

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

**“SÍNTESIS DE DERIVADOS FLUORADOS DE PREGNADIENO CON UN GRUPO
METILO EN C-16”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARTHA OCHOA LUNA



TUTOR: Dr. Eugene A. Bratoeff

AÑO: 2005

M 343298



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

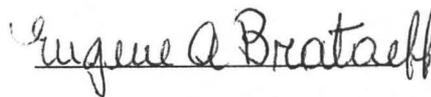
Presidente: Dr. Héctor Jaime Salgado Zamora
Vocal: Dr. Roberto Martínez
Secretario: M. en C. José Manuel Méndez Stivalet
Primer Suplente: Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga
Segundo Suplente: Dr. Bernardo Frontana Uribe

SITIOS EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Lab-125 Conjunto "E", Facultad de Química, UNAM.
Lab-006 Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco.

ASESOR:

Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff



SUSTENTANTE:

Q.F.B. Martha Ochoa Luna



AGRADECIMIENTOS

A CONACyT y DGEP

por haberme otorgado la beca para mis estudios de maestría

A DGAPA

por el proyecto IN208505 que otorgó el soporte financiero para el desarrollo de este proyecto de investigación

Al Dr. Eugene A. Bratoeff

por permitirme formar parte de su grupo de investigación por su tiempo y apoyo durante la realización de la tesis. Gracias por sus enseñanzas

A la Dra. Marisa Cabeza Salinas

por su aportación en la determinación de la actividad biológica de los ésteres

A los miembros del jurado

**Dr. Héctor Salgado, Dr. Roberto Martínez, M. en C. José Manuel Méndez Stivalet,
Dr. Martín Andrés Iglesias, Dr. Bernardo Frontana**
por su tiempo, comentarios y sugerencias a este trabajo de tesis

Al personal académico de la USAI

por la realización de los espectros de UV, IR, EMIE, RMN¹H y RMN¹³C

A la Dra. Elena Ramírez López

por su amistad, apoyo y valiosos consejos durante la realización de la tesis

A mis amigos

**Flavio, Nayeli, Geidy, Arely, Victor, David, Selene, Araceli Franco, Carlitos, Fabian,
Omar, Sergio, Chucho, Norma y Gina**
por su alegría, apoyo y los momentos en que tanto nos divertimos

A mi hermano Cristóbal

por brindarme siempre su entusiasmo, apoyo y comprensión

A las familias Ochoa Rosales y Luna Guerrero

por permitirme vivir con ellos y formar parte de sus vidas durante mis estudios de maestría.
Gracias por brindarme su apoyo y cariño

Gracias a Dios

A:

Mis Padres

La parte de síntesis química del presente trabajo se realizó en el Laboratorio L-125 del conjunto "E" en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Eugene Bratoeff.

La evaluación biológica se realizó en el laboratorio de Hormonas (G-006) del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco, bajo la dirección de la Dra. Marisa Cabeza.

ÍNDICE

ÍNDICE DE COMPUESTOS	1
<hr/>	
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	3
<hr/>	
CAPÍTULO II: ANTECEDENTES	7
<hr/>	
➤ Mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa	8
➤ Antiandrógenos	9
○ Inhibidores de la 5 α -reductasa	9
○ Antagonistas del receptor androgénico	10
➤ Otras alternativas para el tratamiento del cáncer de próstata y la HPB	12
<hr/>	
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	15
<hr/>	
CAPÍTULO IV: DESARROLLO EXPERIMENTAL	17
<hr/>	
Etapa A) Síntesis y caracterización de los derivados	18
➤ Generalidades	18
➤ Caracterización de la materia prima. Acetato de 16-Deshidropregnenolona (4)	21
➤ Preparación de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (5)	22
➤ Preparación de 3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (6)	23
➤ Preparación de acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-en-3 β -ol (7)	24
➤ Preparación de 20-etilendioxi-16 β -metilpregn-5-en-3 β ,17 α -diol (8)	25
➤ Preparación de 3 β ,17 α -dihidroxi-16 β -metilpregn-5-en-20-ona (9)	26
➤ Preparación de 17 α -hidroxi-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (10)	27
➤ Preparación de 17 α -(fenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (1)	28

➤ Preparación de 17 α -(2-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (2)	30
➤ Preparación de 17 α -(3-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (3)	32
Etapa B) Evaluación farmacológica.	34
➤ Generalidades	34
➤ Experimento <i>in vivo</i> : Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre el peso de la próstata de hámster	35
➤ Experimento <i>in vitro</i> : Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre la transformación de la testosterona (I) a dihidrotestosterona (II) en homogeneizados de próstata	36
○ Obtención de la fracción microsomal de próstata	36
<hr/>	
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
<hr/>	
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	53
<hr/>	
BIBLIOGRAFÍA	55
<hr/>	
ANEXO	59
<hr/>	

Espectros:

- 17 α -(fenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (1)
 - Espectro 1 UV
 - Espectro 2 IR
 - Espectro 3 EMIE
 - Espectro 4 RMN ¹H
 - Espectro 5 RMN ¹³C
 - Espectro 6 DEPT

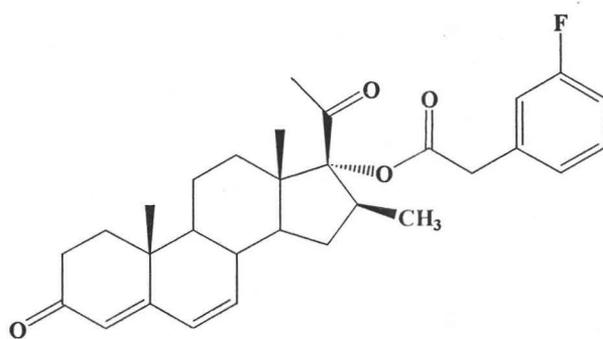
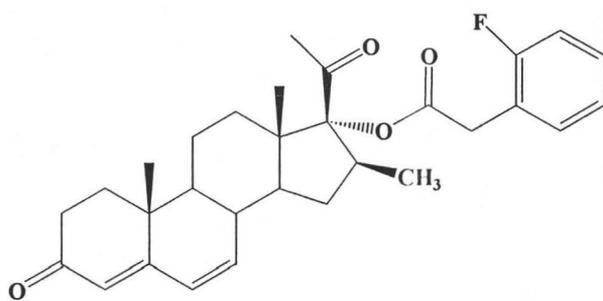
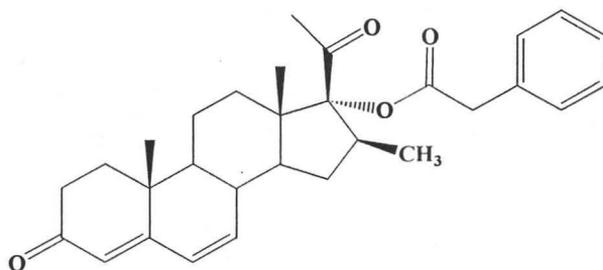
➤ 17 α -(2-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (2)

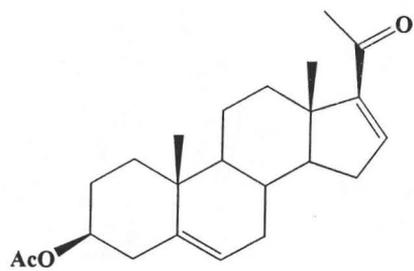
- Espectro 7 UV
- Espectro 8 IR
- Espectro 9 EMIE
- Espectro 10 RMN ¹H
- Espectro 11 RMN ¹³C
- Espectro 12 DEPT

➤ 17 α -(3-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (3)

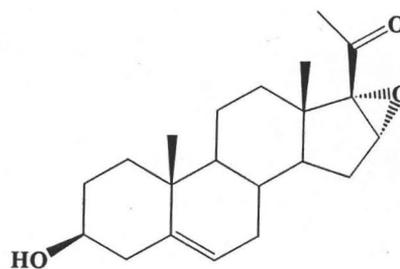
- Espectro 13 UV
 - Espectro 14 IR
 - Espectro 15 EMIE
 - Espectro 16 RMN ¹H
 - Espectro 17 RMN ¹³C
 - Espectro 18 DEPT
-

ÍNDICE DE COMPUESTOS

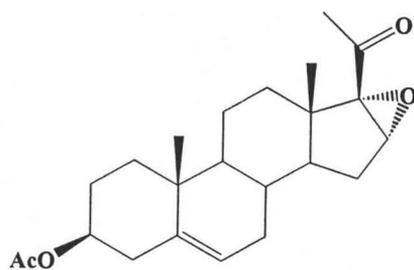




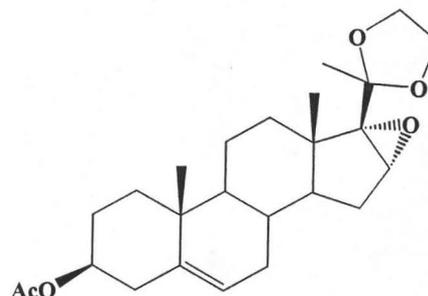
4



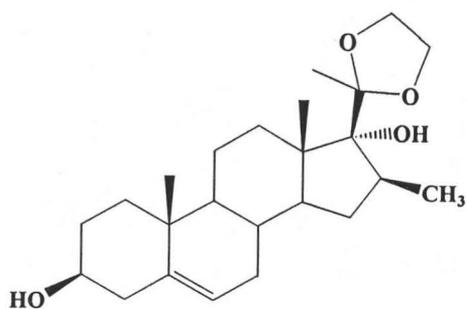
5



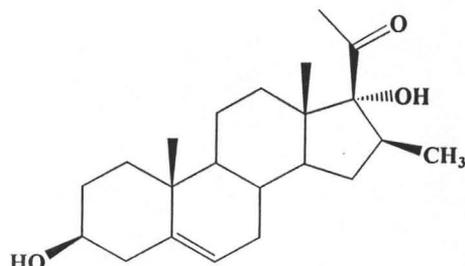
6



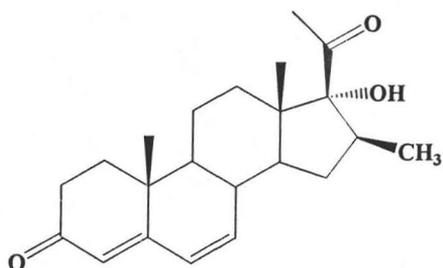
7



8



9



10

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La próstata esta localizada en la parte inferior de la vejiga urinaria, rodeando la uretra prostática, es un órgano glandular con peso aproximado de 20 g y de 3-4 cm de diámetro, que contiene entre 30-50 glándulas tubuloalveolares cuyos conductos desembocan en la uretra prostática. La secreción prostática es un fluido lechoso-alcalino que constituye aproximadamente el 20 % del volumen total del eyaculado.^{1,2}

Frecuentemente, la próstata crece con la edad, lo que ocasiona constricción de la uretra, esta constricción provoca dificultad para orinar. La obstrucción o estrechamiento de la uretra por la próstata y el vaciamiento parcial de la vejiga causan muchos de los problemas asociados con dos de las principales enfermedades de la próstata como son el cáncer de próstata y la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).^{1,3}

Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres estadounidenses y la segunda causa de muerte por cáncer en esta población. La Sociedad Americana de Cáncer estimó que más de 230,000 nuevos casos de cáncer de próstata fueron diagnosticados y que 29,900 murieron a causa de esta enfermedad en Estados Unidos en 2004. Por otra parte, en México, el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) dio a conocer que durante el 2002, se reportaron 4,232 defunciones, de las cuales 3,731 (88 %) corresponden a hombres mayores de 60 años.^{4,5a,5b}

El cáncer de próstata se origina generalmente en el lóbulo posterior de la próstata adyacente al recto, cuando genera metástasis en los ganglios linfáticos se vuelve incurable. Las células del carcinoma prostático, igual que las células glandulares prostáticas normales, dependen en su desarrollo y mantenimiento de la secreción de testosterona (cáncer andrógeno-dependiente).^{6,7}

Existen factores de riesgo del cáncer de próstata como son: historia familiar clínica, actividad profesional, raza, tabaquismo, dieta y edad avanzada.^{3,6,8-10}

Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

Se trata de una hiperplasia multifocal de los elementos glandulares y fibromusculares de la próstata que la agrandan en forma manifiesta; es común en personas de edad avanzada y su causa es desconocida.⁷

Menos de la mitad de los hombres con HPB muestran alguno de los síntomas de la enfermedad. Estos síntomas son, entre otros: vacilación urinaria (comienzo lento o demorado del flujo urinario), flujo de orina débil, necesidad de orinar 2 o 3 o más veces por la noche, dolor al orinar, sangre en la orina, retención de orina o dificultad al orinar, incremento de la frecuencia urinaria, urgencia urinaria e incontinencia.³

La detección oportuna del cáncer de próstata y la HPB es difícil de realizar, debido a que algunos de sus síntomas pueden ser causados por otras enfermedades o considerarse como propios de la edad avanzada. Además, el cáncer de próstata puede ser asintomático incluso teniendo desarrollada la enfermedad durante varios años.¹¹

Andrógenos

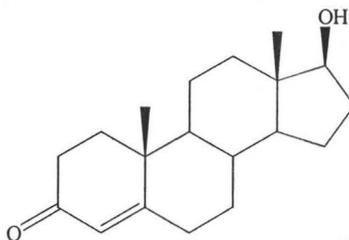
Los andrógenos son secretados por la corteza adrenal y los testículos, siendo los testículos la principal fuente de secreción. Las células de Leydig sintetizan y secretan varias hormonas esteroideas, que se conocen como andrógenos (derivados del andróstano), concepto que engloba las hormonas que se encargan de la expresión del fenotipo masculino. Juegan papeles característicos durante la diferenciación sexual masculina, durante el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales primarias y secundarias en los varones, y durante la iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis. Además ejercen influencia anabólica que estimula la síntesis de proteínas en los músculos y huesos, y acelera el metabolismo de la grasa subcutánea.^{1,2,7,12}

Mecanismo de acción: los andrógenos entran a las células y reaccionan con un receptor citosólico. El complejo hormona-receptor penetra en el núcleo y modula la expresión de ciertos genes.¹³

Los dos andrógenos más importantes en el desarrollo del tracto reproductor masculino son la testosterona (I) y la 5 α -dihidrotestosterona (II). Cada andrógeno tiene un papel específico durante la diferenciación sexual masculina.^{2,12}

Testosterona (I)

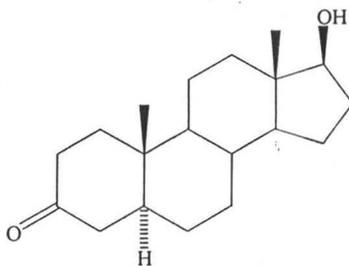
Las funciones de la testosterona (I) son: asegurar el desarrollo normal de las vesículas seminales, próstata, pene, escroto, epidídimo y glándulas de Cowper, incremento de la masa muscular, engrosamiento de la voz, promover y mantener la espermatogénesis, desarrollo del vello facial, púbico y axilar, e incremento del anabolismo de proteínas. También es necesaria para el desarrollo normal del feto masculino y del lactante.^{1,2,12,13}



Testosterona (I)

5 α -dihidrotestosterona (II)

En la mayoría de las células blanco de andrógenos, la testosterona (I) se convierte en su metabolito más potente, la 5 α -dihidrotestosterona (II), por acción de la enzima 5 α -reductasa. La producción excesiva de este andrógeno induce: incremento del pelo facial y del cuerpo, acné, calvicie y crecimiento de la próstata.^{14,15}



5 α -dihidrotestosterona (II)

CAPÍTULO II
ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

La transformación de testosterona (I) a 5 α -dihidrotestosterona (II) consiste en la adición del hidruro del NADPH (forma reducida de la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato) a la posición 5 de la testosterona (I) (Figura 1). El enolato formado en C3-C4 se estabiliza por algún residuo electrofílico (E^{\oplus}) de la enzima 5 α -reductasa. Finalmente, por tautomerismo, se da la formación de la 5 α -dihidrotestosterona (II) y la liberación de $NADP^{\oplus}$.¹⁴⁻¹⁹

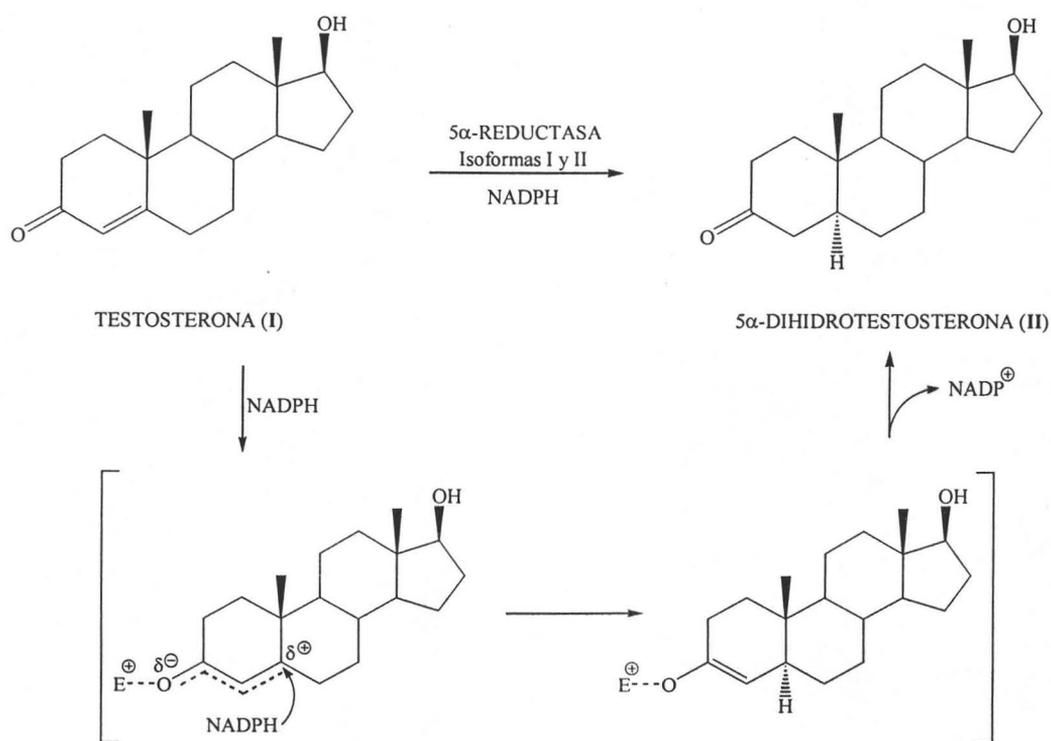


Figura 1. Mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa

La enzima 5 α -reductasa, 3-oxo-esteroide-4-eno-deshidrogenasa, es una proteína hidrofóbica formada por 259 aminoácidos. Su peso molecular es de 29,462 Dalton y esta localizada en la fracción microsomal de la célula blanco. En tejido humano y animal, dos isoenzimas de la 5 α -reductasa que operan a diferentes niveles de pH han sido descritas: la tipo 1, en la cual la actividad máxima se observa a pH 8, y la tipo 2, que actúa a pH 6.²⁰⁻²³

La isoenzima tipo 1 se localiza principalmente en folículos pilosos, glándulas sebáceas de la piel (incluyendo en cuero cabelludo) e hígado; mientras que la isoenzima tipo 2 se localiza predominantemente en la próstata, piel genital, vesículas seminales, epidídimo e hígado.^{24,25}

La producción excesiva de 5α -dihidrotetosterona (**II**) es la principal causa de diferentes trastornos relacionadas con los andrógenos (padecimientos andrógeno-dependientes), como son el cáncer de próstata, el hirsutismo, la alopecia androgénica, el acné y la hiperplasia prostática benigna.^{14,15,26-28}

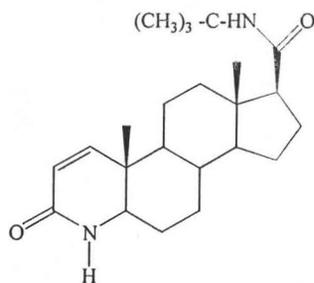
Antiandrógenos

Los antiandrógenos son sustancias químicas generalmente esteroides de origen sintético, que constituyen una amplia gama de fármacos asociados con hiperandrogenismo, reducen los efectos biológicos de los andrógenos al bloquear los receptores androgénicos en los tejidos blanco, esto es debido al carácter antagónico competitivo que presentan los antiandrógenos frente a los andrógenos, ya que compiten de manera directa por la misma proteína receptora. Sin embargo, también puede deberse a que inhiben o modifican la entrada de la testosterona (**I**) a la célula o bien, a la inhibición de su conversión a su forma activa 5α -dihidrotetosterona (**II**).^{29,30}

