

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

“ FACULTAD DE QUIMICA “

SINTESIS DE 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-1,4,6-
PREGNATRIEN-3,20-DIONA
CON ACTIVIDAD ANTIANDROGENICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA-FARMACEUTICA-BIOLOGA

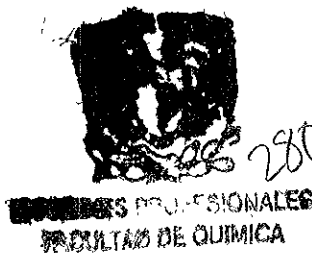
PRESENTA:
MARISOL MEMBRILLO ROSETE

Director: Dr. Eugene Bratoeff T.

MEXICO, D. F.

1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Dra. MA. DEL CARMEN RIVERA MUÑOZ

VOCAL Dr. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA

SECRETARIO Dr. EUGENE BRATOEFF TITEFF

1er. SUPLENTE Dra. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS

2do. SUPLENTE M.C. MARIA ALICIA HERNANDEZ CAMPOS

ASESOR:


Dr. Eugene Bratoeff T.

SUPERVISOR TECNICO:


M.C. Elena Ramirez López

SUSTENTANTE:


Membrillo Rosete Marisol

DEDICATORIAS

A DIOS

*POR DARME UN REGALO TAN MARAVILLOSO
COMO ES LA VIDA,
A EL LE DEBO TODO LO QUE SOY,
ADEMAS DE AGRADECERLE LA FAMILIA,
LAS AMISTADES Y LOS PROFESORES
QUE PUSO EN MI CAMINO.*

A MIS PADRES

***DEDICO ESTA TESIS CON RESPETO Y CARIÑO A MIS PADRES,
LICENCIADO EN EDUCACION SECUNDARIA POR TELEVISION JOSE
TRINIDAD MEMBRILLO ESLAVA Y ANGELA ROSETE ORDOÑEZ POR HABERME
DADO LA VIDA, Y BRINDADO TODO SU APOYO, COMPRENSION Y ENTUSIASMO
EN LOS MOMENTOS MAS DIFICILES DE MI CARRERA.***

***Y HOY JUNTO CON ELLOS CULMINA UNA DE MIS PRIMERAS
ASPIRACIONES DE MI VIDA ESTUDANTIL.***

A ELLOS LES DOY LAS MAS SINCERAS GRACIAS.

A MIS HERMANAS

***NOELIA, ROSALINDA Y ANGELICA POR SU COMPRENSION, PACIENCIA,
ENTUSIASMO, Y CONFIANZA QUE DEPOSITARON EN MI.***

A MIS ABUELOS

PATERNOS

GENARO MEMBRILLO ZAMORATE(+)

LUCRECIA ESLAVA VELASCO(+)

MATERNOS

CELESTINO ROSETE VALDERRAMA(+)

PETRA ORDOÑEZ POBLANO(+)

POR SUS SABIOS CONSEJOS QUE ME BRINDARON A LO LARGO DE MI CARRERA.

A MIS TIOS, TIAS, PRIMOS, PRIMAS Y SOBRIÑOS

*LES AGRADEZCO INFINITAMENTE TODO EL APOYO, CARIÑO Y COMPRESION QUE
ME BRINDARON EN TODO MOMENTO.*

PARA USTEDES AMIGOS Y AMIGAS

SERIA DIFÍCIL ENUMERAR A CADA UNO DE USTEDES, PUES YO NO SABRÍA POR DONDE EMPEZAR YA QUE EN TODO MOMENTO Y EN CADA LUGAR SIEMPRE AFORTUNADAMENTE ALGUIEN ESTUVO AHI PARA APOYARME A RESOLVER LOS PROBLEMAS A LOS QUE TODOS NOS ENFRENTAMOS Y BRINDARME UNAS PALABRAS DE ALIENTO. Y HOY QUE VEO REALIZADO UNO DE MIS SUEÑOS LES DEDICO CON CARIÑO ESTAS PALABRAS.

"GRACIAS POR BRINDARME SU AFECTUOSA Y SINCERA AMISTAD, SABEN BIEN QUE SIEMPRE TENDRAN UN LUGAR EN MI CORAZON Y UNA MANO AMIGA PARA TODA LA VIDA"

*A MIS PROFESORES DE LA
FACULTAD DE QUIMICA*

*A MIS QUERIDOS Y HONORABLES PROFESORES POR SUS VALIOSAS
ENSEÑANZAS Y CONOCIMIENTOS QUE TRANSMITIERON EN MI.*

A MIS PROFESORES DE INGLES

*A MIS ESTIMADOS AMIGOS ANTE TODO, PERO RESPETABLES PROFESORES
QUE CON SU VALIOSO ESFUERZO Y DEDICACION LOGRARON QUE APRENDIERA
Y DOMINARA UN IDIOMA DIFERENTE AL NUESTRO, ADEMAS DE QUE SIEMPRE
ME EXHORTARON A SEGUIR ADELANTE Y CONTINUAR..*

"THE WAY TO SUCCESS".

AL LABORATORIO 125 - A

AGRADEZCO AL Dr. EUGENE BRATOEFF POR PERMITIRME REALIZAR MI TRABAJO DE TESIS Y FORMAR PARTE DE SU EQUIPO, ADEMÁS A CADA UNO DE LOS MIEMBROS QUE FORMAN PARTE DEL LABORATORIO 125-A, PORQUE SIEMPRE ESTUVIERON ALENTÁNDOME, ACONSEJÁNDOME, GUIÁNDOME Y SOBRE TODO ENSEÑÁNDOME. SABEN BIEN QUE FORMAN PARTE DE ESTE TRABAJO.

**A LA GLORIOSA
"FACULTAD DE QUÍMICA"**

*A MI QUERIDA ESCUELA LA FACULTAD DE QUÍMICA POR PERMITIRME
SER PARTE DE ELLA EN EL ÁREA QUÍMICA Y PROPORCIONARME TODO
AQUELLO QUE NECESITE, ASÍ PUES HOY LA HONRO CON ESTE TRABAJO DE
TESIS QUE ESPERO CONTRIBUYA A LAS FUTURAS GENERACIONES.*

SITIO DONDE SE DESARROLLO LA TESIS

La parte química del siguiente trabajo se realizó en el laboratorio 125-A Edificio "E", Departamento de Farmacia de la Facultad de Química UNAM. Ciudad Universitaria bajo la asesoría del Dr. Eugene Bratoeff y la parte biológica en la ENEP Iztacala por el Q.F.B. César Flores.

AGRADECIMIENTOS

Al *USAI* por el registro de los espectros de UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y EMIE.

A la *Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)* que mediante el proyecto **IN 205295** otorgó financiamiento para la realización de este proyecto de investigación.

INDICE GENERAL

	PAGINA.
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	7
CAPITULO I	
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS PARTICULARES.....	31
CAPITULO II	
RUTA DE SINTESIS.....	33
METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	34
CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS DE CADA UNO DE LOS INTERMEDIARIOS Y DEL COMPUESTO FINAL.....	34
ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO.....	34
CAPITULO III	
INHIBICION DE LA 5 α -REDUCTASA TIPO II POR EL COMPUESTO 17 α -BUTIROXI-16 β -METIL-1,4,6-PREGNATRIEN-3-20-DIONA.....	53
CAPITULO IV	
DISCUSION DE RESULTADOS	
A)ESPECTROSCOPICOS.....	57
B)ENZIMATICOS.....	67
CAPITULO V	
CONCLUSIONES.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	72
APENDICE.....	77

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA.
Tabla 1. Características físicas de 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona M8	35
Tabla 2. Características espectroscópicas de M8	35
Tabla 3. Características físicas de 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona M44	36
Tabla 4. Características espectroscópicas de M44	37
Tabla 5. Características físicas de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona M45	38
Tabla 6. Características espectroscópicas de M45	38
Tabla 7. Características físicas de 3 β - Acetoxi - 16 α , 17 α - epoxi - 20 - etilendioxi-5-pregnen-20-ona M46	40
Tabla 8. Características espectroscópicas de M46	40
Tabla 9. Características físicas de 3 β , 17 α - Dihidroxi - 20 - etilendioxi - 16 β - metil-5-pregnen-20-ona M47	42
Tabla 10. Características espectroscópicas de M47	42
Tabla 11. Características físicas de 3 β ,17 α - Dihidroxi -16 β - metil - 5 - pregnen-20-ona M48	43
Tabla 12. Características espectroscópicas de M48	44
Tabla 13. Características físicas de 17 α - Hidroxi - 16 β - metil - 1,4,6 - pregnatrien-3,20 - diona M49	45
Tabla 14 y 15. Características espectroscópicas de M49	46
Tabla 16. Características físicas de 17 α - Butiroxi - 16 β - metil - 1,4,6 - pregnatrien-3,20-diona M9	49
Tabla 17, 18 y 19. Características espectroscópicas de M9	49
Tabla 20. Actividad in - vitro de los compuestos M4, M6, M8, M9, M44 - M49 sobre la 5 α -reductasa	55

INDICE DE ESPECTROS

Espectro 1. Espectro de UV de 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona M8.

Espectro 2. Espectro de IR de 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona M8.

Espectro 3. Espectro de RMN¹H de 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona M8.

Espectro 4. Espectro de IR de 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona M44.

Espectro 5. Espectro de RMN¹H de 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona M44.

Espectro 6. Espectro de IR de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona M45.

Espectro 7. Espectro de RMN¹H de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona M45.

Espectro 8. Espectro de IR de 3 β - Acetoxi - 16 α , 17 α - epoxi - 20 - etilendioxi - 5pregneno M46.

Espectro 9. Espectro de RMN¹H de 3 β - Acetoxi - 16 α , 17 α - epoxi - 20 - etilendioxi - 5- pregneno M46.

Espectro 10. Espectro de IR de 3 β ,17 α - Dihidroxi - 20 - etilendioxi - 16 β - metil 5-pregneno M47.

Espectro 11. Espectro de RMN¹H de 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -metil-5-pregneno M47.

Espectro 12. Espectro de IR de 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona M48

Espectro 13. Espectro de RMN¹H de 3 β ,17 α - Dihidroxi - 16 β - metil - 5 - pregnen - 20-ona M48.

Espectro 14. Espectro de UV de 17 α - Hidroxi - 16 β - metil - 1,4,6 - pregnatrien - 3,20-diona M49.

Espectro 15. Espectro de IR de 17 α - Hidroxi - 16 β - metil - 1,4,6 - pregnatrien - 3,20-diona M49.

Espectro 16. Espectro de RMN¹H de 17 α -Hidroxi - 16 β - metil - 1,4,6 -pregnatrien-3,20-diona M49.

Espectro 17. Espectro de RMN¹³C de 17 α - Hidroxi - 16 β - metil - 1,4,6 - pregnatrien-3,20-diona M49.

Espectro 17.1. Espectro de RMN¹³C en su versión DEPT de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona M49.

Espectro 18. Espectro de EMIE de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona M49.

Espectro 19. Espectro de UV de 17α - Butiroxi - 16β - metil - 1,4,6 - pregnatrien - 3,20-diona **M9**.

Espectro 20. Espectro de IR de 17α - Butiroxi - 16β - metil - 1,4,6 - pregnatrien - 3,20-diona **M9**.

Espectro 21. Espectro de RMN^{1H} de 17α - Butiroxi - 16β - metil - 1,4,6 - pregnatrien - 3,20-diona **M9**.

Espectro 22. Espectro de RMN^{13C} de 17α - Butiroxi - 16β - metil - 1,4,6 - pregnatrien - 3,20-diona **M9**.

Espectro 22.1 Espectro de RMN^{13C} en su versión DEPT de 17α -Butiroxi- 16β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona **M9**

Espectro 23 Espectro de EMIE de 17α - Butiroxi - 16β - metil - 1,4,6 - pregnatrien - 3,20-diona **M9**.

INTRODUCCION

En la actualidad se sabe que patologías tales como la hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata, representan una de las enfermedades con mayor frecuencia en hombres con edad promedio de 55 años, ya que cada año fallecen en el mundo 182,000 hombres por este padecimiento. México contribuyó en el período comprendido entre 1985 y 1994, con 22,900 defunciones.

No se sabe exactamente cuáles son las causas; sin embargo, existen factores a los cuales se les atribuye el padecimiento, de éstos, podemos citar los siguientes: edad-la enfermedad se incrementa después de los 65 años; razas dos veces más común en hombres Africano-Americano que en Americanos de piel blanca; nacionalidad-es común encontrarla en Norteamérica y en el noreste de Europa que en Asia, Africa, Centroamérica y Sudamérica; dieta-los estudios muestran que las personas que ingieren grandes cantidades de grasa, sea natural o vegetal, tienen mayores probabilidades de desarrollarla; actividades físicas-hacer ejercicio regularmente disminuye el riesgo; historia familiar- se le considera como factor genético en donde si el padre tiene la enfermedad, por herencia el hijo tiene muchas probabilidades de desarrollarla; la vasectomía y sistema endocrino también contribuyen al desarrollo de esta enfermedad.

El carcinoma de próstata es el más frecuente de los cánceres en varones, pero es a su vez la tercera causa de muerte. La Sociedad Americana de Cáncer diagnosticó cerca de 184,500 nuevos casos en 1998 de los cuales aproximadamente un tercio tendrá una evolución fatal.

Esta enfermedad surge cuando las células del tejido comienzan a multiplicarse incontrolablemente y de manera progresiva, iniciándose así la producción de una masa celular diferenciable del resto, lo que origina la formación de un tumor; si este tumor no invade los tejidos vecinos y queda encapsulado en el lugar anatómico, se trata de un tumor benigno; sin embargo,

si el tumor invade y se dispersa a otros tejidos provocando metástasis (tumor secundario originado por la diseminación de células cancerosas) entonces se trata de un tumor maligno.

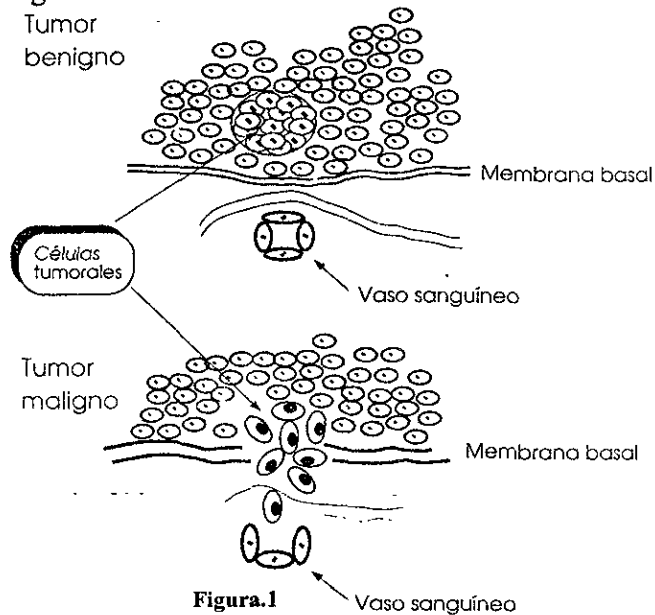


Figura.1

En cuanto a la hiperplasia prostática benigna (hiperplasia nodular o hipertrofia), se caracteriza por la formación de voluminosos nódulos delimitados en la región periuretral de la próstata. Cuando alcanza el tamaño suficiente, los nódulos comprimen y estrechan el conducto uretral y causan una obstrucción parcial, a veces prácticamente completa, de la uretra impidiendo que se lleven a cabo las funciones fisiológicas.

En lo que se refiere al hirsutismo, éste consiste en el crecimiento excesivo de pelo en diferentes zonas anatómicas provocando seborrea, acné, severos casos de neurosis y depresión al punto de suicidio.

El alto grado de incidencia de estas patologías está mostrado en estudios estadísticos recientes los cuales nos indican que existe una elevada tasa de casos diagnosticados y que se han llegado a practicar alrededor de 200, 000 prostatectomías anuales en USA.

Se ha comprobado por los estudios de Huggins y Hodges⁶, que la extensión metastásica de cáncer de próstata se puede detener o retrasar durante cierto tiempo mediante castración, administración de estrógenos o ambos. Esto hizo sospechar lógicamente que los andrógenos desempeñarían un papel causal.

Por otra parte aunque no se conoce la causa de la hiperplasia prostática benigna, los datos disponibles sugieren que en su aparición participan los andrógenos y estrógenos.

La testosterona(**M1**, ver página 10), principal andrógeno en el plasma de los varones, es sintetizada en los testículos, los ovarios y la corteza suprarrenal. En la circulación, **M1** actúa como una prehormona; ya que esta se convierte de forma irreversible a 5α -dihidrotestosterona(DHT)(**M2**, ver página 15) por acción de una enzima localizada en la membrana celular y dependiente de NADPH llamada 5α -reductasa(ver Esquema 3, página 15)

Considerando que **M2** es la forma activa de **M1**, ya que es ella la que se une con mayor afinidad y de manera irreversible al receptor androgénico; además tomando en cuenta que al disminuir la concentración de **M2** puede ayudar considerablemente a controlar la evolución del cáncer de próstata y el desarrollo de hiperplasia prostática benigna; de esta forma es como surgen nuevas estrategias terapéuticas para buscar nuevos compuestos sintéticos que sean capaces de actuar con el receptor androgénico.

Con ello se sugiere que el bloque de andrógenos puede ser el arma terapéutica en algunas enfermedades provocadas por andrógenos, como el cáncer de próstata, el hirsutismo, el acné patológico, la seborrea, la alopecia androgénica, la pubertad precoz y la hiperplasia prostática benigna.

En las últimas décadas se han llevado a cabo diversos estudios encaminados a analizar la inhibición selectiva de varios antiandrógenos sobre la maduración del esperma, por lo que el interés en los agentes antiandrogénicos se ha aumentado. Desafortunadamente, los compuestos que existen son agentes que presentan efectos colaterales adversos.

Dentro de la terapia para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna, así como para el cáncer de próstata se encuentran: la cirugía (prostatectomía radical y transuretral), la radiación (externa e interna), mediante sustancias radioactivas como Metartron, utilizando hormonas y quimioterapia; sin embargo presentan repercusiones como: desequilibrio emocional en el paciente, incontinencia, lesión intestinal, impotencia sexual, sudación, fatiga, náuseas, vómito, pérdida de apetito, pérdida de cabello además de los propios de la radiación.

En la actualidad, se dispone de compuestos sintéticos para inhibir la síntesis de M1 al nivel de hipotálamo (agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina [GnRH]) y los testículos (ketoconazol (M3, ver página 25), liarazol), para evitar la conversión de M1 en M2 en tejidos extraglandulares (Finasteride (M4, ver página 24)), así como para bloquear la unión de los andrógenos a su receptor (Flutamida (M5, ver página 25), Acetato de Ciproterona (M6, ver página 22)). Estos fármacos se están valorando para diversos trastornos en personas de ambos sexos.

El M6 constituye un potente antagonista, que se encuentra ampliamente distribuido en el mercado debido a que se utiliza en el tratamiento de diversas patologías entre ellas pueden mencionarse: acné, calvicie con patrón masculino, hirsutismo y síndromes virilizantes (Neri, 1976; Newmann, 1982; Newmann y Töpert, 1986).

También se ha intentado usar en el tratamiento de la pubertad temprana e hiperplasia y carcinomas prostáticos (Nemer, 1988), así como para inhibir la libido en varones con desviaciones graves de conducta sexual (Laschet y colaboradores, 1967).

Sin embargo, pese al gran uso terapéutico que se le da a este fármaco, presenta efectos secundarios progestacionales (retención de líquidos, desórdenes cardiovasculares, trombosis y ginecomastia) no deseados; es por ello que continua existiendo un gran interés en desarrollar nuevos fármacos que puedan competir en cuanto a actividad farmacológica como M6 y que además presenten el mínimo de efectos progestacionales posibles.

Por el análisis de la relación estructura-actividad biológica de los antiandrogénos esteroideos (M6 y sus derivados) se ha concluido que su actividad se debe a la estructura casi plana de la molécula, a la presencia del grupo 1α - 2α -ciclotmetileno en C-1 y C-2 (o bien un doble enlace entre estos dos átomos de carbono presenta casi el mismo efecto), los dobles enlaces entre los carbonos C-4 y C-5 y los carbonos C-6 y C-7, al sustituyente electronegativo en C-6 y al grupo α -acetoxi en C-17 así como los dos grupos cetónicos en C-3 y C-20.

Se conoce que la relación de la estructura-actividad biológica encontrada en el Laboratorio 125-A Conjunto "E" de la Facultad de Química, es válida en la serie del pregnano (M13, ver página 8)^{5,10,43}. Todo esto nos condujo a proponer el presente trabajo de tesis, sintetizar un derivado de M13 que reúna las características moleculares antes descritas; sin contar con la presencia de un halógeno en C-6 y además adicionando un grupo metilo en C-16.

Este compuesto se evaluará farmacológicamente como inhibidor de la enzima 5α -reductasa y también en su habilidad de formar un complejo con el receptor androgénico y de esta manera poder determinar su actividad antiandrogénica.

Para llegar a obtener el compuesto de interés se siguió una ruta de síntesis lineal con un total de 7 pasos; empleando como materia prima el Acetato de 16-dehidropregnenolona (M8, ver página 15) a la cual se le hicieron las siguientes modificaciones en su estructura molecular.

- * Introducción de dobles ligaduras en los carbonos C-1, C-4, C-6
- ** Formación de un grupo carbonilo en el carbono C-3 y C-20
- *** Introducción de un grupo metilo en el carbono C-16
- **** Introducción de un grupo éster en el carbono C-17

De esta manera se llega al compuesto de interés:
17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M9, ver página 48).

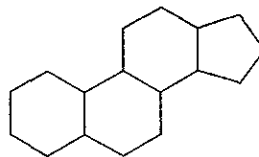
Como es un compuesto nuevo su estructura se caracterizó mediante sus propiedades físicas(color, apariencia y p.f.) y datos espectroscópicos (UV, IR, RMN¹H, RMN¹³C y EMIE).

ANTECEDENTES

[A] ESTEROIDES

Los esteroides son un grupo de compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, se les puede encontrar tanto en materiales vegetales como animales. Cientos han sido aislados de materiales vegetales y otros miles han sido sintetizados en un laboratorio, poseen de 18-29 átomos de carbono, son ópticamente activos, se presentan como polvos cristalinos nacarados, de masas características, insolubles en agua, solubles en disolventes de media y baja polaridad.

La estructura de los esteroides se caracteriza por tener generalmente en su esqueleto base un policiclo llamado núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno **M10**. El grupo alcohol, el grupo ceto y los dobles enlaces son comunes; pero resulta raro que cuenten con los enlaces de ésteres.

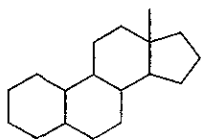


Ciclopentanoperhidrofenantreno[M10]

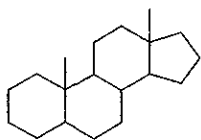
[A.1] CLASIFICACION

Los esteroides se clasifican considerando su estructura química, básicamente se toma en cuenta la cadena que se presenta en la posición del carbono C-17.(ver Esquema 1, página 8)

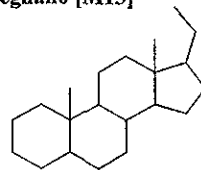
Estrano [M11]



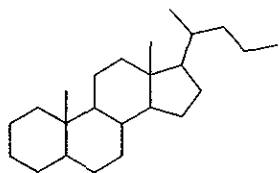
Androstano [M12]



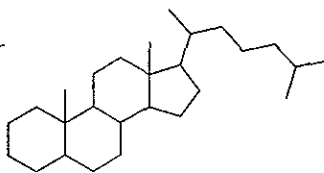
Pregnano [M13]



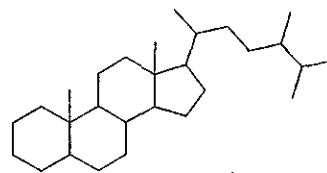
Colano [M14]



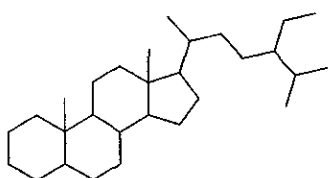
Colestano [M15]



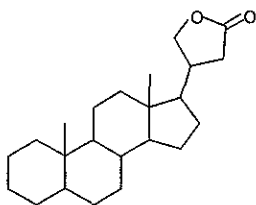
Ergostano [M16]



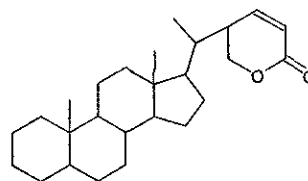
Estigmastano [M17]



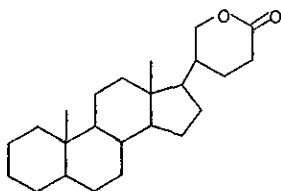
Cardanólido [M18]



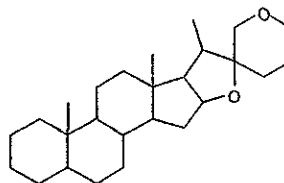
Witanólido [M19]



Bufanólido [M20]



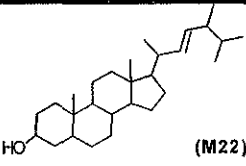
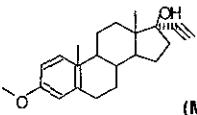
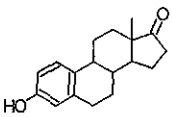
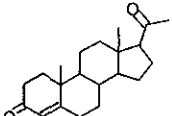
Espirostano [M21]

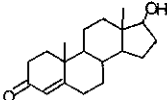
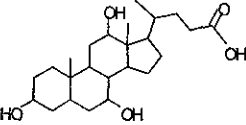
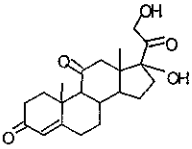
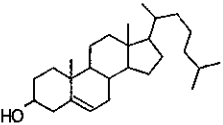


Esquema 1.

[A.1.1] EFECTOS FISIOLÓGICOS

Los efectos fisiológicos de los esteroides varían considerablemente de unos compuestos a otros y van de la actividad de las vitaminas a las hormonas sexuales; en la siguiente tabla se presentan los nombre de algunos esteroides, sus estructuras y las propiedades fisiológicas que poseen.

NOMBRE	ESTRUCTURA	PROPIEDAD FISIOLÓGICA
<p>VITAMINA D₂ Ergocalciferol</p>	 <p>(M22)</p>	<p>Formada a partir de ergosterol y es la encargada de evitar el reblandecimiento óseo por carencia de calcio y fosfato.</p>
<p>MESTRANOL</p>	 <p>(M24)</p>	<p>Es utilizado como anticonceptivo bucal.</p>
<p>ESTRONA</p>	 <p>(M25)</p>	<p>Es la hormona estrogénica de la mujer</p>
<p>PROGESTERONA</p>	 <p>(M26)</p>	<p>Es llamada hormona del embarazo femenino, la segrega el cuerpo amarillo.</p>

NOMBRE	ESTRUCTURA	PROPIEDAD FISIOLÓGICA
TESTOSTERONA	 <p style="text-align: right;">(M1)</p>	Es la hormona sexual masculina, regula el desarrollo de los órganos reproductores y las características sexuales secundarias.
ACIDO COLICO	 <p style="text-align: right;">(M27)</p>	Es el ácido biliar más abundante en la bilis y debido a la existencia de Na ⁺ , K ⁺ y pH alcalino en ésta, se presume que éste y otros están en realidad en forma de sales; los cuales participan en los procesos digestivos
CORTISONA	 <p style="text-align: right;">(M28)</p>	Es una de las 28 hormonas adreno-corticales, no sólo es importante para el control del metabolismo de los carbohidratos, sino que además resulta eficiente para aliviar los síntomas de la artritis reumática
COLESTEROL	 <p style="text-align: right;">(M29)</p>	Es un alcohol esteroideal o esteroil. Se encuentra en casi todos los tejidos vertebrales y es el principal constituyente de los cálculos o piedras biliares. El organismo lo necesita como materia prima para producir otros esteroides.

