



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

00570
5
24

FACULTAD DE QUIMICA

SINTESIS DE 6-HALO-16-BETA METIL-17-ALFA
VALERILOXI-4, 6-PREGNADIEN-3, 20-DIONA
COMO ANTIANDROGENOS,

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN QUIMICA FARMACEUTICA

P R E S E N T A

Q. ELENA GUADALUPE RAMIREZ LOPEZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

25528136

1998



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. ALFONSO ROMO DE VIVAR
VOCAL: Dra. CARMEN RIVERA MUÑOZ
SECRETARIO: M. en C. ALFONSO LIRA ROCHA
1er. SUPLENTE: M. en C. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
2do. SUPLENTE: Dra. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS

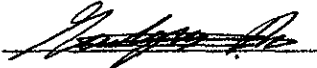
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Farmacia. Edificio E. Lab-125
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR:

Dr. Eugene A. Bratoeff Tittet 

SUSTENTANTE:

Q. Elena Guadalupe Ramírez López 

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) que a través del proyecto IN 205295 otorgó el soporte financiero para la realización de ésta tesis.

Al los integrantes del jurado Dr. Alfonso Romo, Dra. Carmen Rivera, M. en C. Alfonso Lira, M. en C. Francisco Hernández y Dra. Isabel Aguilar por los comentarios y sugerencias hechos a este trabajo.

Al USAI por la espectroscopía de UV, IR, RMP, RMN de C-13 y la espectrometría de Masas. En especial a las maestras Graciela Chávez, Marisela Gutiérrez, Margarita Guzmán y Rosa Isela Del Villar.

Al M. en C. Cesar Mateo F. por la determinación de la actividad biológica.

Al Dr. Manuel Rubio y sus colaboradores por la realización del estudio teórico de la relación estructura actividad-biológica.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 125 del Departamento de Farmacia en el edificio E de la Facultad de Química, por su invaluable ayuda para mi realización personal y profesional.

A la U.N.A.M. por mi formación académica.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo:

A mis queridos padres **MARÍA ELENA** y **RUFINO**
por el amor y apoyo que siempre me han brindado.

A mi abuelita **LUPITA**, guía fundamental en mi camino.

A **JOSÉ LUIS** por su comprensión y cariño.

A **JUANITO** por compartir con nosotros la vida.

A **MARTHITA, LAURA** y **PEDRO** porque me
contagian su entusiasmo.

A mis tíos **J. MANUEL** y **MARTHA** que han estado
conmigo en todo momento.

Con gran respeto y admiración al **DR. EUGENE**
BRATOEFF, quien con sus conocimientos y
paciencia llevó a cabo la dirección de esta tesis.

A la **DRA. MARTA ALBORES, ELVIA**
REYNOSO, JAVIER ALFÁN y **ORESTES**
esperando contar siempre con su amistad.

A mis familiares y amigos.

INDICE.

CONTENIDO	PAGINA
INDICE	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
CAPITULO 1. INTRODUCCION	7
FIGURA 1. Ubicación de la Próstata.	8
FIGURA 2. Biogénesis de la testosterona.	10
FIGURA 3. Síntesis y liberación de la testosterona en el organismo.	11
FIGURA 4. Mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa.	12
FIGURA 5. Ejemplos de Antiandrógenos.	15
FIGURA 6. Molécula Modificada.	17
TABLA 1. Compuestos sintetizados.	17
CAPITULO 2. OBJETIVOS	19
CAPITULO 3. DISCUSION Y RESULTADOS	21
FIGURA 7. Esquema de síntesis.	22
FIGURA 8. Hidrólisis del grupo dioxolano.	28
FIGURA 9. Formación del sistema 4,6-pregnadien-3-ona.	30
FIGURA 10. Estructura enumerada para el análisis por RMN ¹³ C (normal y DEPT).	32
FIGURA 11. Mecanismo de epoxidación en C6-C7.	33
FIGURA 12. Diagrama de fragmentación del derivado clorado (34a).	37

FIGURA 13. Diagrama de fragmentación del derivado bromado (34b).	39
FIGURA 14. Evaluación farmacológica de los intermediarios y compuestos finales.	41
FIGURA 15. Correlación del logP (teórico) en función de la actividad biológica.	45
FIGURA 16. Coeficientes de contribución al LUMO en C-3 y C-5.	46
FIGURA 17. Complejos de activación I) Adición 1-4, II) Adición 1-6.	47
CAPITULO 4. CONCLUSIONES	48
CAPITULO 5. PARTE EXPERIMENTAL	51
TABLA 2. Asignación del desplazamiento químico del compuesto 32 en RMN ¹³ C.	61
TABLA 3. Asignación del desplazamiento químico del compuesto 33 en RMN ¹³ C.	63
TABLA 4. Asignación del desplazamiento químico del compuesto 34a en RMN ¹³ C.	64
TABLA 5. Asignación del desplazamiento químico del compuesto 34b en RMN ¹³ C.	66
CAPITULO 6. ANEXO EXPERIMENTAL	70
Lista de Espectros	71
BIBLIOGRAFIA	96

RESUMEN

El exceso de andrógeno en el organismo está relacionado con una serie de padecimientos entre los cuales se encuentran la hiperplasia prostática benigna y el cáncer prostático. Este último representa actualmente uno de los principales problemas de salud pública entre la población masculina mayor de 60 años. La reducción de la testosterona **3** a 5α -dihidrotestosterona **4** (figura 4, página 12), en la presencia de la enzima 5α -reductasa y NADPH, está relacionada con el cáncer prostático y la hiperplasia prostática benigna.

En este trabajo se describe la síntesis de dos nuevos inhibidores de la enzima 5α -reductasa: 6-cloro- 16β metil- 17α -valeriloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona **34a** (páginas 22 y 63) y 6-bromo- 16β metil- 17α -valeriloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona **34b** (páginas 22 y 65) como antiandrógenos para el tratamiento de enfermedades de la próstata dependientes del andrógeno. En la síntesis de estos compuestos se empleó el acetato de 16β -dehidropregnenolona **25** (página 22) como materia prima debido a su costo accesible, disponibilidad comercial y la presencia de las funciones químicas necesarias para su transformación, en nueve pasos, a los productos finales **34a** y **34b**.

Se analizó la mezcla preincubada de la enzima 5α -reductasa de los testículos de ratas Wistar, NADPH, testosterona y el esteroide problema. El estudio se basó en la capacidad de los productos sintetizados para inhibir la enzima 5α -reductasa. La actividad farmacológica (*in vitro*) se cuantificó por espectroscopia de UV. ($\lambda = 350$ nm.).

El compuesto **34b** (páginas 22 y 41) presentó mayor actividad que los estándares acetato de ciproterona **11**, el proscar **12** y el derivado clorado **34a**. Sin embargo presentó menor actividad que su homólogo butiroiloxi (**21**) que tiene la cadena de ester mas corta en C-17. Al parecer la longitud de la cadena del ester es inversamente proporcional al porcentaje de inhibición sobre la enzima 5 α -reductasa.

Este hecho se confirmó por el estudio teórico de la correlación de la actividad biológica con la estructura de los esteroides utilizando log *P* (carácter hidrofóbico en las moléculas). Figura 15, páginas 45 y 68.

Se analizó el mecanismo de adición de la enzima 5 α -reductasa por mecánica molecular, se vio que la adición 1-6 se favorece por tener asociada la menor energía de activación ($E_{act.} = 28.71$ Kcal/mol) del complejo esteroide-enzima comparado con la correspondiente energía de activación ($E_{act.} = 34.41$ Kcal/mol) para la adición 1,4 (figura 17, página 47).

ABSTRACT

The excess androgen in the organism is related to several health problems such as: benign prostatic hyperplasia and prostate cancer both of which are a common illness in the aging male above 60 years of age. The reduction of testosterone **3** to 5 α -dihydrotestosterone **4** (figure 4, page 12) by NADPH mediated by the enzyme 5 α -reductase is associated with both ailments prostate cancer and benign prostatic hyperplasia.

This work describes the synthesis of two new inhibitors of 5 α -reductase enzyme: 6-chloro-16 β -methyl-17 α -valeroyloxi-4,6-pregnadiene-3,20-dione **34a** (pages 22 and 63) and 6-bromo- 16 β -methyl-17 α -valeroyloxi-4,6-pregnadiene-3,20-dione **34b** (pages 22 and 65) as potential antiandrogens for the treatment of androgen mediated prostate diseases.

For the synthesis of both compounds **34a** and **34b** the commercially available 16-dehydropregnenolone acetate **25** (page 22) was used as starting material.

The pharmacological evaluation (*in vitro*) of both compounds was carried out by UV analysis ($\lambda_{\text{max}} = 350$ nm). The preincubated mixture of 5 α -reductase enzyme obtained from the testes of Wistar rats, NADPH, testosterone and the synthesized steroid was used. The results were expressed in % inhibition of the enzyme 5 α -reductase. Compound **34b** (pages 22 and 41) showed a higher activity than standards cyproterone acetate **11**, proscar **12** and the chlorinated compound **34a**. On the other hand, the butyroyloxi derivative **21**

with the shorter side chain at C-17 showed a higher activity. It appears that the inhibitory activity is inversely proportional to the chain length at C-17. This fact was confirmed by the theoretical studies in which the pharmacological activity was related to log P which is associated with the hydrophobic nature of the steroid (figure 15, pages 45 and 68).

The addition of the enzyme 5α -reductase to the conjugated part of the steroid was analyzed by molecular mechanics. It was observed that the 1,6-addition is preferred (energy of the activated complex $E_{act} = 28.71$ Kcal/mole) as compared to the 1,4-addition ($E_{act} = 34.41$ Kcal/mole) on the grounds of the lower energy for the activated complex for the 1,6-addition (figure 17, page 47).

CAPITULO 1.

INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION:

La próstata es un órgano susceptible a infecciones, agrandamiento o tumores benignos o malignos. Se localiza en la pelvis abajo de la vejiga y rodea la porción superior de la uretra (Figura 1). Debido a esto, cualquier trastorno de la próstata, puede obstruir el flujo de orina causando que la micción se torne difícil y dolorosa. También puede causar alteraciones graves en la vejiga, los uréteres y los riñones. En ocasiones el daño es tal que puede causar necrosis renal y un aumento en la susceptibilidad a las infecciones. El agrandamiento de la próstata es un trastorno que presenta uno de cada tres individuos de mas de 60 años de edad, en los que el órgano incrementa su tamaño dos o cuatro veces en relación al tamaño normal. El cáncer de próstata se extiende primero a los ganglios linfáticos por debajo de la próstata y posteriormente, aparece en huesos y otros órganos, presentando dolor intenso en la pélvis y muslos (1, 2).

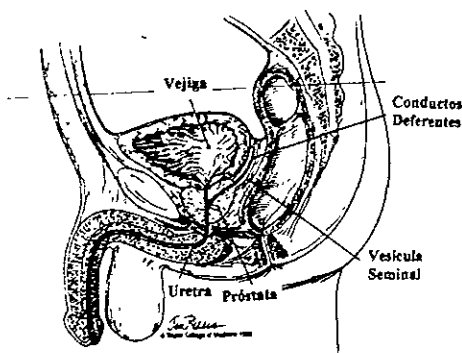


FIGURA 1. Ubicación de la Próstata

El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar internacional entre los tumores que son causa directa de la muerte de varones. La Sociedad Americana de Cáncer estimó 40,000 decesos por año en Estados Unidos (2, 3). El Registro Nacional de Patología en México citó 20,000 casos de este padecimiento al año, de los cuales mueren 3,000 (3). Se cree que, aproximadamente, un 20% más de individuos no acuden a las clínicas por falta de

información o renuencia al examen por tacto rectal que se aplica en estos casos (2, 3).

Otro método de diagnosis es la Prueba del Antígeno Prostático Específico en Sangre (sensibilidad del 80%); el antígeno es una glucoproteína producida por las células epiteliales en la glándula prostática y su concentración se considera anormal si es mayor de 4 mg / ml de sangre. Actualmente, también se utiliza una modificación al método del Antígeno Prostático Específico, que consiste en dividir su concentración entre el volumen de la glándula prostática, el cual se determina por ultrasonografía transrectal. La diagnosis definitiva se realiza a través de una biopsia que nos permite determinar la etapa del padecimiento (2, 3). El cáncer de próstata, la hiperplasia prostática benigna, la alopecia androgénica, entre otros padecimientos, están relacionados con el exceso de andrógeno en el organismo y además se vinculan a factores como la edad, raza, actividad profesional y circunstancias geográficas (1, 4).

Los andrógenos son una clase de esteroides responsables de las características sexuales primarias y secundarias en hombres. Además, poseen actividad anabólica que causa aceleración del crecimiento esquelético, incremento de la masa muscular así como la pérdida de grasa subcutánea. La testosterona (3) es el andrógeno predominante en la circulación endógena, sin embargo, su metabolito 5α -dihidrotestosterona (4) es el andrógeno endógeno más potente 4.

Como otros esteroides, la biogénesis de la testosterona (3) se da a través de la ruta acetato-mevalonato (figura 2), (4, 5). La acetilcoenzima A sufre una serie de reacciones para

obtener el escualeno y posteriormente el colesterol. La degradación parcial de la cadena lateral del colesterol (C-20) permite la obtención de la pregnenolona (1) y posteriormente, de la progesterona (2), la cual es el precursor de la testosterona (3) entre otras hormonas (4, 5).

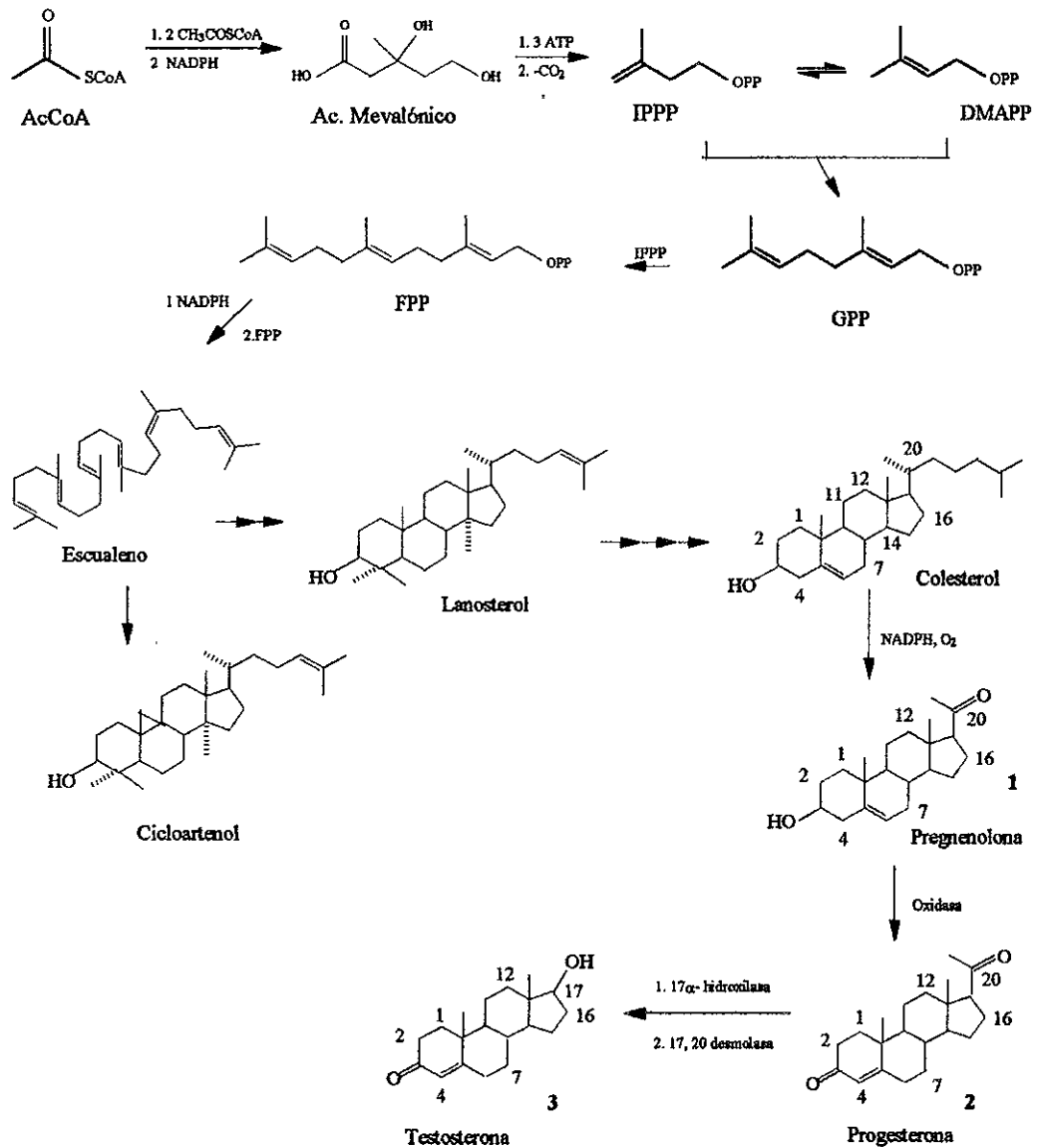


FIGURA 2. Biogénesis de la testosterona.

La síntesis y liberación de la testosterona ³ en el organismo se muestra en la figura 3. El hipotálamo secreta la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (HLG) que controla la síntesis y liberación de las hormonas de las gónadas, su nombre específico es Factor de Liberación de la Hormona Luteinizante, el cual, estimula la secreción de la Hormona Estimulante de las Células Intersticiales (HSCI) y la Hormona Folículo Estimulante (HFS) en el lóbulo anterior de la hipófisis. El siguiente paso es la producción de testosterona, en los testículos, bajo la influencia de HSCI y HFS por las células intersticiales de Leydig. Aproximadamente un 95% de la testosterona se produce en los testículos y el 5% se libera en las glándulas suprarrenales. La testosterona se encuentra relacionada con el desarrollo, crecimiento y conservación de los órganos genitales masculinos (1, 4, 5).

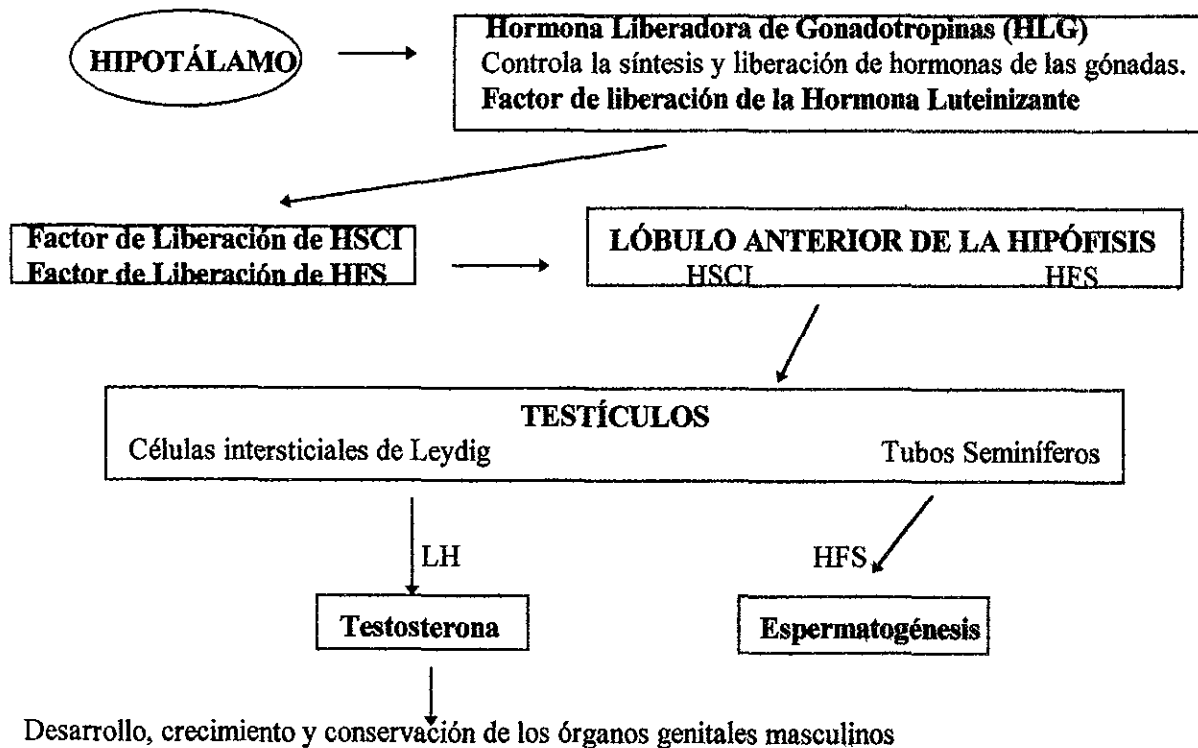


FIGURA 3. Síntesis y liberación de testosterona en el organismo.

Se sabe que el cáncer de la próstata y la hiperplasia prostática benigna están relacionados con la transformación de la testosterona **3** a su metabolito más activo 5 α -dihidrotestosterona **4** en la presencia de la enzima 5 α - reductasa (presente en el citoplasma de las células prostáticas) y el cofactor NADPH (forma reducida de la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato). El mecanismo de acción para esta transformación consiste en la reducción regio y estereoespecífica por la adición del hidruro del NADPH a la posición 5 de la testosterona **3**. El enolato formado en C3-C4 se estabiliza por algún residuo electrofílico (E+) de la enzima 5 α - reductasa. Posteriormente, por tautomerismo, se da la formación de la 5 α - dihidrotestosterona **4** y la liberación de NADPH (figura 4), (6, 7, 16).

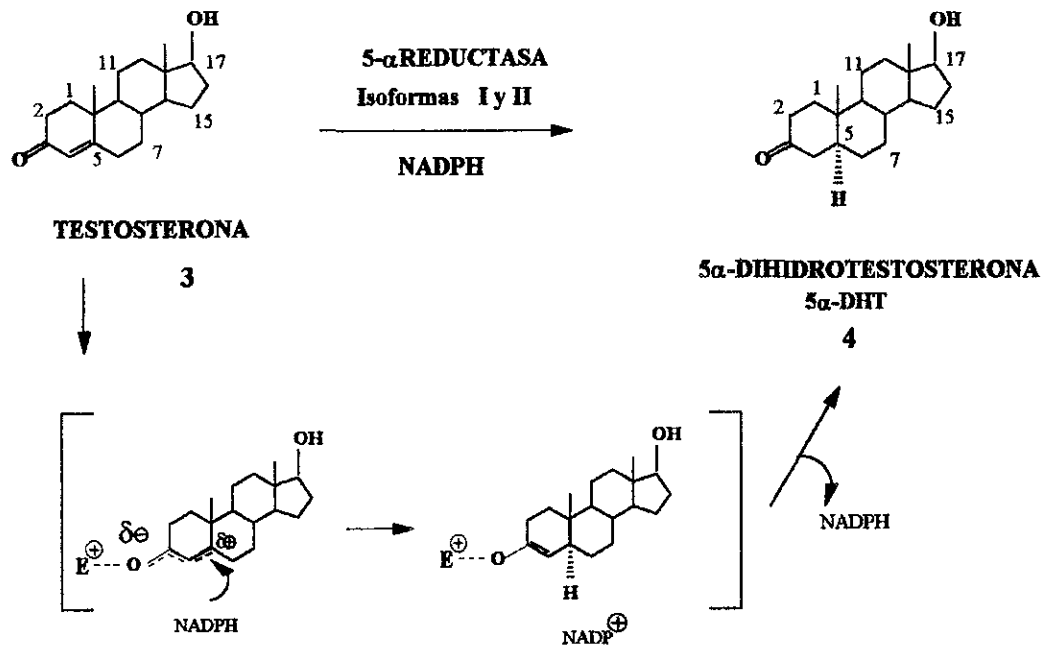


Figura 4. Mecanismo de Acción de la Enzima 5 α -Reductasa.

Recientes investigaciones en biología molecular indicaron que la enzima 5 α - reductasa se encuentra en dos isoformas denominadas Tipo I y Tipo II; las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función (4, 6, 7). La isoenzima Tipo I se encuentra predominantemente en la piel facial y en el hígado, tiene un pH óptimo alcalino (pH= 6-8.5), requiere de concentraciones elevadas de testosterona (3) para saturarse ($K_m= 3 \mu M$), funciona de un modo catabólico en la remoción de los andrógenos por el hígado y la piel no genital. La isoenzima Tipo II tiene un pH óptimo ácido (pH=5) y requiere de concentraciones bajas de testosterona (3) para saturarse ($K_m= 0.5 \mu M$). Se encuentra presente predominantemente en la próstata y testículos y se relaciona directamente al cáncer de próstata y a la hiperplasia prostática benigna (4, 8-10); funciona de manera anabólica en la expresión de los andrógenos por la conversión efectiva de la testosterona (3) a la 5 α -dihidrotestosterona (4). También se menciona la relación inversa que presenta la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo tipo de inhibidor, pues mientras un compuesto resulta ser muy activo sobre la isoenzima Tipo II, en la mayoría de los casos es poco activo sobre la isoenzima Tipo I. Por ejemplo, la finasterida (12) considerada como un potente inhibidor de la enzima 5 α - reductasa presenta alta actividad sobre la isoenzima Tipo II y el efecto contrario sobre la isoenzima Tipo I (4).

Entre algunos de los métodos disponibles para el tratamiento del cáncer de próstata y/o la hiperplasia prostática benigna, se encuentran la prostectomía, la orquiectomía bilateral (extirpación de testículos en donde se sintetiza el 95% de la testosterona endógena), tratamientos con láser como el ILC (Interstitial Laser Coagulation), terapias con microondas como TUMT (Transurethral Microwave Therapy of the Prostate) y las terapias hormonales

utilizando agonistas androgénicos (agentes esteroidales y no esteroidales), que actúan al reducir o modificar la producción de andrógenos a través de la inhibición de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante o por la inhibición de la enzima 5 α - reductasa responsable de la conversión testosterona 3 a dihidrotestosterona 4, o bien con la competencia antagonista por el receptor androgénico, entre otros métodos. La elección de la terapia es influenciada por la etapa de la enfermedad en que se encuentre el individuo, así como la edad, condición física y respuesta al tratamiento (2, 3, 11).

Actualmente, el desarrollo de agentes hormonales antiandrogénicos se ha enfatizado debido a su amplia utilidad en la terapia médica, pues se emplean en el tratamiento del cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna, hipersexualidad en el hombre, pubertad precoz en niños, virilización en la mujer, alopecia androgénica, en el tratamiento del acné y como anticonceptivos en el hombre (4, 10).

El efecto inhibitorio de los agentes antiandrogénicos debe diferenciarse de los compuestos que disminuyen la síntesis o liberación de gonadotropinas del hipotálamo y la hipófisis. Existen sustancias como los estrógenos que son antagonistas de los andrógenos, pero no son considerados como antiandrógenos. Estos compuestos, como el dietilestilbestrol 6 (figura 5), ejercen su acción a nivel gonadotrópico. Los antiandrógenos pueden ser de origen natural como la progesterona 2, (figura 2), o bien de origen sintético (esteroidal y no esteroidal). Entre los compuestos esteroidales se encuentran el acetato de ciproterona 11, finasterida (proscar) 12, acetato de osaterona 13, oxendolona 14, episterida 15, y caproato de gestonorona 16. Algunos antiandrógenos no esteroidales son

flutamida 5, bifluranol 7 tamsulosina 8, mepartricina 9, terazosina 10. Los compuestos antes mencionados se presentan en la figura 5 (2, 4, 12).

