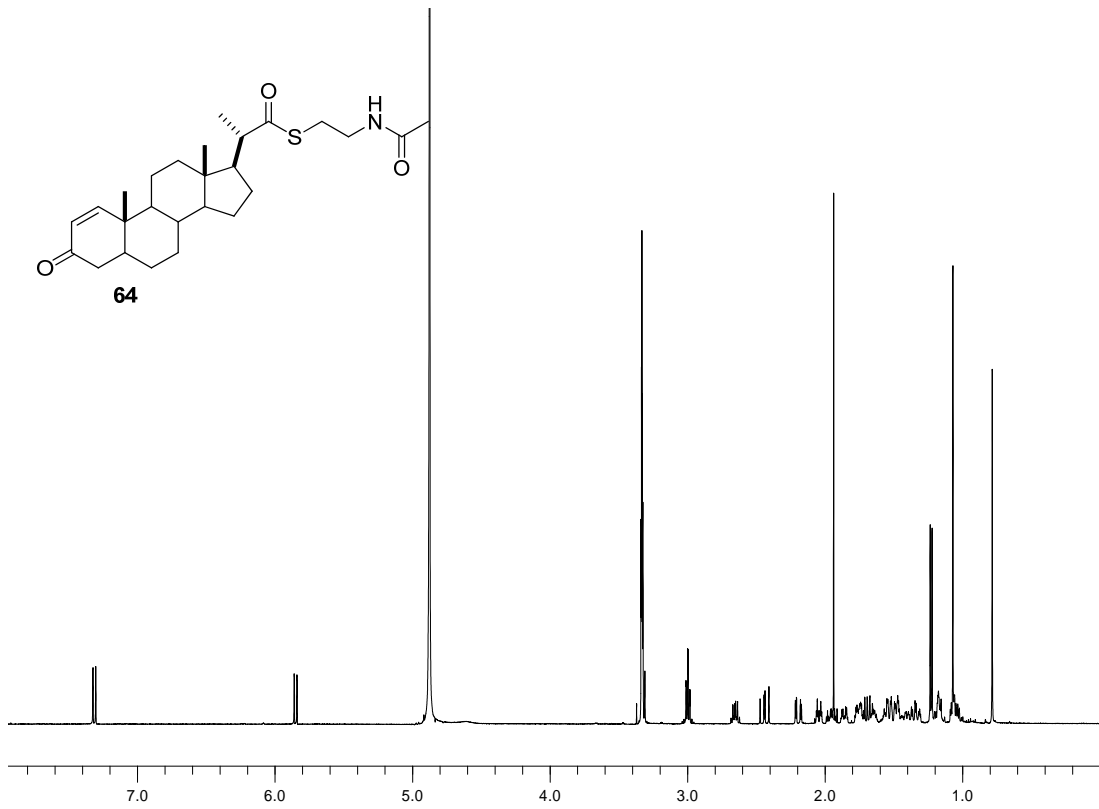
RMN-¹³C (125 MHz, CD₃Cl) δ (ppm): 204.2 (C22, s); 200.2 (C3, s); 170.2 (C25, s); 158.3 (C1, d); 127.5 (C2, d); 55.6 (C14, d); 52.6 (C17, d); 51.8 (C20, d); 49.8 (C9, d); 44.2 (C5, d); 43.0 (C13, s); 40.9 (C12, t); 40.0 (C4, t); 39.5 (C24, t); 38.9 (C10, s); 35.6 (C8, d); 31.2 (C7, t); 28.1 (C23, t); 27.6 (C16, t); 27.5 (C6, t); 24.2 (C15, t); 23.3 (C26, q); 21.2 (C11, t); 17.7 (C21, q); 13.0 (C19, q); 12.4 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 445 (M⁺, 8); 119 (100).

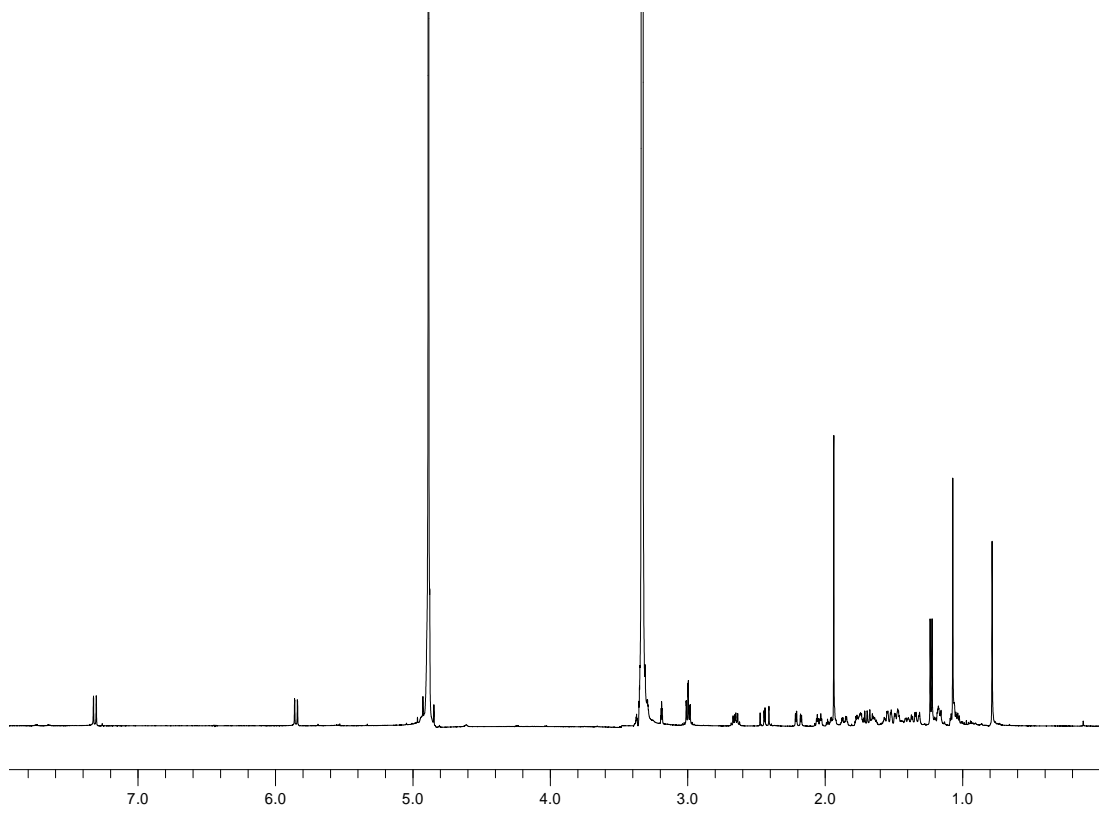
(+)-LRFABMS m/z (%): 446 ([M + H]⁺, 14); 154 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 446.2738 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₄₀NO₃S, 446.2723).

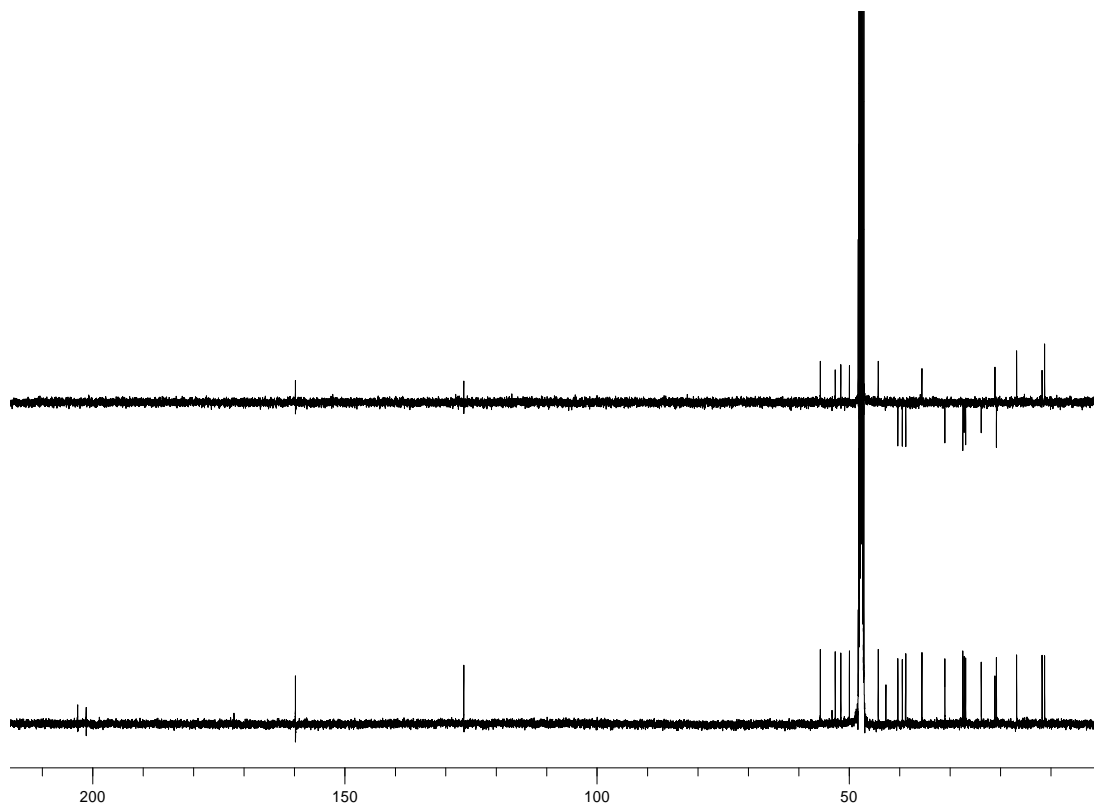
[α]_D = +70.8° [c = 0.2, MeOH].



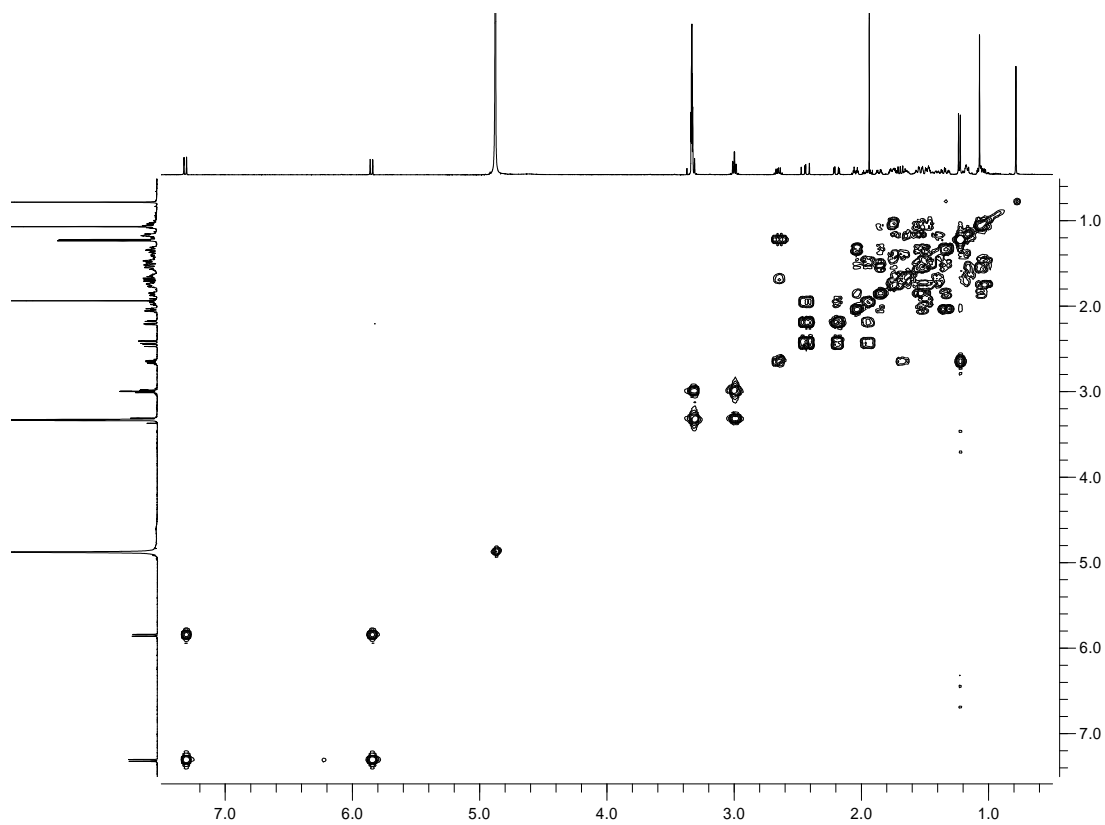
RMN de ¹H (500 MHz) del paratioesteroide B natural (**64**) en CD₃OD.



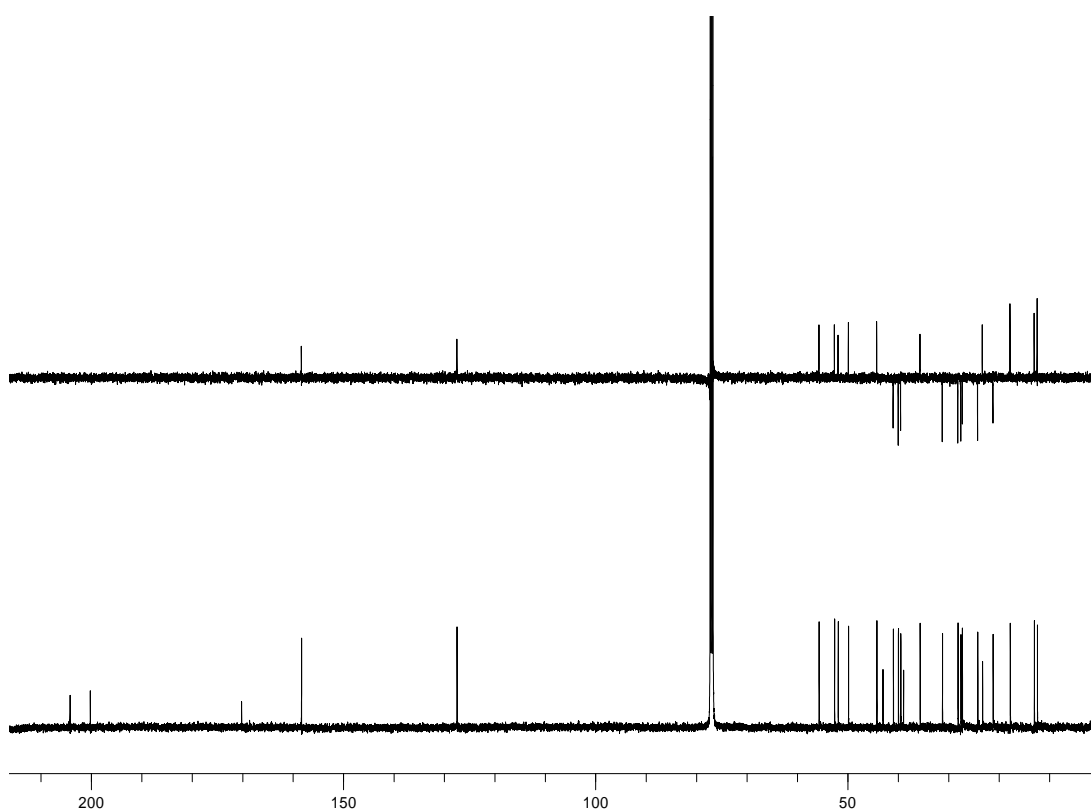
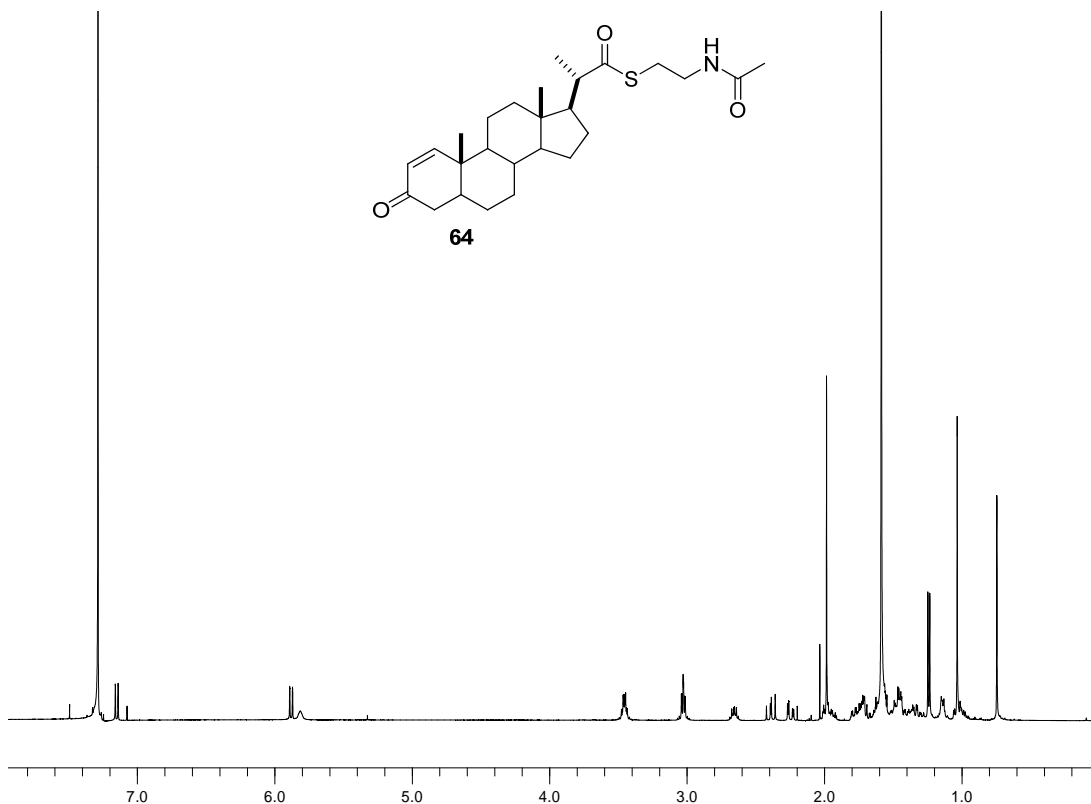
RMN de ¹H (500 MHz) del paratioesteroide B sintético (**64**) en CD₃OD.



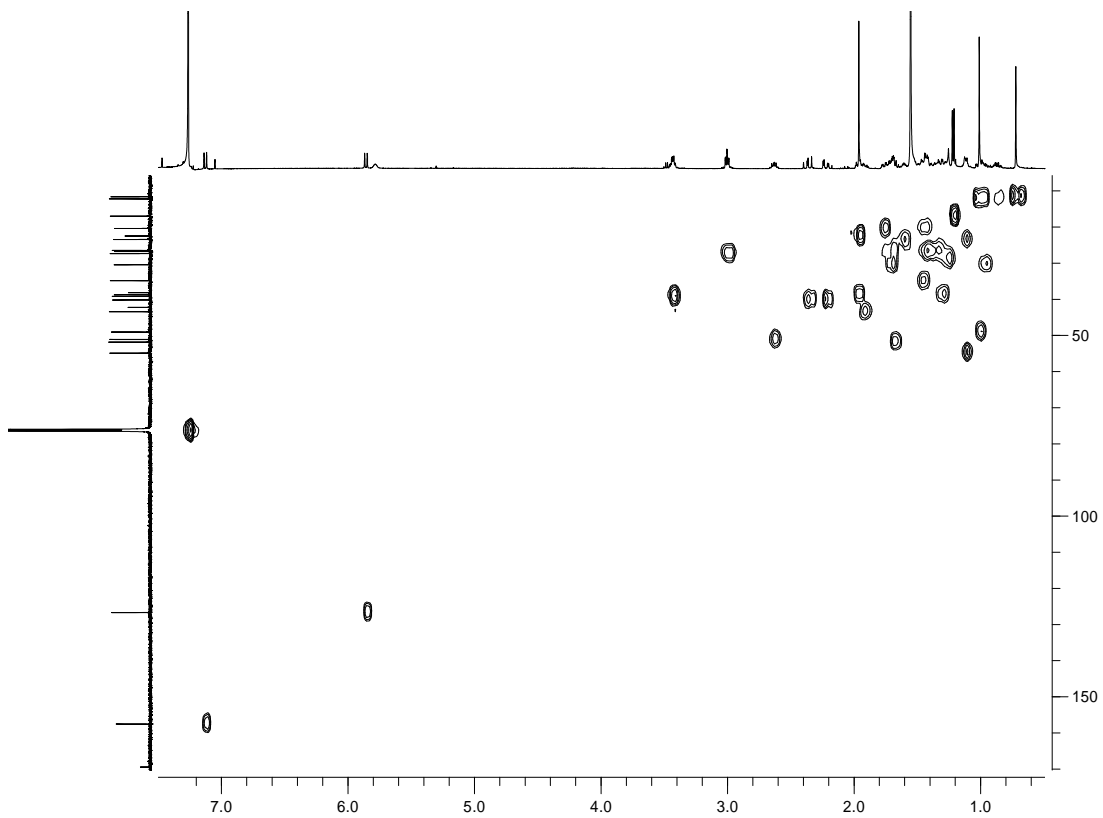
RMN de ^{13}C (125 MHz) del paratioesteroide B (**64**) en CD_3OD .



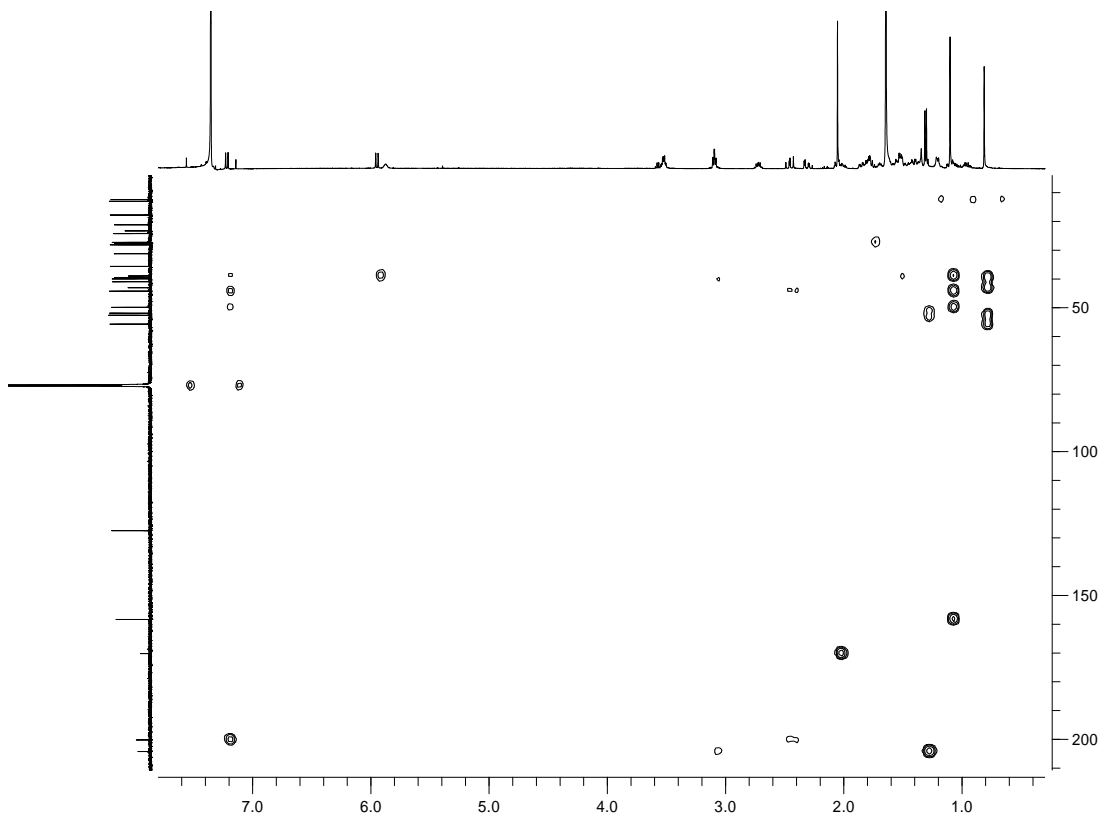
^1H ^1H COSY (500 MHz) del paratioesteroide B (**64**) en CD_3OD .



RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del paratioesteroide (**64**) en CD_3Cl .

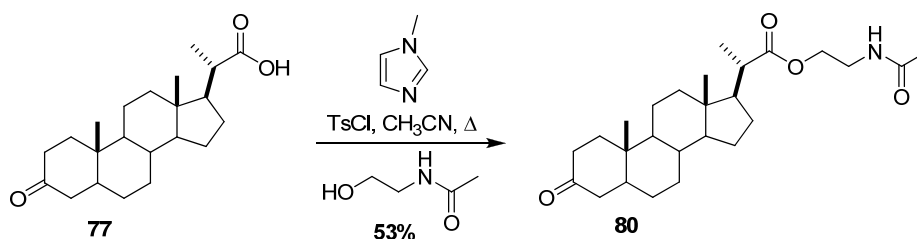


HSQC (500 MHz) del paratioesteroide B (**64**) en CD₃Cl.



HMBC (500 MHz) del paratioesteroide B (**64**) en CD₃Cl.

6.9. Síntesis de análogo 80



Sobre una disolución de ($5\alpha,20S$)-ácido 3-oxopregnan-20-oico (**77**) (50 mg, 0.15 mmol) y N -metilimidazol (35 μL , 0.44 mmol) en CH_3CN (3 mL) se añadió TsCl (36 mg, 0.18 mmol) disuelto en CH_3CN (3 mL). Dejamos la reacción refluendo a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió sobre la mezcla N -acetiletanolamina (19 μL , 0.14 mmol) y la reacción se dejó a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 39 min y fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 7:3) obteniéndose 27 mg del análogo **80**, semisólido blanco, 53%.

RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.78 (NH, 1H, sa); 4.16 (H23, 2H, m); 3.53 (H24, 2H, m); 2.01 (H26, 3H, s); 1.21 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 1.04 (H19, 3H, s); 0.73 (H18, 3H, s).

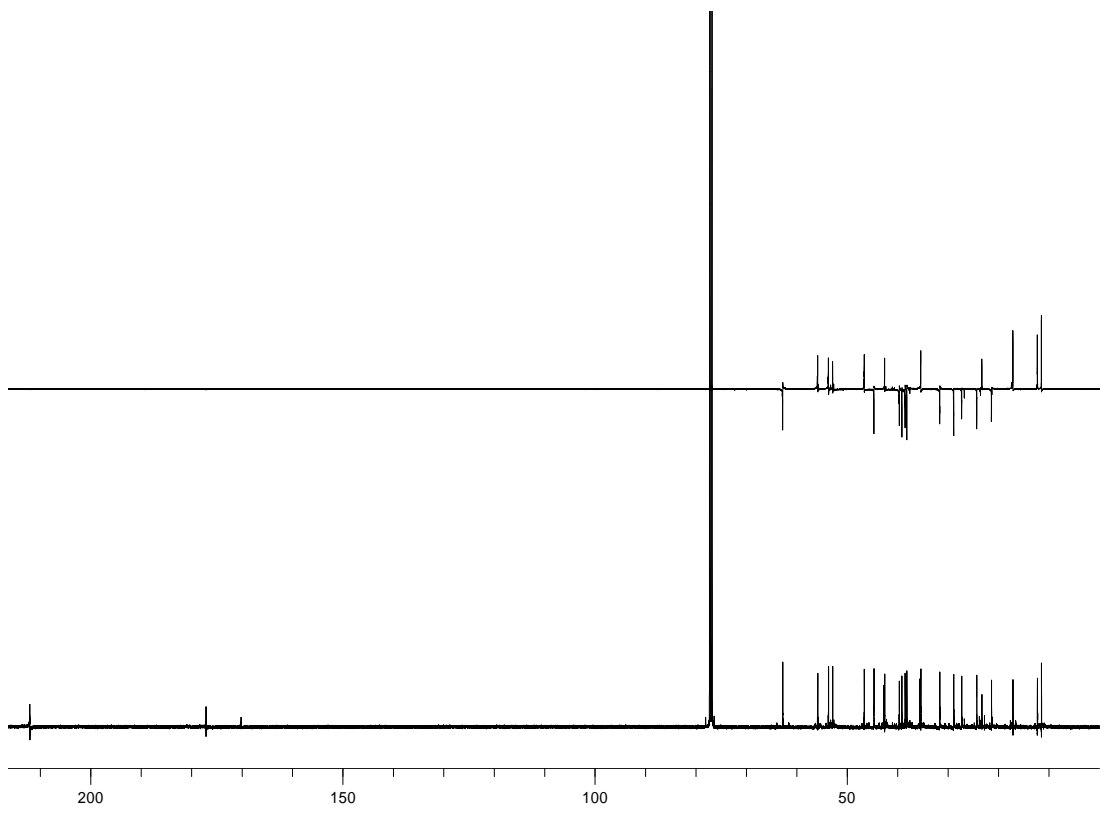
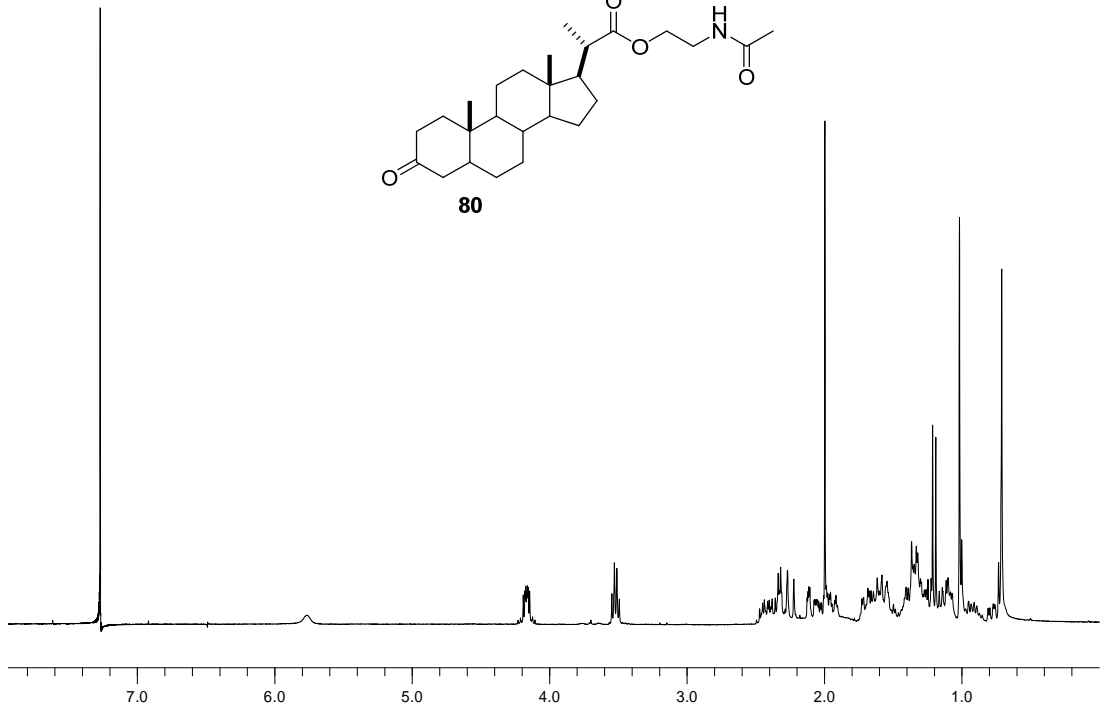
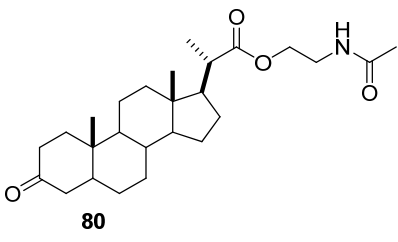
RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 212.1 (C3, s); 177.1 (C22, s); 170.2 (C25, s); 62.8 (C23, t); 55.8 (C14, d); 53.7 (C17, d); 52.8 (C20, d); 46.6; 44.7; 42.8; 42.6; 39.5 (C24, t); 39.2; 38.5; 38.2; 35.6; 35.4; 31.6; 28.8; 27.3; 24.3; 23.3 (C26, q); 21.4 (C11, t); 17.1 (C21, q); 12.3 (C19, q); 11.5 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 431 (M^+ , 8); 86 (100).

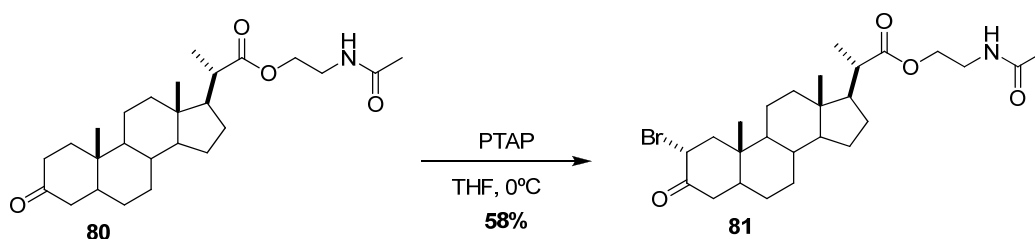
(+)-LRFABMS m/z (%): 432 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 6); 149 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 432.3125 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{NO}_4$, 432.3108).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +116.8° [$c = 0.02$, CH_2Cl_2].



6.10. Síntesis de análogo 81



Sobre una disolución de PTAP (25 mg, 0.65 mmol) a 0°C disuelta en THF (3 mL) se añadió, gota a gota, una disolución del compuesto **80** (30 mg, 0.6 mmol) en THF (4 mL) y se dejó reaccionando a 0°C durante 4 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **79** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 44 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 21 mg del análogo **81**, semisólido blanco, 58%.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.76 (NH, 1H, sa); 4.76 (H2β, 1H, dd, *J* = 13.2, 6.4 Hz); 4.16 (H23, 2H, m); 3.53 (H24, 2H, m); 2.64 (H4a, 1H, m); 2.43 (H1a, 1H, m); 2.01 (H26, 3H, s); 1.21 (H21, 3H, d, *J* = 6.8 Hz); 1.11 (H19, 3H, s); 0.72 (H18, 3H, s).