[A.2] ANDROGENOS

Los andrógenos pertenecen al grupo de las hormonas esteroideas las cuales se elaboran en los tejidos suprarrenales y gonadales a partir de colesterol, se derivan de **M10** y específicamente pertenecen al grupo del hidrocarburo androstano(**M12, ver página 8**).

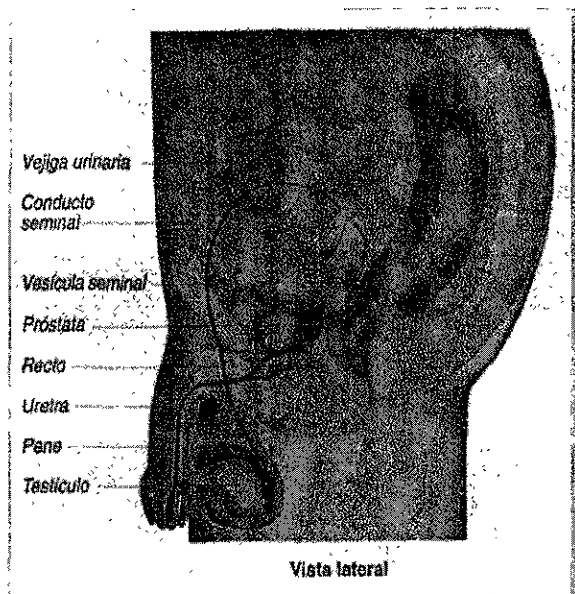
A los andrógenos también se les conoce como hormonas sexuales masculinas y ellas son las que controlan la masculinización. De éstas **M1** es la más importante.

[A.2.1] FISIOLOGIA DEL SISTEMA GENITAL MASCULINO

Los testículos tienen funciones endocrinas y reproductoras a la vez porque producen hormonas y células espermáticas maduras. Estas funciones son llevadas a cabo por tres tipos de células:

- a) Células de Leydig- son células situadas alrededor de los vasos sanguíneos y linfáticos, hacia donde secretan testosterona.
- b) Células de Sertoli- sustentan la espermatogénesis y las células germinales masculinas.
- c) Células testiculares- forman los tubos seminíferos.

El testículo pesa entre 30-45g, con un diámetro aproximado de 2.5-4.5cm, rodeado de una cápsula fibrosa(túnica albugínea), formado por tubos seminíferos conectados al epidídimo, éste a su vez, conectado al conducto deferente, el segmento distal de este conducto se llama conducto eyaculador, es en esta parte donde se conecta la vesícula seminal y la próstata.



En esta figura se observa las parte que constituyen el sistema Genital masculino

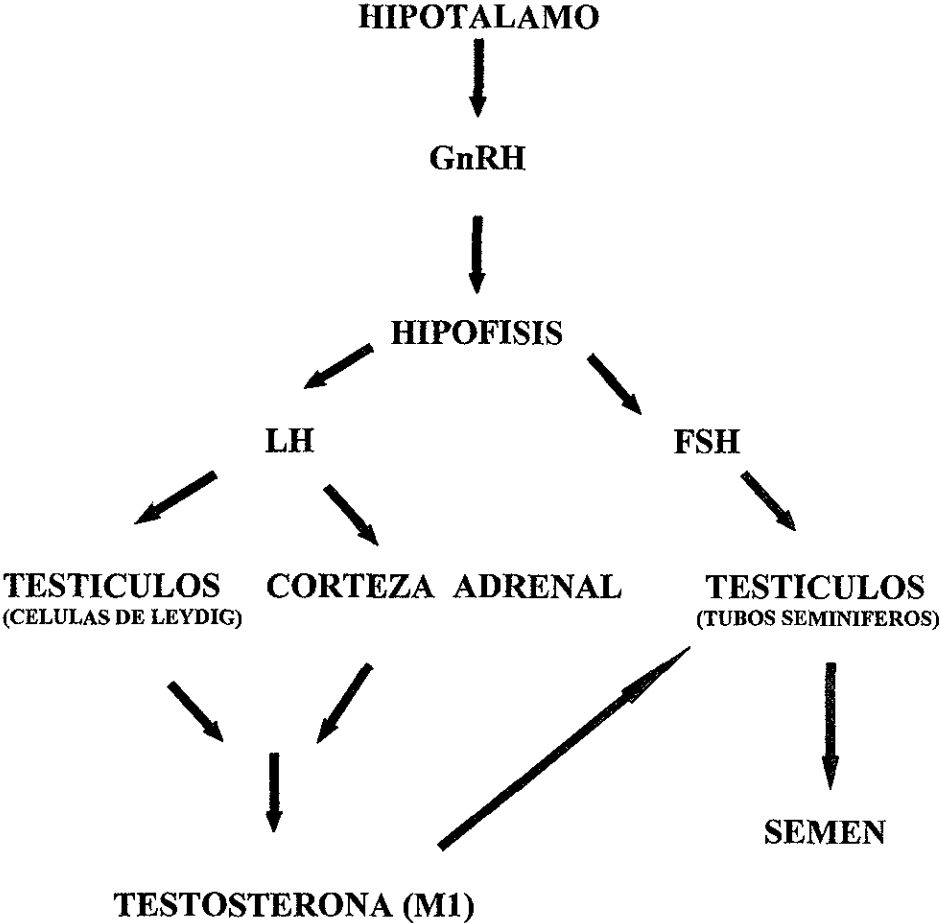
Figura.2

[A.2.1.2] SINTESIS Y LIBERACION DE TESTOSTERONA (M1)

En el momento de la pubertad masculina, el hipotálamo produce la neurohormona GnRH(hormona liberadora de gonadotrofinas) la cual llega a la hipófisis, ésta sintetiza y secreta dos gonadotrofinas: FSH(hormona foliculo estimulante) y LH(hormona luteinizante).

La FSH actúa sobre las células de Sertoli para dar lugar a la espermatogénesis, regulando también las funciones de los tubos seminíferos; mientras que la LH estimula a las células de Leydig para la secreción del andrógeno: **M1**. En el siguiente diagrama se ejemplifica como ocurre en el organismo.

SINTESIS Y LIBERACION DE TESTOSTERONA EN EL ORGANISMO



Esquema 2.

[A.2.1.3] FUNCION DE LA TESTOSTERONA(MI)

En el ámbito molecular la acción primaria de la **MI** consiste en aumentar la síntesis proteica en los tejidos “blanco”, específicamente próstata y vesículas seminales. Su principal función es producir el desarrollo normal de los órganos reproductores masculinos y mantener las características masculinas secundarias como voz grave, crecimiento y patrón del pelo facial y corporal así como el desarrollo del músculo esquelético. **MI** es también efectiva para mantener la espermatogénesis, inhibir el desarrollo, función de la glándula mamaria y estimular la libido.

[A.2.2] PAPEL QUE DESEMPEÑAN LOS ANDROGENOS EN LOS PROCESOS FARMACOLOGICOS Y BIOQUIMICOS

Se han descrito diversas acciones en las que participan los andrógenos: de carácter farmacológico, bioquímico y metabólico. Dentro de las primeras podemos mencionar las siguientes:

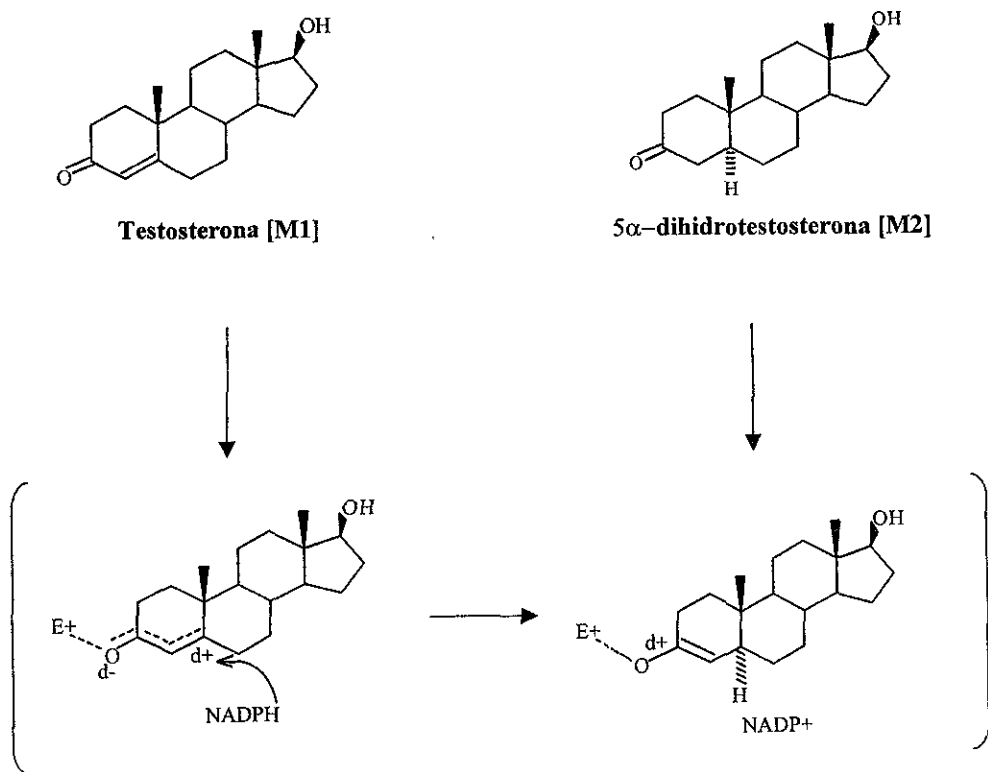
- * Acciones en el sexo masculino(desarrollo y mantenimiento de órganos y caracteres sexuales secundarios),
- * Acciones sobre el sexo femenino(dosis elevadas de **MI** producen fenómenos de virilización),
- * Acción sobre el carcinoma de mama(los andrógenos provocan una acentuada mejoría sintomática con desaparición del dolor).

En cuanto a las acciones metabólicas, involucra las siguientes:

- Metabolismo orgánico(los andrógenos promueven anabolismo proteico)
- Metabolismo de lípidos(los andrógenos disminuyen la concentración de triglicéridos y en menor grado de colesterol sanguíneo).
- Sobre el sistema óseo(el papel de los andrógenos se debe a una recalcificación ósea).

[A.2.2.1] MECANISMO BIOQUIMICO DE LA TESTOSTERONA(M1)

M1 es el principal andrógeno y esta considerada como una prehormona. El mecanismo de acción que sigue la M1 para convertirse en M2 es el siguiente:



Esquema 3.

MECANISMO DE ACCION:

1. - Entrada de **M1** en la célula “ blanco”, al parecer por difusión pasiva.
2. - Transformación de la prehormona a **M2** en el retículo endoplásmico o en la membrana nuclear, Esta formación, es biológicamente irreversible, está catalogada por una enzima que se encuentra fija a la membrana, la 5- α reductasa, que requiere NADPH.
3. - Unión de **M2** a receptores intracelulares proteicos específicos, para formar un complejo hormona receptor.
4. - Este complejo penetra al núcleo celular y se une a la cromatina.
- 5.- Se produce entonces una estimulación de la síntesis del ácido ribonucleico(RNA) tanto el mensajero como el ribosómico.
6. - Como consecuencia, se produce un aumento de la síntesis proteica y de enzimas intracelulares, las cuales son responsables de las acciones androgénicas.

Es importante resaltar que el receptor hormonal que une al esteroide activo, en este caso **M2** es específico, no sólo para el esteroide, sino también para el tejido determinado. Así por ejemplo: el útero tiene receptores para estrógenos, pero no para **M26**, **M1** o glucocorticoides. El timo y el tejido fibroblástico tiene receptores para glucocorticoides, pero no para hormonas sexuales. La próstata y las vesículas seminales contienen receptores solamente para los andrógenos.

**[A.2.2.2] CONSECUENCIAS DEBIDO A LA CARENCIA DE LA ENZIMA
5 α - REDUCTASA**

Existen varones que genéticamente carecen de la enzima 5 α -reductasa, a este padecimiento se le conoce como pseudohermafroditismo masculino; esto fue observado por vez primera en la República Dominicana. En este trastorno el varón genotípico secreta cantidades normales de **M1**, pero esta hormona no se convierte en **M2** y por lo tanto no hay desarrollo de los genitales externos masculinos. Después de la pubertad estos varones manifiestan tres características: no desarrollan la próstata, no aparece acné y no adquieren el patrón típico masculino.

En un principio se creía que esto ocurría por la deficiencia total de la enzima 5 α -reductasa, pero estudios recientes establecen que la deficiencia genética es atribuible a la pérdida solamente de una isoenzima (designada tipo 2) la cual predomina en la próstata; la otra isoenzima (designada tipo 1) se localiza en la región genital, en hígado y en la piel.

[A.2.3] PAPEL QUE JUEGAN LOS ANDROGENOS EN EL CANCER DE PROSTATA

El desarrollo de la próstata está regida por **M1**. El cáncer de próstata se origina generalmente en el lóbulo posterior del órgano adyacente al recto, y cuando provoca metástasis invade otros órganos alejados como los huesos y ganglios linfáticos.

Las células del carcinoma prostático, al igual que las células glandulares prostáticas normales, dependen en su desarrollo de la secreción de testosterona (cáncer hormonodependiente).

Cuando se lleva a cabo la castración se produce atrofia prostática y disminución sustancial de la altura del epitelio glandular, como consecuencia los andrógenos son los que se encargan de reparar dichos desordenes.

Aún no se conoce bien el papel del sistema endocrino en la inducción del cáncer de próstata, pero se ha comprobado que la extensión metastásica del cáncer de próstata se puede detener o retrasar durante cierto tiempo mediante castración; administración de estrógenos o ambos. En la siguiente figura se observa como se forma el tumor cancerígeno en la próstata.

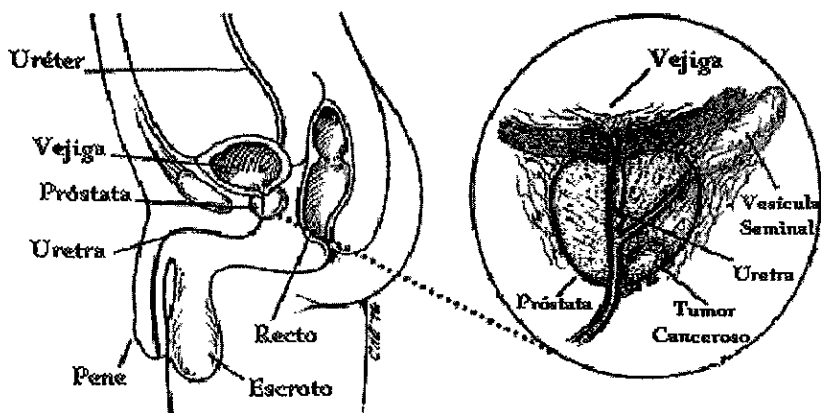


Figura 3.

[A.2.3.1] TRATAMIENTO

El tratamiento que se aplica a pacientes que presentan cáncer de próstata incluye: cirugía(prostactectomía radical y transuretral), radioterapia(externa e interna), mediante sustancias radioactivas como Metartron, utilizando nitrógeno líquido, quimioterapia y hormoterapia.

La cirugía y la radioterapia son el tratamiento ideal de los pacientes con enfermedades localizadas. En este grupo del 50 al 80% de los pacientes continúan con vida después de 10 años.

Se utilizan sustancias radioactivas y nitrógeno líquido cuando la metástasis ha llega a los huesos, lo cual es muy peligroso y puede causar la muerte.

El tratamiento hormonal es muy importante en el carcinoma metastásico avanzado. Como las células tumorales prostáticas dependen de los andrógenos para su mantenimiento, la intención de estas manipulaciones endocrinas es privar a las células tumorales de **MI**.

[A.2.4] PAPEL QUE JUEGAN LOS ANDROGENOS EN LA HIPERPLASIA PROSTATICA

Esta patología se caracteriza por el agrandamiento anormal de la próstata y aunque las cifras de incidencia varían ligeramente, un estudio cuidadoso de la próstata nos muestra, que en un grupo no seleccionado de autopsias, la existencia de hiperplasia prostática benigna se da en el 20% aproximadamente de los hombres de 40 años, cifra que asciende al 70% a los 60 años y al 90% a la edad de 80 años.

Esto hace pensar y proponer que la hiperplasia prostática benigna no es una verdadera enfermedad, sino un proceso normal del envejecimiento.

Gran parte de los datos relativos que se tienen al sugerir que en la aparición de dicha patología participan los andrógenos y estrógenos se ha obtenido de experimentos de perros, ya que esta es la única especie animal que desarrolla hiperplasia prostática benigna en el envejecimiento igual que el hombre.

Se había dicho que la hiperplasia prostática benigna fuera uno de los posibles precursores del cáncer de próstata, pero la mayoría de los expertos no piensan que esta lesión benigna tenga ninguna relación con el desarrollo del cáncer.

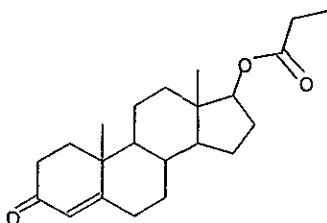
La única relación que se puede encontrar en tales patologías, sería que son muy frecuentes en hombres de edad avanzada.

[A.2.4.1] TRATAMIENTO

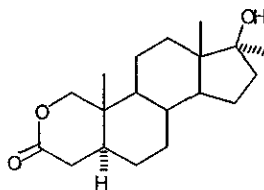
Dentro del tratamiento para la hiperplasia prostática benigna destaca la cirugía, esta resulta una experiencia traumática para el paciente y es entonces donde entra el importante papel de los andrógenos.

Actualmente por su gran demanda en el mercado el producto sintético **M4** es el que se utiliza en la terapéutica de esta enfermedad.

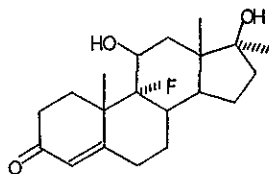
Los efectos colaterales de los andrógenos incluyen: virilización(en mujeres y niños), feminización(varones y niños) y toxicidad(todos los usuarios), dependiendo del medicamento, dosis y duración del tratamiento. Mencionaremos algunos de los andrógenos utilizados en la terapéutica: (Testoject-50) **M1**, Propionato de testosterona(Textex)**M30**, Fluoximesterona (Halostin)**M31**, Cipionato de testosterona (Depo-testosterone) **M32**, Oxandrolona (Oxandrin) **M33**.



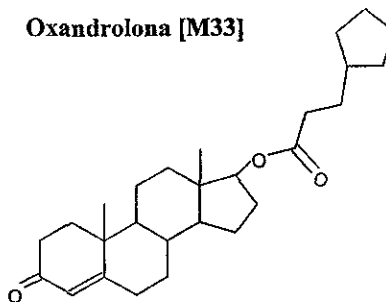
Propionato de Testosterona [M30]



Oxandrolona [M33]



Fluoximesterona [M31]



Cipionato de Testosterona [M32]

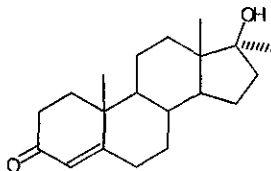
[A.3] ANTIANDROGENOS

Los antiandrógenos son sustancias sintéticas, la mayoría de ellas derivados esteroidales. Estas sustancias bloquean la síntesis de los andrógenos o las acciones de estos últimos.

[A.3.1] SINTESIS

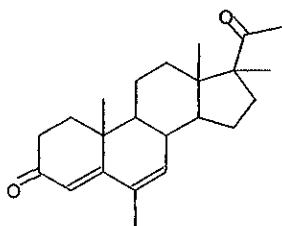
Básicamente existen dos métodos de sintetizar un esteroide con características antiandrogénicas, son los siguientes:

❶ Tomando como esqueleto base la molécula **M1** y efectuar en ella diversas modificaciones estructurales; de manera que se obtenga un efecto antagónico. Así el nuevo compuesto sintetizado tendrá la capacidad de unirse al receptor androgénico bloqueando la formación del complejo andrógeno-receptor. Ejemplos de algunos antiandrógenos derivados de **M1**, como Metiltestosterona **M34**.

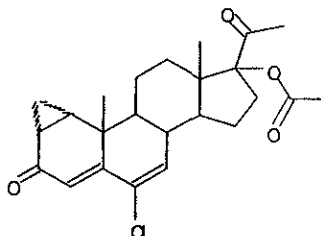


Metiltestosterona [M34]

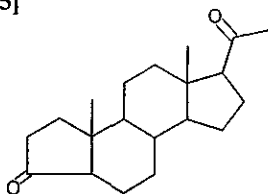
② Modificando la molécula **M26** esta puede ser utilizada como tal, pues presenta severos efectos progestacionales. Al considerar a la progesterona antiandrógeno natural se esperaría que sus análogos sintéticos presentaran la misma actividad biológica. Algunos ejemplos: Medrogesterona **M35**, **M6**, Anorprogesterona **M36**.



Medrogesterona [M35]



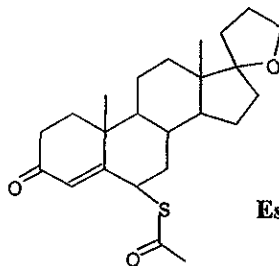
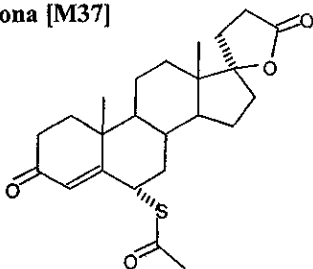
Acetato de Ciproterona [M6]



Anorprogesterona [M36]

Además de los antiandrógenos ya mencionados se conocen otro grupo de estos cuya síntesis no deriva de **M26**, ni de **M1**; tal es el caso de la Espirolactona **M37** y Espirixazona **M38** que poseen características similares a **M6**.

Espirolactona [M37]



Espirixazona [M38]

[A.3.2] FUNCION BIOLOGICA Y FARMACOLOGICA

El efecto antiandrogénico involucra las siguientes funciones:

- a) El antiandrógeno puede interferir con el receptor.
- b) Puede interferir con el transporte del andrógeno.
- c) Puede inhibir la enzima 5α -reductasa
- d) Puede inhibir a los α -adrenoreceptores
- e) Puede inhibir la síntesis de **M1**.

[A.3.2.1] CARACTERISTICAS PARA SU USO TERAPEUTICO

Para que se pueda utilizar como antiandrógeno debe poseer:

- a) Una baja o nula toxicidad.
- b) Presentan elevada actividad antiandrogénica
- c) Presentar baja actividad hormonal
- d) No disminuir la libido.

Los antiandrógenos se emplean en el tratamiento de hiperplasia y carcinoma de la próstata, acné, calvicie con patrón masculino, síndromes virilizantes en mujeres y pubertad temprana en varones, así como en la inhibición del impulso sexual en varones con tendencia a cometer delitos sexuales.

Actualmente el uso de antiandrógenos en la terapéutica médica de las patologías humanas presenta diversos inconvenientes, debido a los efectos colaterales y a la baja actividad.

[A.3.3] CLASIFICACION QUIMICA

Los antiandrógenos se clasifican en dos grupos: esteroidales y no esteroidales.

[A.3.3.1] ESTEROIDALES

Los antiandrógenos de tipo esteroidal son compuestos que derivan de la molécula **M26** ó **M1**.

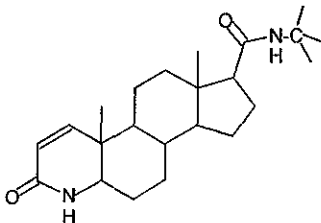
Presentan las siguientes ventajas:

- Actúan específicamente con el receptor androgénico
- Son de mayor interés terapéutico
- La relación costo- eficiencia es la mejor opción.

Como desventajas tenemos las siguientes:

- Reducen la concentración de **M1**
- Reduce la actividad enzimática de 5 α - reductasa
- Reduce el tamaño de órganos sexuales

Como ejemplos de este grupo tenemos a **M6** y **M4**.



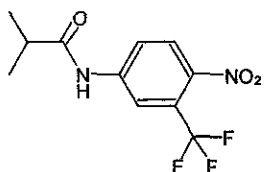
Finasteride [M4]

[A.3.3.2] NO ESTEROIDALES

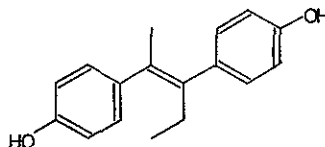
Los antiandrógenos no esteroideos presentan algunas ventajas:

- Tienen afinidad por el receptor debido a su estructura química con geometría semejante y reduce en un 25% a 30% el tamaño de la próstata. Como desventajas tenemos las siguientes:

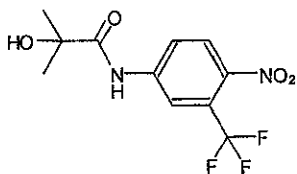
- Actúan sobre la óxido-nitroso sintetasa, que estimula la erección
 - Ocasiona efectos adversos (metahemoglobinemia e insuficiencia hepática)
- Como ejemplos tenemos a **M5**, Dietilestilbestrol **M39**, Hidroxiflutamida **M40**, Anandron **M41** y **M3**.



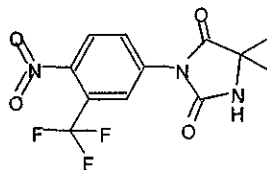
Flutamida [M5]



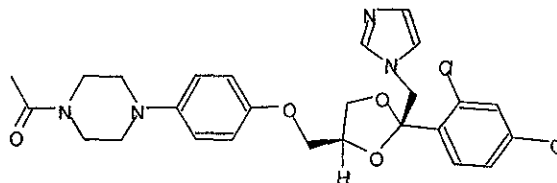
Dietilestilbestrol [M39]



Hidroxiflutamida [M40]



Anandron [M41]



Ketoconazol [M3]

[A.3.4] CLASIFICACION SEGUN EL SITIO DE ACCION

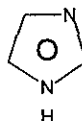
Los antiandrógenos pueden llevar a cabo su acción farmacológica actuando como:

- Inhibidores de la síntesis de andrógenos
- Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa
- Como antagonista de los receptores de andrógenos.

