

*Bøu Lo-tama, chí jí jú*

---

---

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Síntesis de nuevos bioconjugados esteroide-aminoácido  
como potenciales agentes citotóxicos**

**T E S I S**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias Químicas**

**PRESENTA**

Haggeo Vicente Azamar

Dr. Lemuel Pérez Picaso

Dra. Roxana Martínez Pascual

**Director de tesis**

**Co-Director de tesis**

**San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2024**



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/566
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 05 de noviembre de 2024

**M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA**  
**VICE-RECTOR ACADÉMICO**  
**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Químicas** del **c. Haggeo Vicente Azamar**, con número de **Matrícula 22130012**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Síntesis de nuevos bioconjugados esteroide-aminoácido como potenciales agentes citotóxicos**", para su posterior presentación y defensa por el sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente  
*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chi ji jú

**Dr. José Abad Zavaleta**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dr. Lemuel Pérez Picaso – Director de tesis.  
C.c.p. Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos – Coordinadora de la Maestría en Ciencias Químicas.  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/567
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 05 de noviembre de 2024

**C. HAGGEO VICENTE AZAMAR**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**  
**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Químicas** estará integrado por los siguientes investigadores.

Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dr. Omar Viñas Bravo	Presidente
Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín	Secretario
Dr. Jorge Guillermo Domínguez Chávez	Vocal
Dra. Nelda Xanath Martínez Galero	Primer Suplente
Dr. Lemuel Pérez Picaso	Segundo Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú

**Dr. José Abad Zavaleta**  
Jefe de la división de estudios  
de posgrado.



**M. en C. Héctor López Arjon**  
Vicerrector Académico  
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Lemuel Pérez Picaso – Director de tesis.  
C.c.p. Dra. Karla Viridiana Castro Cerritos – Coordinadora de la Maestría en Ciencias Químicas.  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230

## RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de Productos Naturales y Laboratorio de Síntesis de Moléculas Bioactivas pertenecientes al Centro de Investigación Científica (CIC) de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, bajo la dirección del Dr. Lemuel Pérez Picaso y la codirección de la Dra. Roxana Martínez Pascual. Con el apoyo otorgado por la beca CONAHCYT con número del SNP 002517 y clave CVU: 1252346, perteneciente al programa de Maestría en Ciencias Químicas. Además, se agradece al CONAHCYT por el financiamiento del proyecto INFRA-2015-01-252013, 317105 e INFRA-2019-301144.

*A mi familia*

*Lo importante no es en donde estamos, sino en que rumbo nos dirigimos; a veces hay que navegar a favor del viento otras en contra, pero hay que navegar, no ir a la deriva ni echar anclas*

## AGRADECIMIENTOS

*“La gratitud no solo es la mayor de las virtudes, sino la madre de todas las demás”*

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis padres, a mi mamá Alicia y a mi papá Agapito, aunque mi padre ya no está físicamente presente, su espíritu y legado siguen vivos en cada logro que alcanzo. A ti, papá, quiero expresarte mi gratitud eterna por tu amor incondicional, tu apoyo constante y tu confianza en mi capacidad para alcanzar mis metas. Gracias, papá, por creer en mí y por ser mi guía. Este logro es en honor a ti y a todo lo que representas.

Mi gratitud también va para mis hermanos, y en especial para mi hermano Timoteo, por su apoyo incondicional en todo momento.

Agradezco al Dr. Lemuel Pérez Picaso por permitirme unirme a su grupo de investigación, por su tiempo dedicado al proyecto, sus valiosas observaciones y enseñanzas, además, por el trato amable que siempre me ha brindado.

De manera especial, agradezco a la Dra. Roxana Martínez Pascual por su participación en este proyecto. Su amabilidad, comprensión, colaboración y experiencia han sido fundamentales para obtener los resultados de esta tesis.

Gracias al comité de revisión: Dr. Omar Viñas Bravo, Dr. Oscar Abelardo Ramírez Marroquín, Dr. Jorge Guillermo Domínguez Chávez y Dra. Nelda Xanath Martínez Galero. Aprecio el tiempo que dedicaron a revisar el escrito, así como sus comentarios y sugerencias que contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Adolfo López Torres por accesibilidad y colaboración en la obtención de los análisis de masas de alta resolución.

A mis amigos y compañeros del CIC: Shardy, Jair, Lidia, Tere, Edgar, Flavio, Carla, Luisa, Paola y Abiezer, por su amistad y por los buenos momentos.

Y, por último, pero no menos importante, a mis compañeros de generación: Martha, Noé, Ángel, Rodrigo, Rosa, Ary y Eduardo, por los momentos compartidos y el apoyo mutuo.

## CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1. Esteroides .....	3
2.1.1. Los esteroides como hormonas fisiológicas .....	5
2.1.2. Esteroides como antagonistas y moduladores de los receptores en el cáncer .....	5
2.1.3. Estrógenos .....	6
2.1.4. Andrógenos .....	7
2.2. Compuestos heterocíclicos .....	7
2.2.1. Heterociclos esteroidales .....	8
2.2.2. Dicitopiperazinas .....	9
2.3. Compuestos bioconjugados esteroidales .....	10
2.4. Síntesis del sistema esteroidal y DKPs.....	11
2.4.1. Síntesis de los esteroides .....	11
2.4.2. Síntesis de las dicitopiperazinas .....	12
III. ANTECEDENTES .....	14
IV. JUSTIFICACIÓN .....	23
V. HIPÓTESIS .....	24
VI. OBJETIVO GENERAL.....	25
6.1. Objetivos particulares.....	25
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7.1. Reactivos y equipos.....	26
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
8.1. Síntesis de los bioconjugados esteroides-aminoácidos .....	28
8.1.1. Síntesis de ésteres $\alpha$ -aminometílicos .....	29
8.1.2. Ruta sintética 1. Obtención del derivado esteroidal-aminoéster (84).....	30
8.1.2.1. Síntesis de diacetato de (25 <i>R</i> )-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ , 16 $\beta$ -diilo (44) ..	30

8.1.2.2. Síntesis de diacetato de (25 <i>R</i> )-26-yodo-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo (46).....	38
8.1.2.3. Síntesis de diacetato de (25 <i>R</i> )-26-( <i>N</i> -PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo (84) .....	40
8.1.3. Ruta sintética 2. Obtención de los derivados esteroideos-aminoésteres (86a-e).....	44
8.1.3.1. Síntesis del ácido 3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,-diacetoxi-22-oxocolest-eno-26-oico .....	44
8.1.3.2. Síntesis de bioconjugados esteroideal-aminoácido (86a-e) .....	46
8.2. Síntesis de dicetopiperazina (91).....	55
IX. Conclusiones .....	59
X. PARTE EXPERIMENTAL.....	60
9.1. Síntesis de aminoéster metílico de aminoácido.....	60
9.2. Síntesis de diacetato de (25 <i>R</i> )-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ , 16 $\beta$ -diilo .....	60
9.3. Síntesis de diacetato de (25 <i>R</i> )-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo-26 tosilato .....	61
9.4. Síntesis de diacetato de (25 <i>R</i> )-26-yodo-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo .....	62
9.5. Síntesis de diacetato de (25 <i>R</i> )-26-( <i>N</i> -PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo.....	63
9.6. Síntesis del ácido 3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,-diacetoxi-22-oxocolest-eno-26-oico .....	63
9.7. Síntesis de los bioconjugados esteroideos-aminoácidos (86a – e) .....	64
9.8. Ruta 1. Síntesis del ciclo(Lys-Gly) .....	67
9.9. Ruta 2. Síntesis del ciclo(Lys-Gly) .....	67
XI. ANEXO.....	70
XII. BIBLIOGRAFÍA .....	77

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ejemplos representativos de esteroides bioactivos.....	4
<b>Figura 2.</b>	Estructura general y numeración del núcleo esteroidal. ....	4
<b>Figura 3.</b>	Mecanismo de acción de los receptores nucleares intracelulares que miden la señalización de esteroides en las células; imagen tomada y modificada de Cole <i>et al.</i> , 2019 .....	5
<b>Figura 4.</b>	Ejemplos representativos de estrógenos.....	6
<b>Figura 5.</b>	Compuestos heterocíclicos con actividad biológica.....	8
<b>Figura 6.</b>	Derivados de heterociclos esteroidales con actividad biológica. ....	9
<b>Figura 7.</b>	Regioisómeros de las DKPs; 2,3- DKP ( <b>19</b> ), 2,5-DKP ( <b>20</b> ) y 2,6-DKP ( <b>21</b> ). ....	10
<b>Figura 8.</b>	Derivados de estradiol acoplados a aminoácidos protegidos. ....	15
<b>Figura 9.</b>	Complejos de platino con esteroides conjugados de aminoácidos.....	15
<b>Figura 10.</b>	Derivados de amidas de ácidos biliares aromáticos/heteroaromáticos.....	17
<b>Figura 11.</b>	Derivados peptídicos de androstano.....	17
<b>Figura 12.</b>	Derivado de conjugado de tirosina-colesterol. ....	17
<b>Figura 13.</b>	Derivado de bioconjugados de diosgenina y tigogenina. ....	18
<b>Figura 14.</b>	Derivados de diosgenina con actividad citotóxica. ....	19
<b>Figura 15.</b>	Derivados de diosgenina de amonio cuaternario.....	19
<b>Figura 16.</b>	Derivado de diosgenina con sales de fosfonio. ....	20
<b>Figura 17.</b>	Estructura química de la fenilhistina ( <b>72</b> ) y de la plinabulina ( <b>73</b> ). ....	21
<b>Figura 18.</b>	Derivado natural de la 2,5-dicetopiperazina, desoximiceliamida.....	21
<b>Figura 19.</b>	Derivados de 2,5-dicetopiperazinas con sustituyentes olefínicos. ....	22
<b>Figura 20.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto <b>43</b> y <b>44</b> . ....	33
<b>Figura 21.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C del compuesto <b>43</b> (inferior) y <b>44</b> (superior).....	34
<b>Figura 22.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto <b>44</b> y <b>45</b> . ....	36
<b>Figura 23.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de los compuestos <b>44</b> (inferior) y <b>45</b> (superior).....	37
<b>Figura 24.</b>	Espectro de infrarrojo del compuesto <b>44</b> y <b>45</b> .....	38
<b>Figura 25.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de los compuestos <b>45</b> y <b>46</b> . ....	39
<b>Figura 26.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de los compuestos <b>45</b> (inferior) y <b>46</b> (superior).....	40
<b>Figura 27.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H de los compuestos <b>46</b> y <b>84</b> . ....	41
<b>Figura 28.</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C de los compuestos <b>46</b> (inferior) y <b>84</b> (superior).....	42
<b>Figura 29.</b>	Espectro de infrarrojo de los compuestos <b>46</b> y <b>84</b> .....	43
<b>Figura 30.</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H del compuesto <b>44</b> y <b>85</b> . ....	45

<b>Figura 31.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>44</b> (inferior) y <b>85</b> (superior).....	45
<b>Figura 32.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del compuesto <b>85</b> y <b>86a</b> .....	49
<b>Figura 33.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto <b>85</b> (inferior) y <b>86a</b> (superior).....	49
<b>Figura 34.</b> Espectro de infrarrojo de los compuestos <b>85</b> y <b>86a</b> .....	50
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de los productos esteroidales-aminoéster ( <b>86a-e</b> ).....	52
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de los productos esteroidales-aminoéster ( <b>86a-e</b> ).....	54
<b>Figura 37.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de los compuestos <b>90</b> .....	57
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de los compuestos <b>91</b> .....	58

## ÍNDICE DE ESQUEMA

<b>Esquema 1.</b> Ejemplos representativos de reacciones sobre el núcleo esteroidal. ....	12
<b>Esquema 2.</b> Métodos representativos de obtención de 2,5-dicetopiperazinas. ....	13
<b>Esquema 3.</b> Síntesis del derivado de la diosgenina: 22-oxo-26-selenociancolestano.....	16
<b>Esquema 4.</b> Síntesis del derivado de la diosgenina: 22-oxocolestano. ....	16
<b>Esquema 5.</b> Síntesis del derivado de oximas esteroidales.....	18
<b>Esquema 6.</b> Síntesis de derivados: 26-amino-22-oxocolestano y 26-iminourazol-22-oxocolestano.20	
<b>Esquema 7.</b> Síntesis de los sistemas bioconjugados esteroides-aminoácidos.....	29
<b>Esquema 8.</b> Síntesis de ésteres $\alpha$ -aminometílicos. ....	30
<b>Esquema 9.</b> Reacción entre el revelador ninhidrina y un aminoácido. ....	30
<b>Esquema 10.</b> Mecanismo propuesto de la apertura del anillo F de la diosgenina con $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ .31	
<b>Esquema 11.</b> Método B.....	32
<b>Esquema 12.</b> Método B. Posible mecanismo de la apertura del anillo F de la diosgenina. ....	32
<b>Esquema 13.</b> Síntesis de (25 <i>R</i> )-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo 3,16-diacetato 26 tosilato (45). ....	35
<b>Esquema 14.</b> Rendimientos de reacción del proceso de síntesis del compuesto <b>84</b> .....	44
<b>Esquema 15.</b> Método de acilación de bioconjugados de aminoéster. ....	46
<b>Esquema 16.</b> Síntesis de bioconjugados esteroide-aminoácido ( <b>86a – e</b> ).....	47
<b>Esquema 17.</b> Rutas sintéticas para la síntesis de DKP ciclo(Lys-Gly) ( <b>91</b> ). ....	55
<b>Esquema 18.</b> Posible mecanismo de síntesis del dipéptido lineal <b>88</b> .....	56
<b>Esquema 19.</b> Posible mecanismo de síntesis del ciclo[Lys(Boc)-Gly] <b>90</b> .....	57

## ABREVIATURAS

<b>AcOH</b>	Ácido acético
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridina
<b>Fmoc</b>	9-Fluorenilmetiloxycarbonilo
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anhídrido acético
<b>EDC·HCl</b>	Clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
<b><i>p</i>-TsCl</b>	Cloruro de 4-toluenosulfonilo
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración media Inhibitoria
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CCF</b>	Cromatografía de capa fina
<b>DCU</b>	1,3-Diciclohexilurea
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>DKP's</b>	Dicetopiperazinas
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retención
<b>HOBt</b>	Hidroxibenzotrizol
<b>DCC</b>	<i>N, N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
<b>DIPEA</b>	<i>N, N'</i> -Diisopropiletilamina
<b>DMF</b>	<i>N, N'</i> -Dimetilformamida
<b>Py</b>	Piridina
<b>Boc</b>	<i>tert</i> -butiloxycarbonilo
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub></b>	Trifluoruro de boro éter dietílico

## RESUMEN

Los derivados esteroidales han adquirido importancia debido a la amplia variedad de actividades biológicas que presentan, tales como, antitumoral, antiproliferativa, citotóxica, entre otras. Es conocido que las modificaciones del sistema esteroideal por el reemplazo de uno o más carbonos o por la inserción de otras moléculas es una estrategia para mejorar sus propiedades biológicas.

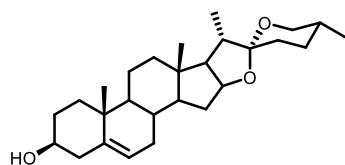
Con base en lo anterior, el presente proyecto se enfocó en sintetizar nuevos derivados esteroidales que tienen un aminoácido unido a la posición del C-26 de la cadena lateral del esteroide, procedente de un derivado semisintético de la diosgenina, la cual es una sapogenina espirostánica económica y es una de la más explotadas a nivel industrial en la elaboración de fármacos esteroidales.

En este trabajo se obtuvo una familia de bioconjugados esteroide-aminoácido, constituido por productos de las reacciones de *N*-acilación de un aminoéster con un derivado esteroideal. La formación de los bioconjugados se logró mediante el acoplamiento de un ácido carboxílico situado en el carbono 26 del esteroide con un aminoéster. Cabe mencionar que también se obtuvo el producto *N*-alquilado mediante una reacción de *N*-alquilación entre el derivado 26-yodo esteroideal (**46**) y el aminoéster (**77a**). Los compuestos *N*-alquilados (**84**) y *N*-acilados (**86a-86e**), se obtuvieron con rendimientos globales bajos que oscilan de 0.42-0.98% y 18-30%, respectivamente. Los aminoésteres se obtuvieron mediante el uso de clorotrimetilsilano en metanol o mediante la reacción de esterificación de Fischer (**77a, 77d, 77e, 78b, 78c**).

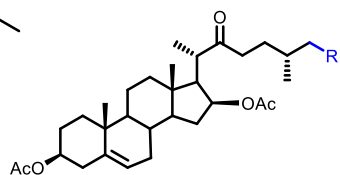
El intermediario **46**, utilizado para la reacción de *N*-alquilación, se formó en secuencia de tres pasos de reacción a partir de diosgenina. Primero, se generó el derivado 26-hidroxi (**44**), a través de una acetólisis a baja temperatura, el alcohol generado en C-26 se tosiló (**45**), luego, mediante una reacción S<sub>N</sub>2 se introdujo el yodo (**46**). Por último, el amino éster (**77a**) se hizo reaccionar con **46** para generar el bioconjugado esperado.

Por otra parte, los bioconjugados con enlace tipo amida se generaron a partir de intermediario del derivado 26-hidroxi (**44**), el cual se oxidó con el reactivo de Jones hacia el ácido carboxílico (**85**). Subsecuentemente, el aminoéster previamente formado, se hizo reaccionar con el ácido carboxílico, usando carbodiimida como agente acoplante.

Finalmente, se exploró el desarrollo de una metodología para la obtención del ciclo (Lys-Gly) (**91**), a partir del dipéptido lineal (**88**), el cual fue sintetizado a partir de los precursores; Fmoc-Lys(Boc)-OH (**87**) y GlyOMe (**77a**). La síntesis de la DKP se realizó con el objetivo de que en futuros trabajos se pueda acoplar a un esteroide para formar un bioconjugado con posible actividad antiproliferativa.

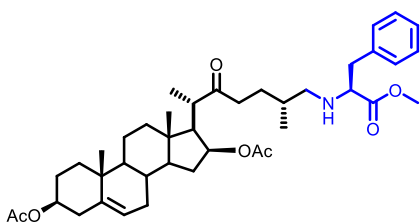


43

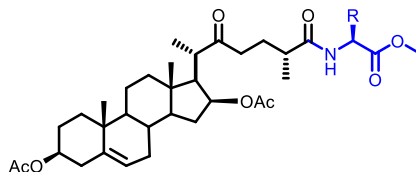


R = 44 -OH  
45 -OTs  
46 -I  
85 -COOH

**Derivados esteroidales**



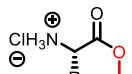
84



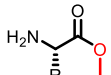
86

86a R=H  
86b R= Isopropil  
86c R = (1S)-1-metilpropil  
86d R= Bencilo  
86e R = CH<sub>2</sub>-(3 indolil)

**Bioconjugados esteroide-aminoácido**



77a, 77d, 77e



78b, 78c

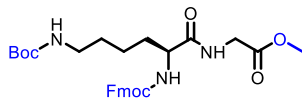
78a R=H  
78b R= Isopropil  
78c R = (1S)-1-metilpropil  
78d R= Bencilo  
78e R = CH<sub>2</sub>-(3 indolil)

**Aminoésteres**



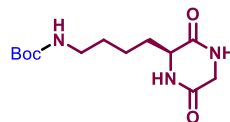
87

**Aminoácido protegido**



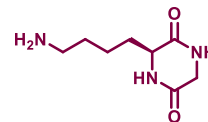
88

**Dipéptido lineal**



90

**Dipéptido cíclico**



91

**Dicetopiperazina**

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas y los microorganismos constituyen fuentes inagotables de moléculas bioactivas, que muestran una amplia variedad de arquitecturas moleculares. Estas moléculas han sido biosintetizadas en respuesta a diferentes factores presentes en el medio que los rodea, mostrando interesantes actividades biológicas. Los productos naturales presentan estructuras privilegiadas que comprenden una gran parte de las herramientas empleadas en el descubrimiento, diseño y síntesis de nuevas moléculas bioactivas.<sup>1-3</sup>

Los esteroides son moléculas orgánicas lipofílicas que poseen una estructura molecular característica compuesta de cuatro anillos de carbono fusionados, estos compuestos desempeñan diversas funciones fisiológicas en el cuerpo humano, como la homeostasis electrolítica, la función reproductiva, la respuesta al estrés, la maduración sexual, entre otras.<sup>4,5</sup>

Las modificaciones en el esqueleto básico de esteroides, la introducción de heteroátomos y la formación de compuestos híbridos, han sido benéficos para mejorar la afinidad con el sitio de interacción con receptores hormonales presentes en el núcleo celular.<sup>6</sup> Se han investigado varios esqueletos de esteroides modificados en el anillo A y/o D donde los carbonos 3 y 17 presentan un agente alquilante del DNA con el fin de modular la actividad anticancerígena, además se han efectuado derivatizaciones de esteroides con aminoácidos y residuos peptídicos con actividad citotóxica en líneas celulares del cáncer.<sup>5,7</sup>

Por otra parte, dos moléculas de aminoácidos se pueden unir de forma covalente a través de un enlace amida sustituido, denominado enlace peptídico, para formar un dipéptido. Este enlace se forma por la eliminación de una molécula del agua (deshidratación) del carboxilo de un aminoácido y el grupo  $\alpha$ -amino del otro.<sup>8</sup> Las formas cíclicas de los péptidos reducen la libertad conformacional de la cadena peptídica, siendo una estrategia que se emplea habitualmente en el diseño de diversos agentes terapéuticos. Las dicetopiperazinas (por sus siglas en inglés DKP's) son dipéptidos cíclicos obtenidos de la condensación de dos  $\alpha$ -aminoácidos. Además, los péptidos suelen ser impermeables a la membrana celular, lo que limita su acceso a objetivos intracelulares. Sin embargo, se ha demostrado que la *N*-alquilación del esqueleto peptídico mejora la estabilidad proteolítica y la permeabilidad a la membrana celular de ciertos péptidos cíclicos.<sup>9</sup> La utilización de péptidos cíclicos como productos farmacéuticos ofrece ventajas debido a la buena afinidad de unión, selectividad y baja toxicidad, por lo que se convierte en un punto de interés para la investigación. Por otra parte, los péptidos lineales tienen mejor estabilidad y son reconocidos fácilmente por las enzimas proteasas, esto lo hace adecuados para ser utilizados contra dianas extracelulares.<sup>10</sup>

En este trabajo se planteó la síntesis de una familia de conjugados esteroides-aminoácidos con potencial actividad citotóxica frente a células cancerosas MCF-7, sin afectar a las células no tumorales. Además, se efectuó la síntesis de una dicetopiperazina, con el propósito de acoplarla al esteroide en un futuro trabajo.

## II. MARCO TEÓRICO

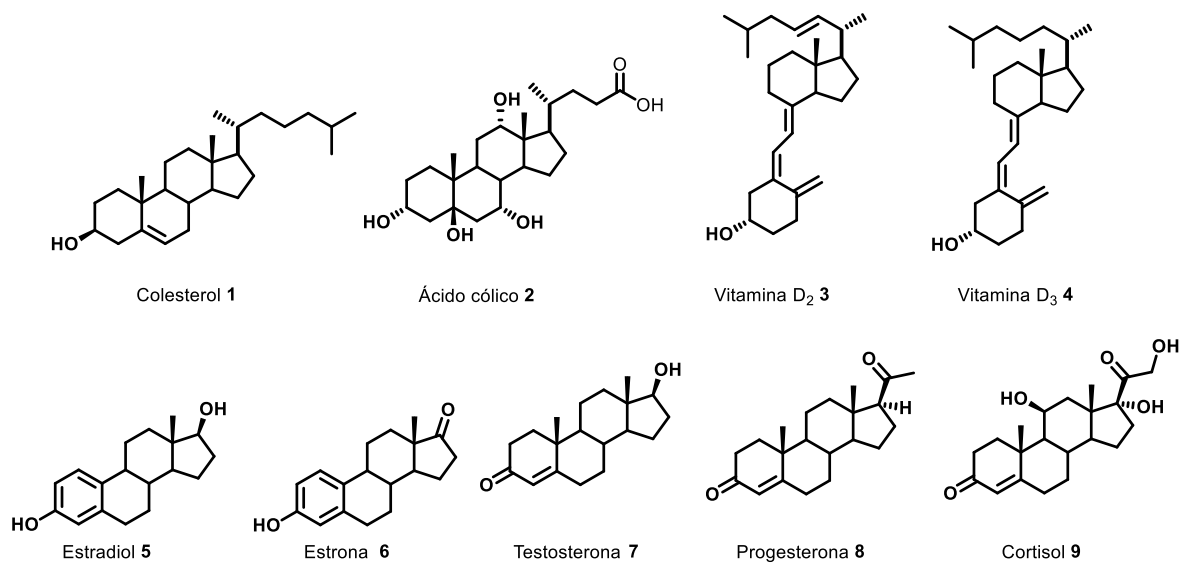
La química farmacéutica abarca el diseño, la síntesis y la evaluación de alguna actividad biológica de compuestos químicos. La generación de los compuestos esteroidales revolucionó la industria farmacéutica, utilizando los avances en la química orgánica, se progresó hasta el punto de la preparación de fármacos “no naturales” a gran escala con costos accesibles.<sup>11,12</sup> Este proceso continuó en la década de 1950 hasta ser parte esencial para la sociedad, por ejemplo, la introducción de agentes psicofarmacológicos, con actividad cardiovascular, inhibidores de enzimas y de nuevos fármacos antivirales y anticancerígenos.<sup>13,14</sup>

Las moléculas bioactivas se encuentran en pequeñas cantidades en los seres vivos, cumpliendo funciones esenciales y no esenciales. Las plantas producen un gran número de moléculas bioactivas con múltiples cualidades, entre las cuales se encuentran los metabolitos secundarios. Estas sustancias bioactivas tienen diversas estructuras químicas, las cuales se pueden obtener de manera sintética donde se presentan todo tipo de dificultades durante los procesos de síntesis y purificación.<sup>15</sup> Por lo cual, la búsqueda de estrategias novedosas y eficientes para la síntesis de un gran número de análogos de productos naturales, ha hecho que esta área reciba mucha atención.<sup>3,16,17</sup>

### 2.1. Esteroides

Los esteroides son compuestos orgánicos medicinalmente activos extremadamente importantes, que se encuentran distribuidos en plantas, animales y organismos vivos. Las estructuras de los esteroides se pueden modificar de diversas maneras para sintetizar diversos derivados. Es importante destacar que las hormonas esteroidales controlan los sistemas endocrinos y regulan las vías metabólicas.<sup>18</sup> Estas hormonas influyen en funciones endocrinas como la diferenciación sexual y la vida reproductiva.<sup>19</sup>

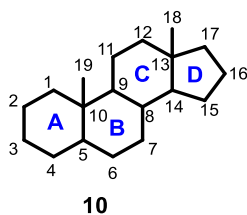
Los esteroides son moléculas orgánicas complejas de al menos cuatro anillos que cumplen muchos roles y funciones en organismos multicelulares, algunos ejemplos de esteroides se muestran en la Figura 1. Son componentes estructurales de las membranas celulares ejemplificados por el colesterol. Además, tienen muchas actividades reguladoras con formas estructurales modificadas del colesterol para funcionar como hormonas endocrinas endógenas.<sup>14</sup> En todos los organismos, las hormonas *in vivo* desempeñan papeles reguladores clave en la mediación de la comunicación, regulación de funciones y procesos importantes dentro de las células, y a través de los tejidos para conectar todos los órganos del cuerpo.<sup>18,20</sup>



**Figura 1.** Ejemplos representativos de esteroides bioactivos.<sup>21</sup>

Las hormonas hidrófilas o solubles en agua actúan principalmente en la superficie celular uniéndose a los receptores de proteínas incrustados en la membrana plasmática.<sup>14,18</sup> Por el contrario, las hormonas hidrofóbicas circulan principalmente unidas a proteínas plasmáticas portadoras y pueden desactivarse libremente a través de las membranas celulares para activar receptores de hormonas intracelulares específicos.<sup>14,19</sup>

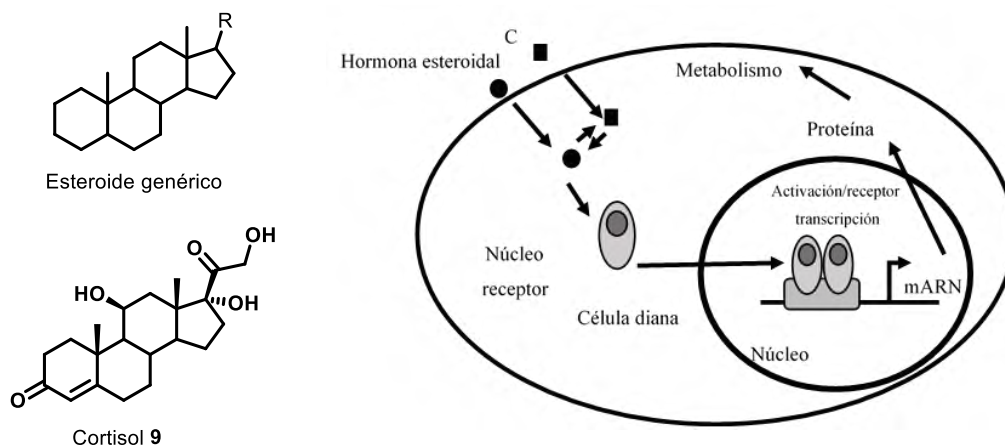
Los compuestos esteroidales poseen un esqueleto definido, que consta de tres anillos de seis miembros y uno de cinco miembros fusionados (núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno). La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada determinó nombrar los anillos como A, B, C y D, y con respecto a la numeración, ésta se describe en la Figura 2. Existen cuatro grandes familias de hormonas esteroidales, los cuales son: progestinas, andrógenos, estrógenos y corticoides.<sup>5,14,21</sup>



**Figura 2.** Estructura general y numeración del núcleo esteroidal.<sup>5</sup>

Las hormonas esteroides ejercen su acción por medio de su unión a receptores miembros de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción, entre los que destacan receptores de andrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos y progesterona.<sup>18</sup> Los receptores de hormonas esteroides comparten una estructura similar, que consiste en un dominio

carboxilo-terminal, el dominio de unión al ligando, una región central capaz de unir al ácido desoxirribonucleico (ADN) y un dominio amino-terminal imprescindible para lograr la actividad transcripcional propia de cada receptor (Figura 3).<sup>11,20</sup>



**Figura 3.** Mecanismo de acción de los receptores nucleares intracelulares que miden la señalización de esteroides en las células; imagen tomada y modificada de Cole *et al.*, 2019<sup>14</sup>

### 2.1.1. Los esteroides como hormonas fisiológicas

Las hormonas esteroides endógenas han sido reconocidas durante mucho tiempo como reguladores fisiológicos del desarrollo, crecimiento, reproducción y homeostasis sistémica. La mayoría de las hormonas esteroides fisiológicas se derivan del colesterol y se sintetizan en células endocrinas especializadas dentro de glándulas endocrinas específicas. Las hormonas esteroides endógenas importantes incluyen los esteroides suprarrenales cortisol y aldosterona, los precursores de andrógenos suprarrenales DHEA y DHEAS, y los esteroides reproductivos estradiol, testosterona y dihidrotestosterona. Las hormonas esteroides sexuales comprenden al estradiol, que se sintetiza predominantemente en el ovario, y la testosterona que se sintetiza predominantemente en los testículos.<sup>14</sup>

### 2.1.2. Esteroides como antagonistas y moduladores de los receptores en el cáncer

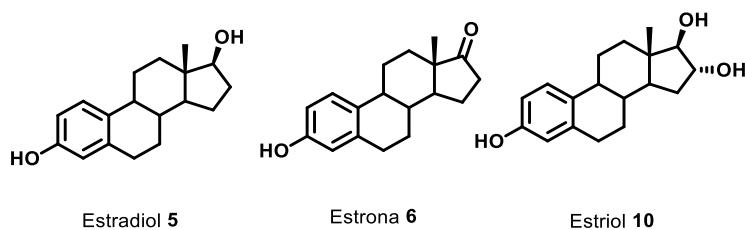
Los agentes que actúan como antagonistas de los receptores hormonales son de especial interés para el tratamiento de cáncer hormonodependientes, por ejemplo, el tamoxifeno, el cual es uno de los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (MSRE) de primera generación, ha sido el estándar de los fármacos terapéuticos de primera línea para todas las etapas del cáncer de mama dependiente de estrógenos y se ha descubierto que reduce la incidencia de cáncer de mama en mujeres pre y posmenopáusicas de alto riesgo. El raloxifeno, un MSRE de segunda generación, fue aprobado recientemente por la FDA para disminuir el riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres

posmenopáusicas.<sup>22</sup> Los MSRE están en continuo desarrollo para las mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama avanzado sensible a las hormonas, mientras que los moduladores selectivos de los receptores de andrógenos (MSRA) son buenos candidatos para tratar tumores prostáticos con efectos menores en los tejidos reproductivos.<sup>4,20</sup> El desarrollo de nuevos bioconjugados esteroidales que sean selectivos de tejidos, ampliará las aplicaciones terapéuticas de los agonista y antagonistas de los receptores de andrógenos (RA).