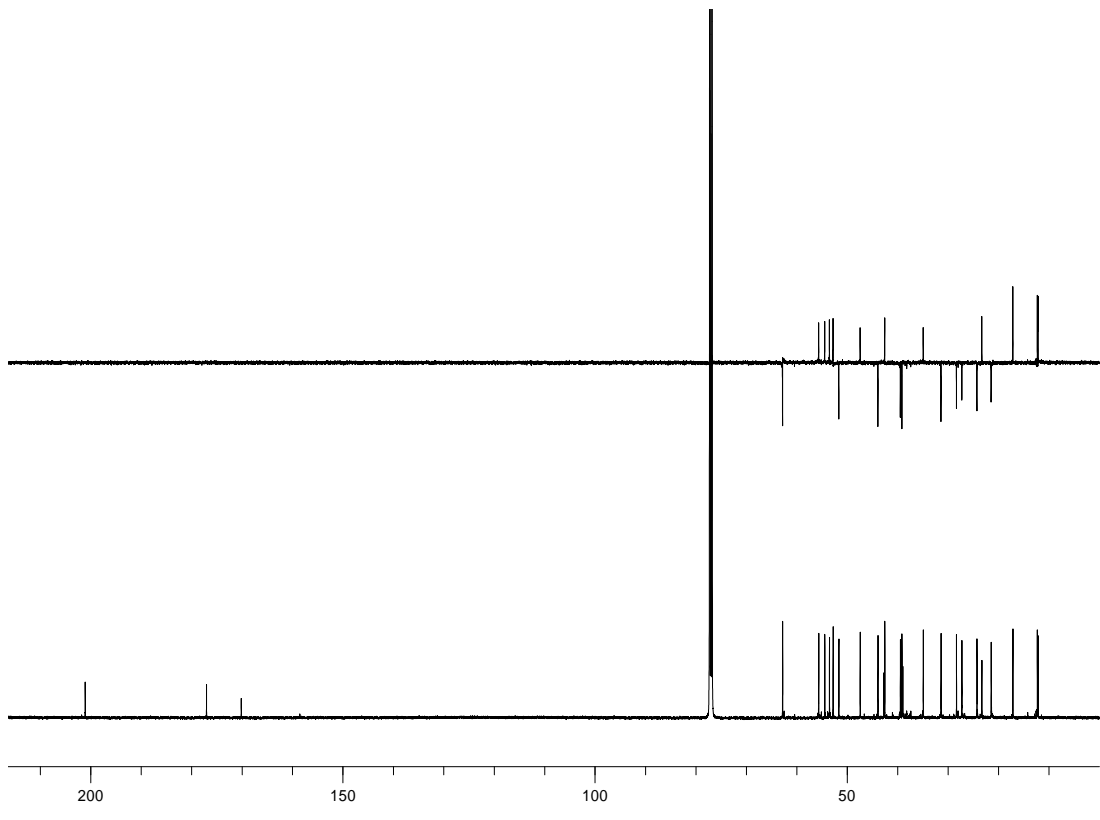
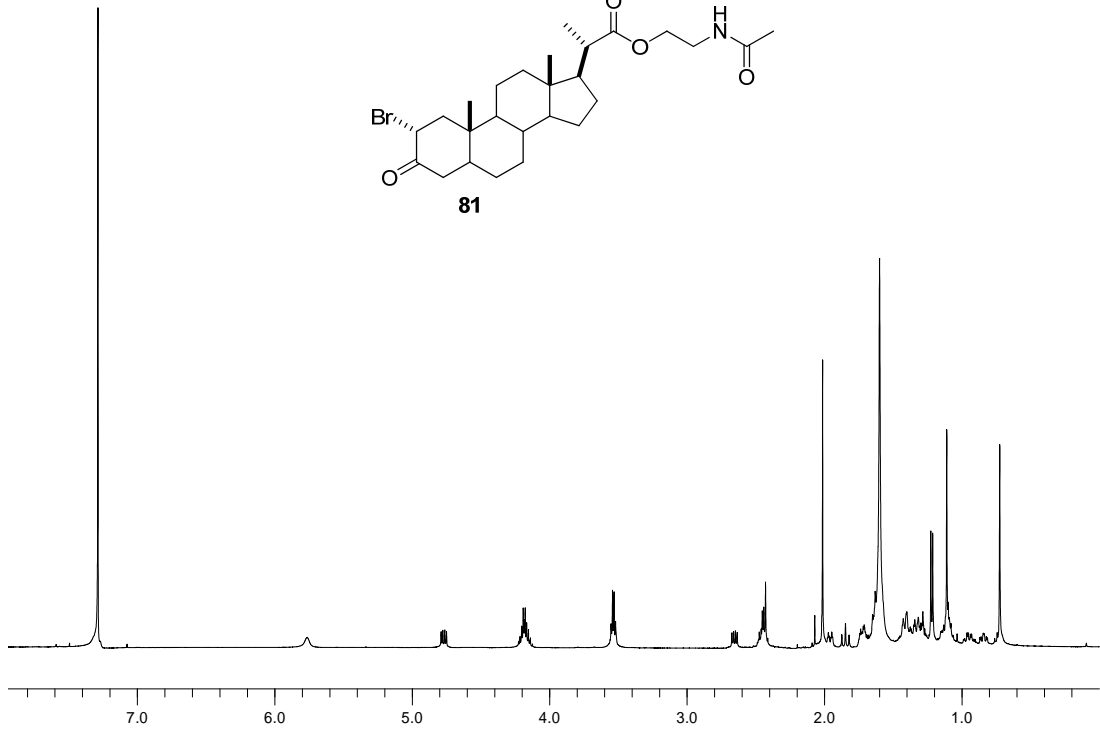
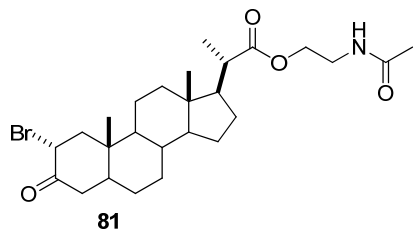
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 201.1 (C3, s); 177.0 (C22, s); 170.1 (C25, s); 62.8 (C23, t); 55.6 (C14, d); 54.4 (C17, d); 53.5 (C20, d); 52.8 (C2, d); 51.6 (C12, t); 47.4 (C9, d); 43.9 (C4, t); 42.7 (C5, d); 42.5 (C13, s); 39.4 (C24, t); 39.1 (C1, t); 39.0 (C10, s); 34.9 (C8, d); 31.4 (C7, t); 28.3 (C6, t); 27.2 (C16, t); 24.3 (C15, t); 23.3 (C26, q); 21.4 (C11, t); 17.1 (C21, q); 12.3 (C19, q); 12.1 (C18, q).

LREIMS (70eV, *m/z* %): 509/511 (M⁺, 8); 149 (100).

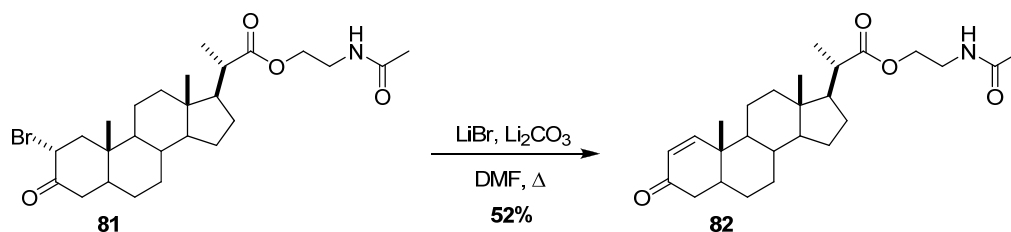
(+)-LRFABMS *m/z* (%): 512 (M⁺, 6); 147 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 532.2040 [M + Na]⁺ (calcd. para C₂₆H₄₀NO₄NaBr, 532.2032).

[α]_D = +216.8° [c = 0.02, CH₂Cl₂].



6.11. Síntesis de análogo 82



A una disolución del 2 α -bromoesteroide **81** (30 mg, 0.06 mmol) en DMF (3 mL), se añadió LiBr (34 mg, 0.34 mmol) y Li₂CO₃ (30 mg, 0.32 mmol). Se dejó reaccionando a 165°C durante 2 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **64** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 37 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 16 mg del análogo **82**, semisólido blanco, 52%.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.15 (H1, 1H, d, $J = 10.2$ Hz); 5.88 (H2, 1H, dd, $J = 10.2, 1.0$ Hz); 5.76 (NH, 1H, sa); 4.18 (H23, 2H, m); 3.54 (H24, 2H, m); 2.01 (H26, 3H, s); 1.22 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 1.04 (H19, 3H, s); 0.74 (H18, 3H, s).

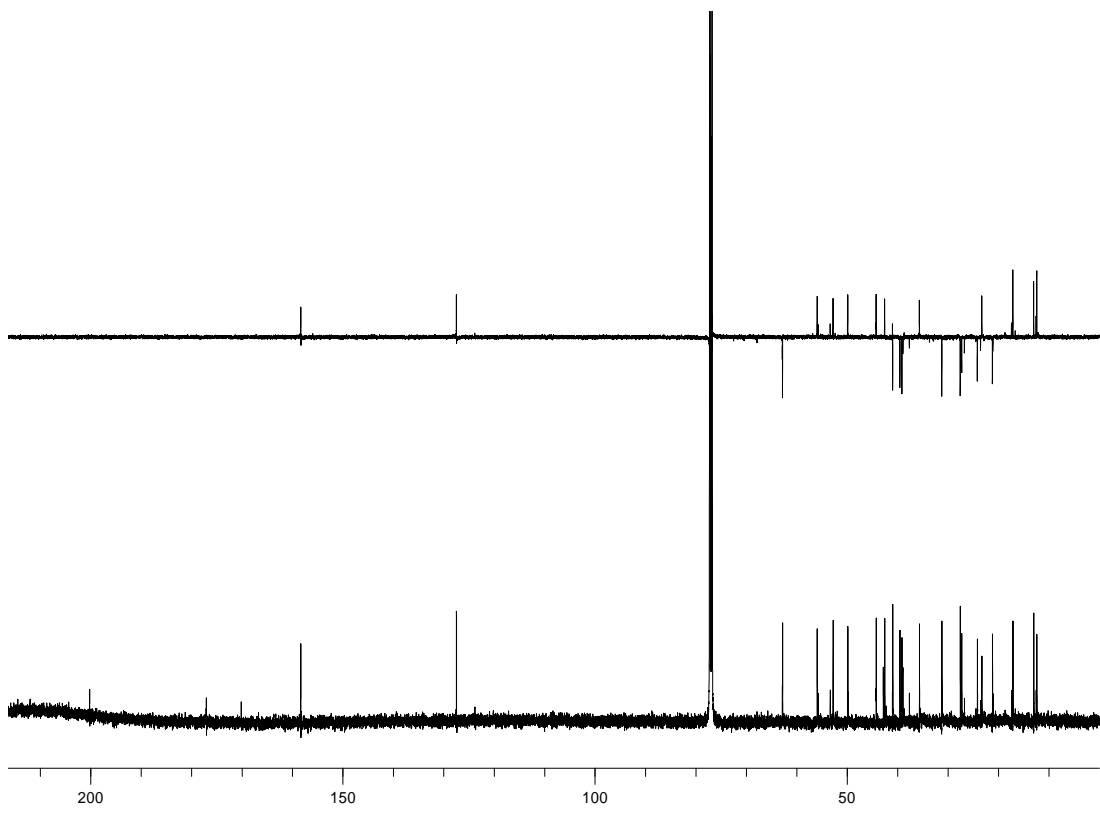
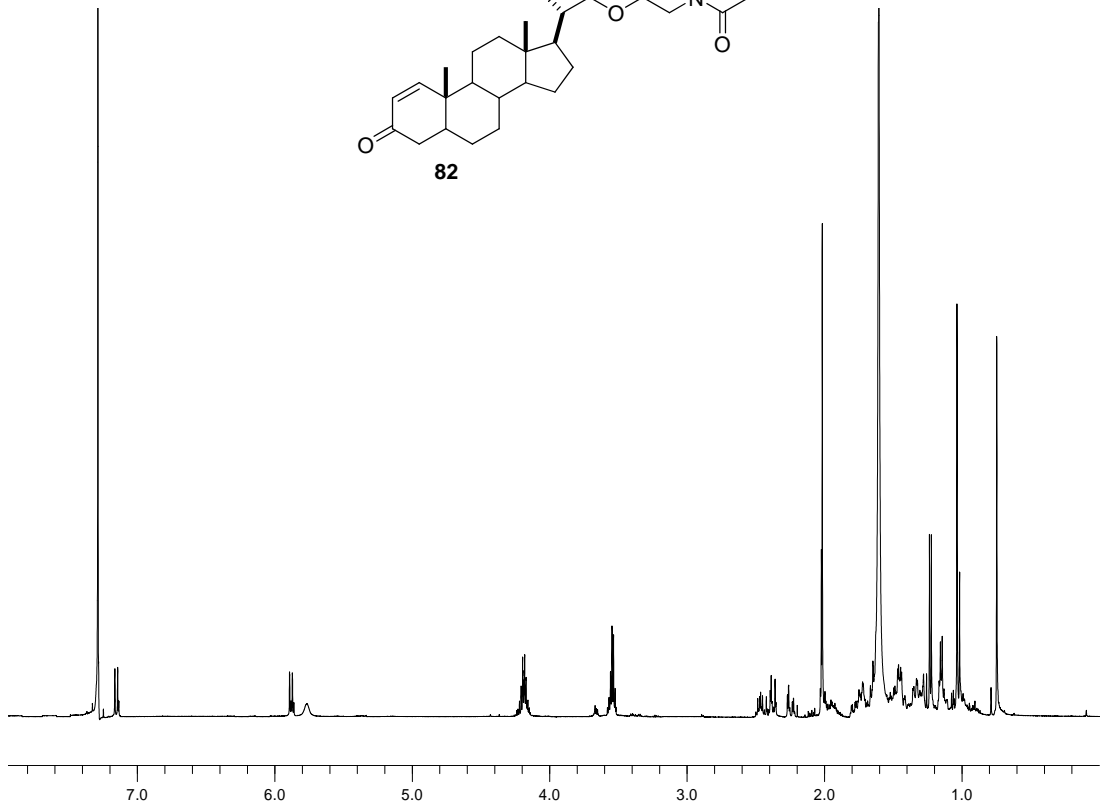
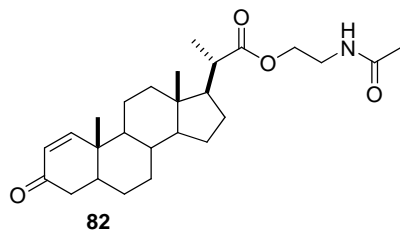
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 200.2 (C3, s); 177.1 (C22, s); 170.2 (C25, s); 158.3 (C1, d); 127.5 (C2, d); 62.8 (C23, t); 56.0 (C14, d); 52.8 (C17, d); 49.8 (C20, d); 44.2 (C9, d); 42.8 (C13, s); 42.5 (C5, d); 41.0 (C12, t); 39.5 (C24, t); 39.1 (C4, t); 39.0 (C10, s); 35.6 (C8, d); 31.2 (C7, t); 27.5 (C6, t); 27.3 (C16, t); 24.2 (C15, t); 23.2 (C26, q); 21.2 (C11, t); 17.1 (C21, q); 13.0 (C19, q); 12.4 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 431 ($[M + H]^+$, 8); 153 (100).

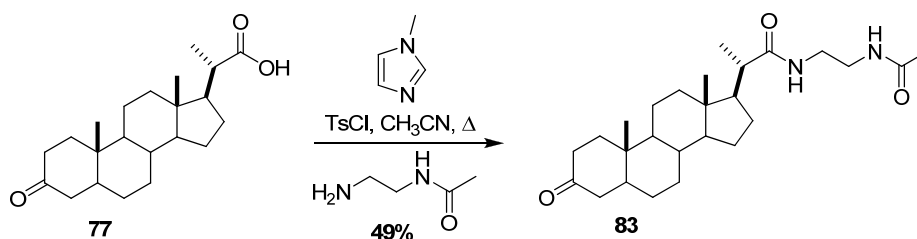
(+)-LRFABMS m/z (%): 432 ($[M + H]^+$, 3); 154 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 452.2770 $[M + Na]^+$ (calcd. para C₂₆H₃₉NO₄Na, 452.2771).

$[\alpha]_D = +84.0^\circ$ [$c = 0.02, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



6.12. Síntesis de análogo 83



Sobre una disolución de (5 α ,20*S*)-ácido 3-oxopregnan-20-oico (**77**) (10 mg, 0.03 mmol) y *N*-metilimidazol (13 μ L, 0.17 mmol) en CH₃CN (3 mL) se añadió TsCl (14 mg, 0.5 mmol) disuelto en CH₃CN (3 mL) y se dejó reaccionando a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió sobre la mezcla *N*-(2-aminoetil) acetamina (6 μ L, 0.05 mmol) que se reflujo a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 22 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 4 mg del análogo **83**, semisólido blanco, 49%.

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.31 (NH, 1H, sa); 6.08 (NH, 1H, sa); 3.40 (H23, H24, 4H, m); 2.00 (H26, 3H, s); 1.18 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 1.02 (H19, 3H, s); 0.71 (H18, 3H, s).

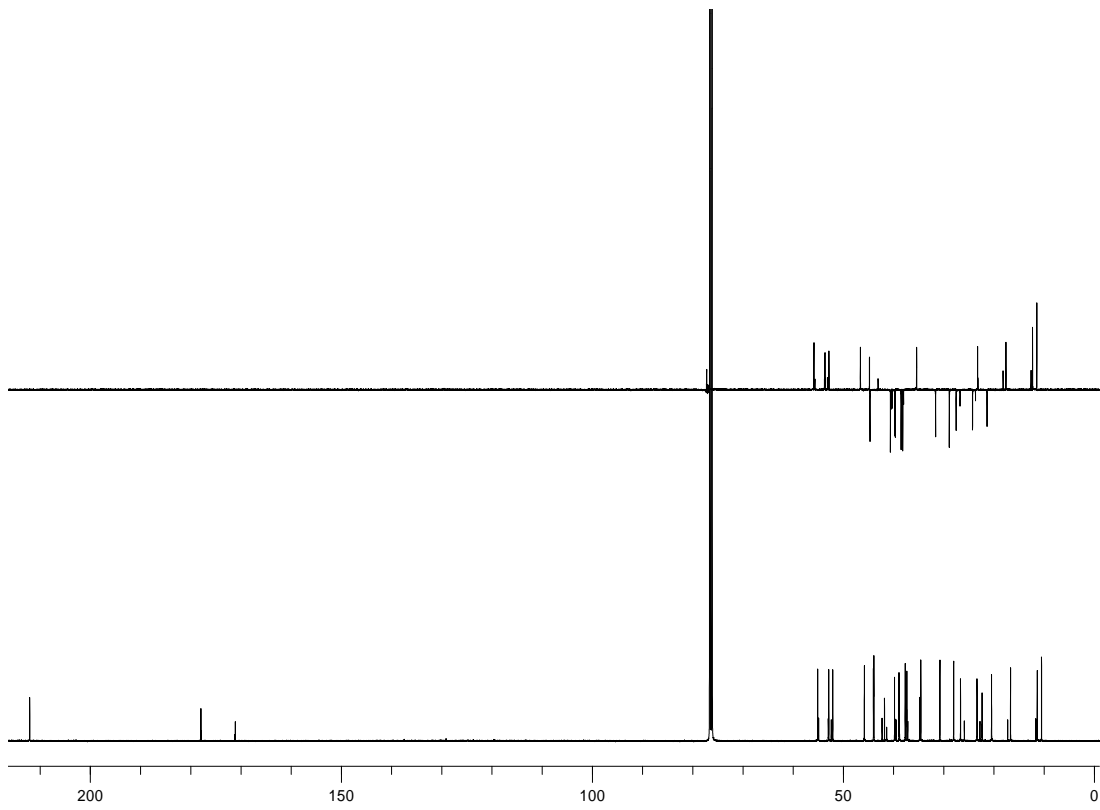
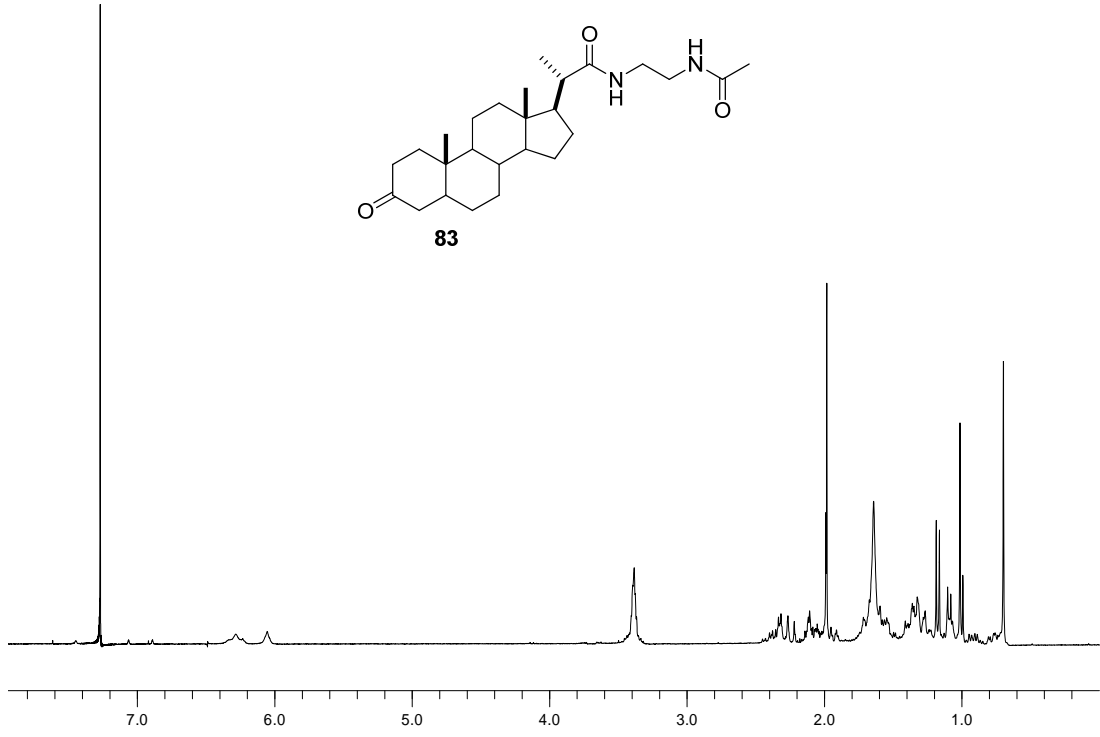
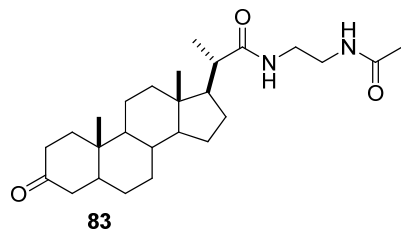
RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212.1 (C3, s); 178.2 (C22, s); 171.3 (C25, s); 55.8 (C14, d); 53.6 (C17, d); 52.8; 46.6; 44.8; 44.7; 42.6; 40.6; 39.8 (C23, t); 39.3 (C24, t); 38.5; 38.2; 35.6; 35.4; 31.6; 28.9; 27.5; 24.3; 23.3 (C26, q); 21.4 (C11, t); 17.6 (C21, q); 12.3 (C19, q); 11.5 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 430 (M^+ , 8); 158 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 431 (M^+ , 62); 154 (100).

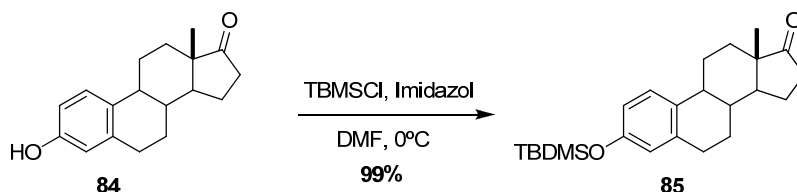
(+)-HRESIMS: m/z 453.3073 [$M + H$]⁺ (calcd. para C₂₆H₄₂N₂O₃Na, 453.3087).

$[\alpha]_D = +36.0^\circ$ [$c = 0.02$, CH₂Cl₂].



7. Síntesis de paratioesteroide C y análogos

7.1. Síntesis de (+)-3-(*tert*-butildimetilsililoxi)-estróna (**85**)



Sobre una disolución de (+) estróna (**84**) (1.08 g, 4.0 mmol) e imidazol (0.68 g, 10.0 mmol) en DMF a 0°C se añadió una disolución de TBMSCl (0.9 g, 6.0 mmol). La mezcla se dejó reaccionando a 0°C durante 1 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió con EtOAc (15 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃, NaCl, agua y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (95:5)], recogiendo 1.5 g del compuesto **85**, semisólido blanco, 99%.

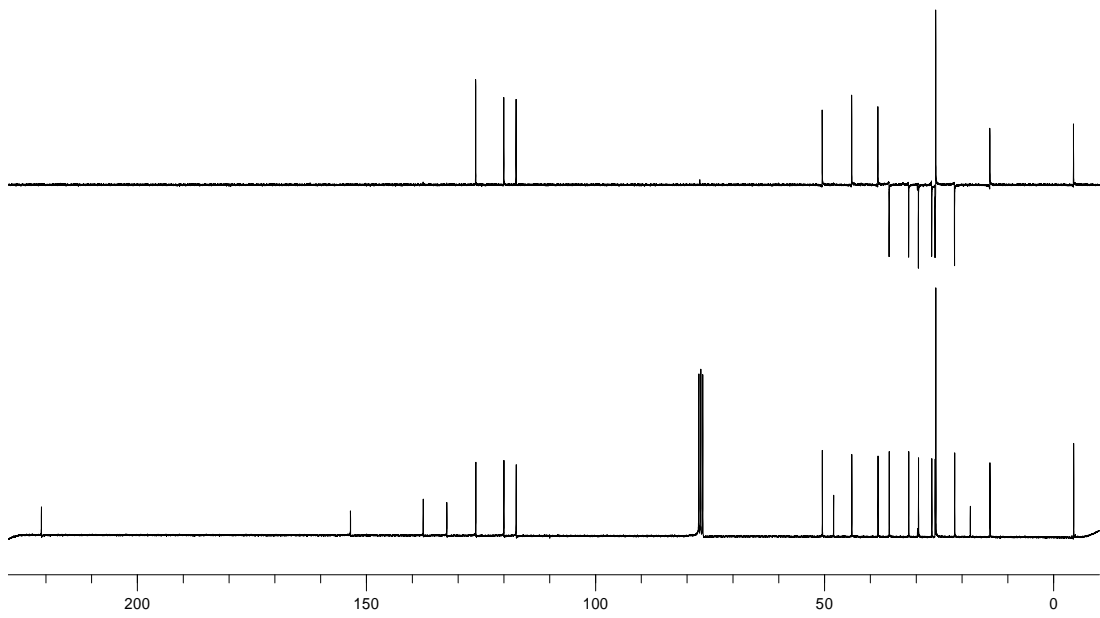
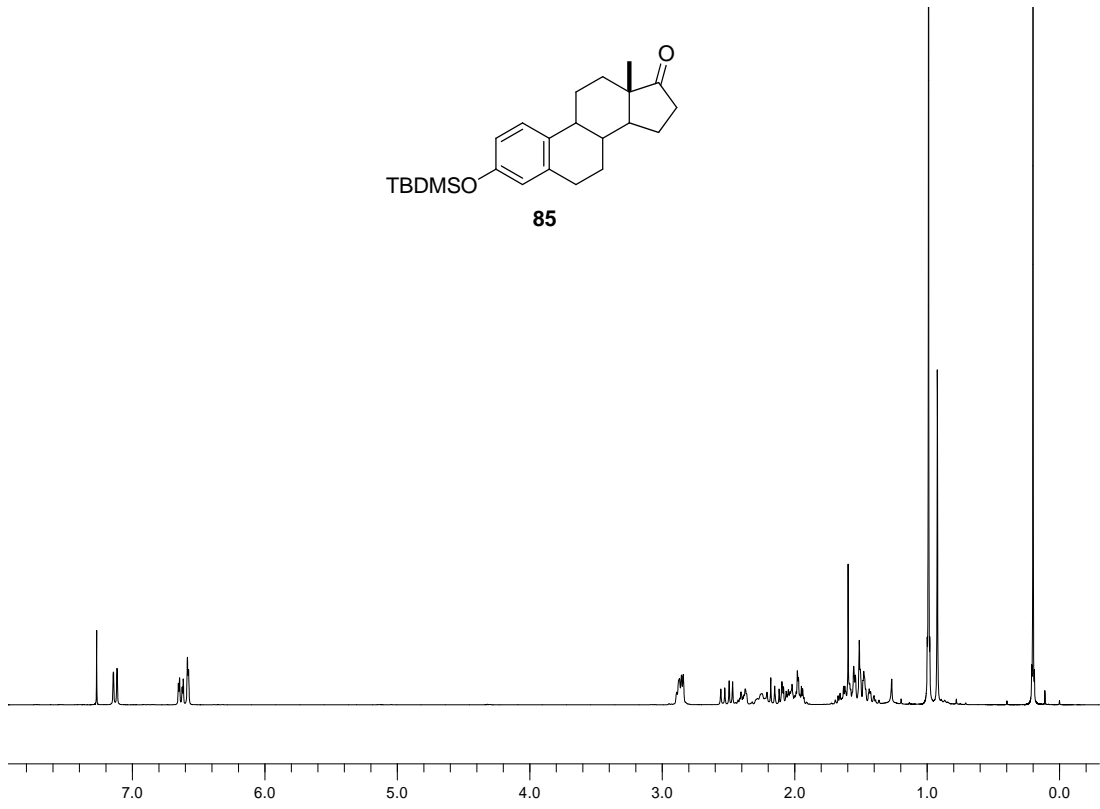
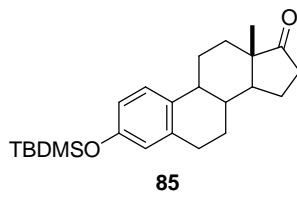
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.12 (H1, 1H, d, *J* = 8.5 Hz); 6.64 (H2, 1H, dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz); 6.58 (H4, 1H, d, *J* = 2.6 Hz); 2.85 (H6, 2H, m); 0.98 (SiC(CH₃)₃, 9H, s); 0.92 (H18, 3H, s); 0.20 (Si(CH₃)₂, 6H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 221.4 (C17, s); 153.9 (C3, s); 138.0 (C5, s); 132.8 (C10, s); 126.5 (C1, d); 120.4 (C4, d); 117.7 (C2, d); 50.4; 48.0; 44.0; 38.3; 35.8; 31.6; 29.4; 26.5; 25.8; 25.6 (SiC(CH₃)₃, q); 21.6 (C11, t); 18.4 (SiC(CH₃)₃, s); 13.8 (C18, q); -4.4 (Si(CH₃)₂, q).

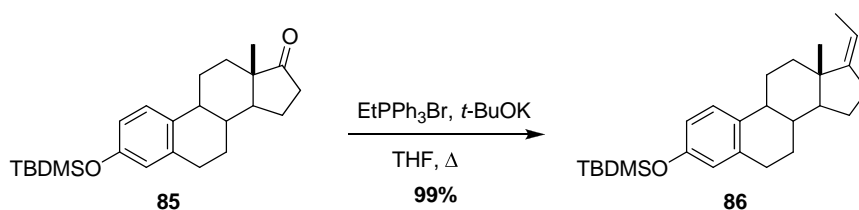
LREIMS (70eV, *m/z* %): 384 (M⁺, 34); 327 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 385.2567 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₄H₃₇O₂Si, 385.2562).

[α]_D = +116.2° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



7.2. Síntesis de compuesto **86**



Sobre una disolución de EtPPh₃Br (1.6 g, 4.4 mmol) y *t*-BuOK (0.5 g, 4.4 mmol) en THF (10 mL) se añadió gota a gota una disolución de la cetona **85** (0.4 g, 1.1 mmol). La reacción se calentó a 85°C durante 24 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió con EtOAc (15 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con NaHCO₃, NaCl, agua y se secaron sobre MgSO₄. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogándose 0.39 g de la olefina **86**, semisólido blanco, 99%.

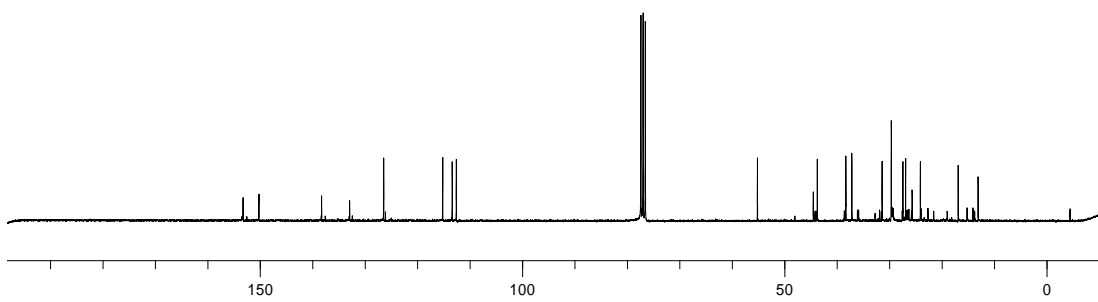
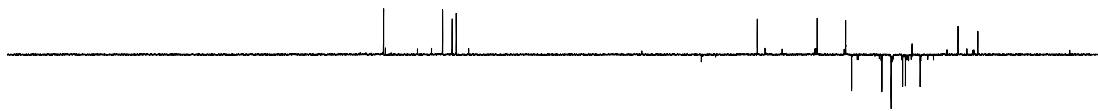
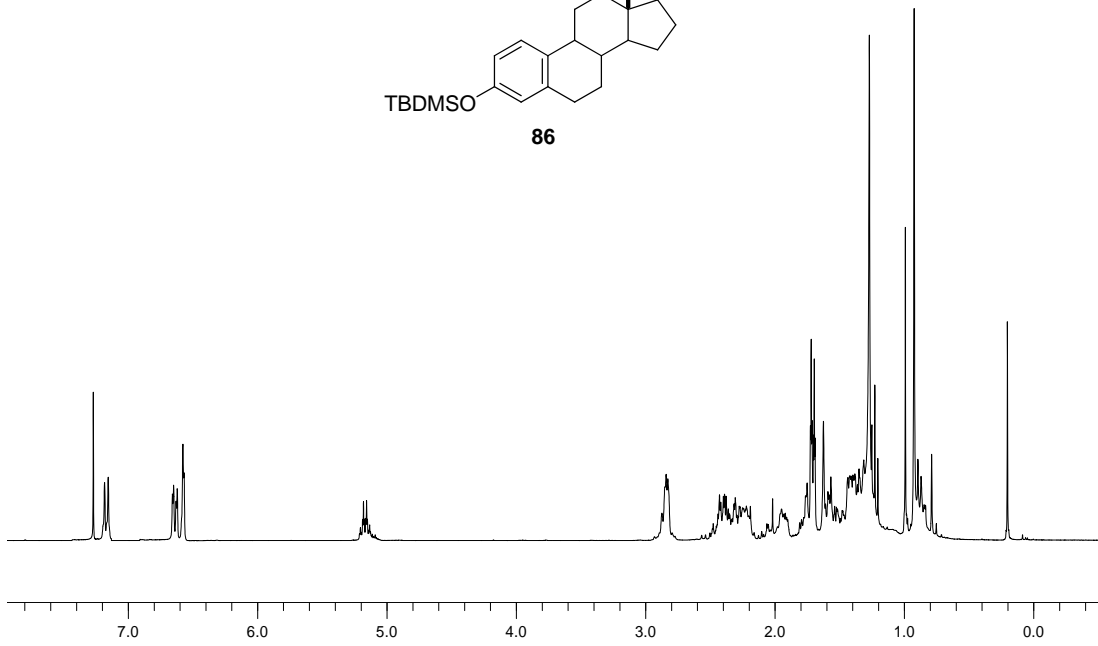
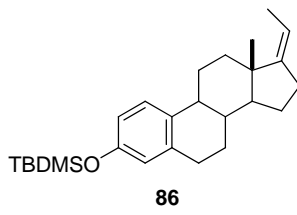
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.12 (H1, 1H, d, *J* = 8.3 Hz); 6.64 (H2, 1H, dd, *J* = 8.3, 2.8 Hz); 6.59 (H4, 1H, d, *J* = 2.8 Hz); 5.16 (H20, 1H, m); 2.84 (H6, 2H, m); 1.27 (H21, 3H, s); 0.99 (SiC(CH₃)₃, 9H, s); 0.92 (H18, 3H, s); 0.20 (Si(CH₃)₂, 6H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 153.2 (C3, s); 150.2 (C17, s); 137.8 (C5, s); 133.2 (C10, s); 126.0 (C1, d); 119.8 (C4, d); 117.1 (C20, d); 113.3 (C2, d); 55.2; 44.5; 43.8; 38.3; 37.2; 31.4; 29.7; 27.6; 26.8; 25.7 (SiC(CH₃)₃, q); 24.1 (C11, t); 18.2 (SiC(CH₃)₃, s); 16.9 (C21, q); 13.1 (C18, q); -4.4 (Si(CH₃)₂, q).

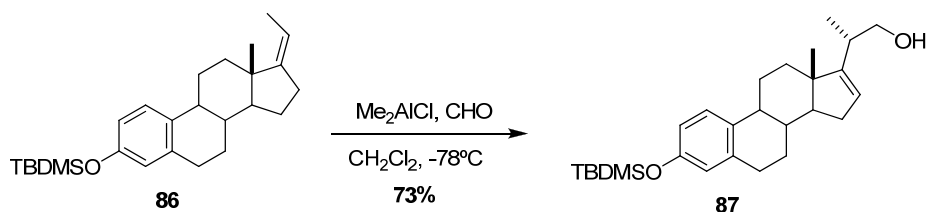
LREIMS (70eV, *m/z* %): 396 (M⁺, 5); 282 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 397.2921 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₄₁OSi, 397.2921).

[α]_D = +50.2° [c = 0.5, CH₂Cl₂].



7.3. Síntesis de alcohol 87



La olefina **86** (0.4 g, 1.2 mmol) y paraformaldehído (0.5 g, 1.8 mmol) se disolvieron en CH_2Cl_2 (10 mL). La mezcla se enfrió a -78°C , se añadió Me_2AlCl (1 M en hexano, 5.9 mL, 5.9 mmol) y se dejó agitando a -78°C durante 30 min. A continuación, se añadió NaHCO_3 , se eliminó el disolvente a presión reducida y se redisolvió el crudo con EtOAc (30 mL). Los extractos orgánicos se lavaron con NaCl, agua y se secaron sobre MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.29 g de la olefina **87**, semisólido blanco, 73%.

RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.11 (H1, 1H, d, $J = 8.3$ Hz); 6.63 (H2, 1H, dd, $J = 8.3, 2.6$ Hz); 6.56 (H4, 1H, d, $J = 2.6$ Hz); 5.48 (H16, 1H, s); 3.63-3.57 (H22, H22', 2H, dd, $J = 11.0, 6.1$ Hz); 1.07 (H21, 1H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.98 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$, 9H, s); 0.83 (H18, 3H, s); 0.19 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, 6H, s).

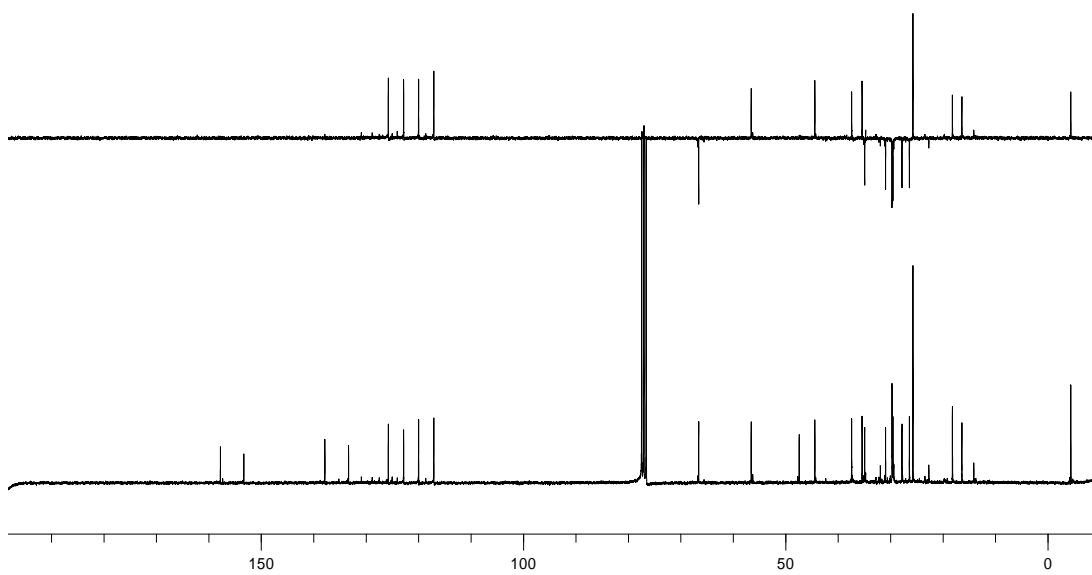
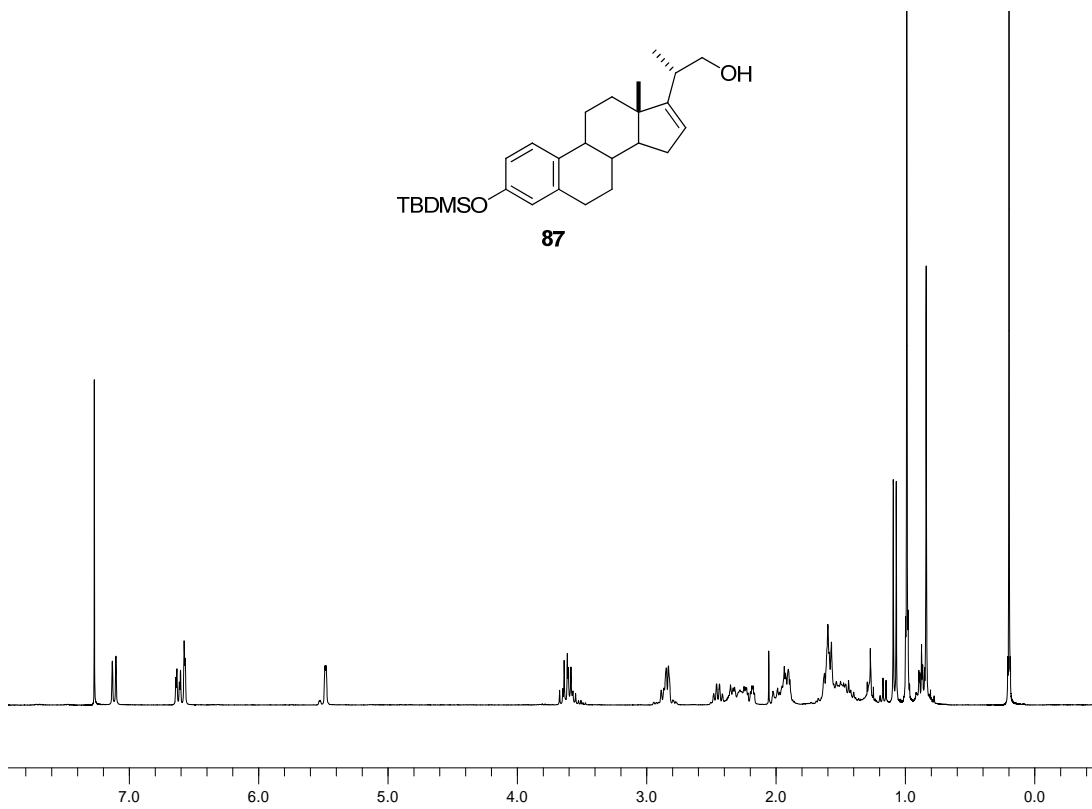
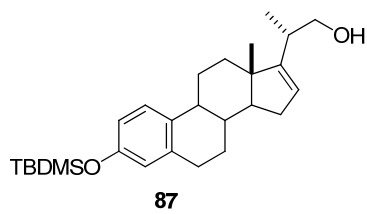
RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 157.7 (C17, s); 153.3 (C3, s); 137.8 (C5, d); 133.3 (C10, d); 125.7 (C1, d); 122.8 (C16, d); 119.9 (C4, d); 117.0 (C2, d); 66.5 (C22, d); 56.5; 47.3; 44.3; 37.3; 35.3; 34.8; 30.9; 29.5; 27.7; 26.3 (C11, t); 26.2 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$, q); 18.2 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$, s); 18.1 (C21, q); 16.3 (C18, q); -4.4 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 426 (M^+ , 63); 417 (100).

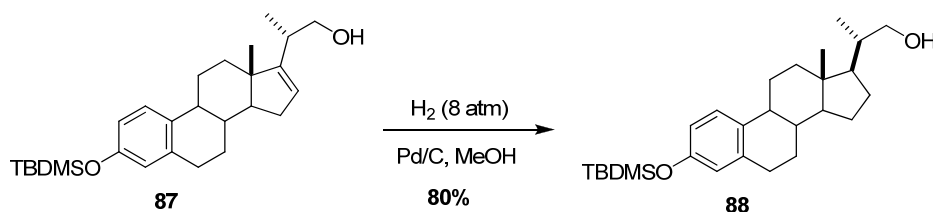
(+)-**LRFABMS m/z (%)**: 427 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 55); 105 (100).

(+)-**HRESIMS: m/z** 428.2201 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{Si}$, 427.3026).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = $+52.1^\circ$ [$c = 0.5, \text{CH}_2\text{Cl}_2$].



7.4. Síntesis de alcohol **88**



Se disolvió el alcohol **87** (0.5 g, 1.0 mmol) en MeOH (20 mL) y después de desoxigenar 30 min, se añadió Pd/C al 5% (0.25 g). Se dejó agitando bajo una atmósfera de H₂ a una presión de 8 atm a t.a. durante 10 h. Al cabo de ese tiempo, se filtró a través de celita y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 0.4 g del alcohol **88**, semisólido blanco, 80%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.11 (H1, 1H, d, *J* = 8.3 Hz); 6.60 (H2, 1H, d, *J* = 8.3, 2.6 Hz); 6.55 (H4, 1H, d, *J* = 2.6 Hz); 3.67 (H22, 1H, m); 3.40 (H22', 1H, m); 2.80 (H6, 2H, m); 1.11 (H21, 3H, d, *J* = 6.6 Hz); 0.99 (SiC(CH₃)₃, 9H, s); 0.73 (H18, 3H, s); 0.19 (Si(CH₃)₂, 6H, s).

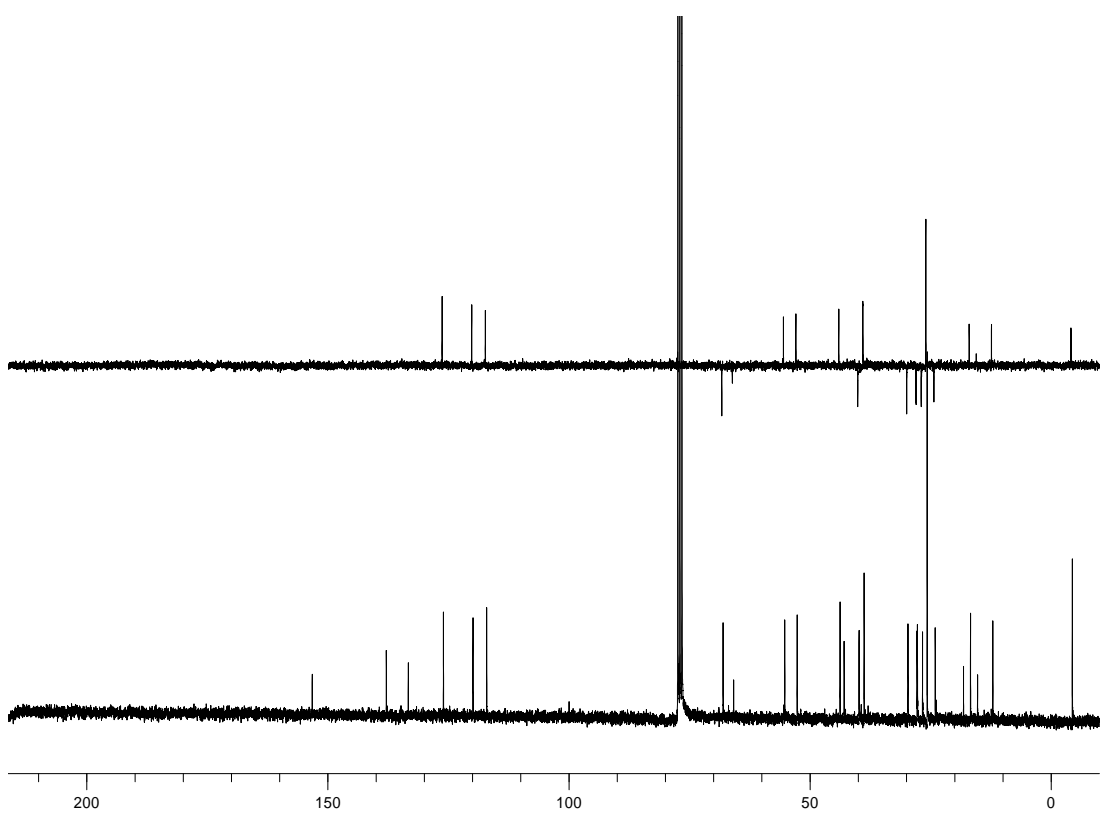
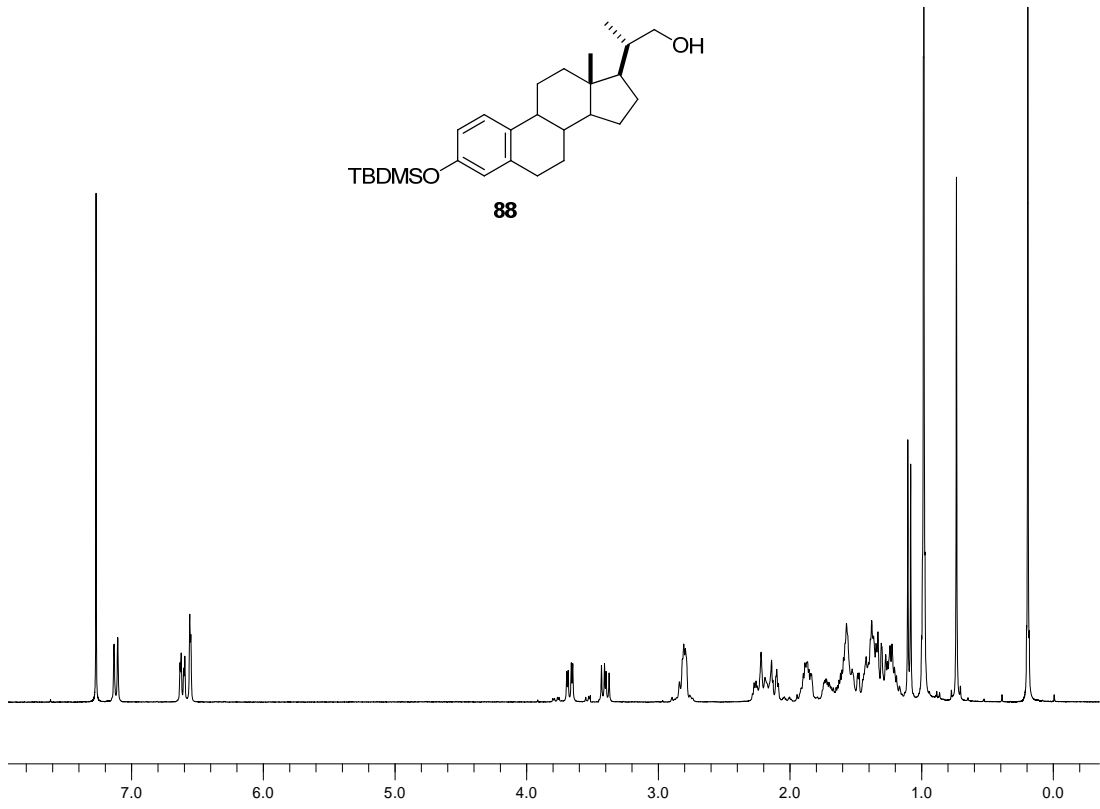
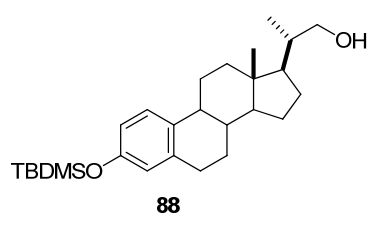
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 153.6 (C3, s); 138.3 (C5, s); 133.8 (C10, s); 126.5 (C1, d); 120.3 (C4, d); 117.5 (C2, d); 68.4 (C22, d); 55.6 (C14, d); 53.0 (C17, d); 44.2 (C13, s); 43.3 (C20, d); 40.2 (C12, t); 39.2 (C9, d); 39.2 (C8, d); 30.1; 28.2; 28.1; 27.1; 26.1 (SiC(CH₃)₃, q); 24.4 (C11, t); 18.5 (SiC(CH₃)₃, s); 17.1 (C21, q); 12.5 (C18, q); -4.4 (Si(CH₃)₂, q).

LREIMS (70eV, *m/z* %): 428 (M⁺, 57); 371 (100).

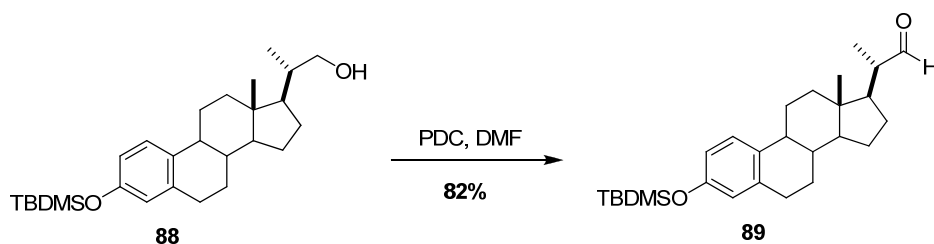
(+)-LRFABMS *m/z* (%): 429 ([M + H]⁺, 68); 428 (100).

(+)-HRESIMS: *m/z* 429.3169 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₅O₂Si, 429.3183).

[α]_D = +62.3° [c = 0.04, CH₂Cl₂].



7.5. Síntesis de aldehído 89



Sobre una disolución del alcohol **88** (0.5 g, 1.5 mmol), en DMF (10 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de PDC (2.0 g, 5.0 mmol) en DMF (10 mL) y se dejó agitando a t.a. durante 5 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], recogiéndose 0.4 g de aldehído **89**, semisólido blanco, 82%.

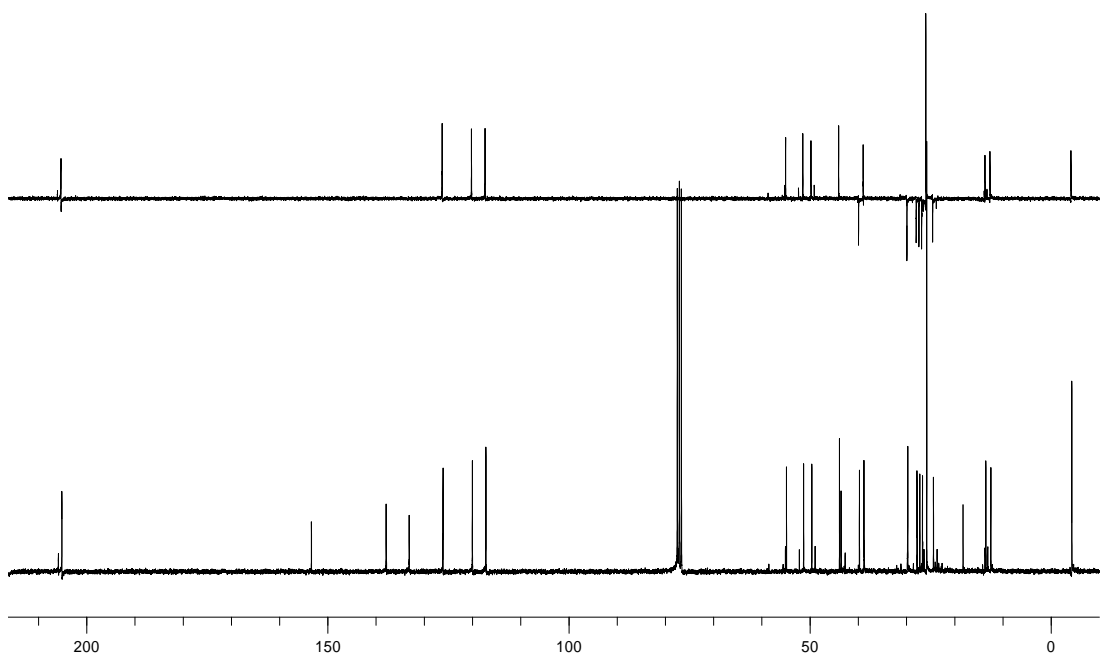
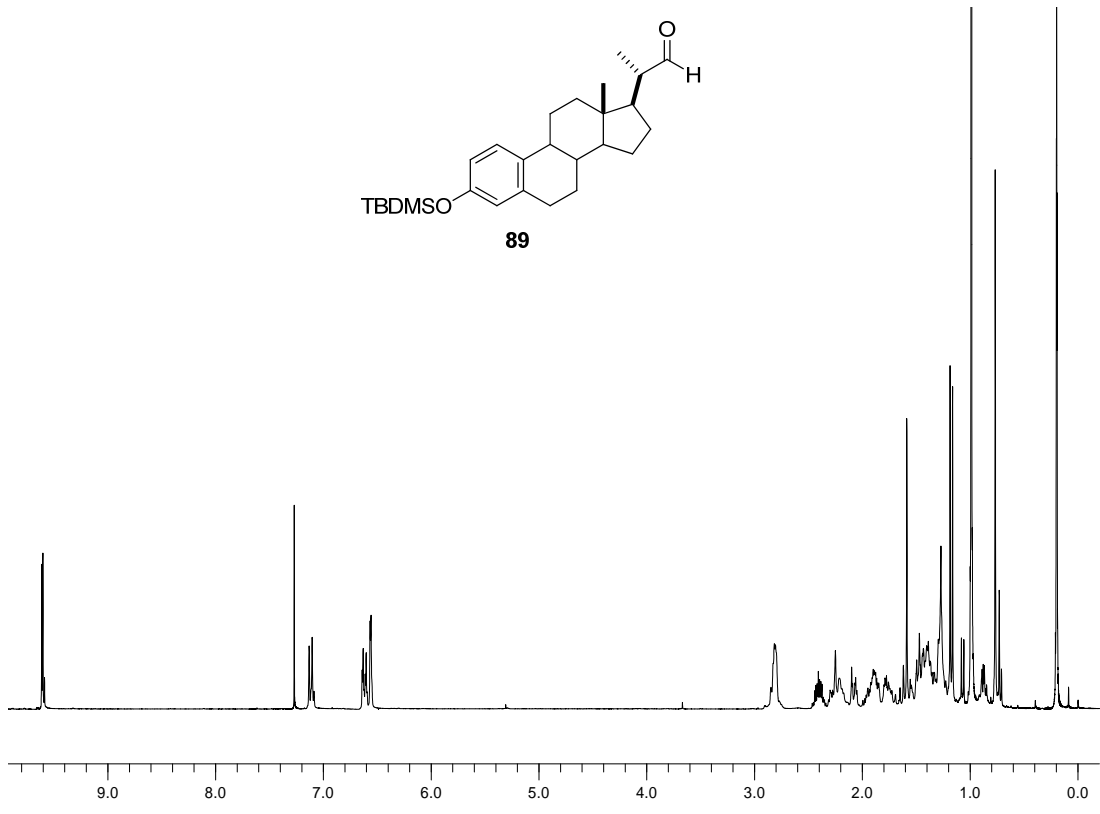
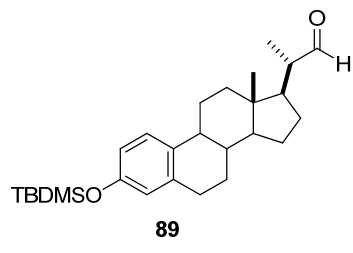
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.60 (H22, 1H, d, *J* = 3.3 Hz); 7.11 (H1, 1H, d, *J* = 8.5 Hz); 6.62 (H2, 1H, dd, *J* = 8.5, 2.6 Hz); 6.57 (H4, 1H, d, *J* = 2.6 Hz); 2.84 (H6, 2H, m); 1.17 (H21, 3H, d, *J* = 6.8 Hz); 0.98 (SiC(CH₃)₃, 9H, s); 0.76 (H18, 3H, s); 0.19 (Si(CH₃)₂, 6H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 205.1 (C22, d); 153.3 (C3, s); 137.8 (C5, s); 133.0 (C10, s); 126.0 (C1, d); 119.9 (C4, d); 117.1 (C2, d); 54.7; 51.2 (C13, s); 49.5; 43.7; 43.5; 39.7; 38.7; 29.6; 27.7; 27.1; 26.6; 25.7 (SiC(CH₃)₃, q); 24.3 (C11, t); 18.2 (SiC(CH₃)₃, s); 13.4 (C21, q); 12.4 (C18, q); -4.4 (Si(CH₃)₂, q).

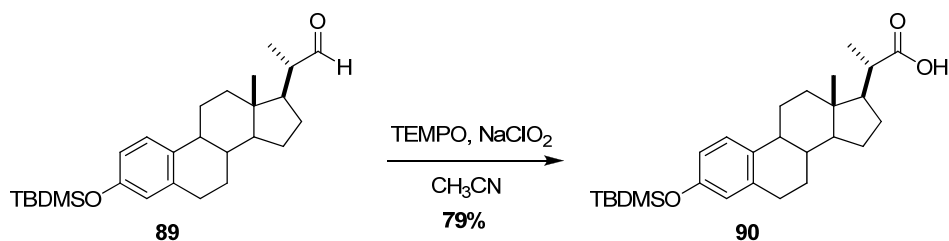
LREIMS (70eV, *m/z* %): 426 (M⁺, 48); 369 (100).

(+)-LRFABMS *m/z* (%): 427 ([M + H]⁺, 72); 426 (100).

[α]_D = +73.2° [c = 0.06, CH₂Cl₂].



7.6. Síntesis de ácido 90



El aldehído **89** (0.10 g, 0.25 mmol) se disolvió en 10 mL de una mezcla de CH₃CN y disolución tampón a pH 6.5 en relación (1.3:1). A continuación se añadió TEMPO (0.07 g, 0.3 mmol), NaClO₂ (0.1 g, 0.02 mmol) y NaClO (0.5 mL) y la mezcla se dejó reaccionando a t.a durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **69** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 0.08 g de ácido **90**, semisólido blanco, 79%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.11 (H1, 1H, d, *J* = 8.5 Hz); 6.60 (H2, 1H, d, *J* = 8.5, 2.7 Hz); 6.57 (H4, 1H, d, *J* = 2.7 Hz); 2.81 (H6, 2H, m); 1.31 (H21, 3H, d, *J* = 6.9 Hz); 0.99 (SiC(CH₃)₃, 9H, s); 0.74 (H18, 3H, s); 0.19 (Si(CH₃)₂, 6H, s).

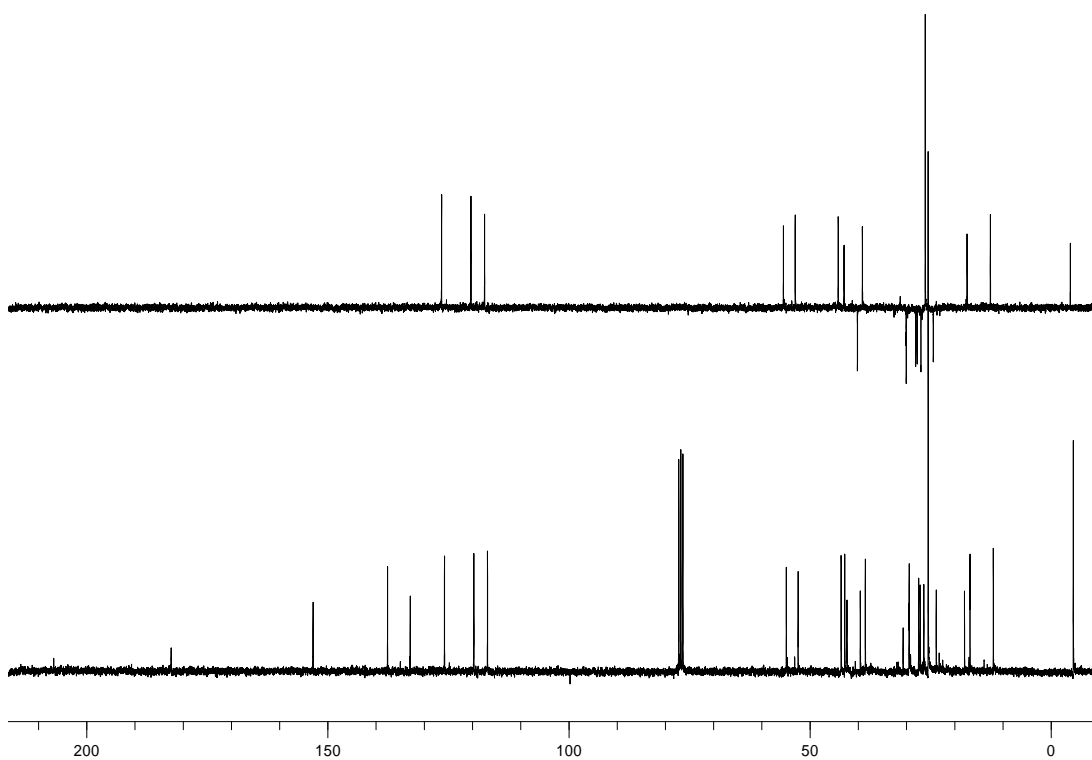
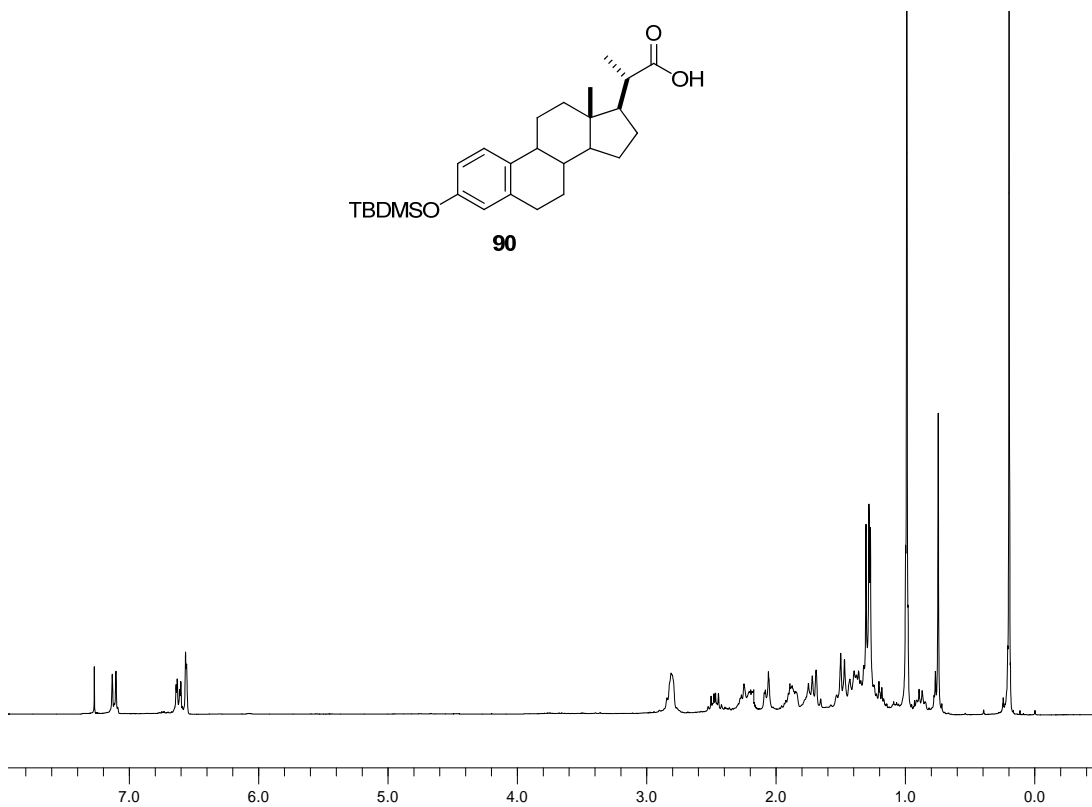
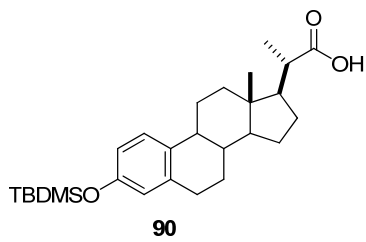
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 181.2 (C22, s); 153.7 (C3, s); 138.2 (C5, s); 133.6 (C10, s); 126.4 (C1, d); 120.4 (C4, d); 117.5 (C2, d); 55.5 (C14, d); 53.0 (C17, d); 44.2; 43.4; 39.5; 39.2; 31.3; 30.0; 28.1; 27.7; 27.0; 26.2 (SiC(CH₃)₃, q); 24.4 (C11, t); 18.5 (SiC(CH₃)₃, s); 17.4 (C21, q); 12.6 (C18, q); -4.4 (Si(CH₃)₂, q).

LREIMS (70eV, *m/z* %): 442 (M⁺, 62); 385 (100).

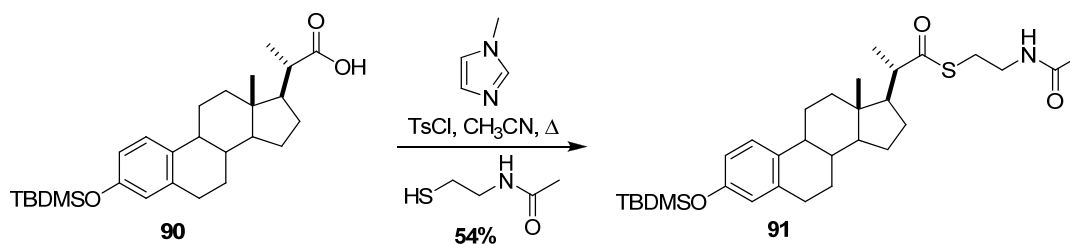
(+)-LRFABMS *m/z* (%): 443 ([M + H]⁺, 68); 442 (100).

(-)-HRESIMS: *m/z* 441.2817 [M - H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₁O₃Si, 441.2832).

[α]_D = +68.5° [c = 0.04, CH₂Cl₂].



7.7. Síntesis de análogo 91



Sobre una disolución de ácido **90** (50 mg, 0.15 mmol) y *N*-metilimidazol (35 μ L, 0.44 mmol) en CH_3CN (3 mL) se añadió TsCl (36 mg, 0.18 mmol) disuelto en CH_3CN (3 mL) y se dejó reaccionando a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió la *N*-acetilcisteamina (16 μ L, 0.14 mmol) y se reflujo a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] obteniéndose 18 mg del compuesto **91**, semisólido blanco, 54%.

RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.15 (H1, 1H, d, $J = 8.5$ Hz); 6.60 (H2, 1H, d, $J = 8.5, 2.7$ Hz); 6.59 (H4, 1H, d, $J = 2.7$ Hz); 5.94 (NH, 1H, sa); 3.48 (H24, 2H, m); 3.07 (H23, 2H, m); 2.82 (H6, 2H, m); 2.02 (H26, 3H, s); 1.29 (H21, 3H, d, $J = 6.9$ Hz); 1.02 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$, 9H, s); 0.74 (H18, 3H, s); 0.22 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, 6H, s).

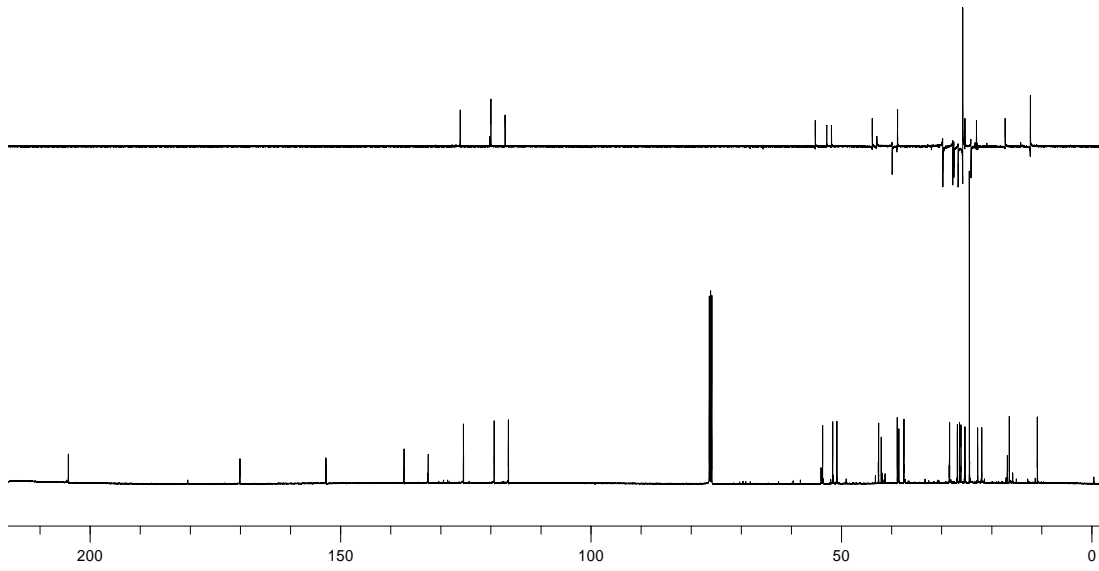
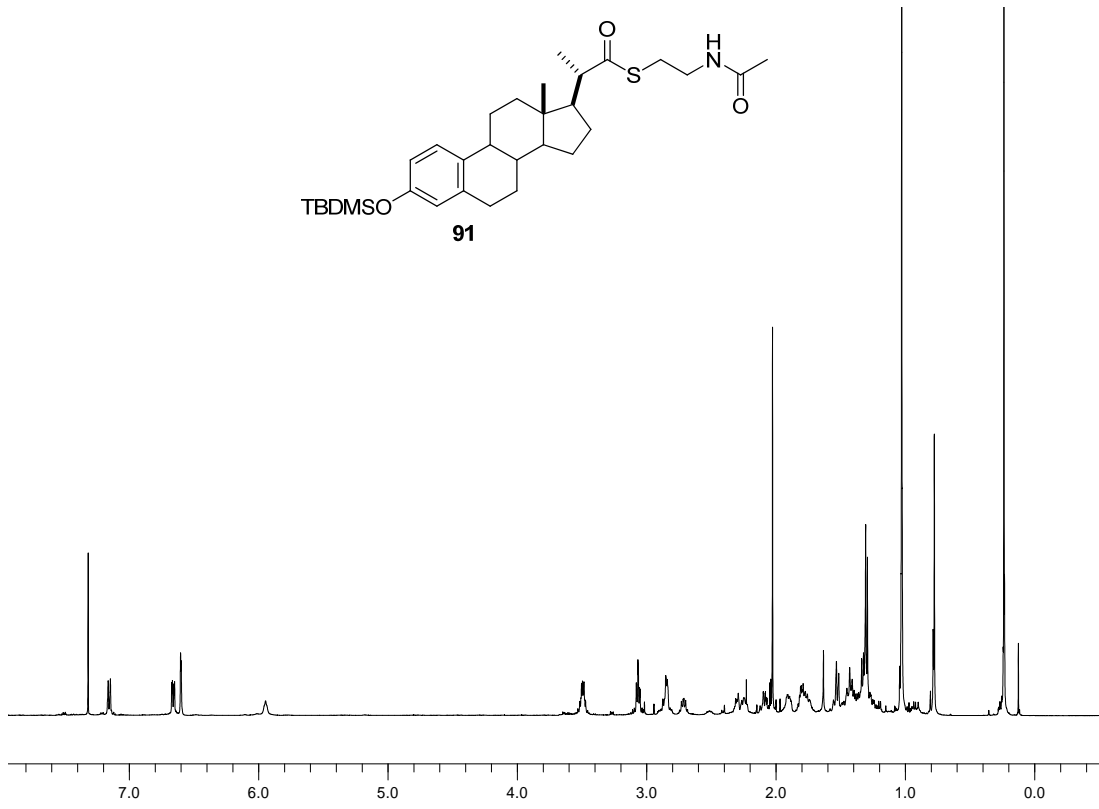
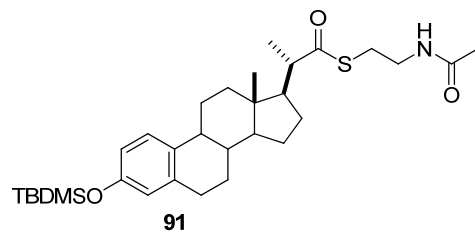
RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 204.5 (C22, s); 170.4 (C25, s); 153.3 (C3, s); 137.8 (C5, s); 133.1 (C10, s); 126.1 (C1, d); 120.0 (C4, d); 117.2 (C2, d); 54.8 (C14, d); 52.8 (C17, d); 52.2 (C20, d); 43.7; 43.3 (C13, s); 40.5 (C24, t); 40.0; 38.7; 29.6; 28.1 (C23, t); 28.0; 27.7; 27.4; 26.7 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$, q); 25.8 (C11, t); 23.3 (C26, q); 18.5 ($\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$, s); 17.8 (C21, q); 12.3 (C18, q); -4.4 ($\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 543 (M^+ , 9); 86 (100).