[A.3.4.1] INHIBIDORES DE LA SINTESIS DE ANDRÓGENOS

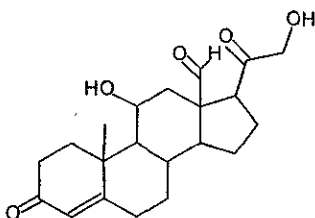
Los compuestos mas eficaces para bloquear la síntesis de **M1** son:

1. Las hormonas liberadoras de gonadotropinas(GnRH) misma o un antagonista como la leuprolida o gonadorelina. Cuando esos compuestos se administran de manera continua, las concentraciones plasmáticas de hormona luteinizante y **M1** muestran declinación, de modo que la consecuencia neta es la inducción de castración farmacológica. Este tipo de tratamientos proporciona una alternativa media a la castración para producir privación de andrógenos en varones con cáncer prostático que no pueden tolerar el Dietilestilbestrol **M39**.
2. Los antimicóticos de la clase del imidazol **M42**, como **M3** y terazol tienen, como efecto secundario la capacidad para bloquear las enzimas citocromo P-450 que participa en la biosíntesis de hormonas esteroidales. Este efecto secundario se ha convertido en una ventaja terapéutica para inducir privación de andrógenos en pacientes seleccionados con cáncer de próstata. La utilidad de esos medicamentos queda limitada por efectos adversos gastrointestinales, duración de acción breve y bloque de la biosíntesis de glucocorticoides suprarrenales.



Imidazol [M42]

3. **M37** es un antagonista de la Aldosterona **M43**, actúa como un inhibidor débil de la unión de los andrógenos a su receptor, bloquea de manera primaria a la biosíntesis de andrógenos, en algunas mujeres con hirsutismo, el medicamento disminuye la tasa de crecimiento y el diámetro medio de pelo facial. Dado que tiende a causar metorragia, **M37** por lo general se administra junto con un anticonceptivo oral. En estudios relacionados con la eficacia, **M37** es menos útil para disminuir las puntuaciones de hirsutismo que **M5**.



Aldosterona [M43]

[A.3.4.2] INHIBIDORES DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA

La conversión de **M1** en DHT **M2** es esencial para algunos efectos androgénicos, la inhibición de la enzima 5 α -reductasa debe bloquear de modo selectivo el efecto de los andrógenos en tejido (próstata, folículos pilosos), en los cuales la producción continua de **M2** es esencial.

1. El azasteroide **M4** es un inhibidor competitivo, activo por vía oral, que bloquea de modo preferencial a la enzima 5 α -reductasa tipo 2, pero inhibe poco a la isoenzima tipo 1. El fármaco suscita un decremento profundo de la concentración plasmática de **M2** en la próstata, pero no causa un cambio de las cifras plasmáticas de **M1** u hormona luteinizante.

En varones con hiperplasia prostática benigna el medicamento **M4** origina disminución constante del tamaño de la próstata y en un 33% de los varones tratados con este compuesto, presentaron mejorías del flujo urinario y reducción de los síntomas; así esto proporciona una alternativa a la intervención quirúrgica en varones con manifestaciones de la enfermedad. **M4** se encuentra en estudio para la terapéutica de la calvicie con patrón masculino y se están investigando otros inhibidores de la 5α -reductasa, entre ellos fármacos específicos para la enzima 5α -reductasa 1.

[A.3.4.3] ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES ANDROGENICOS

Existen en la actualidad varios medicamentos que actúan como antagonistas específicos de la unión de los andrógenos a su receptor. De estos tenemos algunos como:

1. Acetato de ciproterona **M6**, este compuesto deriva de **M26** posee varias propiedades, entre ellas:
 - Es un potente antagonista de andrógenos
 - Presenta actividad progestacional y disminuye la secreción de gonadotropinas
 - Compite con **M2** por la unión al receptor del andrógeno

La administración de 100mg/día de **M6** en varones jóvenes normales, causa decremento de 50% de las concentraciones plasmáticas de LH y FSH y disminución de 75% de **M1** plasmática. Las acciones del medicamento dependen tanto de la inhibición de la producción de testosterona como de interferencia en el efecto androgénico.

M6 se utiliza en el tratamiento de algunas patologías entre ellas podemos mencionar: acné, calvicie con patrón primario masculino, hirsutismo y síndrome virilizante.

También se ha intentado usar en el tratamiento de la pubertad temprana e hiperplasia y carcinomas prostáticos así como para inhibir la libido en varones con desviaciones graves de la conducta sexual.

2. Flutamina **M5**, este fármaco es un antiandrógeno no esterooidal desprovisto de otra actividad hormonal; quizás actúe después de su conversión in vivo en 2-hidroxi flutamida, que es un potente inhibidor competitivo de la unión de **M2** al receptor de andrógenos. **M5** se aplica en el tratamiento del cáncer prostático, por lo general, con bloqueo de GnRH, ó con estrógenos. **M5** también se ha utilizado en experimentos en combinación con un anticonceptivo oral en el tratamiento de hirsutismo en mujeres, incluso causa insuficiencia hepática progresiva es por eso que limita su uso. En la terapéutica del carcinoma de próstata metastásico, **M5** debe proporcionarse junto con un antagonista de la GnRH como la leuprolida.

CAPITULO

I

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar el compuesto esteroidal llamado **17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien -3,20-diona M9**, determinar su potencial antiandr3geno in-vitro mediante la inhibici3n de la actividad de la enzima 5 α -reductasa y contribuir de esta forma en la b3squeda de nuevos agentes antiandrog3nicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Considerando la relaci3n que existe entre la estructura qu3mica - actividad biol3gica de los antiandr3genos de tipo esteroidal y adem3s tomando como modelo molecular al compuesto **M6** se plantean los siguientes objetivos particulares para esta tesis.

✍ Sintetizar un an3logo del Acetato de Ciproterona con los siguientes cambios en esta mol3cula: un grupo metilo en C-16 β - orientado, un grupo 3ster en C-17 α - orientado, un grupo carbonilo en C-3 y C-20; as3 como la introducci3n de dobles ligaduras en C-1, C-4 y C-6, creando con estas dos 3ltimas modificaciones un sistema trien conjugado. Con estos cambios se pretende obtener un nuevo compuesto: **M9** con posible actividad antiandrog3nica.

✍ Aislar, purificar y caracterizar todos los intermediarios, as3 como el compuesto final, mediante sus propiedades f3sicas, espectrosc3picas (UV, IR, RMN¹H, RMN¹³C) y espectrom3tricas (EM).

✍ Probar la actividad antiandrog3nica de los intermediarios y del compuesto final, mediante el ensayo biol3gico de la inhibici3n de la enzima 5 α -reductasa.

CAPITULO

II

NOTA DE SINTESIS

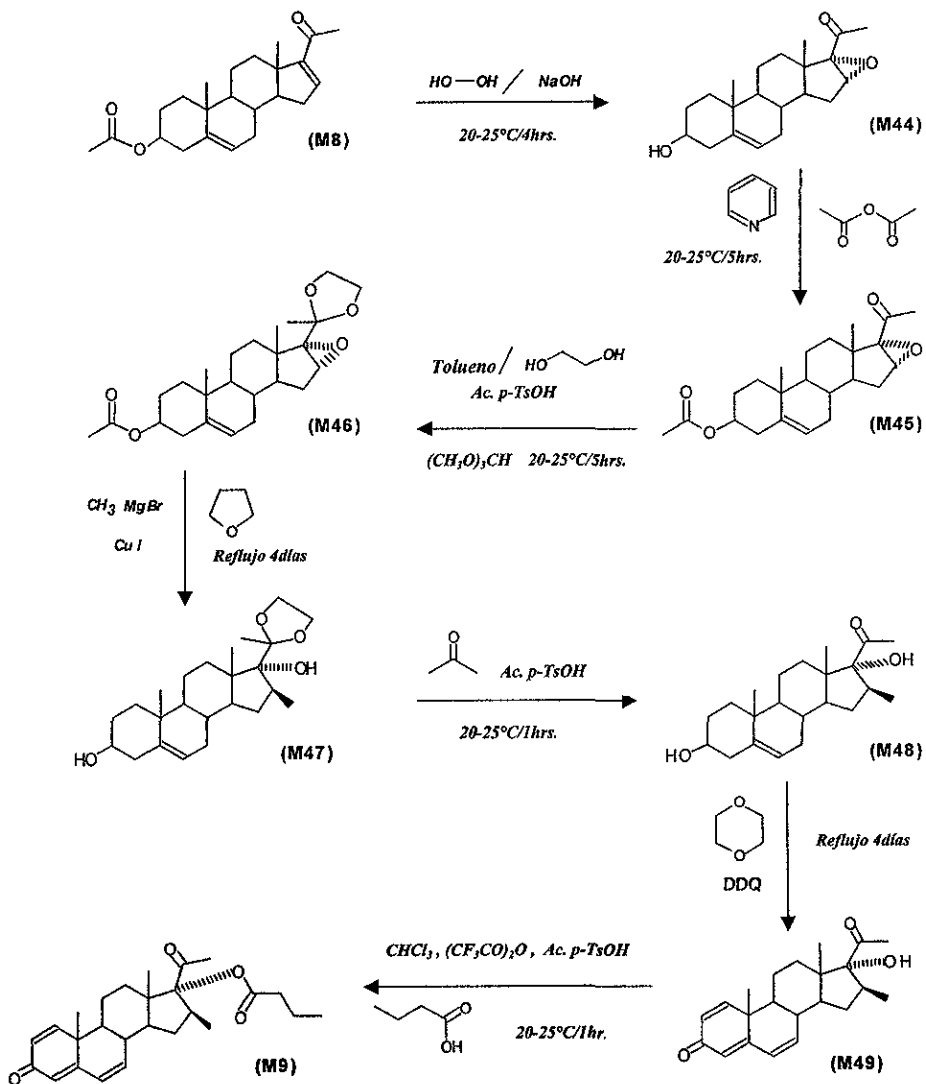
METODOLOGIA EXPERIMENTAL

CARACTERISTICAS FISICAS

Y

ESPECTROSCOPICAS

RUTA DE SINTESIS



METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En esta parte se describe los procedimientos experimentales que se siguieron para la síntesis de cada uno de los intermediarios y del compuesto final, así como los reactivos, catalizadores y disolventes empleados en la formación de éstos. También se menciona el equipo que se empleó en la determinación de los diversos espectros.

Se aclaran de antemano los siguientes puntos:

- * La pureza de los productos y el curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (CCF) (SiO_2 ; n-hexano/AcOEt 7:3) utilizando como soporte o fase adsorbente gel de sílice 60 F254 Merck, utilizando como revelador una solución de CoCl_2 (1%) en H_2SO_4 (2N) y/o lámpara UV $\lambda = 254\text{nm}$.
- * Los productos finales se purificaron por medio de una columna cromatográfica (CC) utilizando como adsorbente gel de sílice 60 Merck y una mezcla de elución adecuada para cada caso.
- * Los puntos de fusión (p.f.) de los compuestos obtenidos se determinaron en un aparato Fisher-Jones.

Los equipos empleados en los diferentes estudios fueron:

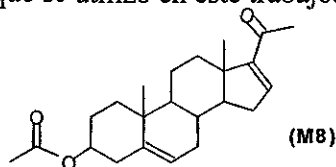
- Para la técnica de Espectrofotometría de Absorción al ultravioleta (UV) se empleó un equipo Perkin Elmer 200s.
- En la Espectrometría de absorción de Infrarrojo (IR) se utilizó un equipo Perkin Elmer 549B; utilizando la técnica de película KBr.
- Para la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN^1H) y de Carbono 13 (RMN^{13}C) equipos Varian Gemini 200 y VRX, utilizando CDCl_3 (cloroformo deuterado) como disolvente; los desplazamientos están dados en ppm referidos al TMS o DMSO como referencia interna.
- Finalmente la Espectrometría de Masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas HP 5985-B CG/MS mediante la técnica de impacto electrónico (IE).

En esta sección se presentan las características físicas y espectroscópicas encontradas y determinadas de cada uno de los intermediarios así como del compuesto de interés.

[A] 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (M8)
(Acetato de 16-dehidropregnenolona)

Este compuesto fue la materia prima que se utilizó en este trabajo.

Aspecto físico: se presenta como un polvo blanco opaco.



Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	181-183
Fórmula Molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₃
Peso molecular (uma)	356.44

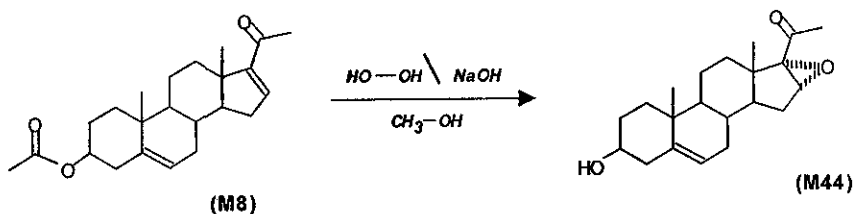
Tabla 1.

Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
UV(nm)	$\lambda_{m\acute{a}x}$ 238	CO α,β insaturado en C-20
IR (cm ⁻¹)	2945.27	-CH ₃
	1729.76	CO de éster en C-3
	1661.20	CO α,β insaturado en C-20
	1583.090	CC en C-16
	1372.77	-CH ₃
	1247.26	-C-O-C- de CH ₃ -COO- en C-3
	1037.03	-C-O-C- de CH ₃ -COO- en C-3
RMN ¹ H(ppm)	0.920 (s,3H)	-CH ₃ en C-18
	1.059 (s,3H)	-CH ₃ en C-19
	2.037 (s,3H)	-CH ₃ en C-21
	2.265 (s,3H)	-CH ₃ de CH ₃ COO- en C-3
	4.600 (m,1H)	H en C-3
	5.400 (d,1H)	C=CH en C-6
	6.700 (t,1H)	C=CH en C-16

Tabla 2.

Ver Espectro 1,2 y 3.

[B] 16 α -17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (M44).^{10,44}



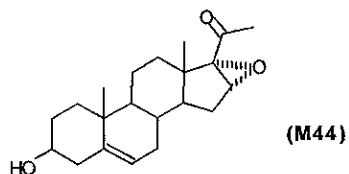
En un matraz bola de 100mL se disolvió 1g(2.8mmol) de M8 en 66mL de metanol caliente, después se agregó 2mL(8mmol) de hidróxido de sodio 4N y 4mL(35.3mmol) de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla de reacción resultante se mantuvo en agitación constante a una temperatura entre 20-25°C durante un período de 4hrs. Se monitoreo el curso de la reacción por CCF y una vez terminado el tiempo de reacción, se eliminó el exceso de metanol, dando lugar al compuesto M44 el cual precipitó en forma de cristales blancos, se lavaron con suficiente agua destilada hasta pH=7. Finalmente el producto se dejó secar al vacío obteniendo 0.9187g (2.57mmol) y determinándosele p.f.

A continuación se presentan las propiedades físicas y espectroscópicas encontradas (Tablas 3 y 4).

Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	180-181
Fórmula Molecular	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
Peso molecular (uma)	330.40
Rendimiento(%)	99.1

Tabla 3.

Aspecto físico:
Se presenta como un polvo
muy fino de color blanco

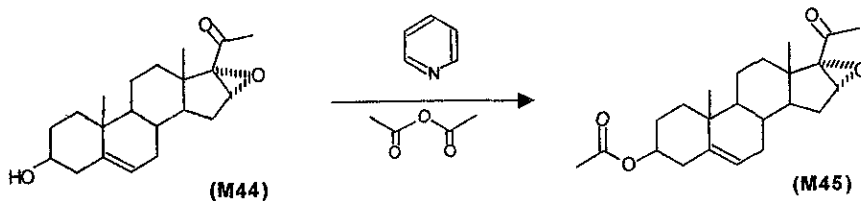


Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
IR(cm^{-1})	3370.92	-OH en C-3
	2937.35	-CH ₃ y -CH ₂ -
	1692.00	CO en C-20
	1632.59	CC en C-5
	1375.92	-CH ₃
	1056.28	C-O en C-3
RMN ¹ H(ppm)	1.023(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
	1.049(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
	2.034(s, 3H)	-CH ₃ en C-21
	3.217(s, 1H)	H en C-16
	3.500(m, 1H)	H en C-3
	3.685(s, 1H)	-OH en C-3
	5.340(d, 1H)	C=CH en C-6

Tabla 4.

Ver Espectro 4 y 5.

[C] 3β-Acetoxy-16α-17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (M45).¹⁰



Se colocó en un matraz bola de 50mL 1g(3mmol) de **M44**, se adicionaron 5mL(61mmol) de piridina y 10mL(100mmol) de anhídrido acético(previamente destilado) la mezcla resultante se mantuvo en agitación constante por un período de 5 horas a una temperatura entre 20-25°C, pasado este tiempo la mezcla de reacción se vertió en un vaso con hielo-agua provocando la formación de un precipitado, éste se filtró, se lavó hasta pH=7 y se dejó secar a vacío, obteniéndose 1.059g(2.84mmol) de **M45** en forma de cristales blancos muy finos, las aguas del filtrado se trataron con HCl diluido para neutralizar la piridina, y posteriormente se determinó su punto de fusión, el curso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina.

A continuación se presentan las propiedades físicas y espectroscópicas encontradas (Tablas 5 y 6).

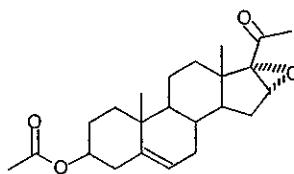
Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	157-159
Fórmula Molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₄
Peso molecular (uma)	372.44
Rendimiento(%)	94

Tabla 5.

Aspecto físico:

Se puede observar como

Pequeños cristales blancos



(M45)

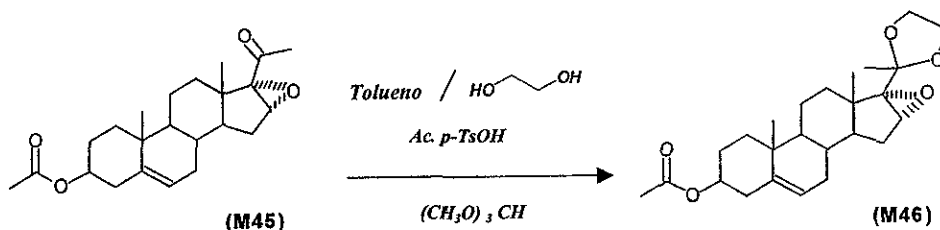
Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
IR(cm ⁻¹)	2942.65	-CH ₃ y CH ₂ -
	1731.92	CO de CH ₃ COO- en C-3
	1697.93	CO de cetona en C-20
	1245.00	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3
	1032.03	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3

RMN ¹ H(ppm)	0.965(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
	0.979(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
	1.962(s, 6H)	-CH ₃ en C-21 y -CH ₃ COO- en C-3
	3.418(s, 1H)	H en C-16
	4.500(m, 1H)	H en C-3
	5.250(d, 1H)	C=CH en C-6

Tabla 6.

Ver Espectro 6 y 7.

[D] 3β-Acetoxi-16α-17α-epoxi-20-etilendoxi-5-pregнено(M46).¹⁰



En un matraz bola de 50mL se disolvió 1g(2.7mmol) de **M45**, en 6mL de tolueno seco, se adicionaron 30mg(1.74mmol) de ácido p-toluensulfónico, 3.5mL(31mmol) de o-formiato de trimetilo y 3mL(53mmol) de etilenglicol.

La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante un lapso de 5 horas a una temperatura entre 20-25°C, bajo condiciones anhidras, al término de la reacción la cual se siguió por CCF se le adicionó 0.040g(0.48mmol) de acetato de sodio anhidro para neutralizar, después se extrajo 4 veces con 50mL de cloroformo, la fase orgánica se lavó con agua destilada hasta pH=7.

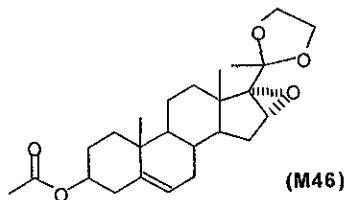
La fase acuosa se desechó mientras que a la fase orgánica se le adicionó sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida eliminado así el disolvente, se recrystalizó de metanol obteniéndose 0.990g(2.37mmol) de **M46**, el cual se observó como un polvo cristalino brillante de color blanco posteriormente se determinó el punto de fusión.

A continuación se presentan las propiedades físicas y espectroscópicas encontradas(Tablas 7 y 8).

Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	192-194
Fórmula Molecular	C ₂₅ H ₃₆ O ₅
Peso molecular (uma)	416.48
Rendimiento(%)	88.5

Tabla 7.

Aspecto físico:
Se presenta como agujas alargadas, brillantes, de color blanco-hielo

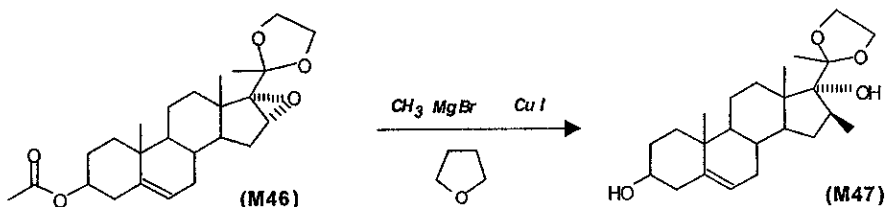


Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
IR(cm ⁻¹)	2941.89	-CH ₃ y CH ₂ -
	1719.36	CO de éster en C-3
	1248.00	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3
	1033.63	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3
RMN ¹ H(ppm)	0.997(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
	1.044(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
	1.443(s, 3H)	-CH ₃ en C-21
	2.039(s, 3H)	-CH ₃ COO- en C-3
	3.390(s, 1H)	H en C-16
	3.954(s, 4H)	-O-CH ₂ -CH ₂ -O- en C-20
	4.520(m, 1H)	H en C-3
	5.370(d, 1H)	C=CH en C-6

Tabla 8.

Ver Espectro 8 y 9.

[E] 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -metil-5-pregнено (M47).¹⁰



En un matraz de 50mL se colocó 1g(2.4mmol) de **M46** y 400mg(2.10mmol) de yoduro de cobre, se adicionó 11mL(11mmol) de bromuro de metil magnesio(1M) en tetrahidrofurano, la mezcla de reacción resultante se calentó a reflujo durante 4 días, bajo una atmósfera de nitrógeno.

Transcurrido el tiempo de reacción se dejó enfriar, enseguida se transfirió a un embudo de separación, conteniendo hielo donde se neutralizó con una solución de cloruro de amonio al 10%. Posteriormente, la fase acuosa se extrajo 3 veces con porciones de 15mL de cloroformo cada una, las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua hasta eliminar las sales de magnesio precipitadas.

A la fase orgánica se le adicionó sulfato de sodio anhidro para eliminar los residuos de agua existentes, se filtró y concentró a sequedad hasta la aparición de un sólido amarillo-paja opaco, el cual se recrystalizó de metanol, obteniéndose cristales en forma de agujas alargadas de color blanco en una proporción de 0.640g(1.63mmol) de **M47** al que posteriormente se le determinó punto de fusión.

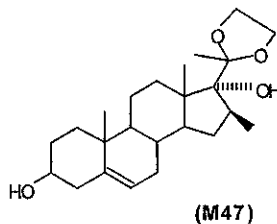
A continuación se presentan las propiedades físicas y espectroscópicas encontradas(Tablas 9 y 10).

Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	164-166
Fórmula Molecular	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
Peso molecular (uma)	390.48
Rendimiento(%)	68.2

Tabla 9.

Aspecto físico:

Se observa en su estado crudo como una cera amarilla con olor desagradable pero cuando está puro los cristales son largas agujas finas.

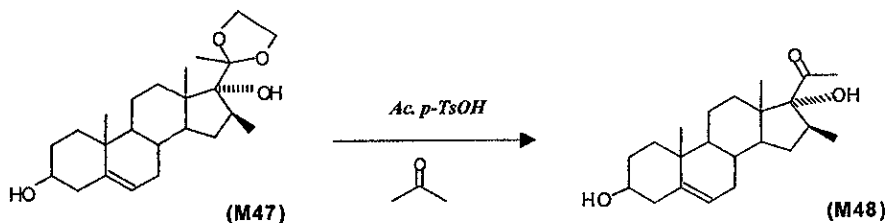


Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
IR(cm ⁻¹)	3450.22	-OH en C-3 y C-17
	2935.00	-CH ₃ y CH ₂ -
	2897.01	-CH ₃ y CH ₂ -
RMN ¹ H(ppm)	0.878(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
	0.988(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
	1.174(d, 3H)	-CH ₃ en C-16
	1.378(s, 3H)	-CH ₃ en C-21
	2.230(s, 1H)	-OH en C-17
	3.500(m, 1H)	-H en C-3
	3.700(s, 1H)	-OH en C-3
	3.950(m, 4H)	-O-CH ₂ -CH ₂ -O- en C-20
	5.350(d, 1H)	C=CH en C-6

Tabla 10.

Ver Espectro 10 y 11.

[F] 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona (M48).^{10,44,45}



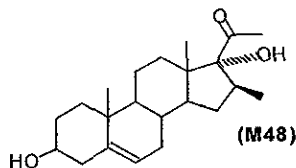
En matraz de bola de 50mL se disolvió 1g(2.5mmol) de **M47** en 40mL de acetona y se adicionó 500mg(2.9mmol) de ácido p-toluensulfónico, se mantuvo en agitación constante por 1 hora a una temperatura entre 20-25°C bajo condiciones anhidras. El curso de la reacción se siguió por CCF. Al término de la reacción se concentró para eliminar casi todo el disolvente quedando una solución aceitosa la cual se vertió en un vaso con hielo-agua propiciando la formación de un precipitado, para neutralizar los residuos de ácido se adicionó una espátula de bicarbonato de sodio, se agitó y dejó reposar 24horas, transcurrido el tiempo se lavó con agua destilada hasta pH=7, se filtró obteniéndose 0.683g(1.97mmol) de **M48** el cual se presentó como un polvo fino de color blanco al que posteriormente se le determinó el punto de fusión.

A continuación se presentan las propiedades físicas y espectroscópicas encontradas(Tablas 11 y 12).

Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	208-210
Fórmula Molecular	C ₂₂ H ₃₄ O ₃
Peso molecular (uma)	346.44
Rendimiento(%)	77

Tabla 11.

Aspecto físico:
Se presenta como un polvo
fino de color blanco opaco.

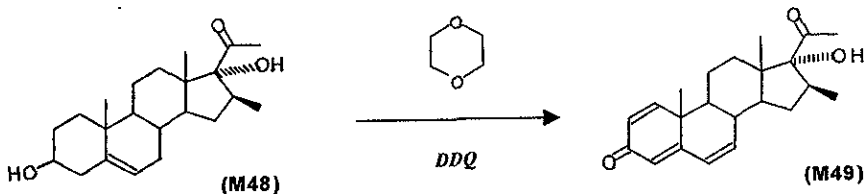


Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
IR(cm ⁻¹)	3400.22	-OH en C-17
	3342.28	-OH en C-3
	2947.22	-CH ₃
	2928.27	-CH ₂ -
	1690.00	CO en C-20
	1052.64	C-O en C-3
RMN ¹ H(ppm)	0.800(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
	0.970(d, 3H)	-CH ₃ en C-16
	1.200(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
	2.100(s, 3H)	-CH ₃ en C-21
	3.420(s, 1H)	-OH en C-3
	3.500(m, 1H)	-H en C-3
	3.900(s, 1H)	-OH en C-17
	5.300(d, 1H)	C=CH en C-6

Tabla 12.

Ver Espectro 12 y 13.