### 2.1.3. Estrógenos

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroides que exhiben diversos mecanismos de acción en múltiples sistemas fisiológicos y también están implicados en el desarrollo o progresión de numerosas enfermedades, como varios tipos de cáncer de mama, ovario, colorrectal, próstata y endometrio, así como osteoporosis, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares.<sup>23</sup> Los efectos que presentan cada uno de los receptores son muy diversos, en el caso del receptor de estrógeno  $\alpha$  ( $E\alpha$ ) induce una respuesta de diferenciación, sobrevivencia y proliferación celular, de tal manera que una alteración en la actividad normal de este receptor aumenta la probabilidad de desarrollar ciertos tipos de cáncer como el de mama y endometrio.<sup>20,23</sup>

Los estrógenos presentan una gran actividad biológica en el organismo, participan regulando diversas funciones en el cuerpo (Figura 4), sin embargo el incremento de estrógenos endógenos se ha visto relacionado con varios tipos de cáncer, tal caso es el cáncer de mama; el riesgo aumenta cuanto existe menarquía temprana, menopausia tardía, obesidad y el uso de terapia de reemplazo hormonal, debido a que incrementan los niveles de estradiol en plasma sanguíneo, por otra parte la expresión de diversas enzimas como aromatasa y sulfotransferasa se han relacionado con mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Diversos estudios relacionan a la enzima sulfotransferasa del incremento en los niveles de estradiol, los cuales elevan el riesgo de desarrollar cáncer de ovario, provocando el aumento de la movilidad celular al perder las uniones de adhesión celular promoviendo procesos metastásicos, además, su receptor, se ha visto asociado con diversas funciones que podrían inducir la acumulación de mutaciones que desencadenen una transformación maligna.<sup>23</sup>



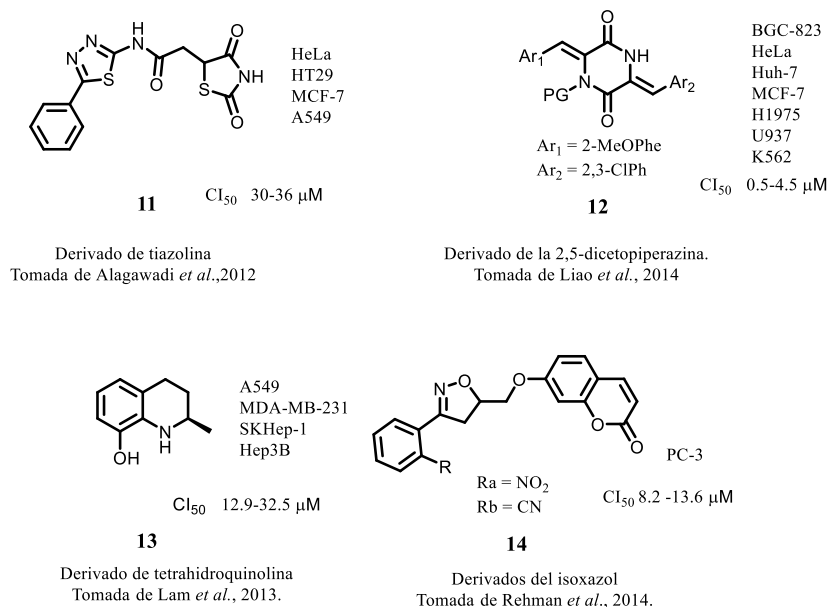
**Figura 4.** Ejemplos representativos de estrógenos.

#### **2.1.4. Andrógenos**

Andrógenos, como la testosterona y su metabolito  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), juegan un papel crucial en varias etapas del desarrollo masculino y están relacionadas con enfermedades como el cáncer de próstata y la atrofia muscular. Las actividades de los andrógenos como hormonas sexuales ocurren principalmente a través de activación del AR, un importante objetivo terapéutico para el tratamiento de enfermedades, como el cáncer de próstata y el hipogonadismo. Los andrógenos también están relacionados con el cáncer de mama, ya que pueden actuar como precursores de estrógenos o al unirse al AR en las células de cáncer de mama.<sup>4,24</sup>

#### **2.2. Compuestos heterocíclicos**

Los compuestos heterocíclicos son importantes para el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer. Para la quimioterapia del cáncer es necesario avanzar en el desarrollo de fármacos anticancerígenos con mayor eficiencia y habilidad para mitigar los efectos secundarios. Esto no sólo ha llevado a que los productos naturales sean utilizados como fármacos, sino que también ha inspirado una generación de compuestos sintéticos basados en sus farmacóforos (parte de la molécula que produce los efectos fisiológicos específicos de un fármaco), entre los cuales se destacan compuestos heterocíclicos como las tiazolidinas, las dicetopiperazinas, los isoxazoles y las tetrahydroquinolinas (Figura 5).<sup>25</sup> Estos fragmentos estructurales se consideran privilegiados en la química medicinal debido a su amplio espectro de actividad biológica y a su afinidad por diferentes dianas moleculares, resaltando su potencial citotóxico y anticancerígeno. En particular, se han introducido al núcleo esteroideal heterociclos como isoxazoles, isoxasolinas, tiazoles, tiadiazoles, pirimidinas, imidazoles, entre otros.<sup>26,27</sup>



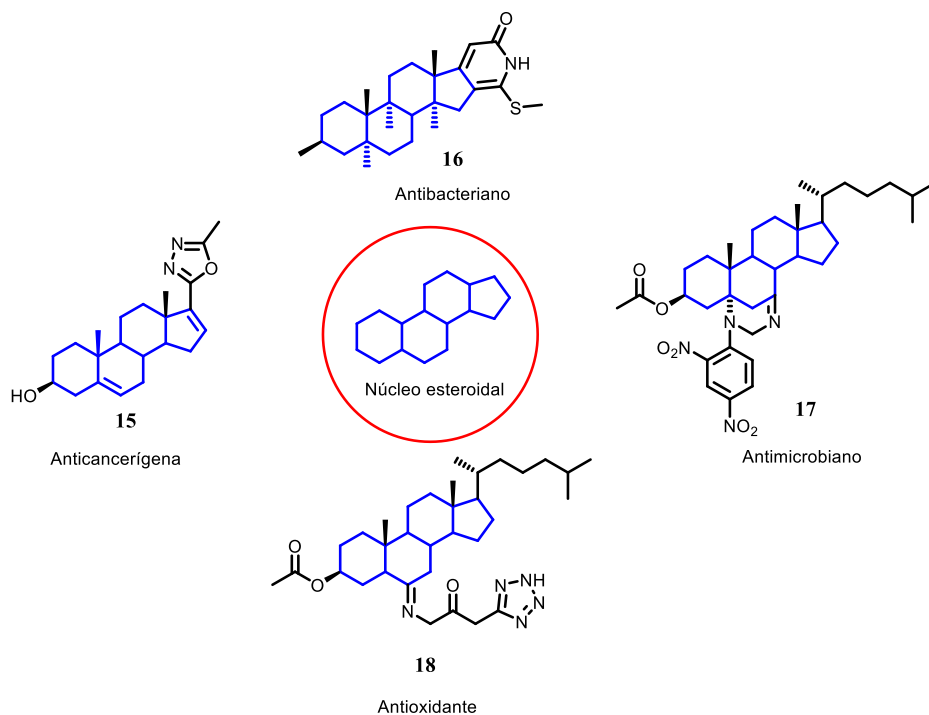
**Figura 5.** Compuestos heterocíclicos con actividad biológica.

### 2.2.1. Heterociclos esteroidales

Los compuestos heteroesteroides, presentes en la naturaleza, demuestran la diversidad en las propiedades biológicas. Algunos esteroides se han utilizado como fármacos convencionales, antibacterianos y hormonales, entre otros. La incorporación de un anillo heterociclo en el esqueleto esteroideal principal o el reemplazo de uno o más átomos provocan cambios en su comportamiento biológico, aumentando la afinidad a ciertos receptores hormonales contra células cancerosas.<sup>26-28</sup>

Todas las modificaciones semisintéticas que involucran el esqueleto esteroideal apolar o los grupos funcionales polares en las posiciones C-3 y C-17 en las hormonas naturales pueden ejercer una influencia significativa en la afinidad con los sitios de unión de receptores hormonales.<sup>13</sup>

La síntesis de hormonas unidas a un heterociclo se efectúa regularmente en las posiciones C-3, C-17 ó C-20, o sobre los átomos de carbono adyacentes a los ya sustituidos C-3, C-17 ó C-26 debido a la facilidad de realizar las modificaciones respectivas. Se ha demostrado que la sustitución en otras posiciones del esqueleto esteroideal es más difícil, necesita varios pasos de reacción y, por lo tanto, rara vez se aplica.<sup>27</sup> En lo que a esto respecta, diversos autores han reportado que además de la actividad hormonal típica que poseen los esteroides, la introducción de heterociclos sobre la estructura del esteroide (Figura 6), ha dado como resultado la obtención de compuestos con actividad antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatoria, y actividad anticancerígena en diversas líneas celulares.<sup>7,13,29,30</sup>



**Figura 6.** Derivados de heterociclos esteroidales con actividad biológica.

En particular, la síntesis de esteroides que contienen un heteroátomo o un anillo heterocíclico unido o fusionado al esqueleto esteroidal ha atraído la atención de muchos grupos de investigación debido a las interesantes propiedades biológicas que presentan.<sup>4</sup>

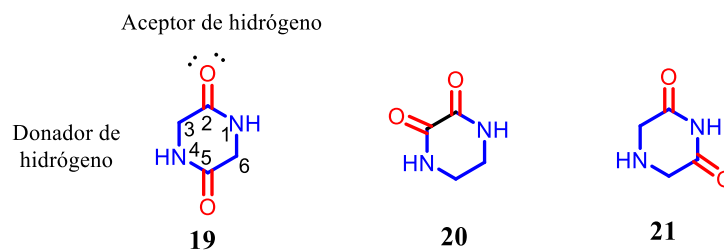
### 2.2.2. Diketopiperazinas

Una serie de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos forman una cadena polipeptídica y cada unidad de aminoácido de un polipéptido se denomina residuo de aminoácido. Una cadena polipeptídica tiene polaridad porque sus extremos son diferentes, con un grupo  $\alpha$ -amino en un extremo y un grupo  $\alpha$ -carboxilo en el otro extremo. La protección de un grupo terminal del aminoácido es una de las cuestiones más importantes en la química de péptidos, para generar dipéptidos lineales y/o cíclicos.<sup>31,32</sup>

Una diketopiperazina es el péptido cíclico más simple y se encuentra conformado por la unión de dos aminoácidos. Las diketopiperazinas DKPs o también denominadas dipéptidos cíclicos han sido muy estudiados debido a sus interesantes actividades biológicas. Las estructuras cristalinas y moleculares de las 2,5-diketopiperazinas se han estudiado ampliamente, debido a que estas moléculas son la clase más simple de péptidos cíclicos. Contienen dos enlaces *cis*-amida, dando lugar a dos sitios aceptores de hidrógeno y dos sitios donadores de enlaces de hidrógeno, importante en la para la unión a enzimas y receptores (Figura 7). Además, la diversidad estructural que poseen las 2,5-diketopiperazinas es

resultado de las seis posiciones en las que se pueden agregar sustituyentes y hasta cuatro posiciones en las que se pueden controlar su estereoquímica. Pueden existir en una conformación esencialmente plana o en forma de bote (ligeramente torcida).<sup>32-34</sup>

Para nombrar a las DKPs, se colocan entre paréntesis los símbolos de los aminoácidos involucrados en el anillo, precedidos por la palabra “ciclo”, ejemplo: ciclo (Val-Gly). La numeración del anillo en una DKP (**19**) inicia a partir del nitrógeno seguido del grupo carbonilo. Además, estos compuestos presentan tres regioisómeros (**19**, **20**, **21**), que difieren en la ubicación de los grupos carbonilo.



**Figura 7.** Regioisómeros de las DKPs; 2,3- DKP (**19**), 2,5-DKP (**20**) y 2,6-DKP (**21**).

Las dicetopiperazinas toman relevancia por su actividad anticancerígena. Por ejemplo, la plinabulina, un derivado semisintético de la fenilhistina natural, se diseñó primero como un agente disruptor vascular y ahora se encuentra en ensayos clínicos de fase II como un fármaco contra el cáncer que se comporta como un potente agente antimicrotúbulo. En este contexto, se ha encontrado que cuanto mayor es la lipofilidad de la dicetopiperazina, mayor es la actividad anticancerígena observada. Por lo tanto, la búsqueda de nuevos productos lipofílicos que tengan un anillo de dicetopiperazina como núcleo central es un tema de interés debido a las actividades biológicas que pueden presentar por ejemplo antibacteriana, antifúngica, antitumoral, antiviral entre otras.<sup>8</sup>

Las propiedades químicas más interesantes de las DKP's para la química medicinal son su resistencia a la proteólisis, la imitación de grupos farmacóforos peptídicos, la estereoquímica de los grupos sustituyentes, la rigidez conformacional, y los grupos aceptores y donadores para la formación de enlaces de hidrógeno con los receptores biológicos. Esto les concede características farmacodinámicas y farmacocinéticas favorables, que las convierten en estructuras privilegiadas para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para tratar enfermedades como el cáncer.<sup>8,31</sup>

El uso de péptidos cíclicos tiene un potencial atractivo como productos farmacéuticos debido a que ofrece ventajas atribuidas a la buena afinidad de unión, selectividad y baja toxicidad.<sup>10</sup>

### 2.3. Compuestos bioconjugados esteroideos

La bioconjugación implica la unión de una molécula con otra mediante un enlace covalente para formar una estructura compleja. Para formar un bioconjugado, al menos una de las moléculas debe

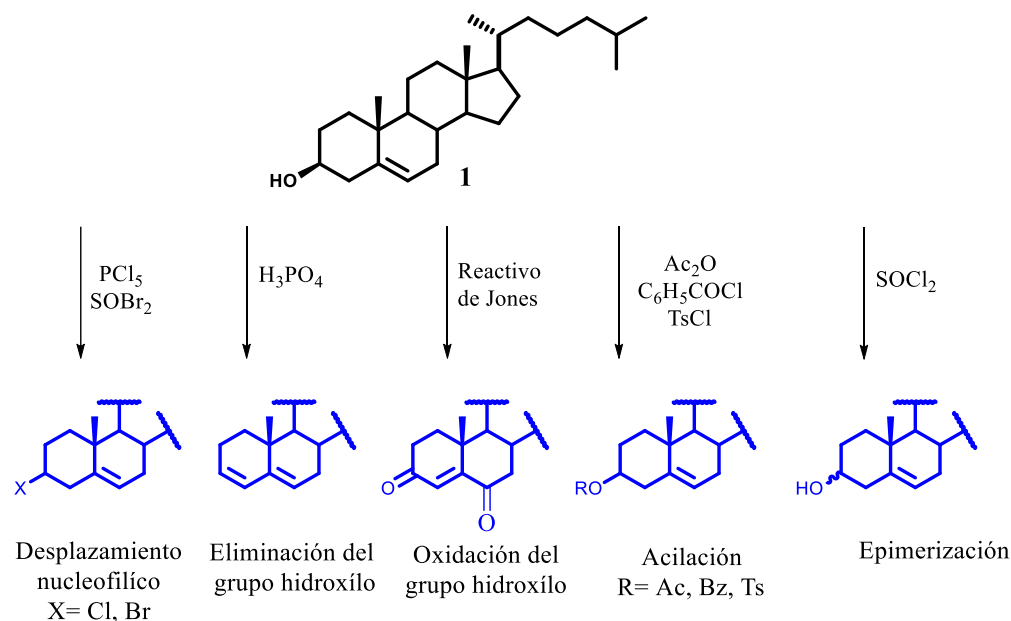
tener un origen biológico o ser un fragmento de una biomolécula. El proceso de obtención de bioconjugados a partir de moléculas distintas crea nuevos compuestos que tienen las propiedades combinadas de cada componente del que están hechos <sup>1,35</sup>

Los bioconjugados esteroidales son moléculas híbridas que combinan un esteroide con otra sustancia bioactiva. Los esteroides, no solo son activos por sí mismos, sino que al conjugarse con diversos restos biológicamente activos resulta en un aumento de la lipofilidad, la estabilidad y la especificidad del objetivo, con una disminución de los efectos adversos. De esta manera, estos bioconjugados pueden dirigirse de manera específica a células o tejidos diana, lo que los hace útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de diversas enfermedades. Los bioconjugados esteroidales han sido ampliamente explorados por su utilidad contra diversos trastornos y han demostrado una utilidad significativa como agentes anticancerígenos, antiinflamatorios, anticoagulantes, antimicrobianos, insecticidas/pesticidas, antioxidantes, antivirales entre otros. <sup>4,6,13</sup>

## **2.4. Síntesis del sistema esteroide y DKPs**

### **2.4.1. Síntesis de los esteroides**

Las reacciones químicas más importantes en sistemas esteroidales se llevan a cabo por lo regular en los anillos A y B (Esquema 1), además de reacciones en la parte norte del esteroide; principalmente en la cadena lateral localizada en la posición C-17. Cuando en la posición C-3 hay un grupo hidroxilo se pueden realizar reacciones de esterificación, oxidación, desplazamiento nucleofílico, eliminación del grupo hidroxilo y epimerización, entre otras reacciones. Es común en los esteroides la presencia de dobles enlaces, estos pueden sufrir reacciones de hidrogenación catalítica, adición, además de reacciones en la posición alfa. En cuanto a las modificaciones que se puedan efectuar a la cadena lateral dependerá de los grupos funcionales presentes. <sup>7,13,29</sup>

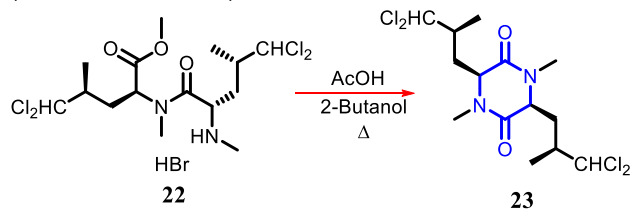


**Esquema 1.** Ejemplos representativos de reacciones sobre el núcleo esteroidal.

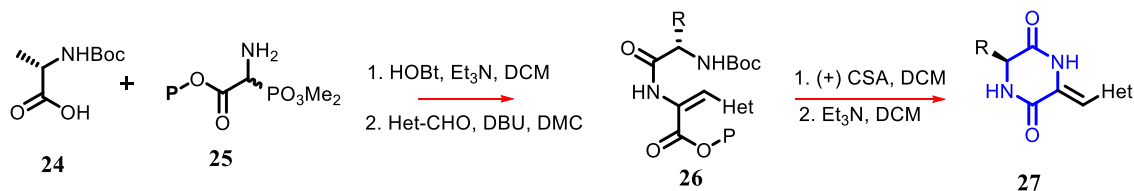
### 2.4.2. Síntesis de las dicetopiperazinas

Existen diversas metodologías para la obtención de 2,5-diketopiperazinas (2,5-DKP) (Esquema 2). Estas metodologías involucran reacciones para la formación del enlace amida, durante la ciclación del dipéptido, por ejemplo, la condensación de aminoácidos (Esquema 2C) y la ciclación de Aza-Witting (Esquema 2D). Además, se han desarrollado métodos basados en reacciones de *N*-alquilación intramolecular de Ugi provenientes de derivados de halogenuros de acilo de aminoácidos, que efectúan el cierre del anillo de  $\alpha$ -haloacetamidas en presencia de una base orgánica (Esquema 2E). Otras estrategias incluyen reacciones de adición de Aza-Michael y Diels-Alder que permiten obtener estructuras de anillos fusionados, aunque estas últimas pueden ser complejas. Por otro lado, también es posible obtener las 2,5-DKPs mediante la *C*-acilación. Peng y Clive han utilizado esta metodología en síntesis asimétricas proveniente de la acilación del enolato en la obtención de sistemas de anillos tricíclicos.<sup>8,32</sup>

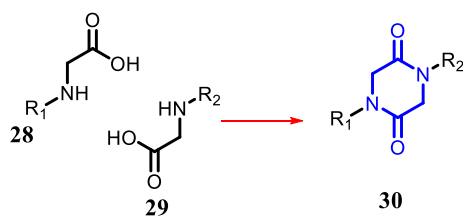
**A. Ciclización de éster dipeptidilmetílico catalizada por ácido**



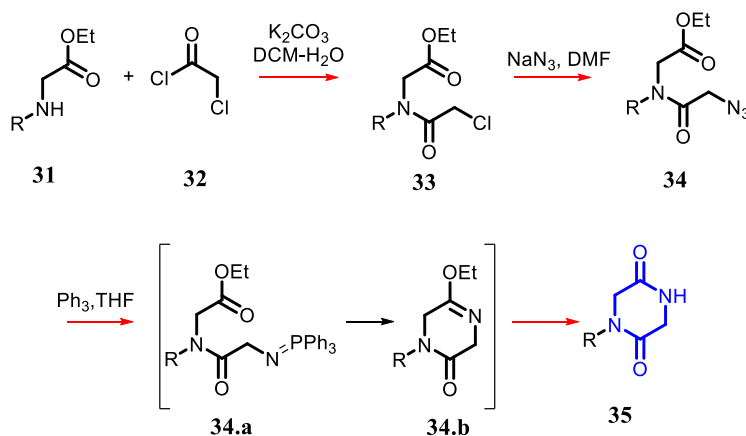
**B. Ciclización catalizada por bases en fase sólida y en solución**



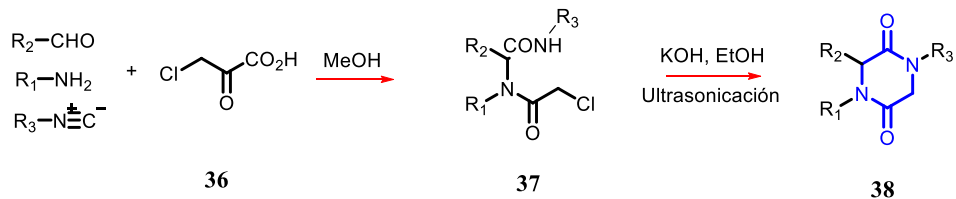
**C. Condensación de aminoácidos**



**D. Ciclación de Aza-Wittig**



**E. Síntesis mediante N-alquilación intramolecular de Ugi**



**Esquema 2.** Métodos representativos de obtención de 2,5-dicetopiperazinas.

### III. ANTECEDENTES

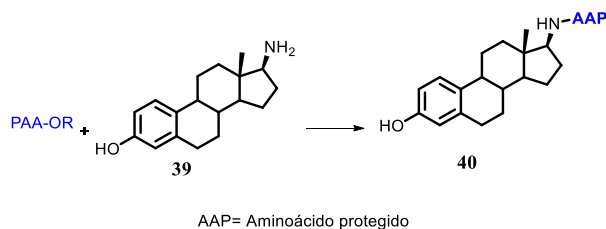
Según la concepción celular de Virchow “toda célula proviene de otra célula”, el cáncer es un proceso lógico coordinado en el que una célula o un grupo de células, sufre cambios especiales diferentes de las células normales. De esta forma, cuando una célula normal se lesiona o envejece, ésta muere por apoptosis, mientras que las células cancerosas evitan el suicidio celular. En otras palabras, el cáncer es un término amplio utilizado para aludir a un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos. Este último proceso se denomina «metástasis», y es una importante causa de defunción por cáncer. Otros términos comunes para designar el cáncer son «neoplasia» y «tumor maligno».<sup>36</sup>

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 o 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.<sup>1,37</sup>

La quimioterapia consiste en la administración de sustancias químicas, también llamadas citostáticos o citotóxicos. El mecanismo de acción general consiste en provocar una alteración celular, ya sea en la síntesis de ácidos nucleicos y/o proteínas, o en la división celular. Los mecanismos de citotoxicidad pueden agruparse en dos grandes grupos: independientes y dependientes de anticuerpos. Entre ellos, se pueden diferenciar los mecanismos restringidos por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés). mediados por células T, y los no restringidos por el MHC, detectados por las células Natural Killer (NK, por sus siglas en inglés). Además, existen las células dependientes de anticuerpos, cuya actividad está dada por las células Lymphokine-Activated Killer (LAK, por sus siglas en inglés).<sup>38</sup>

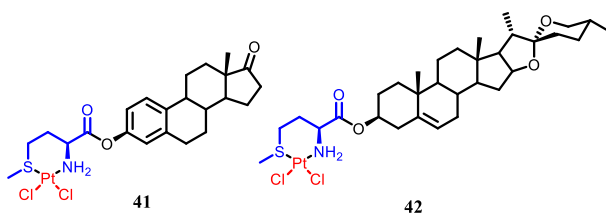
Yan *et al.*, 2005, sintetizaron una biblioteca de conjugados de estradiol y aminoácidos *N*-protegidos por acoplamiento de 17 $\beta$ -aminoestra-1,3,5(10)-trien-3-ol (**39**) (Figura 8) con diferentes aminoácidos (Ala, Leu, Phe, Asp(OBzl), Asp, Lys).<sup>39</sup> Los conjugados acoplados a aminoácidos se utilizaron en el tratamiento de infecciones cutáneas y de tejidos blandos de leves a moderadamente graves. Los estudios revelaron las afinidades de unión entre los receptores de estrógenos y el conjugado de estradiol **40** se vieron alterados por la propiedad química de los aminoácidos, pero el acoplamiento

del sistema conjugado-aminoácido, no afectó la actividad biológica con las líneas de cáncer de mama (MCF-7) y cáncer cervicouterino (HeLa).<sup>2</sup>



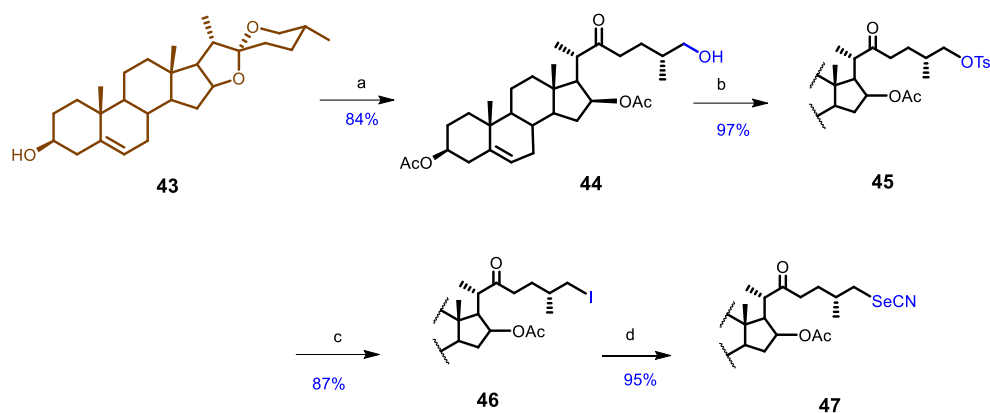
**Figura 8.** Derivados de estradiol acoplados a aminoácidos protegidos.

Kvasnica *et al.*, 2008, sintetizaron complejos de platino (II) coordinados con ésteres esteroideos de metionina e histidina para explorar su actividad antitumoral (Figura 9).<sup>40</sup> La síntesis de ésteres esteroideos se logró mediante la reacción de esterificación de Boc-aminoácidos con el grupo hidroxilo del colesterol, testosterona, diosgenina, entre otros, seguido de la desprotección del grupo Boc del aminoácido con ácido trifluoroacético. El complejo **41** mostró la más alta actividad con concentración media inhibitoria ( $CI_{50}$ ) 14  $\mu$ M y 20  $\mu$ M frente a las líneas celulares CEM (linfoblastos T) y RPMI 8226 (mieloma) respectivamente, mientras que el complejo **42** solo exhibió una actividad en la línea CEM con un  $CI_{50}$ = 18  $\mu$ M.<sup>2</sup>



**Figura 9.** Complejos de platino con esteroides conjugados de aminoácidos.

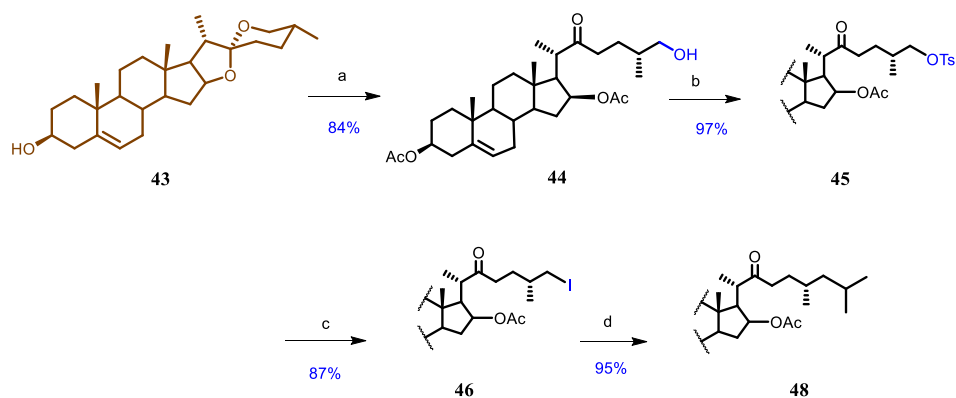
Fernández-Herrera *et al.*, 2014, sintetizaron derivados esteroideos biológicamente activos provenientes de la diosgenina (Esquema 3). La cadena lateral 22-oxocolestánica mostró ser un punto farmacofórico muy importante, siendo el selenio un agente antioxidante prometedor. Se evaluó la actividad antiproliferativa del compuesto **47** en tres líneas celulares de cáncer cervicouterino y se comparó con el fármaco de referencia contra el cáncer Paclitaxel (también conocido como Taxol). Los resultados de  $CI_{50}$  fueron; HeLa 10  $\mu$ M, CaSki 15  $\mu$ M y ViBo 18  $\mu$ M, con respecto al Taxol cuyos valores de  $CI_{50}$  fueron de; 10.9, 2.9 y 1.6  $\mu$ M respectivamente. La citotoxicidad resultante fue significativa, lo que llevó al grupo a investigar acerca de los posibles mecanismos de interacción que presenta este compuesto.<sup>41</sup>



a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; b) *p*-TSCI, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; c) NaI, reflujo; d) KSeCN THF, reflujo.

**Esquema 3.** Síntesis del derivado de la diosgenina: 22-oxo-26-selenociancolestano.

Zeferino-Díaz *et al.*, 2015, sintetizaron derivados esteroidales que contienen la cadena lateral 22-oxocolestano. Encontraron una metodología directa y conveniente para abrir la cadena lateral espiroestánica (Esquema 4). La mesilación del compuesto 26-hidroxi fue menos satisfactoria que la tosilación (45). Por lo que se realizó la reacción de Finkelstein para obtener los esteroides yodados (46) y la reducción quimioselectiva del átomo de yodo en el compuesto con  $\text{Zn}/\text{AcOH}$  dio rápidamente el compuesto objetivo 48. La reducción con  $\text{LiAlH}_4$  no fue selectiva y, por lo tanto, la reacción de Finkelstein fue un paso clave para la metodología. Los resultados de la evaluación biológica mostraron la actividad anticancerígena.<sup>42</sup>

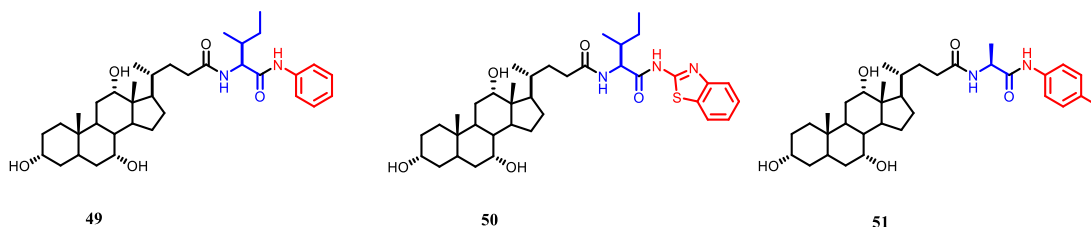


a)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ ; b) *p*-TSCI, Py,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; c) NaI, reflujo; d)  $\text{Zn}/\text{AcOH}$ .

**Esquema 4.** Síntesis del derivado de la diosgenina: 22-oxocolestano.

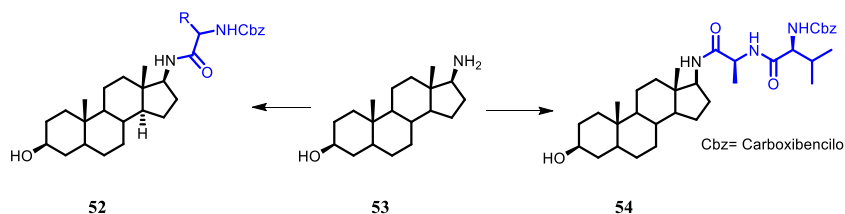
Agarwal *et al.*, 2016, sintetizaron amidas derivados de ácidos biliares aromáticos-heteroaromáticos unidas mediante aminoácidos (Figura 10). Estos conjugados se evaluaron frente a líneas celulares de cáncer de colon (HT29), cáncer de mama (MDA-MB-231) y glioblastoma (U87MG).<sup>2</sup> Algunos de los conjugados mostraron resultados prometedores como agentes anticancerígenos en estudios *in*

*in vitro*. Específicamente, los derivados **49** (Inhibición media de crecimiento,  $GI_{50}$ : 1.35 $\mu$ M), **50** ( $GI_{50}$ : 1.41  $\mu$ M) y **51** ( $GI_{50}$ : 4.52  $\mu$ M), que contienen anilina, *p*-metilanilina y 2-aminobenzotiazol, respectivamente, exhibieron actividad contra las células de cáncer de mama (MDA-MB-231). Estos resultados fueron comparables con la doxorubicina ( $GI_{50}$ : 1  $\mu$ M) y superiores al cisplatino ( $GI_{50}$ : 7.21  $\mu$ M).<sup>21</sup>



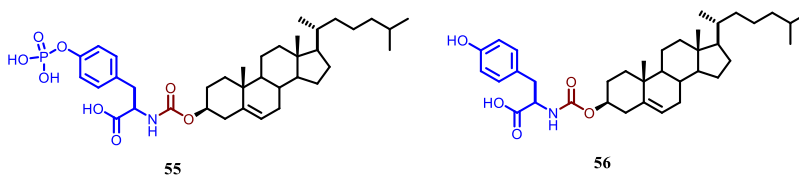
**Figura 10.** Derivados de amidas de ácidos biliares aromáticos/heteroaromáticos.