Entre las opciones disponibles para el tratamiento de diversos padecimientos andrógeno-dependientes existe la terapia hormonal utilizando antiandrógenos, ya sean inhibidores de la 5α -reductasa y/o antagonistas del receptor androgénico.¹⁴

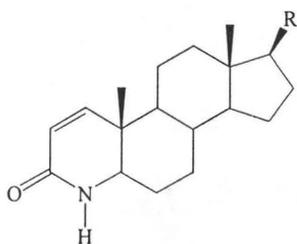
Compuestos que presentan actividad como inhibidores de la 5α -reductasa

Los compuestos que más han sido estudiados como inhibidores de la 5α -reductasa son los 4-azaesteroides³¹ en los cuales se incluye la finasterida (**III**). La finasterida (**III**) ha sido estudiada clínicamente y es el fármaco que actualmente se encuentra en el mercado para el tratamiento de la HPB.^{32,33} Una desventaja de este fármaco son los efectos adversos asociados con su uso, tales como: disminución de la libido, desordenes de la eyaculación, impotencia y hepatotoxicidad.³⁴

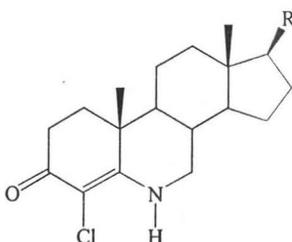


Finasterida (Merck) (III)

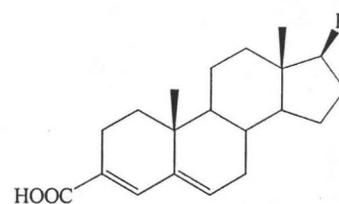
El diseño de nuevos inhibidores de la 5 α -reductasa esta basado en la estructura esteroidal, tal como la de los 4-azaesteroides (IV y V), los 6-azaesteroides (VI) y derivados de ácidos carboxilicos (VII), los cuales han sido ampliamente estudiados.³⁵



R = CONH-CH₂CH(CH₃)₂ (IV)
R = CONH[2,5-(CF₃)₂C₆H₃] (V)



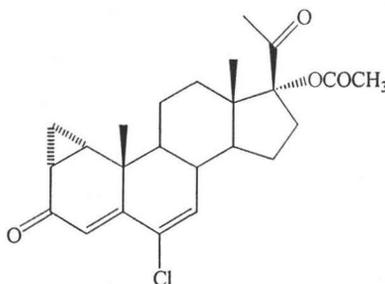
R = CONH[2,5-(CF₃)₂C₆H₃] (VI)



R = CONH(*i*-Pr)₂ (VII)

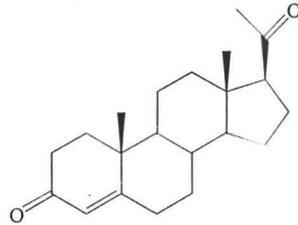
Compuestos que presentan actividad como antagonistas del receptor androgénico

Existen fármacos que son antagonistas específicos en la unión del andrógeno con su receptor. Como ejemplo de este tipo de fármacos se encuentra el acetato de ciproterona (VIII).^{36,37} Este fármaco presenta efectos adversos tales como complicaciones tromboembólicas posiblemente debidas a su acción progestacional y hepatotoxicidad cuando se usa por periodos prolongados.³⁸



Acetato de ciproterona (VIII)

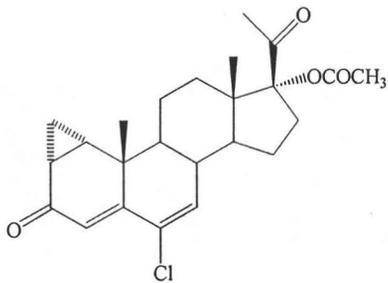
Los antiandrógenos pueden ser de origen natural como la progesterona (IX), o bien de origen sintético (esteroidal y no esteroidal).^{31,35-37}



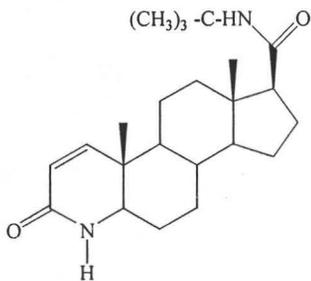
Progesterona (IX)

De origen sintético

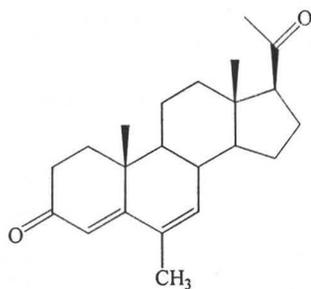
Esteroidales



Acetato de Cipoterona (VIII)

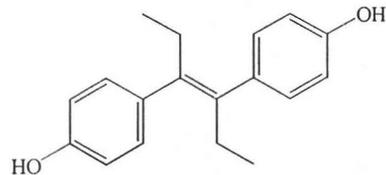


Finasterida (III)

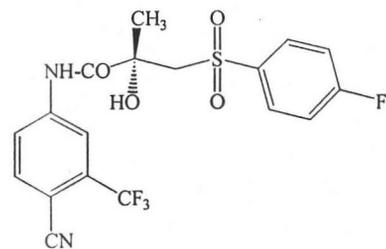


Medrogestona (X)

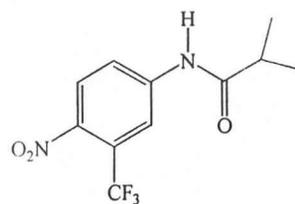
No esteroidales



Dietilestilbestrol (XI)



Bicalutamida (XII)



Flutamida (XIII)

Desafortunadamente, los antiandrógenos que se encuentran en el mercado como el acetato de ciproterona (VIII), la finasterida (III), la flutamida (XIII), entre otros, son los fármacos más eficaces para el tratamiento del cáncer de próstata y la HPB pero muestran severos efectos colaterales, tales como diarrea, vómito, disminución de la libido, daño hepático, entre otros, con lo cual se reduce su uso terapéutico.³⁹

Otras alternativas para el tratamiento del cáncer de próstata y la HPB

La elección del tratamiento apropiado se basa en la severidad de los síntomas, en el grado en que afecten el estilo de vida del individuo y en la presencia de cualquier otra condición médica.^{3,40-42} Además de la terapia con antiandrógenos se cuenta con los diversos métodos quirúrgicos como son:

RTUP: La resección transuretral de la próstata (RTUP) es el tratamiento más común para la HPB y se lleva a cabo insertando un endoscopio a través del pene. La ventaja principal de este procedimiento es que no se hace incisión alguna por lo que se reducen los riesgos de infección.^{3,40-42}

ITUP: La incisión transuretral de la próstata (ITUP) es similar a la RTUP, pero usualmente se realiza en hombres que tienen una próstata relativamente pequeña. Este procedimiento se realiza frecuentemente de manera ambulatoria y no requiere hospitalización.^{3,41,42}

Prostatectomía abierta: suele realizarse bajo anestesia general o epidural, haciendo una incisión a través del área abdominal o perineal (a través del piso pélvico incluyendo la región desde el escroto hasta el ano). Es un procedimiento prolongado que usualmente requiere de hospitalización de 5 a 10 días.^{3,40-42}

Sin embargo, después de someterse a estos métodos quirúrgicos se pueden presentar complicaciones como impotencia e incontinencia urinaria, además de que el tejido de la próstata puede volver a crecer, en cuyo caso los síntomas pueden volver a manifestarse algunos años más tarde.^{3,41}

Orquiectomía bilateral: extirpación de los testículos en donde se produce el 95 % de la testosterona endógena.⁴³

Actualmente, se llevan a cabo diversos estudios para evaluar la efectividad de otros tratamientos para la disminución del tamaño de la glándula como son: la hipertermia, terapia con láser (ILC-Intertitial Laser Coagulation), terapia con microondas (TUMT-Transurethral Microwave Therapy), terapia con energía de ultrasonido (HIFU-High Intensity Focused Ultrasound) así como los implantes prostáticos para mantener abierta la uretra.^{3,16,41-43}

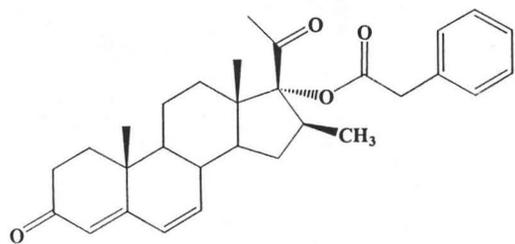
Debido a la gran preocupación que causan en los hombres los problemas de la próstata y/o una cirugía prostática, así como las ventajas y desventajas que presenta la terapia con antiandrógenos, las cuales representan un estímulo en la síntesis de nuevos compuestos que pudieran disminuir los efectos secundarios que se presentan. Es por esto, que en los últimos años, el grupo de trabajo del Dr. Bratoeff ha logrado sintetizar una variedad de moléculas esteroidales con actividad antiandrogénica,^{17,19,44-47} logrando establecer algunos requerimientos para la síntesis de nuevos compuestos con posible actividad antiandrogénica.

Requerimientos:

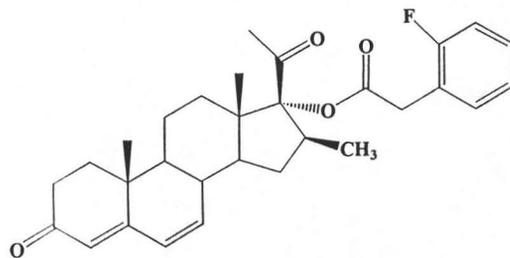
- 1) Presencia del sistema conjugado 4,6-dien-3-ona
- 2) Grupo electronegativo y voluminoso en C-17 en posición α
- 3) Presencia de un grupo alquil en C-16 en posición β

Aparentemente, la presencia del éster en posición C-17 es necesaria para que se presente alta actividad antiandrogénica.^{17,19} Asimismo, la influencia en la actividad biológica del grupo metilo en C-16 ya es conocida.⁴⁴⁻⁴⁶

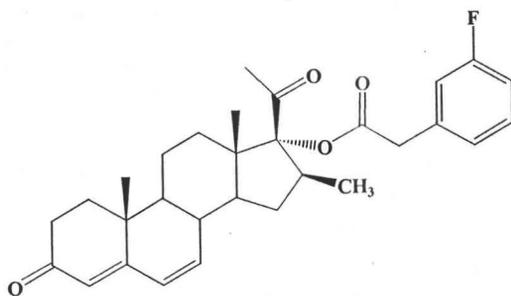
Debido a todo lo anterior, en este trabajo se propone la síntesis de los ésteres **1**, **2** y **3** con el fin de obtener compuestos con posible actividad biológica como inhibidores de la enzima 5α -reductasa y/o antagonistas del receptor androgénico.



1



2



3

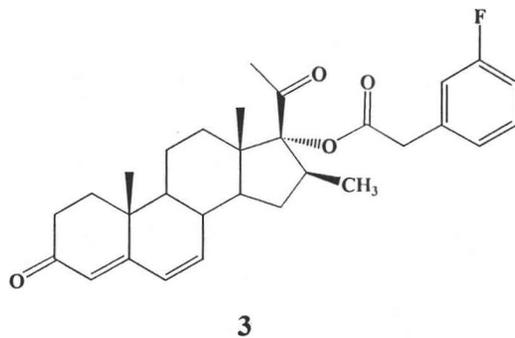
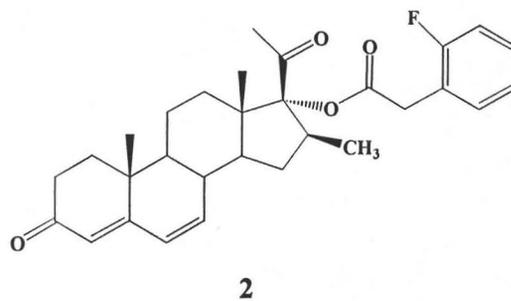
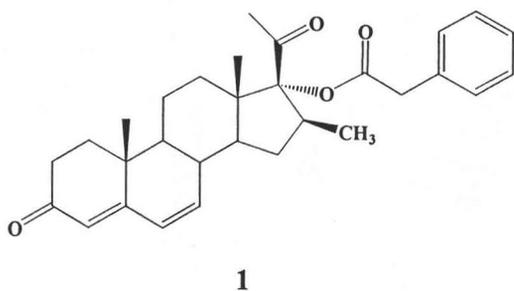
CAPÍTULO III

OBJETIVOS

OBJETIVOS

➤ Efectuar la síntesis de los siguientes compuestos:

- 17 α -(fenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (**1**)
- 17 α -(2-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (**2**)
- 17 α -(3-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (**3**)



➤ Determinar y analizar la actividad biológica (*in vivo* e *in vitro*) de los esteroides **1**, **2** y **3** tomando como estándar la finasterida **III**, el cual es uno de los fármacos de uso actual.

CAPÍTULO IV

DESARROLLO EXPERIMENTAL

DESARROLLO EXPERIMENTAL

ETAPA A) SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS (Figura 2, página 20).

Generalidades

Los espectros de absorción en el UV de los compuestos sintetizados se determinaron en un espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Hitachi modelo 200, en metanol. Los valores se expresan en nm.

Los espectros de infrarrojo para los derivados y productos finales se determinaron en un espectrofotómetro IR de transformada de Fourier, Perkin-Elmer, modelo 1600. Las determinaciones se realizaron en película. Para indicar la intensidad de las bandas se utilizaron las siguientes abreviaturas: (F) fuerte, (M) media y (D) débil. Los valores se expresen en cm^{-1} .

El análisis por espectrometría de masas (EMIE) se realizó con un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5985-B CG/MS, por introducción directa utilizando la técnica de Impacto Electrónico a 70 eV. Los valores se expresan en relación m/z (masa-carga).

Los espectros de RMN de Hidrógeno (^1H) y Carbono-13 (^{13}C) se determinaron en un aparato de RMN Varian VRX-300S, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) a partir de la señal del TMS. Para indicar las señales en ^1H se utilizaron las siguientes abreviaciones: (s) simple, (d) doble, (t) triple, (m) múltiple, (dd) doble de dobles.

Los puntos de fusión (p.f.) se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

El avance de las reacciones se determinó por cromatografía en capa fina (C.C.F.), utilizando placas comerciales de gel de sílice con indicador de fluorescencia F-254, y se revelaron utilizando una lámpara de luz ultravioleta modelo ENF-240C ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y/o solución de CoCl_2 al 1% en H_2SO_4 2N, según fue requerido.

Los compuestos finales (**1**, **2** y **3**) se purificaron por medio de cromatografía, para lo cual se utilizaron placas preparativas de 30 x 30 cm con gel de sílice Merck 60GF254 y 60G, y una mezcla de elusión adecuada para cada caso.

El material que se utilizó para las reacciones que requirieron condiciones anhidras se secó en una estufa durante 24 horas a 80 °C y se utilizó nitrógeno como atmósfera inerte.

Para concentrar los compuestos a presión reducida se utilizó un rotavapor.

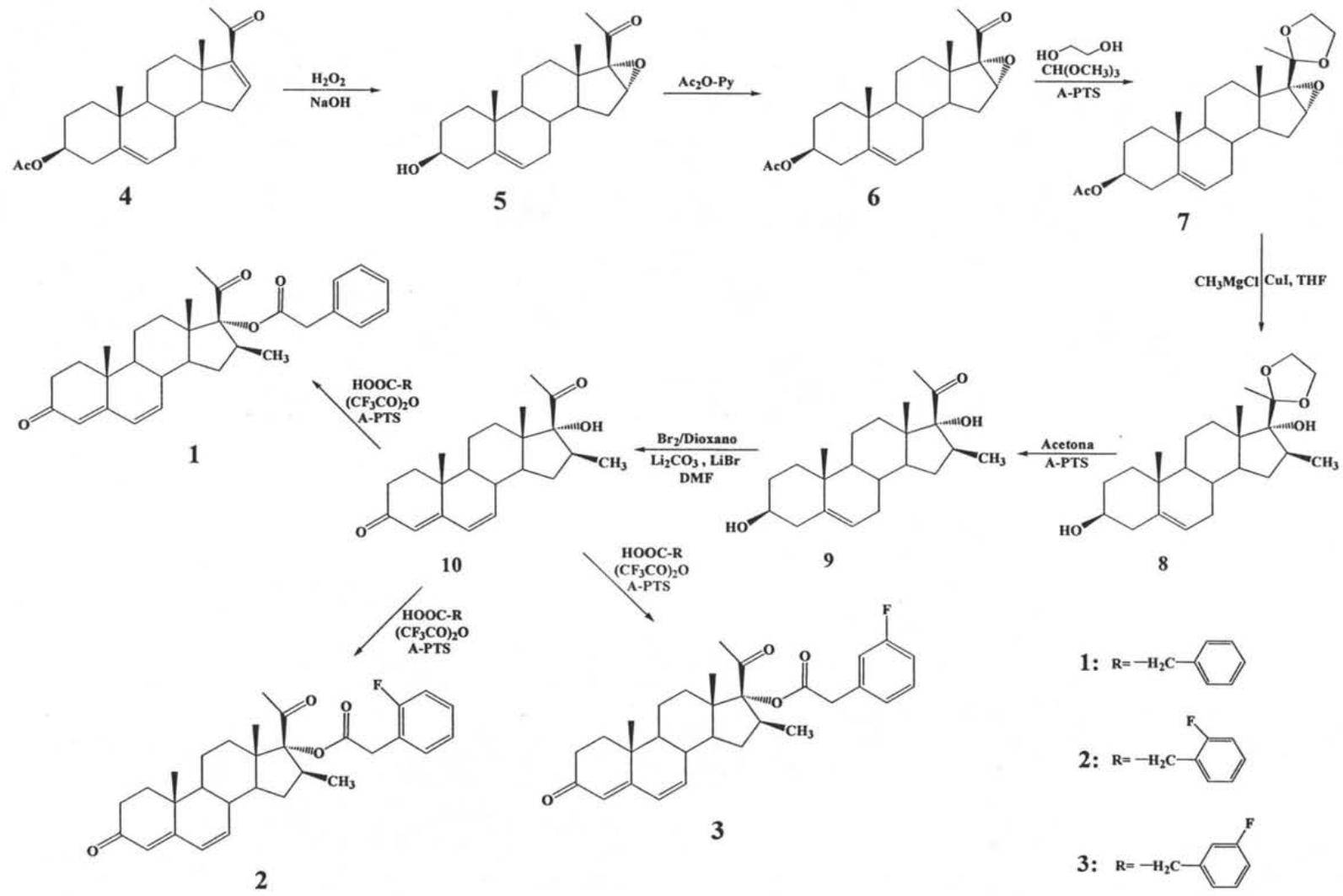
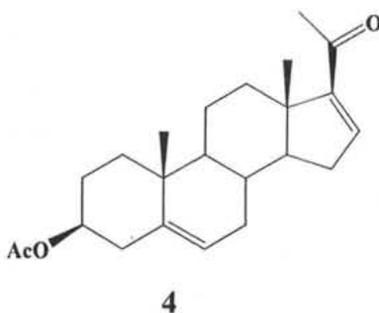


Figura 2. Esquema de Síntesis

Caracterización de la materia prima. Acetato de 16-Deshidropregnenolona (4).⁴⁴



Fórmula Molecular: $C_{23}H_{32}O_3$

Peso Molecular (uma): 356

Punto de Fusión: 171-174 °C

p.f. Lit.: 172-174 °C

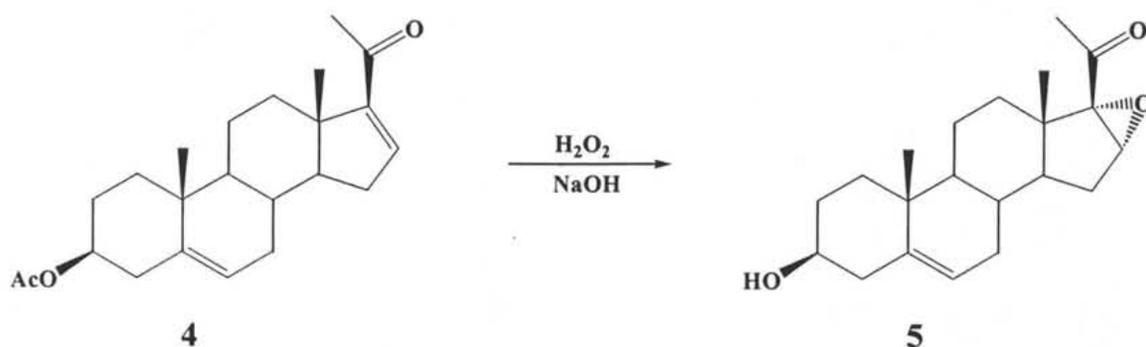
UV (λ_{max} //nm): 238.21 (C=O α , β insaturado en C-20, C16-C17).