[G] 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (M49).¹²



Se colocó en un matraz bola de 50mL 1g(2.88mmol) de **M48**, 2.2g(9.69mmol) de DDQ y 36mL de dioxano seco, la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 4 días, transcurrido el tiempo se filtró para eliminar la hidroquinona(forma reducida del DDQ) después, el filtrado se vertió a un vaso de precipitado conteniendo 100mL(75mmol) de NaOH al 3% y 100mL de cloroformo, se agitó durante 5 minutos.

Posteriormente se extrajo 3 veces con hidróxido de sodio al 3% y otras 3 con una solución saturada de cloruro de sodio, se juntaron las fases orgánicas a las cuales se les adicionó sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida para eliminar el disolvente dando lugar a un sólido de color intenso amarillo-paja, el cual se purificó por CC, obteniéndose 0.6510g(1.91mmol) **M49** al cual se le determinó su punto de fusión.

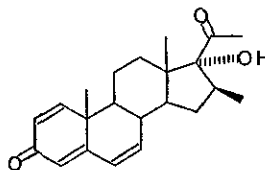
A continuación se presentan las propiedades físicas y espectroscópicas encontradas(Tablas 13 y 14 y 15).

Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	212-215
Fórmula Molecular	C ₂₂ H ₂₈ O ₃
Peso molecular (uma)	340.40
Rendimiento(%)	66.2

Tabla 13.

Aspecto físico:

Se observa en su forma cruda como un sólido amarillo-paja obscuro y opaco de olor desagradable, pero cuando está puro son cristales en forma de largas agujas brillantes




(M49)

Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
UV(nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ 220	CO, α , β -insaturado en C-3
	$\lambda_{\text{máx}}$ 255	CO, α , β -insaturado en C-3, y conjugado en C-4
	$\lambda_{\text{máx}}$ 298	CO, α , β -insaturado en C-3 y conjugado en C-4, C-6
IR(cm^{-1})	3387.73	-OH en C-17
	2941.17	-CH ₃ y CH ₂ -
	1704.81	CO α, β insaturado en C-20
	1655.74	CO en C-3
	1602.18	Dobles ligaduras conjugadas en C-1, C-4 y C-6
	1450.27	-CH ₃ y CH ₂ -
RMN ¹ H(ppm)	1.138(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
	1.196(d, 3H)	-CH ₃ en C-16
	1.295(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
	1.956(s, 3H)	-CH ₃ en C-21
	6.040(s, 1H)	-C=CH en C-4
	6.234(d, 1H)	-C=CH en C-2
	6.293(d, 1H)	-C=CH en C-7
	6.349(d, 1H)	-C=CH en C-6
	7.076(d, 1H)	-C=CH en C-1

Tabla 14.

Ver Espectro 14, 15 y 16.

RMN¹³ C(ppm)

Tipo de carbono	Valor obtenido	Asignación
Carbonos cuaternarios	217.341	C-20
	186.095	C-3
	161.290	C-5
	78.029	C-17
	48.293	C-10
	41.103	C-13




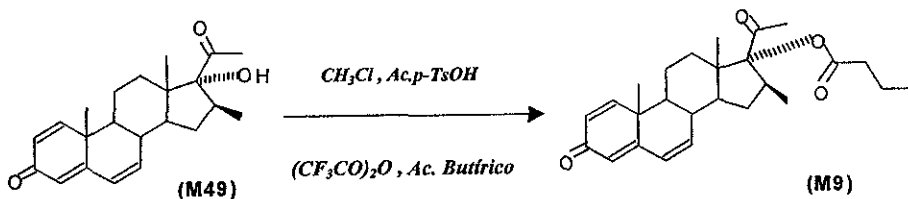
	Carbonos terciarios	152.162	C-1
		135.243	C-4
		128.694	C-7
		128.427	C-2
		123.990	C-6
		47.130	C-8
		46.676	C-16
		43.869	C-9
		36.693	C-14
	Carbonos secundarios	32.844	C-12
		29.142	C-11
		20.642	C-15
	Carbonos primarios	22.139	C-21
		20.575	C-19
		16.004	C-16'
		15.055	C-18
EMIE(m/z)	340	M⁺	
	322	M - H ₂ O	
	307	322 - CH ₃	
	294	322 - CO	
	279	322 - (CH ₃ C=O) ⁺	
(100% Ab.rel.)	225	M - OH - (CH ₃ C=O) ⁺ - CH ₃ - C ₆ H ₁₀ O ₂	
	185	M - C ₆ H ₁₀ O ₂ - C ₃ H ₄	
	43	(CH ₃ C=O) ⁺	

Tabla 15.

Ver Espectro 17,17.1 y 18.

[H] 17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregmatrien-3,20-diona (M9).



En un matraz bola de 15mL se disolvió 200mg(5.87mmol) de M49 en 5mL de cloroformo, se adicionó 10mg(5.8mmol) de ácido p-toluensulfónico, 1.2mL(8.48mmol) de anhídrido trifluoroacético y 0.192mL(2.54mmol) de ácido butírico. La mezcla de reacción se agitó durante 1hora a una temperatura entre 20-25°C bajo condiciones anhidras; se monitoreo el curso de la reacción por CCF. Una vez transformada toda la materia prima, se adicionó 50mL de cloroformo y se vertió a un vaso con hielo-agua.

Se adicionó bicarbonato de sodio hasta que el pH de la fase acuosa fuera neutro. Se separó la fase orgánica de la acuosa, secando la primera con sulfato de sodio anhidro, posteriormente se filtró y concentró a presión reducida para eliminar el disolvente. Obteniéndose un producto oleoso que se purificó por CC(sílica gel 60; n-hexano/AcOEt 8:2 UV=254nm) produciendo 178mg (0.0048mmol) de M9, al cual se le determinó su punto de fusión.

A continuación se presentan las propiedades físicas y espectroscópicas encontradas(Tablas 16 y 17 y 17.1).

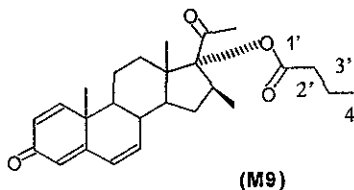
Propiedad determinada	Valor encontrado o calculado
Punto de fusión (°C)	192-194
Fórmula Molecular	C ₂₆ H ₃₄ O ₄
Peso molecular (uma)	410.00
Rendimiento(%)	74

Tabla 16.

Estructura enumerada para el análisis espectroscópico de RMN¹H y RMN¹³C.

Aspecto físico:

Se presenta como un polvo fino blanco, con un olor muy peculiar debido al ácido butírico.



Valor Espectroscópico obtenido		Asignación
UV(nm)	$\lambda_{\text{máx}}$ 221	CO, α , β -insaturado en C-3
	$\lambda_{\text{máx}}$ 255	CO, α , β -insaturado en C-3, y conjugado en C-4
	$\lambda_{\text{máx}}$ 298	CO, α , β -insaturado en C-3 y conjugado en C-4, C-6
IR(cm ⁻¹)	2944.49	-CH ₃
	2868.87	CH ₂ -
	1720.00	CO de éster sobre C-17
	1707.99	CO de éster sobre C-20
	1654.56	CO de éster sobre C-3
	1604.62	CC sistema dieno conjugado de C-4, C-5, C-6 y C-7
	1452.50	-CH ₃
	1377.12	-CH ₂ -
	1285.68	C-O de éster de CH ₃ COO- en C-17
	1186.05	C-O de éster de CH ₃ COO- en C-17

Tabla 17.



Ver Espectro 19 y 20.

RMN ¹ H(ppm)	0.934(t, 3H)	-CH ₃ de éster en C-17
	1.038(d, 3H)	-CH ₃ de éster en C-16
	1.180(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
	1.350(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
	1.598(m, 1H)	-CH ₂ de éster en C-17-3'
	2.261(s, 1H)	-CH ₃ en C-21'
	2.266(t, 1H)	-CH ₂ de éster en C-17-2'
	6.038(s, 1H)	C=CH en C-4
	6.260(d,1H)	C=CH en C-2
	6.294(d,1H)	C=CH en C-7
	6.342(d,1H)	C=CH en C-6
	7.082(d,1H)	C=CH en C-1

Tabla 18.

Ver Espectro 21.

RMN¹³ C(ppm)

Tipo de carbono	Valor obtenido	Asignación
Carbonos cuaternarios	211.877	C-20
	186.214	C-3
	172.670	C-17-1'
	161.658	C-5
	83.981	C-17
	47.738	C-10
	37.926	C-13
	Carbonos terciarios	152.390
	135.719	C-4
	128.531	C-7
	128.357	C-2
	123.835	C-6
	47.143	C-8
	44.652	C-16
	41.197	C-9
	36.624	C-14

Carbonos secundarios		36.286	C-17-2'
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C}- \\ \\ \text{H} \end{array}$		32.933	C-12
		28.811	C-17-3'
		20.896	C-11
		18.363	C-15
		20.722	C-21
Carbonos primarios		20.619	C-19
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ -\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$		17.605	C-18
		15.749	C-16-1'
		13.514	C-17-4'
EMIE(m/z)	410	M^+	
	395	$M^+ - \text{CH}_3$	
	381	$M^+ - \text{CH}_2=\text{CH}_2$	
	380	$-\text{CH}_3, -\text{CH}_3$	
	367	$M^+ - (\text{CH}_3\text{C}=\text{O})^+$	
	322	$M^+ - \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$	
	307	$381 - \text{CH}_3\text{-COOH} - \text{CH}_3$	
(100% Ab.rel.)	294	$M^+ - (\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O})^+ - \text{CH}_3\text{COH}$	
	279	$M^+ - (\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O})^+ - (\text{CH}_3\text{C}=\text{O})^+ - \text{H}_2\text{O}$	
	71	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}^-$	
	43	$(\text{CH}_3\text{C}=\text{O})^+$	

Tabla 19.

Ver Espectro 22.22.1 y 23.

CAPITULO

III

INHIBICION DE LA ENZIMA ALPHA REDUCTASA POR UN COMPUESTO SINTETIZADO

**[E.1] EVALUACION BIOLOGICA DEL COMPUESTO FRENTE A LA ENZIMA
5 α -REDUCTASA.**

El ensayo para evaluar la actividad biológica, consistió en determinar la actividad de la enzima 5 α -reductasa en presencia de los productos finales así como de los intermediarios incluyendo la materia prima. Este ensayo biológico se realizó en la ENEP Iztacala por el Q.F.B César Flores.

**[E.2] METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DEL EXTRACTO: CONCENTRADO
DE PROTEINAS**

Siguiendo técnicas de extracción de la enzima, previamente reportadas en la literatura.³³ Se emplearon dos ratas macho de la cepa Wistar con un peso corporal de 250g, sacrificándolas por desnucamiento. Inmediatamente, fueron extraídos los testículos.

Este órgano se homogeneizó, utilizando una solución de KCl 0.17M. El extracto obtenido se filtró y se centrifugó a 15,000rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se recuperó y se saturó al 50% con sulfato de amonio ((NH₄)₂ SO₄) en frío, el precipitado formado se dializó en contra de 1L de buffer Tris-HCl 50mM, pH 7.3 durante 42 horas. El dializado obtenido se centrifugó a 10,000rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante obtenido se utilizó como extracto concentrado de proteínas para realizar el ensayo enzimático. Todas las operaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C.

La proteína del extracto se determinó por el método de Bradford, utilizando albúmina sérica de bovino para construir la curva estándar. Este método involucra la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a la proteína. La unión del colorante a la proteína provocó un desplazamiento en la longitud de absorción máxima de 465nm(rojo) a 595(azul).

[E.3] CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA 5 α - REDUCTASA

La cuantificación de la actividad de la enzima 5 α -reductasa, se realizó incubando 100 μ de proteína del extracto concentrado obtenido, en un medio de reacción que contenía:

500 μ M de M1

500 μ M del producto a evaluar

buffer Tris-HCl 100mM,

pH=7

NADPH 100 μ M.

Se incubó durante 30 minutos a 30°C a 37°C con agitación y se determinó la actividad antiandrogénica:

- Midiendo la variación de la absorción del NADPH a 340nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda. A esta longitud de onda el NADPH absorbe pero no el NADP⁺, por lo que los cambios en la oxidación pueden ser medidos. Se trabajaron al menos cuatro réplicas por tratamiento, a una sola concentración(500 μ M).

Para poder tener un control de referencia y comparar estos con los derivados sintetizados se evaluaron también M6 que es el antiandrógeno esteroideal de elección en el mercado, así como el inhibidor de la enzima 5 α -reductasa el azasteroide M4, los cuales mostraron 0.3 y 0.4 unidades de actividad enzimática respectivamente.

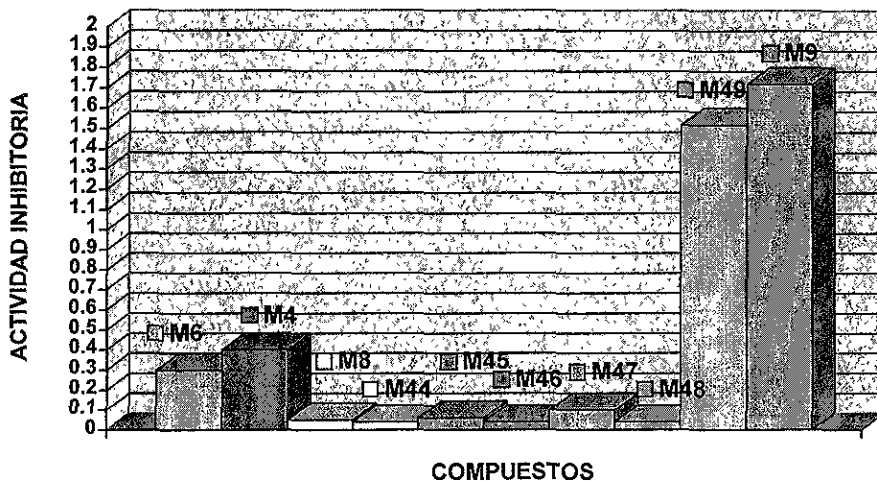
Cabe mencionar nuevamente, que la actividad enzimática obtenida es medida indirectamente a través de la cuantificación de la absorbancia del NADPH presente en cada muestra. Con base a esto, se obtuvo la actividad enzimática para cada compuesto(ver Tabla 0.1 y Gráfica I, página 55).

Actividad in-vitro de los compuestos sobre la enzima 5 α -reductasa

Tabla 0.1.

Número	Compuesto	Actividad enzimática
M6	Acetato de Ciproterona	0.3
M4	Finasteride((17 β -(N-tert-butilcarbamoil)-4-aza-5 α -andros-1-en-3-ona	0.4
M8	Acetato de 16-dehidropregnenolona	0.05
M44	16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona	0.04
M45	3 β -Acetoxi-16 α , 17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona	0.06
M46	3 β -Acetoxi-16 α , 17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено	0.04
M47	3 β , 17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -metil-5-pregнено	0.1
M48	3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona	0.04
M49	17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona	1.52
M9	17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona	1.72

EVALUACIÓN FARMACOLOGICA DE LOS INTERMEDIARIOS Y DEL COMPUESTO FINAL



GRAFICA I

CAPITULO IV

DISCUSION DE

RESULTADOS

[D] DISCUSION DE RESULTADOS

La discusión de resultados se llevará acabo de acuerdo al siguiente orden: primero se realizará la discusión de la síntesis química y posteriormente la referente al ensayo biológico.

[D.1] DISCUSION DE LA SINTESIS QUIMICA



Para el 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (M8).

Llamado también acetato de 16-dehidropregnenolona(16-DPA), el cual fue utilizado como materia prima; dicho esteroide presenta las funcionalidades químicas necesarias para ser transformado en el compuesto deseado. Primeramente se caracterizó la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas, tal como se presenta en las **Tablas 1 y 2**.

M8 (Espectro 1, ver apéndice) absorbe al UV y presenta la existencia del cromóforo conjugado con $\lambda_{\text{máx}}$ de 238nm, que corresponde al grupo α,β -insaturado en C-16 y 20-ona.

En cuanto a su espectro de IR (Espectro 2, ver apéndice) se encuentran dos absorciones en la zona de los carbonilos en 1729.76cm^{-1} y 1661.20cm^{-1} correspondientes al carbonilo del grupo acetoxi en C-3 y de la cetona α,β insaturada en C-20 respectivamente. También se observan señales correspondientes a metilos y metilenos en 2945.27cm^{-1} y 1372.77cm^{-1} ; 1451.45cm^{-1} que indican la presencia de los vinilos. Las señales en 1247.26cm^{-1} y 1037.03cm^{-1} representan la interacción C-O del éster en C-3.

En tanto a la RMN ^1H (Espectro 3, ver apéndice) presenta las siguientes señales: dos singuletes en 0.920ppm y 1.059ppm que integran para tres protones cada una, correspondientes a los protones de los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente, así como dos señales simples en 2.037ppm y 2.265ppm que integran para 3 protones cada una perteneciente al metilo en C-21 y al metilo del grupo acetato sobre C-3 respectivamente, así como una señal múltiple que integra para un protón en 4.60ppm correspondiente al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se presenta un doblete en 5.40ppm que integra para un protón, se debe al protón vinílico en C-6, el cual está acoplado a cada una de los protones vecinos en C-7. Por último la señal triple en 6.7ppm que integra para un protón, se asignó al protón vinílico en C-16 que se encuentra acoplado a los dos protones vecinos en C-15.

Para el 16 α -17 β -Epoxi-3 β hidroxi-5-pregnen-20-ona (M44).

El primer paso de la síntesis involucró la formación de un epóxido en C-16 y C-17. Dicha epoxidación se realizó con peróxido de hidrógeno en medio básico, produciendo una adición nucleofílica del anión hidroperoxido sobre la doble ligadura en C-16 y C-17 mediante un mecanismo tipo Michael, como se cuenta con un medio básico se produjo la hidrólisis del grupo acetoxi en C-3. El compuesto deseado se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas. **Tablas 3 y 4.**

El espectro de IR (Espectro 4, ver apéndice) de este compuesto presenta una banda muy intensa en 1692.00cm^{-1} que corresponde a la frecuencia de absorción del grupo carbonilo en C-20, se confirma la hidrólisis del grupo acetoxi con la ausencia de la señal del carbonilo del éster en 1729.76cm^{-1} así como la aparición de una señal intensa en 3370.92cm^{-1} que corresponde al alcohol en C-3. También se puede observar la presencia de señales en 2937.35cm^{-1} 1375.92cm^{-1} y 1453.25cm^{-1} correspondientes a grupos metilos y metilenos. La señal en 1632.59cm^{-1} se asignó a la insaturación en C-5 y finalmente la señal en 1056.28cm^{-1} correspondiente al enlace C-O del grupo alcohol en C-3.

El análisis del espectro de RMN ^1H (Espectro 5, ver apéndice) indica la desaparición de la señal triple en 6.70ppm correspondiente al protón vinílico en C-16 y la aparición de una señal simple en 3.217ppm que integra para un protón base de epóxido en ese mismo carbono. La señal múltiple de 3.50ppm que integra para un protón se asignó al protón en C-3 y las señales simples en 1.023 y 1.049ppm que integran para 3 protones cada una, correspondiente a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente. También se observa una señal simple que integra para 3 protones en 2.034ppm que corresponde al metilo en C-21, así como la señal doble en 5.34ppm que integra para un protón asignado al protón vinílico en C-6. Finalmente se observa una señal en 3.685ppm que integra para un protón y se asignó al protón del alcohol en C-3.



Para el 3 β Acetoxi-16 α -17 β -epoxi-5-pregnen-20-ona (M45).

El siguiente paso de la síntesis consistió en proteger el alcohol libre en C-3 de **M44** con un grupo acetoxi. Esto se realizó mediante el método convencional de acetilación que emplea una mezcla de anhídrido acético y piridina formando de esta manera el electrófilo acetilpiridino considerado como la especie acetilante. El compuesto se caracterizó por medio de sus propiedades físicas y espectroscópicas como se muestra en las **Tablas 5 y 6**.

El espectro de IR (Espectro 6, ver apéndice) indica la presencia de una señal 1731.92 cm^{-1} asignada al carbonilo del acetoxi en C-3 y la ausencia de la señal en 3370.92 cm^{-1} que correspondía al alcohol libre en la misma posición confirmando de esta manera la acetilación. La señal en 1697.93 cm^{-1} corresponde al carbonilo en C-20 y las señales en 1245.00 cm^{-1} y 1032.03 cm^{-1} son características del éster en C-3. Finalmente la señal en 2942.65 cm^{-1} se debe a los grupos metilos y metilenos.

Con respecto al espectro de RMN ^1H (Espectro 7, ver apéndice) mostró dos señales simples en 0.965ppm y 0.979ppm que integran para tres protones cada una de ellas correspondientes a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente.

El singulete en 1.962ppm que integra para 6 protones se asignó al metilo del grupo acetoxi en C-3 y al metilo en C-21 alfa a la acetona. El protón en C-16 esta representado por una señal simple que integra para un protón en 3.418 ppm y el protón en C-3 se ve como una señal múltiple desplazado a campo bajo en 4.50ppm. Finalmente la señal en 5.25ppm que integra para un protón se asignó al protón vinílico en C-6 acoplado a dos protones vecinos en C-7.



Para el 3 β Acetoxi -16 α , 17 β - epoxi - 20 - etilendioxi - 5 - pregneno (M46).

El paso siguiente en la síntesis implicó la protección del carbonilo en C-20 de **M45** mediante la formación de su cetal, debido a que el próximo paso involucra la apertura del epóxido mediante un reactivo organo-metálico de Grignard el bromuro de metilmagnesio para introducir el grupo metilo en posición C-16 β .

Esta reacción de protección se efectuó empleando etilenglicol, orto-formiato de trimetilo, tolueno como disolvente y ácido p-toluensulfónico como catalizador para dar lugar a la formación del dioxolano. El compuesto obtenido se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas mencionadas en las **Tablas 7 y 8**.

El análisis del espectro de IR (Espectro 8, ver apéndice) refleja la desaparición de la señal correspondiente al carbonilo cetónico en C-20 en 1697.93cm⁻¹, mostrando únicamente la banda del carbonilo del acetoxi en C-3 en 1719.36cm⁻¹. Además de que se siguen conservando las señales referentes a los metilos y metilenos en 2941.89cm⁻¹ y las características del éster en C-3 en 1248.00cm⁻¹ y 1033.63cm⁻¹ que representa la unión C-O.

El espectro de RMN ¹H (Espectro 9, ver apéndice) muestra dos singuletes en 0.997ppm y 1.044ppm que integran para 3 protones cada una, correspondientes a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente. De igual manera se observa un singulete en 1.443ppm que integra para 3 protones asignado al metilo C-21, esta señal se ha desplazado a campo alto con respecto al compuesto acetilado debido a la falta de carbonilo en C-20 que lo protegía.

En el desplazamiento químico de 2.039ppm que integra para tres protones pertenecientes al metilo del acetoxi sobre C-3 y en 3.390ppm otra señal simple que integra para un protón en C-16.

Se registra además, un singulete en 3.954ppm que integra para 4 protones asignado al dioxolano en C-20. En 4.520ppm se observa una señal múltiple que integra para un protón en C-3 que se encuentra acoplado a cuatro protones vecinos situados en C-2 y C-4 y finalmente en 5.370ppm una señal doble que integra para un protón, el cual corresponde al protón vinílico en C-6.

El 3 β , 17 α - Dihidroxi - 20 - etilendioxi - 16 β - metil - 5-pregneno (M47).

El siguiente paso que se llevó a cabo fue la apertura del anillo del oxirano de **M46** mediante un mecanismo de adición nucleofílica, empleando bromuro de metilmagnesio en tetrahidrofurano y yoduro de cobre como catalizador, todo ello con la finalidad de introducir un grupo β metilo en C-16 del esteroide, así como la generación simultánea del oxhidrilo α en C-17. El compuesto obtenido se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas en las **Tablas 9 y 10**.

El espectro de IR (Espectro 10, ver apéndice) de este compuesto muestra una banda en la zona de 3450.22cm^{-1} que corresponde al oxhidrilo en C-17, generado por la apertura del epóxido en C-16-C-17, en esta misma señal se observa una inflexión que se debe al oxhidrilo en C-3 que se presenta como resultado de la hidrólisis del acetato por el reactivo de Grignard, es por ello que esta banda fue asignada a los dos oxhidrilos. Así mismo se observan señales en 2935.00cm^{-1} y 2897.01cm^{-1} características de metilos y metilenos.

El espectro de RMN ^1H (Espectro 11, ver apéndice) presenta dos singuletes en 0.878ppm y en 0.988ppm, ambas señales integran para tres protones, correspondientes a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente; un doblete en 1.174ppm que integra para tres protones, asignada al metilo en C-16.

La señal simple en 1.378ppm integra para tres protones se refiere al metilo C-21 alfa al carbonilo que soporta a la entidad etilendioxi. El desplazamiento químico de 2.230ppm se ubica una señal simple que integra para un protón asignada al protón del oxhidrilo sobre C-17 y en 3.50ppm una señal múltiple que integra para un protón que se encuentra situado en C-3. La señal simple en 3.70ppm que integra para un protón es del oxhidrilo en C-3; el multiplete en 3.950ppm que integra para los cuatro protones del grupo etilendioxi en C-20 y finalmente el doblete en 5.350ppm que integra para un protón se debe al protón vinílico en C-6 acoplado a los dos protones en C-7.



Para el $3\beta, 17\alpha$ -dihidroxi-16 β -metil-5pregnen-20-ona(M48).

Aquí lo que se logró fue regenerar el grupo carbonilo de M47 sobre C-20 utilizando medio ácido de reacción, disolviendo en acetona y agregando ácido p-toluensulfónico; esta reacción produjo un dihidroxi compuesto que se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas vistas en las **Tablas 11 y 12.**

El espectro de IR (Espectro 12, ver apéndice) presenta las dos bandas en la zona de alcoholes en 3400.22cm^{-1} y 3342.28cm^{-1} indicativas a los oxhidrilos en C-17 y C-3 respectivamente. Así mismo se aprecian las señales en 2928.27cm^{-1} y 2947.22cm^{-1} que indican la presencia de grupos metilos y metilenos; en 1052.64cm^{-1} muestran la interacción C-O en C-3 y en 1690.00cm^{-1} una señal muy intensa que corresponde al carbonilo regenerado en C-20 con lo cual se corrobora la reacción de hidrólisis del cetal.

La RMN ^1H (Espectro 13, ver apéndice) también corrobora la regeneración del grupo carbonilo en C-20 ya que la señal múltiple en 3.950ppm que integra para los cuatro protones del grupo etilendioxi en C-20 ha desaparecido; la señal simple en 0.800ppm que integra para tres protones y la señal doble en 0.970ppm que integra de igual manera que la anterior se debe a los metilos C-18 y C-16 respectivamente. Las señales simples que integran para tres protones cada una en 1.20ppm y 2.10ppm corresponden a los metilos C-19 y C-21 alfa al carbonilo. Cabe mencionar que este último valor se desplazó a campo mas bajo(mayores ppm) como era de esperarse ya que los protones se encuentran alfa a carbonilo.

En 3.42ppm se ubica una señal simple que integra para un hidrógeno, asignada al protón del oxhidrilo en C-3, la otra señal simple indicativa del protón de -OH en C-17 se encuentra en 3.90ppm. Se aprecia una señal múltiple en 3.50ppm que integra para un protón en C-3 el cual se encuentra acoplado con los protones vecinos en C-2 y C-4. Por último se distingue una señal doble en 5.30ppm que es debida al protón vinílico en C-6 acoplado a los protones en C-7.