Barbakadze *et al.*, 2016, sintetizaron nuevos derivados peptídicos del 17 $\beta$ -amino-5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol **53** (Figura 11). Utilizaron ésteres activos de aminoácidos, como *N*-Cbz-L-Ala-Bt; *N*-Cbz-L-Val-Bt; *N*-Cbz-L-Phe-Bt; y *N*-Cbz-L-Ala-L-Val-Bt. La *N*-alquilación del precursor **53**, se obtuvieron los compuestos **52** y **54**, las cuales demostraron que poseen actividad antiarrítmica y baja toxicidad.<sup>2</sup>



**Figura 11.** Derivados peptídicos de androstando.

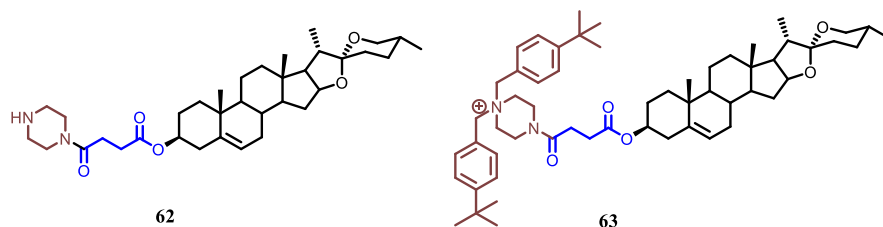
Wang *et al.*, 2016, sintetizaron a los conjugado **55** y **56** derivados de fosfotirosina-colesterol (Figura 12). El compuesto **56** demostró ser eficaz y selectivo contra células cancerosas, incluyendo las células de cáncer de ovario resistentes al *cis*-platino (A2780cis y A2780), con resultados de  $CI_{50}$  de 16  $\mu$ M para las células HeLa. No obstante, el conjugado de tirosina-colesterol **56** presentó menor selectividad mostrando un  $CI_{50}$  de 50  $\mu$ M.<sup>43</sup>



**Figura 12.** Derivado de conjugado de tirosina-colesterol.

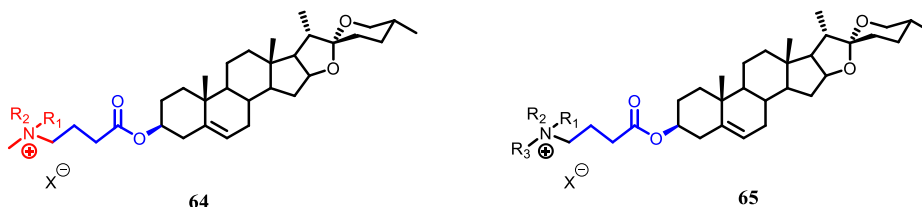
Reyna *et al.*, 2019, sintetizaron una serie de derivados esteroidales del 22-oxocolestano-26-oxima **58** y 27-*nor*-25-hidroxiimino-22-oxocolestano **60** (Esquema 5). Los productos fueron evaluados en un modelo de inflamación aguda, inflamación moderada y el edema inducido por la oreja. Los resultados





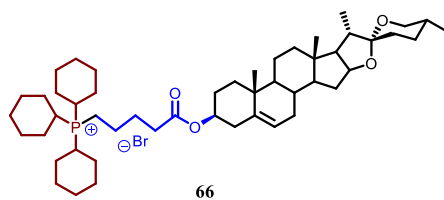
**Figura 14.** Derivados de diosgenina con actividad citotóxica.

Xia *et al.*, 2021, sintetizaron una librería de bioconjugados, en los cuales se realizó un análisis de estructura-actividad introduciendo diversos grupos hidrofóbicos con fragmentos de sales amonio en el C-3 (Figura 15). Los productos **64** y **65** fueron evaluados frente a 8 líneas celulares cancerosas, siendo el derivado **64** reportó actividad de  $CI_{50} = 0.34 \mu M$  frente a la línea de cáncer colorrectal (HCT-116). La solubilidad de los compuestos podría ser una de las razones por las cuales algunos compuestos muestran una mejor actividad antitumoral en comparación con el fármaco de referencia.<sup>45</sup>



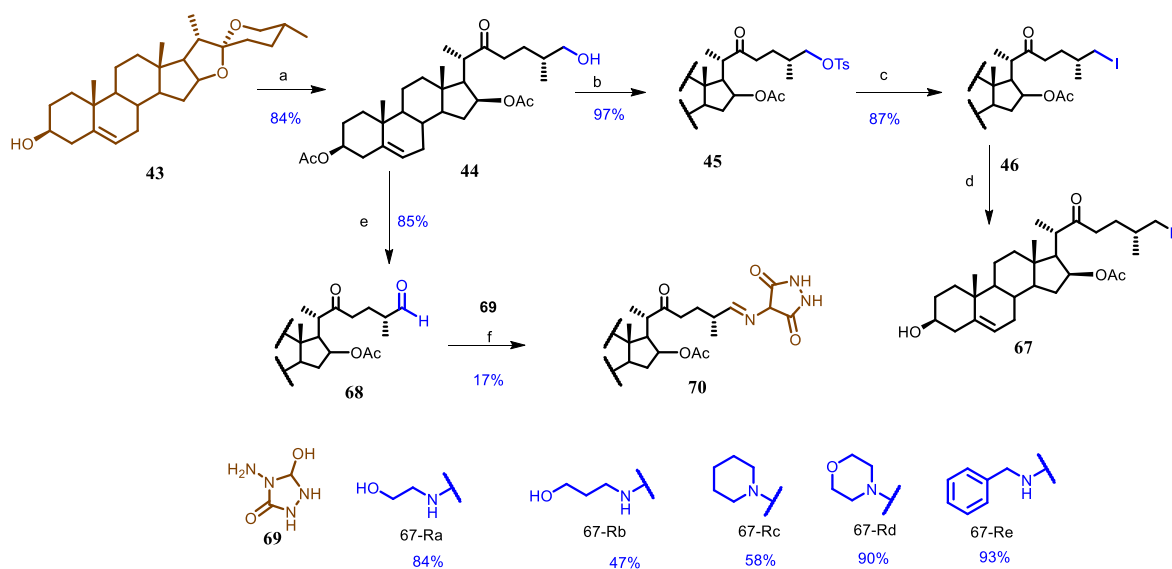
**Figura 15.** Derivados de diosgenina de amonio cuaternario.

Yang *et al.*, 2022, sintetizaron una serie de derivados de diosgenina conteniendo variantes de sales de fosfonio en el C-3 (**66**), con el propósito de mejorar la actividad biológica antiproliferativa, además de aumentar la solubilidad de la diosgenina (Figura 16). La solubilidad en agua fue mayor que la diosgenina, lo indica que pueden mejorar eficazmente la actividad antitumoral de los derivados de diosgenina, al mismo tiempo, la tasa de transporte intracelular de cationes de fosfina es  $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  más alto que cationes de sodio, y sales de fosfonio cuaternarias. Los productos fueron evaluados contra 4 líneas de células cancerosas, cáncer de colon (Aspc-1), cáncer de pulmón (H358), cáncer colorrectal (HCT116), cáncer pancreático (SW620), mostrando muy buena actividad contra todas las células evaluadas, en un rango de  $CI_{50} 0.18 - 31.4 \mu M$ . En muchos casos, superando la actividad del fármaco de referencia utilizando en el estudio, la doxorubicina.<sup>46</sup>



**Figura 16.** Derivado de diosgenina con sales de fosfonio.

Aguilar *et al.*, 2022, realizaron la síntesis asistida por microondas de tres derivados: 26-yodo-22-oxocolestano (**46**), 26-amino-22-oxocolestano (**67**) y 26-iminourazol-22-oxocolestano (**70**). Comparando las velocidades de reacción con el método convencional (Esquema 6). Estos aminoesteroides mostraron una solubilidad y estabilidad adecuadas para ser evaluados *in vitro* en líneas celulares de cáncer cérvicouterino (SiHa), cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) mediante ensayo de sulforodamina B. Destacando los resultados, el derivado de bencilamina **67e** mostró una actividad citotóxica en células cancerosas SiHa (Concentración citotóxica media, CC<sub>50</sub> 6.63  $\mu$ M), mientras que el derivado **67c** con anillo de piperidina, exhibió una actividad citotóxica moderada en la línea celular SiHa y MCF-7 (CC<sub>50</sub> = 15.34 y 16.33  $\mu$ M), respectivamente, siendo el candidato **67a** el derivado más prometedor.<sup>47</sup>

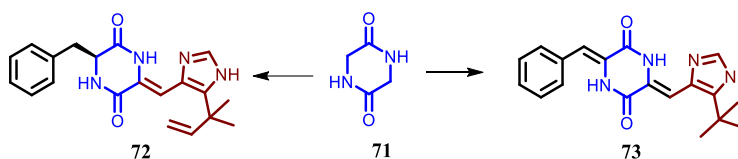


a) 1) Ac<sub>2</sub>O, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>/Et<sub>3</sub>N 2) HCl<sub>aq</sub>; b) *p*-TsCl/Py/DMAP, DCM; c) NaI/Acetona, refluxo 7h; d) Amina a-e/ Acetonitrilo; e) PCC/DCM; f) EtOH a refluxo.

**Esquema 6.** Síntesis de derivados: 26-amino-22-oxocolestano y 26-iminourazol-22-oxocolestano.

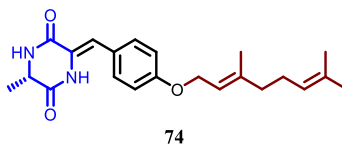
Las DKP's se consideran un andamio importante para el diseño y síntesis de nuevos agentes terapéuticos, que en combinación con estructuras químicas simples han demostrado interesantes

actividades biológicas. Por ejemplo, Liao *et al.*, 2014, sintetizaron la plinabulina (**73**), molécula semisintética desarrollada de la fenilalhistina natural (**72**) (Figura 17), la cual se desarrolló como agente disruptor vascular y ahora se encuentra en etapas clínicas fase I y en fase III como agente anticancerígeno. Se consideran que los derivados no protegidos de DKP's tienen baja solubilidad, se diseñaron y sintetizaron nuevos derivados mono protegidos de la DKP's, donde el compuesto tuvo una fuerte actividad anticancerígena con  $CI_{50}$  entre 0,5-4,5  $\mu\text{M}$  sobre líneas celulares de cáncer gástrico BGC-823, cáncer cervicouterino (HeLa), hepatocarcinoma (Huh-7), cáncer de mama (MCF-7), adenocarcinoma de pulmón (H1975), y especialmente sobre células de linfoma pulmonar (U937) ( $CI_{50}$ = 0,5  $\mu\text{M}$ ) y células de leucemia (K562) ( $CI_{50}$ = 0,9  $\mu\text{M}$ ).<sup>48</sup>



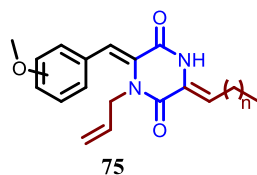
**Figura 17.** Estructura química de la fenilalhistina (**72**) y de la plinabulina (**73**).

Mollica *et al.*, 2014, demostraron que el derivado natural de la DKP's (**74**) (Figura 18), presenta una potente actividad anticancerígena con valores de  $CI_{50}$  en el rango de 2 a 23  $\mu\text{M}$  sobre líneas celulares de glioblastoma (Hs683, U373), cáncer de pulmón (A549), melanoma (SK-MEL-28, B16F10), cáncer de mama (MCF-7). También se resaltó la importancia de la presencia de la cadena lateral geraniloxil y el doble enlace exocíclico de la DKP para la actividad observada.<sup>49</sup>



**Figura 18.** Derivado natural de la 2,5-diketopiperazina, desoximiceliamida.

Liao *et al.*, 2016, sintetizaron nuevas series de derivados *N*-monoalilados de las DKP's (**75**), a los cuales se les evaluó su actividad citotóxica sobre ocho líneas celulares, leucemia (U937, K562, HL60), cáncer de pulmón (A549), cáncer de mama (MCF-7), cáncer cervicouterino (HeLa), cáncer de próstata (DU-145) y cáncer de colon (HT29) (Figura 19). Los resultados de citotoxicidad mostraron que la posición del grupo metoxi en el anillo aromático es importante para la actividad, mostrando un rango de  $CI_{50}$  de 0.36 - 1.9  $\mu\text{M}$  y se observó que la cadena alquílica con 3 a 6 grupos metileno mejoró la actividad.<sup>50</sup>



**Figura 19.** Derivados de 2,5-diketopiperazinas con sustituyentes olefínicos.

Lo anteriormente descrito pone de manifiesto la importancia de los derivados esteroidales en la industria farmacéutica debido a la versatilidad de sus propiedades biológicas. Los esteroides han demostrado ser herramientas valiosas no solo por sus capacidades terapéuticas, sino también por su potencial para servir como base en la creación de nuevas moléculas bioactivas. Por lo tanto, en este trabajo de investigación se propuso realizar la síntesis de compuestos bioconjugados esteroidales con aminoácidos, con el objetivo de obtener nuevos compuestos con potenciales actividades biológicas. Estos compuestos pueden exhibir una gama de actividades, como citotóxica, antiinflamatoria, antimicrobiana, entre otras, las cuales podrían contribuir significativamente al desarrollo de nuevos candidatos de fármacos. La incorporación de aminoácidos y diketopiperazinas al núcleo esteroidal, no solo pueden mejorar sus propiedades farmacocinéticas, sino también aumentar su especificidad y efectividad biológica. De esta manera, la presente investigación busca aportar al campo de la química farmacéutica nuevos compuestos que podrían convertirse en tratamientos efectivos para diversas enfermedades.

## IV. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, una problemática de salud a nivel mundial es el cáncer, siendo el de mama el más común entre las mujeres. El sello distintivo del tratamiento de esta enfermedad ha sido la quimioterapia convencional, sin embargo, los medicamentos quimioterapéuticos no son selectivos a las células cancerosas, debido a que también afectan a las células normales. Por lo cual diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de buscar nuevos tratamientos contra el cáncer, menos tóxicos y más selectivos a células cancerosas.

Los esteroides son moléculas lipofílicas cuyo núcleo se considera una molécula líder para el desarrollo de nuevos fármacos, entre ellos agentes con actividad citotóxica. Cuando el esteroide se une con otra molécula que posee actividad farmacológica se genera un nuevo compuesto llamado bioconjugado. En este contexto, se ha reportado la síntesis de bioconjugados esteroide-aminoácido o esteroide-péptido que han mostrado poseer actividades biológicas muy diversas tales como agentes citotóxicos, antimicrobianos, antivirales, entre otros. Hasta el momento, no se cuenta con reportes previos de la bioconjugación de esteroides con dicetopiperazinas (DKP, dipéptidos cíclicos).

La diosgenina es una sapogenina comercial de fácil adquisición, y materia prima que se ha utilizado para la síntesis de hormonas esteroideas y compuestos con muy diversa actividad biológica, por tanto, resulta interesante desarrollar nuevos bioconjugados esteroide-aminoácido a partir de diosgenina y aminoácidos para desarrollar nuevos agentes citotóxicos.

## V. HIPÓTESIS

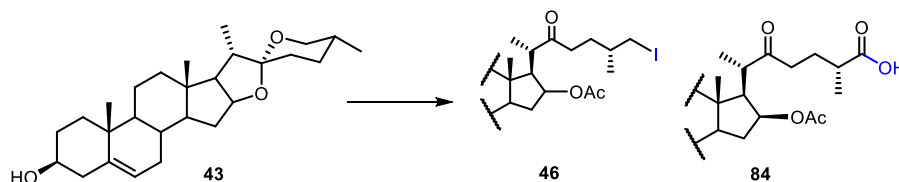
La *N*-alquilación y/o acilación en la posición C-26 de derivados sintetizados a partir de la diosgenina conducirá a la obtención de bioconjugados esteroide-aminoácidos con potencial como agentes citotóxicos.

## VI. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar una familia de conjugados esteroide-aminoácidos unidos a través del C-26 del núcleo esteroideal utilizando como sitio de bioconjugación al grupo amida o una *N*-alquilación.

### 6.1. Objetivos particulares

1.- Sintetizar y caracterizar los derivados 26-yodo (**46**) y 26-ácido (**84**) a partir de diosgenina.



2.- Sintetizar y caracterizar una familia de ésteres  $\alpha$ -aminometílicos.

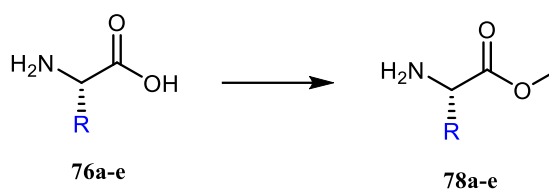
76a R=H

76b R= Isopropil

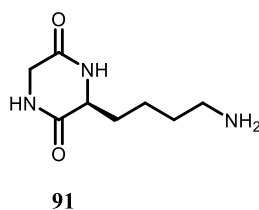
76c R = (1*S*)-1-metilpropil

76d R= Bencilo

76e R = CH<sub>2</sub>-(3 indolil)



3.- Sintetizar y caracterizar la dicetopiperazina (**91**).



4.- Realizar la reacción de acoplamiento entre los esteroides sintetizados en el objetivo 1 con los ésteres  $\alpha$ -aminometílicos mencionados en el objetivo 2.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Reactivos y equipos

#### Reactivos

Los reactivos adquiridos comercialmente en Sigma-Aldrich Productos; ácido acético (AcOH), trietilamina (TEA), *N,N'*-dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (ACN), cloruro de *p*-toluenosulfonilo (*p*-TsCl), piridina (Py), anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O), 4-dimetilaminopiridina (DMAP), piperidina, hidroxibenzotriazol (HOBt), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC·HCl), *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), ácido trifluoroacético (TFA) y trifluoruro de boro éter etílico (BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>), diosgenina, clorotrimetilsilano (TMSCl), ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH), bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>), sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ácido clorhídrico (HCl), yoduro de potasio (KI), sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), trióxido de cromo (CrO<sub>3</sub>), cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), Fmoc-Lys(Boc)-OH, glicina (Gly), L-valina, L-leucina (Leu), L-fenilalanina (Phe), L-triptófano (Trp), y los disolventes grado técnico: hexano, diclorometano (DMC), acetato de etilo (AcOEt), acetona, metanol (MeOH).

Las columnas cromatográficas y las cromatografías en capa fina se realizaron usando gel de sílice con tamaño de partícula 230-400 μm y placas precortadas de sílice gel 60 malla F254, respectivamente.

#### Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros RMN se adquirieron con un espectrómetro Spinsolve, Magritek 80 NMR (80 MHz para <sup>1</sup>H, 20 MHz para <sup>13</sup>C), se utilizaron los siguientes disolventes deuterados, cloroformo (CDCl<sub>3</sub>), dimetilsulfóxido (DMSO-D<sub>6</sub>), metanol (CD<sub>3</sub>OD) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Se realizaron experimentos para una elucidación completa y se obtuvieron espectros de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, así como espectros de experimentos bidimensionales (COSY, HMBC y HSQC). Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hertz (Hz).

#### Espectrometría de masas

##### Pretratamiento de la muestra

Aproximadamente 1 mg de todos los compuestos se diluyeron con ayuda de un sonicador ultrasónico (VEVOR Limpiador Ultrasónico) en 1 mL de metanol absoluto y se tomaron 10 μL del compuesto,

los cuales se diluyeron en 900  $\mu\text{L}$  de metanol acidificado con 0.1 % v/v de ácido fórmico, posteriormente se introdujeron las muestras al sistema de espectrometría.

La determinación de la masa molecular se hizo mediante la inyección por infusión directa a un espectrómetro de masas SYNAPT G2-Si provisto de ionización de electropulverización (ESI), filtro de masas de cuadrupolo sencillo y analizador de masas de tiempo de vuelo (Q-TOF).

### **Espectroscopia de infrarrojo**

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier e interferómetro Dynascan Perkin Elmer Spectrum 100. La adquisición de datos se realizó con 8 escaneos, empleando una ventana espectral de  $515\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ . Los datos se expresan en números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

### **Cromatografía**

Para cromatografía en capa fina (TLC) se utilizaron placas comerciales de gel de sílice grado 60 de 0.2 mm de espesor ALUGRAM Xtra SIL G/UV254 de Macherey-Nagel, Alemania y como fase móvil sistemas de elución de hexano-AcOEt, butanol-agua. Para su revelado se empleó luz ultravioleta de onda corta (254 nm, lámpara de UVG-11) y onda larga (365 nm, lámpara de UVG-11), además se empleó una solución al 10% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  previa a la calcinación de la placa como revelador y para caso de los aminoéster el reactivo ninhidrina que reacciona con el grupo amino produciendo colores al ser revelado.

Para cromatografía en columna, se empleó gel de sílice de 230-400 mallas MN Kieselgel 60 de Macherey-Nagel, Alemania, utilizando como fase móvil mezclas de hexano-AcOEt en diversas porciones.

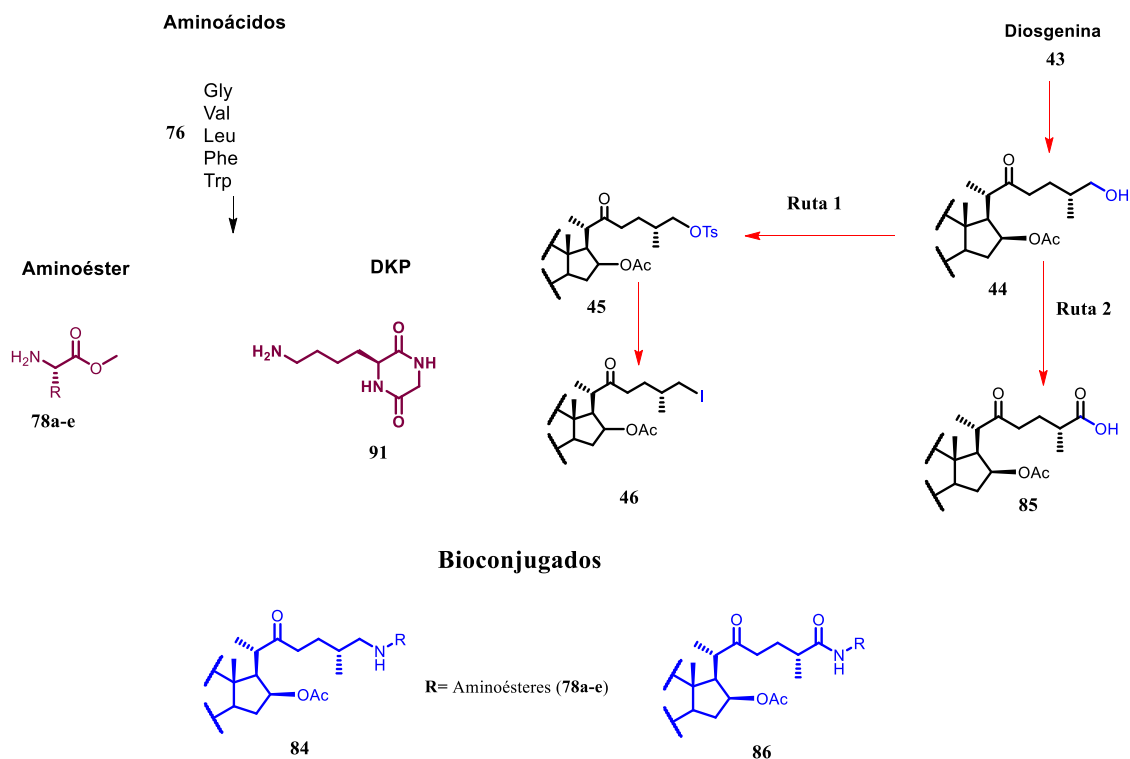
## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Síntesis de los bioconjugados esteroides-aminoácidos

La estrategia planteada para obtener los bioconjugados esteroides-aminoácidos (**84**, **86**) consiste en la *N*-alquilación y la acilación de un aminoéster con un derivado esteroideal (Esquema 7). Los aminoésteres (**78a-e**) se obtuvieron mediante una esterificación del grupo carboxilo de los aminoácidos en medio ácido.

El derivado esteroideal **46**, requerido para la *N*-acilación del grupo aminoéster se obtuvo mediante una ruta que involucra 3 pasos de reacción a partir de la diosgenina (**43**). La ruta planteada implica modificaciones en los anillos E y F, que conduzcan a la obtención del intermediario **44**, que contiene el grupo hidroxilo en el C-26. Posteriormente, se reemplazó el grupo hidroxilo por un grupo tosilato (**45**), obteniendo un precursor más susceptible hacia el ataque nucleofílico debido a las características del grupo saliente del grupo tosilato. Consecutivamente, la conversión al grupo funcional halogenado (**46**), se efectuó mediante la reacción de Finkelstein caracterizada por ser una reacción de S<sub>N</sub>2. Finalmente, la *N*-alquilación con el aminoéster **78a** conducirá a la obtención del bioconjugado **84**.

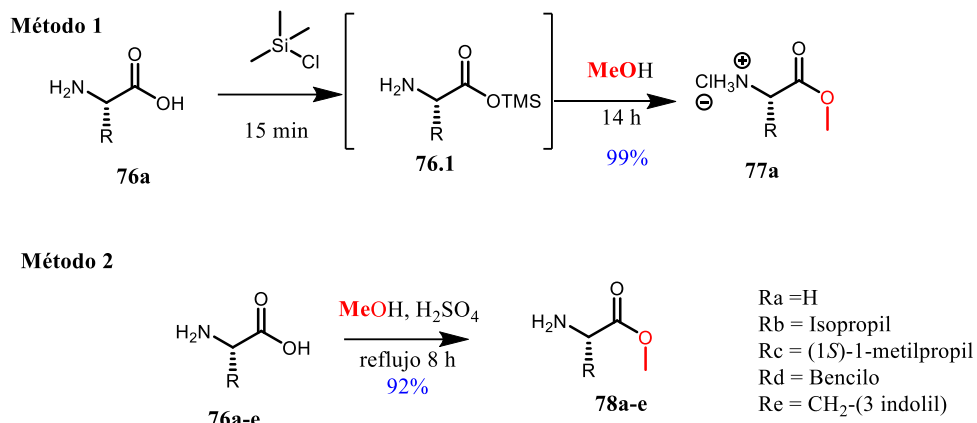
Por otra parte, la estrategia para la obtención del derivado esteroideal **86**, consistió en la oxidación del intermediario **44**, convirtiendo el grupo alcohol al ácido carboxílico en el C-26, mediante el reactivo de Jones. Como último paso, el acoplamiento de los aminoésteres **78a-e** con el derivado esteroideal **85**, condujo a la obtención de una familia de bioconjugados. Lo anterior ocurrió a través de la reacción entre grupo amino del aminoácido con el grupo ácido del esteroide utilizando una carbodiimida como agente acoplante para generar el enlace amida dando como el resultado los productos bioconjugados **86a-e**.



**Esquema 7.** Síntesis de los sistemas bioconjugados esteroides-aminoácidos.

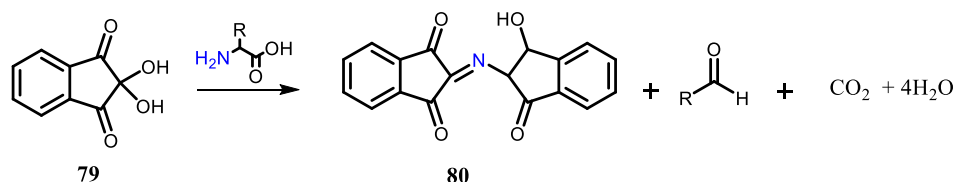
### 8.1.1. Síntesis de ésteres $\alpha$ -aminometílicos

Para la síntesis de ésteres  $\alpha$ -aminometílicos se emplearon dos metodologías. La primera metodología descrita por Sha *et al.*, 2016,<sup>51</sup> consistió en utilizar la glicina (**76a**), la cual se hizo reaccionar con clorotrimetilsilano para formar el derivado sililado (**76.1**). Posteriormente se trató con metanol (MeOH) para producir el clorhidrato del éster correspondiente **77a** (Esquema 8) con rendimientos del 99%. Una segunda metodología descrita por Monro *et al.*, 2008,<sup>52</sup> permitió obtener los ésteres  $\alpha$ -aminometílicos con el grupo amino libre de los aminoácidos: glicina, valina, leucina, fenilalanina y triptófano (**76a-e**), mediante una esterificación de Fischer utilizando ácido sulfúrico como catalizador en metanol a reflujo (Esquema 4), presentando rendimientos superiores al 90%.



**Esquema 8.** Síntesis de ésteres  $\alpha$ -aminometílicos.

Para verificar el consumo total de la materia prima y monitorear la reacción, se utilizó el revelador de ninhidrina (**79**) (Esquema 9), el cual es un agente químico que reacciona de forma selectiva con compuestos que contienen principalmente aminas primarias, para producir el derivado colorido **80**, conocido como el púrpura de Ruhemann.



**Esquema 9.** Reacción entre el revelador ninhidrina y un aminoácido.

### 8.1.2. Ruta sintética 1. Obtención del derivado esteroidal-aminoéster (**84**)

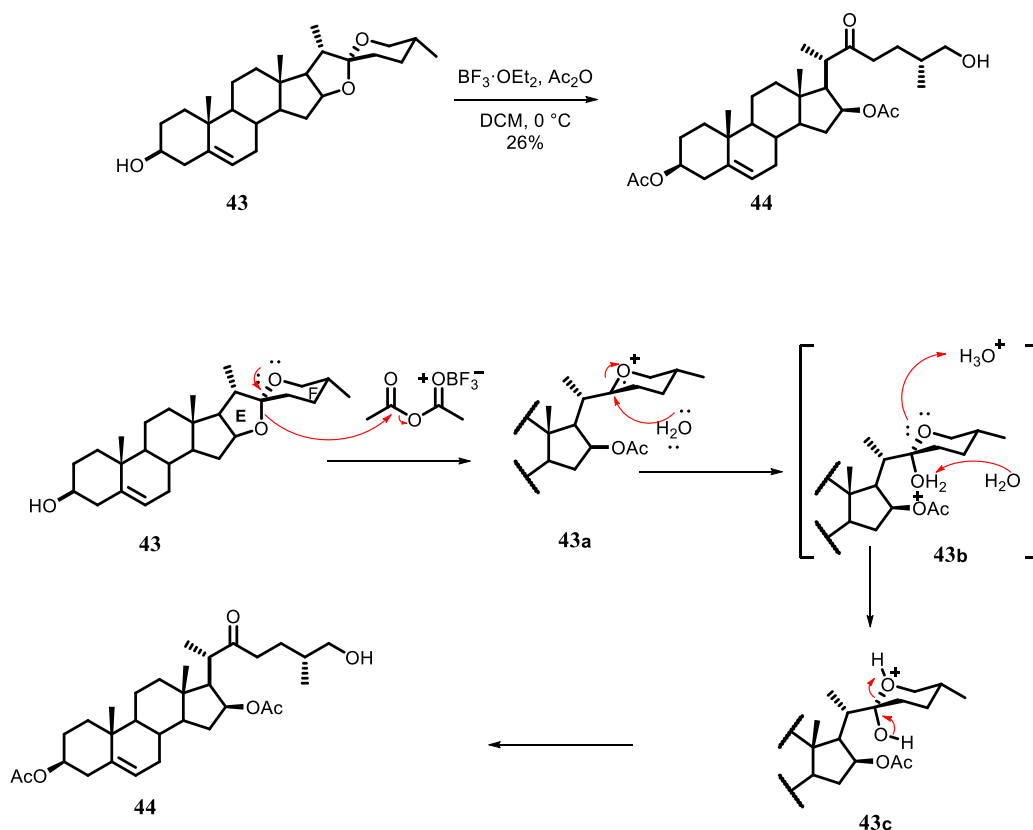
#### 8.1.2.1. Síntesis de diacetato de (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ , 16 $\beta$ -diilo (**44**)

La obtención del compuesto (25R)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**44**) se efectuó mediante dos metodologías diferentes. El método A involucró el uso de BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> y Ac<sub>2</sub>O,<sup>42</sup> mientras que el método B implicó el uso BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> y Ac<sub>2</sub>O seguido de una base orgánica.<sup>53</sup>

**Método A:** Se llevó a cabo una apertura regioselectiva del anillo F de la diosgenina hacia el compuesto **44** utilizando BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> y Ac<sub>2</sub>O en diclorometano (Esquema 10). En esta reacción, uno de los grupos carbonilo del Ac<sub>2</sub>O se activa mediante el ácido de Lewis, mientras que el otro grupo carbonilo es atacado por el par electrónico del enlace entre el C-22 y el átomo de oxígeno del anillo E. Este ataque es promovido por la participación del par electrónico del átomo de oxígeno del anillo F. Posteriormente, el ataque de agua sobre el C-22 genera el intermediario **43b**, la transferencia de

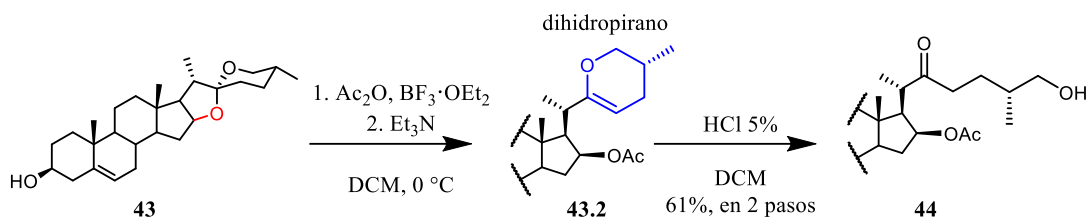
protones da lugar al intermediario **43c**. La apertura del anillo F se facilita mediante la participación de un par electrónico del átomo de oxígeno del hemiacetal intermediario **43c**, lo que finalmente conduce al producto (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (**44**).

En esta metodología la obtención del producto **44** se obtuvo con un rendimiento bajo y al monitorearlo mediante cromatografía de capa fina (CCF) se observó la formación de varios subproductos. El producto deseado se obtuvo un rendimiento del 26%. Por lo que se procedió a realizar la metodología B.