IR (ν_{max} // cm^{-1}): 2945 (D, CH_3 -, CH_2 -), 1729 (F, $MeCOOR$ en C-3), 1661 (F, C=O en C-20), 1584 (D, C=C conjugado en C-16), 1247 (F, $MeCOOR$ en C-3), 1037 (F, $MeCOOR$ en C-3).

Masas (m/z): 296 (pico base), el M^+ (ion molecular) no se observa.

RMN 1H ($CDCl_3$ //TMS//ppm) δ : 6.80 (1H, dd, $J_1=3$ Hz, $J_2=1.5$ Hz, H-16), 5.40 (1H, dd, $J_1=4$ Hz, $J_2=2$ Hz, H-6), 4.60 (1H, m, H-3), 2.26 (3H, s, $MeCOO$ -), 2.04 (3H, s, H-21), 1.06 (3H, s, H-19), 0.92 (3H, s, H-18).

Preparación de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (5).^{44,48}



En un matraz bola de 100 mL, provisto de agitador magnético, se disolvió la materia prima **4** (1 g, 2.8 mmol) en 50 mL de metanol. Posteriormente se adicionaron 2 mL de una solución de hidróxido de sodio 4 N y 4 mL de peróxido de hidrógeno al 30 %. La mezcla resultante se agitó por espacio de 4 horas a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reacción, el exceso de metanol se destiló a presión reducida en un rotavapor y se agregó hielo a la mezcla. El sólido que se formó **5**, se separó por filtración al vacío, y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. El producto se secó a temperatura ambiente y después se recrystalizó con metanol. El rendimiento obtenido fue de 89 % (0.83 g, 2.52 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₁H₃₀O₃

Peso Molecular (uma): 330

Punto de Fusión: 187-190 °C

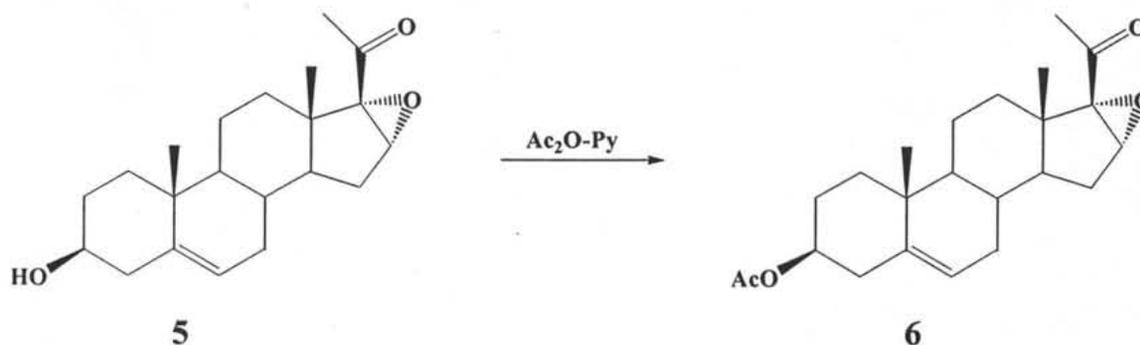
p.f. Lit.: 191-194 °C

IR (ν_{max} /cm⁻¹): 3371 (M, -OH en C-3), 2937 (F, CH₃-, CH₂-), 1692 (F, C=O en C-20), 1376 (M, C=C en C-5), 1056 (M, C-O en C-3), 857 (D, epóxido C16-C17).

Masas (m/z): 330 (M⁺), 159 (pico base).

RMN ¹H (CDCl₃//TMS//ppm) δ : 5.38 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H-6), 3.60 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H-16), 3.52 (1H, m, H-3), 2.03 (3H, s, H-21), 1.05 (3H, s, H-19), 1.02 (3H, s, H-18).

Preparación de 3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (6).^{44,48}



En un matraz bola de 25 mL, provisto de agitador magnético, se disolvió 1 g (3.0 mmol) del producto **5** en 5 mL (61.9 mmol) de piridina. Se agregaron bajo agitación constante 10 mL (106 mmol) de anhídrido acético. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. Al término de la reacción, la mezcla se vertió en un vaso de precipitados con 30 g de hielo y se agitó vigorosamente por 30 min. El precipitado blanco **6** se separó por filtración y se recristalizó con metanol. El rendimiento obtenido fue de 91 % (1.03 g, 2.77 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₃H₃₂O₄

Peso Molecular (uma): 372

Punto de Fusión: 156-159 °C

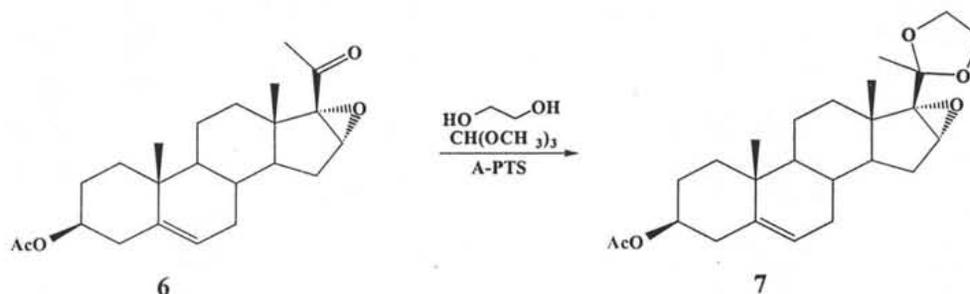
p.f. Lit.: 156-158 °C

IR (ν_{max} //cm⁻¹): 2943 (M, CH₃-, CH₂-), 1731 (F, MeCOOR en C-3), 1697 (F, C=O en C-20), 1376 (M, C=C en C-5), 1245 (F, MeCOOR en C-3), 1032 (M, MeCOOR en C-3).

Masas (m/z): 312 (pico base), el M⁺ (ion molecular) no se observa.

RMN ¹H (CDCl₃//TMS//ppm) δ : 5.30 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H-6), 4.58 (1H, m, H-3), 3.42 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=1 Hz, H-16), 1.96 (3H, s, MeCOO-), 1.95 (3H, s, H-21), 0.98 (3H, s, H-19), 0.97 (3H, s, H-18).

Preparación de acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-pregn-5-en-3 β -ol (7).⁴⁸



En un matraz bola de 50 mL, provisto de agitador magnético, se disolvió 1 g (2.69 mmol) del producto 6 en 6 mL de tolueno. Bajo agitación constante se agregaron, 3.2 mL (53 mmol) de etilenglicol, 4 mL (45 mmol) de ortoformiato de metilo y 0.020 g (0.11 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico (A-PTS) como catalizador. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 0.097 g (1.18 mmol) de acetato de sodio y la mezcla se agitó por 15 min. Después se vertió esta mezcla en un embudo de separación que contenía 20 mL de agua destilada y 20 mL de cloroformo. Posteriormente, se separó la fase orgánica y se lavó con 20 mL de agua destilada. La fase clorofórmica se separó nuevamente y se trató con sulfato de sodio anhidro. Después se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto 7 se recristalizó con metanol. El rendimiento obtenido fue de 79 % (0.89 g, 2.14 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₅H₃₆O₅

Peso Molecular (uma): 416

Punto de Fusión: 192-195 °C

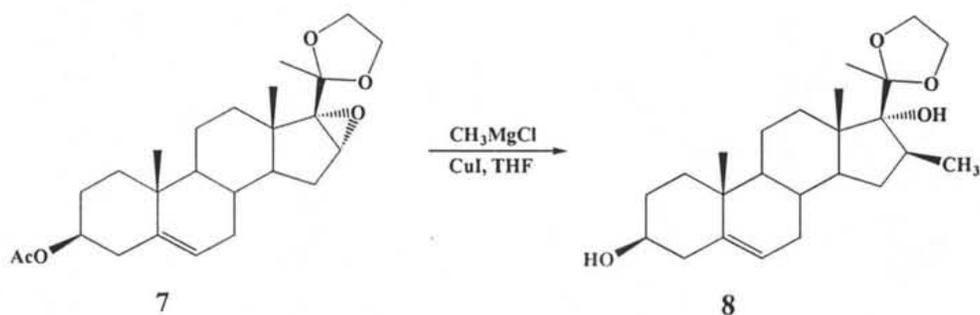
p.f. Lit.: 195-197 °C

IR (ν_{\max} //cm⁻¹): 2942 (M, CH₃-, CH₂-), 1719 (F, MeCOOR en C-3), 1248 (F, MeCOOR en C-3), 1033 (M, MeCOOR en C-3).

Masas (m/z): 416 (M⁺), 87 (pico base).

RMN ¹H (CDCl₃//TMS//ppm) δ : 5.38 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H-6), 4.60 (1H, m, H-3), 3.97 (4H, m, etilendioxi en C-20), 3.39 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=3 Hz, H-16), 2.03 (3H, s, Me de éster en C-3), 1.42 (3H, s, H-21), 1.04 (3H, s, H-19), 0.99 (3H, s, H-18).

Preparación de 20-etilendioxi-16 β -metilpregn-5-en-3 β ,17 α -diol (**8**).^{44,48}



En un matraz de dos bocas de 50 mL, equipado con un refrigerante en posición de reflujo y provisto de agitador magnético, se colocaron 1 g (2.40 mmol) del producto **7**, 0.30 g (1.58 mmol) de yoduro de cobre como catalizador y 22 mL de una solución de cloruro de metilmagnesio 3 M en tetrahidrofurano (THF). La mezcla se mantuvo a reflujo por 26 horas, bajo atmósfera de nitrógeno y agitación constante. Después la mezcla se vertió lentamente en 20 mL de una solución saturada de cloruro de amonio. Esta mezcla se extrajo con tres porciones de cloroformo (20 mL c/u). La fase orgánica se lavó con agua destilada hasta pH neutro, se trató con sulfato de sodio anhidro, se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto **8** se recrystalizó con metanol. El rendimiento obtenido fue de 66 % (0.62 g, 1.59 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₄H₃₈O₄

Peso Molecular (uma): 390

Punto de Fusión: 161-163 °C

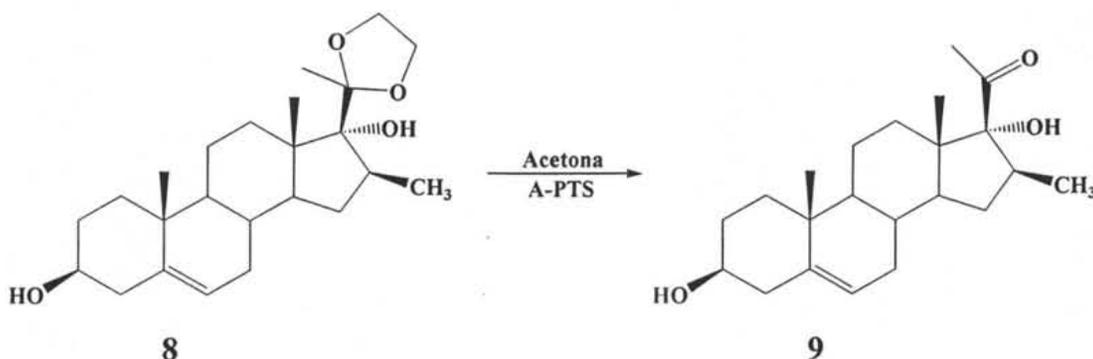
p.f. Lit.: 160-162 °C

IR (ν_{max} //cm⁻¹): 3450 (M, -OH en C-17 y C-3), 2935 (F, CH₃-, CH₂-), 2897 (F, -O-CH₂- de etilendioxi), 1045 (F, C-O-C de etilendioxi).

Masas (m/z): 390 (M⁺), 87 (pico base).

RMN ¹H (CDCl₃//TMS//ppm) δ : 5.30 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H-6), 3.92 (4H, m, etilendioxi en C-20), 3.50 (1H, m, H-3), 1.40 (3H, s, H-21), 1.20 (3H, d, J=2 Hz, Me en C-16 β), 1.01 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, s, H-18).

Preparación de 3 β ,17 α -dihidroxi-16 β -metilpregn-5-en-20-ona (9).^{44,48}



En un matraz bola de 100 mL, provisto de agitador magnético, se colocaron 1g (2.56 mmol) del producto **8** con 0.5 g (2.63 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico (catalizador) en 40 mL de acetona. La mezcla se agito durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se destiló el exceso de acetona a presión reducida en el rotavapor y se agregó hielo a la mezcla. Después, por filtración al vacío se separó el compuesto **9** en forma de un sólido blanco, el cual se lavó con agua destilada hasta pH neutro. El producto **9** se recristalizó con metanol. El rendimiento obtenido fue de 91 % (0.81 g, 2.34 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₂H₃₄O₃

Peso Molecular (uma): 346

Punto de Fusión: 230-233 °C

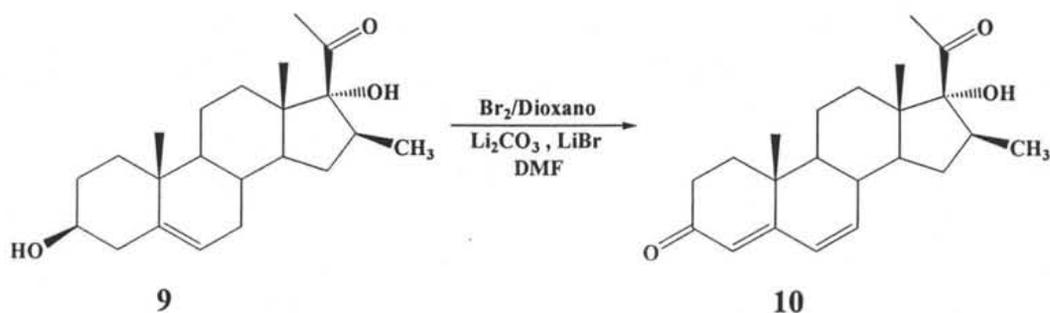
p.f. Lit.: 228-230 °C

IR (ν_{\max} //cm⁻¹): 3400 (M, -OH en C-17), 3342 (M, -OH en C-3), 2928 (F, CH₃-, CH₂-), 1690 (F, C=O en C-20), 1052 (F, C-O en C-3).

Masas (m/z): 346 (M⁺), 285 (pico base).

RMN ¹H (CDCl₃//TMS//ppm) δ : 5.31 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H-6), 3.50 (1H, m, H-3), 2.10 (3H, s, H-21), 1.21 (3H, d, J=2 Hz, Me en C-16 β), 0.98 (3H, s, H-19), 0.96 (3H, s, H-18).

Preparación de 17 α -hidroxi-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (10).^{44,48}



En un matraz de dos bocas de 50 mL, equipado con un refrigerante en posición de reflujo y provisto de agitador magnético, se colocaron 1 g (2.89 mmol) del producto **9**, 3 g (40 mmol) de carbonato de litio, 2 g (22 mmol) de bromuro de litio y 14 mL de dimetilformamida (DMF). La suspensión se agitó durante 30 min. Posteriormente se adicionó lentamente (gota a gota) una solución de bromo (0.70 g, 0.22 mL, 4.38 mmol) en 6.02 mL de dioxano. La mezcla se filtró al vacío y las sales que quedaron en el filtro se lavaron con dimetilformamida. Al filtrado se le agregó 70 mL de una solución de bisulfito de sodio (0.5 g) y bicarbonato de sodio (0.5 g) en 100 mL de agua. Se obtuvo el compuesto **10** en forma de un precipitado amarillo que se separó por filtración al vacío. El producto **10** se recrystalizó con metanol. El rendimiento obtenido fue de 75 % (0.74 g, 2.16 mmol).

Fórmula Molecular: C₂₂H₃₀O₃

Peso Molecular (uma): 342

Punto de Fusión: 210-213 °C

p.f. Lit.: 211-215 °C

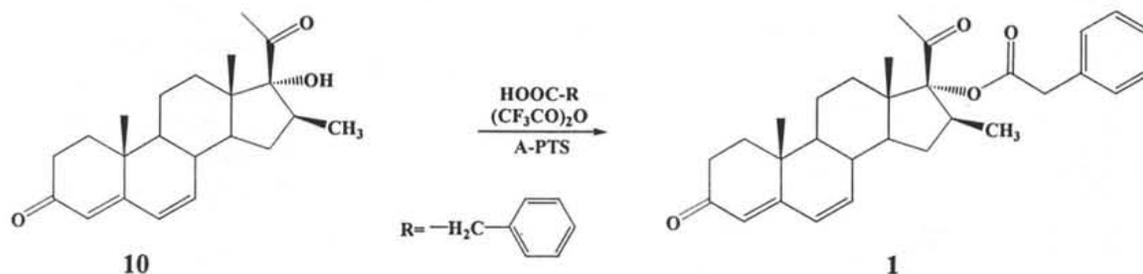
UV (λ_{max} //nm): 284.02 (C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5, C6-C7).

IR (ν_{max} //cm⁻¹): 3500 (M, -OH en C-17), 1706 (F, C=O en C-20), 1666 (F, C=O en C-3), 1617 (D, C=C dieno conjugado en C4-C5, C6-C7).

Masas (m/z): 342 (M⁺ y pico base).

RMN ¹H (CDCl₃//TMS//ppm) δ : 6.16 (1H, d, J₁=2 Hz, H-6), 5.72 (1H, s, H-4), 5.40 (1H, dd, J₁=4 Hz, J₂=2 Hz, H-7), 2.31 (3H, s, H-21), 1.22 (3H, d, J=4 Hz, Me en C-16 β), 1.18 (3H, s, H-19), 1.16 (3H, s, H-18).

Preparación de 17 α -(fenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (1).



En un matraz bola de 5 mL, provisto de agitador magnético, se mezclaron 0.060 g (0.441 mmol) de ácido fenilacético, 0.005 g (0.026 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y 0.062 mL (0.092 g, 0.438 mmol) de anhídrido trifluoroacético. La mezcla se agitó por dos horas a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido este tiempo se agregó el producto **10** (0.05 g, 0.15 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (8.8 g/100 mL), se extrajo con porciones de cloroformo (20 mL c/u) y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y después se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto **1** se purificó por cromatografía en capa fina con sistemas de elución hexano:acetato de etilo (7:3, 8:2 y 9:1) %v/v, sucesivamente, obteniéndose así el compuesto **1**, como cristales blancos, con un rendimiento del 49 % (0.033 g, 0.072 mmol).