ANTIANDRÓGENOS

NO ESTEROIDALES

ESTEROIDALES

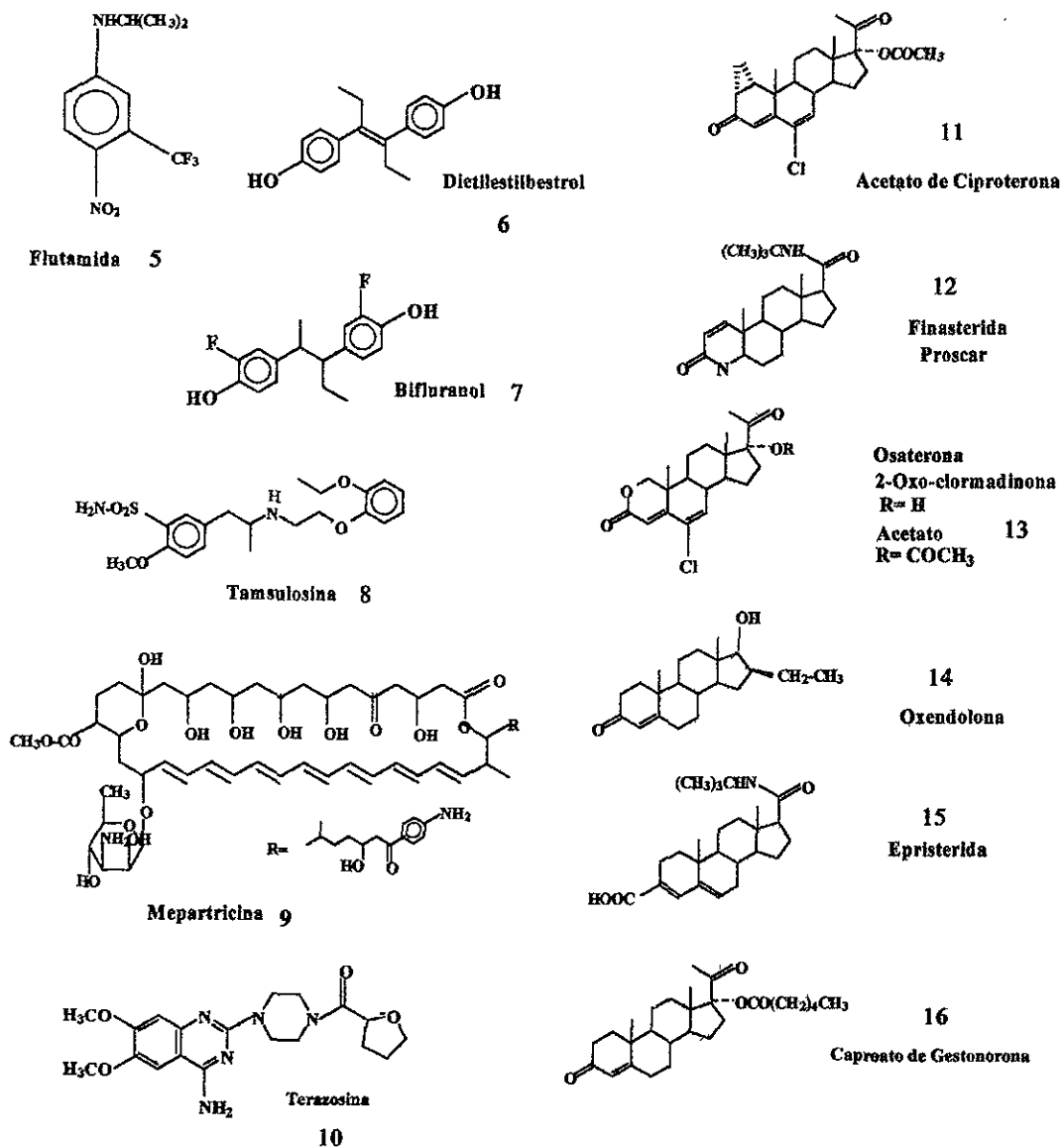


FIGURA 5. Ejemplos de Antiandrógenos

No obstante la gran importancia de los antiandrógenos en la terapia médica, su uso es restringido debido a los efectos colaterales que generalmente ocasionan, como diarrea, intolerancia al alcohol, efectos hepatotóxicos severos, alteraciones hormonales, fallas cardiacas, retención de líquidos y pérdida del deseo sexual, entre otras. (2, 4, 10). Los efectos nocivos provocados por estos fármacos constituyen un factor que estimula el esfuerzo para buscar nuevas entidades químicas con mayor potencia antiandrogénica y menores efectos colaterales.

Para la síntesis de nuevos antiandrógenos, se pueden seguir dos vías:

1- Modificación de la molécula de testosterona 3 (figura 2, página 10) para eliminar efectos androgénicos y anabólicos de esta hormona).

2- Modificar la molécula de progesterona 2 (figura 2, página 10), que es un antiandrógeno natural para eliminar el efecto anabólico y aumentar el efecto antiandrogénico.

La modificación de la molécula de progesterona 2 (figura 2) resulta atractiva para obtener un derivado esteroidal con posible actividad antiandrogénica que presente además baja actividad hormonal, baja toxicidad y no disminuya el deseo sexual (2, 4, 5).

En los últimos años se han sintetizado, en nuestro laboratorio y bajo la dirección del Dr. Bratoeff, una gran variedad de moléculas esteroidales con actividad antiandrogénica (13, 14, 17). Entre los compuestos sintetizados recientemente se encuentran el 16 β -metil-4, 6-pregnadien-17 α -butiriloxi-3, 20-diona. (20) y el 6-bromo-16 β -metil-4, 6-pregnadien-

17 α -butiriloxi-3, 20-diona. (**21**), (figura 6, tabla 1, página 17) . Estos compuestos presentaron una actividad antiandrogénica considerable frente el acetato de ciproterona **11** y la finasterida (proscar) **12** (figura 5, página 15), que es el fármaco inhibidor de la enzima 5 α -reductasa más potente de venta en el mercado (**3**, **15**).

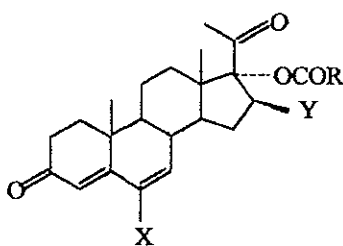


FIGURA 6. Molécula modificada.

TABLA 1: Compuestos sintetizados.

COMPUESTO	R	Y	X	REF.
17	CH ₃	CH ₃	H	14
18	CH ₃	CH ₃	Cl	14
19	CH ₃	CH ₃	Br	14
20	(CH ₂) ₂ CH ₃	CH ₃	H	13
21	(CH ₂) ₂ CH ₃	CH ₃	Br	13
22	H	Fenilo	H	17
23	CH ₃	Fenilo	H	17
24	CH ₂ CH ₃	Fenilo	H	17

En base a estos estudios se ha podido establecer una relación empírica entre el carácter antiandrogénico de cada molécula y su estructura. Considerando ésta relación se plantean a continuación los requerimientos estructurales para el diseño de nuevos antiandrógenos basados en la molécula de progesterona (**13**, **14**, **17**).

- 1.-La presencia del sistema conjugado 4, 6-dien-3-ona en la molécula.
- 2.-Inserción de un átomo de halógeno en C-6 para evitar la reducción enzimática de la doble ligadura en C-4 y el carbonilo en C-3.
- 3.- Introducción de un grupo electronegativo y voluminoso en C-17 (esterificación) para evitar la reducción del carbonilo en C-20.
- 4.- Presencia de un grupo alquilo en C-16 (orientación beta) para evitar la hidrólisis enzimática del grupo ester en C-17 y/o evitar la reducción del carbonilo en C-20.

Para la síntesis de las moléculas planteadas en éste trabajo, 6-cloro-16 β -metil-4,6 pregnadien-17 α -valeriloxi-3,20 diona (**34a**) y el 6-bromo-16 β -metil-4,6 pregnadien-17 α -valeriloxi-3,20 diona (**34b**), se consideró la relación estructura-actividad mencionada anteriormente (tabla 1, figura 6, página 17) y el mecanismo de acción del fármaco.

CAPITULO 2.

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS:

En base a la Relación Estructura-Actividad (SAR) descrita en la literatura (**13, 14, 17**) para los esteroides con actividad antiandrogénica, en este trabajo se propone:

-La síntesis de los compuestos 6-cloro- 16 β metil-17 α -valeriloxi-4, 6-pregnadien- 3, 20-diona **34a** y 6-bromo-16 β metil-17 α -valeriloxi-4, 6-pregnadien-3, 20-diona **34b** con posible actividad antiandrogénica (figura 7, páginas 22, 63 y 65).

-Comparar la actividad de los compuestos finales **34a-34b** y sus intermediarios (**25-33**) frente a los fármacos antiandrogénicos de uso actual: acetato de ciproterona **11** y el proscar **12** (figura 5, páginas 15).

-Analizar la influencia del halógeno en C-6 comparando la actividad entre los compuestos **34a-34b** y su homólogo bromado (**21**) que difiere en el tamaño de la cadena del ester en C-17.

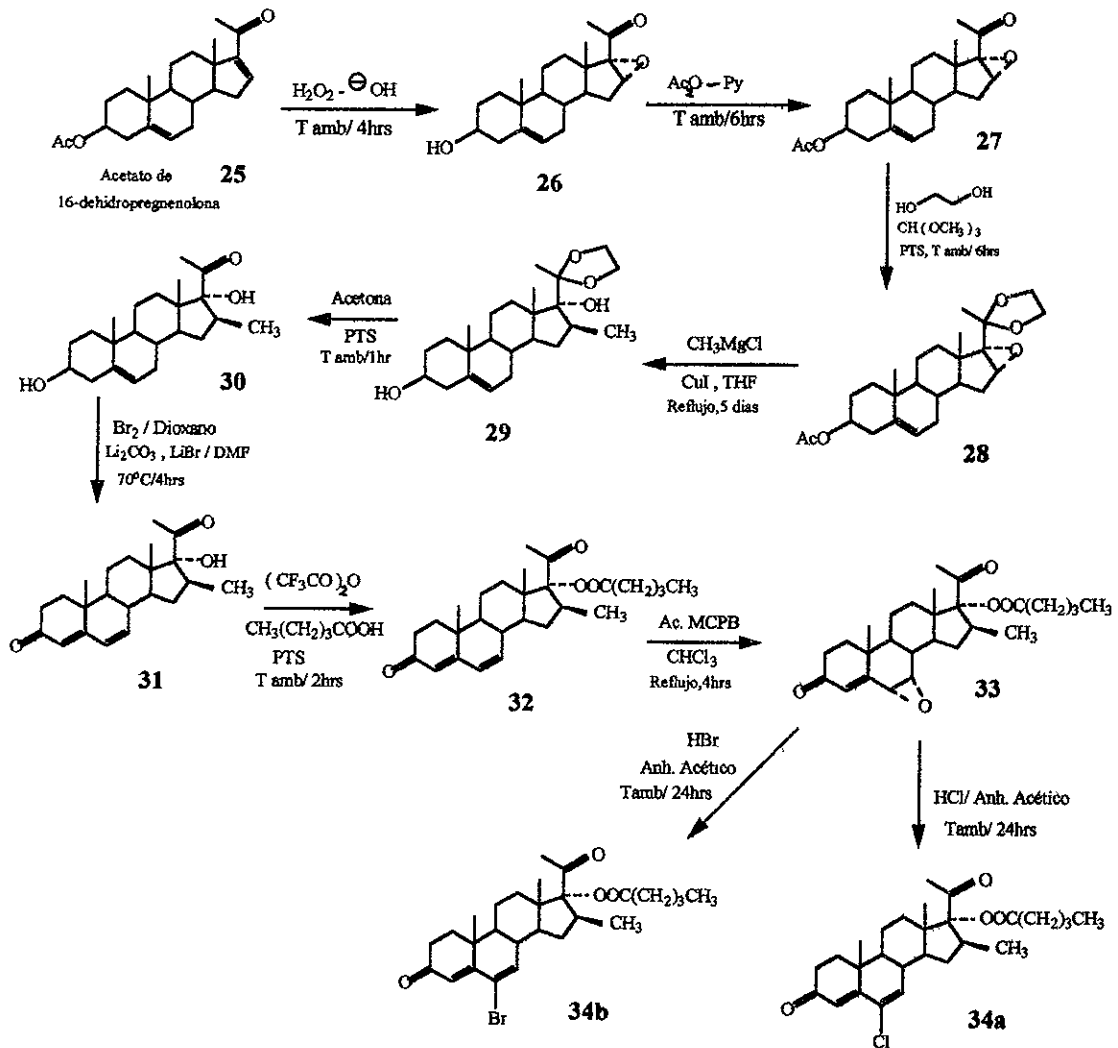
Por otra parte, también se contempla la optimización del proceso de síntesis planteado en este trabajo.

CAPITULO 3.

DISCUSION Y RESULTADOS

3.- DISCUSION Y RESULTADOS:

La preparación de los derivados esteroidales se planteó en base a la ruta de síntesis que se presenta a continuación (figura 7):



PTS: ácido p-toluensulfónico, $\text{Ac}_2\text{O-Py}$: anhídrido acético y piridina, Ac. MCPB : ácido m-cloro-perbenzoico.

FIGURA 7. Esquema de Síntesis.

En la síntesis de los dos nuevos compuestos **34a** y **34b** se utilizó como materia prima el acetato de 16-dehidropregnenolona **25** por su costo accesible, disponibilidad comercial y la presencia de las funciones químicas necesarias para la transformación en nueve pasos a los compuestos finales. En primer término se caracterizó a la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas. El análisis por ultravioleta (espectro 1) mostró la existencia del cromóforo correspondiente a la cetona α,β insaturada en C-20 ($\lambda= 238$ nm). Por espectroscopía de infrarrojo (espectro 2) se observó la presencia de las bandas en 1661.90 y 1729.76 cm^{-1} correspondientes a la cetona α, β insaturada en C-20 y al carbonilo del acetoxi en C-3 respectivamente. En el espectro de resonancia magnética protónica (espectro 3) se observaron cuatro señales simples en 0.92, 1.06, 2.04 y 2.26 ppm, cada señal integra para tres hidrógenos, asignados a los grupos metilos C-18, C-19, C-21 y el metilo del grupo acetoxi en C-3. Se observó un multiplete en 4.68 ppm asignado al protón base del grupo acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se presentó un doblete en 5.40 ppm y una señal en 6.80 ppm que integraron cada una para un protón en C-6 y C-16, respectivamente.

En la ruta de síntesis se propuso la introducción de un grupo metilo en C-16 orientación beta y un hidroxilo en C-17 orientación alfa con el fin de impedir la reducción enzimática del grupo carbonilo en C-20, que causaría disminución en la actividad antiandrogénica. Para tal propósito, el primer paso de la síntesis implicó la epoxidación de la doble ligadura en C16- C17. Se utilizó peróxido de hidrógeno al 30% en un medio básico. La adición nucleofílica (tipo Michael) del anión hidroperóxido sobre la ligadura en C-16 se vio favorecida por la conjugación con la cetona en C-20. El compuesto obtenido **26** se

caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas. Los resultados se compararon con los reportados en la literatura (10, 18).

El espectro de infrarrojo de este compuesto presentó una banda débil en 857.73 cm^{-1} correspondiente al epóxido en C16-C17 y una banda intensa en 1692 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de la cetona en C-20. La banda en 3370 cm^{-1} se asignó al hidroxilo en el C-3, el cual se formó por la hidrólisis en medio básico del grupo acetoxi en C-3. Se observó en 1056.28 cm^{-1} una banda de intensidad media que correspondió al enlace C-O del epóxido. También se observó la desaparición de la señal en 1661.90 cm^{-1} de la cetona α, β insaturada.

El espectro de resonancia protónica (espectro 5) mostró la señal en 3.20 ppm que integró para un protón base del epóxido en C-16 y la desaparición de la señal en 6.80 ppm correspondiente al protón vinílico en C-16. Se observó (por intercambio por deuterio), una señal simple en 3.69 ppm del grupo hidroxilo en C-3. También se registraron tres señales simples que integraron, cada una, para tres hidrógenos en 1.02, 1.05 y 2.03 ppm que correspondieron a los metilos C-18, C-19 y C-21, respectivamente.

El siguiente paso en la síntesis fue la reacción de acetilación del alcohol en C-3 que impidiera la descomposición del reactivo organometálico (cloruro de metil magnesio), el cual sería utilizado para la subsecuente inserción del grupo metilo en C-16. En la introducción del grupo acetoxi en C-3, se empleó la técnica de acetilación convencional que consistió en una mezcla de anhídrido acético y piridina. El derivado acetoxi 27, se

caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas. Los resultados se compararon con los reportados en la literatura 13.

En el espectro de infrarrojo (espectro 6) se observaron dos bandas intensas, una en 1731 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster y otra banda en 1697 cm^{-1} asignada al carbonilo en C-20. Las bandas en 1245 y 1032.03 cm^{-1} se asignaron a las vibraciones C-O-C características del grupo acetoxi en C-3. La ausencia de la señal en 3370 cm^{-1} correspondiente al alcohol confirmó la acetilación en C-3.

El espectro de resonancia protónica (espectro 7), presentó dos señales en 0.97 y 0.98 ppm, que integraron para tres protones cada una y corresponden a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente. En 1.96 ppm se observó una señal que integró para seis protones y correspondió al metilo en C-21 y al metilo del acetoxi en C-3. El protón base del anillo de oxirano se localizó en 3.52 ppm y el protón base del acetoxi en C-3 se observó a 4.58 ppm. Por último, se observó una señal doble de dobles en 5.30 ppm característico del protón vinílico en C-6 acoplado a los protones vecinos en C-7.

En el siguiente paso, el grupo carbonilo en C-20 se protegió por formación de su cetal; debido a que es un centro susceptible al ataque del cloruro de metilmagnesio el cual se utilizó para insertar el grupo metilo en C-16 (orientación beta).

La producción del cetal (derivado etilendioxi 28), se llevó a cabo empleando etilenglicol, ortoformiato de metilo y ácido p-toluensulfónico como catalizador (13). El producto 28, se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

El análisis de infrarrojo (espectro 8) para este compuesto indicó la desaparición de la banda intensa en 1697 cm^{-1} del carbonilo en C-20, confirmando así la transformación. También se apreció la banda intensa de 1719.36 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del acetoxi en C-3.

En el espectro de Resonancia Magnética Protónica (espectro 9), se observaron cuatro señales a 0.99, 1.04, 1.42 y 2.03 ppm correspondientes a los metilos C-18, C-19, metilo en C-21 y metilo del acetoxi en C-3 respectivamente. En 3.39 ppm se ubicó el protón base del epóxido en C-16. La señal múltiple, que integró para cuatro protones en 3.97 ppm confirmó la formación del dioxolano en C-20. La señal múltiple en 4.60 ppm se asignó al protón base del grupo acetoxi en C-3 y la señal doble de dobles en 5.38 ppm se asignó al protón vinílico en C-6.

El paso siguiente de la síntesis fué la apertura del anillo de oxirano, vía un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular (S_n^2). Se empleó el cloruro de metilmagnesio y yoduro de cobre como catalizador. En esta reacción se planteó la inserción del grupo metilo en C-16 beta orientado y simultáneamente la generación del hidroxilo en C-17 alfa orientado (compuesto 29). La mezcla de reacción se mantuvo bajo atmósfera de nitrógeno. El producto obtenido 29 se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas.

El espectro de infrarrojo (espectro 10) confirmó la hidrólisis del acetilo en C-3 por el reactivo organometálico y la apertura del epóxido en C16-C17, al detectar la presencia de la banda correspondiente al alcohol libre en C-17 y C-3 a 3450.22 cm^{-1} . Se presentó una banda intensa en 1044.91 cm^{-1} asignada al grupo C-O-C del etilendioxi.

El espectro de Resonancia Magnética Protónica del compuesto 29 (espectro 11) mostró tres señales en 0.83, 1.01 y 1.40 ppm correspondientes a los metilos en C-18, C-19 y el metilo en C-21 respectivamente. El metilo insertado en C-16 (orientación beta), apareció como una señal doble en 1.20 ppm. La señal múltiple a 3.50 ppm se asignó al protón base del alcohol en C-3. La señal múltiple en 3.92 ppm se asignó a los metilos del grupo etilendioxi en C-20. También se observaron los protones característicos de los hidroxilos libres en C-3 a 3.70 ppm y en C-17 a 2.23 ppm. Por último, en la zona de protones vinílicos se observó una señal doble de dobles en 5.30 ppm perteneciente el protón en C-6 acoplado a los dos protones en C-7.

En el siguiente paso se desprotegió el grupo carbonilo en C-20. En la literatura se han descrito diferentes métodos de hidrólisis del grupo dioxolano. (13, 18-19). Uno de los métodos empleados en trabajos anteriores (13), implicaba una mezcla de reacción con metanol-agua-ácido acético a reflujo moderado, el rendimiento reportado era del 64% . Al parecer el problema de este método se situó en la acidez del medio de hidrólisis, pues la labilidad del alcohol terciario en C-17, permitió fácilmente una reacción de eliminación. El subproducto reportado 35 presentó una insaturación en C16-C17 (figura 8, ref. 13).

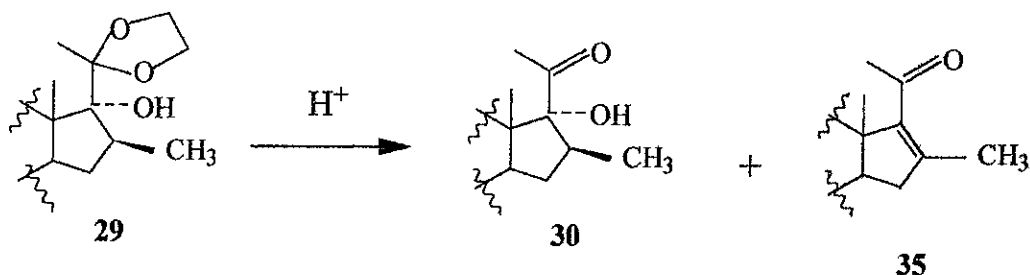


FIGURA 8. Hidrolisis de grupo dioxolano.

Por lo anterior, se decidió hacer una pesquisa bibliográfica para obtener otro método menos drástico para la regeneración del carbonilo en C-20. El método seleccionado se basó en la reacción de transacetalización en medio ácido (19). Se utilizó acetona y ác. p-toluensulfónico a temperatura ambiente. El producto 30 se obtuvo con un rendimiento del 95% y presentó las mismas características físicas y espectroscópicas del producto reportado en la literatura (13).

El espectro de IR del compuesto 30 (espectro 12) mostró una banda intensa en 1690 cm^{-1} asignada al carbonilo de la cetona en C-20, que se generó por la hidrólisis del cetal. Otras bandas de mediana intensidad están en 3400.22 y 3342.58 cm^{-1} correspondientes a los grupos hidroxilos en C-3 beta y en C-17 alfa.

En el espectro de RMP (espectro 13) se verificó la hidrólisis del grupo dioxolano al no registrarse la señal múltiple a 3.92 ppm que integraba para cuatro hidrógenos correspondiente a los metilenos del grupo cetal. Se observaron las señales en 0.96, 0.98, 1.21 y 2.10 ppm correspondientes a los metilos en C-18, C-16 beta, C-19 y C-21, respectivamente. Por otra parte, también se asignó la señal múltiple en 3.50 ppm al protón

en C-3. La señal en 5.31 ppm es característica para el protón vinílico en C-6. También se observaron las señales correspondientes a los grupos hidroxilos en los carbonos C-17 (3.90 ppm) y C-3 (3.41 ppm).

La Espectrometría de Masas por impacto electrónico (espectro 14) presentó un ion molecular de 346 m/z y un pico base en 267 m/z que se da por la pérdida de dos moléculas de agua (deshidratación de los alcoholes en C-3 y C-17) y por la pérdida de la entidad $[\text{MeCO}]^+$. Otras pérdidas registradas a partir del ion molecular aparecieron en 328 y 310 m/z por la pérdida de una o dos moléculas de agua, respectivamente. El pico en 285 m/z se formó por la pérdida de la entidad $[\text{MeCO}]^+$ del pico en 328 m/z.

La metodología para la formación del sistema 4, 6-pregnadien-3-ona en el compuesto **31** anteriormente se describía en dos etapas; primero se oxidaba el sistema 5-en-3-ol por la reacción de Oppenauer (29) para obtener el sistema 4-pregnen-3-ona. Posteriormente, se generaba la doble ligadura en C-6 por deshidrogenación con cloranilo (30-32). Esto implicaba menor rendimiento y mayor costo. El método seleccionado en éste trabajo fue el reportado por Shapiro (13, 18) que permitió, en una sola etapa, la oxidación del alcohol en C-3 y la formación de las dobles ligaduras en C-4 y C-6. La reacción implicó una bromación-deshidrobromación, al utilizar bromo como agente oxidante y el carbonato de litio como base para sustraer el protón en C-7 (figura 9). El producto **31** se obtuvo con un 70% de rendimiento y se caracterizó por sus propiedades espectroscópicas y físicas, las cuales se contrastaron con las propiedades reportadas en la literatura para este compuesto (13).

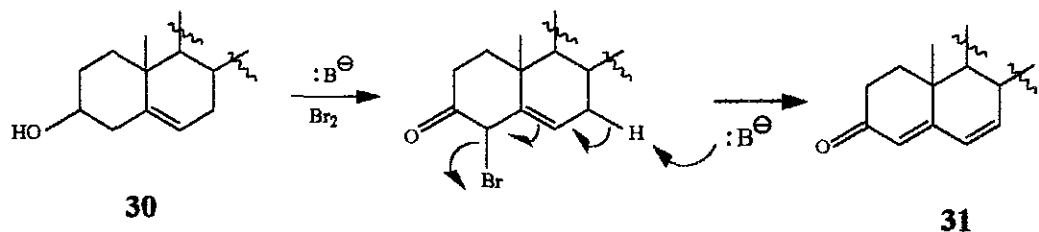


FIGURA 9. Formación del sistema 4,6-pregnadien-3-ona.

La presencia del cromóforo 4, 6-pregnadien-3-ona se confirmó en el espectro de ultravioleta (espectro 15) con la presencia de un máximo de absorción en 284.02 nm.

En el espectro de infrarrojo del compuesto **31** (espectro 16) se observó una señal en 3500.56 cm^{-1} correspondiente al alcohol en C-17. En la zona de carbonilos se observaron dos señales intensas en 1705.93 y 1666 correspondientes al carbonilo en C-20 y al carbonilo $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturado en C-3, respectivamente.

El análisis por RMP (espectro 17) presentó tres señales simples (integración para tres protones cada una) en 0.95, 1.16 y 2.31 ppm correspondientes a C-18, C-19 y C-21, respectivamente. Una señal doble se observó a 1.06 ppm correspondiente al metilo en C-16. En la zona de protones vinílicos se observaron los desplazamientos en 6.16 y 5.72 ppm correspondientes al C-7 y al C-4, respectivamente.

En el espectro de masas (espectro 18) se mostró el ion molecular en 342 m/z. El pico base (324 m/z) de este compuesto **31** se obtuvo por la pérdida de agua (deshidratación en C-17). El pico en 281 m/z se generó al perder la entidad $[\text{MeCO}]^+$ del pico base.

El siguiente paso fue la esterificación del alcohol en C-17 para obtener el compuesto 32. La reacción se llevó a cabo con ácido valérico, anhídrido trifluoroacético y el ácido p-toluensulfónico, como catalizador. En el primer paso se formó el anhídrido mixto valeroiltrifluoroacético que reaccionó con el alcohol en C-17, originando un ester nuevo no reportado en la literatura. La estructura de 32 se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. El rendimiento fue del 70%.

El cromóforo 4, 6-dien-3-ona se determinó por espectroscopía de ultravioleta, en donde se observó un máximo de absorción en 282.11 nm (espectro 19).