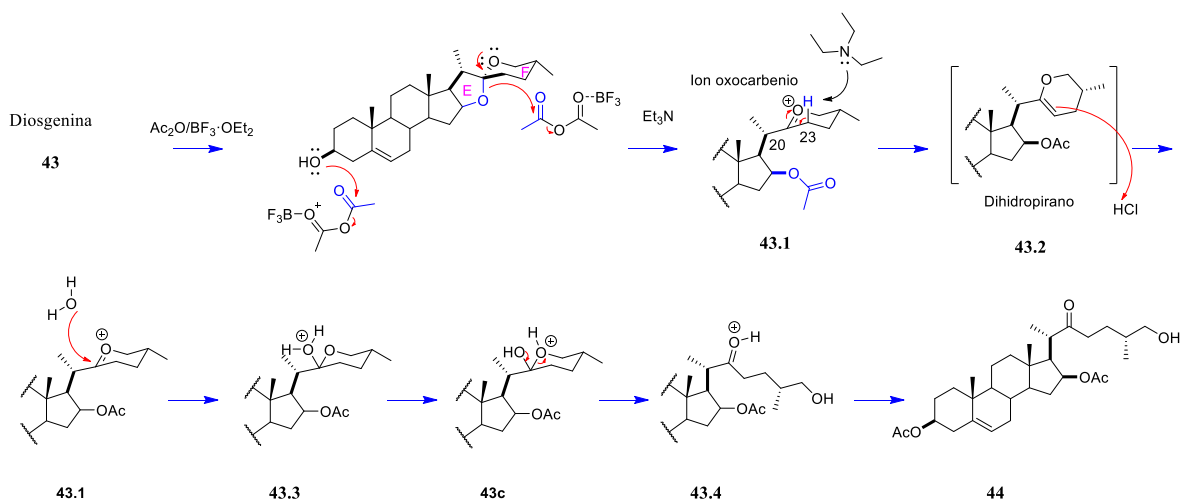
**Esquema 10.** Mecanismo propuesto de la apertura del anillo F de la diosgenina con  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ .

En un método alternativo **B**, se siguió la metodología propuesta por Hilario-Martínez *et al.*, 2016.<sup>53</sup> (Esquema 11), para obtener el compuesto **44**. Se llevó a cabo una acetólisis de la diosgenina utilizando  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  como ácido de Lewis a una temperatura de  $0^\circ\text{C}$ , seguido de una eliminación promovida por la adición de una base orgánica que conduce a la obtención del dihidropirano **43.2**. El compuesto **44** fue obtenido por la apertura del anillo de dihidropirano **43.2** en un medio ácido



**Esquema 11.** Método B

En estas condiciones, uno de los grupos carbonilos del Ac<sub>2</sub>O se activa mediante el BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, generando grupos acetatos en los carbonos 3 y 16, dando lugar al ion oxocarbenio **43.1** (Esquema 12). La adición de la base orgánica favoreció a la eliminación del protón en la posición axial del C-23 dando lugar al intermediario dihidropirano (**43.2**). Una vez obtenido el producto **43.2**, se hizo reaccionar con HCl al 5% propiciando la regeneración del ion oxocarbenio **43.1**, que favorece el ataque nucleofílico en el C-22. Finalmente, la apertura del hemiacetal **43c** en medio ácido conduce a la ruptura del anillo oxano **43c**, obteniendo el compuesto **44**. Es importante destacar que este enfoque mostró un rendimiento de 61%, el cual es mayor al rendimiento de 26% obtenido en la metodología A.



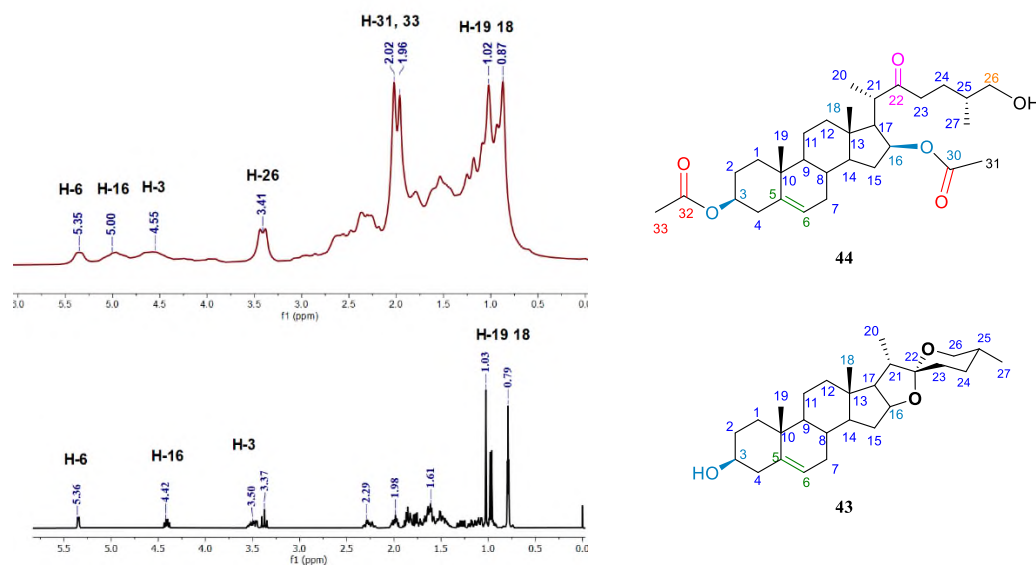
**Esquema 12.** Método B. Posible mecanismo de la apertura del anillo F de la diosgenina.

Para confirmar la formación del compuesto (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3β, 16β-diilo (**44**), se utilizó la espectrometría de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, comparando los desplazamientos químicos del producto y la materia prima (Tabla 1). En el espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 20) los desplazamientos de los protones en los anillos A, B, C y D del núcleo esteroidal en el compuesto **44** son similares a los de la materia prima **43**, a excepción de las posiciones 3 y 16 que están unidos a un oxígeno. Estos oxígenos se encuentran acetilados en el producto y muestran un desplazamiento > 0.5 ppm más alto con respecto a los de la materia prima. Para la diosgenina **43**, los desplazamientos de los protones H-

3 y H-16 son de 3.50 y 4.42 ppm, mientras que para el producto **44** son de 4.55 y 5.0 ppm, respectivamente. Las modificaciones originadas por la apertura del anillo F se corroboran por la presencia de la señal doble de los protones H-26 desplazadas a 3.41 ppm. Asimismo, se observan dos señales simples a campos altos desplazadas a 2.02 y 1.96 ppm, correspondientes a los metilos de los acetatos (H-31 y H-33).

**Tabla. 1** Comparación de los  $\delta_H$  (ppm) representativos de la diosgenina (**43**) y el compuesto **44**.

H	43	44
3	3.50	4.55
6	5.36	5.35
16	4.42	5.0
18	0.79	0.87
19	1.03	1.02
26	3.37	3.41
31		2.02
33		1.96



**Figura 20.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **43** y **44**.

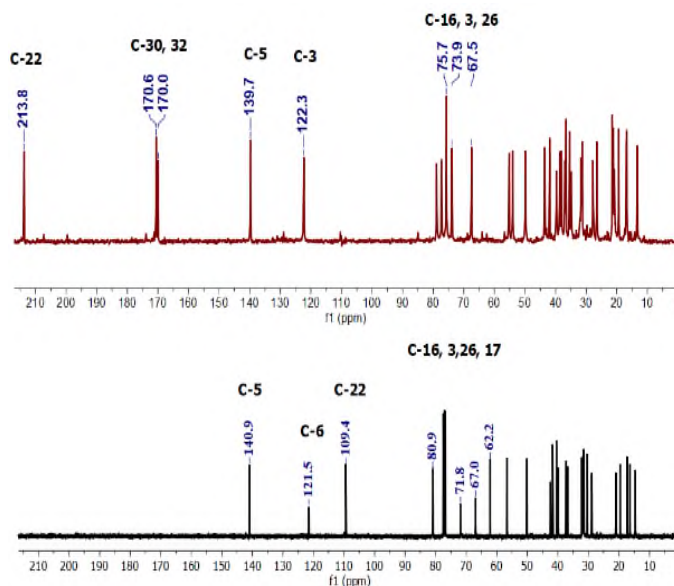
Por otro lado, en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **44** (Figura 21), se observan señales características que corroboran la modificación de la diosgenina (Tabla 2). Por ejemplo, en la región de los carbonilos, una señal a 213.8 ppm, característica del carbonilo de cetona en C-22 y las señales de los carbonilos de los grupos acetato correspondientes a C-30 y C-32 localizados a 170.6 y 170.0 ppm, respectivamente. Cabe resaltar que estas absorciones no se observan en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de la materia prima **43**, debido que el compuesto no posee dichos grupos funcionales. De igual forma la ausencia del carbono espiracetálico C-22 con desplazamiento químico de 109.0 ppm confirma la apertura del anillo F. Las señales en 139.7 y 122.3 ppm, se asignaron a C-5 y C-6,

respectivamente. En cuanto a los desplazamientos químicos de los carbonos base de oxígeno de la diosgenina con respecto al producto **44**, las señales de los carbonos C-3 ( $C_\delta$  71.8 vs 73.9) y C-16 ( $C_\delta$  80.9 vs 75.7), muestran desplazamientos significativos hacia campos altos ( $\Delta C_\delta > 2$  ppm), debido al efecto de desprotección proporcionado por los grupos acetatos, mientras el carbono C-26 ( $C_\delta$  66.9 vs 67.5) presenta un aumento pequeño en su desplazamiento químico hacia campos altos ( $\Delta C_\delta$  0.6 ppm).

Es relevante mencionar que tanto el número de señales como los desplazamientos químicos concuerdan con lo reportado en la literatura.<sup>53</sup> La masa del compuesto se confirmó mediante la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS) para el compuesto **44**, se observó el ion molecular  $[M+H]^+$  con  $m/z = 517.3521$ .

**Tabla. 2** Comparación de los  $\delta_c$  (ppm) representativos de la diosgenina (**43**) y el compuesto **44**.

C	43	44
3	71.8	73.9
5	140.9	139.7
6	121.6	122.3
16	80.9	75.7
17	62.2	55.2
18	16.4	13.3
19	19.6	19.3
22	109.4	213.8
25	28.9	27.8
26	66.9	67.5
27	17.3	16.9
30		170.6
31		21.5
32		170.0
33		20.8



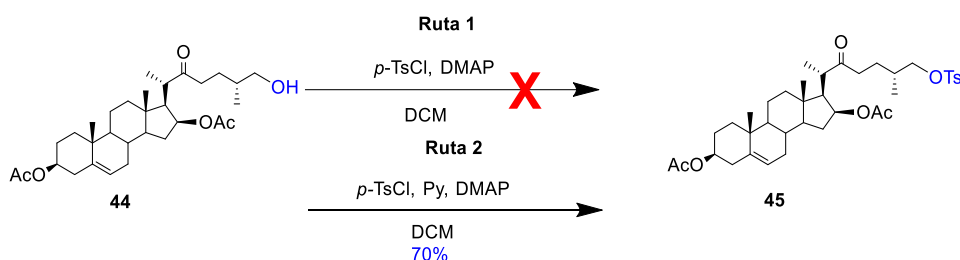
**Figura 21.** Espectro de RMN de  $^{13}C$  del compuesto **43** (inferior) y **44** (superior).

### 8.1.2.2. Síntesis de diacetato de (25R)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo 3,16-26-tosilato (**45**)

Para obtener el compuesto **45**, se llevó a cabo el intercambio de grupo funcional mediante una reacción en el C-26, donde se toсила el grupo hidroxilo haciéndolo reaccionar con cloruro de *p*-toluenosulfonilo (*p*-TsCl). Se evaluaron dos rutas sintéticas para efectuar esta transformación (Esquema 13). En el primer ensayo, el compuesto **44** se mezcló con 4-dimetilaminopiridina (DMAP) y el *p*-TsCl en diclorometano (DCM), utilizando las condiciones previamente reportadas en la literatura.<sup>47</sup> La reacción se efectuó en el interior de un refrigerador, sin agitación, durante 24 horas.

Sin embargo, al analizar el producto por RMN de  $^1\text{H}$ , se observó la materia prima permaneció sin reaccionar.

Por lo tanto, se decidió probar otras condiciones. En la segunda ruta, se mezcló el compuesto **44** con piridina, DMAP y *p*-TsCl en DCM, bajo atmósfera de argón y en ausencia de luz, a una temperatura de  $-5\text{ }^\circ\text{C}$  por 10 horas.<sup>54</sup> Una vez completada la reacción, el producto se purificó mediante cromatografía en columna (CC), y se verificó el consumo total de la materia prima, se utilizó la cromatografía de capa fina (CCF), la cual se observó varios subproductos de reacción. La purificación se realizó utilizando una mezcla de hexano y acetato de etilo (70:30). Finalmente, se caracterizó el producto principal mediante espectroscopía RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Obteniendo un rendimiento favorable de un 70%.



**Esquema 13.** Síntesis de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo 3,16-diacetato 26 tosilato (**45**).

Al comparar los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del producto **45** y la materia prima **44** (Figura 22), se observaron diferencias significativas (Tabla 3). De acuerdo al espectro de  $^1\text{H}$ , los cambios generados en la estructura química de la materia **44**, fue la incorporación del grupo tosilato, las cuales son distinguibles para el producto **45** (Figura 27), en la región de 7.73 y 7.40 ppm se observan dobletes, correspondientes a los protones aromáticos del grupo tosilato (H-a, H-b). Además, se identificó un singulete en 2.45 ppm asignada al metilo en posición *para* del grupo tosilato en H-34. Los desplazamientos químicos de los protones del núcleo esteroidal en ambos compuestos (**44** y **45**), presentan un ligero cambio, para caso del H-3 (4.55 vs 4.56) con un desplazamiento  $>0.01$  ppm más alto que la materia prima, el H-16 (5.00 vs 4.98) su desplazamiento fue menor a la materia prima con valor de  $<0.02$  ppm, además el desplazamiento químico del protón vinílico H-6 (5.35 vs 5.32).

En comparación a las absorciones de los protones H-6, H-16, H-3, se localizan con un desplazamiento químico similar tanto para el producto **45** y la materia prima **44**, mencionado en la Tabla 3. Sin embargo, al comparar el desplazamiento químico del H-26 se observa una variación, para el compuesto **44**, la absorción del protón corresponde a 3.41 ppm, mientras el compuesto **45** se localiza en 3.80 ppm. Esto se debe al cambio del grupo funcional en el C-26.

**Tabla. 3** Comparación de los  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) representativos del compuesto **44** y **45**.

H	44	45
3	4.55	4.56
6	5.35	5.32
16	5.00	4.98
18	0.87	0.87
19	1.02	1.02
26	3.41	3.80
31	2.02	2.02
33	1.96	1.93
34		2.45
Ar		7.73
		7.40

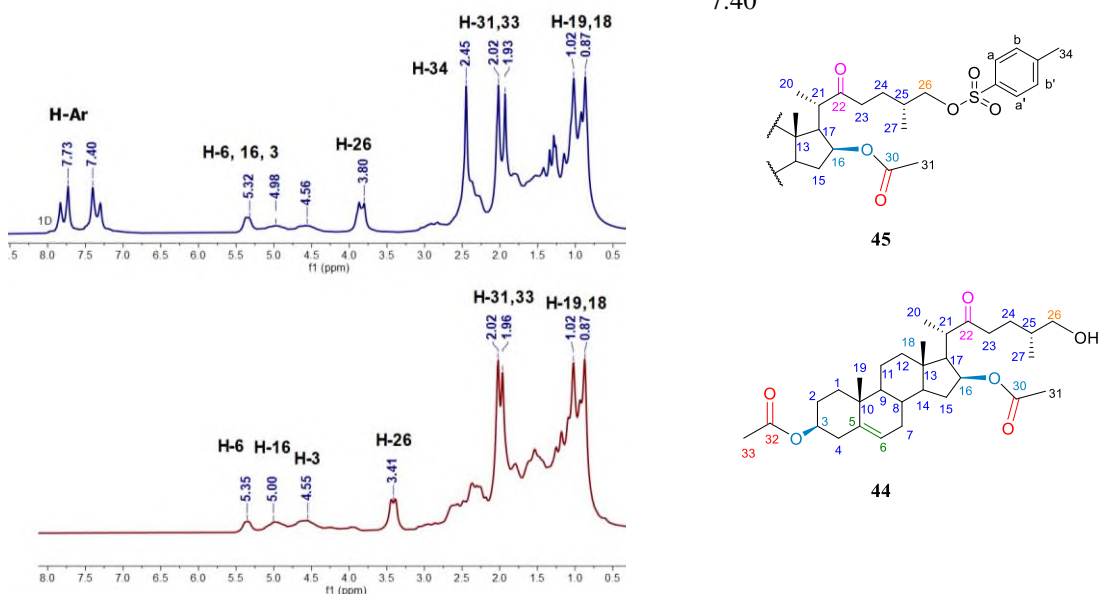


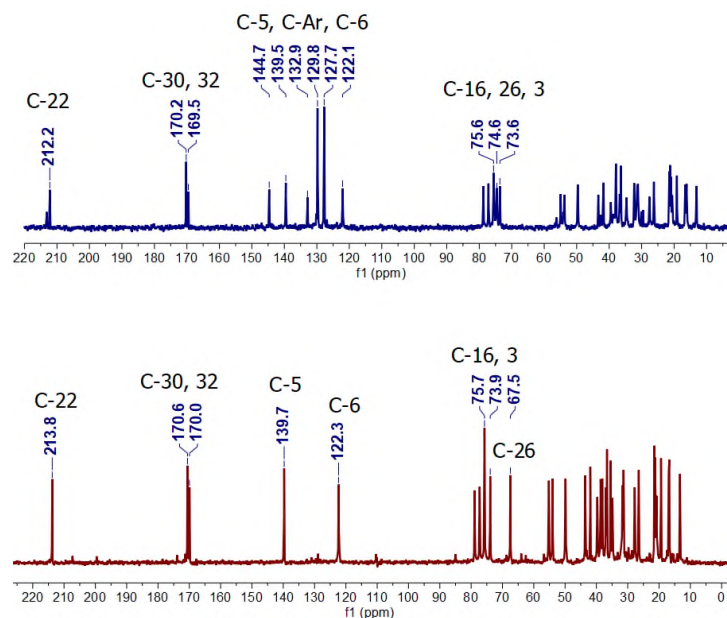
Figura 22. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **44** y **45**.

Por otro lado, en los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 23) del producto **45** y la materia prima **44**, se compararon las absorciones de la región de los carbonilos de cetona y ésteres (Tabla 4). Ambos compuestos poseen absorciones características, para la materia prima **44**, las absorciones de los grupos carbonilos se presentan a 213.8 (C-22, cetona), 170.6 y 170.0 ppm (C-30, C-32; ésteres), mientras que en el compuesto **45**, estas absorciones se observan a 212.2 (C-22, cetona), 170.2 y 169.5 ppm (C-30, C-32; ésteres). La modificación química del producto **45** se corroboró por la presencia de las señales características del anillo aromático, correspondiente al grupo tosilo, las cuales absorben en 144.7, 132.9, 129.8 y 127.7 ppm. Además, el desplazamiento químico del carbono base de oxígeno en C-26, presentó una variación significativa ( $\Delta\text{c}$  7.1 ppm) hacia campos bajos con respecto a la materia prima **44** (67.5 vs 74.6 ppm), debido al efecto electrotractor del grupo tosilo. Por otra parte, se confirmó la masa del compuesto por la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS) para el compuesto **45**, se observaron señales correspondientes a los aductos generados por los iones sodio y

amonio, presentando las siguientes masas;  $[M+Na]^+$ ;  $m/z$  693.3491, y  $[M+NH_4]^+$ ;  $m/z$  = 688.3879 correspondiente a la formula molecular  $C_{38}H_{54}O_8S$  respectivamente.

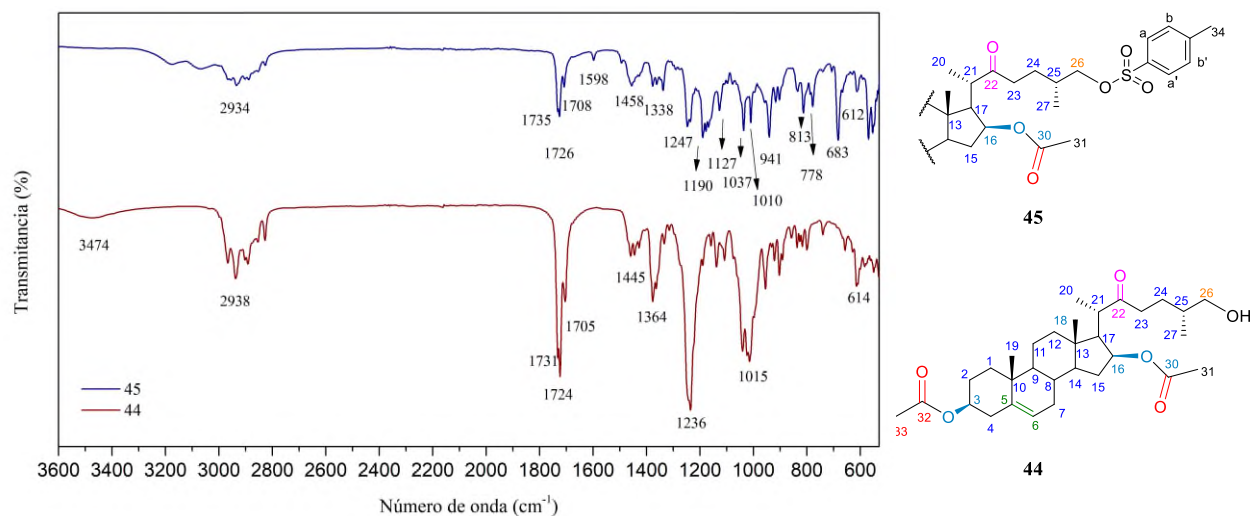
**Tabla. 4** Comparación de los  $\delta_C$  (ppm) representativos de los compuestos **44** y **45**.

C	44	45
3	73.9	73.6
5	139.7	139.5
6	122.3	122.0
16	75.7	75.6
17	55.2	54.9
18	13.3	13.1
19	19.3	19.2
22	213.8	212.2
24	27.8	27.6
25	35.5	32.3
26	67.5	74.6
27	16.9	16.6
30	170.6	170.2
31	21.5	21.3
32	170.0	169.5
33	20.8	20.6
34	21.5	
Ar	144.7	
	132.9	
	129.8	
	127.7	



**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^{13}C$  de los compuestos **44** (inferior) y **45** (superior).

En los espectros de infrarrojo (IR) (Figura 24) correspondientes a los compuestos **44** y **45** se pueden observar las bandas de absorción características de cada grupo funcional. Para el compuesto **44**, en la región de  $3474\text{ cm}^{-1}$ , se aprecia una banda ancha que corresponde a las vibraciones de tensión del enlace O-H. Asimismo, en  $1731$  y  $1724\text{ cm}^{-1}$ , se aprecian las bandas de vibración de tensión del carbonilo (C=O) de los grupos ésteres en C-30 y C-32, respectivamente. Por otro lado, en  $1705\text{ cm}^{-1}$ , se observan señales de vibración de tensión correspondiente al carbonilo de cetona (C=O) en C-22. También, en la región de  $1234\text{ cm}^{-1}$ , se aprecia la banda de tensión del enlace C-O con su respectiva banda de flexión fuera del plano (oop) en  $1015\text{ cm}^{-1}$  del grupo éster, y en la región de  $1364$  y  $1445\text{ cm}^{-1}$ , se observa la banda de tensión correspondiente al doble enlace ubicado en C-5. En contraste, al analizar el espectro del compuesto **45**, no se aprecia la banda característica del grupo alcohol en  $3474\text{ cm}^{-1}$ . Además, podemos identificar las bandas correspondientes del grupo tosilo de compuesto **45**, por ejemplo;  $1037\text{ cm}^{-1}$  (S=O),  $1190\text{ cm}^{-1}$  y  $1127\text{ cm}^{-1}$  ( $SO_2$ ) y en  $813\text{ cm}^{-1}$  y  $683\text{ cm}^{-1}$ , (S-C), de acuerdo a lo reportado en la literatura.<sup>55</sup>



**Figura 24.** Espectro de infrarrojo del compuesto **44** y **45**.

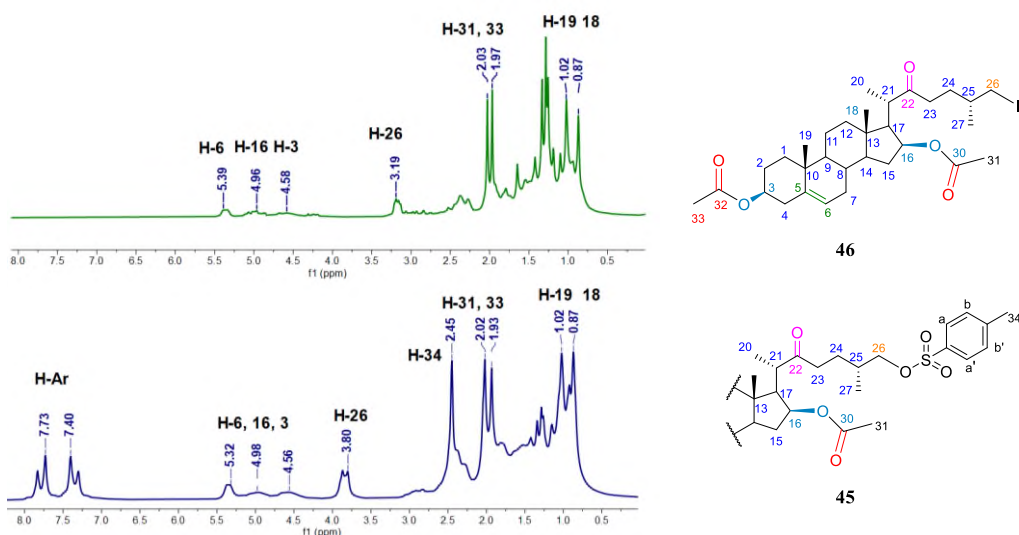
### 8.1.2.2. Síntesis de diacetato de (25*R*)-26-yodo-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo (**46**)

Continuando con la ruta sintética 1, del Esquema 3, se prosiguió con el desplazamiento del grupo tosilo mediante una reacción de S<sub>N</sub>2 para introducir al yodo en la posición C-26. Para ello, se hizo reaccionar al compuesto **45** con yoduro de potasio (KI) en acetona a reflujo. La reacción se purificó por CC utilizando una fase móvil hexano/ AcOEt (90:10). Durante este proceso, se verificó el seguimiento de la reacción, mediante la CCF, en donde se observaron los subproductos obtenidos mediante detección UV y revelado con ácido sulfúrico 50%. El producto resultante presentó un valor de R<sub>f</sub> de 0.47 en el sistema hexano/AcOEt (70/30). El compuesto **46** se obtuvo con un rendimiento bajo del 7%, donde la mayor parte de la masa del crudo de reacción correspondía a la materia prima.

Para caracterizar el producto **46**, se utilizó la RMN de <sup>1</sup>H y se compararon los espectros con la materia prima (**45**). En el espectro de <sup>1</sup>H del compuesto **46** (Figura 25), se confirmó la ausencia de señales en la región de aromáticos cuyo desplazamiento químico se encuentran entre 7-8 ppm, lo que confirmó la sustitución del tosilo por el yodo (Tabla 5). Además, se corroboró la ausencia del metilo de la posición *para* del mismo grupo H-34 con desplazamiento en 2.45 ppm. Con respecto a la absorción del H-26 en ambos compuestos (**45**, **46**), se presentó un desplazamiento químico considerable (3.80 ppm en el producto contra 3.19 ppm de material de partida), debido al intercambio de grupo funcional, esto se debe a la influencia electronegativa del halógeno. A mayor electronegatividad del halógeno, mayor será el efecto de desprotección de los protones y estos se desplazarán a campos bajos.

**Tabla. 5** Comparación de los  $\delta_H$  (ppm) representativos de los compuestos **45** y **46**.

H	45	46
<b>3</b>	4.56	4.58
<b>6</b>	5.32	5.39
<b>16</b>	4.98	4.96
<b>18</b>	0.87	0.87
<b>19</b>	1.02	1.02
<b>26</b>	3.80	3.19
<b>31</b>	2.45	2.03
<b>33</b>	1.93	1.97
<b>34</b>	2.45	
<b>Ar</b>	7.73	
	7.40	

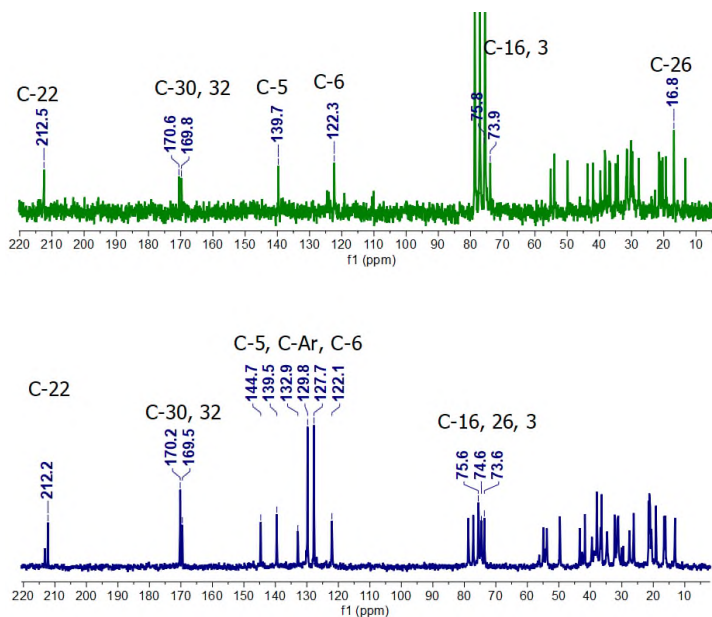


**Figura 25.** Espectro de RMN de  $^1H$  de los compuestos **45** y **46**.

Al comparar los espectros de RMN de  $^{13}C$  (Figura 26), de la materia prima **45** y el producto **46**, se puede observar que las absorciones de los carbonos aromáticos del compuesto **45** en 144.7, 132.9, 129.8 y 127.7 ppm, no aparecen en el espectro del compuesto **46**, debido a la pérdida del grupo tosilo. Mientras que las señales de los carbonilos de cetona y ésteres se observaron en 212.5, 170.6 y 169.8 ppm, correspondientes a C-22, C-30 y C-32 respectivamente (Tabla 6). Respecto a la señal correspondiente a C-26, donde ocurrió el cambio de grupo funcional, hubo un desplazamiento significativo de 74.6 a 16.8 ppm, lo cual concuerda con los datos descritos en la literatura.<sup>47</sup> La masa del compuesto se confirmó mediante la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS), para el compuesto **46** se observó el ion molecular  $[M+H]^+$  con  $m/z = 627.2543$  correspondiente a la fórmula molecular  $C_{31}H_{47}IO_5$ .

**Tabla. 6** Comparación de los  $\delta_c$  (ppm) representativos de los compuestos **45** y **46**.

C	45	46
3	73.6	73.9
5	139.5	139.7
6	122.0	122.3
16	75.6	75.8
17	54.9	55.2
18	13.1	13.3
19	19.2	19.4
22	212.2	212.5
24	27.6	31.5
25	32.3	35.0
26	74.6	16.8
27	16.6	20.8
30	170.2	170.6
31	21.3	21.5
32	169.5	169.8
33	20.6	20.5
34	21.5	
Ar	144.7 132.9 129.8 127.7	



**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **45** (inferior) y **46** (superior).

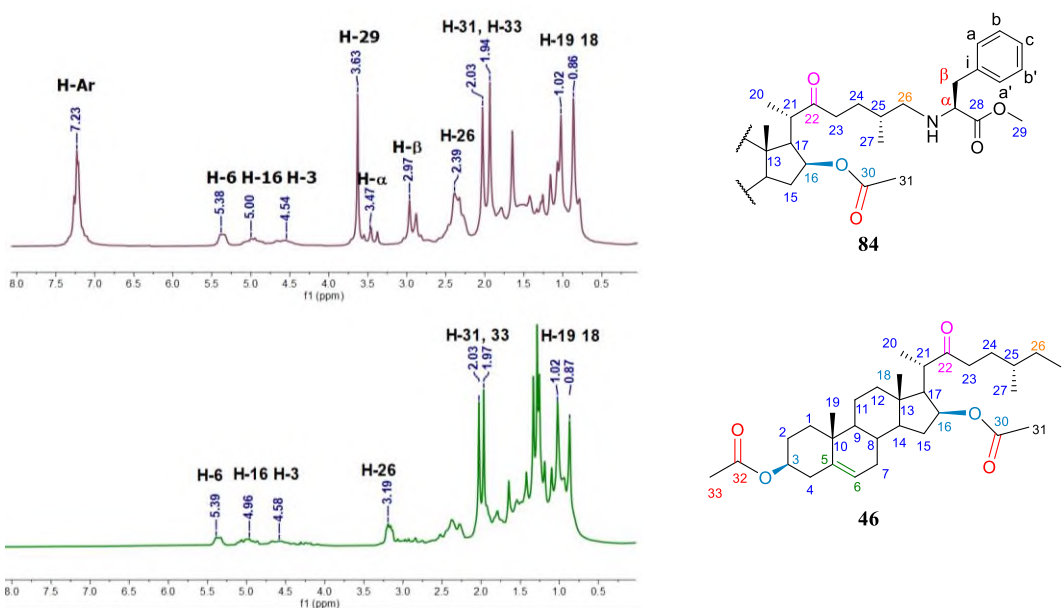
### 8.1.2.3. Síntesis de diacetato de (25R)-26-(N-PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo (**84**)

Finalmente, se trató el compuesto **46** con el clorhidrato de metil éster de fenilalanina (**77d**) en acetonitrilo a reflujo durante 7 h. Una vez concluida la reacción, se procedió a purificar mediante cromatografía por columna utilizando un sistema de elución hexano/AcOEt (80:20) obteniendo un rendimiento del 33% del producto **84**.