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₆O₄

Peso Molecular (uma): 460

Punto de Fusión: 166-169 °C

UV (λ_{max} //nm): 282.97 (C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5, C6-C7). (Espectro 1)

IR (ν_{max} //cm⁻¹): 2947 (D, CH₃- y CH₂-), 1734 (F, COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1661 (F, C=O de cetona en C-3), 1618 (D, C=C dieno conjugado en C4-C5, C6-C7), 1222 (M, COO de éster en C-17), 719 (D, aromático monosustituido). (Espectro 2)

Masas (m/z): 460 (M^+), 281 (pico base). (Espectro 3)

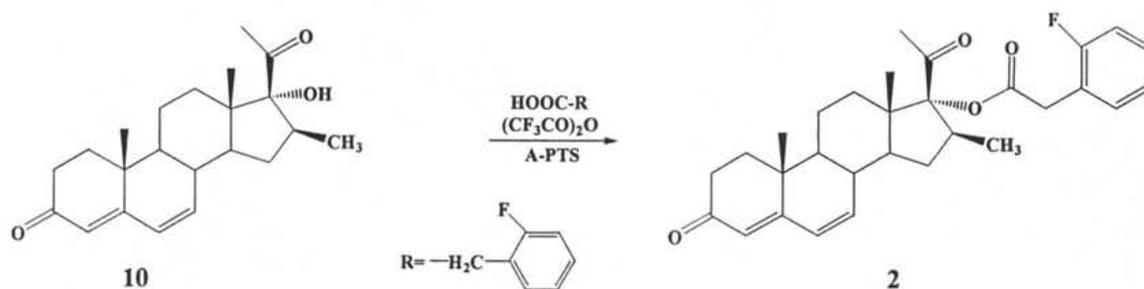
RMN 1H ($CDCl_3//TMS//ppm$) δ : 7.29 (5H, m, aromático monosustituido), 6.15 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H-7), 6.09 (1H, d, $J=10$ Hz, H-6), 5.72 (1H, s, H-4), 3.67 (2H, s, $COO-CH_2-Ph$), 1.84 (3H, s, H-21), 1.34 (3H, d, $J=7$ Hz, Me en C-16 β), 1.11 (3H, s, H-19), 0.74 (3H, s, H-18). (Espectro 4)

Los desplazamientos químicos para cada carbono se determinaron utilizando los espectros de RMN ^{13}C y DEPT (Espectro 5 y 6), los valores fueron asignados utilizando las tablas de datos espectroscópicos reportadas en la literatura.⁴⁹

Tabla 1. RMN ^{13}C ($CDCl_3//TMS//ppm$) δ : (Espectro 5 y 6)

Tipo de Carbono	Asignación: ppm
CH ₃ 1° (4)	C-16' β : 14.84, C-18: 16.29, C-19: 19.70, C-21: 28.11
CH ₂ 2° (6)	C-11: 20.24, C-15: 32.16, C-12: 33.90, C-1: 33.92, C-2: 34.51, C-2': 42.07
CH 3° (12)	C-8: 37.12, C-14: 46.14, C-16: 46.67, C-9: 50.09, C-4: 123.88, C-6: 127.38, C-6': 128.17, C-5': 128.68 (2), C-4': 129.37 (2), C-7: 140.23
C 4° (8)	C-17: 95.61, C-3': 133.17, C-10: 35.96, C-13: 48.64, C-5: 163.24, C=O del éster: 171.24, C=O en C-3: 199.46, C=O en C-20: 204.10

Preparación de 17 α -(2-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (2).



En un matraz bola de 5 mL, provisto de agitador magnético, se mezclaron 0.068 g (0.441 mmol) de ácido 2-fluorofenilacético, 0.005 g (0.026 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y 0.062 mL (0.092 g, 0.438 mmol) de anhídrido trifluoroacético. La mezcla se agitó por dos horas a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido este tiempo se agregó el producto **10** (0.05 g, 0.15 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (8.8 g/100 mL), se extrajo con porciones de cloroformo (20 mL c/u) y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y después se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto **2** se purificó por cromatografía en capa fina con sistemas de elución hexano:acetato de etilo (7:3, 8:2 y 9:1) %v/v, sucesivamente, obteniéndose así el compuesto **2**, como cristales blancos, con un rendimiento del 46 % (0.032 g, 0.067 mmol).

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₅FO₄

Peso Molecular (uma): 478

Punto de Fusión: 176-178 °C

UV (λ_{max} //nm): 283.99 (C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5, C6-C7). (Espectro 7)

IR (ν_{max} //cm⁻¹): 2946 (D, CH₃- y CH₂-), 1728 (F, COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1660 (F, C=O de cetona en C-3), 1617 (M, C=C dieno conjugado en C4-C5, C6-C7), 1262 (M, C-F), 1230 (M, COO de éster en C-17), 756 (M, aromático 1,2-disustituido). (Espectro 8)

Masas (m/z): 478 (M^+), 109 (pico base). (Espectro 9)

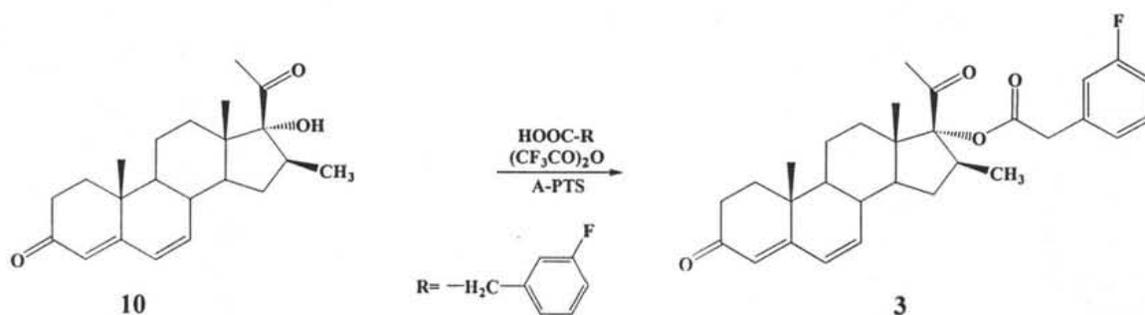
RMN 1H ($CDCl_3//TMS//ppm$) δ : 7.0-7.3 (4H, m, aromático 1,2-disustituido), 6.15 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H-7), 6.09 (1H, d, $J=10$ Hz, H-6), 5.72 (1H, s, H-4), 3.73 (2H, dd, $J_1=6$ Hz, $J_2=1$ Hz, COO-CH₂-Ph), 1.93 (3H, s, H-21), 1.35 (3H, d, $J=7$ Hz, Me en C-16 β), 1.10 (3H, s, H-19), 0.74 (3H, s, H-18). (Espectro 10)

Los desplazamientos químicos para cada carbono se determinaron utilizando los espectros de RMN ^{13}C y DEPT (Espectro 11 y 12), los valores fueron asignados utilizando las tablas de datos espectroscópicos reportadas en la literatura.⁴⁹

Tabla 2. RMN ^{13}C ($CDCl_3//TMS//ppm$) δ : (Espectro 11 y 12)

Tipo de Carbono	Asignación: ppm
CH ₃ 1° (4)	C-16' β : 14.79, C-18: 16.29, C-19: 19.69, C-21: 28.17
CH ₂ 2° (6)	C-11: 20.23, C-15: 32.01, C-12: 33.88, C-1: 33.95, C-2: 34.48, C-2': 35.46
CH 3° (12)	C-8: 37.11, C-14: 46.01, C-16: 46.60, C-9: 50.09, C-5': 115.28, C-7': 115.56, C-6': 123.84, C-4: 124.28, C-6: 128.14, C-8': 129.38, C-7: 131.46, C-4'(C-F): 140.31
C 4° (8)	C-17: 95.80, C-3': 120.98, C-10: 35.94, C-13: 48.72, C-5: 163.37, C=O del éster: 170.37, C=O en C-3: 199.58, C=O en C-20: 204.15

Preparación de 17 α -(3-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (3).



En un matraz bola de 5 mL, provisto de agitador magnético, se mezclaron 0.068 g (0.441 mmol) de ácido 3-fluorofenilacético, 0.005 g (0.026 mmol) de ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y 0.062 mL (0.092 g, 0.438 mmol) de anhídrido trifluoroacético. La mezcla se agitó por dos horas a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido este tiempo se agregó el producto **10** (0.05 g, 0.15 mmol). La mezcla de reacción se agitó por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio (8.8 g/100 mL), se extrajo con porciones de cloroformo (20 mL c/u) y se lavó con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se trató con sulfato de sodio anhidro y después se separó la sal por filtración y el disolvente se evaporó a sequedad por destilación a presión reducida en el rotavapor. El producto **3** se purificó por cromatografía en capa fina con sistemas de elución hexano:acetato de etilo (7:3, 8:2 y 9:1) %v/v, sucesivamente, obteniéndose así el compuesto **3**, como cristales blancos, con un rendimiento del 46 % (0.032 g, 0.067 mmol).

Fórmula Molecular: C₃₀H₃₅FO₄

Peso Molecular (uma): 478

Punto de Fusión: 180-183 °C

UV (λ_{max} //nm): 284.48 (C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5, C6-C7). (Espectro 13)

IR (ν_{max} //cm⁻¹): 2947 (M, CH₃- y CH₂-), 1729 (F, COO de éster en C-17 y C=O de cetona en C-20), 1659 (F, C=O de cetona en C-3), 1617 (F, C=C dieno conjugado en C4-C5, C6-C7), 1261 (F, C-F), 1225 (M, COO de éster en C-17), 755 (F) y 685 (D) (aromático 1,3-disustituido). (Espectro 14)

Masas (m/z): 478 (M^+), 281 (pico base). (Espectro 15)

RMN 1H ($CDCl_3//TMS//ppm$) δ : 7.0-7.3 (4H, m, aromático 1,3-disustituido), 6.16 (1H, dd, $J_1=10$ Hz, $J_2=2$ Hz, H-7), 6.09 (1H, d, $J=9$ Hz, H-6), 5.72 (1H, s, H-4), 3.67 (2H, s, $COO-CH_2-Ph$), 1.86 (3H, s, H-21), 1.35 (3H, d, $J=7$ Hz, Me en C-16 β), 1.11 (3H, s, H-19), 0.75 (3H, s, H-18). (Espectro 16)

Los desplazamientos químicos para cada carbono se determinaron utilizando los espectros de RMN ^{13}C y DEPT (Espectro 17 y 18), los valores fueron asignados utilizando las tablas de datos espectroscópicos reportadas en la literatura.⁴⁹

Tabla 3. RMN ^{13}C ($CDCl_3//TMS//ppm$) δ : (Espectro 17 y 18)

Tipo de Carbono	Asignación: ppm
CH ₃ 1° (4)	C-16' β : 14.86, C-18: 16.32, C-19: 19.70, C-21: 28.15
CH ₂ 2° (6)	C-11: 20.27, C-15: 32.23, C-12: 33.91, C-1: 34.53, C-2: 41.66, C-2': 41.68
CH 3° (12)	C-8: 37.11, C-14: 46.22, C-16: 46.82, C-9: 50.14, C-6': 114.27, C-4': 114.54, C-8': 116.64, C-4: 123.94, C-6: 125.09, C-7': 128.25, C-7: 130.19, C-5'(C-F): 140.04
C 4° (8)	C-17: 95.91, C-3': 135.38, C-10: 35.97, C-13: 48.72, C-5: 163.15, C=O del éster: 170.61, C=O en C-3: 199.43, C=O en C-20: 203.85

ETAPA B) EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Generalidades

La actividad biológica (*in vivo* e *in vitro*) de los esteroides sintetizados **1**, **2** y **3** se determinó mediante dos pruebas:

- 1) Determinación del peso (mg) de la próstata.
- 2) Transformación de la T a DHT en homogeneizados de próstata.

Para el desarrollo de los experimentos se emplearon hámsteres machos adultos de la cepa Syriam Golden con un peso entre 150-200 g, gonadectomizados 30 días antes del estudio. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio, a una temperatura controlada de 22 °C, con comida y agua *ad libitum*, y periodos de luz y oscuridad de 12 horas.

Los equipos empleados en los estudios fueron:

- Para medir la radiactividad, un contador de centelleo Liquid Scintillation Analyzer, modelo Tricards 2100 TR-Packard con impresora Panasonic Quiet KX-P3123.
- Una incubadora modelo BMR-18/25.
- Una centrifuga modelo Allegra 6R Centrifuge Beckman.
- Micropipetas electrónicas, Advanced electronic pipette Rainin modelo Edp 3, con capacidad para 10 µL, 100 µL y 1000 µL.
- Una lámpara UV $\lambda = 254$ nm.

Los reactivos empleados en los estudios fueron:

- Compuestos: **1**, **2** y **3**.
- Cromatofolios de gel de sílice 60F₂₅₄ Merck.
- Treo-1,4-dimercapto-2,3-butanodiol (ditiotreitól DTT).
- Dihidrotestosterona (**II**).
- Dihidrotestosterona tritiada [³H]DHT.
- Diclorometano (CH₂Cl₂).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- Éter.
- Glicerol.
- HCl-Tris (Trisma Hydrochloride).

- Líquido de centelleo Ultima Gold.
- Molibdato de sodio.
- NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato).
- Sacarosa.
- Finasterida (III).
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 y pH 7.0.
- Testosterona (I).
- Testosterona tritiada [³H]T.
- Aceite de sésamo (ajonjolí).

Experimento *in vivo*: Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre el peso de la próstata de hámster.⁵⁰⁻⁵²

Este ensayo biológico se fundamenta en el hecho de que la enzima 5 α -reductasa y los receptores androgénicos se encuentran presentes en este tejido, de tal manera que si el compuesto a evaluar inhibe a dicha enzima o interactúa con el receptor androgénico provocará una disminución en el peso de la próstata debido a la disminución en la concentración de dihidrotestosterona (II) o a la obstrucción de los receptores androgénicos para este metabolito.

Para realizar este bioensayo se utilizaron seis grupos de cuatro hámsteres cada uno, con diferentes tratamientos. A cada uno de los animales de los diversos grupos, se les administraron por vía subcutánea 200 μ g de testosterona (I) y 1 mg de cada uno de los esteroides (1, 2 y 3) disueltos en aceite de sésamo (ajonjolí) como vehículo. Se aplicaron inyecciones diarias por un periodo de seis días. Se utilizaron tres grupos de animales como controles:

- el primero de ellos se trató únicamente con vehículo,
- el segundo con una solución oleosa de testosterona (I) y
- el tercero se trató con una solución oleosa de testosterona (I) más una solución oleosa conteniendo finasterida (III).

Después de seis días, los animales fueron sacrificados anestesiándolos con éter y se obtuvieron las próstatas, las cuales fueron pesadas posteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4 (página 50) y la Figura 3 (página 51).

Experimento *in vitro*: Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre la transformación de la testosterona (I) a dihidrotestosterona (II) en homogeneizados de próstata.⁵⁰⁻⁵²

Este experimento consiste en la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa presente en la fracción microsomal de próstata de hámster a pH 7.0.

Obtención de la fracción microsomal de próstata

Se sacrificaron 50 hámsteres macho con aproximadamente 72 horas de castración. Se separaron las próstatas, los tejidos se limpiaron perfectamente de grasa y se pesaron. Los tejidos se homogeneizaron con una mezcla que contenía: 20 mM de HCl-Tris [$\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3\cdot\text{HCl}$], 1.5 mM de EDTA, 20 mM de molibdato de sodio y 10% de glicerol, con relación al peso de tejido (v/p 3:1).

El tejido homogeneizado se centrifugó a 140,000 rpm durante 1 hora a 2 °C. Posteriormente se separó la fracción microsomal para ser resuspendida en 3 volúmenes de medio A (0.32 M de sacarosa, 0.1 mM de ditioneitol y solución amortiguadora de fosfatos 20 mM a pH 6.5) en relación con el peso del tejido obtenido inicialmente.

Con la fracción microsomal de próstata previamente obtenida, se realizó un estudio metabólico *in vitro* para conocer el posible efecto inhibitorio de los esteroides (1, 2 y 3) sobre la enzima 5α -reductasa.

Para realizar este bioensayo los esteroides a evaluar (1, 2 y 3) fueron incubados en presencia de 250 μg de proteína de microsomas de próstata y una mezcla de incubación que contenía: 2 nM de testosterona tritiada [^3H]T, 2 mM de NADPH, 1 mM de ditioneitol y una solución amortiguadora de fosfatos 40 mM a pH 7. El bioensayo se incubó durante 1 hora a una temperatura de 37 °C con agitación constante.

Además se preparó un control que contenía fracción microsomal y mezcla de incubación sin inhibidor el cual corresponde al 100 % de conversión. La incubación terminó con la adición de CH_2Cl_2 , para después realizar extracciones sucesivas a la mezcla de reacción con el mismo disolvente. La separación de los productos tritiados, [^3H]T y

[³H]DHT, se realizó por C.C.F. en un sistema de elución de cloroformo:acetona (9:1), corriendo la placa 3 veces, separando los compuestos en base a su polaridad (el r.f. de testosterona es 0.55 y el r.f. de dihidrotestosterona es 0.67) y midiendo la radiactividad en la región correspondiente a [³H]DHT (producto obtenido por la transformación de [³H]T en presencia de la enzima 5 α -reductasa). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5 (página 52).

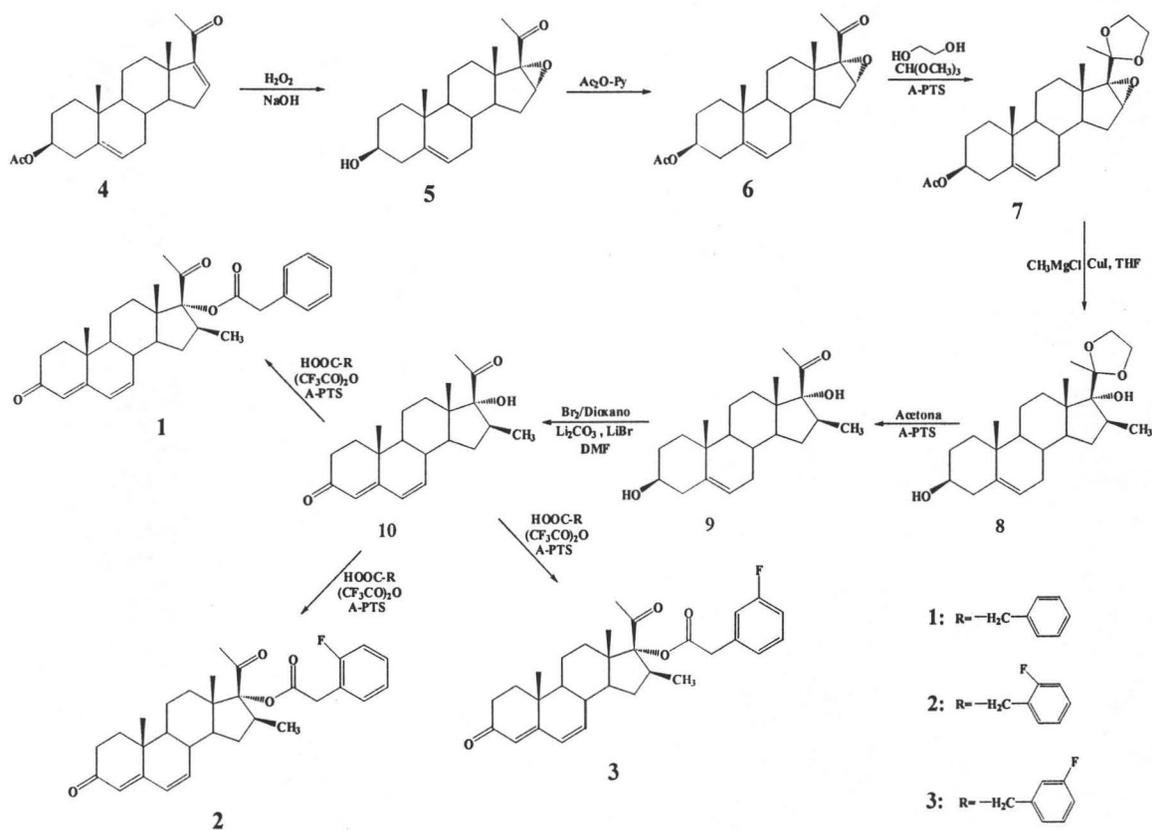
CAPÍTULO V

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

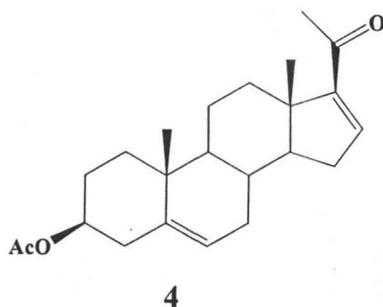
DISCUSIÓN Y RESULTADOS

ETAPA A) SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS

La preparación de los derivados esteroidales propuestos en este trabajo se llevó a cabo considerando el esquema de síntesis que se muestra:



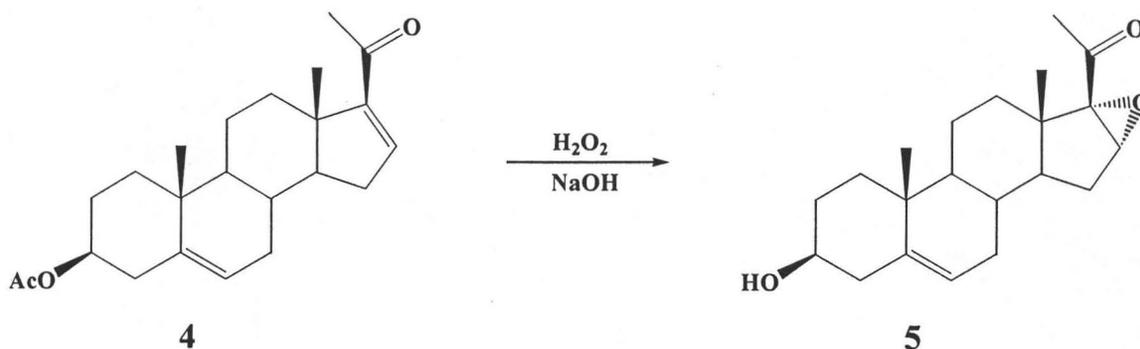
Caracterización de la materia prima. Acetato de 16-Deshidropregnenolona (4).