El espectro de IR (espectro 20) corroboró la esterificación del hidroxilo en C-17 por la desaparición de la señal en 3500.56 cm^{-1} correspondiente al alcohol libre. Por otra parte se observó una nueva señal intensa en 1726 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del ester valérico y al carbonilo de cetona en C-20. La señal característica del grupo 4, 6-pregnadien-3-ona se observó en 1648 cm^{-1} .

En el espectro de Resonancia Magnética Protónica (espectro 21) se observaron cuatro singuletes (cada uno integró para tres hidrógenos) a 0.79, 1.10, 1.37 y 1.99 ppm correspondientes a los metilos en C-18, C-19, C-16 con una orientación beta y el metilo en C-21, respectivamente. También se observó a 0.87 ppm el metilo del ester valérico y a 2.44 ppm una señal múltiple que integró para seis hidrógenos de la cadena del ester. En la zona de protones vinílicos se encontró una señal simple en 5.70 ppm del protón vinílico en C-4 y en 6.17 ppm una señal doble para cada protón vinílico en C-6 y C-7.

Para el análisis por resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ^{13}C) se consideró la numeración presentada en la figura 10. El derivado esterificado **32** presentó por RMN- ^{13}C normal y DEPT (tabla 2, espectros 22 y 23), la evidencia de cinco metilos en C-16, C-18, C-19, C-21 y C'-5 a 15.00, 16.30, 19.90, 22.20 y 13.90 ppm respectivamente. También se asignaron las insaturaciones en C-4, C-5, C-6 y C-7 en 124.00, 163.00, 128.00 y 140.90 ppm respectivamente.

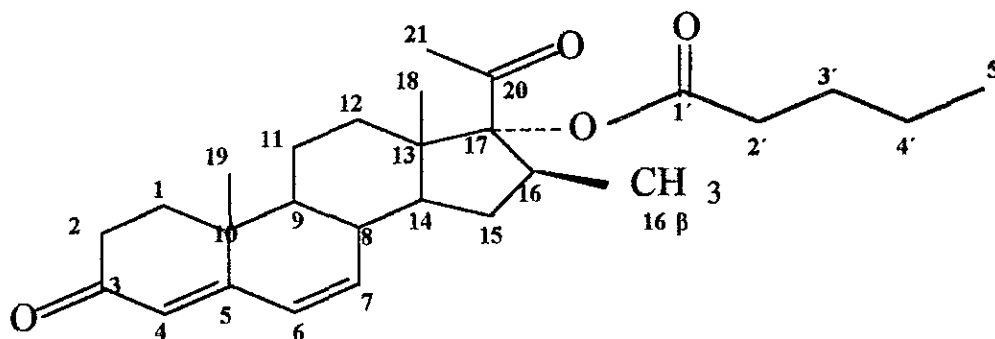


FIGURA 10. Estructura enumerada para el análisis por RMN ^{13}C normal y DEPT.

La señal en 47 ppm se asignó al carbono base del metilo en C-16, la cetona en C-3 (199.13 ppm), el C-17 base del ester en 94.76 ppm y en 204.18 y 173.87 ppm los carbonilos de la cetona en C-20 y del ester en C'-1 respectivamente.

El análisis por espectrometría de masas (espectro 24) mostró un ion molecular en 426 m/z. A partir de esta señal y por la pérdida de la entidad $[\text{MeCO}]^+$ se originó el pico en 383 m/z. Cada una de las señales a 341, 323 y 298 m/z se generó a partir del ion molecular y la pérdida de $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}]^+$ agua o $[\text{MeCO}]^+$ respectivamente. El pico base correspondió a

la señal en 281 m/z y se generó por la pérdida de $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}]^+$ y $[\text{MeCO}]^+$ a partir del ion molecular.

El siguiente paso implicó la formación del epóxido alfa orientado en C6-C-7, debido a que ésta función química es indispensable para la posterior inserción del halógeno en C-6. En la literatura se describe la utilización de perácidos para la epoxidación de dobles ligaduras. Cabe mencionar que en ésta epoxidación no se utilizó el peróxido de hidrógeno en medio básico, porque la entidad nucleofílica $[\text{OOH}]^-$ podría incorporarse (adición tipo Michael) al C-7 y/o al C-5. Lo anterior daría como resultado una mezcla de productos que disminuirían el rendimiento de la reacción. El método seleccionado implicó una reacción estereoespecífica utilizando el ácido m-cloroperbenzoico (**13**, **32**). La especie electrófila se adicionó syn a la ligadura entre C6-C7 (figura 11). La orientación alfa del epóxido resultó del impedimento estérico del metilo angular en C-19 (rendimiento del 70%). Sin embargo, el epóxido beta orientado se ha detectado hasta en un 5%.

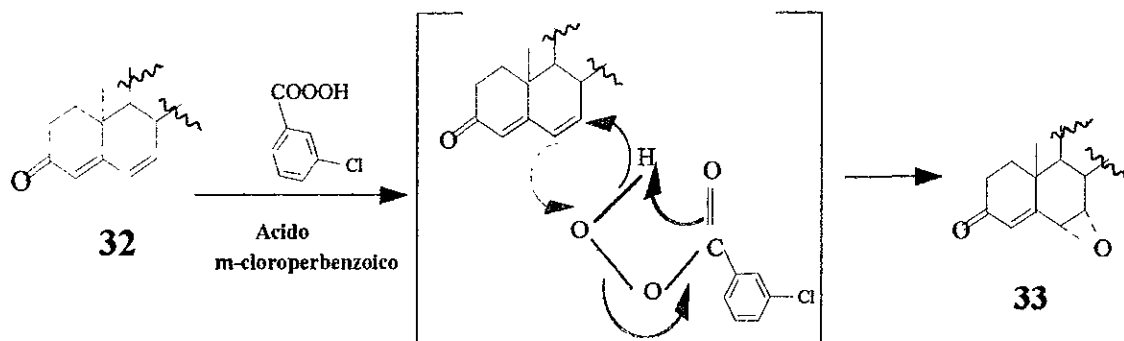


FIGURA 11. Mecanismo de Epoxidación en C6-C7.

El espectro de UV (espectro 25) presentó un máximo de absorción en 236.73 nm correspondiente al cromóforo de la cetona α , β insaturada. La desaparición del sistema 4,6-pregnadien-3-ona en 282.11 nm, fue parte de la evidencia de la presencia del epóxido en la molécula.

El espectro de IR (espectro 26) mostró una banda intensa en 1728 cm^{-1} que correspondió al carbonilo del ester valérico en C-17 y al carbonilo de la cetona en C-20. En 1678.19 cm^{-1} se observó una banda característica de la cetona α , β insaturada.

El análisis por RMP (espectro 27) mostró las señales simples asignadas a los metilos en C-18, C-19, y el metilo en C-21 en 0.71, 1.12 y 1.93 ppm, respectivamente. La señal doble en 1.38 ppm se asignó al metilo en C-16 con una orientación beta. En 0.91 ppm se observó una señal triple correspondiente al metilo del ester. En 3.44 y 3.38 ppm se vio la señal de cada protón base del epóxido entre C-6 y C-7. Por último, en 6.17 ppm se observó el protón vinílico en C-4.

Para el análisis del derivado 33 por RMN ^{13}C normal y DEPT (tabla 3, espectros 28 y 29), se estableció la numeración conforme a la figura 10. La región de los carbonos metílicos y metilénicos no presentó cambios relevantes en los desplazamientos con respecto al compuesto 32. En la zona de carbonos terciarios se observaron variaciones en los carbonos C-4 (131.81 ppm), C-6 (72.30 ppm) y C-7 (62 ppm) por la presencia del grupo oxirano en C6-C7. Por esta razón el carbono cuaternario C-5 se modificó registrando su señal en 128.05 ppm.

En el espectro de masas (espectro 30) se observó el ion molecular en 442 m/z, así como la entidad $[M^+ + 1]$ en 443 m/z. El pico base en 315 m/z se obtuvo de la pérdida de $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}]^+$ y $[\text{MeCO}]^+$ a partir de la señal en 443 ppm. La pérdida del ion $[\text{MeCO}]^+$ a partir del ion molecular dio una señal en 399 m/z y a partir de ésta se fragmentó en 297 m/z por la pérdida del ac. valérico y en 279 m/z por la pérdida de una molécula de agua.

El último paso de la síntesis implicó la inserción del halógeno (cloro ó bromo) en C-6. Se utilizó una mezcla del ácido correspondiente (HCl o HBr) en anhídrido acético (13, 14, 22, 32). En primer término se dio la formación de la halohidrina, la cual por deshidratación formó el derivado halogenado 34a y 34b. Los compuestos halogenados 34a y 34b se identificaron por sus propiedades espectroscópicas y físicas.

El espectro de UV (espectro 31) del compuesto 6-cloro-16 β -metil-4, 6- pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a), presentó la regeneración del cromóforo de la cetona α , β , γ , δ insaturada con un máximo de absorbancia en 285.68 nm.

El espectro de IR (espectro 32) mostró la presencia del carbonilo del ester en C-17 y del carbonilo en C-20 en una señal muy intensa en 1727.34 cm^{-1} . En 1677.63 cm^{-1} se asignó la banda para el carbonilo en C-3.

En el espectro de RMP (espectro 33) se registraron tres señales simples (cada uno integró para tres hidrógenos) en 0.76, 1.13 y 1.95 ppm correspondientes a los metilos en C-18, C-19 y C-21. En 0.90 ppm se vio una señal triple que corresponde al grupo metilo del

ester, por otra parte, el metilo en C-16 mostró una señal doble en 1.35 ppm por la interacción con el protón base en C-16. El fragmento valeriloxi presentó al metileno alfa al carbonilo como una señal triple en 2.38 ppm por la interacción con C-3'. La señal múltiple en 1.69 ppm, que integró para cuatro protones, se asignó a los grupos metilenos C-3' y C-4' de la cadena del ester. En 1.80 ppm se vio una señal múltiple que se asignó al protón en C-8, los protones en C-2 alfa al carbonilo de C-3 dieron una señal múltiple en 2.58 ppm. En la zona de protones vinílicos se observaron dos señales simples en 6.30 y 6.31 ppm correspondientes a cada protón de los carbonos en C-7 y C-4 respectivamente. Al parecer las señales aparecieron muy cercanas por la influencia del halógeno en C-6.

Para el análisis del derivado **34a** por RMN ^{13}C normal y DEPT (tabla 4, espectros 34 y 35), se estableció la numeración considerando la estructura de la figura 10. La región de los metilos y metilenos no presentó cambios relevantes en los desplazamientos con respecto al compuesto **33**. En la zona de carbonos terciarios se observaron variaciones en los carbonos C-4 (122.30 ppm) y C-7 (144.30 ppm) por la presencia del átomo de cloro en C-6. Por esta razón, la señal del C-6 (155.20 ppm) cambió de carbono terciario a cuaternario sin destruir el sistema 4, 6-pregnadien-3-ona.

El espectro de masas (espectro 36) presentó el ion molecular en 460 m/z. El pico base se vio en 333 m/z y se dio por pérdida de los fragmentos $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}]^+$ y $[\text{MeCO}]^+$ a partir del ion molecular. Otras fragmentaciones que se dieron a partir del ion molecular se observaron en 417 m/z por la pérdida de $[\text{MeCO}]^+$, a 376 m/z por la pérdida de $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CO}]^+$, 358 m/z por la pérdida del ácido valérico. Las señales en 315 m/ y 315

m/z se obtuvieron por la pérdida de $[\text{MeCO}]^+$ a partir de los fragmentos en 358 m/z y 359 m/z, respectivamente. La señal en 281 m/z se generó a partir del pico en 315 m/z por la pérdida del átomo de cloro y la señal en 280 m/z por la pérdida de HCl de la señal en 316 m/z (figura 12).

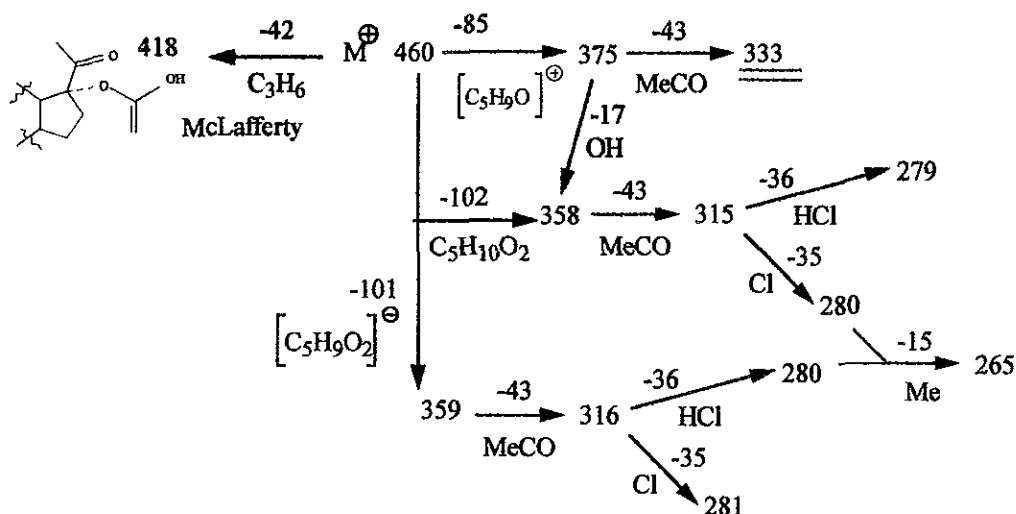


FIGURA 12. Diagrama de fragmentación del derivado clorado **34a**.

Con respecto al compuesto 6-bromo-16 β -metil-4,6 pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (**34b**), el análisis por ultravioleta (espectro 37) verificó la presencia de la cetona en C-3 α , β , γ , δ insaturada con un máximo de absorbancia en 282.43 nm.

El espectro de infrarrojo (espectro 38) mostró una banda muy intensa en 1728 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del ester en C-17 y al carbonilo en C-20. La banda en 1679.95 cm^{-1} se asignó al carbonilo en C-3 α , β , γ , δ insaturado.

En el espectro de RMN (espectro 39) se registraron tres señales simples (cada una integró para tres protones) a 0.78, 1.18 y 1.97 ppm correspondientes a los grupos metilos en C-18, C-19 y C-21, respectivamente. En 0.90 ppm se vio una señal triple del metilo del ester, por otra parte, el metilo en C-16 mostró un doblete en 1.39 ppm por la interacción con el protón base en C-16. El metileno alfa al grupo carbonilo de fragmento valeriloxi se observó como una señal triple en 2.40 ppm por interacción con C-3'. La señal múltiple en 1.61 ppm que integró para cuatro protones se asignó a los metilenos C-3' y C-4' de la cadena del ester. En 1.80 ppm se vio una señal múltiple que se asignó al protón en C-8, los protones en C-2 alfa la carbonilo de C-3 dieron una señal múltiple en 2.50 ppm.

En la zona de protones vinílicos se observaron dos señales simples a 6.35 y 6.60 ppm correspondientes a los protones en C-4 y C-7, respectivamente. El desplazamiento se vio influenciado por la presencia del átomo de bromo en C-6. Cabe mencionar que las señales de los protones en C-4 y C-7 en el compuesto 34b se vieron mejor definidas y mas separadas que las señales homólogas en el compuesto 34a, probablemente por la diferente conformación que presentan las estructuras por la influencia del tamaño y la electronegatividad del los halógenos insertados en C-6.

Para el análisis del derivado 34b por RMN ^{13}C normal y DEPT (tabla 5, espectros 40 y 41), se estableció la numeración considerando la estructura de la figura 10. La región de los metilos y metilenos no presentó cambios relevantes en los desplazamientos con respecto al compuesto 33. En la zona de carbonos terciarios se observaron variaciones en los carbonos C-4 (127.04 ppm) y C-7 (143.30 ppm) por la presencia del átomo de bromo en C-

EVALUACION FARMACOLOGICA.

Se llevó a cabo el estudio *in vitro* de la actividad farmacológica de los nuevos productos 6-cloro-16 β -metil-17 α -valeriloxi-4, 6-pregnadien-3, 20 diona (**34a**), 6-bromo-16 β -metil-17 α -valeriloxi-4, 6-pregnadien-3, 20 diona (**34b**) y sus intermediarios (**25-33**). También se analizaron los compuestos 17 α -butiriloxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20 diona (**20a**) y el 6-bromo-17 α -butiriloxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20 diona (**21a**) (figura 6), que fueron sintetizados anteriormente en nuestro laboratorio (**13**). Todos los compuestos se compararon con el acetato de ciproterona **11** y el proscar **12** (figura 5) que son los fármacos antiandrogénicos del tipo esteroidal utilizados actualmente.

En el ensayo se valoró el porcentaje de inhibición de la enzima 5 α -reductasa como índice de la actividad antiandrogénica (**12, 23-27**). Se empleó el extracto de testículos de dos ratas machos adultos de la cepa Wistar considerando que la isoenzima Tipo II (relacionada directamente al cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna) se encuentra presente predominantemente en la próstata y los testículos (**4, 8-10**). Con los resultados de éste ensayo se planteó la gráfica del porcentaje de inhibición de la enzima 5 α -reductasa *versus* el compuesto analizado (figura 14).

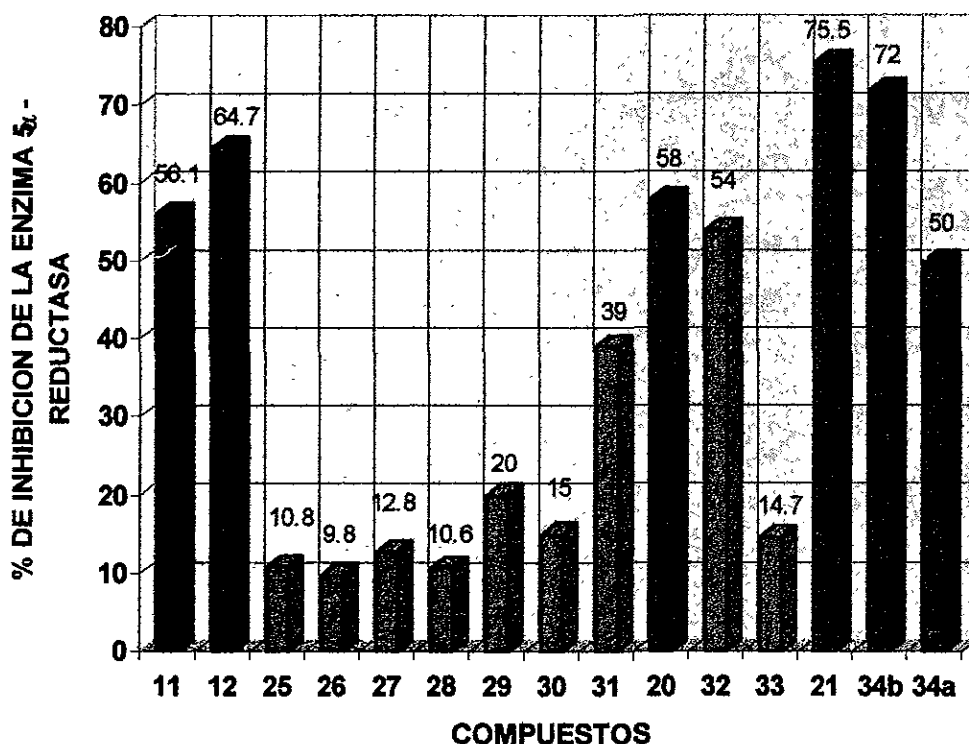


FIGURA 14. Evaluación farmacológica de los intermediarios y compuestos finales.

El análisis de la gráfica mostró que la materia prima 25 y los intermediarios 26-30 y 33 no presentaron actividad inhibitoria apreciable posiblemente por la falta del sistema 4, 6-pregnadien-3-ona. Los compuestos 20 y 32 mostraron un efecto antiandrogénico ligeramente menor o cercano al de proscar 12 pero más alto que el efecto demostrado por el acetato de ciproterona 11. Al parecer el sistema 4, 6-pregnadien-3-ona es uno de los responsables de elevar el poder inhibitorio de éstos compuestos. Por otra parte se observó que el compuesto 32 presentó una actividad considerable con respecto a los estándares, sin embargo dio menor actividad que su homólogo 20 que tiene en C-17 un ester de cadena mas corta. Tal parece que al aumentar la longitud de la cadena del ester baja la actividad farmacológica, probablemente la conformación del esteroide se ve afectada por la

deformación que presente la cadena lineal en C-17 al aumentar su longitud. La importancia del grupo voluminoso en C-17 se comprobó con el derivado 31 que a pesar de tener en su estructura el sistema 4, 6-pregnadien-3-ona presentó menor porcentaje de inhibición de la enzima comparado con el derivado 32 en donde el alcohol en C-17 está esterificado.

Los compuestos 21 y 34b presentaron una actividad inhibitoria mayor que la de los estándares acetato de ciproterona 11 y el proscar 12. Se observó el mismo efecto reportado para los esterés en función de la longitud de la cadena pues a mayor longitud de la cadena en C-17 la actividad inhibitoria sobre la enzima 5α - reductasa decrece.

En la literatura se ha descrito que la enzima 5α -reductasa de humano y rata presentan algunas diferencias con respecto a la especificidad con el grupo voluminoso en C-17 de algunos compuestos (10). Por otra parte, también se conoce que cada isoenzima (tipos I y II) de la enzima 5α -reductasa, se encuentra relacionada a diferentes padecimientos (4, 8-10). Por lo que se sugiere la evaluación *in vitro* utilizando las isoenzimas tipo I y II de la enzima 5α -reductasa de humano para establecer el potencial de los compuestos como inhibidores selectivos.

El derivado bromado 34b, presentó mayor porcentaje de inhibición de la enzima 5α -reductasa comparado con su homólogo clorado 34a, el cual presentó menor actividad biológica aun frente a los compuestos 20 y 32 que no contienen el átomo de halógeno en su estructura.

El bajo poder antiandrogénico que presentó el compuesto 34a resultó acorde con lo descrito en estudios similares para analizar el carácter antiandrogénico de moléculas análogas (14). En éste estudio se analizaron los compuestos 17 - 19 (figura 6, tabla 1, página 17), el derivado clorado 18 presentó un cierto comportamiento androgénico con respecto a su homólogo bromado 19 y al compuesto libre de halógeno 17.

Al parecer, la actividad inhibitoria puede estar vinculada al tamaño del halógeno. Considerando que el átomo de bromo es mas voluminoso que el átomo de cloro, se propone que sea el bromo el que represente mayor impedimento para la reducción del carbonilo en C-3 y por lo tanto se asocie con una mayor actividad antiandrogénica.

Considerando que para la determinación se utilizó un extracto enzimático en donde predominaba la isoenzima tipo II y contemplando la relación inversa que presenta la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo tipo de inhibidor, se propone que el derivado clorado 34a, que presentó menor porcentaje de inhibición de la enzima con respecto al compuesto bromado 34b, tal vez sea mejor inhibidor de la isoenzima Tipo I que de la Tipo II. Para verificar lo anterior, se sugiere un estudio utilizando la isoenzima Tipo I.

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio teórico de la correlación biológica con la estructura de los esteroides 11 (figura 5, página 15), 20-21 (figura 6, tabla 1, página 17) y 34a-34b (figura 7, página 22). Las estructuras fueron construidas empleando la mecánica molecular MMX (38) incluida en el programa PCMODEL (38). Las geometrías fueron optimizadas con el método semiempírico AM1 (39) incluido en el paquete MOPAC 6.0

instalado en una supercomputadora CRAY YMP 4/432 (40). Se determinó el logaritmo del coeficiente de Partición (log P) teórico, utilizando el formalismo de Hückel del programa PIMMS de la serie Oxford Molecular en una estación de trabajo Silicon Graphics Indigo 2 y el hamiltoniano AM1 contenido en el programa UNICHEM (34, 41).

El logaritmo del coeficiente de Partición (log P) es una propiedad relacionada con el carácter hidrofóbico en una molécula y se utiliza para vincular la estructura de las moléculas con su actividad asociada (33). En la literatura se menciona que log P se maneja como un parámetro para establecer el paso de fármaco, a través de las membranas biológicas hasta alcanzar el sitio de acción.

La correlación del log P (teórico) se estudió en función del porcentaje de actividad biológica experimental de los compuestos analizados (figura 15). Los resultados de éste estudio indicaron que la actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α -reductasa disminuyó cuando aumentó se valor de log P teórico (carácter hidrofóbico ó lipofilicidad). Al comparar los esteres 20 (derivado butiriloxi) y 32 (derivado valeriloxi) se observó que al aumentar la longitud de la cadena del ester en C-17, baja la actividad. Un efecto semejante se observó para los compuestos 21 (derivado 6-bromo-17 α -butiriloxi) y 34b (derivado 6-bromo-17 α -valeriloxi), los cuales, mostraron mayor porcentaje de inhibición de la enzima que los estándares acetato de ciproterona 11 y proscar 12. La información obtenida en este análisis fue similar al comportamiento reportado en la evaluación biológica *in vitro*.

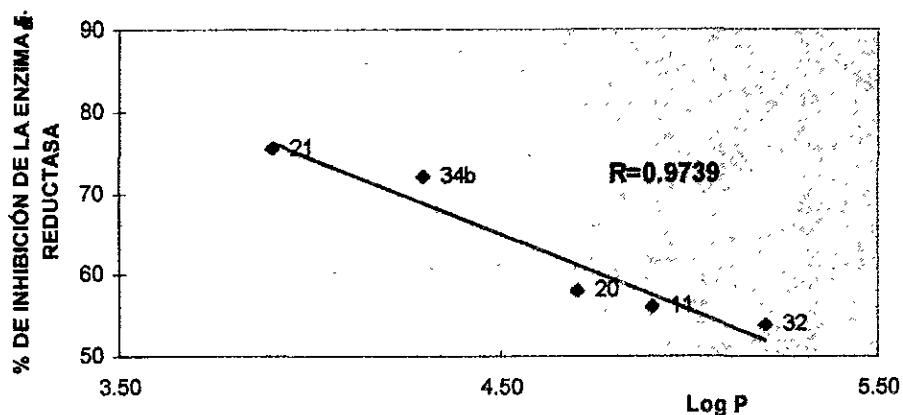


FIGURA 15. Correlación de logP (teórico) en función de la actividad biológica.

Para el desarrollo de nuevas moléculas antiandrogénicas es importante considerar el mecanismo de acción del fármaco. Considerando el mecanismo de reacción propuesto en la literatura (6, 7, 16) para la reducción de la testosterona (**3**) a la 5 α -dihidrotestosterona (**4**) por la acción de la enzima 5 α -reductasa (figura 4), se sugirió que las contribuciones al orbital molecular desocupado de baja energía (LUMO) tienen relación con el porcentaje de actividad biológica experimental. Empleando el programa de mecánica molecular PCMODEL en los esteroides **11** (figura 5, página 15), **20-21** (figura 6, tabla 1, página 17) y **32** y **34b** (figura 7, página 22). Se encontró que las principales contribuciones al LUMO se encuentran en C-3 de cada molécula, por lo que la reducción del esteroide es más probable en este carbono. Se estableció la correlación del porcentaje de la actividad inhibitoria en función de los valores absolutos de los coeficientes de la contribución al LUMO en C-3 (figura 16, serie 1). De este análisis se observó una disminución del porcentaje de inhibición de la enzima cuando aumenta el valor de las contribuciones al LUMO.