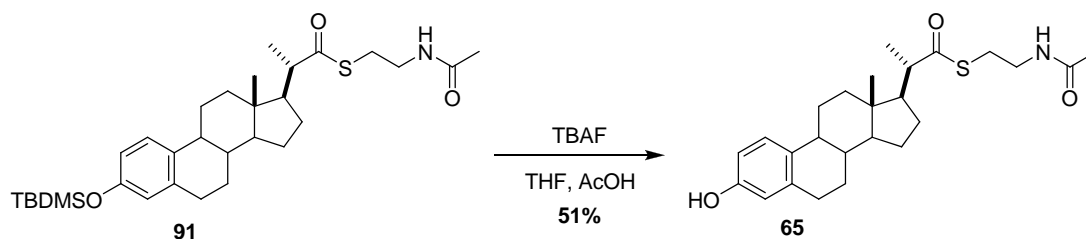
(+)-HRFABMS m/z (%): 544.3282 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd. para $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{NSSi}$, 544.3275).

(+)-HRESIMS: m/z 544.3267 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd. para $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{NO}_3\text{SSi}$, 544.3275).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = $+2.4^\circ$ [$c = 0.05$, MeOH].



7.8. Síntesis de paratioesteroide C (65)



A una disolución del tioesteroide **91** (13 mg, 0.05 mmol) en THF (2 mL) se le añadieron 22 μL (1.5 equiv) de TBAF 1M y una gota de AcOH. Se dejó agitando a t.a. durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se añadió una disolución acuosa de NH_4Cl y EtOAc. La fase orgánica se lavó con agua y se secó con MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (6:4)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 45 min y fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 6:4) obteniéndose 7 mg del paratioesteroide C (**65**), semisólido blanco, 51%.

65: RMN- ^1H y RMN- ^{13}C : ver Tablas 12 y 13.

RMN- ^1H (500 MHz, CD_3Cl) δ (ppm): 7.18 (H1, 1H, d, $J = 8.5$ Hz); 6.66 (H2, 1H, d, $J = 8.5, 2.8$ Hz); 6.61 (H4, 1H, d, $J = 2.8$ Hz); 3.49 (H24, 2H, ddd, $J = 7.0, 6.9, 2.1$ Hz); 3.06 (H23, 2H, ddd, $J = 7.1, 6.9, 0.7$ Hz); 2.85 (H6, 2H, m); 2.71 (H20, 1H, dq, $J = 10.2, 6.8$ Hz); 2.02 (H26, 3H, s); 1.29 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.77 (H18, 3H, s).

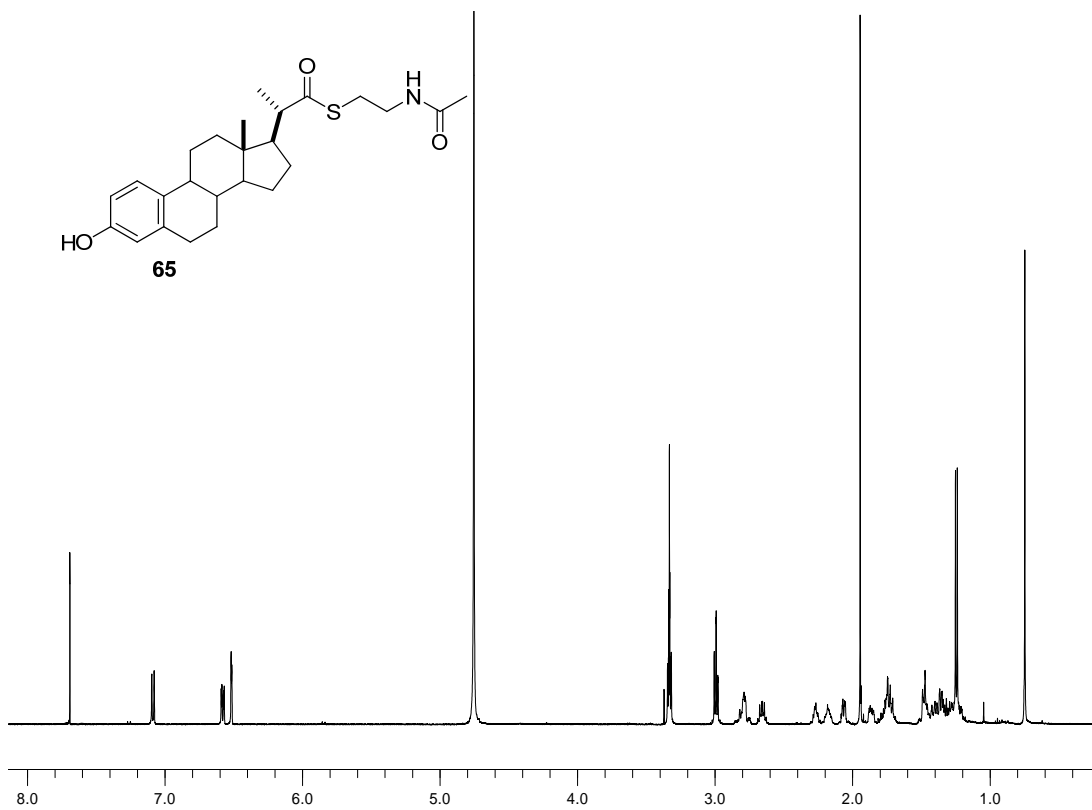
RMN- ^{13}C (125 MHz, CD_3Cl) δ (ppm): 204.4 (C22, s); 170.3 (C25, s); 153.4 (C3, s); 138.3 (C5, s); 132.2 (C10, s); 126.5 (C1, d); 115.3 (C4, d); 112.7 (C2, d); 54.8 (C14, d); 52.9 (C17, d); 52.0 (C20, d); 43.7 (C9, d); 43.1 (C13, s); 40.0 (C12, t); 39.9 (C24, t); 38.8 (C8, d); 29.7 (C6, t); 28.2 (C7, t); 27.6 (C23, t); 27.4 (C16, t); 26.7 (C11, q); 24.1 (C15, t); 23.3 (C26, q); 17.9 (C21, q); 12.3 (C18, q).

(+)-LRFABMS m/z (%): 430 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 7); 154 (100).

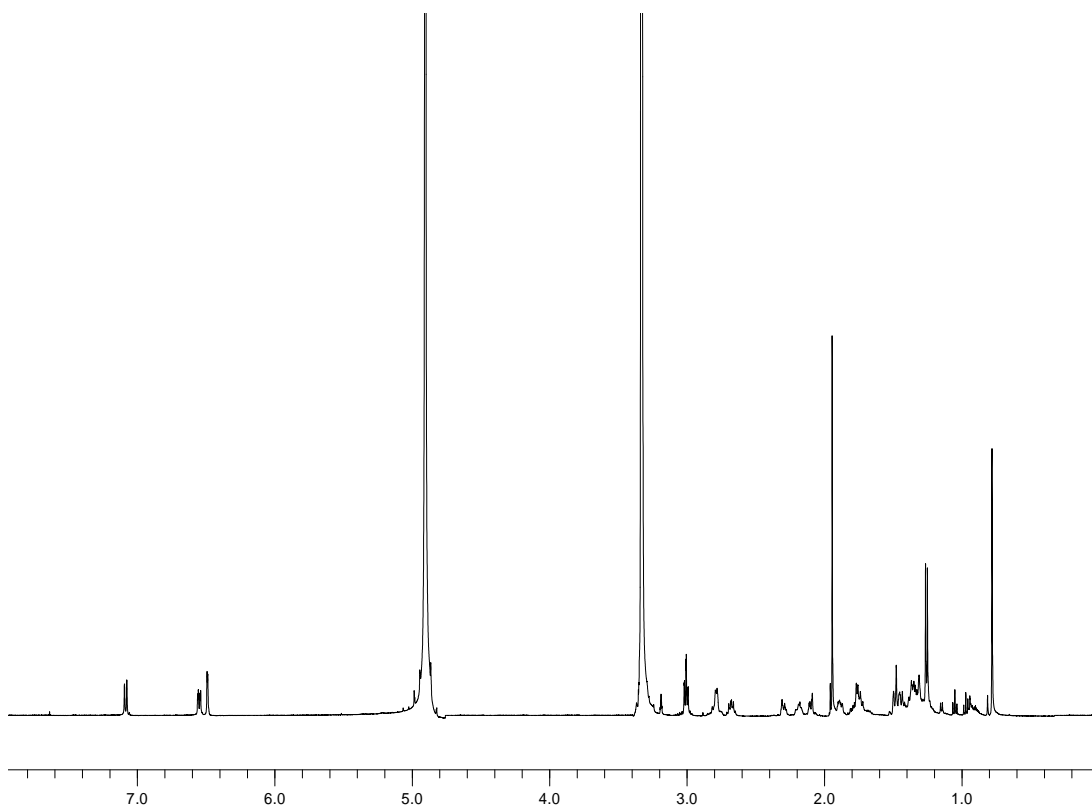
HREIMS: m/z 429.2329 $[\text{M}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{NO}_3\text{S}$, 429.2332).

(+)-HRESIMS: m/z 430.2401 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{NO}_3\text{S}$, 430.2410).

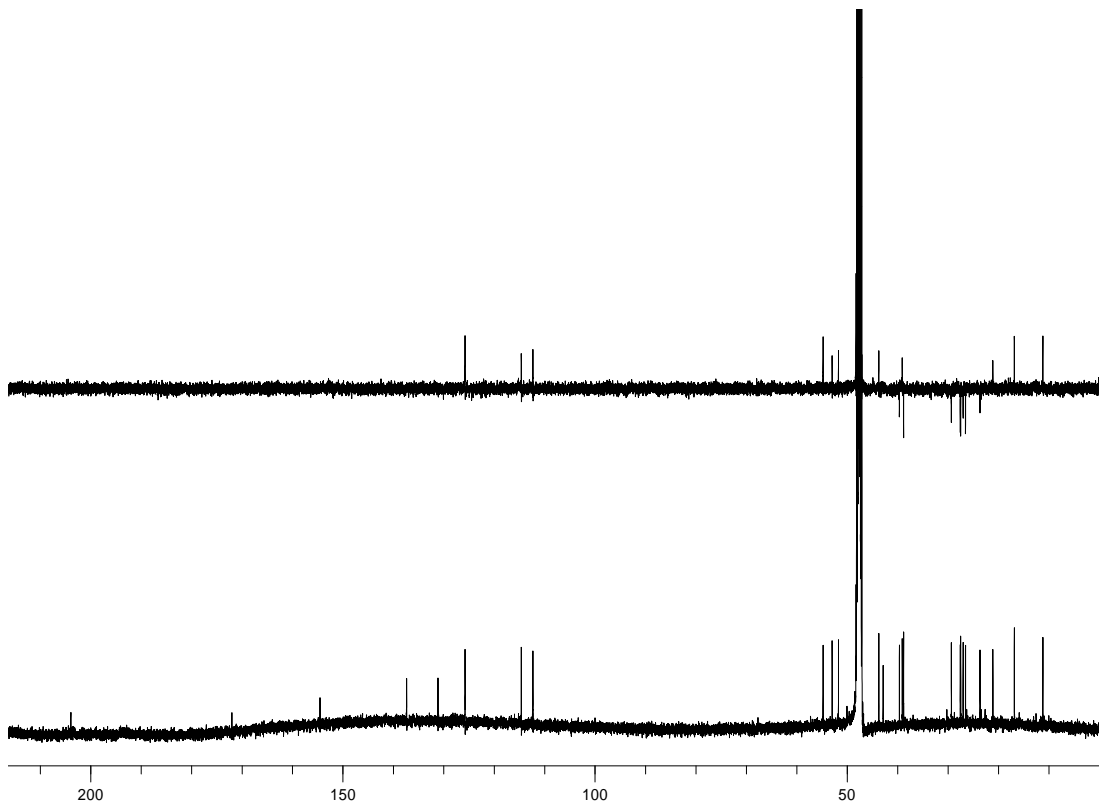
$[\alpha]_{\text{D}}$ = +14.7° [$c = 0.2$, MeOH].



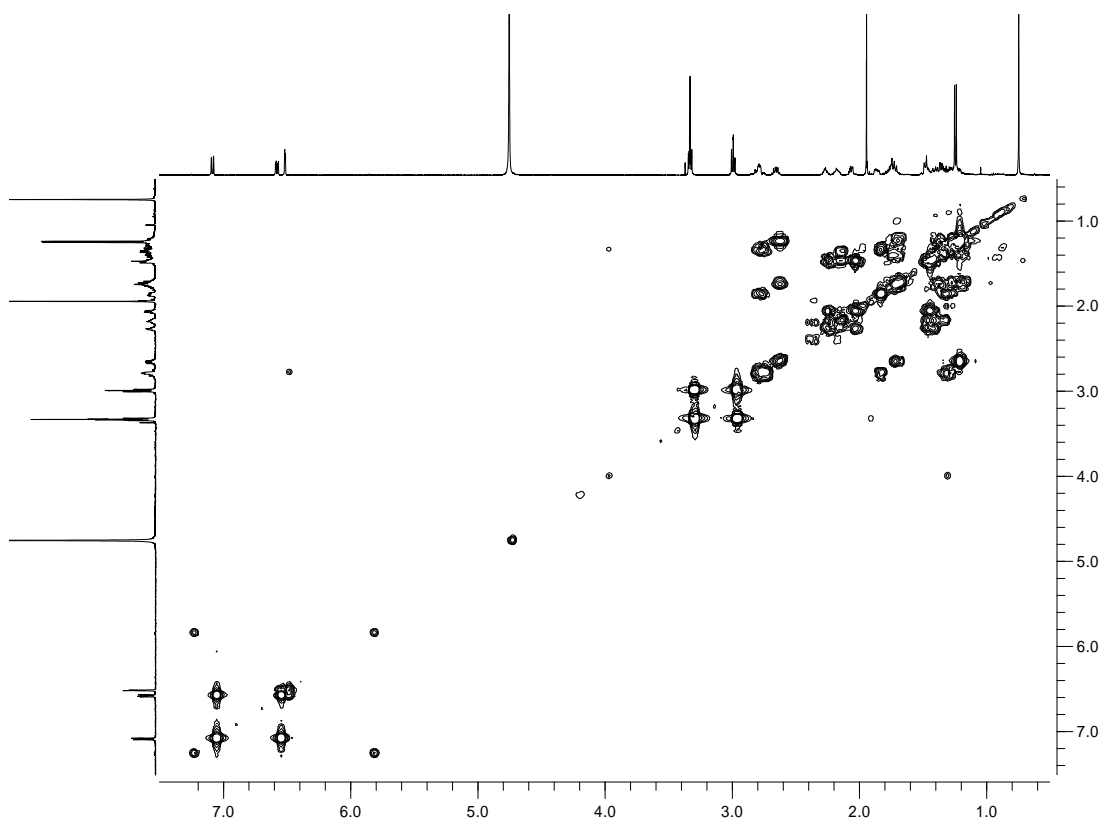
RMN de ¹H (500 MHz) del paratioesteroide C natural (**65**) en CDCl₃/CD₃OD.



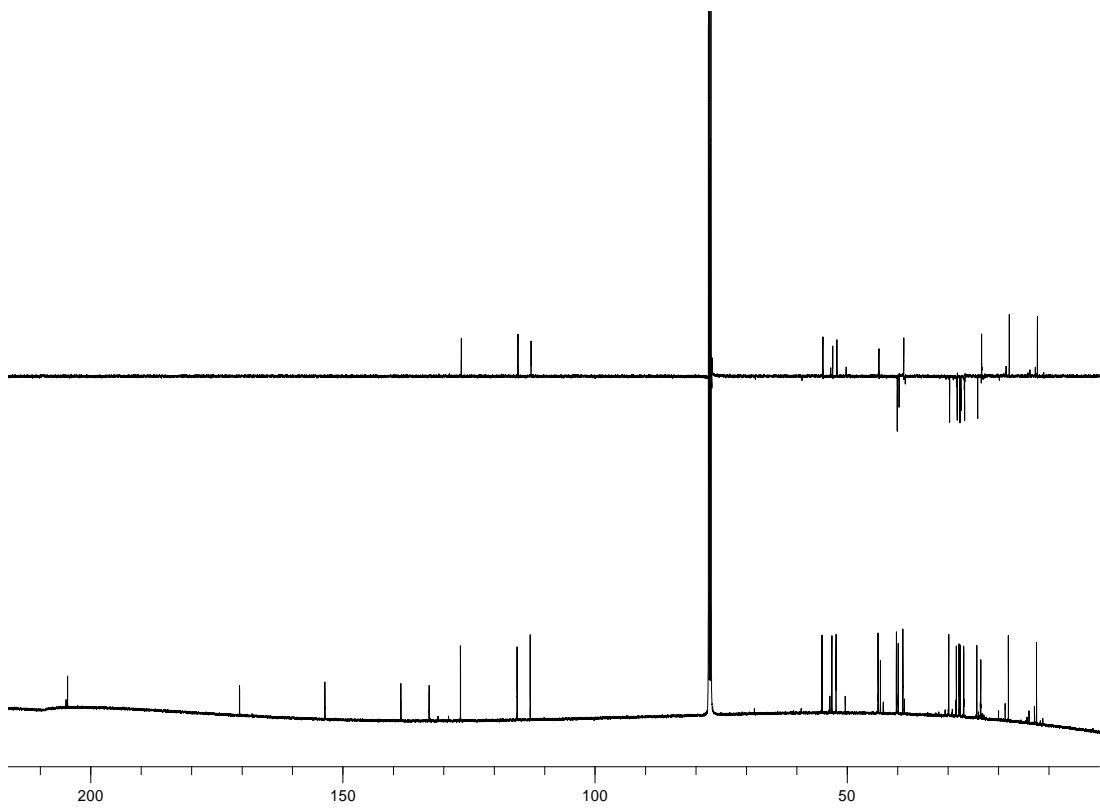
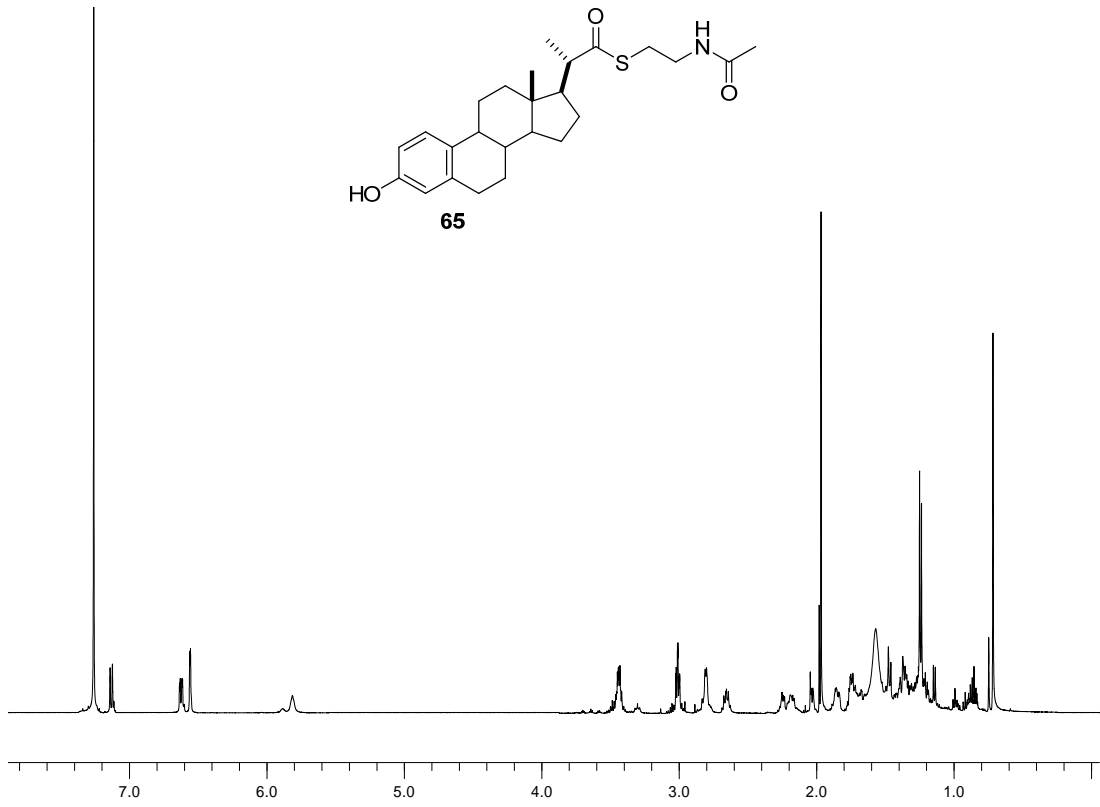
RMN de ¹H (500 MHz) del paratioesteroide C sintético (**65**) en CD₃OD.



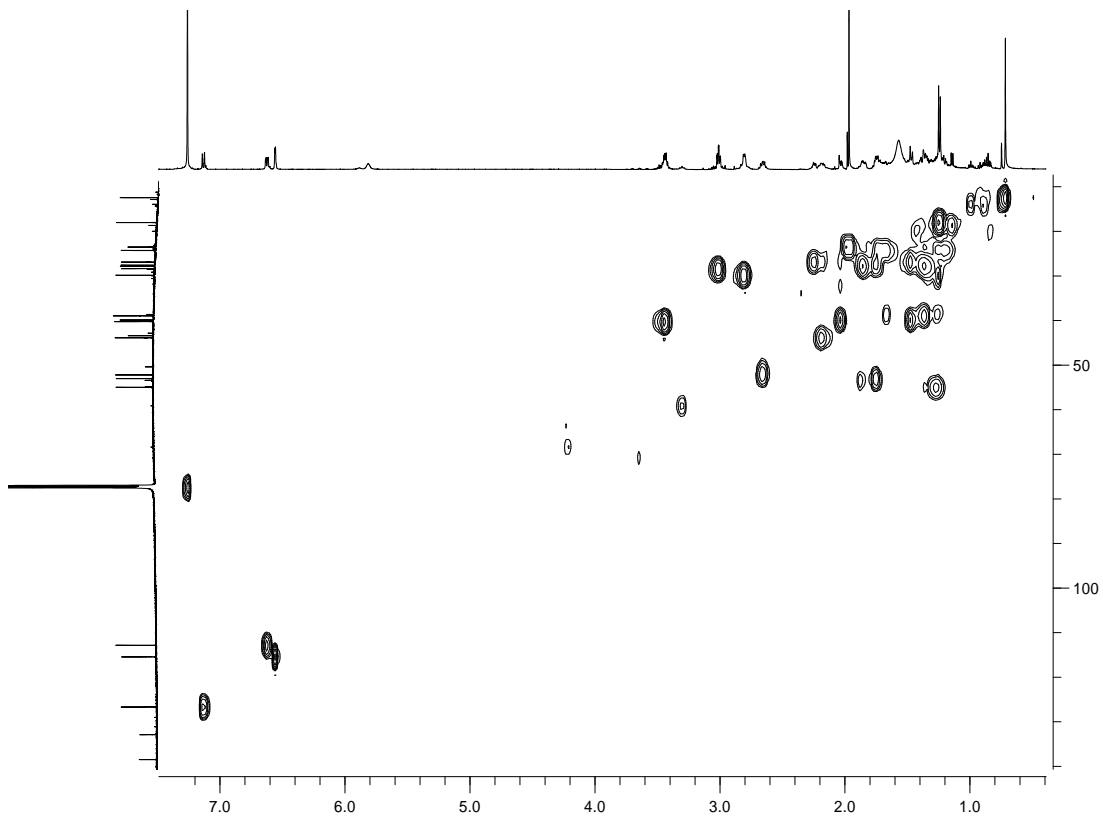
RMN de ^{13}C (125 MHz) del paratioesteroide C (**65**) en CD_3OD .



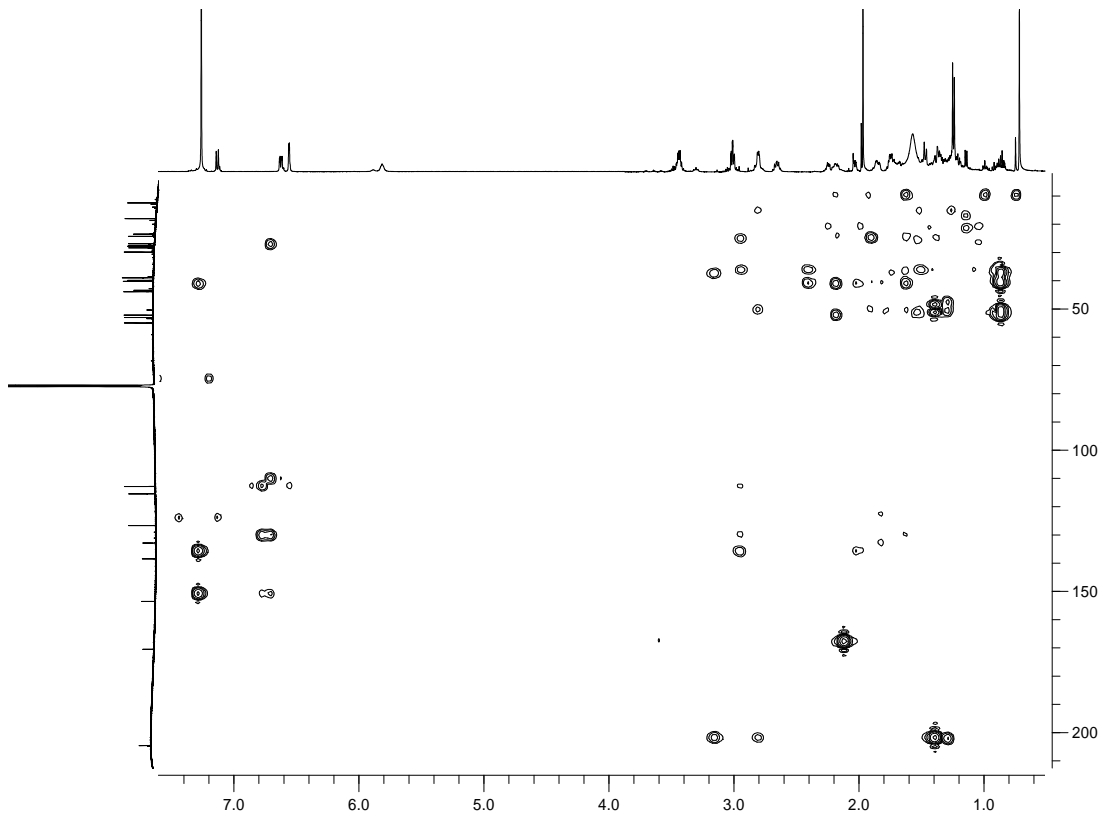
^1H ^1H COSY (500 MHz) del paratioesteroide C (**65**) en $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$.



RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) del paratioesteroide C (**65**) en CD_3Cl .

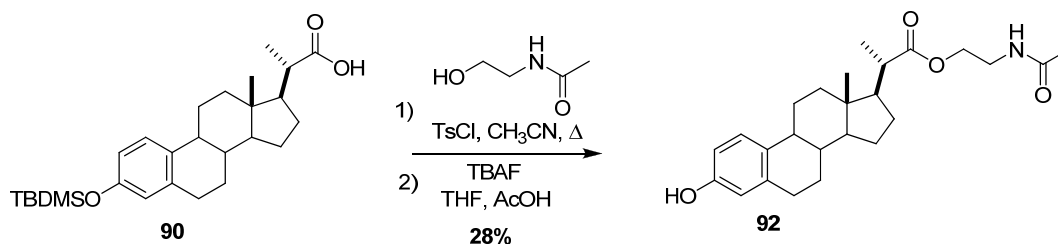


HSQC (500 MHz) del paratioesteroide C (**65**) en CDCl_3 .



HMBC (500 MHz) del paratioesteroide C (**65**) en CDCl₃.

7.9. Síntesis de análogo 92



Sobre una disolución del ácido **90** (15 mg, 0.15 mmol) y *N*-metilimidazol (35 μL , 0.44 mmol) en CH_3CN (3 mL) se añadió TsCl (36 mg, 0.18 mmol) disuelto en CH_3CN (3 mL) se dejó a 85°C para a continuación añadir *N*-acetiletanolamina (19 μL , 0.14 mmol) que se dejó a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción (12 mg, 0.05 mmol) que se disolvió en THF (2 mL) y al que se le añadieron 22 μL (1.5 equiv) de TBAF 1M y una gota de AcOH. Se dejó agitando a t.a. durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **65** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (1:1)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 29 min y fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 6:4) obteniéndose 27 mg del análogo **92**, semisólido blanco, con un 28% de rendimiento tras dos pasos.

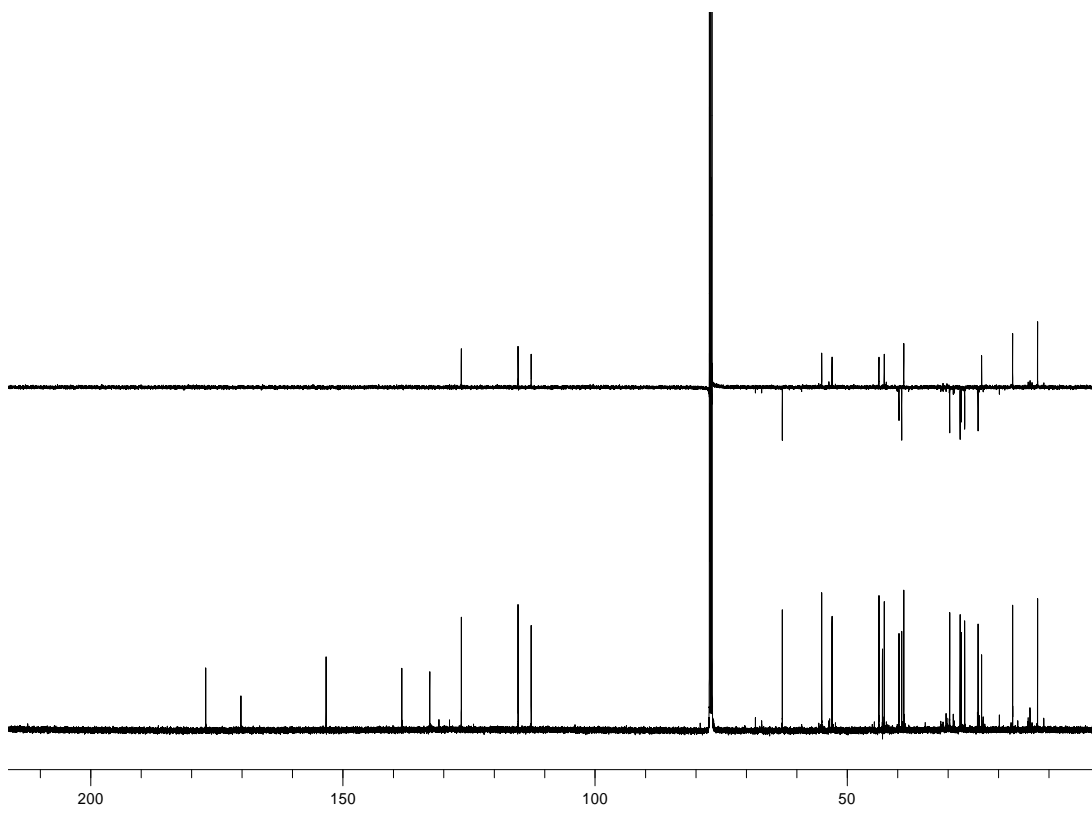
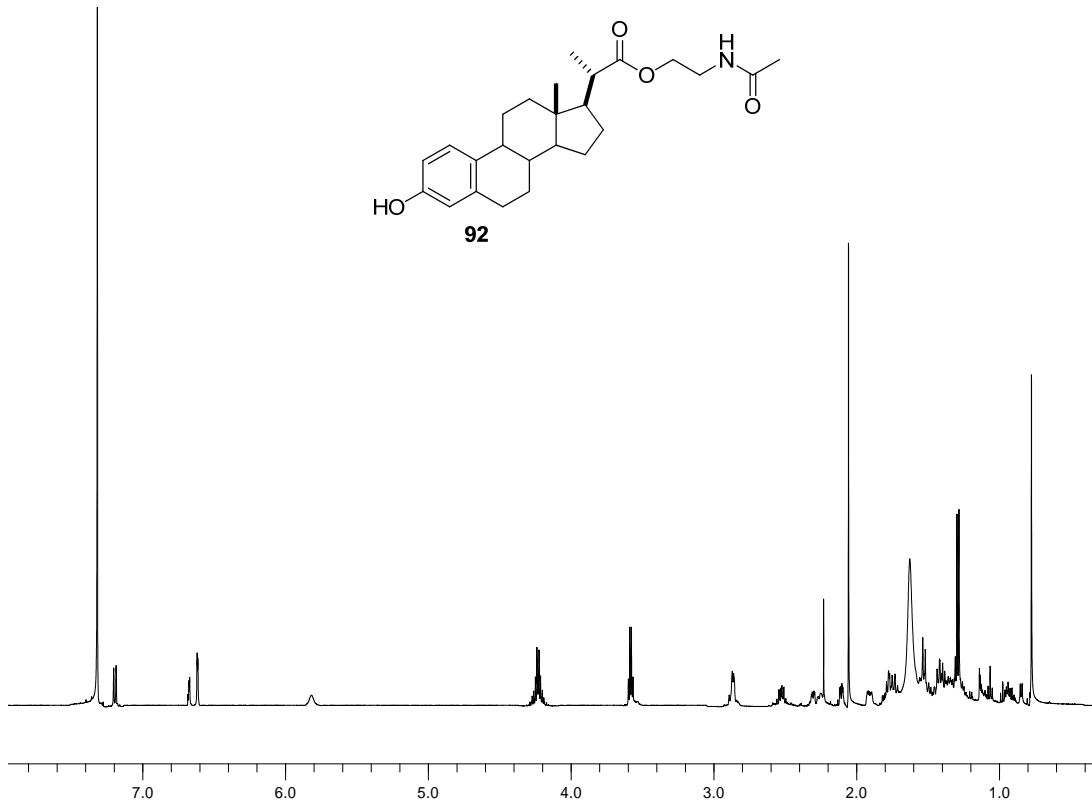
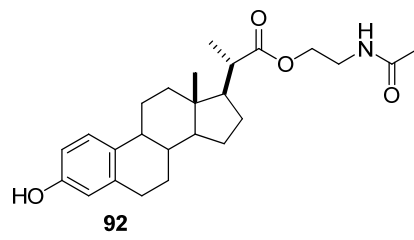
RMN- ^1H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.19 (H1, 1H, d, $J = 8.5$ Hz); 6.67 (H2, 1H, d, $J = 8.5, 2.8$ Hz); 6.61 (H4, 1H, d, $J = 2.8$ Hz); 5.81 (NH, 1H, br.); 4.24 (H24, 2H, m); 3.58 (H23, 2H, m); 2.87 (H6, 2H, m); 2.51 (H20, 1H, m); 2.05 (H26, 3H, s); 1.29 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.77 (H18, 3H, s).