Como primer paso se caracterizó la materia prima **4** por sus propiedades físicas y espectroscópicas, las cuales coinciden con las descritas en la literatura.⁴⁴

Preparación de 16 α ,17 α -epoxi-3 β -hidroxipregn-5-en-20-ona (5).

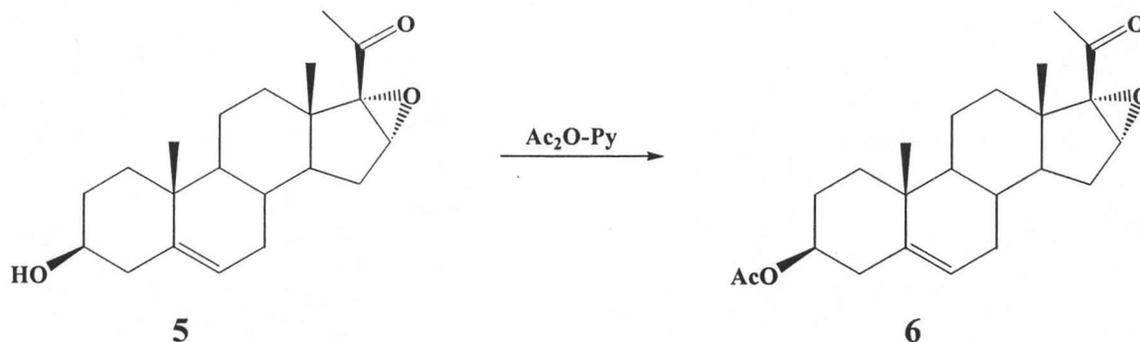
La síntesis de este compuesto se hizo con la técnica descrita en la literatura.^{44,48}



La inserción de un oxígeno en la molécula implicó la epoxidación de la doble ligadura en C16-C17. Se utilizó peróxido de hidrógeno al 30 % en un medio básico. La adición nucleofílica (tipo Michael) del anión hidropéroxido sobre la ligadura en C-16 se vio favorecida por la conjugación con la cetona en C-20. El compuesto obtenido **5** se aisló con un rendimiento del 89 % y se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas, las cuales coinciden con las descritas en la literatura.

Preparación de 3 β -acetoxi-16 α ,17 α -epoxipregn-5-en-20-ona (6).

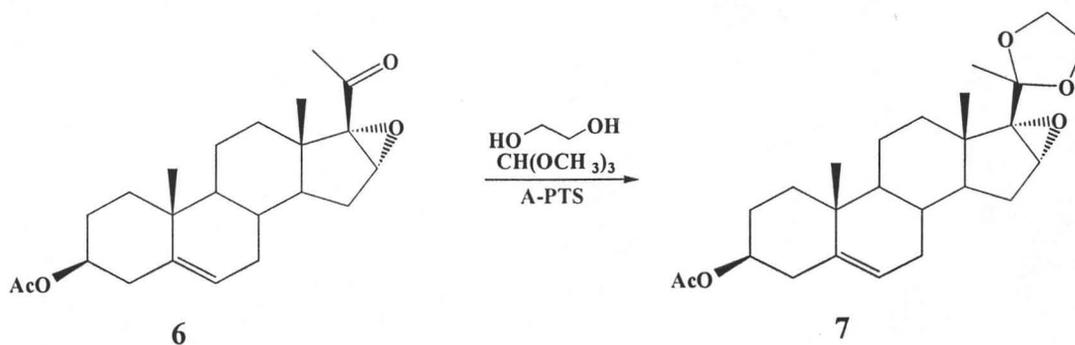
La síntesis de este compuesto se hizo con la técnica descrita en la literatura.^{44,48}



El siguiente paso en la síntesis fue la acetilación del alcohol en C-3 con anhídrido acético y piridina. El derivado acetilado 6 se obtuvo con un rendimiento del 91 %. Se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas, las cuales coinciden con las descritas en la literatura.

Preparación de acetato de 16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxipregn-5-en-3 β -ol (7).

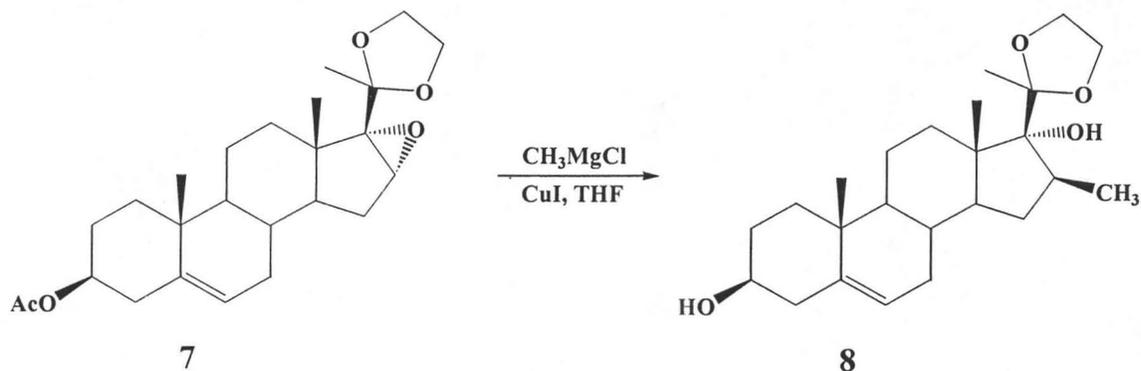
La síntesis de este compuesto se hizo con la técnica descrita en la literatura.⁴⁸



La síntesis del derivado etilendioxi 7 se llevó a cabo empleando etilenglicol, ortoformiato de metilo y ácido *p*-toluensulfónico (A-PTS) como catalizador. El producto 7 se obtuvo con un rendimiento del 79 %. Se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas, las cuales coinciden con las descritas en la literatura.

Preparación de 20-etilendioxi-16 β -metilpregn-5-en-3 β ,17 α -diol (8).

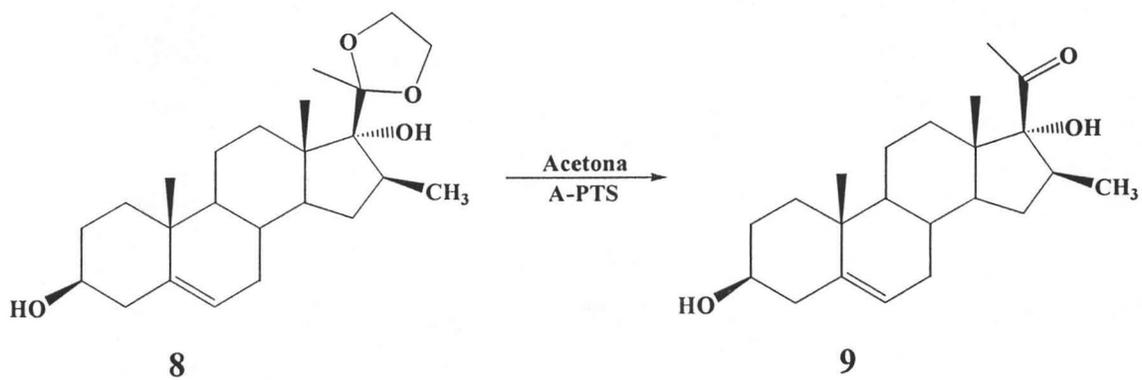
La síntesis de este compuesto se hizo con la técnica descrita en la literatura.^{44,48}



El siguiente paso de la síntesis fue la apertura del anillo de oxirano, vía un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$). En esta reacción se planteó la inserción en C-16 β de un grupo metilo, empleando cloruro de metilmagnesio y yoduro de cobre como catalizador. Se logró mejorar el tiempo de reacción, se encontró que fue de 26 horas de reflujo, en lugar de 5 días de reflujo, como anteriormente se había reportado. El producto 8 se obtuvo con un rendimiento del 66 %. Se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas, las cuales coinciden con las descritas en la literatura.

Preparación de 3 β ,17 α -dihidroxi-16 β -metilpregn-5-en-20-ona (9).

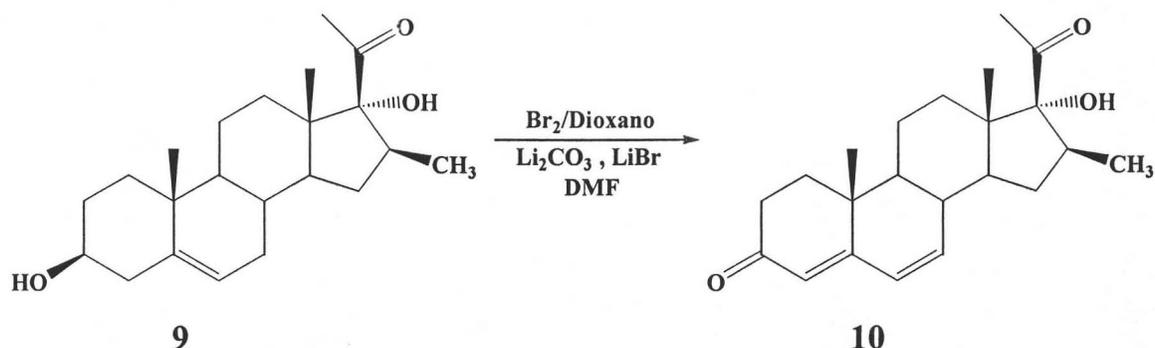
La síntesis de este compuesto se hizo con la técnica descrita en la literatura.^{44,48}



En el siguiente paso se regeneró el grupo carbonilo en C-20 mediante una reacción de transcetalización en medio ácido. Se utilizó ácido *p*-toluensulfónico (catalizador) en acetona a temperatura ambiente. El producto **9** se obtuvo con un rendimiento del 91 %. Se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas, las cuales coinciden con las descritas en la literatura.

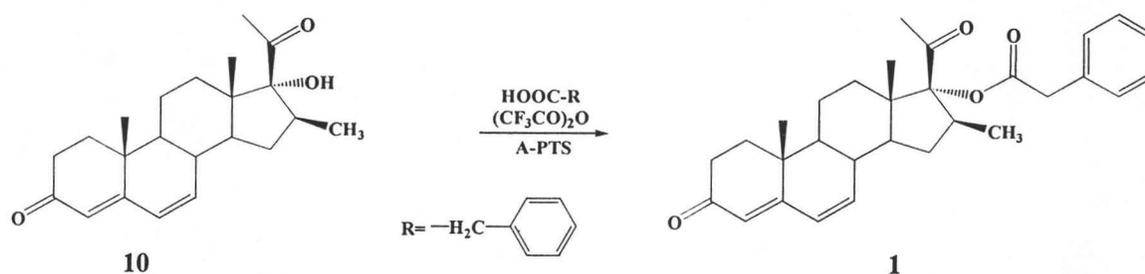
Preparación de 17 α -hidroxi-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (**10**).

La síntesis de este compuesto se hizo con la técnica descrita en la literatura.^{44,48}



La formación del sistema 4,6-pregnadien-3-ona en el compuesto **10**, se llevó a cabo al hacer reaccionar al compuesto **9** con bromo, carbonato de litio, bromuro de litio y dimetilformamida (DMF). En esta reacción se logró reducir la cantidad de bromo reportada en la literatura, obteniéndose un mejor rendimiento. El producto **10** se obtuvo con un rendimiento del 75 %. Se caracterizó por sus constantes físicas y espectroscópicas, las cuales coinciden con las descritas en la literatura.

Preparación de 17 α -(fenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (1).



El siguiente paso fue la esterificación del alcohol en C-17 para obtener el compuesto 1. La reacción se llevó a cabo con ácido fenilacético, ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y anhídrido trifluoroacético. En el primer paso se formó el anhídrido mixto que reaccionó con el alcohol en C-17 del compuesto 10, dando como resultado el compuesto 1. El producto 1 se purificó por cromatografía en placa preparativa con sistemas de elución hexano:acetato de etilo (7:3, 8:2 y 9:1) %v/v, sucesivamente, obteniéndose así el compuesto 1, como cristales blancos, con un rendimiento del 49 %.

El sistema dieno en el producto 1, se verificó utilizando espectroscopia de UV. En el espectro se observó un máximo de absorción a 282.97 nm correspondiente al C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5, C6-C7. (Espectro 1)

En el espectro de infrarrojo del compuesto 1 (Espectro 2) se observó una señal en 1734 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster en C-17 y al carbonilo de cetona en C-20. La señal en 1661 cm^{-1} se asignó al carbonilo en C-3. La señal en 1618 cm^{-1} corresponde al dieno conjugado en C4-C5, C6-C7. La señal en 719 cm^{-1} corresponde a la parte del compuesto aromático monosustituido, que se generó por la esterificación con ácido fenilacético.

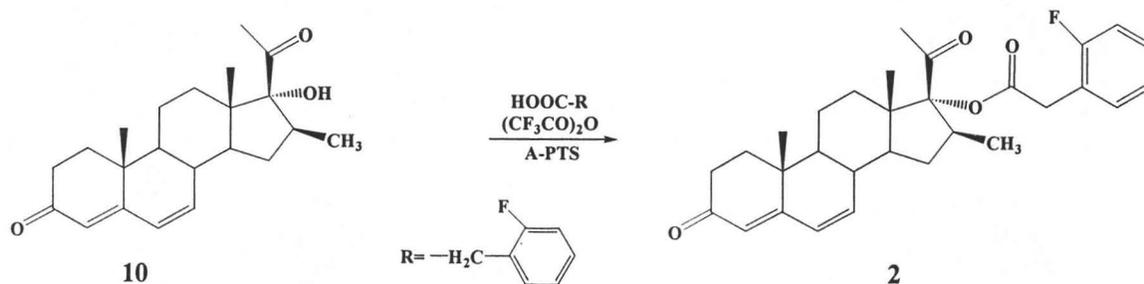
El espectro de masas (Espectro 3) mostró en 460 m/z una señal que corresponde al M^+ (ion molecular). El pico base se observó en 281 m/z se generó por la pérdida de $[\text{Ph-CH}_2\text{-COO}]^+$ y $[\text{MeCO}]^+$ a partir del ion molecular. La señal en 91 m/z corresponde al ion tropilio.

El espectro de RMN de ^1H (Espectro 4) presentó una señal múltiple en 7.29 ppm que se asignó a los protones aromáticos. También se observó una señal doble de dobles en 6.15 ppm correspondiente a H-7 y una señal doble en 6.09 ppm que corresponde a H-6. La señal simple en 5.72 ppm corresponde a H-4. Una señal simple en 3.67 ppm, la cual integra para dos protones, corresponde a H-2' (COO-CH₂-Ph). La señal doble en 1.34 ppm se asignó al metilo en C-16 β . También se observaron tres señales simples en 1.84, 1.11 y 0.74 ppm, que integran para tres protones cada una y corresponden a los protones H-21, H-19 y H-18, respectivamente.

Los desplazamientos químicos para cada carbono se determinaron utilizando los espectros de RMN ^{13}C y DEPT (Espectro 5 y 6), los valores fueron asignados utilizando las tablas de datos espectroscópicos reportadas en la literatura.⁴⁹

En los espectros de RMN de ^{13}C (Espectro 5 y 6) se presentó una señal en 14.84 ppm que corresponde al metilo en C-16 β . Se observaron tres señales en 16.29, 19.70 y 28.11 ppm correspondientes a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Una señal en 42.07 ppm, la cual corresponde a C-2' (COO-CH₂-Ph). También se observó una señal en 123.88 ppm corresponde a C-4 y una señal en 127.38 ppm que corresponde a C-6. La señal en 140.23 ppm correspondiente a C-7. Las señales en 128.17 (1C), 128.68 (2C) y 129.37 (2C) ppm corresponden a C-6', C-5' y C-4' (los carbonos de la parte aromática del compuesto), respectivamente. La señal en 133.17 ppm corresponde a C-3' (C-*ipso*). También se observan tres señales que fueron asignadas a los carbonos de los carbonilos, la señal en 171.24 ppm corresponde al C=O del éster, la señal en 199.46 ppm corresponde al C=O en C-3 y la señal de 204.10 ppm se asignó al C=O en C-20.

Preparación de 17 α -(2-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (2).



Se llevó a cabo la esterificación del alcohol en C-17 para obtener el compuesto **2**. La reacción se llevó a cabo con ácido 2-fluorofenilacético, ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y anhídrido trifluoroacético. En el primer paso se formó el anhídrido mixto que reaccionó con el alcohol en C-17 del compuesto **10**, dando como resultado el compuesto **2**, el cual se purificó por cromatografía en placa preparativa con sistemas de elución hexano:acetato de etilo (7:3, 8:2 y 9:1) %v/v, sucesivamente, obteniéndose así el compuesto **2**, como cristales blancos, con un rendimiento del 46 %.

El sistema dieno en el producto **2**, se verificó utilizando espectroscopia de UV. En el espectro se observó un máximo de absorción a 283.99 nm correspondiente al C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5, C6-C7. (Espectro 7)

En el espectro de infrarrojo del compuesto **2** (Espectro 8) se observó una señal en 1728 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster en C-17 y al carbonilo de cetona en C-20. La señal en 1660 cm^{-1} se asignó al carbonilo en C-3. La señal en 1617 cm^{-1} corresponde al dieno conjugado en C4-C5, C6-C7. La señal en 1262 cm^{-1} se asignó a la vibración C-F. La señal en 756 cm^{-1} corresponde a la parte del compuesto aromático 1,2-disustituido, el cual se generó debido a la esterificación con ácido 2-fluorofenilacético.

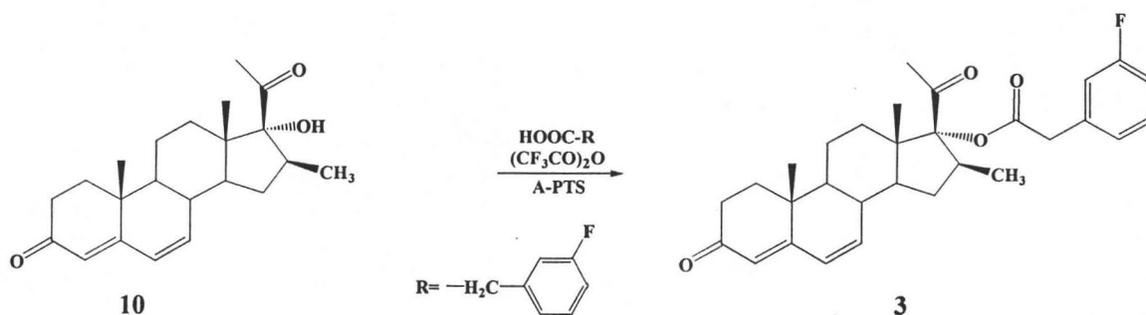
El espectro de masas (Espectro 9) mostró en 478 m/z una señal que corresponde al M^+ (ion molecular). El pico base se observó en 109 m/z y corresponde a la pérdida de $[\text{F-Ph-CH}_2]^+$. La señal en 281 m/z se generó por la pérdida de $[\text{F-Ph-CH}_2\text{-COO}]^+$ y $[\text{MeCO}]^+$ a partir del ion molecular.

El espectro de RMN de ^1H (Espectro 10) presentó una señal múltiple en 7.0-7.3 ppm que se asignó a los protones aromáticos. También se observó una señal doble de dobles en 6.15 ppm correspondiente a H-7 y una señal doble en 6.09 ppm que corresponde a H-6. La señal simple en 5.72 ppm corresponde a H-4. Una señal doble de dobles en 3.73 ppm, la cual integra para dos protones, corresponde a H-2' (COO-CH₂-Ph). La señal doble en 1.35 ppm se asignó al metilo en C-16 β . También se observaron tres señales simples en 1.93, 1.10 y 0.74 ppm, que integran para tres protones cada una y corresponden a los protones H-21, H-19 y H-18, respectivamente.