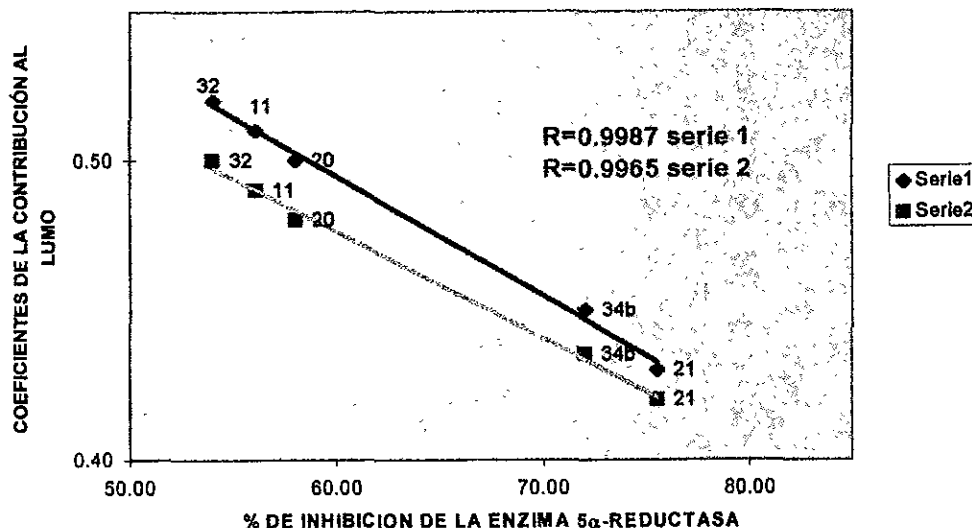


FIGURA 16. Coeficientes de contribución al LUMO en C-3 y C-5.

Los esteroides analizados muestran en su estructura una segunda insaturación en C6-C7 y también el carbono C-5 es susceptible a una reducción. Por lo anterior también se realizó una correlación de las contribuciones al LUMO en C-5 en función al porcentaje de la actividad biológica experimental (figura 16, serie 2). Se observó que el porcentaje de inhibición disminuye cuando aumentan las contribuciones al LUMO. Considerando los resultados presentados en la figura 16 y la propuesta de Petrow (35) para una serie de compuestos similares, se espera que en ambos carbonos (C-3 y C5) se presente una reducción y se favorezca la adición 1-4 o la adición 1-6 (figura 17).

En cada mecanismo de adición se forma un complejo de activación que se asocia a su Energía de Activación (E_{act}), (16, 36). Para que ambas rutas de adición sean factibles la

diferencia entre las energías de los complejos de activación tiene que ser pequeña ($E_{act} < 7$ Kcal/mol). La selección del mecanismo de adición adecuado se basa en la elección del complejo de activación que presente la menor energía (36).

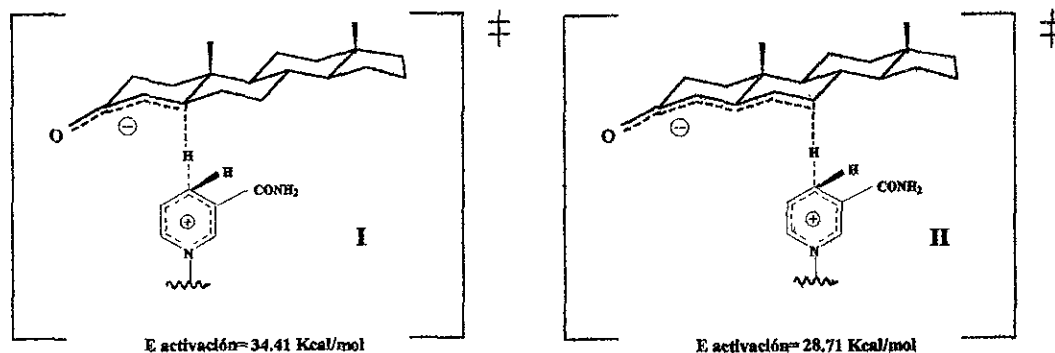


FIGURA 17. Complejos de Activación. I) Adición 1-4, II) Adición 1-6.

Para el desarrollo de éste estudio se simularon las reducciones con el programa AM1 para el biciclo A y B en los esteroides. Este modelo se propuso porque no se encontraron contribuciones importantes al LUMO en los anillos C y D. Se analizó la energía relativa (Kcal/mol) en función de la distancia de reacción C-H (Å), entre el hidruro de NADPH y los carbonos C-5 (complejo de activación I) y C-7 (complejo de activación II). Se observó que el complejo de activación I tiene una energía de 34.41 Kcal/mol para la adición 1-4 y el complejo II presentó una energía de 28.71 Kcal/mol para la adición 1-6. La diferencia entre las energías de activación es de 5.70 Kcal/mol, esto sugiere que aunque los dos mecanismos de adición son factibles se favorece el mecanismo de adición 1-6 por presentar menor energía de activación (figura 17).

CAPITULO 4.

CONCLUSIONES

4.- CONCLUSIONES:

En éste trabajo se presentó la síntesis y la evaluación farmacológica de los compuestos 6-cloro-16 β -metil-4, 6 pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (**34a**) y 6-bromo-16 β -metil-4, 6 pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (**34b**). El rendimiento global para el derivado clorado **34a** fue del 9.90% y para el derivado bromado **34b** fue del 10.35%.

El compuesto **34b** presentó mayor actividad que los estándares acetato de ciproterona (**11**) y el proscar (**12**) que es el fármaco de elección para la inhibición de la enzima 5 α -reductasa actualmente. Sin embargo, presentó menor actividad que su homólogo **21** que tiene menor longitud en la cadena del ester en C-17. Al parecer la longitud de la cadena del ester es inversamente proporcional al porcentaje de inhibición de la enzima enzima 5 α -reductasa. El estudio teórico de la correlación biológica con la estructura de los esteroides utilizando el log P teórico (carácter hidrofóbico o lipofilidad), mostró que la actividad inhibitoria sobre la enzima 5 α -reductasa de lo esteroides disminuye cuando aumenta su lipofilidad.

La inserción de un átomo de halógeno (bromo o cloro) en C-6 le confirió distinta actividad biológica a la molécula. Al introducir el átomo de bromo (compuesto **34b**) se observó una actividad antiandrogénica muy marcada y en el caso del cloro (compuesto **34a**)

se vio una disminución del porcentaje de inhibición de la enzima sugiriendo un cierto carácter androgénico, o bien, que su actividad debe centrarse en la isoenzima Tipo I.

Los resultados de la evaluación farmacológica *in vitro* realizada confirmaron que el porcentaje de inhibición de la enzima aumenta si la molécula conserva la entidad cromófora 4, 6-dien-3-ona, un metilo en C-16, un átomo de bromo en C-6 (beta orientado) y un grupo voluminoso en C-17 considerando que la longitud de la cadena no sea mayor de cinco átomos de carbono.

El análisis teórico del mecanismo de adición de la enzima 5α -reductasa mostró que aunque ambos mecanismos de adición (1-4 y 1-6) son factibles la formación del complejo de activación para la adición 1-6 se favorece por tener asociada la menor energía ($E_{act.} = 28.71 \text{ Kcal/mol}$).

CAPITULO 5.

PARTE EXPERIMENTAL

5.- PARTE EXPERIMENTAL:

Los espectros de infrarrojo se determinaron en el espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Perkin-Elmer modelo 1600. Las determinaciones se realizaron en película. Para indicar la intensidad de las bandas se emplearon las siguientes abreviaturas : (S) fuerte, (M) media y (W) débil.

Los espectros de RMN de Hidrógeno y Carbono-13 para los derivados y productos finales se determinaron en el aparato de RMN Varian VXR-300s, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos están dados en ppm. Los patrones de acoplamiento se designaron con las siguientes abreviaturas : s= señal simple, d= doble, t= triple, dd= doble de dobles, m= múltiple.

El análisis por espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas HP 5985-b CG/MS. Por la técnica de Impacto Electrónico. Los valores se expresan en m/z (masa-carga).

Los espectros de absorción en el UV de los esteroides sintetizados se llevó a cabo en el espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Hitachi modelo 200, utilizando como disolvente metanol.

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

Los compuestos finales se purificaron por cromatografía en capa fina (C.C.F) utilizando gel de sílice Merck 7730. Silicagel 60 GF254 y SilicaGel 60 G.

Etapa A) : Síntesis y caracterización.

4.1 SINTESIS DEL DERIVADO **26** (REF. 13-18).

16 α , 17 α epoxi- 3 β hidroxil- 5- pregnen- 20- ona.

4.1.1. Purificación y caracterización de la materia prima el Acetato de 16-Dehidropregnenolona **25**.

El sólido amarillo se recristalizó con metanol. El producto cristalizó en forma de agujas de color blanco.

Peso Molecular (uma) : 356

Punto de Fusión (°C) : 170-172. Reportado (18), pf.=170-171 °C

UV (espectro 1) λ_{max} = 238.00 nm. (C=O α , β insaturada en C-20)

IR (espectro 2) 2945.27 (W, CH₃-, CH₂-), 1729.76 (S, MeCOOR en C-3), 1661.90 (S, C=O α , β insaturada en C-20), 1583.90 (W, C=C conjugado en C-16), 1372.77 (S, CH₃-), 1247.26 (S, MeCOOR en C-3), 1037.03 (S, MeCOOR en C-3) cm⁻¹.

RMN (espectro 3) 6.80 (t, 1H, J=3Hz, vinílico en C-16), 5.40 (d, 1H, J=3Hz, vinílico en C-6), 4.60 (m, 1H en C-3), 2.26 (s, 3H, Me de acetoxi en C-3), 2.04 (s, 3H, Me en C-21), 1.06 (s, 3H, Me en C-19), 0.92 (s, 3H, Me en C-18) ppm.

4.1.2. Obtención del Epoxi derivado **26**

En un matraz bola de 100 ml, se disolvió la materia prima **25** (1 g, 2.8 mmol) en 66 ml de metanol. Posteriormente se adicionaron 2 ml de una solución de hidróxido de sodio 4 N y 4 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %. La mezcla resultante se agitó por espacio de 4 hrs. a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se destiló el metanol en exceso (por destilación a presión reducida en el rotavapor) y se agregó hielo a la mezcla. Por filtración al vacío se separó un sólido blanco **26**, el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recristalizó con metanol. Rendimiento: 99% (0.92g, 2.79 mmol).

Peso Molecular (uma) : 330

Punto de Fusión (°C) : 180-182. Reportado (**13**, **18**), pf.=180-181 °C

IR (espectro 4) 3370.00 (M, -OH en C-3), 2937.00 (S, CH₃-, CH₂-), 1692.00 (S, C=O en C-20), 1375.90 (M, C=C en C-5), 1056.28 (M, C-O en C-3), 857.73 (W, epóxido C16-C17) cm⁻¹.

RMN (espectro 5) 5.30 (dd, 1H vinílico en C-6, J₁=4Hz y J₂=2Hz), 3.69 (s, 1H, -OH en C-3), 3.52 (s, 1H en C-3), 3.20 (S, 1H base de epóxido en C-16), 2.03 (s, 3H Me en C-21), 1.05 (s, 3H Me en C-19), 1.02 (s, 3H, Me en C-18) ppm.

4.2 SINTESIS DEL DERIVADO **27** (REF. **13**).

3β acetoxi -16α, 17α epoxi- 5- pregnen- 20- ona.

En un matraz bola de 25 ml, se disolvió 1g (3.0 mmol) del producto **26** en 5 ml (61.9 mmol) de piridina. Se agregaron bajo agitación constante 10 ml (106 mmol) de

anhidrido acético. La mezcla de reacción se agitó por 6 horas a temperatura ambiente. Al término de la reacción, la mezcla se vertió en un vaso de precipitados con 30 g de hielo y se agitó vigorosamente por 30 minutos. El precipitado blanco **27** se lavó con agua hasta un pH neutro y se dejó secar. El producto se recristalizó con metanol.

Rendimiento :91% (1.03g, 2.76 mmol).

Peso Molecular (uma) : 372

Punto de Fusión (°C) : 157-159. Reportado (**13**), pf.=160-162 °C

IR (espectro 6) 2942.65 (M, CH₃-, CH₂-), 1731.00 (S, MeCOOR en C-3), 1697.00 (S, C=O en C-20), 1376.09 (M, C=C en C-5), 1245.00 (S, MeCOOR en C-3), 1032.03 (M, MeCOOR en C-3), 852.30 (W, epóxido en C16-C17) cm⁻¹.

RMN (espectro 7) 5.30 (dd, 1H vinílico en C-6, J₁=4Hz y J₂=2Hz), 4.58 (m, 1H en C-3), 3.42 (s, 1H base de epóxido en C-16), 1.96 (s, 6H, Me en C-21 y Me de ester en C-3), 0.98 (s, 3H Me en C-19), 0.97 (s, 3H Me en C-18) ppm.

4.3 SINTESIS DEL DERIVADO **28** (REF. **13**).

3β acetoxi -16α, 17α epoxi- 20 etilendioxi- 5- pregneno.

La formación del producto **28** se llevó a cabo en un matraz bola de 50 ml en donde se disolvió 1g (2.6 mmol) del producto **27** en 6 ml de tolueno. Bajo agitación constante se agregaron, 3.2 ml (53 mmol) de etilenglicol, 4 ml (45 mmol) de ortoformiato de trimetilo y 0.020 g (1.13 mmol) de ac. p-toluensulfónico como catalizador. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas y a temperatura ambiente. Al término de la reacción la

mezcla se neutralizó con 0.097 g (1.18 mmol) de acetato de sodio y se virtió en un embudo de separación que contenía 20 ml de agua. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro y se trató con sulfato de sodio anhidro. Por filtración se separó la sal del líquido el cual se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto **28** se recristalizó con metanol.

Rendimiento :74% (0.83g, 1.99 mmol).

Peso Molecular (uma) : 416

Punto de Fusión (°C) : 194-196. Reportado (**13**), pf.=192-194 °C

IR (espectro 8) 2941.89 (M, CH₃-, CH₂-), 1719.36 (S, MeCOOR en C-3), 1248.00 (S, MeCOOR en C-3), 1033.00 (M, MeCOOR en C-3) cm⁻¹.

RMN (espectro 9) 5.38 (dd, 1H, vinílico en C-6, J₁=4Hz y J₂=2Hz), 4.60 (m, 1H en C-3), 3.97 (m, 4H, etilendioxi en C-20), 3.39 (m, 1H en C-16), 2.03 (s, 3H Me de ester en C-3), 1.42 (s, 3H Me en C-21), 1.04 (s, 3H Me en C-19), 0.99 (s, 3H Me en C-18) ppm.

4.4 SINTESIS DEL DERIVADO **29** (REF. **13**).

3β , 17α dihidroxi- 20 etilendioxi- 3β metil- 5- pregneno.

En un matraz de 50 ml. de dos bocas equipado con un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 1.0 g (2.4 mmol) del producto **28**, 22 ml de una solución de cloruro de metilmagnesio 3M en tetrahidrofurano y 0.30 g (1.58 mmol) de yoduro de cobre como catalizador. La mezcla se mantuvo a reflujo por 5 días, bajo atmósfera de nitrógeno y con

agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente en 20 ml de una solución saturada de cloruro de amonio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto **29** se recristalizó con metanol.

Rendimiento :67% (0.63g, 1.61 mmol).

Peso Molecular (uma) : 390

Punto de Fusión (°C) : 162-165. Reportado (**13**), pf.=160-162 °C

IR (espectro 10) 3450.22 (M, -OH en C-17 y C-3), 2935.00 (S, CH₃-, CH₂-), 2897.00 (S, -O-CH₂- de etilendioxi), 1044.91 (S, C-O-C del etilendioxi) cm⁻¹.

RMN (espectro 11) 5.30 (dd, 1H, vinílico en C-6, J₁=4Hz y J₂=2Hz), 3.92 (m, 4H de etilendioxi en C-20), 3.70 (s, 1H de -OH en C-3), 3.50 (m, 1H en C-3), 2.23 (s, 1H, de -OH en C-17), 1.40 (s, 3H Me en C-21), 1.20 (d, 3H Me en C-16β), 1.01 (s, 3H Me en C-19), 0.83 (s, 3H, Me en C-18) ppm.

4.5 SINTESIS DEL DERIVADO **30** (REF. **13**, **18-19**).

3β , 17α dihidroxi- 16β metil- 5- pregnen- 20 ona.

Se preparó en un matraz bola de 100 ml, una solución del producto **29** (1g, 2.56 mmol) y 0.5 g (28.25 mmol) de ac. p- toluensulfónico (catalizador) en 40 ml de acetona. La mezcla se agitó durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se destiló la acetona en exceso y se agregó hielo a la mezcla. Por filtración al

vacio se separó un sólido blanco **30**, el cual se lavó con agua hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recrystalizó con metanol.

Rendimiento :95% (0.84g, 2.44 mmol).

Peso Molecular (uma) : 346

Punto de Fusión (°C) : 228-230. Reportado (**13, 18**), pf.=227-229 °C

IR (espectro 12) 3400.22 (M, -OH en C-17), 3342.58 (M, -OH en C-3), 2928.00 (S, CH₃-, CH₂-), 1690.00 (S, C=O en C-20), 1052.64 (S, C-O en C-3) cm⁻¹.

RMN (espectro 13) 5.31 (d, 1H vinílico en C-6, J₁=4Hz y J₂=2Hz), 3.90 (s, 1H de -OH en C-17), 3.50 (m, 1H en C-3), 3.41 (s, 1H de -OH en C-3), 2.10 (s, 3H Me en C-21), 1.21 (d, 3H Me en C-19), 0.98 (s, 3H, Me en C-16β), 0.96 (s, 3H Me en C-18) ppm.

Masas (espectro 14) 346 M⁺, 328 (M⁺-H₂O), 310 (M⁺-H₂O-H₂O), 285 (M⁺-H₂O-MeCO), 267 (M⁺-H₂O-H₂O-MeCO, 100%) m/z.

4.6 SINTESIS DEL DERIVADO **31** (REF. **13, 18**).

17α hidroxi- 16β metil- 4, 6- pregnadien- 3, 20 diona.

En un matraz de dos bocas equipado con un embudo de adición y un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 1g (2.89 mmol) del producto **30**, 3g (40 mmol) de carbonato de litio, 2g (22 mmol) de bromuro de litio y 14 ml de dimetilformamida. La suspensión se agitó por espacio de 30 minutos. A través del embudo se adicionó lentamente una solución de bromo (0.93 g, 0.30 ml, 5.82 mmol) en 6.02 ml de dioxano. La mezcla resultante se agitó durante 2.30 horas a 75°C y después se enfrió a

temperatura ambiente. La mezcla se filtró y las sales precipitadas se lavaron con dimetilformamida. Al filtrado se le agregaron 70 ml de una solución de bisulfito de sodio (0.5 g) y bicarbonato de sodio (0.5 g) en 100 ml de agua. Se obtuvo un precipitado amarillo que se separó por filtración a vacío. El producto **31** se recristalizó con acetona y posteriormente con acetato de etilo.

Rendimiento :70% (0.69g, 2.02 mmol).

Peso Molecular (uma) : 342

Punto de Fusión (°C) : 207-209. Reportado (**13, 18**), pf.=211-215 °C

UV (espectro 15) λ_{\max} = 284.02 nm. (C=O α , β , γ , δ insaturada C4-C5, C6-C7)

IR (espectro 16) 3500.56 (M -OH en C-17), 1705.93 (S, C=O en C-20), 1666 (S, C=O α , β , γ , δ insaturada C4-C5, C6-C7), 1617.60 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7) cm^{-1} .

RMN (espectro 17) 6.16 (d, 1H vinílico en C-7, $J_1=4\text{Hz}$ y $J_2=2\text{Hz}$), 5.72 (s, 1H, vinílico en C-4), 5.40 (d, 1H vinílico en C-6, $J=3\text{Hz}$), 3.58 (m, 1H, -OH en C-17), 2.31 (s, 3H Me en C-21), 1.16 (s, 3H Me en C-19), 1.06 (d, 3H Me en C-16 β), 0.95 (s, 3H Me en C-18) ppm.

Masas (espectro 18) 342 M^+ , 324 ($M^+-\text{H}_2\text{O}$, 100%), 281 ($M^+-\text{H}_2\text{O}-\text{MeCO}$) m/z.

4.7 SINTESIS DEL DERIVADO **32** (REF.13, 20-21).

16 β metil- 4, 6- pregnadien- 17 α -valeriloxi- 3, 20 diona.

En un matraz de 50 ml se mezclaron 1.5 ml (1.41 g, 13.79 mmol) de ac. valérico, 6 ml (8.92 g, 42.48 mmol) de anhídrido trifluoroacético y 0.010 g (0.57 mmol) de ac. p-toluensulfónico como catalizador. La mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente. Después se agregó una solución del producto **31** (1g, 2.82 mmol) en 30 ml de cloroformo. La mezcla de reacción se agitó por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro. Se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto **32** se purificó por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano- acetato de etilo (70 :30).

Rendimiento :70% (0.84g, 1.97 mmol).

Peso Molecular (uma) : 426

Punto de Fusión (°C) : 147-149. (No existe p.f. reportado por ser un producto nuevo)

UV (espectro 19) λ_{\max} = 282.11 nm. (C=O α , β , γ , δ insaturada C4-C5, C6-C7)

IR (espectro 20) 2930 (M, CH₃- y CH₂-), 1726 (S, -COO de ester en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1664 (M, C=O α , β , γ , δ insaturada C4-C5, C6-C7), 1618 (W, C=C dieno conjugado C4-C5, C6-C7), 1456 (W, CH₃- y CH₂-), 1224 (W, -COO de ester en C-17), 1174 (W, -COO de ester en C-17) cm⁻¹.

RMN (espectro 21) 6.17 (dd, 2H, vinílicos C-6 y C-7, J₁=4Hz y J₂=2Hz), 5.70 (s, 1H vinílico C-4), 2.44 (m, 6H, CH₂-, de la cadena del ester), 1.99 (s, 3H Me en C-

21), 1.37 (d, 3H Me en C-16 β), 1.10 (s, 3H Me en C-19), 0.87 (t, 3H Me del ester), 0.79 (s, 3H Me en C-18) ppm.

RMN ^{13}C (espectros 22 y 23). Para la asignación de cada carbono ver la figura 10.

TABLA 2. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **32** en Resonancia de Carbono 13.

TIPO DE CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
Primarios (5)	C-16 β :15.00, C-18 :16.30, C-19 :19.90, C-21 : 22.20, C-5' : 13.90
Secundarios (8)	C-1 :32.50, C-2 :31.70, C-11 : 20.20, C-12 :27.00, C-15 : 24.30, C-2' : 34.40, C-3' : 34.00, C-4' :22.20
Terciarios (7)	C-4 :124.00, C-6 :128.00, C-7 :140.90, C-8 :37.50, C-9 :50.00, C-14 : 46.53, C-16 : 47.00
Cuaternarios (7)	C-3 :199.13, C-5 :163.00, C-10 : 36.00, C-13 :48.00, C-17 : 94.76, C-20 : 204.18, C-1' : 173.87

Masas (espectro 24) 426 M^+ , 383 (M^+ -MeCO), 341 (M^+ - $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}$), 323 (M^+ - $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}-\text{H}_2\text{O}$), 324 (M^+ - $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$), 298 (M^+ - $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}-\text{MeCO}$), 281 (M^+ - $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2-\text{MeCO}$, 100%) m/z.

4.8 SINTESIS DEL DERIVADO **33** (REF. 13, 32).

6 α , 7 α -epoxi-16 β metil- 4 pregnen- 17 α -valeriloxi- 3, 20 diona.

En un matraz de dos bocas de 100 ml. equipado con un refrigerante en posición de reflujo se disolvieron el producto **32** (1g, 2.35 mmol) y 1.5 g (8.69 mmol) del ac. m-

cloroperbenzoico en 40ml. de cloroformo. La mezcla se calentó a reflujo por cuatro horas y bajo agitación constante. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se neutralizó con 20 ml de una solución saturada de bicarbonato de sodio. Esta mezcla se extrajo con dos porciones de cloroformo (20 ml c/u). La fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro. Se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó. El producto **33** se purificó por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano- acetato de etilo (70 :30).

Rendimiento :70% (0.73g, 1.65 mmol).

Peso Molecular (uma) : 442

Punto de Fusión (°C) : 158-160. (No existe p.f. reportado por ser un producto nuevo)

UV (espectro 25) λ_{\max} = 236.73 nm. (C=O α,β insaturada C4-C5)

IR (espectro 26) 2930 (M, CH₃- y CH₂-), 1728 (M, COO- del ester en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1678.19 (M, C=O α,β insaturada C4-C5), 1178.20 (M, COO- del ester) cm⁻¹.

RMN (espectro 27) 6.17 (s, 1H vinílico en C-4), 3.44 (d, 1H, base de epóxido en C-6), 3.38 (s, 1H base de epóxido en C-7), 2.37 (m, 6H, CH₂- de la cadena del ester), 1.93 (s, 3H Me en C-21), 1.38 (d, 3H Me en C-16 β), 1.12 (s, 3H Me en C-19), 0.91 (t, 3H Me del ester), 0.71 (s, 3H Me en C-18) ppm.

RMN ¹³C (espectros 28 y 29). Para la asignación de cada carbono ver la figura 10.

TABLA 3. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **33** en Resonancia de Carbono 13.

TIPO DE CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
Primario (5)	C-16 β :15.00, C-18 :17.30, C-19 :20.00, C-21 : 28.50, C-5': 13.90
Secundario (8)	C-1 :31.70, C-2 :28.90, C-11 : 19.81, C-12 :27.00, C-15 : 24.40, C-2': 34.40, C-3' : 32.00, C-4':22.44
Terciario (7)	C-4 :131.81, C-6 :72.30, C-7 :62.00, C-8 :40.50, C-9 : 54.40, C-14: 45.00, C-16 : 46.70
Cuaternario (7)	C-3 :199.10, C-5 :128.05, C-10 : 37.00, C-13 :43.00, C-17 : 95.09, C-20: 204.20, C-1' : 173.90

Masas (espectro 30) 443 $M^+ + 1$, 442 M^+ , 413 ($M^+ + 1 - C_2H_6$), 399 ($M^+ - MeCO$), 358 ($M^+ + 1 - C_5H_9O$), 315 ($M^+ + 1 - C_5H_9O - MeCO$, 100%), 297 ($M^+ - MeCO - C_5H_{10}O_2$), 279 ($M^+ - MeCO - C_5H_{10}O_2 - H_2O$) m/z.

4.9 SINTESIS DEL DERIVADO 34a (REF. 13, 14, 22, 32).

6- cloro- 16 β metil- 4, 6 pregnadien- 17 α -valeriloxi- 3, 20 diona.

La formación del producto 34a se llevó a cabo en un matraz de 250 ml en donde se colocaron 1g (2.26 mmol) de 33 y una mezcla de ácido. clorhídrico (31.0 ml, 37% p/v, $\delta = 1.98$ g/ml) en anhídrido acético (108 ml), previamente preparada. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Después esta mezcla se vertió con precaución sobre hielo y se agitó vigorosamente por 30 minutos. El precipitado formado se filtró y se lavó con agua hasta pH neutro. El producto crudo 34a se purificó

por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano- acetato de etilo (70 :30).

Rendimiento :68% (0.71g, 1.54 mmol).

Peso Molecular (uma) : 460.5

Punto de Fusión (°C) : 163-165. (No existe p.f. reportado por ser un producto nuevo)

UV (espectro 31) λ_{max} = 285.68 nm. (C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5 , C6-C7)

IR (espectro 32) 2954.26 (M, CH₃- y CH₂-), 1727.34 (S, COO- del ester en C-17 y C=O en C-20), 1677.63 (M, C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5 , C6-C7), 1230.25 (M, COO- del ester) cm⁻¹.

RMN (espectro 33) 6.31 (d, 2H vinílicos C-7 y C-4, J₁=4Hz y J₂=2Hz), 2.58 (m, 2H, CH₂- en C-2), 2.38 (t, 2H, CH₂- del ester C'-2), 1.95 (s, 3H Me en C-21), 1.80 (m, 1H en C-8), 1.69 (m, 4H CH₂- en C'-3 y C'-4 del ester), 1.35 (d, 3H Me en C-16 β), 1.13 (s, 3H Me C-19), 0.9 (t, 3H Me del ester), 0.76 (s, 3H Me C-18) ppm.