RMN- ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 177.2 (C25, s); 170.2 (C22, s); 153.3 (C3, s); 138.3 (C5, s); 132.7 (C10, s); 126.5 (C1, d); 115.2 (C4, d); 112.6 (C2, d); 62.8 (C23, t); 55.0 (C14, d); 53.0 (C17, d); 43.7 (C20, d); 43.0 (C13, s); 42.6 (C9, d); 39.7 (C24, t); 39.2 (C12, t); 38.8 (C8, d); 29.6 (C6, t); 27.5 (C16, t); 27.5 (C7, t); 26.7 (C11, t); 24.0 (C15, t); 23.2 (C26, q); 17.2 (C21, q); 12.2 (C18, q).

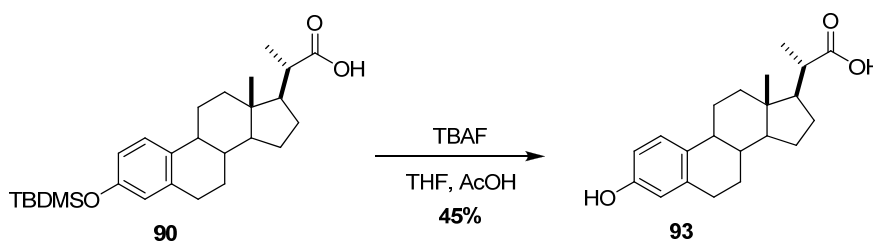
LREIMS (70eV, m/z %): 413 (M^+ , 47); 282 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 414.2638 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ (calcd. para $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{NO}_4$, 414.2639).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +65.4 $^\circ$ [$c = 0.002$, MeOH].



7.10. Síntesis de ácido 93



A una disolución del ácido **90** (12 mg, 0.05 mmol) en THF (2 mL) se le añadieron 22 μL (1.5 equiv) de TBAF 1M y una gota de AcOH. Se dejó agitando a t.a. durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **65** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice con la fase móvil [Hexano:EtOAc (7:3)], para obtener 8 mg del ácido **93**, semisólido blanco, 45%.

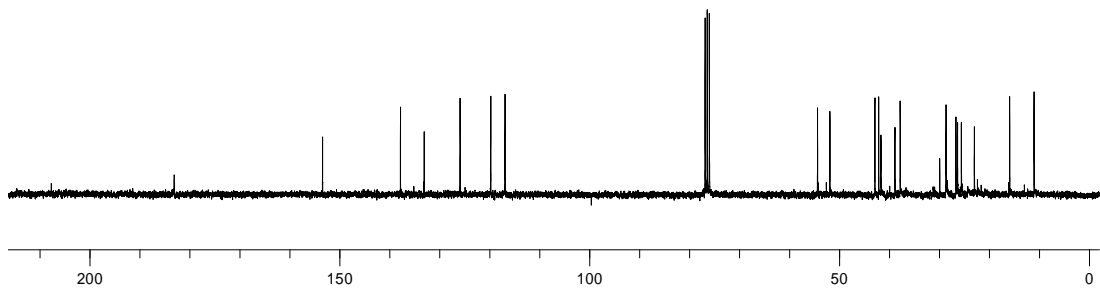
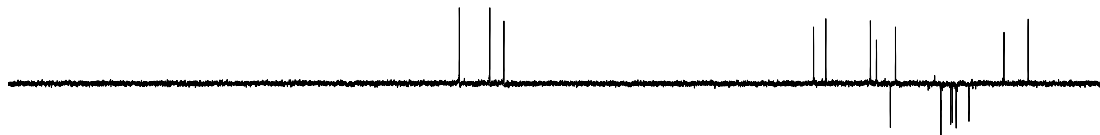
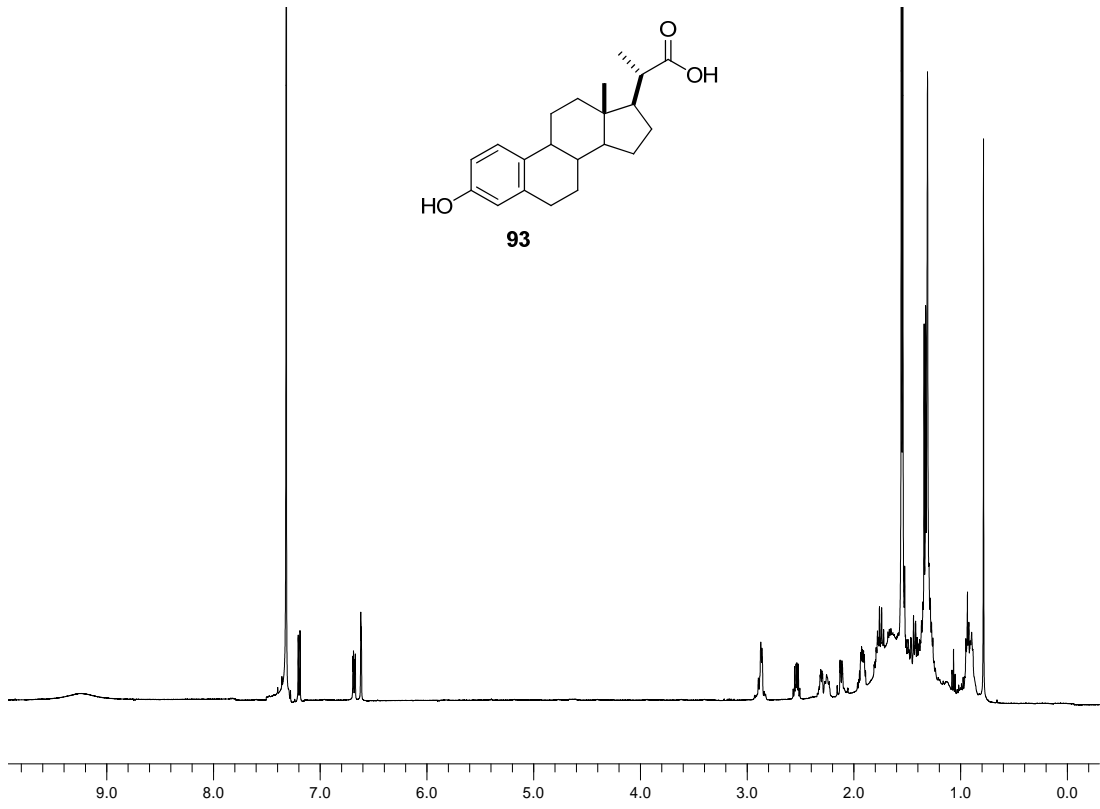
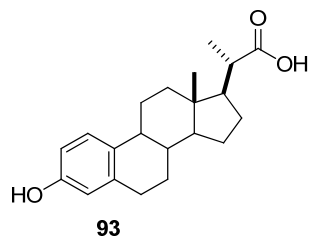
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.19 (H1, 1H, d, $J = 8.5$ Hz); 6.60 (H2, 1H, d, $J = 8.5, 2.6$ Hz); 6.57 (H4, 1H, d, $J = 2.6$ Hz); 2.87 (H6, 2H, m); 1.31 (H21, 3H, d, $J = 7.9$ Hz); 0.78 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 179.2 (C22, s); 153.3 (C3, s); 138.4 (C5, s); 132.8 (C10, s); 126.5 (C1, d); 115.3 (C4, d); 112.6 (C2, d); 55.1 (C14, d); 52.7 (C17, d); 43.7 (C20, d); 42.2 (C13, s) 39.7; 38.8; 29.7; 29.6; 27.6; 27.4; 26.7; 19.4; 17.2 (C21, q); 12.2 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 328 (M^+ , 100).

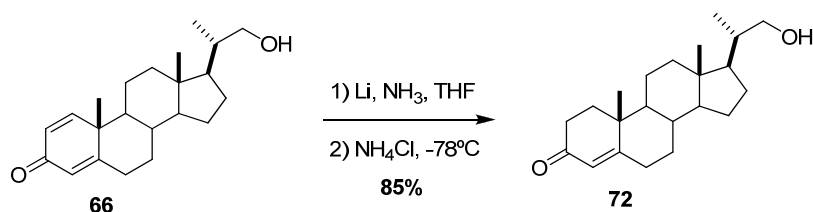
HREIMS: m/z 328.2029 [M]⁺ (calcd. para C₂₁H₂₈O₃, 328.2033).

$[\alpha]_D$ = +92.1° [$c = 0.04$, CH₂Cl₂].



8. Síntesis de análogos con el doble enlace entre las posiciones C-4/C-5

8.1. Síntesis de (5 α ,20S)-20-metil-3-oxo-pregn-4-en-21-ol (72)



Se disolvió litio (0.1 g, 1.3 cm, 1.5 equiv.) en THF (20 mL), que contenía un exceso de amoníaco líquido anhidro a -78°C, originando una disolución que presentó un color azul oscuro. A continuación, se adicionó la 20S-hidroxiometilpregna-1,4-dien-ona (**66**) (1.0 g, 3.0 mmol) disuelta en THF (5 mL) a -78°C durante 20 min. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **7** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)]; recogándose 0.85 g de (5 α ,20S)-20-metil-3-oxo-pregn-4-en-21-ol (**72**), semisólido blanco; 85%.

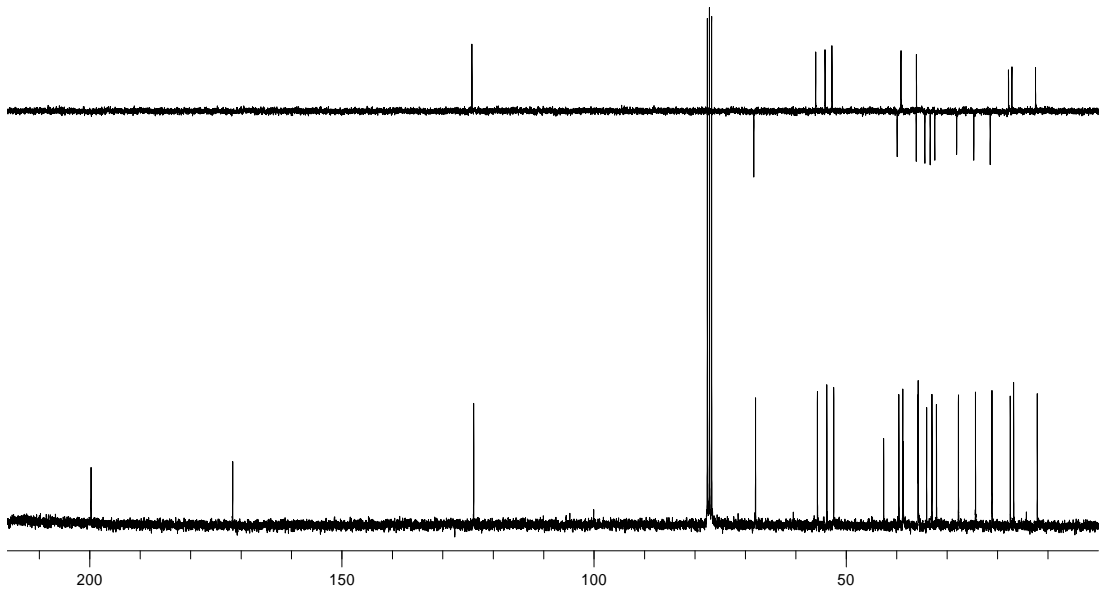
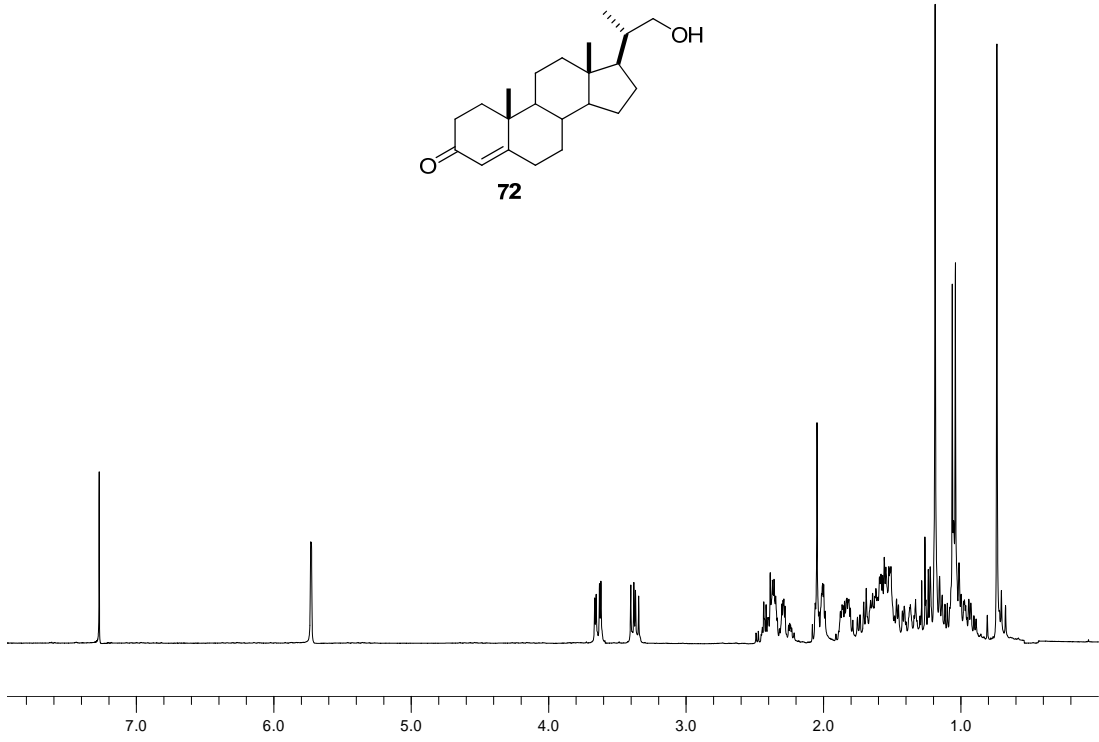
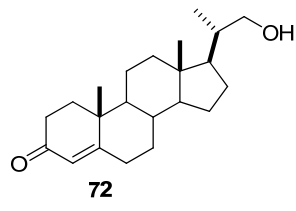
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.72 (H4, 1H, d, J = 1.6 Hz); 3.64 (H22, 1H, m); 3.37 (H22', 1H, m); 1.26 (H19, 3H, s); 1.05 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 0.73 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 199.6 (C3, s); 171.5 (C5, s); 123.7 (C4, d); 67.6 (C22, t); 55.6 (C14, d); 53.7 (C17, d); 52.4; 42.4; 39.4; 38.6; 38.5; 35.6; 35.6; 33.9; 32.8; 32.0; 27.6; 24.2; 21.0 (C11, t); 17.3 (C19, q); 16.6 (C21, q); 12.0 (C18, q).

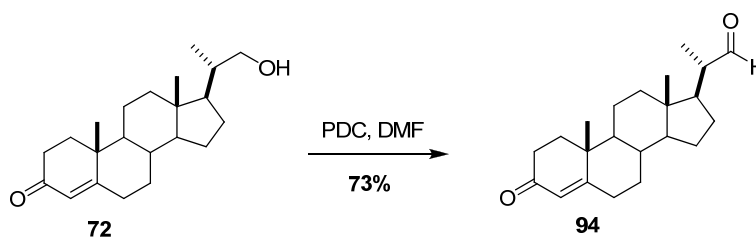
LREIMS (70eV, m/z %): 330 (M⁺, 32); 124 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 331.2639 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₂H₃₅O₂, 331.2631).

$[\alpha]_D$ = +58.4° [c = 0.05, CH₂Cl₂].



8.2. Síntesis de (5 α ,20S)-3-oxopregn-4-eno-20-carboxaldehído (94)



Sobre una disolución de (5 α ,20S)-20-metil-3-oxo-pregn-4-en-21-ol (**72**) (0.25 g, 0.75 mmol), en DMF (10 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de PDC (1.0 g, 2.5 mmol) en DMF (10 mL), se dejó agitando a t.a durante 4 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogándose 0.19 g de (5 α ,20S)-3-oxopregn-4-eno-20-carboxaldehído (**94**), semisólido blanco, 73%.

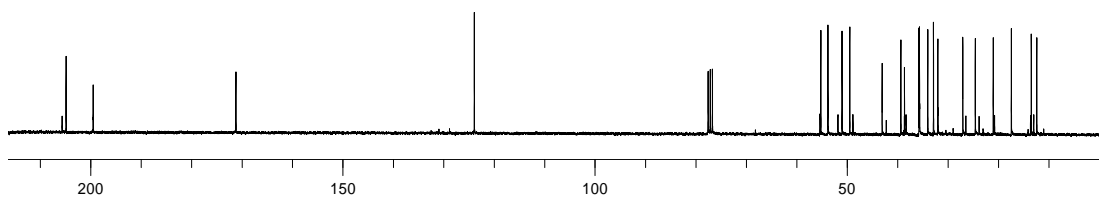
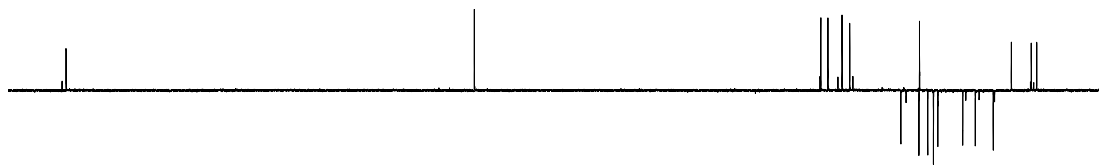
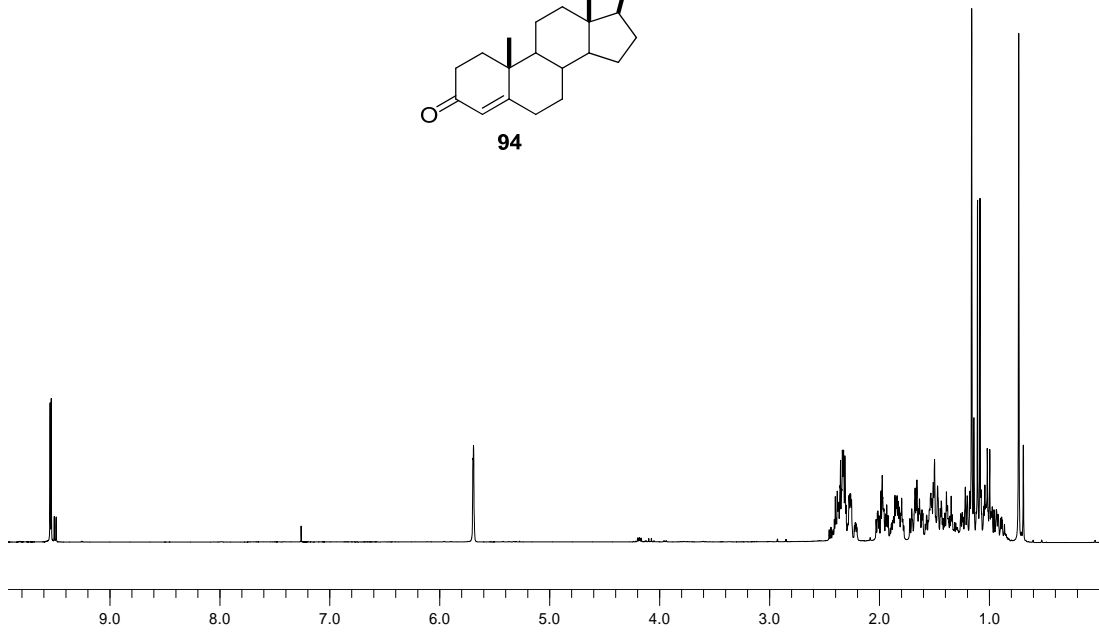
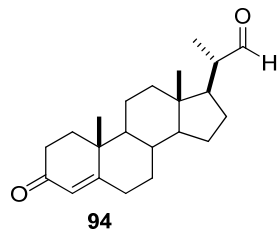
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9.54 (H22, 1H, d, $J = 3.3$ Hz); 5.70 (H4, 1H, d, $J = 1.7$ Hz); 1.17 (H19, 3H, s); 1.10 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.74 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 204.7 (C22, d); 199.4 (C3, s); 171.0 (C4, s); 123.8 (C5, d); 55.0 (C14, d); 53.6 (C17, d); 50.8; 49.3; 42.9; 39.3; 38.4; 35.6; 35.5; 33.8; 32.7; 31.8; 26.9; 24.4; 20.1 (C21, q); 17.3 (C19, q); 13.3; 12.2 (C18, q).

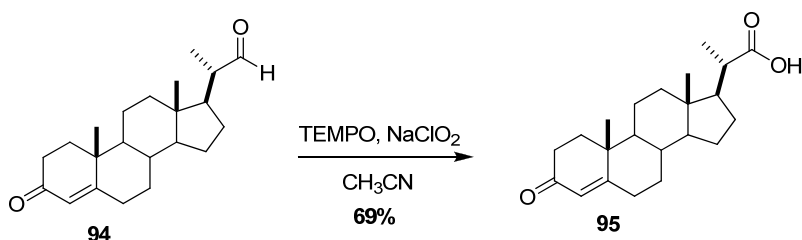
LREIMS (70eV, m/z %): 328 (M^+ , 7); 84 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 329.2468 [$M + H$]⁺ (calcd. para C₂₂H₃₃O₂, 329.2475).

$[\alpha]_D = +93.5^\circ$ [$c = 0.15$, CH₂Cl₂].



8.3. Síntesis de (5 α ,20*S*)-ácido 3-oxopregn-4-en-20-oico (**95**)



El (5 α ,20*S*)-3-oxopregn-4-eno-20-carboxaldehído (**94**) (0.05 g, 0.15 mmol) se disolvió en 5 mL de una mezcla de CH₃CN y disolución tampón a pH 6.5 en relación (1.3:1). A continuación se añadieron TEMPO (0.013 g, 0.07 mmol), NaClO₂ (0.03 g, 0.02 mmol) y NaClO (0.2 mL) y la mezcla se dejó reaccionando a t.a. durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **69** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], recogiénose 30 mg de (5 α ,20*S*)-ácido 3-oxopregn-4-en-20-oico (**95**), semisólido blanco, 69%.

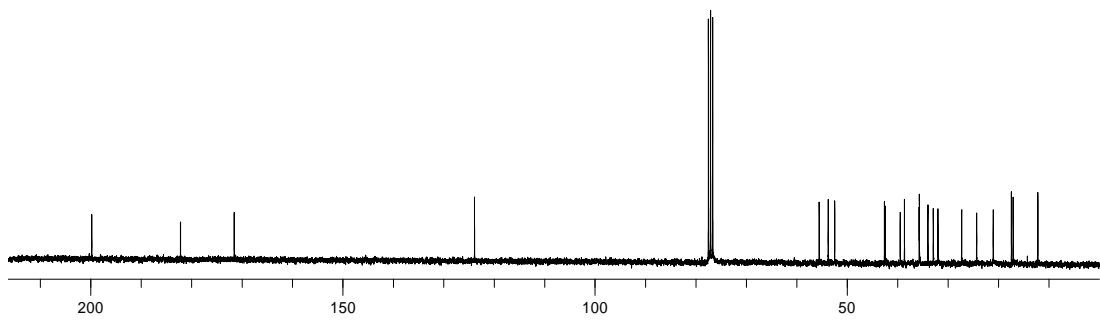
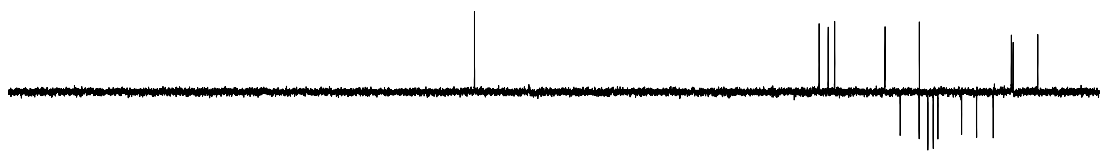
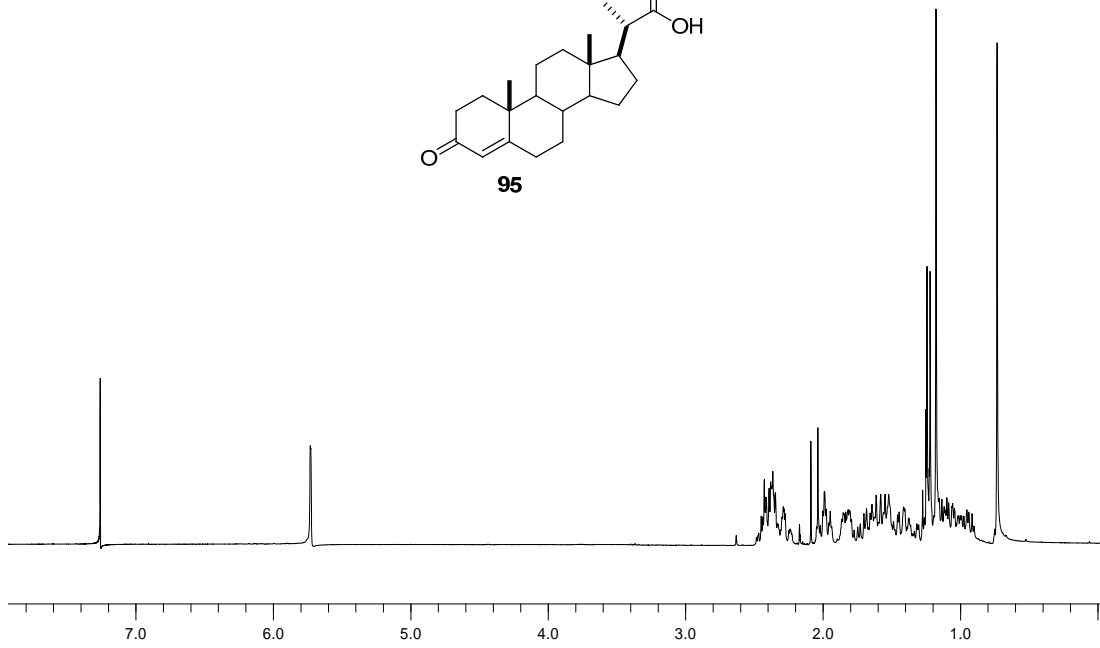
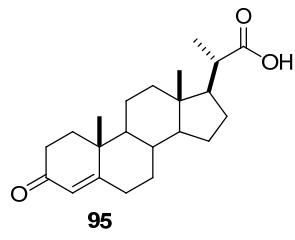
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.74 (H4, 1H, d, J = 1.4 Hz); 1.24 (H21, 3H, d, J = 6.9 Hz); 1.18 (H19, 3H, s); 0.74 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 199.3 (C3, s); 181.7 (C22, s); 171.0 (C5, s); 123.4 (C4, d); 55.0 (C14, d); 53.2 (C17, d); 52.0; 42.1; 42.0; 39.0; 38.1; 35.2; 35.1; 33.4; 32.4; 31.4; 26.7; 23.8; 20.5; 16.9 (C21, q); 16.6 (C19, q); 11.6 (C18, q).

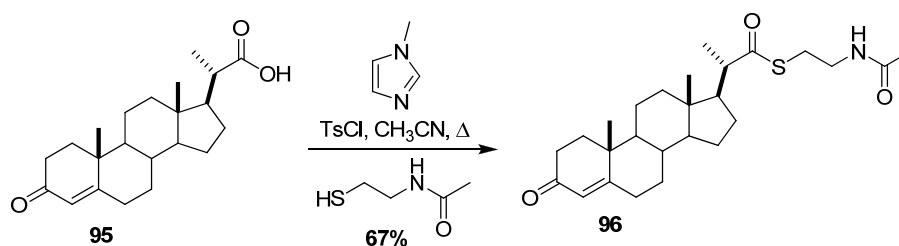
LREIMS (70eV, m/z %): 344 (M⁺, 37); 124 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 345.2434 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₂H₃₃O₃, 345.2424).

$[\alpha]_D^{25}$ = +9.5° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



8.4. Síntesis de análogo 96



Sobre una disolución de (5 α ,20*S*)-ácido 3-oxopregn-4-en-20-oico (**95**) (40 mg, 0.12 mmol) y *N*-metilimidazol (25 μ L, 0.36 mmol) en CH₃CN (3 mL) se añadió TsCl (27 mg, 0.15 mmol) disuelto en CH₃CN (3 mL) y se dejó reaccionando a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió *N*-acetilcisteamina (12 μ L, 0.11 mmol) y la mezcla se refluxó a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 43 min y fase móvil CH₃CN/H₂O, 7:3) obteniéndose 26 mg del análogo **96**, semisólido blanco, 67%.

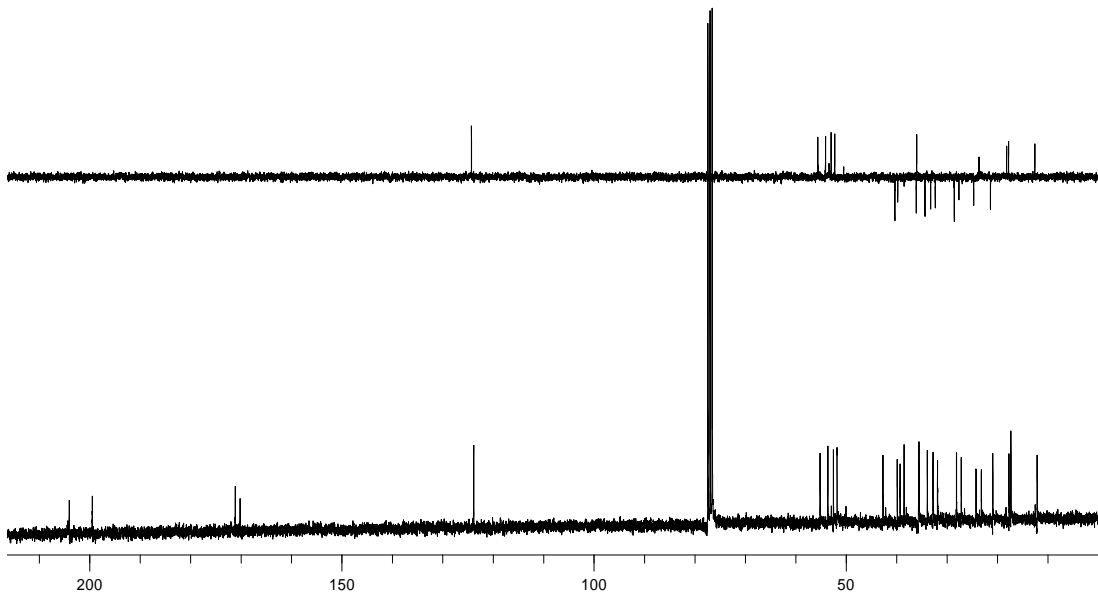
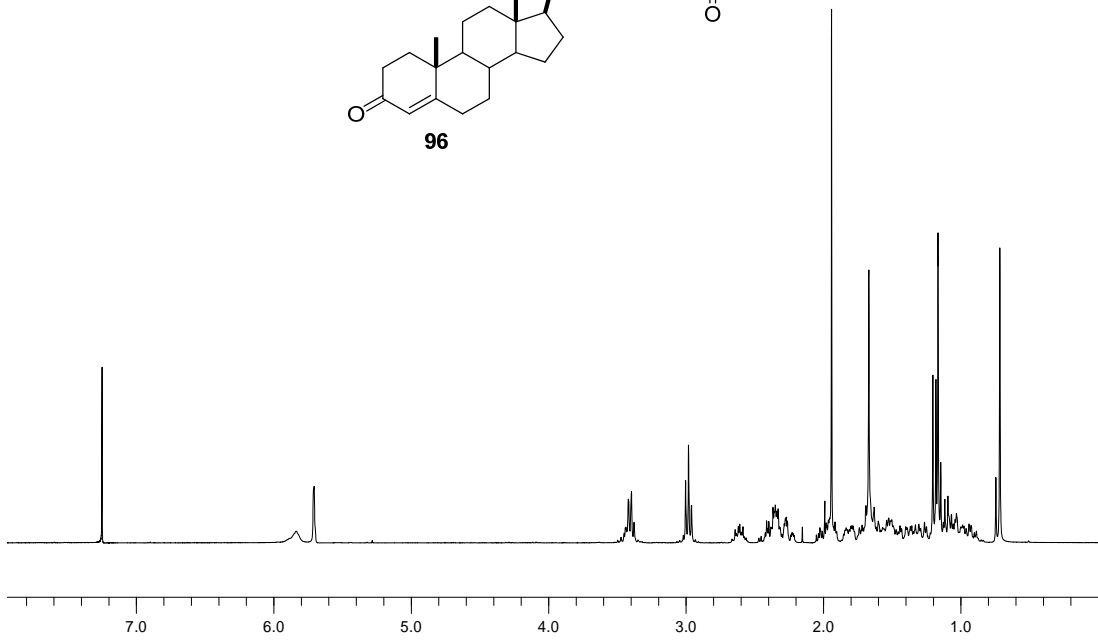
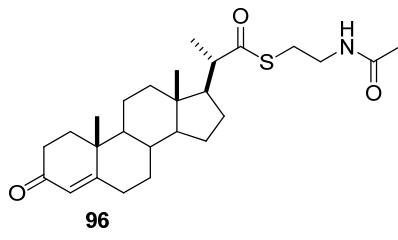
RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.85 (NH, 1H, sa); 5.73 (H4, 1H, d, J = 1.6 Hz); 3.43 (H24, 2H, m); 3.00 (H23, 2H, m); 1.96 (H26, 3H, s); 1.21 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 1.19 (H19, 3H, s); 0.74 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 204.0 (C22, s); 199.5 (C3, s); 171.2 (C25, s); 170.2 (C5, s); 123.8 (C4, d); 55.2 (C14, d); 53.6 (C17, d); 52.5 (C20, d); 51.8; 42.7; 39.8 (C24, t); 39.3; 38.5; 35.6; 35.5 (C8, d); 34.0; 32.7; 31.8 (C23, t); 28.1; 27.1; 24.2; 23.2 (C26, q); 20.9 (C11, t); 17.7 (C21, q); 17.3 (C19, q); 12.1 (C18, q).

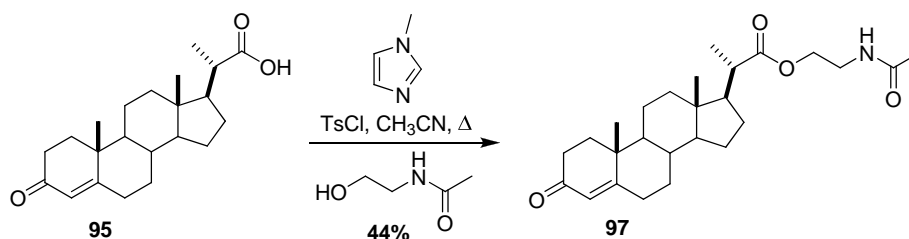
LREIMS (70eV, m/z %): 445 (M⁺, 6); 83 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 446.2744 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₄₀NO₃S, 446.2723).

$[\alpha]_D$ = +30.1° [c = 0.1, CH₂Cl₂].