Los desplazamientos químicos para cada carbono se determinaron utilizando los espectros de RMN ^{13}C y DEPT (Espectro 11 y 12), los valores fueron asignados utilizando las tablas de datos espectroscópicos reportadas en la literatura.⁴⁹

En los espectros de RMN de ^{13}C (Espectro 11 y 12) se presentó una señal en 14.79 ppm que corresponde al metilo en C-16 β . Se observaron tres señales en 16.29, 19.69 y 28.17 ppm correspondientes a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Una señal en 35.46 ppm, la cual corresponde a C-2' (COO-CH₂-Ph). También se observó una señal en 124.28 ppm corresponde a C-4 y una señal en 128.14 ppm que corresponde a C-6. La señal en 131.46 ppm correspondiente a C-7. Las señales en 115.28, 115.56, 123.84, 129.38 y 140.31 ppm corresponden a C-5', C-7', C-6', C-8' y C-4'(C-F) (los carbonos de la parte aromática del compuesto), respectivamente. La señal en 120.98 ppm corresponde a C-3' (C-*ipso*). Así mismo, se observan tres señales que fueron asignadas a los carbonos de los carbonilos, la señal en 170.37 ppm corresponden al C=O del éster, la señal en 199.58 ppm corresponde al C=O en C-3 y la señal de 204.15 ppm se asignó al C=O en C-20.

Preparación de 17 α -(3-fluorofenilacetiloxi)-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (3).



Se llevó a cabo la esterificación del alcohol en C-17 para obtener el compuesto **3**. La reacción se llevó a cabo con ácido 3-fluorofenilacético, ácido *p*-toluensulfónico como catalizador y anhídrido trifluoroacético. En el primer paso se formó el anhídrido mixto que reaccionó con el alcohol en C-17 del compuesto **10**, dando como resultado el compuesto **3**, el cual se purificó por cromatografía en placa preparativa con sistemas de elución hexano:acetato de etilo (7:3, 8:2 y 9:1) %v/v, sucesivamente, obteniéndose así el compuesto **3**, como cristales blancos, con un rendimiento del 46 %.

El sistema dieno en el producto **3**, se verificó utilizando espectroscopia de UV. En el espectro se observó un máximo de absorción a 284.48 correspondiente al C=O α , β , γ , δ insaturado en C4-C5, C6-C7. (Espectro 13)

En el espectro de infrarrojo del compuesto **3** (Espectro 14) se observó una señal en 1729 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster en C-17 y al carbonilo de cetona en C-20. La señal en 1659 cm^{-1} se asignó al carbonilo en C-3. La señal en 1617 cm^{-1} corresponde al dieno conjugado en C4-C5, C6-C7. La señal en 1261 cm^{-1} se asignó a la vibración C-F. La señal intensa en 755 cm^{-1} y la señal débil en 685 cm^{-1} corresponden a la parte del compuesto aromático 1,3-disustituido, el cual se generó debido a la esterificación con ácido 3-fluorofenilacético.

El espectro de masas (Espectro 15) mostró en 478 m/z una señal que corresponde al M^+ (ion molecular). El pico base se observó en 281 m/z se generó por la pérdida de $[F-Ph-CH_2-COO]^+$ y $[MeCO]^+$ a partir del ion molecular. La señal en 109 m/z corresponde a la pérdida de $[F-Ph-CH_2]^+$.

El espectro de RMN de 1H (Espectro 16) presentó una señal múltiple en 7.0-7.3 ppm que se asignó a los protones aromáticos. También se observó una señal doble de dobles en 6.16 ppm correspondiente a H-7 y una señal doble en 6.09 ppm que corresponde a H-6. La señal simple en 5.72 ppm corresponde a H-4. Una señal en 3.67 ppm, la cual integra para dos protones, corresponde a H-2' (COO-CH₂-Ph). La señal doble en 1.35 ppm se asignó al metilo en C-16 β . También se observaron tres señales simples en 1.86, 1.11 y 0.75 ppm, que integran para tres protones cada una y corresponden a los protones H-21, H-19 y H-18, respectivamente.

Los desplazamientos químicos para cada carbono se determinaron utilizando los espectros de RMN ^{13}C y DEPT (Espectro 17 y 18), los valores fueron asignados utilizando las tablas de datos espectroscópicos reportadas en la literatura.⁴⁹

En los espectros de RMN de ^{13}C (Espectro 17 y 18) se presentó una señal en 14.86 ppm que corresponde al metilo en C-16 β . Se observaron tres señales en 16.32, 19.70 y 28.15 ppm correspondientes a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Una señal en 41.68 ppm, la cual corresponde a C-2' (COO-CH₂-Ph). También se observó una señal en 123.94 ppm corresponde a C-4 y una señal en 125.09 ppm que corresponde a C-6. La señal en 130.19 ppm correspondiente a C-7. Las señales en 114.27, 114.54, 116.64, 128.25 y 140.04 ppm corresponden a C-6', C-4', C-8', C-7' y C-5'(C-F) (los carbonos de la parte aromática del compuesto), respectivamente. La señal en 135.38 ppm corresponde a C-3' (C-ipso). También se observan tres señales que fueron asignadas a los carbonos de los carbonilos, la señal en 170.61 ppm corresponden al C=O del éster, la señal en 199.43 ppm corresponde al C=O en C-3 y la señal de 203.85 ppm se asignó al C=O en C-20.

ETAPA B) EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

En la segunda parte de este trabajo se realizó la evaluación biológica de los compuestos **1, 2 y 3**, tomando como estándar la finasterida (**III**).

La actividad biológica de los esteroides sintetizados **1, 2 y 3** se determinó a través de dos pruebas:

- 1) Determinación del peso (mg) de la próstata.
- 2) Transformación de la T a DHT en homogeneizados de próstata.

A continuación se presentan los resultados obtenidos de las ensayos biológicos realizados para evaluar la actividad antiandrogénica de los compuestos **1, 2 y 3**.

Experimento *in vivo*: Efecto de los compuestos **1, 2 y 3** sobre el peso de la próstata de hámster.

Este bioensayo se realizó mediante la técnica descrita en la literatura.⁵⁰⁻⁵²

Tabla 4. Efecto de los esteroides sobre el peso de la próstata de hámster

Grupo	Tratamiento	Peso de la próstata (mg)
1	Vehículo (V)	39.4 ± 10
2	Testosterona (T)	85.7 ± 8
3	T + Finasterida	59.3 ± 8
4	T + compuesto 1	54.2 ± 3
5	T + compuesto 2	56.5 ± 11
6	T + compuesto 3	59.3 ± 12

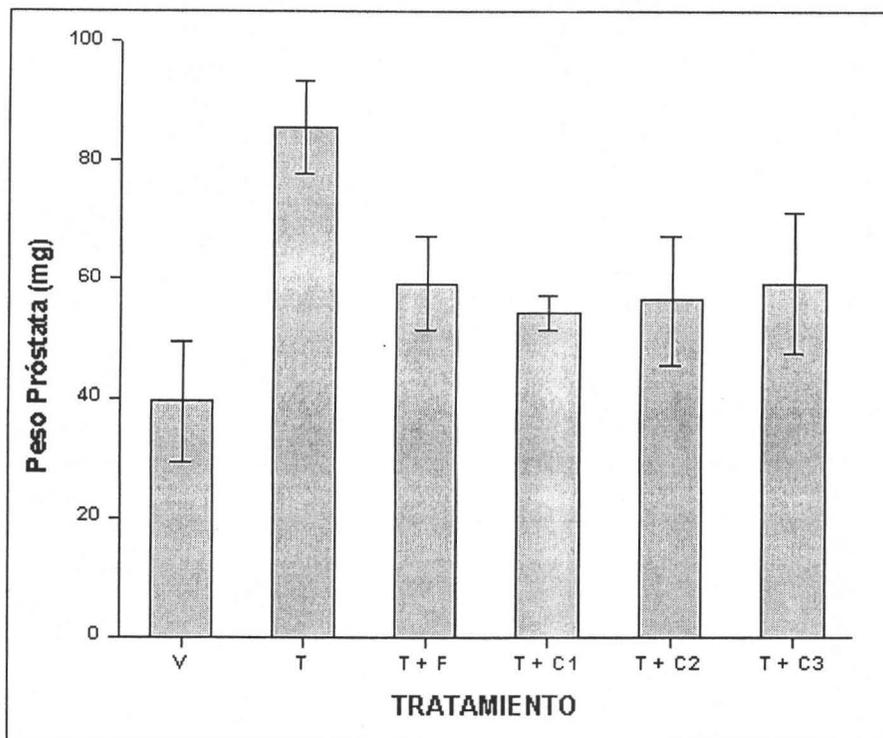


Figura 3. Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre el peso de la próstata de hámster

Después de la castración, el peso de la próstata decrece significativamente con respecto a la próstata de los animales enteros.⁵³ Los resultados mostrados en la Tabla 4 y la gráfica de la Figura 3 indican que el tratamiento diario, durante seis días, con inyecciones de testosterona (I) a los animales gonadectomizados regeneró el peso de la próstata hasta 85.7 mg, mientras que en los animales tratados con testosterona (I) + el estándar finasterida (III) disminuyó el peso de la próstata hasta 59.3 mg tal y como se esperaba.

Como se puede observar en la gráfica de la Figura 3, los compuestos 1, 2 y 3 (disminuyen el peso de la próstata a 54.2, 56.5 y 59.3 mg, respectivamente) por lo que presentan actividad biológica comparable con el estándar finasterida (disminuye el peso de la próstata a 59.3 mg), sin embargo, con esta prueba no es posible concluir que algún compuesto sea mejor ya que los resultados no son estadísticamente significativos ($p > 0.05$). En este bioensayo los compuestos 1, 2 y 3 resultaron ser iguales al estándar finasterida (III) porque no existe diferencia significativa en los resultados.

Experimento *in vitro*: Efecto de los compuestos 1, 2 y 3 sobre la transformación de la testosterona (I) a dihidrotestosterona (II) en homogeneizados de próstata.

Este bioensayo se realizó mediante la técnica descrita en la literatura.⁵⁰⁻⁵²

Tabla 5. Inhibición de la enzima 5 α -reductasa

Compuesto	**IC ₅₀
Finasterida (III)	8.5 nM
Compuesto 1	1.2 nM
Compuesto 2	0.15 mM
Compuesto 3	0.25 mM

** IC₅₀: Concentración que inhibe el 50 % de la actividad de la enzima

Los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* para la inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa presente en la fracción microsomal de próstata de hámster a pH 7.0 que se muestran en la Tabla 5, indican que los compuestos 2 y 3 no son inhibidores de dicha enzima ya que presentan una IC₅₀ de 0.15 mM y de 0.25 mM, respectivamente, mientras que el estándar finasterida (III) muestra una IC₅₀ de 8.5 nM. Sin embargo el compuesto 1 resultó ser un potente inhibidor de la enzima 5 α -reductasa tipo II, aún mejor que el estándar finasterida (III) ya que presenta una IC₅₀ de 1.2 nM.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se logró efectuar la síntesis, purificación e identificación de los nuevos esteroides (Figura 2, página 20):
 - 17α -(fenilacetiloxi)- 16β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (**1**)
 - 17α -(2-fluorofenilacetiloxi)- 16β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (**2**)
 - 17α -(3-fluorofenilacetiloxi)- 16β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona (**3**)

- Se determinó la actividad biológica (*in vivo* e *in vitro*) de los nuevos esteroides sintetizados **1**, **2** y **3** mediante dos pruebas:
 - 1) Determinación del peso (mg) de la próstata.
 - 2) Transformación de testosterona (**I**) a dihidrotestosterona (**II**) en homogeneizados de próstata.

En el ensayo *in vivo*, de la determinación del peso de la próstata, los compuestos **1**, **2** y **3** resultaron ser iguales al estándar finasterida (**III**) porque no existe diferencia significativa en los resultados ($p > 0.05$).

En la prueba *in vitro*, de la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa, el compuesto **1** mostró mayor actividad como inhibidor de la enzima 5α -reductasa que el estándar finasterida (**III**), ya que presentó una IC_{50} de 1.2 nM, la cual es mucho menor comparado con 8.5 nM de la finasterida (**III**). Esto indica que el compuesto **1** es aproximadamente 7.08 veces más activo que el estándar finasterida (**III**).

Los compuestos **2** y **3** no se comportan como inhibidores de la enzima 5α -reductasa. Sin embargo, el hecho de que los compuestos **2** y **3** presentaran disminución en el peso de la próstata indica que su acción androgénica puede atribuirse a la modificación del eje hipotálamo-hipofisis-glándula, inhibiendo la síntesis de andrógenos endógenos o a un posible antagonismo con el receptor androgénico.

BIBLIOGRAFÍA

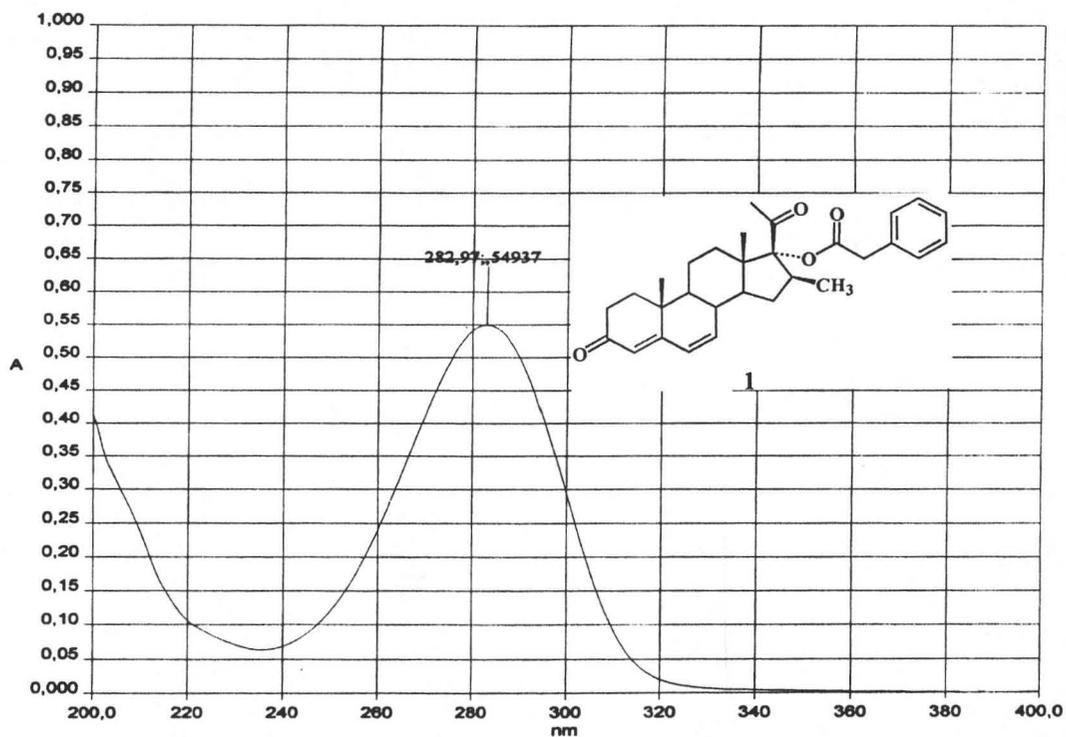
- 1) Stalheim-Smith A, Fitch GK, **Understanding human anatomy and physiology**, West Publishing Company, Minneapolis/St. Paul, Chapter 24, 941-957, (1993).
- 2) Fernandez-Tresguerres JA, Bellido C, **Fisiología humana**, Editorial McGraw Hill-Interamericana de España, Madrid, Capítulo 84, 1073-1086, (1992).
- 3) <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/encyclopedia.html>
- 4) Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, **Cancer statistics, CA: A Cancer J. for Clinicians**, **54**, 8-29, (2004).
- 5) (a) **Cancer facts and figures**. *American Cancer Society*, (2004). www.cancer.org
(b) **Estadísticas del sector salud y seguridad social**, INEGI, Aguascalientes, Cuaderno 20, Capítulo 2, 15-35, (2003). www.inegi.gob.mx
- 6) Amanatullah, DF, Reutens AT, Zafonte BT, Fu M, Mani S, Pestell RG, **Cell-cycle dysregulation and the molecular mechanisms of prostate cancer**, *Frontiers in Bioscience*, **5**, 372-390, (2000).
- 7) Litter M, **Farmacología experimental y clínica**, Editorial El Ateneo, 6ª Edición, Buenos Aires, Capítulo 38, 1218-1236, (1980).
- 8) Thiessen E, **Concerning a familial association between breast cancer and both prostatic and uterine malignancies**. *Cancer*, **34**, 1102-1107, (1974).
- 9) Nomura AMY, Kolonel LN, **Prostate cancer: a current perspective**. *Epidemiol. Rev.*, **13**, 200-207, (1991).
- 10) Honda GD, Bernstein L, Ross RK, Greenland S, Gerkins V, Henderson BE, **Vasectomy, cigarette smoking and age at first sexual intercourse as risk factors for prostate cancer in middle age**, *Br. J. Cancer*, **57**, 326-331, (1988).
- 11) Carter HB, Coffey DS, **The prostate: an increasing medical problem**, *Prostate*, **16**, 39-48, (1990).
- 12) George FW, Wilson JD, Knobil E, Neill JD, **Sex determination and differentiation**, New York, Chapter 1, *The physiology of reproduction* (1994)
- 13) Katzung BG, Trevor AJ, **Farmacología**, Editorial El Manual Moderno, México, D.F., Capítulo 39, 302-305, (1991).

- 14) Metcalf BW, Levy MA, Holt D, **Inhibitors of steroid 5 α -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne**, *Trends Pharmacol. Science*, **10**, 491-495, (1989).
- 15) Giménez AM, **5-alfa-reductasa**, *Act. Dermatolog.*, **10**, 655-666, (1997).
- 16) Cesorsimo RJ, Carr D, **Therapy update prostate cancer: Current and evolving strategies**, *Am. J. Health-Syst. Pharm.*, **53**, 381-396, (1996).
- 17) Bratoeff E, Ramírez E, Murillo E, Flores G, Cabeza M, **Steroidal antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors**, *Curr. Med. Chem.*, **6**, 1107-1123, (1999).
- 18) Hartmann RW, Hector M, Haidar S, Ehmer PB, Reichert W, Jose J, **Synthesis and evaluation of novel steroidal oxime inhibitors of P450-17 (17 α -Hydroxylase/(C17-20-Lyase) and 5 α -reductase types 1 and 2**, *J. Med. Chem.*, **43**, 4266-4277, (2000).
- 19) Flores E, Bratoeff E, Cabeza M, Ramírez E, Quiroz A, Heuze I, **Steroid 5 α -reductase inhibitors**, *Mini Reviews Med. Chem.*, **3**, 225-237, (2003).
- 20) Anderson S, Bishop RW, Russell DW, **Expresion cloning and regulation of steroid 5-alfa reductase, an enzyme essential for male sexual differentiation**, *J. Biol. Chem.*, **264**, 16249-16255, (1989).
- 21) Anderson S, Russell DW, **Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 3640-3644, (1990).
- 22) Jenkins EP, Anderson S, Imperato-Mc Ginley J, Wilson JD, Russell DW, **Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5-alfa reductase**, *J. Clin. Inv.*, **89**, 293-300, (1992).
- 23) Kniwald J, Osredecki V, Gojmerac T, Zechner V, Kniwald Z, **Effect of s-triazine compounds on testosterone metabolism in rat prostate**, *J. Appl. Tox.*, **15**, 215-218, (1995).
- 24) Russell DW, Wilson JD, **Steroid 5 α -reductases: Two genes/two enzymes**, *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 25-61, (1994).
- 25) Wilson JD, Griffin JE, Russell DW, **Steroid 5 α -reductase 2 deficiency**, *Endocr. Rev.*, **14**, 577-593, (1993).