El compuesto **84** se verificó la presencia de las señales características del compuesto, cuya estructura posee el anillo aromático proveniente del clorhidrato del éster metílico (**77d**), de acuerdo al espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 27). Se observaron señales en el rango de 7.44 - 7.03 ppm atribuidas a los cinco protones (H-a, H-a', H-b, H-b', H-c) del anillo aromático. Además, se identificaron tres absorciones en 3.05-2.83, 3.47 y 3.63 ppm asignados a los protones  $\beta$ , al protón  $\alpha$  y a los protones del grupo metilo del éster H-29, respectivamente. La asignación de los protones en H-26 se complementó con experimentos bidimensionales (2D) como; HMBC, HSQC y COSY. El experimento de HMBC confirmó que el sitio de unión estaba localizado entre el C-26 y el protón H- $\alpha$  del fragmento del aminoácido, asignándose el desplazamiento de H- $\alpha$  a la señal de 3.47 ppm. Finalmente, algunas absorciones con desplazamiento similar de los compuestos **46** y **84**, se describen en la Tabla 7.

**Tabla. 7** Comparación de los  $\delta_H$  (ppm) representativos de los compuestos **46** y **84**.

H	46	84
3	4.58	4.54
6	5.39	5.38
16	4.96	5.00
18	0.87	0.86
19	1.02	1.02
26	3.19	2.39
29	2.03	3.63
31	1.97	2.03
33		1.94
Ar		7.23
$\alpha$		3.47
$\beta$		2.97



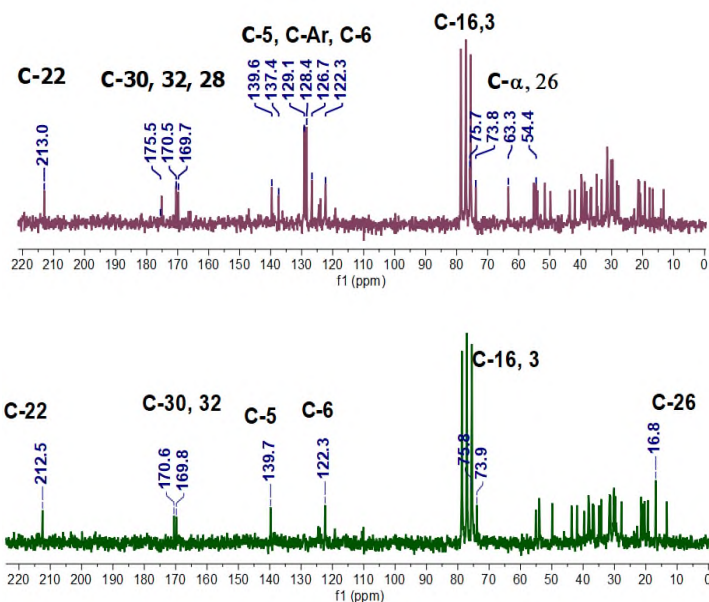
**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1H$  de los compuestos **46** y **84**.

En el espectro de RMN de  $^{13}C$  (Figura 28) se observaron las 41 señales de carbono, que concuerdan con el número de carbonos esperados para el producto **84**, mientras en el compuesto **46** se identificaron los 31 carbonos presentes en la estructura. Para el caso, del compuesto **84** y **46**, poseen absorciones similares localizadas en 213.1, 175.2, 170.5 y 169.7 ppm, que corresponden a los carbonos de los grupos carbonilos de cetona (C-22) y de ésteres (C-28, C-30, C-32), respectivamente y, además, los carbonos vinílicos absorben en la región de 122.3 y 75.5 ppm (C-5, C-6) de acuerdo con la Tabla 8. Mientras que para el compuesto **84**, que es un bioconjugado con el éster metílico de fenilalanina, posee las absorciones de los carbonos correspondientes al anillo aromático, con desplazamientos químicos en 137.4, 129.1, 128.4, 126.7 ppm (C-i, C-a, C-a', C-b, C-b', C-c). Mientras que las señales correspondientes a los carbonos  $\alpha$ ,  $\beta$  y C-29 del éster metílico absorben a 63.4, 38.8 y 51.4 ppm respectivamente. Para el caso del C-26, que es el sitio de la bioconjugación, la

absorción de dicha señal sufre un desplazamiento hacia campos bajos con respecto a la materia prima (16.8 contra 54.4 ppm). Por otra parte, se confirmó la masa del compuesto por la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS), para el compuesto **84** se observa el ion molecular  $[M+H]^+$  con  $m/z = 678.4371$  correspondiente a la fórmula molecular  $C_{41}H_{59}NO_7$ .

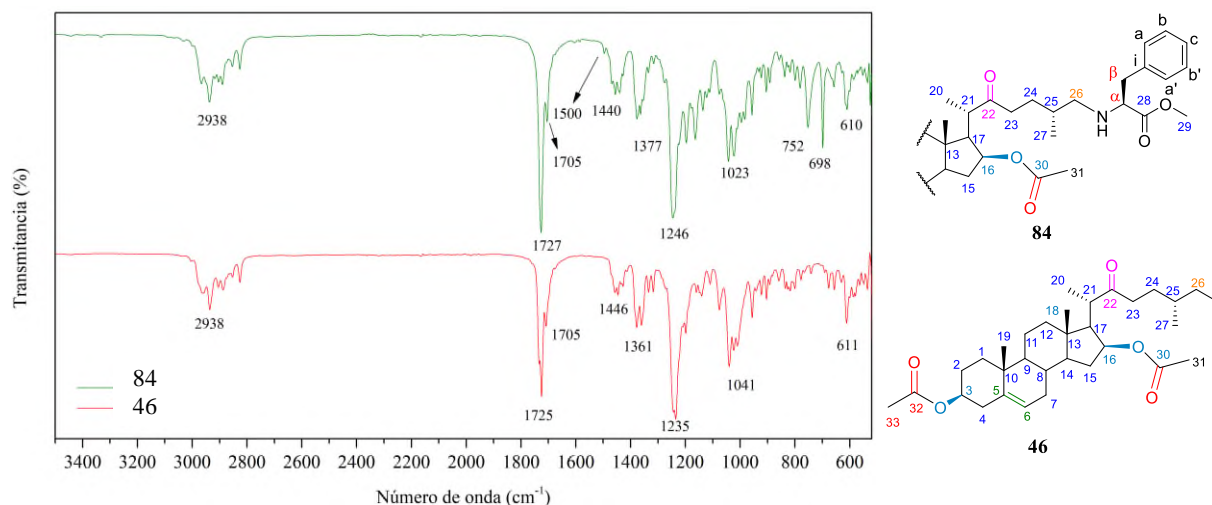
**Tabla. 8** Comparación de los  $\delta_C$  (ppm) representativos de los compuestos **46** y **84**.

C	46	84
3	73.9	73.4
5	139.7	139.7
6	122.3	122.4
16	75.8	75.7
17	55.2	55.2
18	13.3	13.3
19	19.4	19.4
22	212.5	213.1
24	31.5	29.8
25	35.0	33.3
26	16.8	54.4
27	20.8	17.9
30	170.6	170.6
31	21.5	21.5
32	169.8	169.8
33	20.5	20.8
29		51.4
$\alpha$		63.4
$\beta$		38.8
Ar		135.7
		129.2
		128.4
		126.7



**Figura 28.** Espectro de RMN de  $^{13}C$  de los compuestos **46** (inferior) y **84** (superior).

En el espectro infrarrojo para ambos productos **46** y **84** (Figura 29) se observaron bandas de absorción en regiones similares, por ejemplo, a  $2938\text{ cm}^{-1}$ , se identificaron las vibraciones de tensión del enlace C-H. También se detectó la banda de mayor intensidad correspondiente a la absorción en  $1725\text{ cm}^{-1}$ , asociada a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo (C=O) de los acetatos C-30, C-32 y del carbonilo del residuo del aminoácido. Además, a  $1705\text{ cm}^{-1}$  se observa la vibración de estiramiento del C=O del grupo cetona, esto se corroboró con la banda a  $1440\text{ cm}^{-1}$  asignada a la vibración de flexión del grupo carbonilo (OC=O). En la región de  $1235\text{ cm}^{-1}$ , se observa la banda de estiramiento del enlace C-O, junto con una banda de flexión fuera del plano (oop) a  $1023\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al grupo éster. En la región de  $1364\text{ cm}^{-1}$ , se identificaron las vibraciones de flexión del estiramiento del doble enlace en C-5. Al comparar ambos espectros, en  $1500\text{ cm}^{-1}$  se pueden observar que las bandas de absorción debidas al estiramiento de flexión fuera del plano del enlace =C-H del anillo aromático del producto **84**. Estas señales no se observan en el espectro del producto **46** debido a que no posee anillos aromáticos.



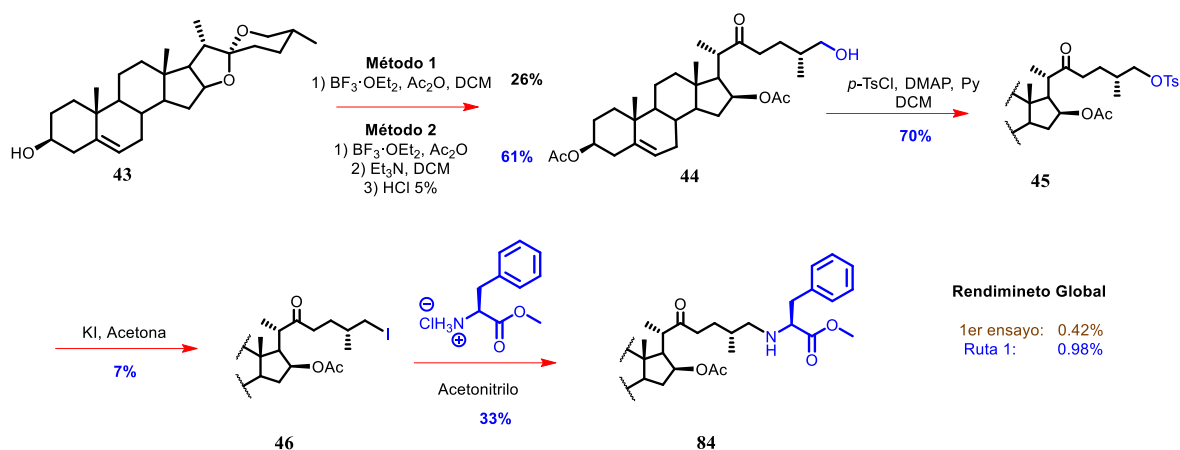
**Figura 29.** Espectro de infrarrojo de los compuestos **46** y **84**.

De acuerdo a las rutas sintéticas para generar el compuesto **84** (Esquema 14), las cuales involucran los intermediarios (**43**, **44**, **45**, **46**), se describen los rendimientos obtenidos para ambas secuencias evaluadas (Tabla 9).

**Tabla. 9** Porcentaje del rendimiento global de reacción.

Productos	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>46</b>	<b>84</b>	Rendimiento global
<b>1er ensayo</b>	26%	70%	7%	33%	0.42
<b>Ruta 1</b>	61%	70%	7%	33%	0.98

Debido al bajo porcentaje de rendimiento de la ruta sintética del primer ensayo para la obtención del producto **84**, se buscaron otras alternativas. Una de las estrategias fue explorar una alternativa para obtener un mejor rendimiento del intermediario **44** (Esquema 14). En este caso, se aplicó la metodología propuesta por Hilario-Martínez *et al.*, 2016.,<sup>53</sup> la cual mostró un rendimiento superior en comparación con la primera metodología descrita por Zeferino-Díaz *et al.*, 2015,<sup>42</sup> logrando un mejor rendimiento global de reacción. Con estos resultados en mente, se continuó buscando otra alternativa para aumentar aún más el rendimiento global de reacción y se propuso una segunda ruta sintética, como se describe en la siguiente sección.



**Esquema 14.** Rendimientos de reacción del proceso de síntesis del compuesto **84**.

### 8.1.3. Ruta sintética 2. Obtención de los derivados esteroidales-aminoésteres (86a-e)

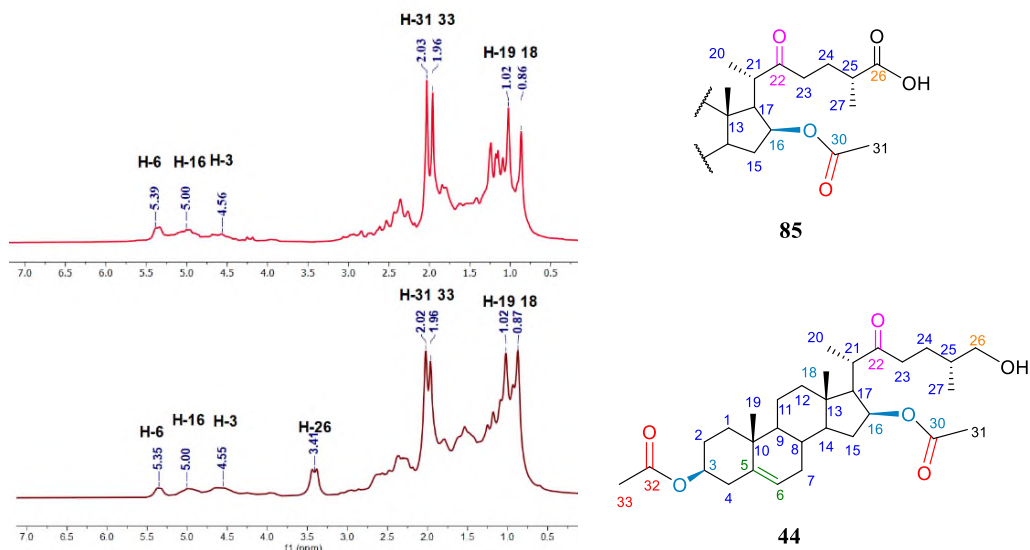
#### 8.1.3.1. Síntesis del ácido $3\beta,16\beta$ -diacetoxi-22-oxocolest-eno-26-oico

Por motivo a las problemáticas presentadas en la ruta 1, se planteó la ruta 2 mostrada en el esquema 7. En esta ruta, se llevó a cabo la oxidación del compuesto 26-OH (**44**) para obtener el producto **85**, el cual contiene un ácido carboxílico en el C-26. La oxidación del hidroxilo del compuesto **44** se realizó siguiendo a la metodología descrita por Del Fuego *et al.*, 2016,<sup>56</sup> donde se utilizó el reactivo de Jones, y como resultado, se obtuvo como producto mayoritario el derivado 22-oxo-26-oico (**85**).

Para verificar la estructura del compuesto **85**, se realizaron análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figura 30), en este caso los derivados esteroidales presentan similitudes en su estructura, excluyendo los protones H-26 que en el producto ya no están presentes. Mientras que los protones H-6, H-3, H-31, H-33, H-19 y H-18 poseen un desplazamiento químico similar, en la Tabla 10 se observan los desplazamientos químicos más importantes de la materia prima y el producto.

**Tabla. 10** Comparación de los  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) representativos de los compuestos **44** y

H	44	85
3	4.55	4.56
6	5.35	5.39
16	5.00	5.00
18	1.02	1.02
19	0.87	0.86
26	3.41	
31	2.02	2.03
33	1.96	1.96

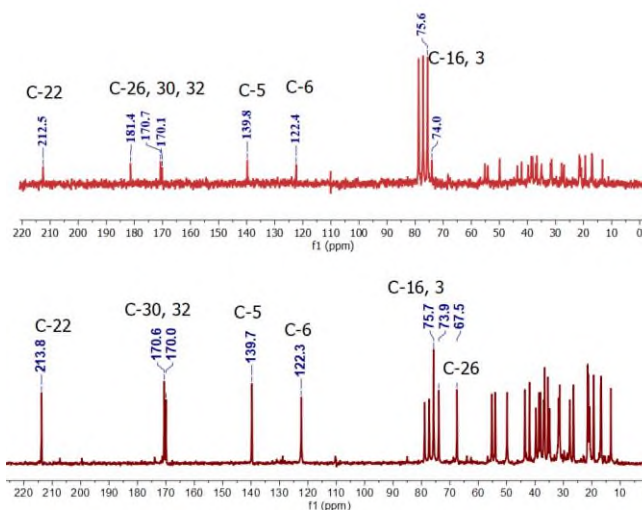


**Figura 30.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto **44** y **85**.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 31) se identificaron los cuatro carbonilos correspondientes a los grupos cetona, ácido carboxílico, y ésteres en 212.4, 181.3, 170.6 y 170.0 ppm, respectivamente, así como los carbonos C-6 y C-5 en 139.6 y 122.3 ppm. El compuesto **85** se diferencia por el carbonilo del ácido, con un desplazamiento químico de 181.3 ppm. Además, se confirmó la masa del compuesto por la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS) del compuesto **85**, observándose el ion molecular  $[\text{M}-\text{H}]^-$  con  $m/z = 529.3167$  correspondiente a la fórmula molecular  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_7$ .

**Tabla. 11** Comparación de los  $\delta_c$  (ppm) representativos de los compuestos **44** y **85**.

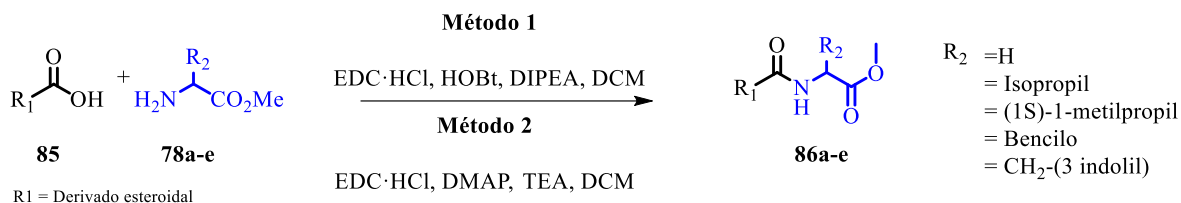
C	<b>44</b>	<b>85</b>
3	73.9	74.0
5	139.7	139.8
6	122.3	122.4
16	75.7	75.5
17	55.2	55.2
18	13.3	13.3
19	19.3	19.4
22	213.8	212.5
24	27.8	27.8
25	35.5	39.7
26	67.5	181.4
27	16.9	17.1
30	170.6	170.7
31	21.5	21.5
32	170.0	170.1
33	20.8	20.8



**Figura 31.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **44** (inferior) y **85** (superior).

### 8.1.3.2. Síntesis de bioconjugados esteroideal-aminoácido (86a-e)

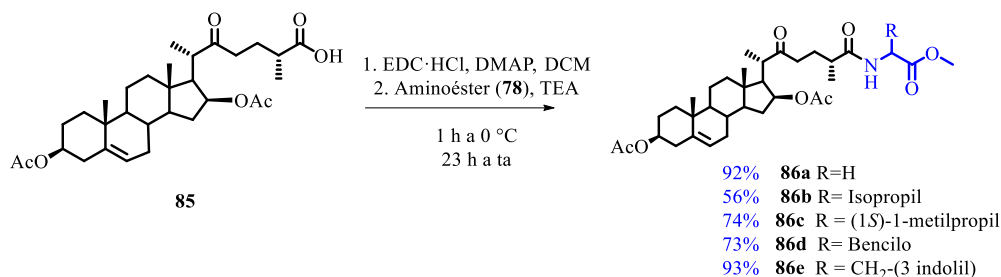
Siguiendo con la ruta 2 (Esquema 7), el compuesto **85** reaccionó con una familia de aminoésteres que involucra los siguientes aminoácidos; glicina, valina, leucina, fenilalanina y triptófano para obtener los bioconjugados **86a-86e**. La acilación del grupo amino del aminoácido se llevó a cabo por el método 2 de la carbodiimida descrita por Chiguils-Pérez *et al.*, 2017<sup>57</sup> (Esquema 15). Este método implica el uso de agentes acoplantes para la obtención del producto, para convertir el grupo hidroxilo en buen grupo saliente y de esta forma transformar los derivados esteroideos en agentes acilantes.



**Esquema 15.** Método de acilación de bioconjugados de aminoéster.

Las carbodiimidas comerciales más representativas son *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC·HCl) y *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC). La DCC es la carbodiimida más barata y empleada como agente acoplante, sin embargo, presenta una desventaja que consiste en la formación de DCU, un subproducto que dificulta la purificación de los productos de reacción por métodos cromatográficos, por lo que la obtención de un producto purificado se vuelve laboriosa. El uso de EDC·HCl se ha convertido en una opción viable debido a que es soluble en agua y la urea que se forma puede ser eliminada a través de un lavado acuoso.

Para la obtención de los bioconjugados **86a-e** (Esquema 16), se efectuó la reacción de *N*-acilación. La cual consistió en la activación del compuesto 26-COOH (**85**) con el agente acoplante EDC·HCl, dando inicio a la activación *in situ* del ácido carboxílico, transformándolo en la especie acilante, aunado a que se utilizó DMAP como catalizador de la reacción, posteriormente se le adicionó TEA y el aminoéster según sea el caso (**77a**, **77d**, **77e**, **78b**, **78c**), dejando la reacción en agitación durante 1 h a 0 °C, finalizado este tiempo se dejó a temperatura ambiente en agitación por 23 h.



**Esquema 16.** Síntesis de bioconjugados esteroide-aminoácido (**86a – e**).

En el acoplamiento de aminoácidos es conocido que la cadena lateral tiene influencia en el rendimiento de reacción.<sup>57</sup> Los compuestos **86a** (92%) y **86c-e** (73-93%) presentan mayores rendimientos que el derivado **86b** (Tabla 12), debido a que sus cadenas laterales presentan menor impedimento estérico durante el paso de acoplamiento. El acoplamiento se ve afectado si el aminoéster introducido está β-ramificado como es el caso del derivado esteroideal de la valina **86b** (56%), que presentó el más bajo rendimiento de reacción de esta familia de compuestos.

**Tabla. 12** Rendimiento global de los bioconjugados esteroides-aminoácidos.

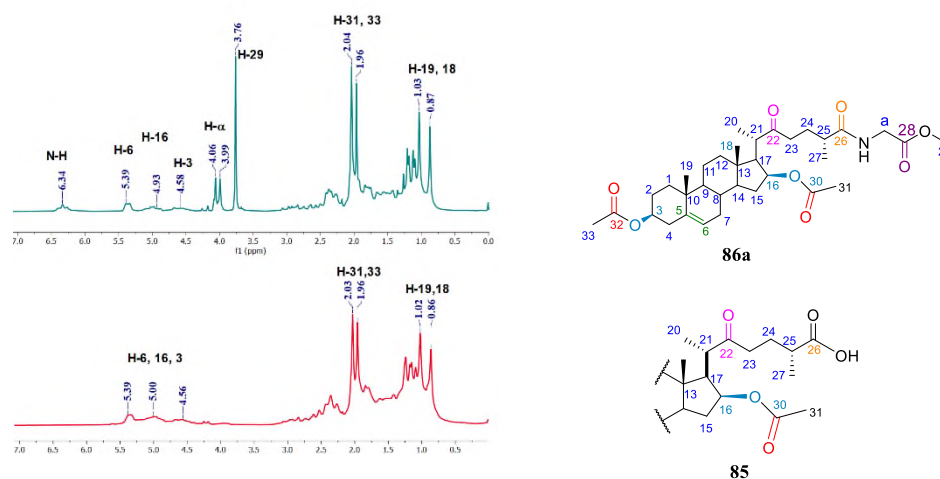
Clave	Estructura	44	85	86	Rendimiento global
<b>86a</b>		61%	53%	92%	29.7%
<b>86b</b>		61%	53%	56%	18.1%
<b>86c</b>		61%	53%	74%	23.9%
<b>86d</b>		61%	53%	73%	23.6%
<b>86e</b>		61%	53%	93%	30.0%

En cuanto al rendimiento general de reacción, al utilizar la mejor ruta de síntesis para obtener los bioconjugados **86a - e**, se observó un significativo aumento en los valores de rendimiento global, que oscilan entre el 18% y el 30% (Tabla 12). Esto contrasta con la ruta 1, donde el rendimiento global fue inferior al 1%. Cabe destacar que ninguno de los bioconjugados esteroideos han sido descritos en la literatura científica (SciFinder, octubre 2024).

Al realizar los análisis espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos (**86a-e**) (Figura 32), con el objetivo de verificar la obtención del producto bioconjugado **86**. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observó una señal triplete en 6.34 ppm asignada al protón de la amida. Además, se identificaron las señales de los protones H-6, H-16, H-3 en 5.39, 4.93 y 4.58 ppm, respectivamente (Tabla 13). En relación a las señales del residuo de aminoéster de glicina, se apreció una señal doble en 4.06 ppm que corresponden a los protones  $\alpha$ . También se observó un singulete a 3.76 ppm, atribuida a los protones del metilo del residuo de glicina. Además, se detectaron señales singuletes en 2.04 y 1.96 ppm, correspondientes a los protones del metilo H-29 y H-33 ppm. En la región de 1.03 y 0.87 ppm, se apreciaron las señales singuletes asignadas a los protones de los metilos H-19 y H-18.

**Tabla. 13** Comparación de los  $\delta_{\text{H}}$  (ppm) representativos de los compuestos **85** y **86a**.

<b>H</b>	<b>85</b>	<b>86a</b>
<b>3</b>	4.56	4.58
<b>6</b>	5.39	5.39
<b>16</b>	5.00	4.93
<b>18</b>	0.86	0.87
<b>19</b>	1.02	1.03
<b>29</b>		3.76
<b>31</b>	2.03	2.04
<b>33</b>	1.96	1.96
<b>N-H</b>		6.34
<b>H-<math>\alpha</math></b>		4.02

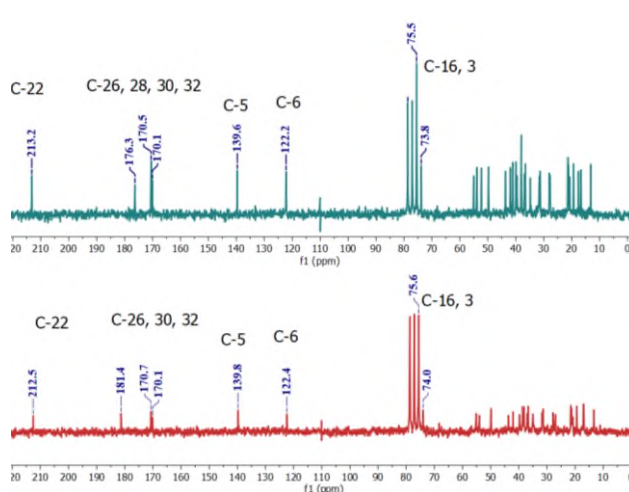


**Figura 32.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **85** y **86a**.

En cuanto al análisis del espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 33), se observaron cuatro señales correspondientes a carbonilos de los distintos grupos funcionales: cetona, amida y éster, en 213.2, 176.3, 170.3, 170.5 170.1 ppm, respectivamente (Tabla 14). Cabe mencionar que la estructura del producto posee 5 carbonilos. Gracias a experimentos de segunda dimensión (2D), como HSQC y HMBC, se lograron identificar los C-16 y C-3, que presentaron el mismo desplazamiento químico a 170.1 ppm. Además, se observaron absorciones a 139.6 y 122.2 ppm correspondiente al C-5 y C-6. La masa del compuesto se verificó por la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS) para el compuesto **86a**. Se observó el ion molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  con  $m/z = 602.3693$ , correspondiente a la fórmula molecular del producto  $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_8$ , y se localizó el ion molecular de  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  con  $m/z = 624.3514$ .

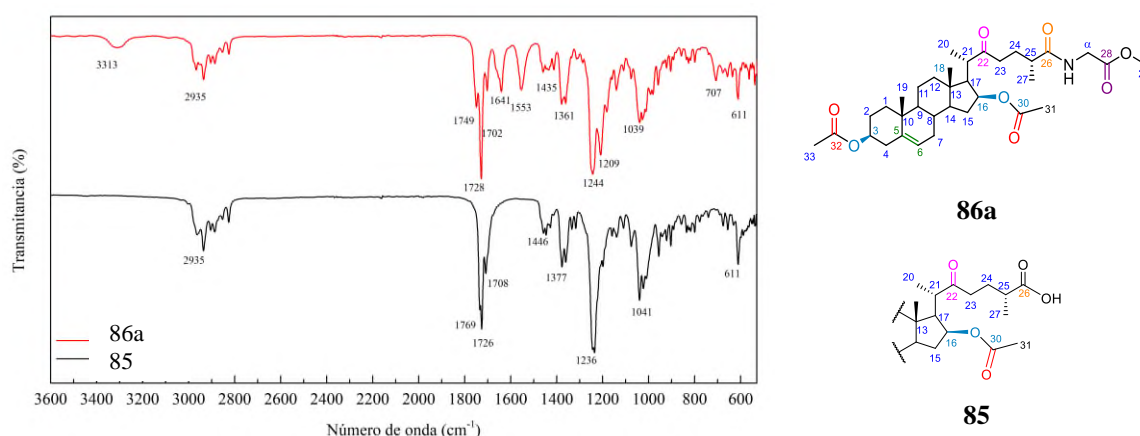
**Tabla. 14** Comparación de los  $\delta_{\text{C}}$  (ppm) representativos de los compuestos **85** y **86a**.

C	85	86a
3	74.0	73.8
5	139.8	139.6
6	122.4	122.2
16	75.5	75.5
17	55.2	55.1
18	13.3	13.1
19	19.4	19.2
22	212.5	213.2
26	181.4	176.3
27	17.1	17.5
28		170.5
30	170.7	170.1
31	21.5	21.3
32	170.1	170.1
33	20.8	20.6
$\alpha$		41.0



**Figura 33.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto **85** (inferior) y **86a** (superior).

En la Figura 34 se presenta el espectro de infrarrojo (IR) correspondiente a los compuestos **85** y **86a**. En este espectro, se pueden observar las bandas de absorción características de cada grupo funcional. Para el compuesto **86a**, en la región de  $2935\text{ cm}^{-1}$ , encontramos la banda de tensión del enlace del metilo, metileno (C-H,  $-\text{CH}_2-$ ) y del enlace N-H de grupo amida. Asimismo, en  $1749$  y  $1728\text{ cm}^{-1}$ , aparece la banda de vibración de tensión del enlace de carbonilo (C=O) de los grupos acetatos presentes en las posiciones C-30 y C-32, respectivamente. Por otro lado, en  $1705\text{ cm}^{-1}$ , se observan señales de vibración de tensión correspondiente al carbonilo de cetona (C=O) en C-22. Además, el carbonilo del grupo amida se localiza en  $1641\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración de tensión del doble enlace C=O. En la región de  $1553\text{ cm}^{-1}$ , se observan una banda correspondiente al estiramiento C=C y en la región de  $1435\text{ cm}^{-1}$  se observa la vibración de estiramiento medio del enlace C-N y del metilo. A  $1361\text{ cm}^{-1}$  se aprecian las vibraciones de estiramiento fuerte de los enlaces del  $\text{CH}_3$ . También, en la región de  $1234\text{ cm}^{-1}$ , se aprecia la banda del estiramiento del enlace C(C=O)-O con su respectiva banda de flexión fuera del plano (oop) en  $1015\text{ cm}^{-1}$  del grupo éster. En contraste, al analizar el espectro del compuesto **86**, no se aprecia las vibraciones de tensión del grupo amida.



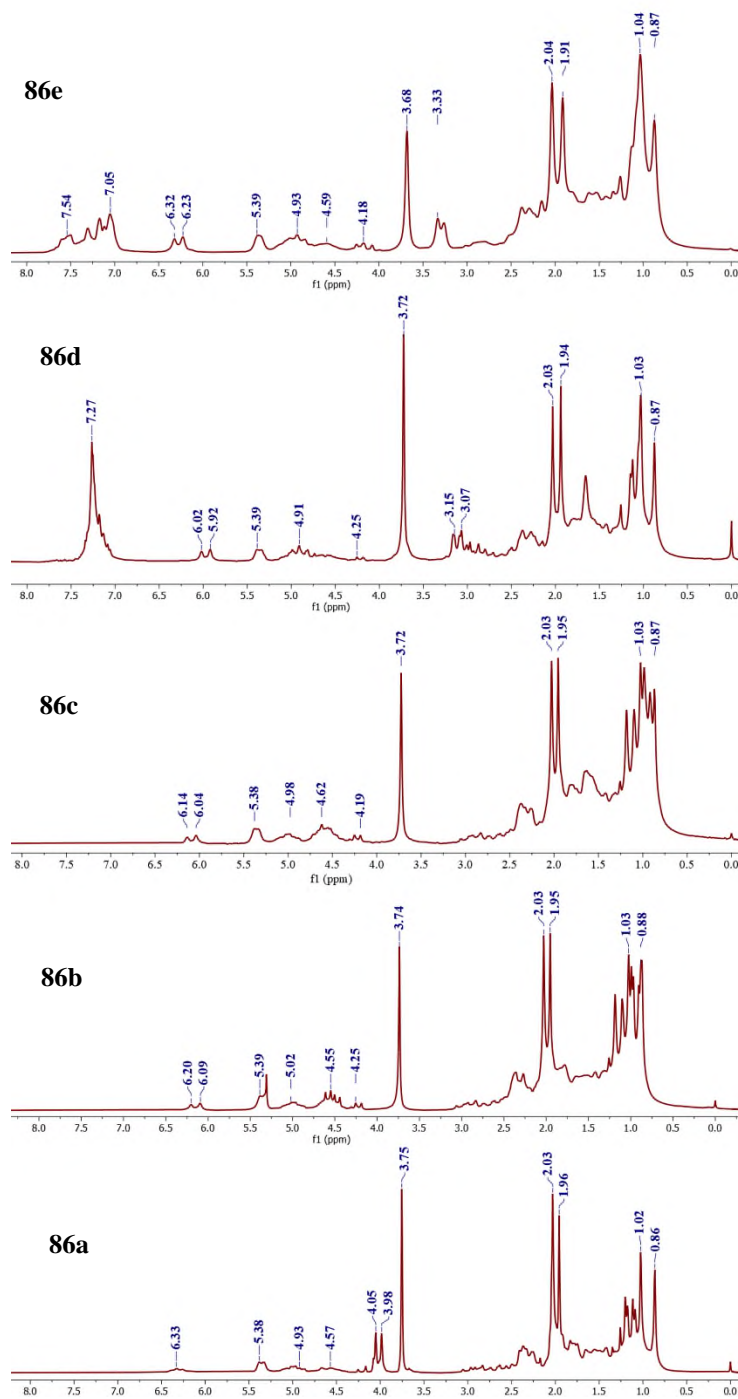
**Figura 34.** Espectro de infrarrojo de los compuestos **85** y **86a**.