RMN ¹³C (espectros 34 y 35). Para la asignación de cada carbono ver la figura 10.

TABLA 4. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **34a** en Resonancia de Carbono 13.

TIPO DE CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
Primario (5)	C-16 β :15.00, C-18 :16.10, C-19 :19.00, C-21 : 27.60, C-5': 14.00
Secundario (8)	C-1 :31.80, C-2 :28.00, C-11 : 20.70, C-12 :26.50, C-15 : 24.10, C-2': 34.56, C-3' : 32.00, C-4' :22.00
Terciario (6)	C-4 :122.30, C-7 :144.30, C-8 :39.9, C-9 : 56.00, C-14: 46.00, C-16 :

	51.00
Cuaternario (8)	C-3 :197.00, C-5 :124.10, C-6 :155.20, C-10 : 37.01, C-13 :48.30, C-17 : 94.20, C-20: 205.00, C-1' : 171.00

Masas (espectro 36) 460 M^+ , 417 (M^+ -MeCO), 376 (M^+ -C₅H₉O), 358 (M^+ -C₅H₁₀O₂), 333 (M^+ -C₅H₉O-MeCO, 100%), 315 (M^+ -C₅H₁₀O₂-MeCO), 281 (M^+ -C₅H₉O₂-MeCO-Cl), 280 (M^+ -C₅H₁₀O₂-MeCO-Cl) m/z.

4.10 SINTESIS DEL DERIVADO **34b** (REF. 13, 14, 22, 32).

6-bromo- 16 β metil- 4, 6 pregnadien- 17 α -valeriloxi- 3, 20 diona.

En un matraz de 25 ml se colocaron 1g (2.26 mmol) de **33** y una mezcla de ac. bromhidrico (4.16 ml, 48% p/v, $\delta=1.49$ g/ml) en anhídrido acético (6.6 ml), previamente preparada. La mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Después esta mezcla se vertió con precaución sobre hielo y se agitó vigorosamente por 30 minutos. El precipitado formado se filtró y se lavó con agua hasta pH neutro. El producto crudo **34b** se purificó por cromatografía en capa fina con un sistema de elución hexano- acetato de etilo (70 :30).

Rendimiento :71% (0.81g, 1.60 mmol).

Peso Molecular (uma) : 505

Punto de Fusión (°C) : 170-172. (no existe p.f. reportado por ser un producto nuevo)

UV (espectro 37) λ_{max} = 282.43 nm. (C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5 , C6-C7)

IR (espectro 38) 2954.50 (M, CH₃- y CH₂-), 1728.00 (S, COO- del ester en C-17 y C=O en C-20), 1679.95 (M, C=O α, β, γ, δ insaturado en C4-C5 , C6-C7),

1230.10 (M, COO- del ester en C-17), 1175.50 (M, COO- del ester en C-17) cm⁻¹.

RMN (espectro 39) 6.60 (d, 1H vinílico en C-7, J=3), 6.35 (d, 1H vinílico en C-4, J=3), 2.50 (m, 2H metileno en C-2), 2.4 (t, 2H metileno en C'-2), 1.97 (s, 3H Me en C-21), (m, 1H en C-8), 1.61 (m, 4H metilenos en C'-3 y C'-4 del ester), 1.39 (d, 3H Me en C-16β), 1.18 (s, 3H Me en C-19), 0.90 (t, 3H Me del ester), 0.78 (s, 3H Me en C-18) ppm.

RMN ¹³C (espectros 40 y 41). Para la asignación de cada carbono ver la figura 10.

TABLA 5. Asignación del desplazamiento químico del compuesto **34b** en Resonancia de Carbono 13.

TIPO DE CARBONO	ASIGNACIÓN: ppm
Primario (5)	C-16β :16.50, C-18 :15.00, C-19 :19.00, C-21 : 28.00, C-5': 13.80
Secundario (8)	C-1 :31.90, C-2 :28.40, C-11 : 20.40, C-12 :26.80, C-15 : 24.30, C-2': 34.60, C-3' : 32.40, C-4' :22.30
Terciario (6)	C-4 :127.04, C-7 :143.30, C-8 :40.00, C-9 : 46.40, C-14: 46.00, C-16 : 49.79
Cuaternario (8)	C-3 :199.13, C-5 :121.41, C-6 :159.38, C-10 : 38.00, C-13 :48.50, C-17 : 94.78, C-20: 204.07, C-1' : 173.81

Masas (espectro 42) 506 M⁺+1, 505 M⁺, 463 (M⁺+1-MeCO), 461 (M⁺-MeCOH), 420 (M⁺-C₅H₉O), 403 (M⁺-C₅H₁₀O₂), 377 (M⁺-C₅H₉O-MeCO, 100%), 360 (M⁺-C₅H₁₀O₂-MeCO), 323 (M⁺-C₅H₁₀O₂-HBr), 281 (M⁺-C₅H₁₀O₂-

MeCO-Br), 280 ($M^+ - C_5H_{10}O_2 - MeCO-HBr$) m/z.

Etapa B) Evaluación farmacológica (*In vitro*).

4.11 Extracción de la enzima 5 α - reductasa. (REF. 13, 23-27).

Para el estudio se utilizaron 2 ratas machos adultos de la cepa Wistar con un peso promedio de 250g. Los animales se sacrificaron por desnucamiento y posteriormente se realizó la disección de los testículos. El tejido se homogeneizó con 20 ml de una solución acuosa de KCl 0.17 M. El homogeneizado se filtró y centrifugó a 15, 000 xg a 4 °C durante 30 minutos. El sobrenadante se recuperó y se saturó con 100 ml de una solución de sulfato de amonio al 50 % en frío. El precipitado se dializó con 1 litro de buffer Tris-HCl 25 mM (pH 7.3), durante 24 horas. El dializado obtenido se centrifugó a 10, 000 xg por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante recuperado se utilizó como extracto proteínico para la determinación enzimática. El contenido de proteínas del extracto se determinó por el método de Bradford 28, utilizando albúmina sérica de bovino como referencia.

4.12 Preparación de la mezcla de incubación y cuantificación de la actividad.enzimática.

Se tomaron 100 μ g del extracto proteínico y se incubaron por 30 minutos a 37 °C con 100 mM de solución buffer Tris-HCl (pH 7.0), 100 μ g de NADPH, 500 μ g ($1.74 \cdot 10^{-3}$ mmol) de testosterona y ($1.74 \cdot 10^{-3}$ mmol) del antiandrógeno que se deseaba

analizar. El blanco en ésta determinación contenía todo lo anterior excepto el antiandrógeno. Las referencias utilizadas fueron el acetato de ciproterona **11** y el proscar **12** (figura 5). En este estudio también se analizó a los compuestos 17 α -butiriloxi-16 β -metil- 4, 6- pregnadien- 3, 20- diona **20** y el 6-bromo-17 α -butiriloxi-16 β -metil- 4, 6- pregnadien- 3, 20- diona **21**, previamente sintetizados en nuestro laboratorio (figura 6, referencia **13**).

La actividad enzimática se determinó siguiendo la disminución de la concentración de NADPH por espectroscopia de UV. ($\lambda=340$ nm). Los resultados obtenidos para cada muestra fueron el promedio de cuatro determinaciones. Los datos se graficaron en función del % de inhibición de la enzima 5 α -reductasa *versus* el tipo de esteroide (figura 14).

Etapa C) Correlación de la actividad biológica con la estructura de los esteroides.

Las estructura de los esteroides propuestos fueron construidas empleando la mecánica molecular MMX (**38**) incluido en el programa PCMODEL para Windows versión 1.0, Serena Software. Las geometrías fueron optimizadas con el método semiempírico AM1 (Atomic Molecular 1), (**39**) incluido en el paquete MOPAC6.0 (**40**) que está instalado en la supercomputadora CRAY YMP 4/432. Las propiedades electrónicas (Orbital molecular desocupado de baja energía -LUMO- y la Energía de

Activación) y el logaritmo del coeficiente de partición se calcularon utilizando el formalismo de Hückel del programa PIMMS de la serie Oxford Molecular en la estación de trabajo Silicon Graphics Indigo 2 y el Hamiltoniano AM1 contenido en el programa UNICHEM (41).

Los resultados del logaritmo del coeficiente de partición ($\log P$) teórico de las moléculas seleccionadas se graficaron en función de la actividad biológica experimental que presentaron en el ensayo *in vitro* (figura 15). Los resultados a las contribuciones en LUMO y las Energía de activación se analizaron en función del mecanismo de adición en la reducción de la testosterona a la 5α -dihidrotestosterona (figura 4, página 12) y el sistema cromóforo 4, 6-dien-3-ona presente en las moléculas sintetizadas. Los resultados se presentan en las figuras 16 y 17 del capítulo 3.

CAPITULO 6.

ANEXO EXPERIMENTAL

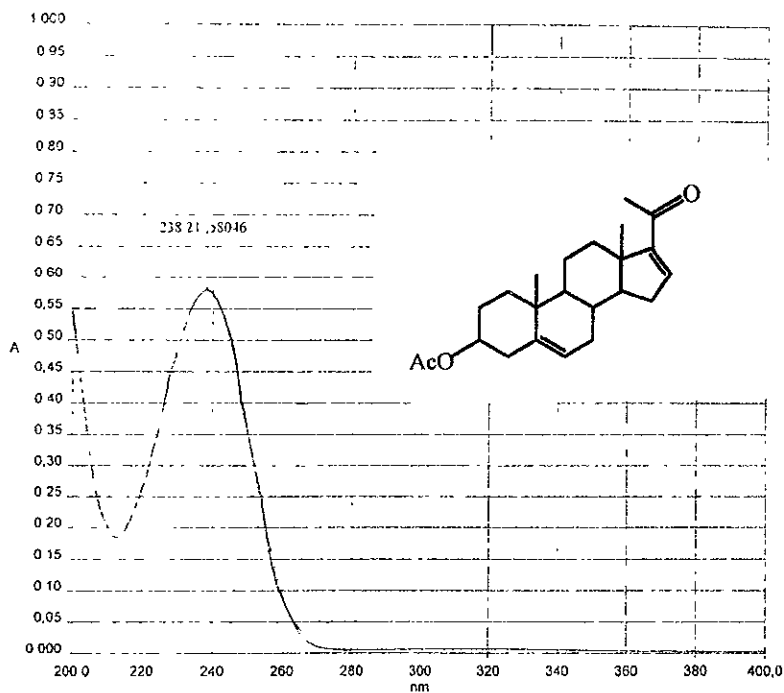
6. ANEXO EXPERIMENTAL: Lista de Espectros.

Espectro	Contenido	Pág.
1	Ultravioleta del compuesto Acetato de 16-Dehidropregnenolona (25).	75
2	Infrarrojo del compuesto Acetato de 16-Dehidropregnenolona (25).	75
3	Resonancia Magnética Protónica del compuesto Acetato de 16-Dehidropregnenolona (25).	76
4	Infrarrojo del compuesto 16 α , 17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (26).	76
5	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 16 α , 17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (26).	77
6	6. Infrarrojo del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α , 17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (27).	77
7	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α , 17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (27).	78
8	Infrarrojo del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α , 17 α -epoxi-20- etilendioxi 5-pregнено (28).	78
9	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α , 17 α -epoxi-20- etilendioxi-5-pregнено (28).	79
10	Infrarrojo del compuesto 3 β , 17 α -Dihidroxi-20- etilendioxi-16 β -metil-5-pregнено (29).	79

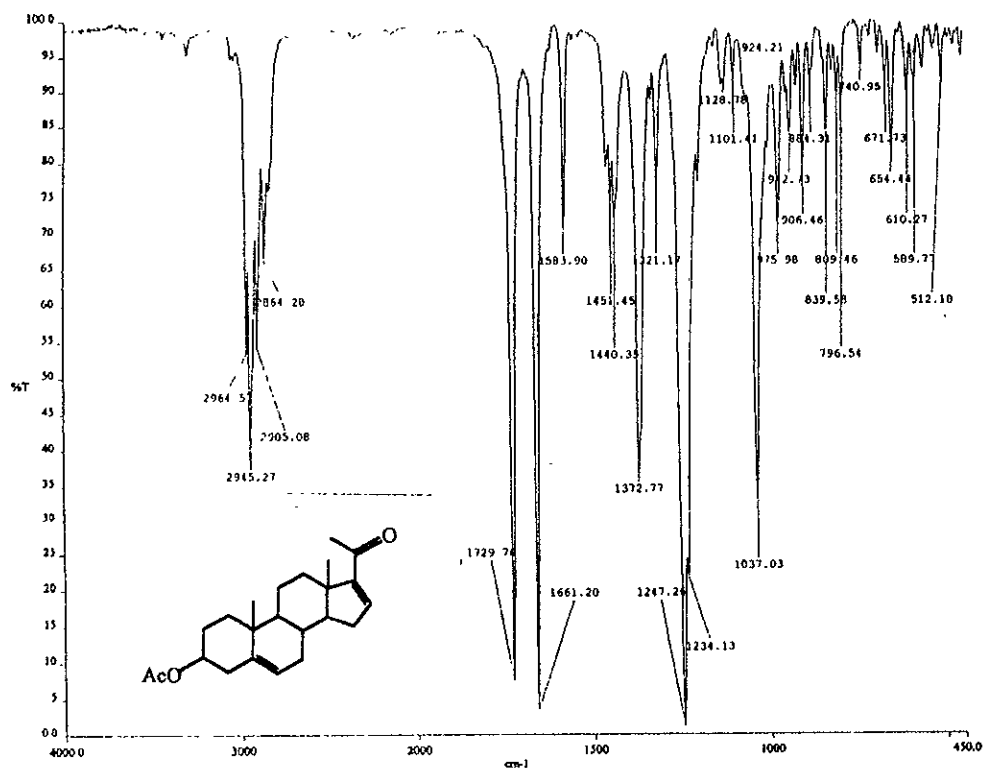
11	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3 β , 17 α -Dihidroxi-20- etilendioxi-16 β -metil-5-pregнено (29).	80
12	Infrarrojo del compuesto 3 β , 17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregn-20 ona (30).	80
13	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3 β , 17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregn-20 ona (30).	81
14	Espectroscopía de Masas del compuesto 3 β , 17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregn-20 ona (30).	81
15	Espectro de Ultravioleta del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).	82
16	Infrarrojo del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).	82
17	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).	83
18	Espectroscopía de Masas del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).	83
19	Espectro de Ultravioleta del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).	84
20	Infrarrojo del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).	84
21	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).	85

22	Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).	85
23	RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).	86
24	Espectroscopía de Masas del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).	86
25	Espectro de Ultravioleta del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).	87
26	Infrarrojo del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).	87
27	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).	88
28	Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).	88
29	RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).	89
30	Espectroscopía de Masas del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).	89
31	Espectro de Ultravioleta del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).	90
32	Infrarrojo del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -	90

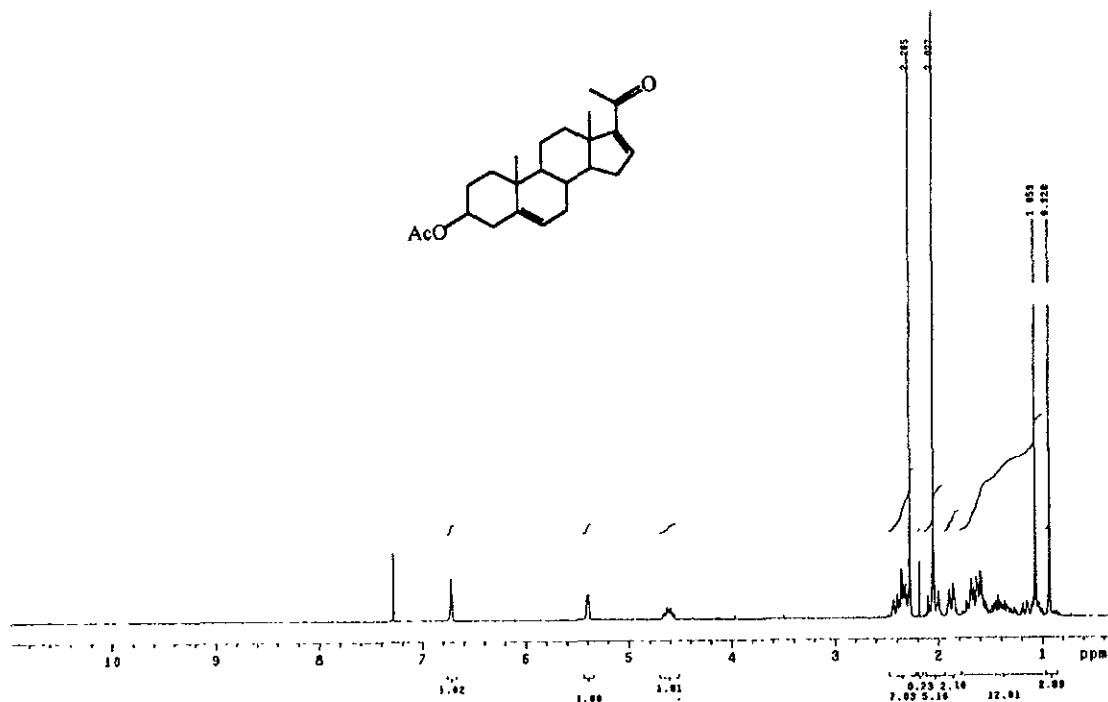
	valeriloxi-3, 20-diona (34a).	
33	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).	91
34	Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).	91
35	RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).	92
36	Espectroscopía de Masas del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).	92
37	Espectro de Ultravioleta del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).	93
38	Infrarrojo del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).	93
39	Resonancia Magnética Protónica del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).	94
40	Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).	94
41	RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).	95
42	Espectroscopía de Masas del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).	95



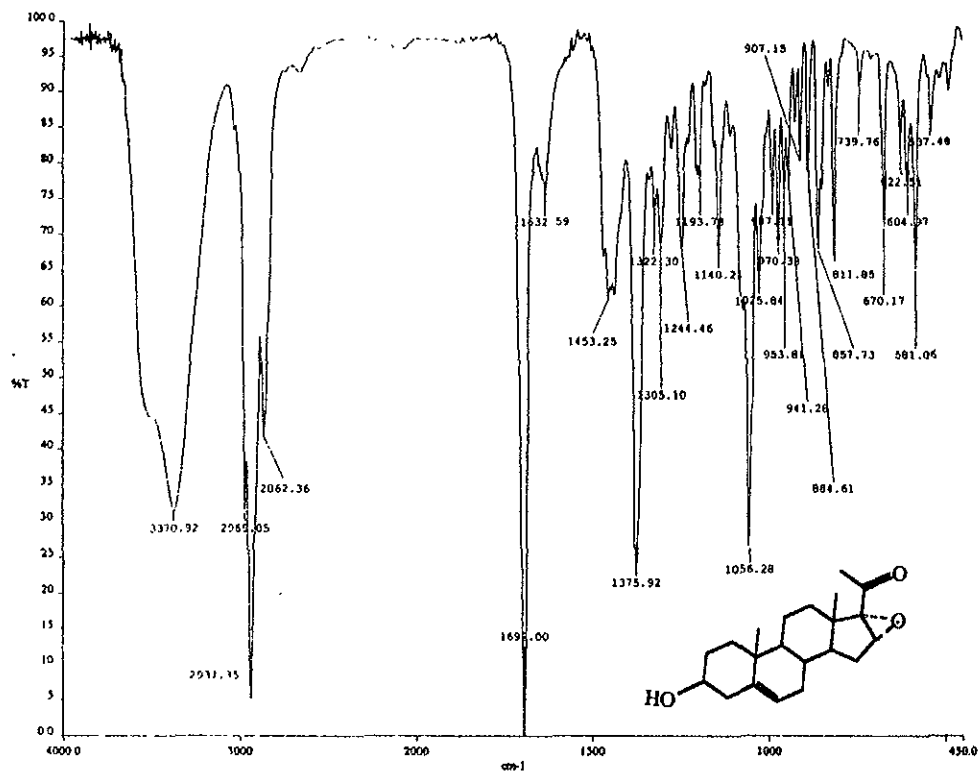
ESPECTRO 1. Ultravioleta del compuesto Acetato de 16-Dehidropregnenolona (25).



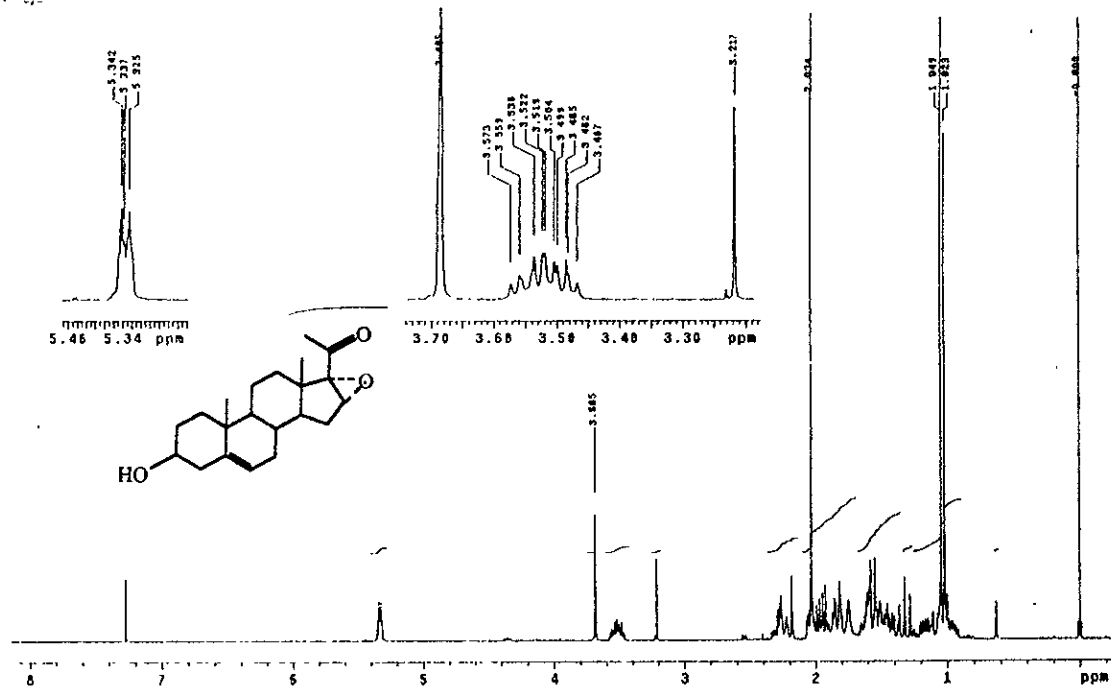
ESPECTRO 2. Infrarrojo del compuesto Acetato de 16-Dehidropregnenolona (25).



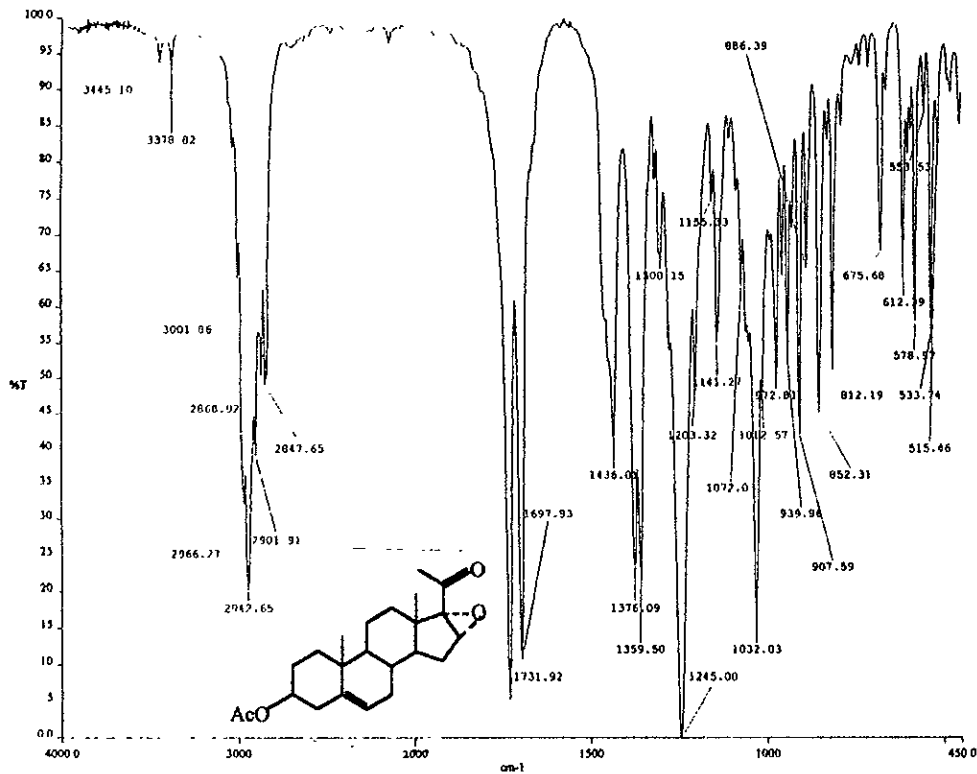
ESPECTRO 3. Resonancia Magnética Protónica del compuesto Acetato de 16-Dehidropregnenolona (25).



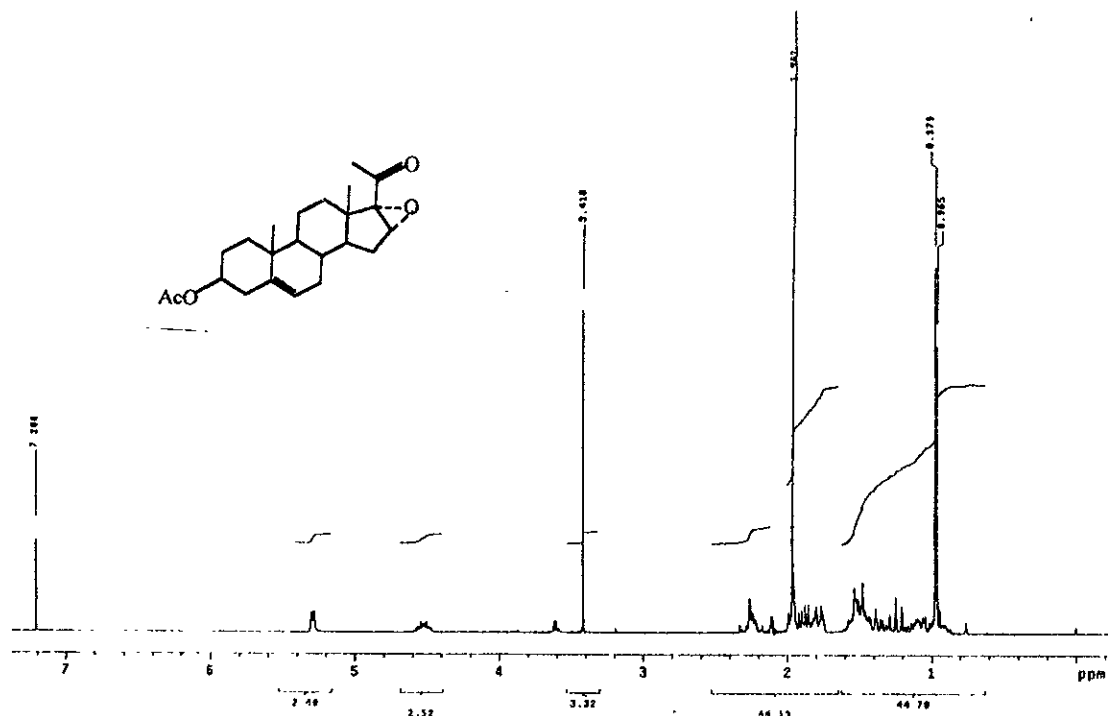
ESPECTRO 4. Infrarrojo del compuesto 16α, 17α-Epoxi-3β-hidroxi-5-pregnen-20-ona (26).