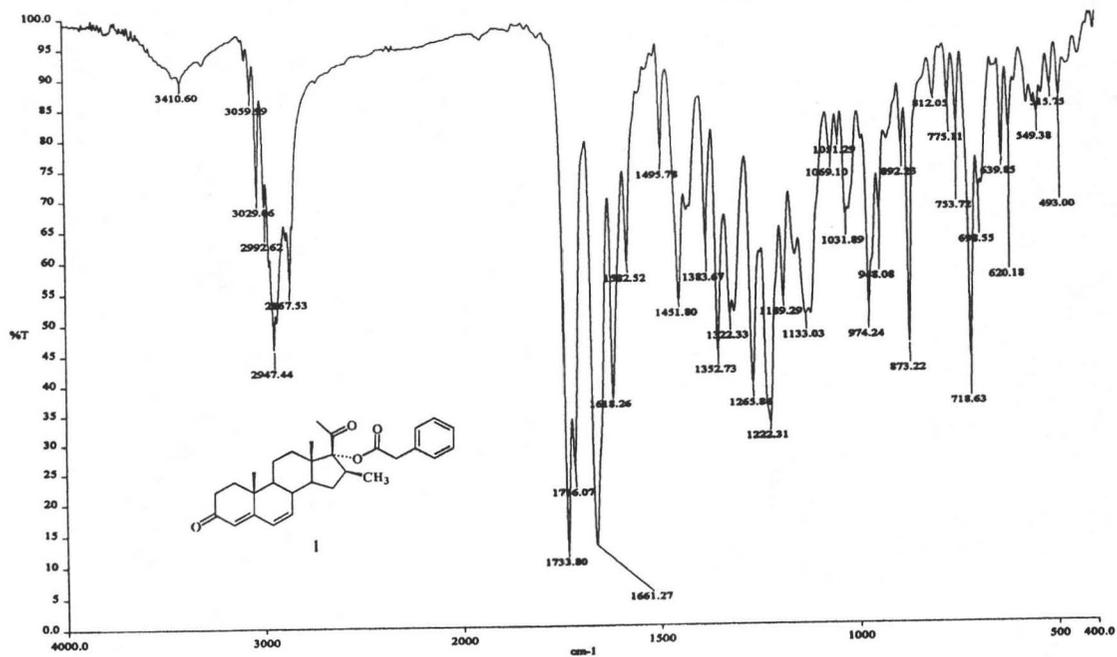
- 26) Guarna A, Occhiato EG, Danza G, Conti A, Serio M, **5 α -reductase inhibitors, chemical and clinical models**, *Steroids*, **63**, 355-361, (1998).
- 27) Gormley GJ, **5 α -reductase inhibitors in prostate cancer**, *Endocrine-Related Cancer*, **3**, 57-63, (1996).
- 28) Njar VCO, Brodie AMH, **Inhibitors of 17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17): Potential agents for the treatment of prostate cancer**, *Curr. Pharm. Design*, **5**, 163-180, (1999).
- 29) Litter M, **Compendio de farmacología**, Editorial El Ateneo, 4^a Edición, Buenos Aires, Capítulo 38, 537-544, (1988).
- 30) Brueggemeier R, **Burger's medicinal chemistry and drug discovery**, John Wiley Inc., 5th Edition, New York, Chapter 42, (1996).
- 31) Brooks JR, Harris GS, Sandler M, Smither HJ, **Design of enzyme inhibition as drugs**, vol. 2. Oxford University Press, New York, 495, (1994).
- 32) Rittmaster RS, **Drug therapy: finasteride**, *New Engl. J. Med.*, **330**, 120-125, (1994).
- 33) Rittmaster RS, Antonian L, New MI, Stoner E, **Effect of finasteride on adrenal steroidogenesis in men**, *J. Andrology*, **15**, 298-301, (1994).
- 34) Uygur MC, Gür E, Arik AI, Altu U, Erol D, **Erectile dysfunction following treatments of benign prostatic hyperplasia: a prospective study**, *J. Androl.*, **30**, 5-10, (1998).
- 35) Kenny B, Ballard S, Blagg J, Fox D, **Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia**, *J. Med. Chem.*, **40**, 1293-1315, (1997).
- 36) Neumann F, **The antiandrogen cyproterone acetate: discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research**, *Clin. Exp. Endocrinol.*, **102**, 1-32, (1994).
- 37) Hammerstein J, **Use of cyproterone acetate (CPA) in the treatment of acne, hirsutism and virilism**, *J. Steroid Biochem.*, **6**, 827-836, (1975).
- 38) Hedlund PO, **Side effects of endocrine treatment and their mechanism: castration, antiandrogens and estrogens**, *Prostate Suppl.*, **10**, 32-37, (2000).
- 39) Santen R, **Hormonal therapy of prostate cancer: choosing among several available options**, *Int. J. of Androl.*, **12**, 165-173, (1989).
- 40) <http://www.tuotromedico.com/temas/hipertrofia.htm>

- 41) <http://www.msd.es/enfermedades/hpb/inicio.html>
- 42) <http://www.uroatlas.net/hpb/hpb.htm>
- 43) Jepsen J, Bruskeiwits R, **Surgical and nonsurgical invasive treatment of benign prostatic hyperplasia**, *Drugs of today*, **34**, 353, (1998).
- 44) Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, Calderón D, Hernández E, **Síntesis de nuevos inhibidores de 5-alfa-reductasa**, *Rev. Mex. Cien. Farm.*, **28**, 13-19, (1997).
- 45) Cabeza M, Gutierrez E, Miranda R, Bratoeff E, Ramírez E, Flores G, **Synthesis and pharmacological effect of 6-halo-16-beta methylpregnane derivatives**, *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **41**, 87-88, (1998).
- 46) Cabeza M, Gutierrez E, Miranda R, Heuze I, Bratoeff E, Flores G, Ramírez E, **Androgenic and antiandrogenic effect of progesterone derivatives with different halogen at C-6 position**, *Steroids*, **64**, 413-421, (1999).
- 47) Cabeza M, Quiróz A, Heuze I, Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Murillo E, **Antiandrogenic effect of new synthetic steroids**, *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, **43**, 1-2, (2000).
- 48) Ramírez E, Cabeza M, Heuze I, Gutierrez E, Bratoeff E, Membrillo A, Lira A, **Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl pregnane derivatives**, *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 15-20, (2002).
- 49) Pretsch E, Bühlmann P, Affolter C, **Structure determination of organic compounds. Tables of spectral data**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, (2000).
- 50) Bratoeff E, Herrera H, Ramírez E, Solorzano K, Murillo E, Quiróz A, Cabeza M, **Antiandrogenic effect of 16-substituted, non-substituted and D-homopregnane derivatives**, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1249-1255, (2000).
- 51) Orozco A, **Derivados de la progesterona como antiandrógenos**, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2003.
- 52) Sánchez N, **Síntesis de 17 α -butiriloxi-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona como un antiandrógeno esteroidal**, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2000.
- 53) Bruchovsky N, Sadar MN, Akakura K, Goldemberg SL, Matsuoka K, Renie PS, **Characterization of 5 α -reductase gene expresion in stroma and epithelium of human prostate**, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **59**, 397-404, (1996).

ANEXO



ESPECTRO 1

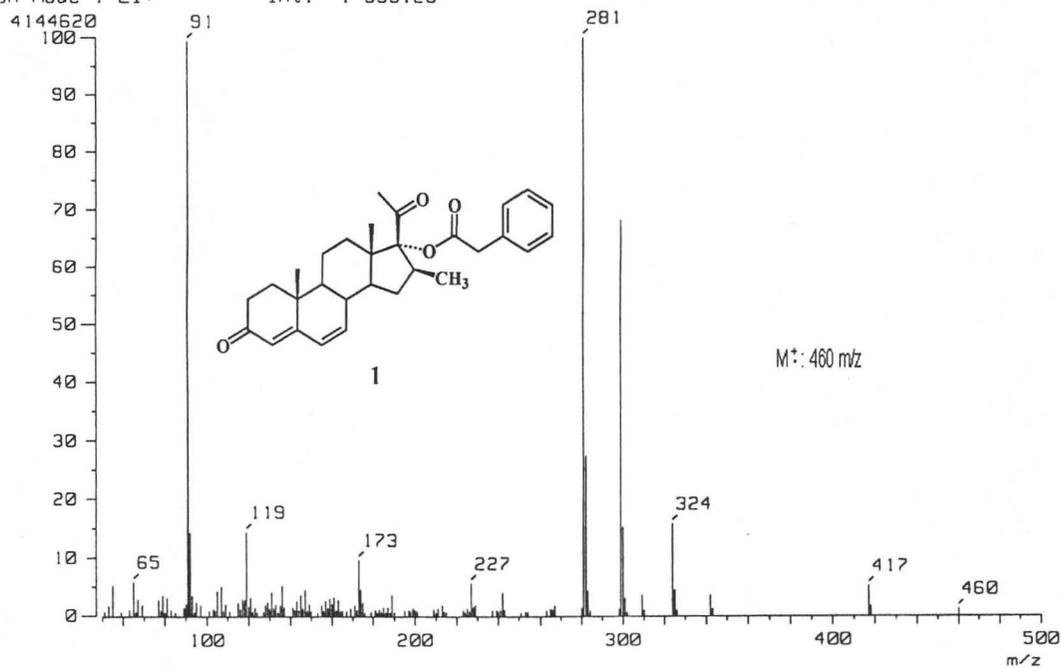


ESPECTRO 2

[Mass Spectrum]

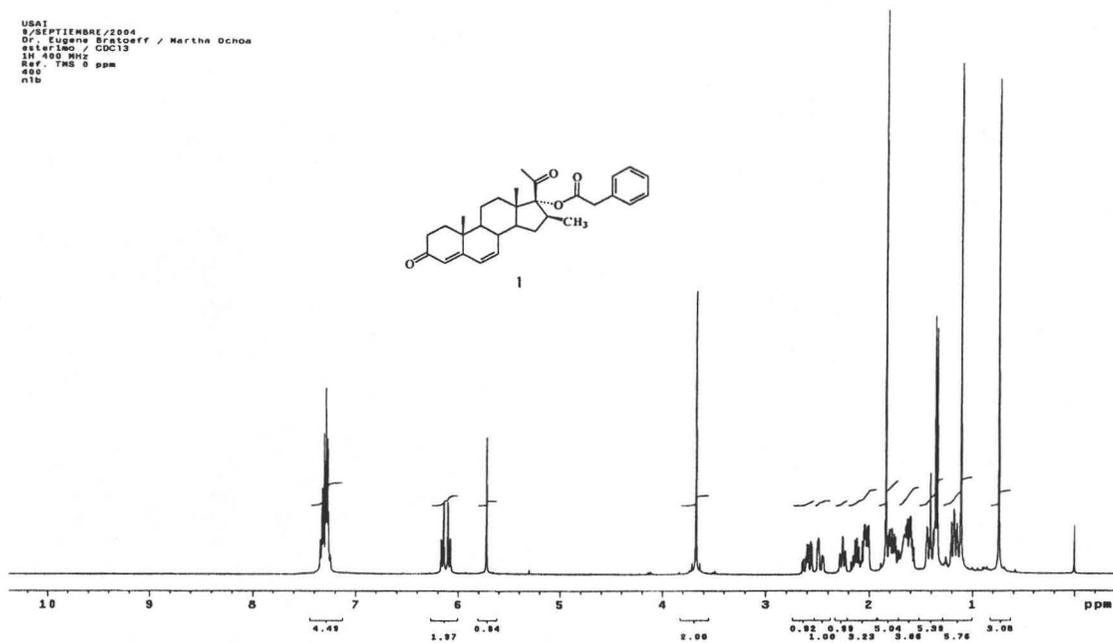
RT : 1.17 min
Ion Mode : EI+

Scan# : (43,46)-k((64,72))[k=1.0]
Int. : 395.26



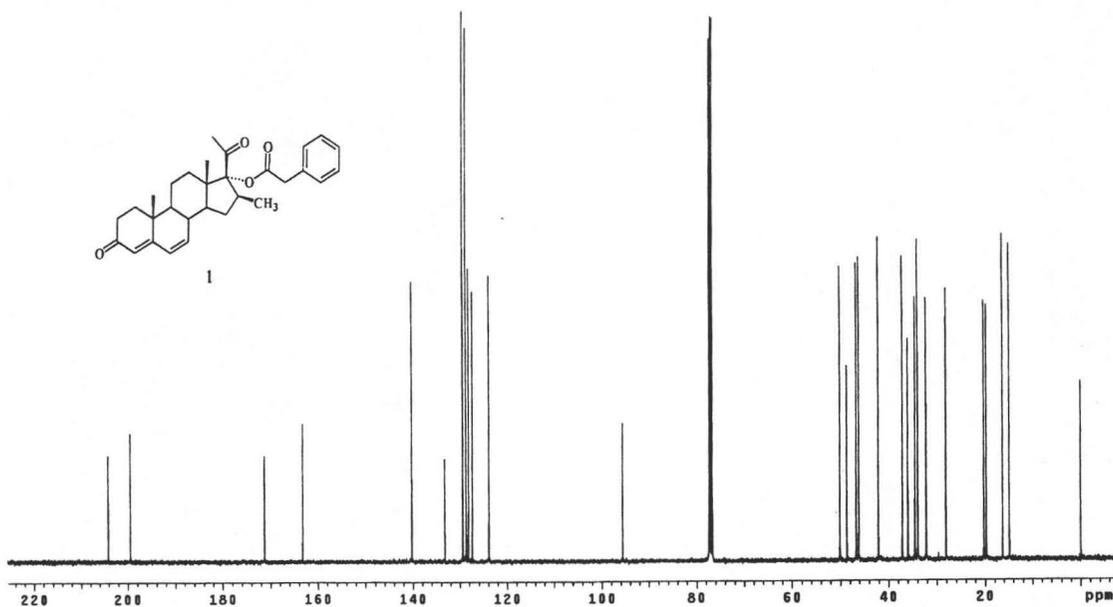
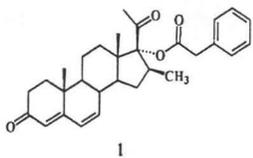
ESPECTRO 3

USA1
9/SEPTEMBRE/2004
Dr. Eugene Bratoeff / Martha Ochoa
asterling / CQC13
1H 400 MHz
Ref. TMS 0 ppm
400
n1b



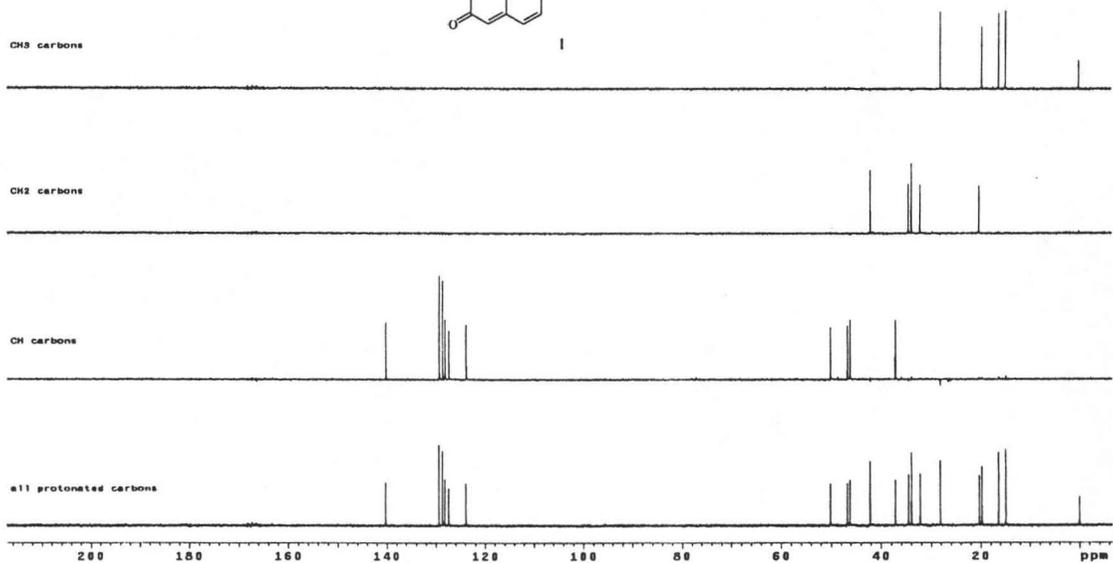
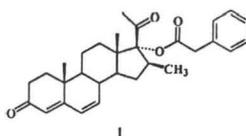
ESPECTRO 4

USAI
14/SEPTIEMBRE/2004
Dr. Eugene Bratoeff / Martha Ochoa
estero / CDCl3
13C 100 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
400
n1b

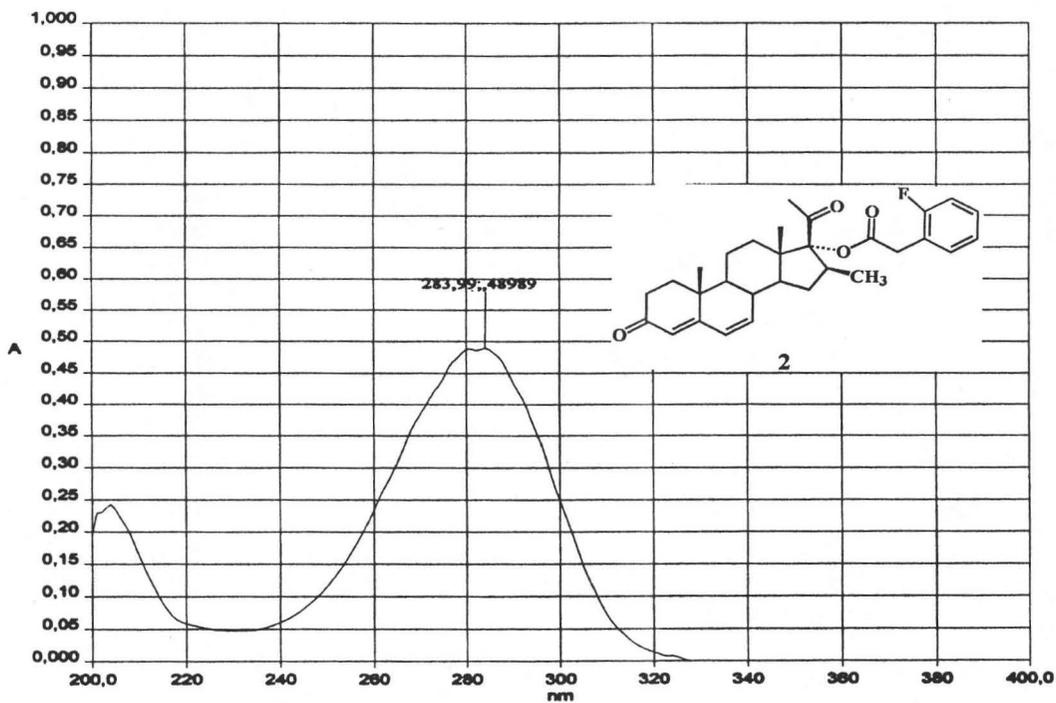


ESPECTRO 5

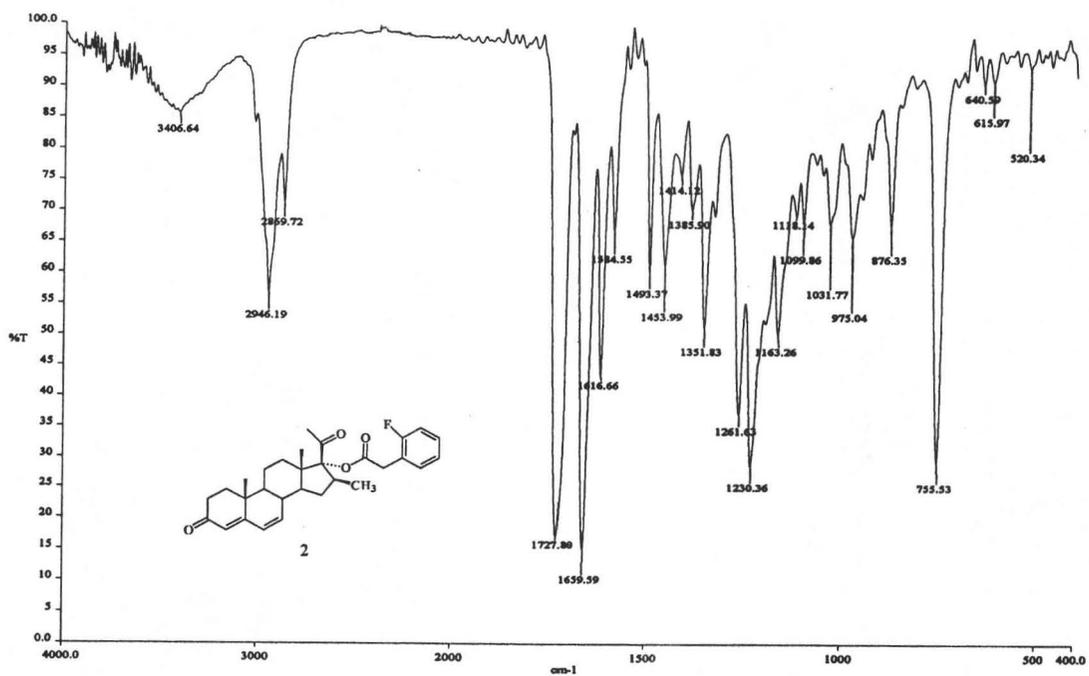
USAI
8/SEPTIEMBRE/2004
Dr. Eugene Bratoeff / Martha Ochoa
estero / CDCl3
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
n1b