8.5. Síntesis de análogo 97



Sobre una disolución de (5 α ,20 S)-ácido 3-oxopregn-4-en-20-oico (**95**) (25 mg, 0.08 mmol) y N -metilimidazol (17 μL , 0.22 mmol) en CH_3CN (3 mL) se añadió TsCl (18 mg, 0.09 mmol) disuelto en CH_3CN (3 mL) y se reflujo a 85°C durante 1 h. A continuación, se añadió N -acetiletanolamina (9 μL , 0.07 mmol) reflujo a 85°C durante 24 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **63** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)] y por HPLC (Sharlau C18, flujo 1 mL/min, tiempo de retención 30 min y fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 7:3) obteniéndose 27 mg del análogo **97**, semisólido blanco, 44%

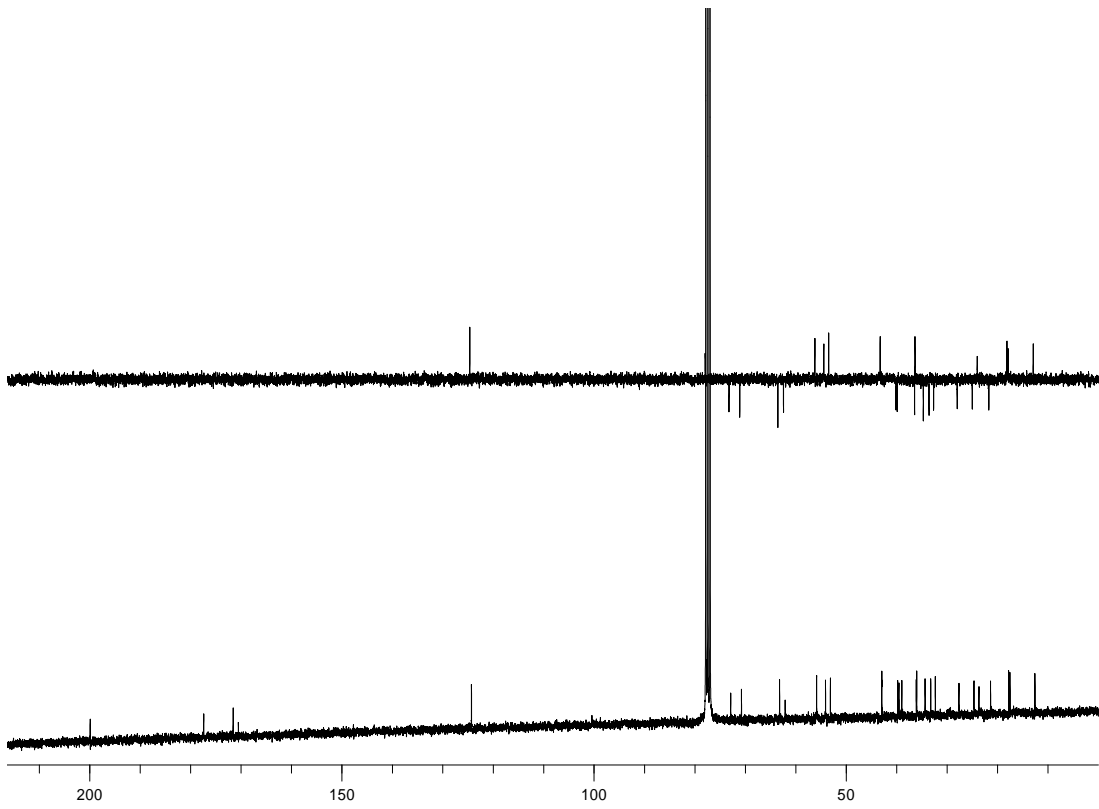
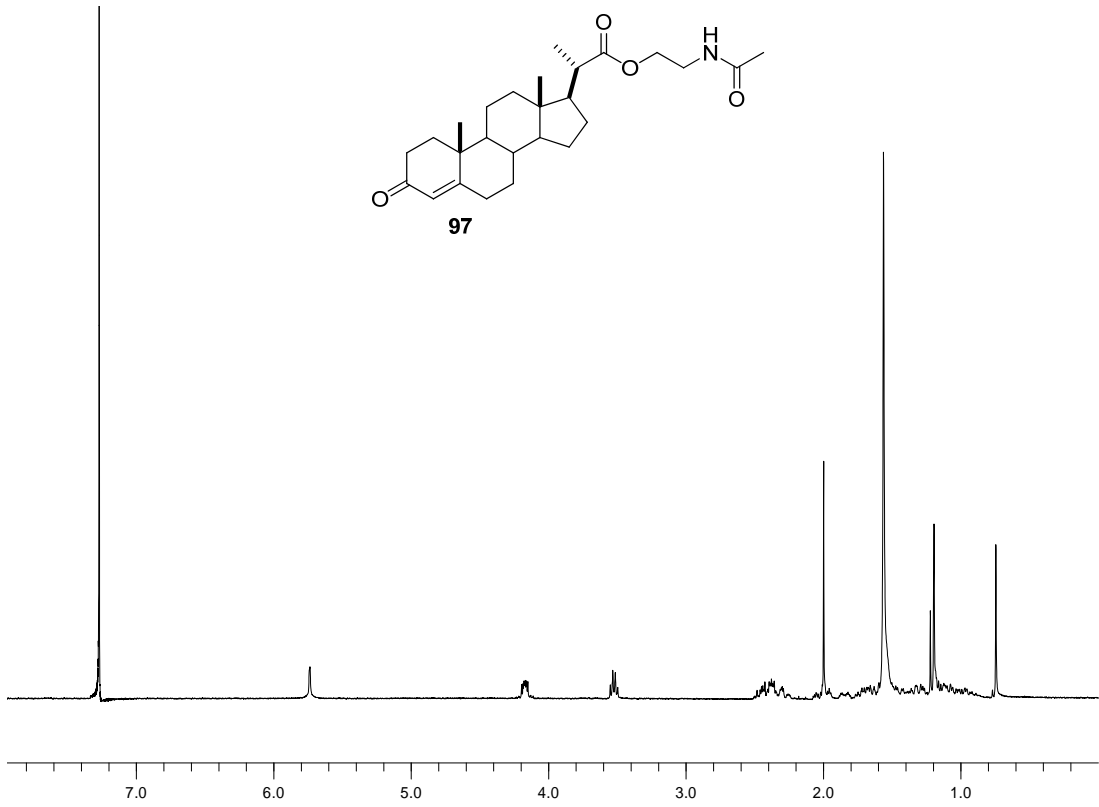
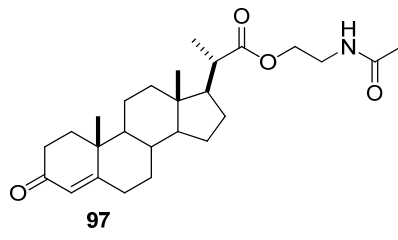
RMN-¹H (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.73 (H4, 1H, s); 4.17 (H23, 2H, m); 3.53 (H24, 2H, m); 2.00 (H26, 3H, s); 1.22 (H19, 3H, s); 1.19 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.74 (H18, 3H, s).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 199.5 (C3, s); 177.0 (C22, s); 171.2 (C25, s); 170.1 (C5, s); 123.9 (C4, d); 72.4; 70.3; 62.7 (C23, t); 55.4 (C14, d); 53.6 (C17, d); 52.7 (C20, d); 42.5; 39.3; 38.5; 35.6 (C8, d); 35.6 (C24, t); 34.0; 32.8; 31.9; 27.2; 24.2; 23.2 (C26, q); 20.9 (C11, t); 17.3 (C21, q); 17.1 (C19, q); 12.2 (C18, q).

LREIMS (70eV, m/z %): 429 (M^+ , 8); 83 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 430.2967 [$\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{NO}_4$, 430.2951).

$[\alpha]_{\text{D}}$ = +21.3° [$c = 0.1$, CH_2Cl_2].



9. Paratioesteroides naturales A-C

El coral blando *Paragorgia* sp. se recolectó cerca de la Isla de Madagascar a una profundidad de 723/790 m. Fue identificado por el Dr. Pablo López de la Universidad de Sevilla (España). El espécimen congelado se registró en PharmaMar con el código de recibo (ORMA001992) donde fue triturado y extraído con 2-propanol. Los extractos combinados se concentraron para obtener un crudo que fue sometido a VLC fase reversa-18 con un gradiente desde H₂O hasta MeOH. Los paratioesteroides A (35 mg), B (2.0 mg) y C (5.6 mg) fueron aislados de las fracciones eluidas con MeOH mediante HPLC semipreparativo (Prep C-18 gradiente H₂O/CH₃CN desde 50 a 100 % CH₃CN, con detector de ultravioleta).

5.5.1. Paratioesteroide A

RMN-¹H y **RMN-¹³C**: ver Tablas 12 y 13.

Sólido amorfo blanco.

IR (KBr) ν_{\max} : 3291, 3080, 2939, 1657, 1621, 1599, 1550, 1438, 1403, 1371, 1291, 1240, 1204, 1009, 964, 930, 886 cm⁻¹.

(+)-LRFABMS, m/z (%): 444 [M + H]⁺.

(+)-HRFABMS: m/z 444.2572 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₃₈NO₃S 444.2564).

[α]_D = +5.9° [c = 0.2, MeOH].

5.5.2. Paratioesteroide B

RMN-¹H y **RMN-¹³C**: ver Tablas 12 y 13.

Sólido amorfo blanco.

IR (KBr) ν_{\max} : 3301, 3080, 2939, 1684, 1546, 1442, 1373, 1274, 1262, 1237, 1199, 1176, 1161, 1107, 966, 935 cm⁻¹.

(+)-LRFABMS, m/z (%): 446 [M + H]⁺.

(+)-HRFABMS: m/z 446.2710 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₆H₄₀NO₃S 446.2729).

[α]_D = +66.2° [c = 0.2, MeOH].

5.5.3. Paratioesteroide C

RMN-¹H y **RMN-¹³C**: ver Tablas 12 y 13.

Sólido amorfo blanco.

IR (KBr) ν_{\max} : 3384, 3148, 2947, 2875, 1679, 1646, 1605, 1572, 1532, 1496, 1452, 1428, 1383, 1359, 1293, 1252, 968 cm⁻¹.

(+)-LRFABMS, m/z (%): 430 [M + H]⁺.

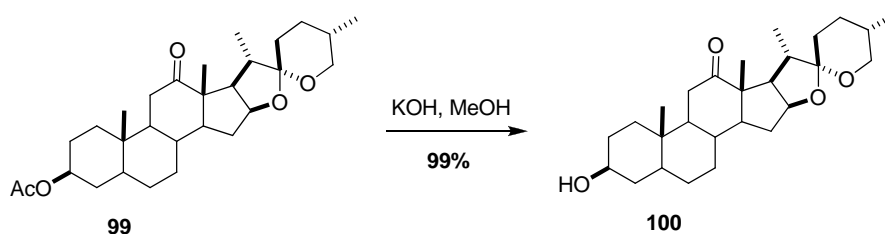
(+)-HRFABMS: m/z 430.2420 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₅H₃₆NO₃S, 430.2416).

[α]_D = +11.2° [c = 0.2, MeOH].

Síntesis de nuevos análogos de las cefalostatinas.

10. Síntesis de bis-hecogenin/22-*epi*-hipuristan-11-ona pirazina

10.1. Síntesis de hecogenina (100)



La hecogenina acetilada (**99**) (2.0 g, 4.0 mmol), se disolvió en una disolución KOH:MeOH al 5% (15 mL) y se dejó reaccionando 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **12** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 2.0 g de la hecogenina (**100**), semisólido blanco, 99%.

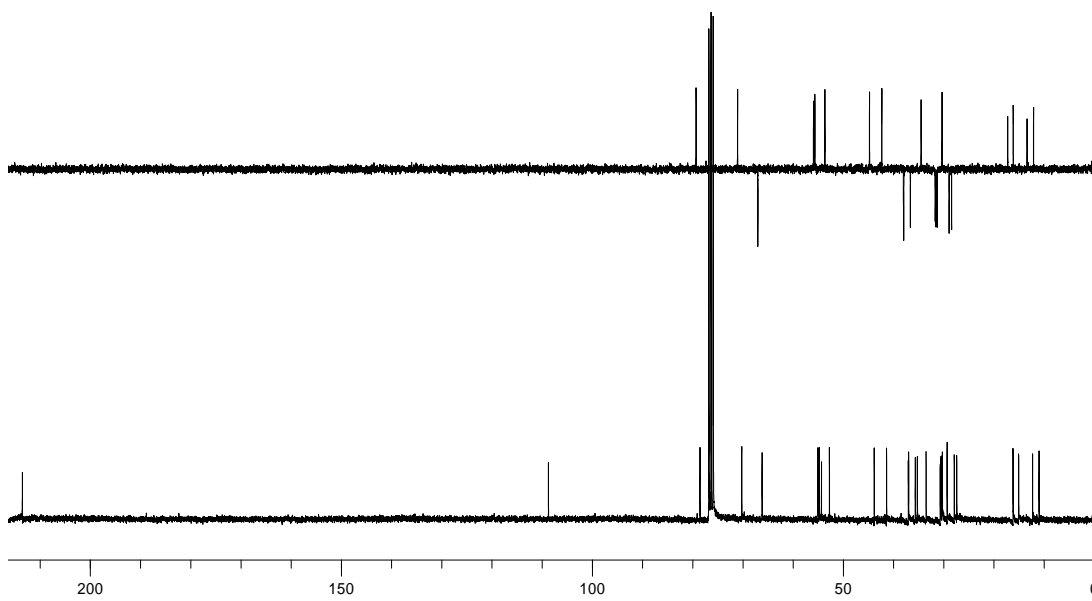
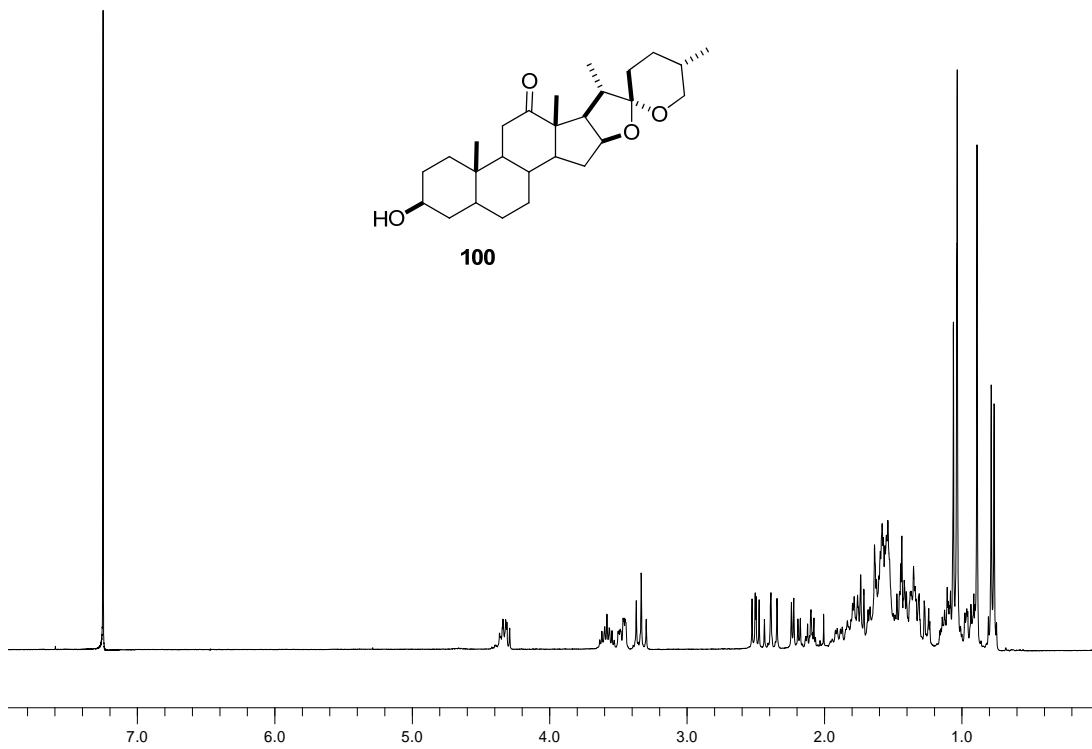
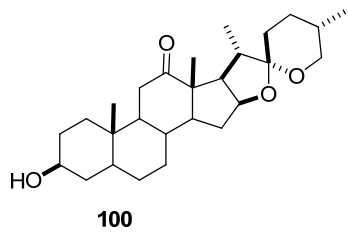
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.33 (H16 α , 1H, m); 3.59 (H3 α , 1H, m); 3.49 (H26b, ddd, $J = 10.9, 4.2, 2.5$ Hz); 3.33 (H26a, 1H, t, $J = 10.9$ Hz); 2.52 (H17, 1H, dd, $J = 9.0, 8.0$ Hz); 2.48 (H11b, 1H, dd, $J = 14.5, 13.5$ Hz); 2.38 (H8, 1H, sa); 2.43-2.32 (H2a, H2b, 2H, m); 2.17 (H11a, 1H, dd, $J = 10.5, 5.0$ Hz); 2.20 - 1.90 (H4a, H4b, 2H, m); 1.25 (H18, 3H, s); 1.06 (H21, 3H, d, $J = 6.9$ Hz); 0.91 (H19, 3H, s); 0.79 (H27, 3H, d, $J = 6.5$ Hz).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 213.5 (C12, s); 109.2 (C22, s); 79.1 (C16, d); 70.9 (C3, d); 66.8 (C26, t); 55.8; 55.5; 55.1 (C13, s); 53.5; 44.6; 42.2; 37.9; 37.8; 36.5; 36.1 (C10, s); 34.4; 31.5; 31.4; 31.2; 31.1; 30.2; 28.7; 28.2; 17.1 (C27, q); 16.0 (C21, q); 13.2 (C19, q); 11.9 (C18, q).

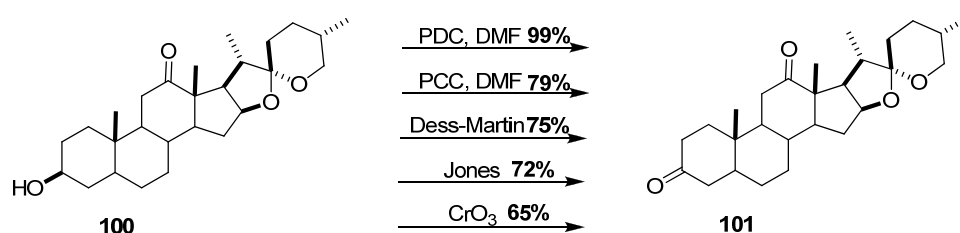
LREIMS (70eV, m/z %): 430 (M^+ , 13); 139 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 431 ($[M + H]^+$, 100).

(+)-HRESIMS: m/z 431.3158 $[M + H]^+$ (calcd. para C₂₇H₄₃O₄, 431.3155).



10.2. Síntesis de hecogenin-3-ona (101)



Procedimiento A: Sobre una disolución de hecogenina (**100**) (1.0 g, 2.0 mmol), en DMF (20 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de PDC (2.0 g, 5.0 mmol) en DMF (30 mL), se dejó agitando a t.a durante 6 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.99 g de la hecogenin-3-ona (**101**), semisólido blanco, 99%.

Procedimiento B: Sobre una disolución de hecogenina (**100**) (1.0 g, 2.0 mmol), en DMF (20 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de PCC (2.0 g, 5.0 mmol) en DMF (30 mL), se dejó agitando a t.a durante 6 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.78 g de la hecogenin-3-ona (**101**), semisólido blanco, 79%.

Procedimiento C: Sobre una disolución del reactivo de Dess-Martin (1.1 g, 5.2 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL), se adicionó, gota a gota hecogenina (**100**) (1.0 g, 2.0 mmol) en CH₂Cl₂ (30 mL). Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **21** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.75 g de la hecogenin-3-ona (**101**), semisólido blanco, 75%.

Procedimiento D: Sobre una disolución de hecogenina (**100**) (1.0 g, 2.0 mmol), a 0°C en Ac₂O (15 mL), se adicionó, gota a gota, el reactivo de Jones (5 mL) preparado *in situ*, dejándolo reaccionar a 0°C durante 6 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **10** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.72 g de la hecogenin-3-ona (**101**), semisólido blanco, 72%.

Procedimiento E: Sobre una disolución de CrO₃ (3.0 g, 18.0 mmol), a 0°C, en THF (15 mL), se adicionó, gota a gota, otra disolución de hecogenina (**100**) (1.0 g, 2.0 mmol), en THF (15 mL). Se dejó evolucionar a t.a. durante 75 min. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiendo 0.65 g de la hecogenin-3-ona (**101**), semisólido blanco, 65%.

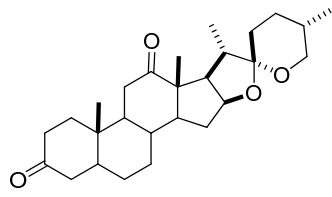
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.34 (H16α, 1H, m); 3.49 (H26b, 1H, ddd, *J* = 10.9, 4.4, 2.0 Hz); 3.34 (H26a, 1H, t, *J* = 10.8 Hz); 2.54 (H17, 1H, dd, *J* = 9.0, 8.0 Hz); 2.48 (H11b, 1H, dd, *J* = 14.5, 13.5 Hz); 2.38 (H8, 1H, sa); 2.43-2.32 (H2a, H2b, 2H, m); 2.17 (H11a, 1H, dd, *J* = 10.5, 5.0 Hz); 2.20-1.90 (H4a, H4b, 2H, m); 1.25 (H18, 3H, s); 1.09 (H21, 3H, d, *J* = 7.0 Hz); 1.06 (H19, 3H, s); 0.79 (H27, 3H, d, *J* = 6.5 Hz).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 212.8 (C12, s); 210.7 (C3, s); 109.2 (C22, s); 79.1 (C16, d); 66.8 (C26, t); 55.5; 55.1 (C13, s); 54.8; 53.5; 46.2; 44.4; 42.2; 37.8; 37.7; 36.2 (C10, s); 34.2; 31.5; 31.4; 31.2; 31.1; 30.2; 28.5; 28.7; 17.1 (C27, q); 16.0 (C21, q); 13.2 (C19, q); 11.2 (C18, q).

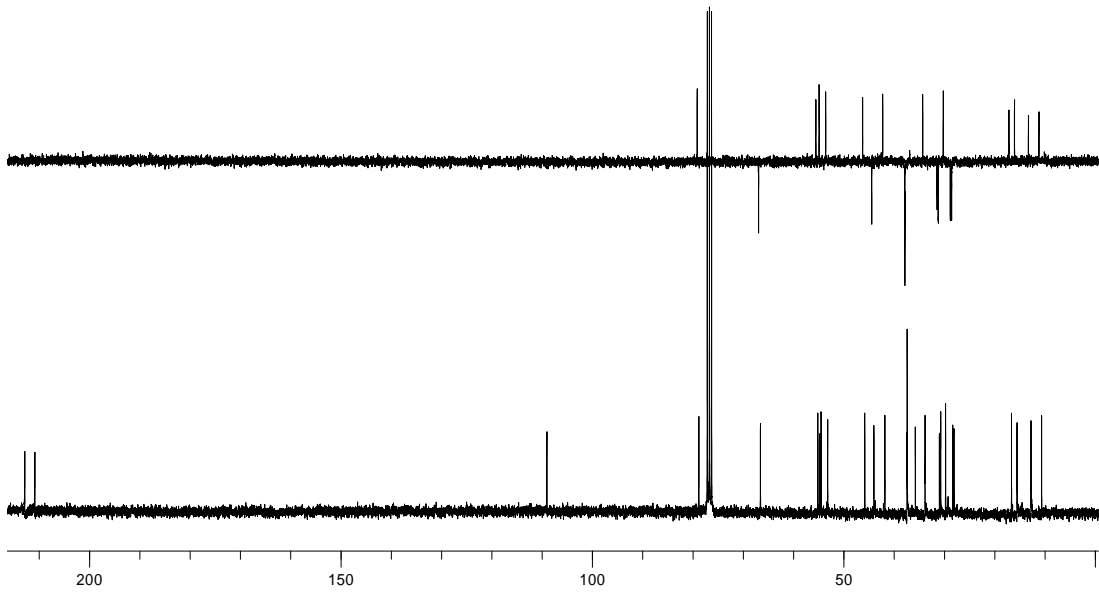
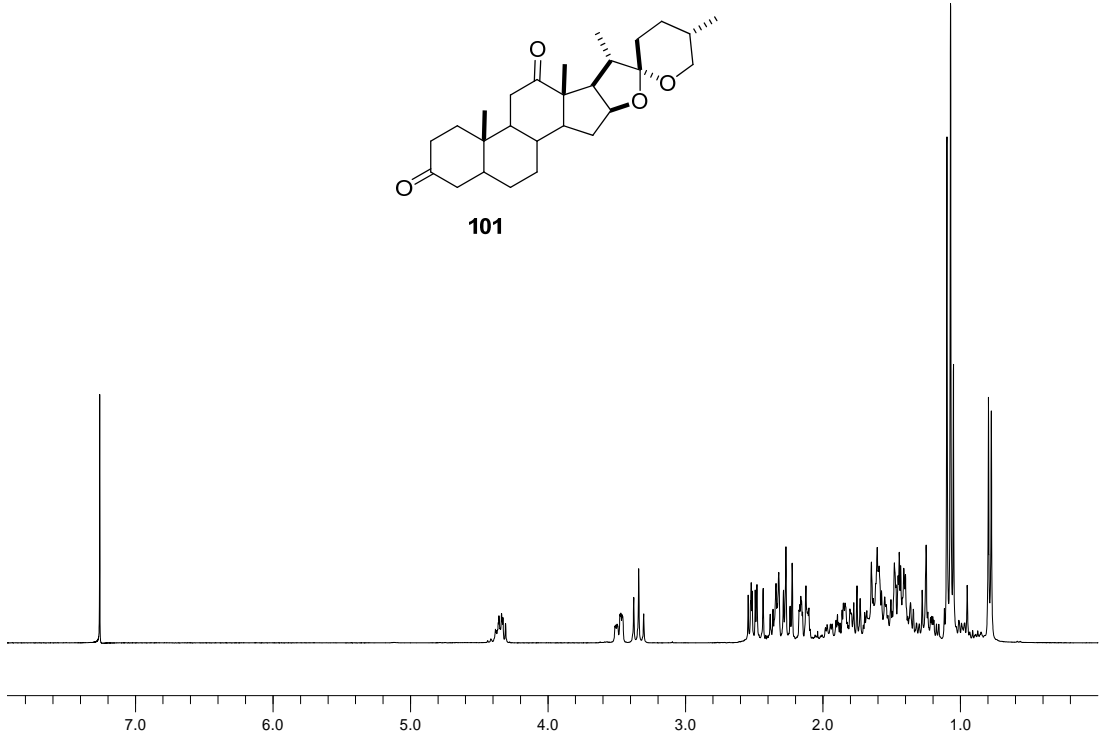
LREIMS (70eV, *m/z* %): 428 (M⁺, 33); 139 (100).

(+)-LRFABMS *m/z* (%): 429 ([M + H]⁺, 57); 133 (100).

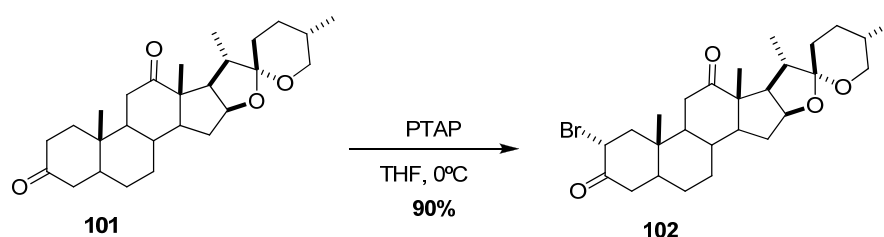
(+)-HRESIMS: *m/z* 429.2998 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₁O₄, 429.2999).



101



10.3. Síntesis de 2 α -bromohecogenin-3-ona (**102**)



Sobre una disolución de PTAP (5.0 g, 12.5 mmol) a 0°C disuelta en THF (20 mL) se añadió, gota a gota, una disolución de la hecogenin-3-ona (**101**) (6.0 g, 13.7 mmol) en THF (20 mL). Se dejó reaccionando a 0°C durante 4 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **79** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], obteniéndose 4.5 g de la 2 α -bromohecogenin-3-ona (**102**), semisólido blanco, 90%.

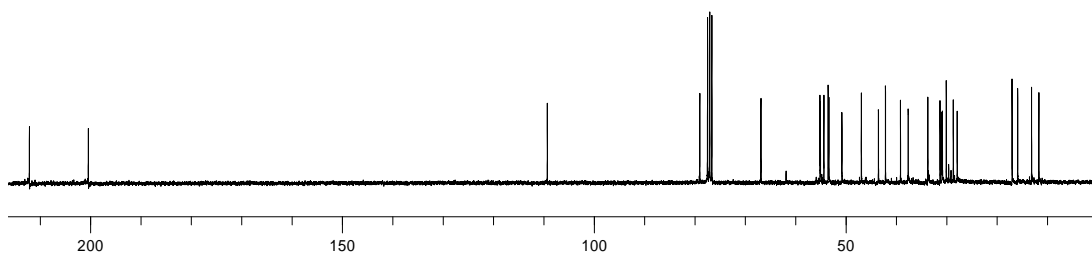
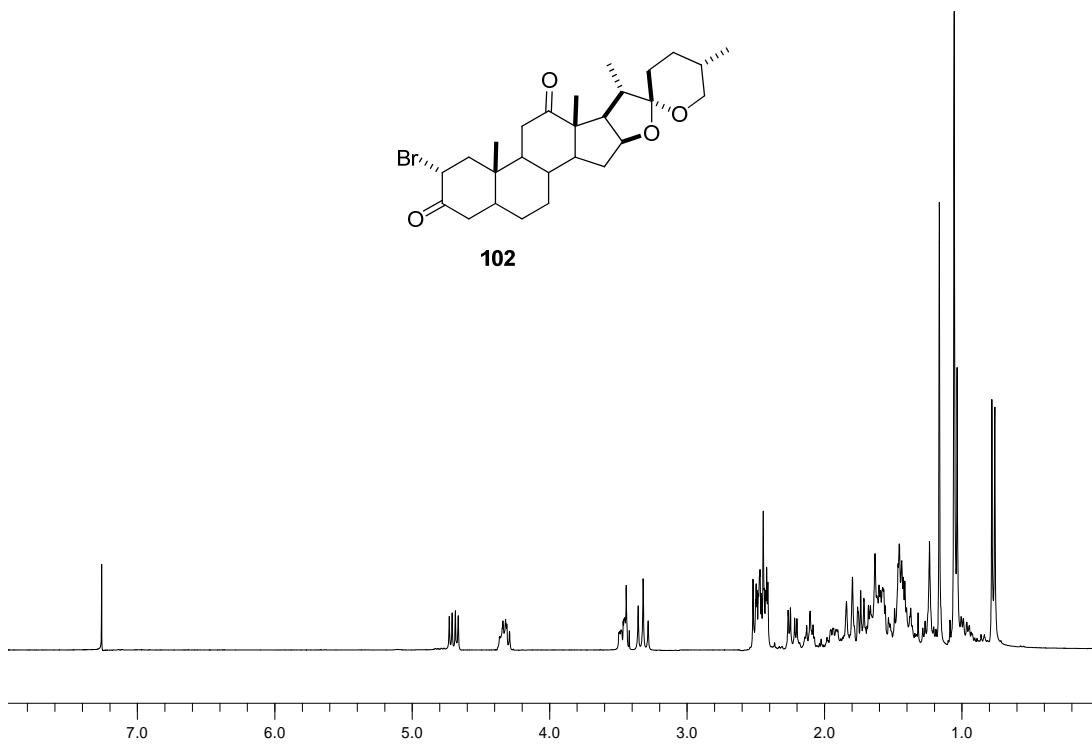
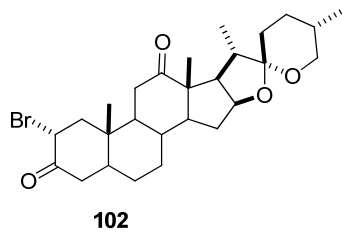
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.70 (H2 β , 1H, dd, J = 13.2 Hz, 6.4 Hz); 4.32 (H16 α , 1H, m); 3.46 (H26b, 1H, m); 3.32 (H26a, 1H, t, J = 11.0 Hz); 2.23 (H11a, 1H, dd, J = 10.5, 5.0 Hz); 2.20-1.90 (H4a, H4b, 2H, m); 1.22 (H18, 3H, s); 1.05 (H21, 3H, d, J = 6.8 Hz); 1.05 (H19, 3H, s); 0.78 (H27, 3H, d, J = 6.5 Hz).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211.8 (C12, s); 200.2 (C3, s); 109.2 (C22, s); 78.9 (C16, d); 66.8 (C26, t); 61.8; 55.2; 54.4; 53.5 (C2, d); 53.4 (C13, s); 50.8; 46.9; 43.5; 42.1; 39.2 (C10, s); 37.6; 33.7; 31.3; 31.0; 30.8; 30.1; 28.7; 27.9; 17.0 (C27, q); 15.9 (C21, q); 13.2 (C19, q); 11.8 (C18, q).

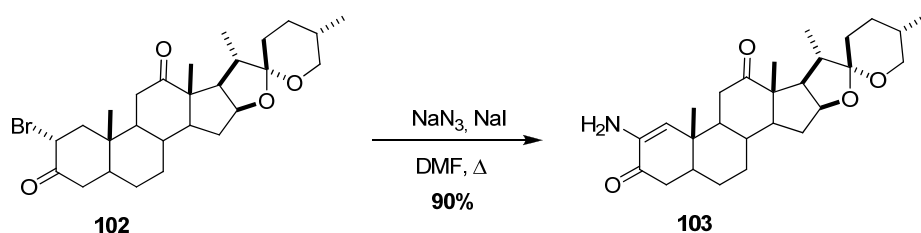
LREIMS (70eV, m/z %): 508 (M^+ , 15) (Br^{81}); 506 (M^+ , 8) (Br^{79}); 139 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 509 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 36) (Br^{81}); 507 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 28) (Br^{79}); 132 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 507.2114 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (Br^{79}) (calcd. para C₂₇H₄₀O₄Br, 507.2104).



10.4. Síntesis de 2-aminohecogenin-1-en-3-ona (103)



Sobre una disolución de 2 α -bromohecogenin-3-ona (**102**) (4.0 g, 7.5 mmol) en DMF (50 mL) se añadió, NaN_3 (5.2 g, 80 mmol) y 15 mg de NaI . Se dejó reaccionando a 50°C durante 1 h. Transcurrido ese tiempo se añadió una disolución saturada de NaHCO_3 (20 mL). La mezcla se extrajo con Et_2O lavandose con NaCl y agua, y se secó con MgSO_4 . El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], obteniéndose 3.6 g de la 2-aminohecogenin-1-en-3-ona (**103**), semisólido blanco, 90%.

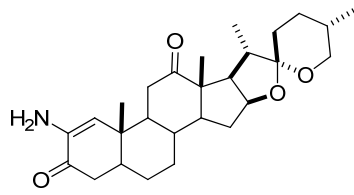
RMN-¹H (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 5.87 (H1, 1H, sa); 4.34 (H16 α , 1H, m); 3.47 (H26b, 1H, m); 3.34 (H26a, 1H, t, $J = 10.8$ Hz); 1.25 (H18, 3H, s); 1.08 (H19, 3H, s); 1.07 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 0.79 (H27, 3H, d, $J = 6.6$ Hz).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 211.9 (C12, s); 194.7 (C3, s); 137.7 (C2, s); 123.5 (C1, d); 108.8 (C22, s); 78.6 (C16, d); 66.4 (C26, t); 55.1 (C13, s); 54.8; 53.2; 51.8; 44.1; 41.8; 39.6 (C10, s); 38.0; 37.3; 34.0; 31.0; 30.6; 30.5; 29.7; 28.3; 26.6; 16.6 (C27, q); 15.6 (C21, q); 13.4 (C19, q); 12.8 (C18, q).