El 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20diona(M49).

En este paso de la síntesis se llevó a cabo la oxidación del grupo oxhidrilo en C-3 y la introducción de dobles ligaduras en C-1, C-4 y C-6 en **M48**; todo esto se logró a través de la deshidrogenación con DDQ. El método empleado permitió disminuir un paso adicional de síntesis, ya que se evitó oxidar primero el sistema 3-ol a través de una oxidación de Oppenauer. Así de esta forma se obtuvo el producto deseado cuya estructura se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas, de acuerdo a las **Tablas 13,14 y 15**.

Se realizó UV (Espectro 14, ver apéndice) debido a que este compuesto presenta un grupo cromóforo 1,4,6-trien-3-ona, se determinó la presencia de éste por medio de un máximo de absorbancia a 255nm y 298nm (257nm y 305nm datos teóricos referidos al dieno y trieno conjugado respectivamente).

En su espectro de IR (Espectro 15, ver apéndice) presenta banda en 3387.73cm^{-1} correspondiente al oxhidrilo en C-17. Se comprueba la oxidación del grupo oxhidrilo en C-3, pues la señal en 3342.28cm^{-1} perteneciente al alcohol en C-3 desapareció y en su lugar se observa una señal en 1655.74cm^{-1} perteneciente al carbonilo en la misma posición. En la misma zona de carbonilos, en 1704.81cm^{-1} debida al carbonilo en C-20 α, β -insaturado. La señal de 1602.18cm^{-1} se asignó a las dobles ligaduras alifáticas conjugadas; por último las bandas 2941.17cm^{-1} y 1450.27cm^{-1} son indicativas de los metilos y metilenos presentes en el esteroide.

El espectro de RMN ^1H (Espectro 16, ver apéndice) nuevamente se confirma la generación de la entidad 1,4,6-trien-3-ona al apreciarse que la señal simple en 3.42ppm que integraba para el protón del oxhidrilo en C-3 desapareció, observándose en la zona de los protones vinílicos cinco señales: una simple que integra para un protón en 6.040ppm que sin duda corresponde al protón vinílico C-4 alfa al carbonilo en C-3, las cuatro señales restantes cuya multiplicidad es doble y su integración es de un protón son las que aparecen en 7.076ppm se asignó al protón en C-1, en 6.234ppm, 6.293ppm y 6.349ppm corresponden a los protones situados en C-2, C-7 y C-6 respectivamente. Las señales restantes son debidas a los metilos presentes en la molécula esteroideal, se aprecia una señal simple que integra para 3 protones en 1.956ppm que corresponde al metilo C-21, otras dos señales simples en 1.295ppm y 1.138ppm se asignaron a los metilos angulares C-19 y C-18 respectivamente. Finalmente una señal doble en 1.196ppm corresponde al metilo en C-16.

La RMN ^{13}C (Espectro 17 y 17.1, ver apéndice) también confirma la presencia de la entidad 1,4,6-trien-ona; ya que en la zona de los carbonilos además de apreciarse la señal en 217.341ppm indicativa del carbonilo en C-20 se observa otra señal en 186.095ppm asignada al carbonilo en C-3 generado por la oxidación. En 161.290ppm, 48.293ppm y 41.103ppm se encuentran los carbonos cuaternarios correspondientes a C-5, C-10 y C-13 respectivamente. El último carbono cuaternario se encuentra en 78.029ppm que corresponde al carbono que sostiene al grupo oxhidrilo en C-17.

Los carbonos terciarios los podemos encontrar formando parte de las dobles ligaduras en 152.162ppm, 135.243ppm, 128.694ppm, 128.427ppm, 123.990ppm, correspondientes a los carbonos C-1, C-4, C-7, C-2, C-6 respectivamente; uniendo los anillos en 47.130ppm, 36.693ppm correspondientes a los carbonos C-8 y C-14 respectivamente; ó sosteniendo a un grupo metilo en 46.676ppm, 43.869ppm, correspondientes a los carbonos C-16 y C-9.

Mientras que los carbonos secundarios solo forman parte de los anillos como en 32.844ppm, 29.142ppm, 20.642ppm que corresponden a los carbonos en C-12, C-11 y C-15 respectivamente.

Finalmente los carbonos primarios generalmente son sustituyentes como podemos apreciarlos en 22.139ppm, 20.575ppm, 16.004ppm, 15.055ppm correspondientes a los carbonos en C-21, C-19, C-16' y C-18 respectivamente.

La EMI (Espectro 18, ver apéndice) muestra un ion molecular de 340 correspondiente al peso molecular de M49. También se observa un pico en 322 dado por la deshidratación del alcohol en C-17. Los picos siguientes situados en 307 y 294 se produjeron por la pérdida de 15 y 28 unidades pertenecientes a (-CH₃ y CO) respectivamente del fragmento m/z 322. El pico de 279 se debe a la pérdida de (CH₃C=O)⁺ o 43 unidades del fragmento 322. El pico de 225 y que además constituye el pico base se debe a la pérdida de C₆H₁₀O₂. El pico de 185 se debe a la pérdida de 40 unidades de C₃H₄. Finalmente el pico en 43 corresponde al fragmento (CH₃C=O)⁺.



Para el nuevo compuesto llamado 16β-metil-17α-butiroxi-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona (M9).

La esterificación del grupo oxhidrilo en C-17 del compuesto M49 se llevó a cabo con ácido butírico dando origen a un nuevo compuesto no reportado en la literatura, cuya estructura se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas presentadas en las Tablas 16, 17 y 18.

El espectro de UV (Espectro 19, ver apéndice) para este nuevo compuesto presenta un grupo cromóforo 1.4.6-trien-3-ona, se determinó la presencia de éste por medio de un máximo de absorbancia a 221nm, 255nm y 298nm (227nm, 257nm y 305nm datos teóricos referidos a la ligadura aislada, al dieno y trieno conjugado respectivamente).

El espectro de IR (Espectro 20, ver apéndice) comprueba la esterificación del oxhidrilo, ya que la banda en 3387.73cm⁻¹ desapareció, observando una señal nueva en 1720cm⁻¹ asignada al carbonilo del éster butírico, así mismo se observan dos señales más en la zona de carbonilos una en 1707.99cm⁻¹ y otra en 1654.56cm⁻¹ referentes al grupo cetona en C-20 y C-3 respectivamente. En 1604.62cm⁻¹ la señal se asignó a la interacción C-C en el sistema dieno conjugado de C-4 a C-7. Las señales en 2944.49cm⁻¹, 1452.50cm⁻¹,

2868.87cm⁻¹, y 1377.12cm⁻¹ se deben a la presencia de metilos y metilenos en la estructura base del esteroide. Finalmente las bandas en 1285.68cm⁻¹ y 1186.05cm⁻¹ fueron asignadas a la interacción C-O del éster en C-17.

El espectro de RMN ¹H (Espectro 21, ver apéndice) reafirma la formación del éster butírico, ya que en 0.934ppm se ve la aparición de una señal triple nueva que integra para tres protones, correspondientes al metilo del grupo butirato en C-17.

En 1.598ppm se ve una señal múltiple que integra para dos protones debida al metileno en la posición 3' del grupo butirato en C-17, se ve un triplete en 2.266ppm que integra para dos protones debida al metileno en la posición 2' del grupo butirato en C-17, en 2.261 se observa una señal simple que integra para tres protones y corresponde al metilo en C-21. Las señales simples en 1.038ppm, 1.180ppm, 1.350ppm que integran para tres protones corresponden a los metilos C-16, C-18, C-19 respectivamente. Los protones vinílicos se observan a campo bajo, una señal simple en 6.038ppm correspondiente al protón en C-4. Otras cuatro en 6.260ppm, 6.294ppm, 6.342ppm y 7.082ppm correspondientes a C-4, C-2, C-7, C-6, C-1 respectivamente cuya multiplicidad es doble e integran para un protón.

La RMN ¹³C (Espectro 22 y 22.1, ver apéndice) una vez más corrobora la formación del éster en C-17, ya que la zona de los carbonilos además de las señales en 211.877ppm y 186.214ppm atribuidas a los carbonilos en C-20 y C-3 respectivamente; se observa una señal mas situada en 172.670ppm debida al carbonilo del éster butírico. Por otro lado en la región de los carbonos primarios aparece una nueva señal en 13.514ppm que corresponde al carbono 4' del éster. También en la región de los carbonos secundarios aparecen dos nuevas señales en 36.286ppm y 28.811ppm que corresponden a los carbonos en C-2' y C-3' respectivamente. Las señales para los demás carbonos primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios se conservan.

La Espectroscopia de Masas por Impacto Electrónico(Espectro 23, ver apéndice) muestra un ion molecular de 410 que corresponde al peso molecular del éster. El pico siguiente en 395 se produjo por la falta de 15 unidades que se deben a la pérdida de la entidad -CH₃, el siguiente pico en 381 se debe a la pérdida de 28 unidades correspondientes a CH₂=CH₂. El pico en 367 se atribuye a la pérdida de 43 unidades de la entidad (CH₃C=O)⁺.

El pico de 322 se debe a la pérdida del fragmento $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-)$. El pico de 307 corresponde a la pérdida de 28 unidades $(\text{CH}_2=\text{CH}_2)$, 60 unidades (CH_3COOH) y 15 unidades $(-\text{CH}_3)$. El pico de 294 y que además constituye el pico base, se debe a la pérdida de $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O})^+$ y CH_3COH . El pico de 279 se debe a la pérdida de $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O})^+$, $(\text{CH}_3\text{C}=\text{O})^+$ y H_2O . El pico de 71 está dado por el fragmento $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O})^+$ y el de 43 por la entidad $(\text{CH}_3\text{C}=\text{O})^+$.

[D.2] DISCUSION DEL ENSAYO ENZIMÁTICO

Existe una gran variedad de inhibidores de la enzima 5α -reductasa, que efectúan un bloque completo del andrógeno, lo cual parece de las mejores opciones para el tratamiento del cáncer de próstata y de la hiperplasia prostática benigna que la cirugía.

Se sabe que algunos compuestos no esteroideos actúan inhibiendo a la enzima 5α -reductasa, la mayoría de los antiandrogénos de interés terapéutico pertenecen a la serie esteroidal, específicamente los derivados de **M26**, así como **M6** y **M4**. Es por ello que se tomaron como referencia estos dos compuestos.

Y con base a estudios que ha realizado el equipo de trabajo del Dr. E. Bratoeff, que la actividad antiandrogénica se ve incrementada en la molécula de la progesterona cuando a ésta se le introduce un átomo de halógeno en C-6, una función éster o un grupo oxhidrilo en C-17, un sistema conjugado y un grupo metilo en C-16(éste es un factor muy importante).

Por lo que para realizar el ensayo in-vitro de la actividad de la enzima 5α -reductasa frente al compuesto final, a los intermediarios obtenidos y a los controles empleados, se utilizó extracto de testículos de ratas Wistar por ser el principal sitio de biosíntesis de **M1** y andrógenos relacionados, valorando la actividad de inhibición de la enzima 5α -reductasa como índice de actividad antiandrogénica potencial.

Se conoce que la reducción enzimática del grupo carbonilo en C-20 baja de forma considerable la actividad antiandrogénica del esteroide y para evitar dicha forma se han diseñado técnicas de síntesis para incorporar grupos voluminosos en C-16 y C-17 impidiendo de esta manera el acercamiento de la enzima al grupo carbonilo en C-20.

El producto nuevo éster **M9** así como los intermediarios: **M8**, **M44**, **M45**, **M46**, **M47**, **M48** y **M49** se evaluaron in-vitro como inhibidores de la enzima 5α -reductasa, todos los compuestos se compararon con **M6** y con el nuevo fármaco del mercado **M4**. Los resultados obtenidos del ensayo biológico se encuentran reportados en la **Tabla 0.1**, así como en la **Gráfica 1**.

Como se esperaba, los compuestos intermediarios: **M8**, **M44** - **M48** no mostraron actividad antiandrogénica apreciable, esto puede deberse a que carecen del átomo de halógeno en C-6, del sistema conjugado y además de que ninguno de ellos presenta un grupo metilo en C-16. El intermediario **M49** que carece del átomo de halógeno en C-6 pero que posee un sistema 1, 4, 6-trien-3-ona, presenta un β -metilo en C-16, mostró una actividad más alta que **M6** y **M4** superando a este último en un 300%.

El nuevo compuesto **M9** posee el sistema conjugado, carbonilo en C-3 y C-20, el β -metilo en C-16 y además se encuentra esterificado en la posición C-17; hechas todas estas modificaciones éste producto superó en actividad antiandrogénica en un 20% al compuesto **M49**.

CAPITULO

V

CONCLUSIONES

[C] CONCLUSIONES

Finalmente se logró concretar este trabajo de tesis tanto en su parte experimental como teórica, investigando, analizando y discutiendo para llegar a lo que ahora llamaremos conclusiones.

✍ Un nuevo inhibidor de la enzima 5α -reductasa: **M9** se logró sintetizar como fármaco potencial para el tratamiento de padecimientos como el Cáncer de próstata mediado por andrógenos y de la Hiperplasia prostática benigna.

✍ El nuevo compuesto **M9** se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas (UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y EMIE).

✍ Los intermediarios **M8**, **M44** – **M48** no mostraron actividad inhibitoria hacia la enzima 5α -reductasa.

✍ El compuesto éster, mostró una potente actividad inhibitoria sobre la enzima 5α -reductasa, superando a los dos controles empleados: **M6** y **M4**. Teniendo esto como antecedente el compuesto puede ser empleado como materia prima para obtener diversos productos con elevada actividad antiandrogénica.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1 Catalona, W.J., and Scott, W.W. Carcinoma of the prostate in Walsh, P.C., et al. (eds): Campbell's Urology. Fifth edition. Philadelphia, W.B. Saunders Co., pag. 1463. 1986.
- 2 Silverberg, E., and Lubera, J. Cancer statistics, CA 39:3, 1989.
- 3 Ramzi S. Cotran, Vinay Kumar y Stanley L. Robbins. Patología Estructural y Funcional 4ª. Edición., Vol II., Editorial Interamericana. McGraw-Hill. Madrid. pag. 1173-1176 1990.
- 4 Hoocker, C.W. Reproduction in the male. In ruch, T.C. and Patton, H.D. Physiology and Biophysics 19th Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia. pag. 1205. 1965.
- 5 Bratoeff E., Flores G., Ramírez E. y Valencia N. The farmacology of the antiandrogens. Química OGGI. México, pag. 67-69. 1997.
- 6 Huggins, C., and Hodges, C.V. Studies of prostatic cancer. The effect of castration, of estrogen, and androgen injections on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. Cancer Res. 1:203. 19441.
- 7 Wilson, J.D. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia Am. J. Med. 68:745, 1980.
- 8 Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 6ª edición. Editorial "El Ateneo" Argentina, pag. 1218-1233. 1980.

- 9 Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 9ª edición, Vol II. Editorial McGraw-Hill- Interamericana. México, pag. 1531-1546. 1996.
- 10 Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Flores C., Calderón D., et al. Síntesis de Nuevos inhibidores de 5 α -reductasa Rev. Mex. Cienc Farm. Vol 28 No.6 México, pag. 13-19-1997.
- 11 Ervin E. Jones Androgenic Effects of oral Contraceptives Implications for Patient Complicance. The American Journal of Medicine. Vol. 98. Pag 116.119. 1996
- 12 Martinez, A., 17-alfa-hidroxi-16-beta-metil-4,6-pregnatrien-3,20-diona como un intermediario en la síntesis de andrógenos. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química UNAM. 1997.
- 13 Orten, J.M. y Neuhaus, O.W. Bioquímica humana. 10ª. Edición, Editorial Medica Panamericana, Argentina, pag. 644-648. 1984.
- 14 Fieser Louis & Fieser Mary. Steroids. Reinhold Publishing Corporation, New York. 1959.
- 15 Klyne, W. Química de los Esteroides. Trad. Cast. Compañía. Editorial Continental, México. 1970.
- 16 Keele, C.A. and Neil, E. Samson Wright's Applied Physiology. 11th Edición, Editorial Oxford University Press, London.1965.
- 17 Paulsen, C.A. The testes. In Williams, R.H. Textbook of Endocrinology. 5th Edición, editorial W. B. Saunders Co., Philadelphia, pag 323.1974.
- 18 Carter, A.C., Cohen, E. J. And Shorr, E. The use of androgens in women. In Harris, R.S and Thimann, K.V. Vitamins and Hormones. Academic Press, Inc., New York, pag. 5, 317. 1947.

- 19 Adair, F.E., Mellors, R.G., Farrow, J.H., et al. The use of estrogens and androgens in advanced mamary cancer. Clinical and Laboratory study of one hundred and five female patients. *J.A.M.A.*, pag. 140,1193.1949.
- 20 Lewinson, E.F., Trimble, F.H and Ganellin, R.S. Advanced mammary cancer trated with sex hormones. *J.A.M.A.*, pag 162,1429. 1956.
- 21 Schwarting, G. And Neth, R. Uber anabole Wirkstoffe. Klinische und Stoffchseluntersuchungen mit einem neuen anabol wikenwen Steroid. *Schweiz. Med. Wchnschr.*, pag. 90,1092.1960.
- 22 Sach, B. A and Wolfman, L. Effect of oxandrolone on plasma lipids and lipoproteins of patients with disorders of lipids metabolism. *Metabolism*, pag 17,400. 1968.
- 23 Albright, f. The effect of hormones on osteogenesis in man. In Pincus, G. *Recent Progress in Hormone Research*. Academic Press Inc., New York., pag. 1,293. 1947.
- 24 Wilson, J.D. Recent studies on the mechanism of action of testosterone. *New England J. Med.*, pag. 287,1284. 1972.
- 25 O'Malley, B.W. Mechanism of actions of steroid hormones. *New England J. Med.*, pag. 284, 370. 1971.
- 26 Goldstein, A., et al. *Farmacología*. Editorial Limusa, México., pag 79-83. 1979.
- 27 Kochakian, C.D., Arimasa, N., The metabolism in Vitro of Anabolic-Androgenic Steroids by Mammalian Tissues. *Handb. Exp. Phamacol.*, pag. 43,287-359. 1997.
- 28 Smith, J. A., Jr. New Methods of endocrine management of prostatic cancer. *Journal Urology*. 137:1. 1987.
- 29 Waxman, J., Pandha, H., y col. Antiandrogens in treatment of prostate cancer. *The Lancet*. Vol 346. Pag 1030-1031. 1995.

- 30 Berry, S. J. et al. The development of human benign prostate hyperplasia with age. *J. Urology*. 132:474,1984.
- 31 Calderón, D., Labra, N., Hernández, J.L., Bratoeff E., y Ramírez, E. Evaluación Farmacológica de dos nuevos fármacos esteroidales sintéticos, con posible actividad antiandrogénica. *Rev. Mex. Cienc. Farma.* Vol. 28. No. 2. México. 1997.
- 32 Calderón, D., Labra, N., Hernández, J.L., Bratoeff E., y Ramírez E. Antiandrógenos más usuales. Relaciones sobre la síntesis orgánica. *Rev. Mex. Cienc. Farma.* Vol. 28. N °1. México., pag. 24-29. 1997.
- 33 Frederikson. D. "Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: delta 4-3-ketosteroid 5 α -reductase of rat prostate". *J.Bio.Chem.*, 246:2584-2593. 1971.
- 34 Bradford M., " A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding". *Ann Biochem.*, 72: 248-254. 1976.
- 35 Passoneou J. Et al., *Enzymatic analysis. A practical guide*, Editorial Humana Press. 1993.
- 36 Morris, J., Hughes, L., Glen, A. Y Taylor, P. Non-steroidal antiandrogens. Design of novel compounds based on an infrared study of the dominant conformation and hydrogen-bonding properties of a series of anilide antiandrogens. *J. Med. Chem.*, 34:447-452. 1991.
- 37 Eliil, C., Ketoconazole binds to the human androgen receptor. *Horm. Metab. Research*, 24:367-370. 1992.
- 38 Petrow, V., Wang, Y., Lack, L. Prostatic cancer 1,6-methylene-4-pregnen-3-one as irreversible inhibitors of rat prostatic D⁴-3-Ketosteroid 5 α -reductase. *Steroids.*, 38:121-139. 1981.
- 39 Traish, A., Muller, R. y Wotiz, H. Interaction of cyproterone acetate with rats prostatic androgen receptors. *Steroids.*, 45:247-262. 1985.

- 40 Bull, H., García, M., Anderson, S. Mechanism based inhibition of human steroid 5α -reductase by finasteride. *J. Am. Chem. Soc.*, 118: 2359-2365.1996.
- 41 Brian W. Metcalf, Mark A. Levy and Dennis A.Holt. Inhibitors of steroid 5α -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne. *Trends Pharmacology Science*, 10.pag. 492-495. 1989.
- 42 Valencia, N., Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración β -en C-16 como antiandrógenos potencial para el tratamiento del cáncer de próstata. Tesis de Maestría de la Facultad de Química UNAM.1997.
- 43 Shapiro E., Weber L., *Med. Chem*, 1972, vol. 15:716.
- 44 Smith M., *Organic Synthesis Mc. Graw Hill, USA* , pag. 655,1994.
- 45 Bratoeff E., Trejo A., Hernández J., *Rev. Mex. Ciencias Farm.*, vol. 22,14 1992.
- 46 Muller J., *Steroids*, vol. 34,793 1979.
- 47 Shibata K., Takegama et al, *Chem. Pharm, Bull* vol. 40,935 1992
- 48 Flores C., Síntesis de un derivado esteroidal con actividad antiandrogénica potencial. Tesis de Maestría en la Facultad de Química UNAM. 1996.
- 49 Sprenc H., John H., *Steroids*, vol. 64,4242 1996
- 50 Merck & Co.Du Pont, Neopharmed, Sigma Tau an Yamanouchi, Finasteride. *Drugs Fut.* 17:1043, 1992.

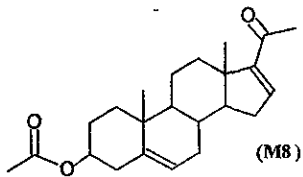
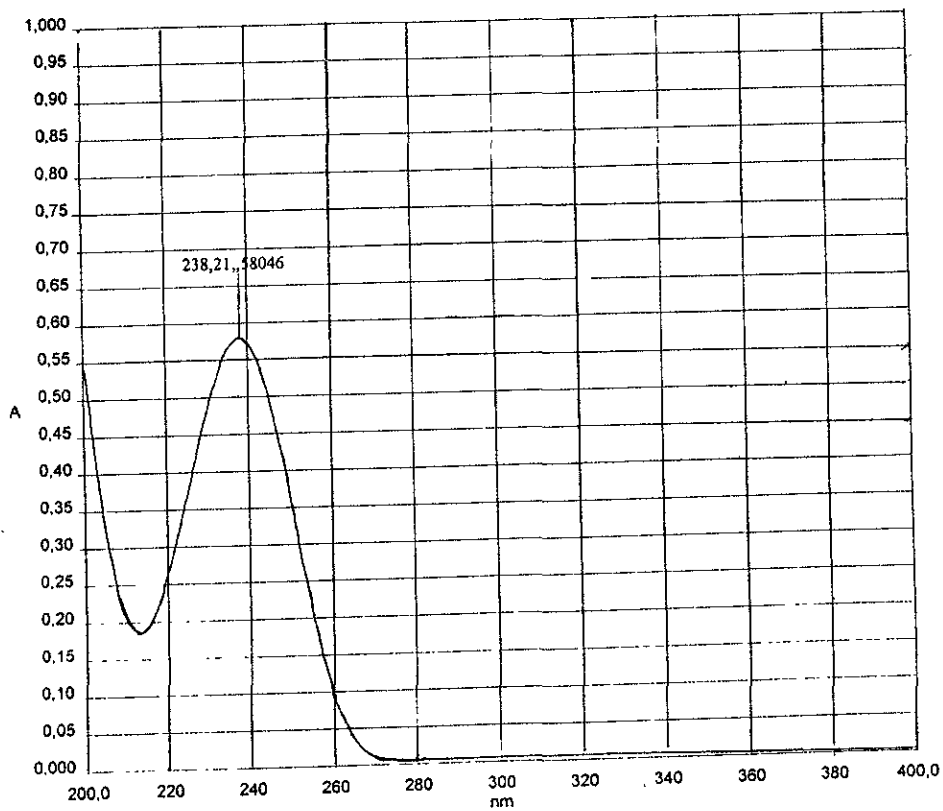
APENDICE