ESPECTRO 6



ESPECTRO 7



ESPECTRO 8

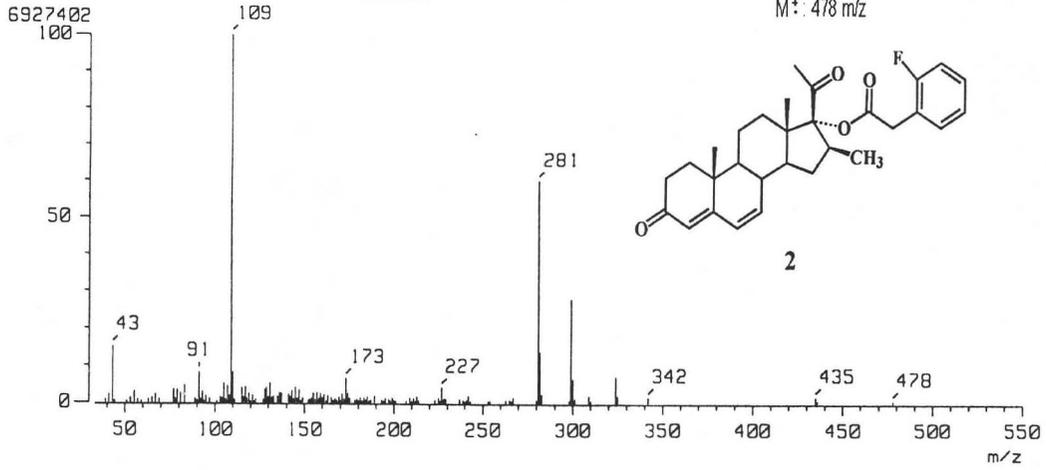
[Mass Spectrum]

RT : 1.96 min

Scan# : (71,73)

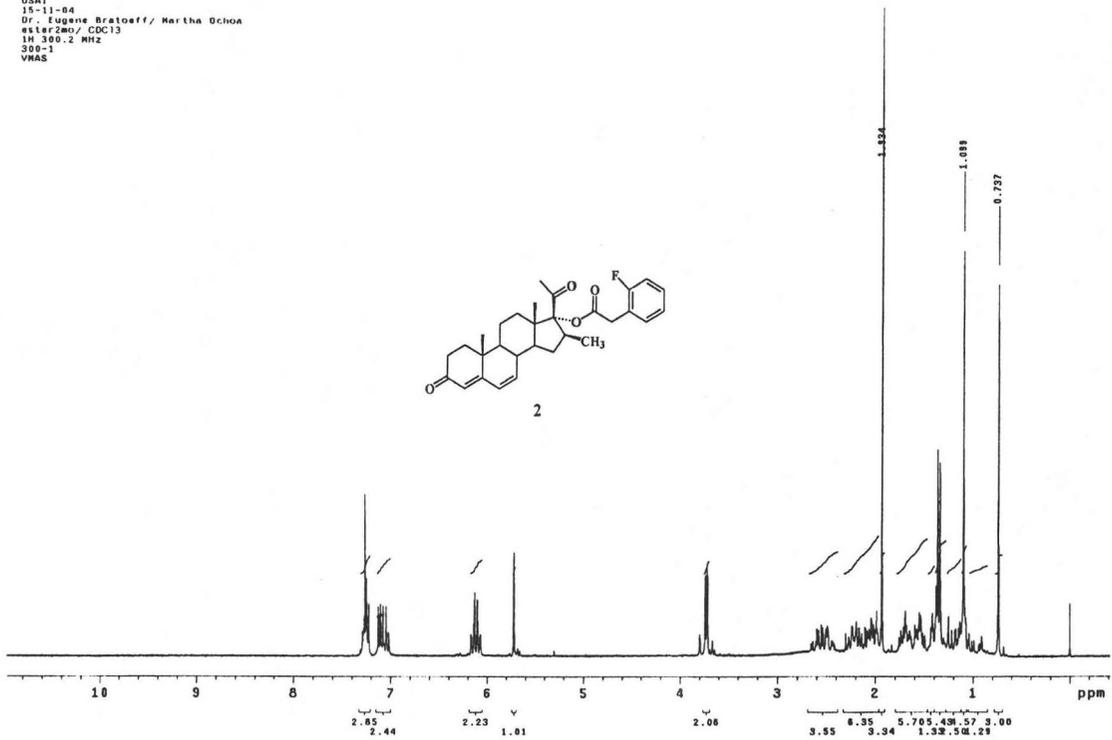
Ion Mode : EI+

Int. : 660.65



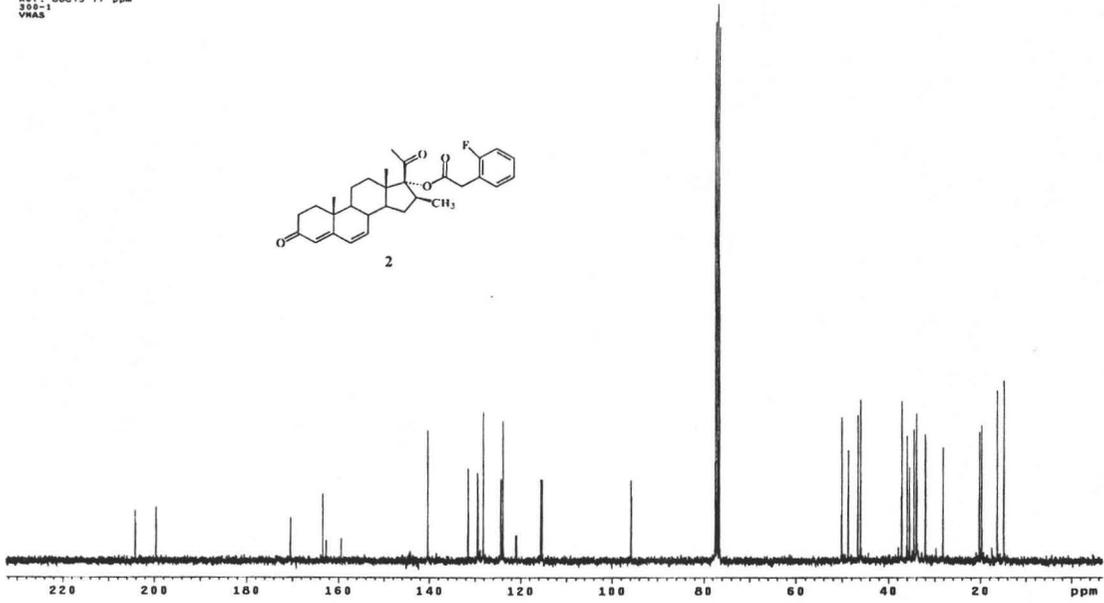
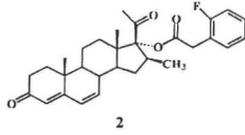
ESPECTRO 9

USA1
15-11-04
Dr. Eugene Bratoeff / Martha Ochoa
ester2mo / CDC13
1H 300.2 MHz
300-1
VRAS



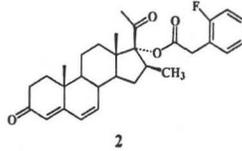
ESPECTRO 10

USA1
15-11-04
Dr. Eugene Bratoeff/Martha Ochoa
641473mo/ CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
VNAS



ESPECTRO 11

USA1
15-11-04
Dr. Eugene Bratoeff/Martha Ochoa
641473mo/ CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
VNAS



Pulse Sequence: dept

CH3 carbons



CH2 carbons



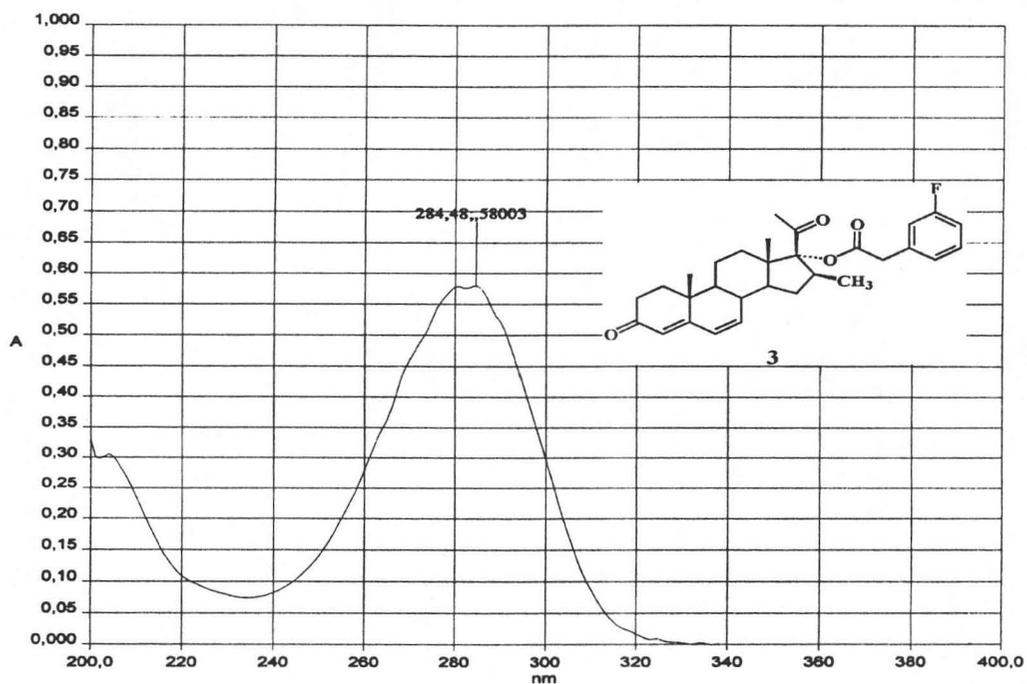
CH carbons



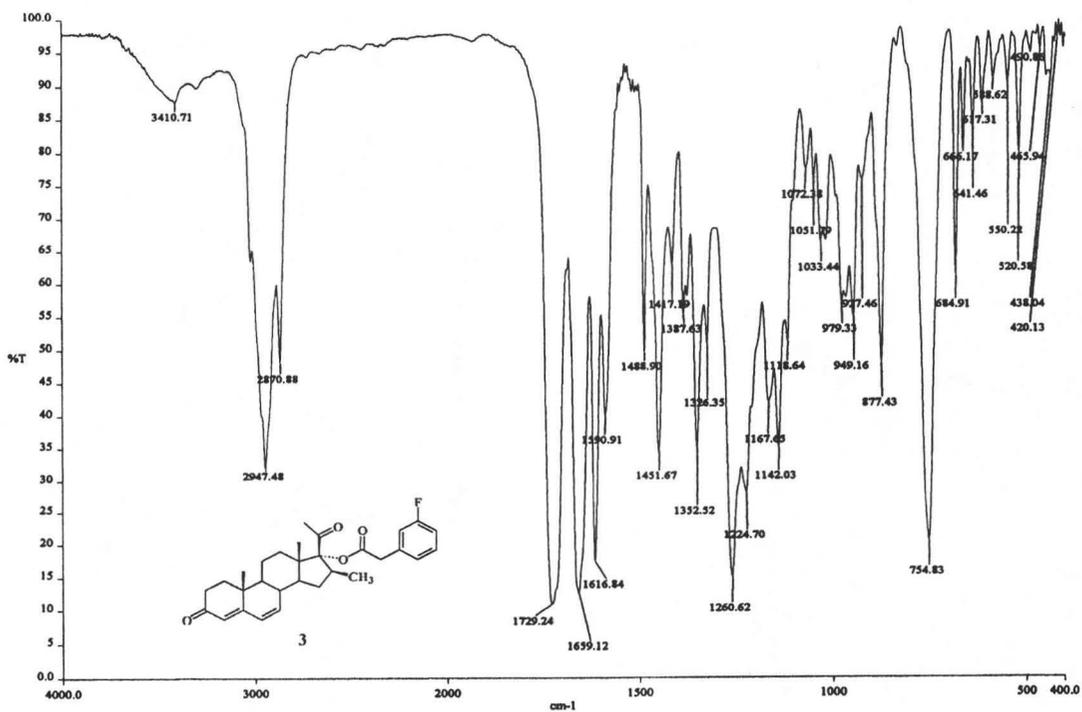
all protonated carbons



ESPECTRO 12



ESPECTRO 13



ESPECTRO 14

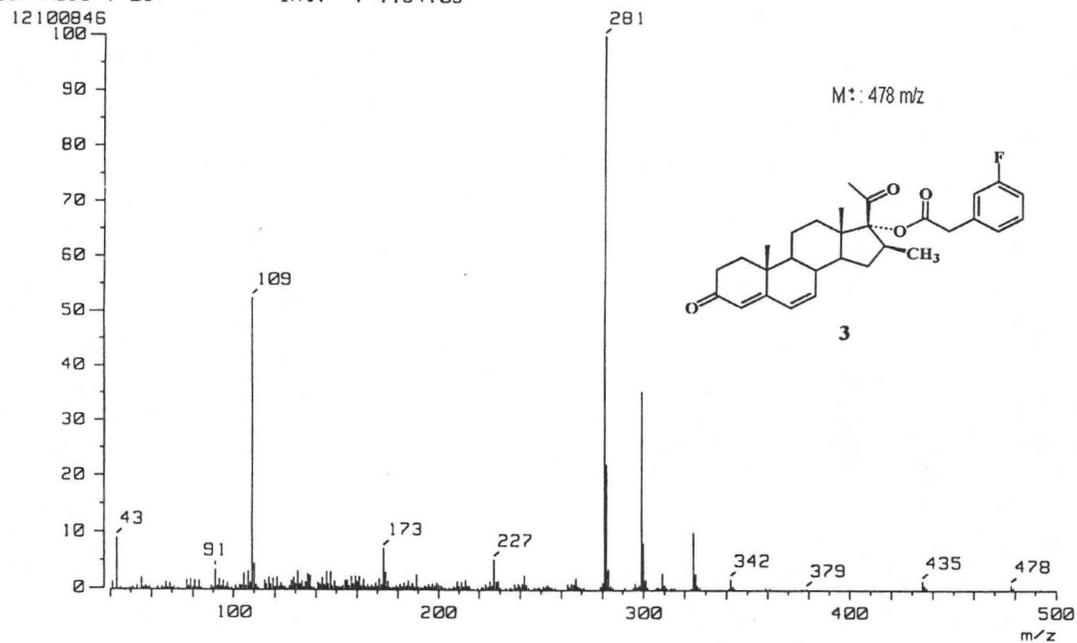
[Mass Spectrum]

RT : 1.23 min

Ion Mode : EI+

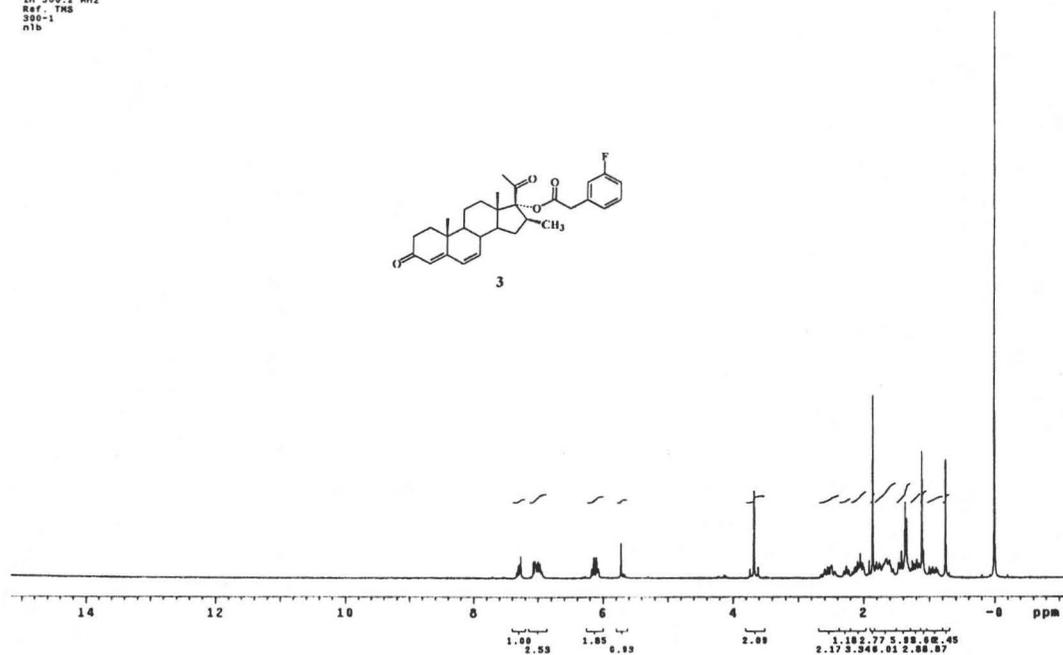
Scan# : (30,35)-k((50,60))[k=1.0]

Int. : 1154.03



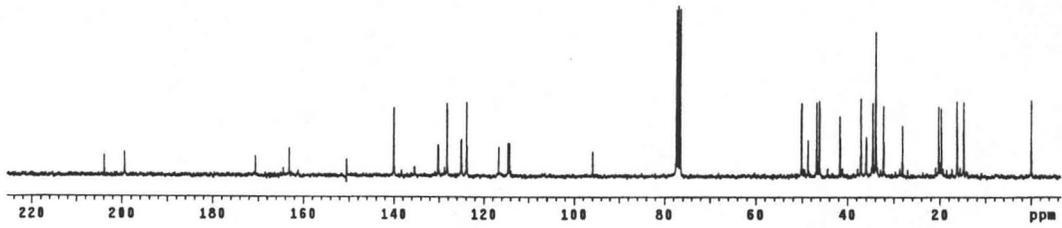
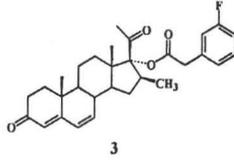
ESPECTRO 15

USA1
19/OCTUBRE/2004
Dr. Eugenio Bratoeff / Martha Ochoa
es1gr3mo / CDC13
IH 300.2 MHz
Ref. TMS
300-1
n1b



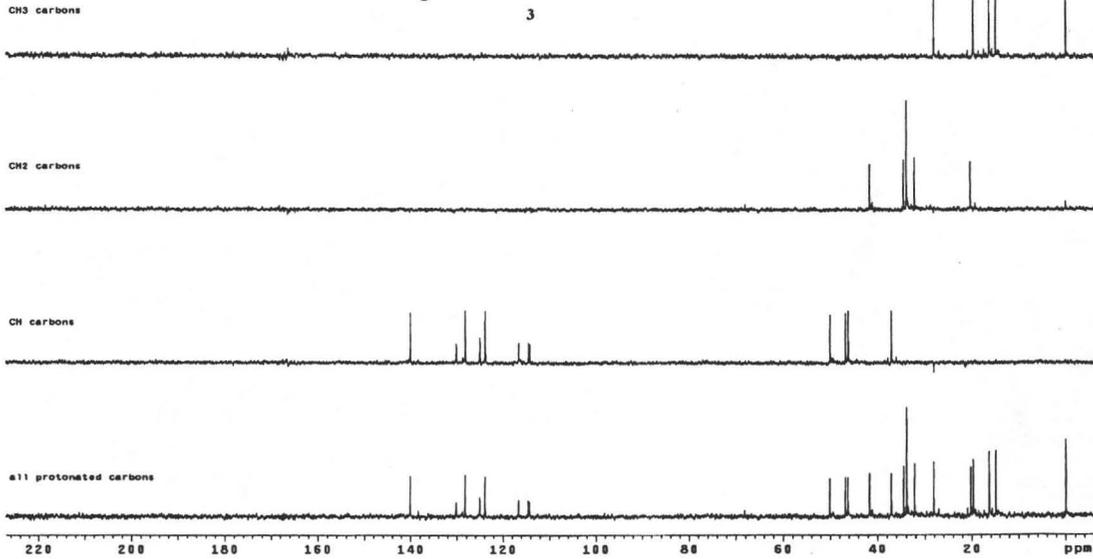
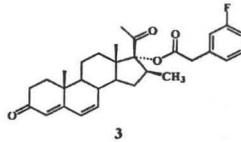
ESPECTRO 16

USA1
19/OCTUBRE/2004
Dr. Eugene Bratoeff / Martha Ochoa
ester3mo / CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
nib



ESPECTRO 17

USA1
19/OCTUBRE/2004
Dr. Eugene Bratoeff / Martha Ochoa
ester3mo / CDC13
13C 75.5 MHz
Ref. CDC13 77 ppm
300-1
nib



ESPECTRO 18