Al comparar los desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  de los cinco bioconjugados esteroides-aminoácidos (**86a-e**) (Figura 35) se observan ligeras variaciones de los grupos comunes presentes en cada una de las moléculas, descritas en la Tabla 15. En particular, los protones pertenecientes al anillo aromático (H-Ar) se localizan a 7.00 a 8.00 ppm, mientras que los protones unidos al nitrógeno del grupo amida (N-H), muestran una señal doble con un desplazamiento alrededor de 6.34 - 6.09 ppm. Además, el protón vinílico se presenta como una señal doble con un desplazamiento químico similar en 5.41-5.31 ppm. Respecto a los protones de base de oxígeno se observan múltiples absorciones: El H-16 muestra señales entre 4.87 - 5.08 ppm, mientras que el H-3 se asigna a la región de 5.51 - 4.62 ppm. Por otro lado, el protón H- $\alpha$  se observa como una señal doble o múltiple dependiendo del

residuo de aminoácido, localizada en el rango de 4.01 - 4.31 ppm, mientras que en los compuestos **86d** y **86e** se observa una señal asignada al protón H- $\beta$ , localizada entre 3.29 - 3.29 ppm. Una de las señales que nos dio indicio de la obtención de los compuestos son los protones del metilo del aminoéster (H-29), la cual se observa como singulete en la región de 3.68 - 3.80 ppm.

**Tabla. 15** Comparación de los  $\delta_H$  (ppm) representativos de los bioconjugados **86a-e**.

<b>H</b>	<b>86a</b>	<b>86b</b>	<b>86c</b>	<b>86d</b>	<b>86e</b>
<b>Ar</b>				7.27	7.0-7.8
<b>N</b>	6.33	6.14	6.09	5.97	6.27
<b>6</b>	5.38	5.39	5.38	5.39	5.39
<b>16</b>	4.93	5.02	4.98	4.91	4.93
<b>3</b>	4.57	4.55	4.62	4.56	4.59
<b><math>\alpha</math></b>	4.01	4.25	4.19	4.25	4.18
<b><math>\beta</math></b>				3.11	3.33
<b>29</b>	3.75	3.74	3.72	3.72	3.68
<b>31</b>	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03
<b>33</b>	1.96	1.95	1.95	1.94	1.94
<b>18</b>	0.86	0.88	0.87	0.87	0.87
<b>19</b>	1.02	1.03	1.03	1.03	1.03



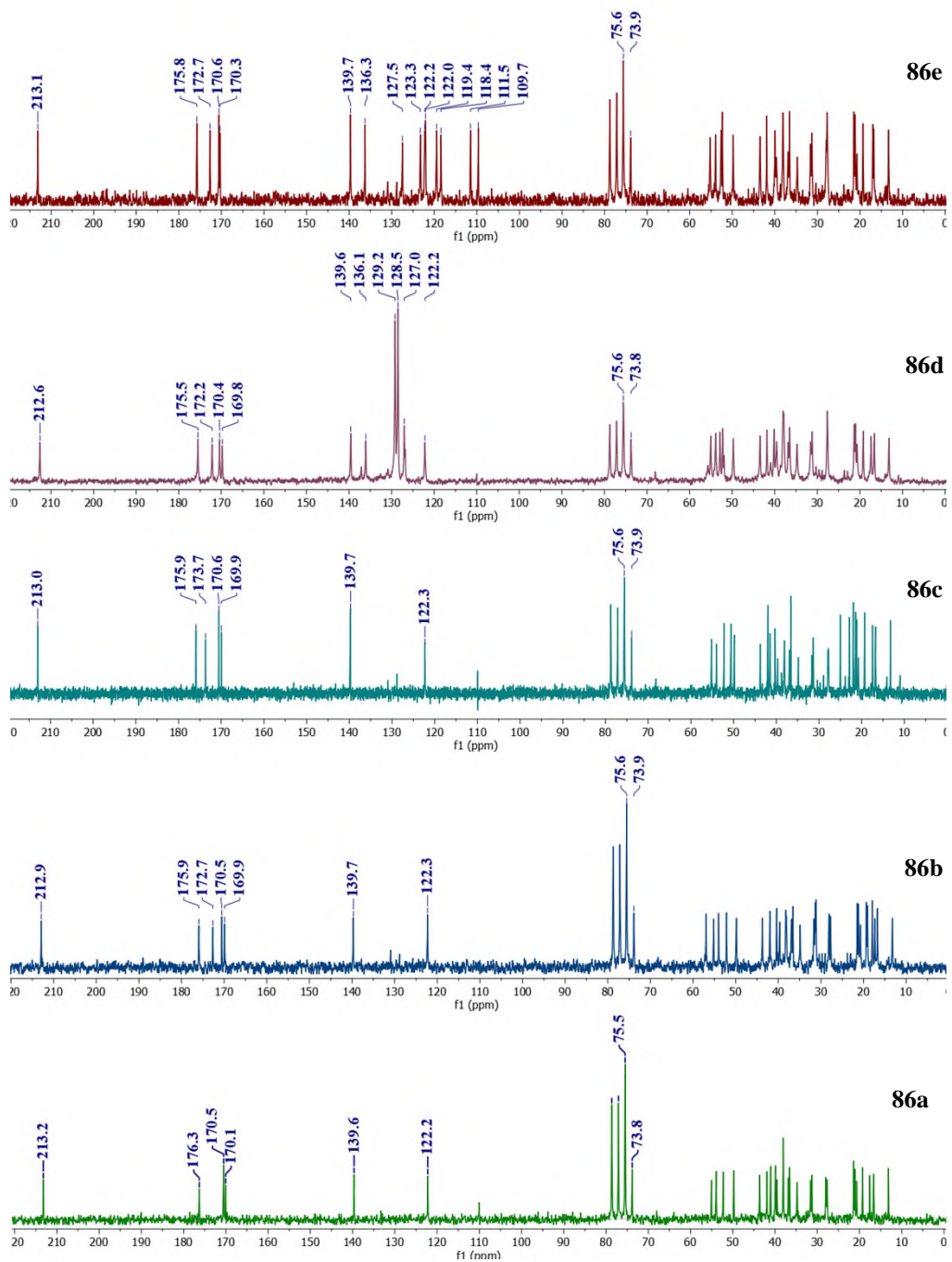
**Figura 35.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de los productos esteroidales-aminoéster (**86a-e**).

En la tabla 16, se muestran algunos desplazamientos químicos importantes de  $^{13}\text{C}$  de los cinco bioconjugado sintetizados. En las regiones de 160 a 215 ppm se localizan las señales asignadas a los carbonilos de diferentes grupos funcionales presente en la molécula (Figura 36). Tal es el caso de las absorciones entre 213.2 a 212.6 ppm asignadas al C-22, perteneciente al grupo funcional de cetona,

mientras que en la región de 176.3 a 175.5 ppm se encuentran las absorciones correspondientes a los carbonilos del grupo amida. Además, los picos asignados a los carbonilos del grupo éster del núcleo esteroidal se localizan en la región de 173.7 a 169.8 ppm. Por otra parte, las señales correspondientes a los carbonilos de éster perteneciente al residuo del aminoácido se encuentran en la región de 52.2 a 53.9 ppm, y en la región de 75.6 y 73.9 ppm se ubican las señales asignadas a los carbonos de base de oxígeno C-16 y C-3, respectivamente. Además, los protones vinílicos también poseen un comportamiento similar, cuyas absorciones se encuentran en 139.7 y 122.2 ppm asignados al C-5 y C-6, respectivamente. Finalmente, para poder asignar los demás carbonos presentes en la estructura, se emplearon los experimentos de dos dimensiones (2D) como HSQC, HMBC, a su vez las estructuras fueron corroboradas por la predicción teórica realizada con el programa MestRenova 14.2 las cuales se reportan la tabla 16.

**Tabla. 16** Comparación de los  $\delta_c$  (ppm) representativos de los bioconjugados **86a-e**.

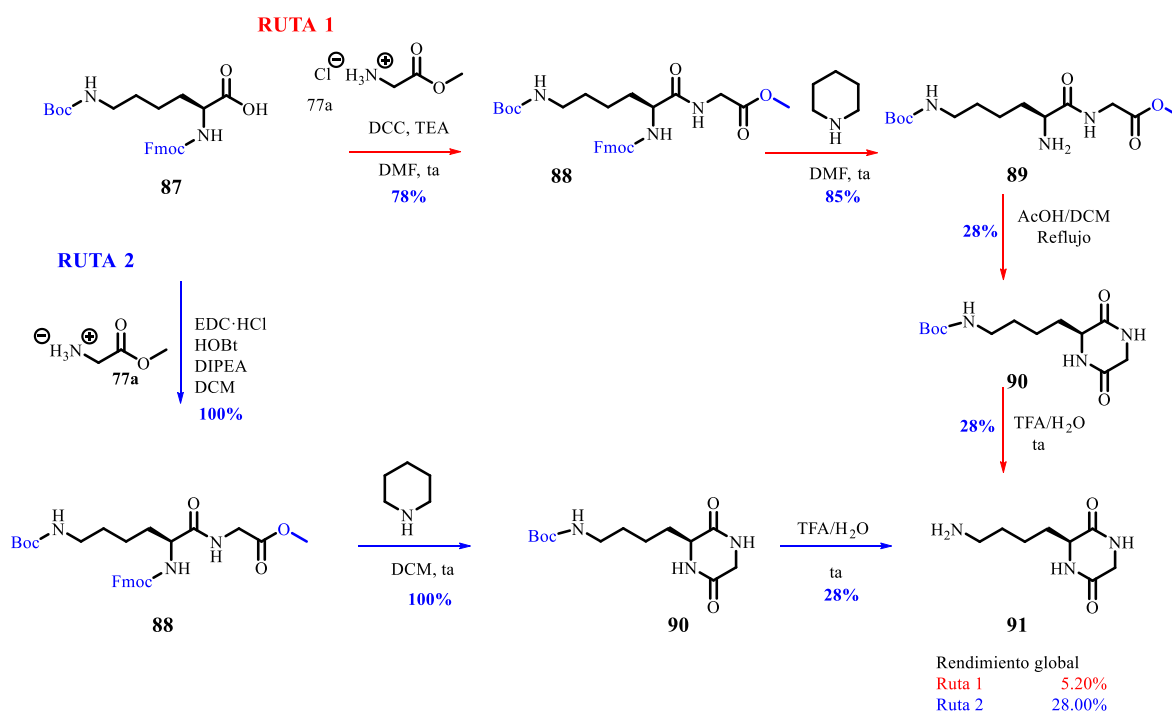
<b>C</b>	<b>86a</b>	<b>86b</b>	<b>86c</b>	<b>86d</b>	<b>86e</b>
<b>22</b>	213.2	212.9	213.0	212.6	213.2
<b>26</b>	176.3	175.9	175.9	175.5	175.8
<b>28</b>	170.5	172.7	173.7	172.2	172.7
<b>30</b>	170.1	170.6	170.6	170.5	170.6
<b>32</b>	170.1	169.9	170.0	169.8	170.4
<b>5</b>	139.6	139.7	139.7	139.7	139.7
<b>6</b>	122.2	122.3	122.3	122.2	122.3
<b>16</b>	75.5	75.6	75.6	75.6	75.6
<b>3</b>	73.8	73.9	73.9	73.9	73.9
<b>29</b>	52.3	53.9	52.3	52.2	52.3
<b><math>\alpha</math></b>	41.0	55.2	50.6	53.9	52.6
<b>31</b>	21.3	21.4	22.0	21.3	21.4
<b>33</b>	20.6	20.7	21.1	20.7	20.7
<b>19</b>	19.2	16.7	19.3	19.2	19.3
<b>18</b>	13.1	13.2	13.2	13.2	13.2
<b>Ar</b>				136.1	136.3
				129.2	127.5
				128.6	123.3
				127.1	122.1
					119.5
					118.5
				111.5	
				109.7	



**Figura 36.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los productos esteroidales-aminoéster **86a-e**.

## 8.2. Síntesis de dicetopiperazina (91)

Como parte de los objetivos del proyecto, se realizaron dos rutas para la síntesis de la dicetopiperazina **91**. El grupo de amino libre presente en la cadena lateral de la lisina, es clave para trabajos futuros, en la obtención de bioconjugados esteroide-DKP, debido a que este grupo será el punto de unión con los derivados esteroidales 26-I (**46**) o 26-COOH (**85**) obtenidos en este trabajo. En el Esquema 17 se describen las secuencias sintéticas empleadas para la formación de la DKP (**91**).

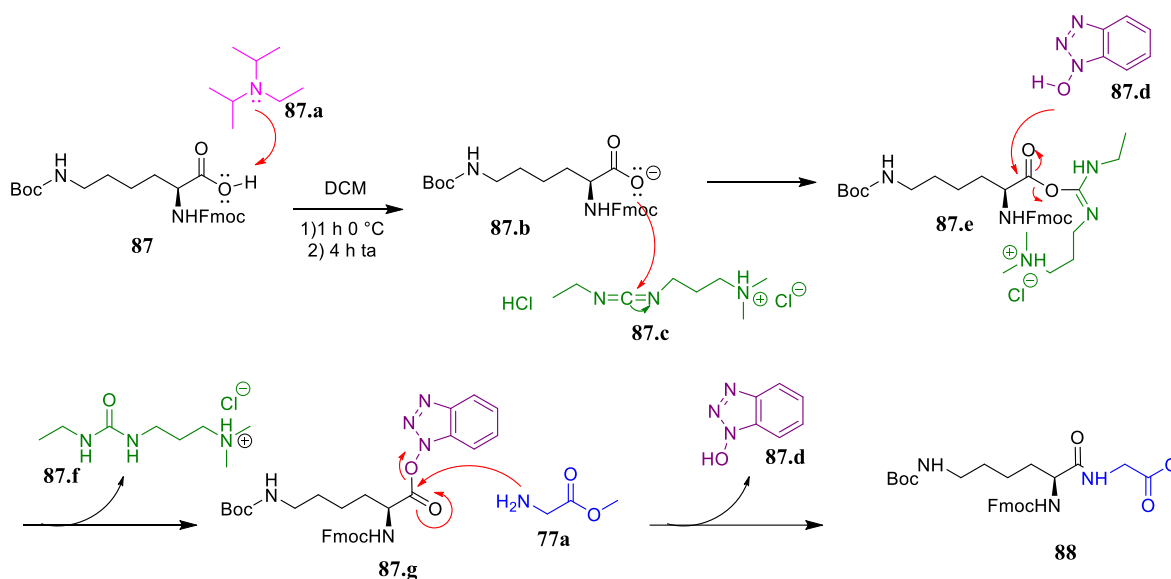


**Esquema 17.** Rutas sintéticas para la síntesis de DKP ciclo(Lys-Gly) (**91**).

Para realizar ambas rutas de síntesis fue necesario la obtención del precursor **77a**, el cual se generó a partir de la reacción entre la glicina, TMSCl y MeOH para obtener el aminoéster correspondiente. Para la ruta 1, el compuesto **77a**, se hizo reaccionar con Fmoc-Lys(Boc)-OH (**87**) en presencia de DCC y TEA en DMF durante 3 días a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, el crudo obtenido se purificó por cromatografía por columna con un sistema eluyente hexano/AcOEt (70:30)→MeOH, y el producto obtenido se caracterizó por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  corroborándose la formación del compuesto deseado **88** con un rendimiento de 78%. En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , se observaron los protones aromáticos del grupo protector Fmoc, el metilo del amino éster de la glicina y las señales intensas de los metilos del grupo protector Boc, en 7.92-7.12, 3.74, 1.43 ppm, respectivamente.

Una vez obtenido el compuesto **88**, se implementó la ruta de la metodología descrita por Xianyu *et al.*, 2014.<sup>58</sup> Para ello, el compuesto **88** se hizo reaccionar en piperidina y DMF para desproteger el grupo Fmoc localizado en el grupo *N*-terminal de lisina. El compuesto **89** se obtuvo con un rendimiento de 85%. La obtención del compuesto **90**, consistió en la ciclación del dipéptido lineal **89** en medio ácido bajo reflujo durante 7 h. El producto **90** se obtuvo como un sólido, con un rendimiento del 28%.

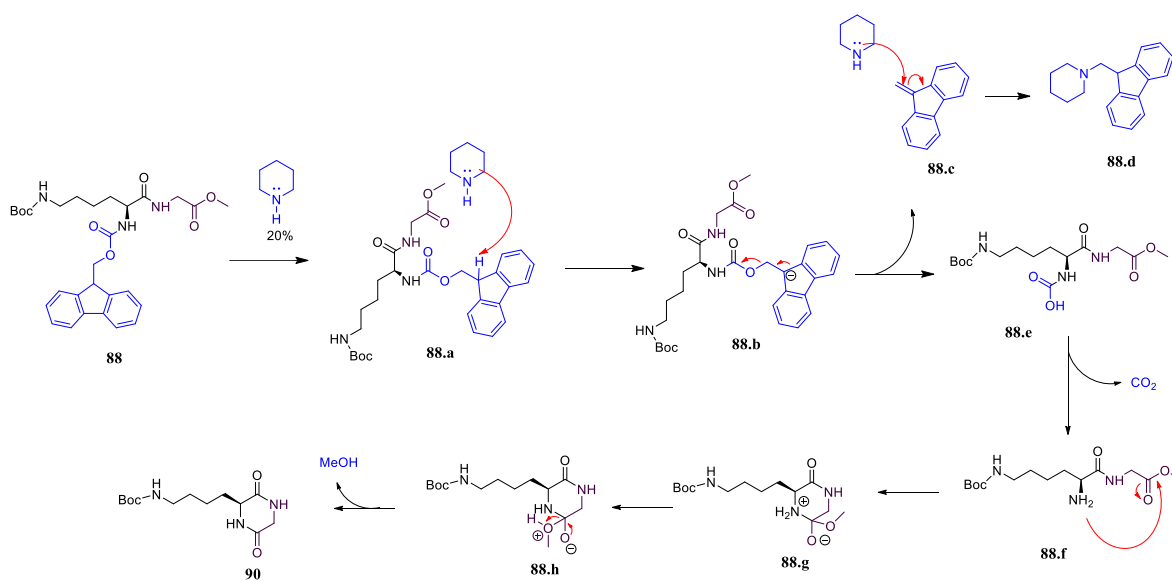
Para mejorar los rendimientos obtenidos se implementó la metodología de Manchineeella *et al.*, 2012<sup>59</sup> (Esquema 18), descrito por la ruta 2 para la síntesis de la DKP. Esta metodología consistió en la activación *in situ* del ácido carboxílico **87** que reacciona con la base orgánica **87.a** y la carbodiimida **87.c** para formar la *O*-acilisourea **87.e**, el cual es un intermediario que presenta un grupo carbonilo susceptible de ser atacado por el nucleófilo **87.d**. El subproducto generado, la urea **87.f**, es un compuesto fácilmente retirado del crudo de reacción mediante un tratamiento acuoso. Posteriormente el ester activo **87.g** es atacado en el carbonilo activado, por el grupo amino del aminoácido **77a**, generando el dipéptido lineal **88**, el cual se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento cuantitativo.



**Esquema 18.** Posible mecanismo de síntesis del dipéptido lineal **88**.

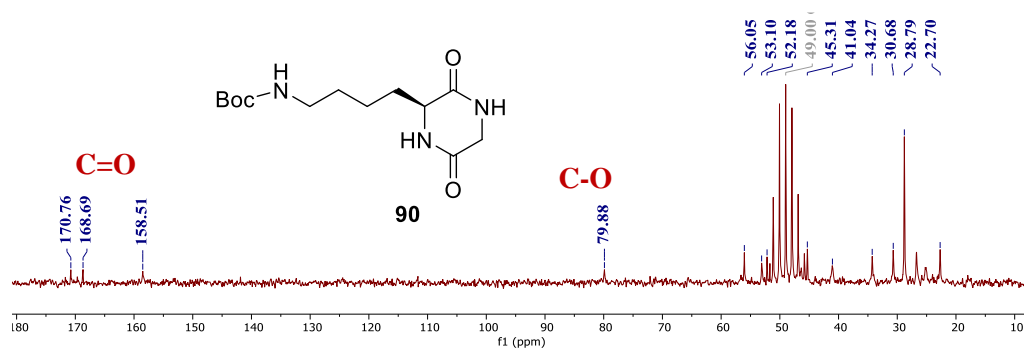
El compuesto **88** se analizó por la técnica de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para verificar la formación del dipéptido lineal. La obtención del producto cíclico **90** con el grupo amino protegido (Esquema 19), se efectuó por tratamiento del dipéptido lineal Fmoc-protegido **88** con piperidina en diclorometano, obteniéndose un sólido blanco con un rendimiento cuantitativo. El mecanismo de esta reacción procede por la abstracción del protón ácido del grupo Fmoc propiciado por la piperidina para

generar el ion estabilizado de dibenzociclopentadienuro **88b**, que al eliminarse da el lugar a dibenzofulveno **88c**. Este último es atrapado por el exceso de piperidina formando la amina terciaria **88d**. Esta eliminación conduce al ácido carbámico **88e**, que descarboxila espontáneamente, generando la amina libre **88f**, en el aminoácido *N*-terminal. Finalmente, el grupo carbonilo del residuo de glicina es atacado por el grupo amino del residuo de la lisina, para generar el ciclo[Lys(Boc)-Gly] **90**.



**Esquema 19.** Posible mecanismo de síntesis del ciclo[Lys(Boc)-Gly] **90**.

El compuesto **90** se caracterizó por RMN de  $^{13}\text{C}$  para verificar la presencia del carbonilo del grupo protector Boc y los carbonilos de amida presentes en la estructura del ciclo[Lys(Boc)-Gly] **90** (Figura 37). Los dos carbonilos de la dicetopiperazina y el carbonilo del grupo protector se observan en la región de 170.8, 168.7 y 158.5 ppm respectivamente, además se observó la absorción de un carbono de base de oxígeno en 79.9 ppm, correspondiente al C-O del grupo Boc. Además, en la región de 28.8 ppm, se distinguieron los metilos del de dicho grupo.



**Figura 37.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **90**

El compuesto **90** se hizo reaccionar con TFA en agua para desproteger el grupo amino de la cadena lateral del residuo de Lys. El crudo de reacción se extrajo con diclorometano y se obtuvo la sal del producto **91** con el ion de trifluoroacetato, como un sólido blanco con un rendimiento del 28%. En el análisis de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 38, se observaron las absorciones de los carbonilos presentes en el compuesto **91**, localizados en 173.3 y 171.0 ppm, y, además, se observaron dos señales debido al acoplamiento carbono-flúor del carbonilo del acetato, asignados en 169.2 y 166.2 ppm. Este comportamiento es un patrón característico de los compuestos con TFA.<sup>60,61</sup> Asimismo, se pueden observar los  $\text{C}_\alpha$  de Gly y Lys en 52.2 y 43.9 ppm, respectivamente. La masa del compuesto **91** se verificó por la técnica de espectrometría de masas (ESI-MS). Se observó el ion molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  con  $m/z = 186.1243$  correspondiente a la fórmula molecular del producto  $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ .

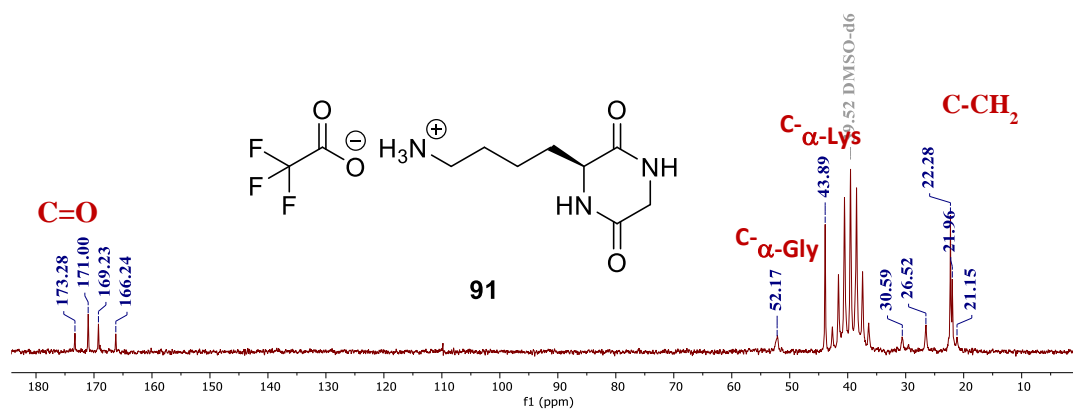


Figura 38. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los compuestos **91**.

## IX. Conclusiones

Se exploraron dos metodologías para la formación del derivado (25*R*)-26-yodo-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo diacetato (**46**), mediante la modificación estructural de la diosgenina. Durante el proceso de síntesis, se obtuvieron los derivados esteroideos; 26-OH **44**, 26-OTs **45** y 26-I **46**, con rendimientos de 61, 70 y 7%, respectivamente. El compuesto halogenado **46** se utilizó como precursor para la reacción de *N*-alquilación, dando lugar al bioconjugado **84** con un rendimiento del 33%. En dicho protocolo, el rendimiento global para formar el bioconjugado fue inferior al 1%.

Debido a los bajos rendimientos de reacción obtenidos en la ruta de *N*-alquilación del derivado **46**, se exploró la metodología en donde se involucró la oxidación del intermediario **44** y el uso del método de la carbodiimida para la formación de los bioconjugados (**86a-e**) con rendimientos globales que oscilaron entre el 18 al 30%. Estos cinco bioconjugados esteroideos aún no se han descrito en la literatura.

Los aminoésteres **77a**, **77d**, **77e** se obtuvieron con buenos rendimientos mediante el uso de clorotrimetilsilano en metanol con rendimientos mayores del 90%. Por otra parte, se implementó la reacción de Fischer como metodología para la obtención de los ésteres  $\alpha$ -aminometílicos con el grupo amino libre del aminoácido, obteniendo los productos **78b** y **78c** con rendimientos del 92 y 95%.

Además, se desarrolló una metodología para la obtención de la dicetopiperazina **91**, a partir del Fmoc-Lys(Boc)-OH (**87**) y GlyOMe (**77a**). La ruta 2 fue la mejor para la obtención del dipéptido cíclico **91**, con un rendimiento global del 28%. Esta ruta permitió la obtención de la Boc-DKP (**90**) en un solo paso, a partir del dipéptido lineal **88** con un rendimiento cuantitativo.

Este trabajo representa un paso significativo hacia la síntesis de novedosos derivados esteroide-aminoácidos con potencial actividad citotóxica que pueden ser explorados en futuras investigaciones a medida que continuemos conociendo las propiedades y aplicaciones de estas moléculas.

## X. PARTE EXPERIMENTAL

### 9.1. Síntesis de aminoéster metílico de aminoácido

#### Clorhidrato de éster metílico de glicina

**Método 1:** En un se mezcló el aminoácido de glicina (2.00 g, 26.64 mmol) y TMSCl (4.9 mL), dejándolo en agitación por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregó MeOH (20 mL) en agitación durante 15 h a temperatura ambiente. Transcurriendo el tiempo se evaporó a presión reducida y se secó al horno a 50 °C, obteniendo un producto de color blanco.

El producto del amino éster de glicina **77a**, se obtuvo con un rendimiento del 99 % (3.36 g). IR 3379  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 2881  $\text{cm}^{-1}$  (N-CH<sub>2</sub>), 1742  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1584  $\text{cm}^{-1}$ , 1499  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), 1243  $\text{cm}^{-1}$ , 1057  $\text{cm}^{-1}$  (C-N, C-O). RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  3.95 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, H-N), 3.85 (3H, s, H-OMe). RMN <sup>13</sup>C (20 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  53.3 (C-OMe), 40.0 (C-CH<sub>2</sub>), 168.6 (C-CO<sub>2</sub>Me).

#### Éster metílico de valina

**Método 2:** En un matraz de 50 mL se colocó el aminoácido valina (**76b**) (1.00 g, 8.00 mmol), luego se añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.02 mmol, 0.56 mL) y metanol (2.4 mL). La reacción se llevó a reflujo durante 2 h. Después de este tiempo, se evaporó hasta sequedad, y se repitió la adición de metanol (2.4 mL), llevándolo nuevamente al reflujo durante 2 h. Este proceso se repitió dos veces, variando el volumen de metanol a 2 mL y 1.5 mL.

Para tratar la reacción, se ajustó el pH a un rango de 3.5-5 utilizando NH<sub>4</sub>OH (0.3 mL), lo que resultó en la formación de un precipitado. Este precipitado se separó por filtración, y las aguas madres se concentraron para eliminar los disolventes obteniendo el producto **78b**. El producto presenta un aspecto amarillo y viscoso, con un rendimiento del 92% (1.03 g).

### 9.2. Síntesis de diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ , 16 $\beta$ -diilo

**Metodología 1:** En un matraz redondo, se colocó la diosgenina (2.00 g, 4.49 mmol) en diclorometano (15 mL) y Ac<sub>2</sub>O (52 mmol, 5 mL). La mezcla se enfrió a 0 °C con agitación, y luego se añadió BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub>, (4.3 mL, 35 mmol) gota a gota. La reacción se mantuvo en agitación por 20 minutos. Para finalizar la reacción, el producto crudo se transfirió a otro matraz que contenía una mezcla de agua y hielo en agitación. A esta solución se le agregó lentamente NaHCO<sub>3</sub> durante 3 h. Después de este tiempo, se realizaron lavados con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> y salmuera. Finalmente, se utilizó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para eliminar trazas de agua. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el producto se purificó, obteniendo un rendimiento del 26% (0.6 g).<sup>42</sup>

**Metodología 2:** En un matraz redondo, se colocó la diosgenina (2.00 g, 4.49 mmol) en diclorometano (DCM, 10 mL) a 0 °C. En otro matraz redondo, se preparó una mezcla de anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O, 72.3 mmol, 6.8 mL) y BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (72.3 mmol, 8.9 mL), también a 0 °C. Luego, se combinaron las soluciones de ambos matraces y se agitaron durante 5 minutos. A continuación, se añadió trietilamina (previamente enfriada a 0 °C) y se mantuvo la agitación durante 5 minutos adicionales.

El producto crudo se sometió a extracción con una solución de NH<sub>4</sub>OH y acetato de etilo (AcOEt), y luego se concentró la fase orgánica hasta la sequedad. Posteriormente, el crudo resultante se disolvió en 48 mL de diclorometano y 36 mL de ácido clorhídrico al 5%, y se dejó en agitación durante 2 horas. Después de este tiempo, se realizaron lavados con soluciones saturadas de NaHCO<sub>3</sub> (3x50mL) y salmuera (50 mL). Finalmente, se utilizó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para eliminar trazas de agua. El disolvente se evaporó a presión reducida, y el producto se purificó por cromatografía en columna.<sup>53</sup>

El producto 26-hidroxi-22-oxocolestano **44** se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de hexano/AcOEt (7:3) → hexano/AcOEt (6:4). Obteniendo un sólido blanco, rendimiento 61% (1.41 g). IR 3474 cm<sup>-1</sup> (O-H), 2934 cm<sup>-1</sup> (C-H, alifático) 1731 cm<sup>-1</sup>, 1724 cm<sup>-1</sup> (C=O, acetato), 1705 cm<sup>-1</sup> (C=O, cetona), 1445 cm<sup>-1</sup>, 1364 cm<sup>-1</sup> (=C-H, vinílico), 1234 cm<sup>-1</sup>, 1015 cm<sup>-1</sup> (C-O, éster). RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.35 (1H, d, *J*=2.4 Hz, H-6), 5.0 (1H, m, H-16), 4.55 (1H, m, H-3), 3.41 (2H, d, *J*=5.6 Hz, CH<sub>2</sub>-26), 2.63 (1H, m, H-23a), 2.39 (1H, m, H-23b), 2.02 (3H, s, 3-acetato), 1.96 (3H, s, 16-acetato), 1.14 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH<sub>3</sub>-21), 1.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 0.97 (3H, d, *J*=7.2 Hz, CH-27), 0.87(3H, s, CH-18). RMN <sup>13</sup>C (20 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 213.8 (C-22), 170.6 (CO<sub>2</sub>-3), 170.0 (CO<sub>2</sub>-16), 139.7 (C-5), 122.3 (C-6), 75.7 (C-16), 73.9 (C-3), 67.5 (C-26), 55.2 (C-17), 54.0 (C-14), 49.9 (C-9), 16.7 (C-20), 41.9 (C-13), 38.6 (C-12), 27.8 (C-23), 38.1 (C-4), 36.9 (C-1), 36.6 (C-10), 35.5 (C-25), 34.9 (C-15), 31.7 (C-7), 31.3 (C-8), 26.5 (C-2), 27.8 (C-24), 21.5 (3-acetato), 20.8 (16-acetato). 21.2 (C-11), 19.3 (C-19), 16.9 (C-27), 43.6 (C-21), 13.3 (C-18). ESI(+)-HRMS: Calculado para C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 517.3529; observado; *m/z* 517.3521.