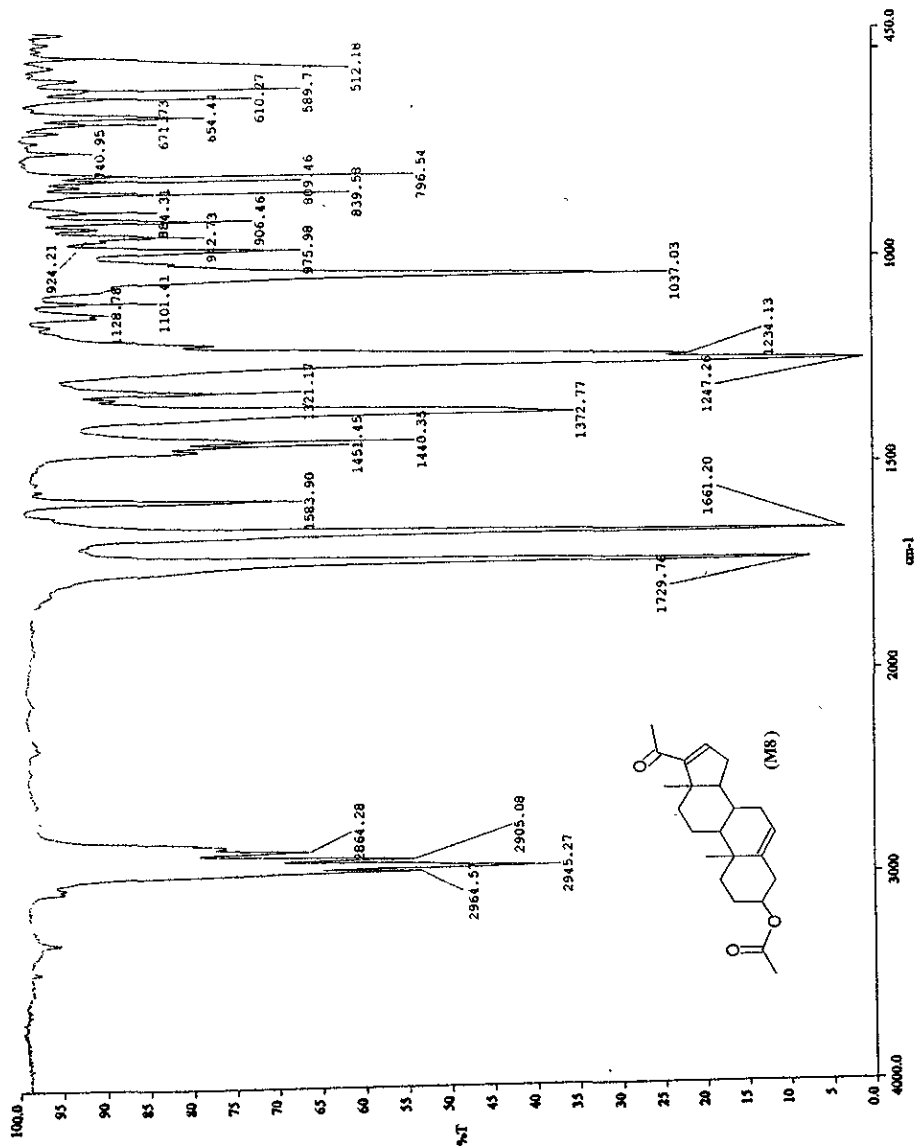
NOTACIONES

Y

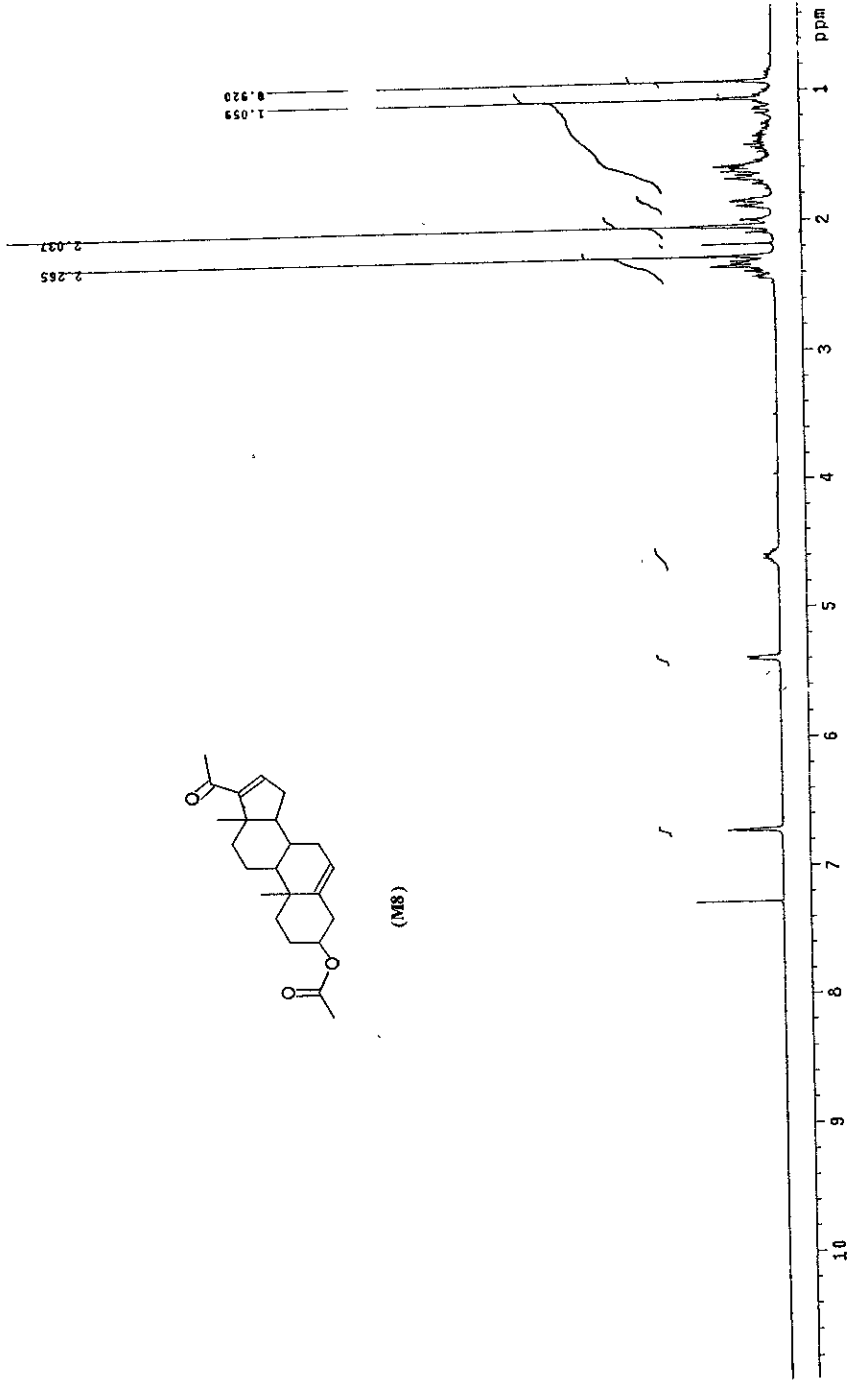
ESPECTROS

Espetro 1 Espetro de UV de 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona(M8)

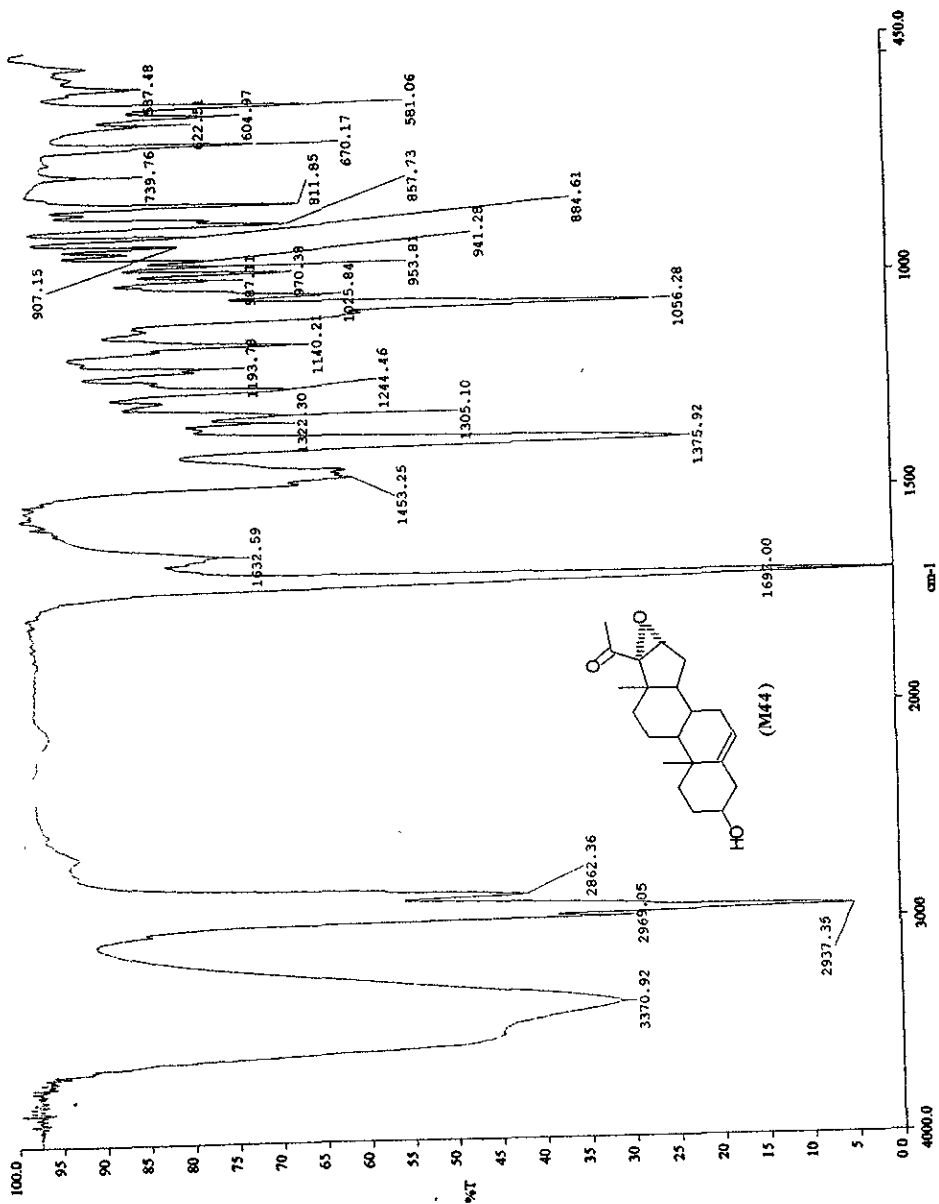




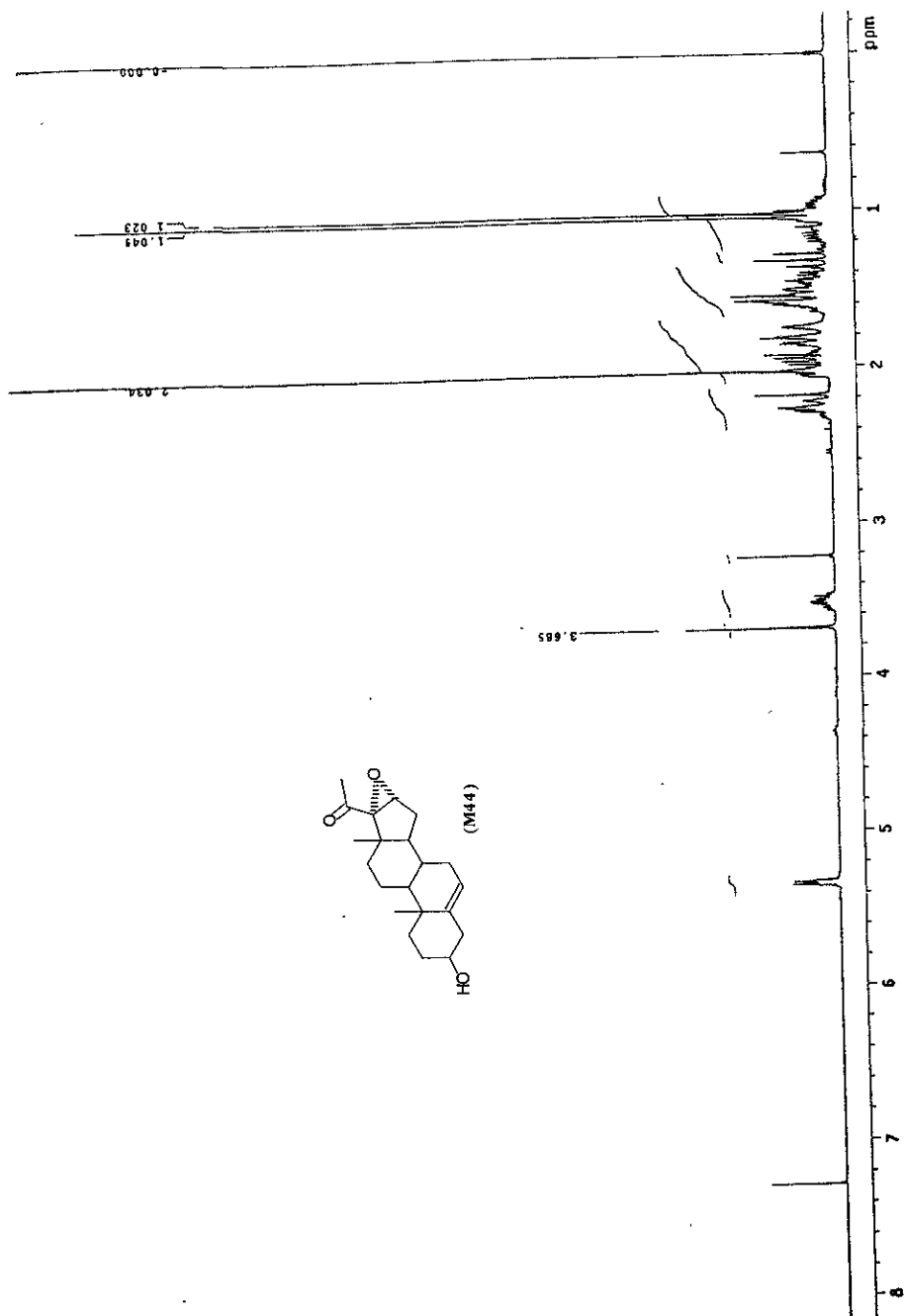
Espectro 2. Espectro de IR de 3β-Acetoxy-5,16-pregnadien-20-one(MS)



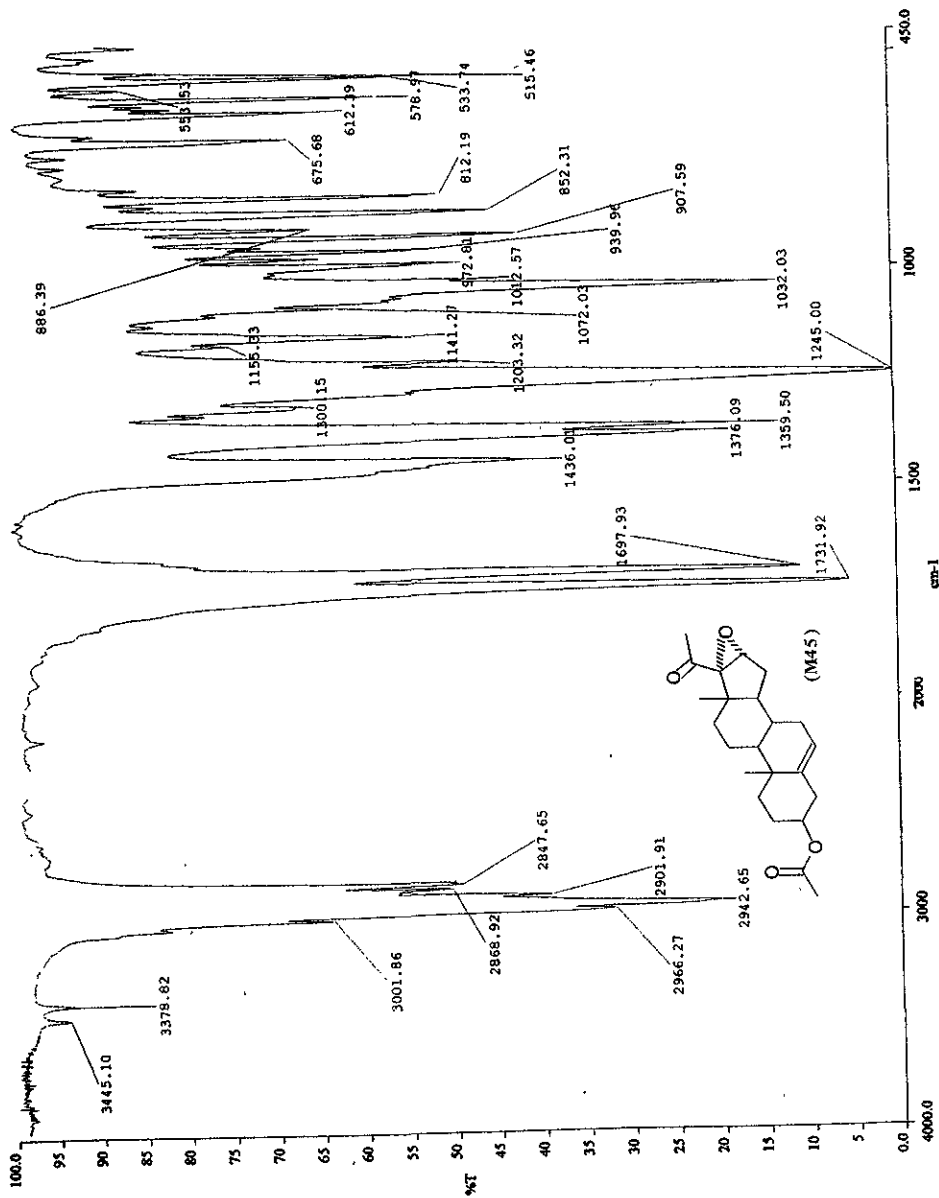
Espectro 3. Espectro de RMN ¹H de 3β-Acetoxy-5,16-pregnadien-20-ona(M8)



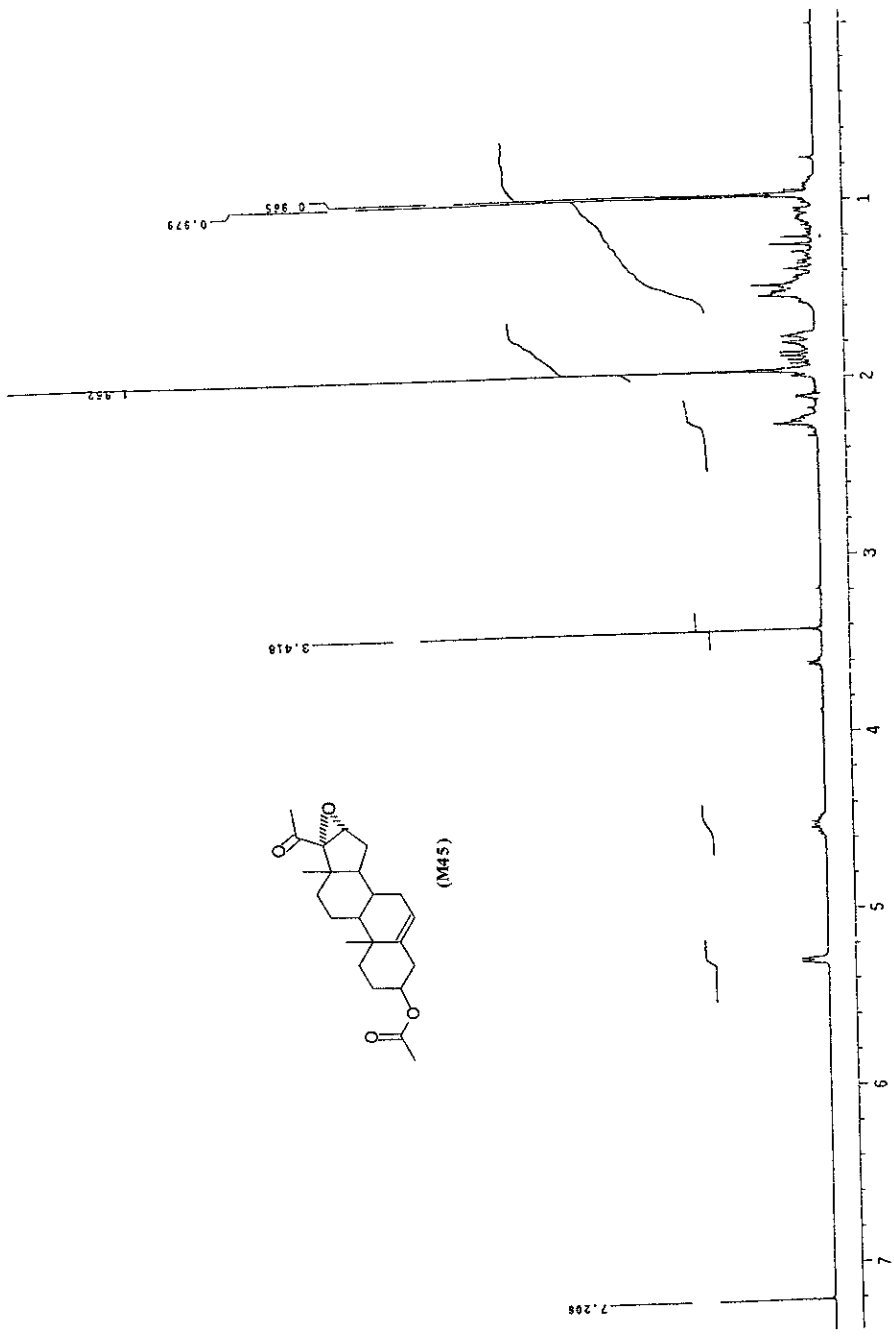
Espectro 4. Espectro de IR de 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona(M44)



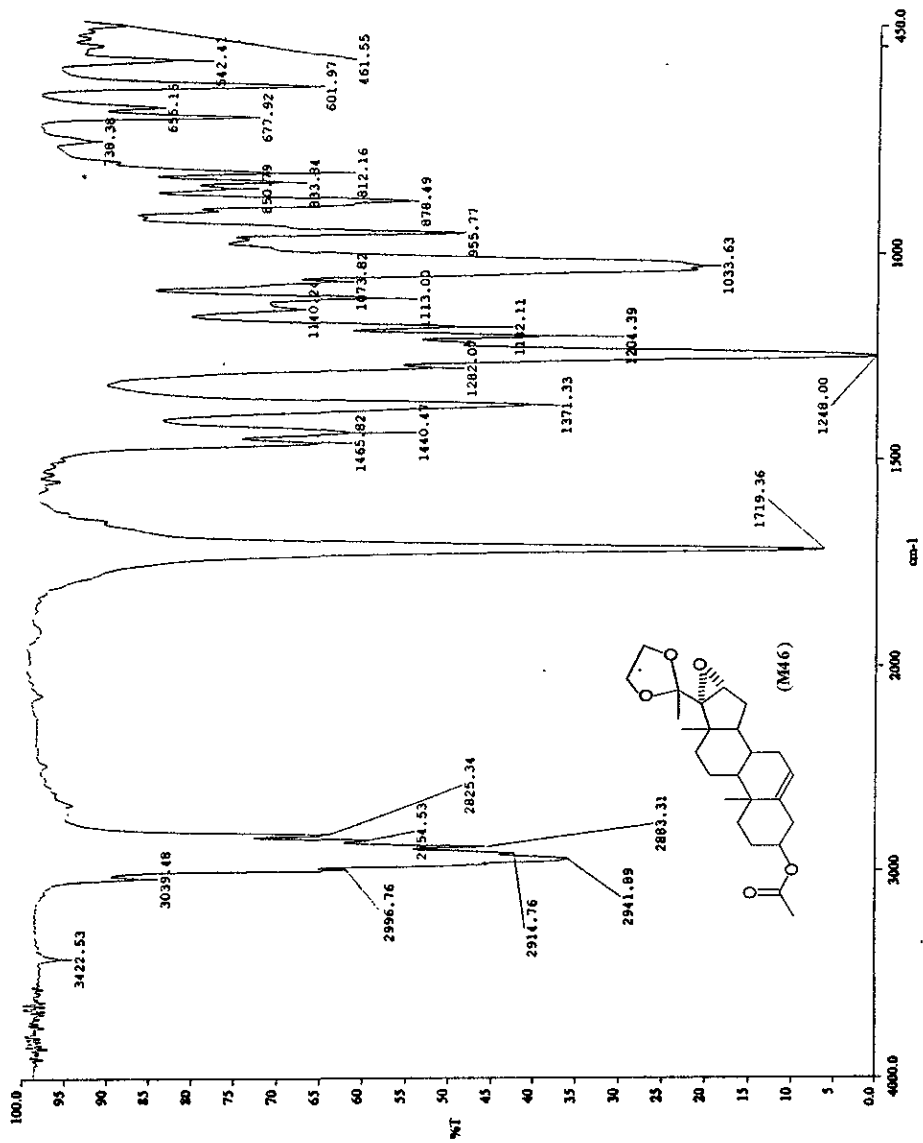
Espectro 5. Espectro de RMN ¹H de 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona(M44)



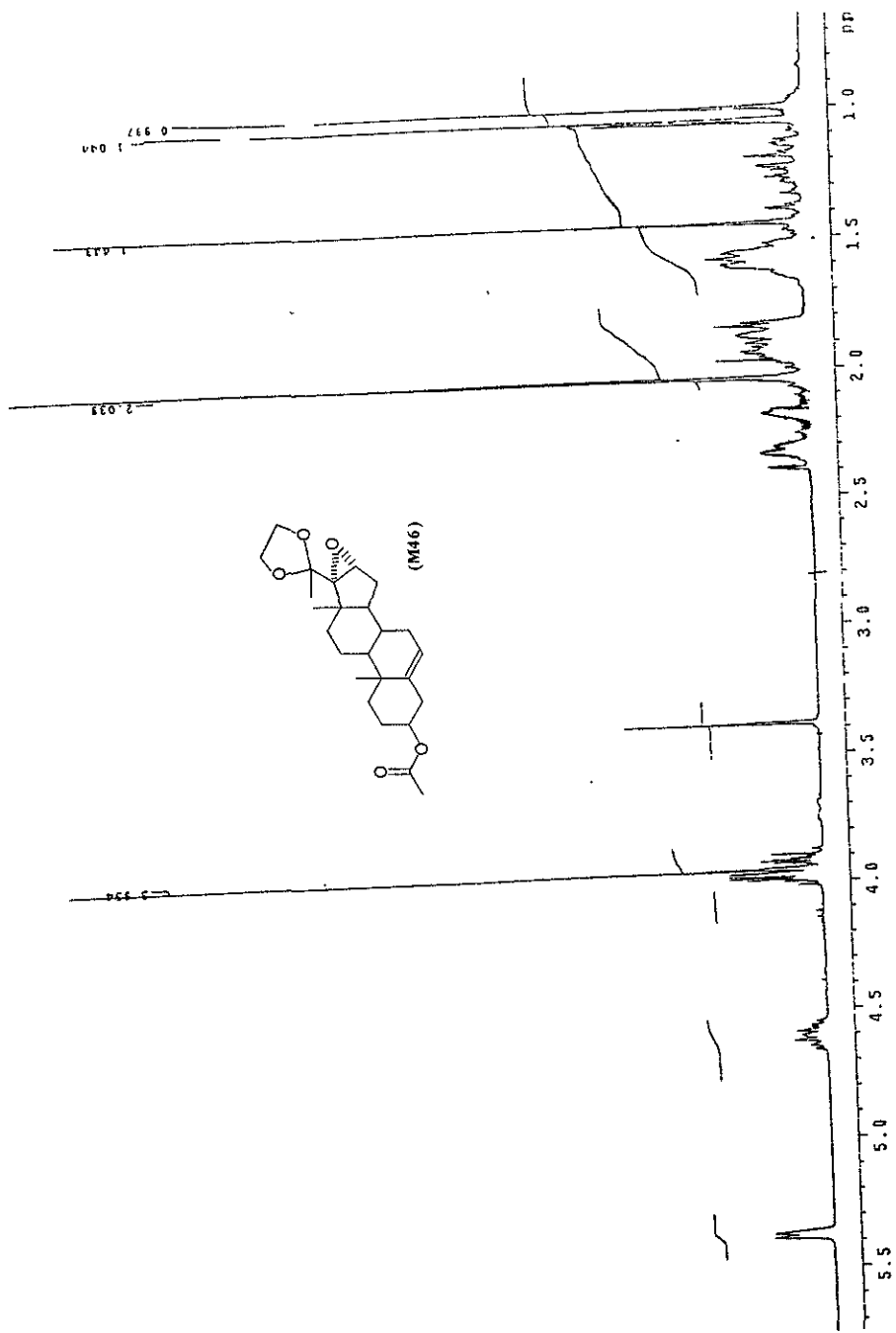
Espectro 6. Espectro de IR de 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxy-5-pregn-20-one(45)