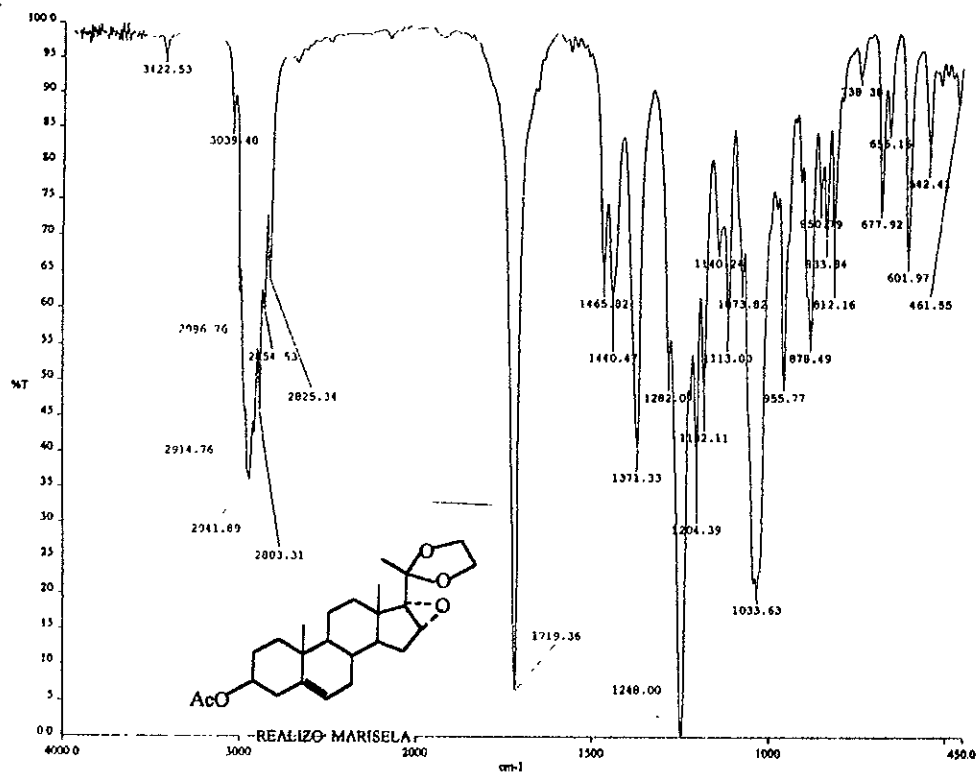
ESPECTRO 5. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 16 α , 17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (26).



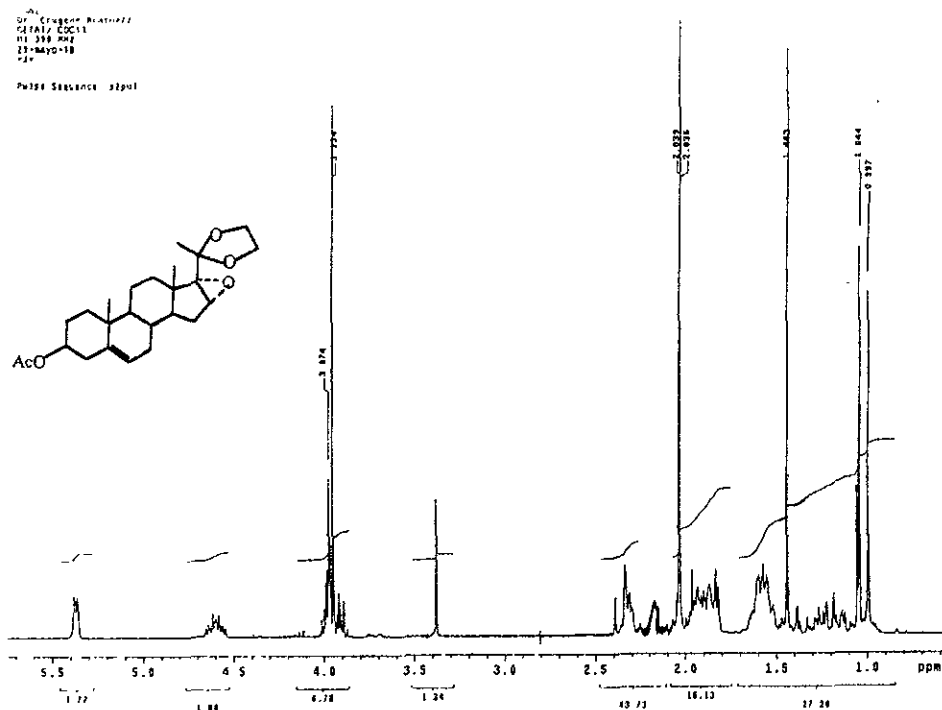
ESPECTRO 6. Infrarrojo del compuesto 3 β -Acetoxy-16 α , 17 α -epoxy-5-pregnen-20-ona (27).



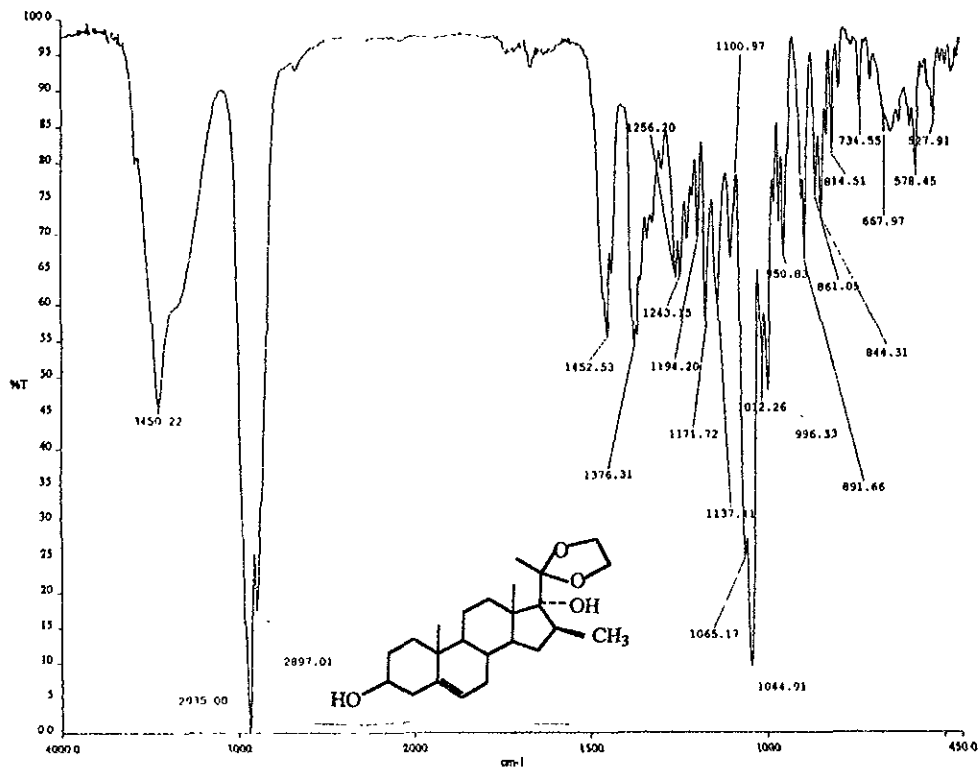
ESPECTRO 7. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3β-Acetoxy-16α, 17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (27).



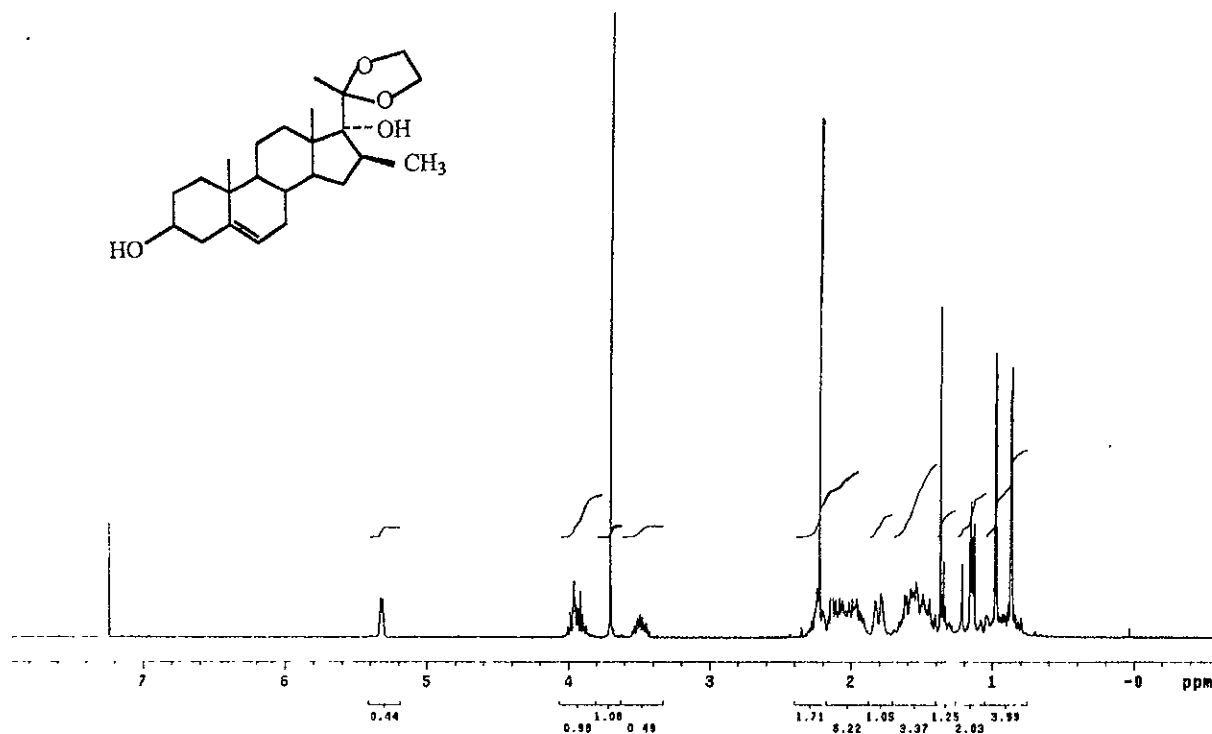
ESPECTRO 8. Infrarrojo del compuesto 3β-Acetoxy-16α, 17α-epoxi-20- etilendioxi-5-pregнено (28).



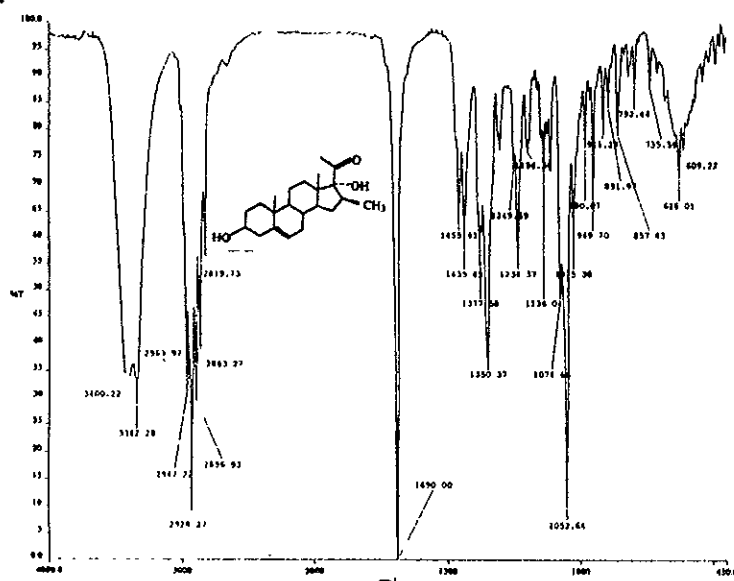
ESPECTRO 9. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3β-Acetoxy-16α, 17α-epoxi-20- etilendioxi-5-pregнено (28).



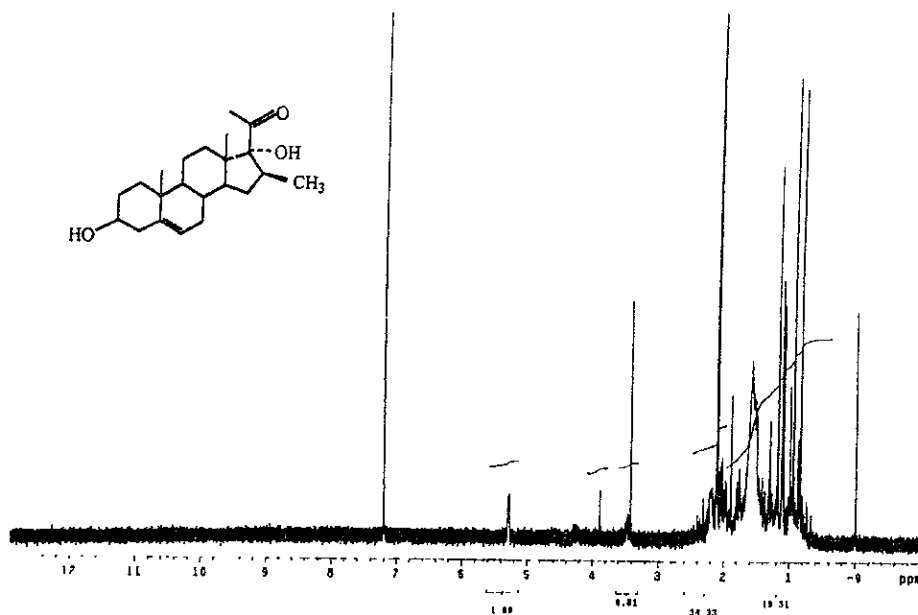
ESPECTRO 10. Infrarrojo del compuesto 3β, 17α-Dihidroxi-20- etilendioxi-16β-metil-5-pregнено (29).



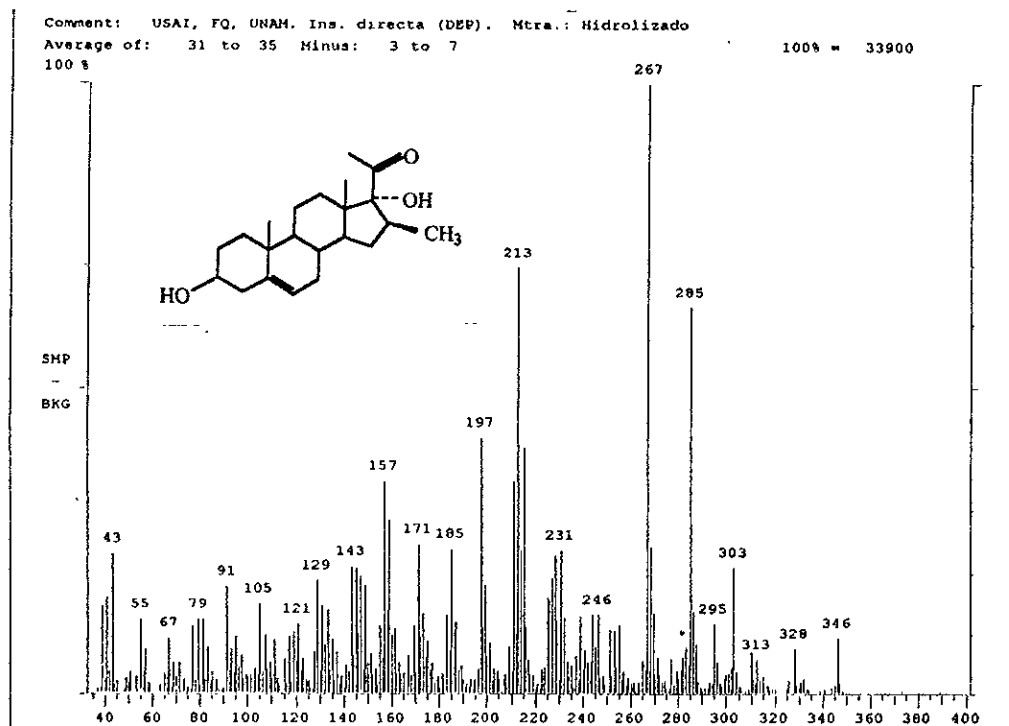
ESPECTRO 11. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3β , 17α -Dihidroxi-20- etilendioxi- 16β -metil-5-pregno (29).



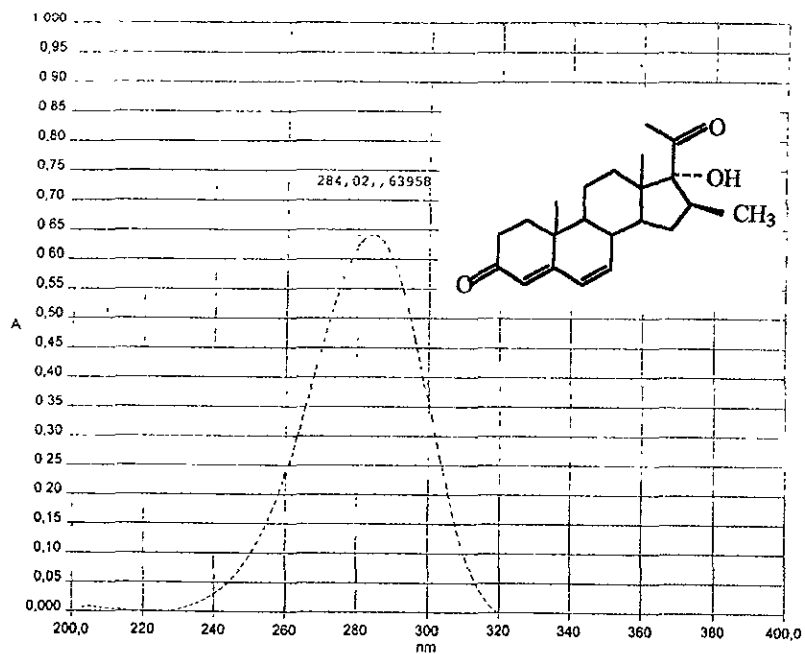
ESPECTRO 12. Infrarrojo del compuesto 3β , 17α -Dihidroxi- 16β -metil-5-pregno (30).



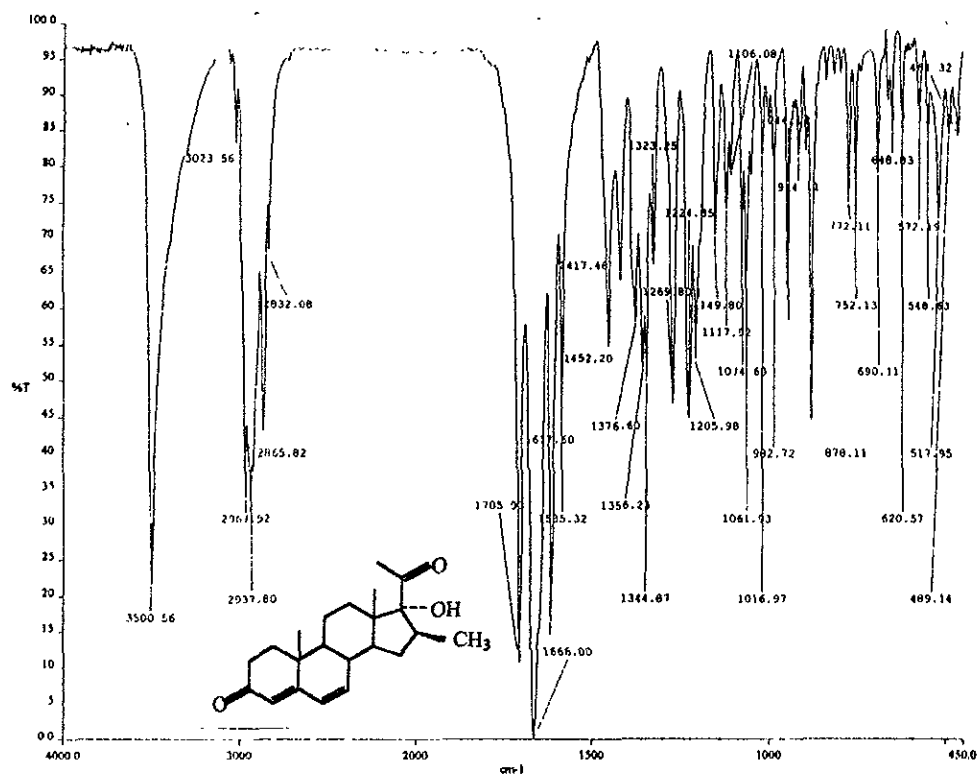
ESPECTRO 13. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 3β, 17α-Dihidroxi-16β-metil-5-pregn-20 ona (30).



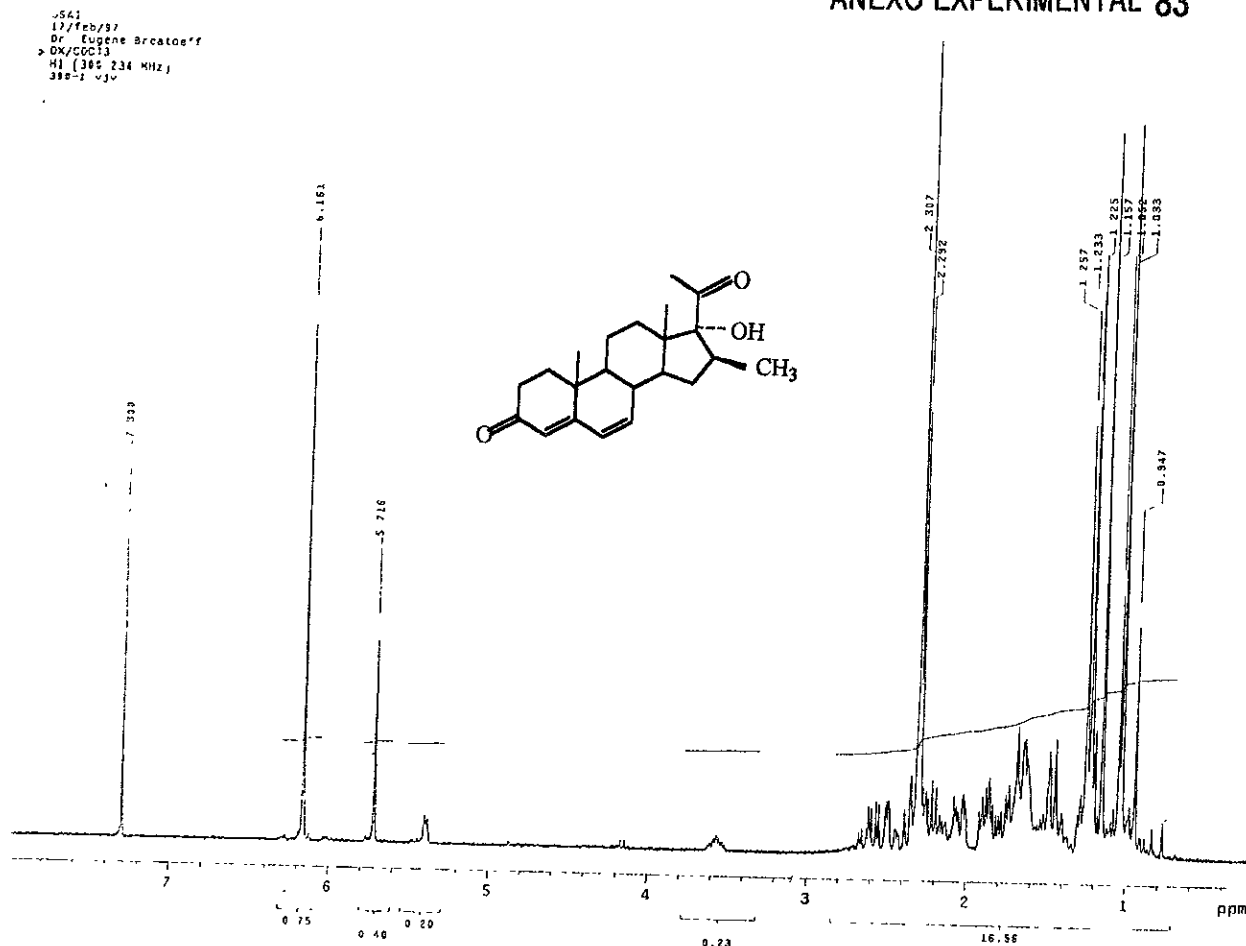
ESPECTRO 14. Espectroscopía de Masas del compuesto 3β, 17α-Dihidroxi-16β-metil-5-pregn-20 ona (30).



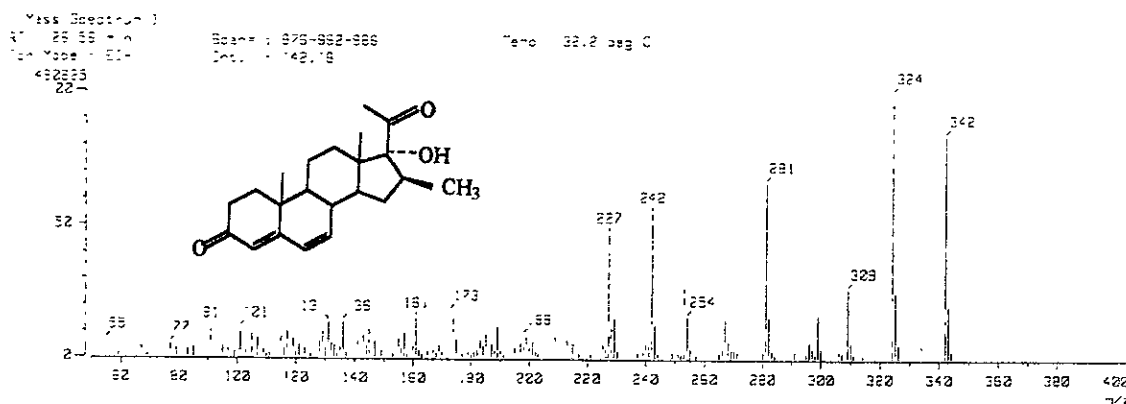
ESPECTRO 15. Espectro de Ultravioleta del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).



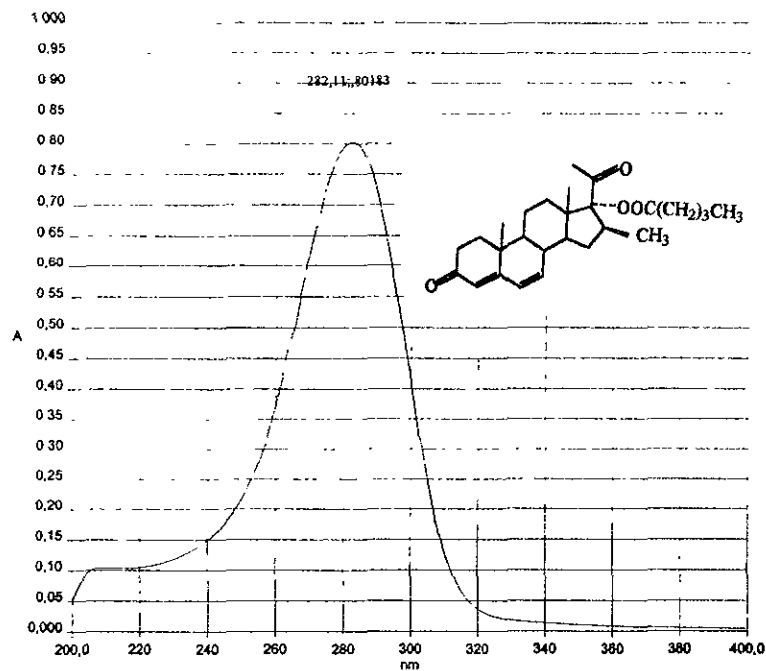
ESPECTRO 16. Infrarrojo del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).