### 9.3. Síntesis de diacetato de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3β,16β,26-triilo-26 tosilato

En un matraz de fondo redondo de 100 mL forrado de papel aluminio se colocó el compuesto **44** (1.00 g, 1.94 mmol) en 10 mL de DCM y se le fue añadiendo el *p*-TsCl (1.68 g, 8.83 mmol), piridina (1.45 mL 18.33 mmol) y cantidades catalíticas de DMAP. La reacción se llevó a -5°C con atmósfera de argón durante 10 h, transcurrido dicho tiempo, se realizaron lavados con HCl al 5% (50 mLx3), posterior a esto se realizaron lavados con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50 mLx2) y para eliminar trazas de agua se utilizó el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, el disolvente se removió a presión reducida, el producto 26-tosiloxi-22-oxocolestano (**45**) se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de Hexano/AcOEt (7:3). Rendimiento 72% (0.91 g). IR 2934 cm<sup>-1</sup> (C-H, C=C-H, alifático, aromático)

1732  $\text{cm}^{-1}$ , 1726  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, acetato), 1708  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, cetona), 1456  $\text{cm}^{-1}$ , 1362  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H, vinílico), 1247  $\text{cm}^{-1}$ , 1037  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, éster), 941  $\text{cm}^{-1}$ , 683  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H, aromático). RMN  $^1\text{H}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.88 - 7.23 (4H, m, H-Ar), 5.32 (1H, d,  $J = 4.1$  Hz, H-6), 5.45-4.75 (1H, m, H-16), 4.77- 4.30 (1H, m, H-3), 3.80 (2H, dd,  $J = 5.6, 2.6$  Hz, H-26), 2.45 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -Ts), 2.02 (3H, s, 3-acetato), 1.93 (3H, s, 16-acetato), 1.14 (3H, d,  $J=7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.02 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), 0.88 (3H, d,  $J=6.8$  Hz,  $\text{CH}_3$ -27), 0.87 (3H, s, CH-18). RMN  $^{13}\text{C}$  (20 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  212.2 (C-22), 170.2 ( $\text{CO}_2$ -3), 169.5 ( $\text{CO}_2$ -16), 139.5 (C-5), 122.0 (C-6), 75.6 (C-16), 73.6 (C-3), 74.6 (C-26), 54.9 (C-17), 53.8 (C-14), 49.6 (C-9), 16.2 (C-20), 41.7 (C-13), 39.5 (C-12), 39.6 (C-23), 37.9 (C-4), 32.3 (C-25), 36.7 (C-1), 34.7 (C-15), 31.3 (C-7), 31.1 (C-8), 26.2 (C-2), 27.6 (C-24), 21.3 (3-acetato), 20.6 (16-acetato), 20.9 (C-11), 19.2 (C-19), 16.6 (C-27), 43.3 (C-21), 13.1 (C-18), 144.7 (C-*ipso*), 127.7 (C-*ortho*), 129.8 (C-*meta*), 132.9 (C-*para*). ESI(+)-HRMS: Aducto calculado con el ion sodio y ion amonio del  $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{O}_8\text{S}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+ = m/z$  693.3491 y  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = m/z$  688.3879.

#### 9.4. Síntesis de diacetato de (25R)-26-yodo-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo

En un matraz de bola, se mezcló a **45** ( 0.65 g, 0.97 mmol) con KI (1.64 g, 9.88 mmol) en acetona (50 mL). La mezcla se llevó a reflujo por 10 h. Transcurrido el tiempo, se concentró para eliminar el exceso de acetona y posteriormente el crudo se disolvió en DCM realizando 2 lavados con solución al 5%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (50 mLx2), lavados con agua (50 mLx3) y para eliminar trazas de agua se utilizó en  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, el disolvente se removió a presión reducida. El producto obtenido se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de Hexano/AcOEt (9:1). Rendimiento 7% (0.120 g).

El producto 26-yodo-22-oxocolestano (**46**) se purificó por cromatografía en columna utilizando una mezcla de hexano/AcOEt (9:1). Sólido blanco, rendimiento 7% (0.122 g). IR 2936  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, alifático) 1733  $\text{cm}^{-1}$ , 1725  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, acetato), 1705  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, cetona), 1446  $\text{cm}^{-1}$ , 1378  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H, vinílico), 1235  $\text{cm}^{-1}$ , 1041  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, éster). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.39 (1H, d,  $J = 4.8$  Hz, H-6), 4.96 (1H, m, H-16), 4.58 (1H, m, H-3), 3.19 (2H, dd,  $J = 4.4$  Hz, H-26) 2.03 (3H, s, 16-acetato), 1.97 (3H, s, 3-acetato), 1.42 (3H, d,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1.02 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), 0.97 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ -27), 0.87 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18). RMN de  $^{13}\text{C}$  (20 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  37.0 (C-1), 27.8 (C-2), 73.9 (C-3), 38.2 (C-4), 139.7 (C-5), 122.3 (C-6), 31.3 (C-7), 30.1 (C-8), 49.9 (C-9), 36.7 (C-10), 21.3 (C-11), 39.7 (C-12), 42.0 (C-13), 54.0 (C-14), 34.3 (C-15), 75.8 (C-16), 55.2 (C-17), 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 16.9 (C-20), 43.7 (C-21), 212.5 (C-22), 38.3 (C-23), 30.5 (C-24), 35.0 (C-25), 16.8 (C-26), 20.8 (C-27), 170.6 ( $\text{CO}_2$ -3), 169.8 ( $\text{CO}_2$ -16), 21.5 (3-acetato), 20.5 (16-acetato). ESI(+)-HRMS: Calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{47}\text{IO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$  627.2535, observado;  $m/z$  627.2543.

### 9.5. Síntesis de diacetato de (25*R*)-26-(*N*-PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo

En un matraz de bola se mezcló el compuesto **46** (122 mg, 0.19 mmol) y el clorhidrato de L-fenilalanina metil éster **77d** (1.36 g 7.6 mmol) en Acetonitrilo (7 mL) a reflujo por 8 h. Una vez transcurrido el tiempo de la reacción, el acetonitrilo fue evaporado a presión reducida y se disolvió con DCM (45 mL) con una solución al 2% de HCl (20 mL). Además, se realizaron los lavados con solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (50mLx2), salmuera (50mLx1) y agua (50mL). Para eliminar trazas de agua se utilizó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, el disolvente se removió a presión reducida.

El producto de diacetato de (25*R*)-26-*N*-(PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo **84** se purificó por cromatografía en columna en el sistema hexano/AcOEt (8:2). Sólido ligeramente blanco, rendimiento 33% (36 mg). IR 2937 cm<sup>-1</sup> (C-H, C=C-H, alifático, aromático), 1727 cm<sup>-1</sup> (C=O, acetato), 1705 cm<sup>-1</sup> (C=O, cetona), 1456 cm<sup>-1</sup>, 1377 cm<sup>-1</sup> (=C-H, vinílico), 1246 cm<sup>-1</sup>, 1023 cm<sup>-1</sup> (C-O, éster), 956 cm<sup>-1</sup>, 698 cm<sup>-1</sup> (=C-H, aromático). RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.23 (5H, m, H-Ar), 5.38 (1H, d, *J* = 4.4 Hz, H-6), 5.00 (1H, dd, *J* = 7.7, 3.9 Hz, H-16), 4.54 (1H, m, H-3), 3.63 (3H, s, H-OMeGly), 3.47 (1H, dd, *J* = 7.5, 6.3 Hz, H- $\alpha$ ), 2.97 (2H, d, *J* = 6.9, H- $\beta$ ), 2.03 (3H, s, 16-acetato), 1.94 (3H, s, 3-acetato), 1.65 (3H, d, *J* = 7.2 Hz, H-21), 1.02 (3H, s, H-18), 0.86 (3H, s, H-19). RMN <sup>13</sup>C (20 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  37.0 (C-1), 27.8 (C-2), 73.4 (C-3), 38.1 (C-4), 139.7 (C-5), 122.4 (C-6), 31.5 (C-7), 30.8 (C-8), 49.9 (C-9), 36.6 (C-10), 21.2 (C-11), 39.7 (C-12), 41.9 (C-13), 54.0 (C-14), 34.9 (C-15), 75.7 (C-16), 55.2 (C-17), 13.3 (C-18), 19.4 (C-19), 16.8 (C-20), 43.6 (C-21), 213.1 (C-22), 39.3 (C-23), 29.8 (C-24), 33.3 (C-25), 54.4 (C-26), 17.9 (C-27), 170.6 (CO<sub>2</sub>-16), 169.7 (CO<sub>2</sub>-3), 21.5 (16-acetato), 20.8 (3-acetato). 175.5 (C-CO<sub>2</sub>-Phe), 51.4 (C-OMePhe), 135.7 (C-ipso), 129.2 (C-ortho), 128.4 (C-meta), 126.7 (C-para). ESI(+)-HRMS: Calculado para C<sub>41</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 678.4370, observado; *m/z* 678.4371.

### 9.6. Síntesis del ácido 3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,-diacetoxi-22-oxocolest-eno-26-oico

Preparación del reactivo de Jones a 2.19 M: En un vaso de precipitado provisto de agitación magnética, se colocó CrO<sub>3</sub> (1.00 g, 10.00 mmol), y se adicionó con mucha precaución gota a gota H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (0.86 mL). La mezcla anterior se diluyó con H<sub>2</sub>O destilada a un volumen final de 3.7 mL manteniendo el vaso de precipitado en un baño de hielo por un tiempo de 30 min.

Preparación del compuesto **85**: En un matraz balón de 50 mL provisto de agitación magnética a temperatura ambiente, se disolvió el compuesto **44** (0.84 g, 1.62 mmol), en una mezcla de DCM/acetona (10 mL/15 mL), mezcla traslúcida.<sup>56</sup> A la disolución del esteroide se le añadió el reactivo de Jones recién preparado gota a gota (4.56 mL). La reacción se monitoreó cada 10 minutos con ayuda de CCF utilizando una mezcla de disolventes Hexano/AcOEt (1:1), hasta observar por

placa que el esteroide se consumió por completo (30 min). Para inactivar la reacción se añadió isopropanol poco a poco hasta que ocurrió un cambio de coloración en la reacción, de naranja a verde.

La mezcla de reacción se filtró al vacío empleando un matraz Kitazato y un embudo con filtro de vidrio que contenía sílica gel como fase estacionaria. El crudo de la reacción se arrastró con ayuda de AcOEt y, por último, en un matraz balón previamente pesado se retiró el exceso de disolvente con ayuda de un rotavapor y se purificó por CC.

El producto **85** se purificó por cromatografía en columna en el sistema hexano/AcOEt (6:4). Sólido blanco, rendimiento 53% (0.43 g). IR 2936  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, alifático) 1739  $\text{cm}^{-1}$ , 1726  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, acetato), 1708  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, cetona), 1446  $\text{cm}^{-1}$ , 1361  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H, vinílico), 1236  $\text{cm}^{-1}$ , 1041  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, éster). RMN  $^1\text{H}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.36(1H, d,  $J = 4.3$  Hz, H-6); 4.97 (1H, s, H-16); 4.59 (1H, s, H-3); 2.03 (3H, s, 3-acetato); 2.03 (3H, s, 16-acetato); 1.96 (1H, m, H-17); 1.84 (2H, m, H-24); 1.27 (1H, m H-12a); 1.18 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-27); 1.15 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-21); 1.02 (1H, s, H-19); 0.86 (3H, s, H-18); RMN  $^{13}\text{C}$  (125.77 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  212.5 (C-22); 181.3 (C-26); 170.7 (CO<sub>2</sub>-3); 170.1 (CO<sub>2</sub>-16); 139.8 (C-5); 122.4 (C-6); 75.5 (C-16); 74.0 (C-3); 55.2 (C-17); 54.1 (C-14); 49.9 (C-9); 16.9 (C-20); 42.0 (C-13); 38.6 (C-12); 39.7 (C-25); 38.2 (C-4); 27.8 (C-23); 37.0 (C-1); 36.7 (C-10); 35.0 (C-15); 31.7 (C-7); 31.4 (C-8); 27.0 (C-2); 27.8 (C-24); 21.5 (16-acetato); 20.8 (3-acetato); 21.2 (C-11); 19.4 (C-19); 17.1 (C-27); 43.6 (C-21); 13.3 (C-18). ESI(-)-HRMS: Calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$  529.3165, observado;  $m/z$  529.3167.

## 9.7. Síntesis de los bioconjugados esteroidales-aminoácidos (86a – e)

### Síntesis del diacetato de (25R)-25-carbamoil-(N-GlyOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo

En un matraz bola de 30 mL se colocó el compuesto **85** (150 mg, 0.29 mmol), con EDC·HCl (0.08 g, 0.44 mmol), DMAP (0.0127 g, 0.1 mmol), en DCM (5 mL) a 0 °C en agitación por 5 min, transcurrido el tiempo se adicionó el aminoéster **78b** (0.08 g, 0.58 mmol), y TEA (80  $\mu\text{L}$ , 0.58 mmol), la cual se dejó por una 1 h en agitación en baño de hielo y posteriormente se dejó en agitación 24 h a temperatura ambiente. La reacción fue monitoreada por CCF, transcurrido el tiempo se le realizó la extracción con solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3 x 30 mL).

### Caracterización de los productos 86a – e

El diacetato de (25R)-25-carbamoil-(N-GlyOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**86a**) se purificó por cromatografía en columna en el sistema hexano/AcOEt (6:4). Sólido blanco, rendimiento 92% (0.66 mg). IR 3313  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 2935  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, alifático) 1749  $\text{cm}^{-1}$ , 1728  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, acetato), 1702  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, cetona), 1641  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, amida), 1554  $\text{cm}^{-1}$  (N-H, C-N), 1435  $\text{cm}^{-1}$ , 1379  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H, vinílico), 1209  $\text{cm}^{-1}$ , 1039  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, éster). RMN de  $^1\text{H}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.4 (1H, t,  $J=5.4$  Hz,

H-NH); 5.36 (1H, d,  $J = 3.9$  Hz, H-6); 4.97 (1H, dt,  $J=7.8, 4.2$  Hz, H-16); 4.85-4.24 (1H, m H-3); 4.02 (2H, d,  $J = 5.4$  Hz, H- $\alpha$ ); 3.75 (3H, s, H-OMe); 2.03 (3H, m, H-16-acetato); 1.96 (3H, m, H-3-acetato); 1.02 (3H, s, H-19); 0.88 (3H, s, H-18). RMN  $^{13}\text{C}$  (20 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  213.2 (C-22); 176.3 (C-26); 170.1 (C-28) 170.1 (CO<sub>2</sub>-16); 170.1 (CO<sub>2</sub>-3); 139.6 (C-5); 122.2 (C-6); 75.5 (C-16); 73.8 (C-3); 55.1 (C-17); 53.9 (C-14); 49.8 (C-9); 43.6 (C-20); 41.9 (C-13); 41.0 (C- $\alpha$ ); 39.9 (C-12); 39.9 (C-25); 38.0 (C-4); 39.5 (C-23); 36.8 (C-1); 36.5 (C-10); 34.8 (C-15); 31.5 (C-7); 31.2 (C-8); 27.6 (C-2); 27.9 (C-24); 21.3 (3-acetato); 20.6 (16-acetato); 21.1 (C-11); 19.2 (C-19); 17.5 (C-27); 16.6 (C-21); 13.1 (C-18). ESI(+)-HRMS: Calculado para  $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{NO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$  602.3693, observado;  $m/z$  602.3691.

El diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-ValOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**86b**) se purificó por cromatografía en columna en el sistema hexano/AcOEt (6:4). Sólido ligeramente amarillo, rendimiento 56%. IR 3301  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 2936  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, alifático) 1729  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, acetato), 1705  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, cetona), 1647  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, amida), 1536  $\text{cm}^{-1}$  (N-H, C-N), 1446  $\text{cm}^{-1}$ , 1376  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H, vinílico), 1245  $\text{cm}^{-1}$ , 1023  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, éster). RMN de  $^1\text{H}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.15 (1H, t,  $J=8.8$  Hz, H-NH); 5.35 (1H, d,  $J = 6.3$  Hz, H-6); 4.96 (1H, m, H-16); 4.73-4.33 (1H, m H-3); 4.22 (2H, d,  $J = 5.3$  Hz, H- $\alpha$ ); 3.75 (3H, s, H-OMe); 2.03 (3H, m, H-3-acetato); 1.95 (3H, m, H-16-acetato); 1.03 (3H, s, H-19); 0.87 (3H, s, H-18). RMN  $^{13}\text{C}$  (20 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  212.9 (C-22); 175.9 (C-26); 172.7 (C-28); 170.6 (CO<sub>2</sub>-3); 169.9 (CO<sub>2</sub>-16); 139.7 (C-5); 122.3 (C-6); 75.6 (C-16); 73.9 (C-3); 57.0 (C-17); 52.1 (C-14); 49.8 (C-9); 43.5 (C-20); 41.9 (C-13); 55.2 (C- $\alpha$ ); 39.9 (C-12); 40.3 (C-25); 36.0 (C-4); 39.6 (C-23); 36.0 (C-1); 36.6 (C-10); 34.8 (C-15); 31.6 (C-7); 31.3 (C-8); 31.1 (C- $\beta$ ); 27.7 (C-2); 28.1 (C-24); 21.4 (16-acetato); 20.7 (3-acetato); 21.1 (C-11); 19.3 (C- $\gamma$ ); 16.7 (C-19); 17.9 (C-27); 17.3 (C-21); 13.2 (C-18). ESI(+)-HRMS: Calculado para  $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{NO}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = m/z$  644.4162, observado;  $m/z$  644.4153.

El diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-LeuOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**86c**) se purificó por cromatografía en columna en el sistema hexano/AcOEt (6:4). Sólido ligeramente amarillo, rendimiento 74%. IR 3295  $\text{cm}^{-1}$  (N-H), 2936  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, alifático) 1729  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, acetato), 1704  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, cetona), 1647  $\text{cm}^{-1}$  (C=O, amida), 1538  $\text{cm}^{-1}$  (N-H, C-N), 1446  $\text{cm}^{-1}$ , 1376  $\text{cm}^{-1}$  (=C-H, vinílico), 1244  $\text{cm}^{-1}$ , 1024  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, éster). RMN  $^1\text{H}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.09 (1H, t,  $J=8.3$  Hz, H-NH); 5.36 (1H, d,  $J = 3.0$  Hz, H-6); 5.14-4.95 (1H, m, H-16); 4.79-4.37 (1H, m H-3); 4.22 (2H, d,  $J = 5.3$  Hz, H- $\alpha$ ); 3.72 (3H, s, H-OMe); 2.03 (3H, m, H-16-acetato); 1.95 (3H, m, H-3-acetato); 1.03 (3H, s, H-19); 0.87 (3H, s, H-18). RMN  $^{13}\text{C}$  (20 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  213.3 (C-22); 175.9 (C-26); 173.7 (C-28); 170.6 (CO<sub>2</sub>-16); 170.0 (CO<sub>2</sub>-3); 139.7 (C-5); 122.3 (C-6); 75.6 (C-16); 73.9 (C-3); 55.2 (C-

17); 54.0 (C-14); 49.8 (C-9); 43.7 (C-20); 41.9 (C-13); 50.6 (C $\alpha$ ); 39.9 (C-12); C- $\beta$  (41.4); 40.3 (C-25); 38.1 (C-4); 39.7 (C-23); 36.9 (C-1); 36.6 (C-10); 34.8 (C-15); 31.7 (C-7); 31.3 (C-8); 27.9 (C-2); 27.7 (C-24); 25.0 (C- $\gamma$ ); 22.8 (C- $\delta$ ); 22.0 (16-acetato); 21.1 (3-acetato); 21.1 (C-11); 19.3 (C-19); 17.4 (C-27); 16.7 (C-21); 13.2 (C-18). ESI(+)-HRMS: Calculado para C<sub>38</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 658.4319, observado; *m/z* 658.4331.

El diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**86d**) se purificó por cromatografía en columna en el sistema hexano/AcOEt (6:4). Sólido ligeramente amarillo, rendimiento 73%. IR 3304 cm<sup>-1</sup> (N-H), 2931 cm<sup>-1</sup> (C-H, alifático) 1729 cm<sup>-1</sup> (C=O, acetato), 1674 cm<sup>-1</sup> (C=O, cetona), 1659 cm<sup>-1</sup> (C=O, amida), 1554 cm<sup>-1</sup> (N-H, C-N), 1460 cm<sup>-1</sup>, 1338 cm<sup>-1</sup> (=C-H, vinílico), 1247 cm<sup>-1</sup>, 1025 cm<sup>-1</sup> (C-O, éster), 801 cm<sup>-1</sup>, 698 cm<sup>-1</sup> (=C-H). RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.40-6.90 (5H, m, H-Ar); 5.97 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-NH); 5.36 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-6); 5.20-4.49 (1H, m, 4.2 Hz, H-16); 4.70-4.40 (1H, m H-3); 4.22 (1H, d, *J* = 5.5 Hz, H- $\alpha$ ); 3.72 (3H, s, H-OMe); 2.03 (3H, m, H-16-acetato); 1.94 (3H, m, H-3-acetato); 1.03 (3H, s, H-19); 0.87 (3H, s, H-18). RMN <sup>13</sup>C (20 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 212.6 (C-22); 175.5 (C-26); 172.2 (C-28); 170.5 (CO<sub>2</sub>-16); 169.8 (CO<sub>2</sub>-3); 139.7 (C-5); 122.2 (C-6); 75.6 (C-16); 73.9 (C-3); 55.0 (C-17); 52.8 (C-14); 49.7 (C-9); 43.4 (C-20); 41.8 (C-13); 53.9 (C $\alpha$ ); 40.2 (C-25); 38.0 (C-4); 39.6 (C-23); 36.8 (C-1); 36.5 (C-10); 34.8 (C-15); 31.6 (C-7); 31.2 (C-8); 27.7 (C-2); 27.7 (C-24); 21.3 (16-acetato); 20.7 (3-acetato); 21.1 (C-11); 19.2 (C-19); 17.4 (C-27); 16.6 (C-21); 13.2 (C-18). 136.1 (C-*ispa*); 129.2 (C-*orto*); 128.6 (C-*meta*) 127.1 (C-*para*). ESI(+)-HRMS: Calculado para C<sub>41</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 692.4162, observado; *m/z* 692.4149.

El diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-TrpOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**86e**) se purificó por cromatografía en columna en el sistema hexano/AcOEt (6:4). Sólido ligeramente blanco, rendimiento 93%. IR 3304 cm<sup>-1</sup> (N-H), 2936 cm<sup>-1</sup> (C-H, alifático) 1727 cm<sup>-1</sup> (C=O, acetato), 1707 cm<sup>-1</sup> (C=O, cetona), 1651 cm<sup>-1</sup> (C=O, amida), 1535 cm<sup>-1</sup> (N-H, C-N), 1459 cm<sup>-1</sup>, 1375 cm<sup>-1</sup> (=C-H, vinílico), 1237 cm<sup>-1</sup>, 1039 cm<sup>-1</sup> (C-O, éster), 826 cm<sup>-1</sup>, 799 cm<sup>-1</sup>, 741 cm<sup>-1</sup> (=C-H). RMN <sup>1</sup>H (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.75-6.88 (5H, m, H-Ar); 6.27 (1H, d, *J*=7.7 Hz, H-NH); 5.36 (1H, d, *J* = 4.3 Hz, H-6); 5.14-4.70 (1H, m, H-16); 4.67-4.40 (1H, m H-3); 4.21 (1H, d, *J* = 6.2 Hz, H- $\alpha$ ); 3.68 (3H, s, H-OMe); 2.03 (3H, m, H-16-acetato); 1.94 (3H, m, H-3-acetato); 1.03 (3H, s, H-19); 0.87 (3H, s, H-18). RMN <sup>13</sup>C (20 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  213.2(C-22); 175.8 (C-26); 172.7 (C-28); 170.6 (CO<sub>2</sub>-16); 170.4 (CO<sub>2</sub>-3); 139.7 (C-5); 122.3 (C-6); 75.6 (C-16); 73.9 (C-3); 55.1 (C-17); 54.0 (C-14); 49.8 (C-9); 43.7 (C-20); 42.0 (C-13); 52.6 (C- $\alpha$ ); 39.9 (C-25); 38.1 (C-4); 39.6 (C-23); 36.9 (C-1); 36.5 (C-10); 34.7 (C-15); 31.6 (C-7); 31.2 (C-8); 27.7 (C-24); 21.4 (16-acetate); 20.7 (3-acetate); 21.1 (C-11); 19.3 (C-19); 17.0

(C-27); 16.7 (C-21); 13.2 (C-18); 27.7 (C-β); 136.3 (C-7a); 127.5 (C-3a); 123.3 (C-2'); 122.1 (C-6'); 119.5 (C-5'); 118.5 (C-4'); 111.5(C-7') 109.7 (C-3'). ESI(+)-HRMS: Calculado para C<sub>43</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> = *m/z* 731.4271, observado; *m/z* 731.4266.

### 9.8. Ruta 1. Síntesis del ciclo(Lys-Gly)

**Preparación del Fmoc-Lys(Boc)-GlyOMe (88).** En un matraz bola se colocó el compuesto de clorhidrato de glicina **77a** (0.53 g, 4.26 mmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (1.00 g, 2.13 mmol), diciclohexilcarbodiimida (DCC) (0.88 g, 4.26 mmol) en DCM (10 mL), una vez obtenida la mezcla se le agregó TEA (600 μL). la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 días. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se filtró por una cama de zeolita realizando los lavados de DCM (10 mLx4), a la solución filtrada se le realizaron extracciones con una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl. (50 mLx2). El disolvente del crudo de reacción se removió a presión reducida y se purificó por cromatografía en columna con un sistema Hexano/AcOEt (8:2)→MeOH(1) . El producto **88** se obtuvo con un rendimiento 78% (0.90 g).

**Preparación del Lys(Boc)-GlyOMe (89).** En un matraz de bola de 30 mL se colocó el compuesto **88** (1.00 g, 1.85 mmol), en DMF (8 mL) y piperidina (2 mL), la reacción se mantuvo en agitación por 2 h a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se adicionó agua (10 mL) y se realizó la extracción con el sistema AcOEt/hexano (9:1), (20 mLx2). Obteniendo un sólido blanco, con un rendimiento del 85% (0.5 g).

**Preparación del ciclo[Lys(Boc)-GlyOMe] (90).** En un matraz de bola de 50 mL se colocó el compuesto **89** (0.5 g, 1.58 mmol) en diclorometano (20 mL) y 3 gotas de AcOH glacial, la reacción se llevó a reflujo por 7 h. Transcurrido el tiempo de reacción. El crudo de la reacción se filtró y se llevó a concentrar a presión reducida. Posteriormente se purificó por cromatografía por columna en un sistema hexano/AcOEt (6:4). Se obtuvo un sólido ligeramente amarillo con un rendimiento del 28% (128 mg).

### 9.9. Ruta 2. Síntesis del ciclo(Lys-Gly)

**Preparación del Fmoc-Lys(Boc)-GlyOMe (88).** En un matraz de bola de 100 mL se colocó el compuesto **87** (2.00 g, 4.26 mmol), adicionando EDC·HCl (70 mg, 4.26 mmol), HOBt (98 mg, 4.26 mmol) en DCM (50 mL) a 0 °C a 10 min, transcurrido el tiempo se le adicionó el compuesto **77a** (54 mg, 4.26 mmol, 20.6 mg) y DIPEA (13.8 mmol, 2.4 mL), la mezcla se dejó en agitación a 0 °C por 1 h. Posteriormente, la mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente por 4 h. La reacción fue monitoreada por CCF y transcurrido el tiempo la reacción se evaporó a sequedad y se extrajo con DCM (30 mLx2) y se realizó el lavado con agua destilada (50 mL), se secó con NaSO<sub>4</sub> para eliminar

las trazas de agua, se removió el disolvente a presión reducida y el crudo **88** se caracterizó por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

El producto **88** se obtuvo un sólido blanco con un rendimiento cuantitativo (3.09 g, crudo). IR  $3297\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $2937\text{ cm}^{-1}$  (C-H, alifático)  $1739\text{ cm}^{-1}$  (C=O, acetato),  $1682\text{ cm}^{-1}$  (C=O, carbamato),  $1650\text{ cm}^{-1}$  (C=O, amida),  $1530\text{ cm}^{-1}$  (N-H, C-N),  $1447\text{ cm}^{-1}$ ,  $1366\text{ cm}^{-1}$  (-CH<sub>2</sub>-),  $1233\text{ cm}^{-1}$ ,  $1033\text{ cm}^{-1}$  (C-O, éster),  $737\text{ cm}^{-1}$ ,  $658\text{ cm}^{-1}$  (=C-H). RMN  $^1\text{H}$  (80 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.85–7.12 (m, 8H, H-Ar), 6.87 (s, H, Lys-N-H), 5.53 (d,  $J = 7.9\text{ Hz}$ , 1H, H-N-Gly), 4.34 (s, 1H, H-1), 4.02 (d,  $J = 6.1\text{ Hz}$ , 2H, H-2), 3.74 (s, 3H, H-Me-Gly), 3.11 (d,  $J = 6.1\text{ Hz}$ , 2H, H- $\delta$ ). RMN  $^{13}\text{C}$  (20 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.8 (C=O-Lys), 170.3 (C=O-Gly), 156.4 (C=O-Fmoc), 156.4 (C=O-Boc), 143.8, 141.8, 127.7, 127.1, 125.1, 110.0 (C-Ar), 78.8 (C-O-Boc), 67.1 (C-O-Fmoc), 54.7 (C- $\alpha$ -Lys), 52.2 (C-OMeGly), 40.01 (C- $\alpha$ -Gly), 28.4 (C-tert-Boc). ESI(+)-HRMS: Calculado para C<sub>29</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> =  $m/z$  562.2529, observado;  $m/z$  562.2529.

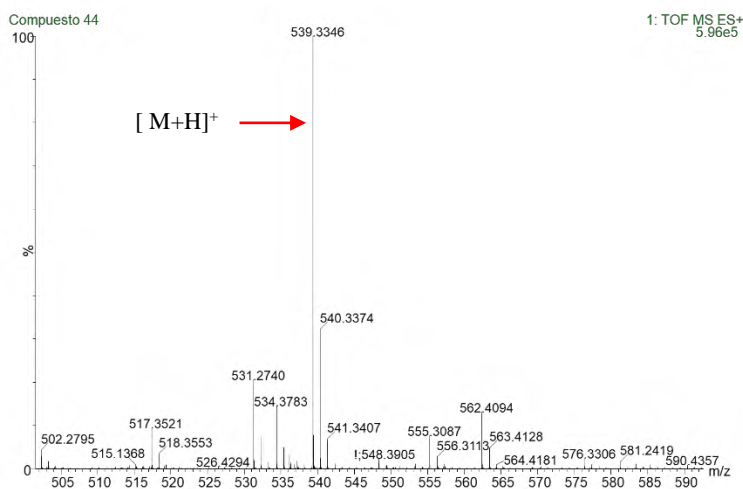
**Preparación del ciclo[Lys(Boc)-Gly] (90).** El crudo Fmoc-Lys(Boc)-GlyOMe (**88**) se utilizó de manera directa sin previa purificación para la obtención del producto **90**. En un matraz de bola de 100 mL se colocó el compuesto **88** (2.30 g, 4.26 mmol), piperidina-DCM (14mL/56 mL), la mezcla se dejó en agitación magnética durante 24 h, el progreso de la reacción se monitorio mediante CCF, transcurrido el tiempo de reacción se realizaron los lavados con una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl en DCM (3 x 50 mL). El disolvente se removió por presión reducida, el producto se disolvió en MeOH para precipitar los compuestos insolubles. Posteriormente, se filtró, y a la solución filtrada se le removió el disolvente para poder ser caracterizado por RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obteniendo las señales significativas como son los carbonilos y los protones correspondiente al grupo Boc. Obteniendo un rendimiento cuantitativo sin previa purificación (1.68 g).

RMN de  $^1\text{H}$  (80 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  4.08- 3.91(3H, m H $\alpha$ ), 3.1 -2.8 (2H, m, H- $\epsilon$ Lys) 2.1-1.2 (15H, m, H-tert,  $\alpha,\beta,\delta,\gamma$ -Lys). RMN  $^{13}\text{C}$  (20 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  170.7 (C=O-Lys), 168.6 (C=O-Gly), 158.5 (C=O-Boc), 78.8 (C-O-Boc), 56.0 (C- $\alpha$ -Lys), 45.3 (C- $\alpha$ -Lys), 41.0 (C- $\epsilon$ -Lys), 34.2 (C- $\delta$ -Lys), 30.7 (C- $\beta$ -Lys), 28.8 (C-tert-Boc), 22.7(C- $\gamma$ -Lys).

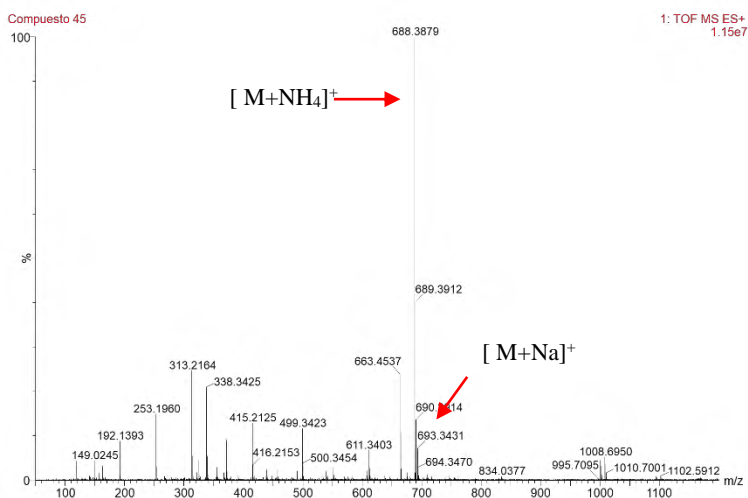
**Preparación del ciclo(Lys-Gly) (91):** Se utilizó el crudo ciclo[(Lys(Boc)-Gly] (**90**), el cual se disolvió en ácido trifluoroacético-agua (2:1, 73 mL), la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h, la mezcla de reacción se evaporó a sequedad y se evaporó con tolueno para obtener el producto **91**, un sólido blanco, con rendimiento 28% (0.23 g). IR  $3364\text{ cm}^{-1}$  (N-H),  $2934\text{ cm}^{-1}$  (C-H, alifático),  $1678\text{ cm}^{-1}$  (C=O, amida),  $1522\text{ cm}^{-1}$  (N-H, C-N),  $1467\text{ cm}^{-1}$ ,  $1366\text{ cm}^{-1}$  (-CH<sub>2</sub>-). RMN  $^1\text{H}$  (80 MHz, DMSO-d)  $\delta$  4.08- 3.91(3H, m H $\alpha$ ), 3.1 -2.8 (2H, m, H- $\epsilon$ -Lys) 2.1-1.2 (15H, m,

H-tert,  $\alpha,\beta,\delta,\gamma$ -Lys). RMN  $^{13}\text{C}$  (20 MHz, DMSO-d)  $\delta$  171.0. (CO<sub>2</sub>-Lys), 169.2 (CO<sub>2</sub>-Gly), 52.0 (C $\alpha$ -Lys), 43.9 (C $\alpha$ -Gly), 38.5 (C $\epsilon$ -Lys), 30.6 (C $\beta$ -Lys), 26.5 (C $\delta$ -Lys), 22.2 (C $\gamma$ -Lys). ESI(+)-HRMS: Calculado para C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> =  $m/z$  186.1243, observado;  $m/z$  186.1252.