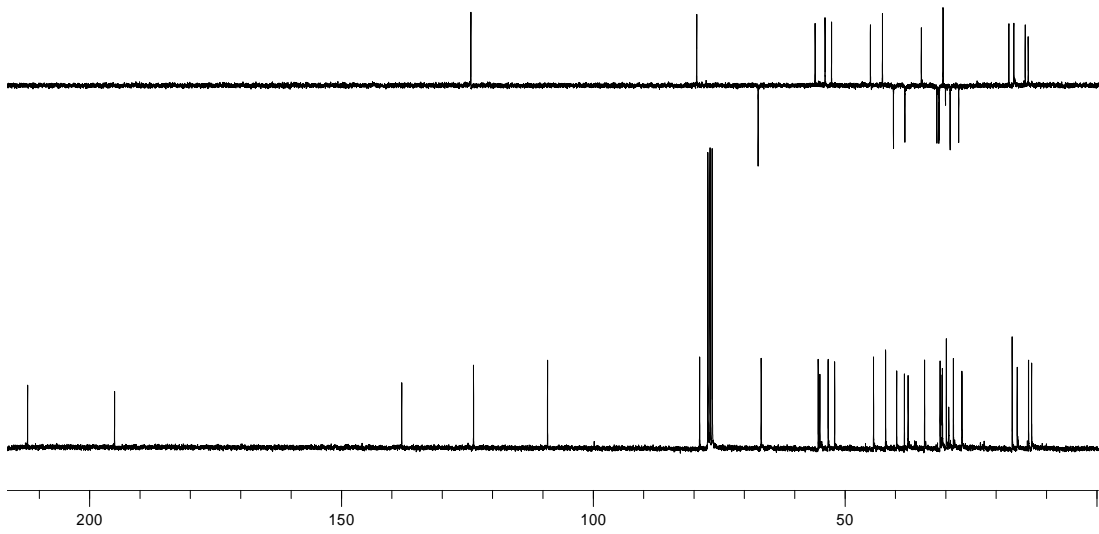
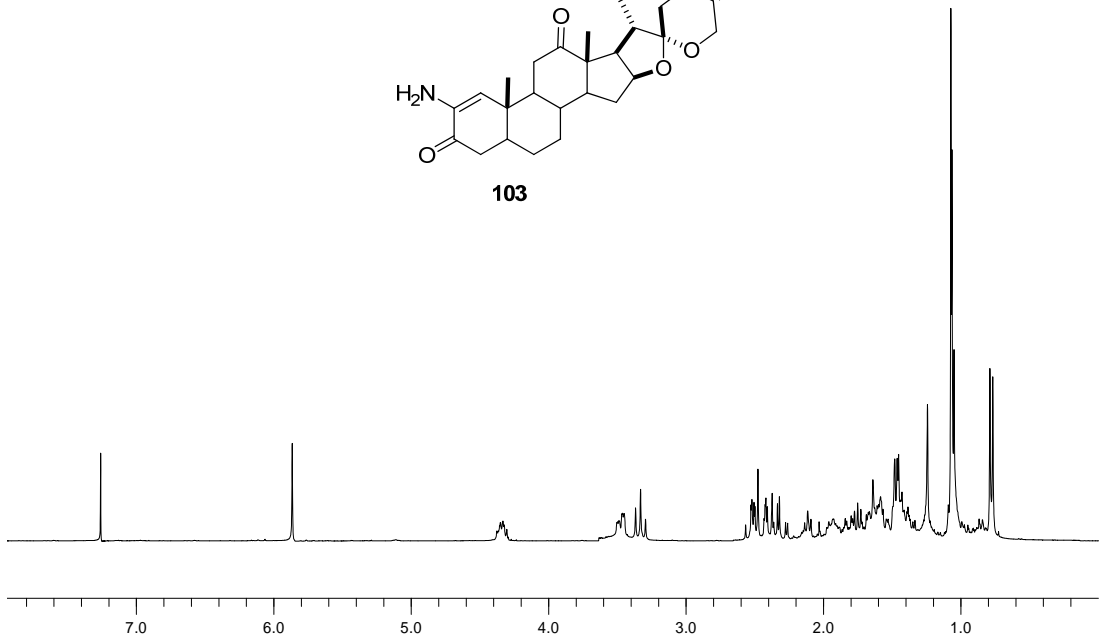
LREIMS (70eV, m/z %): 441 (M^+ , 19); 118 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 442 ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 91); 133 (100).

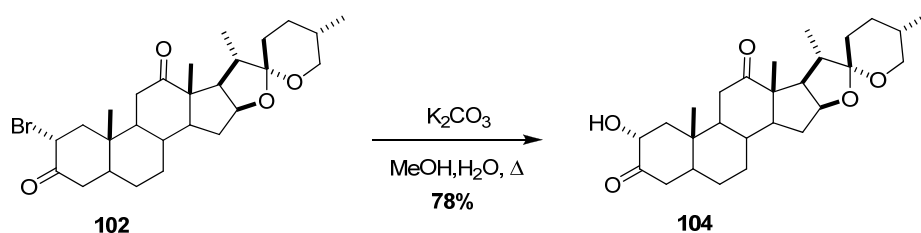
(+)-HRESIMS: m/z 442.2959 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. para $\text{C}_{27}\text{H}_{40}\text{NO}_4$, 442.2951).



103



10.5. Síntesis de 2 α -hidroxihecogenin-3-ona (104)



Sobre una disolución de 2 α -bromohecogenin-3-ona (**102**) (0.2 g, 0.4 mmol) en $H_2O:MeOH$ (1:1) (10 mL) se añadió, K_2CO_3 (1.0 g, 7.2 mmol). Se dejó reaccionando a 45°C durante 15 h. Transcurrido ese tiempo se añadió una disolución saturada de $NaHCO_3$ (20 mL). La mezcla se extrajo con Et_2O , se lavó con agua y se secó con $MgSO_4$. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], obteniéndose 0.17 g de la 2 α -hidroxihecogenin-3-ona (**104**), semisólido blanco, 78%.

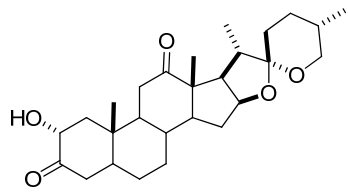
RMN- 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 5.80 (OH, 1H, sa); 4.39 (H16 α , 1H, m); 4.28 (H2 β , 1H, dd, $J = 12.0, 7.0$ Hz); 3.53 (H26b, 1H, m); 3.38 (H26a, 1H, t, $J = 10.8$ Hz); 1.28 (H18, 3H, s); 1.11 (H21, 3H, d, $J = 6.8$ Hz); 1.10 (H19, 3H, s); 0.83 (H27, 3H, d, $J = 6.8$ Hz).

RMN- ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 212.4 (C12, s); 210.2 (C3, s); 109.3 (C22, s); 79.1 (C16, d); 72.5 (C2, d); 66.9 (C26, t); 55.2; 55.1; 54.6; 48.0; 47.7; 42.2; 42.2; 37.9; 37.5; 33.6; 31.4; 31.2; 31.1; 30.2; 29.7; 28.8; 28.2; 17.7 (C27, q); 16.0 (C21, q); 13.3 (C19, q); 12.6 (C18, q).

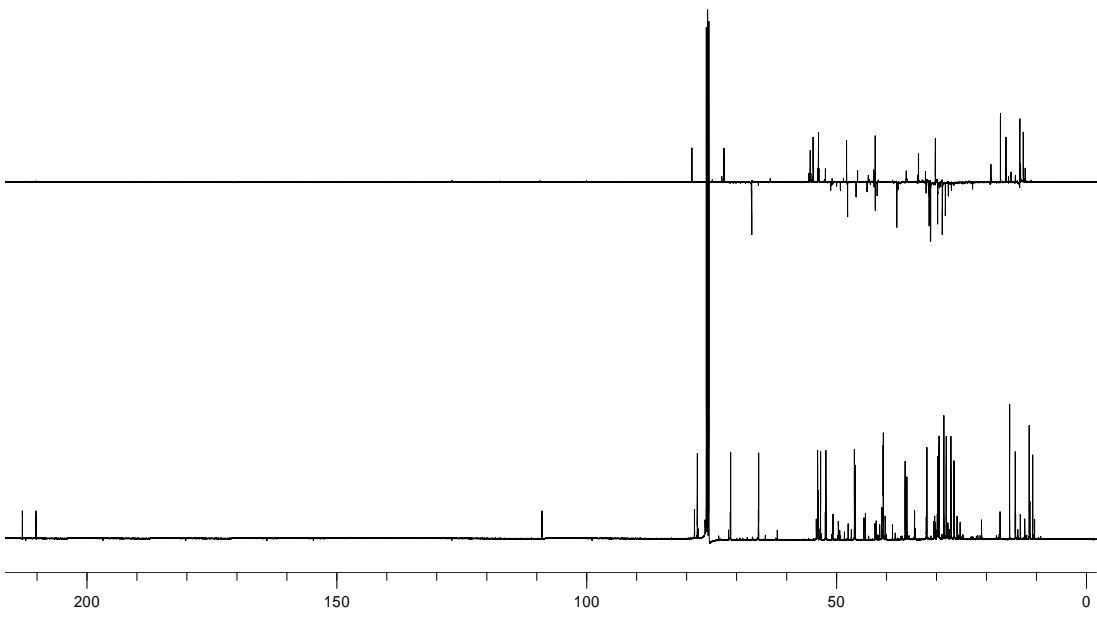
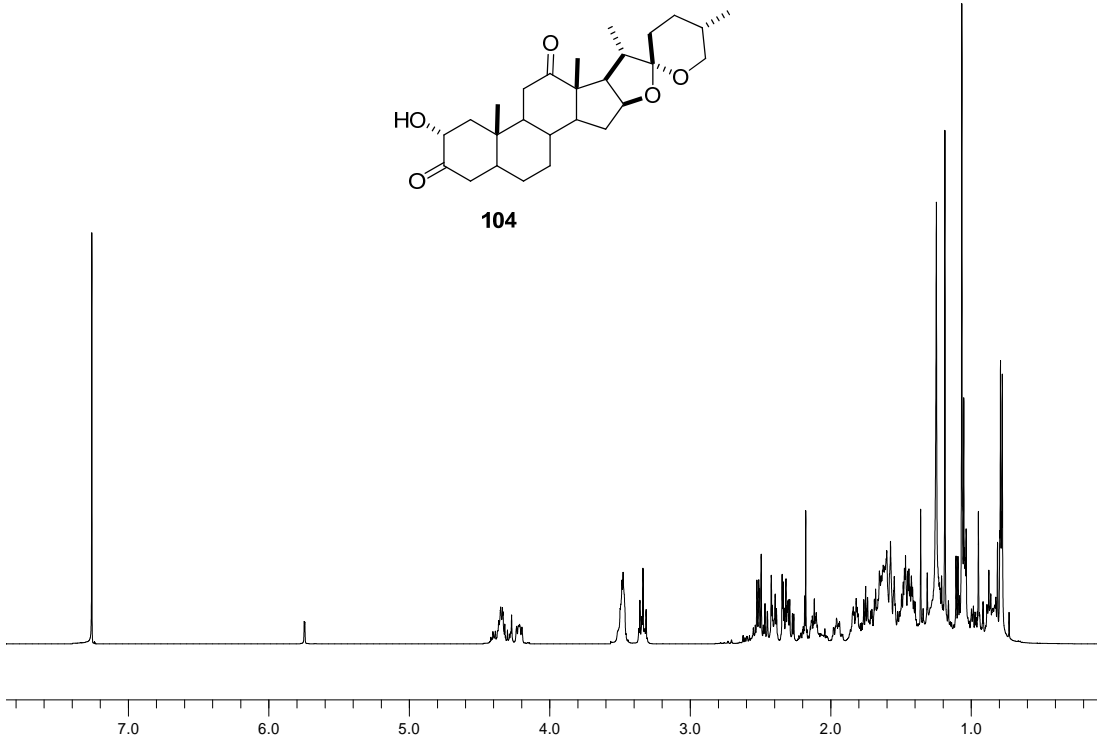
LREIMS (70eV, m/z %): 444 (M^+ , 23); 139 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 445 ($[M + H]^+$, 18); 154 (100).

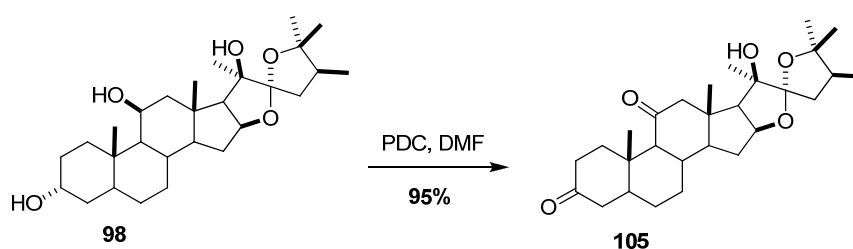
(+)-HRESIMS: m/z 445.2961 $[M + H]^+$ (calcd. para $C_{27}H_{41}O_5$, 445.2948).



104



10.6. Síntesis de 22-*epi*-hipuristan-3,11-diona (105)



Sobre una disolución de 22-*epi*-hippuristanol (**98**) (0.1 g, 0.2 mmol), en DMF (2 mL), se añadió, gota a gota, otra disolución de PDC (0.2 g, 0.5 mmol) en DMF (3 mL), se dejó agitando a t.a durante 6 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **67** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (8:2)], recogiéndose 95 mg de la 22-*epi*-hippuristan-3,11-diona (**105**), semisólido blanco, 95%.

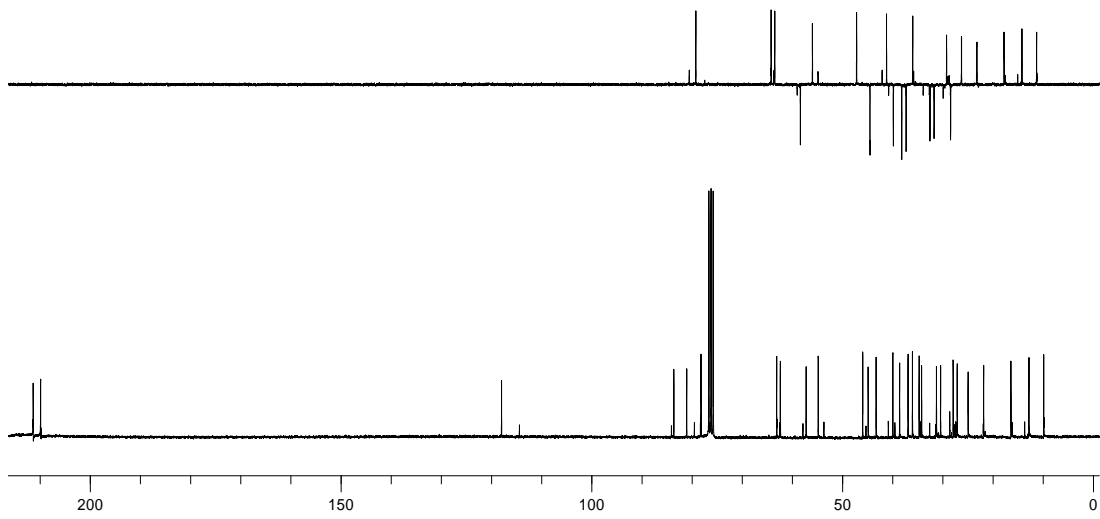
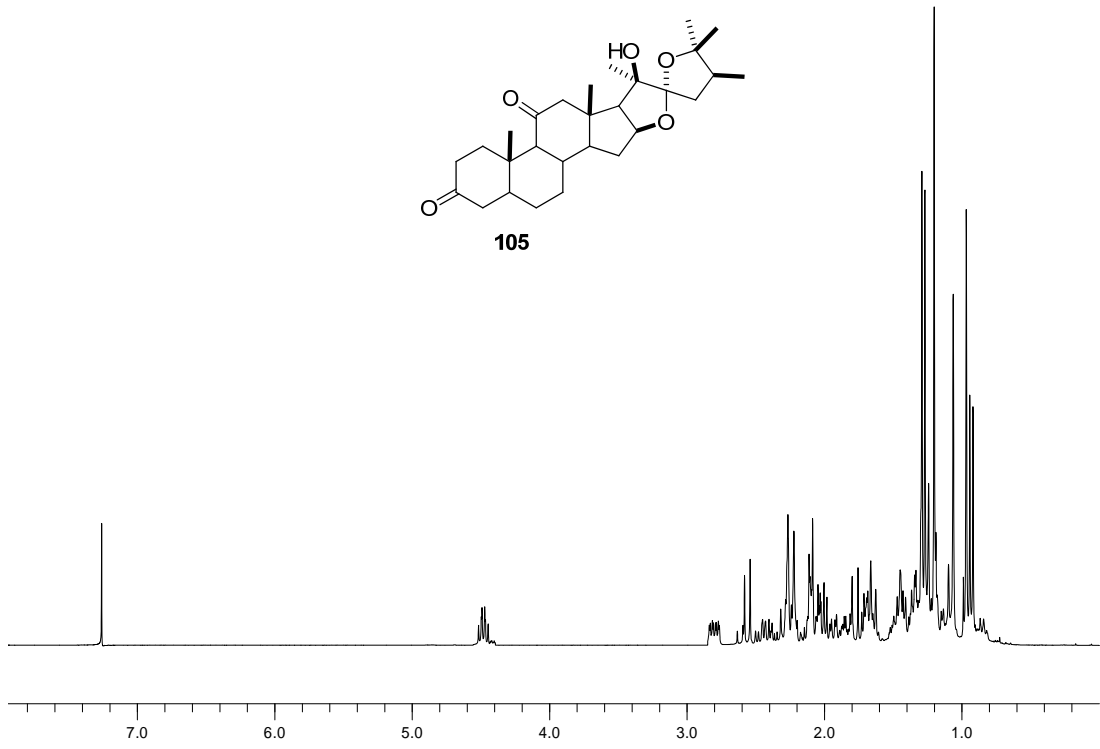
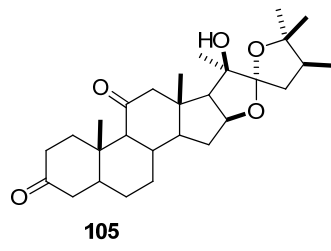
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.48 (H16 α , 1H, m); 1.30 (H18, 3H, s); 1.27 (H27, 3H, s); 1.21 (H21, 3H, s); 1.07 (H19, 3H, s); 0.97 (H26, 3H, s); 0.94 (H28, 3H, d, $J = 6.5$ Hz).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211.4 (C11, s); 210.4 (C3, s); 118.5 (C22, s); 84.3 (C25, s); 81.8 (C20, s); 79.0 (C16, d); 64.0 (C17, d); 63.3 (C9, d); 58.1 (C12, t); 55.7 (C14, d); 46.9 (C5, t); 45.8 (C13, s); 44.3 (C23, t); 40.9 (C24, d); 39.6 (C4, t); 37.9 (C1, t); 37.1 (C2, t); 35.7 (C8, d); 35.2 (C10, s); 32.3 (C7, t); 31.5 (C15, t); 29.0 (C26, q); 28.2 (C6, t); 26.0 (C18, q); 22.9 (C27, q); 17.5 (C21, q); 14.0 (C28, q); 11.0 (C19, q).

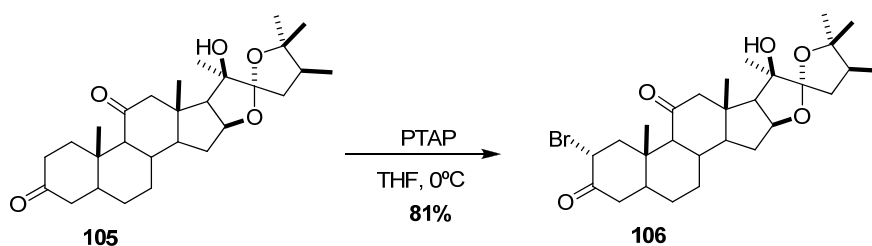
LREIMS (70eV, m/z %): 458 (M^+ , 4); 315 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 459 ($[M + H]^+$, 37); 154 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 459.3104 $[M + H]^+$ (calcd. para C₂₈H₄₃O₅, 459.3105).



10.7. Síntesis de 2 α -bromo-22-*epi*-hipuristan-3,11-diona (**106**)



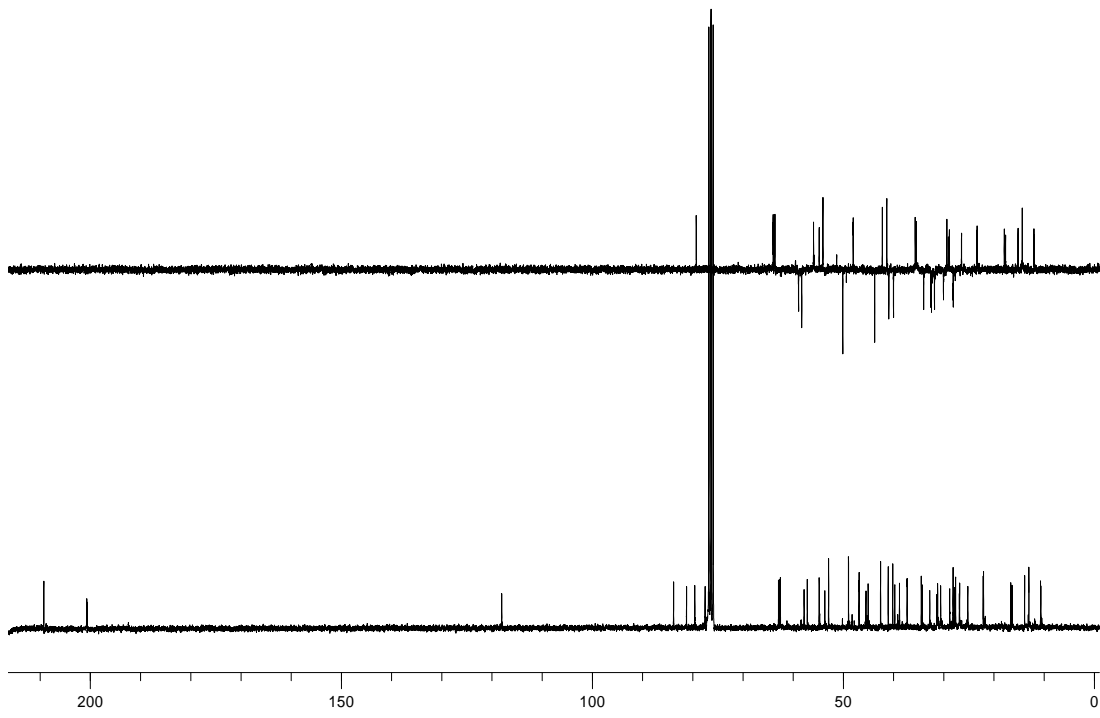
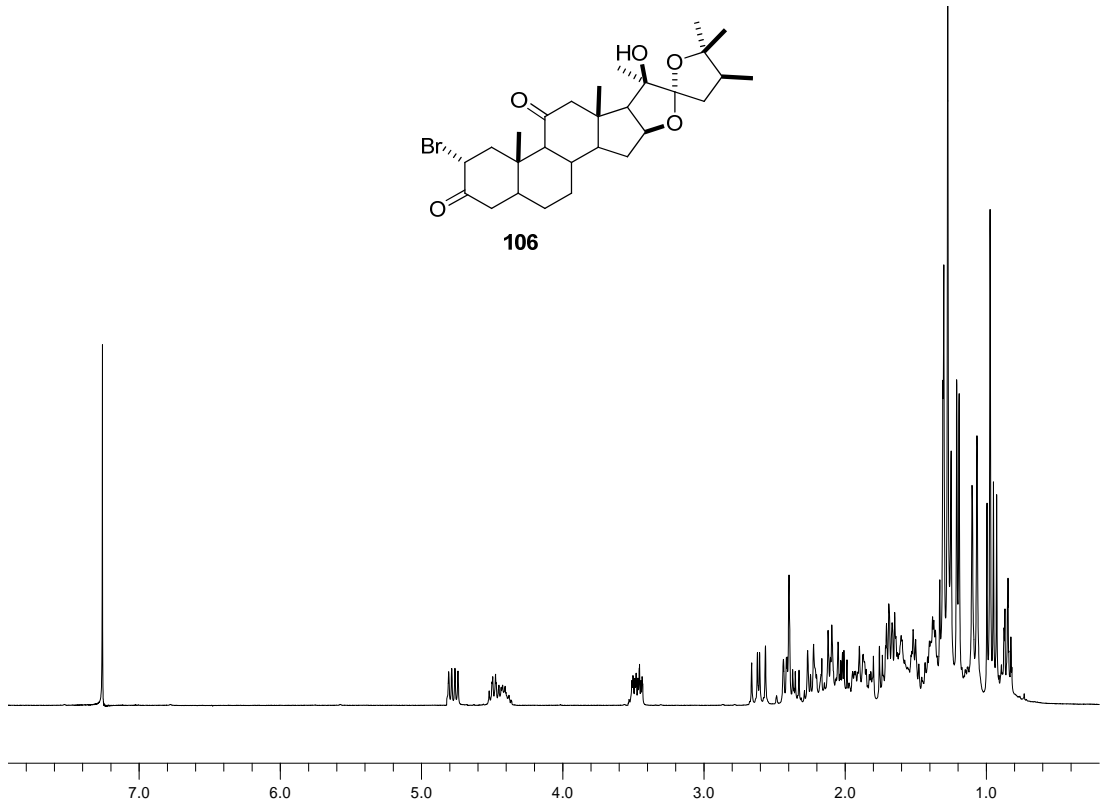
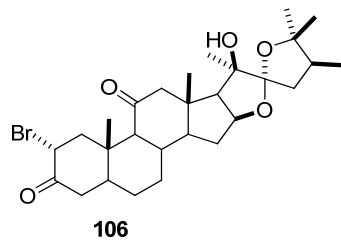
Sobre una disolución de PTAP (80 mg, 0.2 mmol) a 0°C disuelta en THF (2 mL) se añadió, gota a gota, una disolución de la 22-*epi*-hipuristan-3,11-diona (**105**) (95 mg, 0.04 mmol) en THF (3 mL). Se dejó reaccionando a 0°C, durante 4 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **79** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (9:1)], obteniéndose 76 mg de la 2 α -bromo-22-*epi*-hipuristan-3,11-diona (**106**), semisólido blanco, 81%.

RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.78 (H2 β , 1H, dd, J = 13.2, 6.4 Hz); 4.48 (H16 α , 1H, m); 1.30 (H18, 3H, s); 1.28 (H27, 3H, s); 1.24 (H21, 3H, s); 1.07 (H19, 3H, s); 0.98 (H26, 3H, s); 0.94 (H28, 3H, d, J = 6.5 Hz).

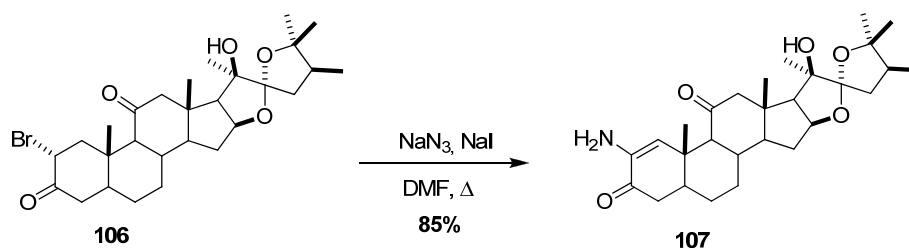
RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 211.4 (C11, s); 202.4 (C3, s); 118.5 (C22, s); 84.3 (C25, s); 80.2 (C20, s); 79.0 (C16, d); 64.0 (C17, d); 63.3 (C9, d); 57.1 (C12, t); 56.1 (C2, d); 54.7 (C14, d); 45.7 (C5, t); 45.3 (C13, s); 44.8 (C23, t); 40.6 (C24, d); 39.9 (C4, t); 37.4 (C1, t); 35.8 (C8, d); 35.6 (C10, s); 32.6 (C7, t); 31.8 (C15, t); 28.7 (C26, q); 28.2 (C6, t); 25.9 (C18, q); 22.5 (C27, q); 17.4 (C21, q); 14.2 (C28, q); 11.4 (C19, q).

(+)-LRFABMS m/z (%): 539 ([M + H]⁺, 5) (Br⁸¹); 537 ([M + H]⁺, 2) (Br⁷⁹); 154 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 537.2212 [M + H]⁺ (Br⁷⁹) (calcd. para C₂₈H₄₂O₅Br, 537.2210).



10.8. Síntesis de 2-amino-22-*epi*-hipurist-1-en-3,11-diona (107)



Sobre una disolución de 2α-bromo-22-*epi*-hipuristan-3,11-diona (**106**) (76 mg, 0.15 mmol) en DMF (3 mL) se añadió, NaN₃ (0.1 g, 8.0 mmol) y 5 mg de NaI. Se dejó reaccionando a 50°C durante 1 h. Siguiendo un procedimiento similar al descrito para el compuesto **103** se obtuvo el crudo de reacción que se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (7:3)], obteniéndose 65 mg de la 2-amino-22-*epi*-hipurist-1-en-3,11-diona (**107**), semisólido blanco, 85%.

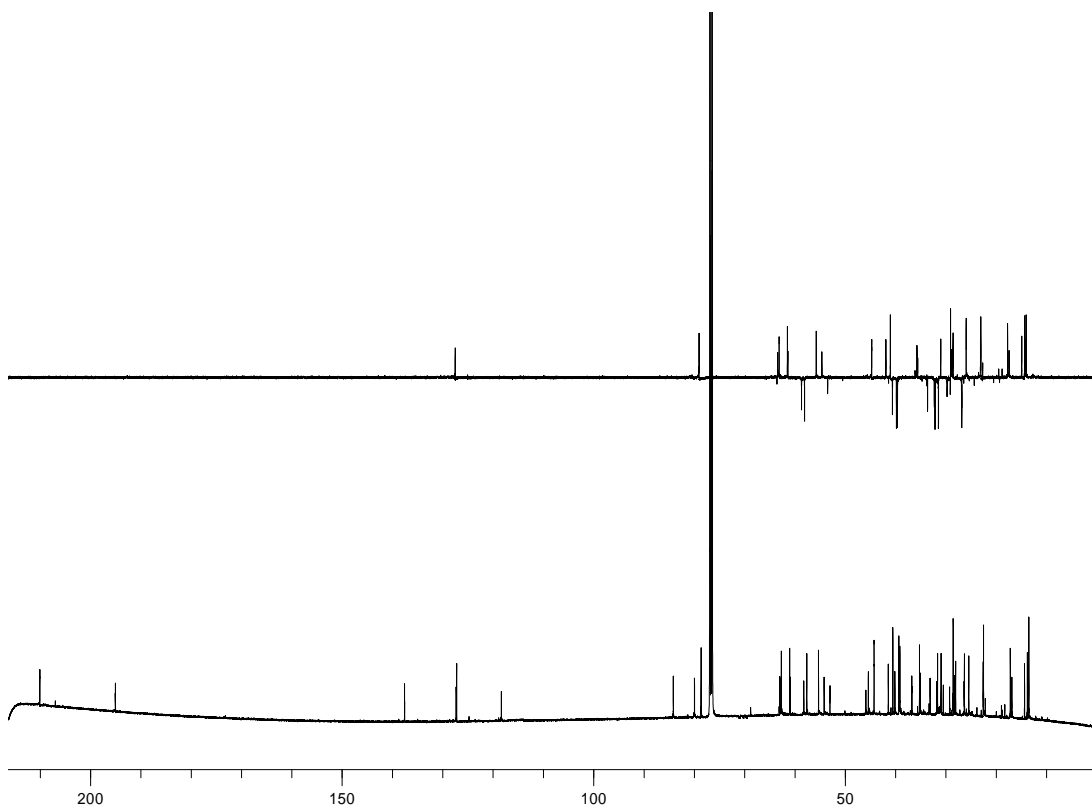
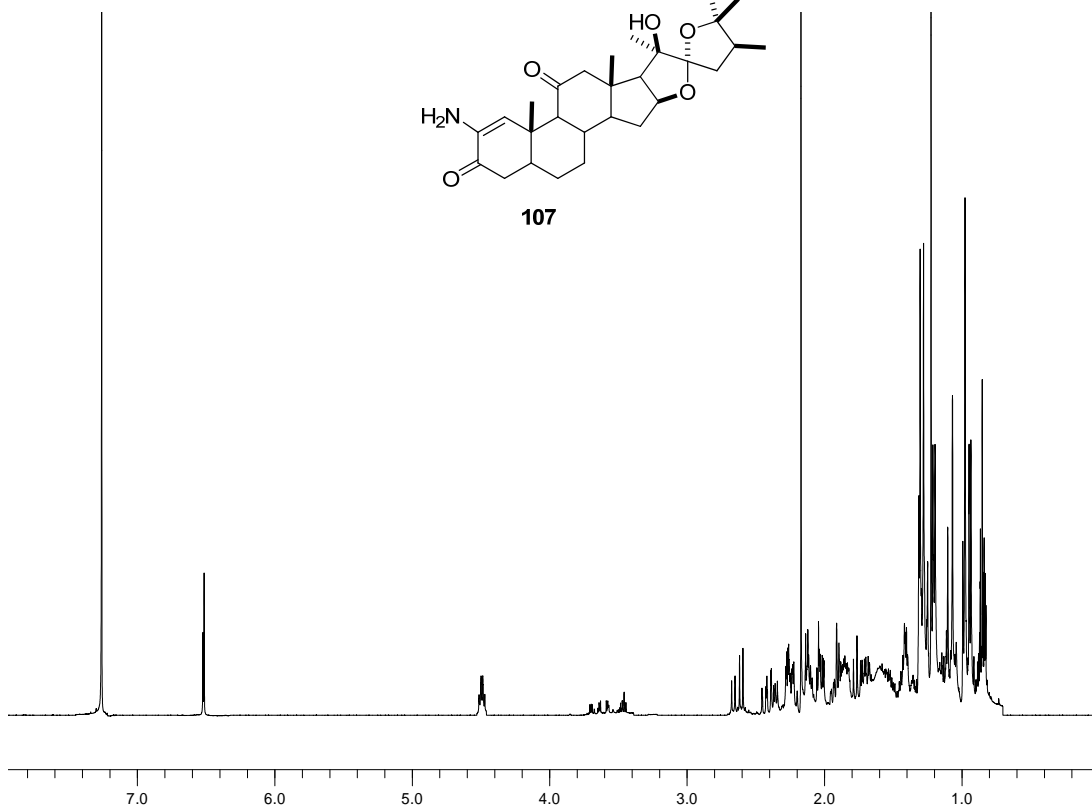
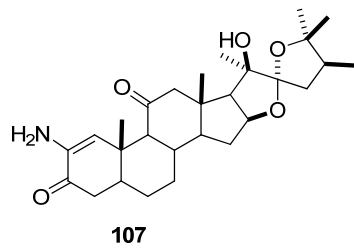
RMN-¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6.57 (H1, 1H, sa); 4.53 (H16 α , 1H, m); 1.36 (H18, 3H, s); 1.31 (H27, 3H, s); 1.26 (H21, 3H, s); 1.12 (H19, 3H, s); 1.04 (H26, 3H, s); 0.99 (H28, 3H, d, $J = 6.5$ Hz).

RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 210.2 (C11, s); 195.3 (C3, s); 137.8 (C2, s); 127.5 (C1, d); 118.6 (C22, s); 84.5 (C25, s); 81.3 (C20, s); 79.1 (C16, d); 63.2 (C17, d); 61.4 (C9, d); 57.1 (C12, t); 54.7 (C14, d); 45.8 (C5, t); 45.2 (C13, s); 44.5 (C23, t); 40.4 (C24, d); 39.5 (C4, t); 35.7 (C8, d); 35.5 (C10, s); 32.1 (C7, t); 31.0 (C15, t); 29.0 (C26, q); 28.2 (C6, t); 25.9 (C18, q); 23.0 (C27, q); 17.7 (C21, q); 14.7 (C28, q); 11.4 (C19, q).

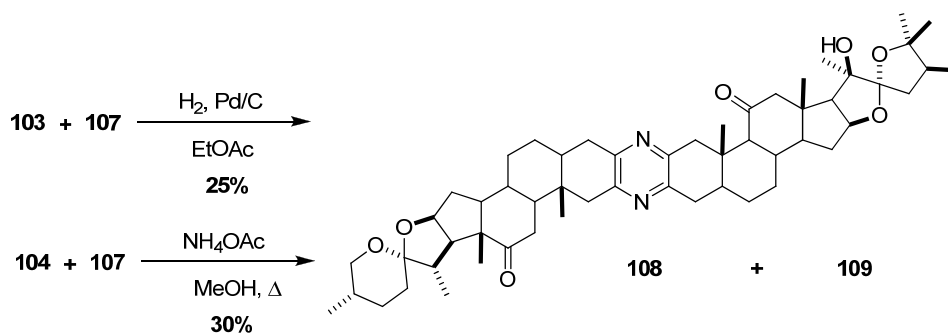
LREIMS (70eV, m/z %): 471 (M⁺, 19); 148 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 472 ([M + H]⁺, 13); 109 (100).