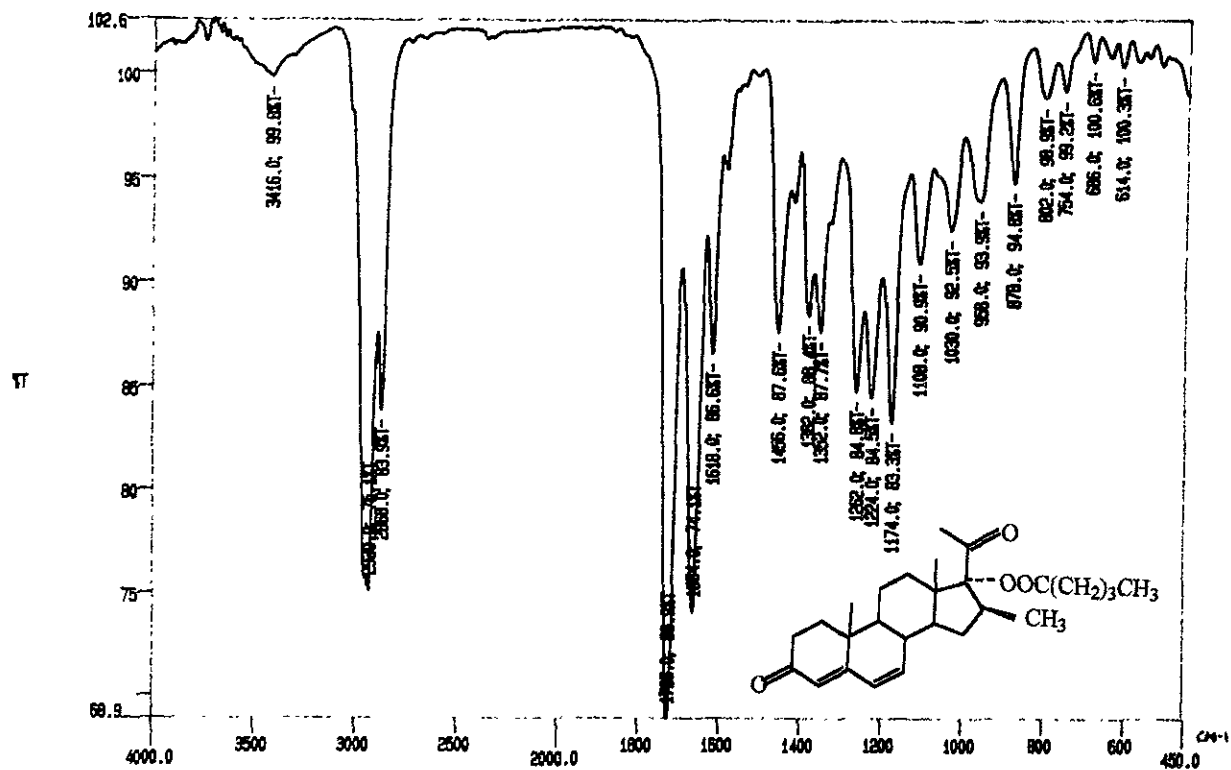
ESPECTRO 17. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).



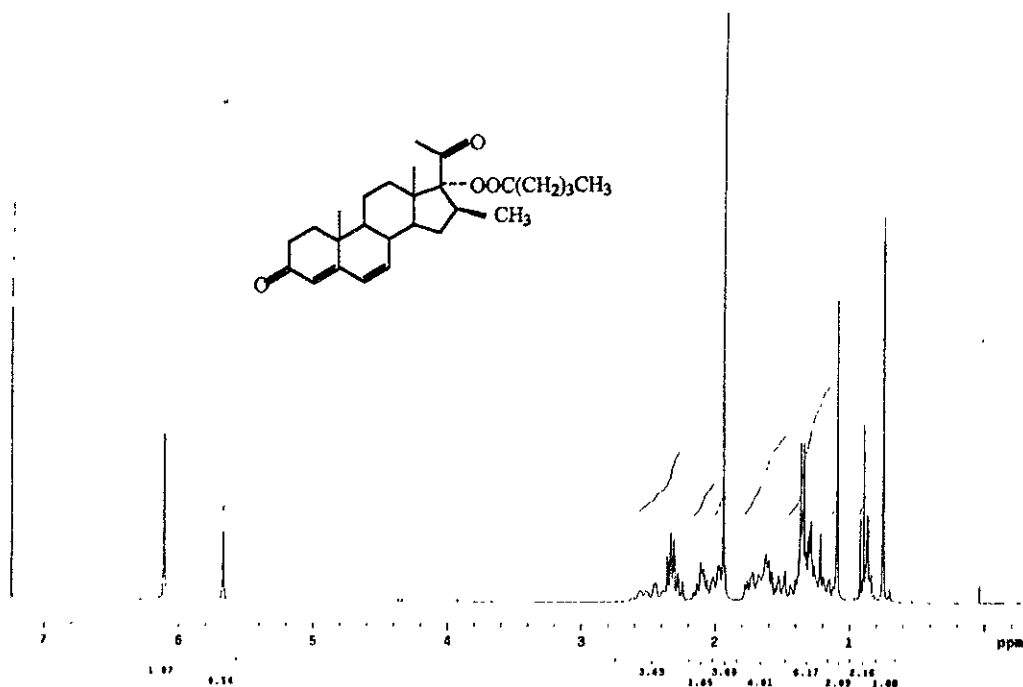
ESPECTRO 18. Espectroscopía de Masas del compuesto 17 α -Hidroxi-16 β -metil-4, 6-pregnadien-3, 20-diona (31).



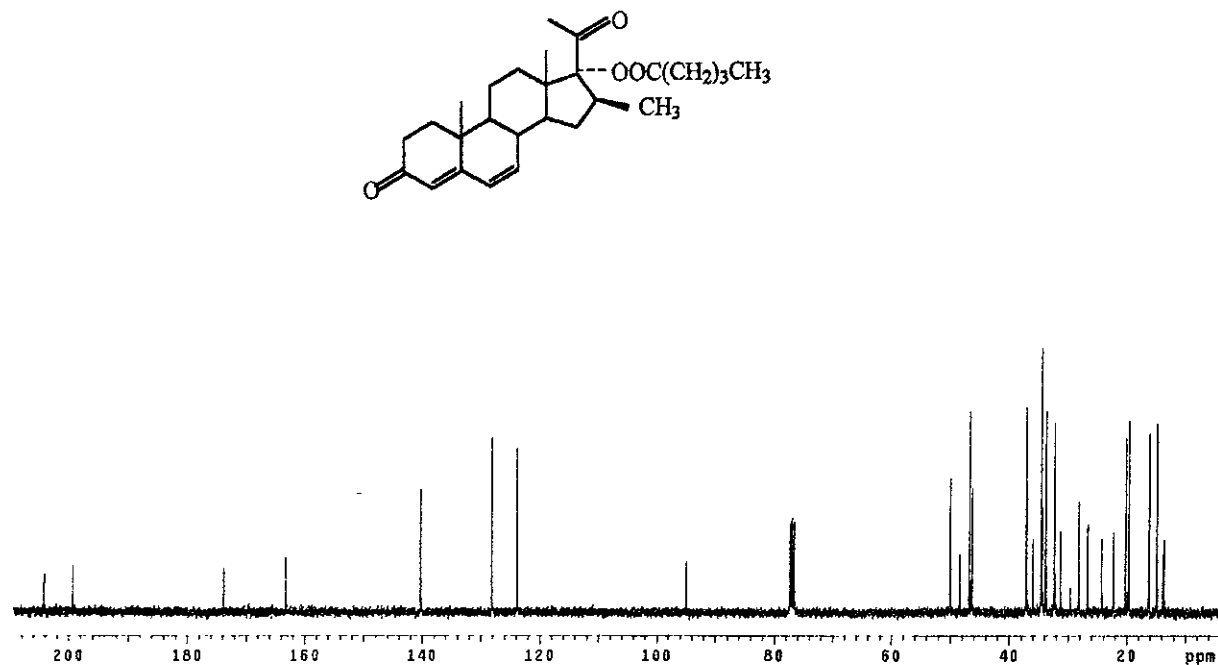
ESPECTRO 19. Espectro de Ultravioleta del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).



ESPECTRO 20. Infrarrojo del compuesto 16 β -Metil-4, 6-pregnadien-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (32).

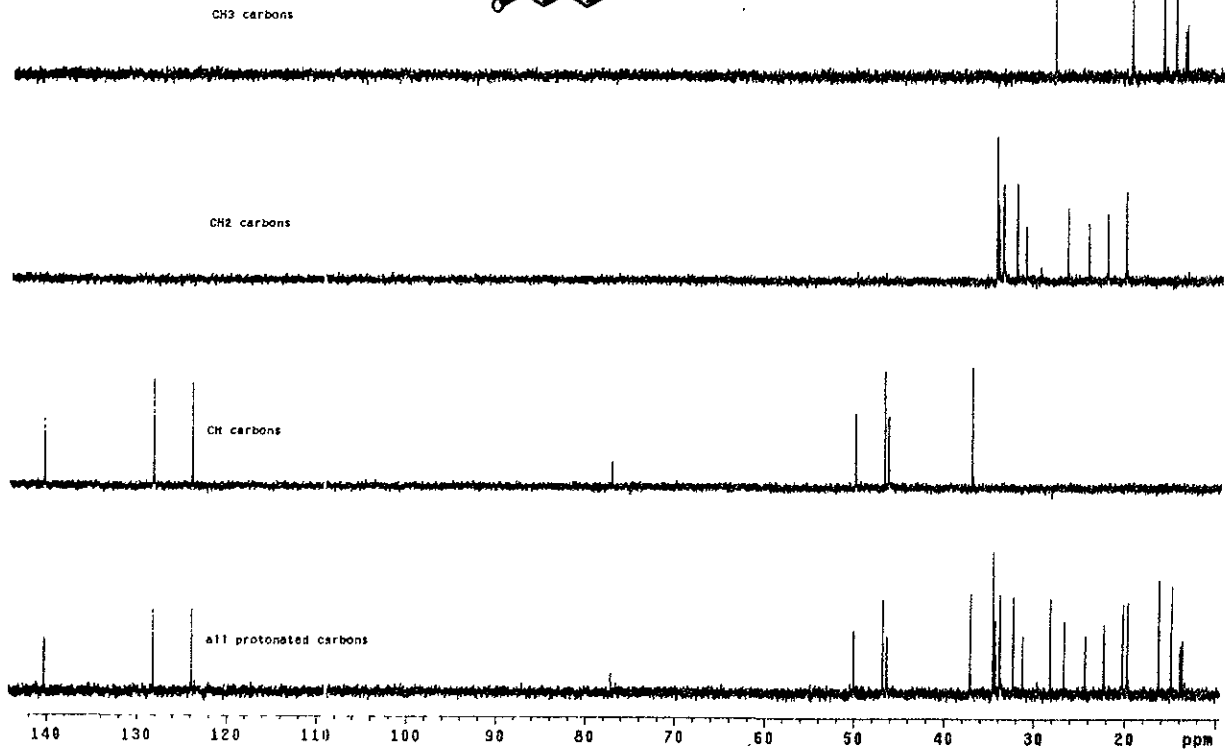
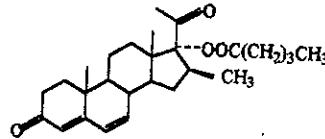


ESPECTRO 21. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 16β-Metil-4, 6-pregnadien-17α-valeriloxi-3, 20-diona (32).

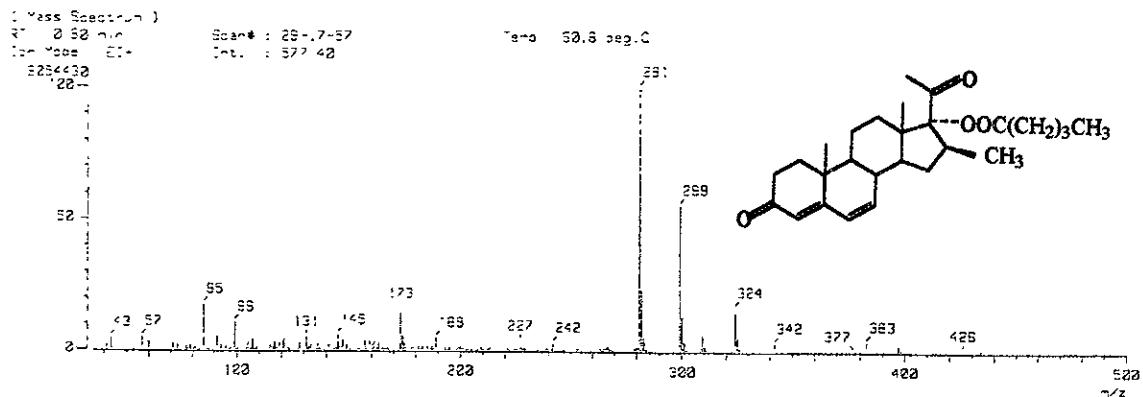


ESPECTRO 22. Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 16β-Metil-4, 6-pregnadien-17α-valeriloxi-3, 20-diona (32).

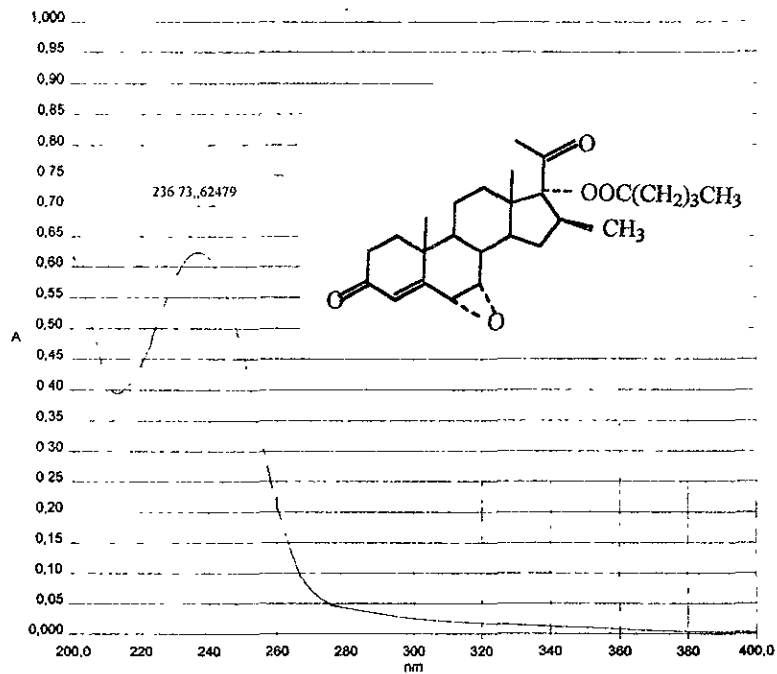
USA1
14 MAYO 1988
Dr. Eugenia Bratoeff T
Est-Va/00013
C13 100 MHz
Ref CDC13 77 ppm
Equipo 405
FOM



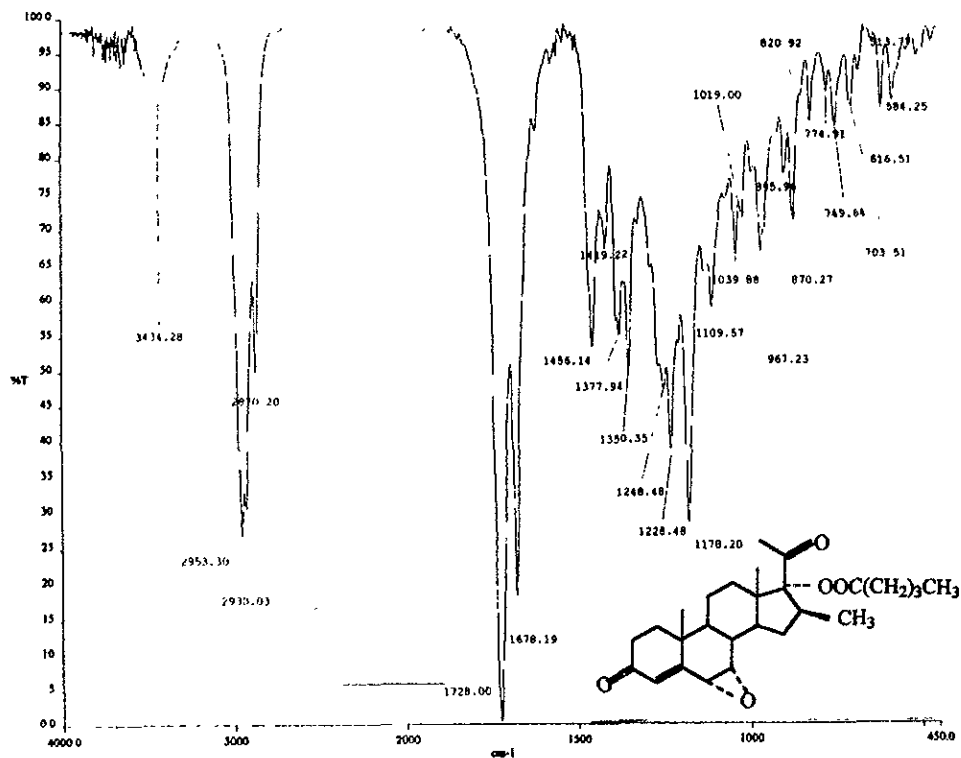
ESPECTRO 23. RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 16β-Metil-4, 6-pregnadien-17α-valeriloxi-3, 20-diona (32).



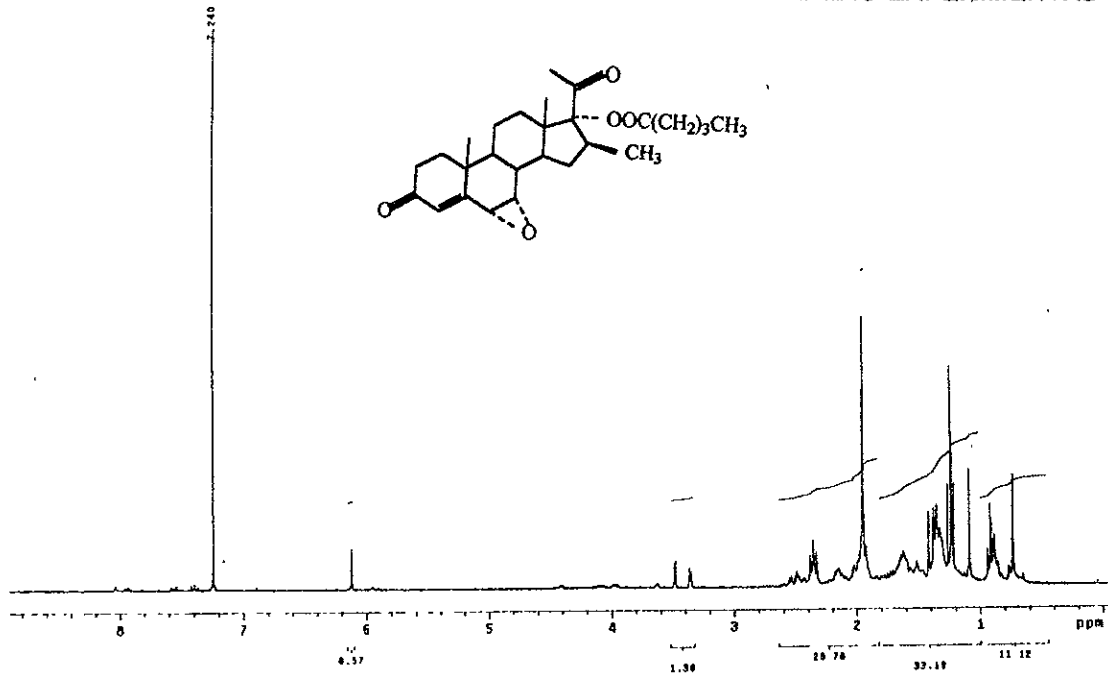
ESPECTRO 24. Espectroscopía de Masas del compuesto 16β-Metil-4, 6-pregnadien-17α-valeriloxi-3, 20-diona (32).



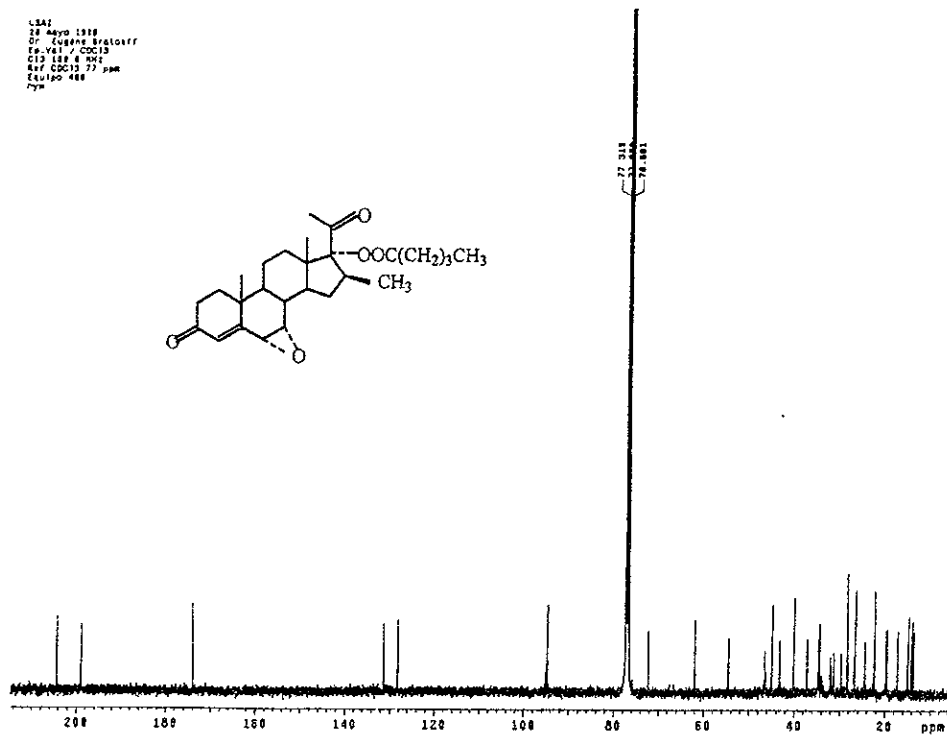
ESPECTRO 25. Espectro de Ultravioleta del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).



ESPECTRO 26. Infrarrojo del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).

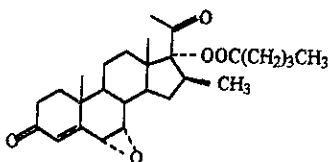


ESPECTRO 27. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).



ESPECTRO 28. Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).

JSA1
28 Mayo 1998
Dr. Eugene Bratoeff
Eq V41 / CDCl3
DEPT 100 6 MHz
Ref CDCl3 77 ppm
Equipo 400
Oym



CH3 carbons

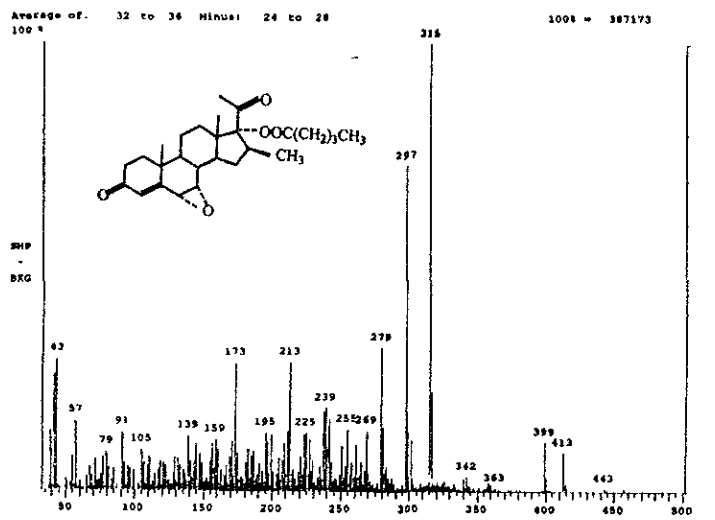
CH2 carbons

CH carbons

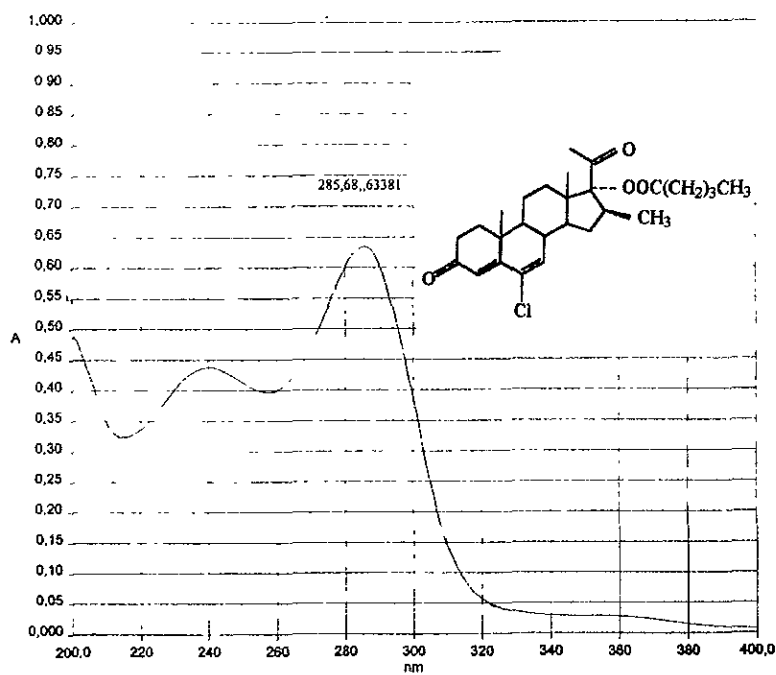
All protonated carbons

160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

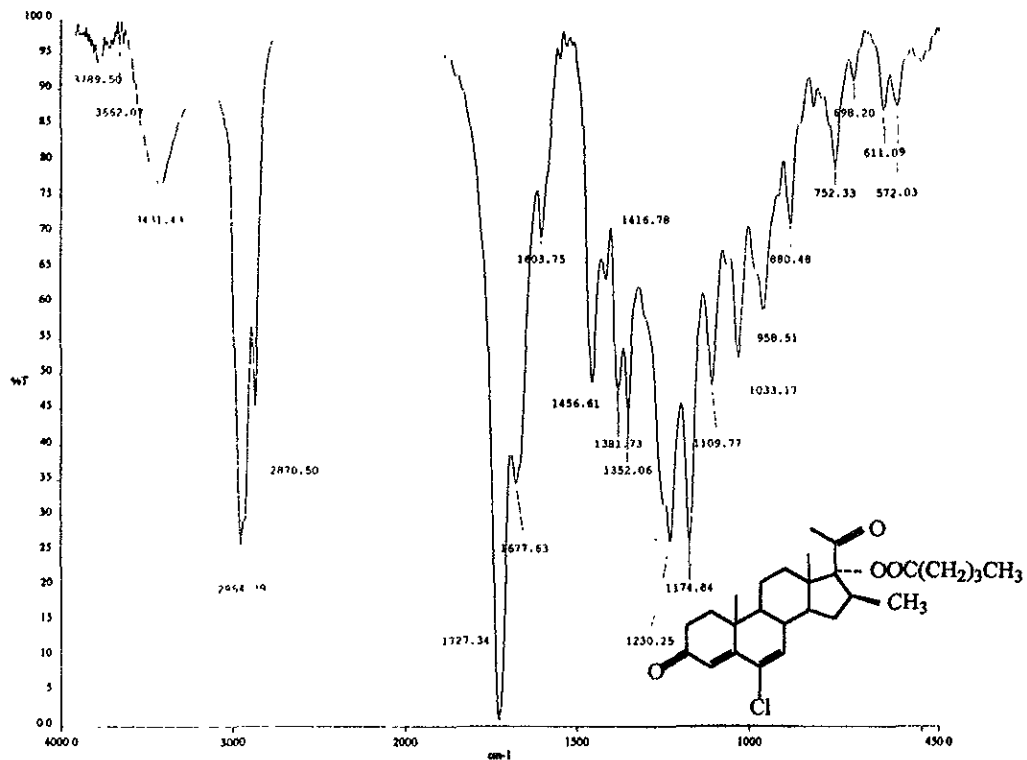
ESPECTRO 29. RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).