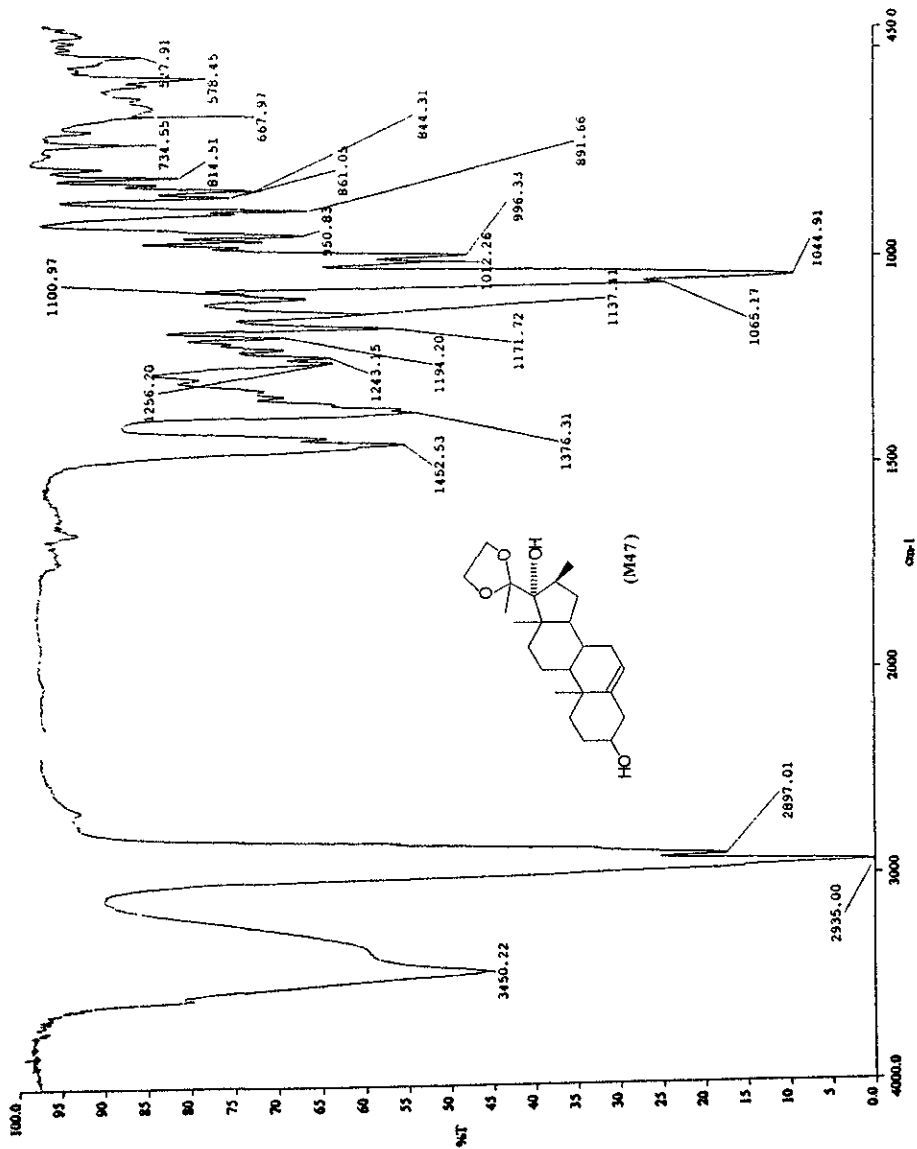
Espectro 7. Espectro de RMN ¹H de 3β-Acetoxi-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona(45)



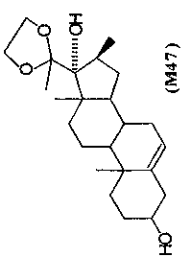
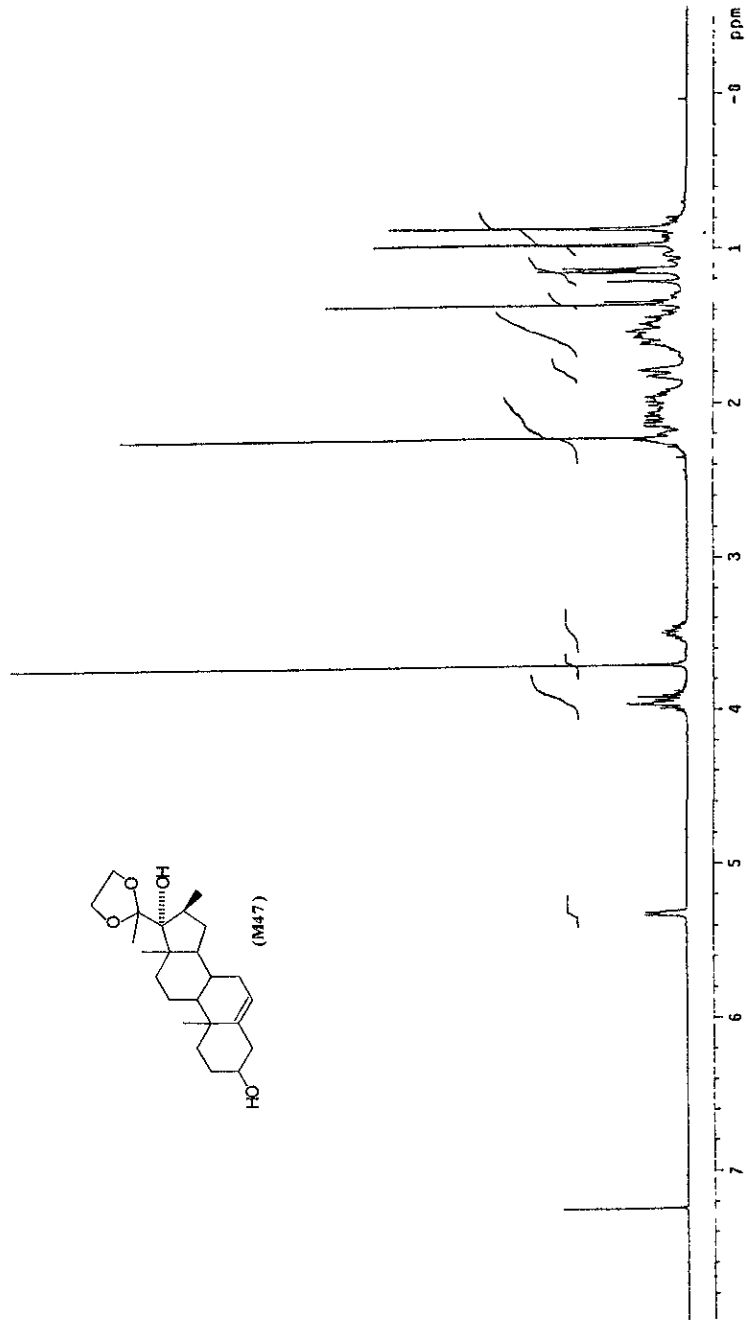
Espectro 8. Espectro de IR de 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxy-20-ethylendioxi-5-pregneno (M46)



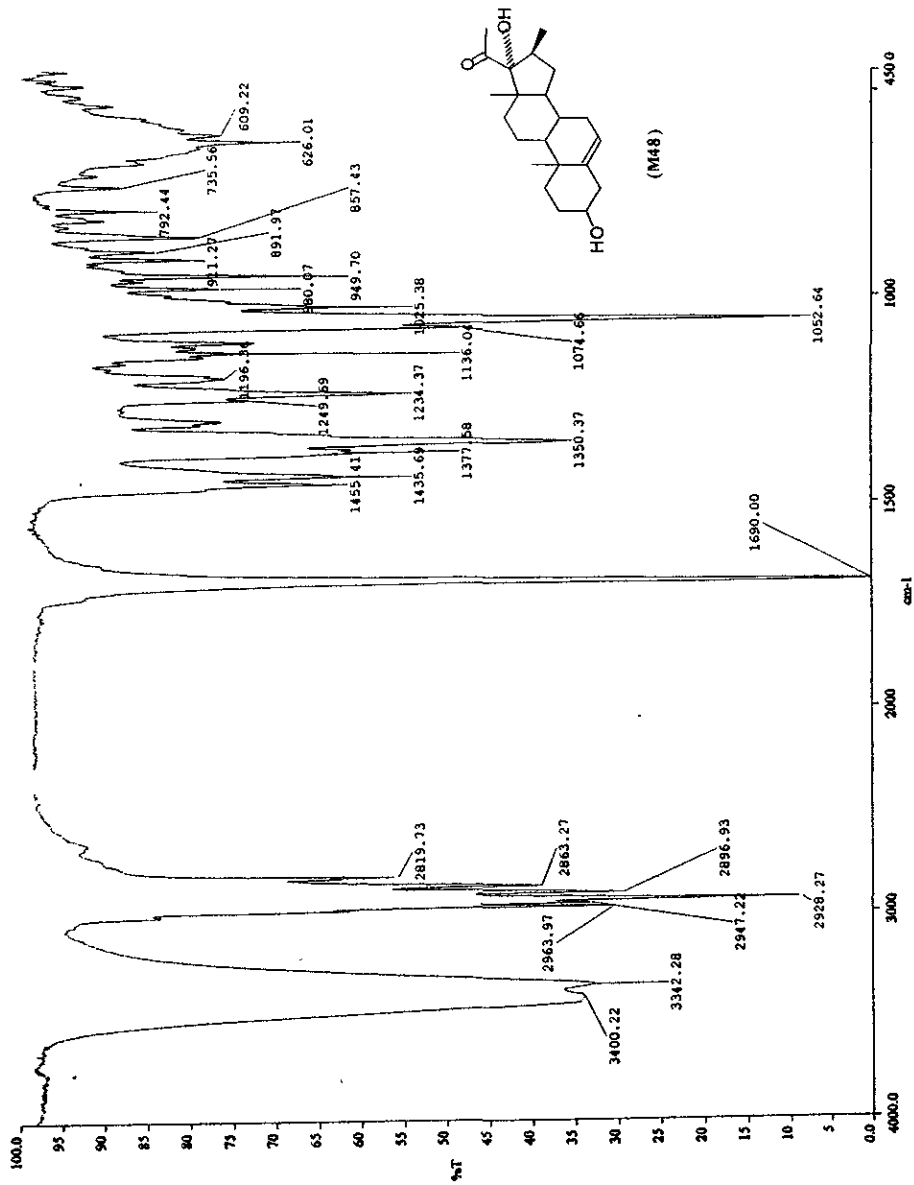
Espectro 9. Espectro de RMN ¹H de 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno(M46)



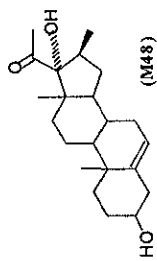
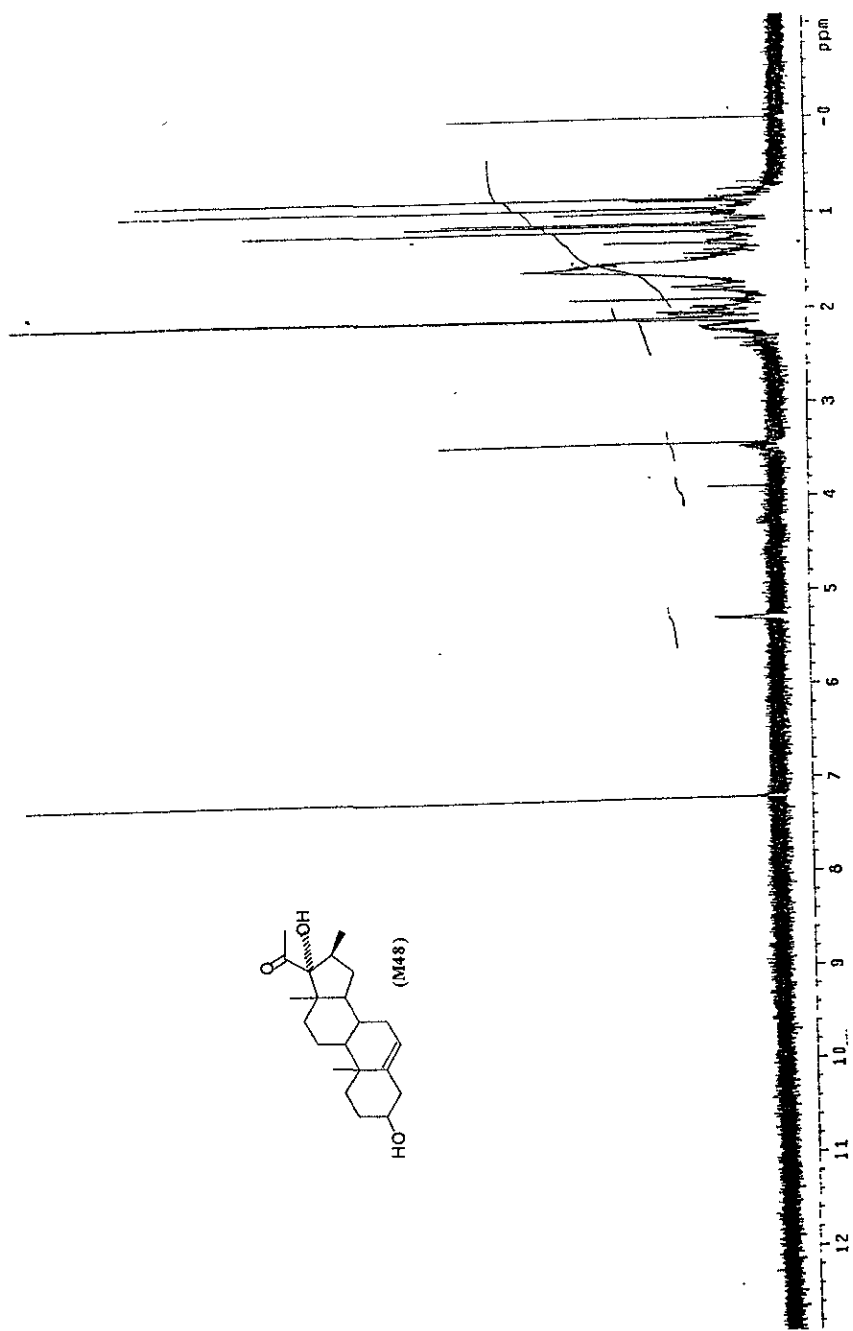
Espectro 10. Espectro de IR de 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -metil-5-pregneno(M47)



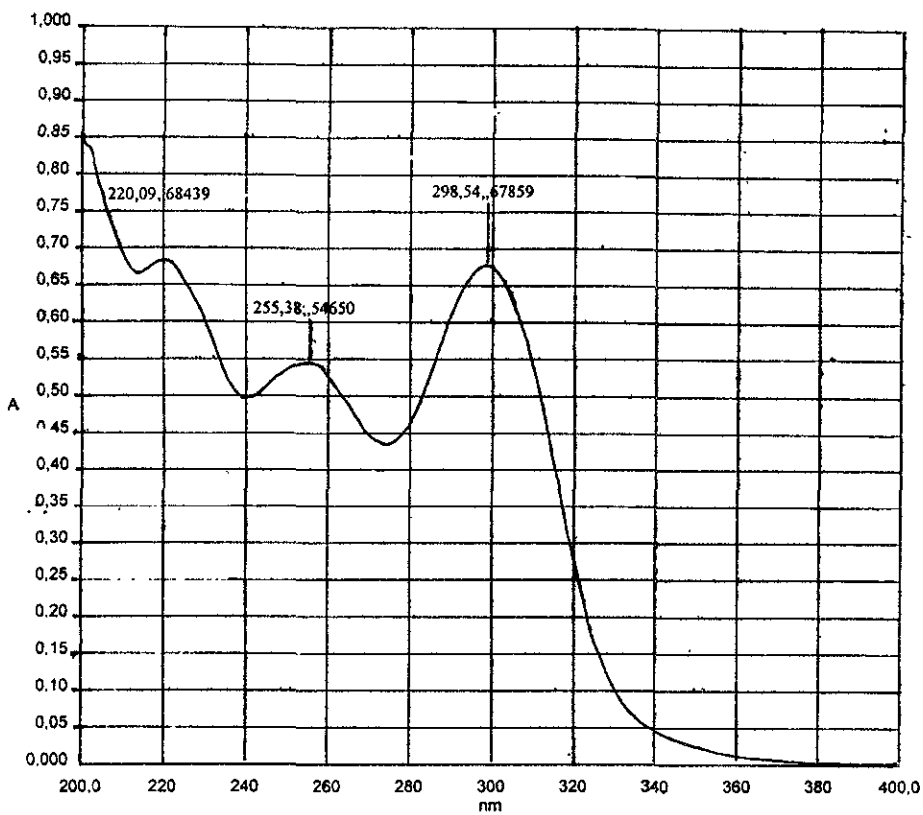
Espectro 11 Espectro de RMN ^1H de 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -metil-5-pregнено(M47)



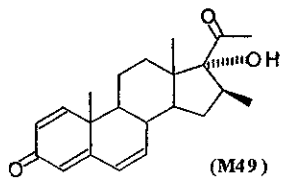
Espectro IR de 3β,17α-Dihidroxi-16β-metil-5-pregnen-20-ona(M48)

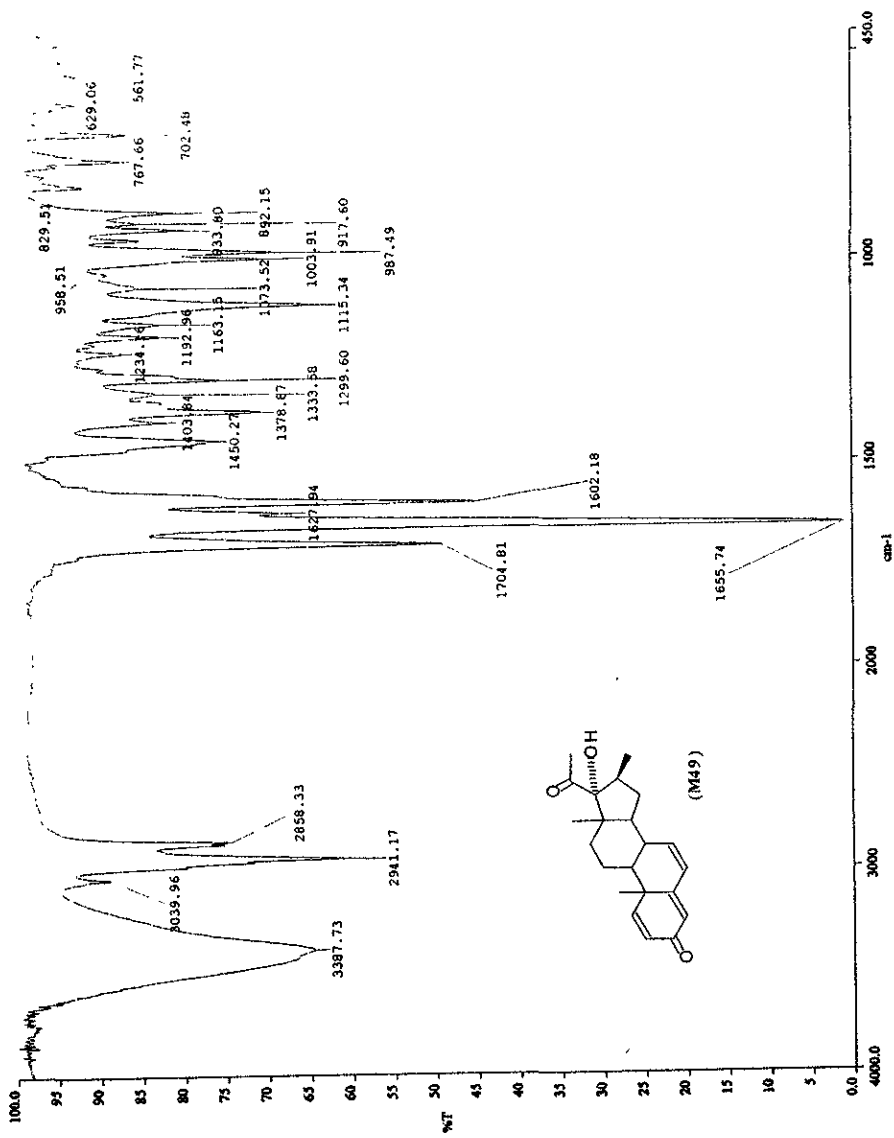


Espectro 13. Espectro de RMN ^1H de 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -metil-5-pregnen-20-ona(M48)

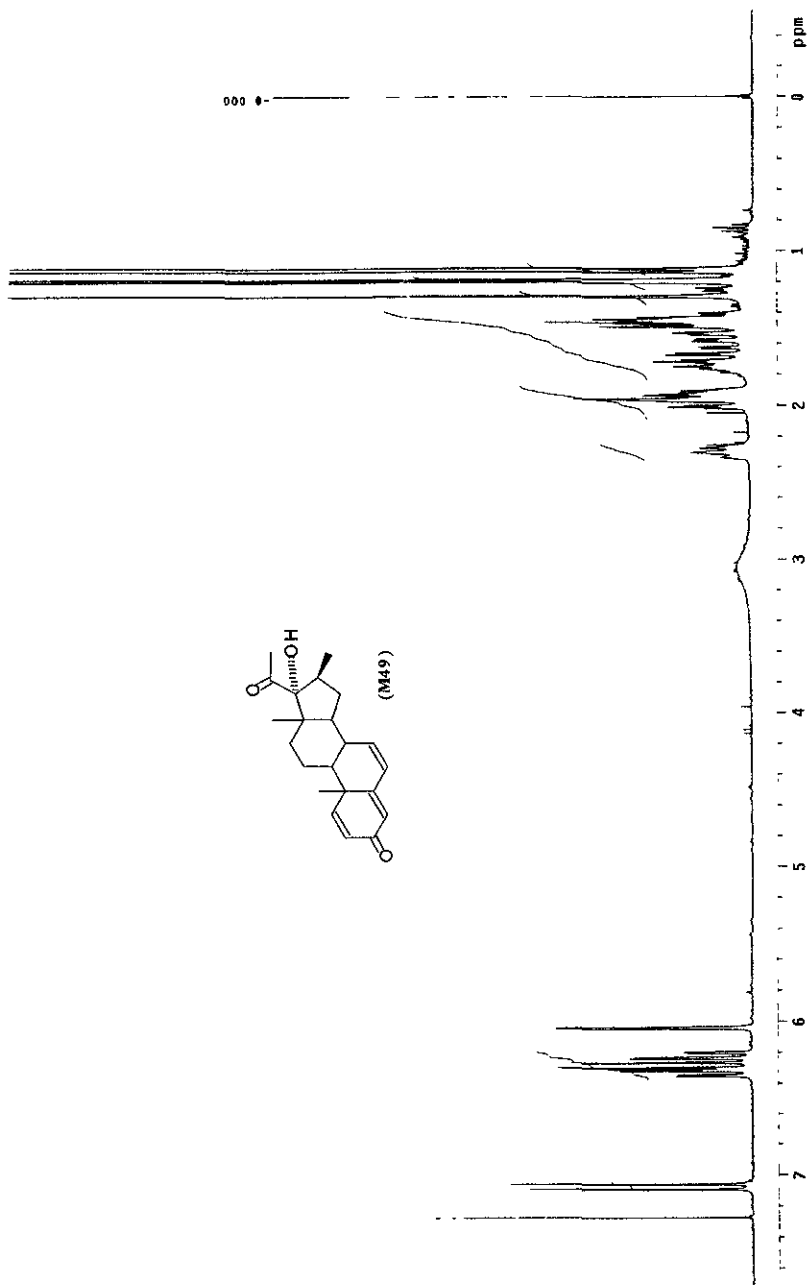


Espectro 14. Espectro de UV de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M49)

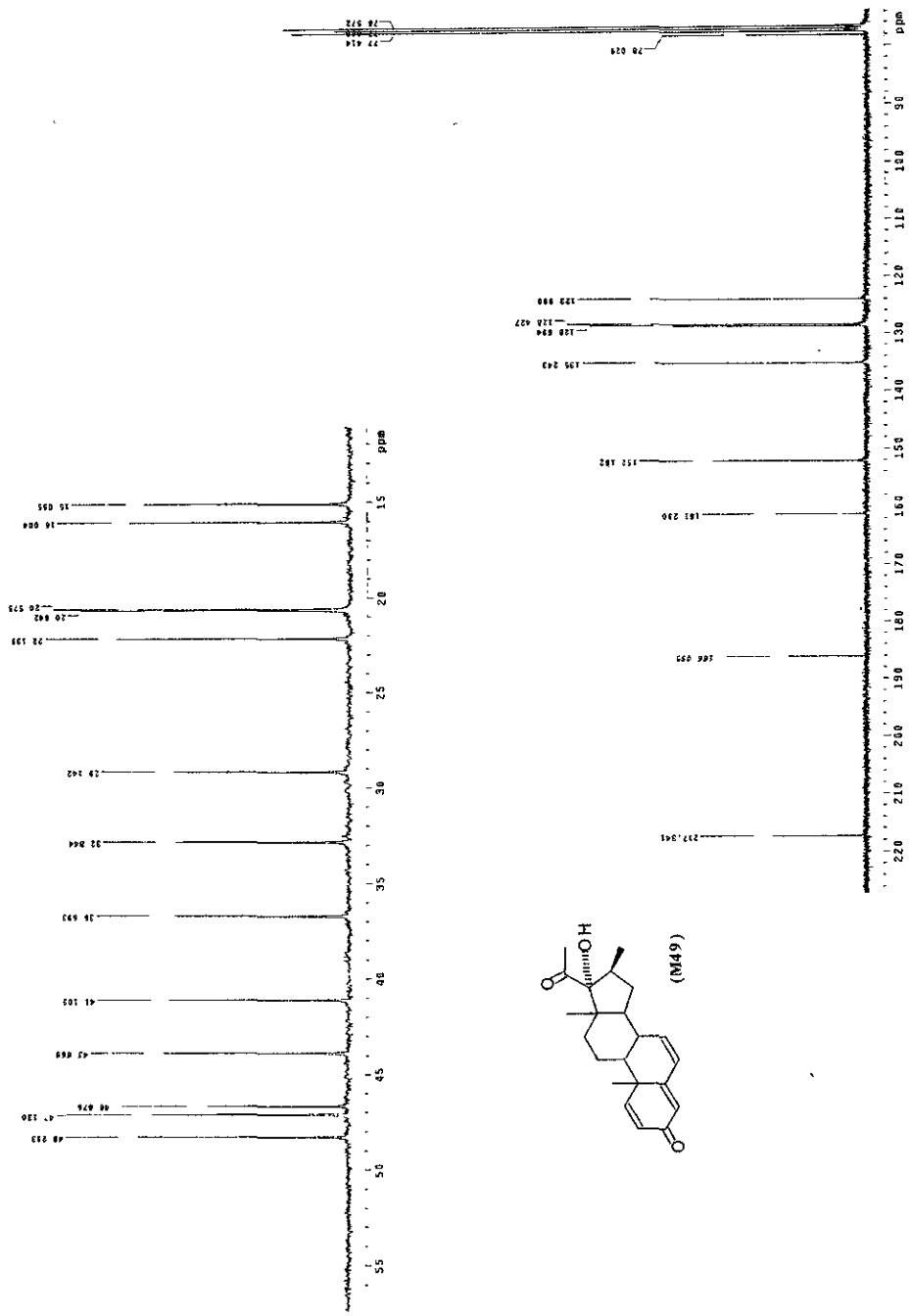




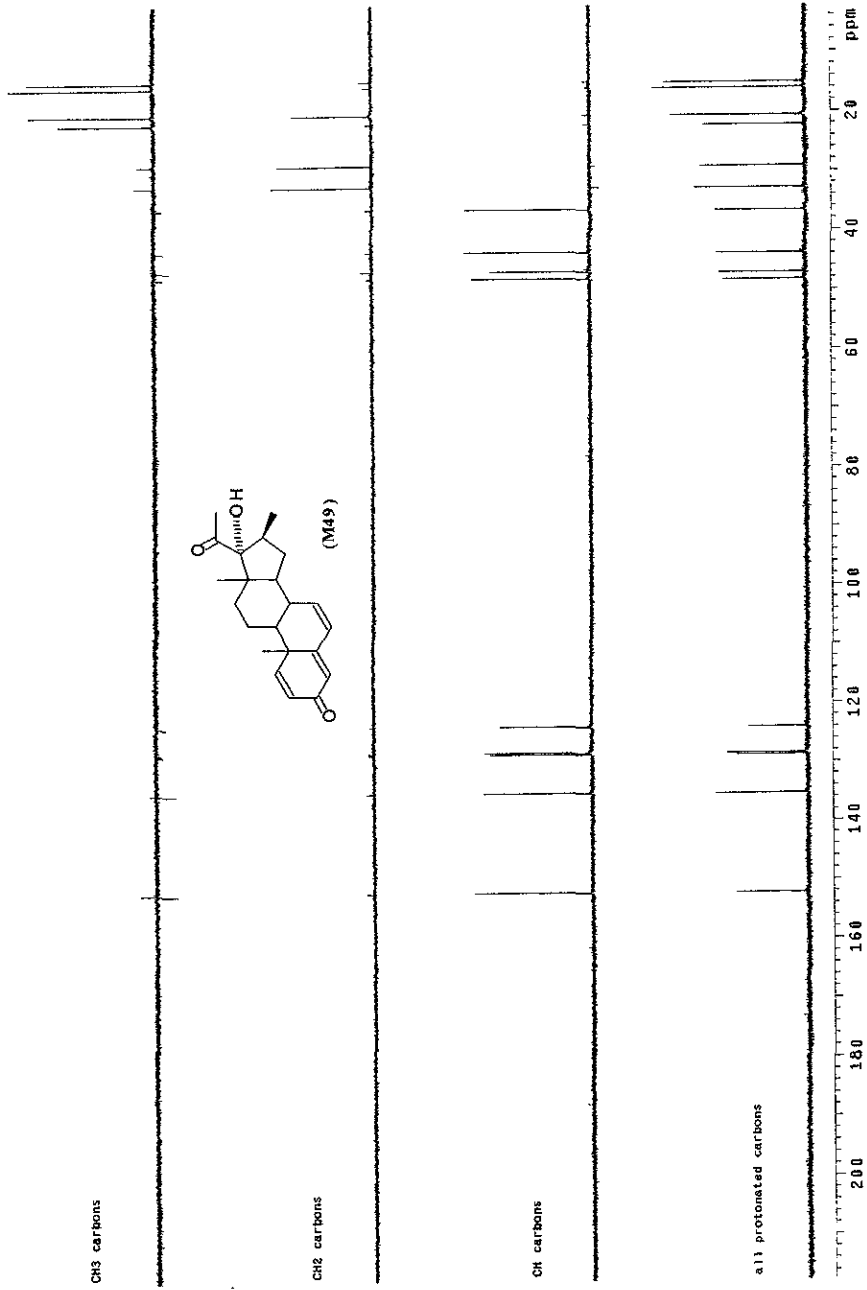
Espectro 15. Espectro de IR de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M49)