(+)-HRESIMS: m/z 472.3063 [M + H]⁺ (calcd. para C₂₇H₄₂NO₅, 472.3057).



10.9. Síntesis de bis-hecogenin/22-*epi*-hipuristan-11-ona pirazina (**108**)



Procedimiento A: Se disolvieron la 2-aminohecogenin-1-en-3-ona (**103**) (12 mg, 0.06 mmol) y la 2-amino-22-*epi*-hipurist-1-en-3,11-diona (**107**) en EtOAc (4 mL), y después de desoxigenar 30 min, se añadió Pd/C al 5% (10 mg) y dos gotas de ácido acético (pH = 5). La mezcla se dejó agitando bajo una atmósfera de H₂ a t.a., durante 24 h. Al cabo de ese tiempo, se filtró a través de celita y se evaporó el disolvente. El crudo de reacción se sometió a separación por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc] y a continuación se purificó por HPLC en fase normal y utilizando como fase móvil, Hexano:EtOAc (1:1), con un flujo de 1 mL/min y un tiempo de retención de 68 min, obteniéndose 3 mg del dímero **108**, semisólido blanco, 25% y 5 mg del bis-esteroide **109**, semisólido blanco, 31%.

Procedimiento B: Se disolvió la 2-amino-22-*epi*-hipurist-1-en-3,11-diona (**107**) (10 mg, 0.04 mmol) y la NH₄OAc (9 mg, 0.11 mmol) en MeOH (3 mL). Se refluyó durante 1h para a continuación adicionar la 2- α -hidroxihecogenin-3-ona (**104**) (10 mg, 0.04 mmol) disuelta en CH₂Cl₂ (1 mL). La mezcla se calentó durante 3 h. Al cabo de ese tiempo se añadió agua y se extrajo con CH₂Cl₂. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna [Hexano:EtOAc (1:1)], recogiendo 3 mg del dímero **108**, semisólido blanco, 30%.

108: RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.54 (H16 α , 1H, m); 4.40 (H16 α' , 1H, m); 3.54 (H26b, 1H, m); 3.40 (H26a, 1H, m); 2.90-2.45 (14H, 8 x bencil H2, 2 x H8, 4 x H11); 1.34 (H18, 3H, s); 1.31 (H18', 3H, s); 1.30 (H27, 3H, s); 1.26 (H21, 3H, s); 1.12 (H19, 3H, s); 1.10 (H21', 3H, d, $J = 6.5$ Hz); 1.07 (H19', 3H, s); 0.98 (H26, 3H, s); 0.93 (H28, 3H, d, $J = 6.5$ Hz); 0.84 (H27', 3H, d, $J = 6.5$ Hz).

RMN-¹³C (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 213.0 (C12', s); 204.5 (C11, s); 148.5/148.5/148.3/148.3 (C2, C2', C3, C3', s); 117.2 (C22, s); 109.4 (C22', s); 84.9 (C25, s); 81.9 (C20, s); 80.4 (C16, d); 79.1 (C16', d); 71.3; 70.6; 70.1; 69.2; 66.9 (C26', t); 65.6; 63.6; 55.7; 55.0; 54.8; 53.5; 45.3; 42.3; 41.6; 37.7; 36.1; 35.3; 34.2; 32.3; 32.0; 31.8; 31.5; 31.2; 30.6; 30.2; 30.1; 29.8; 29.7; 29.6; 29.4; 28.8; 28.1; 26.9; 26.5; 24.8; 23.0 (C27, q); 19.7 (C21, q); 17.5 (C27', q); 16.2 (C21', q); 14.7 (C28, q); 13.4 (C19, q); 13.3 (C19', q); 11.8 (C18', q).

(+)-LRFABMS m/z (%): 879 ([M + H]⁺, 18); 133 (100).

HREIMS (70eV, m/z %): 878.5771 [M⁺] (calcd. para C₅₅H₇₈N₂O₇, 878.5804).

(+)-HRESIMS: m/z 879.5888 [M + H]⁺ (calcd. para C₅₅H₇₉N₂O₇, 879.5881).

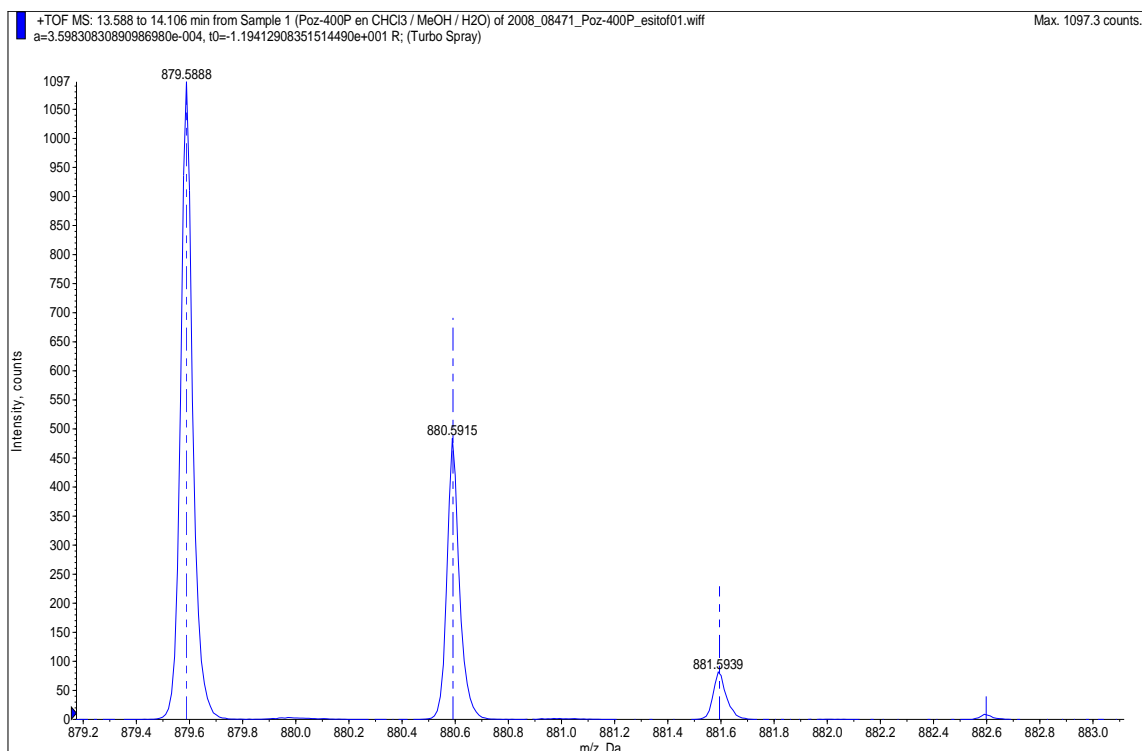
109: RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.40 (H16 α , 1H, m); 3.54 (H26b, 1H, m); 3.39 (H26a, 1H, t, $J = 11.0$ Hz); 2.85-2.45 (14H, 8 x bencil H2, 2 x H8, 4 x H11); 1.29 (H18, 3H, s); 1.10 (H21, 3H, d, $J = 6.3$ Hz); 1.08 (H19, 3H, s); 0.84 (H27, 3H, d, $J = 6.5$ Hz).

RMN-¹³C (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 213.3 (C12, s); 148.4/148.4 (C2, C3, s); 109.2 (C22, s); 78.8 (C16, d); 66.9 (C26, t); 55.4; 54.9; 51.8; 49.7; 45.4; 43.1; 42.8; 37.6; 36.2; 35.3; 34.0; 31.5; 31.2; 30.5; 29.7; 28.8; 28.2; 17.5 (C27, q); 16.2 (C21, q); 13.3 (C19, q); 11.8 (C18, q).

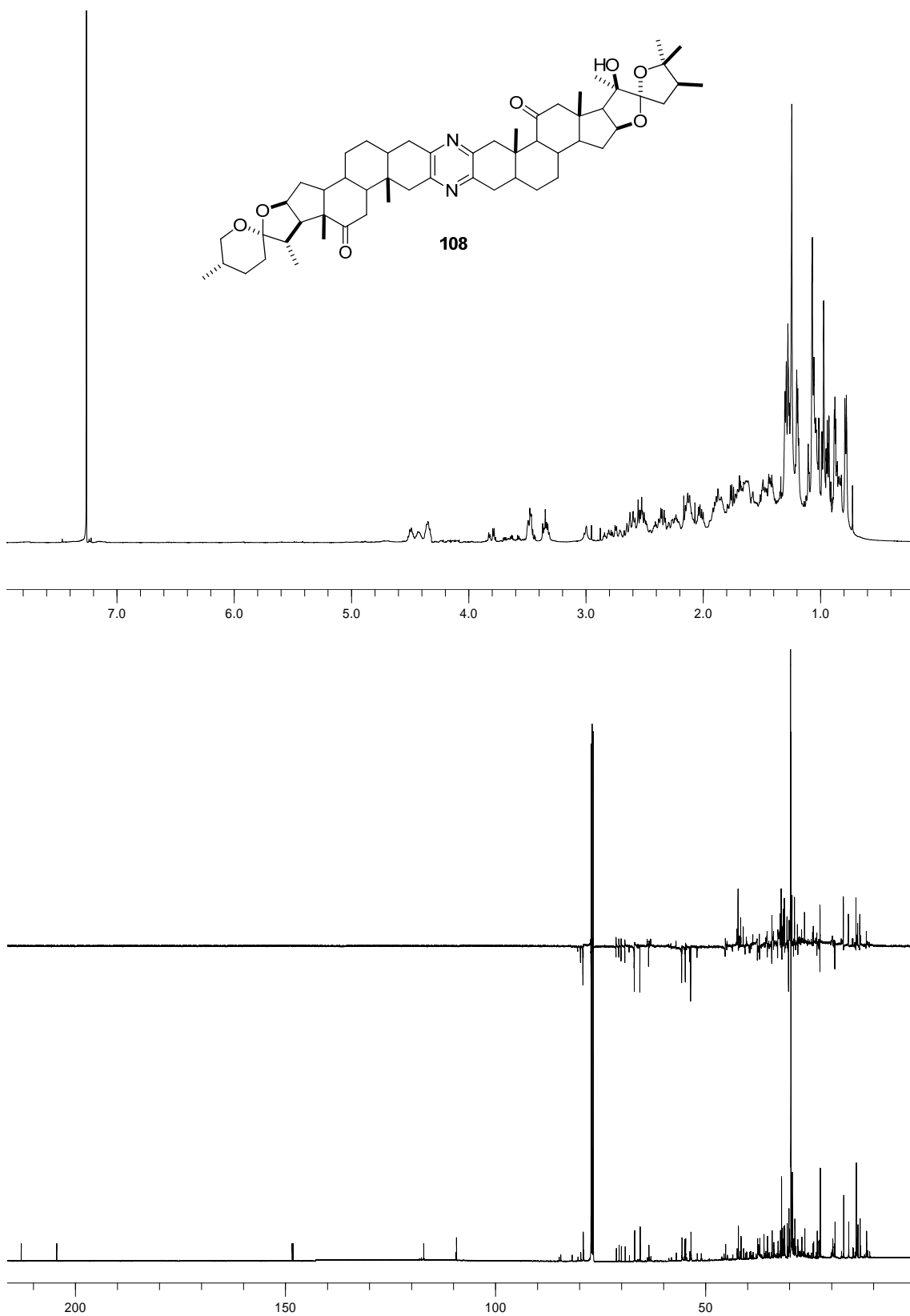
LREIMS (70eV, m/z %): 848 (M^+ , 14); 139 (100).

(+)-LRFABMS m/z (%): 849 ($[M + H]^+$, 9); 133 (100).

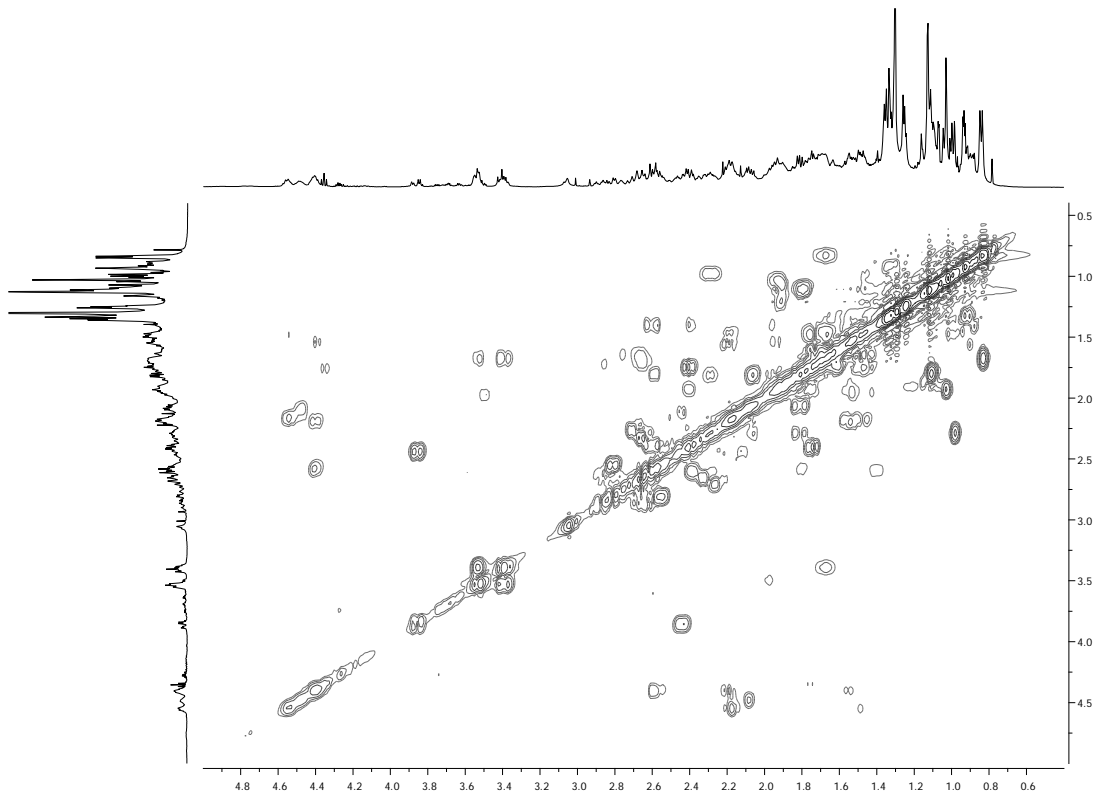
(+)-HRESIMS: m/z 849.5775 $[M + H]^+$ (calcd. para C₅₄H₇₇N₂O₆, 849.5776).



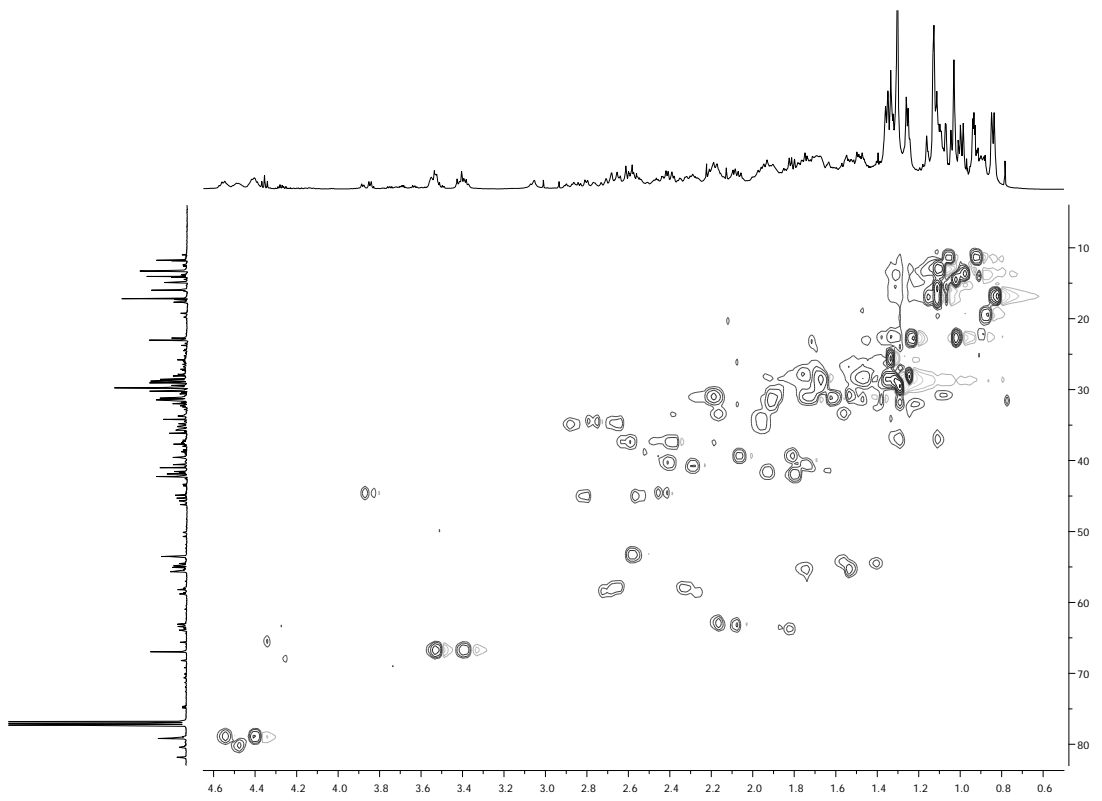
(+)-HRESIMS del compuesto 108



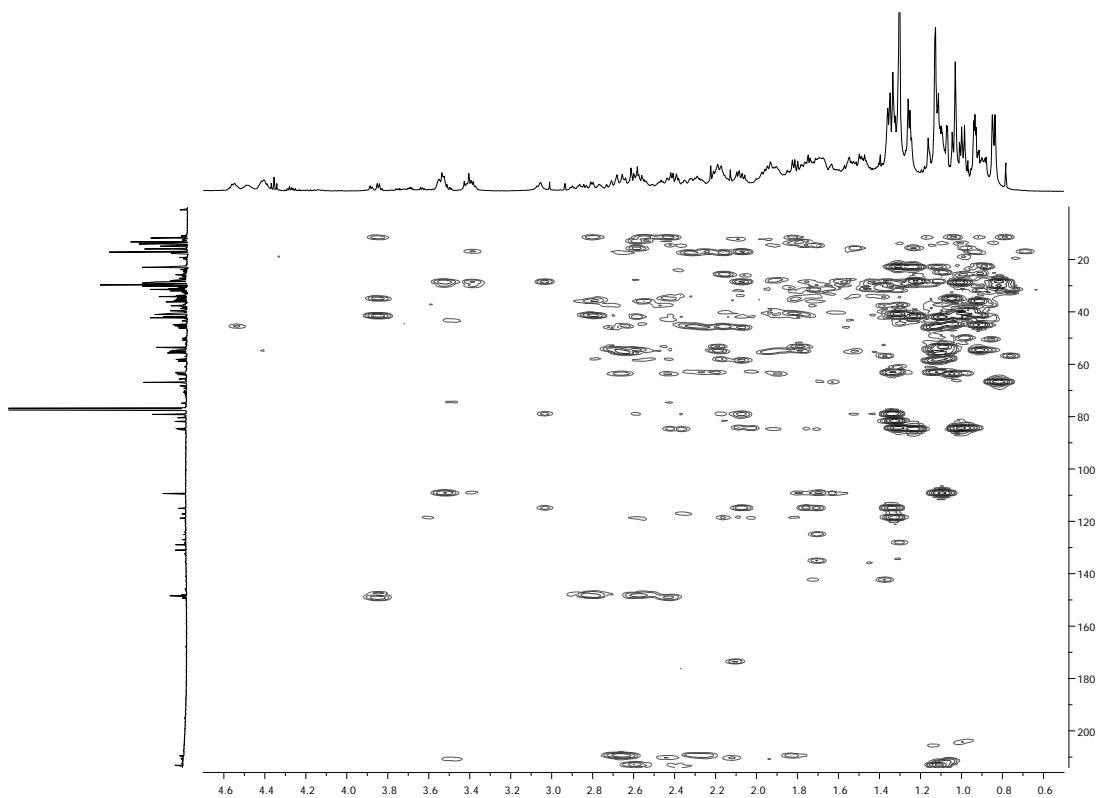
RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) el compuesto **108** en CDCl_3 .



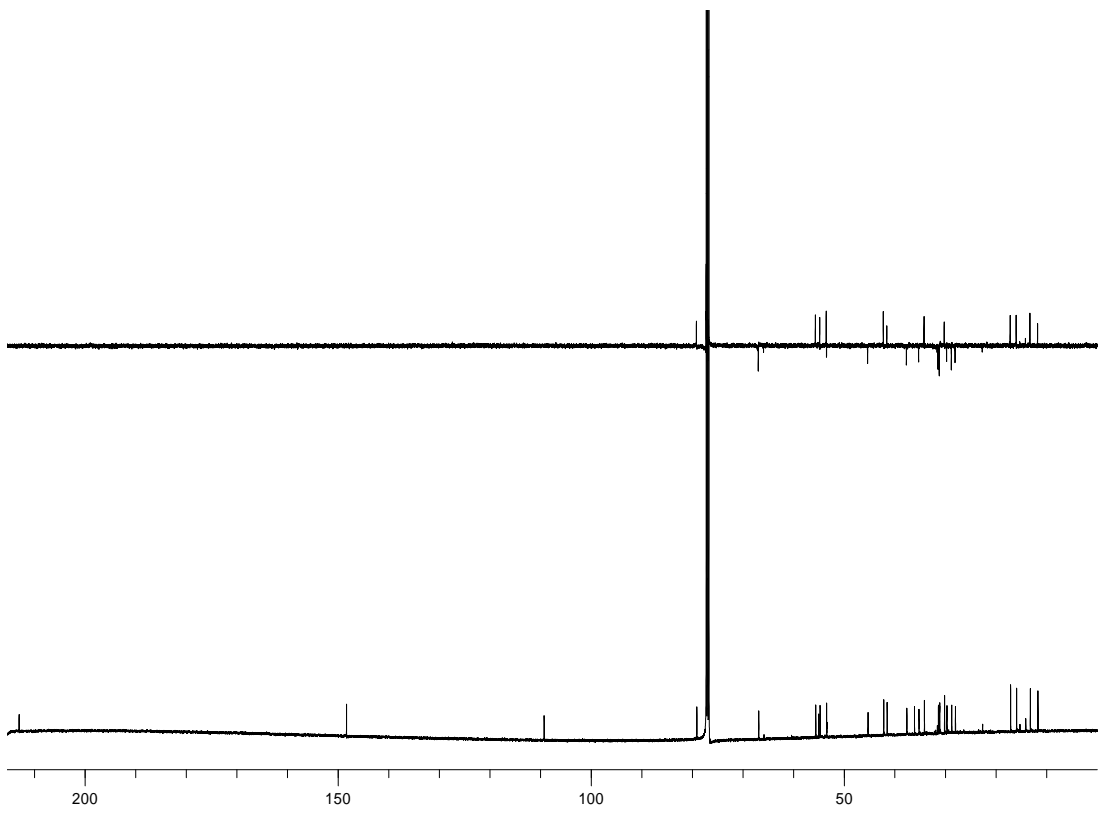
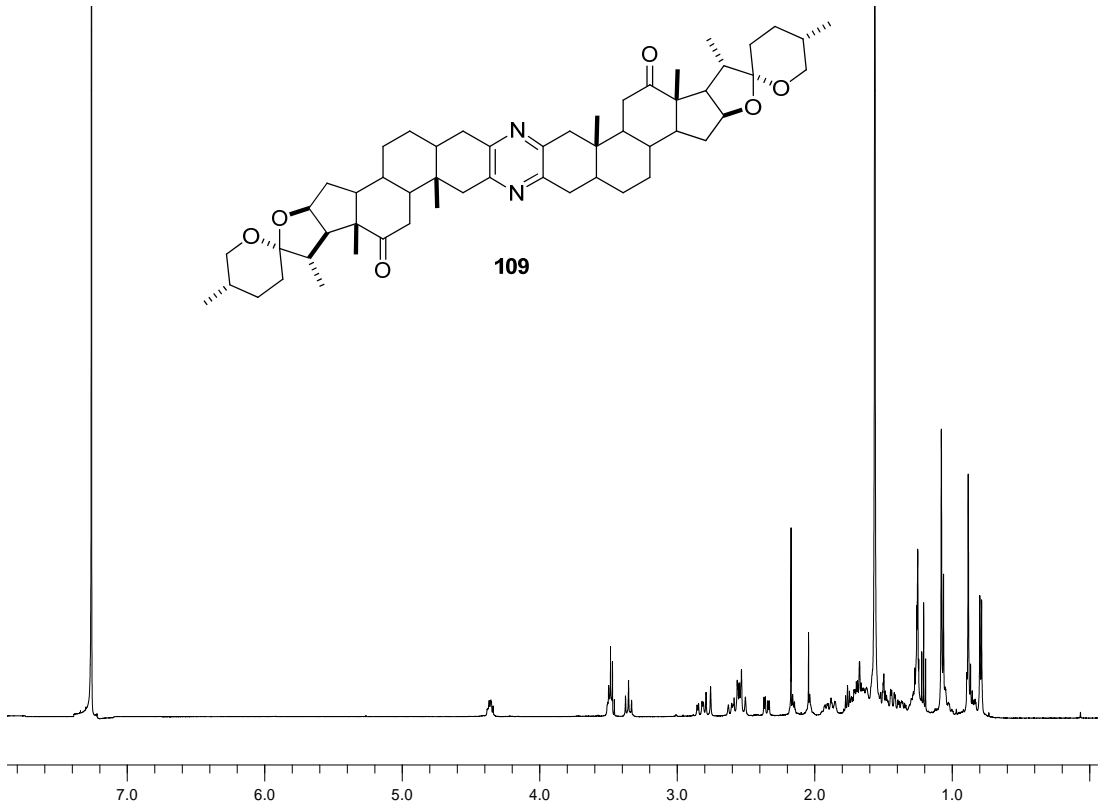
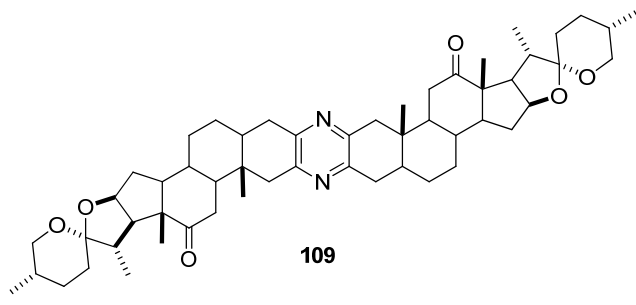
^1H ^1H COSY (500 MHz) del compuesto **108** en CDCl_3 .



HSQC (500 MHz) del compuesto **108** en CDCl_3 .



HMBC (500 MHz) del compuesto **108** en CDCl₃.



Análisis farmacológicos

Los ensayos de citotoxicidad de los compuestos descritos en los capítulos 1, 2, 3 y 4 (Fig. 32) fueron realizados por la empresa PharmaMar frente a un panel de tres líneas celulares tumorales: MDA-MB-231, A-549 y HT-29.

Paralelamente a estos ensayos se realizaron en BIOMAR otros análisis citotóxicos de los análogos descritos en el capítulo 1 frente a un panel de cuatro líneas celulares tumorales.

Los ensayos biológicos realizados en PharmaMar de los paneles celulares A-549 (ATCC CCL-185), carcinoma de pulmón humano; HT-29 (ATCC HTB-38), carcinoma de colon rectal humano y MDA-MB-231 (ATCC HTB-26), adenocarcinoma de pecho humano fueron obtenidos a través de la ATCC. Todas las líneas celulares se mantuvieron en el medio RPMI con un suplemento de 10% de FCS, 2 mM L-glutamina y 100 U/mL de penicilina y estreptomina, a 37°C y 5% CO₂. Se realizó un triplicado de células que fueron incubadas durante 72 h en presencia y en ausencia de compuesto de referencia (con un rango de diez en diez para concentraciones que van desde 10 hasta 0.0026 µg/mL). Para realizar una estimación cuantitativa de la citotoxicidad, se empleó el método de la sulforodamina B (SRB).¹⁸⁹ Seguidamente, se realizaron dos lavados de las células con PBS, durante 15 min en un 1% de disolución de glutaraldehído, para a continuación volver a realizar otro par de lavados con PBS y teñir al 0.4% de una disolución de SBR durante 30 min a temperatura ambiente. Las células volvieron a ser lavadas varias veces con una disolución al 1% de ácido acético y aire seco. La sulforodamina B fue extraída en 10 mM de disolución básica y la absorbancia se midió a 490 nm.

Los ensayos realizados en BIOMAR de los paneles celulares tumorales A-549, HCT-116, PSN1 y T98G consistieron en sembrar las células tumorales en placas con unos pocillos de un material especial, dejándolas crecer durante 24 horas. A continuación, se añadieron distintas concentraciones de compuesto haciendo diluciones seriadas y usando como máxima concentración 10 µg/mL. Las células se dejaron crecer durante 72 horas más y se llevó a cabo el conteo de células que quedaron vivas. Para ello, una vez finalizado el ensayo, las células vivas de cada pocillo (si las hay) se fijaron al fondo, se teñieron con un colorante y se lavaron para eliminar restos de medio y células muertas. A continuación, el colorante se disolvió y se hizo una medida de absorbancia, que será proporcional al número de células en cada pocillo. Como controles se usaron una medida de una placa sin células, otra medida de una placa que ha crecido durante las primeras 24 horas y una tercera medida de una placa de células que se dejaron crecer durante las 72 horas restantes, pero sin adición de ningún compuesto. Una vez teñidos y disuelto el colorante, los pocillos en los que se adicionaron distintas concentraciones de compuesto tendrían una medida de absorbancia y con ellas se construye una curva de concentración frente al porcentaje de crecimiento.

¹⁸⁹ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107.

Además de realizar los ensayos farmacológicos para evaluar la actividad citotóxica, objetivo principal de estudio, algunos de los 6-hidroximoesteroides descritos en el capítulo 1 (compuestos **13**, **14**, **23**, **24**, **53**, **54**, **58a** y **58b**) se sometieron a un estudio como inhibidores de la síntesis de proteínas.

En este estudio se realizaron los experimentos por triplicado, midiéndose las actividades frente a dos enzimas luciferasa: Firefly luciferasa y Renilla luciferasa que están implicadas en el proceso de biosíntesis de proteínas. Los datos se calcularon en función del vehículo control que era el MeOH, empleando como control positivo anisomycin y una concentración de compuesto 50 μM . Desafortunadamente, ninguno de los compuestos ensayados resultó ser activo.

Los resultados de la actividad citotóxica de los compuestos descritos en los capítulos 1, 2, 3 y 4 (Fig. 32) realizados en PharmaMar se expresan en unidades de μM para sus GI_{50} y se muestran en la Tabla 16:

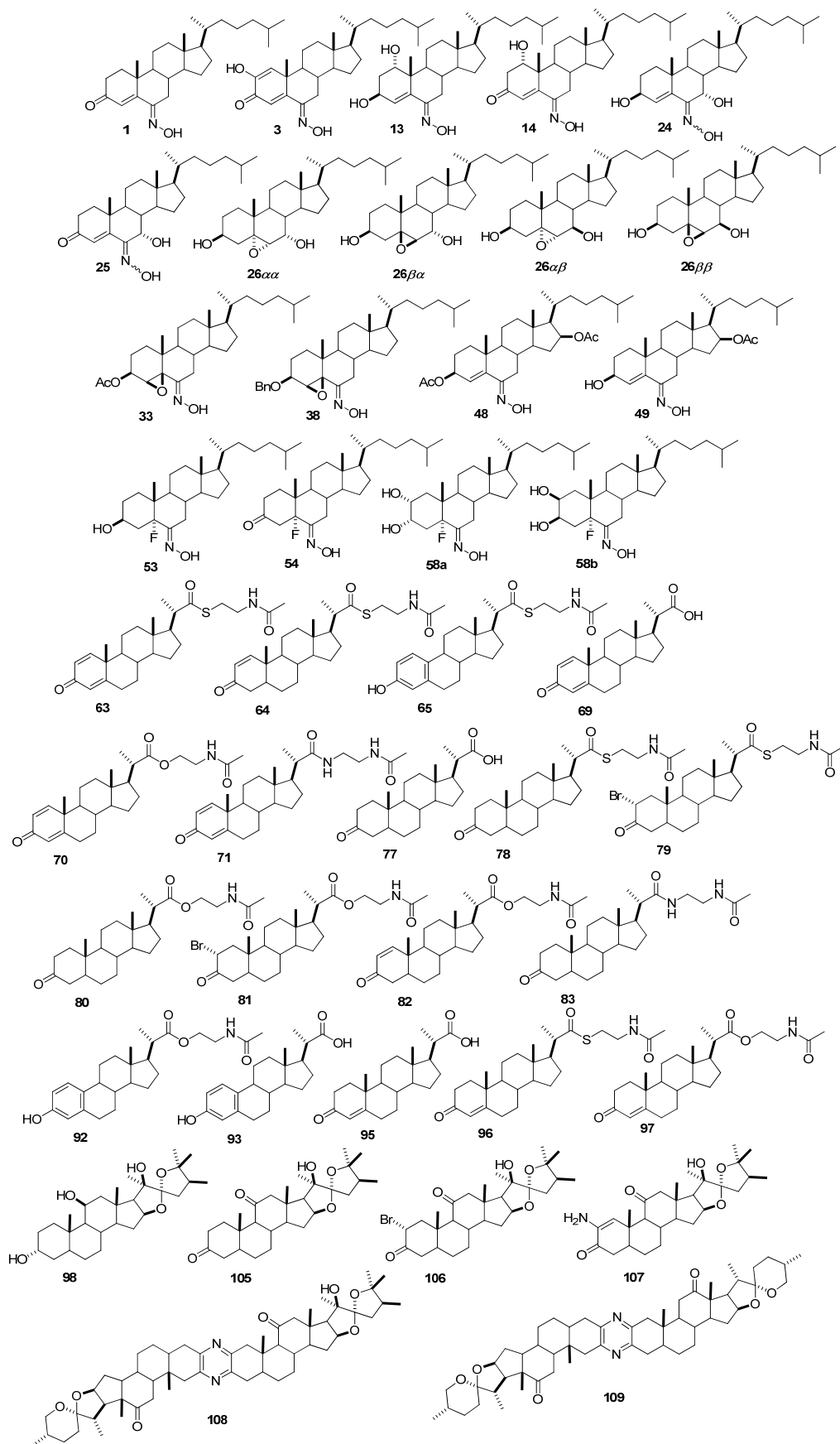


Figura 32. Esteroides sintetizados que se han evaluado frente a diferentes líneas celulares tumorales.

Tabla 16. Actividad citotóxica (GI_{50} en μM) de los esteroides sintetizados frente a los paneles celulares MDA-MB-231, A-549 y HT-29.

Comp.	MDA-MB-231	A-549	HT-29
1	19.6	20.3	20.5
3	3.3	3.5	3.0
13	18.8	18.5	11.6
14	-	-	-
24	-	-	-
25	-	-	13.3
26$\alpha\alpha$	19.1	18.6	11.9
26$\beta\alpha$	20.1	20.3	11.5
26$\alpha\beta$	5.9	5.5	4.8
26$\beta\beta$	2.1	1.2	0.9
33	6.7	8.8	6.3
38	-	-	-
48	18.5	18.7	11.2
49	18.5	18.3	18.6
53	-	-	-
54	18.9	18.9	18.7
58a	18.4	9.9	21
58b	20.8	17.6	-
63	47	38	31
64	13	14	6.5
65	88	-	-
69	-	-	-
70	15	15	10
71	70	90	38
77	-	-	-
78	19	20	6.9
79	62	57	60
80	4.6	4.6	3.0
81	17	29	25
82	13	15	10
83	39	79	72
92	-	-	-
93	-	-	-
95	-	-	-
96	33	-	14
97	62	53	37
98	5.6	3.2	4.5
105	-	-	-
106	-	-	-
107	-	-	-
108	2.0	1.6	1.6
109	2.6	1.7	2.1