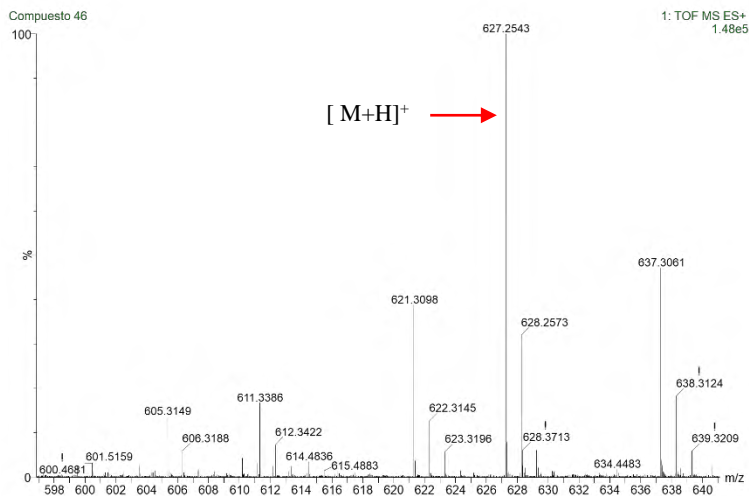
## XI. ANEXO



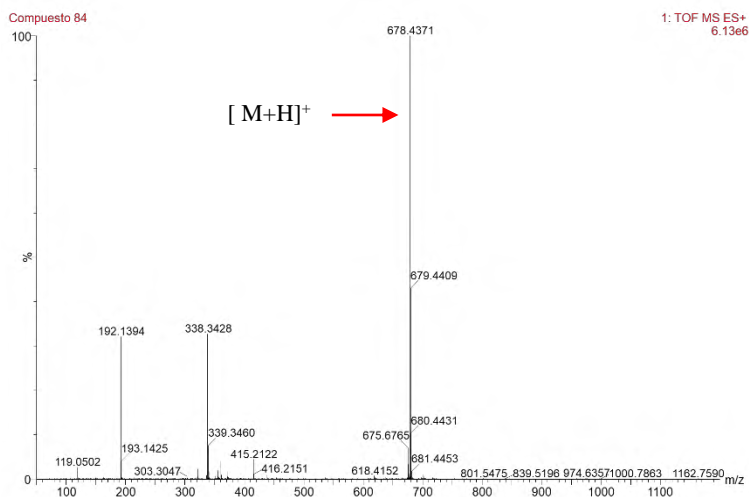
**Espectro 1.** ESI(+)-HRMS del compuesto diacetato de (25*R*)-26-hidroxi-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ , 16 $\beta$ -diilo (**44**).



**Espectro 2.** ESI(+)-HRMS del compuesto diacetato de (25*R*)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,26-triilo-26-tosilato (**45**).

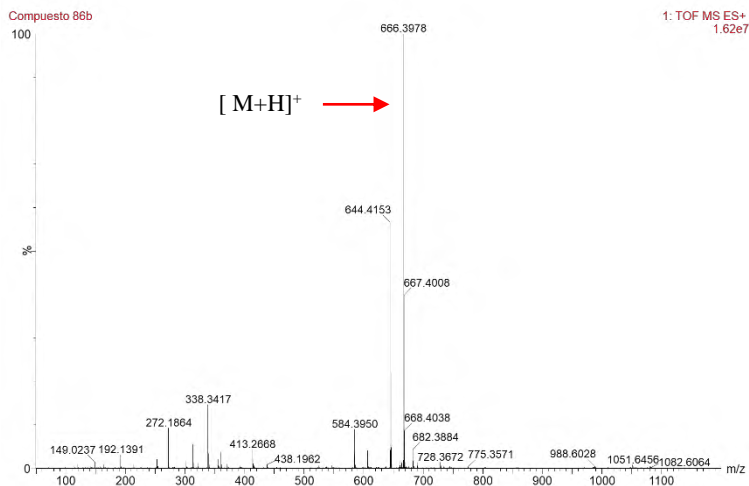


**Espectro 3.** ESI(+)-HRMS del compuesto diacetato de(25*R*)-26-yodo-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo (46).

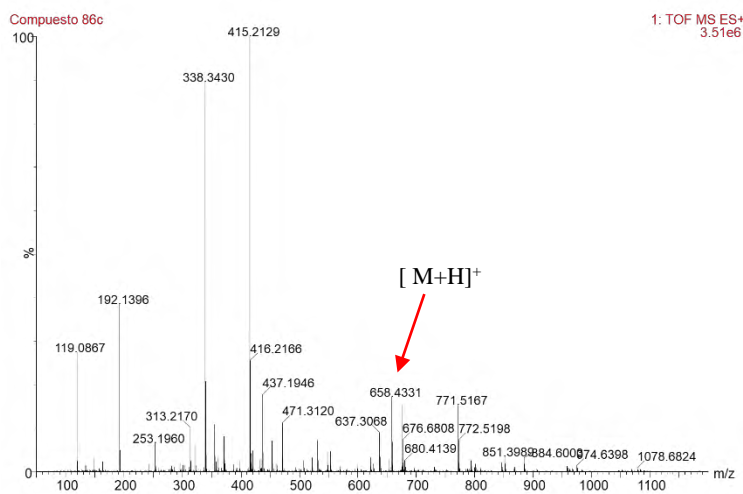


**Espectro 4.** ESI(+)-HRMS del compuesto diacetato de (25*R*)-26-(*N*-PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,diilo (84).

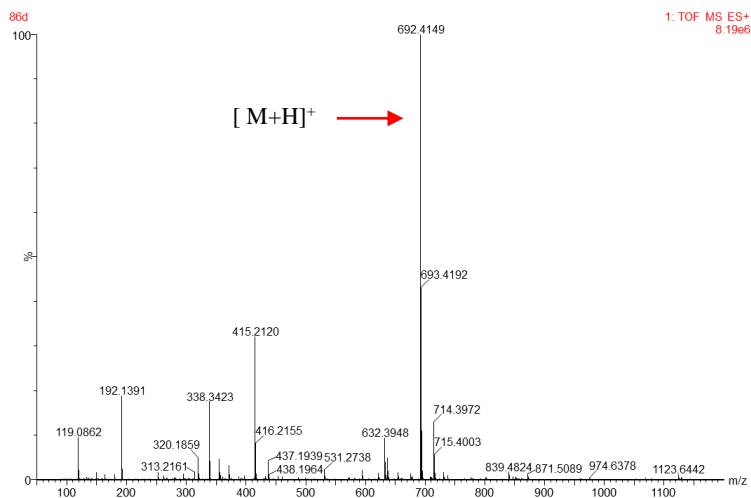




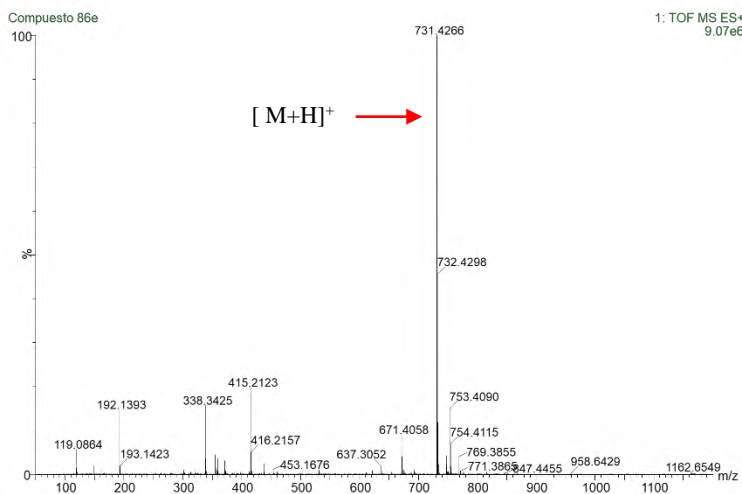
**Espectro 7.** ESI(-)-HRM del compuesto diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-ValOMe)-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (**86b**).



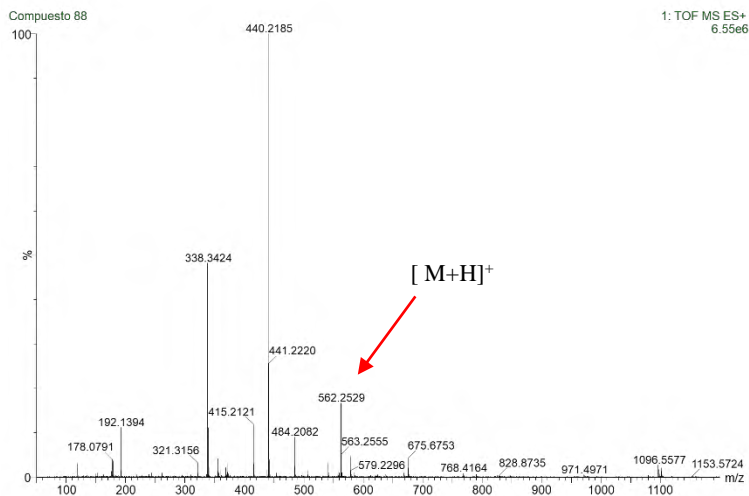
**Espectro 8.** ESI(+)-HRMS del compuesto diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-LeuOMe)-22-oxocolest-5-eno-3β,16β-diilo (**86c**).



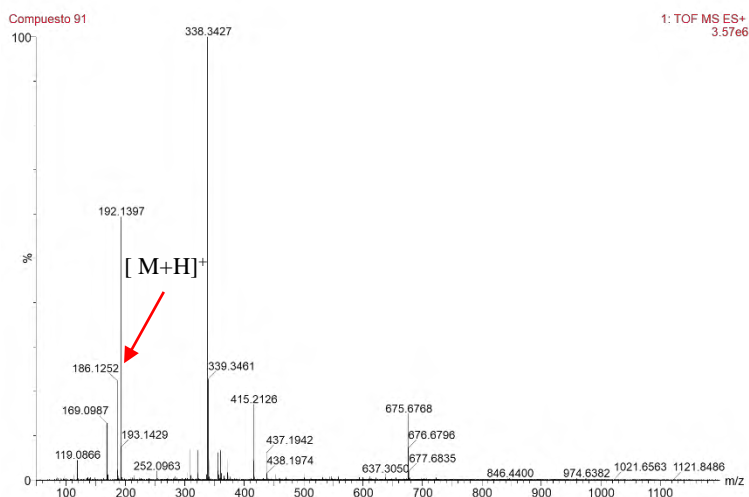
**Espectro 9.** ESI(+)-HRMS del compuesto diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-PheOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**86d**).



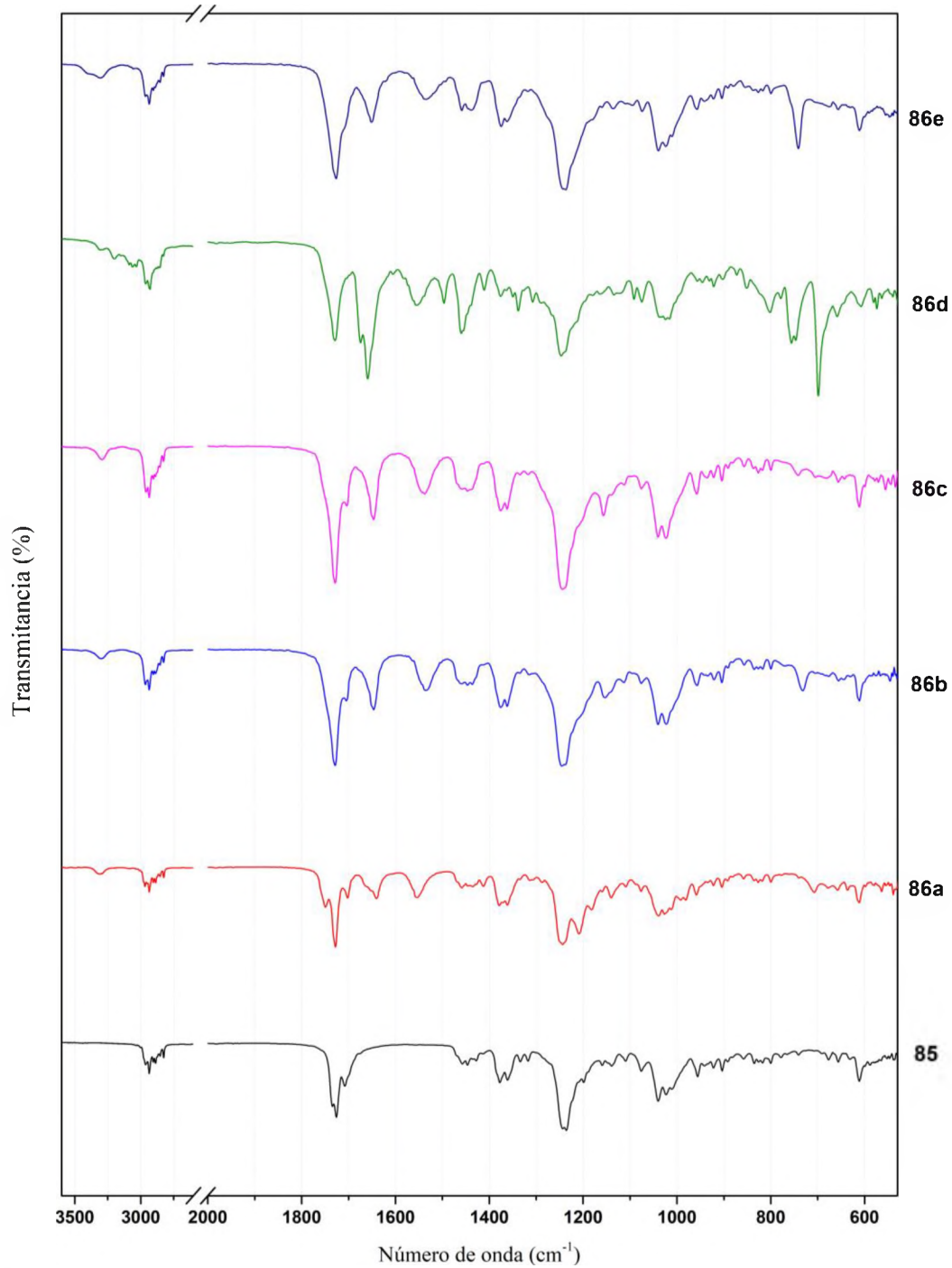
ESI(+)-HRMS del compuesto diacetato de (25*R*)-25-carbamoil-(*N*-TrpOMe)-22-oxocolest-5-eno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diilo (**86e**).



ESI(+)-HRMS del compuesto Fmoc-Lys(Boc)-GlyOMe (**88**).



ESI(+)-HRMS del compuesto ciclo(Lys-Gly) (**91**).



**Espectro 13.** Infrarrojo de los bioconjugados esteroide-aminoéster (**86a-e**).

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bansal, R.; Suryan, A. A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. *ACS Bio and Med Chem Au* **2022**, *2* (4), 340–369. <https://doi.org/10.1021/ACSBIO MEDCHEMAU.1C00071>.
- (2) Singla, P.; Salunke, D. B. Recent Advances in Steroid Amino Acid Conjugates: Old Scaffolds with New Dimensions. *Eur J Med Chem* **2020**, *187*, 111909. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.111909>.
- (3) Pham, J. V.; Yilma, M. A.; Feliz, A.; Majid, M. T.; Maffetone, N.; Walker, J. R.; Kim, E.; Cho, H. J.; Reynolds, J. M.; Song, M. C.; Park, S. R.; Yoon, Y. J. A Review of the Microbial Production of Bioactive Natural Products and Biologics. *Front Microbiol* **2019**, *10* (6), 449147. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01404>.
- (4) Salvador, J. A. R.; Carvalho, J. F. S.; Neves, M. A. C.; Silvestre, S. M.; Leitão, A. J.; Silva, M. M. C.; Sá E Melo, M. L. Anticancer Steroids: Linking Natural and Semi-Synthetic Compounds. *Nat Prod Rep* **2013**, *30* (2), 324–374. <https://doi.org/10.1039/c2np20082a>.
- (5) Zhabinskii, V. N.; Drasar, P.; Khripach, V. A. Structure and Biological Activity of Ergostane-Type Steroids from Fungi. *Molecules* **2022**, *27* (7), 2103. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27072103>.
- (6) A. Zolottsev, V.; Latysheva, A. S.; Pokrovsky, V. S.; Khan, I. I.; Misharin, A. Y. Promising Applications of Steroid Conjugates for Cancer Research and Treatment. *Eur J Med Chem* **2021**, *210*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.113089>.
- (7) Michalak, O.; Krzeczyński, P.; Cieślak, M.; Cmoch, P.; Cybulski, M.; Królewska-Golińska, K.; Kaźmierczak-Barańska, J.; Trzaskowski, B.; Ostrowska, K. Synthesis and Anti-Tumour, Immunomodulating Activity of Diosgenin and Tigogenin Conjugates. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2020**, *198*, 105573. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2019.105573>.
- (8) Li, J.; Huang, H.; Wang, J. Y.; Xu, Z. G.; Chen, Z. Z.; Lei, J. An Intramolecular Hydrogen Bond-Promoted “Green” Ugi Cascade Reaction for the Synthesis of 2,5-Diketopiperazines with Anticancer Activity †. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 33175–33179. <https://doi.org/10.1039/d2ra04958a>.

- (9) Zorzi, A.; Deyle, K.; Heinis, C. Cyclic Peptide Therapeutics: Past, Present and Future. *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *38*, 24–29. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2017.02.006>.
- (10) Ramadhani, D.; Maharani, R.; Gazzali, A. M.; Muchtaridi, M. Cyclic Peptides for the Treatment of Cancers: A Review. *Molecules* **2022**, *Vol. 27, Page 4428* **2022**, *27* (14), 4428. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27144428>.
- (11) Hernández-Rivera, J. A.; Herrera-García, M.; López-Castillo, G. N.; Sandoval-Ramírez, J.; Carrasco-Carballo, A. Epoxide of Diosgenin Acetate Synthesis: DoE for Diastereoselective Yield Optimization, Antimicrobial, Antioxidant and Antiproliferative Effects. *Steroids* **2023**, *197*, 109256. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2023.109256>.
- (12) Bhatti, H. N.; Khera, R. A. Biological Transformations of Steroidal Compounds: A Review. *Steroids* **2012**, *77* (12), 1267–1290. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2012.07.018>.
- (13) Yin, H.; Zhang, M. J.; An, R. F.; Zhou, J.; Liu, W.; Morris-Natschke, S. L.; Cheng, Y. Y.; Lee, K. H.; Huang, X. F. Diosgenin Derivatives as Potential Antitumor Agents: Synthesis, Cytotoxicity, and Mechanism of Action. *J Nat Prod* **2021**, *84* (3), 616–629. <https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.0C00698>.
- (14) Cole, T. J.; Short, K. L.; Hooper, S. B. The Science of Steroids. *Semin Fetal Neonatal Med* **2019**, *24* (3), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.05.005>.
- (15) Wang, Z.; Hui, C. Contemporary Advancements in the Semi-Synthesis of Bioactive Terpenoids and Steroids. *Org Biomol Chem* **2021**, *19* (17), 3791–3812. <https://doi.org/10.1039/D1OB00448D>.
- (16) Zhang, L.; Song, J.; Kong, L.; Yuan, T.; Li, W.; Zhang, W.; Hou, B.; Lu, Y.; Du, G. The Strategies and Techniques of Drug Discovery from Natural Products. *Pharmacol Ther* **2020**, *216*, 107686. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107686>.
- (17) Katz, L.; Baltz, R. H. Natural Product Discovery: Past, Present, and Future. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2016**, *43* (2–3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/S10295-015-1723-5>.
- (18) Whirledge, S.; Cidlowski, J. A. Steroid Hormone Action. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management: Eighth Edition* **2019**, 115-131.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47912-7.00005-6>.

- (19) Borah, P.; Banik, B. K. Diverse Synthesis of Medicinally Active Steroids. *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design* **2020**, 449–490. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817592-7.00012-5>.
- (20) Thiebaut, C.; Vlaeminck-Guillem, V.; Trédan, O.; Poulard, C.; Le Romancer, M. Non-Genomic Signaling of Steroid Receptors in Cancer. *Mol Cell Endocrinol* **2021**, 538, 111453. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2021.111453>.
- (21) Agarwal, D. S.; Anantaraju, H. S.; Sriram, D.; Yogeeswari, P.; Nanjegowda, S. H.; Mallu, P.; Sakhuja, R. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Bile Acid-Aromatic/Heteroaromatic Amides Linked via Amino Acids as Anti-Cancer Agents. *Steroids* **2016**, 107, 87–97. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2015.12.022>.
- (22) Wang, T.; You, Q.; Huang, F. S.; Xiang, H. Recent Advances in Selective Estrogen Receptor Modulators for Breast Cancer. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2009**, 9 (10), 1191–1201. <https://doi.org/10.2174/138955709789055207>.
- (23) Zhou, Y.; Liu, X. The Role of Estrogen Receptor Beta in Breast Cancer. *Biomark Res* **2020**, 8 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40364-020-00223-2/TABLES/2>.
- (24) Janković, Đ.; Šestić, T. Lj.; Bekić, S. S.; Savić, M. P.; Čelić, A. S.; Scholda, J.; Kopp, F.; Marinović, M. A.; Petri, E. T.; Ajduković, J. J. Development of New Steroid-Based Hydrazide and (Thio)Semicarbazone Compounds with Anticancer Properties. *J Steroid Biochem Mol Biol* **2024**, 242, 106545. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2024.106545>.
- (25) Zhang, Q.; Zhou, H.; Zhai, S.; Yan, B. Natural Product-Inspired Synthesis of Thiazolidine and Thiazolidinone Compounds and Their Anticancer Activities. *Curr Pharm Des* **2010**, 16 (16), 1826–1842. <https://doi.org/10.2174/138161210791208983>.
- (26) Rani, S.; Raheja, K.; Luxami, V.; Paul, K. A Review on Diverse Heterocyclic Compounds as the Privileged Scaffolds in Non-Steroidal Aromatase Inhibitors. *Bioorg Chem* **2021**, 113, 105017. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2021.105017>.
- (27) Elattar, K. M.; El-Mekabaty, A. Heterocyclic Steroids: Synthetic Routes and Biological Characteristics of Steroidal Fused Bicyclic Pyrimidines. *J Heterocycl Chem* **2021**, 58 (2), 389–414. <https://doi.org/10.1002/JHET.4174>.

- (28) Monier, M.; El-Mekabaty, A.; Abdel-Latif, D.; Doğru Mert, B.; Elattar, K. M. Heterocyclic Steroids: Efficient Routes for Annulation of Pentacyclic Steroidal Pyrimidines. *Steroids* **2020**, *154*, 108548. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2019.108548>.
- (29) Hajda's, G. H.; Kawka, A.; Koenig, H.; Kułaga, D.; Sosnowska, K.; Mrówczy'mrówczy'nska, L.; Pospieszny, T. Click Chemistry as a Method for the Synthesis of Steroid Bioconjugates of Bile Acids Derivatives and Sterols. *Steroids* **2023**, *199*, 109282. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109282>.
- (30) Farhan, A. M.; Alshamusi, Q. K.; Jebur, M. H. Synthesis of Steroid Bearing Heterocyclic Derivatives and Biological Activity. Review 2014-2020. *J Phys Conf Ser* **2021**, *1853* (1), 012057. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1853/1/012057>.
- (31) Jia, J.; Yao, J.; Kong, J.; Yu, A.; Wei, J.; Dong, Y.; Song, R.; Shan, D.; Zhong, X.; Lv, F.; Fan, Q.; She, G. 2,5-Diketopiperazines: A Review of Source, Synthesis, Bioactivity, Structure, and MS Fragmentation. *Curr Med Chem* **2022**, *30* (9), 1060–1085. <https://doi.org/10.2174/0929867329666220801143650>.
- (32) Borthwick, A. D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products. *Chem Rev* **2012**, *112* (7), 3641–3716. <https://doi.org/10.1021/CR200398Y>.
- (33) Carlos Javier Saavedra; Alicia Boto. Síntesis de 2,5-Dicetopiperazinas, Por Modificación Selectiva de Unidades de Serina y Treonina. (*IPNA*) *Comunicaciones congresos* **2014**, 61.
- (34) Cornacchia, C.; Cacciatore, I.; Baldassarre, L.; Mollica, A.; Feliciani, F.; Pinnen, F. 2,5-Diketopiperazines as Neuroprotective Agents. *Mini Rev Med Chem* **2012**, *12* (1), 2–12. <https://doi.org/10.2174/138955712798868959>.
- (35) Hermanson, G. T. Introduction to Bioconjugation. *Bioconjugate Techniques* **2013**, 1–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382239-0.00001-7>.
- (36) Gabrielli, B.; Midorikawa, Y.; Nachef, L. El; Bouchet, A.; Bourguignon, M.; Foray, N. When DNA Mutations Interplay with Cellular Proliferation: A Narrative History of Theories of Carcinogenesis. *Cánceres* **2024**, *16* (11), 2104. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16112104>.

- (37) Sokolova, A.; Johnstone, K. J.; McCart Reed, A. E.; Simpson, P. T.; Lakhani, S. R. Hereditary Breast Cancer: Syndromes, Tumour Pathology and Molecular Testing. *Histopathology* **2022**. <https://doi.org/10.1111/HIS.14808>.
- (38) Poza, J.; Rega, M.; Paz, V.; Alonso, B.; Rodríguez, J.; Salvador, N.; Fernández, A.; Jiménez, C. Synthesis and Evaluation of New 6-Hydroximinosteroid Analogs as Cytotoxic Agents. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (14), 4722–4740. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2007.05.003>.
- (39) Yan, A. X.; Chan, R. Y. K.; Lau, W. S.; Lee, K. S.; Wong, M. S.; Xing, G. W.; Tian, G. L.; Ye, Y. H. Enzymatic Synthesis and Bioactivity of Estradiol Derivative Conjugates with Different Amino Acids. *Tetrahedron* **2005**, *61* (24), 5933–5941. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2005.02.090>.
- (40) Kvasnica, M.; Budesinsky, M.; Swaczynova, J.; Pouzar, V.; Kohout, L. Platinum(II) Complexes with Steroidal Esters of L-Methionine and L-Histidine: Synthesis, Characterization and Cytotoxic Activity. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16* (7), 3704–3713. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2008.02.003>.
- (41) Fernández-Herrera, M. A.; Sandoval-Ramírez, J.; Sánchez-Sánchez, L.; López-Muñoz, H.; Escobar-Sánchez, M. L. Probing the Selective Antitumor Activity of 22-Oxo-26-Selenocyanocholestane Derivatives. *Eur J Med Chem* **2014**, *74*, 451–460. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2013.12.059>.
- (42) Zeferino-Díaz, R.; Hilario-Martínez, J. C.; Rodríguez-Acosta, M.; Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M. A. 22-Oxocholestanes as Plant Growth Promoters. *Steroids* **2015**, *98*, 126–131. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2015.03.005>.
- (43) Wang, H.; Feng, Z.; Wu, D.; Fritzsche, K. J.; Rigney, M.; Zhou, J.; Jiang, Y.; Schmidt-Rohr, K.; Xu, B. Enzyme-Regulated Supramolecular Assemblies of Cholesterol Conjugates against Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells. *J Am Chem Soc* **2016**, *138* (34), 10758–10761. <https://doi.org/10.1021/JACS.6B06075>.
- (44) Zeferino-Díaz, R.; Olivera-Castillo, L.; Dávalos, A.; Grant, G.; Kantún-Moreno, N.; Rodríguez-Canul, R.; Bernès, S.; Sandoval-Ramírez, J.; Fernández-Herrera, M. A. 22-Oxocholestane Oximes as Potential Anti-Inflammatory Drug Candidates. *Eur J Med Chem* **2019**, *168*, 78–86. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.02.035>.

- (45) Xia, X.; Chen, Y.; Wang, L.; Yang, Z. G.; Ma, X. D.; Zhao, Z. G.; Yang, H. J. Synthesis of Diosgenyl Quaternary Ammonium Derivatives and Their Antitumor Activity. *Steroids* **2021**, *166*, 108774. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2020.108774>.
- (46) Wang, L.; Yao, M.; Hu, Y.; Chen, C.; Jin, L.; Ma, X.; Yang, H. Synthesis and Antitumor Activity of Diosgenin Hydroxamic Acid and Quaternary Phosphonium Salt Derivatives. *ACS Med Chem Lett* **2022**, *13* (5), 786–791. <https://doi.org/10.1021/ACSMEDCHEMLETT.1C00581>.
- (47) Aguilar-Barrientos, J. P.; Moo-Puc, R. E.; Villanueva-Toledo, J. R.; Murillo, F.; Cáceres-Castillo, D.; Mirón-López, G.; De los Santos, M. G.; Sandoval-Ramírez, J.; Zeferino-Díaz, R.; Fernández-Herrera, M. A. Microwave-Enhanced Synthesis of 26-Amino-22-Oxocholestanes and Their Cytotoxic Activity. *Steroids* **2022**, *183*, 109030. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2022.109030>.
- (48) Liao, S.; Qin, X.; Li, D.; Tu, Z.; Li, J.; Zhou, X.; Wang, J.; Yang, B.; Lin, X.; Liu, J.; Yang, X.; Liu, Y. Design and Synthesis of Novel Soluble 2,5-Diketopiperazine Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Eur J Med Chem* **2014**, *83*, 236–244. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2014.06.030>.
- (49) Mollica, A.; Costante, R.; Fiorito, S.; Genovese, S.; Stefanucci, A.; Mathieu, V.; Kiss, R.; Epifano, F. Synthesis and Anti-Cancer Activity of Naturally Occurring 2,5-Diketopiperazines. *Fitoterapia* **2014**, *98*, 91–97. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2014.07.010>.
- (50) Liao, S. R.; Qin, X. C.; Wang, Z.; Li, D.; Xu, L.; Li, J. S.; Tu, Z. C.; Liu, Y. Design, Synthesis and Cytotoxic Activities of Novel 2,5-Diketopiperazine Derivatives. *Eur J Med Chem* **2016**, *121*, 500–509. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2016.06.002>.
- (51) Li, J.; Sha, Y. Molecules A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. *Molecules* **2008**, *13*, 1111–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules13051111>.
- (52) Harold Monro Moody. Process for the Preparation of Amino Acid Methyl Esters (US 8,039,662 B2), March 10, **2008**.
- (53) J. Ciciolil Hilario-Martínez; Reyna Zeferino-Díaz; Miguel A.; Muñoz-Hernández; Ma. Guadalupe Hernández-Linares; José Luis Cabellos. Regioselective Spirostan E-Ring Opening for the Synthesis of Dihydropyran Steroidal Frameworks. *Org. Lett.* **2016**. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b00492>.

- (54) Li, N. S.; Piccirilli, J. A. Synthesis of Stereopure Acyclic 1,5-Dimethylalkane Chirons: Building Blocks of Highly Methyl-Branched Natural Products. *Tetrahedron* **2013**, *69* (46), 9633–9641. <https://doi.org/10.1016/J.TET.2013.09.020>.
- (55) Stuart, B. H. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications* **2005**, 1–224. <https://doi.org/10.1002/0470011149>.
- (56) Del Fuego, M. C.; Dansey, M. V.; Paolo, L. S.; Pecci, A.; Veleiro, A. S.; Burton, G. C(16)-C(22) Oxygen-Bridged Analogues of CeDAF-12 and LXR Ligands. *Steroids* **2016**, *112*, 109–114. <https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2016.05.009>.
- (57) Chiguils-Pérez, Y.; Rodríguez-Hurtado, A. I.; Pérez-Picaso, L.; Ramírez-Marroquín, O. A.; Martínez-Pascual, R.; Hernández-Núñez, E.; Viñas-Bravo, O.; López-Torres, A. Synthesis and Antifungal Activity of New Valine-Azole Hybrids. *Russ J Gen Chem* **2021**, *91* (1), S123–S130. <https://doi.org/10.1134/S1070363222020268/METRICS>.
- (58) Sun, X.; Rai, R.; Mackerell, A. D.; Faden, A. I.; Xue, F. Facile One-Step Synthesis of 2,5-Diketopiperazines. *Tetrahedron Lett* **2014**, *55* (11), 1905–1908. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2014.01.133>.
- (59) Manchineella, S.; Govindaraju, T. Hydrogen Bond Directed Self-Assembly of Cyclic Dipeptide Derivatives: Gelation and Ordered Hierarchical Architectures. *RSC Adv* **2012**, *2* (13), 5539–5542. <https://doi.org/10.1039/C2RA20342A/>.
- (60) Abdelhamid, M. E.; Murdoch, T.; Greaves, T. L.; O'Mullane, A. P.; Snook, G. A. High-Throughput Approach for the Identification of Anilinium-Based Ionic Liquids That Are Suitable for Electropolymerisation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (27), 17967–17972. <https://doi.org/10.1039/C5CP02294K>.
- (61) Wang, J.; Jiang, J. Z.; Chen, W.; Bai, Z. W. Data of <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C NMR Spectra and Degree of Substitution for Chitosan Alkyl Urea. *Data Brief* **2016**, *7*, 1228–1236. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2016.03.099>.