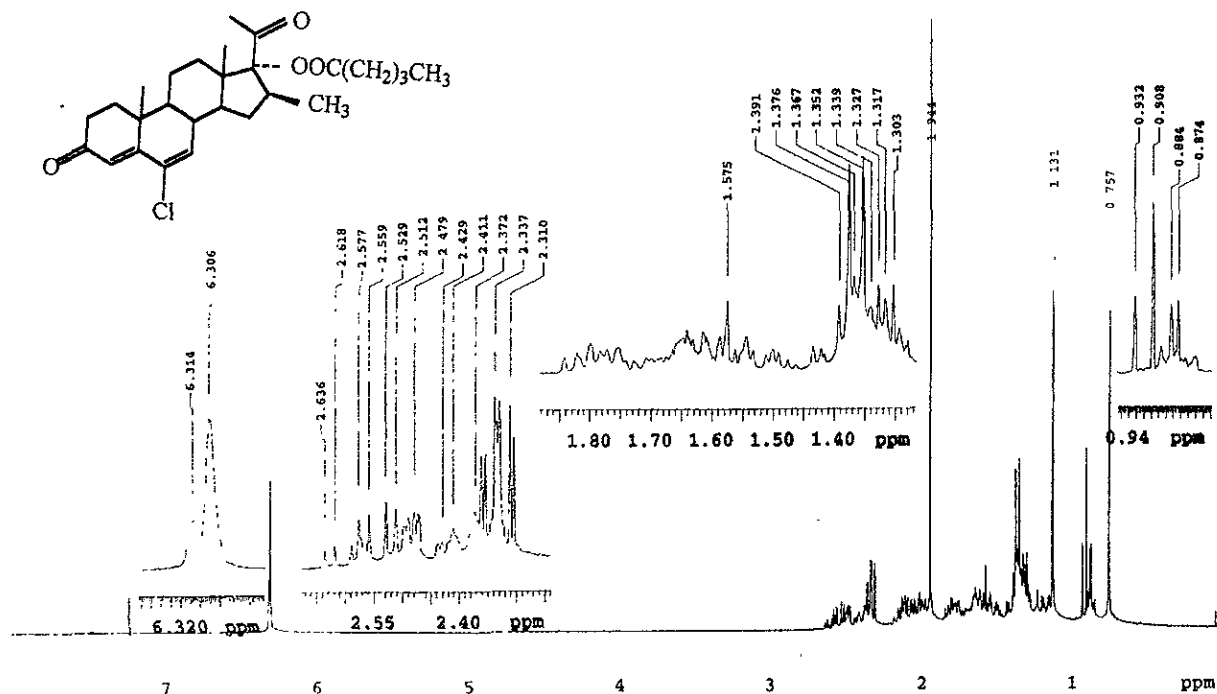
ESPECTRO 30. Espectroscopía de Masas del compuesto 6 α , 7 α -Epoxi-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (33).



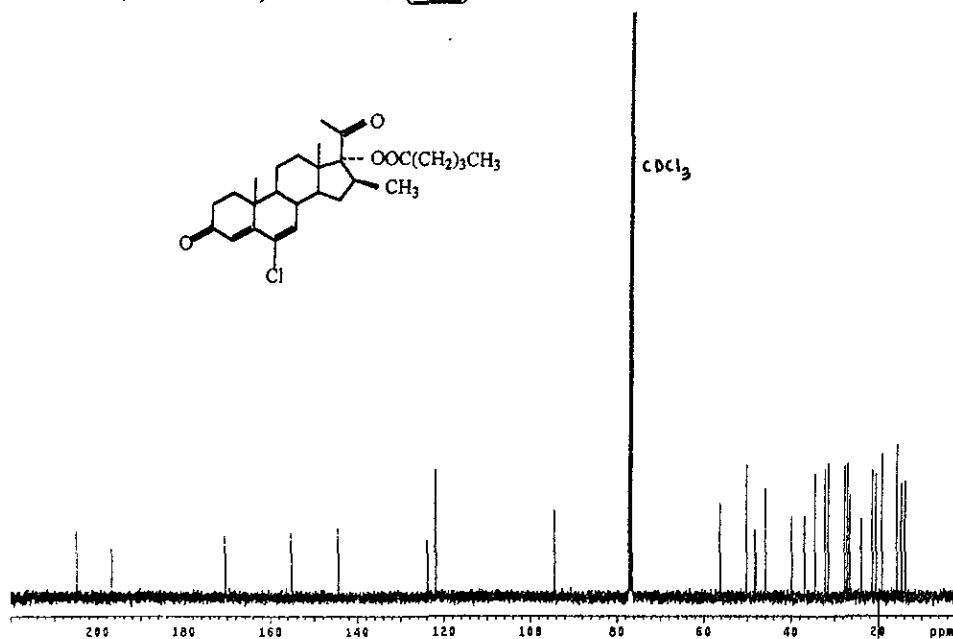
ESPECTRO 31. Espectro de Ultravioleta del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).



ESPECTRO 32. Infrarrojo del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).



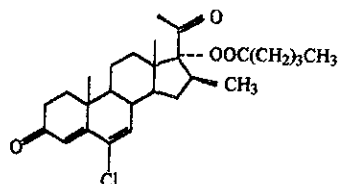
ESPECTRO 33. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4,6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).



ESPECTRO 34. Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 6-Cloro-16 β -Metil-4,6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34a).

5 JUNIO 1998
Dr. Eugene Orloff
Val-Cl / CDCl₃
DEPT 75 5 MHz
Ref CDCl₃
300-1
oym

Pulse Sequence: dept



CH3 carbons

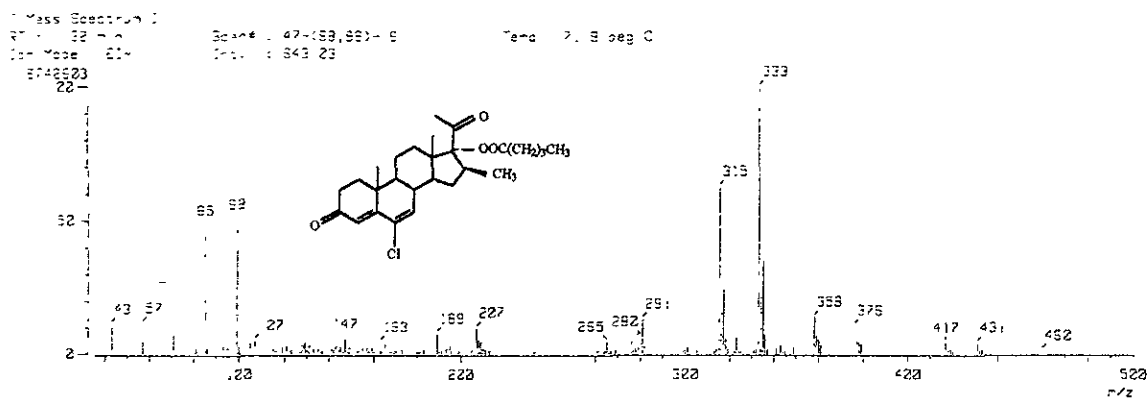
CH2 carbons

CH carbons

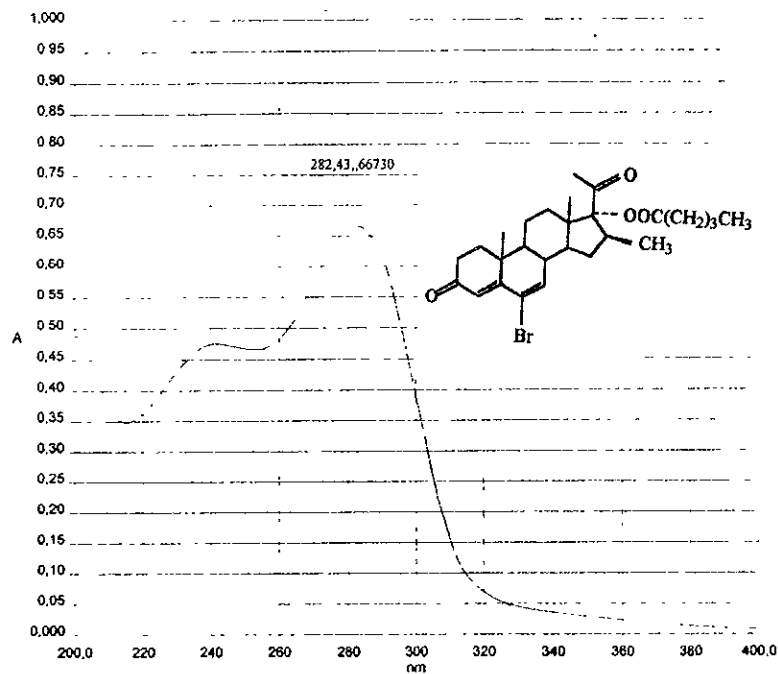
All protonated carbons

180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

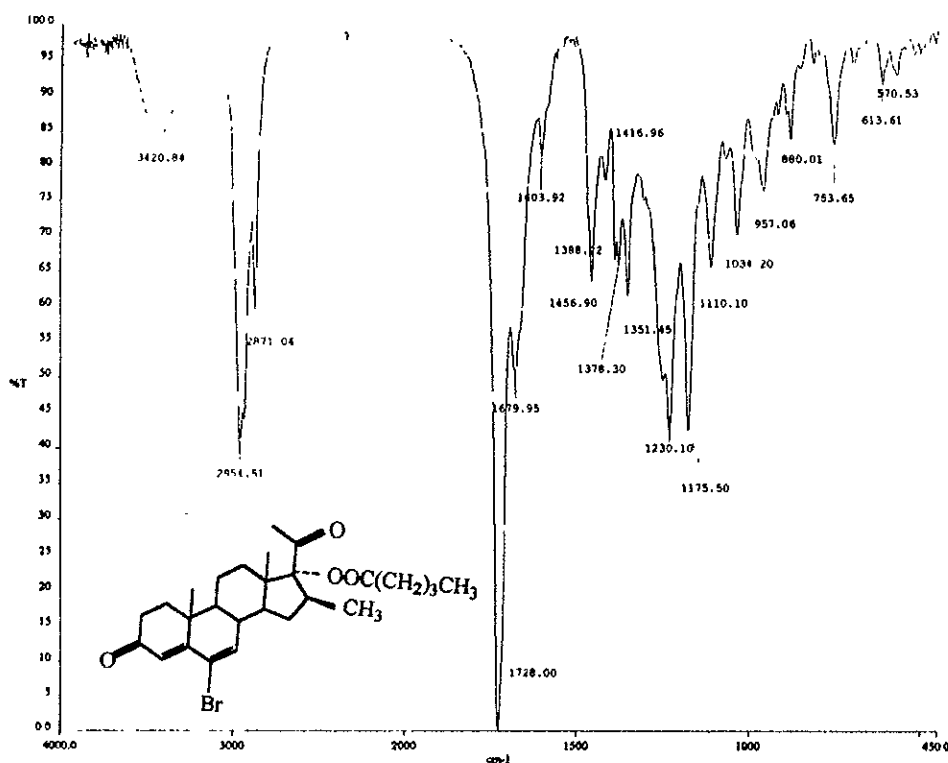
ESPECTRO 35. RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 6-Cloro-16β-Metil-4, 6-pregnen-17α-valeriloxi-3, 20-diona (34a).



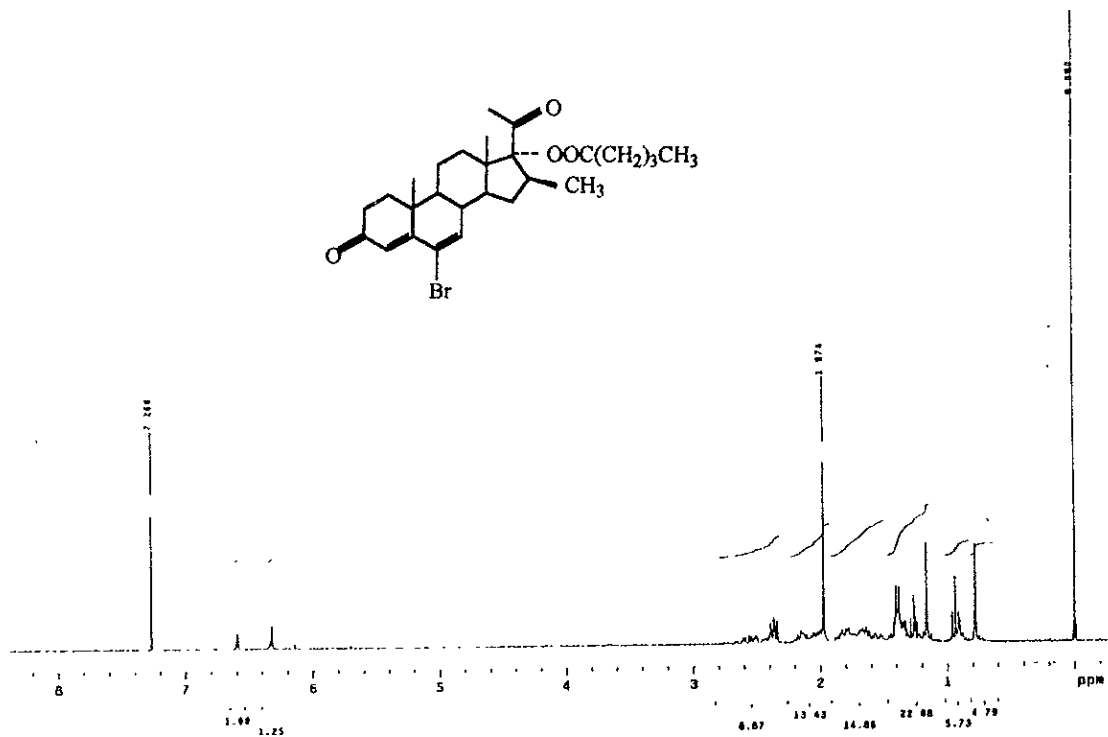
ESPECTRO 36. Espectroscopia de Masas del compuesto 6-Cloro-16β-Metil-4, 6-pregnen-17α-valeriloxi-3, 20-diona (34a).



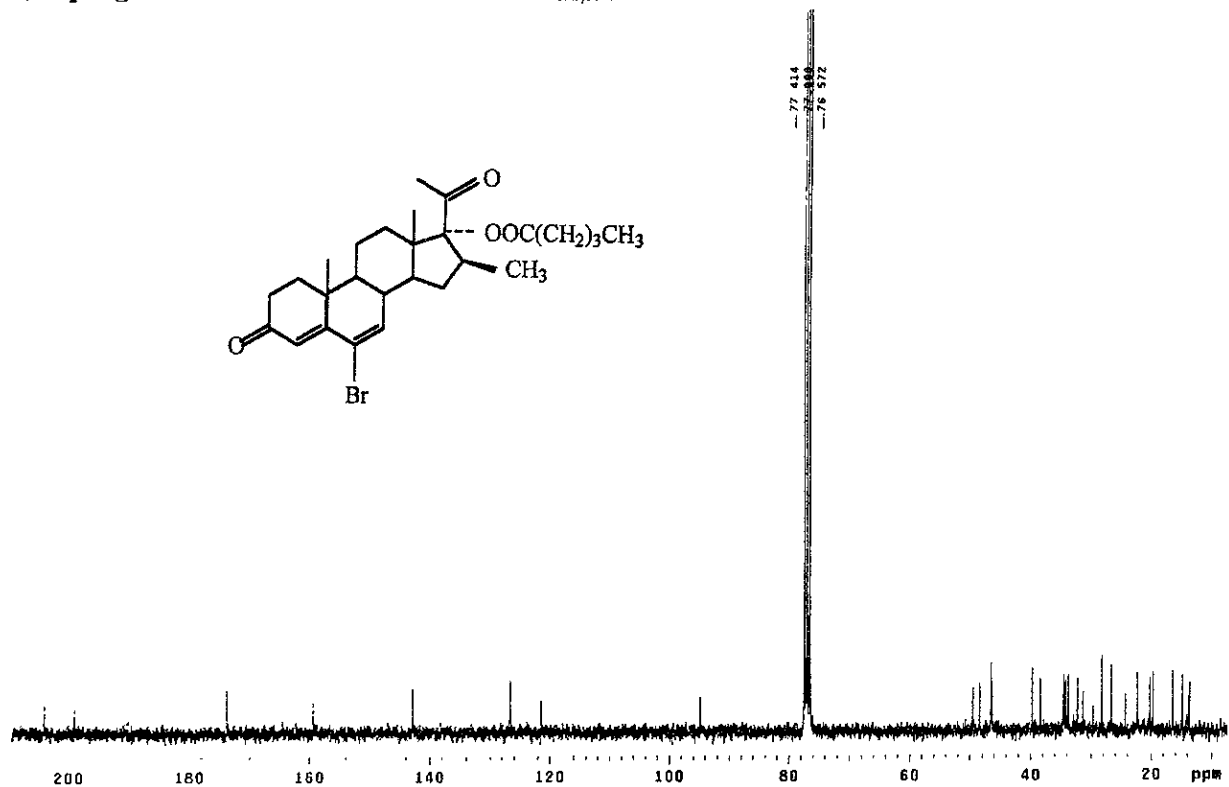
ESPECTRO 37. Espectro de Ultravioleta del compuesto 6-Bromo-16β-Metil-4, 6-pregnen-17α-valeriloxi-3, 20-diona (34b).



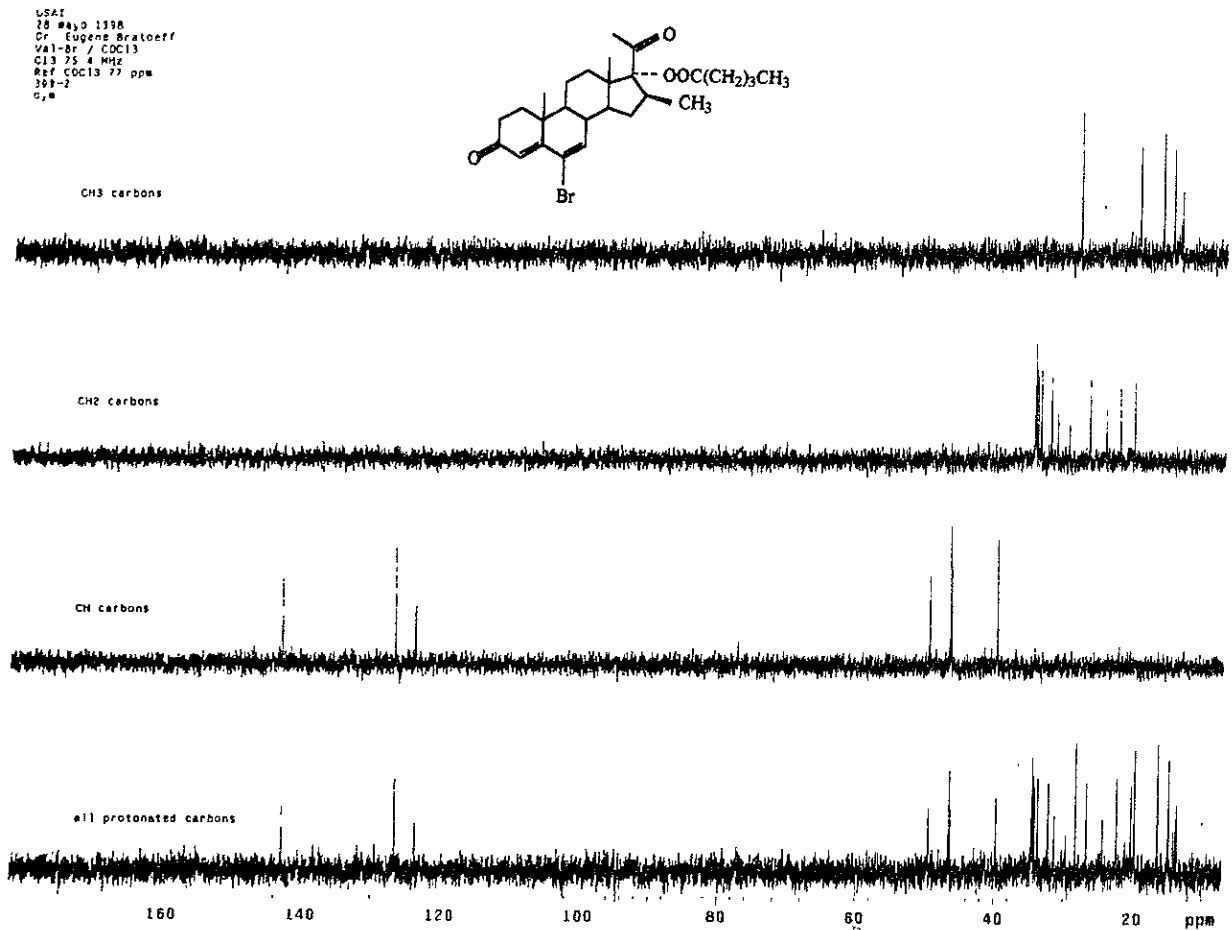
ESPECTRO 38. Infrarrojo del compuesto 6-Bromo-16β-Metil-4, 6-pregnen-17α-valeriloxi-3, 20-diona (34b).



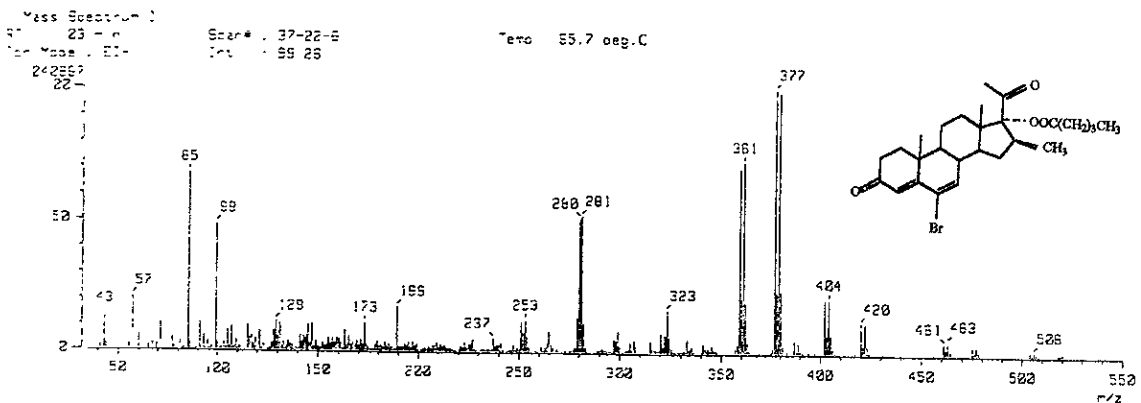
ESPECTRO 39. Resonancia Magnética Protónica del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).



ESPECTRO 40. Resonancia Magnética de Carbono 13 del compuesto 6-Bromo-16 β -Metil-4, 6-pregnen-17 α -valeriloxi-3, 20-diona (34b).



ESPECTRO 41. RMN de Carbono 13 modalidad DEPT del compuesto 6-Bromo-16β-Metil-4, 6-pregnen-17α-valeriloxi-3, 20-diona (34b).



ESPECTRO 42. Espectroscopía de Masas del compuesto 6-Bromo-16β-Metil-4, 6-pregnen-17α-valeriloxi-3, 20-diona (34b).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA:

1. Tortora G., Anagnostakos N., "Principios de Anatomía y Fisiología", Editorial Harla. 3ª Edición. México, D.F., 1984.
2. Cesorsimo R., Carr D., Therapy Update: Am. J. Health-Syst Pharm., (1996), v. 53 : 381.
3. McConell J.D., University of Texas Southwestern Medicinal Center. Conferencia retransmitida por ECO/TELEVISA 6 de Febrero de 1998.
4. Brueggemeier R., "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery", Editorial John Wiley Inc., 5ª Ed. USA, 1996. Capítulo 42.
5. Tayler V., "Pharmacognosy", Editorial Lea & Febiger, 8ª Ed. Philadelphia, USA, 1981. Capítulo 7.
6. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Valencia N., *Chimica Oggi/Chemistry today.*, (1997), 67.
7. Holt D., Levy M., *J.Med.Chem*, (1990), v. 33, 943.
8. Labrie F., Sugimoto Y., *Endocrinology*, (1992), v. 131, 1571.
9. Isaacs J., *Drugs of today*, (1993), v. 29, 335.
10. Shankar M., Li X., Leplante S., *J.Med.Chem*, (1995), v. 38 : 1456.
11. Jepsen J., Bruskevitz R., *Drugs of today*, (1998), v. 34 : 353.
12. The Merck Index, 12th Edition. Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ.
13. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Flores C., Calderón D., *Rev.Mex.Ciencias Farm.*, (1997), v. 28, 13-19.

14. Cabeza M., Miranda G. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., *Steroids*, 1998 (en prensa).
15. Bull H., García M., Anderson S., *J. Am. Chem. Soc.*, (1996), v. 18, 2359.
16. Metcalf B., Levy M., *Trends Pharmacol. Science*, (1989), v. 10, 494.
17. Valencia N., Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración beta en C-16 como antiandrógenos potenciales para el tratamiento del cáncer de próstata.. Tesis de Maestría en la Facultad de Química. UNAM (1997)
18. Shapiro E., Weber L., *J. Med. Chem*, (1972), v. 15 : 716.
19. Smith M., *Organic Synthesis*. Mc Graw Hill, USA, p. 655, (1994).
20. Bratoeff E., Trejo A., Hernández J., *Rev.Mex.Ciencias Farm.*, (1992), v. 22, 14.
21. Muller J., *Steroids*, (1979), v. 34, 793.
22. Shibata K. Takegama et al, *Chem.Pharm.Bull*, (1992), v. 40, 935.
23. Flores C., Síntesis de un derivado esterooidal con actividad antiandrogénica potencial. Tesis de Maestría en la Facultad de Química. UNAM (1996)
24. Calderón D., Hernández E., Labra N., *Perinatol. Repord. Humana.*, (1998), v. 12, 105.
25. Cabeza Marisa, Vilchis F., *Steroids*,. (1995), v. 60, 630,
26. Usui T., Ishibe T., *Archives of Andrology*, (1987), v. 19, 229.
27. Russell D., Wilson D. *Annu. Rev., Biochem.* (1994), v. 63, 25.
28. Bradford M., *Ann. Biochem.*, (1976), v. 72, 248.
29. Djerassi C. *Organic Reactions*, (1951), v. 6, 206.
30. Agnelo E., *J. Am. Chem. Soc.*, (1960), v. 82, 4293.

31. Sprench H., Jahn H., Steroids, (1966), v. 64, 4245.
32. Takegawa S., Naoyuki K., Chem. Pharm. Bull., (1996), v. 44, 746.
33. Silverstein R., "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action". Academic Press Inc. Usa. 1992
34. Bratoeff E., Rubio M., García J., Chimica Oggi. Artículo en revisión.
35. Petrov V., Wang Y., Steroids, (1981), v. 38, 121.
36. Morrison R., Boyd R., "Química Orgánica". Editorial Fondo Educativo Interamericano. México D.F. 1985
37. Gaocho T., Kevin L., J. Am. Chem. Soc., (1995), v. 117, 2369.
38. Allinger N.L., J. Am. Chem. Soc., (1977), v. 99, 8197.
39. Dewar M., Zebisch E., J. Am. Chem. Soc., (1985), v. 107, 3902.
40. Stewar J. J. QCPE program No. 455, Chemistry Department, Indiana University, (1989)
41. Viswanadhan V., TSAR Oxford Molecular; J. Chem. Inf. Compt. Sci., (1989), v. 29, 163.