Espectro 16. Espectro de RMN ¹H de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatren-3,20-diona(M49)

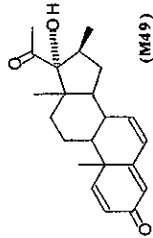
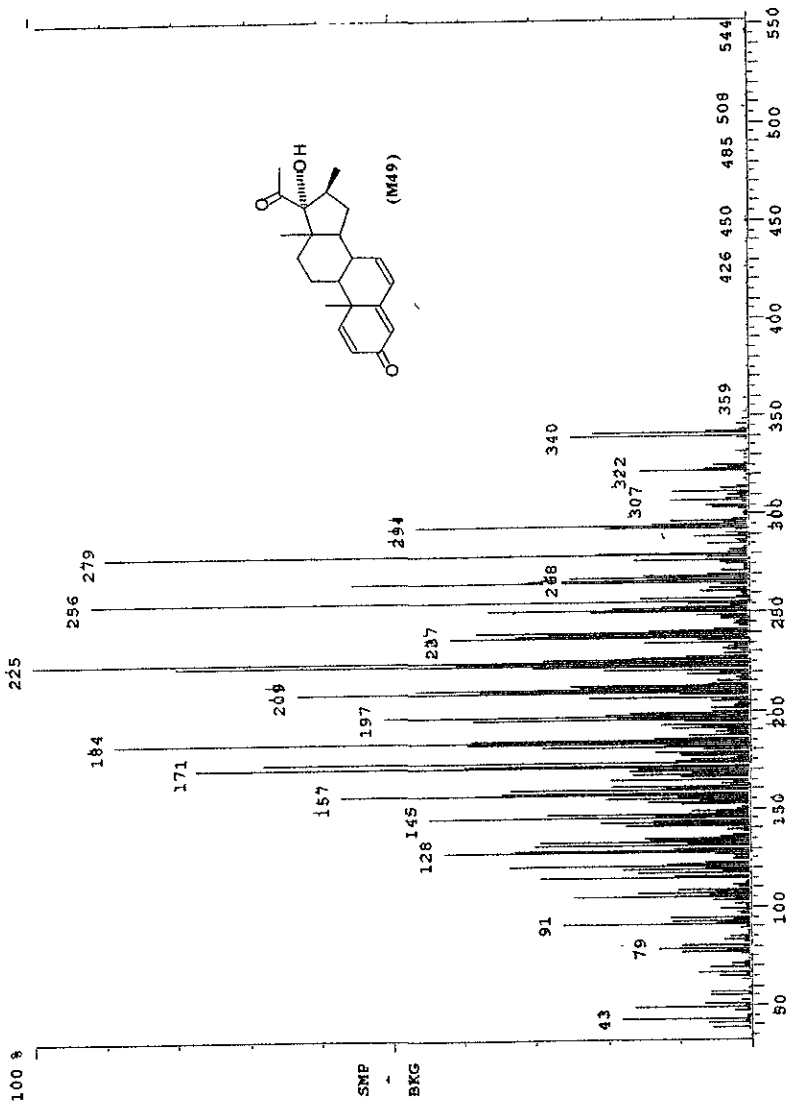


Espectro 17. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M49)

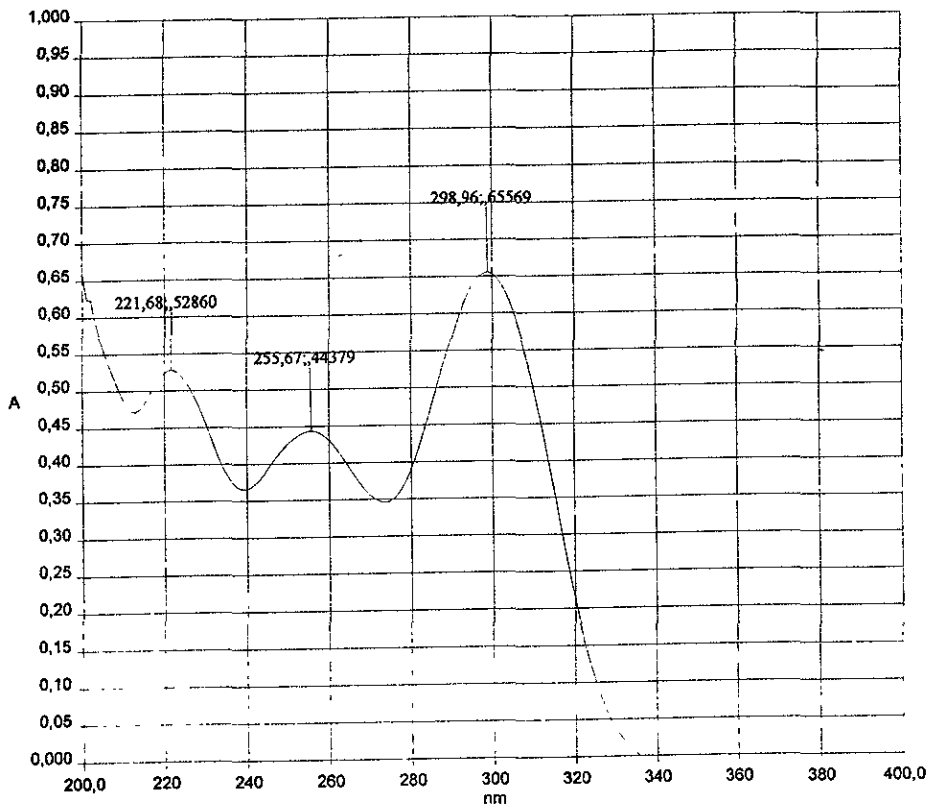


Espectro 17.1. Espectro de RMN ¹³C en su versión DEPT de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M49)

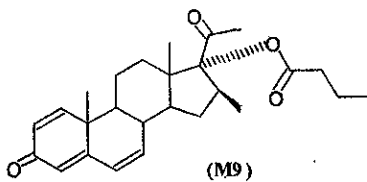
Espectro 18. Espectro de EMIE de 17 α -Hidroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M49)

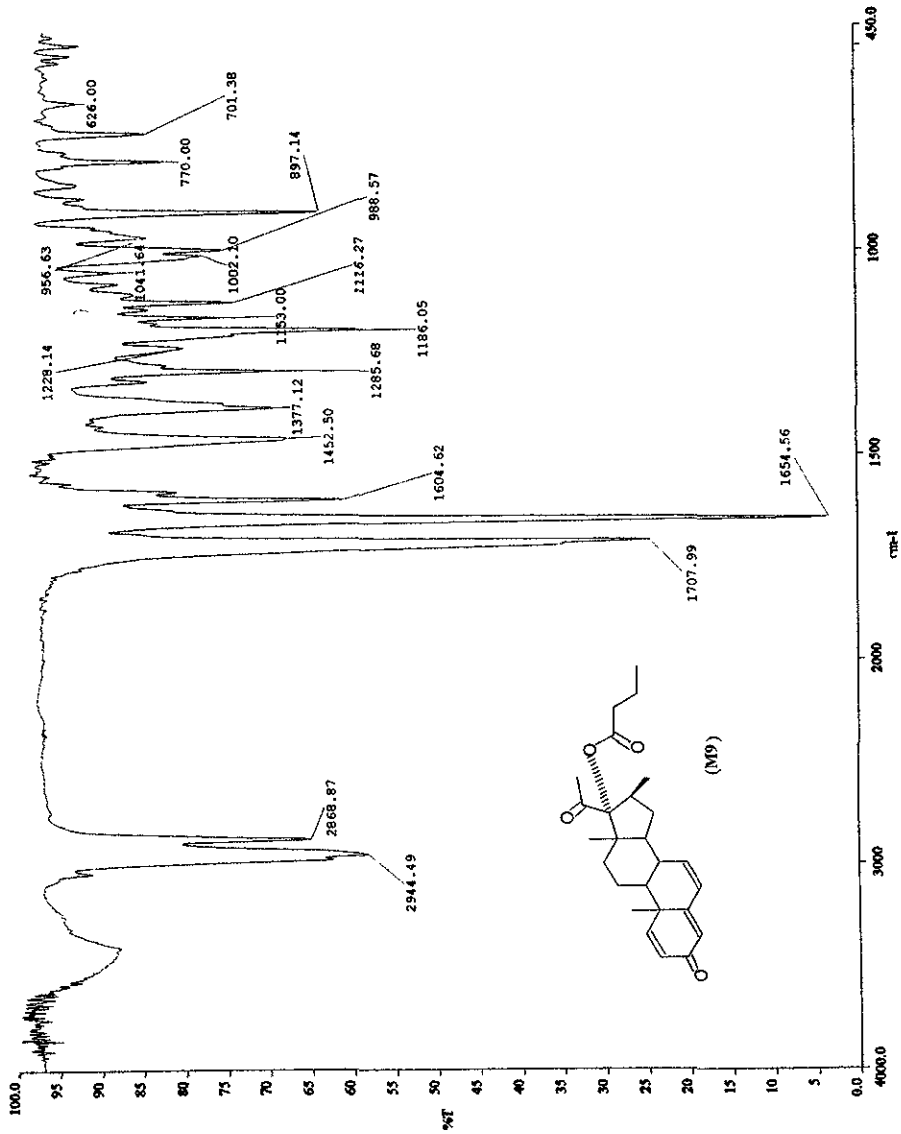


SMP
-
BKG

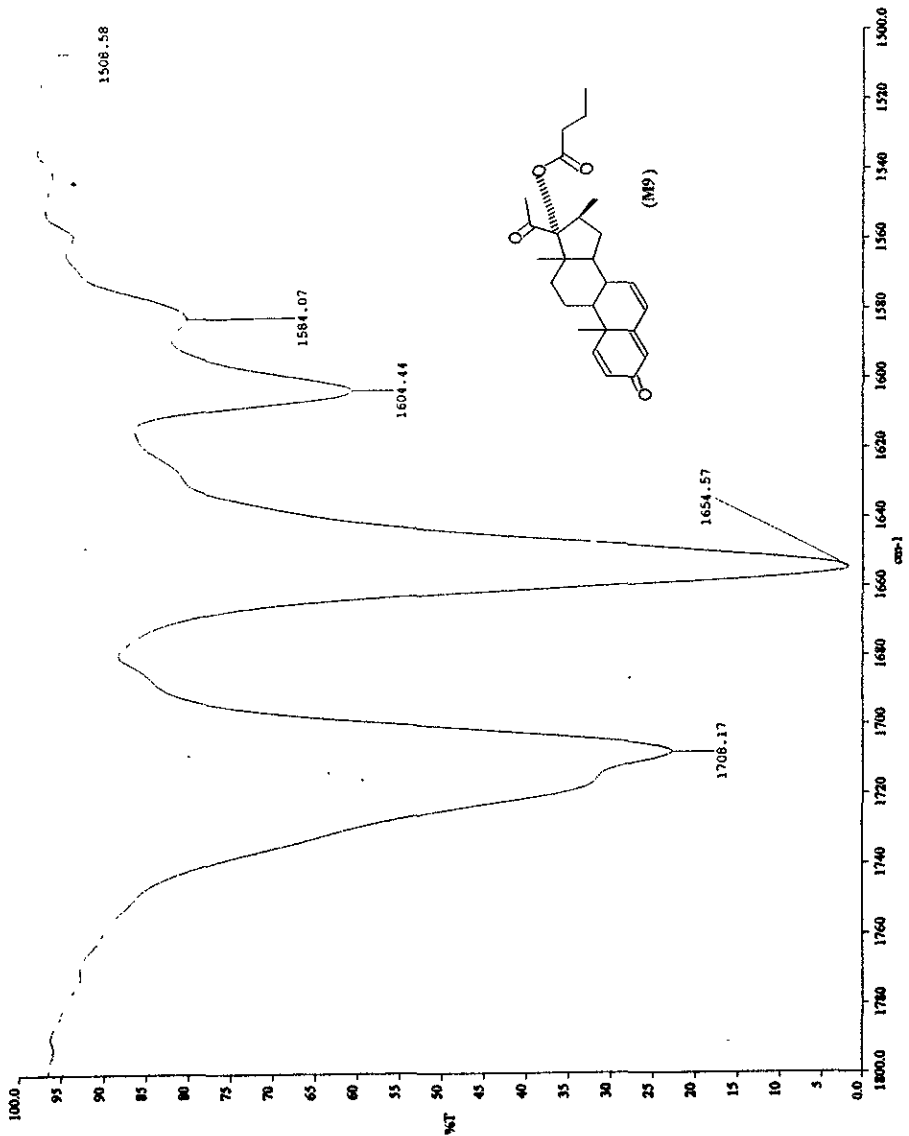


Espectro 19. Espectro de UV de 17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M9)

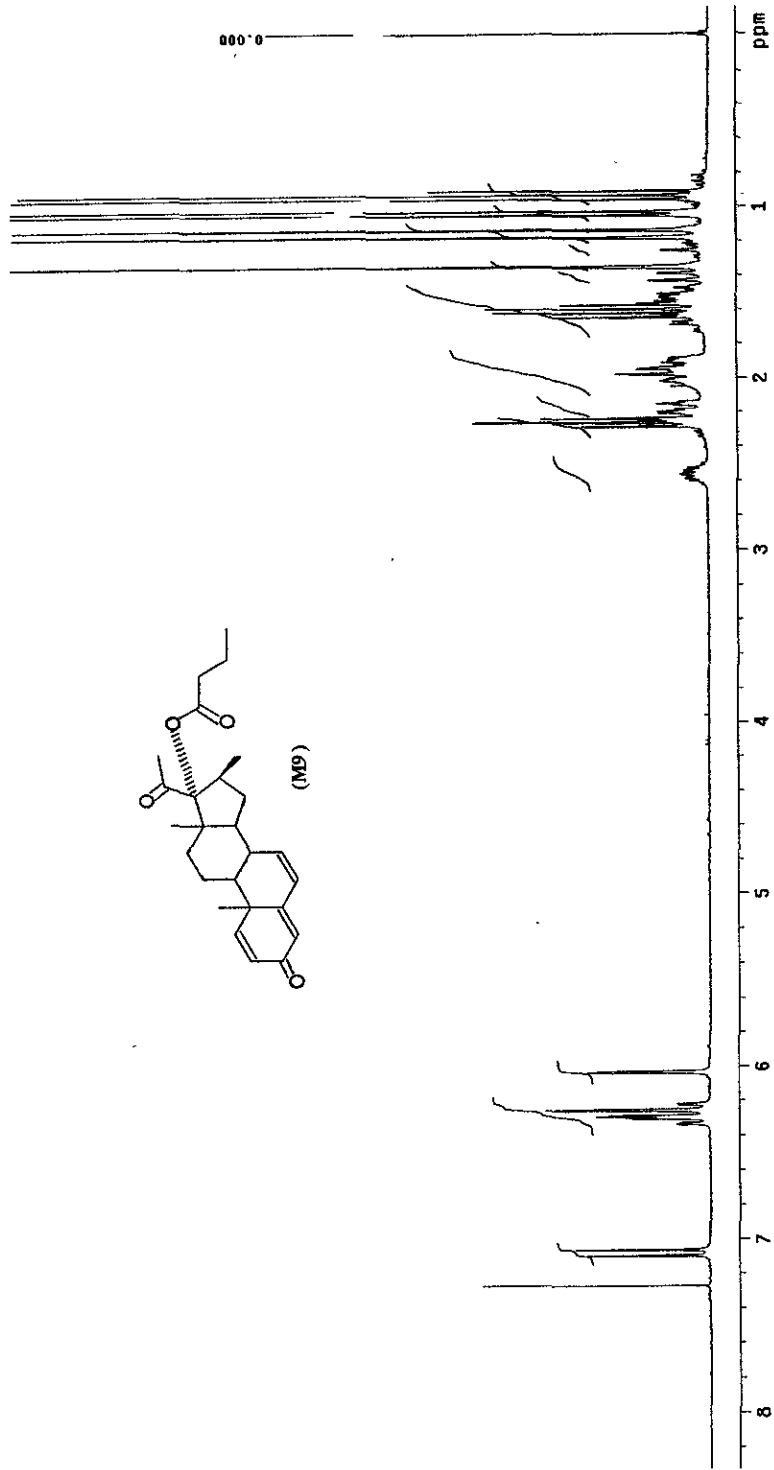




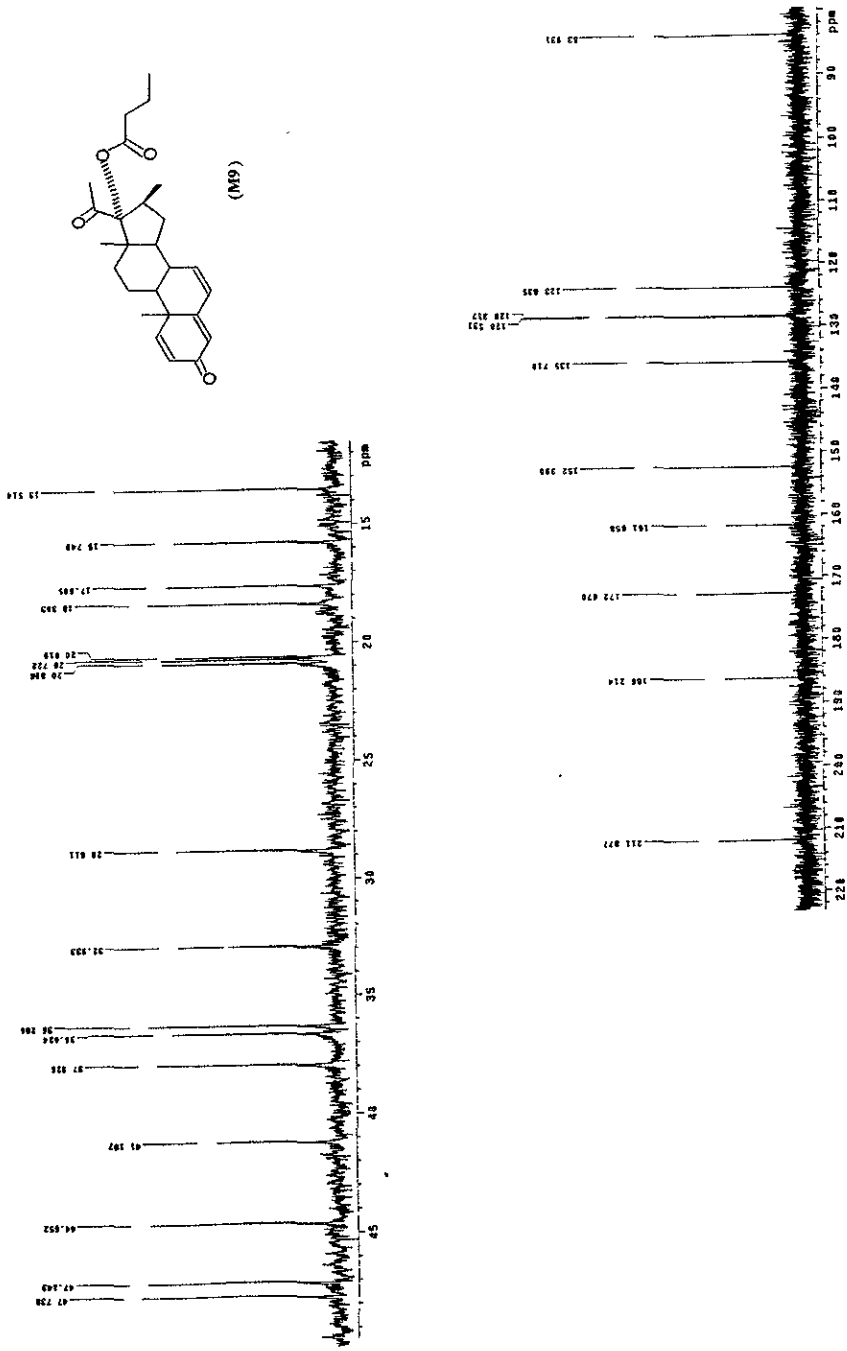
Espectro 20. Espectro de IR de 17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregmatrien-3,20-diona(M19)



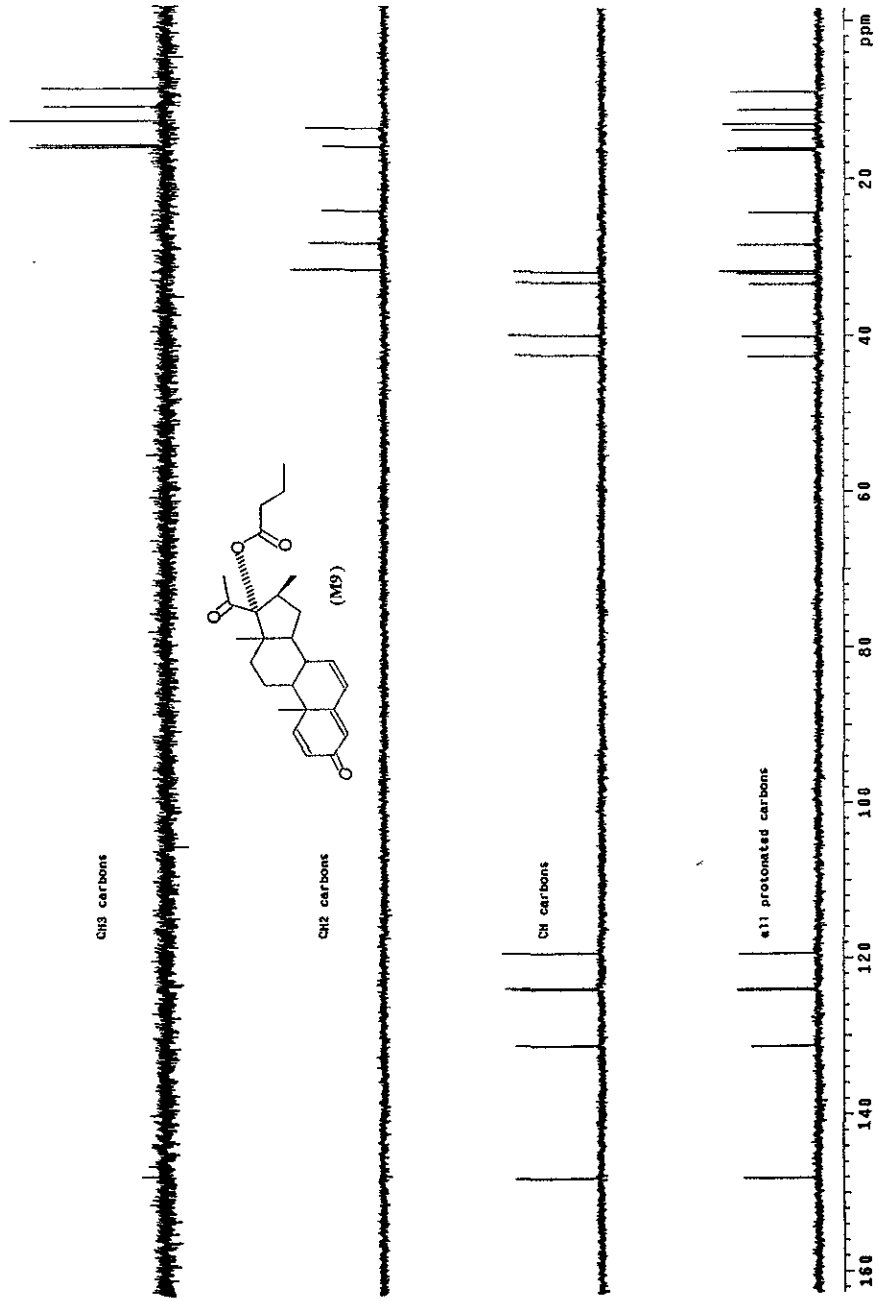
Espectro 20.1. Espectro de IR de 17α-Butiroxi-16β-metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M9)



Espectro 21. Espectro de RMN ^1H de 17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M9)



Espectro 22. Espectro de RMN ¹³C de 17α-Butiroxi-16β-metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M9)



Espectro 22.1.1. Espectro de RMN ¹³C en su versión DEPT de 17α-Butiroxi-16β-metil-1,4,6-pregna-1,3,20-diona(M9)

Espectro 23. Espectro de EMIE de 17 α -Butiroxi-16 β -metil-1,4,6-pregnatrien-3,20-diona(M9)

